

## Originalien

# Richtigkeit der HDL-Cholesterinmessung

P.D. Niedmann, H. Luthe, H. Wieland, G. Schaper und D. Seidel

Abt. Klinische Chemie, Zentrum Innere Medizin, Universitätsklinik Göttingen (Leiter: Prof. Dr. D. Seidel)

### Accuracy of HDL-Cholesterol Determination

**Summary.** The widespread use of different methods for the determination of HDL-cholesterol (in Europe: sodium phosphotungstic acid/MgCl<sub>2</sub>) in connection with enzymatic procedures (in the USA: heparin/MnCl<sub>2</sub> followed by the Liebermann-Burchard method) but common reference values makes it necessary to evaluate not only accuracy, specificity, and precision of the precipitation step but also of the subsequent cholesterol determination. A high ratio of serum vs. concentrated precipitation reagent (10:1 V/V) leads to the formation of variable amounts of  $\Delta$ -3,5-cholestadiene. This substance is not recognized by cholesterol oxidase but leads to an 1.6 times overestimation by the Liebermann-Burchard method. Therefore, errors in HDL-cholesterol determination should be considered and differences up to 30% may occur between HDL-cholesterol values determined by the different techniques (heparin/MnCl<sub>2</sub> – Liebermann-Burchard and NaPW/MgCl<sub>2</sub> – CHOD-PAP).

**Key words:** HDL-cholesterol – Cholestadiene – Normal values for HDL-cholesterol – Precipitation techniques for separation of lipoproteins

### Einleitung

Zu Beginn der 50er Jahre haben Gofman et al. [8] als auch Barr et al. [5] als erste darauf hingewiesen, daß den high-density Lipoproteinen, bzw. den  $\alpha$ -Lipoproteinen ( $\alpha$ -Lp) des menschlichen Plasmas unter Umständen eine den  $\beta$ -Lipoproteinen ( $\beta$ -Lp) entgegengesetzte Rolle in der Pathogenese der atherosklerotischen Gefäßerkrankungen zukom-

men könnte. Während in den Folgejahren durch vielfältige und elegante experimentelle Ansätze der Grundlagenforschung als auch durch klinische Studien der Zusammenhang zwischen erhöhten  $\beta$ -Lp Konzentrationen und der Entwicklung einer frühzeitigen Atherosklerose, speziell der koronaren Herzerkrankung, aufgezeigt, und in wesentlichen pathobiochemischen Mechanismen abgeklärt werden konnten [6, 14], ist der Wissensstand um die Rolle der high-density Lipoproteine im Atherosklerosegeschehen wesentlich lückenhafter.

Durch die Verbreitung einer scheinbar einfachen Methodik zur Messung des Cholesterins der high-density Lipoproteinfraktion [7] wurde in den letzten 6 Jahren, aufbauend auf Vermutungen von Miller and Miller [12] in einer kaum noch zu übersehenden Anzahl von vorwiegend klinischen und epidemiologischen Arbeiten, versucht, die besondere Rolle des sog. HDL-Cholesterins als negativen Risikofaktor herauszustellen [9]. Die Auffassung über die klinische Verwertbarkeit des HDL-Cholesterins als Risikofaktor, war zum Teil sehr euphorisch [4], es wurde sogar als „Schlüssel der Lipoproteindiagnostik“ schlechthin deklariert, zum Teil fehlte es jedoch auch nicht an sehr kritischen Stimmen [16]. Die inzwischen schon sichtbare Abwendung vom HDL-Cholesterin, bei der ärztlichen Beurteilung einer Dyslipoproteinämie, und Hinwendung zu den cholesterinreichen Lipoproteinen des Plasmas, den  $\beta$ -Lipoproteinen, mag durchaus auch aufgrund enttäuschter Erwartungen in der Praxis zustande gekommen sein. Die Diskrepanz zwischen der Propagierung zwar einfacher aber nicht ganz billiger Testsysteme zur Vervollständigung der Lipid- und Lipoproteindiagnostik auf der einen Seite und der fehlenden diagnostischen Hilfe in Form von Richtwerten für ärztliches Handeln auf der anderen Seite, war groß genug, um Zweifel an der Verwertbarkeit dieses

