

INSTITUTO DE CARDIOLOGIA Y CIRUGIA CARDIOVASCULAR

## Micrométodo para la determinación del colesterol total

*Dr. Daniel Sánchez Serrano, Dr. Marcelino Lavín Palmieri, Lic. Teresita Céspedes Cabrera, Téc. Ana M. Maltas Pineda*

Sánchez Serrano, D. y otros: *Micrométodo para la determinación del colesterol total.*

Se describe un micrométodo para la determinación del colesterol total en suero o plasma, basado en el de Abell y colaboradores. El método mostró una buena correlación con el original ( $r = 0,95$ ) y un buen coeficiente de variación para la repetibilidad (5,6%) y para la reproducibilidad (2,8%). Se recomienda por el pequeño volumen de muestra requerida (0,1 ml) y por el bajo consumo de reactivos.

### INTRODUCCION

Múltiples factores importantes se han identificado para predecir el riesgo de aterosclerosis de los vasos sanguíneos. De ellos, la determinación del colesterol total (CT) en el suero o plasma fue uno de los primeros, con una correlación positiva entre las cifras encontradas y la incidencia de esta enfermedad.<sup>1</sup> Estudios posteriores demostraron que la cuantificación del colesterol en las diferentes fracciones de lipoproteínas (Col-LDL, Col-HDL y Col-VLDL), así como diferentes cocientes entre las mismas, constituían índices pronósticos más eficientes.<sup>2</sup>

En cualquier caso, la determinación del colesterol es necesaria y para ello se requiere un método que reúna las condiciones de especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad requeridas.

Durante mucho tiempo, antes de la aparición de los métodos enzimáticos, uno de los procedimientos de elección fue el de Abell y colaboradores,<sup>3</sup> que, incluso, fue recomendado por la OMS en la determinación del CT. En la actualidad, este método sigue utilizándose cuando existen interferencias con los enzimáticos o en aquellos lugares donde estos últimos no son accesibles.

Como quiera que el método original utiliza volúmenes de muestras relativamente grandes (0,5 ml) y consume cantidades apreciables de reactivos, nos dimos a la tarea de evaluar un micrométodo que, sin perder las cualidades del original, obviara estas dificultades.

## MATERIAL Y METODO

### REACTIVOS

Se utilizó hidróxido de potasio (KOH), etanol absoluto, éter de petróleo 60-80 °C, anhídrido acético, ácido acético glacial, ácido sulfúrico concentrado (99%) y colesterol. Todos los reactivos fueron de grado analítico y ninguno se recrystalizó o se redestiló antes de su uso. Las soluciones acuosas se prepararon con agua destilada.

### SOLUCIONES

1. Solución de KOH al 33%: 33 g de KOH se disolvieron y se completó hasta 100 ml con agua destilada.
2. Reactivo de color: 20 volúmenes de anhídrido acético frío, 1 volumen de ácido sulfúrico concentrado y 10 volúmenes de ácido acético glacial. Se utilizó dentro de la hora que sigue a su preparación.
3. Solución patrón de colesterol: 50 mg de colesterol se disolvieron en etanol absoluto y se llevaron a 100 ml (1,29 mmol/l).

PROCEDIMIENTO	Patrón	Muestra
Suero o plasma	—	0,1 ml
Solución patrón	1,0 ml	—
KOH 33%	0,05 ml	0,05 ml
Etanol absoluto	—	1,00 ml
Agua destilada	0,1 ml	—

Se agitó por espacio de 10 segundos en tubos de 13 X 100 mm sin tapa y se colocó en baño de María a 37 °C por no menos de 55 minutos. En el caso del patrón, se utilizaron 3 tubos (para 3 diferentes concentraciones) y tanto las muestras como los patrones fueron procesados por duplicado.

Después de la incubación se añadió a cada tubo 1,5 ml de éter de petróleo 60-80 °C y se agitó por 10 segundos. Se añadió entonces, 0,5 ml de agua destilada y se repitió la agitación por 10 segundos, se dejaron los tubos en reposo hasta la separación de las fases.

De la fase superior de las muestras, se pasó 1,0 ml a tubos limpios de 15 X 150 mm y, de los patrones, 0,3-0,6 y 0,9 ml por duplicado que corresponden a  $2,58 \times 10^{-3}$ ;  $5,17 \times 10^{-3}$  y  $7,76 \times 10^{-3}$  mmol de colesterol, respectivamente. Se evaporó la fase de éter de petróleo en un baño de María entre 90 y 100°C. Después de la evaporación completa del éter de petróleo (entre 10 y 20 minutos), los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y a cada uno de ellos se le añadió 3,0 ml de reactivo de color, se agitó y dejó en la oscuridad durante 30 minutos. Se determinaron las densidades ópticas (DO) a 620 nm en cubetas de cristal de 1 cm de paso de luz, a las muestras y patrones leídos contra el blanco reactivo, que fue el mismo reactivo de color.

