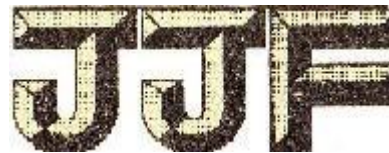


JJF xxxx—xxxx



中华人民共和国国家计量校准规范

JJF xxxx—xxxx

水质毒性分析仪校准规范

Calibration Specification for Water Quality Toxicity Analyzers

(征求意见稿)

xxxx - xx - xx 发布

xxxx - xx - xx 实施

国家市场监督管理总局发布

水质毒性分析仪校准规范
Calibration Specification for Water Quality
Toxicity Analyzers

JJF xxxx—xxxx

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

参加起草单位：重庆市计量质量检测研究院

南京市计量监督检测院

湖南省计量检测研究院

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:

傅博强（中国计量科学研究院）

唐治玉（中国计量科学研究院）

参加起草人:

彭建春（重庆市计量质量检测研究院）

燕茹（南京市计量监督检测院）

李曼莉（中国计量科学研究院）

任昀（湖南省计量检测研究院）

目 录

引言

《水质毒性分析仪校准规范》主要参考了ISO 11348-3:2007 水质—水样对费氏弧菌发光抑制效果的测定(发光细菌试验). 第3部分: 使用冻干细菌的方法(ISO 11348-3:2007 Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria), 完成本规范的制定。

本规范为首次发布。

水质毒性分析仪校准规范

1 范围

本规范适用于便携式和台式水质毒性分析仪的校准。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

ISO 11348-3:2007 Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria

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（包括所有的修订单）适用于本规范。

3 术语和计量单位

3.1 有效浓度 effective concentration, 缩写为 EC [ISO 11348-3:2007]

能够对发光细菌发光产生抑制的水中毒性物质的有效浓度。

注：EC₅₀，半数最大有效浓度 half maximal effective concentration，是能引起50%最大抑制效应的水中毒性物质的浓度。

3.2 相对光单位 relative light unit, 缩写为 RLU

荧光素和荧光素酶将三磷酸腺苷（Adenosine Triphosphate, ATP）水解为一磷酸腺苷（Adenosine Monophosphate, AMP）和焦磷酸盐，或发光细菌生物发光，释放的光量子的相对测量值。

注：非SI单位，不同的检测仪对于同样的样品可能会产生不同的RLU读数。

4 概述

水质毒性分析仪（以下简称仪器）可分为便携式和台式，由检测仓、控制面板、光电探测器、数据采集信号处理系统等组成，台式仪器还配有菌液存储单元（温度控制在4-6℃），混合培养模块（15℃），读数模块（温度控制在15℃）。仪器基于国际标准ISO11348和国家标准GB/T 15441方法，采用非致病性的发光细菌如费氏弧菌、青海弧菌或明亮发光杆菌作为指示生物，以其发光强度的变化为指标，根据菌种对水体的响应获取水质综合毒性数据。凡干扰或损害发光细菌呼吸或生理过程的任何因素都能使细菌发光强度发生变化，并随着毒物浓度的增加而发光减弱。通过检测发光强度的变化，可判断待测水

样的毒性强弱。检测模式一般有毒性抑制率模式和发光强度直读模式（ATP模式）。

5 计量特性

5.1 背景噪声值

5.2 发光强度测量重复性

5.3 浓度测量线性相关系数

5.4 浓度测量相对示值误差

5.5 孔温度示值误差

5.6 孔温度稳定性

5.7 培养孔孔间温度差异

6 校准条件

6.1 环境条件

环境温度：（10~28）℃。

相对湿度：≤80%。

6.2 测量标准及试剂、仪器

6.2.1 数字温度计：采用热电偶测温探头，探头长度不超过20 mm，最大允许误差为±0.2℃，测量范围满足（0.0~50.0）℃。

6.2.2 微弱光发光管，经检定合格。

6.2.3 冷冻干燥的发光细菌，-20℃，避光保存，临用前复溶，即刻使用。

6.2.4 氯化钠，NaCl，分析纯。

6.2.5 氯化钠溶液，将20 g氯化钠（6.2.4）溶于1 L超纯水中，用于水样稀释。

6.2.6 六水合氯化镁，MgCl₂·6H₂O，分析纯。

6.2.7 氯化钾，KCl，分析纯。

6.2.8 冷冻干燥发光细菌稀释溶液，将20 g 氯化钠(6.2.4)，2.035 g 六水合氯化镁(6.2.6)，0.30 g 氯化钾（6.2.7）溶于1 L超纯水中，分装后储存于（-18~-20）℃，用于冷冻干燥发光细菌储备液的稀释。

