

# Die Bestimmung glykosylierter Hämoglobine

A. Hubbuch

Boehringer Mannheim GmbH

## Zusammenfassung:

*Glucose und andere Zucker reagieren in den Erythrozyten mit verschiedenen Aminogruppen des Hämoglobins zu Produkten, die glykosylierte Hämoglobine genannt werden. Die Bestimmung dieser Hämoglobine hat die Überwachung der Stoffwechsellage von Diabetikern wesentlich verbessert: Ein einziger Wert informiert über die mittlere Blutzucker-Konzentration der vergangenen Wochen („Blutzuckergedächtnis“).*

*Zur Bestimmung glykosylierter Hämoglobine stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die unterschiedliche Anteile dieser Hämoglobine erfassen. Bei der Beurteilung der Werte sind methodenabhängige Normalwerte und einzelne Störfaktoren zu beachten.*

*In der Routine-Diagnostik hat sich besonders die Mikrosäulen-Ionenaustausch-Chromatographie zur Bestimmung von HbA<sub>1</sub> bewährt.*

## Schlüsselwörter:

*Glykosylierte Hämoglobine – Bildung – Strukturen – Methoden – Normalwerte – Einflußgrößen*

## Summary:

*The reaction of glucose and other sugars with various amino groups of hemoglobin causes the formation of the so-called glycated hemoglobins. The determination of these hemoglobins has substantially improved the metabolic monitoring of diabetics: A single value provides a profile of the mean blood glucose levels present during the preceding weeks ("blood glucose memory").*

*Glycated hemoglobins can be determined by various techniques which measure different moieties of these hemoglobins. For evaluation of results, the method-dependent reference values and a number of interfering factors must be taken into account.*

*For routine diagnostic purposes, micro-column ion-exchange chromatography for the determination of HbA<sub>1</sub> has proved to be of particular value.*

## Keywords:

*Glycated hemoglobins – formation – structure – methods – reference values – interferences*

## Einleitung

Die Bestimmung von HbA<sub>1</sub> hat inzwischen einen festen Platz in der Stoffwechselkontrolle von Diabetikern eingenommen. Kaum jemand möchte heute noch auf diese relativ einfach zugängliche Information über den mittleren Blutzuckerspiegel der vergangenen 4-8 Wochen, das „Blutzuckergedächtnis“, verzichten.

Außerdem gelten die glykosylierten Hämoglobine als ein wichtiger Indikator für die Glykosylierung anderer Proteine wie Albumin, Gewebsproteine, Lipoproteine u. a. (1, 2). Dieser Prozeß spielt mit großer Sicherheit eine wesentliche Rolle bei den Spätfolgen des Diabetes mellitus; denn die Spätfolgen treten vor allem an solchen Geweben und Organen auf, die erhöhte Konzentrationen glykosylierter Proteine enthalten: z. B. Glomeruli, Retina, Nerven (und Erythrozyten).

Das große Interesse der Diabetes-Forschung an diesen Substanzen und das Bestreben, möglichst einfache Verfahren zur Bestimmung glykosylierter Hämoglobine zu entwickeln, haben zu einer verwirrenden Vielzahl von Methoden und Namen geführt.

Die folgende Arbeit soll einen Überblick über Entstehung, Struktur und Bestimmungsmethoden glykosylierter Hämoglobine geben. Außerdem werden die methodenabhängigen Normalwerte und Störmöglichkeiten besprochen.

## Entstehung und Abbau glykosylierter Hämoglobine

Die Synthese von Glykoproteinen unterliegt normalerweise einer sehr genauen enzymatischen Kontrolle. Dies ist bei den glykosylierten Hämoglobinen jedoch anders:

Glucose und einige andere Zucker (1, 9) können unter physiologischen Bedingungen ohne die Mithilfe von Enzymen mit Hämoglobin reagieren. Diese Reaktion ist als Maillard- oder auch Bräunungsreaktion schon lange bekannt (3).

Bei genauerer Betrachtung dieser Reaktion wird sehr schnell klar, warum die glykosylierten Hämoglobine als eine Art Blutzuckergedächtnis dienen. Sie läßt sich am Beispiel von HbA<sub>1</sub> in drei Phasen einteilen (Abb. 1).

# Halisa® **NEU**

# Der ELISA Test, der Sie in der Diagnostik sicherer macht – bei broncho-alveolären Allergosen.

HALISA ist ein einfach durchführbares, schnell und leicht nachvollziehbares Testverfahren zur Bestimmung von IgG Antikörpern. HALISA liefert quantitative und objektive Testergebnisse durch photometrische Auswertung. HALISA ist so spezifisch und empfindlich wie RIA. HALISA wird als komplettes Test-Kit geliefert.

## ALLERGIE-DIAGNOSTIKA

**Die Brücke zwischen  
Forschung und Praxis.  
Zum Nutzen des Patienten.**

HAL ALLERGIE GmbH  
Kölner Landstr. 34 a  
4000 DÜSSELDORF 13  
Tel. 02 11/78 62 21

fordern Sie ausführliche  
Informationen über HALISA an

Name \_\_\_\_\_

Adresse \_\_\_\_\_

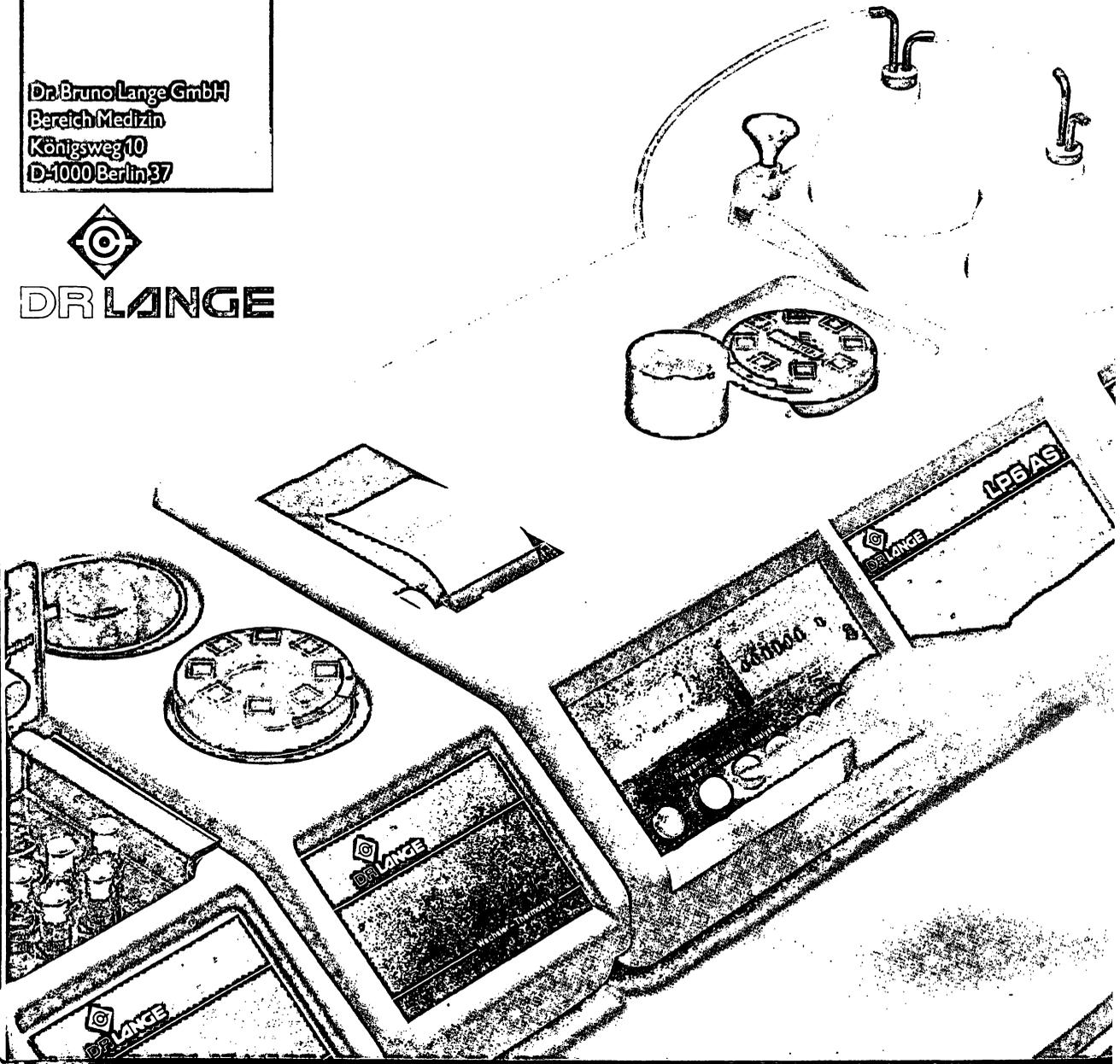
Das LP 6 AS arbeitet  
kostenlos für Sie auf Probe.  
Vereinbaren Sie eine  
Vorführung oder fordern  
Sie weitere Informationen  
an  
Frau Reichelt erreichen Sie  
unter (030) 801021.

# Ganz einfach und automatisch: Substrate, Enzyme und Immundiagnostica. Das LP 6 AS von Dr. Lange.

Dr. Bruno Lange GmbH  
Bereich Medizin  
Königsweg 10  
D-1000 Berlin 37



DR LANGE



Glucose + Hämoglobin  $\xrightarrow{1. \text{ schnell}}$  Labiles HbA<sub>1</sub> (Aldimin)  $\xrightarrow{2. \text{ langsam}}$  Stabiles HbA<sub>1</sub> (Ketoamin)  $\xrightarrow{3. \text{ langsam}}$  HbA<sub>1</sub> wird mit dem Erythrozytenabbau entfernt

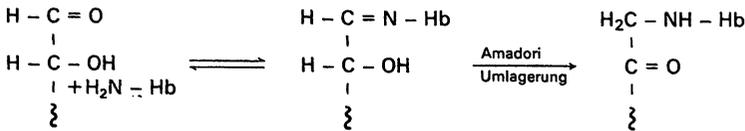


Abb. 1: Entstehung und Abbau von HbA<sub>1</sub>

### 1. Schnelle Bildung des labilen HbA<sub>1</sub> und ähnlich schnelle Rückbildung zu Hämoglobin

Ein plötzlicher Anstieg der Blutzucker-Konzentration führt innerhalb weniger Stunden (4, 5) zu einem Anstieg des labilen HbA<sub>1</sub>, das aber auch wieder recht schnell in Hämoglobin und Glucose zerfällt (Halbwertszeit 3 Std.) (6).

