

健康食品之調節血脂功能評估方法

960718 衛署食字第 0960403114 號公告修正

壹、前言

2001 年，腦血管疾病與心臟疾病分佔國內十大死因的第二與第三位⁽¹⁾，雖無論腦血管疾病或心臟疾病都是由多項因子交互作用所導致，但根據許多研究資料顯示動脈粥狀硬化(Atherosclerosis)是導致這些血管疾病的最主要原因。在動物實驗，常以直接解剖或間接測定的方式來探討動脈粥狀硬化的構致導因或危險因子程度；但在人體試驗，通常只能採間接的方式，主要常包括測定血清或血漿之各種脂質或脂蛋白(Lipoproteins)的含量，以及其低密度脂蛋白(LDL)氧化程度或對氧化之敏感度，來評估其可能罹患動脈粥狀硬化的危險機率。

血清脂質主要包括三酸甘油酯(Triacylglycerols)、膽固醇(Cholesterol)、磷脂質(Phospholipids)和游離脂肪酸(Free fatty acids)等。三酸甘油酯和膽固醇(70-75%以膽固醇酯型態存於血液中)無法溶解於水性的血漿中，故需藉由蛋白質和磷脂質等兩性乳化劑包圍在外側而形成可親水性的脂蛋白顆粒，才能溶解於血漿中，而隨著血液循環運送至身體的各器官組織中。

血漿中之脂蛋白依其顆粒大小或密度，可分為乳糜粒(Chylomicrons)、極低密度脂蛋白(Very low density lipoproteins; VLDL)、低密度脂蛋白(Low density lipoproteins, LDL)、高密度脂蛋白(High density lipoproteins; HDL)。人類血漿脂蛋白的物理特性和其組成大致如表 1⁽²⁾：

表 1. 人類血漿脂蛋白的物理特性與組成 (重量百分比)

脂蛋白	平均直徑 (nm)	密度 (g/ml)	蛋白質 (%)	三酸甘油酯 (%)	膽固醇 (%)	磷脂質 (%)
乳糜粒	100-1000	<0.95	1-2	87	3	8
VLDL	43	0.95-1.006	10	55	17	18
LDL	24-26 ⁽³⁾	1.006-1.063	25	8	45	22
HDL	7-11 ⁽³⁾	1.063-1.210	44	3	23	30

From: Thompson, G.R., Handbook of Hyperlipidemia, 1989

如加以細分時，密度在 1.006-1.019 g/ml 部分可歸為中間密度脂蛋白(Intermediate density lipoproteins; IDL)，密度在 1.019-1.063 g/ml 部分才算為 LDL。不同物種的哺乳類或實驗動物之血漿脂蛋白之密度可能會略有差異，但許多研究還是沿用人類的密度來分離^(4,5)，不過亦有針對該動物種類而選用特殊密度範圍者，例如選用 1.020-1.055 g/ml 來分離倉鼠之 LDL⁽⁶⁾。

低密度脂蛋白含大量的膽固醇(佔血漿總膽固醇的 60-70%)，具有趨動脈粥狀硬化特質，較容易穿透進入血管壁內⁽⁷⁾。當其中的脂質被氧化形成 oxLDL，而被穿透進入血管壁下方的巨噬細胞(Macrophages)所吞食，形成泡沫細胞(Foam cells)，再經一連串變化而形成動脈粥狀硬化，因此目前認為 LDL 的氧化修飾是引發初期動脈粥狀硬化病變的最主要導因(Key step)⁽⁸⁻¹¹⁾。相反的，高密度脂蛋白含較多量的磷脂質(約 30%)與較少量的膽固醇(佔血漿總膽固醇的 20-30%)，從肝臟和小腸釋出進入血液循環後，從周邊組

織移走多餘的膽固醇，因此具有可減少膽固醇在血管壁沈積的作用⁽⁷⁾。目前，已普遍接受如果血漿總膽固醇(TC)或低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)過高是導致動脈粥狀硬化疾病的正相關危險因子；而升高血漿高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)或 HDL-C/LDL-C 的比率，則是導致動脈粥狀硬化疾病的負相關危險因子⁽¹²⁾。但是血漿 LDL 中含太少量的抗氧化劑、含太高比率的多元不飽和脂肪酸(PUFAs)或血漿中太高濃度的 Cu^{++} 、 Fe^{++} 等因素，會導致 LDL 容易氧化，更是產生動脈粥狀硬化的最重要正相關危險因子⁽⁸⁻¹¹⁾。

