SEPARACION DE LIPIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

INTRODUCCION

La cromatografía en capa fina (TLC), es un método simple, rápido y no costoso; utilizado para separar cualitativamente una muestra en sus componentes. La capa delgada se prepara dispersando una suspensión de material adsorbente sobre una placa de vidrio y dejando secar para formar una capa con un grosor aproximado de 250 micras.

Esta técnica puede adaptarse a la separación y caracterización de lípidos, utilizando microcantidades de material; es posible tambien efectuar estimaciones cuantitativas de las distintas clases de lípidos. Por ello, este método ha desplazado a otras técnicas y es ampliamente utilizada tanto en la industria como en los laboratorios clínicos para la separación de lípidos de lípidos séricos, corticosteroides de la orina, hormonas séricas, vitaminas liposolubles, etc.

OBJETIVO

Intentaremos la extraccion de lípidos de muestras biológicas con un alto contenido de lipidos y posteriormente los separaremos e identificaremos utilizando la técnicas de cromatografía en capa fina.

FUNDAMENTO

Basicamente a la cromatografía en capa fina se aplica el mismo fundamento de la cromatografía en papel. Aqui la muestra se coloca sobre una cubierta de sílica gel adsorbida a una placa de vidrio; esta placa se introduce en un eluente contenido en una camara cromatografica dejandolo migrar a traves del material adsorbente (fasè estacionaria). El eluente (fase móvil) al ir desplazandose sobre la sílica, arrastra la muestra. La adsorción y la partición retardan el avance de la muestra; y la resolución de los diferentes componentes se debe a que las sustancias presentes tienen diferente velocidades en direccion del flujo.

Generalmente se permite que la fase móvil avance de 10 a 15 cm. La detección de los componentes separados se hace con vapores de yodo, rociando con ácido sulfúrico al 50%, ó rociando con reactivos especiales como el ácido fosfomolíbdico entre otros.

La identificación se hace calculando el Rf de cada uno de los componentes de la mezcla y comparandolo con los Rf de soluciones lipídicas conocidas. Recordemos que este valor se obtiene al dividir la distancia recorrida por la mancha entre la distancia total recorrida por el solvente.

MATERIAL POR EQUIPO DE CUATRO PERSONAS

PROTOCOLO A: 1 tubo de 18 x 150
1 gradilla
1 matraz erlenmeyer de 50 ml
1 pipeta de 5 ml
1 parrilla eléctrica con agitación
1 embudo de filtración rápida

PROTOCOLO B :1 vaso de precipitados de 250 ml
1 probeta graduada
3 tubos de ensaye de 18 x 150
1 gradilla
2 pipetas de 10 ml
1 embudo de filtración rápida

REACTIVOS

PRCTOCOLO A: 1.- ELUENTE I: Eter de petróleo
2.- ELUENTE II: Hexano: Cloroformo (25:75)
3.- ELUENTE III: Cloroformo-Metanol (95:5)
4.-Eter de petróleo
5.- Mezcla cloroformo metano (50:50)
6.- Soluciones patrón de aceite de oliva, acido oléico, lecitina, colesterol, etc: Disolver 100 mg de cada uno de ellos en 100ml de una mezcla cloroformo: metanol (50:50).
7.- Revelador: Acido fosfomolíbdico al 20% en etanol: Disolver 20- gramos de ácido fosfomolíbdico en 100 ml de etanol y guardarlo en frasco oscuro hasta el momento de su uso.

PROTOCOLO B: 1.- ELUENTE: Cloroformo- Solvente Polar (100:7)
2.- SOLVENTE POLAR: 90 ml de metanol se mezclan con 5 ml de agua - destilada y 5 ml de hidróxido de amonio.
3.- Soluciones patron al 1 mg/ml: prepararlas como el protocolo A.
4.- REVELADOR: Acido fosfomolíbdico al 20% en etanol ó bien vapores de yodo.
5.- Cloroformo- metanol (50: 50)

PREACTIVOS PARA AMBOS PROTOCOLOS: Sílica Gel, y Agua destilada

PREPARACION DE LAS PLACAS CROMATOGRAFICAS

1.- Pese 30 gramos de Silica Gel H ó HF_{254} y suspendalos en 50 ml de agua destilada, esto es suficiente para preparar 5 placas de 250 micras de espesor.

