

# 甲胎蛋白纯品的同位素稀释质谱法测定

刘 钰<sup>1</sup>, 宋德伟<sup>1</sup>, 张方彦<sup>1,2</sup>, 李红梅<sup>1</sup>, 徐 蓓<sup>1</sup>,  
戴新华<sup>1</sup>, 孙慧颖<sup>3</sup>, 陈宝荣<sup>3</sup>

(1. 中国计量科学研究院, 北京 100029; 2. 北京化工大学, 北京 100029; 3. 北京航天总医院, 北京 100076)

**摘要:**建立了基于特征肽段的甲胎蛋白的液相色谱-同位素稀释串联质谱检测方法。选取3条同位素标记的甲胎蛋白特征肽段作为内标,准确称其质量后与酶切后的甲胎蛋白样品定量混合,采取 Phenomenex Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  C18 色谱柱分离,电喷雾三重四极杆串联质谱多反应监测模式(MRM)测定,并对最优酶切条件、酶切效率以及定值结果的不确定度进行了考察和评定,得到的甲胎蛋白标准物质的最终测量结果为(0.329 $\pm$ 0.016) mg/g。

**关键词:**甲胎蛋白;同位素稀释质谱法;标准物质

**中图分类号:**O657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2017)06-0640-07

**doi:**10.7538/zpzb.2016.0199

## Measurement of Alpha-Fetoprotein by Isotope Dilution Mass Spectrometry

LIU Yu<sup>1</sup>, SONG De-wei<sup>1</sup>, ZHANG Fang-yan<sup>1,2</sup>, LI Hong-mei<sup>1</sup>, XU Bei<sup>1</sup>,  
DAI Xin-hua<sup>1</sup>, SUN Hui-ying<sup>3</sup>, CHEN Bao-rong<sup>3</sup>

(1. National Institute of Metrology, Beijing 100029, China;

2. Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

3. Beijing Aerospace General Hospital, Beijing 100076, China)

**Abstract:** Compared with small molecules, it's difficult to achieve accurate quantification of protein biomarkers because of their high molecular weight, complex structure and unstable nature. Due to that, alpha-fetoprotein (AFP) reference measurement procedure and high grade standard material has not been established yet. For protein macromolecular compounds, it is usually needed to split the protein into amino acids or peptide segments then use isotope dilution mass spectrometry to achieve accurate quantification. The method using isotope labeled amino acid as internal standard is relatively mature, but it is only suitable for high purity samples, otherwise it will introduce large errors due to the contamination of exogenous substances containing quantitative amino acids. The method using isotope labeled signature peptide as internal standard is more

收稿日期:2016-12-14;修回日期:2017-05-09

基金项目:国家重点研发计划(2017YFF0205401);国家科技支撑计划(2013BAK10B01);科技部基础性工作专项(2011FY130100)资助

作者简介:刘 钰(1992—),女(汉族),河北人,硕士研究生,分析化学专业。E-mail: liuyu0503@126.com

通信作者:宋德伟(1976—),男(汉族),黑龙江人,副研究员,从事临床蛋白质大分子标准物质研究。E-mail: songdw@nim.ac.cn

accurate and reliable. Therefore, a method for the determination of AFP by liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry based on signature peptides was developed. As a potential value assay method for AFP pure certified reference material (CRM), three isotope labeled peptides of AFP were selected as internal standard, which were added into the digested AFP samples. The samples were separated by PhenomenexKinetex 2.6  $\mu\text{m}$  C18 column, and measured by tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The optimal digestion condition and efficiency of enzymatic hydrolysis were investigated and the determination of uncertainty was calculated and analyzed. The content of the AFP reference material was measured to be  $(0.329 \pm 0.016)$  mg/g. The selection of the signature peptides and the optimization of the digestion conditions were key to the experiment. The signature peptides should have high and reproducible response, no missed cleavages and suitable sequence length. The optimization of the digestion conditions need repeated experiments based on a large number of literatures.

