

36. Henskens YMC, van de Water C, Lanser A, van der Meijden A, van der Kraaij A, de Winter J, H. Bekenes, W. van Gelder. Evaluation of the Paragon 2000 CZE system for the detection and identification of monoclonal components. (abstract) Tijdschr Ned Ver Klin Chem 2000; 25: 75.
37. Keren DF. Capillary zone electrophoresis in the evaluation of serum protein abnormalities. Am J Clin Pathol 1998; 110 (2): 248-52.
38. Clark R, Katzmann JA, Kyle RA, Fleisher M, Landers JP. Differential diagnosis of gammopathies by capillary electrophoresis and immunosubtraction: analysis of serum samples problematic by agarose gel electrophoresis. Electrophoresis 1998; 19(14): 2479-84.
39. Cowdrey G, Firth M, Firth G. Separation of cerebrospinal fluid proteins using capillary electrophoresis: a potential method for the diagnosis of neurological disorders. Electrophoresis 1995; 16(10): 1922-6.
40. Sanders E, Katzmann JA, Clark R, Oda RP, Shihabi Z, Landers JP. Development of capillary electrophoresis as an alternative to high resolution agarose electrophoresis for the diagnosis of multiple sclerosis. Clin Chem Lab Med 1999; 37(1): 37-45.
41. Hiroaka A. Detection by capillary electrophoresis of changes in the beta-trace protein levels in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. Prostaglandins 1996; 51: 290.
42. Hiraoka A, Arato T, Tominaga I, Anjyo A. Capillary electrophoretic analyses of beta-trace protein and other low molecular weight proteins in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. J Pharm Biomed Anal 1997; 15(9-10): 1257-63.
43. Liang H, Wang Y, Wang Q, Ruan MS. Hydrophobic interaction chromatography and capillary zone electrophoresis to explore the correlation between the isoenzymes of salivary alpha amylase and dental caries. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 724: 381-8.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 229-232

Capillaire zone elektroforese en hemoglobinevarianten en -derivaten: de stand van zaken

C.J.A. DOELMAN en C.W. WEYKAMP

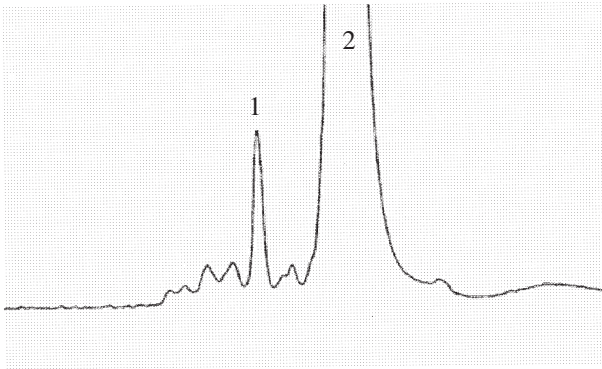
In dit artikel wordt de capillaire zone elektroforese met dynamische coating beschreven. Deze methode wordt op dit moment toegepast bij de analyse van hemoglobinederivaten en -varianten, zoals HbA1c, HbF, HbS. Deze methode, welke goede correlatie vertoont met andere methodieken, is zeer eenvoudig uitvoerbaar en heeft een korte analysetijd. Daarnaast biedt de automatisering en de digitale opslag een groot voordeel. Een overzicht van de literatuur wordt gegeven.

Verschillende elektroforetische technieken, zoals elektroforese in agargel, celluloseacetaat, isoelektrische focussing in polyacrylamide worden gebruikt voor de analyse van hemoglobinederivaten en hemoglobinevarianten. Ook HPLC-technieken worden toegepast (1). Voortbordurend op deze scheidingstechniek zijn er publicaties verschenen waarbij capillaire elektroforese wordt toegepast voor de analyse van hemoglobinevarianten en -derivaten. De capillaire elektroforetische scheidingstechniek is snel. Er wordt een geringe hoeveelheid reagens gebruikt en bovendien is de methode eenvoudig automatiseerbaar. De mogelijkheden voor scheiding van hemoglobinederivaten en -varianten zijn beperkt door de absorptie van eiwitten aan de wand van het capillair. Dit betekent,

