

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора  
ФГБУ «ВНИИОФИ»

Е.А. Гаврилова  
09 2024 г.



«ГСИ. Меры длин волн и интенсивности флуоресценции (комплект).  
Методика поверки»

МП 038.Р3-24

Главный метролог  
ФГБУ «ВНИИОФИ»

С.Н. Негода  
«18» 09 2024 г.

г. Москва  
2024 г.

## 1. Общие положения

1.1 Настоящая методика поверки распространяется на Меры длин волн и интенсивности флуоресценции (комплект) (далее по тексту – меры), предназначенные для хранения и передачи единиц длины волны и интенсивности флуоресценции средствам измерений, и устанавливает порядок, методы и средства проведения первичной и периодической поверки.

1.2 По итогам проведения поверки должна обеспечиваться прослеживаемость к:

– ГЭТ 2-2021 в соответствии с государственной поверочной схемой для средств измерений длины в диапазоне от  $1 \cdot 10^{-9}$  до 100 м и длин волн в диапазоне от 0,2 до 50 мкм, утвержденной приказом Росстандарта от 29 декабря 2018 г. № 2840;

– ГЭТ 196-2023 в соответствии с государственной поверочной схемой для средств измерений массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов, а также флуоресценции в жидких и твердых веществах и материалах на основе спектральных методов, утвержденной приказом Росстандарта от 7 августа 2023 г. № 1569.

1.3 Поверка мер выполняется методом прямых измерений, а также сличением при помощи компаратора.

1.4 Метрологические характеристики мер указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Метрологические характеристики

Наименование характеристики	Значение	
	«1»	«2»
Диапазон длин волн эмиссии, нм	от 400 до 650	от 490 до 800
Пределы допускаемой абсолютной погрешности измерения длин волн, нм		±1
Диапазон интенсивности флуоресценции, ОЕФ		от 0,1 до 2,0
Пределы допускаемой относительной погрешности измерения интенсивности флуоресценции, %		±10

## 2. Перечень операций поверки средства измерений

2.1 При проведении первичной и периодической поверок должны быть выполнены операции, указанные в таблице 2.

Таблица 2 – Операции поверки

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер раздела (пункта) методики поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
Внешний осмотр средства измерений	Да	Да	7
Подготовка к поверке и опробование средства измерений	Да	Да	8
Определение метрологических характеристик средства измерений	Да	Да	9
Проверка диапазона длин волн эмиссии и предела допускаемой абсолютной погрешности измерения длин волн	Да	Да	9.1
Проверка диапазона интенсивности флуоресценции и предела допускаемой относительной погрешности измерения интенсивности флуоресценции	Да	Да	9.2
Подтверждение соответствия метрологическим требованиям	Да	Да	10

2.2 При получении отрицательных результатов при проведении хотя бы одной операции поверка прекращается.

## 3. Требования к условиям проведения поверки

3.1 Все операции поверки проводят при следующих условиях:

- температура окружающего воздуха, °С от + 15 до + 25;
- относительная влажность воздуха, % от 30 до 80;
- атмосферное давление, кПа от 94 до 106.

3.2 В помещении не допускаются посторонние источники излучения, мощные постоянные и переменные электрические и магнитные поля.

#### 4. Требования к специалистам, осуществляющим поверку

4.1 К проведению поверки допускают лиц, изучивших настоящую методику поверки и руководства по эксплуатации (далее по тексту – РЭ) поверяемых мер и средств поверки, ознакомившихся с правилами по охране труда при эксплуатации электроустановок, указанными в приложении к приказу Министерства труда и социальной защиты РФ от 15.12.2020 № 903н, и прошедших полный инструктаж по технике безопасности.

4.2 Поверку средства измерений осуществляют аккредитованные в области обеспечения единства измерений юридические лица и индивидуальные предприниматели.

#### 5. Метрологические и технические требования к средствам поверки

5.1 При проведении первичной и периодической поверок должны быть применены средства поверки, указанные в таблице 3.

Таблица 3 – Средства поверки

Операция поверки, требующие применения средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
п. 8 Подготовка к поверке и опробование средств измерений	Средства измерений температуры окружающей среды в диапазоне от 15 °C до 25 °C с абсолютной погрешностью $\pm 0,2$ °C; Средства измерений относительной влажности воздуха в диапазоне до 80 % с абсолютной погрешностью $\pm 3$ %; Средства измерений атмосферного давления в диапазоне от 84 до 110 кПа с абсолютной погрешностью $\pm 0,13$ кПа	Измеритель параметров микроклимата «Метеоскоп-М» рег. № 32014-11
	Эталоны единицы длины волны, не ниже уровня рабочего эталона 2 разряда по 1 части государственной поверочной схемы, утвержденной приказом Росстандарта от 29.12.2018 № 2840, диапазон воспроизводимых длин волн от 400 до 1000 нм	Государственный рабочий эталон единицы длины волны для волоконно-оптических систем передачи информации от 400 до 3400 нм рег. № 3.1.ZZA.0114.2018
	Спектрофлуориметр со спектральным диапазоном от 200 нм до 900 нм, предел доверительной границы случайной погрешности установки длины волны при $P = 0,95$ 0,2 нм, предел систематической составляющей погрешности установки длины волны при $P = 0,95$ 0,7 нм	Спектрофотометр-флуориметр СФФ-2 «ФЛУОРАН» рег. № 51314-12