**Key words:** alpha-fetoprotein (AFP); isotope dilution mass spectrometry (IDMS); certified reference material (CRM)

甲胎蛋白是一种糖蛋白,其分子质量约为 68 kDa<sup>[1]</sup>,主要在妊娠期产生于胎儿的肝脏。通常情况下,其含量会在胎儿出生后急剧下降,成年后人体将会抑制其合成,正常人体内血清甲胎蛋白含量一般不超过 25  $\mu\text{g/L}$ ,而大于 70%的原发性肝癌患者会由于肿瘤分泌导致体内血清甲胎蛋白含量异常升高,可达 400  $\mu\text{g/L}$ <sup>[2]</sup>。因此,甲胎蛋白被认为是原发性肝癌的标志物<sup>[3]</sup>,其含量检测在疾病临床诊断中起着重要作用<sup>[4-6]</sup>。临床检测常用的免疫分析试剂产品种类多,不同厂家的不同产品所得结果存在较大偏差<sup>[7]</sup>。为保证测量结果的可溯源性、准确性和可比性,实现临床检验的标准化,有必要建立准确可靠的参考方法,研制相关标准物质,以满足临床检验的需求。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与装置

Agilent 6410 QQQ 液相色谱-质谱联用仪:美国 Agilent 公司产品;3K15 型台式离心机:德国 Sigma 公司产品;ME235S 型天平(感量 0.01 mg):德国 Satorius 公司产品;XP26 型天平(感量 0.001 mg):瑞典 Mettler Toledo 公司产品;移液器(10、50、200、1 000、5 000  $\mu\text{L}$ ), 371 型细胞培养箱:均为美国 Thermo Scientific 公司产品。

### 1.2 材料与试剂

乙腈(色谱纯):德国 Merck 公司产品;甲酸(分析纯):美国 Fisher Scientific 公司产品;盐酸(分析纯):北京化工厂产品;去离子水:由美国 Milli-Q 超纯水系统制得;尿素(电泳纯):美国 BIO-RAD 公司产品;碳酸氢铵、碘乙酰胺 (IAA):美国 Sigma-Aldrich 公司产品;二硫苏糖醇(DTT):美国 Inalco 公司产品;胰蛋白酶(测序级):美国 Promega 公司产品;人源甲胎蛋白(理论分子质量 66434.843 Da):芬兰 HyTest 公司产品;3 条特征肽段及其同位素标记物 NIFLASFVHEYSR (NR)、NIF {Leu (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N)}ASFVHEYSR(L-NR)、FLGDRDFNQF-SSGEK(FK)、F {Leu (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N)}GDRDFN-QFSSGEK(L-FK)、FIYEIAR(FR)、FIYE {Ile (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N)}AR(L-FR):南京金斯瑞生物科技有限公司合成,纯度经同位素稀释质谱法准确测定,具体实验条件参见 1.3.1;苯丙氨酸、丙氨酸标准物质:中国计量科学研究院国家标准物质研究中心提供;苯丙氨酸、丙氨酸同位素标记物:美国剑桥同位素实验室提供。

### 1.3 实验条件

**1.3.1 特征肽段的选择与纯度定值** 甲胎蛋白经胰蛋白酶酶解后会在其特定位点断裂,形成若干条肽段,通过采集酶解产物中的信号,与数据库中的肽段信号进行比对和匹配,可得出

样品定性鉴定信息。重复多次酶切实验,并以 UPLC-Q-TOF MS 检测酶切后产物,最终挑选出能够稳定出现、质谱响应强度较高、无漏切位点且序列长度适宜的至少 2 条肽段作为特征肽段。

具体实验条件如下:Waters Synapt G2 Q TOF 超高压液相色谱-串联高分辨离子淌度质谱、ProteinLynx Global Server 蛋白组学分析平台;美国 Waters 公司产品;目标搜索数据库:Swissprot;色谱柱:Waters ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 柱(2.1 mm×100 mm×1.7 μm);进样体积 5 μL,流速 0.2 mL/min;流动相:A 为 0.1%甲酸-水溶液,B 为 0.1%甲酸-乙腈溶液;洗脱梯度:0~40 min(1%~25%B),40~45 min(25%~50%B),45~46 min(50%~90%B),46~50 min(90%B),50~55 min(90%~1%B),55~60 min(1%B)。

