



INSTITUTO NACIONAL
DE VITIVINICULTURA



Ministerio de Agroindustria
Presidencia de la Nación

Determinacion Lisozima por HPLC

Carolina Chiconofri / Carolina Coria / Humberto Manzano

Grupo Normas Analíticas Especiales

Instituto Nacional de Vitivinicultura

Determinación de la Lisozima en vinos por cromatografía líquida de alta resolución

Carolina Chiconofri^a, Carolina Coria^a, Humberto Manzano^a

^aGrupo Normas Analíticas Especiales, Instituto Nacional de Vitivinicultura,
Av. San Martín 430, Mendoza, Argentina.
nae@inv.gov.ar

1. Introducción

Este método describe el procedimiento analítico para la determinación de lisozima en vinos blancos y tintos. Para vinos blancos la determinación se logra en forma directa, mientras que para vinos tintos es necesario llevar a cabo la disociación de la enzima de las macromoléculas polifenólicas, mediante una brusca alcalinización, utilizando como principio el carácter anfótero de la proteína.

2. Campo de aplicación

Este método admite la cuantificación de la lisozima ($\text{mg de proteína.l}^{-1}$) presente en vinos blancos y tintos, independientemente de la actividad enzimática.

3. Principio

El análisis se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con un detector espectrofluorimétrico. El contenido desconocido en la muestra de vino se calcula sobre la base de área del pico cromatográfico, utilizando la metodología del estándar externo.

4. Reactivos

4.1. Solventes y soluciones de trabajo

Acetonitrilo (CH_3CN) "grado HPLC"

Ácido trifluoroacético (TFA)

Agua desionizada "grado HPLC"

Solución modelo: ácido tartárico 1g/l , alcohol etílico 10% V/V ajustado a pH 3,2 con tartrato de potasio neutro.

4.2. Eluentes

A: CH_3CN 1%, TFA 0,2%, H_2O = 98,8%

B: CH_3CN 70%, TFA 0,2%, H_2O = 29,8%

4.3. Soluciones de referencia

Solución de 250 mg.l^{-1} de lisozima estándar, disuelta en la solución modelo mediante agitación continua durante un mínimo de doce horas.

4.4 Preparación de soluciones de Trabajo

Para las soluciones de trabajo, se diluye de la solución madre hasta las concentraciones deseadas con solución modelo.

5. Equipo

- 5.1. Aparato CLAR con sistema de bombeo previsto para efectuar un gradiente de elución
- 5.2. Instalación para columna con termostato (horno)
- 5.3. Detector espectrofluorimétrico
- 5.4. Bucle de inyección, 20 μ L
- 5.5. Columna polímero de fase inversa con los grupos funcionales fenil (diámetro de los poros= 1 000 Å, límite de exclusión = 1 000 000 Da), Tosoh Bioscience TSK-gel Fenil 5PW RP 7,5 cm x 4,6 mm ID, a modo de ejemplo.
- 5.6. Pre-columna del mismo material que la columna, Tosoh Bioscience TSK-gel Fenil 5PW RP Guardgel 1,5 cm x 3,2mm ID, a modo de ejemplo.

6. Condiciones operativas

- 6.1. Flujo del eluyente: 1ml/min
- 6.2. Temperatura de elución: 40°C
- 6.3. Detección espectrofluorimétrica: λ ex = 276 nm; λ em = 345 nm; Gain = 4
- 6.5. Programa de gradiente de elución: 40% B - 45% B 10 min
- 6.6. Tiempo de retención promedio de la lisozima: 7,91 minutos.

Tiempo	Fase Movil A	Fase Movil B
0	60	40
10	55	45
10.10	0	100
10.20	0	100
10.21	60	40

7. Preparación de la muestra

Vinos blancos

Las muestras de vino blanco se filtran por filtros de nylon de 0.45 μ m, e inmediatamente se lleva a cabo el análisis cromatográfico.

