

中华人民共和国国家计量技术规范

JJF 1849—2020

微孔板化学发光分析仪校准规范

Calibration Specification for Microplate Chemiluminescence Analyzers

2020-07-02 发布

2021-01-02 实施

国家市场监督管理总局 发布

微孔板化学发光分析仪

校准规范

Calibration Specification

for Microplate Chemiluminescence Analyzers

JJF 1849—2020

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：上海市计量测试技术研究院

参加起草单位：中国计量科学研究院

河南省计量科学研究院

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：

刘 刚（上海市计量测试技术研究院）

李兰英（上海市计量测试技术研究院）

参加起草人：

武利庆（中国计量科学研究院）

徐 勤（上海市计量测试技术研究院）

丁峰元（河南省计量科学研究院）

王 晶（中国计量科学研究院）



目 录

引言	(II)
1 范围	(1)
2 引用文件	(1)
3 术语	(1)
3.1 化学发光	(1)
3.2 孔间干扰	(1)
3.3 通道差异	(1)
4 概述	(1)
5 计量特性	(1)
5.1 重复性	(1)
5.2 孔间干扰	(1)
5.3 通道差异	(1)
5.4 线性误差	(1)
6 校准条件	(1)
6.1 环境条件	(1)
6.2 校准用标准器	(2)
7 校准项目和校准方法	(2)
7.1 重复性	(2)
7.2 孔间干扰	(2)
7.3 通道差异	(3)
7.4 线性误差	(3)
8 校准结果表达	(4)
9 复校时间间隔	(4)
附录 A 微孔板化学发光分析仪的组成及 96 孔板示意图	(5)
附录 B 线性拟合中斜率与截距的计算	(6)
附录 C 线性误差不确定度评定示例	(7)
附录 D 校准原始记录参考格式	(10)
附录 E 校准证书内页推荐格式	(12)

引 言

本规范按照 JJF 1071—2010《国家计量校准规范编写规则》的要求编制，参考了 JJG 861—2007《酶标分析仪》、YY/T 1174—2010《半自动化学发光免疫分析仪》、JJF 1001—2011《通用计量术语及定义》和 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》等。

本规范为首次发布。



微孔板化学发光分析仪校准规范

1 范围

本规范适用于配置 96 孔板的微孔板化学发光分析仪的校准。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

YY/T 1174—2010 半自动化学发光免疫分析仪

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（包括所有的修改单）适用于本规范。

3 术语

3.1 化学发光 chemiluminescence

在没有光、电、磁、声、热源外来激发的情况下，由化学反应产生的一种光辐射的现象，包含两个基本过程：反应体系中的分子吸收化学反应释放的化学能由基态跃迁至高能激发态；随后，处于高能态的受激分子，以一定的量子产率发射光子。

3.2 孔间干扰 interference among holes

检测器在测量 96 孔板中每个孔杯的发光强度时受到周围邻近孔的发光强度的影响程度。

3.3 通道差异 differences among channels

检测器对每个通道的检测能力的差异。

4 概述

微孔板化学发光分析仪（以下简称分析仪）是一种基于化学发光现象，采用光电检测技术，对微孔板中一系列待测物质与发光试剂发生反应产生的发光强度进行检测分析的仪器。分析仪由微孔板、检测器和数据处理装置三部分组成，分析仪组成图及本规范涉及的微孔板（96 孔板）的结构见图 A.1 和图 A.2。本规范的测量参数为发光强度。

5 计量特性

5.1 重复性

5.2 孔间干扰

5.3 通道差异

5.4 线性误差

6 校准条件

6.1 环境条件

6.1.1 温度：(15~35)℃。

6.1.2 相对湿度：不大于 85%。

6.1.3 电源电压：单相正弦交流 (220±22) V，(50±1) Hz。

6.1.4 校准前，仪器应预热 30 min。

6.2 校准用标准器

光源计量标准器：主要包括光源和光谱中性滤光片两个部分，其中光源由氙光源和 450 nm 干涉滤光片（峰值波长扩展不确定度 ≤ 1 nm；光谱带宽 ≤ 15 nm）组成，光源可以放置于 96 孔板架任意孔位；光谱中性滤光片共 4 片，在 450 nm 处吸光度标称值分别为 0.2、0.5、1.0、1.5（扩展不确定度 ≤ 0.01 ， $k=2$ ），光谱中性滤光片放置于光源之上，形成一套光源计量标准器。

