

ANALIZA ȘI STANDARDIZAREA MEDICAMENTELOR

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A IZOFLAVONELOR ÎN DIVERSE PRODUSE ȘI SUPLIMENTE ALIMENTARE PRIN METODA SPECTROFOTOMETRICĂ UV-VIS

Livia Uncu^{1,2}, Vladimir Valica^{1,2}, Olga Suvorchina², Oxana Vislough²,
Ecaterina Mazur², Zinaida Roman¹

¹Catedra Chimie Farmaceutică și Toxicologică, IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova

²Centrul Științific al Medicamentului, IP USMF „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova

Rezumat

Interesul crescut pentru izoflavonoide datorită beneficiilor asupra sănătății umane își are originea încă de la începutul descoperirii lor. O serie de studii *in vitro* au demonstrat inhibarea carcinogenezei de către flavonoide, existând unele dovezi esențiale că acest lucru se produce și *in vivo*. Cele mai studiate izoflavonoide din acest punct de vedere au fost genisteina și daidzeina. În prezentul studiu a fost determinat conținutul de izoflavone în semințe de soia, dar și într-un șir de suplimente nutritive, fiind dezvoltată și perfectată o tehnică instrumentală simplă (spectrofotometrie în UV-VIS) după extragerea acestora cu metanol 70%. Tehnica utilizată pentru determinare s-a dovedit a fi exactă, sensibilă și reproductivă, limita de detecție a fost de 0,64 μg/ml.

Cuvinte cheie: izoflavone, metoda spectrofotometrică, suplimente alimentare.

Abstract

Quantitative determination of isoflavones in various products and food supplements using uv-vis spectrophotometric methods

Increasing interest to isoflavones is due to the benefits to human health since its discovery. A number of studies *in vitro* has demonstrated the inhibition of carcinogenesis by isoflavones, which manifest the same action *in vivo*. Genistein and daidzein are the well-studied isoflavones from this point of view. In this study it was determined the content of isoflavones in soybean, but also in a few nutritional supplements. The simple instrumental technique (spectrophotometric UV-VIS) for determination of isoflavones after their extraction with methanol 70% have been developed and perfected. The technique used for the determination have been shown to be accurate, reproductive and sensitive, the detection limit was 0,64 mg/ml.

Keywords: isoflavones, spectrophotometric method, food supplements

Introducere

Interesul crescut pentru izoflavonoide datorită beneficiilor asupra sănătății umane își are originea în anii '30, mai exact anul 1936, când au fost descoperite de cercetătorul ungar Szent-Gyorgyi. Dietele bogate în izoflavonoide, fructe și legume, și-au dovedit eficiența protectoare împotriva diferitelor boli, în special cele cardiovasculare și a unor tipuri de cancer. O serie de studii *in vitro* au demonstrat inhibarea carcinogenezei de către flavonoide, existând unele dovezi esențiale că acest lucru se produce și *in vivo*. Cele mai studiate izoflavonoide din acest punct de vedere au fost genisteina și daidzeina. Distribuția pe scară largă a izoflavonelor, varietatea lor și toxicitatea relativ scăzută în comparație cu alți compuși activi din plante (de exemplu alcaloizii), au făcut ca aceasta clasă de compuși să-și găsească afirmarea în mai multe sfere ale medicinei, regăsindu-

se în componența multor preparate medicamentoase. Totodată, sunt extrem de actuale cercetările, ce vin să valorifice noi surse de compuși naturali biologic activi, inclusiv izoflavonele, prin determinarea conținutului acestora în produsele vegetale.

Mai multe metode raportate în literatura de specialitate pentru analiza izoflavonilor sunt bazate pe cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC)¹⁻⁴, gaz-cromatografie și spectrometrie de masă (GC-MS)⁵⁻⁷. Acestea au fost dezvoltate pentru a cuantifica mai multe izoflavone simultan, cu toate acestea implică procese laborioase de preparare a probelor, de separare, de detectare și analiză a datelor.

Reieșind din cele expuse, elaborarea de noi tehnici pentru analiza izoflavonelor în produsele vegetale este destul de actuală pentru cercetarea farmaceutică și justifică realizarea acestei lucrări.

