附件5

生物反应器校准结果

不确定度评定报告

生物反应器的测量过程中主要涉及的参数有温度、pH、溶解氧、搅拌转速、气体流量和液体流量，参数都为使用标准器进行直接测量，测量结果受其他环境因素的影响可忽略。因此，主要分析测量过程中对测量结果影响较大的不确定度分量来源，对其进行不确定度的评定。

1 温度测量结果不确定度评定

1.1 测量方法

按操作说明设置反应器恒温温度37℃，或根据实际使用情况设定一个或多个恒温温度点。将反应器的温度探头放入反应器内，与标准数字温度计靠近放置于反应器同一水平面。在设定的温度点，同时分别读取生物反应器温度示值三次，取各自的三次平均值计算温度示值相对误差。

1.2 测量模型

Δ*T*=R-S

式中：

R——生物反应器的温度探头平均值，℃；

S——标准数字温度计示值平均值，℃；

Δ*T*——温度示值误差，℃。

1.3 不确定度来源

依据上述测量模型，其不确定度来源主要包括以下2个方面：

（1）反应器温度探头测量过程引入的不确定度*u*Ti

（2）标准数字温度计测量过程引入的不确定度*u*TS

1.4 标准不确定度分量计算

本示例中选取一台生物反应器，设定温度为37.0℃，等待仪器稳定后，按确定测量方法重复测量温度结果，连续测量10次，测量结果见表1。

（1）反应器温度探头测量过程引入的不确定度*u*Ti

反应器温度探头测量过程引入的不确定度包括测量重复性引入的不确定度和仪器温度示值分辨力引入的不确定度。

表1 温度测量结果（单位：℃）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 测量次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 仪器温度  示值 | 37.0 | 37.0 | 36.9 | 36.9 | 36.9 | 36.9 | 37.0 | 37.1 | 37.1 | 37.0 |
| 标准温度计  示值 | 37.01 | 36.92 | 36.89 | 36.93 | 36.91 | 36.85 | 36.93 | 37.02 | 37.08 | 37.02 |

根据测试数据，则：

=0.08 ℃

实际测量过程中取3次重复，反应器温度探头测量重复性引入的标准不确定度*u*Ti1：

=0.05 ℃

仪器温度示值分辨力为0.1 ℃，区间半宽为0.05℃，按均匀性分布考虑，则其分辨力引入的标准不确定度*u*Ti2：

=0.03 ℃

因仪器温度探头测量重复性和示值分辨力引入的分量相关，故标准不确定度取较大者*u*Ti1，因此，反应器温度探头测量过程引入的不确定度*u*Ti为：

*u*Ti= *u*Ti1=0.05 ℃

（2）标准数字温度计测量过程引入的不确定度*u*TS

标准数字温度计测量过程引入的不确定度包括测量重复性引入的不确定度、和仪器温度示值分辨力引入的不确定度。

根据重复测试数据结果，则：

=0.08 ℃

实际测量过程中取3次重复，标准数字温度计测量重复性引入的标准不确定度*u*Ts1：

=0.05 ℃

数字温度计示值分辨力为0.01 ℃，区间半宽为0.005℃，按均匀性分布考虑，则其分辨力引入的标准不确定度*u*Ts2：

=0.003 ℃

因数字温度计测量重复性和示值分辨力引入的分量相关，故标准不确定度取较大者*u*Ts1。

数字温度计修正值的扩展不确定度为：*U*=0.03 ℃，*k*=2，则修正值引入的标准不确定度*u*Ts3为：

=0.015℃

因此，数字温度计测量过程引入的不确定度*u*Ts为：

=0.06 ℃

1.5 标准不确定度分量一览表

标准不确定度分量一览表见表2。

表2温度测量结果标准不确定度分量一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准不确定度分量 | 不确定度来源 | 标准不确定度值（℃） |
| *u*Ti | 温度探头测量过程引入 | 0.05 |
| *u*Ts | 标准数字温度计测量过程引入 | 0.06 |