Sonderdruckanfragen an: Dr. P.D. Niedmann (Adresse s. nach Literatur)

laborchemischen Parameters aufkommen zu lassen. Unterstützt werden müssen solche Zweifel durch den Ausgang sorgfältiger und für jeden klinisch-chemischen Parameter zu fordernden Untersuchungen auf Zuverlässigkeit der Methode, die sich aus dem Vergleich der Messergebnisse in verschiedenen Laboratorien ergibt. Die Resultate solcher Studien waren in der überwiegenden Mehrzahl unbefriedigend [15, 16]. So war bereits die Cholesterinbestimmung im niedrigen Bereich (45 mg/dl) mit einem VK von 8,6% behaftet [10]. Bezüglich der Spezifität wurde bereits früher vermutet, daß die unterschiedlichen Polyanionenpräzipitationsverfahren zur Messung des HDL-Cholesterins sowenig übereinstimmen, daß wahrscheinlich und in nicht unerheblichem Maße verschiedene Dinge gemessen werden [15]. Neben einer akzeptablen Präzision ist der Beweis für die Richtigkeit des Meßwertes eine notwendige Forderung und Voraussetzung für die Anwendung einer klinisch-chemischen Meßmethode in der Praxis oder Klinik.

Die vorliegende Untersuchung hat sich daher die Überprüfung der Richtigkeit der Cholesterinbestimmung nach Polyanionenpräzipitation der apo-B-haltigen Lipoproteine zum Ziele gesetzt.

## Material und Methodik

### Serum

Für die Untersuchungen wurden frische Nüchternseren, die sonst keine klinisch-chemischen Auffälligkeiten zeigten, und aus Routineeinsendungen des Zentrallaboratoriums der Universitätsklinik Göttingen stammten, verwendet.

### Polyanionenpräzipitationstechniken

Die Zugabe der Präzipitationslösung zur Probe erfolgte in üblicher Weise mit Kolbenhub-Pipetten.

a) 10 Teile Serum + 1 Teil Präzipitationslösung:

(1) NaPW/MgCl<sub>2</sub>: hierfür wurden sowohl Packungen der Firma Boehringer Mannheim (Best.Nr. 400971, 148393) als auch selbst hergestellte Präzipitationslösungen (NaPW, 4 g/dL, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L) verwendet.

(2) Alternativ wurden in besonderen Versuchsansätzen unter Rühren aus einer Feinbürette (V=1 ml, Typ Dosimat E 412, Firma Metrom) jeweils zu 500 µl Serum in einem Reagiergefäß (V=1,5 ml) in ca. 50 Schritten 50 µl Fällungslösung (NaPW/MgCl<sub>2</sub>) über einen Zeitraum von etwa 45 s zudosiert. Um eine sofortige Vermischung zu erzielen, tauchte der zur Kapillare ausgezogene Teflonschlauch direkt in das gerührte Serum ein.

(3) Na-Heparinat/MnCl<sub>2</sub>: hierfür wurden Fertigtests der Firma Boehringer Ingelheim verwendet (INGO-Test, Best.Nr. 576551).

b) 1 Teil Serum + 10 Teile Präzipitationslösung:

Na-Heparinat/MgCl<sub>2</sub>: Fällungsreagenz zur HDL-Cholesterinbestimmung der Firma Merck, Darmstadt (Best.Nr. 15007).

Präzision und Richtigkeit der Bürette im Vergleich zu der für die analogen Fällungen benutzten Pipette wurden entsprechend abgesichert.

