

## Contrôle de pipettes mécaniques à piston aux volumes 2 à 10 $\mu\text{L}$ : La méthode « à deux colorants et différentes cuves »

Pour contrôler, vérifier ou étalonner une pipette mécanique aux faibles volumes de l'ordre du  $\mu\text{L}$ , la méthode gravimétrique est de mise en place très délicate :

- nécessité de balances de résolution au  $\mu\text{g}$  et nécessité de maîtrise des effets de l'électricité statique ;
- gestion difficile des phénomènes d'évaporation et de l'incertitude associée.

Des méthodes photométriques alternatives à la gravimétrie existent, décrites dans la norme ISO 8655-7 :2005(F) et le rapport technique ISO/TR 16153 :2004(F). Ce document présente la méthode dite « à deux colorants et différentes cuves ».

### 1. Principe de la méthode dite « à deux colorants et différentes cuves »

Le principe de la méthode repose sur la mesure d'un facteur de dilution. Il s'agit de prélever le volume soumis à l'essai (avec la micropipette) à partir d'une solution mère d'un colorant (rouge) et de le transférer dans un volume exactement connu de diluant. Après homogénéisation, l'absorbance est mesurée au pic du colorant. La loi de Beer-Lambert donne alors une relation permettant de calculer le volume soumis à l'essai. Mais on va se heurter à deux difficultés.

Première difficulté. La loi de Beer-Lambert donne effectivement une relation permettant de calculer le volume soumis à l'essai, mais il faut connaître la concentration exacte en colorant de la solution mère (donc la pureté exacte du colorant) et le coefficient d'absorbance spécifique.

Pour s'affranchir de ces deux paramètres, on réalise, en parallèle à l'essai, une solution dite solution étalon par dilution exacte de la solution mère de colorant (rouge) dans le diluant, avec de la verrerie jaugée de classe A. L'absorbance est mesurée au pic du colorant. Grâce au rapport des absorbances, on peut désormais calculer le volume soumis à l'essai en s'affranchissant de la concentration exacte de la solution mère de colorant et du coefficient d'absorbance spécifique.

Seconde difficulté. L'utilisation de cuves de lecture différentes pour l'essai et l'étalon pose alors un double problème :

- des variations de parcours optique peuvent exister entre les différentes cuves ;
- le zéro de cuve peut être imparfait.

Pour le résoudre, on choisit d'utiliser un diluant chargé d'un chromophore (bleu) qui absorbe à une longueur d'onde différente du colorant mère (rouge). De plus, le chromophore du diluant n'absorbe pas au pic du colorant mère et le colorant mère lui-même n'absorbe pas au pic du diluant. Un système d'étalonnage interne en quelque sorte. Les absorbances sont alors mesurées aux deux longueurs d'onde des deux pics du colorant mère et du diluant. Et un calcul subtil de rapports d'absorbances donne la valeur du volume soumis à l'essai !

La complexité théorique de la méthode est réelle mais la lecture du mode opératoire (très simple) et de la démonstration de la formule du calcul devrait éclairer les choses... On remarquera que les absorbances n'apparaissent que comme des rapports et que les concentrations, les coefficients d'absorbance et les trajets optiques disparaissent. Ainsi, on dispose d'une méthode qui permet un calcul avec des grandeurs métrologiquement raccordées (les performances photométriques, les écarts de linéarité à la loi de Beer-Lambert, la verrerie jaugée et les grandeurs d'influence sont, en effet, métrologiquement raccordables) et qui permet une évaluation rigoureuse d'incertitude. Ce qu'il fallait obtenir.

### 2. Réactifs pour des volumes essais de 2 à 10 $\mu\text{L}$

- **Solution mère de chromophore rouge Ponceau S à 6,87 g/L.** L'absorbance théorique à 520 nm en supposant la loi de Beer-Lambert linéaire à l'infini est d'environ 313 pour un trajet optique de 1 cm. Le Ponceau S n'absorbe pas à 730 nm. Il sera conditionné en flacon protégeant de la lumière et réalisé en eau dégazée. La solution est filtrée à travers un filtre de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ . Si la préparation est réalisée stérilement, la conservation est possible 1 mois au réfrigérateur (en cas de précipitation, solubiliser par chauffage léger et homogénéisation).
- **Tampon zéro** : tampon phthalate 0,02 mol/L ajusté à pH 6,0 (4,08 g d'hydrogénophthalate de potassium et 13,3 mL de NaOH à 1 mol/L pour 1 litre). Il sera préparé en eau dégazée. La solution est filtrée à travers un filtre de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ . Le tampon zéro n'absorbe ni à 520 ni à 730 nm. Si la préparation est réalisée stérilement, sa conservation est possible 1 mois au réfrigérateur.
- **Diluant** : tampon zéro 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 à travers un filtre de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ . Le diluant est bleu, présentant un pic d'absorbance à 730 nm et n'absorbant pas à 520 nm. Si la préparation est réalisée stérilement, sa conservation est possible 1 mois au réfrigérateur.

