

METODE CROMATOGRAFICE DE DETECȚIE A RESVERATROLULUI

CHROMATOGRAPHIC METHODS OF RESVERATROL DETECTION

*Cristina-Ștefania Adochițe, Luminița Andronic, Liliana Rogoza,
Gheorghe Coman, Mihaela Badea*

Universitatea Transilvania din Brașov

Autor corespondent: Mihaela Badea, email mihaela.badea@unitbv.ro

Abstract:

Resveratrol is a powerful antioxidant found in grape beans, blueberries, rosehip and wine. Due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, it can also be consumed as a supplement. Purpose of the work was to determine the optimal chromatographic conditions for the chromatographic dosing of resveratrol using HPLC - UV / VIS detection. As an apparatus, an HPLC liquid chromatograph with Shimadzu LC-20ADsp equipped with C18 column - Macherey Nagel, Nucleosil 5 μ m it was used. For a real sample tested, resveratrol Helcor 25 mg supplemental tablet was used, and the chosen solvents were absolute ethyl alcohol and phosphate buffer system at pH 8.0. The performed calibration curves indicate a near-linearity coefficient which indicates a good linearization of the working methods. A higher sensitivity was observed in the case of experiments with absolute ethyl alcohol. In the case of tests performed on real samples, the degree of recovery of the bioactive compound was calculated by the interpolation method. For the experiments with ethyl alcohol solvent, a 84% resveratrol recovery rate was calculated, and in the case of phosphate buffer experiments it had a value of $116.21 \pm 0.19\%$ (using the calibration curve specific to the peak areas) and an overestimation of $161.76 \pm 0.19\%$ (using the calibration curve specific to the height of the peaks). The methods can be successfully used as references for other assays for determinations of resveratrol

Rezumat

Resveratrolul este un antioxidant puternic regăsit în boabele de struguri, afine, măceșe și vin. Având în vedere proprietățile lui antioxidante și antiinflamatoare, acesta este consumat și sub forma suplimentelor alimentare. Scopul acestei lucrări a fost determinarea condițiilor cromatografice optime pentru dozarea resveratrolului folosind sistemul HPLC- cu detecție UV/VIS. Ca aparatură s-a utilizat un cromatograf de lichide HPLC cu echipamentul Shimadzu LC-20ADsp echipat cu o coloană C18- Macherey Nagel, Nucleosil 5 μ m. Pentru proba reală testată s-au folosit comprimate de supliment alimentar de resveratrol Helcor 25 mg, iar ca solvenți s-au ales alcool etilic absolut și sistem tampon fosfat la pH 8.0. Curbele de calibrare realizate indică un coeficient de liniaritate aproape unitar ceea ce indică o liniarizare bună a metodelor de lucru. O sensibilitate mai crescută s-a evidențiat în cazul experimentelor cu alcool etilic absolut. În cazul testelor efectuate pe probe reale de supliment alimentar s-a calculat prin metoda interpolării gradul de regăsire a compusului bioactiv. Pentru experimentele cu solvent alcool etilic s-a calculat un grad de regăsire a resveratrolului de 84%, iar în cazul experimentelor cu sistem tampon fosfat a avut o valoare de $116,21 \pm 0,19\%$ (folosind dreapta de calibrare specifică ariilor picurilor) și respectiv o supraestimare de $161,76 \pm 0,19\%$ (folosind dreapta de calibrare specifică înălțimii picurilor). Metodele se pot utiliza cu succes ca referințe și pentru alte analize pentru determinări ale resveratrolului.

Key-words: *resveratrol, HPLC, liquid chromatography, chromatographic methods*

Cuvinte cheie: *resveratrol, HPLC, cromatografie de lichide, metode cromatografice*

Introducere

Resveratrolul este un compus activ cu proprietăți antioxidante identificat în diverse surse, precum boabele de struguri, planta japoneză *Polygonum Cuspidatum*, afine, măceșe și vin (Jasinski M, 2013).

Fiind un antioxidant puternic și cu

proprietăți antiinflamatoare, resveratrolul poate fi asociat în tratamentul diferitelor stări patologice. Inflamația joacă un rol important în patogeneza diferitelor afecțiuni cardiovasculare, cancer, diabet, Alzheimer și în bolile autoimune (Bellaver B, 2014).

Acest compus este consumat sub formă de

suplimente alimentare și sub formă de plante ca atare în medicina chineză și medicina Ayurvedica din India (Paul B, 1999).

