

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

matig tot slechte vergelijkbaarheid met conventionele meetmethodes (correlatie coëfficiënten voor totaal HDL of LDL <0,54). Biofysische verschillen in parameters relevant voor de scheiding (verschillen in lading + deeltjesgrootte + hydrophobiciteit versus verschillen in soortelijk gewicht) zijn hiervoor verantwoordelijk. Ondanks scherpe pieken te verkrijgen door toepassing van een grote verscheidenheid van "spacers" geeft isotachoforese geen accurate scheiding van het uiterst complexe lipoproteïnen-mengsel, het isotachoforeseptraal kan niet worden vertaald in termen van HDL, LDL, VLDL, IDL en/of chylomycronfracties, zoals dat aanwezig is in normo- en hyperlipemisch serum.

Trefwoorden: capillaire elektroforese; isotachoforese; lipoproteïnen

Lipoproteïnen zijn complexe moleculen bestaande uit één of meer eiwitten en diverse lipiden in verschillende samenstelling. De meest apolaire lipiden, zoals cholesterolesters en triglyceriden bevinden zich in de kern van het partikel. De minder apolaire lipiden, zoals vrij cholesterol en fosfolipiden bevinden zich aan de buitenkant; samen met de apolipoproteïnen vormen ze de schil. Voor scheiding van de lipoproteïnen wordt de ultracentrifugatiemethode als referentiemethode gebruikt. Deze methode maakt gebruik van verschillen in het relatieve soortelijke gewicht van de verschillende lipoproteïnen. De deeltjes met het hoogste vetgehalte ten opzichte van het relatief zware eiwit zullen het eerste floteren na ultracentrifugatie. Een andere scheidingsmethode is elektroforese op agarose. Deze scheiding berust op de specifieke ladingsverschillen van de lipoproteïnen veroorzaakt door de typische apolipoproteïnencomponenten. Er is over het algemeen een goede correlatie tussen de waarden voor de diverse lipoproteïnen bepaald met beide klassieke methodes. Wensen tot schaal- en snelheidsvergroting waren de aanleiding om de mogelijkheden van een geautomatiseerde methode zoals capillaire elektroforese te onderzoeken. Bij elektroforese migreert het eiwit met een snelheid welke wordt bepaald door de elektroforetische krachten minus de elektroosmotische krachten op de buffer. Capillaire zone elektroforese is een relatief snelle methode, zeker op een apparaat met verschillende parallelle capillairen. Voor analyse van lipoproteïnen-patternen is dit principe slechts sporadisch gebruikt. Uit de literatuur blijkt dat voor deze toepassing een duidelijke voorkeur voor isotachoforese bestaat (1-3). Hierbij wordt het monster voorafgegaan door een "leading" buffer met een lagere mobiliteit dan de componenten in het monster en als staart is er de "terminating" buffer met een hogere mobiliteit dan de afzonderlijke componenten in het monster. Het monster in het afgeschermd buffercompartiment is onderhevig aan een elektroforetische kracht waarbij een verdeling van de componenten plaats vindt op basis van o.a. hun individuele mobiliteit. Naarmate de tijd verstrijkt zal de trein van 3 compartimenten het eind van het capillair bereiken, waar zich de detector bevindt. Vele factoren beïnvloeden een optimale scheiding van de compo-

nenten in het buffergedeelte tussen de "leading" en "terminating" buffer. In het geval van lipoproteïnen kan men door het vetachtige karakter een grote absorptie aan het capillairwand verwachten; daarnaast speelt dat de lipiden de eiwitladingen op de apolipoproteïnen af kunnen schermen. Dit kan bij kleuring een variabele binding tot gevolg hebben waardoor kwantificering wordt bemoeilijkt. Voor het opsplitsen van complexe fracties maakt men graag gebruik van "spacers". Dit zijn meestal aminozuren zonder UV-absorptie, die onder invloed van het elektroforetische veld, een soort isoëlectrisch patroon vormen (1-3). Theoretisch kan door een goede keuze van spacers een complex mengsel van verschillende mobiliteit mooi worden opgesplitst in de afzonderlijke pieken. Dit betekent echter niet dat deze pieken dan obligaat verschillend zijn in samenstelling zoals gedefinieerd volgens de conventionele classificatie. Er is dus steeds een controle nodig welke kwalitatieve scheiding er is verkregen.

De capillaire isotachoforesemethode voor de scheiding van lipoproteïnen is nog erg experimenteel. Literatuuronderzoek leert dat één onderzoeksgroep zich op dit gebied buitengewoon heeft onderscheiden; de bevindingen zijn bevestigd (4,5). Na een training van twee dagen op het laboratorium van Prof. Schmitz en voorzien van een uitgebreid en geactualiseerd voorschrift besteedden wij enkele maanden aan het opzetten en valideren van deze methode.

