

O Desafio das Análises de Vitaminas e Aminoácidos por LC e LCMS





- *O Desafio da Análise de Vitaminas por HPLC*
- *Análise de Vitamina em Suplemento Dietético*
- *Análise de Aminoácidos*
- *As Vitaminas do Complexo B*
- *Método de LC-MS/MS sem Derivatização para Determinação de Aminoácidos*



O DESAFIO DA ANÁLISE DE VITAMINAS POR HPLC

As vitaminas desempenham papéis vitais nas atividades metabólicas do organismo. No entanto, como não podem ser sintetizadas em quantidades suficientes, elas devem ser supridas através da ingestão de alimentos ou por outros meios, como suplementos vitamínicos.

As vitaminas podem ser classificadas em dois grupos, hidrossolúveis e lipossolúveis, que podem ser identificadas e quantificadas utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). As vitaminas hidrossolúveis, ou seja, solúveis em água consistem principalmente em bases altamente polares com fraca retenção pela coluna de análise por HPLC, e por isso, normalmente são analisadas utilizando reagentes de pareamento iônico, o que dificulta o uso de uma eluição gradiente. Por outro lado, as vitaminas lipossolúveis consistem em compostos hidrofóbicos e são, geralmente, analisados por HPLC em fase reversa.

Diante do desafio de analisar os dois tipos de vitaminas por um único método, a Shimadzu desenvolveu a coluna Shim-pack MaqC-ODS I, empacotadas com um gel de sílica contendo metal ligado ao grupo octadecilsilano. Além das características hidrofóbicas do grupamento ODS, o metal também fornece efeitos de troca catiônica. Isso aumenta a retenção de compostos básicos. Desta forma, permite o uso apenas de uma solução tampão como fase móvel para análises em que, anteriormente, seria necessária a utilização de um reagente de par iônico, permitindo também o uso de eluição gradiente. Essas características são especialmente benéficas para a análise de vitaminas e produtos farmacêuticos solúveis em água que contêm uma grande quantidade de compostos básicos.

ANÁLISE SIMULTÂNEA DE VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS E LIPOSSOLÚVEIS

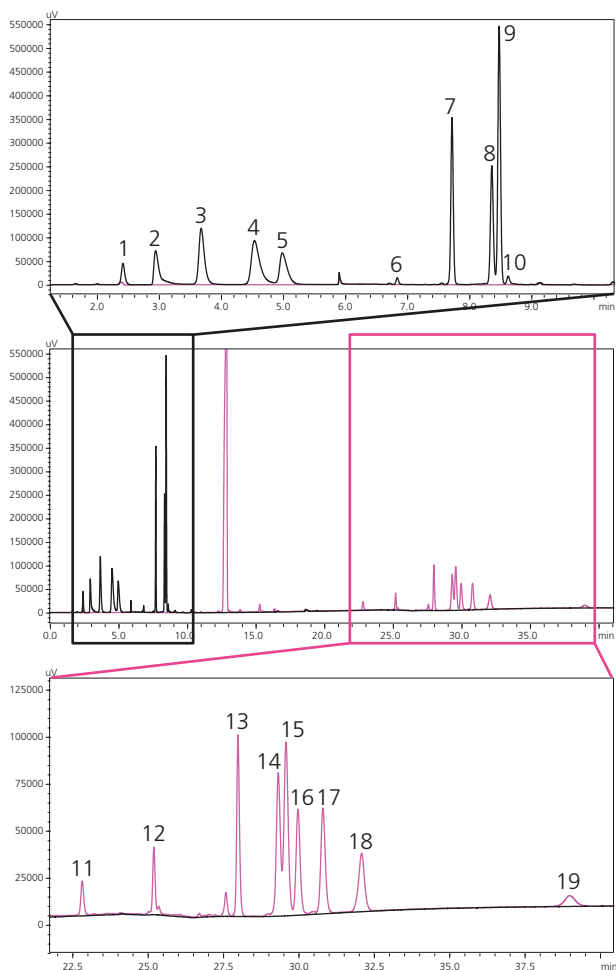
Neste estudo, a coluna Shim-pack MAqC-ODS I foi usada para analisar vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis em um único método.

O sistema integrado da Shimadzu, Prominence-i (LC-2040), com um detector de arranjo de foto diodo (DAD) foi utilizado para detectar 10 vitaminas hidrossolúveis e 9 lipossolúveis de forma rápida e com boa resolução entre os compostos.

Considerando as condições analíticas, a especificação da coluna foi a Shim-pack MAqC-ODS I (150 mm L. x 4.6 mm I.D., 5 µm) com eluição gradiente, utilizando como fases móveis Acetonitrila e 10 mmol/L de tampão Fosfato (pH 2,6). O comprimento de onda utilizado foi de 220 nm.

Os resultados indicaram que a coluna selecionada para análise de vitaminas alcançou uma boa separação entre as 10 vitaminas hidrossolúveis e 9 vitaminas lipossolúveis em uma única corrida (Figura 1).



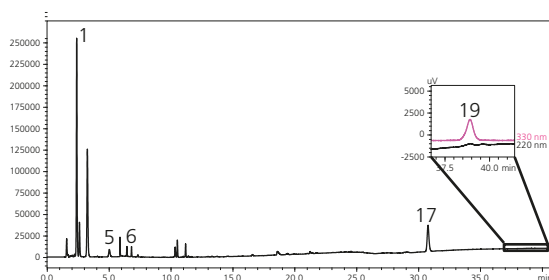


■ Picos

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. Ácido ascórbico (vitamina C) | 11. Retinol (vitamina A) |
| 2. Tiamina (vitamina B1) | 12. Acetato de retinil (acetato de vitamina A) |
| 3. Ácido nicotínico (vitamina B3) | 13. Menaquinona (vitamina K2) |
| 4. Nicotinamida (vitamina B3) | 14. Ergocalciferol (vitamina D2) |
| 5. Piridoxina (vitamina B6) | 15. Colecalciferol (vitamina D3) |
| 6. Ácido pantotênico (vitamina B5) | 16. α -Tocoferol (vitamina E) |
| 7. Ácido fólico (vitamina B9) | 17. Acetato de tocoferol (acetato de vitamina E) |
| 8. Cianocobalamina (vitamina B12) | 18. Fitonadiona (vitamina K1) |
| 9. Riboflavina (vitamina B2) | 19. Palmitato de retinil (palmitato de vitamina A) |
| 10. Biotina (vitamina B7) | |

Fig. 1 - Cromatograma da separação de 19 soluções padrões de vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis.

Uma amostra de água fortificada com polivitamínico foi avaliada. Todas as vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis foram detectadas em um único comprimento de onda, com exceção do palmitato de retinil (pico 19), cujo pico a 220 nm apareceu muito baixo devido à sua baixa concentração. Neste caso, o composto foi detectado a 330 nm, o comprimento de onda de máxima absorção (Figura 2).



- Picos
- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. Ácido ascórbico (vitamina C) | 17. Acetato de tocoferol (acetato de vitamina E) |
| 5. Piridoxina (vitamina B6) | 19. Palmitato de retinil (palmitato de vitamina A) |
| 6. Ácido pantotênico (vitamina B5) | |

Fig. 2 - Cromatograma de separação das vitaminas presentes na água fortificada com polivitamínico.