Bei Verfahren, die das labile zusammen mit dem stabilen HbA<sub>1</sub> erfassen (Methodenbeschreibung beachten), können deshalb nach einem plötzlichen Anstieg der Blutzuckerwerte (bei labiler Stoffwechsellage, nach oraler Glucosebelastung) kurzfristig erhöhte HbA<sub>1</sub>-Werte gemessen werden.

### 2. Langsame Umwandlung des labilen HbA<sub>1</sub> in stabiles HbA<sub>1</sub>

Die Rückbildung des labilen HbA<sub>1</sub> in Hämoglobin und Glucose erfolgt etwa 60mal schneller als die Umwandlung in stabiles HbA<sub>1</sub> (5).

Das hat eine sehr wichtige Konsequenz. Kurzfristig erhöhte Blutzuckerwerte führen zu keiner meßbaren Erhöhung des stabilen HbA<sub>1</sub>, wie folgendes Experiment zeigte (7): Durch Glucose-Infusionen bei gesunden Probanden wurde über 6 Std. ein Blutzuckerspiegel von etwa 310 mg/dl erreicht. In dieser Zeit stiegen die HbA<sub>1</sub>-Werte um etwa 1% HbA<sub>1</sub> an. Dieser, durch den labilen Anteil bedingte Anstieg, war 24 Std. nach Beendigung des Experiments nicht mehr nachweisbar.

### 3. Langsamer Abbau des stabilen HbA<sub>1</sub>

Insbesondere aufgrund der Arbeiten von Bunn et al. (4, 5) geht man heute davon aus (6-8), daß das stabile HbA<sub>1</sub> weitgehend irreversibel entsteht und erst mit dem physiologischen Abbau der Erythrozyten wieder aus dem Blutkreislauf entfernt wird.

Obwohl von einer Arbeitsgruppe (9, 10) eine reversible Bildung des stabilen HbA<sub>1</sub> diskutiert wird, entspricht die allgemeine klinische Erfahrung eher dem weitgehend irreversiblen Modell. Bei der Neueinstellung von Diabetikern dauert es etwa 2 Monate, bis das HbA<sub>1</sub> auf Werte abgesunken ist, die dem neuen mittleren Blutzuckerniveau entsprechen (Abb. 2) (11-14).

Der anschaulichste Hinweis für die langsame Entstehung und den langsamen Abbau von HbA<sub>1</sub> ist Abb. 3 zu entnehmen (15). Bei einem gesunden Probanden wurde nach Infusion eines mit radioaktivem Eisen markierten Transferrin-Präparates der Einbau des radioaktiven Eisensotops in verschiedene Hämoglobin-Fractionen über 100 Tage verfolgt. Der langsame Anstieg der Radioaktivität in der HbA<sub>1</sub>-Fraktion (= HbA<sub>1a</sub> + HbA<sub>1b</sub> + HbA<sub>1c</sub>) spricht dafür, daß HbA<sub>1</sub> langsam, kontinuierlich und

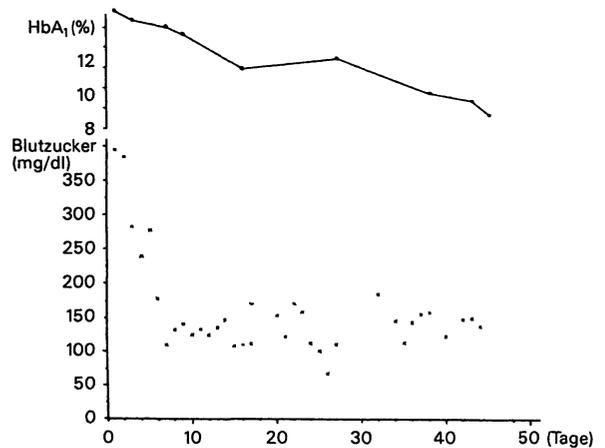


Abb. 2: Nach entgleister Stoffwechsellage normalisiert sich der Blutzuckerspiegel bei guter Einstellung des Diabetikers innerhalb weniger Tage, während die HbA<sub>1</sub>-Werte noch mehrere Wochen erhöht bleiben

Aus: T. Gain et al., *kliniker* 11, 48-51 (1982)

weitgehend irreversibel während der 120tägigen Lebensdauer des Erythrozyten entsteht (Bedeutung der Abkürzungen siehe Tab. 1).

Zusammenfassend kann gesagt werden:

Stabiles HbA<sub>1</sub>, das z. Z. mit den meisten kommerziellen Tests gemessen wird, reagiert kaum auf kurzfristige Blutzuckerschwankungen und ist ein echter Langzeit-Indikator des mittleren Blutzuckerspiegels der vergangenen 4-8 Wochen. Einzelne Blutzucker-Werte „passen“ um so besser zu den HbA<sub>1</sub>-Werten, je stabiler die Stoffwechsellage war bzw. ist (Abb. 4). Gleiches gilt für HbA<sub>1c</sub> und für die anderen glykosylierten Hämoglobine.

## Struktur und Nomenklatur der glykosylierten Hämoglobine

Da Hämoglobin wie die meisten anderen Proteine mehrere freie Aminogruppen enthält (Abb. 5).

- 4 Amino-Endgruppen des Valins aus den beiden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinketten (16)

- insgesamt 44 Seitenketten-Aminogruppen der jeweils 11 Lysine aus den beiden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten (16)

könnten im Prinzip alle diese Aminogruppen mit der Glucose entsprechend Abb. 1 reagieren. Die Reaktionsbereitschaft der einzelnen Aminogruppen hängt dabei von verschiedenen Faktoren wie pK-Wert, räumlicher Zugänglichkeit und Nachbargruppen-Effekten ab (17).

### HbA<sub>1c</sub> und glykosylierte Hämoglobine

Ausführliche Untersuchungen haben gezeigt, daß die Glucose bevorzugt mit den beiden endständigen Aminogruppen der  $\beta$ -Ketten reagiert (17, 18). Dieses glykosylierte Hämoglobin ist am besten untersucht und wird allgemein als HbA<sub>1c</sub> bezeichnet (Abb. 6) (17–19).

Von der Gesamtmenge der Hämoglobin-gebundenen Glucose sind ca. 50% (20), nach anderen Angaben sogar 70% (18), mit weiteren Aminogruppen verknüpft, was wegen der großen Anzahl der Lysine auch nicht verwunderlich ist. Als Oberbegriff für alle diese modifizierten Hämoglobine (einschließlich HbA<sub>1</sub> und HbA<sub>1c</sub>) wird meist der Begriff glykosylierte Hämoglobine verwendet.

### HbA<sub>1c</sub> und HbA<sub>1</sub>

Da die ursprüngliche Methode zur Isolierung des HbA<sub>1c</sub>, die sog. Makrosäulenchromatographie (21–25), methodisch recht aufwendig und auch zeitraubend ist, blieb die HbA<sub>1c</sub>-Bestimmung lange Zeit wissenschaftlichen Einzeluntersuchungen vorbehalten.

Tab. 1: Zusammensetzung der HbA<sub>1</sub>-Fraktion  
nach: K. H. Winterhalter, Schweiz. med. Wschr. 109, 1105 (1979)

HbA <sub>1a1</sub>	= $\beta$ -Ketten N-terminal an Fructose-1,6-diphosphat gebunden
HbA <sub>1a2</sub>	= $\beta$ -Ketten N-terminal an Glucose-6-phosphat gebunden
HbA <sub>1b</sub>	= Deamidation der $\beta$ -Ketten von HbA <sub>1c</sub> Position noch nicht bekannt
HbA <sub>1c</sub>	= $\beta$ -Ketten N-terminal an Glucose gebunden

Um die diagnostischen Vorteile dieser Bestimmung auch in der Routine-Analytik nutzen zu können, wurden einfachere Verfahren entwickelt. In der routinemäßigen Bestimmung hat sich insbesondere das Mikrosäulen-Verfahren bewährt (12, 26–30), bei dem neben dem HbA<sub>1c</sub> auch noch andere Hämoglobin-Varianten mitbestimmt werden; alle zusammen werden HbA<sub>1</sub> genannt (s. Tab. 1). HbA<sub>1c</sub> stellt ca. 70% der HbA<sub>1</sub>-Fraktion, wobei HbA<sub>1</sub> und HbA<sub>1c</sub> eng miteinander korrelieren.

Aufgrund dieser Erkenntnisse lassen sich heute für die Zusammensetzung des normalen Erwachsenen-Hämoglobins die in Tab. 2 zusammengestellten Daten als Anhaltspunkte angeben.

### Anmerkungen zur Nomenklatur

Meist werden die Begriffe „glykosylierte Hämoglobine“ (GHb) und „Glykohämoglobine“ verwendet. Leider sind diese Namen nicht optimal, da die Bezeichnung „glykosyliert“ bzw. „glyko“ an sich schon für solche Proteine vergeben ist, die mit der Glucose über enzymatisch katalysierte Reaktionen mittels einer glykosidischen Bindung verknüpft sind. In der englischsprachigen Literatur wird

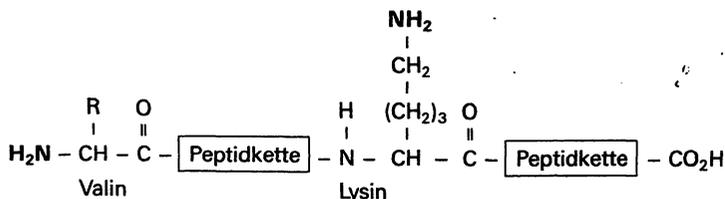


Abb. 5: Freie Aminogruppen der Aminosäuren Valin und Lysin, wie sie z. B. in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von Hämoglobin vorhanden sind

