

36.5.

Контрольный #1

29/12/1



**ФЛУОРИМЕТР ЛАБОРАТОРНЫЙ
КВАНТ - 5**

Методика поверки

Лаб. ФХМ

УТВЕРЖДЕН

РД 512.840.842-85 ЛУ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ФЛУОРИМЕТР ЛАБОРАТОРНЫЙ КВАНТ-5

МЕТОДИКА ПОВЕРКИ

РД 512.840.042-85

1985

Настоящие методические указания распространяются на флуориметр лабораторный КВАНТ-5 ТУ6-88 5Ж2.840.042 ТУ и устанавливают методику их первичной и периодической поверки.

1. ОПЕРАЦИИ ПОВЕРКИ

1.1. При проведении поверки должны быть выполнены следующие операции :

- 1) внешний осмотр (п. 6.1) ;
- 2) опробование (п. 6.2) ;
- 3) определение систематической составляющей абсолютной погрешности и среднего квадратического отклонения случайной составляющей абсолютной погрешности прибора (п. 6.3).

2. СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

2.1. Образцовые средства поверки

2.1.1. Комплект светофильтров типа Ю-100. Коэффициент пропускания светофильтров от 5 до 93 %, аттестованный в диапазоне 190-2500 нм с погрешностью не более 0,35 %.

2.2. Вспомогательные средства поверки

2.2.1. Весы лабораторные общего назначения, 2 класса точности, верхний предел взвешивания 200 г, ГОСТ 24 104-80.

2.2.2. Набор гирь Г-2-210, 2 класса точности ГОСТ 7328-82.

2.2.3. Сушильный электрический шкаф общего лабораторного назначения, ГОСТ 13474-79.

РД 5Ж2.840.042-85

Копылова *Копылова* 21.06
Трухан *Трухан* 22.06

Флуориметр лабораторный
КВАНТ-5

Мет.	Листы	Листов
010М	2	21

Марьяничева *Марьяничева* 23.06

Методические указания

2.2.4. Колбы исполнения 2, вместимостью 500 мл и 1000 мл, 2 класса точности, ГОСТ 1770-74.

2.2.5. Пипетки вместимостью 5, 10 и 20 мл, 2 класса точности, ГОСТ 20292-74.

2.2.6. Стаканчик для взвешивания СН-1, ГОСТ 25336-82.

2.2.7. Колбы плоскодонные, вместимостью 500 мл, ГОСТ 19908-80.

2.2.8. Флуоресценци для флуориметрии х.ч., ~~МРТУ 6-03-07-295-74, ТУ 6-09-2464-82.~~

2.2.9. L - триптофан х.ч., ТУ 6-09-4080-78.

2.2.10. Нильский синий Б, ТУ 6-09-07-146-74.

2.2.11. Калия гидроокись х.ч., СТ СЭВ 1439-78.

2.2.12. Соляная кислота х.ч., ГОСТ 3118-77.

2.2.13. Водорода перекись х.ч., ГОСТ 10929-76.

2.2.14. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72.

2.2.15. Спирт ректифицированный очистка "Высшая" или "Экстра", ГОСТ 18300-72.

3. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

3.1. К приготовлению и работе с растворами флуоресцирующих веществ могут быть допущены лица, прошедшие инструктаж по технике безопасности и проверку знаний в аттестационной или квалификационной комиссии на право самостоятельной работы в химической лаборатории.

3.2. Рабочее место необходимо всегда содержать в чистоте и порядке, не загромождать его излившей посудой.

3.3. Засасывать растворы в пипетку необходимо только грушей. Засасывать ртом категорически воспрещается.

3.4. Со стеклянной посудой следует обращаться осторожно во избежание порезов рук.

3.5. Не оставлять пустую посуду непромытой.

3.6. При мытье химической посуды хромовой смесью или щелочами необходимо надевать медицинские перчатки и фартук.

4. УСЛОВИЯ ПОВЕРКИ

4.1. При проведении поверки должны быть соблюдены следующие условия :

1) температура окружающего воздуха от плюс 10 до плюс 35 °С ;

2) относительная влажность воздуха от 30 до 80 % ;

3) атмосферное давление от 84 до 106,7 кПа ;

4) напряжение питания 220 В с допуском отклонением от плюс 10, минус 15 % ; частотой (50 ± 1) Гц ;

5) внешние электрические и магнитные поля, кроме земных, в месте установки прибора отсутствуют.

