

# Análise de aminoácidos automatizada usando uma coluna Agilent Poroshell HPH-C18

## Nota de aplicação

Teste de alimentos, agricultura, fármaco de moléculas pequenas

### Autor

William Long  
Agilent Technologies, Inc.

### Resumo

Nesta nota de aplicação, um método de derivatização pré-coluna automatizado para aminoácidos com OPA/FMOC, previamente desenvolvido para colunas Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 de 3,5 e 1,8  $\mu\text{m}$ , é ampliado para incluir colunas superficialmente porosas Agilent Poroshell HPH-C18 de 2,7  $\mu\text{m}$ . Esta coluna apresenta boa vida útil e transferibilidade para diferentes dimensões de coluna, ambas mostradas neste trabalho. As aplicações da coluna para produtos de fermentação também são mostradas.



**Agilent Technologies**

## Introdução

A tecnologia de partículas superficialmente porosas (SPP) é baseada em partículas com um núcleo sólido e um revestimento superficialmente poroso. Essas partículas consistem em um núcleo sólido de 1,7 µm com um revestimento poroso de 0,5 µm. No total, o tamanho de partícula é de cerca de 2,7 µm. As partículas superficialmente porosas de 2,7 µm fornecem uma pressão resultante 40 a 50% menor e eficiência de 80 a 90% em relação a partículas totalmente porosas abaixo de 2 µm. As partículas superficialmente porosas apresentam uma distribuição de tamanho de partícula mais estreita do que as partículas totalmente porosas. Isso resulta em um leito de coluna mais homogêneo e reduz a dispersão na coluna. Ao mesmo tempo, o revestimento poroso mais fino oferece menor resistência à transferência de massa. O resultado é uma perda mínima de eficiência em vazões mais altas [1]. Além disso, como as colunas incorporam uma fritada de 2 µm, são tão resistentes a entupimentos quanto as colunas de 3,5 e 5 µm. Até recentemente, todos os materiais SPP à base de sílica possuíam vida útil limitada quando usados com tampões de pH mais alto, incluindo tampões de fosfato. Para alcançar esses tempos de vida útil mais longos, é necessário proteger a partícula base através de modificação de superfície ou modificação por ligação especial. A superfície das partículas da Agilent Poroshell HPH-C18 é quimicamente modificada para formar uma camada orgânica, resistente à dissolução da sílica em condições de pH alto, usando um processo exclusivo.

A melhoria contínua nas colunas e instrumentação de HPLC oferece uma oportunidade para aprimorar os métodos HPLC. Um método comprovado de aminoácido derivatizado de cloroformato de orto-ftalaldeído/9-fluorenilmetil (OPA/FMOC) desenvolvido em sistemas HPLC da série HP 1090 e posteriormente atualizado para a série Agilent 1100, recentemente evoluiu ainda mais aproveitando o LC binário Agilent 1260 Infinity e as colunas Agilent Poroshell HPH-C18 superficialmente porosas [2–8].

## Parte experimental

### Preparo da fase móvel de HPLC

A fase móvel A contém 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH 8,2 e 5 mM de  $\text{NaN}_3$ . Para 1 L, pese 1,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro e 3,8 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  em 1 L de água e 32 mg de  $\text{NaN}_3$ . Ajuste o pH para cerca de 8,4 com 1,2 mL de HCl concentrado e, em seguida, adicione pequenas gotas de ácido até pH 8,2. Aguarde durante o tempo de agitação para que ocorra a dissolução completa dos cristais de borato antes de ajustar o pH. Filtre através de membranas de celulose regenerada de 0,45 µm (P/N 3150-0576). A fase móvel B contém acetonitrila:metanol:água (45:45:10, v:v:v). Todos os solventes da fase móvel eram de grau HPLC. Uma vez que a fase móvel A é consumida a uma taxa mais rápida do que a fase móvel B, é conveniente fazer 2 L de fase móvel A para cada 1 L de fase móvel B.

O diluente de injeção foi de 100 mL na fase móvel A e 0,4 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrado em um frasco de 100 mL, armazenado a 4°C.

Para preparar 0,1 N de HCl, adicione 4,2 mL de HCl concentrado (36%) em um frasco volumétrico de 500 mL parcialmente cheio com água. Misture e preencha com água até à marca. Esta solução destina-se à preparação de soluções estoque de aminoácidos estendidos e padrão interno. Armazene a 4°C.

