

JJF

中华人民共和国国家计量技术规范

JJF ××××—202×

标准物质定值技术规范
有机同位素稀释质谱法

Metrological Technical Specification of Reference Materials -- Isotope
Dilution Mass Spectrometry of Organic Compounds

(征求意见稿)

202×-××-××发布 202×-××-××实施

国家市场监督管理总局发布

标准物质定值技术规范 有机同位素稀释质谱法

**Metrological Technical Specification of
Reference Materials -- Isotope Dilution Mass
Spectrometry of Organic Compounds**

JJF × × × × — 202 ×

本规范经国家市场监督管理总局于 202 × 年 × × 月 × × 日批准，并
自 202 × 年 × × 月 × × 日起施行。

归口单位：全国标准物质计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

参加起草单位：中国农业科学院质量标准与检测
技术研究所

本规范委托全国标准物质计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

参加起草人：

国家标准物质计量技术委员会规范征求意见稿

目录

引言.....	VI
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
3.1 有机同位素稀释质谱法.....	1
3.2 稳定同位素标记化合物.....	1
4 概述.....	2
5 标记化合物的要求.....	3
5.1 标记元素类型.....	3
5.2 标记元素数量.....	3
5.3 标记元素位置.....	3
5.4 同位素分布和化学纯度.....	3
5.5 质谱特征离子.....	3
6 样品制备.....	4
6.1 标记物添加比例.....	4
6.2 添加与平衡.....	4
6.3 校准溶液的制备.....	4
6.4 空白测定.....	4
7 分离与质谱检测.....	4
7.1 仪器操作.....	4
7.2 分离.....	4
7.3 质谱检测.....	5
8 定量校准方法.....	5
8.1 单点校准法.....	5
8.2 括弧法（双点校准法）.....	6
8.3 校准曲线法.....	6
8.4 标准加入法.....	7
9 方法确认与质量控制.....	8

10 计量溯源性说明.....	9
11 标准物质定值要求.....	9
12 测量结果的不确定度评定及表述.....	9
附录 A.....	11
附录 B.....	14
附录 C.....	15

国家标准物质计量技术规范征求意见稿

引言

同位素稀释质谱法是国际物质质量咨询委员会（CCQM）定义的具有基准测量方法特性的方法，是目前复杂基体样品中微量痕量成分测量的唯一具有基准测量方法特性的高准确方法。有机同位素稀释质谱法已经普遍应用于复杂基体中有机化合物的高准确度测量和标准物质定值。

本规范规定了有机同位素稀释质谱法作为标准物质定值方法的技术要求，用于指导同位素稀释质谱法作为标准物质定值方法的建立和确认，规范在标准物质定值中的应用，确保标准物质质量值的准确性与可靠性。

本规范为首次发布。

国家标准物质计量技术委员会规范征求意见稿

标准物质定值技术规范有机同位素稀释质谱法

1 范围

本规范规定了有机同位素稀释质谱法作为标准物质定值方法的技术要求，用于指导采用有机同位素稀释质谱法作为标准物质定值方法的建立和确认。

2 规范性引用文件

本规范引用了下列文件：

JJF 1001 通用计量术语及定义

JJF 1005 标准物质通用术语和定义

JJF1059.1 测量不确定度评定与表示

JJF 1343 标准物质定值的通用原则及统计学原理

JJF 1507 标准物质的选择与应用

GB/T27417 合格评定化学分析方法确认和验证指南

GB/T32465 化学分析方法验证确认和内部质量控制要求

GB/T35655 化学分析方法验证确认和内部质量控制实施指南色谱分析

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（包括所有的修订本）适用于本规范。

3 术语和定义

JJF1001、JJF1005 及以下术语适用于本规范：

3.1 有机同位素稀释质谱法 Isotope Dilution Mass Spectrometry of Organic Compounds

将一定质量的被测有机化合物的稳定同位素标记化合物添加到分析样品中，混合均匀达到平衡，经过必要的前处理步骤后，用质谱测量混合试样中标记化合物和待测组分的峰面积（或峰高），同时测定校准溶液中两种化合物的峰面积（或峰高），通过比较两种化合物物质的量和响应信号比值，计算出分析物含量的方法。

3.2 稳定同位素标记化合物 Stable isotope labeled compounds

用稳定同位素取代有机分子中一种或几种原子的化合物。

注：同位素稀释质谱分析中稳定同位素通常为 $^2\text{H}(\text{D})$ 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{33}S 、 ^{34}S 、 ^{37}Cl 、 ^{81}Br 等。

4 概述

同位素稀释质谱法是国际物质质量咨询委员会（CCQM）定义的可能作为基准测量的方法。其分析步骤通常为：将准确质量的被测有机化合物的稳定同位素标记物加入到分析样品中并与样品混合均匀达到平衡后，采用必要的样品前处理方法将分析物及其标记物从样品中同时提取分离得到样品溶液，用质谱测量混合试样中标记化合物和分析物的峰面积（峰高）；同时制备含有分析物和标记物的校准溶液，测定校准溶液中两种化合物的质谱响应（峰面积或峰高）；根据响应比值、校准溶液中两种化合物的物质的量比值以及样品中所加入的标记物的量，可以计算得到样品中分析物含量。