5. ПОДГОТОВКА К ПОВЕРКЕ

5.1. Перед проведением поверки должны быть выполнены следующие подготовительные работы :

1) образцовые светофильтры тщательно протереть ватным тампоном, смоченным спиртом, с последующей протиркой насухо постиранной сатиновой салфеткой ;

2) приготовить растворы флуоресцеина концентрацией 200 мкг/л и 500 мкг/л, триптофана концентрацией ^{100 мкг/л} ~~500 мкг/л~~ и нильского синего концентрацией 1 мкг/л в соответствии с мето-

дикой приготовления, изложенной в приложении I.

5.2. Подключить заземление к прибору.

5.3. Каждый из исходных потоков флуоресценции характеризуется своими спектральными участками возбуждения и флуоресценции, для выделения которых используются различные комбинации из цветных оптических стекол, входящих в комплект прибора.

Для получения спектральных участков возбуждения и флуоресценции для растворов флуоресцеина установить в гнездо ФИЛЬТР I по ходу луча оптическое стекло СС-15, а в гнездо ФИЛЬТР 2 - комбинацию из цветных оптических стекол ЖС-18 и СЗС-22.

Для получения спектральных участков возбуждения и флуоресценции для раствора триптофана следует установить в гнездо ФИЛЬТР I по ходу луча комбинацию из цветных оптических стекол ЖС-20 и УФС-5, а в гнездо ФИЛЬТР 2 комбинацию из цветных оптических стекол УФС-2 и СЗС-21.

Для получения спектральных участков возбуждения и флуоресценции для раствора нильского синего установить в гнездо ФИЛЬТР I по ходу луча оптическое стекло СЗС-23, а в гнездо ФИЛЬТР 2 комбинацию из цветных оптических стекол КС-19 и ПС-7.

5.4. Установить в прибор кветный узел для измерения под углом 90° с гнездом для светофильтров КС-100.

5.5. Перевести против часовой стрелки до упора ручку КОМПЕНСАЦИЯ ФОНА.

5.6. Установить на нуль шкалу отсчетного лимба.

5.7. Включить прибор в сеть и прогреть в течение времени не менее 30 мин.

5.8. Вращением ручки УСТАНОВКА НУЛЯ установите стрелку индикатора на нуль.

6. ПРОВЕДЕНИЕ ПОВЕРКИ

6.1. Внешний осмотр

6.1.1. При внешнем осмотре должно быть установлено соответствие прибора следующим требованиям :

1) прибор должен быть укомплектован в соответствии с требованиями его эксплуатационной документации.

На периодическую поверку запасные части не представляются;

2) прибор не должен иметь механических повреждений или неисправностей, влияющих на нормальную работу прибора ;

3) на передней панели прибора должны быть нанесены наименование и шифр прибора, знак Госреестра. На задней панели прибора должна быть закреплена фирменная планка на которой нанесен фотохимическим способом товарный знак предприятия-изготовителя, обозначение прибора, заводской порядковый номер прибора и год выпуска прибора.

Все надписи на приборе должны быть четкими и легко читаемыми.

6.2. Спроектирование

6.2.1. При проведении спроектирования должно быть установлено соответствие прибора следующим требованиям :

1) кнопки прибора должны выключаться без затруднений указательным пальцем руки без задержки и иметь четкую фиксацию ;

2) ручки регуляров прибора должны иметь плавный ход, задержка и люфт должны отсутствовать, органы

чения вращения должно ощущаться четко :

3) при открытии и закрытии цветного узла, механизм перемещения колес должен иметь медленный, плавный ход :

4) ручками ФИЛЬТР 1 и ФИЛЬТР 2 должны легко выниматься держатели первичных и вторичных светофильтров.

6.3. Определение систематической составляющей и среднего квадратического отклонения случайной составляющей абсолютной погрешности

6.3.1. Для определения составляющих погрешности прибора производится не менее ^{тридцати} десяти измерений не менее чем в шести точках диапазона измерения. При этом используется метод имитации изменения потока флуоресценции относительно исходного с помощью образцовых нейтральных ослабителей, помещаемых в луче флуоресценции непосредственно за цветной. В этом случае показание прибора соответствует коэффициенту пропускания ослабителя, выраженному в процентах.

В качестве образцовых нейтральных ослабителей используется комплект светофильтров КС-100, аттестованный с абсолютной погрешностью не более 0,5 %.

