

探讨质谱 MRM 方法对于糖化血红蛋白准确测定的应用*

宋智心¹, 王 默², 张顺利², 张 瑞², 马怀安³, 张景丹¹, 王清涛²

(1. 北京市房山区良乡医院, 北京 102401; 2. 首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京 100020;

3. 中国中医科学院眼科医院, 北京 100040)

摘要:目的 应用质谱多反应监测扫描(MRM)技术准确测定糖尿病患者体内糖化血红蛋白的水平。方法 在国际临床化学和实验室医学联盟(IFCC)推荐的质谱法测定糖化血红蛋白参考方法的基础上,利用 IFCC 参考实验室一级校准物质绘制标准曲线,使用质谱单离子检测扫描(SIM)和 MRM 2 种模式测定 IFCC 参考实验室国际比对样本及临床患者标本,计算 2 种方法的均值、精密度和偏倚,评价质谱 MRM 方法测定糖化血红蛋白的优势。结果 在 SIM 和 MRM 2 种监测模式下,均以峰面积为计算依据,横坐标为峰面积比值,纵坐标为浓度 CONC 比值,绘制标准曲线,在给定的浓度范围内,2 种检测方法 r^2 分别为 0.998 8 和 0.999 2;测定 IFCC 参考实验室国际比对样本中糖化血红蛋白的水平, SIM 模式下,精密密度为 0.77%~1.81%,偏倚为 -0.35~0.30 mmol/mol;MRM 模式下,精密密度为 0.81%~1.84%,偏倚为 -0.20~0.40 mmol/mol。结论 在质谱法测定血液样本中糖化血红蛋白水平时,应用 MRM 监测模式可以获得与 SIM 模式一致的结果,检测值和精密密度等监测结果均符合 IFCC 参考实验室国际比对要求,同时灵敏度和信噪比进一步提升,抗干扰能力更好,应用前景广阔。

关键词:质谱多反应监测扫描质谱法; 糖化血红蛋白测定; 参考方法; 糖尿病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.22.003 **中图法分类号:**R587.1;R446.1

文章编号:1673-4130(2018)22-2729-05

文献标识码:A

The application of mass spectrometry MRM to the accurate determination of glycosylated hemoglobin*

SONG Zhixin¹, WANG Mo², ZHANG Shunli², ZHANG Rui², MA Huai'an³,ZHANG Jingdan¹, WANG Qingtao²

(1. Department of Laboratory Medicine, Liangxiang Hospital of Beijing Fangshan District, Beijing 102401, China; 2. Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100020, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Ophthalmology Hospital of Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China)

Abstract: Objective To accurately determine the content of glycosylated hemoglobin (HbA1c) in patients with diabetes mellitus by multi-reaction monitoring (MRM) technique. **Methods** Based on the reference method recommended by IFCC for the determination of glycosylated hemoglobin by mass spectrometry, the standard curve was drawn by using the primary calibration material of IFCC reference laboratory, and the international comparative samples and clinical patient samples of IFCC reference laboratory were determined by single ion monitoring (SIM) and MRM. Calculate the mean, precision and bias of the two methods. **Results** The standard curves were drawn under the SIM and MMR monitoring modes with the peak area as the calculation basis, the abscissa as the peak area ratio, and the ordinate as the concentration CONC ratio. Within the given concentration range, the two R^2 were 0.998 8 and 0.999 2, respectively. The glycosylated hemoglobin content and the SIM model were determined in the international comparison samples of IFCC reference experiments. The CV were 0.77%—1.81%, The bias was -0.35—0.30 mmol/mol; and the CV were 0.81%—1.84% and the bias in MRM mode was -0.20—0.40 mmol/mol. **Conclusion** In the determination of HbA1c in blood samples by mass spectrometry, MRM monitoring model can be used to obtain consistent results with SIM. The detection values are in line with the international comparison requirements of IFCC refer-

* 基金项目:首都临床特色应用研究项目(Z151100004615001)。

作者简介:宋智心,女,副主任技师,主要从事生物化学标准化方面的研究。△ 通信作者,E-mail:lilysong1978@126.com。

本文引用格式:宋智心,王默,张顺利,等.探讨质谱 MRM 方法对于糖化血红蛋白准确测定的应用[J].国际检验医学杂志,2018,39(22):

ence laboratory. The sensitivity and signal-to-noise ratio are further improved, and the application prospect is good.

