

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.14.010

HLC-723 G8 分析仪的糖化血红蛋白质控品的研制与应用*

何 婕,朱淑娥,吴雄君,汪奇云,刘和录

广州医科大学附属深圳沙井医院检验科,广东深圳 518104

摘要:目的 用溶血法研制适合 HLC-723 G8 分析仪的糖化血红蛋白(HbA1c)质控品,并评价其应用效果。**方法** 选择临床标本 2 份,研制溶血比例,按照制备程序,保存于 3 种温度,评价自制质控品的稳定性及不同温度下的变化特点。**结果** 自制质控品的溶血比例在 80:1~500:1,中、高值累积 10 个月的不精密度分别为 1.21%、0.83%,室温颜色变化最快,-20℃保存稳定性>300 d。**结论** 自制 HbA1c 质控品按照溶血比例,可使 HbA1c 水平在 HLC-723 G8 分析仪上顺利被检测到,质控品的稳定性符合国际对 HbA1c 室内不精密度<2%的性能要求,值得临床参考使用。

关键词:自制; 糖化血红蛋白; 质控品; 溶血比例; 不精密度; HLC-723 G8 分析仪

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)14-1985-04

Research and application of glycosylated hemoglobin quality control product in HLC-723 G8 analyzer*

HE Jie, ZHU Shu'e, WU Xiongjun, WANG Qiyun, LIU Helu

Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Shajing Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Shenzhen, Guangdong 518104, China

Abstract: Objective To develop a quality control product of glycosylated hemoglobin (HbA1c) suitable for HLC-723 G8 analyzer by hemolysis method and evaluate its application effect. **Methods** Two clinical specimens were selected and stored at three kinds of temperatures according to the preparation procedure. The hemolysis ratio was developed and the stability of the self-made quality control product was evaluated. **Results** The hemolysis ratio of self-made quality control products was between 80:1 and 500:1. The coefficient of variation of the middle and high value accumulated for 10 months were 1.21% and 0.83% respectively. The color change at room temperature was the fastest, and the storage stability at -20℃ was more than 300 days. **Conclusion** The self-made quality control substance of HbA1c can detect the concentration of HbA1c smoothly on the HLC-723 G8 analyzer according to the hemolysis ratio. The stability of quality control product meets the international performance requirements of indoor imprecision of HbA1c (less than 2%), which is worthy of clinical reference.

Key words: self-made; glycosylated hemoglobin; quality control product; hemolysis ratio; imprecision; HLC-723 G8 analyzer

糖化血红蛋白(HbA1c)是葡萄糖与血红蛋白β珠蛋白链末端缬氨酸残基结合生成的稳定化合物,在糖尿病筛查、诊断及疗效监测中起重要作用^[1],2010年起,HbA1c先后被美国糖尿病协会(ADA)、国际糖尿病联盟(IDF)、世界卫生组织(WHO)等纳入糖尿病诊断标准^[2]。做好 HbA1c 质控既是临床诊断的需求,也是实验室内部质控的要求。目前国内尚无商品化的 HbA1c 质控品,自制质控品虽已陆续被报道,但是针对 TOSOH HLC-723 G8 分析仪,采用溶血法制备质控品,确定溶血比例,并考察 3 种温度下质控品的稳定性,却鲜见报道。本课题组研制的 HbA1c 中、

高值质控品,其不精密度<2%,符合国际对 HbA1c 室内不精密度<2%的性能要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 日本 TOSOH 公司 HLC-723 G8 全自动 HbA1c 分析仪及原装配套试剂、校准品(批号 ZS6001,水平为 5.56%、10.48%)、质控品(批号 AB5060,水平为 4.9%、9.9%)。TOSOH 公司提供的 HbA1c 溶血剂(批号:HW-10C,主要组分:去离子水、EDTA、TritonX、<0.1%的叠氮钠)及全自动平衡离心机,日本三洋-20℃低温冰箱,0.5 mL 一次性塑料离心管(江苏康健医疗有限公司),罗氏 Combas