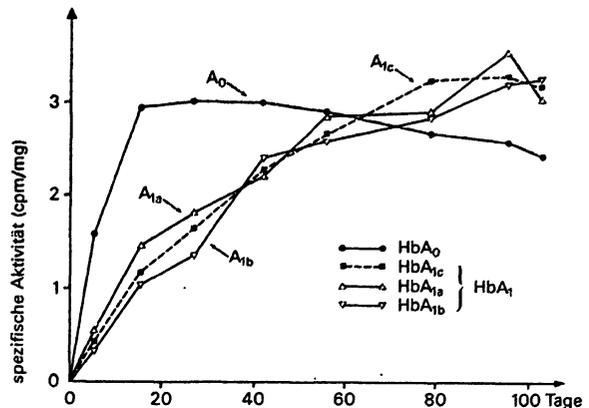


Abb. 3: Einbau von <sup>59</sup>Fe in HbA<sub>0</sub> und HbA<sub>1</sub> (= HbA<sub>1c</sub> + HbA<sub>1a</sub> + HbA<sub>1b</sub>) bei einem gesunden Probanden nach Infusion von [<sup>59</sup>Fe] Transferrin

Aus: H. F. Bunn et al., J. Clin. Invest. 57, 1652–1659 (1976)

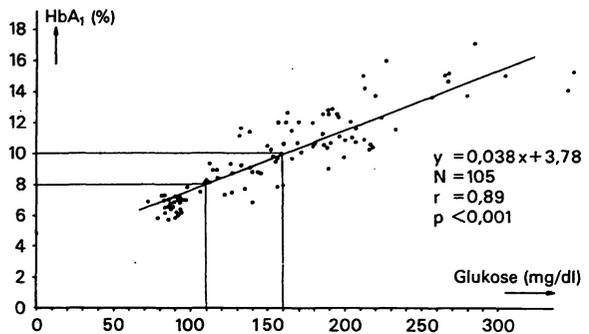


Abb. 4: Korrelation zwischen HbA<sub>1</sub>-Konzentrationen und Blutzuckerwerten (Mittelwerte aller Blutzucker-Tagesprofilwerte der zurückliegenden vier Wochen). Untersucht wurden Diabetiker mit stabiler Stoffwechsellage und gesunde Probanden

Nach: T. Gain et al., kliniker 11, 48–51 (1982)

deshalb neuerdings die Bezeichnung „glycated hemoglobine“ verwendet (35, 89), für die es z. Z. allerdings noch keine passende deutsche Übersetzung gibt.

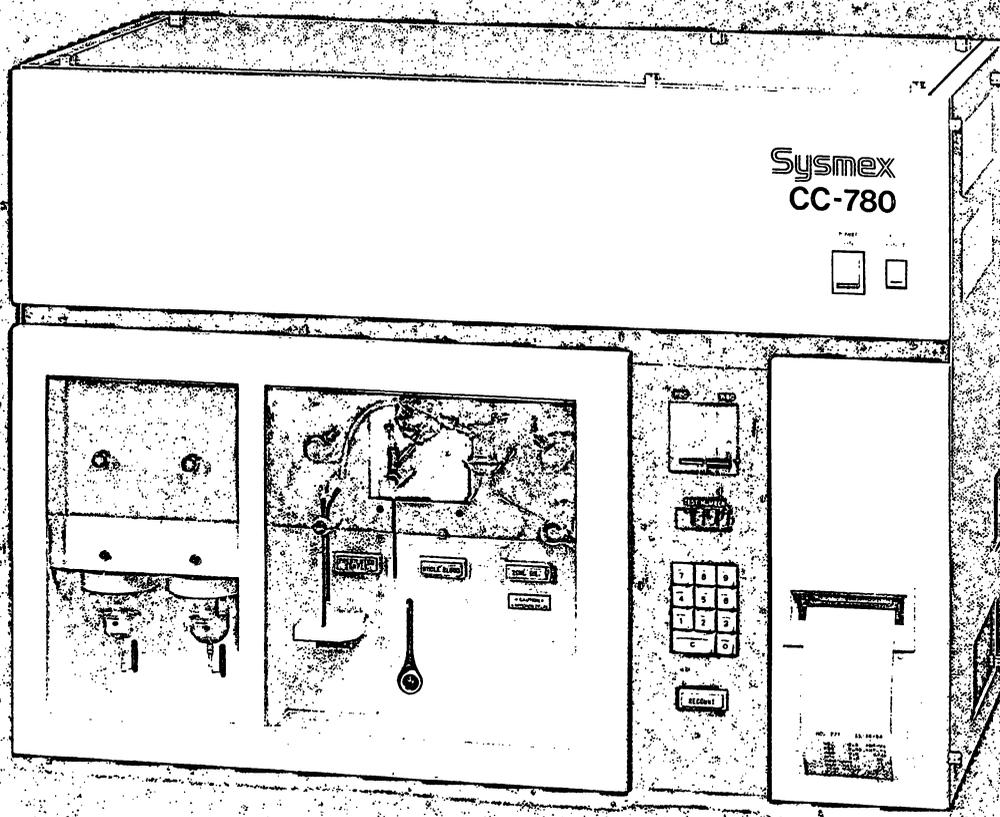
Bei Hämoglobin A<sub>1</sub> ist die Situation ähnlich wie bei dem Begriff „glykosylierte Hämoglobine“:

Die Abkürzung HbA<sub>1</sub> wird in vielen Lehrbüchern der Biochemie für die Hauptfraktion des Erwachsenen-Hämoglobins verwendet, wobei anstelle von HbA<sub>1</sub> allerdings auch häufig HbA und HbA<sub>0</sub> benutzt werden (35–39).

Die Ursache für diese Doppeldeutigkeit der Abkürzungen liegt vermutlich in den Arbeiten von Allen et al. (21–23), in denen erstmals durch Chromatographie über einen schwach sauren Ionen-Austauscher die verschiedenen Hämoglobin-Fractionen isoliert und entsprechend der

# 8-Parameter-Hämatologie-Analysator Sysmex CC-780

Der Mittelpunkt im hämatologischen Labor



- Thrombozyten + 7 hämatologische Werte aus Vollblut oder Kapillarblut
- Absolutzählung ohne Kalibrierfehler (Laboratoriumsmedizin 3/1985, 98-103)
- Abgesicherte Werte aller Parameter im Normal- und pathologischen Bereich

**Sysmex CC-780 – der rationale Automat**

**Sysmex®**

TOA MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.  
Kobe, Japan

Alleinvertretung für die  
Bundesrepublik Deutschland  
und Berlin (West)

Colora Messtechnik GmbH  
Postfach 1240  
7073 Lorch, Württ.  
Telefon: (0 71 72) 60 41  
Telex: 7 248 886

Technische Büros  
in Berlin, Düsseldorf,  
Frankfurt, Hannover,  
Lorch, München

**colora**

Analysentechnik  
für Forschung, Medizin  
und Umweltschutz

gefunden (26, 27, 31-34). Besonders wichtig in diesem Zusammenhang ist, daß sich HbA<sub>1c</sub>- und HbA<sub>1c</sub>-Werte bei einem Diabetiker gleichzeitig und parallel zueinander verändern (Abb. 9). Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Messung der Einzelfraktionen HbA<sub>1c</sub> und HbA<sub>1a+b</sub> beobachtet (Abb. 10). Diese Daten zeigen eindeutig, daß die diagnostische Aussage von HbA<sub>1</sub> und HbA<sub>1c</sub> gleichwertig ist.

### HPLC, FPLC

Die Bestimmung mittels HPLC (43, 44, 90) bzw. FPLC (=Fast Protein Liquid Chromatography) (45) wird zwar

meist wie eine eigenständige Methode behandelt, sie ist aber eigentlich nichts anderes als eine schnelle, komfortable und apparativ aufwendige Weiterentwicklung der „Makrosäulen-Chromatographie“; denn das häufig verwendete Trennmaterial Bio Rex 70 (26, 43, 44) wird auch bei der Makro- bzw. Mikro-Säulentechnik eingesetzt. Erst seit einiger Zeit werden Ionenaustauscher verwendet, die für die speziellen Anforderungen der FPLC/HPLC optimiert sind (45, 90). HPLC bzw. FPLC wurde als Referenzmethode vorgeschlagen (27), da die Messung von HbA<sub>1c</sub> mit guter Richtigkeit und Reproduzierbarkeit möglich ist (45, 90).

### Isoelektrische Fokussierung und Elektrophorese

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eines der leistungsfähigsten Trennverfahren für Proteine. Dies beruht darauf, daß im Prinzip jedes Protein einen anderen iso-

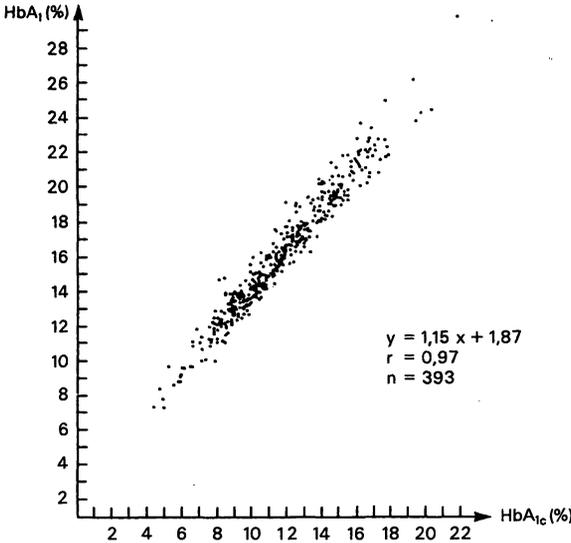


Abb. 7: Vergleich der HbA<sub>1</sub>- und HbA<sub>1c</sub>-Werte bei 393 Proben  
Nach: T. M. James et al., Clin. Biochem. 14, 25-27 (1981)

