

Voorwaarden bij Cholesterol-bepalingen

door M. HANSENS

Principe van de methode.

De methode aangewend voor de bepaling van cholesterol is gesteund op de kleurreactie volgens C. Liebermann (5) en H. Burchard (6), waarbij een groene verkleuring ontstaat wanneer men aan cholesterol, opgelost in chloroform, azijnzuuranhydride en sterk zwavelzuur toevoegt.

Deze kwalitatieve reactie werd o.a. uitgewerkt tot een kwantitatieve photometrische methode door H. Riffart en H. Keller (7), met behulp van den photometer van Pulfrich, voor het doseren van cholesterol in verschillende levensmiddelen (bv. in eieren en boter).

Zij ondervonden dat de Liebermann-reactie afhankelijk is van de hoeveelheid sterk zwavelzuur, van de temperatuur, van het licht en van de reactietijd.

Om deze afhankelijkheidsfactoren uit te schakelen hebben een aantal biologische scheikundigen een gelijkaardige doseringsmethode op punt gesteld voor het bepalen van cholesterol in bloed; dank zij W. M. Sperry en F. G. Brand (8) werd voor het eerst een methode aangegeven waarbij al deze factoren vastgelegd zijn.

Het eerste doel van ons onderzoek is geweest deze methode precies te ijken op zuiver cholesterol, voor verschillende concentraties, om zodoende over de nodige ijkcurven te beschikken voor verdere serie bepalingen van cholesterol in verschillende levensmiddelen, en o.m. in visoliën.

Reagentia.

1) Uitgaande van een standaard cholesterol-oplossing (watervrij cholesterol) in zuurvrij CHCl_3 , werden verdunningen gemaakt met chloroform, welke per 5 cm^3 oplossing 0,218 mg, 0,436 mg en 0,658 mg cholesterol bevatten.

2) Het standaardreagens wordt als volgt verkregen : bij 20 cm^3 azijnzuuranhydride, afgekoeld in ijswater laat

men 1 cm³ sterk H₂SO₄ druppelen onder voortdurend schudden en afkoelen; dit reagens, in ijswater bewaard, geeft na 1 uur constante resultaten.

Temperatuur en lichtregeling.

De temperatuur, waarbij de verkleuring optreedt, wordt bij 24° gehouden door de reactiebuisjes te dompelen in een zelfregelend electrisch waterbad.

Om de invloed van het licht op de verkleuring uit te schakelen wordt de proef in het donker uitgevoerd.

De tijd.

Nadat een schudbuisje met 5 cm³ cholesteroloplossing in CH₂Cl₂ gedurende 9 min. in het waterbad tot temperatuursevenwicht is gekomen, voegt men 2 cm³ koud reagens toe, schudt alles goed dooreen (\pm 10 sec.) en plaatst het buisje terug in het waterbad, in het donker.

Volgens W. M. Sperry en F. G. Brand onstaat de maximale kleurintensiteit (dus de minimale doorlaatbaarheid) 17 tot 18 minuten na het toevoegen van het reagens. Door de bepaling van de doorlaatbaarheid van de bovenvermelde cholesteroloplossingen 10 min., 20 min., 30 min. en 40 min. na het toevoegen van het reagens, hebben wij de invloed van de tijd op de kleurintensiteit vastgesteld met een optimum voor de meting bij 17 tot 18 minuten.

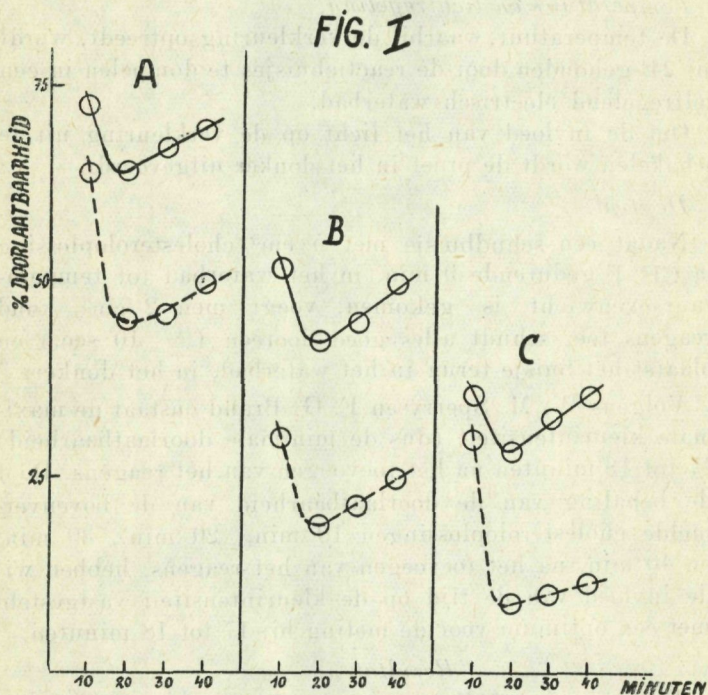
Resultaten.

De bekomen resultaten met de photometer van Pulfrich hebben betrekking op het filter S 61 (het meest geschikte filter in dit geval) en op een compensatievloeistof bestaande uit 5 cm³ CHCl₃ + 2 cm³ standaardreagens.

