

• 检验技术与方法 •

甘油残留量检测方法确认

骆展鹏, 杨俊鸿, 舒勤, 刘加伟, 黎美君[△], 彭楷, 王娟娟, 邹晓萍
(重庆市血液中心, 重庆 400015)

摘要: 目的 采用三酰甘油试剂盒检测冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量, 对该检测方法进行全面评价。方法 对该方法的准确度、批内和批间精密度、线性范围及可报告范围等性能进行确认, 以确保检测结果的准确、可靠。结果 准确度: 偏移小于或等于 2.50%; 批内精密度相对标准偏差(RSD)≤1.0%, 批间精密度 RSD≤2.0%; 在 0.007 8~2.000 0 g/L 浓度范围内, 测定结果与标准溶液浓度呈线性相关, $Y=0.975 2X+0.009 5(r^2=0.999 8)$; 可报告范围下限为 0.007 8 g/L, 上限为 64.0 g/L。结论 采用三酰甘油试剂盒检测甘油残留量的方法能满足采供血机构需求。

关键词: 冰冻解冻去甘油红细胞; 甘油残留量; 方法确认

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.044

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-1039-02

Technology evaluation of analyzing the glycerol residual volume

Luo Zhanpeng, Yang Junhong, Shu Qin, Liu Jiawei, Li Meijun[△], Peng Kai, Wang Juanjuan, Zou Xiaoping
(Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To evaluate the technology that analyzing the glycerol residual volume in the frozen and deglycerolized red blood cells with the triglyceride detection kits. **Methods** The important elements including operators, instruments, accuracy, within-run precision, between-run precision, linear range and the reportable range were evaluated. **Results** The accuracy: Bias≤2.50%, within-run precision RSD≤1.0%, between-run precision RSD≤2.0%. A better linear relation was presented between the analysis results and the corresponding concentration of the reference materials in the concentration range from 0.007 8 g/L to 2.000 0 g/L, $Y=0.975 2X+0.009 5(r^2=0.999 8)$. The reportable lower limit was 0.007 8 g/L and the upper limit was 64.0 g/L. **Conclusion** The technology that analyzing the glycerol residual volume with the triglyceride detection kits is satisfied demand for the blood bank.

Key words: frozen and deglycerolized red blood cells; glycerol residual volume; technology evaluation

甘油残留量作为冰冻解冻去甘油红细胞关键质量指标之一,已在《全血及成分血质量要求》(GB 18469-2012)中做出明确规定。甘油残留量检测方法比较多,如氢氧化钠滴定法、变色酸显色法、渗透压法、高效液相色谱法等^[1-2]。采、供血机构常规检测甘油的方法一直沿用氢氧化钠滴定法和变色酸显色法^[3],但这两种方法操作烦琐、耗时长、试剂不易保存,且为指示剂终点滴定法,结果靠肉眼判读^[4]。《血站技术操作规程》(以下简称《规程》)规定了可以采用三酰甘油试剂盒检测甘油残留量。因此,本文主要研究三酰甘油试剂盒检测甘油残留量的确认,旨在为采、供血机构进行检测方法确认提供理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 研究标本 本中心制备的冰冻解冻去甘油红细胞。

1.2 试剂与仪器 试剂:三酰甘油测定试剂盒(GPO-PAP 法,四川迈克)、丙三醇(纯度大于或等于 99%)、生理盐水、20%三氯醋酸。仪器:NSA-400 型全自动生化分析仪、电子分析天平、容量瓶。所有计量设备均经过计量检定合格并在有效期内。

1.3 方法

1.3.1 甘油浓度检测 电子分析天平精确称取甘油 0.000 3、0.08、0.1、0.12、0.2、0.8、1.6、3.2 g 分别置于 100 mL 的容量瓶中,用生理盐水溶解稀释至刻度,配成 0.003、0.8、1.0、1.2、2.0、8.0、16.0、32.0 g/L 的标准溶液。按三酰甘油检测试剂

说明书要求上机检测甘油浓度。甘油浓度(g/L)=三酰甘油物质的量浓度(mmol/L)×92.09/1 000(92.09 为甘油相对分子质量,1 000 为单位换算因子)。

