中华人民共和国国家计量技术规范

JJF XXXX—XXXX

叶绿素 a 测定仪校准规范

Calibration Specification for Chlorophyll a Instruments

（征求意见稿）

20XX-XX-XX 发布　　20XX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局 发布

叶绿素 a 测定仪校准规范

JJF 20XX- XXXX

Calibration Specification for

Fluorescence Instruments of Chlorophyll a

归 口 单 位：全国环境化学计量技术委员会

主要起草单位：安徽省计量科学研究院

上海市计量测试技术研究院有限公司

参加起草单位：中国计量科学研究院

安徽省合肥生态环境监测中心

本规范委托全国环境化学计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

郝　玮（安徽省计量科学研究院）

丁臻敏（上海市计量测试技术研究院有限公司）

徐　俊（安徽省计量科学研究院）

李　连（安徽省计量科学研究院）

参加起草人：

宁海峰（安徽省计量科学研究院）

朱丹蕾（中国计量科学研究院）

何前锋（安徽省合肥生态环境监测中心）

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
6　校准项目和校准方法 2
6.1　线性误差 2
6.2　重复性 3
6.3　稳定性 4
6.4　示值误差 4
7　校准结果表达 4
8　复校时间间隔 5
附录 A 标准溶液配制方法 6
附录 B 叶绿素 a 参考测定方法（分光光度法） 7
附录 C 叶绿素 a 测定仪校准记录参考格式 11
附录 D 叶绿素 a 测定仪校准证书内页参考格式 13
附录 E 叶绿素 a 测定仪线性误差测量不确定度评定示例 14

引　　言

本规范的编写以 JJF 1001-2011《通用计量术语及定义》、JJF 1071-2010《国家计量校准规范编写规则》和 JJF 1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》为基础和依据，主要参考了 GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》和 HJ 897-2017《水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法》的部分内容。

本规范为首次发布。

叶绿素 a 测定仪校准规范

1 范围

本规范适用于测量范围（0.2～200）μg/L 的基于荧光法的叶绿素 a 测定仪的校准。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

GB/T 14581-1993 水质 湖泊和水库采样技术指导

HJ 494-2009 水质 采样技术指导

HJ 897-2017 水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法

HJ/T 91-2002 地表水和污水监测技术规范

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

叶绿素 a 测定仪（以下简称仪器）基于叶绿素 a 的荧光诱导技术，通过发射特定波长的光照射水体，激发水体中的叶绿素 a 产生特定波长的荧光，荧光强度与叶绿素 a 的浓度在一定范围内成正比，从而得到叶绿素 a 的浓度值。仪器一般由光源、检测器、指示器三部分组成，其原理示意图如图 1 所示。

图 1 仪器原理示意图

4 计量特性

仪器的计量特性要求见表 1。

表 1 计量特性要求

校准项目	计量特性要求
线性误差	±10%
重复性	≤5%
稳定性	≤5%/h

示值误差	±20%

以上计量特性要求仅供参考，不作为判定依据。

5 校准条件

5.1 环境条件：

环境温度：5 ℃～40 ℃。

电源电压及频率：AC (220±22) V，(50±0.5) Hz。

5.2 测量标准及其他设备：

5.2.1 罗丹明 B 有证标准物质：相对扩展不确定度不大于 3%，k=2（标准溶液的配置方法见附录 A）；或叶绿素 a 有证标准物质：相对扩展不确定度不大于 10%，k=2。

5.2.2 吸量管、容量瓶：A 级。

5.2.3 《HJ 897-2017 水质 叶绿素 a 的测定 分光光度法》第 4 章及第 5 章中使用的其它试剂及设备。

6 校准项目和校准方法

6.1 线性误差

在仪器常用测量范围内，按照均匀取点的原则设置 5 个标准点配制对应不同叶绿素 a 浓度的罗丹明 B 系列标准溶液，如在（0.2～200）μg/L 范围，标准点为 0.2 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、150 μg/L、200 μg/L。分别进行 3 次重复测量，用最小二乘法拟合罗丹明 B 标准溶液的浓度值和仪器的叶绿素 a 浓度示值平均值绘制标准曲线得到仪器的线性方程，见公式（1）。

