

FACULTAD DE MEDICINA. CLINICA B

Prof. M. SORIANO

BARCELONA

**«ESTUDIO DE LOS LIPIDOS HUMORALES Y TISULARES MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA. — I. METODOS CROMATOGRAFICOS» (\*)**

Dr. AUGUSTO COROMINAS VILARDELL (\*\*)

*Quisiera destacar bien el significado académico de tres circunstancias que me han movido a presentaros un disertante joven y un investigador notable y de porvenir.*

*Le ilusionaba obtener el Premio «Anales de Medicina y Cirugía» del Concurso 1969. Su trabajo, de grandísimo valor a juicio de la ponencia dictaminadora y de todos —por unanimidad así— lo superó, no obstante, un ensayo quirúrgico, muy ventajoso en teoría y aplicadamente. Y quedó resuelto estimarla «laudable» y publicarla oficialmente, de acceder a la petición corporativa el, entonces, ignorado firmante del mismo.*

*Dicha Memoria había sido inspirada por el profesor Máximo Soriano, consocio nuestro, representando una aportación —en los dominios de la bioquímica de las miopatías— de suma trascendencia últimamente.*

*Para contribuir a que llevara a feliz término la labor especulativa que viene propugnando, se le ha otorgado una Ayuda con cargo al «Fondo Ramón Turró de Ayuda a la Investigación médico-biológica».*

*Lo que va a exponernos al instante es uno de los resultados preliminares de su nuevo estudio de laboratorio.*

*Oigámosle, pues, con atención y benevolencia.*

*Pero es hijo, además, de un Académico Corresponsal Nacional radicado en Bañolas (Gerona).*

*No defraudará —estoy seguro— el deseo de tutela de la investigación científica que bulle en la Academia.*

*Y me lanzo, desde ahora, a vaticinar un triunfo para él y una satisfacción para nosotros.*

B. RODRÍGUEZ ARIAS

I. — INTRODUCCION

1. Objeto del trabajo

Este trabajo tiene por objeto presentar nuestras investigaciones del metabolismo lipídico mediante téc-

nicas de cromatografía. La cromatografía es una técnica introducida por TSWETT (1906), consiste en la separación de una mezcla de solutos. Desde el punto de vista fisicoquímico y atendiendo a la repartición en-

(\*) Comunicación desarrollada en la Sesión del día 24-II-70. Presentación del Académico Numérico Dr. B. Rodríguez Arias.

(\*\*) Han colaborado en el estudio el Dr. CARLOS PASCUAL MOSTAZA y las señoritas María Clarós y Juana María Palomés.

tre la fase fija y la fase móvil de soluto a cromatografiar se pueden distinguir tres tipos principales de cromatografía: a) de adsorción; b) de partición y c) de intercambio iónico.

Podemos clasificar las variantes cromatográficas de acuerdo con la técnica empleada y tenemos entonces la cromatografía en columna, la cromatografía en fase gaseosa y la cromatografía en papel y en capa fina. La cromatografía en columna tiene un papel primordial en la aplicación como método preparativo, es decir, se emplea cuando interesa aislar un compuesto lipídico determinado que está en una mezcla de lípidos. Personalmente empleamos este tipo de cromatografía cuando nos interesa separar los ésteres de colesterol o los fosfolípidos de sueros o tejidos.

La cromatografía en fase gaseosa tiene una gran aplicación como método cuantitativo. Tiene interés, por ejemplo, para conocer la proporción relativa de ésteres metílicos de ácidos grasos de sueros o de productos alimenticios, o bien para analizar los fosfolípidos según el trabajo de HORNING y cols.

La cromatografía en capa fina tiene aplicación como método analítico, si bien puede también emplearse como técnica preparativa.

