

国家计量技术规范规程制修订

《纳升液相色谱仪校准规范》
(征求意见稿)
编制说明

全国生物计量技术委员会

中国计量科学研究院

2023年2月

《纳升液相色谱仪校准规范》（征求意见稿）

编写说明

一、任务来源

根据（原）国家质量监督检验检疫总局 2017 年国家计量技术规范制定、修订及宣贯计划项目表（见质检量函[2017] 25 号文件“质检总局计量司关于国家计量技术规范制定、修订及宣贯计划有关事项的通知”），由中国计量科学研究院牵头承担《纳升液相色谱仪校准规范》的制定工作。归口单位为全国生物计量技术委员会，主要起草单位为中国计量科学研究院，参与单位为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。

二、规范制定的必要性

纳升液相色谱一般是指使用内径小于 100 μm 的毛细管色谱柱，流速范围在每分钟几十至几百纳升的色谱技术。纳升液相色谱仪是针对纳升级、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。此外，随着现代分析水平的发展，对分析仪器的要求越来越向着微量、准确、快速发展，对仪器的检测手段及结果的要求越来越严格。对液相色谱来说，其检测器从紫外、视差、荧光发展到二极管阵列，而与质谱联机则是目前的趋势所在。纳升液相色谱仪可高效分离各种多肽和蛋白质，与质谱联用后是蛋白组学研究的最佳工具，纳升液相色谱可在纳升级的流量水平下实现精确控制和梯度洗脱，极大地提高了质谱检测的灵敏度，可对更多的低丰度多肽进行分离和鉴定。另外，纳升级液相色谱还可拓展应用至代谢靶分子、致病蛋白分子的鉴定，在纳升级稳定流量下质谱检测器可获得很好的

灵敏度、分辨率和重现性。目前，纳升液相色谱已成为蛋白质组学、代谢组学、脂质组学等领域的重要研究工具，并且在食品分析、药物分析、环境污染物分析等常规分析领域有所应用。

许多公司推出了纳升液相色谱仪，包括 Agilent 公司、Dionex 公司、Thermo Fisher 公司、Waters 公司、Eksigent 公司等。目前国内市场纳升液相使用广泛，但还没有统一的校准规范，为了保证纳升级液相色谱的性能，需要对其进行校准，保证灵敏度、分辨率和重现性。

纳升液相色谱仪由于流速很低，色谱柱体积很小，柱外效应显著，因此对色谱仪器系统各个模块的性能以及系统柱外效应的优化提出了较高的要求。另外纳升液相色谱仪的检测器与常规液相的检测器不同，常规液相色谱采用紫外、视差、荧光、二极管阵列等检测器，而纳升级液相主要和质谱联用，应用紫外检测器或荧光检测器的相对较少。一些商品化仪器甚至仅将输液泵和自动进样器进行集成，不配置检测器。

现有的 JJG705-2014 《液相色谱检定规程》主要针对紫外、二极管阵列、荧光、视差、蒸发光散射等检测器的液相色谱仪，并不适用于纳升液相色谱仪。目前，全国对该类仪器的校准还没有统一的技术规范，所以为保证该类仪器检测结果的准确、可比，有必要制定《纳升液相色谱校准规范》，以满足日益增长的需求。

本项目开展了纳升液相色谱仪校准方法的研究，编写了国家校准规范，目的是为该类仪器的校准提供技术依据，使得使用该类仪器检测工作的各医疗机构、检测分析实验室和研究机构，能够更好地为社会、科研、经济建设和发展提供客观、可比、可溯源的检测数据，保

证计量性能的量值传递准确可靠。

三、规范制定过程

1、2016年由中国计量科学研究院联合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通过全国生物计量技术委员会向国家质量监督检验检疫总局申请了《纳升液相色谱仪校准规范》的制定任务。

2、2017年规范制定任务下达后，由中国计量科学研究院联合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成立了规范起草小组。

3、起草小组对市场上使用的纳升液相色谱仪进行了调研，通过走访用户和与厂家沟通交流等方式，分析纳升液相色谱仪的原理和主要技术指标，研究规范的构架设置、校准项目和校准方式。

