

GLICERIDOS DE SUERO I METODOS DE VALORACION*

Dres. CARLOS PASCUAL MOSTAZA y AUGUSTO COROMINAS VILARDELL

Queridos colegas:

He de presentar —y me honro en hacerlo— a dos esforzados investigadores de la cátedra del profesor Máximo Soriano, que trabajan perseverantemente en el Departamento de Bioquímica.

El segundo, ya ha disertado en esta noble Casa, para iniciar la exposición de sus curiosas pesquisas en torno de los lípidos, pesquisas que viene tutelando "in partibus" nuestro "Fondo Ramón Turró".

También ha sabido ofrecernos una gran Memoria, que optaba al Premio "Anales de Medicina y Cirugía" y que fue calificada de "laudable". Dicha Memoria acaba de publicarse en Anales.

Hoy no puede asistir materialmente a la sesión, porque una osteomielitis de fémur, muy pertinaz, le retiene en cama lejos de Barcelona.

Y el primero integra, con otros, el equipo de Corominas. Su modestia y su timidez son tan grandes, que no se decide a ocupar esta tribuna bicentenaria. Pero su valía es de las que confortan el ánimo.

En nombre de los dos resumiré, muy brevemente, la comunicación. Aunque el original aparezca, luego, íntegro en las páginas de la revista aludida.

B. Rodríguez Arias

1. Objeto del trabajo

Este trabajo tiene por objeto presentar una revisión de los métodos de estudio de los glicéridos. En un trabajo posterior, se considerará nuestra experiencia personal sobre el método de EGGSTEIN.

Los glicéridos son lípidos de una gran importancia bioquímica. Se ingieren con la alimentación, en la luz intestinal se hidrolizan por la acción de lipasas, verificándose nueva resíntesis en las células de la mucosa. Por vía linfática pasan a la circulación en

forma de quilomicrones; éstos pueden encontrarse en la sangre unas horas después de las comidas, en condiciones normales, especialmente si éstas han sido grasas. Fuera del período posprandial los glicéridos circulan unidos a la Beta lipoproteína y la Alfa lipoproteína.

Los glicéridos se encuentran localizados especialmente en tejido adiposo, donde, junto con los ácidos grasos libres, constituyen el eje fundamental de las reacciones de lipogenesis y lipolisis.

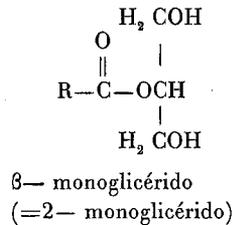
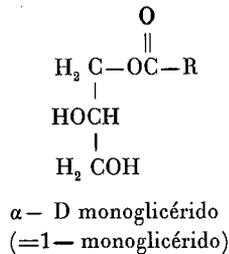
* Comunicación leída en la Sesión del día 2-VII-70. Presentación del Académico Numerario doctor B. Rodríguez Arias.

2. Glicéridos

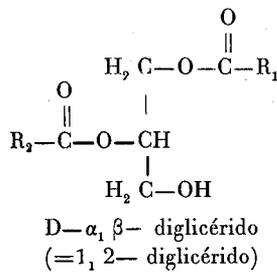
Denominamos glicéridos, los lípidos resultantes de la esterificación del glicerol con ácidos grasos. Según el número de grupos alcohólicos esterificados, de la molécula del glicerol, los glicéridos se clasifican en:

- Monoglicéridos
- Diglicéridos
- Triglicéridos

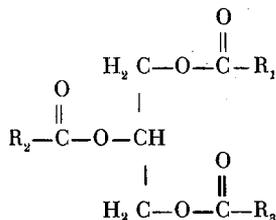
Monoglicéridos. — La molécula del glicerol está esterificada por un solo ácido graso, pudiendo ocupar las posiciones Alfa y Beta, también denominados 1 y 2 respectivamente.



Diglicéridos. — La molécula de glicerol está esterificada por dos ácidos grasos, pudiendo ser iguales o distintos.



Triglicéridos. — La molécula del glicerol está esterificada por tres ácidos grasos.

