



Trabajo práctico:

Métodos de separación cromatográficos

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La cromatografía es una técnica en la cual los componentes de una mezcla se separan a partir de las diferencias de velocidad a la que son transportadas a través de una fase fija o estacionaria por una fase móvil gaseosa o líquida. Su nombre significa “escribir con color” ya que la cromatografía fue empleada por primera vez para separar pigmentos. Existen numerosas variantes del método, pero el fundamento es común a todos los métodos:

“Una Fase Móvil se mueve a través de una Fase Estacionaria arrastrando en su camino las moléculas de una muestra. Estas interactúan de forma diferente con las fases, por lo cual algunas avanzan rápido y otras más lento, logrando así la separación”.

Los métodos cromatográficos pueden ser clasificados según:

El estado físico de la fase: Según el estado de las fases tenemos que la fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la estacionaria puede ser un líquido o un sólido. Se pueden establecer cuatro tipos de cromatografía: gas-líquido, líquido-líquido, gas-sólido, líquido-sólido.

El mecanismo de separación: Existen numerosos mecanismos de interacción entre los componentes de la mezcla y las fases del sistema cromatográfico. En algunos casos participan más de un mecanismo en un mismo proceso de separación por lo que dificulta la clasificación. Los principales mecanismos que intervienen en la separación cromatográfica son: de reparto, adsorción, exclusión molecular, de afinidad e intercambio iónico. Se relacionan con las propiedades físicas de las biomoléculas a separar: solubilidad, tamaño, carga, hidrofobicidad, interacciones por afinidad biológica, interacciones inespecíficas.

El tipo de soporte : Respecto al soporte son varias las formas que existen, se llama soporte inerte si no participa en la separación y soporte activo si participa en el proceso de separación.

La dirección de la corrida: ascendente, descendente o bidireccional.



La metodológica utilizada para el desarrollo de la cromatografía: Los métodos cromatográficos son de dos tipos. En la cromatografía en columna, la fase estacionaria está contenida en un tubo estrecho y se fuerza el paso de la fase móvil a través del tubo, ya sea por presión o por gravedad. En la cromatografía planar la fase estacionaria esta sostenida sobre una placa plana o en los poros de un papel, aquí la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por efecto de la gravedad.

Cromatografía de Adsorción

Gases o líquidos contenidos en la fase móvil son retenidos por una adsorción selectiva en la superficie del sólido (sílice o de alúmina) que constituye la fase estacionaria... Este mecanismo controla la cromatografía gas-sólido y líquido-sólido.

La muestra aplicada en la capa es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostáticas (fuerzas de Vander Waals, puentes de Hidrógeno, efectos inductivos, etc.).

Los disolventes más empleados son el éter de petróleo, el éter etílico, la acetona, el benceno, el metanol, el etanol y el agua. (también se pueden utilizar mezclas de solventes para lograr la polaridad deseada).

Ejemplo: separación de 17-hidroxycorticoides en orina. Posterior cuantificación colorimétrica o por fluorimetría.

Cromatografía de Reparto

Los componentes de la fase móvil son retenidos por la fase estacionaria líquida en función de su solubilidad en ella. Si las dos son líquidas se tiene un proceso de extracción en continuo.

En una cromatografía en donde ambas fases son líquidas, la separación de compuestos es en función de su reparto entre una fase líquida móvil y una fase estacionaria líquida adherida a la superficie interna de un soporte sólido (ambas fases inmiscibles entre sí). Aquí se incluyen la cromatografía líquida de fase normal, que usa un líquido polar como fase estacionaria y la cromatografía líquida de fase invertida, que usa una fase estacionaria apolar.



Cromatografía de Intercambio Iónico

Se basa en el equilibrio del soluto entre el solvente o fase móvil, y los sitios cargados fijados en la fase estacionaria. El intercambio de iones sólido-solución está regulado por la afinidad química de los iones con ambas fases y por sus respectivas concentraciones.

