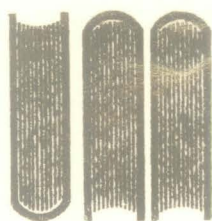


DICME
\$500-

Original *

[Signature]
Manuel
Vo. Bo-

UNIVERSIDAD DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Clasif
040.54
M 491c
1979

Título

CARACTERIZACION DE LOS LIPIDOS DEL SUERO
POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL
QUE PRESENTA

Autores

MARIA DIANA MEDINA CANTU
MARIA IGNACIA MALDONADO GUAJARDO

Julio 800459

QUE EN OPCION AL TITULO DE
LIC. EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD EN
"ANALISIS CLINICOS"

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1979

BIBLIOTECA UNIVERSIDAD DE MONTERREY

A nuestros Padres por
su sacrificio y apoyo

A nuestros Maestros
por enseñarnos el camino

I N D I C E

	Pág.
Introducción.....	1
Material y métodos.....	7
Resultados.....	22
Discusión.....	35
Resumen.....	38
Bibliografía.....	41

I N T R O D U C C I O N

La cromatografía es un método fisicoquímico que permite separar los componentes de una mezcla en movimiento, por medio de adsorción o separación diferencial.

La palabra "cromatografía" viene del griego chromos= color y graphos=escritura. (4)

Mikhail Tswett (5), botánico ruso estableció entre 1903 - 1910, las ventajas de la cromatografía de adsorción aplicadas a la separación de los pigmentos

vegetales.

"Wicker, fue el primer investigador que analizó por medio de la cromatografía en capa delgada los lípidos del suero sanguíneo humano". (18)

Kerchner y Keller (15), llamaron a este método "proceso de la cromatoplaça", el cual ha ganado mucha importancia desde los recientes estudios de Stahl, quien desarrolló un equipo básico que permite sin dificultad la preparación de placas de vidrio que se desarrollan en diferentes eluentes, para la separación e identificación de los lípidos.

Este método presenta ciertas ventajas con relación a los distintos tipos de cromatografía existentes; algunas de ellas se citan a continuación (4, 15, 18):

- a) Corto tiempo de desarrollo (minutos a 1 ó 2 horas).
- b) Control razonable de condiciones.
- c) Buena resolución de substancias hidrofóbicas e hidrofílicas.

- d) Adsorbentes inertes a los agentes corrosivos.
- e) Numerosos reveladores.
- f) Pueden usarse disolventes anhidros.

Este método requiere de un sistema formado por una fase estacionaria, una fase móvil y la muestra a separar. La acción de la fase estacionaria depende de la fuerza de adsorción, o sea la atracción electrostática que ejerce el adsorbente sobre la muestra hacia sus sitios activos. La separación se efectúa porque los componentes en la fase móvil son retardados selectivamente por la fase estacionaria. Las sustancias que son más fuertemente adsorbidas se retardarán mientras las no adsorbidas permanecerán en la fase móvil. (1)

El grado de retención se acostumbra expresar como factor de retardación o R_f , que es la relación de las distancias que han corrido el soluto y el disolvente a partir de un punto llamado "origen". (17)

"Se ha comprobado que la cromatografía en capa delgada es un método de gran valor para analizar los lípi-

dos de tejidos y del suero sanguíneo tanto de humanos como de animales". (18)

Los lípidos que se pretenden caracterizar son:

- * Colesterol.
- * Esteres del Colesterol.
- * Triglicéridos.
- * Fosfolípidos.
- * Acidos grasos libres.

Estos son los principales constituyentes de los lípidos totales presentes en el suero sanguíneo humano.

Los lípidos presentes en mayor cantidad son; ésteres del colesterol, colesterol y fosfolípidos, que se encuentran usualmente en un rango de 150 - 300 mg/100 ml en individuos normales.

Aproximadamente el 70% del colesterol total está esterificado con ácidos grasos de cadena larga, el restante es colesterol libre.

Los triglicéridos son ésteres del glicerol con ácidos

grasos de cadena larga. Su concentración normal está entre un valor de 50 - 150 mg/100 ml.

Los fosfolípidos son derivados del glicerol en los cuales dos de los grupos hidroxilo están esterificados con ácidos grasos de cadena larga y el tercero está unido a un radical fosfato que puede ser enlazado por otros grupos como etanolamina y colina, dando polaridad a la molécula.

Además están presentes en cantidades muy pequeñas mono y diglicéridos, glicerina y ácidos grasos no esterificados. (1)

Los lípidos para su análisis pueden dividirse de acuerdo a su naturaleza química en neutros y polares. Entre los lípidos neutros están los triglicéridos y ésteres del colesterol; se consideran lípidos polares a los fosfolípidos y ácidos grasos. Los mono y diglicéridos también exhiben cierta polaridad y en menor grado el colesterol. (14)

Con este trabajo se pretende seleccionar un método para la caracterización de los lípidos presentes en el suero sanguíneo humano, por medio de la cromatografía en capa delgada con el fin de sentar las bases para posteriores investigaciones, de aplicación diagnóstica y cuantitativa.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Recolección de muestras. El suero stock que se analizó fue obtenido de varios compañeros voluntarios, utilizando una jeringa de plástico con aguja estéril desechable número 21 x 32. Este suero sin hemólisis se guardó en un congelador.

