

Glicohemoglobina: estudio del efecto de la temperatura y de la fracción lábil en diferentes métodos cromatográficos^a

P. Rosel Soria^b, J. Huguet Ballester, A. Rivera Coll, E. Guillén Campuzano, B. Arranz Martí, M.A. Navarro Moreno

Resumen

Es frecuente el uso de la determinación de la glicohemoglobina para el control a largo plazo de la diabetes mellitus. La determinación se fundamenta en la separación de los componentes glicosados y no glicosados de la hemoglobina, pudiéndose distinguir los métodos basados en las diferencias de carga, de estructura (métodos cromatográficos), o en la reactividad química.

Estos métodos están sometidos a distintos factores que pueden falsear los resultados. Debido a la gran importancia de estos factores hemos estudiado: la presencia de la fracción aldimina y el efecto de la variación de la temperatura durante la determinación. El estudio se ha realizado con los métodos de laboratorio más utilizados: cromatografía de afinidad, de intercambio iónico y de alta eficacia.

Los resultados muestran un efecto significativo de la presencia de la fracción aldimina y de la temperatura en la cromatografía de intercambio iónico, y de la temperatura fuera del intervalo 16,0°C-25,0°C en la afinidad. Concluimos que es necesaria la eliminación de esta fracción aldimina y el control de la temperatura cuando se trabaje con ambos métodos.

Introducción

La determinación de la glicohemoglobina (HbA_{1c}), para el estudio del control metabólico a largo plazo de los pacientes diabéticos, ha sido claramente estableci-

Summary

Glycohemoglobin is being used with increasing frequency to monitor long-term blood glucose concentrations in diabetes mellitus. Assays are based on the different separation of glycosated and nonglycosated hemoglobin components which allow us to distinguish between methods based on charge, structural differences (chromatographic methods) or on chemical reactivity.

These methods present several interferences that may produce false results. Due to their importance, we have studied two of these factors: presence of aldimine fraction and temperature variation during the assay. The study was performed using the most common laboratory methods: affinity chromatography, ion-exchange chromatography and high performance liquid chromatography.

Results showed a significant effect of the aldimine fraction and assay temperature in cation-exchange chromatography and affinity chromatography. We can conclude that the extraction of aldimine fraction and the temperature control are necessary when we use these methodologies.

da^(1,2,3,4). La glicación no enzimática de la hemoglobina (Hb) consiste, en primer lugar, en la formación de un compuesto inestable (fracción aldimina) que posteriormente se transforma en un compuesto estable (fracción oxoamina) mediante la transposición de Amadori. Además de la hemoglobina, una gran cantidad de proteínas (albúmina, lipoproteínas, etc.) pueden ser igualmente glicosadas^(5,6). La determinación de alguna de estas proteínas nos proporciona un valor integral de las fluctuaciones de la concentración de glucosa en sangre sufridas por el paciente a lo largo del tiempo y es equivalente a la vida media de la proteína. Los constituyentes determi-

^a El término glicohemoglobina sustituye a la antigua expresión «hemoglobina glucada» siguiendo la recomendación definitiva de la Internacional Union of Biochemistry (IUB).

^b Sección Hormonas. Servicio de Bioquímica Clínica. Hospital Princeps d'Espanya. Barcelona.

Recibido: 21-12-89

Aceptado: 2-5-90

nados en la actualidad para el seguimiento del control metabólico de la diabetes mellitus, son la glicohemoglobina y la fructosamina^(2,7,8,9,10). La metodología de la primera es menos practicable y más cara pero su determinación nos proporciona un control retrospectivo mucho más largo y más discriminante que el proporcionado por la fructosamina, aunque por supuesto ambas tienen una correlación estadísticamente significativa^(11,12).

Los métodos utilizados para la determinación de la glicohemoglobina son numerosos, fundamentándose en la diferente carga de las fracciones de la hemoglobina, en diferencias estructurales, o en la propia reactividad química^(1,2,3,13). Estos métodos pueden verse afectados en mayor o menor proporción por diversos factores que pueden ocasionar aumentos o disminuciones falsos de los resultados. Entre éstos tenemos: presencia de fracción aldimina, hiperlipoproteinemias, ácido acetilsalicílico y derivados, algunos antibióticos, uremia, alteraciones de la temperatura, etc.^(14,15,16,17,18,19). Todos estos factores deben ser considerados en el momento de realizar la determinación e interpretación de los resultados.