La cromatografía de intercambio iónico usa columnas empaquetadas que poseen grupos funcionales cargados unidos a un polímero que funciona como matriz. Existen interacciones electrostáticas entre los grupos ionizables de las sustancias que quieren separarse y los grupos cargados unidos al soporte sólido de la matriz. Los cambiadores iónicos son sustancias insolubles que contienen grupos de cargados con iones móviles de signo contrario que neutralizan los grupos fijos. Estos iones móviles o contra iones pueden intercambiarse de manera reversible con otros iones de la misma carga. Los cambiadores pueden ser catiónicos (intercambian iones positivos) o aniónicos (intercambian iones negativos), los grupos cargados de la matriz insoluble determinan el tipo y la fuerza del cambiador. Los grupos fenólicos, carboxílicos y sulfónicos se utilizan como cambiadores catiónicos, mientras que los grupos amino, alifáticos y aromáticos se utilizan como cambiadores aniónicos.

El mecanismo de separación se basa en la unión reversible de los compuestos a los cambiadores. Las columnas de intercambio aniónico tienen sitios catiónicos inmovilizados, y los solutos aniónicos son retenidos; la cromatografía de intercambio catiónico utiliza columnas con sitios aniónicos inmovilizados, por lo que especies catiónicas son retenidas.

En la preparación de columnas de intercambio iónico se utilizan geles como fase estacionaria, entre ellos celulosa, dextrano, agarosa y poliacrilamida, los cuales se derivatizan para crear grupos cargados inmovilizados.

Los intercambiadores de iones se clasifican como fuertes o débiles, dependiendo si la cantidad de carga inmovilizada puede fácilmente ser controlada con el pH de la fase móvil.

Los ácidos débiles están protonados a pH menores a 4, por lo que pierden su capacidad de intercambio iónico a pH bajos: de similar manera los intercambiadores básicos débiles pierden su carga a pH altos. A su vez, fases móviles con elevada fuerza iónica



tienden a disminuir la fuerza de interacción entre los solutos cargados y la fase estacionaria.

Cromatografía de intercambio catiónico: se utilizan gradientes de pH alto a bajo o, gradientes de baja a alta fuerza iónica.

Cromatografía de intercambio aniónico: se utilizan gradientes de pH bajo a alto o bien, gradientes de fuerza iónica baja a alta.

La cromatografía de intercambio iónico se aplica para la separación de aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Cromatografía de Exclusión Molecular

Especies neutras de alto peso molecular pueden ser separadas en virtud de su tamaño donde la fase estacionaria es un gel hidrofílico altamente poroso que retiene las moléculas de menor tamaño al de los poros. Las moléculas de mayor tamaño son retardadas en su paso por pequeñas fuerzas de adsorción de la superficie externa del gel que luego son excluidas de la fase estacionaria.

En la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel: la columna esta compuesta de perlas porosas fabricadas a partir de poliacrilamida, dextran o agarosa. Aunque las moléculas a separar, fluyen alrededor de las perlas esféricas en la cromatografía por filtración en gel, están pasan cierto tiempo dentro de los grandes orificios que perforan la superficie de las esferas. Dado que los compuestos más pequeños pueden penetrar en los orificios con mayor facilidad que los más grandes, se desplazan por la columna de filtración en gel con mayor lentitud que los más voluminosos. El volumen total de líquido requerido para eluir un compuesto de la columna depende de su masa: cuanto menor sea su masa, mayor será el volumen de elución.

La fase estacionaria es un gel, polímero anhidro muy hidrófilo, que se hincha al sumergirlo en agua o en soluciones electrolíticas. La fase móvil es agua o cualquier solución electrolítica. La elución de las sustancias es independiente del eluyente, de su pH y de su fuerza iónica, solo es función de la forma y tamaño de las sustancias y de los poros del gel.



La separación de diferentes moléculas de una mezcla en la cromatografía de exclusión viene determinada por el espacio recorrido y la resolución, por lo tanto es función de la longitud de la columna y del tamaño de las partículas de gel.

Las condiciones de separación se eligen para evitar la adsorción específica y no específica, de modo que los volúmenes de elución dependen de los tamaños de los solutos como resultado del tamizado molecular.

Se aplica fundamentalmente a la separación de sustancias de peso molecular elevado como péptido, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos.

