

УДК 615.322: 543.2

ІДЕНТИФІКАЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН В ЕКСТРАКТАХ ПЛОДІВ *CITRULLUS COLOCYNTHIS*

Смаглюк А. А., Кобернік А. О.

Одеський національний університет імені І.І.Мечникова
kobernikalena11@gmail.com

В результаті проведених досліджень визначено кількісний вміст ряду біологічно активних речовин в екстрактах плодів *Citrullus colocynthis*.

Ключові слова: фітохімічний аналіз, біологічно активні речовини, флавоноїди

Вступ

В розвинутих країнах світу зростає впровадження ліків рослинного походження в клінічну практику, як один із шляхів вдосконалення лікувального процесу, що обіцяє значні успіхи в збереженні здоров'я населення. Лікарські рослини є основним джерелом отримання величезної кількості біологічно активних сполук, частина з яких може бути використана при лікуванні процесу запалення. На сьогодні лише невелика частина цих сполук встановлена і вивчена [1].

Колонцит — *Citrullus colocynthis*, лікарська рослина з родини Гарбузові (*Cucurbitaceae*), — багаторічна трав'яниста рослина, поширена в африканських та арабських країнах, а також Індії і країнах Середземномор'я. Рослинну сировину *Citrullus colocynthis* застосовують як протидіабетичний, послаблювальний, інсектицидний засіб, як антидот у разі укусів змій, у терапії едеми, бактеріальної інфекції, раку. У народній медицині *Citrullus colocynthis* відомий також як протиревматичний та антигельмінтний засіб. Листя колоцинту ефективні при мігрені та невралгії, а корені — при жовтяниці, фурункулах та пустулах. Екстракти колоцинту виявляють антибактеріальну, фунгіцидну, протизапальну та антиоксидантну активність [2, 3].

Широкий спектр фармакологічної активності *Citrullus colocynthis* обумовлений хімічним складом рослинної сировини.

Наприклад, насіння *Citrullus*

colocynthis багате на жирні кислоти, поліфенольні сполуки, каротиноїди, амінокислоти, вітаміни, мінерали [4].

В плодах і наземних частинах *Citrullus colocynthis* були знайдені флавоно-глюкозиди, сапоніни, білки та редуруючі сахара, в спиртовому екстракті ідентифіковано алкалоїди, флавоноїди, глікозиди. Одними з головних хімічних сполук, що обумовлюють різносторонню фармакологічну активність є група кукурбітацинів [5].

Таким чином, *Citrullus colocynthis* є потенційною рослинною сировиною для виділення як окремих класів біологічно-активних сполук, так і сумарних екстрактів, які проявляють різні фармакологічні властивості та можуть використовуватись для розширення арсеналу фітопрепаратів сучасної медицини.

Метою роботи було вивчення кількісного вмісту деяких груп БАР в екстрактах плодів *Citrullus colocynthis*.

Матеріали та методи дослідження

Для аналізу використовували сухі плоди *Citrullus colocynthis*, сировина була вирощена в Ірані.

Виділення вільних органічних кислот та аскорбінової кислоти із досліджуваної сировини проводили шляхом водної екстракції за різних температурних умов (холодна та гаряча). Для визначення оптимального часу екстракції вільних органічних кислот, нами було відібрано аліквоти для проведення аналізу після 0,5; 1; 1,5; 2 і 3-годинної екстракції. Кількісний вміст вільних органічних кислот визначали тит-

риметричним методом. Відбирали 10 мл витяжки, поміщали в колбу місткістю 200 мл, додавали 100 мл свіжокип'яченої води, 6 крапель 1 % спиртового розчину фенолфталеїну, 12 крапель 0,1 % спиртового розчину метиленового синього і титрували розчином NaOH (0,01 моль/л) до переходу від зеленувато-голубого до лілового забарвлення. Паралельно проводили контрольний дослід. Вміст суми вільних органічних кислот в перерахунку на яблучну кислоту в абсолютно сухій сировині в відсотках (X) розраховували за формулою:

$$X = \frac{(V_0 - V_k) \cdot K \cdot 0,00067 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{10 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

де 0,00067 — кількість яблучної кислоти, що відповідає 1 мл розчину NaOH (0,01 моль/л), в грамах; V_0 — об'єм розчину NaOH (0,01 моль/л), який було використано для титрування дослідних проб, в мл; V_k — об'єм розчину NaOH (0,01 моль/л), який було використано для титрування контрольних проб, в мл; a — маса сировини в грамах; W — втрата в масі при висушуванні сировини в відсотках [6].

