

Ministerio de Educación de la Nación

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Química y Farmacia

"Nuevo Método para la determinación de colesterol libre,

usando sulfato de oxiquinolina"

por

ISABEL CATALINA TALIBERTI

La Plata

1 9 5 6

INTRODUCCION

Desde el año 1909 en que Windaus halló la propiedad del colesterol libre de combinarse con la digitonina para formar un precipitado insoluble en éter de petróleo, alcohol, éter sulfúrico, etc., propiedad que no tiene el colesterol combinado, se emplea este digitónido para determinar colesterol libre en sangre.

A partir de ese año, la bibliografía cita enorme cantidad de métodos propuestos, para la determinación de este tipo de colesterolemia, métodos que, con alguna variante, aplican como reacción fundamental la formación del colesterol digitónido, pero, hasta 1935, ningún autor introdujo una técnica -- que fué se innovadora.

Fuó recién en 1936 cuando Sobel, Dreker y Natelson^{(1),(2)} descubren la interesante propiedad del colesterol libre de precipitar del éter de petróleo como sulfato de colesterol piridina y la aplican en su método para determinar el colesterol total y sus fracciones en sangre.

Hacen además estos autores una interesante observación acerca de los valores de colesterol libre determinados -- por el sulfato de piridina que son un tercio más bajos que los obtenidos en la precipitación con digitonina, lo que les hace -- suponer la existencia de dos formas de colesterol no esterificado: una libre que precipita con el sulfato de piridina y otra en -- combinación, posiblemente con proteínas que precipita conjuntamente con la libre ya mencionada, con la digitonina.

Estas observaciones han servido de base para el presente trabajo de tesis en el que nos proponíamos estudiar el método que ha tenido tan poca difusión hasta el presente; tratar de modificarlo en el sentido de hacerlo más rápido y sencillo para un posterior estudio en la determinación de la fracción del colesterol libre, que reacciona distintamente con digitonina y sulfato de piridina, es decir, esa fracción que los autores denominan: colesterol "flojamente unido", que estudiado -- en las distintas enfermedades, pudiera ser un aporte en el -- diagnóstico.

La técnica que proponen los autores en su método no conformó, puesto que los resultados, de acuerdo a nuestros trabajos fueron inseguros. Estas dificultades se originaban, en la facilidad con que los reactivos se impurifican puesto que es necesario trabajar en medio casi totalmente anhidro, ya que el sulfato de piridina es muy higroscópico y en minutos de expuesto al aire se disuelve en el agua absorbida.

Sobel y otros colaboradores⁽³⁾, en un trabajo posterior (1951), referent al citado anteriormente, modifican la técnica para salvar este inconveniente, produciendo el sulfato de piridina en el seno del líquido, partiendo de piridina y ácido clorosulfónico.

Siendo el ácido clorosulfónico de un manejo difícil y habiendo en mis ensayos descubierto la propiedad del sulfato de oxiquinolina, de combinarse con el colesterol libre para formar una substancia que precipita del éter de petróleo -- cuantitativamente a 0° C, ajusté la técnica para aplicarla como método cuantitativo, en la determinación de la colesterolemia libre y combinada.

Parte experimental

El trabajo se inició, tratando de aplicar el método de Sobel, Dreker y Natelson⁽¹⁾ loc.cit. ajustándonos a -- las normas que dan los autores y ante discrepancias en los resultados resolvimos estudiar los distintos factores: reactivos, temperatura, etc. sin llegar a reducir los errores en las condiciones de nuestras experiencias a los valores que dan los autores del método.

Sobel A.E., (uno de los autores del método) conjuntamente con Goodman J. y Monte Blau⁽³⁾ loc.cit. en un trabajo posterior (año 1951), llegado a nosotros cuando estábamos finalizando estas series de experiencias descriptas reconocen estos inconvenientes del método y proponen, entonces, producir el sulfato de piridina en el seno de la solución de colesterol a determinar, para evitar esta hidratación que es tan perjudicial. Utilizan para ello piridina y ácido clorosulfónico disueltos separadamente en tetracloruro de carbono como soluciones sa

turadas.

