

微粒色谱法和高效液相色谱法检测糖化血红蛋白的相关性研究

杨朝美, 马 珍[△] (重庆市急救中心检验科 400015)

【摘要】 目的 分析微粒色谱法和高效液相色谱法在糖化血红蛋白(HbA1c)检测中的相关性和临床符合情况。**方法** 依照美国临床和实验室标准协会(CLSI)的 EP9-A2 文件要求,每日随机抽取重庆市急救中心门诊或住院患者血液标本 8 份,连续 5 d,共采取 40 份。分别用微粒色谱法和高效液相色谱法测定 HbA1c,并对数据进行比较分析。**结果** 对两种方法测定的 HbA1c 结果进行比对分析,结果表明两检测系统内重复性好,符合相关性实验要求;方法间无离群点存在;线性回归方程为 $Y=1.088\ 5X-0.521\ 4$,相关系数 $r=0.993$,95% 置信区间 $(\hat{B}_{C,low}, \hat{B}_{C,high})$ 为 (0.019 1, 0.181 8),在允许误差 $(-0.35, 0.35)$ 之内,两种方法测定结果无明显差异,不存在有意义的偏倚。**结论** 微粒色谱法和高效液相色谱法可比性高,相关性好,符合临床需求,检验科可根据自身条件,选择适合的测定方法。

【关键词】 糖化血红蛋白; 相关性; 微粒色谱法; 高效液相色谱法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.05.024 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)05-0641-03

Study on relationship between particle chromatography and high performance liquid chromatography in detection of glycosylated hemoglobin YANG Chao-mei, MA Zhen[△] (Department of Clinical Laboratory, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400015, China)

【Abstract】 Objective To analyze the relationship between the particulate chromatography and the high performance liquid chromatography(HPLC) in detecting glycosylated hemoglobin(HbA1c) and their clinical conform-
ance situation. **Methods** According to the Clinical and Laboratory Standard Institute(CLSI) EP9-A2 document, 8
blood samples per day were randomly extracted for 5 consecutive days, a total of 40 samples were collected. The
HbA1c in each sample was detected by the particle chromatography and HPLC respectively, and the detection data
were performed the comparative analysis. **Results** The comparative analysis showed that the two systems had was
repeatability and could meet the criteria of the related laboratory tests. The outlier values were not found. The equa-
tion of linear regression was $Y=1.088\ 5X-0.521\ 4$, the correlation coefficient $r=0.993$, 95% confidence interval;
 $(\hat{B}_{C,low}, \hat{B}_{C,high})$ was (0.019 1, 0.181 8), which was less than the allowable error $(-0.35, 0.35)$. There were no signif-
icant differences in the determination results of HbA1c between the two methods. No meaningful bias was found.
Conclusion The particulate chromatography and HPLC could have high comparability and good correlation, and
could meet the clinical demand. The clinical laboratory could choose the appropriate method according to its own con-
ditions.

【Key words】 glycosylated hemoglobin; correlation; particulate chromatography; high performance liquid chromatography

近年来,随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变,糖尿病的患病率逐年上升,成为威胁大众健康的主要慢性非传染性疾病之一。血糖水平的大幅度变化会激发多途径代谢从而损伤微血管和大血管^[1-2],血糖控制较差的糖尿病患者更易并发感染,其致死、致残率高^[3]。糖化血红蛋白(HbA1c)水平能体现患者近 2 个月的血糖情况,其作为糖尿病血糖回顾性观察的常用指标,在病情评估的同时,有助于临床医生调整患者的降糖方案。近年来, HbA1c 作为糖尿病患者的血糖监测指标在临床上被广泛认可,临床医生已将其作为评估糖尿病血糖控制水平的相对金标准^[4]。微粒色谱法和高效液相色谱法是检测 HbA1c 的两种常用方法,根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)的指南文件 EP9-A2^[5],本研究比较分析了上述两种方法用以 HbA1c 检测的相关性。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 样本标准遵循 EP9-A2^[5]文件要求,随机选定