注 1：同位素稀释质谱法分析中，当同位素标记物加入到样品中，并与样品混合均匀达到平衡后，分析物与内标化合物比值即已恒定，在前处理和测量过程中回收率等系统误差可以进行校正，不受分析过程中其他因素干扰，测定结果的不确定度可以进行全面评估。

注 2：在实验过程中测量的仅仅是样品中分析物和同位素标记物的物质的量之比，结果溯源到校准标准，属于比例基准测量法，测量结果可以最短的溯源链溯源到国际基本单位（SI）。

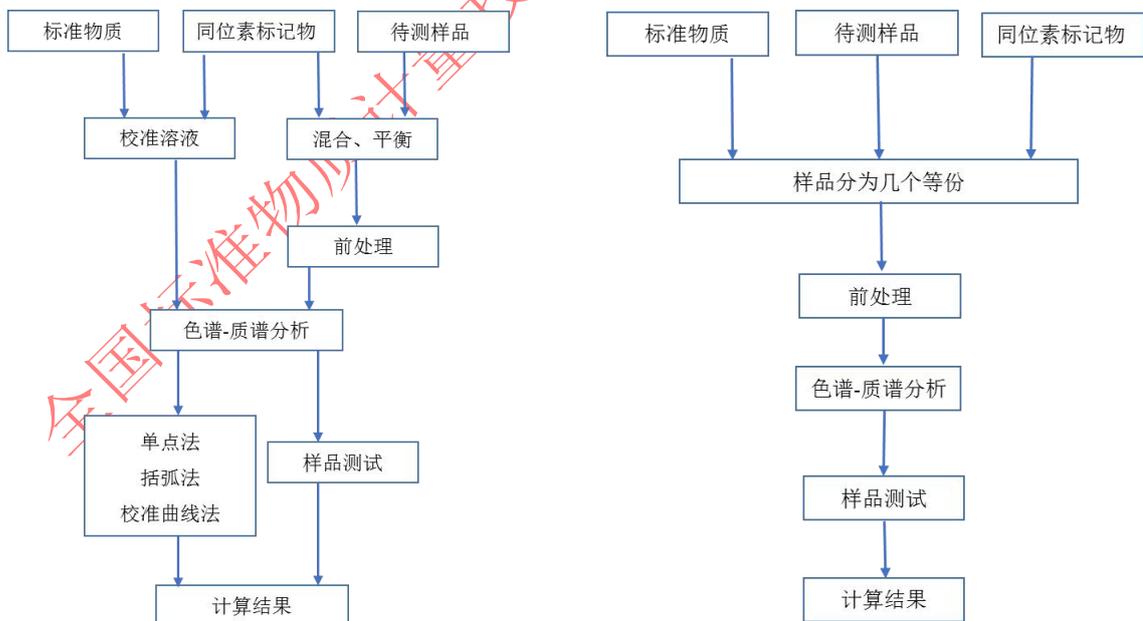


图 1. 有机同位素质谱法分析流程图

左：标准曲线法、括弧法和单点法；右：标准添加法

5 标记化合物的要求

5.1 标记元素类型

同位素标记化合物应该稳定，在分析过程中不与分析物或样品基质中成分发生同位素交换。通常 ^{13}C 和 ^{15}N 标记物比较稳定。 D 和 ^{18}O 标记化合物，尤其在不稳定位置时，可能产生同位素交换或标记元素丢失。

5.2 标记元素数量

由于分析物中 ^{13}C 或 ^2H 等天然同位素存在，分析物本身可能有明显的 $\text{M}+1$ 、 $\text{M}+2$ 等峰。标记碳或氢等原子数量较少时，分析物天然同位素和标记物同位素质谱测量中会因为离子重叠导致非线性响应，包括弧法和单点校准法情况下，影响更为显著。需要对非线性响应进行评估，也可采用非线性模型校准等方法进行测量。

较多数量的同位素标记物 (≥ 3)，能够降低分析物天然 ($\text{M}+1$) 丰度的影响，但是标记元素数量较多时可能会引起标记物与分析物性质的明显差异。

注 1：采用高分辨质谱仪测量一个稳定同位素元素标记物时，需确保分辨率能够满足分析物的天然同位素 ($\text{M}+1$) 峰不影响。

注 2： D 标记元素数量较多 (>4) 时化合物性质可能有较大变化，如色谱分离等。

5.3 标记元素位置

元素应位于化合物的稳定位置，不影响化合物的溶解、离解、衍生反应动力学等特性。由于标记稳定同位素原子量、化学性质等的差异，导致不同稳定同位素标记物与分析物的性质可能存在差异。通常 ^{13}C 标记物的理化性质变化较小。

