

中华人民共和国国家计量技术规范  
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）

实验数据分析报告

# 目 录

1. 仪器.....	1
液相色谱仪 .....	1
液相色谱串联质谱仪 .....	1
色谱柱 .....	1
天平 .....	1
微量移液器 .....	1
恒温混匀仪 .....	1
涡旋式混合器 .....	1
2. 试剂.....	1
标准物质 .....	1
同位素标记 NT-proBNP .....	1
糖苷酶 .....	2
蛋白质水解酶 .....	2
溶剂及其他试剂 .....	2
3. 实验条件 .....	2
样品前处理 .....	2
样品配制 .....	2
酶切处理步骤 .....	3
液相色谱-质谱联用分析 .....	4
液相色谱分离条件 .....	4
质谱数据采集条件 .....	4
数据分析 .....	5
4. 方法性能评价 .....	6
精密度 .....	6
正确度 .....	6
检出限与定量限 .....	6
方法特异性 .....	7
样本稳定性 .....	7

## 1. 仪器

### 液相色谱仪

硬件：Waters ACQUITY Premier UPLC 液相色谱仪，配备二元泵和柱温箱。

软件：MassLynx 4.1。

### 液相色谱串联质谱仪

硬件：Waters TQ-XS 三重四极杆质谱，配备 ESI 离子源。

软件：MassLynx 4.1。

### 色谱柱

Phenomenex Kinetex C18 (2.1×100 mm, 2.6 μm)

### 天平

BP3100S (Sartorius,  $d=0.01$  g)。

### 微量移液器

Eppendorf Research® plus 精密手动移液器。

### 恒温混匀仪

Eppendorf ThermoMixer® C 恒温混匀仪。

### 涡旋式混合器

Scientific Industries Vortex-Genie 2 涡旋振荡器。

## 2. 试剂

### 标准物质

NT-proBNP 有证标准物质 (GBW(E)091242)，标准值 78.5 μg/g,  $U=5.1$  μg/g ( $k=2$ )。氨基酸序列：

NH<sub>2</sub>-MHPLGSPGSA SDLETSGLQE QRNHLQGKLS ELQVEQTSLE  
PLQESPRPTG VWKSREVATE GIRGHRKMVL YTLRAPR-COOH

摩尔质量：8588.7 g/mol。

### 同位素标记 NT-proBNP

通过固相合成、液相色谱纯化获得，氨基酸序列：

NH<sub>2</sub>-MHPLGSPGSA SDLETSGLQE **QR**\*NHLQGKLS ELQVEQTSLE  
PLQESP**R**\*PTG VWKSREVATE GIRGHRKMVL YTLRAPR-COOH

其中，第 22 位精氨酸、第 47 位精氨酸为稳定同位素标记精氨酸（加粗斜体标注）；具体同位素标记信息：<sup>13</sup>C6，<sup>15</sup>N4。摩尔质量：8608.7 g/mol。

### 糖苷酶

Protein Deglycosylation II，一种商品化的可特异切除五种翻译后修饰糖型的混合糖苷酶，NEB 公司。

### 蛋白质水解酶

谷氨酰胺蛋白酶（Glu-c，测序级），Promega 公司。

### 溶剂及其他试剂

水（H<sub>2</sub>O，质谱级），品牌：Fisher。

乙腈（ACN，质谱级），品牌：Fisher。

甲酸（FA，质谱级），品牌：Fisher。

尿素（Urea，生物纯），品牌：Sigma-Aldrich。

碳酸氢铵（NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，分析纯），品牌：Sigma-Aldrich。

三（2-羧乙基）膦盐酸盐溶液（TCEP，≥98%），品牌：Sigma-Aldrich。

乙二胺四乙酸（EDTA，≥99%），品牌：阿拉丁。

碘乙酰胺（IAA，≥99%），品牌：阿拉丁。

2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇（Tris，≥99.5%），品牌：索莱宝。

脱氧胆酸钠（≥97%），品牌：阿拉丁。

蛋白酶抑制剂（EDTA-free 粉末），品牌：Promega。

## 3. 实验条件

### 样品前处理

#### 样品配制

1. **校准溶液配制：**使用移液器吸取约 50 μL 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（~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（~100 倍），得到质量分数为 10 ng/g 的标准工作液（WS）。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。

**2. 内标溶液配制：**（1）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；（2）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；（3）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；（4）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；（5）准确称取 40 mg 内标储备液至 5 mL 低吸附离心管；（6）准确称取 50 mM 磷酸盐缓冲液 3.96 g，与内标储备液混合，得到质量分数为 10 ng/g 的内标工作液（ISWS）。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。

