

ADAM ŚWIDERSKI¹, PIOTR STERKOWICZ², PAWEŁ KASZYCKI¹, HENRYK KOŁOCZEK^{1*}

ZIOŁOMIÓD ZAWIERAJĄCY SULFORAFAN – AGLIKON
O POTENCJALNEJ ROLI W PROFILAKTYCE CHOROÓB
NOWOTWOROWYCH

HERBHONEY CONTAINING SULFORAPHANE – AGLICON WITH POTENTIAL
USE IN CANCER PROPHYLAXIS

¹ Zakład Biochemii

Akademia Rolnicza w Krakowie
31-425 Kraków, al. 29 Listopada 54
Kierownik: dr hab. H. Kołoczek

² Przedsiębiorstwo Pszczelarskie „Apipol-Kraków”
32-410 Dobczyce, Brzączowice 1

Produkty przemian glukozynolanów obecnych w brokułach, takie jak sulforafan, wykazują pozytywne działanie fizjologiczne i biochemiczne na organizm człowieka, w szczególności hamując rozwój nowotworów. W pracy opisano hydrolizę glukozynolanów oraz ekstrakcję i transfer sulforafanu do ziołomiodu. Otrzymano ziołomiod o stężeniu sulforafanu w zakresie jego aktywności biologicznej.

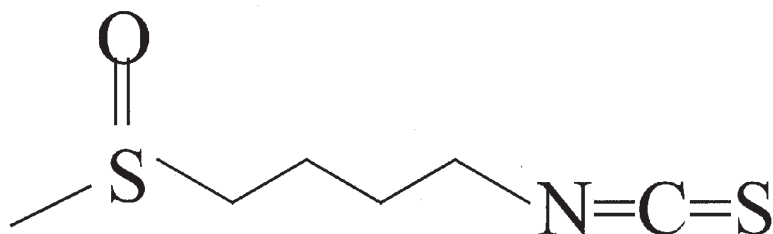
WSTĘP

Glukozynolany, związki glikozydowe zawierające w cząsteczce atom siarki, występujące obficie w roślinach krzyżowych są od wielu lat przedmiotem intensywnych badań ze względu na ich przeciwdziałanie chorobom nowotworowym, jak i działanie profilaktyczne [7, 13, 16, 19].

Badania ostatnich lat dowiodły, że fizjologiczne i biochemiczne działanie na organizmy zwierząt i człowieka mają produkty przemian glukozynolanów. W tkankach roślin krzyżowych glukozynolany występują obok enzymu tioglukozydazy, zwanej potocznie mirozynazą (EC 3.2.3.1), który nie ma z nimi bezpośredniego kontaktu, ale dopiero uszkodzenie tkanki roślinnej powoduje działanie enzymu i szybką hydrolizę glukozynolanów na wiele produktów biologicznie czynnych: izotiocyjanianów, nitryli, tiocyjanianów [8]. Enzymatyczna hydroliza glukozynolanu o nazwie glukorafanina prowadzi do powstania biologicznie czynnych pochodnych izotiocyjanianowych m.in. sulforafanu (Ryc. 1).

Glukorafanina, w porównaniu do innych roślin, występuje w większych ilościach w roślinach krzyżowych, a szczególnie obficie w brokułach powodując niezwykłą popularność tej rośliny w dietetyce zdrowotnej [5].

* adres korespondencyjny.



Ryc. 1. Wzór chemiczny sulforafanu – produktu enzymatycznej hydrolizy mirosinazy.
The chemical formula of sulforaphane – the enzymatic hydrolysis product of myrosinase.