1.6 合成标准不确定度

由于标准不确定度分量之间相互独立，则温度测量的合成标准不确定度*u*Tc为：

=0.08 ℃≈0.1 ℃

1.7 扩展不确定度

取*k*=2，则仪器温度示值误差测量结果的扩展不确定度为：

*U*T=*k*×*u*Tc=0.2 ℃

2 pH示值误差测量结果不确定度评定

2.1 测量方法

根据仪器操作方法对待测反应器的酸度（pH）计传感探头进行校准。根据实际需求选择合适的pH标准溶液，使用仪器pH探头对pH标准溶液进行测量。重复测量操作6次，取平均值作为仪器示值结果，其与pH标准溶液的标准值之差作为pH示值误差。

2.2 测量模型

ΔpH=i-pHS

式中：

i——仪器示值平均值，pH；

pHS——pH溶液标准值，pH；

ΔpH——pH示值误差，pH。

2.3 不确定度来源

依据上述测量模型，其不确定度来源主要包括以下2个方面：

（1）pH传感器测量过程引入的不确定度*u*pHi

（2）pH溶液标准物质引入的不确定度*u*pHS

2.4 标准不确定度分量计算

本示例中选取一台生物反应器，仪器稳定后恒温至25 ℃。将仪器pH传感器校准后，对pH溶液标准物质（本例使用混合磷酸盐标准物质）进行测量，按测量方法重复测量pH结果，连续测量10次，测量结果见表3。

表3 pH测量结果（单位：pH）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 测量次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 仪器示值 | 6.83 | 6.82 | 6.82 | 6.81 | 6.82 | 6.81 | 6.81 | 6.81 | 6.80 | 6.81 |

（1）pH测量过程引入的不确定度*u*pHi

反应器pH探头测量过程引入的不确定度包括测量重复性引入的不确定度和pH示值分辨力引入的不确定度。

根据测试数据，则：

=0.009 pH

实际测量过程中取6次重复，反应器pH探头测量重复性引入的标准不确定度*u*pHi1：

=0.004 pH

仪器pH示值分辨力为0.01 pH，区间半宽为0.005 pH，按均匀性分布考虑，则其分辨力引入的标准不确定度*u*pHi2：

=0.003 pH

因仪器pH探头测量重复性和示值分辨力引入的分量相关，故标准不确定度取较大者，因此，反应器pH探头测量过程引入的不确定度*u*pHi为：

*u*pHi= *u*pHi1=0.004 pH

（2）pH溶液标准物质引入的不确定度*u*pHS

pH溶液标准物质引入的不确定度包括标准物质本身量值的不确定度和温度对pH值影响的不确定度。

根据标准物质得知，pH溶液标准物质的扩展不确定度为：*U*=0.01 pH，*k*=2。则标准物质本身量值引入的标准不确定度为：

=0.005 pH

在不同温度下，pH标准物质的pH是不同的。硼砂为原料的pH标准溶液温度系数最大，其可能引入的不确定度也最高，因而以硼砂为例计算温度对pH溶液标准物质影响的不确定度。硼砂的pH值温度系数为0.009/℃，则：

=0.003 pH

式中：

*δ*1——恒温水槽的均匀性，本例使用恒温水槽均匀性为±0.2℃；

*δ*2——恒温水槽的稳定性，本例使用恒温水槽稳定性为0.2℃；

MPE——温度探头测温的最大允许误差，本例中测温最大允许误差为0.5℃。

因此，pH溶液标准物质引入的不确定度*u*pHS为：

=0.006 pH

2.5 标准不确定度分量一览表

标准不确定度分量一览表见表4。

表4 pH测量结果标准不确定度分量一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准不确定度分量 | 不确定度来源 | 标准不确定度值（pH） |
| *u*pHi | pH测量过程引入 | 0.004 |
| *u*pHS | pH溶液标准物质引入 | 0.006 |

2.6 合成标准不确定度

由于标准不确定度分量之间相互独立，则pH测量的合成标准不确定度*u*pH为：

=0.008 pH≈0.01 pH

2.7 扩展不确定度

取*k*=2，则仪器pH示值误差测量结果的扩展不确定度为：

*U*pH=*k*×*u*pH=0.02 pH

3 溶解氧示值误差测量结果不确定度评定

3.1 测量方法

根据仪器操作方法对待测反应器的溶解氧传感探头进行测试、校准。根据实际需求配制好饱和溶解氧水，使用仪器溶解氧探头对饱和溶氧水溶液进行测量。重复测量操作6次，取平均值作为仪器示值结果，其与饱和溶氧水的理论值之差作为溶解氧示值误差。

