

Les Webinars du



Réunion n°26 du Club des Laboratoires Accrédités

*Partage d'expériences, évolutions dans le domaine de
l'accréditation, évolutions normatives...*

Métrologie des spectrophotomètres

I. Présentation du CT2M

II. Déroulement du webinar

III. Thématique : Métrologie des spectrophotomètres

IV. Questions / réponses

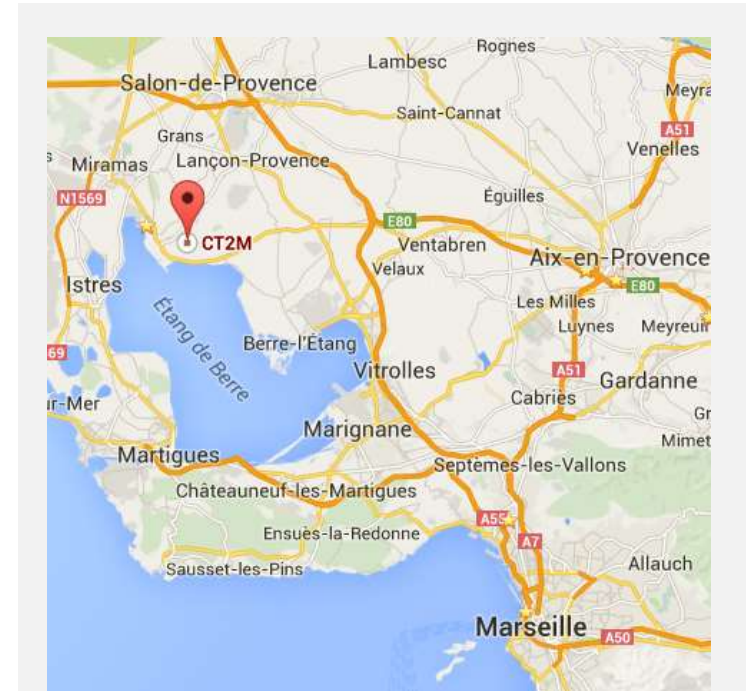
V. Conclusion

Le CT2M :

- ✓ Créé en 1993
- ✓ Laboratoire d'étalonnage de masses accrédité COFRAC selon l'ISO 17025 depuis 1994 (N° accréditation 2-1292, Portée disponible sur www.cofrac.fr)
- ✓ Statut SCOP depuis le 1^{er} avril 2016

Une équipe de 8 formateurs / consultants :

David BENHAMOU.....	dbenhamou@ct2m.fr
Laure DOMENECH.....	ldomenech@ct2m.fr
Boris GEYNET.....	bgeynet@ct2m.fr
Lise HEGRON.....	lhegron@ct2m.fr
Nicolas GARTNER.....	ngartner@ct2m.fr
Cécilia BOYON.....	cboyon@ct2m.fr
Margaux VITELA.....	mvitela@ct2m.fr
Océane ANTOINE.....	oantoine@ct2m.fr



✉ Centre des Creusets
Route de Lançon
13250 SAINT CHAMAS

📞 04 90 50 90 14

💻 www.ct2m.fr



Formation / Conseil / Audit @

« Accompagner les laboratoires dans leurs projets
Qualité et Métrologie »

Contact : David BENHAMOU

dbenhamou@ct2m.fr

06.78.00.10.26

Qualiopi
processus certifié



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

La certification qualité a été délivrée au titre de la catégorie d'action suivante :
ACTIONS DE FORMATION

Organisation de comparaisons interlaboratoires (CIL)

« Organiser des CIL conformément à l'ISO 17043 et sous accréditation
COFRAC pour les CIL sur l'étalonnage de masses de 1 mg à 20 kg »

Contact : Boris GEYNET

bgeynet@ct2m.fr

06.83.94.60.87



N° accréditation 1-7127

Portée disponible sur www.cofrac.fr

Etalonnage de masses pour toutes les classes jusqu'au E2

« Etalonner et vérifier des masses de 1 mg à 5 tonnes
sous accréditation COFRAC »