10 vitaminas hidrossolúveis e 9 vitaminas lipossolúveis foram analisadas com sucesso utilizando a coluna Shim-pack MAqC-ODS I em um único método.

Avançado

i-Series

Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho



ANALYTICAL
INTELLIGENCE

Finalmente, um LC tão Inteligente e Flexível quanto Você.

inovador

Rotinas automatizadas somadas ao conhecimento operacional dos analistas permitem coletar dados por um longo período, reduzindo atividades realizadas em laboratório e melhorando a eficiência do trabalho.

inteligente

Além de facilitar a rotina do usuário, a Inteligência Analítica permite que qualquer pessoa obtenha resultados analíticos confiáveis.

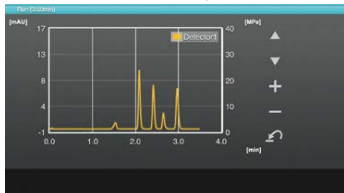
intuitivo

Com seu design intuitivo, até mesmo usuários iniciantes em cromatografia líquida podem operar facilmente a interface do usuário.



Auto amostrador com Fácil Acesso para Inserir Vials

Tela do Smartphone



Monitoramento do Sistema por Meio de Dispositivos Inteligentes



LabSolutionsDirect

Acesso Remoto







ANÁLISE DE VITAMINA EM SUPLEMENTO DIETÉTICO EM CONFORMIDADE COM A USP: ANÁLISE DE CIANOCOBALAMINA COM O NEXERA™ XR

A Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) é usada como referência no controle de qualidade de suplementos alimentares. Embora essa vitamina esteja envolvida na produção de sangue e, também, no metabolismo, ela não pode ser sintetizada no organismo e raramente é encontrada em alimentos de origem vegetal. Como a deficiência de vitamina B12 ocorre facilmente, é necessário incluí-la em muitos suplementos alimentares. Normalmente, a quantidade de vitamina B12 é expressa como o valor equivalente à cianocobalamina.

A USP40-NF35 descreve dois métodos analíticos para cianocobalamina. O primeiro método analítico descrito é por HPLC e o segundo, um ensaio microbiano. Nesta nota de aplicação, a Shimadzu traz um teste de adequação do sistema compatível com a USP40-NF35 para cianocobalamina (vitamina B12) realizado com o sistema Nexera XR. Um suplemento multivitamínico utilizado comercialmente foi quantificado a partir do método proposto e dois modelos diferentes de HPLC da Shimadzu foram avaliados para o teste de adequação do sistema: o Nexera XR e o Prominence.

EXEMPLO DE ANÁLISE: TESTE DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA

O método utilizado com o Nexera XR foi inserido utilizando uma coluna Shim-pack™ GIS-C18 (150 mm x 4,6 mm I.D., 5 µm; código USP L1), com eluição gradiente (Metanol/Água 35:65) e comprimento de onda a 550nm, utilizando um detector PDA. O volume de amostra utilizada foi de 200 µL.

O valor de referência obtido no teste de adequação do sistema está descrito na tabela 1 e a fig. 3 mostra o cromatograma da solução padrão de cianocobalamina. A tabela 2 mostra os resultados da repetibilidade da cianocobalamina. O desvio padrão relativo (% RSD) da área do pico satisfaz o valor de referência, confirmando que o Nexera XR possui adequação do sistema.

Tabela 1. Valor de referência do teste de adequação do sistema para a cianocobalamina

Desvio padrão relativo (% RSD) (n = 6)	≤3
--	----

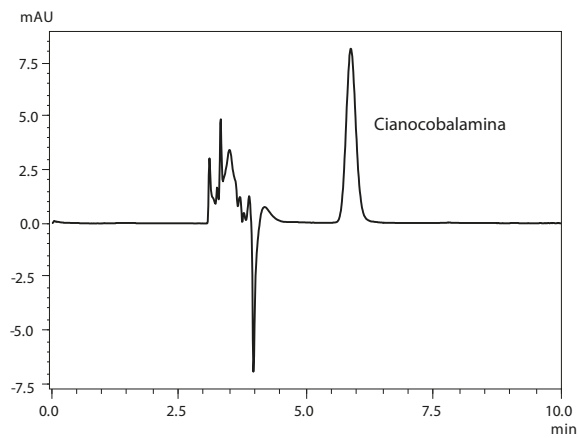


Fig. 3 - Cromatograma de cianocobalamina (1 mg/L)

Tabela 2. Repetibilidade para cianocobalamina (n = 6)

	%RSD	
	Tempo de retenção	Área do pico*
Cianocobalamina	0.122	0.867

* : USP40-NF35 padrão: 3% ou menos

ANÁLISE DA AMOSTRA DE SUPLEMENTO VITAMÍNICO

O suplemento vitamínico comercial foi suspenso em água, misturado e centrifugado, e posteriormente, filtrado antes de injetar no HPLC. A figura 1 mostra o cromatograma da amostra analisada.

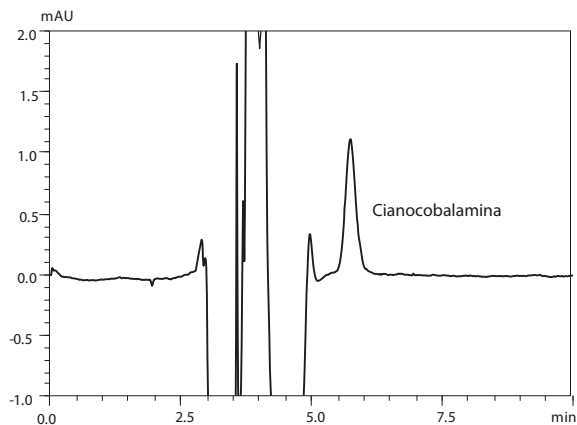


Fig. 1 - Cromatograma do suplemento vitamínico

ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE CIANOCOBALAMINA

O tempo de retenção do pico obtido a partir da análise do suplemento multivitamínico foi comparado com o espectro da solução padrão de cianocobalamina. A Fig. 2 mostra a sobreposição de ambos os espectros que foram normalizados para facilitar a comparação.

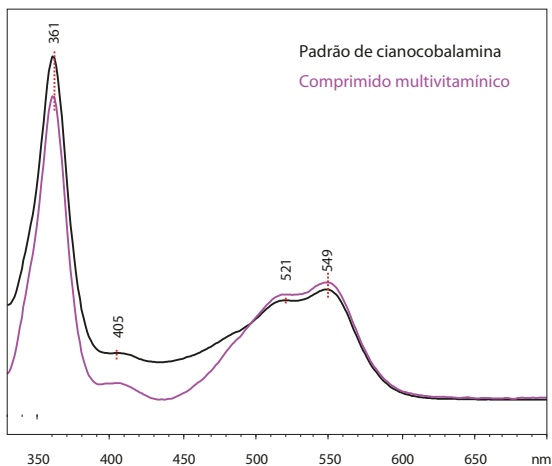


Fig. 2 - Espectros de cianocobalamina

COMPATIBILIDADE COM O MODELO PROMINENCE

O teste de adequação do sistema e a análise do suplemento multivitamínico descrito acima também foi realizado da mesma maneira com o HPLC Prominence da Shimadzu. As condições analíticas e o fluxo de trabalho de pré-tratamento foram os mesmos descritos anteriormente. A Fig. 6 mostra os cromatogramas da solução padrão de cianocobalamina e a Fig. 7 mostra os cromatogramas da amostra analisada. A tabela 4 apresenta a quantificação dos valores da cianocobalamina no suplemento multivitamínico pelos dois sistemas utilizados neste estudo.

