

ПОЛИФЕНОЛЬНЫЙ СОСТАВ И ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА БОБОВ СОЛОДКИ ГЛАДКОЙ (*Glycyrrhiza glabra* L.)

Н.И. Гудинская

к.м.н., доцент,

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (г. Астрахань, Россия)

А.А. Николаев

д.м.н., профессор,

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (г. Астрахань, Россия)

E-mail: chimnik@mail.ru

Актуальность. В последние годы повысился интерес к поиску и использованию натуральных, высокоэффективных и недорогих растительных антиоксидантов для замены существующих синтетических. Сушеные корни солодки широко используется в качестве ароматизатора пищевых продуктов и в различных лечебных целях. Препараты корня солодки известны своими значительными антиоксидантными, противовоспалительными и антипролиферативными свойствами. Однако антипролиферативная активность полифенолов из бобов солодки широко не изучалась.

Цель исследования. Изучение состава полифенолов экстракта бобов солодки и их цитотоксической активности.

Материал и методы. Объектом исследования служила высушенная масса бобов солодки (1000 г). В работе использовали химикаты и реагенты, аналитической степени чистоты, а также этанольный экстракт бобов солодки гладкой. Полифенолы в этанольном экстракте бобов солодки (ЭЭС) анализировали с использованием метода Folin-Ciocalteu. Содержание полифенолов выражали в граммах эквивалента галловой кислоты на 100 г сухой массы. Полифенолы идентифицировали с помощью ВЭЖХ (Gilson колонка C18 4,6×250 мм, 5 мкм). Анализ цитотоксичности выполняли на клеточной культуре LNCaP. После 48 ч воздействия ЭЭС проводили стандартный МТТ тест.

Результаты. Общее содержание полифенолов в ЭЭС в пересчете на галловую кислоту составило 37,17 мкг. Идентифицированы глабрин, катехин, рутин, ликохалкон А, элаговая кислота. После периода инкубации в течение 48 ч этанольный экстракт бобов солодки показал дозозависимое ингибирование роста клеток от 40 до 140 мкг/мл. Максимальный эффект был получен от 100 мкг/мл, который демонстрирует цитотоксический эффект ЭЭС на клетки LNCaP более 85%.

Выводы. Бобы солодки наравне с корнем солодки можно использовать как мощный биологически активный источник природных антиоксидантов и противораковых агентов.

Ключевые слова: *Glycyrrhiza glabra* L., бобы, полифенолы, антипролиферативная активность, антиоксидантная активность.

Для цитирования: Гудинская Н.И., Николаев А.А. Полифенольный состав и цитотоксическая активность экстракта бобов солодки гладкой (*Glycyrrhiza glabra* L.). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(11):15–19. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-11-03>

Природные полифенолы обладают рядом полезных для здоровья человека свойств [1]. Многочисленные исследования показывают, что корень солодки богат различными вторичными метаболитами, среди которых особое место занимают полифенолы и флавоноиды [2].

Полифенолы – вторичные метаболиты растений, они делятся на разные семейства в зависимости от их химической структуры [3]. Несколько классов полифенолов проявляют широкий спектр антимикробного действия [4]. Халконы и изофлавоноиды, полученные из солодки (глабридин, ликорицидин, ликохалкон А), обладают выраженными антибактериальными свойствами.

Показано, что полифенолы в качестве антиоксидантов могут снизить риск хронических заболеваний, обусловленных продукцией активных форм кислорода или окислительным стрессом, включая сахарный диабет, болезнь Альцгеймера и рак [3]. Распространение здорового образа жизни повысило интерес к поиску и использованию натуральных, высокоэффективных и недорогих растительных антиоксидантов для замены существующих синтетических антиоксидантов. Солодка (*Glycyrrhiza glabra* L.) – деревянистый многолетний кустарник семейства бобовых, произрастающий в основном в Центральной Азии, на Ближнем Востоке и в Юго-Восточной Европе. Сушеные корни солодки с дав-

них времен широко используются в качестве ароматизатора пищевых продуктов и в различных лечебных целях [5].

Таким образом, препараты корня солодки известны своими значительными антиоксидантными, противовоспалительными и антипролиферативными свойствами. Эти действия связаны с характерным химическим составом, который включает несколько биологически активных соединений, в том числе глицирризин (~16%), различные сахара (до 18%), флавоноиды, сапонины, стериды, крахмалы, аминокислоты, камеди и эфирные масла [5]. Однако цитотоксическая активность полифенолов из экстрактов бобов солодки изучена недостаточно полно.