MATERIALEN en METHODEN

Capillair

Er wordt gebruik gemaakt van een coated (dimethylpolysiloxane) fused silica capillair (RTX-1)⁰ met een totale lengte van 27 cm (Altech 0,18 mm DB-1). Het capillair wordt, na het branden van een window, ingebouwd in een "cartridge" van Beckman; de detectie vind plaats bij 23 cm.

We gebruiken de methode van Nowicka et al (2); echter de kleuring van serum met Sudan Zwart is vervangen door kleuring met NBD C₆-Ceramide (6).

Oplossingen

- 0,3% (w/v) hydroxypropylmethylcellulose (HMPC, Sigma cat. no H7509) in gedeïoniseerd water. Men bereidt een 1% HMPC-oplossing door 4 dagen te roeren bij 4°C, vervolgens wordt deze verdund tot 0,3% en gefiltreerd door membraanfilters met poriediameters achtereenvolgens van 0,8 µm en 0,45 µm. HMPC verlaagt de elektro-osmose en verhoogt de bufferviscositeit. Hierdoor ontstaan er scherpere zones en een constanter stroomprofiel. Daarnaast stabiliseert HMPC de proteïnen, ook dit komt de reproduceerbaarheid van de scheiding ten goede.
- Buffers: alle buffers worden gemaakt uitgaande van gedeïoniseerd water en worden bij 4°C bewaard.
- Leading buffer met 0,3% HMPC. 10 mMol HCL (182,3 mg, 10 keer verdund HCL) en 17 mMol ammediol (89,34 mg 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, Sigma) worden opgelost in 50 ml 0,3% HMPC-oplossing. De pH dient 8,7 te zijn.

- Leading buffer zonder HPMC. Als boven, maar dan gedeïoniseerd water i.p.v. 0,3% HPMC-oplossing.
- Terminating buffer. 20 mMol alanine (89,09 mg, Sigma A7502) en 17 mMol ammediol (89,34 mg) worden opgelost in 50 ml gedeïoniseerd water (pH 9,6).
- Terminating buffer met Ba(OH)₂. 89,09 mg alanine en 89,34 mg ammediol worden opgelost in gedeïoniseerd water, de pH wordt met verzadigd Ba(OH)₂ gesteld op 10,4 en aangevuld tot 50 ml met gedeïoniseerd water. Alle bufferoplossingen worden vlak voor gebruik door een 20 µm cellulosenitraatfilter (Amicon) gefiltreerd.
- Spacer oplossingen. Van alle spacers worden eerst stockoplossingen gemaakt waarbij 10 mg in 1 ml gedeïoniseerd water wordt opgelost. Deze oplossingen worden bewaard bij 4°C. Er wordt ook een oplossing gemaakt van 10 µg 5-carboxyfluoresceïn (cat. no. C1359, Molecular Probes, Leiden) in 1 ml gedeïoniseerd water; dit is een interne standaard.
- Spacer mix. Maak een mengsel van de volgende stockoplossingen: 100 µl Aces (2-[(2-amino-2-oxoethyl)amino]ethanesulfonic acid (Sigma cat no A7949), 100 µl D-glucuronzuur (Sigma G5269), 100 µl octaansulfonzuur (Sigma 00133), 100 µl glutamine, 100 µl TES (N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-aminoethanesulphonic acid) (Sigma T6541), 100 µl DL-serine (Sigma 4375), 150 µl TAPS (N-tris[hydroxymethyl]methyl-3-aminopropanesulfonic acid) (Sigma T9659) 100 µl tricine (Sigma T7911), 100 µl methionine (Sigma M9500), 50 µl glycine (Sigma 97403), 50 µl carboxyfluoresceïn (Molecular Probes). Van deze gemengde stock-oplossing wordt 100 µl verdund met 500 µl HPMC-bevattende buffer en wordt bewaard bij 4°C.
- Kleuroplossingen. Kleuring met NBD C₆-Ceramide: Los 0,5 mg NBD C₆-ceramide (Molecular Probes N-1154, Leiden) op in 100 µl dimethylsulfoxide, vervolgens wordt ethyleen glycol toegevoegd tot een volume van 1 ml. De kleuroplossingen worden in het donker bij 4°C bewaard.

Monstervoorbereiding

20 µl serum wordt 1:2 verdund met gedeïoniseerd water. Hiervan wordt 20 µl gemengd met 10 µl NBD C₆-Ceramide. Vervolgens wordt dit mengsel gemengd (3:5 v/v) met de spacer-mix.

Alternatief: er wordt een 1% (w/v) oplossing van Sudan Zwart kleurstof in ethyleenglycol gemaakt door 6 uur in het donker te roeren en daarna te filtreren. 25 µl serum wordt geïncubeerd met 13 µl 1% Sudan Zwart oplossing gedurende 30 min bij 4°C in het donker. Vervolgens wordt het monster verder verdund met spacers elk in een concentratie van 5 mg/ml. Verdunningen worden gemaakt met lipoproteïnedeficiënt serum (LPDS: de d>1,185 g/ml fractie van serum zoals geïsoleerd m.b.v. preparatieve ultracentrifugatie, gevolgd door 36 uur dialyse).