注：标记在羰基附近的 D 原子易发生 D -氢交换，氨基酸羧基上的 ^{18}O 原子可能与水中 O 原子发生交换。

5.4 同位素分布和化学纯度

同位素分布测量是评估标记物中不同数量的同位素标记物的百分比，确认标记物中是否含有分析物及其含量水平，含有分析物时，需评估对测量结果的影响及其适用性。与样品中预期目标含量和不确定度水平相比可接受时，需要对结果进行校准或/和进行不确定度评估。

5.5 质谱特征离子

通过质谱裂解分析，选择合适的特征离子或选择合适标记物。通常优先选择分子离子。离子化过程中，标记离子应不丢失。

注：例如，克伦特罗 D6 有两个特征碎片离子，分别为 $m/z203$ 和 $m/z204$ ；而克伦特罗 D9 有一个特征碎片离子 $m/z204$ 。

6 样品制备

6.1 标记物添加比例

应通过预实验确定样品中分析物的含量水平，添加到样品中的标记物质量尽可能与样品中分析物质量接近，使质谱测试溶液中分析物和标记物的质谱响应比值接近 1。单点法校准时，校准溶液中分析物与标记物的浓度应选择等于或略大于样品中相应浓度。分析物浓度接近检出限的情况下，添加标记物的浓度可适当提高，以保证检测的精密度水平。

6.2 添加与平衡

样品中添加标记物后必须进行平衡，需要考察标记物溶剂、平衡方式和时间，以确保分析物和标记物在样品制备、提取、净化、分离、离子化和检测等过程中具有一致的行为，同时须注意样品中分析物与标记物在添加溶液中和分析过程中的化学形式是否发生改变（比如氢氘交换）。

6.3 校准溶液的制备

根据定量校准方法，配制满足需求的定量校准溶液。

6.4 空白测定

通过空白实验，确定分析物及标记物背景干扰。

7 分离与质谱检测

7.1 仪器操作

分离与质谱检测时应按照操作说明使用仪器，测量前须确认仪器的稳定性和重复性等性能良好，同时满足实验室环境条件要求。

7.2 分离

气相色谱（GC）、液相色谱（LC）、毛细管电泳等分离模式与质谱联用均可实现同位素稀释质谱检测。

复杂基体中微量痕量有机物分析时，尽可能使基体中主要干扰成分与分析物和同位素标记物分离，分析物和同位素标记物应具有相同或相近的保留时间，使得离子化、基质干扰、流动相波动等影响尽量一致，以便能够在相同的质谱条件

下同时监控相关离子，并通过峰面积（峰高）评估其信号强度。

注1：程序升温气相色谱分析时，分析物和标记物最好在等温阶段洗脱，以尽可能确保由于柱流失、载气流速等导致的背景干扰相对恒定。

注2：液相色谱分离中，流动相组成可能会影响离子化效率，化合物和标记物保留时间差距较大时，需进行评估。

7.3 质谱检测

单四级杆质谱、三重四级杆串联质谱、飞行时间质谱、离子阱质谱及不同质量分析器组合的质谱均可用于有机同位素稀释质谱分析。

根据分析物特性选择不同类型的离子源实现离子化。不同的监测离子在分析测量的选择性（特异性）和灵敏度等方面可能会存在差异，通常情况下，在分子离子峰强度保证的情况下，应该尽可能选择分子离子以保证选择性，并通过优化条件保证离子化效率。

注：LC-MS 的电喷雾离子源（ESI）通常能够保证其分子离子峰强度，而大气压化学电离源（APCI）可能会产生加合离子而非分子离子影响灵敏度，同时可能影响同位素离子丰度比测量。

注：GC-MS 的化学电离源优于电子电离源（EI），碎片离子的质荷比响应较高，可最大程度减少仪器背景、柱流失和共洗脱组分的干扰。如果分析物色谱保留弱、分子离子信号低、无合适监测碎片离子等情况下，可通过衍生化形成新的化合物后进行分离检测。

8 定量校准方法

同位素稀释质谱定量校准方法主要包括单点法、括弧法、标准曲线法和标准加入法。

8.1 单点校准法

单点校准法即比较定量法，制备与待测分析物含量接近的校准溶液，在校准溶液和样品中添加与分析物浓度相近的标记物，使标记物与分析物比例尽可能接近。根据峰面积比值与质量比值计算得到样品中分析物含量的方法。

$$C_x = \frac{\frac{A_s}{A} \times m'_s \times m}{\frac{A}{A} \times m' \times M_s} \quad (8-1)$$

