

Yüksek Dansiteli Lipoprotein-Kolesterol Tayininde Dekstran Sülfat-Magnezyum ve Fosfotungstat-Magnezyum Presipitasyon Tekniklerinin İncelenmesi

Melahat Dirican*, Emre Sarandöl**, Engin Ulukaya**, Asuman Tokullugil***

ÖZET. Normal sağlıklı kişilerden (n=50) elde edilen serumlarda farklı tekniklerle yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol (HDL-K) tayini yapıldı: 1- Dekstran sülfat-magnezyum (DS-Mg) presipitasyonu, enzimatik yöntemle kolesterol ölçümü (EDS), 2-DS-Mg presipitasyonu, kimyasal yöntemle (Zak) kolesterol ölçümü (ZDS), 3-Fosfotungstat-Mg (FT-Mg) presipitasyonu, enzimatik yöntemle kolesterol ölçümü (EFT), 4-FT-Mg presipitasyonu, kimyasal yöntemle kolesterol ölçümü (ZFT).

Dört değişik şekilde ölçülen HDL-K düzeylerinin birbirlerinden anlamlı şekilde farklı oldukları ancak, aralarında anlamlı düzeyde korelasyon gösterdikleri saptandı. En yüksek korelasyon ($r=0.705$) EFT ile ZDS yöntemleri arasında bulundu. Çalışma-içi değişkenlik katsayısı (% CV) EDS, ZDS, EFT ve ZFT için normal havuzda sırasıyla 9.71, 5.23, 7.38, 3.69; yüksek havuzda 12.15, 15.36, 10.12 ve 6.20 idi. Günler-arası % CV +4°C'de bekletilen serumlarda, -20°C'de bekletilenlere göre biraz daha düşük bulundu.

Sonuçta, HDL-K tayininde isabet derecesinin iyi olmamasından presipitasyon işleminin sorumlu olduğu düşünüldü.

Anahtar Kelimeler .Yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol .lipoprotein presipitasyonu.

Evaluation of Dextran Sulphate-Magnesium and Phosphotungstate-Magnesium Precipitation Techniques for High Density Lipoprotein-Cholesterol Determination

SUMMARY. High density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) was determined in the sera of normal healthy persons (n=50) with different techniques: 1-Precipitation with dextran sulphate-magnesium (DS-Mg), enzymatically cholesterol determination (EDS), 2-Precipitation with DS-Mg, chemicaly (Zak) cholesterol determination (ZDS) 3- Precipitation with phosphotugstate-Mg, enzymatically cholesterol determination (EFT), 4-Precipitation with FT-Mg, chemicaly cholesterol determination (ZFT).

The HDL-C levels found by 4 different methods were significantly different from each other; on the other hand there were significantly correlations among each other. The highest correlation ($r=0.705$) was found between EFT and ZDS methods. Within-run coefficient of variation (% CV) in the normal serum pool for EDS, ZDS, EFT and ZFT were 9.71, 5.23, 7.38, 3.96; and 12.15, 15.36, 10.12, 6.2 in the high serum pool, respectively. Between-day % CV was found slightly lower in the sera kept at +4°C than the sera kept at -20°C.

Finally, we thought that the reason for precision not being satisfactory, is the precipitation step.

Key Words .High density lipoprotein-cholesterol .lipoprotein precipitation.

Koroner arter hastalığı (KAH) riskinin doğru olarak hesaplanabilmesi ve dislipidemi ayırıcı tanısı için

plazma lipit ve lipoprotein (Lp)lerinin doğru ve isabetli bir şekilde ölçülmesi gerekir. Plazma yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol (HDL-K) düzeyi ile arterioskleroz ve KAH insidansı arasındaki ters ilişki nedeniyle HDL-K tayini için çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. HDL'yi ayırmak için kesin veya primer referans yöntem yoktur. Bununla birlikte Atlanta

* Uzm. Dr.; U.Ü. Tıp Fak. Biyokimya ABD.

** Arş. Gör. Dr.; U.Ü. Tıp Fak. Biyokimya ABD.

*** Prof. Dr.; U.Ü. Tıp Fak. Biyokimya ABD.

Geliş Tarihi: 04.07.1995

Kabul Tarihi: 29.11.1995

GA'daki "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) tarafından ultrasantrüfjenden sonra 1.006 kg/L infranatanda heparin-mangan presipitasyonu geçici referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Fakat bu yöntem ile bile Lp(a), HDL fraksiyonundan tam ayırlanamamaktadır ve üstelik bu yöntem çok zahmetli, zaman alıcı ve pahalı olması nedeniyle rutin uygulama için önerilmemektedir^{1,2}.

