



## Análise de aminoácidos não derivatizados no vinho por separação com HILIC e detecção de massa

### Autores

Soo Hyun Park, Katherine Lovejoy,  
Sylvia Grosse, Mauro De Pra,  
Stephan Meding, Frank Steiner

Thermo Fisher Scientific,  
Germering, Alemanha

### Palavras-chave

Aminoácidos não derivatizados, HILIC, detecção de massa de quadrupolo único, quantificação do padrão interno, vinho, ISQ EM, ISQ EC

### Objetivo

- Desenvolver um método sensível e reproduzível para a análise de 22 aminoácidos não derivatizados.
- Empregar método para quantificar 17 aminoácidos no vinho.
- Quantificar a prolina de forma precisa, usando um padrão interno isotopicamente marcado.

### Vantagens da aplicação

- O preparo simples da amostra sem derivatização e passo adicional de limpeza reduz o trabalho do analista e as fontes de erro.
- A detecção de massas possibilita a quantificação de aminoácidos que não são completamente solucionados por cromatografia.
- O método detecta de forma reproduzível e de forma sensível os aminoácidos no vinho.
- Um padrão marcado isotopicamente permite uma quantificação altamente precisa da prolina no vinho.

## Introdução

Os aminoácidos nas uvas servem como fonte de nitrogênio no crescimento das leveduras durante a fermentação do vinho e influencia também nas propriedades organolépticas do vinho como precursores de álcoois, aldeídos e ésteres.<sup>1</sup> O monitoramento dos níveis dos diversos aminoácidos nas uvas, antes da fermentação das leveduras, pode ser de grande importância no controle do processo de produção do vinho.<sup>2</sup> Em especial, a quantidade de nitrogênio disponível na levedura do vinho e o potencial aroma do vinho são afetados pelos níveis e tipos de aminoácidos. O controle rigoroso da disponibilidade de aminoácidos pode ser benéfico para a produção de vinhos de alta qualidade. O teor dos aminoácidos no vinho é influenciado pela cepa da levedura, tratamentos usados durante a fermentação, variedade das uvas e o *terroir*.<sup>3</sup> Inúmeros registros utilizaram de forma exitosa a composição dos aminoácidos para diferenciar os produtos do vinho de acordo com as variedades das uvas, origem geográfica, ano de colheita, entre outros.<sup>2-4</sup> Isso pode ser útil na detecção de adulteração do vinho. Portanto, existe um interesse e necessidade cada vez maiores de analisar de forma precisa tanto a composição dos aminoácidos dos vinhos quanto as alterações no teor dos aminoácidos durante a produção e envelhecimento do vinho. A prolina é o aminoácido mais abundante no vinho, atingindo 30% a 85% do teor total dos aminoácidos.<sup>3</sup> Como a prolina não é metabolizada durante a fermentação das leveduras,<sup>3</sup> ela pode ser usada como marcador diagnóstico para diferentes variedades de uvas e *terroirs*. Além disso, a quantificação precisa de prolina pode ser útil para fins de controle de qualidade.

Como a maioria dos aminoácidos carece de cromóforo ou fluoróforo, é necessária a derivatização pré e pós-coluna para analisá-los por cromatografia líquida (CL) acoplada a um detector UV ou de fluorescência. Além de aumentar a sensibilidade da detecção, a derivatização também possibilita a retenção e separação da maioria dos aminoácidos hidrofílicos nas colunas em fase reversa ao aumentar as partes hidrofóbicas.<sup>5</sup> No entanto, a técnica de derivatização requer a manipulação de produtos químicos tóxicos como o *o-ftalaldeído* (OPA) e o fluorenilmetiloxycarbonil (FMOC). Os reagentes da derivatização podem produzir picos que interferem nos analitos por conta dos subprodutos da reação, do próprio reagente, das impurezas do reagente e dos produtos de degradação. Além disso, a técnica de derivatização requer trabalho adicional por parte do analista, o que pode afetar negativamente a robustez e a reprodutibilidade do método por conta de erros sistemáticos e aleatórios durante a etapa de manipulação da amostra.

A cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC) combinada com a detecção de massas é uma alternativa para a realização da análise dos aminoácidos já que os aminoácidos podem ser analisados sem derivatização. A HILIC é uma boa opção para a retenção e separação dos aminoácidos, que são em sua maioria compostos altamente polares. O uso de detector de massas permite a quantificação precisa de analitos em amostras complexas apesar da separação incompleta. Os detectores de massa de quadrupolo único são fáceis de operar e controlar mesmo para os analistas sem conhecimento profundo em espectrometria de massas.

No presente trabalho, desenvolvemos um método de HILIC sensível e reproduzível combinado com a detecção de massa quadrupolo para realizar a análise de 22 aminoácidos não derivatizados, aplicável a uma grande variedade de amostras como alimentos, bebidas e meios de fermentação. O método desenvolvido foi então empregado em uma amostra de vinho e foram analisados 17 aminoácidos, previamente identificados<sup>3</sup>. Por último, a prolina, um possível marcador diagnóstico para o vinho, foi quantificada usando um padrão interno isotopicamente marcado.

## Experimental

### Produtos Químicos

- Sistema de purificação de água ultrapura Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™ xCAD Plus, água deionizada, 18,2 MΩ·cm a 25 °C (nº de peça 50136149)
- Fisher Scientific™ grau LC/MS Optima™ (nº de peça A955)
- Ácido fórmico Fisher Scientific™ grau LC-MS Optima™ (nº de peça A117)
- Formiato de amônio, grau LC/MS Optima™ (nº de peça A115)
- Padrão de aminoácidos Thermo Scientific™ Pierce™ H (nº de peça PI20088)
- L-Aminoácidos, Sigma-Aldrich (nº de peça SIAL-LAA21-1KT)
- L-prolina-2,5,5-d<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich (nº de peça 791261)
- Ácido clorídrico, fumegante, 37%, Merck (nº de peça 1.00317.1000)

## Manuseio de amostras

- Mini centrífuga Fisherbrand™ (nº de peça 12-006-901)
- Medidor de pH de bancada Thermo Scientific™ Orion 3 Star™ (nº de peça 13-644-928)
- Mini misturador Vortex Fisher Scientific™ Fisherbrand™ (nº de peça 14-955-152)
- Pipetas de canal único de volume variável Thermo Scientific™ Finnpiptette™ F1: 100–1000 µL (nº de peça 4641100N), 10–100 µL (nº de peça 4641070N), 1–10 µL (nº de peça 4641030N)
- Frascos (âmbar de 2 mL), Fisher Scientific (nº de peça 15508760)
- Tampa tipo “Snap Cap” com septo (silicone/PTFE), Fisher Scientific (nº de peça 10547445)
- Frasco de inserção fixa e tampa de encaixe (âmbar, 0,3 mL) (nº de peça 03-FIV(A))
- Kit de frascos de vidro transparente certificado Fisherbrand™, tampa de rosca (silicone/PTFE) PP, para a preparação das amostras (nº de peça 15562320)
- Sartorius™ 17761---K, filtro de seringa RC Minisart® (15 mm, poro de 0,2 µm), adquirido da Fisher Scientific (nº de peça 10712712)

