文章编号：1673-8640（2019）03-0189-08　**中图分类号**：R446.1　**文献标志码**：A　**DOI**：10.3969/j.issn.1673-8640.2019.03.001

液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证

中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会

摘要：液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）是近年来发展极为迅速的新技术。该技术结合了液相色谱的高分离性能和质谱的高敏感性、高特异性等优势，被广泛应用于化工、生物、医药、食品、临床医学、环境等领域。在临床检验和诊断领域，LC-MS/MS作为传统诊断技术的补充，可提供更为准确、可靠的依据，使许多疾病得到准确、快速的诊断。文章结合目前已公布的LC-MS/MS方法相关验证指南、文献及实际操作经验，系统介绍了LC-MS/MS方法开发的关键流程，并以25-羟基维生素D_3 [25（OH）D_3]为实例介绍方法验证的关键要素，为LC-MS/MS技术临床应用方法的建立、验证和实施提供参考。

关键词：液相色谱串联质谱；方法开发；方法验证

Consensus of method development and validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical laboratories *Clinical Mass Spectrometry Committee，Chinese Medical Doctor Association of Laboratory Medicine.*

Abstract：Liquid chromatography-tandem mass spectrometry （LC-MS/MS） is an emerging technology which has developed rapidly in recent years. It has combined the separation properties of liquid chromatography and the high sensitivity and specificity of mass spectrometry，which is widely applied in various areas，such as chemistry，biology，pharmaceutical science，food，clinic and environmental science. Especially in the field of clinical laboratory and diagnostics，LC-MS/MS used as a complement to traditional diagnostic techniques can often provide more accurate and reliable testing results in accurate and rapid diagnosis of diseases. In this review，some internationally published LC-MS/MS method validation guidelines，related literature and practical experience were summarized，and some key processes of LC-MS/MS development were introduced. Using 25-hydroxyvitamin D_3[25（OH）D_3] as an example，the key elements of method validation were reviewed，in order to provide a reference for the establishment，verification and implementation of LC-MS/MS.

Key words：Liquid chromatography-tandem mass spectrometry；Method development；Method validation

近年来，各种检验新理论和新技术不断涌现，极大地推动了临床检验学科的发展。液相色谱串联质谱（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）技术集液相色谱对复杂样本的高分离性能和质谱的高敏感性、高特异性于一体，在临床检验领域被广泛应用，如维生素D和激素检测、新生儿遗传代谢病筛查、治疗药物监测、药物中毒与药物滥用分析以及其他功能医学检测等，尤其在生物样本小分子物质的定量检测上应用越来越广泛。与传统的临床检验方法相比，LC-MS/MS技术具有敏感性高、特异性好、准确度高，且可以同时检测多个目标分析物等优点，有很好的临床应用前景；但也存在自动化程度低、仪器复杂、尚难以标准化等问题。为保障临床LC-MS/MS技术的规范化使用，有必要在实验室建立液相色谱质谱方法时提供开发和验证的指导性意见。相信随着质谱仪敏感性的不断提高、样本前处理技术的持续改进、标准化方法和试剂的逐渐开发，LC-MS/MS技术将在临床检验领域发挥更大作用。

在采用LC-MS/MS技术开展临床检验前，必须建立相应的检测方法并对其进行验证。由于临床检测多针对生物样本（血清、血浆、全血、尿液、唾液、脑脊液、干血滤纸片、组织等），因此在方法开发过程中，需要对样本前处理方法、色谱条件和质谱条件进行开发和优化，确保建立的方法适合临床检测需求。为了保证检测结果的

准确、可靠，证明分析方法的性能符合临床检验的目的和要求，必须对建立的LC-MS/MS方法进行全面而严格的方法学验证。

1　LC-MS/MS临床检验方法的开发

1.1　确定目标分析物

在计划开发一个LC-MS/MS临床检测方法前，首先要了解目标分析物的特性，主要包括以下几个方面：（1）目标分析物的理化性质，如结构式、相对分子质量、沸点、极性大小及酸碱性等。（2）目标分析物的形式（游离型还是结合型，有无类似物、同分异构体或其他代谢产物）和预期浓度（是常量级还是微量级）。（3）目标分析物的临床意义，包括与疾病的相关性以及目前常用的检测方法。（4）生物样本类型，包括血清、血浆、全血、尿液、唾液、胆汁、组织等。（5）样本采集方式（静脉血、足底血、指尖血等）、处理方式（离心或静置）以及储存和运输方式（是否避光，冷藏或冷冻）。

