



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF ××××—202×

人血清中 C 肽测量参考方法 (LC-MS/MS 法)

Reference measurement procedure for C-peptide in human serum (LC-MS/MS
method)

(报批稿)

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布

人血清中 C 肽测量参考方法 (LC-MS/MS 法)

JJF XXXX—202X

Reference measurement procedure for
C-peptide in human serum (LC-MS/MS
method)

归口单位：全国临床医学计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

本规范委托全国临床医学计量技术委员会负责解释。

本规范主要起草人：

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿

目 录

引 言	3
1 范围	4
2 引用文件	4
3 测量原理和方法	4
4 仪器	4
4.1 液相色谱串联质谱联用系统	4
4.2 天平	4
4.3 容量瓶	4
4.4 离心机	5
4.5 移液器	5
4.6 密度计	5
5 试剂和材料	5
5.1 实验用水	5
5.2 试剂	5
5.3 液相色谱柱	6
6 采样和样品	6
6.1 总则	6
6.2 样品用量	6
7 测量系统和分析准备的步骤	6
7.1 液相色谱串联质谱联用系统的准备	6
7.2 检测系统	6
7.3 分析样品的处理	7
8 样品测定	8
8.1 液相色谱条件	8
8.2 串联质谱测量条件	8
8.3 分析过程	9
9 数据处理	9
9.1 校准曲线的建立	9
9.2 样品结果的计算	9

9.3 测量结果的计算	10
9.4 测量不确定度的计算	10
9.5 测量结果单位间换算关系	11
9.6 与其他测量程序所得的结果进行比较	11
10 分析可靠性	11
10.1 总则	11
10.2 分析灵敏度	11
10.3 测量不确定度	11
10.4 测量正确度	11
10.5 测量精密度	11
10.6 检出限和定量限	12
10.8 回收测量	12
11 参考测量程序的确认	12
12 报告	12
13 质量保证	12
13.1 室内质量控制	12
13.2 室间质量控制评价	13
13.3 质量日志	13
附录 A	14
人血清 C 肽参考测量程序标准操作规程示例	14
附录 B	17
人血清中 C 肽测量参考方法不确定度评定示例	17

引 言

JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001《通用计量术语及定义》、JJF 1059.1《测量不确定度评定与表示》和 GB/T 19702《体外诊断医疗器械 生物源性样品中量的测量 参考测量程序的表述和内容的要求》共同构成支撑本规范制定工作的基础性系列规范。

本技术规范规定了人血清中 C 肽测量参考方法，该程序采用同位素稀释液相色谱串联质谱法，其核心内容是对运行该测量程序的试剂配制、样品处理、样品测量、数据分析、不确定度评定等内容进行了规范。该参考测量程序可溯源至国际单位。

本规范所描述的是人血清中的 C 肽。

本规范为首次发布。

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿

人血清中 C 肽测量参考方法(LC-MS/MS 法)

1 范围

本规范适用于医学参考实验室测量人血清 C 肽浓度的参考测量程序。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1001—2011 通用计量术语及定义

JJF 1059.1—2012 测量不确定度的评定与表示

JJF 1071—2010 国家计量校准规范编写规则

JJF 1135—2005 化学分析测量不确定度评定

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19702—2021 体外诊断医疗器械 生物源性样品中量的测量 参考测量程序的表述和内容的要求

凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本规范；凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本规范。

3 测量原理和方法

本规范建立的人血清 C 肽测量参考方法，原理为同位素稀释液相色谱串联质谱测量法。该方法是将稳定同位素标记的 C 肽作为内标添加至血清中，混合均匀后，用磁固相萃取方法提取血清中 C 肽；利用液相色谱仪对样品提取液进行分离，再利用质谱仪对 C 肽和内标的特征离子对进行测量。用 C 肽和内标峰面积比计算血清 C 肽的浓度。