## Instrumentação

Sistema UHPLC Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex composto por:

- Base do Sistema Vanquish Horizon/Flex (P/N VH-S01-A)
- Bomba quaternária Vanquish F (nº de peça VF-P20-A)
- Amostrador de Divisão Vanquish (nº de peça VF-A10-A)
- Compartimento de Coluna Vanquish H (nº de peça VH-C10-A-02)
- Espectrômetro de massa de quadrupolo único Thermo Scientific™ ISQ™ EM (nº de peça ISQEM-ESI)

## Preparação de amostra

As soluções padrões foram preparadas com o padrão de aminoácidos Pierce H, contendo 17 aminoácidos (Ala, Arg, Asp, cisteína, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, and Val) e 5 aminoácidos adicionais (Asn, Gln, Nva, Hyp and Trp) da Sigma-Aldrich, conforme listado na tabela 1. O padrão de aminoácidos Pierce H contém 2,5 mM de cada aminoácido, exceto a cisteína (1,25 mM, dímero da cisteína oxidada) em 0,1 N HCl. As soluções padrões dos cinco aminoácidos adicionais foram preparados a uma concentração de 10 mM em uma solução de NHCl 0,1.

As soluções de trabalho e os padrões de calibração foram preparados diluindo a solução padrão com um volume apropriado da solução padrão de NHCl 0,1. A tabela 2 lista as concentrações e volumes usados para preparar

a mistura padrão de 500 µM para 22 aminoácidos. As curvas da calibração externa para os 22 aminoácidos foram obtidas por meio de injeções dos padrões de calibração com três réplicas em cada nível de concentração, com uma faixa de 0,1 a 500 µM. As soluções padrões da calibração interna para a quantificação de prolina foram preparadas adicionando a mesma concentração de prolina-2,2,5-d3 (50 µM) em cada nível de concentração da calibração. Foi comprado um vinho branco (Riesling de Palatinado, Alemanha) em um supermercado local. Um milímetro de vinho foi filtrado usando um filtro de seringa de 0,20 µm e foi então diluído 5 vezes ou 8 vezes com NHCl 0,1 antes da injeção. Para a quantificação de prolina no vinho usando a calibração interna, 40 µL (5 vezes ou 8 vezes) de vinho filtrado, 100 µL de pro-2,2,5-d3 (100 µM), 60 µL da solução NHCl 0,1 foram misturados, agitados lentamente e transferidos para um frasco da amostra para injeção.

Tabela 1. Peso molecular, massa do monitoramento seletivo de íons (SIM) e polaridade da aquisição SIM para 22 aminoácidos. A massa SIM é [M+H]<sup>+</sup> para a aquisição do modo positivo e [M-H]<sup>-</sup> para a aquisição do modo negativo.

Nome	Sigla	Massa monoisotópica [M]	Massa SIM	Polaridade da aquisição SIM
Alanina	Ala	89,05	90,0	Positiva
Arginina	Arg	174,11	175,1	Positiva
Asparagina	Asn	132,05	133,1	Positiva
Ácido aspártico	Asp	133,04	132,0	Negativa
Cisteína	Indisponível	240,02	241,1	Positiva
Ácido glutâmico	Glu	147,05	146,1	Negativa
Glutamina	Gln	146,10	147,1	Positiva
Glicina	Gly	75,03	76,0	Positiva
Histidina	His	155,07	156,1	Positiva
Hidroxiprolina	Hyp	131,06	132,1	Positiva
Isoleucina	Ile	131,09	132,1	Positiva
Leucina	Leu	131,09	132,1	Positiva
Lisina	Lys	146,11	147,1	Positiva
Metionina	Met	149,05	150,1	Positiva
Norvalina	Nva	117,08	118,1	Positiva
Fenilalanina	Phe	165,08	166,1	Positiva
Prolina	Pro	115,06	116,1	Positiva
Serina	Ser	105,04	106,0	Positiva
Treonina	Thr	119,06	120,1	Positiva
Triptofano	Trp	204,23	205,1	Positiva
Tirosina	Tyr	181,19	182,1	Positiva
Valina	Val	117,15	118,1	Positiva

Tabela 2. Preparo da mistura padrão de 500 µM para 22 aminoácidos

Solução	Concentração	Volume (µL)
Padrão de aminoácidos Pierce H	2,5 mM	200
Asparagina	10 mM	50
Glutamina	10 mM	50
Triptofano	10 mM	50
Norvalina	10 mM	50
Hidroxiprolina	10 mM	50
Ácido clorídrico	0,1 N	550

### Preparo da fase móvel

A fase móvel A foi composta por um tampão formiato de amônio em acetonitrila com pH de 2,8 (90:10 v/v) e a fase móvel B foi composta por tampão de formiato de amônio em água com pH de 2,8 (90:10 v/v). O tampão padrão foi preparado a uma concentração de 200 mM de formiato de amônio em água com pH de 2,8. O pH foi ajustado com ácido fórmico. O tampão padrão de 100 mL foi então adicionado aos 900 mL de acetonitrila para a fase móvel A e aos 900 mL de água para a fase móvel B. A concentração final do tampão nas duas fases móveis foi de 20 mM de formiato de amônio.

## Condições cromatográficas

Coluna:	Thermo Scientific™ Accucore™-150-Amide-HILIC (2,1 × 150 mm, 2,6 µm) Nº de peça 16726-152130	
Fase móvel A:	90/10 (v/v) ACN/200 mM de formiato de amônio aquoso com pH de 2,8	
Fase móvel B:	90/10 (v/v) H <sub>2</sub> O/200 mM de formiato de amônio aquoso com pH de 2,8	
Gradiente:	<i>Tempo (min)</i>	<i>%B</i>
	0	0,0
	5	0,0
	15	15,6
	20	33,3
	30	33,3
	30,2	0,0
	40	0,0
Taxa de fluxo:	0,4 mL/min	
Temperatura da coluna:	30 °C (ventilação forçada com pré-aquecedor ativo a 30 °C)	
Temperatura do amostrador:	4 °C	
Volume de injeção:	0,5 µL	
Solvente de limpeza da agulha:	Acetonitrila/água 50:50 (v/v)	
Modo de limpeza da agulha:	Antes da coleta	

## Configurações do detector da MS

Modo de ionização:	ESI
Polaridade (Tensão do spray):	Positiva (+2500 V) e Negativa (-2000 V)
Verificação completa:	<i>m/z</i> 60–350
Verificação SIM:	as massas SIM estão listadas na tabela 1.
Largura SIM:	0,2 amu
Tempo de residência:	0,1 s
Tensão CID:	20 V exceto para Asp (15 V)
Temperatura do vaporizador:	477 °C
Temperatura do tubo de transferência de íons:	300 °C
Pressões de fluxo de gás:	Gás de impulsão, 80,0 psig Gás auxiliar, 7,3 psig Gás de varredura, 2,0 psig

## Software

O sistema de dados de cromatografia (CDS) Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2.9 foi utilizado para a obtenção e análise de dados.

