

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.14.035

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200529.1031.004.html>(2020-05-29)

NSA-400 型全自动生化分析仪检测 血浆游离血红蛋白的性能评价*

代华友,李小红,杨俊鸿,彭楷,许茜,骆展鹏[△]

(重庆市血液中心 400015)

[摘要] **目的** 利用全自动生化分析仪对邻-甲联苯胺法测定血浆游离血红蛋白(FHb)进行性能评价。**方法** 通过测定不同浓度的标准血红蛋白溶液,评价全自动生化分析仪测定邻-甲联苯胺法的准确度、精密度和线性范围。**结果** 检测 500、1 000 mg/L 血红蛋白时,正确度偏移均小于或等于 2.5%;批内精密度相对标准偏差(RSD) < 6.0%,批间精密度 RSD < 9.0%;检测线性范围为 62.50~4 000.00 mg/L,回归方程 $Y=1.051 1X-29.419$,相关系数(r^2)=0.999 1。**结论** 该研究建立的全自动生化分析仪法可应用于血站红细胞储存期末溶血率监测中的血浆 FHb 检测。

[关键词] 游离血红蛋白;邻-联苯胺法;全自动生化分析仪;性能评价

[中图分类号] R446.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)14-2404-03

Performance evaluation of NSA-400 automatic biochemical analyzer for detecting plasma free hemoglobin*

DAI Huayou, LI Xiaohong, YANG Junhong, PENG Kai, XU Qian, LUO Zhanpeng[△]

(Chongqing Municipal Blood Center, Chongqing 400015, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the performance of O-dimethylaniline in the determination of plasma free hemoglobin (FHb) via automatic biochemical analyzer. **Methods** The accuracy, precision and linear range of O-dimethylaniline method detected by automatic biochemical analyzer were evaluated by the determination of standard hemoglobin solution at different concentrations. **Results** The accuracy deviation was less than or equal to 2.5% in the determination of 500 and 1 000 mg/L hemoglobin. The relative standard deviation (RSD) of intra-batch precision was less than 6.0%, inter-batch precision was less than 9.0%. Within the concentration range of 62.50–4 000.00 mg/L, the determination results showed a linear relationship with the standard concentration. The regression equation was $Y=1.051 1X-29.419$, and the correlation coefficient $r^2=0.999 1$. **Conclusion** The O-dimethylaniline method with automatic biochemical analyzer can be applied to detecting the plasma free hemoglobin in the monitoring of hemolysis rate at the end of red blood cell storage period. **[Key words]** free hemoglobin; O-dimethylaniline method; automatic biochemical analyzer; performance evaluation

游离血红蛋白(free hemoglobin, FHb)即血浆中的血红蛋白,是红细胞保存质量监测的常规指标。《全国临床检验操作规程》推荐的邻-甲联苯胺法是 FHb 检测的标准方法,但该方法耗时长、步骤多、操作复杂,且结果受检测者操作熟练程度影响大,线性范围窄且有一定污染。邻-甲联苯胺法检测血浆 FHb 的原理是血红蛋白中亚铁血红素有类似过氧化物酶的作用,在有过氧化氢参与的情况下,催化无色的邻-甲联苯胺脱氢而显蓝色,吸收峰为 630 nm,加强酸(pH 1.5)后呈黄色,吸收峰为 435 nm。显色的深度与血浆 FHb 水平成正比^[1]。过氧化氢与邻-甲联苯胺反应的

第一步吸收峰为 630 nm 的蓝色中间产物不具有稳定性,手工方法无法准确检测,故需加强酸形成吸收峰为 435 nm 的稳定黄色终产物,而全自动生化分析仪速率法可通过设定特定检测时间而实现对不稳定中间产物的检测。因此,作者推测可通过全自动生化分析仪检测 630 nm 吸收峰的蓝色不稳定产物来测算血浆 FHb 水平。本研究对该方法的建立过程、正确度、精密度、线性范围等进行了初步研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血红蛋白标准液制备

