

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. О.**  
**БОГОМОЛЬЦЯ**  
**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**КАФЕДРА АНАЛІТИЧНОЇ, ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ**

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**на тему «ВИЗНАЧЕННЯ РЕСВЕРАТРОЛУ В ДІСТИЧНИХ**  
**ДОБАВКАХ ХРОМАТОГРАФІЧНИМ МЕТОДОМ»**

Виконала здобувачка вищої освіти 3-го  
курсу, групи 18Б2Б  
напряму підготовки 226 «Охорона  
здоров'я»  
освітня програма «Фармація»  
Дворецька Дар'я Михайлівна

Керівниця: завідувачка кафедри  
аналітичної, фізичної та колоїдної хімії,  
кандидатка хімічних наук, доцентка  
Зайцева Галина Миколаївна

Рецензентка: д.фарм.н., професорка  
Вельчинська Олена Василівна

Київ 2024

## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
Вступ.	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Ресвератрол, методи визначення.	8
1.1. Загальна характеристика сполук фенольної та поліфенольної природи.	8
1.2. Фізико-хімічні методи аналізу ресвератролу.	9
1.3. Визначення сполук фенольної і поліфенольної природи методами хроматографії.	11
1.4. Визначення сполук фенольної і поліфенольної природи в різних об'єктах.	12
Розділ 2. Експериментальна частина.	14
2.1. Реагенти, приготування розчинів та об'єкти дослідження.	14
2.2. Адсорбент для ТЕ.	16
2.2.2. Приготування патронів (хроматографічна колонка) для ТЕ та їх кондиціювання.	17
2.3. Прилади.	17
2.4. Методики дослідження.	19
2.4.1. Пробопідготовка об'єкту дослідження.	19
2.4.2. Методика визначення ресверантролу у зразку.	19
2.4.3. Методика визначення оптимізації умов динамічного концентрування ресвератролу з стандартних розчинів та їх десорбції з фази сорбенту.	20
Розділ 3. Результати та їх обговорення.	21

3.1.	Вибір рухомої фази.	21
3.2.	Підбір оптимальних умов елюювання.	22
3.3.	Вплив складу розчинників.	24
3.4.	Визначення кореляційних залежностей між концентрацією фенольних сполук та хроматографічними параметрами (побудова градувального графіка).	24
3.5.	Дослідження стабільності розчинів ресвератролу у часі.	26
3.6.	Дослідження сорбційних характеристик $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$ в динамічних умовах.	26
3.7.	Оптимізація умов десорбції ресвератролу.	29
3.8.	Визначення ресвератролу в об'єкті дослідження.	30
	Висновки.	32
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	33
	ДОДАТКИ	37
	Анотація (Summary)	40

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВКР – випускна кваліфікаційна робота.

ТЕ – твердофазна екстракція.

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія.

ХМК – хімічно-модифікований кремнезем.

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця.

ГГ – градувальний графік.

SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС- кремнезем із ковалентно-закріпленими групами довголанцюгової четвертинної солі алкіламонію.

г – грам.

мл – мілілітр.

С<sup>0</sup> – градуси Цельсія.

## ВСТУП

Фенольні та поліфенольні сполуки, будучи цінними біологічно активними речовинами (БАР) рослинного походження, мають широкий спектр біологічної активності: антиоксидантну, протівірусну, протизапальну, антибактерицидну, антиканцерогенну, Р-вітамінну, капілярно зміцнюючу та ін. [1].

Зважаючи на великий інтерес до біологічно-активних сполук фенольного типу, розробка надійних методик визначення індивідуальних антиоксидантів набуває великого значення через різну фізіологічну дію окремих складових рослинних екстрактів та харчових добавок, можливості фальсифікації. Особливо це важливо в процесі контролю якості дієтичних добавок та фармацевтичних препаратів.

На даний час для ідентифікації та кількісного визначення сполук фенольної та поліфенольної природи у лікарських засобах та дієтичних добавках широко використовуються методи вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ)[2,3]. Але необхідною стадією пробопідготовки багатокомпонентних фармацевтичних препаратів та рослинної сировини є попереднє концентрування з метою відокремлення цільового компонента від матриці. У зв'язку з вищезазначеним широке розповсюдження отримав метод твердофазної екстракції (ТЕ) [4-12]. Цей метод простий і підтвердив свою ефективність для концентрування різних типів фенольних сполук перед їх хроматографічним визначенням. Проте відомі патрони для концентрування на основі гідрофобізованого силікагелю ( $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ ) погано підходять для концентрування поліфенольних сполук через можливість їх іонізації в нейтральному та лужному середовищах, що призводить в свою чергу до втрат аналізу, невисоких коефіцієнтів концентрування та низької ємності ТЕ по відношенню до поліфенольних сполук.

**Актуальність теми:** Пошук нових адсорбентів для вилучення поліфенолів методом ТЕ, а також їх удосконалення і спрощення багатостадійних етапів пробопідготовки.

**Мета:** даної роботи полягала у розробці хроматографічної методики кількісного визначення ресвератролу у дієтичних добавках.

**Завдання:**

- підібрати оптимальні умови розділення та детектування ресвератролу у складних багатокомпонентних об'єктах – дієтичних добавках;
- розробити та апробувати хроматографічну методику кількісного визначення ресвератролу у дієтичній добавці;
- провести часткову валідацію методики.

**Методи дослідження:** бібліосемантичний, хроматографія, твердофазна екстракція, хемометричний.

**Новизна та значення одержаних результатів:** Вивчено умови концентрування ресвератролу з модельних розчинів на кремнеземі зковалентно-закріпленими групами довголанцюгової четвертинної солі алкіламмонію ( $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС). Встановлено, що сорбент  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС є придатним для використання в якості ТФЕ при концентруванні сполук фенольної природи при  $\text{pH}=5,0$ . Найбільш придатним елюентом для десорбції ресвератролу в умовах, що забезпечують інтеграцію запропонованого підходу з ВЕРХ визначенням сполук в елюаті є 0,5% метанольний розчин соляної кислоти. В оптимальних умовах методом ОФ-ВЕРХ показано можливість використання  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС для ТФЕ ресвератролу та визначення його у дієтичних добавках.

***Апробація результатів дослідження:***

Результати дослідження представлено на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвяченій 25-річчю фармацевтичного факультету, 19-20.12.2023(Додаток 3).

***Структура роботи.*** Рисунків 10, таблиць - 6, додатків - 3, робота представлена на 42 сторінках.

## ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Ресвератрол, методи визначення.

### 1.1. Загальна характеристика сполук фенольної та поліфенольної природи.

Фенольні сполуки - один з найбільш поширених і численних класів природних сполук, що проявляють біологічну активність. Феноли містяться майже у всіх рослинах у вигляді глікозидів або у вільному стані в кількості від 0,1 до 7% [1].

Поліфеноли - збірна назва цілого класу речовин, до яких входять флавоноїди, антоціани, лігніни, кумарини, прості феноли, хінони, дубильні речовини і фітоалексини, наприклад ресвератрол. Ресвератрол (3,5,4'-тригідроксистільбен) (Рис.1.) є антибактеріальною і протигрибковою речовиною, яка виробляється у природі рослинами:

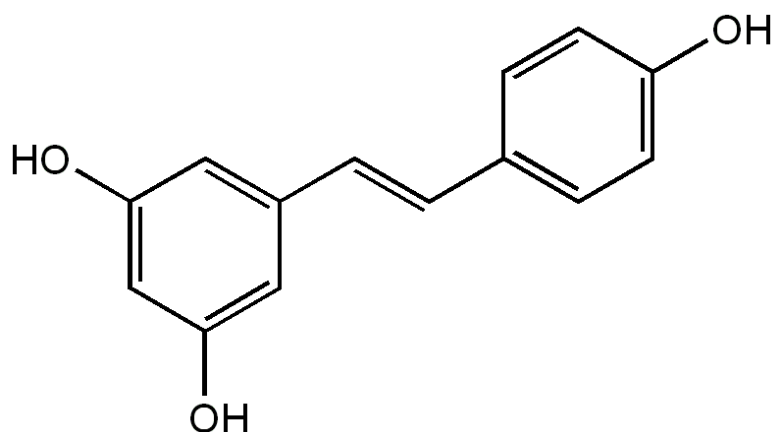


Рис. 1. Ресвератрол.

Рослинні поліфеноли - це потужні антиоксиданти, тобто вони захищають клітини людського організму від шкідливої дії вільних радикалів [2,3], володіють протизапальною [4], протипухлинною [5], капілярозміцнюючою дією, а також сповільнюють процеси старіння [6, 7].



Одним з цікавих біологічно-активних поліфенолів, якому в останні роки присвячено багато робіт, є 3,5,4'-тригідроксистільбен (транс-ресвератрол), що входить до складу низки дієтичних добавок. Окрім потужних антиоксидантних властивостей (що перевершують бета-каротин в 5 разів, вітамін Е - в 50 разів, вітамін С - в 20 разів) [1], цей поліфенол привертає увагу своїми анти-пухлинними та анти-запальними властивостями [8-10], омолоджувальною дією [11], що відкриває можливості його застосування, як терапевтичного препарату для людини [12].

На сьогоднішній день ресвератрол є новим інгредієнтом для індустрії харчових добавок. Існує кілька добавок ресвератролу, доступних в США, у поєднанні з екстрактом винограду або іншими антиоксидантами.

