



# 中华人民共和国国家计量技术规范

JJF ××××—202×

## 人血清中 C-反应蛋白测量参考方法 (ID-LC-MS/MS 法)

Reference method for C-reactive protein in human serum (ID-LC-MS/MS method)

(征求意见稿)

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 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-反应蛋白测量参 考方法（ID-LC-MS/MS 法）

JJF XXXX—202X

Reference method for C-reactive protein in  
human serum (ID-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

南京市计量监督检测院

参加起草单位：

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：

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿

# 目 录

引 言 .....	i
1 范围 .....	2
2 引用文件 .....	2
3 检测原理和方法 .....	2
4 仪器 .....	2
4.1 液相色谱串联质谱联用系统 .....	2
4.2 天平 .....	3
4.3 旋转孵育仪 .....	3
4.4 离心浓缩仪 .....	3
4.5 移液器 .....	3
4.6 恒温培养箱 .....	3
4.7 密度计 .....	3
4.8 容量瓶 .....	3
4.9 pH 计 .....	3
5 试剂 .....	3
5.1 本规范所用水 .....	3
5.2 实验室所用试剂 .....	3
5.3 色谱柱 .....	4
5.4 试剂制备 .....	4
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 分析样品的处理 .....	7
8 样品测定 .....	10
8.1 液相色谱条件 .....	10
8.2 串联质谱测量条件 .....	11
8.3 分析过程 .....	11
9 数据处理 .....	11

9.1 计算公式.....	11
9.2 测量结果的计算.....	12
9.3 测量不确定度的计算.....	12
9.4 与其他测量程序所得的结果进行比较.....	12
10 分析可靠性.....	12
10.1 概念、价值及其应用.....	12
10.2 测量正确度.....	12
10.3 测量不确定度.....	13
10.4 测量准确度.....	13
10.5 测量精密度.....	13
10.6 检出限和定量限.....	13
10.7 分析影响量.....	13
11 参考测量程序的确认.....	13
12 报告.....	13
13 质量保证.....	14
13.1 室内质量控制.....	14
13.2 室间质量控制评价.....	14
13.3 质量日志.....	14
附录 A 人血清中 C-反应蛋白测量参考方法标准操作规程示例（资料性附录）.....	15
附录 B 人血清 C-反应蛋白测量不确定度评定示例（资料性附录）.....	29

## 1.警示与安全注意事项

1.1 测量样品：样品具有潜在生物传染性，应进行必要的防护。

### 1.2 试剂安全

1.2.1 乙腈、无水乙醇、甲酸属易燃有毒危险品，称量及配制试剂时应进行有效防护，依据试剂安全技术说明书和风险评估结果，佩戴化学防护手套、防护眼镜和必要的呼吸防护用品，并在通风橱内操作。

1.2.2 盐酸、三氟乙酸、二硫苏糖醇（DTT）、氢氧化钠、碘乙酰胺（IAM）不易燃，有毒，具强刺激性。碳酸氢铵无毒，易分解为有毒的氨气而具有刺激性。三羟甲基氨基甲烷（Tris-base）、硫酸铵、硼酸、吐温 20、磷酸氢二钠低毒，吸入有一定的刺激性，应注意密闭操作，提供充分的局部排风。称量及配制试剂时建议操作人员佩戴防尘面具（全面罩），穿胶布防毒衣，带橡胶手套。

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿

# 引 言

C-反应蛋白是机体受到微生物入侵或组织损伤等炎症性刺激时由肝脏释放的五聚体结构的血清蛋白，可用于监测心血管疾病和全身炎症状况，是重要的临床标志物之一。本技术规范规定了人血清中 C-反应蛋白参考方法，该参考方法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方法的试剂配制、样品处理、样品检测、数据分析、不确定度评定等内容进行了规范。本规范适用于建立人血清中 C-反应蛋白参考方法的实验室。

本技术规范为首次发布。

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿



# 人血清中 C-反应蛋白测量参考方法（ID-LC-MS/MS 法）

## 1 范围

本规范规定了人血清中 C-反应蛋白的参考测量方法。

本规范主要适用于医学参考实验室，适用于人血清中 C-反应蛋白的参考测量。

## 2 引用文件

JJF 1001 通用计量术语及定义

JJF 1135 化学分析测量不确定度评定

JJF 1059.1 测量不确定度的评定与表示

JJF 1317 液相色谱-质谱联用仪校准规范

JJG 705 液相色谱仪

JJG 646 移液器

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

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 检测原理和方法

本规范建立的人血清中 C-反应蛋白测量参考方法，原理为同位素稀释液相色谱串联质谱测量法。该方法用磁固相萃取方法提取血清中 C-反应蛋白，使用胰蛋白酶将待测血清样品和基质匹配对照品中的 C-反应蛋白酶解成特征肽段；在样品和对照品中加入同位素标记特征肽段作为内标，用于校正进样和质谱响应差异。利用液相色谱仪对酶解后的特征肽段进行分离，再利用串联质谱仪测量 C-反应蛋白特征肽段及其同位素标记特征肽段的离子对信号。以样品中特征肽段与同位素标记特征肽段峰面积比和对照品中相应峰面积比的比值，结合对照品中 C-反应蛋白浓度，计算血清中 C-反应蛋白的浓度。

## 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 I 级天平，检定合格或通过校准

#### 4.3 旋转孵育仪

用于对样品缓慢的上下颠倒混匀，符合实验要求。

#### 4.4 离心浓缩仪

可抽真空、离心，并能够设置温度，使样品在一定温度下离心浓缩。

#### 4.5 移液器

检定合格或校准通过，符合 JJG 646 移液器的要求。

#### 4.6 恒温培养箱

可设置  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ，检定合格或校准通过。

#### 4.7 密度计

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

#### 4.8 容量瓶

A 级合格。

#### 4.9 pH 计

准确度等级 0.01 级，经检定合格。

### 5 试剂

#### 5.1 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 实验室所用试剂

人血清 C-反应蛋白测量参考方法试剂见表 1。

表 1 人血清 C-反应蛋白测量参考方法试剂列表

编号	试剂名称	分子式	分子量	CAS 号	试剂规格
1	乙腈	$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$	41.05	75-05-8	HPLC 级或以上
2	氯化钠	$\text{NaCl}$	58.44	7647-14-5	分析纯
3	氯化钾	$\text{KCl}$	74.55	7447-40-7	分析纯
4	Tris-base	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	121.14	77-86-1	分析纯
5	盐酸	$\text{HCl}$	36.46	7647-01-0	分析纯
6	吐温 20	//	//	9005-64-5	分析纯
7	尿素	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	60.06	57-13-6	分析纯
8	二硫苏糖醇	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	154.25	3483-12-3	分析纯