Aflizing na ... min.	Hoeveelheid watervrij cholesterol in 5 cm ³ CHCl ₃					
	0,218 mg		0,436 mg		0,654 mg	
	% D = % Doorlaatbaarheid met bakje van					
	9,98mm	19,99mm	9,98mm	19,99mm	9,98mm	19,99mm
10	72,8	64,1	52,0	30,1	35,1	30,0
20	64,4	45,3	42,4	19,0	28,5	9,0
30	67,3	46,0	45,0	21,4	32,8	10,3
40	69,6	49,8	50,0	25,0	35,8	11,8

Deze resultaten worden in bijgaande diagrammen verduidelijkt :

Fig. 1 geeft % doorlaatbaarheid t.o.v. de tijd; fig. II



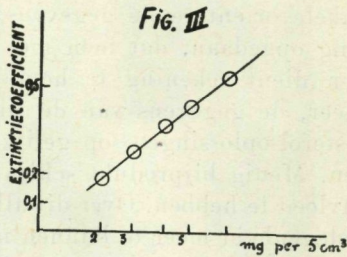
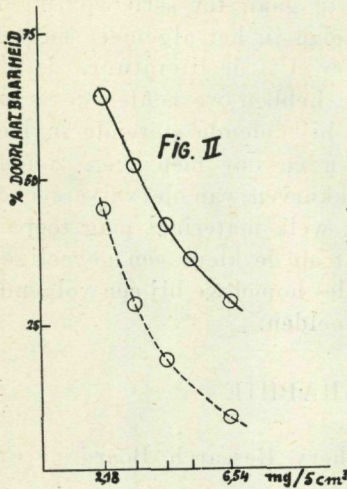
geeft % doorlaatbaarheid t.o.v. het aantal mg cholesterol per 5 cm³ oplossing.

Ze tonen aan dat de maximale kleurintensiteit bij deze omstandigheden optreedt, 18 minuten na het toevoegen van het reagens, wat ten volle overeenstemt met de gegevens van Sperry en Brand.

De logarithmische kurven in fig. II voor de beide bakjes, omgerekend in extinctiecoëfficiënten, geven één en dezelfde rechte lijn (fig. III) in overeenstemming met de wet van Lambert en Beer die luidt : de extinctie coëfficiënt is recht evenredig met de concentratie.

Om de aldus verkregen kurven te controleren hebben

wij nog een drietal punten bepaald : uitgaande van een oplossing, bevattende 0,327 mg cholesterol verkregen wij een doorlaatbaarheid met bakje 9,98 mm van 52,5 %; met 19,99 mm bakje van 28,0 %; terwijl 0,523 mg cholesterol



in 5 cm³ een doorlaatbaarheid vertoonde van 37,0 %. Deze uitslagen stemmen ten volle overeen met de verkregen kurven.

De extinctiecoëfficiënten (E) bekomen voor de onderzochte oplossingen stemmen overeen met :

mg per 5 cm ³	bakje 9,98 mm		bakje 19,99 mm	
	% D	E	% D	E
0,218	64,4	0,192	45,3	0,173
0,327	52,5	0,280	28,0	0,277
0,436	42,4	0,373	19,0	0,360
0,523	37,0	0,433		
0,654	28,5	0,542	9,0	0,523

Besluit.

De Liebermann-reactie, gebruikt bij het doseren van cholesterol in zuivere oplossingen is volkomen reprodu-

ceerbaar, wanneer men temperatuur, licht, concentratie van de reagentia en tijd zorgvuldig in acht neemt.

De ijkkurven, waarover we thans beschikken tot het bepalen van zuiver cholesterol opgelost in chloroform, stellen ons nu in staat over te gaan tot seriebepalingen van cholesterol in levensmiddelen in het algemeen en dus ook in visoliën in het bijzonder. Uit de literatuur, als uit enkele oriënterende gegevens, hebben we echter de ervaring opgedaan, dat men met bijkomende storende invloeden dient rekening te houden en dat men niet, zonder meer, de gegevens van de ijkkurven van de zuivere cholesterol-oplossingen, op gelijk welk materiaal mag toepassen. Menig bijproduct schijnt op de kleur een gevoeligen invloed te hebben. Over dit alles hopen we bij een volgende gelegenheid meer te kunnen melden.

BIBLIOGRAPHIE

1. — H. N. Brocklsby, Fishery Research Board of Canada, Bull. 59 (1941).
2. — M. E. Stansby and J. M. Lemon, U. S. Fish and Wildlife Service, Investigational Rept. I (1941).
3. — H. Beard, Rept. U. S. Commissioner of Fisheries for 1925 (1926).
4. — W. O. Atwater, U. S. Fish Commissioner's Rept., 1888, p. 679.
5. — C. Liebermann : Ber. Deutsch. Chem. Ges. 18 (1884).
6. — H. Burchard : Beitrage zur Kenntnis der Cholesterine-Rostock 1899.
7. — H. Riffart & H. Keller : Z.U.L. 68 (1934) 114-138.
8. — W. H. Sperry & F. G. Brand : Journ. of Biol. Chemistry, Vol. 150, n° 2, October 1943.

Laboratorium voor levensmiddelenleer.
Rijksuniversiteit te Gent.

Bestuurder : Prof. Dr. B. V. J. CUVELIER.