HDL'yi diğer lipoproteinlerden ayırmak amacıyla en yaygın kullanılan yöntemler çöktürme yöntemleridir. Çöktürme yöntemleri iki değerlikli kationların varlığında farklı lipoproteinler ile polianyonlar ve sülfatlanmış polisakaritlerin etkileşimi temeline dayanırlar². Polianyonlar (fosfotungstat, dekstransülfat) ve Mg⁺⁺, apolipoprotein (Apo) B ve/veya Apo E içeren Lp'leri, bu apoproteinlerdeki pozitif yüklü lizin ve arginin birimleriyle iyonik etkileşime girerek çöktürürler³. Apo B içeren Lp'lerin [VLDL, LDL, Lp(a)] çöktürülmesi amacıyla kullanılan maddeler, dekstran sülfat-magnezyum (DS-Mg), heparin-mangan, fosfotungstat-Mg (FT-Mg) ve polietilenglikol (PEG) dür^{4,5}. Çöktürme işlemini takiben süpernatandaki kolesterol, enzimatik veya kimyasal yöntemlerle ölçülebilir.

HDL-K ölçümündeki çöktürme işlemi hataya en fazla yol açabilen basamaktır⁶. Bu çalışmada iki farklı presipitan (DS-Mg ve FT-Mg) kullanılarak süpernatantlarda yine iki farklı yöntemle (enzimatik, kimyasal) kolesterol ölçümü yapıldı. Böylece farklı presipitanların ve farklı kolesterol ölçüm yöntemlerinin sonuca etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Merkez Laboratuvarına başvuran rastgele 50 kişiden elde edilen kan örnekleri kullanıldı. Örnekler 10-12 saatlik açlığı takiben oturur pozisyonda ön kol venasından Vacutainer tüplerine alındı. Serumlar ayrılarak her örnekte total kolesterol (TK), trigliserit (TG) ve HDL-K ölçümü yapıldı.

TK ve TG, enzimatik-spektrofotometrik yöntemle (TK: Biosystems COD: 11505, TG: Biosystems COD: 11529 İspanya) DAX 72 otoanalizöründe ölçüldüler.

HDL-K ölçümü için 2 farklı presipitan kullanıldı. Daha sonra süpernatantlarda hem enzimatik hem de kimyasal yöntemle kolesterol tayini yapıldı.

1) DS-MgCl₂ ile presipitasyon⁷: 0.032 mM dekstransülfat hazırlamak için 16 gr DS-Na tuzu (MA: 500.000, Pharmacia Fire chemicals, Lot. No: 2523, İsveç) 1 lt distile suda çözüldü.

1.5 mol/L MgCl₂.6H₂O (Merck, Art 5832, Almanya) ile DS deneyden önce 1:1 oranında karıştırılarak presipitan olarak kullanıldı.

HDL-K ölçümü için kullanılan yöntemler



İşlem: 0.5 ml serum 50 µl presipitanla karıştırıldı, 20 sn vortexle karıştırıldı ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Takiben 30 dk 1500 xg'de santrifüj edildi.

2) FT-MgCl₂ ile presipitasyon⁷: 8 ml 1M NaOH (Merck, Art 6462) çözeltisine 4 gr fosfotungstik asit (Merck, Art 582) eklendi, distile su ile 80 ml'ye tamamlandı. pH'sı NaOH ile 6.15'e ayarlanarak 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. MgCl₂ çözeltisi olarak 40.6 gr MgCl₂.6H₂O/dl kullanıldı.

İşlem: 1 ml serum üzerine 100 µl fosfotungstat çözeltisi koyup vortexle karıştırıldı, üzerine 25 µl MgCl₂ çözeltisi eklenerek karıştırıldı. 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 30 dk 1500xg'de santrifüj edildi.

Süpernatantlarda kolesterol ölçümü, enzimatik yöntemle (CHOD-PAP) DAX 72 otoanalizöründe; kimyasal yöntemle ise FeCl₃-H₂SO₄ reaksiyonu temeline dayanan Zak metoduna⁸ göre yapıldı ve dilüsyon faktörleriyle çarpılarak sonuçlar elde edildi.

