



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF XXXX—XXXX

纯度标准物质定值技术要求 蛋白质纯度标准物质

Technical Requirement for Purity Assessment of Certified Reference
Materials—Protein Purity Certified Reference Materials

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

国家市场监督管理总局发布

纯度标准物质定值技术要求

蛋白质纯度标准物质

Technical Requirement for Purity Assessment
of Certified Reference Materials—Protein
Purity Certified Reference Materials

JJF XXXX—XXXX

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：

本规范由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.....	II
1 范围.....	1
2 引用文件.....	1
3 术语.....	1
3.1 肽.....	1
3.2 蛋白质.....	1
3.3 序列.....	1
3.4 翻译后修饰.....	2
3.5 生物学变异.....	2
3.6 纯度.....	2
3.7 质量平衡法.....	2
3.8 同位素稀释质谱法.....	2
3.9 定量核磁共振法.....	2
4 通用要求.....	3
4.1 标准物质候选物的筛选.....	3
4.2 标准物质候选物的定性分析.....	3
4.3 纯度定值方式选取原则.....	4
5 定值方法的技术要求.....	6
5.1 质量平衡法.....	6
5.2 同位素稀释质谱法.....	8
5.3 重量-容量法.....	10
5.4 定量核磁共振法.....	11
5.5 其他方法.....	11
6 定值结果的不确定度评定.....	11
6.1 质量平衡法.....	12
6.2 同位素稀释质谱法.....	16
6.3 定量核磁共振法.....	18

引 言

蛋白质纯度标准物质是标准物质的重要组成部分，是复杂基质中蛋白质准确定量和量值溯源的依据。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JJF1059.1 《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。本规范旨在规范我国蛋白质纯度标准物质的定值。

本规范为首次发布。

国家标准物质计量技术规范征求意见稿

纯度标准物质定值技术要求

蛋白质纯度标准物质

1 范围

本规范适用于序列清晰、无复杂翻译后修饰或修饰可清晰表征、无复杂生物学变异或变异可清晰表征、无人为同位素富集、标记或修饰的肽及蛋白质固体纯品、冻干品或溶液中单一肽或蛋白质纯度的标准物质的研制。

2 引用文件

- JJF 1005 标准物质通用术语和定义
JJF 1343 标准物质的定值及均匀性、稳定性评估
JJF 1507 标准物质的选择与应用
JJF 1855 纯度标准物质定值计量技术规范 有机物纯度标准物质
JJF 1265 生物计量术语及定义

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

JJF1005、JJF1265界定的及以下术语和定义适用于本规范。

3.1 肽 peptide

两个或两个以上氨基酸通过脱水缩合共价连接形成的聚合物。

注：

- 1、肽的氨基酸残基数通常低于50个；
- 2、根据氨基酸残基数目的多少，可分为寡肽和多肽。

3.2 蛋白质 protein

由核酸编码的 α 氨基酸之间通过 α 氨基和 α 羧基形成的肽键连接而成的肽链，经翻译后加工和自主折叠生成的具有特定立体结构和生物活性的大分子。

注：蛋白质的氨基酸残基数通常多于50个。

3.3 序列 sequence

肽或蛋白质中氨基酸残基从N端到C端的线性排列顺序。

3.4 翻译后修饰 post-translational modification (PTM)

基因表达翻译合成蛋白质的基本氨基酸序列的过程中或完成后，通过化学修饰在某些氨基酸侧链上键合其他功能基团（如乙酰基、甲基、磷酸、脂和糖等）从而改变蛋白质的结构和功能的共价加工过程。

注：常见的翻译后修饰包括磷酸化、乙酰化、羟基化、甲基化、糖基化、泛素化修饰等，通过翻译后修饰可以调节蛋白质的功能和寿命。

3.5 生物学变异 biological variation

同一蛋白质在不同个体、细胞或生理状态下因遗传差异（如基因多态性）、转录后修饰（如磷酸化、糖基化）或环境因素导致的分子结构等方面的差异。

3.6 纯度 purity

目标肽或蛋白质在给定样品中所占的比例。

注：

- 1、通常以质量分数（如g/g, mg/g）、摩尔分数（如mol/mol, mmol/mol）、质量浓度（如mg/g, μ g/g）、容量浓度（如g/L, mg/mL）等方式表示；
- 2、本规范中纯度的含义与JJF 1855—2020中纯度含义保持一致；
- 3、本规范中纯度的含义不同于通常所说的HPLC纯度或SDS-PAGE纯度，后者一般情况下指肽或蛋白质的仪器信号响应（如峰面积）在同类物质仪器信号响应（如总峰面积）中所占的比例；
- 4、本规范中的目标肽或蛋白质纯度分析仅考虑由序列（一级结构）定义的被测量，不考虑目标肽或蛋白质的高级结构或活性。

3.7 质量平衡法 mass balance method

在基于被测物质质量分数的总和为100%的前提下，通过扣减其中所有非目标肽或蛋白质组分的含量，获得目标肽或蛋白质在给定样品中所占的比例的方法。

注：

- 1、通常情况下质量平衡法仅适用于固态肽或蛋白质纯度的分析；
- 2、通常需要扣减的非目标肽或蛋白质组分包括结构类似物（杂质肽或蛋白质）、水分、无机离子、挥发性有机成分等，目标肽或蛋白质的聚集体是否扣除，需要根据标准物质的预期用途决定。

3.8 同位素稀释质谱法 isotope dilution mass spectrometry (IDMS)

通过向肽或蛋白质样品中添加已知量的稳定同位素标记物质作为内标，样品经消解、水解或酶解后，以国家有证标准物质或准确定值的肽段为标准采用括号法或单点法测定处理后样品中的元素、氨基酸或特异性肽段含量，并根据肽或蛋白质的化学组成计算其纯度的分析方法。

注：

- 1、同位素内标可在样品处理前或样品处理后加入；
- 2、常用的稳定同位素标记物包括稳定同位素富集的无机物质、稳定同位素标记的氨基酸或特异性肽段。

3.9 定量核磁共振法 quantitative nuclear magnetic resonance method (qNMR)

