

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 413—2013

血清肌酐测定参考方法 同位素稀释液相色谱串联质谱法

Reference measurement method for serum creatinine—
Isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry

2013-06-03 发布

2013-12-01 实施



中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：卫生部临床检验中心、中国医学科学院北京协和医院、北京大学第一医院、首都医科大学附属同仁医院。

本标准主要起草人：张传宝、张天娇、申子瑜、陈文祥、赵海舰、马嵘、邱玲、王学晶、刘向祎。

血清肌酐测定参考方法

同位素稀释液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了血清肌酐测定参考方法的技术要求,包括样本采集与处理、仪器测定、数据分析和不确定度分析等内容。

本标准适用于实验室血清肌酐的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

JJF 1135 化学分析测量不确定度评定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

参考测量方法 reference measurement method

经过充分研究的测量方法,其测量值的测量不确定度适合其预期用途,用于评价测量相同量的其他测量方法的正确性和鉴定参考物质方面的用途。

3.2

溯源性 traceability

通过一条具有规定不确定度的不间断的比较链,使测量结果或测量标准的值能够与规定的参考标准(通常是与国家测量标准或国际测量标准)联系起来的特性。

3.3

互通性 commutability

临床检验参考物质或校准物质的互通性,指用不同测量过程测量该物质时,各测量过程测量结果之间的数字关系,与用这些测量过程测量实际临床样本时测量结果的数字关系的一致程度,亦即该物质理化性质与实际临床样本的接近程度。

4 测定原理和方法

本标准建立的血清肌酐参考测量方法以同位素稀释质谱法为测定原理。该法是以稳定同位素标记的肌酐为内标添加至血清中,内标与血清均匀混合后用无水乙醇沉淀蛋白质,用三氯甲烷净化上清液,用液相色谱串联质谱分离和测定血清肌酐和内标特异的离子转变。用肌酐和内标峰面积比计算血清肌酐浓度。

5 试剂

- 5.1 水(H_2O):除非有特别说明,应使用 GB/T 6682 定义的一级实验用水。
- 5.2 无水乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$):色谱纯。
- 5.3 三氯甲烷(CHCl_3):色谱纯。
- 5.4 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 5.5 乙酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$):纯度 $\geq 99\%$ 。
- 5.6 乙酸(CH_3COOH):纯度 $\geq 99\%$ 。
- 5.7 叠氮钠(NaN_3):分析纯。

6 仪器

6.1 液相色谱串联质谱联用系统

液相色谱串联质谱联用系统应满足以下要求:

- a) 高效液相色谱仪;
- b) 三重四极杆串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI),质量校正合格,各项参数指标符合正常工作的要求。

6.2 液相色谱柱

液相色谱柱应满足以下要求:

- a) 具有极性官能团嵌入或端基封尾的 C_{18} 键合色谱柱,在含水量高的流动相中具有良好的稳定性和重现性;
- b) 规格为内径 $2.0\text{ mm} \sim 2.1\text{ mm}$,粒径 $3\text{ }\mu\text{m} \sim 5\text{ }\mu\text{m}$,柱长 150 mm 。

