

国家计量技术规范规程制修订

《氨基酸序列分析仪校准规范》

(征求意见稿)

编制说明

2025 年 10 月

《氨基酸序列分析仪校准规范》

编制说明

一、任务来源

根据国家市场监督管理总局国家计量技术法规制修订文件（见市监计量发【2024】40号），上海市计量测试技术研究院有限公司、中国计量科学研究院、广东省计量科学研究院、上海爱谱蒂康生物科技有限公司和岛津企业管理（中国）有限公司共同承担《氨基酸序列分析仪校准规范》的制定工作，归口单位为全国生物计量技术委员会。

二、规范制定的必要性

氨基酸是蛋白质的基本组成单元，蛋白质的结构与功能由其氨基酸序列所决定。准确解析蛋白质的氨基酸序列，是理解生命活动机制、研究疾病发生发展规律及进行药物靶点筛选的基础。氨基酸序列分析技术作为现代生命科学和生物制药研究中最重要的分析手段之一，在蛋白质组学研究、重组蛋白药物质量控制、标准物质研制以及结构生物学研究中具有不可替代的作用。

氨基酸序列分析仪是实现蛋白质序列解析的核心设备，其基本原理是通过化学或酶学方法依次切除肽链上的氨基酸残基，并利用高效液相色谱结合光度检测，对释放的氨基酸衍生物进行定性与定量分析。岛津 PPSQ 系列等现代自动化氨基酸序列分析仪具有灵敏度高、重复性好、操作自动化程度高等优点，能够实现对纳摩尔级多肽样品的高精度序列测定。然而，该类仪器涉及泵流量示值误差，流量稳定性，反应器、转化器、柱温箱温度示值误差和温度稳定性，基线噪声和基线漂移，分离度，测序正确率等多项关键参数，这些因素均会直接影响氨基酸识别的准确性和序列解析的可靠性。

目前，国内外尚无针对氨基酸序列分析仪的统一校准规范。不同实验室普遍采用厂商自带或内部自编的校准程序进行性能确认，其校准样品、流程、计算方法及判定标准各不相同，导致不同仪器和实验室间测序结果存在可比性差、重复性低等问题，影响了检测结果的溯源性和数据的国际互认性。

因此，建立科学、统一、可追溯的氨基酸序列分析仪校准规范具有重要意义。

首先，它能够为仪器的泵流量示值误差，流量稳定性，反应器、转化器、柱温箱温度示值误差和温度稳定性，基线噪声和基线漂移，分离度，测序正确率等关键指标提供统一的计量评价方法，从而确保分析结果的准确性和一致性。再次，制定统一的校准规范有助于实验室间比对与结果互认，促进检测结果在药品注册检验、临床蛋白质检测及科研领域的广泛应用。

综上所述，制定氨基酸序列分析仪校准规范，不仅是保障仪器分析性能稳定与测序结果准确可靠的必要条件，也是推动生物计量标准体系建设、提升蛋白质分析检测国际竞争力的重要支撑。通过规范化的校准体系，可实现氨基酸序列测定结果的量值溯源，确保其在科研、药品研发及标准物质研制等领域的权威性与可比性。

三、《氨基酸测序分析仪校准规范》制定过程

1、2024年01月至2024年04月，校准规范起草单位组织相关技术人员对氨基酸测序分析仪的校准方法进行了研究，研究了岛津的氨基酸序列分析仪的工作原理及技术参数，对不同条件下测量仪器的计量性能变化有深入的了解，为校准规范的制定不仅积累了相当多的实际经验而且创造了有力的条件。

2、2024年05月至2024年08月，国家市场监管总局办公厅批准全国生物计量技术委员关于《氨基酸序列分析仪校准规范》的立项。上海市计量测试技术研究院有限公司和中国计量科学研究院作为主要起草单位，中国计量科学研究院、广东省计量科学研究院参加起草，项目正式启动。上海市计量测试技术研究院有限公司迅速抽调专业技术人员成立规范制定起草团队，全面落实编制工作。起草团队认真制定了详细的编制计划、实施步骤、经费计划、实验方案等。