由于用于定量的 3 条特征肽段并非已知纯度的标准物质,所以必须经水解后,以同位素稀释质谱法进行准确定值,才可保证最终结果量值的可溯源性。选取同位素标记的亮氨酸、苯丙氨酸和丙氨酸作为内标,分别按质量比约 1:1 与待测肽段样品溶液混合,真空干燥,然后加入 6 mol/L 浓盐酸混合均匀,通 N<sub>2</sub> 除氧密封,于 110 °C 烘箱内水解 24 h,取出后 N<sub>2</sub> 吹干,加 0.1%甲酸-水溶液复溶,过 0.22 μm 滤膜后上机检测。液相色谱-质谱分析条件列于表 1。

表 1 FK、FR、NR 水解定值的液相色谱-质谱分析条件

Table 1 LC-MS/MS conditions of purity measurement for FK, FR and NR	
参数 Parameters	设定值 Set values
色谱柱	Phenomenex Aeris PEPTIDE C18 (2.1 mm×150 mm×1.7 μm)
流动相, A 相 : B 相	90 : 10
流速	0.2 mL/min
进样体积	10 μL
苯丙氨酸定量离子对	$m/z$ 166.0 > 120.0
苯丙氨酸标记物定量离子对	$m/z$ 174.0 > 128.0
丙氨酸定量离子对	$m/z$ 90.0 > 44.1
丙氨酸标记物定量离子对	$m/z$ 94.0 > 47.1
亮氨酸定量离子对	$m/z$ 132.0 > 86.1
亮氨酸标记物定量离子对	$m/z$ 139.0 > 92.1

**1.3.2 标准溶液的配制** 分别配制 NR、FR 和 FK 的储备液及其同位素标记肽段的储备液,再由此储备液分别配制 NR、FR 和 FK 的混合标准溶液及其同位素标记肽段的混合标准溶液,按照未标记肽段与标记肽段的质量比为 0.9 和 1.1 分别配制低标溶液和高标溶液。

**1.3.3 酶切条件** 准确称取一定质量的甲胎蛋白溶液,加入尿素(终浓度 8 mol/L)、DTT(终浓度 10 mmol/L),于 37 °C 变性 6 h;恢复常温后,加入 IAA(终浓度 28 mmol/L),避光反应 1 h;加入碳酸氢铵溶液(50 mmol/L)稀释,使尿素浓度降至 1 mol/L 以下,按照蛋白和胰蛋白酶质量比 20 : 1 加入一定量的胰蛋白酶溶液,于 37 °C 孵育 40 h;取出,加入甲酸(终浓度 1%)终止反应。根据免疫法粗测的甲胎蛋白浓度添加含有等量混合标记肽段的溶液。

**1.3.4 色谱条件** 色谱柱:Phenomenex Kinetex C18 柱(3.0 mm×150 mm×2.6 μm);柱温 30 °C,进样体积 10 μL,流速 0.2 mL/min;流动相:A 为 0.1%甲酸-水溶液,B 为 0.1%甲酸-乙腈溶液;洗脱梯度:0~7 min(20%B),7~10 min(20%~70%B),10~13 min(70%B),13~15 min(70%~90%B),15~20 min(90%B),20~25 min(90%~20%B),25~30 min(20%B)。

**1.3.5 质谱条件** 多反应监测模式(MRM);监测离子对: $m/z$  528.4 >  $m/z$  678.3 (NR), $m/z$  530.6 >  $m/z$  681.8 (L-NR),碰撞诱导解离电压 120 V,碰撞能 8 eV; $m/z$  583.0 >  $m/z$  743.8 (FK), $m/z$  585.3 >  $m/z$  743.8 (L-FK),碰撞诱导解离电压 120 V,碰撞能 13 eV; $m/z$  456.4 >  $m/z$  651.3 (FR), $m/z$  459.9 >  $m/z$  658.5 (L-FR),碰撞诱导解离电压 90 V,碰撞能 10 eV。

## 1.4 结果计算

按照低标-样品-高标-样品-低标的顺序测定,同位素比例分别为 0.9 和 1.1。

由各特征肽段求得蛋白样品浓度,如式(1):

$$c_i = \frac{PP_{HMS}[R_s(I_1 - I_2) - (I_1R_2 - I_2R_1)]Mr}{M(R_1 - R_2)Mr_i} \quad (1)$$