我國⁽⁷⁾與歐洲動脈硬化學會(European Atherosclerosis Society)將血脂異常分成三類：(1) 高膽固醇血症：血漿總膽固醇(TC) >200 mg/dL；(2) 混合型高脂血症：血漿總膽固醇(TC) >200 mg/dL、三酸甘油酯(TG) >200 mg/dL；(3) 高三酸甘油酯血症：血漿三酸甘油酯(TG) >200 mg/dL，且高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C) <35 mg/dL 或 TC/HDL-C >5。美國國家膽固醇教育計畫學程(American National Cholesterol Education Program) 則依 TC、LDL-C 和 HDL-C 濃度分為：(1) 理想膽固醇濃度：TC <200 mg/dL 或 LDL-C <130 mg/dL；(2) 邊緣型高膽固醇濃度：TC =200-239 mg/dL 或 LDL-C =130-159 mg/dL；(3) 過高的膽固醇濃度：TC \geq 240 mg/dL 或 LDL-C \geq 160 mg/dL；(4) 過低的高密度脂蛋白膽固醇濃度：HDL-C <35 mg/dL。

膽固醇除了部分由飲食攝入體內(通常佔體內每天代謝量之 30%左右)外，大部分乃由肝臟和小腸細胞所合成。血漿中膽固醇濃度不會立即受到飲食中膽固醇多寡的影響⁽⁷⁾。三酸甘油酯在肝和脂肪細胞內持續不斷的由血漿脂肪酸和醣的代謝物再酯化合成，作為生理能量的儲蓄資源。肝臟為了避免堆積過多的三酸甘油酯，可藉由極低密度脂蛋白(VLDL)的分泌將之排出，而飲食中的三酸甘油酯可很容易影響到血液中的濃度，另攝取大量的酒精或醣類的食品，亦可在短時間內大幅提高血清三酸甘油酯的濃度。持續的高濃度血清三酸甘油酯，可導致肝細胞中堆積過多的三酸甘油酯，而引起脂肪肝(Fatty liver)之病變⁽⁷⁾。糖尿病患者常伴有血脂異常，例如第二型糖尿病患者有 VLDL-TG 偏高、HDL-C 偏低和出現小而密的 LDL (small, dense LDL)等三種脂蛋白代謝異常特徵⁽³⁾。

貳、評估食品樣本是否具有調節血脂質功能之檢測方法：

廠商除須提供與其產品相關之資料與科學文獻，以佐證該產品或其部分原料可能具有調節血脂質之功能外，必須針對擬以「健康食品」上市之產品，進行至少包括下列所規定之「人體實驗」或「動物實驗」之一。若過去的科學文獻對所提產品的特性瞭解不足時，應同時進行「人體實驗」和「動物實驗」，以加強證據之可信度。本辦法所建議之檢測項目並非每項都必須進行。但欲對產品加以宣稱、廣告或介紹其具有某項生理機能時，則必須提出相符且足夠之科學證據來支持。通常適當的檢測項目越多，其證據越明確。

一、人體實驗：

- (一) 必須委託國內外大學食品營養、醫藥等相關研究所、醫學中心或其他中央衛生主管機關認可之研究機構執行，需有醫師參與，並遵循衛生單位對保健食品人體實驗有關之相關規定。
- (二) 每組人數 \geq 8 人。實驗對象與人數視實驗特性與設計之周密性而定，採用血脂異常病患時，宜考慮選用同型(例如 Type IIb)者。
- (三) 實驗期 \geq 4 週。

實驗前必須有一適當的穩定期，以獲得受試者之血脂質值作為基礎線，才開始進行攝食含欲檢測產品之飲食。實驗後，宜有一適當的恢復期，以觀察停止攝取檢測之產品後，血脂質恢復之情形作為參考。

- (四) 實驗前、實驗期和實驗後除檢測之樣品外，得接受試者按原飲食習慣攝食，但必須維持每天相近穩定之飲食型態(例如應盡量避免應酬和肉食)與營養攝取，且不得有太明顯干擾血脂質之因子(含運動量)。實驗採自體比較的方式，若其於實驗後比實驗前有明顯($P < 0.05$)改善，則可認定該產品具有該項生理功能。