## Resultados e discussão

### Otimização do teor de sais do tampão

O teor de sais do tampão na fase móvel da HILIC é um parâmetro importante no controle tanto do formato do pico quanto da retenção dos analitos, pois ele influencia a interação secundária como a interação polar entre os analitos e a fase estacionária e a espessura da camada de água formada na superfície da fase estacionária. O formiato de amônio ou acetato são sais ideais usados para a detecção de massa por serem voláteis. No entanto, devido a problemas de contaminação para a fonte de íons, recomenda-se uma concentração máxima de 20 mM. A figura 1 ilustra o efeito do teor de sais de formiato de amônio no formato do pico e na retenção para dez aminoácidos de eluição precoce na coluna Accucore-150-Amide-HILIC. Os analitos eluíram mais rapidamente e produziram melhores formatos de pico (mais estreitos) com o aumento do teor de sais na fase móvel. Por exemplo, a metionina e o triptofano produziram picos simétricos usando uma concentração de sal de 20 mM mas exibiram picos com frente (metionina) e picos com cauda (triptofano) com 5 mM. Portanto, 20 mM foi definido como a concentração final do sal. A taxa de fluxo de 0,9 mL/min na fase móvel e o tampão de pH 3 foram usados como condições iniciais. A otimização rendeu as condições finais de 0,4 mL/min para a taxa de fluxo e pH de 2,8 para a fase móvel. A sensibilidade do sinal, os formatos dos picos e a seletividade cromatográfica foram considerados para a otimização. Por exemplo, as respostas gerais do sinal para os 22 aminoácidos analisados no presente trabalho aumentaram aproximadamente 2,6 vezes ao usar um fluxo de trabalho de 0,4 mL/min em relação ao fluxo de trabalho de 0,9 mL/min. Além disso, a melhora dos formatos dos picos (principalmente do ácido aspártico e histidina) e da seletividade cromatográfica no geral foi obtida com o pH 2,8, entre os cinco pH's ensaiados (isto é, pH 2,8, 3,3, 3,5, 4,3 e 4,8) (os dados não são mostrados).

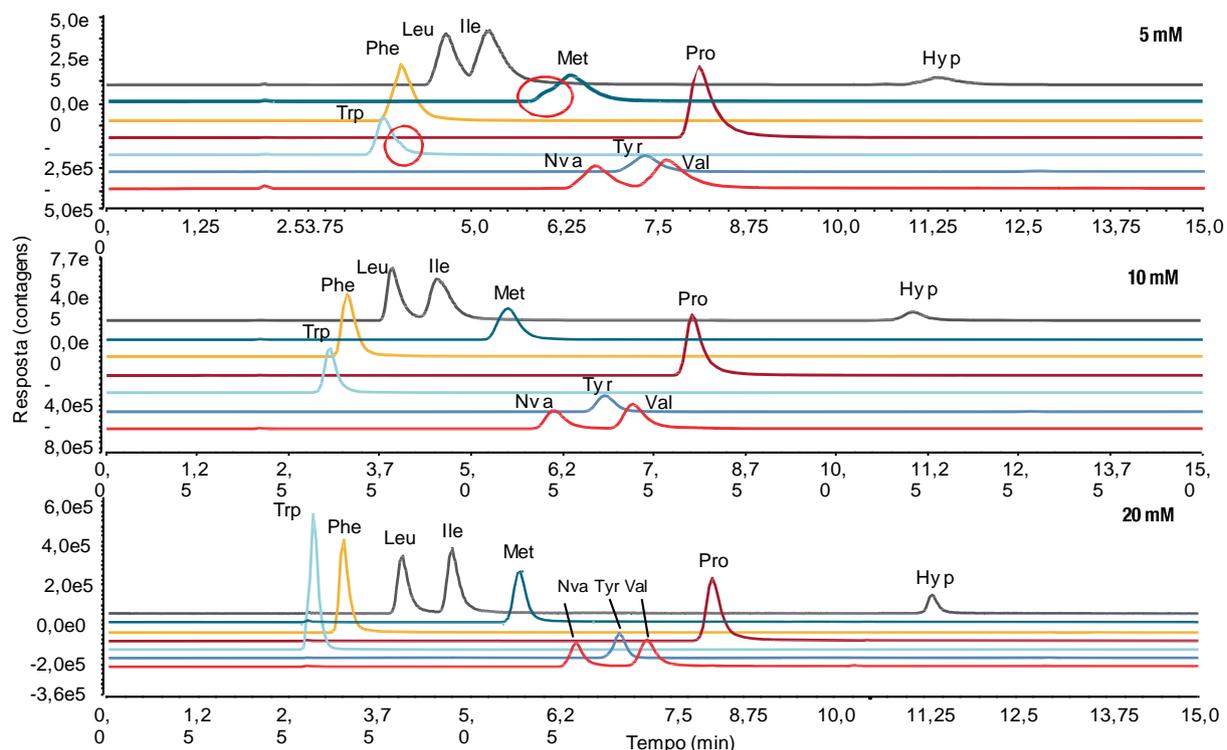


Figura 1. Otimização do teor de sais do tampão na HILIC, mostrando a melhora do formato do pico e da retenção para os dez aminoácidos selecionados na concentração ideal de 20 mM. Foi usado o tampão formiato de amônio (de 5, 10 e 20 mM) com pH de 3 na fase móvel. A mistura padrão de 250  $\mu$ M foi injetada como o volume de injeção de 1  $\mu$ L para a concentração de 5 e 10 mM e de 0,5  $\mu$ L para a concentração de 20 mM à taxa de fluxo de 0,9 mL/min na fase móvel.