1.3.2 准确度 渗透压法和预实验测得本中心冰冻解冻去甘油红细胞甘油残留量在 1.0 g/L 左右,因此将 1.0 g/L 的甘油作为目标检测浓度,检测 0.8、1.0、1.2 g/L 3 个浓度的标本各 3 次,计算偏倚。

1.3.3 精密度 批内精密度:每个浓度水平的标本一批内连续检测 20 次,计算批内精密度。批间精密度:每个浓度水平的标本每天检测 2 批,连续检测 10 d,共检测 20 次,批间精密度。

1.3.4 检测线性及线性范围 将高于说明书给出的线性范围上限的标准溶液进行对倍稀释。以检测浓度均值(Y)和标准溶液浓度(X)计算回归直线方程和相关系数(r^2),并计算方程斜率和截距。

1.3.5 可报告范围 可报告上限:线性上限为 2.0 g/L,用生理盐水将 16.0、32.0、64.0 g/L 的标准溶液,分别按 8、16、32 倍稀释到 2.0 g/L,检测后计算偏移;可报告下限:将 2.0 g/L 的标准溶液进行对倍稀释,检测后计算偏倚。偏倚小于或等于 1/4 ET_a (6.25%) 的原始标本浓度范围即为可报告范围。

1.3.6 常规标本验证 吸取冰冻解冻去甘油红细胞 1 mL 于试管中,加 20%三氯醋酸溶液 1 mL,作用 10 min 破坏红细胞并使血红蛋白沉淀,离心,取上清液,上机检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,分

析线性确认中各浓度理论值与实测值的相关性,计算相对标准偏差。

2 结 果

2.1 准确度确认结果 见表 1。

表 1 准确度确认结果

标准浓度(g/L)	检测浓度(g/L)			偏倚(%)		
0.8	0.81	0.81	0.82	1.25	1.25	2.50
1.0	1.01	1.00	1.01	1.00	0.00	1.00
1.2	1.20	1.18	1.19	0.00	-1.67	-0.83

2.2 精密度确认结果 见表 2。

表 2 精密度确认结果($n=20$)

指标	批内精密度			批间精密度		
	0.8	1.0	1.2	0.8	1.0	1.2
\bar{x} (g/L)	0.82	1.02	1.19	0.81	1.01	1.17
SD	0.004	0.01	0.01	0.013	0.02	0.02
RSD(%)	0.49	0.98	0.84	1.60	1.98	1.71

2.3 线性范围确认结果 在 0.007 8~2.000 0 g/L 浓度范围内,测定结果与标准浓度呈线性相关,回归方程 $Y=0.975X+0.0095$,相关系数(r^2)=0.999 8,斜率 0.975,截距 0.009 5。见图 1。

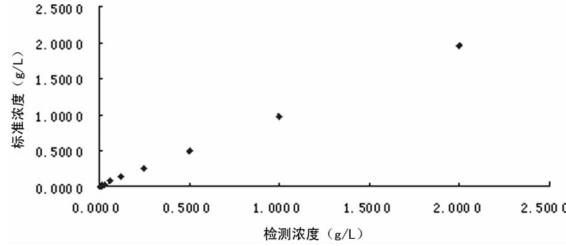


图 1 测定甘油浓度与标准甘油浓度的关系

2.4 可报告范围确认结果 在 0.007 8~2.000 0 g/L 范围内,稀释度为 32 倍时,偏移在 6.25% 以内,即可报告下限为 0.007 8 g/L,可报告上限大于 64.0 g/L。

2.5 常规标本验证结果 20 份标本检测最低值为 0.25 g/L,最高值为 1.58 g/L,均满足《全血及成分血质量要求》要求,并在线性范围内。

3 讨 论

甘油具有无毒性、中性、相对分子质量小、能渗入细胞、与水结合能力强等特点,使水溶液的结晶点明显降低,结晶过程缓慢或形成无结晶凝固,与水结合以防止红细胞的冷冻损伤。但过多甘油进入人体会导致不良反应,引起受血者不适,严重者甚至有生命危险^[5]。因此在使用冰冻解冻红细胞之前,必须经过洗涤去除甘油,要控制洗后红细胞中甘油残留量小于或等于 10 g/L,以消除甘油对人体产生的不良反应,保证输注后的红细胞能够正常发挥生理功能。

