

SOBRE LA DETERMINACIÓ DEL COLESTEROL: APORTACIONS A LA REACCIÓ DE LIFSCHUTZ

Comunicació presentada el dia 23 d'octubre de 1962 pels doctors

A. ORIOL i BOSCH

«Postdoctoral Fellow» de l'«U. S. Public Health Service»
al «Training Institute for Steroid Biochemistry»

i

K. EIK-NES

Professor Associat del Departament de Química Biològica i Director
del «Training Institute for Steroid Biochemistry» de l'Escola de Medicina
de la Universitat d'Utah (EE. UU.)

És un honor per a nosaltres de poder prendre part a les reunions científiques d'aquesta Societat, tornada a la vida després d'un silenci forçat de més de vint-i-cinc anys. El fet que un català i un noruec de l'altra banda de l'Atlàntic intervinguin en aquestes reunions biològiques demostra una vegada més l'internacionalisme de la ciència i d'aquesta institució catalana. Bé que ens sentim satisfets de contribuir a les activitats de la Societat Catalana de Biologia, lamentem extraordinàriament de no poder fer la comunicació personalment.

Colesterol és el nom virtual del compost: Δ^5 -coleston- 3β -ol. Aquest és, quantitativament, el més important d'un grup de compostos, els esterols, que pertanyen a la gran família dels lípids. En medis biològics es troba acompanyat d'una sèrie de companys quantitativament menys importants. Alguns d'aquests són representats a la part inferior de la figura 1. Els compostos amb un doble enllaç en posició 7-dehidro-colesterol i 7-colestonol són especialment abundants en la pell dels mamífers. En l'home contribueixen amb el 3 % de la quantitat total d'esterols hístics. El compost 3β -colestonol o dehidro-colesterol és un compost força estrany que sembla no ésser ni precursor ni metabolit del colesterol. El desmosterol o 24-dehidro-colesterol encara no fa sis anys que fou aïllat i identificat en medis biològics. És intermediari en la síntesi del colesterol que ha guanyat interès últimament, ja que alguna de les últimes drogues antiarterioscleròtiques ocasiona la seva acumulació en teixits. Finalment, hi ha un altre grup amb hidroxils a la cadena lateral que són especialment abundants en el teixit nerviós.

Presentem en una sola figura aquestes cinc fórmules per tal de fer evidents dos fets:

- la gran semblança entre els diferents esterols
- la manca de grups reactius en tots ells.

Per aquests fets ben coneguts no ens podrà, doncs, estranyar la manca de mètodes específics per a determinar el colesterol.

En general, tots els mètodes segueixen passos semblants: hom comença per extreure el medi biològic; després es fa una hidròlisi per alliberar el

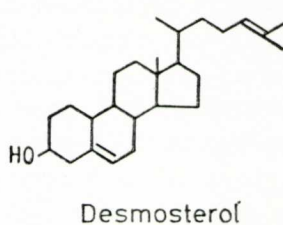
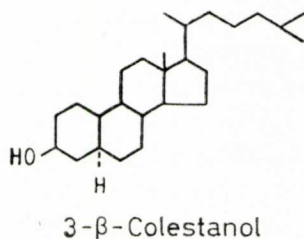
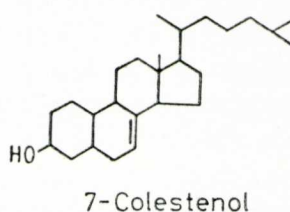
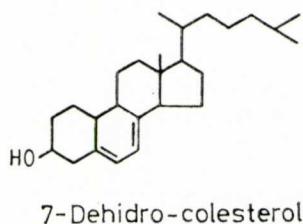
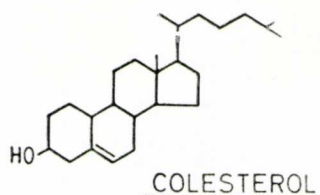


Fig. 1

compost dels seus lligams; hom procedeix a aïllar-lo d'enmig de les substàncies amb les quals pugui interferir, i, per fi, es quantifica. Anirem discutint breument la metodologia del colesterol segons aquest esquema clàssic.

EXTRACCIÓ

En el procés de l'extracció cal requerir el concurs d'un solvent capaç de trencar les unions làbils del colesterol amb les proteïnes i els hidrats de carboni.

Així mateix cal que aquest solvent no origini cap canvi químic en el nostre compost. Quan ens endinsem en el camp del colesterol, que vol dir posar-nos a treballar amb la fracció lipídica, ens és d'una gran utilitat consultar les publicacions d'un gran científic català: Jordi FOLCH. Des de Harvard J. FOLCH ens ha deixat una sèrie de treballs clàssics.. Per a extreure, ell recomana l'ús de la barreja cloroform-metanol en la proporció 2-1, seguit d'un rentat de l'extracte amb aigua. Altres solvents emprats són barreges d'etanol-èter (3-1) i acetona-etanol (1-1).