式中, $i = \text{NR, FR, FK}$ ;  $Mr$  为甲胎蛋白的理论相对分子质量; $Mr_i$  为各特征肽段的理论相对

分子质量;  $P$  为合成非标记肽段的纯度;  $P_H$  为酶切效率;  $m_{IS}$  为加入样品中的标记肽段的质量(g);  $R_s$  为样品中非标记肽段与标记肽段的峰面积比;  $I_1$  为高标溶液中非标记肽段与标记肽段的质量比;  $I_2$  为低标溶液中非标记肽段与标记肽段的质量比;  $R_1$  为高标溶液中非标记肽段与标记肽段的峰面积比;  $R_2$  为低标溶液中非标记肽段与标记肽段的峰面积比;  $M$  为样品质量(g)。

取 3 条肽段所得甲胎蛋白浓度的平均值作为甲胎蛋白的最终浓度, 如式(2):

$$C = \frac{C_{NR} + C_{FR} + C_{FK}}{3} \quad (2)$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 特征肽段的选择及纯度定值结果

本实验最终选择的特征肽段信息列于表 2, 3 条特征肽段的纯度定值结果列于表 3。

表 2 甲胎蛋白定量所用特征肽段信息

Table 2 Information of signature peptides used to quantify AFP

序列 Sequence	位置 Position	理论分子量 Theoretical molecular weight	溶剂 Solvent
FIYEIAR	162-168	911.6	超纯水
FIYEIARFIYE(Ile( $^{13}C_6$ , $^{15}N$ ))AR		918.05	超纯水
FLGDRDFNQFSSGEK	333-347	1746.84	超纯水
F{Leu( $^{13}C_6$ , $^{15}N$ )}GDRDFNQFSSGEK		1753.83	超纯水
NIFLASFVHEYSR	348-360	1582.76	DMSO
NIF{Leu( $^{13}C_6$ , $^{15}N$ )}ASFVHEYSR		1589.76	DMSO

表 3 FK、FR、NR 纯度定值结果

Table 3 Results of the purity measurement for FK, FR and NR

肽段 Peptide	纯度 Purity/%	相对标准偏差 RSD/%
FK	81.84	1.08
FR	74.63	0.95
NR	62.19	2.63

### 2.2 样品测量结果

添加同位素标记肽段后的 AFP 酶切样品 MRM 谱图示于图 1。采用同位素稀释质谱法的测量结果列于表 4。

### 2.3 测量结果不确定度评价

根据式(2), 甲胎蛋白的合成不确定度  $u_c$  可由式(3)计算:

$$u_c = \sqrt{\frac{u_{NR}^2 + u_{FR}^2 + u_{FK}^2}{3}} \quad (3)$$

以 NR 为例, 测量结果的 A 类不确定度  $u_A$  用多次重复测量的标准偏差表示。在本实验中, 对相同样品分 3 组测量, 每组重复测定 3 次, 所以 3 次测量的合并样本标准差可由式(4)

计算<sup>[8]</sup>:

$$s_p = \sqrt{\frac{a^2 + b^2 + c^2}{3}} = 0.0042 \text{ mg/g} \quad (4)$$

实验共进行了 9 次测定, 所以 A 类不确定度  $u_A = \frac{s_p}{\sqrt{9}} = 0.0014 \text{ mg/g}$ 。

以 B 类评定的不确定度主要来源于以下几个方面:

1) 肽段 NR 纯品纯度的不确定度  $u_p$ , 按照水解-同位素稀释质谱法定值, 根据本实验室以往定值经验<sup>[9-10]</sup>, 水解法的标准不确定度保守估计为  $u_p = 1.5\%$ 。

2) NR、L-NR 固体称量引入的不确定度  $u_{m_0}$ , 按照天平制造商给出的线性分量折算成标准不确定度(矩形分布):  $u_{m_0} = 0.001 \text{ mg}/\sqrt{3} = 5.77 \times 10^{-4} \text{ mg}$ 。

3) 所有溶液称量引入的不确定度  $u_M = 0.01 \text{ mg}/\sqrt{3} = 5.77 \times 10^{-3} \text{ mg}$ 。

4) 由酶解效率引入的不确定度  $u_H$ , 按照免疫法对酶解前后样品浓度进行测量, 可认为本研究中酶解效率等于 100%, 标准不确定度保守估计为  $u_H = 1\%$ 。