### Otimização dos parâmetros da fonte de íons do detector de massa

Os parâmetros da fonte de íons para o ácido aspártico e glicina foram otimizados já que os dois aminoácidos exibiram as respostas mais baixas para a mistura padrão de 250  $\mu$ M sob as condições de ensaio, resultando na resposta mais baixa do sinal para o ácido aspártico no vinho diluído 5 vezes e ausência de detecção para a glicina. As configurações inteligentes de fonte em autospray no software Chromeleon CDS inicialmente permitiram uma seleção geral e prática das configurações de fonte como a temperatura de vaporização, temperatura do tubo de transferência de íons e a pressão dos gases de impulsão, auxiliar e de varredura. Os valores padrões para essas configurações de fonte de íons são 227 °C, 300 °C, 42,9, 4,8 e 0,5 psig, respectivamente, à taxa de fluxo de 0,4 mL/min. Nas configurações de fonte de íons em autospray, três barras de controle deslizante, relacionadas aos parâmetros básicos como volatilidade da fase móvel, robustez/sensibilidade e estabilidade térmica dos analitos podem ser movidas para cima e para baixo para fazer o ajuste dos parâmetros<sup>5</sup>. Os valores ajustados de temperatura de vaporização, temperatura do tubo de transferência de íons e a pressão dos gases de impulsão, auxiliar e de varredura foram 427 °C, 300 °C, 72,9, 6,8 e 2 psig, respectivamente. A otimização fina desses parâmetros, juntamente com os dois parâmetros adicionais (como a tensão da fonte e a tensão da dissociação induzida por colisão [CID] da fonte), seguiu como mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Pontos de ensaio para a otimização fina dos parâmetros da fonte de íons

Parâmetro do ensaio	Pontos do ensaio
Temperatura do vaporizador (°C)	377, 425, 477
Pressão do gás de impulsão (psig)	75, 77,5, 80
Pressão do gás auxiliar (psig)	6,8, 7,3, 7,8
Pressão do gás de varredura (psig)	1,5 - 2
Temp. do tubo de transferência de íons (°C)	275, 300, 325
Tensão da fonte positiva (V)	2500, 3000, 3500
Tensão da fonte negativa (V)	1500, 2000, 2500
Tensão CID (V)	0, 5, 10, 15, 20, 25, 30

Os valores otimizados desses parâmetros eram 477 °C, 300 °C, 80, 7,3 e 2 psig, respectivamente, conforme resumido na tabela das configurações do detector da MS.

As respostas do sinal (ou área) para glicina e ácido aspártico foram aumentadas em 5,1 e 7,9 vezes após o ajuste das configurações de fonte de íons em autospray e em 6,1 e 11,7 vezes após a otimização fina (os dados não estão mostrados). As 22 verificações SIM foram realizadas ao mesmo tempo no detector de massa de quadrupolo único ISQ EM.

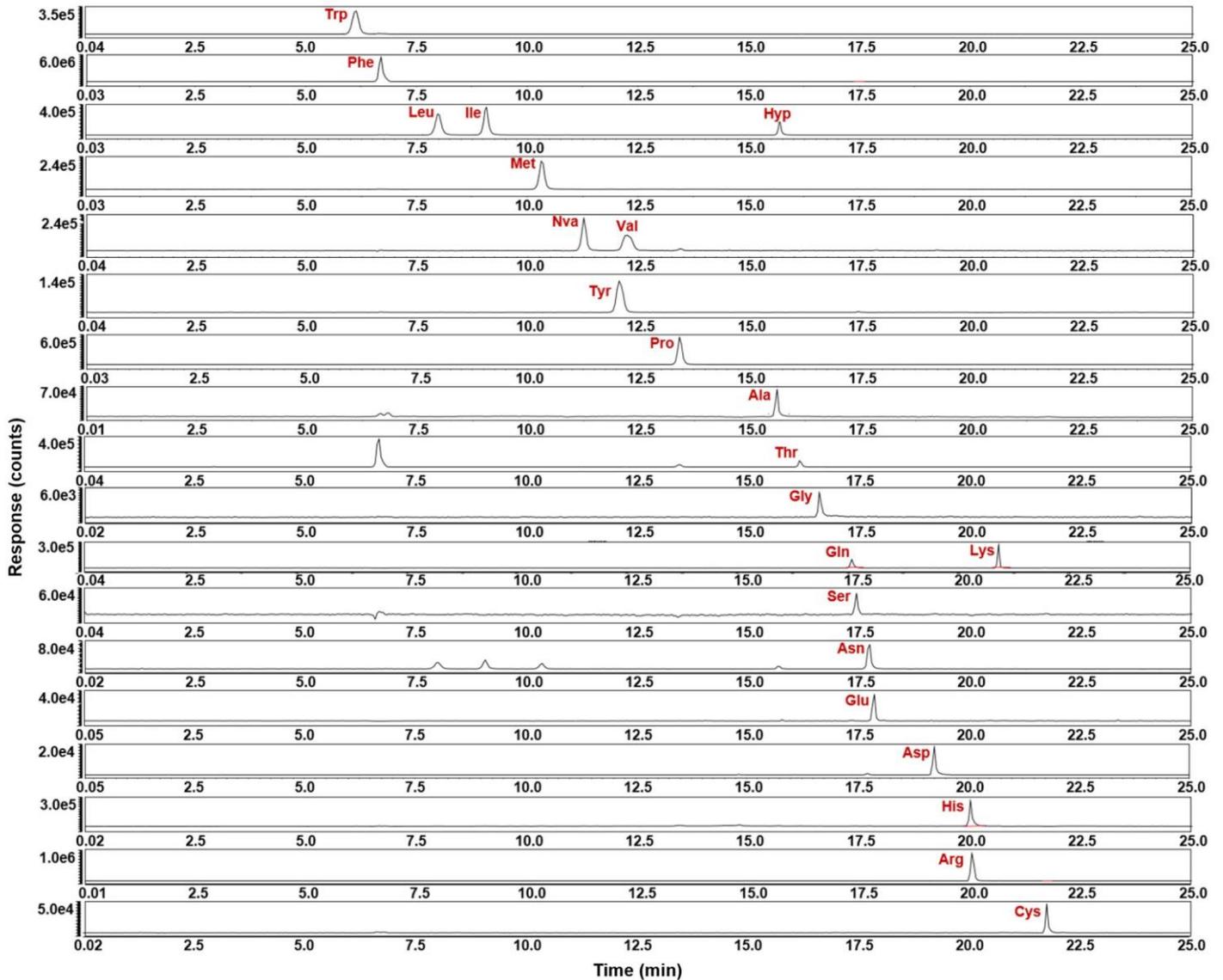


Figura 2. Cromatogramas da verificação SIM dos 22 aminoácidos-padrão a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Os aminoácidos com os mesmos valores  $m/z$  (Leu/Ile/ Hyp, Nva/Val, and Gln/Lys) são detectados nos mesmos canais SIM ( $m/z$  132,1, 118,1 e 147,1).

