

GUIDE TECHNIQUE D'ACCRÉDITATION

ÉTALONNAGE DES INSTRUMENTS VOLUMÉTRIQUES À PISTON

LAB GTA 90

Révision 01



SOMMAIRE

1. OBJET DU GUIDE	3
2. DOCUMENTS DE REFERENCE	3
3. DOMAINE D'APPLICATION	3
4. MODALITE D'APPLICATION.....	4
5. SYNTHESE DES MODIFICATIONS.....	4
6. DEFINITIONS LIEES AUX INSTRUMENTS VOLUMETRIQUES A PISTON.....	4
7. NOMENCLATURE DES ETALONNAGES ET EXPRESSION DES PORTEES D'ACCREDITATION.....	5
8. ETALONNAGE DES INSTRUMENTS VOLUMETRIQUES A PISTON.....	7
8.1 REFERENTIEL TECHNIQUE	7
8.2 RECOMMANDATIONS FABRICANT.....	7
8.3 RECOMMANDATIONS EMANANT DES PRATIQUES USUELLES ET LORS DE L'ETALONNAGE.....	7
8.3.1 Acheminement de l'IVAP vers le laboratoire.....	7
8.3.2 Description de l'IVAP	7
8.3.3 Examen préliminaire.....	7
8.3.4 Traçabilité des IVAP	7
8.4 CONDITIONS AMBIANTES POUR L'ETALONNAGE	8
8.5 METHODE GRAVIMETRIQUE POUR L'ETALONNAGE DES IVAP	8
8.5.1 Principe	8
8.5.2 Moyens	8
8.5.3 Opération de pipetage.....	8
9. GESTION DES MOYENS ET TRAÇABILITE METROLOGIQUE.....	9
9.1 BALANCES ET MASSES.....	9
9.2 MASSE VOLUMIQUE DE L'EAU	9
9.3 AUTRES GRANDEURS PHYSIQUES.....	9
10. ASSURER LA QUALITE DES RESULTATS.....	9
10.1 COHERENCE EXTERNE	9
10.2 COHERENCE INTERNE	10
11. INCERTITUDE D'ETALONNAGE DES IVAP	10
11.1 EXPRESSION DU MESURANDE.....	10
11.2 INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES SUR CERTAINES COMPOSANTES	10
11.2.1 Incertitude d'étalonnage de la balance.....	10
11.2.2 La perte de masse.....	10
11.2.3 Température de l'eau	11
11.2.4 Température de l'air.....	11
11.2.5 Humidité de l'air	11
11.2.6 Pression de l'air	11
11.2.7 Coefficient d'expansion cubique de l'instrument volumétrique à piston	12
11.2.8 Répétabilité des mesures, écart-type expérimental sur la moyenne des mesures.....	12
11.2.9 Effet inter opérateur.....	12
11.2.10 Autres influences.....	13
11.2.11 Effet dû à la mise en application de la méthode dans chaque laboratoire	13
12. EXEMPLE DE BILAN D'INCERTITUDES DE MESURE DES INSTRUMENTS VOLUMETRIQUES A PISTON AVEC LA METHODE GRAVIMETRIQUE	14
13. VALEURS NUMERIQUES EXTRAITES DE LA COMPARAISON INTER LABORATOIRES PIPETTES 2009 (PILOTEE PAR LE LNE A LA DEMANDE DU GROUPE DE TRAVAIL PIPETTE DU COFRAC).....	15
14. CONSTAT DE VERIFICATION.....	15

1. OBJET DU GUIDE

La norme NF EN ISO/CEI 17025 définit les prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'analyses, d'essais et d'étalonnages.

En ligne avec l'annexe B de la norme NF EN ISO/CEI 17025, le présent Guide Technique d'Accréditation (GTA) présente un état des lieux des bonnes pratiques dans le domaine des étalonnages des instruments volumétriques à piston et établit des recommandations résultant de l'application de cette norme au domaine. Ce Guide Technique d'Accréditation a été développé à l'attention des laboratoires d'étalonnage des instruments volumétriques à piston accrédités ou candidats à l'accréditation.

Ce guide ne se substitue pas aux exigences et/ou normes applicables au sein du laboratoire. Les recommandations qu'il contient et que le laboratoire est libre d'appliquer sont celles reconnues comme étant les plus appropriées par le Cofrac pour répondre aux exigences de la norme NF EN/ISO/CEI 17025 et du document LAB REF 02. Dans tous les cas, il appartient au laboratoire de démontrer que les dispositions qu'il prend permettent de satisfaire pleinement aux exigences de la norme NF EN/ISO/CEI 17025.

2. DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

En complément des documents contractuels Cofrac (NF EN ISO/CEI 17025, LAB REF 02, LAB REF 05, LAB REF 08, GEN REF 11) est fournie une liste non exhaustive des documents dont l'utilisation peut s'avérer nécessaire. Le laboratoire, s'il le souhaite, peut utiliser d'autres méthodes dérivées ou d'autres références, ou appliquer ses propres méthodes dès lors qu'il justifie son choix et qu'il valide les méthodes et les performances métrologiques associées.

