



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF 1317—2011

液相色谱-质谱联用仪校准规范

Calibration Specification for Liquid Chromatography-Mass Spectrometers

2011-09-20 发布

2011-12-20 实施

国家质量监督检验检疫总局 发布

液相色谱-质谱联用仪校准规范

Calibration Specification for Liquid
Chromatography-Mass Spectrometers

JJF 1317—2011

本规范经国家质量监督检验检疫总局于 2011 年 9 月 20 日批准，并自 2011 年 12 月 20 日起施行。

归 口 单 位：全国物理化学计量技术委员会

起 草 单 位：中国计量科学研究院

本规范委托全国物理化学计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

戴新华（中国计量科学研究院）

张 伟（中国计量科学研究院）

黄 挺（中国计量科学研究院）

目 录

1 范围	(1)
2 引用文件	(1)
3 术语和计量单位	(1)
4 概述	(1)
5 计量特性	(2)
6 校准条件	(2)
6.1 环境条件	(2)
6.2 标准物质和校准设备	(2)
7 校准项目和校准方法	(3)
7.1 外观检查	(3)
7.2 分辨力	(3)
7.3 信噪比	(3)
7.4 质量准确性	(3)
7.5 峰面积重复性与保留时间重复性	(4)
7.6 离子丰度比重复性	(4)
8 校准结果	(5)
9 复校时间间隔	(5)
附录 A 校准记录内容 (供参考)	(6)
附录 B 液相色谱和质谱参数 (建议条件)	(7)
附录 C 校准用标准溶液浓度、配制方法及其对应校准项目 (建议方法)	(8)
附录 D 不确定度评定	(9)

液相色谱-质谱联用仪校准规范

1 范围

本规范适用于离子阱、单四极杆和三重四极杆型液相色谱-质谱联用仪（以下简称 LC-MS）的校准。

2 引用文件

GB/T 6041—2002 质谱分析方法通则

JJG 705—2002 液相色谱仪

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

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 术语和计量单位

3.1 分辨力 resolution

分辨两个相邻质谱峰的能力，以某离子峰峰高 50% 处的峰宽度（简称半峰宽）表示，记为 $W_{1/2}$ ，单位为原子质量单位（u）。

3.2 流动注射 flow injection

不通过色谱柱，使用注射泵直接将样品溶液输入离子源的一种进样方式。

3.3 选择离子监测 selected ion monitor

对特定质量的单个或多个离子进行检测的方式，简称 SIM。

3.4 选择反应监测 selected reaction monitor

对母离子在特定碰撞能量下产生的子离子进行检测的方式，简称 SRM。

3.5 离子丰度比重复性 repeatability of abundance ratio of ion

同一浓度的待测物在相同测量条件下连续重复测量的离子丰度比之间的重复性。

3.6 电喷雾电离 electrospray ionization

在高电场中对样品溶液进行雾化以辅助实现电离的方式，简称 ESI，分为 ESI 正离子模式（ESI+）和 ESI 负离子模式（ESI-）。

3.7 大气压化学电离 atmosphere pressure chemical ionization

大气压电离的一种类型，在大气压下样品通过喷嘴被氮气流雾化，以电晕或放射源进行电离的离子化方式，简称 APCI，分为 APCI 正离子模式（APCI+）和 APCI 负离子模式（APCI-）。

4 概述

LC-MS 是将液相色谱仪与质谱仪联用的仪器，用于样品定性定量分析。其工作原理为：样品通过液相色谱分离后的各个组分依次进入质谱检测器，各组分在离子源被电

离,产生带有一定电荷、质量数不同的离子。不同离子在电磁场中的运动行为不同,采用质量分析器按不同质荷比(以下简称 m/z)把离子分开,得到依质荷比顺序排列的质谱图。通过对质谱图的分析处理,可以得到样品的定性和定量结果。

