

应用毛细管电泳法和高效液相色谱法 对血红蛋白定量的对比研究

周剑英¹ 谢杏梅¹ 李东至¹ 李坚¹ 廖灿¹ 王婷¹

【摘要】 目的:探讨用法国 Sebia 公司 Capillarys2 全自动毛细管电泳(CZE)对血红蛋白定性与定量分析的准确性。**方法:**采集 205 例广东地区成人 EDTA-K2 抗凝血 2 ml,分别采用高效液相色谱法(HPLC)和 capillarys 方法各自测定血红蛋白含量。**结果:**两种方法测定 HbA2 的准确度,在 205 例样本中,CZE 测定有 93%的测定结果与 HPLC 测定值的百分差异在 $\pm 20\%$ 范围内,与 95%相比较, P 值为 0.1944,差异无统计学意义。其中 CZE 测得的 HbA2 异常 21 例,HbF 增高 5 例,Hb A2+HbF 同时增高 12 例;用 HPLC 对这 205 例样本进行复检对照,结果基本一致。检测出 HbH 7 例,HbE 7 例,Hb NewYork 5 例,Hb G-thailand 3 例,Hb Bart's 3 例,HbS 2 例。但是,对于 HbA2 的定量,用 CZE 测得的水平高于 HPLC。同时,我们观察到 CZE 较 HPLC 对 HbH 和 Hb Bart's 的检测更为敏感。**结论:**HPLC 和 CZE 都能够分离和量化出 HbA2 和 HbF 异常增高,是一种快速、准确、可靠的筛查地中海贫血实验方法,但是两者在鉴定异常血红蛋白时存在区别。

【关键词】 全自动毛细管电泳;HPLC;血红蛋白;贫血,地中海

【中图分类号】 R556 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2013)02-0100-03

Comparison of automated capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography on quantitative study of hemoglobin

ZHOU Jianying XIE Xingmei LI Dongzhi LI Jian LIAO Can WANG Ting

(Institute of Eugenics and Perinatology, Prenatal Diagnostic Center, Guangzhou Maternal & Neonatal Hospital, Guangzhou Women & Children's Medical Center, Guangzhou Medical College, Guangdong, People's Republic of China, Guangzhou, 510623, China)

Corresponding author:

Abstract Objective: To compare automated capillary zone electrophoresis (CZE), the French Sebia company production, with high performance liquid chromatography (HPLC) in the accuracy of qualitative and quantitative analysis of hemoglobin. **Method:** 2 ml EDTA-K2 anti-coagulated blood samples were collected from 205 Guangdong adults. The hemoglobin content was detected by HPLC and CZE respectively. **Result:** Among 205 samples, 93% of the results detected by CZE, was in $\pm 20\%$ difference with the results detected by HPLC, compared with 95%, p -value was 0.1944, there was no significant difference of statistical significance. Among the results, 21 cases were detected by CZE with abnormal HbA2, 15 cases with high HbF, 12 cases with high HbA2 and HbF. The results were almost the same detected by HPLC. Two systems correctly identified a number of hemoglobin variants, 7 cases with HbH, 7 cases with HbE, 5 cases with Hb NewYork, 3 cases with Hb G-Thailand, 3 cases with Hb Bart's and 2 cases with HbS. However, CZE detected result was higher than that of HPLC for HbA2 quantitative analysis. At the same time, CZE was more sensitive for HbH and Hb Bart's detection compared to HPLC. **Conclusion:** Both CZE and HPLC could separate and identify the value of HbA2 and HbF. The two experiment methods were quick and accurate on the screening of thalassemia and some hemoglobin diseases. But there were some differences on the detection of hemoglobin between them.