La elución de las proteínas de una columna cromatográfica se detecta normalmente por absorción de la luz a una longitud de onda de 280 nm. Debido a la composición de sus aminoácidos, las proteínas absorben esta luz y, utilizando un *espectrofotómetro*, se puede detectar la elución de las proteínas en la cromatografía. Los datos se registran en lo que se denomina *diagrama de elución* e indican la posición de las proteínas que se han separado. Después pueden realizarse estudios de actividad biológica, enzimática, etc. de las proteínas fraccionadas.

Cromatografía por Afinidad

Se basa en las interacciones específicas que ocurren entre agentes bioquímicos de reconocimiento y sus ligando. Aquí se utilizan columnas cortas y de alta selectividad para separar un número pequeño de componentes (generalmente 1) de centenares de solutos que no son retenidos.

Los ligando de afinidad son aquellas especies que están ligadas a un soporte sólido, formando la fase estacionaria, los cuales pueden ser específicos que se une a un soluto (ej.: anticuerpo) o generales (análogos de nucleótidos) que se unen a ciertos grupos de solutos.

Los ligando se inmovilizan mediante uniones covalentes con el material soporte en dos pasos: activación del material soporte y posterior unión del ligando de afinidad.

Los grupos funcionales en el ligando pueden ser: amina, tiol. Alcohol y ácido carboxílico. A menudo es necesario la utilización de brazos espaciadores cuando ligando pequeños son inmovilizados, de modo que el ligando inmovilizado pueda



tener acceso al sitio de unión de una macromolécula (pueden ser cadenas hidrocarbonadas sustituidas). El pH durante la inmovilización deber ser controlado ya que determina la reactividad de los grupos funcionales y puede causar daño irreversible del ligando o del material soporte.

La densidad de grupos activos en el material soporte deber ser considerada: la unión de ligandos grandes mediante uniones múltiples al material soporte da lugar a mayor estabilidad, pero puede distorsionar al sitio de unión y disminuir la afinidad; una orientación o espaciamiento incorrecta de los ligando puede también conducir a una reducción de la afinidad.

Un soporte ideal para la cromatografía de afinidad debe ser rígido, estable, tener una elevada área superficial, y no adsorber ninguna especie inespecíficamente.

Baja performance (tamaño de partícula 100 μ m): Agarosa

Mediana performance (tamaño de partícula 40 μ m): poliacrilamidas hidrofóbicas

Alta performance (tamaño de partícula 10 μ m):

La columna está saturada con solvente y se vierte u pequeño volumen de solución que contiene solutos sobre la parte superior. Los solutos se desplazan hacia abajo lentamente a lo largo de la columna y se eluyen en la parte inferior.

De acuerdo con el sistema que se utilice como soporte Hay disponibles muchas formas de cromatografía de líquidos, y la selección de la forma apropiada depende de múltiples factores (tiempo de análisis, el tipo de compuesto y los límites de detección).

Cromatografía en papel

En esta cromatografía se utiliza el fenómeno de partición en donde la fase estacionaria se halla sobre un soporte activo (el papel) que en realidad forma parte de la fase estacionaria que es el agua. Las fases móvil y estacionaria estarán en contacto en una gran interfase, lo que permite una rápida obtención de una distribución de equilibrio del soluto entre ellas. Si la muestra problema está formada por más de un soluto, éstos se separan por sus diferentes coeficientes de partición.

En la este tipo de cromatografía el agua retenida entre las fibras de celulosa actúa como fase estacionaria (polar), mientras que la fase móvil (menos polar) es una mezcla de disolventes orgánicos y acuosos. La mezcla de las sustancias que hay que separar se



aplica próxima a uno de los extremos de una tira de papel adecuado. El extremo del papel que tiene cerca la aplicación de la muestra se introduce en el líquido de desarrollo. Las sustancias más solubles en la fase estacionaria se mueven más lentamente en el papel que las más solubles en la fase móvil. La cromatografía en papel puede ser ascendente o descendente, según de que la fase móvil ascienda por capilaridad o descienda por gravedad y capilaridad a lo largo del soporte. Una vez desarrollada la cromatografía, las sustancias separadas se localizan por su color, si son coloreadas, o se revelan, pulverizando sobre el papel un reactivo que reaccione con las sustancias dando un producto coloreado. Suele utilizarse para la separación de compuestos muy polares o poli funcionales como aminoácidos, azúcares y pigmentos naturales, sustancias de bajo peso molecular. Debido a sus tiempos de desarrollo largos, en la actualidad su empleo es muy reducido.

