



# 中华人民共和国国家计量技术规范

JJF ××××—202×

## 荧光酶标分析仪校准规范

Calibration Specification of Microplate Fluorescence Analyzers

(征求意见稿)

本稿完成日期：2023-09-01

202X-XX-XX 发布

202X-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布

# 荧光酶标分析仪校准规范

Calibration Specification of Microplate  
Fluorescence Analyzers

JJF XXXX—202X

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：

全国生物计量技术委员会

前言中心办公室

# 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)
5.1 环境条件 .....	(2)
5.2 校准用的标准物质及其他设备 .....	(2)
6 校准项目和校准方法 .....	(2)
6.1 激发波长示值误差 .....	(2)
6.2 发射波长示值误差 .....	(3)
6.3 重复性 .....	(3)
6.4 线性 .....	(4)
6.5 检出限 .....	(5)
7 校准结果表达 .....	(6)
8 复校时间间隔 .....	(6)
附录 A 校准原始记录格式 .....	(7)
附录 B 校准证书(内页)格式 .....	(9)
附录 C 测量不确定度评定示例 .....	(10)

# 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。校准方法及计量特性等主要参考了 JJG 537-2006《荧光分光光度计》。

本规范为首次发布。

全国生物计量技术委员会

前言中心办公室

# 荧光酶标分析仪校准规范

## 1 范围

本规范适用于各类板式荧光酶标分析仪、多功能酶标分析仪中荧光分析模块（不含时间分辨荧光分析模块）的校准。

## 2 引用文件

本规范引用了下列文件：

JJG 537-2006 荧光分光光度计

GB/T 32267-2015 分析仪器性能测定术语

注：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 概述

荧光酶标分析仪是利用酶标记抗体等方式，进行免疫分析后，将没有荧光活性的底物经过酶催化转化成具有荧光活性的标记物，在合适波长的激发光作用下发出荧光，其荧光强度与被分析物的含量相关，通过检测荧光强度分析待测物的仪器。荧光酶标分析仪一般由微孔板支架、温控装置、分光装置、光子检测装置、电源部分、计算机及软件组成。仪器采用光电倍增管（PMT）检测单光子信号，传输至放大器并经过模数转换后传输给计算机，通过计算得出检测结果。

## 4 计量特性

荧光酶标分析仪各项计量性能指标见表 1。

表 1 荧光酶标分析仪的主要计量特性指标

计量特性	计量特性指标
激发波长示值误差	±5 nm
发射波长示值误差	±5 nm
重复性	≤8%

续表

线性	$r \geq 0.99$
检出限	以 6.5 的测量结果表示
注：	
1 激发光波长和发射光波长示值误差的计量特性指标也可参照厂商给出的技术要求。	
2 $r$ 为线性相关系数。	
3 以上技术指标不用于合格判别，仅供参考。	

## 5 校准条件

### 5.1 环境条件：

5.1.1 环境温度：(10~30) °C。

5.1.2 相对湿度：≤85%。

注：若制造商为设备规定了工作温、湿度范围，则应在制造商规定的温湿度范围内试验。

### 5.2 校准用的标准物质及其他设备

#### 5.2.1 荧光标准溶液

根据仪器的荧光通道类型，选择具有合适发射和激发波长的荧光物质（硫酸奎宁、荧光素、罗丹明等），配制为合适浓度的荧光标准溶液。

#### 5.2.2 荧光酶标分析仪计量校准板

测量范围为 1%~100%，扩展不确定度不大于 5% ( $k=2$ )；输出光谱峰值波长范围为 (200~800) nm，也可根据仪器的波长范围选择其他合适波长范围的计量校准板，最大允许误差 ±1nm。

