

УТВЕРЖДАЮ



Заместитель директора по инновациям
ФГУП «ВНИИОФИ»

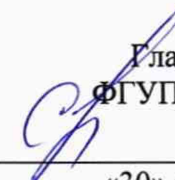
И.С. Филимонов
«30» декабря 2019 г.

Государственная система обеспечения единства измерений

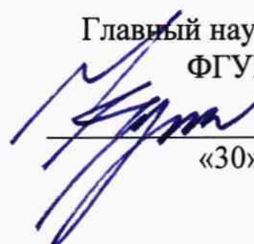
Комплекты мер флуоресценции КМФ-х

МЕТОДИКА ПОВЕРКИ
МП 047.Д4-19

Главный метролог
ФГУП «ВНИИОФИ»


С.Н. Негода
«30» декабря 2019 г.

Главный научный сотрудник
ФГУП «ВНИИОФИ»


В.Н. Крутиков
«30» декабря 2019 г.

Москва
2019 г.

1 Введение

Настоящая методика поверки распространяется на Комплекты мер флуоресценции КМФ-х (далее – комплекты), предназначенные для воспроизведения и передачи относительной единицы флуоресценции (далее - ОЕФ) при поверке (калибровке) флуориметров, спектрофлуориметров, флуориметрических анализаторов, ПЦР-анализаторов и других люминесцентных приборов, и устанавливает порядок, методы и средства проведения первичной поверки.

Комплекты состоят из трех наборов мер (на основе флуоресцеина, родамина, хинина) и предусматривают первичную поверку до ввода в эксплуатацию.

Метрологические характеристики комплектов указаны в таблице 1.

Таблица 1 - Метрологические характеристики

Наименование характеристики	Значение
Значение интенсивности флуоресценции*, ОЕФ: на длине волны эмиссии 514 нм при длине волны возбуждения 405 нм - мера № 1** - мера № 2 - мера № 3 - мера № 4 на длине волны эмиссии 578 нм при длине волны возбуждения 405 нм - мера № 5** - мера № 6 - мера № 7 на длине волны эмиссии 450 нм при длине волны возбуждения 350 нм - мера № 8** - мера № 9 - мера № 10	от 0,8 до 1,2 от 0,07 до 0,15 от 0,006 до 0,020 от 0,0005 до 0,0025 от 0,1 до 0,3 от 0,01 до 0,03 от 0,001 до 0,005 от 0,5 до 1,0 от 0,05 до 0,1 от 0,005 до 0,05
Пределы допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции, % - меры № 1-3, 5-6, 8-9 - меры № 4, 7, 10	± 3 ± 5
Значение интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм*, ОЕФ	от 0,0005 до 500,0
Пределы допускаемой относительной погрешности интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм*, %	± 5
<p>* Действительные значения интенсивности флуоресценции определяются в процессе поверки комплекта для конкретного раствора при длинах волн возбуждения и эмиссии, а также температуре, оговоренных заказчиком;</p> <p>** Для указанных мер может быть приведено спектральное распределение интенсивности флуоресценции для всего диапазона эмиссии по требованию заказчика. Действительные значения интенсивностей в указанном спектральном распределении определяются в процессе поверки комплекта для конкретного раствора при длине волны возбуждения и температуре, оговоренных потребителем, в пределах установленного спектрального диапазона.</p>	

2 Операции поверки

2.1 При проведении первичной поверки должны быть выполнены операции, указанные в таблице 2.

Таблица 2 – Операции при проведении первичной поверки

№ п/п	Наименование операций	Номер пункта НД по поверке	Обязательность выполнения операции при первичной поверке
1	Внешний осмотр	8.1	Да
2	Определение действительного значения интенсивности флуоресценции ^{1) 2)}	8.2.1	Да
3	Определение действительного значения интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм ²⁾	8.2.2	Да
4	Определение относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции	8.2.3	Да
5	Определение относительной погрешности интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм	8.2.4	Да

¹⁾ Для мер № 1, 5, 8 может быть определено спектральное распределение интенсивности флуоресценции для всего диапазона эмиссии по требованию заказчика.

²⁾ Действительные значения определяются в процессе поверки комплекта для конкретной меры при длине волны возбуждения и температуре, оговоренных потребителем, в пределах установленного спектрального диапазона.