Vinos tintos

Las muestras de vino tinto (50 ml) se lleva a pH 11,5. La alcalinización se realiza con OHNH_4 teniendo en cuenta el rango de pH máximo de la columna cromatográfica. Para su determinación mediante CLAR, es necesario filtrar la muestra ha analizar, para lo cual se utilizan filtros de nylon con tamaño de poro de 0,45 μ m. El análisis cromatográfico se lleva a cabo inmediatamente (5 minutos) después de la filtración.

8. Preparación de muestra control

Una muestra es fortificada con la solución estándar de referencia (4.3) y se prepara según el punto 7. Se determina el porcentaje de recuperación.

9. Expresión de Resultados

En vinos blancos la recuperación de la enzima supera el 95% mientras que en vinos tintos el método desarrollado, mostró una recuperación que varía del 50% al 65% de la enzima, dependiendo este factor de la concentración de polifenoles presente en la muestra de vino. El resultado se expresa en miligramos por litro (mg.l^{-1}).

El perfil cromatográfico del estándar de lisozima, mostró una adecuada resolución del analito en estudio con las condiciones cromatográficas estipuladas (Fig.1). El análisis de la muestra sin lisozima permitió observar el perfil del vino sin hallar interferencias en la zona de detección de la enzima (Fig.2). Al adicionar la muestra de vino con estándar de lisozima se observó un área relativa inferior a la obtenida con el estándar, debido a la dilución efectuada para alcalinizar la muestra y su recuperación (Fig. 3).

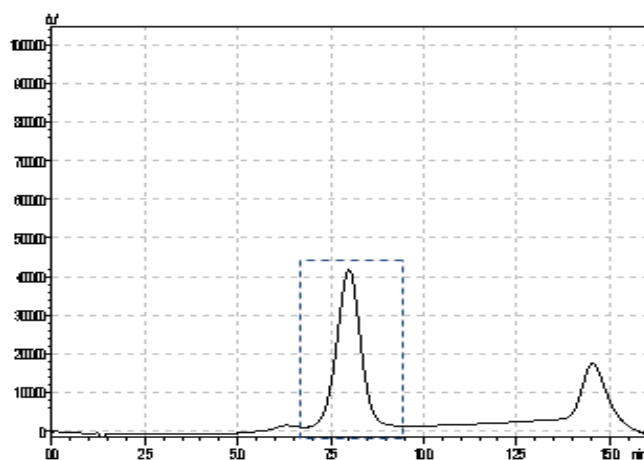


Fig. 1. Cromatograma del estándar de lisozima de 50 mg.l^{-1} .

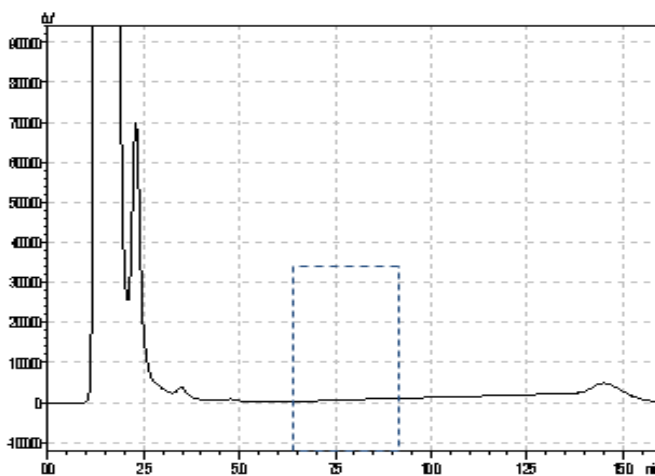


Fig. 2. Cromatograma de un vino tinto sin lisozima.

