

HIGUINALDO J. CHAVES DAS NEVES (*)
ANA MARIA PESTANA DE VASCONCELOS (**)

Departamento de Química e Biotecnia da Faculdade
de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
Quinta da Torre
2825 MONTE DA CAPARICA
Portugal



SEPARAÇÃO E ANÁLISE QUANTITATIVA DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO

ÉSTERES *N*-ETOXICARBONIL
ISOPROPÍLICOS
E ÉSTERES *N*-ETOXICARBONIL-*O*(*S*)-
-TRIMETILSILIL ISOPROPÍLICOS

As propriedades cromatográficas dos ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonilaminoácidos e N-etoxicarbonil-O(S)-trimetilsililaminoácidos são estudadas. Descreve-se o método de preparação destes novos derivados cuja separação em colunas capilares é suficientemente boa para permitir análises quantitativas precisas. A resposta do detector de ionização de chama a este novo tipo de derivados é linear dentro da gama de concentrações estudadas. Através do processo de derivatização proposto, torna-se possível aplicar a cromatografia gás-líquido à análise de aminoácidos em materiais de origem biológica.

(*) Autor a quem deve ser dirigida a correspondência

(**) Assistente do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora.

1 — INTRODUÇÃO

Devido ao enorme potencial analítico, caracterizado por um elevado poder de resolução e alta sensibilidade, a cromatografia gás-líquido apresenta-se como o método de eleição para a análise de misturas complexas. Embora, no caso particular dos aminoácidos, sejam possíveis análises precisas em tempo útil, pelo uso dos modernos analisadores automáticos, as vantagens oferecidas por este tipo de equipamentos devem ser contrapostas ao seu elevado custo. Para além de potencialmente mais sensível que os métodos convencionais de troca-iónica, a cromatografia gás-líquido alia à sua maior versatilidade um investimento inicial relativamente baixo e uma operação e manutenção mais fáceis e económicas, sendo, consequentemente, mais acessível a orçamentos limitados. Por estas razões, são numerosos os investigadores que se têm dedicado ao desenvolvimento de métodos capazes de tornarem os aminoácidos proteicos e não-proteicos, capazes de serem analisados quantitativa e qualitativamente por cromatografia gás-líquido.

Devido à sua volatilidade, os aminoácidos não são directamente analisáveis em fase de vapor, pelo que se torna necessária a sua transformação prévia em derivados voláteis adequados. Neste sentido, os derivados trimetilsilílicos [1], assim como os ésteres *n*-butílicos de *N*-trifluoroacetilaminoácidos [2-4], receberam inicialmente uma atenção detalhada. Este tipo de derivados não se mostrou, porém, isento de problemas, principalmente pela sua tendência à decomposição nas colunas e elevada susceptibilidade à hidrólise na presença de traços de humidade. Por outro lado, a resolução obtida nos sistemas utilizados era, em muitos casos, incompleta. Uma tentativa de circular alguns destes problemas, incluindo o facto de alguns aminoácidos fornecerem picos múltiplos na análise cromatográfica, levou a que um processo combinado de esterificação e *N*-trimetilsiliação fosse sugerido, com vista a aumentar a resolução e eliminar a formação de picos múltiplos obtida pela siliação simples [5].

Os ésteres alquílicos de *N*-heptafluorobutirilaminoácidos são os derivados que mais largamente têm sido utilizados para a análise por cromatografia gás-líquido, nomeadamente os ésteres *n*-propílicos [6-9], isoamílicos [10,11] e isobutílicos [12-14], entre outros. Apesar dos bons resultados a que estes derivados têm conduzido, a sua aplicação como método de rotina à análise de aminoácidos não angariou

ainda aceitação geral, sobretudo por alguns aminoácidos serem de quantificação difícil e, em alguns casos, a resolução ser incompleta. A esterificação da cisteína e da histidina por processos directos é difícil, enquanto que a metionina, a lisina e a tirosina são susceptíveis de resultados pouco precisos na análise quantitativa. À semelhança de outros [15], tem sido possível, no nosso laboratório, obter resultados satisfatórios na cromatografia de ésteres isopropílicos de derivados *N*-O(S)-heptafluorobutíricos de aminoácidos por utilização de colunas capilares. O maior inconveniente encontrado, para além da sua relativa instabilidade, tem sido a decomposição no sistema cromatográfico, mesmo quando a amostra apenas contacta com superfícies de vidro durante a cromatografia.

Na análise de quantidades muito pequenas de material em que os aminoácidos se encontram presentes em concentrações muito baixas, como é o caso de materiais de origem vegetal, sobretudo provenientes de secreções, ou de materiais de origem fermentativa, o processo de derivatização colide com a exigência de volatilidade imposta pelas condições cromatográficas. A necessidade de concentrar soluções durante o processo de derivatização conduz frequentemente a perdas significativas por evaporação, sobretudo nos derivados mais voláteis. A menor volatilidade de derivados como os ésteres metílicos de *N*-isobutoxicarbonilaminoácidos [16] permite circular esta dificuldade. No entanto, este tipo de derivados necessita de um complicado sistema de duas colunas para a sua separação completa, o que torna o método pouco prático em análise de rotina.