#### 5.2.3 光纤光谱仪

测量范围 (200~800) nm，最大允许误差为 ±1nm。

#### 5.2.4 标准汞灯

测量范围 (250~900) nm，最大允许误差为 ±1nm。

#### 5.2.5 板式光谱仪

波长测量范围 (400~800) nm，最大允许误差 ±1nm。

#### 5.2.6 板式荧光模拟器

输出光谱峰值波长范围 (450~650) nm，最大允许误差 ±1nm；输出光亮度可调节，10%~100%亮度范围内线性度不低于 0.999。

注：可根据实际情况配备荧光酶标分析仪计量校准板、光纤光谱仪、标准汞灯、板式光谱仪、板式荧光模拟器中的一种或多种标准器。

## 6 校准项目和校准方法

### 6.1 激发波长示值误差

对于滤光片式的荧光酶标分析仪，将滤光片从仪器激发光路侧卸下，放置在光纤光谱仪的光路中，选择透射比扫描模式，从低于滤光片标称波长 20 nm 处开始扫描，至高于滤光片标称波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长  $w_{ex,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（1）计算激发波长示值误差。

对于光栅式分光的荧光酶标分析仪，选择合适的光纤及接头，连接激发光路与光纤光谱仪，或将光纤接在开孔的酶标板上，从酶标分析仪控制软件上设置所需校准的激发波长，在光纤光谱仪上选择光谱扫描模式，从低于设定激发波长 20 nm 处开始扫描，至高于设定激发波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长  $w_{ex,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（1）计算激发波长示值误差。

也可以使用板式光谱测量仪进行测量。将板式光谱仪置于微孔板架上，从酶标分析仪控制软件上设置所需校准的激发波长，从低于设定激发波长 20 nm 处开始扫描，至高于设定激发波长 20 nm 处为止，通过板式光谱仪的软件读出峰值波长  $w_{ex,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（1）计算激发波长示值误差。

$$\Delta w_{ex} = w_{ex} - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 w_{ex,i} \quad (1)$$

式中：

$\Delta w_{ex}$  —— 激发波长示值误差，nm；

$w_{ex}$  —— 激发波长滤光片标称值或激发波长设定值，nm；

$w_{ex,i}$  —— 激发波长滤光片峰值波长测量值或激发光谱峰值波长测量值，nm。

### 6.2 发射波长示值误差

对于滤光片式的荧光酶标分析仪，将滤光片从仪器发射光路侧卸下，放置在光纤光谱仪的光路中，选择透射比扫描模式，从低于滤光片标称波长 20 nm 处开始扫描，至高于滤光片标称波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长  $w_{em,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（2）计算发射波长示值误差。

$$\Delta w_{em} = w_{em} - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 w_{em,i} \quad (2)$$



式中：

$\Delta w_{em}$ ——发射波长示值误差，nm；

$w_{em}$ ——发射波长滤光片标称值或设定值，nm；

$w_{em,i}$ ——发射波长滤光片峰值波长测量值，nm；

对于光栅式荧光酶标分析仪，选择合适的光纤及接头连接低压汞灯标准光源（或计量标准板）与荧光酶标分析仪的发射光路，打开低压汞灯（或计量标准板）至稳定，在校准点附近选择低压汞灯（或计量标准板）的一条或几条特征谱线。在荧光酶标分析仪上选择发射光谱扫描模式，从低于汞灯标准波长（或计量标准板）20 nm 处开始扫描，至高于汞灯标准波长（或计量标准板）20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长 $w_{em,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（3）计算发射波长示值误差。

也可以使用板式荧光模拟器进行测量。将板式荧光模拟器置于微孔板架上，控制其输出特定波长的标准光源。在荧光酶标分析仪上选择发射光谱扫描模式，从低于标准波长 20 nm 处开始扫描，至高于标准波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长 $w_{em,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式（3）计算发射波长示值误差。

$$\Delta w_{em} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 w_{em,i} - w_{em,s} \quad (3)$$

式中：

$\Delta w_{em}$ ——发射波长示值误差，nm；

$w_{em,s}$ ——荧光酶标分析仪计量标准板波长标准值或标准汞灯值，nm；

$w_{em,i}$ ——标准波长 3 次测量平均值，nm。

### 6.3 重复性

选择合适浓度的标准溶液或荧光酶标分析仪计量标准板或板式荧光模拟器置于微孔板架上，重复测量 6 次，根据式（4）计算相对标准偏差 RSD 作为仪器重复性。

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

式中：

RSD——相对标准偏差，%；

$F_i$ ——第  $i$  次荧光强度的测定值，cps 或无量纲；

$\bar{F}$ ——6 次荧光强度测定结果平均值，cps 或无量纲；

$i$ ——测量序号。

#### 6.4 线性

在低值至高值范围内，配制至少 5 个浓度的标准溶液（系列溶液浓度值至少相差两个数量级），每个溶液均重复测量 3 次，测量结果的平均值与标准溶液的标准值进行线性回归，按公式（5）计算相关系数  $r$ 。