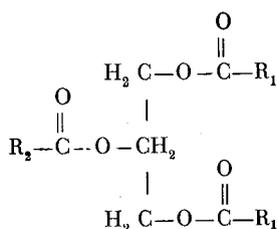


Los ácidos grasos que forman parte de la molécula de los glicéridos y triglicéridos pueden ser iguales o distintos, dando origen a:

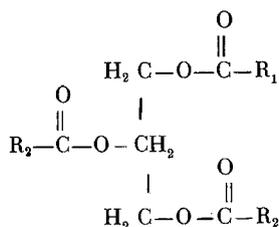
- Glicéridos simples
- Glicéridos mixtos

Los ácidos grasos de la molécula de los triglicéridos mixtos, cuando dos de los ácidos grasos son iguales, pueden adoptar una posición simétrica o asimétrica en la molécula, dando origen a:

- Triglicéridos mixtos simétricos
- Triglicéridos mixtos asimétricos



Triglicérido simétrico



Triglicérido asimétrico

WAREMBOURG, Col. y BERTRAND (Citados por LECOQ) dan los siguientes valores para los ácidos grasos de los glicéridos del suero:

- Ácidos saturados 38 % ± 4
- Ácidos monoinsaturados 45 % ± 5
- Ácido linoleico 14 % ± 3
- Ácido araquidónico 2 % ± 0'7

C. MICHALEC ha separado por cromatografía en capa fina los siguientes triglicéridos del suero.

- Trioleína
- Linoleodioleína.
- Oleodilinoeína
- Trilinoeína

Los monoglicéridos y diglicéridos son componentes minoritarios de los

glicéridos del suero; así el porcentaje del mono y diglicéridos es para J. HIRSCH y Col. tan sólo del 2 % del total de los glicéridos, incluso en el caso de sueros hiperlipémicos; mientras que para A. CARLSON y Col., éstos constituyen entre el 5 % y 10 % del glicerol de glicérido.

3. Clasificación de los métodos para análisis de Glicéridos

Para efectuar un estudio completo de la molécula de los glicéridos, necesitamos efectuar el análisis cuantitativo y estructural de los mismos. Los glicéridos pueden ser valorados indirectamente, por diferencia entre los lípidos totales y los demás parámetros lipídicos mayoritarios, o encaminados

directamente el análisis a su molécula o bien a alguna de sus partes: glicerol, unión éster o ácidos grasos.

Basándonos en estos criterios hemos clasificado los métodos de valoración de glicéridos de la siguiente forma:

- A. Métodos indirectos
- B. Métodos basados en la valoración del glicerol.
- C. Métodos basados en la valoración de los ácidos grasos de la molécula de los glicéridos.
- D. Métodos basados en la determinación de las uniones éster.
- E. Métodos que valoran toda la molécula de los glicéridos.

En la mayoría de los procedimientos se cuantifican los glicéridos, mientras que con otros se establece su estructura (espectrometría de masas).

Seguidamente pasamos a efectuar un breve estudio de los métodos expuestos anteriormente.

A. Métodos indirectos. — Dos son los métodos indirectos más empleados en la determinación de glicéridos.

a) El primero de éstos calcula los glicéridos por diferencia entre los lípidos totales y los demás parámetros lipídicos mayoritarios. Esquemáticamente lo podemos presentar así:

Glicéridos = [Lípidos totales] — [(Fosfolípidos) + (Colesterol libre) + (Colesterol esterificado).]

Teniendo en cuenta que la relación molar entre los ácidos grasos que esterifican la molécula del colesterol y la del éster es de 1'67 y que el valor del fósforo lipídico multiplicado por 25 nos da el valor de los fosfolípidos, la

expresión anterior podemos transformarla en la siguiente: mg. de glicéridos/100 ml = [mg. de lípidos totales por 100 ml.] — [(25 × mg. de P lipídico/100 ml.) + (mg. Colesterol libre/100 ml.) + (1'67 mg. ester de colesterol, expresados como colesterol libre/100 ml.).]

b) En este procedimiento se acude al cálculo de los glicéridos mediante la determinación de los ácidos grasos totales y los esterificados de cada fracción lipídica.

Ácidos grasos de glicéridos = [(Ac. grasos totales) — [(Ac. grasos de fosfolípidos) + (Ac. grasos de colesterol)].

El cálculo de los ácidos grasos de los fosfolípidos se efectúa mediante factores de transformación. Para los ácidos grasos de los fosfolípidos J. G. REINHOLD y col., han adoptado al factor usado por P. MASON y PETERS; éstos efectúan el cálculo multiplicando por 0,58 el valor del fósforo lipídico; en él se tiene en cuenta la presencia de Esfingomielina, que representa un 10 % del fósforo total; este fosfolípido tan sólo contiene un miliequivalente de ácido graso por mol de fósforo. (En los demás fosfolípidos la relación es de dos miliequivalente de ácido graso por mol de fósforo).