* 基金项目:广东省深圳市宝安区科技计划项目(2016CX132)。

作者简介:何婕,女,主管技师,主要从事生化和微生物检验研究。

8000c 701 生化分析仪(简称罗氏 701),罗氏血清指数试剂(批号 142744),0.9%的氯化钠注射液(广西裕源药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 质控品的采集 筛选本院患者近日新鲜 EDTA-K₂ 抗凝血标本 2 份,无溶血、黄疸、脂浊,HBsAg 阴性,HCV 阴性,梅毒阴性,HIV 阴性,血红蛋白(Hb)为 120 g/L。一份标本 HbA1c 水平为 4.8%~5.0%,作为中值质控品的候选,另一份标本 HbA1c 水平为 9.8%~10.0%,作为高值质控品的候选。

1.2.2 质控品溶血比例的研制 采用溶血法制备质控品。将中高值质控品用 TOSOH 公司提供的 HbA1c 溶血剂制成溶血液,选用中值质控品为浅红色,高值质控品为大红色,以此区分不同水平的质控品,将一系列水平的溶血液在罗氏 701 上进行溶血值、吸光度的测定,然后在 HLC-723 G8 分析仪上行 HbA1c 水平测定,观察总面积,以此确定溶血剂和血液的比例。

1.2.3 质控品的制备 将 2 份 EDTA-K₂ 抗凝血标本离心后去除上层血浆,加入等体积生理盐水,充分洗涤,至上清液葡萄糖水平检测为阴性,维持 Hb 水平 120 g/L,以此获得等渗血液,混匀,中值按 500:1 的比例,80 mL HbA1c 溶血剂+160 μ L 混悬液;高值按 80:1 的比例,80 mL HbA1c 溶血剂+1 000 μ L 混悬液,充分溶解,混匀,分装。

1.2.4 质控品的赋值 测定前,使用日本东曹原装校准品、质控品对 HLC-723 G8 分析仪进行校准、质控,在仪器稳定、在控的前提下,取已制备好的中值、高值质控品各 20 支,每支连续测定 2 次,每种水平均获得 40 个数据,统计所得的均值 \bar{x} 作为预期靶值,

$\bar{x} \pm 2s$ 作为可接受范围。

1.2.5 质控品的分装保存 将已配制好的中值、高值质控品各分成 3 份,第 1 份 60 支,第 2 份 120 支,第 3 份 350 支,按 150 μ L 的规格分装至有盖的灭菌 EP 管中,封口,标注,分别置室温(18~25 $^{\circ}$ C)、4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C 避光保存。

1.2.6 质控品的效能检测 启用-20 $^{\circ}$ C 保存下的自制质控品与日本东曹的原装定值质控品进行连续 21 d 比较,通过观察记录,比较自制质控品的质控效果。

1.2.7 3 种温度下质控品的观察及稳定性评价 将 3 种保存温度下的质控品取出,与原装质控品同时进行室内质控,记录检测结果。如质控结果一直在控,继续使用该保存温度的质控品。如失控,则分析原因,确认为质控品失效造成,则停用该保存温度的质控品,启用下一温度保存条件下的质控品。以此类推,连续检测 10 个月。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析,呈正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,自制质控品与原装质控品的比较采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 溶血比例的确定 选用 Hb 为 120 g/L 的标本,在中值配制时,400 μ L 溶血剂+0.8 μ L 全血,不宜高于 500:1 的比例,太稀会导致 Hb 水平过低,HbA1c 不能被检测。在高值配制时,400 μ L 溶血剂+5 μ L 全血,不宜低于 80:1 的比例,太浓会导致 Hb 水平过高,不能被检测。因此全血的溶血比例为 80:1~500:1 可保证 HbA1c 顺利被检测。其研制结果见表 1。