3.2 测量模型

Δ*C*=-*C*S

式中：

——6次溶解氧测量平均值，mg/L；；

*C*S——溶解氧标准值，mg/L；

Δ*C*——溶解氧示值误差，mg/L。

3.3 不确定度来源

依据上述测量模型，其不确定度来源主要包括以下2个方面：

（1）溶解氧测量过程引入的不确定度*u*Ci

（2）饱和溶氧水溶液引入的不确定度*u*CS

3.4 标准不确定度分量计算

本示例中选取一台生物反应器，仪器运行至恒温稳定。使用仪器溶解氧探头进行测量，按测量方法重复测量溶解氧结果，连续测量10次，测量结果见表5。

表5 溶解氧测量结果（单位：mg/L）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 测量次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 仪器示值 | 8.23 | 8.25 | 8.32 | 8.31 | 8.28 | 8.27 | 8.31 | 8.31 | 8.25 | 8.26 |

（1）溶解氧测量过程引入的不确定度*u*Ci

反应器溶解氧探头测量过程引入的不确定度包括测量重复性引入的不确定度和溶解氧示值分辨力引入的不确定度。

根据测试数据，则：

=0.032 mg/L

实际测量过程中取6次重复，反应器pH探头测量重复性引入的标准不确定度*u*Ci1：

=0.013 mg/L

仪器溶解氧示值分辨力为0.01 mg/L，区间半宽为0.005 mg/L，按均匀性分布考虑，则其分辨力引入的标准不确定度*u*Ci2：

=0.003 mg/L

因仪器溶解氧探头测量重复性和示值分辨力引入的分量相关，故标准不确定度取较大者，因此，反应器溶解氧探头测量过程引入的不确定度*u*Ci为：

*u*Ci= *u*Ci1=0.013 mg/L

（2）饱和溶氧水溶液引入的不确定度*u*CS

在不同温度和大气压力下，饱和溶氧水的溶解氧浓度是不同的。饱和溶氧水引入的不确定度来源主要包括饱和溶氧水发生装置的温度、大气压力。

根据溶解氧饱和浓度值表和内插法，本示例温度为25.0 ℃，大气压为100.5 kPa，那么该环境下温度变化每升高1℃引起溶解氧变化的最大系数为0.15 mg/L/℃，大气压力每升高0.1 kPa引起的溶解氧变化的系数为0.085 mg/L/kPa。本示例恒温水槽的均匀性为±0.2 ℃，稳定性为0.2 ℃，温度测试最大允许误差为0.5 ℃，空盒气压表的修正扩展不确定度为*U*P=0.05 kPa，*k*=2。各引入的不确定度变量不相关，则，本示例中饱和溶氧水引入的不确定度*u*CS为：

=0.047 mg/L

式中：

*δ*1——恒温水槽的均匀性；

*δ*2——恒温水槽的稳定性；

MPE——温度探头测温的最大允许误差0.5℃；

*U*P——气压修正不确定度。

3.5 标准不确定度分量一览表

标准不确定度分量一览表见表6。

表6 溶解氧测量结果标准不确定度分量一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准不确定度分量 | 不确定度来源 | 标准不确定度值（mg/L） |
| *u*Ci | 溶解氧测量过程引入 | 0.013 |
| *u*CS | 饱和溶氧水溶液 | 0.047 |

3.6 合成标准不确定度

由于标准不确定度分量之间相互独立，则溶解氧测量的合成标准不确定度*u*C为：

=0.049 mg/L≈0.05 mg/L

3.7 扩展不确定度

取*k*=2，则仪器溶解氧示值误差测量结果的扩展不确定度为：

*U*C=*k*×*u*C=0.10 mg/L

4 转速示值误差测量结果不确定度评定

4.1 测量方法

将反光转速贴片贴于搅拌器旋转叶片或转动轴上，根据实际情况设置合适的转速测量点。用光电转速表对准反光贴片位置测量实际转速，重复测量3次，取平均值*x*标准，并通过公式计算转速相对误差。