4 仪器

4.1 液相色谱串联质谱联用系统

三重四极杆串联质谱仪，配有电喷雾离子源（ESI），与液相系统联用，校准通过，各项参数指标符合 JJF 1317 液相色谱-质谱联用仪校准规范要求。

4.2 天平

分度 0.01 mg 的一级天平，检定合格或通过校准。

4.3 容量瓶

检定 A 级合格或通过校准。

4.4 离心机

低温冷冻离心机，离心力应满足 14000 g，通过校准。

4.5 移液器

检定合格或通过校准。

4.6 密度计

密度计精度为 $\pm 0.001 \text{ g/cm}^3$ ，检定合格或通过校准。

5 试剂和材料

5.1 实验用水

本规范所用水在没有注明其他要求时，均使用 GB/T 6682 定义的一级实验用水。

5.2 试剂

人血清 C 肽测量参考方法试剂见表 1。

表 1 人血清 C 肽测量参考方法试剂列表

试剂名称	分子式	分子量	CAS 号	试剂要求
C 肽纯度有证标准物质	$\text{C}_{129}\text{H}_{211}\text{N}_{35}\text{O}_{48}$	3020.29	59112-80-0	//
*D ₈ -Val ₂ - C 肽	$\text{C}_{129}\text{H}_{195}\text{N}_{35}\text{O}_{48}\text{D}_6$	3036.29	//	//
甲酸	CH_2O_2	46.03	64-18-6	分析纯
乙腈	$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$	41.05	1975/5/8	分析纯
盐酸	HCl	36.46	7647-01-0	分析纯
硼酸盐缓冲液	//	//	//	0.2 mmol/L, pH 8.8
AQC	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$	269.26	148757-94-2	//
PBS	//	//	//	//
Tween20	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	1227.54	9005-64-5	//
BSA	//	约 66.5 kDa	9048-46-8	//
硫酸铵	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132.14	7783-20-2	分析纯
血清 C 肽有证标准物质	//	//	//	//

注 1：标准物质的使用、保存及使用期限应严格按照标准物质证书中的规定和说明。

注 2：*内标除使用本标准提供的 D8-Val₂ - C 肽外，还可使用其他稳定同位素标记的 C 肽为内标，内标的质量比目标分析物应至少大 3Da，标记纯度超过 98%。内标的使用、保存及使用期限应严格遵循生产厂商提供的产品证书中的规定和说明。

5.3 液相色谱柱

液相色谱柱为极性官能团嵌入或端基封尾的 C_{18} 色谱柱，填料为十八烷基键合硅胶；

6 采样和样品

6.1 总则

血清样品具有潜在生物传染性，应严格遵从对潜在生物传染性样品处理的相关规定，遵循生物安全规则，并根据规定对废液进行处理。

分析前因素对该参考测量程序测量样品特性无显著影响。

6.2 样品用量

样品用量可根据 C 肽的浓度在 (0.3~0.9) mL 之间进行调整。为保证取样的准确性、测量的灵敏度和操作的可行性，建议最小取样量不低于 0.3 mL。

6.3 样品的保存

样品若不立即测定，应于 -20℃ 及以下条件保存。避免反复冻融。

7 测量系统和分析准备的步骤

7.1 液相色谱串联质谱联用系统的准备

7.1.1 质谱系统部分准备

测定前应对质谱系统进行性能检查，包括：

- a) 近 3 个月内进行过质量轴和半峰宽校正并合格。
- b) 真空度达到仪器正常工作要求的范围。

7.1.2 液相系统部分准备

测量前应对液相系统进行准备，包括：

- a) 水相：1‰浓度的甲酸的水溶液；有机相：1‰浓度的甲酸的乙腈溶液。
- b) 选择设定的方法进行仪器平衡，平衡时间 ≥ 30 min。

7.2 检测系统

7.2.1 校准曲线的类型

可采用两点法或多点法校准曲线。

7.2.2 校准物质的溯源性

所采用校准物质应符合 ISO15194 规定的计量溯源性要求。

7.2.3 校准溶液的制备

用 0.1 wt% BSA 的 PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲盐水) 溶液溶解并制备 C 肽

校准溶液 配制浓度为 100.00 $\mu\text{g/mL}$ (33.11 $\mu\text{mol/L}$) 的校准溶液用于 C 肽样品的测定（简称为校准溶液）。记录称量过程，准确计算所配制校准溶液的浓度。

