



中华人民共和国国家计量技术规范

JJFxxxx—xxxx

氨基酸序列分析仪校准规范

Calibration Specification for Amino Acid Sequences Analyzers

(征求意见稿)

202×-××-××发布

202××-××-××实施

国家市场监督管理总局发布

氨基酸序列分析仪校准规范

**Calibration Specification for Amino Acid
Sequences Analyzers**

JJFxxxx—xxxx

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：

参加起草单位：

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：

目录

引言	II
1 范围	1
2 引用文件	1
3 概述	1
4 计量特性	1
5 校准条件	2
6 校准项目和校准方法	3
6.1 泵流量设定值误差和流量稳定性	3
6.2 反应器、转化器、柱温箱温度设定值误差和温度稳定性	3
6.3 基线噪声和基线漂移	4
6.4 分离度	5
6.5 测序正确率	5
7 校准结果表达	5
8 复校时间间隔	5
附录 A 不同温度下甲醇密度	7
附录 B 分离度测试方法	8
附录 C 氨基酸序列分析仪校准记录参考格式	10
附录 D 校准证书内页推荐格式	13
附录 E 温度示值误差测量结果的不确定度评定示例	15

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。

本规范的校准方法及计量特性等主要参考了 JJG 705-2014 《液相色谱仪》和 JJG 1064-2011 《氨基酸分析仪》。

本规范为首次发布。

全国生物计量技术委员会

氨基酸序列分析仪校准规范

1 范围

本规范适用于基于埃德曼降解原理全自动测定蛋白质/多肽 N 端氨基酸序列的氨基酸序列分析仪的校准。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJG 705 液相色谱仪

JJG 1064 氨基酸分析仪

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，其最新版本适用于本规范。

3 概述

氨基酸序列分析仪（以下简称分析仪）可以对蛋白质/多肽 N 端氨基酸序列进行全自动测定，工作流程主要由埃德曼（Edman）降解和乙内酰苯硫脲（PTH）-氨基酸两个阶段构成。在碱性条件下，蛋白质 N 端氨基酸残基首先与异硫氰酸苯酯（PITC）偶合，形成苯氨基硫甲酰（PTC）衍生物；随后在三氟乙酸（TFA）作用下，切断 N 端肽键，使末端氨基酸以噻唑啉酮苯胺（ATZ）-氨基酸形式游离，并暴露出下一氨基酸的 α -氨基。ATZ-氨基酸进一步在 TFA 中转化为稳定的 PTH-氨基酸，最终通过高效液相色谱（HPLC）进行分离，并依据保留时间鉴定其种类。每一轮反应结束后，剩余多肽链可回收并进入下一轮循环，从而实现序列的逐次解析。

分析仪主要由反应器、转化器和高效液相色谱（HPLC）系统组成。

4 计量特性

分析仪计量特性如表 1 所示。

表1 分析仪计量特性及指标

序号	计量特性		技术指标	
1	输液系统	流量设定值误差		±3%
		流量稳定性		≤2%
2	控温系统	反应器	温度设定值误差	±1°C
			温度稳定性	≤1°C/h
		转化器	温度设定值误差	±1°C
			温度稳定性	≤1°C/h
		柱温箱	温度设定值误差	±1°C
			温度稳定性	≤1°C/h
3	检测器	基线噪声		≤0.5 mAU
		基线漂移		≤5 mAU/h
4	色谱柱	分离度		≥30%
5	整机性能	测序正确率		≥80%
注：以上技术指标不适用于合格性判别，仅供参考。				