Extracción de las fracciones lípidas. a) Lípidos totales (3). Se pipetea exactamente un ml de suero a un tubo de ensaye, añadiendo 20 ml de una mezcla de alcohol - éter (3 : 1). El tubo se agita vigorosamente y se coloca en un baño de agua a una temperatu-

ra de 60° C por 30 minutos; se centrifuga y el sobrenadante se transfiere a un tubo de tapón de rosca.

b) Fosfolípidos (1). Se extraen del suero con alcohol-éter (3 : 1). A un tubo de ensaye con 20 ml de la mezcla extractora se le agrega un ml del suero con agitación constante. Se deja reposar por varios minutos y se centrifuga a 1500 r. p. m. El sobrenadante contiene los fosfolípidos.

c) Colesterol (3). Se colocan 2 ml de suero en un tubo con tapón de rosca con 2 ml de KOH al 30% para que se lleve a cabo la saponificación. Se añade un volumen igual de etanol se cubre con un vidrio que detenga las burbujas. Se calienta en baño de agua a 80° C por una hora para completa digestión. Después en frío se le añaden con agitación constante entre 15 y 30 ml de éter de petróleo (30° a 60°). Se centrifuga y el sobrenadante se analiza para colesterol.

d) Acidos grasos libres (1). Se prepara una mezcla extractora que contiene 40 volúmenes de isopropanol,

10 volúmenes de hexano y un volumen de ácido sulfúrico 1 N. Se toma un ml de suero y se le agregan 5 ml de la mezcla extractora; se agita vigorosamente. Se deja reposar 10 minutos ó más. Para dividir el sistema en dos fases se añaden 2 ml de hexano y 3 ml de agua. La fase superior se guarda para el análisis.

e) Triglicéridos (1). En un matraz de separación con 2 ml de suero, agregar 8 ml de heptano, 14 ml de isopropanol y 4 ml de ácido sulfúrico 0.08 N. Esperar a que se separen las dos fases y se utiliza la de arriba para los triglicéridos.

Estos extractos fueron evaporados cuidadosamente en una parrilla a 200° C bajo atmósfera de nitrógeno (7) hasta aproximadamente 1/4 de su volumen original.

Al revisar la bibliografía no se encontró un método específico para extraer los ésteres del colesterol, por lo que fueron caracterizados en el extracto de lípidos totales. Los extractos fueron guardados en tubos de tapón de rosca de 18 x 150 mm, se colocaron

dentro de un matraz kitasato de 1000 ml adaptado a entrada y salida de gas nitrógeno, con el fin de tener una atmósfera inerte y conservar los lípidos inalterados. En seguida se guardaron en el congelador. (8)

Los estándares empleados para referencia fueron los siguientes:

1) Lípidos totales. Suero Control Normal Ortho Diagnostics Inc., lote no. 12R019. Se le hizo una extracción de lípidos totales. Este suero contiene colesterol esterificado y libre, fosfolípidos y triglicéridos.

2) Colesterol. Fisher Scientific Company, Chemical Manufacturing Division, lote no. 732063. 50 mg en 50 ml de cloroformo.

3) Acidos grasos libres. Acido palmítico Fisher Scientific Company, Chemical Manufacturing Division, lote no. 761256. 0.1282 gr en 50 ml de hexano. Acido olé-

ico Mallinckrodt Chemical Works, lote RHK. 0.5 ml
en 25 ml de heptano.

4) Triglicéridos. Manteca vegetal INCA. 0.5 gr aproxi-
madamente en 50 ml de éter de petróleo.

5) Fosfolípidos. Estándar de lípidos totales que con-
tiene fosfolípidos.

Estos estándares se guardaron bajo las mismas condi-
ciones que los extractos de las fracciones lipídicas.

Equipo. 1) Placas de vidrio con cantos pulidos de tres
tamaños; 20 x 20 cm, 10 x 20 cm y 5 x 10 cm.

2) Sílica gel G, Kieselgel G nach Stahl, Merck lote
no. 1387056.

3) Aplicador de sílica DESAGA Heidelberg.

4) Plantilla de poliacrílico DESAGA.

5) Soporte plástico de placas para aplicar la sílica
DESAGA.

6) Cubas de vidrio para cromatografía de diversos ta-
maños.

- 7) Portaplacas DESAGA.
- 8) Desecador grande.
- 9) Papel filtro en pliegos grandes.
- 10) Placas de aluminio prefabricadas Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Alufolien, espesor de la capa 0.2 mm (Merck), lote no. 8548043.
- 11) Capilares de vidrio sin heparina, bulbito de hule.
- 12) Pipetas Pasteur de vidrio, Dispo pipets Scientific Products Inc.
- 13) Pulverizadores de plástico y vidrio.
- 14) Centrifugadora Hettich Rotofix II.
- 15) Parrilla eléctrica Thermolyne modelo HP A1915B.
- 16) Equipo de destilación Corning Organic Chemistry Kit.
- 17) Fuente de luz ultravioleta modelo BLF-6. Ultra violet Products Inc.
- 18) Estufa eléctrica. Casa Rocas, Monterrey N. L.
- 19) Balanza granataria OHAUS, capacidad 2610 gr.
- 20) Balanza analítica Mettler.
- 21) Marcador de sílica.
- 22) Cristalería marca PYREX e IVA.

