

Nejistoty kalibrací a měření pístových pipet

**Ing. Alena Vospělová
Český metrologický institut
Okružní 31
638 00 Brno**

NORMATIVNÍ ODKAZY

- ČSN EN ISO 8655-1 Pístové objemové odměrné přístroje –
Část 1: Termíny, všeobecné požadavky a
doporučení pro uživatele
- ČSN EN ISO 8655-2 Část 2: Pístové pipety
- ČSN EN ISO 8655-3 Část 3: Pístové byrety
- ČSN EN ISO 8655-4 Část 4: Zředovací zařízení
- ČSN EN ISO 8655-5 Část 5: Dávkovací zařízení
- ČSN EN ISO 8655-6 Část 6: Gravimetrická metody
stanovení měřicí chyby
- EURAMET cg-19 Version 2.1 (03/2012) Guidelines on the
determination of uncertainty in gravimetric volume calibration
- ISO/TR 20461 Determination of uncertainty for volume
measurements made using the gravimetric method
- EA 4/02 Vyjadřování nejistot měření při kalibracích,
20013
- JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections),
Evaluation of measurement data – Guide to the expression of
uncertainty in measurement.

TYPY PÍSTOVÝCH PIPET

- **Pístové pipety** se používají k odběru nebo dávkování kapalin. Jednokanálové pipety mají jednu sestavu píst/válec. Vícekanálové pipety mají sestavu píst/válec pro každý kanál. Pístové pipety mohou být typu s přímým posunutím nebo se vzduchovým polštářem.

METODA MĚŘENÍ

- Metoda je založena na stanovení objemu destilované vody vypuštěné z píستových pipet. Tento objem je závislý na určení hmotnosti destilované vody a hodnotě její hustoty. Jednotkou objemu je krychlový centimetr cm^3 nebo krychlový milimetr mm^3 . Výraz mililitr (ml) je používán jako speciální název pro krychlový centimetr, stejně jako mikrolitr (μl) je speciální název pro krychlový milimetr.
- Standardní teplota, pro kterou jsou píستové vé měřidla kalibrována, je teplota 20 °C. Teplota prostředí musí být v rozmezí (15 – 30) °C. Po dobu zkoušení se teplota prostředí nesmí měnit více než $\pm 0,5$ °C. Píستové objemové odměrné přístroje se musí temperovat minimálně 2 hodiny na teplotu prostředí, ve kterém se provádí zkouška.
- Píستové objemové odměrné přístroje se kalibrují ve svém jmenovitém objemu, v 50 % a 10 % jmenovitého objemu, pokud se jedná o přístroje s nastavitelným objemem.

POTŘEBNÁ ZAŘÍZENÍ

- a/ analytické váhy nebo ekvivalentní váhy s příslušným rozlišením podle měřeného objemu:

| Rozsah objemu kalibrovaného přístroje | Rozlišení vah mg | Opakovatelnost a linearita vah mg | Standardní nejistota měření mg |
|---|------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| $1 \mu\text{l} \leq V \leq 10 \mu\text{l}$ | 0,001 | 0,002 | 0,002 |
| $10 \mu\text{l} < V \leq 100 \mu\text{l}$ | 0,01 | 0,02 | 0,02 |
| $100 \mu\text{l} < V \leq 1000 \mu\text{l}$ | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| $1 \text{ ml} < V \leq 10 \text{ ml}$ | 0,1 | 0,2 | 0,2 |
| $10 \text{ ml} < V \leq 200 \text{ ml}$ | 1 | 2 | 2 |

- b/ váženky s víčkem nebo nádoby, které mají poměr výšky k průměru menší než 3:1.
- c/ zásobník s destilovanou nebo deionizovanou vodou, jejíž parametry jsou v souladu se 3. stupněm jakosti podle ISO 3696 a která je odplyněná nebo v rovnováze s okolním vzduchem (obsah CO₂). Má být uložena při teplotě laboratoře.
- d/ teploměr s dělením 0,1°C a standardní nejistotou < 0,2°C
- e/ vlhkoměr se standardní nejistotou < 10%
- f/ barometr standardní nejistotou < 0,2 kPa

ODPAR VODY BĚHEM VÁŽENÍ

Pro objemy menší než 50 μl musí být zohledněna chyba způsobená odpařováním vody během vážení. Podle toho, jaké nádoba se použije k vážení odměřené vody, je důležitá doba trvání měření. Chyba způsobená odpařováním zkušebního media se dá zjistit experimentálně a může se matematicky kompenzovat.