Scheidingscondities

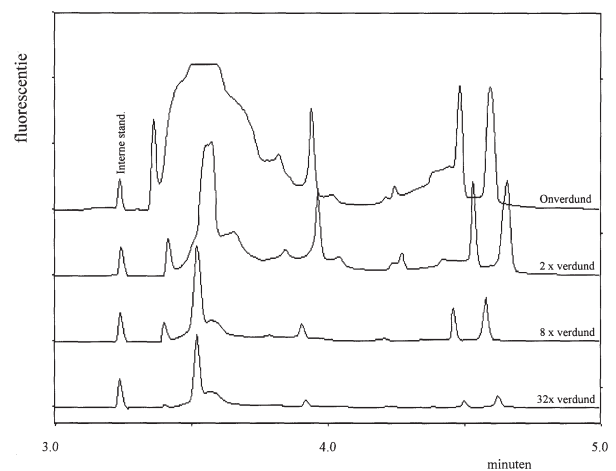
De scheiding wordt uitgevoerd op een Beckman

P/ACE 5000 capillair elektroforese-apparaat onder controle van P/ACE system Gold software. Bij het gebruik van NBD C₆-Ceramide vindt registratie plaats met de LIF-detector, excitatie 488 nm en emissie bij 570 nm, max 1000 RFU. Bij het gebruik van Sudan Zwart vindt registratie plaats door middel van absorptie bij 570 nm. De detector zit aan de kathodekant met gebruikmaking van een "on-line" diode-detector. Het capillair en de buffer worden op een temperatuur van 20°C gehouden. Allereerst wordt het capillair 2 minuten goed doorgespoeld met water, vervolgens met de HPMC-bevattende leading buffer eveneens gedurende 2 minuten (20 psi); vervolgens wordt het monster onder druk geïnjecteerd gedurende 6 seconden (0,5 psi) waarna de stroom gestaag wordt opgevoerd tot 30 mA binnen 1 minuut en het voltage tot 10 kV binnen 2 minuten. Scheiding vindt daarna plaats bij 10 kV constant voltage gedurende 6 minuten. Vervolgens wordt het capillair weer 3 x 20 seconden gespoeld met leading buffer en is hierna weer gereed voor injectie en een nieuwe run. Onder de gegeven omstandigheden kan men aannemen dat het capillair ten minste 50 runs functioneert bij een temperatuur van 20°C.

RESULTATEN

Eerste ervaringen met de capillaire isotachoforese methode op het gastheerlaboratorium

Het klassieke patroon van lipoproteïnen-scheiding in verschillende publicaties van de groep van Schmitz laat een forse piek zien in het HDL gebied en daarnaast een lint van kleinere pieken welke hun oorsprong hebben in vloeïende curves, niet direct vanuit een gemeenschappelijke basislijn (Fig. 1). Klassieke experimenten zijn ingezet met Sudan Zwart als kleurstof. Door toepassing van Ceramide wordt gebruik gemaakt van een fluorescentie detectie. Doordat deze detectie gevoeliger is kan met minder monster worden volstaan, hetgeen de kans op matrixeffecten ver-



Figuur 1. Fluorimetrische registratie van een met NBD C₆ ceramide gemerkt serum onverdund en 2 tot 32 keer verdund met lipoproteïne-deficiënt serum. Van links naar rechts betreft het de volgende moleculen met tussen haakjes de bijbehorende retentietijden: fluoresceïne (3,3 min); ?? (3,4 min); HDL-complex (3,45 tot 3,9 min); HDL (3,95 min); apo B bevattende lipoproteïnen: (4,5 en 4,6 min).