O presente trabalho introduz novos derivados de aminoácidos, sob a forma de ésteres isopropílicos de *N*-etoxicarbonilaminoácidos. Estes derivados mostram-se apropriados para a análise de aminoácidos por cromatografia gás-líquido em materiais de origem biológica, mesmo quando aqueles estão presentes em concentrações muito baixas. Quantidades da ordem das 2 pmoles puderam ser analisadas sem dificuldade em sistemas capilares com repartidor de fluxo. São de fácil preparação e permitem recuperações quantitativas em amostras de reduzido volume. A separação dos derivados é possível num único ensaio cromatográfico e a sua elevada estabilidade fornece resultados reprodutíveis, de análise para análise, durante um longo período de tempo após a derivatização. Complementarmente

foram preparados os ésteres isopropílicos de *N*-etoxicarbonil-O(S)-trimetilsililaminoácidos, capazes de serem separados em tempos de análise mais curtos em colunas pouco polares e possuindo ainda um factor de separação eficiente.

2 — PARTE EXPERIMENTAL

CROMATOGRAFIA

Utilizou-se um cromatógrafo capilar Pye Unicam, modelo PU 4500, equipado com um detector de ionização de chama, um repartidor de fluxo e uma coluna capilar de vidro de parede revestida com FFAP de 25 m × 0,25 mm d.i. Alternativamente, foram igualmente utilizadas colunas capilares de vidro de parede revestida com SE-30 (35 m × 0,5 mm d.i.), SE-52 (19 m × 0,25 mm d.i.) e uma coluna de sílica vítrea de superfície revestida com OV-101 (50 m × 0,2 mm d.i.). Como gás de arrastamento, utilizou-se o hidrogénio; pressão de entrada de 0,5 kg/cm², quando outra não for referida. A velocidade linear *U* é indicada nas figuras para cada caso. As análises foram executadas com temperatura programada. Os resultados quantitativos foram obtidos pelo uso de um integrador computador Spectra Physics SP 4100.

REAGENTES

Os padrões de aminoácidos foram obtidos junto da firma BDH e são cromatograficamente puros. A cicloleucina foi adquirida à firma Aldrich Europe. As soluções alcoólicas de HCl foram obtidas por adição lenta de cloreto de acetilo Merck (Darmstadt) recentemente destilado à quantidade mínima do correspondente álcool, a baixa temperatura e o volume completado em balão volumétrico até se atingir a concentração final desejada. O cloroformiato de etilo, o *n*-hexano e o diclorometano, foram fornecidos pela firma Merck (Darmstadt). A firma Pierce Chemical Co. (Illinois) forneceu os frascos de derivatização de paredes espessas fechados com septos de teflon por tampa de aperto (Reacti Vials), o acetonitrilo para cromatografia (Hypo Vial) e a bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CROMATOGRAFIA

As amostras para os ensaios cromatográficos foram obtidas a partir de uma solução-mãe previamente preparada, obtida por dissolução de cerca de

4 mg de cada aminoácido num mínimo de HCl 0,5 M, completando-se o volume final de 10 ml com água destilada. Desta solução dos aminoácidos foi, por sua vez, retirado 1 ml que se diluiu com água destilada para um volume final de 25 ml. Deste modo, obteve-se uma solução-mãe contendo todos os aminoácidos numa concentração de cerca de 1,6 mg/100 ml.

DERIVATIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os ensaios de derivatização foram efectuados a partir de 500 μ l da solução-mãe, que se mediram para um frasco de derivatização (Reacti Vial, Pierce Chemical Co., Illinois), correspondentes a 0,008 mg de cada aminoácido, aproximadamente. A solução foi levada à secura por evaporação sob fluxo de azoto suave. Ao residuo da evaporação foram adicionados 200 μ l de diclorometano que, seguidamente, foi evaporado sob uma ligeira corrente de azoto. Esta operação foi repetida três vezes para ser assegurada uma completa secagem.

Esterificação — O residuo seco foi dissolvido numa solução de 4 M de HCl no álcool correspondente. O frasco de derivatização foi fechado e aquecido em Reacti Therm (Pierce Chemical Co., Illinois) a 110° por 60 min. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto. Nos casos em que a esterificação por transesterificação foi utilizada, foi usado processo idêntico para a obtenção inicial do correspondente ester metílico dos aminoácidos. Após arrefecimento e evaporação do solvente, a amostra foi tratada como acima descrito para obtenção dos ésteres isopropílicos.

Acilação — ao residuo da operação anterior foram adicionados 250 μ l de acetonitrilo e 50 μ l de cloroformiato de etilo e 10 μ l de etanotiol como antioxidante. A mistura foi aquecida a 150° durante 20 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto. O residuo foi dissolvido em 5 μ l de diclorometano, 0,3-0,5 μ l desta solução foram injectados no cromatógrafo.

Sililação — A sililação dos grupos livres da cadeia lateral dos aminoácidos que os possuem foi levada a cabo por tratamento do residuo da acilação com uma solução de BSTFA em acetonitrilo 3:1, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. A solução obtida foi utilizada directamente para cromatografia.

Cálculo dos factores de resposta relativa — Os FRR foram calculados através da fórmula

$$FRR = \frac{\text{Área}_{\text{aminoácidos}} \times \text{Peso}_{\text{padrão interno}}}{\text{Área}_{\text{padrão interno}} \times \text{Peso}_{\text{aminoácido}}}$$

O padrão interno utilizado foi o octacosano. Um segundo padrão interno contendo ambos os grupos NH₂ e COOH (a cicloleucina) foi adicionado, e os factores de resposta igualmente calculados. O factor de resposta relativo da cicloleucina em função do octacosano é 1,703 (DP% = 6,6).

ESTUDOS DE ACILAÇÃO

As condições de acilação foram estudadas a fim de determinar para cada aminoácido o factor de resposta relativo mais favorável, em função do tempo de acilação e da temperatura. As temperaturas ensaiadas foram 110°, 120° e 150°. Os rendimentos relativos foram determinados para 5, 10, 20, 30, 60 e 120 min. de reacção e expressos sob a forma de respostas relativas em relação a padrões internos. Como padrões internos utilizaram-se a cicloleucina e o octacosano. Os resultados obtidos são a média de, pelo menos, quatro amostras.