也可使用板式荧光模拟器、计量校准板等标准器进行线性测量。将板式荧光模拟器或计量校准板等标准器置于微孔板架上，先设置其标准光源的工作波长，然后分别设定其亮度为 10%、20%、40%、80%、100%（如果设定亮度超过荧光酶标分析仪的测量量程，可适当调整光源亮度），用荧光酶标分析仪测量板上中心区域校准孔荧光强度，每种亮度下重复测量 3 次，取其平均值。将测量结果的平均值与板式荧光模拟器或计量校准板等标准器的相对光强进行线性回归，按公式（5）计算相关系数。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(F_i - \bar{F})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (F_i - \bar{F})^2}} \quad (5)$$

式中：

$r$ ——线性相关系数；

$x_i$ ——标准溶液的浓度值（或板式荧光模拟器等标准器光强度值）；

$\bar{x}$ ——标准溶液的浓度值（或板式荧光模拟器等标准器光强度值）的平均值；

$F_i$ ——标准溶液荧光强度（或板式荧光模拟器等标准器）的测量值；

$\bar{F}$ ——标准溶液荧光强度（或板式荧光模拟器等标准器）的测量值的平均值；

$n$ ——浓度水平（或光强度水平）的个数。

#### 6.5 检出限

在荧光板中心区域选择 10 个孔内加入 0.05 mol/L 硫酸溶液做空白溶液，另 10 个孔内加入等体积  $1 \times 10^{-7}$  g/mL 硫酸奎宁标准溶液，加入的溶液体积为单孔容量的 2/3。设置仪器激发波长 350 nm、发射波长 450 nm。扫描荧光板，得到 10 个空白溶液的荧光强度和 10 个标准溶液的荧光强度。根据公式（7）-（9）计算仪器的检出限。

$$\bar{F} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_{i1} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n F_{i0} \quad (7)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (F_i - \bar{F})^2}{n-1}} \quad (8)$$

$$DL = \frac{C}{\bar{F}} \times 2s \quad (9)$$

式中：

$\bar{F}$  ——平均荧光强度，cps或无量纲；

$F_{i1}$  ——i次检测标准溶液的荧光强度，cps或无量纲；

$F_{i0}$  ——i次检测空白溶液的荧光强度，cps或无量纲；

$n$  ——测量次数；

$s$  ——单次测量的标准偏差，g/mL；

$DL$  ——检出限，g/mL；

$C$  ——标准溶液的浓度，g/mL。

## 7 校准结果表达

### 7.1 校准结果处理

经校准后的荧光酶标分析仪应核发校准证书，校准证书应符合 JJF 1071-2010 中 5.12 的要求，并给出各校准项目名称和测量结果以及扩展不确定度。校准原始记录格式（推荐性表格）见附录 A，校准证书内页格式（推荐性表格）见附录 B。

### 7.2 校准结果的测量不确定度

荧光酶标分析仪校准结果的测量不确定度按 JJF 1059.1-2012 的要求评定，校准结果测量不确定度评定示例见附录 C。

## 8 复校时间间隔

复校时间间隔的长短是由仪器的使用情况、使用者、仪器本身质量等诸因素所决定的，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。

## 附录 A

## 校准原始记录格式

(推荐性表格)

