

Metodă spectrofluorimetrică de determinare a vitaminei E prin extracție din ser în hexan

ANA-MARIA HOSSU^{1*}, MIHAELA ILIE², ANDREEA LETIȚIA NIȚULESCU-ARSENE², NICULINA MITREA², VASILE MAGEARU³

¹Universitatea Valahia Târgoviște, Facultatea de Științe și Arte, Bulevardul Unirii 18-22, 130082, Târgoviște, România

²Universitatea de Medicină și Farmacie "Carol Davila", Facultatea de Farmacie, Str. Traian Vuia, Nr. 6, 020956, București, România

³Universitatea din București, Facultatea de Chimie, Catedra de Chimie Analitică, Aseara Panduri, Nr. 90, 76229, București, România

Liposoluble vitamins can be assayed in biologic matrices by spectrofluorimetric methods provided they possess native fluorescence or can be readily converted to fluorophores. The paper presents a fluorimetric assay of vitamin E in calf serum by extraction with hexane. The method was developed for concentrations of vitamin E in the range 2 to 60 micrograms/mL, with excitation and emission wavelengths of 290 nm and 307 nm, respectively, by using corrected spectra for blank. The method is linear in the range 2 – 50 µg/mL, with a 0.68 µg/mL detection limit and a 2.27 µg/mL quantification limit.

Keywords: tocopherol, spectrofluorimetric assay, biological matrix

Spectrofluorimetria are multe aplicații la determinarea cantitativă a unor compuși organici sau a unor molecule de importanță biologică, cum ar fi tiamina, riboflavina, adrenalina, colesterolul, parafinele, sau a unor medicamente și droguri. Datorită specificității și sensibilității ei, fluorimetria își găsește, de asemenea, largi aplicații în enzimologie, ca, de exemplu, la determinarea activității enzimatică sau determinarea cantitativă a dehidrogenazelor [1]. Determinările fluorimetrice sunt sensibile și selective, putându-se determina concentrații de până la 10^{-10} g/mL, ceea ce corespunde unei sensibilități de 100 - 1000 ori mai mare decât cea a celor mai multe metode bazate pe absorbție moleculară.

Multe dintre vitamine posedă, datorită structurii lor aromatice care conține grupări substituente, fluorescență nativă sau pot deveni fluorofore într-o manieră simplă [1-3].

Tocopherolul prezintă fluorescență nativă atunci când este dizolvat în hexan [2], de aceea poate fi determinat în sânge și esuturi după extracția acestuia din matricea organică în hexan [1, 4, 5]. Lucrarea de față propune elaborarea unei metode de dozare fluorimetrică a vitaminei E din forme farmaceutice, în matrice similară cu cea a probelor biologice (ser, sânge total, omogenat tisular etc.), cunoscându-se rolul antioxidant pe care aceasta îl are în organism [6-8].

Deși precizia și selectivitatea de determinare din matrici biologice sunt mai mari în cazul metodelor cromatografice [9-12] sau electroforetice [13], prepararea probei se face mai ușor în cazul metodelor spectrofluorimetrice. De asemenea, este de remarcat faptul că o astfel de metodă are un preț/analiză considerabil redus față de metodele cromatografice sau de electroforeză capilară.

Partea experimentală

Reactivi: acetat de DL- α -tocopherol, substanță de referință (Merck); vitamina E (EC) capsule gelatinoase moi (Biofarm S.A. București); ser de bou (Institutul Cantacuzino); ser fiziologic; etanol (Chimopar); hexan (Merck).

Soluții utilizate: soluție acetat de DL- α -tocopherol etalon stoc -12,284 mg/mL; soluțiile de DL- α -tocopherol etalon de lucru: din prima soluție se realizează soluții diluate în

etanol, astfel încât să fie acoperit domeniul de investigat; soluția probă stoc de EC: conținutul a 5 capsule gelatinoase moi (echivalent a 1,25 g) se aduc cantitativ într-un balon cotat de 5 mL cu etanol și se omogenizează; soluția probă de lucru: din soluția probă se realizează soluții diluate în etanol pentru a acoperi domeniul de investigat. În continuare s-a lucrat conform tabelului 1.

Determinările au fost efectuate utilizând spectrofluorimetrul Perkin Elmer LS 50B, cu parametri instrumentali de bază redați în tabelul 2, precum și spectrofotometrul de absorbție UV-VIS Cary 100 Bio; graficele au fost realizate cu programul *MicroCal Origin*, versiunea 6.0.

