



Comprobación y calibración de pipetas de pistón de volumen fijo y variable mediante el método gravimétrico

dr Sławomir Janas, Centro de Ensayos y Certificación de Metrología Radwag - Laboratorio de Ensayos, Toruńska 5, Radom 26-600, www.radwag.com



Análisis y revisión de soluciones constructivas en el contexto de la precisión y la ergonomía de uso.

© Copyright by RADWAG Wagi Elektroniczne

Radom 2023

Wydanie I

RADWAG Wagi Elektroniczne

26-600 Radom, ul. Toruńska 5

Tel. 48 48 3848800, fax 48 48 3850010

e-mail: radom@radwag.pl

<http://www.radwag.com>

Índice

1. Introducción.....	4
2. Tipos de pipetas de pistón	5
3. Requerimientos normativos	8
3.1. Requisitos de diseño para el sistema de pesaje.....	11
3.2. Precisión de la medición de masa y volumen del sistema de pesaje	18
4. Puntas de pipeta de pistón	20
5. Condiciones de trabajo en el Laboratorio	21
6. Aspiración y dispensación de líquidos	22
7. Parte de la investigación	24
7.1. Selección del peso para el procedimiento	24
7.2. Precisión de medición del sistema automático AP 12.5Y/ AP 12.1.5Y	25
7.3. La velocidad del sistema automático AP 12.5Y.....	27
7.4. Precisión de las mediciones en el ciclo automático.....	27
7.5. Cortina de vapor para microbalanzas MYA y balanzas de la serie XA	28
7.6. Cortina de vapor de sistema automático AP 12.5Y.....	29
7.7. Procedimiento de calibración de pipetas de pistón.....	30
8. Anexo 1	34
8.1. Fenómenos físicos y principio de medición durante el control de pipetas de pistón	34
8.2. Errores máximos permitidos de las pipetas de pistón	37
8.3. Valores de factores de corrección Z para agua destilada	40
9. Lista de imagenes.....	41
10. Lista de tablas	41

1. Introducción

Los líquidos siempre han sido objeto de investigación científica y de laboratorio y, como sabemos, la cantidad de líquidos durante la prueba es crucial para la precisión del análisis realizado. Inicialmente, se utilizaban pipetas para transferir el volumen por el que el investigador inhalaba una determinada cantidad de sustancia por la boca. Esto parece ser cosa del pasado ahora, ya que este método era simplemente peligroso porque los materiales pipeteados por el operador podían terminar en su boca. Los investigadores han estado expuestos a la absorción de sustancias químicas peligrosas, organismos infecciosos o materiales radiactivos. El primer caso registrado de infección accidental por pipeteo en la boca data de 1893, (informe del Dark Daily) "cuando un médico inhaló accidentalmente un cultivo de fiebre tifoidea en su boca". En 1915, se encontraron 47 casos similares en 57 laboratorios controlados. Como puede ver, el problema de seguridad durante el pipeteo fue significativo.



Imagen 1. Dr. Adah Elizabeth Verder mouth pipetting.
Zródto: <https://www.flickr.com/photos/nihgov/38455898272>,

La seguridad durante la investigación fue y es uno de los aspectos más importantes. Por esta razón, el pipeteo con la boca está actualmente prohibido (por ejemplo, en los EE. UU.) y se usa cada vez menos en el resto del mundo. Se utilizan dispositivos mecánicos o electrónicos como pipetas, buretas, diluyentes, que han eliminado de forma permanente el riesgo asociado a la absorción de factores nocivos por parte del usuario. Hoy, como antes, la medición volumétrica y la transferencia de volumen juegan un papel clave en el laboratorio. Por un lado, se espera precisión, lo que afecta el curso del proceso posterior, aquí es importante comprender los aspectos metroológicos y las buenas prácticas de pipeteo.

Por otro lado, la precisión del pipeteo es también un aspecto económico, porque algunas sustancias son caras, y la seguridad, porque como sabemos, un fármaco se diferencia de un veneno sólo en el tamaño de la dosis. Las expectativas y los requisitos de los laboratorios en el campo de la ergonomía y la precisión de los análisis están en constante crecimiento, y la respuesta a estas necesidades son las pipetas ergonómicas de volumen fijo y variable que ofrece Radwag. Su uso permite un trabajo rápido y eficiente con el más alto grado de seguridad, exactitud y precisión.



Imagen 2. Pipetas de pistón Radwag con volumen variable

Estas pipetas representan una nueva línea de productos en la serie "liquid handling", diseñadas para medición y transferir rápidamente pequeños volúmenes de líquido. Se caracterizan por una alta precisión de dosificación y una construcción ergonómica y sólida.

El mecanismo de la pipeta proporciona una precisión y repetibilidad excepcionales con una presión reducida requerida. Las principales características de esta serie de pipetas son:

- indicador de volumen grande y legible, que es completamente visible durante el pipeteo,
- agarre suave innovador que protege contra la transferencia de calor al interior de la pipeta,
- mecanismo simple de cambio de volumen "por clic"
- la capacidad de autoclavar toda la pipeta,
- resistencia a la radiación ultravioleta UV,
- compatible con la mayoría de puntas disponibles en el mercado.

2. Tipos de pipetas de pistón

El principio de funcionamiento de una pipeta de pistón es siempre el mismo, independientemente de su diseño: la presión manual o automática sobre el pistón empuja el líquido fuera del orificio de la pipeta para dosificarlo. Las pipetas de volumen fijo le permiten dosificar solo una cierta cantidad de líquido sin la posibilidad de ajustar su cantidad. Sin embargo, en el caso de un error sistemático excesivo, es posible ajustar ligeramente la cantidad de líquido dosificado para compensar los errores de pipeta detectados durante la calibración de la pipeta.

Por otro lado, gracias a este pequeño ajuste, es posible afinar la pipeta para una dosificación precisa de líquidos con propiedades distintas al agua. El volumen nominal de las pipetas de volumen variable muestra el límite superior del rango de volúmenes que se pueden transferir. Por debajo de este rango, es posible ajustar el volumen de dosificación dentro del rango provisto por el fabricante de la pipeta.

Otra división de las pipetas se refiere al método de introducir líquido en la pipeta. Es posible aspirar una dosis de líquido de forma que el líquido se separe del émbolo de la pipeta (es una pipeta tipo A) por el llamado "bolsa de aire", cuyo volumen puede denominarse zona muerta de aire de la pipeta. En esta solución, hay menos riesgo de contaminación del volumen transportado, pero desafortunadamente, para dosificar volúmenes pequeños, se obtiene menos precisión debido a la compresibilidad de la zona muerta del aire. Para limitar los efectos adversos que puede generar la zona muerta de aire, se utiliza un movimiento en dos etapas del pistón de la pipeta. En el primer ciclo de movimiento del pistón, se elimina el líquido acumulado en la punta de la pipeta, y durante el segundo movimiento del pistón, se expulsa el aire junto con los restos de líquido que puedan quedar en la punta.



Imagen 3. Inspección de pipetas de pistón: soporte de medición de balanzas de la serie XA y microbalanzas MYA

En la pipeta tipo D, el líquido aspirado tiene contacto directo con el pistón de la pipeta, lo que reduce el problema de imprecisión resultante de la existencia del "bolsa de aire". Esta solución está dedicada a aplicaciones donde el volumen de líquido a transferir es bastante pequeño, por ejemplo, $V < 10 \mu\text{l}$.

El desarrollo de las pipetas monocanal son las pipetas multicanal, que permiten la dosificación simultánea de volúmenes iguales por múltiples puntas. Este modo de operación es imprescindible para muchos laboratorios bioquímicos y de patología, y el uso de una pipeta multicanal aumenta las capacidades de investigación y acelera significativamente el análisis de muestras. El desarrollo de pipetas es tan dinámico que ahora está disponible una amplia gama de pipetas ergonómicas. Su característica principal es la facilidad de uso con el menor esfuerzo posible del operador.

Además de las pipetas manuales, hay disponibles pipetas semiautomáticas controladas electrónicamente. Su principal ventaja es la eliminación de los llamados factores humanos durante la aspiración y descarga de líquidos, lo que lleva a una reducción de errores debido a la aspiración y entrega desiguales de líquidos. Independientemente del diseño de la pipeta, su principio de funcionamiento sigue siendo el mismo y, por lo tanto, el procedimiento de control es el mismo. Requiere medir la masa del líquido dosificado por la pipeta, lo que, dada la densidad conocida del líquido, permite determinar el volumen del líquido, que es igual al volumen de la pipeta.

$$V = \frac{m}{\rho} \quad (1)$$

donde: V volumen de líquido dispensado de la pipeta (cm³)
m masa del líquido (g)
ρ densidad del líquido (g/cm³)



Imagen 4. Pipetas de pistón Radwag

3. Requerimientos normativos

Los requisitos normativos para las pipetas de pistón se encuentran en la serie ISO 8655 - Instrumentos volumétricos de pistón. La terminología, las definiciones se presentan en la parte 1 de la norma, y la construcción y los requisitos para las propiedades metrológicas de las pipetas se dan en la parte dos, es decir, ISO 8655-2 "Pipetas". La parte 6 de la norma ISO 8655 describe el procedimiento de referencia para la medición gravimétrica utilizada para determinar y verificar el volumen de las pipetas de pistón.

Este método se puede utilizar en la supervisión de equipos de medición. Cabe señalar aquí que la necesidad de supervisar el equipo de medición, que es una pipeta de pistón, resulta de los requisitos de la norma ISO 17025: 2018-02, Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración - punto 6.4 Equipos" y de los requisitos de la norma PN-EN ISO 9001:2015-10 "Sistemas de gestión de la calidad - punto 7.1.5.2 Trazabilidad de las mediciones".

Independientemente de los requisitos normativos bajo el llamado ciclo de vida de un instrumento de medición, se debe verificar periódicamente y verificar su precisión mientras se mantiene la trazabilidad de la medición. La evaluación del funcionamiento de la pipeta se refiere principalmente a sus propiedades metrológicas, como la exactitud y precisión de las mediciones, pero puede extenderse a otras áreas, como la ergonomía, la economía de uso, etc. En el imagen 5 se muestra un ejemplo del ciclo de vida de un instrumento de medición.



imagen 5 ciclo de vida de pipeta de pistón

La norma ISO 8655, además de los requisitos de construcción, también proporciona valores para los errores máximos permisibles que puede presentar una pipeta de pistón. Estas normas son principalmente directrices para los fabricantes de pipetas de pistón, pero también se utilizan como criterios de aceptación para los usuarios de pipetas de pistón. Como para muchos instrumentos de medición, se han definido dos tipos de errores para las pipetas de pistón:

- error sistemático es
- y error aleatorio CV.

ERROR SISTEMÁTICO es la diferencia entre el valor medio del volumen de la pipeta que se determinó a partir de una serie de al menos 10 mediciones y el valor nominal del volumen que se analizó.

Desde el punto de vista metrológico, este parámetro se denomina corrección. La forma de calcularlo se da en la ecuación 2 y 2-1.

$$e_s = \bar{V} - V_s \quad (2)$$

$$\eta_s = 100\% \cdot \frac{\bar{V} - V_s}{V_s} \quad (2-1)$$

donde: e_s - error sistemático de medición expresado en unidades de volumen
 V_s - volumen de prueba seleccionado de la pipeta de pistón
 s - error de medición sistemático relativo expresado como porcentaje

El volumen medio del líquido dosificado que sale de la pipeta en ciclos de investigación sucesivos se determina mediante la relación 3.

$$\bar{V} = \frac{\sum_{i=1}^n V_{i,ref}}{n} \quad (3)$$

donde: \bar{V} volumen medio entregado.
 $V_{i,ref}$ cada volumen nominal administrado
 n número de repeticiones



Imagen 6. Inspección de una pipeta de pistón de 200 μ l

La medida del ERROR ALEATORIO que se produce en una serie de mediciones es la desviación estándar s_r , cuando este error se expresa en unidades de volumen, o el coeficiente de variación C_v , cuando el valor de este error se da en porcentaje.

