

ORIGINAL RESEARCH PAPER

QUANTITATIVE ANALYSIS BY FLUORESCENCE OF VITAMIN E IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS[♦]

ANALYSE QUANTITATIVE PAR FLUORESCENCE DE VITAMINE E DANS LES FORMULES PHARMACEUTIQUES

Ana M. Hossu^{1*}, Mihaela F. Maria², Mihaela Ilie³, Alexandru Stoica⁴

¹Université „Valahia” Târgoviște, Faculté de Sciences et d'Arts, Département de
Chimie, 18-20 Unirii, Târgoviște, Roumanie

²Direction de Santé Publique, 17-19 Tudor Vladimirescu, Târgoviște, Roumanie

³Université de Médecine et Pharmacie “Carol Davila”, Faculté de Pharmacie,
Département de Toxicologie, 6 Traian Vuia, Bucarest, Roumanie

⁴Université „Valahia” Târgoviște, Faculté d'Ingénierie de l'Environnement et
Biotechnologies, 18-20 Unirii, Târgoviște, Roumanie

*Corresponding author: anahossu@yahoo.co.uk

Received: July 01, 2010

Accepted: January 06, 2011

Abstract: Many applications of this technique are encountered in the determination of organic compounds or molecules of biological importance, such as thiamin, riboflavin, adrenalin, cholesterol, paraffins or certain medications and drugs. Fluorimetric determinations are sensitive and selective and could determine the concentrations up to 10^{-10} g·mL⁻¹, which corresponds to a sensitivity of 100 - 1000 times higher than most methods based on molecular absorption.

This paper has developed two methods for spectrofluorimetric determination of vitamin E in pharmaceutical formulations (soft gelatin capsules of vitamin E) and serum.

Keywords: *fluorescence, pharmaceutical formulations, tocopherol, vitamin E*

[♦] Paper presented at the 6th edition of *Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, COFrRoCA 2010*, 7-10 July 2010, Orléans, France

INTRODUCTION

Les trois substances principales avec activité de vitamine E qui ont été isolées de sources naturelles α -, β - et γ - tocophérol qui sont méthyle dérivés de la substance mère tocol.

Alternativement, on peut condensé le tocophérol avec une *o*-phénylenediamine après l'oxydation pour obtenir d'un dérivé fluorescent [1]. Avec α -tocophérol on forme un seul produit, avec excitation à 270 nm et 370 nm et émission de couleur verte. Avec β - et γ -tocophérol on forme une mixture de produits distincts par rapport à α -tocophérol.

Tabata *et al.* [2], ont déterminé tocophérol par l'oxydation et une forte fluorescence a été observée après l'oxydation à 365 nm.

Leon-Ruiz *et al.* [3] ont validé une méthode pour l'identification simultanée des vitamines hydrosolubles et liposolubles (A, E, B₁, B₂ et B₆) dans un milieu micellaire aqueux de chlorure de hexadecyltriméthyleammonium utilisant la technique de fluorescence.

Les dernières années on a réalisé le couplage d'une méthode chromatographique de séparation par l'une de fluorescence comme méthode de détection. On a fait plusieurs essais dont on rappelle l'analyse simultanée a huit homologues de la vitamine E, en utilisant leur fluorescence native ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 330$ nm) et hexane comme éluant sur colonne de silicagel [4].

On a essayé aussi une autre méthode de séparation, par exemple, l'électrophorèse capillaire couplée avec un détecteur de fluorescence utilisée dans l'analyse de la vitamine E dans les huiles; on a utilise méthanol/acetonitrile 50/50 v/v avec un contenu de 0,01% acétate d'ammonium et colonne C18 [5].

Le tocophérol peut être déterminé dans le sang et les tissus en mesurant la fluorescence native en hexane ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm) [6, 7]. Seulement la forme libre de tocophérol présente fluorescence, les esters doivent être réduits en alcool (LiAlH₄) pour obtenir du tocophérol total. On peut obtenir moins de 0,6 μg tocophérol/mL sérum.

Toute une série d'ouvrages ont été élaborés ou on a suivi de dosage fluorimétrique de la vitamine E avec un caractère antioxydant des échantillons biologiques et spécialement la plasma et le sérum, connaissant le rôle important que celle-ci dans l'organisme humain et animal [8 – 10].