3、2024年09月至2025年03月，起草团队认真查阅国内外相关行业标准和文献等资料，对氨基酸序列分析仪的使用情况、主要原理、性能指标等进行了全面调研。起草团队走访了氨基酸测序分析仪生产厂家岛津企业管理（中国）有限公司以及使用单位上海海洋大学、上海微谱、张江药谷、上海探实生物科技有限公司等单位，进行现场调研。根据调研结果，就规范的架构设定、校准项目等广泛听取了相关专家的建议和意见。专家来自生产厂家、应用客户、仪器维修单位等各方面，提出了许多建设性的意见和建议。同时，起草团队申请立项了国家市场

监督管理总局科研项目《蛋白质序列测定有关的质量技术基础研究》(项目编号:2024MK024),为规范的制修订提供了经费支持。

4、2025年04月至2025年06月,起草团队开展多次讨论,对规范的框架结构、适用范围、技术指标要求等进行研究,形成了《氨基酸序列分析仪校准规范》(草案)。

5、2025年06月至2025年10月,起草团队到岛津企业管理(中国)有限公司、上海海洋大学、上海微谱、张江药谷、上海探实生物科技有限公司等多家单位做现场实验,对测量数据进行分析和处理,分析判断实验方案的可行性,排除不符合要求的试验方法,再制定新的试验方法和改进意见,形成《氨基酸序列分析仪校准规范》(征求意见稿)。

四、规范制定的主要技术依据与原则

(一)、技术依据

《氨基酸测序分析仪校准规范》的制定参考了JJG 705《液相色谱仪》和JJG 1064《氨基酸分析仪》等标准,按照JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》的要求编制。

(二)、原则

1、构架

根据JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》的要求,本规范构架上包括封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果的表达、复校时间间隔、附录等几个部分。

2、术语与计量单位的选择

术语和计量单位、计量特性、通用技术要求与校准项目和校准方法,原则上与JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》和JJF 1001《通用计量术语及定义》保持一致。

3、计量特性确定原则

氨基酸序列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

工作原理分为 Edman 降解和 PTH-氨基酸分析两步：Edman 降解是蛋白质的 N 端氨基酸残基首先和异硫氰酸苯酯(PITC)在碱性条件下发生偶合反应，形成苯氨基硫甲酰(PTC)衍生物后用三氟乙酸(TFA)从多肽链上切下 N 端的肽键，使末端氨基酸游离成噻唑啉酮苯胺 (ATZ)-氨基酸，同时暴露出序列中第二个氨基酸的 α -氨基；断裂下来的 ATZ-氨基酸与 TFA 反应转化为稳定的乙内酰苯硫脲（PTH）-氨基酸，通过 HPLC 分离后根据保留时间来判断氨基酸的种类。余下的多肽链被回收再进行下一轮降解循环。（图 1）。