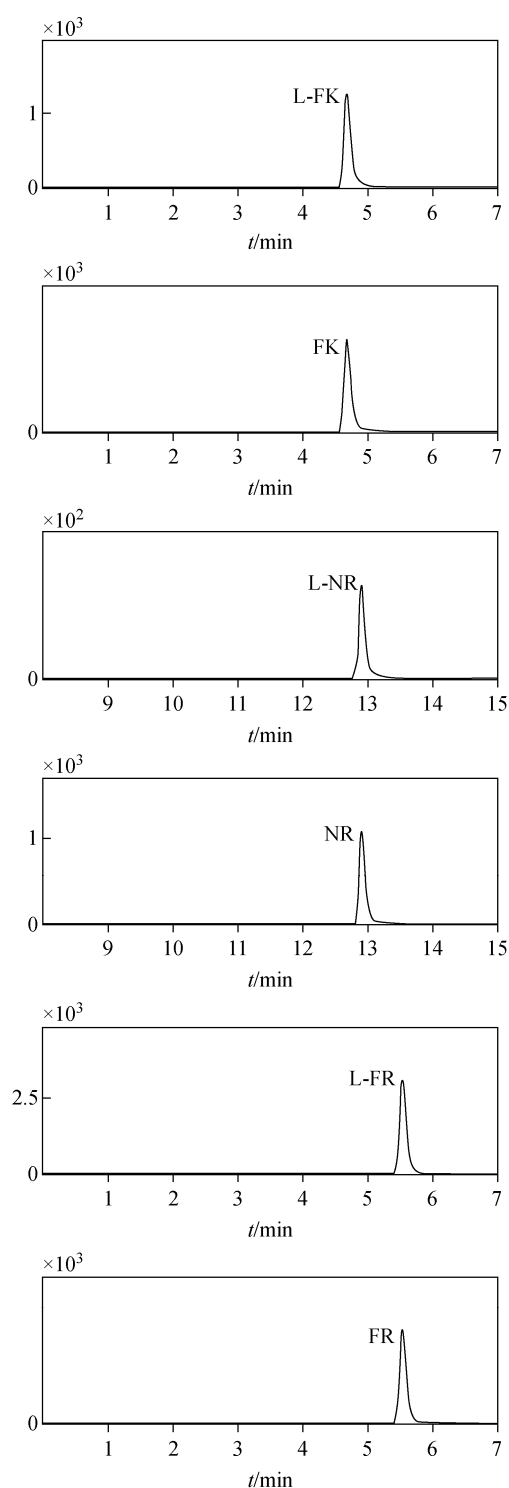


图1 AFP酶切样品的定量MRM谱图

Fig.1 MRM chromatograms of peptides and isotope labeled peptides of enzyme digestion AFP

5) 由空气浮力、分子质量、温度、湿度等引入的测量不确定度可忽略不计。

6) 由酶解过程引入的不确定度已经包含

在测定结果中,并以A类不确定度评价方法进行了评定,因此不再考虑。

7) 将以上各不确定度分量合成。

由式(1)可知,这是一个非线性模型,由于称量的不确定度很小,所以 $I_1$ 、 $I_2$ 被认为是常数,且与 $m$ 不相关,同时 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_s$ 均按常数处理<sup>[11]</sup>,并将相应的值代入式(1)中,则:

$$C_{NR} = \frac{1.52 \times P \times P_H \times m_{IS} \times M_r}{M \times M_{rNR}} \quad (5)$$

对相同含量的AFP样品分3组, $m_{IS}$ 为3组加入NR标记物质量的平均值:

$$m_{IS} = \frac{m_0 \times m_2 \times m_4}{m_1 \times m_3} \quad (6)$$

其中: $m_0$ 为L-NR固体的质量; $m_1$ 为溶解L-NR所加溶剂的质量; $m_2$ 为称取该储备液的质量; $m_3$ 为配制标记肽段混合标准溶液加入的溶剂质量; $m_4$ 为加入样品中的标记肽段混合标准溶液质量。因此,由 $m_{IS}$ 引入的相对标准不确定度可以通过这5项分量的相对标准不确定度合成(因篇幅所限,此处省略了具体计算过程),最终求得 $\frac{u_m}{m_{IS}} = 0.00077$ ;  $M$ 为3组样品质量的平均值100.000 mg。因此B类不确定度 $u_B$ 可以表示为:

$$\frac{u_B}{C_{NR}} = \sqrt{\left(\frac{u_P}{P}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m_{IS}}\right)^2 - \left(\frac{u_M}{M}\right)^2 + \left(\frac{u_{P_H}}{P_H}\right)^2} = 0.026 \quad (7)$$

$$u_B = 0.0087 \text{ mg/g}$$

$$u_{NR} = \sqrt{u_A^2 + u_S^2} = 0.0088 \text{ mg/g} \quad (8)$$

同理,分别计算出肽段FR和FK的不确定度 $u_{FR} = 0.0080 \text{ mg/g}$ 、 $u_{FK} = 0.0067 \text{ mg/g}$ ,根据公式(3),将各个不确定度分量合成,得到合成标准不确定度:

$$u_c = \sqrt{\frac{u_{NR}^2 + u_{FR}^2 + u_{FK}^2}{3}} = 0.0079 \text{ mg/g} \quad (9)$$

取包含因子 $k=2$ ,则扩展不确定度为 $U = k \cdot u_c = 0.016 \text{ mg/g}$ ,测定结果为 $(0.329 \pm 0.016) \text{ mg/g}$ 。

#### 2.4 酶切条件优化及酶切效率考察

有研究表明,甲胎蛋白在尿素浓度低于7.5 mol/L时仍具有稳定的天然结构<sup>[12]</sup>,因此

表 4 甲胎蛋白同位素稀释质谱法的定值结果

Table 4 Certification results of AFP determined by LC-IDMS

样品 序号 No.	NR		FK		FR		三条肽段汇总信息 Summary information		
	$C_{AFP}/$ (mg/g)	SD	$C_{AFP}/$ (mg/g)	SD	$C_{AFP}/$ (mg/g)	SD	平均值 Average	RSD/%	总平均值 Total average
1	0.3372	0.0055	0.3036	0.0064	0.3606	0.0052	0.3338	8.57	0.3286
2	0.3358	0.0041	0.3069	0.0063	0.3554	0.0034	0.3327	7.32	
3	0.3188	0.0024	0.2984	0.0042	0.3408	0.0015	0.3194	6.64	

注:SD为标准偏差

本实验在大于 8 mol/L 的尿素浓度下使甲胎蛋白变性,并确保加入的 DTT、IAA 和胰蛋白酶过量,在此基础上,主要优化变性时间和酶解时间这两个变量,实验结果示于图 2、图 3。

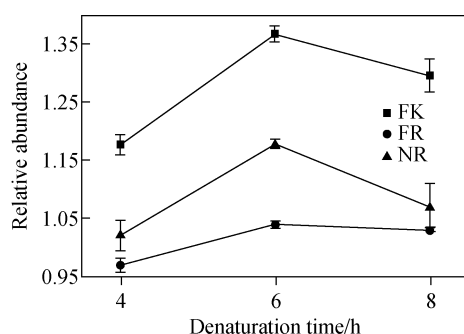


图 2 甲胎蛋白变性时间优化

Fig. 2 Optimization of the denaturation time

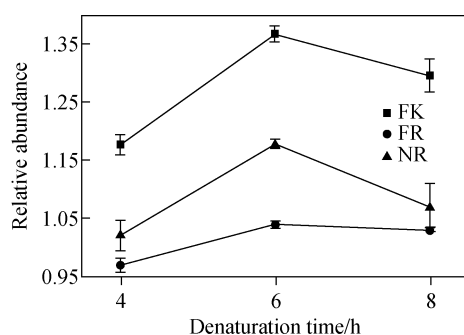


图 3 甲胎蛋白酶解时间优化

Fig. 3 Optimization of the digestion time

酶切效率的考察委托北京航天总医院完成,以电化学发光免疫分析法为原理,分别测量酶切前后样品中甲胎蛋白的含量,实验结果列于表 5。

表 5 甲胎蛋白的酶切效率

Table 5 Efficiency of enzymatic hydrolysis of AFP

样品 Samples	甲胎蛋白含量 $C_{AFP}/(\mu\text{g/L})$	相对标准偏差 RSD/%
酶切 30 h	10.31	2.86
酶切 40 h	<0.61	NA
酶切前(稀释约 20 倍)	18 220.67	8.02

