



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF ××××—202×

纳升液相色谱仪校准规范

Calibration Specification of Nano-Liquid Chromatography

(征求意见稿)

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布

纳升液相色谱仪校准规范

Calibration Specification of Nano-Liquid

Chromatography

JJF XXXX—202x

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

参加起草单位：黑龙江省计量检定测试院

湖南省计量检测研究院

南京计量监督检测院

本规范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：

参加起草人：

全国生物计量技术委员会

目录

引言	(II)
1 范围	(错误! 未定义书签。)
2 引用文件	(错误! 未定义书签。)
3 术语	(错误! 未定义书签。)
3.1 纳升液相色谱	(1)
3.2 输液泵	(1)
4 概述	(1)
5 计量特性	(1)
6 校准条件	(2)
6.1 环境条件	(2)
6.2 校准设备和试剂	(2)
7 校准项目和校准方法	(2)
7.1 外观及功能检查	(2)
7.2 输液泵流量示值误差	(2)
7.3 输液泵流量重复性	(3)
7.4 整机性能 (定性测量重复性)	(4)
8 校准结果表达	(4)
8.1 校准结果处理	(4)
8.2 校准结果的测量不确定度	(4)
9 复校时间间隔	(4)
附录 A 纯水密度表	(5)
附录 B 校准原始记录格式	(6)
附录 C 校准证书 (内页) 格式	(7)
附录 D 测量不确定度评定示例	(8)

引言

JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001《通用计量术语及定义》和JJF 1059.1《测量不确定度评定与表示》共同构成支撑本规范制定工作的基础性系列规范。校准方法及计量特性等主要参考了GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》、GB/T 26792-2019《高效液相色谱仪》、JJG705-2014液相色谱仪检定规程、T/CAIA/YQ002-2016《液体微流量测试方法》。

本规范为首次发布。

全国生物计量技术委员会

纳升液相色谱仪校准规范

1 范围

本规范适用于纳升液相色谱仪的校准。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

GB/T 6682-2008 《分析实验室用水规格和试验方法》

GB/T 26792-2019 《高效液相色谱仪》

JJG705-2014 液相色谱仪检定规程

T/CAIA/YQ002-2016 《液体微流量测试方法》

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（包括所有的修改单）适用于本规范。

3 术语

GB/T 6682-2008、GB/T 26792-2019、JJG705-2014 和 T/CAIA/YQ002-2016 中界定的及以下术语和定义适用于本规范。

3.1 纳升液相色谱 nano liquid chromatography

使用内径小于 100um 毛细管色谱柱，流速范围在每分钟几十至几百纳升的色谱技术。

3.2 输液泵 Infusion pump

液相色谱仪中将流动相匀速注入液相色谱系统中，形成稳定的流路的系统。

4 概述

纳升液相色谱仪（以下简称仪器）是针对纳升级、毛细管、窄径分离而设计的，目的在于获得最高效色谱分辨率、灵敏度及重现性。仪器是由进样系统、分离系统、检测系统等部分组成的分析仪器。仪器主要与质谱串联使用，以质谱作为检测系统，应用紫外-可见光检测器或荧光检测器的相对较少。

仪器根据样品中各组分在色谱柱内固定相和流动相间分配或吸附等特性的差异，由流动相将样品带入色谱柱中进行分离，经检测器检测并通过数据处理系统记录色谱图，依据各组分的保留时间和响应值（峰面积或峰高）进行定量和定性分析。

5 计量特性

表 1 纳升液相色谱仪的主要计量特性指标

计量特性	计量特性指标
------	--------

输液泵流量示值误差	±2%
输液泵流量重复性	±2%
整机性能（定性测量重复性）（如适用）	1%
注：以上技术指标不用于合格判别，仅供参考。	

6 校准条件

6.1 环境条件

- .1.1 环境温度：15℃~35℃；
- .1.2 相对湿度：20%~80%；
- .1.3 大气压力：（75.0~106.0）kPa；
- .1.4 供电电源：交流电压 220 V±22V，频率 50 Hz±0.5 Hz，并接地良好；
- .1.5 室内避免易燃、易爆和强腐蚀性气体及强烈震动、电磁干扰，有良好的通风装置。

6.2 校准设备和试剂

所用计量仪器、仪表等均经计量检定校准并满足量程和精度的要求。

- 6.2.1 电子天平，准确度等级 I 级，分度值不大于 0.01 mg；
- 6.2.2 秒表，分度值不大于 0.1 s；
- 6.2.3 探针数字温度计，测量范围（4~50）℃，最大允许误差±0.1℃；
- 6.2.4 纯水：满足《GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法》中一级水要求，超声脱气。
- 6.2.5 离心管：0.5ml 离心管。
- 6.2.6 肽段标准物质，相对扩展不确定度一般应不大于 5%（ $k=2$ ），或根据用户及仪器的技术要求选择。