基于核磁共振谱图中氢原子信号的积分面积与产生相应共振谱线的肽或蛋白质氢原子之间数量的正比关系进行纯度分析的方法。

注：

- 1、定量核磁共振法通常适用于分子量不超过10000的肽的纯度的定值。
- 2、本规范中定量核磁共振法简称定量核磁法。

4 通用要求

4.1 标准物质候选物的筛选

4.1.1 应选择序列清晰、无复杂翻译后修饰或修饰可清晰表征、无人为同位素富集、标记或修饰，纯度相对较高、均匀性和稳定性良好的肽或蛋白质作为标准物质候选物，可以是固相合成、天然来源或重组表达获得。

4.1.2 肽或蛋白质在常用分析溶剂中应当具有良好的可溶性。

4.1.3 重组表达的蛋白可以切掉标签或保留标签，如果保留标签，标签应不影响标准物质的预期用途，同时标签不应成为重组表达蛋白的主体。

4.1.4 标准物质候选物确定后，应明确定值和预期用途中的被测量，该被测量应当相同或有明确的计量比。

注：

- 1、同一个蛋白可以根据预期用途等的不同定义不同的被测量；
 - 2、带有复杂翻译后修饰的不均一蛋白，应明确被测量是否包括翻译后修饰及修饰的类型；
 - 3、金属蛋白或带有配基的蛋白应明确被测量是否包括金属或配基。
- 4.1.5 标准物质候选物中其他组成不应干扰定值过程或预期用途。必要时，可以根据相关标准与规范对标准物质候选物中的其他组成给出限量规定。
- 4.1.6 标准物质候选物选择时应与定值模式和定值方法的要求保持一致。

注：如采用比对定值模式以国家一级蛋白质溶液标准物质为标准研制国家二级蛋白质溶液标准物质时，应保持标准物质候选物的结构组成与上一级标准物质的结构组成一致；

4.2 标准物质候选物的定性分析

4.2.1 肽的定性分析

4.2.1.1 应至少提供分子量、序列、二硫键位置及交联方式的信息；

注：

- 1、分子量的科学术语为相对分子质量，本规范中简称分子量；

2、分子量、序列、二硫键位置及交联方式应与权威数据库中的信息或预期一致；

4.2.1.2 如果带有修饰，应提供修饰位点及修饰类型的信息；

4.2.1.3 可采用质谱从头测序或Edman降解等方式测定肽的氨基酸序列，序列应100%覆盖。

注：宜采用Edman降解测定肽的氨基酸序列；

4.2.1.4 当单一杂质有机纯度比例不低于1%时应对杂质进行鉴定；当累计杂质比例不低于1.5%时应对杂质进行鉴定直至未鉴定部分低于1.5%。

4.2.1.5 定性分析应给出可靠性说明，如置信水平等。

4.2.2 蛋白质的定性分析

4.2.2.1 应提供蛋白质分子量或分子量分布信息。

注：

1、宜采用质谱技术测定蛋白质的分子量或分子量分布；

2、如果蛋白质的分子量或分子量分布后续用于蛋白质纯度计算，应建立蛋白质分子量或分子量分布测定结果的计量学溯源性并评估测量结果的不确定度；

3、糖基化修饰蛋白宜补充提供切除糖后蛋白质的分子量信息；

4、蛋白质分子量测定结果应与权威数据库中该蛋白质的分子量一致或接近；

5、糖基化修饰等带有翻译后修饰的蛋白质，以及形成聚集体或复合物等原因造成的非均一蛋白质，其分子量为一定区间内的分布，提供的分子量信息应考虑分布并说明分子量的计算方法；

6、由多条肽链组成的蛋白质，宜分别提供完整蛋白及各条肽链的分子量信息。

4.2.2.2 应提供蛋白质序列或蛋白质鉴定结果。

注：

1、宜采用质谱技术测定蛋白质的序列或进行蛋白质鉴定；

2、蛋白质序列覆盖度通常不低于70%，如果存在关键研究位点，应针对性验证；

3、应提供蛋白质序列分析或蛋白质鉴定结果的可靠性信息，如置信水平等；

4、鉴定出的蛋白质序列应当足以可靠区分目标蛋白质与结构类似物（如不同型别、异构体等）；

5、必要时，可提供蛋白质免疫印迹鉴定结果。

4.2.2.3 宜提供蛋白质二硫键位置及交联方式的信息。

注：如被测量的定义中包括二硫键的定位，应针对性验证。

4.2.2.4 宜提供蛋白质翻译后修饰位点及修饰类型信息。

注：如被测量的定义中包括翻译后修饰，应针对性验证。

4.2.2.5 必要时，提供蛋白质高级结构或活性信息。

注：示例：如被测量定义为完整的血红蛋白，应提供分析数据表明4条多肽链按照预期形式组装成完成的血红蛋白分子。

4.2.2.6 当单一杂质有机纯度比例不低于1%时应对杂质进行鉴定；当累计杂质比例不低于1.5%时应对杂质进行鉴定直至未鉴定部分低于1.5%。

4.3 纯度定值方式选取原则

4.3.1 肽或蛋白质纯度定值宜采用两种或两种以上不同原理的独立方法进行定值，以排除单一方法可能存在的系统误差。

注：

1、宜优先采用基准方法、潜在计量基准方法或经验证的权威计量方法为肽或蛋白质标准物质候选物定值，如质量平衡法、同位素稀释质谱法、定量核磁法等；

2、新开发的潜在计量基准方法，如高效液相色谱-圆二色光谱法、同位素稀释红外/拉曼光谱法、单分子计数法、电喷雾微分电迁移颗粒计数法等，应通过国际比对或与已有方法比对验证后使用；

3、国家一级标准物质不宜使用类似原理的方法或溯源至同一标准物质的两种方法研制。例如，基于氨基酸分析的同位素稀释质谱法和基于肽段的同位素稀释质谱法最终均通过国家氨基酸标准物质进行溯源，基于氨基酸分析的同位素稀释质谱法和基于氨基酸分析的高效液相-圆二色光谱法均采用了氨基酸分析策略并最终均通过国家氨基酸标准物质进行溯源，基于特异性肽段的同位素稀释质谱法和基于氨基酸分析的同位素稀释红外光谱法最终均通过国家氨基酸标准物质进行溯源，这些类似的两种方法的组合并不满足严格意义上独立方法的要求，不宜用于国家一级标准物质研制。如果这些不满足严格意义上独立方法要求的方法组合用于国家一级标准物质的定值，应采用至少三种或三种以上的方法进行定值。