1.2　文献调研

如果对目标分析物不熟悉，则需要对目标分析物进行相关文献调研，检索并收集目标分析物的检测方法，特别是用LC-MS/MS技术检测目标分析物的文献，可以以此作为方法开发的起点。需要特别关注的关键信息包括以下几项：（1）样本前处理，包括样本类型、取样量、样本处理方式。（2）液相色谱条件，包括所选用的色谱柱类型、流动相组成、洗脱方式、流速大小、柱温和进样量。（3）质谱条件，包括选用的质谱类型、离子化方式、离子通道以及其他相关质谱参数。此外，还需要关注一些特殊的信息，如样本稳定性以及可能存在的干扰（不同收集管造成的干扰）等。

1.3　质谱方法的建立与优化

临床使用的LC-MS/MS方法大部分为靶向定量方法，常采用多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）和选择反应监测（selected reaction monitoring，SRM）模式进行定量分析。第1步：配制标准物质溶液直接导入质谱检测器进行质谱扫描，获取目标分析物的相关信息，根据目标分析物的极性选择合适的离子化方式[电喷雾离子源（electrospray ionization，ESI）适合中等偏大极性化合物、难挥发或热不稳定性化合物，大气压化学电离离子源（atmospheric-pressure chemical ionization，APCI）适合有一定挥发性的中等极性或低极性的小分子化合物]，根据化合物的功能基团选择正负离子模式；第2步：选择合适的离子对分别作为定量离子对和定性离子对，即选择质谱响应高、选择性和稳定性好的离子对，响应值最高的作为定量离子对。第3步：优化化合物参数，包括离子源参数和质谱扫描参数，使选择的离子对质谱响应值最高。

1.4　色谱方法的建立与优化

LC-MS/MS方法开发需要考虑对色谱柱、流动相、洗脱方式等色谱条件进行选择和优化。首先，在色谱柱的选择上可以根据目标化合物的极性大小和酸碱性选择弱极性固定相，如C18、C8、C4、苯基柱等，也可以选择极性固定相，如氨基柱、氰基柱、硅胶柱等。同时要注意色谱柱的耐压范围和pH值适用范围。在流动相的选择上，最好选择符合分析要求的溶剂，如质谱级水、色谱级或质谱级溶剂（甲醇、乙腈等）；需要用到流动相添加剂时，应选择有挥发性的甲酸、乙酸、甲酸铵、乙酸铵、氨水等试剂，尽量不使用三氟乙酸、七氟丁酸等严重影响样本离子化效率的试剂；不能使用硫酸盐、磷酸盐等不挥发性碱和盐，以免造成污染，导致质谱仪损坏。在洗脱方式的选择上应按照增加色谱保留、提高分离度的目的来进行优化，选择等度洗脱或梯度洗脱，注意起始的溶剂比例、进样量、运行时间、柱温、样本溶剂等因素对分析结果的影响。此外，对检测通量要求高的实验室可以选择粒径小的色谱柱填料来实现对目标分析物的快速分离，同时需要配备较为高端的质谱仪来采集足够的数据点（10～15个点）。另外，还要注意通过液相色谱对同分异构体进行分离。

1.5　样本前处理方法的建立与优化

临床样本主要包括血清、血浆、全血、尿样等种类。这些样本基质复杂，因此必须根据目标分析物的性质选择合适的样本前处理方法。常用的样本前处理方法有：（1）蛋白沉淀法（protein precipitation，PPT），即加

