



Quantificação de vitaminas hidrossolúveis por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência empregando métodos de Planejamento Experimental

Palavras-Chave: Vitaminas; UHPLC; HILIC

Autores:

Milena Ostorero Pereira Magalhães [UNICAMP]

Igor Miranda Santana [UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a Márcia Cristina Breitreitz (orientadora) [UNICAMP]

1. Objetivos e Descrição da Pesquisa

O objetivo central deste trabalho foi a quantificação de vitaminas hidrossolúveis empregando a Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) com detecção por arranjo de fotodiodos (PDA do inglês, *Photo Diode Array*). Para tal, incluiu-se objetivos específicos, como a otimização do método de separação completa de todos os analitos, sendo eles as vitaminas do complexo B (B1, B2, B3, B6, B9 e B12) e a vitamina C. As condições cromatográficas para a separação completa e otimização do método foram estudadas empregando-se planejamento experimental com a finalidade de se obter as condições experimentais onde fosse possível alcançar uma resposta ótima (resolução, fator de retenção) e, através das superfícies de respostas geradas pelos modelos, encontrar a região robusta de trabalho.

Este projeto foi planejado como uma continuação do projeto anterior “*Quantificação de vitaminas hidrossolúveis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência empregando resolução multivariada de curvas (MCR)*”, da quota 2019-2020, e dessa forma, a solubilidade das vitaminas e o método para separação destas já haviam sido estudados e estabelecidos. Nesta etapa, chegou-se à uma condição de solubilização dos analitos, e foram avaliados os espectros de absorção na região do UV-Vis com o intuito de se utilizar seu perfil espectral na identificação do composto na mistura de todas as vitaminas. Nesse sentido, a melhor condição de solubilização foi utilizando H₃PO₄ 0,05% v/v para todas as vitaminas com exceção das

vitaminas B2 e B9, as quais foram solubilizadas em solução de NH₃ 0,5 %. Como todos os analitos estavam previamente solubilizados em suas soluções estoque, não houve problemas de solubilidade na mistura das vitaminas.

Ainda, no projeto anterior também foi desenvolvido o método de separação para os analitos mencionados empregando cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UPLC) no modo fase reversa. Para tal, inicialmente foi realizado um *screening* de colunas para UPLC para se avaliar o tempo de retenção dos compostos, a simetria dos picos, a resolução e a seletividade. O teste foi realizado com 5 colunas diferentes. As colunas avaliadas possuem dimensões de 2,1 x 50 mm e partícula de tamanho sub-2 µm. A coluna mais adequada e a escolhida para o prosseguimento das atividades foi a BEH C18. O equipamento utilizado para as corridas cromatográficas foi o cromatógrafo a líquido UPLC-PDA (Waters). Além disso, ainda no projeto anterior, após a escolha da coluna mais adequada, foram avaliados diferentes modificadores orgânicos (B) e diferentes pH's para o tampão da fase móvel aquosa (A), além de se investigar outras condições cromatográficas como a vazão de fase móvel, volume de injeção, tempo de gradiente e porcentagem inicial e final de modificador orgânico. Esta etapa também incluiu o estudo de um pareador iônico com a finalidade de se melhorar a retenção da vitamina B1.

Nesse contexto, no presente trabalho, buscou-se estudar a otimização do método desenvolvido através das ferramentas do planejamento experimental (DoE, do inglês *Design of Experiments*) e, para isso, utilizou-se o *Fusion QbD*. Este, por sua vez, é um *software* acoplado ao equipamento de UPLC da *Waters* que gera as sequências dos experimentos que devem ser realizados, de acordo com os fatores e níveis selecionados. Os resultados decorrentes das corridas cromatográficas são processados no *software* Empower que controla o equipamento, e exportados ao *Fusion* para tratamento estatístico. As variáveis estudadas foram: vazão, temperatura, pH e tempo de gradiente.

Após a obtenção das condições ótimas de trabalho para separação das vitaminas utilizando o planejamento de experimentos, notou-se que o pico referente a vitamina B1 não estava com o formato adequado, mesmo com a utilização do pareador iônico, o qual aumenta a retenção e a seletividade deste analito na coluna e que, além disso, não houve retenção da vitamina C, sendo esta uma limitação da cromatografia em fase reversa para este composto. Diante deste cenário, decidiu-se avaliar a separação das vitaminas em uma coluna HILIC, a fim de se investigar a retenção da vitamina C e a seletividade para vitamina B1. Com o desenvolvimento do método no modo HILIC, seria realizado um novo planejamento de experimentos para otimização do método cromatográfico.

