



# 中华人民共和国国家计量技术规范

JJF ××××—202×

---

## 人血清中氮末端利钠肽原（NT-proBNP）测量参考方法（ID-LC-MS/MS 法）

Reference measurement procedure for NT-proBNP in human serum (ID-LC-MS/MS method)

(讨论稿)

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

---

国家市场监督管理总局 发布

# 人血清中氮末端利钠肽原 (NT-proBNP) 测量参考方 法 (ID-LC-MS/MS 法)

JJF XXXX—202X

Reference measurement procedure for NT-  
proBNP 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：

参加起草人：

# 目 录

引 言 .....	III
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 .....	5
4.3 固相萃取装置 .....	5
4.4 容量瓶 .....	5
4.5 移液器和微量进样器 .....	5
4.6 密度计 .....	5
4.7 pH 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
6.3 样品的保存 .....	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 .....	7
7.3 分析样品的处理 .....	8
8 样品测定 .....	9
8.1 液相色谱条件 .....	9
8.2 串联质谱测量条件 .....	10
8.3 分析过程 .....	10
9 数据处理 .....	10

9.1 浓度计算.....	10
9.2 测量结果的计算.....	11
9.3 测量不确定度的计算.....	11
10 分析可靠性 .....	11
10.1 总则.....	11
10.2 测量不确定度 .....	12
10.3 测量精密度.....	12
10.4 检出限和定量限 .....	12
10.5 测量范围 .....	12
10.6 回收测量 .....	12
10.7 分析特异性.....	12
11 参考测量程序的确认.....	12
12 报告 .....	13
13 质量保证.....	13
13.1 室内质量控制 .....	13
13.2 室间质量控制评价 .....	13
13.3 质量日志 .....	13
附录 A.....	14
人血清中氮末端 B 型利钠肽原（NT-proBNP）参考测量方法操作规程示例 .....	14
附录 B.....	20
人血清中氮末端 B 型利钠肽原（NT-proBNP）测量不确定度评定示例 .....	20

# 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氮末端利钠肽原 (NT-proBNP) 参考测量程序, 该程序采用同位素稀释液相色谱串联质谱法 (ID-LC-MS/MS), 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。

本技术规范为首次发布。

# 人血清中氮末端利钠肽原（NT-proBNP）测量参考方法（ID-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中氮末端利钠肽原（NT-proBNP）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中氮末端利钠肽原（NT-proBNP）参考测量程序，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 NT-proBNP 作为内标添加至人血清中，混合均匀后，加入糖苷酶切除 NT-proBNP 翻译后修饰 O 糖，随后加入 Glu-c 蛋白酶对包含内源 NT-proBNP、外源稳定同位素标记 NT-proBNP 在内的血清总蛋白进行酶切，完成后使用固相萃取方式收集生成的肽段，并用氮气吹干；加入乙腈水溶液复溶，使用液相色谱串联三重四极杆质谱采集特征肽段离子信号；使用内源性特征肽段和外源性同位素标记特征肽段的质谱峰面积比值，计算原始人血清样本中 NT-proBNP 的浓度。

## 4 仪器

### 4.1 液相色谱串联质谱联用系统

(1) 液相色谱系统可承载压力应不低于 10000 psi，系统死体积不大于 500  $\mu$ L，输液泵流速校准合格；

(2) 质谱系统应配备三重四极杆质量分析器或四极杆串联离子阱质量分析器，并配备电喷雾离子源（ESI），质量轴校正校准通过，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

最小分度为 0.01 mg，应校准合格并在强制检定周期内。

## 4.3 固相萃取装置

各管路连接处密封良好，配置旋塞阀，可在真空泵开启后主动调整流速。

## 4.4 容量瓶

经校准或鉴定合格。

## 4.5 移液器和微量进样器

检定合格。

## 4.6 密度计

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

## 4.7 pH 计

检定合格。

# 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

本方法所用试剂见表 1。

表 1 参考测量程序试剂列表

试剂名称	分子式	分子量	CAS 号	试剂要求
NT-proBNP	/	8588.7 Da	/	GBW(E)0912422
同位素标记 NT-proBNP3	/	8608.7 Da	/	液相纯度 $\geq 98\%$
谷氨酰胺蛋白 酶（Glu-c）	/	/	/	测序级
蛋白去糖基化 混合液 II	/	/	/	NEB P6044S
蛋白酶抑制剂	/	/	/	Promega G6521
脱氧胆酸钠	$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$	414.56 Da	302-95-4	$\geq 97\%$
乙腈	$\text{CH}_3\text{CN}$	41.05 Da	75-05-8	质谱级
甲酸	$\text{CH}_2\text{O}_2$	46.03 Da	64-18-6	质谱级



三(2-羧乙基) 膦盐酸盐溶液	$C_9H_{15}O_6P \cdot HCl$	286.65 Da	51805-45-9	0.5 M, pH 7.0
碘乙酰胺	$C_2H_4INO$	184.96 Da	144-48-9	≥99%
水	$H_2O$	18.01 Da	7732-08-5	质谱级
尿素	$CH_4N_2O$	60.06 Da	57-13-6	≥99%
碳酸氢铵	$NH_4HCO_3$	79.06 Da	1066-33-7	≥99.5%
2-氨基-2-(羟甲 基)-1,3-丙二醇 (Tris)	$C_4H_{11}NO_3$	121.14 Da	77-86-1	≥99.5%
乙二胺四乙酸 (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	292.24 Da	60-00-4	≥99.0%
甲酸	$CH_2O_2$	46.03	64-18-6	LC-MS 级别
注 1：一级序列：氨基端-MHPLGSPGSA SDLETSGLQE QRNHLQGKLS ELQVEQTSLE PLQESPRPTG VWKSREVATE GIRGHRKMVL YTLRAPR-羧基端。				
注 2：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 3：一级序列：氨基端-MHPLGSPGSA SDLETSGLQE <u>Q</u> RNHLQGKLS ELQVEQTSLE PLQES <u>P</u> RPTG VWKSREVATE GIRGHRKMVL YTLRAPR-羧基端。第 22 位 <u>R</u> 、47 位 <u>R</u> （精氨酸）为同位素标记氨基 酸，标记位置和数量（ $^{13}C6, ^{15}N4$ ），单一氨基酸分子量较非标记氨基酸+10 Da，整体+20 Da。				