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (V_i - \bar{V})^2}{n - 1}} \quad (4)$$

$$C_v = 100\% \cdot \left(\frac{s_r}{\bar{V}}\right) \quad (4-1)$$

donde: s_r desviación estándar expresada en unidades de volumen

En el proceso de prueba gravimétrica de pipetas de pistón, siempre se registra el peso del líquido descargado. Por lo tanto, los resultados del pesaje deben convertirse a volumen. Esto se puede hacer por dos métodos. En el primer método, se debe utilizar la fórmula general (5) para calcular el volumen del líquido, teniendo en cuenta factores tales como:

- efecto de la evaporación del líquido en el ciclo,
- densidad del aire atmosférico,
- densidad estándar de masa,
- densidad del agua,
- coeficiente de expansión térmica de la pipeta,
- temperatura de prueba,

$$V_{i,ref} = (m_L - m_E + m_{evap}) \times \frac{1}{\rho_w - \rho_a} \times \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_b}\right) \times [1 - \gamma(t_w - t_{ref})] \quad (5)$$

donde: $V_{i,ref}$ volumen de líquido calculado a temperatura nominal en ml,

m_L Indicación de peso para un recipiente de pesaje después de la administración de líquido en g,

m_E Indicación de peso para el recipiente de pesaje antes de agregar líquido en g (mmi = 0 cuando la balanza se tara con el recipiente de pesaje)

m_{evap} masa estimada evaporada durante el ciclo de prueba en g,

ρ_A densidad del aire en g/ml durante la prueba,

ρ_B densidad estándar de masa (8 g/ml),

ρ_w densidad del agua a la temperatura de ensayo (en °C) en g/ml,

γ coeficiente de expansión térmica combinado de una pipeta volumétrica (°C⁻¹),

t_w temperatura de la pipeta: se supone que es igual a la temperatura del líquido de prueba en °C;

t_{ref} temperatura nominal de la pipeta (20°C o 27°C).

El segundo método es más sencillo porque todos los factores antes mencionados se han incluido en el llamado factor de corrección Z (ecuación 6). La conversión de masa líquida a volumen se basa en el uso de un valor apropiado del indicador, cuyo valor ya tiene en cuenta la densidad del

agua, la presión atmosférica y la temperatura a la que se realiza la prueba. Los valores del factor Z están tabulados en el Anexo A, 8655-6 y el Anexo 1 de este documento.

$$V_i = m_i \times Z \quad (6)$$

$$V_{i,ref} = m_i \times Z \times [1 - \gamma(t_w - t_{ref})] \quad (6-1)$$

donde: γ coeficiente de expansión térmica combinado de una pipeta volumétrica
 t_w temperatura de la pipeta: se supone que es igual a la temperatura del líquido de prueba en °C;
 t_{ref} temperatura nominal de la pipeta (20°C o 27°C).

La relación 6-1 se puede utilizar cuando se conoce el valor del coeficiente de expansión térmica de la pipeta.

En el Apéndice 1 de esta publicación se presenta una descripción detallada de las relaciones físicas que ocurren durante el pipeteo. Estas son consideraciones científicas, cuyo efecto se utilizó en parte en la norma ISO 8655. Comprender estos fenómenos puede ser útil al evaluar la calidad de las pipetas de émbolo comprobadas e identificar áreas con el mayor riesgo potencial.

3.1. Requisitos de diseño para el sistema de pesaje

Las balanzas utilizadas para comprobar y calibrar pipetas tienen un diseño ligeramente diferente en comparación con las balanzas tradicionales porque este diseño debe tener en cuenta las características específicas del proceso. La esencia de medición el volumen de líquido que se descarga de la pipeta consiste en la medición rápida de la masa del líquido en condiciones de temperatura estables con un mayor nivel de humedad relativa del ambiente. Como sabemos, la precisión de la medición de la masa depende de muchos factores ambientales, pero también de la duración del ciclo de medición, que en este caso debería ser lo más breve posible. Por esta razón, la optimización del diseño de la balanza tiene que ver con el tamaño del platillo de pesaje, el tamaño del recipiente metálico en el que se descarga el agua y la garantía de un entorno en el que se minimice el efecto de evaporación del líquido pesado. Un ejemplo de tal estructura se muestra en la Imagen 7.

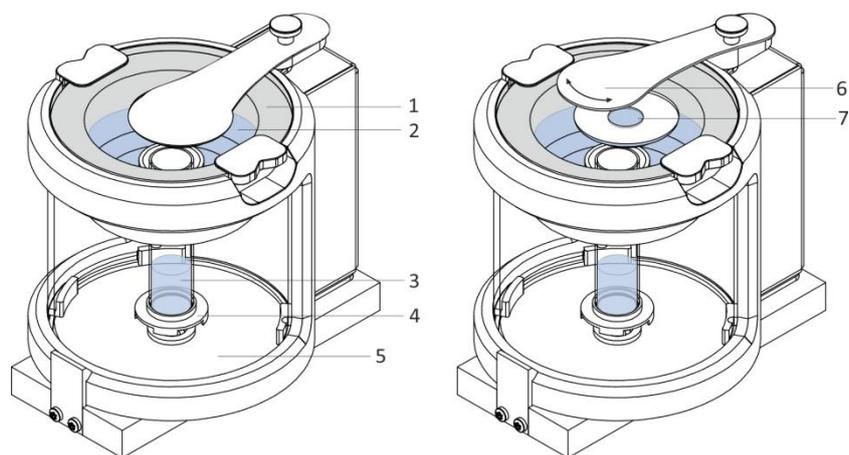


Imagen 7. Cámara de pipeteo automática para balanzas de la serie XA

En lugar de un platillo de pesaje típico, se ha instalado un accesorio especial (5) con un platillo de pesaje (4). En la parte superior del adaptador hay un llamado cortina de vapor (1) llena de agua (2). Encima de la cortina de vapor hay una cubierta de vidrio hermética, gracias a la cual la humedad dentro de la cortina de vapor se mantiene en aproximadamente el 90 %. Esta solución elimina en gran medida el efecto de evaporación del líquido en el recipiente metálico (3).

Cuando se dosifica el líquido, la tapa (6) se mueve automáticamente, lo que deja al descubierto el orificio de inyección: el líquido de la pipeta se puede dosificar en el recipiente de pesaje (3). Después de transferir el líquido de la pipeta al recipiente, la abertura de inyección se cierra automáticamente, lo que permite una medición de masa precisa. El adaptador instalado dentro de la balanza de la serie XA 5Y se muestra en la Imagen 8.



Imagen 8. Balanza XA: un sistema manual para controlar el volumen de las pipetas de pistón

El uso de una cortina de vapor en el sistema de pesaje para pipeteo está de acuerdo con las recomendaciones de la norma ISO 8655-6 en el contexto del efecto de evaporación de líquidos - ver punto 9.1 Norma ISO 8655-6. Las ventanas de la cámara de pesaje se pueden desmontar fácilmente sin el uso de herramientas, lo que da acceso directo al recipiente de pesaje desde cada lado.

En el caso de otras balanzas se utilizó una solución más sencilla en la que existe una tapa de vidrio sobre la tapa de la cortina de vapor. Durante el ciclo de medición, debe moverse manualmente, lo que, sin embargo, no es un problema para el personal. Esta solución se usa comúnmente cuando el control de pipetas de pistón de un solo canal se realiza con el uso de microbalanzas de la serie MYA; un ejemplo de tal solución se muestra en el Imagen 9 y 10.



Imagen 9. Control de volumen de pipetas de pistón utilizando una microbalanza serie MYA

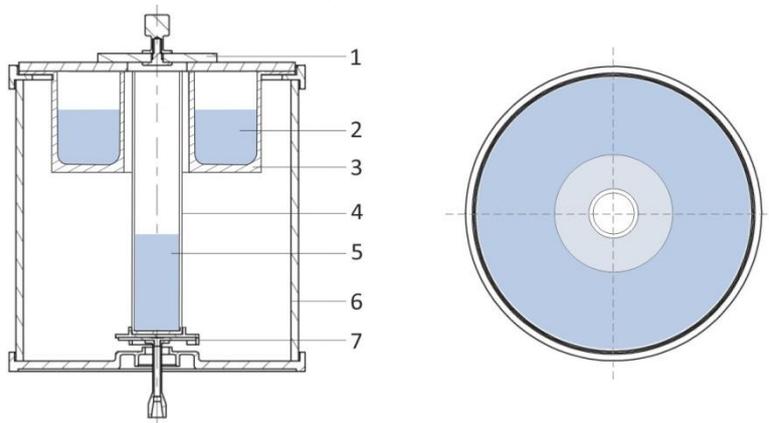


Imagen 10. Esquema de la cortina de vapor de microbalanzas serie MYA y balanzas analíticas serie XA

- | | | |
|---------|-------------------------------------|--|
| Leyenda | 1 - tapa del orificio de inyección; | 2 – agua de cortina de vapor |
| | 3 – cortina de vapor | 4 – un recipiente de pesaje para expulsar el agua de la pipeta |
| | 5 – dosis de agua | 6 – adaptador de calibración de pipetas |
| | 7 –platinillo de balanza | |

Un factor importante en el proceso de pipeteo es la ergonomía del trabajo, que debe proporcionar al usuario un conjunto de instrumentos de medición y un diseño del sistema de medición que permita realizar ciclos de investigación rápidos, precisos y cíclicos. También hay que mencionar al técnico de laboratorio, al que se le debe proporcionar unas condiciones de trabajo cómodas con el menor esfuerzo físico posible. Este es uno de los factores importantes que tienen un impacto real en la cantidad de error aleatorio que se produce en cada ciclo de pipeteo.

Se garantiza un nivel significativo de ergonomía de trabajo mediante el uso de los llamados mesa de calibración de pipetas (Imag. 11). Es un lugar de trabajo integrado equipado con sensores de temperatura, humedad y presión, un programa informático y una balanza que permite una evaluación rápida y precisa de cada pipeta, independientemente del tamaño del volumen que se esté analizando.



Imagen 11. Mesa de control y calibración de pipetas de pistón.

Las soluciones de diseño anteriores están dedicadas a pipetas de un solo canal, independientemente de su tipo y construcción. La verificación de pipetas multicanal es posible incluso para estas construcciones, como se indica en el punto 8.4.b de la norma ISO 8655, es un proceso ineficiente, duradero y antieconómico.

Cuando se controlan pipetas multicanal, se utilizan sistemas automáticos que permiten la dosificación simultánea de líquido de cada canal a recipientes metálicos dedicados.

El ciclo de medición incluye tarado automático y luego pesaje de cada envase vacío o con una porción de líquido. El peso neto del líquido para cada canal se calcula como la diferencia entre el peso del recipiente metálico antes de dosificar el líquido y después de dosificar una porción de líquido de cada canal de la pipeta al recipiente. Esta solución reduce el tiempo de prueba de una pipeta multicanal al menos varias veces. El sistema de medición utilizado para controlar pipetas multicanal se muestra en el Imagen 12 y 13.



Imagen 12. El sistema automático AP 12.5Y dedicado a la prueba de pipetas multicanal.

La introducción de la automatización en el proceso de verificación y calibración de pipetas de pistón brinda beneficios adicionales, especialmente al evaluar la precisión de la operación del dispositivo (cualificación operativa). En el sistema manual, cada prueba requiere el trabajo del operador que debe determinar la relación entre la indicación de la balanza y el valor del patrón por medio de patrones de masa, esto es un error sistemático de la balanza. Sin embargo, al observar la dispersión de los resultados en una serie de mediciones, es posible estimar el valor del error aleatorio de la balanza. Tenga en cuenta que ambas pruebas se realizan con pesos y el control de volumen de la pipeta es para medir el peso del agua. Se supone, sin embargo, que no existen diferencias metroológicas significativas entre estas mediciones, patrones de masa - agua.