Se obtiene el valor de los ácidos grasos esterificados al colesterol, multiplicando el valor del colesterol esterificado por 0,075; este factor lleva incluida la corrección correspondiente a la incompleta reacción de los ácidos grasos de mayor número de átomos de carbono esterificado al Colesterol.

Entre las principales causas de error de los métodos indirectos enumeramos los siguientes:

α) Los factores de transformación que se utilizan son valores promedio, que no pueden ser aplicables a todas las muestras.

β) Los errores que se cometen, tanto los propios de la técnica como los de trabajo, en la determinación de los distintos componentes lipídicos.

γ) Se calculan tan sólo las fracciones lipídicas mayoritarias, no incluyéndose en la valoración otras, como los Glucolípidos y ácidos grasos libres que pueden tener aumentos de importancia en determinadas enfermedades.

B) METODOS BASADOS EN LA DETERMINACION DEL GLICEROL

La clasificación de estos métodos se hace con arreglo al procedimiento final utilizado en la valoración del glicerol, procedente de la hidrólisis de los glicéridos.

Los dividimos en tres grupos:

- a) Colorimétricos.
- b) Fluorimétricos.
- c) Enzimáticos.

a) Métodos Colorimétricos. — Hasta 1956 los glicéridos eran valorados por métodos indirectos o por técnicas cromatográficas, pero en este año CARLSON y col. dieron el fundamento de un nuevo método para su valoración. En 1957 VAN HANDEL y ZIL-

VERS MIT describieron de forma detallada un procedimiento para la valoración de glicéridos con análogo fundamento al de CARLSON y col.

El método CARLSON valora los glicéridos tras ser eliminados los fosfolípidos por cromatografía en columna de ácido silícico. El método comprende las siguientes fases: α) Extracción de los lípidos. β) Separación de los fosfolípidos mediante cromatografía de ácido silícico. γ) Saponificación de los glicéridos. δ) Extracción de los ácidos grasos. ε) Extracción del glicerol de glicéridos. ζ) Valoración de éste por el método de Lambert y Neish modificado (los autores usan la reacción del ácido cromotrópico).

La técnica propuesta por VAN HANDEL y ZILVERSMIT difiere de la anterior fundamentalmente en: α) VAN HANDEL y ZILVERSMIT no realizan una previa extracción de los lípidos. CARLSON realiza una extracción previa, para poder valorar los demás componentes lipídicos.

β) La extracción con Duocil (una Zeolita) de los fosfolípidos utilizada en el método de VAN HANDEL y ZILVERSMIT es más rápida que la cromatográfica en columna de ácido silícico.

γ) CARLSON hace seguir todo el proceso de valoración a la prueba en blanco. mientras que VAN HANDEL y ZILVERSMIT no la someten al proceso de saponificación, alegando que los esteroides y los monoglicéridos son susceptibles de engendrar formaldehído que falsearía los resultados.

δ) VAN HANDEL y ZILVERSMIT no extraen los ácidos grasos que según el

criterio de CARLSON interfieren en la reacción.

Ambas técnicas han sido objeto de gran número de modificaciones, con diferentes fines y resultados. Fundamentalmente, estas modificaciones, se encaminan a la simplificación, aumento de sensibilidad y disminución de la cantidad de suero necesario.

b) Métodos Fluorimétricos. — En el año 1966 KESSLER y LEDEVER (citados por FLETCHER Ms.) describieron un método de valoración de glicéridos por fluorimetría. La reacción por ellos empleada se basa en la condensación de HANTZCH; éste observó que al reaccionar una dicetona, una amina y un aldehído se obtenía un producto que podía ser medido fluorimétricamente. La técnica descrita por KESSLER y LEDEVER comprende las siguientes fases: α) Extracción con alcohol isopropílico de los lípidos. β) Separación de los fosfolípidos de Duocil. γ) Saponificación del glicerol de glicérido. δ) Oxidación del glicerol de glicérido a formaldehído. ε) Condensación del formaldehído con diacetona y amoníaco (condensación de HANTZCH) para formar 3 - 5 diacetil-1, 4 dihidrolutidina, este compuesto se determina fluorimétricamente.

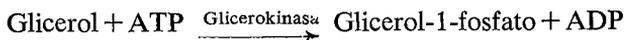
La condensación de HANTZCH ha sido adaptada por NASH para que el producto final pueda ser determinado colorimétricamente. Esta adaptación colorimétrica ha sido utilizada por diversos autores, algunos de los cuales se citan en la bibliografía.

c) Método enzimático. — EGGS-TEIN y KREUS desarrollaron una técnica enzimática para la determinación del glicerol de glicérido, con objeto de valorar pequeñas variaciones en los niveles de glicéridos sanguíneos.

