

# 酶化学法测定糖化血红蛋白性能的验证

肖 弘, 王 敏, 李小盛(上海市长宁区天山中医医院检验科 200051)

**【摘要】** 目的 对酶化学法测定糖化血红蛋白进行方法学性能的验证。方法 参考美国国家临床实验室标准化委员会系列文件和相关文献, 结合工作实际对酶化学法测定糖化血红蛋白进行精密性、准确度的分析测量范围和生物参考区间等进行评价, 并将实验结果与厂家提供的分析性能或公认的质量指标进行比较。结果 批内变异系数(CV) 0.87%~1.29%, 批间 CV 1.74%~2.12%; 在 3.0%~16.0% 范围内线性良好  $Y=1.010X-0.004$ ,  $r=0.9997$ , 平均回收率 101.37%; 该方法与 TOSOH G7 离子交换高效液相色谱法二组比较差异无统计学意义( $Y=0.9622X+0.045$ ,  $r=0.9940$ ,  $P>0.05$ ); 分析测量范围(AMR) 验证和生物参考区间验证结果均符合质量要求。结论 酶化学法测定糖化血红蛋白主要分析性能符合质量目标要求, 适合临床检验科应用。

**【关键词】** 糖化血红蛋白; 酶化学法; 性能验证

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.12.020 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)12-1450-02

**Verification of the analytical performance of haemoglobin A1c measurements tested by chemico-enzymatic method** XI-AO Hong<sup>1</sup>, WANG Min<sup>2</sup>, LI Xiao-sheng<sup>1</sup> (1, Department of Clinical Laboratory, TianShan Hospital of Tradition Chinese Medicine of Changning District, Shanghai 200051, China; 2, Department of Clinical Laboratory, Shanghai Tongren Hospital of Changning District, Shanghai 200050, China)

**【Abstract】** **Objective** To verify the analytical performance of haemoglobin A1c (HbA1c) tested by chemico-enzymatic method. **Methods** Referring to NCCLS evaluation protocols and pertinent literature and based on our practical work, we tested the precision, accuracy, analytical measurements range and biotic interval of HbA1c by chemico-enzymatic method, then compared the result with quality index of the manufacturer or generally accepted. **Results** The within-run coefficient of variation (CV) was 0.87%–1.29% and between-run CV was 1.74%–2.12%. The linear correlation coefficient of the method was satisfactory ( $Y=1.010C-0.004$ ,  $r=0.9997$ ) in 3.0%–16.0%, and the average recovery rate was 101.37%. The difference of the coefficient of correlation between enzymatic method and high performance liquid chromatography (HPLC) was significant ( $Y=0.9622X+0.045$ ,  $r=0.9940$ ,  $P>0.05$ ). The results of the verification for analytical measurements range (AMR) and biotic interval were accorded with the request of the quality. **Conclusion** The HbA1c measurements for enzymatic method is accorded with the request of the quality, which can be applied on automatic diagnose.

**【Key words】** haemoglobin A1c; chemico-enzymatic method; verification

糖化血红蛋白(HbA1c)的化学结构通常为具有一个特定六肽的血红蛋白分子, 是葡萄糖和血红蛋白β链N末端缬氨酸(Val)(βN-1-去果糖基血红蛋白)的一个稳定加和物<sup>[1]</sup>。在人体内, 葡萄糖和血红蛋白β链N末端Val氨基之间进行非酶促反应, 先形成不稳定的希夫碱, 然后缓慢地重排, 形成稳定、不可逆的氨基酮, 其合成过程缓慢且不可逆, 不受血糖浓度暂时波动的影响, 可反映测定前4~8周血糖的平均水平。HbA1c作为糖尿病筛选、诊断、血糖控制、疗效考核的有效监测指标, 在临床中得到了广泛使用, 2002年美国糖尿病协会已将其作为监测糖尿病血糖控制的金标准<sup>[2]</sup>, 故对糖尿病诊断有特殊诊断意义。本文依据美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准化文件对酶化学法测定糖化血红蛋白进行精密性、准确性、分析测量范围和生物参考区间等性能进行验证和评价, 并将实验结果与厂家提供的分析性能或引用专业文献的相关方法学分析性能予以证实<sup>[3]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 仪器 罗氏公司 MODULAR-P 全自动生化分析仪。日本 TOSOH G7 离子交换高效液相色谱法(IE-HPLC)。

1.1.2 试剂 酶化学法试剂由日本积水医疗株式会社提供,

试剂盒的组成包括前处理液、液体型双试剂: 试剂 R1 N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-二甲氨基-二苯胺化钠, 试剂 R2 过氧化物酶、果糖基氨基酸氧化酶。前处理液批号 011RCF, 试剂 R1 批号 010RAF, 试剂 R2 批号 009RAF。IE-HPLC 法试剂采用仪器配套试剂。试剂 1 批号 E7-111M, 试剂 2 批号 E7-201N, 试剂 3 批号 7-305M, 试剂 4 批号 HW-03M。

