

## **TP 8**

### **Métrologie**

En lien avec les Travaux pratiques de biochimie / biologie de l'année 1 du BTSA Anabiotec.

**Métrologie : gestion de tout ce qui concerne les équipements de mesure, d'essais et d'analyse.**

**Etalonnage : concerne protocole permettant de comparer un étalon à un équipement pour établir une erreur de justesse et une incertitude d'étalonnage aboutissant à la conformité ou non-conformité du matériel vis-à-vis l'étalon.**

## Fiche de synthèse

**PARTIE I/****Etalonnage des pipettes automatiques****I.1 Introduction :**

La justesse des pipettes doit être vérifiée régulièrement car leur utilisation (et mauvaise utilisation) leur fait perdre de la justesse. La fréquence de contrôle de la justesse, de la répétabilité et du biais des pipettes doit être définie.

Les méthodes utilisables pour le contrôle sont gravimétriques ou colorimétriques. Une information complète et des instructions spécifiques sont incluses dans les manuels d'utilisation des pipettes, certains étant même disponibles en ligne. Bien lire le manuel du fabricant avant de commencer à pipeter.

Afin d'assurer des performances optimales, la température de la solution et des cônes de pipette doit être identique (des erreurs de volume peuvent survenir, dues à des changements dans le déplacement de l'air et dans la viscosité du liquide). Ne pas pipeter les liquides de température  $> 70^{\circ}\text{C}$ . Des erreurs de volume peuvent aussi se produire avec des liquides ayant une grande pression de vapeur ou une densité/viscosité très différente de l'eau. L'eau est généralement utilisée pour calibrer les pipettes et pour vérifier les erreurs de justesse et de précision.

**I.2 Principe de la méthode :****Méthodes gravimétriques pour vérifier la justesse et la précision des micropipettes**

Le véritable volume de la pipette sera déterminé indirectement grâce à la masse d'un échantillon d'eau distillée, basé sur la densité connue de l'eau. En utilisant l'équation  $D = M/V$ , le volume de la pipette est déduit des deux autres variables. Une balance analytique et le tableau des densités de l'eau suivant la température sont aussi utilisés afin de déterminer le volume avec une précision de 4 chiffres après la virgule. Cette procédure sera répétée afin de donner des indications sur la précision des mesures. Une fois le volume de la pipette déterminé, elle pourra être utilisée pour mesurer la densité d'un liquide inconnu.

### I.3 Equipement nécessaire :

- Balance analytique précise au milligramme et ses accessoires ;
- Eau distillée ;
- Pipette, cônes à la température de la pièce.



Noter le numéro de la pipette .....

### I.4 Procédure métrologique.

1. Regrouper la pipette à tester et quelques millilitres d'eau distillée sur la pailasse. Placer dans l'enceinte de la balance un béccher d'eau pour saturer l'atmosphère de l'enceinte.

Placer un béccher sur la balance analytique, fermer les portes et appuyer sur « tarer ».

2. Essai 1 pour un volume de 1000  $\mu\text{L}$

Régler la pipette sur le volume désiré (1000  $\mu\text{L}$ ) , déterminer quelle quantité d'eau devra être pesée. Amorcer le cône de pipette en le rinçant une fois avec l'eau distillée et en rejetant l'eau dans son récipient. Changer de cône. Cette opération permet de bien remplir le volume mort de la pipette.

Noter

la température de la pièce.....

la pression.....

Aspirer le volume d'eau correct et le rejeter dans le béccher (contenant déjà un peu d'eau), fermer la porte de la balance et enregistrer le poids.

Appuyer sur « tarer ».

Recommencer une dizaine de fois, enregistrer chaque résultat.

Pour un volume testé de 1000  $\mu\text{L}$ , j'obtiens :

| Essais | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| mg     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |

Température de fin de l'essai : ..... °C

3. Série 2

Noter la température de la pièce.....

la pression.....

Idem précédent...

Pour un volume testé de 500 µL, j'obtiens :

|               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| <b>Essais</b> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| <b>mg</b>     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |

4. Série 3

Noter la température de la pièce.....

la pression.....

Idem précédent...