表 1 溶血比例研制表

编号	溶血剂(μ L)	全血量(μ L)	HbA1c(%)	总面积($mV \cdot min$)	溶血值	ABS
中值 1	400	0.6	无值	393.63(总面积太低)	20	50
中值 2	400	0.7	无值	475.59(总面积太低)	23	61
中值 3	400	0.8	5.00	593.73	31	80
中值 4	400	0.9	5.00	706.76	38	98
中值 5	400	1.0	5.00	732.45	40	98
高值 1	400	5.0	5.20	2 648.42	175	440
高值 2	400	6.0	无值	3 063.28	208	526
高值 3	400	7.0	无值	3 147.63	215	540
高值 4	400	8.0	无值	3 355.01(总面积太高)	231	582
高值 5	400	10.0	无值	4 236.58(总面积太高)	317	796

注:总面积值由 HLC-723 G8 分析仪检测 HbA1c 水平的色谱图提供;溶血值和 ABS 由罗氏 701 仪器提供,检测试剂盒为罗氏血清指数检测试剂盒

2.2 质控品的赋值 制备完成后的质控品,获得的

40 个数据,经计算,取得的结果见表 2。

表 2 自制质控品的赋值

质控品	预期靶值(\bar{x})	标准差(s)	不精密度(%)
中值	4.80	0.045	0.94
高值	10.05	0.060	0.60

2.3 质控品的效能检测 自制质控品与原装质控品进行连续 21 d 的比较,自制质控品的不精密度稍高于原装质控品,但是配对 t 检验结果显示,二者差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 自制质控品与原装质控品的比较 ($\bar{x}\pm s, n=21, \%$)

质控品	中值	高值
自制质控品	4.79 \pm 0.05	10.05 \pm 0.06
原装质控品	5.01 \pm 0.05	9.91 \pm 0.05
t	1.988	2.360
P	>0.05	>0.05

2.4 在 3 种温度下质控品的观察及稳定性评价 持续观察 10 个月,室温保存时间最短, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存时间最长, $>300\text{ d}$,累积 10 个月的不精密度值,中值为 1.21%,高值为 0.83%,符合国际上对 HbA1c 室内不精密度 $<2\%$ 的控制标准,3 种温度下的质控品稳定天数见表 4。

表 4 3 种温度下自制 HbA1c 质控品稳定天数(d)

质控品	室温(18~25 $^{\circ}\text{C}$)	4 $^{\circ}\text{C}$	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
中值	7	21	>300
高值	5	18	>300

3 讨论

目前,自制质控品已成为实验室实现节约成本、提高质量的一种重要手段,不少学者对自制质控品进行了大量研究。在自制质控品添加剂选择方面,各研究报道不尽相同,目前国内也对此尚无统一标准^[3-7]。离子交换层析法作为 IFCC 推荐的测量 HbA1c 的金标准,已被广泛应用于临床^[8],日本 TOSOH 公司生产的 HLC-723 G8 分析仪就是应用离子交换高效液相色谱法原理,借助于其电荷的差异,经由阳离子交换柱对 Hb 类物质进行分离及检测^[9-10]。为降低检测成本,本实验室需研制出适合 HLC-723 G8 分析仪的质控品。本研究选用临床标本和 TOSOH 公司提供的溶血剂,采用溶血法制备质控品,在制备过程中,以颜色的深浅来区分不同水平的质控品,减少临床上因颜色相近带来的操作错误,而低水平的 Hb 可导致色谱图的总面积 $<500\text{ mV}\cdot\text{min}$,高水平的 Hb 可导致色谱图的总面积 $>2\text{ }700\text{ mV}\cdot\text{min}$ 。因此,研究合适

的溶血比例是研制该质控品的前提。本研究选择 Hb 水平为 120 g/L,中值溶血比例为 500 : 1,高值溶血比例为 80 : 1,能够保证自制质控品 HbA1c 顺利被检测到,但是由于刚好处在临界值,是否应该降低中值,提高高值的溶血比例,值得进一步研究。溶血比例 80 : 1~500 : 1 可供临床测定 HbA1c 时作为参考稀释比例。