Doba trvání jednoho cyklu kalibrace má být co nejmenší, ideální doba by měla být kratší než 60 s.

GRAVIMETRICKÁ METODA

Je standardní metoda pro kalibraci měřidel objemu. Tato metoda spočívá ve dvojnásobném vážení. Vážení prázdné nádoby, do které dávkujeme kapalinu vypouštěnou z pístové pipety, a vážení s kapalinou. Rozdíl mezi těmito váženími je hmotnost kapaliny dávkované z pístové pipety. Jako měřená kapalina se používá čistá voda (demineralizovaná nebo destilovaná, případně dvakrát destilovaná voda), která musí splňovat požadavky normy ČSN ISO 3696 Jakost vody pro analytické účely, pro stupeň 3, to znamená s vodivostí menší než $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. K přepočtu hmotnosti na odměřený objem při teplotě 20°C lze použít rovnici:

$$V_0 = (I_{plná} - I_{prázdná}) \times \frac{1}{\rho_{vody} - \rho_{vzduch}} \times \left(1 - \frac{\rho_{vzduch}}{\rho_{závaží}} \right) \times [1 - \gamma(t - t_0)] \quad (1)$$

kde V_0 je stanovovaný objem při teplotě t_0

$I_{plná}$ je hmotnost nádoby s dávkovanou vodou

$I_{prázdná}$ hmotnost nádoby před vložení dávkovaného objemu kapaliny

ρ_{vody} hustota kapaliny v g/ml, při teplotě kalibrace t v °C,
vypočítaná podle rovnice (3)

$\rho_{vzduchu}$ hustota vzduchu v g/ml, při teplotě kalibrace t v °C,
vypočítaná podle rovnice (4)

$\rho_{závaží}$ hustota závaží v g/ml, použitého při kalibraci vah, konvenční
hodnota je 8 g/ml

γ kubický teplotní koeficient roztažnosti materiálu špiček v °C⁻¹

t teplota kapaliny v průběhu kalibrace v °C

t_0 referenční teplota kapaliny v °C

Část rovnice (1) lze vyjádřit pomocí korekčního faktoru Z , tak jak je
uveden v normě ČSN ISO 8655-6:

$$Z = \frac{1}{\rho_{vody} - \rho_{vzduchu}} \times \left(1 - \frac{\rho_{vzduchu}}{\rho_{závaží}} \right) \quad (2)$$

Hustota vody v závislosti na teplotě se vypočítá podle vzorce uvedeným Tanakou [1]:

$$\rho_{\text{vod}} = a_5 \left[1 - \frac{(t + a_1)^2 (t + a_2)}{a_3 (t + a_4)} \right] \quad \text{g/ml} \quad (3)$$

kde t = teplota vody, v °C

$$a_1 = -3,983035 \text{ °C}$$

$$a_4 = 69,34881 \text{ °C}$$

$$a_2 = 301,797 \text{ °C}$$

$$a_5 = 0,999974950 \text{ g/ml.}$$

$$a_3 = 522528,9 \text{ (°C)}^2$$

Hustota vzduchu v laboratoři, pokud se hodnota atmosférického tlaku pohybuje mezi 940 hPa a 1080 hPa; teplota mezi 18 °C až 30 °C; vlhkost je nižší než 80 %, se vypočítá podle vzorce uvedeném Spieveckem [2] :

$$\rho_{\text{vzduchu}} = \frac{k_1 p_{\text{vzduchu}} + h_r (k_2 t_{\text{vzduchu}} + k_3)}{t_{\text{vzduchu}} + 273,15}$$