ESTABILIDADE

Ensaio de estabilidade foram efectuados sobre amostras contendo aproximadamente 0,04 mg de aminoácido. As amostras foram analisadas imediatamente após a derivatização e os factores de resposta relativos determinados para cada aminoácido ensaiado. As amostras foram conservadas no frigorífico e analisadas regularmente durante três meses. Em cada ensaio, os factores de resposta relativos foram determinados e expressos como percentagem do valor inicial.

LINEARIDADE

Amostras contendo uma relação de concentrações variável entre aminoácido e padrão interno foram derivatizadas como descrito. As áreas relativas aminoácidos/padrão foram determinadas para relações de concentração de 0,25, 0,5, 1, 1,5 e 2. Os resultados obtidos em cada caso reflectem a média de, pelo menos, quatro análises.

ESTUDOS DE RECUPERAÇÃO

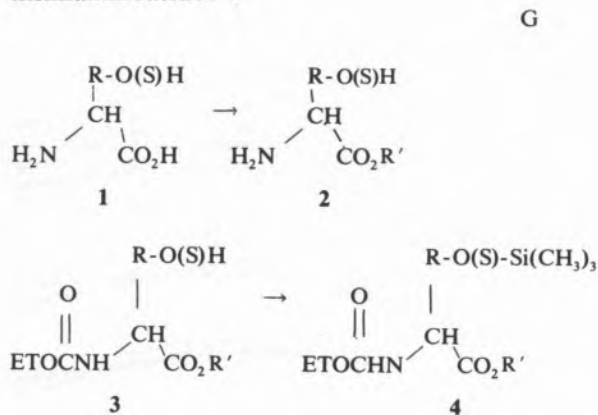
Soluções contendo aminoácidos em concentrações conhecidas foram analisadas após derivatização. Os resultados obtidos foram comparados com os valores teóricos e expressos em percentagem.

APLICAÇÃO À DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS LIVRES NUM VINHO ELEMENTAR

A 5 ml de vinho adicionaram-se cerca de 1 mg de cicloleucina como padrão interno. A solução foi tratada com resina catiónica do tipo Dowex 50W-X8 sob a forma ácida. Após passagem do vinho através da resina, esta foi lavada com 30 ml de água, seguindo-se a eluição com cerca de 50 ml de NH_4OH 4 M. A solução amoniacal foi concentrada em vácuo até um volume aproximado de 1 ml. 500 μl desta solução foram transferidos para um frasco de derivatização, o solvente evaporado sob corrente de azoto e o resíduo, após tratamento com diclorometano para secagem azeotrópica, foi derivatizado como descrito. Os ésteres isopropílicos dos *N*-etoxicarbonilaminoácidos foram analisados cromatograficamente e a composição da mistura calculada.

3— RESULTADOS

A fim de serem transformados em derivados voláteis, os aminoácidos foram submetidos a uma sequência de reacções no sentido de se obterem os ésteres alquílicos de aminoácidos em que os grupos NH_2 se encontram bloqueados por um grupo *N*-etoxicarbonilo. Os ésteres *N*-etoxicarbonílicos **3** assim obtidos podem, eventualmente, sofrer trimetilsililação dos grupos OH ou SH das cadeias laterais, obtendo-se os ésteres de *N*-etoxicarbonil-O(S)-trimetilsililaminoácidos **4**.



A fig. 1 ilustra a separação obtida por cromatografia dos ésteres isopropílicos de *N*-etoxicarbonilaminoácidos em uma coluna capilar de vidro de parede revestida com FFAP, incluindo os derivados correspondentes à histidina e ao triptofano. Todos os picos se encontram bem resolvidos, permitindo

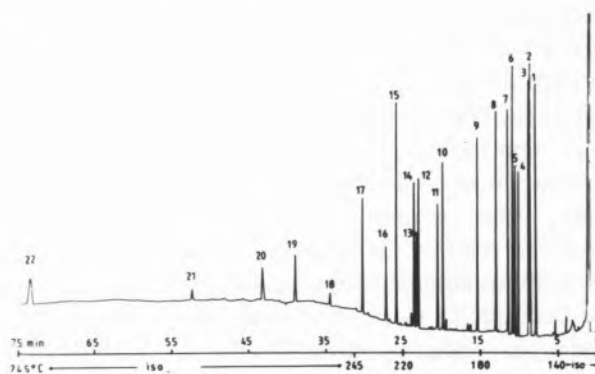


Fig. 1

Cromatograma de ésteres isopropílicos de *N*-etoxicarbonilaminoácidos. Coluna capilar de vidro (WCOT) de FFAP, 25 m \times 0,25 mm d.i. Gás de arrastamento: H_2 , $p_i = 0,5 \text{ kg/cm}^2$; Relação de repartição de fluxo: 1:75; Atenuação: 1×128 ; Alicota injectada correspondendo aproximadamente a 0,3 pmoles de cada aminoácido. 1 — Ala; 2 — Val; 3 — 2-Aba; 4 — Ile; 5 — Ale; 6 — Leu; 7 — Gly; 8 — Pro; 9 — Cle; 10 — Asp; 11 — Thr; 12 — Met; 13 — Ser; 14 — Glu; 15 — Phe; 16 — Cys SH; 17 — Hyp; 18 — His (diacilada); 19 — Orn; 20 — Lys; 21 — Trp; 22 — Tyr.

identificação clara e resultados quantitativos precisos. Os valores de retenção relativos à cicloleucina são apresentados na Tabela 1. A cicloleucina foi