光源应在有效期内使用。

7 校准项目和校准方法

7.1 重复性

将光源放置在 96 孔板架 D7 孔（见图 A.2）上，直接使用分析仪测定此时的发光强度 I_{0i} ，重复测定 6 次，记录仪器示值，并计算平均值，按公式（1）计算相对实验标准偏差，作为分析仪的重复性结果。

$$s_r = \frac{1}{I_0} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (I_{0i} - \bar{I}_0)^2}{n-1}} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

I_{0i} ——发光强度第 i 次测量值；

\bar{I}_0 ——发光强度平均值；

n ——重复测量次数， $n=6$ ；

s_r ——仪器重复性。

7.2 孔间干扰

将光源放置在 96 孔板 D7 孔（图 A.2）上，直接使用分析仪测量中心发光孔发光强度 I_0 和周围孔发光强度 I_{ki} ，孔位分布如图 2 所示，分别记录仪器示值，计算周围孔发光强度的平均值，按公式（2）计算周围孔发光强度与中心发光孔发光强度之比的百分数，表示分析仪的孔间干扰。

C6(I_{k1})	C7(I_{k2})	C8(I_{k3})
D6(I_{k4})	D7(I_0)	D8(I_{k5})
E6(I_{k6})	E7(I_{k7})	E8(I_{k8})

图 2 孔间干扰校准中孔位分布图

$$c = \frac{\sum_{i=1}^8 I_{ki}}{8I_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中：

c ——孔间干扰；

I_{ki} ——周围第 i 孔的发光强度测量值；

I_0 ——中心孔的发光强度测量值。

7.3 通道差异

将光源分别放置在 96 孔板 B2、B7、B11、D2、D7、D11、G2、G7、G11 孔（见图 A.2）上，直接使用分析仪分别测定每个位置的发光强度，分别记录分析仪示值，按公式（3）计算相对实验标准偏差，以实验结果的相对实验标准偏差表示分析仪的通道差异。

$$s_c = \frac{1}{I_{CV}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^9 (I_{CVi} - \overline{I_{CV}})^2}{9-1}} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

I_{CVi} ——第 i 孔位测量的发光强度测量值；

$\overline{I_{CV}}$ ——9 个孔位发光强度测量值的平均值；

s_c ——分析仪通道差异检测中，发光强度平均值的相对标准偏差。

7.4 线性误差

首先，将光源放置在 96 孔板架 D7 孔（见图 A.2）上，直接使用分析仪测定此时的完全发光强度 I_0 ，然后分别采用不同吸光度的光谱中性滤光片标准物质覆盖光源，再使用分析仪测定此时的发光强度 I_i ，吸光度 A 根据公式 $A = -\lg\left(\frac{I_i}{I_0}\right)$ 计算。各吸光度值重复测定 3 次，计算 3 次测得值的平均值，用最小二乘法拟合光谱中性滤光片标准物质吸光度标准值和测得值的平均值，得到仪器的线性方程，见公式（4）。