Reactivos. Los solventes usados en el desarrollo de la cromatografía fueron previamente redestilados y guardados con sulfato de sodio anhidro. (9)

1) Lípidos totales (10).

Solvente I: Eter etílico-ácido acético-éter de petróleo (100 : 3 : 97).

Solvente II: Eter etílico-éter de petróleo (3 : 97).

2) Colesterol (9).

Solvente: Cloroformo-etanol absoluto (80 ; 20).

3) Fosfolípidos (2).

Solvente: Cloroformo-metanol-ácido acético-agua (25 : 15 ; 4 : 2).

4) Triglicéridos (18).

Solvente: Eter de petróleo-ácido acético (85 : 15).

5) Ácidos grasos libres (9).

Solvente: Cloroformo etanol-absoluto (65 : 35).

6) Mezcla lavadora de placas (2). Cloroformo-metanol (4 : 1).

Reactivos de coloración para revelar. Existen infinidad de compuestos reveladores que son universales pues detectan cualquier sustancia orgánica presente. Algunos son más específicos debido a las reacciones que involucran a un grupo funcional determinado.

1) Vapores de yodo metálico (16). En una cámara cerrada se expone el cromatograma a los vapores por un minuto, apareciendo manchas amarillo cafés que son marcadas en la sílica. Detecta cualquier sustancia orgánica.

2) Rodamina B (2). 0.05 gr en 100 ml de alcohol de 96° se rocía el cromatograma y se deja secar a temperatura ambiente. Se observan en luz UV manchas violetas en fondo rosa.

3) Sulfato de amonio (11). 20 gr en 100 ml de agua más 4 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después de rociar la placa, se calienta a 130° C hasta que aparezcan los

lípidos como manchas café oscuro en un fondo blanco.

4) Ninhidrina (2). Preparada comercialmente por Merck en spray al 0.1%. Después de rociar la placa, se calienta en la estufa a 100-110° C por 5 minutos en atmósfera saturada de agua, apareciendo manchas rosas en fondo blanco. Detecta los grupos amino libres de los fosfolípidos.

5) Reactivo de Liebermann-Buchard para el colesterol (2). Acido sulfúrico concentrado-ácido acético 1 : 1 v/v. En la campana de extracción se rocía la mezcla con un aspersor de vidrio sobre la placa, con todas las precauciones. El colesterol aparecerá como manchas rosas que cambian a violeta y al calentar ligeramente en la estufa se vuelven cafés.

DESARROLLO DE LA
CROMATOGRAFIA

Preparación de las placas. Hay varios adsorbentes que pueden ser empleados para este propósito. Domínguez (4) recomienda la sílica gel G que contiene sulfato de calcio como aglutinante; el óxido de aluminio es raramente usado porque hidroliza e isomeriza a los lípidos. (18)

Se prepara una mezcla constante de 30 gr de sílica gel con 60 ml de agua, cuidando que el tiempo de preparación no exceda de dos minutos pues cambia la consisten-

cia de la mezcla. (2)

La superficie del vidrio debe limpiarse escrupulosamente con detergente y un disolvente orgánico para eliminar cualquier resto de grasa. La pasta se vierte en el aplicador que ha sido ajustado a un espesor de 0.25 mm (2, 12) para cubrir las placas corriendo sobre ellas el aplicador de manera uniforme. Se dejan secar al aire para luego ser activadas en la estufa por espacio de 30 minutos a 100-110° C. El grado de activación va a afectar la habilidad electrostática del adsorbente para atraer a los componentes, pues si los sitios activos del adsorbente están ocupados por moléculas de agua, la capacidad de retención se pierde (1). Sin embargo, compuestos hidrofílicos pueden ser desarrollados sobre placas secas al aire y solventes saturados de agua (15).

Lavado. Terminada la activación, las placas frías se colocan en una cuba preparada con la mezcla lavadora de placas. Este tratamiento es necesario para subir la materia orgánica lo más alto posible para que no

interfiera en el análisis (10).

Las placas son retiradas de la cuba para evaporar el solvente y reactivar en la estufa. Al término, se guardan en el portaplacas dentro del desecador hasta que se vayan a usar.

Aplicación de las muestras. Se fabrican micropipetas Pasteur con capilares en un micromechero de Bunsen. Se facilita llenar la pipeta con el extracto si se usa un bulbito de hule para que succione.

En la placa activada se marca el origen a una distancia de dos cm y se raya para formar canales por donde correran varias muestras según convenga (12). Luego son aplicadas las muestras como gotas con diámetro de cinco mm promedio, separadas unos dos cm, procurando no perforar la sílica. El solvente se debe secar antes de volver a aplicar el extracto.

Para obtener buena saturación de la cámara, ésta debe prepararse con el eluyente varias horas antes de poner

a correr las muestras, cubriendo el interior con papel filtro de pliego y cerrándola herméticamente (2).

