

## Validação de metodologia para análise de ácido ascórbico em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Camila S. Campos da Costa<sup>1</sup> (PG)\*, Natasha Kelber<sup>1</sup> (IC), Jéssica Socas<sup>1</sup> (IC), Tiago T. Guimarães<sup>2</sup> (PG) Cristiana Pedrosa<sup>1</sup> (PQ), Anna Paola T.R. Pierucci<sup>1</sup> (PQ).

costa.csd@gmail.com

1. Instituto de Nutrição Josué de Castro, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21944-970, Rio de Janeiro/ RJ.  
2. Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21944-970, Rio de Janeiro/ RJ.

Palavras Chave: Ácido ascórbico, plasma humano, CLAE, validação.

### Introdução

O ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel, presente nos tecidos e fluidos corporais que possui como principal atividade biológica a manutenção do potencial de oxido-redução do organismo. Sendo assim, a determinação de AA no plasma humano é importante para definir seu papel como antioxidante. Existem poucas metodologias para análise de AA em plasma humano, principalmente utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e as que existem apresentam procedimentos demorados e custosos, no preparo de amostra e da fase móvel. O objetivo desse trabalho foi apresentar uma metodologia simplificada para determinação do AA em plasma humano por CLAE com detecção por ultravioleta (UV).

### Resultados e Discussão

Um método isocrático de CLAE foi utilizado para validação da metodologia. Fase móvel composta por 0.2M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  com pH ajustado para 2.4 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Uma coluna C18 (250 x 4.6mm) de fase reversa foi utilizada para separação do AA.

A validação de uma metodologia analítica envolve seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e sensibilidade.

A especificidade foi avaliada com adição de ácido oxálico (AO), que é um produto metabólico do AA, ao plasma humano, a fim de verificar se o método seria específico na determinação do AA entre outras substâncias presentes na amostra como possíveis interferentes da matriz sanguínea. O método separou adequadamente as substâncias com tempos de retenção de 3.052 e 4.577 minutos para o AO e AA, respectivamente.

Linearidade foi determinada pela realização de 12 curvas analíticas através de soluções padrão de AA (nas concentrações de 10 a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) adicionadas ao plasma humano e injetadas no cromatógrafo. Regressão linear foi utilizada e a equação obtida foi  $y = 7133,3x + 6193,8$  com valor de  $r^2 = 0,9998$ .

Precisão foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária. As amostras foram preparadas como especificado na linearidade e foram injetadas no cromatógrafo. A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas através da injeção de cada concentração, em triplicata, no mesmo dia e em dias alternados. Os resultados estão expressos na tabela 1.

**Tabela 1.** Precisão e exatidão da metodologia de CLAE para determinação de AA.

Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Repetibilidade (%C.V.*)	Precisão intermediária (%C.V.*)	Exatidão/recuperação (%)
50	2.45	7.23	100.96
40	3.94	7.04	99.93
30	2.73	2.92	96.43
20	4.17	4.40	101.42
10	1.99	1.93	103.28

\* % Coeficiente de Variação

Exatidão e recuperação foram avaliadas comparando as concentrações teóricas dos padrões adicionados ao plasma e aquelas obtidas no cromatograma. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Limites de quantificação e detecção foram avaliados para determinação da sensibilidade. O limite de quantificação do método é de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  enquanto o limite de detecção é de 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Pequenas mudanças na concentração provocam grandes mudanças na resposta cromatográfica, o que qualifica o método como sensível.

### Conclusões

Um simples, exato e sensível método de CLAE – UV foi desenvolvido e validado para determinação do ácido ascórbico em plasma humano. O processo analítico é rápido e o tempo de corrida para cada amostra foi de 10 minutos.

### Agradecimentos

CAPES/IBQM/FAPERJ/CNPQ

<sup>1</sup> V. Gokmen, N. Kahraman, N. Demir, *J. Chromat. A*, **2000**, 881, 309.

<sup>2</sup> E. Bobrowicz, J.W. Naskalski. *Clin. Chim. Acta*, **2001**, 314, 237.