抽血时间,每日从本院门诊和住院患者中选取 8 例全血标本,连续收集 5 d,共收集 40 例,其中男 17 例、女 23 例,所有标本均无溶血,均以乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,均在 6 h 以内检测。

1.2 仪器与试剂 微粒色谱法检测系统采用挪威 NycoCard Reader II 检测仪;高效液相色谱法检测系统采用上海惠中医疗科技有限公司 MQ-2000PT 糖化血红蛋白仪。所有试剂、校准品、质控品均为相应厂家提供的配套产品。

1.3 检测方法 按照 EP9-A2^[5]文件的方法采样后,以统计学随机标记的方法标注每日的 8 份临床全血标本,按顺序运用 2 个检测系统检测 HbA1c,再反序检测,即每份标本获得 2 个值,连续测定 5 d。检测过程保证仪器的良好性能,由本院检验科经验丰富的技术人员严格遵循标准操作规程进行检测,使每日获得的结果有良好的质量控制。X(比较方法)和 Y(试验方法)分别为微粒色谱法检测系统和高效液相色谱法检测系统。

1.3.1 重复性检验 运用微粒色谱仪检测系统测定 40 份标本,获得的 2 份 HbA1c 结果为 X_{i1} 、 X_{i2} , 2 份测定结果间差的绝对值为 DX_i ; 高效液相色谱法检测系统测定获得的 2 份 HbA1c 结果为 Y_{i1} 、 Y_{i2} , 2 份测定结果间差的绝对值为 DY_i 。计算比较方法差值的绝对值均值 $\overline{DX} = \frac{\sum DX_i}{N}$, 试验方法差值的绝对值均值 $\overline{DY} = \frac{\sum DY_i}{N}$, 比较方法和试验方法各自双份差值范围控制在 $4\overline{DX}$ 和 $4\overline{DY}$, 若不在此范围, 则计算相对差值可接受范围。

1.3.2 离群点检验 获得两方法绝对差值: $E_{ij} = |Y_{ij} - X_i|$, 并求得其均值: $\overline{E} = \frac{1}{2N} \sum_i \sum_j E_{ij}$; 范围界定为 $4\overline{E}$, E_{ij} 若不在此范围内, 需计算相对差值允许范围; 相对差值 $E'_{ij} = \frac{|Y_{ij} - X_i|}{X_i}$, 均值 $\overline{E'} = \frac{1}{2N} \sum_i \sum_j E'_{ij}$; 根据 CLSI EP9-A2^[5] 文件将不符合两个范围的样本作为离群点。

1.3.3 数据作散点图和偏倚图 以比较方法测定的结果为 X, 试验方法测定的结果为 Y, 制作散点图和偏倚图, 计算回归方程, 评价线性程度。

1.3.4 计算预期偏倚与置信区间 选用卫生部临床检验中心室间评价标准, 可接受偏倚定为指标的可接受范围靶值 $\pm 20\%$, 即 $1/4$ 。HbA1c 的医学决定水平 (X_c) 为 7% ^[6]。计算该 X_c 处的预期偏倚 (B_c) 的估计值 $\hat{B}_c$ 及 95% 置信区间。

1.4 统计学处理 将两个检测系统所测得的对应的 HbA1c 数据, 根据 EP9-A2^[5] 文件中的统计分析流程, 运用 Excel2012 进行统计分析。

2 结 果

2.1 重复性检验 计算得 $\overline{DX} = 0.347\ 5$, $\overline{DY} = 0.135\ 0$; $4\overline{DX} = 1.39$, $4\overline{DY} = 0.54$ 。同一标本 HbA1c 双份值间差值均控制在 $4\overline{DX}$ 和 $4\overline{DY}$ 内, 表明方法重复性可, 可进行相关性研究。

2.2 两种方法间离群点检验 计算得 $\overline{E} = 0.31$, $4\overline{E} = 1.24$; 计算获得的每个 E_{ij} 同 $4\overline{E}$ 对比, 无偏离, 说明本实验两方法无离群点。