Вміст аскорбінової кислоти визначали методом комплексометричного титрування. Відбирали 5 мл витяжки, поміщали в колбу для титрування місткістю 100 мл, додавали 5 мл 2 % розчину соляної кислоти, 50 мл води очищеної і титрували свіжоприготовленим 0,001М розчином 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію до появи слабко-рожевого забарвлення, стійкого протягом 60 секунд. Вміст аскорбінової кислоти в абсолютно сухій речовині в відсотках розраховували за формулою:

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 0,000088 \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot a \cdot (100 - W)}$$

де 0,000088 — кількість аскорбінової кислоти, що відповідає 1 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію (0,001моль/л), в грамах; V — об'єм розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію (0,001 моль/л), який було використано для титрування, в мл; a — аліквота зразка екстракту; m — наважка сировини (г), що була взята для екстрагування; W — втрата

в масі при висушуванні сировини в відсотках [6].

Визначення вмісту гідроксикоричних кислот та каротиноїдів в спиртовому екстракті пульпи плодів *C. colocynthis* здійснювали спектрофотометрично. Екстракцію проводили зі зворотним холодильником 70 % етиловим спиртом. Близько 0,5г (точна наважка) сировини, подрібненої до розміру частинок, що проходять крізь сито з отворами діаметром 1 мм, поміщали в плоскодонну колбу зі шліфом місткістю 100 мл і екстрагували 50 мл 70 % етилового спирту протягом 30 хв. Після охолодження витяжку декантували і фільтрували через паперовий фільтр в мірну колбу місткістю 100мл. Залишок в колбі заливали 50 мл 70 % етилового спирту і екстрагували ще раз протягом 30 хв. Витяжки зливали разом та в мірній колбі доводили 70 % етиловим спиртом до мітки (розчин А). 2 мл розчину А переносили в мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм 95 % етиловим спиртом до мітки (розчин Б). Оптичну густину отриманого розчину вимірювали на спектрофотометрі КФК-3 при довжині хвилі 328 і 442 нм. Розчином порівняння слугував 95 % спирт. Вміст гідроксикоричних кислот (в перерахунку на хлорогенову кислоту), каротиноїдів (в перерахунку на віолоксантин) в відсотках в перерахунку на абсолютно суху сировину обчислювали за формулами (1) і (2), відповідно [7].

$$X = \frac{A \cdot W_1 \cdot W_2 \cdot 100\% \cdot 100\%}{m \cdot E_{1cm}^{1\%} \cdot 100 \cdot V_a \cdot (100\% - B\%)} = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 507 \cdot 100 \cdot 2 \cdot (100 - B)} \quad (1)$$

$$X = \frac{A \cdot W_1 \cdot W_2 \cdot 100\% \cdot 100\%}{m \cdot E_{1cm}^{1\%} \cdot 100 \cdot V_a \cdot (100\% - B\%)} = \frac{A \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 2500 \cdot 100 \cdot 2 \cdot (100 - B)} \quad (2)$$

де A — оптична густина розчину B в відповідному максимумі поглинання;

m — маса сировини, г;

V — втрата в масі при висушуванні сировини, %;

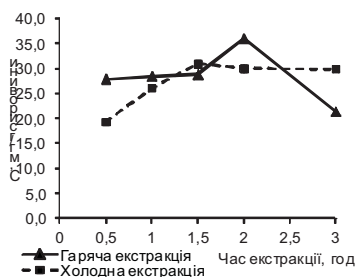
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ — питомий показник поглинання, відповідно 507 для хлорогенової кислоти при 328 нм і 2500 для віолоксантину при 442 нм;

W_1 і W_2 — об'єми мірних колб, використаних для розведення, мл;

V_a — об'єм аліквоти, взятої для аналізу, мл.

Для визначення сумарного вмісту флавоноїдів 1г подрібненої сировини поміщали в колбу зі шліфом місткістю 150 мл, додавали 30 мл 70 % спирту. Колбу приєднували до зворотного холодильника і нагрівали на киплячій бані протягом 30 хвилин. Після охолодження екстракт фільтрували крізь вату в мірну колбу на 100 мл, об'єм доводили до мітки 70 % спиртом і перемішували. Фотометричний метод визначення без попереднього відокремлення компонентів заснований на адитивності значень оптичної густини від всіх компонентів суміші при одній довжині хвилі. Використання такого методу дозволяє визначити суму флавоноїдів в присутності інших поліфенольних сполук, що не утворюють комплексу з хлоридом алюмінію в середовищі 30-96 % спирту. Як стандарт використовували рутин, максимум поглинання комплексу якого найбільш відповідає максимуму поглинання комплексу з хлоридом алюмінію досліджуваного зразка

(максимум поглинання був зафіксований в області — 414 нм) [8]. Розрахунки здійснювали за калібрувальною кривою, побудованою за рутинном.



а

Вміст флавоноїдів визначали після 7-денної холодної та 30-хвилинної гарячої екстракції 70 % етиловим спиртом.

Обговорення результатів

На вихід цільового продукту із сировини і його якість впливають різні фактори, а оптимізація процесу екстракції та збільшення виходу цільового продукту забезпечується підбором оптимальних умов екстракційного процесу.

