

NGHIÊN CỨU ĐỊNH LƯỢNG TRANS-RESVERATROL TRONG NHO VÀ MỘT SỐ SẢN PHẨM TỪ NHO BẰNG HPLC-PDA

• Trần Thị Trúc Thanh*¹ • Trịnh Thị Thùy Linh²

¹ Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

² Công ty Roche

TÓM TẮT

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) thuộc nhóm polyphenol stilbenoids, sở hữu hai vòng phenol liên kết với nhau bằng một cầu ethylene). Polyphenol tự nhiên này đã được phát hiện trong hơn 70 loài thực vật, đặc biệt là trong vỏ và hạt nho và được tìm thấy với số lượng riêng biệt trong rượu vang đỏ và các loại thực phẩm khác nhau của con người. Renaud và De Lorgeril là những người đầu tiên đánh giá mối liên hệ các polyphenol trong rượu vang như resveratrol, với các lợi ích sức khỏe tiềm năng do uống rượu vang thường xuyên và vừa phải (được gọi là “Nghịch lý Pháp”). Phương pháp định lượng resveratrol được xây dựng sau khi khảo sát dung môi chiết, phương pháp chiết từ các nguồn nguyên liệu khác nhau. Sau khi chiết xuất, resveratrol bằng methanol 80%, mẫu được định lượng bằng HPLC với detector PDA. Hàm lượng trans-resveratrol trung bình trong 14 loại rượu khảo sát có giá trị từ 0.1 mg/L đến 1 mg/L, chỉ có mẫu rượu Tuilerie d'aiguepierce Montagne - St - Emilion của Pháp có hàm lượng cao hơn hẳn (5.5275 mg/L), dâu tằm 0.4224mg/100g. Phương pháp được thẩm định với RSD <2%, phương trình hồi quy $y = 136254x$ tương thích và có sự tương quan tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát, độ phục hồi từ 97.53% - 100.10% (80 - 110%).

Từ khóa: *trans – resveratrol, HPLC - PDA, dung môi chiết, pha tĩnh, pha động*

ANALYSIS OF TRANS - RESVERATROL IN GRAPES AND GRAPE PRODUCTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

• Tran Thi Truc Thanh* • Trinh Thi Thuy Linh

ABSTRACT

Resveratrol is a stilbenoids, which consists of two phenolic rings bonded together by a double styrene bond. This natural polyphenol was discovered in more than 70 species of plants, especially in the skin and seed of grapes. Moreover, resveratrol was also found in red wine and various types of food. Renaud and De Lorgeril are the first researchers who evaluated the correlation between red wine polyphenols and human health benefits. This correlation was known as the French Paradox, which was discovered when people consumed regular and moderate red wine. The resveratrol quantitative method was developed when investigating extraction solvents and methods from different materials sources. After extraction with methanol 80%, the sample of resveratrol was measured by HPLC with a PDA detector. The results showed that the average content of trans-resveratrol in 14 red wine samples ranged from 0.1 mg/l to 1 mg/l. The French Tuilerie d'aiguepierce Montagne - St - Emilion sample had the highest content (5.5275 mg/l), followed by the mulberry wine sample (0.4224 mg/100g). The quantitative method was expertized with the RSD value below 2%. The

* Tác giả liên hệ: ThS. Trần Thị Trúc Thanh, Email: thanhttt@hiu.vn

(Ngày nhận bài: 10/10/2022; Ngày nhận bản sửa: 11/11/2022; Ngày duyệt đăng: 16/11/2022)

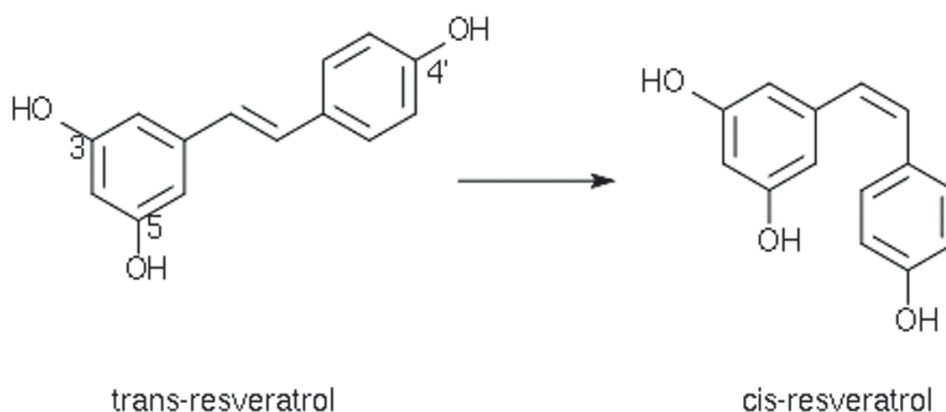
regression equation ($y = 136254x$) was compatible and had a linear correlation in the investigated concentration range. The recovery of method was ranged from 97.53% to 101.10% (80 – 110%).

