



DETERMINATION OF GLYCATED HAEMOGLOBIN HbA1c IN AUTOPSY MATERIAL USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY IONISATION TANDEM MASS SPECTROMETRY (HPLC-ESI-MS)

Krzysztof TUTAJ, Krzysztof BAŃKA, Grzegorz BUSZEWICZ, Grzegorz TERESIŃSKI, Roman MADRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University, Lublin, Poland

Abstract

Glycated haemoglobin (HbA1c) contains the stable adduct of glucose with the N-terminal group of the β chain. To date, attempts to use HbA1c determinations for autopsy diagnostics of intravital metabolic abnormalities have been based on blood tests designed for clinical purposes, which neglected validation of *post-mortem* haemolysis and background effects. The aim of the present study was thus to design such a procedure of HbA1c determinations using HPLC-ESI-MS, which could be useful for autopsy diagnostics and to compare the results obtained using this method and other immunological techniques. For this purpose, the HPLC-ESI-MS method designed and approved by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) was modified in such a way that the erythrocyte centrifugation phase was omitted (the haemolysate of whole blood was digested with endoproteinase). The hexapeptide standards were replaced with glycated haemoglobin standards exposed to digestion. Moreover, the HPLC conditions were changed – the steep gradient was replaced with a linear one, in order to obtain better separation of nonglycated hexapeptide from glycated hexapeptide and from the background. No essential changes in ESI-MS conditions were necessary. Complete validation of the modified method showed its high specificity, accuracy, precision. Furthermore, a linear relation between HbA1c concentration and signals from ions 429 and 857 m/z (mass-to-charge-ratio) was demonstrated. A comparison of HbA1c concentrations (in autopsy blood samples) determined using the modified IFCC reference method and two other immunological techniques (i.e. Konelab and Cobas) did not reveal statistically significant differences. It follows that each of the compared methods may be used for *post-mortem* diagnosis of diabetes, but due to the high specificity of detection of glycated hexapeptides by the HPLC-ESI-MS method, it should be considered as the reference one.

Key words

Glycated haemoglobin; HPLC-ESI-MS; *Post-mortem* diagnosis of diabetes.

Received 30 January 2009; accepted 27 April 2009

1. Introduction

The glycation process is a result of a spontaneous reaction between the aldehyde group of a monosaccharide (usually glucose) and free amine groups of peptides [20, 21], such as haemoglobin (Hb), albumin, lipoprotein or peptides affecting coagulation. Glycated haemoglobin consists of several fractions that dif-

fer not only in location of the glycated amine group but also in the type of the attached monosaccharide. The biggest fraction of glycohaemoglobin (75–80%) is, however, glycated haemoglobin HbA1c, which is produced in a two-step non-enzymatic reaction between D-glucose and an N-terminal amine group of the haemoglobin β chain (HbA, HbA0), which constitutes 97% of the total haemoglobin in the human body [2].

The decisive factors for the rate of this process and the amount of stable form of HbA1c are glucose blood concentration and the duration of the hyperglycemia. On the other hand, the lifetime of erythrocytes (ca. 100–120 days) means that the HbA1c level reflects the mean level of glucose in blood during the last two-three months [9, 21]. Determination of HbA1c in diabetes treatment monitoring is commonly used due to the possibility of retrospective estimation of treatment effects [1, 29] and also the fact that in the case of good metabolic balance, the percentage of HbA1c should be equal to 6–7% [1, 23].

Death caused by coma related to hyperglycemic ketoacidosis or hypoglycemia is possible for any kind of diabetes [7]. However, because of rapid anaerobic glycolysis, it is impossible to show *post-mortem* that hypoglycemia occurred intravitaly. Long-term hyperglycemia can be diagnosed *post-mortem* but only in an indirect way, for example, by determination of glucose and lactic acid concentration in the vitreous body [25] or by determination of the ketone bodies level [28]. Nevertheless, an elevated concentration of these compounds in blood can be a consequence not only of diabetic ketosis but also of malnutrition, hypothermia, acetone or isopropanol poisoning or alcoholic ketoacidosis [4, 17, 27].

Determination of HbA1c in *post-mortem* blood [9, 19, 31] provides an opportunity for both *post-mortem* diagnosis of diabetes and isolation of those cases of ketonemia with an etiology that is non-diabetic [28]. HbA1c determination should thus be used not only in clinical diagnosis, but also in sudden and unexpected death diagnosis, for example in the case of drivers, who were killed in traffic accidents – since undiagnosed and untreated diabetes can cause cardiac standstill [16, 26]. This is an important problem, because the percentage of undiagnosed diabetes in United States is ca. 30–50% of the total diabetic population (7% of the total population) [11]. Such a high percentage of people burdened with a risk of complications, obligates one to consider it as a potential cause of both the sudden death and the accident [33].

For the purposes of clinical diagnosis, the HbA1c concentration is determined using enzymatic [22, 24] and chromatographic methods: ions exchange and affinity [8, 10, 13]. The main analytical problem is related to the heterogeneity of human haemoglobin as well as its different known forms and bindings, for example acetyl-Hb which is produced during pharmacotherapy with aspirin or carbamyl-Hb in the course of uraemia [2, 32]. Inaccuracy of determination can be also influenced by aldimine – an unstable precursor of glycohaemoglobin (for healthy persons, aldimine con-

stitutes 5–8% of the total amount of HbA1, for diabetics even up to 30%), which is determined together with the ketoamine form of HbA1c using methods mentioned above. This is the reason for obtaining results which are slightly elevated [5, 10, 21].

For these reasons, the International Federation of Clinical Chemistry has developed and now recommends two new HPLC methods [14], one of which is a combination of liquid chromatography and capillary electrophoresis (HPLC-CE), and the other is high performance liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). Both methods are comparable and specific for glycated N-terminal hexapeptides from the chain of HbA [14]. This is a consequence of the first step of analysis, during which N-terminal fragments of the chain are cleaved from the haemoglobin molecules by specific endoproteinase (Glu-C) (which leads to formation of glycated and non-glycated hexapeptides). During the second step, the hexapeptides are separated and determined quantitatively, for which a calibration mixture of standards (glycated and non-glycated hexapeptides) is used.

The first attempts to determine the concentration of HbA1c in *post-mortem* blood samples were undertaken in 1983, i.e. a few years after implementation of this parameter for monitoring of glycemia in diabetics [3, 6, 18]. It was found that when the spectrophotometric method was used with barbituric acid [6], the concentration of HbA1c in *post-mortem* blood was slightly higher than the concentration in control samples, i.e. in blood collected from healthy volunteers. In later years, affinity chromatography was introduced for determination of HbA1c concentration [12]. The next developed method, based on electroosmosis, did not, however, enable differentiation between *post-mortem* blood samples collected from healthy men and diabetics [15].

According to Chen et al. [6], who investigated *post-mortem* blood samples, HbA1c is stable in a corpse for at least 36 hours. Hindle et al. [12] found that there is no significant change in HbA1c concentration in blood samples after 40 hours of storage at 4°C. However, it was also observed by Chen et al. [6] that HbA1c concentration was higher not only in the case of all diabetics, but also in 30% of all remaining cases examined – it was established that these (latter) persons had undergone anti-tumor treatment or had had steroids therapy. A higher level of HbA1c in *post-mortem* blood samples for 11% of healthy men was also found by Hindle et al. [12].

Unfortunately, chemical and immunological methods as well as turbidimetric analysis and HPLC can provide false positive results [6, 15] or be inapplicable

to analysis of biologically degraded blood samples [34].