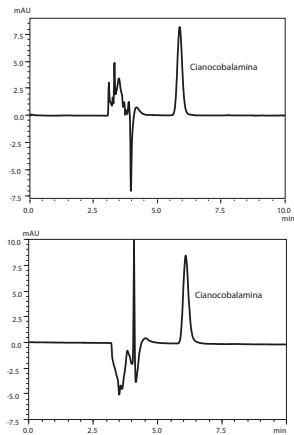


Fig. 6 - Cromatogramas de cianocobalamina (1 mg / L). (Parte superior: Nexera XR, Parte inferior: Prominence)

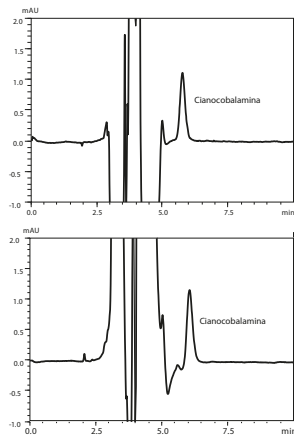


Fig. 7 - Cromatogramas do suplemento comercial. (Parte superior: Nexera XR, Parte inferior: Prominence)

Tabela 4. Valores de quantificação da cianocobalamina no suplemento multivitamínico.

Teor calculado	Nexera XR	0.44 µg
	Prominence	0.49 µg
Teor descrito no rótulo do produto*		0.45-1.25 µg

*: Padrão USP40-NF35: 90% a 150% da quantidade rotulada

CONCLUSÃO

O Nexera XR atendeu ao requisito de adequação do sistema através da análise de cianocobalamina (vitamina B12). Os resultados obtidos foram compatíveis com os do modelo Prominence já existente.

Cromatografia Líquida de Ultra Performance

série Nexera

EXPERIMENTE NOVOS BENCHMARKS

Com mais de 40 anos no mercado de cromatografia líquida, a Shimadzu traz um novo BENCHMARK de inteligência, eficiência e design com a série Nexera LC-40!

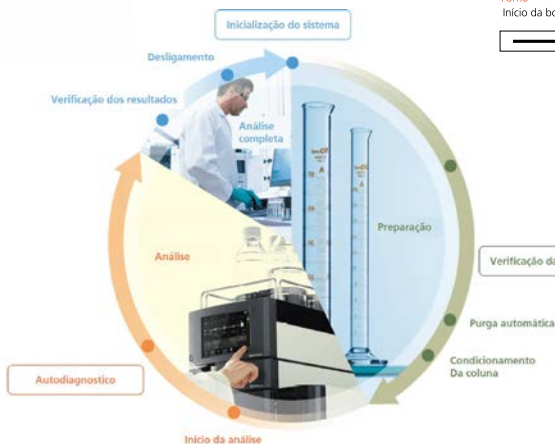
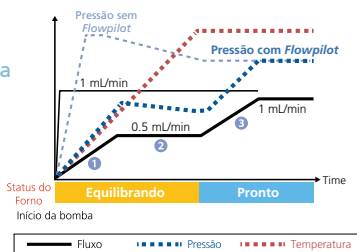
Esse novo conceito combina nos seus quatro modelos exclusivos uma base sólida e know-how tecnológico com funções envolvendo M2M, IoT e AI para atender as demandas atuais.



ANALYTICAL
INTELLIGENCE



- Operação totalmente autônoma da inicialização ao encerramento
- Autodiagnóstico e restabelecimento do sistema
- FlowPilot protege as colunas
- Níveis da fase móvel medidos em tempo real



ANALYTICAL
INTELLIGENCE

Funções de suporte automatizadas utilizando tecnologia digital, como M2M, IoT e Inteligência Artificial (AI), que permitem maior produtividade e confiabilidade máxima.





ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS UTILIZANDO A FUNÇÃO AUTOMÁTICA DE PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRA NO HPLC PROMINENCE™-I E NEXERA XR

A análise de aminoácidos é aplicada em vários segmentos, incluindo alimentos e no desenvolvimento de medicamentos. O método de derivatização pós-coluna é, geralmente, usado na análise de aminoácidos por HPLC. No entanto, é desafiador realizar uma análise rápida devido às características da coluna usada na derivatização pós-coluna. Já o método de derivatização pré-coluna, em que os aminoácidos são derivatizados antes da análise, permite uma análise rápida e simples em comparação com o método anteriormente citado, porque a derivatização pode ser automatizada no próprio sistema. Neste catálogo, são mostrados dois exemplos de aplicações para a análise de aminoácidos com a função automática de pré-tratamento de amostra, presente tanto nos modelos de HPLC integrados quanto nos modulares da Shimadzu.

ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS (GABA) EM CHÁS

A Shimadzu desenvolveu um método rápido para análise de quatro compostos presentes em chás. A teanina, o ácido glutâmico, a arginina e o ácido gama aminobutírico (GABA). Esses compostos foram avaliados nos chás verdes *Sencha* e *Hojicha*.

A análise foi realizada por derivatização pré-coluna com o reagente o-ftalaldeído (OPA) e ácido mercaptopropiônico (MPA) utilizando a função automática de pré-tratamento de amostra do HPLC Prominence-i.

FUNÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTO AUTOMÁTICO

Tanto os sistemas integrados, Prominence-i e Nexera-i, como os modulares da linha Nexera da Shimadzu apresentam originalmente a função de pré-tratamento de amostra através de um amostrador automático com três modos que contemplam a "Diluição", a "Adição" e a "Co-injeção".

A função "Co-injeção" permite a aspiração de amostras de múltiplos frascos na ordem designada e, também, possibilita a execução da mistura de reagentes com um tempo de preparo definido pelo analista.

A figura 1 mostra a tela do software para definir as condições de pré-tratamento (co-injeção). Dessa maneira, aspirações sequenciais de reagentes podem ser configuradas facilmente.

The screenshot shows the 'Pretreatment' window with the 'Mode' set to 'Co-Injection'. The 'Advanced' option is selected under 'Aspiration Settings'. The 'Total Injection Volume' is 24.0 μL and the 'Max Injection Volume' is 100 μL . A table lists the aspiration sequence: Order 1 (Tray 3, Vial 1, Volume 5.0), Order 2 (Tray 3, Vial 2, Volume 2.0), and Order 3 (Analysis sample). The 'Mixing Settings' include a 'Mixing Count' of 10, 'Wait Time' of 2.0 min, and 'Mixing Volume' of 15 μL . The 'Air Gap Volume' is set to 1.0 μL . A diagram on the right illustrates the aspiration process with air gaps. The 'Comment' field is empty. The window has 'OK', 'Cancel', and 'Help' buttons at the bottom.

Order	Tray Number	Vial Number	Volume(μL)
1	3	1	5.0
2	3	2	2.0
3	Analysis sample		

Fig. 1 - Tela de configuração da função de pré-tratamento (co-injeção) Prominence-i (LC-2040C)

EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS

Cerca de 1 g de folha de chá foram preparadas em 50 mL de água a diferentes temperaturas (20, 40, 60, 80 ou 95 °C) e agitadas manualmente por 30 segundos. Em seguida, o chá verde Sencha foi diluído 10 vezes e o Hojicha foi diluído 5 vezes com 0,1 mol / L de ácido clorídrico.

