آنالیز ایندول – ۳- کربینول (یک ترکیب ضد سرطانی خانواده چلیپاییان (Cruciferae)) توسط روش ولتامتری روبش خطی

عبدالعظیم بهفر[۱*]، محمدرضا اویسی[۲]، سید محمد شریعت‌پناهی[۳]، حسین کمیلی‌زاده[٤]، امید سبزواری[٥]، منوچهر حامدی[٦]

۱- دستیار مواد خوراکی و آبشناسی پزشکی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- استادیار گروه مواد خوراکی و آبشناسی پزشکی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- استاد گروه مواد خوراکی و آبشناسی پزشکی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٤- استادیار گروه شیمی‌دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
٥- دانشیار گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٦- متخصص علوم غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه مواد خوراکی و آبشناسی پزشکی
*آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه مواد خوراکی و آبشناسی پزشکی
پست الکترونیک: aa_behfar@yahoo.com

چکیده

سبزیجات جنس براسیکا شامل یک ایندول متیل گلوکوزینولات به نام گلوکوبراسیسن می‌باشند. یکی از فرآورده‌های حاصل از تخریب این گلوکوزینولات، ماده ایندول – ۳- کربینول (I3C) می‌باشد که از خود خواص ضد سرطانی نشان داده است. تخریب گلوکوزینولاتها بر اثر هیدرولیز ناشی از آنزیم میروزیناز است که خود توسط تخریب سلول‌های گیاهی آزاد می شود. I3C دارای اثرات ضد سرطانی می باشد، هر چند که بیشتر مطالعات ضد سرطانی آن توسط مطالعات حیوانی به اثبات رسیده است. با توجه به خصوصیات بافت کلم و حضور مقادیر بالای اسید اسکوربیک، I3C با اسید اسکوربیک ترکیب شده و تولید ماده دیگری به نام آسکوربیژن می نماید. این ترکیب خود دارای اثرات ضد سرطانی بوده و به عنوان منبع اسید اسکوربیک عمل می‌نماید. در این مطالعه از این خصوصیت جهت تعیین مقدار I3C توسط روش ولتامتری استفاده گردید. بدین منظور ولتاموگرامهای اسید اسکوربیک در بافر سیترات – فسفات با pH بهینه ۳/۲ و سرعت روش $^{mv}/_{s}$ ۷۵۰۰ و غلظت‌های $^{mg}/_{ml}$ ۱۷۵ – ۱ رسم شد و سپس تحت همین شرایط ، به محلول حاوی اسید اسکوربیک، غلظت های مختلف I3C اضافه گردید. آنالیز نتایج نشان‌دهنده لگاریتمی بودن منحنی غلظت I3C در مقابل جریان بود. تحت این شرایط، حد شناسایی I3C ، ۰/۰۰۳ mM بود. تکرارپذیری روش با بیان به صورت انحراف از معیار برای غلظت‌های ۰/۸ mM، ۰/۵ mM، ۰/۱۵ mM به ترتیب برابر ۵/۲، ۵ و ۵/۶ درصد بود. منحنی غلظت در مقابل لگاریتم جریان خطی بود و حساسیت روش نیز برابر $logA/_{mM}$ ۲/۶۵ – بود.

گل‌واژگان: ایندول – ۳ – کربینول، چلیپاییان، ولتامتری

مقدمه

از قبل این فرض وجود داشته است که ترکیبات موجود در سبزیجات و میوه‌جات دارای اثر ضدسرطانی می‌باشند که این اثر را به وجود فیبر، ویتامین C و E، کاروتنوییدها، فلاونوییدها، فنل‌ها، فیتواستروژنها، دی آمیل سولفیدها، لیمونن و فرآورده‌های ناشی از هیدرولیز گلوکوزینولات‌ها نسبت می‌دهند. مکانیسم‌های پیشنهادی شامل رقیق‌سازی و باند شدن با کارسینوژنها در روده، اثرات آنتی‌اکسیدانی، مهار تشکیل نیتروزآمین، مهار فعالسازی پروموژن‌ها و پروکارسینوژن‌ها، القا آنزیم‌های دتوکسیفیه کننده و غیره می‌باشد [۱، ۲].