$$A = a + bA_s \quad (4)$$

式中：

A ——光谱中性滤光片标准物质吸光度的仪器测量值；

a ——截距，计算公式见附录 B；

b ——斜率，计算公式见附录 B；

A_s ——光谱中性滤光片标准物质吸光度标准值。

按照公式（5）计算各光谱中性滤光片标准物质仪器测得值的线性方程拟合值。按照公式（6）计算线性误差，线性误差最大绝对值作为校准结果的线性误差。

$$A_i = \frac{\overline{A_i} - a}{b} \quad (5)$$

$$\Delta A_i = (A_i - A_{si}) / A_{si} \times 100\% \quad (6)$$

式中：

ΔA_i ——光谱中性滤光片第 i 点的线性误差；

A_i ——光谱中性滤光片第 i 点线性方程拟合值；

$\overline{A_i}$ ——光谱中性滤光片第 i 点的 3 次测量吸光度值的平均值；

A_{si} ——光谱中性滤光片第 i 点吸光度标准值；

8 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 D。分析仪测量结果的测量不确定度应按 JJF 1059.1 的要求评定，不确定度评定示例见附录 C。经校准的分析仪应出具校准证书，校准证书应符合 JJF 1071—2010 中 5.12 的要求。

9 复校时间间隔

建议复校时间间隔不超过 1 年。然而，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。

附录 A

微孔板化学发光分析仪的组成及 96 孔板示意图

微孔板化学发光分析仪的组成见图 A.1。96 孔板示意图见图 A.2。

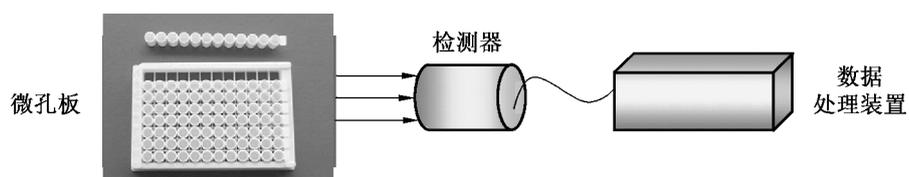


图 A.1 微孔板化学发光分析仪的组成示意图

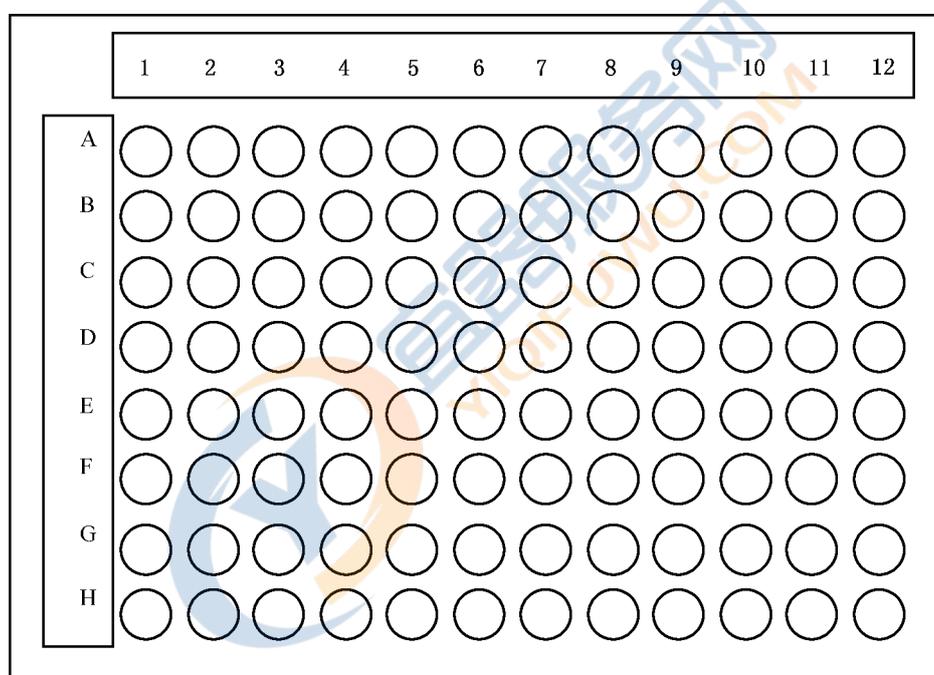


图 A.2 微孔板（96 孔板）示意图

附录 B

线性拟合中斜率与截距的计算

直线方程为：

$$\overline{A}_i = a + bA_{si}$$

斜率：

$$b = \frac{S_{A_{si}\overline{A}_i}}{S_{A_{si}A_{si}}}$$

截距：

$$a = \overline{\overline{A}_i} - b \overline{A_{si}}$$

其中：

$$S_{A_{si}\overline{A}_i} = \sum A_{si} \overline{A}_i - \frac{\sum A_{si} \sum \overline{A}_i}{3}$$