Операция поверки, требующие применения средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
п. 9 Определение метрологических характеристик	Эталоны единицы длины волны, не ниже уровня рабочего эталона 2 разряда по 1 части государственной поверочной схемы, утвержденной приказом Росстандарта от 29.12.2018 № 2840, диапазон воспроизводимых длин волн от 400 до 1000 нм	Государственный рабочий эталон единицы длины волны для волоконно-оптических систем передачи информации от 400 до 3400 нм рег. № 3.1.ZZA.0114.2018 (далее по тексту – рабочий эталон)
	Спектрофлуориметр со спектральным диапазоном от 200 нм до 900 нм, предел доверительной границы случайной погрешности установки длины волны при $P = 0,95$ 0,2 нм, предел систематической составляющей погрешности установки длины волны при $P = 0,95$ 0,7 нм	Спектрофотометр-флуориметр СФФ-2 «ФЛУОРАН» рег. № 51314-12 (далее по тексту – спектрофлуориметр)
	Стандартный образец состава водного раствора флуоресцина натрия Интервал допускаемых значений массовой концентрации флуоресцина натрия от 0,8 до 1,2 мг/дм <sup>3</sup> Допускаемое значение относительной расширенной неопределенности (при $k = 2$ ) не более 2,2 %	Стандартный образец состава водного раствора флуоресцина натрия ГСО 11708-2021
	Дозаторы пипеточные Объем дозирования от 1000 до 10000 мкл Предел допускаемой систематической составляющей основной относительной погрешности $\pm 1,0\%$ Предел допускаемого среднеквадратичного отклонения случайной составляющей относительной погрешности 1,0 %	Дозатор пипеточный одноканальный «Лайт», модификация ДПОП-1-1000-10000 рег. № 37432-13
	Вода дистиллированная Степень чистоты 1 по ГОСТ Р 52501-2005	Вода дистиллированная Степень чистоты 1 по ГОСТ Р 52501-2005

5.2 Допускается применение других средств поверки, обеспечивающих определение метрологических характеристик поверяемого средства измерений с требуемой точностью.

5.3 Средства поверки должны быть аттестованы (проверены) в установленном порядке.

## **6. Требования (условия) по обеспечению безопасности проведения поверки**

6.1 При проведении поверки следует соблюдать требования, установленные ГОСТ 12.1.031-2010, ГОСТ 12.1.040-83, правилами по охране труда при эксплуатации электроустановок, указанными в приложении к приказу Министерства труда и социальной защиты РФ от 15.12.2020 № 903н. Оборудование, применяемое при поверке, должно соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.003-91. Воздух рабочей зоны должен соответствовать ГОСТ 12.1.005-88 при температуре помещения, соответствующей условиям испытаний для легких физических работ.

6.2 При выполнении поверки должны соблюдаться требования РЭ мер.

6.3 Помещение, в котором проводится поверка, должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

6.4 Производственная гигиена в помещении должна соответствовать требованиям ГОСТ Р ИСО 14644-1-2017, класс чистоты не хуже ИСО 6.

## **7. Внешний осмотр средства измерений**

7.1 Внешним осмотром мер должно быть установлено отсутствие видимых механических повреждений, вкраплений, царапин, загрязнений на поверхности мер.

7.2 Меры считаются прошедшими операцию поверки, если они соответствуют требованиям п. 7.1.

## **8. Подготовка к поверке и опробование средства измерений**

8.1 Подготовить к работе спектрофлуориметр в соответствии с его РЭ.

8.2 Установить меру с маркировкой «1» в кюветное отделение спектрофлуориметра, установить спектральные ширины щелей в каналах возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, установить длину волны возбуждения 384 нм.

8.3 Усиление фотоэлектронного умножителя (далее по тексту – ФЭУ), ток лампы подбираются индивидуально. Параметры подбирают таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате измерения спектра флуоресценции меры, находился в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

8.4 Произвести измерение спектра эмиссии в диапазоне от 400 до 650 нм с шагом регистрации 1 нм.

8.5 Сохранить полученный спектр.

8.6 С помощью программы «Обработка спектров», входящей в состав программного обеспечения спектрофлуориметра, определить значения длин волн в максимумах пиков эмиссии измеренного спектра.

8.7 Установить меру с маркировкой «2» в кюветное отделение спектрофлуориметра, установить спектральные ширины щелей в каналах возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, установить длину волны возбуждения 358 нм.

8.8 Усиление ФЭУ, ток лампы подобрать таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате измерения спектра флуоресценции меры, находился в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

8.9 Произвести измерение спектра эмиссии в диапазоне от 490 до 800 нм с шагом регистрации 1 нм.

8.10 Сохранить полученный спектр.

8.11 С помощью программы «Обработка спектров», входящей в состав программного обеспечения спектрофлуориметра, определить значения длин волн в максимумах пиков эмиссии измеренного спектра.

