

高效液相色谱法检测糖化血红蛋白的方法学评价

张文华, 侯晗宇, 张建荣, 王菊英, 周立荣 (宁夏医科大学总医院医学实验中心, 银川 750004)

【摘要】 目的 采用高效液相色谱法(HPLC), 评价全自动糖化血红蛋白分析仪 HLC-723 G8 性能。方法 根据美国国家实验室标准委员会 EP5-A、EP9-A 文件要求, 通过对不同浓度糖化血红蛋白(HbA1c)样品含量的测定, 对仪器精密度、准确度、携带污染率、线性进行评价。结果 批内 CV 均小于 1.0%, 批间 CV 均小于 1.3%; 准确度满足判断标准; 携带污染率小于 2%; HbA1c 在 4.6%~18.1% 范围内线性良好(a 值在 0.95~1.05, $r^2 \geq 0.98$)。结论 该仪器主要指标精密度高、重复性好、结果准确、交叉污染小、线性范围宽, 完全能满足临床检测要求。

【关键词】 高效液相色谱法; 糖化血红蛋白; 方法学评价

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.18.024 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)18-2305-02

high performance liquid chromatography (HPLC) detection of HbA1c method evaluation ZHANG Wen-hua, HOU Han-yu, ZHANG Jian-rong, WANG Ju-ying, ZHOU Li-rong (Medical Research Center, Ningxia Medical University Hospital, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

【Abstract】 **Objective** To evaluate of fully automated glycosylated hemoglobin analyzer HLC-723 the G8 performance by using high performance liquid chromatography(HPLC). **Methods** According to the United States National Laboratory Standards Board EP5-A, EP9-A document requirements, different concentrations of glycosylated hemoglobin (HbA1c) were determined. The instrument precision, accuracy, carryover, linearity were evaluated. **Results** The results of CV was less than 1.0%, inter-assay CV was less than 1.3%; accuracy could meet the criteria; carryover was less than 2%; HbA1c was in the linear range of 4.6%—18.1% (a value of 0.95—1.05, $r^2 \geq 0.98$). **Conclusion** The main indicators of the instrument have high precision, good repeatability and accurate, no cross-contamination between samples, a wide linear range, it is fully able to meet the requirements of clinical testing.

【Key words】 high performance liquid chromatography; glycosylated hemoglobin; method evaluation

糖化血红蛋白(HbA1c)作为糖尿病筛选、诊断、血糖控制、疗效评价的有效指标, 在临床上已广泛使用, 是监测糖尿病的金标准^[1], 高效液相色谱法(HPLC)则被列为检测 HbA1c 参考方法。本中心引进一台日本 TOSOH 公司 HLC-723 G8 全自动糖化血红蛋白分析仪, 除用于测定 HbA1c 外, 还可获得 HbA1、血红蛋白 F(HbF) 的值, 现对其检测 HbA1c 性能进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血样本, 来自本院门诊及住院患者。

1.1.2 仪器 日本 TOSOH 公司 HLC-723 G8 全自动糖化血红蛋白分析仪。

1.1.3 试剂 试剂(批号 EB-102S)、校准品(批号 ZS0002)、质控品(批号 100842), 均为原装配套, 由日本 TOSOH 公司提供。

1.2 方法 样本检测前均采用原公司提供的配套校准品进行校准, 并用 2 个浓度水平的质控品进行控制, 结果在控, 手工操作步骤严格按照《全国临床检验操作规程》^[2] 进行。

1.2.1 精密度试验

1.2.1.1 批内试验 选取新鲜全血样本, 含正常、异常浓度, 分别测定 HbA1c 的含量, 在一天内重复测定 20 次, 计算变异系数。

1.2.1.2 批间试验 采用质控品, 含正常、异常浓度, 分别测定 HbA1c 的含量, 每天上下午各测定 1 次, 连续测定 10 d, 计算变异系数。

1.2.2 准确度试验 使用校准物在分析仪上连续进行 10 次

分析, 统计结果, 计算结果均值与标定值的偏倚, 偏倚应小于或等于 3.0%。

1.2.3 携带污染率 取高浓度全血样本, 混合均匀后连续测定 3 次, 测定值分别为 H1、H2、H3; 再取低浓度全血样本, 连续测定 3 次, 测定值分别为 L1、L2、L3。按公式计算携带污染率($\leq 3.0\%$)。携带污染率 = $(L1 - L3) \times 100\% / (H3 - L3)$ 。

1.2.4 线性试验 (1) 选取高值 HbA1c (18.1%) 和低值 HbA1c (4.7%) 的人全血样品。(2) 吸取 20 μ L 的高值样品注入样品管, 加入 4 mL (200 倍稀释) 溶血洗净液配制成样品 A。(3) 吸取 20 μ L 的低值样品注入样品管, 加入 4 mL (200 倍稀释) 溶血洗净液配制成样品 B。(4) 在分析仪上测定样品 A 和样品 B, 根据打印结果分别确认两个样品的色谱峰总面积 (Total Area), 该总面积表示 HbA1c 的浓度。(5) 调整总面积, 使样品 A 与样品 B 的色谱峰总面积相近, 此时调整后样品 B 的浓度为 4.6%。(6) 按照 100%、80%、60%、40%、20%、0% 比例稀释混匀 (B 为稀释液), 每个样品检测 3 次, 对检测结果的均值和预期值进行直线回归统计。将实测值与理论值作比较 (偏离应小于 10%), 计算 $y = ax + b$, 验证线性。(7) 要求: a 值在 1 ± 0.05 范围内, 相关系数 $r^2 \geq 0.95$ 。