The latest investigations of HbA1c in *post-mortem* blood samples are based on implementation of immunoturbidimetric analysis and HPLC, i.e. methods routinely used in clinical diagnosis. However, the immunoturbidimetric method used by Winecker et al. [34] turned out to be useful only for 80% of the investigated blood samples. The analysis of the remaining blood samples (20%) was impossible because of clots or it turned out to be impossible to determine total haemoglobin for other reasons. This was the main disadvantage of all methods used before 2002. Moreover, Goullé et al. [9] noticed, when using the HPLC method, a risk of interferences between the chromatographic signal from HbA1c and peaks of other components of denatured blood samples.

2. Aim of the study

The aim of the investigations was to modify the two-step method recommended by the IFCC – which is based on haemoglobin treatment using a proteolytic enzyme and separation of peptides obtained using HPLC coupled with mass spectrometry [14] – in order to enable determination of the HbA1c concentration in *post-mortem* blood samples.

A comparison of results obtained using the modified HPLC method with results obtained using the automatic COBAS INTEGRA 400 Plus analyser and the Konelab 60i analyser (i.e. two immunological methods routinely used in clinical diagnosis) was also planned.

3. Materials, apparatus and methods

3.1. Materials and reagents

The blood samples for analysis were collected during routine control examinations. The samples were collected from patients who were being treated for controlled diabetes (group A, $N = 5$), uncontrolled diabetes (group B, $N = 5$) and from healthy men (group C, $N = 5$). Group D was made up of 5 samples collected from deceased diabetics, among which 3 samples were taken from corpses, where acetonemia > 250 mol/l [28] was diagnosed during routine determination of ethanol concentration using the GC method. The samples from living persons were collected into 2 vials (per person). EDTA solution was present in one of the vials, and this sample was used only for immunologi-

cal analysis. The *post-mortem* blood samples were not preserved. Initial preparation of unpreserved (*post-mortem* and intravital) blood samples consisted in centrifugation in order to eliminate clots.

Commercially available blood samples with known concentration of glycosylated haemoglobin were used as standards for calibration purposes: 4.8; 8.2; 10.9 and 13.9% (Sentinel, Italy).

Endoproteinase Glu-C (E.C. 3.4.21.19) from the V8 strain of *Staphylococcus aureus* (Sigma P2922, United States) was applied to blood peptides digestion. It was less purified (and cheaper) in comparison to the endoproteinase used in the reference method, but its specific activity, i.e. its ability to hydrolyse a peptide bond at the end of C-terminal of glutamic acid (Glu, E) residue in acid pH, was well known. It was expected that 8 peptides would be obtained as a result of digestion of the chain of haemoglobin (Fig. 1), including N-terminal hexapeptide VHLTPE (N-valine-histidine-leucine-threonine-proline-glutamic acid-C).



Fig. 1. Sequence of haemoglobin β -chain – the points of intersection by endoproteinase Glu-C are marked and the N-terminal hexapeptide is isolated.

Moreover, solutions of KCN, $K_3Fe(CN)_6$, MES, MRFA, (tetrapeptide: methionine-arginine-phenylalanine-alanine), Na_2EDTA , $NaHCO_3$ and Triton X-100 (Sigma, United States), CH_3CN of LC-MS purity (Riedel-de Haën, Germany) CF_3COOH (TFA) for MS (Fluka Chemie, Germany), NH_3 , CH_3CO_2H and $NaOH$ (Merck, Germany) as well as deionised water filtered by Milli-Q (Millipore, United States) were used.

3.2. Equipment

The peptides separation process was performed using a Thermo Finnigan Surveyor liquid chromatograph equipped with a quaternary gradient pump and an automatic injector coupled with an LCQ Advantage Max ion trap mass spectrometer (Finnigan, San Jose, CA, United States). An electrospray (ESI) was used as

the ionisation method and positive ions were analysed. Both the liquid chromatograph and the mass spectrometer were controlled using X'calibur software, which was also used for data processing.

3.3 Sample preparation

In order to establish a suitable proportion between amount of haemoglobin and endoproteinase, firstly the concentration of total haemoglobin in investigated blood samples was determined by applying a method using Zjistr reagent modified by Worek et al. [35]. Afterwards, the investigated blood was diluted with phosphate buffer (50 mM MES, 10 mM KCN, 1 mM Na₂EDTA, NaOH to obtain pH = 6.2) in order to establish a concentration of 50 mg/l of haemoglobin. The dilution effect was monitored by repeated determination of Hb concentration. Next, to a volume of sample containing 1 mg of Hb, 50 μ l (30 μ g) of endoproteinase Glu-C was added, which had previously been diluted in deionised water to obtain a concentration of 600 μ g/ml (which corresponds to proteolytic activity equal to 312.5 UN/ml). Then, the sample was topped up with a digestion buffer (50 mM NH₄, CH₃CO₂H, pH 4.3) to a volume of 0.5 ml. This mixture was incubated for 18 hours at 37°C, and the reaction was stopped by freezing at -70°C. After centrifugation of the defrosted sample (20,000 g for 5 minutes), the supernatant was analysed using the HPLC-ESI-MS method.

3.4. HPLC-ESI-MS chromatographic procedure

The glycated and non-glycated hexapeptides present in the supernatant were separated at 50°C using a Zorbax SB-CN 150 \times 2.1 (5 mm) chromatographic column with a Zorbax 300SB-C3 2.1 \times 12.5 (5 mm) pre-column produced by Agilent (United States). A binary gradient system with mobile phase flow 0.3 ml/min was applied. At the beginning, the flow phase contained 0.025% TFA (component A) water solution. After 1 min, acetonitrile with 0.023% TFA (component B) was connected to the system; the participation of component B in the mobile phase was increased gradually up to 70% after 28 minutes and 100% after 30 minutes. After 37 minutes, the starting conditions (i.e. 100% of component A) were gradually restored in 13 minutes. The whole chromatographic procedure took 50 minutes. The volume injected was 10 μ l.

The optimal parameters for the analysis of glycated and non-glycated hexapeptides were determined as: capillary voltage – 4.5 kV; capillary temperature = 200°C;

ionising gas – nitrogen at a flow rate of 70 arb (arbitrary unit of LCQ instrument); supporting gas – nitrogen flowing at 10 arb. MRFA was used for calibration of the mass spectrometer. For quantitative analysis, the ions monitoring procedure in the range of 300–1000 m/z (full scan mode) was used. The chromatographic signal for molecular ions [M+2H]²⁺ and [M+H]⁺ of glycated hexapeptide was registered for m/z = 429 and 857, while for non-glycated hexapeptide – for m/z = 348 and 695 (see Table I and Figure 2). The percentage content of HbA1c was calculated from the ratio of the signal area of the glycated hexapeptide to the total signal area of both hexapeptides (glycated and non-glycated) – Figure 4.

TABLE I. CHROMATOGRAPHIC PARAMETERS OF HEXAPEPTIDES ANALYSED USING THE HPLC-ESI-MS METHOD

Analyte	Retention time [min]	Monitored ions [m/z]
Hexapeptide HbA0	9.74	348 [M+2H] ²⁺ 695 [M+H] ⁺
Hexapeptide HbA1c	10.62	429 [M+2H] ²⁺ 857 [M+H] ⁺

Due to the fact that there were no commercial hexapeptide standards available, the MS-MS method was used for identification and confirmation of ions structure. The normalised collision energy was equal to 45% and the ions were monitored in full scan mode in the range of m/z 95–1000.

3.5. Validation

Each of the standardised concentrations of HbA1c (4.8; 8.2; 10.9; 13.9%) was treated eightfold with the digestion procedure described in section 3.3. Next, the level of both hexapeptides (glycated and non-glycated) in the samples was determined. The haemolysate of blood collected from corpse was used as a blind test; it was prepared without the digestion procedure (which was necessary because of the presence of a certain amount of HbA1c in all blood). It was found that the proposed method is fully specific (Figure 2 and 3).

As a limit of quantitation (*LOQ*), the value of 4.8% was assumed, i.e. the lowest HbA1c concentration of the standard solutions used in the preparation of the calibration curve (Figure 2).