4、可获得时，应采用国家一级标准物质作为溯源标准研制肽或蛋白质纯度国家一级标准物质。如采用基于氨基酸分析的同位素稀释质谱法为肽或蛋白质纯度国家一级标准物质定值时，应选用国家一级氨基酸有证标准物质作为溯源标准；

5、定值方法的不确定度应当满足预期要求。

4.3.2 当仅有一种可用方法满足肽或蛋白质纯度定值要求时，应提供相关说明，并对方法的系统误差进行详细研究和考察，采用多家定值的方式进行定值。

注：

1、宜优先采用基准方法、潜在计量基准方法或经验证的权威计量方法为肽或蛋白质标准物质候选物赋值，如质量平衡法、同位素稀释质谱法、定量核磁法等；

2、当有足够的证据表明对样品中的非目标肽或蛋白质进行了良好表征，且纯度定值方法与结果的可靠性已经得到国际计量比对支撑时，可使用单一方法由一家实验室进行定值，但应提供至少两个操作者独立定值的数据；

3、可获得时，应采用国家一级标准物质作为溯源标准研制肽或蛋白质纯度国家一级标准物质；

4、定值方法的不确定度应当满足预期要求。

4.3.3 采用固体形式的肽或蛋白质纯度国家一级有证标准物质，通过重量法或重量-容量法配制，以配制值作为定值结果。

注：

1、该方式仅用于国家二级有证标准物质的研制；

2、同时应采用合适的方法对配制得到的定值结果进行量值核验；

3、配制过程中使用的天平、移液器、移液管、容量瓶等应经过计量；

4、通常在 $(20 \pm 3) ^\circ\text{C}$ 的环境中配制肽或蛋白质纯度标准物质候选物。

4.3.4 不应采用逆向定值方式研制肽或蛋白质纯度标准物质。

注：如采用已有的基体标准物质作为溯源标准，通过同位素稀释质谱法为多肽或蛋白质纯度标准物质定值。

5 定值方法的技术要求

肽或蛋白质纯度定值方法常用的主要有质量平衡法、同位素稀释质谱法、定量核磁法等，可根据预期用途、不确定度水平、定值成本、方法中溯源用标准物质的可获得性等，选取合适的定值方法。

注：除质量平衡法、同位素稀释质谱法、定量核磁法等常用的肽或蛋白质纯度计量方法外，近年来有新的潜在计量基准方法的报道，如高效液相色谱-圆二色光谱法、同位素稀释红外光谱法、单分子计数法、电喷雾微分电迁移颗粒计数法等，这些方法都由国家计量院开发，使用范围较小，本规范没有列出具体技术要求，如有需要可参阅相关文章、专利等。

5.1 质量平衡法

5.1.1 原理

在基于被测肽或蛋白质的质量分数总和为100%的前提下，通过扣减其中所有非目标肽或蛋白质组分的含量，从而获得目标肽或蛋白质在给定样品中所占的比例。

5.1.2 要求

5.1.2.1 需要扣减的非目标肽或蛋白质组分通常包括结构类似物（即杂质肽或杂蛋白）、水分、无机成分、挥发性有机成分等，聚集体是否作为非目标肽或蛋白质组分扣减根据标准物质的预期用途决定。

5.1.2.2 结构类似物扣减时宜对样品中可能存在的全部杂质肽或杂蛋白充分分离并鉴定后，采用外标法或合适的方法进行定量后扣减。定值结果一般按式（1）计算：

$$P = 1 - X_{RS} - X_W - X_V - X_{NV} - X_{AGG} \quad (1)$$

P ——纯度，g/g

X_{RS} ——结构类似物的总量，g/g

X_W ——水分含量，g/g

X_V ——挥发性组分含量，g/g

X_{NV} ——非挥发性组分含量，g/g

X_{AGG} ——聚集体含量，g/g

5.1.2.3 当样品中含有的结构类似物即杂质肽或杂蛋白较少，经5.1.2.5的有机纯度分析后有机纯度不低于98.5%的，定值结果可按式（2）计算：

$$P = P_0(1 - X_W - X_V - X_{NV}) \quad (2)$$

P ——纯度, g/g

P_0 ——有机纯度, %

X_W ——水分含量, g/g

X_V ——挥发性组分含量, g/g

X_{NV} ——非挥发性组分含量, g/g

注:

1、当样品中单一杂质的有机纯度分析结果不低于1%时, 宜对该杂质进行鉴定并采用外标法或合适方法定量后按照式(3)计算纯度定值结果;

2、有机纯度指目标肽或蛋白质占其与结构类似物总量的比值。

5.1.2.4 当样品中含有的结构类似物不能全部鉴定时, 宜对其中的部分含量较高的杂质进行鉴定并采用外标法或合适方法定量, 直至目标肽或蛋白质与经鉴定并定量的杂质含量之和不低于98.5%且不存在含量超过1%的单一杂质后, 按式(3)计算定值结果:

$$P = P_0(1 - X_{RS} - X_W - X_V - X_{NV}) \quad (3)$$

P ——纯度, g/g

X_{RS} ——结构类似物的总量, g/g

X_W ——水分含量, g/g

X_V ——挥发性组分含量, g/g

X_{NV} ——非挥发性组分含量, g/g

5.1.2.5 通常采用高效液相色谱法、毛细管电泳法等分析样品的有机纯度。当使用色谱归一化法测定结构类似物含量时, 应选择通用型检测器, 同时假定:

a) 所有组分都有响应且响应因子相同;

b) 所有结构类似物与目标肽或蛋白质完全分离, 均能够被检出且处于检测线性范围内。若发现有不符合假定的条件, 须进行相应的修正, 并引入相应的不确定度。

c) 应通过对色谱柱、流动相、检测波长、样品浓度等条件进行优化, 确保目标肽或蛋白质与结构类似物完全分离且均被检出, 应考虑目标肽或蛋白质与结构类似物的响应差异并做修正, 同时引入相应的不确定度。

5.1.2.6 肽类杂质的扣减通常采用高效液相色谱-高分辨质谱联用法根据其精确分子量与二级质谱图中 b , y 离子分布确定肽序列, 并根据该序列合成标准肽段后测定样品中该杂质的含量后进行扣减。