Tabela 1

Retenções relativas dos ésteres isopropílicos de *N*-etoxicarbonilaminoácidos. Condições cromatográficas como na fig. 1

Aminoácido	Abreviatura	Retenção Relativa	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo %
Alanina	Ala	0,492	0,001	0,2
Valina	Val	0,545	0,001	0,1
2-Aminobutírico	2-Aba	0,553	0,001	0,1
Isoleucina	Ile	0,662	0,001	0,1
Alo-Leucina	Ale	0,688	0,001	0,1
Leucina	Leu	0,693	0,001	0,1
Glicina	Gly	0,732	0,001	0,1
Norleucina	Nle	0,793	0,001	0,1
Prolina	Pro	0,841	0,005	0,1
Cicloleucina	Cle	1,000	0,000	0,0
Ác. Aspártico	Asp	1,296	0,000	0,0
Treonina	Thr	1,342	0,001	0,1
Metionina	Met	1,497	0,001	0,1
Serina	Ser	1,515	0,001	0,1
Ác. Glutâmico	Glu	1,538	0,001	0,1
Fenilalanina	Phe	1,686	0,001	0,1
Cisteína	Cys	1,772	0,001	0,1
Hidroxiprolina	Hyp	1,969	0,002	0,1
Histidina	His	2,231	0,005	0,2
Ornitina	Orn	2,591	0,005	0,2
Lisina	Lys	2,877	0,005	0,2
Triptofano	Trp	3,398	0,005	0,1
Tirosina	Tyr	4,760	0,008	0,2

escolhida como padrão interno por ser um aminoácido de síntese, pouco provável em produtos de origem natural, ser facilmente obtido no comércio, ser de fácil derivatização quantitativa e produzir um pico bem individualizado numa zona do cromatograma em que não interfere com os picos produzidos pelos restantes derivados. O seu factor de resposta relativa ao octacosano é o mais elevado de todos os aminoácidos ensaiados.

Se bem que os ésteres metílicos possam ser preparados em condições mais suaves por metilação directa dos aminoácidos com diazometano [16], não oferecem, nas nossas condições de trabalho, vantagens nítidas no que se refere a uma eventual maior volatilidade. Os derivados metílicos apresentam valores de retenção muito semelhantes aos dos seus análogos isopropílicos. Para além disso, dão origem a um cromatograma com picos mal separados. Em colunas capilares de FFAP, como se mostra na fig. 2, a isoleucina coelui com a aloleucina e o pico comum aparece insuficientemente separado da leucina. De modo análogo, a serina e o ácido glutâmico dão origem a picos pobremente resolvidos.

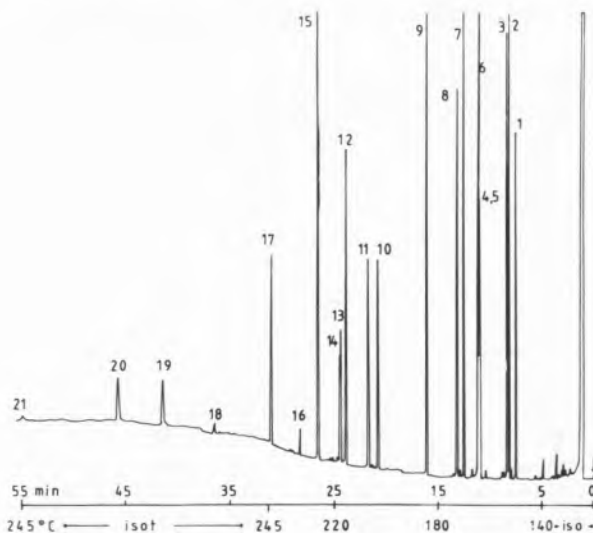


Fig. 2

Cromatograma de ésteres metílicos de N-etoxycarbonilaminoácidos. Condições idênticas às da fig. 1. 1 — Ala; 2 — Val; 3 — 2-Aba; 4 — Ile; 5 — Ale; 6 — Leu; 7 — Gly; 8 — Pro; 9 — Cle; 10 — Asp; 11 — Thr; 12 — Met; 13 — Ser; 14 — Glu; 15 — Phe; 16 — Cys; 17 — Hyp; 18 — His; 19 — Orn; 20 — Lys; 21 — Trp.

Nas condições escolhidas, a esterificação dos aminoácidos dá-se favoravelmente [8]. A histidina, porém, requer dois períodos de aquecimento com

HCl/isopropanol 4 M. Os valores de resposta relativa para a cisteína são mais elevados quando o éster isopropílico é preparado a partir do éster metílico por transesterificação.

No passo de acilação foram considerados dois solventes. Durante os estudos comparativos, verificámos que o acetonitrilo era mais favorável do que o diclorometano para a acilação dos ésteres de aminoácidos básicos, obtendo-se, pelo seu uso, melhores quocientes de recuperação, nomeadamente para a ornitina, a lisina e ainda para o triptofano. A 120°, a ornitina e a lisina são incompletamente derivatizados ao fim de 60 minutos e a histidina não fornece pico detectável. Aquecimento por períodos de 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a 150° foram efectuados. As respostas relativas à cicloleucina foram determinadas para cada aminoácido. Pelo exame da fig. 3 pode concluir-se que, excepto no caso dos ésteres da lisina, ornitina, glicina e prolina, o rendimento em derivado não aumenta significativamente quando se aumenta o tempo de aquecimento de 15 para 20 minutos. Prolongamento do aquecimento para além deste tempo, porém, conduz a uma baixa de rendimento mais ou menos significativa, consoante o tipo de aminoácido. A acilação da histidina, sendo difícil, necessita de aquecimento a 150° por 20 minutos, para a formação de um único derivado. Para os restantes aminoácidos, um tempo de acilação de 15 minutos a 150° é nitidamente suficiente e pode ser adoptado, de uma maneira geral, quando o do-