En el sistema automático, la determinación del valor del error sistemático para la balanza también requiere el uso de patrones de masa, pero la evaluación del error aleatorio se puede realizar en el ciclo automático.

La precisión de las mediciones de peso se puede determinar utilizando la función Autotest, que está disponible para el usuario. El principio de funcionamiento de esta función es mover cíclicamente cada uno de los recipientes metálicos (recipientes metálicos de agua) desde el lugar base hasta la estación de medición de masas. El número de estos ciclos de medición se puede determinar por lo que, después de completar el procedimiento, el AP 12.5Y muestra los valores de desviación estándar para cada recipiente metálico. Es una medición de la precisión con la que se pesará el agua descargada de la pipeta multicanal durante las mediciones reales - verificación, proceso de calibración. Dicha prueba debe realizarse como parte de la calificación operativa del dispositivo (es decir, AP 12.5Y) sin agua. La introducción de incluso una pequeña cantidad de agua en el interior del recipiente metálico provoca el efecto de evaporación del líquido, lo que distorsiona el resultado de la prueba, cuyo objetivo es comprobar la precisión del pesaje automático. Este es un enfoque más realista para evaluar la precisión, que es uno de los parámetros metrologógicos más importantes de cualquier dispositivo. Por supuesto, son posibles modificaciones de este método de investigación, por ejemplo, en la dirección de evaluar la eficacia de la cortina de vapor. El diagrama de los elementos principales del sistema automático AP 12.5Y se muestra en la Img. 13.

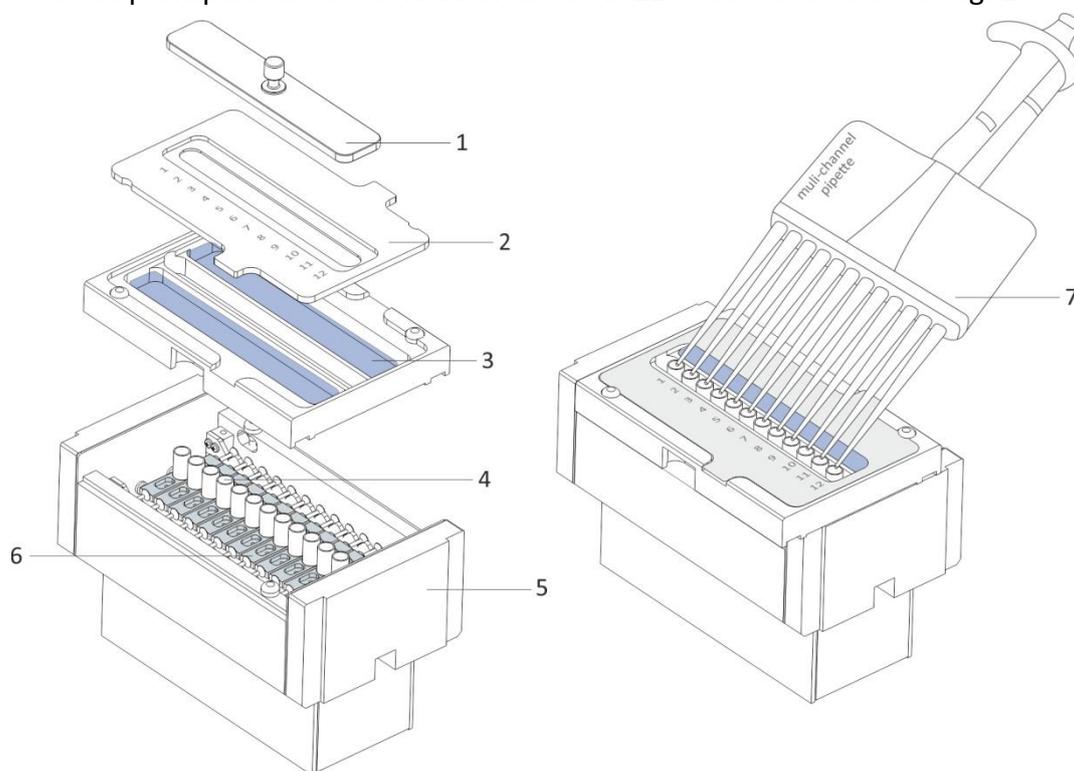


Imagen 13. Diagrama esquemático y principio del sistema automático AP 12.5Y

- Leyenda:
- 1 – cubierta de la pista de medición
 - 2 - cubierta de cortina de vapor
 - 3 - cortina de vapor
 - 4 – orificio de inyección del recipiente metálico
 - 5 – transportador de recipientes metálicos
 - 6 - recipiente metálico para líquido expulsado
 - 7 - pipeta multicanal

El elemento clave que afecta la precisión de la prueba es la estabilidad de la balanza instalada en el sistema AP 12.5Y. Por lo general, es un sistema de microbalanza con una carga máxima de 52 g y una división de $d = 0,01$ mg. En la segunda versión, el sistema de medición tiene una carga máxima de 21 g y la división $d = 0,001$ mg. Esta solución se ha equipado adicionalmente con una cubierta externa de la pista de medición, que aísla el proceso de pesaje de factores externos negativos, principalmente el movimiento del aire.

El funcionamiento del bastidor del transportador de los recipientes metálicos en cada modelo se ha optimizado para garantizar velocidad y alta precisión durante las pruebas. Todas las mediciones se almacenan en la base de datos del sistema automático AP 12.5Y y, al finalizar, se genera un informe de prueba de pipeta. Otra solución es la transferencia directa de cada medición del peso de la dosis líquida a la aplicación externa del cliente, donde se verifica esta información. Es posible enviar el resultado del pesaje por cable (RS 232, Ethernet) o de forma remota a través de WiFi, FreeLink.

3.2. Precisión de la medición de masa y volumen del sistema de pesaje

En el caso de medición la masa de pequeñas cantidades* (líquido, sólido), el único parámetro importante que afecta la calidad/exactitud del análisis es la precisión de la medición. La precisión generalmente se expresa en términos de medidas de imprecisión que muestran qué tan grande es la dispersión de las mediciones en la serie. La mayoría de las veces es la desviación estándar, que es el parámetro metrológico más importante durante el control y la calibración de las pipetas de pistón. Cabe señalar que el valor medio del volumen de la pipeta utilizado para evaluar error sistemático (ecuación 2) puede ser el mismo para una serie de mediciones con una pequeña dispersión que para una serie con resultados extremadamente dispersos. Por este motivo, se han definido límites de desviación estándar para balanzas adecuadas para el control de pipetas de pistón. Otros factores metrológicos como el error de linealidad, el error de centricidad son despreciables, aunque pueden incluirse en el presupuesto de incertidumbre. Los requisitos de precisión de medición en función del volumen nominal de la pipeta se indican en la tabla 1.

*) – pequeño valor de masa es un valor de masa inferior al límite contractual, que para balanzas electrónicas se define como el 5% de la carga máxima de la balanza ($m < 5\% \text{ Max}$).

Tabla 1. Requisitos mínimos para balanza

Volumen nominal del instrumento probado. (V)	División elemental (d)	Repetibilidad (s) _a	Incertidumbre de medición ampliada $U (k = 2)$ _{a, b}
	mg	mg	mg
$0,5 \mu\text{l} \leq V < 20 \mu\text{l}$	0.001 _c 0.1 _d	0.006 _{c, e} 0.03 _d	0.012 _{c e} 0.06 _d
$20 \mu\text{l} \leq V < 200 \mu\text{l}$	0.01	0.025	balanza0.05
$200 \mu\text{l} \leq V \leq 10 \text{ ml}$	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

a – los valores de repetibilidad y la incertidumbre de medición expandida aplicada que se dan en esta tabla son para la determinación de volumen para una pipeta de un solo canal. Cuando se utiliza una balanza de un solo canal únicamente para la determinación de volumen en pipetas multicanal, los valores de repetibilidad y la incertidumbre de medición expandida aplicada son el doble de los valores dados en esta tabla.

b- la incertidumbre de medición ampliada aplicada puede estimarse sobre la base de EURAMET cg-18, ver. 4.0 o ASTM E898 para valores de volumen nominal. La incertidumbre de medición ampliada utilizada incluye errores no corregidos, así como posibles influencias ambientales y de deriva en la sensibilidad de la balanza. La incertidumbre de medición ampliada aplicada puede tomarse del certificado de calibración de la balanza o calcularse por separado.

c – balanza de un canal .

d – balanza multicanal, como AP 12.5Y fabricada por Radwag, utilizada para probar pipetas multicanal. Las balanzas multicanal con una desviación de 0,01 mg pueden utilizarse para probar pipetas multicanal con volúmenes nominales inferiores a 20 μ l solo cuando la incertidumbre expandida de la medición es inferior a la cuarta parte del error sistemático máximo permitido para la pipeta.

e – en el caso de pipetas monocanal con un volumen nominal inferior a 2 μ l, se debe utilizar una balanza cuya repetibilidad e incertidumbre expandida sea mejor que los valores dados en la tabla. Requisito: la incertidumbre expandida debe ser inferior a una cuarta parte del error sistemático máximo permitido de la pipeta.

Cabe señalar que la precisión de la medición es una característica constante de cada balanza: en condiciones de trabajo perfectamente constantes, sin perturbaciones significativas, la precisión tiene un valor constante. Desafortunadamente, la variabilidad de las condiciones ambientales es un hecho, así como el hecho de que la medición se ve perturbada por el trabajo del operador (golpes, falta de repetibilidad en los ciclos), efectos de sorción y desorción de líquidos, etc. No se debe olvidar que la precisión de la medición de masa también está significativamente influenciada por la precisión de la descarga de líquido de la pipeta, la pipeta también es un instrumento de medición. Las posibles fuentes de error que pueden ocurrir durante el pipeteo se muestran en la Imagen 14.

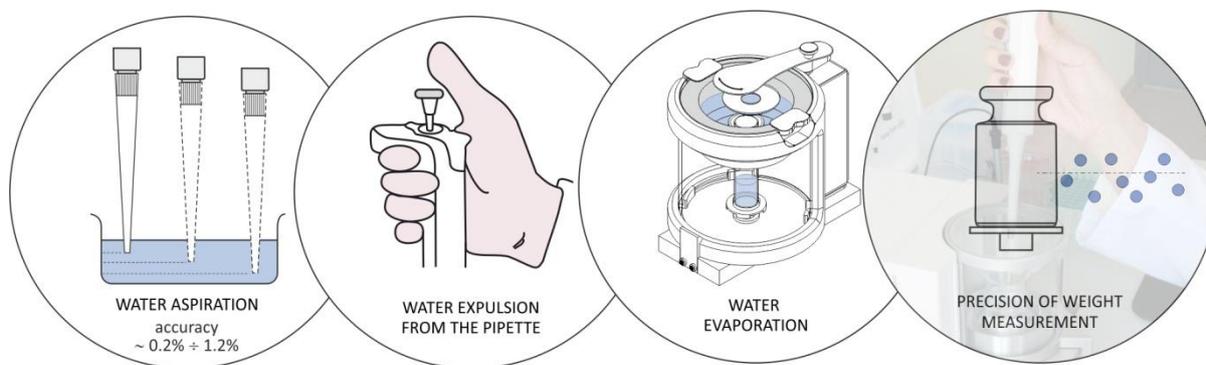


Imagen 14. Fuentes de error en el proceso de pipeteo

4. Puntas de pipeta de pistón

Es una buena práctica utilizar el tipo de puntas de pipeta recomendadas por el fabricante. Esto minimizará el riesgo de errores en las mediciones manteniendo la certeza de que encajarán correctamente en la pipeta y tendrán el volumen interno correcto. Tenga en cuenta que los posibles contaminantes pueden transferirse de una muestra a una pipeta, de una pipeta a una muestra o de una muestra a otra. En el primer caso, el líquido o sus aerosoles se transfieren al cono de la pipeta, principalmente como resultado de un error del operador. La transferencia de impurezas de la pipeta a la muestra es principalmente el efecto de la absorción de aerosoles, por ejemplo, fracciones líquidas finas, acumulación de polvo en el cono de la pipeta. La contaminación puede adherirse a la superficie interna del cono de la pipeta y solo eliminarse durante los ciclos de pipeteo posteriores.

