

# INSTAND - Symposium Berlin 2009

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



INSTAND e.V.  
Referenzlabor  
Dr. Patricia Kaiser

# Referenzmessverfahren

Vollständig erforschtes Messverfahren, bei dem nachgewiesen ist, dass es Werte mit einer Messunsicherheit ergibt, die für ihre vorgesehene Verwendung angemessen ist, besonders bei der Bewertung der Richtigkeit anderer Messverfahren für die gleiche Größe und bei der Merkmalsfeststellung von Referenzmaterialien (EN 12286: 1998, 3.7; ISO/FDIS 15193:2009).



# Referenzmessverfahren

- Rückführbarkeit auf primären Standard
  - SI Einheiten
  - definierte Reinheit
  - definierte Messunsicherheit
- Vergleichbarkeit auf internationaler Ebene
  - Netzwerk (JCTLM, IFCC HbA<sub>1c</sub>)



# Referenzmethodenwert

Bei der Zielwert-Ermittlung für Ringversuche sollte der mit dem Referenzmessverfahren ermittelte Wert (= Referenzmethodenwert) bezüglich

## Unrichtigkeit und Unpräzision

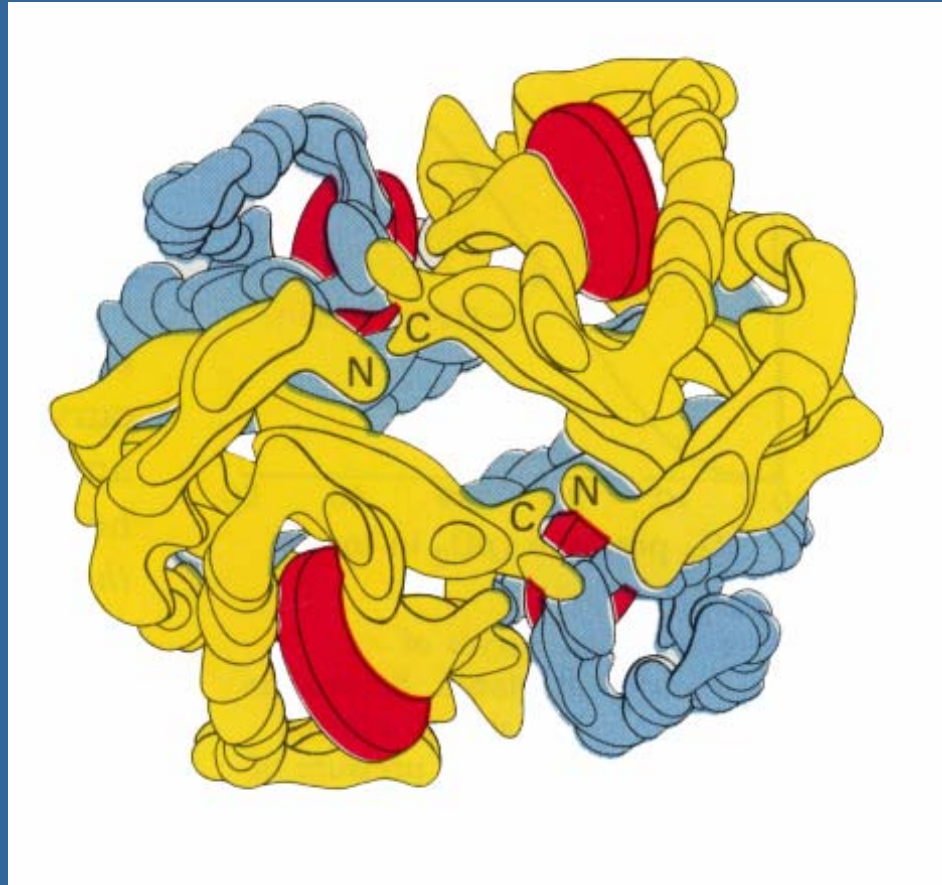
$\frac{1}{4}$  der Grenzen nicht überschreiten, die nach der RiliBäk von Routineverfahren gefordert werden.