Nuestro estudio cromatográfico se basa, en esencia, en la aplicación de la cromatografía en capa fina sobre silicagel para la investigación de lípidos orgánicos. Hemos estudiado tres grupos de componentes orgáni-

cos: a) suero en su aspecto normal y patológico considerando las dislipemias primarias y secundarias; b) otros humores, como orina, LCR, bilis, saliva, plasma seminal, derrames, pus y heces. En estos humores hemos estudiado su composición lipídica. c) Tejidos en los que hemos intentado establecer su «patrón lipídico». Realmente en éstos se observan diferencias cromatográficas de acuerdo con su función, así en tanto, en tejido adiposo predominan los triglicéridos, en el tejido nervioso predominan fosfo y esfingolípidos y en el hígado hay una gran proporción de colesterol libre y esterificado. Hemos estudiado muestras de tejidos procedentes de biopsias y de necropsias.

Hemos estudiado asimismo la composición lipídica de diversos alimentos. Creemos que este estudio es importante:

1.º Por haber observado que nuestros resultados no siempre se parecen a los observados en tablas dedicadas a estas cuestiones. 2.º Por ser interesante conocer la composición lipídica de los alimentos, para establecer un régimen conveniente en dislipémicos y 3.º por ser la CCF un método ideal por su facilidad y rapidez para establecer una composición aproximada de un alimento. Lógicamente para establecer diferencias cuantitativas entre tipos de mantequillas o de aceites debe recurrirse a la cromatografía en fase gaseosa.

El estudio de los lípidos humora-

les mediante CCF es fundamental en Laboratorios de Bioquímica Clínica, permitiendo el estudio en suero de los distintos parámetros lipídicos de una forma relativamente fácil: a) lípidos neutros: esteres de colesterol, esteres metílicos, triglicéridos, colesterol libre, AGL y fosfolípidos. b) Esteres de colesterol: palmitato y estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidonato y c) Fosfolípidos: cefalina, lecitina, esfingomielinas y lisolecitina. Además empleando la cromatografía en fase inversa pueden separarse los triglicéridos entre sí. Finalmente, con el silicagel silanizado puede conseguirse la separación de ácidos grasos.

Por tanto mediante CCF se separan fácilmente 14 parámetros lipídicos y por métodos especiales 10 más (Triglicéridos y ac. grasos), es decir un total de 24 compuestos lipídicos de suero. Todos estos análisis pueden realizarlos dos laborantinas en 6 horas de trabajo. La determinación por métodos químicos de todos estos parámetros sería muchísimo más laboriosa. Hay sin embargo, que tener en cuenta que la CCF no es un método cuantitativo sino solamente cualitativo. Trabajando en condiciones más estandarizadas y rigurosas se convierte en un método semicuantitativo. Actualmente se han introducido los densitómetros de capa fina (Vitatrón, Zeiss) que permiten efectuar una lectura de la mancha, tanto en la zona visible como en la ultravioleta. Tenemos todavía poca experiencia para juzgar

la bondad del método densitométrico, sin embargo las pruebas efectuadas con el densitómetro Vitatron dan un resultado satisfactorio.

El otro método usado para la cuantificación del cromatograma, la elución, está sujeto a grandes errores y debe ser verificado por bioquímicos muy rigurosos puesto que pueden obtenerse errores de un 40 % si no se trabaja de un modo muy fino.

En este primer trabajo presentamos los métodos cromatográficos y de extracción empleados en nuestras investigaciones. En posteriores trabajos expondremos nuestra experiencia en el estudio lipídico de sueros (normales y patológicos), otros humores (orina, LCR., bilis, saliva, plasma seminal, leche materna, derrames y pus), y tejidos. Así mismo estudiaremos la composición lipídica de algunos alimentos.

