

Tutoriales prácticos de aplicación en Alimentación, Nutrición y Trazabilidad en Acuicultura

Práctica 3.2. Determinación de la Composición en Clases Lipídicas

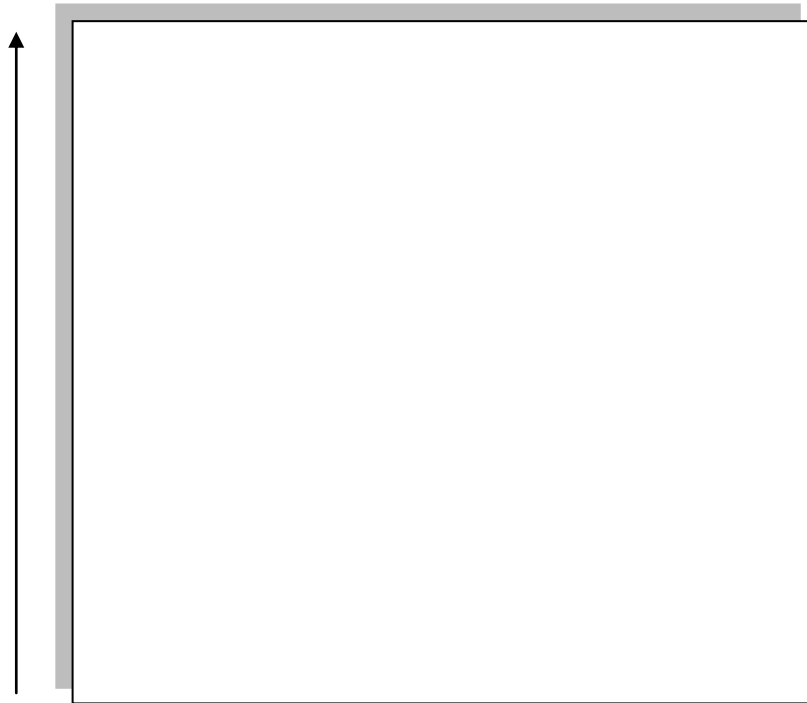


La separación de clases lipídicas se realiza mediante el método de Olsen & Henderson (1989), por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC*), de doble desarrollo unidireccional, en placas de sílica gel de 10cm x 10cm x 0,15mm.

Cromatografía de alta resolución

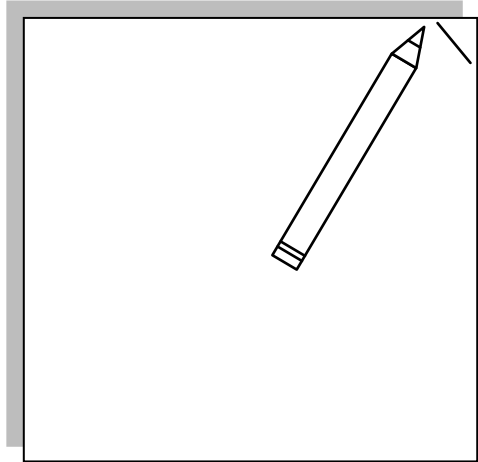
*HPTLC - High-Performance Thin-Layer Chromatography

Unidimensional

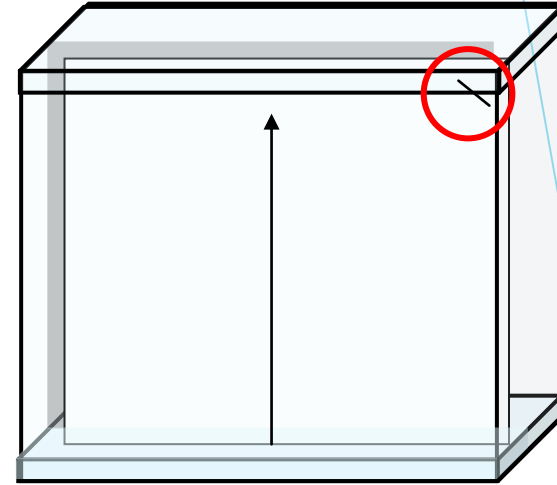


Doble desarrollo

Preparación de las placas para la cromatografía en capa fina de alta resolución:

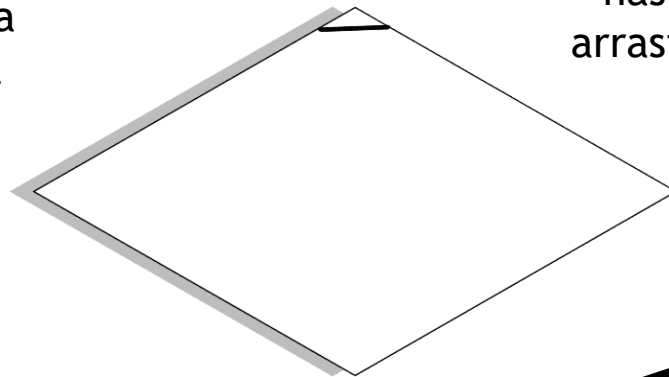


2. Colocar la placa verticalmente en la cubeta con 20 mL de dietiléter y con la marca en la zona superior derecha



Atención
No mover nunca la cubeta, una vez metida la placa.

1. Seleccionar una placa y elegir el borde o esquina más dañado y marcarla con un lápiz de punta blanda para no dañar la placa

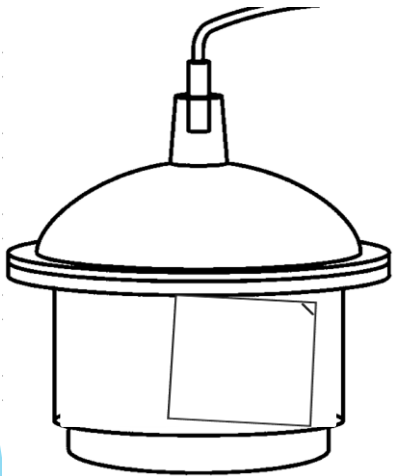


3. Dejar que el solvente llegue hasta el final de la placa, para arrastrar bien todas las impurezas

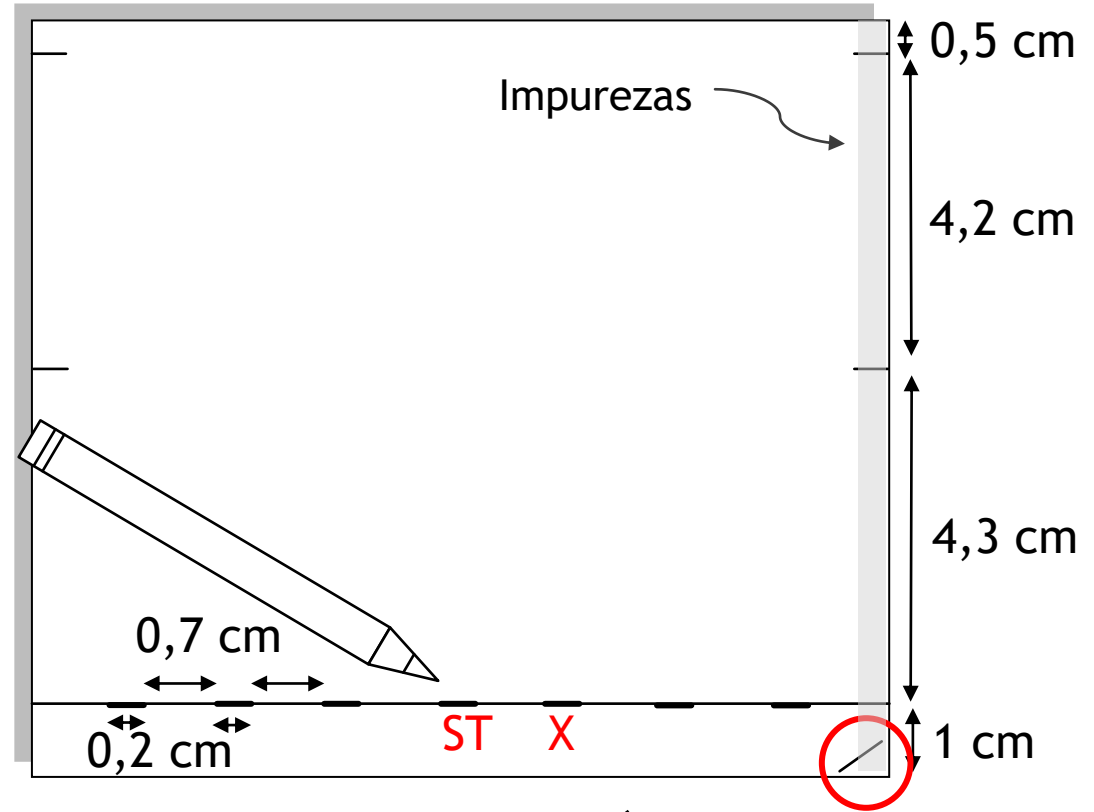
4. Retirar la placa de la cubeta, cogiéndola lo más al borde posible y esperar a que esta se seque, bajo campana extractora