$$y = a + bx \qquad (1)$$

式中：

y——仪器测得的叶绿素 a 浓度值，μg/L；

a——截距；

b——斜率；

x——罗丹明 B 标准溶液的浓度值，μg/L。

按公式（2）计算各测量点线性方程计算的罗丹明 B 浓度值，按照公式（3）计算线性误差（不包含最低浓度点），取结果绝对值最大值为仪器的线性误差校准结果。

$$x_i = \frac{\overline{y_i} - a}{b} \qquad (2)$$

$$\Delta x_i = \frac{x_i - x_{si}}{x_{si}} \times 100\% \qquad (3)$$

式中：

$\overline{y_i}$——第 i 点的仪器测得叶绿素 a 浓度的平均值，μg/L；

x_i——第 i 点线性方程计算的罗丹明 B 浓度值，μg/L；

x_{si}——第 i 点罗丹明 B 标准溶液的浓度值，μg/L；

Δx_i——第 i 点的线性误差，%。

注：如采用叶绿素 a 有证标准物质，不做此项。

6.2　重复性

选用对应叶绿素 a 浓度为 20 μg/L 的罗丹明 B 标准溶液（或直接使用叶绿素 a 有证标准物质配置浓度为 20 μg/L 的叶绿素 a 标准溶液）重复测量 7 次。按公式（4）和公式（5）分别计算测量值的平均值和标准偏差，按公式（6）计算仪器重复性：

$$\bar{c} = \frac{\sum_{i=1}^{7} c_i}{7} \qquad (4)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{7} (c_i - \bar{c})^2}{7-1}} \qquad (5)$$

$$s_{\mathrm{r}} = \frac{s}{\bar{c}} \times 100\% \qquad (6)$$

式中：

c_i——仪器第 i 次测得值，μg/L；

$\bar{c}$——7 次测量值的平均值，μg/L；

s——单次测量值的标准偏差，μg/L，

s_{r}——仪器重复性，%。

6.3 稳定性

选用对应叶绿素 a 浓度为 20 μg/L 的罗丹明 B 标准溶液（或直接使用叶绿素 a 有证标准物质配置浓度为 20 μg/L 的叶绿素 a 标准溶液）进行测定。记录初始测量值 c_0，之后每隔 10 min 测定 1 次，连续测定 1h，记录仪器测量值 c_i，按公式（7）计算仪器稳定性：

$$\Delta S=\frac{\left|c_i-c_0\right|_{\max}}{c_0}\times 100\% \qquad (7)$$

式中：

ΔS——仪器稳定性，%；

c_i——每 10min 测得值，μg/L；

c_0——初始测量值，μg/L。

6.4 示值误差

选取叶绿素 a 浓度值在仪器量值测量范围内的水样，分成 2 份，作为仪器的校准标准液。取其中 1 份试样，依据附录 B 中的分光光度法测量试样中的叶绿素 a 浓度值。再取另外 1 份试样，用仪器进行重复测量 3 次，计算出 3 次测量值的平均值。按公式（8）计算仪器示值误差 Δc_{r}。

$$\Delta c_{\mathrm{r}}=\frac{\bar{c}-c_{\mathrm{s}}}{c_{\mathrm{s}}}\times 100\% \qquad (8)$$

式中：

Δc_{r}——示值误差，%；

$\bar{c}$——仪器 3 次测量值的平均值，μg/L；

c_{s}——分光光度法测得的叶绿素 a 浓度值，μg/L。

注：如使用叶绿素 a 有证标准物质，可在仪器常用测量范围内，按照均匀取点的原则设置 5 个标准点配制不同叶绿素 a 浓度的系列标准溶液，如在（0.2～200）μg/L 范围，标准点为 0.2 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、150 μg/L、200 μg/L，分别进行 3 次重复测量，用 3 次测量值的平均值与标准值参考公式（8）计算仪器示值误差。