### High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

Auf einer HPTLC Platte (Firma Merck, Darmstadt) wurden mittels Nano-Applikator (Firma CAMAG, Muttenz) 400 nl aufgetragen und das Chromatogramm in der antizirkularen Technik [11] (antizirkulare U-Kammer, Firma CAMAG) mit n-Hexan/Diäthyläther 2+1 innerhalb von 3 min entwickelt. Nach kurzem Ventilieren bei Raumtemperatur wurde die Platte in eine 0,2-prozentige Lösung (Methanol/Wasser 1+1) von 8-Anilinonaphthalinsulphonsäure-1, Ammoniumsalz (Firma Merck) getaucht, im warmen Luftstrom (65° C) getrocknet und die bei 366 nm gelbgrün fluoreszierenden Flecke in Fluoreszenz im CAMAG TLC/HPTLC Scanner mit angeschlossenem Rechnerintegrator (Sigma 10, Firma Perkin-Elmer, Überlingen) densitometriert [13].

### Gaschromatographie – Massenspektroskopie (GC/MS)

Die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem kombinierten Gaschromatograph-Massenspektrometer Finnigan 4000 mit einem Datensystem 6000 unter folgenden Analysenbedingungen durchgeführt:

Säule:	SE 30 Quarz- Glas-Kapillare 30 Meter
Einspritzblock Temp.:	240° C
Einspritzmenge:	1 µl, Split less
GC-Ofen Temp.:	200–270° C, 10° C/min
Gasfluß:	ca. 2 ml Helium
Quellentemp.:	280° C
Elektronen Energie:	70 eV

### Probenvorbereitung für GC/MS und HPTLC

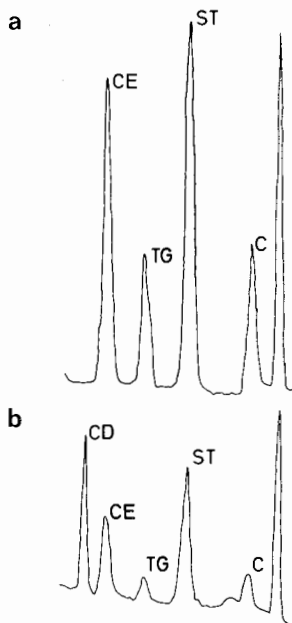
Hundert Mikroliter des zentrifugierten klaren Überstandes der Polyanionenpräzipitation wurden in einem Reagiergefäß mit 1000 µl einer Mischung von Chloroform/Methanol 2+1 versetzt, 10 min geschüttelt und 5 min bei 10000 × g zentrifugiert. Hundert Mikroliter der unteren Phase wurden bei 40° C im Stickstoff-Strom in Wheaton-Vials (V=1 ml) mit Schraubkappe und Teflon-Septum abgedampft und in 30 µl Chloroform/Methanol 2+1 aufgenommen. Ein Teil davon wurde in N<sub>2</sub>-Strom abgedampft und für die GC/MS-Analyse in einer Mischung von Heptan/Chloroform 4+1 aufgenommen.

### Cholesterinbestimmung

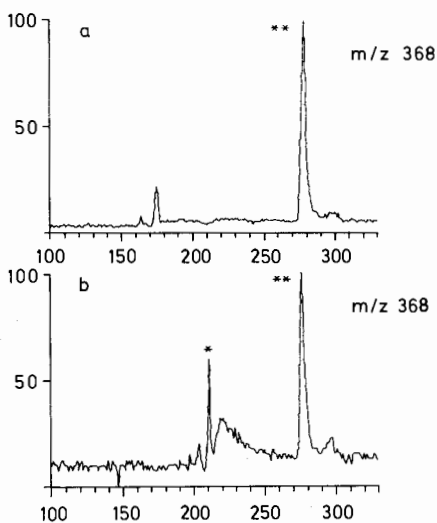
Die enzymatische Messung des Cholesterins aus den Überständen der Polyanionenpräzipitation erfolgte nach der CHOD-PAP-Methode (Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 231347), bei Verwendung der Na-Heparinat/MnCl<sub>2</sub> Methode entsprechend der Vorschrift nach Zentrifugation. Die Messung des Cholesterins wurde nach Extraktion entsprechend der Methode nach L. Abell und F.E. Kendall [1] aus den Überständen der HDL-Cholesterinfällung (NaPW-MgCl<sub>2</sub> bzw. Heparin/MnCl<sub>2</sub>) mit dem Merckotest (Fa. Merck, Best.-Nr. 3312) durchgeführt.