No intentamos ensayar estas modificaciones, porque a nuestro entender, si posiblemente el método mejora en algunas aspectos, en otros resulta perjudicado, puesto que, es bien conocida la agresividad del ácido clorosulfónico.

Sin embargo, a pesar de que este tipo de método no alcanza los niveles de marcha analítica, fácil conservación de reactivos y resultados tan próximos a la exactitud de los métodos que recurren a la digitonina, debemos reconocerle a estos autores: Sobel A.E., Dreker S.J. y Natelson S. el enorme mérito de haber introducido en Análisis Biológicos una innovación completamente original al descubrir la interesante propiedad de la formación del sulfato de colesteril piridina, insoluble en éter de petróleo, sustancia cuya fórmula química ha sido estudiada perfectamente (que no ocurre con el colesteril-digitonido) y que conduce a un nuevo camino en el estudio del colesterol.

Sulfato de 8-oxiquinolina

Ante la discrepancia entre nuestros resultados y los de los autores y basados en la idea de los mismos, estudiamos las propiedades de los derivados del núcleo pirídico. Del estudio de estas drogas consideramos la 8-oxiquinolina, cuyo sulfato, es un sólido estable, de punto de fusión definido: --178-180° C (sin descomposición). Poco higroscópico, de fácil adquisición puesto que, es de uso corriente en farmacia, que se pueda obtener puro, que permite ser secado en estufa a 100° C, y que por su fácil manejo resultaría un reactivo ideal.

Presumiendo un comportamiento similar al del sulfato de piridina se hicieron ensayos para comprobar su reacción frente al colesterol libre, y su inactividad frente al colesterol esterificado; en lo que respecta a formar compuestos insolubles en los solventes del colesterol. Una solución de colesterol en benceno se trató con anhídrido acético-piridina 1:1, se agregó una pizca de sulfato de oxiquinolina y se continuó trabajando de acuerdo a la técnica de Sobel. Con enorme satisfacción comprobamos que el colesterol libre reaccionaba efectivamente con el sulfato de oxiquinolina dando un compuesto insoluble en éter de petróleo.

Hicimos una serie de experiencias con soluciones de concentración conocida de colesterol en benceno y aplicamos la técnica que Sobel, Drekter y Natelson emplean para el sulfato de piridina a este nuevo reactivo que es el sulfato de oxiquinolina.

Habiendo comprobado que el sulfato de oxiquinolina precipita al colesterol libre hicimos un ensayo para saber si precipita al colesterol esterificado como acetato. Para ello se sometió una solución de colesterol puro a la acetilación, obteniéndose acetato de colesteroilo, que fué lavado perfectamente, purificado por sucesivas cristalizaciones y determinado su punto de fusión: 114° C. Con este compuesto se preparó una solución en tetracloruro de carbono, que se sometió al procedimiento del sulfato de oxiquinolina y no hubo formación de precipitado, como tampoco reacción de Liebermann-Burchard positiva después de haber decantado el éter de petróleo.

Siendo los resultados tan alentadores, resolvimos continuar con las experiencias para lo cual realizamos un estudio de:

- a) Humedad del sulfato de oxiquinolina.
- b) Forma de agregado del sulfato de oxiquinolina.
- c) Elección del solvente.
- d) Temperatura
- e) Agitación
- f) Cantidad de reactivo sulfato de oxiquinolina.
- g) Cantidad de éter de petróleo.

Y una vez ajustado el método con soluciones puras de colesterol se hicieron experiencias con suero sanguíneo con el fin de seleccionar solventes y técnicas extractivas.

Ensayos de recuperación

Se hicieron ensayos, sobre sueros humanos, extrayendo con alcohol-acetona 1:1, en caliente, con el fin de estudiar la recuperación que puede acusar el método del sulfato de oxiquinolina en el colesterol agregado a sueros cuyo colesterol libre se determinó previamente:

Canti- dad de suero en ml	Colest. determi- nado mg %	Colest. agrega- do mg %	Total teórico mg %	Total hallado mg %	Cantidad recupe- rada mg %	Dife- rencia	Error %
0.2	48.3	15	63.3	62.6	14.3	0.7	4.6
0.2	52.2	15	67.2	66.7	14.5	0.5	3.3
0.2	47.7	15	62.7	62.0	14.3	0.7	4.6
0.2	50.4	15	65.4	64.6	14.2	0.8	5.3
0.2	60.1	15	75.1	74.4	14.3	0.7	4.6
0.2	38.6	15	53.6	52.9	14.3	0.7	4.6
0.2	59.0	15	74.0	73.3	14.3	0.7	4.6
0.2	42.0	15	57.0	56.4	14.4	0.6	4.0
0.2	60.0	15	75.0	74.4	14.4	0.6	4.0
0.2	49.8	15	64.8	64.1	14.3	0.7	4.6
0.2	65.9	15	80.9	80.3	14.4	0.6	4.0
0.2	54.2	15	69.2	68.4	14.2	0.8	5.3
0.2	50.9	15	65.9	65.3	14.4	0.6	4.0

La recuperación del colesterol agregado es de un 95.58 %, promedio de la serie de ensayos realizados.

Control del método en la determinación de la colesteroemia libre

En una serie de sueros se determinó por el método de la oxiquinolina colesterol libre comparándolo con el método de la digitonina.

Ensa- yo n°	Cantidad de suero en ml	mg % de co- lest.libre Método de la Digiton- ina	mg % de co- lest.libre Método de la Oxiqui- nolina	Diferencia	Error %
1	0.2	63.6	57.9	5.7	8.9
2	0.2	72.0	63.9	8.1	11.0
3	0.2	60.0	54.2	5.8	9.6
4	0.2	58.0	52.9	5.5	9.4
5	0.2	61.0	56.6	4.4	7.2
6	0.2	57.2	50.4	6.8	11.9

7	0.2	65.0	59.6	5.4	8.3
8	0.2	68.2	60.2	8.0	11.9
9	0.2	71.0	64.0	7.0	9.8
10	0.2	62.0	58.0	4.0	6.4
11	0.2	58.7	50.0	8.7	14.0
12	0.2	58.0	51.4	7.4	12.7
13	0.2	64.4	58.0	6.4	9.9
14	0.2	76.0	69.9	6.1	8.0
15	0.2	59.2	46.7	6.2	10.4
16	0.2	72.0	67.2	4.8	6.6
17	0.2	45.0	39.0	6.9	15.3
18	0.2	71.0	60.9	11.1	15.0
19	0.2	74.8	69.1	5.7	7.4
20	0.2	67.0	60.4	6.6	9.8
21	0.2	59.9	53.9	6.0	10.0
22	0.2	58.2	49.2	9.0	15.0
23	0.2	64.1	55.0	9.1	14.0
24	0.2	70.2	62.6	7.6	10.0
25	0.2	65.0	60.2	4.8	7.4
26	0.2	69.2	58.6	10.6	15.0
27	0.2	76.0	69.2	6.8	8.9
28	0.2	69.2	61.9	7.3	10.5
29	0.2	62.0	56.9	5.1	8.2

Se puede apreciar que el método en estudio, controlado con el método a la dig tonina, acusa errores en menes que oscilan entre 6.4 y 15.3 % con un promedio de error en las experiencias realizadas de: 10.43 %.

Control del método en la determinación de la colesterolemia total previa saponificación, comparativamente con el método directo -- (que practica la reacción de Liebermann-Burchard directamente en el extracto sin ningún tratamiento posterior).

Ensa- yo n°	mg% de co- lest.total Método directo	mg % de co lest.total Método oxi quinolina	Diferencia	Error %
1	268.0	252.0	16.0	5.9
2	209.9	188.9	11.0	5.2
3	204.2	189.0	15.2	7.4
4	208.0	192.8	15.2	7.3
5	182.0	168.0	14.0	7.6
6	212.0	198.0	14.0	6.6
7	298.0	254.0	23.8	7.9
8	240.0	228.2	11.8	4.9
9	189.4	174.9	14.5	7.9
10	238.0	222.0	16.0	6.7

El método ensayado acusa un error que oscila de 5.9 a 7.9 % cuando se compara; la colesterolemia total previa sa onificación y precipitación como sulfato de colesteryl oxiquinolina, con el método corriente que practica directamente la reacción de Liebermann-Burchard.