入蛋白沉淀剂，将样本中的蛋白质变性，然后混合离心，取上清液直接检测或稀释后再检测。常用的蛋白沉淀剂包括与水混溶的有机溶剂（甲醇、乙腈、乙醇、丙醇、丙酮、四氢呋喃等）、中性盐（饱和硫酸铵、硫酸钠）、强酸（三氯乙酸、高氯酸）、金属盐（锌盐、铜盐等）。（2）液液萃取法（liquid-liquid extraction，LLE），即采用与水不相容的有机溶剂，将目标分析物从水相中提取并转移至有机相中。该法适用于极性较小的化合物。常用的萃取剂包括正己烷、乙酸乙酯、异辛烷、四氯化碳、氯仿、二氯甲烷、四氢呋喃、乙醚、丙酮等。（3）固相萃取法（solid-phase extraction，SPE），即利用样本基质中不同组分的分配系数不同，使目标分析物保留并洗脱出来，同时选择性地去除样本中的干扰物，获得适用于质谱分析的目标分析物。该法适用于酸性、碱性以及其他极性较大的化合物。选择不同的萃取柱填料，可以实现不同的分离模式，最终达到净化和富集样本中目标分析物的目的。（4）其他方法，包括超滤法（采用超滤膜过滤）、稀释法（稀释后直接进样）、衍生化法（加入衍生化试剂提高检测敏感性）等。若实验室样本量较大且资金允许，可考虑引进自动化样本前处理系统，如在线固相萃取系统。此外，在样本前处理过程中，需要对样本进行复溶时，选择的复溶溶剂最好是初始流动相，避免出现溶剂效应，影响定量检测结果。

2　方法学验证

LC-MS/MS检测方法建立以后，在用于临床检测之前，必须对方法进行全面、严格的验证，以证明检测方法的分析性能可满足临床诊断要求。然而，与相关部门批准的临床检验项目不同，大多数LC-MS/MS方法是实验室自建的。目前，国际上关于LC-MS/MS方法验证的指导原则只有美国食品与药品监督管理局（U. S. Food and Drug Administration，FDA）发布的《生物分析方法验证指南》[1]和美国临床实验室标准化协会（the Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）发布的C62-A[2]、C50-A文件[3]，国内只有中华医学会检验医学分会和国家卫生计生委临床检验中心于2017年联合发布的《液相色谱—质谱临床应用建议》[4]。因此，我们结合目前已公布的LC-MS/MS方法验证指南和相关文献[1，5-10]以及实际操作经验，同时以25-羟基维生素D_3[25-hydroxyvitamin D_3，25（OH）D_3]的LC-MS/MS方法验证为实例，总结出以下几个LC-MS/MS方法验证中的关键点。

2.1　干扰试验（特异性或选择性）

尽管LC-MS/MS技术在特异性和选择性上优于其他检测技术，但样本基质中的内源性物质、同分异构体、其他代谢物等可能会对LC-MS/MS分析产生干扰。同时，由于质谱仪无法区分同分异构体，所以色谱分离也是必要的。因此，在LC-MS/MS方法用于临床检测之前，必须先进行干扰试验（特异性或选择性）研究。干扰试验通常的做法是在患者样本中加入已知的高浓度的潜在干扰物质，由于干扰的正负效应都存在，应对2个不同浓度的样本做干扰测试，以免因竞争效应而使正负干扰相互抵消；此外，在患者样本和空白样本中都加入可能存在的干扰物质，再将其余未加入干扰物质的样本分别进样分析，如果二者未见明显变化，则可认为加入的物质对检测不产生干扰。如25-（OH）D_3和3-epi-25（OH）D_3为同分异构体，只有通过色谱分离，使二者在不同的时间出峰，才能消除3-epi-25（OH）D_3对25（OH）D_3的干扰。见图1。