C_x —待测分析物的含量；

$\frac{A_s}{A}$ -样品中分析物和标记物的峰面积比值；

$\frac{A}{A'}$ -校准溶液中分析物和标记物的峰面积比值；

m_s' -样品中标记物质量；

m' -校准溶液中标记物质量；

m -校准溶液中分析物的质量；

M_s -样品的质量；

当方法存在系统误差时（标准工作曲线不过原点），单点校准比标准曲线或括弧法的误差大，采用单点法进行标准物质定值时需要确认标准曲线过原点或没有显著性差异。

8.2 括弧法（双点校准法）

评估样品中分析物的大致含量后，制备稍高和略低于分析物浓度的两个校准溶液（通常选用 1.05 倍和 0.95 倍），分析物浓度通过“括弧式”校准溶液间的线性内插法计算得出，其中分析物与标记物的比例尽量接近，该方法可以将校准曲线非线性产生的误差最小化。双点校准法是校准曲线法的一种简化。样品的测量结果可由公式（8-2）计算：

$$C_x = \frac{\left[\left(\frac{A_s}{A_s} - \frac{A_l}{A_l} \right) \left(\frac{m_h}{m_h} - \frac{m_l}{m_l} \right) + \frac{m_l}{m_l} \right] \times m_s'}{\left(\frac{A_h}{A_h} - \frac{A_l}{A_l} \right) \times M_s} \quad (8-2)$$

C_x -待测分析物的含量；

$\frac{A_s}{A_s}$ -样品中分析物和标记物的峰面积比值；

$\frac{A_l}{A_l}$ -低浓度校准溶液中分析物和标记物的峰面积比值；

$\frac{A_h}{A_h}$ -高浓度校准溶液中分析物和标记物的峰面积比值；

$\frac{m_h}{m_h}$ -高浓度校准溶液中分析物和标记物的质量比值；

$\frac{m_l}{m_l}$ -低浓度校准溶液中分析物和标记物的质量比值；

m_s' -样品中标记物质量；

M_s - 样品质量；

8.3 校准曲线法

固定同位素标记物浓度，制备不同含量的系列分析物校准溶液，测量各浓度下两种化合物的相对响应值的比值。可通过曲线拟合法计算，以提高准确度。校

准曲线建议至少五个点以上，校准曲线范围需包含测试样品的范围。可根据分析物与标记物的峰面积比值与质量比值之间建立如下线性校准曲线：

$$\frac{A}{A'} = a + k \times \frac{m}{m_s} \quad (8-3)$$

式中：

A -分析物的峰面积；

A' -标记物的峰面积；

m -分析物的质量；

m_s' -样品中同位素标记物的质量；

a -校准曲线的截距；

k -校准曲线的斜率。

样品中分析物的质量 m ：

$$m_x = M \times C_x \quad (8-4)$$

通过转换，可以得到公式（8-5）：

$$C_x = \frac{\left(\frac{A}{A'} - a\right)}{k} \times \frac{m_s'}{M_s} \quad (8-5)$$

其中：

C_x -样品中的分析物含量；

M_s -样品质量；

m_s' -样品中同位素标记物的质量；

校准曲线法适于分析多个不同含量的样品，但因为不如括弧法的匹配度高，测量结果准确度可能会有差异；另外，仪器响应的漂移会引起测量误差。需要进行样品空白测量和不确定度评估。

8.4 标准加入法

将待测样品分为一系列相同量的样品（通常至少 5 个浓度点），除一份样品外，在样品中添加不同量的校准标准和相同量的标记物，充分混匀和平衡后，测量各样品中待测分析物和标记物峰面积比值，以峰面积比值与分析物添加量绘制校准曲线或采用线性最小二乘法进行回归，将校准曲线外推至纵坐标为零，计算待测分析物的含量。该方法能够实现基质的精确匹配，可最大限度消除基质效应的影响，得到最低的不确定度。参照公式 8-3~8-5，可以得到计算公式 8-6。

$$C_X = \frac{a}{k} \times \frac{m_s'}{M_s} \quad (8-6)$$

其中：

C_X -样品中的分析物含量；

k —校准曲线的斜率；

a —校准曲线的截距；

M_s - 样品质量；

m_s' -样品中同位素标记物的质量。

9 方法确认与质量控制

实验室可在综合考虑成本、风险和技术可行性基础上，根据预期用途选择需要确认的方法特性参数及其控制指标。

1) 标准物质是保证定值结果计量溯源性和准确度水平的关键要素，应对标准物质的来源、量值、不确定度、溯源性、使用方法、校准溶液配制过程严格把关并合理评估不确定度。通常重量法制备校准溶液的不确定度比体积法小。

2) 确认同位素标记物中是否含有目标化合物及其含量水平，评估其对量值的影响；标记物的同位素分布及其纯度，决定添加到校准溶液和样品中标记物的质量与分析物的接近程度，应对其来源、纯度和丰度进行确认；确认质谱检测母离子和子离子中标记同位素元素的数量，对于单四级杆质谱检测，同位素标记物监测离子与分析物 m/z 应该不小于 3。