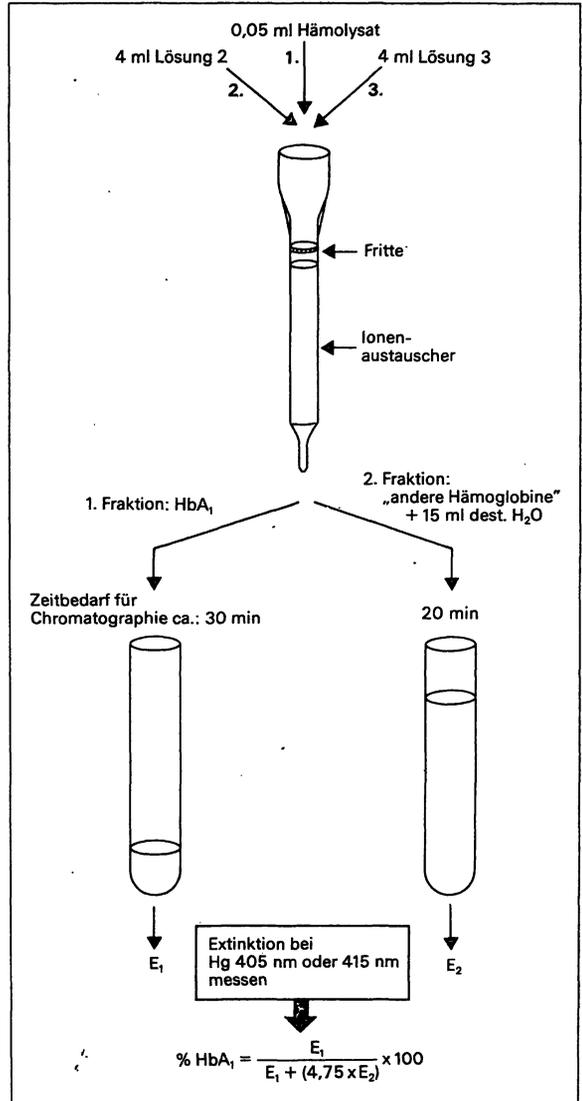


Abb. 8: Schema der HbA<sub>1</sub>-Bestimmung mit einem Mikrosäulen-Verfahren. Die Säulen sollten vor der Bestimmung temperiert werden (z. B. auf 23°C). Das ist mit entsprechenden Temperiergestellen einfach möglich. In ca. 2 Stunden können mit diesem Verfahren 10-30 HbA<sub>1</sub>-Werte bestimmt werden

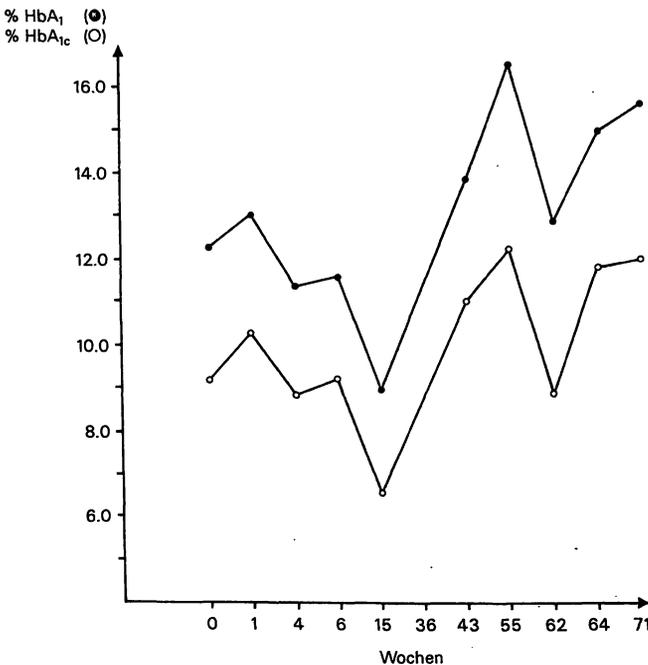


Abb. 9: Verlauf der HbA<sub>1</sub>- und HbA<sub>1c</sub>-Werte bei einem Diabetiker  
Aus: T. M. James et al., Clin. Biochem. 14, 25-27 (1981)

% HbA<sub>1c</sub> (○)  
% HbA<sub>1a+b</sub> (●)

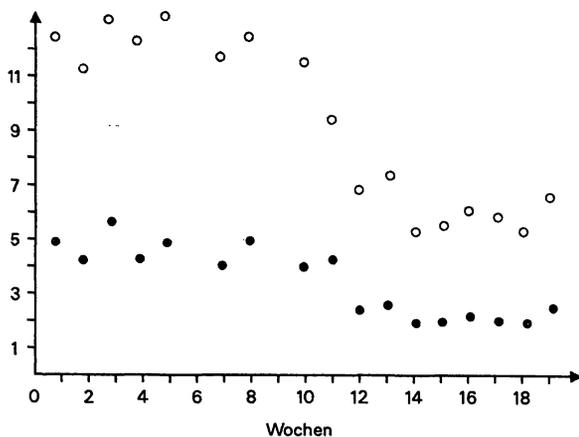


Abb. 10: Zeitliche Veränderung von HbA<sub>1a+b</sub> und HbA<sub>1c</sub> bei einem Diabetiker

Aus: R. J. König et al., *New Engl. J. Med.* 295, 417-420 (1976)

elektrischen Punkt besitzt (= der pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins 0 ist: Bei diesem pH bleibt das Protein während der Elektrophorese liegen und hat gleichzeitig die niedrigste Löslichkeit).

Allerdings erfordern die geringen Differenzen der isoelektrischen Punkte von HbA<sub>1c</sub> und HbA<sub>0</sub> spezielle Maßnahmen, um gut auswertbare Trennbilder zu erhalten (46, 47). Unter optimalen Trennbedingungen wird mit diesem Verfahren ähnlich spezifisch wie mit FPLC (45) das HbA<sub>1c</sub> gemessen (9, 48). Dieses Verfahren wird z. Z. ebenso wie HPLC/FPLC nur in wenigen Laboratorien routinemäßig eingesetzt.

Wesentlich gängiger ist die Bestimmung mittels Elektrophorese bzw. Elektroendoosmose (49). Mit der Elektroendoosmose wird auch HbA<sub>1</sub> gemessen, wobei die Werte gut mit den Mikrosäulen-Werten vergleichbar sind (27, 50).

#### Verfahren, die zwischen glykosylierten und nicht glykosylierten Hämoglobinen differenzieren

Zur Erfassung der glykosylierten Hämoglobine dienen vor allem zwei Verfahren, die von Flückiger und Winterhalter ausgearbeitete Thiobarbitursäure-Methode (51) und die Boronat-Affinitäts-Chromatographie (52).

#### Thiobarbitursäure-Methode (TBA)

Prinzip: Die Hämoglobin-gebundene Glucose wird mit Hilfe schwacher Säuren (meist wird verdünnte wässrige Oxalsäure verwendet) bei Temperaturen um 100°C im Verlauf mehrerer Stunden weitgehend als 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) abgespalten. 5-HMF ergibt nach Umsetzung mit Thiobarbitursäure einen gelben Farbstoff, der bei 443 nm photometrisch gemessen wird. Von diesem Verfahren existiert eine Vielzahl von Varianten, die sich durch die Abspaltungs-Bedingungen und z. B. durch die Kalibration unterscheiden (53-55). Zum Teil werden die dabei gemessenen Werte (nach „Kalibration“ mit Hilfe einer chromatographischen Methode, z. B. HPLC) als HbA<sub>1c</sub> angegeben (26, 67), zum Teil wird das freigesetzte 5-HMF auf Hämoglobin bezogen (53, 54).

#### Affinitäts-Chromatographie

Glucose bildet mit Borat-Anionen Komplexe. Auf diesem, schon lange bekannten Effekt beruht die affinitätschromatographische Bestimmung der glykosylierten Hämoglobine, wobei ebenfalls Mikrosäulen eingesetzt werden können. Als Trennmittel wird das an einen polymeren Träger gebundene m-Amino-Phenylboronat benutzt (52).

Bei der Affinitätschromatographie wird nicht nur das HbA<sub>1c</sub> erfaßt (Glucose an das endständige Valin der β-Ketten gebunden), sondern auch solche Glykohämoglobine, bei denen die Glucose mit anderen Amino-gruppen der Globinketten (insbes. die Lysine) verknüpft ist.

Obwohl sich viele Publikationen mit diesem Verfahren befassen (20, 56-59), liegen z. Z. noch relativ wenig Erfahrungen mit der Anwendung dieses Tests in der Laborroutine vor.

#### Beurteilungskriterien (Normalwerte)

Da die einzelnen Verfahren unterschiedliche Anteile der glykosylierten Hämoglobine erfassen, werden auch verschiedene Normalwerte erhalten (Tab. 4).

Bemerkenswert sind die z. T. deutlichen Differenzen bei den Verfahren, die das HbA<sub>1c</sub> messen. Dies deutet darauf hin, daß verschiedene Methoden bzw. verschiedene Labors nicht die gleichen Hämoglobin-Spezies erfassen.

Demgegenüber stimmen die HbA<sub>1</sub>-Werte, die mit der Ionen-Austausch-Chromatographie meist mit Mikrosäulen gemessen werden, relativ gut überein.

Auffällig ist weiterhin die Ähnlichkeit der Normalwerte aus der Affinitäts-Chromatographie und den HbA<sub>1</sub>-Werten der Ionenaustausch-Chromatographie; denn mit beiden Verfahren werden verschiedene glykosylierte Hämoglobine bestimmt.

Da alle in dieser Übersicht erwähnten Verfahren in dem diagnostisch wichtigen Bereich hohe Korrelationen aufweisen (26, 27, 58, 59), könnte nach einem Vorschlag von Heinze et al. (68) eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Werte mit Hilfe des „Standard deviation score“ (SDS) erreicht werden:

$$SDS = \frac{x - \bar{x}}{s}$$

x = gemessener Einzelwert

$\bar{x}$  = Mittelwert der Normalgruppe

s = Standardabweichung der Normalgruppe.

Durch diese Umrechnung ergeben sich für alle Verfahren bei Werten im Normalbereich ( $x \pm 2s$ ) für SDS Zahlen zwischen -2 und +2, während für zu hohe Werte Zahlen über 2 resultieren.

Nach den Angaben von Heinze stellen für den Diabetiker Werte unter +3,5 SDS wahrscheinlich kein oder nur ein geringes Risiko dar, vaskuläre Spätkomplikationen zu erleiden (68).

#### Präzision und Richtigkeit

Alle in dieser Übersicht beschriebenen Methoden messen HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>1c</sub> und die anderen glykosylierten Hämoglobine mit der diagnostisch erforderlichen Sicherheit:

- Bei Vergleichen zwischen verschiedenen Methoden wurden sehr hohe Korrelationen in den diagnostisch wichtigen Meßbereichen festgestellt (s. oben).

- Die Variationskoeffizienten von Tag zu Tag liegen meist deutlich unter 10%, und Werte unter 5% sind ohne weiteres erreichbar (26-30, 50).

Aus Ringversuchen von INSTAND liegen insbesondere mit den Mikrosäulen-Verfahren ausgiebige Erfahrungen vor (30). Sie haben sich in der Praxis bewährt, und die Erfolgsquote der Ringversuche entsprach derjenigen der gängigen enzymatischen Tests.