Key words automated capillary zone electrophoresis; HPLC; hemoglobin; thalassemia

地中海贫血和异常血红蛋白病是广东地区发病率很高的遗传病,早期检测对于地中海贫血的人群防控具有十分重要的临床意义,因此这类遗传病的临床实验室诊断十分必要^[1-3]。正常成人中血红蛋白的主要成分是 Hb A, HbA2 和 Hb F 则为

次要血红蛋白,但后两种组分在血红蛋白病的诊断和调控中具有重要价值^[4-5]。阳离子交换的高效液相色谱(HPLC)由于其快速准确定量检测 HbA2 和 HbF 已广泛应用于临床检测 β 地贫,同时可根据异常血红蛋白在 HPLC 中的滞留时间在总血红蛋白中所占的比例及色谱图形的特征,对异常血红蛋白作出准确的诊断,但是这项技术需要特殊的仪器和专业的训练,操作相对复杂^[6]。本文对比了

¹ 广州市妇女儿童医疗中心产前诊断(广州, 510623)

Capillary2 全自动毛细管电泳(CZE)和 HPLC 两种方法定量分析血红蛋白的能力以及测量常见异常血红蛋白的效能。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 标本

205 例研究对象来自我院 2010-12—2011-04 门诊血常规筛查疑似地贫(MCV<80 fl)患者,年龄 16~45 岁。血样标本为静脉空腹抽取 3~5 ml EDTA-K2 抗凝血。对所采集的样本同时进行 HPLC 和 CZE 诊断。

1.2 方法

1.2.1 HPLC 对血红蛋白定性及定量检测 应用 VARIANT II β -thalassemia Short Program 系统(HPLC 原理)检测,检测前进行校准品和高、低值质控测定,只有当校准品的滞留时间、校准因子符合要求及室内质控结果在控时才进行临床标本测定,单位为%。本实验确定的健康成人的正常范围 HbF:<2.0%;HbA₂:1.7%~3.1%;如 HbA₂>3.5%则考虑为 β -地贫。

1.2.2 CZE 对血红蛋白定性及定量检测 采用法国公司生产的全自动毛细管电泳分析仪及厂家提供的配套试剂在 9.8 kV 电压、pH 9.4 的缓冲液条件下,8 条并联的石英毛细管内进行血红蛋白电泳,用 415 nm 波长直接检测血红蛋白含量。每次进行毛细管电泳分析时先测定厂家配套的质控品,室内质控合格才进行研究对象标本分析测定,单位为%。我们实验确定的健康成人的正常范围是 HbF<1.0%;HbA₂:2.5%~3.5%;如 HbA₂>3.5%则考虑为 β -地贫。

1.3 统计学方法

对实验数据分布范围的统计,应用 SPSS13.0 统计学软件。

2 结果

2.1 两种方法在 β -地贫筛查中的情况比较

在 205 例样本中,CZE 测得的 Hb A₂ 增高 21 例,HbF 增高 5 例,Hb A₂+HbF 同时增高 12 例;用 HPLC 对这 205 例样本进行复检对照,结果基本一致。

2.2 在无异常血红蛋白时对 HbA₂ 检测结果

HPLC 与 CZE 对没有异常血红蛋白的 178 例样本测定,结果见表 1。两种方法测定 HbA₂ 的准确度,CZE 测定中有 93%的测定结果与 HPLC 测定值的百分差异在 $\pm 20\%$ 范围内,与 95%相比较, P 值为 0.1944,差异无统计学意义。但是,通过 CE 测得的 HbA₂ 值总是高于 HPLC 的结果。

2.3 在 HbS 存在时对 HbA₂ 定量结果

在 2 例含有 HbS 的样本中,用 HPLC 检测的 HbA₂ 的水平明显高于 CZE。

表 1 CZE 与 HPLC 对 HbA₂ 定量的情况对比

测试方法	蛋白组分	例数	$\bar{x} \pm s$	最大值/%	最小值/%
CZE	HbA ₂	205	3.3 $\pm$ 1.27	1.4%	6.6%
HPLC	HbA ₂	205	3.3 $\pm$ 1.23	1.2%	7.0%