CONDIÇÕES ANALÍTICAS

Considerando as condições analíticas, a especificação da coluna foi a Shim-pack GIST C18 (100 mm L. x 3 mm I.D., 3 μ m) com eluição gradiente, utilizando como fases móveis Água/Acetonitrila/Metanol e tampão fosfato de potássio (20mmol/L) (pH 6.5). O detector utilizado foi o de fluorescência (ex. 350 nm, em. 450nm).

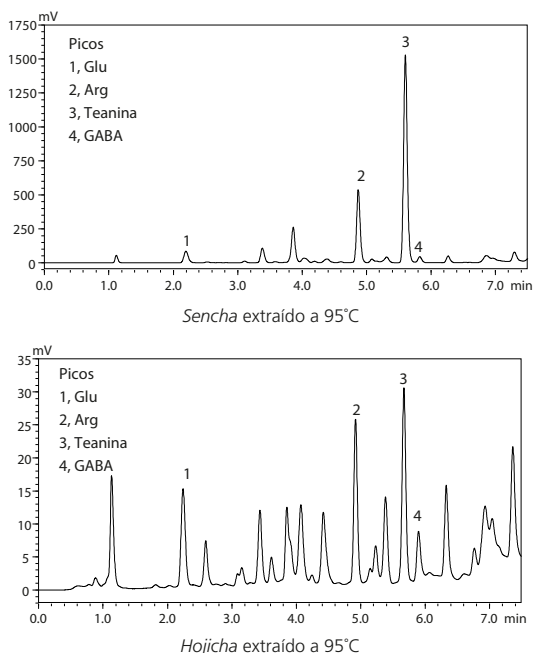


Fig. 2 Cromatogramas dos chás verdes Sencha e Hojicha

LINEARIDADE DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração foi realizada entre 0,5 a 50 $\mu\text{mol/L}$ para ácido glutâmico, arginina e GABA, e de 0,5 a 100 $\mu\text{mol/L}$ para teanina. Os resultados apresentaram excelente linearidade com um coeficiente de determinação $R^2 = 0,999$ ou superior para todos os compostos.

RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO

As concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de compostos presentes nos chás Sencha e Hojicha foram calculados com base nas curvas de calibração. Os resultados são mostrados nas Fig. 3 e Fig. 4. O chá verde Sencha é geralmente caracterizado com um forte sabor umami, enquanto o hojicha tem uma fragrância mais forte. Os resultados confirmaram claramente que o sencha apresentou maior conteúdo dos componentes teanina e ácido glutâmico. Neste estudo, uma quantidade maior de teanina foi extraída a 95°C. No entanto, como a extração das catequinas adstringentes aumentou com a temperatura, pode ser entendido que, a partir desses resultados, a temperatura de 60°C é a adequada para extrair o sabor umami enquanto suprime a adstringência.

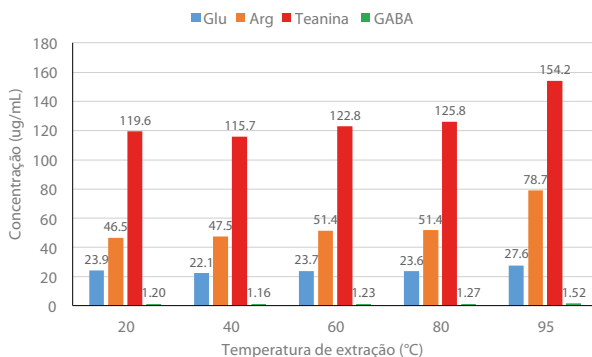


Fig. 3 - Resultados das concentrações dos compostos analisados da extração do chá verde Sencha a diferentes condições de temperatura.

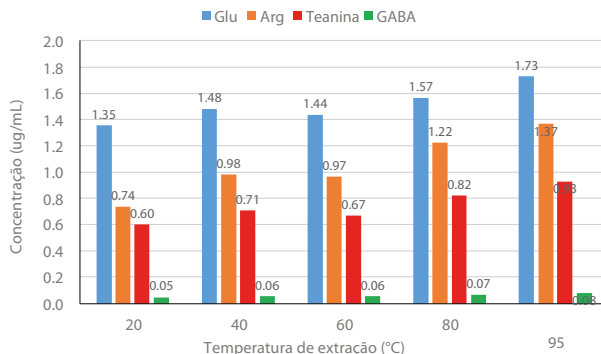
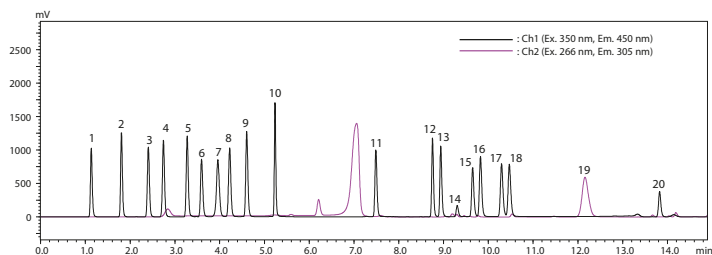


Fig. 4 - Resultados das concentrações dos compostos analisados da extração do chá verde Hojicha a diferentes condições de temperatura.

Outro estudo realizado com a função automatizada de reação de derivatização no sistema de injeção é mostrado na figura 5, em que foi possível a separação de 20 aminoácidos em apenas 14 minutos, utilizando o sistema modular Nexera XR. Sendo assim, há uma maior sensibilidade na análise com menor consumo de amostras e reagentes quando comparado a reações de derivatização realizadas manualmente pelo analista.

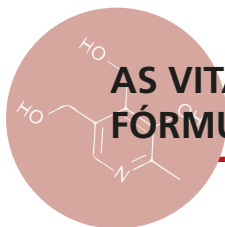


1. Ácido Aspártico; 2. Ácido Glutâmico; 3. Asparagina; 4. Serina; 5. Glutamina; 6. Histidina; 7. Glicina; 8. Treonina; 9. Arginina; 10. Alanina; 11. Tirosina; 12. Metionina; 13. Valina; 14. Cistina; 15. Triptofano; 16. Fenilalanina; 17. Isoleucina; 18. Leucina; 19. Prolina; 20. Lisina.

Fig. 5 - Cromatograma da análise simultânea de 20 aminoácidos (25 µmol/L cada).

Uma análise simples de aminoácidos com derivatização pré-coluna é possível utilizando o método automático com a função de pré-tratamento de amostra presente tanto nos sistemas integrados quanto nos modulares.





AS VITAMINAS DO COMPLEXO B EM FÓRMULAS INFANTIS

O complexo B é formado por 8 vitaminas: B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantotênico), B6 (piridoxina), B7 (biotina), B9 (ácido fólico), B12 (cobalamina). Elas desempenham papéis essenciais para o nosso organismo, como na geração de energia, no sistema imunológico, na saúde da pele, no desenvolvimento de bebês saudáveis entre outros benefícios. Como não são produzidas em quantidades adequadas pelo organismo, essas vitaminas são obtidas em abundância em diversas fontes alimentares.

No período de amamentação, baixos níveis de Vitaminas do complexo B podem afetar de forma negativa o crescimento dos bebês. Portanto, as fórmulas infantis devem incluir quantidades adequadas de nutrientes, incluindo esse tipo de vitaminas.