Mechanizm hamowania i zapobiegania chorobom nowotworowym przez pochodne izotiocyjanianowe nie jest w pełni poznany, jednak wiele prac opartych na doświadczeniach ze zwierzętami i na nowotworowych liniach komórkowych mysich, szczurzych i człowieka, sugeruje aktywację pewnych enzymów powstrzymujących rozwój choroby [6, 15, 17]. Liczni autorzy [14, 15, 17] opisali proces zahamowania choroby raka sutka u szczurów pod wpływem podania sulforafanu izolowanego z brokułów. Inni autorzy donoszą, że dieta bogata w warzywa roślin krzyżowych hamuje wiele chorób nowotworowych człowieka [7, 11]. W przypadkach nadmiernego spożywania alkoholu, dieta obfitująca w rośliny krzyżowe, a przede wszystkim zawartych w nich pochodnych izotiocyjanianowych, chroni wątrobę alkoholików przed rozległymi zmianami patologicznymi, w tym marskością tego organu [11].

Jednak konsumpcja roślin krzyżowych powinna być kontrolowana, aby nadmiar izotiocyjanianów nie spowodował zatrucia organizmu. Ubocznymi efektami działania tych związków może być zahamowanie wchłaniania jodu przez tarczycę i tworzenie się woli, powiększenie wątroby czy nerek [3]. Pożądane efekty działania izotiocyjanianów, w tym sulforafanu, zawierają się w wąskich granicach stężeń, aczkolwiek ostre zatrucia glukozynolanami i ich pochodnymi są rzadko obserwowane [10].

Badania zawartości pochodnych izotiocyjanianów, obejmujące również sulforafan, przeprowadzone przez *Howarda* i wsp. [8] wykazują, że ich stężenie w roślinie zależy od wielu czynników, a głównie od czasu i sposobu przygotowania. Magazynowanie brokułów nawet na okres paru dni powoduje znaczący spadek sulforafanu. Z kolei gotowanie świeżych warzyw obniża poziom sulforafanu o ok. 50% w stosunku do niegotowanych [13].

Opracowanie sposobu podania sulforafanu w trwałej formie i bezpiecznym stężeniu jest przedmiotem niniejszej pracy. Sposób ten postanowiono zrealizować poprzez opracowanie receptury na żywkę zawierającą ekstrakt brokułowy przeznaczony do produkcji ziółomiodów. Prace związane z przygotowaniem receptury obejmowały:

- a. wybór optymalnych warunków enzymatycznej hydrolizy glukorafaniny zawartej w brokułach i ekstrakcji powstałego sulforafanu,
- b. sprawdzenie wydajności transferu sulforafanu z tkanki roślinnej do ekstraktu, a w następnym do ziółomiodu,
- c. opracowania metody wykrywania sulforafanu w ziółomiodach
- d. zbadanie stopnia trwałości tego związku w otrzymanych ziółomiodach.

MATERIAŁY I METODY

Otrzymywanie brokułowego ekstraktu sulforafanu

Materiał do otrzymywania brokułowego ekstraktu sulforafanu stanowiły brokuły (róże) dostępne na rynku, które przechowywano w temperaturze -20°C do momentu rozpoczęcia prac. Do oznaczeń chromatograficznych używano odczynników gradientowej czystości do chromatografii cieczowej i kolumnę firmy Merck, a do ekstrakcji odczynniki P.O.Ch. Gliwice, cz.d.a.

Do ekstrakcji sulforafanu 40 kg róż brokułów w porcjach 2 kg mielono po rozmrożeniu i pozostawiano na 1 dobę w temperaturze pokojowej. Z homogenatu uzyskiwano sok przez wyciśnięcie tkanki roślinnej za pomocą prasy do owoców. Pozostałość zadawano wodą, intensywnie wytrząsano i zlewano z poprzednią porcją soku. Całość zakwaszano roztworem HCl w celu zwiększenia wydajności procesu enzymatycznej hydrolizy glukorafaniny i po 30 minutach w dekantowanym nadsączu oznaczano poziom aglikonu. Reakcja uwalniania sulforafanu podlegała kontroli, i w razie potrzeby, wydłużano czas inkubacji homogenatu. Połączone ekstrakty wodne poddawano ekstrakcji chloroformem w rozdzielaczach. Otrzymane ekstrakty partiami наносono w ilości ok. 25 ml chloroformowego ekstraktu na 250 g cukru i odparowywano chloroform. W ten sposób otrzymywano przeznaczony do skarmiania pszczoł ekstrakt cukrowy sulforafanu.