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

2.3 Поверку средства измерений осуществляют аккредитованные в установленном порядке в области обеспечения единства измерений юридические лица и индивидуальные предприниматели.

3 Средства поверки

3.1 При проведении поверки должны быть применены средства, указанные в таблице 3.

Таблица 3 - Средства поверки

Номер пункта документа по поверке	Наименование и тип основного или вспомогательного средства поверки; обозначение НД, регламентирующего метрологические и основные технические характеристики средства поверки	Основные технические и (или) метрологические характеристики
8.2	Государственный первичный эталон единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твёрдых веществах и материалах на основе спектральных методов (далее – ГЭТ) по ГПС, утвержденной Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30.12.2019 г. № 3455	Массовая концентрация компонента от $1 \cdot 10^{-9}$ до 99,99 г/дм ³ ¹⁾ ; Относительное среднеквадратическое отклонение массовой концентрации компонента от 0,01 до 0,5 % при n=10; Относительная неисключенная систематическая погрешность массовой концентрации компонента от 0,045 до 1,2 %; Относительная стандартная

		неопределенность массовой концентрации компонента: - по типу А от 0,01 до 0,5 % - по типу В от 0,013 до 0,7 % - суммарная от 0,016 до 0,9 % Относительная расширенная неопределенность массовой концентрации компонента при $k=2$ от 0,032 до 1,8 %
	Вспомогательное оборудование: Кварцевая кювета по ГОСТ 20903-75	Ширина окна 10 мм

1) В соответствии с ГПС, утвержденной Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30.12.2019 г. № 3455, за опорную (1 ОЕФ) принимают флуоресцирующую способность водного ($pH=5,5$) раствора флуоресцеина натрия концентрацией 1 мг/дм³ на длине волны 514 нм при возбуждении 405 нм.

3.2 Допускается также применение других средств, не приведенных в таблице 3, но обеспечивающих определение (контроль) метрологических характеристик поверяемых комплектов с требуемой точностью. Средства поверки, указанные в таблице 3, должны быть аттестованы (поверены) в установленном порядке.

4 Требования к квалификации поверителей

К проведению поверки допускают лиц, изучивших настоящую методику поверки и Руководство по эксплуатации комплектов, имеющих квалификационную группу не ниже III в соответствии с правилами по охране труда при эксплуатации электроустановок, указанных в приложении к приказу Министерства труда и социальной защиты РФ от 24.07.13 № 328н и прошедшие полный инструктаж по технике безопасности, прошедших обучение на право проведения поверки по требуемому виду измерений, ученые хранители или лица допущенные к работе на ГЭТ.

5 Требования безопасности

5.1 Комплекты должны поверяться в закрытых взрыво- и пожаробезопасных лабораторных помещениях, оборудованных вытяжной вентиляцией. При проведении поверки следует соблюдать требования, установленные ГОСТ Р 12.1.031-2010, ГОСТ 12.1.040-83. 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.

5.2 Система электрического питания используемых при поверке приборов должна быть защищена от колебаний и пиков сетевого напряжения, искровые генераторы не должны устанавливаться вблизи приборов.

5.3 При выполнении поверки должны соблюдаться требования по ГОСТ 12.1.019-2017, а также требования руководства по эксплуатации комплектов.

5.4 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 Условия поверки

6.1 При проведении поверки следует соблюдать следующие условия:

- температура окружающей среды, °С.....от +20 до +24
- относительная влажность воздуха, %.....не более 60
- атмосферное давление, кПа.....от 96 до 104

- напряжение питающей сети, В.....от 216 до 224;
- частота, Гц.....от 49 до 51.

6.2 Температура кюветного отделения должна быть установлена согласно запросу заказчика, в пределах от +5 до +40 °С. Если не указано иное, поверка проводится при температуре кюветного отделения +22 °С.

6.3 Комплекты не должны подвергаться прямому воздействию солнечных лучей. Не устанавливайте их около окна.

6.4 Рядом с комплектами не должно быть источников тепла, таких как газовая горелка, электронагреватель, печь и т.п. Допускаемый перепад температуры в течение проведения поверки – не более 2 °С.

7 Подготовка к поверке

7.1 Изучить руководство по эксплуатации комплектов.

7.2 До начала поверки должны быть выполнены операции технического обслуживания комплекта в соответствии с разделом 7 руководства по эксплуатации комплекта мер КМФ-х.