1.1.3 标本来源 测定标本均来源于本院门诊、住院患者及体检中心送检标本, 均为空腹采血 2 mL, 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝。验证人群纳入标准: 均为健康体检者, 年龄 24~77 岁。经 B 超、心电图、临床各项检查及血糖、肝肾等检验排除肝病、肾病、冠心病、高血压、肿瘤、糖尿病等病史和疾病。

## 1.2 方法

### 1.2.1 实验方法

1.2.1.1 酶化学法原理 在蛋白酶的作用下, 切断源于血红蛋白 A1c 的 β 链 N 末端的糖化甘氨酸谷氨酰胺, 同时通过测定 600 nm 与 800 nm 的吸光度差, 求出血红蛋白(Hb)的浓度。第 2 反应中, 果糖基氨基酸氧化酶(FPOX)作用于糖化甘氨酸谷氨酰胺, 在过氧化物酶的存在下, 生成的过氧化氢与 N-(羧甲基氨基羰基)-4,4'-二甲氨基二苯胺化钠(显色剂)产生显色反

应。通过测定此吸光度求出 HbA1c 的浓度。用先添加 500  $\mu\text{L}$  的 HbA1c 前处理液于试管中然后离心分离标本 (2 000 rpm/min 5 min) 进行标本的前处理, 从血球层采取 25  $\mu\text{L}$  加入前处理液中混合后, 用前处理标本在罗氏公司 MODULAR-P 全自动生化分析仪上进行测定。

**1.2.1.2 IE-HPLC 原理** 应用 TSK 凝胶 G7His 柱, 根据树脂表面阳离子交换基团和血红蛋白成分之间的离子反应不相同的原理, 分离出 HbA1c 成分。

**1.2.2 验证方法**

**1.2.2.1 精密度验证** 参照 NCCLS EP5-A2 文件<sup>[4]</sup>, 取高、

低 2 个不同浓度的 HbA1c 血标本, 经前处理后标本同 1 d 内进行 20 次检测计算批内精密度。同样取这 2 个标本经前处理后, 分装 -18  $^{\circ}\text{C}$  保存, 每天取出置室温自然融化, 温和混匀后, 上下午各测 1 次, 连续检测 20 d 计算批间精密度。

**1.2.2.2 干扰试验验证** 参照 NCCLS EP7-A2 文件<sup>[5]</sup>, 采用 Sysmex A-PLUS 干扰试剂盒, 将溶解后标本 (干扰物质含胆红素、溶血素、脂肪乳的浓缩液) 1.0 mL 和 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血 9.0 mL 混合制成标本 A, 溶解后的标本 (空白) 1.0 mL 和 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝血 9.0 mL 混合制成标本 B, 标本 A 和标本 B 按以下表格配制稀释系列, 然后对每管进行测定, 见表 1。

表 1 干扰物配制稀释系列

对照	1/10	2/10	3/10	4/10	5/10	6/10	7/10	8/10	9/10	1	
样本 A	—	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
样本 B	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	—

注: — 表示无数据。

**1.2.2.3 准确度验证** 参照 NCCLS EP9-A2 文件<sup>[6]</sup>, 使用该方法与通过美国 NGSP 认证产品 TOSOH G7 IE-HPLC 法进行方法学比较, 每天取 8 例标本, 分别用 2 种方法按顺序 1 $\rightarrow$ 8 进行标本测定, 再按相反顺序 8 $\rightarrow$ 1 重复测定, 测定 5 d, 共 40 例标本 (标本浓度 3.0%~16.0%), 作相关分析。

**1.2.2.4 回收实验验证** 取 1 例新鲜血液标本, 经前处理液溶血后, 分 4 例, 每例 500  $\mu\text{L}$ , 其中 1 例加入 50  $\mu\text{L}$  蒸馏水, 另外 3 例分别加入等量的高、中、低 3 个浓度的试剂配套标准品。记录平均回收率。

**1.2.2.5 分析测量范围 (AMR) 验证** 参照 NCCLS EP6-A2 文件<sup>[7]</sup>, 取测量范围内低高 (H)、(L) 2 个浓度标本, 经前处理后按 10L、8L+2H、7L+3H、4L+6H、5L+5H、4H+6L、3H+7L、2H+8L、10H 比例混合后, 得到 9 个不同浓度的预期值标本, 随机排列分别连续测定 4 次, 记录结果, 将预期值和实测值进行比较。

