

人血清 C-反应蛋白测量不确定度评定示例

1 概述

1.1 测量方法

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

1.2 测量标准

C-反应蛋白纯度标准物质。

1.3 测量对象

某血清 C-反应蛋白标准物质。

1.4 测量过程

每次测量血清中 C-反应蛋白时，应在测量序列的第一个和最后一个位置分别插入由 C-反应蛋白纯度标准物质与空白血清基质配制的对照品。采用中国计量科学研究院生产的冰冻人血清中 C-反应蛋白标准物质共 5 支，对每个样品重复测量 3 次。

2 数学模型

C-反应蛋白定量分析：将酶切好的样品进质谱，通过肽段的浓度推算出 C-反应蛋白的浓度，而肽段的浓度根据液质分析 MRM 模式谱图的峰面积表示；选用 3 条肽段计算 C-反应蛋白浓度，以 3 者平均值定值；

根据肽段 EK 浓度计算 CRP 浓度，计算公式如下：

$$C_{\text{CRP,EK}} = \frac{A_{\text{s,EK}}/A_{\text{s,EK-V}^*}}{A_{\text{cal,EK}}/A_{\text{cal,EK-V}^*}} \times C_{\text{cal}} \quad (1)$$

$$C_{\text{CRP}} = \frac{C_{\text{CRP,EK}} + C_{\text{CRP,GK}} + C_{\text{CRP,QK}}}{3} \quad (2)$$

$C_{\text{CRP,EK}}$ ——根据 EK 特征肽段计算得到的样品中 C-反应蛋白浓度；

$A_{\text{s,EK}}$ ——待测样品中 EK 特征肽段的峰面积；

$A_{\text{s,EK-V}^*}$ ——待测样品中稳定同位素标记特征肽段 EK-V 的峰面积；

$A_{\text{cal,EK}}$ ——校准品中 EK 特征肽段的峰面积;

$A_{\text{cal,EK-V}^*}$ ——校准品中稳定同位素标记特征肽段 EK-V 的峰面积;

c_{cal} ——校准品中 C-反应蛋白的浓度;

c_{CRP} ——样品中 C-反应蛋白的浓度;

根据 GK 和 QK 特征肽段计算样品中 C-反应蛋白浓度时,计算方法与 EK 特征肽段相同。样品中 C-反应蛋白的最终浓度取三条特征肽段计算结果的平均值。

由特征肽段 EK 计算得到的蛋白的浓度,同理,特征肽段 GK、QK 也可得到相应的蛋白浓度。最终人血清中 C-反应蛋白的浓度为这几个浓度的均值。

3 不确定度来源

(1) 标准物质的不确定度

标准物质引入的相对标准不确定度为:

$$u_{1,\text{rel}} = \frac{U}{k \times c} \quad (3)$$

式中: $u_{1,\text{rel}}$ ——C-反应蛋白溶液纯度标准物质的相对不确定度;

U ——C-反应蛋白溶液纯度标准物质的扩展不确定度;

k ——包含因子,取 2。

(2) 天平称量引入的不确定度

根据天平的证书,天平的扩展不确定度为 0.005 mg, $k=2$ 。在实验过程中,需要称量样品的量、C-反应蛋白准物质的量和同位素标记的特征肽段、稀释液质量。天平称量引入的不确定度为:

$$u_{2,\text{rel}} = \frac{U}{k \times \bar{m}} \quad (4)$$

式中: $u_{2,\text{rel}}$ ——天平称量引入的不确定度;

U ——C-反应蛋白溶液纯度标准物质的扩展不确定度;

\bar{m} ——称量对象的平均质量, mg。

(3) 添加内标引入的不确定度

可从移液器校准证书可知。

(4) 胰蛋白酶酶解效率引入的不确定度

蛋白质在胰蛋白酶的作用下酶解成特征肽段，但是在 37℃的环境下不能完全酶解，存在酶解效率问题。由于样品在定值过程中引入标准物质作为对照品，因此极大程度减少酶解效率引起的不确定度。

(5) 测量重复性引入的不确定度

测量重复性引入的不确定度以 5 次重复测量结果的相对标准偏差计。测量重复性引入的不确定度为：

$$u_3=\frac{sd}{\bar{x}\times\sqrt{n}} \tag{5}$$

式中： u_3 ——测量重复性引入的不确定度；

sd ——定值结果的标准偏差；

\bar{x} ——定值结果的平均值；

\sqrt{n} ——重复测量样品次数；

4 不确定度分量的计算

(1) 标准物质的不确定度

使用 C-反应蛋白溶液纯度标准物质作为对照品，其不确定度可以查看标准物质证书，GBW09228 的标准值为 54.9 mg/L，其不确定度为 2.8 mg/L ($k=2$)，因此，其相对标准不确定度为 2.6%。

(2) 天平引入的不确定度

天平的不确定度分量主要来自于校准，采用天平检定证书中提供的最大允差计算，校准证书显示，天平的允差为±0.05 mg，由于其分布未知，一般按矩形分布计算，包含因子 $k=\sqrt{3}$ 。

天平引入的不确定度

天平引入的不确定度 $0.05/\sqrt{3}=0.0228\text{ mg/L}$

表 4 样品称重表

序号	名称	质量（mg）	不确定度
1	血清样品	300	0.0096%
2	纯度标准物质	450	0.0006%
3	同位素标记的特征肽段	10	0.2887%
4	稀释同位素标记的特征肽段的溶液	10000	0.0003%

特征肽段有 3 条，因此天平引入的不确定度分量为：

$$\sqrt{0.0096\%^2+0.0006\%^2+3\times0.2887\%^2+3\times0.0003\%^2}=0.5\%$$

(3) 添加内标引入的不确定度

从移液器校准证书可知，量程 20 μL~200 μL 的移液器引入的不确定度为 0.6%，添加 3 条同位素标记的肽段，因此由移液器引入的不确定度为 1.0%。

(4) 胰蛋白酶酶解效率引入的不确定度

蛋白质在胰蛋白酶的作用下酶解成特征肽段，但是在 37℃的环境下不能完全酶解，存在酶解效率问题。由于样品在定值过程中引入标准物质作为对照品，因此极大程度减少酶解效率引起的不确定度，不确定度定为 1.0%。

(5) 测量重复性引入的不确定度

本次评定使用的是 5 瓶样品，每个样品质谱检测 3 次，每个样品的平均测量结果为 79.03 mg/L，82.09 mg/L，81.53 mg/L，78.04 mg/L，85.05 mg/L。平均值为 81.15 mg/L，定制结果的标准偏差为 2.47 mg/L，测量重复性引入的不确定度为 1.4%。

5 合成标准不确定度评定

(1) 标准不确定度分量一览表

表 5 标准不确定度分量表

序号	来源	类型	不确定度
1	标准物质引入的不确定度	B	2.6%
2	称量引入的不确定度	B	0.5%
3	移液器引入的不确定度	B	1.0%
4	胰蛋白酶酶切引入的不确定度	B	1.0%
5	测量重复性	A	1.4%
合成			3.3%

(2) 合成标准不确定度的计算

合成标准不确定度为：

$$u_c = u_c \times \bar{x} = 3.3\% \times 81.15 = 2.7 \text{ mg/L}$$

6 扩展不确定度评定

取包含因子 $k=2$ ，扩展不确定度为：

$$U = u_c \times k = 2.64 \times 2 = 5.28 \text{ mg/L}$$

7 测量结果不确定度报告与表示

应用人血清中 C-反应蛋白参考方法对血清样品进行测量时，其测量结果为：

$(81.2 \pm 5.3) \text{ mg/L}$ ，($k=2$)。

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