

糖化血红蛋白色谱柱活化时间及影响测定准确性的观察研究*

张 伟, 胡江红, 汤学彪, 汪永强, 袁平宗[△] (四川省内江市第二人民医院检验科 641000)

【摘要】 目的 研究 Bio-Rad D10 糖化血红蛋白仪更换新色谱柱后活化的平衡时间, 以及对糖化血红蛋白 (HbA1c) 测定准确性的影响。方法 新色谱柱安装并活化后校标使用, 每 3 h 测 1 次卫生部临床检验中心 HbA1c 室间质评标本, 连续比较相邻两时间点间结果的差异。无显著性差异后再次校标测试, 比较校标前后准确性的变化; 以室间质评通过标准 (靶值 $\pm 8\% \times$ 靶值) 为水平, 绘制各时间点偏倚散点图及其绝对平均值的趋势线, 根据范围大小及线性变化判断活化平衡时间; 为排除进样对活化时间的干扰, 用另一根同批号的新色谱柱做验证实验, 即经活化静置该段平衡时间后校标测试, 观察其变异系数 (CV) 及与靶值的偏差, 以检测指南中的质量目标来判断其测定准确性。结果 0、3、6 h 间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 6 h 与 9 h 比较及 9 h 校标后与 12 h 比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。偏倚从 $-11.3\% \sim 28.9\%$ 逐渐下降为 $-5.7\% \sim 11.6\%$ 后趋于平稳, 6 h 处为拐点, 校标后继续维持在 $-1.1\% \sim 4.3\%$ 。校标前后两段时间偏倚绝对值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 验证实验批内和日间 CV 分别为 $1.58\% \sim 1.87\%$ 和 $1.72\% \sim 2.64\%$, 偏差在 $\pm 5\%$ 以内, 符合质量目标的要求。结论 Bio-Rad D10 糖化血红蛋白仪色谱柱活化 6 h 已达到平衡, 未充分活化即开始校标测定, 可导致测定结果不准确。

【关键词】 糖化血红蛋白; 色谱柱; 活化时间; 准确性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.011 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0176-03

Observational study on glycosylated hemoglobin chromatographic column activation time and influence of detection accuracy* ZHANG Wei, HU Jiang-hong, TANG Xue-biao, WANG Yong-qiang, YUAN Ping-zong[△] (Department of Clinical Laboratory, Neijiang Municipal Second People's Hospital, Neijiang, Sichuan 641000, China)

【Abstract】 Objective To study the activation equilibrium time after replacing the chromatographic column in the Bio-Rad D10 glycosylated hemoglobin analyzer, and its influence on the detection accuracy of glycosylated hemoglobin (HbA1c). **Methods** The new chromatographic column was installed, activated, calibrated and used. Then the HbA1c external quality assessment (EQA) samples provided by of the Clinical Laboratory Center of the Ministry of Health (NCCL) were detected once per 3 h. The difference of the detection results was compared between the two adjacent time points. The calibration and detection were performed again when without significant difference, the change of accuracy was compared before and after calibration; the bias scattered plot at each time point and the trend line of its average absolute values were drawn with the EQA passing criteria (target value $\pm 8\% \times$ target value) as the level, the activation equilibrium time was judged according to the range size and linear change; another new chromatographic column with the same batch was used to perform the verification test for excluding the interference of sample injection on the activation time, i. e. after activation and atanding for this equilibrium time, then the calibration and detection were conducted, the bias of coefficient of variation (CV) with the target value was observed, the quality target in the detection guidance was detected for determining its accuracy. **Results** The difference among the time points of 0, 3, 6 h was statistically significant ($P < 0.05$), there were no statistically significant differences between 6 h and 9 h and between 9 h and 12 h ($P > 0.05$). The bias was gradually decreased from $-11.3\% \sim 28.9\%$ to $-5.7\% \sim 11.6\%$ and then trended to stabilize, the inflection point was at 6 h, after calibration, the bias continuously maintained at $-1.1\% \sim 4.3\%$. The absolute values of bias had statistically significant difference in the two time perids before and after calibration ($P < 0.05$). In the verification tests, the intra and inter day CV were $1.58\% \sim 1.87\%$ and $1.72\% \sim 2.64\%$, and the bias was less within $\pm 5\%$, which were accordance with the requirements of quality objectives. **Conclusion** The chromatographic column of the Bio-Rad D10 HbA1c analyzer can reach equilibrium. Starting calibration and detection without sufficient activation could lead to inaccuracy of the detection results.