9	碘乙酰胺	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> INO	184.96	144-48-9	分析纯
10	碳酸氢铵	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	79.06	1066-33-7	分析纯
11	三氟乙酸	C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	114.02	76-05-1	分析纯
12	磷酸二氢钾	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	7778-77-0	分析纯
13	磷酸氢二钠	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141.96	7558-79-4	分析纯
14	甲酸	HCOOH	46.03	64-18-6	HPLC 级或以上
15	硼酸	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	10043-35-3	分析纯
16	氢氧化钠	NaOH	40.00	1310-73-2	分析纯
17	硫酸铵	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132.14	7783-20-2	分析纯
18	胰蛋白酶	//	//	9002-07-7	测序级

实验中还使用到其他试剂耗材，说明如下：

(1) C-反应蛋白标准物质应使用国家有证标准物质，其使用、保存及有效期应严格按照标准物质证书中的规定执行。

(2) 特征肽段由人 C-反应蛋白经胰蛋白酶酶解后筛选获得。宜采用高分辨率质谱对酶解产物进行分析，选择响应较高、特异性好、稳定性好且不易受基质干扰的肽段作为定量特征肽段。本方法选用肽段氨基酸序列（N→C）为 ESDTSYVSLK、GYSIFS YATK、QDNEILIFWSK 的肽段作为 C-反应蛋白定量特征肽段，分别简称为 EK、GK、QK，并分别使用相应稳定同位素标记肽段作为内标，简称为 EK-V\*、GK-F\*、QK-F\*。特征肽段及其稳定同位素标记肽段可由合格供应商合成，其中合成特征肽段可用于液相色谱和质谱条件优化。

(3) 磁珠可采用商业化产品，应具有适用于抗体偶联或抗原捕获的性能，并按照产品说明书进行保存和使用。

(4) 抗体可采用商业化产品，应能特异性结合 C-反应蛋白，并按照产品说明书进行保存和使用。

### 5.3 色谱柱

液相色谱柱为极性官能团嵌入或端基封尾的 C<sub>18</sub> 色谱柱，填料为十八烷基键合硅胶；

### 5.4 试剂制备

除另有规定外，试剂配制所用水均应符合 GB/T 6682 规定的一级水要求。试剂配制后应根据试剂性质及实验室质量管理要求进行标识、保存和使用。

#### 5.4.1 TBS 缓冲液

称取氯化钠 0.32g、氯化钾 8mg 和 Tris-base 0.12g，加入约 30mL 水溶解，用

6mol/L 盐酸调节 pH 至 7.4，转移并定容至 40mL，混匀备用。

#### 5.4.2 TBST 缓冲液

向 TBS 缓冲液中加入吐温 20，使吐温 20 的体积分数为 0.1%，混匀备用。配制 30mL TBST 缓冲液时，可取吐温 20 约 30 $\mu$ L，加入 TBS 缓冲液并定容至 30mL，混匀备用。

#### 5.4.3 8mol/L 尿素溶液

称取尿素 4.8g，加水溶解并定容至 10mL，混匀备用。

#### 5.4.4 20mmol/L 二硫苏糖醇溶液

称取二硫苏糖醇 30.84mg，加水溶解并定容至 10mL，混匀备用。该溶液宜现用现配。

#### 5.4.5 0.15mol/L 碘乙酰胺溶液

称取碘乙酰胺 0.277g，加水溶解并定容至 10mL，混匀备用。该溶液应避光保存和使用。

#### 5.4.6 50mmol/L 碳酸氢铵溶液

称取碳酸氢铵 39.53mg，加水溶解并定容至 10mL，混匀备用。

#### 5.4.7 PBS 缓冲液

称取氯化钠 0.316g、氯化钾 8mg、磷酸二氢钾 9.6mg 和磷酸氢二钠 57.6mg，加入约 30mL 水溶解，用盐酸调节 pH 至 7.4，转移并定容至 40mL，混匀备用。

#### 5.4.8 包被缓冲液

称取硼酸 61.8mg，加入约 8mL 水溶解，用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.5，转移并定容至 10mL，混匀备用。

#### 5.4.9 硫酸铵缓冲液

称取硫酸铵 1.98g，加入 4mL 包被缓冲液溶解，用 5mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.5，转移并定容至 5mL，混匀备用。

#### 5.4.10 封闭缓冲液

称取牛血清白蛋白（BSA）50mg 和吐温 20 5mg，用 PBS 缓冲液溶解并定容至 10mL，混匀备用。该溶液中 BSA 的质量浓度为 0.5%（m/V），吐温 20 的质量浓度为 0.05%（m/V）。

#### 5.4.11 洗涤/保存缓冲液

称取牛血清白蛋白（BSA）30mg 和吐温 20 15mg，用 PBS 缓冲液溶解并定容至 30mL，混匀备用。该溶液中 BSA 的质量浓度为 0.1%（m/V），吐温 20 的质量浓度为 0.05%（m/V）。

#### 5.4.12 特征肽段及稳定同位素标记特征肽段储备液

分别称取特征肽段或稳定同位素标记特征肽段适量，采用天平准确称量至 0.01mg，加入适宜溶剂溶解并定容，配制成储备液。储备液浓度应根据称样量、纯度和定容体积准确计算。后续使用时，可根据实验需要逐级稀释为工作液。

## 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。接收外检样品时，应记录样品类型、基质、状态、数量、最小包装量、运输条件、储存条件、危险性及注意事项。

### 6.2 样品用量

样品用量可根据 C-反应蛋白的浓度进行调整。为保证取样的准确性、测量的灵敏度和操作的可行性，建议血清取样量为 0.1mL~1.0mL，最小取样量不低于 0.1mL。

