

# 液质联用法测定血液中糖化血红蛋白 (HbA1c)

## LCMSMS-245

**摘要：** 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用建立血液中 HbA1c 分析方法。HbA1c 在 0%~17.192% 范围内线性良好，相关系数  $r>0.999$ ，对低、中、高不同浓度的质控样品平行测定 6 次，回收率在 95.44%~105.27% 之间，相对标准偏差为 1.80%~3.37%。

**关键词：** 液质联用 血液 糖化血红蛋白

糖化血红蛋白 (HbA1c) 是测定长期血糖水平的金标准，作为糖尿病并发症风险预测因子在临床上广泛应用。由于葡萄糖可以自由进出红细胞，葡萄糖可以与血红蛋白在不同位点以不依赖酶的形式不可逆的结合成糖化血红蛋白。大多数成人体内广泛存在的血红蛋白为血红蛋白 A (HbA)，它由两条  $\alpha$  和两条  $\beta$  链组成。血红蛋白 A 携带三种主要糖化蛋白形式，按照阳离子交换层析时它们的洗脱顺序依次为：HbA1a、HbA1b、HbA1c。HbA1c 为主要的稳定糖化合物，约占总的糖化 HbA1 的 85%。美国糖尿病协会 (ADA) 设定的糖尿病血糖控制的目标为 HbA1c < 7%。如果超过 8%，对病患者采取的临床干预措施就要显著改变。2011 年，ADA 将 HbA1c 检测列入了糖尿病的诊断措施，其参考上限为 5.7%，糖尿病诊断值 6.5%，5.7%~6.4% 作为糖尿病的高危人群。与

血糖监测相比，HbA1c 检测有一定的优势。HbA1c 没有短期波动，其结果相对稳定且在一天的任意时间段都可以检测。

根据电荷的不同或血红蛋白结构的差异，HbA1c 检测方法分为两类。按照结构差别分为亲和色谱，免疫化学和酶法测定。国际临床化学协会 (IFCC) 的方法被公认为糖化血红蛋白检测的标准参考方法。它的原理是通过葡萄糖 -C 蛋白内切蛋白酶将血红蛋白裂解为  $\beta$  链上糖化和未糖化的 N- 端六肽。这些六肽从肽混合物中分离出来，再通过 HPLC-ESI/MS 法或 CE-UV 法定量测定。本文用岛津 LCMS-8050 对糖化血红蛋白水解六肽进行测定，有效排除离子通道干扰，分析时间短，效率高。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver.5.82 SP2 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS 2.1 mm I.D.×50 mm L.,

1.9  $\mu$ m

流速：0.5 mL/min

柱温：50°C

进样量：0.5  $\mu$ L

流动相 A：0.1% 甲酸 +1 mM 乙酸铵水溶液

流动相 B：0.1% 甲酸乙腈溶液

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度 5%，  
时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.20	Pumps	B.Conc	7
2.00	Pumps	B.Conc	25
2.01	Pumps	B.Conc	98
4.50	Pumps	B.Conc	98
4.51	Pumps	B.Conc	5
5.50	Pumps	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: +4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 10.0 L/min

干燥气: 氮气 15.0 L/min

接口温度: 350°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 选择离子监测 (SIM)

驻留时间: 100 msec

SIM 参数: 见表 2

表2 SIM参数

物质名称	SIM 离子
糖化血红蛋白 (HbA1c)	429.2
非糖化血红蛋白 (HbA0)	348.2

### 1.3 样品制备

新鲜的血液采用 EDTA 抗凝, 取 1.5 mL 血 8°C 3000×g 离心 10 min, 弃去血浆, 10 mL 盐水洗涤沉淀 2 次。10 mL 盐水溶液混溶, 37°C 孵育细胞 4 h。弃去上清, 1.0 mL 水混匀细胞。计算总的血红蛋白浓度, 与等量的 50 mMβ-吗啉代乙磺酸混合, 将总血红蛋白稀释至 50 mg/mL。加 NaOH(4 mol/L) 调整 pH 至 6.2。3000×g 离心 20 min 去除细胞碎片。加入 50 μL 内切蛋白酶 Glu-C, 约 1 mg 总血红蛋白溶解在 500 μL 消化液中。轻轻盖上瓶盖, 37°C 孵育, 轻轻摇动 18 h, 形成糖基化的和未糖基化的 β 链 N 末端六肽。-20°C 冷冻 2 h 终止蛋白水解。解冻样本, 8000×g 离心 2 min, 取上清进样分析。

### 1.4 定标液

定标液的制备通过混合纯的 HbA0 和 HbA1c 溶液。制备成 6 个浓度的 HbA1c 校准液 (0%, 3.029%, 6.191%, 9.601%, 13.199%, 17.192%)。