【Key words】 hemoglobin A1c; glycosylated; activation time; accuracy

离子交换高效液相色谱法 (HPLC) 测定糖化血红蛋白 (HbA1c) 是全球标准化计划的指定比对方法^[1-2], 其测定原理是将预先编程设置的不同离子梯度的缓冲液注入系统, 同色谱柱中耦联离子结合程度不同的各血红蛋白成分分离, 经分析通路和 415 nm 光谱测量得到一系列色谱峰并计算 HbA1c 的峰

面积比得出结果^[3]。色谱柱是其检测的核心部件, 伯乐厂家建议最大检测量为 400 个。新柱更换需要进行灌注活化, 作者在实际工作中发现, 经灌注后平衡多少时间可以使用及活化未达平衡是否会影响测定准确性等问题, 说明书或操作规程上并没有明确阐述, 文献中对此问题也鲜见报道。本研究使用卫生部

* 基金项目: 四川省卫生厅科研项目 (100330)。

作者简介: 张伟, 男, 硕士, 主管检验师, 主要从事生化检验工作。 [△] 通讯作者, E-mail: 18990550580@126.com。

HbA1c 室间质评标本进行实验,其优点为采用混合人抗凝全血,基质更接近患者标本。而普通室内质控品属于冻干粉,在更换试剂或色谱柱时可能会有基质效应,程度取决于所用方法^[1]。更重要的是,卫生部临床检验中心是运行国际临床化学会(IFCC)参考方法的认证实验室,HbA1c 室间质评采用不分组、以参考方法定值为靶值的评价方法^[2],这有利于观察精密度和正确度。通过研究活化后几个不同时间点标本测定结果及准确性的变化来分析判断活化达到平衡的时间。同时为排除平衡前进样对活化产生的干扰设置了验证实验,即色谱柱活化并静置该时间点后开始校标进样,分析其是否达到平衡及准确性。现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 使用 2015 年卫生部临检中心 HbA1c 室间质评 201511、201512、201513、201514 和 201515 共 5 个浓度的标本。收到标本后 1 周内完成该实验,2~5 °C 保存,采用标本稀释模式进样(5 μL 标本加入 1.5 mL wash/dilution 试剂,用 1.5 mL 白色标本载管上机),每次取样完成后及时放回冰箱。

1.2 仪器与试剂 仪器为 Bio-Rad D10 糖化血红蛋白仪,分析柱 3 根(批号 A22250AQ)、试剂包(清洗缓冲液 1、清洗缓冲液 2 和清洗/稀释液,批号 AA40199)、校标液(批号 S40112)和灌注用 Prime 全血引物(批号 6400143)均购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 新色谱柱的活化处理 按照说明书的方法进行。首先将灌注用全血引物 primer 从 2~5 °C 冰箱取出 1 瓶,加 1 mL wash/dilution 复溶,平衡到室温使用,休眠状态下更换新柱-系统冲洗-灌注。

1.3.2 活化时间及对测定准确性的影响 分次安装 2 根新色谱柱(柱 1 和柱 2)进行活化处理立即校标,校标完成记录时间为 0 h,校标物为冻干粉加 7 mL wash/dilution 复溶,平衡到室温

使用。每个时间点标本测定在 30 min 内完成,每次各测定 2 遍,按 201511~201515,201515~201511 的顺序进行,每 3 h 测定 1 次。连续比较相邻两时间点间结果的差异,当 P>0.05 时重新校标,再次测定两个时间点。记录测定值及偏倚,比较校标前后两段时间偏倚的差异。比较分析柱 1 和柱 2 测定数据间的差异,判断同批号的色谱柱性能是否一致。以本次室间质评通过标准(靶值±8%×靶值)为水平,以时间点为横坐标,以偏倚为纵坐标,绘制各时间点偏倚的散点图和绝对平均值的趋势线,根据范围大小变化及线性来判断活化平衡时间。