7.2.4 内标溶液的制备

配制稳定同位素标记 0.1 wt% BSA 的 PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲盐水) 溶液为内标溶液：采用与校准溶液相同的过程，配制浓度为 100.00 $\mu\text{g/mL}$ (32.94 $\mu\text{mol/L}$) 的内标溶液用于 C 肽样品的测定（简称为内标溶液）。记录称量过程，准确计算所配制内标溶液的浓度。

7.2.5 校准曲线的处理

多点法校准曲线的校准溶液和内标溶液的质量比应在 0.5~1.5 之间，两点法校准曲线的校准溶液和内标溶液的质量比应在 0.9~1.1 之间。前处理方法同样品处理方法一致。

7.2.6 校准曲线要求

每批次测量均需重新配制校准曲线，且校准曲线相关系数大于 0.995。

7.3 分析样品的处理

7.3.1 样品中 C 肽浓度的初步确定

分析前先初步确定样品的大致浓度，再按照样品测量流程进行测量。

7.3.2 测定血清密度

在分析前，准确测定血清样品的密度。

7.3.3 样品前处理

7.3.3.1 分析样品与内标的混合

在 1.5 mL 离心管中加入一定体积内标，使血清 C 肽与内标的质量比控制在 7.2.5 要求区间内，准确称量其质量 (MIS)，记录读数，并计算加入血清中内标的含量 (QIS)。加入 (0.3~0.9) mL 血清样品，称重得其精确质量 (M_{Ser})，涡旋混合 5 min，在室温下平衡 30 min。

7.3.3.2 磁固相萃取

将磁珠从冰箱中取出并恢复至室温，涡旋均匀后取 125 μL 磁珠溶液（约 12.5mg 磁珠）于离心管中，使用 250 μL 涂层缓冲液 (0.1 mol/L Na_3BO_3 , pH=9.5) 重悬洗涤后在磁力架上静置，去除上清液；再将 102.04 μL 抗体加入磁珠中，加入 81.71 μL 涂层缓冲液，再加入 103.75 μL 耦合缓冲液 (3 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH=9.5)，混合均匀后在 37°C 条件下孵育过夜，反应完成后置于磁力架上静置，去除上清液，加入 312.5 μL 封闭缓冲液 (含有 0.5 wt% BSA 和 0.05 wt% Tween®20 的 PBS 缓冲液)，混合均匀后在 37°C 条件下孵育 16-24 h，孵育完成后置于磁力

架上静置,去除上清液使用 250 μL 洗涤/储存缓冲液(含有 0.1 wt% BSA 和 0.05 wt% Tween®20 的 PBS 溶液)洗涤三次后,加入 500 μL 洗涤/储存缓冲液重悬磁珠,使所得抗体偶联磁珠溶液中的抗体偶联磁珠浓度为 25 mg/mL。通过将抗体偶联磁珠悬浮于 100 μL 0.1 vol%三氟乙酸中进行三次洗脱,并在室温下用氮气干燥样品。

7.3.3.3 衍生化

将 7.3.3.2 中所得样品复溶于 0.2 mol/L 硼酸盐缓冲液(60 μL , pH=8.8)并在室温氮气流下干燥。再复溶于 20 μL 的 10 mg/mL AQC 乙腈溶液,将样品在 55°C 的温度下在加热块中加热 40 min,然后在室温氮气流下干燥,复溶于 5 vol% ACN 的水溶液中离心取上清。

8 样品测定

8.1 液相色谱条件

使用者可根据实验需要进行适当的条件优化,但需按 10.11 进行分析特异性的评价。

8.1.1 液相色谱仪器条件

- a) 色谱柱: 见 5.3;
- b) 柱温: 室温;
- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 进样量: 10 μL ;
- e) 水相: 1 vol%浓度的甲酸的水溶液; 有机相: 1 vol%浓度的甲酸的乙腈溶液。

8.1.2 液相色谱洗脱条件

0~5min, 5% B; 5~20min, 5-65% B; 20~21min, 65-98% B; 21~23min, 95% B; 23~25min, 95-5% B。