Otrzymywanie ziołomiodu

W okresach letnich, w których jest mało kwitnących roślin i występuje niedobór nektaru wykorzystano pszczoły do wytwarzania ziołomiodu. Z przygotowanego cukru wzbogaconego brokułowym ekstraktem sulforafanu sporządzono roztwór o zawartości 50% wody i wprowadzono jako wziątek ziołowy (w ilości 3 l/dobę/ul) do uli systemu Apipol, opisanego w pracy *Kalisz-Niemyska* [9]. Pszczoły traktowały wziątek jako nektar, wprowadzając go do wola, dodając własnych enzymów, hormonów i innych składników i zagęszczając go w komórkach do konsystencji miodu pokrywały produkt warstwą wosku. Ten produkt nazywano ziołomiodem [1]. Cykl podawania wziątku trwał ok. 2 tygodni. Zasklepione plastry z ziołomiodem poddawano dalszemu opracowaniu [18].

Analiza sulforafanu w ekstrakcie i w ziołomiodach

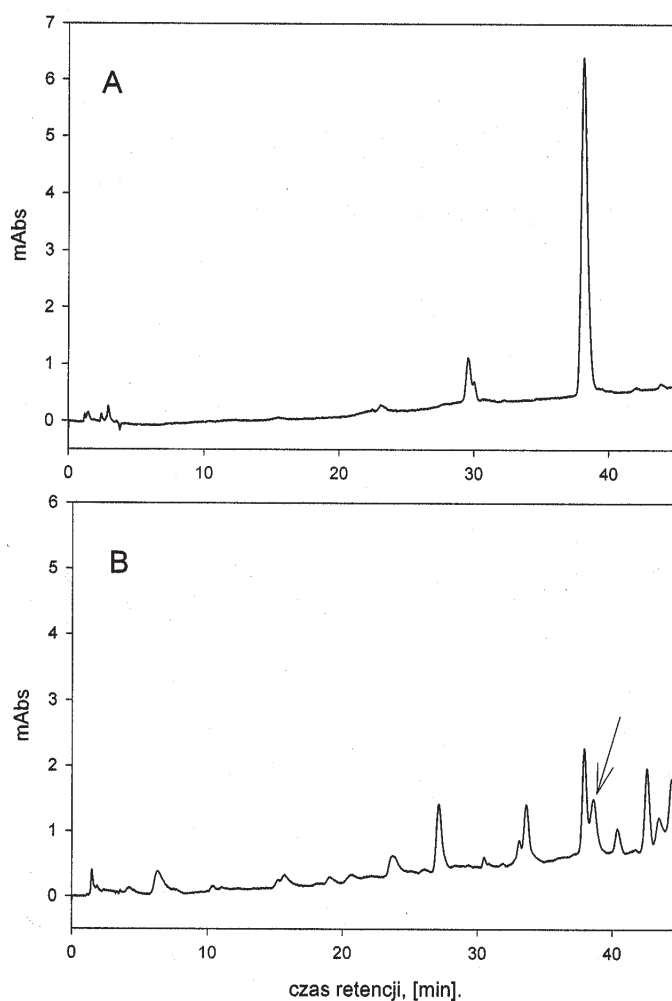
Analizę jakościową i ilościową sulforafanu przeprowadzono metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) stosując jako standard otrzymany chemicznie sulforafan (syntezę syntetycznego sulforafanu przeprowadzono w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie w oparciu o metodę *Schmidta* i *Karrera* [16]. Tożsamość i czystość chemiczna związku została zweryfikowana za pomocą metod NMR i UV. Rozdział prowadzono stosując metodę HPLC na aparacie firmy Shimadzu LC-10AS z dwukanałowym detektorem UV (detekcja przy 238 nm i 254 nm) na kolumnie LiChrospher RP18, 25 cm z przedkolumną 1 cm, w programie gradientu stężeń w układzie woda – acetonitryl (Roztwór A acetonitryl 2,5% w H_2O , Roztwór B acetonitryl 100%) z szybkością przepływu 1,0 ml/min. Przy identyfikacji sulforafanu w próbkach porównywano czasy retencji i stosunek absorbancji mierzonej detektorem aparatu HPLC przy długości fali 238 nm do absorbancji mierzonej przy 254 nm w drugim torze pomiarowym dla próbki i standardu.