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会医学科研计划面上项目(2017MSXM129)。 作者简介:代华友(1983—),主管检验师,本科,主要从事血液质量管理与质量控制研究。 [△] 通信作者, E-mail:19741644@qq.com。

按《全国临床检验操作规程(第 4 版)》制备血红蛋白标准液^[2],并经氰化高铁蛋白分光光度计定值(浓度为 100 g/L),使用时按需稀释。

1.1.2 仪器与试剂

邻-甲联苯胺(分析纯,批号 20120301)、冰乙酸(分析纯,批号 2016101101)、30%过氧化氢溶液(分析纯,批号 20180501),均购自成都科龙化工试剂厂;2 g/L 邻-甲联苯胺溶液:称取邻联甲苯胺 0.2 g,溶于 60 mL 冰乙酸中,溶解后加蒸馏水定容至 100 mL;1 g/L 过氧化氢溶液:30%过氧化氢液 330 μL,加蒸馏水定容至 100 mL;NSA-400 型全自动生化分析仪购自沈阳东软医疗系统有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基本参数

在 NSA-400 型全自动生化分析仪中设置参数。速率法,反应温度 37℃;反应时间 8 min;主波长 600 nm,副波长无;样品量 5 μL;试剂 A:2 g/L 邻-甲联苯胺 250 μL,试剂 B:1 g/L 过氧化氢溶液 250 μL;标准品 500 mg/L。实验前使用蒸馏水为空白和标准品进行定标。

1.2.2 正确度检测

将血红蛋白标准液稀释为 1 000、500、100 mg/L 3 个浓度,各检测 3 次,计算偏倚。偏倚百分比=(检测浓度-血红蛋白标准液浓度)/血红蛋白标准液浓度×100%。

1.2.3 精密度的检测

选择高浓度(900 mg/L)、中浓度(400 mg/L)、低浓度(100 mg/L)水平标本各 1 份,批内连续检测 20 次,计算标准差(SD)、相对标准偏差(RSD)。高、中、低浓度水平标本各进行 20 批次检测(每天上午、下午各测定 1 次,连续检测 10 d),计算批间精密度。 $SD = \sqrt{\frac{((x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2)}{n}}$, x_1, x_2, \dots, x_n 代表每一份样品的检测结果, \bar{x} 代表平均值, n 代表样本量; $RSD = SD / \text{平均值} \times 100\%$ 。

1.2.4 检测线性及线性范围

将血红蛋白标准液稀释为 8 000、4 000、2 000、1 000、500、250、125、62.5 mg/L,以检测浓度(Y)和稀释浓度(X)计算回归直线方程和相关系数(r^2)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,计算偏移百分比、平均值、SD 等。

2 结果

2.1 正确度

选择 100、500、1 000 mg/L 3 个浓度的血红蛋白分别检测 3 次,100 mg/L 血红蛋白检测偏倚较大,500 mg/L 和 1 000 mg/L 血红蛋白检测偏倚小,见表 1。

2.2 精密度

选择 3 个浓度样品,批内精密度的 1.14%~5.40%,批间精密度的 3.89%~8.09%,见表 2。

2.3 线性范围

在血红蛋白 62.50~4 000.00 mg/L 浓度范围内,测定结果与标准浓度呈线性关系,回归方程 $Y = 1.0511X - 29.419$, $r^2 = 0.9991$,见图 1。

表 1 血红蛋白检测正确度

稀释浓度 (mg/L)	检测浓度(mg/L)			偏倚百分比(%)		
	检测 1	检测 2	检测 3	检测 1	检测 2	检测 3
100	140.3	125.72	123.14	40.30	25.72	23.14
500	508.37	504.5	497.88	1.67	0.90	-0.42
1 000	1 025.02	1 022.49	1 015.1	2.50	2.25	1.51

表 2 血红蛋白检测精密度(n=20)

项目	批内精密度			批间精密度		
	低浓度	中浓度	高浓度	低浓度	中浓度	高浓度
平均值(mg/L)	102.56	397.52	861.93	118.38	418.45	897.23
SD(mg/L)	5.54	4.53	20.46	9.57	21.39	34.92
RSD(%)	5.40	1.14	2.37	8.09	5.11	3.89