二、動物實驗：

- (一) 以測定生化指標為主的實驗應採用倉鼠(Hamster)，進行其他指標實驗者可採用其他適宜之實驗動物。
- (二) 動物必須來自公立研究機構、公立大學或其他中央衛生主管機關認可之實驗動物中心。
- (三) 每組動物 ≥ 8 隻。
- (四) 建議實驗飼料應有 2-3 組高低不同的欲測保健食品劑量進行實驗，實驗後廠商得由所獲結果來推估該產品的適當建議攝取量(以每人每日攝取 500 克乾重食物為基準)。但若試驗樣品之主成分過去已有研究文獻、實驗報告或已有相似的產品已通過『健康食品』的認證等參考資料，可預估能顯示其生理功能的適當劑量；或該產品已上市而欲證實其所建議的劑量能顯示擬宣稱的生理功能時，實驗得採用單劑量。
- (五) 從『天然食品』中經萃取濃縮製成之產品，當以動物實驗來檢測其生理功能時，建議人攝取劑量應為動物適當劑量的 1-1/2 倍(即動物實驗劑量為人攝取劑量的 1-2 倍)；而產品之主成分除脫水外，保有大部分的天然食品成分時，則其建議人攝取劑量得為動物適當劑量的 1-1/5 倍(即動物實驗劑量為人攝取劑量的 1-5 倍)。
- (六) A. 實驗可採先餵一合理範圍之高油脂(倉鼠實驗得添加 0.2%的膽固醇)飼料，使動物升高其血清脂質(可由尾巴採血或另分一組動物來確定)，才開始正式實驗。實驗期以相同之高油脂飼料為基礎飼料。實驗結束時，如攝取含檢測食品之飼料組的血脂質明顯($P < 0.05$)比控制組低，則可認定該產品具降低血脂質之功能。
- B. 實驗亦可採以血脂質正常的動物來進行，基礎飼料可為高油脂(得添加 0.2%的膽固醇)飼料。經飼養適當週數後，控制組之血脂質會逐漸上升，若攝取含檢測樣品飼料的實驗組，其血脂質明顯($P < 0.05$)低於控制組，則可認定該產品具降低血脂質之功能。
- (七) 實驗期 4-8 週或是視實驗需要而定。
- (八) 實驗必須記錄每隻動物之體重改變與平均每日飼料攝取量。

三、血脂質測定指標：

- (一) 包括血清(或血漿；以下皆同)三酸甘油酯(TG)、總膽固醇(TC)、高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白膽固醇(LDL-C)值。動物實驗另應依受試樣品調節血脂功效之可能作用機制，加測其肝臟(糞便)三酸甘油酯和膽固醇，以了解受試樣品是否會造成肝脂肪的堆積。

- (二) 人體或動物實驗中，若測定 LDL 對氧化之穩定度，當實驗組之 LDL 被氧化所需之誘發時間(Lag phase)比控制組顯著延長($P < 0.05$)時，則可宣稱「攝取該產品可延緩低密度脂蛋白之氧化」。實驗亦可測其 LDL 之 TBARS 值供參考。

四、血脂質測定方法：

抽取血液樣品前，以空腹 12-14 小時⁽⁷⁾為原則，但得視實驗特性而改變。實驗報告必須詳細載明所採用之分析方法。測定血清或血漿中脂質和脂蛋白濃度，以及 LDL 氧化的測定方法得採用當時一般學術界和醫學檢驗機構普遍採用或認可之方法，以下所附之方法僅供參考用。得使用適當的市售生化試劑(Test kits)直接測定，如能以超高速離心方式，將各密度之脂蛋白加以分離，然後再分別測定各不同密度脂蛋白所含膽固醇量，則更佳。

(一) 血清三酸甘油酯(Serum Triacylglycerol, TG)

利用酵素法(GPO-PAP)⁽¹³⁾，在定量的血清中加入呈色劑，經 22-25°C 下水浴，以分光光度計於波長 500 nm 下測定，經計算後可得 TG 的濃度⁽⁹⁾。

(二) 血清總膽固醇(Serum Total Cholesterol; TC)

