

# 12. Cromatografía en capa fina de lípidos

Isaac Túnez Fiñana, María del Carmen Muñoz

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004-Córdoba.*

## RESUMEN

La palabra cromatografía significa literalmente “escribir en colores”, ya que cuando fue desarrollada, los componentes separados eran colorantes. Se trata de una técnica o método físico de separación de dos o más solutos presentes en una mezcla basada en la velocidad de desplazamiento de los mismos. En ella participan dos fases, una móvil (líquida o gaseosa) y otra estacionaria (sólida o líquida). La presente práctica estará dirigida a la comprensión y asimilación de los fundamentos básico-teóricos de este procedimiento físico, así como de su metodología, tipos y uso en la bioquímica clínica, especialmente en la separación de lípidos. Para tal efecto, se realizará una cromatografía en capa fina para la separación de lípidos neutros y fosfolípidos.

*Palabras clave:* gel, placas, HPLC, sílice, vidrio

*Abreviaturas.* HPLC: High-Pressure Liquid Chromatography

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

A principios del siglo XX el botánico-químico ruso Michael Tswett, vertió extracto de hojas vegetales en un tubo de ensayo que contenía carbonato cálcico pulverizado. Al añadir posteriormente disolvente, pudo comprobar que los pigmentos coloreados se separaban, de ahí el nombre “cromatos” (del griego, color) para una serie de técnicas que se engloban bajo la denominación genérica de cromatografía y que poseen características generales similares. Conviene aclarar, ya desde el principio, que la mayoría de separaciones no son coloreadas, teniendo que revelar mediante reactivos adecuados las distintas bandas de separación.

El objetivo fundamental de cualquier tipo de cromatografía es la separación de los componentes de mezclas en base a la diferencia de propiedades físicas de aquéllos. Son técnicas analíticas de separación de materiales que utilizan la distribución de las sustancias entre dos fases, una móvil y otra estacionaria. La primera, también conocida como eluyente, de naturaleza líquida o gaseosa tiene como misión arrastrar las sustancias a través de la fase fija. En la estacionaria o fija se verifica la separación de la mezcla.

Según la naturaleza de las dos fases se puede hablar de diversos tipos de cromatografía: cromatografía en papel, en capa fina, líquido-líquido, gaseosa, de filtración en gel, líquida de alta presión o HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography), de intercambio iónico, de afinidad, etc.

Cuando una especie química se distribuye entre dos fases, a este fenómeno se le denomina reparto. Cuando la muestra está formada por multicomponentes y el reparto es muy diferente entre las dos fases consideradas, se habla de extracción, si está más equilibrado se denomina fraccionamiento.

Dependiendo de la interacción de las sustancias a separar con la fase estacionaria se puede hacer la siguiente clasificación de técnicas cromatográficas:

- De adsorción.
- De reparto.
- De intercambio iónico.
- De permeabilidad.
- De afinidad.

De acuerdo con el sistema utilizado como soporte, la cromatografía puede efectuarse en columna, en papel o en capa fina.

El presente capítulo tiene como objetivo principal el aprendizaje de las técnicas cromatográficas, incluyendo su definición, tipos y conceptos teóricos sobre los que se asientan. Ello permitirá el conocimiento de sus fundamentos, metodología y aplicaciones, resaltando su importancia en la Bioquímica Clínica.

### **1.1. Cromatografía de adsorción**

Se realiza generalmente en columna (también es posible en capa fina), que se rellena de un adsorbente adecuado. El sistema es bañado por un solvente que fluye a través de la columna para comprobar el funcionamiento de la misma. Por la parte superior se introduce la sustancia a separar disuelta adecuadamente. Se deja fluir por la columna. Antes de que ésta quede totalmente seca se incorporan los disolventes de acuerdo con la solubilidad de las sustancias, sufriendo durante su arrastre interacciones de polaridad con el sólido adsorbente. Los eluatos son recogidos para su determinación posterior, normalmente por un método espectroscópico (espectrofotometría, espectrofluorimetría). Las separaciones se basan en las diferencias de distribución de los solutos entre el adsorbente (fase estacionaria) y el disolvente (fase móvil) de acuerdo con sus respectivas isoterms de adsorción.

Los adsorbentes más utilizados, ordenados de mayor a menor actividad son:

- Alúmina
- Sílice
- Carbonato cálcico

Este tipo de cromatografía se utiliza en el laboratorio clínico para la separación de 17-cetosteroides, 17-hidrocorticoides, catecolaminas y otras sustancias urinarias.