注:

1、质谱软件自动从头解析的肽序列仅可作为参考, 其结果不一定正确, 需要人为甄别;

2、合成标准肽段的保留时间、分子量与二级质谱图应与样品中该杂质的保留时间、分子量与二级质谱图一致。

5.1.2.7 蛋白类杂质的扣减通常采用质谱技术，结合高效液相色谱、SDS-PAGE电泳、双向电泳等手段，对分离出的杂质进行鉴定，并以该蛋白质纯品测定样品中该杂质的含量后进行扣减。

注：

1、通过质谱技术鉴定出的杂蛋白应给出可靠性说明，如置信水平等；

2、应充分定量方法的适宜性，如采用免疫法定量时应考虑方法的特异性以及蛋白质纯品是否与样品中的杂蛋白具有相同或接近的免疫亲和性。

5.1.2.8 必要时，需要考虑由于目标肽或蛋白质修饰、二硫键错配等结构类似物对定值结果的影响。

5.1.2.9 水分的测量通常采用卡尔费休法或105℃烘干恒重的方法测定。

注：采用卡尔费休法测定时操作过程不应引入环境中水分的影响，采用烘干恒重法时应注意天平的分辨力适合所称量的水分失重。

5.1.2.10 挥发性组分通常采用气相色谱-质谱联用或气相色谱-火焰离子化检测器法测定。应根据肽或蛋白质合成、纯化、包装、储存等过程中可能使用到的挥发性溶剂选择需要进行分析的挥发性组分。

注：如在纯化中使用了乙腈，应对乙腈含量进行分析。

5.1.2.11 不挥发性组分通常采用电感耦合等离子质谱、离子色谱、灼烧残渣等方法测定。应根据肽或蛋白质合成、纯化、包装、储存过程中可能使用到的不挥发性物质选择需要进行分析的不挥发性组分。当不挥发性组分含量较高时，宜采用国家有证标准物质作为溯源标准对不挥发性组分进行准确定量。

注：

1、如在纯化中使用了三氟乙酸，应对三氟乙酸的含量进行分析；

2、应充分考虑分析方法的适用范围，可采用多种方法的组合实现全部不挥发性组分的检测；

3、电感耦合等离子体质谱法可以测定主要的元素，如果发现个别元素含量较高(>10⁻³ g/g)或者含有盐类时，需进一步使用电感耦合等离子体发射光谱法或离子色谱法等方法进行确证与准确测量。

5.1.2.12 肽或蛋白质聚集体的分析通常采用高效液相凝胶排阻色谱法、凝胶毛细管电泳法等进行分析。应通过对色谱柱、流动相、检测波长、样品浓度等条件进行优化，确保聚集体能够完全分离且均被检出。

5.2 同位素稀释质谱法

5.2.1 原理

通过向肽或蛋白质样品中添加已知量的稳定同位素标记物质作为内标，样品经消解、水解或酶解后，以国家有证标准物质或准确定值的肽段为标准采用括号法或单点法测定处理后样品中的元素、氨基酸或特异性肽段含量，并根据肽或蛋白质的化学组成计算其纯度。

5.2.2 要求

5.2.2.1 采用同位素稀释质谱方法对肽或蛋白质标准物质候选物纯度定值时，应对样品中可能存在的杂质肽或杂蛋白以及其他可能带来影响的因素进行分析并消除。

注：

1、如杂质肽或杂蛋白消解后产生与目标肽或蛋白质消解后同样的无机物，从而使得同位素稀释质谱定值结果产生正向的系统误差；

2、如杂质肽或杂蛋白水解后产生与目标肽或蛋白质水解后同样的氨基酸，从而使得同位素稀释质谱定值结果产生正向的系统误差；

3、如杂蛋白为目标蛋白质的修饰产物或降解片段，酶解后产生与目标蛋白质同样的定量肽段，从而使得同位素稀释质谱定值结果产生正向的系统误差；

4、如样品溶液中含有游离的无机物或氨基酸，从而使得基于无机物的同位素稀释质谱或基于氨基酸分析的同位素稀释质谱定值结果产生正向的系统误差；

5、样品中杂质肽或杂蛋白的总量超过1%时，或其总量大于定值结果扩展不确定度的1/10时，应对这些杂质肽或杂蛋白进行准确分析并对同位素稀释质谱的定值结果进行修正，同时在不确定度评定时应包含杂质肽或杂蛋白分析及修正引入的不确定度；当样品中杂质肽或杂蛋白的总量小于1%时，或其总量小于定值结果扩展不确定度的1/10时，可不对杂质肽或杂蛋白进行准确定量及修正定值结果，但是在不确定评定时应包含杂质肽或杂蛋白引入的不确定度。

6、肽类杂质的扣减通常采用高效液相色谱-高分辨质谱联用法根据其精确分子量与二级质谱图中b, y离子分布确定肽序列，并根据该序列合成标准肽段后测定样品中该杂质的含量，计算出该杂质消解或水解后产生的无机物含量或氨基酸含量并用于同位素纯度分析结果的修正。

7、蛋白类杂质通常采用质谱技术，结合高效液相色谱、SDS-PAGE电泳、双向电泳等手段，对分离出的杂质进行鉴定并定量，计算出该杂质消解、水解或酶解后产生的无机物含量、氨基酸含量或特异性肽段含量并用于同位素纯度分析结果的修正。

注：以基于氨基酸分析的同位素稀释质谱方法为例，完成杂质肽或杂蛋白的鉴定与定量后，根据式(4)计算肽或蛋白质纯度的定值结果：

$$x_P = \left(\frac{M_r(P)}{Z_1} \right) \left[\frac{n_{AA}}{m_m} - \sum Y_{IMP_i} \frac{x_{IMP_i}}{M_r(IMP_i)} \right] \quad (4)$$

x_P ——肽或蛋白质的纯度，g/g

m_m ——用于分析的样品质量，g

$M_r(P)$ ——肽或蛋白质的分子量，g/mol

Z_1 ——一个肽或蛋白质分子中含有的指定氨基酸的个数

n_{AA} ——样品中指定氨基酸的物质的量，mol

Y_i ——第*i*个杂质肽或杂蛋白中含有的指定氨基酸的个数

x_{IMP_i} ——第*i*个杂质肽或杂蛋白的含量，g/g

$M_r(\text{IMP}_i)$ ——第*i*个杂质肽或杂蛋白的相对分子质量, g/mol

8、当鉴定杂质肽或杂蛋白存在困难时,可采用组分收集后分别分析来自目标肽或蛋白质,以及来自杂质肽或杂蛋白中指定无机物、氨基酸或特异性肽段的比例,并用于校正同位素稀释质谱法的纯度定值结果。采用此法时,非目标肽或蛋白质应与目标肽或蛋白质基线分离;