### 5.3 液相色谱柱

采用反相 C18 色谱柱，粒径≤3 μm；耐压上限不低于 10000 psi。

## 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。

### 6.2 样品用量

应保证可供分析的血清样本量不少于 1 mL，单次称量以 0.5 g 为起始用量。

### 6.3 样品的保存

人血清样本在超低温冰箱中保存（-70℃~-80℃），可至少保存 2 年；分析前，将样本取出置于 4℃冰箱缓慢解冻，随后开展前处理；

当全血离心完毕获得新鲜血清，且距离样本前处理在 4h 以内时，可短暂置于 4℃冰箱短暂保存。所有样本在前处理前要充分混匀，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：0.1%甲酸水溶液；有机相：0.1%甲酸甲醇溶液。
- b) 选择设定的方法进行仪器平衡，平衡时间 $\geq 30$  min。

## 7.2 检测系统

### 7.2.1 校准曲线的类型

采用多点法校准曲线。

### 7.2.2 校准物质的溯源性

所采用溯源标准物质为 GBW(E)091242，符合 ISO15194 规定的计量溯源性要求。

### 7.2.3 校准溶液的制备

采用逐级稀释法：使用移液器吸取约 50  $\mu\text{L}$  的 GBW(E)091242 原液，天平准确称量后使用 50 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 稀释原液 ( $\sim 100$  倍)，获得浓度为 1000 ng/g 的储备液；随后，继续使用 50 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 稀释储备液 ( $\sim 100$  倍)，得到 10 ng/g 的工作液。各步骤均需精确称量起始与最终溶液质量以确保计量溯源性。上述所有溶液经分装密封后，在超低温条件下保存 ( $-70^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ )，避免反复冻融，有效期 1 年。

### 7.2.4 内标溶液的制备

采用与校准溶液相似的配制过程 (7.2.3)，制备 10 ng/g 的内标工作液。同样，各级溶液可在超低温条件下保存 ( $-70^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ )，避免反复冻融，有效期 1 年。

### 7.2.5 校准曲线的处理

校准曲线采用多点法进行制备。精密称取适量校准溶液与内标溶液，使校准溶液与内标溶液的质量比分别设定为约为 0.25-2.5，使用质谱级纯水，将每一组混合液补齐至 50  $\mu\text{L}$ 。

溯源标准物质与固相合成内标虽不含糖基化修饰，但与血清样本保持一致，也将开展相同前处理，具体包括 (1) 酶切 O 糖、(2) 蛋白酶切、(3) 固相萃取三个主要过程。

#### (1) 酶切 O 糖

使用 NEB 公司的 Protein Deglycosylation II 混合糖苷酶，具体步骤：(a) 向混合标准工作溶液加入 50  $\mu\text{L}$  Deglycosylation Mix Buffer II，在  $75^{\circ}\text{C}$  水浴中保持 10 min，随后冷却；(b) 加入 5  $\mu\text{L}$  Protein Deglycosylation Mix II，缓慢混匀， $25^{\circ}\text{C}$  静置 30 min；(c) 转移至  $37^{\circ}\text{C}$  水浴，反应 2 h。

#### (2) 固相萃取

使用 C18 固相萃取 (SPE) 小柱作为分离介质，安装于 SPE 装置并压紧、扣紧，通过旋塞阀控制萃取液流速约 1 滴/秒，具体步骤：(a) 向小柱中添加 2 mL 甲醇、2 mL 纯水分

别进行活化和清洗；(b) 将第一步反应后的上清液转移至萃取小柱，吸附完毕后加入 2 mL 纯水进行清洗；(c) 添加 50%乙腈水溶液（含 0.1%甲酸）进行洗脱，收集洗脱液氮气吹干（亦可离心浓缩或真空冷冻干燥）。

### (3) 蛋白酶切

首先需对净化产物中的蛋白质总量进行测定，以确定 Glu-c 蛋白酶使用量，具体步骤：

(1) 向吹干离心管中加入 100  $\mu\text{L}$  磷酸盐缓冲液（50mM, pH 6.8）复溶，使用 BCA 蛋白试剂盒按说明书对回收总蛋白进行量值初测（亦可使用 Nanodrop 等紫外快速测定仪等）；  
(2) 加入 50  $\mu\text{L}$  尿素水溶液（8M），室温下振荡 1 h；(3) 加入 50  $\mu\text{L}$  三（2-羧乙基）膦（TCEP, 40 mM, pH 7.0）溶液，室温下振荡 10 min，以还原总蛋白中二硫键；(4) 加入碘乙酰胺溶液，使其终浓度达到 20 mM，暗反应 30 min，以烷基化半胱氨酸；(5) 以第 1 步中测量得到的浓度值，按质量比 25:1（总蛋白/Glu-c, w/w）向反应体系中加入 Glu-c 蛋白酶溶液，并迅速加入 50 mM 碳酸氢铵水溶液，使终体积达到 400  $\mu\text{L}$ ；(6) 37℃下振荡反应 16 h，随后加入 10  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂（1 $\times$ ）终止反应，氮气吹干（亦可离心浓缩或真空冷冻干燥），准备上机检测。

