

УДК 615.2:615:3

Л. В. Еберле*, А. А. Цісак, Ю. І. Смокіна

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра фармакології та технології ліків,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна
*E-mail: lidaeberle@gmail.com

ОПТИМІЗАЦІЯ ЕКСТРАКЦІЇ ТА АНАЛІЗ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ПЛОДАХ *FICUS CARICA* L. МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Досліджено оптимальні умови та методи екстракції стиглих плодів *Ficus carica* L., які забезпечують максимальне вилучення фенольних сполук з рослинної сировини. Встановлено, що найбільший вихід цільового продукту відзначався при екстрагуванні продукту в апараті Сокслета 70% водно-етанольною сумішшю при співвідношенні розчинника до рослинного матеріалу як 1:8 та подрібненні до розміру 5 мм. Методом високоефективної рідинної хроматографії встановлено, що дослідний зразок екстракту з плодів *Ficus carica* L. містить фенольні сполуки в сумарній кількості 1420,28 мкг/мл, де на долю не ідентифікованих сполук приходилось 478,19 мкг/мл. Серед досліджуваних груп фенольних сполук були виявлені фенольні кислоти, флавоноли, флавонопохідні, флаваноїди, катехіни та в найбільшій кількості катехінопохідні сполуки, які становили 599,29 мкг/мл.

Ключові слова: фенольні сполуки, екстракція, оптимальні умови, методи екстракції, плоди *Ficus carica* L., високоефективна рідинна хроматографія.

Одним із важливих завдань сучасної фармакології і фармації є пошук та розробка безпечних та ефективних лікарських засобів. Незважаючи на сучасну тенденцію розвитку органічної хімії та появу на ринку України нових синтетичних речовин, актуальним залишається пошук та поглиблене вивчення рослинної сировини, яка б проявляла низьку токсичність та мала високі показники біологічної активності.

Перспективним представником, згідно літературних джерел, для подальшого дослідження є стиглі плоди *Ficus carica* L. родини *Moraceae*. Відомо, що плоди *Ficus carica* L. містять цілий комплекс біологічно активних речовин, а саме: фенольні сполуки, фітонутрієнти, вітаміни групи В, С, РР, глікозиди, сапоніни, дубильні речовини, пектин, каротин, вітамінів. Збагачені білками, жирами, глюкозою та фруктозою, кальцієм, калієм, залізом, магнієм, міддю, фосфором [1, 2, 3].

Сполуки фенольної природи, які синтезуються та накопичуються в плодах *Ficus carica* L., забезпечують їх антиоксидантною, протизапальною, жовчогінною та спазмолітичною дією [3, 4, 5].

Мета роботи – дослідження методом ВЕРХ якісного складу та кількісного вмісту біологічно активних сполук фенольної природи в стиглих плодах *Ficus carica* L.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження були стиглі плоди *Ficus carica L.* вирощені в Одеській області (Україна) в 2023 році.

Плоди *Ficus carica L.* екстрагували за різних умов та методів екстракції. В якості розчинника було обрано різні концентрації водно-етанольної суміші (30%, 50% та 70%) при співвідношенні розчинника до рослинної сировини 1:8 та подрібненні рослинного матеріалу до розмірів 5 мм.

Серії екстракцій проводили в апараті Сокслета та методом мацерації до повного вилучення цільового продукту. Основним критерієм оцінювання оптимальних умов та методу екстракції був кількісний вміст фенольних сполук, який визначали спектрофотометрично за методом Фоліна-Чокальтеу [6, 7, 8], розрахунки здійснювали за калібрувальним графіком, побудованим за галловою кислотою.

Ідентифікацію накопичених поліфенольних сполук здійснювали методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на системі Shimadzu (Японія) із модулем автоматичної подачі проб Auto sampler SIL-20A/20AC, модулем рухомої фази LC-20 AD, колонним модулем CTO-20A/20AC, дегазатором DGU-20A3/DGU-20A5 та діодним ультрафіолетовим детектором SPD-20A/SPD-20AV. Хроматографічне розділення виконували на зворотно-фазовій колонці Microsorb-MV C18 (150×4,6 мм, зерно сорбенту – 5 мкм). У роботі використовували реактиви, розчинники і чисті речовини фірм Fluka, Merck, Lab-Scan.