7 校准项目和校准方法

7.1 外观及功能检查

仪器外表应平整光滑、字迹清晰，无明细划痕、露底、裂纹、气泡、毛刺等现象；仪器的各调节旋钮、控制按键、开关等工作应正常、无松动，指示、显示应清晰完整。

7.2 输液泵流量示值误差

用仪器专用管路连接输液泵的出口、入口，以纯水为流动相(将数字温度计探针插入流动相内，测定此时流动相的温度)。设定合适流量，待输液泵运行稳定后，按照表 2 分别设定流量，在流动相排出口用事先称重过的离心管收集流动相，同时用秒表计时，

待达到表 2 规定的收集时间后停止收集流动相，并按下秒表停止计时，每个流量下各测试三次。按式（1）计算流量，按式（2）计算流量示值误差。

表 2 输液泵流量示值误差测量条件

流量设定值 F_s nL/min	收集流动相时间 t min	测量次数
300	30	3

注：流量的设定可根据输液泵的流量范围以及用户实际使用情况而定。

$$F_m = \frac{m_2 - m_1}{\rho(T)t} \times 10^3 \quad (1)$$

$$s_s = \frac{F_s - \bar{F}_m}{\bar{F}_m} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

F_m ——流量实测值，nL/min；

m_2 ——离心管+纯水质量，mg；

m_1 ——离心管质量，mg；

$\rho(T)$ ——纯水在测量温度（ T ）下的密度，g/mL；

t ——收集流动相的时间，min；

s_s ——流量示值误差，%；

F_s ——流量设定值，nL/min；

\bar{F}_m ——同一设定流量三次测量值的平均值，nL/min；

注：不同温度下水密度参考值参见附录A。

7.3 输液泵流量重复性

同 7.2，按照式（3）计算输液泵的流量重复性。

$$s_R = \frac{F_{max} - F_{min}}{\bar{F}_m} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

s_R ——流量重复性，%；

F_{max} ——同一设定流量三次测量的最大值，nL/min；

F_{min} ——同一设定流量三次测量的最小值，nL/min；

\bar{F}_m ——同一设定流量三次测量值的平均值，nL/min;

7.4 整机性能（定性测量重复性）（如适用）

将仪器各部分联接好，选好毛细管 C18 色谱柱，用 0.1%甲酸水溶液为流动相 A 相，0.1%甲酸乙腈溶液为流动相 B 相，流速设定为 300nL/min。取标准物质，经毛细管色谱柱注入相应量的肽段溶液标准物质，观察色谱图，记录色谱峰的保留时间，连续测定 6 次，按公式计算相对标准偏差 RSD，按公式（4）计算相对标准偏差 RSD 作为定性重复性的结果。

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4)$$

式中：

x_i ——第 i 次测量保留时间，min;

\bar{x} —— n 次测量保留时间的算数平均值，min;

i ——测量次数序号；

n ——测量次数总次数（ $n = 6$ ）。

8 校准结果表达

8.1 校准结果处理

经校准后的仪器应填发校准证书，校准证书应符合 JJF 1071—2010 中 5.12 的要求，并给出各校准项目名称和测量结果以及扩展不确定度。校准原始记录参考格式见附录 A，校准证书结果页参考格式见附录 B。

8.2 校准结果的测量不确定度

纳升液相色谱仪校准结果的不确定度按 JJF 1059.1—2012 的要求评定，温度和 FIB 示值误差的不确定度评定示例见附录 C。

9 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，建议不超过 1 年。

附录 A

纯水密度表

($\times 10^{-3} \text{g/mL}$)