### **1.2. Cromatografía de reparto**

Produce la separación de sustancias en base a la diferente distribución de éstas entre una fase orgánica y una fase acuosa, de acuerdo con las respectivas

solubilidades (coeficiente de reparto). Puede realizarse en capa fina, papel o columna.

### 1.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

Aunque la incluyamos en este apartado, la TLC puede ser, de acuerdo con la composición de la capa cromatográfica y de su forma de preparación, bien de reparto o de adsorción. Así, si la capa de adsorbente se deposita como una suspensión acuosa que se deja secar a temperatura ambiente (caso más frecuente), será la película de agua depositada sobre las partículas de adsorbente quien actuará de fase estacionaria, por lo que con solventes orgánicos la partición supondrá, al menos mayoritariamente, equilibrios de reparto líquido-líquido (cromatografía de reparto). Por el contrario, si la capa de adsorbente se seca por calentamiento en estufa, la partición supondrá equilibrios de adsorción sólido-líquido (cromatografía de adsorción).

En este método se utilizan como soporte placas de vidrio, plástico, aluminio, etc. en las que se deposita una fina capa de adsorbente (gel de sílice, almidón, polvo de celulosa, etc.) cuyo espesor puede ajustarse a conveniencia. En el mercado se encuentran disponibles ya fabricadas placas comerciales.

A la altura de 1,5 cm (aproximadamente) de una de las bases se marca débilmente con un lápiz fino una línea teniendo cuidado de no romper la capa adsorbente. Esta línea servirá de base para situar las muestras a analizar. Con una micropipeta de vaciado automático se depositan 5  $\mu$ l sobre un punto o varios en la línea de base (línea de aplicación) teniendo siempre cuidado de no tocar la placa con la punta de la pipeta para no dañarla.

Tras aplicación de la muestra, se deja secar a temperatura ambiente o con ayuda de un pequeño secador. A continuación la placa se introduce en una cubeta que contiene el disolvente de desarrollo adecuado en cada caso, cuyo nivel no debe nunca llegar a la línea de siembra. Su ascenso por capilaridad produce el efecto cromatográfico. Si se realizan dos desarrollos consecutivos con eluyentes apropiados en cada caso, se habla de *cromatografía bidimensional*. Las sustancias se visualizan en la placa una vez desarrollada mediante su color, absorción ultravioleta o revelado específico que produce una reacción coloreada.

Para su cuantificación, se raspa la parte donde se ubique el componente que se quiere medir, se extrae con los disolventes adecuados y se analiza según el método empleado.

La diversidad de adsorbentes (ver anteriormente) y eluyentes disponibles, permiten que esta técnica sea de utilidad para separar e identificar un amplio repertorio de biomoléculas: aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, proteínas, etc.

Una vez revelada la placa se puede establecer un coeficiente de relación entre la distancia alcanzada por el frente y la distancia alcanzada por una sustancia específica, a esta relación se conoce con el nombre de  $R_f$  ( $R_f$  = distancia de la sustancia/frente de la fase móvil).

### 1.2.2. Cromatografía en papel

Puede ser ascendente o descendente, según la fase móvil ascienda por capilaridad o descienda por gravedad 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 específico a cada sustancia, que origine la aparición de un producto coloreado.

En química clínica se utiliza este procedimiento para la separación de aminoácidos, azúcares y otras sustancias de bajo peso molecular. Su empleo es reducido en la actualidad debido a sus largos periodos de tiempo de desarrollo.

### **1.3. Cromatografía de intercambio iónico**

Esta cromatografía está basada en las interacciones electrostáticas que se producen entre los grupos ionizables de los productos a separar y los grupos cargados unidos a un soporte inerte (fase estacionaria). Existen dos clases principales de soportes (cambiadores), según el tipo de grupos enlazados que posea:

- Catiónicos: con grupos cargados negativamente y que intercambian iones del medio con carga positiva.
- Aniónicos: con grupos positivos y que intercambian iones negativos.

Los grupos cargados de la matriz insoluble determinan el tipo y la fuerza del cambiador. La fase cargada inmóvil está inicialmente neutralizada por cationes o aniones (contraiones), dependiendo de su naturaleza. Cuando la mezcla iónica a separar se pone en contacto con la fase inmóvil, en condiciones oportunas de fuerza iónica y pH, se produce el intercambio iónico formándose sales y asociaciones iónicas entre la fase estacionaria y la móvil:

- Los grupos fenólico, carboxilo y sulfónico se utilizan como cambiadores catiónicos.
- Los grupos amino, alifático y aromático, se utilizan como cambiadores aniónicos.