Contact : Anaïs LAMOUR

alamour@ct2m.fr

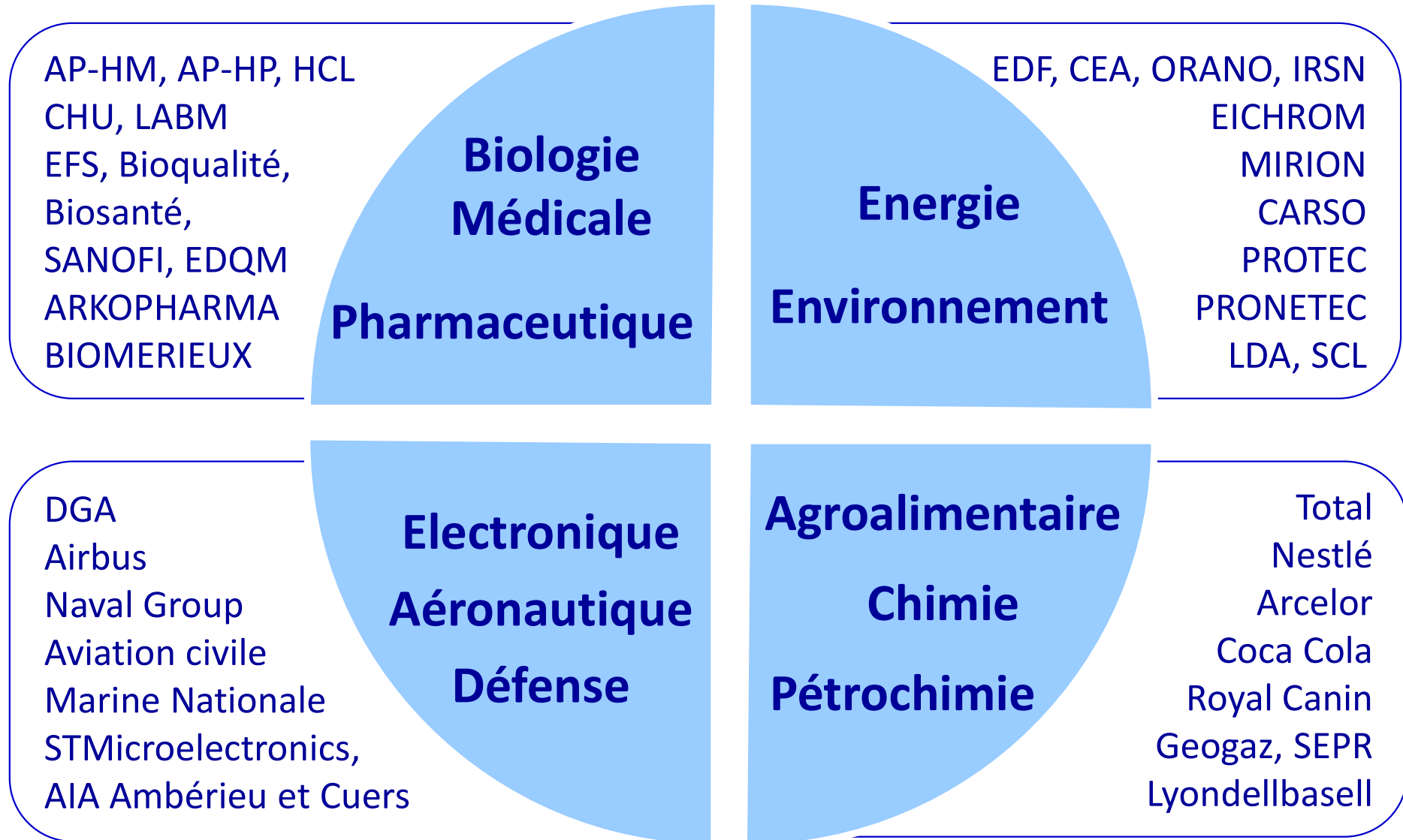
04.90.50.90.14



N° accréditation 2-1292

Portée disponible sur www.cofrac.fr

Ils nous font confiance...