7.3 Проверить наличие средств поверки комплектов, указанных в таблице 3, и укомплектованность их документацией.

8 Проведение поверки

8.1 Внешний осмотр.

8.1.1 При внешнем осмотре должно быть установлено:

- соответствие состава комплекта требованиям п.5.1 его руководства по эксплуатации;
- отсутствие механических повреждений футляра, мер комплекта;
- наличие маркировки, подтверждающей тип и заводской номер комплекта;
- читаемость надписей на мерах комплекта;
- соответствие комплектации заявленной в руководстве по эксплуатации (РЭ)
- однородность вещества мер, отсутствие осадка или газовых включений.

8.1.2 Комплекты считаются прошедшими операцию поверки, если они соответствуют всем перечисленным выше требованиям.

8.2 Определение метрологических характеристик

8.2.1 Определение действительных значений интенсивности флуоресценции

8.2.1.1 Включить люминесцентный комплекс из состава ГЭТ. Установить ширину щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии 2 нм в соответствии с РЭ на ГЭТ.

8.2.1.2 Содержимое ампулы из комплекта поместить в кварцевую кювету с окном шириной 10 мм по ГОСТ 20903-75.

8.2.1.3 Установить кварцевую кювету с мерой в измерительный отсек люминесцентного комплекса.

8.2.1.4 В соответствии с РЭ на люминесцентный комплекс выполнить десять измерений действительных значений интенсивности флуоресценции I_i , ОЕФ. Измерения интенсивности флуоресценции проводят для мер № с 1 по 4 на длине волны эмиссии 514 нм при длине волны возбуждения 405 нм, для мер № с 5 по 7 на длине волны эмиссии 578 нм при длине волны возбуждения 405 нм, для мер № с 8 по 10 на длине волны эмиссии 450 нм при длине волны возбуждения 350 нм.

8.2.1.5 Повторить п.8.2.1.2 - 8.2.1.4 поочередно для каждой из мер комплекта.

8.2.1.6 Из полученных значений в п. 8.2.1.5 для каждой меры рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции \bar{I} , ОЕФ, по формуле

$$\bar{I}_i = \frac{\sum_{n=1}^n I_i}{n}, \quad (1)$$

где I_i – измеренное значение интенсивности флуоресценции, ОЕФ;

n – номер измерения;

i – номер меры.

8.2.1.7 Комплекты считаются прошедшими операцию поверки, если полученные значения интенсивности флуоресценции соответствуют значениям, указанным в таблице 4.

Таблица 4 – Значения интенсивности флуоресценции

Наименование характеристики	Значение
Значение интенсивности флуоресценции, ОЕФ: на длине волны эмиссии 514 нм при длине волны возбуждения 405 нм	
- мера № 1	от 0,8 до 1,2
- мера № 2	от 0,07 до 0,15
- мера № 3	от 0,006 до 0,020
- мера № 4	от 0,0005 до 0,0025
на длине волны эмиссии 578 нм при длине волны возбуждения 405 нм	
- мера № 5	от 0,1 до 0,3
- мера № 6	от 0,01 до 0,03
- мера № 7	от 0,001 до 0,005
на длине волны эмиссии 450 нм при длине волны возбуждения 350 нм	
- мера № 8	от 0,5 до 1,0
- мера № 9	от 0,05 до 0,1
- мера № 10	от 0,005 до 0,05

8.2.2 Определение действительных значений интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм

8.2.2.1 Аналогично п. 8.2.1.1 - 8.2.1.4 выполнить измерения интенсивности флуоресценции I_i , ОЕФ, на участках диапазона спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм и при длине волны возбуждения, определённых в запросе заказчика. Ширина щелей монохроматоров возбуждения и эмиссии, если иное не указано заказчиком, составляет 2 нм.

8.2.2.2 В соответствии с РЭ на люминесцентный комплекс по полученным в п. 8.2.2.1 значениям интенсивности флуоресценции рассчитать значения интегральной интенсивности флуоресценции.

8.2.2.3 Повторить определение действительных значений интегральной интенсивности флуоресценции 10 раз для каждой из мер.

8.2.2.4 По полученным в п.8.2.2.1 - 8.2.2.3 значениям для каждой меры рассчитать среднее арифметическое действительное значение интегральной интенсивности флуоресценции, $\bar{I}_{\text{интегр.}i}$, ОЕФ.

$$\bar{I}_{\text{интегр.}i} = \frac{\sum_{n=1}^n I_{\text{интегр.}i}}{n}, \quad (2)$$

где $I_{\text{интегр.}i}$ – значение интегральной интенсивности флуоресценции, ОЕФ.