La placa es puesta dentro de la cuba en ángulo de 30° (13) procurando que el eluente no toque el origen pues disolvería las muestras. Se deja ascender el eluente a la altura dada lo que tarda varios minutos. Transcurrido el tiempo de desarrollo, se abre la cámara y se marca el frente del solvente. Para evaporar el disolvente se usó una secadora manual de pelo como fuente de aire caliente y seco. Enseguida, la placa se expone a los vapores de yodo, que harán visibles las muestras corridas en el cromatograma. Las manchas desaparecen al cabo de un rato porque el yodo se volatiliza y es necesario marcarlas inmediatamente después de el revelado (6).

Cuando las manchas yodadas han desaparecido, el cromatograma se rocía con el revelador correspondiente, en cantidad tal que la superficie se humedezca en forma homogénea, (si la mezcla es corrosiva o produce vapores irritantes, el revelado debe hacerse en una cam-

pana de extracción de gases), y así dejar secar la placa a temperatura ambiente hasta que aparezcan las manchas coloreadas.

Lípidos totales. Se aplican las muestras y los estándares de cada fracción lipídica; extracto de lípidos totales, estándares de colesterol, triglicéridos, ácido oléico, ácido palmítico y suero control normal. En seguida se corren las muestras en el solvente I, hasta que se alcancen una altura de 9 cm aproximadamente. Se retira la placa de la cámara dejando que se evapore el solvente; finalmente se expone la placa al solvente II dejando que corra hasta el tope. Se deja secar al aire y se revela con yodo y sulfato de amonio.

Colesterol. Se aplica la muestra, el extracto de colesterol, el estándar de colesterol y el suero control normal. Se dejan correr por el eluyente hasta el tope; luego el cromatograma se retira de la cuba y se deja evaporar el solvente. Se revela con yodo y luego con el reactivo de Liebermann Buchard.

Triglicéridos. La placa que contiene el extracto de triglicéridos, el estándar y el suero control normal, se desarrolla en el eluente y se revela con yodo y rodamina B (examinada en luz UV).

Fosfolípidos. Se aplica la muestra de los fosfolípidos y el estándar; se desarrolla el cromatograma en la cuba, se deja secar y se revela con yodo y ninhidrina.

Acidos grasos libres. La placa se prepara aplicando la muestra y los estándares de ácido oléico y palmítico. Se expone al solvente y se deja subir hasta el tope, se deja secar y se revela con yodo y sulfato de amonio.

R E S U L T A D O S

Para caracterizar cada compuesto se tiene: el valor del R_f , el revelador específico y la comparación con el estándar.

El colesterol se caracterizó por medio del reactivo de Liebermann-Buchard, apareciendo una coloración rosa violeta tanto el estándar como el extracto. El R_f teórico coincide con el obtenido experimentalmente en la placa de lípidos totales (tabla I), así como en la cromatografía de las fracciones lípidas (tabla II) el valor de R_f del estándar coincide con el del extracto.

Los fosfolípidos se identificaron tomando en cuenta los grupos amino que fueron detectados por la ninhidrina (prueba específica), por lo que el extracto y el suero control normal aparecieron como manchas rosas en fondo blanco. En la placa de los lípidos totales se caracterizaron con el valor del Rf teórico y experimental.

Los triglicéridos se identificaron comparando el valor de los Rf del estándar y del extracto resultando ser muy aproximados.

Los estándares de ácido palmítico y oléico sirvieron para caracterizar a los ácidos grasos, tomándose en cuenta los valores de los Rf y comparándose con el del extracto, resultando ser muy semejantes.

Los ésteres del colesterol se caracterizaron con el suero control normal como estándar, en la placa de lípidos totales, encontrándose en la bibliografía revisada (10, 13) que los ésteres del colesterol suben a la parte más alta del cromatograma, con respecto a los

demás lípidos.

A continuación se presentan las estructuras químicas de cada uno de los lípidos estudiados, así como también las tablas y los cromatogramas obtenidos.

LIPIDOS TOTALES

EC	0			0	0	0	0	0			0		
T	0		0	0	0	0	0	0	0		0		
AG			0	0	0	0	0	0		0			
C	0	0		0	0	0	0	0			0	0	
F	0	0		0	0	0	0	0			0	0	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	4	3	2	1

Figura 1.

EC = Esteres del Colesterol, T = Triglicéridos, AG =
 Acidos Grasos, C = Colesterol, F = Fosfolípidos.

1 = Estándar de Colesterol, 2 = Suero Control Normal,
 3 = Estándar de Acido Oléico, 4 = Estándar de Triglicéridos,
 5 - 9 = Extracto de Lípidos Totales.

