

Les Petits Déjeuners du



Réunion n°24 du Club des Laboratoires Accrédités

*Partage d'expériences, Evolutions dans le domaine de
l'accréditation, audits croisés*

Métrologie des AVAP et les évolutions de la
série des normes ISO 8655

- I. Thématique : Métrologie des AVAP et les évolutions de la série des normes ISO 8655**

- II. Programme d'échanges d'auditeurs internes**



LE PARTENAIRE À VOTRE MESURE

Métrologie des AVAP et les évolutions de la série des normes ISO 8655

1. **Introduction**
2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique
3. Exigences liées aux balances
4. Les principales évolutions de la série des normes ISO 8655
5. REX : Validation des méthodes d'étalonnage
 - Incertitude sur l'évaporation (LAB GTA 90)
 - Effet opérateur (LAB GTA 90)
 - Etalonnage des pipettes multi-canaux
 - Déclaration de conformité simplifiée + niveau de risque

La série de normes ISO 8655 : 2022 annule et remplace la première édition de norme ISO 8655 : 2002

Elles servent souvent aux laboratoires de **base technique** pour l'établissement de leur méthode d'étalonnage.

La plupart des laboratoires d'étalonnage est **accrédité en méthode interne**.

Autre document de référence :

LAB GTA 90 « Étalonnage des instruments volumétriques à piston »

La dernière version (rév 02) date de mars 2023, elle est disponible sur le site www.cofrac.fr

1. Introduction

- **ISO 8655-1 : 2022** : Définitions, exigences générales et recommandations pour les utilisateurs
- **ISO 8655-2 : 2022** : Pipettes
- **ISO 8655-3 : 2022** : Burettes
- **ISO 8655-4 : 2022** : Diluteurs
- **ISO 8655-5 : 2022** : Distributeurs
- **ISO 8655-6 : 2022** : Mode opératoire de mesure gravimétrique de référence pour la détermination de volumes
- **ISO 8655-7 : 2022** : Mode opératoire de mesure alternatifs pour la détermination de volumes
- **ISO 8655-8 : 2022** : Mode opératoire de mesure photométrique de référence pour la détermination de volumes
- **ISO 8655-9 : 2022** : Seringues de laboratoire haute précision pour utilisation manuelle
- **PROJET : ISO/DIS 8655-10** : *Recommandations d'utilisation et exigences relatives aux compétences et à la formation des utilisateurs, ainsi qu'à l'adéquation des AVAP*

1. Introduction
2. **Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique**
3. Exigences liées aux balances
4. Les principales évolutions de la série des normes ISO 8655
5. REX : Validation des méthodes d'étalonnage
 - Incertitude sur l'évaporation (LAB GTA 90)
 - Effet opérateur (LAB GTA 90)
 - Etalonnage des pipettes multi-canaux
 - Déclaration de conformité simplifiée + niveau de risque

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique

a. Equipements nécessaires

Exigences minimales sur les dispositifs de mesures, dans ISO 8655-6 : 2022

Equipements	Résolution	Incertitude de mesure élargie (k=2)
Balance étalonnée	<i>Voir partie 2</i>	<i>Voir partie 2</i>
Thermomètre pour liquide	0,1 °C	0,2 °C
Thermomètre pour air ambiant	0,1 °C	0,3 °C
Hygromètre	1 % d'humidité relative	5 % d'humidité relative
Baromètre	0,1 kPa	1 kPa
Chronomètre	1 s	Non applicable

Autre dispositif : Dans le cas des faibles volumes (< 50µl), pour limiter les erreurs dues à l'évaporation : couvercle, piège à humidité.

Exigences minimales sur les consommables dans ISO 8655-6 : 2022

Eau distillée ou déionisée : Qualité 3 (ISO 3696) avec $T_{\text{eau}} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ de T_{ambiante}

LAB GTA 90 : le laboratoire doit s'assurer que la qualité requise est satisfaite.