1.3.3 验证实验 选择第 3 根新色谱柱用于验证实验。即经活化后静置该段平衡时间开始校标测试,第 1 天 6、9、12、24 h 进行测试,以后早晚各测 1 次,每次进样 2 遍,按上述顺序进行,共测 5 d。观察变异系数(CV)及与靶值的偏差,以室内 CV<3%,与卫生部回报结果各靶值的差值在±0.5%范围内为标准判断测定结果的准确性。

1.4 统计学处理 使用 Excel 制作散点图和趋势线,SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足方差齐性的正态分布资料比较采用两独立标本 t 检验,非正态分布资料采用秩和检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 柱 1 和柱 2 各时间点测定数据的比较 标本 201511~201515 的靶值分别为 5.3、6.1、6.9、7.6、9.2。0 h 与 3 h、3 h 与 6 h 测定结果比较,差异有统计学意义(P<0.05),6 h 和 9 h 比较,差异无统计学意义(P>0.05)。此时再次校标后重测 9 h 前后时间段进行偏倚绝对值比较,差异有统计学意义(P<0.05)。结果表明分析柱活化后可影响测定结果的变化,且随着时间的延长变化幅度逐渐减小;活化平衡后校标测定值准确性高于活化后立即校标测定值。两根色谱柱所测定的数据比较分析,差异无统计学意义(P>0.05),表明相同批号的色谱柱性能一致。见表 1。

表 1 5 个标本各时间点 HbA1c 测定值及偏倚(%)

| 标本号 | 柱号 | 0 h | | 3 h | | 6 h | | 9 h | | 9 h 重新校标 | | 12 h | |
|--------|-----|------|-------|-----|------|-----|------|-----|------|----------|------|------|------|
| | | 测定值 | 偏倚 | 测定值 | 偏倚 | 测定值 | 偏倚 | 测定值 | 偏倚 | 测定值 | 偏倚 | 测定值 | 偏倚 |
| 201511 | 柱 1 | 4.7 | -11.3 | 4.8 | -9.4 | 5.1 | -3.8 | 5.1 | -3.8 | 5.5 | 3.8 | 5.5 | 3.8 |
| | | 4.7 | -11.3 | 4.8 | -9.4 | 5.1 | -3.8 | 5.2 | -1.9 | 5.4 | 1.9 | 5.5 | 3.8 |
| | 柱 2 | 4.9 | -7.5 | 4.9 | -7.5 | 5.0 | -5.7 | 5.0 | -5.7 | 5.4 | 1.9 | 5.4 | 1.9 |
| | | 4.9 | -7.5 | 4.9 | -7.5 | 5.2 | -1.9 | 5.1 | -3.8 | 5.5 | 3.8 | 5.4 | 1.9 |
| 201512 | 柱 1 | 5.8 | -4.9 | 5.9 | -3.3 | 6.1 | 0.0 | 6.0 | -1.6 | 6.2 | 1.6 | 6.2 | 1.6 |
| | | 5.9 | -3.3 | 6.0 | -1.6 | 5.9 | -3.3 | 6.0 | -1.6 | 6.1 | 0.0 | 6.2 | 1.6 |
| | 柱 2 | 5.9 | -3.3 | 6.0 | -1.6 | 6.0 | -1.6 | 6.1 | 0.0 | 6.1 | 0.0 | 6.1 | 0.0 |
| | | 5.9 | -3.3 | 6.0 | -1.6 | 6.0 | -1.6 | 6.2 | 1.6 | 6.3 | 3.3 | 6.2 | 1.6 |
| 201513 | 柱 1 | 7.8 | 13.0 | 7.8 | 13.0 | 7.6 | 10.1 | 7.6 | 10.1 | 7.2 | 4.3 | 7.1 | 2.9 |
| | | 7.6 | 10.1 | 7.8 | 13.0 | 7.5 | 8.7 | 7.5 | 8.7 | 7.2 | 4.3 | 7.2 | 4.3 |
| | 柱 2 | 8.1 | 17.4 | 7.8 | 13.0 | 7.7 | 11.6 | 7.6 | 10.1 | 7.1 | 2.9 | 7.1 | 2.9 |
| | | 8.1 | 17.4 | 7.8 | 13.0 | 7.7 | 11.6 | 7.7 | 11.6 | 7.0 | 1.4 | 7.1 | 2.9 |
| 201514 | 柱 1 | 9.1 | 19.7 | 8.5 | 11.8 | 7.7 | 1.3 | 7.7 | 1.3 | 7.7 | 1.3 | 7.6 | 0.0 |
| | | 9.4 | 23.7 | 8.5 | 11.8 | 7.5 | -1.3 | 7.7 | 1.3 | 7.6 | 0.0 | 7.6 | 0.0 |
| | 柱 2 | 9.5 | 25.0 | 8.7 | 14.5 | 7.7 | 1.3 | 7.6 | 0.0 | 7.6 | 0.0 | 7.7 | 1.3 |
| | | 9.8 | 28.9 | 8.8 | 15.8 | 7.7 | 1.3 | 7.7 | 1.3 | 7.6 | 0.0 | 7.5 | -1.3 |
| 201515 | 柱 1 | 10.0 | 8.7 | 9.5 | 3.3 | 9.9 | 7.6 | 9.8 | 6.5 | 9.2 | 0.0 | 9.3 | 1.1 |
| | | 10.2 | 10.9 | 9.5 | 3.3 | 9.7 | 5.4 | 9.8 | 6.5 | 9.2 | 0.0 | 9.1 | -1.1 |
| | 柱 2 | 10.1 | 9.8 | 9.7 | 5.4 | 9.7 | 5.4 | 9.8 | 6.5 | 9.1 | -1.1 | 9.2 | 0.0 |
| | | 10.3 | 12.0 | 9.8 | 6.5 | 9.8 | 6.5 | 9.7 | 5.4 | 9.1 | -1.1 | 9.1 | -1.1 |