Як рухому фазу використовували систему компонентів «метанол-0,9%-й розчин ортофосфорної кислоти» за їх початкового співвідношення 1:9. Вибір цієї системи здійснювали згідно з методичними рекомендаціями, які дають змогу отримати бездоганні піки стандартних речовин, що відрізняються за часом виходу та є показовими для більш точного розрахунку сумарного вмісту окремих представників фенольних сполук. У ході відпрацювання умов хроматографування було розроблено оптимальний режим градієнтного елюювання. Схема зміни градієнта по метанолу:

- перші 13 хв: підвищення концентрації з 10 до 40%;
- з 13 по 20 хв: підвищення концентрації з 40 до 53%;
- з 20 по 26 хв: підвищення концентрації з 53 до 55%;
- з 26 по 40 хв: постійна концентрація 55%;
- з 40 по 41 хв: зниження концентрації до 10%;
- з 41 по 56 хв: постійна концентрація 10%.

Усі зміни концентрацій лінійні.

Швидкість подачі елюента – 0,5 мл/хв. Температура колонки +40 °С.

Об'єм проб для аналізу – 5 мкл.

Ідентифікацію речовин у досліджуваних екстрактах здійснювали шляхом порівняння часу утримання та спектральних характеристик досліджуваних речовин з аналогічними характеристиками стандартів відповідно зі способом ідентифікації поліфенолів. Для точної ідентифікації або визначення приналежності досліджуваних речовин до конкретних груп поліфенолів використовували такі стандарти: хлорогенова і кавова кислоти, катехін, флаванолі, кверцетин, рутин і міріцетин, флаванони нарингенин, нарингін і гесперидин, флавонолі лютеолін і апигенін, ізо-

флавонони, дайдзеїн, генистеїн і геністин, антоціанін ціанідин (Sigma-Aldrich, Німеччина).

Екстракти перед аналізом фільтрували з використанням фільтрів Supelco Iso-Disc Filters PTFE25-4 (25 mm×0,45µm).

Статистичну обробку даних робили з використанням програми STATISTICA 8. При порівняльному аналізі результатів досліджень використовували параметричний критерій Ст'юдента. Для всіх видів аналізу статистично достовірними вважали відмінності $p < 0,05$ (95%) [9].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Першим етапом дослідження було встановлення оптимальної концентрації розчинника та методу екстракції, які б забезпечували максимальне вилучення фенольних сполук. Дослідження вмісту фенолів визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 645 нм за методом Фоліна-Чокальтео в перерахунку на галову кислоту.

За результатами дослідження показано, що серед обраних розчинників найбільший вихід цільового продукту відзначався при екстрагуванні 70% водно-етанольною сумішшю в апараті Сокслета та становив $0,49 \pm 0,04\%$ на 1 г сухої сировини. Екстракція плодів *Ficus carica L.* в апараті Сокслета пришвидшувала вихід фенольних сполук в фазу розчинника у порівнянні з екстракцією методом мацерації. Повне вилучення фенолів з свіжих плодів в Сокслета відзначалось вже на 6 годину екстракції тоді, як мацерація впродовж 14 діб забезпечила вихід досліджуваних активних речовин в обсязі $0,31 \pm 0,02\%$ на 1 г сухої сировини, що на 36,7% менше, ніж в першому випадку екстракції.

Сумарний вміст фенольних сполук в екстракті з плодів *Ficus carica L.* за різних умов та методів екстрагування представлений в таблиці 1.

Таблиця 1.

Сумарний вміст фенольних сполук в екстракті з плодів *Ficus carica L.* за різних умов та методів екстрагування (% у 1 г сухої сировини)

Table 1.

The total content of phenolic compounds in the extract from the fruits of *Ficus carica L.* for different conditions and methods of extraction (% per 1 g of dry raw material)

Методи екстракції	Концентрація розчинника, %		
	30	50	70
Мацерація	$0,22 \pm 0,02^*$	$0,29 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,02^*$
Апарат Сокслета	$0,36 \pm 0,03^*$	$0,42 \pm 0,05$	$0,49 \pm 0,04^*$

Примітка: * – $p < 0,05$

Для подальшого дослідження фенольних груп методом високоефективної рідинної хроматографії та ідентифікації їх окремих представників було обрано екстракт *Ficus carica L.*, який пройшов екстракцію в апараті Сокслета та містив найбільшу кількість біологічно активних сполук фенольної природи.

За результатами ВЕРХ при довжині хвилі 225 нм встановлено, що екстракт *Ficus carica L.* містить такі групи фенольних сполук, як: фенольні кислоти (101,4 мкг/мл), катехіни (98,08 мкг/мл), катехіноподібні речовини (599,29 мкг/мл), флаваноли (1,07 мкг/мл), флавонолоподібні (43,10 мкг/мл), флаваноїди (99,15 мкг/мл) (рис. 1., табл. 2).