La concentración del colesterol se calculó en las muestras según el método original:<sup>3</sup>

$$\text{Colesterol total (mmol/l)} = \frac{\text{Volumen de éter de petróleo} \times 2,586}{S \times \text{Vol. éter de pet. desecado} \times \text{Vol. muestra}}$$
$$S = \frac{\text{D O cada patrón}}{\text{Cantidad de colesterol desecado de la fase éter de cada patrón en mg}}$$

El valor 2,586 proviene de multiplicar el factor de conversión a *mmol/l* (0,02586) por 100 en la fórmula original.

Si todas las *S* calculadas son aproximadamente iguales, puede utilizarse un promedio; si difieren en  $\pm 0,3$ , tomar para el cálculo el patrón cuya *DO* se aproxime más a la de la muestra.

#### ESPECIFICIDAD

Para probar la especificidad del método se utilizaron 10 muestras diferentes, en las que se determinó el colesterol total por el método original y por el micrométodo; se calculó el coeficiente de correlación, *r*. Además, en otras 10 muestras el colesterol fue determinado por los métodos anteriores y por el enzimático CHOD-PAP de la firma Boehringer-Manheim. Se halló la correlación entre los diferentes métodos.

#### REPETIBILIDAD

Se determinó el colesterol total por el micrométodo a 10 alícuotas de una muestra en forma simultánea. Se calculó el coeficiente de variación y se aceptó un valor del 5 % o menos como satisfactorio.

#### REPRODUCIBILIDAD

Alícuotas de una misma muestra fueron congeladas. Dicha muestra procesada por duplicado durante 10 días consecutivos. Cada alícuota fue descongelada y utilizada una sola vez. Se empleó el mismo criterio utilizado en la *repetibilidad* para el coeficiente de variación.

#### LINEALIDAD

Se preparó un patrón de colesterol (150 *mg* hasta 100 *ml* con etanol absoluto), cuya concentración fue de 3,88 *mmol/l*. De la fase éter de petróleo para evaporar, se tomaron los siguientes volúmenes por duplicado: 0,5; 0,10; 0,20 y 0,30 *ml*, que correspondieron a concentraciones de colesterol de 1,94; 3,88; 7,76 y 11,64 *mmol/l*.

#### RECUPERACION

Se utilizó el patrón de 3,88 *mmol/l* y se preparó adicionalmente una solución de colesterol 0,129 *mmol* en cloroformo. Todas las alícuotas fueron procesadas por cuadruplicado. Cuatro tubos de ensayo contenían 0,1 *ml* de la solución patrón 3,88 *mmol/l* y los 16 restantes 0,2; 0,4; 0,8 y 2,6 *ml* de la solución de colesterol, en cloroformo

solamente; las alícuotas de cloroformo fueron evaporadas en baño de María a 100°C y después de alcanzar la temperatura ambiente se añadió a estos tubos 0,1 ml de la solución patrón 3,88 mmol/l. A todos los tubos se añadió 0,9 ml de etanol absoluto y 0,05 ml de KOH al 33%. En lo adelante, el método fue aplicado en la forma descrita antes.

Con este procedimiento se lograron concentraciones variables y crecientes de colesterol 3,88; 4,14; 4,39; 4,91 y 5,94 mmol/l correspondientes a la adición de 0,0; 0,026; 0,052; 0,103 y 0,206 mmoles de colesterol.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El método de Abell y colaboradores para la determinación del colesterol total posee una excelente especificidad (99%).<sup>4</sup>

La correlación hallada entre éste y el micrométodo ( $r = 0,95$ ) corresponde a un nivel de significación de  $p < 0,001$ , de lo cual se infiere que este último conserva una buena especificidad. Adicionalmente, en otra serie de 10 muestras, la correlación entre el método enzimático y el micrométodo fue de  $r = 0,96$  para un nivel de significación  $p < 0,001$ , lo cual sustenta adicionalmente su especificidad.

Los coeficientes de variación obtenidos para la *reproducibilidad* y la *repetibilidad*, el 2,8 y 5,6 %, respectivamente, se encuentran dentro de los rangos permisibles para los métodos de utilización en el laboratorio clínico.<sup>5</sup>

Se estudió el rango de concentraciones de colesterol para el cual el micrométodo mantenía linealidad con las DO obtenidas.

Se escogió un rango de concentraciones entre 1,94 y 11,64 mmol/l. En la figura pueden apreciarse los resultados. El procedimiento propuesto mostró linealidad en el rango de concentraciones utilizado.