7 校准结果表达

经校准后的仪器，出具校准证书，校准证书应符合 JJF 1071-2010 中 5.12 的要求，校准原始记录格式参见附录 C，校准证书（内页）格式参见附录 D。

8 复校时间间隔

由于复校时间间隔是由仪器的使用者、使用情况以及仪器本身质量等诸因素所决定的，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。

建议复校时间间隔一般不超过 1 年。如果仪器更换重要部件、维修或对仪器性能有怀疑时，应随时校准。

附录 A

标准溶液配制方法

警告：罗丹明 B 被列入可能致癌/诱导有机体突变的物质，操作过程中必须戴手套。

A.1　罗丹明 B 有证标准物质

相对扩展不确定度不大于 3%（k=2）。

A.2　罗丹明 B 标准溶液的配制

采用仪器说明书中的方法计算校准所需罗丹明 B 标准溶液的浓度（20 ℃下），并依据所用罗丹明 B 标准物质的浓度，配制校准用罗丹明 B 标准溶液。例如，根据某企业说明书，在 20 ℃时 20 μg/L 的叶绿素 a 所对应的罗丹明 B 浓度为 290 μg/L。用 10mL 单标线吸量管准确移取 1 mg/mL 的罗丹明 B 标准物质，置于 1000 mL 单标线容量瓶中，用试验用空白水稀释至刻度，定容并摇匀，得到 1000 mL 浓度为 10 mg/L 的罗丹明 B 储备标准溶液。再用分度吸量管移取 29 mL 罗丹明 B 储备溶液置于 1000mL 单标线容量瓶中，即可配制成 290 μg/L 罗丹明 B 稀释标准溶液。

A.3　罗丹明 B 标准溶液的保存与使用

按上述步骤配制的罗丹明 B 储备标准溶液需在（0～4）℃下避光保存，防止分解。罗丹明 B 稀释标准溶液必须在配制后的 24 h 内使用。

A.4　废液处理

实验室过程中产生的废液，应集中收集，并做好相应的标识，委托有资质的单位处理。

附录 B

叶绿素a参考测定方法（分光光度法）

B.1　方法原理

将一定量样品用滤膜过滤截留藻类，研磨破碎藻类细胞，用丙酮溶液提取叶绿素，离心分离后分别于 750 nm、664 nm、647 nm 和 630 nm 波长处测定提取液吸光度，根据公式计算水中叶绿素 a 的浓度。

B.2　试剂和材料

除非另有说明，分析时均使用符合国家标准的分析纯试剂，实验用水为新制备的去离子水或蒸馏水。

B.2.1 丙酮（CH_3COCH_3）。

B.2.2 碳酸镁（$MgCO_3$）。

B.2.3 丙酮溶液：9+1。 在 900 mL 丙酮（4.1）中加入 100 mL 实验用水。

B.2.4 碳酸镁悬浊液。 称取 1.0 g 碳酸镁（4.2），加入 100 mL 实验用水，搅拌成悬浊液（使用前充分摇匀）。

B.2.5 玻璃纤维滤膜：直径 47 mm，孔径为 0.45 μm～0.7 μm。

B.3　仪器和设备

B.3.1 采样瓶：1 L 或 500 mL 具磨口塞的棕色玻璃瓶。

B.3.2 过滤装置：配真空泵和玻璃砂芯过滤装置。

B.3.3 研磨装置：玻璃研钵或其他组织研磨器。

B.3.4 离心机：相对离心力可达到 1000 ×g（转速 3000 r/min～4000 r/min）。

B.3.5 玻璃刻度离心管：15 mL，旋盖材质不与丙酮反应。

B.3.6 可见分光光度计：配 10 mm 石英比色皿。

B.3.7 针式滤器：0.45 μm 聚四氟乙烯有机相针式滤器。

B.4 样品

B.4.1 样品采集

按照 GB/T 14581、HJ/T 91 和 HJ 494 中的相关规定进行样品的采集。样品的采集一般使用有机玻璃采水器或其他适当的采样器采集水面下 0.5 m 样品，湖泊、水库