$t_{90}(\text{°C})$	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
0	999.843	999.850	999.856	999.862	999.869	999.874	999.880	999.886	999.891	999.897
1	999.902	999.907	999.911	999.916	999.920	999.924	999.928	999.932	999.936	999.940
2	999.943	999.946	999.949	999.952	999.955	999.957	999.959	999.962	999.964	999.965
3	999.967	999.969	999.970	999.971	999.972	999.973	999.974	999.974	999.975	999.975
4	999.975	999.975	999.975	999.974	999.974	999.973	999.972	999.971	999.970	999.968
5	999.967	999.965	999.963	999.961	999.959	999.957	999.954	999.952	999.949	999.946
6	999.943	999.940	999.937	999.933	999.929	999.926	999.922	999.918	999.913	999.909
7	999.904	999.900	999.895	999.890	999.885	999.880	999.874	999.869	999.863	999.857
8	999.851	999.845	999.839	999.833	999.826	999.819	999.813	999.806	999.798	999.791
9	999.784	999.776	999.769	999.761	999.753	999.745	999.737	999.728	999.720	999.711
10	999.703	999.694	999.685	999.676	999.666	999.657	999.648	999.638	999.628	999.618
11	999.608	999.598	999.588	999.577	999.567	999.556	999.545	999.534	999.523	999.512
12	999.500	999.489	999.477	999.466	999.454	999.442	999.430	999.418	999.405	999.393
13	999.380	999.367	999.355	999.342	999.329	999.315	999.302	999.289	999.275	999.261
14	999.247	999.233	999.219	999.205	999.191	999.176	999.162	999.147	999.132	999.118
15	999.103	999.087	999.072	999.057	999.041	999.026	999.010	998.994	998.978	998.962
16	998.946	998.930	998.913	998.897	998.880	998.863	998.846	998.829	998.812	998.795
17	998.778	998.760	998.743	998.725	998.707	998.689	998.671	998.653	998.635	998.617
18	998.598	998.580	998.561	998.542	998.523	998.505	998.485	998.466	998.447	998.427
19	998.408	998.388	998.369	998.349	998.329	998.309	998.288	998.268	998.248	998.227
20	998.207	998.186	998.165	998.144	998.123	998.102	998.081	998.060	998.038	998.017
21	997.995	997.973	997.951	997.929	997.907	997.885	997.863	997.841	997.818	997.796
22	997.773	997.750	997.727	997.704	997.681	997.658	997.635	997.612	997.588	997.564
23	997.541	997.517	997.493	997.469	997.445	997.421	997.397	997.372	997.348	997.323
24	997.299	997.274	997.249	997.224	997.199	997.174	997.149	997.124	997.098	997.073
25	997.047	997.021	996.996	996.970	996.944	996.918	996.891	996.865	996.839	996.812
26	996.786	996.759	996.732	996.706	996.679	996.652	996.624	996.597	996.570	996.543
27	996.515	996.488	996.460	996.432	996.404	996.376	996.348	996.320	996.292	996.264
28	996.235	996.207	996.178	996.150	996.121	996.092	996.063	996.034	996.005	996.976
29	995.946	995.917	995.888	995.858	995.828	995.799	995.769	995.739	995.709	995.679
30	995.649	995.619	995.588	995.558	995.527	995.497	995.466	995.435	995.404	995.373
31	995.342	995.311	995.280	995.249	995.217	995.186	995.154	995.123	995.091	995.059
32	995.027	994.996	994.963	994.931	994.899	994.867	994.834	994.802	994.769	994.737
33	994.704	994.671	994.638	994.605	994.572	994.539	994.506	994.473	994.439	994.406
34	994.372	994.339	994.305	994.271	994.237	994.204	994.170	994.135	994.101	994.067
35	994.033	993.998	993.964	993.929	993.894	993.860	993.825	993.790	993.755	993.720
36	993.685	993.650	993.614	993.579	993.543	993.508	993.472	993.437	993.401	993.365
37	993.329	993.293	993.257	993.221	993.184	993.148	993.112	993.075	993.039	993.002
38	992.965	992.929	992.892	992.855	992.818	992.781	992.744	992.706	992.669	992.632
39	992.594	992.557	992.519	992.481	992.443	992.406	992.368	992.330	992.292	992.253
40	992.215	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：1 t_{90} 为 1990 年国际温标 (ITS-90)。

2 水密度值采用 JJG 42-2011 工作玻璃浮计附录 A。

附录 B

校准原始记录（参考）格式

仪器名称			型号	
制造厂商			出厂编号	
委托单位	名称		联系人	
	地址		电话	
温度			湿度	
大气压			试剂批号	
记录编号			证书编号	
校准员			核验员	

一、外观及功能检查

<input type="checkbox"/> 符合要求	<input type="checkbox"/> 不符合要求
-------------------------------	--------------------------------

二、输液泵流量示值误差

F_s (nL/min)	$\rho(T)$ (g/mL)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	F_m (nL/min)	t (min)	\bar{F}_m (nL/min)	s_s (%)	$U(k=2)$ (%)

三、输液泵流量重复性

F_s (nL/min)	F_m (nL/min)	\bar{F}_m (nL/min)	S_R (%)