En general, la selecció del solvent dependrà de la polaritat del compost que vulguem extreure, i triarem l'un o l'altre, segons les finalitats de cadascú.

SAPONIFICACIÓ

Part del colesterol del medi biològic és combinat amb àcids grassos. A fi de trencar aquestes unions caldrà saponificar l'extret. Ara: no totes les unions esters són igual d'estables. Mentre algunes són relativament làbils, d'altres, com les dels àcids palmítics i esteàrics, són bastant resistents a la saponificació. És, per tant, difícil de definir les condicions ideals per a saponificar. Seran preferibles aquelles condicions suaus que permetin l'alliberament complet del material no saponificable; però aquestes condicions variaran segons la qualitat del material biològic originari. Caldrà definir experimentalment les condicions ideals de saponificació en cada cas. Uns autors empren solucions debils d'hidròxid de potassa (KOH) i fan la hidròlisi a altes temperatures (100 °) en atmosfera de nitrogen. D'altres prefereixen, contràriament, d'incrementar la concentració del KOH i reduir la temperatura. Finalment, altres autors provaren les hidròlisis enzimiques que malauradament han demostrat ésser incompletes, puix que afecten solament alguns tipus d'unions. Com Cook expressa clarament en el seu llibre sobre colesterol, la saponificació és un procés necessari i convenient, però la manca d'un mètode senzill i eficaç per a hidrolitzar, que al mateix temps que no creï artefactes sigui complet, és de doldre fortament.

AÏLLAMENT

La fracció no saponificable és una fracció de gran complexitat. A més dels esterols, ens trobem amb d'altres hidrocarburs saturats i no saturats. Convindrà

de continuar la purificació de l'extret, i per a aconseguir-ho podem fer ús d'una sèrie de mètodes que descriurem breument tot seguit.

a) *Partició entre solvents i recristallitzacions.* — El fet que diferents substàncies mostrin distinta solubilitat en els solvents pot ésser emprada per a aconseguir separacions semiquantitatives (p.e.: l'acetona és un dissolvent pobre per als fosfolípids, però no ho és per als altres lípids). Aquest mètode resulta limitat per les interaccions dels diferents components d'una barreja, en la qual les solubilitats d'aquells es modifiquen mútuament.

Quan l'extret ja és bastant enriquit, les recristallitzacions repetides són un bon mètode de purificació, bé que per a separar segons quins esterols cal repetir el procés més de deu vegades, i encara la separació no és total.

Quan hom treballa amb material radioactiu no pot evitar l'ús de la recristallització fins a activitat específica constant com a mitjà per a caracteritzar el compost radioactiu.

b) *Cromatografia.* — La cromatografia en totes les seves accepcions ha estat usada per a separar els esterols. La cromatografia d'adsorció en columnes d'òxid d'alumini o d'àcid salícic ha estat emprada amb èxit per a separar el colesterol lliure de l'esterificat i d'altres esterols amb grups oxigenats en el carboni 7. Tot sovint hom procedeix a la formació de derivats que siguin més fàcilment separables que els compostos originals. IDLER i BAUMAN formaven derivats nitrogenats amb l'avantatge que pel fet d'ésser acolorits hom pot seguir-ne visualment el progrés en la columna. STOKES separa els components de l'isocolesterol (esterols del greix de la llana) mitjançant la formació de derivats benzoats o p-iodobenzoats.

Hom acostuma a portar a terme la cromatografia de partició sobre paper, i per això s'anomena cromatografia en paper. Aquest ha estat un mètode de gran èxit en la separació dels esteroides, i, en canvi, en el camp dels esterols no ha satisfet completament. NEHER i WETSTEIN, de la Ciba de Basilea, modificaren un sistema de ZAFFARONI per separar esterols poc polars (fase estacionària: fenilcelosolve; fase mòbil: heptà). KRITXEVSKY usa un sistema a base de quilon-metanol, i separa els Δ^7 esterols de l'ergosterol. Quan usa hexà - querosè 60 % - 60 % propà, separa els esterols lliures dels conjugats i els monooxidats dels que tenen, de més a més, un altre oxigen en posició 7. Malgrat aquests i d'altres resultats positius, la cromatografia en paper, ara per ara, ha fracassat en separar els esterols que tenen un oxigen únic, un doble enllaç en posició 5 però de 27, 28 i 29 carbonis.