naast de variabele snelheid van de elektroosmotische flow, dat de reproduceerbaarheid van de bepaling dan te wensen overlaat. Sommige onderzoekers hebben getracht dit probleem te verhelpen door de elektroforese uit te voeren bij een relatief hoge pH waardoor een sterke en constante electro-osmotische flow verkregen werd. Dit leidde tot een zeer sterke vermindering van de resolutie waardoor lange capillairen gebruikt dienden te worden wat weer een lange analysetijd tot gevolg heeft (2,3,4). Castagnola c.s. beschrijven methoden om hemoglobine tetrameren, globineketens en/of aminozuren te scheiden met behulp van capillaire zone elektroforese (CZE) of micellaire elektrokinetische capillaire chromatografie (MECC) (2). Ook wordt capillaire isoelektrische focussing met gecoate capillairen toegepast, waarmee getracht werd om hemoglobinevarianten te scheiden. Alhoewel analysetijden van rond de twintig minuten zijn beschreven, wordt de CIEF-techniek toch gezien als een techniek voor routineonderzoek. Ook werd aangegeven dat de mogelijkheid bestond om geglyceerd hemoglobine te scheiden van de andere hemoglobinederivaten, echter de data ontbreken daarvoor. Gezien de eenvoud van de techniek verdient het gebruik van capillaire zone elektroforese de voorkeur boven de capillaire isoelektrische focussing. De onder andere door onszelf geïntroduceerde techniek van capillaire zone elektroforese met een dynamische coating brengt voor het scheiden van hemoglobinevarianten en -derivaten een duidelijk voordeel. In dit artikel zullen wij deze techniek voor het voetlicht brengen.

Streekziekenhuis Koningin Beatrix, Winterswijk

Correspondentie: Dr. C.J.A. Doelman, Beatrixpark 1, Postbus 9005, 7100 GG Winterswijk
E-mail: c.j.a.doelman@skbwinterswijk.nl



Figuur 1. Elektroferogram van een bloedmonster, waarbij de HbA1c(1) en HbA0(2) piek zijn weergegeven. Totale elektroforesetijd bedraagt niet meer dan 5 minuten. Er wordt een duidelijke scheiding verkregen tussen HbA1c en HbA0.

CZE met dynamische coating

Capillaire elektroforese kent verschillende uitvoeringsvormen afhankelijk van het medium, waarmee het capillair is gevuld (gel, micellen, amfolieten). De capillaire zone elektroforese wordt op dit moment het meest toegepast en is eenvoudig in gebruik. In de klinische chemie wordt deze uitvoeringsvorm, waarbij slechts één soort elektrolyt gebruikt wordt, voornamelijk toegepast (5). Binnen dit scheidingsstelsel kan ruimschoots gevarieerd worden met de pH van de buffer, de ionensamenstelling maar kan men ook met een innovatieve dynamische coating gaan werken (6). Bij het gebruik van een dynamische coating wordt voor het injecteren van het betreffende monster eerst een "initiator" in het capillair gebracht door een spanning over het capillair aan te brengen. De initiator bindt aan de capillairwand. Vervolgens wordt in het betreffende capillair geëlektroforeerd waarbij aan de elektroforesebuffer ook nog allerlei polymeren kunnen worden toegevoegd. Tijdens de daarop volgende elektroforetische analyse blijft de coating aan de wand van het capillair gebonden door elektrostatische krachten. Na uitvoering van de elektroforese kan het gehele capillair worden schoongemaakt door te spoelen met natriumhydroxyde, waarna de uitgangssituatie zonder coating weer is teruggeroepen. Deze techniek welke door Analis is gepatenteerd, heeft een aantal voordelen. Ze is in het gebruik uitermate goedkoop, praktisch en eenvoudig. Door gebruik te maken van de initiator (bijvoorbeeld albumine) wordt de elektro-osmotische flow gestabiliseerd bij een minder extreme pH en wordt de variatie in de EOF geminimaliseerd. Dit geeft naast een betere reproduceerbaarheid van de elektroforese, ook een nadrukkelijke reductie van de analysetijd.