The calibration curve was linear in the concentration range 4.8–13.9% with a correlation coefficient

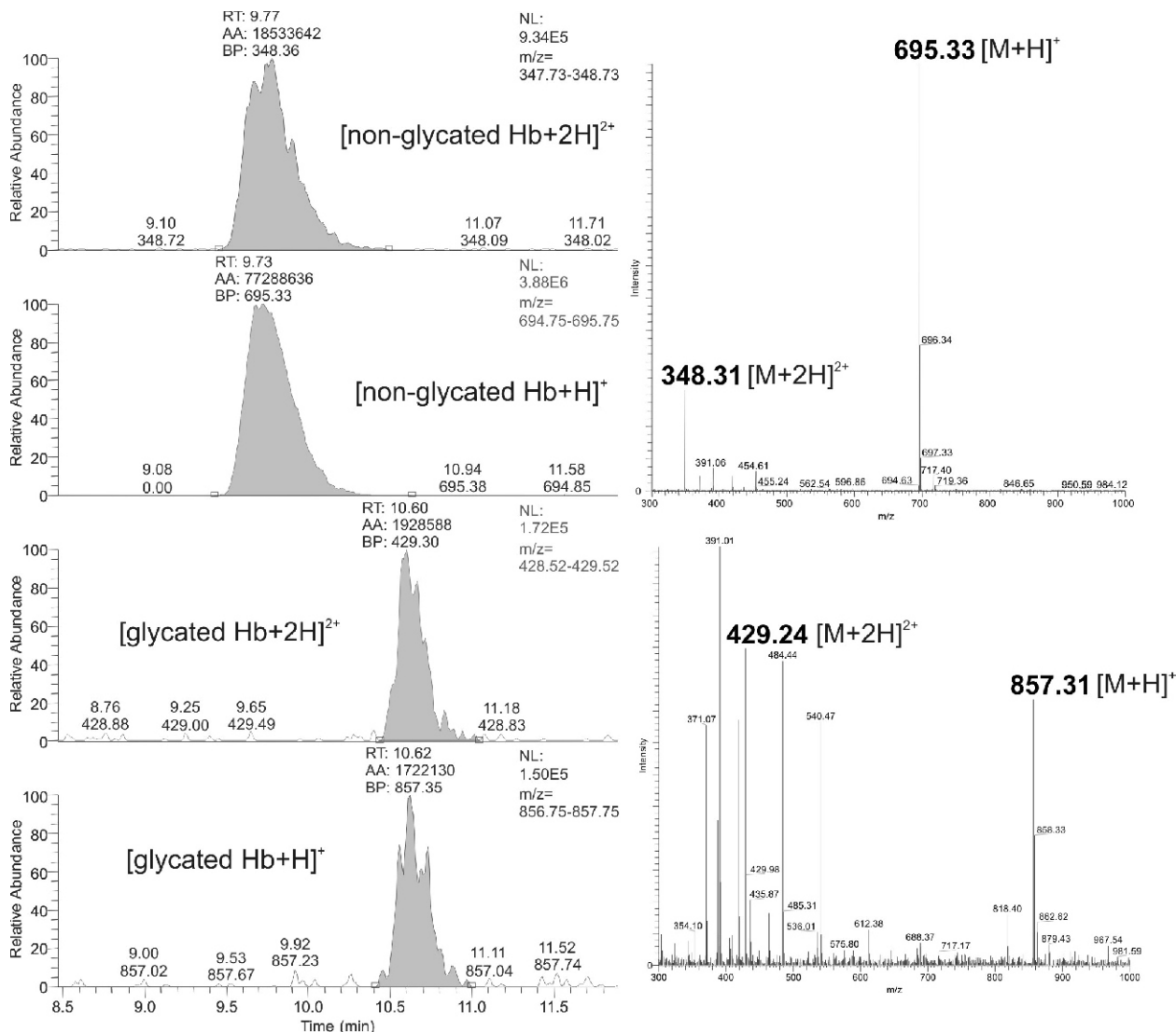


Fig. 2. Fragment of chromatogram and mass spectrum of glycated and non-glycated hexapeptide from a standard blood sample where the concentration of HbA1c was 4.8%.

equal to 0.977 (Figure 4). The parameters defining the accuracy and precision of HbA1c determination are presented in Table II.

3.6. Determination of Hb1Ac with immunological methods

Immunoturbidimetric methods, which are nowadays used for routine clinic examinations, were also applied in the determination of the HbA1c concentration in the samples. The COBAS INTEGRA 400 Plus automatic analyser (Roche Diagnostics, Germany) as well as the Konelab 60i (Thermo, Finland), which, in the case of analysis of fresh blood samples with the addition of EDTA, fulfils requirements of IFCC standardisation procedure [30], were used. The following

equations which take into account the concentration of Hb, were used to determine the level of HbA1c:

$$\text{HbA1c [\%]} = 0.915 \left(\frac{\text{HbA1c [g/l]}}{\text{Hb [g/l]}} \right) 100 + 2.15$$

(for Konelab 60i);

$$\text{HbA1c [\%]} = \left(\frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} \right) 87.6 + 2.27$$

(for COBAS INTEGRA 400 Plus).

3.7. Statistical analysis of the obtained results

The results of HbA1c determination using the HPLC-ESI-MS method (after digestion of haemoglobin) and immunological methods were analysed using