2.3 相关散点图及偏倚图分析 以比较方法结果为 X, 试验方法结果为 Y 制作散点图, 相关系数 $r = 0.993$, $r^2 = 0.986$, 线性回归方程为 $Y = 1.088\ 5X - 0.521\ 4$, 回归线性良好, 且 $r \geq 0.975$, 表明两种方法的数据相关性好, 见图 1。两种方法测定的平均值无明显差异, 且在 X 轴两侧均匀排列, 见图 2。

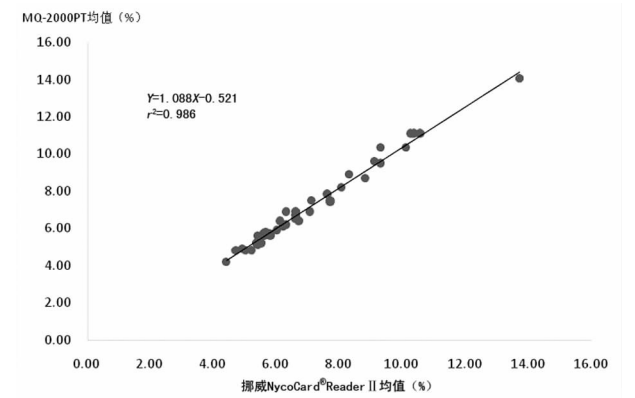
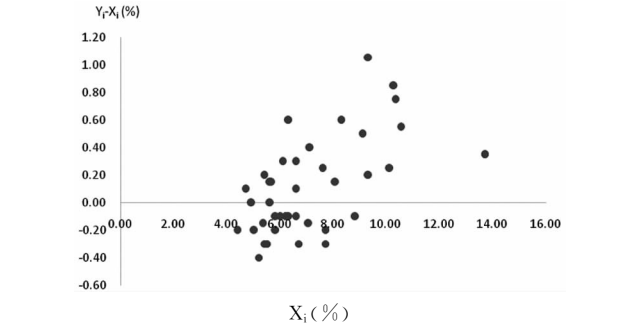


图 1 挪威 NycoCard Reader II 检测仪和 MQ-2000PT 均值散点图

2.4 置信区间与临床可接受性分析 本研究的 X_c 为 7% ,

$\hat{B}_c = 0.100\ 4$, 95% 置信区间 ($\hat{B}_{c, low}$, $\hat{B}_{c, high}$) 为 $(0.019\ 1, 0.181\ 8)$, 允许误差为 $(-0.35, 0.35)$, 可见 $\hat{B}_c$ 的 95% 置信区间在允许误差以内, 说明系统误差小, 差异可被接受, 本研究的两组检测系统的 HbA1c 检测结果具可比性, 同时出现的偏倚较小, 可忽略。



注: $\overline{Y_i} - \overline{X_i}$ 为两方法双份测定平均值之差, $\overline{X_i}$ 为平均值。

图 2 两种检测系统的偏倚图

3 讨 论

糖尿病患者的血糖监测具有重要的临床意义, 临床上主要通过检测末梢血糖反映患者的实时血糖水平; 而长期的血糖水平则主要依据 HbA1c 水平的检测值, 该值可反映患者近 2 个月的血糖控制情况^[7]。人体血液红细胞中的正常血红蛋白 (Hb) 主要由 HbA1 组成, 占 97% ; 其次为 HbA2 和 HbF, 分别占 2.5% 、 0.5% 。糖化血红蛋白为葡萄糖分子与血红蛋白 A 组分的组合产物, 通过红细胞的非酶促反应, 生成 HbA1c 酮胺化合物。HbA1c 水平可体现被检测者的长期血糖水平, 对糖尿病患者的血糖控制和用药方案的制订具有指导作用。目前用于 HbA1c 检验的方法较多, 主要依靠电荷或被检测物的结构进行检测。而色谱法是临床检测 HbA1c 的“金标准”, 主要包括阳离子交换层析法和高效液相色谱法^[8-9]。本研究通过比较分析同一被测物微粒色谱法与高效液相色谱法的临床评价结果, 分析其检验性能, 为实验室 HbA1c 检测方法的选择提供指导和参考依据。