2.2 各时间点偏倚散点图和趋势线 见图 1。0~9 h, 每个时间点都有偏倚超出±8%的情况, 但偏倚的范围逐渐减小, 从-11.3%~28.9%逐渐下降为-5.7%~11.6%后趋于平稳, 6 h 处为拐点, 校标后偏倚范围下降明显, 维持在-1.1%~4.3%。经过检测结果和偏倚比较可以看出色谱柱活化平衡的时间为 6 h。

2.3 验证实验结果 验证实验中 6、9、12 h 间结果差异无统计学意义($P>0.05$), 准确性主要以精密度和正确度评价。5 个标本各批内 CV 为 1.25%~1.87%, 日间 CV 为 1.72%~2.64%, 各标本 CV 和偏差, 见表 2。检测结果均符合《糖化血红蛋白实验室检测指南》提出的质量目标。这表明在活化 6 h

后进行校标测定有可靠的准确性。

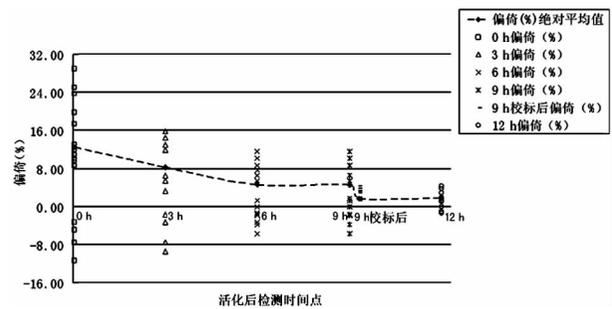


图 1 各时间点偏倚散点图及绝对平均值的趋势线

表 2 验证柱测定 5 个标本精密度和偏差 (%)

| 标本号 | 靶值 | 批内精密度 | | | 日间精密度 | | | 偏差 |
|--------|-----|-----------|---------|------|-----------|---------|------|----------|
| | | \bar{x} | s | CV | \bar{x} | s | CV | |
| 201511 | 5.3 | 5.27 | 0.098 5 | 1.87 | 5.22 | 0.130 9 | 2.51 | -0.3~0.1 |
| 201512 | 6.1 | 6.02 | 0.111 5 | 1.85 | 6.09 | 0.160 5 | 2.64 | -0.3~0.3 |
| 201513 | 6.9 | 7.05 | 0.131 4 | 1.86 | 7.01 | 0.139 2 | 1.99 | -0.1~0.3 |
| 201514 | 7.6 | 7.73 | 0.096 5 | 1.25 | 7.69 | 0.132 3 | 1.72 | -0.2~0.2 |
| 201515 | 9.2 | 9.38 | 0.148 5 | 1.58 | 9.30 | 0.181 5 | 1.95 | -0.3~0.3 |