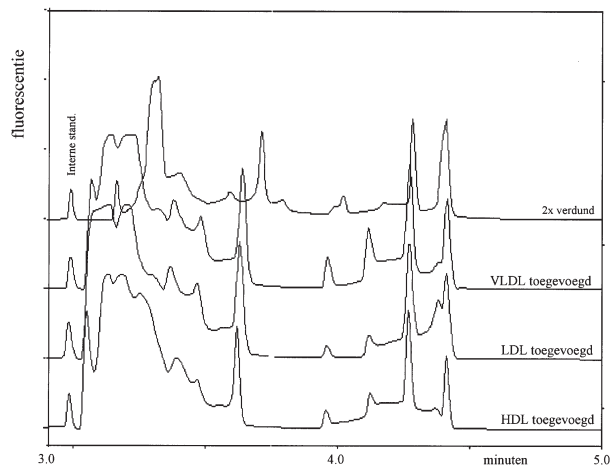
kleint. Echter, het patroon verandert hierdoor niet. Figuur 1 geeft hiervan een voorbeeld. Met een stabiele basis is het vervolgens mogelijk met het beschikbare computerprogramma de achtergrond te substraheren, waardoor er een patroon ontstaat dat gekarakteriseerd kan worden als: "een opeenvolgend piekpatroon met een stabiele basis". Deze geoptimaliseerde resultaten zijn door de groep van Schmitz echter nog niet gepubliceerd. In dit manco is voorzien door de publicatie van Schlenck et al (5), die met het recente protocol van Schmitz een vergelijkbaar piekenpatroon bestaande uit 8 pieken krijgt. Opgemerkt moet worden dat er enig verschil is in de benoeming van de pieken (5). Schlenck et al. benoemen de pieken als volgt: na de interne standaard volgt: een forse HDL piek, een duale HDL piek en nog een vierde HDL piek, vervolgens zijn er een VLDL-, een IDL- en twee LDL pieken. Schmitz et al denken dat de tweede duale piek albumine voorstelt. Ook wat betreft de pieken in het apo B gedeelte is er geen volledige overeenstemming: de apo B bevattende lipoproteïnen kunnen worden onderverdeeld in drie grote subgroepen: chylomicronachtige deeltjes en grote VLDL; de tweede subgroep bestaat uit kleine VLDL en intermediaire lipoproteïnen (IDL) en de derde groep bestaat uit LDL-subfracties. De scheidingen met de apparatuur van Schmitz bleken in de twee dagen dat we de apparatuur aldaar mochten gebruiken zeer reproduceerbaar. Opvallend was wel, dat wanneer wij VLDL-vrij serum oprachten het piekpatroon niet veranderde ten opzichte van niet-gefractioneerd serum (2 waarnemingen). De piek die doorging voor VLDL veranderde niet, terwijl de IDL piek iets korter was. Na toevoeging van LDL bleken met name de pieken in het VLDL en HDL gebied veranderd te zijn. Kortom; suppletie experimenten leidden tot vragen over de specificiteit van de isotachoforetische scheiding.

Ervaringen op het eigen laboratorium

Met toepassing van het protocol van Schmitz worden vlot patronen verkregen die redelijk overeenkomen. Echter, in onze handen blijkt het piekenpatroon in het dominante HDL-gebied meer heterogeen, terwijl dat in het apo B gebied minder heterogeen is. Door bovenstaande twijfelachtige resultaten betreffende additie en suppletie en ook op basis van de regelmatig optredende storingen werd besloten vooralsnog verder te gaan met de ruwe piekregistratie zonder correctie voor achtergrond.

Verdunningsreeksen en addities

Het blijkt dat de isotachoforetische scheiding erg gevoelig is voor matrixeffecten. Verdunning met buffer geeft een shift in piektijden. Daarom is het noodzakelijk het serum te verdunnen met lipoproteïne-deficiënt serum (LPDS). Dit materiaal resulteert bij isotachoforetische analyse slechts in twee kleine pieken bovenop een positieve golfbeweging in het HDL gebied. Deze mini-pieken zijn verwaarloosbaar ten opzichte van de macropieken die waarneembaar zijn bij de analyse van serum. Dit duidt erop, dat de brede piek in het linkse gedeelte van de curve obligeert HDL is. Bij 2 tot 32 keer met LPDS verdund serum nemen

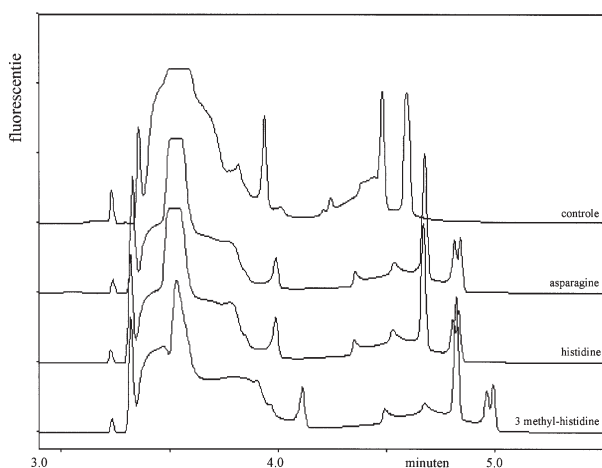


Figuur 2. Fluorimetrische registratie van 2 keer met LPDS verdund serum en van 2 keer met VLDL, LDL en HDL-verdund serum. In het HDL-gebied zijn er duidelijk verschillen t.g.v. matrixeffecten eerder dan t.g.v. extra lipoproteïnen. Door toevoeging van VLDL is er een extra piek zichtbaar waarvan het rechterbeen van de piek niet terugloopt tot de basislijn. Toevoeging van LDL of HDL geeft op dezelfde plaats een piek, maar kleiner, terwijl de basislijn rechts van de piek aanzienlijk is veranderd.

