

УТВЕРЖДАЮ



Заместитель директора по инновациям
ФГУП «ВНИИОФИ»

И.С. Филимонов
«05» октября 2018 г.

Государственная система обеспечения единства измерений

Флуориметр Кристалл-БИО

МЕТОДИКА ПОВЕРКИ
МП 069.Д4-18

Главный метролог
ФГУП «ВНИИОФИ»

С.Н. Негода
«05» октября 2018 г.

Москва
2018 г.

1 Введение

Настоящая методика поверки распространяется на Флуориметр Кристалл-БИО (далее – флуориметр), предназначенный для измерений относительных единиц флуоресценции и анализа флуоресцентного сигнала жидкой пробы, содержащей флуорофоры, в том числе, на основе полупроводниковых квантовых точек (КТ), и устанавливает порядок, методы и средства проведения первичной и периодической поверок.

Интервал между поверками 1 год.

2 Операции поверки

2.1 При проведении первичной и периодической поверок должны быть выполнены операции, указанные в таблице 1.

Таблица 1 – Операции проведения поверки

№ п/п.	Наименование операций	Номер пункта НД по поверке	Обязательность выполнения операции при поверке	
			Первичной	Периодической
1	Внешний осмотр	8.1	Да	Да
2	Опробование	8.2	Да	Да
3	Проверка идентификации программного обеспечения	8.3	Да	Да
4	Определение метрологических характеристик	8.4		
5	Определение диапазона измерений интенсивности флуоресценции при мощности лазера 12 % и относительной погрешности измерения интенсивности флуоресценции	8.4.1	Да	Да

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 первичной и периодической поверок должны быть применены средства, указанные в таблице 2.

Таблица 2 - 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
8.4	Государственный первичный эталон единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твёрдых веществах и материалах на основе	Спектральный диапазон регистрации эмиссии: от 300 до 850 нм; спектральный диапазон возбуждения: от 200 до 700 нм; диапазон измерений

	спектральных методов (далее - ГЭТ) по ГОСТ Р 8.735.0-2011	интенсивности флуоресценции: от 10^{-5} до 10^5 отн.ед.флуор.; стандартная неопределенность по типу А: 1,2 %; стандартная неопределенность по типу В: 1,3 %; суммарная стандартная неопределенность: 1,3 %; расширенная неопределенность ($k=2$; $p=0,95$): 2,6 %.
8.2, 8.4	Вспомогательное оборудование: - Уранин А ТУ 2463-289-00204197-2003 (флуоресценн натрия высший сорт) - Вода высокой чистоты по ОСТ В.95.823-95	-

3.2 Средства поверки, указанные в таблице 2, должны быть поверены и аттестованы в установленном порядке. Допускается также применение других средств, не приведенных в таблице 2, но обеспечивающих определение (контроль) метрологических характеристик поверяемого флуориметра с требуемой точностью.

4 Требования к квалификации поверителей

К проведению поверки допускают лиц, изучивших настоящую методику поверки и руководство по эксплуатации флуориметра, 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.

5 Требования безопасности

5.1 Флуориметр должен устанавливаться 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 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, указанные в «Правилах техники безопасности при эксплуатации электроустановок потребителей», утвержденных Госэнергонадзором, а также требования руководства по эксплуатации флуориметра.

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.

5.5 При использовании легковоспламеняющихся и токсичных растворителей для пробоподготовки необходимо обеспечить эффективную вентиляцию лабораторного помещения; иначе существует возможность отравления персонала и воспламенения испарений.

6 Условия поверки

6.1 При проведении поверки следует соблюдать следующие условия:

- температура окружающей среды, °С..... от +18 до +28
- относительная влажность воздуха, %, не более 80
- атмосферное давление, мПа..... от 94 до 106.

6.2 В помещении, где проводится поверка, должны отсутствовать факторы появления пыли, интенсивных воздушных потоков, вибрации и паров, вызывающих коррозию.

6.3 Флуориметр не должен подвергаться прямому воздействию солнечных лучей.

6.4 Флуориметр должен быть установлен на ровную горизонтальную поверхность.

7 Подготовка к поверке

7.1 В соответствии с приложением Б подготовить растворы № 1, 2, 3 на основе разбавления чистого флуоресцеина натрия, указанного в таблице 2.

7.2 Присоединить стандартный кабель электропитания к флуориметру и подключите его к сети электропитания.