La partició cromatogràfica entre fase líquida i gasosa o gas-cromatografia ens ofereix un esdevenidor optimista. En el curs dels dos últims anys han començat a aparèixer publicacions descrivint separacions de diferents esterols generalment en forma de derivats metilats. Bé que els esterols que s'han de separar fins ara són els més senzills de separar, la potència de separació d'aquest mètode ens fa creure que d'ací poc temps tindrem, gràcies a la gascromatografia, un sistema ràpid i eficaç per a determinar quantitativament cada un dels esterols per separat.

c) *Precipitació amb digitonina.* — L'any 1909, WINDAUS descobreix que en barrejar solucions alcohòliques de colesterol i de digitonina es forma un complex insoluble que precipita. Ell emprà aquest mètode per a una determinació gravimètrica del colesterol. Bé que avui la determinació gravimètrica ha caigut en desús, ha quedat, en canvi, la precipitació amb digitonina com un mètode clàssic per a purificar els esterols. El colesterol no és l'únic cos que forma complexos insolubles amb digitonina, ja que un gran nombre d'esterols i d'esteroides, així com d'altres substàncies — fenols i alcohols poliinsaturats del tipus dels terpens — precipiten amb la digitonina. És difícil de formular una llei general respecte a la solubilitat dels complexos digitonínics per la presència de molts altres factors. Però, en general, hom pot afirmar que els complexos més insolubles són els formats per substàncies amb la configuració $3\text{-}\beta\text{-OH-}\Delta_5$ o $3\text{-}\beta\text{-OH-5-}\alpha\text{-H}$, especialment quan la cadena lateral és de tipus hidrat de carboni. L'epimerització de l'hidroxil del carboni 3. a la posició α o la seva protecció per l'hidrogen del carboni 5. en posició β originen complexos solubles. Enmig dels dos extrems hi ha un gran nombre d'altres substàncies que formen complexos digitònics de solubilitat intermèdia. Si el colesterol no és l'únic que precipita amb digitonina, tampoc no és la digitonina l'únic glucòsid que forma complexos insolubles amb els esterols. Recentment KABARA descriu l'ús de la tomatina (glucòsid del tomàquet), que té més especificitat per al colesterol que no la digitonina.

d) *Dibromació.* — La substitució de dos àtoms de Br en el doble enllaç del colesterol dóna lloc al dibromat, que es caracteritza per la seva insolubilitat. La dibromació és actualment el millor mètode per a purificar el colesterol que tenim a les nostres mans. En menys de 48 hores purificarem el colesterol, una mostra, d'un punt de fusió de 147 fins a 150'5 graus, gràcies a aquest mètode. Lamentablement, no el podem aplicar amb facilitat a la metodologia analítica quantitativa, a causa de la baixa i inconstant recuperació del material original.

REACCIONS DE COLOR

Un cop aïllat el compost que volem determinar, procedirem a la seva quantificació, i per aconseguir-ho recorrerem a una reacció de color, sempre que ens sigui possible, per raó dels avantatges i de la senzillesa d'aquest tipus de quantificacions. El colesterol, conegut ja des de mitjan segle XVIII, és un compost que sempre ha estat de moda. No és sorprenent, doncs, que KRITXEVSKY citi, en el seu magnífic llibre sobre el colesterol, 24 reaccions de color

Taula I

REACCIONS DE COLOR PEL COLESTEROL

PROVA	BARREJA REACTIVA	REFERENCIA
LIEBERMAN-BURCHARD	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CO} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CO} \end{array} + \text{H}_2\text{SO}_4$	LIEBERMAN: BER. 18:1803 (1885) BURCHARD: CHEM. ZSCHR. 61:25 (1890)
TSCHUGAEFF	$\text{CH}_3\text{COCl} + \text{ZnCl} + \text{CH}_3\text{COOH}$	TSCHUGAEFF: Z. ANG. CHEM. 14:618 (1900)
LIFSCHUTZ	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{FeCl}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$	LIFSCHUTZ: Z. PHYSIOL. CHEM. 50:436 (1907)

diferents. Nosaltres, més modestos, en presentem a la taula I solament tres de les 24.

El mecanisme d'aquestes reaccions no està establert completament. Sembla evident que en el medi fortament àcid en què es desenvolupen es produeixen deshidratacions i es formen compostos amb nous dobles enllaços. Aquests *dienes* van formant productes de polimerització del tipus del 3-3'-bis (3-5-colestaniene). Aquests complexos, per a tenir 4 dobles enllaços, són molt cromogènics, però, alhora que són altament excitables per l'energia lluminosa, són inestables. A mesura que van adoptant d'altres formes de polimerització, la intensitat del color va disminuint, i canvien de longitud d'ona. Aquestes reaccions en cadena expliquen els canvis de color en el temps que després descriurem amb més detall i que són ben coneguts en aquest tipus de reaccions. La introducció de substàncies oxidants, com el clorur fèrric o l'ús d'àcids més dèbils, pot produir canvis en el sentit de donar a la reacció més especifitat o més sensibilitat.