Keywords: *trans - resveratrol, HPLC - PDA, extraction solvent, stationary phase, mobile phase*

1. GIỚI THIỆU

Bệnh tim mạch là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới và tại Việt Nam. Mỗi năm khoảng 200.000 người Việt chết vì bệnh tim mạch. Vấn đề điều trị và dự phòng các bệnh tim mạch đang là vấn đề quan tâm. Bên cạnh việc sử dụng thuốc, người ta có khuynh hướng lựa chọn và sử dụng nguồn thực phẩm hàng ngày để phòng tránh các biến cố về tim mạch.

Trans-resveratrol là một trong những tác nhân đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống bệnh tật, đặc biệt là phòng chống bệnh tim mạch. Là một chất chống oxy hóa được tìm thấy trong nhiều loài thực vật, ngày càng nhiều những tác dụng sinh học của trans-resveratrol đã được khám phá, phải kể đến ở đây như các tác động chống kết tập tiểu cầu, chống hình thành các mảng xơ vữa, bên cạnh đó còn có tác dụng chống ung thư, hoạt tính kháng viêm,...[1] Hiện nay người ta còn dựa vào tác động dọn dẹp các gốc tự do để sử dụng trans-resveratrol với vai trò là chất bảo quản có nguồn gốc tự nhiên [2] mang đến nhiều hiệu quả và sự tin cậy cho người tiêu dùng.



Hình 1. Công thức hóa học của *trans - resveratrol*

Trans-resveratrol, một thành phần có trong nho đỏ, đặc biệt trong rượu vang đỏ. Đây cũng chính là nguyên nhân gây nên nghịch lý tại Pháp (French Paradox) [3], người dân Pháp có tỷ lệ mắc bệnh tim mạch thấp tuy khẩu phần ăn của họ có rất nhiều chất béo do thói quen sử dụng rượu vang trong bữa ăn hàng ngày. Ở Việt Nam chúng ta hiện nay, mức sống ngày càng gia tăng, người ta cũng dần dần chuyển thói quen dùng rượu vang đỏ. Nắm bắt được nhu cầu này, các cơ sở sản xuất rượu vang trên khắp cả nước đã và đang được mở rộng. Nguồn nguyên liệu chính là nho được trồng ngay tại Việt Nam. Vấn đề đặt ra là thực sự trong nho Việt Nam có trans-resveratrol hay không, có mối quan hệ với hàm lượng trans-resveratrol trong sản phẩm rượu vang trong nước. Vì thế chúng tôi quyết định thực hiện đề tài nghiên cứu định lượng trans-resveratrol trong nho và sản phẩm từ nho ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU [4 -10]

2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị

2.1.1 Vật liệu

Rượu vang đỏ gồm có 18 loại rượu vang đỏ trên thị trường thu mua từ Đà Lạt, Phan Rang và

một số loại rượu vang nước ngoài. Trái dâu tằm Đà Lạt, vỏ và hạt nho Phan Rang.

2.1.2 Hóa chất

Chất chuẩn trans-resveratrol (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), Ether ethylic, methanol, ethyl acetat, ether dầu hỏa, ethanol 96%, n hexan tiêu chuẩn PA, methanol, acetonitril, acid acetic dùng trong HPLC (Merck và Baker), HPLC Alliance Waters 2695-PDA 2996.

2.1.3. Thiết bị

HPLC Alliance Waters 2695-PDA 2996, cân điện tử phân tích HR-200, máy cô quay chân không R-210S (Buchi), bếp cách thủy Memmert WB-14, tủ sấy Memmert WM500 CO, bể siêu âm Elma- Đức, đèn UV Vilber Lourmat.