COLESTEROL

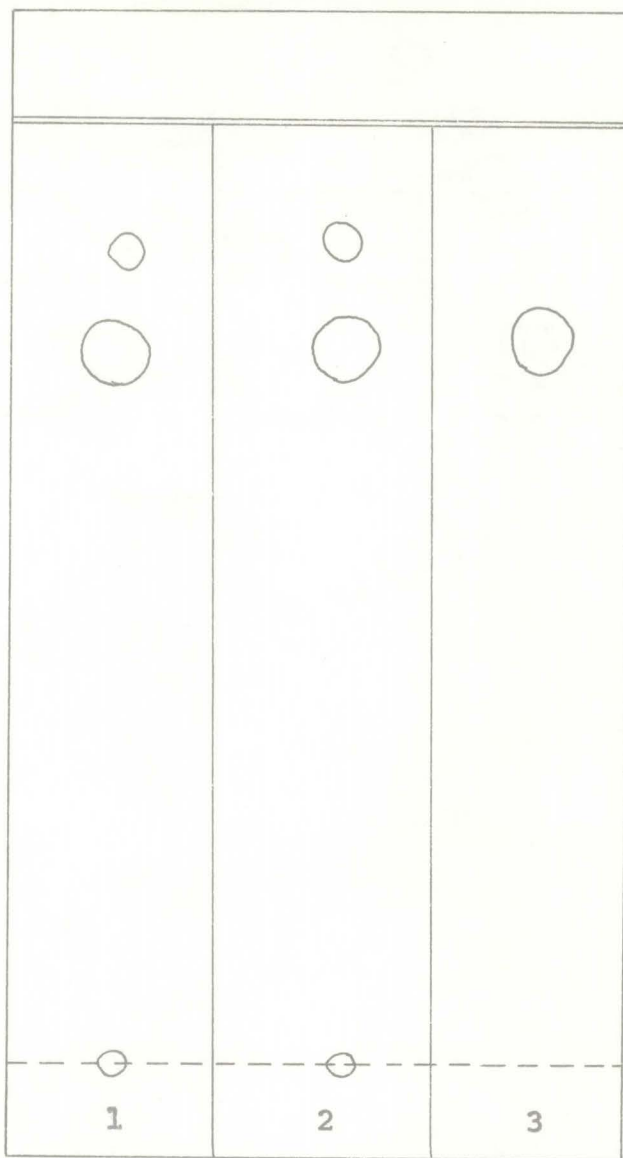


Figura 2.

1 = Suero Control Normal, 2 = Extracto de Colesterol,
3 = Estándar de Colesterol.

FOSFOLIPIDOS

FOSFOLIPIDOS					
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
1	2	3	4	5	1

Figura 3.

1 = Suero Control Normal, 2 - 5 = Extracto de Fosfolipidos.

TRIGLICERIDOS

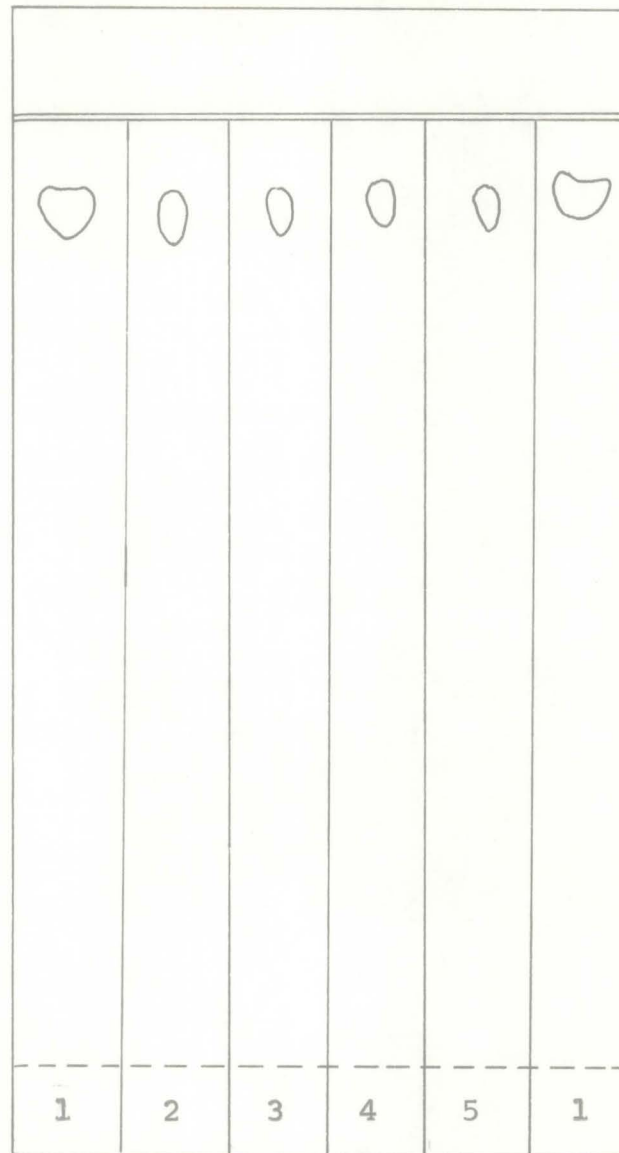


Figura 4.

1 = Estándar de Triglicéridos, 2 - 5 = Extracto de Triglicéridos.