Com que la literatura sobre la reacció de LIEBERMAN-BURCHARD és molt extensa i la reacció de TSCHUGAEFF avui no és gaire emprada, ens limitarem a discutir la reacció de LIFSCHÜTZ. Aquesta reacció, la més recent de les tres, ha entrat en un període de moda gràcies a la tasca popularitzadora de dos americans, ZACK i ZLATKIS. Nosaltres, que fa uns quants mesos buscàvem un mètode ràpid i còmode per a determinar esterols totals, l'adoptàrem per

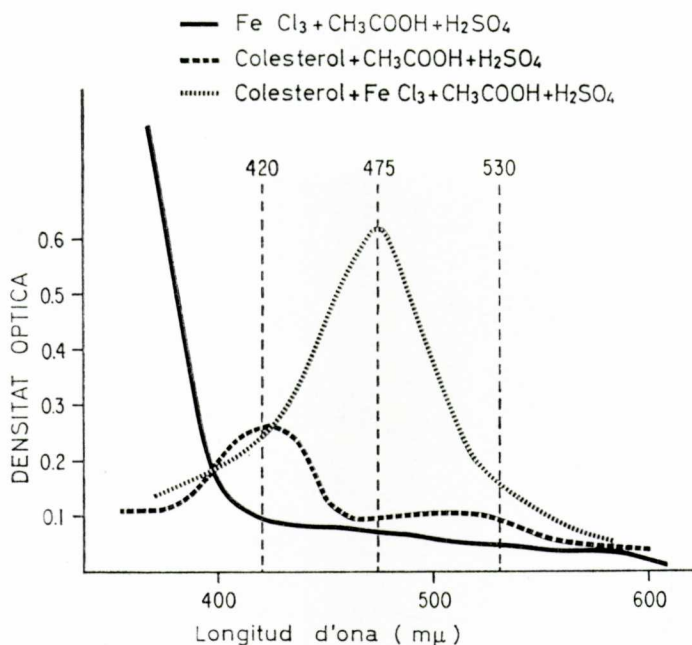


Fig. 2

diverses raons. Però de bon començament els nostres resultats començaren a diferir dels descrits en la literatura, i com que eren millors que no esperàvem, ens interessàrem en un estudi un xic més profund de la problemàtica d'aquesta reacció.

a) Per començar vegem com es forma el cromogen i quin paper hi exerceix cada un dels 4 components de la reacció. A la figura 2 tenim representats els espectres d'absorció, registrats automàticament en un espectrofotòmetre Beckman DK-2, de tres barreges diferents: Clorur fèrric (Cl_3Fe) en acètic-sulfúric, colesterol en acètic-sulfúric i, finalment, la combinació de tots quatre. Veiem que el Cl_3Fe no contribueix per ell sol amb cap màxim

d'absorció en aquesta zona de l'espectre. El colesterol en presència dels àcids dóna un cromogen de poca intensitat, la màxima de la qual es troba a 420 m μ de longitud d'ona de l'espectre. Quan els quatre components hi són tots presents és evident la formació d'un pic encrespat amb el màxim al voltant de 475 m μ . Aquesta és la configuració del pic ideal per a usar en quantificacions espectrofotomètriques. Aquest pic no correspon, però, al del