## II. — MATERIAL Y METODOS

### 1. Preparación de la capa fina

Se toma 50 gr. de Silicagel G (Merck) y se añade 100 ml de agua destilada en un frasco de Erlemeyer. Se agita durante dos minutos y medio, exactamente, con objeto de tener condiciones idénticas en todos los experimentos. Esta mezcla se vierte en la cámara de un extensor Desaga que se hace deslizar sobre 5 placas de vidrio (limpiadas con agua y alcohol muy escrupulosamen-

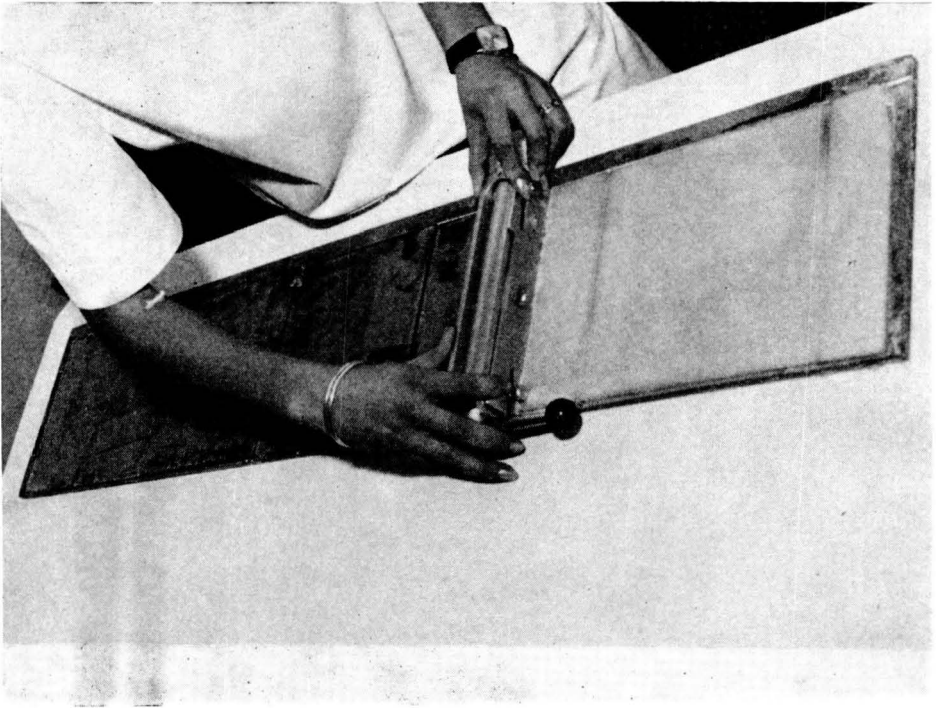


Figura 1. — Preparación de las placas cromatográficas. Se colocan las placas de vidrio sobre un soporte apropiado sobre el que se desliza el extensor Desaga, el cual contiene la mezcla de silicagel y agua.

te), 20 x 20, apoyadas sobre un soporte especial para este método. Existe un aparato, Stratomat, que hace las placas de una forma automática.

Se puede emplear otros tipos de capa fina como la poliamida, o el silicagel de diversa composición (H, GF<sub>254</sub>, HF<sub>254</sub>, Silanizado...).

Para la cromatografía en fase invertida, si empleamos el nitrato de plata en lugar de mezclar el silicagel con agua, se mezcla con una solución acuosa de nitrato de plata al 12,5%, conviene en este caso operar rápidamente y guardar las placas al abrigo de la luz. Así mismo, conviene limpiar rápidamente el extensor.

La impregnación con undecano se verifica después de preparada la placa como habitualmente. Se sumerge durante 1/2 minuto la placa de silicagel en un recipiente que contiene una solución de undecano al 5 % en éter de petróleo, dejándose a continuación evaporar el éter de petróleo.

Las placas preparadas deben ser «activadas», es decir, deshidratadas, por lo cual, se introducen en una estufa de desecación a 130° durante 30'. Si estas placas no se emplean al poco rato de ser activadas y enfriadas deben introducirse en un recipiente que contenga un absorbente de la humedad ambiental (Silicagel azul).

Pueden usarse así mismo placas preparadas o láminas de aluminio sobre las que se ha depositado el silicagel. (Cromatoplasas o cromatofolios).

En las figuras 1 a 8 presentamos las distintas fases del proceso cromatográfico.

