

Jan 02, 2025

Version 2

Protocolo de Uso do Isolera-Biotage para "Wide-Polarity-Range" (WPR) V.2

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly6e2wgx9/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.eq2ly6e2wgx9/v2>

Protocol Citation: Ricardo Borges 2025. Protocolo de Uso do Isolera-Biotage para "Wide-Polarity-Range" (WPR). **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.eq2ly6e2wgx9/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 02, 2025

Last Modified: January 02, 2025

Protocol Integer ID: 117501

Keywords: applicable to silica gel, biotage para, biotage system, silica gel, biotage, method on the isolera, compound, secondary metabolite, such as secondary metabolite, fractionating complex mixture, complex mixture, com ampla variação de polaridade, 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.

English:

This protocol describes the procedure for fractionating complex mixtures using the Wide-Range-Polarity (WRP) method on the Isolera-Biotage system. This method employs a controlled elution gradient to separate compounds with a wide range of polarity, such as secondary metabolites from natural extracts. The method is applicable to silica gel or C18 stationary phase columns, depending on the sample characteristics.

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:**

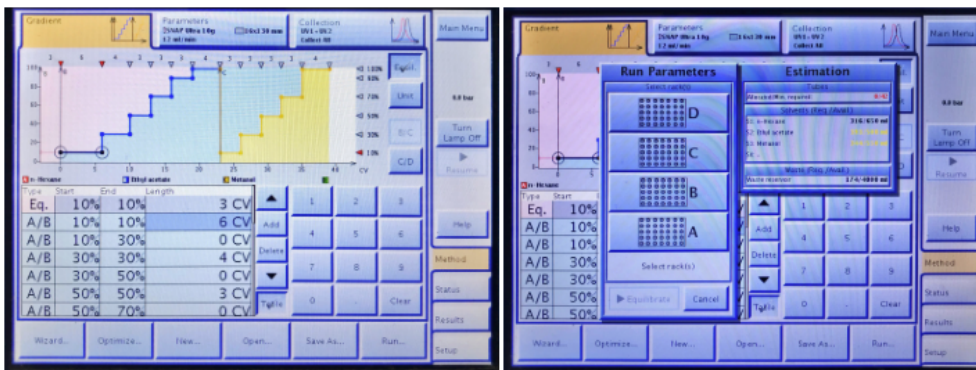
- Em "**Setup**", insira os volumes dos solventes nas garrafas.
- Selecione "**Method**" → "**Open**" → "**System Owner**" ("**LAABio**") e escolha o método correspondente:

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

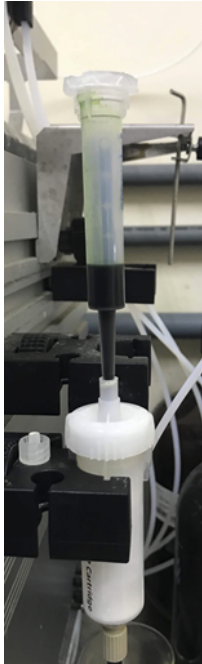
12 Equilíbrio:

- 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