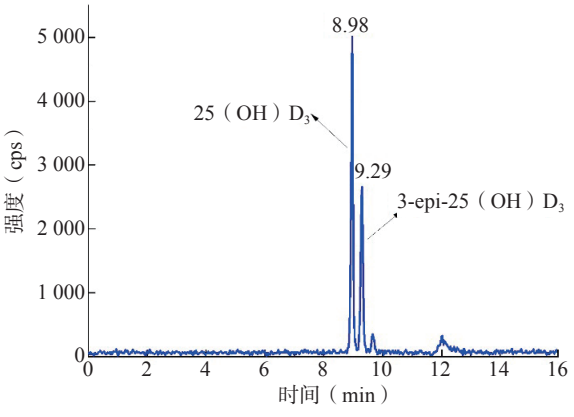


图1　25（OH）D_3和3-epi-25（OH）D_3的色谱图

2.2　基质效应[1]

基质效应实验的目的就是用于验证目标分析物在生物样本和纯溶液中的质谱响应是否有

差异，是否影响目标分析物的准确定量。基质效应的评价可以采用以下几种方法。

2.2.1　柱后灌注法[11]　将含有目标分析物的溶液在色谱柱之后质谱之前以恒定的速度泵入质谱仪，再将处理过的空白基质样本注入质谱仪，液相色谱运行时使质谱仪持续采集数据。经过一段时间，分析物在进样时会显示出一段基线响应，若在分析物应该被洗脱的梯度区域内出现明显的基质抑制或增强，说明存在基质效应。

2.2.2　样本处理后加入法[12]　取空白基质样本，经前处理后加入目标分析物至一定的浓度，可制备出临界值的1/2、临界值的2倍、线性范围上限的80% 3个浓度的样本，每个浓度的样本分为5份，每份样本重复测定3次。将该样本与相同浓度的以纯溶剂为基质的样本一同进样分析，然后比较其各自的响应值。基质样本和溶剂样本响应值的差与溶剂样本响应值的比值即为该过程的基质效应，该方法用于评价绝对基质效应。通过改变样本前处理方法或色谱条件，可以减少或消除绝对基质效应。

2.2.3　混合实验[13]　选取目标分析物的纯溶液、生物基质样本以及二者的1∶1混合液，分别处理后进样分析。如果1∶1混合液样本的响应值与生物基质样本和纯溶液样本响应值的均值相比，差异低于一定比例（20%），则证明基质效应是否存在并不影响目标分析物的准确定量，该法用于评价相对基质效应。以25（OH）D_3为例，分别对其绝对基质效应和相对基质效应进行考察，由于25（OH）D_3为内源性激素，很难找到不含25（OH）D_3的空白基质，可通过向经前处理的血清样本中添加一定量的内标25（OH）D_3-[$^2H_3$]作为后加标样本，与等量的未经提取的纯溶液样本获得的色谱峰面积进行比较，考察方法的绝对基质效应；采用混合实验的方法，即通过检测血清基质样本、溶液基质样本、二者质量比1∶1混合物这3种基质样本中待测物与内标的峰面积比值来计算相对基质效应，结果见表1、表2。

表1　25（OH）D_3的绝对基质效应结果

乙醇基质			血清基质（提取后）		
样本名称	组分名称	峰面积	样本名称	组分名称	峰面积
Sample1-1	D3-IS	93 240	Sample3-1	D3-IS	259 600
Sample1-1	D3-IS	97 270	Sample3-1	D3-IS	272 200
Sample1-1	D3-IS	97 910	Sample3-1	D3-IS	270 100
Sample1-2	D3-IS	111 300	Sample3-2	D3-IS	260 900
Sample1-2	D3-IS	111 000	Sample3-2	D3-IS	261 900
Sample1-2	D3-IS	112 500	Sample3-2	D3-IS	262 300
Sample1-3	D3-IS	97 200	Sample3-3	D3-IS	256 800
Sample1-3	D3-IS	99 710	Sample3-3	D3-IS	273 500
Sample1-3	D3-IS	96 880	Sample3-3	D3-IS	261 100
Sample1-4	D3-IS	105 500	Sample3-4	D3-IS	274 100
Sample1-4	D3-IS	111 500	Sample3-4	D3-IS	272 400
Sample1-4	D3-IS	111 200	Sample3-4	D3-IS	278 100
Sample1-5	D3-IS	106 800	Sample3-5	D3-IS	276 200
Sample1-5	D3-IS	106 700	Sample3-5	D3-IS	278 600
Sample1-5	D3-IS	108 900	Sample3-5	D3-IS	272 000
Sample1-6	D3-IS	114 100	Sample3-6	D3-IS	270 100
Sample1-6	D3-IS	112 900	Sample3-6	D3-IS	263 000
Sample1-6	D3-IS	113 300	Sample3-6	D3-IS	268 800
均值		105 995	均值		268 428
CV（%）		6.61	*CV*（%）		2.55