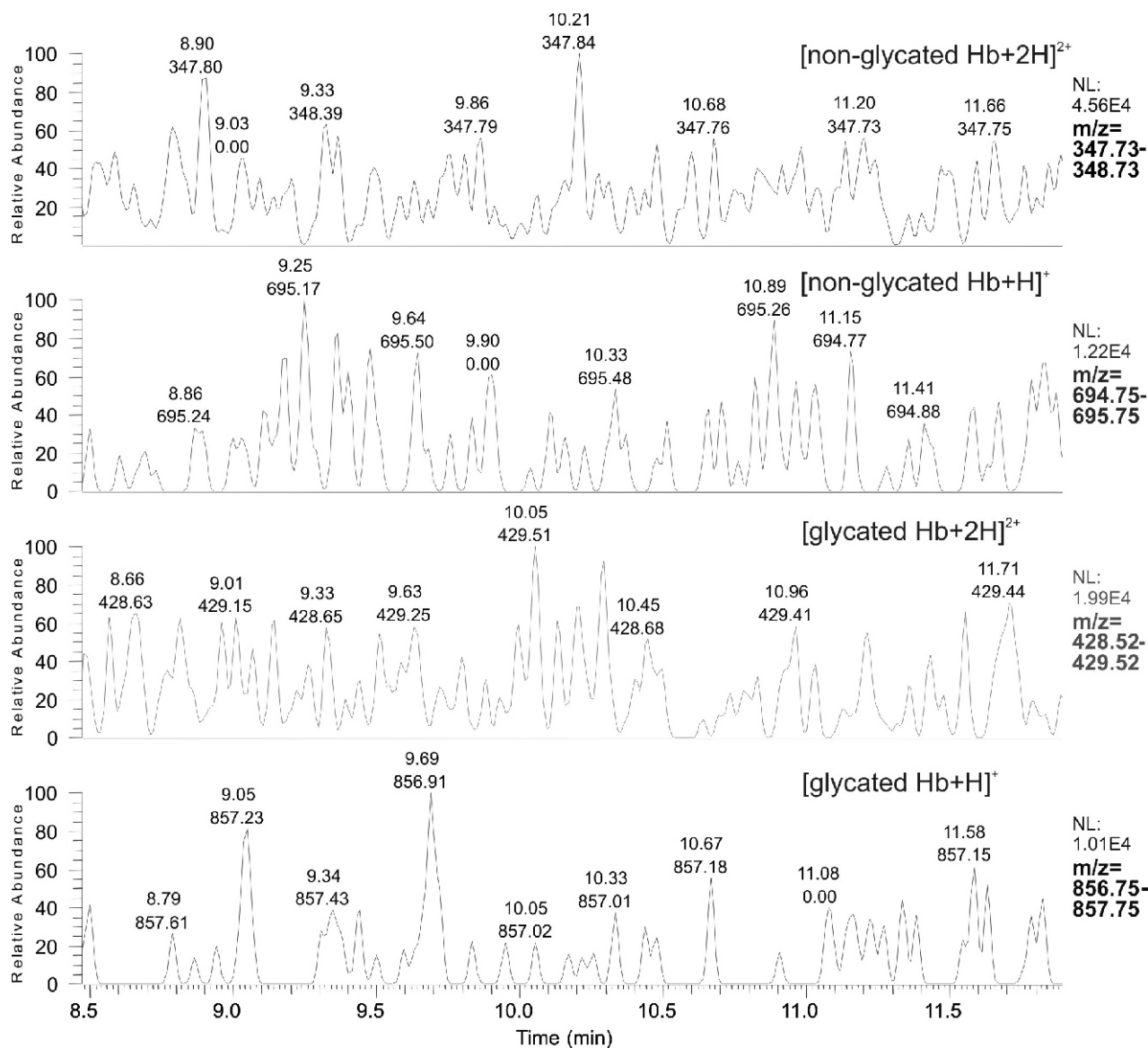


Fig. 3. Fragment of chromatogram (corresponding to the range presented in Figure 2) of analysis of blood sample collected from corpse, without enzyme (blind test) – lack of signals interfering with signals from glycated and non-glycated hexapeptide ions.

TABLE II. ACCURACY AND PRECISION OF THE HPLC-ESI-MS METHOD USED FOR HBA1C DETERMINATION, N = 8

Provided concentration [%]	Mean found concentration [%]	Mean accuracy [%]	SD [%]	Precision [% RSD]
4.8	5.1	107	0.39	8.12
8.2	8.0	98	0.51	6.17
10.9	10.1	93	0.58	5.34
13.9	14.4	104	0.66	4.79

Statistica 6.0 (Statsoft, United States), with application of the Wilcoxon matched pair test. Moreover, the correlation between the results obtained using the

HPLC-ESI-MS method and the COBAS and Konelab methods was compared using NCSS software.

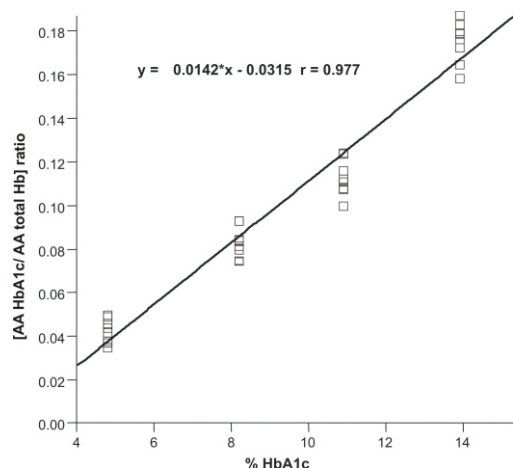


Fig. 4. Calibration curve of HbA1c in the concentration range 4.8%–13.9%.

4. Results and discussion

A literature review indicates that the present work constitutes the first report of determination of the HbA1c level in *post-mortem* blood using HPLC-ESI-MS analysis of the glycosylated N-terminal of the α -chain of haemoglobin. Using the developed method, known potential factors which increase the risk of analytical errors during determination of HbA1c concentration [10, 35] are minimised. This is due to the usage of whole blood haemolysate and simultaneous analysis of the total haemoglobin haemolysis products (including HbA1c). Moreover, in the final calculations of the concentration, only the ratio of the glycosylated hexapeptide signal area to the signal area of all hexapeptides is used. The obtained result is therefore independent of the level of Hb.

The digestion of whole blood by V8 proteinase can lead to formation of different peptides (which theoretically can interfere with the N-terminal hexapeptide of the haemoglobin α -chain, Figure 1). However, during the analysis of digested as well as non-digested (blind test) blood samples using the developed method described in section 3.3, peaks whose molecular masses and retention times were close to those of HbA1c and HbA0 were not observed. It was found that the HPLC-ESI-MS method, in which the gradient separation of peptides was applied, was highly specific (Figure 2 and 3).

The HPLC-ESI-MS method of HbA1c determination modified by the authors, is linear ($r = 0.977$) in the whole concentration range of HbA1c (which is necessary in *post-mortem* diagnosis of long-term hyperglycemic conditions) (Figure 4). Moreover, it is accurate and precise (see Table II).

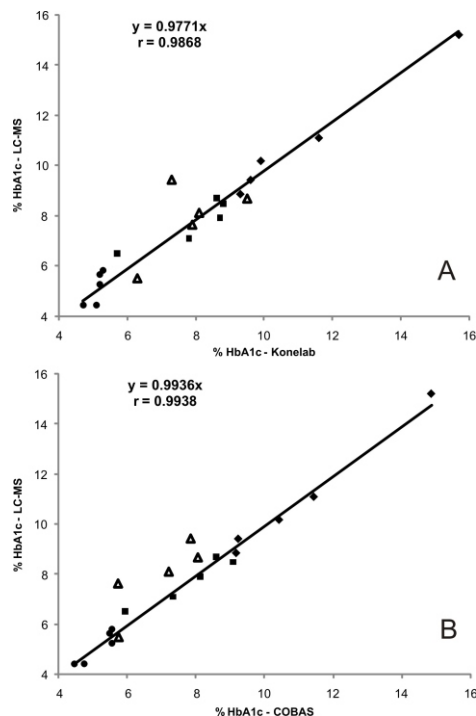


Fig. 5. Correlation of results of determination of HbA1c concentration using the HPLC-ESI-MS (LC-MS) method and Konelab (A) as well as LC-MS and COBAS (B) in samples collected from diabetics (\blacklozenge – uncontrolled glycemia and \blacksquare – controlled glycemia) and healthy patients (\bullet). The results of HbA1c determination in *post-mortem* blood samples (\square) were not taken into account during determination of correlation factor (r).

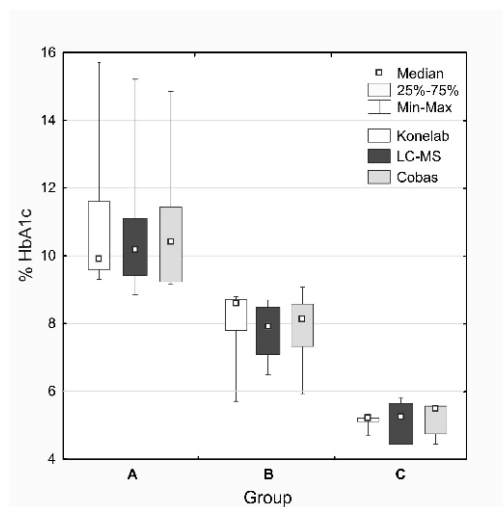


Fig. 6. Comparison of HbA1c levels determined using Konelab, HPLC-ESI-MS and COBAS methods in blood samples collected from diabetics (A – uncontrolled glycemia and B – controlled glycemia) and healthy patients – C.

A comparison of the results of HbA1c determinations obtained using the HPLC-ESI-MS method and immunoturbidimetric methods concerning blood sam-

ples collected from living persons (Figure 5 and 6, groups A, B and C) did not reveal any statistically important variability (the Wilcoxon matched pair test, $P > 0.1$). A comparison of the results of blood analysis collected from living persons (A + B + C) obtained using the HPLC-ESI-MS method with results obtained by the Konelab and COBAS methods showed a high correlation ($r = 0.9868$ and $r = 0.9938$ respectively).