注：当样品中 C-反应蛋白浓度较低时，可适当增加取样量；当样品中 C-反应蛋白浓度较高时，可适当减少取样量或进行适当稀释。

### 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。长期保存时，宜置于-70℃及以下条件保存。

测量前，应将冷冻血清样品在室温或 2℃~8℃条件下融化，充分混匀后进行测量。冻干样品应按照规定说明书规定的条件保存，使用前按照说明书要求复溶并充分混匀。

## 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 质谱系统准备

测定前应对质谱系统进行性能检查，至少包括：

- a) 近 3 个月内进行过质量轴和半峰宽校正，且结果合格；
- b) 电喷雾离子源（ESI）安装正确，状态满足测量要求；
- c) 真空度达到仪器正常工作要求；
- d) 质谱系统各项参数指标符合 JJF1317 的相关要求。

### 7.1.2 液相系统准备

测量前应对液相系统进行准备，至少包括：

- a) 流动相的制备：

有机相为 0.1%（体积分数）甲酸乙腈溶液，可取甲酸 1mL，加乙腈定容至 1L，混匀；

水相为 0.1%（体积分数）甲酸水溶液，可取甲酸 1mL，加水定容至 1L，混匀。

- b) 按设定的液相色谱方法进行系统平衡，平衡时间应不少于 30min。

c) 测量前应检查液相系统压力、流速、进样器和色谱柱状态，确认系统运行稳定。

### 7.1.3 环境条件

液相色谱串联质谱联用系统运行环境应满足仪器使用说明书要求，并符合下列条件：

a) 仪器室内不得有明显机械振动和强电磁干扰，不得存放与试验无关的易燃、易爆和强腐蚀性气体或试剂；

- b) 环境温度：15℃～30℃；

- c) 相对湿度：15%～80%；

- d) 电源电压：（220±22）V，频率：（50±0.5）Hz。

## 7.2 分析样品的处理

### 7.2.1 样品中 C-反应蛋白浓度的初步确定

分析前，可采用常规方法，如免疫比浊法、酶联免疫法、化学发光法等，初步确定分析样品中 C-反应蛋白的浓度。

不具备常规测量条件时，可采用 LC-MS/MS 预实验初步确定样品浓度。预实验时，可向样品中加入适量稳定同位素标记特征肽段，使酶切后内源特征肽段与



稳定同位素标记特征肽段的峰面积比处于方法线性响应范围内。经前处理和 LC-MS/MS 测量后,估算样品中 C-反应蛋白的大致浓度,再按正式测量流程进行测量。

### 7.2.2 血清密度的测定

分析前应测定血清样品密度。测得的密度值应至少保留 4 位有效数字,用于必要时的质量浓度与体积浓度换算。

### 7.2.3 样品前处理

#### 7.2.3.1 磁珠活化

磁珠活化应按照磁珠产品说明书进行。可按下列步骤操作:

a) 将商品化磁珠从 2℃~8℃条件下取出,恢复至室温后涡旋混匀不少于 30s,使磁珠充分重悬;

b) 移取 125μL 磁珠悬液至 1.5mL 离心管中;

c) 加入 250μL 包被缓冲液,振荡混匀;

d) 将离心管置于磁力架上静置 1min,弃去上清液;

e) 取下离心管,加入 100μL 包被缓冲液,将磁珠充分重悬。

注:磁珠悬液中磁珠质量应按照产品说明书或实际浓度计算。

#### 7.2.3.2 抗体偶联

抗体偶联应按照磁珠和抗体产品说明书进行。可按下列步骤操作:

a) 向活化并洗涤后的磁珠中加入适量包被缓冲液;

b) 按照抗体与磁珠质量比约为 40μg:1mg 的比例加入 C-反应蛋白抗体;

c) 加入硫酸铵缓冲液,使反应总体积为 1250μL,混匀后于 37℃条件下缓慢旋转孵育 16h~24h;

d) 将离心管置于磁力架上静置 2min,弃去上清液;

e) 加入 1250μL 封闭缓冲液,混匀后于 37℃条件下孵育 16h~24h;

f) 将离心管置于磁力架上静置 2min,弃去上清液;

g) 加入 1mL 洗涤/保存缓冲液重悬磁珠,置于磁力架上静置后弃去上清液,重复洗涤 3 次;