挪威 NycoCard Reader II 检测仪 (微粒色谱法) 的原理: 检测包含红、绿、蓝 3 对发光二极管^[10]。光电二极管路线以白色样品为参比样品, 对检测样品的光反射情况进行测量。在 NycoCard Reader II 检测仪的测试菜单中选择某一种检测后, 检测所需发光二极管将照亮待测样品, 样品对某些光的反射将在光电二极管回路中引起相反的电流, 从而对电容进行放电, 使其电压从 V1 线性降低至 V2。电压降至 V2 后, 微处理器接受系统发送的讯号, 并计算电压从 V1 降低至 V2 所需时间 (T)。反射光密度 (I) 与 T 呈反比, 微处理器将时间转换为浓度值, 并将其显示出来。

MQ-2000PT 糖化血红蛋白分析仪采用高效液相色谱法, 由于非糖化血红蛋白带正电荷, 而 HbA1c 几乎不带电, 因此可根据所带电量的不同将其分离。固定相选择弱酸性阳离子交换固定相, 存在交换阳离子的基团, 能同带正电荷的非糖化血红蛋白结合, 在低浓度下洗脱出 HbA1c, 再利用高浓度洗脱液洗脱获得非糖化血红蛋白。被分离出来的血红蛋白洗脱液通过 415 nm 波长的紫外光检测吸光度, 得到相应的血红蛋白层色谱。HbA1c 水平以色谱图中 HbA1c 的峰面积占血红蛋白面积的百分率表示。高效液相色谱法分离效率高, 能分离 HbF、L-A1c 等血红蛋白的变异体, 降低血红蛋白变异体对稳定的 HbA1c 检测结果的干扰, 使 HbA1c 的测定结果更加

可靠。

本实验结果表明,上述两种检测方法的重复性好,相互间无离群点存在; $r=0.993$,符合 $r\geq 0.975$,相关性好。两种方法在可进行相关性研究的范围内,结果无明显差异。此外,系统误差可接受,偏倚分布佳。两种方法的检测原理虽有差异,检测手段虽然不同,但实际所测结果无明显差异。临床上同一实验室采用多种方法测定 HbA1c 的现象较多,而实际的临床应用要求所获得的结果不受测定方法的影响,因此实验室在应用不同方法测定 HbA1c 时必须可比、可替代。微粒色谱法和高效液相色谱法测定的 HbA1c 结果具有可比性和较好的相关性,表明两种方法的测定结果类似,可相互替换,均可用于临床。

综上所述,微粒色谱法和高效液相色谱法可比性高,相关性好,符合临床需求。实验室可根据自身条件,选择适合的测定方法。

参考文献

[1] 张薇薇,严光,孙梦雯,等.糖化血红蛋白在心血管疾病中的研究进展[J].中国临床保健杂志,2012,15(3):324-326.

[2] Sciarretta S,Valenti V,Tocci G,et al. Association of renal damage with cardiovascular diseases is independent of individual cardiovascular risk profile in hypertension: data from the Italy-developing education and awareness on microalbuminuria in patients with hypertensive disease study [J]. J Hypertens,2010,28(2):251-258.

(上接第 640 页)

($P<0.05$)。对两组患者术后并发症的发生情况进行比较,观察组并发症的总发生率低于对照组($P<0.05$)。表明采用人工股骨头置换术治疗高龄不稳定型股骨粗隆间骨折具有其特殊的优势,患者一般下床早、愈合快、并发症少,对患者术后生活影响小,临床效果明显。但值得注意的是,在实施人工股骨头置换术的过程中,要尽量缩短手术时间,减少创伤;同时术中应注意严格的无菌操作,皮肤切开前适当使用抗菌药物,预防手术感染;最重要的是在股骨头的选择上注意保持患者肢体长度,人工股骨头直径不可过大,宜小于切除股骨头 1~2 mm,以避免术后活动产生疼痛^[10]。

综上所述,人工股骨头置换治疗高龄不稳定型股骨粗隆间骨折疗效较 PFNA 内固定更佳,值得在临床中推广应用。

参考文献

[1] 庞向华,欧兆强,欧阳建江,等.半髋关节置换与防旋型股骨近端髓内钉治疗高龄不稳定型股骨粗隆间骨折的疗效对比[J].重庆医学,2013,42(10):1086-1088.