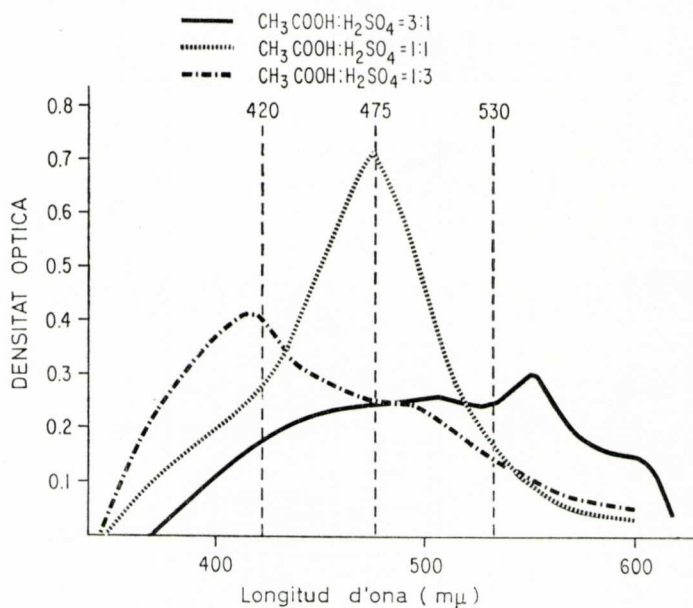


Fig. 3

cromogen usualment descrit en la reacció de LIFSCHÜTZ, en la qual el màxim, segons ZACK, és a 550 m μ . És per això que anàrem darrera l'efecte que la concentració relativa dels àcids acètic i sulfúric pogués tenir en aquesta divergència entre els nostres resultats i els reports existents. A la figura 3 tenim els espectres originats per igual concentració de colesterol en el reactiu en el qual canviem la proporció acètic-sulfúric. És a parts iguals d'ambdós quan es forma el cromogen amb el pic a 475 m μ . Si l'acètic domina, el cromogen té un pic a 550 m μ i sembla el de la literatura, i si, al contrari, és el sulfúric el que domina, el pic format apareix a 410 m μ . Però cap dels dos darrers pics no té l'alçada ni l'encrespament que té el pic a 475 m μ .

b) Com ja hem dit, totes les reaccions d'aquest tipus són extraordinàriament inestables. Nosaltres no podíem deixar d'estudiar l'efecte del temps en la formació del cromogen. A la figura 4 hem col·locat cinc espectres característics a mesura que es prolonga la incubació. El primer espectre que hom detecta, abans dels cinc minuts, presenta un màxim d'absorció al voltant de

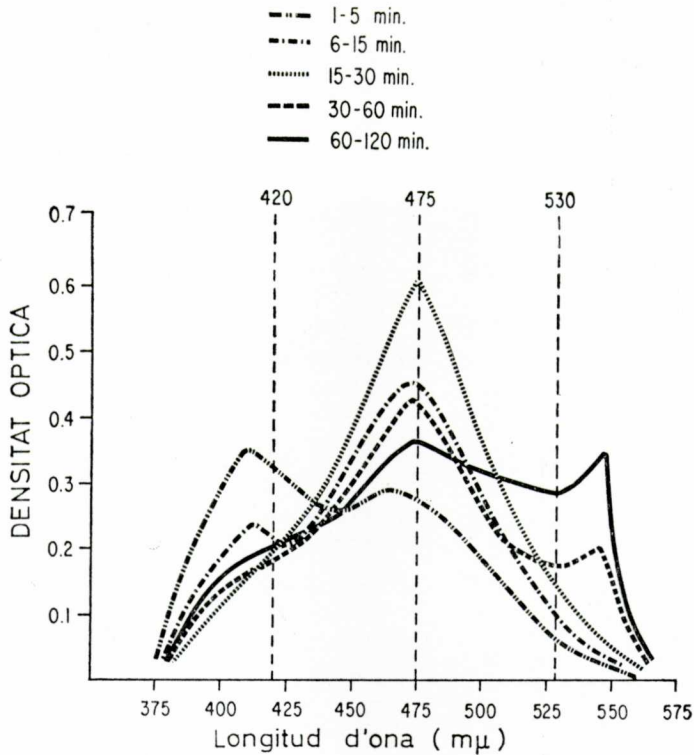


Fig. 4

les 400 mμ. A mesura que el temps passa, aquest pic va disminuint, i, en canvi, apareix un pic al voltant de les 450 mμ, que creix i es desplaça, fins a obtenir el seu màxim d'intensitat al voltant dels 20 minuts, trobant-se, llavors, a les 475 mμ. Després, aquest pic es redueix, i a les seves expenses es forma un màxim als 550 mμ. Si aquests són els canvis qualitius de l'espectre d'absorció, a la figura 5 hem representat els canvis quantitius de la intensitat òptica calculada, segons la fórmula d'ALLEN, a través del temps. És evident un ràpid increment de la densitat òptica als primers minuts fins a aconseguir