La realización de la cromatografía en papel implica la siembra de la muestra problema en un soporte de papel de buena calidad, en general Whatman N°1 para cromatografía analítica, que luego se introducirá en una cuba de desarrollo de modo que el solvente (fase móvil) ascienda por capilaridad (técnica ascendente) o descienda por capilaridad y gravedad (técnica descendente). La fase estacionaria es un complejo celulosa - agua que tiene un poder diferente que el del agua pura.

Etapas de la cromatografía en papel

Siembra

Se aplican muestras en solución a no menos de 1,5 cm del borde inferior de una tira rectangular de papel, y a no menos de 1,5 cm de los bordes laterales, manteniendo a su vez, entre mancha y mancha una distancia no menor de 1 cm. Se hace un toque, se evapora el solvente, se hace otro toque, tratando de concentrar la muestra sin superar un diámetro de la mancha de 3 mm. La siembra es puntual para fines analíticos, y en banda para fines preparativos.

Desarrollo

Ascendente: el solvente se coloca en el fondo de la cuba y el papel se suspende colocado en la parte superior de la cuba.



Descendente: el solvente se coloca en un depósito inerte ubicado en la parte superior de la cuba cromatográfica. En el fondo de la cuba se coloca también un poco de solvente para asegurar la saturación con el vapor. La parte superior del papel se sumerge en el disolvente y se tapa herméticamente la cuba (al igual que en la técnica ascendente). La siembra quedará en la parte superior del papel.

Bidimensional: se corre el papel en una dirección y luego del desarrollo y secado se gira 90° y se corre con otro solvente.

Revelado

Si los compuestos de la mezcla son coloreados, las manchas son visibles directamente. De lo contrario habrá que revelarlas.

Luz UV: si los compuestos absorben esta radiación las manchas se verán con fluorescencia.

Reactivos de color: especiales para cada compuesto. Se deberá tener en cuenta que no se pueden usar reveladores que destruyan el papel como el ácido sulfúrico o el calor.

Vapores de yodo sublimado: es un revelador universal.

Evaluación

Se efectúa el cálculo del R_f para cada componente de la mezcla por separado, que es característico de cada compuesto en condiciones constantes: soporte, temperatura, solventes, altura de desarrollo.

Se define R_f de una sustancia al cociente entre la distancia migrada por ella y la corrida por el frente cromatográfico. El R_f es un valor característico de cada sustancia en cada sistema de separación que sirve para identificarla. El R_f es una magnitud que se ve influida por factores como la temperatura, el pH del medio, la saturación de la cámara de desarrollo, la cantidad de sustancia sembrada, etc.



Distancia recorrida por el compuesto desde el origen o punto de siembra

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto desde el origen o punto de siembra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente desde el origen o punto de siembra}}$$

El R_f toma valores entre 0 y 1 y puede ser usado para la identificación de los componentes de una muestra, siempre y cuando se trate de sistemas cromatográficos idénticos.

Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (thin layer chromatography) . es una técnica de reparto liquido-liquido en la que resultan muy importantes las interacciones por adsorción.

La TLC utiliza como soportes el gel de sílice, la celulosa, las poliaminas, el gel de óxido de aluminio y el gel de silicato magnésico. Los geles se extienden sobre una placa rígida de vidrio, plástico o aluminio, formando una capa fina cuyo espesor puede ajustarse a conveniencia. Es más rápida y más sensible que la cromatografía en papel. Se aplica para la separación de lípidos, esteroides, aminoácidos, azúcares y en general para la separación de compuestos de bajo peso molecular. Puede desarrollarse de forma ascendente . Las sustancias se localizan en la placa, una vez desarrollada la cromatografía, por su color, absorción ultravioleta o revelada específico con los reactivos adecuados. Las sustancias separadas pueden eluirse de la placa raspando el soporte y extrayéndolas con los disolventes adecuados, para luego proceder al a cuantificación por los métodos adecuados.

Fase estacionaria

Sílica Gel 60 (granulometría menor de 10 a 40 μm de diámetro) G (con agregado de yeso al 12% que permite que el adsorbente se adhiera al soporte).