4、2018年~2020年，项目立项后起草小组通过多方讨论和调研，初步确定了纳升液相色谱仪的校准项目，并对校准方法开展了研究，形成了《纳升液相色谱仪校准规范（初稿）》，经过验证实验和专家意见的反馈，起草小组对纳升液相色谱仪的校准项目和校准方法进行了修改。

5、2021年~2022年，项目起草小组综合纳升液相色谱仪生产厂商和用户的意见，合理确定了纳升液相色谱仪的计量特性、校准条件、校准项目和校准方法等内容，完成了适用性验证实验，最后编制完成《纳升液相色谱仪校准规范》（征求意见稿），编制说明和实验报告。

四、规范制定的主要技术依据及原则

（一）、依据

本次制订中校准规范文本结构按照 JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》的要求完成。其中不确定度评定部分按照 JJF 1059.1《测量不确定度评定与表示》要求完成。根据 JJF1071《国家计量校准规范编写规则》的要求，此规范架构上包括封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、术语和计量单位、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果表达、复校时间间隔、附录几个部分。

（二）、原则

1、架构

架构结构根据封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、术语和计量单位、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果表达、复校间隔时间几个部分制定《纳升液相色谱仪校准规范》。

2、术语与计量单位的选择

术语和计量单位的选择遵照 JJF1001《通用计量术语及定义》选择使用。

3、计量特性确定原则

根据纳升液相色谱仪的结构及特点，确定纳升液相色谱仪的计量特性；计量特性确定过程中也参照了现行有效的 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》等标准和规程。

五、规范制定说明

《纳升液相色谱仪校准规范》共分为 10 个部分，即范围、引用文献、术语和计量单位、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准

方法、校准结果表达、复校时间间隔和附录等 10 个部分。

1、范围：

本规范适用于纳升液相色谱仪的校准。

2、引用文件

列出了本规范参考和引用的文件包括 JJF1001 通用计量术语及定义、JJF1071 国家计量校准规范编写规则、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（包括所有的修订单）适用于本规范。

3、术语和计量单位

这一部分对规范中使用的名词术语进行了定义，包括纳升液相色谱和输液泵。

4、概述

这部分主要描述了纳升液相色谱仪的仪器原理和特点，并介绍了纳升液相色谱仪的仪器构成和仪器的检测装置。

5、计量特性

本部分规定了纳升液相色谱仪的计量特性，经过参考高效液相色谱仪的标准以及对厂家的调研，选择了输液泵流量示值误差、输液泵流量重复性和整机性能（定性测量重复性）3 个指标作为纳升液相色谱仪的计量特性指标，同时参考行业标准的要求，给出了这些计量特性的限定范围。但是在规范中也指出“以上技术指标不用于合格性判

别，仅供参考”。

6、校准条件

这部分主要规定了纳升液相色谱仪校准时需要满足的环境条件，以及使用的校准设备和试剂。

7、校准项目和校准方法

这部分主要针对纳升液相色谱仪的外观及功能检查、输液泵流量示值误差、输液泵流量重复性和整机性能（定性测量重复性）等指标的具体校准方法进行了具体说明和数学公式化处理。

针对外观及功能检查，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。

针对输液泵流量示值误差校准项目，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 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 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（1）计算流量，按式（2）计算流量示值误差。

表 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。

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

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

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。

针对输液泵流量重复性校准项目, 方法和输液泵流量示值误差校准项目相同, 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;

针对整机性能 (定性测量重复性) (如适用) 校准项目, 如果纳升液相色谱仪配有质谱检测器可以进行该项目的校准。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术平均值，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

经过校准的实时纳升液相色谱仪出具校准证书，证书应符合 JJF 1071-2010 中 5.12 的要求，校准记录格式见附录 A，校准证书内容见附录 B。

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，复校时间间隔建议不超过 1 年。

10、附录

附录 A 给出了纯水密度表，附录 B 和附录 C 给出了校准记录和校准证书的内容，附录 D 给出了输液泵流量示值误差校准结果的不确定度评定示例。

《纳升液相色谱仪》国家校准规范制定起草小组

2023 年 2 月