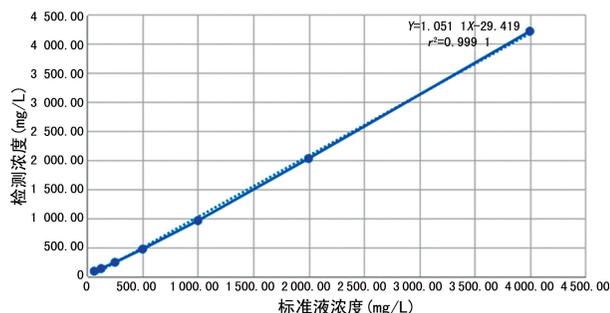


图 1 测定血红蛋白与标准液浓度的关系

3 讨论

红细胞离体后在保存过程中由于生理生化环境改变、外界温度变化、代谢物积累等因素影响,其形态结构和生理生化功能会发生改变,这些改变统称为红细胞的储存损伤^[3-4]。血浆 Fhb 检查是指检测血浆中的血红蛋白。血红蛋白通常存在于红细胞中,当红细胞破坏,血红蛋白就释放到血浆中^[5-6]。通过检测血浆 Fhb 并计算储存期末溶血率来检测红细胞在制备、储存过程中的破坏程度^[7-8]。《全血及成分血质量要求》规定全血类及红细胞类制品储存期末溶血率小于红细胞总量的 0.8%^[9-10]。储存期末溶血率不可直接测量,需通过血细胞计数仪检测血细胞比容(Hct)和总血红蛋白水平(Hb),邻-甲联苯胺法检测血浆 Fhb 水平后计算^[11]。邻-甲联苯胺法是《全国临床检验操作规程》推荐的 Fhb 检测的标准方法,但该方法具有一定局限性。因此,国内同行探索了三波长法^[12-13]、“A、B 液法”^[14]、过氧化氢钼酸铵测定法、4-氨基安替比林法^[15]等方法检测血浆 Fhb,但这些方法仍需手工操作。

作者参照标准方法在利用全自动生化分析仪的邻-甲联苯胺法(下称仪器法)中将试剂量进行了等比例减量。因本实验室全自动生化分析仪无 630 nm 滤光片,故选择使用 600 nm 波长检测;检测时间设置为

第 8 分钟末;这些偏移对检测标本和标准品的吸光度值影响程度完全相同,不会对最终结果产生影响。预实验中发现,在检测 100 mg/L 浓度时偏倚较大,而 500 mg/L 浓度时偏倚可接受。100 mg/L 作为标准曲线的标准品浓度会导致较大的系统性误差,因此,后续所有检测中标准曲线的标准品浓度均为 500 mg/L。

正确度和精密度是评价检测方法最重要的两个指标,本研究检测结果显示:(1)血红蛋白在 500 mg/L 和 1 000 mg/L 水平,正确度偏倚均小于或等于 2.5%,低于冀慧^[15]报道的邻-甲联苯胺法(传统方法)和 4-氨基安替比林法;血红蛋白 100 mg/L 水平,偏倚大于 20%,高于冀慧^[5]的报道,表明用 NSA-400 型全自动生化分析仪检测血浆 Fhb 在中高浓度时偏倚较低,优于其他方法,但在低浓度时偏移过大。(2)低、中、高 3 个浓度水平批内精密度 RSD 值分别为 5.40%、1.14% 和 2.37%,批间精密度 RSD 值分别 8.09%、5.11% 和 3.89%,与报道的其他方法相近^[12-15]。本研究结果显示,在中浓度(500 mg/L)和高浓度(1 000 mg/L)水平,正确度和精密度都很好;而在低浓度(100 mg/L)水平,正确度和精密度都相对较差。线性范围是反映检测方法精密度和准确度均符合要求且成线性的受试物浓度范围,本研究结果显示在 62.50~4 000.00 mg/L 浓度范围内,测定结果与标准浓度呈线性关系,回归方程 $Y = 1.051 1X - 29.419$, $r^2 = 0.999 1$ 。