- GUM (JCGM 100 (disponible sur le site du BIPM) ou NF ISO/CEI GUIDE 98-3 Juillet 2014) Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure ;
- V.I.M (JCGM 200 ou Guide ISO/CEI 99 :2007) Vocabulaire International de Métrologie - Concepts fondamentaux et généraux et termes associés ;
- EA-4/02 M Expressions of the Uncertainty of Measurements in Calibration (including supplement 1 to EA-4/02) (previously EAL-R2) ;
- EA-2/15 M - EA Requirements for the Accreditation of Flexible Scopes ;
- NF EN ISO 8655-1 Appareils volumétriques à piston partie 1 : Définitions, exigences générales et recommandations pour l'utilisateur ;
- NF EN ISO 8655-2 Appareils volumétriques à piston partie 2 : Pipettes à piston ;
- NF EN ISO 8655-5 Appareils volumétriques à piston partie 5 : Dispenseurs ;
- NF EN ISO 8655-6 Appareils volumétriques à piston partie 6 : Méthodes gravimétriques pour la détermination de l'erreur de mesure ;
- ISO/TR 20461 Détermination de l'incertitude de mesure pour les mesurages volumétriques effectués au moyen de la méthode gravimétrique ;
- ISO 3696 Eau pour laboratoire à usage analytique ;
- Comparison of Micropipettes Calibration by Accredited Laboratories » 4th International Metrology Conference CAFMET Marrakech, Morocco 23-27 April 2012;
- LAB GTA 95 - Etalonnage d'Instruments de Pesage à Fonctionnement Non-Automatique ;
- LAB GTA 22 - Métrologie des Masses.

3. DOMAINE D'APPLICATION

Le présent guide s'applique à l'étalonnage des instruments volumétriques à piston (IVAP), selon la méthode gravimétrique (méthode de référence) :

- pipette à piston à déplacement d'air monocanal à volume fixe, pipette à piston monocanal à volume variable, pipette à piston multicanaux ;
- pipette à piston à déplacement positif monocanal à volume variable ;
- distributeur : distributeur répétitif et mono-distributeur.

Note : l'IVAP peut être à fonctionnement manuel, appelé usuellement pipette mécanique car le piston est manœuvré par l'utilisateur, ou à fonctionnement automatique, appelé usuellement IVAP électronique car le piston est motorisé.

Le présent guide technique s'adresse :

- à l'ensemble des laboratoires accrédités ou candidats à une accréditation dans le domaine de l'étalonnage des instruments volumétriques à piston ;
- aux évaluateurs techniques du Cofrac, et constitue en outre une base d'harmonisation à leur usage ;
- aux membres des instances du Cofrac (Comité de section, Commission d'Accréditation Mécanique-Thermique),
- aux membres de la structure permanente du Cofrac,
- aux laboratoires d'analyses ou d'essais, souhaitant étalonner en interne leurs IVAP.

4. MODALITÉ D'APPLICATION

Le présent document est applicable à compter du **1^{er} Août 2017**.

5. SYNTHÈSE DES MODIFICATIONS

Les modifications apportées sont indiquées par une marque de révision en marge gauche du document.

Ces modifications concernent :

- la reformulation de l'expression des portées d'accréditation, telles que définies dans le document LAB REF 08. Elles touchent uniquement la forme des dénominations des portées d'accréditation et ne modifient pas le champ de compétence revendiqué.
- la suppression du paragraphe « MODALITES DE REEXAMEN »

6. DÉFINITIONS LIÉES AUX INSTRUMENTS VOLUMÉTRIQUES À PISTON

Les termes selon NF EN ISO 8655 :

Instrument Volumétrique à Piston (IVAP) également appelé Appareil Volumétrique à Piston (AVAP).

Pipettes à piston : Les pipettes à piston sont utilisées pour prélever et distribuer les liquides. Les pipettes à piston monocanal disposent d'un seul montage corps/piston. Les pipettes à piston multicanaux disposent d'un montage corps/piston pour chaque canal ; un volume de liquide identique peut être distribué vers plusieurs récipients simultanément. Les pipettes à piston peuvent être de type à déplacement positif ou à déplacement d'air.

Distributeurs : Les distributeurs sont utilisés pour la distribution de volumes prédéfinis de liquide. Il existe deux modèles :

- les mono-distributeurs fournissant une distribution unique à chaque course de remplissage ;
- les distributeurs à distribution multiple ou les distributeurs répétitifs fournissant des distributions multiples à chaque course de remplissage.

Volume nominal : Le volume nominal est le plus grand volume spécifié par le fabricant et utilisé pour l'identification et l'indication de la plage de mesure. Pour les pipettes à piston multicanaux, le volume nominal est spécifié pour un seul canal.

Plage de volume : La plage de volume est la gamme de volume, reconnue par le fabricant, qui permet la distribution d'un liquide en respectant les erreurs maximales tolérées spécifiées dans la partie applicable de l'ISO 8655. La limite supérieure de la plage de volume est toujours le volume nominal. La limite inférieure est 10 % du volume nominal sauf indication contraire par le fabricant.

Volume sélectionné : Le volume sélectionné est le volume choisi par l'utilisateur dans la plage de

volume d'un instrument volumétrique à piston à volume variable. Pour un instrument volumétrique à piston à volume fixe, le volume sélectionné est égal au volume nominal.

