

Comparação de HPLC/UV e LC/MS/MS na análise de fitoestrógenos da soja

Guilherme Julião Zocolo* (PG), Mary Rosa R. Marchi (PQ)

Instituto de Química da UNESP-Araraquara. Rua Francisco Degni, s/n, Araraquara-SP.

*gjzocolo@yahoo.com.br

Palavras Chave: isoflavonas, HPLC/UV, LC/MS/MS

Introdução

Sabe-se que certas moléculas podem interferir em rotas do sistema endócrino produzindo uma resposta indesejada, a qual pode afetar a saúde, crescimento e a reprodução de um grande número de organismos. Essas substâncias são coletivamente conhecidas como alteradores endócrinos (AEs). Cientistas têm focado sua atenção em dois principais grupos de alteradores endócrinos de origem natural, as isoflavonas e as lignanas. As isoflavonas são encontradas, em altos níveis, na soja. Desta forma, estão presentes na dieta humana e possivelmente também podem estar dispersas no meio ambiente por efeito de lixiviação em regiões onde existam grandes cultivos. Com uma produção de mais de 51,1 milhões de toneladas e exportando mais de 30 milhões de toneladas em 2004, o Brasil se tornou um dos maiores exportadores de soja do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. O projeto em que está inserido este trabalho visa avaliar a presença e o possível impacto que as isoflavonas possam causar em uma região onde predomina a cultura de soja na bacia do Rio Dourados (MS). Neste trabalho apresenta-se a comparação de dois métodos cromatográficos para a determinação de genisteína e daidzeína (Figura 1), as isoflavonas mais estáveis e abundantes na soja.

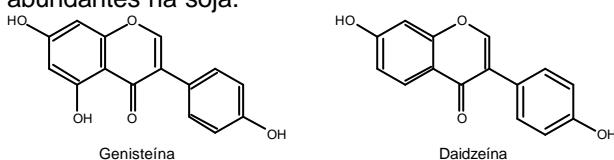


Figura 1. Estruturas das isoflavonas estudadas

Experimental

Os padrões das isoflavonas utilizadas neste trabalho foram adquiridos da Sigma-Aldrich, (EUA), com grau de pureza > 98%. Os sistemas cromatográficos utilizados foram um cromatógrafo líquido Varian Pro Star, com detector UV com arranjo de diodos (HPLC/UV-DAD) e um cromatógrafo líquido com detector de espectrometria de massas tandem (LC-ESI-MS/MS), Varian 320MS TQ. As condições de análise foram otimizadas para ambos os sistemas e estão sumarizadas na Tabela 1.

Foram injetadas pelo menos 9 soluções padrão mistas, com concentrações variando entre 1,0 e 200 ng mL⁻¹ para o sistema LC/MS/MS e entre 0,10 e 20,0 µg mL⁻¹ para o sistema HPLC/UV. Todos os padrões foram injetados em triplicata.

Tabela 1. Condições de análise das isoflavonas

	HPLC/UV	LC-ESI-MS/MS
Coluna	C18 (Phenomenex, 4,6 mm x 250 mm x 5 µm).	C18 (Varian, 3 µm 150 x 4.6 mm) (Pursuit XRs)
Fase Móvel	ACN/H ₂ O 30% a 65% ACN (10 min.), e fluxo 1 mL min ⁻¹	ACN/H ₂ O 10% a 65% ACN (10 min.), e fluxo 300 µL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL (injeção automática)	10 µL (injeção automática) Modo negativo As transições monitoradas foram: genisteína (m/z 268,6 — >132,7) daidzeína (m/z 252,4 —>207,6) genistina (m/z 431,2 —>267,7) daidzina (m/z 415 —> 251,6)
Deteção	260 nm	

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir dos parâmetros da curva Área vs concentração, que por sua vez foi construída com os pontos que pertenciam ao intervalo linear dinâmico¹.

Resultados e discussão

	LD	LQ	R ²
LC/MS/MS			
Genisteína	0,1 ng mL ⁻¹	1,0 ng mL ⁻¹	0,9945
Daidzeína	0,1 ng mL ⁻¹	1,0 ng mL ⁻¹	0,9978
HPLC/UV			
Genisteína	0,17 µg mL ⁻¹	0,53 µg mL ⁻¹	0,9997
Daidzeína	0,15 µg mL ⁻¹	0,46 µg mL ⁻¹	0,9994

Conclusões

Os limites de detecção e quantificação do sistema LC/MS/MS foram 3 ordens de grandeza menores do que os mesmos parâmetros para o sistema HPLC/UV. Ambos os sistemas apresentaram linearidade adequada ($R^2 > 0,99$)¹. Considerando-se que dados da literatura reportam concentrações de genisteína da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ em água superficial, para que seja possível a utilização da análise por HPLC/UV será necessário o tratamento da amostra de modo a pré-concentrar os analitos em 1000 vezes

Referências

(1) RIBANI, M. et al. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

Agradecimentos