→	HbA <sub>1c</sub> RMW:	Unpräzision	≤	2,5 %
		Unrichtigkeit	≤	2,5 %



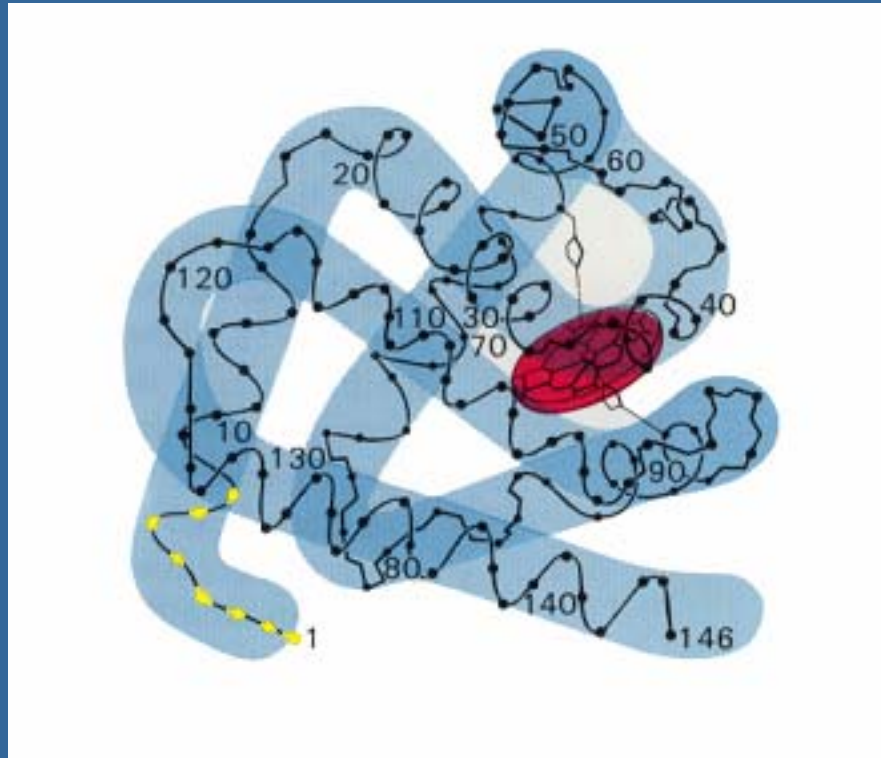
INSTAND e. V.

# Hämoglobin





# β-Kette des Hämoglobins



HbA0

Val – His – Leu – Thr – Pro – Glu – Glu – Lys –

HbA1c

Glc – Val – His – Leu – Thr – Pro – Glu – Glu – Lys –



# Referenzmethode Bestimmung von HbA1c im Blut mittels HPLC-ESI-MS nach IFCC

Meßprinzip:

Bestimmung der Ratio des glykierten zum nicht-glykierten  $\beta$ -N-terminalen Hexapeptids vom Hämoglobin

1. Hämolyse der Vollblut-Probe

2. Proteolyse des Hämolysats

3. HPLC-ESI-MS-Analyse



INSTAND e. V.

# Proteolyse des Hämolyats

HbA0

Val – His – Leu – Thr – Pro – Glu

HbA1c

Glc – Val – His – Leu – Thr – Pro – Glu



Glu – Lys –  
Glu – Lys –



# Referenzmethode Bestimmung von HbA1c im Blut mittels HPLC-ESI-MS nach IFCC

Meßprinzip:

Bestimmung der Ratio des glykierten zum nicht-glykierten  $\beta$ -N-terminalen Hexapeptids vom Hämoglobin

1. Hämolysse der Vollblut-Probe

2. Proteolyse des Hämolysats

3. HPLC-ESI-MS-Analyse



IN STAND e. V.

# HPLC-ESI / MS-Analyse

## HPLC (Shimadzu)

Pumpe A  
Pumpe B  
Mischkammer

Autosampler  
Säulenoven  
Degasser  
Schaltventil

Controller

## MS (Applied Biosystems)

AB Sciex QTRAP 5500      triple quadrupole mass spectrometer

ESI-Quelle:                      TurboV™ ion source mit Turbolon Spray™ probe

Software:                        Analyst™





# HPLC-ESI / MS-Analyse

## HPLC-Bedingungen:

Zorbax SB-CN, 5  $\mu$  2.1 mm x 150 mm      50 °C, 2  $\mu$ l

Eluent A:            0.025 % TFA in Wasser

Eluent B:            0.023 % TFA in Acetonitril

Gradient:            300  $\mu$ l/min

Zeit [min]	0	3	9	13.5	13.6	17	17.1	23
% B	0	0	5	5	100	100	0	stop

## MS-Bedingungen:

Scan type:            Q1 Multiple Ions

Masse:                m/z 348.3 (nicht-glykiertes Hexapeptid)

m/z 429.3 (glykiertes Hexapeptid)