Volume mort : Le volume mort est le volume d'air entre la partie inférieure du piston et la surface du liquide. L'expansion du volume mort est définie par la première butée du piston.

Autre définition :

Robustesse d'une méthode : La robustesse d'une méthode est la capacité à maintenir ses performances lorsqu'elle est soumise à de petites variations des conditions expérimentales, telles celles susceptibles de se produire lors de sa mise en œuvre par un autre opérateur, sur un autre matériel ou dans un autre laboratoire.

7. NOMENCLATURE DES ÉTALONNAGES ET EXPRESSION DES PORTÉES D'ACCREDITATION

L'expression de la compétence d'un organisme est décrite dans sa portée d'accréditation. Le mode retenu pour exprimer la portée d'accréditation des laboratoires permet de préciser, par domaine de compétence technique, le profil de flexibilité de l'accréditation auquel le laboratoire concerné postule. Les éléments nécessaires pour l'expression des portées d'accréditation ainsi que les définitions des quatre profils de flexibilité (profil FIXE, FLEX1, FLEX2 et FLEX3) sont décrits dans les documents LAB REF 08 et EA-2/05.

Le laboratoire présentera sa portée selon le modèle proposé dans le tableau ci-après (valeurs numériques données à titre indicatif) :

LA VERSION ELECTRONIQUE FAI/FOI

Objet soumis à étalonnage	Mesurande	Étendue de mesure	Incertitude élargie (k=2) (nominal/50%/10%)	Principe de mesure et référence de la méthode	Moyens d'étalonnage (équipements, étalons)	Prestation en laboratoire (L) et/ou sur Site (S)
Pipettes à piston de type monocanal (volume fixe et volume variable)	Volume	10 000 µl ■	20 µl / 15 µl / 10 µl	Méthode gravimétrique Ref xxx 10 déterminations en simple pesée	Balance de portée 210 g avec une résolution de 0.01 mg	L
		5 000 µl ■	9,0 µl / 5,0 µl / 3,0 µl			
		2 000 µl ■	5,5 µl / 3,0 µl / 2,0 µl			
		1 000 µl ■	2,0 µl / 1,5 µl / 1,0 µl			
		500 µl ■	0,80 µl / 0,75 µl / 0,75 µl			
		200 µl ■	0,50 µl / 0,45 µl / 0,40 µl			
		100 µl ■	0,40 µl / 0,40 µl / 0,35 µl			
		50 µl ■	0,21 µl / 0,21 µl / 0,20 µl			
		20 µl ■	0,11 µl / 0,11 nl / 0,11 nl			
		10 µl ■	70 µl / 65 nl / 60 nl			
		2 µl ■	75 nl / 60 nl / 60 nl			
		10 000 µl ■	55 µl / 45 µl / 30 µl	Méthode gravimétrique Ref xxx 4 déterminations en simple pesée	Balance de portée 210 g avec une résolution de 0.01 mg	
		5 000 µl ■	24 µl / 7,5 µl / 4,5 µl			
		2 000 µl ■	15 µl / 6,0 µl / 3,5 µl			
		1 000 µl ■	3,5 µl / 3,0 µl / 1,5 µl			
		500 µl ■	2,5 µl / 2,0 µl / 1,5 µl			
		200 µl ■	0,90 µl / 0,65 µl / 0,50 µl			
		100 µl ■	0,45 µl / 0,45 µl / 0,40 µl			
		50 µl ■	0,40 µl / 0,35 µl / 0,30 µl			
		20 µl ■	0,20 µl / 0,15 µl / 0,15 µl			
10 µl ■	0,15 µl / 0,13 µl / 0,10 µl					
2 µl ■	0,13 µl / 0,10 µl / 0,08 µl					

Tableau 1

■ Valeur ponctuelle

Conditions particulières :

Pour les volumes ayant une valeur nominale intermédiaire aux valeurs citées dans le tableau, l'incertitude est celle du volume immédiatement supérieur. Dans le cas des instruments à volume variable, le volume le plus faible est la limite inférieure de la plage de volume ou 10% du volume nominal (la valeur la plus élevée des deux). Dans le cas des distributeurs à volume variable, l'incertitude du volume nominal s'applique à tous les volumes choisis à travers la gamme du distributeur.

Portée FIXE : Le laboratoire est reconnu compétent pour pratiquer les étalonnages en respectant strictement les méthodes mentionnées dans la portée d'accréditation. Les modifications du mode opératoire ne sont pas autorisées.

Les incertitudes élargies correspondent aux aptitudes en matière de mesures et d'étalonnage (CMC) du laboratoire pour une probabilité de couverture de 95%.

8. ÉTALONNAGE DES INSTRUMENTS VOLUMÉTRIQUES À PISTON

8.1 Référentiel technique

La norme NF EN ISO 8655, parties 1, 2, 5 et 6, est à consulter pour plus d'informations concernant les exigences et recommandations de mise en œuvre des IVAP. La partie 6 concerne plus particulièrement la méthode gravimétrique utilisée pour la détermination de leur erreur de mesure.