Este tipo de cromatografía se usa para la separación de aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y, en general, para los compuestos que tengan naturaleza iónica. En clínica, se utilizan para la separación de hemoglobinas, isoenzimas, esteroides, etc.

### **1.4. Cromatografía de filtración en gel o de exclusión molecular**

La fase inmóvil es un gel, polímero anhidro muy hidrófilo, que al sumergirlo en la fase móvil (agua o cualquier solución electrolítica) se hincha formándose una matriz de poros semiuniformes que actúan como un tamiz molecular, útil para separar macromoléculas (ejemplo proteínas). Las sustancias que se van a separar se aplican sobre el lecho de gel, previamente dispuesto como relleno de una columna, y posteriormente se eluyen con un disolvente apropiado. En la elución, al pasar la muestra a través del gel, las moléculas mayores que el diámetro máximo de los poros de éste, pasan por los espacios que dejan entre sí las partículas del gel, siendo eluidas en primer lugar. Por el contrario, cuanto menores sean las moléculas, más se incluirán dentro de las partículas del gel y retrasarán su salida.

La elución, por tanto, se produce en orden decreciente al tamaño de las moléculas.

Esta técnica permite, usando patrones adecuados, calcular los pesos moleculares de las sustancias que se separan.

### **1.5. Cromatografía de afinidad**

Se basa en la fijación por enlace covalente de un ligando sobre un soporte inerte, bien de manera directa o a través de un brazo espaciador. El ligando debe interactuar específicamente con la sustancia que se desea separar, con lo que la mezcla sobrante puede eliminarse.

Son frecuentes en este tipo de cromatografía interacciones específicas como las existentes entre un antígeno y su anticuerpo, entre una hormona y su receptor, entre una enzima y su sustrato, etc.

### **1.6. Cromatografía en fase reversa**

Constituye una forma de partición líquido-líquido en la que el carácter polar de las fases se invierte respecto al de la cromatografía en papel.

La fase fija la forma un líquido no polar inmovilizado sobre un sólido relativamente inerte y la fase móvil es un líquido más polar.

### **1.7. HPLC**

En este tipo de cromatografía, la fase móvil, bombeada a presión, fluye a través de la columna estrechamente empaquetada, lo que ocasiona tiempos de análisis muy reducidos. Los eluatos se identifican cuando abandonan la columna por métodos como absorción UV, índice de refracción ó medidas de fluorescencia.

#### **1.7.1. Ventajas de HPLC**

- Su elevada resolución permite la purificación de rutina de mezclas cuya separación no se consigue por otras técnicas.
- Su velocidad permite que la mayor parte de las separaciones se consigan significativamente en tiempos menores a 1 hora.
- Su elevada sensibilidad permite la valoración cuantitativa de cantidades de material menores del picomol.
- Su capacidad de automatización.

#### **1.7.2. Desventajas de HPLC**

- Pequeña capacidad, no pudiéndose hacer purificaciones a gran escala.
- Gasto elevado de la instrumentación.

### **1.8. Cromatografía de gas-líquido**

La fase estacionaria es un sólido inerte como ladrillo refractario pulverizado, impregnado con un líquido de volatilidad baja (polietilenglicol, aceite de silicona,

etc.).

El sólido se empaqueta en una columna larga y estrecha, manteniéndose a temperatura elevada (200 °C). La fase móvil es una corriente de gas inerte (Ar, He, N<sub>2</sub>) en la que se evapora instantáneamente la mezcla que se va a analizar.

Las sustancias sometidas a análisis por este procedimiento deben ser volátiles y estables a temperaturas altas. También cabe la posibilidad de aplicar la técnica a compuestos poco volátiles, tras formación de derivados suyos más volátiles.

## **2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO**

### **2.1. Equipamiento**

Baño termostatzado.  
Placas de vidrio recubiertas con gel de sílice activado (20 x 20 cm).  
Cámaras de cromatografía.  
Cámaras secadoras.  
Cámara de revelado con vapor de yodo.  
Estufa de desecación (40 – 200° C).

### **2.2. Material**

Pipetas de 1 – 5 ml.  
Micropipetas o pipetas de pistón.  
Vasos de precipitado.  
Lápiz.

### **2.3. Reactivos**

Agua destilada.  
Solventes orgánicos.  
Suero sanguíneo.

## **3. PROTOCOLO A REALIZAR**

### **3.1. Extracción de los lípidos de la muestra biológica**

**3.1.1.** Se toma 1 ml de suero.

**3.1.2.** Se agregan 2 ml de una mezcla cloroformo-metanol (2:1)

**3.1.3.** Se pone la muestra en un baño termostatzado a 50°C durante 30 min.

**3.1.4.** Se enfría y dejan separar las fases.

**3.1.5.** Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 min y se separa la fase clorofórmica, pasándola a un tubo de vidrio hasta su total desecación en un baño o corriente de aire.