3 讨论

目前, HbA1c 在欧美等地区不仅是血糖控制的监测指标, 还是糖尿病的诊断标准。我国未将 HbA1c 列入诊断标准的主要原因有两个, 其一, WHO 提出的诊断切点($>6.5\%$)是否适用于中国人群有待验证; 其二, 目前我国 HbA1c 测定标准化程度不够, 各实验室间结果差异较大, 如果采用 HbA1c 诊断糖尿病必然会造成很高的漏诊率和误诊率^[4]。随着糖尿病患者数量的增加, 糖尿病诊断及鉴别诊断对 HbA1c 检测的需求也越来越强烈。提高检验质量是 HbA1c 标准化工作的重中之重^[5-6]。

本实验中新色谱柱活化后各时间点的测定结果表现出不同的差异, 从趋势图中可见与靶值偏倚的绝对平均值逐渐减低并趋于稳定, 这说明测定准确性与其活化程度有着密切的关系。其原因可能是色谱柱进行活化时, 柱中填充料表面具有非特异性吸附能力的位点被饱和掉, 其速度取决于所测定物质的相对分子质量大小, 而血红蛋白是一种含铁的大分子蛋白, 其扩散速度相对较慢, 位点被完全饱和达到平衡需要一定的时间。趋势线 6 h 时出现拐点, 且经验证实验去除进样对活化进程的影响后确定在 6 h 时已达到活化平衡。然而不同批号的色谱柱其活化时间可能由于填充料位点数量的差异存在一定的误差, 本实验没有过多的探讨。但在实际工作中可将色谱柱活化后过夜使用, 保证其足够的活化时间。

专家共识 HbA1c 测定的质量目标是室内 CV 应小于 3.0%, 以小于 2.0% 为宜, 与可接受参考值的差值应在±0.5% 范围内, 以控制在±0.3% 范围内为宜^[7-8]。卫生部临床检验中心 2014 年的通过标准为靶值±10%×靶值, 而 2015 年已减小为靶值±8%×靶值。实验中 9 h 时间点校标前后偏倚绝对值比较, 差异有统计学意义($P<0.05$), 可见选择在活化或未活化状态下校标对测定准确性有影响。分析可能为色谱柱未充分活化时的校标曲线在活化平衡状态下测试某

些标本可能会带入一定的系统误差造成的, 色谱柱完全活化平衡后重新校标测试可以一定程度地提高检测质量。

参考文献

- [1] 王冬环, 陈文祥, 张传宝, 等. 糖化血红蛋白实验室检测指南[J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 12(8): 673-678.
- [2] 何祖玲. 糖化血红蛋白测定在糖尿病诊断中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(9): 1121-1122.
- [3] 林岚, 彭必江, 杜红心, 等. 离子交换高效液相色谱法测定糖化血红蛋白的初步评价[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(30): 7377-7378.
- [4] 王薇, 钟堃, 何法霖, 等. 我国糖化血红蛋白参考区间和切点调查与分析[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(12): 859-863.
- [5] 王冬环, 陈文祥. 糖化血红蛋白诊断糖尿病的时代——糖化血红蛋白实验室检测指南解读[J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 21(8): 679-681.
- [6] 陈晓婷, 李云飞, 张炳峰, 等. BIO-RAD Variant II TURBO 糖化血红蛋白仪色谱图分析及处理[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(18): 2455-2456.
- [7] 糖化血红蛋白测定专家共识委员会. 糖化血红蛋白测定专家共识[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 12(6): 853-858.
- [8] Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Position statement executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus[J]. Diabet Care, 2011, 34(6): 1419-1423.