2.4 在含有 HbE 的样本中测量 HbE 和 HbA₂

在本实验中有 7 例 HbE 增高的样本,应用 CZE 能将 HbA₂ 和 HbE 完全分离从而对 HbA₂ 精确定量,而 HPLC 不能得到 HbA₂ 的准确值。HPLC 试图识别 HbA₂,但是由于 HbE 与 HbA₂ 重叠太多而不能得到一个可靠的评估。在同样情况下,CZE 能够准确分离 HbA₂ 和 HbE。

2.5 其他异常血红蛋白的鉴定

除了上述的异常血红蛋白样本外,还有以下样本:HbH 7 例,Hb NewYork 5 例(HPLC 不能诊断 NEW YORK),Hb Q-thailand 3 例,Hb Bart's 3 例,都通过 HPLC 和 CZE 得到了鉴定。

3 讨论

传统用于检测血红蛋白的方法有碱性醋酸纤维膜电泳洗脱法、凝胶电泳/光密度扫描法、柱层析法等,而这方法操作繁琐,变异范围大。凝胶电泳/光密度扫描测定 HbA₂ 的变异系数(CV)高达 33.6%,柱层析法 CV 值亦可达 14.6%^[7]。近年来快速发展的 HPLC 和全自动毛细管电泳由于其操作简单,自动化分析程度高,快速且准确已广泛应用于临床的血红蛋白检测。

通过本次实验对比研究,HPLC 与 CZE 对没有异常血红蛋白的 178 例样本测定,两种方法测定 HbA₂ 的准确度,CZE 测定中有 93%的测定结果与 HPLC 测定值的百分差异在 $\pm 20\%$ 范围内,与 95%相比较, P 值为 0.1944,差异无统计学意义。研究表明,HPLC 和 CZE 都能对血红蛋白病进行准确检测,且具有良好的相关性。但是两者也一些存在差异,表现在:①CZE 操作更为简单,快速,仪器可以扫描条码,只需标识、取样、电泳而不需要其他操作;HPLC 有着复杂的洗脱模式,增加了日常工作时间和工作量。②CZE 对结果解读的自动化分析程序较 HPLC 系统更加易懂;但是当检测样本中缺乏 HbA 时,CZE 系统无法划分区域。必须进行第 2 次调试,然而用 HPLC 方法测定就不需要。③本实验中,其中 7 例 HbE 增高的样本,应用 CZE 能将 HbA₂ 和 HbE 完全分离,从而对 HbA₂ 精确定量。CZE 方法的一个突出特点就是能将 HbA₂ 从含有 HbE 的样本中准确分离出来,而 HPLC 不足以有效分离。总之,HPLC 与全自动毛细管电泳是 2 项互补的血红蛋白检测技术,且都具有操作简单,自动化程度高,检测时间短等优点,适合在临床实验室的推广应用。

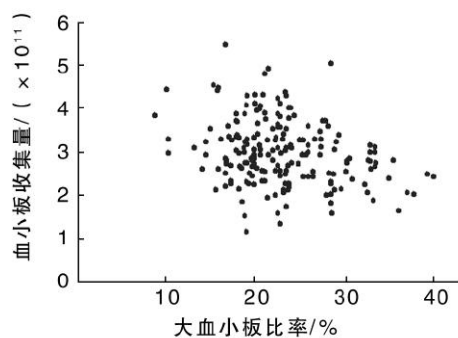


图3 采血前外周血大血小板比率与血小板收集量

小板的比重有一定的影响,许多对机采血小板的研究都将重点放在血小板平均体积上,其中有研究认为机采血小板制品中血小板收集量与献血者采前外周血小板平均体积存在正相关关系^[2]。但本研究与上述实验结论不同:在单因素分析中,机采血小板制品中血小板收集量与献血者采前外周血小板平均体积呈负相关关系。对献血者采前的外周血液检测的数据分析,血小板平均体积反映的是所有检测到的血小板的体积的均值,受过大和过小血小板体积的影响,其数值大小易出现偏移,用此指标并不能真实反映血小板的体积分布状况。血小板体积分布宽度是指取血小板体积直方图波峰为100%,在其20%水平高度上所测量的数学宽度,反映的是80%以上比例的血小板的体积差距,其数值小,说明血小板体积接近,体积分布均匀。大血小板比率是较大体积的血小板在所有血小板中所占的比例,血小板体积分布宽度与大血小板比率相结合,与血小板平均体积相比,是反映血小板体积分布的更客观和真实的指标。本次研究发现,随着献血者血小板体积分布宽度的增大,机采血小板制品中血小板收集量明显降低,说明献血者外周血小板体积差距较大,血小板大小不均,当血细胞分

