Chula Med J Vol. 50 No. 7 July 2006

ไขมันในเลือด: ความสำคัญทางคลินิกและการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

นวพรรณ จารุรักษ์*

Charuruks N. Blood lipids: Its clinical importance and laboratory method. Chula Med J 2006 Jul; 50(7): 443 - 58

In the serum, lipids exist as lipoproteins. Measurement of lipoproteins in the clinical laboratory has become increasingly important because of their predictive association with cardiovascular diseases, especially coronary artery disease. However, lipoprotein measurement was once limited to a few confirmatory tests, as analytical methods involved laborious and costly procedures. Therefore calculation using Friedewald formula is widely used for estimation of low density lipoprotein cholesterol (LDL-C). Although convenient, the Friedewald formula has limitation due to several factors. These problems led to attempts to develop of more accurate direct measurement methods. Recently, methods for lipoprotein analyses have improved dramatically. Fully automated homogenous assays for high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and LDL-C have potential for better precision as well as more convenient and cost-effective measurements. This has moved lipoprotein assessment into the routine clinical laboratory procedures and offers clinicians a rapid means of estimating lipoprotein levels. In order to provide background and knowledge for suitable interpretation of lipoprotein measurement the author reviewed its clinical importance and laboratory methods.

Keywords : *Lipid, Lipoprotein, Laboratory method.*

Reprint request : Charuruks N. Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. December 15, 2005.

*ภาควิชาเวชศาสตร์ชันสูตร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไขมันและองค์ประกอบ

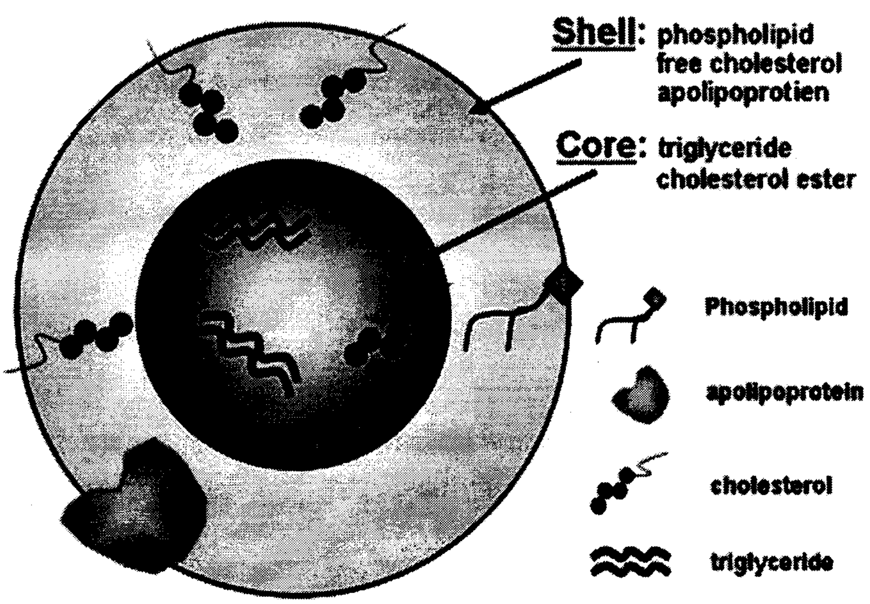
ไขมันในภาษาอังกฤษเรียกว่า "ไลปิด" (lipid) หรือ "แฟต" (fat) เป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ไม่ละลายน้ำ มีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ phospholipids, triglyceride, glycolipid, cholesterol, fatty acid

ไขมันในเลือดที่สำคัญ คือ ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride, Tg) และ คลอเลสเทอรอล (cholesterol, chol) ไขมันเหล่านี้รวมอยู่กับโปรตีน ที่เรียกว่า "อะโปโปรตีน" (apoprotein) ได้สารที่เรียกว่า "ไลโปโปรตีน" (lipoprotein, Lp) โดย lipoprotein เหล่านี้จะมีรูปร่างกลม (spherical particle) มีไขมันที่มีคุณสมบัติ hydrophobic ได้แก่ cholesterol esters และ Tg อยู่ตรงกลางเป็นแกนกลาง (core) และมีโปรตีน apolipoprotein และไขมันที่มีคุณสมบัติ hydrophilic ได้แก่ phospholipid และ free cholesterol อยู่ที่ผิวนอก (รูปที่ 1)[1] ไลโปโปรตีนในกระแสเลือดมีหลายชนิดแบ่งตามความหนาแน่น (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังมีไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) ซึ่งรวมอยู่กับโปรตีนอัลบูมิน (albumin)

สำหรับ chol เป็นส่วนประกอบของ lipoprotein ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ กว่าร้อยละ 70-75 เป็นส่วนประกอบของ low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), และอีกประมาณร้อยละ 25 เป็นส่วนประกอบของ high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) นอกจากนี้ยังมีไขมันชนิดอื่น ๆ อีก 3 ชนิด คือ very-low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), intermediate-density lipoprotein cholesterol (IDL-C) และ lipoprotein (a) [Lp (a)] [2] (รูปที่ 2)

ความสำคัญของไขมัน

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary heart disease, CHD) เป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญ และหนึ่งในปัจจัยเสี่ยงสำคัญยิ่งของ CHD คือ ภาวะไขมันในเลือดสูง[3-4] มีการกำหนดเกณฑ์ระดับไขมัน chol โดย the National Cholesterol Education Program (NCEP) ออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้ 1) ระดับที่ยอมรับ (desirable level) <200 mg/dL (<5.2 mmol/L), 2) ระดับก้ำกึ่ง (borderline level) 200-239 mg/dL (5.2-6.2 mmol/L), และ 3) ระดับสูง (high level) ≥240 mg/dL (≥6.2 mmol/L) และแนะนำให้ประชาชนดูแลระดับไขมัน chol ให้อยู่ในระดับที่ยอมรับ เพื่อลดปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของ CHD ลง[4] นอกจากนี้ยังมีการกำหนดเกณฑ์ระดับไขมันอื่น ๆ ไว้อีกด้วย (ตารางที่ 2)[2, 5]