Dwell time:           1 s

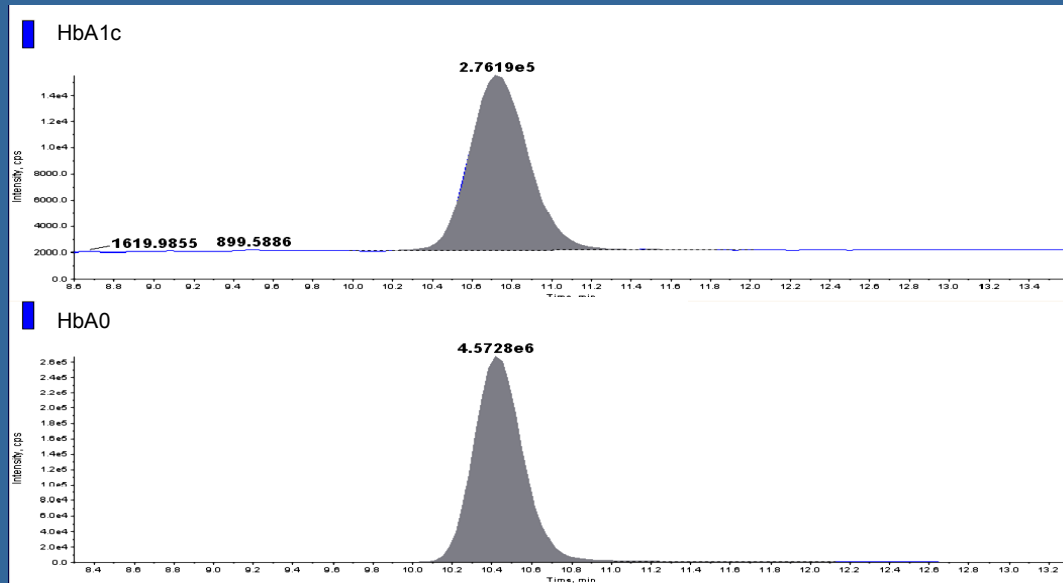
Temperatur:           500 °C



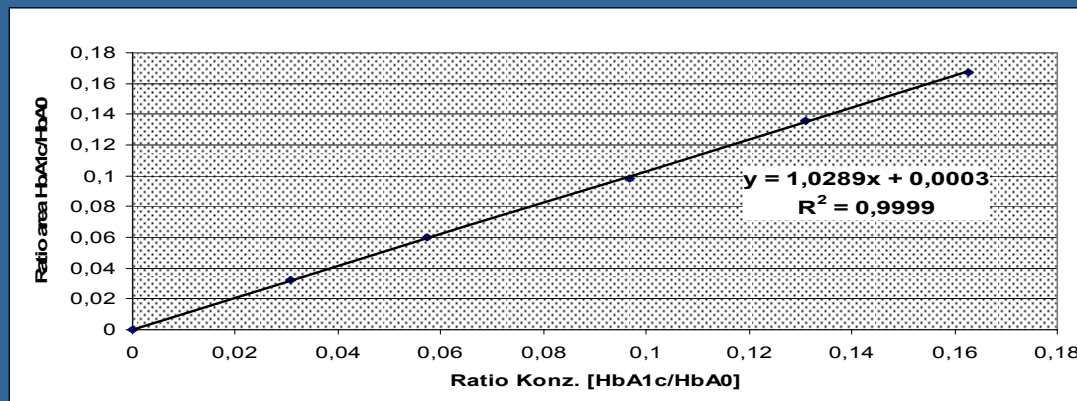
INSTAND e. V.

# HPLC-ESI / MS-Analyse

LC-MS Chromatogramm einer Hämolytat-Probe mit 63 mmol/mol HbA<sub>1c</sub>



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





# Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen

Analyt	Zielwert	Max. erlaubte rel. Abweichung des Einzelwertes	Ringversuch
HbA1c	RMW	10%	18%



# Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen

Einheit von HbA<sub>1c</sub> in [mmol/mol]

## Termine B1

Inkrafttreten: 1.4.2008

Übergangsfrist: 24 Monate

Umstellung der internen Qualitätskontrolle: spätestens bis 31.3.2010

Umstellung der externen Qualitätssicherung (Ringversuche) auf die neue Richtlinie: 1.1.2009

Bei HbA<sub>1c</sub> wird die alte Einheit % noch bis zum 31.12.2009 akzeptiert.