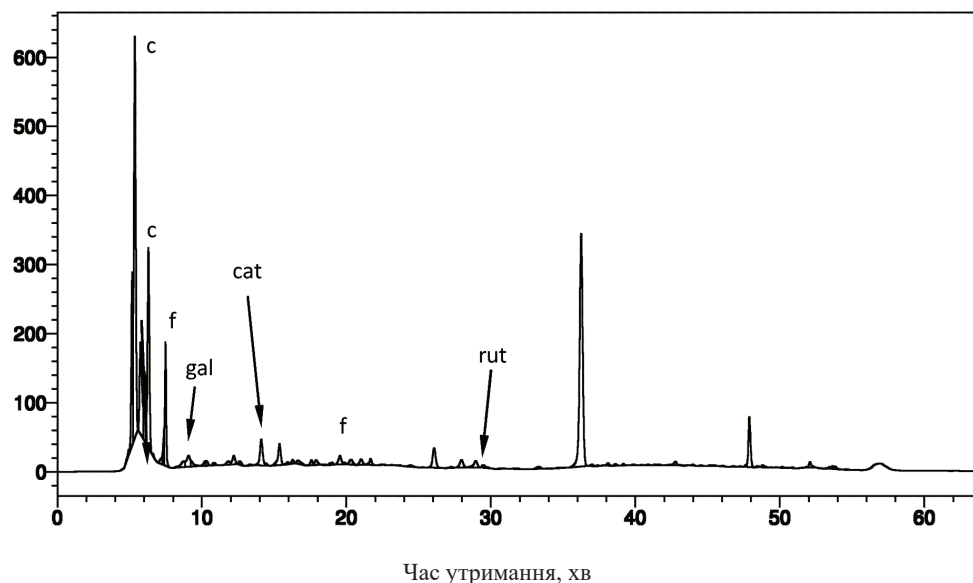


Рис. 1. Хроматограма екстракту *Ficus carica L.* за довжини хвилі 255 нм.
Примітка: f – фенольні кислоти, (+)cat – катехін, c – катехіноподібні,
gal – галова кислота, rut – рутин.

Fig. 1. Chromatogram of *Ficus carica L.* extract at a wavelength of 255 nm.
Note: f – phenolic acids, (+)cat – catechin, c – catechin-like, gal – gallic acid, rut – rutin.

Слід відмітити, що серед фенольних кислот було ідентифіковано галову кислоту в сумарній кількості 3,26 мкг/мл. Серед флавонолів було виявлено рутин в кількості 1 мкг/мл та в незначній кількості глікозид миріцитину 0,07 мкг/мл. Проте, такі речовини, як: хлорогенова кислота, кавова кислота, ферулова кислота, корична кислота, кверцетин, глікозиди лютеоліну, лютеолін, глікозиди апігеніну, апігенін в екстракті не було ідентифіковано (табл. 2).

Згідно результатів дослідження показано, що сумарний вміст фенольних сполук в екстракті *Ficus carica L.* за методом ВЕРХ становить 1420,28 мкг/мл. На долю не ідентифікованих сполук приходить 478,19 мкг/мл.

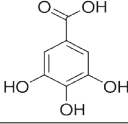
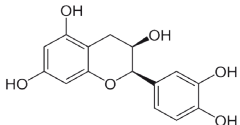
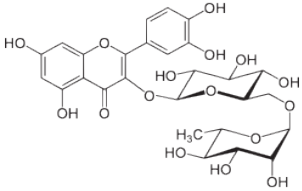
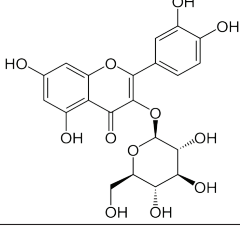
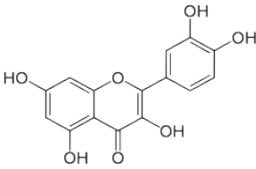
Таким чином, дослідний зразок свіжих плодів *Ficus carica L.* є перспективним джерелом біологічно активних сполук фенольної природи та може бути потенційною складовою нових фітопрепаратів комплексної дії.