6.2.9 七水合硫酸锌标准物质，ZnSO₄·7H₂O，纯度≥99%。

6.2.10 七水合硫酸锌标准储备溶液，将19.34 mg 七水合硫酸锌（6.2.9）溶于100 mL氯化钠溶液中（6.2.5），浓度为193.4 mg/L。

6.2.11 容量瓶，100 mL，经检定合格。

6.2.12 移液器：（1~10）μL，（20~200）μL，（100~1000）μL各1支，经检定合格。

6.2.13 仪器专用玻璃检测管

6.2.14 电子天平：分度值0.01mg，经检定合格。

6.2.15 计时器

7 校准项目和校准方法

7.1 背景噪声值

将空的仪器专用玻璃检测管（6.2.13）放入仪器的检测仓中，调节到发光强度直读模式（ATP 模式），测量仪器的 RLU 示值，连续读取 10 次，得到仪器背景值。按式（1）计算，背景值的平均值加上其 3 倍标准偏差 s ，作为仪器的背景噪声值 N 。

按式（1）计算背景噪声值：

$$N = \bar{B} + 3s = \bar{B} + 3\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (B_i - \bar{B})^2}{n-1}} \quad (1)$$

式中： N ——仪器的背景噪声值，RLU；

\bar{B} ——10 次测定的背景值的算术平均值，RLU；

s ——10 次测定的背景值的标准偏差，RLU；

B_i ——第 i 次测定的背景值，RLU；

n ——测定次数。

7.2 发光强度测量重复性

将微弱光发光管（6.2.2）放入仪器的检测仓中，调节到发光强度直读模式（ATP 模式），测量仪器的 RLU 示值，重复测定 10 次。以 10 次实验结果的相对标准偏差（ RSD 值）表示仪器发光强度测量的重复性。按式（2）计算 RSD 值：

$$RSD = \frac{1}{\bar{R}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_i - \bar{R})^2}{n-1}} \times 100 \% \quad (2)$$

式中： RSD ——重复性（相对标准偏差），%；

R_i ——第 i 次测量的结果，RLU；

\bar{R} —— n 次测量结果的平均值，RLU；

n ——测量次数，次。

7.3 浓度测量线性相关系数

按附录 A 制备发光细菌测试菌悬液，按附录 B 制备七水合硫酸锌系列标准工作溶液，浓度约为 19.34 mg/L、9.67 mg/L、4.835 mg/L、2.4175 mg/L、1.208mg/L 的七水合硫酸锌标准工作溶液，临用前配制。

发光细菌测试菌悬液放在 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，孵育 15min 后，按仪器操作指南，用仪器测定菌悬液加入样品前的发光强度 I_0 。

将 5 种浓度的七水合硫酸锌标准工作溶液和 20g/L 氯化钠对照溶液 (6.2.5) 分别与保存在 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的发光细菌测试悬液混合，放在 $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，孵育 15min 后，按仪器操作指南，用仪器测定发光强度 I_t 或抑制效果，每个浓度测定 1 次。用计时器 (6.2.15) 记录不同管之间测定的时间间隔，精确控制在 5s-20s。

根据仪器显示的发光抑制率 H_t ，计算平均值，为了评估浓度-效应关系，使用公式 (3) 计算每个浓度水平的 gamma 值：

$$\Gamma_t = [\bar{H}_t / (100 - \bar{H}_t)] \quad (3)$$

式中：

Γ_t -样品反应 15min 后的 gamma 值；

\bar{H}_t -抑制率的平均值；

以硫酸锌标准工作溶液浓度的对数值 ($\lg c_t$) 为 y 轴，硫酸锌标准工作溶液抑制效果的 gamma 值的对数值 ($\lg \Gamma_t$) 为 x 轴，绘制校准曲线，进行线性拟合，得到校准方程。

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a \quad (4)$$

式中：

$\lg c_t$ -样品浓度的对数值，mg/L；

$\lg \Gamma_t$ -样品反应 15min 后的 gamma 值的对数值；

b -方程斜率。

$\lg a$ -方程的截距。

按式 (5) 计算相关系数 r ，取 $r \geq 0.995$ 的浓度范围作为线性范围。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (\lg \Gamma_{ti} - \overline{\lg \Gamma_t})(\lg c_{ti} - \overline{\lg c_t})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (\lg \Gamma_{ti} - \overline{\lg \Gamma_t})^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n (\lg c_{ti} - \overline{\lg c_t})^2}} \quad (5)$$