Os reagentes de derivatização (tampões de borato, OPA e FMOC) são soluções prontas fornecidas pela Agilent. Eles simplesmente devem ser transferidos de seu recipiente para um vial de amostrador automático. Algumas precauções incluem:

- O OPA é enviado em ampolas em gás inerte para prevenir oxidação. Após aberto, o OPA é adequado para uso por cerca de sete a dez dias. Recomendamos a transferência de alíquotas de 100 µL de OPA para inserts de microviais. Identifique com nome e data, tampe e refrigere. Substitua o microvial do amostrador automático com OPA diariamente. Cada ampola tem uma duração de dez dias.
- O FMOC é estável em ar seco, mas se deteriora com a umidade. Ele também deve ser transferido em alíquotas de 100 µL para inserts de microviais. Identifique com nome e data, tampe bem e refrigere. Tal como o OPA, uma ampola aberta de FMOC transferida para dez inserts de microviais deve ter uma duração de dez dias (um vial/dia).
- O tampão de borato pode ser transferido para um vial de amostrador automático de 1,5 mL sem um insert de vial. Substitua a cada três dias.

### Preparação de padrões de aminoácidos

A Agilent oferece soluções de 17 aminoácidos em cinco concentrações (10 pmol/µL a 1 nmol/µL) para curvas de calibração. Divida cada ampola de 1 mL de padrões (P/N 5061-3330 a 5061-3334) em porções de 100 µL em inserts de vial cônicos. Tampe e refrigere as alíquotas a 4°C.

Para preparar a solução estoque de aminoácidos estendidos (EAA), pese 59,45 mg de asparagina, 59,00 mg de hidroxiprolina, 65,77 mg de glutamina e 91,95 mg de triptofano em um frasco volumétrico de 25 mL. Preencha até a metade com 0,1 N de HCl e agite ou leve ao sonificador até que esteja dissolvida. Preencha até à marca com água para uma concentração total de 18 nmol/µL de cada aminoácido.

Para a solução estoque de EAA de alta sensibilidade, use 5 mL desta solução de sensibilidade padrão e dilua com 45 mL de água (1,8 nmol/µL). As soluções que contêm padrões estendidos são instáveis à temperatura ambiente. Mantenha-os congelados e descarte aos primeiros sinais de intensidade reduzida.

Para soluções estoque de ISTD de aminoácidos primários, pese 58,58 mg de norvalina em um frasco volumétrico de 50 mL. Para os aminoácidos secundários, pese 44,54 mg de sarcosina no mesmo frasco de 50 mL. Preencha até a metade com 0,1 N de HCl e agite ou leve ao sonificador até dissolver e, em seguida, preencha até à marca com água para uma concentração final de 10 nmol de cada aminoácido/ $\mu\text{L}$  (sensibilidade padrão). Para solução estoque de ISTD de alta-sensibilidade, use 5 mL da solução de sensibilidade-padrão e dilua com 45 mL de água. Armazene a 4°C.

As curvas de calibração são criadas usando dois a cinco padrões, dependendo da necessidade experimental. Normalmente, são usados 100 pmol/ $\mu\text{L}$ , 250 pmol/ $\mu\text{L}$  e 1 nmol/ $\mu\text{L}$  para criar uma curva de calibração de três pontos para análise de sensibilidade padrão.

### Parâmetros da bomba

Os parâmetros da bomba para todos os métodos incluem compressibilidade ( $\times 10^{-6}$  bar) de A: 35, B: 80, com curso mínimo de A, B de 20  $\mu\text{L}$ .

### Derivatização online

Dependendo do modelo do amostrador automático, o programa de derivatização online automatizado pode ser ligeiramente diferente. Para o amostrador automático de líquidos de placas de poços (WPALS) do Agilent G1376C, com programa de injeção:

1. Colete 2,5  $\mu\text{L}$  do vial de borato (P/N 5061-3339).
2. Colete 1,0  $\mu\text{L}$  do vial de amostra.
3. Misture 3,5  $\mu\text{L}$  na porta de lavagem cinco vezes.
4. Aguarde 0,2 minutos.
5. Colete 0,5  $\mu\text{L}$  do vial de OPA (P/N 5061-3335).
6. Misture 4,0  $\mu\text{L}$  na porta de lavagem dez vezes na velocidade padrão.
7. Colete 0,4  $\mu\text{L}$  do vial de FMOC (P/N 5061-3337).
8. Misture 4,4  $\mu\text{L}$  na porta de lavagem dez vezes na velocidade padrão.
9. Colete 32  $\mu\text{L}$  do vial de diluente de injeção.
10. Misture 20  $\mu\text{L}$  na porta de lavagem oito vezes.
11. Injete.
12. Aguarde 0,1 minutos.
13. Bypass da válvula.

A localização dos reagentes de derivatização e das amostras é da responsabilidade do analista e da configuração da bandeja do ALS. Usando o G1367C com uma bandeja de placas de  $2 \times 56$  poços (P/N G2258-44502), as posições foram:

- Vial 1: Tampão de borato
- Vial 2: OPA
- Vial 3: FMOC
- Vial 4: Diluente de injeção
- P1-A-1: Amostra

### Compartimento de coluna termostaticado (TCC)

As temperaturas esquerda e direita foram definidas para 40°C. A análise pode ser realizada quando a temperatura estiver dentro de  $\pm 0,8^\circ\text{C}$ . Consulte a Tabela 5 para obter o dissipador de calor que deve ser usado.