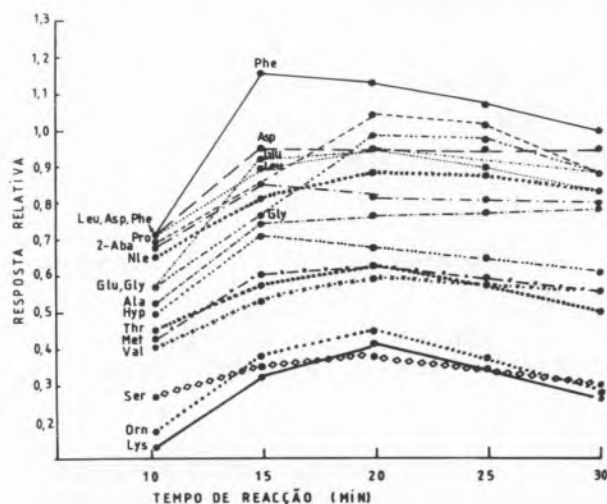


Fig. 3

Rendimento em derivados N-etoxycarbonílicos dos ésteres isopropílicos de aminoácidos em função do tempo de aquecimento a 150°

seamento da histidina não está em jogo. Na Tabela 2 apresentam-se os valores de resposta relativa em relação à cicloleucina, determinados por análise replicada de, pelo menos, quatro amostras. O desvio padrão é inferior a 4% em quase todos os derivados, à excepção dos mais fortemente retidos.

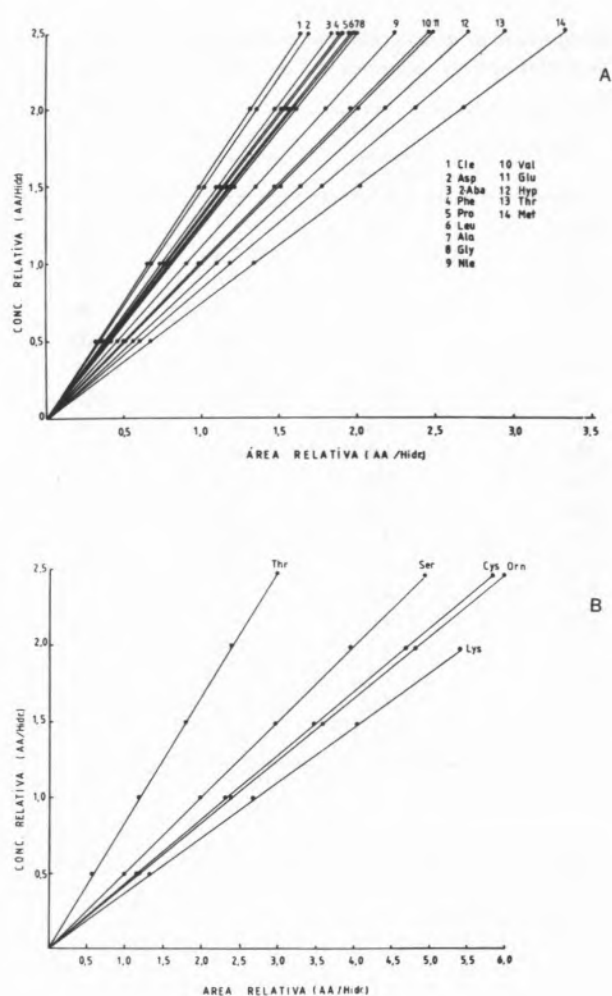
Tabela 2

Estabilidade dos ésteres isopropílicos de derivados N-etoxicarbonílicos de aminoácidos. Os factores de resposta relativa obtidos nas análises periódicas são expressos em percentagem dos valores obtidos em cada caso logo após a derivatização

Aminoácido	1.ª Análise		Tempo após a acilação (dias) (armazenamento em frigorífico)		
	Resposta relativa (Cle = 1)	DP %	30	60	90
Ala	0,756	1,7	70	65	50
Val	0,583	2,2	104	98	89
2-Aba	0,848	2,5	70	70	70
Ile	0,959	3,8	100	100	100
Ale	0,959	3,8	100	100	100
Leu	0,959	3,8	100	100	100
Gly	0,979	0,7	103	103	103
Nle	0,878	2,5	100	100	100
Pro	1,039	3,3	104	99	99
Asp	0,951	0,0	99	95	93
Thr	0,621	2,7	90	70	70
Met	0,618	0,5	103	95	92
Ser	0,247	1,1	100	77	76
Glu	0,928	1,6	98	83	82
Phe	1,123	1,4	103	98	95
Hyp	0,672	1,0	95	85	85
Cys	0,849	1,0	—	—	97
Orn	0,441	1,0	50	50	50
Lys	0,416	1,0	50	50	50
Tyr	0,320	1,0	87	—	—

A fig. 4A e B ilustram os resultados obtidos nos testes de linearidade efectuados sobre quantidades de 1-4 pmoles injectados na coluna. Dificuldades na linearidade foram encontradas para a histidina, o triptofano e a tirosina. Estes desvios da linearidade a concentrações baixas de aminoácidos que apresentam valores de retenção mais elevados, podem dever-se a um número de factores entre os quais se encontram seguramente o desvio da linha de base a valores de atenuação baixa, dificultando a avaliação da área absoluta do pico correspondente e o valor da função de «slope» escolhido para a integração.