8.12 Результат опробования считается положительным, если определенные по п.п. 8.2 – 8.6 и п.п. 8.7 – 8.11 значения длин волн в максимумах пиков эмиссии для любых двух пиков измеренных спектров находятся в пределах спектральных диапазонов, указанных в таблице 4.

Таблица 4 – Значения спектральных диапазонов длин волн

Наименование характеристики, единицы величины	«1»		«2»	
	Порядковый номер максимума пика ( <i>l</i> )	Спектральный диапазон, нм	Порядковый номер максимума пика ( <i>l</i> )	Спектральный диапазон, нм
Диапазон допускаемых значений длин волн максимума эмиссии	1	от 400 до 425	7	от 490 до 530
	2	от 430 до 450	8	от 635 до 685
	3	от 525 до 545	9	от 730 до 800
	4	от 545 до 565	–	–
	5	от 575 до 595	–	–
	6	от 600 до 650	–	–

## 9. Определение метрологических характеристик средства измерений

9.1 Проверка диапазона длин волн эмиссии и предела допускаемой абсолютной погрешности измерения длин волн

9.1.1 Подготовить к работе спектрофлуориметр в соответствии с его РЭ.

9.1.2 Определить функцию коррекции шкалы длин волн эмиссионного монохроматора спектрофлуориметра:

– Установить в кюветное отделение спектрофлуориметра излучатель, входящий в состав рабочего эталона длины волны, и направить его излучение в входное окно эмиссионного канала спектрофлуориметра.

– Произвести в режиме флуоресценции измерение спектра эмиссии в диапазоне длин волн от 400 нм до 800 нм при спектральной ширине щелей каналов возбуждения и эмиссии 5 нм и при выключенной ксеноновой лампе, входящей в состав спектрофлуориметра.

– С помощью компьютерной программы «Обработчик спектров», входящей в состав программного обеспечения спектрофлуориметра, определить измеренные значения длин волн в максимумах интенсивности (пиках) спектральных линий излучателя рабочего эталона длины волны, соответствующих номинальным значениям, приведенным в таблице 5.

Таблица 5 – Основные метрологические характеристики рабочего эталона длины волны

Наименование характеристики	Значение
Спектральный диапазон воспроизводимых длин волн, нм	от 400 до 3400
	404,653
	435,838
	546,093
	576,944
	696,529
	763,496
	811,510
Длины волн излучения рабочего эталона в диапазоне от 400 до 1000 нм	

9.1.3 Используя данные, определенные по п. 9.1.2, аппроксимировать зависимость номинальных значений длин волн рабочего эталона длины волны, приведенных в таблице 5, от измеренных по формуле:

$$\lambda_{\text{номин.}} = A_0 + A_1 \cdot \lambda_{\text{изм.}}, \quad (1)$$

где  $\lambda_{\text{номин.}}$  – номинальное значение длины волны эмиссии рабочего эталона длины волны, приведенное в таблице 5, нм;

$\lambda_{\text{изм.}}$  – измеренное на спектрофлуориметре значение длины волны эмиссии, нм;

$A_0$  и  $A_1$  – коэффициенты, вычисляемые по линейному методу наименьших квадратов по формулам:

$$A_1 = \frac{N \cdot \sum_{i=1}^N (\lambda_{\text{номин.},i} \cdot \lambda_{\text{изм.},i}) - \sum_{i=1}^N \lambda_{\text{номин.},i} \cdot \sum_{i=1}^N \lambda_{\text{изм.},i}}{N \cdot \sum_{i=1}^N (\lambda_{\text{изм.},i})^2 - (\sum_{i=1}^N \lambda_{\text{изм.},i})^2}, \quad (2)$$

$$A_0 = \frac{\sum_{i=1}^N \lambda_{\text{номин.},i} \cdot \sum_{i=1}^N (\lambda_{\text{изм.},i})^2 - \sum_{i=1}^N \lambda_{\text{изм.},i} \cdot \sum_{i=1}^N (\lambda_{\text{изм.},i} \cdot \lambda_{\text{номин.},i})}{N \cdot \sum_{i=1}^N (\lambda_{\text{изм.},i})^2 - (\sum_{i=1}^N \lambda_{\text{изм.},i})^2}, \quad (3)$$

где  $\lambda_{\text{номин.},i}$  – номинальное значение длины волны эмиссии с порядковым номером  $i$  рабочего эталона длины волны, приведенное в таблице 5, нм;

$\lambda_{изм,i}$  – измеренное на спектрофлуориметре значение длины волны эмиссии с порядковым номером  $i$ , нм;

$N$  – количество длин волн.

9.1.4 Во всех дальнейших измерениях длин волн эмиссии, выполняемых с помощью спектрофлуориметра, следует корректировать определяемые значения длин волн эмиссии с помощью формулы 1.

9.1.5 Установить меру с маркировкой «1» в кюветное отделение спектрофлуориметра, установить спектральные ширины щелей в каналах возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, включить ксеноновую лампу, входящую в состав спектрофлуориметра, установить длину волны возбуждения 384 нм.

