

海水叶绿素 a 传感器 荧光性能计量测试规范

(编制说明)

国家海洋标准计量中心

二零二二年十月

海水叶绿素 a 传感器荧光性能计量测试规范编制说明

一、任务来源

本规范是根据 2022 年国家计量技术法规制修订计划，项目计划号为《市场监管总局办公厅关于印发 2022 年国家计量技术规范项目制定、修订及宣贯计划的通知》（市监计量发〔2022〕70 号）。国家海洋标准计量中心为主要起草单位，国家海洋局北海标准计量中心、国家海洋技术中心和中国科学院深圳先进技术研究院为参加起草单位，归口单位是全国海洋专用计量器具计量技术委员会。

二、计量测试规范制定的目的和意义

叶绿素 *a* (chl-*a*) 是富营养化常见的相应指标，是藻类光合作用的主要色素，存在于大部分海洋浮游植物中，可以利用 chl-*a* 评估藻类生长状况。因此海水中 chl-*a* 的含量已经成为评价海洋水质富营养化和预测赤潮灾害必不可少的重要参数，因此，及时、准确地监测海水中 chl-*a* 的浓度和变化规律，不仅对赤潮、绿潮等海洋生态灾害起到风险预警作用，对于海洋生态环境保护、海水养殖、海洋渔业等具有重要作用。

《GB/T 12763.6 海洋调查规范第 6 部分：海洋生物调查》规定 chl-*a* 需要采样、萃取、测试分析、数据处理等步骤，过程繁琐、工作耗时长，需要有经验人员才能获得可靠数据，且数据不连续。随着科技进步，多参数水质仪配备的叶绿素 *a* 传感器可测量海洋中的活体 chl-*a*，具备实时原位、连续测量、不需取样等特点，对出现的特殊情况即时做出判断，因此被日趋广泛应用。

目前市场上常见的海水叶绿素 *a* 传感器主要是荧光测量原理，国内生产和研制单位有国家海洋技术中心、山东省科学院海洋仪器仪表研究所、中国科学院深圳先进技术研究院等，国外主要生产厂商有美国 WETLabs 公司、美国 Turner 公司、美国 YSI 公司、日本 ALEC 公司等。

表 1 国内外海水叶绿素 *a* 传感器技术指标一览表

序号	生产或研制单位	测量范围	最大允许误差
1	国家海洋技术中心	(0~15) $\mu\text{g/L}$	0.3 $\mu\text{g/L}$
2	山东省科学院海洋仪器仪表研究所	(0~200) $\mu\text{g/L}$	$\pm 2\%$
3	中国科学院深圳先进技术研究院	(0~200) $\mu\text{g/L}$	$\pm 2\%$
4	美国 WETLabs 公司	(0~230) $\mu\text{g/L}$	$\pm 2\%$

5	美国 Turner 公司	0.01~125 $\mu\text{g/L}$	$\pm 1\%$
6	美国 YSI 公司	(0~400) $\mu\text{g/L}$	$\pm 5\%$
7	日本 ALEC 公司	(0~200) $\mu\text{g/L}$	$\pm 1\%$
8	加拿大 RBR 公司	0.02~150 $\mu\text{g/L}$	$< \pm 2\%$

为了获得高质量的数据，需经常检查和评估传感器的性能。美国、澳大利亚等发达国家选择用荧光物质来评估传感器的荧光性能，当传感器荧光信号稳定，表明该传感器性能稳定，测得的 chl-*a* 浓度可靠，若荧光信号发生漂移，则传感器性能不稳定，需要和国标法比对确保结果可靠。因此针对国内缺乏可靠的规范/标准来评价海水叶绿素 *a* 传感器性能的情况，急需制定海水叶绿素 *a* 传感器荧光性能的计量测试规范，从一定程度上确保仪器的荧光性能稳定和数据可靠。

三、校准规范编写依据

依据 JJF 1071—2010《国家计量校准规范编写规则》编制。本规范的编写主要参考以下文件：

1. JJF 1001—2011《通用计量术语及定义》
2. JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》
3. JJF 1094—2002《测量仪器特性评定》
4. GB/T 22554—2010《基于标准样品的线性校准》

