

Contrôle d'une pipette à piston à 2 , 5 et 10 μL

Méthode photométrique

INSTRUCTIONS – (ADAPTE DE ISO 8655-7 :2005(F) et ISO/TR 16153 :2004(F))

Réactifs (pour contrôle de pipette 2 à 10 μL)

- Solution mère de chromophore Ponceau S à 6,87 g/L. L'absorbance théorique en supposant la loi de Beer-lambert linéaire à l'infini est de 313,5, à 520 nm, pour un trajet optique de 1 cm. Filtré 0,2 μm .
- Diluant : tampon phthalate 0,02 mol/L pH 6,0 contenant 3,74 g/L d'EDTA tétrasodique et 1,12 g/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 6,0, filtré sur 0,2 μm et présentant ainsi un pic d'absorbance à 730 nm.
- Tampon phthalate 0.02 mol/L pH 6,0

Préparation de la solution étalon (pour contrôle de pipette 2 à 10 μL)

Diluer la solution mère de chromophore Ponceau S dans le diluant : 2 mL exactement de solution mère de chromophore Ponceau S (pipette jaugée 2 traits de classe A) qsp 1000 mL avec le diluant en fiole jaugée de classe A. Fermer soigneusement. Soit R le facteur de dilution. ($R = 1/500$).

Réalisation des mesures

L'idéal est de travailler avec un spectrophotomètre réalisant les mesures en mode multilongueur d'onde.

Préparer une cuve pour photométrie contenant du tampon phthalate. Régler le photomètre à zéro d'absorbance pour les 2 longueurs d'onde 520 et 730 nm.

Réalisation

Vider cette première cuve, la rincer et la charger en solution étalon. (Il ne faut absolument pas toucher aux faces optiques, l'idéal serait de pouvoir manipuler sans déplacer la cuve).

Lire les absorbances à 520 nm et 730 nm : A_{S1} et A_{S2} respectivement.

Préparer une nouvelle cuve contenant $V_D = 2,00$ mL de diluant délivrés à l'aide d'une pipette jaugée 2 traits de classe A. Lire les absorbances à 520 nm et 730 nm : A_{D1} et A_{D2} respectivement.

Ajouter à cette cuve (contenant les 2,00 mL de diluant) « V_U » de la solution mère de chromophore, homogénéiser et mesurer l'absorbance à 520 nm. Soit A_U la valeur obtenue. « V_U » est le volume de la pipette à contrôler.

Calculs d'incertitude-type sur les mesures de volumes (En orangé les cellules à renseigner)

		Tolérance	u(xi)		
Volume diluant (VD) mL	2	0,01	0,006		
Volume fiole jaugée mL	1000	0,4	0,23	u(1/R)	u(R)
R	0,002			1,45	0,0000058

	Incertitude	Incertitude-type	Type
PJ classe A 2 mL (mL)	0,01	0,006	B
FJ classe A 1000 mL (mL)	0,4	0,231	B
Fidélité Absorbance A=0		0,0005	A
Fidélité Absorbance A=0,5		0,0005	A
Fidélité Absorbance A=1,0		0,0010	A
Fidélité Absorbance A=1,5		0,0020	A
Température échantillon °C	0,2		B
Reproductibilité de λ (nm)	0,5	0,29	B
Non-linéarité photométrique sur l'étendue 8:1		0,0014	A

	Volume contrôlé (en µL)		
Valeurs « attendues » d'absorbance	2	5	10
AS1		0,627	
AS2		0,593	
AD1		0,000	
AD2		0,593	
AU	0,313	0,782	1,560

Dans les calculs ci-dessous il n'est pas prévu de termes d'incertitude-type pour :

- Evaporation du diluant et de la solution mère durant un stockage éventuel (voir ISO/TR 16153)
- Sources d'incertitudes négligeables comme le coefficient de température de la verrerie de classe A et la dégradation des solutions pendant un stockage éventuel.

$$V_U = V_D \left[\frac{\frac{A_U - A_{D1}}{A_{D2} - A_{D1}}}{\left(\frac{1-R}{R} \right) \frac{A_{S1}}{A_{S2}} - \left(\frac{A_U - A_{D1}}{A_{D2} - A_{D1}} \right)} \right]$$

