Ermittlung von Referenzintervallen der affinitätschromatographischen Bestimmung glycierter Serumproteine an Aminophenylboronsäure-Agarose

Evaluation of Reference Values of the Affinity Chromatographic Estimation of Glycated Serum Proteins by the Use of Aminophenylboronic Acid Agarose

S. Krantz¹, W. Baufeld²

¹ Institut für Biochemie

² Institut für Pathologische und Klinische Biochemie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, O-2200 Greifswald

Zusammenfassung:

Ein kommerzieller Kit (Glyc-Hb®) zur affinitätschromatographischen Bestimmung glycierter Hämoglobine kann ohne Änderung der Anwendungsvorschriften zur Ermittlung des Glycierungsgrades der Serumproteine eingesetzt werden.

An 197 Serumproben gesunder Personen wurden die Mittelwerte, Standardabweichung, Normalverteilung der Daten und die Referenzintervalle für glycierte Serumproteine ermittelt, wobei zur Proteinbestimmung in den Säuleneluates die UV-Absorption bei 280 nm und eine Coomassie Blau-Methode verwendet wurden. Die Albuminkonzentrationen wurden immunturbidimetrisch bestimmt. Folgende Daten wurden für die glycierten Serumproteine erhalten (Werte für die Coomassie Blau-Bestimmung in Klammern): Mittelwert 3,61 % (3,38 %), Standardabweichung 0,79 (0,68), Median 3,58 % (3,42 %), 0,95 Vertrauensintervall des Mittelwertes 3,50–3,72 % (3,28–3,47 %), oberes Referenzlimit 5,16 % (4,70 %) mit dem empfohlenen 0,9 Konfidenzintervall von 5,0–5,32 % (4,56–4,84 %). Die Werte für glyciertes Albumin sind: Mittelwert 2,62 %, Standardabweichung 0,63, 0,95 Konfidenzintervall des Mittelwertes 2,53–2,71 %, Median 2,53 %, oberes Referenzlimit 3,85 % (3,72–3,98 %). Die Daten der glycierten Serumproteine sind normal verteilt.

Schlüsselwörter:

Glycierte Serumproteine – Affinitätschromatographie – kommerzieller Kit – Referenzwerte

Summary:

A commercial kit (Glyc-Hb®) used for the affinity chromatographic estimation of glycated haemoglobins is suited for the determination of glycated serum proteins without changing the original instructions.

From 197 serum samples of healthy persons the main values, standard deviations, medians and reference ranges are evaluated employing 280 nm UV absorbance and a Coomassie Blue reagent for total protein determination in the column eluates. Albumin concentrations were determined by immunoturbidimetry. The following data were obtained (values for Coomassie Blue estimates in parentheses): Mean 3.61 % (3.38 %), standard deviation 0.79 (0.68), median 3.58 % (3.42 %), 0.95 confidence interval of the mean 3.50–3.72 % (3.28–3.47 %), upper reference limit 5.16 % (4.05 %) with the recommended 0.9 confidence interval of 5.0–5.32 % (4.56–4.84 %). Values for glycated albumin were: mean 2.62 %, standard deviation 0.63, 0.9 confidence interval of the mean 2.53–2.71 %, median 2.53 %, upper reference limit 3.85 % (3.72–3.98 %). The data for glycated proteins fit a Gaussian distribution.

Keywords:

Glycated serum proteins – affinity chromatography – commercial kit – reference values

Einleitung

Der Glycierungsgrad der Serumproteine ist ein Parameter zur mittelfristigen Beurteilung der Stoffwechselsituation beim Diabetes mellitus.

Zur Bestimmung der glycierten Serumproteine stehen zwei Methoden dem klinisch-chemischen Labor zur Verfügung, der Fructosaminestest und die Affinitätschromatographie mittels an Agarose gekoppelten Aminophenylboronsäurederivaten. Während über den Fructosaminestest eine

umfangreiche internationale Literatur existiert, ist über die Eignung der Aminophenylboronsäure-Affinitätschromatographie zur Ermittlung des Glycierungsgrades der Serumproteine zwar überwiegend befürwortend, aber nicht sehr umfangreich berichtet worden (1).