Pour un volume testé de 100 µL, j'obtiens :

|               |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| <b>Essais</b> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| <b>mg</b>     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |

**5. Calculer pour chaque série 1, 2 et 3****Le poids moyen en mg.****Le volume moyen correspondant aux poids obtenus après les essais.****L'écart type sur les masses puis à transcrire en volume et en  $\mu\text{L}$** **6. Déterminer le coefficient Z :**

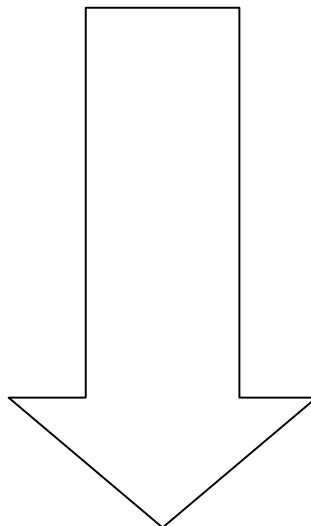
Pour cet étalonnage, il faut déterminer un coefficient, nommé Z. Ce coefficient dépend de la pression atmosphérique et de la température. Ce facteur de correction est obtenu en fonction du tableau ci-joint en tenant compte de la **pression et de la température de la pièce.**

| température<br>en $^{\circ}\text{C}$ | Pression atmosphérique en hPa |        |        |        |        |
|--------------------------------------|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|
|                                      | 853                           | 907    | 960    | 1013   | 1067   |
| 15                                   | 1,0018                        | 1,0019 | 1,0019 | 1,0020 | 1,0020 |
| 15,5                                 | 1,0019                        | 1,0019 | 1,0020 | 1,0020 | 1,0021 |
| 16                                   | 1,0020                        | 1,0020 | 1,0021 | 1,0021 | 1,0022 |
| 16,5                                 | 1,0020                        | 1,0021 | 1,0022 | 1,0022 | 1,0023 |
| 17                                   | 1,0021                        | 1,0022 | 1,0022 | 1,0023 | 1,0023 |
| 17,5                                 | 1,0022                        | 1,0023 | 1,0023 | 1,0024 | 1,0024 |
| 18                                   | 1,0023                        | 1,0024 | 1,0024 | 1,0025 | 1,0025 |
| 18,5                                 | 1,0024                        | 1,0025 | 1,0025 | 1,0026 | 1,0026 |
| 19                                   | 1,0025                        | 1,0025 | 1,0026 | 1,0027 | 1,0027 |
| 19,5                                 | 1,0026                        | 1,0026 | 1,0027 | 1,0028 | 1,0028 |
| 20                                   | 1,0027                        | 1,0027 | 1,0028 | 1,0029 | 1,0029 |
| 20,5                                 | 1,0028                        | 1,0028 | 1,0029 | 1,0030 | 1,0030 |
| 21                                   | 1,0029                        | 1,0030 | 1,0030 | 1,0031 | 1,0031 |
| 21,5                                 | 1,0030                        | 1,0031 | 1,0031 | 1,0032 | 1,0032 |
| 22                                   | 1,0031                        | 1,0032 | 1,0032 | 1,0033 | 1,0033 |
| 22,5                                 | 1,0032                        | 1,0033 | 1,0033 | 1,0034 | 1,0035 |
| 23                                   | 1,0033                        | 1,0034 | 1,0035 | 1,0035 | 1,0036 |
| 23,5                                 | 1,0035                        | 1,0035 | 1,0036 | 1,0036 | 1,0037 |
| 24                                   | 1,0036                        | 1,0036 | 1,0037 | 1,0038 | 1,0038 |
| 24,5                                 | 1,0037                        | 1,0038 | 1,0038 | 1,0039 | 1,0039 |
| 25                                   | 1,0038                        | 1,0039 | 1,0039 | 1,0040 | 1,0041 |
| 25,5                                 | 1,0040                        | 1,0040 | 1,0041 | 1,0041 | 1,0042 |
| 26                                   | 1,0041                        | 1,0042 | 1,0042 | 1,0043 | 1,0043 |
| 26,5                                 | 1,0042                        | 1,0043 | 1,0043 | 1,0044 | 1,0045 |
| 27                                   | 1,0044                        | 1,0044 | 1,0045 | 1,0045 | 1,0046 |
| 27,5                                 | 1,0045                        | 1,0046 | 1,0046 | 1,0047 | 1,0047 |
| 28                                   | 1,0046                        | 1,0047 | 1,0048 | 1,0048 | 1,0049 |
| 28,5                                 | 1,0048                        | 1,0048 | 1,0049 | 1,0050 | 1,0050 |
| 29                                   | 1,0049                        | 1,0050 | 1,0050 | 1,0051 | 1,0052 |
| 29,5                                 | 1,0051                        | 1,0051 | 1,0052 | 1,0052 | 1,0053 |
| 30                                   | 1,0052                        | 1,0053 | 1,0053 | 1,0054 | 1,0055 |