Z. Z. gibt es keine Referenzmethode zur Bestimmung von HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1c</sub> oder glykosylierten Hämoglobinen. Wie schon oben erwähnt, wird bei optimalen Trennbedingungen mit HPLC bzw. FPLC und der isoelektrischen Fokussierung das HbA<sub>1c</sub> vermutlich mit der höchsten Richtigkeit gemessen.

Bei der TBA-Methode und der Affinitäts-Chromatographie sind zwar keine Störungen durch Hämoglobin-Varianten und modifizierte Hämoglobine bekannt, dafür hängt die Wiederfindung des Anteils von glykosyliertem Hämoglobin jedoch wesentlich von der jeweiligen Methoden-Variante ab (20, 54, 55, 57).

Dies liegt einfach daran, daß die an verschiedene Aminogruppen des Hämoglobins gebundene Glucose deutliche Stabilitätsunterschiede bei der Behandlung mit verdünnten Säuren aufweist (54, 55). Ähnliches gilt auch für die Affinität zu Boronat-Anionen (20, 56, 57).

### Beeinflussung durch andere Erkrankungen und Störgrößen

Die Messung der glykosylierten Hämoglobine kann durch verschiedene Erkrankungen bzw. Störgrößen beeinflusst werden. Dabei gibt es methodenunabhängige und methodenabhängige Einflüsse.

### Methodenunabhängige Einflüsse

Bei der Beurteilung der glykosylierten Hämoglobin-Werte wird im allgemeinen stillschweigend vorausgesetzt, daß Bildung, Lebensdauer und Abbau der Erythrozyten normal sind. Dies trifft auch in den meisten Fällen zu.

Eine veränderte Lebensdauer der Erythrozyten führt jedoch auch zu anderen Konzentrationen der glykosylierten Hämoglobine. Die Veränderung ist abhängig davon, wieviel länger bzw. kürzer das Hämoglobin in den Erythrozyten mit der Glucose reagieren kann. Die wichtigste Größe in diesem Zusammenhang ist demnach die Altersverteilung der Erythrozyten.

Erniedrigte Werte erhält man:

- nach hohen oder chronischen Blutverlusten mit rascher Erythrozyten-Neubildung (37, 69). Sehr niedrige HbA<sub>1c</sub>-Werte helfen z. B. gastrointestinale Blutungen zu erkennen (69).

- bei hämolytischen Anämien (4, 70)

- bei Leberzirrhose (37); vermutliche Ursache (71): erhöhte Blutungsbereitschaft und verstärkter Abbau der Erythrozyten.

- bei chronischer Niereninsuffizienz kann die Lebensdauer der Erythrozyten verkürzt sein (72).

Erhöhte Werte wurden bei Eisenmangelanämien beobachtet, die nach Therapiebeginn rasch absanken. Dies läßt sich folgendermaßen erklären (73): Die Eisenmangelanämie führt zu einem erhöhten Anteil älterer, HbA<sub>1c</sub>-reicher Erythrozyten. Die rasche Neubildung von Erythrozyten nach Therapiebeginn führt zu einem schnellen Absinken der HbA<sub>1c</sub>-Werte.

### Methodenabhängige Einflüsse

Bestimmte Hämoglobin-Varianten besitzen ähnliche elektrophoretische und chromatographische Eigenschaften wie HbA<sub>1c</sub> bzw. HbA<sub>1</sub>.

Tab. 4: Richtwerte für HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>1c</sub> und glykosylierte Hämoglobine bei verschiedenen Verfahren

Meßgröße	Methode	Einheit	Mittelwert	Normalbereich	Größe des Kollektivs	Lit.
HbA <sub>1</sub>		Anteil	6,45	5,23-7,7	103	28
HbA <sub>1</sub>	Ionen-austausch-Chromat. (IAC)	am	6,4	5,3 -7,5	112	59
HbA <sub>1</sub>		Gesamt-	6,5	5 -8	-	60
HbA <sub>1</sub>		Hb in %	6,6*	5,7 -7,5	40	61
HbA <sub>1</sub>		(% HbA <sub>1</sub> )	6,5*	5 -8	20	62
HbA <sub>1</sub>		Elektrophorese	% HbA <sub>1</sub>	6,6	5,6 -7,6	50
HbA <sub>1c</sub>	IAC	% HbA <sub>1c</sub>	4,5	3,1 -5,9	52	64
HbA <sub>1c</sub>	HPLC/IAC	% HbA <sub>1c</sub>	4,2	3,2 -5,2	20	43
HbA <sub>1c</sub>	HPLC/IAC	% HbA <sub>1c</sub>	5,4	4,9 -6,2	74	44
HbA <sub>1c</sub>	FPLC/IAC	% HbA <sub>1c</sub>	5,4	4,2 -6,6	99	45
HbA <sub>1c</sub>	IEF	% HbA <sub>1c</sub>	4,9	3,9 -6,4	76	46
HbA <sub>1c</sub>	IEF	% HbA <sub>1c</sub>	6,5	5,5 -7,6	257	65
HbA <sub>1c</sub>	IEF	% HbA <sub>1c</sub>	5,4**	4,4 -6,4	57	65
HbA <sub>1c</sub>	IEF	% Anteil am HbA <sub>0</sub>	7,07	5,07-9,07 ( $\bar{x} \pm 1s$ )	36	66
GHb	TBA	mol 5-HMF/100 mol Hb	5,51	4,6 -6,1	65	54
GHb	TBA	% HbA <sub>1c</sub>	4,8	3,8 -6,3	19	67
GHb	Affin.-Chrom.	Anteil am	6,9	5,5 -7,5	112	59
GHb	Affin.-Chrom.	Gesamt-Hb	6,8	6,2 -7,4	24	58
GHb	Affin.-Chrom.	in %	6,4	5,3 -7,5	124	56

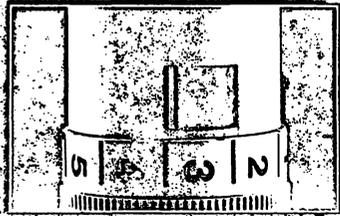
\* Labiles HbA, vorher abgetrennt

\*\* Erythrozyten 14 h bei 37°C inkubiert

# Ortho® DISPENSER

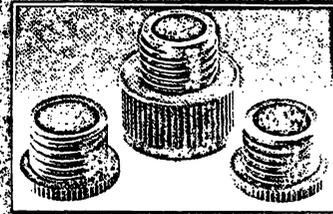
## Perfektion in Präzision und Material

- Digital-Volumeneinstellung
- Richtigkeitswert  $\pm 0,5\%$
- Reproduzierbarkeit  $\pm 0,1\%$
- Autoklavierbar bis  $121^\circ\text{C}$



Fehlerfreies Ablesen durch Digital-  
anzeige, gesteigerte Präzision durch  
kalibrierten Rastermechanismus.

- Hochwertige Materialien:  
Tezell, Keramik, Rubin,  
Platin, Teflon, Neutralglas
- Größen: 2, 5 und 10 ml
- Preis incl. Adapter DM 210,-



Hohe Wirtschaftlichkeit und Flexibilität  
durch maßgerechte Adapter.



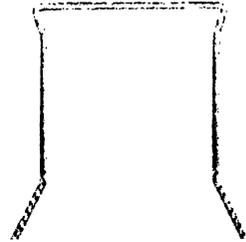
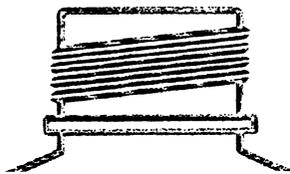
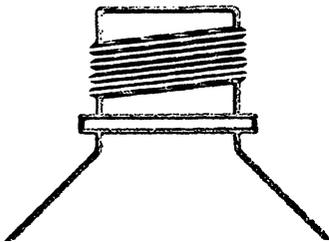
Entspricht den neuesten  
Sicherheitsanforderungen.



Ortho Diagnostic Systems GmbH

DR. MOLTER GMBH

Karl-Landsteiner-Str 1 D-6903 Neckargemund ☎ (062 23) 77-0





**Nur Steuervorteile,  
die man kennt,  
kann man nutzen!**

**7. Auflage**

**Hand aufs Herz:**

- Verschenken Sie nicht auch Jahr für Jahr viel Geld an das Finanzamt?
- Nehmen Sie alle legalen Steuerminderungsmöglichkeiten in Anspruch?
- Stellen Sie rechtzeitig die notwendigen Anträge?
- Haben Sie Zeit und Gelegenheit, sich über Ihre berufsspezifischen Steuerfragen in den Steuerfachzeitschriften zu orientieren?
- Verlassen auch Sie sich ganz auf Ihren Berater?
- Haben Sie schon einmal einen Praxiskostentest gemacht?
- Wissen Sie, ob Sie mehr oder weniger als Ihre vergleichbaren Kollegen verdienen?

## **Steuerdienst für den Arzt**

– das Loseblattwerk von Obersteuerrat Linden hat seinen festen Platz im Fachschrifttum. Die jetzt erschienene 7. Auflage entwertet nicht die früheren Auflagen, da diese ständig durch Ergänzungslieferungen auf dem neuesten Stand gehalten werden.

## **Steuerdienst für den Arzt**

Das Werk enthält u. a. die statistischen Kostensätze der Ärzte aller Fachrichtungen sowie Testbögen, die eine genaue Kostenanalyse der Praxis ermöglichen. Der Rationalisierung ihrer Praxis dient das ausführliche „ABC der abzugsfähigen Ausgaben bei der Einkommensteuer“.

**Verlag Kirchheim**

Kaiserstraße 41, D-6500 Mainz

Hiermit bestelle ich ein Grundwerk „Steuerdienst für den Arzt“ (2 Bände) zum Preis von 99,80 DM und die künftig vierteljährlich erscheinenden Ergänzungslieferungen zum Seitenpreis von – 26 DM.

Datum/Praxisstempel/Unterschrift

Lab. med. 6/85

JURA



**2. Auflage**

# **JURAMED®**

**RECHT DES NIEDERGELASSENEN ARZTES**

## **Was ist JURAMED?**

**JURAMED** ist ein praxisnahes Werk über das Recht des niedergelassenen Arztes, zusammengestellt von anerkannten Fachleuten, die wissen, wo den niedergelassenen Arzt (juristisch) der Schuh drückt.