6.3 天平

十万分之一天平(最小分度 0.01 mg),应校准合格并在强制检定周期内。

6.4 离心机

水平转头离心机。离心力应能达到 $1\,500\text{ g}$ 。

6.5 旋涡式混合器

适用于安瓿、试管等的旋涡式混合装置。

6.6 加热吹干装置

加热方式应为干热,不宜使用水浴加热的装置。

6.7 微量移液器

经校准合格的微量移液器两支,规格分别为 $1\,000\text{ }\mu\text{L}$ 和 $200\text{ }\mu\text{L}$ 。

6.8 血液混匀器

适用于安瓿、密封瓶等的血液或液体混匀装置。

6.9 安瓿或试管

规格 5 mL。试管应配有聚四氟乙烯密封塞。安瓿应配有融封装置。

7 样本

7.1 通则

本参考测量方法适用于新鲜、冰冻或冻干血清样本的肌酐浓度测定。

在处理样本时,应该严格遵从对潜在生物传染性样本处理的相关规定。使用时遵循生物安全规则,并根据规定对废物进行处理。

7.2 样本用量

样本所需用量根据肌酐的浓度确定,一般用量为 0.1 mL~0.4 mL。为保证取样量的准确性和操作可行性,最小取样量不得低于 0.1 mL。

7.3 样本的保存

新鲜血清样本若不立即测定,应于 -20°C 冰冻保存,保存时间不应超过 3 个月。长期保存应置于 -70°C 以下,可稳定保存至少 1 年。使用前应在室温下将血清融化、充分混匀。冻干样本应按照说明书描述的使用期限和条件保存,临用前按照说明复融重组,充分混匀。

8 测定系统和分析部分的准备

8.1 液相色谱串联质谱联用系统的准备

8.1.1 质谱系统部分的准备

测定前应对质谱系统进行性能检查,包括:

- 最近 3 个月内进行过质量校准并合格。若上一次质量校准时间与测定时间超过 3 个月,应重新校准至合格;
- 离子源装配电喷雾离子源,运行正常;
- 真空度达到正常工作要求的范围。所需辅助气体纯度符合要求、供应充足、气路通畅。

8.1.2 液相系统部分准备

测定前应对液相系统进行准备,包括:

- 流动相准备:纯水,乙酸铵水溶液;
- 色谱柱的平衡:用流动相(见 9.2)冲洗色谱柱约 30~40 倍柱床体积,直至色谱柱达到平衡。

8.2 校准溶液的准备

8.2.1 校准物质

8.2.1.1 纯度标准物质

应使用肌酐纯品的国际有证标准物质或国家一级标准物质为校准物质。校准物质的使用、保存及使用期限应符合标准物质研制机构提供的标准物质证书。

8.2.1.2 同位素标记物质

应使用稳定同位素标记的肌酐为内标,标记的稳定同位素个数应不低于3个。内标的使用、保存及使用期限应符合生产厂商提供的产品证书或使用说明书。

8.2.2 校准溶液的制备

本法使用包括法(bracketing method)校准。用重量法制备肌酐纯度标准物质(见8.2.1.1)的水溶液为校准物质溶液:配制浓度约为0.10 mg/g的校准物质溶液用于肌酐浓度大于200 $\mu\text{mol/L}$ 样本的测定(简称为校准物质溶液1);配制浓度约为0.01 mg/g的校准物质溶液用于肌酐浓度小于200 $\mu\text{mol/L}$ 样本的测定(简称为校准物质溶液2)。记录称量过程,准确计算所配制校准物质溶液的浓度。校准物质溶液应于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

用重量法制备稳定同位素标记肌酐(见8.2.1.2)的水溶液为内标溶液:配制浓度约为0.10 mg/g的内标溶液用于肌酐浓度大于200 $\mu\text{mol/L}$ 样本的测定(简称为内标溶液1);配制浓度约为0.01 mg/g的内标溶液用于肌酐浓度小于200 $\mu\text{mol/L}$ 样本的测定(简称为内标溶液2)。记录称量过程,准确计算所配制内标溶液的浓度。内标溶液应于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

用重量法将校准物质溶液与其对应浓度的内标溶液按照一定比例精确混合,制成高低两个浓度水平的校准溶液(见表1)。要求其中一个校准溶液(简称为低标,其中用于肌酐浓度大于200 $\mu\text{mol/L}$ 样本测定的记为低标1,用于肌酐浓度小于200 $\mu\text{mol/L}$ 样本测定的记为低标2)所含肌酐校准物质与内标的质量比控制在0.9~1之间,另一个校准溶液(简称为高标,其中用于肌酐浓度大于200 $\mu\text{mol/L}$ 样本测定的记为高标1,用于肌酐浓度小于200 $\mu\text{mol/L}$ 样本测定的记为高标2)所含肌酐校准物质与内标的质量比控制在1~1.1之间。准确记录所取校准物质溶液与内标溶液的质量,计算校准溶液中肌酐校准物质与内标质量的精确比例。