### Detector de arranjo de diodos (DAD)

Sinal A: 338 nm, largura de banda de 10 nm e comprimento de onda de referência de 390 nm, largura de banda de 20 nm.

Sinal B: 262 nm, largura de banda de 16 nm e comprimento de onda de referência de 324 nm, largura de banda de 8 nm.

Sinal C: 338 nm, largura de banda de 10 nm e comprimento de onda de referência de 390 nm, largura de banda de 20 nm.

O DAD foi programado para alternar para 262 nm, largura de banda de 16 nm, comprimento de onda de referência de 324 nm, largura de banda de 8 nm, após a eluição da lisina e antes da eluição da hidroxiprolina. O sinal C foi determinado examinando os intervalos de tempo do sinal A e do sinal B entre os picos 20 e 21 e, em seguida, escolhendo um ponto adequado para realizar a alternância dos comprimentos de onda. Assim que o tempo de alternância foi estabelecido e programado no método, o sinal A e o sinal B passaram a ser opcionais.

Foram usadas configurações de largura de pico  $>0,01$  minutos para todas as colunas.

## Resultados e discussão

Tal como é possível verificar na Figura 1, usando as mesmas condições cromatográficas, a separação foi muito semelhante. A ordem de eluição da mistura em ambas as colunas foi a mesma e, conforme apresentado na Figura 2, a relação dos tempos de retenção das amostras de aminoácidos indicou alta correlação entre a Eclipse Plus C18 e a Poroshell HPH-C18, com um coeficiente de correlação de

0,997. Tal como é possível verificar nos cromatogramas, os tempos de retenção foram ligeiramente menores na coluna Poroshell HPH-C18. Algumas diferenças cromatográficas são notáveis. Assim, a separação da leucina e lisina parece melhor na Poroshell HPH-C18, enquanto a separação da lisina e hidroxiprolina e o par sarcosina/ prolina parecem pior. Como sugerido nas notas de aplicação anteriores, a cromatografia pode ser alterada para melhorar a resolução dos pares de picos desejados.

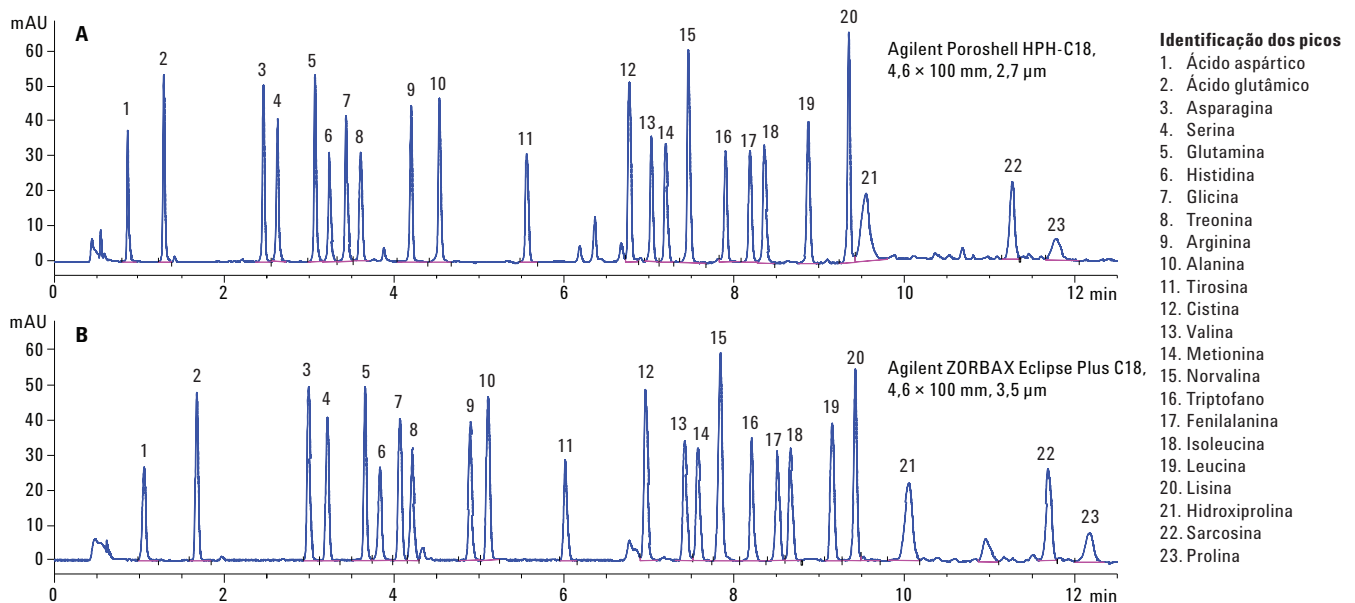


Figura 1. Comparação de uma coluna Agilent Poroshell HPH C18 com uma coluna Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 usando o método de aminoácidos.

