

Apéndice

CROMATOGRAFÍA

La cromatografía agrupa un importante grupo de técnicas que permiten separar componentes de mezclas complejas.

En todas las separaciones cromatográficas la muestra que se desea separar se disuelve en la "fase móvil" que normalmente está formada por un gas o un líquido. La fase móvil se hace pasar a través de una "fase estacionaria", la cual se mantiene fija en una columna o en una superficie sólida que actúa como soporte.

NOTA:

Fase móvil: aquella en la cual están los solutos que se van a separar

Fase estacionaria: lecho a través del que fluye la fase móvil

Los componentes fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Los componentes con baja afinidad por la fase estacionaria se desplazan con más rapidez al ser arrastrados por la fase móvil.

Una vez que todos los componentes han atravesado la fase estacionaria, salen separados unos de otros lo que permite utilizar las fracciones en procesos de identificación o cuantificación.

FASES DEL PROCESO CROMATOGRÁFICO

1. Preparación de la fase estacionaria
2. Introducción de la muestra vehiculada por una fase móvil
3. Paso a través de una fase estacionaria donde se producen las interacciones que más tarde llevarán a su separación
4. Elución (según en que técnica)
5. Lectura de los resultados para obtener el cromatograma

MECANISMOS IMPLICADOS

1. Adsorción
2. Reparto
3. Intercambio iónico
4. Exclusión molecular
5. Afinidad

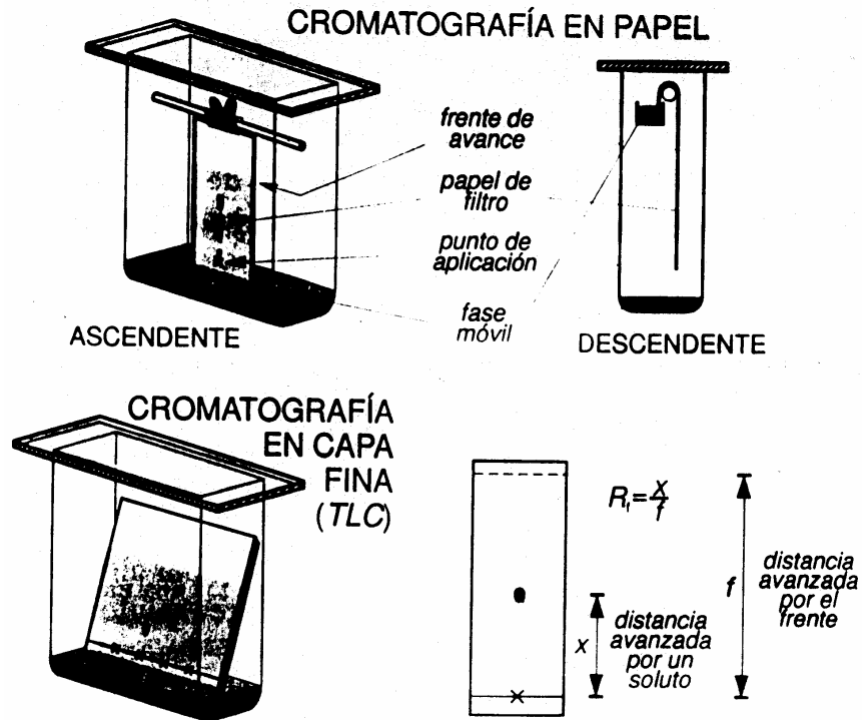
Cromatografía de adsorción: poco usada en clínica

Cromatografía de reparto: basada en las diferencias de solubilidad de los distintos analitos en dos fases inmiscibles. Ejemplo: cromatografía en capa fina (ver la figura):