Dois aminoácidos (isto é, ácido glutâmico e ácido aspártico) com cadeias laterais no ácido carboxílico foram detectados no modo íon negativo na mesma corrida dos outros 20 aminoácidos detectados pelo modo íon positivo. A figura 2 ilustra os cromatogramas típicos das verificações SIM dos 22 aminoácidos-padrão. O valor  $m/z$  para a verificação SIM para cada componente de aminoácido está listado na tabela 1. Todos os aminoácidos com a exceção de cinco pares de pico (isto é, Tyr/Val, Ala/Hyp, Gln/Ser, Asn/Glu, His/Arg) foram separados na linha de base na coluna Accucore-150-Amide-HILIC em 22 minutos. Além disso, dois pares de isômeros no pico (isto é, Leu/Ile e Val/Nva) foram bem solucionados com os valores da resolução de pico  $R$ , de 5,37 e 3,20, respectivamente.

### Linearidade, sensibilidade e reprodutibilidade do método

As curvas de calibração foram construídas ou com ajuste

linear ou ajuste quadrático, com base nas áreas médias dos picos das verificações SIM correspondentes. A figura 3 mostra exemplos das curvas de calibração dos seis aminoácidos selecionados. Os resultados da calibração para os 22 aminoácidos estão listados na tabela 4. A linearidade do método e os ajustes da curva se mostraram excelentes, com o coeficiente de determinação  $R^2$  maior que 0,991 para os 22 aminoácidos e 0,999 para 10 deles.

Além dos parâmetros de calibração (como a faixa de calibração, tipo de ajuste,  $R^2$ ), os valores do limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD) estão listados na tabela 4. Os valores LOQ e LOD para cada analito foram estimados por extrapolação das relações sinal-ruído (S/N) de 10 e 3, respectivamente, a partir de medidas reais das amostras diluídas até que o seu S/N ficasse próximo a 10 para LOQ e 3 para LOD.

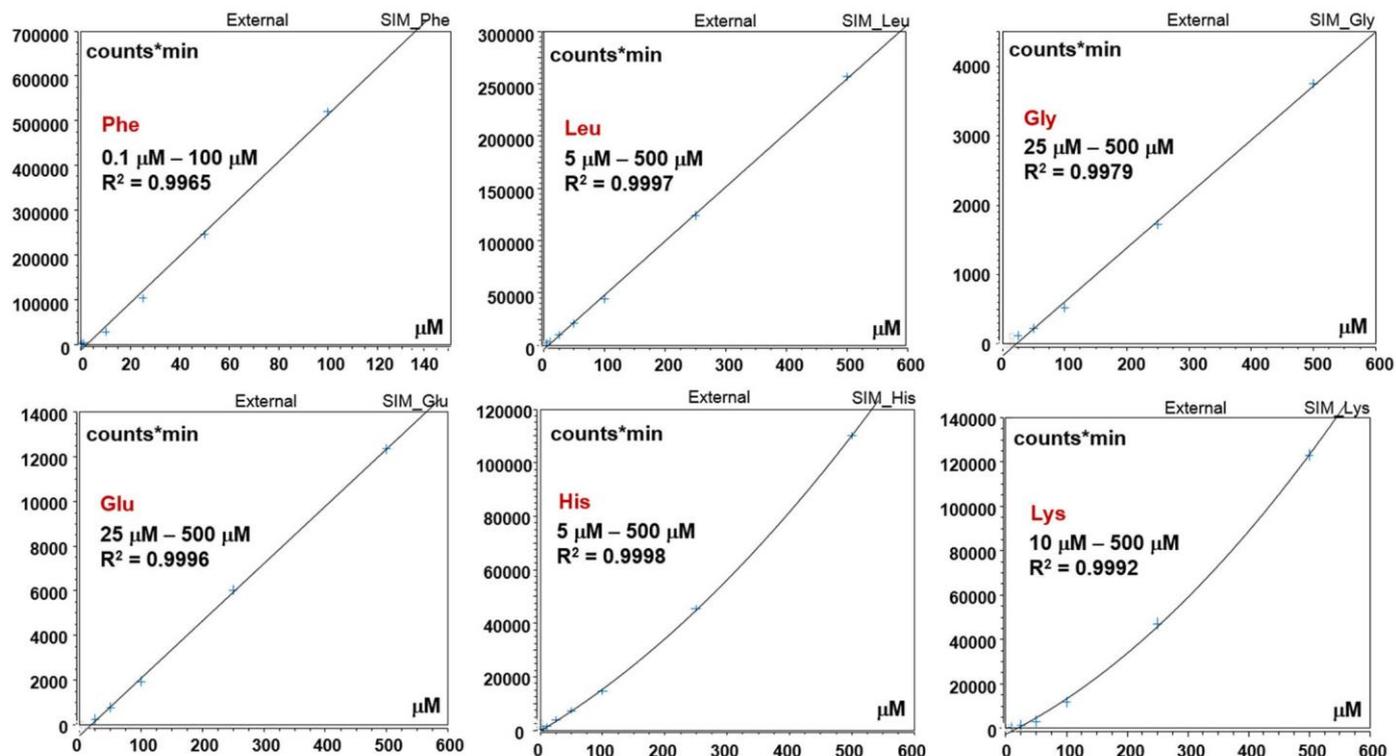


Figura 3. Exemplos das curvas de calibração de seis aminoácidos selecionados (Phe, Leu, Gly, Glu, His, and Lys). As curvas de calibração foram obtidas com base na área média do pico de cada verificação SIM (n=3). Phe, Leu, Gly, and Glu possuem ajustes lineares já His e Lys possuem ajustes quadráticos.