- ✓ Les échanges se font par écrit dans le **fil de conversation**
- ✓ Les questions sont abordées **au fil de la présentation**
- ✓ Les **réponses aux questions** sont apportées :
 - Lorsqu'elles concernent le sujet qui est abordé
 - Si elles peuvent intéresser les autres participants
 - En fin de webinar si elles n'ont pas été vues avant

La **présentation** sera disponible sur notre site internet :

<https://ct2m.fr/communication/petits-dejeuners/>

La **vidéo du webinar** vous sera transmise avec un lien disponible 1 semaine uniquement.



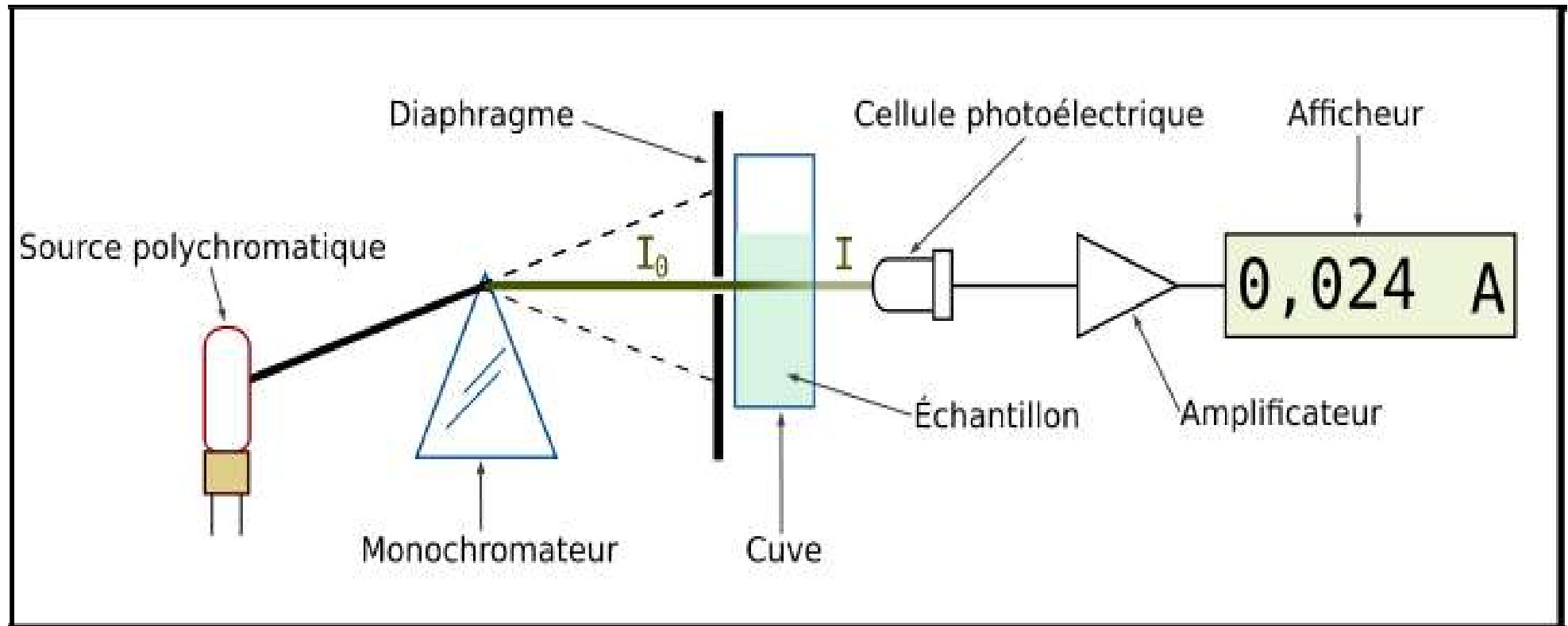
LE PARTENAIRE À VOTRE MESURE

Thématique : Métrologie des spectrophotomètres

1. **Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre**
2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre
 - a. Principe général
 - b. Etalonnage en longueur d'onde
 - c. Etalonnage en absorbance
 - d. Effet inter-canal
3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

1. Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre

Un **spectrophotomètre UV-visible** est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution homogène à une longueur d'onde donnée ou sur une région spectrale donnée.



1. Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre

Choix de la longueur d'onde à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux



Interaction de la lumière avec l'échantillon



Absorbance A (ou densité optique DO) avec $A = \log(I_0/I)$

La mesure de l'absorbance est liée à la concentration par la **loi de Beer-Lambert** :

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

ϵ : coefficient d'absorption molaire (en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

C : concentration de l'analyte (en $mol \cdot L^{-1}$)

l : longueur du trajet optique à travers la solution (en cm)

1. Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre
2. **Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre**
 - a. **Principe général**
 - b. Etalonnage en longueur d'onde
 - c. Etalonnage en absorbance
 - d. Effet inter-canal
3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

a. Principe général

Références :

- NF EN ISO/IEC 17025:2017 : Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais
- LAB REF 02 : Exigences pour l'accréditation des laboratoires selon la norme NF EN ISO/IEC 17025:2017
- GEN REF 10 : Traçabilité des résultats de mesure – Politique du Cofrac et modalités d'évaluation
- Guide d'étalonnage des spectrophotomètres, Les Guides Techniques du Collège Français de Métrologie (CFM)
- LAB GTA 05 : Analyses physico-chimiques des eaux
- LAB GTA 27 : Essais en immuno-sérologie animale
- LAB GTA 40 : Essais en Santé Végétale

Principe de l'étalonnage

**VALEUR
INDIQUÉE**

Comparaison

**VALEUR
ÉTALON**



ERREUR DE JUSTESSE

$$E_j = \text{Valeur « lue »} - \text{Valeur « vraie »}$$

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

a. Principe général

Vérification métrologique (ou déclaration de conformité) :

La vérification métrologique permet de s'assurer que les écarts entre les valeurs indiquées et les valeurs de référence sont tous inférieurs aux Erreurs Maximales Tolérées (EMT).

$$|E_j| + U_{et} \leq EMT$$

Le calcul pour estimer l'incertitude d'étalonnage U_{et} sera détaillé lors de la nouvelle formation **Métrologie des spectrophotomètres** (ouverture en **2025**).

1. Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre
2. **Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre**
 - a. Principe général
 - b. Etalonnage en longueur d'onde**
 - c. Etalonnage en absorbance
 - d. Effet inter-canal
3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre b. Etalonnage en longueur d'onde

Objectif

S'assurer que la longueur d'onde affichée correspond à la longueur d'onde réelle (vérification de la position des pics).

Choix des étalons

Filtres ou plaques étalons présentant des pics étroits à plusieurs longueurs d'onde caractéristiques :

- **Étalons solides en verre** (filtre de didymium et d'oxyde d'holmium)
- **Étalons liquides** (filtres d'oxyde d'holmium)

Les valeurs de référence associées à leurs incertitudes ($k=2$) de l'étalon se trouvent dans son **Certificat d'étalonnage (CE)**.

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

b. Etalonnage en longueur d'onde

Essai de justesse

L'essai est effectué avec chaque filtre pour plusieurs longueurs d'onde.

Les longueurs d'onde λ_{lue} correspondant aux pics du spectre d'absorption du filtre sont comparées aux valeurs certifiées λ_{ref} issues du CE de l'étalon.