[2] Kouzelis A,Krawas A,Mylonas S,et al. Double axis cephalocondylic fixation of stable and unstable intertrochanteric fractures: early results in 60 cases with the veronail system[J]. Open Orthop J,2014,8(1):60-68.

[3] Dhamangaonkar AC, Joshi D, Goregaonkar AB, et al. Proximal femoral locking plate versus dynamic hip screw for unstable intertrochanteric femoral fractures[J]. J Or-

[3] 教忠磊.胰岛素泵治疗糖尿病合并感染患者的疗效观察[J].临床合理用药,2012,5(9):50.

[4] Lazzeri C,Chiostrì M,Sofi A,et al. Postprocedural hyperglycemia in ST elevation myocardial infarction submitted to percutaneous coronary intervention:a prognostic indicator and a marker of metabolic derangement[J]. J Cardiovasc Med (Hagerstown),2010,11(1):7-13.

[5] 周艳.极差法比对和 EP9-A2 指南在不同仪器系统间可比性的联合应用[J].长江大学学报:自然科学版,2013,10(8):87-89.

[6] 余玲丽,赵莹,吴建平.糖化血红蛋白两种检测方法的比对[J].实验与检验医学,2009,27(5):487-488.

[7] 欧阳清,石青峰,刘健,等.糖尿病患者空腹血糖、血清果糖胺、糖化血红蛋白测定的研究[J].华夏医学,2009,22(3):411-412.

[8] 孙占宇,徐红. EP9-A2 对两种发光免疫分析法的一致性分析[J].中国医药指南,2013,11(17):19-20.

[9] 向阳,姜艳,张琼.2 种糖化血红蛋白检测方法的比对和结果一致性评价[J].新疆医科大学学报,2013,36(7):979-980.

[10] 张捷,张沫,孙颖,等. Nycocard Reader II 检测仪检测糖化血红蛋白的初步评价[J].中国城乡企业卫生,2012,2(6):16-18.

(收稿日期:2014-10-26 修回日期:2014-12-28)

thop Surg (Hong Kong),2013,21(3):317-322.

[4] 王卫东,白峰.人工股骨头置换术与 PFNA 内固定治疗高龄不稳定型股骨粗隆间骨折的疗效比较[J].科学技术与工程,2012,12(35):9640-9643.

[5] Li J,Xu XZ,You T,et al. Early results of the proximal femoral nail antirotation-Asia for intertrochanteric fractures in elderly Chinese patients[J]. Saudi Med J,2014,35(4):385-390.

[6] 苏宝霞,王志强,谢鹏.应用 PFNA 治疗高龄不稳定型股骨粗隆间骨折 45 例分析[J].武警后勤学院学报:医学版,2013,22(6):527-528.

[7] 马涛,宋伟,张育民.人工关节置换与切复内固定治疗高龄不稳定型股骨粗隆间骨折的疗效对比分析[J].陕西医学杂志,2012,41(10):1324-1325.

[8] 李钰军,李志斌,余文浩,等.动力髋螺钉与股骨近端防旋髓钉治疗老年股骨粗隆间不稳定骨折的病例对照研究[J].中国骨伤,2013,26(12):977-980.

[9] Hou Z,Shi J,Ye H,et al. Treatment of unstable intertrochanteric fractures with percutaneous non-contact bridging plates[J]. Inter J Surgery,2014,12(5):538-543.

[10] 周荣,黄坤,秦步平,等.骨水泥型双动头人工股骨头置换治疗高龄不稳定型股骨粗隆间骨折[J].江苏医药,2013,39(5):594-595.

(收稿日期:2014-11-05 修回日期:2014-12-10)