

Comparação entre as técnicas de cromatografia a líquido em fase reversa e de interação hidrofílica na separação de ácidos orgânicos

Marilda Rigobello-Masini*¹ (PQ), José C. P. Penteado¹ (PQ), Maurício Tiba (PG), Jorge C. Masini¹ (PQ)
rmmarilda@gmail.com

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077, 05513- 970, São Paulo, SP

Palavras Chave: cromatografia a líquido, ácidos orgânicos, interação hidrofílica, fase reversa.

Introdução

Ácidos orgânicos de baixa massa molar (mono, di ou tricarboxílicos) são encontrados em solos e águas em função da atividade metabólica de plantas, fungos e microrganismos. Sua determinação intracelular e no ambiente tem importância em investigações sobre as rotas metabólicas relacionadas aos processos de assimilação de carbono atmosférico por plantas aquáticas tais como as microalgas, conhecidas por sua relevante contribuição como sorvedouro de dióxido de carbono.¹ A determinação desses ácidos pode ser feita por diferentes técnicas analíticas tais como eletroforese capilar, cromatografia a gás, cromatografia de íons, cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC) e cromatografia a líquido de interação hidrofílica (HILIC). As duas últimas técnicas são especialmente interessantes, pois usam instrumentação convencional de cromatografia a líquido e não requerem derivatização. Neste trabalho avaliou-se o desempenho destas duas técnicas utilizando uma coluna SeQuant™ ZIC®-HILIC de 250 x 4,6 mm, 5 µm, 200Å em PEEK da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) em comparação com duas colunas (250 x 4,6 e 150 x 4,6 mm) Synergi 4u Fusion RP 80Å da Phenomenex (Torrance, CA, USA) conectadas em série. Usou-se um cromatógrafo Shimadzu LC9A com o detector UV a 210 nm (RP-HPLC) ou 220 nm (HILIC). Para HILIC as separações foram realizadas no modo isocrático com uma fase móvel constituída por 70 % (v v⁻¹) acetonitrila (ACN) em tampão acetato de amônio (NH₄Ac) 20 mmol L⁻¹ (pH 6,8) a 0,50 mL min⁻¹. No caso de fase reversa as corridas também foram isocráticas usando fases móveis constituídas de KH₂PO₄ 10 mmol L⁻¹ (pH 2,6), ou 93:7 (v v⁻¹) KH₂PO₄ 25 mmol L⁻¹:metanol a 0,60 mL min⁻¹ (pH 2,6).

Resultados e Discussão

A retenção de ácidos orgânicos em RP-HPLC é obtida usando fases móveis com baixas concentrações de solvente orgânico e baixo pH, entre 2,0 e 2,6, ajustado com ácido fosfórico. Nesse pH os grupos carboxílicos encontram-se protonados, diminuindo o caráter iônico, aumentando a afinidade pela fase estacionária

33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

hidrofóbica (C₁₈). Já na HILIC, cujo mecanismo de separação se baseia na partição do soluto entre a fase móvel (rica em solvente orgânico) e uma camada de água estagnada na fase estacionária, a retenção dos ácidos pode ser manipulada com maior flexibilidade por variações de concentração de solvente orgânico e pH.² A Tabela 1 apresenta alguns resultados dos dois tipos de cromatografia.

Tabela 1. Tempos de retenção e limites de Detecção (LOD) de ácidos carboxílicos relacionados ao metabolismo de assimilação de carbono por microalgas

Ácido	RP-HPLC		HILIC	
	t _R (min)	LOD (µM)	t _R (min)	LOD (µM)
βOHpiruvico	6,1	65	8,7	100
glicólico	6,7	3	11,2	1000
Oxalacético	7,3	1	6,9	5
Málico	7,5	3	15,6	20
α-cetoglutárico	8,0	21	13,2	60
isocítrico	8,5	1	21,5	20
Fumárico	12,1	17	14,6	2
Cítrico	13,9	1	21,5	20

Não se observou um significativo ganho de resolução na coluna HILIC. Enquanto em fase reversa se observa co-eluição entre os ácidos oxalacético e málico, que são muito bem resolvidos na HILIC, nessa última não existe separação entre os ácidos cítrico e isocítrico, facilmente obtida em RP-HPLC. Os limites de detecção e o consumo de solvente orgânico em RP-HPLC foram menores.

Conclusões

Aplicação de HILIC com detecção no UV não se mostrou vantajosa em relação a RP-HPLC. Entretanto, deve-se mencionar a maior compatibilidade da HILIC com detectores de massa (alto teor de ACN e baixa força iônica), os quais, em relação à absorção no UV, apresentam vantagens em termos de sensibilidade e identificação de espécies em amostras complexas.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP

¹ Kazuyuki, K., Fukushima, T.; Yuji, R.; Miyano, K.; Hirayama, K. *Biomed Chromatogr.* **2005**, *19*, 788.

² Guo, Y.; Srinivasan, S.; Gaiki, S. *Chromatographia* **2007**, *66*, 223.