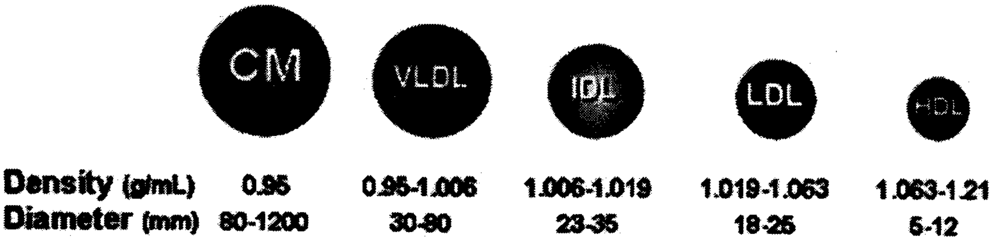


รูปที่ 1. ภาพโครงร่างโครงสร้างของไลโปโปรตีน

ตารางที่ 1. ชนิดและรายละเอียดของไลโปโปรตีนที่อยู่ในกระแสเลือด

ชนิด	ขนาด/ความหนาแน่น	สัดส่วนระหว่างโปรตีนและไขมัน	คุณสมบัติ	อะโปโปรตีน
Chylomicron	ใหญ่ที่สุด มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 80-1200 mm/0.95 g/mL	1:100	สร้างที่ลำไส้เล็ก องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น Tg จากอาหารที่บริโภค ทำหน้าที่ขนส่งไขมันที่ได้จากอาหารออกจากลำไส้ ไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย	A, B-48, C-II, C-III
VLDL	ขนาดรองลงมา มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30-80 mm/ 0.95-1.006 g/mL	1:9	สร้างที่ตับ องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น Tg ที่ได้จากการสังเคราะห์ที่ตับ ทำหน้าที่ขนส่งไขมันจากตับไปใช้เป็นพลังงาน	B-100, C-II, C-III, E
IDL	ขนาดรองลงมา มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 23-35 mm/ 1.006-1.019 g/mL	vary	สร้างจากเมตะบอลิสซึ่มของ VLDL ซึ่งเปลี่ยนเป็น IDL ก่อนไปเป็น LDL และเนื่องจากมีปริมาณน้อยมากในคนปกติ และเป็นเพียงผลของเมตะบอลิสซึ่มของ VLDL ก่อนเปลี่ยนไปเป็น LDL จึงไม่ได้รับความสนใจมากนัก	B-100, C-II, C-III, E
LDL	ขนาดรองลงมาอีก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 18-25 mm/ 1.019-1.063 g/mL	1:4	สร้างจากเมตะบอลิสซึ่มของ VLDL ซึ่งเปลี่ยนเป็น IDL ก่อนไปเป็น LDL องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น chol ทำหน้าที่ขนส่งไขมันจากตับไปยังเนื้อเยื่อปลายทางเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อ และคั่งค้างอยู่ตามหลอดเลือด	B-100
HDL	ขนาดเล็กที่สุด มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-12 mm/ 1.063-1.210 g/mL	1:1	สร้างที่ลำไส้เล็กและตับ และเสร็จสมบูรณ์ในกระแสเลือด องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น chol ทำหน้าที่เป็นไขมันชนิดดีที่ช่วยขนย้ายไขมันที่คั่งค้างอยู่ตามผนังหลอดเลือดไปทำลายที่ตับ และป้องกันการอุดตันจากไขมัน	B-100

VLDL = very low-density lipoprotein IDL = intermediate-density lipoprotein LDL = low-density lipoprotein
HDL = high-density lipoprotein Tg = triglyceride chol = cholesterol



รูปที่ 2. ชนิดของ lipoprotein จะสังเกตว่ายิ่งมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางจะมีขนาดเล็กลง

ตารางที่ 2. เกณฑ์ระดับไขมันในกระแสเลือดที่กำหนดโดย the National Cholesterol Education Program (NCEP)[2, 5]

ชนิดไขมัน	ระดับที่ยอมรับ mg/dL (mmol/L)	ระดับก้ำกึ่ง mg/dL (mmol/L)	ระดับเสี่ยงสูง mg/dL (mmol/L)	หมายเหตุ
Cholesterol	<200 (5.2)	200-239 (5.2-6.2)	≥240 (6.2)	
LDL-C	<130 (3.4)	130-159 (3.4-4.1)	≥160 (4.1)	ระดับที่ดี <100 (2.6)
HDL-C	>60 (1.6)	-	<35 (0.9)	
Triglyceride	<150 (1.7)	150-199 (1.7-2.2)	200-499 (2.2-5.6)	ระดับเสี่ยงสูงมาก ≥500 (5.6)
Tg/HDL-C ratio	<5	5-6	>6	

LDL-C = low-density lipoprotein cholesterol HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol Tg = triglyceride

องค์ความรู้ในปัจจุบันพบว่าทั้ง HDL-C และ LDL-C จัดเป็นไขมันที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิด atherosclerosis หรือการแข็งตัวของหลอดเลือด ดังนั้นระดับที่ผิดปกติของทั้ง HDL-C และ LDL-C นี้ จึงจัดเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดหลอดเลือดอุดตัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิด CHD ซึ่งเป็นปัญหาการเสียชีวิตที่สำคัญในประเทศอุตสาหกรรม[3] ในปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงว่าระดับ HDL-C และ LDL-C ในเลือดมีความสัมพันธ์กับการเกิด CHD[3, 6] โดยพบว่า HDL-C ที่ <60 mg/dL (1.6 mmol/L) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญปัจจัยหนึ่งต่อการเกิดโรคดังกล่าว และควรควบคุมให้ LDL-C <100 mg/dL (2.6 mmol/L) โดยถือว่าเป็นระดับที่ดีที่สุด แม้ว่า LDL-C ที่ <130 mg/dL (3.4 mmol/L) จะเป็นระดับที่ยอมรับก็ตาม[5] สำหรับ HDL-C เป็นไขมันที่มีความสัมพันธ์กับการเกิด atherosclerotic lesion แบบผกผัน กล่าวคือ การลดลงของ HDL-C ทำให้โอกาสเกิด atherosclerotic lesion สูงขึ้น ส่วน LDL-C นั้นดังที่ได้กล่าวมาแล้วเบื้องต้นว่ามี chol เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ เป็นไขมันที่มีความสำคัญมากต่อการเกิด CHD เนื่องจากเป็นไขมันชนิดเดียวที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิด atherosclerotic lesion โดยตรง และพบว่าการเพิ่มขึ้นของ LDL-C ทำให้ atherosclerotic lesion ขยายใหญ่ขึ้น ในขณะที่การลดลงสามารถลดโอกาสเกิด CHD ลงได้[7]

รายการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับไขมัน

การตรวจวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับไขมันยังต้องการการพัฒนาต่อไปอีก อย่างไรก็ตามเนื่องจากไขมันมีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับความผิดปกติต่าง ๆ ของร่างกายจำนวนมาก ทำให้ไขมันเป็นการตรวจวิเคราะห์ที่แพทย์นิยมสั่งตรวจ และเนื่องจากมีไขมันหลายชนิดและแต่ละชนิดมีความสำคัญไม่เท่ากันและยังแตกต่างกันอีกด้วย ดังนั้นจึงอาจจำแนกรายการตรวจไขมันออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มหรือรายการที่นิยมตรวจทั่วไป กลุ่มหรือรายการที่ต้องการตรวจเพิ่มเติม และกลุ่มหรือรายการที่ต้องการตรวจเป็นพิเศษหรือเฉพาะกรณี (ตารางที่ 3)

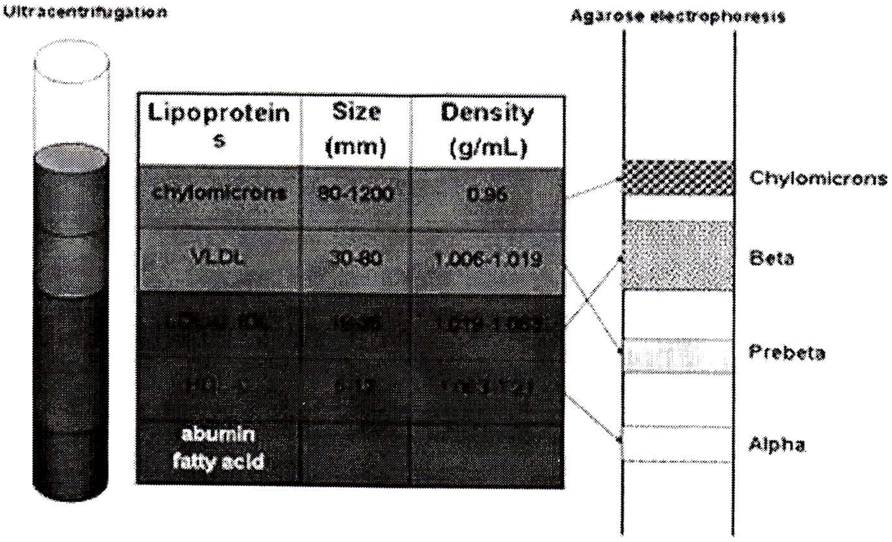
วิธีวิเคราะห์

วิธีการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสำหรับไขมันโดยทั่วไปมี 5 วิธี ได้แก่ ultracentifugation, electrophoresis, calculation, precipitation with polyanions, และ homogeneous assay รูปที่ 3. แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี ultracentifugation และ electrophoresis