ACIDOS GRASOS

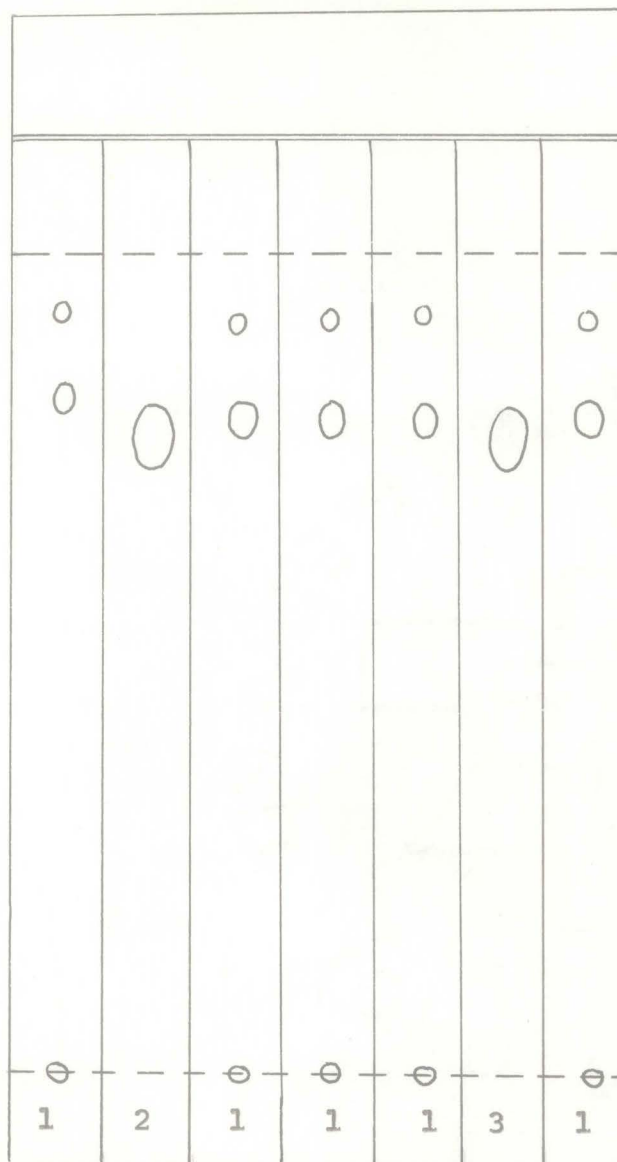
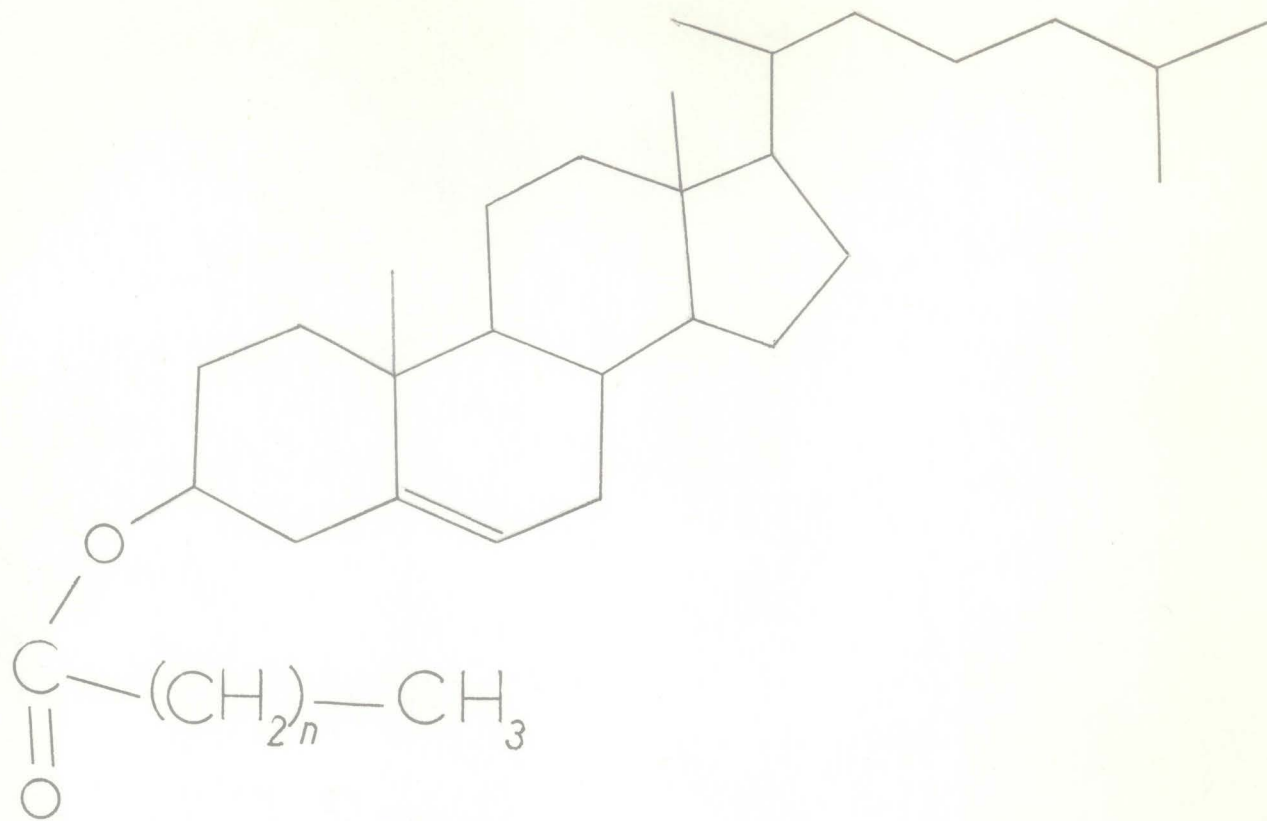
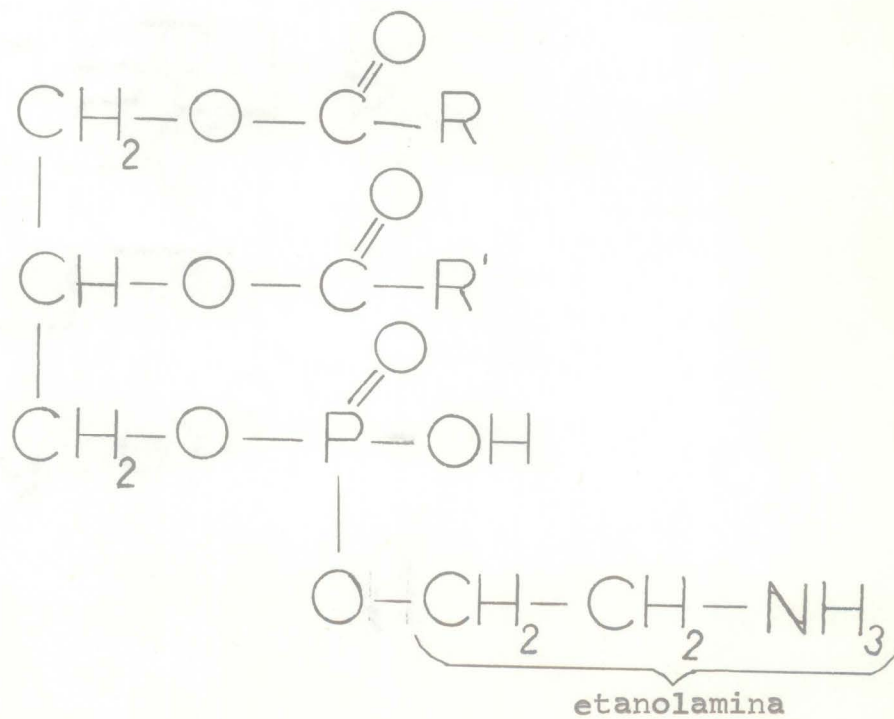