Una solución más avanzada son las puntas provistas de filtros (Ima. 15) que resultan útiles cuando se utilizan materiales radiactivos, infecciosos o cuando existe riesgo de contaminación cruzada. Esta solución elimina en gran medida los problemas de transporte de impurezas dentro de la estructura de la pipeta. En otras soluciones, las pipetas de desplazamiento están equipadas con un pistón con un sello, que evita el movimiento de impurezas hacia la pipeta.

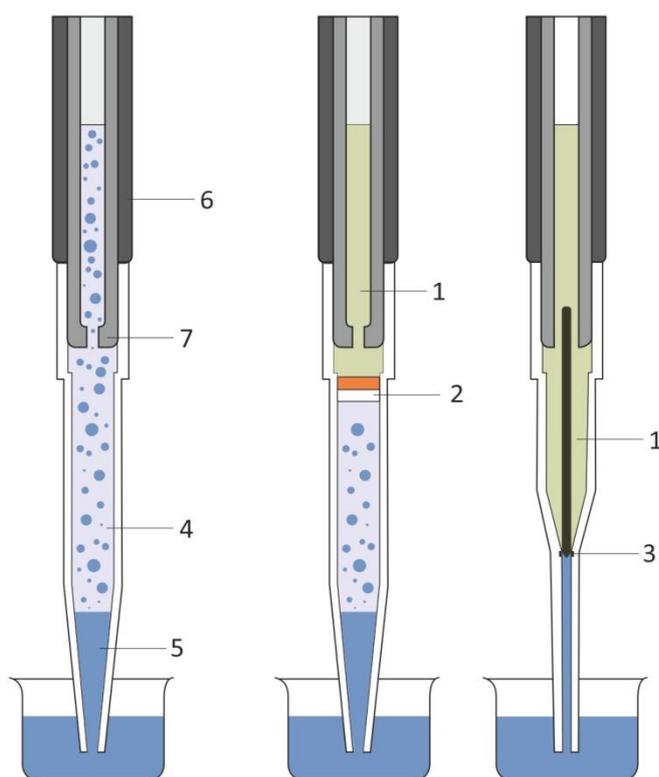


Imagen 15. Aspiración de líquidos para diferentes diseños de pipetas

En el caso de las pipetas de desplazamiento positivo (tipo A), la punta de la pipeta, normalmente de plástico, se coloca sobre el cono de la pipeta y, tras transferir el volumen, se retira sin intentar limpiarlo. También son aplicables puntas de pipeta hechas de materiales como metal, vidrio, plástico recubierto de teflón, que se pueden limpiar rápidamente, por ejemplo, con métodos ultrasónicos.

- Leyenda:
- 1 – área segura
 - 2 – filtro
 - 3 – protección de los bordes del pistón de la pipeta
 - 4 – área desprotegida de la pipeta (posibilidad de transferencia de contaminación)
 - 5 – dosis de líquido extraído en la pipeta
 - 6 – pipeta
 - 7 – cono de pipeta

5. Condiciones de trabajo en el Laboratorio

La ergonomía de trabajo en el laboratorio debe mantenerse incluso cuando no se esperan muchas pruebas repetitivas. La ergonomía es un término muy general, pero este término debe entenderse como una ubicación, estructura, equipo y tamaño del lugar de trabajo que proporciona condiciones de trabajo estables y minimiza la carga de trabajo del operador y el riesgo de cometer errores (Imagen 14).

El elemento de medición durante el control de las pipetas de pistón es el peso, por lo que se espera temperatura ambiente constante, humedad estable, vibraciones no significativas del suelo y excesivo movimiento de aire. La estabilidad de la temperatura ambiente también es importante para la pipeta y las puntas debido al efecto de la expansión térmica y la transferencia de calor. Cabe señalar que la estabilización recomendada y la temperatura de prueba de 20°C pueden ser difíciles de lograr para muchos laboratorios. El uso de aire acondicionado tradicional montado en la pared siempre provoca un movimiento de aire excesivo, lo que definitivamente interfiere con la medición de la masa. Como resultado, la prueba de la pipeta puede ser errónea.



Imagen 16. Puestos de control de pipetas de pistón de varios volúmenes

La mejor solución es la llamada Climatización laminar en la que el aire es aspirado desde abajo a través de un sistema de varias rejillas de ventilación. A continuación, se transporta a un sistema de dispersión que suele instalarse en el techo del laboratorio o por encima de él. En el interior de la instalación, el aire se limpia, humedece, calienta o enfría.

6. Aspiración y dispensación de líquidos

A pesar de la aparente simplicidad, el proceso de pipeteo es bastante complicado, ya que requiere que el operador realice acciones que finalmente dan como resultado un funcionamiento suave y regular del pistón de la pipeta. Vale la pena recordar que durante las pruebas, generalmente se realiza una serie de aproximadamente 10 repeticiones, y la medida de la exactitud y precisión de la pipeta es el valor medio o la desviación estándar de una serie de mediciones. Debe recordarse que la metodología de pipeteo también incluye elementos tales como el método para retirar la punta de la pipeta del recipiente, la profundidad de inmersión de la punta de la pipeta, el tiempo que se mantiene la pipeta en el líquido, etc.

La regla es la posición vertical de la pipeta al aspirar líquidos. Las desviaciones de este patrón pueden dar lugar a imprecisiones debido a las diferentes presiones del fluido en la punta de la pipeta. La profundidad de inmersión de la punta también es importante y este valor puede variar según el tamaño, el tipo y la marca de la pipeta; consulte las recomendaciones del fabricante. Cuando no se indiquen tales recomendaciones, se pueden utilizar las pautas generales de la Tab 2.

Tabla 2. Profundidad de inmersión de la punta de pipeta según el volumen nominal de la pipeta

Volumen de pipeta (μl)	Profundidad de inmersión de la punta de la pipeta (mm)	Tiempo de espera (sek.)
≤ 1	1 ÷ 2	1
> 1 ÷ 100	2 ÷ 3	1
> 100 ÷ 1 000	2 ÷ 4	1
> 1 000 ÷ 5 000	3 ÷ 5	3

Se ha encontrado experimentalmente que humedecer previamente la punta de la pipeta varias veces es útil para mantener la precisión de la operación de la pipeta, ya que reduce la posibilidad de aspirar burbujas de aire. La humectación previa estabiliza aún más la zona muerta del volumen de aire de la pipeta entre el líquido y el pistón de la pipeta. Humedecer la punta de la pipeta es imprescindible cuando el líquido que se va a transferir es un líquido hidrofóbico o muy viscoso. Esto es especialmente importante para líquidos con alta presión de vapor. Para pipetas de desplazamiento positivo con un volumen de menos de aproximadamente 10 μl, no es necesario prehumedecer (Blues, Bayliss & Buckley - Measurement Good Practice Guide No. 69. The Calibration and Use of Piston Pipettes).

Después de la aspiración de líquido, las gotas adheridas a la punta del líquido deben eliminarse con cuidado. Si todavía se observa un exceso de líquido adherido a la superficie exterior de la punta, se puede eliminar con cuidado con un material adecuado para evitar la contaminación del líquido transferido. Si se forman más gotas en la punta de la pipeta, esto puede indicar una punta desajustada o inestabilidad en el volumen de aire muerto, especialmente en líquidos con alta presión de vapor. La aspiración de líquido inadecuada puede ser un factor que genere errores significativos, como se muestra en La Imagen 17.

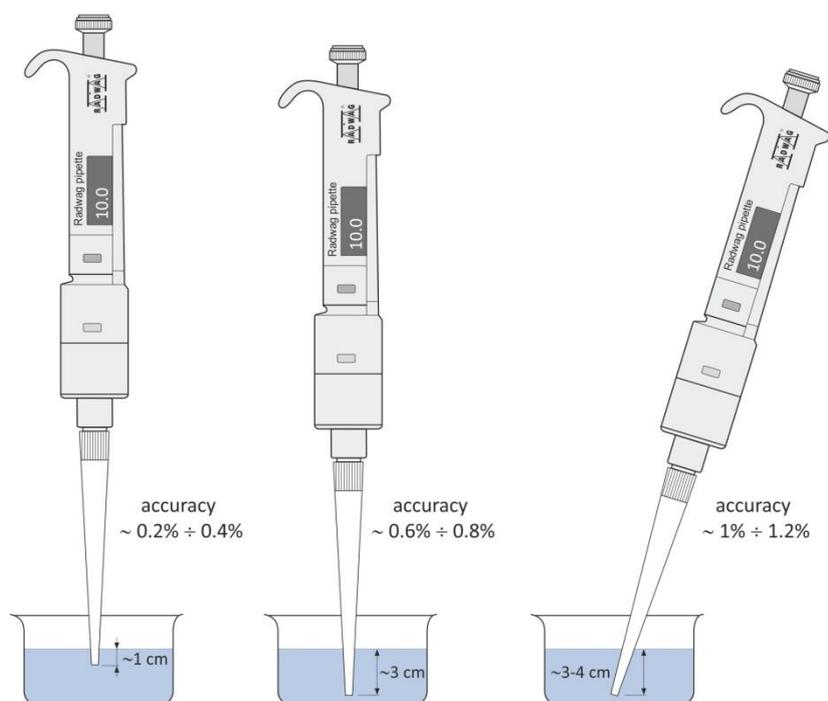


Imagen 17. Posibles errores de medición al aspirar agua.

La dosificación de líquido es un procedimiento durante el cual la punta de la pipeta toca suavemente la pared del recipiente metálico justo por encima de la superficie del líquido en un ángulo de aproximadamente 30° a 45°, y luego la punta se mueve verticalmente hacia arriba por la pared interna del recipiente metálico para una altura de 8-10 mm después de la dosificación.

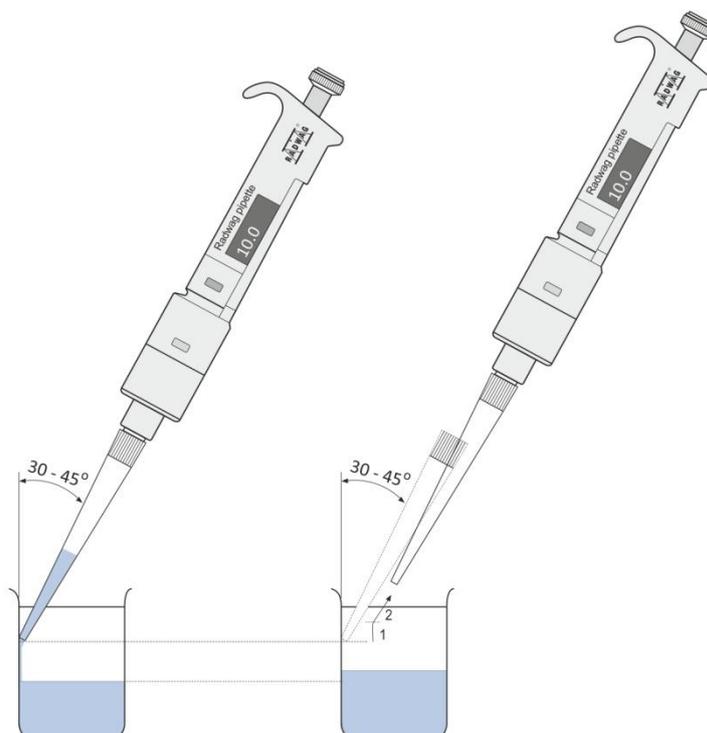


Imagen 18. Método para expulsar líquido de una pipeta

7. Parte de la investigación

N El parámetro metrológico más importante de cada balanza utilizada para controlar el volumen de las pipetas de pistón es la repetibilidad de las indicaciones, que se mide por la desviación estándar. En el caso de balanzas dedicadas a pipetas de un solo canal, la evaluación de la precisión de la medición se refería al proceso en el que el platillo de la balanza se carga cíclicamente con el mismo patrón de masa. Este método de evaluación de la precisión de la medición no tiene en cuenta los errores que puede generar el operador durante la prueba de la pipeta (golpes, burbujas de aire, ángulo de inclinación de la pipeta, etc.). Se supone aquí que la influencia del error humano puede reducirse significativamente mediante la formación. Vale la pena mencionar que la incertidumbre expandida de la balanza como medida de la utilidad/corrección de hacer coincidir la balanza con el volumen de la pipeta probada también incluye otros factores como la desviación de la balanza, el efecto de evaporación del líquido, etc. La parte de investigación de las balanzas dedicado a las pipetas de un solo canal incluye la evaluación de su repetibilidad de las indicaciones (Tabla 3) y la dinámica de la evaporación del líquido desde un recipiente de pesaje. Estos son dos factores que están básicamente fuera del control del operador.