Principe van de methode

Tot nu toe is deze "capillaire zone elektroforese met dynamische coating" techniek beschreven voor bepaling van HbA1c en HbA2 en HbF en voor het diagnosticeren van congenitale hemoglobinopathieën (7,8,9). Als initiator wordt albumine (een polycation) toegepast, in een maleïnezuur/ argininebuffer. Het volbloed monster wordt gehemolyseerd in dezelfde buffer (pH = 5,3) waaraan ethyleenglycol, triton X-100,

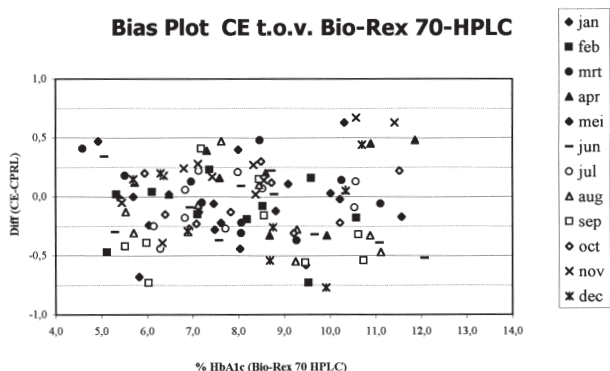
saponine en chondroïtine sulfaat (een polyanion) zijn toegevoegd. De elektroforesebuffer bevat maleïnezuur, arginine, ethyleenglycol, triton X-100 en chondroïtinesulfaat bij een pH van 4,65. Na analyse wordt het capillair met 1 M NaOH gespoeld. Het principe van deze scheiding berust op de interactie tussen het polyanion chondroïtine en de bij lage pH positief geladen eindstandige aminogroep van hemoglobine. Deze aminogroep is bij glycosylering minder in staat een interactie met een negatief geladen molecuul aan te gaan dan bij een niet-glycosyleerd hemoglobine-molecuul, waardoor de lading van het hemoglobine afhankelijk wordt van de glycosylering. Dit houdt in dat bij lage pH het HbA1c eerder langs de detector zal gaan dan HbA₀. Bij een hogere pH zal dit mogelijk precies omgekeerd gebeuren. Daarnaast wordt in deze techniek de capillair wand gestabiliseerd door albumine. Het albumine geeft op de silica capillaire wand een controleerbaar en hoog aantal ladingen waardoor de elektroosmotische flow wordt gestabiliseerd. Deze methode maakt het scheiden van hemoglobinederivaten en -varianten mogelijk binnen een analysetijd van 5 minuten.

De toepassing: hemoglobinederivaten en -varianten

De hierboven beschreven techniek is uitermate geschikt om hemoglobinederivaten zoals gecarbamyleerd hemoglobine, geacetyleerd hemoglobine, methemoglobine en geglycosyleerd hemoglobine te scheiden van elkaar en van HbA₀ (7). Hierdoor kan een zeer betrouwbare HbA1c-waarde verkregen worden. Een elektroferogram wordt getoond in figuur 1. Daarbij is de scheiding tussen HbA₀ en HbA1c aangegeven. Sinds 1997 wordt deze methode als secundaire referentiemethode voor HbA1c gebruikt in ons laboratorium en is hiermee ruim ervaring opgedaan. Vooral de HbA1c bepaling bij patiënten met verhoogd HbF, gecarbamyleerd Hb en hemoglobinopathieën blijkt zeer goed te voldoen. De scheidingskarakteristieken zijn weergegeven in tabel 1. Deze tabel toont de "relative apparent mobility", waarbij de elektroforesetijd is opgegeven ten opzichte van een referentiepiek. De gebruikte referentiepiek is de piek van de hemolyseervloeistof, die geen interactie met het capillair vertoont en met de elektroosmotische flow wordt

Tabel 1. Relative apparant mobilities van hemoglobinevarianten en -derivaten bij een buffer pH van 4,5. Mobilities zijn opgegeven ten opzichte van de piek van de hemolyseerbuffer. N is het aantal onafhankelijke monsters waaruit de standaarddeviatie is bepaald.