### 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需 $\geq 0.98$ 。

## 7.3 分析样品的处理

### 7.3.1 样品中 NT-proBNP 浓度的初步确定

为保证分析灵敏度，每次取约 500  $\mu\text{L}$  人血清样本进行测量。分析前可通过 ELISA 试剂盒、化学发光体外诊断试剂等，初步确定血清样品中目标物的大致浓度，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，采用密度计或称重法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

根据初测浓度取适量人血清样品，加入计算好的内标工作液，使内源性 NT-proBNP 与添加内标的质量比约为 1:1，记录血清样品及内标质量。室温平衡 10 min，期间多次手动翻转、混匀。

#### 7.3.3.2 酶切 O 糖

使用 NEB 公司的 Protein Deglycosylation II 混合糖苷酶，具体步骤：(a) 向 500  $\mu\text{L}$  混合溶液中加入 50  $\mu\text{L}$  Deglycosylation Mix Buffer II，在 75℃水浴中保持 10 min，随后冷却；  
(b) 加入 10  $\mu\text{L}$  Protein Deglycosylation Mix II，缓慢混匀，25℃静置 30 min；(c) 转移至 37℃水浴，反应 2 h。

### 7.3.3.3 固相萃取

使用 C18 固相萃取 (SPE) 小柱作为分离介质, 安装于 SPE 装置并压紧、扣紧, 通过旋塞阀控制萃取液流速约 1 滴/秒, 具体步骤: (a) 向小柱中添加 2 mL 甲醇、2 mL 纯水分分别进行活化和清洗; (b) 将第一步反应后的上清液转移至萃取小柱, 吸附完毕后加入 2 mL 纯水进行清洗; (c) 添加 50% 乙腈水溶液 (含 0.1% 甲酸) 进行洗脱, 收集洗脱液氮气吹干 (亦可离心浓缩或真空冷冻干燥)。

### 7.3.3.4 蛋白酶切

首先需对净化产物中的蛋白质总量进行测定, 以确定 Glu-c 蛋白酶使用量, 具体步骤:

- (1) 向吹干离心管中加入 100  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (50mM, pH 6.8) 复溶, 使用 BCA 蛋白试剂盒按说明书对回收总蛋白进行量值初测 (亦可使用 Nanodrop 等紫外快速测定仪等);
- (2) 加入 50  $\mu$ L 尿素水溶液 (8M), 室温下振荡 1 h; (3) 加入 50  $\mu$ L 三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP, 40 mM, pH 7.0) 溶液, 室温下振荡 10 min, 以还原总蛋白中二硫键; (4) 加入碘乙酰胺溶液, 使其终浓度达到 20 mM, 暗反应 30 min, 以烷基化半胱氨酸; (5) 以第 1 步中测量得到的浓度值, 按质量比 25:1 (总蛋白/Glu-c, w/w) 向反应体系中加入 Glu-c 蛋白酶溶液, 并迅速加入 50 mM 碳酸氢铵水溶液, 使终体积达到 400  $\mu$ L; (6) 37°C 下振荡反应 16 h, 随后加入 10  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂 (1 $\times$ ) 终止反应, 氮气吹干 (亦可离心浓缩或真空冷冻干燥), 准备上机检测。

## 8 样品测定

### 8.1 液相色谱条件

可参照附录 A 进行适当的条件优化。

#### 8.1.1 液相色谱仪器条件

- a) 色谱柱: 见 5.3;
- b) 柱温: 30°C;
- c) 流速: 0.25 mL/min;
- d) 进样量: 5  $\mu$ L;
- e) A 相: 质谱级纯水 (0.1% 甲酸); B 相: 质谱级乙腈 (0.1% 甲酸)。

#### 8.1.2 液相色谱洗脱条件

使用者可根据实验需要进行适当的条件优化 (附录 A), 见表 2。

表 2 液相色谱洗脱条件

时间 (min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0.0	98	2
10.0	98	2
30.0	85	15
30.1	15	85

36.0	15	85
36.1	98	2
40.0	98	2

## 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。

本规范使用电喷雾离子源正离子模式（ESI+），定量离子对见表 3。

表 3 NT-proBNP 及其内标的测量离子对

肽段氨基酸序列（N→C）	母离子		子离子	
	m/z	价态	m/z	价态
QRNHLQGKLSE （简称 QE）	437.5	3+	536.3	1+
QR*( <sup>13</sup> C6, <sup>15</sup> N4)NHLQGKLSE （简称 QE*）	440.8	3+	546.2	1+
SPRPTGVWKSRE （简称 SE）	467.5	3+	596.2	1+
SPR*( <sup>13</sup> C6, <sup>15</sup> N4)PTGVWKSRE （简称 SE*）	470.8	3+	606.6	1+