7.3 Подключить флуориметр к персональному компьютеру (далее - ПК) с помощью Ethernet-кабеля. Установить на ПК программное обеспечение (далее - ПО), для этого необходимо скопировать содержимое флеш-накопителя, входящего в комплект поставки на ПК и вывести ярлык пускового файла на рабочий стол.

7.4 Включить флуориметр, используя выключатель на его задней панели. По завершении предварительных настроек на передней панели загорится зелёная лампочка (см. рисунок 1).

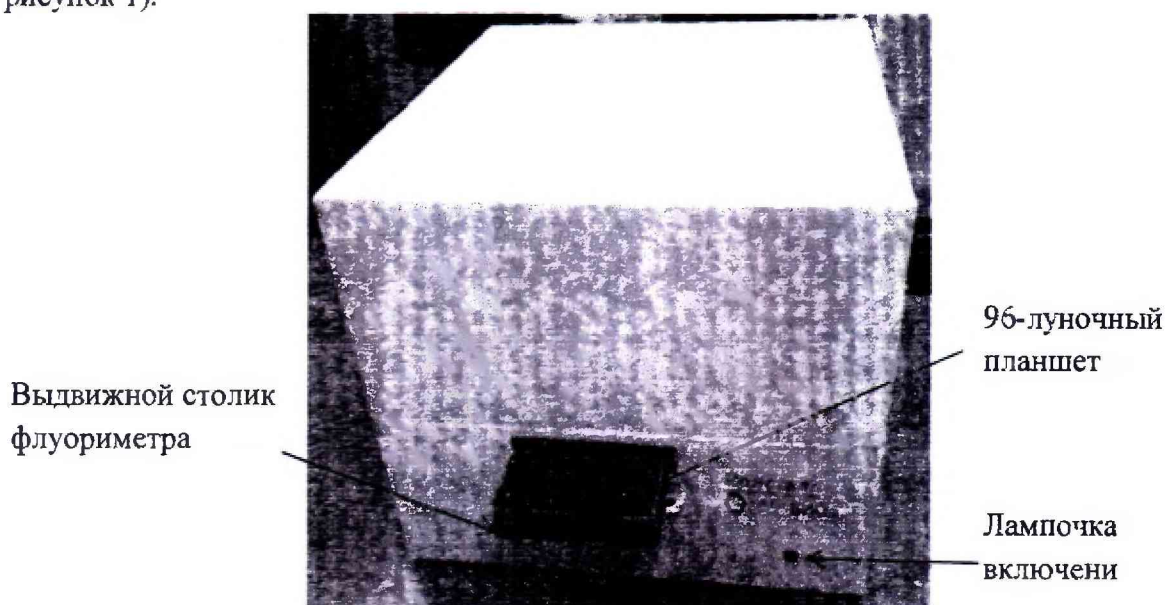


Рисунок 1 - Общий вид флуориметра

7.5 Активировать приложение «Люминесцентный сканер» и нажать кнопку «Подключение» в интерфейсе программы (см. Рисунок 2).

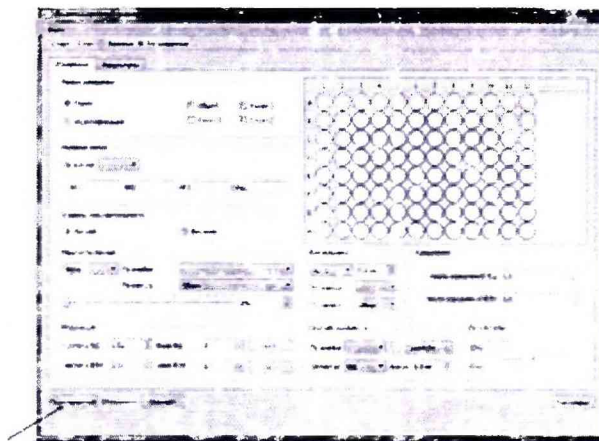


Рисунок 2

Когда подключение к флуориметру будет завершено, справа от вышеуказанной кнопки указание «Отключено», выполненное чёрными буквами, изменится на указание «Подключено», выполненное зелёными буквами.

8 Проведение поверки

8.1 Внешний осмотр

8.1.1 Внешним осмотром флуориметра должно быть установлено:

- наличие маркировки, подтверждающей тип и заводской номер флуориметра;
- соответствие комплектности флуориметра требованиям нормативно-технической документации (руководство по эксплуатации и описание типа);
- отсутствие на наружных поверхностях флуориметра повреждений, влияющих на их работоспособность;
- чистота гнезд, разъёмов и клемм.

8.1.2 Флуориметр считается прошедшим операцию поверки, если он соответствует всем перечисленным выше требованиям.