式中： r ——线性相关系数；

$\lg \Gamma_{ti}$ ——第 i 个浓度点的 γ 值的对数值；

$\overline{\lg \Gamma_t}$ ——用于计算线性范围的所有浓度点的 γ 值的对数值的平均值；

$\lg c_{ti}$ ——第 i 个浓度点的样品浓度的对数值；

$\overline{\lg c_t}$ ——用于计算线性范围的所有浓度点的浓度值的对数值的平均值；

n ——用于计算线性范围的测量点的个数。

7.4 浓度测量相对示值误差

配制浓度为 5.5 mg/L 的七水合硫酸锌溶液，与发光细菌混合，测定抑制效果，平行测定 5 次，记录仪器显示的发光抑制率 H_i ，计算平均值，按公式（3）换算为抑制效果的 γ 值 Γ_i ，代入 7.3 中得到的校准方程中，计算得到此七水合硫酸锌溶液浓度的测定值。

按式（6）计算浓度测量相对示值误差：

$$\Delta \chi_i = \frac{c_i - c_{si}}{c_{si}} \times 100\% \quad (6)$$

式中： $\Delta \chi_i$ ——浓度测量的相对示值误差，%；

c_i ——按照校准方程计算得到的浓度的测定值，mg/L；

c_{si} ——浓度的配制值，mg/L。

对于配有菌液存储单元（温度控制在 4-6℃），混合培养模块（15℃），读数模块（温度控制在 15℃）的台式仪器，还需要依据 7.5、7.6 和 7.7 对温控系统进行校准。

7.5 孔温度示值误差

根据仪器要求，设定仪器菌液存储孔（一般 5.0℃），培养孔（一般 15℃），读数孔（一般 15℃）的温度，进入恒温状态后，在菌液存储孔、读数孔和任一个培养孔，各插入一个装有 1.0 mL 氯化钠溶液（6.2.2）的仪器专用玻璃检测管（6.2.13），分别将数字温度计的温度探头插入检测管中，稳定 5 min 后，每隔 5 min 记录 1 次数字温度计

的示值，持续记录 30 min。将数字温度计的 7 次测量的平均值作为温度标准值，与仪器的温度设定值之差作为温度示值误差。

按式（7）计算温度示值误差：

$$\Delta T = T_i - \bar{T}_{si} \quad (7)$$

式中： ΔT ——温度示值误差， $^{\circ}\text{C}$ ；

T_i ——仪器的温度设定值， $^{\circ}\text{C}$ ；

\bar{T}_{si} ——数字温度计测得的温度标准值的算术平均值， $^{\circ}\text{C}$ 。

孔温度示值误差的不确定度评定实例见附录 C。

7.6 孔温度稳定性

对仪器的菌液存储孔、培养孔、读数孔，根据 7.5 的测量结果，将每种孔的 7 次温度测量结果的标准偏差（ SD 值）表示仪器的菌液存储孔、培养孔、读数孔的孔温度稳定性。按式（8）计算 SD 值：

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (T_{si} - \bar{T}_{si})^2}{n - 1}} \quad (8)$$

式中： SD ——稳定性（标准偏差）， $^{\circ}\text{C}$ ；

T_{si} ——第 i 次孔温度测量的结果， $^{\circ}\text{C}$ ；

\bar{T}_{si} ——数字温度计测得的温度标准值的算术平均值， $^{\circ}\text{C}$ ；

n ——测量次数，次。

7.7 培养孔孔间温度差异

根据仪器要求，设定仪器培养孔（一般 15°C ）的温度，进入恒温状态后，选取具有代表性的培养孔位置（例如培养模块的中心孔和四周任意选取四个孔位），每个孔中插入一个装有 1.0 mL 氯化钠溶液（6.2.2）的仪器专用玻璃检测管（6.2.13），待稳定 5 min 后，读取数字温度计测量结果 T_{si} 。