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique

b. Conditions ambiantes et précautions

➤ Conditions ambiantes :

- Humidité relative entre 45% et 80%
- Température de $20\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ avec une variation maximale de $\pm 0,5\text{ °C}$ durant l'étalonnage

➤ Opérations préalables :

- Mettre au moins 2h au préalable le matériel et l'eau dans la pièce d'essai
- Les conditions ambiantes doivent être satisfaites pendant cette période (temps d'équilibrage)

➤ Etapes préliminaires

- Mettre dans le fond du récipient de pesage une quantité d'eau (couvrir le fond du récipient)
- Enregistrer la température de l'eau, la température ambiante, la pression barométrique et l'humidité relative
- Disposer le récipient de pesage sur le plateau de la balance

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique c. Mode opératoire d'étalonnage

Étalonnage des pipettes à déplacement d'air

➤ Cycle d'essai:

(avant la première pesée)

- a) Installer le cône sélectionné sur la pipette à piston
- b) Aspirer le liquide d'essai à 5 reprises (humidité du volume d'air et du cône)
- c) Noter la valeur indiquée par la balance (m_o) ou tarer la balance ($m_o = 0$)
- d) Démarrer le chronomètre (sauf si piège à humidité et $V > 50\mu\text{l}$)

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique

c. Mode opératoire d'étalonnage

Étalonnage des pipettes à déplacement d'air

➤ Cycle d'essai (à partir de la première pesée) :

- e) Appuyer sur le piston
- f) En maintenant la pipette en position verticale, immerger le cône dans le liquide d'essai à la profondeur appropriée (Tableau)

Volume [μ l]	Profondeur d'immersion [mm]	Temps d'attente [s]
≤ 1	1 à 2	1
> 1 à 100	2 à 3	1
> 100 à 1000	2 à 4	1
> 1 000 à 20 000	3 à 6	3

- g) Relâcher lentement le piston s'il est actionné manuellement
- h) Patienter pendant la durée recommandée (Tableau)

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique

c. Mode opératoire d'étalonnage

- i) Retirer le cône avec précaution du liquide d'essai en le maintenant à la verticale
- j) Positionner le cône sur un bord à l'intérieur du récipient à un angle d'environ 30° à 45°
- k) Appuyer sur le piston pour distribuer le liquide d'essai dans le récipient de pesage
- l) Utiliser la purge de la pipette à piston afin d'expulser la dernière goutte de liquide
- m) Essuyer le cône le long de la paroi interne sur environ 8 mm à 10 mm
- n) Retirer le cône de la pipette du récipient de pesage
- o) Relâcher le piston
- p) Noter la valeur indiquée par la balance m_i ($i = 1$ à n)
- q) Répéter le cycle d'essai depuis l'étape e)

Durant le cycle (10 répétitions), **le cône doit être changé au moins une fois** (tous les 5 mesurages). Lors du changement, une humidification du cône est nécessaire (étape b).

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique

c. Mode opératoire d'étalonnage

Cas particuliers pour :

Pipettes à volumes variables :

- Les essais sont réalisés pour 3 volumes :
 - Volume Bas
 - Volume Moyen
 - Volume Haut
- 10 mesures sont réalisées pour chaque volume

Pipettes à déplacement positif :

- Il n'est pas nécessaire de réaliser les 5 humidifications préalables (sauf si requis par le fabricant)
- Changer les cônes de pipettes uniquement pour les pipettes de type D2 (cône à usage unique)
- Précautions du fabricant à suivre pour éviter les bulles d'air lors du remplissage du cône

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique c. Mode opératoire d'étalonnage

Cas particuliers pour :

Pipettes à piston multicanaux :

- Chaque canal doit être considéré comme une pipette
- Avec une **balance monocanal** : tous les canaux doivent être remplis et seul le liquide du canal soumis à essai doit être vidé dans le récipient de pesée
- Avec une **balance multicanaux** : tous les canaux sont remplis et vidés simultanément (possible par rangées de canaux)

➔ Partie 4

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique

d. Enregistrement et traitement des résultats

Enregistrer les données suivantes :

- **Les 10 pesées**

→ Pour chaque volume (Bas, Moyen, Haut) pour les pipettes à volume variable

- **La masse d'évaporation** $e_{\text{moy}} = (m_{10} - m_{11}) / 10$

→ Pour les volumes < 50µl

Note : Une autre formule et une autre méthodologie sont présentées dans l'ISO 8655-6 (2022), mais celles-ci sont plus complexes et il est précisé dans la norme que toute autre méthode ou formule appropriée peut être utilisée.