The differences between the results of HbA1c analysis in *post-mortem* blood samples (group D) obtained by the HPLC-ESI-MS method and both immunoturbidimetric methods were slightly greater in comparison to the results for blood samples collected from living persons (Figure 6). However, they did not reach the level of statistical significance ($P = 0.08$). Moreover, these differences were similar to those that occur in all cases of analysis when two independent analytical methods are used for chemical investigation of degraded biological material.

It was estimated that the total cost of the materials required for the analysis of one sample using the developed HPLC-ESI-MS method is € 8.5 and the time taken (for the repeatable activities) is about 2–3 hours. Nevertheless, it is worth making this effort in order to confirm or exclude the hypothesis that a road accident was caused by diabetes, or to decide whether ketonemia was caused by hypothermia or by different metabolic disorders.

5. Conclusions

1. The modified HPLC-ESI-MS method of analysis of HbA1c can be considered the method of choice for analysis of samples of *post-mortem* blood.
2. The Konelab and COBAS immunoturbidimetric methods can be applied to *post-mortem* blood analysis.

References

1. Genuth S. [et al.], American Diabetes Association: implications of the United Kingdom prospective diabetes study (position statement), *Diabetes Care* 2002, 25, suppl. 1, S28–S32.
2. Bry L., Chen P. C., Sacks D. B., Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin, *Clinical Chemistry* 2001, 47, 153–163.
3. Bunn H. F., Haney D. N., Gabbay K. H. [et al.], Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1975, 67, 103–109.
4. Buszewicz G., Teresiński G., Bańka K., Mądro R., Ocena przydatności diagnostycznej współczynnika α -hydroksymasłan/aceton w sędowo-lekarskiej diagnostyce nagłych zgonów, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2007, 57, 289–293
5. Camargo J. L., Felisberto M., Gross J. L., Effect of pre-analytical variables on glycohemoglobin measurements in routine clinical care, *Clinical Biochemistry* 2004, 37, 836–839.
6. Chen C., Glagov S., Mako M. [et al.], Post-mortem glycosylated hemoglobin (HbA1c): evidence for a history of diabetes mellitus, *Annals of Clinical and Laboratory Science* 1983, 13, 407–410.
7. DiMaio V. J. M., Sturner W. Q., Coe J. I., Sudden and unexpected deaths after the acute onset of diabetes mellitus, *Journal of Forensic Sciences* 1977, 22, 147–151.
8. Garlick R. L., Mazer J. S., Higgins P. J. [et al.], Characterization of glycosylated hemoglobins. Relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other proteins, *Journal of Clinical Investigation* 1983, 71, 1062–1072.
9. Goullé J. P., Lacroix C., Bouige D., Glycated hemoglobin: a useful post-mortem reference marker in determining diabetes, *Forensic Science International* 2002, 128, 44–49.
10. Guntinas M. B., Wissiack R., Bordin G. [et al.], Determination of haemoglobin A1c by liquid chromatography using a new cation-exchange column, *Journal of Chromatography B* 2003, 791, 73–83.
11. Harris M. I., Flegal K. M., Cowie C. C. [et al.], Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, *Diabetes Care* 1998, 21, 518–524.
12. Hindle E. J., Rostron G. M., Gatt J. A., The diagnostic value of glycated haemoglobin levels in post-mortem blood, *Annals of Clinical Biochemistry* 1985, 22, 144–147.
13. Huisman T. H., Henson J. B., Wilson J. B., A new high-performance liquid chromatographic procedure to quantitate hemoglobin A1c and other minor hemoglobins in blood of normal, diabetic, and alcoholic individuals, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1983, 102, 163–173.
14. Jeppsson J. O., Kobold U., Barr J. [et al.], Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2002, 40, 78–89.
15. John W. G., Scott K. W. M., Hawcroft D. M., Glycated haemoglobin and glycated protein and glucose concentrations in necropsy blood samples, *Journal of Clinical Pathology* 1988, 41, 415–418.
16. Jouven X., Lemaître R. N., Rea T. D. [et al.], Diabetes, glucose level, and risk of sudden cardiac death, *European Heart Journal* 2005, 26, 2142–2147.

17. Kanetake J., Kanawaku Y., Mimasaka S. [et al.], The relationship of a high level of serum beta-hydroxybutyrate to cause of death, *Legal Medicine* 2005, 7, 169–174.
18. Kernbach G., Picht S., Brinkmann B. [et al.], Postmortem diagnosis of diabetes mellitus by determination of Hb A1, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1983, 90, 303–308.
19. Khoo H. M., Robinson C. A., Brissie R. M. [et al.], Postmortem diagnosis of unsuspected diabetes mellitus established by determination of decedent's hemoglobin A1c level, *Journal of Forensic Sciences* 1999, 44, 643–646.
20. Krone C. A., Ely J. T., Ascorbic acid, glycation, glycohemoglobin and aging, *Medical Hypotheses* 2004, 62, 275–279.
21. Lapollaa A., Traldi P., Fedele D., Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins, *Clinical Biochemistry* 2005, 38, 103–115.
22. Liu L., Hood S., Wang Y. [et al.], Direct enzymatic assay for % HbA1c in human whole blood samples, *Clinical Biochemistry* 2008, 41, 576–583.
23. Sacks D. B., Bruns D. E., Goldstein D. E. [et al.], Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus, *Clinical Chemistry* 2002, 48, 436–472.
24. Sakurabayashi I., Watano T., Yonehara S. [et al.], New enzymatic assay for glycohemoglobin, *Clinical Chemistry* 2003, 49, 269–274.
25. Sippel H., Mottonen M., Combined glucose and lactate values in vitreous humour for postmortem diagnosis of diabetes mellitus, *Forensic Science International* 1982, 19, 217–222.
26. Spooner P. M., Sudden cardiac death: influence of diabetes, *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2008, 10, 523–532.
27. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., The influence of ethanol on the level of ketone bodies in hypothermia, *Forensic Science International* 2002, 127, 88–96.
28. Teresiński G., Buszewicz G., Mądro R., Acetonaemia as an initial criterion of evaluation of a probable cause of sudden death, *Legal Medicine* 2009, 11, 18–24.
29. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial, *Diabetes* 1996, 45, 1289–1298.
30. Tuula H., Mirja K., Hannu L. [et al.], Evaluation of a glycohemoglobin (HbA1c) assay on Konelab 60i analyzer, IFCC Euromedlab, XIX European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory medicine, Prague, Czech Republic, 27–31 May 2001 [www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_23387.pdf].
31. Valenzuela A., Postmortem diagnosis of diabetes mellitus. Quantitation of fructosamine and glycated hemoglobin, *Forensic Science International* 1988, 38, 203–208.
32. Weykamp C. W., Penders T. J., Muskiet F. A. J. [et al.], Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods, *Clinical Chemistry* 1993, 39, 1717–1723.
33. White V. L., Chaturvedi A. K., Canfield D. V. [et al.], Association of postmortem blood hemoglobin A1c levels with diabetic conditions in aviation accident pilot fatalities, U.S. Department of Transportation Federal Aviation Administration Final Report 2001, [www.hf.faa.gov/docs/508/docs/cami/0112.pdf].
34. Winecker R. E., Hammett-Stabler C. A., Chapman J. F. [et al.], HbA1c as a postmortem tool to identify glycemic control, *Journal of Forensic Sciences* 2002, 47, 1373–1379.
35. Worek F., Mast U., Kiderlen D. [et al.], Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood, *Clinica Chimica Acta* 1999, 288, 73–90.