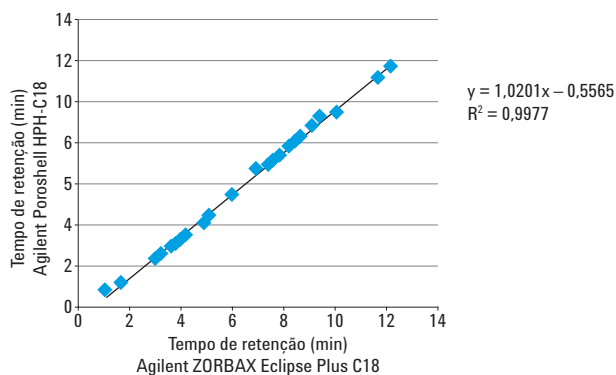


Figura 2. Correlação de tempos de retenção usando colunas Agilent Poroshell HPH-C18 e Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18.

Tabela 1. Condições para a Figura 1.

|            |   |
|------------|---|
| Coluna:    | Agilent Poroshell HPH C18, 4,6 × 100 mm, 2,7 μm (P/N 695975-702) ou Agilent Eclipse Plus C18, 4,6 × 100 mm, 3,5 μm (P/N 959961-902) |
| Vazão:     | 1,5 mL/min  |
| Gradiente: | Tempo (min) %B  |
|            | 0 2   |
|            | 0,35 2  |
|            | 13,4 57   |
|            | 13,5 100  |
|            | 15,7 100  |
|            | 15,8 2  |
|            | 18 Final  |

## Dimensões de coluna

O método pode ser facilmente ajustado para diferentes dimensões de coluna. Neste trabalho, foram estudadas três dimensões de coluna. Todas as colunas tinham 100 mm de comprimento com 4,6, 3,0 ou 2,1 mm de diâmetro interno, conforme apresentado na Figura 3. Neste caso, as únicas mudanças no método foram realizadas alterando a vazão. A Tabela 1 lista o programa de gradiente usado. As vazões são alteradas geometricamente com o diâmetro da coluna. A vazão usada com a coluna de 4,6 × 100 mm foi de 1,5 mL/minuto. As vazões para as colunas de 3 e 2,1 mm foram de 0,62 e 0,21 mL/min, respectivamente. Em todos os casos, o trocador de calor de baixo volume foi usado com um tubo curto vermelho para minimizar o volume adicional da coluna. Usando o LC binário Agilent 1260 Infinity com aquecimento e tubo de baixa dispersão, a pressão da coluna foi de aproximadamente 175 bar.

Observamos que o tempo de retenção de todos os analitos aumentou ligeiramente (sem alteração na seletividade) à medida que as colunas reduziam o seu diâmetro interno. Isso se deve ao aumento no tempo de atraso do gradiente. À medida que as vazões são ajustadas e, conseqüentemente, reduzidas para diâmetros internos menores, o volume morto do gradiente permanece constante, aumentando assim o tempo que leva para o gradiente atingir a coluna. A diferença na retenção entre vários diâmetros internos de coluna pode ser potencialmente reduzida ou eliminada ajustando o volume morto do gradiente no sistema LC (adicionando ou removendo comprimento/diâmetro/volume capilar entre a bomba e o injetor da coluna).