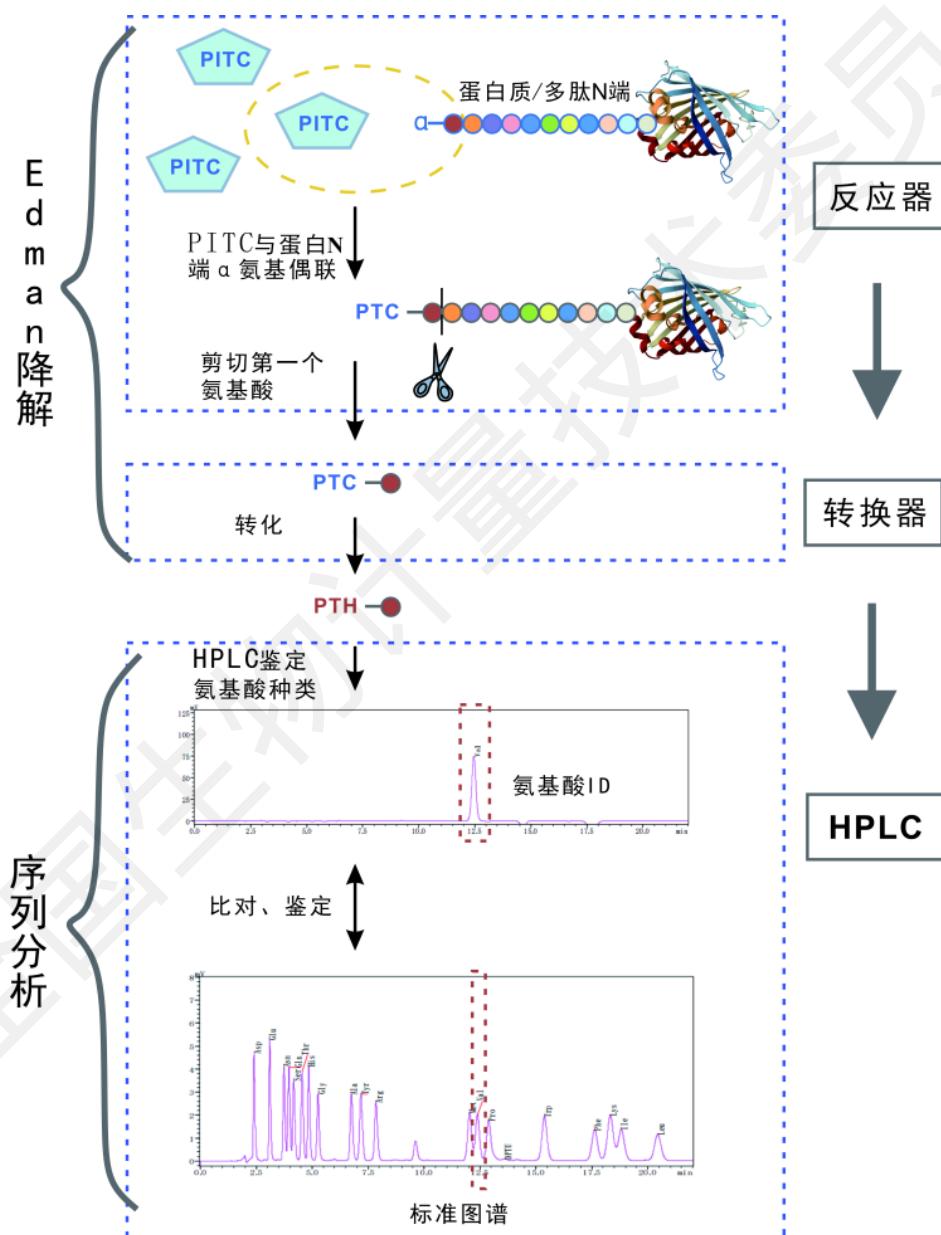


图 1 氨基酸序列分析仪工作原理图

氨基酸序列分析仪的测序过程是在恒定流速与恒定温度条件下进行的，泵流量的微小波动或温控系统的不稳定均可能导致反应试剂配比偏差或反应效率变化，从而影响降解反应的完整性和氨基酸峰形分离效果。柱温箱温度的示值误差与稳定性直接影响 PTH-氨基酸的色谱保留时间与峰面积重现性；而反应器、转化器的温控精度对 Edman 降解与转化反应的化学效率具有决定性作用。基线噪声和基线漂移则是评估检测灵敏度和信号稳定性的关键指标，过高的噪声或漂移会降低低丰度氨基酸的识别能力。分离度反映了相邻氨基酸衍生物峰的分离效果，是判断系统分离性能的重要参数；测序正确率则综合体现了系统的稳定性、反应效率及检测准确性，是衡量仪器整体性能的核心指标。

4、校准用标准器及标准物质选择的原则

基于 Edman 降解反应（Edman degradation）与高效液相色谱（HPLC）分离检测的联用，是一种用于测定蛋白质或多肽 N 端氨基酸序列的经典化学方法。计量特性确定的实验研究过程中使用了一等标准铂电阻温度标准装置及配套专用等温块。测温系统作为氨基酸序列分析仪的温度量值的标准器，溯源至一等标准铂电阻温度计标准装置。分离度校准选择用混合氨基酸标准溶液，基线漂移和基线噪声的校准使用甲醇即可。表 1 列举了该仪器校准用标准器及标准物质。

表 1 计量特性及测量设备或试剂

计量特性	测量设备或试剂
反应器温度示值误差/稳定性	
转化器温度示值误差/稳定性	量程范围包括 (20~80) °C，最大允许误差为±0.3 °C
柱温箱温度示值误差/稳定性	
泵流量示值误差/流量稳定性	秒表：最小分度值不大于 0.1 s; 分析天平：最大称量不小于 100 g, 最小分度值不大于 1 mg; 容量瓶等玻璃器皿。 试剂：甲醇
基线漂移/基线噪声	甲醇
分离度	甘氨酸纯度标准物质：标准值为 98.8%，扩展不确定度小于