Figura 5.

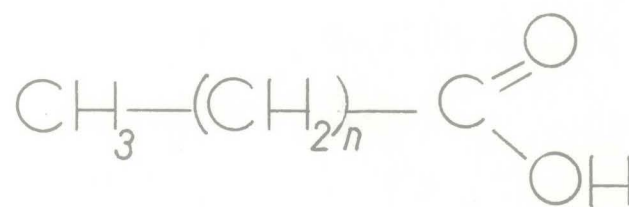
1 = Extracto de Acidos Grasos, 2 = Estándar de Acido Oléico, 3 = Estándar de Acido Palmítico.



Ester del Colesterol



Fosfolípido



Acido graso libre

TABLA I CROMATOGRAFIA DE LIPIDOS TOTALES

Solvente I: dietil éter-ác. acético-éter de petróleo (100:3:97)			
Solvente II: dietil éter-éter de petróleo (3:97)			
Placa 20 x 20	Tiempo = 45'	T = 26° C	Espesor = 0.2 mm
Rf x 100			
Fracción lipida	Estándar	Extracto	Teórico
Colesterol	37	40	40
Fosfolípidos	0	0	0
Acidos grasos	66	64	-
Triglicéridos	42	45	-
Esteres del Colesterol	72	72	87

TABLA II CROMATOGRAFIA DE LAS FRACCIONES LIPIDAS.

Placas 20 x 10	Espesor = 0.2 mm		Rf x 100		
	Extracto	Solvente	Proporción	Std	Ext.
Colesterol	Cloroformo- etanol	80 : 20	80	80	77
Fosfolípidos	Cloroformo- metanol-ác. acético-agua	25:15:4:2	66	64	70*
Acidos Grasos	Cloroformo etanol	65 : 35	74	77	-
Triglicéridos	Eter de pe- tróleo-ác. acético.	85 : 15	83	84	-

* Fosfatidiletanolamina.

D I S C U S I O N

El resultado primordial de éste método cromatográfico es la separación e identificación de los lípidos del suero de una forma rápida y sencilla.