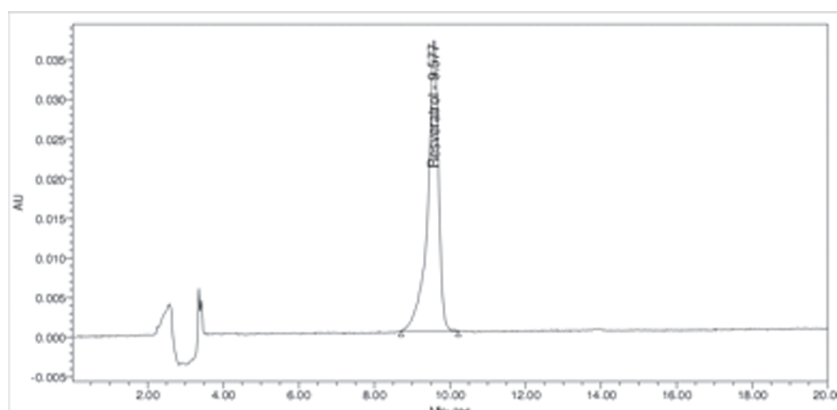
2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chiết trans-resveratrol từ các nguồn nguyên liệu

Các nguyên liệu được ngâm kiệt bằng ethanol, methanol. Dịch chiết cô, lắc với dung môi hữu cơ có độ phân cực khác nhau. Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng để xác định trans – resveratrol.

2.2.2. Thăm dò điều kiện phân tích trans-resveratrol bằng HPLC-PDA

Thăm dò trên 3 cột: Phenomenex Luna 5 μ m C18 (250x4.6x5 μ m), Symmetry C18 3.5 μ m (4.6x75mm), Eurospher 100-5- C8 (250 x 4.6 x 5 μ m). Tốc độ dòng từ 0,5 mL – 1 mL, thể tích bơm mẫu 10 – 20 mL. Pha động khảo sát: acetonitrile, methanol, nước.



2.2.3. Định lượng trans-resveratrol bằng HPLC – PDA

Thăm định quy trình phân tích

Mẫu chuẩn nồng độ 5 mg/L pha trong methanol. Tiến hành bơm 6 lần liên tiếp mẫu chuẩn nồng độ 5 mg/L. Tính giá trị trung bình, SD, RSD của các thông số để xác định tính tương thích hệ thống. Tính tuyến tính thực hiện với gam chuẩn 0,1 – 10 mg/L, xây dựng phương trình hồi quy. Độ đúng bị ảnh hưởng bởi sai số hệ thống và được biểu thị bằng tỷ lệ hồi phục (%) của các giá trị tìm thấy với giá trị thực thêm vào mẫu thử với tỷ lệ 80%.100% và 120%.

Định lượng trans – resveratrol

Chuẩn trans-resveratrol được pha trong methanol. Mẫu cần ether được hòa tan trong methanol, Lọc dung dịch chuẩn và dung dịch thử qua màng lọc 0.45 μ m. Tiến hành định lượng bằng HPLC và tính toán kết quả.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thăm định phương pháp

- Tính tương thích hệ thống

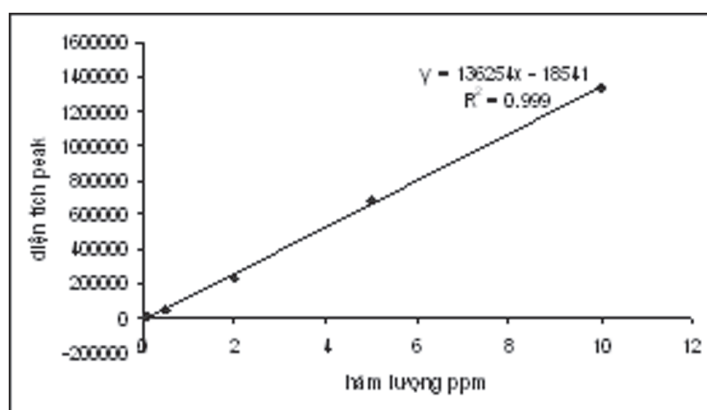
Bảng 1. Kết quả tính tương thích hệ thống