Din punct de vedere chimic, resveratrolul se găsește sub două forme structurale, și anume *cis* și *trans*-resveratrol (figura 1). Forma *trans*-resveratrol este forma sterică relativ stabilă, dacă este pretejată de un pH crescut și de lumină. În schimb, forma *cis*-resveratrol este stabilă doar la pH neutru și complet privată de lumină (Trela B, 1996). Forma *trans* este de cele mai multe ori studiată în laboratoare.

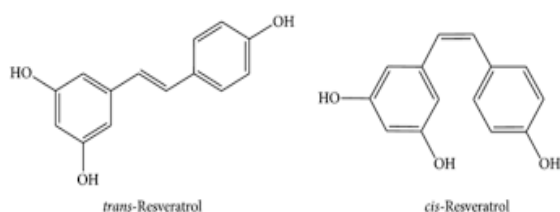


Fig 1. Formele structurale ale resveratrolului

Studiile despre relația dintre activitatea și structura sa au demonstrat că structura *trans* a resveratrolului prezintă efecte terapeutice, fiind un component esențial și vital pentru corpul uman. Substituțiile grupelor hidroxil la metoxi stimulează activitatea citotoxică, iar gruparea hidroxil din conformația *trans*- de la poziția 4- și 4'- este esențială pentru activitatea antiproliferativă a resveratrolului. Introducerea grupelor de halogeni ar putea furniza informații despre activitatea antibacteriană (Murias M, 2005).

Literatura de specialitate indică detecții electrochimice și cromatografice ale resveratrolului din diferite probe. Un studiu de specialitate oferă date importante despre stabilitatea și solubilitatea *trans*-resveratrolului din punct de vedere termic și a pH-ului, folosindu-se de trei metode analitice, și anume: spectrometrie UV/VIS, HPLC și UPLC. Metoda UPLC este folosită pentru a separa *trans*-resveratrol de *cis*-resveratrol și producții de degradare cu o rezoluție mai bună decât cea oferită de HPLC (Zupanciu S, 2015).

O altă detecție cromatografică pentru *trans*-resveratrol este descrisă prin metoda cromatografiei lichide cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS). Această metodă este folosită pentru cuantificarea moleculelor mici dintr-un complex biologic. Domeniul de liniaritate pentru *trans*-resveratrol a fost de 0,024-25 mM, cu LOQ = 0,024 mM și LOD = 0,006 mM (Svilar L, 2019).

S-au identificat în literatura de specialitate și detecții electrochimice ale resveratrolului în vin. Metoda electrochimică folosită în acest studiu este voltametria în puls diferențial (DPV) cu un potențial variabil între 0 și -0,5 V. Senzorul folosit este unul cu electrod de lucru cu grafit (Liu L, 2017). S-a confirmat faptul că metoda este una rapidă, sensibilă și prezintă acuratețe mare, având importanță mare pentru a îmbunătăți procesul de fabricație, de a controla condițiile de depozitare și bineînțeles de a evalua valorile nutriționale ale vinului (Liu L, 2017).

Scopul acestei lucrări a fost determinarea condițiilor cromatografice optime pentru dozarea cromatografică a resveratrolului folosind sistem HPLC- cu detecție UV/VIS din probe standard și din probe din supliment alimentar.

Materiale și aparatură

Reactivii utilizați pentru detecția cromatografică HPLC au fost: resveratrol de puritate 99% (Sigma Aldrich Corporation, Saint Louis, Missouri, USA), fosfat de sodiu monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de puritate 100% (Poch S.A., Gliwice Polonia), fosfat de sodiu dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) de puritate 99% (Poch S.A., Gliwice, Polonia), acetonitril HPLC grade (Scharlau, Spania), alcool etilic absolut (Chimreactiv S.R.L, București, România) și apă distilată ultrapură (Millipore Direct-Q cu filtru de 0,22 mm).

Pentru proba reală testată s-au folosit comprimate de supliment alimentar de resveratrol Helcor 25 mg (Bioline, România).

S-a utilizat un cromatograf de lichide HPLC cu echipamentul Shimadzu LC-20ADsp echipat cu o coloană C18- Macherey Nagel, Nucleosil 5 μm .

S-au folosit doi solvenți (sistem tampon fosfat cu pH 8.0 și alcool etilic absolut) pentru prepararea probei de lucru cu suplimentul alimentar.

Mod de lucru

Cromatograful HPLC a fost setat la 30°C, detecția UV a avut loc la lungimea de undă 306 nm, iar debitul fazei mobile s-a setat la 1,0 mL/min.