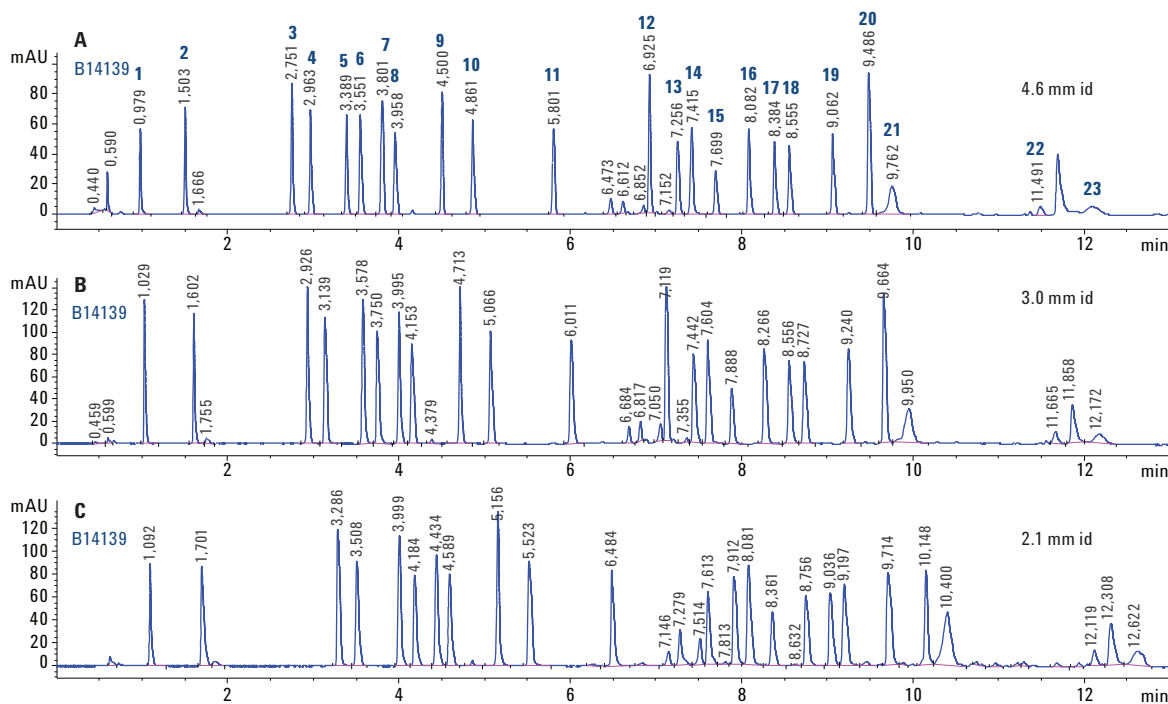


Figura 3. Colunas Agilent Poroshell HPH-C18 de 100 mm de diferentes dimensões internas usando o método de aminoácidos.

## Variabilidade lote a lote

A reprodutibilidade lote a lote é também um fator importante no desenvolvimento de métodos. Recomenda-se que, antes de adotar um método, seja realizada uma verificação do desempenho do método em, pelo menos, três colunas de lotes diferentes como primeira etapa de validação.

Seguindo a boa prática de validação, três colunas carregadas com partículas de diferentes lotes de produção foram examinadas para colunas de 4,6, 3,0 e 2,1 × 100 mm. As sobreposições dessas três configurações são apresentadas nas Figuras 4A–C. Tal como é possível verificar na Figura 4A,

a separação de aminoácidos na coluna de 4,6 × 100 mm apresentou um bom pico e uma boa forma de separação na linha de base para todos os compostos. Nenhuma alteração na ordem de eluição foi observada e a reprodutibilidade lote a lote parecia boa. Uma ligeira alteração no tempo de retenção pode ser verificada na Figura 4A, embora o valor *k* tenha permanecido constante. No entanto, é necessária uma ligeira alteração no tempo de alternância do comprimento de onda, pois ele está vinculado aos tempos de eluição da lucina e da hidroxiprolina. Foi evidenciada uma reprodutibilidade semelhante nas Figuras 4B e 4C para as colunas com diâmetros internos menores.

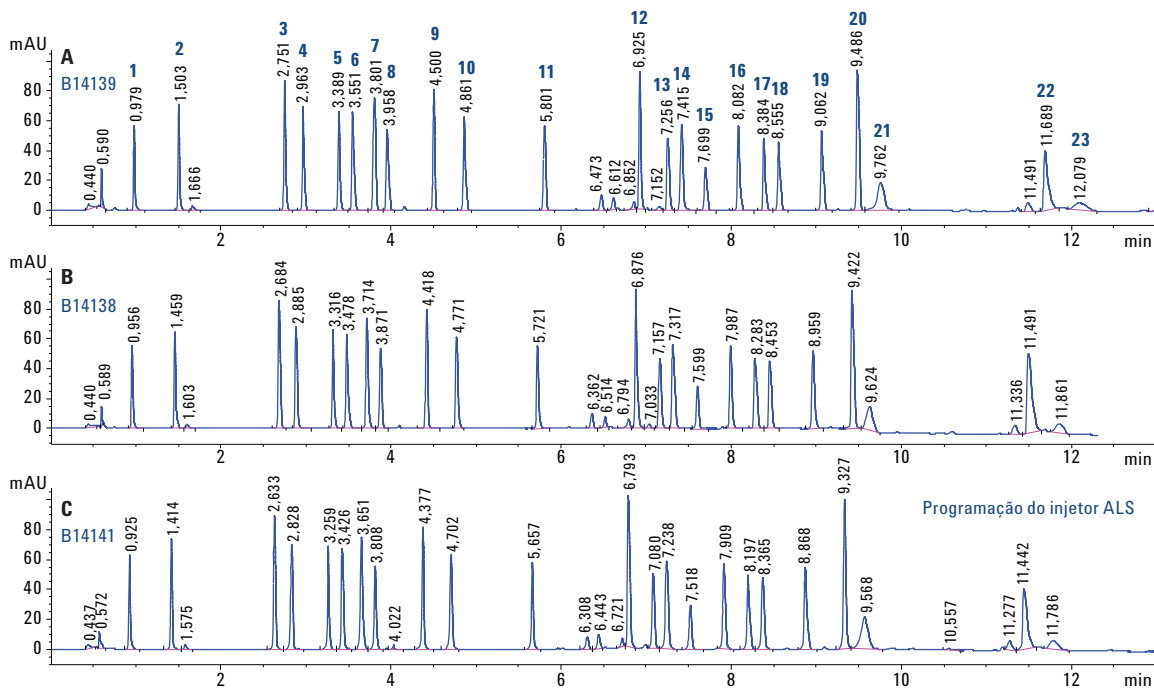


Figura 4A. Separação de aminoácidos e padrões internos em três lotes de Agilent Poroshell HPH-C18, 4,6 x 100 mm, 2,7 µm (P/N 695975-702).