Rezultate și discuții

Inițial am determinat lungimea de undă de excitare cea mai potrivită ca fiind maximul benzii de absorbție în UV a soluției de vitamină E în hexan (fig. 1). Acest lucru a condus la o lungime de undă de excitare de 290 nm (puțin diferită de cea indicată în literatură, de 295 nm), care apoi a fost verificată spectrofluorimetric ca fiind optimă pentru determinarea vitaminei E în hexan.

S-au trasat spectrele de emisie ale extractelor în hexan pentru seriile de etaloane preparate, pentru blank și pentru probele de EC în etanol. Se observă apariția la 316 nm a benzii Raman a solventului (hexan) care poate conduce la interferențe spectrale [1]. De aceea, spectrele au fost corectate cu proba blank (fig. 2), obținând în aceste condiții o bandă de emisie cu maxim la 307 nm, care a fost utilizat ulterior la trasarea curbelor de calibrare. Trebuie remarcat faptul că la 340 nm (lungime de undă indicată în referințele bibliografice pentru analiza vitaminei E în hexan - [1, 4, 5, 11, 12]) apare doar un umăr al benzii de emisie a vitaminei E, în timp ce banda de la 307 nm este evident o bandă analitică bună pentru dozare.

Am verificat faptul că spectrele probelor blank corespunzătoare serului fiziologic și celui de bou sunt, practic, identice în condițiile metodei, așa că în continuare am utilizat drept blank serul fiziologic.

Pe baza valorilor intensităților radiațiilor emise obținute pentru maximul de la 307 nm a fost trasată dreapta de etalonare utilizată pentru dozarea vitaminei E. Aici trebuie

* email: anahossu@yahoo.co.uk

	Blank	Etalon	Probă
Ser de bou sau ser fiziologic	100 µL	100 µL	100 µL
EC în etanol	-	-	100 µL
Etanol	100 µL	-	-
Vitamina E etalon	-	100 µL	-
Se agită ușor 15 secunde pe mixer Vortex			
Hexan	2.4 mL	2.4 mL	2.4 mL
Se agită energic 30 secunde pe mixer Vortex			
Hexan	2.4 mL	2.4 mL	2.4 mL
Se agită ușor 15 secunde pe mixer Vortex			
Se centrifughează 15 minute la 3000 rotații/minut			
Se colectează și se determină spectrofluorimetric vitamina E dintr-un aliquot de 2 mL fracție organică			

Tabelul 1
ETAPELE DE PREGĂTIRE A
BLANKULUI, ETALOANELOR ^a1 A
PROBELOR

Parametru	Absorbție UV	Fluorescență	
		Excitare	Emisie
Lungimea de undă fixă	—	290 nm	—
Fantă	2 nm	3 nm	3 nm
Domeniul înregistrat	250 – 300 nm	-	300 – 410 nm
Viteza de trasare a spectrului	600 nm/min	-	1000 nm/min

Tabelul 2
PARAMETRII INSTRUMENTALI
FOLOSITI LA TRASAREA
SPECTRELOR

menționat faptul că, în cadrul unor experimente preliminare de dozare a vitaminei E în hexan prin spectrofluorimetrie, s-a constatat că, la concentrații mai mari de 100 µg/mL, apare un fenomen de inhibiție a fluorescenței datorată concentrației (efect de cuvă internă), ceea ce ne-a determinat să alegem concentrația maximă de lucru mai mică de 100 µg/mL (fig. 3).

A fost trasată curba de etalonare a vitaminei E în n-hexan prin extracție utilizând valorile corectate ale intensității maximelor radiațiilor emise (fig. 4). Fiecare punct este media a 5 determinări independente. După cum se poate observa, intensitatea radiației emise este liniară cu concentrația de vitamină E în domeniul 2 – 50 µg/mL, cu un coeficient de corelație de 0,99526.

Pentru dozarea vitaminei E din preparatul farmaceutic EC s-au luat în lucru 5 capsule gelatinoase moi EC, cărora le-a fost extras conținutul uleios cu o seringă de 1 mL. S-a cântărit conținutul celor 5 capsule (1,25 g) și a fost adus cantitativ la balon cotat de 50 mL cu etanol. S-a obținut astfel o soluție stoc de preparat farmaceutic din care s-au efectuat soluții diluate pentru a intra în domeniul de concentrații investigat pentru vitamina E acetat.

Limitele de detecție (DL) și de cuantificare (QL) au fost determinate pe baza formulelor (1) și (2), recomandate de normele de validare ICH Q2(R1) [14]:

$$DL = \frac{3.3 \cdot \sigma_A}{B} \quad (1)$$

$$QL = \frac{10 \cdot \sigma_A}{B} \quad (2)$$

unde:

σ_A – este abaterea standard a ordonatei la origine,
B – panta dreptei de dozare.