8.2 Recommandations fabricant

Les recommandations fabricant se retrouvent dans la notice d'utilisation :

- mode d'emploi ;
- maintenance et réparation ;
- désinfection ou stérilisation ;
- erreurs systématiques et erreurs aléatoires admissibles ;
- ajustement de l'instrument volumétrique à piston ;
- choix des consommables (cônes, seringues,...) à utiliser avec l'instrument volumétrique à piston ;
- réglage (pas ajustage) du volume sur les instruments volumétriques à piston mécanique analogique (rattrapage du jeu).

8.3 Recommandations émanant des pratiques usuelles et lors de l'étalonnage

8.3.1 Acheminement de l'IVAP vers le laboratoire

Lors du transport, un emballage adapté pour ne pas altérer l'étalonnage est à prévoir afin d'assurer des bonnes conditions d'acheminement des instruments volumétriques à piston (par exemple variations de température ou vibrations mécaniques).

8.3.2 Description de l'IVAP

Elle comprend :

- le numéro de série ou tout autre numéro d'identification unique ;
- le volume nominal ;
- la plage de volume (modèle à volume variable) ;
- l'unité de mesure, par exemple : "µl" ou "ml" ;
- des informations concernant le modèle et le fabricant ;
- l'identification des consommables utilisés lors de l'étalonnage (seringue, cône, capillaire).

8.3.3 Examen préliminaire

Il s'agit de s'assurer que l'IVAP ne présente pas de défaut tel que, par exemple :

- un défaut d'étanchéité ou de fonctionnement (affichage, piston, hystérésis des IVAP à volume variable) ;
- une contamination interne ou externe.

Les recommandations s'appliquent également aux consommables (cône, seringue,...) des IVAP employés en routine qui sont à fournir de préférence par l'utilisateur (la qualité du consommable a une influence significative sur le volume délivré).

8.3.4 Traçabilité des IVAP

Pour assurer tout suivi de traçabilité, il est préconisé de réaliser « en l'état » un étalonnage même simplifié avant toute intervention de maintenance ou de réparation. Le résultat de cet étalonnage

est à indiquer de manière non ambiguë dans le certificat pour ne pas induire de confusion lors de l'exploitation du certificat.

Cette prestation est à proposer systématiquement à l'utilisateur.

8.4 Conditions ambiantes pour l'étalonnage

Les conditions ambiantes (température de l'air, humidité relative et pression atmosphérique) ont une influence sur le pesage, l'IVAP et le liquide de test donc sur le résultat d'étalonnage des instruments volumétriques à piston et sur le bilan des incertitudes de mesure correspondant. L'étalonnage est effectué dans un environnement maîtrisé (température et hygrométrie). La quantification de la perte de masse due à l'évaporation de l'eau en fonction de la température et de l'hygrométrie est à réaliser dans les conditions d'étalonnage.

Compte tenu de l'incidence de l'effet d'évaporation de l'eau sur le résultat des mesures, il est préconisé de maintenir l'humidité relative à un niveau supérieur ou égal à 50% lors de l'étalonnage.

Avant d'effectuer l'étalonnage, il convient de s'assurer que la température de l'instrument volumétrique à piston a atteint la température ambiante du laboratoire. Un temps de mise en température de 2 heures au minimum est recommandé. Il en est de même pour les consommables associés et l'eau de test utilisée.

Lors d'étalonnages réalisés sur un site client, les conditions ambiantes du laboratoire d'étalonnage temporaire doivent être également maîtrisées. Les paramètres de ces conditions ambiantes peuvent être dégradés, ce qui pourra conduire à dégrader les incertitudes d'étalonnage.

8.5 Méthode gravimétrique pour l'étalonnage des IVAP

8.5.1 Principe

Les IVAP sont étalonnés par gravimétrie selon des méthodes internes adaptées de la norme NF EN ISO 8655-6.

Le principe consiste à déterminer la masse du volume de liquide à l'aide de l'indication fournie par un instrument de pesage, puis à la convertir en un volume, en s'appuyant sur la masse volumique du liquide étalon utilisé qui est de l'eau d'une pureté maîtrisée. La traçabilité métrologique du volume est réalisée par l'intermédiaire des grandeurs physiques « masse » et « masse volumique ».

Un étalonnage complet comprend la répétition de 10 mesures par volume étalonné. Un nombre inférieur de mesures correspond à un étalonnage simplifié qui impacte le bilan d'incertitude.

8.5.2 Moyens

Les instruments de pesage sont des balances analytiques équipées des accessoires nécessaires (tels que réservoir avec une contenance supérieure à 10 fois le volume étalonné, système anti-évaporation, dispositif de protection contre les courants d'air). Les balances sont étalonnées à l'aide d'étalons de masse.

Le liquide étalon à utiliser pour la méthode gravimétrique est de l'eau au minimum de qualité 3 selon la norme NF EN ISO 3696.

8.5.3 Opération de pipetage

La phase de remplissage est réalisée avec grand soin : l'IVAP est tenu verticalement et le geste est doux et lent, l'extrémité ne touchant pas la paroi intérieure du réservoir contenant l'eau prélevée. Il convient de respecter un temps d'attente en fin de remplissage selon le volume prélevé, ainsi qu'une valeur de profondeur d'immersion adaptée à l'IVAP concerné.