h) 加入洗涤/保存缓冲液重悬磁珠,制备成适宜浓度的磁珠-抗体复合物。制备后的磁珠-抗体复合物宜于 2℃~8℃条件下保存,并按照产品说明书或经验证

的保存期限使用。

#### 7.2.3.3 C-反应蛋白纯化

样品中 C-反应蛋白可采用磁珠-抗体复合物进行免疫富集，步骤如下：

a) 取适量血清样品置于 1.5mL 离心管中，样品体积可根据 C-反应蛋白浓度在 0.1mL~1.0mL 范围内调整；

b) 加入适量磁珠-抗体复合物，使其捕获能力满足样品中目标蛋白的富集要求；

c) 室温条件下旋转孵育 1h，使血清中的 C-反应蛋白与磁珠-抗体复合物充分结合；

d) 将离心管置于磁力架上静置 1min，弃去上清液；

e) 用 1mLTBST 缓冲液洗涤 3 次，再用 1mLTBS 缓冲液洗涤 1 次；

f) 加入 100 $\mu$ L0.1%（体积分数）三氟乙酸水溶液，重悬磁珠-抗体-抗原复合物，室温条件下旋转孵育 1h，使结合于磁珠上的 C-反应蛋白洗脱；

g) 将离心管置于磁力架上静置 1min，转移上清液至新的 1.5mL 离心管中。

#### 7.2.3.4 C-反应蛋白酶切

纯化后的 C-反应蛋白按下列步骤进行酶切：

a) 将装有纯化后 C-反应蛋白洗脱液的离心管置于离心浓缩仪中，于 50℃条件下离心浓缩至干；

b) 加入适量 8mol/L 尿素溶液和 20mmol/L 二硫苏糖醇溶液，混匀后于 37℃条件下孵育 1h，使蛋白变性并还原；

c) 加入 0.15mol/L 碘乙酰胺溶液，室温避光反应 1h，使半胱氨酸残基烷基化；

d) 加入 50mmol/L 碳酸氢铵溶液，稀释尿素浓度至适宜胰蛋白酶酶切的范围；

e) 加入胰蛋白酶，酶与蛋白质质量比宜为 1:10~1:50，于 37℃条件下孵育 1h；

f) 加入甲酸终止酶切反应；

g) 加入适量稳定同位素标记特征肽段溶液，混匀；

h) 样品经滤膜过滤或离心后，取上清液用于 LC-MS/MS 测量。

注：稳定同位素标记特征肽段的加入时点应与校准品或对照品保持一致。若用于校正酶切前处理过程，稳定同位素标记物应在酶切前加入；若为稳定同位素



标记特征肽段，通常在酶切后加入，用于校正进样和质谱响应差异。

### 7.2.3.5 对照品制备

根据 7.2.1 初步确定的样品中 C-反应蛋白浓度，取适量 C-反应蛋白纯度标准物质，加入空白血清基质中，制备与待测样品浓度水平相近的基质匹配对照品。

对照品应与待测样品同步进行免疫富集、洗涤、洗脱、酶切和 LC-MS/MS 测量。稳定同位素标记特征肽段的加入量和加入时点应与待测样品保持一致。对照品宜设置于待测样品序列前后，用于监测测量过程稳定性并降低批内测量偏差。

## 8 样品测定

### 8.1 液相色谱条件

使用者可根据实验需要对液相色谱条件进行适当优化。优化时应以保证目标特征肽段与干扰组分有效分离、提高色谱柱柱效和方法稳定性为原则，优化后的条件应满足本方法对特异性和重复性的要求。

#### 8.1.1 液相色谱仪器条件

- a) 色谱柱：见 5.3；
- b) 柱温：45℃；
- c) 流速：0.2mL/min；
- d) 进样量：20μL；
- e) 流动相 A：0.1%（体积分数）甲酸水溶液；流动相 B：0.1%（体积分数）甲酸乙腈溶液。

#### 8.1.2 液相色谱洗脱条件

使用者可根据实验需要对洗脱条件进行适当优化，参考洗脱条件见表 2。

表 2 液相色谱洗脱条件

时间/min	A 相/%	B 相/%
0.00	95	5
23.00	65	35
23.01	5	95
26.00	5	95
26.01	95	5

## 8.2 串联质谱测量条件

由于质谱仪器型号存在差异，使用者可根据实验需要，以提高离子化效率为原则，对离子源类型、温度、气流等参数进行适当优化；以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适当优化，以提高测量灵敏度。选用不同的特征肽段或稳定同位素标记肽段时，所监测的离子对可相应调整。

本规范采用电喷雾电离源（ESI）正离子模式，C-反应蛋白特征肽段及其稳定同位素标记肽段的定量离子对见表 3。

表 3 C-反应蛋白特征肽段及其内标的测量离子对

肽段简称	肽段氨基酸序列（N→C）	母离子 m/z	子离子 m/z
EK	ESDTSYVSLK	564.8	347.2
EK-V*	ESDTSYV*SLK	567.9	347.2
GK	GYSIFSYATK	568.8	193.1
GK-F*	GYSIF*SYATK	573.9	193.1
QK	QDNEILIFWSK	696.9	470.3
QK-F*	QDNEILIF*WSK	702.1	470.3

## 8.3 分析过程

### 8.3.1 样品检测顺序

在待测样品的前后加上对照品，待测样品至少 3 个平行。

### 8.3.2 样品检测次数

除明确规定的测定次数外，检测次数至少为 3 次。

## 9 数据处理

### 9.1 计算公式

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；

$c_{\text{cal}}$ ——校准品中 C-反应蛋白的浓度；

$c_{\text{CRP}}$ ——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。

## 9.2 测量结果的计算

计算每批次测量平均值、标准差、变异系数和所有测量结果的平均值、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, 附录 B。

## 9.4 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 概念、价值及其应用

应依据方法的正确度、不确定度、准确度、精密度、检出限等来评估 C-反应蛋白参考测量程序的分析可靠性。相关文献及参考测量程序的实验室测量数据表明本参考测量程序的分析性能优于临床 C-反应蛋白浓度测量的常规方法, 适合于临床常规方法的溯源。

## 10.2 测量正确度

采用 GBW09228 C-反应蛋白溶液纯度标准物质、GBW09865~09868 冰冻人血清中 C-反应蛋白标准物质——国家一级标准物质对同位素稀释质谱方法进行了正确度验证。采用基于特征肽段分析的同位素稀释质谱法对该标准物质进行测定。

每个样品连续检测 5 次，检测 3 天。测量结果的平均值都在标准物质定值结果范围内，因此该方法准确可靠。

### 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。本参考测量程序测量结果的相对扩展不确定度宜小于 10% ( $k=2$ )。

### 10.4 测量准确度

是一个定性的概念，包括正确度和精密度两层含义。可以采用如下一个或两个术语进行表达：合成标准不确定度  $u_c$ ——是由测量不确定度评定而获得的结果；扩展不确定度  $U$ ——用包含因子  $k$  处理而获得 ( $U=u_c \times k$ )。

### 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、实验室内复现性精密度。本参考测量程序在浓度为 1.54 mg/L, 12.37 mg/L 和 51.62 mg/L 时的重复性精密度为 2.97%, 0.71%, 1.91%。

### 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检出限为 0.1  $\mu\text{g}$ ，定量限为 0.4  $\mu\text{g}$ 。

### 10.7 分析影响量

经评价，本参考方法不受溶血、脂血和黄疸等因素的干扰。

## 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。

测定 C-反应蛋白的国际有证标准物质或国家一级标准物质，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

每个工作日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。

## 附录 A 人血清中 C-反应蛋白测量参考方法标准操作规程示例（资料性附录）

### A.1 试剂配制

除另有规定外，试剂配制所用水均应符合 GB/T 6682 规定的一级水要求。试剂配制后应注明试剂名称、浓度、配制日期、有效期、保存条件和配制人员。使用后的废液应按照实验室相关规定分类收集和处理。