## 2. Preparación de extractos lipídicos

a) Suero. 2 ml. de suero se precipitan en un matraz aforado de 50 ml. de cloroformo-metanol (1-1), llegando a ebullición unos momentos. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se diluye a 50 ml. con cloroformo. Se filtra y se agita en embudo de separación con 15 ml de agua. Se deja en reposo unas horas. Se separan 25 ml. de la capa inferior (clorofórmica) que contiene los lípidos. Se evapora a sequedad con Rotavapor (Buchi) y se disuelve en 0,5 ml. de cloroformo-metanol. Se aplican 10-20  $\mu$ l en la placa. Este método lo hemos usado así mismo para otros líquidos orgánicos, como la saliva, jugo gástrico, semen, aumentando la concentración de la solución lipídica en la placa cromatográfica.

b) Extractos tisulares.

$\alpha$ ) Extracción en el aparato de SOXHLET, cantidades conocidas de tejidos procedentes de necropsias, son cortados en pequeños trozos por medio de un bisturí, se disponen en el cuerpo del extractor SOXHLET y en el matraz inferior se vierten 100 c.c. de cloroformo-metanol, que se

pone en ebullición mediante una placa calefactora blindada. El proceso de la extracción dura 3-4 horas, al cabo de las cuales se evapora el cloroformo y se redissuelve el residuo lipídico.

$\beta$ ) Para el estudio de los lípidos cerebrales LOWENTHAL y VAN SANDE, emplean el micrométodo de JATZKEWITZ que detallamos a continuación: tomar una pequeña cápsula de vidrio o porcelana, que se pesa. Una pequeña cantidad (unos 100 mg) de cerebro (precisar zona, tipo de sustancia, edad y causa del fallecimiento) se coloca en la cápsula dentro de un desecador que contiene cloruro cálcico y pentóxido de fósforo ( $P_2O_5$ ). Hacer el vacío con una bomba y mantener durante 10-12 horas. Nuevamente se pesa la cápsula con su contenido y así conocemos el peso del fragmento seco.

Extracción con microsoxhlet o micromatraz (25 c.c.) y condensador de reflujo, con 10-12 c.c. de cloroformo-metanol (2/1). Se dispone el matraz (añadir perlitas de vidrio) en un bañomaría y se prolonga el proceso durante 5-6 horas.

Filtrar con filtro deslipidizado y poner la solución en un microerlemeyer previamente pesado. El micromatraz de la extracción será lavado dos veces con 2 c.c. de cloroformo-metanol (2/1). Evaporación al bañomaría a 45° C del solvente, bajo atmósfera  $N_2$ . Colocación del matraz con lípidos desecados en un desecador con  $Cl_2$  Ca y  $P_2O_5$ , y cortes finos de un bloque de parafina para ab-



Figura 2. — Las placas preparadas se activan en la estufa de desecación a 120° C durante 20 ó 30 minutos.

sorber disolventes orgánicos. Pesar de nuevo el micromatraz, conocemos el peso de los lípidos contenidos en él, así como la proporción lipídica contenida en el fragmento seco de cerebro, cuyo peso habíamos determinado con anterioridad.

Disolver los lípidos secos con cloroformo-metanol (1-1 ó 2-1) según la siguiente fórmula

$$\frac{P}{2} = 10 V$$

Por ejemplo: si el peso de los lípidos obtenidos es de 50 mg, disolver en 0,25 ml. de cloroformo-metanol. De esta solución dispondremos 20-50 y 100  $\lambda$  en la placa cromatográfica.

$\gamma$ ) Estudio de los lípidos procedentes de biopsias cerebrales.

Cuando se trabaja en pequeñas cantidades de tejido tiene gran interés el empleo de la técnica de extracción propuesta por D. KARCHER. Los fragmentos tisulares se congelan, con nieve carbónica (aparato carbo-niege, París), y mediante un criostato se hacen cortes de 20 micras que se depositan sobre un porta-objetos. Sobre los portas se ponen unas décimas de cloroformo-metanol 2/1 con una pipeta Pasteur y después de mover en todas direcciones el porta, se toman 10 lambdas que se depositan a 2 cm del borde inferior de una placa de silicagel en forma de línea de 1 cm de longitud.