یک گروه از سبزیجات که به صورت گسترده‌ای به عنوان ضدسرطان‌های بالقوه مطالعه شده‌اند، خانواده چلیپاییان می باشند. سبزیجات این خانواده منبع اصلی گلوکوزنیولاتها در رژیم غذایی می‌باشند. سبزیجات عمومی خانواده چلیپاییان در جدول شماره ۱ آورده شده است [۳].

میزان گلوکوزینولات گیاهان وابسته به خانواده سبزیجات، شرایط کشت، آب و هوا و فاکتورهای کشاورزی و همین‌طور بسیار وابسته به قسمت گیاه می‌باشد. ایندول‌گلوکوزینولات‌ها در جوانه‌ها و برگ‌های رشد کرده، پیدا می‌شوند [٤].

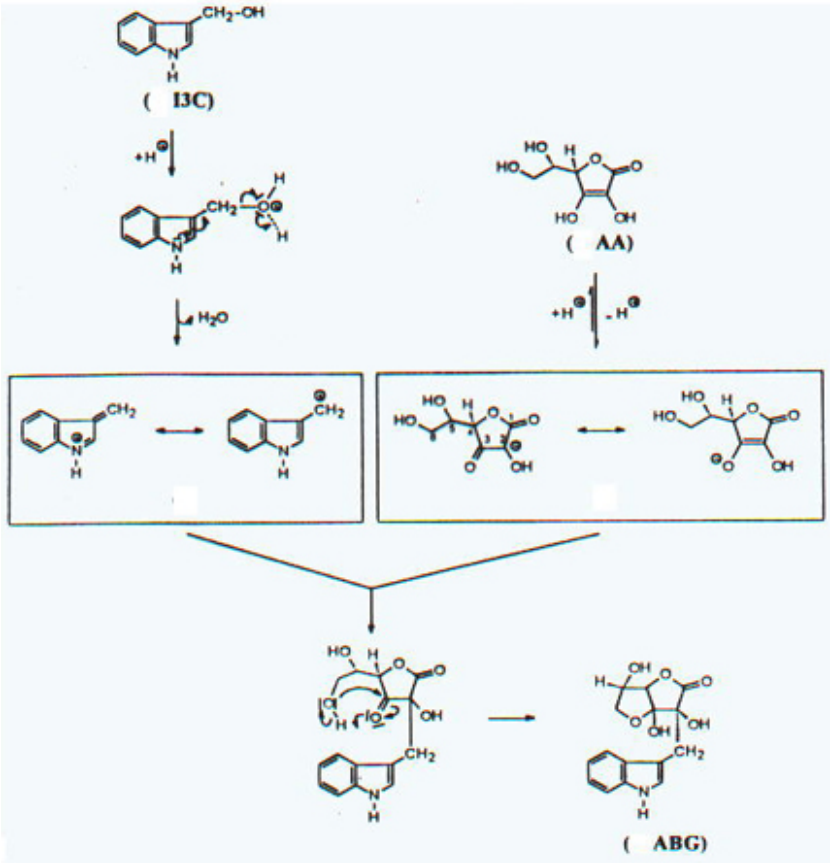
جذب mg ١٦-١٢ گلوکوزینولات برای هر شخص در روز توسط Heany و Fenwick پیشنهاد شده است [٣].