注：绝对基质效应为153.25%，即基质效应增强；D3-IS为25（OH）D_3的内标；*CV*为变异系数（coefficient of variation）

表2　25（OH）D_3相对基质效应结果

样本	峰面积比值				*CV*（%）	偏差（%）
	第1次测定	第2次测定	第3次测定	均值		
乙醇基质	1.52	1.53	1.49	1.51	1.38	1.96
血清基质	0.53	0.52	0.53	0.53	1.10	
1：1混合物	1.01	1.01	0.97	1.00	2.32	

2.3　携带污染（残留）

在评估携带污染时，先重复进样低浓度样本（最好是定量下限样本），然后交替进样高浓度样本和低浓度样本。比较第1次进样的低浓度样本的检测结果与随后进样的低浓度样本检测结果的差异，若低于预定标准（20%）[13]，则认为在测定该高浓度及以下浓度样本时不存在明显的携带污染。以25（OH）D_3为例，对其携带污染率进行考察，结果见表3，其携带污染率为–1.82%，可认为该方法不存在明显的携带污染。

2.4　检测限与定量下限

检测限为所建立的LC-MS/MS方法能够检测出的目标分析物的最低值，定量下限为LC-MS/MS方法在满足实验室对准确度和精密度要求的前提下检测出的目标分析物的最低值。采用LC-MS/MS方法进行检测，以平均信噪比（signal-to-noise ratio，R_{SN}）=3时的浓度作为方法的检测限。定量下限可以选择3个浓度接近检测限的样本，每个浓度样本分为5份进行处理，每份样本重复测定3次，连续测定3个批次，分别评估每个浓度样本的总精密度（*CV*）及其浓度测定均值与理论浓度的偏差，可将*CV*≤20%、准确度<15%的最低浓度样本的测定均值作为方法的定量下限，这样可以保证得到的真值接近定量下限。以25（OH）D_3为例，选取3个浓度的样本，每个浓度样本分为5份进行处理，每份样本重复测定3次，连续测定3个批次，结果见表4。将*CV*为13.94%、偏移为12.80%的样本2的测定均值作为方法的定量下限。

2.5　线性与稀释

配制基质适宜的标准品（最好与样本基质一致）用于制作标准曲线。可以选择预制备的商品化标准物质，也可以使用纯品制备标准物质。线性评估的最佳做法是至少设置6个非零浓度点，每个浓度点重复测定2～4次，采用多项式回归方程，*r*值应>0.99，同时应避免逐级稀释。25（OH）D_3的检测标准曲线见图2，选择2.5、10、20、50、100、200 ng/mL 6个浓度点，每个浓度点重复测定2次，采用加权最小二乘法进行线性拟合，其标准曲线的线性方程和相关系数均符合要求。

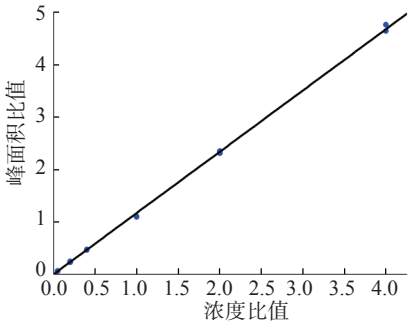
表3　25（OH）D_3携带污染考察结果

样本	25（OH）D_3	L-L	H-L
L1	1.11		
L2	1.13	1.13	
L3	1.09	1.09	
H1	52.80		
H2	53.45		
L4	1.16		1.16
H3	53.60		
H4	52.56		
L5	1.10		1.10
L6	1.14	1.14	
L7	1.09	1.09	
L8	1.05	1.05	
H5	52.28		
H6	53.48		
L9	1.09		1.09
H7	52.14		
H8	53.09		
L10	1.15		1.15
H9	52.79		
H10	53.02		
L11	1.12		1.12
均值		1.10	1.12
携带污染率（%）		–1.82	