**3. 稀释溶液配制：**按下表分别称量 WS、ISWS，混合后置于振荡器，充分混匀。

稀释液编号	低标 1	低标 2	高标 1	高标 2
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

**4. 待测样品来源与浓度初测：**本实验中待测样品来自于 NT-proBNP 血清标准物质候选物，由临床检验剩余样本混合而成，分为低、中、高三个 NT-proBNP 表达水平。经免疫发光体外诊断试剂测量，浓度分别为：321 pg/mL、2107 pg/mL、17125 pg/mL。

**5. 待测样品添加内标：**根据步骤 4 初测值，加入一定质量的 ISWS，保持内源性 NT-proBNP 与 ISWS 摩尔比 $\approx$ 1: 1，该样本编号：S1, S2, ..., Sn。

### 酶切处理步骤

**6. 样品前处理：**使用 NEB 公司的 Protein Deglycosylation II 混合糖苷酶对 Sn、低标 1、低标 2、高标 1、高标 2 开展平行前处理：（1）向溶液/血清样本中加入 50 µL Deglycosylation Mix Buffer II，在 75℃ 水浴中保持 10 min，随后冷却；

（2）加入 5 µL Protein Deglycosylation Mix II，缓慢混匀，25℃ 静置 30 min；（3）转移至 37℃ 水浴，反应 2 h。

**7. 固相萃取：**将 C18 固相萃取小柱（1cc, 30 mg HLB 填料，Waters 品牌）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，随后：

（1）向小柱中分次加入总共 2 mL 甲醇、2 mL 纯水分别进行活化和清洗；（2）将第 6 步切糖反应后的上清液转移至萃取小柱，吸附完毕后分次加入总共 2 mL

纯水进行清洗；(3) 添加 500  $\mu\text{L}$  50%乙腈水溶液（含 0.1%甲酸）进行洗脱，收集洗脱液氮气吹干。

**8. 蛋白酶解：**对复溶后 SPE 产物中总蛋白进行测定，以确定 Glu-c 蛋白酶使用量，具体步骤：(1) 向氮气吹干后的离心管中加入 100  $\mu\text{L}$  磷酸盐缓冲液（50mM, pH 6.8）复溶，混匀后连续取 3 次 1  $\mu\text{L}$ ，使用 Nanodrop 对复溶也中总蛋白进行初测；(2) 加入 50  $\mu\text{L}$  尿素水溶液（8M），室温下振荡 1 h；(3) 加入 50  $\mu\text{L}$  TCEP 溶液（40 mM, pH 7.0），室温下振荡 10 min，以还原总蛋白中二硫键；(4) 加入 IAA 溶液，使其终浓度达到 20 mM，暗反应 30 min；(5) 以第 1 步中测得浓度值，按质量比 25:1（总蛋白/Glu-c, w/w）向溶液中加入 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°C 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。

## 液相色谱-质谱联用分析

### 液相色谱分离条件

采用 Phenomenex Kinetex C18（2.1 $\times$ 100 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ）为色谱柱，流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液，流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈。洗脱梯度为：0-10 min, 2% B；10-30 min, 2%-15% B；30-30.1 min, 15%-85% B；30.1-36 min, 85% B；36-36.1 min, 2% B；36.1-40 min, 2% B。流速 0.25 mL/min，样品进样 5  $\mu\text{L}$ ，柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ 。每个样品或校准样品重复进样分析 3 次。

### 质谱数据采集条件

在 TQ-XS 质谱（Waters 公司）中采用多反应监测模式（MRM），采集特征肽段 QE、QE\*/SE、SE\*质谱信号。在 ESI+模式下，设置毛细管电压 3.5 kV、萃取电压 25 V、锥孔电压 4 V、锥孔温度 100  $^{\circ}\text{C}$ 、脱溶剂气流速 500 L/h、脱溶剂气温度 300  $^{\circ}\text{C}$ 。