9.1.6 Усиление ФЭУ, ток лампы подобрать таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате измерения спектра флуоресценции меры, находился в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

9.1.7 Произвести 5 измерений в условиях повторяемости зависимостей сигналов флуоресценции от длины волны (спектров эмиссии), в каждом из спектральных диапазонов, указанных в таблице 4, с шагом регистрации 0,1 нм.

9.1.8 Сохранить полученные спектры.

9.1.9 Установить меру с маркировкой «2» в кюветное отделение спектрофлуориметра, включить ксеноновую лампу, входящую в состав спектрофлуориметра, установить спектральные ширины щелей в каналах возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, установить длину волны возбуждения 358 нм.

9.1.10 Усиление ФЭУ, ток лампы подобрать таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате измерения спектра флуоресценции меры, находился в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

9.1.11 Произвести 5 измерений в условиях повторяемости зависимостей сигналов флуоресценции от длины волны (спектров эмиссии), в каждом из спектральных диапазонов, указанных в таблице 4, с шагом регистрации 0,1 нм.

9.1.12 Сохранить полученные спектры.

9.1.13 В каждом из измеренных спектров для мер с маркировкой «1» и «2» соответственно с помощью программы «Обработка спектров» определить значения длин волн, соответствующие максимуму пика эмиссии для каждого из спектрального диапазона, указанного в таблице 4.

9.1.14 Установить меру с маркировкой «1» в кюветное отделение спектрофлуориметра, установить спектральные ширины щелей в каналах возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, установить длину волны

возбуждения и эмиссии в соответствии с таблицей 6, с помощью программного обеспечения спектрофлуориметра задать режим «Сигналы». Усиление ФЭУ, ток лампы подобрать таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате измерения сигнала флуоресценции меры, находился в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

9.1.15 Произвести 10 измерений в условиях повторяемости сигнала флуоресценции.

9.1.16 Установить меру с маркировкой «2» в кюветное отделение спектрофлуориметра, установить спектральные ширины щелей в каналах возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, установить длину волны возбуждения и эмиссии в соответствии с таблицей 6, с помощью программного обеспечения спектрофлуориметра задать режим «Сигналы». Усиление ФЭУ, ток лампы подобрать таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате измерения сигнала флуоресценции меры, находился в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

9.1.17 Произвести 10 измерений в условиях повторяемости сигнала флуоресценции.

Таблица 6 – Параметры измерения соотношения сигнал – шум

№ п/п.	Маркировка меры	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны эмиссии, нм
1	«1»	384	400
2	«2»	358	800

9.2 Проверка диапазона интенсивности флуоресценции и предела допускаемой относительной погрешности измерения интенсивности флуоресценции

9.2.1 Подготовить к работе спектрофлуориметр в соответствии с его РЭ.

9.2.2 Подготовить контрольную пробу на основе ГСО 11708-2021 с массовой концентрацией флуоресцеина натрия, соответствующей номинальному значению интенсивности флуоресценции 1,0 ОЕФ. Для этого в кварцевую флуориметрическую кювету внести с помощью пипет-дозатора 2,0 см<sup>3</sup> исходного раствора ГСО 11708-2021.

9.2.3 Подготовить контрольную пробу на основе ГСО 11708-2021 с массовой концентрацией флуоресцеина натрия, соответствующей номинальному значению интенсивности флуоресценции 0,25 ОЕФ. Для этого в кварцевую флуориметрическую кювету внести с помощью пипет-дозатора 0,5 см<sup>3</sup> исходного раствора ГСО 11708-2021 и 1,5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Полученный раствор тщательно перемешать.

9.2.4 Контрольную пробу, подготовленную в соответствии с п. 9.2.3, установить в кюветное отделение спектрофлуориметра.

9.2.5 Произвести в режиме флуоресценции измерение спектров эмиссии при следующих условиях работы спектрофлуориметра: длина волны возбуждения эмиссии 405 нм, диапазон длин волн регистрации спектра эмиссии от 470 до 570 нм, ширина щелей каналов возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, шаг регистрации 1 нм.

9.2.6 При проведении измерений спектров эмиссии в соответствии с п. 9.2.5 значение усиления ФЭУ, тока лампы спектрофлуориметра подбирают таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате измерения спектра флуоресценции контрольной пробы на основе флуоресцина натрия, подготовленного в соответствии с 9.2.3, находился в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

9.2.7 Сохранить полученный спектр.

9.2.8 С помощью программы «Обработка спектров» спектрофлуориметра определить значения интенсивности флуоресценции, соответствующей длине волны эмиссии 514 нм.

9.2.9 Контрольную пробы, подготовленную в соответствии с п. 9.2.2, установить в кюветное отделение спектрофлуориметра.

9.2.10 Произвести в режиме флуоресценции измерение спектров эмиссии при следующих условиях работы спектрофлуориметра: длина волны возбуждения эмиссии 405 нм, диапазон длин волн регистрации спектра эмиссии от 470 до 570 нм, ширина щелей каналов возбуждения и эмиссии 5 нм, шаг регистрации 1 нм.

9.2.11 При проведении измерений спектров эмиссии в соответствии с п. 9.2.10 значение усиления ФЭУ, тока лампы спектрофлуориметра подбирают таким образом, чтобы сигнал в измерительном канале, полученный в результате измерения спектра флуоресценции контрольной пробы на основе флуоресцина натрия, подготовленного в соответствии с 9.2.2, находился в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

9.2.12 Сохранить полученный спектр.