8.2 Проверка идентификации программного обеспечения

Проверить соответствие идентификационных данных программного обеспечения сведениям, приведенным в описании типа на спектрофотометры.

8.2.1 Идентификационные данные программного обеспечения флуориметра отражаются в верхней строке главного окна программы Люминесцентный сканер после названия (см. рисунок 2).

8.2.2 Флуориметр считается прошедшим операцию поверки, если идентификационные данные программного обеспечения соответствуют значениям, приведенным в таблице 3.

Таблица 3 - Идентификационные данные

Идентификационные данные (признаки)	Значение
Идентификационное наименование ПО	Люминесцентный сканер
Номер версии (идентификационный номер) ПО	1.0 и выше
Цифровой идентификатор ПО (контрольная сумма исполняемого кода)	-

8.3 Опробование

8.3.1 В интерфейсе программы нажать кнопку «Планшет» (рядом с кнопкой «Подключение»). В результате нажатия выдвигается столик флуориметра для размещения планшета (см. рисунок 1).

8.3.2 В 96-луночной планшете из комплекта флуориметра заполнить каждую лунку ряда А водой высокой чистоты, из таблицы 2, в объёме 150 мкл, рядов В, С, D растворами № 1, 2, 3 соответственно, в объёме 150 мкл, подготовленными в п. 7.1.

8.3.3 Установить планшет на выдвинутом столике флуориметра и нажать клавишу «Планшет», после чего столик с планшетом помещаются в кюветное отделение флуориметра.

8.3.4 В главном окне ПО открыть вкладку «Измерения» в режиме «Расширенные» и установить настройки измерений: лунки для анализа – ряды А-D (выбранные лунки окрашиваются в светло-зелёный цвет), режим измерения – Общий, мощность лазера 12 %, нулевая линия – по любой из ячеек А2 - А11, фокусировка – по любой из ячеек В2 - В11.

8.3.5 Для запуска измерений нажать кнопку «Старт», после чего открыть вкладку «Результаты» (см. рисунок 3). Измеренные значения сигнала флуоресценции от лунок появятся в виде цифр, располагающихся в соответствующих ячейках таблицы результатов.

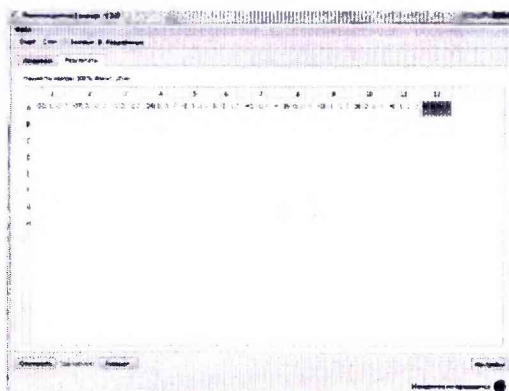


Рисунок 3 – Результаты измерений

8.3.6 Флуориметр считается прошедшим операцию поверки, если значения интенсивности в ряду А находятся в диапазоне от минус 20 до плюс 20 усл.ед., в ряду В – в диапазоне от 10000 до 20000 усл.ед., в ряду С – в диапазоне от 1000 до 2000 усл.ед., в ряду D – в диапазоне от 100 до 200 усл.ед.

8.4 Определение метрологических характеристик

8.4.1 Определение диапазона измерений интенсивности флуоресценции при мощности лазера 12 % и относительной погрешности измерения интенсивности флуоресценции

8.4.1.1 Измерить на люминесцентном комплексе из состава ГЭТ суммарную относительную интенсивность флуоресценции растворов № 1 и № 2 для длины волны возбуждения 445 нм и спектрального диапазона регистрации флуоресцентного сигнала от 470 до 700 нм, $I_{ЭТ1}$ и $I_{ЭТ2}$, отн.ед.флуор.

8.4.1.2 Рассчитать коэффициент градуировки, отн.ед.флуор./усл.ед., на основании результатов измерений, проведённых в соответствии с п.8.3.5, по формуле (1):

$$K = \frac{I_{ЭТ1} \cdot 12}{\sum_{i=1}^{12} I'_{Вi}}, \quad (1)$$

где $I_{ЭТ1}$ – значение относительной интенсивности в отн.ед.флуор. для раствора №1, полученное на люминесцентном комплексе из состава ГЭТ в соответствии с п.8.4.1.1;

$I'_{Вi}$ – значение интенсивности сигнала в усл.ед., полученное на флуориметре для ячеек В1-В12 в соответствии с п.8.3.5.