در بافت‌های گیاهی پیر یا تخریب شده گلوکوزید گلوکوبراسیسن با نام شیمیایی (indol-3-yl;I3C)acetothio-S-(β-D-glucopyranosil) hydroxyimyl-O-sulfate بر اثر آنزیم میروزیناز تولید Skatylisothiocyanate می نماید. تلاشها جهت به‌دام انداختن یا جداسازی این ماده تاکنون ناموفق بوده است. این ترکیب به آسانی به ایندول – ۳- کربینول هیدرولیز می گردد. I3C تشکیل شده توسط اسیداسکوربیک موجود به‌دام افتاده و تولید ماده دیگری به نام آسکوربیژن با نام 2-C-[(indol-3-yl)methyl]-α-L-threo-L-glycero3-exulofuranosonic acid1,4Lactone می‌نماید. این ماده اولین بار از آب کلم در سال ۱۹۵۷ جداسازی شد (٥). البته به غیر از مواد فوق بر اثر هیدرولیز گلوکوزینولات مقادیر کمی ایزوتیوسیانات، تیوسیانات و نیتریت نیز تولید می گردد.

I3C خود در محیط اسیدی ناپایدار بوده و تولید یکسری از ترکیبات می‌نماید که مهم‌ترین آنها عبارتند از: di(indol-3-yl)methane، سیکلوتریمر و 5,11dihydroindolo[3,2-b]carbazole (ICZ). ICZ بر اثر القا آنزیمی نیز تولید می‌گردد [٦].

جدول شماره ۱- سبزیجات عمومی خانواده چلیپاییان

جنس	گونه	نام عمومی
Armoracia	rusticana	Horseradish
Brassica	campestris	Turnip
	chinensis	Pak choy
	juncea	Brown mustard
	napus	Rape,Swede,Rutabaga
	oleracea	Cabbage, kale, Brusselssprouts, Cauliflower, Broccoli, Kohlrabi
	pekinensis	Chinese cabbage
Lepidium	sativum	Garden cress
Nasturtium	officinale	Watercress
Raphanus	sativus	Radish
Sinapis	alba	Mustard



شکل شماره ۱- مکانیسم فرض شده جهت تشکیل آسکوربیژن (ABG)

آسکوربیژن در محیط مایی و pH های اسیدی در ابتدا یک مولکول اسید اسکوربیک از دست می‌دهد و کاتیون باقی‌مانده (indol-3-yl) methyl به مولکول دیگر آسکوربیژن از سمت ایندولی آن ترکیب و تولید آسکوربیژن دیمر و یا تریمر می‌نماید. در این شرایط ICZ نیز دیده شده است [۷].

البته در شرایط قلیایی یک قند احیا با نام l- deoxy-1-(indol-3-yl)-l-sorbopyranose از طریق دکربوکسیلاسیون قلیایی و ایزومریزاسیون تشکیل می‌شود [۸].

همان‌طور که ذکر شد جهت تولید I3C و ترکیبات حاصل از آن وجود آنزیم میروزیناز ضروری است.

این آنزیم بر اثر تخریب سلول گیاهی مثلاً توسط بریدن یا جویدن ایجاد می‌شود . بر اثر فراوری مثلاً پختن سبزیجات، آنزیم میروزنیاز غیر فعال می‌شود و تخریب دمایی و شستشو حدوداً ۶۰-۳۰ درصد از گلوکوزینولاتهای قابل دسترسی را از بین می‌برد. البته آنزیم میروزیناز در فلورمیکروبی روده نیز یافت شده است [۳] و این زمانی مهم است که کلم دست نخورده مصرف شود.

ایزوتیوسیانان‌ها و ایندول‌های حاصل از گلوکوزینولات در سبزیجات خانواده چلیپاییان نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های فاز ۱ و ۲ دتوکسیفیه شدن را بهبود می‌بخشند. القا آنزیم‌های فاز ۱

می‌تواند در مهار فعالیت ترکیبات و به‌علاوه بیواکتیواسیون برخی مواد موثر باشد که با القا آنزیم‌های فاز ۲ علاوه بر فاز ۱ ، ترکیبات فعال شده می‌توانند دتوکسیفیه شوند.