8.2 串联质谱测量条件

由于质谱仪器型号差别,使用者可以有效提高离子化效率为原则,对离子源类型、温度、气流等按时进行优化;以有效提高离子传输效率为原则,对锥孔电压、碰撞电压等参数进行优化,进而实现提高测量灵敏度的目的。选用不同的同位素内标,所监测的内标离子对将有所不同,应根据其标记同位素的数量和位置确定。

本规范使用电喷雾电离源(ESI),负离子模式,定量和定性离子对见表 3。

表 3 C 肽及其内标的测量离子对

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z
-----	-----------	-----------

C 肽	1064.0	371.1
	1064.0	171.0
D 同位素标记的 C 肽	1068.3	371.1
	1068.3	171.0

8.3 分析过程

8.3.1 分析系列

C 肽样品测定用校准物质溶液和内标溶液所配制的校准曲线溶液。

8.3.2 样品测量顺序

按照空白，校准曲线（低浓度到高浓度），质控品，样品，质控品，校准曲线（高浓度到低浓度），空白的顺序测量。

8.3.3 样品测量次数

根据分析目的设定测量批次和每批测量次数，建议每个样品测量 3 个批次，每批次测量 2 个平行样。

9 数据处理

9.1 校准曲线的建立

以 C 肽/内标色谱峰的峰面积比为自变量，以质量比为因变量，建立校准曲线线性回归方程：

$$y = bx + m \quad (1)$$

x——C 肽/内标质量比 W；

y——C 肽/内标色谱峰的峰面积比 I；

b——校准曲线线性回归方程的斜率；

m——校准曲线线性回归方程的截距。

9.2 样品结果的计算

测量血清样品可得到 C 肽/内标色谱峰的峰面积比 IS，通过式（1）校准曲线可计算得到 C 肽/内标质量比 WS。则样品浓度 c 可通过以下公式计算得到：

$$c = \frac{W_S \times Q_i}{V_S} \times \frac{1000}{M} \times P \quad (2)$$

c——实际样品中 C 肽浓度， nmol/L；

V_S ——血清样品的体积, μL ;

W_S ——血清样品中 C 肽/内标质量比;

Q_I ——血清样品中内标的含量, ng ;

M ——C 肽分子量。

式中: $V_S = m_S / D_S$;

$$Q_I = c_I \times m_I / D_{\text{sol}};$$

$$W_S = (I_S - m) / b;$$

将其带入公式 (2) :

$$c = \frac{I_S - m}{b} \times \frac{m_I \times c_I}{D_{\text{sol}}} \times \frac{D_S}{m_S} \times \frac{1000}{M} \times P \quad (3)$$

W_S ——血清样品中 C 肽/内标质量比;

m_I ——加入内标溶液的质量, ng ;

c_I ——内标溶液浓度;

P ——标准物质的纯度值 (由标准物质证书提供);

m_S ——血清样品的质量, ng ;

D_S ——血清样品的密度, g/cm^3 ;

D_{sol} ——0.1 wt% BSA 的 PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲盐水) 溶剂密度, g/cm^3 。

9.3 测量结果的计算

计算每批次测量平均值、标准差、变异系数和所有批次的平均值、标准差和变异系数。

9.4 测量不确定度的计算

根据 JJF 1059.1 测量不确定度的评定与表示, JJF 1135 化学分析测量不确定度评定计算测量结果不确定度。

9.5 测量结果单位间换算关系

换算关系： $100\text{ }\mu\text{g/mL} = 33.11\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

9.6 与其他测量程序所得的结果进行比较

若涉及可比性问题，应与其他同等级别的参考测量程序进行比较。

10 分析可靠性

10.1 总则

应依据分析灵敏度、测量不确定度、正确度、精密度、检出限和定量限、测量范围、回收测量、特异性来评估 C 肽参考测量程序的分析可靠性。本参考测量程序适用于临床常规方法的溯源和准确度评价。

10.2 分析灵敏度

校准曲线的斜率，实验室可以根据自己实验条件设定本参考测量程序的分析灵敏度范围。在本程序的测量条件下，方法的分析灵敏度的范围为：0.8-1.2。

10.3 测量不确定度

应根据 JJF 1059.1 测量不确定度的评定与表示，JJF 1135 化学分析测量不确定度评定计算测量结果不确定度，不确定度评定见附录 B。本参考测量程序测量结果的相对扩展不确定度宜小于 7.5% ($k=2$)。