Fase móvil

Mezcla de solventes tal que los componentes de la muestra no corran con el frente del solvente, ni queden retenidos en el lugar de siembra. Los R_f ideales serán entre 0,25 y 0,75.

Es fundamental el uso de solventes anhidros y miscibles.



La cuba cromatográfica deberá estar saturada con la fase móvil antes de introducir la placa, de lo contrario el solvente en vez de ascender por capilaridad continuamente, tenderá a evaporarse de la capa de adsorbente para equilibrar al líquido con su presión de vapor. Eso implicaría un ascenso no homogéneo del frente del solvente.

Etapas de la cromatografía en placa fina

Siembra

Se disuelve la muestra en un solvente adecuado y volátil y la siembra se efectúa con un capilar cargado a 2 cm del borde inferior y de los bordes laterales de la placa. Se hace un toque, se seca, se hace otro toque, cuidando de que el diámetro no supere los 3mm. Las muestras deben estar separadas 1 cm entre sí.

Desarrollo

La placa sembrada se introduce en la cuba previamente saturada con el solvente (15 minutos), de modo que el solvente toque la placa, pero no la zona de siembra. La cuba se tapa y se deja que el solvente ascienda por capilaridad hasta 2cm antes del borde superior de la placa. Se retira y se deja secar.

Revelado

Si las manchas no son visibles hay que revelarlas.

Luz UV: se observará fluorescencia.

Yodo: revelador universal. Se observarán manchas marrones o amarillas. Al quitar la placa del contacto con los vapores las manchas se decoloran.

Sulfúrico con calor: método destructivo. Se rocía la placa con sulfúrico al 50% y se coloca en estufa a 120 °C por unos minutos. Aparecerán manchas marrones, pardas, rojizas, opacas.

Reactivos de color: específicos para cada grupo químico o compuesto.



Azul de Bromotimol al 0,1% en NaOH 0,01M (ácidos carboxílicos)

$K_2Cr_2O_7$ en H_2SO_4 al 4% (compuestos orgánicos no volátiles)

Cl_3Sb al 50% en ácido acético (Esteroides, vitaminas, carotenoides)

Ninhidrina al 0,3% en n-butanol (Aminoácidos y aminos)

Si la placa es preparativa no pueden usarse reveladores destructivos.

Evaluación

Calculando los R_f característicos para cada sustancia en idénticos sistemas cromatográficos.

Tipos de cromatografía en capa delgada

Adsorción

Formación de enlaces por puentes de hidrógeno
Interacciones ácido-base

Partición

Fase normal
Fase reversa

Aplicaciones de la cromatografía en capa delgada

Industria farmacéutica

Control de calidad
Controles de identidad y pureza

Medioambiente

Análisis de aguas, de suelos y de residuos

Análisis de alimentos

Control de calidad

Aditivos (vitaminas)

Pesticidas



Controles de estabilidad

Medicina forense

Detección de documentos falsificados

Investigación en envenenamientos

Aspectos físicos de la Cromatografía

- **La velocidad lineal de flujo**, nos dice cuántos cm recorre el disolvente dentro de la columna en un minuto.
- **Cromatograma**, es un gráfico que representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución. □
- **Tiempo de retención** t_r , de un componente es el tiempo necesario después de la inyección de una mezcla en la columna hasta que ese componente llegue al detector.
- **Volumen de retención** V_r , el volumen de la fase móvil necesario para eluir un soluto determinado de la columna.
- **Eluyente**, fluido que entra por la columna.
- **Eluato**, fluido que sale por el extremo de la columna.(efluente)
- **Coeficiente de reparto**, o **partición de un soluto entre una fase móvil y estacionaria**.
- **Coeficiente de distribución D** , se define:

$$D = \frac{\text{Concentración total de la Fase 2}}{\text{Concentración total de la Fase 1}}$$

En general, los cocientes de partición y distribución se asocian a la fuerza de retención de los diferentes componentes del soluto por la fase estacionaria.

Eficacia de la separación

- Diferencia de tiempos de elución de los respectivos picos, cuanto más distantes sean mejor.
- Anchura de los picos, cuanto más anchos sean los picos, peor la separación.