### 1.5 质控

-70°C 储存合并患者溶血产物, HbA0 和 HbA1c 值由 IFCC 网络确定。

## 结果讨论

### 2.1 方法选择性

取 HbA1c 浓度为 0% 和 3.029% 的校准点，稀释 100 倍，按前述条件分析，如下图 1 所示。

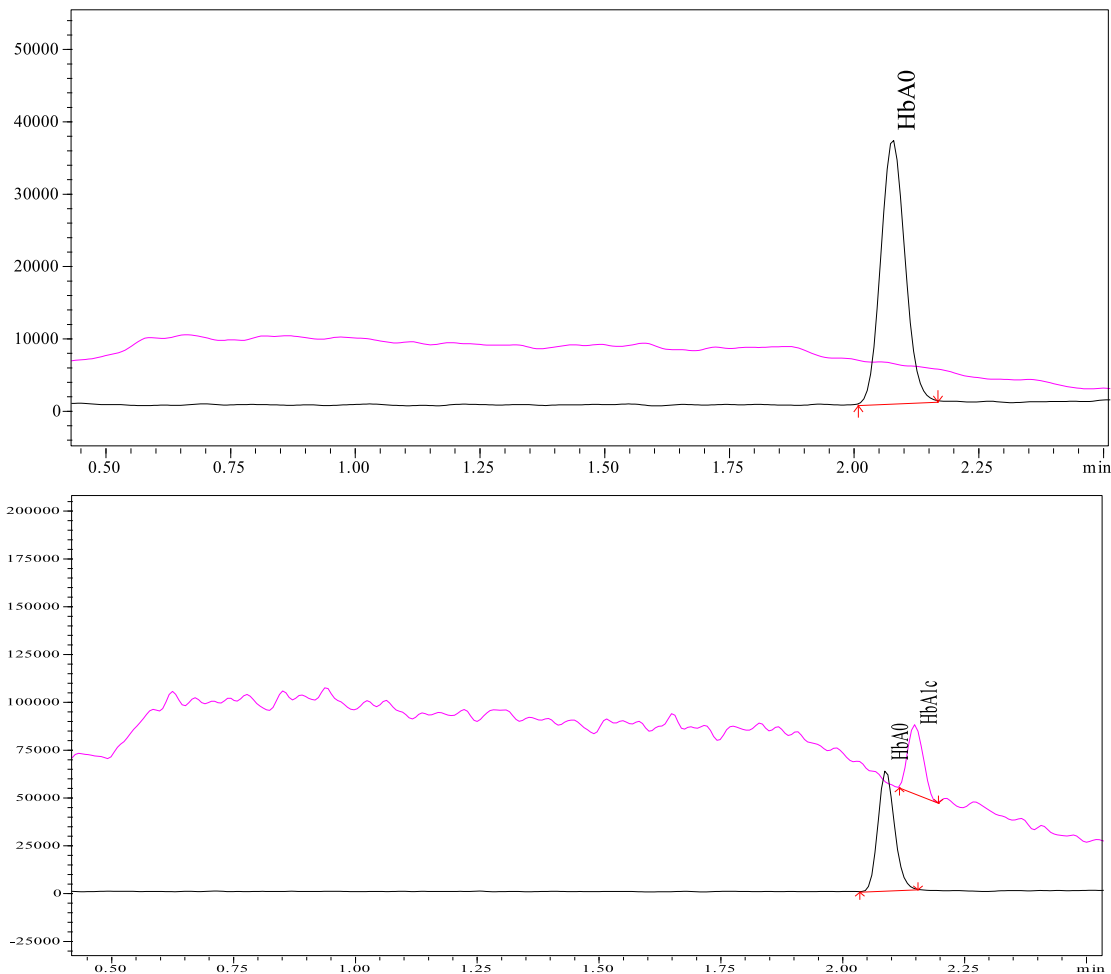


图1 HbA1c浓度为0%和3.029%的校准点SIM色谱图

### 2.2 线性范围

将 HbA1c 浓度为 0%，3.029%，6.191%，9.601%，13.199%，17.192% 的校准液，稀释 100 倍，按前述分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，HbA0 为内标，制作校准曲线，线性方程、线性范围和相关系数见表 4。

表4 HbA1c线性方程及相关系数

物质名称	校准曲线	线性范围(%)	准确度(%)	相关系数 R
HbA1c	$Y = (1.968)X + (-0.005522)$	0~17.192	95.8~101.8	0.9993

### 2.3 回收率、精密度及准确度

将 QC1, QC3, QC5 稀释 100 倍, 按前述条件各平行测定 6 次, 考察仪器的重复性及回收率。结果见表 5。

表5 HbA1c低、中、高三个浓度质控回收率及精密度

物质名称	QC 1(3.167%)		QC 3(4.539%)		QC 5(6.520%)	
	Recovery(n=6)	RSD(%)	Recovery(n=6)	RSD(%)	Recovery(n=6)	RSD(%)
HbA1c	96.21%	3.37	105.27%	2.18	95.44%	1.8

### 2.4 实际样品定量

7 个实际血液样品, 按照 1.3 样品制备方法处理, 稀释 100 倍进样测定。结果如下表 6。

表6 7份样品中HbA1c定值结果

样品编号	HbA1c 含量(%)
1	4.140
2	4.476
3	6.403
4	9.943
5	5.009
6	3.663
7	7.252

## 结论

本文采用岛津 LCMS-8050 建立了血液中糖化血红蛋白的测定方法。HbA1c 在 0%~17.192% 范围内线性良好, 相关系数  $r > 0.999$ , 对低、中、高不同浓度的质控样品平行测定 6 次, 回收率在 95.44%~105.27% 之间, 相对标准偏差为 1.80%~3.37%。该方法具有分析速度快, 灵敏度高, 重复性好的优势, 可用于糖尿病人血液中 HbA1c 的测定。