### 3. Desarrollo cromatográfico

La separación de los lípidos en clases, es decir, esterés de colesterol, triglicéridos, colesterol libre, ácidos grasos libres y fosfolípidos, pueden conseguirse mediante múltiples sistemas. Nosotros hemos empleado dos sistemas diferentes.

Una vez preparada la placa cromatográfica y habiendo dispuesto los extractos a 2 cm del borde inferior, se prepara la cámara cromatográfica (Desaga), envuelta en la parte interior en papel de filtro o de cromatografía (por ejemplo, WHATMANN 3 MM), con objeto de conseguir una saturación total. Añadiendo los solventes que habitualmente son, cloroformo y benceno (3:2) unos 100 c.c., se espera que el frente del disolven-

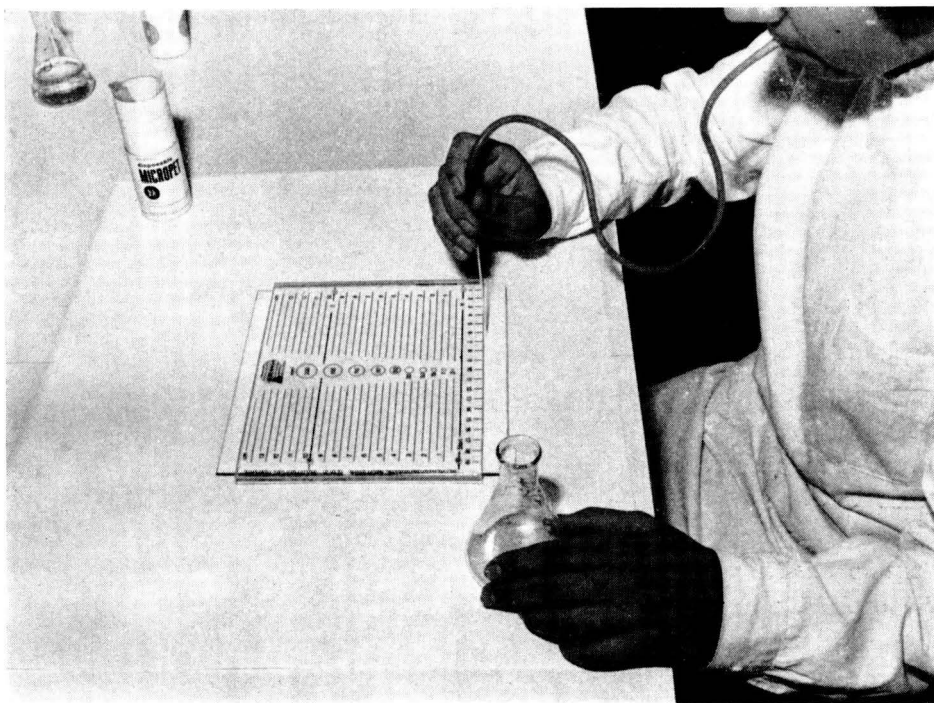


Figura 3. — El extracto lipídico se deposita a 2 cm del borde inferior de la placa. Es muy importante, para evitar contaminaciones, emplear pipetas desechables.

te, recorra 15 cm. (se tarda aproximadamente 45 minutos), secándose la placa cromatográfica y esperando que se seque a temperatura ambiente o todavía mejor a 70° C, durante 30 min. Se deja enfriar y la placa está dispuesta para el revelado, que describiremos en el próximo apartado.

Mediante este sistema se separan de arriba abajo los siguientes compuestos:

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

Ocasionalmente por encima de los esterres de colesterol se separa otra fracción que se ha demostrado que se trata del escualeno.

Asimismo en ocasiones se separan los mono, diglicéridos y esterres metílicos. Hemos ensayado en algunos casos la cromatografía bidimensional, empleando en los dos desarrollos el mismo solvente.