採用 Enzymatic colorimetric method⁽¹⁴⁾，於定量的血清中加入呈色劑，置於 37°C 水浴，作用之後可產生紅色化合物，於 500 nm 波長下測定其吸光度，而換算得知血清總膽固醇的濃度。

(三) 血清高密度脂蛋白膽固醇(Serum HDL-C)

1. 利用酵素作用及比色測定之原理⁽¹⁴⁾，先取定量的血清加入適當的沈澱劑，將 Chylomicrons、極低密度脂蛋白(VLDL)及低密度脂蛋白(LDL)沈澱，作用完全之後將其離心，取定量上清液並加入測定膽固醇之試劑，在波長 500 nm 下測定吸光值，經計算後可得 HDL-C 的濃度。
2. 以簡易沈澱法測定人類的 HDL-C^(17, 18)：

由於許多實驗室或醫院並沒有昂貴的超高速離心機，因此可以考慮採用簡易的沈澱法來測定人類的 HDL-C。本方法的基本原理是利用試劑與 VLDL 和 LDL 表面的 Apolipoprotein B 結合，而使 VLDL 和 LDL 沈澱，因此可取得只含 HDL 的上層液。目前在市面上較普遍的沈澱試劑有 (1) Sodium phosphotungstate-magnesium chloride; (2) Dextran sulfate-magnesium chloride; (3) Heparin-manganese chloride; (4) Heparin-calcium chloride; (5) Polyethylene glycol。到底那一沈澱試劑最好，目前沒有定論。但根據 American Association for Clinical Chemistry 於 1994 刊出的 Laboratory Measurement of Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins (Edited by N. Rifai and G. R. Warnick) 所引述的調查數據，大約有 55% 的實驗室是採用上述第一項的 Sodium phosphotungstate- magnesium chloride; 而約有 30% 採用第二項的 Dextran sulfate-magnesium chloride。因此本功能評估方法推薦盡量一致採用最普遍被採用的 Sodium phosphotungstate-magnesium chloride 沈澱試劑之方法。

測定時，除小心按商業試劑所附的檢測步驟來進行，以及必須很精確取樣和試劑量外，特別要提醒注意 (1) 血液樣品盡量採用血清 (serum) 或非使用 EDTA 取得的血漿 (plasma)，以免殘留的 EDTA 與沈澱試劑結合，而導致 VLDL 和 LDL 沒完全沈澱，以致高估了 HDL-C 值； (2) 要預備新鮮的試劑； (3)

要讓樣品與試劑回溫到室溫才進行（即前後要盡量恆溫）；（4）使用精確的 dispenser 來定量取樣；（5）沈澱作用後，以 1,500 x g 在 4 °C 離心 45 分鐘。必須作用時間、離心速率、溫度、時間與每一步驟都應一致，才能達到較高的再現性（reproducibility）；（6）需很小心的取出上層液，轉移至一適當的容器；（7）測得的膽固醇濃度必須再乘上該步驟中的稀釋因子。

（四）血清低密度脂蛋白膽固醇(Serum LDL-C)

1. 利用酵素作用及比色測定之原理⁽¹⁴⁾，取定量之血清加入適當的沈澱劑將 LDL 沈澱，作用完全之後將其離心，取定量上清液並加入測定膽固醇之試劑，在波長 500 nm 下測其吸光值，經計算後，再以總膽固醇值扣除上清液膽固醇值，可得 LDL-C 的濃度。
2. 由簡易沈澱法估算人類的 LDL-C^(17, 18):

目前並沒有一簡易方法可獲得 LDL 層來供檢測，而 Friedwald 等人於 1972 年提出一簡易的估算法，其理論基礎是人類血漿中的 TG 大部分是存在於 VLDL，且 VLDL 中 TG 與 Cholesterol 的重量比例大約為 5:1。由於血漿中的 TC、total TG 與 HDL-C 值（藉沈澱法）均可測得，且 $TC = VLDL-C + LDL-C + HDL-C$ （將 IDL-C 併到 LDL-C），以及 $VLDL-C = (\text{plasma total TG})/5$ ，所以 $LDL-C = TC - HDL-C - (\text{plasma total TG})/5$ 。由於上述的二個假設並不精確，因此求得的計算值 LDL-C 只是一近似值。Friedwald 等人比較了不同型態高血脂症與正常人樣品的計算值與測定值，發現除了血液樣品中含有明顯量的 Chylomicrons 或血漿 TG > 400 mg/dL 之外，大致上計算值與測定值相近。如沒要求數值很精確，可以於測得血漿之 Total cholesterol (TC)、Total triacylglycerols(TG)及 HDL-C 之後，以 $LDL-C = TC - HDL-C - (\text{plasma total TG})/5$ 之公式，求得 LDL-C 的估算值。目前本估算方法在醫院的臨床檢測上普遍被使用。此估算 LDL-C 方法，不一定能適用於一些動物系統中。