MATEMATICKÉ VYJÁDŘENÍ OBJEMU V ZÁVISLOSTI NA JEDNOTLIVÝCH PROMĚNNÝCH

$$V_0 = \frac{m}{\rho_{vody}(t_{vody}) - \rho_{vzduchu}(t_{vzduchu}, p_{vzduchu}, h_r)} \times \left(1 - \frac{\rho_{vzduchu}(t_{vzduchu}, p_{vzduchu}, h_r)}{\rho_{závaží}} \right) \times [1 - \gamma(t - t_0)] + \delta V_{odpar} + \delta V_{opakovatelnost} \quad ml, (5)$$

$$m = (I_{p\ln y} - I_{prázdný}) + \delta m, \quad \rho_{vody}(t_{vody}) = \rho_{vody, vzorec}(t_{vody}) + \delta \rho_{vody, vzorec}$$

$$t_{vody} = t_{vody_0} + \delta t_{vody},$$

$$t_{vzduchu} = t_{vzduchu_0} + \delta t_{vzduchu}$$

$$t = t_{vody} + \delta t$$

$$\rho_{vzduchu}(t_{vzduchu}, p_{vzduchu}, h_r) = \rho_{vzduchu, vzorec}(t_{vzduchu}, p_{vzduchu}, h_r) + \delta \rho_{vzduchu, vzorec}$$

kde m je hmotnost náplně za aktuálních podmínek,

δm je složka vážení nevztahující se ani k $u(I_{plný})$ ani $u(I_{prázdný})$. Uvažuje se, že je nulová.

$t_{vody 0}$ je naměřená teplota vody,

δt_{vody} je odchylka vyplývající z nehomogenity teploty vody,

$t_{vzduchu 0}$ je naměřená teplota vzduchu,

$\delta t_{vzduchu}$ je odchylka vyplývající z nehomogenity teploty vzduchu,

δt odchylka mezi teplotou vody a špičky,

$\rho_{vody, vzorec}$ použitý vzorec na výpočet hustoty vody,

$\rho_{vzduchu, vzorec}$ použitý vzorec na výpočet hustoty vzduchu,

$\delta \rho_{vody, vzorec}$ odhad odchylky hustoty vody, vyplývající z vlivu podmínek na použitý vzorec na výpočet hustoty vody

$\delta\rho_{\text{vzduchu, vzorec}}$ odhad odchytky hustoty vzduchu, vyplývající z vlivu podmínek na použitý vzorec na výpočet hustoty vzduchu,

δV_{odpar} množství objemu odpařené vody, potřebné na korekci konečného objemu

$\delta V_{\text{opakovatelnost}}$ množství objemu vody dané opakovatelností

NEJISTOTY JEDNOTLIVÝCH VSTUPNÍCH VELIČIN

1. Hmotnost

Rovnice (7) vyjadřuje jednotlivé příspěvky k nejistotě vážení:

$$u(m) = \left[u^2(I_{\text{plný}}) + u^2(I_{\text{prázdný}}) - 2r(I_{\text{plný}}, I_{\text{prázdný}}) u(I_{\text{plný}}) u(I_{\text{prázdný}}) + u^2(\delta m) \right]^{1/2} \quad (6)$$

Střední člen představuje korelaci vážení plné a prázdné váženky. Vzhledem ke krátké době mezi oběma váženími a tím i k zanedbatelným změnám podmínek vážení se korelace neuvažuje, tak jako poslední člen rovnice.

2. Teplota vody

$$u(t) = \left[u^2(\text{kalibrace}_{\text{teploměřep}}) + u^2(\delta t) + u^2(\Delta t) \right]^{1/2} \quad (7)$$

δt odhad nejistoty způsobené možným driftem a stárnutím měřícího systému teploty po jeho kalibraci,

Δt odhad nejistoty průměrné teploty vody způsobené teplotními rozdíly, které mohou být měřeny nebo odhadovány mezi spodní a horní mezí při kalibraci.

$$\Delta t = \frac{(t_{\max} - t_{\min})}{\sqrt{12}} \quad (8)$$

3. Hustota vody

Pokud se pro výpočet hustoty použije vzorec (3) podle

Tanaky, potom příspěvek k nejistotě je $U_{\rho\text{vody}} = 9 \cdot 10^{-7} \text{ g/ml}$.

