

Cleanup de amostra de clara de ovo para determinação de lisozima

Bibliografia:

E. M. Thurman and M. S. Mills, "Solid-Phase Extraction: Principles and Practice," In: J. D. Winefordner, Ed., Chemical Analysis, A Series of Monographs on Analytical and Its Applications, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 1998, pp. 1-339.

Masini J.C., Semi-micro reversed-phase liquid chromatography for the separation of alkyl benzenes and proteins exploiting methacrylate-and polystyrene-based monolithic columns. J. Sep. Sci. 39 (2016) 1648 - 1655

Do Nascimento et al. Construction of polymer monolithic columns in polypropylene ink-pen tubes for separation of proteins by cation-exchange chromatography. J. Sep. Sci 43 (2020) 4123

Do Nascimento, F.H.N., Vitek, R., Masini, J.C., Porous polymer monoliths with complementary retention mechanisms for online solid-phase extraction liquid chromatography to determine lysozyme in egg white. Advances in Sample Preparation 7 (2023) 100069

Objetivos

Efetuar uma cleanup de amostra de clara de ovo visando a determinação de lisozima

Instrumentação

1. Equipamento: HPLC Thermo Ultimate 3000 equipado com detector de UV-Vis;
2. Coluna analítica com estrutura monolítica polimérica (poly(BMA-co-EDMA), com 100 mm de comprimento por 1,0 mm de diâmetro interno;
3. Coluna de extração em fase sólida baseada no polímero monolítico poly(GMA-co-EDMA)-IDA;

BMA- grupo C4 (metacrilato de butila) – fase reversa

IDA – grupo iminodiacetato – troca catiônica fraca

Reagentes

1. Solução de lisozima 1 mg/mL;
2. TFA (ácido trifluoroacético) 0,1% em acetonitrila (ACN) grau HPLC ;
3. TFA 0,1% em água;
4. Tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 7,0
5. Água deionizada;
6. Amostra de clara de ovo diluída 1:10 em tampão fosfato.

Procedimento

Antes do experimento, pesquise sobre ponto isoelétrico (pI) de proteínas e especialmente o pI das proteínas presentes em clara de ovo.

1 - Injetar 1 µL de amostra de clara de ovo seguindo o gradiente de acetonitrila em TFA 0,1% (5 a 10% de ACN em 0,1% (v v⁻¹) TFA;

2- Injetar 1 µL de solução de lisozima 1 mg/mL e sobrepor o cromatograma da lisozima com o da clara de ovo

3 – Passar um dado volume (500 µL) da clara de ovo na coluna IDA condicionada a pH 7 e lavar a coluna o tampão fosfato (1000 µL);

4 – Inverter a direção de fluxo na coluna e eluir com 500 µL de solução de acetonitrila 5% (v v⁻¹) em TFA 0,1%;

5 – Injetar 1 µL de amostra submetida ao SPE no cromatógrafo seguindo o mesmo programa de eluição da etapa 1.

QUESTÕES

Questão 1 – Com base no pI de proteínas como a lisozima e a ovalbumina, explique os mecanismos envolvidos no cleanup da amostra

Questão 2 – Qual é a função do tampão fosfato a pH7,0 e da etapa de lavagem?

Questão 3 – Qual é a função do TFA (ácido trifluoroacético) e da acetonitrila?

Questão 4 – Como você faria a quantificação da lisozima na clara de ovo?