DOI:10.16016/j.1000-5404.1983.03.008



# 三种高密度脂蛋白胆固醇测定方法的比较

魏明竟 李可能

（第一附属医院）

汪仕忠

（061指挥部医院）

高密度脂蛋白胆固醇（HDL-Ch）测定始于预防医学，以预言个体发生冠心病的可能性。识别这些人群的重要性，在于医学可能从饮食、药物控制及体育锻炼以预防和延迟冠心病的发生。1975年以后几组大数量流行病学的研究表明[1][2]：血清HDL-Ch浓度的变化与临床冠心病发病率呈显著负相关；是预言冠心病较好的脂质指标；它似比总胆固醇敏感。因此受到大家的重视，检测HDL-Ch的方法亦不断发展和创新。

测定HDL-Ch的方法甚多，计有超速离心法、电泳法、柱层析法、化学沉淀法和免疫学方法分离脂蛋白后测其胆固醇。在临床常规检验中，近年来多采用化学沉淀法即用肝素-钙、肝素-锰、磷钨酸钠-镁、硫酸葡聚糖-镁、聚乙二醇-6000等沉淀乳糜微粒、低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白，而HDL则留在上清液中，用酶学法或化学法测定上清液中胆固醇含量，即HDL-Ch。我们对聚乙二醇、肝素-锰法和磷钨酸钠-镁法进行了实验比较，认为采用聚乙二醇法分离测定血清HDL-Ch优点较多，适合临床常规应用。现将结果报告如下：

## 方 法

**一、磷钨酸钠-镁法**[3]：0.3ml血清加0.3ml沉淀剂（溶解0.4克磷钨酸钠和1.0g氯化镁于100ml蒸馏水中）混匀，1500×g离心10分钟，按下述方法测定胆固醇含量。

**二、肝素-锰法**[4]：0.3ml血清加0.3ml沉淀剂（肝素钠150mg和$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 3.64g/100ml蒸馏水）摇匀，同上离心后测定上清液胆固醇含量。

**三、聚乙二醇法**[5]：吸取0.3ml血清加0.3ml 20%聚乙二醇-6000水溶液，混匀，1500×g离心10分钟，取上清液备用。

**四、测定胆固醇**：取上述三种方法离心分离后的上清液0.3ml，加无水乙醇2.7ml（边加边摇！使血清蛋白成为极细的沉淀），放置5分钟后离心（2000转/分）5分钟。取此乙醇提取液2ml，加磷硫铁试剂（2.5%三氯化铁浓磷酸溶液8ml，加浓硫酸至100ml）2.0ml摇匀，冷后比色，波长550nm。

另取0.1ml胆固醇标准液（1ml=0.5mg胆固醇）加相应的脂蛋白沉淀剂0.1ml，再加无水乙醇1.8ml和磷硫铁试剂2ml，摇匀，作为标准管。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

取0.1ml生理盐水代替标准液同标准管操作，作为试剂空白调节吸光度零点。

$$\text{计算}-\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}}\times 0.05\times\frac{100}{0.1}=\text{HDL-Ch mg/dl}$$

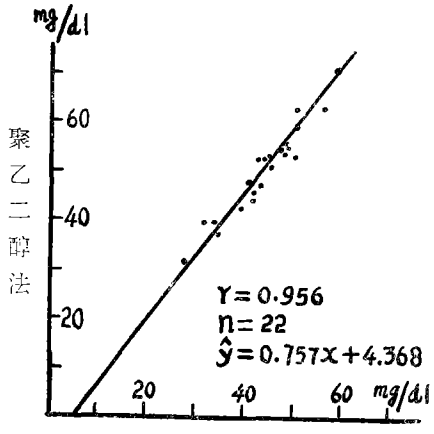
## 实 验 和 讨 论

**一、温度的影响：** 对聚乙二醇(PEG)等三种方法分别进行了室温(13°～15℃)和37℃观察，即将血清加沉淀剂后分别放室温或37℃水浴10分钟后立即离心，测定上清液胆固醇，结果见表1。经统计学处理后看出温度改变对磷钨酸钠-镁和PEG法影响不大，而肝素-锰法在温度高时结果偏低。但应指出，PEG法如在低于10℃的室温中操作，常因试剂变稠而不易离心分离。