器具名称		客户名称						
型号/规格		客户地址						
出厂编号		制造厂商						
环境温度	℃	相对湿度	%RH					
大气压		校准日期	年 月 日					
校准员		核验员						
校准地点								
校准依据								
标准器及配套设备								
名称/型号	编号	测量范围	不确定度或准确度等级 或最大允许误差	证书编号/有 效期至	溯源机构名称			
1、外观检查:								
2、激发波长示值误差								
标称/设定值 $w_{ex}/nm$	测量值, $w_{ex,i}/nm$			测量平均值 $\bar{w}_{ex,i}/nm$	示值误差 $\Delta w_{ex}/nm$			
	1	2	3					
3、发射波长示值误差								
标称/设定值 $w_{em}/nm$	测量值, $w_{em,i}/nm$			测量平均值 $\bar{w}_{exmi}/nm$	示值误差 $\Delta w_{em}/nm$			
	1	2	3					
4、重复性								
样品	1	2	3	4	5	6	平均值	重复性

5、线性										
浓度		测量值			平均值	线性相关系数				
		1	2	3						
6、检出限										
样品名称						样品浓度				
NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$F_{i0}$										
$F_{i1}$										
$F_i$										
平均值 $\bar{F}$						标准偏差 s				
检出限										
结果/说明:										

## 附录 B

## 校准证书（内页）格式

（推荐性表格）

序号	校准项目	校准结果
1	发射波长示值误差	
2	激发波长示值误差	
3	重复性	
4	线性	
5	检出限	

校准员：\_\_\_\_\_ 核验员：\_\_\_\_\_

## 附录 C

## 测量不确定度评定示例

## C.1 激发波长示值误差测量结果不确定度评定

## C.1.1 测量方法

对于采用滤光片式的荧光酶标分析仪，将滤光片从仪器上卸下，放置在光纤光谱仪的光路中，选择透射比扫描模式，从低于滤光片标称波长 20 nm 处开始扫描，至高于滤光片标称波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长 $w_{ex,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式 (C.1) 计算激发光波长示值误差。

## C.1.2 测量模型

$$\Delta w_{ex} = w_{ex} - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 w_{ex,i} \quad (\text{C.1})$$

式中：

$\Delta w_{ex}$ ——激发波长示值误差，nm；

$w_{ex}$ ——激发波长滤光片标称值或激发光波长设定值，nm；

$w_{ex,i}$ ——激发波长滤光片峰值波长测量值或激发光谱峰值波长测量值，nm。

## C.1.3 不确定度来源

根据以上测量模型以及测量方法，其不确定度来源主要包括以下 3 个方面：

- 测量重复性引入的标准不确定度 $u_1$ ；
- 光纤光谱仪分辨力引入的标准不确定度 $u_2$ ；
- 标准器具引入的标准不确定度 $u_3$ 。

## C.1.4 测量不确定度评定

C.1.4.1 测量重复性引入的不确定度分量 $u_1$ 

使用光纤光谱仪对标称 350 nm 的激发光波长进行测量，连续测量 3 次，对重复测量结果进行分析，测量结果见表 C.1。

表 C.1 激发光波长示值误差测量结果 (nm)

$w_{ex}$	$w_{ex,i}$			$\bar{w}_{ex,i}$	$\Delta w_{ex}$
350	348.2	347.6	348.9	328.2	1.8

则单次测量结果的标准差 $s$ 如下：

$$s = \frac{348.9-347.6}{1.69} \text{ nm} = 0.769 \text{ nm}$$

实际测试时在重复性条件下连续测量 3 次，以 3 次测量的算术平均值作为结果，则由测量重复性引入的标准不确定度分量为：

$$u_1 = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.769}{\sqrt{3}} \text{ nm} = 0.444 \text{ nm}$$

#### C.1.4.2 光纤光谱仪分辨力引入的不确定度 $u_2$

光纤光谱仪的分辨力为 0.1 nm，区间半宽为 0.05 nm，按均匀分布计算，由此引入的标准不确定度分量为：

$$u_2 = \frac{0.05}{\sqrt{3}} \text{ nm} = 0.029 \text{ nm}$$

#### C.1.4.3 标准器具引入的不确定度 $u_3$

光纤光谱仪的最大允许误差为 $\pm 1$  nm，按均匀分布计算，由此引入的标准不确定度分量为：

$$u_3 = \frac{1}{\sqrt{3}} \text{ nm} = 0.577 \text{ nm}$$

#### C.1.5 标准不确定度分量一览表

标准不确定度一览表见表 C.2。

表 C.2 激发光波长示值误差测量结果标准不确定度一览表

不确定度来源	$u$	标准不确定度分量
测量重复性 <sup>a</sup>	$u_1$	0.444 nm
分辨力 <sup>b</sup>	$u_2$	0.029 nm
标准器具	$u_3$	0.577 nm