Faza mobilă a fost preparată cu acetonitril și apă ultrapură în proporții de 30:70 (v:v). Volumul de injecție pentru fiecare probă a fost de 10 μL .

Pentru experimentele cu solvent etanol s-au preparat 4 soluții pentru a trasa curbă de calibrare de diferite concentrații, respectiv 0,125mM,

0,25mM, 0,5 mM și 1 mM.

Pentru proba reală de supliment alimentar s-a preparat cu etanol o soluție inițială de concentrație 0,3mM. Proba testată cromatografic a fost diluată (un volum de 10mL din soluția inițială s-a sonicat 100 secunde cu 1,5mL etanol).

Pentru experimentele cu sistem tampon fosfat (pH 8) s-au preparat 7 soluții standard de resveratrol, cu concentrații variind între 0,1 mM și 0,7mM. La testarea probelor reale de supliment alimentar în sistem tampon, s-au adăugat ulterior și concentrații cunoscute de standard de resveratrol, cu scopul studierii gradului de regăsire a acestuia în proba reală.

Rezultate și discuții

S-au trasat dreptele de calibrare folosind datele cromatogramelor corespunzătoare valorilor ariilor și respectiv înălțimilor picurilor. S-au testat soluțiile de supliment alimentar cu etanol și cu sistem tampon și, prin interpolare pe dreptele de calibrare, s-au determinat concentrațiile acestora.

4.1. Detecția resveratrolului în soluție de etanol

Dreptele de calibrare pentru condițiile experimentale cu etanol pentru valorile ariei picului, respectiv înălțimii picului s-au înregistrat în figurile 2 și 3.

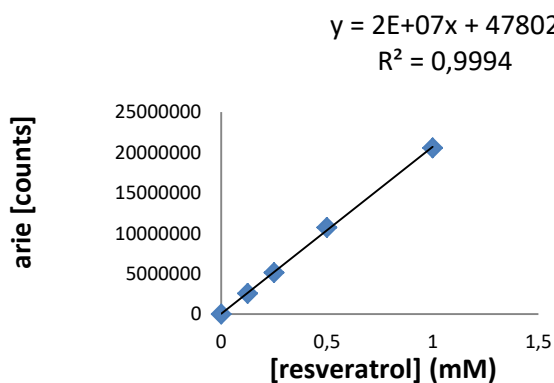


Fig 2. Dreapta de calibrare folosind variația ariei picului la diverse concentrații de resveratrol standard în soluție etanol

Se observă în figura 2 un coeficient de liniarizare foarte bun ($R^2=0,9994$). Domeniul de liniaritate pentru ecuația dreptei a fost de 0-1mM.

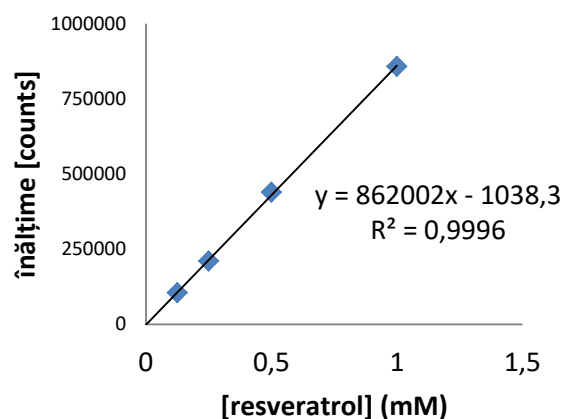


Fig 3. Dreapta de calibrare folosind variația înălțimii picului la diverse concentrații de resveratrol standard în soluție etanol

În figura 3 se observă domeniul de liniaritate pentru ecuația dreptei de 0-1mM. Coeficientul de liniarizare este aproape unitar, cu o valoare de 0,9996.

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele raportate și în literatura de specialitate (Satveer J. 2019).

4.2. Detecția resveratrolului în soluție de sistem tampon fosfat (pH 8.0)

Dreptele de calibrare pentru condițiile experimentale cu etanol pentru valorile ariei picului, respectiv înălțimii picului s-au înregistrat în figurile 4 și 5.