## 8.3 分析过程

### 8.3.1 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。

### 8.3.2 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 浓度计算

使用多点校准方法建立校准函数，以标准品峰面积与其内标峰面积的比值为纵坐标，以标准品与其内标的质量比为横坐标，使用 Excel 等科研作图软件，用最小二乘法进行直线拟合，得到公式如下：

$$I_{\text{std}} = a \times W_{\text{std}} + b \quad (1)$$

式中：

$W_{\text{std}}$ —标准溶液中 NT-proBNP 特征肽段 (QE、SE) 与内标 (QE\*、SE\*) 的质量比；

$I_{\text{std}}$ —标准溶液中 NT-proBNP 特征肽段 (QE、SE) 与内标 (QE\*、SE\*) 的峰面积比值 (实测值)；

a——标准曲线线性回归方程的斜率；

b——标准曲线线性回归方程的截距。

校准曲线符合标准后, 通过质谱仪实际测得的人血清样本中 NT-proBNP 特征肽段 (QE、SE) 与其内标 (QE\*、SE\*) 的峰面积, 得到两者的峰面积比值, 按公式 (1) 先计算出血清样本中 NT-proBNP 特征肽段 (QE、SE) 与其内标 (QE\*、SE\*) 的质量比, 然后按公式 (2) 计算可得到来自血清样本 NT-proBNP 特征肽段 QE 和 SE 的浓度。

$$C_{\text{sample}} = W_{\text{sample}} \times M_{\text{IS}} \times C_{\text{IS}} \times D_{\text{serum}} \times 1000 \div M_{\text{serum}} \div M_{\text{peptide}} \quad (2)$$

式中：

$C_{\text{sample}}$	——	血清样本中 NT-proBNP 释放 QE、SE 的浓度 (nmol/L)
$W_{\text{sample}}$	——	血清样本中 NT-proBNP 释放 QE、SE 与内标释放 QE*、SE* 的质量比
$M_{\text{IS}}$	——	血清样品中内标的质量 (天平称量的重量, g)
$C_{\text{IS}}$	——	内标浓度 (pg/g)
$D_{\text{serum}}$	——	血清密度 (g/mL)
$M_{\text{serum}}$	——	血清样品的质量 (天平称量的重量, g)
$M_{\text{peptide}}$	——	QE、SE 特征肽段的相对分子量 (g/mol)

## 9.2 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。

## 9.3 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。

# 10 分析可靠性

## 10.1 总则

应依据分析灵敏度、测量不确定度、准确度、精密度、检出限、线性范围、回收测量、特异性来评估 NT-proBNP 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 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 10.0% ( $k=2$ )。

## 10.3 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。本参考测量程序重复性 CV% 宜小于 6.5%, 实验室内复现性 CV% 宜小于 7.5%。

## 10.4 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检出限不低于 70 pg/g, 定量限不低于 240 pg/g。

## 10.5 测量范围

测量范围为: 300-20000 pg/g, 样品未做稀释和浓缩。

## 10.6 回收测量

以 NT-proBNP 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 NT-proBNP 浓度, 计算方法的加样回收率。

加标回收率在  $(100\pm5)\%$  范围之间。

## 10.7 分析特异性

本参考测量程序的分析特异性, 基于 UniProt 在线蛋白组数据库, 对已知的人类种属蛋白是否含有 QE、SE 氨基酸序列进行检索, 确定了 QE、SE 为唯一存在于 NT-proBNP 的序列。

## 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

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。



## 附录 A

### 人血清中氮末端 B 型利钠肽原 (NT-proBNP) 参考测量方法操作规程示例

#### A.1 试剂配制

##### A.1.1 流动相的配制

###### A.1.1.1 流动相 A: 0.1%甲酸水溶液配制步骤

- 用量筒量取 1000 mL 去离子水并加入到流动相瓶中
- 向其中加入 1 mL 甲酸, 混匀
- 放在液相色谱流动相水相接口
- 保质期: 可稳定 10 天
- 用后处置: 倾倒入废液收集器, 按《医疗废物收集、处理管理程序》处理
- 可接受标准: 溶液澄清, 无明显浑浊

###### A.1.1.2 流动相 B: 0.1%甲酸乙腈溶液配制步骤

- 用量筒量取 1000 mL 乙腈并加入到流动相瓶中
- 向其中加入 1 mL 甲酸, 混匀
- 放在液相色谱流动相有机相接口
- 保质期: 可稳定 30 天
- 用后处置: 倾倒入废液收集器, 按《医疗废物收集、处理管理程序》处理
- 可接受标准: 溶液澄清, 无明显浑浊

##### A.1.2 溶液配制

###### A.1.2.1 磷酸盐缓冲溶液 (50mM, pH 6.8) 配制步骤

- 称量 2.76 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 溶于 100 mL 去离子水, 溶液浓度 0.2M (a)
- 称量 5.36 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 溶于 100 mL 去离子水, 溶液浓度 0.2M (b)
- 量取 51 mL 溶液 a 和 49 mL 溶液 b, 再加入 300 mL 去离子水
- 保质期: 室温避光下, 可稳定 90 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.1.2.2 尿素水溶液 (8M) 配制步骤

- 称量 48 g 尿素, 放入烧杯中
- 加入 50 mL 去离子水, 使用玻璃棒混匀、溶解, 再加入 50 mL 去离子水
- 保质期: 置于密闭容器保存于 4℃ 冰箱, 可稳定 7 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.1.2.3 TCEP 溶液 (40 mM, pH 7.0) 配制步骤

- 量取 1 mL TCEP (0.5 M, pH 7.0), 置于 15 mL 离心管
- 加入 11.5 mL 去离子水后振荡混匀
- 保质期: 现用现配
- 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.1.2.4 碘乙酰胺溶液 (100 mM) 配制步骤

- 称量 92.5 mg 碘乙酰胺粉末, 置于 15 mL 离心管
- 加入 5 mL 去离子水, 振荡、溶解
- 保质期: 现用现配, 避光放置
- 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.1.2.5 碳酸氢铵溶液 (50 mM) 配制步骤

