

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора  
ФГБУ «ВНИИОФИ»



Е.А. Гаврилова

«15» июля 2025 г.

«ГСИ. Меры относительной интенсивности флуоресценции (комплект).  
Методика поверки»

МП 027.РЗ-25

Главный метролог  
ФГБУ «ВНИИОФИ»

С.Н. Негода

«15» июля 2025 г.

г. Москва  
2025 г.

## 1. Общие положения

1.1 Настоящая методика поверки распространяется на Меры относительной интенсивности флуоресценции (комплект) (далее по тексту – меры), предназначенные для воспроизведения, хранения и передачи единицы относительной интенсивности флуоресценции (при длинах волн возбуждения 532, 633 и 785 нм) рамановским спектрометрам, раман-люминесцентным спектрометрам и рамановским микроскопам, а также их поверки и калибровки, в соответствии с Локальной поверочной схемой для средств измерений волновых чисел линий комбинационного рассеяния света, относительных интенсивностей линий комбинационного рассеяния света и флуоресценции, утвержденной ФГБУ «ВНИИОФИ» 03 марта 2025 г. (структурная схема приведена в Приложении А), и устанавливает порядок, методы и средства проведения первичной и периодической поверки.

По итогам проведения поверки должна обеспечиваться прослеживаемость к ГЭТ 86-2017 в соответствии с Локальной поверочной схемой для средств измерений волновых чисел линий комбинационного рассеяния света, относительных интенсивностей линий комбинационного рассеяния света и флуоресценции, утвержденной ФГБУ «ВНИИОФИ» 03 марта 2025 г.

1.2 Поверка мер выполняется методом прямых измерений.

1.3 В результате поверки мер должны быть подтверждены метрологические требования, приведенные в таблице 1.

Таблица 1 – Метрологические характеристики

Наименование характеристики	Значение		
	$\lambda_{\text{возб.}} 532 \text{ нм}$	$\lambda_{\text{возб.}} 633 \text{ нм}$	$\lambda_{\text{возб.}} 785 \text{ нм}$
Диапазон воспроизведения относительных интенсивностей флуоресценции	от 0,1 до 1,0		
Пределы допускаемой относительной погрешности воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции в диапазоне волновых чисел, %	$\pm 10$		

## 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



Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер раздела (пункта) методики поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
Определение диапазона воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции и относительной погрешности воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции	Да	Да	9.1
Подтверждение соответствия средства измерений 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, °C от плюс 15 до плюс 25;
- относительная влажность воздуха, %, не более 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 поверки должны быть применены средства поверки, указанные в таблице 3.

Таблица 3 – Средства поверки

Операция поверки, требующая применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
п. 8 Подготовка к поверке и опробование средства измерений	Средства измерений температуры окружающей среды в диапазоне от плюс 15 °С до плюс 25 °С с абсолютной погрешностью $\pm 0,2$ °С; Средства измерений относительной влажности воздуха в диапазоне не более 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» рег. № 32014-06
	Эталоны единицы относительных интенсивностей флуоресценции, не ниже уровня рабочего эталона 1 разряда по Локальной поверочной схеме для средств измерений волновых чисел линий комбинационного рассеяния света, относительных интенсивностей линий комбинационного рассеяния света и флуоресценции, утвержденной ФГБУ «ВНИИОФИ» 03 марта 2025 г, диапазон воспроизводимой относительной интенсивности флуоресценции от 0,1 до 1,0	Государственный рабочий эталон 1 разряда единиц волновых чисел линий комбинационного рассеяния света, относительных интенсивностей линий комбинационного рассеяния света и флуоресценции рег. № 3.1.ZZA.0142.2025
п. 9 Определение метрологических характеристик	Эталоны единицы относительных интенсивностей флуоресценции, не ниже уровня рабочего эталона 1 разряда по Локальной поверочной схеме для средств измерений волновых чисел линий комбинационного рассеяния света, относительных интенсивностей линий комбинационного рассеяния света и флуоресценции, утвержденной ФГБУ «ВНИИОФИ» 03 марта 2025 г, диапазон воспроизводимой относительной интенсивности флуоресценции от 0,1 до 1,0, $\delta_I = 0,007$	Государственный рабочий эталон 1 разряда единиц волновых чисел линий комбинационного рассеяния света, относительных интенсивностей линий комбинационного рассеяния света и флуоресценции рег. № 3.1.ZZA.0142.2025

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

5.3 Средства поверки должны быть аттестованы (поверены) 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.