9、应对使用的同位素标记物进行验证,不含有非标记物或其含量足够低对纯度定值结果无明显影响。

5.2.2.2 采用基于无机物的同位素稀释质谱法测定肽或蛋白质纯度时,样品宜进行消解后测定,无机物标准物质及同位素内标的元素形态应与消解后待测样品中的无机物元素形态保持一致,需对消解条件进行优化并验证。如有必要,在采用消解液中无机物含量计算肽或蛋白质纯度之前应对杂质肽或杂蛋白引入的无机物或溶液中的游离的无机物进行扣除;

注:当采用基于无机物的同位素稀释质谱法测定非肽链结构时,需证明定量的无机物与目标肽或蛋白质之间严格的计量比。如采用同位素稀释质谱测定金属蛋白中的金属离子并计算蛋白质纯度时,应证明样品中蛋白质与金属离子的严格计量比,并在纯度定值结果的不确定度分析中引入此分析过程带来的不确定度。

5.2.2.3 采用基于氨基酸分析的同位素稀释质谱法为肽或蛋白质纯度标准物质定值时,应使用至少3种在水解过程中保持稳定的氨基酸(如果存在)进行定量,需对水解条件进行优化并验证;必要时,进行水解效率或氨基酸降解的分析并用于纯度定值结果的修正;必要时,在采用水解液中氨基酸含量计算肽或蛋白质纯度之前应对杂质肽或杂蛋白引入的氨基酸或溶液中的游离氨基酸进行扣除;不同氨基酸计算的蛋白质纯度结果之间的差异应不超过1%或定值结果不确定度的1/10。

注:常用的在水解过程中能够保持稳定的氨基酸包括脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、丙氨酸等。

5.2.2.4 采用基于特异性肽段的同位素稀释质谱法为肽或蛋白质纯度标准物质定值时,对于国家一级标准物质,组成蛋白质的每条多肽链应使用至少2条特异性肽段进行定量;对于国家二级标准物质,如果组成蛋白质的仅有一条多肽链,应至少使用2条特异性肽段进行定量,如果组成蛋白质的多肽链不止一条,每条多肽链至少使用1条特异性肽段进行定量。选取的特异性肽段的氨基酸个数一般不少于6个并在目标蛋白中具有特异性。作为标准的特异性肽段应按照本规范的4.3中的所述定值方式准确测定其纯度,同时应证明该肽段在整个定值和使用过程中的稳定性。应对酶切条件进行优化并验证,必要时,进行酶解效率或肽段降解的分析和修正。必要时,在采用特异性肽段浓度计算蛋白质纯度之前应对杂蛋白如聚集体或降解片段引入的特异性肽段进行扣减。根据不同特异性肽段计算的蛋白质纯度结果之间的差异应不超过1%或定值结果不确定度的1/10。

5.3 重量-容量法

5.3.1 原理

称量已知质量的固体肽或蛋白质纯度国家一级有证标准物质溶解于已知质量或体积的溶液中,从而制备出肽或蛋白质溶液标准物质。

5.4.2 要求

应使用肽或蛋白质纯度国家一级有证标准物质进行制备，使用的天平和/或容量器具的不确定度应当满足预期不确定度的要求，配制使用的溶剂应当证明不含有目标肽或蛋白质成分，应在 (20 ± 3) ℃的环境下进行配制。配制后应采用合适的分析方法对配制结果进行量值核验。

5.4 定量核磁共振法

5.4.1 原理

基于核磁共振谱图中氢原子信号的积分面积与产生相应共振谱线的肽或蛋白质氢原子之间数量的正比关系进行纯度分析。

注：定量核磁共振法可分为内标法和外标法。通常外标法比内标法需考虑更多因素(样品溶液与外标溶液的核磁管尺寸、射频脉冲传输效率、温度、匀场等因素的一致性)，从而导致较大的测量不确定度。

5.4.2 要求

采用肽或蛋白质中可产生准确定量核磁共振信号的原子如的H(羟基、氨基和巯基等基团中的氢一般不适用)。使用各种手段确认用于定量的峰为仅由该目标肽或蛋白质产生的孤立峰(即不与杂质峰重叠)，或已扣减所有与定量峰重叠的杂质峰。常用的确认方法包括：分析峰形的对称性；验证同一化合物内部的信号强度一致性；改变溶剂、温度、酸碱度等条件；使用二维核磁共振法寻找可能的杂质；使用色谱、质谱等其他方法寻找可能的杂质等。

5.4.2.1 内标法要求

内标物与样品同时溶解在相同溶剂中；样品与内标物在核磁谱图中分别有孤立的峰存在；内标物、样品和溶剂互相不发生反应；内标物能被准确取样，且其纯度可溯源至SI单位。在满足上述条件的前提下，尽量选择不确定度小的内标物。

5.4.2.2 外标法要求

外标物能被准确取样，且其纯度可溯源至SI单位。

5.5 其他方法

5.5.1 原理

优选不确定度符合预期要求的潜在计量基准方法或经过严格表征和验证的适用分析方法测定蛋白质纯度。

注：潜在计量基准方法是指符合计量基准方法定义但是尚未被国际计量局(BIPM)物质的量咨询委员会(CCQM)正式发布的方法，这些方法同样具有最高计量学品质，方法的测量原理可以被完全的描述和理解，其测量不确定度可以被完整评定并以SI单位表示。