	Gemiddelde	standaarddeviatie	N
HbF	1,05	0,013	6
Labele fractie	1,09	0,001	8
HbCarb	1,08	0,001	28
HbA1c	1,13	0,011	40
HbAcet	1,16		1
Verouderingspiek	1,18	0,007	26
HbA0	1,24	0,015	40
HbS	1,33		1
HbC	1,46		1



Figuur 2. Stabiliteit CE-methode ten opzichte van Bio-Rex 70 methode. In deze figuur wordt het verschil weergegeven tussen de CE-methode en de primaire referentiemethode (Bio-Rex 70-HPLC) in absolute eenheden (%HbA1c). Per maand worden er 10 monsters uitgewisseld. Een aantal monsters bleek gecarbamyleerd hemoglobine te bevatten en werden daardoor hoger gemeten in de HPLC-methode.

meegenomen De techniek is weinig gevoelig voor potentiële interferentie door veroudering van het monster of voor geacetyleerd hemoglobine en gecarbamyleerd hemoglobine. Zoals al eerder beschreven (7), is het niet-interfereren van gecarbamyleerd hemoglobine een duidelijk voordeel ten opzichte van de BioRex-70 HPLC-techniek, zoals die gebruikt wordt binnen het Amerikaanse referentienetwerk van laboratoria, waarin ook wij participeren. Om de referentietechnieken wereldwijd op elkaar af te stemmen vindt maandelijks een uitwisseling van ingevroren volbloedmonsters plaats, waarbij ons laboratorium gebruik maakt van onder andere de capillaire elektroforese techniek. Verschillende keren is al gebleken dat een afwijking van de capillaire elektroforese techniek ten opzichte van de Bio-Rex 70 methode te wijten was aan de aanwezigheid van gecarbamyleerd hemoglobine in het monster. Bij de selectie van monsters wordt nu terdege ermee rekening gehouden dat slechts monsters zonder carbHb kunnen worden uitgewisseld in dit kwaliteitscontrole programma. Onze CE-methode bleek in de afgelopen jaren ook zeer stabiel en kan zich uitstekend handhaven als secundaire referentiemethode binnen de nauwe grenzen van het Amerikaanse systeem ($V.C. < 3\%$). De resultaten zijn weergegeven in figuur 2. Opvallend is dat het gemiddelde verschil over 1 jaar tussen de primaire referentiemethode en de capillaire elektroforesemethode zeer klein is. Dit kan op toeval berusten maar het lijkt toch wel gerechtvaardigd om te stellen dat hier sprake is van een zeer stabiele techniek ten opzichte van de referentiemethode. In geval van hemoglobinevarianten kan met de betreffende techniek eenvoudig een geglycosyleerde hemoglobinevariant worden bepaald. Een heterozygote HbC of HbS, HbE blijkt eenvoudig te analyseren. Opvallend is daarbij dat zowel de HbA1c als de HbS1c, HbC1c of HbE1c te scheiden zijn van HbA0, HbS0, HbC0 en HbE0. Ook de HbF fractie is goed te scheiden van HbA1c en HbA0. De HbJ0 en HbJ1c fractie vallen samen met de HbA1c en HbA0 fractie. Daarnaast is het mogelijk om bij een hogere pH (8,7) een omgekeerd migratiepatroon te verkrijgen.

Tabel 2. Relative apparant mobilities bij een pH van 8,7. De betreffende hemoglobinevarianten zijn zeer goed te scheiden met behulp van deze methode.