Hemos estudiado el efecto de la fracción lábil (aldimina) y de la variación de la temperatura en tres métodos cromatográficos habituales para la determinación de la glicohemoglobina.

Material y métodos

El estudio se ha realizado utilizando especímenes de sangre recogida en tubos con etilendiaminotetraacetato de tripotasio como anticoagulante, procedentes de individuos con diabetes mellitus. Las muestras han sido almacenadas a una temperatura comprendida entre 2,0 y 4,0°C y analizadas entre el 1^{er} y 5^o día posterior a su obtención.

El estudio se ha estructurado en dos partes:

1) Influencia de la fracción lábil: se ha determinado la glicohemoglobina y su fracción oxoamina en 388 muestras de pacientes diabéticos.

2) Estudio del efecto de la temperatura: se ha estudiado en 18 muestras de sangre, analizándose a distintas temperaturas (7,0 °C; 16,0°C; 25,0°C y 30,0°C) para la cromatografía de afinidad y en 19 muestras a 21,0°C y 30,0°C) para la cromatografía de afinidad y en 19 muestras a 21,0°C; 23,0°C; 25,0°C y 27°C para la cromatografía de intercambio iónico.

Los métodos utilizados han sido:

— Cromatografía de afinidad (Glyc-Affin GHb, n° Ref SG-6200, Isolab, Ohio, USA): la muestra de sangre se hemolisa inicialmente, aplicándose posteriormente a la co-

lumna. Se eluye en primer lugar el conjunto de hemoglobinas no glicadas (HbA_{1O}), mientras que la glicohemoglobina queda unida al ligando específico de la columna; después, al añadir el segundo eluyente, es la glicohemoglobina la que se eluye. Finalmente se leen ambos eluatos en un espectrómetro a 415 nm y se calcula la fracción de masa de glicohemoglobina.

— Cromatografía de intercambio iónico en columna (BioSystems, n° Ref. 11019, Atom, España): en la fase inicial se procede a la hemólisis y eliminación de la fracción lábil con el reactivo de semicarbácida-anilina. A continuación se aplica este hemolizado a la columna, eluyéndose en primer lugar la glicohemoglobina al añadir solución amortiguadora de fosfato pH=6,7 y en segundo lugar la HbA₀ al añadir solución de NaCl (soluciones suministradas por la casa comercial en el equipo de reactivos). Ambos eluatos se leen espectrométricamente a 415 nm, calculándose la fracción de masa de glicohemoglobina.

— Cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) con intercambio iónicos (Auto Alc analyzer HA-8110, Kyoto, Daiichi, Menarini): inicialmente hemolisamos la muestra con una solución amortiguadora de KH₂PO₄ (4,38 mmol/L) y K₂HPO₄ (1,13 mmol/L) y una sustancia tensoactiva desconocida (todos ellos suministrados por la casa comercial), aplicándose posteriormente el hemolizado a la columna. Quince minutos más tarde se obtienen los resultados impresos incluyendo la representación gráfica de la distribución de la HbA_{1O} y de las fracciones de la glicohemoglobina: HbA_{1C} y HbA_{1A+B}.

El estudio de la influencia de la fracción lábil se ha efectuado con los tres métodos, mientras que el del efecto de la temperatura únicamente se ha realizado con las columnas de afinidad y de intercambio iónico, ya que las columnas de HPLC están termostatazadas.

— Análisis estadístico: para el estudio de la comparación de medias se han utilizado las pruebas *t* de Student y *T* de Wilcoxon para datos apareados en función del número de casos disponibles (riesgo $\alpha=0,05$ en todos los casos).

Resultados

1) Evaluación del efecto de la fracción lábil: los resultados obtenidos se muestran en la tabla I. En ésta se observa que tanto en cromatografía de afinidad como en cromatografía de intercambio iónico, obtenemos diferencias estadísticamente significativas ($P<0,001$ y $P<0,01$ respectivamente) al aplicar la prueba estadística *t* de Student para datos apareados entre los valores obtenidos de

Tabla I
Efecto de la fracción lábil sobre las distintas técnicas cromatográficas

	Fracción de masa (1)		n	P
	Glicohemoglobina $\bar{x} \pm s$	Fracción oxoamina de la glicohemoglobina $\bar{x} \pm s$		
Cromatografía de afinidad	0,114 ± 0,053	0,110 ± 0,051	47	<0,001
Cromatografía de intercambio iónico	0,110 ± 0,028	0,110 ± 0,024	146	<0,01
HPLC	0,104 ± 0,024	0,100 ± 0,023	19	NS