Para mejorar la separación de los solutos en una mezcla, se desarrolló la cromatografía líquida de alta performance (HPLC). En esta técnica, la fase móvil se fuerza bajo presión a través de una larga y estrecha columna, produciendo una separación excelente en un tiempo relativamente corto.



PARTE EXPERIMENTAL I

Cromatografía de Partición o Reparto

Objetivo

-Separar y detectar mediante cromatografía de partición en papel, los hidratos de carbono y aminoácidos presentes en jugo de frutas.

Separación y detección de hidratos de carbono en jugo de fruta

Reactivos y Materiales

Tiras de papel Whatman Nº 1 (15 x 20 cm)

Lápiz de grafito

Cuba de desarrollo

Capilares para siembra

Secador de pelo

Siembra: puntual

Muestras: jugo de fruta y muestra problema aportada por la cátedra.

Exprimir 5 ml de jugo de naranja, uva, kiwi y centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos. A 1 ml de sobrenadante agregar 3 ml de etanol para precipitar las proteínas y sales. Centrifugar. Sembrar en forma puntual 3 gotas.

Muestra problema: mezcla al 1% de H de carbono. Sembrar 2 gotas

Standard de glucosa, fructosa y sacarosa: Sembrar 2 gotas de cada uno.

Desarrollo: ascendente

Fase móvil: butanol: ácido acético: agua (5:1:2)



Revelador: Nitrato de plata 40% (para usar diluir 1:40 en acetona)

NaOH en etanol (1ml NaOH 1N + 20 ml etanol)

Tiosulfato de sodio 2,5 %

La reacción en medio alcalino es la siguiente:

Reacción principal: $\text{Ag}^+ \text{-----} \text{Ag}^0$

Reacción secundaria $\text{Ag}^+ \text{-----} \text{Ag}_2\text{O}$

Los reactivos deben estar en solución no acuosa para no disolver los azúcares, el tiosulfato compleja y solubiliza la plata del óxido de plata.

Resultados: determinación de Rf.



Separación y detección de aminoácidos en jugo de fruta

Materiales a utilizar

Tiras de papel Whatman Nº 1 (15 x 20 cm)

Lápiz de grafito

Cuba de desarrollo

Capilares para siembra

Secador de pelo

Siembra: puntual

Muestras: jugo de fruta y muestra problema aportada por la cátedra.

Exprimir 5 ml de jugo de naranja, uva, kiwi y centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos. A 1 ml de sobrenadante agregar 3 ml de etanol para precipitar las proteínas y sales. Centrifugar. Sembrar en forma puntual 3 gotas de cada muestra.

Muestra problema: mezcla al 1% de aminoácidos. Sembrar 2 gotas

Standard de lisina, aspártico y alanina. Sembrar 2 gotas de cada uno.

Desarrollo: ascendente

Fase móvil: etanol: agua: amoníaco (70:20:10)

Revelador: ninhidrina 0,2 % en acetona y luego calentar a 100 °C durante 15 minutos

Resultados: calcular R_f y comparar con estándares.



PARTE EXPERIMENTAL II

Cromatografía planar en capa fina TLC: Evaluación de colesterol total y fraccionado.

Objetivo

Determinar colesterol libre y esterificado en sangre, mediante una técnica de cromatografía de adsorción en placa delgada que resulta simple, precisa y reproducible.

Se extrae el colesterol sérico mediante una mezcla de solventes orgánicos simples, en caliente, que lo separan de su unión con las globulinas. Sobre una pequeña alícuota del extracto evaporado se practica una corrida cromatográfica en microplacas de Silicagel F₂₅₄ mediante un sistema de disolventes adecuados. El colesterol libre y esterificado resultan separados con respectivos R_f muy distanciados entre si, lo que permite su identificación y posterior cuantificación por una modificación del método del cloruro férrico de Zack y Boyle. (5)(6).

Reactivos y materiales

Alcohol-acetona (reactivo precipitante de las proteínas). Se mezclan alcohol etílico absoluto y acetona en la proporción 1:1 (v/v).

Cloroformo.

Fase móvil: n-hexano:cloroformo:ácido acético glacial 1,25:3,45:0,30 (v/v).

Revelador: solución de ácido fosfotúngstico 20 % en etanol (p/v).

Reactivo férrico el cual se prepara de la siguiente manera:

Sulfato férrico amónico 0,17 g.