Tabela 4. Parâmetros de calibração, valores LOQ e LOD

Nome	Faixa de concentração (µM)	Tipo de ajuste da curva	R2	LOQ (µM)	LOD (µM)
Trp	1–50	Linear	1,0000	0,66	0,20
Phe	0,1–100	Linear	0,9965	0,08	0,02
Leu	5–500	Linear	0,9997	1,56	0,47
Ile	5–500	Linear	0,9993	1,18	0,35
Met	5–250	Linear	0,9994	1,06	0,32
Nva	5–250	Linear	0,9983	2,34	0,70
Tyr	5–500	Linear	0,9991	2,42	0,73
Val	10–250	Linear	0,9997	6,21	1,86
Pro	1–500	Linear	0,9974	0,44	0,13
Ala	10–250	Linear	0,9984	5,50	2,50
Hyp	5–250	Linear	0,9968	2,95	0,88
Thr	5–250	Linear	0,9952	2,42	0,72
Gly	25–500	Linear	0,9979	18,12	5,67
Gln	10–250	Quadrático	0,9991	6,15	1,84
Ser	25–500	Linear	0,9971	17,73	5,32
Asn	5–250	Linear	0,9919	2,49	0,75
Glu	25–500	Linear	0,9996	17,56	5,27
Asp	10–500	Linear	0,9981	7,98	2,39
His	5–500	Quadrático	0,9998	2,08	0,62
Arg	5–500	Linear	1,0000	1,01	0,30
Lys	10–500	Quadrático	0,9992	10,00	3,10
Cisteína	5–250	Quadrático	0,9982	9,65	2,89

Os ensaios de repetibilidade foram realizados com dez injeções de uma mistura padrão de 100  $\mu\text{M}$  para 21 aminoácidos, com exceção da fenilalanina para a qual se usou uma solução de 25  $\mu\text{M}$ . O método se mostrou altamente reproduzível, exibindo valores baixos de desvio padrão relativo (RSD) para tempo de retenção e área de pico (tabela 5) para a maioria dos aminoácidos. O RSD do tempo de retenção foi menor que 0,1% para todos os aminoácidos com exceção da valina (RSD de 0,18%) e asparagina (RSD de 0,12%). Além disso, a etapa de lavagem de coluna prorrogada por 10 minutos com 33,3%B se mostrou eficiente na manutenção do desempenho estável da coluna durante as 20 injeções consecutivas.

### Quantificação dos aminoácidos no vinho

Dezessete aminoácidos, comumente encontrados no vinho<sup>3</sup>, foram quantificados por meio de calibração externa. As diluições de 5 vezes e 8 vezes do vinho branco foram injetadas três vezes cada e os valores médios foram usados para a quantificação. Um exemplo de cromatograma do SIM dos aminoácidos no vinho é mostrado na figura 4, que apresenta excelente resolução cromatográfica dos três aminoácidos isobáricos. Os três aminoácidos, detectados no mesmo  $m/z$  de 132,1, foram bem solucionados na coluna Accucore-150-Amide-HILIC, inclusive um par desafiador de isômeros no pico Leu/Ile (Rs de 5,37). Os picos foram identificados e/ou atribuídos comparando os tempos de retenção no cromatograma de uma amostra de vinho (inferior) com aqueles no cromatograma sobreposto (superior), obtidos para a

Tabela 5. Reprodutibilidade do tempo de retenção (TR) e área do pico para os aminoácidos-padrão (n = 10), juntamente com o TR médio correspondente

Nome	TR médio (min)	RT RSD (%)	Area RSD (%)
Trp	6,11	0,008	2,15
Phe	6,64	0,005	9,50
Leu	7,96	0,012	2,80
Ile	9,07	0,008	2,49
Met	10,31	0,000	2,10
Nva	11,26	0,007	2,06
Tyr	12,05	0,000	1,85
Val	12,20	0,177	2,43
Pro	13,42	0,000	1,86
Ala	15,62	0,000	1,89
Hyp	15,68	0,041	2,00
Thr	16,17	0,003	3,22
Gly	16,60	0,000	6,44
Gln	17,36	0,025	2,47
Ser	17,46	0,000	3,98
Asn	17,73	0,120	2,99
Glu	17,87	0,078	4,05
Asp	19,24	0,003	9,46
His	20,01	0,000	1,85
Arg	20,05	0,002	2,96
Lys	20,68	0,000	3,81
Cisteína	21,78	0,002	8,24

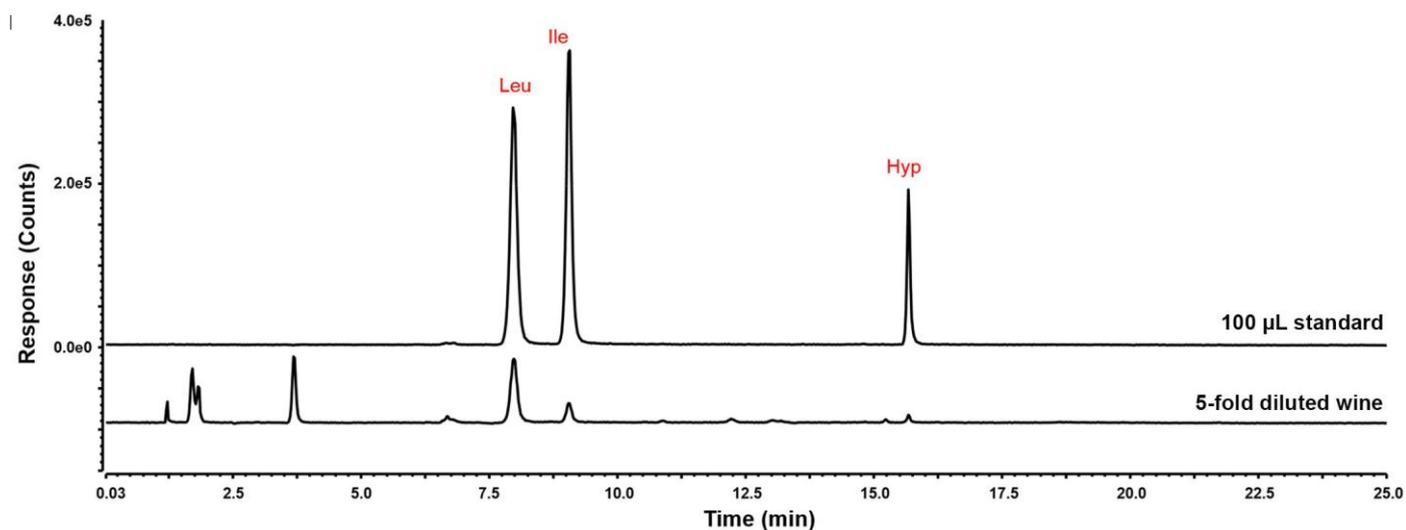


Figura 4. Exemplo de cromatogramas do SIM dos aminoácidos no vinho, registrado em  $m/z$  132,1. O cromatograma da amostra de vinho (5 vezes diluído) (inferior) foi sobreposto com a quele dos aminoácidos correspondentes na solução padrão de 100  $\mu\text{M}$  (superior). Três aminoácidos (Leu, Ile, e Hyp) com o mesmo valor  $m/z$  puderam ser separados e as suas identidades foram atribuídas com base nos seus tempos de retenção.