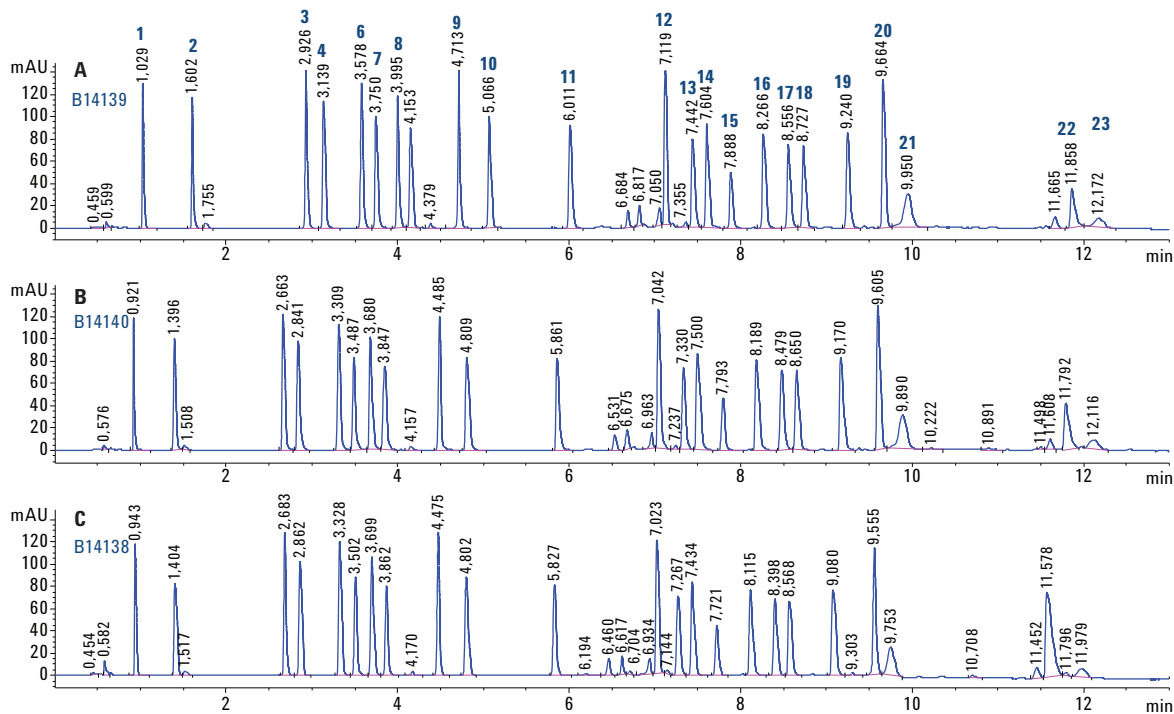


Figura 4B. Separação de aminoácidos e padrões internos em três lotes de Agilent Poroshell HPH-C18, 3 x 100 mm, 2,7 µm (P/N 695975-502).