ในปัจจุบันวิธี ultracentrifugation สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หา lipoprotein ได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง และได้รับการยอมรับให้เป็นวิธีอ้างอิงสำหรับการวิเคราะห์หา lipoprotein เป็นส่วน

ตารางที่ 3. รายการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการสำหรับไขมัน

ประเภทการตรวจ		รายการตรวจ
รายการตรวจทั่วไป	Cholesterol	
	Triglyceride	
	HDL-C, LDL-C	
	Apo A-I, Apo B	
	Lp(a)	
รายการตรวจเพิ่มเติม	Lipoprotein fractions	quantitative lipoprotein electrophoresis
	Apo A-II, Apo A-IV	
	Apo C-II, Apo Lp(a)	
รายการตรวจพิเศษ	Abnormal lipoproteins	Lp-X, b-VLDL, LDL
	Lipolytic enzymes	Lipoprotein lipase (LPL), Hepatic triglyceride hydrolase (HTGL), Lecthin-cholesterol-acyl-transferase (LCAT), Phospholipase A (PLA)
	Cholesterol ester transfer protein (CETP)	
	Receptor analysis	LDLreceptor, LDL-related receptor
	Defect ligands	Apo B3500
	Apoprotein polymorphisms	Apo E polymorphism, Apo A-IV polymorphism
	Oxidised LDL	
	Autoantibodies against oxidized LDL	



รูปที่ 3. แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี ultracentifugation และ electrophoresis

ใหญ่ อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีความยุ่งยาก ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่ได้รับความนิยม ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ lipoprotein ที่เรียกว่า direct method โดยอาศัยหลักการทางด้านเคมีและวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นสำคัญ วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมสำหรับการตรวจวัดค่าในห้องปฏิบัติการทั่วไป ทั้งนี้เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมาก ในขณะที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ สำหรับ chol และ HDL-C แล้ว the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 2003 (CLIA'03) ยอมรับให้ค่าที่วิเคราะห์ได้ คือ ค่าเป้าหมาย ±10 % และ ±30 % ตามลำดับ นั่นย่อมหมายความว่าในการตรวจวิเคราะห์เพื่อวัดปริมาณไขมันในห้องปฏิบัติการทั่วไปนั้น ยังต้องการการพัฒนา และยังมีโอกาสที่ค่าจะมีความแตกต่างหรือแกว่งได้สูงถึงบวกลบร้อยละ 10 และ 30 ตามลำดับด้วย ซึ่งแตกต่างอย่างมากหากเปรียบเทียบกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั่วไปสำหรับรายการตรวจอื่น ๆ เช่น glucose ที่มี ค่าเป้าหมาย ± 5 %[8] เท่านั้น

ข้อที่พึงสังเกตอีกประการหนึ่งก็คือ ค่าที่มีความถูกต้องแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ สำหรับ chol และ HDL-C แล้ว ยังมีความแตกต่างกันอีกในแต่ละองค์กร เช่น NCEP ยอมรับให้ค่าที่วิเคราะห์ได้ คือ ค่าเป้าหมาย ± 9 และ ± 13 % ตามลำดับ[2] ดังนั้นในการแปลผลการตรวจวิเคราะห์ไขมัน แพทย์จึงพึงทำความเข้าใจและใช้ความระมัดระวังให้มาก

วิธีวิเคราะห์ cholesterol

เนื่องจากระดับ chol มีความสัมพันธ์กับการเกิด CHD ฉะนั้นการวิเคราะห์หาระดับ chol จึงได้รับความสนใจและคำนึงถึงความถูกต้องแม่นยำ ดังนั้นศูนย์ควบคุมโรคแห่งสหรัฐอเมริกา (the Centre for Disease Control, CDC) จึงได้ก่อตั้งเครือข่ายห้องปฏิบัติการเพื่อหาวิธีอ้างอิงในการวิเคราะห์หา chol ในเลือด (the Cholesterol Reference Method Laboratory Network, CRMLN) โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี ด้วยการปรับปรุง (modification) วิธีการวิเคราะห์จากวิธี the Abell-Levy-Brodie-Kendall chemical method และกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) มีค่า <2.0 %[1] โดยปฏิกิริยาดังกล่าว cholesterol ester จะถูก hydrolyzed ด้วย alcoholic KOH จากนั้นทำการสกัด chol ด้วย hexane และนำมาทำปฏิกิริยาให้เกิดสีกับน้ำยา Liebermann-Burchard (acetic anhydride-acetic acid-sulfuric acid) วัดสีที่เกิดขึ้นที่ 620 nm แม้ว่าจะมีความถูกต้องแม่นยำสูง แต่วิธีนี้มีความยุ่งยาก ใช้เวลานาน และไม่เหมาะที่จะนำไปปฏิบัติใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้น CRMLN จึงช่วยผู้ผลิตในการพัฒนาวิธีที่เหมาะสมแก่การนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ในปัจจุบันการตรวจวัดค่า cho ในห้องปฏิบัติการนิยมใช้วิธี enzymatic colorimetric method

วิธีวิเคราะห์ HDL-C

วิธีอ้างอิงที่ใช้ในการวิเคราะห์ HDL-C นั้นคือวิธีที่ CDC ใช้อยู่ เป็นวิธีที่มีอยู่ 2 ขั้นตอน คือ เริ่มต้นด้วยการนำน้ำเลือด (serum) ไปปั่น ultracentrifugation (density 1.006 kg/L) ที่ 105000 g หรือด้วยความเร็วรอบสูงถึง 40,000 rpm ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง เพื่อทำการแยกไขมันให้ลอยเป็นชั้น ๆ คือ VLDL, LDL, chylomicron และแยกออกจาก HDL-C ได้ และตามด้วยวิเคราะห์หา HDL-C[9] วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูง มีความยุ่งยาก ใช้เวลานาน และไม่เหมาะที่จะนำไปปฏิบัติใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การตรวจวิเคราะห์หา HDL-C และ LDL-C (สำหรับ LDL-C จะกล่าวต่อไป) นั้น มีตั้งแต่วิธี ultracentifugation, electrophoresis, various high performance liquid chromatograpghy (HPLC) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความซับซ้อน มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน ต้องการบุคลากรที่มีทักษะเฉพาะ และต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ ปัญหาเหล่านี้เป็นอุปสรรคที่ทำให้วิธีที่กล่าวนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นการตรวจประจำสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นเพื่อพัฒนาวิธีการที่ทำได้ง่ายสะดวกและมีค่าใช้จ่ายต่ำสำหรับที่จะนำมาใช้เป็นการตรวจประจำสำหรับห้องปฏิบัติ

การทั่วไป จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจด้วยเทคนิคการตกตะกอน หรือแยก HDL-C และ LDL-C โดยปฏิกิริยาทางเคมี (chemical precipitation) แล้วทำการตรวจวิเคราะห์เฉพาะ HDL-C และ LDL-C โดยตรง จึงนิยมเรียกวิธีการนี้ว่า "direct method" หรือ วิธีการโดยตรง วิธีการนี้พัฒนามาตั้งแต่ first generation จนปัจจุบันเป็น third generation homogenous assay แล้ว และเป็นวิธีที่สามารถทำการวิเคราะห์โดยเครื่องอัตโนมัติได้สะดวกรวดเร็ว[9-10] (ตารางที่ 4) นอกจากนี้บริษัทแต่ละแห่งยังได้พัฒนาน้ำยากลุ่ม third generation homogenous assay ของตนเองจนเป็นน้ำยารุ่นใหม่ ๆ เกิดขึ้น และเรียกน้ำยารุ่นใหม่ที่ตนเองพัฒนาว่า 1st generation, 2nd generation ซึ่งสร้างความสับสนแก่ ผู้ทำงานในห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นผู้ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการจึงพึงระมัดระวัง

ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธี direct method สำหรับการวิเคราะห์ HDL-C สำหรับการตรวจวัดค่าในห้องปฏิบัติการทั่วไป วิธีดังกล่าวสามารถทำการวิเคราะห์ได้สะดวกและรวดเร็ว ที่นิยมมีอยู่ 4 วิธี ดังนี้

1. immunoseparation (IS) เป็นวิธีที่เคลือบ polyclonal antiserum ที่จำเพาะต่อ apolipoprotein ไว้บน bead เพื่อให้จับกับ chylomicrons, LDL, และ VLDL ไว้ แล้วให้ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase ทำปฏิกิริยากับ HDL-C และให้ hydrogen peroxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ chromogen เกิดเป็นสารที่มีสี ที่สามารถทำการวัดได้จากการดูดซึมคลื่นแสงที่กำหนด

2. polyanion polymer/detergent (PPD) เป็นวิธีที่ให้ synthetic polyanions ดูดซับบน LDL และ VLDL ทำให้ทั้ง LDL และ VLDL มีเสถียรภาพ ดังนั้น detergent จะละลาย HDL และทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยากับ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase เกิดเป็นสารที่มีสี ที่สามารถทำการวัดได้จากการดูดซึมคลื่นแสงที่กำหนด

3. polyethylene glycol-modified enzyme/α-cyclodextrin sulfate (PEGME) สาร cyclodextrin sulfate และ dextran sulfate จะทำปฏิกิริยากับ LDL, VLDL,

ตารางที่ 4. พัฒนาการวิธีการโดยตรงในการตรวจวิเคราะห์หา HDL-C และ LDL-C[9-10]

HDL-C	LDL-C
First generation	
• Heparin Mn^{2+}	• Heparin at pH 5.12
• Dextran sulfate-Mg^{2+}	• Polyvinylsulfate
• Phosphotungstate- Mg^{2+}	• Unspecific amphiphatic polymers
• Polyethylene glycol	• Dextran sulfate
Second generation	
• Magnetic with dextran sulfate-Mg^{2+}	• Immunoseparation method
Third generation	
• Antibody four-reagent method	• Antibody four-reagent method
• Polythylene glycol-modified enzymes with cyclodextrin	• Polythylene glycol-modified enzymes with cyclodextrin
• Synthetic polymer/detergent	• Synthetic polymer/detergent
• Antibody, two reagents	• Antibody, two reagents
• Catalase	• Catalase

และ chylomicrons ปล่อยให้ HDL-C เกิดปฏิกิริยากับ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase เกิดเป็นสารที่มีสี ที่สามารถทำการวัดได้จากการดูดซึมคลื่นแสงที่กำหนด

4.clearance method เป็นวิธีที่ใช้ buffer ทำปฏิกิริยากับ chylomicrons, LDL, และ VLDL แล้วแยกออกโดยให้ทำปฏิกิริยากับ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase ที่เติมลงไป จากนั้นเหลือ HDL-C ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับน้ำยาชนิดที่สองที่เติมลงไป คือ surfactant และ enzyme

วิธีวิเคราะห์ LDL-C

LDL-C จัดเป็น chol ที่มีปริมาณสูงถึงสองในสามของ total chol ที่มีอยู่ในกระแสเลือด แม้ว่าการหาระดับของ LDL-C ในกระแสเลือด จะมีทั้งวิธีคำนวณและวิธีวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีวิธีใดที่ได้รับการยอมรับใช้เป็นวิธีอ้างอิงสำหรับ LDL-C อย่างไรก็ตาม วิธีที่ the Centre for Disease Control (CDC) ใช้อยู่นั้นได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีความถูกต้องสูง วิธีที่ CDC ใช้ในการวัด LDL-C นั้นเป็นวิธีของ Lipid Research Clinics (LRC) beta-quantification procedure (BQ)[10-11] วิธี BQ นี้ทำโดยการนำเลือดไปปั่น ultracentrifugation ดังบรรยายไว้แล้วเบื้องต้น เพื่อแยก VLDL-C และ chylomicron ออก และหา chol[12] และ HDL-C ด้วยวิธีอ้างอิง จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-C จากการนำค่า chol ที่หาได้มาหักเอา HDL-C ออก จะเห็นว่าวิธี ultracentrifugation ดังกล่าวนี้นอกจากจะต้องใช้ปริมาณเลือดมากแล้ว ยังเป็นวิธีที่ยุ่งยากซับซ้อนทำได้ลำบาก เสียเวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูง

นอกจากนี้ยังมีวิธีที่ใช้วิเคราะห์ LDL-C อีกหลายวิธี[10] เช่น chromatography, electrophoresis, precipitation เป็นต้น ส่วนวิธี chromatography, และ electrophoresis ก็จัดว่าเป็นวิธีที่ยุ่งยากทำลำบาก เสียเวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูงเช่นกัน ส่วนวิธี precipitation เป็นวิธีที่ใช้ได้ดี แต่มีข้อแม้ว่าระดับ Tg ในเลือดต้องไม่สูงมากนัก ดังนั้นทั้งวิธี ultracentrifugation, chromatography, electrophoresis, และ precipitation จึงไม่นิยมทำในห้องปฏิบัติการคลินิกทั่วไป

เนื่องจากการวิเคราะห์หาระดับ LDL-C เป็นวิธีที่ยุ่งยากทำลำบาก มีค่าใช้จ่ายสูง มีข้อจำกัด และไม่ได้รับความนิยม ดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว จึงมีการพยายามหาโดยใช้วิธีคำนวณ วิธีคำนวณที่นิยม คือ การใช้สูตรของ Friedewald[13] อย่างไรก็ตามการใช้สูตรดังกล่าวมีข้อจำกัดอยู่มากดังจะกล่าต่อไป จึงมีความพยามพัฒนาวิธีวิเคราะห์อื่น ๆ ที่สามารถทำได้ง่ายและสะดวกในห้องปฏิบัติการคลินิกทั่วไป ในปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้วิเคราะห์หาระดับ LDL-C ได้แก่ immunoseparation (IS),[14] zwitterionic detergent (ZI)[15], clearance method[16] เป็นต้น

1. immunoseparation (IS) เป็นวิธีที่เคลือบ polyclonal antiserum ที่จำเพาะต่อ apolipoprotein ไว้บน bead เพื่อให้จับกับ chylomicrons, HDL, และ VLDL ไว้ แล้วไปทำการปั่นแยก เอา chylomicrons, HDL, และ VLDL ออก ดังนั้นจึงเหลือเฉพาะ LDL ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase ที่เติมลงไป และให้ hydrogen peroxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ chromogen เกิดเป็นสารที่มีสี ที่สามารถทำการวัดได้จากการดูดซึมคลื่นแสงที่กำหนด

2. zwitterionic detergent (ZI) หรือ homogenous enzymatic colorimetric assay เป็นวิธีที่ใช้ detergent ที่มีทั้งประจุบวกและลบทำปฏิกิริยากับ VLDL ทำให้เหลือ LDL ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับน้ำยาชนิดที่สองที่เติมลงไป ได้เป็น LDL polyanion complex และสามารถวัดหาระดับได้จากความขุ่นที่เกิดขึ้น วิธีนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เกิดจากการทำปฏิกิริยากับ apo-B แต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ subform อื่นได้