Llegamos finalmente a proponer el siguiente método:

Método propuesto

Reactivos:

- 1) Alcohol absoluto-acetona, 1:1 (en volumen) purificados.
- 2) Tetracloruro de carbono, purificado.
- 3) Sulfato de 8-oxiquinolina.
- 4) Piridina, purificada
- 5) Anhídrido acético puro, recientemente destilado.
- 6) Mezcla anhídrido acético-piridina 2:1, recientemente preparada.
- 7) Eter de petróleo 30-42° C purificado.
- 8) Acido acético purísimo.
- 9) Acido sulfúrico purísimo.
- 10) Colesterol purísimo.
- 11) Solución de hidróxido de potasio alcohólico 0.5 N.
- 12) Anhídrido acético-ácido sulfúrico 25:1, recientemente preparado, enfriado. Reactivo A.

Solución testigo

Testigo 1 - 40 mg de colesterol / 100 ml ácido acético
1 ml = 0.4 mg

Testigo 2 - 10 mg de colesterol/ 100 ml ácido acético
1 ml = 0.1 mg

Testigo 3 - 5 mg de colesterol/ 100 ml ácido acético
1 ml = 0.05 mg

Determinación de colesterol libre

Extracción según: Sobel, Goodman y Monte Blau

0.2 ml de suero se agregan gota a gota a 4 ml de alcohol-acetona 1:1, en un tubo de centrifuga; se agita y centrifuga a 2.000 r.p.m., 10 minutos, se vierte el líquido sobre-

nadante en un tubo para la reacción. Se lava el precipitado de proteínas con 1 ml de alcohol-acetona 1:1, centrifuga y vuelca el sobrenadante en el tubo de reacción. Este se lleva a un baño a 60° C, se asciende la temperatura lentamente de modo que 45 minutos más tarde sea de 100° C y se deja 15 minutos hasta evaporación total. El extracto seco se disuelve en 0.5 ml de tetracloruro de carbono. Inmediatamente se agrega 0.1 ml de la solución siguiente, preparada en el acto:

Sulfato de 8-oxiquinolina: aproximadamente 90 mg (cantidad que puede abarcar la punta de un bisturí) que se disuelve en:

Anhidrido acético	0.2 ml
Piridina	0.1 ml

Se tapa el tubo con un tapón de corcho aislándolo así de la humedad ambiente. Se agita 2 minutos dando con el dedo golpes suaves en el fondo del tubo. Se descansa 1 minuto y se repite dos veces más. Se coloca en estufa a 37-50° C durante 15 minutos, se saca y agita 2 minutos más y se vuelve a la estufa durante 10 minutos. Se lleva a la heladera donde se deja 20 minutos, se agregan 7 ml de éter de petróleo enfriado en heladera, se agita y se deja en la heladera durante 40 minutos. Se centrifuga a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se decanta el éter de petróleo que lleva disueltos los ésteres de colesterol y el sedimento se suspende en 4 ml de éter de petróleo agitando con una varilla, que además sirve para desprender el precipitado de sulfato de colesterol oxiquinolina adherido a las paredes del tubo. Se retira la varilla y se centrifuga. Se decanta el éter de petróleo sobrenadante y se repite este lavado una vez más.

Una vez decantado el éter de petróleo se evaporan los últimos vestigios colgando el tubo y la varilla en la estufa a 45° C.

Se disuelve el residuo en 1 ml de ácido acético ayudando con la varilla y calentando en un baño a 45° C. En otro tubo de reacción se coloca 1 ml de solución testigo n° 3.

Se agrega a ambos 3 ml del Reactivo A. Se deja en la obscuridad 25-30 minutos y se compara colorimétricamente.

Colesterol total: Se extrae de 0.2 ml de suero co

mo para colesterol libre, con alcohol-acetona 1:1, que una vez evaporado se disuelve en 1 ml de ácido acético, se le agrega el Reactivo A, se mezcla y se deja en la obscuridad 25-30 minutos y se compara con 1 ml de la solución tipo de colesterol n° 1 tratado en la misma forma.

Colesterol combinado: Se obtiene por diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre.

