

· 论 著 ·

高血脂高胆红素对 IE-HPLC 法检测糖化血红蛋白干扰的评价*

萧金丽, 张秀明, 徐胜男, 索明环, 徐全中, 陈亚琼, 吴剑杨, 李曼, 阙丽娟, 温冬梅[△]

(中山大学附属中山医院检验医学中心, 广东中山 528403)

摘要:目的 探讨高血脂和高胆红素对离子交换高效液相色谱法(IE-HPLC)检测糖化血红蛋白的干扰。方法 将收集的新鲜 EDTA-K₂ 抗凝全血标本分成 4 组: 对照组(HbA1c<6.2%)、糖尿病组(HbA1c≥6.2%)、高血脂组(TG 3~20 mmol/L)、高胆红素组(TBIL 21~549 μmol/L)。分别用硼酸盐亲和层析高效液相色谱法(AC-HPLC)和 IE-HPLC 检测 HbA1c。结果 当 HbA1c≤18.7% 时 IE-HPLC 检测 HbA1c 相关系数 $r=0.993$; 95% 置信区间(95% CI) 为 $-0.71\sim0.89$; 偏差(%) 为 $-5.8\%\sim6.8\%$; 差异无统计学意义($P=0.198$)。当 HbA1c<16.3% 时 IE-HPLC 检测 HbA1c 相关系数 $r=0.997$; 95% CI 为 $-0.31\sim0.67$; 偏差(%) 为 $-5.8\%\sim4.3\%$; 差异有统计学意义($P=0.000$), 结果无显著干扰; 当 %HbA1c 为 16.3~18.7 时结果出现正偏倚。当 TG≤20.78 mmol/L 时 IE-HPLC 检测 HbA1c 结果相关系数 $r=0.995$; 95% CI 为 $-0.26\sim0.50$; 偏差(%) 为 $-5.5\%\sim5.8\%$; 差异有统计学意义($P=0.000$) 结果无显著干扰; 当 TBIL≤549.3 μmol/L 对 IE-HPLC 检测 HbA1c 相关系数 $r=0.990$; 95% CI 为 $-0.08\sim0.63$; 偏差(%) 为 $-14\%\sim4.1\%$; 差异有统计学意义($P=0.000$); 当 TBIL≤342.1 μmol/L 对 IE-HPLC 检测 HbA1c 相关系数 $r=0.994$; 95% CI 为 $-0.09\sim0.50$; 偏差(%) 为 $-5.5\%\sim4.1\%$, 结果无显著干扰; 当 TBIL 为 380.7~549.3 μmol/L 时结果出现负偏倚。结论 实验数据表明 IE-HPLC 检测 HbA1c 有良好的抗脂血能力; 当 TBIL≤342.1 μmol/L 和 HbA1c<16.3% 对检测 HbA1c 无明显干扰能满足一般临床检测需求; 当 HbA1c 标本的 TG≥20.78 mmol/L、TBIL≥342.1 μmol/L、HbA1c≥16.3% 临床工作者应结合患者本身情况选择更合适检测 HbA1c 的方法。

关键词: 糖尿病; 糖化血红蛋白; 高血脂; 高胆红素

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.17.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)17-2492-03

The interference evaluation of hyperlipidemia and hyperbilirubinaemia to HbA1c measurement with IE-HPLC method*

Xiao Jinli, Zhang Xiuming, Xu Shengnan, Suo Minghuan, Xu Quanzhong, Chen Yaqiong,

Wu Jianyang, Li Man, Kan Lijuan, Wen Dongmei[△]