根据需要可进行分层采样或混合采样，采样体积为 1 L 或 500 mL。如果样品中含沉降性固体（如泥沙等），应将样品摇匀后倒入 2 L 量筒，避光静置 30 min，取水面下 5 cm 样品，转移至采样瓶（5.1）。在每升样品中加入 1 mL 碳酸镁悬浊液（4.4），以防止酸化引起色素溶解。注：如果水深不足 0.5 m，在水深 1/2 处采集样品，但不得混入水面漂浮物。

B.4.2 样品保存

样品采集后应在 0 ℃～4 ℃避光保存、运输，24 h 内运送至检测实验室过滤（若样品 24 h 内不能送达检测实验室，应现场过滤，滤膜避光冷冻运输），样品滤膜于 -20 ℃避光保存，14 d 内分析完毕。

注：样品采集后，如条件允许，宜尽快分析完毕。

B.4.3 试样的制备

B.4.3.1 过滤

在过滤装置（5.2）上装好玻璃纤维滤膜（4.5）。根据水体的营养状态确定取样体积，见表 1，用量筒量取一定体积的混匀样品，进行过滤，最后用少量蒸馏水冲洗滤器壁。过滤时负压不超过 50 kPa，在样品刚刚完全通过滤膜时结束抽滤，用镊子将滤膜取出，将有样品的一面对折，用滤纸吸干滤膜水分。

注：仅当富营养化水体的样品无法通过玻璃纤维滤膜时，可采用离心法浓缩样品，但转移过程中应保证提取效率，避免叶绿素 a 的损失及水分对丙酮溶液浓度的影响。

表 B.1 参考过滤样品体积

营养状态	富营养	中营养	贫营养
过滤体积（mL）	100～200		500～1000

B.4.3.2 研磨

将样品滤膜放置于研磨装置（5.3）中，加入 3 mL～4 mL 丙酮溶液（4.3），研磨至糊状。补加 3 mL～4 mL 丙酮溶液（4.3），继续研磨，并重复 1～2 次，保证充分研磨 5 min 以上。将完全破碎后的细胞提取液转移至玻璃刻度离心管（5.5）中，用丙酮溶液（4.3）冲洗研钵及研磨杵，一并转入离心管中，定容至 10 mL。

注：叶绿素对光及酸性物质敏感，实验室光线应尽量微弱，能进行分析操作即

可，所有器皿不能用酸浸泡或洗涤。

B.4.3.3 浸泡提取

将离心管中的研磨提取液充分振荡混匀后，用铝箔包好，放置于 4 ℃避光浸泡提取 2h 以上，不超过 24 h。在浸泡过程中要颠倒摇匀 2～3 次。

B.4.3.4 离心

将离心管放入离心机（5.4），以相对离心 1000×g（转速 3000 r/min～4000 r/min）离心 10min。然后用针式滤器（5.7）过滤上清液得到叶绿素 a 的丙酮提取液（试样）待测。

B.4.4 空白试样的制备

用实验用水按照与试样的制备（6.3）相同的步骤进行实验室空白试样的制备。

B.5 分析步骤

B.5.1 试样测定

将试样移至比色皿中，以丙酮溶液（4.3）为参比溶液，于波长 750 nm、664 nm、647 nm、630 nm 处测量吸光度。750 nm 波长处的吸光度应小于 0.005，否则需重新用针式滤器（5.7）过滤后测定。

B.5.2 空白试验

按照与试样测定（7.1）相同的步骤进行实验室空白试样（6.4）的测定。

B.6 结果计算

试样中叶绿素 a 的质量浓度（mg/L），按照公式（B.1）进行计算：

$$\rho_1 = 11.85 \times \left(A_{664} - A_{750}\right) - 1.54 \times \left(A_{647} - A_{750}\right) - 0.08 \times \left(A_{630} - A_{750}\right) \qquad \text{（B.1）}$$