Lần tiêm mẫu	t _R (phút)	Diện tích đỉnh	K'	A _s
1	9.577	732663	5.8405	0.7526
2	9.658	730775	5.8986	0.7823
3	9.663	727049	5.9020	0.7860
4	9.680	729514	5.9143	0.7809
5	9.695	722506	5.9253	0.7831
6	9.694	719491	5.9242	0.7871
Trung bình	9.661	726999	5.9008	0.7787
SD	0.044	5083.78	0.0315	0.0129
RSD	0.46%	0.69%	0.53%	1.66%

- Tính tuyến tính

Bảng 2. Kết quả xây dựng đường tuyến tính trans-resveratrol

Hàm lượng trans-resveratrol (mg/L)	0.1	0.5	2	5	10
Diện tích peak	6067	48362	228968	683313	1338664



Hình 3. Đường tuyến tính và phương trình hồi quy

Bảng 3. Bảng xử lý số liệu thống kê

Hệ số tương quan	0.9990
Hệ số B ₀	136254
Giá trị t của hệ số B ₀	55.9105
Hệ số B	-18540
Giá trị t của hệ số B	-1.4963
Giá trị F	3125.9859
Phương trình hồi quy	y = 136254x

- Độ lặp lại

Bảng 4. Kết quả độ lặp lại của mẫu rượu vang

Mẫu tiêm	Mẫu rượu vang	
	S _x	Nồng độ (mg/l)
1	756342	5.5510
2	724656	5.3184
3	742773	5.4514
4	749454	5.5004
5	730804	5.3635
6	740485	5.4346
TB	740752.3	5.4366
SD		0.0857
RSD		1.58%

- Độ đúng

Bảng 5. Kết quả độ đúng trên mẫu thử rượu vang

Thêm chuẩn	Hàm lượng chuẩn thêm vào (mg/L)	Hàm lượng chuẩn tìm thấy (mg/L)	Tỉ lệ hồi phục	Tỉ lệ hồi phục trung bình
80%	2.0112	2.0288	100.87%	97.53%
	2.0112	1.9247	95.70%	
	2.0112	1.9313	96.03%	
100%	2.5140	2.4827	98.75%	100.10%
	2.5140	2.4606	97.88%	
	2.5140	2.6060	103.66%	
120%	3.0168	3.0420	100.83%	99.74%
	3.0168	2.9929	99.21%	
	3.0168	2.9919	99.17%	

(Tỉ lệ hồi phục lí thuyết là 80 – 110%)

Định lượng trans-resveratrol trong các mẫu thử

Mẫu dâu tằm

Bảng 6. Kết quả định lượng

Tên mẫu	Kí hiệu	S _x	C _x (mg/l)	P _x (mg/100g)
Dâu tằm	D	576212.3	4.228957	0.4224

Mẫu nho

- Mẫu vỏ nho và hạt nho không qua quá trình lên men

Bảng 7. Kết quả hàm lượng của Resveratrol

Tên mẫu	Kí hiệu	S _x	C _x (mg/l)	P _x (mg/100g)
Vỏ nho	Vt	180344	1.3236	0.0529
Hạt nho	Ht	1075843	7.8959	0.6314

- Mẫu vỏ nho và hạt nho qua quá trình lên men

Bảng 8. Kết quả hàm lượng của Resveratrol trong vỏ và hạt nho

Tên mẫu	Kí hiệu	S _x	C _x (mg/l)	P _x (mg/100g)
Vỏ nho 1	V1	945916	6.9423	0.2776
Hạt nho 1	H1	129417	0.9498	0.0380
Vỏ nho 2	V2	550580	4.0408	0.1615
Hạt nho 2	H2	699797	5.1360	0.8212
Vỏ nho 3	V3	35515	0.2607	0.0143
Hạt nho 3	H3	22690	0.1665	0.0067