## Ergebnisse

Die Abb. 1 zeigt im Dünnschichtchromatogramm eines Präzipitationsüberstandes (Testansatz Boeh-



**Abb. 1 a, b.** Vergleich von HPTLC-Mustern eines Lipidextraktes aus Vollserum (a) und eines Lipidextraktes eines Überstandes einer NaPW/MgCl<sub>2</sub>-Fällung (b). C=Freies Cholesterin, ST=Standard (5- $\alpha$ -Cholestan-3-on), TG=Triglyceride, CE=Cholesterinester, CD= $\Delta$ -3,5-Cholestadien



**Abb. 2.** Rekonstruiertes Massenchromatogramm (repetitive scanning mit 2 s pro scan) auf dem Fragment m/z 368 aus einer nicht behandelten Serumprobe (a) und einem NaPW/MgCl<sub>2</sub>-Filtrat (b). Der mit (\*) gekennzeichnete Peak repräsentiert das bei der Präzipitation entstandene  $\Delta$ -3,5-Cholestadien, (\*\*) das freie Cholesterin

ringer, Mannheim) eine Substanz, die sich im ursprünglichen Vollserum nicht befindet (CD).

Ähnliches beobachtet man bei gaschromatographischer Trennung und nachfolgender Massenspektrometrie (GC/MS) desselben Materials

(Abb. 2). Auch hier zeigt sich eine Komponente (\*), die im Präzipitationüberstand vor dem Hauptpeak (\*\*) – dem Peak des freien Cholesterins – eluiert wird. Die massenspektroskopische Analyse dieser Fraktion zeigt, daß es sich bei der unbekannt Substanz um  $\Delta$ -3,5-Cholestadien handelt, das unter den Präzipitationsbedingungen offenbar aus freiem Cholesterin entsteht (s. Abb. 3).

Die Abb. 4 zeigt das Massenfragmentogramm bei der Masse m/z 368 von den Überständen von 3 nebeneinander am selben Serum durchgeführten NaPW/MgCl<sub>2</sub>-Präzipitationen. Die relativen Mengenverhältnisse der beiden Peaks sind deutlich unterschiedlich. Peak 1 (\*) entspricht dem unter der Polyanionenpräzipitation entstandenen  $\Delta$ -3,5-Cholestadien, Peak 2 (\*\*) dem freien Cholesterin der Probe. Es zeigt sich die erhebliche Varianz in den Mengenverhältnissen der beiden Komponenten.

In der Abklärung der Frage nach möglichen Einflüssen einer solch stark unterschiedlichen  $\Delta$ -3,5-Cholestadienentwicklung unter der Polyanionenpräzipitation, wurde versucht, die übliche manuelle Methode durch eine langsame Zugabe des Fällungsmittels (Titration) zu ersetzen. Aus der Darstellung in Abb. 5 ergibt sich, daß es tatsächlich unter sehr sorgfältig kontrollierten Bedingungen, gelingt, die  $\Delta$ -3,5-Cholestadienbildung unter der Polyanionenpräzipitation auf ein Minimum zu reduzieren. Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, hängt die Menge des aus dem freien Cholesterin entstandenen  $\Delta$ -3,5-Cholestadiens weiterhin wesentlich von den Endvolumen des Präzipitationsansatzes ab. Es wird deutlich, daß diesem bei gleichem Serum Reagenzienverhältnis (10+1), die  $\Delta$ -3,5-Cholestadienbildung umgekehrt proportional ist. Bei einem Serum Reagenzienverhältnis 1+10 (Heparin/MgCl<sub>2</sub>) kommt es nur zur geringen Bildung von  $\Delta$ -3,5-Cholestadien unter den angegebenen Testbedingungen. Die unterschiedliche  $\Delta$ -3,5-Cholestadienbildung in diesen beiden Testansätzen beruht nicht auf den verschiedenen Polyanionen NaPW und Heparin, denn der 10+1-Ansatz mit Heparin/MnCl<sub>2</sub> führt zu einer vergleichbaren  $\Delta$ -3,5-Cholestadienbildung wie NaPW (MgCl<sub>2</sub>).