alle pieken proportioneel af, maar de pieken blijven waarneembaar. Vanaf een 16-voudige verdunning hebben alle pieken, met name die in het HDL-gebied, een achtergrond vergelijkbaar met LPDS. De 1:1 verdunning van LPDS met LDL of VLDL geeft een groter verschil te zien ten gevolge van de verdunning dan ten gevolge van de extra lipoproteïnen. Verdunning met HDL geeft een toename te zien van 2 kleine pieken die ook al in het LPDS waarneembaar zijn, implicerend dat LPDS nog sporen van enkele zeer zware HDL subfracties bevat. Toevoeging van VLDL-, LDL-, en HDL- aan 1:1 verdund controleserum blijkt moeilijk interpreteerbaar (Figuur 2). Na toevoeging van LDL is er een extra piek te bespeuren links van een piekdoublet, de basis wordt niet bereikt. Na toevoeging van LDL of HDL wordt in principe hetzelfde waargenomen. Eerder het achtergrondpatroon dan het piekpatroon wordt hier beïnvloed. Vergelijking van deze resultaten met die in de literatuur leert, dat daar over het algemeen gunstiger resultaten worden geboekt (5,7). Echter, alles is beschrijvend, kwantitatieve resultaten voor een exacte vergelijking ontbreken en hierdoor kan subjectiviteit in de oordeelsvorming niet worden uitgesloten. Zoals eerder gemeld, pakte een beperkte praktijkproef op het laboratorium van Schmitz voor wat betreft addities/deleties niet al te positief uit. Echter, gezien de beperkte tijdsinvestering blijft er enige onzekerheid.

Detergent-gehalte en de lipoproteïnen-stabiliteit

Het octaansulfonzuur dat gebruikt wordt om de lipoproteïnen een negatieve lading te geven (vergelijkbaar met het detergens natriumlaurylsulfaat bij de klassieke SDS elektroforese) zou bij een te hoge concentratie kunnen leiden tot het uit elkaar vallen van de lipoproteïnedeeltjes. Patronen verkregen met 1/4 tot 100 keer de originele octaansulfonzuurconcentraties leiden slechts tot kleine veranderingen in het patroon.



Figuur 3. Fluorimetrische registratie van serum met hieraan toegevoegd extra asparagine, histidine of 3-methyl-histidine. De resultaten van deze addities zijn onvoorspelbaar.

Alleen zeer hoge SDS concentraties in de aanwezigheid van 20% acetonitril blijken in staat lipoproteïnen te delipideren; met deze mengsels kan men dus apo-lipoproteïnen analyseren (8). Dit is hier echter niet aan de orde.

Het effect van verschillende spacers op het piekpatroon

Nagegaan werd het effect van toevoeging van een extra spacer in de gebruikelijke concentratie aan het monster. Het blijkt dat asparagine, histidine, 3-methyl-histidine, pseudo-uridine eerder een effect hebben op de retentietijd van de diverse pieken dan dat ze het aantal pieken beïnvloeden (Figuur 3). Dit is begrijpelijk: spacers tonen alleen effect indien ze bij de gegeven matrix een retentietijd hebben gelijk met die van een component. Door toevoeging van de extra spacers verandert het piekpatroon regelmatig zonder dat eenduidig kan worden aangegeven wat het meest karakteristieke effect van spacer-toevoeging is.

Analyse van hyperlipemisch serum

Lipemische sera met een verhoogde serum triglyceriden- en dus very low density lipoproteïnenconcentratie of met een verhoogd cholesterol ten gevolge van verhoogde low density lipoproteïnenconcentraties zijn geanalyseerd in vergelijking met normolipemisch serum. Binnen de vrij grote variatie in achtergrondregistratie blijken verhoogde serum VLDL of LDL concentraties niet eenduidig geassocieerd met verhoogde pieken in het isotachoforesepatroon. Bij sterk verhoogde concentraties is in een bepaald gebied het hele patroon vaak onherkenbaar veranderd, hetgeen kwantificering uiteraard zeer bemoeilijkt. Opgemerkt moet worden dat er geen carry-over effect kon worden vastgesteld: het LPDS-patroon voor/na de analyse van een sterk lipemisch serum is vergelijkbaar. In tegenstelling tot onze bevindingen tonen Schmitz et al een groot aantal isotachoforesescans die moeten aantonen dat de isotachoforetische analyse van humane serummonsters van patiënten met diverse vormen van hyperlipoproteïnemie vergelijkbaar is met de classificatie van Fredrickson; de typische biochemi-

sche verschillen zijn goed waarneembaar. Kwalitatief gaat dit inderdaad min of meer op, kwantitatief is dit echter nog niet bewezen (3). In de literatuur is het opvallend dat men alleen bij normolipemische sera geprobeerd heeft tot kwantificering te komen.

“Bottle necks” van de capillaire isotachoforesescheidingen

Normaal gesproken verlopen elektroforetische scheidingen beter bij lage temperatuur. Echter, lipiden binnen lipoproteïnen kunnen uitkristalliseren bij te lage temperatuur. De isotachoforese is daarom steeds bij 20°C uitgevoerd. Hoewel het capillair goed op temperatuur wordt gehouden geldt dit niet voor het buffercompartiment. Om vroegtijdige schade aan het capillair te voorkomen vonden wij het nodig gekoelde (4°C) buffers te gebruiken, die elke 90 minuten worden vervangen door verse oplossingen. Dit verkleint ons inziens ook een secundair optredende herverdeling van ceramide tijdens de isotachoforetische run van het ene lipoproteïne naar het andere bij een veranderende matrix.