5.5.2 要求

选择的方法应对被测量具有特异性，方法应经过严格表征，不确定度满足预期不确定度的要求；对测量方法准确度有影响的杂质应当充分表征并且其影响应当被评估并修正。

6 定值结果的不确定度评定

定值结果的不确定度应按照JJF 1059.1的要求进行评定，常用方法如质量平衡法、同位素稀释质谱法、定量核磁法的不确定度评定应参照6.1~6.3 进行。

6.1 质量平衡法

6.1.1 有机纯度 P_o 的不确定度评定

有机纯度的计算按式(5)进行计算，不确定度按式(6)进行评定。

$$P_o = \frac{A_o}{A_o + \sum_{i=1}^n A_i} \quad (5)$$

式中：

P_o ——有机纯度值；

A_o ——目标肽或蛋白质的峰面积；

A_i ——杂质肽或杂蛋白 i 的峰面积；

n ——杂质肽或杂蛋白的个数。

$$u_{rel}(P_o) = \sqrt{u_{rel,1}^2 + u_{rel,2}^2 + u_{rel,3}^2 + u_{rel,4}^2} \quad (6)$$

式中：

$u_{rel}(P_o)$ ——有机纯度的相对不确定度；

$u_{rel,1}$ ——测量重复性引入的相对不确定度；

$u_{rel,2}$ ——响应因子差异引入的相对不确定度；

$u_{rel,3}$ ——仪器检测线性引入的相对不确定度，如果分析过程均在仪器检测线性范围内，该不确定度分量可忽略不计；

$u_{rel,4}$ ——仪器检出限引入的相对不确定度，根据仪器可检测到的杂质最低浓度与待测物溶液浓度的比值计算。

其中响应因子差异引入的不确定度评定见式(7)：

$$u_{rel,2} = \frac{1}{\sum B_i} \left(\frac{\sqrt{\sum u_{2-i}^2}}{\sqrt{3}} \right) \quad (7)$$

式中：

$\sum B_i$ ——总组分的含量，总是等于1；

u_{2-i}^2 ——杂质 i 的响应因子差异引入的不确定度，按式(8)计算。

$$u_{2-i} = B_{i \max \lambda} - B_{i \text{char} \lambda} = \frac{A_{i \max \lambda}}{\sum A_{i \text{char} \lambda}} - \frac{A_{i \text{char} \lambda}}{\sum A_{i \text{char} \lambda}} \quad (8)$$

$A_{i \max \lambda}$ ——杂质 i 最大响应波长下的峰面积；

$A_{i\text{char}\lambda}$ ——杂质*i*定值波长下的峰面积；

$\sum A_{i\text{char}\lambda}$ ——定值波长下的总峰面积；

$B_{i\text{max}\lambda}$ ——杂质*i*最大响应波长下的面积百分比；

$B_{i\text{char}\lambda}$ ——杂质*i*定值波长下的面积百分比。

6.1.2 结构类似物定量结果的不确定度评定

样品中含有的每个杂质肽或杂蛋白 X_i 可以通过单点法或标准曲线法定量，当采用单点法定量时， X_i 测定结果的不确定度按式（9）计算：

$$u_{\text{rel}}(X_i) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(A_i)]^2 + [u_{\text{rel}}(A_i')]^2 + [u_{\text{rel}}(V)]^2 + [u_{\text{rel}}(V_i')]^2 + [u_{\text{rel}}(W)]^2 + [u_{\text{rel}}(W_i')]^2 + [u_{\text{rel}}(P_i)]^2} \quad (9)$$

式中：

$u_{\text{rel}}(A_i')$ ——杂质*i*纯品溶液中杂质*i*的峰面积的相对不确定度；

$u_{\text{rel}}(A_i)$ ——待测物中杂质*i*的峰面积的相对不确定度；

$u_{\text{rel}}(V)$ ——待测物溶液的体积的相对不确定度；

$u_{\text{rel}}(V_i')$ ——杂质*i*纯品溶液的体积的相对不确定度；

$u_{\text{rel}}(W)$ ——待测物溶液中待测物的质量的相对不确定度；

$u_{\text{rel}}(W_i')$ ——杂质*i*纯品溶液中杂质*i*的质量的相对不确定度；

$u_{\text{rel}}(P_i)$ ——杂质*i*纯品的纯度的相对不确定度。

当采用标准曲线法定量时， X_i 测定结果的不确定度按式（10）计算：

$$u_{\text{rel}}(X_i) = \sqrt{[u_{\text{rel}}(C_i)]^2 + \sum_{j=1}^m [u_{\text{rel}}(V_{ij}')]^2 + \sum_{j=1}^m [u_{\text{rel}}(W_{ij}')]^2 + [u_{\text{rel}}(V)]^2 + [u_{\text{rel}}(W)]^2 + [u_{\text{rel}}(P_i)]^2} \quad (10)$$

式中：

m ——标准溶液的个数；

$u_{\text{rel}}(C_i)$ ——标准曲线引入的相对标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(V_{ij}')$ ——杂质*i*纯品的第*j*个标准溶液的体积的相对标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(W_{ij}')$ ——杂质*i*纯品的第*j*个标准溶液中杂质*i*的质量的相对标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(V)$ ——待测物溶液的体积的相对标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(W)$ ——待测物溶液中待测物的质量的相对标准不确定度；

$u_{\text{rel}}(P_i)$ ——杂质*i*纯品的纯度的相对标准不确定度。

杂质肽或杂蛋白总量的不确定度按式（11）计算：

$$u(X_{\text{RS}}) = \sqrt{\sum_{i=1}^n [u(X_i)]^2 + u_{\text{LOD}}^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n X_i [u_{\text{rel}}(X_i)]^2 + u_{\text{LOD}}^2} \quad (11)$$

式中：

$u(X_{\text{RS}})$ ——杂质肽或杂蛋白总量的标准不确定度，g/g；

n ——杂质的个数；

$u(X_i)$ ——杂质*i*的不确定度，g/g;

X_i ——杂质*i*的含量，g/g;

u_{LOD} ——仪器检出限 (LOD)引入的相对不确定度，根据仪器可检测到的杂质最低浓度与待测物溶液浓度的比值计算；

$u_{rel}(X_i)$ ——杂质*i*的相对不确定度。

6.1.3 全部杂质鉴定并定量后扣减时，定值结果一般按式（1）计算，不确定度按照式（12）进行评定。

$$u(P) = \sqrt{[u(X_{RS})]^2 + [u(X_w)]^2 + [u(X_V)]^2 + [u(X_{NV})]^2 + [u(X_{AGG})]^2} \quad (12)$$