Tabla II
Efecto de la fracción aldimina en el método de cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC)

	Fracción de masa (1)	P	n
	$\bar{x} \pm s$		
HPLC (glicohemoglobina)	0,106 \pm 0,024		
Cromatografía de intercambio iónico (fracción oxoamina de la glicohemoglobina)	0,107 \pm 0,024	NS	176

Tabla III
Efecto de la temperatura en la técnica de cromatografía de afinidad por columna

Temperatura °C	Fracción de masa (1)	n	P
	Fracción oxoamina de la glicohemoglobina $\bar{x} \pm s$		
7,0	0,147 \pm 0,061	18	
16,0	0,140 \pm 0,058	18	< 0,05
25,0	0,141 \pm 0,063	18	NS
30,0	0,131 \pm 0,058	18	< 0,05

Tabla IV
Efecto de la temperatura en la técnica de cromatografía de intercambio iónico

Temperatura °C	Fracción de masa (1)	n	P
	fracción oxoamina de la glicohemoglobina $\bar{x} \pm s$		
23,0	0,107 \pm 0,020	19	
21,0	0,120 \pm 0,022	19	< 0,001
25,0	0,114 \pm 0,021	19	< 0,001
27,0	0,104 \pm 0,020	19	< 0,05

Tabla V
Aspectos prácticos de las metodologías estudiadas para la determinación de glicohemoglobina

	HPLC	Cromatografía de intercambio iónico	Cromatografía de afinidad
Requiere extracción de la fracción lábil	no	sí	sí
Requiere control de la temperatura	no	sí (23,0-24,0°C)	sí < 16,0°C > 25,0°C
Duración de la determinación	15 min	3 horas	2 horas
Precio (Pts) por determinación	1200	400	400

glicohemoglobina y de la fracción oxoamina de la glicohemoglobina.

En el intercambio iónico por HPLC, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para ambas al aplicar la prueba estadística *t* de Wilcoxon para datos apareados.

Una vez comprobado que la presencia de la fracción lábil no interfiere en el método de HPLC se han estudiado las posibles diferencias entre los valores obtenidos de HbA₁ por el método de HPLC y su fracción oxoamina por el método de cromatografía de intercambio iónico, obteniendo los valores indicados en la tabla II. No se observa diferencia significativa alguna entre ambas series de valores.

2) Estudio del efecto de la temperatura: se ha evaluado este efecto para la técnica de cromatografía de afinidad, y la técnica de cromatografía de intercambio iónico. Los resultados obtenidos con la cromatografía de afinidad se muestran en la tabla III. En ésta se observa la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos a 7,0°C y 16,0°C, y entre los obtenidos a 25,0°C y 30,0°C al aplicar la prueba estadística *T* de Wilcoxon ($P < 0,05$ en ambos casos). En cambio no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre 16,0°C y 25,0°C.

En cuanto a la cromatografía de intercambio iónico, los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV, observando al aplicar la prueba estadística *T* de Wilcoxon la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos a 21,0°C, 25,0°C y 27,0°C y los obtenidos a 23,0°C ($P < 0,001$, $P < 0,001$ y $P < 0,05$ respectivamente).

Discusión

Tal como se refleja en las tablas I y II, la extracción de la fracción lábil (aldimina) es necesaria cuando se trabaja con columnas de intercambio iónico o de afinidad, pero parece que no es necesaria si se trabaja con HPLC. El proceso de eliminación de la fracción lábil puede efectuarse por distintos métodos como son la preincubación con semicarbácida-anilina durante 20 minutos a 37,0°C, el lavado de hemáties con solución de NaCl 0,15 mol/L⁽⁸⁾ o el tratamiento de la sangre con soluciones amortiguadores tipo acetato o borato.

En cuanto a la temperatura, se ha observado que en la cromatografía de afinidad se puede establecer un intervalo de temperaturas óptimo para el desarrollo de la técnica (16,0°C a 25,0°C). Este hecho no sucede en la cromatografía de intercambio iónico por columna, ya que en esta técnica la termoestabilidad es de $\pm 0,5^\circ\text{C}$ y aunque con el equipo comercial se suministre una tabla de conversión de los valores con respecto a la temperatura, no es correcto trabajar fuera del intervalo de 23,0-24,0°C. Aún así, dentro de este margen hay que realizar la conversión del porcentaje cuando no se trabaja exactamente a 23,0°C. La temperatura es tan importante que en cada serie es necesario colocar un termómetro dentro de una columna de elución. Los reactivos deben de estar igualmente a 23 °C para que en el momento de introducirlos en la columna no varíe la temperatura interna. Dada la termostatación de la columna de HPLC, en este método no es necesario llevar a cabo un control tan estricto de la temperatura.