Навряд чи знайдуться інші речовини, що володіють настільки різноманітною оздоровчою дією на організм людини. Це обумовлює застосування ресвератролу у медицині, фармакології, біохімії, харчовій промисловості [13-16].

## **1.2. Фізико-хімічні методи аналізу ресвератролу.**

В останні роки все більшого розповсюдження одержують різні фізико-хімічні методи аналізу фенольних сполук, які мають ряд переваг, порівняно з гравіметричними і титриметричними методами, а саме: швидкість і точність аналізу, визначення навіть незначних кількостей, і що дуже важливо, можливість детектування окремих флавоноїдів.

### *Спектрофотометричний метод*

Дані методи засновані на здатності флавоноїдів поглинати світло в УФ- та видимій області спектра [13-16]. Кількісне визначення досліджуваних флавоноїдів в УФ- та видимій області спектрів ґрунтується на вимірі поглинання при довжині хвилі в максимумах поглинання як розчинів аналізованих речовин, так і розчинів їх забарвлених комплексів (боргідридний метод, застосування HCl - BuOH, ваніліну, реакцій діазотування).

При цьому робочими діапазонами довжин хвиль слугують як довгохвильові максимуми для флавоноїдів - 300-370 нм, так і короткохвильові. Короткохвильові максимуми, хоча є і більш інтенсивними, але в ряді випадків менш придатні для аналітичних цілей через малу «площу» вершини піку, що призводить до більших помилок визначення.

Володіючи високою чутливістю, спектрофотометричні методи не є селективними, так як не контролюють вміст кожної речовин, дають дещо завищені результати, проте вони можуть дати інформацію про загальну кількість фенольних сполук у складних зразках (рослинній сировині, фітохімічних препаратах) [17-18] та бути використаними у попередніх дослідженнях.

#### Люмінісцентні та сорбційно-люмінесцентні методи

Комплексоутворюючі властивості флавоноїдів покладені в основу флуорометричного методу, що є на порядок більш чутливим, ніж спектрофотометричний. Кількісно оцінити вміст флавоноїдів цим методом можливо при наявності 0,05-1 мкг речовини в 1 мл розчину .

Авторами [18-19] показано, що ресвератрол здатен підвищувати хемілюмінесценцію реакції між  $\text{KMnO}_4$  та НСНО в сірчаній кислоті на сорбенті  $\text{C}_{18}$ . За оптимальних умов можна визначати ресвератрол в межах  $1,32 \cdot 10^{-8}$  -  $1,32 \cdot 10^{-5}$  моль/л з межею виявлення  $3,30 \cdot 10^{-9}$  моль/л.

Висока чутливість флюорометричного методу розкриває широкі можливості його застосування для попередньої ідентифікації біологічно активних речовин в тканинах рослин. Однак отримати об'єктивні результати при аналізі сировини і фітохімічних препаратів можна тільки після розділення речовин за допомогою різних видів хроматографії [20].

#### Електрохімічні методи

Електрохімічні методи визначення флавоноїдів засновані на здатності їх молекул окислюватися на поверхні електродів з матеріалів різної природи.

Із даної групи методів застосовують полярографію, метод амперометричного титрування, вольтамперометрію [21-25], циклічну вольтамперометрію [23].

До недоліків методу можна віднести його малу вибірковість через близькість величин потенціалів півхвиль та малу чутливість, що ускладнює визначення без попереднього розділення сполук в рослинній сировині та фітопрепаратах [30, 31].

#### Метод капілярного електрофорезу

У сучасній науці для виявлення і кількісного визначення флавоноїдів у рослинній сировині використовується метод капілярного електрофорезу [25]. Перевагами капілярного електрофорезу є: висока ефективність розділення, економічність (мала витрата реактивів) і експресність [25].

Метод капілярного електрофорезу отримує все більшого поширення для визначення фармакологічно важливих сполук у рослинах.

У роботі [26] було розроблено методику розділення та визначення 4-х поліфенолів в листі *Ricinus communis Linn* методом капілярного електрофорезу з амперметричним детектором протягом 10 хв на плавленому кварцовому капілярі при напрузі розділення 15 кВ в 50 мМ боратному буфері (рН 9.0).

### **1.3. Визначення сполук фенольної і поліфенольної природи методами хроматографії.**

За останнє десятиліття різко зросла кількість публікацій, присвячених хроматографічним дослідженням природних і синтетичних біологічно активних сполук. Для визначення фенолів у складних сумішах найчастіше використовують хроматографію і капілярний електрофорез. Через термічну і хімічну лабільності більшості поліфенольних сполук застосовують тонкошарову хроматографію, капілярний електрофорез і високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) [26].

Газова хроматографія обмежено застосовується для аналізу природних біологічно активних сполук через необхідність дериватизації фенолів у

метил- або триметилсілілпохідні. Тим не менше такі роботи проводять. Методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням визначені фенольні кислоти з екстракту коріандру, основні флавоноїди та їх глікозиди з деревини верби, феноли в олії полину [26].

Найбільш часто для визначення поліфенолів використовують високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ). Це пояснюється наступними перевагами методу: швидкістю, високою селективністю сорбентів, чутливістю і селективністю діод-матричного, ультрафіолетового, флуоресцентного, мас-спектрометричного детекторів і м'якими температурними умовами аналізу, при яких речовини, які аналізуються, не розкладаються, гарною відтворюваністю, невеликими кількостями досліджуваних речовин [27-29].

На практиці, поділ фенольних сполук частіше проводять на модифікованих силікагелях в обернено-фазовому варіанті, оскільки при поділі на даних нерухомих фазах вища селективність розділення, краща відтворюваність результатів і спостерігається більш тривалий термін служби колонок.

#### **1.4. Визначення сполук фенольної і поліфенольної природи в різних об'єктах.**

У літературі за останні роки з'явилося багато хроматографічних робіт, присвячених дослідженням фенольних сполук у різних об'єктах методом ВЕРХ. Труднощі, що виникають при визначенні фенолів хроматографічними методами, в основному пов'язані (крім необхідності попереднього очищення екстрактів перед введенням в колонку) з відсутністю необхідних стандартів через величезне розмаїття природних форм цих сполук. Тому іноді при аналізі складних рослинних екстрактів використовують, так званий fingerprint-метод ідентифікації - «метод відбитків пальців». Ці «відбитки» є специфічними для кожного виду рослин і можуть бути використані при визначенні джерела походження рослинної сировини. Для виявлення

фальсифікації лікарських форм використовують поєднання методу «відбитків пальців» і хроматографічного аналізу біологічних рідин [27-29].

Однак більш інформативні дані при аналізі природних об'єктів можуть бути отримані при спільному використанні індексів утримування і спектральних характеристик.

## Розділ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.

### 2.1. Реагенти, приготування розчинів та об'єкти дослідження.

Як стандарт використовували транс-ресвератрол компанії «Фітопанацея» (98,5% чистоти).

Для приготування розчинів та елюентів використовували наступні реактиви:

- органічні розчинники: ацетонітрил (*1 сорт, Sigma*), метиловий спирт (*for HPLC, Sigma*);
- ацетатна кислота (*99%, for HPLC, Sigma*);
- 1М хлоридна кислота (*х.ч.*) (*виготовлена з фіксаналу*);
- ацетат натрію (*х.ч.*)
- гідрофосфат натрію (*х.ч.*)
- дигідрофосфат калію (*х.ч.*)
- вода деіонізована (очищена на Millipore, Direct-Q).

*Приготування стандартних і робочих розчинів фенольних сполук здійснювали згідно вимог ДФУ [30].*

Вихідний розчин ресвератролу ( $C_T=5000$  мг/л) готували шляхом розчинення капсули у 10 мл метанолу.

Стандартні розчини готували змішуванням аліквот вихідних розчинів та розведенням суміші метанолом. Вихідні та стандартні розчини зберігали в темному місці за температури  $5^{\circ}\text{C}$  протягом не більше ніж 1 місяць.

Робочі розчини\* готували методом розбавлення вихідних розчинів у відповідних розчинниках безпосередньо в день проведення досліду.

\**Приготування робочого розчину з рН=2:* В окремі мірні колби на 50 мл відбирали по 2,5 мл вихідного розчину ресвератролу, додавали 5,0 мл метанолу та встановлювали значення рН додаванням необхідної кількості 0,1М HCl, розчин доводили до мітки деіонізованою водою.

\* *Приготування робочого розчину з рН=5:* В окремі мірні колби на 50 мл відбирали по 2,5 мл вихідного розчину ресвератролу, додавали 5,0 мл метанолу та доводили до мітки 0,01М ацетатним буфером.

*Приготування елюентів та допоміжних розчинів.*

**Елюент А:** вода (0,1%-ий розчин ацетатної кислоти). Елюент готували шляхом додавання 0,3 мл ацетатної кислоти до 300 мл деіонізованої води.

**Елюент В:** ацетонітрил (0,1%-ий розчин ацетатної кислоти). Елюент готували шляхом додавання 0,3 мл ацетатної кислоти до 300 мл ацетонітрилу. Всі розчинники перед використанням фільтрували крізь скляний фільтр з водоструминним вакуумним насосом.