Esta técnica, que también puede ser aplicada a extractos de tejidos, comprende los siguientes pasos: α) Determinación del glicerol libre. β) Saponificación de la muestra. γ) Determinación del glicerol de glicérido en el saponificado.

El glicerol libre del suero y el glicerol de glicérido (éste es convertido en glicerol libre en el proceso de la sanopificación), son determinados mediante una reacción enzimática que se desarrolla en tres fases:

α) Reacción principal: En ella el glicerol reacciona con Adenosintrifosfato dando glicerol - 1 - fosfato y adenosindifosfato; esta reacción está catalizada por la gliceroquinasa.

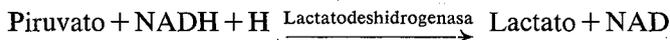


β) Reacción coadjuvante: El adenosindifosfato formado en la reacción anterior, reacciona con el fosfoenolpiru-

vato, en presencia de la piruvatokinasa, dando piruvato y regenerándose adenosintrifosfato.



γ) Reacción indicadora: El piruvato formado en el proceso anterior reacciona con el nicotinamido-adenosin dinucleótico reducido para dar Lactato y nicotinamido-adenosin-dinucleótico, la reacción es catalizada por la Lactato-deshidrogenasa.



El proceso transcurre mol a mol, por tanto por cada mol de NADH_2 que pase a NAD , habrá reaccionado un mol de glicerol. Si medimos la cantidad de NAD producida por espectrofotometría, podemos conocer la cantidad de glicerol; tanto el libre (si no hemos practicado hidrólisis previa) como el procedente de los glicéridos (si se ha sometido la muestra a hidrólisis). De este último se deducen los glicéridos presentes en la muestra analizada.

En el proceso de hidrólisis también son saponificados los fosfolípidos, pero éstos como producto final dan Glicerol-1-Fosfato, que es parcialmente transformado en Glicerol - 2 - fosfato, que no interfieren en la reacción.

La técnica de determinación del glicerol en tres fases no es específica de esta substancia, sino que otras, tales como la diacetona y el L-Gliceraldehído también la dan; no obstante, estas substancias no se presentan en la sangre.

El método que hemos descrito es el utilizado por nuestro laboratorio para la valoración de los glicéridos y que será objeto de un trabajo posterior.

C) Métodos basados en la valoración de los ácidos grasos de la molécula de los glicéridos.

Estos métodos precisan una separación previa de los glicéridos por cro-

matografía. Posteriormente se eluyen y valoran los ácidos grasos de los mismos.

La reacción que es empleada, más generalmente, para la valoración de los ácidos grasos se funda en una observación de FEIGL y col. sobre el comportamiento de los esteres y aldehidos al reaccionar con hidroxilamina; esta reacción da lugar a los ácidos hidroxiamínicos, que en presencia de iones férricos dan una coloración amarilla, ésta por seguir la ley de BEER, sirve para su valoración. Para el cálculo de los glicéridos se tendrá en cuenta si son mono, di o triglicéridos ya que darán 1, 2 o 3 mols. de ácido graso respectivamente.

D) Métodos basados en la determinación de enlaces ester.

a) Espectrofotometría infrarroja. Los glicéridos pueden ser analizados por este procedimiento en términos de frecuencias de absorción de los esteres carbonílicos.

El procedimiento implica una separación cuantitativa previa de los glicéridos, éstos una vez separados se disuelven en Sulfuro o Tetracloruro de Carbono y se efectúan las correspondientes determinaciones en la región del infrarrojo.

Por este procedimiento la molécula de los glicéridos no es destruida, lo

cual representa una ventaja dado que se puede seguir operando con ella.

Al trabajar en espectrofotometría infrarroja es necesario tener en cuenta la pureza de los reactivos, éstos han de tener pureza analítica, someterse a redestilación y proceder a la comprobación de su espectro de absorción al infrarrojo de sus soluciones.

Teniendo en cuenta que la separación de los glicéridos se efectúa en una primera fase por cromatografía de capa fina o por columna y en una fase posterior por cromatografía de gases, las técnicas de espectrofotometría al infrarrojo han sido relegadas a la identificación de las distintas fracciones de los glicéridos.

b) Espectrometría de masas. — La espectrometría de masas es aplicada para el análisis estructural de los glicéridos.