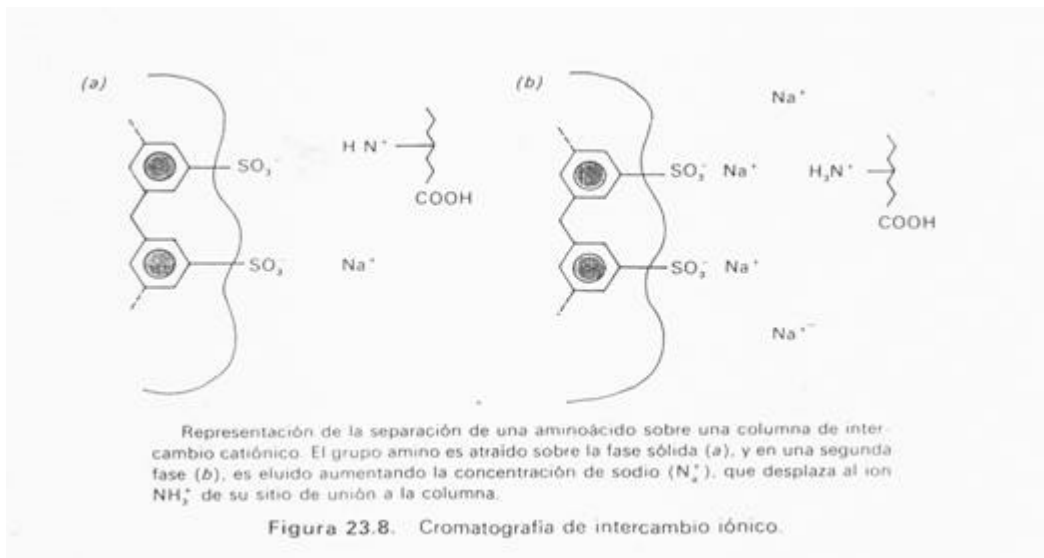
- Sobre un cristal u otra superficie se deposita una suspensión uniforme de partículas (ej gel de sílice) que más tarde se seca y activa. En dicha placa se aplica la muestra y se deja secar.
- Se introduce la placa en una cámara en cuyo fondo hay un disolvente que va subiendo por capilaridad y arrastrará a los componentes de la mezcla en función de la solubilidad de los mismos en la fase móvil.
- Se deja hasta que el frente llegue al final

- Los resultados se visualizan por ejemplo por tinción con colorantes. Aparecerán unas manchas que se pueden identificar mediante el uso de patrones o cuantificar mediante densitometría o raspado de las manchas, disolución y determinación espectrofotométrica.

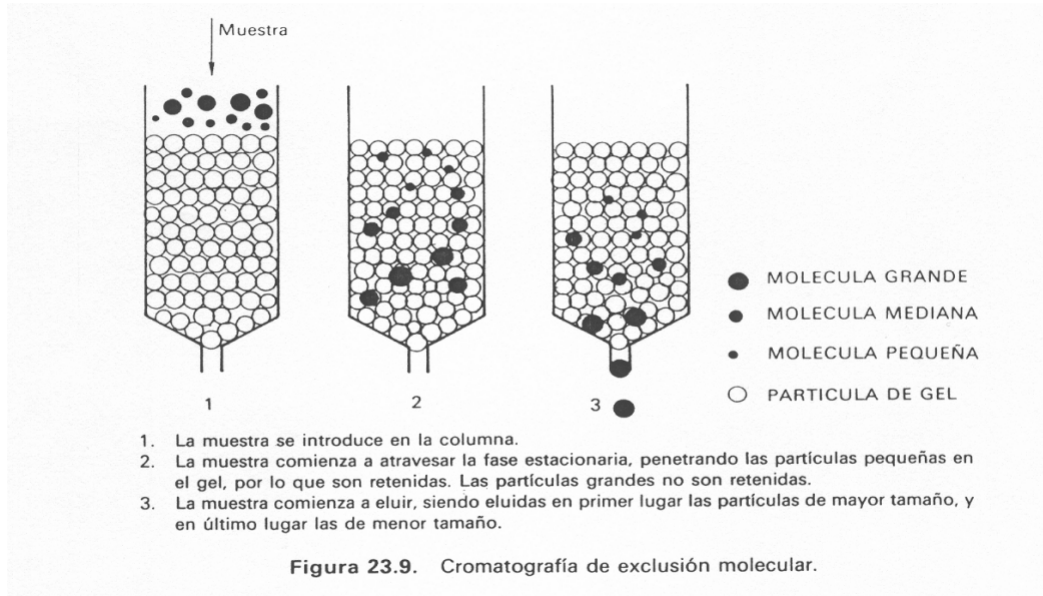
Cromatografía de intercambio iónico: basada en un mecanismo