8.4.1.3 На основании результатов измерений, полученных в п.8.3.5, рассчитать средние значения интенсивности сигнала в усл.ед., по формулам (2) и (3):

$$\bar{I}_B = \frac{\sum_{i=1}^{12} I_{Вi}}{12}, \quad (2)$$

$$\bar{I}_C = \frac{\sum_{i=1}^{12} I_{Ci}}{12}, \quad (3)$$

где I_{B_i} – значение интенсивности сигнала в усл.ед., полученное для ячеек В1 - В12;
 I_{C_i} – значение интенсивности сигнала в усл.ед., полученное для ячеек С1 - С12.

8.4.1.4 Рассчитать значения интенсивности флуоресценции в отн.ед.флуор. для растворов № 1, № 2 в по формулам (4) и (5):

$$I_1 = K \cdot \bar{I}_B, \quad (4)$$

$$I_2 = K \cdot \bar{I}_C, \quad (5)$$

где К – коэффициент градуировки, полученный в п.8.4.1.2.

8.4.1.5 Рассчитать значения относительной погрешности проведённых измерений интенсивности флуоресценции, %, по формулам (6) и (7):

$$\Delta I_1 = \frac{\bar{I}_B - I_{ЭТ1}}{I_{ЭТ1}} \cdot 100 \quad (6)$$

$$\Delta I_2 = \frac{\bar{I}_C - I_{ЭТ2}}{I_{ЭТ2}} \cdot 100 \quad (7)$$

8.4.1.6 За относительную погрешность измерения интенсивности флуоресценции принимают наибольшее из значений, полученных в соответствии с п.8.4.1.5.

8.4.1.7 Флуориметр считается прошедшим операцию поверки, если значения интенсивности флуоресценции находятся в пределах от 1 до 50 отн.ед.флуор., а значение относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции не превышает $\pm 5\%$.

9 Оформление результатов поверки

9.1 Результаты измерений заносятся в протокол (приложение А).

9.2 Флуориметр, прошедший поверку с положительным результатом, признается годными и допускается к применению. На него выдается свидетельство о поверке установленной формы и наносят знак поверки 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 Флуориметр, прошедший поверку с отрицательным результатом, признается непригодными, не допускается к применению. Свидетельство о предыдущей поверке и (или) оттиск поверительного клейма аннулируют и 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»

 М.М. Чугунова

Ведущий инженер ФГУП «ВНИИОФИ»

 А.Н. Шобина

Инженер 2 категории ФГУП «ВНИИОФИ»

 В.А. Кормилицына

ПРОТОКОЛ
первичной / периодической поверки
от « _____ » _____ 201__ года

Средство измерений: Флуориметр Кристалл-БИО
(Наименование СИ, тип (если в состав СИ входит несколько автономных блоков))

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

Зав.№ 001 _____
Заводские номера блоков

Принадлежащее _____
Наименование юридического лица, ИНН

Поверено в соответствии с методикой поверки МП 069.Д4-18 «ГСИ. Флуориметр Кристалл-БИО. Методика поверки», утвержденной ФГУП «ВНИИОФИ» 05 октября 2018 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 окружающего воздуха, °С
- относительная влажность воздуха, %, не более
- атмосферное давление, кПа

Внешний осмотр _____

Проверка ПО _____

Опробование _____

Получены результаты поверки метрологических характеристик:

Таблица 1 - Флуориметр Кристалл-БИО

Характеристика	Результат	Требования методики поверки
Диапазон измерения интенсивности флуоресценции при мощности лазера 12 %, отн.ед. флуор.		от 1 до 50
Пределы допускаемой относительной погрешности измерения интенсивности флуоресценции, %		± 5

Рекомендации _____
Средство измерений признать пригодным (или непригодным) для применения

Исполнители: _____
_____ подписи, ФИО, должность

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРОВ НА ОСНОВЕ РАЗБАВЛЕНИЯ ЧИСТОГО ФЛУОРЕСЦЕИНА НАТРИЯ

Б.1 Назначение и область применения

Настоящая методика регламентирует процедуру приготовления водных растворов флуоресцеина натрия на основе разбавления Уранина А ТУ 2463-289-00204197-2003 (флуоресцеин натрия высший сорт). Указанные растворы предназначены для испытаний с целью утверждения типа Флуориметра Кристалл-БИО. Значение концентрации флуоресцеина натрия в растворах № 1, 2, 3 составляет 0,1; 0,01; 0,001 мг/дм³ соответственно.