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

7.1 Внешним осмотром мер должно быть установлено отсутствие видимых механических повреждений и загрязнений на поверхности оптических элементов 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 рамановский микроскоп из состава рабочего эталона в соответствии с его РЭ.

8.2 Установить меру на предметный столик рамановского микроскопа, установить соответствующую ей длину волны возбуждения рамановского рассеяния на микроскопе.

8.3 В соответствии с РЭ на рамановский микроскоп выставить настройки, обеспечивающие измерение спектра флуоресценции в диапазоне длин волн, указанном в таблице 4, для соответствующей длины волны возбуждения меры, указанной на ее этикетке.

Таблица 4 – Диапазоны длин волн и волновых чисел измерений спектров флуоресценции

Длина волны возбуждения меры, нм	Диапазон длин волн измерений спектров флуоресценции, нм	Диапазон волновых чисел, для которого нормированы метрологические характеристики, см <sup>-1</sup>
532	от 530 до 680	от 150 до 4000
633	от 630 до 850	от 150 до 4000
785	от 795 до 1010	от 200 до 2800

8.4 Провести предварительную фокусировку лазерного излучения на поверхность оптического элемента меры, ориентируясь на максимум детектируемого сигнала флуоресценции. Возбуждающее излучение лазера рамановского микроскопа должно попадать только на оптический элемент меры.

8.5 Подобрать условия измерений спектров флуоресценции таким образом, чтобы обеспечивалось наилучшее соотношение сигнал/шум.

8.6 Провести измерения спектров флуоресценции всех поверяемых мер в соответствии с п.п. 8.2 – 8.5 настоящей методики поверки.

8.7 Результат опробования считается положительным, если:

- в измеряемом спектральном диапазоне, указанном в таблице 4, наблюдается единственная широкая линия флуоресценции;

- минимальное значение сигнала флуоресценции в диапазоне волновых чисел, указанном в таблице 4, составляет не менее 0,02 от максимального значения сигнала.

## 9. Определение метрологических характеристик средства измерений

### 9.1 Определение диапазона воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции и относительной погрешности воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции

9.1.1 Подготовить к работе рамановский микроскоп из состава рабочего эталона в соответствии с его РЭ.

9.1.2 Установить меру на предметный стол рамановского микроскопа, включить лазер, соответствующий рабочей длине волны возбуждения поверяемой меры. Убедиться, что в программном обеспечении рамановского микроскопа спектральная шкала настроена на отображение волновых чисел частотных сдвигов при заданной длине волны возбуждения.

9.1.3 Произвести серию из десяти измерений спектров для поверяемой меры в условиях повторяемости, сохранить их в памяти компьютера.

9.1.4 Произвести измерения в соответствии с п.п. 9.1.2 – 9.1.3 настоящей методики поверки для всех поверяемых мер.

## 10. Подтверждение соответствия средства измерений метрологическим требованиям

10.1 Для каждой серии измерений вычислить усредненный спектр по формуле

$$\overline{I_{изм.}}(k_i) = \frac{\sum_{j=1}^N I_j(k_i)}{N}, \quad (1)$$

где  $N$  – число измерений в условиях повторяемости;  $j$  – порядковый номер измерения в условиях повторяемости;  $i$  – номер волнового числа в спектре;  $I_j(k_i)$  – интенсивность флуоресценции  $j$ -го измерения спектра, аппаратно-зависимые единицы (а.з.е.);  $k_i$  – значения волновых чисел, для которых измерены интенсивности флуоресценции меры,  $\text{см}^{-1}$ .