Corresponding author

Grzegorz Buszewicz
Uniwersytet Medyczny
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
ul. Jaczewskiego 8
PL 20-090 Lublin
e-mail: g.buszewicz@am.lublin.pl

OZNACZANIE GLIKOWANEJ HEMOGLOBINY HbA1c W MATERIALE POŚMIERTNYM METODĄ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ SPRZEŻONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (HPLC-ESI-MS)

1. Wprowadzenie

Proces glikacji polega na samorzutnej reakcji grupy aldehydowej cząsteczki monosacharydu (najczęściej glukozy) z wolnymi grupami aminowymi białek [20, 21], takich jak hemoglobina (Hb), albuminy, lipoproteiny oraz białka układu krzepnięcia. Hemoglobina glikowana składa się z kilku frakcji różniących się nie tylko lokalizacją glikowanej grupy aminowej, ale także rodzajem połączonego z nią monosacharydu. Największą frakcją glikohemoglobiny (75–80%) jest jednak hemoglobina glikowana HbA1c, która powstaje dwustopniowo na drodze nieenzymatycznej reakcji D-glukozy z N-końcową grupą aminową łańcucha hemoglobiny (HbA, HbA0) stanowiącej u dorosłego człowieka około 97% całkowitej hemoglobiny [2]. Stężenie glukozy we krwi i czas trwania hiperglikemii decydują o szybkości tego procesu oraz ilości stabilnej formy HbA1c. Długość życia erytrocytów (około 100–120 dni) decyduje zaś o tym, że poziom HbA1c odzwierciedla średni poziom glukozy we krwi w ciągu ostatnich dwóch – trzech miesięcy [9, 21]. Oznaczanie HbA1c w monitorowaniu leczenia cukrzycy zaczęto powszechnie stosować po tym, jak wykazano, że pozwala na retrospektywną ocenę efektów leczenia cukrzycy [1, 29] oraz że w przypadku dobrego wyrównania metabolicznego odsetek HbA1c powinien wynosić 6–7% [1, 23].

W przebiegu każdego typu cukrzycy może dojść do zgonu [7] wskutek wystąpienia śpiączki związanej z hiperglikemiczną kwasica ketonową lub ostrą hipoglikemią. Pośmiertne wykazanie zażyciowej hipoglikemii nie jest jednak możliwe ze względu na szybką beztlenową glikolizę. Długotrwałą hiperglikemię można zaś wykazać pośmiertnie tylko pośrednio, np. przez oznaczanie stężenia glukozy i kwasu mlekowego w cieple szklistym [25], ewentualnie przez określenie poziomu ciał ketonowych [28]. Jednak ich podwyższone stężenie we krwi może być skutkiem nie tylko ketozy cukrzycowej, lecz również niedożywienia, wychłodzenia, zatrucia acetonem lub izopropanolem czy też poalkoholowej kwasicy ketonowej [4, 17, 27].

Oznaczanie HbA1c z użyciem krwi pobranej ze zwłok [9, 19, 31] stwarza szansę zarówno pośmiertnego rozpoznania cukrzycy, jak i wyodrębnienia tych przypadków ketonemii, które mają etiologię inną niż cukrzycowa [28]. Oznaczanie HbA1c powinno więc być wykorzystywane nie tylko w diagnostyce klinicznej, ale również w diagnostyce zgonów nagłych i niektórych zgonów

gwałtownych, np. w odniesieniu do kierowców, którzy zginęli w wypadkach komunikacyjnych – ponieważ niezdiagnozowana i nieleczona cukrzyca może prowadzić do nagłego zatrzymania akcji serca [16, 26]. Jest to istotny problem, bowiem w Stanach Zjednoczonych osoby z niezdiagnozowaną cukrzycą (7% całej populacji) stanowią około 30–50% ogólnej liczby chorych na tę chorobę [11], a tak wysoki odsetek osób obciążonych ryzykiem występowania powikłań okołocukrzycowych zobowiązuje do brania ich pod uwagę nie tylko jako przyczyny nagłego zgonu [19], ale również jako przyczyny zdarzenia [33].

Dla potrzeb diagnostyki klinicznej HbA1c oznacza się przy pomocy metod enzymatycznych [22, 24] oraz chromatograficznych: jonowymiennej i powinowactwa [8, 10, 13]. Ich wspólny problem analityczny stanowi niejednorodność hemoglobiny ludzkiej oraz to, że znane są jej różne połączenia, takie jak, np. acetyl-Hb podczas farmakoterapii aspiryną lub karbamyl-Hb w przebiegu mocznicy [2, 32]. Na niedokładność oznaczeń może mieć wpływ także nietrwały prekursor glikohemoglobiny – aldimina (u osób zdrowych stanowi ona 5–8% całkowitej ilości HbA1, a u cukrzyków nawet do 30%), która tymi metodami oznaczana jest łącznie z końcową ketoaminową formą HbA1c, co powoduje zawyżenie wyników [5, 10, 21].

Z tych względów Międzynarodowa Federacja Chemii Klinicznej IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) opracowała i poleca dwie nowe metody HPLC [14], z których jedna stanowi połączenie z elektroforezą kapilarną (HPLC-CE), a w drugiej wykorzystano spektrometrię mas jonów uzyskanych przez elektrorozpylanie (HPLC-ESI-MS). Obie metody są bowiem swoiste wobec glikowanych N-końcowych heksapeptydów z łańcucha Hb (HbA, HbA0) i porównywalne [14]. Wynika to stąd, że na pierwszym etapie tych metodyk swoista endoproteinaza (Glu-C) odszczepia od cząsteczek hemoglobiny N-końcowe fragmenty łańcuchów (co prowadzi do powstania heksapeptydów glikowanych i nieglikowanych), a na drugim etapie heksapeptydy te są rozdzielane i oznaczane ilościowo, przy czym do kalibracji stosuje się mieszaninę heksapeptydów (nieglikowanego i glikowanego).

Pierwsze próby oznaczeń stężenia HbA1c we krwi ze zwłok podjęto już w 1983 roku, czyli kilka lat po wprowadzeniu tego parametru do monitorowania glikemii u osób leczonych z powodu cukrzycy [3, 6, 18]. Okazało się wówczas, że spektrofotometryczna metoda z kwasem

tiobarbiturowym [6] dawała we krwi pobranej ze zwłok nieznacznie większe stężenia HbA1c niż te, które stwierdzano w materiale kontrolnym, tj. we krwi pobranej od osób zdrowych. W późniejszych latach do oznaczeń HbA1c wprowadzono metodę chromatografii powinowactwa [12]. Kolejna metoda oparta na elektroosmozie nie pozwalała natomiast na późniejsze różnicowanie osób zdrowych i cukrzyków [15].

Chen i in. [6], badając krew pobraną ze zwłok, stwierdzili co najmniej 36-godziną stabilność HbA1c w zwłokach, zaś Hindle i in. [12] nie obserwowali istotnych zmian w stężeniu HbA1c podczas przechowywania próbek krwi przez 40 godzin w temperaturze 4°C. Chen i in. [6] zaobserwowali jednak, że stężenie HbA1c podwyższone było nie tylko u wszystkich cukrzyków, ale również w 30% pozostałych przypadków, przy czym ustalono, że osoby te przeszły terapię przeciwnowotworową lub stosowały steroidy. W trakcie badań pośmiertnych zawyżony poziom HbA1c we krwi 11% osób, które nie chorowały na cukrzycę, wykazali także Hindle i in. [12].

Metody chemiczne, immunologiczne, turbidymetryczne oraz HPLC wykorzystywane do badania poziomu HbA1c mogą niestety dostarczać wyników fałszywie pozytywnych [6, 15] lub nie nadawać się do analizy biologicznie zdegradowanych próbek krwi [34].

W najnowszych pracach dotyczących oznaczania HbA1c we krwi pobranej ze zwłok wykorzystywano stosowaną rutynowo w diagnostyce klinicznej metodę immunoturbidymetryczną oraz metodę HPLC. Metoda immunoturbidymetryczna zastosowana przez Winecker i in. [34] okazała się jednak przydatna do oznaczeń jedynie 80% próbek krwi ze względu na to, że w pozostałych 20% były skrzepy lub z innych przyczyn niemożliwe okazało się oznaczenie hemoglobiny całkowitej, co stanowiło główną wadę wszystkich metod stosowanych do 2002 roku. W metodzie HPLC Goullé i in. [9] zauważyli natomiast ryzyko interferencji piku HbA1c z pikami innych związków powstających podczas denaturacji próbek krwi.