**Розчини хлоридної кислоти:** 1М розчин хлоридної кислоти готували з фіксаналу. Інші розчини кислот ( $10^{-3}$  та  $10^{-4}$  М) готували шляхом розведення вихідного розчину.

**Буферний розчин рН=5:** Для приготування 200 мл вихідного 0,1М ацетатного буферного розчину з рН=5,0 змішували 59 мл розчину А і 141 мл розчину В. **А:** 0,1 М ацетатна кислота (0,6 мл льодяної ацетатної кислоти розчиняли в 100 мл води); **В:** 0,1 М ацетат натрію (2,72 г солі натрій ацетату розчиняли в 200 мл води). 0,01 М буферний розчин готували шляхом розведення вихідного буферного розчину.

**Буферний розчин рН=6,5:** Для приготування 200 мл вихідного фосфатного буферного розчину з рН=7,0 змішували 62,6 мл розчину А і доводили до мітки розчином В. **А:** натрій гідрофосфат ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); **В:** калій дигідрофосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

**Буферний розчин рН=7:** Для приготування 200 мл вихідного фосфатного буферного розчину з рН=7,0 змішували 153 мл розчину А і доводили до мітки розчином В. **А:** натрій гідрофосфат ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ); **В:** калій дигідрофосфат ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

*Об'єкти дослідження.*

В роботі на вміст ресвератролу була досліджена дієтична добавка «Евелор» (капсули 50 мг), виробник «Agetis Supplements Ltd», Кипр, ЕС, далі – зразок:



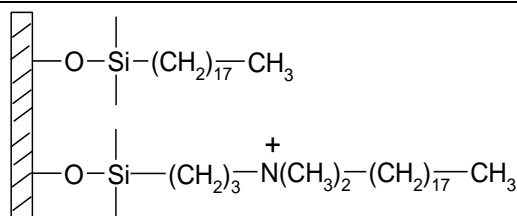
Рис. 2. Зразок, який був використаний у дослідженні.

До складу капсули входить ресвератрол – 50 мг, порошок сої, крохмаль, лактоза, аеросил, магній стеарат.

## **2.2. Адсорбент для ТЕ.**

В якості адсорбенту застосовували кремнезем з аніонообмінними (ЧАС) групами ( $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС). Будова поверхні адсорбційних фаз представлена на Рис.3. Адсорбент був синтезований на кафедрі аналітичної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка.





SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС

Рис.3. Будова поверхні адсорбційних фаз.

### 2.2.2. Приготування патронів (хроматографічна колонка) для ТЕ та їх кондиціонування.

В роботі використовували патрони для ТЕ фірми *Agilent* з фазою C<sub>18</sub> (m=0,1 г, h=5 мм). Патрони для ТЕ з фазою SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС готували шляхом заповнення стандартного пластикового картриджа водно-метанольною суспензією, яка містила 0,1 г адсорбенту. Після осадження ТЕ розчин відфільтровували та закривали поверхню адсорбенту терефталевою мембраною. Таким чином отримували картридж з наступними параметрами: h=5 мм, d= 3 мм. Картридж зберігали під шаром води.

Перед проведенням досліду сорбент кондиціонували 1 мл метилового спирту, 5 мл метилового спирту та дистильованої води (1:1), 10 мл дистильованої води.

### 2.3. Прилади.

Розділення та визначення поліфенолів проводили на модульному рідинному хроматографі *Agilent 1200 Series* (Agilent Technologies, США). Загальні параметри приладу наведені у Табл.1.

Таблиця 1. Інструментальні параметри хроматографічної системи.

<b>Прилад:</b>	Рідинний хроматограф серії <i>Agilent 1200</i>
<b>Насос:</b>	Градiєнтний, <i>Agilent 1200 Series Quaternary Pump</i>
<b>Інжектор:</b>	<i>Agilent 1200 Series Manual Injector</i> з петлею-дозатором об'ємом 20 мкл
<b>Термостат:</b>	Повітряний, <i>Agilent 1200 Series Thermostatted Column Compartment</i>
<b>Детектор:</b>	Діодно-матричний, <i>Agilent 1200 Series Diode Array and Multiple Wavelength Detectors</i>
<b>Програмне забезпечення:</b>	<i>Chemstation</i> A.08.03 ( <i>Agilent Technologies, США</i> )

- ✓ Наважки сухих речовин зважували з точністю до четвертого знаку на аналітичних терезах фірми METTLER TOLEDO.
- ✓ Вимірювання рН розчинів проводили на Іономірі рН-150МИ з комбінованим електродом ЭСК-10603.
- ✓ Для перемішування розчинів використовували лабораторну магнітну мішалку LabDisk (IKA Werke, Німеччина).
- ✓ Для відбору аліквот досліджуваних сполук використовували автоматичний дозатор BIONIT PROLINE (100-1000 µl).
- ✓ Для фільтрування проб безпосередньо перед хроматографічним аналізом використовували мембранні фільтри ISO-DISC 0,45 µm.
- ✓ Спектри поглинання індивідуальних фенольних сполук вимірювали на двопробеному спектрофотометрі Spectrofotometr Unico 2800 UV/VIS та Evolution 600 UV-Vis Spectrophotometer Thermo Scientific у діапазоні довжин хвиль 190 – 400 нм. Для вимірювання використовували кварцові кювети з довжиною оптичного шляху 1 см.
- ✓ Для пропускання розчинів аналітів через ТФЕ застосовували перистальтичний насос марки ПН – 1М

## 2.4. Методики дослідження.

### 2.4.1. Пробопідготовка об'єкту дослідження.

Капсулу (зразок) розкривали і переносили її вміст у хімічний стакан на 50 мл, розчиняли у метанолі, створювали рН = 5,0 додаванням 10 мл 1 М ацетатного буферу, 10 мл отриманого розчину пропускали через заздалегідь кондиційований картридж.

### 2.4.2. Методика визначення ресвератролу у зразку.

Визначення вмісту ресвератролу в об'єкті дослідження проводили методом стандартних добавок. Для цього попередньо готували розчин стандарту ( $C_T=1000$  мг/л) і відбирали по 1 мл у мірну колбу на 10 мл та доводили до мітки деіонізованою водою. З приготовленого розчину стандарту відбирали 100 мкл у мірну колбу на 10 мл і доводили до риски розчином зразка з попередньо встановленим рН=5,0. Отриману суміш стандарту та зразка, фільтрували крізь мембранний фільтр і переносили у віялу. Хроматографували отриманий розчин та розчин зразка, розраховували вміст (в мг/мл) ресвератролу в пробі за формулою:

$$\frac{S_a}{C_a \cdot \left(\frac{V_o}{V_k}\right)} = \frac{S_{a.d}}{C_a \cdot \left(\frac{V_o}{V_k}\right) + C_c \cdot \left(\frac{V_c}{V_k}\right)}$$

де  $S_a$  – аналітичний сигнал, площа піку,  $\text{мм}^2$ ;  $C_a$  – визначувана концентрація компоненту, мг/мл;  $V_o$  - початковий об'єм проби, мл;  $V_c$  - об'єм стандартного розчину добавки, мл з концентрацією  $C_c$ , мг/мл;  $V_k$  - кінцевий об'єм розчину проби з внесеною добавкою, мл.

### **2.4.3. Методика визначення оптимізації умов динамічного концентрування ресвератролу з стандартних розчинів та їх десорбції з фази сорбенту.**

Оптимальні умови сорбції ресвератролу з модельної суміші на поверхні модифікованого кремнезему встановлювали в динамічному режимі. Для цього через ТЕ пропускали робочі розчини зі швидкістю 1 мл/хв. Водні розчини збирали у пробірку і відбирали 1 мл у віалу для хроматографування для перевірки повноти сорбції. Ступінь адсорбції кожного аналіту розраховували за різницею його початкового та рівноважного вмісту в розчині.

З метою оптимізації умов десорбції аналіту, через ТЕ пропускали 10 мл деіонізованої води, потім пропускали певний об'єм розчину елюента з різною елююючою здатністю, елюат збирали по 1 мл та хроматографічно визначали в ньому вміст аналітів. Для елюювання використовували: 1) метанол; 2) метанольні розчини HCl (0,05-0,5%); 3) метанольні розчини оцтової кислоти (0,05-0,5%).

### РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення.

Відомо, що розділення поліфенольних сполук найчастіше проводять на модифікованих октадецильних сорбентах [28]. Тому для роботи було взято силікагель з привитими октадецилсилільними групами *Eclipse XDB-C18* (4,6 мм x 150 мм, 5 мкм), модифікований групами довголанцюгової четвертинної солі алкіламмонію ( $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС). Синтез (Рис.4.) та концентрацію закріплених груп (0,68/0,76 ммоль/г) визначали за даними елементного аналізу у попередніх дослідженнях [28-29]:

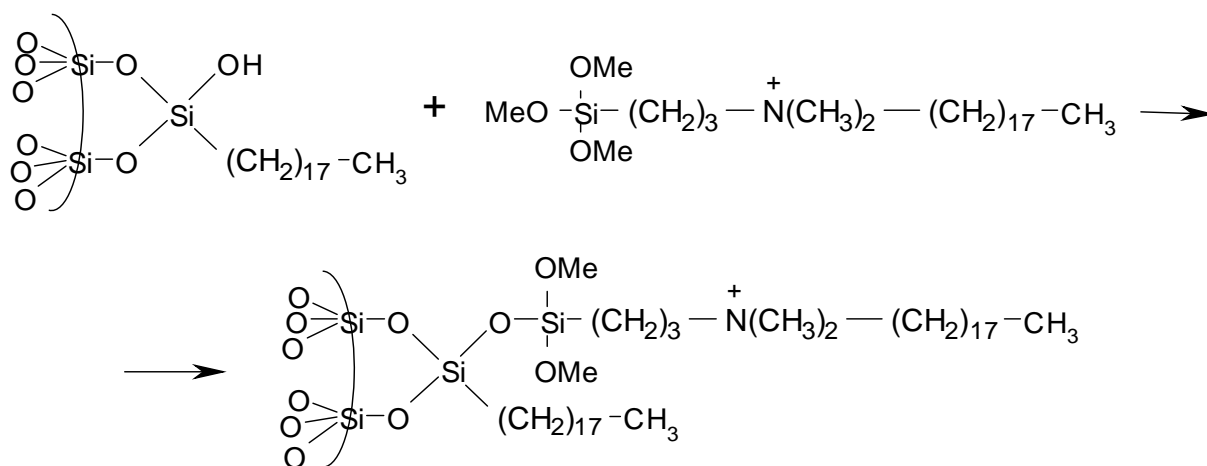


Рис 4. Синтез біфункціональної фази  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС.

#### 3.1. Вибір рухомої фази.

У якості рухомої фази використовували елюенти: А - вода, В - ацетонітрил з додаванням до них 0,1 % оцтової кислоти. Вибір ацетонітрилу в якості органічного модифікатора рухомої фази зумовлений низкою причин: розчинник доступний в чистому вигляді, володіє великою елюючою здатністю, малою в'язкістю, повністю змішується з водою, розчиняє фенольні сполуки; крім того, ацетонітрил не модифікує поверхню щеплених силікагелів, що характерно для деяких інших органічних розчинників, наприклад, ацетону. У роботі були використані підкислені елюенти з метою поліпшення хроматографічного розділення піків і подовження термінів

служби хроматографічних колонок при аналізі складних сумішей фенольних сполук.

### 3.2. Підбір оптимальних умов елюювання.

Оптимальні умови елюювання підбирали на стандартному розчині ( п.2.1.). Параметри апробованих градієнтних режимів наведені у таблицях 2 та 3:

Таблиця 2. Параметри використаних градієнтних режимів.

Параметри градієнтного режиму 1		Параметри градієнтного режиму 2	
Час (хв.)	%В	Час (хв.)	%В
0	0	0	10
7	10	5	30
9	30	7	30
11	30	8	10
13	10		

Таблиця 3. Експериментальні параметри хроматографічної системи.

Введення проби:	2 мкл
Швидкість потоку:	2 мл/хв
Склад елюенту:	Елюент А: вода (0,1% ацетатної кислоти) Елюент В: ацетонітрил (0,1% ацетатної кислоти)
Т колонки:	30°C
Детектування ресвератролу	305 нм, 355 нм, 369 нм.

На Рис. 5. представлено хроматограми модельного розчину в градієнтному режимі 1 та, відповідно, режимі 2, при довжині хвилі 305, 355

та 369 нм. З наведених хроматограм можна зробити висновок, що більш оптимальним для градієнтного елюювання є режим 2 та детектування при 305 нм:

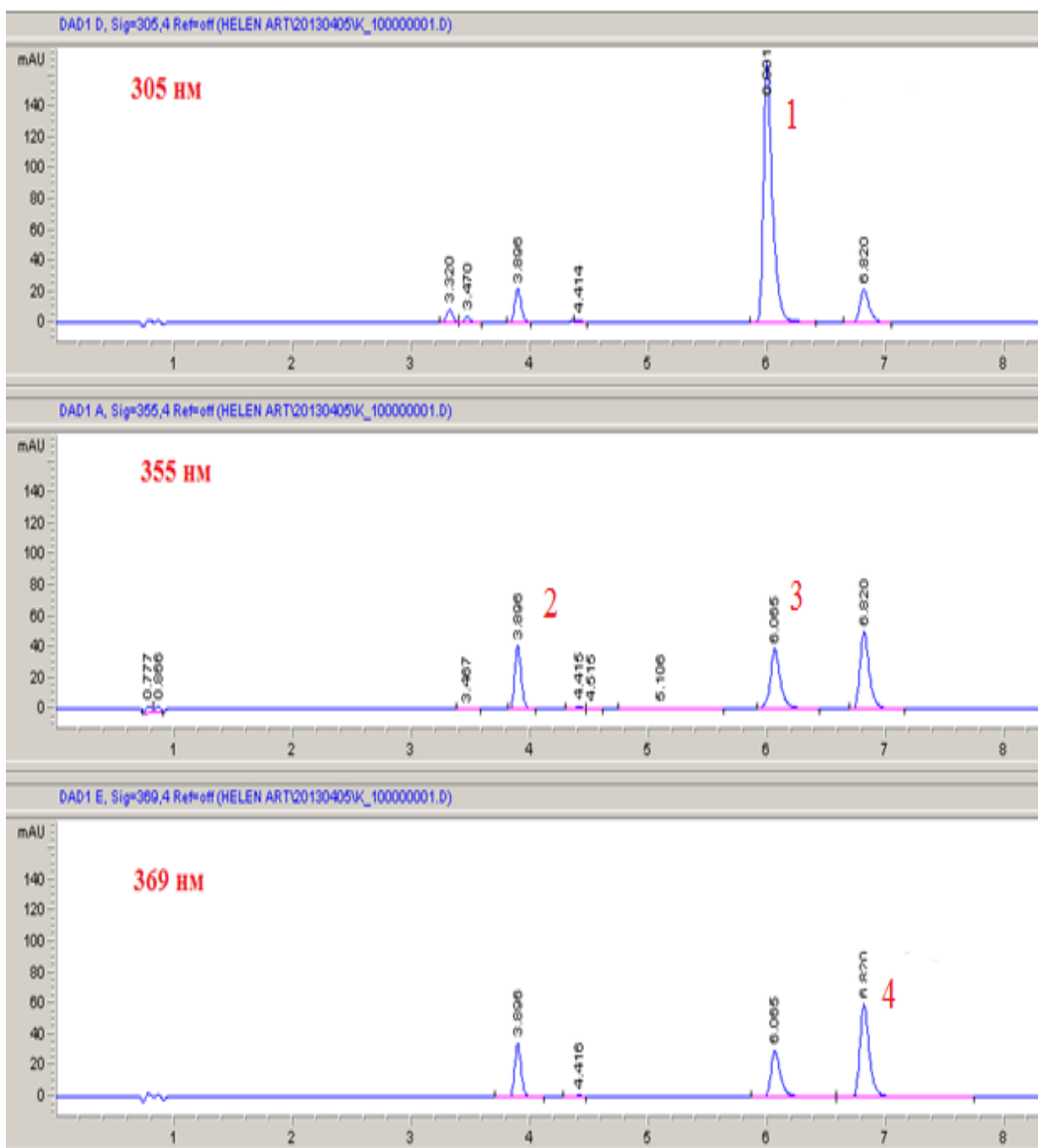


Рис.5.Хроматограми розділення аналітів стандартної суміші ( $C_0 = 100$  мг/л) на колонці *Eclipse XDB-C18* в градієнтному режимі 2, 1- ресвератрол, 2- рутин, 3– морин, 4 – кверцетин при різних довжинах хвиль детектування: 305 нм, 355 нм, 369 нм, введення проби: 2 мкл, швидкість потоку 2 мл/хв.

Порівняння ефективності розділення сполук модельної суміші, отриманої на хроматографічній колонці *Eclipse XDB-C18* (4,6 мм x150 мм, 5 мкм) при різних градієнтах свідчить, що обраний градієнтний режим 2 дозволяє скоротити час проведення аналізу, не погіршуючи при цьому параметри розділення.

### 3.3. Вплив складу розчинників.

Було досліджено вплив складу розчинників, а саме співвідношення метанол: вода, на час утримування ресвератролу. Результати досліджень представлено у Таблиці 4. Дані таблиці свідчать про зменшення часу утримування ресвератролу по мірі зменшення частки води і збільшення частки метанолу у зразку. Це можна пояснити тим, що метанол є модифікатором, який володіє більшою елююючою силою, за рахунок чого і зменшується час утримування ресвератролу.

Таблиця 4. Часи утримування ресвератролу, отримані при різних співвідношеннях розчинників.

	Співвідношення розчинників	$t_R$ , хв.
ресвератрол	4 H <sub>2</sub> O : 1 MeOH	10,834
	1 H <sub>2</sub> O : 1 MeOH	10,830
	MeOH	10,824

### 3.4. Визначення кореляційних залежностей між концентрацією фенольних сполук та хроматографічними параметрами (побудова градуовального графіка).