Materiale și metode

Pentru efectuarea experimentelor a fost utilizată veselă de laborator, utilaj și aparataj calibrat și standardizat, în conformitate cu cerințele Farmacopeei Europene.

Standardul de genisteină a fost procurat de la ChromaDex (SUA). Au fost utilizate semințe de soia din recolta anului 2014, comercializate pe piață; suplimente nutritive: Phyto soya, Estroplus, Aktiv meno, care au fost achiziționate în farmacie. Metanolul a fost procurat de la Merck (Darmstadt, Germania).

Condiții instrumentale și analitice.

Analizele spectrofotometrice în UV-VIS au fost efectuate la spectrofotometrul Agilent 8453, Germania. În calitate de solvenți și soluție de compensare s-a utilizat amestecul de metanol-apă (90:10). S-a examinat spectrul de absorbție în diapazonul lungimilor de undă 200-450 nm, detecția s-a realizat la 260 ± 2 nm.

Extragerea izoflavonelor din semințe de soia și din suplimente nutritive. Conținutul unei capsule sau a unui comprimat, sau 1.0 g de probă măcinată de semințe de soia sunt plasate într-un balon cu fund rotund de 100 ml, se adaugă 50 ml metanol 70% și se extrage cu ultrasunet timp de 10 minute, agitând apoi 20 minute. Extractul răcit la tempe-

ratura camerei este filtrat printr-un filtru de celuloză cu dimensiunea porilor de $0,45 \mu\text{m}$ într-un balon cotate de 100 ml, aducând cu metanol 70% pînă la cotă; se amestecă cu grijă.

Prepararea soluțiilor pentru analize.

Soluția standard de genisteină: masa exactă de substanță standard (2,5 mg genisteină) se dizolvă în balon cotate de 25 ml în amestec de metanol-apă (90:10), se omogenizează și se aduce cu același solvent la cotă (100 $\mu\text{g/ml}$).

Soluții ale probelor analizate: 2 ml extract, obținut în condițiile redată mai sus, se trec în balon cotate de 10 ml, se omogenizează și se aduce la cotă cu amestec metanol-apă (90:10).

Rezultate și discuții

Dozarea izoflavonelor prin metoda spectrofotometrică ca regulă se realizează în regiunea vizibilă, în urma reacției cu clorura de aluminiu. Totodată, prezența în structura izoflavonelor a multiplelor grupări cromofore condiționează și absorbanta în regiunea UV.

S-a înregistrat spectrul de absorbție a soluției standard de genisteină la spectrofotometru în diapazonul lungimilor de undă 200-450 nm (figura 1).