MATERIAUX ET METHODES D'ANALYSE

Les recherches de laboratoire ont été effectuées avec acétate DL- α -tocophérol, substance de référence (Merck); la *vitamine E* capsules gélatineuses molles (Biofarm S.A. București); *n*-hexane (Merck); sérum physiologique; éthanol (Chimopar).

Pour la première méthode, on a réalisé une solution standard de DL- α -tocophérol de laquelle on a fait des dilutions en *n*-hexane avec concentrations contenues entre 2,32 – 232,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et une solution mère de l'échantillon de laquelle on a fait aussi des dilutions en *n*-hexane pour couvrir le domaine d'investigation.

Pour la deuxième des méthodes, on a réalisé une solution standard de DL- α -tocophérol de laquelle on a fait des dilutions en éthanol avec des concentrations entre 2,45 – 61,42

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et une solution mère de l'échantillon de laquelle on a fait des dilutions en éthanol.

En utilisant le spectrofluorimètre Perkin Elmer LS 50B se sont effectuées les études de spectrofluorimétrie et les graphiques ont été réalisés par le programme *MicroCal Origin* version 6.0.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Se sont réalisées les spectres d'émission utilisant les paramètres instrumentaux du Tableau 1. On observe que la longueur d'onde d'excitation utilisée (290 nm), dans la zone 315 nm apparaît la bande Raman du solvant (*n*-hexane), ce qui impose la correction de fond pour les spectres d'émission obtenus (Figure 1). Dans ces conditions, le maximum d'émission de la vitamine E a été établie à 306 nm et a été utilisé ultérieurement dans l'analyse.

Tableau 1. Paramètres instrumentaux utilisés au tracé des spectres d'excitations et d'émission

| Paramètre | Excitation | Emission |
|--|------------|-----------|
| Longueur d'onde fixe [nm] | 290 | – |
| Fente [nm] | 2,5 | 2,5 |
| Le domaine enregistré [nm] | – | 300 – 410 |
| La vitesse de tracé du spectre [$\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$] | – | 600 |

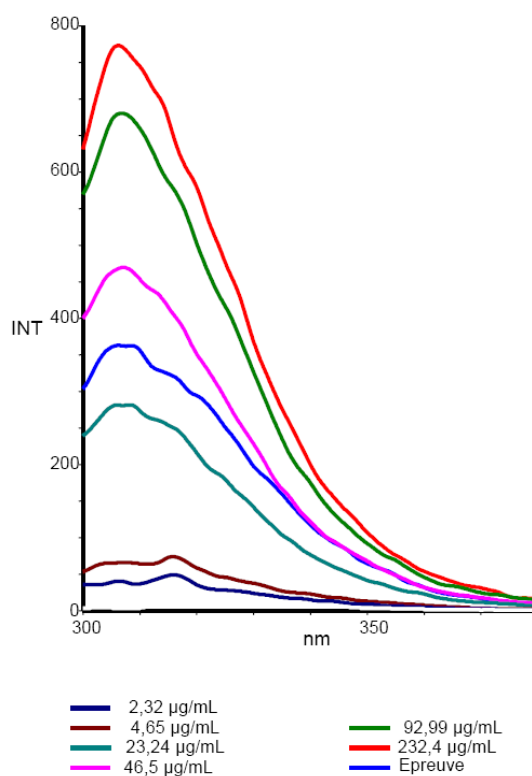


Figure 1. Spectre d'émission fluorescente pour la vitamine E en *n*-hexane (excitation à 290 nm, avec correction de fond)

Figure 1 présente une sélection de spectres obtenus par des concentrations différentes de vitamine E acétate et pour l'échantillon de vitamine E produit pharmaceutique duquel on a réduit le spectre témoin (des spectres utilisés au tracement de la droite de calibrage).

On a tracé la courbe d'étalonnage de la vitamine E en *n*-hexane utilisant les valeurs corrigées de l'intensité des pics d'émission (Tableau 2, Figure 2). On constate que la vitamine E présente un phénomène d'inhibition de la fluorescence avec la concentration marquée à des concentrations qui dépassent $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figure 2). Pour cela on a tracé la droite de dosage dans le domaine $1 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, le domaine de linéarité (Figure 3), la limite de détection étant $2,32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et la limite de quantification la même.