O Consumo Dietético de Referência (DRI) e o Aditivo Alimentar emitiu o valor de referência da exigência diária de Vitaminas do complexo B em fórmulas infantis.

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR LC-MS/MS DE 8 VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS EM LEITE EM PÓ INFANTIL

Foi desenvolvido um método por LC-MS/MS (LCMS-8060 NX) Para a detecção e quantificação precisa e simultânea de 8 vitaminas do complexo B solúveis em água em fórmula infantil com 5 compostos marcados isotopicamente como padrões internos e com um procedimento simples de extração simples de amostra.

Foram utilizados oito padrões vitamínicos solúveis em água: tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), nicotinamida (B3), ácido

pantotênico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7) e ácido fólico (B9). Cinco compostos marcados isotopicamente foram utilizados como padrões internos $^{13}\text{C}_4$ -tiamina (IS B1), $^{13}\text{C}_4$, $^{15}\text{N}_2$ -riboflavina (IS B2), $^2\text{H}_4$ -nicotinamida (IS B3), $^{13}\text{C}_6$, Ácido $^{15}\text{N}_2$ -pantotênico (IS B5) e $^2\text{H}_2$ -biotina (IS B7).

As vitaminas B1, B3, B5 e B6 foram diluídas com água enquanto as vitaminas B2, B7 e B9 foram diluídos usando NaOH 0,01M para a solução estoque. Todos os padrões de vitaminas e padrões internos foram diluídos em soluções de trabalho para construir as curvas de calibração. Para o método de preparação de amostras, 1 g de fórmula infantil foi pesada, suspendida em água, centrifugada, com adição posterior de 1% de ácido acético, filtrada e diluída 5x para injeção. O LCMS utilizado foi o modelo LCMS-8060NX com ESI aquecido. Para a separação dos compostos, foi utilizada a coluna Shim-pack GIST C18-AQ (2,1 mm x 50 milímetros; 1,9 μm) em eluição gradiente.

MÉTODO MRM PARA 8 VITAMINAS B SOLÚVEIS EM ÁGUA E PADRÕES INTERNOS

A otimização automatizada de MRM de 8 padrões de vitaminas solúveis em água e 5 padrões internos foram realizados usando o software LabSolutions. Os precursores foram seus íons protonados, $[\text{M} + \text{H}]^+$. Duas transições de MRM para cada composto foi escolhido para quantificar e confirmar (Tabela 1).

Tabela 1. Transições MRM para as 8 vitaminas hidrossolúveis e os 5 padrões internos.

Nome do composto	Íon quantificador	Íon qualificador	Padrão interno	Íon quantificador	Íon qualificador
B1	265.00>81.10	265.00>144.10	IS B1	269.00>122.10	269.00>148.10
B2	377.00>243.15	377.00>172.20	IS B2	383.00>249.15	383.00>175.15
B3 (ácido nicotínico)	124.00>53.10	124.00>78.10	IS B3	127.00>84.10	127.00>81.10
B3 (nicotinamida)	123.00>53.10	123.00>78.05			
B5	170.00>77.10	170.00>152.10			
B6	220.10>90.10	220.10>202.25	IS B5	224.00>206.10	224.00>188.10
B7	245.00>227.10	245.00>97.10	IS B7	247.00>229.10	247.00>99.10
B9	442.10>295.10	442.10>176.10			

Curvas de calibração foram obtidas para todos os 8 compostos vitamínicos solúveis em água com faixa entre 10 ng/mL a 750 ng/mL A curva apresentou boa linearidade com coeficiente de correlação (R^2) > 0,999.

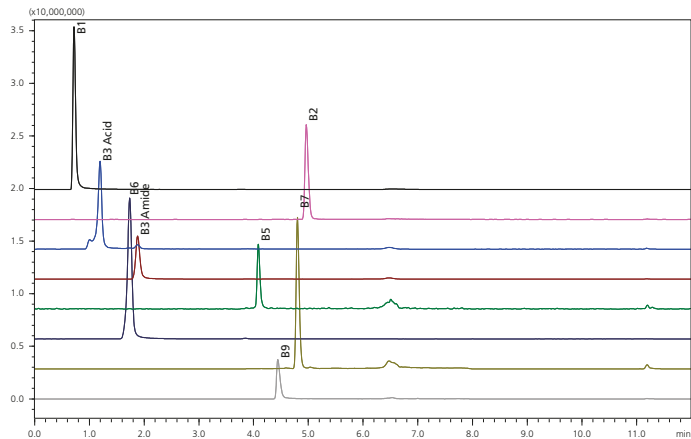


Fig.1 - Cromatogramas total dos íons dos padrões de 8 vitaminas do complexo B a concentração de 50 ng/mL.

O LOD e o LOQ das 8 vitaminas B solúveis em água variou de 0,08 - 1,36 ng/mL e 0,23 - 4,13 ng/mL, respectivamente. Os testes de repetibilidade (n = 6) foram realizados em concentração de 10 ng/mL para cada padrão vitamínico e os resultados são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados de Linearidade, LOD, LOQ, e repetibilidade das 8 vitaminas do complexo B.

Nome do composto	Faixa (ng/mL)	R ²	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/ml)	RSD% (n=6)
B1	1-500	0.9994	0.52	0.17	2.80
B2	1-750	0.9999	0.23	0.08	3.67
B3 (ácido nicotínico)	1-750	0.9993	0.97	0.32	3.20
B3 (nicotinamida)	1-750	0.9994	0.52	0.17	2.36
B5	5-500	0.9990	4.13	1.36	1.91
B6	1-750	0.9999	0.51	0.17	3.94
B7	1-100	0.9991	0.32	0.11	2.07
B9	1-100	0.9992	1.00	0.33	2.87

ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DE 8 VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS EM FÓRMULA INFANTIL

Um teste de recuperação foi realizado com a amostra de fórmula infantil em pó. As 8 vitaminas hidrossolúveis foram adicionadas na fórmula infantil em pó em diferentes concentrações: 25 mg/kg para as vitaminas B3 (ácido nicotínico e nicotinamida) e B5; 5 mg/kg para as vitaminas B1, B2 e B6; 0,5 mg/kg para as vitaminas B7 e B9.

O teste de recuperação foi realizado duas vezes para aumentar ainda mais a confiabilidade dos resultados. Cada duplicata foi injetada três vezes e a concentração média foi utilizada para o cálculo de recuperação. Os resultados indicaram boa recuperação das 8 vitaminas hidrossolúveis, alcançando percentuais entre 90,1 a 113,6% (Tabela 3).

Tabela 3. Média de recuperação das 8 vitaminas hidrossolúveis em fórmula infantil (n=2 x 3).

Nome do composto	Recuperação (%)
B1	113.6
B2	105.2
B3 (ácido nicotínico)	101.6
B3 (nicotinamida)	109.8
B5	104.9
B6	108.0
B7	90.1
B9	90.1

QUANTIFICAÇÃO DE 8 VITAMINAS HIDROSSOLÚVEIS DO MATERIAL DE REFERÊNCIA PADRÃO NIST 1849A.

O método estabelecido foi avaliado usando o material de referência padrão, NIST 1849a, para fórmulas infantis/adulto. Três amostras de leite em pó NIST 1849a foram utilizadas e preparadas para uma

extração eficiente dos compostos de interesse, sendo injetadas em triplicata para garantir a precisão do método. Os resultados obtidos estão dentro da concentração esperada e são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Resultado da quantificação das 8 vitaminas do complexo B em fórmula nutricional NIST 1849 (Fator de diluição. = 200).