9.2.13 С помощью программы «Обработка спектров» спектрофлуориметра определить значения интенсивности флуоресценции, соответствующей длине волны эмиссии 514 нм.

9.2.14 Установить меру с маркировкой «1» в кюветное отделение спектрофлуориметра, установить спектральные ширины щелей в каналах возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, установить длину волны возбуждения 384 нм, установить значения параметров ФЭУ и тока лампы идентичным, использованным при проведении измерений спектров эмиссии в соответствии с п.п. 9.2.4 – 9.2.6.

9.2.15 Произвести 5 измерений в условиях повторяемости зависимостей сигналов флуоресценции от длины волны (спектров эмиссии) в спектральном интервале от 400 до 650 нм, с шагом регистрации 1 нм.

9.2.16 Сохранить полученные спектры.

9.2.17 С помощью программы «Обработка спектров» спектрофлуориметра провести усреднение измеренных спектров.

9.2.18 Установить меру с маркировкой «2» в кюветное отделение спектрофлуориметра, установить спектральные ширины щелей в каналах возбуждения и эмиссии 10 нм и 5 нм соответственно, установить длину волны возбуждения 358 нм, установить значения параметров ФЭУ и тока лампы идентичным, использованным при проведении измерений спектров эмиссии в соответствии с п.п. 9.2.4 – 9.2.6.

9.2.19 Произвести 5 измерений в условиях повторяемости зависимостей сигналов флуоресценции от длины волны (спектров эмиссии) в спектральном интервале от 490 до 800 нм, с шагом регистрации 1 нм.

9.2.20 Сохранить полученные спектры.

9.2.21 С помощью программы «Обработка спектров» спектрофлуориметра провести усреднение измеренных спектров.

9.2.22 Для меры с маркировкой «2» дополнительно произвести 5 измерений в условиях повторяемости зависимостей сигналов флуоресценции от длины волны (спектров эмиссии) в спектральном интервале от 430 до 470 нм, с шагом регистрации 1 нм, при спектральной ширине щелей в каналах возбуждения и эмиссии 5 нм, длине волны возбуждения 369 нм.

9.2.23 Сохранить полученные спектры.

9.2.24 С помощью программы «Обработка спектров» спектрофлуориметра провести усреднение измеренных спектров.

## 10. Подтверждение соответствия средства измерений метрологическим требованиям

10.1 Для каждой длины волны, соответствующей максимуму пика эмиссии, определенной в соответствии с п. 9.1.13, мер с маркировкой «1» и «2» вычислить среднее значение длины волны в максимуме пика эмиссии по формуле:

$$\lambda_{\text{эмис-}l} = \frac{1}{N} \sum_{m=1}^N \lambda_{\text{эмис-}l,m}, \quad (4)$$

где  $\lambda_{\text{эмис-}l,m}$  – значение длины волны в максимуме пика эмиссии, полученное в  $m$ -ом измерении для пика с порядковым номером  $l$ , нм;  
 $N$  – количество измерений.

10.2 В соответствии с п.п. 9.1.14 – 9.1.17 определить отношения сигнал – шум:

– Для каждой из пар длин волн, указанных в таблице 6, вычислить среднее значение интенсивности флуоресценции по формуле:

$$\bar{I} = \frac{1}{N} \sum_{m=1}^N I_m, \quad (5)$$

где  $I_m$  – значение интенсивности флуоресценции, полученное в  $m$ -ом измерении, аппаратно-зависимые единицы флуоресценции (далее по тексту – а.з.е.ф.);  $N$  – количество измерений.

– Рассчитать среднеквадратическое отклонение интенсивности флуоресценции для каждой из пар длин волн, указанных в таблице 6, по формуле:

$$S_F = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^N (I_m - \bar{I})^2}{N-1}}, \quad (6)$$

где  $I_m$  – значение интенсивности флуоресценции, полученное в  $m$ -ом измерении, а.з.е.ф.;

$\bar{I}$  – среднее значение интенсивности флуоресценции, а.з.е.ф.;

$N$  – количество измерений.

– Рассчитать отношение сигнал шум для каждой из пар длин волн, указанных в таблице 6, по формуле:

$$SNR = \frac{\bar{I}}{S_F}, \quad (7)$$

где  $\bar{I}$  – среднее значение интенсивности флуоресценции, рассчитанное по формуле 5, для пары длин волн, указанных в таблице 6, а.з.е.ф.;

$S_F$  – стандартное (среднеквадратическое) отклонение интенсивности флуоресценции, рассчитанное по формуле 6, для пары длин волн, указанных в таблице 6, а.з.е.ф.

10.3 Результат проверки диапазона длин волн эмиссии считается положительным, если:

– значения длин волн максимумов пиков эмиссии для мер с маркировкой «1» и «2» соответственно лежат в пределах спектрального диапазона, указанного в таблице 4;

– отношение «сигнал – шум» для каждой из пар длин волн возбуждения и эмиссии, приведенных в таблице 6, не более 60.