A titre d'exemple, le tableau ci-après donne pour des plages de volume, des fourchettes de profondeur d'immersion et des temps d'attente raisonnables :

Plage de volume	Profondeur d'immersion	Temps d'attente
0,1 µl - 1 µl	1 – 2 mm	1 s
> 1 µl - 100 µl	2 – 3 mm	1 s
> 100 µl - 1000 µl	2 – 4 mm	2 s
> 1000 µl	3 – 6 mm	3 s

Tableau 2

9. GESTION DES MOYENS ET TRAÇABILITÉ MÉTROLOGIQUE

9.1 Balances et masses

Les balances peuvent être étalonnées soit en externe (sous accréditation), soit en interne conformément aux préconisations du document LAB GTA 95. Il convient d'étalonner la balance sur sa plage d'utilisation tout en prenant en compte une éventuelle tare.

Dans ce dernier cas, lorsque les masses sont étalonnées en interne par comparaison à des masses de référence, il convient de se référer au document Cofrac LAB GTA 22.

En complément, il est nécessaire d'effectuer des surveillances régulières des balances afin de détecter une éventuelle dérive et d'anticiper un réétalonnage.

Le laboratoire distingue, le cas échéant, les étalons de référence des étalons de travail, les étalons susceptibles d'être employés à l'extérieur du laboratoire et les étalons susceptibles d'être utilisés hors du cadre de l'accréditation.

9.2 Masse volumique de l'eau

L'eau utilisée pour l'étalonnage des IVAP est un étalon de conversion masse/volume. Il est à ce titre suivi métrologiquement comme un étalon. C'est de plus un consommable à usage unique dont les caractéristiques peuvent se dégrader.

Dans le cas d'un approvisionnement auprès d'un tiers, il appartient au laboratoire de qualifier le fournisseur et de s'assurer de la qualité du produit à réception.

Dans le cas d'une production interne (bi-distillation ou filtration), la procédure de fabrication et les dispositions pour s'assurer de sa qualité sont à formaliser.

Dans tous les cas, il convient de documenter et de suivre la gestion de ce consommable (en particulier sa péremption).

9.3 Autres grandeurs physiques

Il conviendra que la documentation du laboratoire fasse état des instruments de mesure liés aux autres grandeurs intervenant dans l'étalonnage, en particulier pour le mesurage des températures (air et eau), de la pression et de l'humidité relative de l'air ambiant (ces paramètres permettant la détermination de leur masse volumique).

10. ASSURER LA QUALITÉ DES RÉSULTATS

10.1 Cohérence externe

Compte tenu de la variabilité de la mise en œuvre de la méthode gravimétrique employée, il est vivement conseillé aux laboratoires de participer à une comparaison inter laboratoires. L'écart normalisé permet de valider l'aptitude d'étalonnage et l'incertitude déclarée de chaque participant.

L'évaluation de l'aptitude du laboratoire est établie avant la première accréditation et elle est suivie conformément aux prescriptions du document LAB REF 02.

10.2 Cohérence interne

Le laboratoire définit des modalités de vérification de la cohérence de ses résultats d'étalonnage. Pour une meilleure lisibilité, il est préférable que les résultats fassent l'objet d'un suivi graphique. Il est possible, à partir d'un échantillon d'IVAP représentatif de la portée, d'évaluer l'aptitude de l'ensemble des opérateurs à réaliser un étalonnage à un moment donné et à les suivre dans le temps par des étalonnages réguliers. L'exploitation des résultats obtenus permet entre autre d'évaluer la composante opérateur, la stabilité de la méthode, etc.

11. INCERTITUDE D'ÉTALONNAGE DES IVAP

11.1 Expression du mesurande

L'ISO/TR 20461, "Détermination de l'incertitude de mesure pour les mesurages volumétriques effectués au moyen de la méthode gravimétrique", sera pris en considération lors de l'élaboration du bilan d'incertitude. Conformément à ISO/TR 20461, le volume délivré pour la température de référence de 20 °C sera calculé comme suit :

La méthode d'étalonnage par gravimétrie peut être modélisée par la formule suivante :

$$V_{20^{\circ}\text{C}} = (m - m_0) \cdot \underbrace{\left(\frac{1}{\rho_W - \rho_A} \right) \cdot (1 - \gamma(t - 20)) \cdot \left(1 - \frac{\rho_A}{\rho_B} \right)}_{\text{Facteur Z x Y}}$$

Avec :

$V_{20^{\circ}\text{C}}$	volume à 20 °C	ml
m	valeur lue sur la balance	mg
m_0	tare de la balance	mg
ρ_w	masse volumique de l'eau	mg/ml
ρ_A	masse volumique de l'air	mg/ml
ρ_B	masse volumique de la masse utilisée pour l'étalonnage de la balance	mg/ml
t	température de l'essai	°C
γ	coefficient de dilatation pipette	1/°C

Le rapport technique ISO/TR 20461 décrit l'évaluation de l'incertitude du volume délivré en détaillant un certain nombre de composantes influençant le résultat, qui sont complétées dans la suite de ce guide. La liste n'étant pas exhaustive, chaque laboratoire d'étalonnage est invité à la compléter suivant sa propre méthode.

Les composantes suivantes sont à prendre en considération dans le bilan d'incertitude en plus de celles figurant dans l'ISO/TR 20461 : « effet opérateur » et « effet méthode ».

