

ДОСЛІДЖЕННЯ КАРОТИНОЇДІВ МОМОРДИКИ ХАРАНТІЇ

Бурлака І.С.¹, Король В.В.²,
Попик А.І.², Мірошниченко О.М.³

Харківський міжнародний медичний університет¹,
Національний фармацевтичний університет²,
Національний педагогічний університет
імені Г.С. Сковороди³

Актуальність

Третє десятиліття XXI століття вважається періодом зародження нової концепції фармацевтичної науки, що пов'язана з використанням інноваційних промислових продуктів і технологій [1]. Останнім часом все гостріше стоїть проблема забезпечення людини оптимальною кількістю вітамінів [2]. Добитися цього тільки за рахунок продуктів харчування дуже важко, а іноді і неможливо. Виникла нагальна необхідність створення продуктів, збагачених вітамінними добавками [3]. До однієї з найбільш перспективних груп дієтичних добавок відносяться каротиноїди [4]. Організм людини неспроможний до синтезу цих сполук. Тому актуальним залишається пошук нової, цінної сировини в Україні з метою розробки на її основі дієтичних добавок, функціональних продуктів харчування, активних фармацевтичних інгредієнтів для створення вітчизняних таргетних лікарських засобів – продуктів із прогнозованою фізіологічною дією, які будуть чинити оздоровчий вплив на організм людини та зможуть забезпечувати профілактику виникнення і лікування низки захворювань.

У сучасній світовій експериментальній та практичній медицині використовується тільки близько десятка каротиноїдів, хоча виділено з природних джерел та встановлена структура та активність для понад 700 представників цього класу сполук [5]. Каротиноїди є природними пігментами, які широко синтезуються представниками рослинного світу, тому ще один шлях їх застосування - у вигляді харчових барвників. Вони можуть знаходитися в рослинах як у вільному стані, так і у вигляді каротин-протеїново-ліпідних комплексів та ін. У зв'язку з тим, що представники цього класу сполук мають широкий спектр біологічної активності, а саме виявляють провітамінну, антиоксидантну, антиканцерогенну (одним з важливих аспектів впливу каротиноїдів на імунітет є їх інгібуючий вплив на розвиток пухлин: у експериментах *in vivo* доведено, що β-каротин зупиняє розвиток фібросаркоми за рахунок збільшення імунних реакцій; лютеїн гальмує розвиток пухлин молочної залози; лікопін і β-каротин *in vitro* пригнічують ріст клітин раку молочної залози) та інші види активності, каротиноїди мають перспективи для більш широкого застосування клініцистами у профілактичних та терапевтичних цілях [6, 7, 8].

Відповідно до рекомендацій щодо споживання, основними нутрієнтами з класу каротиноїдів є β-каротин, лікопін, лютеїн, зеаксантин та астаксантин.

Традиційними джерелами каротиноїдів та лікарських засобів (ЛЗ) на їх основі є обліпихи плоди свіжі, шипшини плоди, томати, моркви коренеплоди, гарбуза м'якоть плодів, календули квітки та ін., причому цей список постійно розширюється за рахунок нових видів. Зі світовим потеплінням пов'язано безліч змін у кліматі та погоді. І, крім цілого ряду негативних, є і безумовно позитивні. Теплі умови дають можливість вирощувати ті рослини, що раніше здавалися суто тропічними або субтропічними. Одним з таких нових видів рослинної сировини України, що накопичує каротиноїди, є момордики харантії плоди і насіння. Момордика харантія – *Momordica charantia L.* (індійський огірок, гіркий гарбуз, гірка диня) – однорічна витка ліана родини гарбузові (*Cucurbitaceae*), овочева та лікарська рослина з Південно-Східної Азії, яка добре проростає у Харківській, Полтавській та ін. областях України [9]. Ця рослина виявляє різноманітні біологічні, лікувальні та фармакологічні функції, а саме: антигельмінтну, протизапальну, протималярійну, проносну, гіпоглікемічну, антимуtagenну, противиракову, протиліполітичну, гепатопротекторну, протипухлинну, противірусну, протибактеріальну тощо. Аналіз літературних даних показав, що гірка диня містить різні групи біологічно активних сполук (БАС): тритерпеноїди, пептиди, ефірну та жирну олії, комплекс фенольних сполук, каротиноїди, алкалоїди та ін. [10]. Проте відомості щодо досліджень фітохімічного складу рослин, що культивують в Україні, дуже обмежені. Помаранчеве забарвлення момордики харантії дозрілого плода свідчить про те, що і в шкірці плода, і в оранжево-жовтій м'якоті, і в навколопліднику, і в насінні накопичується значна кількість каротиноїдів. Тому актуальним є дослідження груп БАС, а саме каротиноїдів момордики харантії.

