

Determinación de fosfolípidos (Bötcher, et al. 1961. Anal. Chim. Acta 24, 203-204).
Método de Fiske.

Reactivos:

1. Fósforo inorgánico como standar 0.4mM (normalmente KH_2PO_4 con PM de 136.1)
2. HClO_4 60%
3. Reactivo de Molibdato: 2.2 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 14.3ml H_2SO_4 conc., por litro de disolución. Añadir el sulfúrico sobre el agua y no al revés).
4. Acido ascórbico (vit C) 10%.
5. Preparar los tubos como a continuación se describe para hacer la recta de calibrado:

Tubo	Pi 0.4 mM (μl)	nmoles Pi	H_2O (μl)
1	0	0	0
2	50	20	350
3	100	40	300
4	150	60	250
5	200	80	200
6	250	100	150
7	400	160	0

Secar los tubos en estufa hasta que no quede líquido.

Añadir 0.4 ml de HClO_4 60% y calentar a 180-190 °C durante 30 min.

Esto se puede hacer en tubos de ensayo de 13x100 tapados con canicas o bien en tubos más largos.

Si lo hacemos con canicas, cuidar que al quitarlas cuando aún estén en el baño de arena, no caiga la gota condensada. Luego dejar enfriar.

Añadir 4ml de Reactivo de Molibdato

Añadir 500 μl de Acido ascórbico (vit C) 10% al mismo tiempo que se agitan los tubos enérgicamente

Incubar los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos.

Enfriar los tubos y leer absorbancia a 812 nm

$$Vol(\mu\text{l}) = \frac{100}{1000} * \frac{Pm. fosfolípido}{mglip./ml}$$

El volumen a añadir en los tubos problema se calcula con la siguiente ecuación:

Para calcular la concentración del lípido en mg/ml:

$$conc.lip(mg / ml) = \frac{nmoles * Pm}{1000 * V(\mu\text{l})}$$