

---

中华人民共和国国家计量技术规范  
人血清中 C-反应蛋白参考测量程序  
(LC-MS/MS 法)

实验数据分析报告

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿

# 目录

1. 仪器 .....	3
1.1 液相色谱串联质谱联用系统 .....	3
1.2 生化分析仪 .....	3
1.3 天平 .....	3
1.4 移液器 .....	3
1.5 密度计 .....	3
2. 试剂 .....	3
3. 实验条件 .....	4
3.1 质谱条件 .....	4
3.2 液相条件 .....	4
4. 方法性能评价 .....	5
4.1 精密度 .....	5
4.2 正确度 .....	5
4.3 检出限和定量限 .....	6
4.4 测量范围 .....	6
4.5 回收测量 .....	7

全国临床医学计量技术委员会征求意见稿

## 1. 仪器

### 1.1 液相色谱串联质谱联用系统

AB SCIEX 高效液相色谱串联质谱联用仪；

仪器软件：Analyst™。

### 1.2 生化分析仪

贝克曼。

### 1.3 天平

赛多利斯电子天平(分度 0.01 mg)。

### 1.4 移液器

Eppendorf 移液器，20  $\mu$ L、100 $\mu$ L、1 mL。

### 1.5 密度计

数字手持式密度计，规格 PLD-135A，精度为  $\pm 0.001\text{g/cm}^3$ 。

## 2. 试剂

表 1. 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	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	41.05	75-05-8	HPLC 级或以上
2	氯化钠	NaCl	58.44	7647-14-5	分析纯
3	氯化钾	KCl	74.55	7447-40-7	分析纯
4	Tris-base	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	121.14	77-86-1	分析纯
5	盐酸	HCl	36.46	7647-01-0	分析纯
6	吐温 20	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>10</sub>	522.67	9005-64-5	分析纯
7	尿素	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	60.06	57-13-6	分析纯
8	二硫苏糖醇	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	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	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>12</sub> P <sub>3</sub>	372.10	9002-07-7	/

### 3. 实验条件

#### 3.1 质谱条件

离子源筛选: ESI, 负离子模式

离子对选择: 母离子、子离子

表 2. 离子条件

母离子 (Da)	子离子 (Da)	驻留时间(msec)	ID	碰撞能 (CE)	碰撞电压 (DP)
564.6	347.2	7.53	EK	24	114
567.9	347.2	7.53	EK-V*	24	120
568.9	193.1	12.47	GK	28	130
573.9	193.1	12.47	GK-F*	28	130
911.2	293.1	16.02	YP	50	200
917.2	293.1	16.02	YP-V*	50	220
696.9	470.3	17.18	QK	33	120
702.1	470.3	17.18	QK-F*	33	120

表 3. 气体参数

Parameters	Value
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

#### 3.2 液相条件

柱温: 40 °C;

流速: 0.2 mL/min; 进样量: 5µL;

有机相: 乙腈 (+0.1%甲酸); 水相: 去离子水 (+0.1%甲酸);

梯度洗脱, 洗脱时间 30 min

A.3 质谱仪液相参数

序号	时间 (min)	流动相 B (%)
1	0	5
2	23	35

3	23.01	95
4	26.00	95
5	26.01	5
6	30.00	5

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。

#### 4. 方法性能评价

对项目的精密度、正确度、检出限和定量限、测量范围、回收测量、分析灵敏度、特异性等进行了评估，各指标均符合要求，具体结果如下：

##### 4.1 精密度

根据参考方法检测特点，精密度验证实验为：三个浓度水平的样品，每个浓度水平样品每批抽取 3 支进行检测，批内精密度是同一批的 3 个样品每个样品连续进样 3 次，共 9 个数据。批间精密度是重复批间实验连续检测 5 天，共 45 个数据。结果显示：各项目精密度均小于 3%，符合实验室要求。

表 4.项目精密度数据

浓度 mg/L	CV%	
	批内(n=9)	批间 (n=9×5)
1.54	2.30%	1.84%
12.37	0.71%	0.70%
51.62	1.91%	2.29%