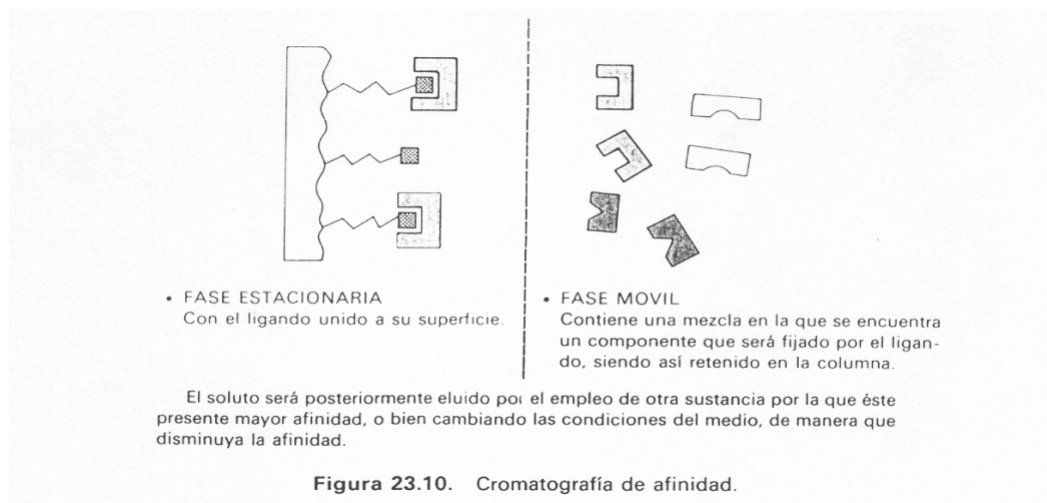
electrostático por atracción entre iones de distinta carga. En el laboratorio clínico se utiliza en analizadores de aminoácidos, separación de Hb, isoenzimas y esteroides.



Cromatografía de exclusión molecular: basadas en la diferencia de tamaño de las distintas sustancias a separar. En clínica se utiliza para purificaciones ej de hormonas.



Cromatografía de afinidad: basada en mecanismos que implican interacciones específicas entre dos moléculas como uniones enzima-sustrato, hormona-receptor, antígeno-anticuerpo.



HPLC o cromatografía líquida de alta presión (resolución): es un sistema de cromatografía en columna (la fase estacionaria se deposita en una columna) con un sistema inyector de la muestra y un impulsor de la fase móvil que acelera el proceso

Preguntas de revisión

a) Espectrofotometría

1. ¿Qué expresión matemática define la relación entre la concentración de una sustancia y su absorbancia?

2. Para trabajar en la zona UV por debajo de 320 nm se precisan cubetas de:

- a) Vidrio
- b) Poliestireno
- c) Polietileno
- d) Cuarzo
- e) Plástico

3. Un blanco de suero se emplea:

- a) Cuando tenemos prisa
- b) Cuando queremos eliminar interferencias por el reactivo
- c) Cuando queremos eliminar interferencias por el suero
- d) Cuando queremos eliminar interferencias de la fuente de luz
- e) Cuando hay que hacer una curva de calibración

4. Un blanco de reactivo se emplea:

- a) Cuando tenemos prisa
- b) Cuando queremos eliminar interferencias por el reactivo
- c) Cuando queremos eliminar interferencias por el suero
- d) Cuando queremos eliminar interferencias de la fuente de luz
- e) Cuando hay que hacer una curva de calibración

5. Desviaciones de la ley de Beer (desviaciones en la relación lineal entre concentración de una solución y absorbancia) se producen cuando:

- a) Se miden concentraciones muy elevadas de cromógeno
- b) La radiación incidente no es monocromática
- c) La luz es transmitida por otros mecanismos
- d) La cubeta está sucia
- e) Todos los anteriores

6. La curva de calibración:

- a) Describe la relación entre transmitancia y absorbancia
- b) Describe la relación entre absorbancia y concentración
- c) Describe la relación absorbancia y velocidad de reacción
- d) b y c son correctas