Die Affinitätschromatographie zur Bestimmung glycierter Hämoglobine (GHb) ist Dank kommerzieller Kits gut etabliert. Deshalb war der Gedanke naheliegend, einen kom-

merziellen Kit (Glyc-Hb, Merck) unter Beibehaltung der Anwendungsvorschrift für Hämoglobin zur Bestimmung glycierter Serumproteine zu verwenden (1). Die mitgeteilten Ergebnisse waren Anlaß, das Referenzintervall der Methode aus einer größeren Zahl stoffwechselgesunder Probanden zu ermitteln. Da die UV-Spektrometrie bei 280 nm zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Säuleneluat in klinisch-chemischen Labor nicht üblich ist, wurden zum Vergleich Eiweißbestimmungen mit einer Coomassie Blue-Methode durchgeführt. Die Albuminkonzentrationen in den Säuleneluat wurden immun-turbidimetrisch bestimmt.

Material und Methoden

Probandenmaterial: 197 Seren von stoffwechselgesunden Probanden, davon 18 Blutspender (Serumglucosewerte 55 bis 126 mg/dl).

Bestimmungsmethoden: Die Affinitätschromatographie wurde an Glyc-Hb-Säulen (Merck, Darmstadt), wie für die Bestimmung glycierter Hämoglobine beschrieben, durchgeführt. 0,05 ml Serum wurden auf die Säulen aufgegeben.

Die Gesamteiweiß-Konzentration in den Eluat wurde mittels UV-Spektrometrie bei 280 nm in 1-cm-Küvetten bestimmt. Parallel dazu wurde die Eiweißkonzentration mit dem Coomassie Blau-Reagenz (Pierce, Rockford, Ill.) ermittelt.

Die Albuminkonzentration wurde immunchemisch unter Verwendung des Turbiquant-Albumin-Tests (Behringwerke, Marburg) bestimmt.

Qualitätskontrolle: Je zwei Säulen des Glyc-Hb-Kits wurden zur Bestimmung der intraserialen (zweimal je 6 Bestimmungen/Tag) und interserialen (je zwei Bestimmungen an 10 aufeinanderfolgenden Tagen) unter Verwendung eines Sammelserums von drei Blutspendern benutzt.

Statistische Auswertung: Aus den Analyseergebnissen wurden die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen ($x \pm sd$) und die Mediane ermittelt und die Daten auf Normalverteilung geprüft. Zum Vergleich wurden die Daten mittels der linearen Regressionsanalyse miteinander verglichen (2). Die Referenzbereiche wurden entsprechend (3) definiert.

Ergebnisse und Diskussion

Präzision und Richtigkeit: Die Reproduzierbarkeit, ausgedrückt als Variationskoeffizient; ermittelt an zwei Säulen, betrug innerhalb einer Serie 6,9 und 7,3%. Der interserielle Variationskoeffizient betrug 7,7 und 10%. Damit wurden die Ergebnisse der vorangegangenen Studie (1) bestätigt.

Wertedarstellung: Die statistische Auswertung der mit dem Glyc-Hb-Kit erhaltenen Daten glycierter Serumproteine von 197 gesunden Personen ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Referenzlimits wurden unter Vereinbarung eines Vertrauensintervalls von 0,9 für die Quantilen = 0,025 und 1- = 0,975 (Referenzbereich 0,95) berechnet. Die erhaltenen Daten für die glycierten Proteine sind normal verteilt. Deshalb ist die Anwendung parametrischer Methoden (3) erlaubt.

Für die Diabetikerbetreuung sind nur die oberen Referenzgrenzen von Interesse.

Tab. 1: Ergebnisse der Bestimmung glycierter Proteine mit der Aminophenylboronsäure-Affinitätschromatographie (Glyc-Hb®) an 197 Serumproben gesunder Personen

Parameter	Meßmethodik der Proteinkonzentrationen der Säuleneluate		
	UV (280 nm)	Coomassie Blau	Albumin
Mittelwert x	3,61	3,38	2,62
Standardabweichung sd	0,79	0,68	0,63
Median x	3,58	3,42	2,53
Minimum	1,53	1,61	0,95
Maximum	5,37	4,95	4,77
Normalitätstest			
Schiefe	-0,1262	-0,1064	0,56
Wölbung	-0,6382	-0,4655	0,86
Prüfgröße	3,87	2,15	16,70
Normalverteilung	ja p<0,001	ja p<0,001	ja p<0,01
0,95 Konfidenzintervall für den Mittelwert	3,50-3,72	3,28-3,47	2,53-2,70
Unteres Referenzlimit	2,06	2,05	1,39
	1,90-2,22	1,91-2,19	1,26-1,52
Oberes Referenzlimit	5,16	4,70	3,85
	5,00-5,32	4,56-4,84	3,72-3,98
x + 2 sd	5,19	4,74	3,88