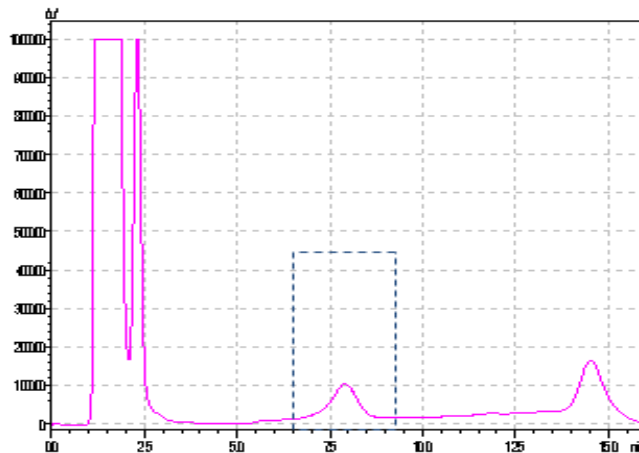


Fig. 3. Cromatograma de un vino tinto con 50 mg.l⁻¹ lisozima.

10. Performance analítica

10.1 Parámetros de Validación Interna

10.1.1 Repetibilidad

El método fue desarrollado para una repetibilidad en los límites de 2 mg.l⁻¹ a 25mg.l⁻¹ en vino tinto. Se analizaron por duplicado 21 muestras de vino tinto adicionadas con distintas concentraciones de lisozima.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos

Tabla N°1: Muestras de vino tinto adicionadas de lisozima en un rango de 2mg/l a 25mg/l.

Muestra N°	X _i (mg.l ⁻¹)	X' _i (mg.l ⁻¹)	W _i (valor absoluto)
1	1	1	0
2	1	1	0
3	2	2	0
4	2	2	0
5	3	2	1
6	3	2	1
7	3	3	0
8	5	5	0
9	6	6	0
10	6	6	1
11	5	5	0
12	4	5	1
13	5	5	0

14	7	8	1
15	8	8	0
16	7	6	1
17	7	8	1
18	8	6	2
19	14	14	0
20	14	14	0
21	14	14	0

Los resultados obtenidos para la repetibilidad fueron los siguientes:

Desviación estándar de repetibilidad $S_r = 0,51 \text{mg.l}^{-1}$

Repetibilidad $r = 1,4 \text{mg.l}^{-1}$

El resultado confirma que a un nivel de probabilidad del 95% el método en cuestión tendrá una repetibilidad de al menos $1,4 \text{mg.l}^{-1}$. Siendo la desviación estándar de repetibilidad de $0,51 \text{mg.l}^{-1}$.

10.1.2 Linealidad

Para el calculo de la linealidad se realizaron 27 mediciones de las áreas de pico de 6 concentraciones distintas de lisozima, sobre el rango de mediciones de 0mg.l^{-1} a 25mg.l^{-1} en vino tinto, con las cuales se calculó, el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación.