Key words: multi-reaction monitoring mass spectrometry; glycosylated hemoglobin; reference method; diabetes mellitus

目前,国际上定义糖化血红蛋白(HbA1c)化学构成为葡萄糖稳定的连接在血红蛋白(HbA0)β链 N 末端缬氨酸(Val)残基上,即血红蛋白(血液)-N-(1-脱氧果糖基)血红蛋白 β 链^[1]。

HbA1c 作为糖尿病患者长期血糖控制的重要指标,长期以来一直受到临床医生的广泛关注^[2],其参考方法一直沿用国际临床化学联合会(IFCC)推荐的液相色谱串联质谱或液相色谱串联毛细管电泳^[3],本研究在 IFCC 推荐的质谱法测量 HbA1c 的基础上,利用质谱多反应监测(MRM)技术,选择了二级质谱二个离子对, HbA0 的质荷比(m/z)为 348.2→110 和 HbA1c 的 m/z 为 429.2→245,替代了单反应监测(SIM)中 HbA0 的 m/z 为 348.2 和 HbA1c 的 m/z 为 429.2,获得了准确一致的结果,抗干扰能力强,标本处理方法简便^[4],有望成为 HbA1c 准确测定的新方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有临床标本均来自北京朝阳医院和良乡医院的健康体检患者,空腹采集新鲜乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝静脉血,经筛查人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和丙型肝炎病毒表面抗原(HCV)均为阴性,依据 IFCC 推荐的 HbA1c 参考测量方法实验流程处理血液标本 8 支(S1~S4,各 2 支);IFCC HbA1c 网络参考实验室比对样本 18 支(包括 Melborume8、Berlin1、California1、California8 和 Milano 6~10,各 2 支);IFCC 一级校准物 Pcal A~F 共 6 支,浓度范围 0~150 mmol/mol。

1.2 仪器和试剂 1290-6490 三重四级杆质谱仪来自安捷伦科技(中国)有限公司(液相色谱和质谱参数见表 1),仪器处于最佳工作状态。有机化学试剂(甲酸、甲醇、乙腈)均为 HPLC 等级,购自默克公司;endoproteinase GLU-C 为测序等级,购自罗氏诊断;醋酸、乙酸胺、β-吗啡代乙磺酸、EDTA-K₂、磷酸、氯化钠、氢氧化钠等,均为分析纯(AR),购自北京化工有限公司。

1.3 方法 在 2 个独立的工作日,将全部血液样品按细胞内蛋白 Glu-C 200 μg/mL,37 °C 酶解 18 h 以上,-20 °C 冻存终止反应,获得酶解产物。将酶解物室温放置 20 min 后,应用 IFCC 推荐的液相色谱串联三重四级杆质谱法测定所有实验标本,SIM 模式下监测 m/z 为 348.2(HbA0)和 429.2(HbA1c),计算峰面积比值;同时选择 MRM 模式下监测了二级质谱

HbA0 m/z 为 348.2→110,HbA1c 的 m/z 为 429.2→245,计算对应峰面积比值;每个样本重复测定 3 次,利用 m/z 峰面积比值计算样本中 HbA1c 的水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,对各组数据进行正态性检验,符合正态分布的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

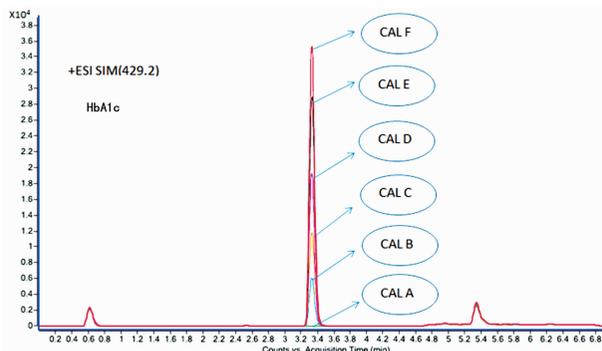
2 结果

2.1 SIM 与 MRM 模式下测定 HbA1c 的液相色谱和质谱条件 见表 1。

表 1 液相色谱和质谱条件

色谱条件参数		质谱条件参数	
流动相	A:水(水+0.1%甲酸) B:甲醇	扫描类型	SIM/MRM
梯度	0 min 10% B; 3 min 30% B; 4 min 95% B; 6 min 95% B; 6 min 10 s 10% B; 8 min 10% B;	CAP 电压 喷雾气体 喷雾器压力 气体流速 气体温度 扫描范围	3 500 V 氮气 241 kPa 15 L/min 370 °C 300~2 000 m/z
流速	400 μL/min		