根据红细胞储存期末溶血率计算公式^[11]和《全血及成分血质量要求》规定溶血率的控制范围(溶血率小于 0.8%),结合本实验室大量累计检测数据的分析结果,有意义的血浆 Fhb 浓度至少应大于 1 100 mg/L(以全血进行推算,考虑献血者 Hct 的正常参考值范围和血液采集后的稀释比例)。因此,研究中仪器邻-甲联苯胺法在 100 mg/L 浓度水平的较大偏移不影响其在红细胞储存期末溶血率检测过程中的应用价值;本法精密度好,尤其在中、高浓度具有较高的批内精密度和批间精密度,说明该方法稳定性好;能直接检出更高浓度的血浆 Fhb,在应用于洗涤红细胞、浓缩红细胞等产品的血浆 Fhb 检测时可无需预稀释。

综上所述,本研究采用仪器邻-甲联苯胺法简化了操作步骤,提高了自动化水平,提升了工作效率,减少了人员操作间差异;降低了工作人员接触致癌物质邻-甲联苯胺的机会;正确度、精密度、检测线性能满足采供血结构用于红细胞储存细末溶血率检测的需要,可进一步扩大数据验证后加以推广应用。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:164.

- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会医政医管局. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015:64.
- [3] 王向明,王珏,甘佳,等. 储存红细胞生化指标研究进展[J]. 中国输血杂志,2016,29(10):1203-1207.
- [4] 肖达玲,梁月娟. 红细胞储存损伤与功能变化的研究进展[J]. 医药,2016,13:152.
- [5] GKOU MASSI E, DIJKSTRA-TIEKSTRA M J, HOENTJEN D, et al. Hemolysis of red blood cells during processing and storage[J]. Transfusion, 2012, 52(3):489-492.
- [6] SAINI N, BASU S, KAUR R, et al. Assessment of changes in plasma hemoglobin and potassium levels in red cell units during processing and storage[J]. Transfus Apher Sci, 2015, 52(3):319-325.
- [7] PATIDAR G K, JOSHI A, MARWAHA N, et al. Serial assessment of biochemical changes in irradiated red blood cells[J]. Transfus Apher Sci, 2014, 50(3):479-487.
- [8] 杨俊鸿,骆展鹏,黄霞. 储存红细胞质量检测研究进展[J]. 中国输血杂志,2019,32(5):503-505.
- [9] 原国家卫生部. 全血及成分血质量要求:GB18469-2012[S]. (2012-05-11)[2019-07-21]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/s9493/201207/55380/files/a1bb8c98233146408357e804b09013b4.PDF>.
- [10] 原国家卫生和计划生育委员会. 全血及成分血质量监测指南:WS/T 550-2017[S]. (2017-05-12)[2019-07-21]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2017/05/20170531161107491.pdf>.
- [11] 国家卫生健康委. 血站技术操作规程:国卫医函[2019]98 号[S]. (2019-04-28)[2019-07-21]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7658/201905/bdd4f4ccd15c4201bfb6d9e7492d7fab/files/9c6c4c3a40a64bf786f5b5d8ee08b220.pdf>.
- [12] 李建华. 三波长比色法测定血浆游离血红蛋白的探讨[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(6):1364-1365.
- [13] 于青,王红,刘嘉馨,等. 游离血红蛋白测定:三波长法和邻联甲苯胺法的比较研究[J]. 中国输血杂志,2012,25(2):138-141.
- [14] 魏寿忠,肖小慧,许冰峰. “A、B 液法”测定血浆游离血红蛋白的探讨[J]. 中国输血杂志,2005,18(6):491-492.
- [15] 冀慧. 4-氨基安替比林法和邻-甲联苯胺法测定游离血红蛋白结果比较[J]. 河南医学研究,2014,23(6):28-31.