Na kolumnę wprowadzano próbki o objętości 20 μl . Ekstrakty chloroformowe sulforafanu poddawano wprost analizie HPLC. Pozostałe próbki do analiz chromatograficznych przygotowywano z brokułowego ekstraktem cukru, przeznaczanego do skarmiania pszczoł, lub z ziołomiodu uzyskanego z podanego pszczołom ekstraktu. Ziołomiód lub ekstrakt cukrowy o masie 25 g rozpuszczano w wodnych roztworach etanolu, a następnie z tych roztworów ekstrahowano chloroformem sulforafan. Roztwory rozdzielano w rozdzielaczach oraz odwirowywano otrzymując ekstrakt chloroformowy o objętości 10 ml, w którym oznaczano sulforafan.

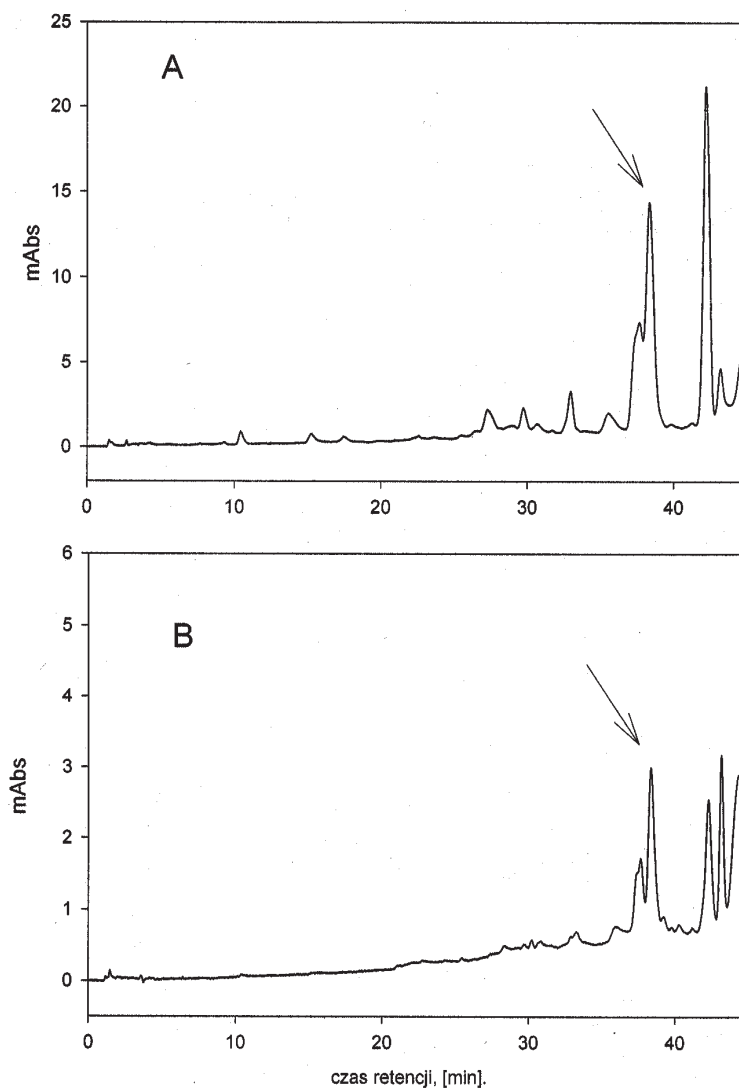
WYNIKI

Na rycinie 2A przedstawiono chromatogram roztworu syntetycznego sulforafanu w chloroformie o stężeniu 0,26 mM, używanego w niniejszej pracy jako wzorzec – czas retencji wzorca wynosił 38,5 min. Analiza chromatogramu i porównanie absorbancji przy 238 i 254 nm wykazała, że próbka wzorca zawierała 96% sulforafanu.

Chromatogram chloroformowego ekstraktu próbki ziołomiodu zamieszczono na ryc. 2 B.



Ryc. 2. Chromatograficzny rozdział sulforafanu (A-standard) i ziołomiodu (B). Strzałka wskazuje szczyt zidentyfikowany jako sulforafan. Czas retencji sulforafanu wynosi 38,5 min. The chromatographic profiles of sulforaphane (A-standard) and herbal honey (B). The arrow indicates the peak of sulforaphane. The time retention of sulforaphane is equal to 38.5 min.



Ryc. 3. Rozdział HPLC chloroformowego ekstraktu soku z brokułów (A) i cukrowego ekstraktu sulforafanu (B). Strzałka wskazuje szczyt o czasie retencji równym 38,5 min zidentyfikowany jako sulforafan.

The HPLC profiles of broccoli (A) and sulforaphane sugar extracts (B). The arrows indicate the peaks with retention time equal to 38.5 min.