Die nunmehr wichtigste Frage, war die, ob das  $\Delta$ -3,5-Cholestadien, das unter der Polyanionenpräzipitation entsteht, sich bei der nachfolgenden Cholesterinbestimmung wie Cholesterin verhält oder nicht. Um dies zu beantworten, wurden die zwei gebräuchlichsten Cholesterinbestimmungsverfahren in dieser Hinsicht untersucht und miteinander verglichen. Wie erwartet, ergab sich, daß die enzymatische Methode (CHOD-PAP) als die übliche Folgemethode nach NaPW/MgCl<sub>2</sub>-Präzi-

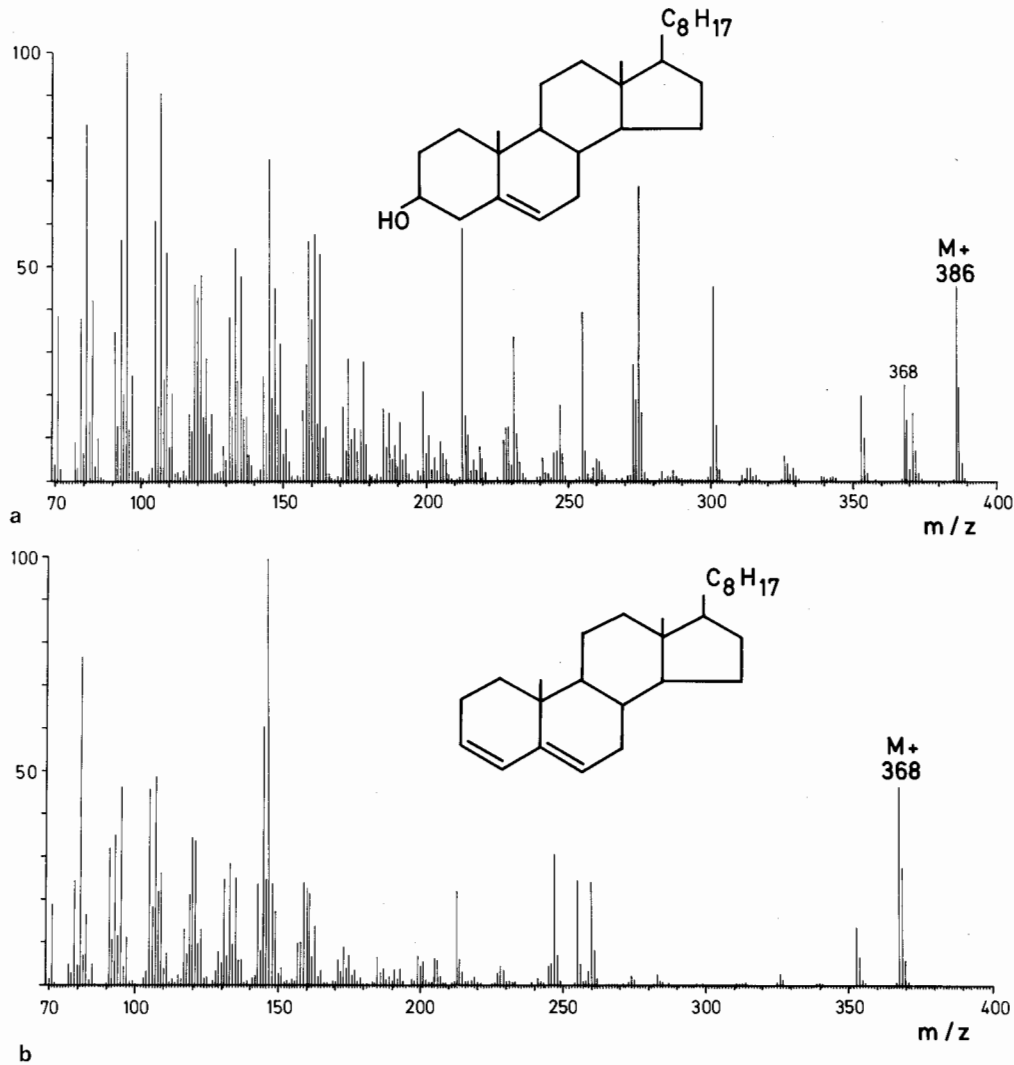


Abb. 3a, b. 70 eV Massenspektrum des Cholesterins (a) und des  $\Delta$ -3,5-Cholestadiens (b)

pitation,  $\Delta$ -3,5-Cholestadien nicht erfaßt. Hier wirkt sich der Verlust der für den Angriff der Oxidase notwendigen  $3\beta$ -Hydroxylgruppe aus [3]. Im anderen Falle stellt sich heraus, daß der molare Extinktionskoeffizient für  $\Delta$ -3,5-Cholestadien in der chemischen Reaktion nach Extraktion [13] im Meßbereich bei 578 nm um ca. den Faktor 1,6 über dem des freien Cholesterin liegt (s. Abb. 7). Somit läßt sich feststellen, daß das  $\Delta$ -3,5-Cholestadien sich bei keiner der gängigen Cholesterinbestimmungen im Anschluß an eine Polyanionenpräzipitation wie freies Cholesterin verhält. Bei der enzymatischen Methode wird es nicht erfaßt, bei der Methode nach Abell und Kendall wird es dagegen überbewertet.