2. Resultados

Os resultados do projeto anterior indicaram que as variáveis que têm maior impacto na resolução, eficiência e fator de retenção dos analitos são o pH da fase móvel aquosa, o tempo de gradiente, a temperatura da coluna e a vazão da fase móvel. Além disso, a condição cuja resposta gerada foi satisfatória para separação dos compostos em questão foi encontrada utilizando como fase móvel aquosa (A) um tampão de fosfato de amônio em pH 5 (10 mmol.L^{-1} com 25 mmol.L^{-1} de pareador iônico), MeOH como fase orgânica (B), a temperatura da coluna em 25°C , vazão de $0,3 \text{ mL/min}$ e com uma corrida cromatográfica em gradiente de 10 minutos (cromatograma referente a esta condição apresentado na Figura 1). Nesse sentido, continuando com a proposta inicial do projeto, buscou-se no presente trabalho, otimizar essas variáveis previamente selecionadas, onde.

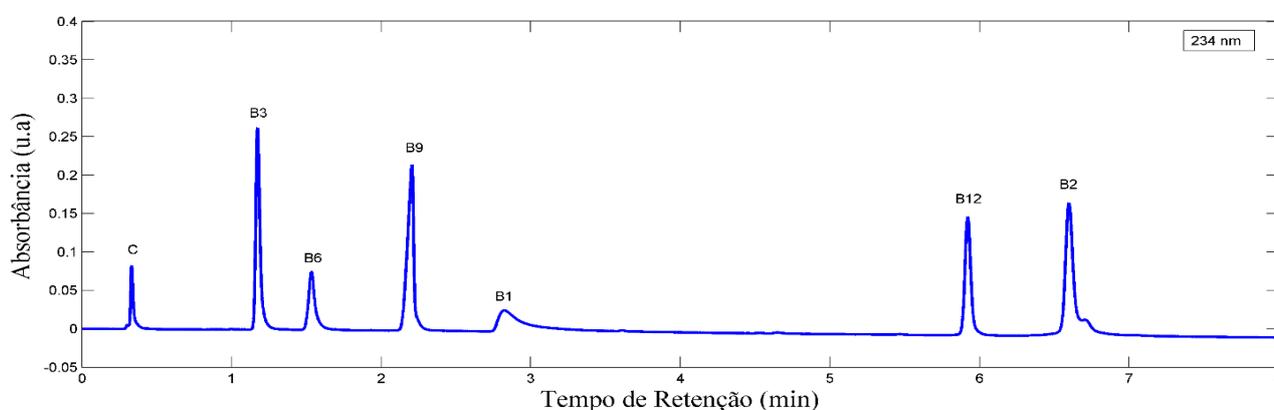


Figura 1. Cromatograma obtido para a mistura das vitaminas com o uso do pareador iônico na fase (A) e coluna BEH C18. Condições cromatográficas: vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura 30°C , volume de injeção $1,0 \mu\text{L}$, fase aquosa (A) tampão fosfato de amônio 10 mmol.L^{-1} (pH 5) com heptanossulfonato de sódio $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$, fase orgânica (B) MeOH. Eluição em modo gradiente: 5% até 35% de B em 10 min. Detecção em 234 nm .

Tabela 1. Níveis para os fatores estudados no Planejamento Experimental.

Nível	pH	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Tempo gradiente (min)	Vazão (mL.min^{-1})
+ 1	5,5	50,0	12,5	0,50
0	5,0	37,5	10,0	0,35
- 1	4,5	25,0	7,5	0,20

O planejamento escolhido para otimização das variáveis foi o Planejamento Composto Central de Face Centrada. Este planejamento é aplicado à 3 níveis dos fatores selecionados, os pontos fatoriais (+1/- 1) e o ponto central (0), sendo a sequência dos experimentos executada pelo *software Fusion QbD*. Após o término de todos os experimentos, analisando os resultados, observou-se que havia três pares críticos, ou seja, três pares de vitaminas que não estavam bem resolvidas, sendo elas B1 e B9, B2 e B12, B3 e B6. Sendo assim, avaliou-se as condições em que a seletividade dessas vitaminas fosse a melhor possível, buscando-se a separação completa de todos os analitos. Para isso, foram

estudadas as superfícies de resposta geradas pelo tratamento estatístico. A Figura 2 exemplifica uma das condições ótimas encontradas para as vitaminas B2 e B1.