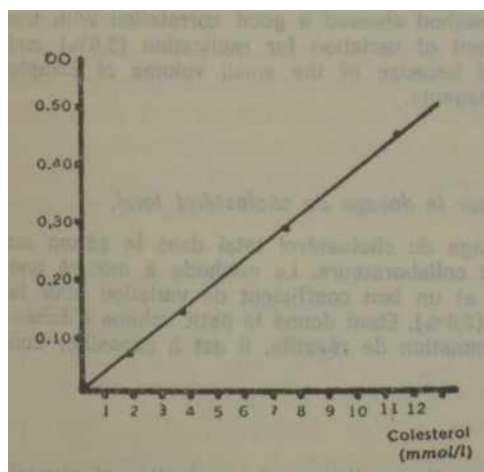


Figura. Sensibilidad del micrométodo propuesto para la determinación del colesterol total en suero o plasma.

Los resultados del experimento de *recuperación* aparecen en la tabla. Ellos muestran una buena recuperación en el rango escogido, que abarca sólo el rango considerado "normal".

Tabla. *Recuperación del colesterol añadido a 0,1 ml de patrón 3,88 mmol/l. (Valores presentados x + DS n = 4)*

Colesterol añadido (mmol)	DO	Colesterol total (mmol/l)	Colesterol recuperado (% recuperación)
0,0	0,164 ± 0,004	3,78 ± 0,05	0,0
0,026	0,174 ± 0,011	4,19 ± 0,21	97,5
0,052	0,184 ± 0,006	4,39 ± 0,24	97,5
0,103	0,208 ± 0,016	4,94 ± 0,25	100,5
0,206	0,250 ± 0,014	6,41 ± 0,09	107,5

En los resultados puede observarse que la máxima diferencia entre el colesterol añadido y el recuperado fue de un 7,5%, es decir, 0,19 mmol de colesterol por cada 2,59 mmol. Si se tiene en cuenta que el método original sólo puede detectar diferencias de 0,26 mmol o más entre muestras, este porcentaje de recuperación puede aceptarse como bueno.

El estudio de la *especificidad, reproducibilidad, repetibilidad, linealidad y recuperación* del método propuesto nos permite recomendar el uso del mismo, pues los resultados obtenidos no difieren de los registrados para el método original.

#### SUMMARY

Sánchez Serrano, D. et al.: *Micromethod for determination of total cholesterol.*

A micromethod for determination of total cholesterol in serum or plasma, based on that of Avell and coworkers, is described. The method showed a good correlation with the original one ( $r = 0,95$ ) and a fine coefficient of variation for replication (5,6%) and reproductiveness (2,8%). It is recommended because of the small volume of sample required (0,1 ml) and low consumption of reagents.

#### RÉSUMÉ

Sánchez Serrano, D. et al.: *Microméthode pour le dosage du cholestérol total.*

Il est décrit une microméthode pour le dosage du cholestérol total dans le sérum ou dans le plasma, fondée sur celle d'Avell et collaborateurs. La méthode a montré une bonne corrélation avec l'original ( $r = 0,95$ ) et un bon coefficient de variation pour la répétabilité (5,6%) et pour la reproductibilité (2,8%). Etant donné le petit volume d'échantillon nécessaire (0,1 ml) et la faible consommation de réactifs. Il est à conseiller son emploi.

#### BIBLIOGRAFIA

1. *Kannel, W. B. et al.*: Risk factors In coronary heart disease -An evaluation of several serum lipids as predictor of coronary heart disease. The Framingham Study. Ann Intern Med 61: 888-899, 1964.

2. *Wayne, T. f.; P. Alaupovic; M. O. Curry; E. T. Lee; P. S. Anderson; E. Schechter*: Plasma apolipoprotein B and VLDL-, LDL-, and HDL-Cholesterol as risk factors In the development of coronary artery disease in male patients examined by angiography. *Atherosclerosis* 39: 411-424, 1981.
3. *Abell, L. L.; B. B. Levy; B. B. Brodle; F. E. Kendall*: Cholesterol in Serum. *Standard Methods of Clinical Chemistry*. Vol. 2. New York, N. Y., Ed. Academic Press INC., 1958. Pp. 26-33.
4. *Craig, L. C.; C. Golumbic; H. Mighon; E. Titus*: Identification of small amounts of organics compounds by distribution studies III. Use of buffers in conuntercurrent distribution. *J Biol Chem* 161: 321-332, 1945.
5. *Thiel mann, K.*: Principios de Metodología en Bioquímica Clínica. Ciudad de La Habana, Ed. Organismos, Instituto Cubano del Libro, 1973. Pp. 62-63.

Recibido: 3 de diciembre de 1985

Aprobado: 8 de diciembre de 1985

Dr. Daniel Sánchez Serrano  
Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular  
Calle 17 y A.  
Vedado  
Ciudad de La Habana 4  
Cuba