Çalışmada kullanılan serumların artan kısımları karıştırılarak çeşitli serum havuzları hazırlandı ve bu havuzlarda "precision" çalışmaları yapıldı. Ayrıca bu havuzlar +4°C'de ve -20°C'de bekletilerek bekleme ortamının etkileri de araştırıldı.

Veriler Epistat istatistik paket program kullanılarak "paired student-t testi" ve "Pearson korelasyon katsayısı" hesaplanarak değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan 50 olgunun ortalama TK düzeyi 217.6 ± 53.3 mg/dl (X ± SD), TG düzeyi ise 146.5 ± 68.3 mg/dl olarak saptandı. Çeşitli yöntemlerle saptanan HDL-K düzeyleri ise Tablo: I'de verilmiştir.

Tablo: I- DS-Mg ve FT-Mg Presipitasyonu ile enzimatik ve kimyasal yöntemlerle saptanan HDL-K değerleri

HDL-K (mg/dl)	DS-Mg presipitasyonu		FT-Mg Presipitasyonu	
	Enz. Kol. Ölç.	Kim. Kol. Ölç.	Enz. Kol. Ölç.	Kim. Kol. Ölç.
	41.28 ± 9.38	37.40 ± 11.55	44.88 ± 10.35	50.22 ± 12.66

Enz. Kol. Ölç.: Enzimatik Kolesterol Ölçümü

Kim. Kol. Ölç.: Kimyasal Kolesterol Ölçümü

Çeşitli tekniklerle ölçülen HDL-K değerleri birbirleriyle "paired student-t testi" ile karşılaştırıldı ve yapılan tüm karşılaştırmalarda birbirlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı oldukları görüldü (EDS-EFT<0.01, EDS-ZDS<0.05, diğerleri < 0.001).

Tablo II'de ise 4 değişik şekilde ölçülen HDL-K değerlerinin birbirleriyle korelasyonları ve lineer regresyon denklemleri verilmiştir. Çeşitli tekniklerle elde edilen HDL-K değerlerinin birbirleriyle anlamlı (p < 0.001) olarak korelasyon gösterdiği saptandı.

Tablo: II- Çeşitli yöntemlerle ölçülen HDL-K değerlerinin birbirleriyle korelasyonları ve regresyon denklemleri

Karşılaştırılan Yöntem	Korelasyon Katsayısı	Anlamlılık Derecesi	Regresyon Denklemi
EDS - EFT	0.592	< 0.001	17.87 + 0.65 X
EDS - ZDS	0.515	< 0.001	11.18 + 0.63 X
EDS - ZFT	0.435	< 0.001	24.97 + 0.61 X
EFT - ZDS	0.705	< 0.001	2.09 + 0.78 X
EFT - ZFT	0.689	< 0.001	12.42 + 0.84 X
ZDS - ZFT	0.664	< 0.001	22.98 + 0.72 X

Çalışmada kullanılan serumların bir kısmı normal (TK: 200 mg/dl, TG: 140 mg/dl) ve yüksek (TK: 267 mg/dl, TG: 309 mg/dl) serum havuzları hazırlamak üzere birleştirildi. Bu havuzlarda "within-run precision" çalışmaları yapıldı (Tablo: III).

Tablo: III- Normal ve yüksek serum havuzlarında saptanan deney-içi (intra-assay) değişkenlik katsayısı (% CV) değerleri

Yöntem	Normal havuz (n=14)			Yüksek havuz (n=14)		
	\bar{X}	SD	% CV	\bar{X}	SD	% CV
EDS	37.86 (33-46)*	3.68	9.71	37.10 (30-46)	4.51	12.15
EFT	42.10 (39-49)	3.11	7.38	43.71 (40-54)	4.43	10.12
ZDS	36.00 (33-39)	1.89	5.23	41.29 (37-61)	6.34	15.36
ZFT	48.79 (46-53)	1.81	3.69	44.40 (42-49)	2.76	6.20

* Parantez içindeki sayılar en küçük ve en büyük değerlerdir.

Hazırlanan serum havuzları eşit hacimlerde tüplere bölünerek bir kısmı +4°C'de, bir kısmı da -20°C'de bekletilerek her gün birer tanesi çalışıldı ve günler-arası değişkenlik saptandı (Tablo: IV ve V).