评价质控品好坏的关键是稳定性^[11-12]。室内质控的目的在于监测结果的精密度,以提高批间和批内检测结果的一致性^[13]。国际上对 HbA1c 的检测性能提出了控制标准,室内不精密度 $<2.0\%$,室间不精密度 $<3.5\%$ ^[14],本研究研制的 HbA1c 质控品,通过连续 21 d 与原装质控品的比较,二者与均值的差值比较,差异无统计学意义($P>0.05$),自制质控品达到了原装质控品的质控效果。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存下的中值、高值质控品累积不精密度值分别为 1.21% 和 0.83%,符合国际上对 HbA1c 室内不精密度 $<2\%$ 的要求。

HbA1c 化学结构通常为具有一个特定六肽的 Hb 分子,是葡萄糖和 Hb 链中 β -端结氨酸(β -中值-1-去氧果糖基 Hb)的一个稳定加合物^[15],本研究考察了溶血液保存在 3 种温度下, HbA1c 值的稳定性规律,常温稳定时间最短,颜色变化最快,中、高值分别在 7、5 d 出现失控,高值由开始的鲜红色渐变为红褐色。冷藏稳定时间相对较长,能稳定在 14 d 以上,高值在 14 d 仍保持鲜红色,中、高值分别在 21、18 d 出现失控,这与石晓东等^[16]报道的溶血液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 2 周内,仍表现出较好稳定性的结论基本一致。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 稳定性最佳,保存 10 个月后颜色未发生变化,其稳定性优于室温和冷藏。Hb 是由 4 个亚基和 4 个卟啉的复杂蛋白质,在脱离红细胞后容易解聚成为 $\alpha\beta$ 二聚体,同时卟啉环中的二价铁容易氧化成三价铁,使 Hb 变为无载氧活性的高铁 Hb(MetHb),它的 3 种构型,即氧合型、还原型和高铁氧化型,具有颜色变化规律^[17-18]。脱离的 Hb 在溶血液中容易被氧化,生成 MetHb,而温度高有利于氧化反应进行, Hb 发生改变,最后变为褐色,进而影响 HbA1c 的稳定性,这可能是 HbA1c 质控品在室温下难以长期保存的原因。

综上所述,使用临床新鲜标本,厂家提供的溶血剂,通过溶血比例、低温保存等方法,用溶血法制备适用于 HLC-723 G8 分析仪的 HbA1c 质控品,具有标本容易收集、试剂来源方便、不损伤仪器、成本低廉的特点,室内不精密度 $<2\%$,可实现室内质控的要求,值得临床参考使用。

参考文献

[1] 纪玲. 糖化血红蛋白检测技术的发展[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(11): 808-811.

- [2] 居漪. 再谈糖化血红蛋白[J]. 检验医学, 2015, 30(6): 547-553.
- [3] 许华斌, 李媛媛. 血细胞质控物开封后的稳定性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 31(5): 456-458.
- [4] International Organization for Standardization. Reference material general and statistical principles for certifications: ISO Guide 35[S]. Geneva: ISO, 2006.
- [5] 崔婷, 马建锋. 以患者新鲜血清标本制备室内控品的应用研究[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(6): 737-738.
- [6] JAMTSHO R X. Stability of lyophilized human serum for use as quality control material in Bhutan[J]. Indian J Clin Biochem, 2013, 28(4): 418-421.
- [7] 袁学进, 李全双, 邓演超. 自制糖化血红蛋白质控物及其性能评价[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(18): 2310-2311.
- [8] 刁奇志, 黄利君, 莫展, 等. 离子交换层析法离子交换层析法测量糖化血红蛋白的不确定度评定及应用[J]. 中国医药导报 2018, 15(10): 131-134.
- [9] 林振忠, 陈雅斌, 蒋建家, 等. 泉州健康成人糖化血红蛋白 A1c 水平及参考区间的研究[J]. 中国循证医学杂志, 2016, 8(10): 1121-1126.
- [10] 唐立萍, 欧元祝, 刘文彬, 等. 运用上海地区室间质评结果评价 2 种糖化血红蛋白 POCT 分析仪[J]. 检验医学, 2018, 6(4): 184.
- [11] 李金明, 申子瑜. 正确认识临床实验室认可与提高检验质量之间的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 136-139.
- [12] 张秀明, 庄俊华, 郑松柏, 等. 临床化学发光免疫法检测 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(11): 1293-1297.
- [13] 薛一峰, 黄建荣. 自制电化学发光检测 N 末端 B 型利钠肽室内质控物及应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(19): 2718-2722.
- [14] SACKS D B, ARNOLD M, BAKRIS G L, et al. Position statement executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2011, 34(6): 1419-1423.
- [15] NORDIN G, DYBKAER R. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1C" [J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(8): 1081-1082.
- [16] 石晓东, 路秀玲, 郑春阳, 等. 血红蛋白在膜分离过程中的氧化规律和抗氧化探索[J]. 过程工程学报, 2005, 5(6): 659-663.
- [17] 沈同, 王镜岩, 赵邦梯, 等. 生物化学(上)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 141-143.
- [18] 朱永宁. 关于血红蛋白(Hb)低温稳定性的研究[J]. 大连大学学报, 2001, 22(6): 42-46.