Таблиця 2

Кількісний вміст поліфенольних сполук в екстракті *Ficus carica L.*

Table 2

Quantitative content of polyphenolic compounds in the extract of *Ficus carica L.*

Група фенолів	Вміст, мкг/мл	Окремі речовини	Вміст, мкг/мл	Структурна формула
Фенольні кислоти	101,4	Хлорогенова кислота	-	Не ідентифіковано
		Кавова кислота	-	Не ідентифіковано
		Галова кислота	3,26	
		Ферулова кислота	-	Не ідентифіковано
		Корична кислота	-	Не ідентифіковано
Катехіни	98,08	(+)катехін	66,10	
Катехіноподібні*	599,29	-	-	-
Флавоноли	1,07	Рутин	1,00	
		Кверцетин	-	Не ідентифіковано
		Глікозиди мирицитину	0,07	
Флавонолоподібні	43,10	-	-	-
Ізофлаволи	-	-	-	Не ідентифіковано
Флаволи	0	Глікозиди лютеоліну	-	Не ідентифіковано
		Лютеолін	-	Не ідентифіковано
		Глікозиди апігеніну	-	Не ідентифіковано
		Апігенін	-	Не ідентифіковано
Флавоноїди	99,15	-	-	
Неідентифіковані сполуки			478,19	
Сума фенольних сполук			1420,28	

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що максимальне вилучення фенольних сполук з плодів *Ficus carica* L. відзначалось при екстракції 70% водно-етанольною сумішшю у співвідношенні розчинника до рослинного матеріалу 1:8 та подрібненні розміром до 5 мм.

2. Показано, що серед методів екстракції найбільший вихід фенольних сполук з рослинної сировини до фази розчинника відзначався при екстрагуванні в апараті Сокслета (0,49% на 1 г сухої сировини) впродовж 6 годин.

3. Методом високоефективної рідинної хроматографії досліджено, що сумарний вміст фенольних сполук в екстракті *Ficus carica* L. становить 1420,28 мкг/мл.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mopuri R., Islam S. Antidiabetic and anti-obesity activity of *Ficus carica*: In vitro experimental studies // *Diabetes metabolism.*– 2016. – N42. – P. 300. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2016.07.020>
2. Mahmoudi S, Khali M., Benkhaled A., Benamirouche K., Baiti I. Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian *Ficus carica* L. varieties // *Asian Pacific J. Tropical Biomed.*– 2016. – Vol. 6, N3. – P. 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.010>
3. Pérez C., Canal J.R., Torres M.D. Experimental diabetes treated with *ficus carica* extract: effect on oxidative stress parameters // *Acta Diabetol.*– 2013. –N40. – P. 3–8. <https://doi.org/10.1007/s005920300001>
4. Purnamasari R., Winarni D., Permanasari A., Agustina E., Hayaza S. Anticancer Activity of Methanol Extract of *Ficus carica* Leaves and Fruits Against Proliferation, Apoptosis, and Necrosis in Huh7it Cells // *Sage J.*– 2019. – P. 38–49. <https://doi.org/10.1177/1176935119842576>
5. Wang T., Jiao J., Gai Q., Wang P. Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica* L.) leaves using deep eutectic solvents // *J. Pharm. Biomed. Anal.*– 2017. – Vol. 145. – P. 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.002>
6. Komaki A., Hoseini F., Shahidi S., Baharlouei N. Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats // *J. Traditional Complementary Med.*– 2016. – Vol. 6, N3. – P. 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.01.001>
7. Kravchenko I.A., Kobernik A.A., Eberle L.V. Optimization of extraction methods for total polyphenolic compounds obtained from rhizomes of *Zingiber officinale* // *Trends in Phytochem. Res.*– 2018. – N2 (1). – P. 37–42.
8. Magalhães L.M., Santos F., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity // *J. Talanta.*– 2010. – Vol. 83, N2. – P. 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042>
9. Еберле Л.В., Цісак А. О., Радаєва І. М., Казанцева А. С. Аналіз фенольних сполук у екстракті плодів чорного горіха (*Juglans nigra* L.) за допомогою високоефективної рідинної хроматографії // *Фармацевтичний журнал.*– 2023.– № 2. – С. 49–57. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.23.06>

Стаття надійшла до редакції 24.09.2023

L. V. Eberle, A. A Tsisak, Yu. I. Smokina

Odesa I. I. Mechnikov National University, 2 Dvorianska St, Odesa, 65082, Ukraine,
E-mail: lidaeberle@gmail.com

EXTRACTION OPTIMIZATION AND PHENOLIC COMPOUNDS ANALYSIS IN *FICUS CARICA L.* FRUITS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

One of the important tasks of modern pharmacology and pharmacy is the search and development of safe and effective medicines. On the pharmaceutical market of Ukraine, there is a trend of development of organic chemistry and the emergence of new synthetic medicines. However, the search and in-depth study of plant raw materials remains relevant, as medicinal products based on it show low toxicity and have high indicators of biological activity.