**二、三种方法实际标本对照：** 22例血清标本用三种方法同时测定HDL-Ch。结果（见图1、2）：磷钨酸钠-镁法平均51.52mg/dl，PEG法平均51.94mg/dl，较为一致。肝素-锰

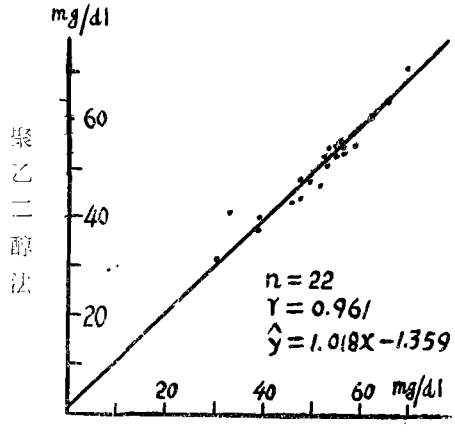
表1 不同温度对分离HDL-Ch的影响

| 方法 | 例次 | 结果mg/dl | | 显著性 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 14℃ | 37℃ | | |
| PEG法 | 19 | 51.3 | 53.2 | t 1.95 | p >0.05 |
| 肝素-锰 | 16 | 49.2 | 47.4 | t 5.62 | p <0.01 |
| 磷钨酸钠-镁 | 10 | 50.8 | 51.3 | t 0.69 | p >0.05 |




肝素-锰法

图1 PEG法和肝素-锰法结果比较




磷钨酸钠-镁法

图2 PEG法与磷钨酸钠-镁法结果比较

法平均43.66mg/dl，结果偏低。将三种方法离心沉淀后的上层血清和沉淀物(经洗涤后复溶于生理盐水中)用苏丹黑B预染，作聚丙烯酰胺电泳证实：三种方法沉淀后的上层血清均仅含α-脂蛋白；在PEG法和磷钨酸钠-镁法分离的沉淀物中未见α-脂蛋白，可见β-和前β-脂蛋白带。而肝素-锰法分离的沉淀物中除清晰可见β-和前β-脂蛋白带外，在α-脂蛋白部位可见轻微灰色带，这将能说明肝素-锰法结果偏低的原因。如前述，温度对肝素-锰法结果有影响，离

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

心时温度高，结果偏低。美国“脂质研究临床实验室”和日本临床病理学会推荐的肝素-锰法[6]，均规定在4 C离心。我们在对照中由于条件所限，在室温离心分离，可能致使HDL部份沉淀，HDL-Ch结果明显偏低。

**三、高甘油三酯标本的分离**：肝素-锰和磷钨酸钠-镁两法遇高甘油三酯标本时，血清加入沉淀剂离心后上层液仍呈现混浊，需要用诸如超滤等方法处理，这在临床检验中不易办到。PEG法不存在这个缺点。我们在三个方法的实际标本对照中发现：当血清甘油三酯达500 mg/dl，肝素-锰法上层液呈现混浊；甘油三酯至700mg/dl左右，磷钨酸钠 镁法上层液亦出现混浊；PEG法即使甘油三酯达1000mg/dl以上亦能清晰分离，上层液无混浊现象。这些高甘油三酯血症病人恰恰很需要了解其血清HDL-Ch浓度，PEG 法可以方便的使用，为一大优点。

**四、关于PEG的浓度**：我们试用了12%、16%、18%、20%、24%和28% 六种浓度的PEG与血清等量混合，经离心分离的上层液和沉淀物用苏丹黑B预染后作聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。结果仅20%PEG能使HDL和其他脂蛋白清楚分离；高于这个浓度则沉淀物中出现α-脂蛋白带，而低于这个浓度则在上清液中出现β 脂蛋白带。