A estabilidade dos aminoácidos foi ensaiada durante um período de 90 dias. Os factores de resposta relativos à cicloleucina foram determinados imediatamente após a acilação e comparados com os obti-



Figs. 4A e B

Linearidade da resposta do detector de ionização da chama aos ésteres isopropílicos de N-etoxicarbonilaminoácidos.

dos em análises periódicas efectuadas durante aquele intervalo de tempo. Os resultados estão resumidos na Tabela 2.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos na análise de misturas de aminoácidos de composição conhecida. A composição da mistura analisada é comparada com a composição determinada por cromatografia gás-líquido e os valores desta expressos em percentagem de recuperação para cada aminoácido analisado. Os valores mais baixos foram obtidos no caso da ornitina, da prolina e da alanina. A aplicação do método à análise de aminoácidos livres de um vinho, forneceu resultados comparáveis aos obtidos por outros métodos. Os valores encontrados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 3

Recuperação de aminoácidos por cromatografia gás-líquido dos derivados ésteres isopropílicos de N-etoxicarnilaminoácidos

Aminoácidos	Composição Mistura Teórica %	Composição Analisada %	Recuperação %
Ala	3,9	3,5	90
Val	7,6	7,5	99
2-Aba	3,9	3,6	94
Leu	3,9	3,9	100
Nle	4,1	4,1	100
Pro	6,3	5,1	81
Cle	9,1	9,1	100
Gli	4,9	4,5	91
Glu	4,9	4,5	91
Thr	4,0	3,9	98
Met	3,8	4,0	105
Ser	10,1	10,7	105
Asp	4,7	3,9	83
Phe	4,7	3,9	83
Hyp	4,6	4,5	98
Cys	9,3	9,1	98
Orn	5,2	4,9	94
Lys	5,0	5,0	100
Total	100	95,7	

Tabela 4

Composição de um vinho elemental em aminoácidos livres

Aminoácido	Conc. (mg/l)	Composição %
Ala	57,2	9,1
Val	42,0	6,7
Leu	49,6	7,9
Gly	26,0	4,1
Pro	214,8	34,1
Asx	31,4	5,0
Thr	20,2	3,2
Met	10,4	1,7
Ser	5,5	8,7
Glu	37,8	6,0
Phe	24,0	3,8
Hyp	9,6	1,6
Orn	21,0	3,3
Lys	30,4	4,8

4 — DISCUSSÃO

Derivatização incompleta foi encontrada no caso da histidina e triptofano. A arginina é o aminoácido mais difícil de derivatizar por este método, facto que é comum aos restantes métodos de derivatização. Dado, porém, que este aminoácido pode ser quantitativamente convertido em ornitina pela acção da

arginase [16], a dificuldade da sua derivatização directa pode ser facilmente circulada.

Os factores de resposta relativos são diferentes para cada um dos derivados e variam entre valores da ordem de 0,24 para a serina até 1,1 para a fenilalanina. Este facto deve-se à própria natureza qualitativa e quantitativa dos grupos funcionais contidos nos próprios aminoácidos. De facto, alguns aminoácidos contêm múltiplos grupos derivatizáveis. Por exemplo, a lisina e a ornitina contêm um segundo grupo amina na cadeia lateral, admitindo, por isso, dois grupos etoxicarbonilo, enquanto que os aminoácidos dicarboxílicos são duplamente esterificáveis. A massa adicional do grupo isopropílico nos ácidos aspártico e glutâmico confere-lhes uma maior resposta do detector de ionização de chama do que o obtido pela introdução adicional de grupos etoxicarbonilo na lisina ou ornitina, facto a que se deve o menor coeficiente de resposta relativa apresentado por cada um destes últimos. Nas condições da reacção, os grupos laterais OH da serina, treonina, hidroxiprolina e tirosina não são acilados. Igualmente, o grupo SH da cisteína mantém-se livre após a acilação. Que assim é, deduz-se directamente da observação dos cromatogramas apresentados na fig. 5.

A fig. 5 A mostra o cromatograma obtido a partir dos aminoácidos após etoxicarbonilação dos ésteres isopropílicos numa coluna de OV-101. Os derivados correspondentes à serina, treonina, hidroxiprolina e tirosina não são eluídos em tempo útil, tal como seria de esperar numa coluna deste tipo, para derivados contendo ainda um grupo OH livre. O cromatograma da fig. 5 B corresponde à análise da mistura anterior, após tratamento com BSTFA em acetoni-trilo. Os aminoácidos que não contêm grupos funcionais derivatizáveis na cadeia lateral, ou aqueles que já se encontram completamente derivatizados na reacção anterior, mantêm no cromatograma os tempos de retenção correspondente.

A silição dos grupos OH têm como consequência o aparecimento no cromatograma dos picos correspondentes aos derivados da serina, treonina, hidroxiprolina e tirosina. Embora a cisteína seja eluída sem silição, após tratamento com a mistura sili-lante, modifica a sua posição na ordem de eluição, o que demonstra a disponibilidade do grupo SH da cadeia lateral para a silição. A introdução de um grupo trimetilsililo adicional na cisteína, serina, treonina, tirosina e hidroxiprolina aumenta significativamente a resposta relativa do detector de ioni-