2.2 SIM 与 MRM 模式下测定 HbA1c 色谱图的比较 以对应 m/z 的峰面积作为计算依据,其中图 1 为 SIM 方法测定的 HbA1c 色谱图,对应 m/z 为 429.2;图 2 为 SIM 方法测定的 HbA0 色谱图,对应 m/z 为 348.2;图 3 为 MRM 方法测定的 HbA1c 色谱图,对应 m/z 为 429.2→245;图 4 为 MRM 方法测定的 HbA0 的色谱图,对应 m/z 为 348.2→110。由色谱图可以看到 2 种模式下均可以获得均匀光滑的色谱峰,并且 MRM 监测模式下 HbA1c 杂峰比较少。



注:CALA-CALF 为 IFCC HbA1c 一级标准物质,浓度分别为 0、29.4、58.3、87.6、116.6、146.7 mmol/mol)

图 1 SIM 方法测定的 HbA1c 色谱图

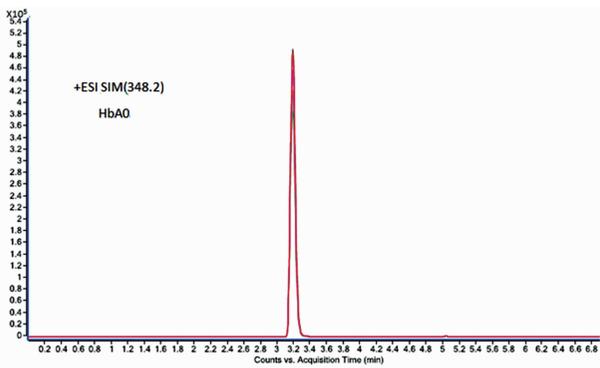
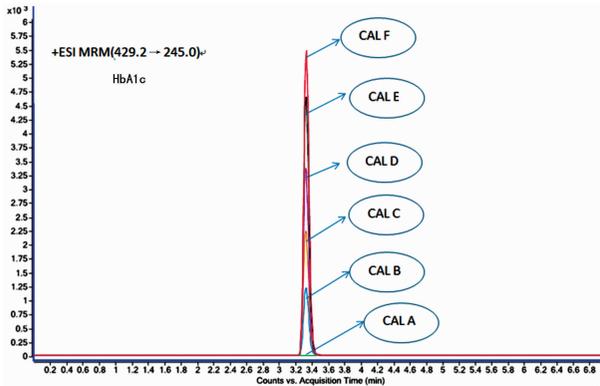


图 2 SIM 方法测定的 HbA0 色谱图



注:CALA-CALF 为 IFCC HbA1c 一级标准物质,浓度分别为 0、29.4、58.3、87.6、116.6、146.7mmol/mol)

图 3 MRM 方法测定的 HbA1c 色谱图

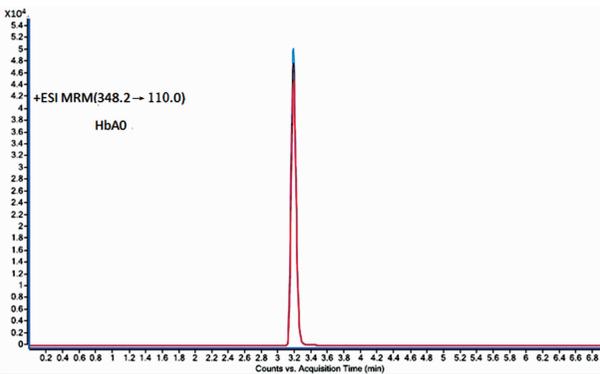


图 4 MRM 方法测定的 HbA0 色谱图

2.3 SIM 与 MRM 方法测定 HbA1c 标准曲线的绘制 在 SIM 模式下,以峰面积为计算依据,横坐标为 HbA1c:HbA0 浓度 CONC 比值,纵坐标以 m/z 峰面积比值(429.2/348.2),绘制标准曲线,见图 5;在 MRM 模式下,以峰面积为计算依据,横坐标以 HbA1c:HbA0 浓度 CONC 比值;纵坐标为 m/z 峰面积比值(429.2→245/348.2→110),绘制标准曲线,见图 6;2 种方法 r^2 分别为 0.998 8 和 0.999 2,线性相关性良好。