Otro sistema que ocasionalmente hemos usado es la mezcla de éter etílico, éter de petróleo y ácido acético (10/90/1) Recorrido 15 cm. Se separan las siguientes fracciones:

- Esteres de colesterol
- Triglicéridos
- Ac. grasos libres



Figura 4. — La placa se dispone en la cuba cromatográfica, cuyo interior se ha recubierto de papel de filtro para aumentar la saturación del solvente dentro de la cuba.

- Colesterol
- Mono y diglicéridos
- Fosfolípidos

b) Separación de esteres de colesterol.

Los esteres de ácidos grasos de colesterol se separan entre sí mediante 4 eluciones de 10 cm cada vez y secado con aire caliente después de cada una, con éter de petróleo (60-80) y cloroformo 90/10.

El tiempo de cada elución es de 25 minutos.

Se preparan los siguientes esteres:

- Colesterol estearato y palmitato
- Colesterol oleato
- Colesterol linoleato
- Colesterol linolenato
- Colesterol araquidonato

La cantidad que aplicaremos por prueba es de 2 y 5  $\lambda$ . KARCHER y colaboradores, para el estudio de los esteres de colesterol del tejido cerebral, aplican 10  $\mu$ l de extracto de cerebro sobre la placa. Hacen dos recorridos de 16,5 cm cada uno con éter de petróleo (40-60) y diisopropil éter (98,6/ 1,4 V/V). Después de cada recorrido se seca la placa.

c) Separación de fosfolípidos séricos.

Se aplica a la placa 30 y 50  $\lambda$  del extracto sérico. Recorrido 10 cm, con cloroformo - metanol - agua 65/25/4. Asimismo hemos empleado el sistema que recomienda CARTON y cols. (1968), cloroformo, metanol, agua, ácido acético (60/30/6/1).

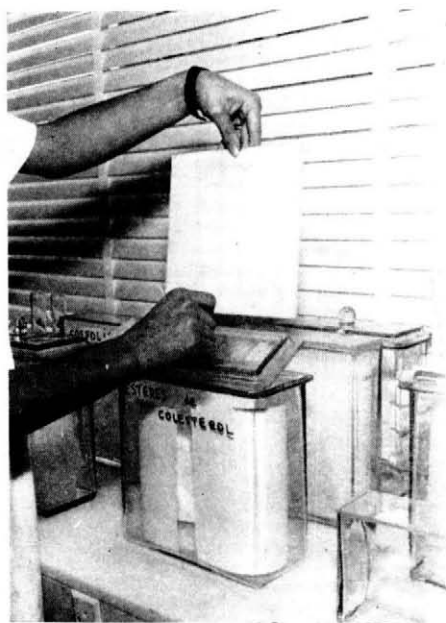


Figura 5. — Cuando el frente del solvente ha llegado a la distancia deseada, 10, 15 ó 20 cm, según el desarrollo cromatográfico, se saca la placa cromatográfica de la cuba.



Recorrido 15 cm que tarda unos 45 minutos en realizarse.

En el suero se separan:

- Cefalina
- Lecitina
- Esfingomielinas
- Lisolecitina

Cuando interesan hacer separaciones más perfectas de los fosfolípidos y esfingolípidos en el caso de los extractos cerebrales, LOWENTHAL y cols. recomiendan el método JATZKEWITZ que detallamos a continuación.



Figura 6. — Secado de la placa a 120° C durante 20 ó 30 minutos, a 70° C durante 2 horas.

Conviene emplear un espesor de silicagel de 400 micras. El sistema se basa en dos recorridos con dos tipos de solventes.

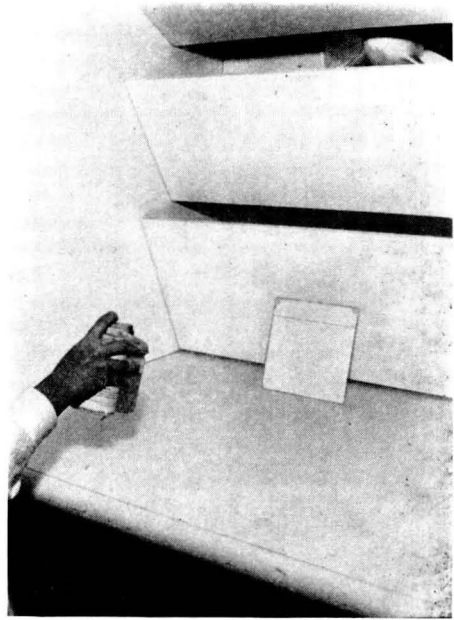


Figura 7. — La placa se coloca en el interior de una campana de extracción para la tinción. Esta se verifica pulverizando una solución apropiada (ác. fosfomolibdico, rodamina, 2,7, diclorofluoresceína...) mediante un compresor o Jet-Pack.