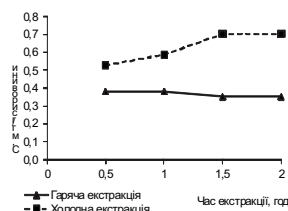
Температура є важливим фактором впливу на вихід кінцевого продукту при екстракції. Тому, для порівняння нами було проведено дві паралелі дослідів, які відрізнялись між собою температурними умовами: «холодна» екстракція та «гаряча».

На рис. 1 (а та б) наведено результати динаміки виходу вільних органічних кислот та аскорбінової кислоти в часі з сировини в систему розчинника.

Встановлено, що оптимальною для виділення вільних органічних кислот є «гаряча» екстракція протягом 2 годин, вихід склав — 36,0 мг/г сировини. Для холодної екстракції максимум вмісту вільних кислот — 31,0 мг/г спостерігається в екстракті, експозиція якого тривала 1,5 години (рис. 1.а).

Експериментально було доведено, що оптимальною для виділення аскорбінової кислоти з сировини є холодна екстракція протягом 1,5-годинної експозиції, вихід склав 0,704 мг/г сухої сировини.

При гарячій екстракції через 0,5 год



б

Рис. 1. Вміст вільних органічних кислот (а) та аскорбінової кислоти (б), мг/г сухої сировини пульпи плодів *C. colocynthis*.

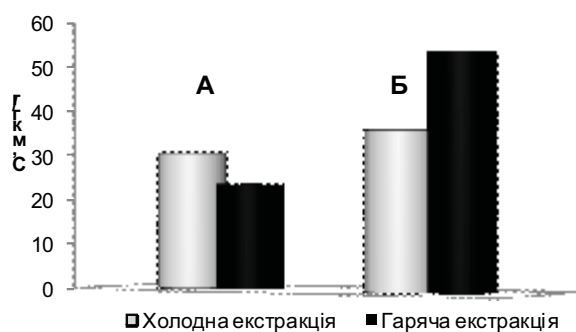


Рис. 2. Вміст флавоноїдів в пульпі сухих плодів (А) та насінні (Б), мкг/г *C. colocynthis*.

концентрація аскорбінової кислоти склала 0,381 мг/г сировини, після чого відбувалося її зменшення, що можливо пояснити частковою деструкцією аскорбінової кислоти під впливом температури.

Також було визначено вміст гідроксикоричних кислот та каротиноїдів в пульпі плодів. Виявлено, що їх вміст складає 26 мкг та 3 мкг/г в перерахунку на 1 г сухої сировини. З літературних джерел відомо, що вміст в-каротину в плодах *Citrullus colocynthis* складає 0,18 мкг/г [9].

Вміст флавоноїдів в насінні *C. colocynthis* за умови «холодної» 7-денної екстракції складає 35,7 мкг/г сухої сировини, а за умови 30-хвилинної «гарячої» екстракції підвищується в 1,5 рази, складаючи 52,9 мкг/г сухої сировини (рис. 2). Натомість, при екстракції флавоноїдів з сухих плодів, було одержано протилежні результати впливу температурних умов екстракції на ступінь їх виділення. Показано, що концентрація флавоноїдів в сухих плодах вища при «холодній» 7-денній екстракції, ніж при «гарячій», і їх концентрація складає — 30,7 та 23,6 мкг/г в перерахунку на 1 г сухої сировини, відповідно.

Таким чином, оптимальними температурними умовами для максимального виділення флавоноїдів з насіння є «гаряча» екстракція, а з сухих плодів — «холодна», що можливо пояснити різною природою окремих сполук флавоноїдів в складі відповідної сировини, а також різними показниками їх термостабіль-

ності.

Високі показники вмісту флавоноїдів та органічних кислот в досліджуваній сировині *Citrullus colocynthis* звідчать про доцільність її подальшого більш детального вивчення як перспективного об'єкта для виділення БАР.

Висновки

Показано, що час екстракції, температурні умови та метод екстракції сировини значним чином впливають на вихід кінцевого продукту.

Ідентифіковано та встановлено концентрацію ряду БАР, які обумовлюють широкий спектр фармакологічної активності.

Базуючись на отриманих результатах хімічного аналізу, доведено доцільність проведення подальших досліджень для вивчення фармакологічної дії екстрактів *C. Colocynthis*.