Sulforafan w próbkach zidentyfikowano zgodnie z czasem retencji wzorca równym 38,5 minuty oraz poprzez porównanie wartości stosunku absorbancji przy 238 i 254 nm dla wzorca i analizowanych ekstraktów. Ekstrakty chloroformowe próbek otrzymano w czterech powtórzeniach, a analizy HPLC wykonywano w dwóch seriach. Błędy względne zastosowanej metody analizy nie przekraczają 6,4%.

Na rycinie 3 przedstawiono chromatogramy próbki chloroformowego ekstraktu brokułów (A) i cukrowego ekstraktu brokułowego przeznaczonego do skarmiania pszczół (B). Średnie stężenie sulforafanu w ekstrakcie chloroformowym brokułów wynosiło 30,6 μM , a po odpowiednim zmieszaniu z cukrem we frakcji cukrowej – 3,9 μM . Uzyskane w ziołomiodzie stężenie sulforafanu wynosiło 1,2 μM .

DYSKUSJA

Wiele doniesień z piśmiennictwa opisuje chemoprotekcyjne działanie pochodnych izotiocyjanianowych, w tym sulforafanu, poprzez modyfikację szlaków metabolizmu kancerogenów (najczęściej cytowanym procesem jest hamowanie enzymów tzw. Fazy I powodujących w organizmie przekształcenie substancji chemicznej w aktywny kancerogen) lub/i poprzez indukcję enzymów Fazy II detoksyfikujących substancje kancerogenne [2, 7]. Na podstawie tych badań uważa się, że indukcja i stymulacja enzymów Fazy II – transferazy S-glutationowej (EC 2.5.1.18) i reduktazy chinonowej (EC 1.6.99.2) jest podstawowym szlakiem hamującym niekorzystne działanie kancerogenów i innych reakcji stresu chemicznego. W eksperymentach ze zmienionymi nowotworowo komórkami hepatocytów *Hepa 1c1c7* myszy, podanie sulforafanu w stężeniu 0,2 μM powodowało podwojenie aktywności reduktazy chinonowej (QR) w stosunku do kontroli i wzrost aktywności tego enzymu zmieniał się liniowo wraz ze wzrostem dawki sulforafanu do stężenia 10 mM. Powyżej tego stężenia obserwowano cytotoksyczny efekt działania sulforafanu [6]. W tym samym przedziale stężeń sulforafanu wykazano 2-krotny wzrost aktywności transferazy S-glutationowej (GST).