6.3.2. Исходные потоки флуоресценции создаются с помощью:

1) растворов флуоресцеина концентрацией 200 мкг/л и 500 мкг/л - для спектральных участков возбуждения с

$\lambda_{max} \text{ возд} = 480 \text{ нм}$ и флуоресценции с $\lambda_{max} \text{ флуор.} = 520 \text{ нм}$;

2) раствора триптофана концентрацией ^{100 мкг/л} 500 мкг/л - для спектральных участков возбуждения с $\lambda_{max} \text{ возд.} = 290 \text{ нм}$ и флуоресценции с $\lambda_{max} \text{ флуор.} = 360 \text{ нм}$;

3) раствора нильского синего концентрацией 1 мкг/л - для спектральных участков возбуждения с $\lambda_{max} \text{ возд.} = 645 \text{ нм}$

и флуоресценции с $\lambda_{\text{max флуор.}} = 700$ нм, приготовляемых по методике приложения I.

6.3.3. Каждый из исходных потоков флуоресценции характеризуется своими спектральными участками возбуждения и флуоресценции, для выделения которых используются различные комбинации из цветных оптических стекол.

Для получения спектральных участков возбуждения и флуоресценции для растворов флуоресцеина устанавливают в гнездо ФИЛЬТР I по ходу луча оптическое стекло СС-15, а в гнездо ФИЛЬТР 2 - комбинацию из цветных оптических стекол ЖС-18 и СЗС-22.

Для получения спектральных участков возбуждения и флуоресценции для раствора триптофана устанавливают в гнездо ФИЛЬТР I по ходу луча комбинацию из цветных оптических стекол ЖС-20 и УФС-5, а в гнездо ФИЛЬТР 2 - комбинацию из цветных оптических стекол УФС-2 и СЗС-21.

Для получения спектральных участков возбуждения и флуоресценции для раствора нильского синего устанавливают в гнездо ФИЛЬТР I по ходу луча оптическое стекло СЗС-23, а в гнездо ФИЛЬТР 2 - комбинацию из цветных оптических стекол КС-19 и ПС-7.

6.3.4. При отсутствии компенсации фона измерения проводятся в трех участках спектров возбуждения и флуоресценции при минимальном (растворы триптофана, флуоресцеина и нильского синего) и максимальном (раствор флуоресцеина) исходных потоках флуоресценции в следующем порядке :

I) устанавливают в прибор кюветный узел для измерения под углом 90° с гнездом для светофильтров КС-100 ;

2) переводят против часовой стрелки до упора ручку КОМПЕНСАЦИИ ФОНА;

3) устанавливают на нуль шкалу отсчетного лимба ;

4) включают прибор в сеть и вращением ручки УСТАНОВКА НУЛЯ устанавливают стрелку индикатора на нуль ;

5) устанавливают в прибор кювету с одним из исходных растворов (тринтосана, флуоресцеина или нильского синего) и нажимают кнопку 3 ПРУВО при максимальном потоке флуоресценции или 1 ПРУВО при минимальном потоке флуоресценции. Первым устанавливают раствор флуоресцеина концентрацией 500 мкг/л ;

6) нажимают на кнопку ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ и вращением ручки УСТАНОВКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ добиваются отклонения стрелки индикатора на отметку 20 по шкале ;

7) устанавливают шкалу отсчетного лимба ОТНОШЕНИЕ % на отметку 100, нажимают кнопку ИЗМЕРЕНИЕ и вращением ручки УСТАНОВКА 100 % ТОЧНО устанавливают стрелку индикатора на нуль ;

8) нажимают кнопку ИЗМЕРЕНИЕ и вращают ручку КОМПЕНСАЦИИ ФОНА по часовой стрелке до упора и затем против часовой стрелки до упора. При этом следят за стрелкой индикатора, которая во время вращения ручки КОМПЕНСАЦИИ ФОНА не должна отклоняться от нуля более ^{2 мкА} ~~одного деления~~ ;

9) поочередно устанавливая светофильтры КС-100 (предварительно их тщательно следует протереть ватным тампоном, смоченным спиртом ректификованный очистка "Высшая" или "Экстра" ГОСТ 18300-72, с последующей протиркой насухо простиранной батиговой салфеткой) в кюветный узел, проводят измерения.

Для этого нажимают кнопку ИЗМЕРЕНИЕ и, вращая отсчетный лимб ОТНОШЕНИЕ % против часовой стрелки, устанавливают стрелку индикатора на нуль. Результат измерения снимают со шкалы от-

счетного лимба ОТНОШЕНИЕ %.

Измерения проводят, переходя последовательно от светофильтров с максимальным коэффициентом пропускания к минимальному и обратно; при этом с каждым светофильтром должно быть проведено не менее тридцати измерений, а интервал между измерениями должен быть не менее 1 мин.