(Laboratory Medicine Center, Zhongshan Hospital Affiliated to Sun

Yat-Sen University, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: Objective To investigate the interference of hyperlipidemia and hyperbilirubinaemia to HbA1c measurements by ion-exchange high-performance liquid chromatography(IE-HPLC) method. **Methods** Fresh whole-blood samples collected with EDTA-K₂ anticoagulant tubes were divided into four groups: control group(HbA1c<6.2%), diabetes group(HbA1c≥6.2%), hyperlipidemia group(TG 3-20 mmol/L); hyperbilirubinaemis group (TBIL 21-549 μmol/L). HbA1c of these samples were measured with affinity chromatography(AC-HPLC) and IE-HPLC respectively. **Results** When HbA1c≤18.7%, $r=0.993$; 95% confidence interval(CI) of HbA1c results by using IE-HPLC method was $-0.71\sim0.89$; coefficient of variation was $-5.8\%\sim6.8\%$; $P=0.198$ and the difference was not statistically significant. When HbA1c<16.3%, $r=0.997$; 95% CI of HbA1c results with IE-HPLC method is $-0.31\sim0.67$; coefficient of variation was $-5.8\%\sim4.3\%$. $P=0.000$ and the difference was statistically significant. No interference was detected with the results; When HbA1c was 16.3%-18.7%, positive bias was observed with the results. When TG≤20.78 mmol/L, $r=0.995$; 95% CI of HbA1c results with IE-HPLC method was $-0.26\sim0.50$; coefficient of variation was $-5.5\%\sim5.8\%$. $P=0.000$ and the difference was statistically significant. No interference was detected with the results; When TBIL≤549.3 μmol/L, $r=0.990$; 95% CI of HbA1c results with IE-HPLC method was $-0.08\sim0.63$; coefficient of variation was $-14\%\sim4.1\%$. $P=0.000$ and the difference was statistically significant. When TBIL≤342.1 μmol/L, $r=0.994$; 95% CI of HbA1c results with IE-HPLC method was $-0.09\sim0.50$; coefficient of variation was $-5.5\%\sim4.1\%$. No interference was detected with the results. When TBIL was 380.7-549.3 μmol/L, negative bias was observed with the results. **Conclusion** Our data indicated that HbA1c measurement with IE-HPLC method could resist the interference of hyperlipidemia; When TBIL≤380.7 μmol/L and HbA1c<16.3%, the results could meet the needs of general clinical detection. Clinical staff should choose more specific HbA1c measurement method according to the patient's condition.

Key words: diabetes; glycosylated hemoglobin; hyperlipidemia; hyperbilirubinaemia

2010 年美国糖尿病学会(ADA)发布的糖尿病治疗准则 准, 5.7%~6.2% 为糖尿病高危人群, ≥9.5% 为糖尿病并发症
中, 正式将糖化血红蛋白(HbA1c)≥6.5% 作为糖尿病诊断标 准的独立危险因素。HbA1c 测定作为糖尿病流行病学和监测糖

* 基金项目: 中山市科技计划项目(20122A034)。 作者简介: 萧金丽, 女, 主管技师, 主要从事临床生化研究。 △ 通讯作者, E-mail: 10075515@qq.com。

尿病长期治疗效果的重要指标,近年来备受关注^[1-2]。因此,在充分肯定 HbA1c 诊断糖尿病的优越性的同时,客观地阐明 HbA1c 在实际临床应用中的缺陷同样很有必要,这对于 HbA1c 更好地应用于临床具有重要的意义^[3]。本研究参考美国国家糖化血红蛋白标准化计划(NGSP)认证的 I 级实验室的标准,以美国 Primus Ultra2 糖化血红蛋白分析仪硼酸盐亲和层析高效液相色谱法(AC-HPLC)为对照系统^[4-6],与美国 Bio-Rad Variant II 糖化血红蛋白分析仪离子交换高效液相色谱法(IE-HPLC)HbA1c 检测结果进行比较分析,探讨高血糖和高胆红素对 IE-HPLC 的影响。

1 资料与方法

1.1 标本来源 全血标本来源于 2012 年 5 月至 2013 年 10 月中山市人民医院的住院、门诊患者或健康体检者。收集当天新鲜 EDTA-K₂ 抗凝全血标本, -70 °C 保存。将收集的新鲜 EDTA-K₂ 抗凝全血标本分成 4 组:对照组(HbA1c < 6.2%)、糖尿病组(HbA1c ≥ 6.2%)、高血脂组(TG 3~20 mmol/L)、高胆红素组(TBIL 21~549 μmol/L)^[7]。对照组标本来自本院健康体检中心体检的 40 例健康成年人,无浑浊、无血红蛋白变异体、无高胆红素、无高血脂。糖尿病组标本来源于本院确诊的 2 型糖尿病患者,无贫血、溶血,无血红蛋白变异体,无高胆红素、高血脂,同时排除尿毒症和慢性肾衰的患者,共 40 例;糖尿病的诊断标准符合世界卫生组织(WHO)1999 年诊断标准。高胆红素组标本来自本院住院或门诊患者, TBIL ≥ 21 μmol/L;无贫血、溶血,无血红蛋白变异体,患者无高血脂、尿毒症,共 40 例。高血脂组来自本院住院、门诊患者或健康体检者, TG ≥ 3 mmol/L;无贫血、溶血,无血红蛋白变异体,无高胆红素,患者无尿毒症,共 40 例。各组标本来源患者的一般资料见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