四、与“国际建议”、“国际文件”、“国际标准”、“国内标准”等兼容情况

关于海水叶绿素 *a* 传感器的校准方法，未查询到相关的“国际建议”，鉴于叶绿素 *a* 传感器基于荧光测量原理，查询到荧光仪器相关的国际标准有 ASTM E2719 - 09 (2014)《荧光仪器校准和鉴定用标准指南》(Standard Guide for Fluorescence – Instrument Calibration and Qualification)，该标准利用系列荧光水溶液校准传感器检测系统的特性；因此本规范参考该标准，利用荧光水溶液实现海水叶绿素 *a* 传感器荧光性能的测试。

海水叶绿素 *a* 传感器荧光性能计量测试规范统一了国内在海洋荧光法仪器的测试方法，使得今后相关仪器的验收、检验、质量评价有章可循，与“国内标准”等是兼容的。

五、校准规范内容说明

本规范是基于海水叶绿素 *a* 传感器的测量原理和实际使用情况基础上制定

的，充分考虑仪器的工作原理、使用环境、任务需求，同时兼顾方法的科学性、权威性和实用性原则，确定规范内容说明为以下几项：

1. 关于范围的确定说明

海水叶绿素 a 传感器主要用于现场测量海水中的活体叶绿素浓度，应用于海洋科学调查、海上浮标等现场观测，获得的测量数据实时、连续、快速反应海水浮游生物的状况。因此本规范适用于海洋现场用的海水叶绿素 a 传感器荧光性能的计量测试。

2. 计量特性的确定说明

本规范充分考虑海水叶绿素 a 传感器的工作原理、使用环境、海洋调查人物的需求等条件，测试内容主要包括荧光线性范围、荧光示值误差、荧光测量重复性。

2.1 荧光线性范围

利用荧光物质配制系列标准溶液，在完全避光环境下，用传感器准确测量的最小值和最大值的范围，然后用传感器的荧光信号值与标准溶液浓度值绘制校准曲线，进行线性拟合，并得出 R^2 ，从而得到传感器的荧光响应特性。

2.2 荧光示值误差

利用荧光物质配制不同浓度的系列标准溶液，通过比较传感器测量值和标准值，实现荧光示值误差的校准。

2.3 荧光测量重复性

传感器在使用一段时间后，重复性会下降，影响测量精度，因此需要对荧光测量重复性进行校准。

3. 关于测试条件的说明

测试条件包括环境条件、测试用标准器具和配套设备。为了使测量结果具有较小的不确定度，需要建立一种较稳定的环境条件，降低环境因素对测量过程带来的附加误差，需要具有一定准确度要求的标准器具和配套设备。

3.1 环境条件

根据荧光物质的稳定性要求，规定环境条件确定如下：

环境温度：（15~25）℃；

相对湿度：≤85%；

因为本规范所选的荧光素钠，在温度高于 25℃时会加快其降解，因此设置环境温度最高为 25℃。另外，由于外界光源对荧光物质溶液有一定影响，因此要求测试过程中周围无影响仪器正常工作的电磁、其它光源干扰等。

3.2 测试用标准器具和配套设备

ASTM E2719-09(2014)指出利用具有荧光性质的溶液可以实现荧光传感器的校准^[1]，因其容易操作、重复性好而广受欢迎。因此本规范借鉴该标准，采用荧光性能的溶液实现海水叶绿素 *a* 传感器的荧光性能计量测试。

在实验室开展测量范围线性响应、准确性和可靠性的测试，其测试目的是评估荧光检测系统的性能而不是生物学上基于叶绿素荧光浓度的变化，采用一种荧光染料作为参考标准。因此本规范所要解决的首要问题是选择满足以下 5 个性能的参考标准物质：1) 具有水溶性；2) 与海水叶绿素 *a* 传感器具有相似的激发波长和吸收波长；3) 在一定条件下，其水溶液的荧光响应与荧光物质浓度是线性相关；4) 在一定温度和光照下不容易降解；5) 可适用性，经济实惠。满足上述 5 个性能的参考标准物质有罗丹明、荧光素钠，但荧光素钠是最敏感的，也就是在低浓度范围内，传感器的荧光信号增加幅度较大；最关键的是荧光素钠在 530nm~650nm 范围内具有与浮游植物相似的发射光谱。因此本规范选用荧光素钠作为参考标准物质。