6.3.5. При наличии компенсации фона измерения проводят с использованием в качестве исходного раствор флуоресцеина концентрацией 200 нг/л в следующем порядке:

- 1) выполняет операции по п. 6.3.4, подпункты 1)...7);
- 2) устанавливает в кюветодержатель светофильтр КС-100 с коэффициентом пропускания 30-39 %;
- 3) устанавливает шкалу отсчетного лимба ОТНОШЕНИЕ % на нуль;
- 4) нажимают кнопку ИЗМЕРЕНИЕ и ручкой КОМПЕНСАЦИЯ ФОНА стрелку индикатора нуля выводят на нуль;
- 5) вынимают из держателя кюветы установленный светофильтр и вместо него поочередно вставляют светофильтры с коэффициентом пропускания более 60 % и с каждым светофильтром проводят измерение по п. 6.3.4, подпункт 9);
- 6) через 25-30 измерений следует производить проверку и при необходимости корректировку установки 100 %.

6.3.6. Полученные экспериментальные данные обрабатываются в соответствии с ГОСТ 8.009-84.

6.3.6.1. Абсолютная погрешность измерения без компенсации фона определяется по формуле

$$\Delta_c = x_c - \bar{c}, \quad (6.1)$$

с компенсацией фона - по формуле

$$\Delta_c = x_c - \frac{100(\bar{c} - \bar{c}_f)}{100 - \bar{c}_f}, \quad (6.2)$$

где Δ_i — абсолютная погрешность, % ;
 x_i — показания прибора, % ;
 $C_{\text{св}}$ — коэффициент пропускания светофильтра КС-100, % ;
 $C_{\text{ф}}$ — коэффициент пропускания светофильтра КС-100, по которому было установлено значение компенсации фона, %.

6.3.6.2. Систематическая составляющая абсолютной погрешности определяется по формуле

$$\Delta_s = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \Delta_i \quad (6.3)$$

где Δ_s — систематическая составляющая абсолютной погрешности, % ;

n — число измерений.

6.3.6.3. Среднее квадратичное отклонение случайной составляющей абсолютной погрешности определяется по формуле

$$\sigma[\Delta] = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\Delta_i - \Delta_s)^2}{n-1}} \quad (6.4)$$

где $\sigma[\Delta]$ — среднее квадратическое отклонение случайной составляющей абсолютной погрешности, %.

6.3.7. Результат поверки считается положительным, если систематическая составляющая абсолютной погрешности не превышает $\pm 1\%$ в области спектра 400–600 нм, $\pm 1,5\%$ в остальной области спектра и $\pm 2,5\%$ при работе с компенсацией фона, а среднее квадратическое отклонение не превышает 0,4 % при работе без компенсации фона и 0,5 % при работе с компенсацией фона.

6.4. При проведении операций поверки необходимо вести протокол записи результатов наблюдений по форме приложения 2.

7. ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОВЕРКИ

7.1. Результаты поверки считаются положительными, если прибор удовлетворяет всем требованиям настоящих методических указаний.

7.2. Положительные результаты поверки оформляются путем записи в паспорт результатов и даты поверки.

7.3. Результаты поверки считаются отрицательными, если при проведении поверки установлено несоответствие поверяемого прибора хотя бы одному из требований настоящих методических указаний.

7.4. Отрицательные результаты поверки оформляются путем выдачи извещения о непригодности с указанием причин непригодности.

7.5. Приборы с отрицательным результатом поверки в эксплуатации не допускаются, в паспорте заносится запись о непригодности прибора.

ПРИЛОЖЕНИЕ I
Обязательное

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРОВ

I. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

I.1. Настоящая методика предназначена для приготовления растворов флуоресцирующих веществ, используемых в процессе испытаний лабораторного флуориметра КВАНТ-5 (далее - прибора) для создания исходных потоков флуоресценции в различных участках спектров возбуждения и флуоресценции.

I.2. Для создания минимальных исходных потоков флуоресценции предназначены растворы флуоресцина концентрацией 200 нг/л, толуидина концентрацией ^{100 мкг/л} 500 мкг/л и нильского синего концентрацией 1 мг/л ;

для создания максимального исходного потока - раствор флуоресцина концентрацией 500 мкг/л.

2. НОРМЫ ТОЧНОСТИ

2.1. Погрешность приготовления растворов по данной методике не превышает $\pm 20\%$.

3. МЕТОД ПРИГОТОВЛЕНИЯ

3.1. Растворы готовят путем взвешивания определенной навески флуоресцирующего вещества и растворением её в заданном объеме растворителя с последующим разбавлением исходного

раствора.

В качестве растворителя применяют раствор калия гидроксида для флуоресцеина или дистиллированную воду для триптофана и нильского синего.