En el caso del sistema automático AP 12.5Y, la masa del líquido dosificado se calcula en base a la diferencia de masa del recipiente metálico antes de la inyección y después de la inyección. La consecuencia de esto es una doble medición del peso del envase, lo que no es favorable desde el punto de vista metrológico. En la primera etapa se determinó la precisión para las mediciones de la masa concentrada, que fue la masa de ajuste interna. El propósito de esta prueba era determinar si el sistema de medición está funcionando correctamente. En la segunda etapa, se verificó la precisión del pesaje de todos los recipientes metálicos. El factor variable en esta prueba fue el movimiento dinámico del tren de rodaje, que al colocar cíclicamente recipientes metálicos sucesivos provocaba pequeños impactos. El último estudio fue para determinar el impacto de la falta de una cortina de vapor en la medición de masa: la dinámica de evaporación de líquido de un recipiente de pesaje.

7.1. Selección del peso para el procedimiento

La selección de una balanza para el procedimiento de control o calibración de una pipeta de pistón se refiere en primer lugar a la repetibilidad de las indicaciones de la balanza. Este es un requisito obligatorio, que ha sido confirmado en la norma ISO 8655-6, ver tabla 1. Además del valor de repetibilidad de la balanza, también es importante el valor de la incertidumbre expandida, que debe estar relacionado con el valor de los errores sistemáticos máximos de la pipeta. En la tabla 3, los requisitos contenidos en la norma ISO 8655-6 se han adaptado a tipos específicos de balanza, lo que es una solución útil para aquellos usuarios que se encuentran en la etapa de diseño de su propio puesto de medición.

Tabla 3. Selección de una balanza para el volumen probado de una pipeta de pistón.

	Máxima capacidad	División elemental	Repetibilidad desviación estándar	Volumen de pipeta
MYA 21.5Y.P ¹⁾	21g	d=1µg	S=1.0µg	1 µl ≤ V ≤ 10 µl 10 µl < V ≤ 100 µl 100 µl < V ≤ 1000 µl 1 ml < V ≤ 10 ml
XA 6/21.5Y.M.A.P ²⁾	6/21g	d=1/2µg	S=1.3µg	
XA 21.5Y.M.A.P ²⁾	21g	d=1µg	S=1.3µg	
XA 21/52.5Y.M.A.P ²⁾	21/52g	d=1/5µg	S=1.5µg	
XA 53.5Y.M.A.P ^{2,3)}	52g	d=1µg	S=1.5µg	
XA 52.5Y.M.A.P ^{2,3)}	52g	d=5µg	S=2.2µg	10 µl < V ≤ 100 µl 100 µl < V ≤ 1000 µl 1 ml < V ≤ 10 ml
XA 82/220.5Y.A ⁴⁾	82/220g	d=0.01/0.1mg	S=5µg	
XA 120/250.5Y.A ⁴⁾	120/250g	d=0.01/0.1mg	S=5µg	

1) – cooperación con el adaptador de calibración de pipetas tipo MY 11

2) – cooperación con el adaptador de calibración de pipetas tipo XA 1

3) – cooperación con el adaptador de calibración de pipetas tipo XA 17

4) – cooperación con el adaptador de calibración de pipetas XA 100

7.2. Precisión de medición del sistema automático AP 12.5Y/ AP 12.1.5Y

La precisión de las medidas para el AP 12.5Y se determinó mediante el método automático, que consistió en el pesaje cíclico de cada recipiente metálico colocado en las posiciones 1 a 12 (función Autotest). La puesta a cero de la indicación de la balanza tuvo lugar solo antes de comenzar una serie de mediciones. Resultados de precisión de medición en la Imagen 19.

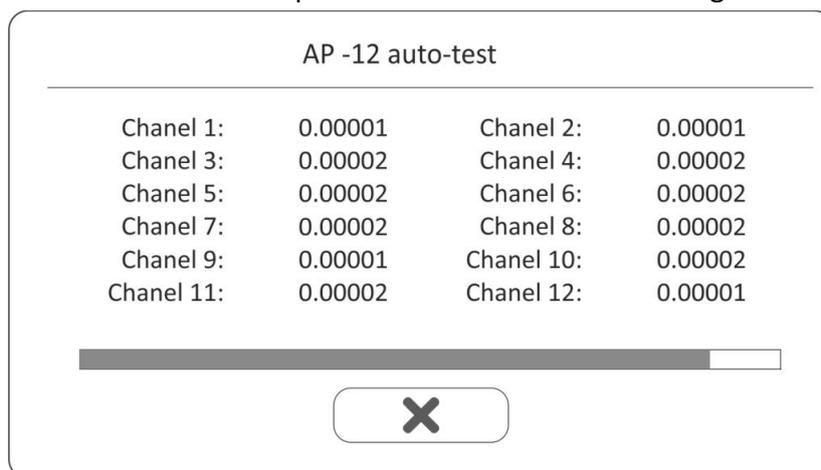


Imagen 19. Resultados del procedimiento de control automático - desviación estándar de una serie de 10 mediciones

La precisión de las mediciones de peso de los recipientes metálicos medidas en el ciclo automático está dentro del rango de 0,01 mg ÷ 0,02 mg. Esto está en línea con los requisitos de la norma ISO 8655-6.

Para el sistema automático AP 12.1.5Y con una división de $d = 1 \mu\text{g}$, la precisión de la medición de masa se determinó utilizando el método semiautomático: los recipientes metálicos sucesivos se trasladaron al puesto de pesaje utilizando la aplicación de servicio. En este modo, se realizaron 6 series de medidas. El tiempo necesario para obtener una medida estable para un solo pesaje fue de unos 10 segundos.

Tabla 4. Precisión de la medición de masa AP 12.1.5Y, división $d = 1 \mu\text{g}$

Nr kont.	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4	serie 5	serie 6	\bar{x}	S (μg)
1	9,229802	9,229802	9,229796	9,229797	9,229800	9,229797	9,229799	2,68
2	9,263251	9,263250	9,263244	9,263248	9,263246	9,263244	9,263247	2,99
3	9,257741	9,257741	9,257736	9,257736	9,257738	9,257736	9,257738	2,45
4	9,256452	9,256449	9,256444	9,256441	9,256446	9,256443	9,256446	4,07
5	9,283330	9,283327	9,283324	9,283321	9,283326	9,283326	9,283326	3,01
6	9,234612	9,234610	9,234608	9,234603	9,234609	9,234608	9,234608	3,01
7	9,230830	9,230823	9,230822	9,230818	9,230822	9,230824	9,230823	3,92
8	9,216691	9,216687	9,216688	9,216682	9,216686	9,216689	9,216687	3,06
9	9,235992	9,235988	9,235987	9,235981	9,235989	9,235987	9,235987	3,61
10	9,197869	9,197863	9,197864	9,197858	9,197865	9,197864	9,197864	3,54
11	9,300828	9,300822	9,300823	9,300821	9,300822	9,300823	9,300823	2,48
12	9,245068	9,245059	9,245062	9,245057	9,245062	9,245061	9,245062	3,73

La precisión de medir la masa de recipientes metálicos oscilan entre $2,45 \mu\text{g}$ y $4,07 \mu\text{g}$. Estos valores son ligeramente superiores a los mantenidos durante las pruebas del mismo parámetro con una masa concentrada. La principal diferencia entre los métodos de prueba se refiere al punto de suspensión del centro de gravedad de la masa probada.

En el caso de una masa estándar externa o de ajuste interna, el centro de gravedad del objeto pesado es bastante bajo. Debido a la especificidad de las mediciones, el centro de gravedad del recipiente metálico en el que se descarga el líquido es mucho más alto. Esto es desfavorable para el sistema de fuerzas que se producen durante el pesaje (fig. 20).

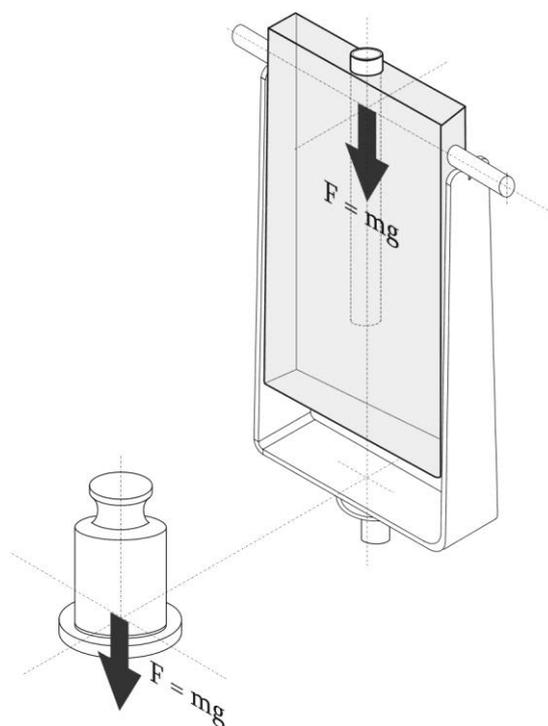


Imagen 7. Pesaje del recipiente metálico

7.3. La velocidad del sistema automático AP 12.5Y

La principal ventaja de la automatización en cualquier área es el aumento de la velocidad y eficiencia del trabajo, como es el caso del sistema AP 12.5Y. En esta solución, el dispositivo fue optimizado en términos de aspectos mecánicos, electrónicos y metrológicos. Determinar el peso del agua dosificada para una pipeta de 12 canales requiere mediciones precisas del peso de cada recipiente metálico (cada dosis de líquido). Para ello, los denominados mecanismo de funcionamiento de búfer gracias al cual se obtuvo la velocidad de trabajo adecuada manteniendo la precisión de la medición. El tiempo de medición de la masa de un solo recipiente es de aproximadamente 5 segundos, y el tiempo total necesario para determinar la masa del líquido dosificado de una pipeta de 12 canales es de aproximadamente 85 segundos. Al probar una pipeta de 12 canales de acuerdo con los requisitos de PN-EN ISO 8655-6:2022 en un ciclo de 10 mediciones para 3 volúmenes, el tiempo total de prueba es de aproximadamente 50 - 55 minutos, teniendo en cuenta la necesidad de 30 dosis de agua y software de funcionamiento..