También se puede determinar saponificando el residuo de evaporación del éter de petróleo decantado de la separación de colesterol libre y precipitándolo como sulfato de colesteril oxiquinolína utilizando la siguiente solución testigo:

20 mg de colesterol / 100 ml de ácido acético 1 ml = 0.2 mg

Con el método del sulfato de oxiquinolína se hicieron de terminaciones de colesterol libre, combinado y total con la técnica que describimos anteriormente, sobre sueros de hombres y mujeres, cuyos análisis de sangre y orina, practicados a los efectos del certificado de buena salud, resultaron normales.

En sa n°	Colest. libre Met. oxiquin. mg %	Colesterol com bin. (Diferen.) mg %	Colesterol total Mét. Directo mg %	Relación combinado al total %
1	58.0	210.0	268.0	78.35
2	49.2	169.7	209.9	76.55
3	55.0	149.2	204.2	73.06
4	62.6	145.4	208.0	71.25
5	60.2	121.8	182.0	66.92
6	58.6	153.4	212.0	72.35
7	69.2	228.8	298.0	76.10
8	61.9	178.1	240.0	74.20
9	50.6	138.8	189.4	73.28
10	56.9	181.1	238.0	76.09
11	49.2	163.8	213.0	76.90
12	52.3	179.7	232.0	77.46
13	48.9	138.0	186.9	73.83
14	39.6	140.3	179.9	77.98
15	53.0	157.2	210.2	77.78
16	46.0	150.2	196.2	76.55
17	42.9	155.1	198.0	78.33
18	50.4	153.9	204.3	75.33
19	62.0	168.0	230.0	73.04

Comentario: Los resultados consignados en la pág. 6 (comparación del método de la oxiquinolína con el método directo) acusan una disminución notable en lo que respecta al promedio de error y a la amplitud de los errores frente a los resultados de comparación del método de la oxiquinolína con el de la digitonina (pág. 5).

Estas diferencias podrían atribuirse a que en las últimas experiencias estamos trabajando con cantidades relativamente grandes de colesterol que oscilan entre 168 mg% y 252 mg% mientras que en las de comparación ^{con} el método de la digitonina van desde 39.0 a 69.0

También puede imputarse a que tanto la digitonina como la oxiquinolina puedan comportarse frente a fracciones de colesterol libre y aún del combinado en diferente forma y no podemos opinar sobre cual de los dos reactivos precipitantes está más próximo a la realidad, puesto que requiere un amplio estudio dada la complejidad del estado del colesterol en la sangre.

Conclusiones: 1) El método de Sobel, Dreker y Natelson, en las condiciones de nuestras experiencias y trabajando con soluciones de colesterol puro, acusa un error de 10 a 12% que no está de acuerdo con el que dan los autores.

2) Por la acción del sulfato de oxiquinolina sobre el colesterol libre en medio anhídrido acético/piridina se obtiene un compuesto insoluble en éter de petróleo, posiblemente sulfato de colesteril oxiquinolina.

3) Esta reacción es prácticamente cuantitativa y no se produce con el éster acetato de colesterilo.

4) Basados en esta reacción, proponemos un método para la determinación de la colesterolemia libre y combinada.

El error que acusa con soluciones puras de colesterol es de:

mínimo: 3.2 %	máximo: 5.3 %	promedio: 4.42 %
---------------	---------------	------------------

Del colesterol libre agregado a sueros (15 mg %) la recuperación fué:

mínima: 94.7 %	máxima: 96.7 %	promedio: 95.58 %
----------------	----------------	-------------------

Por comparación con el método de la digitonina el error fué:

mínimo: 6.4 %	máximo: 15.3 %	promedio: 10.43 %
---------------	----------------	-------------------

Por comparación con el método directo el error fué:

mínimo: 4.9 %	máximo: 7.9 %	promedio: 6.74 %
---------------	---------------	------------------

Bibliografía

- 1) Sobel A.E., Dreker S.J. y Natelson S.- J.Biol.Chem., 115, 381 (1936)
- 2) Dreker S.J., Sobel A.E. y Natelson S.- J.Biol.Chem., 115, 391 (1936).
- 3) Sobel A.E., Goodman J. y Monte Blay - Am.Chem., 23, 516-19 (1951).