### 3. Réalisation de la solution étalon

Diluer exactement la solution de mère de Ponceau S (rouge) avec le diluant (bleu) selon :

- $V_1 = 2 \text{ mL}$  à la pipette jaugée deux traits de classe A de solution mère en fiole jaugée de 1 L de classe A ( $V_f$ ). Soit R le facteur de dilution,  $R = 1/500$ .
- Homogénéiser (10 retournements). On peut flaconner en rinçant au préalable le flacon avec l'étalon. Il faut absolument boucher et éviter le plus possible toute évaporation.

Il est fondamental d'utiliser de la verrerie jaugée de **classe A de qualités métrologiques connues**. Ainsi l'incertitude-type sur R sera connue. Il n'est pas recommandé de diminuer les volumes  $V_1$  et  $V_f$  car on augmente alors l'incertitude-type sur R.

### 4. Mise à zéro du spectrophotomètre

Travailler avec un spectrophotomètre réalisant des mesures en mode multi-longueurs d'onde.

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

### 5. Absorbances de l'étalon et des essais

Vider cette première cuve, la rincer **4 fois** en solution étalon et la remplir de 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 (bleu) 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 bleu) «  $V_U$  » de la solution mère de chromophore Ponceau S, homogénéiser (10 retournements) et mesurer l'absorbance à 520 nm. Soit  $A_U$  la valeur obtenue. «  $V_U$  » est le volume soumis à essai de la pipette à contrôler.

### 6. Calcul des volumes $V_U$ des essais

La formule est la suivante : (démonstration disponible sur <http://www.perrin33.com/metr equip/volumes/justifcalculvu.html>)

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

### 7. Incertitude composée sur $V_U$

La méthode proposée n'a de sens que si elle est raccordée aux étalons internationaux et qu'on peut estimer l'incertitude composée sur le volume  $V_U$  (il faut aussi que l'incertitude soit faible devant les spécifications).

La méthode d'estimation de l'incertitude composée sur  $V_U$  met en œuvre la méthode analytique et la loi de propagation des écart-types. Elle exige de dériver la formule F selon tous les paramètres pouvant entraîner des incertitudes : linéarité de réponse combinée de l'ensemble spectrophotomètre/colorants, fidélité en absorbance du spectrophotomètre, dérive en longueur d'onde du spectrophotomètre, incertitudes liées à la verrerie utilisée pour réaliser R et  $V_D$ , variations de température, imperfection des homogénéisations, incertitude du pH exact du diluant et problèmes d'évaporation. On pourra alors calculer une incertitude composée élargie. La méthode n'est pas simple et est hors programme. Voici un tableau des incertitudes obtenues avec le matériel et les conditions du lycée St Louis pour  $V_U = 2, 5$  et  $10 \mu\text{L}$ .

Valeur cible pour $V_U$	Incertitude-type	Incertitude élargie (k=2)
2 $\mu\text{L}$	0,013 $\mu\text{L}$ (0,67%)	0,026 $\mu\text{L}$ (1,4%)
5 $\mu\text{L}$	0,032 $\mu\text{L}$ (0,65%)	0,064 (1,3 %)
10 $\mu\text{L}$	0,066 $\mu\text{L}$ (0,66%)	0,13 (1,3 %)
Les valeurs d'incertitude-types et d'incertitudes élargies présentées ont été obtenues par calcul en utilisant la méthode décrite dans ISO/TR 16153:2004(F) et les conditions du lycée Saint-Louis (spectrophotomètre genesys6 ou ultraspec3100pro)		

### 8. EMT sur les volumes délivrés

Pour chaque volume à vérifier, il convient de connaître l'écart maximum toléré (EMT). Cette valeur est à établie en fonction des données fabricant concernant la pipette à vérifier et des exigences locales ;

Evidemment l'EMT devra être grand devant l'incertitude composée élargie sur  $V_U$  (un rapport d'au moins 3 est conseillé).

### 9. Travail à réaliser

Vérification à 2  $\mu\text{L}$  pour une pipette de type P1-10  $\mu\text{L}$ .

Données : EMT  $\pm 0,15 \mu\text{L}$  ( $\pm 7,5\%$ ) ----- Incertitude composée élargie (k=2, 95%) sur une mesure de volume vers 2  $\mu\text{L}$  dans les conditions proposées = 1,4% (cf. tableau ci-dessus).

Vérifier sur 5 mesures pour le réglage à 2  $\mu\text{L}$ .

Compte-rendu : résultats expérimentaux. Calcul des 5 volumes essais. Conclusion.

### 10. Bibliographie

- Norme ISO 8655-7 : 2005(F) et Rapport technique ISO/TR 16153 : 2004(F)
- G. R. Rodrigues, The standard uncertainty of photometric volume measurements, an analysis of dual-dye ratiometric photometry, Artel, 19A4518A, 2003
- <http://www.perrin33.com/metr equip/volumes/vol-genphoto-dual.php>