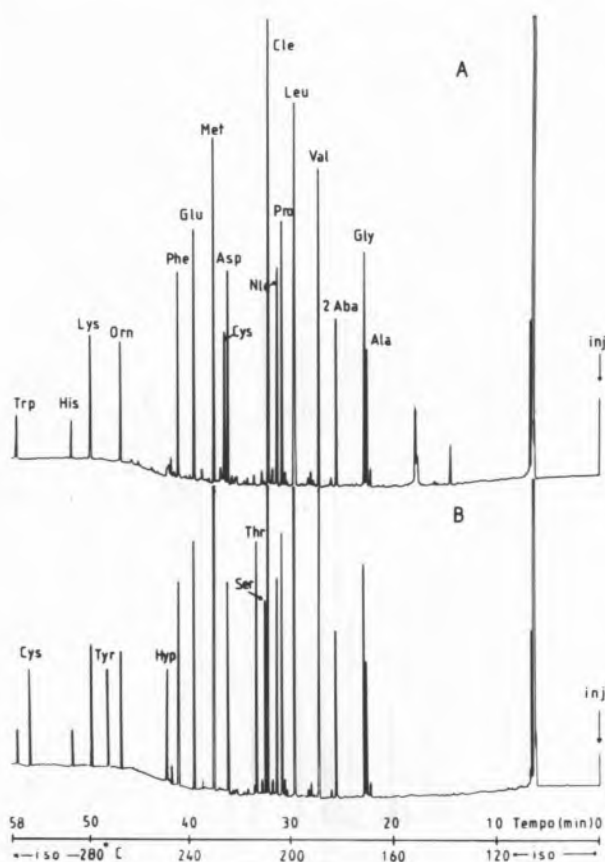


Fig. 5

Cromatograma de ésteres isopropílicos de *N*-etoxicarbonilaminoácidos (A) e de ésteres isopropílicos de *N*-etoxicarbonil-*O*(*S*)-trimetilsililaminoácidos. O cromatograma B foi obtido a partir da mistura analisada em A, após evaporação do solvente e trimetilsililação. Coluna OV-101 50 m \times 0,25 mm de sílica vítrea (SCOT). Gás de arrastamento H_2 , $p_i = 1,7 \text{ kg/cm}^2$; Relação de repartição de fluxo 1 \times 100; Atenuação 1 \times 64.

zação de chama a este tipo de derivados, além de permitir a análise de todos os derivados em tempos significativamente mais curtos em colunas pouco polares. Como inconvenientes, há que citar a sua fraca estabilidade, motivada pela susceptibilidade hidrolítica do grupo trimetilsililo e a necessidade de evaporação cuidadosa das soluções durante eventuais concentrações.

Se bem que, para a maior parte dos ésteres isopropílicos dos aminoácidos, um tempo de acilação de 15 minutos a 150° se possa considerar satisfatório, tal não é o caso da histidina, que é incompletamente derivatizada, originando dois picos no cromatograma, correspondendo ao derivado *N*-acilado e ao *N*, *N*_{im} diacilado. Para a obtenção de um único pico correspondendo a este último são necessários

20 minutos a 150°. Nestas condições, a maior parte dos derivados é formada com rendimentos máximos à excepção da fenilalanina, ac. 2-aminobutírico, hidroxiprolina, cujos factores de resposta diminuem ligeiramente.

Uma vantagem importante dos ésteres isopropílicos dos derivados *N*-etoxicarbonílicos dos aminoácidos é a sua elevada estabilidade. Exceptuando os casos da alanina, ac. 2-aminobutírico, ornitina, lisina e tirosina, a maior parte dos derivados mantém-se estável por largo período de tempo, quando guardados no frigorífico, não perdendo mais de 10% da sua concentração inicial em 30 dias. Curiosos são os casos do ac. 2-aminobutírico, ornitina e lisina, que, após uma degradação inicial, mantém uma concentração constante durante um largo período. A maior instabilidade do derivado correspondente à histidina deve-se à perda do grupo acilo no azoto imidazólico. Por isso mesmo, análises de histidina devem ser efectuadas logo após a acilação. A técnica usual de coinjecção com um agente acetante [8] não deu, no nosso caso, resultados reprodutíveis.

A quantificação de aminoácidos pelo método descrito foi estabelecida pela análise de quatro misturas sintéticas contendo quantidades conhecidas de aminoácidos. A percentagem de recuperação foi calculada, para cada aminoácido, por comparação do valor obtido na análise com o valor teórico, tal como consta da Tabela 3. A aplicação do método à determinação dos aminoácidos em materiais biológicos é ilustrada pela análise dos aminoácidos livres existentes num vinho elementar. A importância da adição de um padrão interno, que contenha ambos os grupos NH_2 e $COOH$, reside no facto de que, por este modo, é possível controlar a eficiência da recuperação dos aminoácidos durante o passo de isolamento por troca iónica. Deste modo, o grau de confiança nos resultados analíticos aumenta de modo importante, sobretudo na análise de aminoácidos em materiais complexos de origem biológica. Pelas razões já apontadas, a escolha recaiu sobre um aminoácido não natural, a ciclولةucina, que, deste modo, assume um papel central na aplicação do método à análise quantitativa. Este facto justifica o ter-se optado, no presente trabalho, por referir os valores de resposta relativa e retenção relativa a este segundo padrão interno. Os resultados obtidos na análise dos aminoácidos no vinho são coerentes com os resultados obtidos por outros

métodos, e são referidos na Tabela 4. As figs. 6 e 7 mostram os cromatogramas obtidos em cada um dos sistemas utilizados.

Estudos sobre a extensão de aplicação do método encontram-se presentemente em curso. Tendo em consideração os resultados obtidos no presente trabalho, parece ser possível afirmar que o método descrito é aplicável a um largo espectro de situações, desde estudos de composição de produtos naturais, investigação nutricional e estudos bioquímicos.

