

《荧光法叶绿素 a 测定仪校准规范》

不确定度评定报告（线性误差）

1 概述

1.1 被校对象：荧光法叶绿素 a 测定仪。

1.2 标准物质和校准设备

1.2.1 标准物质：罗丹明 B 有证标准物质。

1.2.2 校准设备：温度计、吸量管、容量瓶。

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。

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。

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，%。

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：

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

4 标准不确定度分量评定

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 D.1。

表 D.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 ($\mu\text{g/L}$)	罗丹明 B 标准浓度值 ($\mu\text{g/L}$)	仪器测量值 ($\mu\text{g/L}$)				线性方程计算 罗丹明 B 浓度值 ($\mu\text{g/L}$)	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：

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

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

以 $50 \mu\text{g/L}$ 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：

$x_i = 717.09 \mu\text{g/L}$ ，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：

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

4.2 由标准物质引入的不确定度分量 $u(c_s)$

4.2.1 有证标准物质本身引入的不确定度分量 $u_{\text{rel}}(c_s)_1$

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

$$u_{\text{rel}}(c_s)_1 = \frac{U_{\text{rel}}}{k} = \frac{3\%}{2} = 1.5\%$$

4.2.2 标准物质稀释过程引入的不确定度分量 $u_{\text{rel}}(c_s)_2$

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 50 $\mu\text{g/L}$ 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 $\pm 0.020\text{mL}$ ，1000mL 单标线容量瓶的最大允许误差为 $\pm 0.40\text{mL}$ ，50mL 分度吸量管（吸取 36mL）的最大允许误差为 $\pm 0.10\text{mL}$ ，500mL 单标线容量瓶的最大允许误差为 $\pm 0.25\text{mL}$ 。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：

$$u_{1\text{rel}} = \frac{0.020}{10 \times \sqrt{3}} \times 100\% = 0.12\%$$

$$u_{2\text{rel}} = \frac{0.40}{1000 \times \sqrt{3}} \times 100\% = 0.023\%$$

$$u_{3\text{rel}} = \frac{0.10}{36 \times \sqrt{3}} \times 100\% = 0.16\%$$

$$u_{4\text{rel}} = \frac{0.25}{500 \times \sqrt{3}} \times 100\% = 0.029\%$$

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 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 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 $2.1 \times 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ，因此产生的体积变化率为 $\pm (2 \times 2.1 \times 10^{-4})$ ，引入的相对标准不确定度为

$$u_{5\text{rel}}=0.024\%。$$

因此，叶绿素 a 浓度为 50μg/L 时：

$$\begin{aligned} u_{\text{rel}}(c_s)_2 &= \sqrt{u_{1\text{rel}}^2 + u_{2\text{rel}}^2 + u_{3\text{rel}}^2 + u_{4\text{rel}}^2 + u_{5\text{rel}}^2} \\ &= \sqrt{(0.12\%)^2 + (0.023\%)^2 + (0.16\%)^2 + (0.029\%)^2 + (0.024\%)^2} = 0.20\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} u(c_s) &= u_{\text{rel}}(c_s) \times c_s = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(c_s)_1 + u_{\text{rel}}^2(c_s)_2} \times c_s \\ &= \sqrt{(1.5\%)^2 + (0.20\%)^2} \times 715\mu\text{g/L} = 10.8223\mu\text{g/L} \end{aligned}$$

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：

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

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

$$\begin{aligned} u_c(\Delta x_i) &= \sqrt{c^2(x_i)u^2(x_i) + c^2(x_{si})u^2(x_{si})} \\ &= \sqrt{\left[0.001399(\mu\text{g/L})^{-1}\right]^2 \times (3.0472\mu\text{g/L})^2 + \left[-0.001403(\mu\text{g/L})^{-1}\right]^2 \times (10.8223\mu\text{g/L})^2} = 1.6\% \end{aligned}$$

同理，叶绿素 a 浓度为 100μg/L 时： $u_c(\Delta x_i) = 1.6\%$

叶绿素 a 浓度为 150μg/L 时： $u_c(\Delta x_i) = 1.5\%$

叶绿素 a 浓度为 200μg/L 时： $u_c(\Delta x_i) = 1.5\%$

6 扩展不确定度

扩展不确定度为：

叶绿素 a 浓度为 50μg/L 时： $U = ku_c(\Delta x_i) = 2 \times 1.6\% = 3.2\%$ （ $k=2$ ）

叶绿素 a 浓度为 100μg/L 时： $U = ku_c(\Delta x_i) = 2 \times 1.6\% = 3.2\%$ （ $k=2$ ）

叶绿素 a 浓度为 150μg/L 时： $U = ku_c(\Delta x_i) = 2 \times 1.5\% = 3.0\%$ （ $k=2$ ）

叶绿素 a 浓度为 200μg/L 时： $U = ku_c(\Delta x_i) = 2 \times 1.5\% = 3.0\%$ （ $k=2$ ）