According to literature sources, ripe fruits of *Ficus carica L.* of the Moraceae family are a promising object for further research. It is known that the fruits of *Ficus carica L.* contain a whole complex of biologically active substances that provide them with antioxidant, anti-inflammatory, choleric and antispasmodic effects.

The aim of the work was to study the qualitative composition and quantitative content of biologically active compounds of phenolic nature in ripe fruits of *Ficus carica L.* by the method of high-performance liquid chromatography.

The fruits of *Ficus carica L.* were extracted under different conditions and methods of extraction. Various concentrations of the water-ethanol mixture (30%, 50% and 70%) were chosen as the solvent, with a ratio of solvent to plant material of 1:8 and grinding of the plant material to a size of 5 mm.

A series of extractions was carried out in a Soxhlet apparatus and by the maceration method until the target product was completely extracted. The main criterion for evaluating the optimal conditions and extraction method was the quantitative content of phenolic compounds, which was determined spectrophotometrically according to the Folin-Chocalteu method in terms of gallic acid.

It was established that the optimal conditions that ensure the maximum extraction of polyphenolic compounds from plant raw materials are the use of 70% alcohol as an extractant when using both extraction methods. It has also been proven that higher rates of target product yield are observed when extracted in a Soxhlet apparatus.

Using the method of high-performance liquid chromatography at a wavelength of 225 nm, it was established that the extract of *Ficus carica L.* contains such groups of phenolic compounds as: phenolic acids (101.4 µg/ml), catechins (98.08 µg/ml), catechin-like substances (599.29 µg/ml), flavanols (1.07 µg/ml), flavonol-like (43.10 µg/ml), flavonoids (99.15 µg/ml). The total content of polyphenolic compounds in the studied sample of the extract from the fruits of *Ficus carica L.* is 1420.28 µg/ml, where the share of unidentified compounds is 478.19 µg/ml.

Key words: phenolic compounds, extraction, optimal conditions, extraction methods, fruits of *Ficus carica L.*, high performance liquid chromatography.

REFERENCES

1. Mopuri R., Islam S. *Antidiabetic and anti-obesity activity of Ficus carica: In vitro experimental studies.* Diabetes metabolism, 2016, no 42, P. 300. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2016.07.020>
2. Mahmoudi S, Khali M., Benkhaled A., Benamirouche K., Baiti I. *Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian Ficus carica L. varieties.* Asian Pacific J. Tropical Biomed., 2016, vol. 6, no 3, pp. 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.010>

3. Pérez C., Canal J.R., Torres M.D. *Experimental diabetes treated with ficus carica extract: effect on oxidative stress parameters*. Acta Diabetol., 2013, no 40, pp. 3–8. <https://doi.org/10.1007/s005920300001>
4. Purnamasari R., Winarni D., Permanasari A., Agustina E., Hayaza S. *Anticancer Activity of Methanol Extract of Ficus carica Leaves and Fruits Against Proliferation, Apoptosis, and Necrosis in Huh7it Cells*. Sage J., 2019, pp. 38–49. <https://doi.org/10.1177/1176935119842576>
5. Wang T., Jiao J., Gai Q., Wang P. *Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (Ficus carica L.) leaves using deep eutectic solvents*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2017, vol. 145, pp. 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.002>
6. Komaki A., Hoseini F., Shahidi S., Baharlouei N. *Study of the effect of extract of Thymus vulgaris on anxiety in male rats*. J. Traditional Complementary Med., 2016, vol. 6, no 3, pp. 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.01.001>
7. Kravchenko I.A., Kobernik A.A., Eberle L.V. *Optimization of extraction methods for total polyphenolic compounds obtained from rhizomes of Zingiber officinale*. Trends in Phytochem. Res., 2018, no 2, pp. 37–42.
8. Magalhães L.M., Santos F., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. *Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity*. J. Talanta., 2010, vol. 83, no 2, pp. 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042>
9. Eberle L.V., Tsisak A.O., Radaeva I.M., Kazantseva A.S. *Analiz fenolnykh spoluk u ekstrakti plodiv chornoho horikha (Juglans nigra L.) za dopomohoiu vysokoeffektyvnoi ridynnoi khromatohrafiu*. Farmatsevtichnyi zhurnal, 2023, no 2. pp. 49–57. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.23.06> (in Ukrainian)