Цель исследования – изучение полифенольного состава экстракта бобов солодки и их цитотоксической активности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Для работы собирали плоды *Glycyrrhiza glabra* L., которые созревают в конце августа, сентябре. Именно бобы *Glycyrrhiza glabra* L. по аналогии с горохом, фасолью и другими растениями наиболее богаты биоактивными полифенолами [6]. Использовали 1000 г высушенной и измельченной массы бобов солодки, собранных в сентябре 2018 г. в Красноярском районе Астраханской области.

Химикаты и реагенты. В исследовании использовали метанол, ацетонитрил, этилацетат, метановую кислоту (ОСЧ) «Duksan Pure Chemical Co., Ltd.» (Корея). Воду дважды дистиллировали и фильтровали (FH-0,45 мкм, Advantec MFS, Inc., Япония) с помощью декомпрессионного насоса («Division of Millipore», Waters, США). Применяли этанол, петролейный эфир и хлороформ (ЧДА) («Реахимприбор», Россия). Клетки LNCaP клона ФСК (ECACC 89110211) приобретены в ECACC «General Cell Collection» (Великобритания).

Экстракция полифенолов из бобов солодки. Высушенные бобы *Glycyrrhiza glabra* L. измельчали до порошкообразного состояния на гомогенизаторе «POLYTRON PT 3100 D». Далее 20 г порошка бобов солодки замачивали в 100 мл этанола (50%) на 24 ч при температуре 20 °С. Осадок фильтровали (ацетатцеллюлозные фильтры «Sartorius», тип 11106, пора 0,45 мкм) и дополнительно экстрагировали трехкратно в тех же условиях. Фильтраты объединяли и концентрировали на роторном испа-

рителе до исходного объема 100 мл. Фракцию этилацетата использовали для анализа ВЭЖХ.

Количественное определение полифенолов. Анализ полифенолов в ЭЭБС проводили на основе метода Folin–Ciocalteu [7]. Сначала смешивали 0,2 мл ЭЭБС (1 мг/мл в метаноле) и 1,0 мл фенольного раствора реактива Folin–Ciocalteu и инкубировали в стеклянной пробирке при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем к смеси добавляли 2,5 мл 5%-ного Na₂CO₃, перемешивали и доводили деионизированной водой до 10 мл. Через 40 мин оптическую плотность измеряли при 765 нм с помощью двухлучевого спектрометра UV-V (UV-VIS PB 2201).

Расчет содержания полифенолов вели в пересчете на галловую кислоту на 100 г сухой массы. В качестве стандартного образца для количественного определения фенольных соединений использовали галловую кислоту. Были приготовлены растворы галловой кислоты в диапазоне концентраций от 0 до 6,75 мкг/мл

Идентификация полифенольных соединений с помощью ВЭЖХ. Метанольный раствор ЭЭБС (100 мкг/мл) фильтровали с помощью однофазового шприцевого фильтра «Sartorius» 0,45–5,0 мкм и исследовали методом ВЭЖХ с использованием сорбента типа C18 на колонке 4,6 × 250 мм, 5 мкм, «Shimadzu Europa». Хроматографирование выполняли на хроматографе «Gilson HPLC», система «Modules Data Master 62». В качестве подвижной фазы А использовали ацетонитрил, в качестве подвижной фазы В – 2%-ный раствор муравьиной кислоты в воде. Хроматографирование проводили в градиентном режиме по составу подвижной фазы. Скорость потока: 0,4 мл / мин; 0 мин, 15% (А); 1 мин, 35% (А); 2 мин, 40% (А); 5 мин, 75% (А); 15 мин, 15% (А); и 20 мин, 15% (А). Объем инъекции составил 10 мкл. Детектирование выполняли с помощью УФ-детектора 2487 при 330 нм.