Estos pueden ser introducidos directamente en el espectrógrafo o lo que es más frecuente se hace pasar la muestra por un cromatógrafo de gases y a la salida las muestras son analizadas por un espectrógrafo de masas, consiguiéndose así la separación de los distintos glicéridos y el análisis estructural de su molécula.

Estas técnicas presentan grandes ventajas, sobre las que podríamos denominar técnicas clásicas de análisis de glicéridos, pues éstas tan sólo valoran los glicéridos pero no identifican su estructura. Para investigar los ácidos grasos que integran la molécula de los mismos es necesario, por los procedimientos clásicos, efectuar una hidrólisis química o enzimática seguida

de la esterificación con grupo metilo de los ácidos grasos resultantes y posterior análisis con el cromatógrafo de gases; no obstante este procedimiento no soluciona, salvo en determinados casos, el problema de los isómeros, que es resuelto en la mayoría de ellos por el espectrómetro de masas. El ahorro de tiempo y material de este aparato es importante, aunque su precio es elevado. En el momento actual esta técnica no se aplica de forma rutinaria, al estudio de glicéridos.

E. METODOS QUE VALORAN TODA LA MOLECULA DE LOS GLICERIDOS

En este apartado incluimos los procedimientos cromatográficos.

- a) Cromatografía en columna
- b) Cromatografía en capa fina
- c) Cromatografía de gases

Los procedimientos cromatográficos, al no destruir la molécula, nos permiten la separación de los distintos tipos de glicéridos y su posterior análisis cuantitativo y también su análisis estructural (espectrometría de masas). Es muy frecuente que se empleen dos tipos de cromatografía en un mismo análisis, así citaremos por ejemplo, el análisis de los ácidos grasos de los glicéridos, empleando cromatografía en capa fina y cromatografía de gases. Con la cromatografía en capa fina se separan los glicéridos, éstos son sometidos a hidrólisis, química o enzimática y los ácidos grasos resultantes, una vez sometidos al proceso de esterificación me-

tílica, son cromatografiados en fase gaseosa.

a) *Cromatografía en columna.* — De los distintos tipos de sustancias de relleno, para cromatografiar glicéridos, la que hasta el momento presente ha sido más empleada es el ácido silícico; con ella se obtienen excelentes resultados para el fraccionamiento de lípidos séricos. A CARLSON y col. emplearon la columna de ácido silícico para separar los glicéridos de los fosfolípidos; éstos cromatografían el extracto lipídico del suero y tras elución con cloroformo separan los glicéridos, que son arrastrados, de los fosfolípidos, los cuales son retenidos; aquéllos son valorados por el procedimiento que se describió en el apartado correspondiente.

En el año 1959 HIRSCH y col. publicaron un trabajo en el cual explican detalladamente la metódica a seguir para el fraccionamiento de los lípidos séricos por cromatografía en columna de ácido silícico. Estos autores acoplan a la columna un colector de fracciones y proceden a la elución del extracto de los lípidos séricos con una mezcla formada por éter etílico y éter de petróleo en volúmenes y concentraciones crecientes. Usando este eluyente separaron las siguientes fracciones:

- I y II: Carótenos
- III: Esteres de colesterol
- IV: Triglicéridos y ácidos grasos no esterificados
- V: Colesterol libre