注：a,b 取数值大的合成不确定度。

#### C.1.6 合成标准不确定度 $u_c$

由于各不确定度间不相关，则

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2} = 0.729 \text{ nm}$$

#### C.1.7 扩展不确定度 $U$

取  $k=2$ ，则

$$U = k \times u_c = 1.5 \text{ nm}$$

### C.2 发射波长示值误差测量结果不确定度评定

#### C.2.1 测量方法

对于采用滤光片式的荧光酶标分析仪，将滤光片从仪器上卸下，放置在光纤光谱仪的光路中，选择透射比扫描模式，从低于滤光片标称波长 20 nm 处开始扫描，至高于滤



光片标称波长 20 nm 处为止，通过软件读出峰值波长 $w_{em,i}$ ，重复三次取其平均值，根据式 (C.2) 计算发射光波长示值误差。

### C.2.2 测量模型

$$\Delta w_{em} = w_{em} - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 w_{em,i} \quad (\text{C.2})$$

式中：

$\Delta w_{em}$ ——发射波长示值误差，nm；

$w_{em}$ ——发射波长滤光片标称值，nm；

$w_{em,i}$ ——发射波长滤光片峰值波长测量值，nm。

### C.2.3 不确定度来源

根据以上测量模型以及测量方法，其不确定度来源主要包括以下 3 个方面：

- 测量重复性引入的标准不确定度 $u_1$ ；
- 光纤光谱仪分辨力引入的标准不确定度 $u_2$ ；
- 标准器具引入的标准不确定度 $u_3$ 。

### C.2.4 测量不确定度评定

#### C.2.4.1 测量重复性引入的不确定度分量 $u_1$

使用光纤光谱仪对标称 553 nm 的发射光波长进行测量，连续测量 3 次，对重复测量结果进行分析，测量结果见表 C.3。

表 C.3 发射光波长示值误差测量结果 (nm)

$w_{em}$	$w_{em,i}$			$\bar{w}_{em,i}$	$\Delta w_{em}$
553	555.6	557.2	556.7	556.5	-3.5

则单次测量结果的标准差 $s$ 如下：

$$s = \frac{557.2-555.6}{1.69} \text{ nm} = 0.947 \text{ nm}$$

实际测试时在重复性条件下连续测量 3 次，以 3 次测量的算术平均值作为结果，则由测量重复性引入的标准不确定度分量为：

$$u_1 = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.947}{\sqrt{3}} \text{ nm} = 0.547 \text{ nm}$$

#### C.2.4.2 光纤光谱仪分辨力引入的不确定度 $u_2$

光纤光谱仪的分辨力为 0.1 nm，区间半宽为 0.05 nm，按均匀分布计算，由此引入的标准不确定度分量为：

$$u_2 = \frac{0.05}{\sqrt{3}} \text{ nm} = 0.029 \text{ nm}$$

### C.2.4.3 标准器具引入的不确定度 $u_3$

光纤光谱仪的最大允许误差为 $\pm 1 \text{ nm}$ ，按均匀分布计算，由此引入的标准不确定度分量为：

$$u_3 = \frac{1}{\sqrt{3}} \text{ nm} = 0.577 \text{ nm}$$

### C.2.5 标准不确定度分量一览表

标准不确定度一览表见表 C.4。

表 C.4 发射光波长示值误差测量结果标准不确定度一览表

不确定度来源	$u$	标准不确定度分量
测量重复性	$u_1$	0.547 nm
分辨力	$u_2$	0.029 nm
标准器具	$u_3$	0.577 nm

注：a,b 取数值大的合成不确定度。

### C.2.6 合成标准不确定度 $u_c$

由于各不确定度间不相关，则

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2} = 0.796 \text{ nm}$$

### C.2.7 扩展不确定度 $U$

取  $k=2$ ，则

$$U = k \times u_c = 1.6 \text{ nm}$$

## C.3 检出限不确定度评定

### C.3.1 测量方法

在 96 孔板中选 10 个孔加入 200 $\mu\text{L}$  的 0.05 mol/L 硫酸溶液作空白，另选 10 个孔加入 200 $\mu\text{L}$  的  $1 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$  硫酸奎宁溶液，计算出 10 个荧光强度，计算公式为：