培养孔孔间温度差异 R_{si} 按式（9）计算：

$$R_{si} = T_{si \max} - T_{si \min} \quad (9)$$

式中： R_{si} ——孔间温度差异， $^{\circ}\text{C}$ ；

$T_{si \max}$ ——所选取的样品孔中的温度标准值的最大值， $^{\circ}\text{C}$ ；

$T_{si\ min}$ ——所选取的样品孔中的温度标准值的最小值，°C。

校准原始记录格式见附录 D。

8 校准结果表达

经校准的水质毒性分析仪，出具校准证书，校准证书应符合 JJF1071-2010 中 5.12 的要求，推荐的校准证书（内页）格式内容见附录 E。

9 复校时间间隔

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。复校时间间隔建议不超过一年。

附录 A

发光细菌测试菌悬液的配制

A.1 制备储备菌悬液

将发光细菌冻干粉从-20℃取出，根据发光细菌冻干粉使用说明书，加入（4±3）℃的一定体积的复苏液进行复溶。

复苏液要一次全部加入，以减少在水合过程中对细胞的损伤。加复苏液要快速，避免菌结团或活性损失。

复溶后的菌悬液做为储备液，保存于（4±3）℃条件下。临用前只能反复冻融 1 次。

A.2 制备测试菌悬液

A.2.1 准备

储备菌悬液（A.1）取出后，放置在（15±1）℃至少 10min，准备进行稀释。

A.2.2 稀释

取储备菌悬液，根据水质毒性分析仪的响应范围，用冷冻干燥发光细菌稀释溶液（6.2.8）进行适当稀释。如对约 10^8 cells/mL 的储备菌悬液（A.1），取 10 μL 加入到保存在（4±3）℃的 500 μL 冷冻干燥发光细菌稀释溶液（6.2.8）中，用手晃动混匀，得到测试菌悬液。

取 100 μL 测试菌悬液，加入到仪器专用玻璃检测管（6.2.13）中，保存在（15±1）℃的培养孔中待测。

附录 B

七水合硫酸锌系列标准工作溶液的配制

B.1、试剂与材料

B.1.1 七水合硫酸锌， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，纯度 $\geq 99\%$ ，分析纯。

B.1.2 氯化钠溶液，将 20 g 氯化钠（分析纯）溶于 1 L 超纯水中，用于硫酸锌溶液稀释。

B.1.3 容量瓶，1 L，经检定合格。

B.1.4 离心管，15 mL。

B.1.5 移液器：（1~10） μL ，（20~200） μL ，（100~1000） μL ，5 mL 各 1 支，经检定合格。

B.2、仪器

B.2.1 电子天平：分度值 0.1 mg，经检定合格。

B.3、七水合硫酸锌系列标准工作溶液的配制

精确称取七水合硫酸锌 19.34 mg（精确到 0.1 mg），置于 100 mL 容量瓶中，加氯化钠溶液（B.1.2）溶解定容。混匀，得到硫酸锌标准母液，七水合硫酸锌浓度为 193.4 mg/L。

取 150 μL 七水合硫酸锌标准母液，置于 2 mL 离心管中，加氯化钠溶液（B.1.2）1.35 mL 混匀，得到硫酸锌标准工作液 1，七水合硫酸锌浓度为 19.34 mg/L。

取 1 mL 硫酸锌标准工作液 1，置于 2 mL 离心管中，加氯化钠溶液（B.1.2）1 mL 混匀，得到硫酸锌标准工作液 2，七水合硫酸锌浓度为 9.67 mg/L。

取 1 mL 硫酸锌标准工作液 2，置于 2 mL 离心管中，加氯化钠溶液（B.1.2）1 mL 混匀，得到硫酸锌标准工作液 3，七水合硫酸锌浓度为 4.835 mg/L。

取 1 mL 硫酸锌标准工作液 3，置于 2 mL 离心管中，加氯化钠溶液（B.1.2）1 mL 混匀，得到硫酸锌标准工作液 4，七水合硫酸锌浓度为 2.4175 mg/L。

取 1 mL 硫酸锌标准工作液 4，置于 2 mL 离心管中，加氯化钠溶液（B.1.2）1 mL 混匀，得到硫酸锌标准工作液 5，七水合硫酸锌浓度为 1.2087 mg/L。

按照上面的稀释方法，依次得到系列硫酸锌标准工作液，七水合硫酸锌浓度依次为 9.67 mg/L、4.835 mg/L、2.4175 mg/L、1.2087 mg/L。