2 结果

2.1 精密度试验 见表 1。

2.2 准确度试验 见表 2。

2.3 携带污染率 本次试验验证的携带污染率为 1.09%, 满足要求 ($\leq 3.0\%$)。

2.4 线性试验 将检测结果的均值和预期值进行直线回归统计。将实测值与理论值作比较 (偏离应小于 10%), 计算 $y = ax$

+b, 其中 $a=0.9832, r^2=0.9922$, 满足要求 (a 值在 1 ± 0.05 范围内, 相关系数 $r^2 \geq 0.95$)。

表 1 精密度试验

项目	HbA1c	
	水平 1	水平 2
批内	n	10
	\bar{x}	5.63
	s	0.048
	CV	0.85%
批间	n	10
	\bar{x}	5.9
	s	0.08
	CV	1.29%

表 2 准确度试验-定值校准品

项目	HbA1c	
	低值	高值
n	10	10
\bar{x}	6.00	10.99
标定值	6.00	11.00
偏倚	0.00%	-0.09%
判断标准	$\leq 3.0\%$	$\leq 3.0\%$

3 讨 论

HbA1c 水平反映的是在检测前 120 d 内的平均血糖水平, 而与抽血时间、患者是否空腹等因素无关, 是监测糖尿病控制情况的良好指标^[3]。

美国颁布的《临床实验室修正法案的最终法规》、ISO 15189 医学实验室认可标准以及美国病理家学会 (CAP) 的认证标准^[4-6]均要求实验室对引进或改变的检测系统进行性能验证后方可用于常规工作。全自动糖化血红蛋白分析仪 HLC-723 G8 基于高效液相色谱分析法的原理, 通过阳离子交换柱利用电位差将血红蛋白组分分离。利用 3 种不同浓度洗脱液使包括 HbA1c 在内的多种血红蛋白进行梯度分离, 分离成 6 个部分。经检测器检测分离后的各血红蛋白组分的吸光度, 以

百分率形式表示出各血红蛋白的组分结果与色谱图。作者通过测定全血中 HbA1c 的含量, 从以下几个方面对该仪器性能进行综合评价。

3.1 精密度 批内变异系数小于 1.0%, 批间变异系数小于 1.3%, 符合 CLIA'88 对室内评估的允许误差要求, 1/4 允许误差范围为批内不精密度判断限 ($\leq 3.0\%$), 1/3 允许误差范围为日间不精密度判断限 ($\leq 4.0\%$), 说明该仪器的重复性好, 测定结果稳定。

3.2 准确度评价 分析厂商提供的 HbA1c 校准品, 用校准品校准后, 连续重复测定该批号校准品 10 次, 统计结果, 计算检测均值与标定值的偏倚, 测试结果偏倚均小于 3.0%, 满足要求, 说明该仪器准确性高。

3.3 其携带污染率小于或等于 3.0%, 样品间的交叉污染极小, 满足检测要求。

3.4 通过线性试验, 可观察各稀释点均呈现较好线性, a 值及 r^2 均满足要求, 试验所验证项目的测量范围符合线性。

综上所述, 全自动糖化血红蛋白分析仪 HLC-723 G8 精密度高、准确性好、交叉污染极小, 且具有良好的线性等优点; 另外, 测试速度快、操作简便。为临床调整糖尿病治疗方案提供准确依据, 有很好的应用前景。

参考文献

- [1] 王笠, 李琳. 糖化血红蛋白的检测和临床应用[J]. 上海医学检验杂志, 2003, 18(2): 119-121.
- [2] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 223.
- [3] 纪立农, 宁光. 糖化血红蛋白[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 2-16.
- [4] 魏昊, 丛玉隆. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004: 59-75.
- [5] Department of Health and human Services, Centers for Medicare & Medicaid Services. Clinical Laboratory improvement amendments of 1988: final rule[M]. Fed Register, 2003; 3704.
- [6] 毕波, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 143-145.

(收稿日期: 2012-05-05)

(上接第 2304 页)

因, 作者认为 Cys C 在血液与间质流体之间不存在大的差异。

综上所述, 作者认为 CysC 能够准确可靠的使用胶颗粒增强免疫透射比浊法测定末梢血样本。

参考文献

- [1] Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate[J]. Clin Chem, 2002, 48(5): 699-707.
- [2] 景戌, 吴立翔. 静脉血与末梢血检验结果比较[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(4): 224-225.
- [3] Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene[J]. Biochem

J, 1990, 268(2): 287-294.

- [4] Bökenkamp A, Dieterich C, Schumann G. Pediatric reference values for cystatin C revisited[J]. Pediatr Nephrol, 1999, 13(4): 367-368.
- [5] 刘军, 杨好治. 胱抑素 C 的临床意义与测定应用[J]. 检验医学与临床, 2008, 19(2): 78-79.
- [6] 陶松青. 血清胱抑素 C 检测判断早期肾损伤的价值[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(8): 875.
- [7] 王萍, 牛莉莉, 阎萍. 糖尿病肾病患者血清胱抑素 C 水平变化及意义[J]. 实用医技杂志, 2012, 19(2): 160-161.

(收稿日期: 2012-04-18)