10.4 Рассчитать для каждого максимума пика эмиссии меры значения случайной составляющей погрешности измерения длины волны максимума пика эмиссии с порядковым номером  $l$ , лежащего в спектральном диапазоне, указанном в таблице 4, по формуле:

$$S_{\text{обс.}_l} = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^N (\lambda_{\text{эмис.}_l, m} - \lambda_{\text{эмис.}_l})^2}{N(N-1)}}, \quad (8)$$

где  $\lambda_{\text{эмис}_l}$  – среднее значение длины волны в максимуме пика эмиссии, рассчитанное по формуле 4, для максимума пика эмиссии с порядковым номером  $l$ , нм;

$\lambda_{\text{эмис}_l, m}$  – значение длины волны в максимуме пика эмиссии, полученное в  $m$ -ом измерении пика эмиссии с порядковым номером  $l$ , нм;

$N$  – количество измерений.

10.5 Рассчитать систематическую составляющую погрешности измерения длины волны по формуле:

$$\Delta\lambda_i = |\lambda_{\text{изм}_i} - \lambda_{\text{номин}_i}| \quad (9)$$

где  $\lambda_{\text{номин}_i}$  – номинальная  $i$ -ая длина волны рабочего эталона, приведенная в таблице 5, нм;

$\lambda_{\text{изм}_i}$  – измеренная на спектрофлуориметре  $i$ -ая длина волны рабочего эталона, нм.

За систематическую составляющую погрешности измерения длины волны спектрофлуориметра принимается максимальное значение, рассчитанное по формуле 9 для  $i$ -й длины волны рабочего эталона.

10.6 Рассчитать доверительную границу погрешности измерения длин волн по формуле:

$$\delta_l = \sqrt{S_{\text{афс}_l}^2 + \Delta\lambda_{i_{\text{max}}}^2} \quad (10)$$

где  $S_{\text{афс}_l}$  – значение случайной составляющей погрешности измерения длины волны в максимуме пика эмиссии с порядковым номером  $l$ , лежащего в спектральном диапазоне, указанном в таблице 4, и рассчитанного по формуле 8, нм;

$\Delta\lambda_{i_{\text{max}}}$  – максимальное значение систематической составляющей погрешности измерения длины волны спектрофлуориметра, определенное согласно п. 10.5, нм.

10.7 Результат проверки предела допускаемой абсолютной погрешности измерения длин волн считается положительным, если значения доверительных границ абсолютной погрешности измерения длин волн, рассчитанных по формуле 10, не превышают 1 нм.

10.8 Рассчитать интенсивность флуоресценции, выраженной в ОЕФ, для максимумов пиков эмиссии мер с маркировкой «1» и «2» соответственно, по формуле:

$$I_{\text{меры}}^{\text{ОЕФ}}(\lambda_6, \lambda_{\text{э1}} \div \lambda_{\text{э2}}) = \frac{I_{\text{меры}}^{\text{а.з.е.ф.}}(\lambda_6, \lambda_{\text{э1}} \div \lambda_{\text{э2}}, U_{\text{меры}})}{I_{\text{ГСО}}^{\text{а.з.е.ф.}}(405,514, U_{\text{ГСО}})} \cdot K_{\text{пересчета}} \cdot F_{\text{ГСО-ОЕФ}}, \quad (11)$$

где  $I_{\text{меры}}^{\text{а.з.е.ф.}}(\lambda_6, \lambda_{\text{э1}} \div \lambda_{\text{э2}}, U_{\text{меры}})$  – значение интенсивности флуоресценции меры в максимуме пика эмиссии, полученное при измерении спектра эмиссии в соответствии с п.п. 9.2.14 – 9.2.24, а.з.е.ф.;

$I_{RCO}^{a.z.e.\phi}(405, 514, U_{RCO})$  – значение интенсивности флуоресценции контрольной пробы на основе флуоресцина натрия при длине волны эмиссии 514 нм и длине волны возбуждения 405 нм, полученное при измерении спектра эмиссии в соответствии с п.п. 9.2.4 – 9.2.13, а.з.е.ф;

$\lambda_e$  – длина волны возбуждения, нм;

$\lambda_{s1} \div \lambda_{s2}$  – диапазон длин волн эмиссии, нм;

$U_{меры}$  – напряжение на ФЭУ, подобранное для оптимального измерения спектра эмиссии меры при выбранной длине волны возбуждения и диапазоне длин волн эмиссии, В;

$U_{RCO}$  – напряжение на ФЭУ, подобранное для оптимального измерения спектра эмиссии контрольной пробы на основе флуоресцина натрия, В;

$F_{RCO\_OE\phi}$  – значение интенсивности флуоресценции контрольной пробы на основе ГСО 11708-2021, приготовленной в соответствии с п.п. 9.2.2 – 9.2.3, ОЕФ;

$K_{пересчета}$  – коэффициент пересчета, в случае если применяемое напряжение на ФЭУ отличается для меры и контрольной пробы на основе флуоресцина натрия, рассчитанный по формуле:

$$K_{пересчета} = \frac{I(405, \lambda_x, U_{меры})}{I(405, \lambda_x, U_{RCO})}, \quad (12)$$