5. Marcar la placa con un lápiz blando los siguientes márgenes:

ATENCIÓN: Girar la placa dejando el borde marcado en la parte inferior derecha de la placa. Así, las posibles impurezas estarán en la zona más a la derecha de la placa, que no se utilizará



7. Colocar la placa en un desecador (en oscuridad) hasta que se enfríe



ST: Extracto de Huevo de Bacalao (estándar)
X: Blanco (zona sin muestra)



6. Colocar la placa en la estufa a 110°C durante 30 minutos, para quemar impurezas y eliminar la humedad de la placa

8. Preparar las soluciones (en el momento de usar), para la separación de las clases lipídicas



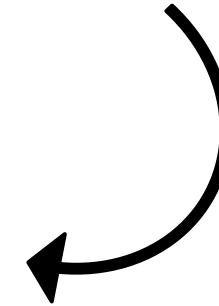
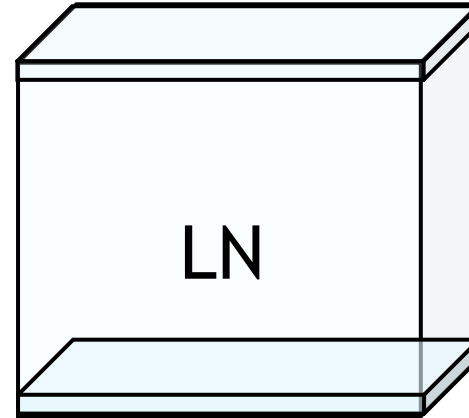
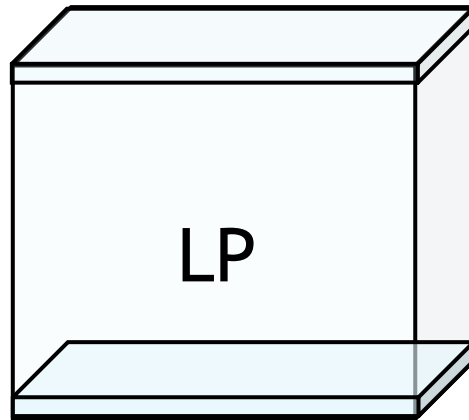
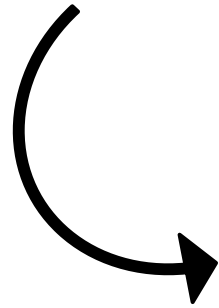
Lipidos polares:

5 mL Isopropanol
5 mL Cloroformo
5 mL Metil Acetato
2 mL Metanol
1,8 mL KCl 0,25%



Lipidos neutros:

20 mL Hexano
5 mL Éter
0,5 mL Ácido Acético

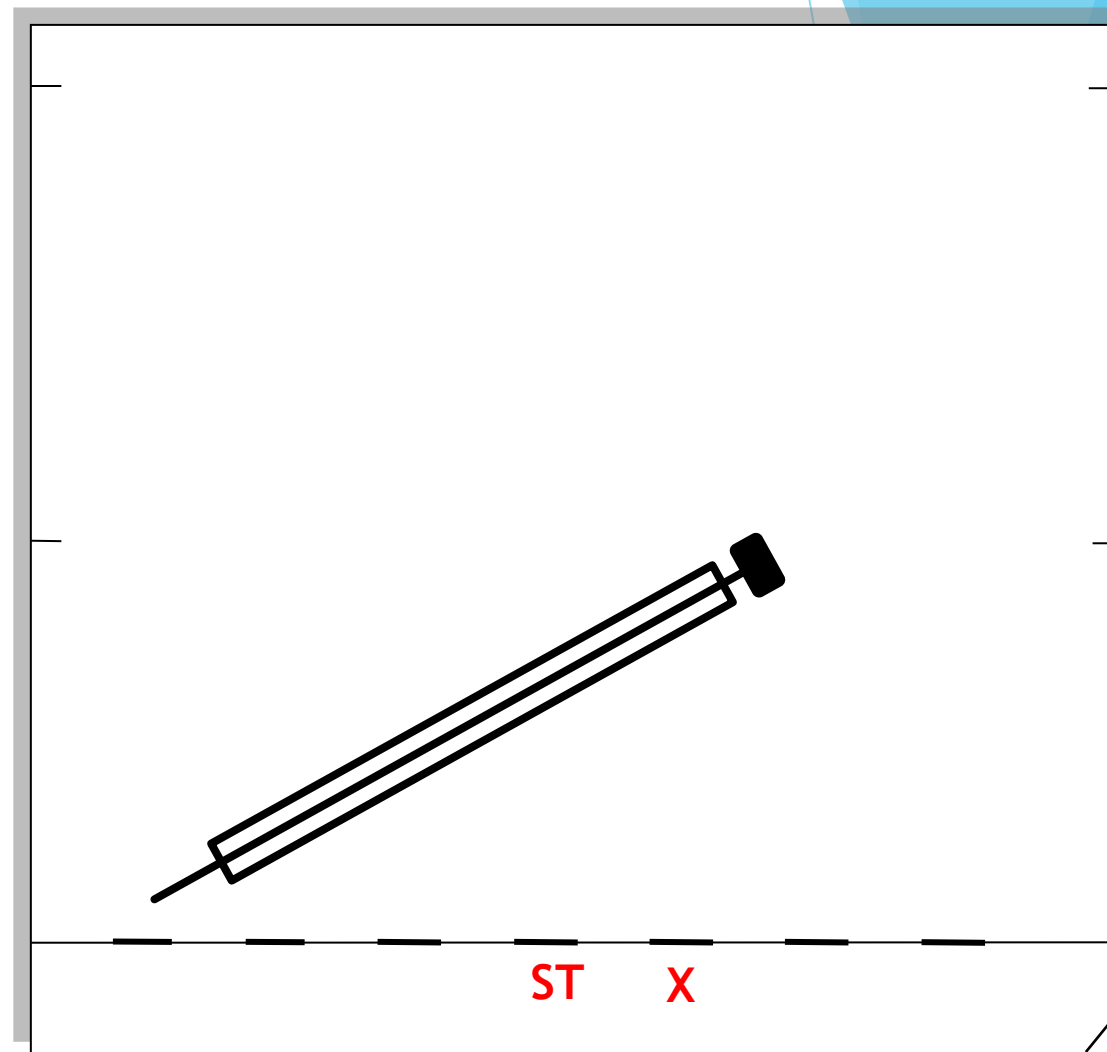


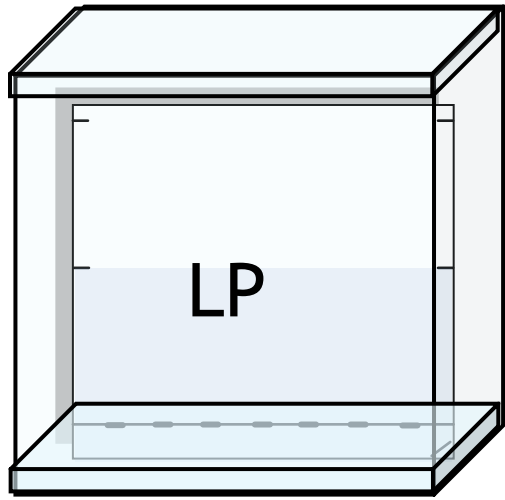
9. Verter cada solución en su respectiva cubeta y tapar para que todo el volumen se sature y ayude así a que la placa se desarrolle más rápidamente.

10. Con una microjeringa Hamilton de 10 μL , depositar sobre la placa, gota a gota y en cada marca correspondiente, 2 μg de extracto lipídico (disuelto en clorofomo:metanol (2:1 v/v) a una concentración de 10 mg/ml), de cada una la muestras. Entre gota y gota aplicada, secar con nitrógeno para no extender la mancha. Cargar igualmente en la placa 2 μL de ESTÁNDAR (ST; extracto lipídico de hueva de bacalao que ayuda a identificar la posición de nuestras clases lipídicas en la placa).