Анализ клеточной пролиферации осуществляли методом ингибирования роста клеточных линий *in vitro* [8]. Клетки LNCaP клона ФСК (ECACC 89110211) были посеяны в 96-луночные планшеты (2000 клеток/лунку в 150 мкл стандартной среды RPMI-1640, содержащей 2 mM глутамин, 1,0 mM пирувата натрия и 10% сыворотки теленка) с концентрациями 0; 20,0; 60,0 и 100 мкмоль/л ЭЭБС. После 48 ч воздействия ЭЭБС проводили стандартный МТТ тест: 50 мкл раствора 3-(4,5-диметилтиазол)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ)

(250 мкг/мл в среде RPMI-1640) добавляли в каждую лунку, и клетки инкубировали при 37 °С в течение 4 ч; планшеты центрифугировали при 380 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, а затем добавляли 200 мкл диметилсульфоксида в каждую лунку. Через 20 мин регистрировали оптическую плотность (A) каждой лунки при длине волны 490 нм. Коэффициент выживаемости клеток рассчитывали по следующей формуле: Клеточная выживаемость (%) = A опыт / A контроль × 100.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы «Statistica 6.0» (StatSoft). Распределение результатов проверяли по критерию Колмогорова–Смирнова, так как распределение показателей не отличались от нормального (значимость различий оценивали по Стьюденту). Для описания полученных количественных признаков данные представляли в

виде средней (M) и ошибки средней (m). Различия между выборками считали достоверными при $p < 0,05$. Хроматограммы обрабатывали с помощью программного обеспечения «Z-Lab», позволяющего проводить планиметрический анализ пиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании общего содержания фенолов и флавоноидов определили содержание полифенолов и флавоноидов в ЭЭС методом Folin–Ciocalteu [7] (табл. 1). Из полученных результатов следует, что общее содержание полифенолов в ЭЭС составляет 37,17 мкг/мг экстракта в пересчете на галловую кислоту, а содержание в корнях солодки – 42,75 мкг/мг в пересчете на галловую кислоту [5]. Возможно, различие, вызвано разными методами экстракции и, конечно, разными анатомическими частями растений.

Таблица 1. Характеристика пиков высокоэффективной жидкостной хроматографии этанольного экстракта бобов *Glycyrrhiza glabra* L.

№ пика	Время выхода, мин	Название вещества	Содержание, мг/100 г сухой массы
1	0,375	Неидентифицирован	2,62±0,25
2	0,85	Глабрин	5,28±0,16
3	1,25	катехин	6,4±0,18
4	1,9	рутин	7,14±0,12
5	3,8	Ликохалкон А	7,4±0,28
6	5,6	Элаговая кислота	8,33±0,31

Общее содержание полифенолов в ЭЭС в пересчете на галловую кислоту составляет в среднем 37,17±4,13 мкг