Angaben der Proteinkonzentrationen in %

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß mit dem Mittelwert plus zweifache Standardabweichung die obere Grenze ebensogut beschrieben wird wie durch die Anwendung quantilenbezogener Auswertungsverfahren.

Die UV-Spektrometrie kann durch die Coomassie-Methode zur Proteinbestimmung in den Säuleneluat ersetzt werden.

Die Regressionsanalyse der Daten UV-Spektrometrie (y) vs Coomassie Blau-Proteinbestimmung (x) entsprechen folgender Gleichung.

$$y = 1.86 + 0.52 x$$

$$r = 0.74; B = 0.55; p < 0.001 \text{ für } r;$$

$$r = \text{Korrelationskoeffizient; } B = \text{Bestimmtheitsmaß.}$$

Die Werte für das glycierte Albumin (x) stehen zu den glycierten Gesamtproteinen in den durch die folgenden Regressionsgleichungen ausgedrückten Beziehungen.

$$\text{UV-Spektrometrie (y)}$$

$$y = 2.45 + 0.44 x$$

$$r = 0.49; B = 0.24; p < 0.001;$$

$$\text{Coomassie Blau-Methode (y)}$$

$$y = 1.94 + 0.55 x$$

$$r = 0.51; B = 0.26; p < 0.001.$$

Beim Vergleich verschiedener Proteinbestimmungsmethoden ist zu berücksichtigen, daß auftretende Unterschiede von den differentiellen Mechanismen abhängen, die zum Proteinnachweis genutzt werden. So besitzt Albumin eine im Vergleich zu anderen Plasmaproteinen hohe Farbstoffbindungskapazität, aber einen geringen Tyrosin- und Tryptophangehalt, der der UV-Spektrophotometrie bei 280 nm zugrunde liegt.

Der Mittelwertvergleich und die Bestimmung der Referenzgrenzen zeigen, daß beide Methoden zur Evaluierung des Glycierungsgrades der Serumproteine geeignet sind.

Aus der individuellen Variabilität der Albuminkonzentrationen erklärt sich auch die mäßige Korrelation der im-

munchemisch bestimmten Daten zu den Werten der Gesamteiweißbestimmungen. Über die Bestimmung des Albumingehalts in den Säuleneluat ist der Glycierungsgrad ebenfalls zu ermitteln. Jedoch erbringt die aufwendigere und teure immunchemische Albuminbestimmung für die angestrebten Aussagen keine Vorteile (1).

Danksagung

Herrn Dr. Vormbrock der Firma E. Merck, Darmstadt, danken wir für die Überlassung von Glyc-Hb-Kits, dem Coomassie Blau-Reagenz sowie für die Übergabe von Serumproben.

Herrn Dr. Frick, Abteilung für Blutspende- und Transfusionswesen der Medizinischen Fakultät sind wir für die Gabe von Blutproben, Herrn Dr. Brachmann, Institut für Pathologische und Klinische Biochemie der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität für die Bestimmung der Serumglucosekonzentrationen zu Dank verpflichtet. Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Lewandowski, Frau Zacharias, Frau Beyersdorf und Frau Häßner danken wir für die technische Assistenz.

Schrifttum:

1. Krantz, S., Baufeld, W., Lober, S. (1991) Affinitätschromatographische Bestimmung glycylierter Serumproteine mittels Aminophenylboronsäure-Agarose (Glyc-Hb[®]). *Lab.med.* 15, 367-371.
2. Grimm, H., Recknagel, R. D. (1985) *Grundkurs Biostatistik*. Fischer, Jena.
3. Solberg, H. E. (1983) The theory of reference values. Part 5: Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 749-760.

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. S. Krantz
Institut für Biochemie

Dr. W. Baufeld
Institut für Pathologische und Klinische Biochemie
Medizinische Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Klinikum Fleischmannstraße
O-2200 Greifswald

□