Lavar bien con Cl:MET la microjeringa entre muestra y muestra.

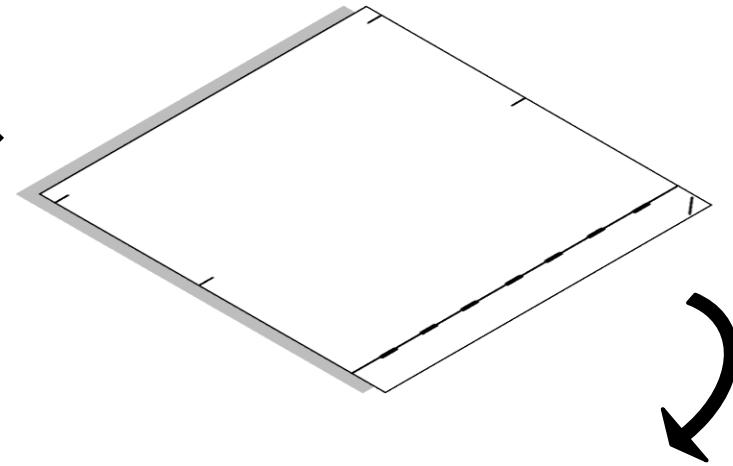
Dejar una de las marcas sin muestra (este será nuestro blanco)



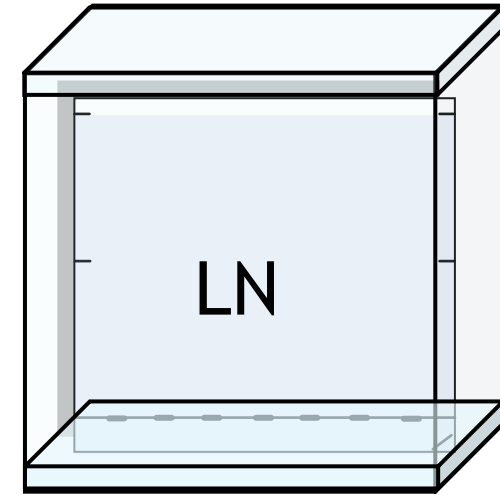


11. Colocar la placa verticalmente y apoyada en la pared posterior, primero en la cubeta con los solventes para separación de los lípidos polares. Tapar la cubeta. Dejar que esta se desarrolle hasta la mitad.

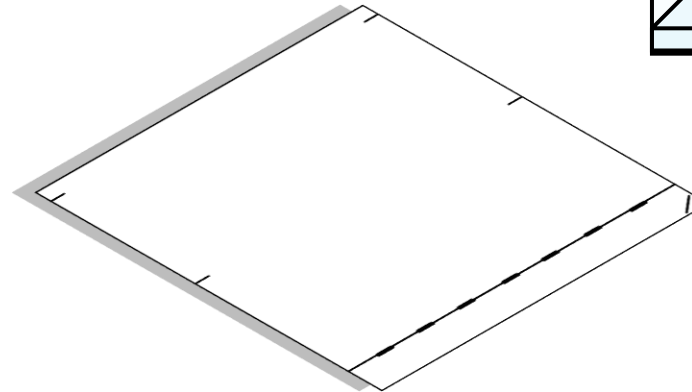
12. Una vez que el disolvente llega a la marca situada a la mitad de la placa, se retira la placa de la cubeta y se espera a que se seque un poco al aire y bajo campana extractora.



13. Cuando esté seca colocar la placa verticalmente y apoyada en la pared posterior ahora en la cubeta de LN. Tapar la cubeta. Dejar que esta se desarrolle hasta la marca superior situada a 0,5 cm del borde.

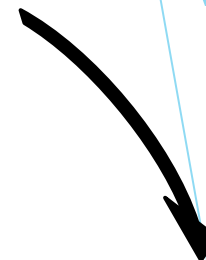


14. Una vez que el solvente llega a la marca superior, se retira la placa de la cubeta y se espera a que se seque un poco al aire y bajo campana extractora.