Tartışma

Presipitasyon yöntemleri HDL-K tayininde çok yaygın olarak kullanılır. Bununla beraber bu yöntemler ultrasantrüfüle her zaman aynı sonucu vermezler. Bunun çeşitli nedenleri olabilir: Apo B

Tablo: IV- +4°C'de bekletilen serum havuzlarında HDL-K düzeyinde saptanan günler-arası (Between-day) değişkenlik

Yöntem	Normal havuz (n=10)			Yüksek havuz (n=10)		
	\bar{X}	SD	% CV	\bar{X}	SD	% CV
EDS	41.00 (34-52)*	5.37	13.10	36.60 (29-45)	4.88	13.33
EFT	48.10 (40-60)	6.30	13.09	40.90 (35-54)	7.06	17.26
ZDS	38.20 (27-47)	6.48	16.95	33.90 (29-41)	4.36	9.47
ZFT	46.00 (36-60)	8.19	17.80	40.50 (32-50)	5.80	14.31

* Parantez içindeki sayılar en küçük ve en büyük değerlerdir.

Tablo: V- -20°C'de bekletilen serum havuzlarında HDL-K düzeyinde saptanan günler-arası (Between-day) değişkenlik

Yöntem	Normal havuz (n=10)			Yüksek havuz (n=10)		
	\bar{X}	SD	% CV	\bar{X}	SD	% CV
EDS	41.40 (28-54)*	8.06	19.46	38.10 (29-48)	6.19	16.24
EFT	52.50 (45-64)	5.85	11.15	40.60 (35-54)	5.39	13.27
ZDS	39.50 (31-48)	5.40	13.67	36.20 (28-43)	5.27	16.27
ZFT	47.30 (41-56)	5.44	11.49	42.50 (34-53)	6.92	16.27

* Parantez içindeki sayılar en küçük ve en büyük değerlerdir.

içeren Lp'lerin (beta-Lp'ler) tam çöktürülememesi, alfa-Lp'lerin bir kısmının da çöktürülme olasılığı, prebeta-Lp'lerde azalma olması veya d>1.063 Kg/L fraksiyonunda apoB içeren Lp'lerin bulunması, presipitasyonun kolesterol ölçümünde kullanılan ayıraçlarla etkileşmesi bu nedenler arasında sayılabilir⁷.

Dekstran sülfat, apoE içeren HDL'yi de presipite ederek heparin-Mn, PEG ve ultrasantrüfüle göre daha düşük HDL-K değerlerinin saptanmasına yol açar^{9,10}. Na-tungstat'ın da heparin-Mn ve ultrasantrüfüle göre HDL-K'ün % 2-4 mg daha düşük bulunmasına yol açtığı bildirilmiştir¹⁰. Diğer yandan Mn'in da bir kısım HDL₂ fraksiyonunu çöktürerek total HDL-K'ün daha düşük bulunmasına sebep olduğu saptanmıştır¹¹. Görüldüğü gibi çeşitli presipitasyonla saptanan HDL-K değerleri birbirlerinden farklı sonuçlara neden olmaktadır.

Çalışmamızda da 4 değişik teknikte ölçülen HDL-K değerlerinin birbirlerinden anlamlı olarak farklı olduğu bulundu. Bununla birlikte DS presipitasyonu sonrası enzimatik ve kimyasal yöntemlerle ölçülen HDL-K değerleri birbirlerine en yakın bulunan değerlerdi. Bunu, EDS ve EFT ile bulunan değerler takip etti. FT presipitasyonunu takiben kimyasal

yöntemle ölçülen HDL-K değerleri diğer yöntemlerden oldukça farklı sonuçlara neden oldu.

Yapılan korelasyon çalışmaları sonunda en iyi korelasyon EFT ve ZDS arasında ($r=0.705$), daha sonra ise EFT ile ZFT arasında ($r=0.689$) saptandı. Grauholt ve arkadaşları DS-Mg ve FT-Mg presipitasyonu kullanarak enzimatik yöntemle ölçülen HDL-K değerlerinin oldukça iyi korelasyon ($r=0.98$) gösterdiğini bildirmişlerdir¹².