**JURAMED** ist in klarer, verständlicher Sprache – nicht in verklausuliertem Juristendeutsch – geschrieben. In 20 übersichtlichen Gruppen werden die für den niedergelassenen Arzt aktuellen Rechtsfragen erstmals in einem Werk behandelt.

## **Warum ist JURAMED® immer aktuell?**

**JURAMED** ist eine stets aktuelle Loseblatt-Sammlung. Sie werden immer auf dem neuesten Stand der Gesetzgebung und Rechtsprechung sein. Dafür sorgen die Nachtragslieferungen (ca. einmal jährlich).

## **Was bietet JURAMED® sonst noch?**

Viele praxisnahe Musterverträge, Formulare, Zeugnismuster (Geheimsprache in Zeugnissen), die viel lästige, zeitraubende Arbeit ersparen.

**Verlag Kirchheim**

Kaiserstraße 41, D-6500 Mainz

Hiermit bestelle ich das Grundwerk **JURAMED** (Loseblatt-Werk), 518 Seiten, zum Preis von DM 98,- sowie die ca. 1–2mal jährlich erscheinenden Nachtragslieferungen (Seitenpreis 24 Pf.). Alle Preise inklusive Mehrwertsteuer zuzüglich Versandkosten.

Datum/Praxisstempel/Unterschrift

Lab. med. 6/85

## Hämoglobinopathien

In unseren Breiten ist in erster Linie an erhöhte Konzentrationen von fetalem Hämoglobin (HbF) zu denken, da HbF bei der Ionenaustausch-Chromatographie und bei der Elektrophorese zusammen mit dem HbA<sub>1c</sub> erfaßt wird (49, 50). Gleiches gilt für HbA<sub>1c</sub> bei manchen HPLC-Verfahren (74). In der Regel sind die Konzentrationen von HbF bei Erwachsenen so gering, daß ihr Einfluß vernachlässigt werden kann (87, s. Tab. 2). Durch HbF erhöhte HbA<sub>1c</sub>-Werte können vor allem bei Kleinkindern bis zum Alter von etwa vier Jahren auftreten (75) sowie vereinzelt während der Schwangerschaft (94).

Die abnormen Hämoglobine HbS und HbC führen zu erniedrigten (76), HbH zu erhöhten Werten (77) bei der Mikrosäulen-Ionenaustausch-Chromatographie. Derartige Hämoglobinopathien sind in Mitteleuropa außerordentlich selten. Sie können bei Afro-Amerikanern eine Rolle spielen: 8% der Afro-Amerikaner sind Heterozygote mit HbS und 2–3% mit HbC (76).

## Medikamente

Patienten, die Azetylsalicylsäure in hohen Dosierungen (3–6 g täglich) über mehrere Monate eingenommen hatten, wiesen erhöhte HbA<sub>1c</sub>- bzw. HbA<sub>1c</sub>-Werte auf (78, 79; Methoden: Elektrophorese, HPLC). Vermutlich werden mit Mikrosäulen-Verfahren ebenfalls erhöhte Werte beobachtet.

Penicillin soll ebenfalls zu erhöhten HbA<sub>1c</sub>-Werten führen (80). Dieser Einfluß ist leider nicht gut dokumentiert. Eine 1983 veranlaßte Recherche bei DIMDI (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information) verlief ergebnislos, und die z.Z. sicherlich vollständigste Zusammenstellung über Medikamenteneinflüsse „Drug Interference and Effects in Clinical Chemistry 1984“ von N. Tryding et al., Apoteksbolaget AB, Stockholm 1984, enthält ebenfalls keine Hinweise auf eine Störung durch Penicillin.

## Alkohol-Abusus

Bei Alkoholikern wurden unterschiedliche Ergebnisse gefunden: z. T. wurde bei Verwendung von Mikrosäulen keine Beeinflussung beobachtet (81), z. T. erhöhte Werte gefunden [Mikrosäule (82) und HPLC (74)]. Die Diskrepanzen hängen vermutlich mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kollektive zusammen. Sicherlich spielt die Leberzirrhose, wie oben schon erwähnt, in diesem Zusammenhang auch eine Rolle.

## Niereninsuffizienz

Bei Patienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz wurden mit den Mikrosäulen-Verfahren immer wieder er-

höhte HbA<sub>1c</sub>-Werte beobachtet, die nicht durch eine verschlechterte Glucose-Toleranz erklärt werden konnten (37). Vermutlich wird bei diesen Patienten vermehrt ein carbamyliertes Hämoglobin gebildet (83), das bei den gängigen chromatographischen Tests zusammen mit dem HbA<sub>1c</sub> (83) bzw. HbA<sub>1c</sub> (88) erfaßt wird. Nach Thiele (71) muß jedoch auch daran gedacht werden, daß die erhöhten HbA<sub>1c</sub>-Werte nicht nur auf methodischen, sondern auch auf pathophysiologischen Einflüssen beruhen können. Da bei niereninsuffizienten Patienten die Bildung von Erythropoetin vermindert ist, kann die Erythrozyten-Bildungsrate bei normaler Erythrozyten-Lebensdauer vermindert sein. Häufig wird in solchen Fällen auch eine Anämie beobachtet. Dies kann, wie oben schon beschrieben, zu einem erhöhten Anteil älterer Erythrozyten im Blut führen und damit auch zu erhöhten Werten von HbA<sub>1c</sub> bzw. HbA<sub>1c</sub>.

Tab. 5 ist zu entnehmen, daß erst bei Serum-Creatininwerten über 5 mg/dl deutlich erhöhte HbA<sub>1c</sub>-Werte gemessen werden (63).

## Patientenvorbereitung, Probennahme und Stabilität

Eine besondere Vorbereitung des Patienten ist nicht erforderlich. Tageszeit, Körperlage, Stauung, venöse oder kapillare Blutentnahme haben keinen Einfluß auf die Werte. Dies liegt daran,

- daß die Konzentration der stabilen glykosylierten Hämoglobine sich innerhalb mehrerer Tage praktisch nicht verändert und,

- daß die Werte auf die Gesamt-Hämoglobinkonzentration bezogen werden (z. B. % HbA<sub>1c</sub>), weshalb probennahmebedingte Veränderungen der Hämoglobinkonzentration (Fehler bei der Gewinnung von Kapillarblut, Einfluß von Stauung und Körperlage) keine Rolle spielen.

Bei Verfahren, die durch das labile HbA<sub>1c</sub> beeinflusst werden, können allerdings wegen der postprandial erhöhten Blutzuckerwerte etwas höhere HbA<sub>1c</sub>-Werte gemessen werden.

Die Stabilität der Proben hängt von der Probenaufbereitung, Lagerungstemperatur und dem Meßverfahren ab (84).

Für die gängige Mikrosäulen-Ionenaustauschchromatographie empfiehlt sich die Verwendung von EDTA- oder Heparin-Blut. Bei +2 bis +8°C kann dieses Probenmaterial 12 Tage gelagert werden, bei Raumtemperatur 3–4 Tage (85, 86). Ein Versand mit der Post ist deshalb ohne weiteres möglich (85). Vor allem im Sommer wäre jedoch ein gekühlter Transport empfehlenswert, da die HbA<sub>1c</sub>-Werte bei stärkerer Temperaturbelastung ansteigen (84).

Tab. 5: Verhalten des HbA<sub>1c</sub> (in % des totalen Hämoglobins) bei verschiedenen Schweregraden der Niereninsuffizienz

Aus: H. K. Stummvoll et al., Wien. Med. Wschr. 130, Suppl. Nr. 64 (1980), 16–18

	Kontroll Gruppe n = 106	Gruppe 1 P <sub>Kr</sub> < 2,5 n = 12	Gruppe 2 P <sub>Kr</sub> 2,6–5,0 n = 19	Gruppe 3 P <sub>Kr</sub> < 5,0 n = 14	Hämodialyse Gruppe	
					Glukose-Frei n = 20	Glukose 4,4 g/l n = 6
Plasma-Creatinin (mg/dl)	0,79 ± 0,11	1,9 ± 0,36	3,47 ± 0,85	9,46 ± 2,82	11,45 ± 3,00	12,56 ± 2,74
% HbA <sub>1c</sub>	7,24 ± 0,91	7,42 ± 0,61	8,03 ± 1,01	8,96 ± 0,75	10,05 ± 2,49	9,90 ± 1,20

## Schlußbetrachtung

Die Möglichkeit, HbA<sub>1c</sub> im Labor einfach und sicher bestimmen zu können, ist eine außerordentliche Bereicherung für die Diabetes-Diagnostik.

Nach Auswertung der mehrjährigen Erfahrungen mit der Bestimmung von HbA<sub>1c</sub> läßt sich dieses Urteil fällen, obwohl die heutigen Verfahren noch nicht dem hohen Standard moderner enzymatischer Tests, wie z. B. der Cholesterin- oder der Blutzucker-Bestimmung entsprechen.

Selbstverständlich wären einfachere Verfahren, die auch automatisierbar sind, wünschenswert. Vielversprechende Ansätze hierfür sind vorhanden (35).