**1.2.2.6 生物参考区间验证** 参考 NCCLS C28-A2 文件<sup>[8]</sup>, 选择 60 例经健康体检无系统疾病参考标本, 统计各参考个体检测值, 与生产厂方说明书提供的参考区间比较。

**1.3 统计学方法** 采用 Microsoft Excel 2000 软件和 SPSS 11.5 统计软件进行数据统计分析。浓度用  $\bar{x} \pm s$  表示、显著性检验用成组 *t* 检验。

**2 结 果**

**2.1 精密度验证结果** 按照 2010 年上海市临床检验中心临床化学质量控制允许偏差范围, 糖化血红蛋白的允许误差限值为  $T \pm 15\%$ , 现该方法批内 CV (%) 均小于 1/4 允许误差限值 (3.75%)、批间 CV (%) 均小于 1/3 允许误差限值 (5.00%), 均符合要求<sup>[9]</sup>。结果见表 2。

表 2 精密度试验结果 ( $n=20, \%$ )

标本	均值	批内 CV	批间 CV
1	5.43	0.87	1.74
2	8.91	1.29	2.12

**2.2 干扰试验验证结果** 含较高浓度干扰物质 (胆红素 200 mg/dL、溶血素 5 000 mg/dL、乳糜浊度 30 000 度的浓缩液) 的测定值均在已知标本浓度  $6.80 \pm 1.96s$  (95% 可信限), 可视为

无显著性干扰。

**2.3 准确度验证结果** 以酶化学法测定值为 (Y), TOSOH G7 IE-HPLC 法测定值为 (X), 直线回归方程为  $Y=0.9622X+0.045, r=0.9940, P>0.05 (n=40)$ , 其中  $r>0.975$ , 两者相关良好。当 HbA1c 浓度为 6.5% 时, 其偏倚为 2.46%, 符合临床要求。

**2.4 回收试验验证结果** 取 1 例新鲜血液标本, 经前处理液溶血后, 分 3 例, 每例 500  $\mu\text{L}$ , 分别加入等量的高 (10.5%)、中 (8.5%)、低 (4.3%) 浓度的试剂配套标准品。平均回收率为 101.37%。回收率均在 90%~110% 以内, 属可接受范围<sup>[3]</sup>。结果见表 3。

表 3 回收试验 (%)

标本	测定浓度	加入浓度	回收浓度	回收率
0	6.80	—	—	—
1	7.20	0.39	0.40	102.56
2	7.59	0.77	0.79	102.60
3	7.74	0.95	0.94	98.95

注: — 表示无数据。

**2.5 分析测量范围 (AMR) 验证结果** 结果显示, 将预期值和实测值进行比较, 得到相关方程  $Y=1.010X-0.004, r=0.9997$ 。结果显示  $r \geq 0.975$ , b 在 0.95-1.05 范围内, a 近于 0 可直接判断该测定方法测量范围在 3.0% 和 16.0% 限值之间。

**2.6 生物参考区间验证结果** 选择 60 例经健康体检无系统疾病参考标本, HbA1c ( $\bar{x} \pm s$ ) 为  $5.15 \pm 0.38$ , 仅有 2 例标本超出范围, 年龄、性别差异无统计学意义。与生产厂方说明书提供的参考区间 4.3~5.8% 比较,  $r \geq 90\%$ 。验证结果可以接受, 可以引用该参考区间。

**3 讨 论**

HbA1c 是血红蛋白的成分之一, 生成缓慢, 和血液中葡萄糖浓度持续升高呈正比, 而与采血当时的血糖浓度并不相关。由于葡萄糖可自由透过红细胞膜, Hb 的半衰期为 60 d, 故糖化 HbA1c 可反映测定前 1~2 个月内血糖的平均水平, 故可作为糖尿病长期监测的良好指标<sup>[10]</sup>。 (下转第 1454 页)

的血液分析仪,但对非配套仪器的校准结果较差。但血液分析仪的校准物少,价格贵,不易保存,且实验室内仪器种类型号较多,甚至一些血液分析仪无配套的校准物,因此要保证血细胞分析仪检测结果的准确性和可比性,除了要有完善的质量控制体系,还必须建立合理实用可行的校准程序,使实验室内所有仪器的检测结果校准到偏差控制在一定范围内,各台仪器具有可比性<sup>[3-5]</sup>。本实验使用性能良好、规范操作并经具有溯源性的校准品 Sysmex SCS-1000 校准的 Sysmex TX-2000i 血液分析仪作为参比仪定值 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的新鲜血作为校准物,校准迈瑞 BC-3000 血液分析仪,实验表明用 Sysmex TX-2000i 血液分析仪定值的新鲜全血对 BC-3000 血液分析仪校准后的检测结果与参比值的偏差比校准前明显降低。用新鲜全血校准仪器虽较麻烦,但适用于所有仪器,且经济易得,适用性强,适用于同一实验室多台不同型号血细胞分析仪的校准。