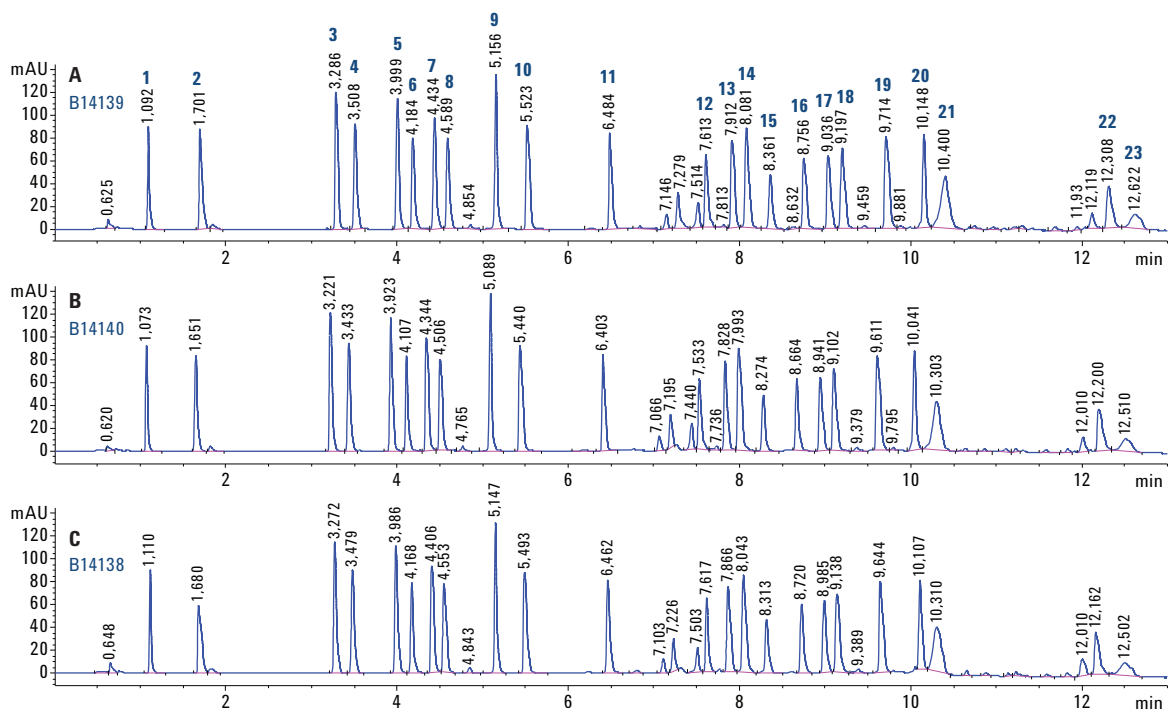


Figura 4C. Separação de aminoácidos e padrões internos em três lotes de Agilent Poroshell HPH-C18, 2,1 x 100 mm, 2,7 µm (P/N 695775-702).

## Vida útil

O tempo de vida útil da coluna é uma consideração importante para os cromatógrafos que analisam amostras de aminoácidos. A maioria das colunas de sílica perde eficiência após exposição prolongada a essas condições. Kirkland *et al.* [9] e Tindall e Perry [10] discutiram as possíveis razões para a redução da vida útil das colunas de sílica em tampão de fosfato, mas ambos concordam que as colunas não possuem alta duração.

Existem duas abordagens para alcançar a estabilidade em pH alto em colunas de HPLC de sílica. Uma forma é o uso de uma fase estacionária ligada especial, como na coluna Agilent ZORBAX Extend C18. Esta coluna usa ligação bidentada para proteger a sílica da dissolução em pH alto. Outra forma de alcançar a estabilidade em pH alto é modificar a própria sílica, tornando-a menos solúvel. A superfície das partículas da Poroshell HPH é quimicamente modificada para formar uma camada orgânica, resistente à dissolução da sílica em condições de pH alto, usando um processo exclusivo [11].

A Figura 5 apresenta uma sobreposição de quatro cromatogramas. As fases móveis A e B foram preparadas em frascos individuais de 4 L. Uma única coluna de 2,1 × 100 mm foi usada para testes de vida útil a partir de uma série de 500 análises ao longo de um período de quatro semanas. Nesta série, foram efetuadas aproximadamente 102 injeções em cada semana usando misturas padrão de aminoácidos e reagentes recém-abertos. No final da sequência, a coluna foi lavada com fase móvel B total por 40 minutos e o instrumento foi desligado. Desta forma, o método foi executado por 3,5 dias e a coluna foi armazenada por 3,5 dias sem análise. Isto permitiu simular a prática de laboratório comum na qual as amostras são executadas por um longo período de tempo e, em seguida, a coluna é lavada e armazenada. O armazenamento de uma coluna em fase móvel B total era recomendado nos métodos de quantificação de aminoácidos originais e é uma prática comum em muitos laboratórios de sucesso que trabalham frequentemente com aminoácidos. Foi realizado um estudo realista de tempo de vida útil, que evidenciou um excelente tempo de vida útil da coluna ao longo de um mês de uso, com mais de 500 injeções padrão, desligando e armazenando após cada sequência. Tal como é possível verificar na Figura 5, a amostra de 17 aminoácidos não apresentou perda na resolução e apenas uma ligeira mudança no tempo de retenção foi observada.

