



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF XXXX-XXXX

时间分辨荧光免疫分析仪校准规范

Calibration Specification of Time-resolved Fluorescence

Immunoassay Analyzers

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局发布

时间分辨荧光免疫分析仪 校准规范

Calibration Specification for
Time-resolved Fluorescence Immunoassay
Analyzers

JJF XXXX-XXXX

归口单位：全国生物化学计量技术委员会

起草单位：广东省计量科学研究院

中国计量科学研究院

珀金埃尔默医学诊断产品（上海）有限公司

广州市达瑞生物技术股份有限公司

广州万孚生物技术有限公司

本规程委托全国生物计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

周瑾艳（广东省计量科学研究院）

黄彦捷（广东省计量科学研究院）

武利庆（中国计量科学研究院）

王 晶（中国计量科学研究院）

黄哲锋（珀金埃尔默医学诊断产品（上海）有限公司）

李志雄（广州市达瑞生物技术股份有限公司）

孙雅玲（广州万孚生物技术股份有限公司）

目 录

目 录.....	I
引 言.....	II
1 范围.....	1
2 引用文件.....	1
3 概述.....	1
4 计量性能要求.....	2
5 校准条件.....	2
6 校准项目和校准方法.....	3
7 校准结果的表达.....	7
8 复校时间间隔.....	7
附录 A 荧光性能校准用标准物质的配制.....	8
附录 B 临床项目校准用标准物质的选择原则.....	9
附录 C 校准原始记录格式.....	10
附录 D 时间分辨荧光免疫分析仪校准证书内页格式.....	12
附录 E 示值误差不确定度评定示例.....	13

引言

JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001-2011《通用计量术语及定义》、JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》、JJF 1094-2002《测量仪器特性评定》，共同构成支撑本校准规范制订工作的基础性系列规范。

本规范参考了 JJF1752-2019《全自动封闭型发光免疫分析仪国家规范》、YY/T 1533-2017《全自动时间分辨荧光免疫分析仪》、YY/T 1304.1-2015《时间分辨荧光免疫检测系统 第 1 部分：半自动时间分辨荧光免疫分析仪》、YY/T 1304.2-2015《时间分辨荧光免疫检测系统 第 2 部分：时间分辨荧光免疫分析定量测定试剂（盒）》。

本规范为首次发布。

时间分辨荧光免疫分析仪校准规范

1 范围

本校准规范适用于时间分辨荧光原理的免疫分析仪。

2 引用文件

本规范引用下列文件：

JJF1752-2019《全自动封闭型发光免疫分析仪国家规范》

YY/T 1533-2017《全自动时间分辨荧光免疫分析仪》

YY/T 1304.1-2015《时间分辨荧光免疫检测系统 第1部分：半自动时间分辨荧光免疫分析仪》

YY/T 1304.2-2015《时间分辨荧光免疫检测系统 第2部分：时间分辨荧光免疫分析定量测定试剂（盒）》

凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本校准规范；凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单），适用于本校准规范。

3 概述

时间分辨荧光免疫分析仪是一种采用非放射性同位素免疫分析技术的体外微量分析仪器。根据标记物的荧光光谱的特点，通过延缓测量时间，排除标本中非特异性荧光的干扰，达到准确定量分析的目的。仪器通常采用稀土金属铕离子（ Eu^{3+} ）作为示踪物，标记蛋白质、多肽、激素、抗体、核酸探针或生物活性细胞，实现待测物的荧光定量检测。该仪器广泛用于医院、防疫站、生物制品及科研院校等部门，用于蛋白质和多肽激素、半抗原、病原体抗原抗体、肿瘤标志物分析、干血斑样品、核酸及天然杀伤细胞的活力等方面的测定，是临床体外诊断检测中常用仪器。

时间分辨荧光免疫分析仪分全自动和半自动两种模式。全自动由样本加注模块、微板搬运模块、振荡孵育模块、洗板模块、试剂加注模块、时间分辨荧光检测模块和控制系统组成。半自动时间分辨荧光免疫分析仪与全自动相比，没有样品自动处理模块，主要由光源、样品池、滤光系统、信号光接收透镜组、光电检测系统组成。



图 1 全自动时间分辨荧光免疫分析仪结构图



图 2 半自动时间分辨荧光免疫分析仪结构图

4 计量性能要求

计量性能要求见表 1。

表 1 计量特性要求

校准项目	技术要求	全自动	半自动
检测限	$\leq 10^{-12}$ mol/L	+	+
线性	$r \geq 0.99$	+	+
重复性	$\leq 3\%$	+	+
稳定性	$\pm 10\%$	+	+
温度准确度和波动度	温度准确度: $\pm 1.5^\circ\text{C}$ 温度波动度: $\pm 1.5^\circ\text{C}$	+	-
临床项目示值误差	$\pm 10\%$	+	+
临床项目重复性	$\leq 15\%$	+	+
携带污染率	$\pm 3\%$ (高低值相差三个数量级以上) $\pm 5\%$ (高低值相差两个数量级)	+	-