$$S_{A_{si}A_{si}} = \sum A_{si}^2 - \frac{(\sum A_{si})^2}{3}$$

式中

- \overline{A}_i ——光谱中性滤光片第 i 点的 3 次测量吸光度值的平均值；
- A_{si} ——光谱中性滤光片第 i 点吸光度标准值；
- i ——拟合直线的第 i 个标准点；
- a ——拟合直线的截距；
- b ——拟合直线的斜率。

附录 C

线性误差不确定度评定示例

C.1 测量模型

C.1.1 建立测量模型

$$\Delta A_i = (A_i - A_{si}) / A_{si} \times 100\% \quad (\text{C.1})$$

$$\Delta A_i = \left(\frac{\bar{A}_i - a}{bA_{si}} - 1 \right) \times 100\% \quad (\text{C.2})$$

式中：

ΔA_i ——光谱中性滤光片第 i 点的线性误差；

A_i ——光谱中性滤光片第 i 点线性方程拟合值；

A_{si} ——光谱中性滤光片第 i 点吸光度标准值；

\bar{A}_i ——光谱中性滤光片第 i 点的 3 次测量吸光度值的平均值；

a ——截距；

b ——斜率。

C.1.2 合成标准不确定度计算

合成标准不确定度可按下式计算：

$$u_c(\Delta A_i) = \sqrt{\left[\frac{\partial(\Delta A_i)}{\partial(\bar{A}_i)} \right]^2 u^2(\bar{A}_i) + \left[\frac{\partial(\Delta A_i)}{\partial(A_{si})} \right]^2 u^2(A_{si}) + \left[\frac{\partial(\Delta A_i)}{\partial(a)} \right]^2 u^2(a) + \left[\frac{\partial(\Delta A_i)}{\partial(b)} \right]^2 u^2(b)} \quad (\text{C.3})$$

$$u_c(\Delta A_i) = \sqrt{\left[\frac{1}{bA_{si}} \right]^2 u^2(\bar{A}_i) + \left[-\frac{(A_i - a)}{bA_{si}^2} \right]^2 u^2(A_{si}) + \left[-\frac{1}{bA_{si}} \right]^2 u^2(a) + \left[-\frac{(A_i - a)}{b^2 A_{si}} \right]^2 u^2(b)} \quad (\text{C.4})$$

C.2 输入量的标准不确定度评定

C.2.1 输入量 \bar{A}_i 的标准不确定度 $u(\bar{A}_i)$ 的评定

输入量 \bar{A}_i 的标准不确定度 $u(\bar{A}_i)$ 主要来源于微孔板化学发光分析仪校准过程中人员操作、仪器稳定性、环境条件波动等诸多因素。根据微孔板化学发光分析仪校准中仪器的测光值重复性项目 s_r 和线性误差项目中每点重复测定 3 次，进行 A 类评定。重复性数据见表 C.1。由此可以得出输入量 A_i 的相对标准不确定度 $u(\bar{A}_i) = \frac{s_r}{\sqrt{3}} \times \bar{A}_i = 0.044\%$ 。

表 C.1 重复性数据

发光强度						重复性
217 000	219 000	218 000	218 000	217 000	217 000	0.38%

C.2.2 输入量 A_{si} 的标准不确定度 $u(A_{si})$ 的评定

输入量 A_{si} 的标准不确定度 $u(A_{si})$ 主要来源于光谱中性滤光片标准物质的不确定

度，可以根据光谱中性滤光片校准证书提供的吸光度扩展不确定度 U_A 和包含因子 k_A

获得 $u(A_{si}) = \frac{U_A}{k_A} = \frac{0.01}{2} = 0.005$ 。

C.2.3 输入量 a 、 b 的标准不确定度 $u(b)$ 和 $u(a)$ 的评定

输出量 a 、 b 的不确定度 $u(a)$ 和 $u(b)$ 的评定见公式 (C.5)、公式 (C.6)。

$$u(a) = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y'_i)^2}{N-2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{C.5})$$

$$u(b) = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y'_i)^2}{N-2}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{C.6})$$