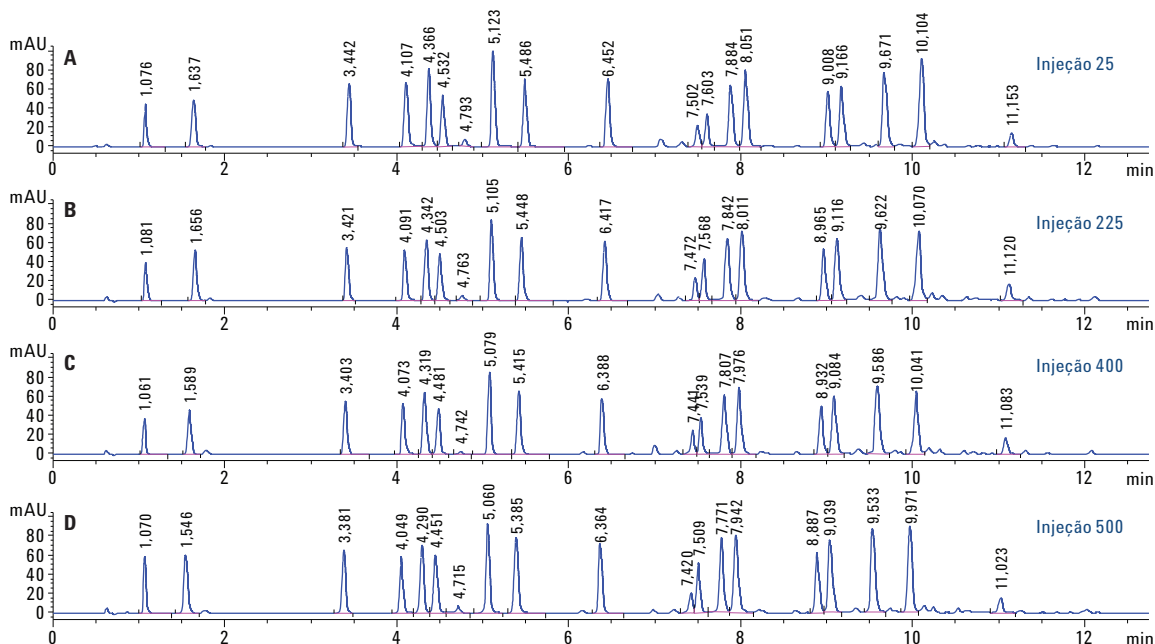


Figura 5. Teste de vida útil da coluna usando uma coluna Agilent Poroshell HPH-C18, 2,1 × 100 mm executando um método de aminoácidos.

## Conclusões

A Agilent Poroshell HPH-C18 tem seletividade semelhante à Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 totalmente porosa. Isso permite uma fácil transferência de métodos existentes, bem como o método de aminoácidos. Neste trabalho, nenhuma alteração nas condições cromatográficas foi realizada, embora pudessem ser realizadas alterações no gradiente para melhorar a resolução em aminoácidos selecionados. Na maioria dos casos, a Poroshell HPH-C18 apresentou menor retenção em comparação com a Eclipse Plus C18 totalmente porosa. O método foi investigado com colunas de 4,6, 3,0 e 2,1 mm × 100 mm. Recomenda-se o uso de um aquecedor de coluna de baixo volume. No total, quatro lotes de partículas foram investigados, exigindo apenas ligeiras alterações no tempo de alternância do comprimento de onda. Foi realizado um estudo realista de tempo de vida útil, que evidenciou um excelente tempo de vida útil da coluna ao longo de um mês de uso, com mais de 500 injeções padrão, desligando e armazenando após cada sequência.

## Referências

1. Wang, X.; Barber, W. E.; Long, W. J. Applications of superficially porous particles: High Speed, high efficiency or both? *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1228*, 72–88.
2. Schuster, R.; Apfel, A. A new technique for the analysis of primary and secondary amino acids; nota de aplicação, número de publicação Hewlett-Packard 5954-6257, **1986**.
3. Schuster, R. Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* **1988**, *431*, 271–284.
4. Henderson, Jr., J. W.; Ricker, R. D.; Bidlingmeyer, B. A.; Woodward, C. Rapid, Accurate, Sensitive and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids; nota de aplicação, Agilent Technologies, Inc. Número de publicação 5980-1193E, **2000**.
5. Woodward, C.; Henderson, Jr., J. W.; Todd Wielgos, T. High-Speed Amino Acid Analysis (AAA) on Sub-Two Micron Reversed-phase (RP) Columns; nota de aplicação, Agilent Technologies, Inc. Número de publicação 5989-6297EN, **2007**.
6. Gratzfeld-Huesgen, A. Sensitive and Reliable Amino Acid Analysis in Protein Hydrolysates using the Agilent 1100 Series HPLC; nota de aplicação, Agilent Technologies, Inc. Número de publicação 5968-5658EN, **1999**.
7. Greene, J.; Henderson, Jr., J. W.; Wiksw, J. P. Rapid and Precise Determination of Cellular Amino Acid Flux Rates Using HPLC with Automated Derivatization with Absorbance Detection; nota de aplicação, Agilent Technologies, Inc. Número de publicação 5990-3283EN, **2009**.
8. Henderson, Jr., J. W.; Brooks, A. Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals; nota de aplicação, Agilent Technologies, Inc. Número de publicação 5990-4547EN, **2010**.
9. Kirkland, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings. *J. Chromatogr. A.* **1998**, *797*, 111–120.
10. Tindall, G. W.; Perry, R. L. Explanation for the enhanced dissolution of silica column packing in high pH phosphate and carbonate buffers. *J. Chromatogr. A.* **2003**, *988*, 309-312.
11. Anon. Extending Column Lifetime in Pharmaceutical Methods with High pH-Stable Poroshell HPH Chemistries; descrição técnica, Agilent Technologies, Inc. Número de publicação 5991-5022EN, **2014**.

## Mais informações

Esses dados representam resultados típicos. Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o nosso site em [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Impresso nos Estados Unidos  
7 de julho de 2015  
5991-5571PTBR



**Agilent Technologies**