	1.5%， $k=2$ ； 苏氨酸纯度标准物质：标准值为 99.2%，扩展不确定度小于 1.5%， $k=2$ ； 组氨酸纯度标准物质：标准值为 99.5%，扩展不确定度小于 2.5%， $k=2$ ； 苯丙氨酸纯度标准物质：标准值为 99.9%，扩展不确定度小于 1.5%， $k=2$ ； 盐酸赖氨酸纯度标准物质：标准值为 99.2%，扩展不确定度小于 1.6%， $k=2$ ； 异亮氨酸纯度标准物质：标准值为 99.7%，扩展不确定度小于 1.5%， $k=2$ ；
测序正确率	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

五、规范制定说明

《氨基酸序列分析仪校准规范》共分为封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、术语、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果的表达、复校时间间隔、附录。其中，封面、扉页和目录三个部分根据 JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》撰写。

(一)、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。

(二)、引用文件

《氨基酸序列分析仪校准规范》主要参考了主要参考了 JJG 705 《液相色谱仪》和 JJG 1064 《氨基酸分析仪》。

(三)、概述

本部分主要对氨基酸序列分析仪的仪器组成和工作原理进行了简要介绍。氨基酸序列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。

氨基酸序列分析仪主要由反应器、转化器和高效液相色谱（HPLC）系统组成。

（五）、计量特性

尽管氨基酸序列分析仪已经得到了广泛应用，但是国内外尚无氨基酸序列分析仪的通用校准方法，各检测实验室采用自校验或厂家校验的方式对分析仪进行校准，校验条件、校验项目、校验方法及校验结果的处理各不相同。我们有必要制定一套校准方法来公正地评价仪器的各项性能指标，保障分析仪的产品质量以及测量结果的量值具有溯源性、准确性和可靠性。

目前市场上氨基酸序列分析仪广泛用于蛋白质和多肽的 N 端序列测定、结构确认及质量验证等，主要应用于在蛋白质结构研究、生物药物质量控制、蛋白标准物质研制、以及蛋白质组学鉴定验证等方面发挥核心作用。

本部分通过对氨基酸序列分析仪主要原理、性能指标等全面调研以及实际中的使用情况确定了《氨基酸序列分析仪校准规范》中的计量特性。包括：泵流量示值误差，流量稳定性，反应器、转化器、柱温箱温度示值误差和温度稳定性，基线噪声和基线漂移，分离度和测序正确率。

1、泵流量示值误差和流量稳定性

氨基酸衍生物的分离依赖于高效液相系统的定量流体输送性能。泵流量示值误差反映了实际流量与设定值之间的偏差，是色谱保留时间与峰形稳定的基础。泵的示值误差会导致流动相实际流量与设定值不符，从而引起梯度浓度偏差和流速差异，影响各氨基酸的洗脱时间及峰面积定量准确度。通过对泵流量示值误差进行校准，可确保流动相输送量的计量准确性，为系统分离性能的重复性及测序结果的定量可比性提供保证。泵在长期运行过程中可能因密封老化、活塞磨损或气泡滞留等因素产生流量波动，造成基线噪声增加、峰形展宽或序列解析失败。校准泵流量稳定性可用于评价系统在恒流输出条件下的动态一致性，保证氨基酸残基洗脱时间的连续性与序列解析的完整性。具体校准过程如图 2 所示，先卸下

色谱柱，将管路内的液体置换为甲醇或纯水，使用少量置换溶液清洗送液单元的吸滤头，将其放入甲醇的容量瓶中，将送液单元的排液阀旋钮沿逆时针方向转动 180° ，打开排液阀。将排液管的前端插入事先清洗、干燥、称重过的容量瓶收集流动相。同时用秒表计时，收集 10 min ，在分析天平上称重，计算泵流速和流量稳定性。

