



# 中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX/ISO

## 基于同位素稀释液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS)的人血清雌二醇参考测量程序

An Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method Based  
Reference Measurement Procedure for Estradiol in Human Serum

(工作组讨论稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会（SAC/TC 136）归口。

本文件起草单位：广东省中医院

本文件主要起草人：黄宪章，张乔轩，展敏，韩丽乔，严君，王建兵，张鹏伟，林海标，柯培锋，庄俊华

# 基于同位素稀释液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）的人血清雌二醇参考测量程序

## 1. 范围

本文件描述了基于同位素稀释液相色谱串联质谱法测量人血清雌二醇的参考测量程序。

本文件适用于实验室建立和运行人血清雌二醇参考测量程序。

## 2. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

本规范引用了下列文件：

JJF 1001—2011 通用计量术语及定义

JJF 1059.1—2012 测量不确定度的评定与表示

JJF 1071—2010 国家计量校准规范编写规则

JJF 1135—2005 化学分析测量不确定度评定

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19702—2021 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

凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本规范；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. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 原始样本 primary sample

最初从一个系统中取出的一个或几个部分的集合物，旨在提供该系统的信息或作为对该系统做出决定的基础。

注：在某些情况下，所提供的信息可以适用于一个较大的系统或一组系统，此时取样系统是这些系统的组成部分。

### 3.2 实验室样本 laboratory sample

准备送到实验室或实验室接收的用于测定的原始样本或原始样本的分样本。

### 3.3 分析样本 analytical sample

自实验室样本制备的、可从中取出分析部分的样本。

注:在取出分析部分之前,分析样本可经过各种处理。

### 3.4 分析部分 analytical portion

从分析样本中取出的用于实际测定和观察的物质部分。

注:如果不需预处理,分析部分直接从原始样本或实验室样本中取出。某些情况下,需将分析部分溶解成分析溶液再上机测定。

### 3.5 分析溶液 analytical solution

将分析部分溶解在气体、液体或固体中而制备的溶液,溶解过程中可以有反应发生或无反应发生。

### 3.6 基质 matrix

一个物质系统中除被分析物之外的所有成分。

### 参考方法 reference method

在校准或表征标准物质时为提供测定结果所采用的测定方法适用于评定由同类量的其他测定方法获得的被测量值的测定正确度。

### 灵敏度 sensitivity

测定系统的示值变化除以相应的被测定值变化所得的商。

注1:测定系统的灵敏度可能与被测定的量值有关。

注2:所考虑的被测定值的变化必须大于测定系统的分辨力。

### 分析特异性 analytical specificity

测定方法只测定可测定的量的能力。

### 分析干扰 analytical interference

由一个影响量引起的系统测定误差,该影响量自身在测定系统中不产生信号,但它会引起示值的增高或降低。

**影响量 influence quantity**

被测定以外的可影响测定结果的量

**被测量 measurand**

拟测定的量。

注1：对被测定的说明要求了解的种类，以及含有该的现象、物体或物质状态的描述，包括有关成分及所涉及的化学实体。

注2：在VIM第二版和TEC 60050-300:2001中，被测定定义为受到测定的量。

注3：测定包括测定系统和实施测定的条件，它可能会改变研究中的现象、物体或物质,使被测定的量可能不同于定义的被测定。在这种情况下，适当的修正是必要的。

**检出限 detection limit, limit of detection**

由给定测定方法获得的测得值，其声称的物质成分不存在的误判概率为 $\beta$ ，声称物质成分存在的误判概率为 $\alpha$ 。

注1：国际理论和应用化学联合会(IUPAC)推荐 $\alpha$ 和 $\beta$ 的默认值为 0.05。

注2：有时使用缩写词 LOD。

注3：不要用术语“灵敏度”表示“检出限”。

**校准品 calibrator**

用于校准的测定标准。

**4. 要求****4.1 仪器要求****4.1.1 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。

**4.1.2 天平**

分度 0.01 mg 的一级天平，检定合格。

**4.1.3 容量瓶**

检定 A 级合格。

#### 4.1.4 离心机

水平转头离心机，离心力应满足 14000 g，校准通过。

#### 4.1.5 移液器

检定合格。

#### 4.1.6 密度计

密度计精度为 $\pm 0.001\text{g/cm}^3$ ，经检定合格。

### 4.2 试剂和材料要求

#### 4.2.1 实验用水

本文件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。

#### 4.2.2 试剂

人血清雌二醇参考测量程序试剂见表 1。

表 1 人血清雌二醇参考测量程序试剂列表

编号	试剂名称	分子式	分子量	CAS 号	试剂规格
1	雌二醇纯度有证标准物质	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$	272.38	50-28-2	纯度 $\geq 98\%$ 不确定度 $\leq 2.0\%$
2	17 $\beta$ -雌二醇-2-3-4- $^{13}\text{C}_3$	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$	275.41	1261254-48-1	纯度 $\geq 98\%$ , 同位素丰度 $\geq 99\%$
3	无水乙醇	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	46.07	64-17-5	HPLC 级或以上
4	乙腈	$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$	41.05	75-05-8	HPLC 级或以上
5	乙酸乙酯	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	88.11	141-78-6	HPLC 级或以上
6	正己烷	$\text{C}_6\text{H}_{14}$	86.18	110-54-3	HPLC 级或以上
7	氟化铵	$\text{NH}_4\text{F}$	37.00	12125-01-8	纯度 $\geq 99\%$
8	血清雌二醇有证标准物质	//	//	//	不确定度 $\leq 5\%$