ایندول‌ها به‌خصوص I3C غیر مشابه با ایزوتیوسیانات‌ها، آنزیم فاز ۱ استرادیول ۲-هیدورکسیلاز را القا می‌نماید که این باعث بیوترانسفورماسیون استرادیول به هیدروکسی استرون می‌شود. این ماده فعالیت استروژنی کمتری دارد.

همچنین مشاهده شده است که تعدیل اثرات ایندول‌ها مستقیماً به القا آنزیم‌های فاز ۱ مرتبط نیست اما به طرف تعادل بین آنزیم‌های فاز ۱ و ۲ در آنزیم‌های مطلوب فاز ۲ پیش می رود [۹، ۱۰].

علاوه بر خصوصیات مفید فرآورده‌های حاصل از گلوکوزینولات‌های خانواده چلیپاییان، این ترکیبات دارای اثرات جانبی نیز می‌باشند. تعداد کمی از ایزوتیوسیانات‌ها و ایندول‌ها همانند ایندول ۳- استونیتریل از خود خصوصیات موتاژنی و کارسینوژنی نشان داده‌اند [٤]. البته هیچ اثر سمی وقتی انسان از یک رژیم غذایی شامل مقادیر بالای

جدول شماره ۲ـ اثرات I3C و انواع کلم در انسان

ترکیب / سبزیجات	مقدار و مدت مصرف	جنس	اثر
I3C	۵۰۰mg(۶ - ۷mg/kg)در روز به‌مدت یک هفته	مرد	افزایش Estradiol 2-hydroxylation
I3C	۵۰۰mg(۶ - ۷mg/kg)در روز به‌مدت یک هفته	مرد و زن	افزایش Estradiol 2-hydroxylation
I3C	٤۰۰mg در روز به‌مدت سه ماه	زن	افزایش نسبت 2-Hydroxy- Estiol estrone :
Brusseles sprouts	۳۰۰g در روز برای سه هفته	مرد	افزایش سطح پلاسمایی GST
Brusseles sprouts	۳۰۰g در روز برای سه هفته	مرد	افزایش سرعت کلیرانس antipyrine، کاهش غلظت پلاسمایی phenacetin بدون اثر بر نیمه عمر phenacetin
Brussels sprouts & Cabbage	۳۰۰g و ۲۰۰g به ترتیب برای ۱ و ۷ روز	مرد و زن	بدون اثر بر فعا لیت GST ، افزایش سطح GST-α و GST-π رکتالی
Brussels sprouts	۳۰۰g برای ۷ روز	مرد و زن	افزایش نسبت 2-Hydroxy- : 16α-hydroxyestrone estrone
Brussels sprouts	۳۰۰g برای ۷ روز	مرد و زن	بدون اثر بر نسبت 6-hydroxychlorzoxazone:chlorzoxazone
Brussels sprouts , Cabbage,Broccoli & Cauliflower	٤۰۰-۳۸۰ گرم در روز به‌مدت ۵ روز	زن	افزایش نسبت متابولیک کافیین
Broccoli	۵۰۰ گرم در روز به‌مدت ۱۲ رمز	مرد و زن	افزایش نسبت 2-Hydroxy- : 16α-hydroxyestrone estrone
Broccoli	۵۰۰ گرم در روز به‌مدت ۱۰ رمز	مرد و زن	افزایش فعالیت P450 1A2،بدون اثر بر فعالیت N-acetyltransferase & xanthine oxidase

کلم استفاده می‌کنند، مشاهده نشده است.

به‌علاوه، سبزیجات این خانواده دارای خصوصیت گواترزایی می‌باشند. اثرات گواترزایی را ناشی از فرآورده‌های هیدرولیزی گلوکزینولات‌ها، به‌خصوص یون تیوسیانات و ۵- وینیل اکسازولیدین -۲ – تیون (goitrin) می‌دانند [٤].