Для визначення кореляційної залежності між концентрацією фенольних сполук та площею під піком аналітичного сигналу готували серію розчинів в діапазоні концентрацій 50 – 200 мг/л: в промаркіровані хроматографічні віали відбирали 100,0; 200,0; 400,0 мкл вихідного розчину ресвератролу ( $C_T=500$  мг/л) і розбавляли до 1000 мкл метанолом. Концентраційний вміст кожного аналіту визначали хроматографічно. За результатами вимірювань будували залежність  $S, \text{ mAU} \cdot \text{s} - C_{(\text{фенолу})}, \text{ мг/л}$ . Нижче наведено градувальний графік (Рис.6) та параметри лінійності:

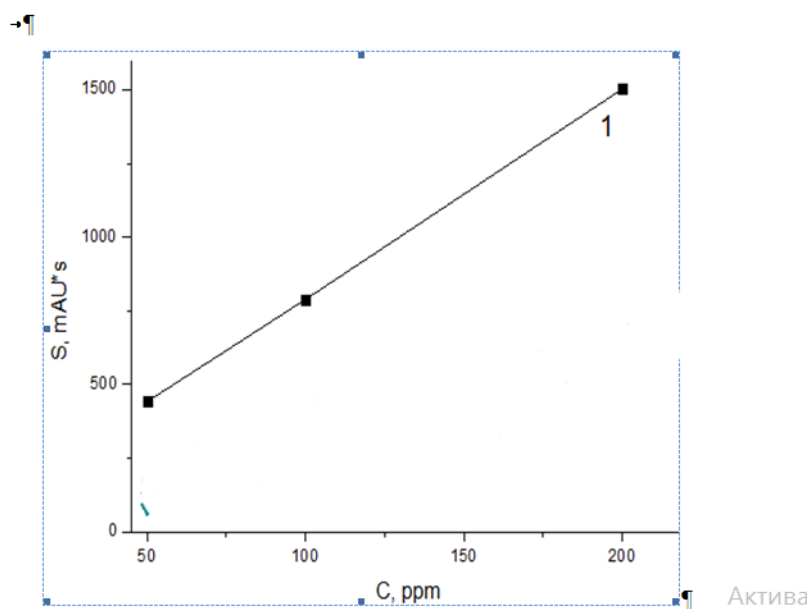


Рис.6. Залежність площі під піком від концентрації ресвератролу (1),:  $\lambda = 305$  нм (1).

Як видно з Рис. 6. графік лінійний в усьому діапазоні. Для визначуваних сполук розраховані наступні градувальні залежності, які відповідають вимогам ДФУ:

$$S, = (14,1 \pm 1,5) + (7,05 \pm 0,89) * C_{\text{мг/л}}; \text{ або у нормалізованій системі координат}$$

$$y = (14,1 \pm 1,5) + (7,05 \pm 0,89) \cdot x$$

$$MB = 0,63 \text{ мг/л}$$

$$R^2 = 0,9998; n = 3.$$

### 3.5. Дослідження стабільності розчинів ресвератролу у часі.

Було досліджено стабільність розчинів ресвератролу з часом зберігання. Результати досліджень наведено у Таблиці 5.

Таблиця 5. Зміна оптичної густини в розчинах ресвератролу від тривалості зберігання розчину:  $C_0 = 4,1$  мг/л, довжина хвилі 305 нм.

$N_{п/п}$	Тривалість зберігання розчину, днів	Оптична густина розчину, 305 нм
1	5	0,36
2	13	0,365
3	21	0,365
4	27	0,37

Результати Таблиці 5 свідчать, що максимум поглинання для ресвератролу при 305 нм залишається практично сталим. Це ще раз підтвердило використати дану довжину хвилі для подальшого спектрофотометричного детектування розчинів ресвератролу.

### 3.6. Дослідження сорбційних характеристик $SiO_2-C_{18}/ЧАСв$ динамічних умовах.

Динамічну сорбційну ємність сорбенту  $SiO_2-C_{18}/ЧАС$  по відношенню до ресвератролу досліджували при рН=2,3 (№1); рН=5,4 (№2); рН=6,5 (№3) та рН=7,3 (№4) для вибору оптимальної кислотності сорбції:

## Експериментальні умови досліджень ефективності ТЕ

Аналіт	Твердофазний екстрагент
	SiO <sub>2</sub> -C <sub>18</sub> /ЧАС
Умови сорбції	
Ресвератрол	№1. pH=2,3
	№2. pH=5,4
	№3. pH=6,5
	№4. pH=7,3
Умови десорбції	
Ресвератрол	CH <sub>3</sub> OH + 0-0,5% HCl (1-5 мл)
	CH <sub>3</sub> OH + 0,05-05 % CH <sub>3</sub> COOH (1-5 мл)

Оскільки ми приділяли увагу дослідженню умов концентрування ресвератролу, На Рис. 7 наведені криві повної динамічної ємності досліджених ТЕ до ресвератролу при різних значеннях кислотності середовища.

Як видно з Рис.7. найбільші значення повної динамічної ємності SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС по відношенню до ресвератролу (45 мкмоль/г) отримуємо при використанні розчинів ресвератролу з pH=5,4. Тому оптимальним для ТЕ ресвератролу SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС було обране pH=5,0, яке створювали ацетатним буфером.

На Рис. 8. представлено залежність ступеня вилучення водно-метанольних розчинів ресвератролу на SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС від кислотності розчинів. Як бачимо. ступінь вилучення ресвератролу SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС становить більше 95% практично для всього інтервалу кислотності.

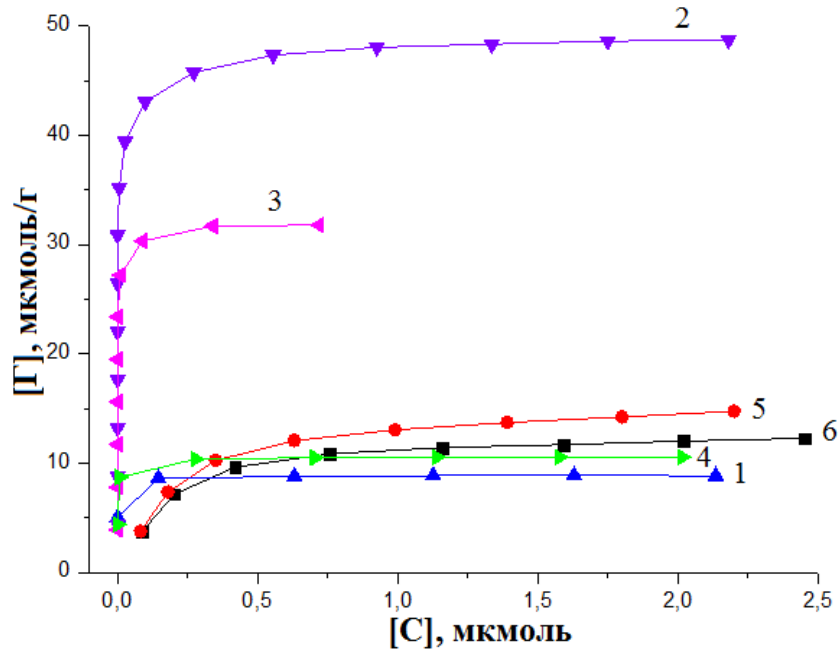


Рис.7. Криві повної динамічної ємності  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$  (1-4) та  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$  (5,6) для ресвератролу з розчинів із  $\text{pH} = 2,2\text{-}2,3$  (1,4);  $5,3$  (2,6);  $6,5$  (3),  $7,3$  (4,5).  $C_0 = 100$  (1-4),  $21$  мг/л (5,6),  $m(\text{сорб.}) = 0,10$  г,  $T = 20^\circ\text{C}$ .

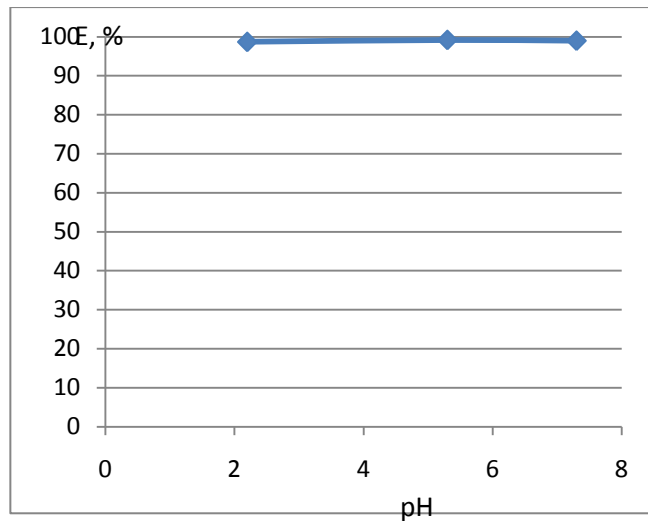


Рис.8. Залежність ступеня сорбції ресвератролу на поверхні сорбенту від кислотності розчину;  $C_0 = 5$  мг/л (1),  $50$  мг/л (2),  $m(\text{сорб.}) = 0,10$  г,  $V = 10$  мл,  $V_{\text{ельюату}} = 5$  мл,

Тому, для подальших досліджень з метою ефективного вилучення та концентрування ресвератролу проводили твердофазну екстракцію в оптимальних умовах при  $pH=5,0$ .

### 3.7. Оптимізація умов десорбції ресвератролу.

В якості елюенту, для десорбції ресвератролу з поверхні  $SiO_2-C_{18}/ЧАС$  використовували метанольні розчини, які були підкислені розчинами хлоридної чи оцтової кислот.