Tableau 2. Les valeurs de l'intensité d'émission fluorescente utilisées pour le tracement de la courbe de dosage ($\lambda_{\text{excitation}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 306 \text{ nm}$)

| Concentration de la vitamine E [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] | Intensité d'émission (en moyenne) | La déviation standard de la moyenne | Coefficient de variation [%] |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Fente d'excitation et émission de 2,5 nm | | | |
| 2,32 | 29,852 | 1,6926 | 5,66997 |
| 4,65 | 56,042 | 3,1021 | 5,53531 |
| 23,24 | 232,155 | 10,60775 | 4,56925 |
| 46,5 | 392,092 | 16,6046 | 4,23487 |
| 92,99 | 564,759 | 24,23795 | 4,29173 |
| 232,4 | 631,801 | 30,59005 | 4,84172 |

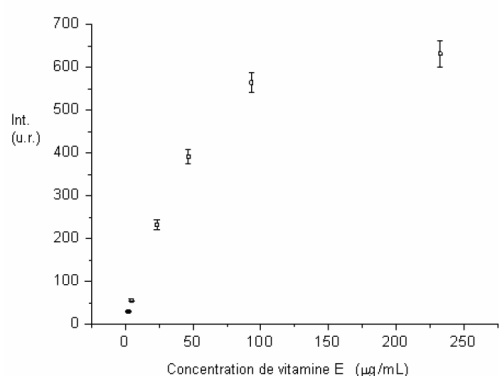


Figure 2. Courbe d'étalonnage de la vitamine E en *n*-hexane, employant des valeurs corrigées de l'intensité d'émission

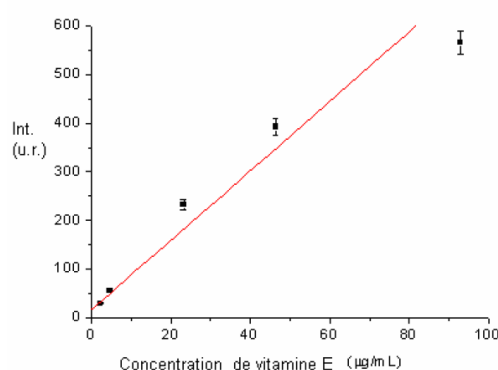


Figure 3. La droite d'étalonnage de la vitamine E en *n*-hexane, employant des valeurs corrigées de l'intensité d'émission

Pour le dosage de la vitamine E du produit pharmaceutique *vitamine E* ont été prises dans le travail 5 capsules gélatineuses molles de *vitamine E*, auxquelles extrait le contenu huileux avec une seringue d'utilisation unique de 1 mL. On a pesé le contenu des cinq capsules (1,2341 g) et a été porté quantitatif au ballon côté de 5 mL avec *n*-hexane. On a obtenu ainsi une solution mère de préparé pharmaceutique duquel on a réalisé des solutions diluées pour entrer dans le domaine de concentrations étudié pour la vitamine E acétate. Le spectre du préparé pharmaceutique (dilution 1:25 de dilution 1:100) est présenté dans la Figure 1.

Tableau 3. Valeurs des paramètres obtenues pour la droite de calibrage

| Tableau 17 : valeurs des paramètres estimées pour l'analyse de calibration | | | |
|--|---------|----------|---------|
| Paramètre | | Valeur | Erreur |
| A | | 16,34915 | 7,40974 |
| B | | 7,14056 | 0,90248 |
| R | SD | N | P |
| 0,97687 | 4,45261 | 5 | 0,00421 |

Utilisant la formule de calcul (1) et les valeurs des paramètres du Tableau 3, après la correction par le facteur de dilution (1:25 de dilution 1:200), on a obtenu pour la vitamine E acétate du préparé pharmaceutique *vitamine E* capsules gélatineuses molles, concentration de 140,3 mg/capsule de produit pharmaceutique:

$$I_{306} = 16,34915 + 7,14056 \cdot [E] \quad (1)$$

où on a noté par [E], la concentration de vitamine E exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Pour la deuxième méthode, on a tracé les spectres d'émission utilisant des paramètres instrumentaux du Tableau 4, pour les séries d'étalons préparées pour témoin et pour les échantillons de vitamine E en éthanol.