11.2 Informations complémentaires sur certaines composantes

Dans ce guide, des informations complémentaires à l'ISO/TR 20461 sont fournies afin d'apporter une aide à l'évaluation des incertitudes de ces composantes.

11.2.1 Incertitude d'étalonnage de la balance

Le certificat d'étalonnage de la balance fournit l'incertitude élargie de l'instrument de pesage U(IP).

11.2.2 La perte de masse

Lors de l'opération de distribution réalisée avec l'instrument volumétrique à piston, la surface de l'eau est en contact avec l'air, il est important de prendre en compte les pertes par évaporation.

Les pertes par évaporation peuvent être soit déterminées, soit estimées sur la base de l'expérience personnelle tout en tenant compte du volume étalonné. Afin de minimiser l'influence de l'évaporation, les balances peuvent être équipées d'un système anti-évaporation.

11.2.3 Température de l'eau

L'écart de température entre le point de mesure et le point de prélèvement est à évaluer, et si nécessaire pris en compte.

L'incertitude sur la mesure de la température de l'eau est composée à partir de :

- la justesse et la fidélité du thermomètre :
 - Si le thermomètre est vérifié conforme à une EMT, alors le bilan d'incertitude minimal est établi à partir de cette EMT, de la résolution et de la répétabilité du thermomètre ;
 - Si le thermomètre est étalonné sans établissement d'une conformité et que la correction d'étalonnage est appliquée, le bilan d'incertitude minimal est établi à partir de l'incertitude d'étalonnage (mentionnée dans le certificat), de la dérive (ou pérennité), de la résolution et de la répétabilité du thermomètre.
- la variation de température maximale admissible de l'eau durant l'étalonnage, correspondant à la différence entre la température avant la première mesure et après la dernière mesure. Elle est à limiter à 0,5 °C (Cf. NF EN ISO 8655-6).

11.2.4 Température de l'air

L'incertitude sur la mesure de la température de l'air est composée à partir :

- de la justesse et la fidélité du thermomètre :
 - Si le thermomètre est vérifié conforme à une EMT, alors le bilan d'incertitude minimal est établi à partir de cette EMT, de la résolution et de la répétabilité du thermomètre ;
 - Si le thermomètre est étalonné sans établissement d'une conformité et que la correction d'étalonnage est appliquée, le bilan d'incertitude minimal est établi à partir de l'incertitude d'étalonnage (mentionnée dans le certificat), de la dérive (ou pérennité), de la résolution et de la répétabilité du thermomètre.
- du défaut d'homogénéité de la température de l'air.

11.2.5 Humidité de l'air

L'incertitude sur la mesure de l'humidité de l'air est composée à partir de la justesse et la fidélité de l'hygromètre :

- Si l'hygromètre est vérifié conforme à une EMT, alors le bilan d'incertitude minimal est établi à partir de cette EMT, de la résolution et de la répétabilité de l'hygromètre ;
- Si l'hygromètre est étalonné sans établissement d'une conformité et que la correction d'étalonnage est appliquée, le bilan d'incertitude minimal est établi à partir de l'incertitude d'étalonnage (mentionnée dans le certificat), de la dérive (ou pérennité), de la résolution et de la répétabilité de l'hygromètre.

Lors de l'étalonnage, l'hygrométrie est maintenue au-dessus d'une valeur minimale de 50%. Pour s'assurer de la conformité à cette consigne, l'incertitude de mesure sur l'hygrométrie de l'air durant l'étalonnage est à prendre en compte.

11.2.6 Pression de l'air

L'incertitude sur la mesure de la pression de l'air est composée à partir de la justesse et la fidélité du baromètre:

- Si le baromètre est vérifié conforme à une EMT, alors le bilan d'incertitude minimal est établi à partir de cette EMT, de la résolution et de la répétabilité du baromètre ;
- Si le baromètre est étalonné sans établissement d'une conformité et que la correction d'étalonnage est appliquée, le bilan d'incertitude minimal est établi à partir de l'incertitude d'étalonnage (mentionnée dans le certificat), de la dérive (ou pérennité), de la résolution et de la répétabilité du baromètre.

11.2.7 Coefficient d'expansion cubique de l'instrument volumétrique à piston

En raison des différents types et variantes des instruments volumétriques à piston, le coefficient de dilatation cubique ne peut pas être déterminé de manière universelle. Le coefficient de dilatation cubique d'un instrument volumétrique à piston se compose du coefficient de dilatation linéaire des composants raccordant les butées du piston et du coefficient de dilatation de la section du piston.

Les propriétés des matériaux, les combinaisons de matériaux ainsi que les différentes géométries et réalisations sont tous des paramètres ayant une influence sur le coefficient de dilatation cubique. Toutefois, ces influences ne peuvent pas être représentées en termes mathématiques et ne peuvent donc être définies par aucun fabricant.

Le mesurande cependant se rapporte à la température prise durant la mesure. La température de référence pour l'étalonnage des pipettes à piston est 20 °C, conformément à la norme EN ISO 8655-1. Si l'étalonnage est effectué à une autre température, cet écart est à prendre en compte.

Il est indispensable de conserver les instruments volumétriques à piston dans la pièce où la mesure est effectuée pendant assez longtemps (au minimum 2 heures). Étant donné qu'il n'est pas possible de mesurer la température des pipettes directement, leur température est assimilée à la température ambiante. La contribution à l'incertitude de mesure qui en découle est à estimer (Cf. ISO/TR 20461).