8.2.2.5 Комплекты считаются прошедшими операцию поверки, если полученные действительные значения интегральной интенсивности флуоресценции находятся в диапазоне от 0,0005 до 500 ОЕФ.

8.2.3 Определение относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции

8.2.3.1 Рассчитать относительное среднее квадратическое отклонение среднего арифметического значения измерений интенсивности флуоресценции, %, по формуле (3):

$$S_x = \frac{1}{\bar{I}_i} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^n (I_i - \bar{I}_i)^2}{n(n-1)}} \cdot 100 \quad (3)$$

8.2.3.2 Рассчитать доверительные границы случайной погрешности оценки интенсивности флуоресценции по формуле (4):

$$\varepsilon = t \cdot S_x, \quad (4)$$

где $t=2,262$ – коэффициент Стьюдента для $n=10$ и доверительной вероятности $P=0,95$.

8.2.3.3 Рассчитать среднее квадратическое отклонение неисключенной систематической погрешности массовой концентрации компонента по формуле (5):

$$S_\theta = \frac{\theta}{\sqrt{3}}, \quad (5)$$

где θ – неисключенная систематическая погрешность массовой концентрации компонента люминесцентного комплекса из состава ГЭТ, равная относительной стандартной неопределенности массовой концентрации компонента по типу В из сертификата калибровки, %.

8.2.3.4 Рассчитать относительную погрешность измерений интенсивности флуоресценции по формуле (6):

$$\Delta_i = \frac{\varepsilon + \theta}{S_x + S_\theta} \cdot S_\Sigma, \quad (6)$$

где S_Σ – суммарное среднее квадратическое отклонение оценки интенсивности флуоресценции, %, рассчитанное по формуле (7):

$$S_\Sigma = \sqrt{S_\theta^2 + S_x^2} \quad (7)$$

8.2.3.5 Комплекты считаются прошедшими операцию поверки, если полученные значения относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции для мер № 1-3, 5-6, 8-9 не превышают ± 3 %, а для мер № 4, 7, 10 не превышает ± 5 %.

8.2.4 Определение относительной погрешности интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм

8.2.4.1 Рассчитать относительное среднее квадратическое отклонение среднего арифметического значения измерений интегральной интенсивности флуоресценции, %, по формуле (8):

$$S_{\text{интегр.}x} = \frac{1}{\bar{I}_{\text{интегр.}i}} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^n (I_{\text{интегр.}i} - \bar{I}_{\text{интегр.}i})^2}{n(n-1)}} \cdot 100 \quad (8)$$

8.2.4.2 Рассчитать доверительные границы случайной погрешности оценки интегральной интенсивности флуоресценции по формуле (9):

$$\varepsilon = t \cdot S_{\text{интегр.}x}, \quad (9)$$

где $t=2,262$ – коэффициент Стьюдента для $n=10$ и доверительной вероятности $P=0,95$.

8.2.4.3 Рассчитать среднее квадратическое отклонение неисключенной систематической погрешности массовой концентрации компонента, S_{θ} , по формуле (5).

8.2.4.4 Рассчитать относительную погрешность измерений интегральной интенсивности флуоресценции по формуле (10):

$$\Delta_{\text{интегр.}i} = \frac{\varepsilon + \theta}{S_{\text{интегр.}x} + S_{\theta}} \cdot S_{\text{интегр.}\Sigma}, \quad (10)$$

где $S_{\text{интегр.}\Sigma}$ – суммарное среднее квадратическое отклонение оценки интегральной интенсивности флуоресценции, %, рассчитанное по формуле (11):

$$S_{\text{интегр.}\Sigma} = \sqrt{S_{\theta}^2 + S_{\text{интегр.}x}^2} \quad (11)$$

8.2.4.5 Комплекты считаются прошедшими операцию поверки, если полученные значения относительной погрешности измерений интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм не превышает $\pm 5 \%$.

9 Оформление результатов поверки

9.1 Результаты измерений заносятся в протокол (приложение А).