Pour chaque longueur d'onde : $E_j = \lambda_{lue} - \lambda_{ref}$

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

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

b. Etalonnage en longueur d'onde

Essai de fidélité

La fidélité du spectrophotomètre est évaluée en **condition de répétabilité** :

- Effectuer au moins 6 mesures d'un filtre à la même longueur d'onde
- Calculer l'écart-type de ces 6 valeurs : **S**
- L'écart-type **S** pourra être utilisé dans le calcul de l'incertitude d'étalonnage.

	Longueur d'onde (nm)
	446,0
	446,1
	446,1
	446,0
	445,9
	446,0
Ecart-type S	0,08

1. Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre
2. **Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre**
 - a. Principe général
 - b. Etalonnage en longueur d'onde
 - c. **Etalonnage en absorbance**
 - d. Effet inter-canal
3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre c. Etalonnage en absorbance

Objectif

S'assurer que l'absorbance affichée correspond à l'absorbance réelle.

Choix des étalons

Filtres ou plaques étalons affichant une absorbance spécifique à une longueur d'onde donnée dans le Certificat d'étalonnage :

- **Filtres liquides de dichromate de potassium** pour l'UV
- **Filtres solides de densité optique neutre** (en quartz métallisés) pour l'UV et le visible

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

c. Etalonnage en absorbance

L'étalonnage en absorbance est à effectuer après l'étalonnage en longueur d'onde.

Précaution importante : la mesure d'absorbance doit être indépendante de l'erreur liée à la longueur d'onde.

Ainsi, on choisira un filtre ou une solution étalon qui présente **un signal plat ou un pic à large bande à la longueur d'onde de l'étalonnage.**

De plus, la **largeur de la fente** doit être déterminée pour régler la **bande passante**. Elle doit être la plus proche de celle sélectionnée lors de l'étalonnage des étalons.

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

c. Etalonnage en absorbance

Essai de justesse

L'absorbance est mesurée à l'aide de l'étalon choisi en se plaçant aux longueurs d'onde du CE.

L'erreur de justesse est évaluée de la manière suivante :

- Effectuer une ou plusieurs mesures d'absorbance $A_{lue,i}$ (10 répétitions conseillées)
- Calculer la moyenne de ces mesures pour chaque longueur d'onde considérée A_{lue}
- Pour chaque longueur d'onde : $E_j = A_{lue} - A_{ref}$ (avec A_{ref} issue du CE de l'étalon)

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

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

c. Etalonnage en absorbance

Essai de fidélité

Evaluation de la fidélité en **condition de répétabilité** :

Calculer **l'écart-type S d'au moins 6 mesures d'absorbance** effectuées lors de l'essai de justesse pour chaque longueur d'onde.

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

c. Etalonnage en absorbance

Essai de linéarité

L'essai de linéarité est réalisé en choisissant un des étalons utilisé pour l'étalonnage en absorbance, en prenant une **gamme de concentration croissante de manière à couvrir le domaine de travail** (environ 5 sur la gamme).

On trace un graphe avec les **absorbances mesurées en ordonnée** et les **valeurs certifiées d'absorbance en abscisse**.

La courbe d'étalonnage est modélisée en faisant passer un **modèle linéaire** par la régression des moindres carrés.

Les écarts de linéarité seront pris en compte dans le calcul de l'incertitude d'étalonnage du spectrophotomètre.

1. Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre
2. **Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre**
 - a. Principe général
 - b. Etalonnage en longueur d'onde
 - c. Etalonnage en absorbance
 - d. **Effet inter-canal**
3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre

d. Effet inter-canal

Pour calculer l'effet inter-canal, on quantifie la **variabilité des mesures entre les différents canaux**.

La répétabilité inter-canal est évaluée grâce à **l'écart-type des moyennes d'absorbance de chacun des canaux** pour une longueur d'onde donnée.

Pour limiter cet effet, on peut utiliser des **corrections logicielles ou matérielles** pour aligner les réponses des différents canaux.