#### A.1.1 流动相的配制

##### A.1.1.1 流动相 A：0.1%（体积分数）甲酸水溶液

——量取约 900 mL 水，置于 1 L 容量瓶中；

——加入甲酸 1 mL；

——用水定容至 1 L，混匀；

——转移至液相色谱流动相瓶中。

**储存条件：**室温密闭保存。

**保存期限：**宜现用现配，最长保存期限应经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

##### A.1.1.2 流动相 B：0.1%（体积分数）甲酸乙腈溶液

——量取约 900 mL 乙腈，置于 1 L 容量瓶中；

——加入甲酸 1 mL；

——用乙腈定容至 1 L，混匀；

——转移至液相色谱流动相瓶中。

**储存条件：**室温密闭保存，远离热源和火源。

**保存期限：**宜现用现配，最长保存期限应经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入有机废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

#### A.1.2 缓冲液的配制

##### A.1.2.1 TBS 缓冲液

——称取氯化钠 0.32 g、氯化钾 8 mg 和 Tris-base 0.12 g；

——加入约 30 mL 水，搅拌使其充分溶解；

——用 6 mol/L 盐酸调节 pH 至 7.4；

——转移至 40 mL 容量瓶中，用水定容至 40 mL，混匀。

**储存条件：**2 °C~8 °C 保存。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物；pH 为 7.4±0.1。

#### A.1.2.2 TBST 缓冲液

- 量取约 25 mL TBS 缓冲液；
- 加入吐温 20 约 30  $\mu\text{L}$ ；
- 用 TBS 缓冲液定容至 30 mL，混匀。

**储存条件：**2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

**注：**该溶液中吐温 20 的体积分数约为 0.1%。

#### A.1.2.3 PBS 缓冲液

- 称取氯化钠 0.316 g、氯化钾 8 mg、磷酸二氢钾 9.6 mg 和磷酸氢二钠 57.6 mg；
- 加入约 30 mL 水，搅拌使其充分溶解；
- 用盐酸调节 pH 至 7.4；
- 转移至 40 mL 容量瓶中，用水定容至 40 mL，混匀。

**储存条件：**2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物；pH 为 7.4 $\pm$ 0.1。

#### A.1.2.4 包被缓冲液

- 称取硼酸 61.8 mg；
- 加入约 8 mL 水，搅拌使其充分溶解；
- 用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.5；
- 转移至 10 mL 容量瓶中，用水定容至 10 mL，混匀。

**储存条件：**2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物；pH 为 9.5 $\pm$ 0.1。

#### A.1.2.5 硫酸铵缓冲液

- 称取硫酸铵 1.98 g；
- 加入约 4 mL 包被缓冲液，搅拌使其充分溶解；
- 用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 9.5；
- 转移至 5 mL 容量瓶中，用包被缓冲液定容至 5 mL，混匀。

**储存条件：**2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

**保存期限：**经实验室验证后确定。



**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物；pH 为  $9.5 \pm 0.1$ 。

#### A.1.2.6 封闭缓冲液

——称取牛血清白蛋白（BSA）50 mg 和吐温 20 5 mg；

——加入适量 PBS 缓冲液，混匀使其充分溶解；

——用 PBS 缓冲液定容至 10 mL，混匀。

**储存条件：**2 °C~8 °C 保存。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

**注：**该溶液中 BSA 的质量浓度为 0.5%（m/V），吐温 20 的质量浓度为 0.05%（m/V）。

#### A.1.2.7 洗涤/保存缓冲液

——称取牛血清白蛋白（BSA）30 mg 和吐温 20 15 mg；

——加入适量 PBS 缓冲液，混匀使其充分溶解；

——用 PBS 缓冲液定容至 30 mL，混匀。

**储存条件：**2 °C~8 °C 保存。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

**注：**该溶液中 BSA 的质量浓度为 0.1%（m/V），吐温 20 的质量浓度为 0.05%（m/V）。

### A.1.3 变性、还原、烷基化和酶切试剂的配制

#### A.1.3.1 8 mol/L 尿素溶液

——称取尿素 4.8 g；

——加入约 8 mL 水，搅拌使其充分溶解；

——用水定容至 10 mL，混匀。

**储存条件：**宜现用现配；如需短期保存，应置于 2 °C~8 °C 条件下。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

#### A.1.3.2 1 mol/L 二硫苏糖醇储备液

——称取二硫苏糖醇（DTT）154.25 mg；

——加入适量水，搅拌使其充分溶解；



——用水定容至 1 mL，混匀。

**储存条件：**宜现用现配；确需保存时，应分装并置于 -20 °C 及以下条件保存，避免反复冻融。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

#### **A.1.3.3 8 mol/L 尿素-20 mmol/L 二硫苏糖醇工作液**

——称取尿素 4.8 g；

——加入 1 mol/L 二硫苏糖醇储备液 200 μL；

——加入适量水，搅拌使尿素充分溶解；

——用水定容至 10 mL，混匀后立即使用。

**储存条件：**现用现配。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

**注：**该工作液中尿素浓度为 8 mol/L，二硫苏糖醇浓度为 20 mmol/L。

#### **A.1.3.4 0.15 mol/L 碘乙酰胺溶液**

——称取碘乙酰胺（IAM）0.277 g；

——加入适量水，搅拌使其充分溶解；

——用水定容至 10 mL，混匀。

**储存条件：**避光，宜现用现配。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

#### **A.1.3.5 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液**

——称取碳酸氢铵 39.53 mg；

——加入适量水，搅拌使其充分溶解；

——用水定容至 10 mL，混匀。

**储存条件：**2 °C~8 °C 保存。

**保存期限：**宜现用现配，最长保存期限应经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

#### A.1.3.6 0.1%（体积分数）三氟乙酸水溶液

——量取约 90 mL 水，置于 100 mL 容量瓶中；

——加入三氟乙酸 100  $\mu\text{L}$ ；

——用水定容至 100 mL，混匀。

**储存条件：**室温密闭保存。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

**用后处置：**倒入指定废液收集容器，按照实验室相关规定处理。

**可接受标准：**溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物。

#### A.1.4 C-反应蛋白标准物质和基质匹配单点校准品的配制

##### A.1.4.1 C-反应蛋白标准储备液

——按照标准物质证书要求取用 C-反应蛋白标准物质；

——根据标准物质证书给出的纯度、浓度或含量信息，加入适宜溶剂，配制成标准储备液；

——准确记录标准物质编号、批号、称样量或取样量、溶剂类型、定容体积和计算浓度。

**储存条件：**按照标准物质证书规定执行。

**保存期限：**按照标准物质证书规定执行。

**可接受标准：**标准物质状态应符合证书要求，配制记录完整且可追溯。

##### A.1.4.2 基质匹配单点校准品

——根据待测样品中 C-反应蛋白的预估浓度，取适量 C-反应蛋白标准储备液；

——加入空白血清基质，配制成与待测样品浓度水平接近的基质匹配单点校准品；

——充分混匀，分装备用；

——准确记录标准储备液取样量、空白血清基质用量、配制体积和单点校准品浓度。

**储存条件：**短期保存时置于  $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$  条件下；长期保存时置于  $-20^{\circ}\text{C}$  及以下条件下，避免反复冻融。