注 1：标准物质的使用、保存及使用期限应严格按照标准物质证书中的规定和说明。

注 2：内标除使用本标准提供的 17 $\beta$ -雌二醇-2-3-4- $^{13}\text{C}_3$ 外，还可使用其他稳定同位素标记的雌二醇为内标，建议内标的质量比目标分析物至少大 3Da，标记纯度超过 98%。内标的使用、保存及使用期限应严格遵循生产厂商提供的产品证书中的规定和说明。

#### 4.2.3 液相色谱柱

液相色谱柱为极性官能团嵌入或端基封尾的 C18 色谱柱，填料为十八烷基键合硅胶。

## 5 试验方法

### 5.1 采样和样品

#### 5.1.1 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。

该参考测量程序不需考虑分析前因素对样品特性的影响。

#### 5.1.2 样品用量

样本用量可根据雌二醇的浓度在（0.2~1.0）mL之间进行调整。为保证取样的准确性、检测的灵敏度和操作的可行性，建议最小取样量不低于0.2 mL。

#### 5.1.3 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。

### 5.2 测量系统和分析准备的步骤

#### 5.2.1 液相色谱串联质谱联用系统的准备

##### （1）质谱系统部分准备

测定前应对质谱系统进行性能检查，包括：

- a)近3个月内进行过质量轴和半峰宽校正并合格。
- b)真空度达到仪器正常工作要求的范围。

##### （2）液相系统部分准备

测量前应对液相系统进行准备，包括：

- a)水相：0.2 mmol/L 氟化铵（NH<sub>4</sub>F）水溶液；有机相：乙腈。
- b)选择设定的方法进行仪器平衡，平衡时间≥30 min。

#### 5.2.2 检测系统

- （1）校准曲线的类型：可采用多点法校准曲线。
- （2）校准物质的溯源性：所采用校准物质应符合 ISO15194 规定的计量溯源性要求。
- （3）校准溶液的制备

用无水乙醇溶解并制备雌二醇校准溶液：配制浓度为 500 pg/mL (1835 pmol/L)的校准物质溶液用于雌二醇浓度>100 pg/mL (367 pmol/L)样本的测定(简称为校准溶液 1)；配制浓度为 100 pg/mL (367 pmol/L)的校准物质溶液用于雌二醇浓度≤100 pg/mL (367 pmol/L)样本的测定(简称为校准溶液 2)。记录称量过

程，准确计算所配制校准溶液的浓度。

#### (4) 内标溶液的制备

配制稳定同位素标记雌二醇的乙醇溶液为内标溶液：采用与校准溶液相同的过程，配制浓度为 500 pg/mL 的内标溶液用于雌二醇浓度 >100 pg/mL (367 pmol/L) 样品的测定（简称为内标溶液 1）；配制浓度为 100 pg/mL 的内标溶液用于雌二醇浓度 ≤100 pg/mL (367 pmol/L) 样品的测定（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。

#### (5) 校准曲线的处理

多点法校准曲线的校准溶液和内标溶液的质量比应在 0.5 - 1.5 之间。前处理方法同样品处理方法一致。

#### (6) 校准曲线要求

每批次测量均需重新配制校准曲线，且校准曲线相关系数 ≥0.995。

### 5.2.3 分析样品的处理

#### (1) 样品中雌二醇浓度的初步确定

分析前初步确定样品的大致浓度，再按照样品测量流程进行测量。

#### (2) 测定血清密度

在分析前，准确测定血清样品的密度。

#### (3) 样品前处理

在 15 mL 离心管中加入一定体积内标，使血清雌二醇与内标的质量比控制在 7.2.5 要求区间内，准确称量其质量 (MIS)，记录读数，并计算加入血清中内标的含量 (QIS)。45°C 条件下氮气吹干。加入 (0.2~1.0) mL 血清样品，称重得其精确质量 (MSer)，涡旋混合 5 min，在室温下平衡 30 min。

向上述样品中加入 1 mL 等体积混合的正己烷/乙酸乙酯溶液，涡旋 5 min 后，在振荡器上震荡混合 10 min，13000 g 离心 10 min，用移液器移取上清液至试管中，于 45°C 氮气流下吹干。用 50% 甲醇-水溶液复溶，涡旋混匀，震荡 10 min。

## 5.3 样品测定

### 5.3.1 液相色谱条件

a) 色谱柱：液相色谱柱为极性官能团嵌入或端基封尾的 C18 色谱柱，填料为十八烷基键合硅胶；

- b) 柱温：45℃；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 进样量：20 μL；
- e) 水相：0.2 mmol/L 氟化铵水溶液；有机相：乙腈。
- f) 液相色谱洗脱条件，见表 2。

使用者可根据实验需要进行适当的条件优化。

表 2 液相色谱洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.1	70	30
0.5	70	30
5.0	22	78
5.1	1	99
6.6	1	99
6.7	70	30
9.0	70	30