LC-MS 主要包括液相色谱系统、离子源、质量分析器、检测器、真空系统和数据处理系统等部分。

5 计量特性

LC-MS 各项计量性能指标见表 1。

表 1 LC-MS 主要计量性能指标

计量性能	仪器类型	电离模式	计量性能指标
分辨力	三重四极杆、单四极杆、离子阱	ESI+	$\leq 1 \text{ u}$
信噪比	三重四极杆	ESI+	$\geq 30:1$
		ESI-	$\geq 10:1$
		APCI+	$\geq 30:1$
	单四极杆、离子阱	ESI+	$\geq 10:1$
		ESI-	$\geq 10:1$
		APCI+	$\geq 10:1$
质量准确性	三重四极杆、单四极杆、离子阱	ESI+	$\leq 0.5 \text{ u}$
峰面积重复性	三重四极杆、单四极杆	ESI+	$\leq 10\%$
离子丰度比重复性	离子阱	ESI+	$\leq 30\%$
保留时间重复性	三重四极杆、单四极杆、离子阱	ESI+	$\leq 1.5\%$
注: 以上指标不是用于合格性判别, 仅供参考。			

6 校准条件

6.1 环境条件

6.1.1 仪器室内不得有明显的机械振动, 无电磁干扰, 不得存放与实验无关的易燃、易爆和强腐蚀性气体或试剂。

6.1.2 温度: $15^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$ 。

6.1.3 相对湿度: 不大于 80% 。

6.1.4 电源电压: $(220 \pm 22) \text{ V}$; 频率: $(50 \pm 0.5) \text{ Hz}$ 。

6.2 标准物质和校准设备

标准物质均应使用国家有证标准物质, 校准设备需经计量检定合格。

6.2.1 利血平溶液标准物质, 相对扩展不确定度优于 5% ($k=2$)。

6.2.2 移液器或移液管: 量程范围 $100 \mu\text{L}$ 或 $200 \mu\text{L}$, B 级及以上。

6.2.3 容量瓶：10 mL 或 25 mL，B 级及以上。

7 校准项目和校准方法

7.1 外观检查

仪器铭牌上标示仪器的名称、型号、制造厂名、产品序列号、出厂日期等内容。

7.2 分辨力

待仪器运行稳定后，根据仪器说明书的推荐条件设置参数，将扫描范围设为 $m/z=606\sim 612$ ，直接注入（是指流动注射方式，或者使用液相色谱系统的进样器将样品不经色谱柱直接注入离子源的方式）或者经色谱柱（液相色谱条件按照附录 B）注入 5 ng 利血平。观察质谱图，记录 m/z 609 质谱峰，并计算其 50% 峰高处的峰宽，得到 $W_{1/2}$ ，作为分辨力的结果。

7.3 信噪比

根据附录 B 设定液相色谱条件并优化质谱条件，将检测离子的 m/z 设为表 2 中特征离子的 m/z ，经色谱柱注入相应量的利血平。观察色谱图，记录其色谱峰峰高作为 H_s 。同时记录信号峰后 1 min~3 min 时间内的基线输出信号的最大值与最小值之差，作为 H_n 。根据公式（1）计算信噪比 S/N ，连续测量 6 次，以 6 次测量 S/N 的平均值作为信噪比的结果。

$$S/N = H_s/H_n \quad (1)$$

式中： H_s ——提取离子（ m/z ）的色谱峰峰高；

H_n ——基线噪声值。

表 2 信噪比测量条件

仪器类型	电离模式	进样量/pg	特征离子的 m/z
三重四极杆	ESI+	50	609（母离子）→195（子离子）
单四极杆、离子阱	ESI+	500	609
三重四极杆	ESI—	500	607
三重四极杆	APCI+	50	609
单四极杆、离子阱	ESI—	500	607
单四极杆、离子阱	APCI+	500	609