### Schrifttum:

1. BUNN, H. F.: Non enzymatic glycosylation of protein: a form of molecular aging. *Schweiz. med. Wschr.* 111, 1503-1507 (1981).
2. WIELAND, O. H.: Zur Pathogenese diabetischer Gefäßkomplikationen: Mögliche Beteiligung der nichtenzymatischen Glykosylierung von Proteinen. *Hämostaseologie* 3, 92-26 (1983).
3. ANGRICK, M., REWICKE, D.: Die Maillard-Reaktion. *Chem. in unserer Z.* 14, 149-157 (1980).
4. BUNN, H. F., HANEY, D. N., KAMIN, S., GABBAY, K. H., GALLOP, P. M.: The Biosynthesis of Human Hemoglobin A<sub>1c</sub>. *J. Clin. Invest.* 57, 1652-1659 (1976).
5. HIGGINS, P. J., BUNN, H. F.: Kinetic Analysis of the Nonenzymatic Glycosylation of Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 256, 5204-5208 (1981).
6. ZIELKE, R., HENRICH, H. R.: Bestimmung der Reaktionskonstanten der HbA<sub>1c</sub>-Bildung aufgrund von In-vivo-Daten. *Lab. med.* 8, 134-136 (1984).
7. GOEBEL, F.-D., FÜESSEL, H.: Klinische Relevanz der Aldimin-Form der glykosylierten Hämoglobine bei raschen Blutzuckerschwankungen. *Ärzt. Lab.* 29, 23 (1983).
8. GAIN, Th., GYARAM, H., HENDERKOTT, U., BOTTERMANN, P.: Untersuchungen zur Bildung und Elimination der Aldimin-Form. *Lab. med.* 8, 114-119 (1984).
9. MORTENSEN, H. B., CHRISTOPHERSEN, C.: Glycosylation of Human Hemoglobin A. Kinetics and Mechanisms studied by Isoelectric Focusing. *Biochim. Biophys. Acta* 707, 154-163 (1982).
10. MORTENSEN, H. B., VØLUND, A., CHRISTOPHERSEN, C.: Glycosylation of human haemoglobin A. Dynamic variation in HbA<sub>1c</sub> described by a biokinetic model. *Clin. Chim. Acta* 136, 75-81 (1984).
11. MORTENSEN, H. B., VØLUND, AA.: Variations in Hemoglobin A<sub>1c</sub> and Blood Glucose in Children with newly Diagnosed Diabetes Mellitus described by a biokinetic Model. *Diab. et Metabolism* 10, 18-24 (1984).
12. GAIN, Th., BOTTERMANN, P.: Möglichkeiten durch Hämoglobin A<sub>1c</sub>-Bestimmung. *Kliniker* 11, 48-51 (1982).
13. GOEBEL, F. D., FÜESSEL, H., SEIDL, O.: Möglichkeiten der Langzeitkontrolle von Stoffwechselerkrankheiten. *Munch. med. Wschr.* 122, 1731-1734 (1980).
14. KNICK, B., GROTH, U., KOBERSTEIN, R., PANITZ, N.: Dauerhafte Verbesserung der Einstellung insulinbedürftiger Typ-I- und Typ-II-Diabetiker. *med. wst.* 34, 15-18 (1983).
15. BUNN, H. F., HANEY, D. N., KAMIN, S. et al.: The Biosynthesis of Hemoglobin A<sub>1c</sub>. *J. Clin. Invest.* 57, 1652-1659 (1976).
16. BRAUNITZER, G., GEHRING-MÜLLER, R., HILSCHMANN, N., HILSE, K., HOBOM, G., RUDLOFF, V., WITTMANN-LIEBOLD, B.: Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 325, 283-286 (1961).
17. SHAPIRO, R., McMANUS, M. J., ZALUT, C., BUNN, H. F.: Sites of Nonenzymatic Glycosylation of Human Hemoglobin A. *J. Biol. Chem.* 255, 3120-3127 (1980).
18. GARLICK, L. R., MAZER, S., HIGGINS, P. J., BUNN, H. F.: Characterization of Glycosylated Hemoglobins. *J. Clin. Invest.* 71, 1062-1072 (1983).
19. FLÜCKIGER, R., WINTERHALTER, K. H.: In Vitro Synthesis of Hemoglobin A<sub>1c</sub>. *FEBS Letters* 71, 356-360 (1976).
20. FLÜCKIGER, R., WOODTLI, T., BERGER, W.: Quantitation of Glycosylated Hemoglobin by Boronate Affinity Chromatography. *Diabetes* 33, 73-76 (1984).
21. ALLEN, D. W., SCHROEDER, W. A., BALOG, J.: Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin: A Study of the Effects of Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content. *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 1628-1634 (1958).
22. CLEGG, M. D., SCHROEDER, W. A.: A Chromatographic Study of the Minor Components of Normal Adult Human Hemoglobin Including a Comparison of Hemoglobin from Normal and Phenylketonuric Individuals. *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 6065-6069 (1959).
23. SCHNEK, A. G., SCHROEDER, W. A.: The Relation between the Minor Components of Whole Normal Human Adult Hemoglobin as Isolated by Chromatography and Starch Block Electrophoresis. *J. Amer. Chem. Soc.* 83, 1472-1478 (1961).
24. TRIVELLI, L. A., RAMNEY, H. M., LAI, H.-T.: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 284, 353-357 (1971).
25. HUISMAN, T. H. J., MEYERING, C. A.: Studies on the heterogeneity of hemoglobin. *I. Clin. Chim. Acta* 5, 103-123 (1960).
26. SCHLEBUSCH, H., SORGER, M., BURISCH, H.: Vergleich verschiedener Methoden zur Bestimmung glykosylierter Hämoglobine. *Klin. Wochenschr.* 62, 787-792 (1984).
27. NIEDERAU, C. M., REINAUER, H.: Analysenverfahren für glykosidierte Hämoglobine. Ein Methodenvergleich. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 1097-1101 (1981).
28. GAIN, Th., HENDERKOTT, U., BOTTERMANN, P.: Ein Routineverfahren zur chromatographischen HbA<sub>1c</sub>-Bestimmung mittels Mikrosäulentechnik. *Klin. Wochenschr.* 59, 219-228 (1981).
29. HAMMONS, G. T., JUNGER, K., McDONALD, J. M., LADENSON, J. L.: Evaluation of Three Minicolumn Procedures for Measuring Hemoglobin A<sub>1c</sub>. *Clin. Chem.* 28, 1775-1778 (1982).
30. REINAUER, H.: Ringversuche auf dem Gebiet der glykosylierten Hämoglobine. *Lab. med.* 8, 218-219 (1984).
31. GABBAY, K. H., HASTY, K., BRESLOW, J. L., ELLISON, R. C., BUNN, H. F., GALLOP, P. M.: Glycosylated Hemoglobins and Long-Term Blood Glucose Control in Diabetes Mellitus. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 44, 859-864 (1977).
32. KOENIG, R. J., PETERSON, C. M., JONES, R. L., SAUDEK, Ch., LEHRMANN, M., CERAMI, A.: Correlation of Glucose Regulation and Hemoglobin A<sub>1c</sub> in Diabetes Mellitus. *Now Engl. J. Med.* 295, 417-420 (1976).
33. DOLHOFFER, R., STÄDELE, A., WIELAND, O. H.: Clinical and Biochemical Studies on the Significance and Formation of Hemoglobin A<sub>1c</sub> and A<sub>1α+β</sub> in Diabetes Mellitus. *Klin. Wschr.* 55, 945-954 (1977).
34. JAMES, T. M., DAVIS, J. E., McDONALD, J. M., SANTIAGO, J. V., LADENBURG, J. H.: Comparison of Hemoglobin A<sub>1c</sub> and Hemoglobin A<sub>1</sub> in Diabetic Patients. *Clin. Biochem.* 14, 25-27 (1981).
35. DEEG, R., SCHMITT, U., ROLLINGER, W., ZIEGENHORN, J.: A New Approach to Photometry of Glycated Hemoglobin in Human Blood. *Clin. Chem.* 30, 790-793 (1984).
36. BUNN, H. F.: Nonenzymatic Glycosylation of Protein: Relevance to Diabetes. *Amer. J. Med.* 70, 325-330 (1981).
37. BOTTERMANN, P.: Nichtenzymatische Glykosylierung von Hämoglobin. *Lab. med.* 8, 31-35 (1984).
38. PETZOLD, R.: Glykosylierte Hämoglobuline (HbA<sub>1c</sub>), in: *Labor und Diagnose*, L. THOMAS, Hrsg., Mediz. Verlagsges., 2. Aufl., Marburg/Lahn 1984, 124-126.
39. WINTERHALTER, K. H.: Glykosylierte Hämoglobine und ihre Bedeutung beim Diabetes mellitus. *Schweiz. med. Wschr.* 109, 1105-1106 (1979).
40. BUNN, H. F., BRIEHL, R. W., LARRABEE, P., HOBART, V.: The Interaction of 2,3-Diphosphoglycerate with various Hemoglobins. *J. Clin. Invest.* 49, 1088-1095 (1970).
41. BECCARIA, L., CHIUMELLO, G., GIANAZZA, G. et al.: Hemoglobin A<sub>1c</sub> separation by isoelectric focusing. *Am. J. Hematol.* 4, 367-374 (1978).
42. ABRAHAM, E. C., HUFT, T. A., COPE, N. D. et al.: Determination of the Glycosylated Hemoglobins (HbA<sub>1c</sub>) with a New Microcolumn Procedure. *Diabetes* 27, 931-937 (1978).
43. SCHIFFRIN, R. S., HICKINGBOTHAM, J. M., BOWERS, G. N.: Accuracy, Precision, and Stability in Measurement of Hemoglobin A<sub>1c</sub> by "High-Performance" Cation-Exchange Chromatography. *Clin. Chem.* 26, 466-472 (1980).
44. BLOUQUIT, Y., SERAN, C., ROSA, J.: An Automated Method for Determination of Glycosylated Hemoglobins Using Low-Pressure Liquid Chromatography. *J. Chrom.* 275, 41-50 (1983).
45. STENMANN, U.-H., PESONEN, K., YLINEN, K. et al.: Rapid Chromatographic Quantitation of Glycosylated Haemoglobins. *J. Chromat.* 297, 327-332 (1984).
46. SIMON, M., CUAN, J.: Hemoglobin A<sub>1c</sub> by Isoelectric Focusing. *Clin. Chem.* 28, 9-12 (1982).
47. MORTENSEN, H. B.: Quantitative Determination of Hemoglobin A<sub>1c</sub> by Thin-Layer Isoelectric Focusing. *J. Chromat.* 182, 325-333 (1980).
48. CASTAGNOLA, M., CARADONNA, P., CASSIANO, L. et al.: Analysis of the globins from fast haemoglobins by isoelectric focusing on polyacrylamide gel rods. *J. Chrom.* 307, 91-102 (1984).
49. MENARD, L., DEMPSEY, M. E., BLANKENSTEIN, L. A. et al.: Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A<sub>1c</sub> by agar gel electrophoresis. *Clin. Chem.* 26, 1598-1602 (1980).
50. MAYER, T. K., FREEDMAN, Z. R.: Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility. *Clin. Chim. Acta* 127, 147-184 (1983).
51. FLÜCKIGER, R.: Die Thiobarbitursäuremethode zur HbA<sub>1c</sub>-Bestimmung. *Lab. med.* 8, 120-121 (1984).
52. MALLIA, A. K., HERMANSON, G. T., KROHN, R. I., FUJIMOTO, E. K., SMITH, P. K.: Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins. *Anal. Lett.* 14, 649-661 (1981).
53. SUBRAMANIAM, C. V., RADHAKRISHNAMURTHY, B., BERENSON, G. S.: Photometric Determination of Glycosylation of Hemoglobin in Diabetes Mellitus. *Clin. Chem.* 26, 1683-1687 (1980).
54. STANDEFER, J. C., EATON, R. P.: Evaluation of a Colorimetric Method for Determination of Glycosylated Hemoglobin. *Clin. Chem.* 29, 135-140 (1983).
55. NICOL, D. J., CURNOW, D. H., DAVIS, R. E.: Standardization of the Colorimetric Assay for Glycosylated Hemoglobin. *Clin. Chem.* 29, 1694-1695 (1983).
56. KLENK, D. C., HERMANSON, G. T., KROHN, R. I. et al.: Determination of Glycosylated Hemoglobin by Affinity Chromatography: Comparison with Colorimetric and Ion-Exchange Methods, and Effects of Common Interferences. *Clin. Chem.* 28, 2088-2094 (1982).
57. TALWAR, D., BARR, B. B., KESSON, C. M. et al.: Determination of glycosylated adult and foetal haemoglobins by affinity chromatography. *Clin. Chim. Acta* 128, 61-67 (1983).
58. HEROLD, D. A., BOYD, J. C., BRUNS, D. E. et al.: Measurement of Glycosylated Hemoglobins Using Boronate Affinity Chromatography. *Ann. Clin. Lab. Science* 13, 482-488 (1983).
59. WILLEY, D. G., ROSENTHAL, M. A., CALDWELL, S.: Glycosylated haemoglobin and plasma glycoprotein assays by affinity chromatography. *Diabetologia* 27, 56-58 (1984).
60. HENRICH, R., in: „Fortschritte in der Diabetes-Therapie“, Seminarveranstaltung Medica 1980. *Sonderheft Medica* 1, 98-99 (1980).
61. HUISMAN, W., KUIJKEN, J. P. A., TAN-TJONG, H. L., DUURKOOP, E. P., LEIJNE, B.: Unstable glycosylated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta* 118, 303-309 (1982).
62. PAULSEN, E. P., KOURY, M.: Hemoglobin A<sub>1c</sub> Levels in Insulin-dependent and independent Diabetes Mellitus. *Diabetes* 25 (Suppl. 2), 890-896 (1976).
63. STUMMVOLL, H. K., MÜLLER, M. M., SCHERNTHANER, G., WOLF, A., PINGGERA, W. F.: Glukosetoleranz und Hämoglobin A<sub>1c</sub> bei chronischer Niereninsuffizienz. *Wien. med. Wschr.* 130, Suppl. Nr. 64, 16-18 (1980).
64. DOLHOFFER, R., STÄDELE, A., WIELAND, O. H.: Clinical and Biochemical Studies on the Significance and Formation of Hemoglobins A<sub>1c</sub> and A<sub>1α+β</sub> in Diabetes Mellitus. *Klin. Wschr.* 55, 945-954 (1977).
65. MORTENSEN, H. B., SVENDSEN, P. A.: Determination of haemoglobin A<sub>1c</sub> by iso-electric focusing. Effect of incubation of erythrocytes and comparison of results obtained by ion-exchange chromatography. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 41, 451-455 (1981).