$u(P)$ ——纯度的标准不确定度，g/g

$u(X_{RS})$ ——结构类似物的标准不确定度，g/g

$u(X_w)$ ——水分含量的标准不确定度，g/g

$u(X_V)$ ——挥发性组分含量的标准不确定度，g/g

$u(X_{NV})$ ——不挥发性组分含量的标准不确定度，g/g

6.1.4 当样品中含有杂质较少没有进行单一杂质鉴定和定量时，定值结果可按式（2）计算，不确定度按式（13）进行评定。

$$u(P) = Pu_{rel}(P) = P \sqrt{[u_{rel}(P_0)]^2 + \frac{[u(X_w)]^2 + [u(X_V)]^2 + [u(X_{NV})]^2}{(1 - X_w - X_V - X_{NV})^2}} \quad (13)$$

$u(P)$ ——纯度的标准不确定度，g/g

$u_{rel}(P)$ ——纯度的相对标准不确定度

$u_{rel}(P_0)$ ——有机纯度的相对标准不确定度

$u(X_w)$ ——水分含量的标准不确定度，g/g

$u(X_V)$ ——挥发性组分含量的标准不确定度，g/g

$u(X_{NV})$ ——不挥发性组分含量的标准不确定度，g/g

6.1.5 当仅对样品中部分杂质进行鉴定和定量时，定值结果可按式（3）计算，不确定度按式（14）进行评定。

$$u(P) = Pu_{rel}(P) = P \sqrt{[u_{rel}(P_0)]^2 + \frac{[u(X_{RS})]^2 + [u(X_w)]^2 + [u(X_V)]^2 + [u(X_{NV})]^2}{(1 - X_{RS} - X_w - X_V - X_{NV})^2}} \quad (14)$$

$u(P)$ ——纯度的标准不确定度，g/g

$u_{rel}(P)$ ——纯度的相对标准不确定度

$u_{rel}(P_0)$ ——有机纯度的相对标准不确定度

$u(X_{RS})$ ——结构类似物的标准不确定度，g/g

$u(X_w)$ ——水分含量的标准不确定度，g/g

$u(X_V)$ ——挥发性组分含量的标准不确定度，g/g

$u(X_{NV})$ ——不挥发性组分含量的标准不确定度，g/g

6.1.6 水分含量测量不确定度按式(15)计算：

$$u(X_w) = X_w \sqrt{u_{rel,1}^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(W)}{W}\right)^2 + \left(\frac{u(f)}{f}\right)^2} \quad (15)$$

式中：

$u_{rel,1}$ ——测量重复性引入的相对不确定度；

$u(m)$ ——样品质量的不确定度，g；

$u(W)$ ——水的的质量的标准不确定度，g；

$u(f)$ ——修正系数引入的不确定度，由校准用的水分标准物质的标准不确定

度计算，或由电解效率、副反应偏离、固体样品未释放水分的不确定度合成。

6.1.7 挥发性组分含量一般通过气相色谱-质谱联用、气相色谱-火焰离子化检测器等方法测定，测定结果的不确定度按6.1.2计算。

6.1.8 不挥发性组分一般通过灼烧残渣法、热重分析法(TGA) (通常升温至800℃或以上)、ICP-MS(电感耦合等离子体质谱仪)法等测定。ICP-MS法测定不挥发组分的结果的不确定度按6.1.2计算；灼烧残渣法和TGA法不挥发性组分含量测定结果及不确定度分别按式(16)和式(17)计算：

$$X_{NV} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \quad (16)$$

X_{NV} ——不挥发性组分含量，g/g；

W_0 ——空坩埚的质量，g；

W_1 ——灼烧前的总质量，g；

W_2 ——灼烧后的总质量，g。

$$u(X_{NV}) = \sqrt{u_A^2 + c_0^2 u_0^2 + c_1^2 u_1^2 + c_2^2 u_2^2 + 2c_0 c_1 u_0 u_1 r_{0,1} + 2c_0 c_2 u_0 u_2 r_{0,2} + 2c_1 c_2 u_1 u_2 r_{1,2}} \quad (17)$$

其中：

$$c_0 = \frac{W_2 - W_1}{(W_1 - W_0)^2}$$

$$c_1 = \frac{W_0 - W_2}{(W_1 - W_0)^2}$$

$$c_2 = \frac{1}{W_1 - W_0}$$

式中：

$u(X_{NV})$ ——不挥发性组分含量的不确定度，g/g；

u_A ——测量重复性引入的不确定度，g/g；

u_0 ——空坩埚的质量 W_0 的不确定度，g；

u_1 ——灼烧前的总质量 W_1 的不确定度，g；

u_2 ——灼烧后的总质量 W_2 的不确定度，g；

c_0 —— W_0 的灵敏系数， g^{-1} ；

c_1 —— W_1 的灵敏系数， g^{-1} ；

c_2 —— W_2 的灵敏系数， g^{-1} ；

$r_{0,1}$ —— W_0 与 W_1 的相关系数；

$r_{1,2}$ —— W_1 与 W_2 的相关系数；

$r_{0,2}$ —— W_0 与 W_2 的相关系数。

注：如果使用同一设备称量质量，则相关系数=1，否则相关系数=0。

6.2 同位素稀释质谱法

采用某一氨基酸AA通过同位素稀释质谱括号法测定肽或蛋白质纯度时，首先按式(18)计算水解液中氨基酸AA的浓度，

$$c_{AA} = \frac{P_{AA} m_{L-AA} [R(I_1 - I_2) - (I_1 R_2 - I_2 R_1)]}{M(R_1 - R_2)} \quad (18)$$

式中：

c_{AA} ——水解液中氨基酸AA的浓度，g/g；

P_{AA} ——氨基酸AA标准物质纯度，g/g；

m_{L-AA} ——水解液中同位素标记氨基酸AA的质量，g；

R ——样品中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的峰面积比；

I_1 ——高标溶液中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的质量比；

I_2 ——低标溶液中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的质量比；

R_1 ——高标溶液中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的峰面积比；

R_2 ——低标溶液中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的峰面积比；

M ——水解样品质量，g；

根据式（20），氨基酸AA浓度的不确定度按式（19）计算：

$$u(c_{AA}) = \sqrt{[c(P_{AA})u(P_{AA})]^2 + [c(m_{L-AA})u(m_{L-AA})]^2 + [c(R)u(R)]^2 + [c(I_1)u(I_1)]^2 + [c(I_2)u(I_2)]^2 + [c(R_1)u(R_1)]^2 + [c(R_2)u(R_2)]^2 + [c(M)u(M)]^2} \quad (19)$$

