

Jan 01, 2025

Version 2

Protocolo para a Quantificação de Cafeína, Ácido Clorogênico, Mangiferina e outros por HPLC-DAD V.2

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.n92ldr71og5b/v2>

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/v2>

Protocol Citation: Ricardo Borges 2025. 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/v2> Version created by **Ricardo M. Borges**

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: January 01, 2025

Last Modified: January 01, 2025

Protocol Integer ID: 117500

Keywords: Quantificação, Ácido Clorogênico, Mangiferina, Cafeína, compostos bioativos como cafeína, ácido clorogênico, chlorogenic acid, plant extract, bioactive compounds such as caffeine, utiliza hplc acoplado, bioactive compound, clorogênico, cafeína, compound, diode array detector, composto, caffeine, acid, mangiferin, hplc

Abstract

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

English:

This protocol is suitable for the analysis of bioactive compounds such as caffeine, chlorogenic acid, mangiferin, and others in matrices like plant extracts. The method employs HPLC coupled with a diode array detector (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.