4. Hustota vzduchu

Pokud se použije vzorec (4), potom nejistota je:

$$u(\rho_{\text{vzduchu}}) = \frac{5 \cdot 10^{-7}}{\sqrt{3}} \quad \text{g/ml} \quad (9)$$

5. Hustota závaží

Hustota závaží použitého při kalibraci vah je uvedena v kalibračním listě včetně nejistot. Nebo se může použít konvenční hustota 8 g/ml a nejistota se odhadne podle OIML R 111-1 kapitola 10.

6. Koeficient objemové roztažnosti pipet

Je třeba zdůraznit, že koeficient teplotní objemové roztažnosti není dobře definovaný v důsledku různých typů a provedení jednotlivých pipet a nelze jej univerzálně určit. Objemový koeficient teplotní roztažnosti pipety se skládá z lineárního koeficientu roztažnosti různých složek, např. pístové části, zarážka zdvihu pístu apod. Materiálové vlastnosti použitých materiálů a různé geometrie a vzory, To vše má vliv na objemovou roztažnost. Nicméně, tyto vlivy nemohou být univerzálně vyjádřeny matematicky pro zařízení kteréhokoliv z výrobců. Pro materiál špiček (polypropylen) je $\gamma = 2,4 \cdot 10^{-4} / \text{C}$. Nejistota se vypočítá:

$$u(\gamma) = \frac{\gamma}{\sqrt{3}}$$

7. Korekce na odpar

Pokud při kalibraci je používána vlhkostní past (trap), korekce se nezapočítává. Pokud se nepoužívá, je potřeba Stanovit korekci na odpar výše popsaným způsobem.

Nejistota se stanoví:

$$u(V_{odpar}) = \frac{V_{odpar}}{\sqrt{3}}$$

8. Opakovatelnost

Rovnice pro nejistotu typu A:

$$u(\delta V_{opakovatelnost}) = \frac{s(V_0)}{\sqrt{n}} \quad (10)$$

Kde $s(V_0)$ směrodatná odchylka od průměru

n je počet měření

Získáme jí z výběrového rozptylu $s^2(V_0)$ hodnot V_i , který je stanoven:

$$s^2(V_0) = \frac{1}{n-1} \sum (V_i - \bar{V})^2$$

Kladná odmocnina $s(V_0)$ takto stanoveného rozptylu je výběrová směrodatná odchylka .

CITLIVOSTNÍ KOEFICIENTY

Pro snadnější vypočet definujeme substituce:

$$1. \quad A = \frac{1}{\rho_{vody} - \rho_{vzduchu}}$$

$$2. \quad B = 1 - \left(\frac{\rho_{vzduchu}}{\rho_{závaží}} \right)$$

$$3. \quad C = 1 - \gamma (t - t_0)$$

$$4. \quad m = I_{plný} - I_{prázdný}$$

Potom rovnici (1) můžeme vyjádřit:

$$V_0 = m \times A \times B \times C + \delta V_{odpar} + \delta V_{opakovatelnost} \quad (11)$$

1.Hmotnost

$$\left(\frac{\delta V_0}{\delta m} \right) = A \times B \times C \quad (12)$$

2.Teplota vody

$$\left(\frac{\delta V_0}{\delta t} \right) = m \times A \times B \times (-\gamma) \quad (13)$$

3.Hustota vody

$$\left(\frac{\delta V_0}{\delta \rho_{\text{vody}}} \right) = -m \times B \times C \times \frac{1}{(\rho_{\text{vody}} - \rho_{\text{vzduchu}})} = -m \times A^2 \times B \times C \quad (14)$$

4. Hustota vzduchu

$$\left(\frac{\delta V_0}{\delta \rho_{\text{vzduch}}} \right) = m \times C \times A \times \left[\frac{1}{(\rho_{\text{vody}} - \rho_{\text{vzduchu}})} \times \left(1 - \frac{\rho_{\text{vzduchu}}}{\rho_{\text{závaží}}} \right) - \frac{1}{\rho_{\text{závaží}}} \right] = m \times A \times C \times \left(\frac{B \times A}{\rho_{\text{závaží}}} - \frac{1}{\rho_{\text{závaží}}} \right)$$