## Données à calculer ou à déterminer par le tableau corrélation ci dessus.



|  | Série 1<br>1000 $\mu\text{L}$ | Série 2<br>500 $\mu\text{L}$ | Série 3<br>100 $\mu\text{L}$ |
|--|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Volume moyen<br>$\mu\text{L}$                          |                               |                              |                              |
| Poids moyen<br>mg                                      |                               |                              |                              |
| Ecart type des<br>volumes<br>$\mu\text{L}$             |                               |                              |                              |
| Facteur de<br>correction<br>Z en $\mu\text{L mg}^{-1}$ |                               |                              |                              |



**7. Déterminer l'erreur de justesse pour chaque série :**

**ERREUR DE JUSTESSE = Volume moyen- volume testé**



|         | Volume moyen<br>μL<br>calculée pour<br>chaque série | Volume testé<br>μL | Erreur<br>de justesse en<br>μL | Volume étudié<br>μL |
|---------|---|--------------------|--------------------------------|---------------------|
| Série 1 |   | 1000 μL            |                                | 1000 μL             |
| Série 2 |   | 500 μL             |                                | 500 μL              |
| Série 3 |   | 100 μL             |                                | 100 μL              |

**8. Déterminer l'incertitude d'étalonnage**

Il faut connaître

**N le nombre de pesées = 10**

**$u_Z = (Z_{max} - Z_{min}) / 2\sqrt{3}$  = en μL**

Z max, valeur max pour la température de travail

Z min, valeur min pour la température de travail

$u_M$  = incertitude de la balance / 2

= EMT de la balance /  $\sqrt{3}$

On prend la valeur de EMT de balance de 1 mg car nous sommes toujours dans des zones de pesées de 0 à 50 mg.

$u_M$  = 1 mg /  $\sqrt{3}$

**$u_M$  = 0.578 mg**

**M masse moyenne pesée = mg**

**s: Ecartype = ..... μL .**



Calculer l'incertitude relative du volume étudiée correspondant à  $U_{20}$ .....pour 20 °C

$$U_{20} \text{ volume moyen de } x \text{ ml} = \sqrt{(M^2 u_Z^2 + Z^2 u_M^2 + (s / \sqrt{N})^2)}$$

$U_{20}$  volume moyen de x ml =.....

$U_{20}$  volume moyen de x ml = .....

$U_{20}$  volume moyen de x ml =.....  $\mu\text{L}$

9. Conformité de la pipette pour la justesse

**Erreur de justesse +  $U$  volume moyen de x ml  $\leq$  EMT systématique**

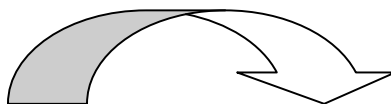


Tableau à remplir

| Volume étudié      | Erreur de justesse | $U_{20}$ moyen | Calcul Justesse+ $U_{20}$ | EMT systématique  | Conformité |
|--------------------|--------------------|----------------|---------------------------|-------------------|------------|
| 1000 $\mu\text{L}$ |                    |                |                           | 8 $\mu\text{L}$   |            |
| 500 $\mu\text{L}$  |                    |                |                           | 4 $\mu\text{L}$   |            |
| 100 $\mu\text{L}$  |                    |                |                           | 0,8 $\mu\text{L}$ |            |

10. Conformité de la pipette pour la fidélité.

**s (écart type) de chaque série  $\leq$  EMT aléatoire**

| Volume étudié      | Ecart type de chaque série | EMT aléatoire correspondant | Conformité |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|------------|
| 1000 $\mu\text{L}$ |                            | 3                           |            |
| 500 $\mu\text{L}$  |                            | 1,5                         |            |
| 100 $\mu\text{L}$  |                            | 0,6                         |            |

11. Réglages de volumes suite à la conformité.

**Si la pipette n'atteint pas les critères fixés, mettez en place des actions correctives (et recommencer le contrôle).**

**Ne pas utiliser de pipettes n'ayant pas réussi les tests. Avertir le superviseur.**

Note : une maintenance régulière (nettoyage par exemple) doit être pratiquée, soit par l'utilisateur, soit par un technicien, et en suivant les instructions du fabricant.

**Détailler l'action corrective effectuée si nécessaire :**

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## **PARTIE II/ Déterminer l'homogénéité sur les 3 parties du bain-marie utilisées en enzymologie pour améliorer le calcul de la vitesse enzymatique.**

### **II.1 Introduction**

Cette étude du bain marie doit permettre de déterminer la zone de l'appareil, la plus stable, la plus juste pour garder la bonne température.

Principe de la méthode

Cette étude s'effectue sur trois zones de l'appareil qu'il faut définir.

Cf enseignant

### **II.2 Equipement nécessaire**

Bain-marie avec de l'eau distillée rempli au 2/3.  
Thermomètre étalon du lycée.  
Chronomètre étalonné.