9.2 Комплекты, прошедшие поверку с положительным результатом, признаются годными и допускаются к применению. На них выдается свидетельство о поверке установленной формы и наносят знак поверки на свидетельство о поверке согласно Приказу Министерства промышленности и торговли Российской Федерации №1815 от 02.07.2015 «Об утверждении Порядка проведения поверки средств измерений, требования к знаку поверки и содержанию свидетельства о поверке».

9.3 Комплекты, прошедшие поверку с отрицательным результатом, признаются непригодными, не допускаются к применению. Выписывают «Извещение о непригодности» с указанием причин в соответствии с требованиями Приказа Министерства промышленности и торговли Российской Федерации №1815 от 02.07.2015.

Начальник отдела ФГУП «ВНИИОФИ»

А.В. Иванов

Начальник сектора ФГУП «ВНИИОФИ»

А.Н. Шобина

Ведущий научный сотрудник
ФГУП «ВНИИОФИ»

М.М. Чугунова

Инженер 2 категории ФГУП «ВНИИОФИ»

В.А. Кормилицына

ПРИЛОЖЕНИЕ А**(Обязательное)**

к Методике поверки МП 047.Д4-19

«ГСИ. Комплекты мер флуоресценции КМФ-х. Методика поверки»

ПРОТОКОЛ**первичной / периодической поверки**

от « _____ » _____ 201 ____ года

Средство измерений: _____ Комплекты мер флуоресценции КМФ-х
(Наименование СИ, тип (если в состав СИ входит несколько автономных блоков)

то приводят их перечень (наименования) и типы с разделением знаком «косая дробь» /)

Зав.№ _____ **№/№** _____
Заводские номера блоков**Принадлежащее** _____
Наименование юридического лица, ИНН**Поверено в соответствии с методикой поверки** МП 047.Д4-19 «ГСИ. Комплекты мер флуоресценции КМФ-х. Методика поверки», утвержденной ФГУП «ВНИИОФИ»
«30» декабря 2019 г.

Наименование документа на поверку, кем утвержден (согласован), дата

С применением эталонов _____
(наименование, заводской номер, разряд, класс точности или погрешность)**При следующих значениях влияющих факторов:**
(приводят перечень и значения влияющих факторов, нормированных в методике поверки)

- температура кюветного отделения, °С
- температура окружающего воздуха, °С
- относительная влажность воздуха, %, не более
- атмосферное давление, кПа
- напряжение питающей сети, В
- частота, Гц

Внешний осмотр: _____**Получены результаты поверки метрологических характеристик:**

Таблица А.1 - Результаты измерений

Наименование характеристики	Результат	Требования методики поверки
Значение интенсивности флуоресценции*, ОЕФ: на длине волны эмиссии 514 нм при длине волны возбуждения 405 нм - мера № 1** - мера № 2 - мера № 3 - мера № 4 на длине волны эмиссии 578 нм при длине волны возбуждения 405 нм - мера № 5** - мера № 6 - мера № 7		от 0,8 до 1,2 от 0,07 до 0,15 от 0,006 до 0,020 от 0,0005 до 0,0025 от 0,1 до 0,3 от 0,01 до 0,03 от 0,001 до 0,005

Наименование характеристики	Результат	Требования методики поверки
на длине волны эмиссии 450 нм при длине волны возбуждения 350 нм - мера № 8** - мера № 9 - мера № 10		от 0,5 до 1,0 от 0,05 до 0,1 от 0,005 до 0,05
Пределы допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции, % - меры № 1-3, 5-6, 8-9 - меры № 4, 7, 10		± 3 ± 5
Значение интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм*, ОЕФ		от 0,0005 до 500,0
Пределы допускаемой относительной погрешности интегральной интенсивности флуоресценции для участков спектра эмиссии шириной от 1 до 500 нм*, %		± 5

* Действительные значения интенсивности флуоресценции определяются в процессе поверки комплекта для конкретного раствора при длинах волн возбуждения и эмиссии, а также температуре, оговоренных заказчиком;

** Для указанных мер может быть приведено спектральное распределение интенсивности флуоресценции для всего диапазона эмиссии по требованию заказчика. Действительные значения интенсивностей в указанном спектральном распределении определяются в процессе поверки комплекта для конкретного раствора при длине волны возбуждения и температуре, оговоренных потребителем, в пределах установленного спектрального диапазона.

Рекомендации

Средство измерений признать пригодным (или непригодным) для применения

Исполнители:

подписи, ФИО, должность