Tableau 4. Paramètres instrumentaux employés au tracement des spectres d'émission

| Paramètre | Excitation | Emission |
|--|------------|-----------|
| Longueur d'onde fixe [nm] | 290 | – |
| Fente [nm] | 3 | 3 |
| Le domaine enregistré [nm] | – | 300 – 410 |
| La vitesse de tracement du spectre [$\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$] | – | 1000 |

Tableau 5. Les étapes de préparation du témoin, des étalons et des échantillons

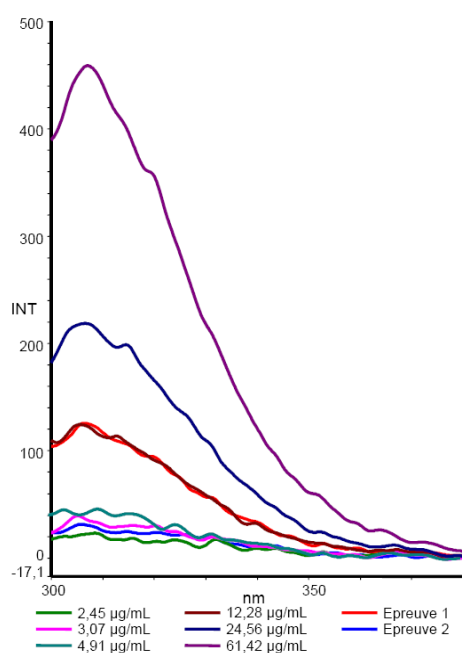
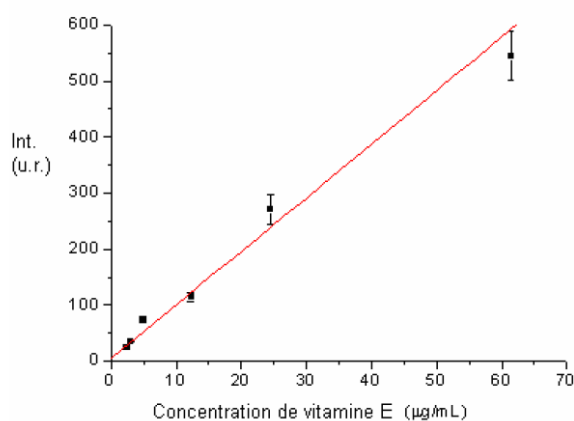
| Composant | Témoin | Étalon | Échantillon |
|--|--------|--------|-------------|
| Sérum physiologique [μL] | 100 | 100 | 100 |
| <i>Vitamine E</i> en éthanol [μL] | – | – | 100 |
| Éthanol [μL] | 100 | – | – |
| Étalon vitamine E [μL] | – | 100 | – |
| On agite doucement 15 s sur Vortex | | | |
| Hexane [mL] | 2,4 | 2,4 | 2,4 |
| On agite énergiquement 30 s sur Vortex | | | |
| Hexane [mL] | 2,4 | 2,4 | 2,4 |
| On agite doucement 15 s sur Vortex | | | |
| On centrifuge 15 min à $3000\text{ rotations}\cdot\text{min}^{-1}$ | | | |

On observe à 316 nm la bande Raman du solvant (hexane) qui peut influencer les déterminations. Pour cela, des spectres ont été corrigés par l'échantillon témoin (Figure 4), obtenant dans ces conditions une bande d'émission avec maximum à 307 nm, qui a été utilisée ultérieurement en tracement des courbes de calibrage [11].

On a tracé la droite d'étalonnage de la vitamine E en *n*-hexane par l'extraction employant les valeurs corrigées de l'intensité des pics d'émission (Tableau 6, Figure 5).

Tableau 6. Les valeurs de l'intensité d'émission fluorescente utilisées pour le tracement de la courbe de dosage ($\lambda_{excitation} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{émission} = 307 \text{ nm}$)

| Concentration de la vitamine E [$\mu\text{g.mL}^{-1}$] | Intensité d'émission (moyenne) | La déviation standard de la moyenne | Coefficient de variation [%] |
|--|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Fente d'excitation et émission de 3 nm | | | |
| 2,45 | 24,761 | 2,42 | 9,77343 |
| 3,07 | 35,16433 | 0,67252 | 1,91251 |
| 4,91 | 75,0215 | 5,9705 | 7,95839 |
| 12,28 | 114,327 | 8,591 | 7,51441 |
| 24,56 | 271,68234 | 26,8516 | 9,88345 |
| 61,42 | 544,96667 | 43,04534 | 7,89871 |

**Figure 4.** Spectre d'émission fluorescente corrigée pour la droite d'étalonnage**Figure 5.** La droite d'étalonnage de la vitamine E en n-hexane, employant des valeurs corrigées de l'intensité d'émission

