

Dec 29, 2024

Version 1

Protocolo de Uso do Isolera-Biotage para "Wide-Polarity-Range" (WPR) V.1

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly6e2wgx9/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.eq2ly6e2wgx9/v1>

Protocol Citation: Ricardo Borges 2024. Protocolo de Uso do Isolera-Biotage para "Wide-Polarity-Range" (WPR). **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly6e2wgx9/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 24, 2024

Last Modified: December 29, 2024

Protocol Integer ID: 117271

Keywords: biotage para, biotage, com ampla variação de polaridade, sistema isolera, como metabólitos secundário

Abstract

Este protocolo descreve o procedimento para fracionamento de misturas complexas utilizando o método **Wide-Range-Polarity (WRP)** no sistema Isolera-Biotage. Esse método emprega um gradiente de eluição controlado para separar compostos com ampla variação de polaridade, como metabólitos secundários de extratos naturais. O método é aplicável para colunas de fase estacionária de sílica gel ou C18, dependendo das características da amostra.

Guidelines

Observações Importantes

Utilize sempre solventes de grau espectroscópico/HPLC.

Certifique-se de que todos os equipamentos estejam limpos e devidamente calibrados antes do uso.

Não reutilize colunas para diferentes amostras, a fim de evitar contaminação cruzada. Este protocolo garante a eficiência, a reprodutibilidade e a segurança no fracionamento cromatográfico de misturas complexas utilizando o método WRP.

Materiais e Reagentes Necessários

- 1 **Resina adsorvente:**
 - Sílica gel (colunas de 10 g ou 12 g).
 - Sílica gel funcionalizada com C18 (colunas de 10 g ou 12 g).
 - HP20-ss (colunas de 10 g ou 12 g).

 - Coluna/cartucho para cromatografia flash.
 - Frits para coluna.
 - seringa para injeção da amostra (luer-lock).
 - pipeta de vidro.

 - Tubos de vidro de 16 mL carbonizados com tampa de rosca (devidamente identificados): 40 unidades para cada amostra a ser fracionada.
 - Vials de 1,5 mL tarados (para balanço de massa) com tampa: 40 unidades por amostra.
 - Equipamento de evaporação (Speed-vac) ou fluxo de nitrogênio (N₂).
 - Rack para organização de tubos e vials.
- 2 **Solventes:**
 - Para colunas de sílica gel (fase normal):
Solvente 1: Hexano (posição 1S).
Solvente 2: Acetato de Etila (posição 2S).
Solvente 3: Metanol (posição 4S).

 - Para colunas C18 (fase reversa):
Solvente 1: Água (posição 3S).
Solvente 2: Metanol (posição 4S).
Solvente 3: Acetato de Etila (posição 2S).
- 3 **Equipamentos:**
 - Isolera-Biotage.
 - SpeedVac ou fluxo de nitrogênio (N₂).
 - Etiquetas resistentes a solventes.

Preparo Inicial

- 4 **Preparação da Coluna:**
 - Empacotamento da coluna.
 - Posicione a coluna no sistema Isolera-Biotage.



- Equilibre a coluna passando **3 volumes de coluna (CV)**: parte do método.

5 **Preparação da Amostra:**

- Solubilize a amostra (até 500 mg para a coluna de 10-12g) no menor volume possível do solvente inicial do gradiente.
- Certifique-se de que a amostra esteja homogênea e livre de partículas.

6 **Configuração dos Solventes:**

- Encha as garrafas correspondentes com os solventes apropriados e conecte-as às posições corretas do Isolera-Biotage.
- Corrija as quantidades em cada garrafa.

7 **Organização dos Tubos:**

- Identifique os tubos de fração com etiquetas e organize-os nos racks do equipamento conforme o número necessário.

Configuração do Sistema

8 **Inicialização:**

- Ligue o Isolera-Biotage.
- Selecione a opção "**Chemistry**".

9 **Configuração do Método:**

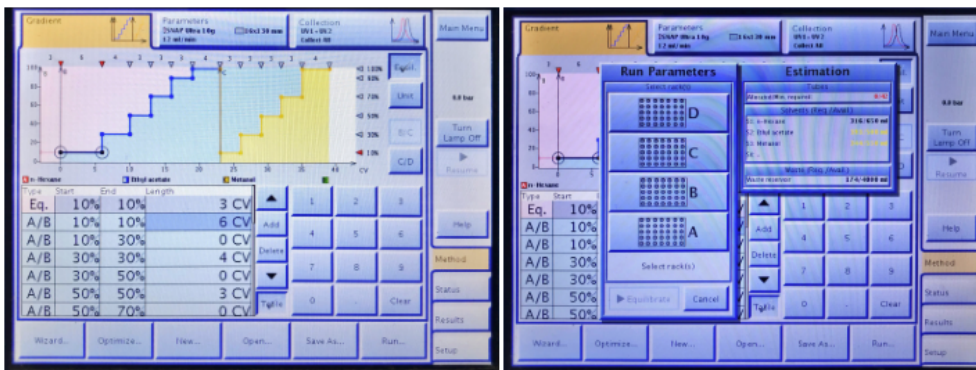
- Em "**Setup**", insira os volumes dos solventes nas garrafas.
- Selecione "**Method**" → "**Open**" → "**System Owner**" ("**LAABio**") e escolha o método correspondente:

WRP-HEX-ACET-MeOH para sílica gel.

WRP-C18 para C18 funcionalizada.

- Nomeie a amostra e salve o método.

10



11 Ajustes de Gradiente:

- Conferir o gradiente de eluição e as condições de fracionamento.

Para sílica gel: Gradiente de 100% Hexano → 100% Acetato de Etila → 100% Metanol.

Para C18: Gradiente de 100% Água → 100% Metanol.

Execução do Fracionamento

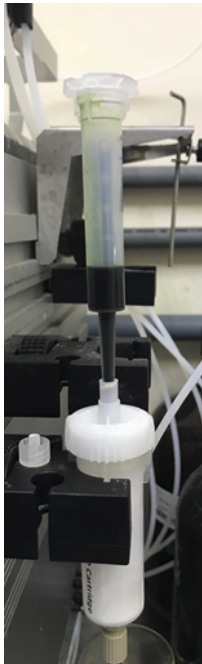
12 Equilíbrio:

- Selecione **"Equilibrate"**
- Aguarde o sistema passar o volume necessário do solvente inicial pela coluna.
- E todas as etapas iniciais.

13 Carregamento da Amostra:

- Retire a mangueira da cabeça da coluna.
- Conecte a Seringa (sem o seu embulo) e adicione a amostra solubilizada por cima.
- Injete a amostra com a seringa diretamente na coluna com a seleção da opção **"LOAD SAMPLE"** para liberar o fluxo.
- Ao finalizar a injeção da amostra, selecione **"CLOSE"** para evitar a entrada de ar.
- Reposicione a mangueira na coluna.

14



15 **Início da Corrida:**

- Selecione "**Gradient**" e o processo de fracionamento será iniciado..

16 **Finalização:**

- Ao término, selecione "**TURN LAMP OFF**".
- Retire os tubos contendo as frações e os solventes residuais.
- Retire a coluna.
- Copie os dados do cromatograma em um pendrive.

17



Pós-Fracionamento

18 **Concentração das Frações:**

- Concentre as frações utilizando SpeedVac ou fluxo de N₂ até a secura, se desejado.

19 **Armazenamento:**

- Armazene as frações secas em freezer (-20 °C ou -80 °C, se disponível).

20 **Registro e Atualização:**

- Registre as informações das frações no sistema de gerenciamento de amostras do laboratório.

21