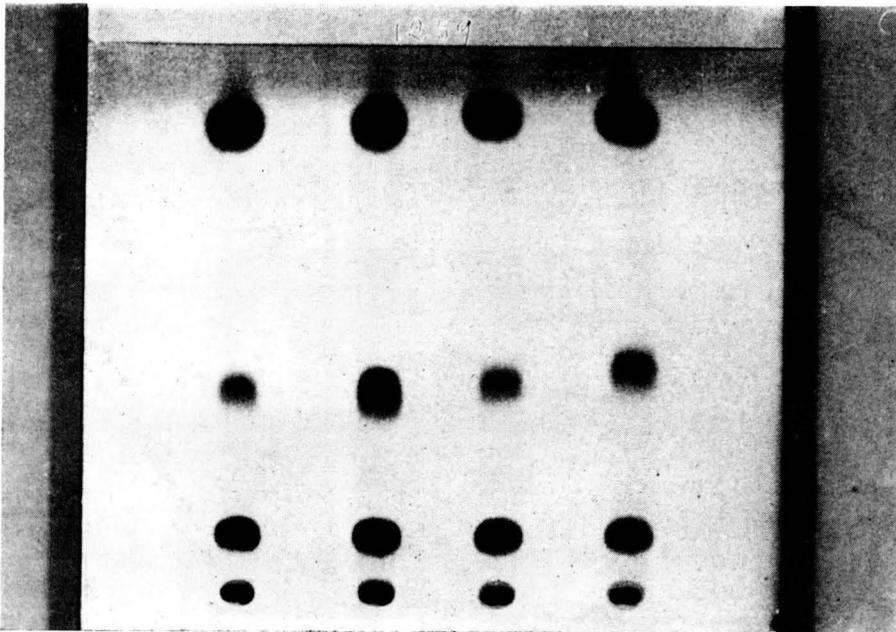


Figura 1. — Cromatografía en Capa Fina de Lípidos Neutros. Soporte: Silicagel G. Eluyente: Cloroformo-Benceno (3:2). De arriba abajo se separan las siguientes fracciones: Esteres de Colesterol, Triglicéridos, Colesterol libre y Fosfolípidos.

Finalmente empleando como eluyente el metanol, separaron la fracción VIII: Fosfolípidos

Los mismos autores efectuaron determinaciones con plasma hiperlipémico, después de la inyección de heparina; en éste consiguieron separar las siguientes fracciones:

- Esteres de colesterol.
- Triglicéridos.
- Ácidos grasos no esterificados.
- Colesterol libre.
- Diglicéridos.
- Monoglicéridos.

En este plasma hiperlipémico la proporción de mono y diglicéridos tan sólo representa un 2 % del total de la fracción glicéridos.

Podemos afirmar que la cromatografía en columna de ácido silícico es un método excelente para el fraccionamiento de los lípidos, presentando la ventaja sobre la cromatografía en capa fina de que con ella podemos fraccionar cantidades considerables de extracto lipídico. La cromatografía en columna es fundamentalmente preparativa.

b) Cromatografía en capa fina. — Mediante cromatografía en capa fina pueden separarse las distintas clases de lípidos. Se opera efectuando la extracción de los lípidos (método de FOLCH) de la muestra a analizar y cromatografiando seguidamente el extracto lipídico.

Para la cromatografía de los lípidos neutros, se emplean placas de silicagel G. Se depositan de 10 a 30 landas a un cm. de uno de los bordes; una vez

evaporado el disolvente la placa es situada en la cámara de desarrollo, la cual contiene unos 100 cm³ de una mezcla cloroformo-benzeno (3 - 2). Se espera que el frente del disolvente recorra 15 cm. y se seca a continuación la placa a 70° durante 15 minutos. Posteriormente se pulveriza con solución alcohólica de ácido fosfomolibdico al 10 % calentándose seguidamente.

Mediante este procedimiento se separan de arriba abajo las siguientes fracciones: (Fig. 1)

- Esteres de colesterol
- Triglicéridos
- Colesterol libre
- Ácidos grasos libres
- Fosfolípidos.

Pueden también usarse como solvente una mezcla formada por éter etílico, éter de petróleo y ácido acético (10:90:1) Recorrido 15 minutos.

Con esta mezcla se separan de arriba a abajo las siguientes fracciones:

- Esteres de colesterol
- Triglicéridos
- Ácidos grasos libres
- Colesterol
- Mono y diglicéridos
- Fosfolípidos.

Pueden separarse los triglicéridos entre sí con cromatografía sobre placas impregnadas con nitrato de plata; para preparar las placas en lugar de mezclar el silicagel con agua se mezcla con una solución acuosa de nitrato de plata al 12,5 %. Conviene

operar rápidamente y guardar las placas al abrigo de la luz. Como solvente se emplea el benceno puro.

La separación que puede conseguirse según MICHALECH es la de los siguientes triglicéridos:

- Trioleína
- Linoleodioléina
- Oleodilinoleína
- Trilinoleína
- Mezcla de mono y diglicéridos con ácidos grasos.

La cromatografía en capa fina es una técnica excelente para el estudio de los lípidos, de gran valor demostrativo y a nuestro juicio semicuantitativa.

c) Cromatografía de gases. — Por cromatografía de gases podemos efectuar análisis cuantitativos y cualitativos de los glicéridos, asimismo se puede proceder al estudio de los ácidos grasos que forman parte de su molécula.