# Master Equation

## Umrechnung

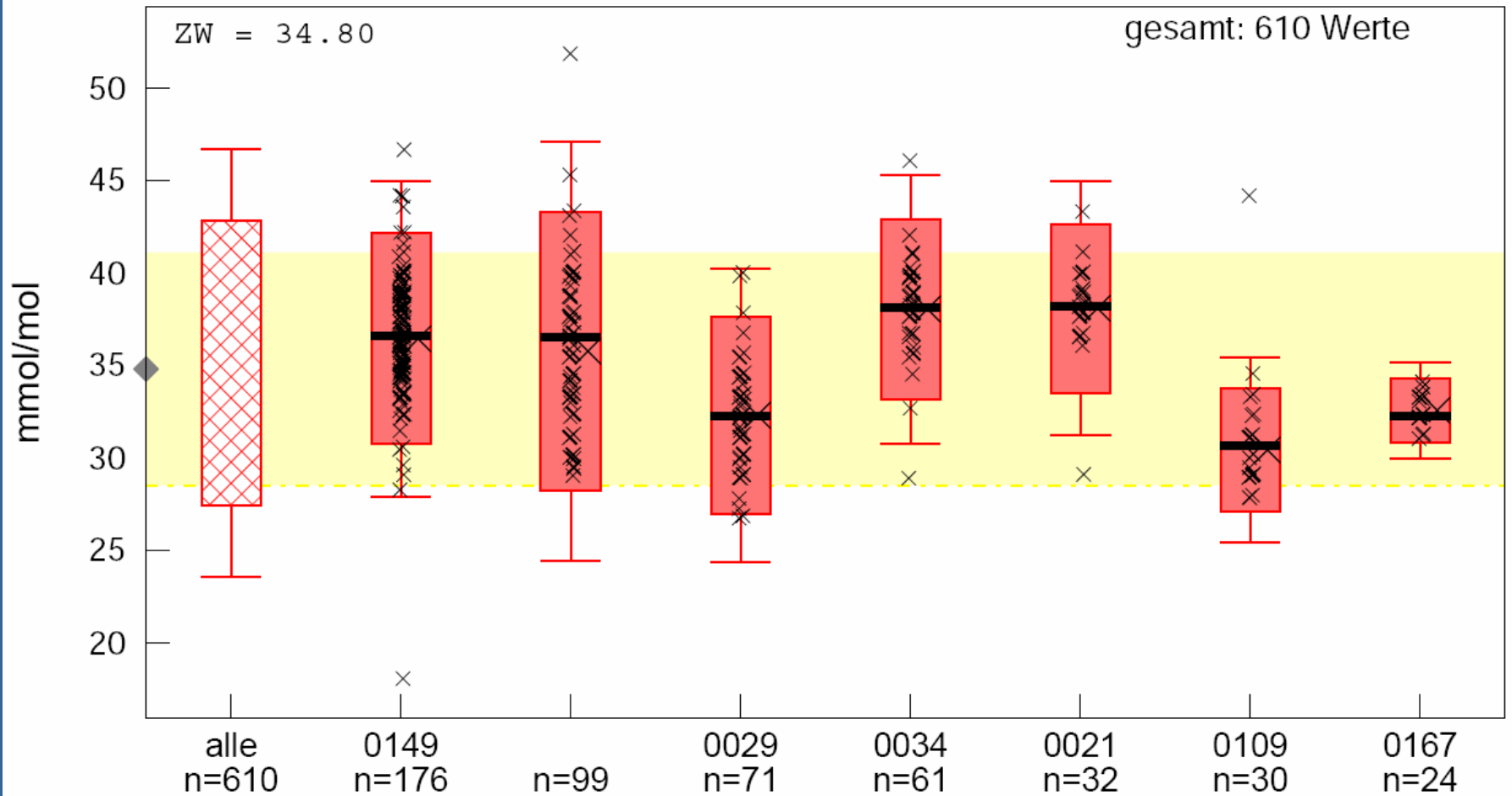
NGSP Werte [%]  
in  
IFCC Werte [mmol/mol]