4.2 测量模型

式中：

*δ*L——转速相对误差，r/min；

*x*i——转速设定值，r/min；

*x*标准——转速测量平均值，r/min。

4.3 不确定度来源

依据上述测量模型，其不确定度来源主要包括以下3个方面：

（1）转速重复测量过程引入的相对不确定度*u*r1

（2）标准器引入的相对不确定度*u*r2

（3）搅拌电机分辨力引入的相对不确定度*u*r3

4.4 标准不确定度分量计算

本示例中选取一台生物反应器，仪器运行至搅拌电机运行转速稳定。使用光电转速表对转速进行测量，按测量方法重复测量转速结果，连续测量10次，测量结果见表7。

表7 转速测量结果（单位：r/min）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 测量次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 实测值 | 120.4 | 120.2 | 120.2 | 120.3 | 119.8 | 119.7 | 120.0 | 120.1 | 120.5 | 120.2 |

（1）转速重复测量过程引入的相对不确定度*u*r1

根据测试数据，则：

=0.25 r/min

实际测量过程中取3次重复，那么针对该转速下：

=0.12%

（2）标准器引入的相对不确定度*u*r2

根据光电转速表的标准器溯源证书，可知其相对扩展不确定度为*U*relS=0.01%，*k*=2。则标准器引入的相对不确定度*u*r2为：

=0.005%

（3）搅拌电机分辨力引入的相对不确定度*u*r3

仪器搅拌转速示值分辨力为1 r/min，区间半宽为0.5 r/min，按均匀性分布考虑，则在该转速下其分辨力引入的相对标准不确定度*u*r3：

=0.24%

4.5 标准不确定度分量一览表

标准不确定度分量一览表见表8。

表8 转速测量结果相对标准不确定度分量一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准不确定度分量 | 不确定度来源 | 相对标准不确定度值（%） |
| *u*r1 | 转速重复测量过程引入 | 0.12 |
| *u*r2 | 标准器引入 | 0.005 |
| *u*r3 | 搅拌电机分辨力 | 0.24 |

4.6 合成相对标准不确定度

由于相对标准不确定度分量之间相互独立，则转速测量的合成相对标准不确定度*u*rx为：

=0.27%≈0.3%

4.7 相对扩展不确定度

取*k*=2，则仪器转速示值误差测量结果的相对扩展不确定度为：

*U*rx=*k*×*u*rx=0.6%

5 液体流量示值误差不确定度评定

5.1 测量方法

根据生物反应器的配置需求，选择相应的蠕动泵及管路。选择适配的管路连接液体管路出口、入口，以纯水作流动相，通过管路系统运行，使其充满流动相。将温度计插入流动相，监控试验温度。根据需要选择该蠕动泵的流速范围中适当的流量，进行测量。开启蠕动泵，运行稳定后，选用事先称重的合适的容量瓶，分别接收规定时间流出的流动相。将收集好流动相的容量瓶在分析天平上称重，重复三次，分别计算流量的实测值和流量设定值误差。

5.2 测量模型

式中：

*Ss*——流量示值误差，%；

——同一设定流量3次测量值的算术平均值，mL/min；

*Fs*——流量设定值，mL/min。

其中，流量实测值公式为：

*Fm*=(*W*2-*W*1)/(*ρt*×*t*)

式中：

*Fm*——流量实测值，mL/min；

*W*1——容量瓶的质量，g；

*W*2——容量瓶加流动相的质量，g；

*ρt*——实验温度下流动相的密度，g/cm3；

*t*——收集流动相的时间，min。

5.3 不确定度来源

依据上述测量模型，其不确定度来源主要包括以下3个方面：

（1）液体流量重复测量引入的相对不确定度*u*rF1

（2）流动相引入的相对不确定度*u*rF2

（3）计时时间引入的相对不确定度*u*rF3

5.4 标准不确定度分量计算

本示例中选取生物反应器上的蠕动泵，设定流速为10 ml/min，运行至稳定。按测量方法重复测量流量结果，连续测量10次，测量结果见表9。

表9 液体流量测量结果（单位：mL/min）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 测量次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 实测值 | 10.04 | 10.06 | 9.97 | 9.94 | 9.98 | 10.07 | 10.05 | 10.11 | 10.05 | 10.02 |