Recebido 3. Junho. 1983

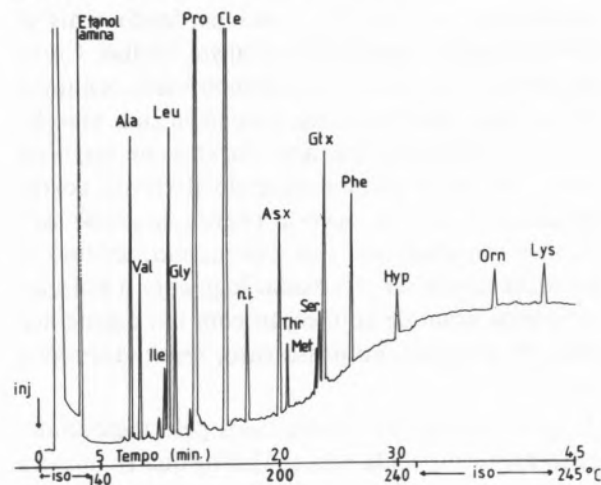


Fig. 6

Cromatograma dos aminoácidos livres de um vinho após derivatização sob a forma de ésteres isopropílicos de derivados N-etoxycarbonílicos-O(S)-trimetilsilílicos. Condições como na fig. 1. ni = não identificado.

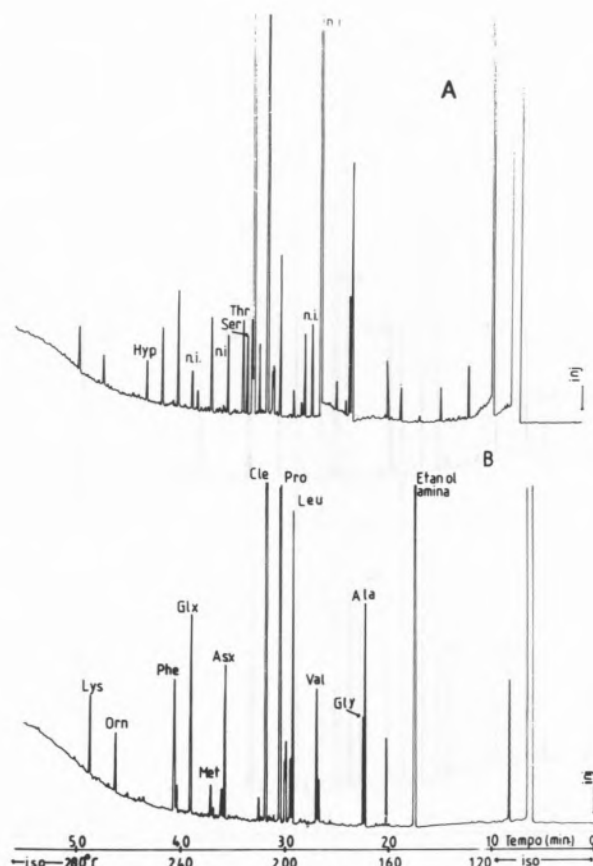


Fig. 7

Cromatograma dos aminoácidos livres de um vinho após derivatização sob a forma de ésteres isopropílicos de derivados N-etoxycarbonílicos-O(S)-trimetilsilílicos (A) e de derivados N-etoxycarbonílicos (B). Condições como na fig. 5. ni = não identificado.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C.W. GEHRKE, K. LEIMER, *J. Chromatogr.*, **57**, 219 (1971).
- [2] C.W. GEHRKE, H. TAKEDA, *J. Chromatogr.*, **76**, 63 (1973).
- [3] V. AMICO, G. ORIENTE, C. TRINGALI, *J. Chromatogr.*, **131**, 233 (1977).
- [4] L.A. APPELQUIST, B.M. BLAIR, *J. Chromatogr.*, **124**, 239 (1976).
- [5] J.F. HARDY, S.L. KERRIN, *Anal. Chem.*, **44**, 1497 (1972).
- [6] C.W. MOSS, M.A. LAMBERT, *J. Chromatogr.*, **57**, 209 (1971).
- [7] C.W. MOSS, M.A. LAMBERT, F.J. DIAZ, *J. Chromatogr.*, **60**, 134 (1971).
- [8] J. JOENSSON, J. EYEM, J. SJOQUIST, *Anal. biochem.*, **51**, 204 (1973).
- [9] J.F. MARCH, *Anal. Biochem.*, **69**, 420 (1975).
- [10] J.P. ZANETTA, J. VINCENDON, *J. Chromatogr.*, **76**, 91 (1973).
- [11] P. FELKER, R.S. BANDURSKI, *Anal. Biochem.*, **67**, 245 (1975).
- [12] S.L. MACKENZIE e D. TENASCHUK, *J. Chromatogr.*, **97**, 19 (1974).
- [13] R.J. SIEZEN e T.H. MAGUE, *J. Chromatogr.*, **130**, 151 (1977).
- [14] R.J. PEARCE, *J. Chromatogr.*, **136**, 113 (1977).
- [15] H. FRANK, A. RETTENMEIER, H. WEICKER, G.J. NICHOLSON, E. BAYER, *Clin. Acta*, **105**, 201 (1980).
- [16] M. MAKITA, S. YAMAMOTO, M. KONO, *J. Chromatogr.*, **120**, 129 (1976).

ABSTRACT

N-Ethoxycarbonyl isopropyl and *N*-Ethoxycarbonyl-O(S)-trimethylsilyl isopropyl esters

The chromatographic properties of the title derivatives are studied. The preparation method of these novel derivatives of amino acids is described. The separation of 23 amino acids in a single chromatographic analysis in capillary column is good enough to allow precise quantitative analysis. Within the concentration values studied the flame ionisation detector shows a linear response to the derivatives. The method can be used for the determination of amino acids in biological materials.