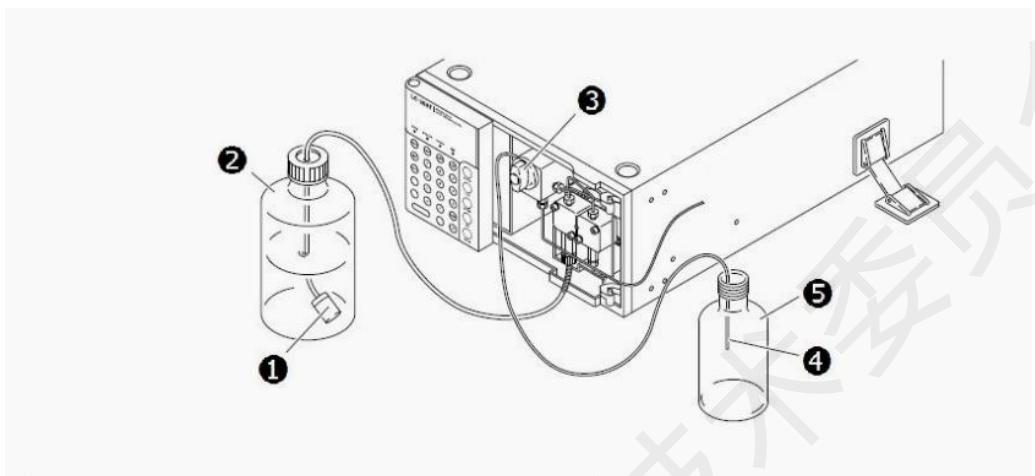


图 2 泵流量检测示意图

2、反应器、转化器、柱温箱温度示值误差和温度稳定性

温控系统在长期运行或负载变化下可能出现周期性波动或漂移，影响衍生反应的稳定性及检测信号的基线噪声。通过校准温度稳定性，可评价各温控单元在设定条件下的热稳定性能，确保系统在分析全程内温度恒定、峰形稳定。反应器、转化器和柱温箱的温度示值若与实际温度存在偏差，将导致衍生反应速率和分离条件不一致，进而引起色谱峰面积、保留时间和响应强度的系统性误差。通过校准温度示值误差，可确保仪器显示温度与实际温度一致，为反应动力学和色谱条件的准确再现提供计量保证。如图 3 所示，将数字温度计探头用导热泥分别固定在转化器、反应器、柱温箱内，其探头尽可能贴壁靠里，温度分别设置为转化器温度为 60°C 、反应器温度为 46°C 、柱温箱温度为 40°C （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，一般 Edman 降解反应与 PTH-氨基酸色谱分析完成一个循环需要 1h ，考察 1h 内的反应器、转化器、柱温箱的温度示值误差和温度稳定性，如图 3 所示。



图 3 转化器、反应器、柱温箱的测温点

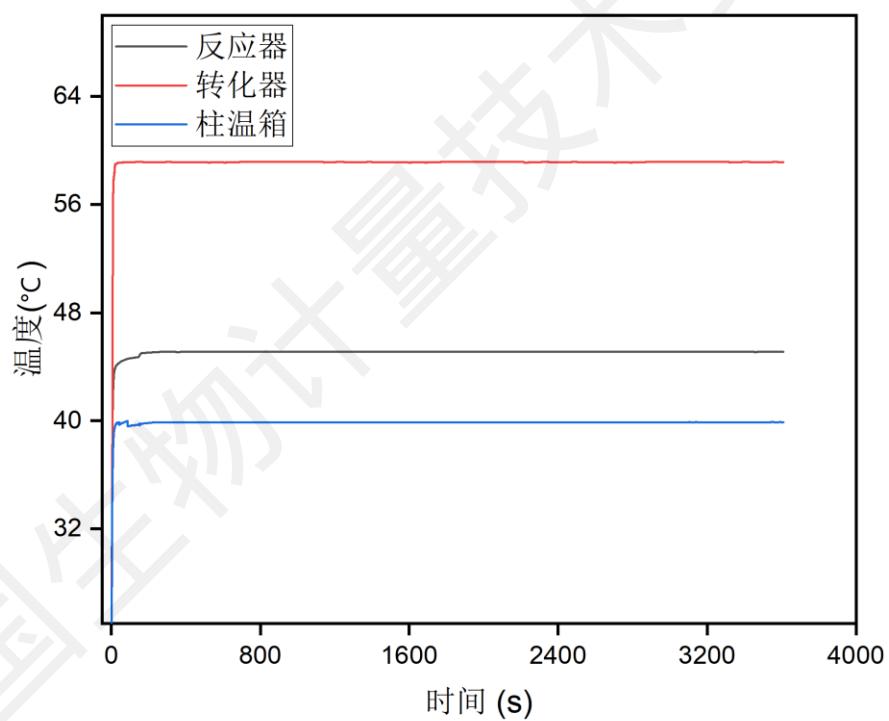


图 3 反应器、转化器、柱温箱 1 小时内温度变化曲线

3、基线噪声和基线漂移

基线噪声表示检测器信号在短时间内的随机波动幅度，主要受光源能量稳定性、电子放大器噪声以及流动相纯度等因素影响。噪声水平直接决定仪器的检测限及最低可定量浓度。通过校准基线噪声，可量化检测系统在设定条件下的信号