10.4 测量正确度

测量有证标准物质的 $|En| \leq 1$ 。（注：方法的不确定度满足 10.3 要求）

10.5 测量精密度

应根据实验室测量条件评估建立的参考测量程序的重复性和实验室内复现性。本参考测量程序的重复性，CV%宜小于 3.75%；实验室内的复现性，CV%宜小于 5%。

10.6 检出限和定量限

与质谱仪的信号响应有关。本参考测量程序测量的定量限应不低于 0.003 ng（柱上进样量，S/N=10）。

10.7 测量范围

测量范围为 0.19~8.49 ng/mL (0.063~2.811 nmol/L)，样品未做稀释和浓缩。

10.8 回收测量

以 C 肽标准物质为标准品，添加至血清中，混合均匀。用所建立的测量程序测定添加标准品前后的 C 肽浓度，计算方法的加样回收率。

加标回收率应在 $(100 \pm 5)\%$ 范围之内。

11 参考测量程序的确认

参考测量程序进行确认以表明其符合预期用途。确认应尽可能充分以满足应用领域或特定应用的需求。测量程序应涉及确认方案和报告。

用于确认的技术可以包括但不限于：

实验室间研究进行验证，测定结果应符合所参加实验室间研究的要求，如参加由权威机构组织的能力验证、国际比对等。

应使用与校准物质不同的有证标准物质用于正确度验证。

12 报告

报告应包含但不限于以下内容：

样品类型和来源的识别，采样日期和测量日期，参考测量程序的名称，包含被测量的名称、数值和测量单位的结果，测量不确定度的表述，样品不常见特性的记录，关于测量程序的异常特征或改变参考测量程序的记录，生理学和临床信息，如相关。

13 质量保证

13.1 室内质量控制

每个批次开始正式测量样品前均测量质控物质，当质控符合要求后才进入正式测量。应建立包括质控规则、操作步骤的室内质控 SOP 文件及记录。

13.2 室间质量控制评价

定期参加参考实验室能力比对，结果应符合要求。当出现不符合情况时，应认真查找原因，建立失控及失控跟踪记录。

13.3 质量日志

每个工作日完成工作日志及环境控制的质量记录。

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿

附录 A

人血清 C 肽参考测量程序标准操作规程示例

A.1 试剂配制

A.1.1 缓冲液试剂的配制

A.1.1.1 封闭缓冲液配制步骤

- 称量 50 mg BSA, 5 mg Tween®20, 溶于 10 mL PBS (pH 7.4) 溶液
- 储存: 储存在 4-8°C
- 保质期: 可稳定 48 天
- 用后处置: 倾倒入废液收集器, 按实验室相关规定处理
- 可接受标准: 溶液澄清, 无明显浑浊

A.1.1.2 洗涤/储存缓冲液配制步骤

- 称量 10 mg BSA, 5 mg Tween®20, 溶于 10 mL PBS (pH 7.4) 溶液
- 储存: 储存在 4-8°C
- 保质期: 可稳定 48 天
- 用后处置: 倾倒入废液收集器, 按实验室相关规定处理
- 可接受标准: 溶液澄清, 无明显浑浊

A.1.2 校准溶液的配制

A.1.2.1 校准溶液贮存液 (100 µg/mL) 的配制步骤

- 准确称取 1 mg C 肽标准品, 溶于 10 mL 0.1 wt% BSA 的 PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲盐水)
- 储存: 储存在 4-8°C, 密封以避免溶剂挥发
- 保质期: 可稳定 60 天

A.1.3 内标溶液的配制

A.1.3.1 内标贮存液 (100 µg/mL) 的配制步骤

- 准确称取 1 mg D 同位素标记 C 肽标准品, 溶于 10 mL 0.1 wt% BSA 的 PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲盐水)
- 储存: 储存在 4-8°C, 密封以避免溶剂挥发
- 保质期: 可稳定 60 天

A.2 仪器准备

A.2.1 质谱仪准备

三重四极杆质谱仪离子源选择 ESI, 正离子模式。相关仪器参数设置为: 质谱脱溶剂气温度 500°C, 脱溶剂气流速 1000 L/h, 锥孔气流速 150 L/h; 毛细管电压