注1:可在校准物质溶液和内标溶液中加入0.1%叠氮钠作为防腐剂。

注2:样本浓度划分的依据是操作的可行性与合理性(见8.3.7),不是临床医学决定水平。

表1 校准溶液的配制

针对的样本	校准溶液	校准物质溶液	内标溶液	校准物质与内标的质量比
肌酐浓度 $>200\text{ }\mu\text{mol/L}$	高标1	校准物质溶液1	内标溶液1	1~1.1
	低标1	校准物质溶液1	内标溶液1	0.9~1
肌酐浓度 $<200\text{ }\mu\text{mol/L}$	高标2	校准物质溶液2	内标溶液2	1~1.1
	低标2	校准物质溶液2	内标溶液2	0.9~1

8.3 分析样本的处理

8.3.1 常规方法测定肌酐浓度

在分析前,使用常规方法(如碱性苦味酸法或酶法)初步测定各种分析样本中肌酐的浓度。

8.3.2 测定血清密度

在分析前,应准确测定血清样本的密度,所得结果应保留4位有效数字。

8.3.3 样本前处理流程图

样本前处理流程见图1。

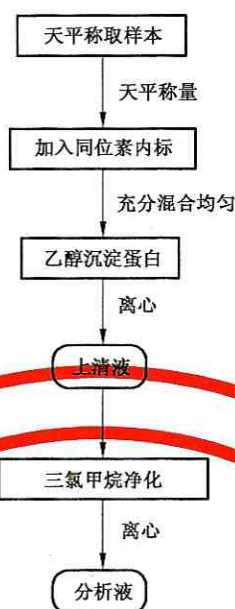


图 1 样本的处理流程图

8.3.4 分析样本与内标的混和

用微量移液器取约 0.1 mL~0.4 mL 样本,称重得其精确质量。用微量移液器取约 0.1 mL 内标溶液,称重得其精确质量,加入样本中充分混合。所取样本的量应使其所含肌酐与内标的质量比约为 1:1。肌酐浓度大于 200 $\mu\text{mol/L}$ 的样本使用浓度约为 0.10 mg/g 的内标溶液,肌酐浓度小于 200 $\mu\text{mol/L}$ 的样本使用浓度约为 0.01 mg/g 的内标溶液。

加入适量水,使其终体积约为 0.5 mL,轻轻混匀,室温下放置 1 h 平衡。

8.3.5 去除蛋白

加入 2 mL 无水乙醇,涡旋振荡 5 min 后以 1 500g 离心力离心 5 min。取 2 mL 上清液至安瓿或试管中,60 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干。

8.3.6 提取净化

残渣溶于 0.6 mL 水中,加入 0.6 mL 三氯甲烷,涡旋振荡 5 min 后以 1 500g 离心力离心 5 min。将水相移至 2 mL 色谱分析样本瓶中进行液相色谱串联质谱分析。

8.3.7 高浓度样本的处理

为保证取样量的准确性,要求最小取样量不得低于 0.1 mL。当样本肌酐浓度大于 850 $\mu\text{mol/L}$,取样量不满足要求时,可增加样本的量以到达最小取样量要求,同时相应增加内标溶液的加入量,使其中所含肌酐与内标的质量比仍保持约为 1:1。仪器分析前将样本用流动相稀释,使其保持与其他样本一致的浓度水平。

注:高值样本是根据操作的可行性与合理性而设定的,不是临床医学决定水平。

示例:样本肌酐浓度约为 1 150 $\mu\text{mol/L}$,取该血清约 0.15 mL,称重得其精确质量,加入 0.2 mL 浓度为 0.10 mg/g 的内标溶液,称重得其精确质量,混匀。按照 8.3 进行样本前处理,LC/MS/MS 测定前将样本稀释 2 倍,设定进样体积为 1 μL 。