注：H为高浓度样本；L为低浓度样本

表4　25（OH）D_3定量下限检测结果

样本名称	理论浓度（ng/mL）	样本数	测定均值（ng/mL）	R_{SN}	*CV*（%）	偏移（%）
样本1	0.50	15	0.65	5	17.61	30.00
样本2	1.25	15	1.41	26	13.94	12.80
样本3	2.50	15	2.71	47	9.33	8.40



注：Y=1.163 58X–0.001 80（r=0.999 60）

图2　25（OH）D_3的标准曲线

在测量范围以外的稀释需要进行验证。由于在LC-MS/MS分离和离子化过程中，样本的基质会对结果产生重大影响，因此选择合适的稀释液及控制稀释程度非常重要，免稀释的原始基质液是最好的选择。稀释验证实验应包括重复性和回收率实验。在验证实验中，回收率决定了稀释液的适用性和允许稀释程度。当浓度大于定量下限的3倍时，回收率在100%±15%的范围内是可接受的。如回收率超过这个范围，表明稀释过度，或者有基质效应。对于整体稀释实验来说，每次稀释需要重复5次。对于每个单独的样本来说，每次稀释需重复1次。在平均回收率和/或准确度±15%、不精密度≤15%的范围内是可接受的。但回收率和不精密度具体的可接受标准取决于临床实际应用。

2.6　精密度验证

精密度验证应至少评估3个分布在分析测量高、中、低范围内的样本，每个样本既要评估批内精密度，也要评估总精密度。可以采取如下方法开展验证实验：选取3个浓度分布在分析测量范围内的样本，建议选取的浓度为临界值的1/2、临界值的2倍、线性范围上限值的80%，每个批次每个浓度样本分3份进行处理，连续测定6个批次，总样本数为54份，分别评估每个浓度样本的批内精密度和总精密度；或者每个批次每个浓度样本分5次进行处理，连续测定3个批次，总样本数为45份，分别评估每个浓度样本的批内精密度和总精密度。另外，当实验条件（如操作人员、色谱柱或试剂）发生变更时，也应对方法的精密度进行验证。在25（OH）D_3的精密度验证中，选用了低、中、高3个浓度的样本，每个浓度样本分5份进行处理，连续测定3个批次，总样本数为45份，分别评估其批内精密度、批间精密度和总精密度，结果见表5。

表5　25（OH）D_3精密度验证结果

样本	批次	均值（ng/mL）	批内CV（%）	批间CV（%）	总CV（%）	总均值（ng/mL）
低浓度	1	10.04	1.38	4.19	4.25	10.55
	2	10.75	1.88			
	3	10.85	2.11			
中浓度	1	16.51	2.08	2.23	3.44	16.29
	2	15.87	2.40			
	3	16.49	3.21			
高浓度	1	33.06	2.11	0.92	2.17	32.89
	2	33.07	2.19			
	3	32.54	1.16			

注：由于收集到的25（OH）D_3原始血清样本浓度范围为10~30 ng/mL，故验证所用的血清样本浓度范围也是10~30 ng/mL，并未按照前文所述以临界值的1/2、临界值的2倍、线性范围上限值的80%来收集血清进行精密度验证

2.7　正确度验证

可以通过分析具有互通性的有证参考物质或者可接受的替代品来评估方法的正确度，如可以测定国家一级或二级标准物质以及美国国家标准和技术研究院（the National Institute of Standards and Technology，NIST）、检验医学溯源性联合委员会（the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine，JCTLM）的参考物质或者用参考方法确定靶值的室间质评/能力验证材料[我国国家卫生计生委临床检验中心正确度验证计划、美国疾病预防控制中心（the Centers for Disease Control and Prevention，CDC）和美国病理学家协会（the College of American Pathologists，CAP）能力验证计划、