离机在对血小板进行自动探测时,兼顾血小板的浓度及体积,造成血小板收集效果的降低,并且,血小板体积分布宽度与大血小板比率具有较高的相关性($r=0.936$),大血小板比率过大,就会造成过多的大血小板在血细胞分离机离心时,沉降于血小板的下层,机器难以识别,造成血小板收集量的降低,在研究中对献血者采前外周血中的血小板平均体积、血小板体积分布宽度和采后机采血小板制品中的血小板平均体积、血小板体积分布宽度进行了配对均数比较,机采血小板制品中的血小板平均体积和血小板体积分布宽度均明显减小,机采血小板制品中的血小板收集量并不随献血者采前外周血小板平均体积的增大而增大,说明血细胞分离机采集血小板时对献血者外周血小板的体积分布和形态有严格的选择标准,采集得到的血小板体积分布较均匀。提示机采血小板制品中以形态适中的血小板为主,功能较差、形态巨大的血小板很少^[3]。上述结论与崔徐江等进行机采血小板献血者筛选时,外周血小板分布图呈双峰或多峰者不宜单采的结论具有一致性。

本文建议:筛选献血者时,外周血小板平均体积不应大于10 fl,外周血小板体积分布宽度不应大于11 fl,外周血大血小板比率应在0.25以内。

参考文献

- [1] 汪传喜,田兆嵩. 血小板输注的前景与展望[J]. 中国输血杂志,2000,(13)4:280-283.
- [2] 陈会友,汪传喜,梁华钦,等. 献血者血液因素对机采血小板采集量的多因素分析[J]. 中国输血杂志,2001,14(4):217-218.
- [3] 江朝富,崔徐江,王传喜,等. 血细胞分离机制备的浓缩血小板与洗涤血小板的体外实验对照[J]. 中国输血杂志,2002,15(3):162-164.

(收稿日期:2012-05-17)

(上接第101页)

参考文献

- [1] OLIVIERI N F. The β -thalassemias [J]. N Engl J Med,1999,341:99-109.
- [2] JOINER C H. Universal newborn screening for hemoglobinopathies[J]. J Pediatr,2000,136:145-146.
- [3] WAJCMAN H, PREHU C, BARDAKDJIAN-MICHAU J, et al. Abnormal hemoglobins: laboratory methods[J]. Hemoglobin,2001,25:169-181.
- [4] LOUAHABIA, PHILIPPEM, LAUS, et al. Evaluation of a new sebia kit for analysis of hemoglobin fractions and variants on the capillary system[J]. Clin Chem Lab Med,2006,44:340-345.
- [5] WEATHERALL D J. The thalassemias[M]//BEUTLER E, LICHTMAN M A, COLLIER B S, et

al. Williams hematology. New York: McGrawHill, 1995:581-615.

- [6] BEUTLER E. The sickle cell disease and related disorders[M]//BEUTLER E, LICHTMAN M A, COLLIER B S, et al. Williams hematology. New York: McGraw-Hill,1995:616-650.
- [7] JOUTOVSKY A, HADZI NESIC J, NARDI M A. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variant and hemoglobinopathies: A study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory [J]. Clin Chem,2004,50:1736-1747.
- [8] 周玉球,李文典,徐湘民. 用于血红蛋白病遗传筛查的实验室诊断技术[J]. 国际遗传学杂志,2008,31(1):17-22.

(收稿日期:2012-08-18)