Pe baza parametrilor calculați pentru dreapta de dozare și a formulelor (1) și (2), au fost determinate limitele de detecție și de cuantificare de 0,68 µg/mL și 2,27 µg/mL, respectiv.

Pentru determinarea concentrației vitaminei E din preparatul farmaceutic EC a fost folosită formula de calcul (3) și valorile intensității radiației emise corectate pentru probe.

$$I_{307} = 5,7633 + 9,54454 \cdot [E] \quad (3)$$

unde cu $[E]$ a fost notată concentrația de vitamină E exprimată în µg/mL.

După corecția cu factorul de diluție, s-a obținut pentru vitamina E acetat din preparatul farmaceutic EC concentrația de $133,5 \pm 0,2$ mg/capsulă de produs farmaceutic, folosind două soluții diluate ale probei din capsulă, preparate în acest scop. Coeficientul de regăsire

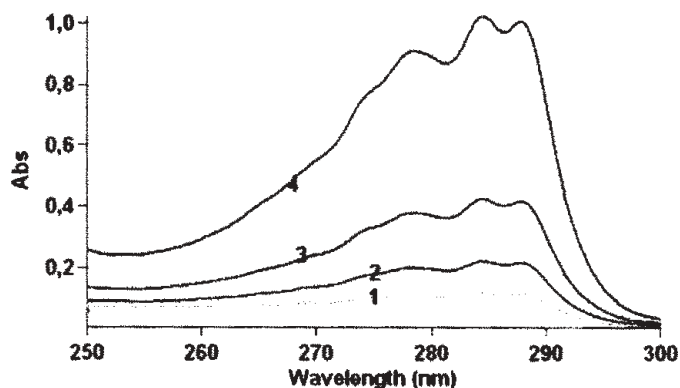


Fig. 1. Spectre de absorbție UV ale vitaminei E în hexan
(1 = 21.1 $\mu\text{g/mL}$, 2 = 42.3 $\mu\text{g/mL}$, 3 = 84.7 $\mu\text{g/mL}$,
4 = 211.9 $\mu\text{g/mL}$) bună pentru dozare.

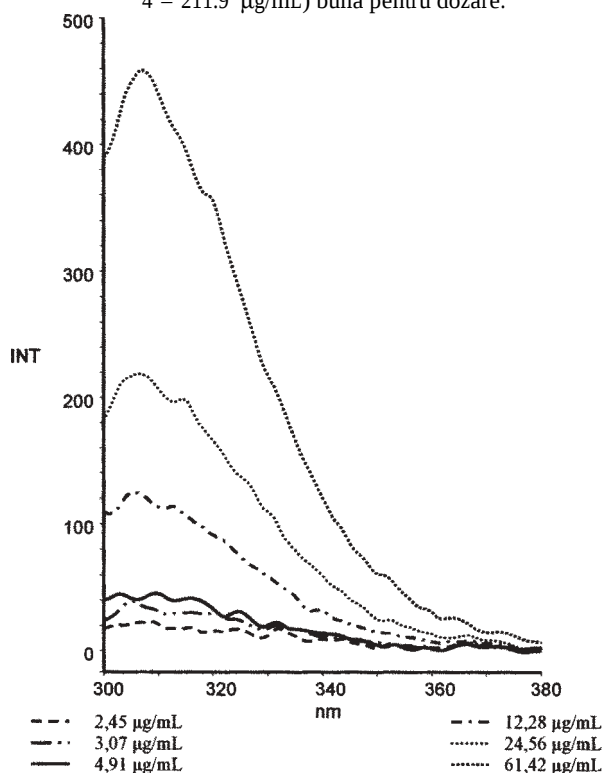


Fig. 2. Spectre de fluorescență corectate de fond, utilizate pentru dreapta de etalonare

mediu determinat a fost de 92,7%, pe baza a cinci determinări independente.

Concluzii

Metodele spectrofluorimetrice prezintă specificitate, selectivitate și limite coborâte de detecție, fiind de mare interes în determinările cantitative ale unor analizi din matrici complexe, biologice.

Lucrarea prezintă o metodă spectrofluorimetrică de dozare a vitaminei E din ser, folosind extracția acestei vitamine liposolubile în n-hexan. În acest scop, s-a elaborat un procedeu de extracție care utilizează dizolvarea în etanol, ca agent intermediar între matricea apoasă și cea organică. Determinarea a fost făcută față de o probă blank, extrasă în mod similar, al cărei spectru a fost scăzut din spectrul de emisie al etaloanelor și probelor, pentru eliminarea semnalelor parazite (banda Raman).