- **L'hygrométrie**

- **La température moyenne de l'eau**

- **La pression atmosphérique**

LAB GTA 90 : le calcul de l'écart-type s_r doit s'appuyer sur un nombre n minimum de 10 mesurages. Sinon appliquer le facteur de Student t avec un niveau de confiance de 68% tel que :

n	t (à 68,27 %)
3	1,32
4	1,20
5	1,14
6	1,11
7	1,09
8	1,08
9	1,07

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique

d. Enregistrement et traitement des résultats

Transformation de la masse en volume (formule ISO 8655)

$$V_i = m_i \times Z$$

Z en µl/mg, fonction de la température et de la pression (Tableau A.1 de l'ISO 8655-6)

Pression (kPa) Température (°C)	100	101,3	105
18	1,0025	1,0025	1,0025
19	1,0026	1,0027	1,0027
19,5	1,0027	1,0028	1,0028
20	1,0028	1,0029	1,0029
20,5	1,0029	1,0030	1,0030
21	1,0031	1,0031	1,0031
22	1,0033	1,0033	1,0033
23	1,0035	1,0035	1,0036
24	1,0037	1,0038	1,0038

2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique d. Enregistrement et traitement des résultats

Calcul de l'erreur systématique

L'erreur systématique est déterminée par la relation :

$$e_s = V_{\text{moy}} - V_{\text{essai}}$$

Avec :

V_{essai} : volume d'essai (volume sélectionné sur la pipette)

V_{moy} : volume moyen :

$$V_{\text{moy}} = \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{n}$$

V_i : correspond à chaque volume distribué

N : nombre de répétitions

1. Introduction
2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique
3. **Exigences liées aux balances**
4. Les principales évolutions de la série des normes ISO 8655
5. REX : Validation des méthodes d'étalonnage
 - Incertitude sur l'évaporation (LAB GTA 90)
 - Effet opérateur (LAB GTA 90)
 - Etalonnage des pipettes multi-canaux
 - Déclaration de conformité simplifiée + niveau de risque

3. Exigences liées aux balances

Exigences minimales sur la balance (pipette monocanal) dans ISO 8655-6 : 2022

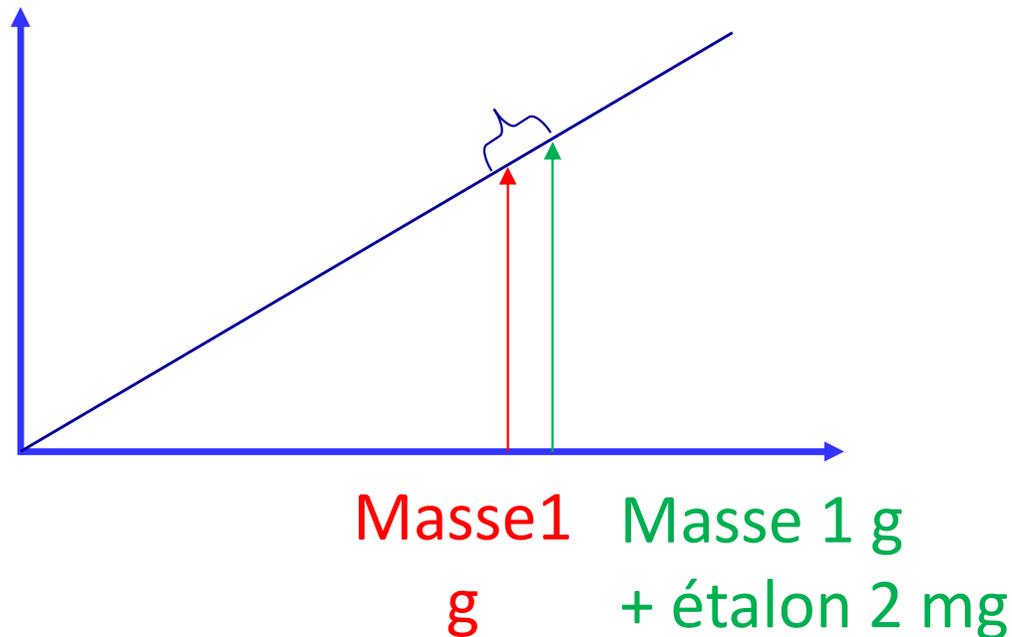
Volume nominal (V)	Résolution mg	Répétabilité mg	Incertitude élargie lors de l'utilisation $U_{\text{pesée}} (k=2)$ mg
$0,5 \mu\text{l} \leq V < 20 \mu\text{l}$	0,001	0,006	0,012
$20 \mu\text{l} \leq V < 200 \mu\text{l}$	0,01	0,025	0,05
$200 \mu\text{l} \leq V \leq 10 \text{ ml}$	0,1	0,2	0,4
$10 \text{ ml} < V \leq 1\ 000 \text{ ml}$	1	2	4
$1\ 000 \text{ ml} < V \leq 2\ 000 \text{ ml}$	10	10	40