Література

1. Лупинская С.М. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сывороточных экстрактов на их основе / С.М. Лупинская, С.В. Орехова, О.Г. Васильева // Химия растительного сырья. — 2010. — № 3. — С. 143 — 145.
2. Gurudeeban S., Rajamanickam E., Ramanathan T. et al. Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* ulfofmannar // Int. J. Curr. Res. — 2010. — V. 2. — P. 78–81.
3. Najafi S. Phytochemical screening and antibacterial of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schard against *Staphylococcus aureus* / Shahla Najafi, Nima Sanadgol, Batool Sadeghi Nejad et al // Journal of Medicinal Plants Research. — 2010. — № 4 (22).- P. 2321-2325.
4. Pravin B. Review on *Citrullus colocynthis* / Borahade Pravin, Dechmukh Tushar, Patil Vijay et al // International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry. — 2013. — № 3 (1).- P. 46-53.
5. Yuan G. Natural products and anti-inflammatory activity/ Gaofeng Yuan, Mark L Wahlqvist, Guoqing He et al // Asia Pac J Clin Nutr. — 2006. — № 15 (2). — P. 143-152
6. Тринеева О.В. Определение органических кислот в листьях крапивы двудомной / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин, С.С. Ворopaева // Вестник ВГУ, серия: химия, био-

- логия, фармация. — 2013. — № 2. — С. 215 — 219
7. Тринеева О.В. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*URTICA DIOICA L.*) / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин, Е.Ф. Сафонова // Химия растительного сырья. — 2015. — №2. — С. 105 — 110
 8. Лобанова А.А. Исследование биологически активных флаваноидов в экстрактах из растительного сырья / А.А. Лобанова, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // Химия растительного сырья. — 2004. — №1. — С.47 — 52.
 9. Abdullah I. Hussain *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): Are view of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential / Hassaan A Rathore, Munawar Z.A Sattar, Shahzad AS. Chatha at all // Journal of Ethnopharmacology. —2014.- №155. — P. 54–66.
- References**
1. Lupinskaya S.M. The study of biologically active substances of Linden, nettle and oregano and whey extracts on their basis / S.M. Lupinskaya S.V. Orekhova. O.G. Vasilyeva // *Khimiya rastitel'nogo syria* – 2010, Vol. 3, pp. 143–145. (in Russian).
 2. Gurudeeban S., Rajamanickam E., Ramanathan T. et al. Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* ulfofmannar // *Int. J. Curr. Res.* – 2010. – V. 2. – P. 78–81.
 3. Najafi S. Phytochemical screening and antibacterial of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schard against *Staphylococcus aureus* / Shahla Najafi, Nima Sanadgol, Batool Sadeghi Nejad at all // *Journal of Medicinal Plants Research.* – 2010. - № 4 (22).- P. 2321-2325.
 4. Pravin B. Review on *Citrullus colocynthis* / Borahade Pravin, Dechmukh Tushar, Patil Vijay at all // *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry.* – 2013. - № 3 (1).- P. 46-53.
 5. Yuan G. Natural products and anti-inflammatory activity/ Gaofeng Yuan, Mark L Wahlqvist, Guoqing He at all // *Asia Pac J ClinNutr.* – 2006. - № 15 (2). – P. 143-152.
 6. Trineeva O.V. Determination of organic acids is in the leaves of nettle of diclinous / O.V. Trineeva, A.I. Slivkin, S.S. Voropaeva // *Vestnik VGY, seriya: himiya, biologiya, farmaciya* – 2013. – V.2. – pp. 215 – 219. (in Russian)
 7. Trineeva O.V. Determination of hydroxycinnamic acids, carotenoids and chlorophyll in nettle leaves (*URTICA DIOICA L.*) / O.V. Trineeva, A.I. Slivkin, E.F. Safonova / *Himiya rastitel'nogo sirya* – 2015. – V.2. – pp. 105 – 110 (in Russian).
 8. Lobanova AA Study of biologically active flavonoids in extracts from plant material / AA Lobanova, V.V. Bydaeva, G.V. Sakovich // *Himiya rastitel'nogo sirya* – 2004. – V.1. – pp.47 – 52. (in Russian).
 9. Abdullah I. Hussain *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): Are view of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential / Hassaan A Rathore, Munawar Z.A Sattar, Shahzad AS. Chatha at all // *Journal of Ethnopharmacology.* –2014.- №155. – P. 54–66.
- Резюме**
- ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЭКСТРАКТАХ ПЛОДОВ *CITRULLUS COLOCYNTHIS***
- Смаглиук А.А., Коберник А.А.*
- В результате проведенных исследований было определено количественное содержание ряда биологически активных веществ в экстрактах плодов *Citrullus colocynthis*.
- Ключевые слова:** фитохимический анализ, биологически активные вещества, флаваноиды.
- Summary**
- IDENTIFICATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN EXTRACTS *CITRULLUS COLOCYNTHIS***
- Smagliuk A.A., Kobernik A.A.*
- As a result of the studies, the quantitative content of a number of biologically active substances was determined in extracts of *Citrullus colocynthis*.
- Key words:** phytochemical analysis, biologically active substances, flavonoids.
- Впервые поступила в редакцию 07.11.2017 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*