式中：ρ_1——试样中叶绿素 a 的质量浓度，mg/L；

A_{664}——试样在 664 nm 波长下的吸光度值；

A_{647}——试样在 647 nm 波长下的吸光度值；

A_{630}——试样在 630 nm 波长下的吸光度值；

A_{750}——试样在 750 nm 波长下的吸光度值。

样品中叶绿素 a 的质量浓度（μg/L），按照公式（B.2）进行计算：

$$\rho = \frac{\rho_1 \cdot V_1}{V} \qquad \text{（B.2）}$$

式中：ρ——样品中叶绿素 a 的质量浓度，μg/L；

ρ_1——试样中叶绿素 a 的质量浓度，mg/L；

V_1——试样的定容体积，mL；

V——取样体积，L。

附录 C

叶绿素a测定仪校准记录参考格式

仪器名称		证书编号	
单位名称		制造厂家	
规格型号		出厂编号	
测量范围		校准依据	
校准日期		校准地点	
环境温度		相对湿度	
校准人员		核验人员	

1. 线性误差

叶绿素 a 标准浓度值（μg/L）	罗丹明 B 标准浓度值（μg/L）	仪器测量值（μg/L）				线性方程计算罗丹明 B 浓度值（μg/L）	线性误差（%）	扩展不确定度 U（k=2）（%）
		1	2	3	平均值			
							/	/
截距					斜率			

2. 重复性

标准值（μg/L）	测量值（μg/L）								重复性（%）
	1	2	3	4	5	6	7	平均值	
20									

3. 稳定性

标准值（μg/L）	20							稳定性（%）
测量时间（min）	0	10	20	30	40	50	60	
测量值（μg/L）								

4. 示值误差

4.1 罗丹明 B 标准物质法：

不同波长下的吸光度值		分光光度法测量值（μg/L）	仪器测量值（μg/L）		示值误差（%）
A_{664}			1		
A_{647}			2		
A_{630}			3		
A_{750}			平均值		

4.2 叶绿素 a 标准物质法：

叶绿素 a（μg/L）	仪器测量值（μg/L）		示值误差（%）
	1		
	2		
	3		
	平均值		

附录 D

叶绿素 a 测定仪校准证书内页参考格式

1. 测量范围：_____

2. 线性误差：

扩展不确定度 U（k=2）：

3. 重复性：

4. 稳定性：

5. 示值误差：

5.1 罗丹明 B 标准物质法：

分光光度法测量值（μg/L）	仪器测量值（μg/L）	示值误差（%）

5.2 叶绿素 a 标准物质法：

叶绿素 a 标准值（μg/L）	仪器测量值（μg/L）	示值误差（%）

附录 E

叶绿素 a 测定仪线性误差测量不确定度评定示例

E.1　概述

E.1.1　被校对象：叶绿素 a 测定仪。

E.1.2　标准物质和校准设备

E.1.2.1　标准物质：罗丹明 B 有证标准物质。

E.1.2.2　校准设备：温度计、吸量管、容量瓶。

E.1.3　校准方法：在仪器常用测量范围（0.2～200）μg/L 内，按照均匀取点的原则设置 0.2 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、150 μg/L、200 μg/L 等 5 个叶绿素 a 标准浓度点，配制罗丹明 B 系列标准溶液。分别进行 3 次重复测量，用最小二乘法拟合罗丹明 B 标准溶液的浓度值和仪器的叶绿素 a 浓度示值平均值绘制标准曲线得到仪器的线性方程，按照方程计算出的罗丹明 B 浓度值与罗丹明 B 标准溶液浓度值进行比较（不包含最低浓度值），得到线性误差。