(15)

5. Hustota závaží

$$\left(\frac{\delta V_0}{\delta \rho_{\text{závaží}}} \right) = m \times A \times C \times \frac{\rho_{\text{vzduchu}}}{\rho_{\text{závaží}}^2} \quad (16)$$

6. Objemový teplotní koeficient

$$\left(\frac{\delta V_0}{\delta \gamma} \right) = m \times A \times B \times (- (t - t_0)) \quad (17)$$

7. Odpar

$$\left(\frac{\delta V_0}{\delta \delta V_{odpar}} \right) = 1 \quad (18)$$

8. Opakovatelnost

$$\left(\frac{\delta V_0}{\delta \delta V_{opakovatelnost}} \right) = 1 \quad (19)$$

KOMBINOVANÁ STANDARDNÍ NEJISTOTA

V rámci hypotézy o aplikaci zákona o šíření nejistoty, lze kombinovanou standardní nejistotu vyjádřit:

S použitím výše uvedených vztahů, je výsledná kombinovaná standardní nejistota: (20)

$$u(V_0) = \left[\left(\frac{\delta V_0}{\delta m} \right)^2 u^2(m) + \left(\frac{\delta V_0}{\delta t} \right)^2 u^2(t) + \left(\frac{\delta V_0}{\delta \rho_{\text{vody}}} \right)^2 u^2(\rho_{\text{vody}}) + \left(\frac{\delta V_0}{\delta \rho_{\text{vzduchu}}} \right)^2 u^2(\rho_{\text{vzduchu}}) + \left(\frac{\delta V_0}{\delta \rho_{\text{závaží}}} \right)^2 u^2(\rho_{\text{závaží}}) + \left(\frac{\delta V_0}{\delta \gamma} \right)^2 u^2(\gamma) + u^2(\delta V_{\text{odpar}}) + u^2(\delta V_{\text{opakovanost}}) \right]^{1/2} \quad (21)$$

ROZŠÍŘENÉ STANDARDNÍ NEJISTOTA

Standardní rozšířenou nejistotu U počítáme pro pravděpodobnost pokrytí cca 95 %:

kde $k = 2$ je koeficient pokrytí .

$$U = k \times u_c$$

Tabulka výpočtu nejistoty u_B

| | veličina | odhad | nejistota | koef.citlivosti | příspěvek k nejistotě μl |
|-----------------|--|---------------------|----------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Váhy | | | | | |
| 1.hodnota | nejistota kalibrace m [mg] | 99,89872 | 0,03794733 | 1,00302 | 0,038062 |
| 2.hodnota | Nejistota kalibrace m [mg] | 99,89872 | 0,03794733 | 1,00302 | 0,038062 |
| 1.hodnota | dílek váhy m [mg] | 0,01 | 0,00288675 | 1,00302 | 0,0028955 |
| 2.hodnota | dílek váhy m [mg] | 0,01 | 0,00288675 | 1,00302 | 0,0028955 |
| | korekce na odpar[mg] | 0,012 | 0,00693 | 1,00302 | 0,01 |
| | | 0,1 | | | 0,00169 |
| | nejistota kalibrace teploměru $t_{\text{vody}} [^{\circ}\text{C}]$ | | 0,07 | 0,024 | |
| Teplota | Drift teploty během kalibrace | 0,05 | 0,0144338 | 0,024 | 0,000347 |
| Hustota vody | | 0,998089 | $1,3 \cdot 10^{-6}$ | -1003 | 0,0013 |
| Hustota vzduchu | | 0,00115 | $2,89 \cdot 10^{-7}$ | 877 | 0,000253 |
| Hustota závaží | | 0,8 | 0,03 | 0,0187 | 0,000562 |
| | koeficient teplotní roztažnosti [K^{-1}] | $2,4 \cdot 10^{-4}$ | 0,0001386 | 0,027 | 0,013 |
| | Nejistota typu A | | 0,0371 | 1 | 0,0371 |
| | Standardní nejistota | | | | 0,0403 |
| | V [μl] | 100,111 | K=2 | | 0,081 |

Dámy a pánové
děkuji za pozornost.