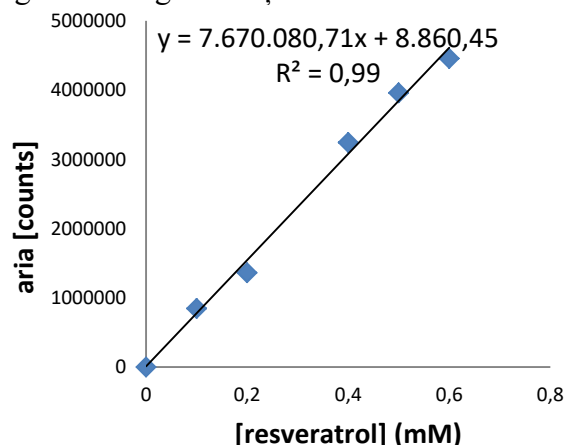


Fig 4. Dreapta de calibrare folosind variația ariei picului la diverse concentrații de resveratrol standard în sistem tampon la pH 8.0

În figura 4 se observă domeniul de liniaritate pentru ecuația dreptei de 0-0,6 mM. Coeficientul de liniarizare are o valoare de 0,9938.

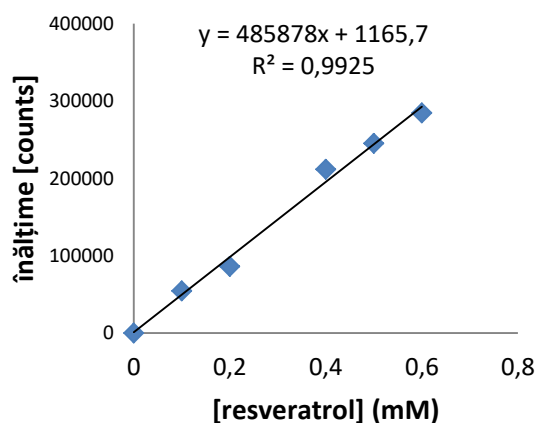


Fig. 5. Dreapta de calibrare folosind variația înălțimii picului la diverse concentrații de resveratrol standard în sistem tampon la pH 8.0

Figura 5 evidențiază coeficientul de liniarizare a ecuației dreptei pentru curba de calibrare cu o valoare de 0,9925 și un domeniu de liniaritate de 0-0,6 mM.

4.3. Comparație între cele două experimente

Analizând datele obținute s-a observat posibilitatea de a detecta resveratrolul folosind condițiile menționate.

S-au comparat rezultatele pentru cele două condiții experimentale testate, iar rezultatele sunt indicate în figurile 6 și 7.

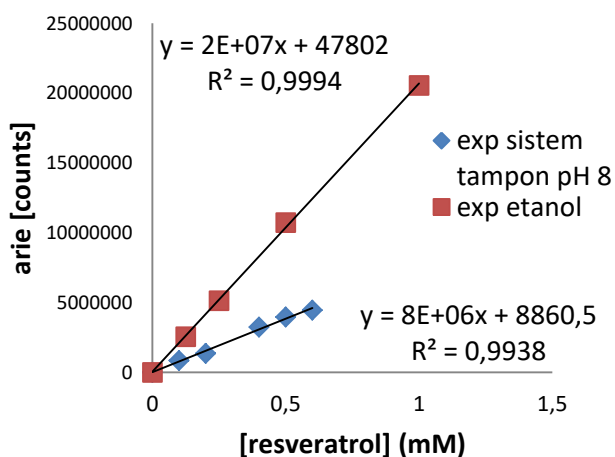


Fig 6. Comparație între valorile ariilor picurilor de la experimentele desfășurate în sistem tampon la pH 8.0 și experimentele desfășurate în etanol

În figura 6 este evidențiată diferența dintre panta experimentului cu solvent alcool etilic și cea a experimentului cu sistem tampon. S-a observat o sensibilitate mai mare (de 2.5 ori) a experimentului ce a utilizat etanol, în comparație cu cea a experimentalului care a utilizat sistem tampon.

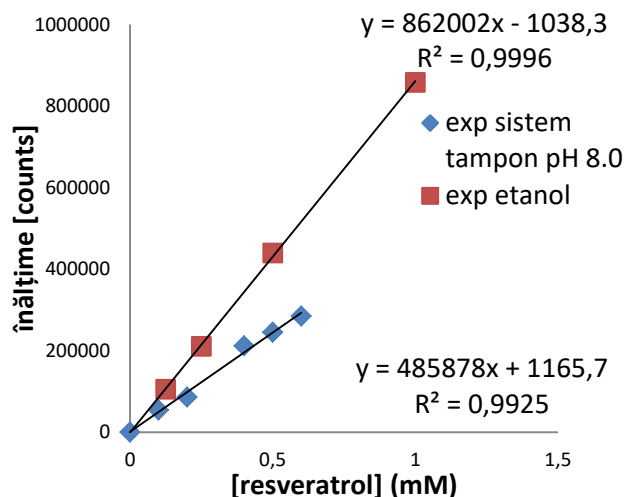


Fig. 7. Comparație între valorile înălțimii picurilor de la experimentele desfășurate în sistem tampon la pH 8.0 și experimentele desfășurate în etanol

Ca și în cazul figurii 6, și în figura 7 este evidențiată diferența dintre panta dreptei de calibrare corespunzătoare experimentului cu solvent alcool etilic și cea a experimentului cu sistem tampon, indicând o sensibilitate de aproximativ de două ori mai mare în prima condiție experimentale menționată.