روش‌های آنالیز ترکیب و مقدار گلوکوزینولات‌ها توسط Mc Gregor و همکارانش در یک مقاله مروری بررسی شده است [۱۱]. جهت اندازه‌گیری گلوکوزینولات تام، از اندازه‌گیری رنگ‌سنجی گلوکز آزاد شده توسط هیدرولیز میروزیناز استفاده می‌گردد. همچنین از HPLC,GC و الکتروفورز موبینه جهت تعیین مقدار گلوکوزینولات‌ها و فرآورده‌های حاصل از آنها استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر از تکنیک ولتامتری که دارای جایگاه ویژه‌ای در بین تکنیک‌های تجزیه‌ای جهت شناسایی و تعیین مقدار غلظت‌های کم بسیاری از مواد آلی، ارگانومتالیک و غیر آلی است، استفاده گردید.

بر خلاف اسید اسکوربیک که یک مولکول الکترواکتیو می‌باشد، ایندول -۳- کربینول تحت شرایط آزمایش الکترواکتیو نبود. بدین منظور ابتدا شرایط بهینه رسم ولتاموگرامهای جریان – پتانسیل اسید اسکوربیک تعیین و سپس از اثر کاهشی I3C بر روی اسید اسکوربیک جهت تعیین مقدار I3C استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

دستگاه: در این مطالعه از یک trace analyer، مدل ۷٤۷ Metrohm ساخت سوئیس استفاده شد. این دستگاه شامل محفظه الکترولیز با حجم حدود ۵۰ml، سه ورودی برای سه الکترود کار، کمکی و مرجع و یک ورودی جهت وورد نیتروژن می‌باشد.

از یک الکترود صفحه‌ای مسطح طلا به قطر ۲ میلی‌متر که با ماده تفلون دور آن پوشانیده شده بود، استفاده گردید. از الکترود Ag/Agcl به عنوان الکترود مرجع و یک میله پلاتینیومی به عنوان الکترود کمکی استفاده شد.

واکنشگرها و محلول‌ها: تمام واکنشگرها از شرکت Merck وسیگما تهیه گردید. در ضمن از آب دو بار تقطیر و دیونیزه شده جهت تهیه محلول‌ها استفاده گردید. جهت حل نمودن ایندول – ۳- کربینول از حلال‌های مختلفی استفاده شد که تنها در الکل اتیلیک دارای حلالیت کافی بود.

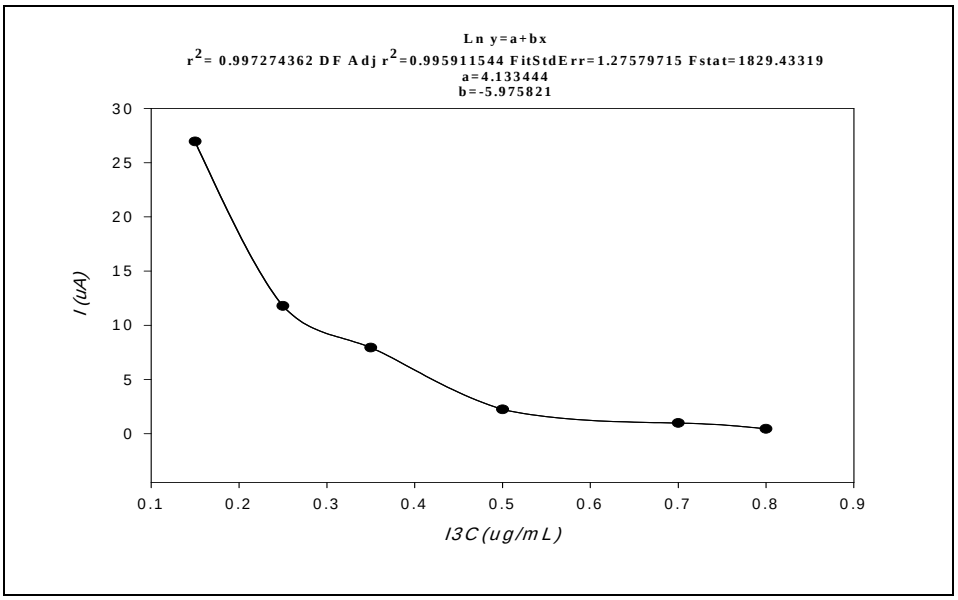
از آنجایی‌که در گیاه اسید اسکوربیک و ایندول – ۳- کربینول در محیط اسیدی با هم ترکیب می‌شوند از بافر سیترات – فسفات با pH حدود ۳ استفاده گردید. سپس ولتاموگرام‌های اسید اسکوربیک در بافر انتخابی و شرایط بهینه pH = ۳/۲ و سرعت روش $^{mv}/_{s}$ ۷۵۰۰ و غلظت $^{mg}/_{ml}$ ۱۷۵ رسم گردیدند، بعد به اسید اسکوربیک تحت همین شرایط غلظت‌های مختلف I3C اضافه گردید، آنالیز نتایج نشان‌دهنده لگاریتمی بودن منحنی غلظت I3C در مقابل جریان بود. در مرحله بعد طبق الگوی ارزیابی روش (Method Validation) این آنالیز بررسی شد و نتایج مربوط در جدول شماره ۳ آورده شده است. طبق منحنی‌های کالیبراسیون I3C، منحنی غلظت I3C در مقابل جریان لگاریتمی و به صورت زیر می‌باشد.