3) 样品中同位素标记物的存在形态应该与分析物检测形态一致。同位素标记物添加到样品后，需要监测同位素标记物与基体成分达到充分交换与平衡。

4) 基体样品测量时，应充分考虑和评估目标化合物和同位素标记物之间基质效应程度，并通过前处理和质谱测量技术消除或校正。不同基体样品、不同来源同一类基体样品均需要进行基质效应评估。多目标同时测量时，需要评估每种分析物的基质效应。

5) 验证采用的校准方法的有效性。

6) 应保证测量所用仪器设备的计量有效性。

7) 采用相关标准物质（与被测样品相同基质、分析物含量水平无明显差异），参加相关的比对和能力验证，验证方法的可靠性。

10 计量溯源性说明

应根据方法原理和测量模型，将测量结果计量溯源至 SI 单位或具有计量溯源性的测量标准及标准物质。

采用同位素稀释质谱测量时，同位素标记物的纯度或浓度不要求计量溯源性，校准用标准物质的特性量值应具有计量溯源性，建议首选国家有证标准物质，在无可供使用的有证标准物质时，可参照 JJF1343 和 JJF1855 等确认校准标准的量值和不不确定度，实现测量结果的可溯源性。测量所用的仪器设备，应经过计量检定或校准。应合理评估各影响因素引入的测量不确定度分量。

有机同位素稀释质谱法计量溯源性关键点在于：校准标准用纯度或溶液标准物质、制备校准溶液及其逐级稀释的溯源性及其不确定度；称量的准确性；适合的样品制备方法（提取、净化、分离等），以确保分析物的提取效率、过程中分析物形态的一致性和稳定性；质谱检测中分析物 and 同位素标记物离子化效率的一致性及其稳定性；定性和定量离子选择；质谱检测器相关参数设置的选择和确认；采用的定量校准方法的确认过程及其不确定度等。

11 标准物质定值要求

当由一家实验室采用同位素稀释质谱法定值时用同位素稀释质谱法对标准物质进行定值时，应有证据证明该方法具有国家最高计量学品质，能够确保测量的有效性；有条件的情况下，应参加国际计量比对，以取得方法的国际等效度，证明方法的有效性和满足预期要求。标准物质定值应有两个或两个以上有能力执行方法操作程序、保证测量结果有效的分析者独立进行测量，并尽量使用不同的实验装置，每个分析者提供至少 6 个独立数据。除了采用同位素稀释质谱法测量，强烈建议采用另一独立测量程序开展确认测量，证明没有过失误差。确认测量程序得到的测量结果通常具有更高的不确定度，因此无需与参考测量程序得到的测量结果合并。

使用该方法要求严格控制每一操作程序，对影响特性值不确定度的所有因素逐一进行深入研究和客观分析，并控制到最小。

12 测量结果的不确定度评定及表述

经过系统验证的同位素稀释质谱法测量环节清晰、数学表达式严格，不确定度能够明确评定和表达。同位素稀释质谱法的定值结果不确定度可分为 A 类评定

和 B 类评定。A 类评定是在定值测量条件下测得结果用统计分析的方法进行的测量不确定度分量的评定，通常为方法测量重复性，计算见式 (12-1)；B 类评定包括标准物质、称量、校准溶液制备等。标准曲线法、单点法、括弧法和标准加入法的 B 类不确定度评估见附录 B。

$$u_{A,rel} = \frac{RSD}{\sqrt{n}} \quad (12-1)$$

结果的不确定度如下：

$$u_{rel} = \sqrt{u_{A,rel}^2 + u_{B,rel}^2} \quad (12-2)$$

扩展不确定度：

$$U_{rel} = k u_{rel}(k=2) \quad (12-3)$$

国家标准物质计量技术规范征求意见稿

附录 A

校准方法不确定度

A.1 单点法

单点校准同位素稀释质谱法定值测量结果和有关参数有以下函数关系：

$$C_x = \frac{\frac{A_s}{A} \times m_s' \times m}{\frac{A}{A} \times m' \times M_s} \quad (\text{A-1})$$

单点法不确定度采用以下公式评估：

$$u_{rel}(C_x) = \sqrt{\left(u_{rel}\left(\frac{A_s}{A_s}\right)\right)^2 + \left(u_{rel}\left(\frac{A}{A}\right)\right)^2 + (u_{rel,m})^2 + (u_{rel,m'})^2 + (u_{rel,m'_s})^2 + (u_{rel,M_s})^2} \quad (\text{A-2})$$

其中：

$u_{rel}\left(\frac{A_s}{A_s}\right)$ - 样品中分析物与同位素标记物峰面积比值的相对不确定度；

$u_{rel}\left(\frac{A}{A}\right)$ - 校准溶液中分析物与同位素标记物峰面积比值的相对不确定度；

$u_{rel,m}$ - 校准溶液中分析物质量的相对不确定度；

$u_{rel,m'}$ - 校准溶液中同位素标记物质量的相对不确定度；

u_{rel,m'_s} - 样品中同位素标记物质量的相对不确定度；

u_{rel,M_s} - 样品质量的相对不确定度。

A.2 括弧法

括弧法校准同位素稀释质谱法定值测量结果和有关参数有以下函数关系：

$$C_x = \frac{\left[\left(\frac{A_s}{A_s} \frac{A_l}{A_l}\right) \left(\frac{m_h}{m_h} \frac{m_l}{m_l}\right) + \frac{m_l}{m_l}\right] \times m_s'}{\left(\frac{A_h}{A_h} \frac{A_l}{A_l}\right) \times M_s} \quad (\text{A-3})$$