（1）液体流量重复测量引入的相对不确定度*u*rF1

根据测试数据，则：

=0.05 mL/min

实际测量过程中取3次重复，那么在该流速下：

=0.30%

（2）流动相引入的相对不确定度*u*rF2

测量过程使用的流动相为纯水，其不确定度由天平称重时由天平引入的不确定度、密度的不确定度组成。天平重复测量的不确定度已包含在测量过程的整体不确定度中，因而不另外考虑，此处主要考虑天平修正引入的不确定度。根据电子天平的标准器溯源证书，可知其修正值的扩展不确定度为*U*=0.4 mg，*k*=2。本示例中的称重的流动相质量平均值为99.9934 g，则电子天平引入的相对不确定度*u*rF2a为：

=0.20%

本示例中控制温度为25.0℃。温度探头测温的最大允许误差0.5℃，则由温度测量不准确引起的纯水密度最大变化量约为0.000129 g/ml，体积平均测量结果100 ml。那么按均匀分布考虑，温度变化引入的流动相质量变化的相对不确定度*u*rF2b为：

=0.01%

则，流动相引入的相对不确定度*u*rF2为：

=0.20%

（3）计时时间引入的相对不确定度*u*rF3

计时器计时重复性引入的不确定度已包含在流量测量重复性的不确定度中，本示例中使用的计时器分度值为0.01 s，其引入的不确定度远低于计时重复性的不确定度，且为关联项目，因而不作考虑。

5.5 标准不确定度分量一览表

标准不确定度分量一览表见表10。

表10 液体流速相对标准不确定度分量一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准不确定度分量 | 不确定度来源 | 相对标准不确定度值（%） |
| *u*rF1 | 液体流量重复测量 | 0.30 |
| *u*rF2 | 流动相密度 | 0.20 |

5.6 合成相对标准不确定度

由于相对标准不确定度分量之间相互独立，则液体流量测量的合成相对标准不确定度*u*rF为：

=0.36%≈0.4%

5.7 相对扩展不确定度

取*k*=2，则液体流量示值误差测量结果的相对扩展不确定度为：

*U*rF=*k*×*u*rF=0.8%

6 气体流量示值误差不确定度评定

6.1 测量方法

选取实际工作常用的气体介质，将气体流量测量装置串联入气体流路中。调节反应器的气体流量计，选择用户常用的气体流量作为测量点，连续测量3次，记录每次的测定值，计算得平均值，并根据公式计算气体流量相对示值误差。

6.2 测量模型

（11）

式中：

——气体流量设定值，L/min；

——流量测量平均值，L/min；

——气体流量相对示值误差，%。

6.3 不确定度来源

依据上述测量模型，其不确定度来源主要包括以下3个方面：

（1）气体流量测量重复性引入的相对不确定度*u*rQ1

（2）标准气体流量计引入的相对不确定度*u*rQ2

6.4 标准不确定度分量计算

本示例中针对生物反应器上气体流量计选择合适的流速和气体介质，本示例选择高纯氮气作为介质，控制流速为5.0 L/min。待其运行至稳定。按测量方法重复测量气体流量结果，连续测量10次，测量结果见表11。

表11 气体流量测量结果（单位：L/min）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 测量次数 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 实测值 | 5.04 | 5.05 | 5.02 | 5.05 | 5.07 | 5.02 | 5.05 | 5.01 | 5.06 | 5.02 |

（1）气体流量测量重复性引入的相对标准不确定度*u*rQ1

根据测试数据，则：

=0.02 L/min

实际测量过程中取3次重复，那么在该流速下：

=0.23%

（2）标准气体流量计引入的相对标准不确定度*u*rQ2

根据标准气体流量计的溯源证书，可知其修正值的相对扩展不确定度为*U*rel=0.6%，*k*=2。那么，气体流量计引入的相对不确定度*u*rQ2为：

=0.30%

6.5 标准不确定度分量一览表

标准不确定度分量一览表见表12。

表12 气体流速相对标准不确定度分量一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 标准不确定度分量 | 不确定度来源 | 相对标准不确定度值（%） |
| *u*rQ1 | 气体流量测量重复性 | 0.23 |
| *u*rQ2 | 标准气体流量计 | 0.30 |

6.6 合成相对标准不确定度

由于相对标准不确定度分量之间相互独立，则气体流量测量结果的合成相对标准不确定度*u*rQ为：

=0.38%≈0.4%

6.7 相对扩展不确定度

取*k*=2，则气体流量示值误差测量结果的相对扩展不确定度为：

*U*rQ=*k*×*u*rQ=0.8%