7.4. Precisión de las mediciones en el ciclo automático.

La precisión del pesaje durante la operación automática se verificó determinando la diferencia entre el peso del recipiente metálico que se registró durante la tara y el peso de los recipientes metálicos durante su pesaje. Se asumió que para un sistema que funcione perfectamente, el valor de la masa del recipiente metálico medido debe ser igual o insignificamente diferente del valor de la tara. En esta prueba no se utilizó cortina de vapor y los recipientes metálicos estaban perfectamente secos. Este enfoque era necesario para eliminar las desviaciones en la indicación del peso que ocurren cuando hay incluso una pequeña cantidad de agua dentro del recipiente metálico.

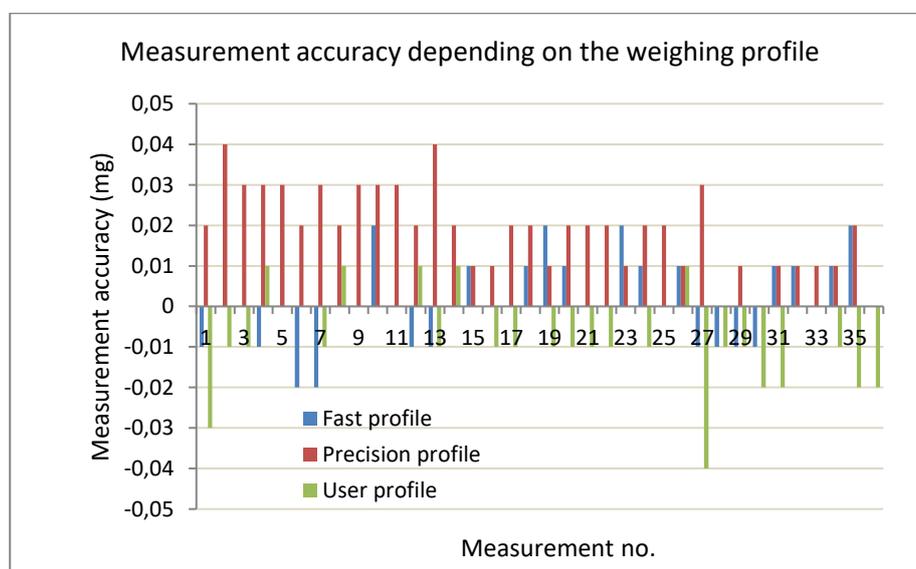


Imagen 8. Precisión de la medición del peso del recipiente metálico en un ciclo automático

Independientemente del perfil de pesaje seleccionado, la masa del líquido dispensado puede tener una desviación de no más de 0,02 mg cuando se utiliza el perfil de pesaje Rápido (Fast) y con una desviación en el rango de 0,02 ÷ 0,03 mg para el perfil de Usuario. Se obtienen

resultados ligeramente peores para el perfil Precisión. El perfil predeterminado para las comprobaciones de pipetas es el perfil Rápido (Fast).

7.5. Cortina de vapor para microbalanzas MYA y balanzas de la serie XA

Medir la masa de muestras que son susceptibles a la sorción o desorción de humedad es siempre un desafío porque es bastante difícil desarrollar un método de prueba que sea inmune a este fenómeno. Un caso especial es el proceso de medición de masa líquida, especialmente cuando el intervalo de la balanza es de 1 μg . Incluso un sistema de pesaje cerrado siempre se esfuerza por lograr un equilibrio en términos de humedad y presión. La falta de una cortina de vapor durante el pesaje del líquido dosificado da como resultado un cambio dinámico que se muestra en la Imagen. 22.

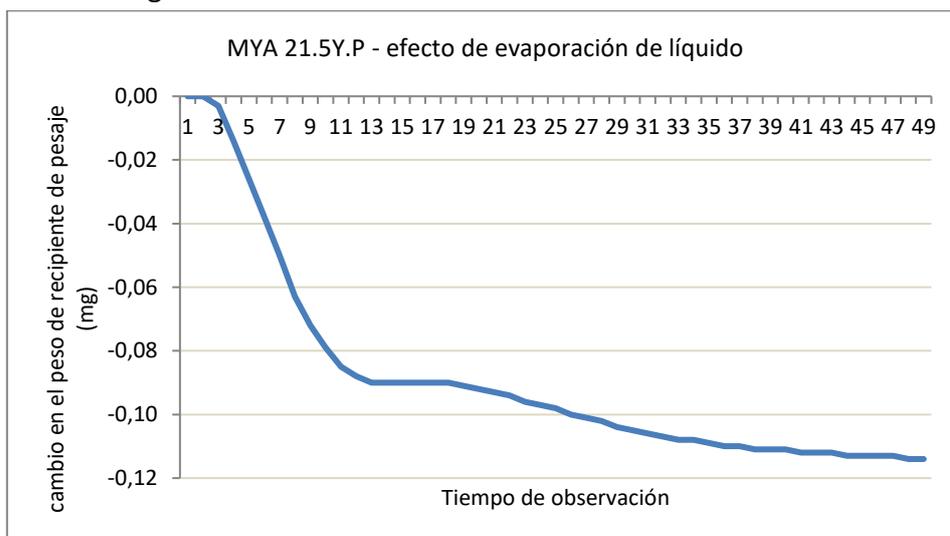


Imagen 9. MYA 21.5Y.P – efecto de evaporación de líquido



Imagen 10. Microbalanza MYA 21.5Y.P con cortina de vapor.

7.6. Cortina de vapor de sistema automático AP 12.5Y

Limitar la evaporación del líquido del recipiente de pesaje es crucial para obtener el resultado correcto para el volumen de pipeta probado. En el caso de las pipetas monocal, el proceso de medición de la masa de una dosis de agua es bastante rápido, por lo que el fenómeno de variabilidad de masa no tiene por qué ser significativo. Al analizar una pipeta multicanal, debe tenerse en cuenta que solo se pesa inmediatamente la primera dosificación del primer canal de la pipeta. Cuanto mayor sea el número de canal de la pipeta, mayor será el tiempo de espera para la medición de masa. Por este motivo, la cortina de vapor del sistema automático y la construcción del recipiente de pesaje deben limitar al máximo el proceso de evaporación. La Imagen. 24 muestra la diferencia entre el funcionamiento del sistema sin cortina de vapor y con cortina de vapor.

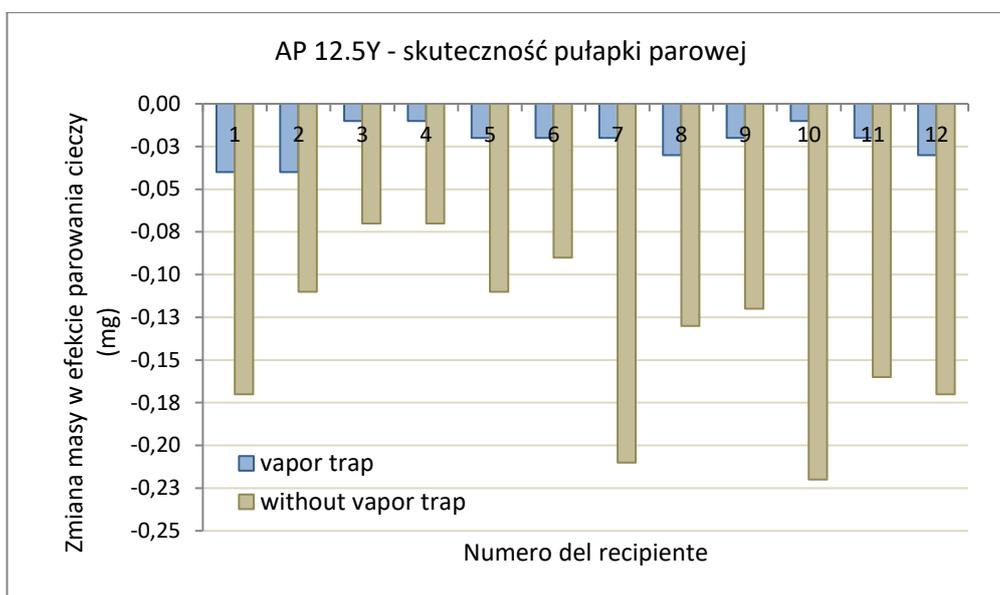


Imagen 11. Efecto de la evaporación de líquido de un recipiente de pesaje en el sistema AP 12.5Y

El cambio en el peso de los recipientes con líquido es solo de aproximadamente 0,02 mg - 0,03 mg, pero debe recordarse que este valor está sujeto a un error de repetibilidad de la indicación. Por lo tanto, se puede suponer que el efecto de evaporación es mucho menor. La evaporación del líquido en ausencia de una trampa de vapor es al menos varias veces mayor y oscila entre 0,10 mg y 0,20 mg. Este rápido estudio muestra la importancia de las condiciones óptimas en el proceso de pipeteo.

7.7. Procedimiento de calibración de pipetas de pistón

RADWAG Wagi Elektroniczne Witold Lewandowski 26-600 Radom, ul. Toruńska 5 CENTRUM METROLOGII, BADAŃ I CERTYFIKACJI - LABORATORIUM POMIAROWE 26-600 Radom, ul. Starowiejska 17A tel. /48/ 386 64 70; fax.: /48/ 385 00 11		 POLSKIE CENTRUM AKREDYTACJI WZORCOWANIE AP 069 			
 Laboratorium wzorcujące akredytowane przez Polskie Centrum Akredytacji, sygnatariusza porozumień EA MLA i ILAC MRA dotyczących wzajemnego uznawania świadectw wzorcowania. Numer Akredytacji AP 069.					
<h1>ŚWIADECTWO WZORCOWANIA</h1>					
Data wydania:	18 lutego 2022 r.	Nr świadectwa:	2137/470/22	Strona:	1 / 2
OBIEKT WZORCOWANIA	Pipeta tłokowa jednokanałowa Typ: o zmiennej objętości Producent: Finnpipette Numer fabryczny: OH81643 Objętość: 20-200 µl Typ końcówki: dostarczone przez zleceniodawcę				
ZGŁASZAJĄCY					
UŻYTKOWNIK					
MIEJSCE WZORCOWANIA	RADWAG Wagi Elektroniczne Centrum Metrologii, Badań i Certyfikacji - Laboratorium Pomiarowe ul. Starowiejska 17 A, 26-600 Radom				
METODA WZORCOWANIA	Procedura wzorcowania: PW 05 wydanie II z dnia 14 października 2021 r.				
WARUNKI ŚRODOWISKOWE	Temperatura powietrza: (21,95 ÷ 22,11) ± 0,20 °C Wilgotność względna powietrza: (49,3 ÷ 51,2) ± 1,1 % Ciśnienie atmosferyczne: (987,3 ÷ 987,3) ± 0,6 hPa Temperatura wody: (21,27 ÷ 21,29) ± 0,20 °C				
DATA WZORCOWANIA	18 lutego 2022 r.				
SPÓJNOŚĆ POMIAROWA	Świadectwo jest wydane w ramach porozumienia EA MLA w zakresie wzorcowania i potwierdza spójność pomiarową wyników pomiarów z jednostkami miar Międzynarodowego Układu Jednostek Miar (SI).				
WYNIKI WZORCOWANIA	Podano na stronie 2 niniejszego świadectwa wraz z wartościami niepewności pomiaru.				
NIEPEWNOŚĆ POMIARU	Niepewność pomiaru została określona zgodnie z dokumentem EA-4/02 M:2021. Podane wartości niepewności stanowią niepewności rozszerzone przy prawdopodobieństwie rozszerzenia około 95 % i współczynniku rozszerzenia $k = 2$.				
					
Niniejsze świadectwo może być okazywane lub kopiowane tylko w całości.					

Imagen 12. Certificado de calibración de pipetas monocanal

**WYNIKI
WZORCOWANIA**

Wyniki przeprowadzonego wzorcowania przedstawione poniżej, odnoszą się wyłącznie do obiektu wzorcowania opisanego na pierwszej stronie świadectwa.