10.2 Вычислить скорректированный по интенсивности спектр флуоресценции по формуле

$$I_{корр.}(k_i) = \overline{I_{изм.}}(k_i) \cdot I_{насп.}(k_i), \quad (2)$$

где  $\overline{I_{изм.}}(k_i)$  – усредненный спектр флуоресценции меры, рассчитанный по формуле (1);  $I_{насп.}(k_i)$  – функция спектральной коррекции, приведенная в паспорте на меру.

10.3 Получить спектр относительной интенсивности по формуле

$$I_{корр\_отн.}(k_i) = \frac{I_{корр.}(k_i)}{I_{корр.}(k_{макс.})}, \quad (3)$$

где  $I_{корр.}(k_i)$  – скорректированный по интенсивности усредненный спектр флуоресценции;  $i$  – номер волнового числа в спектре;  $k_{макс.}$  – значение волнового числа, соответствующее максимальному значению интенсивности флуоресценции в диапазоне волновых чисел,  $\text{см}^{-1}$ , указанном в таблице 4.

10.4 Аппроксимировать и представить в протоколе первичной поверки спектр относительной флуоресценции, рассчитанный по формуле (3), полиномом 5 степени методом наименьших квадратов

$$I_{корр\_отн.}(k) = B_0 + B_1 k + B_2 k^2 + B_3 k^3 + B_4 k^4 + B_5 k^5, \quad (4)$$

где  $B_0, B_1, \dots, B_5$  – коэффициенты, вычисляемые по методу наименьших квадратов;  $k$  – значение волнового числа,  $\text{см}^{-1}$ .



10.5 Рассчитать для волновых чисел, лежащих в спектральном диапазоне, указанном в таблице 4, значения относительного среднеквадратического отклонения (ОСКО) случайной составляющей погрешности воспроизведения интенсивности флуоресценции по формуле

$$S(k_i) = \frac{1}{\overline{I_{изм}}(k_i)} \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [I_j(k_i) - \overline{I_{изм}}(k_i)]^2}{(N-1)}} \cdot 100, \quad (5)$$

где  $I_j(k_i)$  – интенсивность флуоресценции  $j$ -го измерения спектра, а.з.е.;  $\overline{I_{изм}}(k_i)$  – усредненная интенсивность флуоресценции меры, рассчитанная по формуле (1), а.з.е.;  $N$  – число измерений в условиях повторяемости;  $i$  – номер волнового числа в спектре;  $k_i$  – значения волновых чисел, для которых измерены интенсивности флуоресценции меры, см<sup>-1</sup>.

10.6 Рассчитать значения случайной составляющей погрешности воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции по формуле

$$S_{отн.i}(k_i) = \frac{S(k_i)}{\sqrt{N}} \cdot t, \quad (6)$$

где  $S(k_i)$  – значения ОСКО случайной составляющей погрешности измерений интенсивности флуоресценции;  $N$  – число измерений;  $t$  – коэффициент Стьюдента при  $P = 0,95$  и  $N = 10$ .

10.7 Рассчитать относительную систематическую погрешность воспроизведения интенсивности флуоресценции по формуле

$$S_{сист.i}(k_i) = \frac{|I_{насн.}(k_i) - \overline{I_{изм}}(k_i)|}{I_{насн.}(k_i)} \cdot 100, \quad (7)$$

где  $\overline{I_{изм}}(k_i)$  – усредненный спектр флуоресценции меры, найденный по формуле (1);  $I_{насн.}(k_i)$  – функция спектральной коррекции, приведенная в паспорте на меру.