A figura 5 mostra a quantidade dos 17 aminoácidos na amostra de vinho, que inclui Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Hyp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val. Foram detectadas quantidades ligeiramente maiores (de 1,02 a 1,5 vezes) para todos os aminoácidos, com exceção da prolina e valina, usando o vinho diluído 8 vezes do que com o vinho diluído 5 vezes, possivelmente por conta da menor supressão do sinal induzido por matriz.

Os níveis de valores atípicos, para prolina e valina, foram 1,2 e 1,02 maiores do que no vinho diluído 5 vezes. As quantidades de aminoácidos estavam dentro da faixa dos valores reportados para aquelas obtidas dos 42 vinhos branco gregos.<sup>6</sup> Três aminoácidos (Gly, Hyp, Ser) para o vinho diluído 5 vezes e seis aminoácidos (Gly, Hyp, Ile, Met, Ser, Val) para o vinho diluído 8 vezes foram detectados em níveis entre LOQ e LOD.

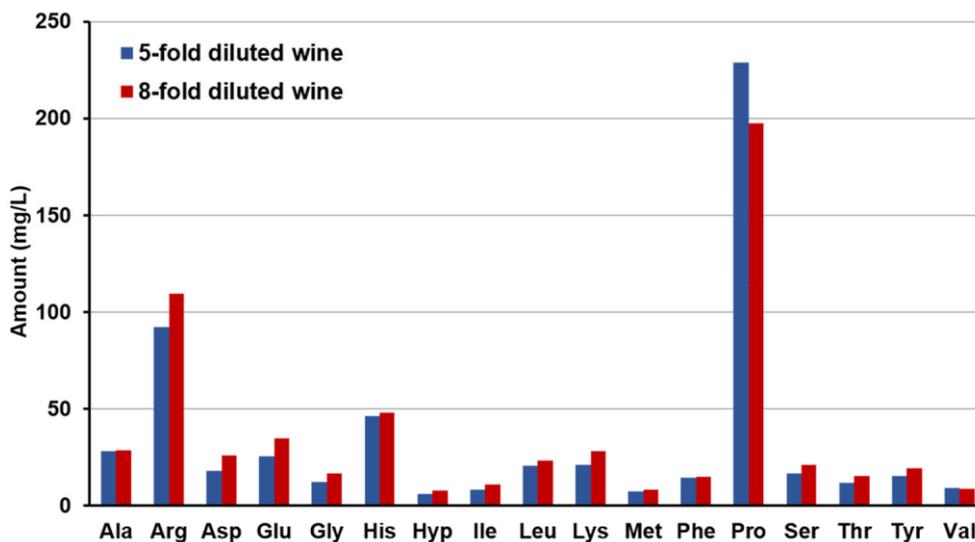


Figura 5. Quantidade dos 17 aminoácidos no vinho. O teor dos aminoácidos (mg/L) foi quantificado com calibração externa. Vinhos brancos diluídos 5 e 8 vezes com N HCl 0,1 foram injetados três vezes cada, com volume de injeção de 0,5 µL e estão apresentadas as concentrações médias dos aminoácidos.

Tabela 6. Resultados da quantificação dos 17 aminoácidos no vinho branco. A unidade de quantidade é mg/L e os desvios padrões para as injeções das três réplicas são mostrados em parênteses.

Nome	Vinho diluído 5 vezes	Vinho diluído 8 vezes	Quantidade mínima no vinho grego <sup>6</sup>	Quantidade máxima no vinho grego <sup>6</sup>
Ala	28,0 (± 1,25)	28,6 (± 1,19)	3,79	238
Arg	92,1 (± 5,44)	109,6 (± 4,36)	4,05	1075
Asp	17,9 (± 0,51)	26,0 (± 0,46)	3,90	74,8
Glu	25,5 (± 0,25)	34,8 (± 2,88)	6,74	140,2
Gly	12,4 (± 0,27)	16,9 (± 0,79)	2,43	38,4
His	46,3 (± 2,54)	48,3 (± 2,01)	1,02	79,4
Hyp	5,9 (± 0,37)	8,0 (± 0,25)	América do Norte	América do Norte
Ile	8,2 (± 0,04)	11,2 (± 0,11)	0,00	18,0
Leu	20,6 (± 0,11)	23,2 (± 0,67)	3,92	44,5
Lys	20,9 (± 0,22)	28,0 (± 0,77)	5,42	78,8
Met	7,2 (± 0,13)	8,4 (± 0,22)	0,38	14,8
Phe	14,4 (± 0,11)	14,9 (± 0,02)	2,75	52,5
Pro	228,9 (± 3,95)	197,2 (± 4,28)	América do Norte	América do Norte
Ser	16,7 (± 0,38)	20,9 (± 0,79)	1,14	47,4
Thr	11,8 (± 0,23)	15,5 (± 0,22)	4,88	62,6
Tyr	15,5 (± 0,67)	19,3 (± 0,87)	1,86	36,2
Val	9,0 (± 0,37)	8,9 (± 0,57)	0,00	37,5

Além disso, a prolina exibiu a maior quantidade de aminoácidos com 228,9 mg para o vinho diluído 5 vezes, que corresponde a 39% do teor total de aminoácidos. O próximo aminoácido mais abundante foi a arginina, que está presente em grandes quantidades no vinho, dependendo das quantidades dos outros aminoácidos, preferencialmente utilizados pela levedura de vinho.<sup>6</sup>

### Quantificação de prolina no vinho branco através de calibração interna

A quantificação de prolina foi realizada de forma adicional usando um padrão interno isotopicamente marcado (isto é, prolina-2,5,5-d<sub>3</sub>). A concentração de prolina-2,5,5-d<sub>3</sub> de 50 μM foi adicionada a cada um dos sete níveis de padrão de calibração (1, 10, 25, 50, 100, 250, and 500 μM). Conforme mostrado na figura 6a, foi obtida uma excelente linearidade (R<sup>2</sup> de 0,9999) na faixa de calibração de 1 μM a 500 μM. Os resultados para a quantificação de prolina estão resumidos na tabela 7. A quantidade de prolina foi determinada ser 204,3 mg/L e 203,5 mg/L para os vinhos diluídos 5 e 8 vezes, respectivamente. O resultado foi comparado ao que usa calibração externa para averiguar se a calibração externa pode ser empregada de forma adequada para a quantificação de prolina no vinho. A curva da calibração externa está ilustrada na figura 6b, exibindo uma linearidade um pouco menor (R<sup>2</sup> de 0,9973) em relação à mesma faixa de calibração. A quantidade de prolina foi determinada ser 228,9 mg/L e 197,2 mg/L para os vinhos diluídos 5 e 8 vezes, respectivamente. O uso de calibração interna (em relação à calibração externa) para a quantificação de prolina produziu menos variação do fator de diluição, implicando a redução de uma variação na resposta do sinal na matriz do vinho (isto é, a eliminação dos efeitos da matriz). Além disso, foram encontradas menos variações nas quantidades de prolina entre as injeções usando a calibração interna, mostrando melhora da precisão da quantificação. Os valores do desvio padrão mostrados na tabela 7 reflete essa melhora.