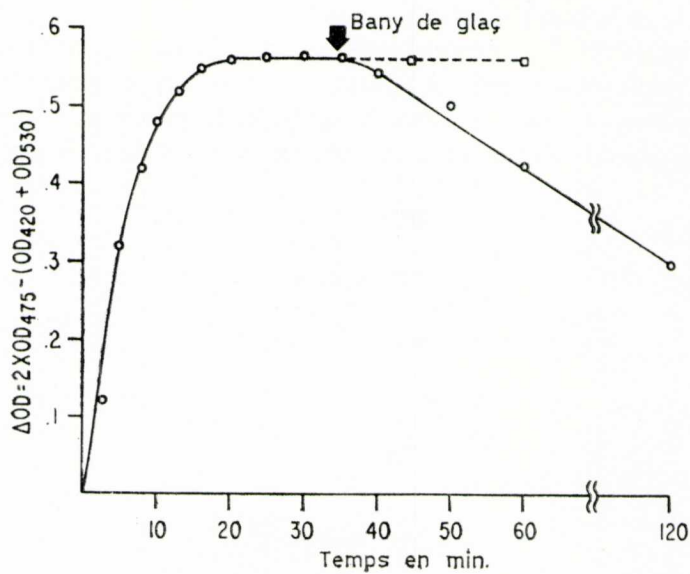


Fig. 5

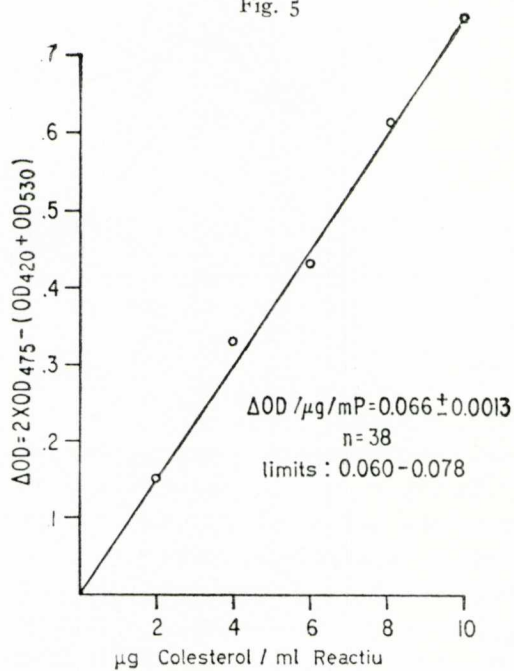


Fig. 6

un replà als 20 minuts, en el qual es manté més o menys fins als 30-35 minuts. Després comença a decreixer gradualment. Un fet del qual volem deixar constància és l'estabilització del cromogen un cop el posem a baixes temperatures. Un duplicat posat en glaç, quan ha aconseguit el màxim, no ha canviat en absolut la intensitat de la seva extinció al cap de 10 a 30 minuts.

c) Perquè una reacció sigui aprofitable per a fins quantitatius ha de seguir la llei de BEER, és a dir: les densitats òptiques han d'ésser linealment proporcionals a les concentracions de la substància a mesurar. A la figura 6 mostrem com fent servir el màxim de 475 mμ de la reacció de LIFSCHÜTZ, es compleix la llei de BEER. La linealitat és clara fins als 10 μg per centímetre

Taula II

TIPUS DE REACCIÓ	PIC D'ABSORCIÓ	OP/μg/ml	ε	REFERÈNCIES
LIEBERMAN-BURCHARD	620	0,0037	1437	SCHOENHEIMER & SPERRY: JBC <u>106</u> :745 (1934)
LIEBERMAN-BURCHARD	620	0,0057	2210	ABELL <u>et al.</u> : JBC <u>195</u> :357 (1952)
P-TOLUENSULFONIC	550	0,0035	1355	PEARSON: ANAL. CHEM. <u>25</u> :813 (1953)
TSCHUGAEFF	FILTRE BLAU	0,0075	2900	TRINDER: ANALYST <u>77</u> :321 (1952)
TSCHUGAEFF	522	0,0262	10155	JORGENSEN & DAM: ACTA CHEM. SCAND. <u>11</u> :1201 (1957)
LBSCHUTZ	550	0,0254	9350	BOWMAN & WOLFF: CLIN. CHEM. <u>8</u> :302 (1962)
LBSCHUTZ	550	0,0241	9835	—II— —II—
LBSCHUTZ	475	0,0666	25814	ORJOL-BOSCH & EIK-NES:

cúbic de reactiu. No hem investigat concentracions més altes, perquè preferim de diluir les mostres en lloc de llegir densitats òptiques superiors als .8 o .9., ja que a partir d'aquesta zona els errors de lectura comencen a ésser considerables. Si expressem la intensitat de la reacció o pendent de la coberta mitjançant la densitat òptica constant per μg i per ml, ens trobem amb un valor mitjà de 0.066, per 38 determinacions diferents. L'error *standard* d'aquest valor mitjà és 0.0013. Què volem dir amb aquestes xifres? Per a entendre-ho serà millor de comparar-les amb d'altres, tretes de la literatura. A la taula II tenim les constants de mètodes diversos. Les dues primeres són de dos mètodes clàssics: l'un, el primer, és probablement el mètode més acreditat per a la investigació; l'altre té un gran prestigi com a mètode clínic. Després ve el mètode de PEARSON amb toluensulfònic, que és d'una gran senzillesa. Després, dues determinacions usen la reacció de TSCHUGAEFF i, finalment, els mètodes que empren la reacció de LIFSCHÜTZ. A la segona columna tenim el màxim d'absorció on s'efectua la lectura espectrofotomètrica. A les dues columnes següents hi ha les densitats òptiques per ml i μg i l'extinció molar (ε), respec-

tivament, i, per fi, a l'última columna hi ha les referències bibliogràfiques. És evident, per les xifres indicades, que la reacció de LIFSCHÜTZ, tal com nosaltres la portem a terme utilitzant el màxim d'absorció de 475 m μ , és almenys el doble sensitiva que la que la segueix. Això vol dir que mitjançant aquesta reacció podem utilitzar menys material biològic, car