(收稿日期: 2019-01-16 修回日期: 2019-04-08)

(上接第 1984 页)

肺、前列腺和睾丸的肿瘤^[10]。淡竹叶除了镉超标, 铅和铜的水平也较高, 人体铅和铜过量都会造成中毒反应, 危害健康。

本研究选择 12 种精神科常用中草药, 利用电感耦合等离子体质谱法简便、快速、准确^[11-12]地检测了这些中草药中 24 种微量元素的水平, 并分析了不同中草药间微量元素的分布差异, 为精神科常用中草药的抗精神病性症状的作用机制研究提供了一定的数据支持。

参考文献

- [1] 张静娇, 姜范成, 郑尚季, 等. ICP-MS 法测定 6 种中草药注射液中重金属含量研究[J]. 中国药物评价, 2017, 34(3): 165-167.
- [2] 田柱萍, 何邦平, 王小燕, 等. 中草药材的药效与其所含微量元素关系的研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2005, 22(4): 54-56.
- [3] 章颖慧, 王秀英, 杨明, 等. 中草药有害残留物限量制定原则及其影响因素[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 558-567.
- [4] 中华人民共和国对外贸易经济合作部发部. 药用植物及制剂进出口绿色行业标准: WM2-2001[S]. 北京: 中华人民共和国对外贸易经济合作部发部, 2001.
- [5] 张伯礼, 张俊华. 中医药现代化研究 20 年回顾与展望[J]. 中国中草药杂志, 2015, 40(17): 3331-3334.
- [6] 赵艳青, 滕晶. 基于中医传承辅助平台系统精神分裂症的组方用药规律分析[J]. 中国中医急症, 2014, 23(11): 1980-1983.
- [7] 姜敏. 浅谈王琦教授治疗失眠的经验与思路[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(6): 425-426.
- [8] 王永志, 杜仪, 韩玉, 等. 柴胡疏肝散对抑郁症大鼠海马神经递质含量的影响[J]. 北京中医药, 2014, 33(1): 50-53.
- [9] 刘绛云, 陈炯华. 清心安神颗粒治疗失眠之痰热扰心证的临床观察[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(3): 217-220.
- [10] 金慧英, 胡惠民, 周雍, 等. 急性镉中毒的肝脏损伤机制及金属硫蛋白的保护作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1998, 16(1): 45-48.
- [11] 赵静, 刘勇, 张艾华, 等. 不同产地三七中重金属元素的含量测定及分析[J]. 中国中草药杂志, 2014, 39(20): 4001-4006.
- [12] 卢丹, 周凌, 赵月然. ICP-MS 法测定减肥类保健品中重金属的含量[J]. 中国药物评价, 2016, 33(5): 414-416.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-04-02)