### 5.3.2 串联质谱测量条件

由于质谱仪器型号差别，使用者可以有效提高离子化效率为原则，对离子源类型、温度、气流等按时进行优化；以有效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优化，进而实现提高测量灵敏度的目的。选用不同的同位素内标，所监测的内标离子对将有所不同，应根据其标记同位素的数量和位置确定。

本文件使用电喷雾电离源 (ESI)，负离子模式，定量和定性离子对见表 3。

表 3 雌二醇及其内标的测量离子对

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z
雌二醇	271.1	144.9 <sup>a</sup>
	271.1	182.9 <sup>b</sup>
<sup>13</sup> C 同位素标记的雌二醇	274.1	148 <sup>a</sup>
	274.1	186 <sup>b</sup>

注：<sup>a</sup> 用于定量的离子对，<sup>b</sup> 用于定性的离子对。

### 5.3.3 分析过程

#### (1) 分析系列

雌二醇浓度 > 100 pg/mL (367 pmol/L) 样品测定用校准物质溶液 1 和内标溶液 1，雌二醇浓度 ≤ 100 pg/mL (367 pmol/L) 样品测定用校准物质溶液 2 和内标溶液 2 所配制的校准曲线溶液。

#### (2) 样品测量顺序

按照空白，校准曲线（低浓度到高浓度），质控品，样品，质控品，校准曲线（高浓度到低浓度）的顺序测量。

### （3）样品测量次数

每个样品至少测量 3 个批次，每批次至少测量 2 个平行样。

## 5.4 数据处理

### 5.4.1 校准曲线的建立

以雌二醇/内标色谱峰的峰面积比为自变量，以质量比为因变量，建立标准曲线线性回归方程：

$$y = bx + m \quad (1)$$

x ——雌二醇/内标质量比  $W$ ；

y ——雌二醇/内标色谱峰的峰面积比  $I$ ；

b ——标准曲线线性回归方程的斜率；

m ——标准曲线线性回归方程的截距。

### 5.4.2 样品结果的计算

测量血清样本可得到雌二醇/内标色谱峰的峰面积比  $I_S$ ，通过式（1）校准曲线可计算得到雌二醇/内标质量比  $W_S$ 。则样本浓度  $c$  可通过以下公式计算得到：

$$c = \frac{W_S \times Q_I}{V_S} \times \frac{1000}{M} \times P \quad (2)$$

$c$  ——实际样本中雌二醇浓度，单位为 pmol/L；

$V_S$  ——血清样本的体积；

$W_S$  ——血清样本中雌二醇/内标质量比；

$Q_I$  ——血清样本中内标的含量，单位为 pg；

$M$  ——雌二醇分子量。

式中： $V_S = m_S / D_S$ ；

$$Q_I = c_I \times m_I / D_{sol}$$

$$W_S = (I_S - m) / b$$

将其带入公式（2）：

$$c = \frac{I_S - m}{b} \times \frac{m_{IS} \times c_I}{D_{sol}} \times \frac{D_S}{m_S} \times \frac{1000}{M} \times P \quad (3)$$

$W_S$  ——血清样本中雌二醇/内标质量比；

$m_I$  ——加入内标溶液的质量；

$c_I$  ——内标溶液浓度；

$P$  ——标准物质的纯度值（由标准物质证书提供）；

$m_S$  ——血清样本的质量；

$D_S$  ——血清样本的密度；

$D_{sol}$  ——乙醇溶剂密度。

#### 5.4.3 测量结果的计算

计算每批次测量平均值、标准差、变异系数和所有批次的平均值、标准差和变异系数。

#### 5.4.4 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。

#### 5.4.5 测量结果单位间换算关系

换算关系:  $1 \text{ pg/mL} = 3.67 \text{ pmol/L}$

## 6 分析可靠性

### 6.1 总则

应依据分析灵敏度、测量不确定度、准确度、精密度、检出限、线性范围、回收测量、特异性来评估雌二醇参考测量程序的分析可靠性。本文件适用于临床常规方法的溯源和准确度评价。

### 6.2 分析灵敏度

为校准曲线的斜率。实验室可以根据自己的实验条件设定本室的分析灵敏度范围。

### 6.3 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。不确定度评定见附录 B。本参考测量程序测量结果的相对扩展不确定度小于 7.5% ( $k=2$ )。行

标的 1/4。

#### 6.4 测量准确度

测量有证标准物质的 $|En| \leq 1$ 。

#### 6.5 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。本参考测量程序重复性精密度宜小于 3.75%(1/8)；实验室内复现性精密度宜小于 5% (1/6)。

#### 6.6 检出限

与质谱仪的信号响应有关。本参考测量程序的检出限不低于 2 pg/mL (7pmol/L)。

#### 6.7 测量范围

测量范围为：12-3783 pg/mL (44-13889 pmol/L)，样品未做稀释和浓缩。

#### 6.8 回收测量

以雌二醇标准物质为标准品，添加至血清中，混合均匀。用所建立的测量程序测定添加标准品前后的雌二醇浓度，计算方法的加样回收率。加标回收率应在 (100±5) % 范围之内。