Diese Fehler lassen sich nicht durch einen Korrekturfaktor eliminieren, da das Ausmaß der  $\Delta$ -3,5-Cholestadienbildung bei bestimmten For-

men der Polyanionenpräzipitation nicht vorhersehbar ist. Es ergab sich eine Differenz von bis zu 20% zwischen den beiden Verfahren zur HDL-Cholesterinbestimmung.

### Diskussion

Die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchung zeigen, daß die im Augenblick am häufigsten verwendeten Präzipitationsverfahren zur Ermittlung des sog. HDL-Cholesterins einfachen Anforderungen an der Zuverlässigkeit klinisch-chemischer Methoden nicht gerecht werden. Hier wird erstmals deutlich, daß nicht nur Präzision und Spezifität der Präzipitationsverfahren und die Präzision der Cholesterinbestimmung Anlaß zur berechtigten Kritik geben, sondern sogar auch die Richtigkeit der Cholesterinbestimmung. Dieses ist um so gra-

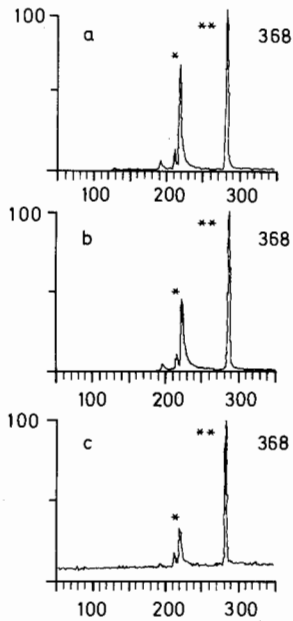


Abb. 4a-c. Massenfragmentogramm auf dem Ion m/z 368 an drei Überständen von am selben Serum ausgeführten NaPW/MgCl<sub>2</sub>-Fällungen (\*)  $\Delta$ -3,5-Cholestadien, (\*\*) freies Cholesterin