3. clearance method เป็นวิธีที่ใช้ detergent ทำปฏิกิริยากับ chylomicrons, HDL, และ VLDL ทำให้ปลดปล่อย cholesterol ออกมา และทำปฏิกิริยากับ cholesterol esterase และ cholesterol oxidase ที่เติมลงไป ดังนั้นจึงเหลือเฉพาะ LDL-C ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับน้ำยาชนิดที่สองที่เติมลงไป วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและทำ

ออกจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตามสาร detergent และน้ำยาชนิดที่สองที่ใช้แตกต่างกันไปในแต่ละบริษัท ดังนั้นค่าที่ได้จึงมักแตกต่างกันไปด้วย

วิธีคำนวณ

วิธีคำนวณนั้น คิดโดย Friedewald WT และคณะ[13] ซึ่งได้มีการเผยแพร่มาตั้งแต่ในปี ค.ศ. 1972 เป็นวิธีที่มีข้อดี คือ ถูก ง่าย สะดวก

> Friedewald formula:
> LDL-C (mg/dL) = Total Cholesterol (mg/dL)
> – HDL-C (mg/dL) – 1/5 Total Triglyceride (mg/dL)

อย่างไรก็ตามวิธีคำนวณนี้มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ[17-18] ดังนี้

1. ความถูกต้องแม่นยำของ LDL-C ที่ได้จากวิธีคำนวณ ขึ้นอยู่กับความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์หาค่าของ chol, High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), และ Tg ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสูตรคำนวณ

2. สูตรคำนวณมีความถูกต้องแม่นยำลดลงเมื่อค่า Tg >200 mg/dL และไม่ควรใช้เมื่อค่า Tg $\geq$400 mg/dL

3. ต้องมีการอดอาหาร เนื่องจากการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ค่า Tg ที่ถูกต้อง ผู้ที่จะรับการตรวจจะต้องมีการอดอาหารอย่างเพียงพอ 10-12 ชั่วโมง

เนื่องจากสูตรคำนวณใช้วิธีคิดโดยการกำหนดให้ VLDL = Tg/5 ทั้งที่ในความเป็นจริงแล้วโครงสร้างไขมันมีความซับซ้อน และ VLDL ก็ยังเป็นองค์ประกอบของ chylomicron ด้วย ดังนั้นในกรณีอดอาหาร จะต้องอดให้เพียงพอคือ 10 -12 ชั่วโมง ดังนั้นด้วยข้อจำกัดของวิธีคำนวณจึงทำให้มีผู้พยายามปรับปรุงสูตรคำนวณในระยะต่อมาอีกหลายครั้ง[19-21] และนิยมเรียกสูตรที่ปรับปรุงขึ้นใหม่นี้ว่า modified Friedewald formula แม้กระทั่งในประเทศไทยก็มีผู้พยายามปรับปรุงสูตรนี้ขึ้นใหม่เช่นกัน และเรียกว่าว่า new modified Friedewald formula[22] ซึ่งหากดูในรายละเอียดจะพบว่าสูตรเหล่านี้มีความใกล้เคียงกันและยังคงมีข้อจำกัดอยู่เช่นเดิม ด้วยข้อจำกัดของวิธีคำนวณที่พบว่าแม้จะใช้ตามคำแนะนำก็ยังมีปัญหาอยู่ จึงมีผู้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการคำนวณกับวิธีวิเคราะห์โดยตรง และแนะนำให้ใช้วิธีวิเคราะห์โดยตรงหาก Tg $\geq$200 mg/dL[18] อย่างไรก็ตามสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีงบประมาณมากพอ แนะนำให้ทำการวิเคราะห์หาโดยตรง[23] เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความถูกต้องสูงกว่าการคำนวณ

> Modified Friedewald formula:
> LDL-C (mg/dL) = Total Cholesterol (mg/dL)
> – HDL-C (mg/dL) – 0.15 Total Triglyceride (mg/dL)

> New modified Friedewald formula
> (when fasting Tg in the range of
> 200-499 (mg/dL):
> LDL-C (mg/dL) = Total Cholesterol (mg/dL)
> – HDL-C (mg/dL) – 1/6 Total Triglyceride (mg/dL)

ข้อพึงระวัง

สูตรคำนวณได้มาจากการศึกษาที่มีผู้พยายามนำมาใช้แทนการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ยาก ใช้เวลา และมีค่าใช้จ่ายสูง อย่างไรก็ตามวิธีการคำนวณเป็นเพียงการประมาณค่าเท่านั้น ในการวิเคราะห์จริง ค่า total Chol อาจไม่เท่ากับค่า LDL-C รวมกับ HDL-C และ 1/5 total Tg ได้ ทั้งนี้บ่อยครั้งพบว่าแพทย์มักจะเข้าใจว่าค่า total Chol ต้องเท่ากับค่า LDL-C รวมกับ HDL-C และ 1/5 total Tg ดังนั้น เมื่อได้รับรายงานผลที่ไม่เป็นไปตามที่คาดหวังไว้ ก็จะเกิดความสงสัยและไม่เชื่อผลการวิเคราะห์ที่รายงานจากห้องปฏิบัติการ

วิธีวิเคราะห์ Triglyceride

เนื่องจากที่ผ่านมาการวิเคราะห์หา Tg ไม่มีความสำคัญทางคลินิกอย่างชัดเจนนัก และเป็นการวิเคราะห์

เพียงเพื่อให้สามารถคำนวณหาค่า LDL-C ได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์จึงไม่ได้รับความสนใจและได้รับการพัฒนามากนัก ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์หา Tg ที่นิยม คือ Enzymatic colorimetric method โดยในขั้นตอนแรกนิยมใช้ lipase-mediated hydrolysis เพื่อเปลี่ยน Tg เป็น glycerol และ fatty acids และจากนั้นทำปฏิกิริยาต่อจนเกิดสี[24]

ความสนใจเกี่ยวกับไขมันยังมีลึกลงไปในระดับ subfraction ของ lipoprotein ทั้ง VLDL, LDL, และ HDL สามารถใช้เทคนิค ultracentifugation อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีปัญหาอยู่มากทำให้ไม่ได้รับความนิยม [25] เทคนิคอื่นที่มีใช้ เช่น nondenaturing gradient gel electrophoresis (NDGGE)[26] ซึ่งพัฒนาเป็นการค้าโดยบริษัท Zaxis เรียก ว่า "LFS Lipogel System®, Zaxis", และ nuclear magnetic resounance (NMR)[27] ซึ่งพัฒนาเป็นการค้าโดยบริษัท LipoMed (Raleigh, NC) เรียกว่า "LipoMed NMR Lipoprofile®" และในราวปี ค.ศ. 2000 บริษัท Quantimetrix ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ไขมันขึ้นใหม่อีกวิธี โดยอาศัยความแตกต่างในเรื่องประจุและขนาดอนุภาคของ lipoprotein วิธีนี้ทำโดยการการนำตัวอย่างเลือดที่ต้องการตรวจมาวิเคราะห์ มาทำการแยกอนุภาคของ lipoprotein ตามประจุและขนาด โดยใช้ 3% polyacrylamind gel tube (linear polyacrylamind gel tube electrophoresis system) ทำให้เกิดแถบไขมัน (band) ขึ้น และสามารถทำการวัดปริมาณด้วยเครื่อง Densitometer โดยใช้ software ที่ the National Institutes of Health (NIH) พัฒนาขึ้นแสดงผลการวิเคราะห์เป็นภาพกราฟ (รูปที่ 4)[28-29] วิธีนี้มีชื่อเรียกว่า "Lipoprint TM System" วิธีนี้มีความสะดวกเนื่องจากมีชุดตรวจสำเร็จรูป อย่างไรก็ตามยังใช้เวลาในการตรวจแต่ละครั้งที่ค่อนข้างนานถึงเกือบ 3 ชั่วโมง และแม้ว่าจะมีชุดตรวจสำเร็จรูปแต่ขั้นตอนการวิเคราะห์ยังค่อนข้างมีความยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง และต้องใช้อุปกรณ์เฉพาะ ดังนั้นการวิเคราะห์หา subfraction ของ lipoprotein จึงยังไม่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ที่สำคัญความสำคัญทางคลินิกของ subfraction ของ lipoprotein นั้นยังต้องการผลการศึกษาเพิ่มเติม

