

## 中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 412—2013

### 血清甘油三酯测定参考方法 同位素稀释气相色谱质谱法

Reference measurement method for serum triglycerides—  
Isotope dilution gas chromatography 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：胡翠华、张传宝、马蝶、陈文祥、申子瑜、邱玲、王学晶、刘向祎。



# 血清甘油三酯测定参考方法

## 同位素稀释气相色谱质谱法

### 1 范围

本标准规定了血清甘油三酯测定参考方法的同位素稀释气相色谱-质谱法的技术要求,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甘油三酯的测定。

### 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

### 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** *referrance 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

**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 方法原理

本标准建立的血清甘油三酯参考测量方法以同位素稀释气相色谱质谱法为测量原理。方法是以稳定同位素 3 个<sup>13</sup>C 标记的甘油为内标添加至血清中,氢氧化钠乙醇溶液水解血清甘油酯为游离甘油,用丙酮沉淀蛋白,使用 *N*-(特丁基二甲基硅烷基)甲基三氟乙酰胺(MTBSTFA) 衍生甘油为特丁基二甲基硅烷醚(tBDMS),气相色谱质谱在电子轰击(EI) 电离模式下选择检测甘油和内标的特征离子,用甘油和内标峰面积比计算血清甘油三酯浓度。

### 5 试剂

所用试剂如下:

a) 水(H<sub>2</sub>O):除非有特别说明,应使用 GB/T 6682 定义的一级实验用水;

- b) *N*-(特丁基二甲基硅烷基)甲基三氟乙酰胺(MTBSTFA):衍生级;
- c) 无水乙醇:色谱纯;
- d) 氢氧化钠:分析纯;
- e) 盐酸:分析纯;
- f) 四氯化碳:分析纯;
- g) 丙酮:色谱纯;
- h) 乙腈:色谱纯。

## 6 仪器

### 6.1 取样装置

#### 6.1.1 自动稀释分配器

稀释注射器 2 500 mL,取样注射器 250 mL。在 23 °C 时,去离子水取样体积达到了该仪器说明书标示的 30%~50%,对应的准确度为±1.0%,不精密度≤0.2%。

#### 6.1.2 微量移液器

经校准合格的微量移液器,规格分别为 1 000  $\mu$ L、200  $\mu$ L 和 50  $\mu$ L。

### 6.2 前处理装置

6.2.1 血液混匀器:具有调速功能。

6.2.2 恒温水浴箱:可在 30 °C~60 °C 温度区间保持恒温。

6.2.3 离心机:具有水平转头,离心力能达到 1 500 *g*。

6.2.4 旋涡式混合器:具有调速功能。

6.2.5 真空干燥箱:可在 30 °C~200 °C 温度区间保持恒温 and 干燥。

6.2.6 氮吹仪:具有 30 °C~100 °C 温度区间加热功能的干性氮吹仪。

### 6.3 分析仪器

#### 6.3.1 气相色谱仪

6.3.1.1 进样口:具有不分流进样功能。

6.3.1.2 柱温箱:具有程序升温功能。可在 50 °C~300 °C 温度区间内进行调节。

6.3.1.3 毛细管色谱柱:内涂层为 100% 二甲基聚硅氧烷,柱长 30 m,内径 0.25 mm,涂层内膜 0.25  $\mu$ m。

6.3.1.4 载气:高纯氮气,99.999%。

#### 6.3.2 质谱仪

6.3.2.1 具有气质联机接口。

6.3.2.2 具有电子轰击离子源。

6.3.2.3 具有选择离子检测功能,并使用自动调谐模式进行质量校正。

6.3.2.4 数据处理系统:能够实时采集、记录及存储质谱数据。

## 7 样本

### 7.1 分析样本

包括校准物质、正常人或病人血清、质控血清(冰冻或冻干)。样本所需用量为 0.1 mL。

## 7.2 样本的保存

人血清样本若不立即测定,则应于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,长期保存应置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。冰冻样本应在室温下融化、充分混匀后使用。冻干样本应按照相关说明书所描述的使用期限和条件保存,临用前按照说明复溶重组,充分混匀。

## 8 校准

### 8.1 标准物质

使用有证甘油标准物质,标准物质的使用、保存及有效期限应符合有证标准物质的说明。

### 8.2 内标

使用3个 $^{13}\text{C}$ 标记的甘油,标示同位素丰度大于99%。

### 8.3 甘油校准工作液的制备

分别准确吸取一定量的甘油标准物质,用移液管准确量取5 mL,10 mL,20 mL,30 mL和40 mL于5个100 mL容量瓶,用去离子水稀释定容,配制成浓度为50 mg/dL,100 mg/dL,200 mg/dL,300 mg/dL,400 mg/dL的校准工作溶液。熔封于1 mL安瓿,每支为0.5 mL。置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