9 液相色谱串联质谱系统(LC/MS/MS)测定

9.1 LC/MS/MS 使用前检查

测定前检查 LC/MS/MS,使其符合 8.1 的要求。

9.2 液相色谱测定条件

流动相为 5 mmol/L 乙酸铵(pH 5.5,100%水相),流速为 0.2 mL/min。肌酐浓度小于 200 $\mu\text{mol/L}$ 样本的进样体积为 10 μL ,肌酐浓度大于 200 $\mu\text{mol/L}$,样本的进样体积为 1 μL 。

9.3 串联质谱测定条件

9.3.1 数据采集模式

使用电喷雾电离源(ESI)正离子模式和多反应监测(MRM)模式分析。监测的母离子为 $[M+H]^+$,子离子为母离子失去一个羰基后的碎片离子,即监测肌酐 m/z 114 $\rightarrow$ 86 的离子转变和同位素内标相应的离子转变。

注:选用不同的同位素内标,所监测的内标离子转变将有所不同,应根据其标记同位素的数量和位置确定。

9.3.2 辅助气体、离子源条件参数的设置

调整辅助气体、离子源条件等参数的设置,使肌酐和内标色谱峰的信噪比达到最佳。

9.4 分析过程

9.4.1 分析系列

每个样本与其对应浓度水平的校准溶液(即低标和高标)同一批测定,其中肌酐浓度大于 200 $\mu\text{mol/L}$ 的样本使用低标 1 和高标 1,肌酐浓度小于 200 $\mu\text{mol/L}$ 的样本使用低标 2 和高标 2,每个样本至少重复测定 3 次。分析的顺序如下为:

第一次:低标;样本 1;样本 2;...高标;

第二次:高标;样本 1;样本 2;...低标;

第三次:低标;样本 1;样本 2;...高标;

9.4.2 原始数据的有效性检查

要求三次重复测定所得肌酐和内标的峰面积比的变异系数小于 1%。应按照 8.1 的要求进行仪器准备,保证测定数据符合要求。

10 数据处理

10.1 有效数据

符合 9.4 要求的 3 次重复测定结果的均值为样本测定的有效数据。

10.2 结果计算

使用包括法计算血清肌酐浓度,计算公式见(1):

$$c = \left[\frac{(I_{\text{Sam}} - I_{\text{Low}}) \times (W_{\text{Hi}} - W_{\text{Low}})}{(I_{\text{Hi}} - I_{\text{Low}})} + W_{\text{Low}} \right] \times \frac{Q_{\text{IS}}}{M_{\text{Ser}}} \times D_s \times P_{\text{Std}} \times \frac{1\,000}{113} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c ——血清中肌酐的浓度,单位为微摩尔每升($\mu\text{mol/L}$);

I_{Sam} ——样本中肌酐与内标的峰面积比(测定值);

I_{Low} ——低标中肌酐与内标的峰面积比(测定值);

I_{Hi} ——高标中肌酐与内标的峰面积比(测定值);

W_{Low} ——低标中肌酐与内标的含量比;

W_{Hi} ——高标中肌酐与内标的含量比;

Q_{IS} ——血清样本中内标的含量,单位为微克(μg);

M_{Ser} ——血清样本的质量,单位为克(g);

D_{S} ——血清的密度;

P_{Std} ——校准品的认定纯度(由标准物质证书提供);

113 ——肌酐的相对分子质量。

11 分析可靠性

11.1 不确定度评估

11.1.1 不确定度来源分析

本标准的血清肌酐参考测量程序以同位素稀释质谱法为测定原理,以包括法为校准方法。校准溶液的配制、样本和内标的添加使用重量法。分析测定的不确定度主要来源见表2。

表2 不确定度主要来源分析表

项目	类型
肌酐校准品的称量	B
水的称量	B
肌酐校准品的纯度	B
样本的称量	B
内标溶液的称量	B
样本的重复测定	A

11.1.2 不确定度的计算

根据 JJF 1135 和 11.1.1 中不确定度主要来源计算合成不确定度(u_c)。以包含因子 k 为 2,计算扩展不确定度(U)与相对扩展不确定(U_{rel})。