- 称量 800 mg 碳酸氢铵粉末, 置于 500 mL 烧杯中
- 加入 160 mL 去离子水, 玻璃棒搅动, 充分溶解后再加入 40 mL 去离子水
- 保质期: 现用现配, 4℃放置
- 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.1.3 校准溶液的配制

#### A.1.3.1 校准储备液 (1000 ng/g) 的配制步骤

- 准确称取 50 mg GBW(E)091242 标准物质溶液至 5 mL 低吸附离心管
- 准确称取 50 mM 磷酸盐缓冲液 3.875 g, 与标准物质溶液混合
- 储存: -70℃~-80℃中保存, 避免反复冻融
- 保质期: 可稳定一年

#### A.1.3.2 校准工作液 (10 ng/g) 的配制步骤

- 准确称取 50 mg 校准储备液至 5 mL 低吸附离心管
- 准确称取 50 mM 磷酸盐缓冲液 3.875 g, 与校准储备液混合
- 储存: -70℃~-80℃中保存, 避免反复冻融
- 保质期: 可稳定一年

### A.1.4 内标溶液的配制

#### A.1.4.1 内标储备液 (1000 ng/g) 的配制步骤

- 使用铝箔小船, 准确称取 1 mg 内标粉末, 全部转移至 5 mL 低吸附离心管
- 准确称取 50 mM 磷酸盐缓冲液 2.5 g, 与铝箔小船混合, 充分振荡溶解
- 准确称取 50 mM 磷酸盐缓冲液 39 g、溶解后的内标溶液 1 g, 置于 50 mL 离心管中充分混匀, 此时内标溶液浓度 10 µg/g
- 准确称取 50 mM 磷酸盐缓冲液 3.6 g、10 µg/g 内标溶液 0.4 g, 置于 5 mL 低吸附离

心管中充分混匀，得到 1000 ng/g 内标储备液

--储存：-70℃~-80℃中保存，避免反复冻融

--保质期：可稳定一年

#### A.1.4.2 内标工作液（10 ng/g）的配制步骤

--准确称取 40 mg 内标储备液至 5 mL 低吸附离心管

--准确称取 50 mM 磷酸盐缓冲液 3.96 g，与内标储备液混合

--储存：-70℃~-80℃中保存，避免反复冻融

--保质期：可稳定一年

### A.2 仪器准备

#### A.2.1 质谱仪准备

采用电喷雾离子源的正离子模式（ESI+），以多反应监测（MRM）采集离子数据。离子对的选择及相关仪器参数设置见表 A.1-A.2。

##### A.1 质谱仪参数

ID	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	CE (kV)
QE	437.5	536.3	16
QE*	440.8	546.2	16
SE	467.5	596.2	17
SE*	470.8	606.6	17

##### A.2 质谱仪离子源参数

参数	数值
Capillary 电压	3.5 kV
Extraction 电压	25 V
Cone 电压	4 V
锥孔温度	100℃
脱溶剂气流速	500 L/h
脱溶剂气温度	300℃

#### A.2.1 液相系统准备

液相系统条件如下：

色谱柱：Phenomenex Kinetex C18（2.1×100 mm，2.6 μm）；

柱温：30℃；

流速：0.25 mL/min；

进样量：5 μL；

水相（A 相）：水（0.1%甲酸）；

有机相（B 相）：乙腈（0.1%甲酸）；

洗脱梯度按照表 A.3 设置。

表 A.3 液相洗脱梯度

时间 (min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0.0	98	2
10.0	98	2
30.0	85	15
30.1	15	85
36.0	15	85
36.1	98	2
40.0	98	2

将仪器设置参数进行保存，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 样品处理

#### A.3.1 校准曲线的处理

a. 使按照表 A.4 在 1.5 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, 0.5, 1.5 和 2.5。

表 A.4 校准曲线配制表

Mass Ratio	0.25	0.5	1.5	2.5
WS, 10 ng/g	0.05 g	0.10 g	0.30 g	0.50 g
ISWS, 10 ng/g	0.20 g	0.20 g	0.20 g	0.20 g

b. 使用 NEB 公司的 Protein Deglycosylation II 混合糖苷酶，具体步骤：(1) 向表 A.4 混合后的标准溶液加入 50  $\mu$ L Deglycosylation Mix Buffer II，在 75 $^{\circ}$ C 水浴中保持 10 min，随后冷却；(2) 加入 5  $\mu$ L Protein Deglycosylation Mix II，缓慢混匀，25 $^{\circ}$ C 静置 30 min；(3) 转移至 37 $^{\circ}$ C 水浴，反应 2 h；

c. 使用 C18 固相萃取 (SPE) 小柱作为分离介质，安装于 SPE 装置并压紧、扣紧，通过旋塞阀控制萃取液流速约 1 滴/秒，具体步骤：(1) 向小柱中添加 2 mL 甲醇、2 mL 纯水分别进行活化和清洗；(2) 将第一步反应后的上清液转移至萃取小柱，吸附完毕后加入 2 mL 纯水进行清洗；(3) 添加 50% 乙腈水溶液 (含 0.1% 甲酸) 进行洗脱，收集洗脱液氮气吹干；

d. 对净化产物中的蛋白质总量进行测定，以确定 Glu-c 蛋白酶使用量，具体步骤：(1) 向吹干离心管中加入 100  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (50 mM, pH 6.8) 复溶，使用 BCA 蛋白试剂盒按说明书对回收总蛋白进行量值初测 (亦可使用 Nanodrop 等紫外快速测定仪等)；(2) 加入 50  $\mu$ L 尿素水溶液 (8M)，室温下振荡 1 h；(3) 加入 50  $\mu$ L 三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP, 40 mM, pH 7.0) 溶液，室温下振荡 10 min，以还原总蛋白中二硫键；(4) 加入碘乙酰胺溶液，使其终浓度达到 20 mM，暗反应 30 min，以烷基化半胱氨酸；(5) 以第 1 步中测量