$$\text{IFCC [mmol/mol]} = (\text{NGSP [%]} - 2.15) / 0.0915$$



# HbA<sub>1c</sub> Ringversuch Mai 2009

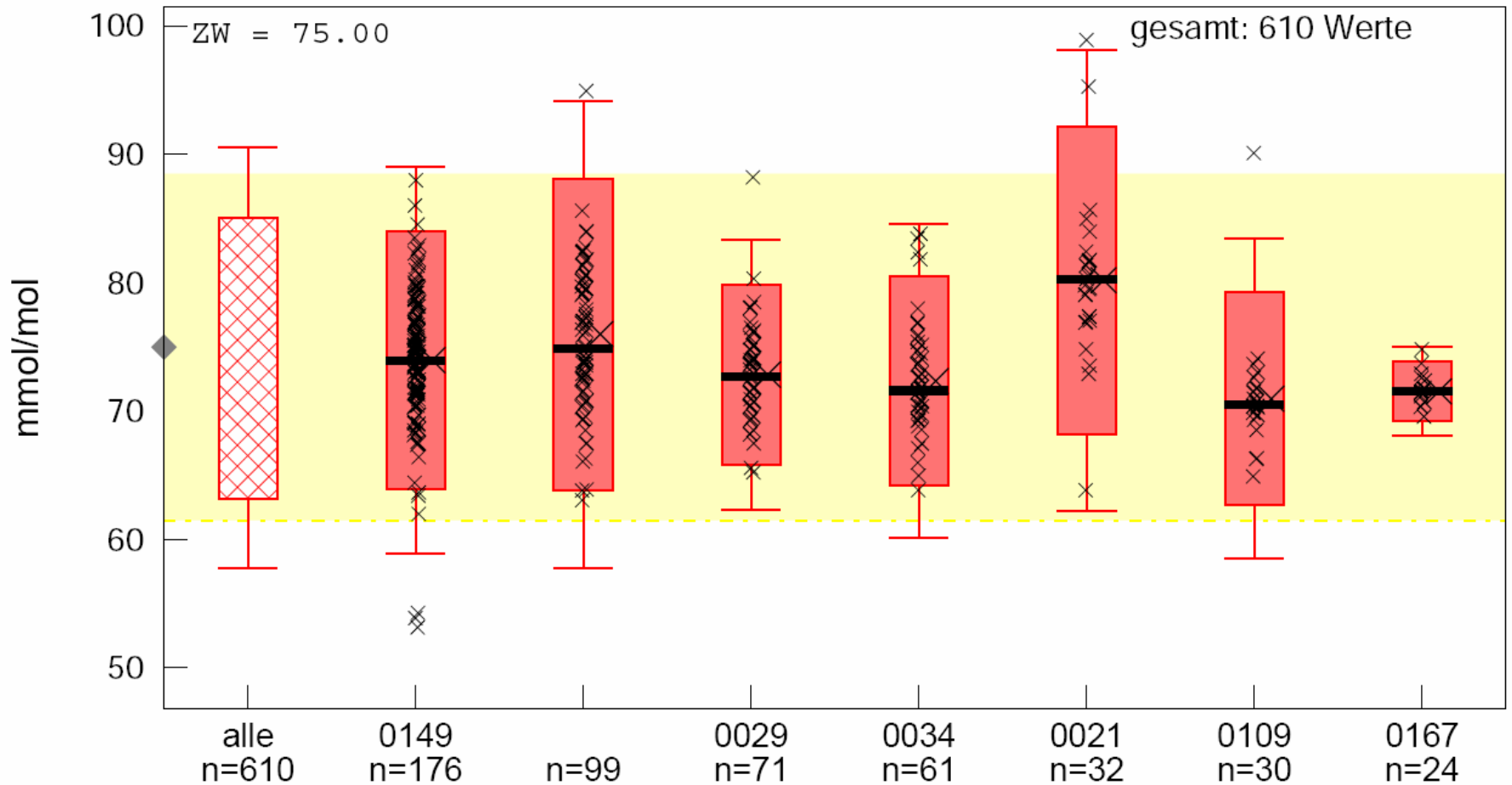
## Probe 31





# HbA<sub>1c</sub> Ringversuch Mai 2009

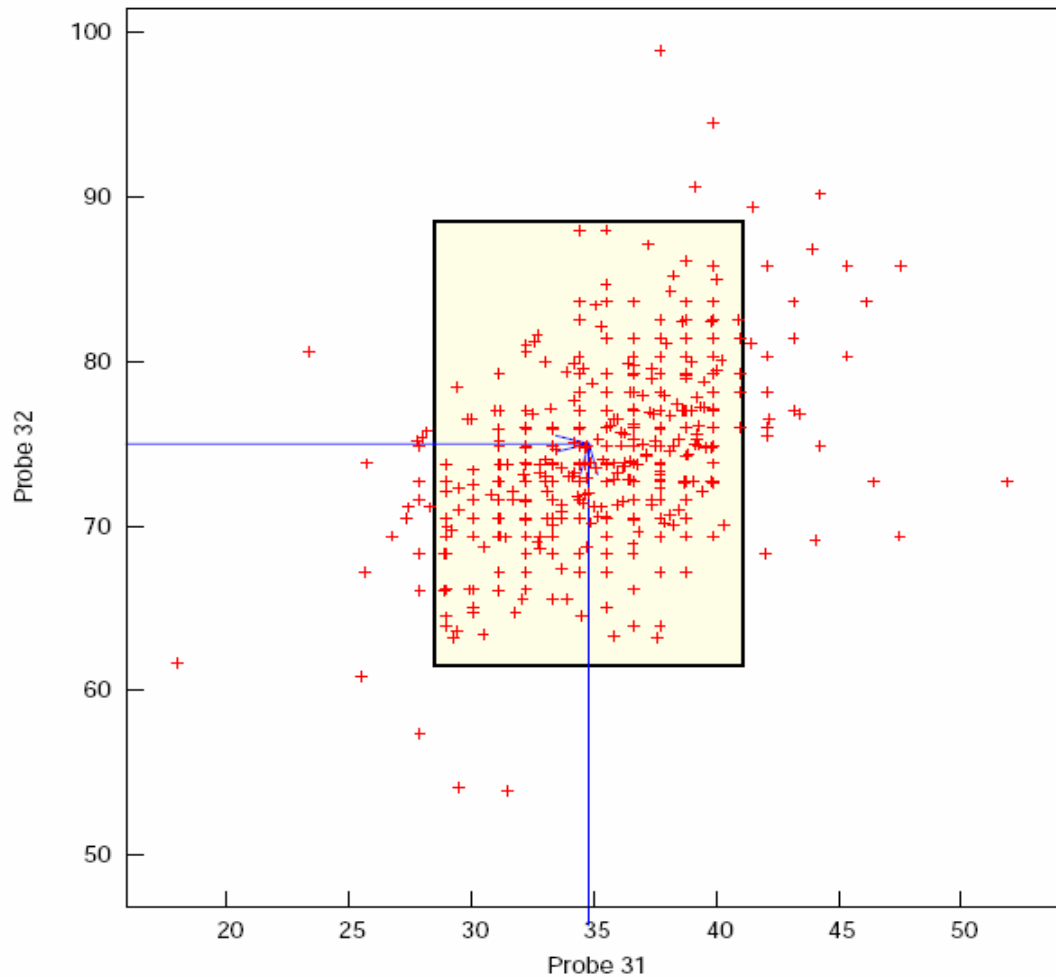
## Probe 32





# HbA<sub>1c</sub> Ringversuch Mai 2009

Programm A + B Mai 2009  
HbA<sub>1c</sub> (145-2)





Clinical Chemistry 54:6  
1018–1022 (2008)

Endocrinology and Metabolism

---

## Modified HPLC-Electrospray Ionization/ Mass Spectrometry Method for HbA<sub>1c</sub> Based on IFCC Reference Measurement Procedure

Patricia Kaiser,<sup>1\*</sup> Theodorus Akerboom,<sup>2</sup> Petra Molnar,<sup>1</sup> and Hans Reinauer<sup>1</sup>