นอกจากนี้ยังมีวิธีการวิเคราะห์สำหรับไขมันอื่น ๆ แต่ความสำคัญทางคลินิกและความนิยมใช้ยังมีอยู่จำกัด ทำให้การพัฒนาเป็นไปในระดับหนึ่งเท่านั้น เช่น

- Apolipoprotein A-I

หลักการ: อาศัยวิธี immunoturbidimetry โดยให้ apolipoprotein A-I ที่ต้องการจะหาปริมาณ ทำปฏิกิริยากับ specific antibody ทำให้ความขุ่นเนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งสามารถวัดได้ที่ 340 nm

- Apoprotein B

หลักการ: อาศัยวิธี immunoturbidimetry โดยให้ apolipoprotein B ที่ต้องการจะหาปริมาณ ทำปฏิกิริยากับ specific antibody ทำให้ความขุ่นเนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งสามารถวัดได้ที่ 340 nm

- Lipoprotein (a)

1. Lp(a) turbidimetry

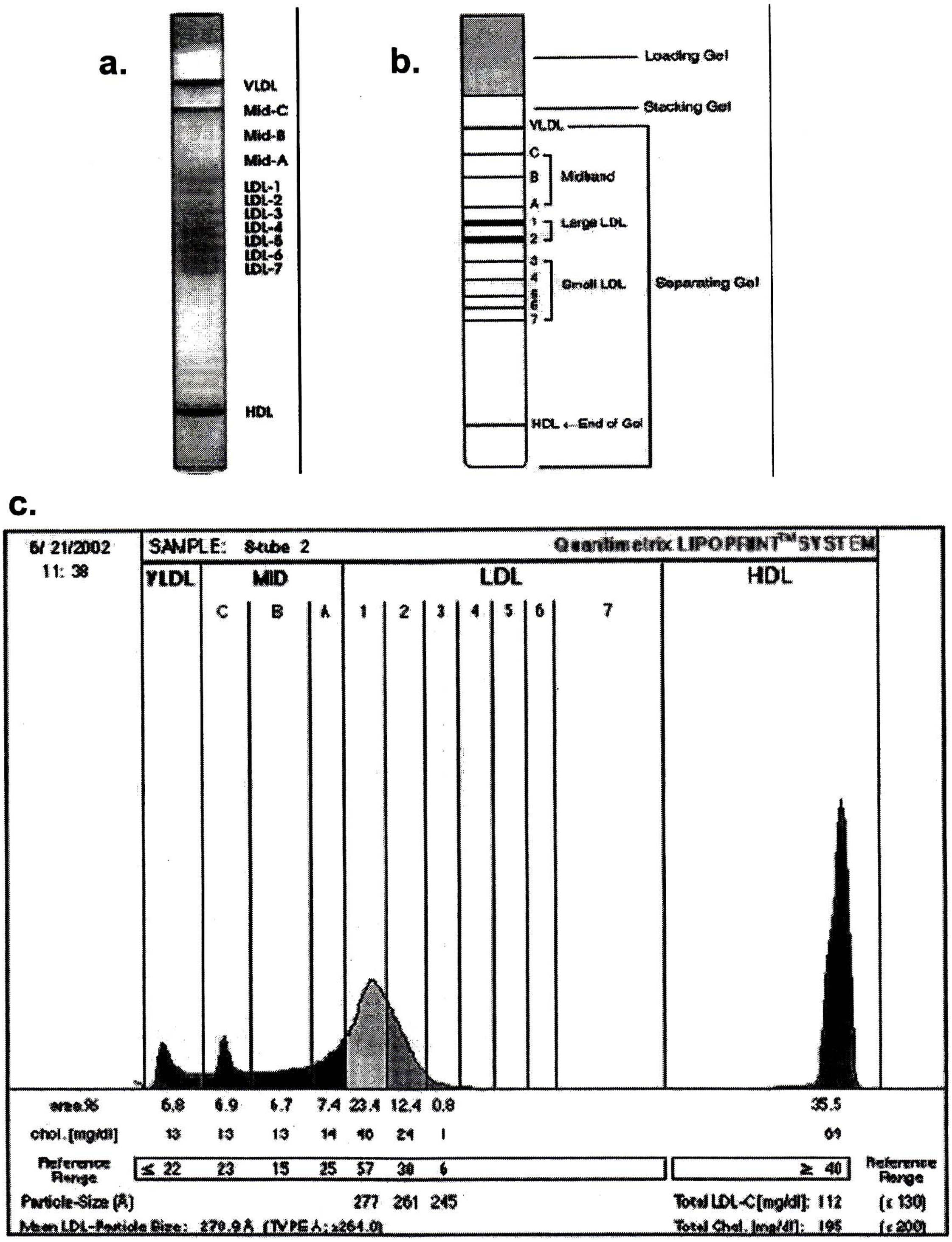
หลักการ: อาศัยวิธี immunoturbidimetry โดยให้ Lp(a) ที่ต้องการจะหาปริมาณ ทำปฏิกิริยากับ specific antibody ทำให้ความขุ่นเนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน แล้วทำการวัดปริมาณ

$$\text{Triglyceride} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{Glycerol} + \text{Fatty acid}$$

$$\text{Glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Gylcerokinase}} \text{Glycerophosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerophosphate} + {}^{-}O_2 \xrightarrow{\text{Gylcerophosphate oxidase}} \text{Dihydroxyacetone} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{dye} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{color}$$



รูปที่ 4. การแยก subfraction ของ lipoprotein a.) แถบไขมันที่แยกได้โดยวิธี Lipoprint b.) ภาพไดอะแกรม เปรียบเทียบแถบไขมันที่แยกได้จากภาพ a. และ c.) ภาพรายงานของ subfraction ของ lipoprotein จากตัวอย่างเลือดของคนปกติ ที่ Lipoprint รายงานเมื่อใช้ software ของ NIH วิเคราะห์ผลจากแถบไขมัน (ปรับปรุงจาก Muniz N, Never G, Duncan D. Impact of triglyceride concentration on the levels of lipoprotein tractions and subfractions in a random population. Presented at AACC 54th Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, July 28-August 1, 2003)[29]

2. Lp(a) Latex

หลักการ: อาศัยวิธี enhanced immunoturbidimetry โดยให้ Lp(a) ที่ต้องการจะหาปริมาณ ทำปฏิกิริยากับ specific antibody ที่เคลือบไว้บนสาร latex ทำให้ความขุ่นเนื่องจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน แล้วทำการวัดปริมาณที่ 552 nm โดยสาร latex ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มสัญญาณทำให้ทำการวิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น