### 8.4 甘油内标工作液的制备

准确吸取内标原液,置于50 mL容量瓶中,用去离子水稀释定容,配制成浓度为400 mg/dL的工作液,置于 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

## 9 样本前处理

### 9.1 通则

本参考测量方法用于新鲜、冰冻或冻干血清样本的甘油浓度测定。

在处理样本时,应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。

### 9.2 取样和加内标及水解甘油酯

用稀释器的稀释功能取样同时加入内标和水解液。内标混匀在氢氧化钠乙醇溶液中,用作冲洗液。样本体积为0.1 mL,冲洗液体积1 mL,冲入5 mL安瓿中。漩涡混匀后,置 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴温育30 min。

### 9.3 中和及净化

加入0.8 mL盐酸,混匀。再加入1.5 mL四氯化碳,混匀,4 000 r/min离心10 min。

### 9.4 沉淀蛋白

取0.2 mL上清液于2 mL安瓿中,加入2 mL丙酮,漩涡振荡5 min,4 000 r/min离心25 min。

### 9.5 衍生化

取上清液0.8 mL至2 mL样本瓶中, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干。残渣加入0.5 mL MTBSTFA和

0.5 mL 乙腈,密封混匀,60 °C 下 1 h。反应完毕后冷却至室温,用于进行气相色谱-质谱(GC/MS)分析。

## 10 仪器分析

### 10.1 仪器条件设定

#### 10.1.1 气相色谱条件设定

选择适当操作条件来分析甘油和甘油-内标衍生产物,推荐条件为:

- a) 进样方式:不分流进样 1  $\mu$ L;
- b) 进样口温度:250 °C;
- c) 载气流速:1.0 mL/min,省气模式持续恒流;
- d) 气质接口温度:255 °C;
- e) 毛细管色谱柱:固定相 100%二甲基聚硅氧烷,柱长 30 m,内径 0.25 mm,膜厚 0.25  $\mu$ m;
- f) 梯度升温:初始温度 110 °C,以 50 °C/min 的速度升温至 250 °C,停留 1.6 min。

#### 10.1.2 质谱条件设定

10.1.2.1 使用全扫描(SCAN)方式进行定性分析,用于谱库检索,确认待测物性质。

10.1.2.2 使用选择离子检测(SIM)方式进行定量分析,检测待测物的特征离子峰。

10.1.2.3 在高分辨率状态下,调整溶剂延时和驻留时间的设置,使色谱峰分离达到理想效果。

10.1.2.4 仪器调谐,仪器分析开始前需选用自动调谐方式进行调谐,校正质量 69、219、502 离子峰的质荷比,进行调谐评价,通过后保存调谐文件。

### 10.2 SIM 检测过程

10.2.1 按 10.1 要求设置气相色谱-质谱联用仪条件。

10.2.2 分析系列:每个样本与校准品同一批测定,每个样本应重复 3 次进样测定。

10.2.3 原始数据的有效性检查:在样本 SIM 分析过程时,观察检测到的峰型,确保峰型正常、仪器运行可靠。要求 3 次重复进样测定所得甘油和内标的峰面积比的变异系数小于 1%。

### 10.3 样本测定

将分析样本按照 10.1~10.2 所述的程序进行测定,得到监测离子对的色谱图。

## 11 数据处理

### 11.1 有效数据

符合 10.2.3 要求的 3 次重复进样测定结果的均值为样本测定的有效数据。

### 11.2 原始资料的处理

用气质联用仪的数据分析软件对 SIM 检测的色谱图进行积分处理,提取监测离子对,在积分器中选择化学积分模式,设定好积分参数,对样本与内标的离子丰度值进行峰面积积分。

### 11.3 定量计算

#### 11.3.1 采用内标法

计算样本与内标的峰面积比值,用两者的峰面积比进行定量计算。



### 11.3.2 标准曲线的构建

以峰面积比值为自变量,标示浓度值为因变量得出直线回归方程,用公式(1)表示为:

$$Y = aX + b \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$X$  ——分析样本中待测化合物的量;

$Y$  ——样本与内标的峰面积比;

$a$  ——截距;

$b$  ——斜率。

测量所需的最小校准点数是 5 个,标准溶液浓度值和峰面积比值的相关系数大于 0.999 9。

### 11.3.3 样本浓度的计算和结果换算

将样本峰面积比值代入公式(1),计算得样本浓度。样本质量浓度单位为 mmol/L(毫摩尔/升),如果需要换算成 mg/dL(毫克/分升)的情况,用公式(2)计算:

$$x_0 = x \times 885.4/10 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$x_0$  ——试样中甘油的含量,单位为毫克每分升(mg/dL);