7. La longitud de onda a la que se mide una reacción es:

- a) Aquella a la que el cromógeno tienen menos absorción
- b) Aquella a la que el cromógeno tiene el máximo de absorción.
- c) Aquella a la que la lámpara da más luz.
- d) Aquella a la que se lee más deprisa

8. Construya una curva de calibración para una técnica de determinación de glucosa en suero con los siguientes datos:

A	Concentración (mg/dl)
0.05	50
0.1	100
0.150	150
0.250	250
0.500	500
0.600	800

A partir de ella:

- a) Calcule la concentración de glucosa en un suero que da una lectura de 0.125
- b) ¿Qué haría con un suero que diera una lectura de 0.7? ¿Interpolaría la lectura sin más o lo diluirías?

c) ¿Cuál se consideraría el límite de linealidad con arreglo a esta curva de calibración? ¿Por qué?

9. Vamos a hacer una determinación de glucosa en sangre, y para ello recurrimos al empleo de una solución estándar de glucosa de concentración 100mg/dl. Una vez llevada a cabo la lectura obtenemos los siguientes datos:

Absorbancia del estándar: 0,2

Absorbancia del problema-1: 0,4

Absorbancia del problema-2: 0,8

Absorbancia del problema-3: 1,5

a) Con estos datos, calcular las concentraciones que tendrían los tres sueros problema.

b) Sabiendo que el límite de linealidad de la técnica es de 600mg/dl ¿habría que diluir alguna muestra y repetir la determinación? ¿Cuáles diluiría y qué factores de dilución emplearía? ¿Por qué?

c) Diluimos la muestra número tres al 1/5, y repetimos la determinación. Ahora, la lectura que obtenemos es de 0,320 ¿Cuál será la concentración real de glucosa en ese suero?

b) Otros contenidos teóricos del tema

1. Al hacer una determinación de glucosa es conveniente separar la células lo antes posible ¿por qué? ¿qué tipo de error cometeríamos si no lo hiciéramos?

2. Un paciente tiene una glucemia basal de 120mg/dl ¿Qué prueba llevaría a cabo para confirmar una posible diabetes? ¿Cómo realizaría dicha prueba?

3. ¿Cuáles son los dos métodos enzimáticos más utilizados para la determinación de glucosa en una muestra de suero?

4. ¿Qué utilidad tiene la cuantificación de proteínas glicosiladas?

5. ¿Cuáles son las dos determinaciones de proteínas glicosiladas más utilizadas en el laboratorio clínico?

6. Cite algún método para analizar hemoglobina glicosilada

7. En los métodos anteriores ¿Qué se utiliza como muestra?

a) Suero

b) Plasma

c) Sangre completa

d) Hemolizado de eritrocitos

8. ¿Cómo se llama la presencia de cuerpos cetónicos en orina? ¿Cómo se determinan habitualmente?

a) Por cromatografía de afinidad

b) Mediante espectrofotometría

c) Mediante electroforesis

d) Mediante inmunodifusión

9. Hemos determinado la glucosa en una muestra de orina recibida en el laboratorio por medio de dos técnicas: a) método de Benedict b) método GOD/POD. Los resultados obtenidos han sido: a) 200 mg/dL, b) 150mg/dL. ¿A qué puede ser debida la disparidad de ambos valores.

10. ¿Qué determinaciones harías a un paciente que llega al laboratorio para controlarse?

11. ¿Qué determinaciones harías a un paciente para diagnosticar una diabetes?

12. A un paciente le han solicitado una determinación de hemoglobina glicada para averiguar si tiene diabetes ¿Es correcta la petición? ¿Por qué?
13. A las cinco de la tarde llega una muestra de sangre al laboratorio que se extrajo a las ocho de la mañana, para determinar la glucosa, y que se había dejado olvidada encima de la mesa desde entonces. ¿Qué debemos hacer? ¿Por qué?
14. Un paciente viene al laboratorio para hacerse un análisis de glucosa, y nos explica que ha desayunado hace 20 minutos ¿Qué debemos hacer? ¿Por qué?