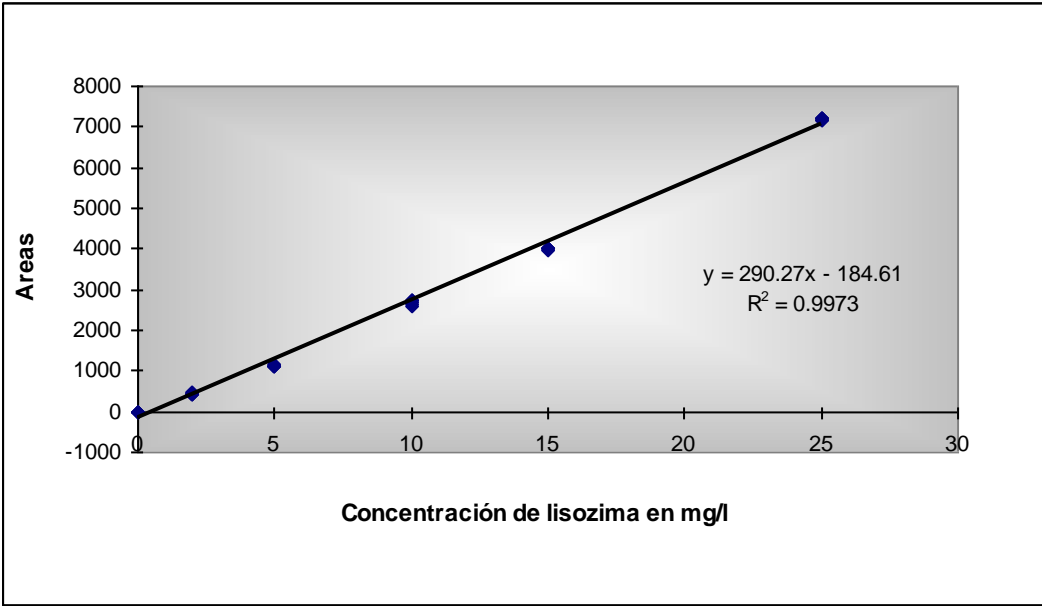


Gráfico Nº 1: Rango dinámico de lisozima en vinos tintos hasta 25mg. L^{-1}

El siguiente gráfico muestra el análisis de residuos, los cuales se encuentran distribuidos regularmente alrededor de la línea $x = 0$.

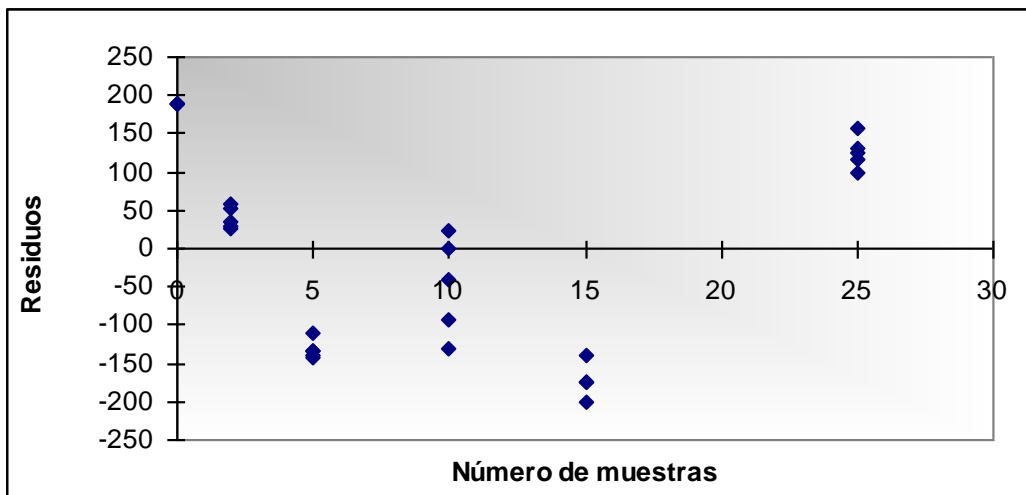


Gráfico Nº 2: Análisis de residuos

10.1.3 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

El límite de Detección para este método fue calculado en $0,88 \text{ mg.l}^{-1}$ de lisozima en vinos tintos, obteniendo un Límite de Cuantificación de $1,15 \text{ mg.l}^{-1}$.

Bibliografía

1. Determinación de lisozima en vinos por cromatografía líquida de alta performance OENO-SCMA 10 458.
2. Resolución OENO 8/2007 “Determinación de la lisozima en el vino por Cromatografía Líquida de Alta Resolución” (2007).
3. Molina Úbeda, R.: Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas. Editorial Mundi Prensa Libros S.A., pp. 211-213. Madrid, España (2000).
4. Vanina Herrera, Juan Carlos Ticona, Enrique Udaeta, Rogelio Chuqui y Alberto Jiménez. Validación de método analítico para la cuantificación de alcaloides quinolíticos del extracto de Galipea Longiflora Krause Kallunki. Biofarbo, Vol 16, Dic. 2008