注: +为校准项目, -为非校准项目, 计量特性条文中给出的技术指标不是用于合格性判定, 仅供参考。

5 校准条件

5.1 环境条件

5.1.1 环境温度: $(10\sim 30)^\circ\text{C}$

5.1.2 相对湿度: $\leq 70\%$

5.1.3 室内应具备良好的防尘措施, 仪器远离震动、电磁干扰。

5.2 校准用标准物质、试剂及装置

5.2.1 标准物质

铊单元素溶液国家有证标准物质，相对扩展不确定度不大于 2% ($k=2$)。具体配制方法可参考附录 A。

临床项目校准可选用甲胎蛋白、雌三醇、人胰岛素等有证标准物质，相对扩展不确定度不大于 5% ($k=2$)。标准物质的选择原则参照附录 B。

5.2.2 试剂

配套体外诊断试剂盒。

5.2.3 校准装置

荧光特性校准可选用含有不同浓度金属铊 ($E_x=340\text{ nm}$ 、 $E_m=614\text{ nm}$) 溶液或与其浓度等效的时间分辨荧光校准用标准板，相对扩展不确定度不大于 5% ($k=2$)。

数字温度计：测量范围 (0~100) °C，最小分度 0.1 °C。

电子天平：分度值不低于 0.1 mg，I 级合格。

容量瓶、移液管：A 级合格。

6 校准项目和校准方法

6.1 检测限

采用有证标准物质参考附录 A 方法配制 10^{-12}mol/L 铊标准液和增强液各 2 份，或使用与其浓度等效的时间分辨荧光校准用标准板，分别在仪器上连续测 10 次，分别计算 2 份样品的荧光平均值 \bar{X}_{EU} 、 \bar{X}_{ES} 以及测量结果标准差 s_{EU} 、 s_{ES} ，设置置信因子为 2.58，当式(1)成立，即检测限不大于 10^{-12}mol/L 。

$$\bar{X}_{\text{EU}} - 2.58s_{\text{EU}} > \bar{X}_{\text{ES}} - 2.58s_{\text{ES}} \quad (1)$$

式中：

\bar{X}_{EU} — 10^{-12}mol/L 铊标准液(Eu^{3+})的荧光均值；

\bar{X}_{ES} —增强液的荧光均值；

s_{EU} — 10^{-12}mol/L 铊标准液(Eu^{3+})的荧光强度标准偏差；

s_{ES} —增强液的荧光强度标准偏差。

6.2 线性

采用有证标准物质参考附录 A 方法配制标准溶液，或使用与其浓度等效的时间分辨荧

光校准用标准板，在低值至高值范围内，选取至少 5 个浓度梯度的标准溶液进行测量，重复测量 3 次，取其平均值。将各标准物质浓度对数值(X_i)与荧光对数值(Y_i)进行线性回归，按公式(2)~公式(5)计算线性相关系数 r ：

$$S_{xx} = \sum X^2 - \frac{\sum X^2}{n} \quad (2)$$

$$S_{yy} = \sum \bar{Y}^2 - \frac{\sum \bar{Y}^2}{n} \quad (3)$$

$$S_{xy} = \sum X\bar{Y} - \frac{\sum X\bar{Y}}{n} \quad (4)$$

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx}S_{yy}}} \quad (5)$$

式中：

X —每个水平的标准物质浓度对数值；

\bar{Y} —每个水平的标准物质荧光对数值 3 次测量平均值；

n —标准物质浓度水平的个数；

r —线性相关系数。

6.3 重复性

采用合适的标准溶液，或使用与其浓度等效的时间分辨荧光校准用标准板，连续测量 6 次，计算测得荧光值的相对标准偏差作为重复性的表征，如公式(6)所示。

$$s_{rel,1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{y}} \times 100\% \quad (6)$$

式中：

$s_{rel,1}$ —荧光性能测量相对标准偏差，%；

y_i —第 i 次测量结果；

\bar{y} —6 次测量结果的平均值；

n —测量次数。

6.4 稳定性

待分析仪开机处于稳定工作状态后，取适中的荧光标准溶液或使用与其浓度等效的时间分辨荧光校准用标准板，连续测量 10 次，计算测定结果的平均值，过 4 h、8 h 后分别再上机重复测试 10 次，计算测定荧光的平均值，以第 1 次的测定结果作为基准值，按式(7)计算相对偏移以表示稳定性(α , %):

$$\alpha = \frac{\bar{y}_n - \bar{y}_1}{\bar{y}_1} \times 100\% \quad (7)$$

式中:

α —稳定性;

\bar{y}_n —第 4 h、8 h 测定的均值;

\bar{y}_1 —初始测定值的平均值。

6.5 温度准确度与波动度

在每个孵育舱中布一个测温点，待孵育系统内温度稳定后进行测量，每隔 2 分钟记录一次，每个孵育舱各记录 10 次，各测量点温度实测值为 10 次测量的平均值，孵育系统温度准确性 Δt_d 按公式 (8) 计算:

$$\Delta t_d = \bar{t} - t_s \quad (8)$$

式中:

Δt_d —孵育系统温度准确度， $^{\circ}\text{C}$;

\bar{t} —每个孵育舱所有测温点的温度实测平均值， $^{\circ}\text{C}$;

t_s —仪器设定的温度值， $^{\circ}\text{C}$ 。

孵育舱温度波动度: 在仪器稳定状态下，对各孵育舱连续测量 10 min(每 1 min 记录一次)，实测最高温度和最低温度温差的一半，冠以“ \pm ”，如公式 (9) 计算，取全部测量点中温度变化量最大值作为温度波动度校准结果。

$$\Delta t_f = \pm \max[(t_{j\max} - t_{j\min}) / 2] \quad (9)$$

式中:

Δt_f —温度波动度， $^{\circ}\text{C}$;

$t_{j\max}$ —测量点 j 在 n 次测量中的最高值， $^{\circ}\text{C}$;

$t_{j\min}$ —测量点 j 在 n 次测量中的最低值， $^{\circ}\text{C}$ 。

6.6 临床项目示值误差

示值误差的校准采用免疫分析仪配套检测试剂（含校准品与质控品）以及相应项目具有互换性的国家有证标准物质。通常采用检测项目的校准点应包括 1 个低值点和 1 个高值点，低值点和高值点至少相差一个数量级，且低值点和高值点应当覆盖客户要求的校准点或校准区间，当客户要求时，也可进行单点校准。

分别测量选定检测项目的校准点，每个校准点分别重复测量 3 次，计算 3 次测量结果的平均值。根据公式(10)计算示值误差：

$$\Delta c = \bar{c} - c_s \quad (10)$$

式中：

Δc —示值误差；

\bar{c} —3 次测量结果平均值；

c_s —标准物质的认定值。

测量结果的单位应与国家有证标准物质认定值的单位保持一致。

6.7 临床项目检测重复性

采用与仪器配套的检测试剂（含校准品与质控品），以相关项目国家有证标准物质作为测量样本，在仪器上重复测量 6 次，按照公式(11)计算测量结果的相对标准偏差，以表征临床项目检测重复性。

$$s_{rel,2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\% \quad (11)$$

式中：

$s_{rel,2}$ —临床项目测量相对标准偏差，%；

x_i —第 i 次测量结果；

\bar{x} —6 次测量结果的平均值；

n —测量次数。

6.8 携带污染率

采用与仪器配套的检测试剂（含校准品与质控品），选取合适临床项目标准物质的

低值和高值为测量样本进行交替测量，低值和高值的浓度至少相差两个数量级，先对低值样本重复测量 4 次，接着对高值样本重复测量 4 次，再对低值样本重复测量 4 次，获得 2 组低浓度测量值和 1 组高浓度测量值，然后按照公式(12) 和公式(13) 将每相邻的两组数值进行计算，得到低浓度到高浓度的携带污染率计算值 ΔC_{LH} 和高浓度到低浓度的携带污染率计算值 ΔC_{HL} ，取两者最大值作为最终的携带污染率。

$$\Delta C_{LH} = \frac{(H_2 + H_3 + H_4)/3 - H_1}{(H_2 + H_3 + H_4)/3 - (L_{12} + L_{13} + L_{14})/3} \times 100\% \quad (12)$$

$$\Delta C_{HL} = \frac{L_{21} - (L_{22} + L_{23} + L_{24})/3}{(H_2 + H_3 + H_4)/3 - (L_{22} + L_{23} + L_{24})/3} \times 100\% \quad (13)$$