#### 6.9 分析特异性

应验证建立的参考测量程序的分析特异性，评价的雌二醇结构类似物包括但不限于 17 $\alpha$ -雌二醇。

### 7 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。

应使用与校准物质不同的有证标准物质用于正确度验证。

### 8 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。

## 9 质量保证

### 9.1 室内质量控制

每个批次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。

### 9.2 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。

## 10 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

### 人血清雌二醇参考测量标准操作规程示例

#### A.1 试剂配制

##### A.1.1 流动相的配制

###### A.1.1.1 1 mmol/L 氟化铵 (NH<sub>4</sub>F) 贮存液配制步骤

- 称量 7.41mg NH<sub>4</sub>F, 溶于 160 mL 水
- 转移到 200mL 容量瓶中定容
- 储存: 储存在-20℃
- 保质期: 可稳定 48 天
- 用后处置: 倾倒入废液收集器, 按实验室相关规定处理
- 可接受标准: 溶液澄清, 无明显浑浊

###### A.1.1.2 0.2 mmol/L NH<sub>4</sub>F 水溶液配制步骤

- 用量筒量取 1 mmol/L NH<sub>4</sub>F 贮存液 100mL
- 转移到容量瓶中定容 500 mL
- 用 0.22μm 的滤膜过滤, 用作液相色谱流动相水相, 放在水相泵接口
- 保质期: 可稳定 10 天
- 用后处置: 倾倒入废液收集器, 按实验室相关规定处理
- 可接受标准: 溶液澄清, 无明显浑浊

#### A.1.2 校准溶液的配制

##### A.1.2.1 校准溶液贮存液 (100 μg/mL) 的配制步骤

- 准确称取 20 mg 雌二醇标准品, 溶于 150 mL 乙醇
- 转移到 200 mL 容量瓶中定容
- 储存: 储存在 4-8℃, 密封以避免溶剂挥发
- 保质期: 可稳定 60 天

##### A.1.2.2 校准溶液母液 (100 ng/mL) 的配制步骤

- 用移液器量取 100 μL 校准溶液贮存液 (100 μg/mL) 于 100 mL 容量瓶中, 用乙醇定容
- 储存: 储存在 4-8℃, 密封以避免溶剂挥发
- 保质期: 可稳定 60 天

## A.1.2.3 校准溶液工作液（WS，500 pg/mL）的配制步骤

--用移液器取 500 $\mu$ L 校准溶液母液（100ng/mL）于 100mL 容量瓶中，用乙醇定容

--储存：储存在 4-8 $^{\circ}$ C，密封以避免溶剂挥发

--保质期：可稳定 60 天

## A.1.3 内标溶液的配制

A.1.3.1 内标贮存液（100  $\mu$ g/mL）的配制步骤

--用 1mL 移液器，精确移取 1 mL 乙醇（LC-MS 级）于 100  $\mu$ g 内标中

--储存：储存在-20 $^{\circ}$ C

--用封口胶密封可长期保存

## A.1.3.2 内标母液（100 ng/mL）的配制步骤

--用移液器量取 100  $\mu$ L 校准溶液贮存液（100 $\mu$ g/mL）于 100 mL 容量瓶中，用乙醇定容

--储存：储存在-20 $^{\circ}$ C，密封以避免溶剂挥发

--用封口胶密封可长期保存

## A.1.3.3 内标工作液（ISWS，500 pg/mL）的配制步骤

--用移液器取 500  $\mu$ L 校准溶液母液（100ng/mL）于 100 mL 容量瓶中，用乙醇定容

--储存：储存在-20 $^{\circ}$ C，密封以避免溶剂挥发

--用封口胶密封可长期保存

## A.2 仪器准备

## A.2.1 质谱仪准备

三重四极杆质谱仪离子源选择 ESI，负离子模式。离子对的选择及相关仪器参数设置见表 A.1，表 A.2。

A.1 质谱仪参数

Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (msec)	ID	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
271.1	144.9	100	E2 1	-110	-51	-17
271.1	182.9	100	E2 2	-110	-53	-20
274.1	148	100	E2-C3 1	-110	-53	-15
274.1	186	100	E2-C3 2	-110	-55	-18

## A.2 质谱仪气体参数

Parameters	Value
Curtain Gas (CUR)	20
Collision Gas (CAD)	7
IonSpray Voltage (IS)	-4500
Temperature (TEM)	650
Ion Source GAS 1 (GS1)	55
Ion Source GAS 2 (GS2)	30

## A.2.2 液相系统准备

色谱柱：菲罗门 Knetex 100\*2.10 mm, 2.6  $\mu$ m;

柱温：45°C;

流速：300  $\mu$ L/min;

进样量：20  $\mu$ L;

有机相：乙腈;

水相：0.2 mmol/L 氟化铵水溶液;

洗脱梯度按照表 5 设置。

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。

## A.3 校准曲线和样品处理

## A.3.1 校准曲线的处理

a. 使按照表 A.4 在 15 mL 离心管中分别加入不同体积的标准溶液工作液 (WS) 和相同体积的内标工作液 (ISWS)，使得两者的质量比 (Mass ratio) 为 0.5, 0.8, 1.0, 1.2 和 1.5。