其次，根据荧光溶液的配制过程，配备了电子天平、容量瓶、移液管等，要求具有法定计量检定机构出具的检定证书；结合传感器的测试过程，采用黑色亚克力材质研制了测试专用桶，降低外界光源环境的干扰，保证荧光测试的准确性。通过文献了解到荧光素钠在短短几个小时的黑暗环境下，测试传感器的荧光性能是不会改变线性斜率的。

4. 校准项目和校准方法

考虑到海水叶绿素 *a* 传感器的工作原理和工作环境，在本规范中确定测试项目为荧光线性范围、荧光示值误差、荧光测量重复性。下面就具体的测试方法和数据处理方法做详尽的说明。

4.1 荧光线性范围

根据 GB/T 22554—2010《基于标准样品的线性校准》^[2]5.3 条：所选标准样品的值范围应尽可能覆盖测量系统正常操作条件下被测量的范围；所选标准样品

的组分应尽可能接近于被测样品的组分；标准样品的值应大致等距离分布在测量系统正常操作条件下的整个测量范围。用于校准函数评估的标准溶液不少于 3 个，校准函数初始评估时，建议标准样品数多于 3 个。

另外通过文献得知，无论近岸水还是大洋水，海洋中浮游植物叶绿素 *a* 含量基本包含在 (0.05~50) $\mu\text{g/L}$ 之内^[3]，WETLabs 传感器在测量荧光信号的同时还显示叶绿素 *a* 浓度，发现当荧光素钠浓度在 50 $\mu\text{g/L}$ 时，其显示叶绿素 *a* 结果在 11 $\mu\text{g/L}$ 附近。因此本规范设定在仪器量程范围或常用测量范围 (0~200) $\mu\text{g/L}$ ，在该范围内按照均匀取点的原则设定 5 个测试点，如常用测量范围 (0~200) $\mu\text{g/L}$ 内，浓度点依次为 0 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、150 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ ；如在仪器量程范围 (0~150) $\mu\text{g/L}$ 内，浓度点依次设为 0 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、150 $\mu\text{g/L}$ 。传感器按照浓度从低到高的顺序测定，记录传感器的电信号值，再利用传感器的电信号与标准溶液浓度值进行线性拟合，当线性的 $R^2 \geq 0.99$ ，说明该传感器在该线性范围内的荧光影响特性较好；若 $R^2 < 0.99$ ，说明需要调整线性范围。

4.2 荧光示值误差

将 4.1 步骤中海水叶绿素 *a* 传感器测得的电信号平均值带入线性方程中，计算仪器的荧光测量值，通过比较荧光测量值和系列溶液的标准值，得到该传感器的荧光示值误差，以此来表征该传感器提供数值准确与否的能力。

4.3 荧光测量重复性

选择荧光溶液浓度最大点，进行重复性测量，测量 10 次，根据贝塞尔公式计算仪器的实验标准差以表征该传感器提供相近示值的能力。

5. 关于测试结果的表达和复校时间间隔

测试结果的描述采用了 JJF1071-2010 中规定的内容。其中“测试结果及其测量不确定度的说明”中给以具体化的要求：应给出每个被测点对应的输出平均值，及相应的不确定度和包含因子，可取最大的扩展不确定度作为最终结果。

一般，传感器复测时间间隔的长短是由传感器的稳定性等自身质量情况和使用情况所决定的，使用者可根据实际情况自主决定复测，但是根据实践建议复测时间不超过 1 年。新购置或更换或经过调试维修后的传感器应及时进行测试。

参考文献:

1. ASTM E2719 - 09 (2014) Standard Guide for Fluorescence – Instrument Calibration and Qualification[S].International: ASTM, 2014.
2. 国家质量检验监督检疫总局.GB/T 22554-2010《基于标准样品的线性校准》[S].北京: 中国标准出版社.2010.
3. 范陈清.叶绿素 a 荧光计设计与开发[D].山东: 中国石油大学(华东),2009.