式中：

ΔC_{LH} —从低浓度到高浓度的携带污染率，%；

ΔC_{HL} —从高浓度到低浓度的携带污染率，%；

L_{11}, \dots, L_{14} —第一组低浓度的测量值；

H_1, \dots, H_4 —第一组高浓度的测量值；

L_{21}, \dots, L_{24} —第二组低浓度的测量值。

7 校准结果的表达

校准记录应详尽地记载测量数据和计算结果，推荐的校准记录检附录 C。示值误差测量结果的测量不确定度按照 JJF1059.1 的要求评定，不确定度评定示例见附件 E。经校准后的时间分辨免疫荧光分析仪应出具校准证书，校准证书应符合 JJF1071-2010 中 5.12 的要求。

8 复校时间间隔

由于复校时间间隔的长短是由仪器的使用情况、使用者、仪器本身质量等诸因素所决定的，因此，送校单位可根据实际使用情况自主决定复校时间间隔，建议复校时间间隔为 1 年。

附录 A

荧光性能校准用标准物质的配制

A.1 试剂

A.1.1 铊单元素溶液国家二级或以上有证标准物质；

A.1.2 纯水：新鲜制备，符合 GB/T 6682-2008 一级水规格要求；

A.1.3 增强液：时间分辨荧光免疫分析仪的配套试剂。

A.2 设备与器材

使用的设备与器材须经计量部门检定或校准。

A.2.1 天平：检定分度值不低于 0.1 mg，合格；

A.2.2 玻璃量器：容量瓶（10 mL、100 mL），单标线吸量管（0.1 mL、1 mL），A 级合格；

A.2.3 可调移液器：100 μL ，合格。

A.3 空白溶液的配制

在 $(20\pm 3)^\circ\text{C}$ 下，取 100 μL 纯水于 10 mL 容量瓶中，增强液定容，混合均匀，即可得到空白溶液。

A.4 铊工作标准溶液的配制

在 $(20\pm 3)^\circ\text{C}$ 下，用天平准确称取所需的铊单元素溶液标准物质于 100 mL 容量瓶中，纯水定容，混合均匀，配制成浓度为 1×10^{-4} mol/L 的铊溶液母液。使用 10 mL 容量瓶，按下表配制系列铊溶液：

编号	铊浓度 (mol/L)	配制方法
A1	1×10^{-6}	吸取 0.1 mL 母液，纯水定容至 10 mL
A2	1×10^{-7}	吸取 1 mL A1，纯水定容至 10 mL
A3	1×10^{-8}	吸取 1 mL A2，纯水定容至 10 mL
A4	1×10^{-9}	吸取 1 mL A3，纯水定容至 10 mL
A5	1×10^{-10}	吸取 1 mL A4，纯水定容至 10 mL

分别取 100 μL 系列铊溶液于 10 mL 容量瓶中，增强液定容，混合均匀，即可得到浓度分别为 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-10} 、 1×10^{-11} 、 1×10^{-12} mol/L 的工作标准溶液。

工作标准溶液应现配现用。可根据实际情况参考以上方法配制其他浓度梯度标准溶液。

附录 B

临床项目校准用标准物质的选择原则

B.1 标准物质的选择

人胰岛素、游离雌三醇或甲胎蛋白等有证标准物质不可获得或客户要求时，可选择其他检验项目的有证标准物质进行校准。

B.2 校准示值误差的标准物质

校准示值误差的标准物质应具有互换性*，由于免疫分析存在基质效应，校准示值误差时不建议将有证标准物质稀释使用，否则可能影响互换性。

*互换性指对于给定标准物质的规定量，由两个给定测量程序所得到测量结果之间关系与另一个制定物质所得测量结果之间关系一致程度表示的标准物质特性。[JJF 1001-2011，定义 8.16]

B.3 校准临床项目重复性、携带污染率的标准物质

校准重复性、携带污染率时可采用高纯有证标准物质按照重量-容量法配制校准溶液，但此时应当考虑配制过程中引入的不确定度；用于携带污染率校准的两个标准物质浓度应至少相差一个数量级。

附录 C

校准原始记录格式

(推荐性表格)

送检单位													
仪器名称							制造厂						
型号规格							出厂编号						
温度							湿度						
原始记录号							校准时间						
校准员							核验员						
一、检测限													
测量 时间	检测结果										\bar{X}_n	s	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Eu(3+)													
空白													
结论	$\bar{X}_{EU} - 2.58s_{EU}$ $\bar{X}_0 - 2.58s_0$												
二、线性													
标准物质	测定值			平均值	标准值	线性相关系数							
	1	2	3										
1													
2													
3													
4													
5													
三、重复性													
测量次数	1	2	3	4	5	6	重复性%						
测量结果													
四、稳定性													
测量 时间	检测结果										\bar{x}_n	α	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
x_1													
x_4													
x_8													