**保存期限：**经实验室验证后确定。

可接受标准：单点校准品应充分混匀，无明显沉淀或絮状物；其浓度水平应与待测样品浓度水平接近。

注：单点校准品与待测样品的浓度水平应尽量接近，使内源特征肽段与相应稳定同位素标记特征肽段的峰面积比处于方法的适用范围内。

### A.1.5 稳定同位素标记特征肽段溶液的配制

#### A.1.5.1 稳定同位素标记特征肽段储备液

——分别称取稳定同位素标记特征肽段 EK-V\*、GK-F\* 和 QK-F\* 适量；

——准确称量至 0.01 mg；

——分别加入适宜溶剂溶解并定容，配制成储备液；

——根据实际称样量、纯度和定容体积计算储备液浓度。

储存条件：按照供应商证书或说明书规定执行。

保存期限：按照供应商证书或说明书规定执行。

可接受标准：溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物；配制记录完整且可追溯。

#### A.1.5.2 稳定同位素标记特征肽段工作液

——分别取适量 EK-V\*、GK-F\* 和 QK-F\* 储备液；

——根据实验需要逐级稀释；

——配制成混合内标工作液；

——调整混合内标工作液浓度，使待测样品和单点校准品中内源特征肽段与相应稳定同位素标记特征肽段的峰面积比处于方法适用范围内。

储存条件：宜分装保存，避免反复冻融。

保存期限：经实验室验证后确定。

可接受标准：溶液澄清，无明显浑浊、沉淀或絮状物；各稳定同位素标记特征肽段响应稳定。

## A.2 仪器准备

### A.2.1 质谱仪准备

三重四极杆串联质谱仪采用电喷雾电离源（ESI），正离子模式，以多反应监测模式（MRM）采集数据。

测量前应确认：

- 质量轴和半峰宽校正结果符合仪器要求；
- 离子源安装正确且状态稳定；
- 仪器真空度达到正常工作要求；
- 碰撞气、雾化气和辅助气供应正常；
- 系统中无明显残留或污染。

质谱离子源参数应根据仪器型号进行优化。参考设置项目见表 A.2。

表 A.2 质谱离子源参数设置表

参数	参考设置
离子源类型	ESI
离子模式	正离子模式
监测模式	MRM
Curtain Gas (CUR)	35
Collision Gas (CAD)	Medium
IonSpray Voltage (IS)	5500
Temperature (TEM)	500
Ion Source GAS 1 (GS1)	50
Ion Source GAS 2 (GS2)	50

C-反应蛋白特征肽段及稳定同位素标记特征肽段的参考离子对见表 A.3。

表 A.3 C-反应蛋白特征肽段及稳定同位素标记特征肽段参考 MRM 参数

肽段简称	肽段氨基酸序列 (N→C)	母离子 m/z	子离子 m/z	驻留时间 /ms	锥孔电 压/V	碰撞电 压/V	碰撞室出 口电压/V
EK	ESDTSYVSLK	564.8	347.2	100	110	114	24
EK-V*	ESDTSYV*SLK	567.9	347.2	100	110	120	24
GK	GYSIFS YATK	568.8	193.1	100	110	130	28
GK-F*	GYSIF*SYATK	573.9	193.1	100	110	130	28
QK	QDNEILIFWSK	696.9	470.3	100	110	120	33
QK-F*	QDNEILIF*WSK	702.1	470.3	100	110	120	33

注 1：\* 表示稳定同位素标记氨基酸。V\* 表示稳定同位素标记缬氨酸，F\* 表示稳定同位素标记苯丙氨酸。

注 2：表中参数为参考值。使用不同型号的质谱仪时，应根据仪器响应情况进行优化。

注 3：母离子均为双电荷离子，子离子均为单电荷碎片离子。

## A.2.2 液相系统准备

液相色谱系统参考条件如下：

——色谱柱：ACQUITY UPLC CSH C18 Column, 130Å, 1.7 μm, 2.1 mm X 100 mm；

——柱温：45 °C；

——流速：0.2 mL/min；

——进样量：20 μL；

——流动相 A：0.1%（体积分数）甲酸水溶液；

——流动相 B：0.1%（体积分数）甲酸乙腈溶液。

液相色谱参考洗脱条件见表 A.4。

表 A.4 液相色谱参考洗脱条件

Time/min	PumpA	PumpB
0.00	95	5
23.00	65	35
23.01	5	95
26.00	5	95
26.01	95	5
30.00	95	5
30.01	95	5

按照设定的液相色谱和质谱条件进行系统平衡。待系统压力稳定、基线平稳且无明显波动后，设定样品测量序列和进样次数。

### A.3 样品处理

#### A.3.1 样品中 C-反应蛋白浓度的预估

——采用免疫比浊法、酶联免疫法、化学发光法或其他适宜常规方法，初步确定样品中 C-反应蛋白的浓度；

——根据初步测量结果确定血清取样量、磁珠-抗体复合物加入量、稳定同位素标记特征肽段工作液加入量和基质匹配单点校准品的浓度水平。

不具备常规测量条件时，可先进行 LC-MS/MS 预实验。预实验时，加入适量稳定同位素标记特征肽段工作液，使内源特征肽段与相应稳定同位素标记特征肽段的峰面积比处于方法适用范围内。根据预实验结果调整待测样品取样量、单点校准品浓度水平和稳定同位素标记特征肽段工作液加入量后，再按照正式测量流程进行测量。