得到的浓度值,按质量比 25:1 (总蛋白/Glu-c, w/w) 向反应体系中加入 Glu-c 蛋白酶溶液,并迅速加入 50 mM 碳酸氢铵水溶液,使终体积达到 400  $\mu$ L; (6) 37 $^{\circ}$ C 下振荡反应 16 h,随后加入 10  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂 (1 $\times$ ) 终止反应,氮气吹干。

e. 使用 100  $\mu$ L 50%乙腈水溶液 (含 0.1%甲酸) 复溶,涡旋混和 2 min,转移至带有内插管的液相瓶中,上机检测。

#### A.3.2 检测样品的处理

a. 根据初测浓度取适量人血清样品,加入计算好的内标工作液,使内源性 NT-proBNP 与添加内标的质量比约为 1:1,记录血清样品及内标质量。室温平衡 10 min,期间多次手动翻转、混匀。

b. 使用 NEB 公司的 Protein Deglycosylation II 混合糖苷酶,具体步骤: (1) 向步骤 a 混合后的样本溶液加入 50  $\mu$ L Deglycosylation Mix Buffer II,在 75 $^{\circ}$ C 水浴中保持 10 min,随后冷却; (2) 加入 5  $\mu$ L Protein Deglycosylation Mix II,缓慢混匀,25 $^{\circ}$ C 静置 30 min; (3) 转移至 37 $^{\circ}$ C 水浴,反应 2 h;

c. 使用 C18 固相萃取 (SPE) 小柱作为分离介质,安装于 SPE 装置并压紧、扣紧,通过旋塞阀控制萃取液流速约 1 滴/秒,具体步骤: (1) 向小柱中添加 2 mL 甲醇、2 mL 纯水分别进行活化和清洗; (2) 将第一步反应后的上清液转移至萃取小柱,吸附完毕后加入 2 mL 纯水进行清洗; (3) 添加 50%乙腈水溶液 (含 0.1%甲酸) 进行洗脱,收集洗脱液氮气吹干;

d. 对净化产物中的蛋白质总量进行测定,以确定 Glu-c 蛋白酶使用量,具体步骤: (1) 向吹干离心管中加入 100  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (50 mM, pH 6.8) 复溶,使用 BCA 蛋白试剂盒按说明书对回收总蛋白进行量值初测 (亦可使用 Nanodrop 等紫外快速测定仪等); (2) 加入 50  $\mu$ L 尿素水溶液 (8M),室温下振荡 1 h; (3) 加入 50  $\mu$ L 三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP, 40 mM, pH 7.0) 溶液,室温下振荡 10 min,以还原总蛋白中二硫键; (4) 加入碘乙酰胺溶液,使其终浓度达到 20 mM,暗反应 30 min,以烷基化半胱氨酸; (5) 以第 1 步中测量得到的浓度值,按质量比 25:1 (总蛋白/Glu-c, w/w) 向反应体系中加入 Glu-c 蛋白酶溶液,并迅速加入 50 mM 碳酸氢铵水溶液,使终体积达到 400  $\mu$ L; (6) 37 $^{\circ}$ C 下振荡反应 16 h,随后加入 10  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂 (1 $\times$ ) 终止反应,氮气吹干。

e. 使用 100  $\mu$ L 50%乙腈水溶液 (含 0.1%甲酸) 复溶,涡旋混和 2 min,转移至带有内插管的液相瓶中,上机检测。

### A.4 数据处理

#### A.4.1 工作曲线的建立

根据样品浓度选择两次检测标准液质量比: 0.25, 0.5, 1.5, 2.5, 及其对应的色谱峰的峰面积比建立工作曲线,其中以 NT-proBNP 特征肽段 QE、SE 和内标色谱峰的质量比为自变量,以峰面积比为因变量。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  $a$  和截距  $b$ ，并建工作曲线方程：

$$I_{\text{std}} = a \times W_{\text{std}} + b$$

$W_{\text{std}}$ ——标准溶液中 NT-proBNP 特征肽段 QE、SE 与内标 NT-proBNP\*特征肽段 QE\*、SE\*的质量比；

$I_{\text{std}}$ ——标准溶液中 NT-proBNP 特征肽段 QE、SE 与内标 NT-proBNP\*特征肽段 QE\*、SE\*的峰面积比值（测定值）；

$a$ ——标准曲线线性回归方程的斜率；

$b$ ——标准曲线线性回归方程的截距。

以 NT-proBNP 特征肽段 QE、SE 和内标的质量比为自变量，以色谱峰的峰面积比为因变量。在 Excel 中用 CORREL 公式计算标准液峰面积比与质量比的相关系数  $r$ ，若  $r > 0.98$  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

上机检测得到 NT-proBNP 特征肽段 QE、SE 和内标 QE\*、SE\*离子流色谱峰的峰面积比，通过工作曲线可计算得到 NT-proBNP 特征肽段 QE、SE 和内标 QE\*、SE\*质量比。特征肽段与完整 NT-proBNP 等摩尔量，且 QE、SE 摩尔质量可由氨基酸一级序列计算，因此根据样本称量结果，可计算得到样本中内源性 NT-proBNP 浓度。

$$C_{\text{sample}} = W_{\text{sample}} \times M_{IS} \times C_{IS} \times D_{\text{serum}} \times 1000 \div M_{\text{serum}} \div M_{\text{peptide}}$$