国际临床化学和检验医学联合会参考实验室外部质量评价计划（the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine External Quality Assessment Scheme for Reference Laboratories in Laboratory Medicine，RELA）等]。如参考物质不易获得或无参考方法，可以采用加标回收的方法来评估正确度，如果加标回收率均在可接受范围（±15%）内，则证明建立的LC-MS/MS方法的正确度符合要求。具体实验方法为：选取一个已知浓度样本作为原始样本，分别向该样本中加入低（临界值的1/2）、中（临界值的2倍）、高（线性范围上限值的80%）3个浓度的标准溶液，制备出3个浓度的加标样本，每个浓度样本分为5份，每份样本重复测定3次，分别计算各个浓度下的加标回收率，如每个浓度的加标回收率均在可接受范围内，则证明方法的正确度符合要求。此外，也可以与已有检测方法进行比较，证明其相关性，样本数不少于40份。

下面以25（OH）D_3为例，分别采用检测RELA能力验证样本和加标回收实验2种方式对LC-MS/MS方法的正确度进行验证。

2.7.1　采用IFCC-RELA能力验证样本评估方法的正确度　采用建立的检测25（OH）D_3的LC-MS/MS方法测定2015—2017年IFCC-RELA能力验证样本，其结果与靶值的偏移均在2%以内，证明该方法的正确度符合要求。

2.7.2　采用加标回收实验评估方法的正确度　通过检测加标前后血清25（OH）D_3浓度计算加标回收率，并以此考察方法的正确度，结果见表6。该方法的加标回收率为99%~101%，说明该方法正确度可控制在1%以内。

表6　25（OH）D_3加标回收实验结果

样本编号	加标前（ng）	加入量（ng）	测定量（ng）	回收率（%）	平均回收率（%）	*CV*（%）
1	4.05	5.01	5.01	100.00	99.40	0.53
	4.03	5.03	4.99	99.20		
	4.06	5.00	4.95	99.00		
2	4.09	10.22	10.39	101.66	100.22	1.22
	4.09	10.33	10.29	99.61		
	4.09	10.19	10.14	99.51		
3	4.04	20.09	20.12	100.15	99.92	0.25
	4.08	20.05	19.98	99.65		
	4.05	20.11	20.10	99.95		

2.8　稳定性

评估目标分析物的稳定性主要包括以下2个方面：（1）在生物基质中的稳定性，如在室温放置4～24 h的短期稳定性，在2～8 ℃、−20 ℃、−70 ℃下分别放置1周、1个月、6个月、1年的长期稳定性以及反复冻融的稳定性；（2）处理后样本的稳定性，包括处理后室温放置的稳定性、处理后自动进样器放置的稳定性。

质控品可用来评价运行的LC-MS/MS方法的性能，保证检测结果的准确性可满足预期医学用途。质控品必须与样本等同处理，同时对其短期、长期、反复冻融的稳定性进行考察，监测其偏差和精密度。

另外，必须对内标在提取和重组溶剂等生物基质中的稳定性进行监测。如果提取或重组溶剂的pH值不适用，则内标有可能会降解或者转化。

2.9　参考区间

采用所建立的LC-MS/MS方法检测大批量的临床样本，从而确定目标分析物的参考区间，具体方法可参考CLSI EP28-A3C文件[10]。若分析物的检测值呈正态分布，可采用$\bar{x}\pm2s$或$\bar{x}\pm3s$确定参考区间的上下限；若分析物检测值呈非正态分布，则采用百分位数法确定参考区间的上下限，如将第99%位数值或第99.5%位数值作为上限，以第1%位数值或第0.5%位数值作为下限。

2.10　稳健性

方法的稳健性可以理解为方法能够稳定、

持续地提供正确检测结果的能力。因此，需要定期监测分析物及其内标的保留时间和响应值、标准曲线的斜率以及定性与定量离子的离子比等指标，以确保建立的LC-MS/MS方法能够满足检测要求，并定期参加室间质评等对方法的正确度进行持续监测。