1.2 仪器与试剂 美国 Primus Ultra2 糖化血红蛋白分析仪采用硼酸盐 AC-HPLC 检测,美国 Bio-Rad Variant II 糖化血红蛋白分析仪采用 IE-HPLC 检测进行比较分析,采用各检测仪器配套的试剂、校准品、质控品和耗材。

1.3 方法

1.3.1 仪器校准 采用新鲜全血校准的方法,一致性测定数据见文献^[8]。参照 NGSP 能力验证方法,检测健康对照组 40 份标本,每天检测 8 份,连续测定 5 d。

1.3.2 实验方法 参照 CLSI EP9-A 文件^[9],实现 2 个检测系统结果的一致性后,参照相关文献^[5-7],所有检测 HbA1c 的方法中以硼酸盐 AC-HPLC 最不受干扰,故以 Primus Ultra2 作为对照系统, Bio-Rad Variant II 为实验系统,分别检测

糖尿病组、高胆红素组和高血脂组标本,每天检测 8 份,连续测定 5 d。

1.4 统计学处理

1.4.1 使用 Microsoft Excel 软件进行统计学分析。参照 NGSP I 级实验室能力验证可接受标准^[10],对两种检测系统的实验数据进行直线回归分析和偏差(%)分析,实验系统与对照系统差值的 95%置信区间(95%CI)差异在参考系统的 ±0.70 范围内以及实验系统与对照系统偏差小于 6%作为检测结果可比的 2 项可接受标准。

1.4.2 使用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。检测结果的组间比较采用配对 *t* 检验,采用直线回归相关性分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组的比对 经新鲜全血校准后,对 2 台仪器进行对照组标本的比对试验。以 Primus Ultra2 的测定值为 *Y*, Bio-Rad Variant II 的测定值为 *X*, 直线回归方程为 $Y = 0.9594X + 0.2053$, $r = 0.993$, 差异无统计学意义 ($P = 0.795$); 95%CI: $-0.20 \sim 0.15$, 符合在 ±0.70 范围内的标准; 偏差(%)为 $-0.20\% \sim 0.30\%$ 符合偏差小于 6%的标准。见图 1、2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 异常组的比对 用 2 台仪器分别测定糖尿病组、高胆红素组和高血脂组 3 组标本并作直线回归分析。3 组数据的相关系数均大于 0.95 说明结果分布范围符合要求。当 HbA1c ≤ 18.7% 时 IE-HPLC 检测 HbA1c 相关系数 $r = 0.993$, 95%CI 为 $-0.71 \sim 0.89$, 偏差(%)为 $-5.8\% \sim 6.8\%$, 差异无统计学意义 ($P = 0.198$)。当 HbA1c < 16.3% 时 IE-HPLC 检测 HbA1c 相关系数 $r = 0.997$, 95%CI 为 $-0.31 \sim 0.67$, 偏差(%)为 $-5.8\% \sim 4.3\%$, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$), 无明显干扰; 当 HbA1c 为 16.3%~18.7% 时结果出现正偏倚。当 TG ≤ 20.78 mmol/L 时 IE-HPLC 检测 HbA1c 结果相关系数 $r = 0.995$; 95%CI 为 $-0.26 \sim 0.50$; 偏差(%)为 $-5.5\% \sim 5.8\%$; 差异有统计学意义 ($P = 0.000$), 结果无明显干扰。当 TBIL ≤ 549.3 μmol/L 时, 用 IE-HPLC 检测 HbA1c, 相关系数 $r = 0.990$; 95%CI 为 $-0.08 \sim 0.63$; 偏差(%)为 $-14\% \sim 4.1\%$; 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。当 TBIL ≤ 342.1 μmol/L 时 IE-HPLC 检测 HbA1c, 相关系数 $r = 0.994$; 95%CI 为 $-0.09 \sim 0.50$; 偏差(%)为 $-5.5\% \sim 4.1\%$; 结果无明显干扰; 当 TBIL 为 380.7~549.3 μmol/L 时结果出现负偏倚。见表 2 及图 3~6(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 2 Bio-Rad Variant II 与 Primus Ultra2 两系统检测 HbA1c 的直线回归分析和偏差分析