Mẫu rượu vang

Bảng 9. Hàm lượng trans-resveratrol trong các loại rượu khảo sát

Thương hiệu rượu vang	Diện tích peak trans-resveratrol	Hàm lượng trans-resveratrol (mg/l)
Vang Đà Lạt Premium	133685	0.9614
Vang Đà Lạt Latulip	46608	0.3352
Vang Đà Lạt Cabernet Melot	108899	0.7831
Vang Đà Lạt Extra	18041	0.1297
Vang Đà Lạt Superior	67149	0.4829
Vang Château Bouscaillous	142588	1.0254
Vang đỏ Vĩnh Tiến	21569	0.1551
Vang Vĩnh Tiến Syrah	50119	0.3604
Vang ngọt Viết Nghi	38818	0.2971
Rượu vang Làng Nho	90381	0.6499
France Merlot 13%	81715	0.5876
Chevaux des Girondins	83811	0.6027
Tuileries d'aiguepierce Montagne - St - Emilion	768636	5.5275
Renmano Premium Australia	47909	0.3445

4. KẾT LUẬN

Phương pháp HPLC detector PDA với pha động MeOH - H₂O (30:70), tốc độ dòng 1 ml/phút và thể tích tiêm 20 µl trên cột Phenomenex Luna 5 µm C18 (250x4.6x5 µm) được áp dụng để định lượng trans – resveratrol trong nho, dâu tằm và một số rượu vang đã được thẩm định. Đối với nguyên liệu, mẫu được xử lý bằng MeOH và ethyl acetat, rượu vang được phân tích trực tiếp. Phương pháp được thẩm định với tính tương thích RSD < 2%, Phương trình hồi quy $y = 136254x$ tương thích và có sự tương quan tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát, độ đúng với tỷ lệ hồi phục từ 97.53 – 100.10%. Kết quả định lượng đối với rượu vang giúp người tiêu dùng có sự chọn lựa loại rượu thích hợp có thể sử dụng như là thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Đối với nho tươi trồng tại Việt nam, xác định được có chứa thành phần trans-resveratrol, đặc biệt nhiều trong vỏ và hạt vụn nên “Ăn nho xin đừng bỏ vỏ và hạt”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Robert E. King, Joshua A. Bomser, and David B. Min, “Bioactivities of Trans-resveratrol”, *Comprehensive Food Science and Food Safety*, 5, 65-70, 2006.
- [2] Julie Chong, Anne Poutaraud, Philippe Huguency, “Metabolism and roles of stilbenes in plants”, *Plant Science*, 177, 143-155, 2009.
- [3] S. Renaud, M. De Lorgeril, “Wine, Alcohol, Platelets, and French paradox for coronary heart disease”, *The Lancet*, 339, 1523-1526, 1992.
- [4] V. Louli, N. Ragoussis, K. Magoulas, “Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products”, *Bioresouce Technology*, 92, 201-208, 2004.
- [5] Nuno Ratola, Joaquim Luis Faria and Arminda Alves, “Analysis and Quantification of trans-trans-resveratrol in wine from Alentejo Region (Portugal)”, *Food Technol. Biotechnol.*, 42(2), 125-130, 2004.
- [6] Laszlo Mark, Martin S. Pour Nikfardjam, Peter Avar, and Robert Ohmacht . A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans – resveratrol and trans – piceid in Hungarian wines, *J. Chromatographie Science*, vol.43, Oct 2005, 445 – 448
- [7] Nuno Ratola, Joaquim Luis Faria and Arminda Alves (2004), “Analysis and Quantification of trans-trans-resveratrol in wine from Alentejo Region (Portugal)”, *Food Technol. Biotechnol.*, 42(2), 125-130.
- [8] Ana I. Romero-Pérez, Rosa M. Lamuela-Raventós, Cristina Andrés-Lacueva and M. Carmen de la Torre-Boronat. Method for the Quantitative Extraction of Resveratrol and Piceid Isomers in Grape Berry Skins. Effect of Powdery Mildew on the Stilbene Content. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1, 210–215.
- [9] Navindra P. Seeram, Vishal V. Kulkarni, Subhash Padhye (2005), “Sources and Chemistry of Trans-resveratrol” (2005), *Taylor and Francis Group Chapter 2*, 17-32.
- [10] J. L. Rudoft, A. V. A. Resurreccion, F. K. Saalia, R. D. Phillips (2005), “Development of a reverse-phase high performance liquid chromatography method for trans-resveratrol in peanut kernels”, *Food Chemistry*, 89, 623-638.