

Dec 30, 2024

Version 1

Protocolo para a Quantificação de Cafeína, Ácido Clorogênico, Mangiferina e outros por HPLC-DAD V.1

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.n92ldr71og5b/v1>

Ricardo Borges¹

¹UFRJ

LAABio-IPPN-UFRJ



Ricardo M. Borges

UFRJ

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.n92ldr71og5b/v1>

Protocol Citation: Ricardo Borges 2024. Protocolo para a Quantificação de Cafeína, Ácido Clorogênico, Mangiferina e outros por HPLC-DAD. protocols.io <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.n92ldr71og5b/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited



Protocol status: In development

We are still developing and optimizing this protocol

Created: December 29, 2024

Last Modified: December 30, 2024

Protocol Integer ID: 117359

Keywords: Quantificação, Ácido Clorogênico, Mangiferina, Cafeína, compostos bioativos como ácido clorogênico, ácido clorogênico, clorogênico, utiliza hplc acoplado, cafeína, composto, hplc, dad este

Abstract

Este protocolo é adequado para a análise de compostos bioativos como ácido clorogênico, mangiferina e cafeína em matrizes como extratos vegetais. O método utiliza HPLC acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD).

Safety warnings

! Notas Importantes:

O ácido clorogênico é sensível à luz, então evite exposição prolongada.

A mangiferina pode ter baixa solubilidade; assegure que está completamente dissolvida.

Certifique-se de que o equipamento esteja devidamente calibrado e a coluna em bom estado.

Reagentes, Padrões e Equipamentos

- 1
 - **Cafeína** (grau analítico).
 - **Ácido clorogênico** (grau analítico).
 - **Ácido cafeico** (grau analítico).
 - **Ácido ferúlico** (grau analítico).
 - **Ácido p-cumárico** (grau analítico).
 - **Mangiferina** (grau analítico).
 - **Quercetina** (grau analítico).
 - **Kaempferol** (grau analítico).
 - **Epicatequina** (grau analítico).
 - **Epigallocatequina** (grau analítico).

 - **Metanol** (grau HPLC).
 - **Acetonitrila** (grau HPLC)
 - **Ácido fórmico** ou **ácido acético glacial** (grau HPLC).
 - **Água ultrapura** (resistividade $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).
 - **Mistura hidroalcóolica padrão** (se aplicável, por exemplo, 50% metanol/água v/v).
- 2
 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de diodos (DAD).
 - Coluna cromatográfica: **C18** (ex.: 250 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μm).
 - Filtro de membrana de 0,45 μm (PVDF ou PTFE).
 - Micropipetas e ponteiras.
 - Banho ultrassônico.
 - Tubos Falcon de 15 mL ou 50 mL.
- 3 Fase móvel
 - Solvente A: Água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico (v/v) ou ácido acético.
 - Solvente B: Metanol ou acetonitrila (grau HPLC).
 - Filtrar e desgaseificar a fase móvel em ultrassom antes do uso.

Soluções estoque de padrões

- Prepare soluções estoque de ácido clorogênico, mangiferina e cafeína em metanol a uma concentração de 1 mg/mL.
- Armazene em frascos âmbar a 4 °C.

Soluções de trabalho

- Dilua as soluções estoque em diferentes concentrações para construir a curva de calibração:
- ex.: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 µg/mL

Amostra

- Pese cerca de **100 mg de folhas de secas e moídas**.
- Extraia com 10 mL de metanol:água (50:50, v/v) em ultrassom por 30 minutos.
- Centrifugue a 4000 rpm por 10 minutos.
- Filtre o sobrenadante através de uma membrana de 0,45 µm antes da injeção.

4 Condições Cromatográficas

Coluna: C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm).

Fase móvel:

- Solvente A: Água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico.
- Solvente B: Acetonitrila.

Gradiente:

- 0–5 min: 10% B.
- 5–20 min: 10–60% B.
- 20–25 min: 60–90% B.
- 25–30 min: 90–10% B.
- 30–35 min: reequilíbrio em 10% B.

Vazão: 1,0 mL/min.

Temperatura da coluna: 30 °C.

Volume de injeção: 20 µL.

Comprimentos de onda:

- Cafeína: 272 nm
- Ácido clorogênico: 325 nm
- Ácido cafeico: 320 nm
- Ácido ferúlico: 320 nm
- Ácido p-cumárico: 310 nm
- Mangiferina: 258 nm
- Quercetina: 370 nm
- Kaempferol: 370 nm
- Epicatequina: 280 nm
- Epigallocatequina: 280 nm

Validação do Método

5 Para garantir a robustez do método:

- Linearidade: Avaliar o intervalo de calibração para todos os compostos.
- Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ): Calcular para cada composto.
- Precisão: Verificar a reprodutibilidade intradia e interdias.
- Recuperação: Avaliar a eficiência de extração dos compostos na matriz.

Análise

6 Calibração:

- Injete as soluções de calibração para obter o gráfico da relação entre a concentração e a área dos picos.
- Calcule as equações das curvas (regressão linear) e os coeficientes de correlação (R^2).

Análise da amostra:

- Injete as amostras.
- Identifique os picos comparando os tempos de retenção (TR) com os padrões.
- Quantifique os compostos utilizando as equações das curvas de calibração.

Validação (se aplicável):

- Teste linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão (reprodutibilidade), e recuperação.

7 Controle de Qualidade

Injete um padrão de referência a cada 10 amostras para monitorar a estabilidade do sistema.
Verifique os parâmetros do sistema, como resolução dos picos e simetria.



8 Resultados e Relatório

Expresse os resultados em mg/g de extrato seco ou outra unidade adequada.

Apresente cromatogramas representativos, tabela com concentrações calculadas, e parâmetros de validação.