Мета дослідження

Метою даного дослідження було вивчення якісного складу та визначення кількісного вмісту каротиноїдів у момордики харантії плодах та насінні.

Матеріали та методи

Об'єкти дослідження: момордики харантії свіжі зріло-зелені плоди і насіння, які заготівляли у Полтавській області в 2021 р. Висушену сировину подрібнювали за допомогою електричного подрібнювача. У результаті досліджень провели визначення і обґрунтування режиму сушіння сировини та вибору екстрагента.

У зв'язку з високою молекулярною масою та термолабільністю каротиноїдів варіанти газової хроматографії для їх аналізу не застосовуються. Для ідентифікації каротиноїдів момордики харантії плодів та насіння використовували метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) відповідно до монографії ДФУ, при цьому їх ідентифікація здійснювалася за величинами коефіцієнтів рухливості (Rf) [11, 12]. Одержання каротиноїдів із досліджуваної сировини для ТШХ аналізу проводилося наступним чином: щоб уникнути окиснення, запобігання фотоізомеризації, руйнування каротиноїдів, підготовка зразків

проводилася при охолодженні і в затінку. Близько 2,0 г подрібненої сировини поміщали в конічну колбу з притертою пробкою місткістю 100 мл, додавали 25 мл гексану та екстрагували при кімнатній температурі і періодичному струшуванні протягом 1 год. Отриману витяжку фільтрували, концентрували і використовували для виявлення каротиноїдів на пластинках «Sorbfil» висхідним способом. Умови хроматографування: хроматографічні пластинки «Sorbfil, ПТСХ-П-А» розміром 10x15 см. У ТШХ на процес хроматографування впливають істотним чином розчинник, сорбент і умови хроматографічного аналізу, причому найбільш сильним може виявитися вплив розчинника. Для розділення компонентів витяжки було випробовувано ряд систем органічних розчинників. Рухомі фази: 1 - гексан-бензен (29:1); 2 - ацетон-петролейний ефір (3:7); 3 - гексан – ацетон (8:2); 4 - хлороформ – етанол (19:1). Елюенти готували змішуванням компонентів у зазначених співвідношеннях безпосередньо перед використанням. У процесі приготування змішаних елюентів враховували точне дозування речовин, оскільки навіть невеликі зміни складу суміші можуть призвести до зміни величини Rf. Камери попередньо насичували сумішшю розчинників протягом 30 хв. Для запобігання неприпустимості знебарвлення хроматографічних зон хроматографічні камери затінювали чорним папером. На лінію старту пластинки мікрошприцем наносили по 20 мкл випробовуваних розчинів і близько 2 мкл 10% розчину β-каротину. Пластинки з нанесеними пробами поміщали в камери. Коли фронт розчинників проходив близько 13 см, пластинки виймали з камери, сушили на повітрі протягом 5 хв. і переглядали у видимому світлі. Хроматографування проводили у декількох повторностях. Ідентифікацію речовин проводили у видимому світлі за характерним жовтим і жовто-помаранчевим забарвленням зон абсорбції і величинами коефіцієнта рухливості (Rf). Ідентифікацію β-каротину, який набував яскраво жовто-оранжевого кольору, через наявність в структурі його молекули системи зв'язаних подвійних зв'язків, можливо проводити візуально без використання спеціальних реактивів для детектування. Каротиноїди, на відміну від хлорофілів, не здатні до флуоресценції, тому їх зони на хроматограмах набувають тільки більш темного коричневого забарвлення. Переваги цього методу (експресність, простота, доступність, можливість препаративного поділу і невелика кількість досліджуваної речовини) роблять його незамінним при дослідженні цього складного класу речовин [13, 14]. Висока чутливість реакції і утворення стійкого інтенсивного забарвлення продуктів взаємодії каротиноїдів із реагентом були основними критеріями вибору проявника: пари йоду, 10% розчин кислоти фосфорно-молібденової в етанолі, реактив Штала, без проявника.