Poziționarea curbei spectrale a soluției standard

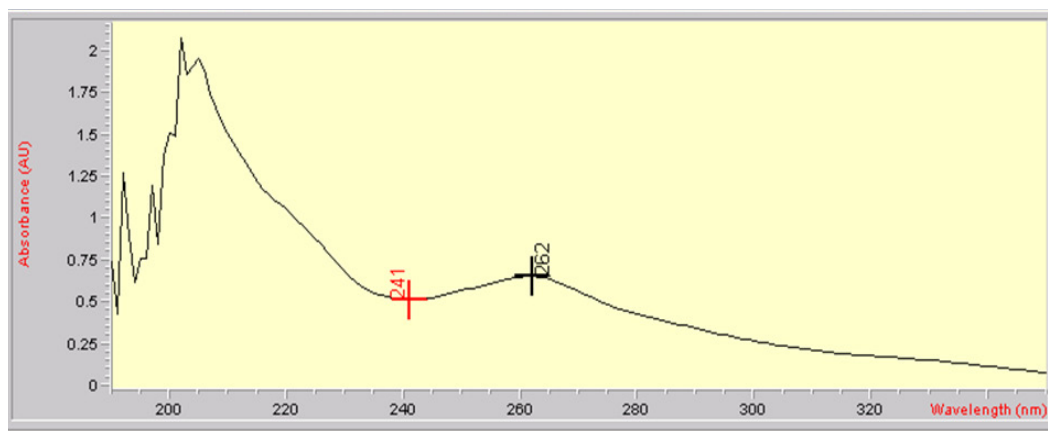


Figura 1. Spectrul de absorbție al soluției standard de genisteină

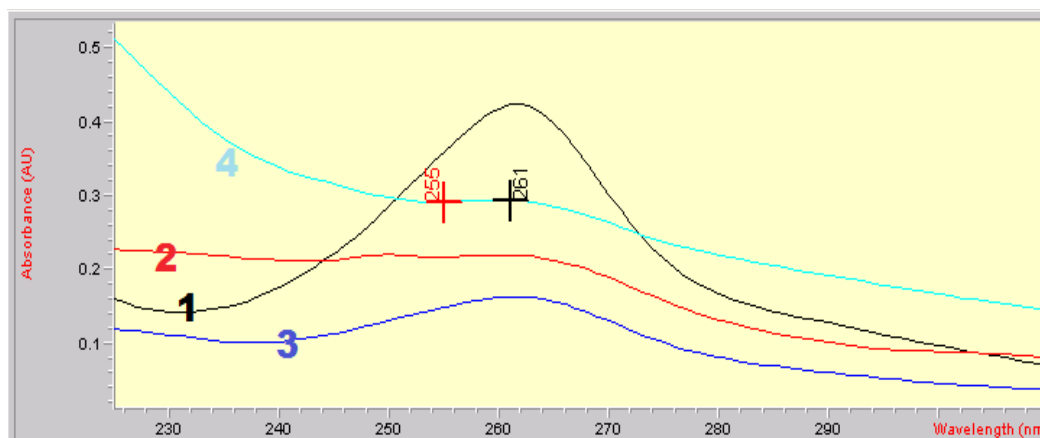


Figura 2. Spectrele de absorbție ale extractelor metanolice: 1- extractul metanolic din Phyto soya; 2-extractul metanolic din Estroplus; 3-extractul metanolic din Aktiv meno; 4-extractul metanolic din semințe de soia

de genisteină cu maxim de absorbție bine conturat la $\lambda=262$ nm, ne-a determinat să considerăm această lungime de undă în calitate de una analitică și pentru analiza produselor luate în studiu.

La analiza spectrofotometrică a extractelor metanolice din soia praf și din suplimentele nutritive Phyto soya, Estroplus, Aktiv meno se observă poziționarea analogică a maximelor de absorbție în raport cu standardul de genisteină (figura 2).

Din figură se observă că extractele metanolice nu repetă absorbția maximală a soluției standard la 262 nm, sunt devieri cauzate de alte componente ale acestor extracte, dar manifestă absorbantă în regiunea apropiată la $\lambda=250-260$ nm.

Tehnica de lucru elaborată a fost validată după principalii parametri – linearitate, precizie, exactitate/acuratețe, limită de detecție și de cuantificare⁸.

Linearitatea

A fost găsită o corelație liniară ($r^2 = 0,9998$) între valorile absorbanței și concentrația soluțiilor de genisteină. Datele analizei de regresie sunt prezentate în Tabelul 1 și figura 3.

Tabelul 1. Rezultatele analizei de regresie în determinarea linearității metodei spectrofotometrice de dozare a izoflavonelor

Parametri	Rezultatele analizei de regresie
Coefficient de regresie	0,99988
Panta±deviația standard	0,0142±0,00009
Intercepția±deviația standard	0,0003±0,00099
Deviația standard relativă (RSD)	0,75
Diapazon de concentrații $\mu\text{g/ml}$	50 – 300
Număr de determinări	6

Coefficientul de corelare a modelului de regresie liniară pentru graficul de etalonare este 0,99988, ceea ce demonstrează că punctele experimentale se aproximează bine și se fitează în jurul dreptei de regresie. Prin urmare, se poate considera că curba trece prin origine. Valoarea scăzută a RSD (0,75%) indică precizia ridicată a curbei de calibrare.

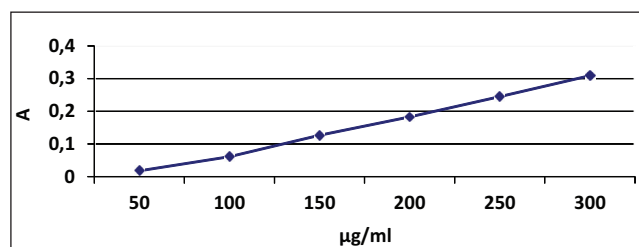


Figura 3. Graficul de etalonare a genisteinei
 $r=0,99988$

Precizia

În determinarea preciziei intra-grup ($n = 6$), conținutul mediu de izoflavone exprimat în genisteina în semințe de soia a fost $5,20$ mg/g produs (RSD = 0,63%). Pentru precizia inter-grup ($n = 12$), media obținută a fost de $5,29$ mg/g produs (RSD = 1,12%). Valori ale RSD mai mici decât 2,0% atestată precizia metodei.