---



# Modifizierte chromatographische Bedingungen

## Reversed Phase C12 Säule (Jupiter™ Proteo 2.0 x 50 mm, 4 µm)

### Elutionsbedingungen:

Eluent A: 0.1 % Ameisensäure in Wasser

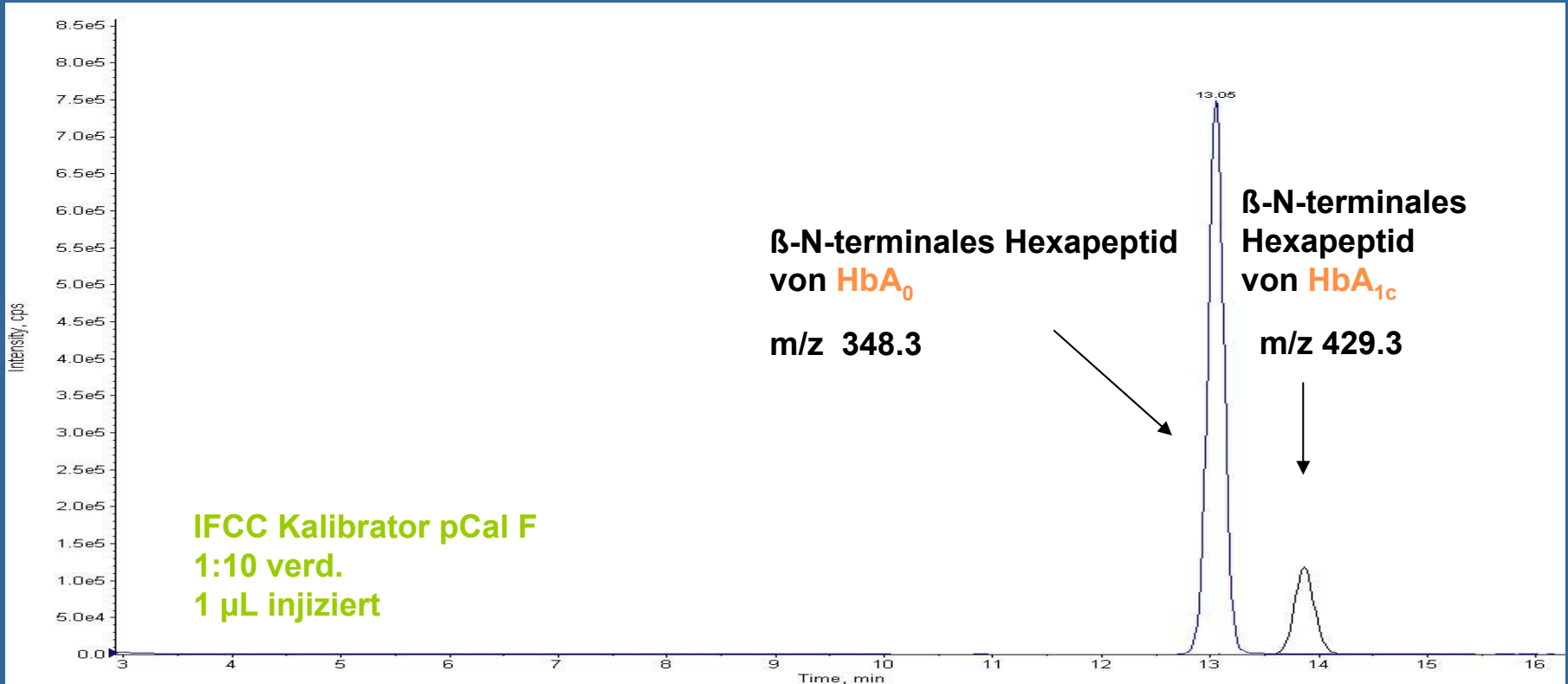
Eluent B: 0.1 % Ameisensäure in Acetonitril

Zeit	[min]	0	3	9	16.5	16.6	19.5	19.6	28.0
	[% B]	0	0	6	6	100	100	0	stop

Flussrate: 300 µl / min



# Modifizierte chromatographische Bedingungen





# Modifizierte chromatographische Bedingungen

## Unpräzision und Unrichtigkeit

<b>RMW</b> [mmol/mol HbA <sub>1c</sub> ]	<b>n</b>	<b>mean ± SD</b> [mmol/mol HbA <sub>1c</sub> ]	<b>CV</b> [%]	<b>bias</b> [%]
<b>32.1</b>	4	31.9 ± 0.60	1.86	- 0.78
<b>32.4</b>	4	32.7 ± 0.30	0.84	+ 1.00
<b>84.8</b>	4	84.7 ± 0.60	0.71	- 0.09
<b>85.8</b>	4	85.1 ± 1.2	1.41	- 0.87



INSTAND e. V.