Полієнова структура каротиноїдів обумовлює інтенсивне поглинання електромагнітного випромінювання в інтервалі від 400 до 500 нм. Їх ідентифікують, як правило, за положеннями максимумів світлопоглинання, які варіюють залежно

від довжини полієнового фрагмента, наявності у структурі циклічних кінцевих груп, природи використовуваного розчинника та ін. [15]. Для кількісного визначення каротиноїдів близько 1,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в конічну колбу місткістю 100 мл з притертою пробкою, заливали 25 мл гексану і екстрагували при періодичному помішуванні (при кімнатній температурі) протягом 15 хв. Потім гексановий екстракт перенесли в мірну колбу місткістю 100 мл, сировину заливали новими порціями гексану (25 мл) і повторювали екстракцію вказаним вище способом ще двічі. Гексанові екстракти об'єднували, доводили гексаном до позначки. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали на спектрофотометрі OPTIZEN POP (Корея) при довжині хвилі 450 (470) нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували гексан.

Вміст суми каротиноїдів (X, %) у перерахунку на β-каротин (для плодів) і на лікопін (для насіння) та абсолютну суху сировину обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot 100 \cdot 100}{A_{1cm}^{1\%} \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де: A_1 – оптична густина випробовуваного розчину;

m – наважка сировини, г;

W – втрата в масі при висушуванні, %;

$A_{1cm}^{1\%}$ – питомий показник поглинання β-каротину при довжині хвилі 450 нм, який дорівнює 2592.

$A_{1cm}^{1\%}$ – питомий показник поглинання лікопіну при довжині хвилі 470 нм, який дорівнює 3450.

Результати та обговорення

Зелені плоди гіркої дині для проведення експерименту сушили на повітрі при температурі (25-35°C), вони повністю дозрівали на 5 день. Плоди при сушінні ставали зморшкуватими. Шкірка плодів при цьому набувала блискучого жовто-червоного кольору, а забарвлення насіння змінювалося зі світло-кремового на червоне. Насіння відокремлювали від навколоплідника і видаляли сторонні домішки.

Оскільки при зберіганні сировини, що містить каротиноїди, в результаті процесів окиснення та ферментативного розщеплення, відбувається зміна їх структури і, як наслідок, активності, то вилучення каротиноїдів з рослинних об'єктів проводилося в найкоротші терміни. За відсутності можливості швидкої переробки і з метою зменшення деструктивних процесів допускається заморожування сировини. Каротиноїди є термолабільними сполуками, тому виключається можливість сушіння вихідної сировини при високих температурах. Відомо, що нагрівання каротиноїдовмісної сировини і вплив світла призводять до руйнування фармакофора молекули каротиноїду, зокрема, полієнового ланцюга, і як наслідок до зниження фармакологічної активності. Проте сушіння сировини дозволяє концентрувати будь-які БАС у вихідній сировині, зокрема і каротиноїди, що, своєю чергою, позитивно впливає на

ефективність процесу екстракції. Тому першочергово нами експериментально було проведено дослідження вибору умов сушіння сировини, в результаті чого науково обґрунтовано і запропоновано наступний режим сушіння вихідної сировини: температурний режим - до 40 °С, без доступу прямих сонячних променів, до показника втрата в масі при висушуванні сировини: не більше 15 %.

Важливим завданням, враховуючи фізико-хімічні особливості каротиноїдів, було проведення випробувань стосовно вибору екстрагента щодо нових видів сировини [15]. Попередні дослідження проводили, використовуючи різні розчинники (хлороформ, петролейний ефір, н-гексан), що дало підставу зробити висновок про найкраще застосування низькополярного універсального розчинника для всіх підкласів каротиноїдів – н-гексана.

Ідентифікація каротиноїдів проводилася методом ТШХ. Аналітичні сигнали проведених реакцій ідентифікації свідчили про наявність каротиноїдів у плодах та насінні момордики харантії [16, 17]. Так як розділення пігментів краще було у рухомій фазі 3, то результати хроматографування у ній були взяті за основу. На рис. 1 наведено схему хроматограми ідентифікації каротиноїдів у досліджуваних видах сировини: 1 – референс зразок β -каротину; 2 – екстракт плодів момордики харантії; 3 – екстракт насіння момордики харантії, на рис. 2 наведено схему хроматограми ідентифікації каротиноїдів після обробки хромогеним реактивом - 10% розчином кислоти фосфорно-молібденової в етанолі.