| 组别 | 回归方程 | <i>r</i> | -95%CI | +95%CI | 偏差(%) | <i>P</i> |
|------------|------------------------|----------|--------|--------|----------|----------|
| 健康对照组 | $Y = 0.9594X + 0.2053$ | 0.993 | -0.16 | 0.15 | -2.3~2.3 | 0.795 |
| 糖尿病组 | $Y = 0.9394X + 0.7790$ | 0.995 | -0.71 | 0.89 | -5.8~6.8 | 0.198 |
| 糖尿病组剔除数据后 | $Y = 0.9795X + 0.4008$ | 0.997 | -0.31 | 0.67 | -5.8~4.3 | 0.000 |
| 高胆红素组 | $Y = 1.0044X + 0.2467$ | 0.990 | -0.08 | 0.63 | -14~4.1 | 0.000 |
| 高胆红素组剔除数据后 | $Y = 1.0285X + 0.0498$ | 0.994 | -0.09 | 0.5 | -5.5~4.1 | 0.000 |
| 高血脂组 | $Y = 0.9976X + 0.1360$ | 0.995 | -0.26 | 0.5 | -5.5~5.8 | 0.000 |

3 讨论

2013 年国际糖尿病联盟(IDF)公布,中国糖尿病的患病人数

数为 9 840 万,居全球首位,同时根据 IDF 估计,到 2035 年中国的糖尿病患者人数将达到 1.43 亿。HbA1c 作为首选诊断

指标,与 FBG 和 OGTT 相比,检测便捷、可任意时间采血,准确性、可重复性高,是一个宏观的控制指标。在过去的 20 多年中,HbA1c 检测主要用于糖尿病控制、治疗效果评价以及并发症风险评估,从“评估指标”发展到“诊断指标”,体现出 HbA1c 在临床应用中的优势和价值^[4]。但目前我国 HbA1c 的检测结果一致性现状与临床要求尚存在差距。国内各临床实验室分析仪器种类较多,采用的试剂来源较多,检测性能、试剂规格、分析参数亦各不相同。这些原因使不同实验室间的检测结果存在差异,不具有可比性,给临床应用带来不便^[11]。多种因素可影响 HbA1c 检测,其中疾病状态,如高脂血症、高胆红素血症都会干扰 HbA1c 检测^[4]。并且临床医生在解读 HbA1c 结果时,HbA1c 变化值超过 0.5% 时医生就有可能改变治疗方案,不准确的结果会造成对患者病情的误判或延误治疗。本研究旨在分析高血脂和高胆红素对 HbA1c 的检测造成的影响。

IE-HPLC 是根据 HbA1c 与 HbA0 的等电点不同进行分离。葡萄糖与 Hb 的 β 链 N 末端 Val 连接降低了等电点,导致糖化 Hb 带的正电荷比未糖化 Hb 的少,与树脂的附着力小,可以分别用不同离子浓度的缓冲液在不同的时间将 Hb 从阳离子交换柱中洗脱下来,再根据每个峰值下的面积来计算 HbA1c 占总 Hb 的比例^[12]。常规的离子交换 HPLC 法经过多年技术上的改进,检测精密密度、分辨率及抵抗多种糖化血红蛋白变异体的能力有了明显提高,基本可以达到临床需求,但是还存在众多干扰因素^[13]。

本研究表明:人体内的 HbA1c < 16.3% 时 IE-HPLC 检测 HbA1c 相关系数 $r = 0.997$; 95% CI 为 $-0.31 \sim 0.67$; 偏差 (%) 为 $-5.8\% \sim 4.3\%$ 结果无显著干扰。随着 HbA1c 浓度增加,正干扰逐渐递增。当 $TG \leq 20.78 \text{ mmol/L}$ 时 IE-HPLC 检测 HbA1c 结果相关系数 $r = 0.995$; 95% CI 为 $-0.26 \sim 0.50$; 偏差 (%) 为 $-5.5\% \sim 5.8\%$ 结果无显著干扰。TBIL $\leq 342.1 \mu\text{mol/L}$ 对 IE-HPLC 检测 HbA1c 相关系数 $r = 0.994$; 95% CI 为 $-0.09 \sim 0.50$; 偏差 (%) 为 $-5.5\% \sim 4.1\%$ 结果无显著干扰,随着胆红素浓度增加,负干扰逐渐递增,与厂家声明干扰因素及本课题组前期外源性高血脂高胆红素对 HbA1c 的干扰相一致^[14]。