Vitamina	Teor (mg/kg)	Replicata (mg/kg) (n=3)		
		Primeira	Segunda	Terceira
B1 - Tiamina	12.57 ± 0.98	13.14	13.23	12.89
B2 - Riboflavina	20.37 ± 0.52	20.59	20.80	20.77
B3 - Nicotinamida	108 ± 10	100.92	101.31	100.53
B5 – Ácido pantotênico	68.2 ± 1.9	69.02	67.99	67.34
B6 - Piridoxina	13.46 ± 0.93	13.58	14.03	13.82
B7 - Biotina	1.99 ± 0.13	2.06	2.09	2.09
B9 – Ácido fólico	2.293 ± 0.062	2.253	2.285	2.277

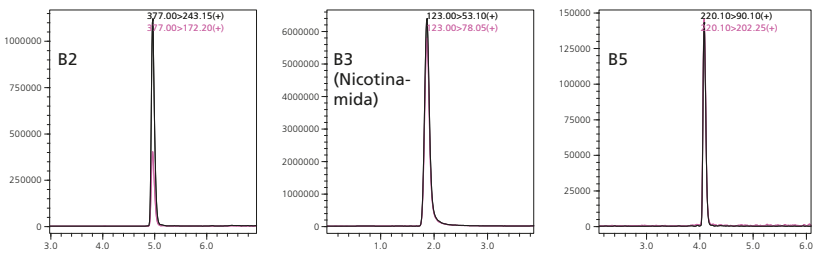


Fig. 2 - Cromatogramas de MRM selecionados da amostra NIST 1849a.

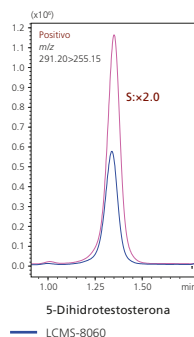
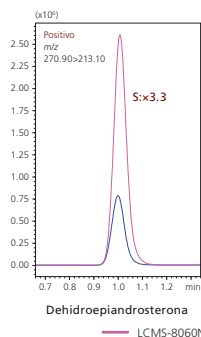
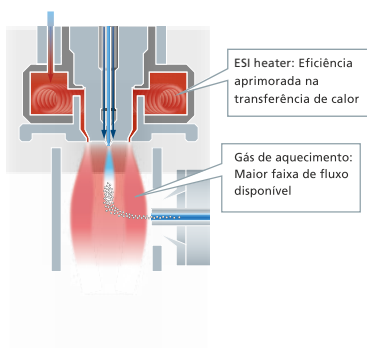
O método desenvolvido com o LCMS-8060NX utilizando um procedimento simples de preparo de amostra, apresentou sensibilidade e seletividade para a detecção e a quantificação de 8 vitaminas do complexo B. Para este método, foi utilizado um material de referência padrão, NIST 1849a. Os resultados da quantificação se enquadraram dentro dos valores oficiais.

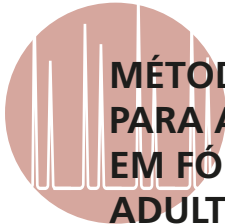


Desempenho, Sensibilidade e Robustez aprimoradas

O LCMS-8060NX é o espectrômetro de massas triplo quadrupolo com maior sensibilidade e velocidade de detecção do mercado. Ele fornece robustez e facilidade de operação superiores, bem como funções de Inteligência Analítica para maximizar a produtividade de seu laboratório.

- Maior Sensibilidade e Velocidade de Detecção do Mercado
- Excelente Facilidade de Uso para Maior Eficiência nos Procedimentos Analíticos
- Robustez Aprimorada para uma Maior Produtividade do Laboratório
- Maior Eficiência de Dessolvatação para Maior Sensibilidade





MÉTODO DE LC-MS/MS SEM DERIVATIZAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM FÓRMULAS NUTRICIONAIS INFANTIS E ADULTOS DE ACORDO COM AS NORMAS DA AOAC

As análises quantitativas de L- α -aminoácidos proteinogênicos, assim como também da taurina, em fórmulas infantis e adultos são realizadas rotineiramente em laboratórios de controle de qualidade. O leite em pó, fonte de proteínas de alta qualidade, contém os aminoácidos essenciais (EAA) que devem ser obtidos da ingestão nutricional. A taurina é comumente encontrada em leite em pó infantil, que pode proteger o ser humano da exposição a substâncias tóxicas.

As análises quantitativas de aminoácidos são convencionalmente realizadas por HPLC-RF com derivatização pré ou pós-coluna que envolve um procedimento tedioso. Normalmente, três procedimentos de hidrólise são necessários para determinar todas os AA listados nos requisitos da AOAC. Recentemente, foi relatado o método por LC-MS/MS sem derivatização, simples e rápido, e foi aplicado a quantificação de aminoácidos livres e hidrolisados proteicos em vários alimentos e/ou amostras biológicas. Este estudo se concentra na validação do método por LC-MS/MS sem derivatização para determinação do total de aminoácidos proteinogênicos e da taurina utilizando o material de referência padrão (SRM) NIST 1849a de fórmula infantil e adulto.

PREPARO DA AMOSTRA

Uma solução-estoque com 20 aminoácidos (AA) e taurina (Tau) foram preparados a partir de um padrão de aminoácido (Sigma-Aldrich).

O material de referência padrão de fórmula infantil e adultos NIST 1849a (Sigma-Aldrich) foi usada para fins de validação de método.- Seis fórmulas nutricionais para adultos e crianças foram adquiridas nos mercados locais e utilizadas para a análise de aminoácidos e da taurina neste estudo. Diferentes processos de hidrólise foram usados no preparo de amostras. (1) Hidrólise ácida: 0,5 mL de ácido clorídrico a 37% (HCl) e 0,5 mL de ácido propiônico foram adicionados a 50 mg amostra e aquecido a 160 °C por 1 hora, seguido de secagem com gás N₂. (2) Hidrólise alcalina: 1mL de NaOH 4N foi adicionado a 50 mg de amostra e aquecido a 195 °C por 1 hora. O pH foi ajustado para 4 com solução de HCl 1N e os sais formados foram removidos por centrifugação. (3) Pré-oxidação seguida de hidrólise ácida: 2 mL de ácido performico recém-preparado (Ácido fórmico 9: 1: H₂O₂ a 30%) foi adicionado a 50 mg de amostra e aquecido a 50 °C em banho-maria por 1 hora. Em seguida, a amostra foi hidrolisada por hidrólise ácida com o mesmo procedimento descrito acima.

CONDIÇÕES ANALÍTICAS

Uma coluna de aminoácidos dedicada (coluna Intrada de Aminoácidos 100 mmL x 3 mmI.D, 3 µm) foi selecionada para a separação dos compostos com uma eluição gradiente programada. As condições detalhadas de LC e MS estão descritas na nota de aplicação (n° AD 0184A). As amostras hidrolisadas foram injetadas no LCMS-8045 triplo quadrupolo para análise.