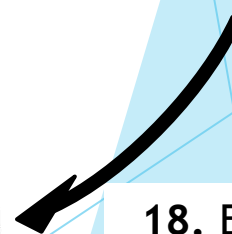
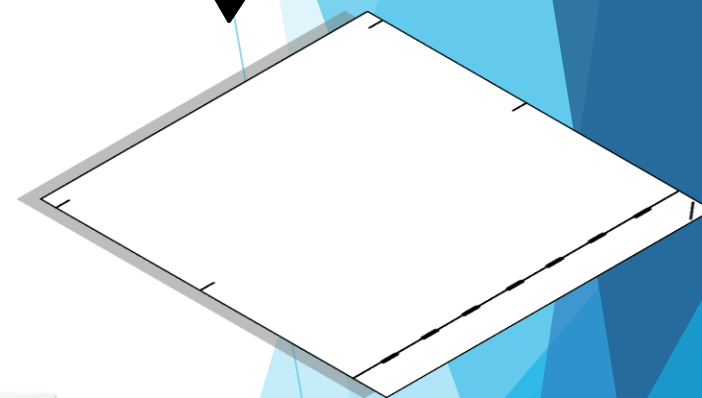




16. Colocar la placa en la estufa a 160°C durante 10-15 minutos.



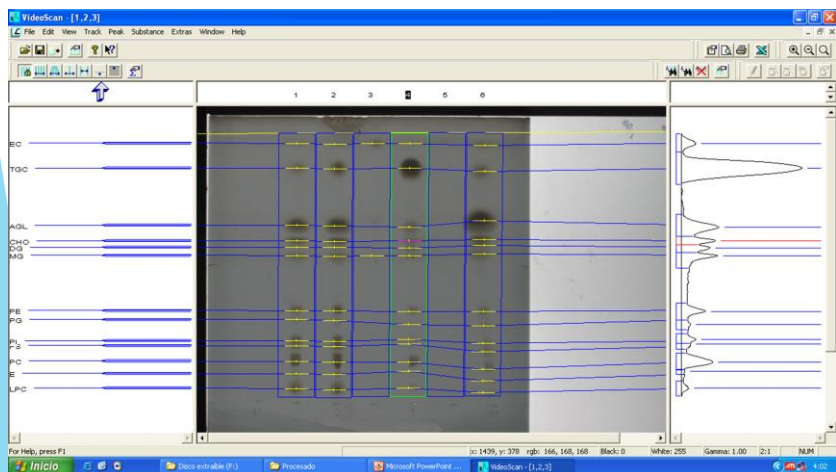
17. Dejar que la placa se enfríe



18. Escanear la placa en el CAMAG TLC Visualizer mediante el software winCATS versión 1.4.4.