Pour le dosage de la vitamine E du produit pharmaceutique *vitamine E* ont été prises dans le travail 5 capsules gélatineuses molles de *vitamine E*, auxquelles extrait le contenu huileux avec une seringue d'un mL d'utilisation unique. On a pesé le contenu des cinq capsules (1,25 g) et a été porté quantitatif au ballon côté de 50 mL avec éthanol. On a obtenu ainsi une solution mère de préparé pharmaceutique duquel on a réalisé des solutions diluées pour entrer dans le domaine de concentrations étudié pour la vitamine E acétate. On suivi les étapes de préparation du témoin, des étalons et des échantillons conformément au Tableau 5.

Le spectre du préparé pharmaceutique est présenté dans la Figure 4.

Tableau 7. Valeurs de paramètres obtenues de la droite de calibrage

| Tableau 1 : Valeurs de paramètres obtenues de la droite de régression | | | |
|---|---------|---------|---------|
| Paramètre | | Valeur | Erreur |
| A | | 5,7633 | 3,96087 |
| B | | 9,54454 | 1,17722 |
| R | SD | N | P |
| 0,9709 | 2,28901 | 6 | 0,00126 |

Utilisant la formule de calcul (2) et les valeurs des paramètres du Tableau 7, après la correction par le facteur de dilution, on a obtenu pour la vitamine E acétate du préparé pharmaceutique *vitamine E* capsules gélatineuses molles, la concentration de 133,5 mg/capsule de produit pharmaceutique:

$$I_{307} = 5,7633 + 9,54454 \cdot [E] \quad (2)$$

où on a noté par $[E]$, la concentration de vitamine E exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

CONCLUSIONS

Les méthodes spectrofluorimétriques sont pratiquées parce qu'elles assurent de la spécificité, de la sélectivité et des limites de détection descendues. Et pourtant, peu des laboratoires sont équipés par spectrofluorimètres, qui ont un prix relativement élevé par rapport aux appareils d'absorption UV/VIS, indispensables dans les laboratoires d'analyse.

Puisque la fluorescence de la vitamine E n'a pas peut être révélé dans le chloroforme, on a développé un méthode spectrofluorimétrique de dosage de la vitamine E en hexane en utilisant des spectres d'émission corrigées de fond, avec excitation à 290 nm et émission à 306 nm. La méthode est spécifique et linéaire, dans le domaine $1 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R = 0,97687$). Hors le domaine de linéarité on a pu mettre en évidence un effet d'inhibition de la fluorescence avec la concentration.

On a élaboré une méthode de dosage de la vitamine E par extraction du sérum, en utilisant éthanol et hexane des spectres d'émissions corrigées de fond, avec excitation à 290 nm et émission à 307 nm. Dans ce but on a élaboré un procédé d'extraction, la détermination étant faite par rapport à un échantillon témoin extrait dans une manière similaire, dont le spectre a été défalqué du spectre d'émission des étalons et des épreuves, en assurant ainsi la spécificité de la méthode. La méthode est linéaire dans le domaine $2,45 - 61,42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R = 0,9709$).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kofler, M.: *Helv. Chim. Acta*, **1947**, 30, 1053;
2. Tabata, T., Yamanouchi, H., Shimizu, Y.: *Vitamin*, **1969**, 40 (4), 245-250;
3. Leon-Ruiz, V., Vera, S., San Andres, M.P.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2005**, 381 (8), 1568-1575;
4. Hewavitharana, A.K., Lanari, M.C., Becu, C.: *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1025 (2), 313-317;
5. Aturki, Z., D'Orazio, G., Fanali, S.: *Electrophoresis*, **2005**, 26 (4-5), 798-803;
6. Duggan, D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, 84, 116;

7. Hansen, L.G., Waewick, W.J.: *Am. J. Clin. Pathol.*, **1966**, **46**, 133;
8. Fedder, R., Ploger A.: *Journal of AOAC International*, **2005**, **88** (6), 1579-1582;
9. Qian H., Sheng M.: *Journal of Chromatography A*, **1998**, **825** (2), 127-133;
10. Amaral, J.S., Alves, M.R., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.: *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, **53** (13), 5467-5472;
11. Hossu, A.-M., Ilie, M., Nițulescu-Arsene, A., Mitrea, N., Magearu, V.: *Revista de Chimie*, **2007**, **58** (12), 1188-1189.