在日常工作中,实验室工作人员面对复杂多样标本,要在短时间内检测出正确结果,需要每个从业者了解每种 HbA1c 检测原理,能根据患者本身情况选择更合适的检测 HbA1c 的方法。

参考文献

[1] 王丽娟,纪立农. 国际专家委员会关于糖化血红蛋白检测在糖尿

病诊断中的作用的报告[J]. 中国糖尿病杂志, 2009, 17(8): 563-568.

[2] 陆祖谦,许樟荣. 糖化血红蛋白在糖尿病诊断中的作用[J]. 中国糖尿病杂志, 2009, 17(8): 579-582.

[3] 李娅,宋宇,段勇. 糖化血红蛋白检测的局限性[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(6): 501-504.

[4] Roberts WL, Frank EL, Moulton L, et al. Effects of nine hemoglobin variants on five glycohemoglobin methods[J]. Clin Chem, 2000, 46(4): 569-572.

[5] Little RR, Vesper H, Rohlfing CL, et al. Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits[J]. Clin Chem, 2005, 51(1): 264-265.

[6] Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, et al. Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb (HbA1c) by 23 methods[J]. Clin Chem, 2008, 54(8): 1277-1282.

[7] Holownia P, Bishop E, Newman DJ, et al. Adaptation of latex-enhanced assay for percent glycohemoglobin to a Dade Dimension? analyzer[J]. Clin Chem, 1997, 43(1): 76-84.

[8] 温冬梅,张秀明,吴剑杨,等. 新鲜全血赋值传递实现不同 HbA1c 检测系统测定结果的溯源性和可比性[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(10): 790-792.

[9] Clinical Laboratory Standard institute. EP9- A2 Method comparison and bias estimation using patient samples[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2002.

[10] National Glycohemoglobin Standardization Program. NGSP: HbA1c assay interferences [EB/OL]. [2014-11-24]. <http://www.ngsp.org/interf.asp>.

[11] 吴炯,邵文琦,周琰,等. 上海地区糖化血红蛋白一致性计划建立和结果初步评价[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(4): 370-372.

[12] 宋智心,徐国宾,马怀安,等. 糖化血红蛋白测定的标准化现状[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(6): 497-500.

[13] 居漪. 糖化血红蛋白检测技术和质量控制[J]. 检验医学, 2010, 25(11): 914-917.

[14] 陈颖,温冬梅,张秀明,等. 四种方法检测糖化血红蛋白的干扰性能评价[J]. 临床检验杂志, 2013(10): 786-787.

(收稿日期: 2015-06-08)



(上接第 2491 页)

中的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2014, 6(6): 961-963.

[4] 张敏,李卫征. 2 型糖尿病合并脑梗死患者血清超敏 C 反应蛋白及同型半胱氨酸与颈动脉粥样硬化的关系[J]. 中国全科医学, 2012, 15(20): 2292-2294.

[5] 任继欣. 血清超敏 C 反应蛋白、同型半胱氨酸、D-二聚体和血脂水平检测在急性脑梗死诊断中的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(22): 2800-2802.

[6] 刘会,荣良群,魏秀娥. 血清同型半胱氨酸、超敏 C 反应蛋白及白细胞水平对脑梗死的影响[J]. 实用心脑血管病杂志, 2013, 21(2): 75-76.

[7] 周俊山,徐梦怡,陆敏. 中青年急性脑梗死患者血浆同型半胱氨酸水平和超敏 C 反应蛋白与颈动脉粥样硬化的关系[J]. 脑与神经疾病杂志, 2011, 9(2): 110-112.

[8] 张家盆,仇圣刚. 脑梗死患者同型半胱氨酸和 C 反应蛋白与颈动脉硬化的关系[J]. 右江医学, 2013, 41(6): 810-812.

[9] 律静. 同型半胱氨酸联合超敏 C 反应蛋白、D-二聚体、颈动脉内膜厚度与脑梗死的关系[J]. 陕西医学杂志, 2013, 16(12): 1602-1603.

(收稿日期: 2015-04-24)