式中：

$C_{\text{sample}}$	——	血清样本中 NT-proBNP 释放 QE、SE 的浓度（nmol/L）
$W_{\text{sample}}$	——	血清样本中 NT-proBNP 释放 QE、SE 与内标释放 QE*、SE* 的质量比
$M_{IS}$	——	血清样品中内标的质量（天平称量的重量，g）
$C_{IS}$	——	内标浓度（pg/g）
$D_{\text{serum}}$	——	血清密度（g/mL）
$M_{\text{serum}}$	——	血清样品的质量（天平称量的重量，g）
$M_{\text{peptide}}$	——	QE、SE 特征肽段的相对分子量（g/mol）

## 附录 B

### 人血清中氮末端 B 型利钠肽原（NT-proBNP）测量不确定度评定示例

#### B.1 概述

按照数学模型进行不确定度评定

##### B.1.1 测量方法

国家计量技术规范 JJFXXXX-XXXX《人血清中氮末端 B 型利钠肽原（NT-proBNP）测量参考方法（ID-LC-MS/MS 法）》。

##### B.1.2 测量标准

GBW(E)091242 氮末端 B 型利钠肽原（NT-proBNP）溶液标准物质。

##### B.1.3 测量对象

NT-proBNP 血清标准物质候选物

##### B.1.4 测量过程

本方法以稳定同位素标记的 NT-proBNP 为内标添加至待测血清样品中，采用 O 糖苷酶混合酶切除 O 糖、固相萃取、Glu-c 蛋白酶酶切为主要手段，使用液相色谱串联质谱技术对最终生成的特征肽段进行检测，采集样品中用于定量的特征肽段及其同位素标记肽段，用定量特征肽段和其内标肽段的峰面积比计算人血清中 NT-proBNP 含量。

#### B.2 测量模型

使用多点校准方法建立校准函数，以标准品峰面积与其内标峰面积的比值为纵坐标，以标准品与其内标的质量比为横坐标，使用 Excel 软件，用最小二乘法进行直线拟合，得到公式如下：

$$I_{\text{std}} = a \times W_{\text{std}} + b \quad (\text{A-1})$$

式中

$W_{\text{std}}$ ——标准溶液中 NT-proBNP 特征肽段 QE、SE 与内标 NT-proBNP\*特征肽段 QE\*、SE\*的质量比；

$I_{\text{std}}$ ——标准溶液中 NT-proBNP 特征肽段 QE、SE 与内标 NT-proBNP\*特征肽段 QE\*、SE\*的峰面积比值（测定值）；

$a$ ——标准曲线线性回归方程的斜率；

$b$ ——标准曲线线性回归方程的截距。

校准曲线符合通过标准后，通过仪器测出的血清样本中 QE、SE 与其内标的峰面积，得到两者的峰面积比值，按公式（A-1）先计算出血清样本中 QE、SE 与其内标的质量比，然后按公式（A-2）计算可得到血清样本中 QE、SE 的浓度。

$$C_{\text{sample}} = W_{\text{sample}} \times M_{\text{IS}} \times C_{\text{IS}} \times D_{\text{serum}} \times 1000 \div M_{\text{serum}} \div M_{\text{peptide}} \quad (\text{A-2})$$

式中：

$C_{\text{sample}}$	——	血清样本中 NT-proBNP 释放 QE、SE 的浓度 (nmol/L)
$W_{\text{sample}}$	——	血清样本中 NT-proBNP 释放 QE、SE 与内标释放 QE*、SE* 的质量比
$M_{\text{IS}}$	——	血清样品中内标的质量 (天平称量的重量, g)
$C_{\text{IS}}$	——	内标浓度 (pg/g)
$D_{\text{serum}}$	——	血清密度 (g/mL)
$M_{\text{serum}}$	——	血清样品的质量 (天平称量的重量, g)
$M_{\text{peptide}}$	——	QE、SE 特征肽段的相对分子量 (g/mol)

### B.3 不确定度分量列表

表 B-1 不确定度分量列表

不确定度分量				单位	标准不确定度 $u(x)$
测量重复性		样品测定标准偏差	$C_{\text{NT-proBNP}}$	pg/g	$u_1(a)$
标准溶液	贮存液	标准物质纯度	$P_{\text{CRM}}$	μg/g	$u_2(b)$
		标准物质称量质量	$M_{\text{CRM}}$	g	
		磷酸盐缓冲液质量 1	$M_{\text{PBS-1}}$	g	
	工作液	磷酸盐缓冲液质量 2	$M_{\text{PBS-2}}$	g	
校准曲线		校准工作液-0.25	$M_{\text{CAL-1}}$	g	$u_3(b)$
		校准工作液-0.5	$M_{\text{CAL-2}}$	g	
		校准工作液-1.5	$M_{\text{CAL-3}}$	g	
		校准工作液-2.5	$M_{\text{CAL-4}}$	g	
		内标工作液	$M_{\text{CAL-IS}}$	g	
样品制备		样品称量质量	$M_{\text{sample}}$	g	$u_4(b)$
		样品中内标质量	$M_{\text{sample-IS}}$	g	
血清密度			$D_s$	g/mL	$u_5(b)$
样品复溶		50%乙腈水溶液质量	$M_{\text{复溶}}$	g	$u_6(b)$
		复溶体积	$V$	mL	
O 糖酶切反应		酶切效率	/	/	$u_7(b)$
蛋白酶解反应		酶切效率	/	/	$u_8(b)$