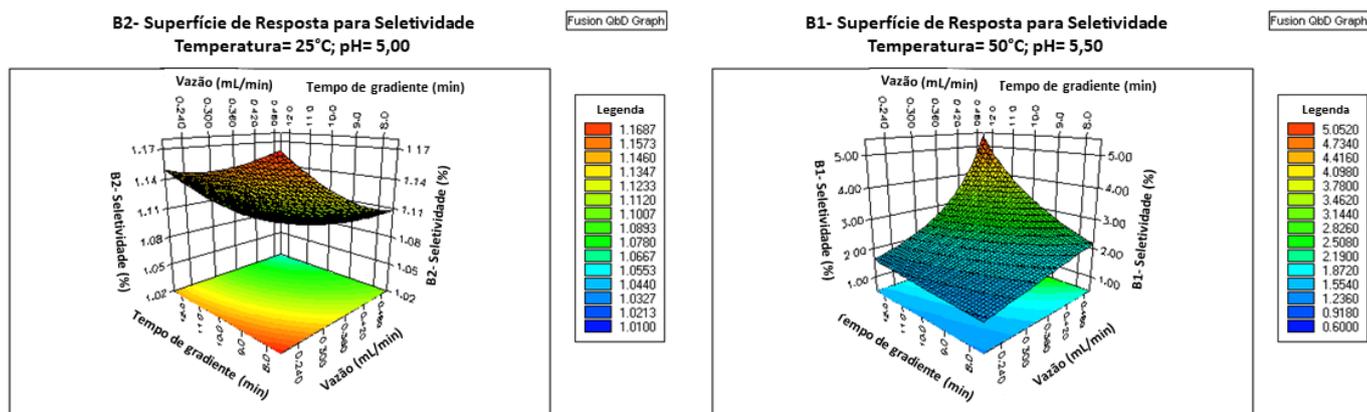


Figura 2. Superfície de resposta gerada pelo *Fusion QbD* para seletividade das vitaminas B2 (à esquerda) e B1 (à direita)

Os gráficos apresentam, para uma dada temperatura e pH, a resposta ótima referente à seletividade em função da vazão e tempo de gradiente. Nesse contexto, avaliando a conjunto de dados como um todo e com base nas análises estatísticas geradas pelo *Fusion QbD*, buscou-se uma condição única em que a seletividade para os três pares críticos fosse a melhor possível (intersecção dos mapas de contorno). Dessa forma, pela otimização realizada através do planejamento experimental, a condição ótima encontrada quando se utilizou MeOH foi: temperatura= 50 °C; pH= 4,85; vazão= 0,5 mL.min⁻¹; tempo de gradiente= 7,9 min.

Durante a realização dos experimentos, houveram alguns problemas com a coluna e então, por este motivo, decidiu-se refazer o planejamento em uma nova coluna. Entretanto, como em fase reversa a vitamina C não apresenta retenção e como o formato do pico da vitamina B1 ainda não havia se mostrado satisfatório, decidiu-se avaliar uma coluna HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*). As separações cromatográficas baseadas no mecanismo de HILIC são empregadas, usualmente, para componentes com caráter polar, como as vitaminas hidrossolúveis, sendo uma técnica que tem se mostrado interessante para separação de composto com tais características, pois fornece um mecanismo de separação alternativo à cromatografia em fase reversa.

O mecanismo de retenção da HILIC envolve, basicamente, a partição do analito entre a fase móvel e uma camada de fase móvel enriquecida com água, a qual é parcialmente imobilizada pela fase estacionária, ou seja, o analito não interage diretamente com as partículas da fase estacionária, embora sabe-se que ainda possa ocorrer alguma adsorção do composto na mesma.

Nesse contexto, como as vitaminas estudadas neste trabalho apresentam caráter hidrofílico, a HILIC se mostrou ser uma alternativa interessante para separação destes compostos. Ainda, devido à baixa, ou nenhuma, retenção da vitamina C em fase reversa, a HILIC mostra-se promissora, pois espera-se que por ser um composto altamente polar sua retenção seja

significativamente maior nesta coluna. Também, devido às interações com os silanóis residuais em fase reversa, a vitamina B1 apresentou um fator de cauda alto e grande assimetria do pico, o que prejudicaria sua quantificação. Dessa forma, o modo HILIC mais uma vez, se mostrou ser uma alternativa notável para melhorar o formato do pico deste composto, visto que o analito não tem interação direta com a fase estacionária.

Foi avaliada uma coluna HILIC (2,1 x 100 mm, tamanho de partícula sub-2 μm) com modificador orgânico ACN e fase aquosa contendo tampão acetato de amônio com trietilamina (TEA). Para análise do formato dos picos, fator de retenção e seletividade, injetou-se a mistura das vitaminas. Como um novo modo cromatográfico seria estudado, foram investigados novamente, quais fatores seriam impactantes nas respostas obtidas. Sendo assim, estudou-se inicialmente, diferentes pH's (4, 5 e 6) e concentrações do tampão (5, 10, 15 e 20 mmol.L^{-1}) para se avaliar qual seria o impacto dessas modificações na separação dos analitos e, em seguida, analisou-se os efeitos da temperatura, vazão e tempo de gradiente. Nesse sentido, observou-se que a melhor condição experimental para separação dos compostos, ainda que haja algumas coeluições foi utilizando-se fase móvel (A) tampão acetato de amônio 10 mmol em pH 5 com TEA (25 mmol.L^{-1}) e ACN como fase (B), temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$, vazão 0,4 mL.min^{-1} e iniciando a corrida com um gradiente de 5-20% de A em 0,3 minutos e de 20-40% de A em 3,2 minutos.

Após a obtenção dessas condições de operação, seria aplicado o DoE para se encontrar a melhor condição de separação dos analitos e encontrar a região de robustez do método de forma a manter o menor tempo de corrida, afim de se diminuir o consumo de ACN, já que o uso excessivo de solvente aumenta o custo de operação. Entretanto, a otimização do método não foi realizada devido aos atrasos gerados pela pandemia de COVID-19, sendo esta, uma etapa que poderá ser concluída futuramente em outros trabalhos.