四、整机性能（定性测量重复性）（如适用）

保留时间测定值						RSD
1	2	3	4	5	6	

附录 C

校准证书（内页）格式

（推荐性表格）

校准项目	校准结果			
外观及功能检查				
输液泵 流量示 值误差	$F_s(\text{nL/min})$	$\bar{F}_m(\text{nL/min})$	$s_s(\%)$	$U/\% (k=2)$
输液泵 流量重 复性	$F_{max}(\text{nL/min})$	$F_{min}(\text{nL/min})$	$\bar{F}_m(\text{nL/min})$	$s_R(\%)$
定性测 量重复 性	RSD			

校准员： 核验员：

附录 D

输液泵流量示值误差测量不确定度评定示例

D.1 测量方法

用仪器专用管路连接输液泵的出口、入口，以纯水为流动相(将数字温度计探针插入流动相内，测定此时流动相的温度)。设定合适流量，待输液泵运行稳定后，按照表 D.1 分别设定流量，在流动相排出口用事先称重过的离心管收集流动相，同时用秒表计时，待达到表 D.1 规定的收集时间后停止收集流动相，并按下秒表停止计时，每个流量下各测试三次。按式 (D.1) 计算流量，按式 (D.2) 计算流量示值误差。

表 D.1 输液泵流量示值误差测量条件

流量设定值 F_s nL/min	收集流动相时间 t min	测量次数
300	30	3

注：流量的设定可根据输液泵的流量范围以及用户实际使用情况而定。

D.2 测量模型

示值误差可由公式 D.1 和公式 D.2 给出：

$$F_m = \frac{m_2 - m_1}{\rho(T)t} \times 10^3 \quad (\text{D.1})$$

$$s_s = \frac{F_s - \bar{F}_m}{F_m} \times 100\% \quad (\text{D.2})$$

式中：

F_m ——流量实测值，nL/min；

m_2 ——离心管+纯水质量，mg；

m_1 ——离心管质量，mg；

$\rho(T)$ ——纯水在测量温度 (T) 下的密度，g/mL；

t ——收集流动相的时间，min；

s_s ——流量示值误差，%；

F_s ——流量设定值，nL/min；

\bar{F}_m ——同一设定流量三次测量值的平均值，nL/min；

注：不同温度下水密度参考值参见附录A。

将公式 (D.1) 代入公式 (D.2) 中，得到公式 (D.3)：

$$s_s = \left(\frac{F_s \rho(T) t}{(m_2 - m_1) \times 10^3} - 1 \right) \times 100\% \quad (\text{D.3})$$

D.3 合成标准不确定度计算公式

依据不确定度传播律，当各不确定度间不相关时， $u_c^2 = \sum_{i=1}^N c_i^2(x_i) u^2(x_i)$ ，则

$$u_c = \sqrt{c_{m_1}^2 u_{m_1}^2 + c_{m_2}^2 u_{m_2}^2 + c_t^2 u_t^2 + c_T^2 u_T^2} \quad (\text{D.4})$$

由公式 (D.3) 得

$$c_{m_1} = \frac{\partial s_s}{\partial m_1} = \frac{F_s \rho(T) t}{[(m_2 - m_1) \times 10^3]^2}$$

$$c_{m_2} = \frac{\partial s_s}{\partial m_2} = \frac{F_s \rho(T) t}{[(m_2 - m_1) \times 10^3]^2}$$

$$c_t = \frac{\partial s_s}{\partial t} = \frac{F_s \rho(T)}{(m_2 - m_1) \times 10^3}$$

$$c_T = \frac{\partial s_s}{\partial T} = \frac{\partial s_s}{\partial \rho(T)} \cdot \frac{\partial \rho(T)}{\partial T} = \frac{F_s t}{(m_2 - m_1) \times 10^3} \cdot \frac{\partial \rho(T)}{\partial T}$$

D.4 不确定度来源

不确定度来源包括：

- 输入量 m_1 和 m_2 引入的标准不确定度 u_{m_1} 和 u_{m_2} ；
- 输入量 t 引入的标准不确定度 u_t ；
- 输入量 T 引入的标准不确定度 u_T 。

D.5 标准不确定度分量评定

D.5.1 输入量 m_1 和 m_2 引入的标准不确定度 u_{m_1} 和 u_{m_2}

选定一台纳升液相色谱仪，设置 1000nL/min 的流速进行校准，测量结果见表 D.2。

表 D.2 输液泵流量示值误差测量结果 (T=25.0 °C)