2.4 SIM 与 MRM 模式测定样本中 HbA1c 水平的比较。以 IFCC 参考实验室国际比对样本 Melborume8、Berlin1、California1、California8 为质控品,测定 IFCC 国际比对样本(Milano 6~10)和临床血液标本中 HbA1c 水平,见表 2;SIM 模式下,偏倚为

-0.35~0.30 mmol/mol,MRM 模式下,偏倚为 -0.20~0.40 mmol/mol,2 种方法测得的 HbA1c 水平均符合 IFCC 国际比对要求范围。

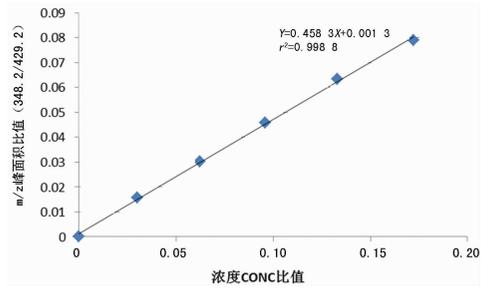


图 5 SIM 法测定 HbA1c 标准曲线

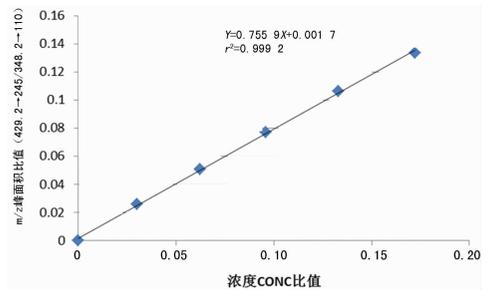


图 6 MRM 法测定 HbA1c 标准曲线

表 2 SIM 与 MRM 模式测定样本中 HbA1c 水平的比较 (mmol/mol)

样本	SIM			MRM		
	均值	精密度(%)	偏倚	均值	精密度(%)	偏倚
Melborume8	86.20	1.10	-0.20	87.00	1.33	+0.40
Berlin1	32.00	1.22	+0.20	32.20	1.70	+0.40
California1	31.30	1.35	+0.30	30.80	1.35	-0.20
California8	78.50	1.81	-0.30	79.10	1.30	+0.30
Milano6	54.34	1.44	+0.14	54.11	1.69	-0.08
Milano7	88.15	1.32	-0.35	88.63	1.13	+0.13
Milano8	77.80	1.25	-0.20	77.85	1.84	-0.15
Milano9	40.48	1.17	+0.18	40.39	1.03	+0.09
Milano10	42.15	1.38	-0.35	42.42	1.09	-0.08
S1	34.49	0.77		34.55	0.81	
S2	50.57	1.43		50.21	1.36	
S3	62.33	1.24		62.51	1.22	
S4	86.85	1.66		86.67	1.58	

3 讨论

HbA1c 是葡萄糖与血红蛋白 B 链 N 末端的缬氨酸进行非酶促反应后形成的糖基化蛋白,与红细胞的生存周期密切相关^[5],由于其反映糖尿病患者 2~3 个月前的血糖控制平均水平^[6],一直被临床医生认可,各国研究人员也参照 IFCC 推荐的参考方法开展地区间和国际间的 EQA 计划^[7],由于推荐的质谱参考方法标本处理时间长,检测稳定性和重复性要求高,也有报道对其进行改良实验^[8]。随着三重四极杆