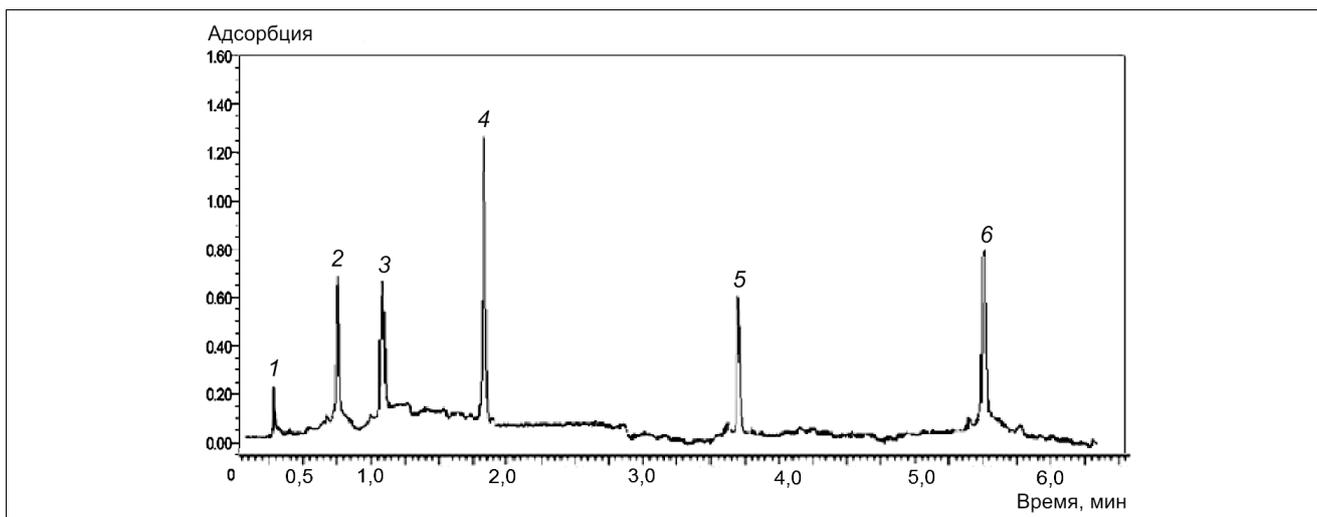


Рисунок. Хроматограмма экстракта ЭЭС при 330 нм: 1 – неидентифицирован; 2 – глабрин; 3 – катехин; 4 – рутин; 5– ликохалкон А; 6 – элаговая кислота

Как следует из рисунка и табл. 1, шесть соединений были обнаружены с помощью анализа ВЭЖХ. Пики 2, 3, 4, 5, 6 были идентифицированы как глабрин, катехин, рутин, ликохалкон А и элаговая кислота соответственно при сравнении с аутентичными стандартами. Идентичность пика 1 установить не удалось. Содержание каждого иден-

тифицированного соединения определяли с помощью анализа ВЭЖХ (табл. 1).

МТТ тест проводили на клетках LNCaP для оценки антипролиферативного эффекта ЭЭБС. Все тестируемые клетки обрабатывались различными концентрациями (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 мкг/мл) в течение 24 и 48 ч (табл. 2).

Таблица 2. Ингибирующий эффект ЭЭБС на пролиферацию клеток LNCaP

Число наблюдений	Концентрация, мкг/мл	Процент угнетения по сравнению с контролем	
		Экспозиция 24 ч; p_{24}	Экспозиция 48 ч; p_{48}
13	20	89,1 ± 12,2%; $p=0,4377$	76,7 ± 11,8%; $p=0,1431$
13	40	76,2 ± 9,7%; $p=0,0916$	62,5 ± 8,9%; $p=0,0245$
13	60	64,2 ± 10,3%; $p=0,0402$	30,2 ± 3,8%; $p=0,0008$
13	80	49,4 ± 8,1%; $p=0,0083$	19,4 ± 8,6%; $p=0,0026$
13	100	44,9 ± 12,3%; $p=0,0207$	14,2 ± 8,1%; $p=0,0018$
13	120	42,0 ± 9,1%; $p=0,0078$	15,0 ± 9,8%; $p=0,0032$
13	140	41,2 ± 11,5%; $p=0,0145$	12,6 ± 9,3%; $p=0,0025$

Примечание: p_{24} – достоверность различий между воздействием ЭЭБС и контролем при 24-часовой экспозиции с ЭЭБС; p_{48} – достоверность различий между воздействием ЭЭБС и контролем при 48-часовой экспозиции с ЭЭБС.

Этанольный экстракт бобов солодки показал небольшую антипролиферативную активность против клеток LNCaP с подавлением 64,2 ± 10,3% при 60 мкг/мл по сравнению с контролем через 24 ч (при концентрациях 20 и 40 мкг/мл различия недостоверны). При росте дозы ЭЭБС не отмечается дозозависимого эффекта и антипролиферативная активность устанавливается примерно 40% от контроля. После периода инкубации в течение 48 ч ЭЭБС продемонстрировал дозозависимое ингибирование от 40 до 140 мкг/мл на клетках LNCaP. Обработка клеток 60,0 мкг/мл ЭЭБС в течение 24 ч уменьшала рост клеток на 40%, а обработка в течение 48 ч – на 70%. Максимальный эффект был получен при концентрации ЭЭБС 100 мкг/мл, который демонстрирует цитотоксический эффект ЭЭБС на клетки LNCaP более 85%.