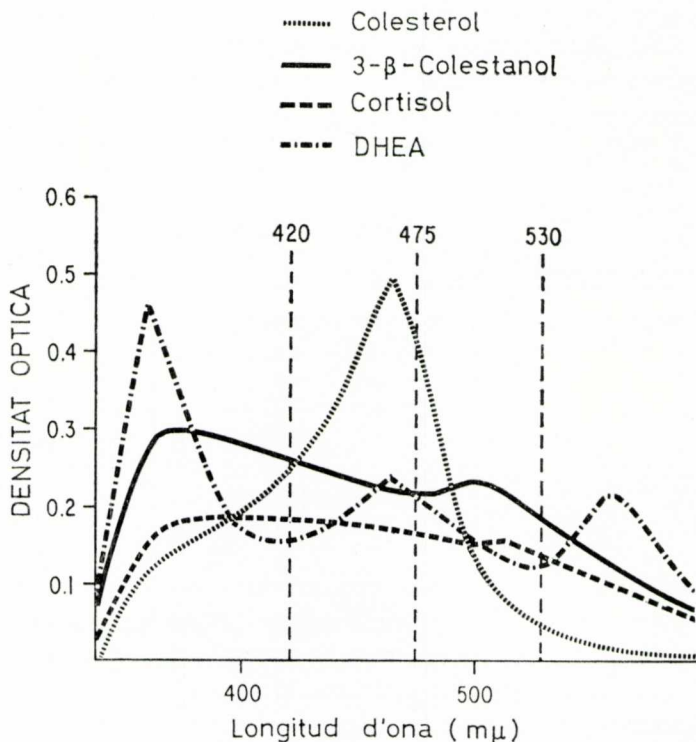


Fig. 7

la reacció acolorida no ens és cap factor limitant. En no necessitar tant de material biològic tindrem menys impureses que puguin interferir, i, per tant, podrem purificar la mostra en menys passos.

d) Al començament hem dit que no eren d'esperar reaccions específiques per al colesterol. Nosaltres procedírem a mirar quines substàncies poden interferir i estudiàrem tots els esterols i molts dels esteroides que teníem a la nostra disposició. A la figura 7 hem col·locat els espectres d'absorció més representatius. El 3 β -colestanol o dehidro-colesterol no té cap pic en el seu espectre

d'absorció en aquesta zona. Com ell es comporten altres esterols saturats, com són: 3β -coprostanol, colestano, coprostanol. L'espectre del cortisol és típic dels esteroides de 21 carbonis amb el doble enllaç en posició 4. Aquí tampoc no hi ha cap pic, i el mateix espectre ens donaren la progesterona i la corticosterona. Hem triat l'espectre de la dehidroepiandrosterona com el més típic dels esteroides de 19 i 21 carbonis amb el doble enllaç en posició 5. Aquests

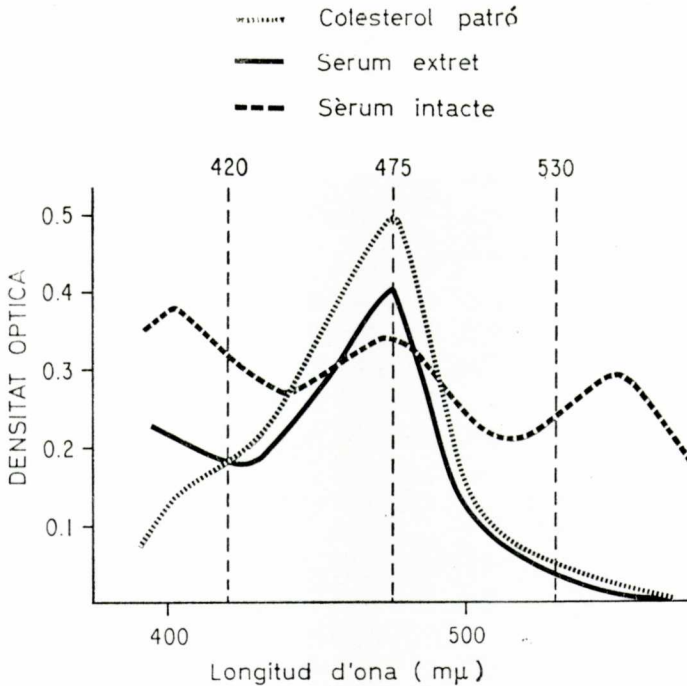


Fig. 8

compostos donen un màxim d'absorció al voltant dels 390 mμ i un petit pic als 475 mμ de molta menys intensitat que el del colesterol. La possibilitat d'interferències d'aquests esteroides en les determinacions de colesterol són mínimes, ja que les diferències de concentració són massa grosses. Dels compostos estudiats sembla que podem deduir que per a la formació del cromogen calen substàncies que tinguin les característiques següents:

- un hidroxil en carboni 3,
- un doble enllaç en posició 5,
- una cadena lateral d'una certa longitud.