где  $I(405, \lambda_x, U_{меры})$  – значение интенсивности флуоресценции меры, а.з.е.ф.;

$I(405, \lambda_x, U_{RCO})$  – значение интенсивности флуоресценции контрольной пробы на основе флуоресцина натрия, а.з.е.ф.;

$U_{меры}$  – напряжение на ФЭУ, подобранное для оптимального измерения спектра эмиссии меры, В;

$U_{RCO}$  – напряжение на ФЭУ, подобранное для оптимального измерения спектра эмиссии контрольной пробы на основе флуоресцина натрия, В;

$\lambda_x$  – длина волны эмиссии, на которой при возбуждении на 405 нм при обоих значениях напряжения ФЭУ ( $U_{меры}$  и  $U_{RCO}$ ) получаются сигналы эмиссии в пределах от 20 до 80 % диапазона измерений.

При подборе значений  $U_{меры}$  и  $U_{RCO}$  следует стремиться к тому, чтобы  $U_{меры} = U_{RCO}$ , в этом случае  $K_{пересчета} = 1$ .

10.9 Результат проверки диапазона интенсивности флуоресценции считается положительным, если рассчитанное значение интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, для меры с маркировкой «1» составляет менее 0,1 ОЕФ, а для меры с маркировкой «2» составляет более 2,0 ОЕФ.

10.10 Рассчитать для каждого пика с порядковым номером максимума пика  $l$ , лежащим в спектральном диапазоне, указанном в таблице 4, меры с маркировкой «1» и «2» соответственно, значения интенсивностей флуоресценции в максимумах пиков эмиссии, выраженных в ОЕФ, по формуле:

$$I_{\text{меры}}^{\text{OEФ}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}})_{l-i} = \frac{I_{\text{меры}}^{\text{а.з.е.ф}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}}, U_{\text{меры}})_{l-i}}{I_{\text{ГСО}}^{\text{а.з.е.ф}}(405, 514, U_{\text{ГСО}})} \cdot K_{\text{пересчета}} \cdot F_{\text{ГСО\_OEФ}}, \quad (13)$$

где  $I_{\text{меры}}^{\text{а.з.е.ф}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}}, U_{\text{меры}})_{l-i}$  – значение  $i$ -го измерения интенсивности флуоресценции меры в максимуме пика эмиссии с порядковым номером максимума пика  $l$ , полученное при измерении спектра эмиссии в соответствии с п. 9.2, а.з.е.ф.;

$I_{\text{ГСО}}^{\text{а.з.е.ф}}(405, 514, U_{\text{ГСО}})$  – значение интенсивности флуоресценции контрольной пробы на основе флуоресцина натрия при длине волны эмиссии 514 нм и длине волны возбуждения 405 нм, полученное при измерении спектра эмиссии в соответствии с п. 9.2, а.з.е.ф.;

$\lambda_b$  – длина волны возбуждения, нм;

$\lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}}$  – диапазон длин волн эмиссии, нм;

$U_{\text{меры}}$  – напряжение на ФЭУ, подобранное для оптимального измерения спектра эмиссии меры при выбранной длине волны возбуждения и диапазоне длин волн эмиссии, В;

$U_{\text{ГСО}}$  – напряжение на ФЭУ, подобранное для оптимального измерения спектра эмиссии контрольной пробы на основе флуоресцина натрия, В;

$F_{\text{ГСО\_OEФ}}$  – значение интенсивности флуоресценции контрольной пробы на основе ГСО 11708-2021, приготовленной в соответствии с п.п. 9.2.2 – 9.2.3, ОЕФ;  $K_{\text{пересчета}}$  – коэффициент пересчета, определенный в соответствии с п. 9.2;  $l$  – порядковый номер максимума пика эмиссии.

10.11 Рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, для каждого пика с порядковым номером максимума пика  $l$ , по формуле:

$$\bar{I}_{\text{меры}}^{\text{OEФ}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}})_l = \frac{1}{N} \cdot \sum_{n=1}^N I_{\text{меры}}^{\text{OEФ}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}})_{l-i}, \quad (14)$$

где  $I_{\text{меры}}^{\text{OEФ}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}})_{l-i}$  – значение  $i$ -го измерения интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, для каждого пика с порядковым номером максимума пика  $l$ , меры с маркировкой «1» и «2» соответственно, рассчитанное по формуле 13, ОЕФ;

$N$  – количество измерений спектров эмиссии;

$l$  – порядковый номер максимума пика эмиссии.

10.12 Рассчитать относительную случайную составляющую погрешности измерения интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, по формуле

$$S_{\text{отн.}_l} = \frac{1}{\bar{I}_{\text{меры}}^{\text{OEФ}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}})_l} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (I_{\text{меры}}^{\text{OEФ}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}})_{l-i} - \bar{I}_{\text{меры}}^{\text{OEФ}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}})_l)^2}{N(N-1)}} \cdot 100, \quad (15)$$

где  $I_{\text{меры}}^{\text{OEФ}}(\lambda_b, \lambda_{\text{з1}} \div \lambda_{\text{з2}})_{l-i}$  – значение  $i$ -го расчета интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, выполненного по п. 10.11, ОЕФ;

$\bar{I}_{меры}^{OE\Phi}(\lambda_{\beta}, \lambda_{\beta} \div \lambda_{\beta 2})_l$  – среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, рассчитанное по формуле 14, ОЕФ;  
 $N$  – количество измерений спектров эмиссии;  
 $l$  – порядковый номер максимума пика эмиссии.