$$F_i = F_{i1} - F_{i0}$$

式中：

$F_{i1}$ ——标准溶液的荧光强度；

$F_{i0}$ ——空白溶液的荧光强度。

使用 10 个荧光强度的数值计算出平均值  $\bar{F}$ 、标准偏差  $s$  和检出限。

## C.2.2 测量模型

$$DL = \frac{c}{F} \times 2s$$

式中：

$DL$ ——检出限的测量结果，g/mL；

$C$ ——标准溶液的质量浓度，g/mL；

$s$ ——10次荧光强度测量值的标准偏差；

$\bar{F}$ ——10个荧光强度测量值的平均值。

## C.2.3 不确定度来源

根据数学模型，检出限的不确定度将取决于荧光强度测量值、荧光强度测量值的标准偏差以及硫酸奎宁的质量浓度引起的不确定度。

## C.2.4 测量不确定度评定

C.2.4.1 荧光强度测量值相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(\bar{F})$ 与荧光强度测量值的标准偏差的相对标准不确定度 $u_{\text{rel}}(s)$ 的评定

输出量 $\bar{F}$ 和 $s$ 的标准不确定度 $u(\bar{F})$ 和 $u(s)$ 的来源，主要是由被测仪器读数的不稳定性引起的。使用浓度为0.05 mol/L 硫酸溶液和 $1 \times 10^{-11}$  g/mL 硫酸奎宁标准溶液。测量数据如下所列：

NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$F_{i0}$	27	19	24	13	13	11	24	21	16	19
$F_{i1}$	2101	2037	2062	2278	2067	2024	2027	2057	2086	2203
$F_i$	2074	2018	2038	2265	2054	2013	2003	2036	2070	2184
平均值 $\bar{F}$	2075.50					标准偏差 $s$			84.07	
检出限	8.1×10 <sup>-9</sup> g/mL									

计算得：

$$u_{\text{rel}}(\bar{F}) = \frac{u(\bar{F})}{\bar{F}} \times 100\% = \frac{s}{\sqrt{n} \times \bar{F}} \times 100\% = \frac{84.07}{\sqrt{10} \times 2075.5} \times 100\% = 1.28\%$$

$$u_{\text{rel}}(s) = \frac{u(s)}{s} \times 100\% = \frac{s}{\sqrt{2(n-1)} \times s} \times 100\% = \frac{84.07}{\sqrt{2(10-1)} \times 84.07} \times 100\% = 23.57\%$$

### C.2.4.2 硫酸奎宁的质量浓度引起的相对不确定度 $u_{\text{rel}}(c)$ 的评定

仪器检出限的检定中，采用的硫酸奎宁质量浓度为  $1 \times 10^{-7} \text{ g/mL}$ 。标准溶液配制过程为先准确称取 5mg 硫酸奎宁固体标准物质，溶解并定容至 500mL 容量瓶中，得到浓度为  $1 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$  硫酸奎宁标准溶液，再将该溶液稀释得到所需浓度的标准溶液。具体配制方法见下表。

欲配标准溶液		所取标准母液	
质量浓度(g/mL)	配制体积(mL)	质量浓度(g/mL)	移液体积(mL)
$1 \times 10^{-6}$	250	$1 \times 10^{-5}$	25
$1 \times 10^{-7}$	100	$1 \times 10^{-6}$	10