根据表 5 中的结果可以看出,酶切 30 h 后,肽段含量的增加趋于平缓;40 h 后的酶切效率可认为达到 100%。因此,本研究最终选择变性时间 6 h,酶切时间 40 h 作为甲胎蛋白的最优酶切条件。

### 3 结论

以同位素稀释质谱法为基本原理,对多肽及蛋白质生物大分子进行准确定量已经受到了广泛关注,并在实现化学测量国际溯源中起到重要的作用。其中,以同位素标记氨基酸作为内标的蛋白水解-同位素稀释质谱法发展最为成熟,但该方法的最大缺陷是会受到来自目标蛋白(如含有定量氨基酸的杂质肽或杂质蛋白)以外定量氨基酸的干扰,进而严重影响测量结果的准确性。因此,特异性更强、准确度更高的蛋白酶解-同位素稀释质谱法和全蛋白-同位素稀释质谱法应运而生。本研究以蛋白酶解后的特征肽段为测量对象,对所有不确定度来源进行了讨论和评定,建立了一种高准确度的甲胎蛋白定值方法,为研制甲胎蛋白纯品及血清标准物质奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] FAN F, SHEN H, ZHANG G, et al. Chemiluminescence immunoassay based on microfluidic chips for  $\alpha$ -fetoprotein[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2014, 431: 113.
- [2] PARSHETTI G K, LIN F H, DOONG R A. Sensitive amperometric immunosensor for  $\alpha$ -fetoprotein detection based on multifunctional dumbbell-like Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, heterostructures[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2013, 186(186): 34-43.
- [3] LIU K, ZHANG J, LIU Q, et al. Electrochemical immunosensor for alpha-fetoprotein determination based on ZnSe quantum dots/Azure I/gold nanoparticles/poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified Pt electrode[J]. *Electrochimica Acta*, 2013, 114: 448-454.
- [4] JAGOTAMOY D, KYUNGMIN J O, JAE W L, et al. Electrochemical immunosensors using *p*-aminophenol redox cycling by hydrazine combined with a low background current [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(7): 2 790-2 796.
- [5] YASUSHI T, MASATO I, HIROKAZU K, et al. Clinical advantage of highly sensitive in-chip immunoassay for fucosylated fraction of alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2010, 55(12): 3 576-3 583.
- [6] TANG D, REN J. In situ amplified electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen using horseradish peroxidase-encapsulated nano-gold hollow microspheres as labels[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(21): 8 064-8 070.
- [7] DIAR H A, NAKWA F L, THOMAS R, et al. Evaluating the quikread C-reactive protein test as a point-of-care test[J]. *PaediatrInt Child Health*, 2012, 32(1): 35-42.
- [8] 倪育才, 实用测量不确定度评定(第五版)[M]. 北京: 中国质检出版社, 2016: 80-81.
- [9] 宋德伟, 董晓杰, 徐蓓, 等. C反应蛋白纯品的同位素稀释质谱法测定与国际比对[J]. *质谱学报*, 2014, 35(5): 462-466.
- SONG Dewei, DONG Xiaojie, XU Bei, et al. Measurement and international comparison for C-reactive protein by isotope dilution mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2014, 35(5): 462-466(in Chinese).
- [10] 孙雪晴, 胡高飞, 宋德伟, 等. 高效液相色谱-同位素稀释-串联质谱法测定人源瘦素的含量[J]. *质谱学报*, 2015, 36(1): 16-22.
- SUN Xueqing, HU Gaofei, SONG Dewei, et al. Quantification of human leptin by HPLC-IDMS [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2015, 36(1): 16-22(in Chinese).
- [11] 武利庆, 王晶. 同位素稀释质谱法测定多肽含量[J]. *化学分析计量*, 2007, 16(2): 20-23.
- WU Liqing, WANG Jing. Quantification of peptide by isotope dilution mass spectrometry[J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2007, 16(2): 20-23(in Chinese).
- [12] 高丰厚, 郑佐娅. 甲胎蛋白的结构与功能[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004, 25(1): 77-82.
- GAO Fenghou, ZHENG Zuoya. Structure and function of alpha fetoprotein[J]. *Foreign Medical Sciences (section of Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine)*, 2004, 25(1): 77-82(in Chinese).