Б.2 Нормы и погрешности

Б.2.1 Характеристики погрешности растворов флуоресцеина натрия оценивают по процедуре приготовления с учетом всех составляющих погрешностей, вносимых на каждой стадии приготовления.

Б.2.2 Настоящая методика обеспечивает получение растворов флуоресцеина натрия с погрешностью значений концентрации флуоресцеина натрия, не превышающих при доверительной вероятности $P=0,95$ доверительных интервалов абсолютной погрешности ($\pm \Delta_A$) при соблюдении всех регламентированных условий.

Б.3 Средства измерений, приборы и реактивы

Б.3.1 Весы лабораторные, класс точности специальный (1) по ГОСТ Р 53228-2008.

Б.3.2 Колбы мерные 2-го класса точности с притертой пробкой по ГОСТ 1770-74 объемом 100 см³;

Стаканчик для взвешивания типа СВ по ГОСТ 25336-82 объемом 18 см³.

Б.3.3 1-канальный механический дозатор с варьируемым объемом дозирования от 1 до 10 см³, допускаемая систематическая относительная погрешность \pm (от 0,6 до 3,0) %, допускаемое СКО от 0,15 до 0,6 %.

1-канальный механический дозатор с варьируемым объемом дозирования от 0,1 до 1,0 см³, допускаемая систематическая относительная погрешность \pm (от 0,6 до 3,0) %, допускаемое СКО от 0,2 до 0,6 %.

1-канальный механический дозатор с варьируемым объемом дозирования от 0,01 до 0,1 см³, допускаемая систематическая относительная погрешность \pm (от 0,8 до 3,0) %, допускаемое СКО от 0,2 до 1,0 %.

Или пипетки 2-го класса точности по ГОСТ 29169-91, ГОСТ 29228-91 объемом дозирования от 100 до 1000 мкл.

Б.3.4 Уранина А ТУ 2463-289-00204197-2003 (флуоресцеин натрия высший сорт).

Б.3.5 Вода высокой чистоты по ОСТ В.95.823-95.

Б.4 Требования безопасности

Применение флуоресцеина натрия не требует соблюдения каких-либо специальных мер безопасности. Необходимо соблюдать только требования инструкций безопасности при работе в химической лаборатории.

Б.5 Требования к квалификации оператора

К приготовлению растворов флуоресцеина натрия и вычислениям допускают лиц, имеющих квалификацию инженера-химика или техника-химика и опыт работы в химической лаборатории.

Б.6 Условия приготовления растворов флуоресцеина натрия

Б.6.1 Приготовление растворов флуоресцеина натрия проводят при соблюдении в лаборатории следующих условий:

- температура окружающего воздуха от + 15 до +25 °С
- атмосферное давление от 94 до 106 кПа
- относительная влажность воздуха не более 80 %

Б.6.2 Приготовленные растворы флуоресцеина натрия следует хранить в колбах с хорошо притертыми пробками при температуре от + 15 до +25 °С, вдали от прямых солнечных лучей.

При соблюдении условий хранения растворы флуоресцеина натрия устойчивы в течение 1 года.

Б.7 Приготовление растворов флуоресцеина натрия

В стаканчик для взвешивания, помещённый на чашку лабораторных весов, вводят 0,0023 г флуоресцеина натрия.

Переносят флуоресцеин натрия в мерную колбу вместимостью 100 см³. Доводят до метки водой высокой чистоты, закрывают колбу пробкой и перемешивают содержимое колбы, переворачивая её 10 раз. Полученный исходный раствор имеет концентрацию флуоресцеина натрия 23 мг/дм³.

Из исходного раствора с концентрацией флуоресцеина натрия 23 мг/дм³ готовят растворы флуоресцеина натрия с концентрациями 0,1 мг/дм³ (раствор № 1) и 0,01 мг/дм³ (раствор № 2) посредством отбора аликвот в 435 мм³ и 43 мм³, соответственно, и переноса их в колбы на 100 см³. Колбы доводят водой высокой чистоты до метки, закрывают колбу пробкой и перемешивают содержимое колб, переворачивая их 10 раз.

Из раствора с концентрацией флуоресцеина натрия 0,01 мг/дм³ готовят раствор с концентрацией 0,001 мг/дм³ (раствор № 3) посредством отбора аликвоты в 10 см³ и переноса её в колбу на 100 см³. Колбу доводят водой высокой чистоты до метки, закрывают колбу пробкой и перемешивают содержимое колбы, переворачивая её 10 раз.