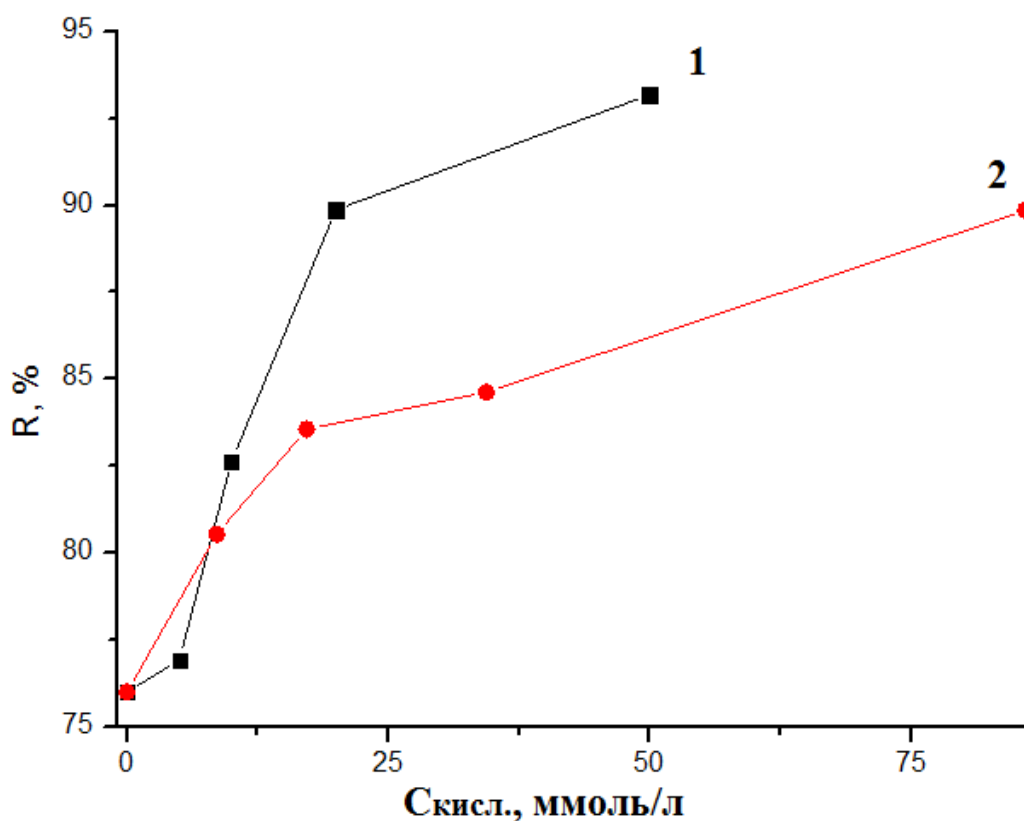


Рис.9. Криві залежності ступеня елюювання ресвератролу з поверхні сорбенту  $SiO_2-C_{18}/ЧАС$  від концентрації доданої кислоти до метанольного розчину елюенту: хлоридної (1) та оцтової (2);  $C_0=10$  мг/л,  $m(\text{сорб.})=0,10$  г,  $pH_{\text{рівн.}}=5,3$ ,  $V_{\text{р-ну}}=5$  мл,  $V_{\text{ел.}}=1$  мл.

На Рис.9. наведено результати досліджень умов десорбції ресвератролу з поверхні  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС в залежності від вмісту хлоридної та оцтової кислот в елюенті.

Також було досліджено вплив об'єму досліджуваного розчину на ступінь вилучення ресвератролу. Результати досліджень наведено на Рис. 10, з яких видно, що для повного (>95%) концентрування та вилучення ресвератролу краще використовувати об'єм не більший за 25 мл:

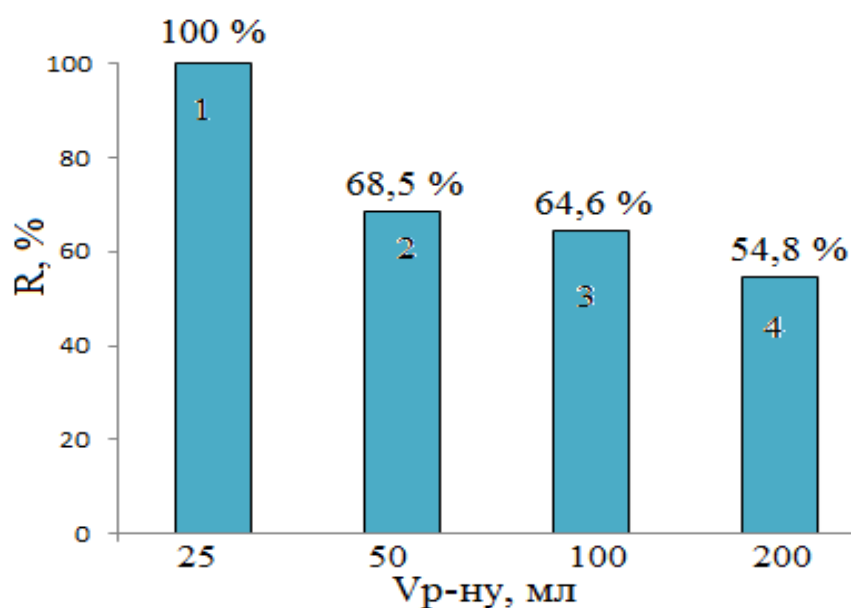


Рис. 10. Залежність впливу об'єму розчину на ступінь вилучення ресвератролу  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС:  $C_0=10$  мг/л,  $m(\text{сорб.})=0,10$  г,  $\text{pH}_{\text{сорб.}}=5,3$ ,  $V_{p-ну}$ : 25мл (1), 50мл (2), 100мл (3), 200 (4) мл.

### 3.8. Визначення ресвератролу в об'єкті дослідження.

Для дослідження були обрані наступні вихідні умови: об'єм розчину для аналізу 10 мл, об'єм елюенту – 1 мл, аліквота для введення в хроматограф – 2 мкл. Визначення проводили методом абсолютного калібрування і концентрацію діючої речовини встановлювали за градувальним графіком. Нижче наведено (Табл.6) кількісне визначення

ресвератролу у дослідженому зразку та для наочності у Додатку 2 представлена хроматограма кількісного визначення проби № 1:

Таблиця 6. Кількісне визначення ресвератролу у зразку дослідження.

№ проби	Концентрація діючої речовини у зразку, мг (враховуючи розведення)
1	45,96
2	46,01
3	46,03
RSD, %	0,078
дисперсія $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{v}$	0,0013
довірчий інтервал $\bar{x} \pm t_{p,v} \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm \Delta_{\bar{x}}$	46,00 ± 0,09
відносна похибка середнього значення: $\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\%$	0,19%
оцінка збіжності	$ x_1 - x_n  < L(P, n) \cdot s$ 46,03 – 45,96 < 3,31 · 0,036 0,07 < 0,12

Згідно [30-32], результати можна вважати збіжними.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що сорбент  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС кількісно вилучає ресвератрол при  $\text{pH}=5,0$ . Найбільш придатним елюентом для десорбції ресвератролу в умовах, що забезпечують інтеграцію запропонованого підходу з ВЕРХ визначенням сполук в елюаті є 0,5% метанольний розчин соляної кислоти.
2. В оптимальних умовах методом ВЕРХ показано можливість використання  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ /ЧАС для твердофазної екстракції ресвератролу. Умови ОФ-ВЕРХ у порівнянні з іншими дають можливість більш швидко визначити ресвератрол (за 8 хв).
3. Проведено часткову валідацію методики за лінійністю, специфічністю, збіжністю.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. // *J. Nutr. Biochem.* – 2002. - № 13. – P. 572-584.
2. Ревина А.А., Ларионов О.Г., Кочетова М.В., Луцик Т.К., Эль-Регистан Г.И. ВЕРХ ряду фенольных и полифенольных сполук. // *Вісник. АН. Сер. хім.* – 2003. - № 11 – С. 2257.
3. Kochetova. M.V., Semenistaya E.N., Larionov O.G., Revina A.A. Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques. // *Russ.Chem.Rev.* – 2007. – № 76 – 79-90 P.
4. Middleton Jr.E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. // *Pharmacol. Rev.* – 2000 - V.52, № 4 – P. 673-751.
5. H.Nishino, M.Murakoshi, X.Y.Mou, S.Wada, M.Masuda, Y.Ohsaka, Y.Satomi, K.Jinno. Cancer prevention by phytochemicals. // *Oncology* – 2005. - № 69 – P. 38-40.
6. Diaz M.N., Frei B., Vita J.A., Keaney J.F. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. // *New Engl. J. Med.* – 1997. - V.337. – P. 408-416.
7. Joshipura K.J., Hu F.B., Manson J.E., Stampfer M.J., Rimm E.B., Speizer F.E., Colditz G., Ascherio A., Rosner B., Spiegelman D., Willett W.C. The Effect of Fruit and Vegetable Intake on Risk for Coronary Heart Disease. // *Ann. Intern. Med.*, - 2001. – V.134, № 12. – P. 1106-1114.
8. Hassan-Khabbar S, Cottart CH, Wendum D, Vibert F, Clot JP, Savouret JF, Conti M, Nivet-Antoine V. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. // *Liver Transplant.* – 2008. – V.14, № 4. – P. 451-459.