2. Cel pracy

Cel pracy stanowiła taka modyfikacja i standaryzacja zalecanej przez IFCC dwuetapowej metody polegającej na trawieniu hemoglobiny enzymem proteolitycznym i rozdzielaniu uzyskanych peptydów metodą HPLC oraz ich analizie za pomocą spektrometrii mas [14], by przy jej użyciu możliwe było oznaczanie HbA1c we krwi pobranej ze zwłok.

Zaplanowano także porównanie wyników uzyskanych za pomocą zmodyfikowanej metody z rezultatami oznaczeń HbA1c przy użyciu automatycznego analizatora COBAS INTEGRA 400 Plus i analizatora Konelab 60i

(tj. dwiema metodami immunologicznymi stosowanymi obecnie w diagnostyce klinicznej).

3. Materiały, aparatura i metody

3.1. Materiały i odczynniki

Materiał do analizy stanowiła krew pozostała po rutynowych badaniach kontrolnych. Pobrano ją od pacjentów leczących się z powodu cukrzycy niewyrównanej (grupa A, $N = 5$) i wyrównanej (grupa B, $N = 5$) oraz od osób, u których wykluczono cukrzycę (grupa C, $N = 5$). Grupę D stanowiły 2 próbki krwi pobrane od zmarłych chorujących na cukrzycę oraz 3 próbki takiej krwi ze zwłok, w której podczas rutynowego oznaczania etanolu metodą GC stwierdzono acetonemię $> 250 \text{ mol/l}$ [28]. W jednej z 2 fiolek, do których pobierano krew od osób żywych, znajdowało się EDTA – próbki te służyły wyłącznie do analizy metodami immunologicznymi. Krwi pobranej ze zwłok nie konserwowano. Wstępne przygotowanie krwi niekonserwowanej (zarówno od osób żywych, jak i ze zwłok) polegało na jej odwirowaniu w celu usunięcia skrzepów.

Materiałem do kalibracji były próbki krwi o znanych stężeniach hemoglobiny glikowanej 4,8; 8,2; 10,9 i 13,9% (Sentinel, Włochy).

Do trawienia białek krwi użyto endoproteinazy Glu-C (E.C. 3.4.21.19) ze *Staphylococcus aureus* szczepu V8 (Sigma P2922, Stany Zjednoczone), mniej oczyszczonej (czyli tańszej) niż zastosowana w metodzie referencyjnej, ale o znanej aktywności specyficznej polegającej na tym, że w kwaśnym pH hydrolizuje ona wiązanie peptydowe przy C-końcu reszty kwasu glutaminowego (Glu, E). W wyniku trawienia przez nią łańcucha hemoglobiny spodziewano się bowiem uzyskać 8 peptydów (rycina 1), w tym glikowany N-końcowy heksapeptyd VHLTPE (N-walina-histydyna-leucyna-treonina-prolina-kwas glutaminowy-C).

Zastosowano ponadto KCN, $K_3Fe(CN)_6$, MES, MRFA (tetrapeptyd: metionina-arginina-feniloalanina-alanina), Na_2EDTA i $NaHCO_3$ oraz Triton X-100 (Sigma, Stany Zjednoczone), CH_3CN o czystości LC-MS (Riedel-de Haën, Niemcy), CF_3COOH (TFA) do MS (Fluka Chemie, Niemcy), NH_3 , CH_3CO_2H i $NaOH$ (Merck, Niemcy) oraz wodę dejonizowaną filtrowaną przy użyciu systemu Mili-Q (Milipore, Stany Zjednoczone).

3.2. Aparatura

Rozdział peptydów przeprowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego Thermo Finningan Surveyor wyposażonego w czteroskładnikową pompę gradientową i automatyczny dozownik sprzężony ze spektrometrem mas typu pułapka jonowa LCQ Advantage Max (Fin-

ningan, San Jose, CA, Stany Zjednoczone). Jonizację uzyskano przez elektrorozpylanie (ESI). Analizowano jony dodatnie. Chromatograf cieczerwowy i spektrometr masowy pracowały pod kontrolą programu X'calibur, który wykorzystano również do obróbki danych.

3.3. Przygotowanie materiału do oznaczeń

W celu uzyskania właściwej proporcji między ilością hemoglobiny a ilością endoproteiny, najpierw oznaczono całkowite stężenie Hb w badanych próbkach krwi, stosując metodę z odczynnikiem Zijstra zmodyfikowaną przez Worek i in. [35]. Na tej podstawie badaną krew rozcieńczono następnie buforem do przechowywania (50 mM MES, 10 mM KCN, 1 mM Na₂EDTA, NaOH do uzyskania pH 6,2) tak, by stężenie hemoglobiny wynosiło 50 mg/ml, a efekt rozcieńczenia kontrolowano przez ponowne oznaczenie stężenia Hb. Z tak przygotowanej próbki krwi odmierzano następnie objętość zawierającą 1 mg Hb i dodawano do niej 50 l (tj. 30 g) roztworu endoproteiny Glu-C, którą wcześniej rozpuszczono w wodzie dejonizowanej do stężenia 600 g/ml (co odpowiada aktywności proteolitycznej 312,5 UN/ml), po czym próbkę uzupełniano buforem do trawienia (50 mM NH₄, CH₃CO₂H, pH 4,3) do objętości 0,5 ml. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C, a reakcję zatrzymywano przez zamrożenie w temperaturze -70°C. Do analizy HPLC-ESI-MS wykorzystywano supernatant uzyskany po odwirowaniu rozmrożonej próbki przy 20 000 g przez 5 min.

3.4. Procedura chromatograficzna HPLC-ESI-MS

Rozdział chromatograficzny glikowanych i nieglikowanych heksapeptydów, które zawierał supernatant, przeprowadzono przy użyciu kolumny Zorbax SB-CN 150 × 2.1 (5 m) z prekolumną Zorbax 300SB-C3 2,1 12,5 (5 Fm) firmy Agilent (Stany Zjednoczone) w temperaturze 50°C. Zastosowano dwuskładnikowy system gradientowy z fazą ruchomą o przepływie 0,3 ml/min. Początkowo był to 0,025% wodny roztwór TFA (tj. składnik A). Po 1 min dołączano acetonitryl z 0,023% TFA (tj. składnik B), którego udział w fazie ruchomej wzrastał stopniowo do osiągnięcia 70% w 28 min i 100% po 30 min, a od 37 min przywracano stopniowo przez 13 min stan wyjściowy (tj. 100% składnika A). Cała procedura chromatograficzna trwała 50 min. Objętość nstrzyku wynosiła 10 l.

Optymalnymi do analizy glikowanych i nieglikowanych heksapeptydów parametrami pracy spektrometru masowego okazały się: napięcie kapilary - 4,5 kV; temperatura kapilary - 200°C; gaz jonizujący - azot o przepływie 70 arb (ang. arbitrary unit of LCQ instrument); gaz pomocniczy - azot o przepływie 10 arb. Do kalibracji

spektrometru masowego użyto MRFA. Przy analizie ilościowej zastosowano opcję monitorowania jonów dodatnich w zakresie 300-1000 m/z (*full scan mode*). Sygnał pochodzący od właściwych dla heksapeptydu glikowanego pozornych jonów molekularnych [M+2H]²⁺ i [M+H]⁺ rejestrowano przy m/z = 429 i 857, a dla heksapeptydu nieglikowanego przy m/z = 348 i 695 (tabela I oraz rycina 2). Procentową zawartość HbA1c obliczano na podstawie proporcji między polem powierzchni pików heksapeptydu glikowanego a łączną powierzchnią pików obu heksapeptydów (tj. glikowanego i nieglikowanego) - rycina 4.