Serumla presipitanların karıştırılması 10:1 gibi (v/v) yüksek oranda olduğunda ortamda değişik miktarlarda delta-3,5 kolestadien oluşur. Bu madde enzimatik yöntemde karışıklık yaratmaz, ancak bir kimyasal yöntem olan Liebermann-Burchard yönteminde 1:6 kez daha yüksek değerler bulunmasına yol açar^{4,13}. Çalışmamızda özellikle FT-Mg ile presipite edilen serumlarda HDL-K düzeyi enzimatik yöntemle kıyasla kimyasal yöntemle daha yüksek bulundu. $FeCl_3-H_2SO_4$ 'ün kullanıldığı Zak yöntemi de aynı mekanizmayla yüksek sonuçlara yol açmış olabilir. Kimyasal yöntemle kolesterol ölçümü yapılacaksa presipitan olarak dekstran sülfat-CaCl₂ önerilmektedir⁴. Diğer yandan enzimatik kolesterol ölçümünde de çeşitli presipitanlar interferanslara yol açabilmektedir. Heparin-Mn ve DS-Mg'un enzimatik kolesterol ayıraçlarıyla etkileştiği ve bu nedenle de enzimatik kolesterol ölçümünde FT ve PEG presipitasyonunun tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir^{2,7}.

Çalışma içi % CV değerlerinin yüksek havuzda normal havuza göre daha yüksek bulunması, hiperlipidemik serumlarda HDL-K tayininin problemliliğini yansıtmaktadır. Hiperlipidemik serumlar için en etkin presipitasyonun sırasıyla PEG > FT > Heparin-Mn ile sağlandığı bildirilmiştir⁷. Çalışmamızda da en düşük % CV ZFT yöntemiyle elde edilmiştir (normal havuz için % 3.69, yüksek havuz için 6.20). Çalışmamızda elde edilen % CV değerlerinin bazı araştırmacıların saptadıkları değerlerden yüksek olduğu gözlemlendi^{9,12}. Bu yükseklikten HDL-K tayinindeki ilk basamak olan presipitasyon basamağındaki işlemlerin etkili olduğu düşünüldü. Çünkü daha önce yapılan çalışmada (Yayına hazırlanmakta) hem enzimatik hem de kimyasal yöntemle kolesterol tayininde günler-arası % CV değerlerinin bile 3.7'den daha düşük olduğu saptanmıştı. Diğer yandan Tsai ve arkadaşlarının FT-Mg presipitasyonu ile saptadıkları % CV değerinin (% 4.8) Zak yöntemiyle saptadığımız değerlere oldukça yakın olduğu görüldü¹⁴.

Günler-arası % CV değerlerinin örnekler +4°C de saklandığında normal havuzda % 13-17, yüksek havuzda % 9-17 arasında olduğu görüldü (Tablo: IV). Saklama işleminin -20°C de olduğu örneklerde ise bu değerler biraz daha yüksekti (Tablo: V). HDL-K ölçümü yapılacak örneklerin depolanmasının

etkilerine ilişkin karışık bulgular bildirilmiştir (artış, azalış veya değişmeme şeklinde)¹⁵. +4°C de 1 ay, -20°C de 2 ay, -80°C de uzun süre örneklerin saklanabileceği önerilmektedir¹². Ancak +4°C de serumları bekletme sonrası presipitasyon işleminin tam yapılamaması riski vardır¹⁶. Daha düşük sıcaklık derecelerinde de muhtemelen partikül agregasyonu sonucu presipitanlarla apoB içeren Lp'lerin etkileşimi bozularak presipitasyonun etkin şekilde yapılması engellenebilir. Bu nedenle örneklerin saklanması gerekiyorsa presipitasyon işlemi taze serumda yapıp süpernatantların -80°C de saklanması önerilmektedir^{1,17}.

Sonuç

- 1- Farklı presipitanlarla farklı HDL-K sonuçları elde edildiğinden, özellikle epidemiyolojik çalışmalarda hangi presipitanın kullanıldığına dikkat edilerek karşılaştırma yapılmalı ya da değerler buna göre yorumlanmalıdır¹⁰.
- 2- HDL-K değerleri için laboratuvarlar-arası değişkenlik katsayısı % 9 ile 38 arasında olabildiğinden¹⁸, özellikle tedavi etkinliğinin izlenmesinde aynı laboratuvar sonuçlarının kullanılması uygun olacaktır.
- 3- Diyet veya ilaç tedavileri HDL-K düzeyinde küçük değişimler yarattığından 5 mg/dl lik değişimi ölçmek önemlidir⁶. Bu nedenle HDL-K ölçüm yöntemleri çok isabetli olmak zorundadır. İsbet derecesinin kötü olması, kolesterol ölçümünde kullanılan yöntemden ziyade presipitasyon işlemindeki hatalar sonucudur.
- 4- Örneklerin saklanması gerekiyorsa serum olarak değil, süpernatant olarak saklanmalıdır.
- 5- LDL-Kolesterol'ün hesaplanması da (Friedwald formülü ile) HDL-K düzeyinin doğru ölçülmesini gerektiren diğer bir nedendir.