11.2.8 Répétabilité des mesures, écart-type expérimental sur la moyenne des mesures

L'écart-type expérimental de la valeur moyenne d'une série de n mesures individuelles est appliqué en tant que répétabilité. L'écart-type expérimental caractérise la dispersion des données mesurées dans les mêmes conditions que lors de l'étalonnage de pipettes à piston.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

L'incertitude-type (intervalle de confiance de la valeur moyenne) due à la répétabilité est déterminée conformément à "L'évaluation de type A de l'incertitude" (GUM) et est calculée en appliquant la formule suivante : $u_x = s / \sqrt{n}$

11.2.9 Effet inter opérateur

La contribution liée au maniement de l'instrument volumétrique à piston est une valeur minimale à prendre en considération au niveau du bilan des incertitudes. Cette valeur inclut les influences sur le volume distribué pendant l'étalonnage. Elle dépend fortement de l'expérience de l'opérateur dont le niveau est à maintenir et à développer grâce à des formations régulières. Les points à considérer en particulier sont :

- le temps d'attente après l'aspiration ;
- la vitesse régulière du rythme de distribution ;
- l'angle d'inclinaison pendant l'aspiration/distribution ;
- la force d'opération (ne s'applique pas aux pipettes électroniques) ;
- la profondeur d'immersion du cône dans le récipient de prélèvement.

La chaleur des mains est un facteur individuel qui dépend de l'opérateur et du type de l'IVAP. En raison de la position du piston aspirant le liquide, son influence s'exerce le plus fortement sur le volume nominal. Afin de minimiser cette influence, il convient de réduire le temps de contact avec l'objet à étalonner au strict minimum. La chaleur des mains provoque une réduction du volume (dérive temporelle). Si l'influence de la chaleur des mains s'exerce pendant l'étalonnage, cette contribution est à prendre en compte dans l'incertitude de mesure.

Ces facteurs ont une incidence sur la répétabilité du processus de mesure mais également sur la reproductibilité inter-opérateurs, la moyenne obtenue par un opérateur pouvant être notablement différente de celle obtenue par un autre opérateur.

L'effet opérateur a une incidence qui peut varier selon le volume de l'IVAP étalonné et le type d'IVAP :

- pipette à piston mécanique à déplacement d'air monocanal à volume fixe, pipette à piston monocanal à volume variable, pipette à piston multicanaux ;

- pipette à piston à déplacement positif monocanal à volume variable ;
- dispenseurs : distributeur répétitif et mono-distributeur ;
- pipette à piston électronique à déplacement d'air à volume variable, pipette à piston multicanaux.

Pour déterminer l'effet opérateur, on peut utiliser un traitement statistique de séries de données, chaque opérateur produisant une série de données, tel que présenté dans la norme ISO 21748.

Une autre approche, simplifiée consiste à demander à chaque opérateur d'étalonner plusieurs fois une pipette (un minimum de 3 répétitions est recommandé) puis de calculer la moyenne des erreurs systématiques E_i obtenue pour chaque opérateur, l'indice i correspondant au numéro de l'opérateur.

On peut alors calculer la demi-étendue de l'intervalle de dispersion des valeurs par la relation :

$$a = \frac{MAX(E_i) - MIN(E_i)}{2}$$

En faisant l'hypothèse d'une loi de probabilité normale, on obtient comme incertitude type :

$$u = \frac{a}{3}$$

Ces suggestions pour estimer l'effet inter-opérateurs ne sont que des exemples ; ils ne sont pas exhaustifs.

Si le laboratoire ne dispose que d'un opérateur qualifié, il peut s'inspirer des valeurs données à titre d'exemple dans le tableau 4 au § 14.

11.2.10 Autres influences

D'autres influences affectent la contribution liée au maniement de l'instrument volumétrique à piston, comme les influences mécaniques qui incluent, en particulier :

- l'hystérésis de l'indicateur numérique (dans le cas des instruments volumétriques à piston à volume variable, mais pas dans le cas des instruments volumétriques à piston électroniques) ;
- la reproductibilité de la course du piston.

11.2.11 Effet dû à la mise en application de la méthode dans chaque laboratoire

Les comparaisons inter laboratoires ont mis en évidence l'existence d'un biais propre à chaque laboratoire qui remet en cause la robustesse de la méthode utilisée pour l'étalonnage des instruments. Il convient donc de prendre en compte cette composante liée à la mise en application de la méthode dans chaque laboratoire qui se différenciera des autres composantes déjà intégrées dans le calcul d'incertitudes.

Il appartient au laboratoire d'évaluer cette composante liée à la mise en application de la méthode dans son propre laboratoire en participant à des comparaisons avec d'autres laboratoires accrédités.

A défaut de données exploitables, on pourra s'inspirer des valeurs données dans le tableau du paragraphe 14. Ces valeurs ont été établies à partir d'une comparaison organisée entre les différents constructeurs de pipettes accrédités. La prise en compte de ces valeurs par défaut ne dispense pas le laboratoire d'une participation régulière à des CILs.