$$\text{Ln } y = 4.13 + 5.98x \qquad r^2=0.997$$

در صورتی‌که مخلوط اسید اسکوربیک و I3C با غلظت کم، به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شود و سپس با اتیل استات استخراج و خشک شود، با استفاده از سلیکاژل F_{254} و مخلوط فاز متحرک کلروفرم، متانول، اسید استیک به نسبت ۱:۱۰:۹۰، لکه‌ای با R_f = ۰/۱۵ مشاهده می‌گردد که این مربوط به آسکوربیژن می‌باشد.

بحث

تکنیک‌های ولتامتری بر اساس اندازه‌گیری جریان



شکل شماره ۱- منحنی استاندارد I3C

منتج شده از اکسیداسیون یا احیاء در سطح الکترود و به دنبال اعمال یک پتانسیل متغیر به سل الکتروشیمیایی بنا شده‌اند و مولکول‌های بیولوژیک را می‌توان پس از آماده‌سازی اولیه توسط تکنیک ولتامتری و در حد مقادیر بسیار ناچیز اندازه‌گیری نمود. در بسیاری از موارد، هنگامی‌که واکنش الکتروشیمیایی در یک پتانسیل خاص، کاملاً اختصاصی است، این امکان وجود دارد که مولکول مورد نظر را به صورت مستقیم در مخلوط شناسایی و تعیین مقدار نمود که شرط اصلی آن نیز الکترواکتیو بودن ماده مد نظر در آن شرایط می‌باشد.

متاسفانه I3C در محیط مایی و pH اسیدی که شرایطی تا حدودی مشابه بافت گیاه است، الکترواکتیو نبود، که شناسایی و تعیین مقدار مستقیم آن را غیر ممکن نمود. ولی از آنجایی‌که در بافت گیاه، اسید اسکوربیک با غلظتی حدود ۱mM یافت می‌شود، پس در این مطالعه از غلظت اسید اسکوربیک معادل آن و غلظت‌های مختلف I3C استفاده گردید. .همان‌طور که از منحنی استاندارد نیز مشخص است در غلظت‌های پایین I3C، واکنش با اسید اسکوربیک به‌صورت تقریباً مول به مول می‌باشد (قسمت ابتدای منحنی استاندارد I3C) که با افزایش غلظت I3C به شکل منحنی در آمده و در غلظت‌های بالای I3C به‌صورت حدی به سمت صفر میل پیدا می‌کند. این رفتار مشاهده شده با داده‌های قبلی مبنی بر تشکیل آسکوربیژن دیمر و تریمر و یا حتی پلی‌مر در غلظت‌های بالای I3C در محیط اسیدی مطابقت دارد.