	Moyenne des absorbances
Canal 1	0,51
Canal 2	0,52
Canal 3	0,54
Canal 4	0,55
Canal 5	0,52
Canal 6	0,52
Canal 7	0,51
Canal 8	0,54
Ecart-type inter-canal	0,015

1. Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre
2. Méthode d'étalonnage et de vérification d'un spectrophotomètre
 - a. Principe général
 - b. Etalonnage en longueur d'onde
 - c. Etalonnage en absorbance
 - d. Effet inter-canal
3. **Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie**

3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

Exigences de raccordement métrologique des équipements incluant les spectrophotomètres :

- Le laboratoire doit identifier les équipements ayant une **influence sur la validité des résultats** et s'assurer de leur maintien en **bon état de fonctionnement** (propreté, maintenance, contrôle) (cf. LAB GTA 27 et 40).
- Ils doivent faire l'objet d'un **raccordement métrologique** conformément aux dispositions décrites dans la **norme NF EN ISO/IEC 17025**, le document **LAB REF 02** et le document Cofrac **GEN REF 10** à une fréquence définie et argumentée par le laboratoire (cf. LAB GTA 05, 27 et 40).
- Ils doivent faire l'objet de la définition des **critères de performance (EMT)** attendus et argumentés par le laboratoire en fonction des besoins des méthodes (officielles ou internes) (cf. LAB GTA 40).

3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

LAB GTA 05 (Analyses physico-chimiques des eaux) :

- ❑ Spectrophotomètre UV - Visible : l'utilisation de **filtres raccordés aux étalons nationaux** est fortement recommandée pour les analyses en lecture directe telles que la couleur et la chlorophylle faisant intervenir le coefficient spécifique d'absorption. L'utilisation de ce type de filtre est possible dans le cas des analyses colorimétriques.

- ❑ En l'absence de **matériaux de référence certifiés (MRC) adaptés** (niveaux de concentration et matrice), la vérification des appareils peut être réalisée par l'utilisation de **matériaux de référence (MRE ou MRI)**.

3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

LAB GTA 27 (Essais en immuno-sérologie animale) :

- ❑ Spectrophotomètres : La **fidélité, la linéarité et l'effet intercanal** des spectrophotomètres utilisés doivent **systematiquement être vérifiés** pour chaque longueur d'onde utilisée. La **vérification de la justesse** doit être effectuée quand elle s'avère **critique** (quand le résultat est interprété à partir des densités optiques brutes ou pour des méthodes ELISA quantitatives).

- ❑ Les moyens mis en œuvre pour déterminer **la linéarité et la justesse** (le cas échéant) doivent être **raccordés au SI, au moins sur trois points**.

- ❑ Le laboratoire peut utiliser une **plaque, raccordée au SI**, qu'il ne maîtrise pas en permanence, sous réserve qu'il réalise lui-même la **vérification du spectrophotomètre**. Dans tous les cas, la **compétence du laboratoire** à réaliser la vérification des spectrophotomètres est examinée lors des évaluations.

3. Raccordement métrologique des spectrophotomètres en chimie et en biologie

LAB GTA 40 (Essais en Santé Végétale) :

- Spectrophotomètres : La **fidélité, la justesse et la linéarité** des photomètres utilisés sont **systematiquement vérifiées**.
- Les **plaques étalons** sont **raccordées au SI**.
- Le laboratoire peut utiliser une plaque qu'il ne maîtrise pas en permanence, sous réserve qu'elle soit **raccordée au SI** et qu'il réalise lui-même la **vérification du spectrophotomètre**. Dans tous les cas, la **compétence du laboratoire** à réaliser la vérification des spectrophotomètres est examinée lors des évaluations.



LE PARTENAIRE À VOTRE MESURE

Ouverture en 2025 de la formation Métrologie des spectrophotomètres

Inscriptions : ct2m@ct2m.fr

Nos formations pour aller plus loin :

Formation	Dates en INTER
MG1 – Métrologie par la pratique	Du 15 au 18 octobre 2024 jusqu'à 12h30
MG2B – Estimation des incertitudes d'étalonnage et constitution des dossiers VDM en voie 3 interne	26 au 28 novembre 2024