实验室内有多台血液分析仪时,应进行结果的比对<sup>[6]</sup>。本科实验室内有多台不同品牌及不同型号的血液分析仪,本文选择了 Sysmex TX-2000i 和 BC-3000 血液分析仪两台仪器为例,进行了为期 2 个月较长时间共 180 例标本的比对试验,根据实验结果用 SPSS13.0 统计软件对 2 台仪器各参数采用拟合直线回归方程分析,分析中将比对仪测定结果作应变变量 Y,参比仪测定结果作自变量 X,计算 2 台仪器 5 组参数的相关系数和回归方程,结果 r<sup>2</sup> 均大于 0.95,表明各参数之间密切相关,一致性良好,完全符合临床需要。但相比较而言 MCV、PLT 一致性相对较差,这可能是由于仪器的原理不同,精密度差异等因素所致,如出现偏差过大,必须及时进行校准。

虽然使用抗凝新鲜全血用于校准血液分析仪比直接使用商品化校准物较为繁杂,但新鲜全血是临床实验室易得物质,控制得当,经济可靠,也有人采用新鲜全血应用于血液分析仪的室内质控,也取得了较好的效果<sup>[7-8]</sup>。

通过本实验,作者体会到为了保证实验室内多台血细胞分

析仪检测结果的准确性和可比性,对仪器的校准和比对及室内和室内质控都是血细胞分析质量控制必不可少的环节,使用新鲜血定期对不同品牌及不同型号进行校准比对,是目前比较经济有效的办法。

参考文献

- [1] Kutzner M. Metrological traceability of values assigned to sysmex SCS-1000 haematology calibrator [J]. Sysmex J International, 2002, 12: 49-55.
- [2] 丛玉隆. 血液学体液学检验与临床释疑 [M]. 北京:人民军医出版社, 2004: 294.
- [3] 彭明婷, 申子瑜. 血细胞分析溯源体系的建立及有关问题的探讨 [J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(3): 132-133.
- [4] 彭明婷, 岳育红, 申子瑜, 等. 北京市三级医院全血细胞计数结果可比性和准确性调查 [J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(9): 987-991.
- [5] 彭黎明, 王伟鑫, 聂李平, 等. 用参考方法验证多台血液分析仪的校准结果 [J]. 临床检验杂志, 2007, 25(6): 463-465.
- [6] 彭明婷. 血液分析仪质量控制的问题与对策 [J]. 检验医学, 2008, 23(6): 551-552.
- [7] 王文娟, 王佩佩, 李雪芬, 等. 新鲜血比对方法在血液分析仪室内质量控制中的应用 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2008, 37(1): 88-91.
- [8] 段秋林, 殷海燕, 樊超英, 等. 新鲜全血标本在多台血细胞分析仪室内质控中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 187-188.

(收稿日期: 2011-03-15)

(上接第 1451 页)

目前, HbA1c 的测定方法主要有 IE-HPLC 法、亲和层析法、胶乳免疫测定、电泳法等, 有些方法需要贵重的仪器, 有些方法手工操作太不方便, 有些方法有反应杯污染情况, 本文采用的酶化学反应法测定, 是基于比色法操作简单, 仪器设备要求不高, 能在实验室原有各种生化仪进行检测, 经方法学性能验证均显示该实验是一种精密度高, 重复性好, 线性范围宽, 与 TOSOH G7 IE-HPLC 法进行方法学比较相关性良好, 且收费低廉, 从降低患者医疗费用方面具有较高的社会效益, 完全能满足临床对糖尿病患者的监测要求, 可在使用自动生化分析仪的各级医院使用。

参考文献

- [1] International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC Scientific Division, Nordin G, et al. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c" [J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(8): 1081-1082.
- [2] American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus [J]. Diabetes Care, 2003, 26: 533.
- [3] 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(5): 143-145.

- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods [S]. EP5-A2, CLSI, 2004: 80.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry [S]. EP7-A2, CLSI, 2005: 75.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. EP9-A2, CLSI, 2002: 109.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement Procedures [S]. EP6-A2, CLSI, 2003: 75.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory [S]. C28-A2, CLSI, 2000: 40.
- [9] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 66.
- [10] Krishnamuyti U, Stelfes MW. Glycohemoglobin: a primary predictor of development or reversal of complications of diabetes mellitric [J]. Clin Chem, 2001, 47(5): 1157-1165.

(收稿日期: 2011-01-23)