### **II.3 Procédure métrologique**

Délimiter la zone ;

Placer un portoir dans l'eau en laissant de chaque côté de la zone au moins 2 cm.

Mesurer la hauteur d'eau.

Placer la température à 35°C (Attention : ne pas toucher le bouton de réglage de l'appareil. A voir avec le responsable du matériel). Attendre 20 minutes

**II.31 Essai 1****Pour la zone 1 : A gauche.**

Déterminer la composante Homogénéité :

Mesurer la température en 9 points autour du portoir en veillant à laisser 1 cm entre le fond et la sonde température.

|        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Essais | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

Homogénéité du bain-marie= Max –Min en °C.

Homogénéité= °C

Calculer l'incertitude absolue :

$$u = \text{Homogénéité}/2\sqrt{3}$$

u = °C

Calculer la composante stabilité du bain-marie

Placer la sonde au milieu du portoir et faire 20 mesures (lecture de température) en tenant compte du temps de réponse du thermomètre.

|        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Essais | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| °C     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Stabilité du bain-marie= Max –Min en °C.

Homogénéité= °C

Calculer l'incertitude absolue :

$$u = \text{stabilité}/2\sqrt{3}$$

u = °C

**II.31 Essai 2****Pour la zone 2 : Au centre du bain-marie.**

Faire la même chose que précédemment...

Déterminer la composante Homogénéité :

Mesurer la température en 9 points autour du portoir en veillant à laisser 1 cm entre le fond et la sonde température.

| Essais | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

Homogénéité du bain-marie= Max –Min en °C.

Homogénéité= °C

Calculer l'incertitude absolue :

$$u = \text{Homogénéité}/2\sqrt{3}$$

u = °C

Calculer la composante stabilité du bain-marie

Placer la sonde au milieu du portoir et faire 20 mesures (lecture de température) en tenant compte du temps de réponse du thermomètre.

| Essais | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| °C     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

Stabilité du bain-marie= Max –Min en °C.

Homogénéité= °C

Calculer l'incertitude absolue :

$$u = \text{stabilité}/2\sqrt{3}$$

u = °C

### II.31 Essai 3

Pour la zone 3 : A droite du bain-marie.

Faire la même chose que précédemment....

Déterminer la composante Homogénéité :

Mesurer la température en 9 points autour du portoir en veillant à laisser 1 cm entre le fond et la sonde température.

|        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Essais | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

Homogénéité du bain-marie= Max –Min en °C.

Homogénéité= °C

Calculer l'incertitude absolue :

$$u = \text{Homogénéité}/2\sqrt{3}$$

u = °C

Calculer la composante stabilité du bain-marie

Placer la sonde au milieu du portoir et faire 20 mesures (lecture de température) en tenant compte du temps de réponse du thermomètre. (Pour le thermomètre que vous avez, il faut prendre une mesure toutes les 10 secondes)

|               |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Essais</b> | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> | <b>13</b> | <b>14</b> | <b>15</b> | <b>16</b> | <b>17</b> | <b>18</b> | <b>19</b> | <b>20</b> |
| °C            |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |

Stabilité du bain-marie= Max –Min en °C.

Homogénéité= °C

Calculer l'incertitude absolue :

$$u = \text{stabilité}/2\sqrt{3}$$

u = °C

#### II.4 Interprétation du choix de la zone de test pour l'activité enzymatique.

Le bain marie convient bien pour les tests enzymatique sur la (les) zones :

|        | Conforme | Non conforme |
|--------|----------|--------------|
| Zone 1 |          |              |
| Zone 2 |          |              |
| Zone 3 |          |              |

**PARTIE III/ Vérification simplifiée ou contrôle de la dérive possible de la balance en salle de biologie.****A CHAQUE JOUR D'UTILISATION.**

Comparer à l'aide d'une grandeur de référence (étalon, matériau stable) la valeur obtenue et la valeur attendue.

a/ Tolérance de l'utilisation de la balance :

L'EMT de la balance est inscrite au-dessus du clavier.

Pour une utilisation sur la journée, il faut que

$$\text{Tolérance} = \pm \text{EMT balance}$$

| <b>Étalon</b> | <b>Réponse de la balance</b> |
|---------------|------------------------------|
| <b>100 mg</b> | <b>mg</b>                    |

b/ Si problème :

Refaire un calibrage de la balance en utilisant le manuel d'utilisation.

Refaire une vérification avec l'étalon.

Appeler un métrologue pour un étalonnage. Prestation payante.

**Fin des contrôles métrologiques en salle de biologie !**