10.8 Рассчитать доверительную границу погрешности воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции по формуле

$$\delta_i = \sqrt{S_{отн.i}^2(k_i) + S_{сист.i}^2(k_i)}, \quad (8)$$

где  $S_{отн.i}$  – значение случайной составляющей погрешности воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции, рассчитанное по формуле (6), %;  $S_{сист.i}(k_i)$  – значение относительной систематической погрешности воспроизведения интенсивности флуоресценции, рассчитанное по формуле (7), %;  $i$  – номер волнового числа.

10.9 Меры считаются прошедшими операцию поверки с положительным результатом, если в диапазоне волновых чисел, указанном для каждой из мер в таблице 4, рассчитанное минимальное значение относительной интенсивности флуоресценции составляет менее 0,1 отн. ед., а максимальное значение составляет не менее 0,99, если максимальное значение доверительной границы относительной погрешности воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции, вычисленное по формуле (8), не превышает  $\pm 10$  %, и соответствуют обязательным требованиям, предъявляемым к рабочим эталонам 2-го разряда по Локальной поверочной схеме для средств измерений волновых чисел линий комбинационного рассеяния света, относительных интенсивностей линий комбинационного рассеяния света и флуоресценции, утвержденной ФГБУ «ВНИИОФИ» 03 марта 2025 г.

## 11. Оформление результатов поверки

11.1 Результаты поверки оформляются протоколом поверки. Рекомендуемая форма протокола поверки приведена в приложении Б.

11.2 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.