Solvente I

- Cloroformo - 73
- Metanol - 28
- Agua - 4,5

Recorrido de 20 cm de longitud y esperar 10 minutos más antes de sacar la placa de la cámara. El tiempo del recorrido total es de 1 hora 30 minutos.

Después de este recorrido debe sacarse la placa 3 horas a temperatura ambiente o 30 minutos a 70° C. Dejar enfriar la placa y colocarla en la cámara cromatográfica saturada con el otro solvente II

- Propanol, 80
- NH<sub>4</sub>OH 25%, 8
- H<sub>2</sub>O, 12

Recorrido 9 cm contados a partir del punto de aplicación, tiempo 1 h. 45 minutos. La placa se deja secar durante 2 horas a 70° C. estando entonces a punto de pulverizar con el reactivo de KAGI-MISCHER. Mediante este sistema se separan perfectamente.

- Colesterol
- Ac. grasos libres
- 2 Cerebrosidos
- Etanolamina fosfatido
- 2 Sulfatidos
- Colin fosfatido
- Etanolaminalisofosfatido
- 2 Esfingomielinas
- Colin lisofosfatido
- Serinfosfatido
- 3-4 gangliosidos

En los casos que interesa la separación de los gangliosidos entre sí, pueden usarse los siguientes solventes.

- Cloroformo, 60
- Metanol, 35
- Hidróxido amónico 10 %, 8

Dejar la placa dos horas en la cámara. Secar y pulverizar con reactivo de orcinol.

#### 4. Métodos de detección

Los métodos de revelado para la cromatografía en capa fina aplicados a los lípidos son muy numerosos.

Nosotros empleamos en general la tinción con ácido fosfomolibdico al 10 %. Una vez seca la placa cromatográfica, se coloca en una campana, donde mediante un pulverizador (pera de goma, aparato compresor o

Jet Pak) se hacen varias pasadas sobre la placa con la solución de ácido fosfomolibdico, a continuación se introducen en la estufa 110-130° C. durante 10-15 minutos, apareciendo los lípidos de color negro, con el fondo amarillo. Puede decolorarse el fondo introduciendo la placa en una cámara que contenga vapores de amoníaco durante unos minutos.

En estudios de los esteres de colesterol en ocasiones hemos empleado vapores de yodo colocando la placa cromatográfica en una cámara con yodo metálico en su interior, el I<sub>2</sub> se fija en los dobles enlaces de los ácidos grasos no saturados.

Asimismo, hemos empleado el áci-



Figura 8. — Después de la pulverización, la placa, en general, debe calentarse unos minutos a 120° C hasta que aparezcan visibles las fracciones lipídicas. Si se emplean colorantes, como Rodamina o fluoresceína, la placa no debe calentarse, en estos casos debe mirarse bajo luz UV.

do sulfúrico como substancia de revelado, apareciendo los lípidos de color marrón oscuro, sin embargo, creemos que es mejor la tinción con ac. fosfomolibdico.

Las aspersiones con solución 2,7 diclorofluoresceina y con rodamina B (0,5 %) permiten la visualidad de los lípidos, bajo la luz ultravioleta. Este método tiene interés en la cromatografía preparativa para aislar un grupo de lípidos determinado y posteriormente, recomatografiarlo en capa fina, o mejor con el cromatógrafo de gases.

En el estudio de los lípidos cerebrales da un buen resultado al revelado con reactivo de KAGI-MISCHER.