### B.4 不确定度分量的计算

#### B.4.1 样品测定引入的不确定度

本次评定使用的是 6 瓶血清标准物质候选物样品, 将 6 瓶样品分别进行测量, 每瓶样品测量 2 次,



对样品进行 12 次独立测量，数据见表 B-2

表 B-2 测量结果汇总(单位: pg/g)

测量序号 样品	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6
1	1726	1688	1747	1813	1783	1694
2	1759	1716	1798	1786	1824	1671
总均值	1750					
总标准差	52					

故其相对标准不确定度为:

$$u_{rel,1}(a) = \frac{u_1(a)}{1750} \times 100\% = \frac{52}{1750} \times 100\% = 2.97\%$$

#### B.4.2 标准溶液引入的不确定度

根据 NT-proBNP 标准物质 (GBW (E) 091242) 证书可知, 该标准物质的质量分数为 78.5 μg/g, 扩展不确定度为 5.1 μg/g ( $k=2$ ), 其标准不确定度为:

$$u_{rel,CRM} = \frac{2.55}{78.5} \times 100\% = 3.25\%$$

标准溶液配制过程采用天平称重, 根据天平检定校准证书可知, 当称量范围在 0.001g-50g 之间时, 变动性和最大允差合成后不确定度为 0.0129 mg。标准溶液配制时称量的相对不确定度示例见下表 B-3:

表 B-3 标准溶液配制时引入的不确定度分量

不确定度来源		数值	单位	标准不确定度	相对合成标准不确定度
标准溶液储存液	标准物质标准值	78.5	μg/g	/	3.25%
	标准物质质量	0.05	g	0.00026	0.03%
	磷酸盐缓冲液质量 1	3.875	g	0.000003	
标准溶液工作液	储存液质量	0.05	g	0.00026	0.03%
	磷酸盐缓冲液质量 2	3.875	g	0.000003	

将上述不确定度分量进行合成, 得到标准溶液配制过程引入的相对不确定度为:

$$u_{rel,2}(b) = \sqrt{3.25^2 + 0.03^2 + 0.03^2} = 3.25\%$$

#### B.4.3 校准曲线引入的不确定度

校准曲线采用天平称重, 根据天平检定证书最大允差进行不确定度计算, 标准曲线称量的相对不确定度示例见下表 B-4:

表 B-4 校准曲线引入的不确定度分量

不确定度分量		数值	单位	标准不确定度	相对合成标准不确定度
校准曲线	校准工作液-0.25	0.25	g	0.0000516	0.005%

	校准工作液-0.5	0.30	g	0.000043	0.004%
	校准工作液-1.5	0.50	g	0.0000258	0.003%
	校准工作液-2.5	0.70	g	1.84286E-05	0.002%
	内标工作液	0.2	g	0.0000645	0.006%

将上述不确定度分量进行合成，得到校准曲线引入的相对不确定度为：

$$u_{rel,3}(b) = 0.0098\%$$

#### B.4.4 样品处理过程引入的不确定度

全程用天平称重，根据天平检定证书最大允差进行不确定度计算，样品处理过程引入的相对不确定度示例见 B-5：

表 B-5 样品制备引入的不确定度分量

不确定度分量		数值	单位	标准不确定度	相对合成标准不确定度
样品制备	样品质量	0.5	g	0.0000258	0.00258%
	样品中内标质量	0.1	g	0.000129	0.0129%

将上述不确定度分量进行合成，得到样品制备引入的相对不确定度为：

$$u_{rel,4}(b) = 0.0132\%$$

#### B.4.5 血清密度引入的不确定度

测定时所使用手持式密度计经校准提供的相对扩展不确定度为  $0.00004\text{g/cm}^3(k=2)$ ，则手持式密度计引入的标准不确定度为：

$$u_6(b) = 0.00004\text{ g/cm}^3 \div 2 = 0.00002\text{ g/cm}^3$$

血清密度为  $1.024\text{ g/cm}^3$ ，则样品密度引入的相对标准不确定度为：

$$u_{rel,6}(b) = 0.00002/1.024 = 0.00195\%$$

#### B.4.6 复溶溶液的不确定度

称量不确定度：用电子天平称量加入的 50%乙腈水质量，称量引入的不确定度计算过程参照 B4.1.3，称量引入的相对标准不确定见下表 B-7：

表 B-6 50%乙腈水引入的标准不确定度计算

来源	数值, g	标准不确定度, g	相对标准不确定度
50%乙腈水质量	0.062	0.0000129	0.0021%

#### B.4.7 酶切反应效率引入的不确定度

由于标准物质和内标的氨基酸序列，与内源性 NT-proBNP 序列略有差异，前两者在氨基端多出一个甲硫氨酸，因此可能造成内外源性 NT-proBNP 在 O 糖酶切和蛋白酶切过程中产生潜在差异。根据 CCQM 关于多肽和蛋白类物质的国际比对报告，本规范将潜在的酶切效率差异所引入的不确定度，按 1%进行合成。

## B.5 标准不确定度的计算

### B.5.1 标准不确定度分量一览表

表 B-7 标准不确定度分量一览表

序号	分量	相对标准不确定度	相对标准不确定度合成
1	测量重复性	2.97%	4.62%
2	标准溶液配制	3.25%	
3	校准曲线	0.0098%	
4	样品处理	0.0132%	
5	Ds	0.0020%	
6	样本复溶	0.0021%	
7	O 糖酶切反应	1%	
8	蛋白酶解反应	1%	

根据表B-7合成结果可知：本方法相对不确定度 $u_{c, rel}=4.62\%$ 。

## B.6 扩展不确定度

取包含因子  $k=2$ ，扩展不确定度为：

$$U = k \times u_{c, rel} = 2 \times 4.62\% = 9.24\%$$