9. Finke M., Muth G., Reichhelm T., Thoma M., Duchene M., Hungerer K.D., Domdey H., B.U. von Specht. Protection of immunosuppressed mice against infection with *Pseudomonas aeruginosa* by recombinant *P. aeruginosa* lipoprotein I and lipoprotein I-specific monoclonal antibodies. // *Infect. Immun.* – 1991. - V.59, №4. - P. 1251–1254.
10. Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. // *J Leukoc Biol.* – 2004. - V.75, №6. - P.1156-1165.
11. Yanagida N., Irie T., Tanaka E., Teramoto C., Kuwabara K., & Tajimi A. New choke diseases and their molecular phylogenetic analysis in *Agropyronciliare* var. *minus* and *Agropyronciliare* var. *transiens*. // *Mycologia.* – 2005. - V.97. – P. 1287-1291.
12. Asenstorfer R.E., Wang Y., Mares D.J. Chemical structure of flavonoid compounds in wheat (*Triticum aestivum* L.) flour that contribute to the yellow colour of Asian alkaline noodles. // *J. Cereal Sci.* – 2006. - V43, №1. - P. 108-119.
13. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. // *Rev Food Sci Nutr.* – 2006. - V46, №2. - P. 101-123.
14. Arlorio M., Coi'sson J.D., Travaglia F., Varsaldi F., Miglio G., Lombardi G., Martelli A. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from Theobromine cacao hulls extracted with super critical CO<sub>2</sub>. // *Food Res. Int.* – 2005. – V38, №8. - P. a1009-1014.
15. Ruidavets J.-B, Teissedre P.-L., Ferrieres J., Carando S., Bougard G., Cabanis J.-C. Catechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine. – 2000. – V153, №1. - P. 107-117.
16. Tsanova-Savova S, Ribarova F, Gerova M. (+)- and (-)- Epicatechin in Bulgarian Fruits. // *Journal of Food Composition and Analysis.* – 2005. – V.18. – P. 691-698.

17. Зиятдинова, Г.К. Г.К. Будников. Визначення флавонолів в фармпрепаратах методом вольтамперометрії// Хим.-фарм. журн.- 2005.- Т.39, № 10.- С.54-56.
18. Бельтюкова С.В., Бычкова А.А. Сорбційно-люмінесцентне визначення кверцетина в лікарських рослинах. – праці Одеського політехнічного університету. //Одеса- 2008. - №2. - С. 242-246.
19. JuanJuanRen, HaiYanLiu, YuHongHao, PinGangHe, YuZhi Fang. Determination of resveratrol in red wine by solidphase extraction-flow injection chemiluminescence method. //ChineseChemicalLetters. - 2007. - V.18,№ 8. - P. 985–988.
20. Основи аналітичної хімії. Під редакцією В.М.Зайцева.
- 21.Слепченко Т.Б. Контроль якості біологічно активних добавок методами вольтамперометрії. Визначення вітамінів В1, В2, С, Е. і кверцетина // Хим.-фарм. Журн., - 2005. – Т. 39, № 3. – С.54-56.
22. Makhotkina O., Kilmartin P.A. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. // AnalyticaChimicaActa. – 2010. – V.668.- P. 155–165.
23. Hongfang Zhang, Lifeng Xu, Jianbin Zheng. Anodic voltammetric behavior of resveratrol and its electroanalytical determination in pharmaceutical dosage form and urine. //Talanta. - 2007. – V.71 - P.19-24.
24. Zielinska D., Nagels L., Piskula M.K.Determination of quercetin and its glucosides in onion by electrochemical methods. // Analytica Chimica Acta. – 2008. – V.617.- P.22-31.
- 25.Абдуллабекова В.Н. Идентификация рутина в растительном сырье методом капиллярного электрофореза/ В.Н. Абдуллабекова// Вестник фармации. – 2009. – №3. – С.23-28.
26. Кочетова М.В., Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Ревина А.А. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных

об'єктах методами хроматографії.// Успехи химии. –2007. - Т.76,№1. – С.89-100.

27. Халаф В.А., Зайцев В.М. Пробовідбір та пробопідготовка в хроматографії: навч. посіб. для студ. Вищ. навч. закл. – К.: Вид-во – 2010 – 280 с.

28. Зайцев В. М., Халаф В. А., Зайцева Г. М. Методи концентрування та визначення фенольних сполук. // Методы и объекты химического анализа. - 2008. – 4-21 с.

29. Зайцев В. Н. Комплексообразующие кремнеземы: синтез, строение привитого слоя и химия поверхности. // Харьков: Фолио, 1997. - 240 с.

30. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.

31. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.

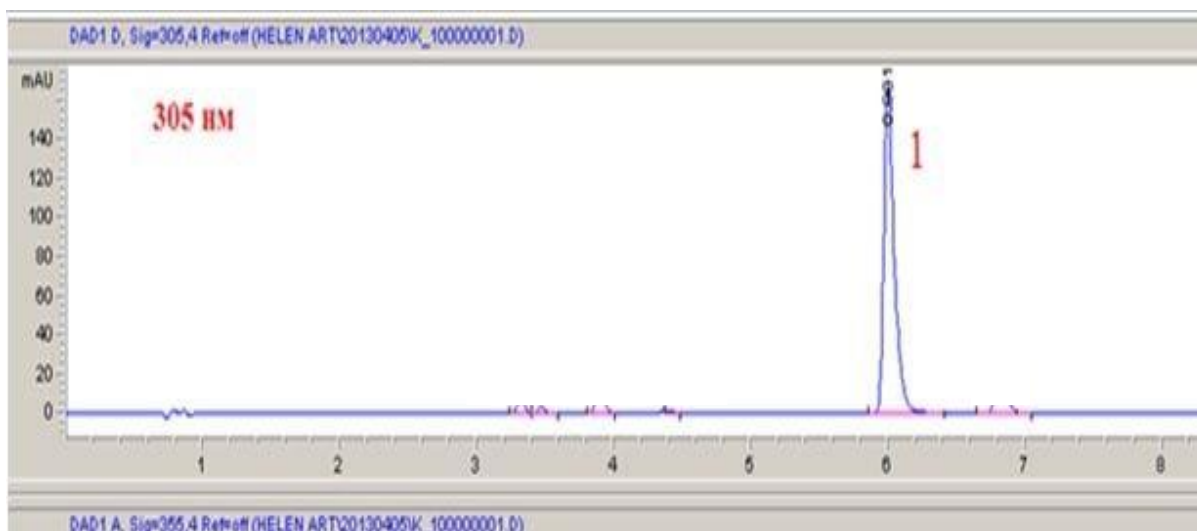
32. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. Фармацевтичний часопис. 2007. №2. С.13 – 18.

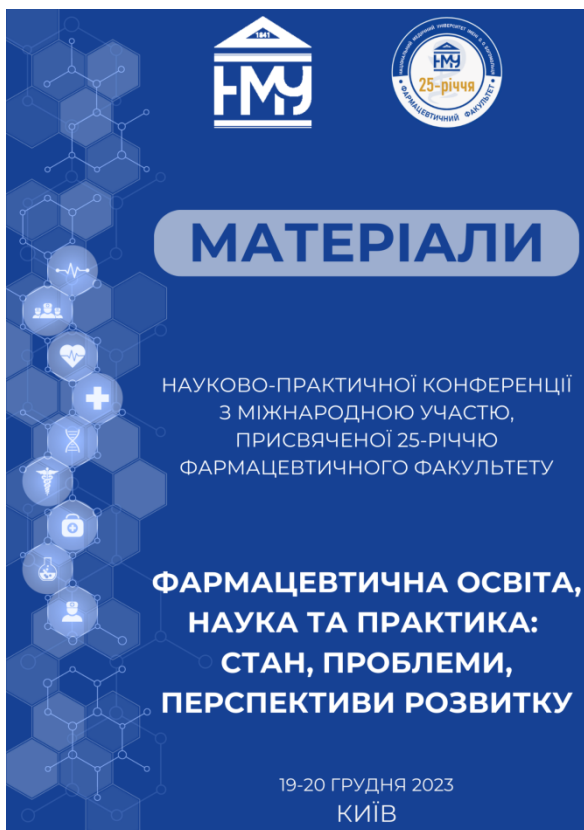
ДОДАТОК 1 Рідинний хроматограф серії *Agilent 1200*.



ДОДАТОК 2.Хроматограмма кількісного визначення ресвератролу у зразку.

Об'єм розчину для аналізу 10 мл, об'єм елюенту – 1 мл, аліквота для введення в хроматограф – 2 мкл.





**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ РЕСВЕРАТРОЛУ В ДІЄТИЧНИХ ДОБАВКАХ ХРОМАТОГРАФІЧНИМ МЕТОДОМ**

Коноплицька О.П.<sup>1</sup>, Зайцева Г.М.<sup>2</sup>, Дворецька Д.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра аналітичної хімії

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

<sup>2</sup>Кафедра аналітичної, фізичної та колоїдної хімії

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця м. Київ, Україна

**Вступ.** Зважаючи на великий інтерес до біологічно-активних сполук фенольного типу, до яких відносяться і ресвератрол, розробка надійних методик визначення індивідуальних антиоксидантів набуває великого значення. Це обумовлено як різною фізіологічно дією складових рослинних екстрактів та біологічно-активних добавок, так і можливістю фальсифікації. Особливо це важливо в процесі контролю якості дієтичних добавок.