5 校准条件

5.1 环境条件

5.1.1 温度：(15~30) °C；

5.1.2 相对湿度：30%~80%；

5.1.3 供电电源：电压(220±22) V，频率(50±1) Hz；

5.1.4 室内清洁，无易燃易爆和腐蚀性气体，排风量好，无影响仪器正常工作的电磁场及机械振动。

5.2 测量标准及其他设备

5.2.1 秒表：最小分度值不大于0.1 s。

5.2.2 分析天平：最大称量不小于100 g，最小分度值不大于1 mg。

5.2.3 数字温度计：量程范围包括(20~80) °C，最大允许误差为±0.3 °C。

5.2.4 容量瓶等玻璃器皿。

5.2.5 标准物质：

分离度校准用混合氨基酸标准溶液：采用氨基酸纯度标准物质进行配置（纯度大于 98%，扩展不确定度小于 3.0%， $k=2$ ），配置方法见附录 A。

蛋白质/多肽标准物质：N 末端未修饰，且具有明确的 N 末端氨基酸序列。

5.2.6 其他耗材：聚偏二氟乙烯（PVDF）膜、玻璃纤维盘。

6 校准项目和校准方法

6.1 泵流量示值误差和流量稳定性

将仪器各部分连接好，以 100% 甲醇为流动相，设定泵流量为 1 mL/min，按说明书启动仪器，待压力稳定后，在流动相出口处用事先称重过的洁净容量瓶收集流动相，同时用秒表计时，收集 10 min，在分析天平上称重，按公式（1）计算流量实测值 F_m (mL/min)。按公式（2）、公式（3）计算泵流量示值误差 S_S 和流量稳定性 S_R ，重复测量 3 次。

$$F_m = (W_2 - W_1) / (\rho_t \cdot t) \quad (1)$$

式中：

F_m —流量实测值，mL/min；

W_2 —容量瓶+流动相的质量，g；

W_1 —容量瓶的质量，g；

ρ_t —实验温度下甲醇的密度，g/cm³，（不同温度下甲醇的密度计算公式参见附录 A）；

t —收集甲醇的时间，min。

$$S_S = (\bar{F}_m - F_S) / F_S \times 100\% \quad (2)$$

式中：

\bar{F}_m —设定流量 3 次测量值的算术平均值，mL/min；

F_S —流量设定值，mL/min。

$$S_R = (F_{\max} - F_{\min}) / F_m \times 100\% \quad (3)$$

式中：

F_{\max} —设定流量 3 次测量值的最大值，mL/min；

F_{\min} —设定流量 3 次测量值的最小值，mL/min。

6.2 反应器、转化器、柱温箱温度示值误差和温度稳定性

将数字温度计探头分别固定在反应器、转化器、柱温箱内，分别选择 43 °C

(反应器)、60 °C (转化器)、45 °C (柱温箱) (也可根据用户使用温度设定) 进行校准。按仪器说明书操作, 通电升温, 待温度稳定后, 记下温度计读数并开始计时, 以后每隔 10 min 记录 1 次读数 T_d , 共计 7 次, 求出平均值 \bar{T}_d 。按公式 (4)、公式 (5) 计算温度示值误差 ΔT_s 与温度稳定性 T_c 。

$$\Delta T_s = \bar{T}_d - T_s \quad (4)$$

$$T_c = T_{\max} - T_{\min} \quad (5)$$

式中:

ΔT_s —温度设定值误差, °C;

\bar{T}_d —7 次温度测量值的平均值, °C;

T_s —温度设定值, °C;

T_c —温度稳定性, °C;

T_{\max} —测量温度最大值, °C;

T_{\min} —测量温度最小值, °C。

6.3 基线噪声和基线漂移

按说明书设置泵流速设为 1 mL/min, 检测器开始波长为 265 nm, 结束波长为 273 nm, 启动仪器, 待仪器稳定后记录基线 60 min; 60 min 内基线偏离起始点的最大值为基线漂移。选取 60 min 内基线偏离起始点绝对值最大信号值 (H_s , mAU), 按公式 (6) 计算 60 min 内基线漂移 (N_s)。选取基线中噪声最高值 (H_{\max} , mAU), 最低值 (H_{\min} , mAU), 按公式 (7) 计算基线噪声 (N_d)。

$$N_s = H_s - H_0 \quad (6)$$

式中:

N_s —基线漂移, mAU;

H_s —60 min 内基线偏离起始点绝对值最大值, mAU;

H_0 —基线中起始点信号值, mAU。

$$N_d = H_{\max} - H_{\min} \quad (7)$$

式中:

N_d —基线噪声, mAU;

H_{\max} —基线中噪声最大峰的最大值, mAU;

H_{\min} ——基线中噪声最小峰的最大值, mAU。

6.4 分离度

在确认色谱柱正确安装且柱温箱、泵系统及检测器预热稳定后, 运行附录 B 的测试方法, 根据氨基酸的色谱峰的保留时间, 按公式 (8) 计算苏氨酸 (Thr) -组氨酸 (His) -甘氨酸 (Gly) 、苯丙氨酸 (Phe) -赖氨酸- (Lys) -异亮氨酸 (Ile) 这两组氨基酸的分离度 R :

$$R = \frac{t_{R_3} - t_{R_1}}{t_{R_3} - t_{R_2}} \quad (8)$$

式中:

t_{R_1} ——同一组中保留时间最短的色谱峰所对应的保留时间, min;

t_{R_2} ——同一组中保留时间居中的色谱峰所对应的保留时间, min;

t_{R_3} ——同一组中保留时间最长的色谱峰所对应的保留时间, min。

6.5 测序正确率

根据客户实际需求进行选择适宜的蛋白质或多肽标准物质, 建议优先选用马肌红蛋白。在完成分离度校准后, 取 5 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的马肌红蛋白溶液点样于 PVDF 膜上, 经干燥并固定于反应器内, 进行 N 末端序列分析。测定其 N 末端前 15 位氨基酸序列, 并按公式 (9) 计算序列正确率 P 。

$$P = P_{\text{C}}/P_{\text{m}} \times 100\% \quad (9)$$

式中:

P_{C} ——预测正确的氨基酸个数;

P_{m} ——预测氨基酸总个数, 该实验要求总个数为 15。

7 校准结果表达

校准记录应尽可能详尽地记载测量数据和计算结果, 推荐的校准记录格式见附录 C。温度示值误差的测量不确定度应按 JJF 1059.1 的要求评定, 不确定度评定实例见附录 E。经校准的仪器应出具校准证书, 校准证书应符合 JJF 1071-2010 中 5.12 的要求, 校准证书内页格式见附录 D。

8 复校时间间隔

建议复校时间间隔不超过 1 年。由于复校时间间隔的长短是由仪器的使用情

况、使用者、仪器本身质量等着多因素所决定的，因此，送校单位可根据实际使用情况自主确定复校时间间隔。

全国生物计量技术委员会

附录A

不同温度下甲醇密度

A.1 甲醇的密度

不同温度下甲醇的密度按公式 (A.1)计算得出：

$$\rho_t = \rho_{20} - k(t - 20) \quad (A.1)$$

式中：

ρ_t — t 温度条件下甲醇的密度；

ρ_{20} —20 °C时甲醇的密度，0.791 g/cm³；

t —测定流速时温度，°C；

k —温度校正系数，0.00093 g/cm³·°C⁻¹。

附录B

分离度测试方法

B.1 测试实验环境及所需的试剂、仪器和耗材

B.1.1 实验环境

温度: (15~30) °C;

相对湿度: 不大于 80%。

B.1.2 试剂

分离度校准用氨基酸混合标准溶液: 采用氨基酸纯度标准物质进行配置(纯度大于 98%, 扩展不确定度小于 3.0%, $k=2$)。

0.1 mol/L 盐酸溶液。

聚凝胺: 用作蛋白质/多肽载体, 进行蛋白质测序。

PTH-氨基酸混合标准样品。

偶合试剂: 5% 的异硫氰酸苯酯正庚烷溶液, 12% 的三甲胺溶液;