#### A.3.2 磁珠活化

——将商品化磁珠从 2 °C~8 °C 条件下取出，恢复至室温；

- 涡旋混匀不少于 30 s, 使磁珠充分重悬;
- 移取 125  $\mu\text{L}$  磁珠悬液至 1.5 mL 离心管中;
- 加入 250  $\mu\text{L}$  包被缓冲液, 振荡混匀;
- 将离心管置于磁力架上静置 1 min, 弃去上清液;
- 加入 100  $\mu\text{L}$  包被缓冲液, 将磁珠充分重悬。

### A.3.3 抗体偶联

- 向活化并洗涤后的磁珠中加入适量包被缓冲液;
- 按照抗体与磁珠质量比约为 40  $\mu\text{g}$ : 1 mg 的比例加入 C-反应蛋白抗体;
- 加入硫酸铵缓冲液, 使反应总体积为 1250  $\mu\text{L}$ ;
- 混匀后于 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下缓慢旋转孵育 16 h~24 h;
- 将离心管置于磁力架上静置 2 min, 弃去上清液;
- 加入 1250  $\mu\text{L}$  封闭缓冲液, 混匀后于 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 16 h~24 h;
- 将离心管置于磁力架上静置 2 min, 弃去上清液;
- 加入 1 mL 洗涤/保存缓冲液, 充分重悬磁珠;
- 将离心管置于磁力架上静置后弃去上清液;
- 重复洗涤 3 次;
- 加入洗涤/保存缓冲液重悬磁珠, 配制成适宜浓度的磁珠-抗体复合物。

**储存条件:** 2  $^{\circ}\text{C}$ ~8  $^{\circ}\text{C}$  保存。

**保存期限:** 按照产品说明书或实验室验证结果确定。

**可接受标准:** 磁珠应能够充分重悬, 无明显聚集; 磁珠-抗体复合物捕获能力应满足方法要求。

### A.3.4 C-反应蛋白纯化

- 取 0.1 mL~1.0 mL 血清样品, 置于 1.5 mL 离心管中;
- 加入适量磁珠-抗体复合物;
- 室温条件下旋转孵育 1 h, 使血清中的 C-反应蛋白与磁珠-抗体复合物充分结合;
- 将离心管置于磁力架上静置 1 min, 弃去上清液;
- 加入 1 mL TBST 缓冲液, 重悬磁珠;
- 将离心管置于磁力架上静置 1 min, 弃去上清液;
- 重复使用 TBST 缓冲液洗涤 3 次;
- 加入 1 mL TBS 缓冲液, 重悬磁珠;
- 将离心管置于磁力架上静置 1 min, 弃去上清液;
- 加入 100  $\mu\text{L}$  0.1% (体积分数) 三氟乙酸水溶液, 重悬磁珠-抗体-抗原复合物;
- 室温条件下旋转孵育 1 h, 使结合于磁珠上的 C-反应蛋白洗脱;
- 将离心管置于磁力架上静置 1 min;