Ácido clorhídrico conc. 0,5 ml.



Ácido cítrico 0,9 g.

Ácido acético glacial csp. 100 ml.

El reactivo resulta habitualmente de lenta disolución, si bien se aclara dejándolo reposar durante la noche. Conservado en frasco oscuro permanece estable a temperatura ambiente durante meses. Es fundamental que el ácido acético sea totalmente anhidro.

Ácido sulfúrico concentrado.

Cromatofolios o placas de silicagel F₂₅₄ de 2,5 x 7,5 cm. Se traza la línea de siembra a 1,5 cm del borde inferior.

Cámara cromatográfica: se emplea vaso de Coplin de los usados en tecnología histológica.

Suero testigo de colesterol conteniendo colesterol libre y esterificado.

Testigo de colesterol (concentración 200 mg % p/v).

Metodología

Extracción de colesterol.

Se miden 0,5 ml del suero recientemente extraído y libre de hemolisis y se colocan en un tubo de centrifuga. Se agregan 4,5 ml del precipitante alcohol: acetona (1:1), se mezcla y se lleva a baño de agua caliente hasta ebullición incipiente. Se retira del baño y se deja reposar 10 minutos. A continuación centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm, separándose luego el sobrenadante en un vaso de precipitados pequeños. Se repite una nueva extracción con 5 ml de la mezcla extractante. Juntar los sobrenadantes y evaporar a sequedad. El residuo se disuelve en 0,5 ml de cloroformo y se centrifuga hasta que el sobrenadante quede límpido. Se evapora hasta volumen de una gota.



Corrida cromatográfica.

Se activan las placas de calor a 100 °C durante 30 minutos. Luego se colocan en desecador con silicagel hasta ser usadas. Sembrar 5^º ul del extracto en la línea de siembra mediante varios toques con un capilar o micro pipeta. Previamente se vierten 5 ml de la fase móvil en el vaso de Colpin para saturar la cuba. Se realiza la corrida colocando la placa dentro del vaso. Se tapa herméticamente y se deja que el disolvente ascienda hasta la marca superior, situada a 5 cm del punto de siembra. Resulta práctico retirar por raspado la línea de capa adsorbente coincidente con el frente del disolvente a efectos de que la corrida se detenga espontáneamente a los 5 cm exactos.

Revelado de las placas.

Una vez aplicado el reactivo revelador, se invalida el uso de la placa con fines cuantitativos. Consiste en pulverizar la solución de ácido fosfotúngstico sobre la corrida. Colocar en estufa a 100 °C hasta que se visualicen las manchas.

El colesterol libre ocupa el primer lugar a partir de la siembra y los esteres del último.

Evolución y cuantificación.

Se realiza dividiendo en partes iguales la longitud de la corrida. Se raspan ambas mitades y se colocan respectivamente en 2 tubos que se rotulan CE y CL.

Se agregan 4,5 ml de reactivo férrico, se agita enérgicamente, se reposa unos minutos y se centrifuga a 2500 rpm. Se separan los sobrenadantes y se pasan a 2 tubos rotulados como los anteriores. Preparar un testigo de colesterol colocando 50 ul de solución de testigo de 200 mg% en un tubo marcado T. se agregan 4,5 ml del reactivo férrico y se mezcla. Efectuar un blanco de reactivos en igual forma.

A todos los tubos anteriores (CE, CL, T y B) se le agrega 3 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agitan con muchísimo cuidado. Se reposan 20 minutos hasta que alcancen la temperatura ambiente y se leen las absorbancias a 530 nm.



Cálculos

El porcentaje de cada fracción se calcula así:

Lectura D.O. de CL + lectura D.O. de CE = 100 %

$\%CL = (\text{D.O. de CL} / \text{lectura D.O. de CL} + \text{CE}) \cdot 100 \%$