66. MARG, W., GUNSCHERA, H., HENKE-WOLTER, J.: Die HbA<sub>1c</sub>-Bestimmung mit der Methode der Isoelektrofokussierung in der ambulanten Überwachung juveniler Diabetiker. *Klin. Pädiat.* **194**, 56–59 (1982).
67. FISCHER, R. W., DE JONG, C., VOIGT, E., BERGER, W., WINTERHALTER, K. H.: The colorimetric determination of HbA<sub>1c</sub> in normal and diabetic subjects. *Clin. Lab. Haemat.* **2**, 129–138 (1980).
68. HEINZE, E., VETTER, U., THON, A., KOHNE, E.: Die „risikolose“ Hämoglobin-A<sub>1c</sub>-Konzentration für den Typ-I-Diabetiker? Der SD-Score für die Minorbestandteile des HbA<sub>1c</sub>. *Dtsch. med. Wschr.* **108**, 1632–1634 (1983).
69. PANZER, S., MERYN, S., LOCHS, H. et al.: Glykolyseierte Hämoglobine (Ghb) zur Diagnose gastrointestinaler Blutungen. *Verh. d. Dt. Ges. Inn. Med.* **88**, 537–539 (1982).
70. PANZER, S., GRANINGER, W., KRONIG, G. et al.: Glycosylated Hemoglobin as a Long-Term Parameter in Appraising the Severity of Hemolytic Disease. *Klin. Wochenschr.* **61**, 839–843 (1983).
71. THIELE, I.: Der Einfluß verschiedener Erkrankungen auf die Konzentration der glykosylierten Hämoglobine (HbA<sub>1c</sub>). Inaugural Dissertation, München 1984.
72. FREEDMAN, D., DANDONA, P., FERNANDO, O., MOORHEAD, J. F.: Glycosylated hemoglobin in chronic renal failure and after renal transplantation. *J. Clin. Pathol.* **35**, 737–739 (1982).
73. SLUITER, W. J., VAN ESSEN, L. H., REITSMA, W. D., DOORENBOS, H.: *Lancet* **II**, 531–532 (1980).
74. HUISMAN, T. H. J., HENSON, J. B., WILSON, J. B.: A new high-performance liquid chromatographic procedure to quantitative hemoglobin A<sub>1c</sub> and other minor hemoglobins in blood of normal, diabetic, and alcoholic individuals. *J. Lab. Clin. Med.* **102**, 163–173 (1983).
75. KAPLAN, L. A., CLINE, D., GARTSIDE, P. et al.: Hemoglobin A<sub>1c</sub> in Hemolysates from Healthy and Insulin-Dependent Diabetic Children, as Determined with a Temperature-Controlled Mini-Column Assay. *Clin. Chem.* **28**, 13–18 (1982).
76. GRÄFENSTEIN, K., DUCHNA, W.: Fakten und Probleme zur strukturellen Aufklärung, Bestimmungsmethodik und klinischen Bedeutung der glykosylierten Hämoglobine. *Z. ges. inn. Med.* **37**, 159–167 (1982).
77. KRIUSWIJK, T., DIAZ, D. P., HOLTkamp, H. C.: Interference of Hemoglobin H in the Column-Chromatographic Assay of glycosylated Hemoglobin A. *Clin. Chem.* **27**, 641–642 (1981).
78. NATHAN, D. M., FRANCIS, T. B., PALMER, J. L.: Effect of Aspirin on Determinations of Glycosylated Hemoglobin. *Clin. Chem.* **29**, 466–469 (1983).
79. BRIDGES, K. R., SCHMIDT, G. J., JENSEN, M., CERAMI, A., BUNN, H. F.: The acetylation of hemoglobin by aspirin in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* **56**, 201–207 (1975).
80. GABBAY, K. H.: Glycosylated Hemoglobin and Diabetes Mellitus. *Med. Clin. North Amer.* **66**, 1309–1315 (1982).
81. HOMAIDAN, F. R., KRICKA, L. J., CLARK, P. M. S. et al.: Acetaldehyde-Hemoglobin Adducts: An Unreliable Marker of Alcohol Abuse. *Clin. Chem.* **30**, 480–482 (1984).
82. STEVENS, V. J., FANTL, W. J., NEWMAN, C. B. et al.: Acetaldehyde Adducts with Hemoglobin. *J. Clin. Invest.* **67**, 361–369 (1981).
83. FLÜCKIGER, R., HARMON, W., MAIER, W., LOO, S., GABBAY, K. H.: Hemoglobin Carbamylation in Uremia. *New Engl. J. Med.* **304**, 823–827 (1981).
84. PETERSON, C. M., JOVANOVIC, L., RASKIN, P., GOLDSTEIN, D. E.: A comparative evaluation of glycosylated haemoglobin assays: feasibility of references and standards. *Diabetologia* **26**, 214–217 (1984).
85. GAIN, T., HENDERKOTT, U., BOTTERMANN, P.: Möglichkeiten der Probenaufbewahrung vor der Analyse von Hämoglobin A<sub>1c</sub>. *Akt. Endokrin.* **4**, 80 (1983).
86. SCHAUDER, P., HINTZ, W.: Bestimmung glykosylierter Hämoglobine mit dem „Fast Hemoglobin Test System“. *Dtsch. med. Wschr.* **106**, 262–266 (1981).
87. SVENDSEN, P. A., SØEGAARD, U.: Haemoglobin F and the assessment of glucose control by chromatographically determined HbA<sub>1c</sub> levels. *Scand. J. Lab. Invest.* **42**, 535–537 (1982).
88. DE BOER, M.-J., MIEDEMA, K., CASPARIE, A. F.: Glycosylated Haemoglobin in Renal Failure. *Diabetologia* **18**, 437–440 (1980).
89. ROTH, M.: „Glycated Hemoglobin“, Not „glycosylated“ or „Glucosylated“. *Clin. Chem.* **29**, 1991 (1983).
90. HUMFELD, S., REINAUER, H.: Hochdruckflüssigkeitschromatographische Analyse der glykosylierten Hämoglobine. *Lab. med.* **8**, 385–389 (1984).
91. NATHAN, D. M., DUNN, B. S., FRANCIS, T. B.: Two Commercial Methods Evaluated for Eliminating the Labile Fraction from the Assay for Glycated Hemoglobin (Glycohemoglobin). *Clin. Chem.* **30**, 109–110 (1984).
92. REINAUER, H., NIEDERAU, C. M.: Glykosylierte Hämoglobine – Bildung und Beseitigung der Aldiminform. *Lab. med.* **8**, 68–73 (1984).
93. ROLLINGER, W., TRUNG, G., ZIEGENHORN, J.: Schnelles und praktikables Verfahren zur Elimination der labilen Form bei der Messung des glykosylierten Hämoglobins (HbA<sub>1c</sub>). *Fresenius Z. Anal. Chem.* **317**, 704–705 (1984).
94. KRAUSE, J. R., STOLC, V., CAMPBELL, E.: The Effect of Hemoglobin F Upon Glycosylated Hemoglobin Determinations. *Am. J. Clin. Pathol.* **78**, 767–769 (1982).

**Anschrift des Verfassers:**

Dr. rer. nat. Arnulf Hubbuch  
Boehringer Mannheim GmbH  
Sandhofer Straße 116  
6800 Mannheim 1