——转移上清液至新的 1.5 mL 离心管中。

#### A.3.5 C-反应蛋白酶切

——将装有 C-反应蛋白洗脱液的离心管置于离心浓缩仪中；

——于 50 °C 条件下离心浓缩至干；

——加入 60 μL 8 mol/L 尿素-20 mmol/L 二硫苏糖醇工作液；

——混匀后于 37 °C 条件下孵育 1 h，使蛋白充分变性并还原；

——加入 20 μL 0.15 mol/L 碘乙酰胺溶液；

——室温避光反应 1 h，使半胱氨酸残基烷基化；

——加入 900 μL 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液，降低尿素浓度；

——加入适量胰蛋白酶，使酶与蛋白质的质量比为 1：10~1：50；

——于 37 °C 条件下孵育 1 h；

——加入适量甲酸，使反应体系酸化，终止酶切反应；

——加入适量稳定同位素标记特征肽段工作液，混匀；

——样品经滤膜过滤或离心后，取上清液转移至进样瓶中，用于 LC-MS/MS 测量。

注：稳定同位素标记特征肽段工作液的加入量和加入时点应在待测样品和单点校准品之间保持一致。

#### A.3.6 基质匹配单点校准品的处理

——取与待测样品浓度水平接近的基质匹配单点校准品；

——单点校准品的取样量宜与待测样品保持一致；

——按照 A.3.4 和 A.3.5 的步骤，与待测样品同步进行免疫富集、洗涤、洗脱、酶切和 LC-MS/MS 测量；

——稳定同位素标记特征肽段工作液的加入量和加入时点应与待测样品保持一致；

——单点校准品宜设置于待测样品序列前后，用于计算待测样品浓度并监测测量过程稳定性。



注：待测样品和单点校准品的取样量不一致时，应在结果计算中进行校正。

## A.4 样品测量

### A.4.1 样品测量顺序

样品测量宜按照下列顺序进行：

空白、质控品、基质匹配单点校准品、待测样品、基质匹配单点校准品、质控品、空白。

当样品数量较多时，应在测量序列中适当插入基质匹配单点校准品和质控品，用于监测测量过程稳定性。

同一待测样品前后分别测量基质匹配单点校准品时，可采用两次单点校准品测量结果的平均值计算待测样品浓度。

### A.4.2 样品测量次数

每个样品宜测量不少于 3 个批次，每批次不少于 2 个平行样。同一批次内，各平行样应独立完成取样、前处理和 LC-MS/MS 测量。

## A.5 数据处理

### A.5.1 峰面积比计算

分别积分 C-反应蛋白特征肽段 EK、GK 和 QK，以及相应稳定同位素标记特征肽段 EK-V\*、GK-F\* 和 QK-F\* 的色谱峰面积。

第 (i) 条特征肽段的峰面积比按照式 (A.1) 计算：

$$R_i = \frac{A_i}{A_i^*} \quad (\text{A.1})$$

式中：

$R_i$  —— 第 (i) 条特征肽段的峰面积比；

$A_i$  —— 第 (i) 条内源特征肽段的峰面积；

$A_i^*$  —— 第 (i) 条稳定同位素标记特征肽段的峰面积。

### A.5.2 单点校准品峰面积比的计算

在待测样品前后分别测量基质匹配单点校准品时，第 (i) 条特征肽段对应的



单点校准品平均峰面积比按照式（A.2）计算：

$$\frac{R_{\text{cal},i,1} + R_{\text{cal},i,2}}{2} \quad (\text{A.2})$$

式中：

$\bar{R}_{\text{cal},i}$ ——第(i)条特征肽段对应的单点校准品平均峰面积比；

$R_{\text{cal},i,1}$ ——待测样品测量前，单点校准品中第(i)条特征肽段的峰面积比；

$R_{\text{cal},i,2}$ ——待测样品测量后，单点校准品中第(i)条特征肽段的峰面积比。

仅测量一次单点校准品时，可直接使用该次测量得到的峰面积比。

### A.5.3 采用单点同位素稀释质谱法计算样品浓度

待测样品与基质匹配单点校准品采用相同取样量、相同内标加入量和相同前处理步骤时，根据第 (i) 条特征肽段计算得到的样品中 C-反应蛋白浓度按照式（A.3）计算：

$$\frac{R_{s,i}}{\bar{R}_{\text{cal},i}} \times c_{\text{cal}} \quad (\text{A.3})$$

式中：

$c_{s,i}$ ——根据第 (i) 条特征肽段计算得到的待测样品中 C-反应蛋白浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

$R_{s,i}$ ——待测样品中第 (i) 条特征肽段与相应稳定同位素标记特征肽段的峰面积比；

$\bar{R}_{\text{cal},i}$ ——基质匹配单点校准品中第 (i) 条特征肽段的平均峰面积比；

$c_{\text{cal}}$ ——基质匹配单点校准品中 C-反应蛋白的浓度，单位为毫克每升（mg/L）。

待测样品与基质匹配单点校准品的取样量不一致时，根据第(i)条特征肽段计算得到的样品中 C-反应蛋白浓度按照式（A.4）计算：

$$\frac{R_{s,i}}{R_{cal,i}} \times c_{cal} \times \frac{V_{cal}}{V_s} \quad (A.4)$$

式中：

$V_{cal}$ ——基质匹配单点校准品取样体积，单位为毫升（mL）；

$V_s$ ——待测样品取样体积，单位为毫升（mL）。

采用称量法取样时，可将式（A.4）中的体积比替换为相应的质量比，并在必要时结合血清密度进行换算。

#### A.5.4 测量结果计算

分别根据 EK、GK 和 QK 三条特征肽段计算样品中 C-反应蛋白浓度。样品中 C-反应蛋白的最终测量结果按照式（A.5）计算：

$$\frac{c_{s,EK} + c_{s,GK} + c_{s,QK}}{3} \quad (A.5)$$

式中：

$\bar{c}_s$ ——样品中 C-反应蛋白的最终测量结果，单位为毫克每升（mg/L）；

$c_{s,EK}$ ——根据 EK 肽段计算得到的 C-反应蛋白浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

$c_{s,GK}$ ——根据 GK 肽段计算得到的 C-反应蛋白浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

$c_{s,QK}$ ——根据 QK 肽段计算得到的 C-反应蛋白浓度，单位为毫克每升（mg/L）。

#### A.5.5 结果有效性判断

测量结果应符合下列要求：

- 空白样品中不得出现明显干扰峰；
- 内源特征肽段与相应稳定同位素标记特征肽段的保留时间应一致，或处于实验室规定的允许偏差范围内；
- 待测样品和基质匹配单点校准品中，内源特征肽段与相应稳定同位素标记特征肽段的峰面积比应处于方法适用范围内；
- 各平行样测量结果的变异系数应满足实验室质量控制要求；

e) EK、GK 和 QK 三条特征肽段计算结果之间的相对偏差应满足实验室规定要求；

f) 待测样品前后测量的基质匹配单点校准品峰面积比之间的相对偏差应满足实验室质量控制要求；

g) 质控品测量结果应处于实验室规定的控制范围内；

h) 若单点校准品或质控品测量结果不符合要求，应查明原因，必要时重新进行样品前处理和测量。

## A.6 操作记录

操作记录至少应包括：

a) 样品编号、样品类型、样品状态、样品取样量和样品密度；

b) 标准物质、稳定同位素标记特征肽段、抗体、磁珠和胰蛋白酶的名称、批号和有效期；

c) 基质匹配单点校准品的配制记录，包括标准储备液取样量、空白血清基质用量、配制体积、计算浓度、配制日期、保存条件和配制人员；

d) 试剂配制记录，包括称样量、定容体积、配制日期、有效期、保存条件和配制人员；

e) 磁珠活化、抗体偶联、样品纯化和酶切过程记录；

f) 液相色谱串联质谱联用系统型号、仪器状态、液相色谱条件和质谱条件；

g) 测量序列、进样次数、原始峰面积和峰面积比数据；

h) 单点校准品测量结果、数据处理过程、计算结果、质量控制结果和结果判定；

i) 异常情况、原因分析及处理措施。

## 附录 B 人血清 C-反应蛋白测量不确定度评定示例（资料性附录）

按照数学模型进行不确定度评定

### B.1 概述

#### B.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)》。

#### B.1.2 测量标准

C-反应蛋白纯度标准物质。

#### B.1.3 测量对象

某血清 C-反应蛋白标准物质。

#### B.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。

### B.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：

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

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

$C_{\text{CRP,EK}}$ ——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；

$c_{\text{cal}}$ ——校准品中 C-反应蛋白的浓度；

$c_{\text{CRP}}$ ——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。

### B.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：

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

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：

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

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：

$$u_3 = \frac{sd}{\bar{x} \times \sqrt{n}} \quad (\text{B.5})$$

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；

### B.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  $\pm 0.05$  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  $0.05/\sqrt{3}=0.0228$  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：

$$\sqrt{0.0096\%^2 + 0.0006\%^2 + 3 \times 0.2887\%^2 + 3 \times 0.0003\%^2} = 0.5\%$$

### (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  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$  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%。

## B.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：

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

### B.6 扩展不确定度评定

取包含因子  $k=2$ ，扩展不确定度为：

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

### B.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