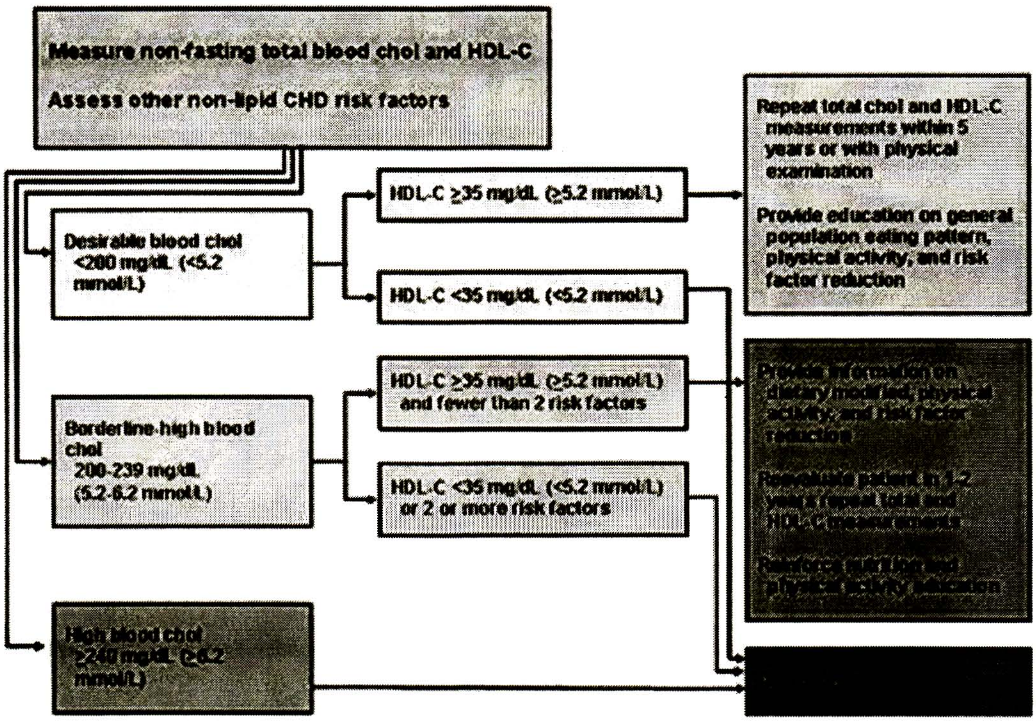
● Apoliprotein Polymorphism

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาผู้ป่วยที่มีไขมัน variant ต่าง ๆ หรือไขมันที่ผิดปกติชนิดต่าง ๆ เช่น apo A-I, apo C-II, apo E เป็นต้น

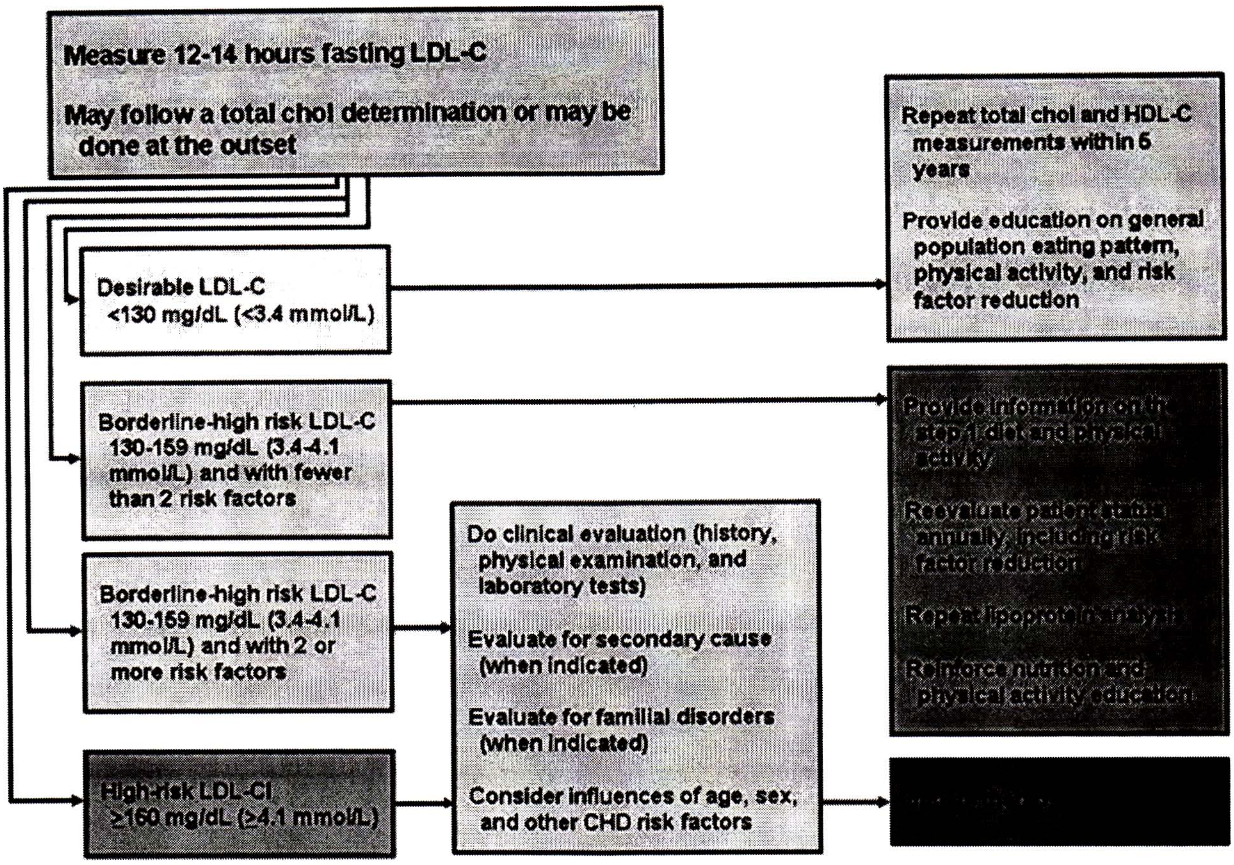
หลักการ: อาศัยคุณสมบัติของไขมันที่แตกต่างกัน จะมี isoelectric focusing ต่างกัน แล้วตามด้วยการทำ immunoblottin

การใช้ระดับไขมันในการประเมินความเสี่ยงของ CHD

การใช้ระดับไขมันเพื่อประเมินความเสี่ยงของ CHD นั้น สำหรับผู้ที่มีค่า chol <200 mg/dL และ HDL-C >35 mg/dL ไม่จำเป็นต้องหาค่า LDL-C[30] คำแนะนำเพิ่มเติมสำหรับแนวทางในการดูรายบุคคลทั่วไปที่มีระดับไขมัน chol และ HDL-C ในระดับต่าง ๆ ดูละเอียดได้จากรูปที่ 5[30] ส่วนการใช้ระดับ LDL-C เพื่อประเมินความเสี่ยงของ CHD นั้น สำหรับผู้ที่มีค่า LDL-C <130 mg/dL การให้คำแนะนำและการตรวจติดตามระดับไขมันสามารถทำซ้ำได้ภายใน 5 ปี[22] คำแนะนำเพิ่มเติมดูรายละเอียดได้จากรูปที่ 6[30]



รูปที่ 5. แนวทางเบื้องต้นในการดูแลบุคคลที่ไม่มีความผิดปกติ และตรวจพบระดับ chol และ HDL-C ในระดับต่าง ๆ (ปรับปรุงและดัดแปลงจาก JAMA 1993;269:3015-23) [30]



รูปที่ 6. แนวทางเบื้องต้นในการดูแลบุคคลที่ไม่มีความผิดปกติและตรวจพบระดับ LDL-C ในระดับต่าง ๆ (ปรับปรุงและดัดแปลงจาก JAMA 1993;269:3015-23)[30]