（五）血清低密度脂蛋白(人體 1.006-1.063 g/ml 或 1.019-1.063 g/ml；或倉鼠 1.020-1.055 g/ml)分離方法：

1. 取 2 ml 全血，於 4°C 以 2,100 X g 離心 15 分鐘。
2. 約可取得 1 ml 的血清(或血漿)，取 10ul 做總膽固醇之測定。
3. 從每樣品取 0.5 ml 血清至於超高速離心管中，加入 2.5 ml 密度為 1.006 g/ml 之 NaBr 溶液，在 4°C 下，以 120,000 x g 離心 16 小時(或 453,000 x g，離心 3.5 小時)，取浮於最上層部分約 0.5ml，得密度 ≤ 1.006 g/ml 之 VLDL。若欲獲得人體 1.019-1.063 g/ml 或倉鼠 1.020-1.055 g/ml 之 LDL 時，本步驟可直接加密度為 1.019 g/ml 或 1.020 之 NaBr，相同條件離心後可得人體 ≤ 1.019 g/ml 或倉鼠 ≤ 1.020 g/ml 之 VLDL+IDL。
4. 需要時，可由該層取 20 ul 定量其膽固醇等。
5. 假設剩下之溶液為 2.5 ml，再加入密度 1.348 g/ml (倉鼠 1.230 g/ml)之 NaBr 溶液 0.5 ml，得總體積 3 ml 溶液。

其計算方法為 $1.006 \text{ g/ml} \times 2.5 \text{ ml} + 1.348 \text{ g/ml} \times 0.5 \text{ ml} = 1.063 \text{ g/ml} \times 3 \text{ ml}$ ；或倉鼠 $1.020 \text{ g/ml} \times 2.5 \text{ ml} + 1.230 \text{ g/ml} \times 0.5 \text{ ml} = 1.055 \text{ g/ml} \times 3 \text{ ml}$ 。

6. 再於 4°C 下，以 120,000 x g 離心 20 小時(或 453,000 x g，離心 3.5 小時)，

得密度 $1.006 \text{ g/ml} < d \leq 1.063 \text{ g/ml}$ 之 LDL 約 1 ml。可取 20 ul 之 LDL 定量其膽固醇等。

7. 假定剩下溶液有 2 ml，可再加入 1.5 ml 密度 1.406 g/ml 之 NaBr 溶液，得總體積為 3.5 ml 之溶液。

8. 重複於 4°C 下，以 $120,000 \times g$ 離心 20 小時(或 $453,000 \times g$ ，離心 3.5 小時)，得密度 $1.063 \text{ g/ml} < d \leq 1.210 \text{ g/ml}$ 之 HDL 約 0.5 ml。可取 20 ul 之 HDL 定量其膽固醇等。

