

Determinação de aminoácidos por HPLC e UFLC

Nota de Aplicação – HPLC

Nº 2

Introdução

A análise de aminoácidos é especialmente empregada em laboratórios de análises clínicas, bioquímicas e em indústrias de processamento de alimentos.

A determinação da composição total e individual dos aminoácidos presentes em fluídos biológicos tornou-se prática comum na investigação de distúrbios metabólicos, pois permitem além de avaliar o estado nutricional e metabólico do paciente, acompanhar as intervenções terapêuticas realizadas, sejam estas pela ingestão de suplementos vitamínicos ou modificações alimentares.

A análise cromatográfica de aminoácidos é geralmente realizada por derivatização pré ou pós-coluna, com o intuito de aumentar a sensibilidade da detecção e a seletividade da separação. Como os aminoácidos de interesse possuem estruturas químicas muito semelhantes, é necessário utilizar sistemas HPLC ou UFLC capazes de realizar eluições gradientes com elevada precisão para permitir uma boa resolução. Nesta nota de aplicação é apresentada uma análise comparativa entre a determinação de aminoácidos utilizando os sistemas HPLC e UFLC.

Resultados

A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia em fase reversa e as amostras foram tratadas seguindo o procedimento descrito abaixo:

Pré-tratamento de amostra

- 1) Adição da amostra a uma mistura contendo:
200 µl de acetonitrila
100 µl de tiocianato de fenila (100×10^{-3} mol/L)
100 µL de trietilamina (1 mol/L)
- 2) Solução em repouso por 1 hora a 25 °C
- 3) Extração da solução com 400 µl de hexano
- 4) Filtração da fase inferior da mistura e injeção da amostra

As condições analíticas utilizadas nos sistemas HPLC e UFLC são apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Condições de análise no sistema HPLC

| | |
|-------------|---|
| Coluna: | STR-ODS-II (4,6 mm x150 mm) |
| Fase móvel | A) 10 mM tampão fosfato (pH 7,0) B) Acetonitrila |
| Eluição | Gradiente |
| Vazão | 1,0 mL/min |
| Temperatura | 40 °C |
| Detecção | 254 nm |
| Volume | 4 µL |

Tabela 2. Condições de análise no sistema UFLC

| | |
|-------------|---|
| Coluna: | Shim-pack XR-ODS (3,0 mm x75 mm) |
| Fase móvel | A) 10 mM tampão fosfato (pH 7,0) B) Acetonitrila |
| Eluição | Gradiente |
| Vazão | 1,2 mL/min |
| Temperatura | 40 °C |
| Detecção | 254 nm |
| Volume | 1 µL |

Os cromatogramas obtidos para as análises de aminoácidos, na concentração de 400 pmol/uL cada, realizadas nos sistemas HPLC e UFLC podem ser observados, respectivamente, nas Figuras 1 e 2.

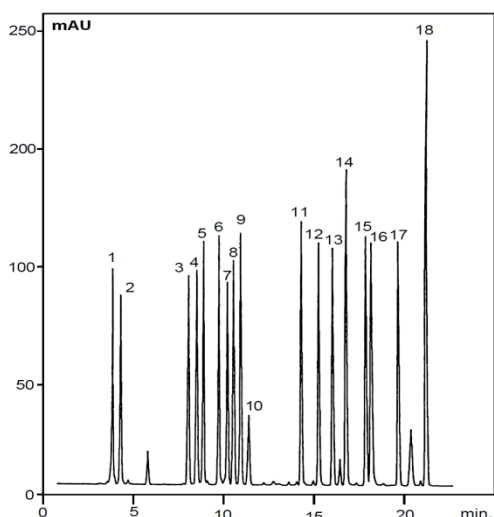


Figura 1. Análise de aminoácidos no sistema HPLC.

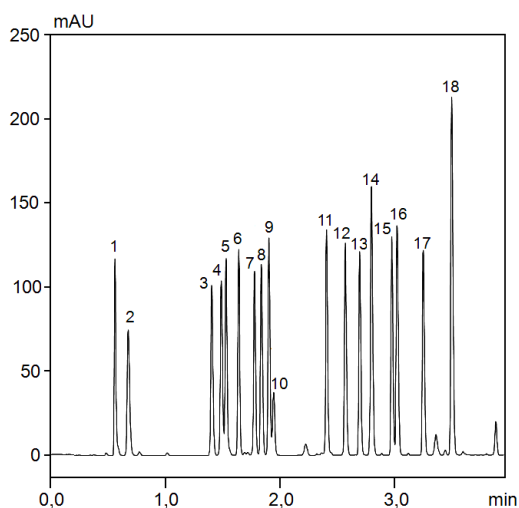


Figura 2. Análise de aminoácidos no sistema UFLC.

Os picos observados nos cromatogramas das Figuras 1 e 2 encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3. Ordem de eluição cromatográfica dos aminoácidos

| Pico | Sigla | Aminoácido |
|------|---------|--------------|
| 1 | Asp | Aspartato |
| 2 | Glu | Glutamato |
| 3 | Ser | Serina |
| 4 | Gly | Glicina |
| 5 | His | Histidina |
| 6 | Arg | Arginina |
| 7 | Thr | Treonina |
| 8 | Ala | Alanina |
| 9 | Pro | Prolina |
| 10 | Amônia | Amônia |
| 11 | Tyr | Tirosina |
| 12 | Val | Valina |
| 13 | Met | Metionina |
| 14 | Cys-Cys | Cisteína |
| 15 | Ile | Isoleucina |
| 16 | Leu | Leucina |
| 17 | Phe | Fenilalanina |
| 18 | Lys | Lisina |

Analisando as Figuras 1 e 2, observa-se elevada reprodutibilidade do perfil cromatográfico e que este independe do sistema utilizado (HPLC ou UFLC). Embora ambos os sistemas mostrem-se adequados para a análise de aminoácidos, o sistema UFLC é capaz de realizar a mesma análise em um tempo 6 vezes menor que o sistema HPLC convencional, aumentando a produtividade e a economia de solvente. Todavia, a resolução de alguns picos no sistema UFLC (4, 5, 10, 15 e 16) é diminuída em função do menor tempo de retenção dos compostos na coluna.