7.4 质量准确性

根据表 3 和 LC-MS 质量数应用范围，选用相应的标准物质或试剂，将扫描范围设为表 3 中相应特征离子理论值 ± 5 的范围（例如对于咖啡因，设为 $m/z=190\sim 200$ ），直接注入相应量的标准物质或试剂。观察质谱图，记录特征离子的实测质量数（有效数字取小数点后两位）。根据公式（2）计算 ΔM ，以 ΔM 的最大值作为质量准确性的结果。

$$\Delta M = |M_{i\text{测}} - M_{i\text{理}}| \quad (2)$$

式中： $M_{i\text{测}}$ ——第 i 个离子的测量值， u ；

$M_{i\text{理}}$ ——第 i 个离子的理论值， u 。

表 3 质量准确性的测量条件和特征离子理论值

LC-MS 质量数应用范围	标准物质或试剂	进样量/ng	特征离子理论值 m/z
质量数不大于 1000	咖啡因	5	195.09
	黄体酮	10	315.23
	利血平	10	609.28
质量数大于 1000	PPG425、PPG1000、 PPG2000 混合溶液	50	59.05
			175.13
			616.46
			906.67
			1254.93
			1545.13 *
			2010.47 *
			2242.64 *
* 可选的检测离子。			

7.5 峰面积重复性与保留时间重复性

将检测离子的 m/z 设为表 4 中特征离子的 m/z ，经色谱柱注入相应量的利血平。观察色谱图，记录其色谱峰的峰面积和保留时间。连续测量 6 次。根据公式 (3) 分别计算峰面积与保留时间的相对标准偏差 (RSD)，作为峰面积重复性与保留时间重复性的结果。

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (x_i - \bar{x})^2}{6-1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3)$$

式中： x_i ——第 i 次测量保留时间 (min) 或峰面积；

$\bar{x}$ ——6 次测量保留时间 (min) 或峰面积的算术平均值；

i ——测量序号。

表 4 峰面积重复性与保留时间重复性的测量条件

仪器类型	进样量/pg	特征离子的 m/z
三重四极杆	50	609 (母离子) → 195 (子离子)
单四极、离子阱	500	*609

7.6 离子丰度比重复性

将检测离子的 m/z 设为母离子 m/z 609 的两个子离子 m/z 397 和 m/z 448，经色谱柱注入利血平 500 pg。观察质谱图，分别记录 m/z 397 和 m/z 448 的丰度。连续测量

6 次, 根据公式 (4) 计算两个子离子丰度比值的相对标准偏差 (RSD), 作为离子丰度比重复性的结果:

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (x_i - \bar{x})^2}{6-1}} \times \frac{1}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4)$$

式中: x_i ——第 i 次测量的 m/z 397 丰度与 m/z 448 丰度之比;
 $\bar{x}$ ——6 次测量的 m/z 397 丰度与 m/z 448 丰度之比的平均值;
 i ——测量序号。

8 校准结果

校准结果应在校准证书或校准报告上反映。校准证书或报告至少包括以下信息:

- a) 标题, 如“校准证书”或“校准报告”;
- b) 实验室名称和地址;
- c) 进行校准的地点 (如果不在实验室内进行校准);
- d) 证书或报告的唯一性标识 (如编号), 每页及总页数的标识;
- e) 送校单位的名称和地址;
- f) 被校对象的描述和明确标识;
- g) 进行校准的日期, 如果与校准结果的有效性和应用有关时, 应说明被校对象的接受日期;
- h) 如果与校准结果的有效性和应用有关时, 应对抽样程序进行说明;
- i) 对校准所依据的技术规范的标识, 包括名称及代号;
- j) 本次校准所用测量标准的溯源性及有效性说明;
- k) 校准环境的描述;
- l) 校准结果及测量不确定度的说明;
- m) 校准证书或校准报告签发人的签名、职务或等效标识以及签发日期;
- n) 校准结果仅对被校对象有效的声明;
- o) 未经实验室书面批准, 不得部分复制证书或报告的声明。

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、仪器本身质量等因素所决定, 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。更换重要部件、维修、重新安装或对仪器性能有怀疑时, 应随时校准。

附录 A

校准记录内容
(供参考)