DISCUSSIE

De nieuwe, tweede generatie, capillair elektroforese-apparatuur is in staat goed reproduceerbare runs te leveren. Belangrijke variabelen zijn: de kwaliteit van de capillaire coating, de temperatuur, de specificiteit van de kleurstof die als lipoproteïnenmerker wordt gebruikt en de vloeistofmatrix binnen het capillair. Voor het analyseren van bijvoorbeeld LDL-subfracties dient men het geïsoleerde LDL eerst met lipoproteïne deficiënt serum (LPDS) te verdunnen, anders zijn de patronen niet te vergelijken met die in serum (4). Hieruit blijkt dat de serumeiwitten kennelijk participeren in de scheiding. Dit kan problematisch zijn bij de analyse van pathogeen serum: de veranderde eiwitsamenstelling kan de scheiding, die is geoptimaliseerd met een normale serumeiwitconcentratie, mogelijk nadelig beïnvloeden. Overigens is van de klassieke agarose-elektroforese bekend dat extra albumine, homogeen door de buffer gemengd alvorens de gel te gieten, een extra scheidend vermogen oplevert in het gebied tussen de pré- β -band en de β -band (9). De variabiliteit in de isotachoforetische patronen ten gevolge van temperatuurvariaties is met de huidige apparatuur belangrijk verminderd. Echter, in een niet geacclimatiseerde ruimte is aandacht voor de temperatuur van de buffers in onze ogen noodzakelijk. In het serum zitten diverse enzymen die bij hogere temperatuur substraatveranderingen kunnen geven. Op basis van de korte analysetijd lijkt substraatverandering ten gevolge van lecithine cholesterol acyl transferase, diverse phospholipasen en hydrolasen niet te verwachten. Voor de kliniek tellen ook de kwantitatieve resultaten. Hoe is de vergelijking met conventionele methodes voor de bepaling van lipoproteïnen? Schmitz et al rapporteren een goede correlatie voor HDL-waarden verkregen met ceramidefluorescentie versus waarden verkregen met conventionele precipitatie-methodes. Schlenk et al verkrijgen hoge correlaties ($r=0,87$) tussen de LDL-index

bepaald met isotachoforese versus LDL berekend met de Friedewald formule. De LDL-index waarden correleerden ook goed ($r=0,80$) met de immunologisch bepaalde totaal apo B concentratie. Over het algemeen echter waren met bivariantie analyse de correlatie coëfficiënten tussen ITP indices en de diverse lipo- of apolipoproteïne indices maximaal 0,60 (5). Een en ander is wel enigszins verwonderlijk in het licht van de gerapporteerde "bevredigende" resultaten van systematisch uitgevoerde suppletie experimenten in deze studie. Opgemerkt moet hierbij echter worden, dat de resultaten van suppletie-experimenten nooit in "recovery"-percentages zijn uitgedrukt (5). Onze resultaten geven slechts een indruk en zijn van onvoldoende gewicht om definitieve uitspraken te doen. Hiervoor is nog meer onderzoek nodig. Op grond van ons recente onderzoek betreffende binding van lipofiele merkers in veranderende concentratie-gradiënten (10) is het niet uitgesloten dat het gebruik van ceramide onverwachte problemen kan geven. De veranderende matrix die het gevolg is van de elektroforetische scheiding kan aanleiding geven tot een shift van de kleurstof vlak voor de banden spontaan scheiden. Op grond van deze hypothese raden wij het gebruik van kleurstoffen die irreversibel aan het lipoproteïne binden (zoals Sudan Zwart, Oil Red O, Fat Red 7B) niet af, zij het dat hiervoor de fluorimetrische optie moet worden verlaten. Met name Sudan Zwart heeft een sterke band met het lipoproteïne welke 3h stand houdt bij 20°C en 6h bij 4°C (1). De analyse wordt hierdoor echter een stuk ongevoeliger hetgeen de invloed van de matrix doet toenemen. Uit de literatuur komt verder naar voren dat benzyalcohol een merker voor lipoproteïnen zou kunnen zijn (11). Deze sterk UV-absorberende stof kan met de UV-optie worden geregistreerd. Ten gevolge van de aromatische benzeenring is de stof matig oplosbaar in waterige oplossingen. Goede kleuring vraagt daarom het nodige vooronderzoek. Tot nu toe is het gebruik van benzyalcohol echter alleen beschreven bij de elektroforese van voorgezuiverde lipoproteïnenoplossingen. Door vergelijking met via preparatieve isotachoforese geïsoleerd materiaal kunnen Schmitz e.a. de geïsoleerde fracties uit totaal serum metabool nader karakteriseren met behulp van celstudies in vitro. Zo blijkt de snelst migrerende HDL-fractie vnl. apo A-1 en fosfatidylcholine te bevatten; de snelst migrerende (vierde) HDL-piek bevat het merendeel van de totale lecithine cholesteryl acyltransferase in het serum (12). Bittolo Bon en Cazzolato (4) gebruiken isotachoforese om LDL-subfracties en negatief geladen geoxideerd LDL te scheiden: men kan 4 verschillende LDL-subfracties onderscheiden. Hier wordt duidelijk dat de methode zowel onderscheid maakt op deeltjes grootte als op lading. Het op SDS-gelijklend detergent octaansulfonzuur bindt aan de diverse LDL-deeltjes afhankelijk van de chemische samenstelling waardoor de deeltjes een verschil in elektroforetische lading verkrijgen. Dit verklaart waarom de ratio snel migrerende ten opzichte van langzaam migrerende LDL ($LDL1+LDL2/LDL3+LDL4$) negatief correleert met de LDL-deeltjes grootte ($r=-0,74$). Ook is er een sterke positieve correlatie tussen het per-