Ze względu na to, że użycie wzorców odpowiednich heksapeptydów nie było możliwe (gdyż nie są dostępne komercyjnie) do identyfikacji i potwierdzenia struktury analizowanych jonów, wykorzystano spektrometrię MS/MS. Zastosowano przy tym znormalizowaną energię kolizji = 45%, zaś jony potomne monitorowano w trybie pełnego skanowania (*full scan*) w zakresie 95-1000 m/z.

3.5. Walidacja

Każde z wzorcowych stężeń HbA1c (4,8; 8,2; 10,9; 13,9%) poddano ośmiokrotnie procedurze trawienia w sposób przedstawiony w rozdziale 3.3, po czym w każdej próbce oznaczono poziom obu heksapeptydów (glikowanego i nieglikowanego).

Jako próbę ślełą zastosowano hemolizat krwi pobranej ze zwłok, który przygotowywano do analizy z pominięciem procedury trawienia (co było konieczne, ponieważ każda krew zawiera pewną ilość HbA1c) i wykazano, że proponowana metoda jest w pełni specyficzna (rycina 2 i 3).

Za granicę oznaczalności (*LOQ*) przyjęto 4,8%, tj. najmniejsze stężenie HbA1c z roztworów wzorcowych użyte w krzywej kalibracyjnej (rycina 2).

Krzywa kalibracyjna wykazywała linowość w zakresie stężeń 4,8-13,9%. Współczynnik korelacji otrzymanej krzywej kalibracyjnej *r* wynosił 0,977 (rycina 4). Parametry określające dokładność i precyzję oznaczeń HbA1c przedstawiono w tabeli II.

3.6. Oznaczanie HbA1c metodami immunologicznymi

Zawartość HbA1c we wszystkich próbkach krwi oznaczano nie tylko przy użyciu metody HPLC-ESI-MS zmodyfikowanej w sposób wyżej przedstawiony, ale również metodami immunoturbidymetrycznymi stosowanymi obecnie rutynowo do badań klinicznych, tj. przy użyciu automatycznego analizatora COBAS INTEGRA 400 Plus (Roche Diagnostics, Niemcy) oraz analizatora Konelab 60i (Thermo, Finlandia), który w przypadku analizy świeżej krwi pobranej do fiolki zawierającej EDTA spełnia wymogi standaryzacji IFCC [30], gdzie

do określania zawartości HbA1c stosowane są wzory uwzględniające stężenie Hb:

$$\text{HbA1c [\%]} = 0,915 \left(\frac{\text{HbA1c [g/l]}}{\text{Hb [g/l]}} \right) 100 + 2,15$$

(dla Konelab 60i);

$$\text{HbA1c [\%]} = \left(\frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} \right) 87,6 + 2,27$$

(dla COBAS INTEGRA 400 Plus).

3.7. Statystyczna analiza wyników

Wyniki oznaczeń HbA1c metodą HPLC-ESI-MS (po trawieniu hemoglobiny) oraz metodami immunologicznymi opracowano przy użyciu programu Statistica 6.0 (Statsoft, Stany Zjednoczone) z wykorzystaniem testu kolejności par Wilcoxon. Ponadto za pomocą programu NCSS zbadano korelację między wynikami uzyskanymi metodą HPLC-ESI-MS a metodami COBAS i Konelab.

4. Wyniki i ich omówienie

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, iż niniejsza praca stanowi pierwsze doniesienie dotyczące oznaczania HbA1c we krwi pobranej ze zwłok metodą bazującą na analizie glikowanego N-końca -łańcucha hemoglobiny przy użyciu metody HPLC-ESI-MS. Przy wspomnianej metodzie znane czynniki ryzyka popełnienia błędu przy oznaczaniu HbA1c [10, 35] nie wpływają (z założenia) na otrzymywany wynik, gdyż umożliwia ona wykorzystanie hemolizatu krwi pełnej i równoczesne oznaczanie produktów hydrolizy hemoglobiny całkowitej (w tym HbA1c), a w kalkulacji wyniku uwzględnienie jedynie proporcji między powierzchnią pików heksapeptydów glikowanego a powierzchniami pików wszystkich heksapeptydów. Uzyskany za jej pomocą wynik nie zależy zatem od oznaczania poziomu Hb.

Mimo że trawienie proteinazą V8 pełnej krwi prowadzić może do pojawienia się peptydów innych niż z HbA1c (a te teoretycznie mogą interferować z analizowanym N-terminalnym heksapeptydem -łańcucha hemoglobiny, rycina 1), to po zastosowaniu procedury opisanej w rozdziale 3.3 zarówno we krwi trawionej, jak i nietrawionej (tj. próbie ślepej), nie zaobserwowano takich pików tła, których masy molekularne i czasy retencji zbliżone byłyby do heksapeptydów HbA1c i HbA0. Metoda HPLC-ESI-MS gradientowego rozdziału peptydów okazała się wysoce specyficzna (rycina 2 i 3).

Zmodyfikowana przez autorów tej pracy metoda HPLC-ESI-MS oznaczania HbA1c jest liniowa ($r = 0,977$) w całym (niezbędnym dla pośmiertnej diagnostyki długo utrzymujących się stanów hiperglikemicznych) zakresie

stężeń HbA1c (rycina 4) oraz dokładna, powtarzalna i precyzyjna (tabela II).

Różnice między wynikami oznaczeń HbA1c uzyskanymi za pomocą metody HPLC-ESI-MS a wynikami otrzymanymi metodami immunoturbidymetrycznymi, jakie stwierdzono, badając krew pobraną od osób żywych (rycina 5 i 6, grupy A, B i C), nie wykazały znamienności statystycznej (test kolejności par Wilcoxon, $P > 0,1$). Porównania tych wyników badań krwi pobranej od osób żywych (A + B + C), które uzyskano metodą HPLC-ESI-MS, z wynikami otrzymanymi zarówno metodą Konelab, jak i COBAS, wykazało natomiast, iż korelacje między nimi są bardzo wysokie (odpowiednio: $r = 0,9868$ i $r = 0,9938$).

Różnice między wynikami oznaczeń HbA1c metodą HPLC-ESI-MS a obiema metodami immunoturbidymetrycznymi, jakie stwierdzono, badając krew pobraną ze zwłok (tj. w grupie D) były wprawdzie nieco większe niż w przypadku krwi pobranej od osób żywych (rycina 6), ale również nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej ($P = 0,08$). Ponadto nie odbiegały one od tych, jakie pojawiają się zawsze w przypadku zestawienia rezultatów dwóch niezależnych metod użytych do analizy chemicznej zdegradowanego materiału biologicznego.

Według szacunku autorów niniejszej pracy całkowity koszt materiałów jednej analizy metodą HPLC-ESI-MS w zaproponowanej tu modyfikacji wynosi obecnie ok. 8.5 €, a czas, jaki musi poświęcić analityk na czynności powtarzalne, to ok. 2–3 godziny. Jednak nakłady te warto ponieść po to, by potwierdzić lub wykluczyć hipotezę, że przyczyną wypadku drogowego stała się cukrzyca, ewentualnie po to, by rozstrzygnąć, czy ketonemia spowodowana została przez nadmierne wychłodzenie czy też przez inne zaburzenia metaboliczne.

5. Podsumowanie

1. Zmodyfikowaną procedurę analityczną HPLC-ESI-MS oznaczania HbA1c należy traktować jako metodę „z wyboru” do badania krwi ze zwłok.
2. Metody immunoturbidymetryczne Konelab i COBAS mogą być wykorzystane do analizy krwi pobranej ze zwłok.