括弧法不确定度采用以下公式评估：

$$u_{rel}(C_x) = \sqrt{\left(u_{rel}\left(\frac{A_s}{A_s}\right)\right)^2 + \left(u_{rel}\left(\frac{A_l}{A_l}\right)\right)^2 + \left(u_{rel}\left(\frac{A_h}{A_h}\right)\right)^2 + (u_{rel,m_h})^2 + (u_{rel,m_l})^2 + (u_{rel,m'_h})^2 + (u_{rel,m'_l})^2 + (u_{rel,M_s})^2 + (u_{rel,m'})^2} \quad (\text{A-4})$$

其中：

$u_{rel}\left(\frac{A_s}{A_s}\right)$ —样品中分析物与同位素标记物峰面积比值的相对不确定度；

$u_{rel}\left(\frac{A_l}{A_l}\right)$ —低浓度校准溶液中分析物与同位素标记物峰面积比值的相对不确定度；

$u_{rel}\left(\frac{A_h}{A_h}\right)$ —高浓度校准溶液中分析物与同位素标记物峰面积比值的相对不确定度；

u_{rel,m_h} —高浓度校准溶液中分析物质量的相对不确定度；

u_{rel,m_l} —低浓度校准溶液中分析物质量的相对不确定度；

u_{rel,m'_h} —高浓度校准溶液中同位素标记物质量的相对不确定度；

u_{rel,m'_l} —低浓度校准溶液中同位素标记物质量的相对不确定度；

u_{rel,M_s} —样品质量的相对不确定度；

$u_{rel,m'}$ —样品中同位素标记物质量的相对不确定度。

A.3 校准曲线法

校准曲线同位素稀释质谱法定值测量结果和有关参数有以下函数关系：

$$C_x = \frac{\left(\frac{A}{A'} - a\right)}{k} \times \frac{m'_s}{M_s} \quad (\text{A-5})$$

校准曲线法不确定度采用以下公式评估：

$$u_{rel(C_x)} = \sqrt{(u_{rel,A})^2 + (u_{rel,A'})^2 + (u_{rel,c})^2 + (u_{rel,M_s})^2 + (u_{rel,m'})^2} \quad (\text{A-6})$$

其中：

$u_{rel,A}$ —样品中分析物峰面积的相对不确定度；

$u_{rel,A'}$ —样品中同位素标记物峰面积的相对不确定度；

$u_{rel,c}$ —校准曲线的相对不确定度；

u_{rel,M_s} —样品质量的相对不确定度；

$u_{rel,m'}$ —样品中同位素标记物质量的相对不确定度；

$$u_{rel,c} = \frac{S}{k} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{\left(\frac{c_0}{c} - \frac{\bar{c}}{c}\right)^2}{S_{xx}}} \quad (\text{A-7})$$

残差标准偏差 S 为：

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n \left[\frac{A_j}{A_j} - \left(a + k \cdot \frac{c_j}{c_j} \right) \right]^2}{n-2}} \quad (\text{A-8})$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n \left(\frac{c_j}{c_j} - \frac{\bar{c}}{\bar{c}} \right)^2 \quad (\text{A-9})$$

其中：

k —斜率；

A —截距；

p —测试 c_0 的次数；

n —测试校准液的次数；

$\frac{c_0}{c_0}$ —测出分析物与同位素标记物的比值；

$\frac{\bar{c}}{\bar{c}}$ —不同校准溶液分析物与同位素标记物比值平均值（ n 次测试）；

j ：表示获取校准曲线测量次数。

A.4 标准加入法

标准加入同位素稀释质谱法定值测量结果和有关参数有以下函数关系：

$$C_X = \frac{a}{k} \times \frac{m'_s}{M_s} \quad (\text{A-10})$$

B 类不确定度采用以下公式评估：

$$u_{rel(C_x)} = \sqrt{(u_{rel,c})^2 + (u_{rel,m'_s})^2 + (u_{rel,M_s})^2} \quad (\text{A-11})$$

其中：

$u_{rel,c}$ —校准曲线引入不确定度(参见 A-7~ A-9)；

u_{rel,m'_s} —样品中同位素标记物质量的相对不确定度；

u_{rel,M_s} —样品质量的相对不确定度。

附录 B

基质效应评估方法

建立同位素稀释质谱定值方法时，应评估分析物和同位素标记物间是否存在基质效应及其影响程度，必要时需采取校正措施，评估其引入的不确定度。所有不同基体或者不同基质组成的标准物质，均需要评价基质效应的影响。