4. АППАРАТУРА, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА И РЕАКТИВЫ

4.1. Аппаратура, вспомогательные устройства и реактивы - в соответствии с п. 2.2 настоящих методических указаний.

5. УСЛОВИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРОВ

5.1. Условия приготовления растворов следующие :

- 1) температура окружающего воздуха $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$;
- 2) относительная влажность воздуха от 30 до 80 % ;
- 3) атмосферное давление от 84 до 106,7 кПа.

6. ПОДГОТОВКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРОВ

6.1. Мытье посуды

6.1.1. Посуду промывают проточной водой, готовят смесь Комаровского, состоящую из равных объемов 20 % раствора соляной кислоты и 6 % раствора перекиси водорода. Смесью ополаскивают посуду, после чего промывают проточной водой, затем дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 50-60 $^\circ\text{C}$.

6.2. Приготовление водного раствора калия гидроксида молярной концентрации 0,01 моль/л (растворитель для флуоресцеина)

6.2.1. Навеску ($0,6 \pm 0,1$) г гидроокиси калия взвешивают на лабораторных весах в боксе и растворяют в 15-25 мл дистиллированной воды, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

6.3. Приготовление исходных растворов флуоресцеина, триптофана и нильского синего концентрацией 100 мг/л

6.3.1. Для приготовления растворов флуоресцирующих веществ поочередно взвешивают на лабораторных весах 2 класса точности навески массой ($0,1 \pm 0,002$) г флуоресцеина, триптофана и нильского синего. Затем каждую навеску растворяют в небольшом объеме своего растворителя, переносят в мерные литровые колбы и доводят до метки растворителем.

7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

7.1. Раствор триптофана и флуоресцеина концентрацией 500 мкг/л готовят следующим образом: пипеткой на 5 мл отбирают раствор концентрацией 100 мг/л, переносят в мерную литровую колбу и доводят растворителем объем раствора до метки.

7.2. Раствор нильского синего концентрацией 1 мг/л готовится следующим образом: пипеткой на 5 мл отбирают раствор нильского синего концентрацией 100 мг/л, переносят в мерную колбу на 500 мл и доводят растворителем объем раствора до метки.

7.3. Раствор флуоресцеина концентрацией 200 мкг/л готовится следующим образом: пипеткой на 10 мл отбирают раствор концентрацией 500 мкг/л, переносят в мерную литровую колбу и доводят растворителем объем раствора до метки. Полу-

... промежуточный раствор концентрацией 5 мкг/л.

Затем отбирают пипеткой на 20 мл раствор концентрации 5 мкг/л, переносят в мерную колбу на 500 мл, доводят раствором объем раствора до метки и получают требуемую концентрацию.

8. ХРАНЕНИЕ И ПОРЯДОК ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТВОРОВ

8.1. Приготовленные растворы должны храниться в колбах из кварцевого стекла, покрытых снаружи черным лаком. Применение резиновых и корковых пробок не допускается.

8.2. Для испытаний допускается применять растворы со сроком хранения не более 30 ч с момента их приготовления.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Обязательное

ПРОТОКОЛ №

" " 19 г.

первичной (периодической) поверки флуориметра
лабораторного КВАНТ-5

заводской номер _____, с пределами измере-
ния 5-100 % , с пределами систематической составля-

ющей абсолютной погрешности $\pm 1,5\%$ и пределом *не превышает по флуоресценции $\pm 1,0\%$*
по стритиону и нильскому саму $\pm 1,5\%$, при работе с компенсацией фона
средне квадратического отклонения $\pm 0,5\%$, а среднее квадратическое отклонение при работе без
компенсации фона не превышает $0,4\%$, с компенсацией - $0,5\%$,
принадлежащего или ввезенного из производства.

(дата, предприятие, заполняется при первичной поверке)

ПРИМЕНЯЕМЫЕ СРЕДСТВА ПОВЕРКИ

Наименование	Тип	Номер	Класс точности, погрешность	Наличие поверки и срок последующей поверки	Другие характеристики и уточнения

Условия проведения поверки :

температура окружающего воздуха $^{\circ}\text{C}$:

относительная влажность воздуха % :

атмосферное давление кПа :

напряжение питания В, частота Гц

Результаты поверки

1. Внешний осмотр _____

2. Испробование _____

3. Определение систематической составляющей и средне-
кватратического отклонения абсолютной погрешности
прибора сведено в таблицу.

Среднее квадратическое отклонение случайной составляющей
абсолютной потребности %.

Заключение по протоколу _____

годен, не годен, указать

Поверитель _____

ФАМИЛИЯ, ИМЯ, ОТЧЕСТВО

ПОДПИСЬ