五、温度准确性及波动性							
次数	指示温度(°C)	实 测 值 (°C)					
		1	2	3	4	5	最大值-最小值
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
平均值							
温度波动(30 min):							
温度偏差:							
六、示值误差							
标准物质	测定值		平均值		标准值	示值误差	
低值							
高值							
七、临床项目检测重复性							
测量次数	1	2	3	4	5	6	重复性%
测量结果							
八、携带污染率							
浓度	1	2	3	4	携带污染率%		
低					/		
高					$\Delta C_{LH} =$		
低					$\Delta C_{HL} =$		

附录 D

时间分辨荧光免疫分析仪校准证书内页格式

证书编号 Certificate No.		原始记录编号 Record No.	
序号	校准项目	校准结果	
1	检测限		
2	线性		
3	重复性		
4	稳定性		
5	温度准确性及波动性		
6	示值误差		
7	临床项目重复性		
8	携带污染率		
说明			
1. 示值误差校准结果的扩展不确定度： $U=$ ， $k=2$ 。			
2. 计算测量结果的扩展不确定度： JJF1059.1-2012 不确定度评定与表示。			

附录 E

示值误差不确定度评定示例

E.1 概述

本校准方法采用时间分辨荧光免疫分析仪测定有证标准物质，并与标准物质标称值进行比对。

E.2 数学模型

$$\Delta c = \bar{c} - c_s \quad (\text{E.1})$$

式中：

Δc —示值误差；

\bar{c} —3 次测量结果平均值；

c_s —标准值。

单位与标准物质标称值单位一致。

E.3 方差和灵敏系数

对公式 E.1 求偏导，则

$$u(\Delta c) = \sqrt{c_1^2 u^2(\bar{c}) + c_2^2 u^2(c_s)} \quad (\text{E.2})$$

其中，灵敏系数 $c_1=1$ ， $c_2=1$

$$u(\Delta c) = \sqrt{u^2(\bar{c}) + u^2(c_s)} \quad (\text{E.3})$$

E.4 测量不确定度分量

时间分辨荧光免疫分析仪示值误差的不确定度来源：

- (a) 标准物质的标准不确定度 $u(c_s)$ ；
- (b) 时间分辨荧光免疫分析仪测量重复性引入的标准不确定度 $u(\bar{c})$ 。

下面以一次时间分辨荧光免疫分析仪校准为例具体分析其测量不确定度。临床项目采用甲胎蛋白国家有证标准物质。在校准中甲胎蛋白标准物质 3 次测定的结果分别为 24.605 IU/mL、26.672IU/mL、27.212IU/mL，该标准物质的标准值为(25.6±1.2) IU/mL($k=2$)。

E.4.1 标准物质的标准不确定度 $u(c_s)$

由标准物质引入的不确定度分量 $u(c_s)$ 可以根据标准物质证书提供的扩展不确定度 $U(c_s)$ 和包含因子 k 根据公式(E.4)计算:

$$u(c_s) = \frac{U(c_s)}{k} \quad (\text{E.4})$$

式中:

$u(c_s)$ —标准物质引入的标准不确定度, IU/mL;

$U(c_s)$ —标准物质证书提供的扩展不确定度, IU/mL;

k —标准物质证书提供的包含因子。

甲胎蛋白标准物质的标准值为 (25.6 ± 1.2) IU/mL ($k=2$), 则由标准物质引入的标准不确定度分量:

$$u(c_s) = \frac{U(c_s)}{k} = \frac{1.2}{2} = 0.6 (\text{IU/mL})$$

E.4.2 测量重复性引入不确定度分量 $u(\bar{c})$

选定一台时间分辨荧光免疫分析仪, 对该甲胎蛋白标准物质连续测量 7 次, 的得到一组测量值: 26.334 IU/mL、25.164 IU/mL、27.987 IU/mL、26.119 IU/mL、26.534 IU/mL、25.911 IU/mL、28.937 IU/mL。

则单次测量结果标准偏差:

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 1.30 (\text{IU/mL})$$

实际校准时在重复性条件下连续测量 3 次, 以 3 次测量的算术平均值作为结果, 则由重复性引入的标准不确定度分量为:

$$u(\bar{c}) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} = \frac{1.30}{\sqrt{3}} = 0.751 (\text{IU/mL}) \quad (\text{E.5})$$

E.4.3 合成不确定度 u_c

$$u_c = \sqrt{u(\bar{c})^2 + u(c_s)^2} \approx 1.0 (\text{IU/mL}) \quad (\text{E.6})$$

E.5 扩展不确定度

取包含因 $k=2$, $U = k \times u_c \approx 2.0 (\text{IU/mL})$