9. 計算 VLDL、LDL 和 HDL 膽固醇濃度時，須注意單位之換算。

註：當上述方法操作時，若所得各分離層體積有變動或欲取得密度不同之實驗動物之脂蛋白時，所需加入 NaBr 之密度與量可以下列公式來計算：

$$V_2 = V_1 \frac{D - D_1}{D_2 - D}$$

V_1 = 原溶液體積

V_2 = 須加入 NaBr 溶液體積

D = 最終所欲獲得溶液之密度

D_1 = 原溶液密度

D_2 = 加入 NaBr 溶液之密度

(六) 血清低密度脂蛋白氧化(Serum LDL Oxidation)之測定：

採銅離子誘導 LDL 氧化之延滯期(Lag phase)方法^(15,16)。取適量透析後之 LDL，以 pH7.0-7.4 之 Phosphate buffered-saline (PBS) 調整其濃度，使最終濃度約 $50 \mu\text{g/ml}$ ，誘導氧化之最終銅離子濃度為 $1.67\sim 25 \mu\text{M}$ 之內。於波長 232 nm 每固定時間測定其吸光值變化，直至 Conjugated dienes 生成量達最高，不再有明顯變化為止。計算出誘導低密度脂蛋白氧化之 Lag phase (以 Propagation phase 的切線對 X 軸之截距代表 Lag phase)。亦可測 TBARS 或其他適當值對時間的變化作為 LDL 對氧化穩定度之指標⁽¹⁵⁾。

參、宣稱、廣告與產品標示：

食品進行以本評估方法推薦之實驗或以更嚴謹之其他被醫學或相關科學界所認可的實驗或檢測方法，且得明確之結果時，得向中央衛生主管機關申請與實驗結果相符的宣稱、廣告或產品介紹，例如僅降低血清三酸甘油酯者，不得廣泛宣稱能降低血脂肪，以免誤導以為亦可降低血清膽固醇等其他脂肪。凡經人體實驗證實，有兩項結果對調節血脂具正面調控之意義者，且其中一項為能降低血清 LDL-C (同時可誘升 HDL-C 更佳) 或延緩 LDL 氧化的產品，得核可「攝取本產品可能有助於減少發生心血管疾病或動脈粥狀硬化的危險因子」之功效宣稱或其他相近有科學依據的詞句。

肆、參考文獻

1. 衛生署。 2002。 中華民國公共衛生概況。 行政院衛生署編印。
2. Thompson, G.R. 1989. Handbook of Hyperlipidemia. Current Science Ltd., London.
3. Reaven, G.M., Chen, Y.D.I., Jeppesen, J., Maheux, P. and Krauss, R.M. 1993. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense, low density

- lipoprotein particles. *J. Clin. Invest.* 92:141-146.
4. Chapman, M.J. 1980. Animal lipoproteins: chemistry, structure and comparative aspects. *J. Lipid Research* 21:789-853.
 5. Daumerie, C.M., Woollett, L.A. and Dietschy, J.M. 1992. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:10797-10801.
 6. Woollett, L.A., Spady, D.K. and Dietschy, J.M. 1992. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *J. Lipid Research* 33:77-88.
 7. 行政院衛生署。 1997。 高血脂防治手冊,國人血脂異常診療及預防指引。 遠流出版公司,台北。
 8. Frankel, E.N. 1998. *Lipid Oxidation.* Oily Press Ltd., Scotland.
 9. Brown, M.S. and Goldstein, J.L. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 52:223-261.
 10. Lin, P.J. and Chang, C.H. 1994. Endothelium dysfunction in cardiovascular disease. *Chang Gung Med. J.* 17:198-210.
 11. Chait, A., Brazg, R.L., Tribble, D.L. and Krauss, R.M. 1993. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern M. *Am. J. Med.* 94:350-356.
 12. Kritchevsky, D. 1984. Dietary fiber and atherosclerosis. In: "Dietary fiber, Basic and Clinical Aspects", pp.265-274, Ed. Vahouny, G.V. and Kritchevsky, D. Plenum Press, N.Y.
 13. Bucolo, G. and David, H. 1973. Quantitative determination of serum triglyceride by the use of enzyme. *Clin. Chem.* 19: 476-482.
 14. Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W. and Fu, P.C. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20:470-475.
 15. Puhl, H., Waeg, G. and Esterbauer, H. 1994. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins, in "Methods in Enzymology", Vol. 233 Oxygen Radicals in Biological Systems, Part C, ed. Packer, pp. 425-441. Academic Press, Inc., San Diego.
 16. Kleinveld, H.A., Hak-Lemmers, H.L.M., Stalenhoef, F.H. and Demacker, P.N.M. 1992. Improved measurement of low-density lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: Application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin. Chem.* 38 (10):2066-2072.
 17. Rifai, N. and Warnick, G.R. 1994. Laboratory measurement of lipids, lipoproteins and apolipoproteins, pp. 91-105. American Association for Clinical Chemistry Press.
 18. Friedewald, W.T., Levy, R.I. and Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in plasma, without use of the

preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 18(6): 499-502.