测定结果的相对扩展不确定度应 $\leq 2\%$ 。

11.2 加样回收实验

以肌酐标准物质(见 8.2.1.1)为标准品,添加至待测血清中,混合均匀。用所建测量程序测定添加标准品前后的肌酐浓度。计算方法的加样回收率。

加样回收率应在 $(100 \pm 2)\%$ 范围之间。

11.3 测定有证标准物质

测定血清肌酐的国际有证标准物质或国家一级标准物质,所得结果应在标准物质(认定值 $\pm$ 不确定

度)的范围之间。

应使用与校准物质(见 8.2.1.1)不同的有证标准物质用于正确性验证。

示例:美国国家标准和技术研究院(NIST)有证标准物质 SRM 909b 和 SRM 967b。

11.4 测定精密度

为保证测定结果的可靠性,应对样本进行重复性测定,包括批内试验和批间试验。

测定结果的批内和批间不精密度应 $\leq 2\%$ 。

12 实验室间验证

除按照 11 的要求对所使用的测定过程进行分析可靠性的研究,还应通过有计划的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。

示例:参加由国际临床化学联合会(IFCC)和德国临床化学与检验医学学会(DGKL)共同组织的环形比对试验(Ring Trials)。

13 特殊情况

使用本标准描述的参考测量方法测定制备物(如质控品和校准品)或有证标准物质的肌酐浓度,其结果不能直接用于肌酐常规测定方法的校准。应考察制备物或有证标准物质的互通性对肌酐常规测定方法的影响。

14 报告

14.1 样本来源的说明

应报告样本的类型:新鲜、冰冻或冻干。

应报告样本的保存方式和保存时间。

重组的样本应同时报告重组的过程。

14.2 使用测量程序的说明

应说明所使用测量程序的原理:同位素稀释液相色谱串联质谱法。

应报告所使用校准物质的溯源性、名称和认定纯度。

14.3 测定结果

报告血清肌酐浓度的单位为微摩尔每升($\mu\text{mol/L}$)。

应报告测定结果的不确定度。

参 考 文 献

- [1] 张天娇,赵海舰,张传宝,等. 同位素稀释液相色谱串联质谱法测定血清肌酐. 中华检验医学杂志, 2009, 32(5): 509-514
- [2] Stokes P, O'Connor G. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the high-accuracy determination of creatinine in serum. Journal of Chromatography B, 2003, 794: 125-136
- [3] 张传宝,陈忠余,马嵘,等. 血清肌酐测定基质效应的研究. 中华检验医学杂志. 2009, 32(5): 515-520
- [4] IFCC External quality assessment scheme for reference (calibration) laboratories in laboratory medicine procedures. Website: http://www.dgkl-rfb.de:81/IFCC_EQAS_ProcManual.pdf
- [5] ISO 15193. In vitro diagnostic systems—Measurement of quantities in samples of biological origin—Presentation of reference measurement procedures. ISO, Geneva, Switzerland (2002)
- [6] Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, PREAMBLE (2004). Website: <http://www.bipm.org>
- [7] Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, Working Group II, Procedure Manual. Website: <http://www.bipm.org>
-



中 华 人 民 共 和 国 卫 生
行 业 标 准
血清肌酐测定参考方法
同位素稀释液相色谱串联质谱法
WS/T 413—2013

*

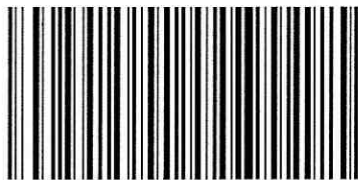
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 18 千字
2013年6月第一版 2013年6月第一次印刷

*

书号: 155066·2-25033 定价 18.00 元



WS/T 413—2013

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107