Metoda presupune excitarea probei extrase la 290 nm și citirea intensității radiației emise, după corectarea cu proba blank, la 307 nm. A fost demonstrată liniaritatea metodei în domeniul 2 – 50 $\mu\text{g/mL}$ ($R=0,99526$) și au fost determinate limita de detecție (0,68 $\mu\text{g/mL}$) și limita de

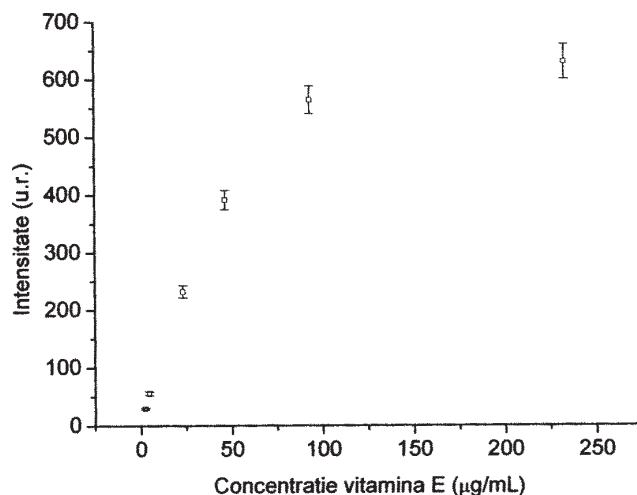


Fig. 3. Efectul de inhibiție a fluorescenței cu concentrația pus în evidență pentru vitamina E în hexan

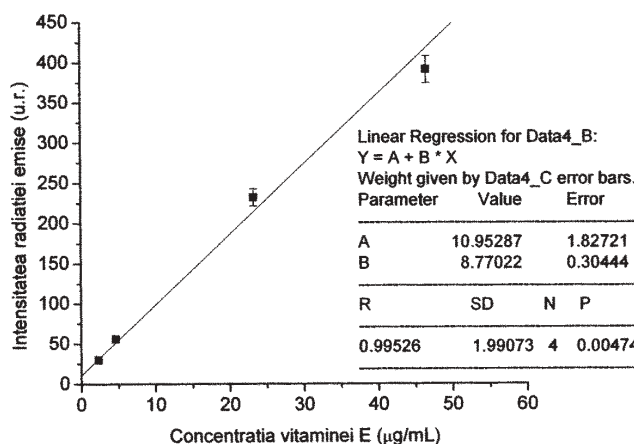


Fig. 4. Dreapta de etalonare a vitaminei E în n-hexan, utilizând valori corectate ale intensității radiației emise

cuantificare 2,27 $\mu\text{g/mL}$. Coeficientul mediu de regăsire determinat a fost de 92,7%.

Bibliografie

1. GUILBAULT, G.G., Practical Fluorescence, Second Edition, New York, 1990, p. 9-10, 231-267, 575-774
2. TĂNASE, I.G., Analiză instrumentală, partea a 2-a, București, 1991
3. ROUESSAC, F., ROUESSAC, A., Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes, 5^e edition, Dunod, Paris, 2000, p. 193
4. DUGGAN, D., Arch. Biochem. Biophys., **84**, 1959, p. 116
5. HANSEN, L.G., WARWICK, W.J., Am. J. Clin. Pathol., **46**, 1966, p.133
6. FEDDER, R., PLOGER, A., J. AOAC Int., **88**, nr. 6, 2005, p. 1579-82
7. QIAN, H., SHENG, M., J. Chrom. A, **825**, nr. 2, 1998, p. 127-33
8. AMARAL, J.S., ALVES, M.R., SEABRA, R.M., OLIVEIRA, B.P., J. Agricultural Food Chem., **3**, nr. 13, 2005, p. 5467-72
9. LEON-RUIZ, V., VERA, S., SAN ANDRES, M.P., Analytical and Bioanalytical Chemistry, **381**, nr. 8, 2005, p. 1568-75
10. HEWAVITHARANA, A.K., LANARI, M.C., BECU, C., J. Chrom. A, **1025**, nr. 2, 2004, p. 313-7
11. GOFFMAN, F.G., BECKER, H.C., Crop Science, **41**, 2001, p. 1072
12. JORDAN, J.M., DE ROOS, A.J., RENNER, J.B., LUTA, G., COHEN, A., CRAFT, N., HELMICK, C.G., HOCHBERG, M.C., ARAB L, Am. J. Epidemiol. **159**, nr. 10, 2004, p. 968
13. ATURKI, Z., D'ORAZIO, G., FANALI, S., Electrophoresis, **26**, nr. 4-5, 2005, p. 798
14. *** Validation on Analytical Procedures: Text and Methodology – ICH Q2(R1) – International Conference on Harmonisation, Geneva, Switzerland, 2005

Întriat în redacție: 8.05.2007