2.11　不确定度评估

目前，还没有相关标准就如何评估LC-MS/MS方法检测结果的不确定度进行说明，因此建议基于LC-MS/MS技术的参考方法的不确定度评估可以依据《测量不确定度表示指南》（GUM）[14]和《分析测量中不确定度的量化》（QUAM）[15]，采用自下而上的方法对测量结果的不确定度进行评估；而临床实验室基于LC-MS/MS技术的常规检测方法可以采用自上而下（Top-Down）的方法对测量结果的不确定度进行评估。

3　结论

目前，LC-MS/MS方法大多数是由不同实验室根据自己的实际检测需求建立的。因此，在用于常规检测之前，这些实验室自建方法必须要经过全面而严格的验证，以证明其分析性能可满足临床诊断的要求，建立的LC-MS/MS方法通过性能验证之后，实验室还要对同一实验室不同操作人员因操作习惯不同而引起的结果差异进行比对和评估，并长期监控某些分析参数，如目标分析物和内标的响应值、保留时间的变化、峰形的变化、离子比等，同时采取完善的质控措施，包括室内质控和室间质评等质量保证措施，以确保检测结果的准确、可靠。

执笔人员：

曹　正　李水军　沈　敏　程雅婷　马志军　韩连书

审阅、校验人员：

翟燕红　赵　贞　张天娇　朱宇宁　张　钧　廖志雄　李惠玲　田国力　蒋　黎　程黎明　赵蓓蓓　尹沛源　杨　鹤　苏增留　贾继明　刘华芬　李幽然　万智慧

参考文献

[1]　Food and Drug Administration. Bioanalytical method validation guidance for industry[Z]. 2018.

[2]　Clinical and Laboratory Standards Institute. Liquid chromatography-mass spectrometry methods[S]. C62-A，CLSI，2014.

[3]　Clinical and Laboratory Standards Institute. Mass spectrometry in the clinical laboratory：general principles and guidance[S]. C50-A，CLSI，2007.

[4]　中华医学会检验医学分会，卫生计生委临床检验中心. 液相色谱—质谱临床应用建议[J]. 中华检验医学杂志，2017，40（10）：770-779.

[5]　Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures[S]. EP05-A3，CLSI，2014.

[6]　李水军，SIHE W. 液相色谱-质谱联用技术临床应用[M]. 上海：上海科学技术出版社，2014：10.

[7]　VOGESER M，SEGER C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory[J]. Clin Chem，2010，56（8）：1234-1244.

[8]　BOŽOVIĆ A，KULASINGAM V. Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation：from small molecules to proteins[J]. Clin Biochem，2013，46（6）：444-455.

[9]　VAN DEN OUWELAND J M，KEMA I P. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2012，883-884：18-32.

[10]　Scientific Working Group for Forensic Toxicology. Scientific Working Group for Forensic Toxicology（SWGTOX）standard practices for method validation in forensic toxicology [J]. J Anal Toxicol，2013，37（7）：452-474.

[11]　BONFIGLIO R，KING R C，OLAH T V，et al. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds[J]. Rapid Commun Mass Spectrom，1999，13（12）：1175-1185.

[12]　TAYLOR P J. Matrix effects：the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry[J]. Clin Biochem，2005，38（4）：328-334.

[13]　EI-KHOURY J M，BUNCH D R，REINEKS E，et al. A simple and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for measurement of underivatized L-arginine，symmetric dimethylarginine，and asymmetric dimethylarginine and establishment of the reference ranges[J]. Anal Bioanal Chem，2012，402（2）：771-779.

[14]　International Organization for Standardization. Guide to the expression of uncertainty in measurement[S] .1995.

[15]　European Chemical Measurement Traceability and Quality Improvement of Network Organization/Chemical Analysis of International Traceability Cooperation Group. Quantifying uncertainty in analytical measurement[S]. EURACHEM/CITAC，2000.

（收稿日期：2018-07-07）

（本文编辑：龚晓霖）