Autorzy publikowanych prac uważają, że indukcja i stymulacja enzymów GST, QR jak również innych (hydrolazy epoksydowej, wzrost poziomu glutationu, wzrost aktywności enzymów jego redukcji i enzymów sprzęgania toksyn ze związkami glukuronowymi) może powstrzymać lub zapobiec chorobie nowotworowej u ludzi [2, 6, 7]. W tym kontekście przeprowadzono badania związane z transferem sulforafanu z warzyw do ziołomiodu przeznaczonego do konsumpcji zasługują na szczególną uwagę ze względu na jego znaczenie profilaktyczne.

Konstrukcja ula systemu Apipol pozwala na karmienie pszczół w ściśle kontrolowanych warunkach. Podanie ekstraktu zawierającego sulforafan pozwala pszczołom na przeprowadzenie go do ziołomiodu. Taki sposób transferu tego aglikonu zapewnia stężenie sulforafanu w bezpiecznych dla zdrowia człowieka granicach, a jednocześnie, sądząc po wzroście aktywności GST indukowanej stężeniem 0,2 μM , umożliwia wprowadzenie tego związku w fizjologicznych dawkach do ziołomiodu. Jak wspomiano we wprowadzeniu, stosując takie postępowanie przywiązujemy nadmierną, a nawet przesadną wagę do aspektów bezpieczeństwa. Uzyskane stężenie sulforafanu w ziołomiodach na poziomie 1,2 μM jest dawką zapewniającą jego profilaktyczne działanie. W doświadczeniach na izolowanych mysich komórkach raka wątroby traktowanych dawkami od 0,4 μM do 12,5 μM sulforafanu, *Gerhauser* obserwował 6-krotny wzrost aktywności reduktazy chinonowej QR [6]. Efekt cytotoksyczności sulforafanu był obserwowany po 24 h inkubacji komórek mysiej hepatomy przy stężeniu wyższym od 8 μM . Dlatego sądzimy, że poziom zawartości sulforafanu w uzyskanym ziołomiodzie jest w pełni bezpieczny dla zdrowia, a jednocześnie wydaje się być na tyle wysoki, aby pełnić rolę induktora detoksyfikujących enzymów Fazy II i inhibitora enzymów Fazy I.

WNIOSKI

W pracy wykazano możliwość przygotowania ziołomiodu zawierającego sulforafan z brokułów, wykazujący działanie chemoprotekcyjne. Opracowano metodę przygotowania i wzbogacenia pożywki dla pszczoł zawierającej naturalny ekstrakt sulforafanu. Pożywka była pobierana przez pszczoły w ulach zbudowanych w systemie Apipol i sulforafan był transferowany do ziołomiodu. Stwierdzono, że stężenie sulforafanu w ziołomiodzie wynosi 1,2 μM .

Podziękowania. Autorzy wyrażają podziękowanie Prezesowi Przedsiębiorstwa Pszczelarskiego ApiPol Panu inż. Ryszardowi Tomaszewskiemu za pomoc w przygotowaniu pracy oraz prof. Małgorzacie Poniedziałek i prof. Władysławowi Poniedziałek za inspirację tematem związanym z sulforafanem.

A. Świdorski, P. Sterkowicz, P. Kaszycki, H. Kołoczek

HERBHONEEY CONTAINING SULFORAPHANE – AGLICON WITH POTENTIAL USE IN CANCER PROPHYLAXIS

Summary

Cruciferous vegetables play an important role because of their sulphoraphane contents which are enzymatically released from the glucosinolate known as glucoraphanin. The physiological properties of the compound exhibit antitumorogenic activity. The work describes the chloroform extraction method of sulforaphane from the broccoli and the preparation of sulforaphane sugar extract. The extract was then used to feed bees in a specially constructed beehive so that sulforaphane could be transformed into herbal honey. The concentration of sulforaphane was determined in the obtained herbal honey as high as 1.2 μM .