切割试剂: 三氟乙酸。

转化试剂: 25% 的三氟乙酸溶液。

其他溶剂: 乙酸乙酯, 1-氯丁烷, 37%的乙腈溶液, 100%甲醇。

B.1.3 仪器耗材

电子天平: 分度值优于 1 mg, ② 级。

其他耗材: PTFE 滤膜、PVDF 膜、玻璃纤维盘。

B.2 实验用溶液的配置

B.2.1 分离度校准用混合氨基酸标准溶液的配制

分别准确称取 59.6 mg 苏氨酸纯度标准物质, 77.6 mg 组氨酸纯度标准物质、37.5 mg 甘氨酸纯度标准物质、82.6 mg 苯丙氨酸纯度标准物质、73.1 mg 盐酸赖氨酸纯度标准物质和 65.6 mg 异亮氨酸纯度标准物质, 用 0.1 mol/L HCl 溶解并定容于 50 mL 容量瓶中, 配置成 10 mmol/L 单一氨基酸储备液。随后, 分别移取各储备液 100 μL 至一个 10 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol/L HCl 定容, 得到每种氨基酸浓度均为 100 μmol/L 的分离度校准用混合氨基酸标准溶液。

B.2.2 实验用聚凝胺溶液的配制

用纯水将聚凝胺稀释至 500 nmol/L，并于-20 °C冷冻保存。

B.3 分离度测试

- (1) 启动分析仪，按照仪器使用说明书设置相关参数，并清洗样品环。检查 HPLC 分析系统处于可进行分析状态。
- (2) 对 HPLC 分析系统进行校准：量取 90 μ L PTH-氨基酸混合标准样品溶液置于样品管中，进行分析；根据结果修正各氨基酸的保留时间，完成系统校准。
- (3) 准备玻璃纤维盘：向玻璃纤维盘注入 15 μ L 浓度为 500 nmol/L 的聚凝胺溶液，干燥后，用新的 PTFE 滤膜将其固定于反应器内，随后分析仪自动执行清洗处理。
- (4) 向经聚凝胺处理的玻璃纤维盘中注入分离度校准用氨基酸混合标准溶液，干燥后以 PTFE 滤膜固定，设置循环次数为 2，启动序列分析。
- (5) 实验结束后进行数据处理，依据色谱图中各氨基酸的保留时间进行定性确认，按规范正文中公式（8）计算分离度。

附录 C

氨基酸序列分析仪校准记录参考格式

送校单位		校准地址	
仪器型号		仪器编号	
制造厂商		校准日期	
环境温度	°C	相对湿度	%
校准人		核验人	
技术依据			
主要测量设	名称/型号	测量范围	不确定度/准确度等级/最大允许误差

C.1 泵流量设定值误差及泵流量稳定性

流量 (mL/min)		流动相		密度 ρ	
采集流动相时间(min)					S_S (%)
容量瓶重量(g)					
容量瓶+流动相重量(g)					S_R (%)
流动相体积(mL)					
F_m (mL/min)					$\bar{F} =$

C.2 反应器、转化器、柱温箱温度示值误差和温度稳定性

反应器温度示值误差和控温稳定性的检测														
温度 设定 值(°C)	温度测量值(°C)							温度 平均 值(°C)	ΔT_s (°C)	T_c (°C/h)				
	1	2	3	4	5	6	7							
反应器温度示值误差 ΔT_s (°C)					反应器温度稳定性 T_c (°C/h)									
转化器温度示值误差和控温稳定性的检测														
温度 设定 值(°C)	温度测量值(°C)							温度 平均 值(°C)	ΔT_s (°C)	T_c (°C/h)				
	1	2	3	4	5	6	7							
转化器温度示值误差 ΔT_s (°C)					转化器温度稳定性 T_c (°C/h)									
柱箱温度示值误差和控温稳定性的检测														
温度 设定 值(°C)	温度测量值(°C)							温度 平均 值(°C)	ΔT_s (°C)	T_c (°C/h)				
	1	2	3	4	5	6	7							
柱箱温度示值误差 ΔT_s (°C)					柱箱温度稳定性 T_c (°C/h)									