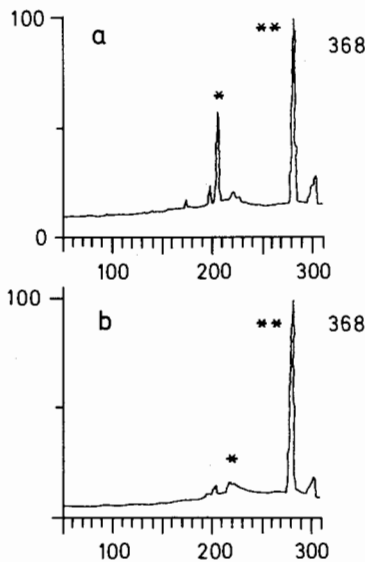


Abb. 5a, b. Massenfragmentogramme auf dem Ion m/z 368 nach manueller Polyanionenfällung (a) und nach „Titration“ (b), (\*)  $\Delta$ -3,5-Cholestadien, (\*\*) freies Cholesterin

vierender, als Richtwerte für Deutschland zur Beurteilung von HDL-Cholesterin überwiegend auf Ergebnissen von Untersuchungen U.S.-amerikanischer Kollektive beruhen. In den USA wurden solche Untersuchungen vornehmlich unter Verwendung der Heparin/MnCl<sub>2</sub> und der nachfolgenden chemischen Cholesterin-Messung vorgenommen, während in Deutschland überwiegend die

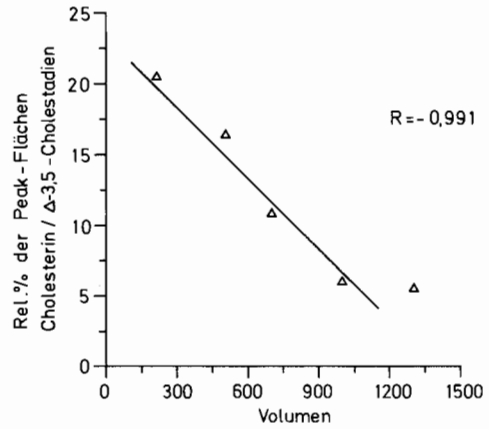


Abb. 6. Darstellung der Abhängigkeit der  $\Delta$ -3,5-Cholestadienbildung im Präzipitationsüberstand (NaPW/MgCl<sub>2</sub>) von Reaktionsvolumen bei konstantem Serum/Reagenzienverhältnis (10+1). Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert von 3 Präzipitationsansätzen

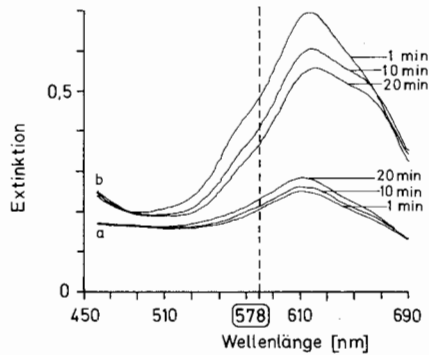


Abb. 7a, b. Wellenlängen-scan der Absorption zwischen 460 und 690 nm der Liebermann-Burchard-Reaktion nach verschiedenen Inkubationszeiten. a Cholesterin; b  $\Delta$ -3,5-Cholestadien (7.76 mMol/L)