Exactitate/acuratețe

Acesta a fost investigată prin metoda adausului standard, la trei niveluri de concentrație în triplicat ($n = 9$). Recuperarea medie a 100,56% (RSD = 0,32%) a asigurat exactitatea metodei.

Limita de detecție și de cuantificare

Limita de detecție, calculată cu utilizarea parametrilor curbei de calibrare a fost 0,64 mg/ml. La analiza spectrofotometrică a soluțiilor diluate a fost posibil determinarea absorbantei la 262 nm în concentrații de 0,14 mg/ml, valoarea absorbantei fiind 0,0025. Limita de cuantificare calculată cu utilizarea parametrilor curbei de calibrare a fost 0,98 mg/ml.

S-a calculat conținutul total de izoflavone în recalcul la genisteină în toate produsele analizate (tabelul 2).

Tabelul 2. Conținutul total de izoflavone determinat prin metoda spectrofotometrică UV-VIS

Produse	Absorbanta	Concentrația ±deviația standard
PHYTO SOYA	0,56537	39,74 mg/caps±0,07
ESTROPLUS	0,21955	17,72 mg/caps±0,04
AKTIV MENO	0,16349	47,16 mg/caps±0,09
SOIA SEMINȚE	0,64965	5,20 mg/g produs±0,03

Rezultatele obținute denotă un conținut optim de izoflavone în recalcul la genisteină în semințele de soia (acesta se poate încadra între 1-7 mg/g produs). Pentru semințe este important de a ține cont de anumiți factori, care pot influența în mod direct acest conținut: varietatea speciilor de soia, perioada de colectare, localizarea geografică și condițiile pedo-climatice⁹. Conținutul de izoflavone în suplimentele alimentare studiate s-a încadrat în limitele declarate de producători.

Concluzii

Metoda spectrofotometrică în UV-VIS, propusă pentru dozarea izoflavonelor în semințe de soia și în suplimente nutritive s-a dovedit a fi una simplă și ieftină. Tehnica dezvoltată a respectat principalii parametri de validare. Prin urmare, ea poate fi aplicată pentru determinarea izoflavonelor în analizele de rutină de control al calității diverselor produse din soia, precum și a suplimentelor nutritive cu conținut de fitoestrogeni. Totodată poate fi folosită ca un test preliminar pentru a evalua conținutul genisteinei din diverse extracte de soia.

Bibliografie

1. Delmonte, P.; Perry, J.; Rader, J. I.; Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: extraction followed by basic or acid hydrolysis. *J. Chromatogr., A* 2006, 1107, 59.
 2. Chen, L. J.; Zhao, X.; Plummer, S.; Tang, J.; Games, D. E.; Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2005, 1082, 60.
 3. Klejduš, B.; Mikelová, R.; Petřlová, J.; Potesil, D.; Adam, V.; Stiborová, M.; Hodek, P.; Vacek, J.; Kizek, R.; Kubán, V.; Determination of isoflavones in soy bits by fast column high-performance liquid chromatography coupled with UV-visible diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 5848.
 4. Thompson, L. U.; Boucher, B. A.; Liu, Z.; Cotterchio, M.; Kreiger, N.; Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr. Cancer* 2006, 54, 184.
 5. Kuo, H. W.; Ding, W. H.; Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2004, 1027, 67.
 6. Grace, P. B.; Taylor, J. I.; Botting, N. P.; Fryatt, T.; Oldfield, M. F.; Bingham, S. A.; Quantification of isoflavones and lignans in serum using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2003, 315, 114.
 7. Wang, C. C.; Prasain, J. K.; Barnes, S.; Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2002, 777, 3.
 8. *Validation of Analytical Procedures: Methodology – ICH Harmonized Tripartite Guideline*; International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 1996.
 9. Dixon, R. A.; *Anual Rev. Plant Biol.* 2004, 55, 225.
-