F_s (nL/min)	$\rho(T)$ (g/mL)	m_1 (mg)	m_2 (mg)	F_m (nL/min)	t (min)	s_s (%)
300	0.997704	506.69	515.7	301.02	30	-0.47

使用经过校准的 XS205 型天平，根据电子天平的校准证书，天平的扩展不确定度 U 为 0.00002g ($k=2$)，天平引入的不确定度按矩形分布计算，取包含因子 $k=\sqrt{3}$ ，由此引入的标准不确定度分量为：

$$u_{m_1} = u_{m_2} = \frac{0.00001}{\sqrt{3}} \text{ g} = 5.7735E - 06 \text{ g}$$

D.5.2 输入量 t 引入的标准不确定度 u_t

使用的计时器最大允许误差为 $\pm 0.5 \text{ s/d}$ ，相当于 $600 \text{ s} (10 \text{ min})$ 最大允许误差 0.00347 s ，按均匀分布处理，取包含因子 $k=\sqrt{3}$ ，由此引入的标准不确定度分量为：

$$u_T = \frac{0.00347}{\sqrt{3}} = 0.002 \text{ s} = 3.34115E - 05 \text{ min}$$

D.5.3 输入量 T 引入的标准不确定度 u_T

使用的温度计最大允许误差为 $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ，按均匀分布处理，取包含因子 $k=\sqrt{3}$ ，由此引入的标准不确定度分量为：

$$u_T = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 0.0577 \text{ }^\circ\text{C}$$

D.5.4 灵敏度系数的计算

将附录A中纯水密度（换算单位为 g/mL ）与温度在 $[24.0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 26.9 \text{ }^\circ\text{C}]$ 范围内的数据进行线性拟合，得到

$$\rho(T) = 1.0036 - 0.0002607 \times T$$

根据上述公式，则

$$\frac{\partial \rho(T)}{\partial T} = -0.0002607$$

将表D.2中数据代入灵敏度系数计算公式，则灵敏度系数的计算结果如下：

$$C_{m_1} = \frac{\partial s_s}{\partial m_1} = \frac{F_s \rho(T) t}{[(m_2 - m_1) \times 10^3]^2} = \frac{1000 \times 0.997704 \times 30}{[(515.7 - 506.69) \times 10^3]^2} = 0.000101562 \text{ g}^{-1}$$

$$C_{m_2} = \frac{\partial s_s}{\partial m_2} = \frac{F_s \rho(T) t}{[(m_2 - m_1) \times 10^3]^2} = \frac{1000 \times 0.997704 \times 30}{[(515.7 - 506.69) \times 10^3]^2} = 0.000101562 \text{ g}^{-1}$$

$$C_t = \frac{\partial s_s}{\partial t} = \frac{F_s \rho(T)}{(m_2 - m_1) \times 10^3} = \frac{1000 \times 0.997704}{(515.7 - 506.69) \times 10^3} = 0.100647931 \text{ min}^{-1}$$

$$C_T = \frac{\partial s_s}{\partial T} = \frac{\partial s_s}{\partial \rho(T)} \cdot \frac{\partial \rho(T)}{\partial T} = \frac{F_s t}{(m_2 - m_1) \times 10^3} \cdot \frac{\partial \rho(T)}{\partial T} = \frac{1000 \times 30}{(515.7 - 506.69) \times 10^3} \times 0.0002607$$

$$= -0.000258545 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$$

D.6 标准不确定度一览表

标准不确定度一览表见表 D.3。

表 D.3 输液泵流量示值误差测量结果标准不确定度一览表

被测量	不确定度来源	标准不确定分量	灵敏系数	输出量的标准不确定度分量
输液泵流量示值误差	m_1	5.7735E-06 g	0.000101562g^{-1}	5.86368E-10
	m_2	5.7735E-06 g	0.000101562g^{-1}	5.86368E-10
	t	3.34115E-05 min	$0.100647931\text{min}^{-1}$	3.39334E-06
	T	0.0577 °C	$-0.000258545\text{ }^\circ\text{C}^{-1}$	0.00001491805

D.7 合成标准不确定度

由于各不确定度间互不相关，则由公式（D.8）可得合成标准不确定度 u_c 为：

$$u_c = \sqrt{c_{m_1}^2 u_{m_1}^2 + c_{m_2}^2 u_{m_2}^2 + c_t^2 u_t^2 + c_T^2 u_T^2} \times 100 \% = 0.01 \%$$

D.8 扩展不确定度

取包含因子 $k=2$ ，则扩展不确定度 U 为：

$$U = k \times u_c = 0.02 \%$$