ANÁLISE QUANTITATIVA DE 20 AMINOÁCIDOS E DA TAURINA POR LC-MS/MS

Os 20 aminoácidos proteinogênicos e a taurina são os analitos alvo em amostra de fórmula infantil e adulto. Um método MRM para análise quantitativa dos 20 aminoácidos e taurina foi estabelecido usando a mistura de padrões. Para a curva de calibração, foi utilizada

uma faixa de concentração 0,1 a 50 μM em HCl 0,1N e utilizada para a análise do padrão de referência e, também, para as amostras. Os cromatogramas MRM dos padrões dos 20 aminoácidos e da taurina obtidos no LCMS-8045 são mostrados na Figura 1.

Os testes de precisão e repetibilidade (com base na área) do método MRM foram realizados pela repetição da injeção do padrão puro de 20 μM . Os resultados obtidos são satisfatórios para o estabelecimento da curva de calibração (dados não mostrados).

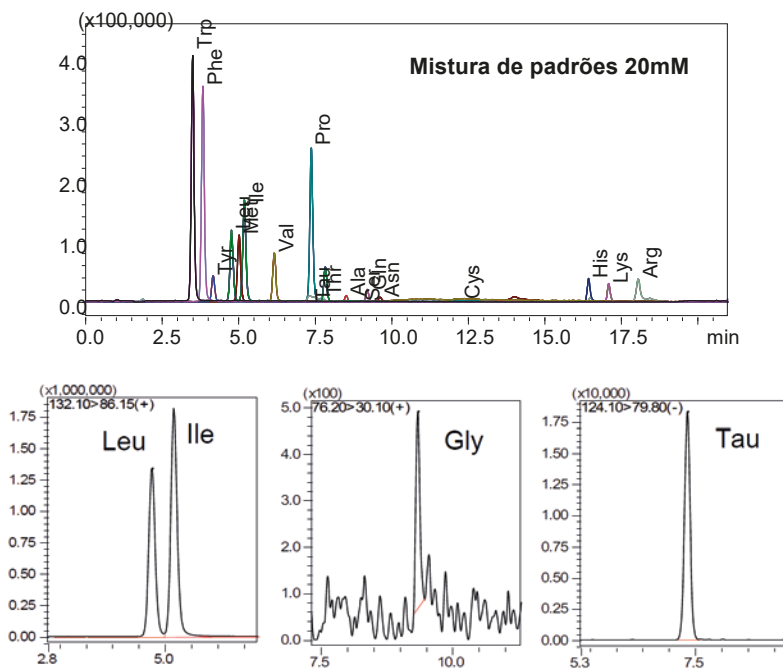


Fig. 1 - Cromatogramas MRM do mix de padrão de 20 AA e taurina preparada em solução de HCl 0,1 N. (superior); mistura de padrões em concentração de 20 mM; (inferior): picos MRM de AA selecionado, 20 mM.

AValiação dos Métodos de Hidrólise da Amostra com SRM

Os materiais de referência padrão (SRM) NIST 1849a foram utilizados para avaliação do pré-tratamento da amostra (hidrólise) e para análise por LC-MS/MS. As proteínas da fórmula infantil foram hidrolisadas

por hidrólise ácida (método 1) a 160 °C. O tempo de duração da hidrólise foi testado e os resultados (Figura 2) indicam claramente que as maiores quantidades de aminoácidos foram produzidas com 1 hora de hidrólise. Devido à degradação do triptofano sob a condição da hidrólise ácida, a hidrólise alcalina (método 2) foi definida para a análise de triptofano. Já a pré-oxidação seguida de hidrólise ácida (método 3) foi realizada para a análise de cisteína/cistina. Na hidrólise alcalina, a amostra foi hidrolisada com solução de NaOH 4N por 30 minutos submetida a diferentes temperaturas. Os resultados mostrados na Figura 3 indicam que a hidrólise a 195 °C apresentou o melhor resultado para o triptofano e a maioria dos aminoácidos, exceto para prolina, ácido aspártico e taurina, cujos resultados foram melhores com a hidrólise a 180 °C. Sendo assim, um tempo de aquecimento a 195 °C por uma hora foi definido para hidrólise alcalina. No método de hidrólise de pré-oxidação com ácido per fórmico, a cisteína e a cistina são convertidas em ácido cisteico, que foi quantificado com outra curva de calibração. Os resultados da análise do hidrolisado SRM estão resumidos na Tabela 1 e comparados com os valores de referência do NIST. Os resultados quantitativos de 6 dos 18 aminoácidos correspondem aos valores oficiais de referência (Ile, Val, Glu, Cys, His e Tau, recuperação 86%~109%). Os resultados de 11 aminoácidos se mostraram ligeiramente fora dos valores de referência (8 abaixo da recuperação em 71% ~ 91%, 3 acima da recuperação em 123% ~ 138%), mas o resultado medido de Ala está significativamente abaixo do valor de referência (recuperação: 26,4%).

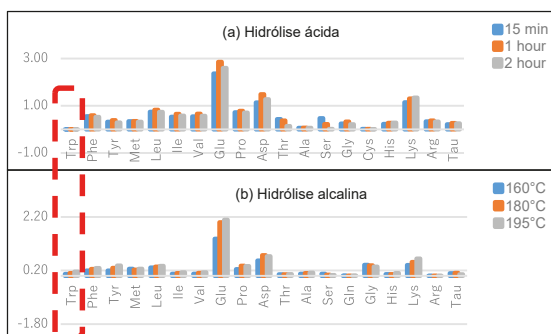


Fig. 2 - Perfis do total de aminoácidos no SRM sob diferentes condições de hidrólise: a) hidrólise ácida a 160 °C em diferentes tempos. b) hidrólise alcalina a temperaturas diferentes com tempo constante de 0,5 h.

Tabela 1. Resumo dos resultados da quantificação de aminoácidos e da taurina (g / 100g) em SRM (NIST 1849a).

Aminoácido	Transição MRM	RT (min)	Concentração (g/100g)	Valor NIST 1849a	Incerteza	Recuperação (%)	Efeito matriz (%) ^[3]
Triptofano ^[1]	205.1>188.1	3.49	0.161	0.184	0.01	87.5	- ^[3]
Fenilalanina	166.1>120.1	3.83	0.711	0.58	0.021	122.6	80.8
Tirosina	182.1>136.0	4.16	0.435	0.51	0.043	85.2	82.6
Leucina	132.1>86.2	4.76	0.947	1.261	0.05	75.1	86.9
Isoleucina	132.2>86.2	5.18	0.666	0.66	0.071	100.9	85.4
Valina	118.1>72.1	6.16	0.654	0.76	0.11	86.1	90.5
Ácido glutâmico	148.1>84.1	7.21	2.832	2.59	0.27	109.3	104.2
Prolina	116.1>70.1	7.37	0.842	1.195	0.086	70.5	90.4
Ácido aspártico	134.2>74.1	8.24	1.228	1.07	0.057	114.8	118.1
Treonina	120.1>74.0	7.73	0.524	0.64	0.022	81.9	104.5
Alanina ^[1]	90.1>44.1	8.51	0.120	0.455	0.021	26.4	- ^[3]
Serina	106.1>60.2	9.00	0.526	0.72	0.03	73.1	112.3
Glicina	76.2>30.1	9.37	0.180	0.241	0.019	74.7	133.5
Cisteína ^[2]	241.0>152.0	12.24	0.125	0.1286	0.0071	97.2	-
Histidina	156.1>110.1	16.44	0.305	0.315	0.036	96.9	123.6
Lisina	147.0>84.1	17.10	1.392	1.01	0.071	137.9	115.0
Arginina	175.1>70.1	18.07	0.366	0.4	0.029	91.4	114.5
Taurina ^[1]	(-)124.1>80.0	7.36	0.040	0.0366	0.0018	109.3	- ^[3]

Nota: ^[1] Os resultados de Trp, Ala, Tau são baseados no método de hidrólise alcalina. ^[2] O resultado de cistina / cisteína é calculado com base nos dados de ácido cisteico pelo método de hidrólise de pré-oxidação. ^[3] ME foi determinado apenas para a amostra de hidrólise ácida.

DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM FÓRMULAS INFANTIS E ADULTOS

Os resultados dos seis leites em pó avaliados são mostrados na Tabela 2 e figuras 3 e 4.

Pode-se observar que o total de aminoácidos das fórmulas para adultos é mais que o dobro das quantidades encontradas nos aminoácidos de fórmulas infantis, com exceção da taurina. Além disso, lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico são comumente presentes em altas quantidades em comparação a outros aminoácidos.

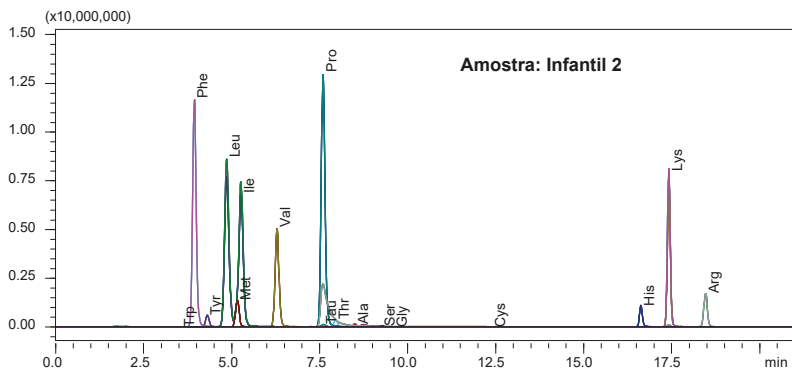


Fig. 3 - Cromatogramas MRM de 18 aminoácidos em amostras de leite em pó: infantil 2 e adulto.

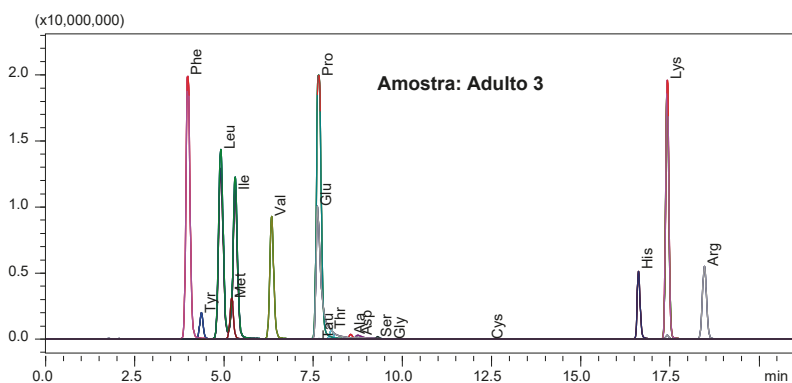


Fig. 4 - Cromatogramas MRM de 18 aminoácidos em amostras de leite em pó: infantil 2 e adulto 3.



LCMS-8045

Tabela 2. Resultados quantitativos de 17 AA e taurina (g/100g) em amostras de fórmulas infantis e adultos pelo método LC-MS/MS.

Aminoácido	Infantil 1	Infantil 2	Média (Infantil)	Adulto 1	Adulto 2	Adulto 3	Adulto 4	Média (Adulto)
Triptofano [1]	0.09	0.16	0.12	0.22	0.23	0.20	0.19	0.21
Fenilalanina	0.40	0.40	0.40	0.73	0.70	0.76	0.83	0.76
Tirosina	0.17	0.16	0.16	0.44	0.36	0.50	0.57	0.47
Leucina	0.69	0.67	0.68	1.02	1.06	1.13	1.21	1.10
Isoleucina	0.58	0.56	0.57	0.82	0.57	0.89	0.92	0.80
Valina	0.48	0.46	0.47	0.77	0.79	0.86	1.07	0.87
Ácido glutâmico	1.39	1.52	1.46	3.98	3.64	4.36	5.61	4.40
Prolina	0.57	0.58	0.58	0.96	1.03	1.06	1.16	1.05
Ácido aspártico	0.70	0.70	0.70	1.37	1.29	1.43	1.66	1.43
Treonina	0.23	0.21	0.22	0.33	0.39	0.40	0.59	0.43
Alanina [1]	0.11	0.10	0.11	0.21	0.21	0.18	0.17	0.19
Serina	0.09	0.08	0.09	0.19	0.25	0.24	0.30	0.24
Glicina	0.12	0.12	0.12	0.30	0.65	0.34	0.37	0.42
Cisteína [2]	0.20	0.21	0.21	0.26	0.17	0.29	0.29	0.25
Histidina	0.13	0.14	0.13	0.46	0.44	0.63	0.61	0.53
Lisina	0.75	0.76	0.76	1.66	1.78	2.00	1.97	1.85
Arginina	0.16	0.20	0.18	0.55	0.66	0.72	0.73	0.67
Taurina [1]	0.048	0.037	0.04	0.0010	0.010	0.050	0.030	0.02
Total	6.91	7.07	6.99	14.27	14.21	16.04	18.28	15.70

Notas: ^[1] Os resultados de Trp, Ala, Tau são baseados no método de hidrólise alcalina. ^[2] O resultado da cistina / cisteína é calculado com base nos dados do ácido cisteico pelo método da hidrólise de pré-oxidação.

CONCLUSÃO

O padrão de referência de fórmula infantil e adulto NIST® 1849a foi utilizada para validação do método do procedimento de hidrólise e análise de 18 aminoácidos (AA) sem derivatização por LC-MS/MS. Foram necessários três procedimentos de hidrólise para determinar todos os AA listados nos requisitos AOAC.

Os resultados obtidos dos 18 AA são correspondentes ou similares aos valores de referência, exceto alanina, cuja recuperação foi de apenas 26,4%. Um estudo mais aprofundado sobre este baixo recuperação de alanina é necessário.

Siga-nos



@shimadzubrasil



LinkedIn

Contato

info@shimadzu.com.br



Shimadzu do Brasil Comércio Ltda.

www.shimadzu.com.br

Use apenas para pesquisa. Não use em procedimentos de diagnóstico.

Esta publicação pode conter referências de produtos que não estão disponíveis na sua região. Entre em contato conosco para verificar a disponibilidade.

O conteúdo desta publicação não deve ser reproduzido, alterado ou vendido para qualquer propósito comercial sem a aprovação por escrito da Shimadzu.

Consulte <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html> para obter detalhes.

Marcas e nomes comerciais de terceiros podem ser usados nesta publicação para se referir às entidades ou seus produtos / serviços, sejam eles ou não são usados com o símbolo de marca comercial "TM" ou "®".

O conteúdo desta publicação é baseado nas informações disponíveis para a Shimadzu na data de publicação ou antes dela, fornecido sem garantia de qualquer tipo, e esta sujeito a alterações sem aviso prévio. A Shimadzu não assume qualquer responsabilidade ou obrigação por qualquer dano, direto ou indireto, relativa à utilização desta publicação.