**Vielen Dank  
für Ihre Aufmerksamkeit**

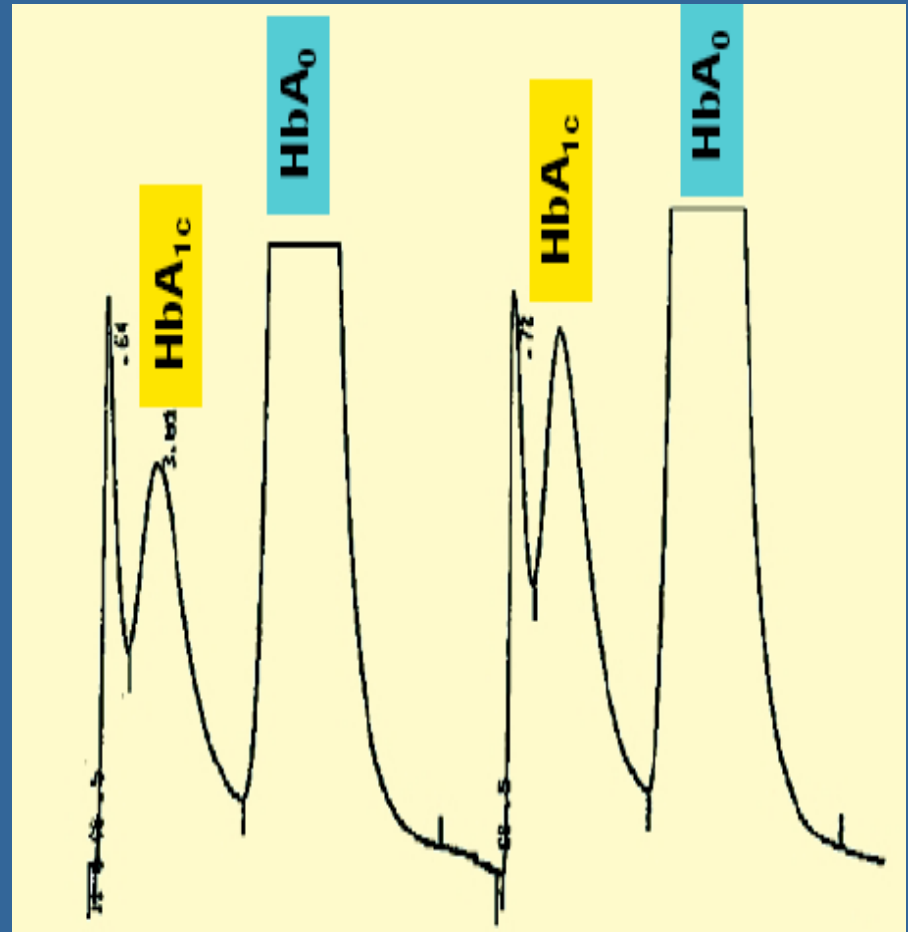


# DCCT / NGSP calibration (according to Goldstein et al.)

HPLC method with  
ion exchange column

- no separation of HbA<sub>1c</sub>, HbF and carbamylated haemoglobines
- interference of HbA<sub>0</sub> with glycated haemoglobines
- interferences with abnormal haemoglobines

→ 2.1 % bias (abs.)



# $\beta$ -Kette von verschiedenen Hämoglobinen (N-Term. AA 1-9)

- Val-His-Leu-Thr-Pro-**Glu**-Glu-Lys-Ser **HbA**
- Val-His-Leu-Thr-Pro-**Val**-Glu-Lys-Ser **HbS**
- Val-His-Leu-Thr-Pro-**Val**-Glu-Lys-Ser **HbC**
- **Gly**-His-**Phe**-Thr-**Glu**-Glu-**Asp**-Lys-**Ala** **HbF**  
1 3 6 9 AA



# Wie entstehen Standards ?

## Bedarf für Standardisierung

1. Vergleichbarkeit
2. Richtigkeit
3. Präzision



## Wiss. Fachgesellschaften

national  
international



## Arbeitsgruppen



## Referenzmessverfahren nach ISO 15193



Zertifiziertes Referenzmaterial (WHO; IRMM; NIBSC)