- 50 ml. ácido acético
- 1 ml.  $\text{SO}_4 \text{H}_2$
- 0,3 ml. anisaldehido

Pulverizar los 50 c.c. sobre la placa y colocarla a la estufa durante 15 minutos a  $110^\circ \text{C}$ .

Cuando interesa el estudio específico de los gangliosidos conviene el empleo del reactivo de orcinol, que debe guardarse en nevera.

Cl H conc.	40,7 ml.
Orcinol	100 mg.
$\text{Cl}_3 \text{Fe}$ 1 %	1 ml.
$\text{H}_2 \text{O}$ hasta	50 ml.

*Discusión.* — El prof. Pedro Domingo alaba el método y la finalidad del trabajo de investigación que ha empezado a resumirnos y comentarnos su autor, tanto más de estimar cuanto que lo viene desarrollando en el ámbito de un laboratorio.

Glosa muy brevemente, a seguida, la importancia que tiene en la alimentación más usual la ingesta sostenida de lípidos.

Y felicita últimamente, al disertante, por su auténtico espíritu científico y por los resultados primeros que ha sabido ofrecernos.

El prof. A. Pedro Pons (Presidente) dice que la incidencia y la gravedad de las lesiones arterioescleróticas requiere un conocimiento óptimo del mecanismo patogénico que las causa.

El factor alimentario es de los que interesan más y la concentración —en ocasiones bastante ignorada— de lípidos en lo que solemos comer a diario habría de tenerse muy en cuenta.

Los hallazgos de Corominas Vilar-dell ponen de manifiesto que desconocemos todavía lo graso y lo energético de más de un alimento.

El disertante agradece las intervenciones de los dos profesores y recalca que ha tratado de aportar hechos más que llegar a conclusiones.

## BIBLIOGRAFIA

- ADRIAENSSENS, K; LOWENTHAL, A.; KARCHER, D.; MARDENS, Y.; VAN SANDEM and VAN HEULE (1967): Biochemical Screening methods for biopsies. Some results of lipid, protein and aminoacid determinations. En cerebral lipidosis II. Edited by Nunes Vicente, Dustin P. y Lowenthal. A. Presses academiques Europeennes Bruxelles.
- BOBBIT JAMES, M. (1963): Thin — Layer Chromatography. Reinhol Publishing Corporation.
- COEUR, M. et CREYSSEL, R. (1965): Chromatographie des lipides seriques sur couche mince de silice. Technique de routine Semicuantitative. Rev. Française d'et Clin. et biol. X, 852.
- COROMINAS VILARDELL, A. (1969): Contribución al estudio bioquímico de los lípidos. Lipidurias. Publicado por «Institut d'Estudis Catalans».
- COROMINAS VILARDELL, A. y PASCUAL MOSTAZA (1970): «Interés de la cromatografía en capa fina en el estudio de los lípidos humorales». Comunicación IX Congreso Nacional de Medicina Interna. Santiago de Compostela, 11-13 junio 1970.
- COROMINAS VILARDELL, A. (1970): «Aplicación de la cromatografía en capa fina al estudio de los lípidos tisulares. Su interés en el diagnóstico de las lipidosis». Comunicación IX Congreso Nacional de Medicina Interna.
- COROMINAS VILARDELL, A. y POU CLAVEL (1970): «Experiencia personal del método de KARCHER para la extracción de lípidos tisulares». En prensa.
- JATZKEWITZ, H. and E. MEHL (1970): Zur Dünnschicht-Chromatographie der Gehirn-Lipoide, ihrer Un und Abbauprodukte. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische chemie Band 320-251257.
- KIRCHNER JUSTAS, G. (1967): Thinlayer Chromatography. Interscience Publishers New York. London.
- MARINETTI GUIDO, V. (1967): Lipid chromatographic analysis, Volumen I. Marcel Dekker. Inc. New York.
- PADLEY, F. B. (1964): Thin — Layer Chromatography of lipids. Thin — Layer Chromatography. Ed. by G. B. Marino-Bettolo. Ed. Elsevier publishing company.