TLC مخلوط اسید اسکوربیک و I3C با غلظت کم فقط نشان‌دهنده تشکیل آسکوربیژن است ولی در غلظت‌های بالاتر I3C علاوه بر لکه مربوط به آسکوربیژن، لکه‌های دیگری نیز مشاهده می‌شود.

در اینجا پیشنهاد می‌گردد که جهت مطالعه خواص الکتروشیمیایی I3C از ترکیباتی که به‌طور طبیعی در بافت گیاه وجود دارند برای الکترواکتیو نمودن آن استفاده گردد و سپس با استفاده از روش‌های پیشرفته ولتامتری همانند ولتامتری چرخه‌ای به مطالعه کینیتیکی این ماده پرداخته شود.

جدول شماره ۳- نتایج ارزیابی روش اندازه گیری I3C

دقت		
تجدید پذیری	تکرار پذیری	غلظت
٪۱۲/۰	٪۵/۲	٪۸ mM
٪۹/۰	٪۵/۰	٪۵ mM
٪۱۰/۹	٪۵/٦	٪۱۵ mM

صحت				
میانگین	بازیافت	مقدار خوانده شده	مقدار اضافه شده	مقدار اولیه
٪۹٤/٤	٪۹۲/۰	۰/۵۱ mM	۰/۰۵ mM	۰/۵ mM
	٪۹۷/۰	۰/۵۸ mM	۰/۱ mM	۰/۵ mM
	٪۹٤/۲	۰/٦٦ mM	۰/۲ mM	۰/۵ mM
حد شناسایی				۰/۰۰۳ mM
حد اندازه‌گیری				۰/۰۱ mM
حساسیت				−۲/٦۵ log A/mM

منابع

1. Dragsted LO, Strube M and Larsen Jc. cancer - protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol*. 1993; 1: 116-35.

2. Wattenberg LW. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res*. 1992; 52: 2085 s -91 s.

3. Fenwick GR and Heany RK. Glucosinolates and their breakdown Products in Cruciferous crops, foods, and feedingstuffs. *Food chem*. 1983; 11: 249-71.

4. McDanell R and Mclean AEM. Chemical and biological Properties of indole glucosinolates (glucobrassicins): a reviw. *Food chem. Toxicol*. 1988; 26:59-70.

5. Kutacek M, Prochazka Z and Grunberger D. Biogenesis of Ascorbigen, 3-Indolylacetonitrile and Indole-3-Carboxylic aeid from D,L-Tryptophan-3-C in *Brassica oleracea* L. *Nature* 1960; 4731:61-2.

6. Grose kk and Bjeldanes LF. Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid. *Chemical Research in Toxicol*. 1992; 5:188-93.

7. Preobrazhenskaya MN, korolev AM and Lazhako EI. Ascorbigen as a Precursor of 5,11-dihydroindolo [3,2-b] carbazele. *Food chemistry* 1993; 48:57-62.

8. Preobrazhenskaya MN, Lazhako EI and korolev AM.Transformation of Ascorbigen into 1-Deoxy-1-(indol-3-yl)-α-L-sorbopyranose and 1-Deoxy-1-(indol-3-yl)-α-Ltagatopyranose. *Tetrahedron,* 1996; 7:461-6.

9. Dashwood RH. Indole-3-carbinol:Anticarcinogen or tumor promoter in brassica vegetables?, *Chemico - biological Interactions*, 1998; 110:1-5.

10. Jongen WMF, Topp RJ, VanBladeren PJ and Leenen R. Modulating effect of indoles on benzo[a]pyrene-induced sister chromatid exchanges and the balance between drug-metabolizing enzymes. *Toxic. in vitro,* 1989; 3:207-13.

11. McGreogor DI, Mullin WJ and Fenwick GR. Review of ananlysis of glucosinolates: analytical methodology for determining glucosinolate composition and content. *J. Assoc. off. Anal. chem*. 1983;63:825-49.