式中：

a ——拟合线性方程的截距；

b ——拟合线性方程的斜率；

x_i ——拟合线性方程中光谱中性滤光片第 i 点吸光度标准值；

\bar{x} ——拟合线性方程中四种光谱中性滤光片吸光度标准值的平均值；

y_i ——拟合线性方程中光谱中性滤光片第 i 点吸光度检测值；

y'_i ——拟合线性方程中光谱中性滤光片第 i 点线性方程拟合值；

N ——拟合线性方程中测量点数目与重复测量次数的乘积， $N=12$ 。

根据表 C.2 中线性误差校准数据，按公式 (C.5) 和公式 (C.6) 计算得到斜率和截距评定结果： $u(a)=0.0033$ ， $u(b)=0.0036$ 。

表 C.2 线性误差校准数据

吸光度标准值	0.200	0.479	0.776	1.879
吸光度测量值平均值	0.187	0.455	0.730	1.721
拟合结果	$a=0.015$ $b=0.910$			
吸光度计算值	0.189	0.484	0.786	1.875
单点线性误差	-5.5%	0.9%	1.3%	-0.2%

C.2.4 标准不确定度分量一览表

输入量的标准不确定度一览表见表 C.3 (以 $A_s=0.200$ 为例)。

表 C.3 输入量标准不确定度一览表

输入量	标准不确定度	灵敏系数
\bar{A}_i	$u(\bar{A}_i)=0.044\%$	$\frac{1}{bA_{si}}=5.495$
A_{si}	$u(A_{si})=0.005$	$-\frac{(\bar{A}_i - a)}{bA_{si}^2} = -4.780$
a	$u(a)=0.0033$	$-\frac{1}{bA_{si}} = -5.495$
b	$u(b)=0.0036$	$-\frac{(\bar{A}_i - a)}{b^2 A_{si}} = -1.051$

C.3 合成标准不确定度

合成标准不确定度按照公式 (C.4) 计算, 结果见表 C.4。

C.4 扩展不确定度

取 $k=2$, 则仪器线性误差的扩展不确定度按 $U=2u_c(\Delta A_i)$ 计算, 结果见表 C.4。

表 C.4 合成标准不确定度和扩展不确定度结果

线性误差/%	合成标准不确定度 $u_c(\Delta A_i)$ /%	扩展不确定度 U /%	包含因子 k
-5.5	3.1	6.2	2



附录 D

校准原始记录参考格式

送校单位		校准地址		
仪器型号		仪器编号		
制造厂商		检测日期		
环境温度	℃	相对湿度	%	
校准人		核验人		
技术依据				
主要 测量 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

D.1 重复性

发光强度						
重复性/%						

D.2 孔间干扰

中心孔 发光强度						
周围孔发光强度						
周围孔发光 强度平均值						
孔间干扰/%						

D.3 通道差异

光源位置	B2	B7	B11	D2	D7	D11	G2	G7	G11
发光强度									
通道差异/%									

D.4 线性误差

吸光度标准值												
完全发光强度												
发光强度												
吸光度测量值												
吸光度测量值 平均值												
线性方程												
吸光度计算值												
单点线性误差/%												
线性误差/%												
线性误差 不确定度 ($k=2$)/%												



附录 E

校准证书内页推荐格式

E.1 校准证书内页

证书编号××××××-××××			
校准环境条件及地点：			
温度	℃	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×页 共×页

E.2 校准证书校准结果页

证书编号××××××-××××

校准结果

被校项目及校准结果：

校准项目	校准结果	
重复性/%		
孔间干扰/%		
通道差异/%		
线性误差/%		扩展不确定度($k=2$)/%

以下空白

第×页 共×页