PIŚMIENNICTWO

1. Artykuł redakcyjny – Inżynieria pszczelarska. Apipol-Informator Regionalnego Zrzeszenia Pszczelarzy 1986, 1, 3–5.
2. Barcelo S., Gardiner J.M., Gescher A., Chipman J.K.: CYP2E1-mediated mechanism of anti-genotoxicity of the broccoli constituent sulforaphane. *Carcinogenesis* 1996, 17, 277–282.
3. Carlson D.G., Daxenbichler M.E., Van Eppen C.H., Kwolek W.F., Williams P.H.: Glucosinolates in Crucifer Vegetables: Broccoli, Brussels Sprouts, Cauliflower, Collards, Kale, Mustard Greens, and Kohlrabi. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1987, 112, 173–178.
4. Chen I., McDougal A., Wang F., Safe S.: Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorogenic activity of diindolylmethane. *Carcinogenesis* 1998, 19, 1631–1639.
5. Fahey J.W., Zhang Y., Talalay P.: Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 10367–10372.
6. Gerhäuser C., You M., Liu J., Moriarty R.M., Hawthorne M., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M.: Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Research* 1997, 57, 272–278.
7. Hecht S.S.: Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. Symposium on phytochemicals: biochemistry and physiology. *J. Nutr.* 1999, 129, 768S–774S.
8. Howard L.A., Jeffery E.H., Walling M.A., Klein B.P.: Retention of Phytochemicals in Fresh and Processed Broccoli. *J. Food Sci.* 1997, 62, 1098–1101.
9. Kalisz-Niemyska J.: Katalog sprzętu Systemu Apipol 2001, 1–20.

10. *Kore A.M., Spencer G.F., Wallig M.A.*: Purification of the w-(Methylsulfinyl)alkyl Glucosinolate Hydrolysis Products: 1-Isothiocyanato-3-(methylsulfinyl)propane, 1-Isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane, 4-(Methylsulfinyl)butanenitrile and 5-(Methylsulfinyl) pentanenitrile from *Broccoli* and *Lesquerella fedleri*. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 89–95.
11. *McCarty M.F.*: Inhibition of CYP2E1 with natural agents may be a feasible strategy for minimizing the hepatotoxicity of ethanol. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 29, 231–40.
12. *McGregor D. I., Mulin W. J., Fenwick G.R.*: Review of analysis of glucosinolates. Analytical methodology for determining glucosinolate composition and content. *J. Assoc. Anal. Chem.* 1983, 66, 4.
13. *Matusheski N.V., Wallig M.A., Juvik J.A., Klein B.P., Kushad N.M., Jeffery E.H.*: Preparative HPLC method for the purification of sulforaphane and sulforaphane nitrile from *Brassica oleracea*. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1867–72.
14. *Posner G.H., Cho Ch., Green J.V., Zhang Y., Talalay P.*: Design on synthesis of bifunctional isothiocyanate analogs of sulforaphane: Correlation between structure and potency as inducers of anticarcinogenic detoxication enzymes. *J. Med. Chem.* 1994, 37, 170–176.
15. *Prochaska H.J., De Long M.J., Talalay P.*: On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: A unifying proposal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 8, 8232–8236.
16. *Schmidt H., Karrer P.*: Synthese der racemischen und der optisch aktiven Formen des Sulforaphans. *Helv. Chim. Acta* 1948, 31, 1497–1505.
17. *Talalay P., De Long M.J., Prochaska H.J.*: Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 8261–8265.
18. *Wilde J.*: *Gospodarka pasieczna. Pszczelnictwo – praca zbiorowa*, Red. J. Prabucki, Wyd. Albatros, Szczecin 1998, s. 403–405.
19. *Zhang Y., Talalay P., Cho Ch., Posner G.H.*: A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 2399–2403.

Otrzymano: 2002.02.02