NB : Lorsqu'une balance monocanal est utilisée exclusivement à des fins de détermination du volume de pipettes multicanaux, les valeurs de répétabilité et d'incertitude élargie lors de l'utilisation sont deux fois supérieures aux valeurs de ce tableau.

3. Exigences liées aux balances

a. Caractérisation de la justesse avec tare

Dans le cas d'une balance utilisée en **pesée différentielle de charges d'essai très proches comme lors de l'étalonnage des AVAP**, l'essai de justesse n'est pas utile et il est plus judicieux d'évaluer la linéarité au point d'utilisation.



Essai de justesse avec tare :

- Déposer une masse de valeur proche de la tare,
- Ajouter une masse étalon proche de la valeur ou des valeurs pesées lors de l'étalonnage des pipettes.

1. Introduction
2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique
3. Exigences liées aux balances
4. **Les principales évolutions de la série des normes ISO 8655**
5. REX : Validation des méthodes d'étalonnage
 - Incertitude sur l'évaporation (LAB GTA 90)
 - Etalonnage des pipettes multi-canaux
 - Déclaration de conformité simplifiée + niveau de risque

Les principales modifications sont :

- Les EMT évoluent pour les pipettes de volumes nominaux compris entre 1 et 3 μl (voir diapo suivante) ;
- Les conditions ambiantes en température et l'hygrométrie requises pour l'étalonnage sont plus restrictives ;
- Durant le cycle (10 répétitions), le cône doit être changé au moins une fois (tous les 5 mesurages). Lors du changement, une humidification du cône est nécessaire ;
- Dans l'ISO 8655-6 (2022), il n'existe plus de formule pour l'estimation d'incertitude simplifiée sur le volume distribué par l'AVAP (formule ISO 8655-6 (2003) erronée).

4. Les principales évolutions de la série des normes ISO 8655

Volume nominal [μ l]	Volume sélectionné [μ l]	EMT _{systematique} 2003	EMT _{systematique} 2022	EMT _{aleatoire} 2003	EMT _{aleatoire} 2022
1	1	5%	2,5%	5%	2,0 %
	0,5	10%	5,0 %	10%	4,0 %
	0,1	50%	25 %	50%	20 %
2	2	4 %	2,5%	2%	2,0 %
	1	8 %	5,0 %	4%	4,0 %
	0,2	40 %	25 %	20%	20 %
5	5	2,5 %	2,5%	1,5 %	1,5 %
	2,5	5,0 %	5,0 %	3 %	3,0 %
	0,5	25 %	25 %	15 %	15 %
10	10	1,2 %	1,2 %	0,8 %	0,8 %
	5	2,4 %	2,4 %	1,6 %	1,6 %
	1	12 %	12 %	8,0 %	8,0 %
1 000	1 000	0,8 %	0,8 %	0,3 %	0,3 %
	100	8,0 %	8,0 %	3,0 %	3,0 %

1. Introduction
2. Rappels : Étalonnage par la méthode gravimétrique
3. Exigences liées aux balances
4. Les principales évolutions de la série des normes ISO 8655
5. **REX : Validation des méthodes d'étalonnage**
 - Incertitude sur l'évaporation (LAB GTA 90)
 - Effet opérateur (LAB GTA 90)
 - Etalonnage des pipettes multi-canaux
 - Déclaration de conformité simplifiée + niveau de risque