委托单位					
单位地址			联系人		
联系电话			校准日期		
仪器型号			制造厂		
出厂编号			设备编号		
环境温度			环境湿度		

1 外观检查

2 分辨力

标准物质	浓度	进样量	质谱仪类型
电离方式	调节方式	结果	

3 信噪比

标准物质	浓度	进样量	进样方式
扫描范围	电离方式	提取离子 m/z :	
S/N: 1	2	3	4
5	6	平均	

4 质量准确性

标准物质	浓度	进样量	进样方式
	m/z	m/z	m/z
理论值			
实测值			

5 重复性

1) 标准物质	浓度	进样量	进样方式
保留时间 1	2	3	4
5	6	RSD	
峰面积 1	2	3	4
5	6	RSD	
2) 标准物质	浓度	进样量	进样方式
丰度比 1	2	3	4
5	6	RSD	

校准员

核验员

附录 B

液相色谱和质谱参数
(建议条件)

B.1 液相色谱条件

色谱柱：2.1 mm 内径的 C18 色谱柱。

液相色谱流动相流速：0.2 mL/min ~ 0.4 mL/min (不分流)。

ESI+与 APCI+模式下的流动相：甲醇：水 (80：20，体积分数)，加入 0.1% (体积分数) 甲酸或乙酸。

ESI-模式下的流动相：甲醇：水 (80：20，体积分数)，加入 0.1% (体积分数) 甲酸或乙酸，再加入 0.2% (体积分数) 氨水。

使用 GB/T 6682 规定的一级水，电导率 (25 °C) ≤ 0.01 mS/m，吸光度 (254 nm，1 cm 光程) ≤ 0.001 ，可溶性硅 (以 SiO_2 计) 含量 ≤ 0.01 mg/L。

B.2 质谱参数

对于信噪比的校准，首先应使用仪器的质谱优化功能进行优化。可以采用浓度为 1.00 ng/ μL 的利血平溶液标准物质，以直接注入或经液相色谱进样的方式分别对质谱仪的如下参数进行优化，即毛细管电压值、锥孔电压值、碰撞能量、雾化气温度和气流大小，使利血平在 m/z 609 的离子峰高最高。将质谱采集数据的阈值设为 0。其他项目的校准，参照该条件。

在离子丰度比重复性校准中，优化二级质谱条件时，选择适当的碰撞能量，使两个子离子的丰度比值在 40%~150%之内，再进行校准。

附录 C

校准用标准溶液浓度、配制方法及其对应校准项目
(建议方法)

标准物质或试剂	溶剂	浓度	校准项目
利血平溶液标准物质	异丙醇水溶液, 异丙醇: 水=1:1 (体积分数)	1.00 ng/ μ L	峰面积重复性、离子丰度比重复性和质量准确性
利血平标准溶液	液相色谱流动相	100 pg/ μ L	分辨力、信噪比和峰面积重复性
利血平标准溶液	液相色谱流动相	10 pg/ μ L	信噪比和峰面积重复性
PPG 425、PPG 1000 和 PPG 2000 混合标准溶液	含有 0.1% 甲酸和 2 mmol/L 乙酸铵的甲醇水溶液, 甲醇: 水=1:1 (体积分数)	10 ng/ μ L~ 100 ng/ μ L	质量准确性
咖啡因 (纯度大于 95%)	甲醇	10 ng/ μ L	质量准确性
黄体酮 (纯度大于 95%)	甲醇	10 ng/ μ L	质量准确性
注: 使用 GB/T 6682 规定的一级水。			

附录 D

不 确 定 度 评 定

在 LC-MS 校准中, 对信噪比的不确定度进行如下评价。

D.1 数学模型

本校准规范计算信噪比结果的公式如下, 为方便表述, 使用 z 表示信噪比 (S/N):

$$z = \frac{H_s}{H_n} = \frac{KcV_1V}{H_nV_2} \quad (\text{D.1})$$

式中: z ——信噪比;

H_s ——提取离子 (m/z) 的色谱峰峰高;

H_n ——基线噪声值;

K ——单位质量响应值, 为常数, pg^{-1} ;

c ——所用溶液标准物质的质量浓度, $\text{pg}/\mu\text{L}$;

V_1 ——稀释溶液标准物质时, 移液器或移液管的取液体积, mL ;

V_2 ——稀释溶液标准物质时, 所用容量瓶的体积, mL ;