稳定性，为分析仪的灵敏度评价和日常性能比对提供依据。基线漂移表示检测信号在较长时间内的系统性变化趋势，常由温度波动、光学路径污染、泵流速不稳定或流动相挥发等原因引起。漂移过大将导致色谱峰定量结果偏差和保留时间不稳定。通过校准基线漂移，可判断仪器光学检测及流体系统的稳态控制能力，确保色谱检测信号长期稳定。基线噪声与漂移的校准应在仪器正常运行状态下、无样品进样条件下进行。以空载运行 1h 的检测信号为依据，计算信号随机波动幅度（噪声）及信号变化趋势（漂移）值如图所示。

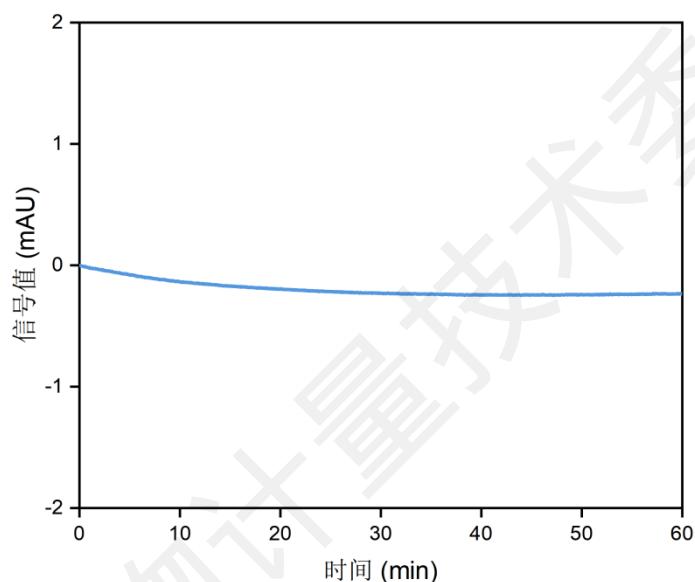


图 4 1 小时内氨基酸分析仪的基线情况

4、分离度

氨基酸序列分析仪的分离度反映了系统对相邻氨基酸衍生物（PTH-氨基酸）进行色谱分离的能力，是保证氨基酸识别准确、序列解析正确的关键计量特性。若分离度不足，相邻氨基酸峰发生重叠，将导致保留时间判定错误或峰面积积分不准，从而直接影响测序正确率和定量结果的可靠性。我们以苏氨酸、组氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、盐酸赖氨酸和异亮氨酸混合氨基酸为测试样品，在规定的色谱条件下测定各峰的保留时间及峰宽，计算相邻氨基酸的分离度。当分离度小于规定限值时，应检查系统流路密封性、流动相比例、色谱柱性能及温控系统稳定性，并进行维护或调整后复核。

5、测序正确率

氨基酸序列分析仪的主要功能是对蛋白质或多肽的 N 端氨基酸序列进行自动测定，其测序正确率反映了仪器在 Edman 降解、转化衍生、分离检测及序列判读全过程中的综合性能，是评价仪器分析准确性和可靠性的重要计量特性之一。测序正确率校准应选用结构明确、序列已知的标准多肽样品，在规定的分析条件下进行全程测序，并将实测序列与理论序列进行比对，计算测序正确率。为保证氨基酸序列分析仪测序正确率及分离性能的评估结果具有代表性和可重复性，本规范选用胰岛素（Insulin）、马肌红蛋白（Myoglobin）、人纤维蛋白肽 B（Fibrinopeptide B）以及合成多肽作为校准用样品。其中，推荐使用马肌红蛋白作为首选校准物质。马肌红蛋白为单链球状蛋白，N 端暴露充分、结构稳定，能够在不经复杂前处理的条件下实现稳定的 Edman 降解循环，所得 PTH-氨基酸信号峰形良好、保留时间重复性高，适用于分离度、测序正确率等项目的性能评价色谱图如图 5 所示。胰岛素分子中由二硫键连接的 A 链与 B 链构成双链结构，为保证 N 端氨基酸的有效降解，需在上样前通过还原剂，处理以断开二硫键进行解链，方可用于测序分析，前处理较为麻烦，且 A 链与 B 链解离不完全，如图 6 所示。人纤维蛋白肽 B 的 N 端被修饰封闭，无法进行 Edman 降解反应，因此不适合作为 N 端测序校准样品。对于合成多肽样品，由于其在溶液中可能存在末端杂质或非特异性吸附，需在测序前进行 GDF（聚凝胺）前处理，以去除多余杂质并提高上样浓度与重复性，从而保证降解循环效率和检测信号的稳定性，如图 7 所示。