**Мета дослідження** полягала у розробці хроматографічної методики визначення ресвератролу та способу його ідентифікації.

Об'єктами дослідження обрано твердофазний екстрагент для концентрування ресвератролу з розчинів зразків перед стадією його рідинно-хроматографічного визначення - кремнезем із ковалентно-закріпленими групами довголанцюгової четвертинної солі алкіламонію (SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС) та дієтичну добавку антиоксидантної дії «Евелор» (капсули, активний інгредієнт: транс-ресвератрол 50 мг), «Agetis Supplements Ltd», Кипр, ЕС.

**Методи дослідження.** У роботі використано патрони для твердофазної екстракції (ТФЕ) фірми Agilent з фазою C<sub>18</sub> та патрони із фазою SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС, що готували шляхом заповнення стандартного пластикового картриджа водно-метанольною суспензією, яка містила 0,1 г сорбенту. Визначення ресвератролу проведено на модульному рідинному хроматографі Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США).

415

підвищення до значення меж його визначення»  
 визначення» з'єднання SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС для концентрування ресвератролу  
 відносно (SiO<sub>2</sub>-ЧАС) з вивченням його впливу на хроматографічний  
 ковалентно-закріпленим ідентифікації доводилося використовувати солі  
 ідентифікації шляхом твердофазної екстракції ресвератролу на кремнеземі із  
**Висновки:** запропоновано надійний визначення ресвератролу за способом  
 екстракції на SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС.  
 хроматографічного визначення чисел ресвератролу в одній дослідження  
 ресвератролу в різних одержках за допомогою розробленої методики.

Оптимальні умови сорбції/десорбції ресвератролу на поверхні модифікованого кремнезему SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС досліджували в динамічному режимі шляхом пропускання через патрони з ТФЕ стандартних розчинів зі швидкістю 1 мл/хв. Порції розчину на виході із патрону збирали та визначали вміст аналіту хроматографічним методом. Ступінь адсорбції ресвератролу розраховували за різницею його початкового та рівноважного вмісту в розчині після пропускання через патрон.

Ідентифікацію ресвератролу проводили методом стандартних добавок, а також за спектрами оптичного поглинання індивідуальних сполук. Довжина хвилі детектування транс-ресвератролу 305 нм.

Вихідні розчини ресвератролу (C=5000 мг/л) готували шляхом розчинення капсули стандарту транс-ресвератролу компанії «Фітопанце» (98,5 % чистоти) у 10 мл метанолу. Стандартні розчини готували змшуванням алікват вихідних розчинів та розведенням суміші метанолом. Вихідні та стандартні розчини зберігали в темному місці за температури 5 °С протягом не більше ніж 1 місяць.

**Результати.** Встановлено, що ресвератрол сорбується значно краще на сорбенті SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС, ніж на SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>. Це можна пояснити тим, що у процесі сорбції ресвератролу на SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС, приймають участь не лише гідрофобні октадецильні групи сорбенту, але й групи четвертинної амонійної солі сорбенту. Значення повної динамічної ємності SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС по відношенню до ресвератролу складає 45 мкмоль/г при рН=5,4. За цих значень рН силанольні групи SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС перебувають у молекулярному вигляді і не впливають на адсорбцію ресвератролу. Тому оптимальним для ТФЕ ресвератролу SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС є рН=5,4, яке створювали ацетатним буфером. За цих умов ступінь вилучення ресвератролу на SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ЧАС становить більше 99 %.

Показано, що ефективність твердофазної екстракції залежить від ступеня іонізації сполук, тобто від рН досліджуваного розчину. Встановлено, що із збільшенням іонізованості молекул аналіту ефективність вилучення ресвератролу зростає і досягає максимуму при рН≥5,0. А ефективність слювання зростає за умов перебування аналіту в молекулярній формі, тобто у розчинах із рН≤2,0. Кількісна десорбція ресвератролу в умовах, що забезпечують інтеграцію запропонованого підходу з ВЕРХ визначенням ресвератролу в елюаті досягається застосуванням метанольного розчину із вмістом 0,5 % хлоридної кислоти.

Для ідентифікації ресвератролу застосовано метод внутрішнього та зовнішнього стандартів (метод добавок). Встановлено, що час утримування ресвератролу в модельній суміші та в об'єктах дослідження практично однаковий. Тому, ідентифікація піків проводили шляхом порівняння спектрів поглинання чистих речовин із положенням піків стандартів в методі добавок.

Показано, що інтенсивність піків на хроматограмі зростає пропорційно збільшенню концентрації ресвератролу. Підтверджено, що час утримування ресвератролу у розчині без та з пробіондою співпадають. Це дає можливість застосувати отримані результати для кількісного визначення вмісту

416

QUANTITATION OF RESVERATROL IN DIETARY SUPPLEMENTS BY  
CHROMATOGRAPHIC METHOD

Introduction. Considering the great interest in biologically active compounds of the phenolic type, which includes resveratrol, the development of reliable methods for the determination of individual antioxidants is of great importance. This is due to both the different physiological effects of the components of plant extracts and biologically active additives, as well as the possibility of falsification. This is especially important in the quality control process of dietary supplements.

The purpose of the study was to develop a chromatographic technique for the determination of resveratrol and a method for its identification.

A solid-phase extractant for concentration of resveratrol from sample solutions before the stage of its liquid chromatographic determination - silica with covalently fixed groups of long-chain quaternary alkylammonium salt ( $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{CHAS}$ ) and dietary supplement with antioxidant action "Evelor" (capsules, active ingredient: trans-resveratrol 50 mg), Agetis Supplements Ltd, Cyprus, EU.

Research methods. Cartridges for solid-phase extraction (SFE) from Agilent with the  $\text{C}_{18}$  phase and cartridges with the  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{CHAS}$  phase were used in the work, prepared by filling a standard plastic cartridge with a water-methanol suspension containing 0.1 g of sorbent. Determination of resveratrol was carried out on a modular liquid chromatograph Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, USA).

The optimal conditions of sorption/desorption of resveratrol on the surface of modified silica  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{CHAS}$  were studied in dynamic mode by passing standard solutions through TFE cartridges at a rate of 1 ml/min. Portions of the solution at the exit from the cartridge were collected and the analyte content determined by the chromatographic method. The degree of adsorption of resveratrol was



calculated by the difference between its initial and equilibrium content in the solution after passing through the cartridge.

Identification of resveratrol was carried out by the method of standard additions, as well as by optical absorption spectra of individual compounds. The detection wavelength of trans-resveratrol is 305 nm.

The initial solution of resveratrol (St=5000 mg/l) was prepared by dissolving a capsule of trans-resveratrol standard of the company "Fitopanaceya" (98.5% purity) in 10 ml of methanol. Standard solutions were prepared by mixing aliquots of the original solutions and diluting the mixture with methanol. The starting and standard solutions were stored in a dark place at a temperature of 50C for no more than 1 month.

Research results. It was established that resveratrol is sorbed much better on SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/CHAS sorbent than on SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>. This can be explained by the fact that in the process of sorption of resveratrol on SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/CHAS, not only the hydrophobic octadecyl groups of the sorbent, but also the quaternary ammonium salt groups of the sorbent take part. The value of the full dynamic capacity of SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ CHAS in relation to resveratrol is 45 μmol/g at pH=5.4. At these pH values, the silanol groups of SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/CHAS are in molecular form and do not affect the adsorption of resveratrol. Therefore, the optimal pH for TFE of resveratrol SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/CHAS is 5.4, which was created with an acetate buffer. Under these conditions, the degree of extraction of resveratrol on SiO<sub>2</sub>-C<sub>18</sub>/ CHAS is more than 99%.

It is shown that the efficiency of solid-phase extraction depends on the degree of ionization of compounds, that is, on the pH of the investigated solution. It was established that with increasing ionization of the analyte molecules, the efficiency of resveratrol extraction increases and reaches a maximum at pH≥5.0. And the efficiency of elution increases if the analyte is in molecular form, i.e. in solutions with pH ≤ 2.0. Quantitative desorption of resveratrol under conditions that ensure the integration of the proposed approach with HPLC determination of resveratrol

in the eluate is achieved using a methanol solution containing 0.5% hydrochloric acid.

The method of internal and external standards (additive method) was used to identify resveratrol. It was established that the retention time of resveratrol in the model mixture and in the research objects is practically the same. Therefore, the identification of the peaks was carried out by comparing the absorption spectra of pure substances with the position of the peaks of the standards in the additive method.

It is shown that the intensity of the peaks on the chromatogram increases in proportion to the increase in the concentration of resveratrol. It has been confirmed that the retention time of resveratrol in the solution without and with sample preparation coincides. This made it possible to apply the obtained results for quantitative determination of resveratrol content in real objects using the additive method. The result of the chromatographic determination of the content of resveratrol in the research object is  $46 \pm 0.09$  mg.

Conclusions. A methodology for the determination of resveratrol and a method of identification by solid-phase extraction of resveratrol on silica with covalently attached groups of long-chain quaternary alkylammonium salt ( $\text{SiO}_2\text{-CHAS}$ ) followed by its liquid chromatographic determination are proposed. The use of  $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{CHAS}$  to concentrate resveratrol leads to a decrease in its detection limit.