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

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


Зам. начальника лаборатории Р-3

Ведущий научный сотрудник лаборатории Р-3

Инженер лаборатории Р-3

 В.И. Нагаев

 А.Д. Левин

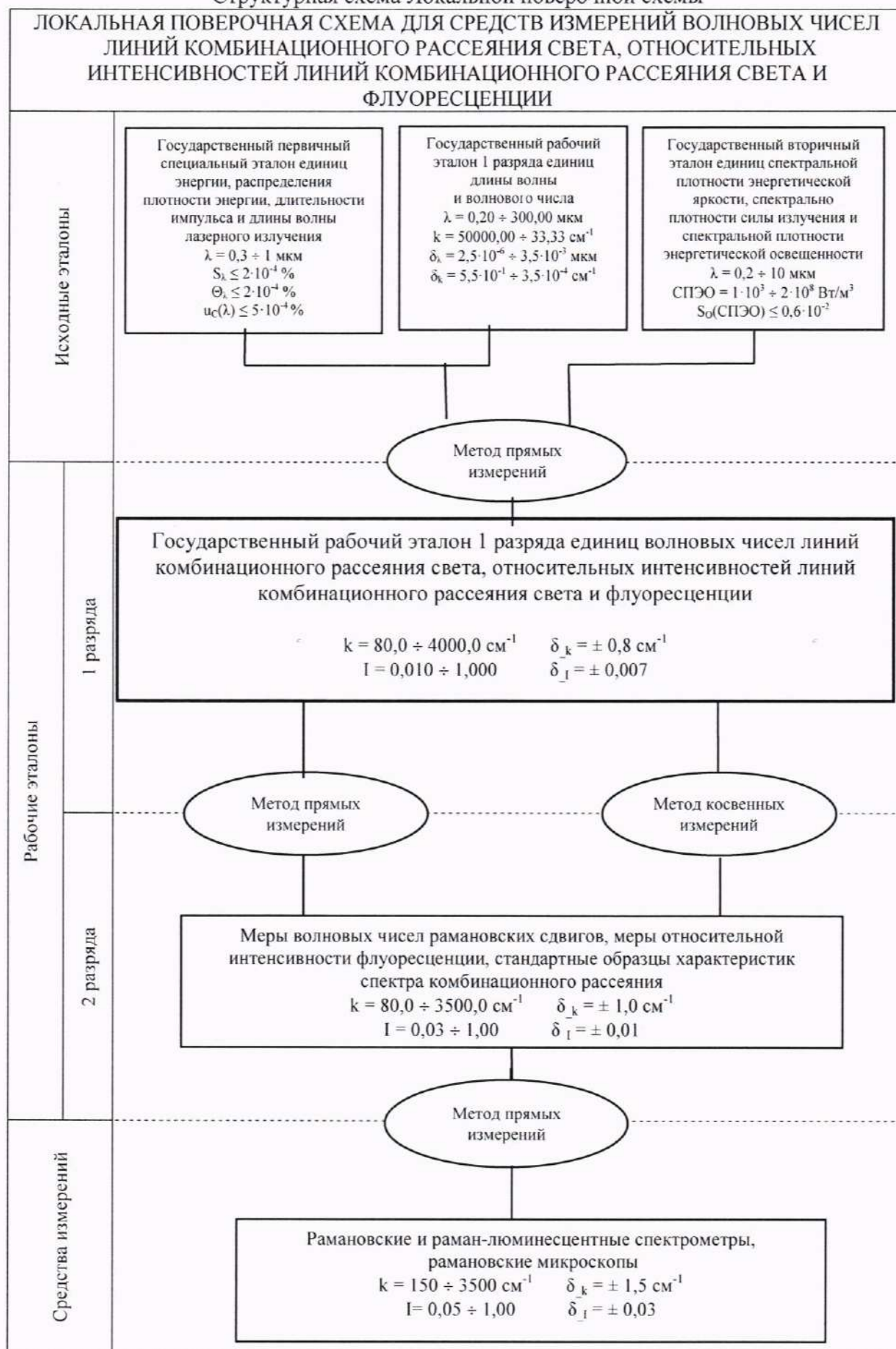
 А.А. Юшина



# ПРИЛОЖЕНИЕ А к МП 027.РЗ-25

(обязательное)

Структурная схема Локальной поверочной схемы



ПРИЛОЖЕНИЕ Б к МП 027.РЗ-25

(рекомендуемое)

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

Меры относительной интенсивности флуоресценции (комплект)

(наименование, тип СИ и исполнения в соответствии с описанием типа, в единственном числе)

Заводской номер:	
Год выпуска:	
Изготовитель:	ФГБУ «ВНИИОФИ»
Регистрационный номер в ФИФ:	
Владелец СИ:	
Применяемые средства поверки:	
Применяемая методика поверки:	МП 027.РЗ-25
Место проведения поверки:	
Условия поверки:	
– температура окружающего воздуха, °С	
– атмосферное давление, кПа	
– относительная влажность воздуха, %	

Проведение поверки:

1. Внешний осмотр средства измерений: Соответствует/Не соответствует
2. Подготовка к поверке и опробование средства измерений: Соответствует/Не соответствует
3. Определение метрологических характеристик средства измерений:

Таблица Б1 – Результаты определения метрологических характеристик

Наименование характеристики	Единица измерений	Измеренное значение	Вывод о соответствии
Диапазон воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции	-		
Относительная погрешность воспроизведения относительной интенсивности флуоресценции	%		

Таблица Б2 – Коэффициенты полинома, аппроксимирующего зависимость относительной интенсивности от волнового числа

Длина волны возбуждения меры, нм	Коэффициент	Значение коэффициента
	$A_0$	
	$A_1$	
	$A_2$	
	$A_3$	
	$A_4$	
	$A_5$	



4. Заключение по результатам поверки:

По результатам поверки средство измерений соответствует/не соответствует метрологическим характеристикам, указанным в описании типа, и признается пригодным/не пригодным к применению. Средство измерений соответствует/не соответствует эталону 2 разряда по ЛПС для средств измерений волновых чисел линий комбинационного рассеяния света, относительных интенсивностей линий комбинационного рассеяния света и флуоресценции, утвержденной ФГБУ «ВНИИОФИ» 03 марта 2025 г.

Поверитель:

\_\_\_\_\_  
подпись

\_\_\_\_\_  
Ф.И.О.

Дата поверки: \_\_\_\_\_

Руководитель:

\_\_\_\_\_  
подпись

\_\_\_\_\_  
Ф.И.О.