Por los resultados obtenidos se puede inferir que de

los tres métodos estudiados, la cromatografía de intercambio iónico por HPLC presenta numerosas ventajas debido a su automatización, su independencia de la temperatura ambiente y a la no interferencia de la fracción lábil (aldimina). Además se trata de un método rápido con el que en 15 minutos podemos obtener el resultado; no obstante no hay que olvidar el elevado coste que supone este método en comparación con los otros de ámbito puramente manual (ver tabla V, según datos aportados por las distintas casas comerciales).

Es factible utilizar en el laboratorio clínico de rutina cualquiera de los tres métodos estudiados, pero siempre teniendo en cuenta los factores e interferencias que afectan a cada una de ellos.

Bibliografía

1. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McLKenzie EM. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986; 32: B64-B70.
2. Nathan DM, Singer DE, Huxthall K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* 1984; 310: 341-346.
3. Jovanovic L, Peterson CM. The clinical utility of glycosylated hemoglobin. *Am J Med* 1981; 70: 331-338.
4. Goldstein DE, Parker KM, England JD, Hsiao-Mei Wiedmeyer. Clinical application of glycosylated hemoglobin measurements. *Diabetes* 1982; 31: 70-78.
5. Miller JA, Gravallosa E, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins: relevance to diabetes. *J Clin Invest* 1980; 65: 896-901.
6. Wietum JL, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg, D. Nonenzymatic glucosylation of low density lipoprotein alters its biological activity. *Diabetes* 1982; 31: 283-291.
7. Rosel P, Ortolá J, Montaña E, Arranz B, Vinzia C, Navarro MA. Hemoglobina glucada: comparación de métodos. *Rev Diag Biol* 1989; 38: 134.
8. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982; 27: 87-95.
9. Hindle EJ, Glenise M, Rostron, Gatt JA. The estimation of serum fructosamine: an alternative measurement to glycated haemoglobin. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 84-89.
10. Seng Lim Y, Staley MJ. Measurement of plasma fructosamine evaluated for monitoring diabetes. *Clin Chem* 1985; 31: 731-733.
11. Vernetta A, Alvarez V, Prat J, Jiménez J. Medida de fructosamina en suero como alternativa a la determinación de hemoglobina glucada en el control de la diabetes mellitus. *Quim Clin* 1989; 8: 31-35.
12. Armbruster DA. Fructosamine: structure, analysis and clinical usefulness. *Clin Chem* 1987; 33: 2153-2163.
13. Moore JC, Outlaw MC, Barnes AJ, Turner RC. Glycosylated plasma protein measurement by a semi-automated method. *Ann Clin Biochem* 1986; 23: 198-203.
14. Lind T, Cheyne GA. Effect of normal pregnancy upon the glycosylated haemoglobin. *Br J Obstet Gynaecol* 1979; 86: 210-213.
15. Sosenko JM, Flickinger R, Platt OS, Gabbay KH. Glucosylation of variant hemoglobins in normal and diabetic subjects. *Diabetes Care* 1980; 3: 590-593.
16. Diux D, Cohen D, Kingsley S, Lea MJ, Sankbeil J, Sexton K. Interference by lactescence in glycohemoglobin analysis. *Clin Chem* 1979; 25: 494-495.
17. Coriello A, Giugliano D, Dello Russo P, Sgambato S, D'Onofrio F. Increased glycosylated haemoglobin A1 in opiate addicts. Evidence for hyperglycaemic effect of morphine. *Diabetologia* 1982; 22: 379.
18. Rosel P, Barragán F, Martínez M, Vinzia C, Marigo M, Navarro MA. Hemoglobina glucosilada: valoración de las fracciones lábil y estable en diabéticos tipos I y II. *Med Clin (Barc)* 1985; 84: 349-352.
19. Fernández I, Rodríguez MA, Rivas M, Griera JL, Durán S. Determinación de los niveles de hemoglobinas glucosiladas⁽¹⁾: aspectos metodológicos. *Med Clin (Barc)* 1983; 81: 143-146.