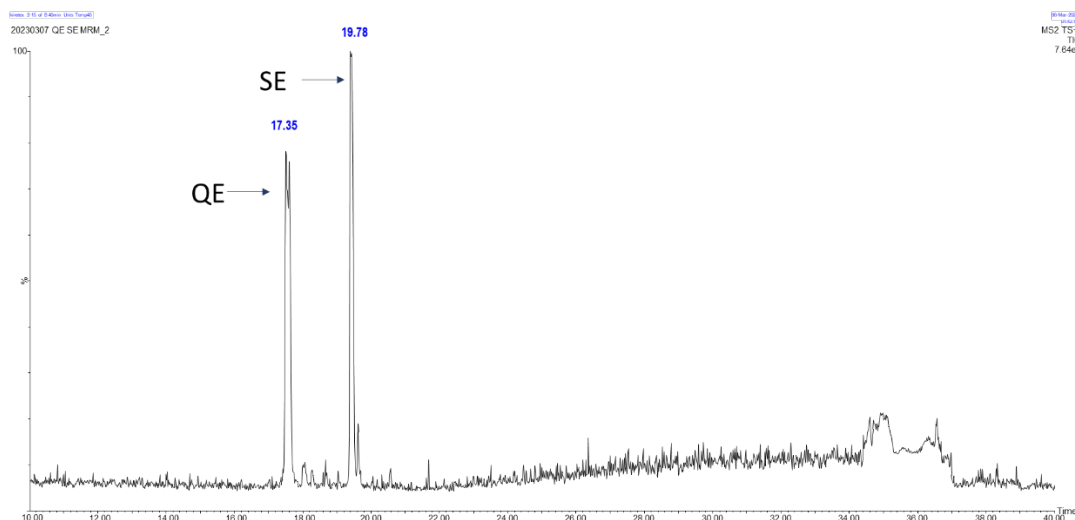
特征肽段及其对应的稳定同位素标记肽段的一级、二级离子的质荷比及碎裂参数如下：

QE:  $m/z$  437.5 $\rightarrow$ 536.3, 碰撞能量 CE=16 V;

QE\*:  $m/z$  440.8 $\rightarrow$ 546.2, 碰撞能量 CE=16 V;

SE:  $m/z$  467.5 $\rightarrow$ 596.2, 碰撞能量 CE=17 V;

SE\*:  $m/z$  470.8 $\rightarrow$ 606.6, 碰撞能量 CE=17 V。



UPLC-MRM 下 QE、SE 保留时间分布

## 数据分析

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：

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

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（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（2）计算可得到血清样本中 QE、SE 的浓度。

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

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

$M_{IS}$	——	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）
$D_{serum}$	——	血清密度（g/mL）
$M_{serum}$	——	血清样品的质量（天平称量的重量，g）
$M_{peptide}$	——	QE、SE 特征肽段的相对分子量（g/mol）

#### 4. 方法性能评价

对本方法测量结果的精密度、正确度、方法检出限与定量限、方法特异性、样本稳定性等进行了评估，各指标均符合要求，具体结果如下。

##### 精密度

实验人血清样本中 NT-proBNP 免疫发光初测结果为 2100 pg/mL。精密度验证实验方法为：抽取 3 支样本进行检测，每个样本经前处理后共连续进行液-质联用分析 3 次，取 3 次连续进样分析结果的平均值作为该支样本的测量结果。经统计分析，结果显示：该方法的精密度 3.59%。

表 1 实验样本的 3 次独立重复测量结果

定量肽	NT-proBNP 测量结果（pg/g）			平均值 (ng/g)	精密度
	测量 1	测量品 2	样品 3		
QE	1714	1745	1659	/	/
SE	1981	1955	1813	/	/
平均值 (ng/g)	1847	1850	1736	1811	3.59%

##### 正确度

由于目前全球尚未有 NT-proBNP 血清标准物质、参考方法、国际比对发表，在样本或方法角度无法提供用于正确度验证的标本和参考；另外，本实验使用 GBW(E)091242 标准物质为校准标准，也不适合用于其不同浓度样本的定值。因此，未开展正确度验证实验。

##### 检出限与定量限

检出限（LoD）与定量限（LoQ）的判别标准分别为：定量肽段满足 LOD: S/N=3、LOQ: S/N=10，重复 3 次，CV≤15.0%。实际测量时，选取临床方法测量结果小于 50 pg/mL 的健康人血清为样本，通过加标或稀释方式，进行测量，结



果如下：LoD = 54.4 pg/g，LoQ = 228.6 pg/g。

### 方法特异性

本实验以 NT-proBNP 酶切后特异性肽段作为直接定量对象，因此，人类蛋白组中（P16860）是否存在其他相同分子量的物质，将决定本方法是否具备特异性。

经 Uniprot 数据库比对分析，QE(QRNHLQGKLSE)、SE(SPRPTGVWKSRE) 均只存在于 P16860 的 Natriuretic Peptide B 蛋白，理论上无其他蛋白在酶解后会产生这两条肽段。

### 样本稳定性

人血清 NT-proBNP 标准物质候选物制备于 2023 年 12 月，保存于 -80℃ 超低温冰箱，至今保存时间约 30 个月。期间开展过四次长期稳定性监测，结果表明三个表达水平的候选物标准值无显著差异，表明该物质血清在超低温下具有较好稳定性。