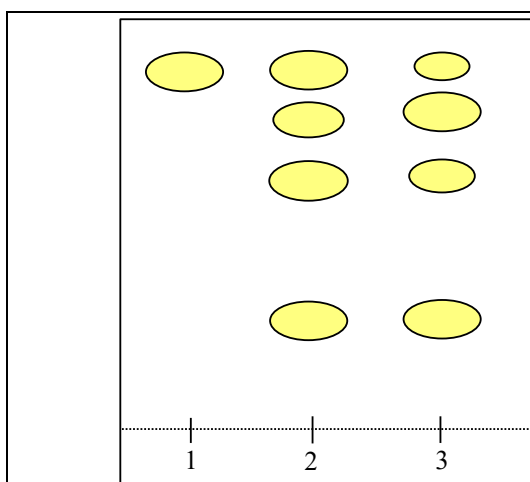


Рис. 1. Схема хроматограми ідентифікації каротиноїдів у плодах (2) та насінні (3) момордики харантії без проявника

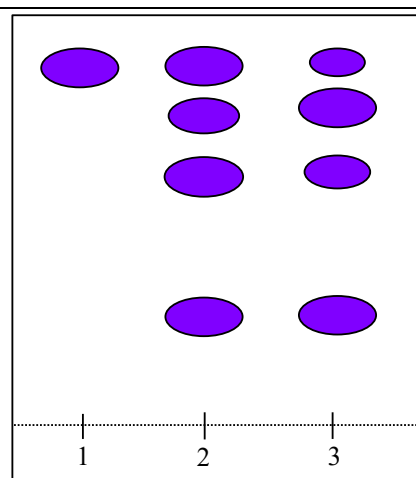


Рис. 2. Схема хроматограми ідентифікації каротиноїдів у плодах та насінні момордики харантії після обробки 10% розчином кислоти фосфорно-молібденової в етанолі.

Досліджувані зразки містили по 4 зони жовто-коричневого кольору на білому тлі, які було попередньо віднесено до класу каротиноїдів. Потім хроматограми обробляли 10% розчином кислоти фосфорно-молібденової в етанолі. Після прогрівання платівки при температурі 60-80 °С, каротиноїди виявлялися у вигляді зон синього кольору на жовто-зеленому тлі. Відносна швидкість переміщення однієї з них співпадала з величиною R_f β -каротину, а інших відповідала даним літератури і вони були ідентифіковані як лютеїн (0,373), β -криптоксантин (0,612), лікопін (0,802) та β -каротин (0,973). Було також виявлено, що лікопін є домінуючим каротиноїдом у насінні, а β -каротин у плодах.

Вміст каротиноїдів у момордики харантії плодах становив $10,21 \pm 0,01$ мг/%, у перерахунку на β -каротин, у насінні – $9,13 \pm 0,02$ %, у перерахунку на лікопін.

Висновки

Системний підхід до аналізу сполук групи каротиноїдів може бути основою аналітичного супроводу технології отримання субстанцій каротиноїдів і бути відправною точкою їх стандартизації. Експериментально запропоновано режим сушіння вихідної сировини: температурний режим - до 40 °С, без доступу прямих сонячних променів, до показника втрата в масі при висушуванні сировини: не більше 15 %.

Уперше проведено дослідження каротиноїдного комплексу момордики харантії плодів і насіння. Методом ТШХ було встановлено наявність в них лютеїну, β -криптоксантину, лікопіну та β -каротину. Було також виявлено, що лікопін є домінуючим каротиноїдом у насінні, а β -каротин у плодах. Вміст каротиноїдів у момордики харантії плодах становив $10,21 \pm 0,01$ мг/%, у перерахунку на β -каротин, у насінні – $9,13 \pm 0,02$ %, у перерахунку на лікопін, що свідчить про можливість їх застосування

для виготовлення лікарських засобів і функціональних продуктів харчування.

Отримані результати свідчать про перспективність подальших досліджень цих нових для України видів сировини.