สรุป

เป็นที่ยอมรับว่าไขมันมีความสัมพันธ์กับโรคหลายชนิด และที่สำคัญก็คือเป็นปัจจัยเสี่ยงในลำดับต้น ๆ ของโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญสำหรับประชากรโลก ดังนั้นแพทย์จึงมีการสั่งการตรวจวัดระดับไขมันเป็นจำนวนมาก และทำให้การตรวจวัดระดับไขมันในเลือดเป็นการตรวจทั่วไปที่มีความสำคัญยิ่ง[31] อย่างไรก็ตามวิธีที่ห้องปฏิบัติการทั่วไปใช้ในการวิเคราะห์หาระดับไขมันในเลือด ยังเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำที่จำกัด กอรปกับการควบคุมกระบวนการก่อนการวิเคราะห์มีความสำคัญต่อการกระบวนการวิเคราะห์เป็นอย่างยิ่ง การเตรียมผู้ป่วยที่ไม่ดีสามารถส่งผลกระทบต่อผลการตรวจวิเคราะห์ได้สูงมาก ดังนั้นในการแปลผลการตรวจแพทย์จึงพึงระลึกไว้เสมอว่าจะต้องใช้ความระมัดระวังให้มากด้วย ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ การใช้สูตรคำนวณโดยเชื่อว่าค่าที่คำนวณได้และค่าที่วิเคราะห์ได้ต้องสอดคล้องกันเสมอเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดปัญหาในการแปลผลได้บ่อยครั้ง ดังนั้นแพทย์จึงควรจะต้องมีความเข้าใจถึงการได้มาซึ่งสูตรคำนวณ และเข้าใจในข้อจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ การตรวจวิเคราะห์เพื่อวัดระดับไขมันในเลือดควรจะต้องมีการอธิบายวิธีการเตรียมตัวแก่ผู้ป่วยให้ทราบและจะต้องได้รับความร่วมมือในการเตรียมตัวจากผู้ป่วยด้วย นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการที่ให้บริการก็จะต้องตระหนักในบทบาทของตนเอง มีการบริการที่มีการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการที่มาตรฐาน และได้รับการรับรอง เลือกใช้วิธีในการตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำตามเกณฑ์ที่ได้รับการยอมรับที่เหมาะสม มีการติดต่อประสานงานที่ดีกับแพทย์ผู้ใช้บริการอยู่ตลอดเวลา ความรู้ความ

เข้าใจและความร่วมมือทั้งจากแพทย์พยาบาล ซึ่งมีความใกล้ชิดกับผู้ป่วยหรือผู้ใช้บริการ จากตัวผู้ป่วยหรือผู้ใช้บริการหรือญาติ รวมทั้งจากทางห้องปฏิบัติการ จะช่วยให้การตรวจวิเคราะห์เพื่อวัดระดับไขมันในเลือดทางห้องปฏิบัติการเป็นการตรวจที่มีคุณภาพและเกิดประโยชน์อย่างสูงสุดต่อประชาชน

อ้างอิง

1. Abel G, Laposata M. Lipids and lipoproteins. In: McClatchey KD, ed. Clinical Laboratory Medicine. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 306-21
2. Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. Clin Chem 1995 Oct;41(10):1414-20
3. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kammel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein levels: the Framingham study. JAMA 1986 Nov 28; 256(20):2835-8
4. Myers GL, Kimberly MM, Waymack PP, Smith SJ, Cooper GR, Sampson EJ. A reference method laboratory network for cholesterol: a model for standardization and improvement of clinical laboratory measurements. Clin Chem 2000 Nov;46(11):1762-72
5. Executive Summary of Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) JAMA 2001 May 16; 285(19):2486-97
6. Jones PH. Low-density lipoprotein cholesterol reduction and cardiovascular disease prevention: the search for superior treatment. Am J Med 2004 Mar 22;116 Suppl 6A: 17S-25S
7. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. Lancet 2005 Oct 8;366(9493):1267-78
8. Westgard JO. Basic QC Practices: Training in Statistical Quality Control for Healthcare Laboratories. 2nd ed. Madison: Westgard QC, 2002
9. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. Clin Chem 2001 Sep;47(9):1579-96
10. Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. Clin Chem 2002 Feb;48(2):236-54
11. Bachorik PS. Measurement of low density lipoprotein cholesterol. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. Handbook of Lipoprotein Testing. Washington DC: AACC Press, 1997: 145-6
12. Cooper GR, Smith SJ, Duncan IW, Mather A, Fellows WD, Foley T, Frantz ID Jr, Gill JB, Grooms TA, Hynie I, et al. Interlaboratory testing of the transferability of a candidate reference method for total cholesterol in serum. Clin Chem 1986 Jun;32(6):921-9

13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972 Jun;18(6):499-502
14. McNamara JR, Cole TG, Contois JH, Ferguson CA, Ordovas JM, Schaefer EJ. Immunoseparation method for measuring low-density lipoprotein cholesterol directly from serum evaluated. Clin Chem 1995 Feb;41(2):232-40
15. Nauck M, Graziani MS, Bruton D, Cobbaert C, Cole TG, Lefevre F, Riesen W, Bachorik PS, Rifai N. Analysis and clinical performance of a detergent-based homogenous LDL cholesterol assay: a multicenter evaluation. Clin Chem 2000 Apr;46(4):506 -14
16. Okada M, Matsui H, Ito Y, Fujiwata A, Inano K. Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: a new superior method. J Lab Clin Med 1998 Sep;132(3): 195-201
17. Charuruks N, Milintagas A. Evaluation of calculated low-density lipoprotein againt a direct assay. J Med Assoc Thai 2005 Sep; 88 Suppl 4:S274-9
18. McNamara JR, Cohn JS, Wilson PW, Schaefer EJ. Calculated values for low-density lipoprotein in the assessment of lipid abnormalities and coronary diseases risk. Clin Chem 1990 Jan; 36(1):36-42
19. Tighe DA, Ockene IS, Reed G, Nicolosi R. Calculated low density lipoprotein cholesterol levels frequently underestimate directly measured low density lipoprotein cholesterol determinations in patients with serum triglyceride levels </=4.52 mmol/l: An analysis comparing the LipiDirect(R) magnetic LDL assay with the Friedewald calculation. Clin Chim Acta 2006 Mar; 365 (1-2): 236-42
20. Rao A, Parker AH, el-Sheroni NA, Babelly MM. Calculation of low-density lipoprotein cholesterol with use of triglyceride/cholesterol ratios in lipoproteins compared with other calculation methods. Clin Chem 1988 Dec; 34(12):2532-34
21. Masse J. SI units and the Friedewald formula. Ann Intern Med 1992 Nov 15;117(10):876
22. Puavilai W, Laoragpongse D. Is calculated LDL-C by using the new modified Friedewald equation better than the standard Friedewald equation? J Med Assoc Thai 2004 Jun;87(6): 589-93
23. Aufenanger J, Zawta B. LDL cholesterol: don't guess. Measure it. A critical examination of Friedewald formula. Clin Lab 1999;45(11-12): 617-22
24. Warnick GR. Measurement of cholesterol and other lipoprotein constituents in the clinical laboratory. Clin Chem Lab Med 2000 Apr; 38(4):287-300
25. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. J Lipid Res 1982 Jan; 23(1):97-104
26. Austin MA, Bresiow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, etc al. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. JAMA 1988 Oct; 260(13):1917-21
27. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for

determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. Clin Chem 1992 Sep; 38(9):1632-8

28. Hoefner DM, Hidel SD, O'Brien JF, Branum EL, Sun D, et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfraction with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL system. Clin Chem 2001; 47(2):266-74

29. Muniz N, Never G, Duncan D. Impact of triglyceride concentration on the levels of lipoprotein fractions and subfractions in a random population. Presented at AACC 54th Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, July 28-August 1, 2003

30. Summary of Second Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II) JAMA 1993 Jun 16; 269(23):3015-23

31. Warnick GR, Remaley AT. Measurement of cholesterol in plasma and other body fluids. Curr Atheroscler Rep 2001 Sep;3(5):404 -11