	Gemiddelde	standaard-deviatie	N
HbC	1,06		1
HbA2/HbE	1,081	0,003	29
HbS	1,11	0,002	11
HbF	1,127	0,005	11
HbA0	1,164	0,005	31
HbA1c	1,192	0,004	27
HbJ	1,216	0,005	5

Hierbij zullen de aminogroepen van het hemoglobine molecuul negatief geladen zijn waardoor koppeling met het polyanion niet (of gedeeltelijk) zal plaatsvinden. Dit resulteert in een kortere migratietijd voor HbA0 dan voor HbA1c. In tabel 2 zijn de “relative apparant mobilities” weergegeven van de verschillende varianten zoals deze gemeten zijn in ons laboratorium. Deze techniek wordt door ons ook gebruikt voor het kwantitatief bepalen van HbA2, HbF en andere hemoglobinevarianten. Vooral de snelheid, de eenvoud, de goede reproduceerbaarheid en precisie zijn de grote voordelen van deze techniek (8,9,10). Bij het kwantitatief bepalen van HbA2 en HbF (diagnostiek van thalassemieën) wordt een zeer goede precisie en reproduceerbaarheid gehaald (3-6%) zowel in fysiologische als pathologische concentraties.

Discussie

De CE-methode lijkt ons een zinvolle toevoeging aan de huidige mogelijkheden voor hemoglobine analyse binnen de klinische chemie. Vooral de hier beschreven techniek van dynamische coating in combinatie met een dragerion is ons inziens een inventieve methode. Groot voordeel is de eenvoud van handelingen en de grote mate van reproduceerbaarheid. Bovendien kan bij de HbA1c-bepaling (buffer pH van 4,5) direct worden geswitched naar een bepaling van HbA2 en HbF (buffer pH van 8,7) door slechts eenmalig te spoelen met NaOH. Vooral bij afwijkende HbA1c monsters kan op die manier snel duidelijkheid worden verkregen over de hemoglobine derivaten en varianten aanwezig in het betreffende monster. De methode van de dynamische coating is zowel in de Verenigde Staten als in Europa gepatenteerd. Helaas is ons de afgelopen jaren gebleken dat het onderzoek naar de toepasbaarheid van de methode soms wat moeizaam verloopt omdat het bedrijfsbelang wel eens kan conflicteren met de wetenschappelijke interesse. Ons inziens is dat de reden dat het aantal publicaties over deze bijzondere methode zo beperkt is. Is nu de CE-methode voor het bepalen van hemoglobinederivaten en -varianten een optie voor ieder laboratorium? Bij deze vraag dienen toch een aantal kanttekeningen geplaatst te worden. Ten eerste denken wij dat de CE-techniek een aanvulling is voor de bepaling van HbA1c. Niet als routinebepaling, daarvoor zijn goede geautomatiseerde methoden beschikbaar die grote aantallen snel verwerken, maar vooral voor die monsters die vreemde uitslagen geven bij de routine

technieken of waarbij de clinicus bedenkingen uit over de betrouwbaarheid van de gerapporteerde HbA1c waarde. De CE-methode moet dan eigenlijk gezien worden als een aanvullende techniek, die niet in ieder laboratorium toegepast hoeft te worden. Daarnaast biedt de CE-techniek (met hoge buffer pH) voor de diagnostiek van thalassemieën en hemoglobinopathiën voordelen boven de gelelektroforese techniek. Er is namelijk eenvoudig te vergelijken met eerdere monsters (bestanden worden digitaal opgeslagen) en er kan een kwantitatief resultaat verkregen worden. Nadelen van de CE-techniek zijn op dit moment nog de relatief hoge investeringskosten in apparatuur en het geringe aantal toepassingen voor de klinische chemie. Dit maakt dat de CE-techniek (voorlopig) nog niet tot het standaardpakket voor elk klinisch-chemisch laboratorium zal gaan behoren. Voorts kan de CE gebruikt worden als primaire referentiemethode voor het vaststellen van de HbA1c-concentratie, in combinatie met HPLC als alternatief voor de BioRex-70 HPLC techniek (11). Het gebruik van deze methode (10 laboratoria wereldwijd binnen het IFCC netwerk) is dusdanig beperkt dat hierop verder niet wordt ingegaan.