质谱技术的发展,通过利用相对分子质量的不同,采用多重离子对监测技术,有效地排除杂质干扰,增加专属性和灵敏度,并做出快速的分析^[9]。近年来该技术在分析化学领域,尤其在临床医学研究领域得到日益广泛的应用。对于复杂的、基质背景高的生物样本,高灵敏度和高信噪比的 MRM 方法受到实验室工作人员的重视,尤其对于分辨率要求高的生物样本,此前 ZHANG 等^[10]也开展了应用 MRM 方法测定 HbA1c 相关内容的研究,本研究实验中发现在质谱定量分析 HbA1c 实验中,同时选择了二级质谱 HbA0 的 m/z 为 348.2→110, HbA1c 的 m/z 为 429.2→245 替代 IFCC 推荐 SIM 质谱法的 m/z 为 348.2(HbA0) 和 429.2(HbA1c),2 种模式下相关系数 r^2 均大于 0.99,线性关系良好,测定结果也符合 IFCC 参考实验室国际比对的要求,由于血液样本的复杂性,MRM 在抗干扰方面优于 SIM,有望成为准确测定 HbA1c 的一种新方法。

在 HbA1c 测定的比对方法中^[11],质谱法测定一直受到各界专家的认可,IFCC HbA1c 标准化工作组国际参考网络成员中,80%的实验室采用此方法,其准确性和一致性已经过反复的论证,MRM 技术在处理复杂生物样本时,具有灵敏度高,抗干扰能力强,准确度高等特点,在蛋白质测定和小分子蛋白定量检测中有着非常广阔的应用前景。

虽然本研究提示质谱 MRM 技术对于准确测定 HbA1c 有很明显的应用价值,但是由于本研究只涉及较少的实验样本,准确的循证医学研究还需要大量的后续样本的验证以便确定更准确和更优化的质谱参数^[12]。

4 结 论

本研究使用 MRM 质谱技术应用于糖化血红蛋白的检测,稳定性和重复性均符合参考方法比对要求,与 IFCC 推荐的 SIM 质谱参考方法比较干扰能力强,准确度高。

参考文献

[1] INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, IFCC SCIENTIFIC DIVISION, NORDIN G, et al. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c" [J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(8):1081-1082.

- [2] 兰凯. 2 型糖尿病糖化血红蛋白与血清胱抑素 C 相关性对照研究[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(19):2948-2949.
- [3] JEPSSON J O, KOBOLD U, BARR J, et al. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood[J]. Clin Chem Lab Med, 2002, 40(1):78-89.
- [4] 柏慧, 张仁慈, 王曦烨, 等. 三重四级杆质谱技术在中药研究中的应用进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2018, 33(3):208-212.
- [5] 邱友燕, 李素燕, 曾炼坤, 等. 2 型糖尿病患者血清 C 肽与糖化血红蛋白水平的价值评估[J]. 中国实用医药, 2018, 13(21):89-91.
- [6] 李宏. 探讨糖化血红蛋白在糖尿病检测中的临床意义[J]. 当代医学, 2018, 24(20):137-138.
- [7] KAISER P, SPANNAGL M, VAN CAMPENHOUT C A, et al. HbA1c : EQA in Germany, Belgium and the Netherlands using fresh whole blood samples with target values assigned with the IFCC reference system[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(11):1769-1775.
- [8] KAISER P, AKERBOOM T, MOLNAR P, et al. Modified HPLC-electrospray ionization/Mass spectrometry method for HbA1c based on IFCC reference measurement procedure[J]. Clin Chem, 2008, 54(6):1018-1022.
- [9] 王少敏, 张甦, 毛丹, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-三重四级杆液质法测定中药材中展青霉素[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 3(3):337-340.
- [10] ZHANG T, ZHANG C, CHEN W, et al. Quantification of hemoglobin A(1c) by off-line HPLC separation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a modification of the IFCC reference measurement procedure[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(4):569-576.
- [11] GEISTANGER A, ARENDS S, BERDING C A, et al. Statistical methods for monitoring the relationship between the IFCC reference measurement procedure for hemoglobin A(1c) and the designated comparison methods in the United States, Japan, and Sweden[J]. Clin Chem, 2008, 54(8):1379-1385.
- [12] WONG L, LIU H, YONG S, et al. Improved reference measurement method for hemoglobin A1C by use of liquid chromatography-isotope dilution-tandem mass spectrometry[J]. Clin Chem, 2015, 61(2):435-436.

(收稿日期:2018-05-26 修回日期:2018-08-02)