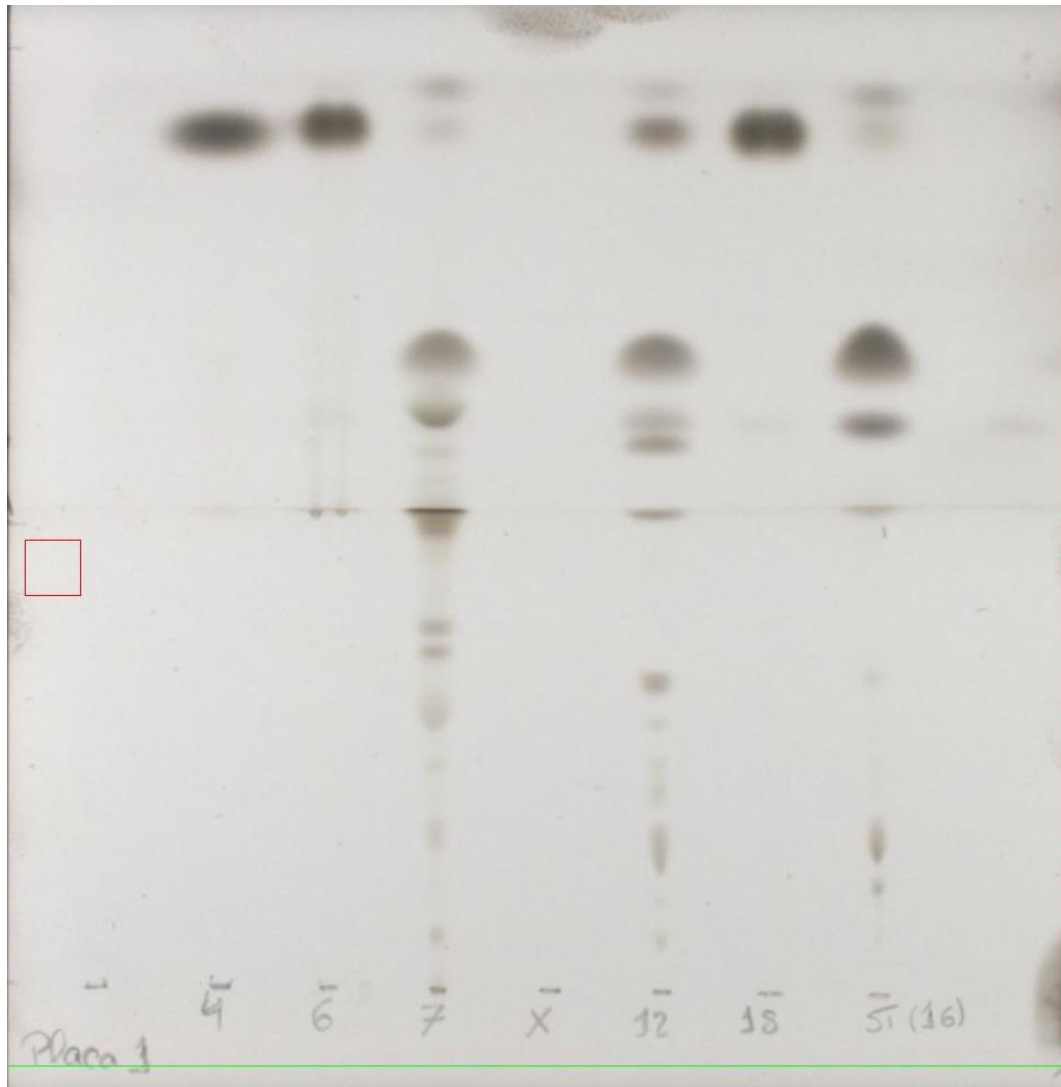


19. Procesar las imágenes por densitometría usando el software VideoScan para obtener la proporción de cada CL de la muestra.



15. Pulverizar la placa de forma homogénea con una solución de acetato cúprico al 3% y ácido ortofosfórico en metanol al 8%.