Literatuur

1. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Saunders, Philadelphia 1999; 1657-1687.
2. Castagnola M, Messana I, Cassiano L, Rabino R, Rossetti DV, Giardina B. The use of capillary electrophoresis for the determination of hemoglobin variants. *Electrophoresis* 1995; 16: 1492-1498.
3. Molteni S, Frischknecht H, Thormann W. Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants. *Electrophoresis* 1994; 15: 22-30.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 232-238

De scheiding van serum lipoproteïnen met behulp van capillaire elektroforese/isotachoforese

P. van HEIJST, P. LINSSEN* en P.N.M. DEMACKER

Wij inventariseerden door middel van literatuuronderzoek en experimenten op ons laboratorium de mogelijkheid om lipoproteïnen te kwalificeren en kwantificeren met behulp van capillaire elektroforese/isotachoforese.

Afdeling Algemene Interne Geneeskunde en het Centraal Hematologisch Laboratorium, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, 6500 HB Nijmegen*

Correspondentie: Dr. P.N.M. Demacker, Lab Algemene Interne Geneeskunde, 564 CKCL, Universitair Medisch Centrum St Radboud, 6500 HB Nijmegen.
E-mail: P.Demacker@AIG.AZN.NL

4. Hempe JM, Craver RD. Quantification of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing. *Clin Chem* 1994; 40:2288-2295.
5. Stob S, Lauer HH, Zwart A. Capillaire zone elektroforese in de klinische chemie. *Tijdschr NVKC* 1993; 18: 299-305.
6. Janssens J, Chevigne R, Louis P. Capillary electrophoresis detection and/or analysis method and unit. European Patent 0 733 900 A2, US Patent 08/412,032; 1996.
7. Doelman CJA, Siebelder CWM, Nijhof WA, Weykamp CW, Janssens J, Penders ThJ. Capillary electrophoresis system for hemoglobin A1c determinations evaluated. *Clin Chem* 1997; 43: 644-648.
8. Cotton F, Changying L, Fontaine B, Gulbis B, Janssens J, Vertongen F. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determinations of hemoglobins A2 and F. *Clin Chem* 1999; 45: 237-243.
9. Mario N, Baudin B, Bruneel A, Janssens J, Vaubourdolle M. Capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital hemoglobinopathies. *Clin Chem* 1999; 45: 285-288.
10. Lin C, Cotton F, Fontaine B, Gulbis B, Janssens J, Vertongen F. Capillary zone electrophoresis: an additional technique for the identification of hemoglobin variants. *Hemoglobin* 1999; 23:97-109.
11. Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997; 43: 1944-1951.

Summary

Analysis of hemoglobine derivatives by capillary zone electrophoresis. Doelman CJA and Weykamp CW. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 229-232.

In this article capillary zone electrophoresis with dynamic coating has been described. This technique may be used in the analysis of hemoglobin A1c for diabetes mellitus, hemoglobinopathies or thalassemias. This method correlates well with other known techniques and can easily be performed. A review of the literature has been given.

reze/isotachoforese. Het bleek mogelijk een kwalitatieve scheiding te verkrijgen in een aantal pieken die apolipoproteïne A en een aantal pieken die apolipoproteïne B bevatten. De volgende variabelen bleken van invloed op de scheiding: de eiwitmatrix; de temperatuur, het gebruik van verschillende "spacers", de gebruikte kleurstof en de kwaliteit van het gebruikte capillair. Terwijl verdunningsexperimenten bevredigend leken, vielen suppletie-experimenten met gezuiverde lipoproteïnen tegen. Ook het analyseren van verschillende soorten hyperlipemische sera versus normolipemische sera was onbevredigend. Recente bevindingen in de literatuur sluiten hierbij aan: een