Objętość nominalna V_o μl	Wartość objętości zmierzona V μl	Wartość bł. systemat. e_s μl	Wartość bł. systemat. e_s %	Wartość bł. przypad. S_r μl	Wartość bł. przypad. CV %	Niepewność pomiaru U μl
200	197,21	-2,79	-1,40	0,15	0,07	0,53
50	98,64	-1,36	-1,36	0,20	0,21	0,27
20	20,29	0,29	1,46	0,02	0,11	0,07

Autoryzował: Tomasz Jędrzejewski



Imagen 13. Certificado de calibración de pipetas monocanal – resultados



Laboratorium wzorcujące akredytowane przez
Polskie Centrum Akredytacji, sygnatariusza porozumień EA MLA
i ILAC MRA dotyczących wzajemnego uznawania świadectw wzorcowania.
Numer Akredytacji AP 069.



AP 069



ŚWIADECTWO WZORCOWANIA

Data wydania: 18 lutego 2022 r.

Nr świadectwa: 2136/470/22

Strona: 1 / 2

OBIEKT WZORCOWANIA

Pipeta tłokowa ośmiokanałowa
Typ: o zmiennej objętości
Producent: Eppendorf
Numer fabryczny: J38259G
Objętość: 10-100 μ l
Typ końcówek: dostarczone przez zleceniodawcę

ZGŁASZAJĄCY

UŻYTKOWNIK

METODA WZORCOWANIA

Procedura wzorcowania: PW 05 wydanie II z dnia 14 października 2021 r.

WARUNKI ŚRODOWISKOWE

Temperatura powietrza: (21,73 ÷ 21,78) \pm 0,20 $^{\circ}$ C
Wilgotność względna powietrza: (48,8 ÷ 50,2) \pm 1,2 %
Ciśnienie atmosferyczne: (986,5 ÷ 995,1) \pm 0,7 hPa
Temperatura wody: (21,20 ÷ 21,25) \pm 0,20 $^{\circ}$ C

DATA WZORCOWANIA

18 lutego 2022 r.

SPÓJNOŚĆ POMIAROWA

Świadectwo jest wydane w ramach porozumienia EA MLA w zakresie wzorcowania i potwierdza spójność pomiarową wyników pomiarów z jednostkami miar Międzynarodowego Układu Jednostek Miar (SI).

WYNIKI WZORCOWANIA

Podano na stronie 2 niniejszego świadectwa wraz z wartościami niepewności pomiaru.

NIEPEWNOŚĆ POMIARU

Niepewność pomiaru została określona zgodnie z dokumentem EA-4/02 M:2021. Podane wartości niepewności stanowią niepewności rozszerzone przy prawdopodobieństwie rozszerzenia około 95 % i współczynniku rozszerzenia $k = 2$.



KIEROWNIK
Laboratorium Pomiarowego
Tomasz Jędrzejewski

Niniejsze świadectwo może być okazywane lub kopiowane tylko w całości.

Imagen 14. Certificado de calibración de pipetas multicanal

**WYNIKI
WZORCOWANIA**

Wyniki przeprowadzonego wzorcowania przedstawione poniżej, odnoszą się wyłącznie do obiektu wzorcowania opisanego na pierwszej stronie świadectwa.

Objętość nominalna V_o μl	Wartość objętości zmierzona V μl	Wartość bł. systemat. es μl	Wartość bł. systemat. es %	Wartość bł. przypad. Sr μl	Wartość bł. przypad. CV %	Niepewność pomiaru U μl
100 μl Kanał						
1	100,05	0,05	0,05	0,15	0,15	0,27
2	100,16	0,16	0,16	0,16	0,16	0,27
3	99,90	-0,10	-0,10	0,22	0,22	0,27
4	99,99	-0,01	-0,01	0,13	0,13	0,27
5	99,96	-0,04	-0,04	0,10	0,10	0,27
6	99,99	-0,01	-0,01	0,13	0,13	0,27
7	100,06	0,06	0,06	0,11	0,11	0,27
8	99,98	-0,02	-0,02	0,12	0,12	0,27
50 μl Kanał						
1	49,79	-0,21	-0,43	0,07	0,13	0,17
2	49,88	-0,12	-0,24	0,12	0,24	0,17
3	49,90	-0,10	-0,21	0,13	0,25	0,17
4	49,86	-0,14	-0,28	0,08	0,16	0,17
5	49,85	-0,15	-0,30	0,07	0,14	0,17
6	49,90	-0,10	-0,21	0,06	0,12	0,17
7	49,80	-0,20	-0,41	0,08	0,15	0,17
8	49,80	-0,20	-0,40	0,05	0,10	0,17
10 μl Kanał						
1	9,976	-0,024	-0,239	0,041	0,414	0,050
2	9,979	-0,021	-0,211	0,063	0,631	0,050
3	9,987	-0,013	-0,129	0,049	0,493	0,050
4	9,986	-0,014	-0,142	0,048	0,482	0,050
5	9,979	-0,021	-0,214	0,044	0,439	0,050
6	9,965	-0,035	-0,347	0,021	0,208	0,050
7	9,971	-0,029	-0,289	0,045	0,452	0,050
8	9,961	-0,039	-0,391	0,059	0,593	0,050

Autoryzował: Tomasz Jedrzejewski

Imagen 28. Certificado de calibración de pipetas multicanal - resultados

8. Anexo 1

8.1. Fenómenos físicos y principio de medición durante el control de pipetas de pistón

La evaluación de todos los factores que pueden afectar potencialmente la precisión de la ingesta de líquido por una pipeta de émbolo con la bolsa de aire requiere la representación de este proceso en forma matemática. Un proceso de naturaleza similar es el proceso de cambio isotérmico del estado de agregación de un gas ideal, que puede ser descrito por la ecuación (1).

$$P_a \times V_o = (P_a - P_h - P_s) \times (V_o - V_{str} - V) \quad (1)$$

donde: P_a /presión del aire
 P_h /presión hidrostática
 P_s / presión capilar
 V_o /volumen de aire atrapado
 V_{str} / volumen de carrera del pistón
 V /volumen de líquido aspirado

El valor de la presión hidrostática provocada por la columna de líquido (en la punta de la pipeta) depende de varios factores que se incluyen en la ecuación (2).

$$P_h = \rho_w \times g \times h \quad (2)$$

donde: ρ_w densidad del líquido (agua)
 g aceleración gravitacional
 h la altura de la columna de líquido dentro de la punta

Teniendo en cuenta las relaciones presentadas en las ecuaciones (1) y (2), el volumen del líquido aspirado *) teniendo en cuenta los efectos de la evaporación del líquido, las diferencias de temperatura y el manejo de la pipeta se puede calcular según la ecuación (3)

$$V = V_{str} - V_o \times \frac{(\rho \times g \times h) + P_s}{P_a - (\rho \times g \times h) - P_s} - V_{ev} \pm V_{Tdiff} \pm V_{handling} \quad (3)$$

dónde:
 V_{ev} pérdida de volumen debido a la evaporación de líquido en la bolsa de aire durante la succión
 V_{Tdiff} efecto del cambio de temperatura en bolsa del aire durante la succión
 $V_{handling}$ cambio de volumen debido a diferentes efectos de manejo

Los principales elementos y pasos del pipeteo se muestran en la Figura 29. Antes de comenzar a pipetear, el pistón de la pipeta (1) está en la posición inicial (5), el espacio vacío (2) contiene el llamado bolsa de aire. La punta de la pipeta (4) se sumerge ligeramente en el líquido. La estanqueidad de la estructura está asegurada por el alojamiento de la pipeta (3).

Después de aspirar el líquido, el pistón se mueve a la posición final (6), expandiendo así el aire atrapado en la bolsa de aire, el líquido llena el espacio de la punta hasta la altura (h). En este punto tiene lugar el proceso de evaporación del líquido hacia el interior de la bolsa de aire, lo que se traduce en un aumento de su volumen. Al aumentar el volumen de la bolsa de aire, a su vez, se expulsa una pequeña cantidad de líquido de la punta de la pipeta. Como resultado de este fenómeno, el volumen de la dosis de líquido suministrada es menor. Los cambios de temperatura $\Delta T/T$ que pueden ocurrir durante este proceso cambian el volumen de la bolsa de aire V_{eff} , lo que también conduce a un cambio en el volumen del líquido entregado.

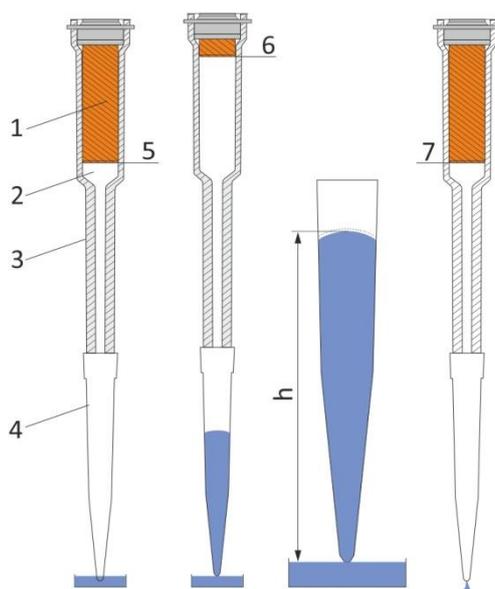


Imagen 29. Pipeta de pistón - etapas de aspiración de líquidos

Cuando se expulsa el líquido, el pistón se mueve a la posición (7) y el líquido se expulsa de la punta de la pipeta. Además de los factores físicos, los factores humanos también pueden tener un impacto significativo en la precisión del pipeteo. En este sentido, se pueden distinguir los siguientes factores:

- ángulo de inclinación durante la recogida de líquido
- tiempo de espera después de la aspiración,
- el tiempo durante el cual la punta todavía está sumergida en el líquido de prueba,
- tiempo entre aspiraciones sucesivas,
- la profundidad de inmersión de la punta en el líquido de prueba,
- fuerza de trabajo que actúa sobre el pistón,
- transferencia de calor de la mano del operador a la estructura de la pipeta

La ecuación 3 describe los aspectos físicos de la transferencia de fluidos, como la evaporación y los cambios de temperatura. Un análisis muy detallado de este fenómeno puede llevarse a cabo utilizando la ecuación 4, donde también se tuvo en cuenta otro factor relacionado con el proceso de pipeteo.

$$V = V_{str} - V_o \times \frac{(\rho \times g \times h) + P_s}{P_a - (\rho \times g \times h) - P_s} + [A_{fl} \times P_d \times (1 - S) \times k \times t_{AnsW}] \pm \left[V \times m \times \frac{\Delta T}{T} \right] -/+ \left[A_{fl} \times b \times \frac{\Delta T}{T} \right] \pm V_{handling} \quad (4)$$

donde

- A_{fl} la superficie de contacto entre el líquido y la bolsa de aire
- P_d es la presión de vapor del líquido.
- S es la saturación de vapor de la bolsa de aire en % HR
- t_{AnsW} es el tiempo de aspiración más el tiempo de espera
- k es el coeficiente de evaporación (volumen por superficie, presión de vapor y tiempo)
- V volumen de succión
- Factor M teniendo en cuenta la conducción de calor radial. $m = 0,3 \dots 0,9$, dependiendo del tamaño de la pipeta
- b coeficiente que tiene en cuenta la conducción de calor axial (volumen por superficie, tiempo dependiente de t_{AnsW}).
- $\Delta T/T$ cambio relativo de temperatura en la bolsa de aire

Los valores de algunos coeficientes, como S , k , m , no se conocen y deben determinarse experimentalmente, lo cual es un desafío, principalmente en el ámbito de la investigación.