A 2 μL					En μL		%
			Dérivée	u(xi)	Incertitude-type		
dVu/dAS1, effet imprécision relevé absorbance			0,003185	0,00071	0,0023	0	0,11
dVu/dAS2, effet imprécision relevé absorbance			0,003367	0,00071	0,0024	0	0,12
dVu/dAU, effet imprécision relevé absorbance			0,006380	0,00050	0,0032	0	0,16
dVu/dAD1, effet imprécision relevé absorbance			0,009747	0,00050	0,0049	0	0,24
dVu/dAD2, effet imprécision relevé absorbance			0,003367	0,00050	0,0017	0	0,08
Dérive en λ entre les relevés à 520 nm			0,000006	0,29	0,0018	0	0,09
Dérive en λ entre les relevés à 730 nm			0,0000017	0,29	0,0005	0	0,02
dVu/dR, incertitude sur R			0,9984	0,0000058	0,0058	0	0,29
dVu/dVd, effet imprécision sur Vd			0,0010	0,006	0,0058	0	0,29
dVu/dT, effet imprécision température étalon / inconnus			0,0000010	0,16	0,0002	0	0,01
Mélange incomplet étalon			0,0019968	0,001	0,0020	0	0,10
Mélange incomplet inconnus			0,0019968	0,001	0,0020	0	0,10
Effet incertitude pH			0,0000200	0,10	0,0020	0	0,10
Non linéarité système			0,0019968	0,0014	0,0028	0	0,14
					u(y)	0,012	
					u(y)/y	0,0059	
A 5 μL					En μL		%
			Dérivée	u(xi)	Incertitude-type		
dVu/dAS1, effet imprécision relevé absorbance			0,007957	0,00071	0,0056	0	0,28
dVu/dAS2, effet imprécision relevé absorbance			0,008413	0,00071	0,0059	0	0,30
dVu/dAU, effet imprécision relevé absorbance			0,006380	0,00050	0,0032	0	0,16
dVu/dAD1, effet imprécision relevé absorbance			0,014792	0,00050	0,0074	0	0,37
dVu/dAD2, effet imprécision relevé absorbance			0,008413	0,00050	0,0042	0	0,21
Dérive en λ entre les relevés à 520 nm			0,000006	0,29	0,0018	0	0,09
Dérive en λ entre les relevés à 730 nm			0,0000042	0,29	0,0012	0	0,06
dVu/dR, incertitude sur R			2,4944	0,0000058	0,0144	0	0,72
dVu/dVd, effet imprécision sur Vd			0,0025	0,006	0,0144	0	0,72
dVu/dT, effet imprécision température étalon / inconnus			0,0000025	0,16	0,0004	0	0,02
Mélange incomplet étalon			0,0049888	0,001	0,0050	0	0,25
Mélange incomplet inconnus			0,0049888	0,001	0,0050	0	0,25
Effet incertitude pH			0,0000499	0,10	0,0050	0	0,25
Non linéarité système			0,0049888	0,0014	0,0070	0	0,35
					u(y)	0,026	
					u(y)/y	0,0053	

A 10 µL				En µL		%
		Dérivée	u(xi)	Incertitude-type		
dVu/dAS1, effet imprécision relevé absorbance		0,015873	0,00071	0,0112	0	0,56
dVu/dAS2, effet imprécision relevé absorbance		0,016783	0,00071	0,0119	0	0,59
dVu/dAU, effet imprécision relevé absorbance		0,006380	0,00050	0,0032	0	0,16
dVu/dAD1, effet imprécision relevé absorbance		0,023162	0,00050	0,0116	0	0,58
dVu/dAD2, effet imprécision relevé absorbance		0,016783	0,00050	0,0084	0	0,42
Dérive en λ entre les relevés à 520 nm		0,000006	0,29	0,0018	0	0,09
Dérive en λ entre les relevés à 730 nm		0,0000084	0,29	0,0024	0	0,12
dVu/dR, incertitude sur R		4,9761	0,0000058	0,0288	0	1,44
dVu/dVd, effet imprécision sur Vd		0,0050	0,006	0,0287	0	1,44
dVu/dT, effet imprécision température étalon / inconnus		0,0000050	0,16	0,0008	0	0,04
Mélange incomplet étalon		0,0099522	0,001	0,0100	0	0,50
Mélange incomplet inconnus		0,0099522	0,001	0,0100	0	0,50
Effet incertitude pH		0,0000995	0,10	0,0100	0	0,50
Non linéarité système		0,0099522	0,0014	0,0139	0	0,70
				u(y)	0,051	
				u(y)/y	0,0051	