Uzm. Dr. Melahat DIRICAN
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya ABD
Tel.: (224) 442 82 00 / 21190
16059 Görükle / BURSA

Kaynaklar

1. McNamara JR, Huang C, Massov T, Leary ET, Warnick GR: Modification of the dextran-Mg++ high density lipoprotein cholesterol precipitation method for use with previously frozen plasma. Clin Chem. 40(2): 233-239, 1994.
2. Olmos JM, Lasuncion MA, Herrera E: Dextran sulphate complexes with potassium phosphate to interfere in determinations of high-density lipoprotein cholesterol. Clin Chem. 38(2): 233-237, 1992.
3. Chiba H, Eto M, Fujisawa S, Akizawa K, Intoh S: Increased plasma apolipoprotein E-rich high density lipoprotein and its effect on serum high-density lipoprotein cholesterol determination in patients with familial hyperal-

- phalipoproteinemia due to cholesteryl ester transfer activity deficiency. *Biochem Med Metab Biol.* 49(1): 79-89, 1993.
4. Herrmann W, Schutz C, Reuter W: Zur Bestimmung des HDL-Cholesterols. *Z Gesamte Inn Med.* 38(1): 17-22, 1983.
 5. Penttila IM, Voutilainen E, Laitinen P, Juutilainen P: Comparison of different analytical and precipitation methods for direct estimation of serum high-density lipoprotein cholesterol. *Scand J Clin Lab Invest.* 41(4): 353-360, 1981.
 6. Schectman G, Sasse E: Variability of lipid measurements: Relevance of the clinician. *Clin Chem.* 39(7): 1495-1503, 1993.
 7. Demacker PNM, Vos-Janssen HE, Hijmans AGM, Van't Laar A, Jansen AP: Measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum: Comparison of six isolation methods combined with enzymic cholesterol analysis. *Clin Chem.* 26(13): 1780-1786, 1980.
 8. Özkan K, Türkvan M: Klinik Biyokimya Laboratuvar Elkitabı. Bursa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yayın No: 2, Seyhan Matbaası, Bursa, 1975, s. 122.
 9. Dias VC, Parsons HG, Boyd ND, Keane P: Dual-precipitation method evaluated for determination of high-density lipoprotein (HDL), HDL2 and HDL3 cholesterol concentrations. *Clin Chem.* 34 (11): 2322-2327, 1988.
 10. Albers JJ, Warnick GR, Johnson N, Bachorik PS, Muesing R: Quality control of plasma high-density lipoprotein cholesterol measurement methods. The lipid research clinics program prevalence study. *Circulation.* 62: (IV): 9-17, 1980.
 11. Whitaker CF, Srinivasan SR, Berenson GS: Simplified methods for measuring cholesterol concentrations of high-density lipoprotein subclasses in serum compared. *Clin Chem.* 32(7): 1274-1278, 1986.
 12. Grauhoft A, Grande P, Horby-Petersen J, Jensen J, Rostgaard M, Meinertz H: High density lipoprotein cholesterol assay by magnesium dextran sulphate precipitation. *Scand J Clin Lab Invest.* 46 (8): 715-721, 1986.
 13. Niedmann PD, Luthe H, Wieland H, Schaper G, Siedel D: Richtigkeit der HDL-Cholesterinmessung. *Klin Wochenschr.* 61(3): 133-138, 1983.
 14. Tsai LY, Peng MR, Tsai SM, Hsieh SF: The determination of high density lipoprotein cholesterol separated by electrophoresis and sodium phosphotungstate/Mg²⁺ precipitation: a physical evaluation. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih.* 5(9): 498-504, 1989.
 15. Demacker PN, Jansen AP: Stability of high-density lipoprotein cholesterol in frozen sera. *Clin Chem.* 29: 567-568, 1983.
 16. Bachorik PS, Walker R, Brownell KD, Stunkard AJ, Kwiterovich P: Determination of high density lipoprotein-cholesterol in stored human plasma. *J Lipid Res.* 21: 608-616, 1980.
 17. Bachorik PS, Walker R, Kwiterovich PO: Determination of high density lipoprotein-cholesterol in human plasma stored at -70 degrees C. *J. Lipid Res.* 23(8): 1236-1242, 1982.
 18. Warnick GR, Albers JJ, Teng-Leary E: HDL cholesterol: results of interlaboratory proficiency test. *Clin Chem.* 26: 169-170, 1980.