3.0kV，锥孔电压 30 V；碰撞气（Ar）流速 0.13 mL/min，碰撞能量 4eV。

A.2.2 液相系统准备

色谱柱：XSelect Peptide CSH TM C₁₈ 色谱柱，规格为 2.1 mm × 100 mm，粒径 2.5 μm。

柱温：室温；

流速：200 μL/min；

进样量：10 μL；

水相：1 vol%浓度的甲酸的水溶液；

有机相：1 vol%浓度的甲酸的乙腈溶液。

仪器平衡：按照设定好的色谱质谱条件进行仪器平衡，柱压稳定，无明显波动后设定样品数量和进样次数，选择设定好的检测方法。

A.3 校准曲线和样品处理

A.3.1 校准曲线的处理

a. 使按照表 A.4 在 15 mL 离心管中分别加入不同体积的标准溶液工作液（WS）和相同体积的内标工作液（ISWS），使得两者的质量比（Mass ratio）为 0.25，0.43，1.0，2.33，4.0。

表 A.4 校准曲线配制表

质量比	0.25	0.43	1.0	2.33	4.0
WS/mL	0.2	0.3	0.5	0.7	0.8
ISWS/mL	0.8	0.7	0.5	0.3	0.2

- 分别加入 200 μL 空白血清，涡旋混合 5 min，在室温下平衡 30 min。
- 分别加入 40 μL 抗体偶联磁珠，涡旋 5 min 后，在振荡器上震荡混合 10 min。
- 13000 g 离心 10 min。
- 用移液器取上层清液，于 45℃条件下氮气吹干。
- 用 500 μL 甲酸/水（1:999，v/v）复溶，涡旋混匀，震荡 10 min。
- 将复溶的样品装入进样瓶，然后放入样品盘。

注：实验证明无基质效应后，b-g 步骤可省略。

A.3.2 样品的处理

- 对于已采用常规方法检测过的样品，首先在 15 mL 离心管中加入与样品中 C 肽浓度相同的内标（根据样品体积计算需要加入 ISWS 的体积）。
- 加入 200 μL 血清样品，涡旋混合 5 min，在室温下平衡 30 min。

c-g 步骤与校准曲线处理相同。

注：对于盲样的检测，需在精确测量前采用常规测量方法获得样品大概浓度，若实验室无常规检测仪器也可采用质谱方法增加预实验，预实验于步骤 a 加入一定体积的 ISWS（通常 200 μL ），使样品中 C 肽与内标的质量比（Mass ratio）在 0.3~4.5 区间内，然后采用 b-h 的样品前处理步骤进行样品处理并检测。按照所检测的结果对内标浓度进行调整，使其与样品中 C 肽浓度相同，再按照样品检测流程进行重新检测。

A.4 数据处理

A.4.1 工作曲线的建立

选择两次检测校准溶液与内标溶液质量比：0.25, 0.43, 1.0, 2.33 和 4.0。及其对应的色谱峰的峰面积比建立工作曲线，其中以 C 肽/内标色谱峰的峰面积比为自变量，以质量比为因变量。在 Excel 中分别用 SLOPE（斜率）和 INTERCEPT（截距）公式计算标准曲线线性回归拟合方程的斜率 b 和截距 m ，并建工作曲线方程：

$$y = bx + m$$

x ——C 肽/内标质量比 W ；

y ——C 肽/内标色谱峰的峰面积比 I ；

b ——校准曲线线性回归方程的斜率；

m ——校准曲线线性回归方程的截距。

以校准溶液的 C 肽/内标色谱峰的峰面积比为自变量，以质量比为因变量。在 Excel 中用 CORREL 公式计算校准溶液峰面积比与质量比的相关系数 r ，若 $r > 0.995$ 为合格，若不符合要求则需重新建立标准曲线。