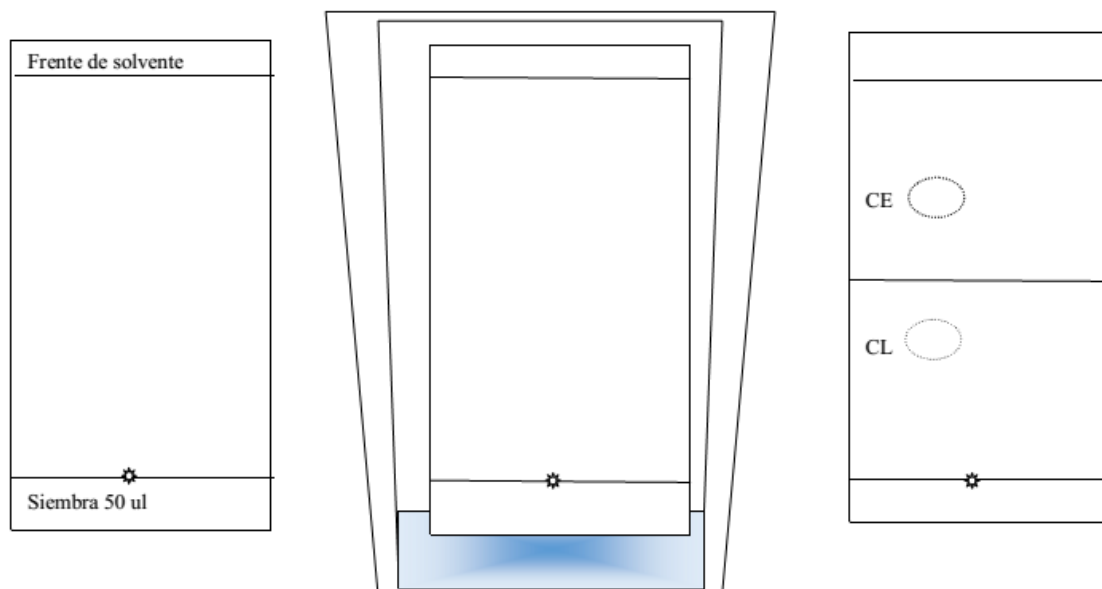
$\%CE = (\text{D.O. de CE} / \text{lectura D.O. de CL} + \text{CE}) \cdot 100 \%$

Para efectuar el cálculo en mg% se evalúa el colesterol sérico total en igual forma que el testigo, pero agregando, por supuesto, 50 ul del suero en lugar de la solución testigo de colesterol.

$\text{Mg\% CT} = (\text{D.O. del suero} / \text{lectura D.O. del testigo}) \cdot 200$.

Sobre la base del contenido en colesterol total se calculan los mg% del CL y CE.

Para la técnica propuesta se hallaron los siguientes valores normales para individuos de hasta 40 años: 68 a 76 % de colesterol.





PARTE EXPERIMENTAL III

Cromatografía en columna: filtración molecular

Objetivo

- Separar los componentes de una mezcla mediante una columna de tamiz molecular.
- Verificar la separación de los compuestos.

Reactivos , materiales y desarrollo.

Muestra a sembrar: mezclar 200 ul de Blue-Dextrán (1 mg/ml) y 200 ul de Hemoglobina bovina (1 mg/ml)

Volumen a sembrar: 0,4 ml

Fase estacionaria: Sephadex G-100 (rango de fraccionamiento de 4.000 a 100.000 Daltons)

Altura del gel en la columna: 12 cm

Fase móvil: agua destilada

Recolección del eluato: fracciones de 1 ml por tubo desde el instante en que se siembra la muestra en el gel.

El análisis de las fracciones obtenidas se realiza en forma visual, ya que ambas sustancias son coloreadas, y por lectura de su absorbancia a 280 nm para el caso de la proteína.

Confeccionar el diagrama de elución de la hemoglobina.

Masa molecular de Blue-Dextrán: mayor a 500.000 Daltons

Masa molecular de Hemoglobina: aproximadamente 60.000 Daltons

Bibliografía

- Corton, E. Química Bioanalítica. Eudeba. 1ª Ed. Buenos Aires. 2011. Pág.: 331-355.
- González de Buitrago J. Tecnología y métodos de laboratorio clínico. Salvat. Barcelona (España). 1990. Pág.: 237-250.
- Rivera J. M., Pertierra A. Fundamentos de Bioquímica estructural. Alfaomega. 1ª Ed. México. 2005. Pág.: 83-84.
- Skoog D. Fundamentos de Química Analítica. Thomson. 8º Ed Madrid (España). 2004. Pág.: 931-938.