基于标准物质定值校准模型，基质效应可以采用校准曲线斜率、单点等模式评估。

对于校准曲线斜率比法，空白样品或待测样品经前处理后的待测液，配制系列浓度的基质匹配校准曲线，通过与校准溶液比较斜率评估基质效应。对于单点法校准模式，可以采用上述方法，比较特定浓度水平下的基质效应。

$$\Theta = \frac{ME_x\%}{ME_i\%} \quad (\text{B-1})$$

其中：

$$ME_x = \frac{K_{x-m}}{K_{x-s}} \times 100\% \quad (\text{B-2})$$

$$ME_i = \frac{K_{i-m}}{K_{i-s}} \times 100\% \quad (\text{B-3})$$

式中：

Θ -分析物与标记物间的基质效应；

ME_x -分析物的基质效应；

ME_i -标记物的基质效应；

K_{x-m} -基质匹配液中分析物校准曲线斜率；

K_{x-s} -校准溶液中分析物校准曲线斜率；

K_{i-m} -基质匹配液中标记物校准曲线斜率；

K_{i-s} -校准溶液中标记物校准曲线斜率。

附录 C

应用实例 1

有机同位素稀释质谱法用于“猪肉粉中克伦特罗”有证标准物质 (GBW10135) 的定值

C.1 仪器与试剂

C.1.1 仪器

- 1) 静电场离子轨道阱高分辨质谱 (Obitrap Q Exactive™) ;
- 2) 液相色谱三重四极杆串联质谱 (LC-MS/MS) ;
- 3) 天平 (感量 0.001mg, 感量 0.1mg) ;
- 4) 匀浆机 (德国 IKA 公司) ;
- 5) 涡旋混合器;
- 6) 离心机;
- 7) PCX 固相萃取柱 (6 mL, 150 mg) ;
- 8) 水浴氮吹仪。

C.1.2 试剂与样品

- 1) 盐酸克伦特罗纯度标准物质 (CLB, GBW(E)061890, 99.0%, U=0.6%) ;
- 2) 盐酸克伦特罗同位素标记物 (盐酸克伦特罗-D9, CLB-D9, 纯度>99.7%; 盐酸克伦特罗-D6, CLB-D6, 纯度>99.8%±0.1%) ;
- 3) 猪肉粉中克伦特罗成分分析标准物质 (GBW10135) ;
- 4) 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司) ;
- 5) 甲酸 (分析纯, 北京化工厂) ;
- 6) 实验室用水为经 Milli-Q 净水系统 (0.22μm 过滤膜) 过滤的去离子水。

C.2 稳定同位素标记化合物的准备

C.2.1 同位素分布和化学纯度

采用 QE Obitrap-HRMS, 蠕动泵流动注射 100μg/kg 的同位素标记物甲醇溶液, 采集 1 min 总离子流图 (TIC), 随机选择 10 张质谱图, 依据 Full MS 质谱图中的目标分析物及其可能杂质 (不同氘代数物质) 的质谱峰平均强度, 计算其归一化后百分比, 得到 CLB-D9 和 CLB-D6 的同位素分布。采用 HPLC-DAD 测定 2 个标

记物的化学纯度。结果见表 C.1。

表 C.1 CLB-D6 和 CLB-D9 的同位素分布和纯度 (%)

化合物	纯度	M-D ₀	M-D ₄	M-D ₅	M-D₆	M-D ₇
CLB-D ₆	99.9	0.14±0.02	0.51±0.04	8.17±0.13	91.19±0.13	/
	纯度	M-D ₀	M-D ₆	M-D ₇	M-D ₈	M-D₉
CLB-D ₉	99.8	0.49±0.03	0.21±0.03	0.92±0.06	9.23±0.21	89.15±0.22

C.2.2 质谱特征离子

采用 LC-MS/MS 采集 CLB-D9、CLB-D6 和 CLB 的质谱碎片离子信息，CLB-D6 在碎裂过程中产生 m/z 204.01、m/z 203.01 两个强度接近特征离子，CLB-D9 产生稳定的 m/z 204.02 特征离子，质谱响应强度与 CLB 的特征离子 m/z 203.01 差异较小，因此选择 CLB-D9 作为同位素稀释剂。

表 C.2 三种化合物的分子离子和特征碎片离子

化合物	分子离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)
CLB	277.08	259.07, 203.01, 168.04, 132.06
CLB-D ₆	283.12	265.11, 204.01, 203.01, 168.04, 132.06
CLB-D ₉	286.14	268.13, 204.02, 168.04, 132.06

C.2.3 标记物添加比例确定及平衡时间

采用 LC-MS/MS 法初测猪肉粉中克伦特罗含量为 3.7μg/kg，按照 CLB-D9 同位素分布、纯度以及其定量离子对质谱响应，重量法配制 CLB-D9 校准溶液，使其质谱响应与目标物 CLB 的比值在 0.95-1.05 之间。