Tabela 7. Resultados da quantificação de prolina no vinho branco. A unidade de quantidade é mg/L e os desvios padrões para as injeções das três réplicas são mostrados em parênteses.

	Vinho diluído 5 vezes	Vinho diluído 8 vezes
Calibração interna	204,3 (± 2,14)	203,5 (± 3,32)
Calibração Externa	228,9 (± 3,95)	197,2 (± 4,28)

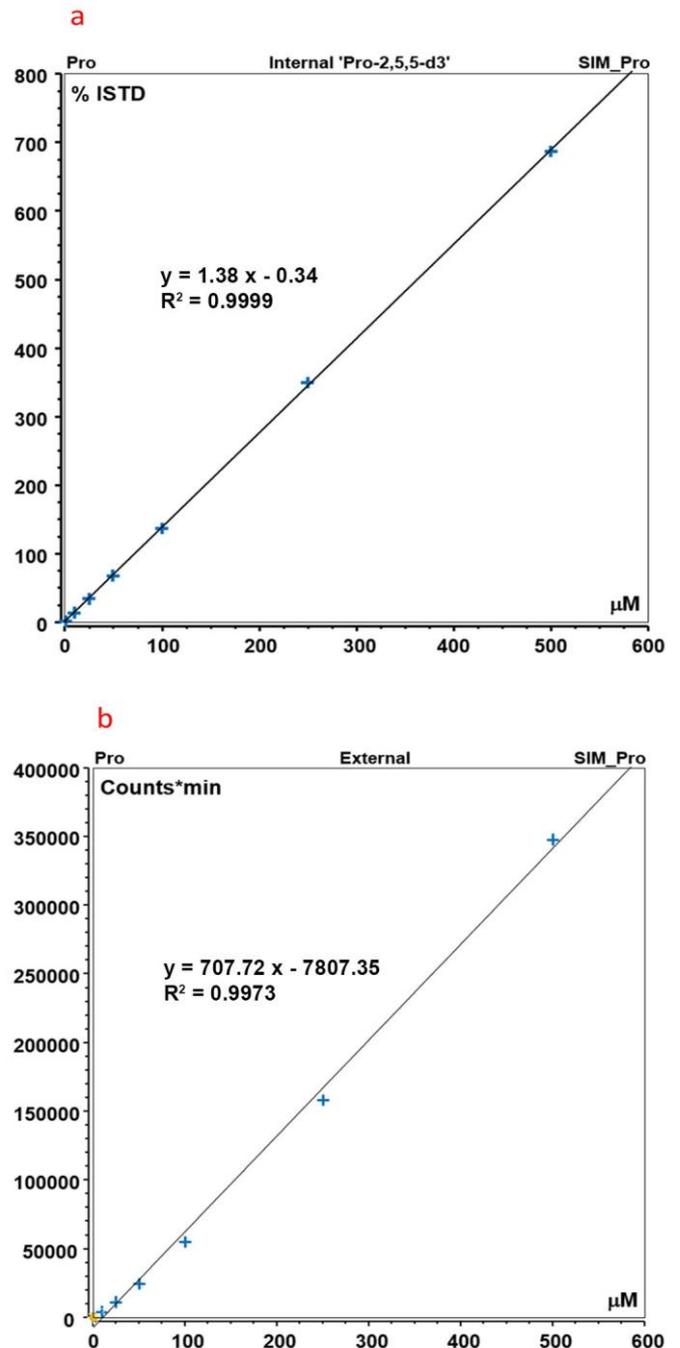


Figura 6. curvas da calibração (a) interna e (b) externa da prolina. Sete níveis de calibração (1, 10, 25, 50, 100, 250, e 500 μM) foram usados nas duas calibrações. Para a calibração interna, uma concentração de prolina-2,5,5-d<sub>3</sub> de 50 μM foi adicionada a cada um dos sete padrões de calibração. Na curva da calibração interna, o eixo Y representa o % ISTD calculado pelo percentual da razão da área do analito (isto é, a prolina) e o padrão interno (isto é, a prolina-2,5,5-d<sub>3</sub>). O eixo X representa a concentração da prolina. O eixo Y na calibração externa representa a área do pico.

## Conclusão

- Um método prático e reproduzível para a análise de 22 aminoácidos não derivatizados foi desenvolvido na coluna Accucore-150-Amide-HILIC com detector de massa SQ EM.
- O ISQ EM fornece quantificação precisa ao mesmo tempo que adquire várias verificações SIM nas duas polaridades em paralelo.
- A quantificação de prolina foi mais consistente e precisa com a calibração interna do que com a calibração externa, por eliminar a influência da matriz da amostra.
- O método diminui erros sistemáticos e aleatórios com menos manipulações das amostras, resultando em robustez do método.
- O método descrito aqui é totalmente transferível ao ISQ EC.

## Referências

1. Belda, I.; Ruiz, J.; Esteban-Fernández, A.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A.; Moreno-Arribas, M.V. Contribuição microbiana ao aroma do vinho e o seu uso pretendido para a melhora da qualidade do vinho, *Molecules* 2017, 22, 189–217.
2. Callejón, R.M.; Troncoso, A.M.; Morales, M.L. Determinação de aminoácidos em produtos derivados do vinho: Uma revisão, *Talanta* 2010, 81, 1143–1152.
3. Lehtonen, P., Determinação de amins e aminoácidos no vinho – Uma revisão, *Am. J. Enol. Vitic.* 1996, 47, 127–133.
4. Soufleros, E.H.; Bouloumpasi, E.; Tsarchopoulos, C.; Biliaderis, C.G. Perfis primários dos aminoácidos em vinhos brancos gregos e o seu uso na classificação de acordo com a variedade, origem e colheita, *Food Chemistry* 2003, 80, 261–273.
5. Gokmen, V.; Serpen, A.; Mogol, B.A., Determinação rápida de aminoácidos em alimentos por cromatografia líquida com interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 403, 2915–2922.
6. Nota de Aplicação da Thermo Scientific 72976: Confirmação de identidade e quantificação precisa de uma impureza genotóxica em um ingrediente farmacêutico ativo por UHPLC-UV acoplada a um detector de massa quadrupolo. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-72976-lc-ms-genotoxic-impurity-pharmaceutical-an72976-en.pdf>

Saiba mais em **thermofisher.com**