表 2 测序正确率校准用蛋白质/多肽信息

样品名称	样品信息	N 端序列
胰岛素	NIM-RM3697	A 链: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
		B 链: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
马肌红蛋白	NIM-RM3624	GLSDGEWQQVQLNVWGKVEAD
人纤维蛋白肽 B	NIM-RM2087	EGVNDNEEGFFSAR
多肽	合成多肽	GLSDGEWQQVQLNVWGKVEAD

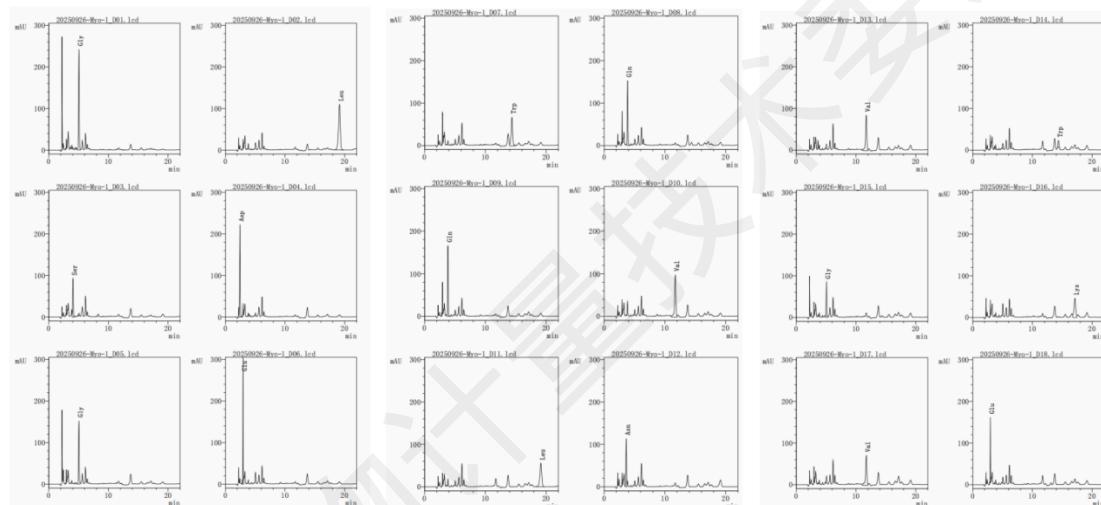


图 5 马肌红蛋白的序列测定谱图

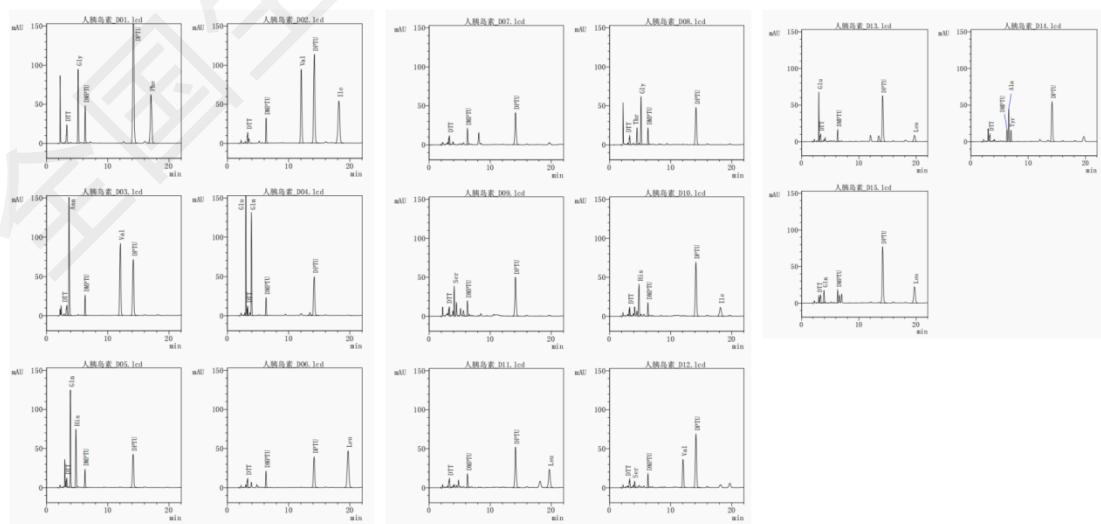


图 6 人胰岛素的序列测定谱图

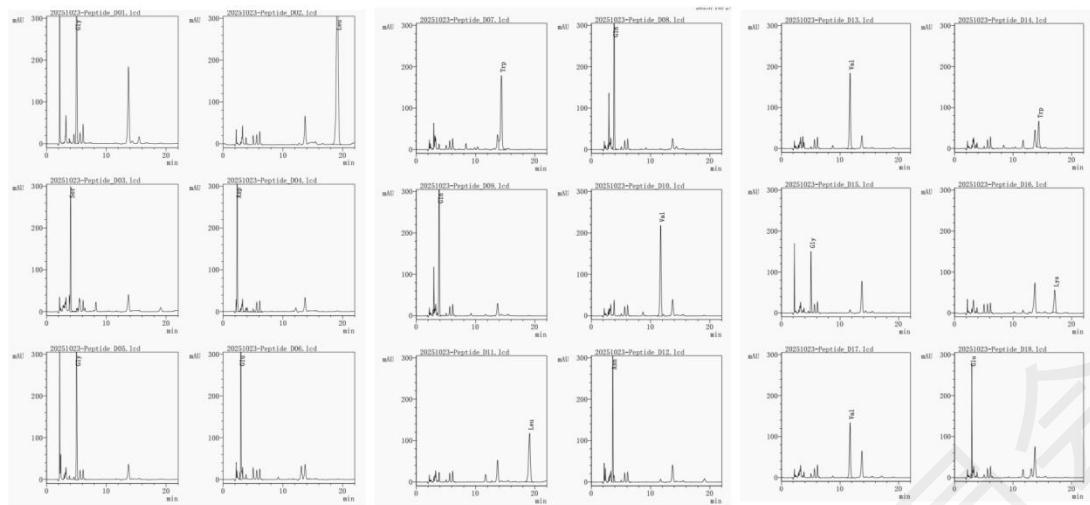


图 7 合成多肽的序列测定谱图

(六)、校准条件

1、环境条件

环境温度：(15~30) °C，相对湿度：不大于 80%；供电电源：电压 (220±22) V，频率 (50±1) Hz；实验室环境应满足仪器安装的要求，不得存在强烈的机械振动和电磁干扰；

2、测量标准及其他设备

秒表：最小分度值不大于 0.1s。非接触式转速表：0.1 级，测量范围不小于 (100~2000) r/min。

分析天平：最大称量不小于 100 g，最小分度值不大于 1 mg。

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

容量瓶等玻璃器皿。

标准物质：

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%， $k=2$ ），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。

其他耗材：聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜、玻璃纤维盘。

(七)、校准项目和校准方法

主要针对氨基酸序列分析仪的特点，选择一定数量的、不同型号的仪器进行试验测试。通过分析在一定数量、具有代表性的不同型号生产的氨基酸序列分析

仪实验数据的基础上,综合氨基酸序列分析仪在实际应用中的主要功能和性能指标,考虑其具体应用的要求,形成了本规范确定的校准项目和校准方法。

1、校准项目

本部分主要规定了氨基酸序列分析仪校准前的准备工作和校准项目包括泵流量示值误差,流量稳定性,反应器、转化器、柱温箱温度示值误差和温度稳定性,基线噪声和基线漂移,分离度和测序正确率的校准方法。

(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1mL/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10min,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。

(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。

（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。

(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 :

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

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。

(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 μ L 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 。

$$P = P_C / P_m \times 100\% \quad (9)$$

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。

(八) 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规范附录 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规范附录 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规范附录 D。

(九) 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。

(十)、附录

本部分主要对不同温度的甲醇密度、分离度测试方法、校准记录参考格式、校准证书内页推荐格式、温度测量结果的不确定度评定示例进行了具体的描述和规定。