Ens queda per investigar l'efecte que pugui tenir el doble enllaç en posició 7 o en la cadena lateral, així com els grups metil en carboni 4, 14, i 24. En els darrers anys, diferents autors, entre ells ZACK i ZLATKIS i PEARSON, han postulat mètodes per a la determinació dels esterols plasmàtics usant directament el reactiu en el plasma o sèrum. Aquests mètodes han estat atacats fortament per altres autors en trobar que donaven resultats erronis. Però, atesa la senzillesa d'aquests mètodes, cal provar si veritablement hom

Taula III

DETERMINACIÓ DE COLESTEROL

EXTRACCIÓ:	1) 10 vol. Acetona : EtOH (1 : 1)
	2) Centrifugar i decantar
	3) Assecar
REACCIÓ DE COLOR:	a) Dissoldre en $\text{CH}_3\text{-COOH}$
	b) Refredar al bany de glaç
	c) Afegir-hi reactiu $\text{FeCl}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ (conservar-lo a la nevera)
	d) Agitar 10 sec.
	e) Refredar-ho 1 min. al bany de glaç
	f) Deixar-ho a temperatura ambient i llegir passats 20-30 minuts a 420, 475 i 530 m μ

pot estalviar l'extracció i la purificació. A la figura 8 hem representat els espectres d'absorció de colesterol *standard* i el que origina el reactiu aplicat directament al plasma o a l'extret d'aquest plasma. És evident la diferència entre els dos espectres d'absorció. En el plasma íntegre hi ha substàncies que donen màxims d'absorció a 400 i a 550 m μ . Això fa que el pic a 475 m μ quedi parcialment interferit pels seus veïns. Quan ens prenem la molèstia d'extreure amb acetona-etanol, l'espectre d'absorció és pràcticament idèntic al del colesterol *standard* (almenys fins a arribar a la zona dels 420 m μ).

e) Després d'haver discutit breument tots aquests factors en la reacció de LIFSCHÜTZ, volem presentar els diversos passos de la reacció tal com nosaltres la usem per a determinar esterols totals en teixits o en plasma. A la taula III tenim descrits els passos a seguir. Extraïem amb la barreja d'acetona-etanol a parts iguals, amb un mínim de 10 volums. Centrifuguem i decanem o bé senzillament filtrem. En la fase lipídica, que ha de tenir aspecte clar, l'assequem a 40 graus en atmosfera de nitrogen. Redissolem el residu amb

àcid acètic glacial i posem la solució en un bany de glaç. Pipetegem un volum igual de reactiu. El reactiu es fa a base d'un centímetre cúbic de solució de clorur fèrric al 10 % en acètic, portada a 100 centímetres cúbics amb àcid sulfúric concentrat. El pipeteig del reactiu es fa amb cura, deixant-lo caure per la paret del tub perquè es formin dues fases. Després sacsegem per aconseguir una barreja homogènia. Immediatament es posa la mostra en el bany de glaç, per un minut. Després es treu i es deixa a temperatura ambient, de 20 a 30 minuts. La lectura es fa en un espectrofotòmetre a les longituds d'ona de 420, 475 i 530 m μ . Es calcula la densitat òptica usant la fórmula de correcció d'ALLEN.

Per finalitzar voldríem fixar l'atenció dels lectors en la diferència existent entre la quantificació dels esterols totals i la del colesterol. Si el que hom necessita és determinar la quantitat d'esterols presents en un material biològic, podem fer ús d'un gran nombre de mètodes de relativa senzillesa que ens proporcionaran resultats satisfactoris, i n'és un el que avui hem descrit. Però si el que cal és determinar específicament el colesterol, problema que cada dia es planteja més, tenim per seguir prèviament un camí llarg, penós i complicat. No podem prescindir pràcticament de cap dels passos que hem citat breument: extracció, saponificació, cromatografia, precipitació amb digitonina, dibromació i especialment, si hom treballa amb material radioactiu, les recristallitzacions fins a assolir una activitat específica constant. L'únic raig d'esperança, ens l'ofereix la gascromatografia, sobre la qual esperem de poder parlar en aquesta Societat l'any vinent.