12. EXEMPLE DE BILAN D'INCERTITUDES DE MESURE DES INSTRUMENTS VOLUMÉTRIQUES À PISTON AVEC LA MÉTHODE GRAVIMÉTRIQUE

À titre indicatif.

	Demi-étendue	Distribution	Incertitude type $u_{(xi)}$	Coefficient de sensibilité C_i	INCERTITUDE $C_i * u_{(xi)}$ (nl)
balance					
incertitude balance	U_{ip}	-	$U_{ip} / 2$ μg	1 nl/ μg	U_{ip}
perte de masse	évaporation μg	rectangulaire	évap. / $\sqrt{3}$ μg	1 nl/ μg	U_{ev}
eau					
sonde température	incertitude d'étalonnage du thermomètre: 0,2 K	-	0,2 / 2 K	C_{tw} nl/K	U_{tEAU}
pérennité thermomètre	min = U étalonnage	-	0,2 / 2 K	C_{tw} nl/K	U_{ptEAU}
dérive température	dérive température : 0,2 K	rectangulaire	0,2 / $\sqrt{3}$ K	C_{dtw} nl/K	U_{dtEAU}
air					
sonde température	incertitude d'étalonnage thermomètre 0,2 K	-	0,2 / 2 K	C_{ta} nl/K	U_{ta}
pérennité thermomètre	min = U étalonnage	-	0,2 / 2 K	C_{tw} nl/K	U_{pta}
dérive température	dérive température : 0,2 K	rectangulaire	0,2 / $\sqrt{3}$ K	C_{dta} nl/K	U_{dta}
sonde pression	incertitude d'étalonnage pression : 1 hPa	-	1 / 2 hPa	C_{pa} nl/hPa	U_{pa}
dérive pression	dérive pression : 5 hPa	rectangulaire	5 / $\sqrt{3}$ hPa	C_{dpa} nl/hPa	U_{dpa}
sonde humidité relative	incertitude d'étalonnage hygromètre : 1 %	-	1 / 2 %	C_{φ} nl/%	U_{φ}
dérive humidité	dérive hygromètre : 10%	rectangulaire	10 / $\sqrt{3}$ %	$C_{d\varphi}$ nl/%	$U_{d\varphi}$
Instrument volumétrique à piston					
coeff. exp. cubique	1.10^{-5} K^{-1}	rectangulaire	$1.10^{-5} / \sqrt{3} \text{ K}^{-1}$	C_{acc} nl.K	U_{elIVAP}
Effet opérateur					
Effet opérateur	erreur Op μg	normale	erreur Op. / 3 μg	1 nl/ μg	U_{Op}
Effet de la méthode					
Effet de la méthode	Biais de la méthode nl	rectangulaire	erreur Mo. / $\sqrt{3}$	1 nl/nl	U_{Mo}
Incertitude type pour la détermination du volume avec la méthode gravimétrique				$u_{process} = \sqrt{\sum (C_i * u_{(xi)})^2}$	
Incertitude due à l'écart type expérimental sur la moyenne de n répétitions				$u_x = s / \sqrt{n}$	
Incertitude type composée de l'étalonnage				$u_{c(V20)} = \sqrt{(u_{process})^2 + u_x^2}$	
Incertitude élargie $k = 2$				$U_{l(V20)} = 2. u_{c(V20)}$	

Tableau 3

13. VALEURS NUMÉRIQUES EXTRAITES DE LA COMPARAISON INTER LABORATOIRES PIPETTES 2009 (PILOTÉE PAR LE LNE À LA DEMANDE DU GROUPE DE TRAVAIL PIPETTE DU COFRAC)

Les laboratoires sont encouragés à participer aux comparaisons bilatérales ou multilatérales existantes au niveau national ou international de manière ponctuelle ou périodique.

Les valeurs renseignées dans le tableau ci-après sont données à titre d'exemple. Elles sont issues de l'exploitation de la comparaison inter laboratoires réalisée en 2009 avec la participation des cinq laboratoires accrédités représentant chacun une marque de micropipette. Les micropipettes sont de type mono canal et de volume fixe.

Volume nominal	Composante -type méthode	Composante -type effet Opérateur	Autres Composantes -type	Incertitude composée (k=2)
2 µl	24 nl	11 nl	13 nl	59 nl
10 µl	27 nl	15 nl	14 nl	68 nl
100 µl	0,15 µl	0,12 µl	0,08 µl	0,42 µl
1 000 µl	0,62 µl	0,55 µl	0,40 µl	1,8 µl
5 000 µl	3,9 µl	0,60 µl	1,8 µl	8,7 µl

Tableau 4

14. CONSTAT DE VÉRIFICATION

Compte tenu de l'ordre de grandeur de l'incertitude d'étalonnage au regard des EMT définies dans la norme ISO 8655, il est toléré que l'incertitude puisse ne pas être prise en compte pour déclarer la conformité.

Il importe que la règle soit préalablement convenue avec le bénéficiaire de la prestation et que le rapport concerné la stipule de manière univoque.

Ce commentaire s'applique également pour une conformité prononcée suivant d'autres textes (normes constructeurs ou exigences client).

Dans tous les cas, il est rappelé que :

- le document servant de référence est à citer dans le rapport contenant la déclaration de conformité,
- l'incertitude est à indiquer dans le certificat d'étalonnage.