表 A.4 校准曲线配制表

质量比	0.5	0.8	1.0	1.2	1.5
500 pg/mL WS( $\mu$ L)	100	160	200	240	300
500pg/mLISWS( $\mu$ L)	200	200	200	200	200

b. 45°C 条件下氮气吹干。

c. 分别加入 500  $\mu$ L 空白血清，斡旋混合 5 min，在室温下平衡 30 min。

d. 分别加入 1 mL 正己烷/乙酸乙酯 (50:50, v/v)，斡旋 5 min 后，在震荡器上震荡混合 10 min。

e. 13000 g 离心 10 min。

f. 用移液器取上层清液，于 45°C 条件下氮气吹干。

g. 用 200  $\mu\text{L}$  甲醇/水 (30:70, v/v) 复溶, 涡旋混匀, 震荡 10 min。

h. 将复溶的样品装入进样瓶, 然后放入样品盘。

注: 实验证明无基质效应后, c-f 步骤可省略。

### A.3.2 样品的处理

a. 对于已采用常规方法检测过的样品, 首先在 15 mL 离心管中加入与样品中雌二醇浓度相同的内标(根据样品体积计算需要加入 ISWS 的体积)。

b. 45  $^{\circ}\text{C}$  条件下氮气吹干。

c. 加入 500  $\mu\text{L}$  血清样品, 旋混合 5 min, 在室温下平衡 30 min。

d-h 步骤与校准曲线处理相同。

注: 对于盲样的检测, 需在精确测量前采用常规测量方法获得样品大概浓度, 若实验室无常规检测仪器也可采用质谱方法增加预实验, 预实验于步骤 a 加入一定体积的 ISWS (通常 200  $\mu\text{L}$ ), 使样品中雌二醇与内标的质量比 (Mass ratio) 在 0.3-4.5 区间内, 然后采用 b-h 的样品前处理步骤进行样品处理并检测。按照所检测的结果对内标浓度进行调整, 使其与样品中雌二醇浓度相同, 再按照样品检测流程进行重新检测。

## A.4 数据处理

### A.4.1 工作曲线的建立

选择两次检测校准溶液与内标溶液质量比: 0.5, 0.8, 1.0, 1.2 和 1.5, 及其对应的色谱峰的峰面积比建立工作曲线, 其中以雌二醇/内标色谱峰的峰面积比为自变量, 以质量比为因变量。在 Excel 中分别用 SLOPE (斜率) 和 INTERCEPT (截距) 公式计算标准曲线线性回归拟合方程的斜率  $b$  和截距  $m$ , 并建工作曲线方程:

$$y = bx + m$$

$x$ ——雌二醇/内标质量比  $W$ ;

$y$ ——雌二醇/内标色谱峰的峰面积比  $I$ ;

$b$ ——校准曲线线性回归方程的斜率;

$m$ ——校准曲线线性回归方程的截距。

以校准溶液的雌二醇/内标色谱峰的峰面积比为自变量, 以质量比为因变量。在 Excel 中用 CORREL 公式计算校准溶液峰面积比与质量比的相关系数  $r$ , 若  $r > 0.995$  为合格, 若不符合要求则需重新建立标准曲线。

#### A.4.2 样品浓度计算

样本测量可得到雌二醇/内标色谱峰的峰面积比，通过校准曲线计算可得到雌二醇/内标质量比。则样本浓度可通过 9.2 样品结果的计算得到。

## 附录 B

## 人血清雌二醇测量不确定度评定示例

## 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 《人血清中雌二醇测量参考方法（LC-MS/MS 法）》。

## B.1.2 测量标准

雌二醇纯度标准物质。

## B.1.3 测量对象

国际参考实验室能力比对计划样品（2018 年 RELA-A）

## B.1.4 测量过程

雌二醇纯度标准物质（以下简称标准物质）配制系列浓度工作标准液，每批测量前后分别进行，2018 年 RELA-A 样品 5 瓶按要求复溶后使用，3 天共测量 15 次，取其平均值计算。

## B.2 数学模型

$$y = bx + m \quad (1)$$

$x$ ——雌二醇/内标质量比  $W$ ；

$y$ ——雌二醇/内标色谱峰的峰面积比  $I$ ；

$b$ ——标准曲线线性回归方程的斜率；

$m$ ——标准曲线线性回归方程的截距。

检测血清样品可得到雌二醇/内标色谱峰的峰面积比  $I_S$ ，通过式（1）校准曲线可计算得到雌二醇/内标质量比  $W_S$ 。则样品浓度  $c$  可通过以下公式计算得到：

$$c = \frac{W_S \times Q_I}{V_S} \times \frac{1000}{M} \times P \quad (2)$$

$c$  ——实际样品中雌二醇浓度，单位为 pmol/L；

$V_S$ ——血清样品的体积；

$W_S$ ——血清样品中雌二醇/内标质量比；

$Q_I$ ——血清样品中内标的含量，单位为 pg；

$M$  ——雌二醇分子量。

式中： $V_S=m_S/D_S$ ;

$$Q_I=c_I \times m_I/D_{sol};$$

$$W_S=(I_S-m)/b;$$

将其带入公式 (2):

$$c = \frac{I_S - m}{b} \times \frac{m_{IS} \times c_I}{D_{sol}} \times \frac{D_S}{m_S} \times \frac{1000}{M} \times P \quad (3)$$

$c$  ——实际样品中雌二醇浓度，单位为 pmol/L;

$W_S$  ——血清样品中雌二醇/内标质量比;

$I_S$  ——样品中雌二醇/内标色谱峰的峰面积比;

$m_I$  ——加入内标溶液的质量;

$c_I$  ——内标溶液浓度;

$D_S$  ——血清样品的密度;