用检测三酰甘油的试剂盒检测游离甘油是对原方法的偏离^[6],因此需对方法的一般要素、准确性、精密度、线性及线性范围、可报告范围进行确认。由于浓度为 100% 的甘油,其黏

稠度很高,倍比稀释过程中,如果某一浓度点混匀不均,会导致其后一系列浓度点出现较大的系统误差。因此,在各浓度点的甘油标准液配制上,采用了直接称量配制的方法。

准确度是评估检测方法是否满足需要的首要指标,准确度评估的最常用的方法有方法比较试验(与参加过能力验证的检测方法比较)、参加能力验证活动和检测定值标本,由于甘油检测没有能力验证活动,因此选择定值标本检测的方法。CLIA'88 规定三酰甘油总允许误差(ETa)为 25%,以偏倚小于或等于 $1/4 ETa$ 作为可接受标准,即偏倚小于或等于 6.25%,本方法 0.8、1.0、1.2 g/L 3 个浓度偏倚均小于 6.25%。

检测结果必须具有较好的精密度,否则准确性就无从谈起。参照文献[7]提出高效检验对精密度要求的观点,批内精密度相对标准偏差(RSD)应小于 CLIA'88 允许误差的 $1/4$,批间精密度 RSD 应小于 CLIA'88 允许误差的 $1/3$ 。CLIA'88 规定三酰甘油 ETa 为 25%,因此,甘油残留量检测方法的批内 RSD 应小于 6.25%,批间 RSD 应小于 8.33%。本研究发现,在 0.007 8~2.000 0 g/L 浓度范围内,测定结果与标准浓度呈线性相关,回归方程 $Y=0.975X+0.0095$,相关系数(r^2)=0.999 8,斜率 0.975,截距 0.009 5。

本文采用标本稀释后进行检测来得到可报告范围,64 g/L 甘油标准溶液直接稀释 32 倍得到 2 g/L 甘油溶液即为扩展分析物,检测结果总误差满足预定的标准,64 g/L 已大大超出国标规定的 10 g/L,因此,再进行稀释已无意义。

用常规检测标本验证时,20% 的三氯醋酸可以破坏红细胞使细胞内残存的甘油释放出来,测定红细胞内外残留甘油总浓度比测定红细胞悬液上清液中的甘油浓度更为准确反映残留甘油的浓度。有文献报道,严重溶血对酶法试剂盒测定三酰甘油浓度有一定的影响^[8],三氯醋酸可以沉淀血红蛋白,减少其对检测结果的影响。

用于甘油浓度检测的方法较多,三酰甘油检测试剂盒检测冰冻解冻去甘油红细胞残留量是一种自动化检测的方法,其准确度、精密度、线性和可报告范围均能满足采、供血机构的使用需要。

参考文献

- 刘春燕,张孝山,李浩泷,等.丙酮酸激酶法检测冰冻红细胞解冻后残留甘油含量研究[J].天津医药,2007,35(10):794-795.
- 黄海涛,杜力佳,丁中涛,等.高效液相色谱法测定果酒中的糖、甘油和乙醇[J].云南大学学报,2002,24(5):375-377.
- 安万新.输血检验学[M].大连:大连出版社,2002;303-304.
- 林俊杰,徐蓓,邱颖婕,等.冰冻红细胞中甘油残留量不同测定方法的比较[J].中国输血杂志,2002,15(5):323-324.
- 王庆利.甘油的非临床安全性评价[J].药学研究,2013,32(8):435-438.
- 李健斋.用酶试剂测定血清三酰甘油(一步终点法)[J].中华医学检验杂志,1987,10(5):262.
- 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础[M].上海:上海科学技术文献出版社,2003;162-181.
- 冯仁丰,黄晓岚.酶法测定三酰甘油能否消除游离甘油的影响[J].上海医学检验杂志,2000,15(3):12.

(收稿日期:2013-12-17)