NaPW/MgCl<sub>2</sub>:CHOD-PAP Bestimmung Anwendung findet. Wie aus Abb. 7 hervorgeht, führt eine kurze Inkubationszeit zu einem überproportional höheren Signal für  $\Delta$ -3,5-Cholestadien bei der Liebermann-Burchard Methode, was bei der Verwendung von Autoanalyzern besonders stark ins Gewicht fällt. Unterschiede in der HDL-Cholesterinbestimmung zwischen beiden Verfahren können somit, wie wir und vor uns früher andere gezeigt haben [15], bis zu 20% betragen. Die Bildung von  $\Delta$ -3,5-Cholestadien aus Cholesterin und dessen Verhalten bei der Cholesterinmessung muß als Ursache oder Teilursache für beschriebene Diskrepanzen angesehen werden. Es ist zu vermuten, daß die Fehlbestimmungen, die alleine auf die Methode zurückzuführen sind, im Ausmaß über dem liegen können [5-10 mg/dl HDL-Cholesterin), was als klinisch bedeutender Unterschied angesehen wird [9]. Die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung

zeigen unseres Erachtens, daß bei weiteren klinischen und epidemiologischen Untersuchungen und noch mehr bei der Anwendung in der Praxis, von solchen Präzipitationsverfahren Abstand genommen werden sollte, die zur  $\Delta$ -3,5-Cholestadienbildung führen. Der nach wie vor interessanten Frage nach der Bedeutung der  $\alpha$ - oder high-density Lipoproteine bei der Atheroskleroseentstehung wird daher mit anderen Präzipitations- bzw. Meßverfahren, z.B. der quantitativen Lipoprotein-Elektrophorese [17] – in speziellen Fällen auch Ultrazentrifugation – oder der Messung von Apoproteinen [2], nachgegangen werden müssen. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen mögen als warnendes Beispiel zeigen, wie wichtig die kritische Überprüfung auf Präzision und Richtigkeit eines klinisch-chemischen Verfahrens ist, bevor es mit allem Nachdruck propagiert und mit praktischen Konsequenzen eingesetzt wird.

### Literatur

1. Abell L, Kendall FE (1958) Standard methods of clinical chemistry. vol 2. Academic Press, New York pp 26–33
2. Albers JJ, Cheung MC, Hazzard WR (1978) High density lipoproteins in myocardial infarction survivors. *Metabolism* 27:479–485
3. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20:470–475
4. Assmann G, Schriewer H, Schulte H, Oberwittler W (1980) Der Stellenwert des HDL-Cholesterin als Risikoindikator der koronaren Gefäßkrankheit. *Internist* 21:1–11
5. Barr DP, Russ EM, Eder HA (1951) Protein-lipid relationships in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions. *Am J Med* 11:480–493
6. Brown MS, Goldstein JL (1976) Receptor mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191:150–154
7. Burstein M, Scholnik HR, Morfin R (1970) Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res* 11:583–595
8. Gofmann JW, Lindgren F, Elliott H, Mantz W, Hewitt J, Strisower B, Herring V (1950) The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Science* 3:166–171, 186
9. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawbner TR (1977) High density lipoprotein as a prospective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 62:707–713
10. Hainline Jr A, Cooper GR, Olansky AS, Winn CL, Miller DT (1980) CDC Survey of high density lipoprotein cholesterol measurement: a report. Clinical Chemistry Division, U.S. Dept. of Health and Human Services
11. Kaiser RE (1978) Anticircular high performance thin layer chromatography. *HRC CCm* 1:164
12. Miller GJ, Miller NE (1975) Plasma high-density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet* 1:16–19
13. Niedmann PD (in Vorber)
14. Ross R, Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 180:1332–1339
15. Warnick GR, Cheung MC, Albers JJ (1979) Comparison of current methods for high density lipoprotein cholesterol quantitation. *Clin Chem* 25:596–604
16. Warnick GR, Albers JJ, Teng Leary E (1980) HDL-cholesterol: Results of interlaboratory proficiency tests. *Clin Chem* 26:169–170
17. Wieland H, Seidel D (1978) Fortschritte in der Analytik des Lipoproteinmusters. *Inn Med* 5:290–300

Eingegangen am 6. Mai 1982

Angenommen am 30. August 1982

Dr. P.D. Niedmann  
Abt. Klin. Chemie  
Zentrum Innere Medizin d. Univ. Klinik  
Robert-Koch-Str. 40  
D-3400 Göttingen  
Bundesrepublik Deutschland