因此硫酸奎宁质量浓度引入的不确定度主要由硫酸奎宁标准物质的不确定度、称量过程引入的不确定度、定容和稀释过程引入的不确定度组成。

### C.2.4.3 标准物质引入的相对标准不确定度

硫酸奎宁标准物质的纯度为 98.6%，相对扩展不确定度为 0.5%， $k=2$ ，故其相对标准不确定度为：

$$u_{\text{rel}}(P) = \frac{0.5\%}{2 \times 98.6\%} \times 100\% = 0.254\%$$

### C.2.4.4 称量引入的相对标准不确定度

称量使用十万分之一天平，因称量硫酸奎宁标准物质在 5mg 左右，天平最大允许为  $\pm 0.05\text{mg}$ 。按照矩形分布估计，其相对标准不确定度为：

$$u_{\text{rel}}(m) = \frac{0.05}{\sqrt{3} \times 5} \times 100\% = 0.577\%$$

### C.2.4.5 定容和稀释过程引入的不确定度

标准溶液配制过程中使用的移液管、容量瓶均为 A 级，按照三角分布估计其不确定度，可得到配制过程中各移液管和容量瓶的引入的相对标准不确定度为：

$$u_{\text{rel}}(V) = \frac{\text{MPE}}{\sqrt{6} \times V} \times 100\%$$

移液和定容体积的不确定度还应考虑温度引入的不确定度，实验室温度变化为  $(10 \sim 35)^\circ\text{C}$ ，与  $20^\circ\text{C}$  的最大温度变化为  $15^\circ\text{C}$ ，水的体积膨胀系数为  $2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ，由温度效应导致的体积变化服从反正弦分布，则由温度变化引入的相对标准不确定度为：

$$u_{\text{rel}}(T) = \frac{15 \times 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{2}} \times 100\% = 0.223\%$$

定容和移液体积引入的不确定度应由 $u_{\text{rel}}(V)$ 和 $u_{\text{rel}}(T)$ 以方和根形式合成。根据标准溶液的配制方法，定容和稀释体积引入的不确定度见下表。

序号 i	玻璃量器	体积(mL)	MPE(mL)	$u_{\text{rel}}(V)$	$u_{\text{rel}}(T)$	$u_{\text{rel}}(V_i)$
1	容量瓶	500	±0.25	0.0289%	0.233%	0.235%
2		250	±0.15	0.0346%		0.236%
3		100	±0.10	0.0577%		0.240%
4	移液管	25	±0.030	0.0693%		0.243%
5		10	±0.020	0.115%		0.260%
6		1	±0.007	0.404%		0.466%

$1 \times 10^{-7}$  g/mL 硫酸奎宁标准物质浓度计算公式为：

$$c = \frac{P \times m \times V_{25\text{mL}} \times V_{10\text{mL}}}{V_{500\text{mL}} \times V_{250\text{mL}} \times V_{100\text{mL}}}$$

则该标准物质的相对标准不确定度为：

$$\begin{aligned} u_{\text{rel}}(c) &= \sqrt{u_{\text{rel}}^2(P) + u_{\text{rel}}^2(m) + u_{\text{rel}}^2(V_1) + u_{\text{rel}}^2(V_2) + u_{\text{rel}}^2(V_3) + u_{\text{rel}}^2(V_4) + u_{\text{rel}}^2(V_5)} \\ &= \sqrt{0.254\%^2 + 0.577\%^2 + 0.235\%^2 + 0.236\%^2 + 0.240\%^2 + 0.243\%^2 + 0.260\%^2} \\ &= 0.832\% \end{aligned}$$

### C.2.5 合成标准不确定度 $u_c$

由于各影响因素互不相关，因此用方和根合成可得检出限的合成标准不确定度为：

$$\begin{aligned} u_{\text{rel}}(DL) &= \sqrt{u_{\text{rel}}^2(\bar{F}) + u_{\text{rel}}^2(s) + u_{\text{rel}}^2(c_B)} = \sqrt{0.28\%^2 + 23.57\%^2 + 0.832\%^2} = 23.6\% \\ u(DL) &= 8.1 \times 10^{-9} \times 23.6\% = 1.9 \times 10^{-9} \text{ g/mL} \end{aligned}$$

### C.2.6 扩展不确定度 $U$

取 $k=2$ ，检出限的扩展不确定度为：

$$U(DL) = 3.8 \times 10^{-9} \text{ g/mL}, k=2$$