比较样品中添加标记物后立即进行前处理及 LC-MS/MS 测定、平衡 1h、2h、6h、12h 和 24h 后测定，发现 1h 后测定结果已经稳定，确定平衡时间为不少于 1h。

C.3 样品前处理

C.3.1 提取

称取样品 0.5 g (准确至 0.0001 g)，加 1.5 g 水复溶，加入适量 CLB-D9 标记物溶液混匀后放置 1 小时。加 5 ml 水，14000 rpm 匀浆 1 min，用 5 mL 水清洗刀头，清洗液与匀浆液合并。加 0.1%甲酸乙腈溶液 10 mL，涡旋混合 2 min。12000 rpm (4°C) 冷冻离心 15 min，收集上清液过 0.45 μm 聚醚砜 (PES) 滤膜，待净化。

C.3.2 净化

PCX 固相萃取柱依次经 8 mL 甲醇、8 mL 水、8 mL 0.2%甲酸水溶液活化。提取液全部上样，分别用 0.2%甲酸水溶液和 50%甲醇水溶液各 8 mL 淋洗，抽干，用 8 mL 正己烷淋洗、抽干。用 5%氯化乙酸乙酯：甲醇（2:1，v/v）溶液 10 mL 洗脱。洗脱液在 45°C 水浴下氮吹至近干，用 0.1%甲酸水溶液 2 mL 复溶，过 0.22 μm 聚醚砜(PES)滤膜，供 LC-MS/MS 检测。

C.4 色谱-质谱测量

色谱条件：ACQUITY CSH C18 色谱柱(100 mm×3.0 mm, 1.7 μm)；流动相 A 为乙腈，流动相 B 为 20%乙腈水溶液（含 0.1%甲酸）。梯度洗脱程序：0~5 min, 100%B；5~5.1 min, 100%B~30%B；5.1~9 min, 30%B；9~9.1 min, 30%B~100%B；9.1~16 min, 100%B。流速：0.2 mL/min；柱温：40°C；进样体积：20 μL 。

质谱条件：正离子扫描方式；多反应检测(MRM)；雾化气压力(GS1)：50 Psi；辅助气压力(GS2)：60 Psi；气帘气压力(CUR)：15 Psi；去簇电压(DP)：40V；碰撞室入口电压(EP)：13V；碰撞室出口电压(CXP)：14V；CAD: medium; IS: 1500V；TEM:600°C。各特征离子对碰撞电压参数见表 2。

表 C.3 各特征离子对碰撞电压参数表

化合物	定量离子对	CE(V)	定性离子对	CE(V)	保留时间 (min)
CLB	277.0/203.0	25	277.0/168.0	45	3.29
CLB-D9	286.0/204.0	24	277.0/132.0	45	3.29

C.5 基质效应评估

猪肉标准物质候选物中 CLB 与 CLB-D9 均存在较明显的基体抑制现象，CLB 的基质效应为 61.6%，而 CLB-D9 的基质效应为 53.4%，说明两种化合物受到基体抑制的程度差别较大，测量校正因子 θ 为 1.15，基质效应影响不能忽略，因此采用基质匹配校准溶液对样品进行测量。

C.6 定量校准方法

初测 0.1~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 克伦特罗仪器测量的线性方程,截距接近“零”，因此可采用单点法进行定量校准。采用空白猪肉粉样品，添加适量 CLB 与 CLB-D9 溶液，制备与标准物质候选物含量水平相近的基质匹配校准溶液，采用单点校准法进行定

量。

C.7 方法验证

方法准确度与精密度

取空白猪肉粉添加相同浓度的 CLB 与 CLB-D9, 样品中分析物浓度分别为 0.1、0.2、1.0 和 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 按照 C.3 部分进行前处理, 按照 C.4 部分测量方法回收率和精密度, 结果如下, 猪肉中克伦特罗的回收率为 97.0% ~ 102.30% 之间, 精密度 (RSD) 在 2.0% ~ 4.8% 之间。

C.8 测量结果不确定度评定

采用单点基质匹配校准方法定量, 对猪肉粉中克伦特罗测量结果的不确定度进行了评定, 评定包括了全部测量步骤: 测量重复性、样品称重、CLB 校准溶液、CLB-D9 稳定同位素标记物质量、样品称量、分析物与同位素标记物峰面积比值等。

表 C.4 测量克伦特罗结果的不确定度评定

不确定度类型	参数	$u_{\text{rel}(xi)}$ (%)
A 类	方法精度	2.6
B 类	样品中 CLB 与 CLB-D9 峰面积比值	1.1
	校准溶液中 CLB 与 CLB-D9 峰面积比值	0.61
	CLB 校准溶液	0.45
	校准溶液中 CLB -D9 质量	0.11
	样品中添加 CLB- D9 质量	0.19
	样品称量	0.038
合成标准不确定度(%)		2.9