V ——进样体积, μL 。

从公式 (D.1) 分析, 信噪比的相对合成不确定度 $u_r(z)$ 由下式计算:

$$u_r(z) = \sqrt{u_{rA}^2 + u_r^2(c) + u_r^2(V_1) + u_r^2(V_2) + u_r^2(V) + u_r^2(H_n)} \quad (\text{D.2})$$

D.2 不确定度来源与量化分析

信噪比不确定度来源主要包括 6 个方面, 其中测量重复性为 A 类不确定度, 其他为 B 类不确定度。

D.2.1 测量重复性 u_{rA}

测量重复性可以通过计算 6 次测量平均值的相对标准偏差得到:

$$u_{rA} = \frac{s}{\bar{z}} \times \frac{1}{\sqrt{6}} = \frac{1}{\sqrt{6}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^6 (z_i - \bar{z})^2}{6-1}} \times \frac{1}{\bar{z}} \quad (\text{D.3})$$

式中: $\bar{z}$ ——信噪比测量结果, 为 6 次测量的平均值;

z_i ——第 i 次测量的信噪比结果;

i ——测量次数;

s ——实验标准偏差。

D.2.2 溶液标准物质浓度的相对不确定度 $u_r(c)$

通过标准物质证书查得标准物质的浓度 (c)、扩展不确定度 (U_{CRM}) 和包含因子 (k_{CRM}), 根据下式计算标准物质的相对不确定度:

$$u_r(c) = \frac{U_{\text{CRM}}}{k_{\text{CRM}}c} \quad (\text{D.4})$$

D.2.3 移液器或移液管取液体积的相对不确定度 $u_r(V_1)$

对于移液器, 通过其检定证书, 查得检定点为所用的取液体积 (V_1) 对应的容量

允许误差 $[E_{\text{rel}}(V_1)]$, 其为相对值], 以下式计算该项不确定度:

$$u_r(V_1) = \frac{E_{\text{rel}}(V_1)}{\sqrt{3}} \quad (\text{D.5})$$

对于移液管, 通过其检定证书, 查得标称容量为所用的取液体积 (V_1) 对应的允差 $E(V_1)$, 按下式计算该项不确定度:

$$u_r(V_1) = \frac{E(V_1)}{\sqrt{3} V_1} \quad (\text{D.6})$$

D.2.4 容量瓶体积的相对不确定度 $u_r(V_2)$

通过容量瓶的检定证书, 查得标称容量 (V_2) 对应的允差 $E(V_2)$, 以下式计算该项不确定度:

$$u_r(V_2) = \frac{E(V_2)}{\sqrt{3} V_2} \quad (\text{D.7})$$

D.2.5 进样体积的相对不确定度 $u_r(V)$

一般 LCMS 采用自动进样方式, 可通过微量注射器的容量允许误差 $E_{\text{rel}}(V)$, 以下式计算该项不确定度:

$$u_r(V) = \frac{E_{\text{rel}}(V)}{\sqrt{3}} \quad (\text{D.8})$$

D.2.6 噪声强度测量不确定度 $u_r(H_n)$

噪声强度的 A 类不确定度已经在“测量重复性”中计算, 该项为噪声强度的 B 类不确定度。在实际计算中, 将谱图放大后从软件上读取噪声强度, 该项不确定度极小, 可忽略。

D.3 扩展不确定度

通过以上分析, 将上述各分量代入公式 (D.2), 计算得到信噪比的相对合成不确定度, 取包含因子 $k=2$ (95% 的置信度), 根据下式计算信噪比结果的扩展不确定度 U :

$$U = k u_r(\bar{z}) \bar{z} \quad (\text{D.9})$$

D.4 计算实例

以下是一次实际校准不确定度计算实例。

此次校准是对三重四极杆 LC-MS 的校准, 进样量要求为 50 pg 的利血平。使用的标准物质为 1.00 ng/ μL 利血平溶液, 扩展不确定度为 0.05 ng/ μL , 相对扩展不确定度为 5%。使用 100 μL 的移液器取上述标准溶液 100 μL 至 10 mL 的容量瓶中, 使用流动相溶剂定容至 10 mL, 得到 10 pg/ μL 的利血平标准溶液。连续 6 次进样, 每次进样体积为 5 μL , 谱图略, 根据公式 (D.1), 6 次信噪比计算结果分别为: $z_1=104$, $z_2=100$, $z_3=101$, $z_4=102$, $z_5=100$, $z_6=105$ 。平均值 $\bar{z}=102$, 实验标准偏差 $s=1.9$ 。