式中：

$u(c_{AA})$ ——水解液中氨基酸AA的浓度的不确定度，g/g；

$u(P_{AA})$ ——氨基酸AA标准物质纯度的不确定度，g/g；

$u(m_{L-AA})$ ——水解液中同位素标记氨基酸AA的质量的不确定度，g；

$u(R)$ ——样品中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的峰面积比的不确定度；

$u(I_1)$ ——低标溶液中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的质量比的不确定度；

$u(I_2)$ ——高标溶液中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的质量比的不确定度；

$u(R_1)$ ——低标溶液中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的峰面积比的不确定度；

$u(R_2)$ ——高标溶液中氨基酸AA与同位素标记氨基酸AA的峰面积比的不确定度；

$u(M)$ ——水解样品质量的不确定度，g；

$$c(P_{AA}) = \frac{m_{L-AA}[R(I_1 - I_2) - (I_1 R_2 - I_2 R_1)]}{M(R_1 - R_2)}$$

$$c(m_{L-AA}) = \frac{P_{AA}[R(I_1 - I_2) - (I_1 R_2 - I_2 R_1)]}{M(R_1 - R_2)}$$

$$c(R) = \frac{P_{AA}m_{L-AA}(I_1 - I_2)}{M(R_1 - R_2)}$$

$$c(I_1) = \frac{P_{AA}m_{L-AA}(R - R_2)}{M(R_1 - R_2)}$$

$$c(I_2) = \frac{P_{AA}m_{L-AA}(R_1 - R)}{M(R_1 - R_2)}$$

$$c(R_1) = \frac{P_{AA}m_{L-AA}I_2}{M(R_1 - R_2)} - \frac{P_{AA}m_{L-AA}[R(I_1 - I_2) - (I_1 R_2 - I_2 R_1)]}{M(R_1 - R_2)^2}$$

$$c(R_2) = \frac{P_{AA}m_{L-AA}I_2}{M(R_1 - R_2)} - \frac{P_{AA}m_{L-AA}[R(I_1 - I_2) - (I_1 R_2 - I_2 R_1)]}{M(R_1 - R_2)^2}$$

$$c(R_2) = -\frac{P_{AA}m_{L-AA}I_1}{M(R_1 - R_2)} + \frac{P_{AA}m_{L-AA}[R(I_1 - I_2) - (I_1 R_2 - I_2 R_1)]}{M(R_1 - R_2)^2}$$

经过杂质校正后的AA氨基酸浓度按式（20）计算，其不确定度按式（21）计算。

$$c_{AA, \text{corr}} = c_{AA} - \sum_{i=1}^n c_{\text{IMP-AA}, i} \quad (20)$$

式中：

$c_{AA, \text{corr}}$ ——杂质校正后水解液中氨基酸AA的浓度，g/g；

$c_{\text{IMP-AA}, i}$ ——杂质*i*水解后产生的氨基酸AA的浓度，g/g；

$$u(c_{AA, \text{corr}}) = \sqrt{u^2(c_{AA}) + \sum_{i=1}^n u^2(c_{\text{IMP-AA}, i})} \quad (21)$$

$u(c_{AA, \text{corr}})$ ——杂质校正后水解液中氨基酸AA的浓度的不确定度，g/g；

$u(c_{\text{IMP-AA}, i})$ ——杂质*i*水解后产生的氨基酸AA的浓度的不确定度，g/g；

样品中肽或蛋白质的浓度按式（22）计算，其不确定度按式（23）计算：

$$c_p = \frac{c_{AA, \text{corr}} M_p}{M_{AA} N_{AA}} \quad (22)$$

式中：

c_p ——样品中肽或蛋白质的浓度，g/g；

M_{AA} ——氨基酸的摩尔质量，g/mol；

N_{AA} ——肽或蛋白质中含有的氨基酸的个数；

M_p ——肽或蛋白质的摩尔质量。

$$u(c_p) = c_p \sqrt{\left[\frac{u(c_{AA, \text{corr}})}{c_{AA, \text{corr}}} \right]^2 + \left[\frac{u(M_{AA})}{M_{AA}} \right]^2 + \left[\frac{u(N_{AA})}{N_{AA}} \right]^2 + \left[\frac{u(M_p)}{M_p} \right]^2} \quad (23)$$

6.3 定量核磁共振法

定量核磁共振法样品纯度测量结果按式（24）计算，测量结果的不确定度按式（25）计算：

$$P_x = \frac{I_x}{I_{std}} \frac{N_{std}}{N_x} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{m_{std}}{m_x} P_{std} \quad (24)$$

式中：

P_x ——待测物的纯度，g/g；

I_{std} ——内标物的信号响应；

N_{std} ——内标物的自旋核数目；

M_{std} ——内标物的摩尔质量，g/mol；

m_{std} ——内标物的称量质量，g；

P_{std} ——内标物的纯度，g/g；

I_x ——待测物的信号响应；

N_x ——待测物的自旋核数目；

M_x ——待测物的摩尔质量，g/mol；

m_x ——待测物的称量质量，g。

$$\frac{u(P_x)}{P_x} = \sqrt{\left(\frac{u(I_x / I_{std})}{I_x / I_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_x)}{M_x}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{std})}{M_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{std})}{m_{std}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_x)}{m_x}\right)^2 + \left(\frac{u(P_{std})}{P_{std}}\right)^2} \quad (25)$$

$u(I_x / I_{std})$ ——定量峰面积比值的相对标准不确定度，通常等于多次测量 的相对标准偏差；

$u(M_x)$ ——待测物的摩尔质量的相对标准不确定度；

$u(M_{std})$ ——内标物的摩尔质量的相对标准不确定度；

$u(m_x)$ ——待测物的称量质量的相对标准不确定度；

$u(m_{std})$ ——内标物的称量质量的相对标准不确定度；

$u(P_{std})$ ——内标物的纯度的相对标准不确定度。

全国标准物质计量技术委员会规范征求意见稿