Los lípidos son separados en virtud de su diferente polaridad, la cual depende de los grupos funcionales del compuesto y de su localización en la molécula. Conociendo la naturaleza polar de los lípidos se debe elegir el eluyente más apropiado. En la cromatografía de lípidos totales (fig. 1) el primer sistema separó al colesterol y a los ácidos grasos. El segun-

do sistema resolvió los triglicéridos y los ésteres del colesterol; los fosfolípidos permanecieron en el origen pues requieren de una mezcla muy polar. Esto se explica porque las sustancias menos polares obtienen un valor de R_f más alto con solventes de baja polaridad. La resolución del cromatograma dependerá de la composición del eluyente, por ejemplo: si un lípido neutro como los triglicéridos se desarrollan en un solvente no polar como el éter de petróleo, serán llevados al frente del disolvente dando un R_f muy alto; por lo que es necesario añadir un solvente polar como el ácido acético para eliminar éste efecto.

La cromatografía en capa delgada presenta algunas discrepancias en los valores del R_f debido a cambios en las condiciones ambientales, como la temperatura y humedad relativa, cambios mecánicos, variaciones en la sílica y espesor de la capa; por lo que deben llegar a estandarizarse todas éstas variables para realizar una buena caracterización. Como el valor del R_f no es una prueba definitiva de identificación, el uso de una sustancia patrón, y el reactivo cromógeno son de

gran ayuda.

El método cromatográfico es muy útil en el diagnóstico clínico debido a que puede proporcionar relaciones cualitativas y cuantitativas de la mayoría de los metabolitos presentes en los líquidos corporales.

R E S U M E N

Este procedimiento es recomendado para separación y cuantificación; consta de cuatro pasos:

- 1) Preparación de las placas.
- 2) Aplicación de las muestras.
- 3) Desarrollo de la cromatografía.
- 4) Identificación de las sustancias.

Por sus ventajas ha sido usado para la separación y caracterización de las fracciones lípidas del suero sanguíneo humano.

Placa 20 x 10		T = 26 ° C		Espesor = 0.2 mm	
Fracción Lípida	Eluente	Mezcla Extractora	Reactivo Revelador	Tiempo de Desarrollo	
Colesterol	Cloroformo- etanol	KOH alcohol éter de pe- tróleo	Liebermann Buchard	38'	
Fosfolípidos	Cloroformo- metanol-ác. acético-agua	Alcohol-éter (3:1)	Ninhidrina	90'	
Triglicéridos	Eter de Pe- tróleo-ác. acético	Heptano-iso- propanol-H ₂ SO ₄ 0.08 N	Rodamina B	55'	
Acidos Grasos	Cloroformo- etanol	Isopropanol- Hexano-H ₂ SO ₄ 1 N	Bisulfato de Amonio 20%	60'	
Lípidos Totales*	Solvente I Solvente II	Alcohol-éter (3:1)	Bisulfato de Amonio 20%	13' 30'	

* Placa 20 x 20

Serie Mixotrópica de solventes de acuerdo
a Hecker. (15)

Soluciones salinas (Buffers)	Etil acetato
Acidos inorgánicos	Metil etil cetona
Agua	Dietil éter
Acido láctico	Cloruro de metileno
Formamida	Tetracloroetano
Morfolina	Cloroformo
Acido fórmico	Dicloroetano
Nitrometano	Benceno
Acetonitrilo	Tolueno
Acido acético	Tetracloruro de carbono
Metanol	Disulfuro de carbono
Etanol	Ciclopentano
Fenol	Ciclohexano
Anilina	Trimetilpentano
Acetona	Heptano
Dioxano	Hexano
Tetrahidrofurano	Parafina líquida.
Piridina	

B I B L I O G R A F I A

- (1) Ackermann, Bauer y Toro, CLINICAL LABORATORY METHODS. St. Louis Missouri, the C. V. Mosby, 1974.
- (2) Barclay and Skipski, GENERAL ANALYTICAL METHODS.
- (3) Colowick and Kaplan, METHODS OF ENZIMOLOGY. Volumen III.
- (4) Domínguez S. Jorge A., CROMATOGRAFIA EN PAPEL Y EN CAPA DELGADA. I. T. E. S. M. , Monterrey N. L. 1975.

- (5) Journal of Chromatography, 73 (1972) 303.
- (6) J. of Chrom., 80 (1973) 133.
- (7) J. of Chrom., 17 (1965) 513.
- (8) J. of Chrom., 17 (1965) 278.
- (9) J. of Chrom., 32 (1968) 587.
- (10) J. of Chrom., 90 (1974) 365. 800459
- (11) J. of Chrom., 23 (1966) 480.
- (12) J. of Chrom., 51 (1970) 545.
- (13) J. of Chrom., 14 (1964) 301.
- (14) Mazur, Harrow, BIOQUIMICA BASICA. México D. F.
Editorial Interamericana. 1973.
- (15) Merck E., CHROMATOGRAPHY. Alemania, 1968.
- (16) Merck E., REACTIVOS DE COLORACION PARA CROMATO-
GRAFIA EN CAPA FINA Y EN PAPEL. Darmstadt (Rep.
F. de Alemania).
- (17) Peckson, Robert L. y Donald Shields, METODOS MO-
DERNOS DE ANALISIS QUIMICOS. Ed. Limusa, México
D. F., 1973.
- (18) Stahl, Egon, A THIN LAYER CHROMATOGRAPHY LABORATO-
RY HANDBOOK. New York, Academic Press Inc., 1965.