centage elektro-negatief geladen LDL en de ratio $LDL1+LDL2/LDL3+LDL4$ ($r=0,87$). In deze studie worden nog meer interessante bevindingen gerapporteerd onder andere over de relatie van de diverse LDL-subfracties met de serumlipiden. Is bij de methode van Bittolo Bon en Cazzolato de LPDS-matrix essentieel voor de scheiding van elektro-negatief LDL, Stocks et al (13) kunnen negatief geladen geoxideerd LDL scheiden van natief LDL met capillaire zone elektroforese in plaats van isotachoforese. Er wordt gebruik gemaakt van een niet gecoat capillair. Als elektroforese buffer wordt methylglucamine-Tricine, pH 9,0 gebruikt en de veldsterkte is 350 V/cm. In 8-10 minuten kan het met koper geoxideerde LDL worden gescheiden van natief LDL, wat kan worden gevolgd door UV-registratie (piek absorptiemaximum bij 234 nm, specifiek voor de gevormde diënen). Ook elektro-negatief LDL bereid door reactie van malondialdehyde met LDL is op deze manier van natief LDL te scheiden.

Conclusie

Met isotachoforese is een nieuwe manier van lipoproteïnscheiding binnen bereik gekomen. De scheiding blijkt te berusten op verschillen in lading, deeltjesgrootte en hydrophobiciteit. Het is daarom niet te verwachten dat de resultaten vergelijkbaar zijn met conventionele resultaten, verkregen op basis van scheiding op soortelijk gewicht. Of onze teleurstellende resultaten exclusief hieraan te wijten zijn is onduidelijk. Ons onderzoek betreft een momentopname. Met een grotere investering in tijd zouden de resultaten kunnen verbeteren. Vooralnog ontbreken hiervoor de mogelijkheden. De situatie zoals die zich voordoet lijkt op het ontdekken van een hiërogliefentableau in een Egyptische piramide. De opeenvolging van pieken wil duidelijk iets zeggen, maar wat het betekent voor ziekte en gezondheid valt pas na lang onderzoek te doorgronden. Duidelijk is in ieder geval dat het allemaal anders in elkaar zit dan we gewend zijn.

Literatuur

1. Schmitz G, Borgmann, Assmann G. Analytical capillary isotachopheresis: a routine technique for the analysis of lipoproteins and lipoprotein subfractions in whole serum. *J Chromatogr* 1985; 320: 253-262..
2. Nowicka G, Bruning T, Grothaus B, Kahl G, Schmitz G. Characterization of apolipoprotein B -containing lipoproteins by preparative free flow isotachopheresis. *J Lipid Res* 1990; 31:1173-1186.
3. Schmitz G, Nowicka G, Möllers C. Capillary isotachopheresis in the analysis of lipoproteins. In: Christe WW, ed. *Advances in Lipid Methodology*. Dundee: Oily Press Ltd. 1993; 2: 157-193.
4. Bittolo Bon G and Cazzolato G. Analytical capillary isotachopheresis of total serum lipoproteins; a new tool to identify atherogenic low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1999; 40: 170-177.
5. Schlenck A, Herberth B, Siest G, Visvikis S. Characterization and quantification of serum lipoprotein subfractions by capillary isotachopheresis; relationships with lipid, apolipoprotein, and lipoprotein levels. *J Lipid Res* 1999; 40: 2125-2133.

