

## Stanovení albuminurie – porovnání imunoturbidimetrické metody a vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Fořtová M.<sup>1,2</sup>, Klappková E.<sup>1</sup>, Průša R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>2</sup>Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN, Praha

### SOUHRN

*Cíl studie:* Cílem studie bylo zavést HPLC metodu pro stanovení albuminurie, potvrdit či vyvrátit tvrzení, že HPLC poskytuje falešně vyšší koncentrace albuminu v moči díky interferenci s dalšími bílkoviny, porovnat koncentrace albuminu v moči stanovené HPLC a imunoturbidimetricky.

*Materiál a metody:* Metodu HPLC jsme zavedli za následujících podmínek: složení mobilní fáze: složka A) voda, složka B) acetonitril, složka C) 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a složka D) 1 % trifluoroctová kyselina; kontinuální gradient mobilní fáze; průtok mobilní fáze 2 ml/min; teplota analýzy 22 °C; UV detekce při 280 nm; kolona Zorbax 300 SB-C3, kapalinový chromatograf Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). Analyzovali jsme 2 směsné moči. Do směsi 1 připravené ze vzorků 30 imunoturbidimetricky negativních močí byl přidán standard albuminu. Směs 2 byla připravena z 30 imunoturbidimetricky „mikroalbuminurických“ vzorků. Soubor tvořilo 301 pacientů (161 diabetiků a 140 nediatetiků, 182 mužů a 119 žen, věk 44,1 ± 25,3 let).

*Výsledky:* Za uvedených analytických podmínek transferrin, α-1-kyselý glykoprotein, α-1-antitrypsin, α-1-antichymotrypsin a hemopexin neinterferují s albuminem, zatímco eluční křivka prealbuminu se štěpí na několik píků, z nichž některé z nich s albuminem koeluuují. Vzhledem k nízkým sérovým i močovým koncentracím prealbuminu lze usuzovat, že je tato interference klinicky nevýznamná. Ve směsi 1 jsme nezaznamenali významný rozdíl v hodnotách albuminurie mezi metodami (79,1 mg/l imunoturbidimetricky vs. 82,5 mg/l HPLC), oproti tomu, ve směsi 2 byla HPLC zjištěná hodnota o 26 % vyšší (79,5 mg/l imunoturbidimetricky vs. 99,9 mg/l HPLC). Tyto výsledky nasvědčují na existenci imunonereaktivního albuminu. Zjistili jsme statisticky významný rozdíl mezi metodami v případě patientských vzorků moči (soubor všech pacientů [medián ± SEM]: 21,1 ± 38,2 mg/l imunoturbidimetricky vs. 30,4 ± 42,2 mg/l HPLC, p < 0,0001, Mann-Whitneyův test), nejmarkantnější u imunoturbidimetricky „normoalbuminurických“ diabetiků.

*Závěr:* Naše výsledky svědčí pro vyšší senzitivitu HPLC metody pro zachycení „mikroalbuminurie“ (ve srovnání s imunoturbidimetrií). Uvedená HPLC metoda je dostatečně specifická pro stanovení albuminu v moči, nedochází k významným interferencím s dalšími bílkoviny.

*Klíčová slova:* albuminurie, HPLC, imunoturbidimetrie, imunonereaktivní albumin, diabetes

### SUMMARY

**Fořtová M., Klappková E., Průša R.: Assessment of albuminuria – Comparison between immunoturbidimetric and high performance liquid chromatographic methods**

*Objective:* The aim of our study was the implementation of HPLC method for assessing albuminuria, confirming or refusing the hypothesis about the existence of co-eluting proteins, and comparison of urine albumin concentrations assessed using HPLC and immunoturbidimetric methods in patient samples.

*Material and Methods:* We developed the HPLC method under these chromatographic conditions: multilinear gradient of mobile phase consisting of water (solvent A), acetonitrile (solvent B), 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (solvent C), 1 % trifluoroacetic acid (solvent D), flow rate 2 mL/min, temperature 22 °C, UV detection in the wavelength 280 nm, chromatographic column Zorbax 300 SB-C3, liquid chromatograph Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). We analyzed two mixtures of urine. The first one was prepared from 30 patient urine samples with immunoturbidimetrically physiological albuminuria, to which we added albumin standard. The second mixture was prepared from 30 patient urine samples with mild albuminuria. We analyzed and compared albuminuria in a group of 301 patients (161 diabetics and 140 nondiabetics, 182 males and 119 females, age 44.1 ± 25.3 years).

*Results:* Transferrin, α-1-acid glycoprotein, α-1-antitrypsin, α-1-antichymotrypsin and hemopexin do not interfere with albumin in the presented HPLC method, whereas the elution curve of prealbumin splits into several peaks, of which a few interfere with albumin. With regard to very low prealbumin concentrations in serum and in urine, we can assume that this interference is not of clinical importance. In mixture 1 we did not find a significant difference between the albuminuria assessed using both methods (79.1 mg/L immunoturbidimetrically vs. 82.5 mg/L HPLC), while in mixture 2 we measured over 26 % greater albuminuria using HPLC (79.5 mg/L immunoturbidimetrically vs. 99.9 mg/L HPLC). These results suggest that immunoreactive albumin really exists. We found a statistically significant difference between the methods in patient urine samples (entire patients' group: [median ± SEM]: 21.1 ± 38.2 mg/L immunoturbidimetrically vs. 30.4 ± 42.2 mg/L HPLC, p < 0.0001, Mann-Whitney test), which was most remarkable in the group of diabetic patients with immunoturbidimetrically physiological albuminuria.

*Conclusion:* Our results prove that the HPLC method for albumin detection is more sensitive than immunoturbidimetry and sufficiently specific and there are no significant interferences with other proteins.

*Key words:* albuminuria, HPLC, immunoturbidimetry, immunoreactive albumin, diabetes