Study of carotinoids of momordica harantia Iryna Burlaka, Victoria Korol, Andrii Popyk , Olha Miroshnichenko

Introduction. Carotenoids are one of the most promising groups of dietary supplements. The human body is incapable of synthesizing these compounds. Therefore, the search for new, valuable raw materials in Ukraine with the aim of developing dietary supplements, functional food products, and active pharmaceutical ingredients on its basis remains relevant. It can be used to create domestic targeted medicines or products with a predictable physiological effect. These products will have a health-improving effect on the human body and will be able to provide prevention and treatment of a number of diseases. Traditional sources of carotenoids and medicines based on them are sea buckthorn fresh fruits, rose hips fruits, tomatoes, carrots root crops, pumpkin fruit pulp, calendula flowers, etc. This list is constantly expanding due to new species. *Momordica charantia* L. (Indian cucumber, bitter gourd, bitter melon) is an annual vine of the pumpkin family (Cucurbitaceae). It is a vegetable and medicinal plant from Southeast Asia that grows well in Kharkiv, Poltava, etc. regions of Ukraine. This plant exhibits various biological, medicinal and pharmacological functions, namely: anthelmintic, antifertility, antimalarial, laxative, hypoglycemic, antimutagenic, antiulcer, antilipolytic, hepatoprotective, antitumor, antiviral, antibacterial, etc. Analysis of literature data showed that bitter melon contains various groups of biologically active compounds (BACs): triterpenoids, peptides, essential and fatty oils, a complex of phenolic compounds, carotenoids, alkaloids, etc. However, information about research into the phytochemical composition of plants cultivated in Ukraine is very limited. That is why the study of ALS groups, namely the carotenoids of *Charantia momordica*, is relevant. **The aim of this research** was to study the qualitative composition and determine the quantitative content of carotenoids in the fruits and seeds of *Momordica Harantia*. **Material & methods.** The objects of the study is the fresh, mature green fruits and seeds of the *Momordica charantia* L. They were harvested in the Poltava region in 2021. The dried raw materials were crushed using an electric grinder. The method of thin-layer chromatography (TLC) was used in accordance with the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) monograph to identify the carotenoids of *Momordica charantia* L. fruits and seeds. While their identification was carried out by the values of the mobility coefficients (Rf). Sample preparation for obtaining carotenoids from the studied raw materials for TLC analysis was carried out under cooling and in the shade to avoid oxidation, prevention of photoisomerization, destruction of carotenoids. About 2.0 g of the crushed raw material was placed in a 100 ml conical flask with a ground stopper, 25 ml of hexane was

added and extracted at room temperature with periodic shaking for 1 hour. The resulting extract was filtered, concentrated and used to detect carotenoids on Sorbfil plates in an ascending manner. Chromatography conditions: chromatographic plates "Sorbfil, PTSH-P-A". size 10x15 cm. **Results & discussion.** Carotenoids were identified by TLC method. Analytical signals of the identification reactions indicated the presence of carotenoids in the fruits and seeds of *Momordica charantia* L.. Since the separation of pigments was better in mobile phase 3, the results of chromatography in it were taken as a basis. The studied samples contained 4 zones of yellow-brown color on a white background, which were assigned to the class of carotenoids. Then the chromatograms were treated with a 10% solution of phosphoric-molybdic acid in ethanol. After heating the plate at a temperature of 60-80 °C, carotenoids appeared in the form of blue spots on a yellow-green background. The relative speed of movement of one of them coincided with the Rf value of β -carotene, and the others corresponded to the data of the literature and they were identified as lutein (0.373), β -cryptoxanthin (0.612), lycopene (0.802) and β -carotene (0.973). Lycopene was also found to be the dominant carotenoid in the seeds and β -carotene in the fruits. The carotenoids content of the *Momordica charantia* L. fruits was 10.21 ± 0.01 mg/%, calculated on β -carotene, in *Momordica charantia* L. seeds - 9.13 ± 0.02 %, calculated on lycopene.

Conclusions. It is the first time, a study of the carotenoid complex of the *Momordica charantia* L. fruits and seeds was carried out. The presence of lutein, β -cryptoxanthin, lycopene and β -carotene was determined by the TLC method. Lycopene was also found to be the dominant carotenoid in the seeds and β -carotene in the fruits. The content of carotenoids in the *Momordica charantia* L. fruits was 10.21 ± 0.01 mg/%, in terms of β -carotene, in seeds - 9.13 ± 0.02 %, in terms of lycopene. These data indicate the possibility of using the studied raw materials for the manufacture of medicinal products and functional food products.