##### 4.2 正确度

通过测量有证标准物质来评价本参考测量程序的正确度：每个样品连续检测 5 次，检测 3 天。结果显示：各次检测结果均符合要求，具体数据见表 3。

表 5. 正确度验证实验数据

样品	检测天数	靶值 (mg/L)	测量值(mg/L)	相对标准偏差%	偏倚%
GBW 09228	1	54.9 ± 2.8	55.7	1.8	1.5

	2	54.9 ± 2.8	56.0	1.5	2.0
	3	54.9 ± 2.8	54.3	1.0	-1.2
GBW 09865	1	3.3 ± 0.3	3.2	2.6	-2.4
	2	3.3 ± 0.3	3.4	2.4	3.6
	3	3.3 ± 0.3	3.5	2.0	6.1
GBW 09866	1	35.8 ± 2.8	35.3	0.9	-1.5
	2	35.8 ± 2.8	34.1	1.5	-4.6
	3	35.8 ± 2.8	36.8	1.9	2.8
GBW 09867	1	51.6 ± 4.1	51.3	1.9	-0.7
	2	51.6 ± 4.1	49.3	1.7	-4.5
	3	51.6 ± 4.1	52.8	1.8	2.4
GBW 09868	1	81.5 ± 6.5	84.7	1.1	3.9
	2	81.5 ± 6.5	82.5	0.7	1.2
	3	81.5 ± 6.5	80.4	0.8	-1.4

#### 4.3 检出限和定量限

LOD: S/N=3、LOQ: S/N=10

LOD=0.1 mg/L; LOQ=0.4 mg/mL

重复 4 次, CV≤15.0%

表 7.检测灵敏度

	信噪比(S/N)	CV, % (n=4)	浓度, mg/L
LOD	≥3	9.23	0.2
LOQ	≥10	6.42	0.5

#### 4.4 测量范围

收集临床上的 C-反应蛋白高值血清样品 (128.5 mg/L) 和低值血清样品 (0.1 mg/L), 然后按照下表中的稀释方案后配成一系列浓度点的样品, 每个浓度点样品取 3 支后按照本参考测量程序中样品处理步骤处理后进样检测, 所得结果实测值与预测值进行二元回归分析, 所得曲线为  $y = 1.025x - 0.891$  ( $R^2 = 0.999$ ), 本参考测量程序的测量范围为 (0.9-128.5) mg/L。

表 8. 本项目的测量范围结果

Sample	Dilution	Expected	Detected values (μmol/L)
--------	----------	----------	--------------------------

No.	Scheme <sup>a</sup>	values ( $\mu\text{mol/L}$ )	set 1	set 2	set 3	Average	SD	RSD%
1	9H	128.5	125.7	123.9	127.6	125.7	1.9	1.5
2	8H+L	114.3	113.9	112.4	110.5	112.3	1.7	1.5
3	7H+2L	100.1	101.7	99.4	98.8	100.0	1.5	1.5
4	6H+3L	86.0	84.7	86.1	83.2	84.7	1.5	1.7
5	5H+4L	71.8	70.9	69.5	68.8	69.7	1.1	1.5
6	4H+5L	57.6	55.3	57.4	56.5	56.4	1.1	1.9
7	3H+6L	43.4	44.2	41.9	42.6	42.9	1.2	2.7
8	2H+7L	29.3	29.7	31.2	30.1	30.3	0.8	2.6
9	1H+8L	15.1	15.9	16.5	17.1	16.5	0.6	3.6
10	9L	0.9	1.0	1.1	1.0	1.0	0.1	5.6

#### 4.5 回收测量

选一个待测样品，分成 8 份，在其中 6 份中分别加入已知的三种不同浓度的 CRP 标准品（每个浓度 2 份），另外 2 份不加。然后在每份中加入已知浓度的内标物，加入内标浓度保持内标与标准物质的质量比为 1:1。按照 LC/MS/MS 的进样液处理以上样品，进样检测。

表 9. 加样回收实验

Added (mg/L)	Expected	Detected (E3/IS)	Recovery, %	CV, % n=3
12.4	12.4	11.9	96.0%	2.51%
35.8	35.8	34.7	96.6%	0.84%
51.6	51.6	50.5	97.9%	0.58%

计量规范编写组  
2024 年 10 月 30 日