### **3.2. Aplicación y desarrollo cromatográfico**

**3.2.1.** Se reextrae el extracto seco con 0.5 ml de cloroformo.

**3.2.2.** Se indica en la placa de vidrio con gel de sílice la línea de aplicación u origen, siempre por encima de la mezcla del eluyente presente en la cámara separadora.

**3.2.3.** Se aplican las muestras en volúmenes de 5, 10 y 20  $\mu\text{L}$  y se colocan controles en igual cantidad.

**3.2.4.** Se introduce la placa en la cámara separadora conteniendo el solvente adecuado.

**3.2.5.** Se deja desarrollar la placa hasta que la línea de frente del solvente haya recorrido 13–15 cm desde la línea de aplicación.

### **3.2. Revelado cromatográfico**

**3.2.1.** Se introduce la placa, una vez finalizado el desarrollo de la muestra, en una cámara saturada de vapores de yodo.

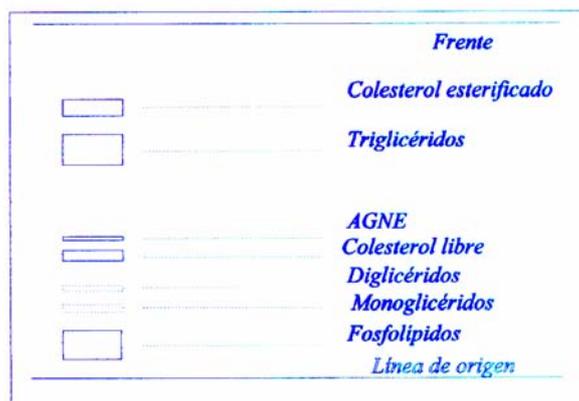
**3.2.2.** Se compara el desarrollo de las muestras con el de los controles y tablas.

## **4. RESULTADOS**

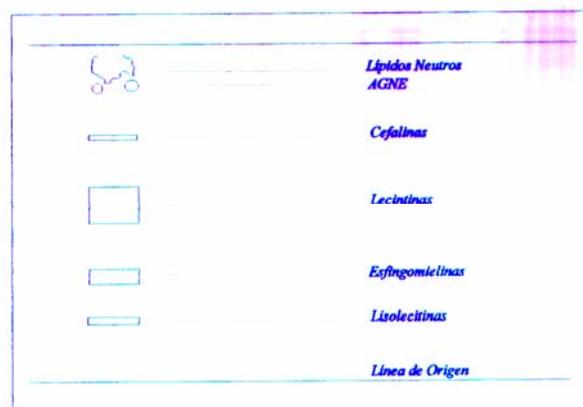
Tras pocos minutos de exposición al sublimado de yodo, aparecen una serie de fracciones o manchas cuya intensidad y superficie varía con la cantidad de muestra aplicada. El raspado de estas manchas y su correspondiente extracción con solventes apropiados permitirá la medición cuantitativa de las diferentes fracciones, menester que puede conseguirse mediante procedimientos espectrofotométricos o con sistemas tales como la cromatografía gaseosa y HPLC.

El desarrollo cromatográfico de estas muestras proporcionará las fracciones que se muestran esquemáticamente en las figuras A (lípidos neutros) y B (fosfolípidos).

A



B



## 5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

## 6. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- González de Buitrago JM (1985): Cromatografía. En González de Buitrago JM (eds): "Técnicas de Laboratorio Clínico", 1ª Ed. Editorial Alambra (Madrid, España), pp. 128 – 141.
- González de Buitrago JM (1998): Osmometría. Cromatografía. Electroforesis. Técnicas electroquímicas. En González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Segade M, Sánchez A (eds): "Bioquímica Clínica", 1ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana (Madrid, España), pp. 17 – 27.
- Lozano J (1988): Cromatografía. En: Lozano JA, Tudelo J (eds): "Prácticas de Bioquímica. Experimentación y Simulación", 1ª ed. Editorial Síntesis (Madrid, España), pp. 25 – 35.

## ANEXO 1: SOLUCIONES

Los solventes orgánicos (eluyentes) utilizados según el tipo de lípidos a separar estarán constituidos por:

- Lípidos neutros: éter de petróleo, éter etílico y ácido acético (85/15/2)
- Fosfolípidos: cloroformo, metano y agua (65/25/4)