A.4.2 样品浓度计算

样本测量可得到 C 肽/内标色谱峰的峰面积比，通过校准曲线计算可得到 C 肽/内标质量比。则样本浓度可通过 9.2 样品结果的计算得到。

附录 B

人血清中 C 肽测量参考方法不确定度评定示例

B.1 按照不确定度的来源进行评定

B.1.1 概述

B.1.1.1 测量方法

国家计量技术规范 JJFXXXX-XXXX 《人血清中 C 肽测量参考方法 (LC-MS/MS 法)》。

B.1.1.2 测量标准

GBW09241, C 肽纯度标准物质, 纯度为 81.2%。

B.1.1.3 测量对象

GBW09871, 冰冻人血清中 C 肽标准物质

B.1.1.4 测量过程

GBW09241 (以下简称标准物质) 配制系列浓度校准溶液, 每批测量前后分别进行, 样品按要求复溶后使用, 3 天共测量 15 次, 取其平均值计算。

B.1.2 不确定度来源分析

同一血清样品在不同的时间按相同的条件测量即重复进样分析, 测定值会出现上下波动, 这与仪器自身的性能, 测定的浓度水平有关。在正式测定前, 为了保证分析的准确性, 对仪器进行了维护, 以保证处于比较稳定状态。分析后考察所有的分析数据。该因素作为随机误差体现在整个测量过程的重复性中, 不单独计算此类不确定度。

按照分析的要求, 对同一浓度的血清样品进行了多次测定, 包括批内和批间的重复测定, 由此引入重复测定产生的不确定度。本研究所用的标准溶液均使用重量法配制, 由此引入称量产生的不确定度。配制用的标准品纯度引入校准品产生的不确定度。分析时血清和内标溶液的添加都使用称重的方法得到其精确量, 由此引入称量产生的不确定度。

综上, 计算血清 C 肽测量的不确定度列在表 B.1:

表 B.1 血清 C 肽测量的不确定度来源分析

参数	不确定度来源	量值	标准不确定度	自由度	类型	数据来源
样品重复测量(ng/mL)	多次重复测量的标准偏差	2.66	0.023	14	A	重复测定 15 份样品
同位素内标固体称量	天平称量	1.201	5.77×10^{-4}	large	B	天平校准证书
同位素标记储备溶液称	天平称量	20.23	5.77×10^{-3}	large	B	天平校准证书
同位素标记溶液称量	天平称量	20.12	5.77×10^{-3}	large	B	天平校准证书
标物纯度(%)	标物纯度	81.2	4.2	large	B	标物证书
血清样品称量(mg)	天平称量	152.57	5.77×10^{-3}	large	B	天平校准证书
血清密度测量	密度计测定	1.035	0.0058	large	B	实验结果

B.1.3 不确定度分量的计算

根据 CNAS—GL06: 2006, 数值 y 的合成标准不确定度 $u_c(y)$ 和其所依赖的独立参数 $x_1, x_2 \dots x_n$ 的不确定度之间的总关系式如下:

$$u_c(y(x_1, x_2 \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2} = \sqrt{\sum_{i=1, n} u(y, x_i)^2}$$

B.1.4 合成标准不确定度评定

根据 GB/T15000.3-2008/ISO Guide 35: 2006, 扩展合成不确定度是通过合成定值测量、均匀性和稳定性对特征值总不确定度的贡献来评估的。

$$u_{CRM} = k \sqrt{u_{\text{char}}^2 + u_{\text{bb}}^2 + u_{\text{lis}}^2 + u_{\text{sts}}^2}$$

其中包含因子 $k=2$ 。由于规定的运输条件（干冰运输）与长期保存的条件一致，故不考虑运输不稳定性造成的不确定度；在规定的使用条件下（室温或 4℃ 密闭放置 1 天内使用）各项目的浓度变化极小，因此认为 u_{sts} 可以不予统计。

根据上述原则，计算不确定度见表 B.2:

表 B.2 合成不确定度

RM	量值 ($\mu\text{mol/L}$)	u_{char}	u_{bb}	u_{ts}	合成 不确定度	包含 因子	扩展 不确定度	相对 扩展 不确定度%
GBW09871	2.66	0.049	0.0007	0.0065	0.049	2	0.098	3.81

B.1.5 测量结果不确定度报告与表示

应用人血清 C 肽参考测量程序对样品进行测量时, 经数值修约后, 值为 (2.66 \pm 0.05) ng/mL ($k=2$)

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