Согласно результатам анализа, антипролиферативный эффект ЭЭБС может быть связан с полифенольными составляющими. Представленное исследование предполагает, что полифенолы из бобов солодки при детальном анализе могут послужить разработке противоопухолевых средств.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования о цитотоксических свойствах экстракта бобов солодки могут представлять практический интерес. В данном исследовании глабрин, катехин, рутин, ликохалкон А, элаговая кислота были определены как основные компоненты ЭЭБС. Этанольный экстракт бобов солодки продемонстрировал мощную антипролиферативную активность, которая может быть связана с полифенольными составляющими. Проведенный анализ показывает, что бобы солодки наравне с корнем солодки могут быть использованы в качестве мощного биологически активного источника природных противоопухолевых агентов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ferrazzano G.F., Amato I., Ingenito A., Zarrelli A., Pinto G., Pollio A. Plant polyphenols and their anti-carcinogenic properties: A review. *Molecules*. 2011; 16: 1486–1507.
2. Grenier D., Marcoux E., Azelmat J., A Ben Lagha P. Gauthier Biocompatible combinations of nisin and licorice polyphenols exert synergistic bactericidal effects against *Enterococcus faecalis* and inhibit NF- κ B activation in monocytes. *AMB Express*. 2020; 10(1): 120–129.

3. *Fraga C.G., Croft K.D., Kennedy D.O., Tomas-Barberan F.A.* The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* 2019; 10: 514–528.
4. *Daglia M.* Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012; 23: 174–181.
5. *Vlaisavljević S., Šibul F., Sinka I., Zupko I., Ocsovszki I., Jovanović-Santa S.* Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. *Ind. Crop. Prod.* 2018; 112: 217–224.
6. *Гаммерман А.Ф.* Лекарственные растения. М.: Высшая школа. 990. 453 с. (Gammerman A.F. *Lekarstvennye rastenija*. М.: Vysshaja shkola. 990. 453 s.).
7. *Fogarasi, Kun, Tanko, Stefanovits-Banyai, Hegyesne-Vecseri.* A comparative assessment of antioxidant properties, total phenolic content of einkorn, wheat, barley and their malts. *Food Chem.* 2015; 167(1): 1–6. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.084. Epub 2014 Jul 1.
8. *Zhang Y., Zhou X., Tao W., Li L., Wei C., Duan J.* Antioxidant and antiproliferative activities of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves. *Journal of Functional Foods.* 2016; 27: 645–654.

Поступила после доработки 4 октября 2021 г.

POLYPHENOLIC COMPOSITION AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF SMALL MALT BEAN EXTRACT (*Glycyrrhiza glabra* L.)

© N.I. Gudinskaya, A.A. Nikolaev, 2021

N.I. Gudinskaya

Ph.D. (Med.), Associate Professor,
Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Astrakhan, Russia)

A.A. Nikolaev

Dr.Sc. (Med.), Professor,
Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Astrakhan, Russia)
E-mail: chimnik@mail.ru

Relevance. In recent years, there has been increased interest in finding and using natural, highly effective and inexpensive plant antioxidants to replace existing synthetic antioxidants. Dried licorice roots have long been widely used as a food flavoring and for various medicinal purposes. Licorice root preparations are known for their significant antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties. However, the antiproliferative activity of polyphenols from licorice beans has not been extensively studied.

The aim of this study was to study the composition of polyphenols in licorice beans and their antiproliferative activity.

Material and methods. We used 1000 g of dried mass of licorice beans. Chemicals and reagents used in the work were of analytical grade. We used an ethanol extract of licorice beans. The analysis of polyphenols in ethanol extract of licorice beans (EEBS) was carried out on the basis of the Folin - Ciocalteu method. The content of polyphenols was expressed in grams of gallic acid equivalent (EGA) per 100 g dry weight (g EGA / 100 g DM). Polyphenols were identified by HPLC (Gilson C18 column 4.6x250 mm, 5 μm). Cytotoxicity analysis was performed on LNCaP cell culture. After 48 h of exposure to EEBS, a standard MTT test was performed.

Results. The total content of polyphenols in the EEBS in recalculation of gallic acid was 37.17 μg. Glabrin, catechin, rutin, lycochalcon A, and ellagic acid have been identified. After an incubation period of 48 hours, the ethanolic licorice bean extract showed a dose-dependent inhibition of cell growth from 40 to 140 μg/ml. The maximum effect was obtained from 100 μg/ml, which demonstrates the cytotoxic effect of EEBS on LNCaP cells over 85%.

Conclusion. It has been shown that licorice beans, along with licorice root, can be used as a powerful biologically active source of natural antioxidants and anticancer agents.

Key words: *Glycyrrhiza glabra* L, beans, polyphenols, antiproliferative activity, antioxidant activity.

For citation: Gudinskaya N.I., Nikolaev A.A. Polyphenolic composition and antiproliferative activity of small malt bean extract (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2021;24(11):15–19. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-11-03>