Posición de las diferentes clases lipídicas en la placa de HPTLC



Ésteres de esterol, Ceras
Triaciglicéridos

Ácidos grasos libres

Colesterol
Diaglicéridos

Pigmentos, Monoaglicéridos

Fosfatidiletanolamina

Fosfatidilglicerol

Fosfatidilinositol
Fosfatidilserina

Fosfatidilcolina

Esfingomielina

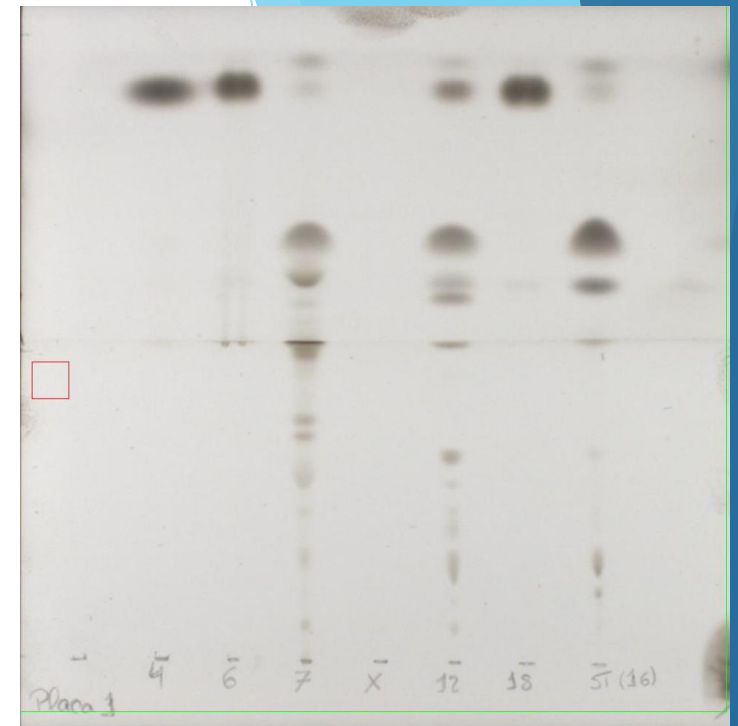
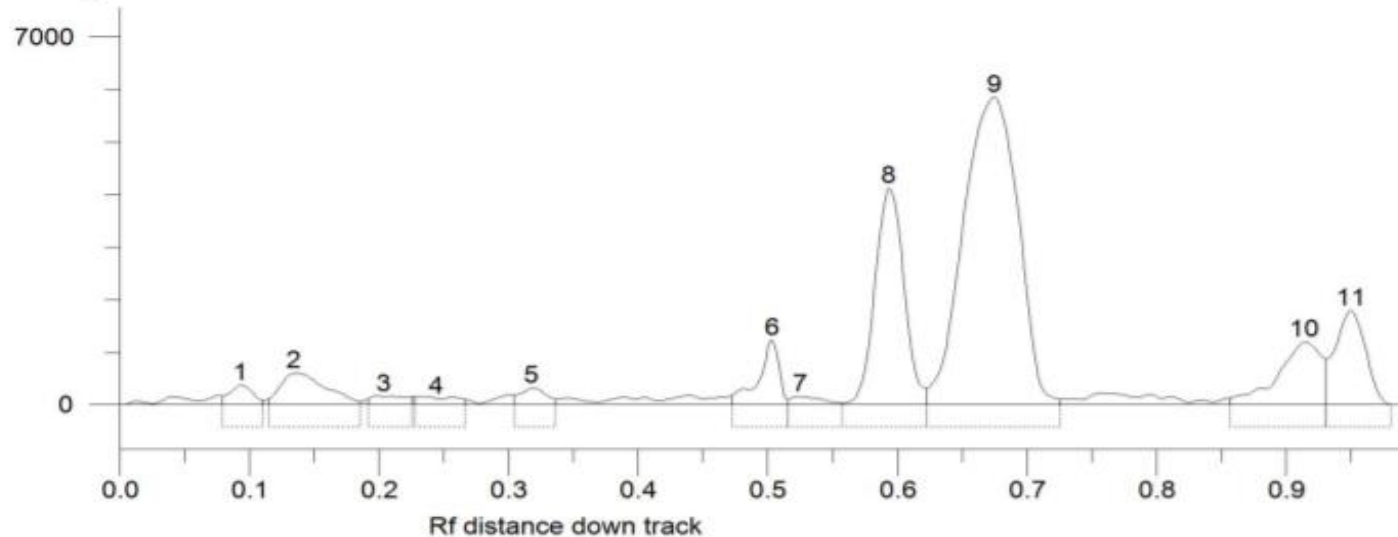
Lisofosfatidilcolina

20. Identificación de picos/clases lipídicas del estándar

Track 7

Profile height

Huevo de bacalao (ST)



Pico #	AREA %	Clase lipídica
1	1,38	Esfingomielina
2	4,31	Fosfatidilcolina
3	0,91	Fosfatidilserina
4	0,92	Fosfatidilinositol
5	1,27	Fosfatidiletanolamina
6	3,96	Pigmentos, Monoglicéridos
7	0,79	Diglicéridos
8	18,97	Colesterol
9	50,72	Ácidos grasos libres
10	8,13	Triglicéridos
11	8,64	Ésteres de esteroles, Ceras



Universidad
de La Laguna



Tutorial realizado por:



Dra. Covadonga Rodríguez



Dra. Ana Galindo



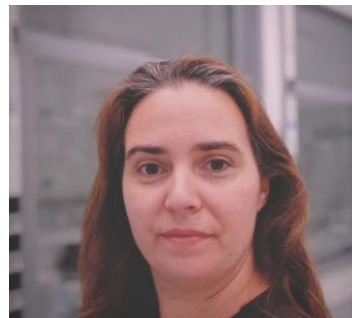
Dr. Manuel Marrero



Dr. José A. Pérez



Dra. Deiene Rodríguez



Dra. Diana B. Reis



Jesús Villora



Nieves G. Acosta