$P$  ——标准物质的纯度值 (由标准物质证书提供);

$m_S$  ——血清样品的质量;

$M$  ——雌二醇分子量;

$D_{sol}$  ——乙醇溶剂密度。

### B.3 不确定度分量列表

序号	分量	次分量	分量名称	量值	单位
1	$W_S=(I_S-m)/b$ ;		血清样品中雌二醇/内标质量比	1.31	/
2		$B$	斜率	0.7143	/
3		$M$	截距	-0.0478	/
4		$I_S$	样品中雌二醇/内标色谱峰的峰面积比	0.838	/
6	$Q_I=c_I \times m_I/D_{sol}$		血清样品中内标的含量		pg
7		$c_I$	内标溶液浓度	500	pg/mL
8		$m_I$	加入内标溶液的质量	0.0792	g
9		$D_{sol}$	乙醇溶剂密度	0.78775	g/cm <sup>3</sup>
10	$V_S=m_S/D_S$		血清样品的体积	200	μL

11		$m_s$	血清样品的质量	0.2033	g
12		$D_s$	血清样品的密度	1.024	$\text{g/cm}^3$
13	$P$		标准物质纯度	98.4	%
14	$M$		雌二醇分子量	272.38	/

#### B.4 不确定度分量的计算

##### B.4.1 计算 $W_s = (I_s - m)/b$ 的不确定度分量 $u_1$

由于该分量用于计算血清样品中雌二醇/内标质量比  $W_s$ ，使用校准曲线，通过样品中雌二醇/内标色谱峰的峰面积比计算得到。因此，其主要不确定度评定需要考虑标准原液制备、工作标准液制备、标准物质纯度、线性拟合、测量变异等，该部分不确定度表示为  $u_1(a)$ 。

另外，样品中雌二醇/内标色谱峰的峰面积比  $I_s$  是通过 3 份样品进行重复测量得到，不同瓶的样品间存在差异。将 3 瓶样品分别进行测量，每瓶样品测量 5 次，对 RELA-A 样品进行 15 次独立测量。因此还应考虑  $I_s$  重复测量引入的不确定度，该部分不确定度表示为  $u_1(b)$ 。

##### B.4.1.1 标准曲线测量不确定度分量的量化 $u_1(a)$

###### a. 天平, $u_{s1}$

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  $= 0.09/\sqrt{3} = 0.02887$  mg，校准品称量过程中，称量雌二醇标准物质 20.00 mg，则相对标准不确定度： $u_{s1} = (0.02887/20) \times 100\% = 0.14\%$ 。

###### b. 标准物质纯度, $u_{s2}$

单独评估标准物质纯度引入的标准不确定度，因此本部分不进行重复评定。

###### c. 容量瓶, $u_{s3}$

容量瓶的不确定度分量主要来自于校准，采用容量瓶检定证书中提供的最大允差计算。

200 mL 容量瓶 A 级允差为  $\pm 0.15$  mL，按三角分布计算，包含因子  $k=\sqrt{6}$ 。200mL 容量瓶的不确定度  $= 0.15/\sqrt{6} = 0.06124$  mL，其相对不确定度为： $u_{200vf} = (0.06124/200) \times 100\% = 0.03\%$ 。

100 mL 容量瓶 A 级允差为  $\pm 0.10$  mL，按三角分布计算，包含因子  $k=\sqrt{6}$ 。100mL 容量瓶的不确定度  $= 0.10/\sqrt{6} = 0.04082$  mL，其相对不确定度为： $u_{100vf} = (0.04082/100) \times 100\% = 0.04\%$ 。

标准溶液制备的过程中，使用了 2 次 100 mL 容量瓶，因此，对上述容量瓶引入的不确定度进行合成

$$u_{s3} = \sqrt{(u_{200vf})^2 + (u_{100vf})^2 + (u_{100vf})^2} = \sqrt{(0.03\%)^2 + (0.04\%)^2 + (0.04\%)^2} = 0.06\%$$

d. 移液器,  $u_{s4}$ 

100  $\mu\text{L}$  移液器引入的标准不确定度：校准证书显示，100  $\mu\text{L}$  移液器的相对扩展不确定度为 0.80% ( $k=2$ )，100  $\mu\text{L}$  移液器引入的相对标准不确定度为  $u_{100p} = 0.80\%/2 = 0.40\%$ ；

1000  $\mu\text{L}$  移液器引入的标准不确定度：校准证书显示，1000  $\mu\text{L}$  移液器的相对扩展不确定度为 0.30% ( $k=2$ )，1000  $\mu\text{L}$  移液器引入的相对标准不确定度为  $u_{1000p} = 0.30\%/2 = 0.15\%$ 。

$$u_{s4} = \sqrt{(u_{100p})^2 + (u_{1000p})^2} = \sqrt{(0.40\%)^2 + (0.15\%)^2} = 0.43\%$$

## e. 线性拟合

标准曲线： $y = bx + m$

标准曲线的数据处理采用最小二乘法计算（线性拟合），其测量不确定度按《QUAM》理论的线性拟合公式计算。

$$u_{line} = \frac{s}{b} \left( \frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x}_s - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \right)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