6. Schmitz G, Möllers C, Richter V. Analytical capillary isotachopheresis of human serum lipoproteins. *Electrophoresis* 1997; 18: 1807-1813.
7. Zorn U, Wolf CF, Wennauer R, Bachem MG, Grunert A. Separation of lipoproteins by capillary isotachopheresis combined with enzymatic derivatization of cholesterol and triglycerides. *Electrophoresis* 1999; 20: 1619-1626.
8. Cruzado ID, Crockill SL, McNeal CJ, MacFarlane RD. Characterization and quantification of apolipoprotein B-100 by capillary electrophoresis. *J Lipid Res* 1998; 39: 205-217.
9. Noble RP. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gels. *J Lipid Res* 1968, 9: 693-699..
10. Demacker PNM, Hectors MPC and Stalenhoef AFH. Chylomicron processing in familial dysbetalipoproteinemia and familial combined hyperlipidemia studied with vitamin A and E as markers; a new physiological concept. *Atherosclerosis* 2000; 149: 169-180.
11. Hu AZ, Cruzado ID, Hill JW, McNeal CJ, MacFarlane RD. Characterization of lipoprotein (a) by capillary zone electrophoresis. *J Chromat* 1995; 717: 33-39.
12. Schmitz G and Möllers C. Analysis of lipoproteins with capillary isotachopheresis. *Electrophoresis* 1994; 15: 31-39.
13. Stocks J, Miller NE. Capillary electrophoresis to monitor oxidative modification of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1998; 39: 1305-1309.
14. Schmitz G, Borgmann, Assmann G. Analytical capillary isotachopheresis: a routine technique for the analysis of lipoproteins and lipoprotein subfractions in whole serum. *J Chromatogr* 1985; 320: 253-262.
15. Nowicka G, Bruning T, Grothaus B, Kahl G, Schmitz G. Characterization of apolipoprotein B –containing lipoproteins by preparative free flow isotachopheresis. *J Lipid Res* 1990; 31:1173-1186.
16. Schmitz G, Nowicka G, Möllers C. Capillary isotachopheresis in the analysis of lipoproteins. In: Christe WW, ed. *Advances in Lipid Methodology*. Dundee: Oily Press Ltd. 1993, 2: 157-193.
17. Bittolo Bon G and Cazzolato G. Analytical capillary isotachopheresis of total serum lipoproteins; a new tool to identify atherogenic low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1999; 40: 170-177.
18. Schlenck A, Herberth B, Siest G, Visvikis S. Characterization and quantification of serum lipoprotein subfractions by capillary isotachopheresis; relationships with lipid, apolipoprotein, and lipoprotein levels. *J Lipid Res* 1999; 40: 2125-2133.
19. Schmitz G, Möllers C, Richter V. Analytical capillary isotachopheresis of human serum lipoproteins. *Electrophoresis* 1997; 18: 1807-1813.
20. Zorn U, Wolf CF, Wennauer R, Bachem MG, Grunert A. Separation of lipoproteins by capillary isotachopheresis combined with enzymatic derivatization of cholesterol and triglycerides. *Electrophoresis* 1999; 20: 1619-1626.
21. Cruzado ID, Crockill SL, McNeal CJ, MacFarlane RD. Characterization and quantification of apolipoprotein B-100 by capillary electrophoresis. *J Lipid Res* 1998; 39: 205-217.
22. Noble RP. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gels. *J Lipid Res* 1968, 9: 693-699..
23. Demacker PNM, Hectors MPC and Stalenhoef AFH. Chylomicron processing in familial dysbetalipoproteinemia and familial combined hyperlipidemia studied with vitamin A and E as markers; a new physiological concept. *Atherosclerosis* 2000; 149: 169-180.
24. Hu AZ, Cruzado ID, Hill JW, McNeal CJ, MacFarlane RD. Characterization of lipoprotein (a) by capillary zone electrophoresis. *J Chromat* 1995; 717: 33-39.
25. Schmitz G and Möllers C. Analysis of lipoproteins with capillary isotachopheresis. *Electrophoresis* 1994; 15: 31-39.
26. Stocks J, Miller NE. Capillary electrophoresis to monitor oxidative modification of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1998; 39: 1305-1309.

Summary

Analysis of lipoproteins in serum using capillary isotachopheresis. Heijst P van, Linszen P, and Demacker PNM Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 232-238.

By means of a literature review and by practical experiments performed at our laboratory we inventorised the possibilities to quantify lipoproteins in serum using capillary isotachopheresis. It appeared possible to separate peaks in domains typical for apolipoprotein A- or B-containing lipoproteins. Several variables could be identified which influenced the results: the serum proteins, the temperature, the use of different spacers, the fluorescent marker and the quality of the capillary system. While dilution experiments appeared satisfactory, suppletion experiments with purified lipoproteins questioned specificity. Analysis of hyperlipemic samples underlined this. Our results support recent data in the literature: results obtained for LDL and HDL indices show a low correlation ($r < 0.60$) with LDL-cholesterol and HDL-cholesterol concentrations measured with conventional methodologies by bi-variance analysis. Reasons for this are the obvious differences in biophysical indices providing the separation with either method.

In conclusion: despite the occurrence of sharp peaks due to the use of spacers, the pattern obtained is difficult to translate in terms of conventional lipoproteins classification.

Key-words: capillary electrophoresis; isotachopheresis; lipoproteins; fluorescent probe; transfer.