GEN REF 10 :

Les étalonnages réalisés en voie 3-interne doivent faire l'objet d'une validation de méthode qui traite en particulier de :

- Raccordement métrologique
- Equipements et consommables
- Exigences attendues pour la méthode (EMT, incertitude, capabilité)
- Performances de la méthode
- Compétences du personnel
- Conditions ambiantes et installations
- Manutention des objets d'étalonnage
- Assurance de la validité des résultats d'étalonnage
- Meilleures possibilités d'étalonnage

+ Déclaration d'aptitude

LAB GTA 90 : la portée d'accréditation peut être décrite selon une méthode interne car le respect stricto sensu de la norme ISO 8655-6 n'est pas toujours approprié (exemple : changement de cône).

5. REX : Validation des méthodes d'étalonnage

a. Incertitude sur l'évaporation (LAB GTA 90)

Test d'évaporation

Pour un volume nominal < 50 μ l prendre en compte les erreurs dues à l'évaporation :

- Noter la durée totale des 10 pipetages, à la seconde près
- Après la dernière pesée, laisser le bécher sur le plateau de la balance pendant la durée des 10 pipetages réalisés précédemment
- Relever la masse m11 qui permettra de calculer la perte de masse

A la fin du cycle (relevé de m11 inclus) :

- Relever la température de l'eau et calculer la température moyenne

NB : Afin de maintenir l'erreur due à l'évaporation aussi faible que possible, l'utilisation d'un piège à humidité ou d'un couvercle peut être envisagée.

5. REX : Validation des méthodes d'étalonnage

b. Effet Opérateur(LAB GTA 90)

LAB GTA 90 : « La contribution liée à l'usage et au maniement de l'instrument volumétrique à piston est une valeur à prendre en considération au niveau du bilan des incertitudes. »

Qu'il y ait un seul opérateur ou plusieurs dans le laboratoire, il est recommandé d'évaluer cette composante, par exemple à l'aide d'un **plan d'expérience selon l'ISO 5725-2** et d'en tenir compte dans l'incertitude finale.

Cela sera parfois la composante majeure de l'incertitude d'étalonnage et elle peut grandement impacter votre capacité d'étalonnage.

5. REX : Validation des méthodes d'étalonnage

b. Étalonnage des pipettes multicanaux

Selon l'ISO 8655-7 §9.4 :

Méthode A	Méthode B
<p>Distribuer tous les canaux simultanément dans une microplaque</p> <p>Approche hybride gravimétrique/photométrique (annexe D, ISO 8655-7)</p>	<p>Utilisation balance multicanal</p> <p>Approche gravimétrique</p>
Méthode C	Méthode D
<p>Distribuer les canaux un à un après aspiration du liquide dans tous les canaux (collecter le volume distribué par un canal puis jeter le reste)</p> <p>Approche gravimétrique</p>	<p>Distribuer les canaux un à un après aspiration du liquide dans le canal étalonné (induit un facteur d'influence supplémentaire)</p> <p>Approche gravimétrique</p>

Déclaration de conformité : $|E_j| + U_{et} \leq EMT$

Exception : à la demande client, il est possible de ne pas tenir compte de U_{et}

Mais attention :

- L'information doit être spécifiée dans la revue de contrat
- Le risque associé (risque de déclarer la pipette conforme alors qu'elle n'est pas conforme) doit être indiqué (cf. §7.8.1.2 ISO 17025 et §7.4 **LAB GTA 90**)



LE PARTENAIRE À VOTRE MESURE

Merci pour votre attention

Nos formations sur le sujet :

- ✓ MS4 – Métrologie des volumes → 3 au 5 oct 2023
- ✓ MG2B – Estimation des incertitudes d'étalonnage et constitution des dossiers VDM en voie 3 interne → @14 au 16 nov + 28 au 30 nov 2023
- ✓ MG1C – Savoir évaluer les niveaux de risques lors d'une déclaration de conformité → nous contacter
- ✓ En 2024, création d'une formation MS4B : Perfectionnement à la métrologie des volumes pour approfondir ces sujets

Inscriptions : ct2m@ct2m.fr