10.13 Относительная систематическая погрешность измерения интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, принимается равной относительной расширенной неопределенности аттестованного значения ГСО 11708-2021, указанной в паспорте на него.

10.14 Рассчитать доверительную границу погрешности измерения интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, по формуле:

$$\delta_l = \sqrt{S_{омн\_l}^2 + S_{сист.}^2} \quad (16)$$

где  $S_{омн\_l}$  – значение случайной составляющей погрешности измерения интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, рассчитанной по формуле 15, %;

$S_{сист.}$  – относительная систематическая погрешность измерения интенсивности флуоресценции, выраженная в ОЕФ, в соответствии с п. 10.13, %;

$l$  – порядковый номер максимума пика эмиссии.

10.15 Результат проверки предела допускаемой относительной погрешности измерения интенсивности флуоресценции, выраженной в ОЕФ, считается положительным, если значения, вычисленные по п. 10.14, не превышают 10 %.

10.16 Рассчитать абсолютную погрешность воспроизведения длины волны для каждой длины волны, соответствующей максимуму пика эмиссии мер с маркировкой «1» и «2», по формуле:

$$\delta_{эмис\_l} = |\lambda_{эмис\_l} - \lambda_{эмис\_l\_паспорт}|, \quad (17)$$

где  $\lambda_{эмис\_l}$  – значение длины волны в максимуме пика эмиссии, рассчитанное по формуле 4, для пика с порядковым номером  $l$ , нм;

$\lambda_{эмис\_l\_паспорт}$  – значение длины волны в максимуме пика эмиссии для пика с порядковым номером  $l$ , указанное в паспорте на меру, в нм.

10.17 Результат определения абсолютной погрешности воспроизведения длины волны считается положительным, если значения, вычисленные по п. 10.16, не превышают 1 нм.

## 11. Оформление результатов поверки

11.1 Результаты поверки оформляются протоколом поверки. Рекомендуемая форма протокола поверки приведена в приложении А. Протокол может храниться на электронных носителях.

11.2 Меры считаются прошедшими поверку с положительным результатом и допускаются к применению, если все операции поверки пройдены с положительным

результатом, а также соблюдены требования по защите средства измерений от несанкционированного вмешательства. В ином случае меры считаются прошедшим поверку с отрицательным результатом и не допускаются к применению.

11.3 По заявлению владельца средства измерений или лица, представившего его на поверку, с учетом требований методики поверки аккредитованное на поверку лицо, проводившее поверку, в случае положительных результатов поверки (подтверждено соответствие средства измерений метрологическим требованиям) выдает свидетельство о поверке, оформленное в соответствии с требованиями к содержанию свидетельства о поверке, утвержденными приказом Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 31.07.2020 № 2510. Нанесение знака поверки на средство измерений не предусмотрено.

11.4 По заявлению владельца средства измерений или лица, представившего его на поверку, с учетом требований методики поверки аккредитованное на поверку лицо, проводившее поверку, в случае отрицательных результатов поверки (не подтверждено соответствие средства измерений метрологическим требованиям) выдает извещение о непригодности к применению средства измерений.

11.5 Сведения о результатах поверки (как положительных, так и отрицательных) передаются в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений.

Зам. начальника лаборатории

В.И. Нагаев

Ведущий научный сотрудник

А.Д. Левин

Научный сотрудник

М.К. Аленичев

ПРИЛОЖЕНИЕ А  
(рекомендуемое)  
Примерная форма протокола поверки

ПРОТОКОЛ \_\_\_\_\_ ПОВЕРКИ №\_\_\_\_\_

Меры длин волн и интенсивности флуоресценции (комплект)  
(наименование, тип СИ и модификации в соответствии с описанием типа, в единственном числе)

Заводской номер:	
Год выпуска	
Изготовитель	
Регистрационный номер в ФИФ:	
Владелец СИ:	
Применяемые средства поверки:	
Применяемая методика поверки:	МП 038.Р3-24
Место проведения поверки:	
Условия поверки:	
– температура окружающего воздуха, °С	
– атмосферное давление, кПа	
– относительная влажность воздуха, %	

Проведение поверки:

- 1 Внешний осмотр: Соответствует/не соответствует п.
- 2 Опробование: Соответствует
- 3 Определение метрологических характеристик:
- 4 Заключение по результатам поверки: По результатам поверки средство измерений соответствует метрологическим характеристикам, указанным в описании типа средства измерений, и признается пригодным к применению.

### МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Наименование характеристики	Единица измерения	Измеренное значение	Вывод о соответствии
Диапазон длин волн эмиссии	нм		
Предел допускаемой абсолютной погрешности измерения длин волн	нм		
Диапазон интенсивности флуоресценции	ОЕФ		
Предел допускаемой относительной погрешности измерения интенсивности флуоресценции	%		

Поверитель \_\_\_\_\_ ФИО