式中：

$p$ —每个浓度测量的次数

$n$ —总实验次数

$x_i$ —每次测量的质量比值

$\bar{x}$ —理论质量比均值

$\bar{x}_s$ —标准曲线预测值

$b$ —拟合曲线斜率

$S^2$ —实测峰面积比值与理论峰面积比值误差

$y_i$ —每次实验的测量峰面积比

$\hat{y}_i$ —每次实验理论峰面积比

5 个点的标准曲线，每个点重复检测 3 次 ( $p=3$ )，共 15 次检测，则  $n=15$ ，则  $\bar{x} = 1.0$ 。

标准曲线为： $y = 0.7143x - 0.0478$ ， $R^2 = 0.9992$

$x$	雌二醇/内标质量比	<b>0.5</b>	<b>0.8</b>	<b>1</b>	<b>1.2</b>	<b>1.5</b>
$y$	雌二醇/内标色谱峰的峰面积比	0.410872	0.675182	0.865067	1.056633	1.341625
		0.412353	0.688445	0.864937	1.048206	1.324372

		0.407699	0.691362	0.886081	1.045993	1.335212
$\hat{y}_i$	每次实验理论峰面积比	0.410308	0.684997	0.872028	1.050277	1.333736

经计算  $s = 0.007187$

s	b	n	p	$\bar{x}_s$	$\bar{x}$
0.007187	0.7143	15	3	1.24	1.0

$$u_{line} = \frac{0.007187}{0.7143} \left( \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{15} + \frac{(\bar{x}_s - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \right) = 0.006622$$

样品中 x (质量比) 的均值为 1.31,

$$u_{line}' = \frac{0.006622}{1.31} \times 100\% = 0.534\%$$

#### f. 重复测量

计算标准曲线中每个浓度点多次测量结果的标准偏差, 为降低风险, 以最大的标准偏差作为标准曲线精密标准不确定度分量。经计算  $u_{rep} = 0.862\%$ 。

由分量校准引入的不确定度  $u_1'(a)$

$$u_1'(a) = \sqrt{u_{s1}^2 + u_{s3}^2 + u_{s4}^2 + u_{line}^2 + u_{rep}^2} = 1.110\%$$

#### B. 4.1.2 $I_s$ 重复测量引入的不确定度 $u_1(b)$

本次评定使用的是 3 瓶冻干粉样品, 不同瓶的样品间存在差异。将 3 瓶样品分别进行测量, 每瓶样品测量 5 次, 对 RELA-A 样品进行 15 次独立测量, 数据如下 (单位: pmol/L):

样品 测量序号	样品 1	样品 2	样品 3
1	1235	1189	1216
2	1230	1161	1199
3	1231	1209	1173
4	1207	1203	1212
5	1179	1207	1239
均值	1216	1194	1208
标准差	23.7	32.7	24.2

实际测量时, 样品 1 取 5 次测量平均值计算, 故  $u_1(I_1) = \frac{s}{\sqrt{5}} = \frac{23.7}{\sqrt{5}} = 10.582$ ,

故其相对标准不确定度为  $u_1'(I_1) = \frac{u_1(I_1)}{1216} \times 100\% = \frac{10.582}{1216} \times 100\% = 0.869\%$ ;

样品 2 取 5 次测量平均值计算, 故  $u_1(I_2) = \frac{s}{\sqrt{5}} = \frac{32.7}{\sqrt{5}} = 14.603$ ,

故其相对标准不确定度为  $u_1'(I_2) = \frac{u_1(I_2)}{1194} \times 100\% = \frac{14.603}{1194} \times 100\% = 1.223\%$ ;

样品 3 取 5 次测量平均值计算，故  $u_1(I_3) = \frac{s}{\sqrt{5}} = \frac{24.2}{\sqrt{5}} = 10.841$ ，

故其相对标准不确定度为  $u'_1(I_3) = \frac{u_1(I_3)}{1208} \times 100\% = \frac{10.841}{1208} \times 100\% = 0.897\%$ 。

$$u'_1(b) = \sqrt{(0.869\%)^2 + (0.750\%)^2 + (0.897\%)^2} = 1.458\%$$

则， $W_S = (I_S - m)/b$  的不确定度分量  $u_1$ ：

$$u'_1 = \sqrt{(u'_1(a))^2 + (u'_1(b))^2} = \sqrt{(1.110\%)^2 + (1.458\%)^2} = 1.833\%$$

#### B. 4.1.3 计算 $Q_I = c_I \times m_I / D_{sol}$ 的不确定度分量 $u_2$

a. 式中内标溶液浓度  $c_I$  为给定值，不引入不确定度， $u'_2(a) = 0$ ；

b.  $m_I$  为样品检测过程中，使用天平称量加入内标的质量，计算使用天平称量内标引入的不确定度：天平的允差为  $\pm 0.05$  mg，按矩形分布，包含因子取  $k = \sqrt{3}$ ，天平引入的不确定度  $= 0.05 / \sqrt{3} = 0.02887$  mg，天平称取  $0.0792$  g 的内标溶液，则相对标准不确定度： $(0.02887 / 0.0792) \times 100\% = 0.364\%$ 。

c.  $D_{sol}$  为乙醇密度，测定时所使用手持式密度计经校准提供的相对扩展不确定度为  $0.25\%$  ( $k=2$ )，则手持式密度计引入的相对标准不确定度为： $0.25\% / 2 = 0.125\%$ 。