D.4.1 测量重复性 u_{rA}

根据公式 (D.3) 得:

$$u_{rA} = \frac{s}{\sqrt{6}} \times \frac{1}{\bar{z}} = \frac{1.9}{\sqrt{6}} \times \frac{1}{102} = 0.76\% \quad (\text{D.10})$$

D.4.2 溶液标准物质浓度的相对不确定度 $u_r(c)$

通过标准物质证书查得标准物质的浓度 ($c = 1.00 \text{ ng}/\mu\text{L}$)、扩展不确定度 ($U_{\text{CRM}} = 0.05 \text{ ng}/\mu\text{L}$)和包含因子 ($k_{\text{CRM}} = 2$), 根据公式 (D.4) 得:

$$u_r(c) = \frac{U_{\text{CRM}}}{k_{\text{CRM}}c} = \frac{0.05}{2 \times 1.00} = 2.5\% \quad (\text{D.11})$$

D.4.3 移液器取液体积的相对不确定度 $u_r(V_1)$

通过所用移液器的检定证书, 查得检定点为所用的取液体积 ($V_1 = 100 \mu\text{L}$) 对应的容量允许误差 [$E_{\text{rel}}(V_1) = 2.0\%$, 其为相对值], 根据公式 (D.5) 得:

$$u_r(V_1) = \frac{E_{\text{rel}}(V_1)}{\sqrt{3}} = \frac{2.0\%}{\sqrt{3}} = 1.2\% \quad (\text{D.12})$$

D.4.4 容量瓶体积的相对不确定度 $u_r(V_2)$

通过容量瓶的检定证书, 查得标称容量 ($V_2 = 10 \text{ mL}$) 对应的允差 [$E(V_2) = 0.020 \text{ mL}$], 根据公式 (D.7) 得:

$$u_r(V_2) = \frac{E(V_2)}{\sqrt{3}V_2} = \frac{0.020}{\sqrt{3} \times 10} = 0.12\% \quad (\text{D.13})$$

D.4.5 进样体积的相对不确定度 $u_r(V)$

采用的进样量为 $V = 5 \mu\text{L}$ 。参照《移液器检定规程》(JJG 646—2006) 中对于标称容量为 $5 \mu\text{L}$ 的移液器的容量允许误差 $E_{\text{rel}}(V) = 8.0\%$, 根据公式 (D.8) 得:

$$u_r(V) = \frac{E_{\text{rel}}(V)}{\sqrt{3}} = \frac{8.0\%}{\sqrt{3}} = 4.6\% \quad (\text{D.14})$$

D.4.6 噪声强度测量不确定度 $u_r(H_n)$

参见 D.2.6, 该项可忽略。

D.4.7 扩展不确定度

根据公式 (D.2) 计算相对合成不确定度 $u_r(\bar{z})$:

$$u_r(\bar{z}) = \sqrt{u_{rA}^2 + u_r^2(c) + u_r^2(V_1) + u_r^2(V_2) + u_r^2(V) + u_r^2(H_n)}$$

$$u_r(\bar{z}) = \sqrt{0.76^2 + 2.5\%^2 + 1.2\%^2 + 0.12\%^2 + 4.6\%^2 + 0^2} = 5.4\% \quad (\text{D.15})$$

根据公式 (D.9) 计算信噪比结果的扩展不确定度 U :

$$U = ku_r(\bar{z})\bar{z} = 2 \times 5.4\% \times 102 = 11 \quad (\text{D.16})$$

因此, 信噪比结果为 102, 扩展不确定度为 11 ($k=2$)。