2.- Agite el matraz bola que contiene la mezcla durante un minuto vigorosamente.

3.-Vierta la suspensión en el distribuidor para placas, y rápidamente páselo sobre los cristales limpios y desengrasados con acetona.

4.- Deje que las placas se sequen al aire, permaneciendo siempre sobre el nivelador.

5.- Activar las placas llevandolas a secar en una estufa a 110°C durante unahora para eliminar la mayor parte del agua.

6.- Guarde el estante con las placas dentro de un desecador hasta el momentode su uso

PARTE EXPERIMENTAL

Segun sea el material biológico con el que se cuente, el intructor indicará el protocolo adecuado.

PROTOCOLO A

1.-PREPARACION DE LA MUESTRA

a) Si su muestra es una grasa ó aceite, disuelva 1 gramo de ella en 4 ml deéter de petróleo.

b) Si trabaja con suero, entonces adicion 1 ml de suero a 25 ml de una mezcla de clorformo-metanol (50:50) en un matraz erlenmeyer de 50 ml. Caliente -- brevemente para precipitar proteínas, y filtre a través de papel filtro No.1

2.-APLICACION DE LA MUESTRA

La muestra y las soluciones patrón se aplicaran en forma de gota pequeñasobre la sílica, utilizando la plantilla especial para ello, procurando que las muestras queden bien separadas entre sí. Coloque 3 gotas de cada solu-- ción permitiendo que la gota se seque antes de aplicar la siguiente.

3.-DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

a) Introduzca la plca en la cámara cromatográfica colocandola previamente en el dispositivo especial para ello, y eluya hasta una altura de 16 cm con el eluent e I. Saque la placa, y deje secar al aire.

b) Introduzca la placa en otra cámara que contenga el eluente II y eluya hasta una altura de 12 cm, deje secarla al aire, y posteriomente eluya con el eluente III hasta una altura de 5 cm. y seque al aire.

4.-DETECCION DE LAS MUESTRAS

Rocie la placa con ácido fosfomolíbdico al 20% en etanol, y calientela - una vez seca, en el horno a una temperatura de 105C - 110°C durante 5 minutos.

5.-IDENTIFICACION

Delimite los contornos de las manchas con un alfiler ó un lápiz de punta fina, coloque un punto en el centro de cada mancha, y determine el Rf.

PROTOCOLO B

1.- PREPARACION DE LA MUESTRA

En vaso de precipitados de 250 ml, coloque la yema de un huevo, y añada 100 ml de una mezcla cloformo-metanol (50:50). Agite vigorosamente y luego filtre usando un embudo de filtración rápida, ó bien deje reposar hasta que se separe bien el sobrenadante.

Del sobrenadante o´ del filtrado, prepare diluciones 10^{-1} y 10^{-2} en mezcla cloformo-metanol (50:50); la solución más diluída permite la determinación de fosfatidiletanolamina (cefalinas) y lecitina. La solución más concentrada demuestra la presencia de fosfatidil-serina y fosfatidilinositol.

2.- APLICACION DE LA MUESTRA

Las muestras y las soluciones patrón utilizadas se aplicarán en forma de gota sobre la sílica, utilizando para ello la plantilla de plástico. Deje secar la gota antes de colocar la siguiente; ya que deberá aplicar 5 gotas de cada solución.

3.- DESARROLLO DEL CROMATOGRAMA

Introduzca la placa de cromatografía en la cuba, acomodandola previamente en el dispositivo especial para ello; la cuba deberá contener el eluyente. Permita que el eluente migre una distancia de 10 cm a 15 cm. En seguida saque las placas de la cámara cromatográfica y déjelas secar al aire.

4.-DETECCION DE LAS MUESTRAS

Rocie las placas con ácido fosfomolíbdico al 20% en etanol, y caliéntelas, una vez secas, a 110°C durante 5 minutos.

5.-IDENTIFICACION

Delimite los contornos de cada una de las manchas utilizando para ello un alfiler ó un lápiz con punta fina, y luego coloque un punto en el centro de la mancha. Mida la distancia desde el centro de la mancha hasta el orígen, y la distancia desde el orígen hasta el frente del solvlente.

Determine el Rf de las manchas, e identifique los componentes de su muestra comparando los Rf de estos con los Rf de soluciones conocidas.