*) Primarias: Feldmann, R., Lochner, K.H. Influences on volume in piston-operated air-displacement pipettes. Accred Qual Assur 21, 69–82 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00769-015-1171-y>

8.2. Errores máximos permitidos de las pipetas de pistón

Tabla 1. Niveles máximos de error permitidos para pipetas de tipo A y D1 (monocanal)

Volumen de pipeteo		Error sistemático máximo permitido ^a	Error aleatorio máximo permitido
Volumen nominal μl	Valor como proporción del volumen nominal %	\pm %	% b
1 do 3 ^c	100	2,5	2,0
	50	5,0	4,0
	10	25	20
> 3 do 5	100	2,5	1,5
	50	5,0	3,0
	10	25	15
> 5 do 10	100	1,2	0,8
	50	2,4	1,6
	10	12	8,0
> 10 do 50	100	1,0	0,5
	50	2,0	1,0
	10	10	5,0
> 50 do 5 000	100	0,80	0,30
	50	1,6	0,60
	10	8,0	3,0
> 5 000 do 20 000	100	0,60	0,30
	50	1,2	0,60
	10	6,0	3,0

^a - para calcular los errores en microlitros, multiplique los errores máximos permitidos por el volumen seleccionado.

b - expresado como coeficiente de variación según ISO 8655-6, ISO 8655-7 o ISO 8655-8.

c - el procesamiento de pequeñas cantidades puede ser muy difícil.

Tabla 6. . Niveles máximos de error permitidos para pipetas de tipo A y D1 (multicanal)

Volumen de pipeteo		Error sistemático máximo permitido ^a	Error aleatorio máximo permitido
Volumen nominal μl	Valor como proporción del volumen nominal %	\pm %	% ^b
2 ^c	100	8,0	8,0
	50	16	16
	10	25	25
> 2 do 5	100	5,0	3,0
	50	10	6,0
	10	25	25
> 5 do 10	100	2,4	1,6
	50	4,8	3,2
	10	24	16
> 10 do 20	100	2,0	1,0
	50	4,0	2,0
	10	20	10
> 20 do 50	100	2,0	0,80
	50	4,0	1,6
	10	20	8,0
> 50 do 2 000	100	1,6	0,60
	50	3,2	1,2
	10	16	6,0

^a - para calcular los errores en microlitros, multiplique los errores máximos permitidos por el volumen seleccionado.

^b - expresado como coeficiente de variación según ISO 8655-6, ISO 8655-7 o ISO 8655-8.

^c - el procesamiento de pequeñas cantidades puede ser muy difícil.

Tabla 7. Niveles máximos de error permitidos para pipetas D2

Volumen de pipeteo		Error sistemático máximo permitido ^a	Error aleatorio máximo permitido
Volumen nominal μl	Valor como proporción del volumen nominal %	\pm %	% ^b
5 ^c	100	2,5	1,5
	50	5,0	3,0
	10	25	15
> 5 do 10	100	2,0	1,0
	50	4,0	2,0
	10	20	10
> 10 do 20	100	2,0	0,80
	50	4,0	1,6
	10	20	8,0
> 20 do 100	100	1,4	0,60
	50	2,8	1,2
	10	14	6,0
> 100 do 1 000	100	1,2	0,40
	50	2,4	0,80
	10	12	4,0

^a - para calcular los errores en microlitros, multiplique los errores máximos permitidos por el volumen seleccionado.

^b - expresado como coeficiente de variación según ISO 8655-6, ISO 8655-7 o ISO 8655-8.

^c - el procesamiento de pequeñas cantidades puede ser muy difícil.

8.3. Valores de factores de corrección Z para agua destilada

Tabla 8. Factores de corrección Z para agua destilada en función de la temperatura del agua y la presión del aire - Se dan los valores Z en µl/mg

Temperatura (°C)	Presión del aire (Kpa)						
	80	85	90	95	100	101,3	105
15,0	1 001 7	1 001 8	1 001 9	1 001 9	1 002 0	1 002 0	1 002 0
15,5	1 001 8	1 001 9	1 001 9	1 002 0	1 002 0	1 002 0	1 002 1
16,0	1 001 9	1 002 0	1 002 0	1 002 1	1 002 1	1 002 1	1 002 2
16,5	1 002 0	1 002 0	1 002 1	1 002 1	1 002 2	1 002 2	1 002 2
17,0	1 002 1	1 002 1	1 002 2	1 002 2	1 002 3	1 002 3	1 002 3
17,5	1 002 2	1 002 2	1 002 3	1 002 3	1 002 4	1 002 4	1 002 4
18,0	1 002 2	1 002 3	1 002 3	1 002 4	1 002 5	1 002 5	1 002 5
18,5	1 002 3	1 002 4	1 002 4	1 002 5	1 002 5	1 002 6	1 002 6
19,0	1 002 4	1 002 5	1 002 5	1 002 6	1 002 6	1 002 7	1 002 7
19,5	1 002 5	1 002 6	1 002 6	1 002 7	1 002 7	1 002 8	1 002 8
20,0	1 002 6	1 002 7	1 002 7	1 002 8	1 002 8	1 002 9	1 002 9
20,5	1 002 7	1 002 8	1 002 8	1 002 9	1 002 9	1 003 0	1 003 0
21,0	1 002 8	1 002 9	1 002 9	1 003 0	1 003 1	1 003 1	1 003 1
21,5	1 003 0	1 003 0	1 003 1	1 003 1	1 003 2	1 003 2	1 003 2
22,0	1 003 1	1 003 1	1 003 2	1 003 2	1 003 3	1 003 3	1 003 3
22,5	1 003 2	1 003 2	1 003 3	1 003 3	1 003 4	1 003 4	1 003 4
23,0	1 003 3	1 003 3	1 003 4	1 003 4	1 003 5	1 003 5	1 003 6
23,5	1 003 4	1 003 5	1 003 5	1 003 6	1 003 6	1 003 6	1 003 7
24,0	1 003 5	1 003 6	1 003 6	1 003 7	1 003 7	1 003 8	1 003 8
24,5	1 003 7	1 003 7	1 003 8	1 003 8	1 003 9	1 003 9	1 003 9
25,0	1 003 8	1 003 8	1 003 9	1 003 9	1 004 0	1 004 0	1 004 0
25,5	1 003 9	1 004 0	1 004 0	1 004 1	1 004 1	1 004 1	1 004 2
26,0	1 004 0	1 004 1	1 004 1	1 004 2	1 004 2	1 004 3	1 004 3
26,5	1 004 2	1 004 2	1 004 3	1 004 3	1 004 4	1 004 4	1 004 4
27,0	1 004 3	1 004 4	1 004 4	1 004 5	1 004 5	1 004 5	1 004 6
27,5	1 004 5	1 004 5	1 004 6	1 004 6	1 004 7	1 004 7	1 004 7
28,0	1 004 6	1 004 6	1 004 7	1 004 7	1 004 8	1 004 8	1 004 8
28,5	1 004 7	1 004 8	1 004 8	1 004 9	1 004 9	1 005 0	1 005 0
29,0	1 004 9	1 004 9	1 005 0	1 005 0	1 005 1	1 005 1	1 005 1
29,5	1 005 0	1 005 1	1 005 1	1 005 2	1 005 2	1 005 2	1 005 3
30,0	1 005 2	1 005 2	1 005 3	1 005 3	1 005 4	1 005 4	1 005 4

9. Lista de imagenes

Imagen 1. Dr. Adah Elizabeth Verder mouth pipetting.	4
Imagen 2. Pipetas de pistón Radwag con volumen variable	5
Imagen 3. Inspección de pipetas de pistón: soporte de medición de balanzas de la serie XA y microbalanzas MYA.....	6
Imagen 4. Pipetas de pistón Radwag	7
imagen 5 ciclo de vida de pipeta de pistón.....	8
Imagen 6. Inspección de una pipeta de pistón de 200 µl	9
Rysunek 13. Schemat budowy i zasada układu automatycznego AP 12.5Y ...	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Rysunek 14. Źródła błędów w procesie pipetowania	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Rysunek 15. Pobieranie cieczy dla pipet o różnej konstrukcji	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Rysunek 16. Stanowisko do sprawdzania pipet tłokowych o różnych objętościach	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Rysunek 17. Potencjalne błędy pomiaru przy pobieraniu wody	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Rysunek 18. Metoda wydalania cieczy z pipety.....	23
Rysunek 19. Wyniki z automatycznej procedury kontroli – odchylenie standardowe z serii 10 pomiarów	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Rysunek 20. Wążenie kontenera	26
Rysunek 21. Dokładność pomiaru masy kontenerów w cyklu automatycznym.....	27
Rysunek 22. MYA 21.5Y.P – efekt parowania cieczy.....	28
Rysunek 23. Mikrowaga MYA 21.5Y.P z kurtyną parową.	28
Rysunek 24. Efekt parowania cieczy z naczynia wagowego w układzie AP 12.5Y	29
Rysunek 25. Świadectwo wzorcowania pipety jednokanałowej	30
Rysunek 26. Świadectwo wzorcowania pipety jednokanałowej - wyniki.....	31
Rysunek 27. Świadectwo wzorcowania pipety wielokanałowej.....	32
Rysunek 28. Świadectwo wzorcowania pipety wielokanałowej - wyniki	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Rysunek 29. Pipeta tłokowa - etapy pobierania cieczy.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.

10. Lista de tablas

Tabela 1. Requisitos mínimos para balanzas	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Tabela 2. La profundidad de inmersión de la punta de la pipeta depende del volumen nominal de la pipeta	22
Tabela 3. Selección de la balanza para el volumen ensayado de la pipeta de pistón.....	Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.
Tabela 4. Precisión de la medición de masa AP 12.1.5Y, działka elementarna $d = 1\mu\text{g}$	26
Tabela 5. Niveles máximos de error permitidos para pipetas de tipo A y D1 (monocanal).....	37

Tabela 6. Niveles máximos de error permitidos para pipetas de tipo A y D1 (multicanal)..... 38

Tabela 7. Niveles máximos de error permitidos para pipetas D2.....

Błąd! Nie zdefiniowano zakłádki.

Tabela 8. Factores de corrección Z para agua destilada en función de la temperatura del agua y la presión del aire - Se dan los valores Z en $\mu\text{l}/\text{mg}$40

11. Literatura

1. R. Feldmann and Karl Heinz Lochner, Influences on volume in piston-operated air-displacement pipettes, *Accred Qual Assur* (2016), 21, 69-82.
2. Guide on the Calibration, Operation and Handling of Micropipettes. Final REPORT. EURAMET PROJECT 1295, Ed. Zoe Metaxiotou, Hellenic Institute of Metrology (NQIS/EIM).
3. General European OMCL Network (GEON). Guideline Qualification of Equipment - Annex 6:Qualification of Piston Pipettes. 2018.
4. Kornelia Ewald, Fundamentals of dispensing - Userguide No. 19. Eppendorf AG, Hamburg, Germany. 2015
5. John Blues¹, David Bayliss², Mike Buckley³. Measurement Good Practice Guide No. 69. The Calibration and Use of Piston Pipettes. 2004.
¹)National Weights and Measures Laboratory
²)National Physical Laboratory
³)South Yorkshire Trading Standards Uni
6. PN-EN ISO 9001:2015-10. Systemy zarządzania jakością
7. PN-ISO 5725-1:2002. Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów. Część -1. Ogólne zasady i definicje.
8. Pn-EN ISO/IEC 17025:2018-02. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
9. ISO 8655-2:2022. Tłokowe przyrządy do pomiaru objętości. Część 2 – pipety.
10. ISO 8655-6:2022. Tłokowe przyrządy do pomiaru objętości. Część 6 – referencyjna procedura pomiaru grawimetrycznego do wyznaczania objętości.
11. S. Janas. Pomiary w skali mikro – wydanie II. Centrum Metrologii Badań i Certyfikacji Radwag Wagi Elektroniczne. 2022.



RADWAG BALANZAS ELECTRÓNICAS

CENTRO DE PRUEBAS Y CERTIFICACIÓN DE METROLOGÍA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN



26-600 RADOM, calle. Toruńska 5
tel.: +48 (48) 386 60 00, Fax: +48 (48) 385 00 10
www.radwag.com