Având cele două grafice sugestive din figurile 6 și 7, se poate observa faptul că datele ariilor oferă o mai bună precizie analitică în comparație cu datele înălțimilor picurilor.

Prin urmare, o sensibilitate mai crescută a experimentului s-a evidențiat în cazul experimentului cu etanol.

4.4. Validarea metodelor pe probe reale

Având în vedere condițiile de la experimentele cu solvent etanol, testarea s-a repetat în cvadruplicat și s-a obținut o valoare medie a concentrației de compus bioactiv, resveratrol, de $0,56 \pm 0,03$ mM în 10 mL supliment. Ținându-se cont de datele furnizate de firma producătoare a suplimentului, gradul de regăsire a resveratrolului prin această metodă a fost de 84%, în concordanță cu datele acceptate de literatura de specialitate.

Folosind datele obținute pentru experimentul cu solvent sistem tampon fosfat, s-au calculat gradele de regăsire ale compusului bioactiv din probele standard de resveratrol (de concentrații 0,1mM, 0,2mM, 0,3mM și 0,4 mM) adăugat suplimentar peste matricea de supliment alimentar. Valorile obținute au fost $116,21 \pm 0,19\%$

(folosind dreapta de calibrare a datelor ariilor specifică figurii 4) și respectiv o supraestimare de $161,76 \pm 0,19\%$ (folosind dreapta de calibrare a datelor înălțimilor specifică din figura 5).

Concluzii

Având în vedere curbele de calibrare și liniarizarea acestora, metodele se pot utiliza pentru detecția resveratrolului atât ca probe standard, cât și a compusului activ din probe reale de suplimente alimentare.

Importanța detecției este reflectată prin beneficiile terapeutice ale compusului și utilizarea sa de către persoane atât din surse naturale, cât și ca supliment alimentar cu proprietăți antioxidante puternice.

Metodele testate pot fi utilizate ca referință pentru detecția resveratrolului și prin alte metode clasice sau moderne.

Bibliografie

- [1] Bellaver B, Souza DG, Souza DO, Quincozes-Santos A (2014). Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. *Toxicol. In Vitro* 28, 479–484.
- [2] Jasinski M, Jasinska L, Ogradowczyk M. Resveratrol in prostate diseases – A short review. *Central European Journal of Urology*, 66(2), 2013; 144–149.
- [3] Liu L, Zhou Y, Kang Y, Huang H, Li C, Xu M, Ye B (2017). Electrochemical evaluation of trans-resveratrol in red wines based on the interaction between resveratrol and graphene. *Hindawi. Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 8 pag.
- [4] Murias M, Jager W, Handler N, Erker T, Horvath

- Z, Szekeres T, Nohl H, Gille L (2005). Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: Structure-activity relationship. *Biochem. Pharm* 69, 903–912.
- [5] Paul B, Masih I, Deopujari J, Charpentier C (1999). Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakhasava, an Ayurvedic medicine from India, *J Ethnopharmacol* 68, 71–76.
- [6] Svilar L, Martin JC, Defoort C, Paut C, Tourniaire F, Brochot A (2019). Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in human plasma using high performance liquid chromatography tandem quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 1104, 119-129.
- [7] Trela B, Waterhouse A (1996). Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability, *J Agric Food Chem* 44, 1253–1257.
- [8] Zupancic S, Lavric Z, Kristl J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 93, 2015; 196-204.
- [9] Satveer J, Sunil J, Dinesh D, Gan S.H, Kiran J (2019) A Stability Indicating Reversed Phase HPLC Method for Estimation of trans-Resveratrol in Oral Capsules and Nanoliposomes, *Analytical Chemistry Letters*, 9:5, 711-726.

Contribuția autorilor: conceptualizare: MB, GhC, LA, LR; designul cercetării: MB, LA, validarea metodologiei CSA, LA, MB; culegerea datelor CSA, MB, LA, analiza datelor și / sau interpretarea datelor: CSA, MB; scrierea pregătirea textului inițial CSA, MB; revizuire și editare: GhC, RL

Conflict de interese: Nu există conflict de interese