E.1.4　校准环境条件：

环境温度：5℃～40℃。

电源电压及频率：AC (220±22) V，(50±0.5) Hz。

E.2　测量模型

$$\Delta x_i = \frac{x_i - x_{si}}{x_{si}} \times 100\%$$

式中：

x_i——第 i 点线性方程计算的罗丹明 B 浓度值，μg/L；

x_{si}——第 i 点罗丹明 B 标准溶液的浓度值，μg/L；

Δx_i——第 i 点的线性误差，%。

E.3　不确定度传播率

各不确定度分量彼此独立且不相关，

$$[u_c(\Delta x_i)]^2 = c^2(x_i)u^2(x_i) + c^2(x_{si})u^2(x_{si})$$

式中：

$$c(x_i)=\frac{1}{x_{si}}，\ c(x_{si})=-\frac{x_i}{x_{si}^2}$$

E.4　标准不确定度分量评定

E.4.1　线性方程计算的罗丹明 B 浓度值引入的不确定度分量$u(x_i)$

对 5 个浓度的罗丹明 B 系列标准溶液各测量 3 次（n=3），共计 15 次（N=15），测得的叶绿素 a 浓度示值及线性计算数据见表 E.1。

表 E.1 罗丹明 B 系列标准溶液的线性测量结果

叶绿素 a 标准浓度值（μg/L）	罗丹明 B 标准浓度值（μg/L）	仪器测量值（μg/L）				线性方程计算罗丹明 B 浓度值（μg/L）	线性误差（%）
		1	2	3	平均值		
0.2	3	0.22	0.21	0.17	0.20	/	/
50	715	52.02	52.03	51.98	52.01	717.09	+0.29
100	1430	103.43	103.49	103.43	103.45	1427.59	-0.17
150	2140	155.65	155.73	155.63	155.67	2148.86	+0.41
200	2860	206.94	206.90	207.04	206.96	2857.29	-0.09
截距		0.0925		斜率		0.0724	

得到拟合直线的线性方程为：

$$y=a+bx=0.0925+0.0724x$$

拟合直线的残余标准偏差为：

$$s_{y/x}=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}\left(y_i-(a+bx_{si})\right)}{N-2}}=0.3407\text{μg/L}$$

罗丹明 B 标准浓度值的平均值为：$\overline{x_{si}}=1429.60\text{μg/L}$

以 50μg/L 的叶绿素 a 浓度点为例，线性方程计算的罗丹明 B 浓度值为：$x_i=717.09\text{μg/L}$，线性误差为：$\Delta x_i=+0.29\%$。

则线性方程计算的罗丹明 B 浓度值引入的不确定度分量为：

$$u(x_i)=\frac{s_{y/x}}{b}\sqrt{\frac{1}{n}+\frac{1}{N}+\frac{\left(x_i-\overline{x_{si}}\right)^2}{\sum_{i=1}^{N}\left(x_{si}-\overline{x_{si}}\right)^2}}=\frac{0.3407}{0.0724}\sqrt{\frac{1}{3}+\frac{1}{15}+\frac{(717.09-1429.60)^2}{15289659.6}}\text{μg/L}=3.0472\text{μg/L}$$

E.4.2　由标准物质引入的不确定度分量$u(c_s)$

E.4.2.1　有证标准物质本身引入的不确定度分量$u_{\mathrm{rel}}(c_{\mathrm{s}})_1$

由有证标准物质的证书可知，罗丹明 B 的浓度为 1.003mg/mL，$U_{\mathrm{rel}}=3\%(k=2)$。则由标准物质引入的相对不确定度为：

$$u_{\mathrm{rel}}(c_{\mathrm{s}})_1=\frac{U_{\mathrm{rel}}}{k}=\frac{3\%}{2}=1.5\%$$

E.4.2.2　标准物质稀释过程引入的不确定度分量$u_{\mathrm{rel}}(c_{\mathrm{s}})_2$

稀释过程引入的不确定度来源主要考虑吸量管和单标线容量瓶体积校准的不确定度和温度对体积的影响。

依据仪器说明书，以配制对应叶绿素 a 浓度为 50μg/L 的罗丹明 B 标准溶液为例，需经两次稀释，第一次稀释用到 10mL 单标线吸量管和 1000mL 单标线容量瓶，第二次稀释需要 50mL 分度吸量管（吸取 36mL）和 500mL 单标线容量瓶。

a）玻璃量器体积校准引入的不确定度分量

10mL 单标线吸量管的最大允许误差为±0.020mL，1000mL 单标线容量瓶的最大允许误差为±0.40mL，50mL 分度吸量管（吸取 36mL）的最大允许误差为±0.10mL，500mL 单标线容量瓶的最大允许误差为±0.25mL。可以认为均匀分布，则由吸量管或单标线容量瓶体积校准引入的相对标准不确定度为：