附录 C

孔温度示值误差测量结果的不确定度评定示例

C.1、数学模型

$$\Delta T = T_i - \bar{T}_{si}$$

式中： ΔT ——温度示值误差，℃；

T_i ——仪器的温度示值，℃；

\bar{T}_{si} ——数字温度计测得的温度标准值的算术平均值，℃。

C.2、不确定度来源

(1) 测量重复性引入的不确定度。

(2) 数字温度计引入的不确定度。

C.3、不确定度分量的计算

C.3.1 重复性引入的不确定度 $u_1(\bar{T}_{si})$

表C.1 培养孔7次温度测量结果

No.	1	2	3	4	5	6	7	标准偏差
T_{si} (°C)	15.2	15.2	15.3	15.3	15.2	15.5	15.4	0.12

计算7次温度测量结果平均值的标准偏差 s ，根据表C.1测量结果，

$$u_1(\bar{T}_{si}) = s / \sqrt{7} = 0.044^\circ\text{C}$$

C.3.2 数字温度计引入的不确定度。

由数字温度计校准证书得到， $u_2(T_s) = u_c / k = 0.050^\circ\text{C}$

C.4、标准不确定度分量一览表

温度示值误差测量结果的标准不确定度分量见表 C.2。

表 C.2 标准不确定度分量一览表

标准不确定度分量 (u_i)	来源	标准不确定度/°C
$u_1(\bar{T}_{si})$	重复性	0.044
$u_2(T_s)$	数字温度计	0.050

C.5、合成不确定度

$$u(\Delta T) = \sqrt{u_1^2(\bar{T}_{si}) + u_2^2(T_s)} = 0.067^\circ\text{C}$$

C.6、扩展不确定度

取包含因子 $k=2$ ，则仪器温度示值误差的扩展不确定度为：

$$U = 2u(\Delta T) = 0.2^\circ\text{C}$$

附录 D

校准原始记录格式

(推荐性表格)

送校单位: 校准日期: 年 月 日

仪器名称: 制造厂:

型号: 出厂编号:

委托单号: 证书编号:

校准地点:

环境温度: °C 相对湿度: %

表D.1 背景噪声值

次数 n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
背景值 $B_i(\text{RLU})$										
背景值 平均值 $\bar{B}(\text{RLU})$										
标准偏 差 s (RLU)										
背景噪 声值 N (RLU)										

表D.2 发光强度的测量重复性

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
仪器示值 $R_i(\text{RLU})$										

RSD (%)	
---------	--

表D.3 浓度测量的线性相关系数

硫酸锌标准工作溶液浓度 (mg/L)	硫酸锌标准工作溶液浓度对数值 (lg c_t)	样品反应 15min 后的抑制率 H_t (%)	样品反应 15min 后的 gamma 值 (Γ_t)	lg Γ_t	校准曲线的校准方程	相关系数 r
19.34						
9.67						
4.835						
2.4175						
1.2087						

表D.4 浓度测量的相对示值误差

发光抑制率 H_t (%)	发光抑制率的平均值 (%)	七水合硫酸锌溶液浓度的配制值 c_{si} (mg/L)	方程计算所得的七水合硫酸锌溶液浓度的测定值 c_i (mg/L)	相对示值误差 $\Delta \chi_i$ (%)

表D.5 菌液存储孔孔温度示值误差和温度稳定性

时间/min	0	5	10	15	20	25	30
温度/°C							
平均值 \bar{T}_{s_i} /°C							
设定值 T_i /°C							
示值误差/°C							
标准偏差/°C							

表D.6 培养孔孔温度示值误差和温度稳定性

时间/min	0	5	10	15	20	25	30
温度/°C							
平均值 \bar{T}_{s_i} /°C							
设定值 T_i /°C							
示值误差/°C							
标准偏差/°C							

表D.7 培养孔孔间温度差异

任意 5 个孔温度/°C					$T_{s_i \max}$ /°C	$T_{s_i \min}$ /°C	R_{s_i} ($T_{s_i \max} - T_{s_i \min}$) /°C

表D.8 读数孔孔温度示值误差和温度稳定性

时间/min	0	5	10	15	20	25	30
温度/°C							
平均值 \bar{T}_{s_i} /°C							
设定值 T_i /°C							
示值误差/°C							
标准偏差/°C							

校准员：_____ 核验员：_____

附录 E

校准证书（内页）格式

（推荐性表格）

序号	校准项目	结果	相对扩展标准不确定度 ($k=2$)
1	背景噪声值		/
2	发光强度测量重复性		/
3	浓度测量线性相关系数		/
4	浓度测量相对示值误差		/
5	菌液存储孔孔温度示值误差		
6	菌液存储孔孔温度稳定性		/
7	培养孔孔温度示值误差		
8	培养孔孔温度稳定性		/
9	培养孔孔间温度差异		/
10	读数孔孔温度示值误差		
11	读数孔孔温度稳定性		/

校准员：_____ 核验员：_____