$x$  ——试样中甘油的含量,单位为毫摩尔每升(m mol/L);

885.4——甘油的摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol)。

## 11.4 不确定度评估

### 11.4.1 不确定度来源分析

本标准建立的血清甘油三酯参考方法是以同位素稀释气相色谱质谱法为测量原理,以标准曲线法为校准方法。校准溶液的配制,样本和内标的加入使用稀释器。分析测定的不确定度来源包括 A 类和 B 类不确定度。A 类不确定度为样本的重复测定、标准曲线法中一元二次回归方程的偏差。B 类不确定度为甘油校准品的配制、甘油校准品的纯度。

### 11.4.2 合成不确定度( $U_c$ )的计算

根据 11.4.1 中不确定度来源计算合成不确定度。

### 11.4.3 扩展不确定( $U$ )的计算

扩展不确定度( $U$ )为包含因子乘以合成不确定度,用公式(3)表示为:

$$U = kU_c \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$k$  ——包含因子,在 95%的可置信水平取  $k=2$ ;

$U_c$  ——合成不确定度。

## 12 测量准确度

实验室内验证所建测量过程的准确性,可以通过如下实验说明:测定有证参考物质,所得结果应在不超过认定值的不确定度范围。

测量过程的批内、批间和总不精密度应小于 2 %。

### 13 特殊情况

使用本标准描述的参考测量程序测定制备物或有证标准物质的血清甘油三酯浓度,其结果不能直接用于其他常规甘油三酯测定方法的校准。应考虑制备物或有证标准物质的互通性对常规甘油三酯测定方法的影响。

### 14 报告

#### 14.1 样本来源的说明

应报告样本的类型:血清、制备物(质控品或校准品)或有证标准物质。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为同位素稀释气相色谱质谱法。报告所使用的校准物质的名称和认定纯度。

#### 14.3 测量结果

应报告血清甘油三酯浓度的单位为 mol/L。应报告测量结果的不确定度。

## 参 考 文 献

- [1] WS/T 254—2005 体外诊断医学器具 生物源样品中量的测量 参考测量程序的表达
- [2] Ellerbe P, Sniegowski LT, Welch MJ. Isotope dilution mass spectrometry as a candidate definitive method for determining total glycerides and triglycerides in serum. *Clin Chem*, 1995, 41(3): 397-404
- [3] Siekamann L, Schönfelder A, Siekamann A. Isotope dilution-mass spectrometry of total glycerol in human serum - a reference method in clinical chemistry. *Fresenius Z Anal Chem*, 1986, 324:280-281
- [4] Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stockl D, et al. Determination of reference method values by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry: a five years experience of two European Reference Laboratories. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1996, 34:853-860
- [5] 陈文祥,王抒,董军,等. 高效液相色谱测定血清甘油三酯的研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2000, 23(2):87-90
- [6] Li HX, Dong J, Chen WX, et al. Measurement of serum total glycerides and free glycerol by high-performance liquid chromatography. *J Lipid Res*, 2006, 47:2089-2096
- [7] Schwenk WF, Berg PJ, Beaufreere B, et al. Use of t-butyltrimethylsilylation in the gas chromatographic/mass spectrometric analysis of physiologic compounds found in plasma using electron-impact ionization. *Anal. Biochem*, 1984, 141:101-109
- [8] Magni F, Arnoldi L, Monti L, et al. Determination of plasma glycerol isotopic enrichment by isotope dilution mass spectrometry: An alternative glycerol derivative. *Anal Biochem*, 1993, 211: 327-328
- [9] Flakoll PJ, Zheng M, Vaughan S, et al. Determination of stable isotopic enrichments of glycerol in plasma via gas chromatography-mass spectrometry for the estimation of lipolysis in vivo. *J Chromatogr B*, 2000, 744:47-54
- [10] Bernert JT, Bell CJ, McGuffey JE, et al. Determination of "free" glycerol in human serum reference materials by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1992, 578:1-7
-

中华人民共和国卫生  
行业标准  
血清甘油三酯测定参考方法  
同位素稀释气相色谱质谱法  
WS/T 412—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](http://www.spc.net.cn)

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235

读者服务部:(010)68523946

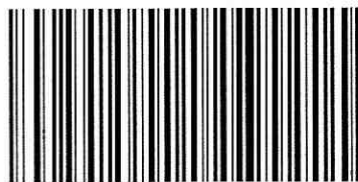
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字  
2013年6月第一版 2013年6月第一次印刷

\*

书号: 155066·2-25032 定价 16.00 元



WS/T 412-2013

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