$$u_{1\mathrm{rel}}=\frac{0.020}{10\times\sqrt{3}}\times100\%=0.12\%$$

$$u_{2\mathrm{rel}}=\frac{0.40}{1000\times\sqrt{3}}\times100\%=0.023\%$$

$$u_{3\mathrm{rel}}=\frac{0.10}{36\times\sqrt{3}}\times100\%=0.16\%$$

$$u_{4\mathrm{rel}}=\frac{0.25}{500\times\sqrt{3}}\times100\%=0.029\%$$

b）稀释过程中温度变化引入的不确定度分量

在移液及定容过程中由于实验室温度在（20±2）℃之间变动，引入的不确定度通过温度变化范围与体积膨胀系数确定，水的体积膨胀系数为 2.1×10^{-4} ℃$^{-1}$，因此产生的体积变化率为±（$2\times2.1\times10^{-4}$），引入的相对标准不确定度为$u_{5\mathrm{rel}}$=0.024%。

因此，叶绿素 a 浓度为 50μg/L 时：

$$u_{\mathrm{rel}}(c_{\mathrm{s}})_2=\sqrt{u_{1\mathrm{rel}}^2+u_{2\mathrm{rel}}^2+u_{3\mathrm{rel}}^2+u_{4\mathrm{rel}}^2+u_{5\mathrm{rel}}^2}$$

$$=\sqrt{(0.12\%)^2+(0.023\%)^2+(0.16\%)^2+(0.029\%)^2+(0.024\%)^2}=0.20\%$$

$$u(c_{\mathrm{s}})=u_{\mathrm{rel}}(c_{\mathrm{s}})\times c_s=\sqrt{u_{\mathrm{rel}}^2(c_{\mathrm{s}})_1+u_{\mathrm{rel}}^2(c_{\mathrm{s}})_2}\times c_s$$

$$=\sqrt{(1.5\%)^2+(0.20\%)^2}\times 715\mu\mathrm{g/L}=10.8223\mu\mathrm{g/L}$$

E.5　合成标准不确定度

以上各不确定度分量彼此独立且不相关，则合成标准不确定度为：

叶绿素 a 浓度为 50 μg/L 时：

$$c\left(x_i\right)=\frac{1}{x_{si}}=\frac{1}{715\mu\mathrm{g/L}}=0.001399(\mu\mathrm{g/L})^{-1},$$

$$c\left(x_{si}\right)=-\frac{x_i}{x_{si}^2}=-\frac{717.09\mu\mathrm{g/L}}{(715\mu\mathrm{g/L})^2}=-0.001403(\mu\mathrm{g/L})^{-1}$$

$$u_{\mathrm{c}}(\Delta x_i)=\sqrt{c^2(x_i)u^2(x_i)+c^2(x_{si})u^2(x_{si})}$$

$$=\sqrt{\left[0.001399(\mu\mathrm{g/L})^{-1}\right]^2\times(3.0472\mu\mathrm{g/L})^2+\left[-0.001403(\mu\mathrm{g/L})^{-1}\right]^2\times(10.8223\mu\mathrm{g/L})^2}=1.6\%$$

同理，叶绿素 a 浓度为 100μg/L 时：$u_{\mathrm{c}}(\Delta x_i)=1.6\%$

叶绿素 a 浓度为 150μg/L 时：$u_{\mathrm{c}}(\Delta x_i)=1.5\%$

叶绿素 a 浓度为 200μg/L 时：$u_{\mathrm{c}}(\Delta x_i)=1.5\%$

E.6　扩展不确定度

扩展不确定度为：

叶绿素 a 浓度为 50μg/L 时：$U=ku_{\mathrm{c}}(\Delta x_i)=2\times1.6\%=3.2\%$（$k$=2）

叶绿素 a 浓度为 100μg/L 时：$U=ku_{\mathrm{c}}(\Delta x_i)=2\times1.6\%=3.2\%$（$k$=2）

叶绿素 a 浓度为 150μg/L 时：$U=ku_{\mathrm{c}}(\Delta x_i)=2\times1.5\%=3.0\%$（$k$=2）

叶绿素 a 浓度为 200μg/L 时：$U=ku_{\mathrm{c}}(\Delta x_i)=2\times1.5\%=3.0\%$（$k$=2）