用聚乙二醇-6000沉淀血清低密度和极低密度脂蛋白时，PEG的最后浓度文献报导有较大差异（从6%～12%）[10][11][12]。出现这种差异有多方面的原因。Demacker等[13]认为主要是不同来源的聚乙二醇制品本身的差异造成的。我们试验了两种制品（上海试剂一厂781001，上海奉贤光明化工厂800709）其结果无显著差异。由于试验的PEG制品种类太少，很难说明不同PEG制品对结果的影响。

Polson 等指出[14]，PEG的最后浓度和溶液的最后pH都可以影响蛋白质的沉淀。我们用酸度计测定7.5%和10%PEG溶液及混合血清的pH，试剂pH为3.1～3.2；血清pH7.9～8.0。当PEG溶液同血清混合的比例不一样时，尽管PEG的最后浓度完全一样，其最后pH亦不一样。我们用15%和20%PEG溶液与血清等量混合，其pH为7.70和7.59；用45%和60%PEG液与血清按1：5混合，其pH为8.02和7.92。用六份血清按这两种比例混合后离心，测定上清液的胆固醇含量。结果：按1：1方式混合，PEG最后浓度7.5%者平均75.4mg/dl，PEG最后浓度10%者平均52.5mg/dl；按1：5方式混合，PEG最后浓度7.5%者平均56.0mg/dl，PEG最后浓度10%者平均52.8mg/dl。从这个结果看似乎同最后pH关系不密切，而试剂与血清的比例不同结果可有差异（7.5%PEG）。这可能和蛋白质浓度不同有关。

总之文献上应用PEG最后浓度的差异同PEG制品本身的差异（分子量、纯度等）和试剂与血清的比例不同有关。我们认为用上海试剂一厂产品，试剂与血清1：1混合，PEG最后浓度10%为好。

**五、PEG法的重复试验**：为了观察PEG法的精密度，我们对一份混合血清作了20次重复测定，平均58.4mg/dl，CV = 2.0%，重复性良好。

**六、磷钨酸钠-镁法或肝素-锰法沉淀低密度和极低密度脂蛋白时，试剂pH影响很大[7]，亦受试剂中镁或锰浓度改变的影响**。而所用的氯化镁或氯化锰又极易潮解，很难保证配制时试剂浓度的准确性[8]。加之肝素的来源和品质不同也可产生不同的结果[9]。这些因素必须小心加以控制，否则将影响这两个方法的准确性和精密度。相比之下，PEG法试剂配制简便，试剂浓度的准确性容易控制，保存时间长，测定精度高，干扰因素少，高甘油三酯标本亦能得到良好分离测定，不干扰酶学法胆固醇测定，适合医院化验室常规使用。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 参 考 文 献

(1) Miller GJ,et al: Lancet 1:16, 1975
(2) Gorden J,et al: Am J Med 62:707, 1977
(3) 杨昌国: 中华医学检验杂志 2:85, 1979
(4) Bachorik PS,et al: Clin chem 22:1828, 1976
(5) Allen JK, et al; Clin Chem 25:324, 1979
(6) 日本临床病理学会标准化委员会: 临床病理 29:1123, 1981
(7) Grove TA: Clin Chem 25:560, 1979
(8) Joern WA: Clin Chem 25:639, 1979
(9) Maytield C: Clin Chem 25:1309, 1979
(10) Viikari J: Scand J Clin Invest 36:265, 1976
(11) 渡道富久子等: 临床病理 28:60, 1980
(12) Allen IK,et al: Clin Chem 25:1346, 1979
(13) Demacker PNM,et al: Clin Chem 26:1775, 1980
(14) Polson A, et al: Biochem. Biophy Acta 82:463. 1964

# Comparison of Three Methods to Determine Cholesterol with High Density Lipoprotein

Wei Mingjing, et al
(First Teaching Hospital)

Three methods to determine HDL-Ch, polyethylene glycol precipitation, heparin-$Mn^{++}$, and sodium phosphotungstate-magnesium, were compared. It was found that when 20 g/dl (20%) PEG-6000 was mixed with equal volume of serum and the mixture was centrifuged, well seperation of HDL-Ch could be obtained even the serum triglyceride level in a sample was as high as 1000mg/dl. Since this method is easy to manipulate and the reagent is stable, it is suitable to be used in hospital labs as aroutine procedure.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net