C.3 基线噪声和基线漂移

起始点值(mAU)	偏离起始点最大值(mAU)	基线漂移(mAU)
最低值(mAU)	最高值(mAU)	基线噪声(mAU)

C.4 分离度

苏氨酸 (Thr) -组氨酸 (His) -甘氨酸 (Gly)			
t_{R_1}		t_{R_2}	
t_{R_3}		分离度 $R(\%)$	
苯丙氨酸 (Phe) -赖氨酸- (Lys) -异亮氨酸 (Ile)			
t_{R_1}		t_{R_2}	
t_{R_3}		分离度 $R(\%)$	

C.5 测序正确率

测序正确率的检测			
预测正确的氨基酸个数		预测氨基酸总个数	
测序正确率 $P(\%)$			

附录 D

校准证书内页推荐格式

D.1 校准证书内页

证书编号XXXXXX-XXXX			
校准环境条件及地点:			
温度	°C	地点	
相对湿度	%	其他	
校准使用的主要设备			
名称/型号	测量范围	不确定度/准确度等级/最大允许误差	检定/校准证书编号/有效期

第X页共X页

D.2 校准证书校准结果页

证书编号XXXXXX-XXXX		
校准结果		
被校项目及校准结果:		
校准项目	校准结果	
流量示值误差		
流量稳定性		
反应器温度示值误差		扩展不确定度 ($k=2$)
反应器温度稳定性		
转化器温度示值误差		扩展不确定度 ($k=2$)
转化器温度稳定性		
柱箱温度示值误差		扩展不确定度 ($k=2$)
柱箱温度稳定性		
基线噪声		
基线漂移		
分离度	苏氨酸 (Thr) - 组氨酸 (His) - 甘氨酸 (Gly)	
	苯丙氨酸 (Phe) - 赖氨酸- (Lys) - 异亮氨酸 (Ile)	
测序正确率		
以下空白		
第X页共X页		

附录 E

温度示值误差测量结果的不确定度评定示例

E.1 测量模型

温度设定值误差的计算公式为：

$$\Delta T_s = \bar{T}_d - T_s \quad (E.1)$$

式中：

ΔT_s —温度设定值误差, $^{\circ}\text{C}$;

\bar{T}_d —7 次温度测量值的平均值, $^{\circ}\text{C}$;

T_s —温度设定值, $^{\circ}\text{C}$;

E.2 不确定度来源

- (1) 测量重复性引入的不确定度。
- (2) 数字温度计引入的不确定度。

E.3 不确定度分量评定

E.3.1 温度测量重复性引入的不确定度 $u_1(\bar{T}_d)$

表 1 温度测量重复性结果

次数	1	2	3	4	5	6	7
温度/ $^{\circ}\text{C}$	59.1	59.1	59.1	59.12	59.14	59.12	59.12

根据表 1 测量结果, $u_1(\bar{T}_d) = s / \sqrt{7} = 0.006 ^{\circ}\text{C}$

E.3.2 数字温度计引入的相对不确定度 $u_2(T_s)$

由数字温度计校准证书得到, $u_2(T_s) = u_c / k = 0.05 ^{\circ}\text{C}$, $k=2$

E.4 合成标准不确定度

按公式 (E.2) 计算合成相对不确定度。

$$u(\Delta T) = \sqrt{u_1^2(\bar{T}_d) + u_2^2(T_s)} \quad (E.2)$$

结果见表 E.3。

E.5 扩展不确定度

取 $k=2$, 转化器温度示值误差测量结果的不确定度按公式 (E.3) 计算, 结果见表 E.3。

$$U_r = k \times u(\Delta T) \quad (E.3)$$

表 E.3 合成标准不确定度和扩展不确定度结果

项目	$u_1(\bar{T}_d)$	$u_2(T_s)$	合成标准不确定度	扩展不确定度 ($k=2$)
结果 (°C)	0.006	0.05	0.050	0.1