Keywords: *Momordica charantia* L. seeds, *Momordica charantia* L. fruits, carotenoids, thin-layer chromatography (TLC).

Referenses

1. Arden NS, Fisher AC, Tyner K , Lawrence XYu, Lee SL, Kopcha M. Industry 4.0 for pharmaceutical manufacturing: Preparing for the smart factories of the future. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021. Volume 602. P. 1-8. DOI:10.1016/j.ijpharm.2021.120554
2. Fletcher RH, Fairfield KM. Vitamins for chronic disease prevention in adults: clinical applications. *JAMA*. 2002. Vol 287(23):3127-9. DOI:10.1001/jama.287.23.3127
3. Datta M, Vitolins MZ. Food Fortification and Supplement Use - Are there Health Implications? *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. 2016. Oct 2. 56(13). P. 2149–2159. DOI:10.1080/10408398.2013.818527
4. Khachik F. Distribution and metabolism of dietary carotenoids in humans as a criterion for development of nutritional supplements. *Pure and Applied Chemistry*.

2006. Vol. 78. No. 8. P. 1551–1557.
DOI:10.1351/pac200678081551.
5. González-Peña MA, Ortega-Regules AE, Anaya de Parrodi C, Lozada-Ramírez JS. Chemistry, Occurrence, Properties, Applications, and Encapsulation of Carotenoids—A Review. *Plants*. 2023. Vol 12(2). P. 313. DOI: 10.3390/plants12020313
 6. Samadov BS, Jalilova FS, Jalilov FS, Murodova NA. Pharmacological properties and chemical composition of medicinal plant raw materials “*Momordica charantia* L”. *New Day in Medicine*. 2020. Vol. 1(29). P. 379-381.
 7. Bortolotti M, Mercatelli D, Polito L. *Momordica charantia*, a nutraceutical approach for inflammatory related diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2019. Vol. 10. P. 486. DOI:10.3389/fphar.2019.00486
 8. Sur S, Ray RB. Bitter melon (*Momordica charantia*), a nutraceutical approach for cancer prevention and therapy. *Cancers*. 2020. Vol. 12 (8). C. 1-22. DOI:10.3390/cancers12082064
 9. Kholova ShS, Ergasheva GN. Morphological characteristics of *Momordica charantia* L. in conditions of Dushanbe (Tajikistan). *Bulletin of the Tajik national university. Series of natural sciences*. 2016. Vol. 1-2 (196). P. 261-265.
 10. Javed A, Saima A, Showkat R. *Momordica charantia* Linn. (*Cucurbitaceae*): Review on phytochemistry and pharmacology. *Research Journal of Phytochemistry*. 2017. Vol. 11. P. 53-65. DOI:10.3923/rjphyto.2017.53.65
 11. State Pharmacopoeia of Ukraine. SE "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products". 2nd edition. Kharkiv. State "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products". 2015. Vol. 1. 1128 p.
 12. State Pharmacopoeia of Ukraine. SE "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products". 2nd edition. Kharkiv. State "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products". 2014. Vol. 3. 732 p.
 13. Grynenko UV, Zhuravel IO. Determination of the chlorophylls and carotenoids content in spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). *Collection of scientific works of staff member of P. L. Shupyk NMAPE*. 2018. Vol. 28. P. 29-33.
 14. Vrubel OR, Zin AR, Antonyuk VO. Investigation of lipophilic substances of the leaves and flowers of spindle tree (*Euonymus europaea* L.). *Farmatsevtychnyi zhurnal*. 2019. Vol. 2. P. 73-79. DOI: 10.32352/0367-3057.2.19.08
 15. Dere Ş, Güneş T, Sivaci R. Spectrophotometric determination of chlorophyll – A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*. 1998. Vol. 22. P. 13-17.
 16. Daniel P, Supe U, Roymon MG. A review on phytochemical analysis of *Momordica charantia*. *International journal of advances in pharmacy, biology and chemistry*. 2014. Vol. 3(1). P. 214-220.
 17. Doli R Das, Anupam Kr Sachan, Mohd. Imtiyaz, Mohd Shuaib. Comparative review on different varieties of *Momordica* species. *International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research*. 2016. Vol. 4. P. 150-157.