#### B. 4.1.4 计算 $V_S = m_S / D_S$ 的不确定度分量 $u_3$

a.  $m_S$  为检测过程中称取血清样品的质量，该过程还涉及冻干粉样品复溶，因此还应考虑样品复溶过程的不确定度  $u_3(a)$ 。

(1) 复溶时由电子天平引入的标准不确定度  $u_3(a_1)$

样品复溶过程中，天平引入的不确定度：天平的允差为  $\pm 0.05$  mg，按矩形分布，包含因子取  $k = \sqrt{3}$ ，天平引入的不确定度  $= 0.05 / \sqrt{3} = 0.02887$  mg，加入  $2$  mL 水复溶，则相对标准不确定度： $u'_3(a) = (0.02887 / 2.000) \times 100\% = 0.0014\%$ 。

(2) 复溶温度变化导致水密度变化引入的标准不确定度  $u_3(a_2)$

复溶开始时温度为  $20.035^\circ\text{C}$ ，复溶结束时温度为  $20.266^\circ\text{C}$ ， $\Delta t = 0.231$ ，水的体积膨胀系数为  $2.1 \times 10^{-4}$  mL/ $^\circ\text{C}$ ，故区间半宽  $a = \Delta t \times 2.1 \times 10^{-4}$  mL  $= 0.231 \times 2.1 \times 10^{-4}$  mL，按矩形分布，包含因子取  $k = \sqrt{3}$ ， $V = 2.00$  mL，则复溶温度变化导致水密度变化引入的标准不确定度分量  $u_3(a_2)$  为：

$$u_3(a_2) = \frac{a}{k} = \frac{0.231 \times 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0.28 \times 10^{-4} \text{ (mL)}$$

其相对标准不确定度分量为：

$$u'_3(a_2) = \frac{0.28 \times 10^{-4}}{2} \times 100\% = 0.0014\%$$

(4) 样品检测过程中使用加入样品引入的不确定度  $u_3(a_3)$

样品检测过程中，天平称量样品引入的不确定度：天平的允差为 $\pm 0.05$  mg，按矩形分布，包含因子取 $k=\sqrt{3}$ ，天平引入的不确定度 $=0.05/\sqrt{3}=0.02887$  mg，天平称取样品为 $0.2033$ g，则相对标准不确定度： $(0.02887/203.3)\times 100\%=0.014\%$ 。

则 $u'_3(a)$

$$u'_3(a) = \sqrt{(u'_3(a_1))^2 + (u'_3(a_2))^2 + (u'_3(a_3))^2}$$

$$= \sqrt{(0.0014\%)^2 + (0.0014\%)^2 + (0.014\%)^2} = 0.014\%$$

b.  $D_S$ 为血清密度，测定时所使用手持式密度计经校准提供的相对扩展不确定度为 $0.25\%$  ( $k=2$ )，则手持式密度计引入的相对标准不确定度为： $u_3(b)=0.25\%/2=0.125\%$ 。

#### B. 4.1.5 计算 $P$ 的不确定度分量 $u_4$

雌二醇标准物质纯度  $P$  示值为  $98.4\%$ ，扩展不确定度为  $U = 0.3\%$  ( $k=2$ )，故其区间半宽  $a = U = 0.30\%$ ，则校准使用标准物质引入的相对标准不确定度分量为：

$$u_1(S) = \frac{a}{k} = \frac{0.3\%}{2} = 0.15\%$$

### B. 5 合成标准不确定度评定

#### B. 5.1 标准不确定度分量一览表

序号	分量	次分量	分量名称	量值	单位	相对标准不确定度
1	$W_S = (I_S - m)/b$		血清样品中雌二醇/内标质量比	1.31	/	1.833%
2		$b$	斜率	0.7143	/	1.110%
3		$m$	截距	-0.0478	/	
4		$I_S$	样品中雌二醇/内标色谱峰的峰面积比	0.838	/	1.458%
6	$Q_I = c_I \times m_I / D_{sol}$		血清样品中内标的含量		pg	0.126%
7		$c_I$	内标溶液浓度	500	pg/mL	
8		$m_I$	加入内标溶液的质量	0.0792	g	0.036%
9		$D_{sol}$	乙醇溶剂密度	0.78775	g/cm <sup>3</sup>	0.125%
10	$V_S = m_S / D_S$		血清样品的体积	200	μL	0.126%
11		$m_S$	血清样品的质量	0.2033	g	0.014%

12		$D_s$	血清样品的密度	1.024	$\text{g}/\text{cm}^3$	0.125%
13	$P$		标准物质纯度	98.4	%	0.15%
14	$M$		雌二醇分子量	272.38	/	
	合成					1.847%

### B.5.2 合成标准不确定度的计算

合成标准不确定度为

$$u_c = u'_c \times \bar{x} = 1.847\% \times 1206 = 22.3 \text{ pmol/L}$$

### B.6 扩展不确定度的评定

取包含因子  $k=2$ ，扩展不确定度为：

$$U = k \times u_c = 2 \times 22.3 = 44.6 \text{ pmol/L}$$

### B.7 测量结果不确定度报告与表示

应用人血清中雌二醇参考方法对冻干粉样品进行测量时，其测量结果为： $1206 \pm 44.6 \text{ pmol/L}$  ( $k=2$ )。