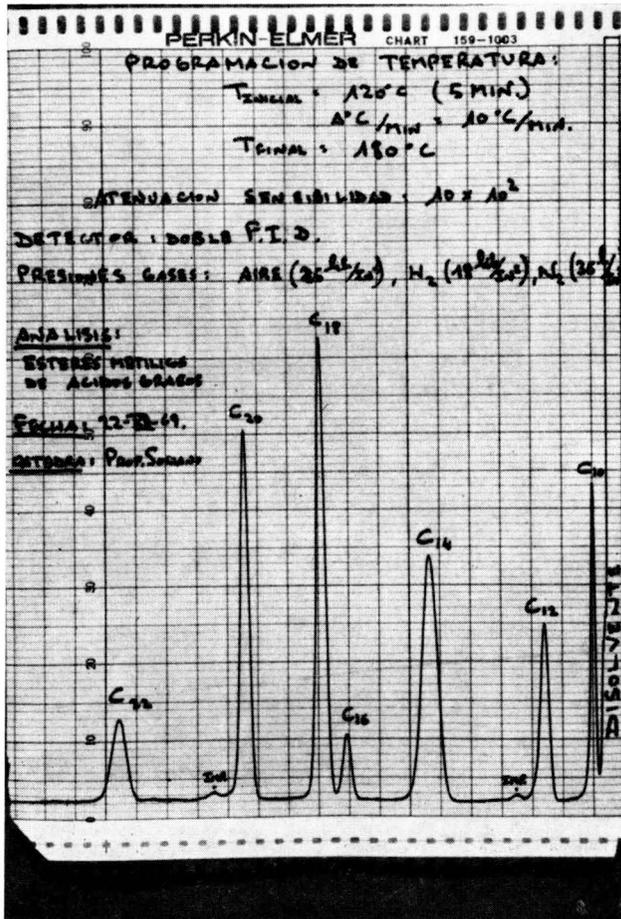


Figura 2. — Cromatografía en Fase Gaseosa de Esteres Metílicos de Acidos Grasos. Programación de Temperatura.

Para aplicar esta técnica es necesario separar los glicéridos de los restantes componentes lipídicos.

Los primeros estudios de glicéridos séricos por cromatografía de gases fueron encaminados al análisis de los ácidos grasos de su molécula. Al hablar de espectrometría de masas se indicó el camino que se sigue para la investigación de los ácidos grasos. El problema de los isómeros apuntados en aquel apartado puede, en ocasiones, ser resuelto. Así cuando se cromatografían ácidos grasos de igual número de átomos de carbono, pero unos son saturados y otros desaturados, es posible su reparación formando derivados de estos últimos; esto se consigue someténdole a una oxidación. Estos derivados al cromatografiarse aparecen separados de los ácidos grasos saturados.

Actualmente se cromatografían los triglicéridos directamente; no así los mono y diglicéridos, los cuales han de someterse a una preparación previa. Esta preparación tiene por objeto convertirlos en derivados más estables o volátiles; de esta forma se obtiene una mayor resolución y su recuperación es más fácil (en los cromatógrafos de investigación existe una derivación a nivel del detector, que permite obtener, además del registro gráfico, cada una de las fracciones que se van separando). Normalmente se acude a la formación de los acil y silil ésteres de mono y diglicéridos para los fines antes señalados.

Generalmente, tanto la identificación de glicéridos como de ácidos grasos se

realiza mediante el empleo de patrones (figura 2).

RESUMEN

Se presenta una revisión de los distintos métodos para la valoración de glicéridos séricos, después de considerar la estructura química de mono, di y triglicéridos del suero.

Se consideran los métodos indirectos de determinación valorando los otros parámetros lipídicos (ésteres de colesterol, colesterol libre y fosfolípidos) y restando estas cifras del valor absoluto de lípidos totales.

Entre los métodos basados en la determinación del glicerol destacamos los colorímetros (CARLSON y VAN HANDEL), fluorimétricos y enzimáticos (EGGSTEIN y KREUS).

Entre los métodos basados en la determinación del enlace ester consideramos la espectrofotometría infrarroja y la espectrometría de masas.

Se presenta un estudio de los métodos cromatográficos (Columna, Capa fina y gases), aplicados al estudio de los glicéridos. Se indica el valor de estas técnicas en el análisis de glicéridos. Se hace referencia a las separaciones logradas por HIRST (columna), MICHALEC (capa fina) y por nuestro laboratorio (capa fina).

SUMMARY

We present a revision of the different methods of valuating seric glycerides, after considering the chemical

structure of mono, di and triglycerides of the serum.

Indirect methods of determination are considered, valuating other lipid parameters (cholesterol esters, free cholesterol and phospholipides) and resting these results from the absolute value of total lipids.

Among the methods based on the determination of glycerol, we stand out the colorimetric (CARLSON and VAN HANDEL), fluorimetric and enzymatic (EGGSTEIN and KREUS).

Among the methods based on the determination of the ester bond we consider the infra-red spectrophotometry and the mass spectrometry.

A study is presented of the chromatographic methods (column, thin layer and gas) applied to the study of glycerides. The value of these techniques in

the analysis of glycerides is indicated and a reference is made of the separations achieved by HIRST (column), MICHALEC (thin layer) and by our laboratory (thin layer).

Discusión. — El prof. A. Pedro Pons (Presidente) lamenta la ausencia, por enfermedad y otra circunstancia fortuita, de los disertantes y agradece al secretario general el resumen que ha hecho del trabajo, del máximo interés hoy día por el valor atribuido a los glicéridos en la patogenia de numerosas dolencias corrientes.

Dar con métodos seguros y no dificultosos en la práctica ordinaria, requiere un sano espíritu de investigador que, afortunadamente, poseen los autores, a quienes felicita por su labor nunca en desmayo.

BIBLIOGRAFIA

- BARBER, M. J.; CHAPMAN, R.; WOLSTENHOLME, W. A.: "Lipid Analysis by Coupled mass Spectrometry Gas Chromatography." *J. Mass Spectrometry and Ion Physics* 1, 98-101, 1968.
- BARBER, M. and MERREN, T. O.: "The Mass Spectrometry of Large Molecules I. The Triglycerides of Straight Chain Fatty Acids." *Tetrahedron Letters*, n.º 18, pp. 1063-67, 1964.
- CARLSON, L. A. and WADSTRÖM, L. B.: "Determination of Glycerides in Blood Serum." *Clin. Chim. Acta* 4, 197, 1959.
- COROMINAS VILARDELL, A.: "Contribución al estudio bioquímico de lípidos." *Lipidurias*. Publicado por el "Institut d'estudis Catalans", 1970.
- EGGSTEIN, M. U.; KREUTZ, F. H.: "Eine neue Bestimmung der Neutrahette in Blutserum und Gewebe." *Klin. Wschr.* 44, 262, 1966.
- FLETCHER, M. S.: "A Colorimetric Method for Estimating Serum Triglycerides." *Clin. Chem. Acta* 22: 393 — 7 nov. 1968.
- HENRY, R. J.: "Química Clínica. Bases y Principios." Vol. II, págs. 1053-61. *Jims*, 1969.
- HIRSCH, J. and AHRENS, E., Jr.: "The Separation of Complex Lipide Mixtures by the Use of Silicic Acid Chromatography." *J. Biol. Chem.* 233 (2), 311-20, 1958.
- KENNETH KRELL and HASHIM SAMI, A.: "Measurement of Serum Triglycerides by Thin-Layer Chromatography and Infrared Spectrophotometry." *J. Lipid Res.* 4, 407-12. Oct., 1963.
- KREUTZ, F. H.: "Enzymatic Determination of Glycerol in the Measurement of Triglycerides." *Clin. Chem.* 9: 492, 1963.
- LECOQ, R.: "Manuel d'Analyses Médicales 2.ª Edition." Págs. 928-940.

- MARINETTI, G. V., "Lipid chromatographic Analysis." Vol. 1. Marcel Dekker. New York. 1967.
- MICHALEC, C.: "Analysis of Cholesteryl Esters and Triglycerides by Thin-Layer Chromatography." *Nature*, 193, 63-64, 1962.
- RANDERATH, H.: "Cromatografía en capa fina." Enciclopedia de la Química Industrial. Ediciones Urmo. Bilbao, 1969.
- REINHOLD, J. G.; YONAN, V. L. y GERSHMAN, E. R.: "Métodos Seleccionados de Seleccionados de Análisis Clínicos. Vol. IV. Págs. 109-28. Aguilar, 1966.
- SCHETTLER, G.: *Lipids and Lipidoses*. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1967.
- SEARCY, R. L.: "Diagnostic Biochemistry. Págs. 517-25. Mc. Graw-Hill Book Company. New York, 1969.
- VAN HANDEL, E. and ZILVERSMIT, P. B.: "Micromethod for the Direct Determination of Serum Triglycerides." *J. Lab. Clin. Med.* 50, 152, 1957.
- VISHWANATH, M. SARDESAI and MANNING, Joan A.: "The Determination of Triglycerides in Plasma and Tissues." *Clin. Chem.*, 14 (2), 157-61, 1968.