

# VARIACIÓN DE LOS RESULTADOS DE MEDICIÓN DE VOLUMEN EN LAS PIPETAS DE PISTÓN RESPECTO DE LAS CONDICIONES DE USO DE LA PUNTA DESECHABLE Y LA HUMEDAD DEL AMBIENTE

Sonia Trujillo Juárez, Alicia Imelda Morales Estrada  
Centro Nacional de Metrología (CENAM)  
Apdo. Postal 1-100 Centro. Querétaro, Qro. MEXICO  
Tel (442) 211-05-00 fax 211-05-68  
[strujill@cenam.mx](mailto:strujill@cenam.mx), [amorales@cenam.mx](mailto:amorales@cenam.mx);

**Resumen:** Controlando todos los factores descritos por la norma ISO 8655-6 (2002), Piston-operated volumetric apparatus –Part 6: Gravimetric methods for the determination of measurement error [1] se realizan mediciones con pipetas de pistón variando el uso de la punta de plástico desechable y realizando las mediciones en un ambiente de humedad relativa por abajo del 50% para cuantificar su efecto en el volumen entregado por la pipeta y su contribución en la incertidumbre de medición. Se presentan datos de mediciones efectuadas con puntas desechables nuevas, reutilizadas, pre-enjuagadas y sin enjuagar y se comparan los resultados obtenidos con los que se esperaba obtener, de acuerdo a la norma referida previamente.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las pipetas de pistón se utilizan para recoger y entregar líquidos, definiendo el volumen del líquido que se mide con uno o más golpes de uno o más pistones o émbolos. Estas pipetas pueden estar diseñadas para entregar un solo volumen o bien, el usuario puede seleccionar diferentes volúmenes dentro de un cierto intervalo.

En los últimos años, se ha incrementado notablemente el uso de las pipetas de pistón dentro de los laboratorios farmacéuticos, de salud, de análisis de alimentos, inmunología y bioquímica entre otros, donde las mediciones de micro-volúmenes son críticas para obtener los resultados de alta confiabilidad que se requieren.

De acuerdo a las especificaciones que publican los fabricantes de las pipetas de pistón, se puede pensar que las mediciones de volumen que se realizan con estas pipetas presentan una alta exactitud. La realidad es que en muy pocos laboratorios se logran los resultados que especifican los fabricantes, ya que la repetibilidad y la calidad de la entrega del líquido dependen de un conjunto de operaciones (en ocasiones desconocidas por el usuario) que tienen que ser reproducidas rigurosamente cada vez que se realiza una medición o calibración con pipetas de pistón con puntas desechables, si se quieren obtener resultados de alta exactitud.

Algunas de las operaciones importantes que podemos citar, y que deben reproducirse en cada medición y/o calibración de acuerdo a la norma ISO 8655-6 (2002) cuando se llevan a cabo mediciones con pipetas de pistón son las siguientes:

- a) Utilizar las puntas desechables solo una vez.
- b) Pre-humedecer cada una de las puntas antes de la medición.
- c) Mantener la humedad relativa dentro del laboratorio por encima del 50 %.

El objetivo de este trabajo es cuantificar experimentalmente el efecto en las mediciones de volumen cuando se varían las condiciones a), b) y c), con el fin de que los usuarios y el personal técnico que realiza las calibraciones de pipetas de pistón tenga una idea del impacto en los resultados de volumen que provoca la omisión o variación de cualquiera de estas condiciones.

## 2. CONDICIONES DE MEDICIÓN

Todas las mediciones fueron realizadas por el mismo operador y se llevaron a cabo con la misma pipeta, utilizando siempre el mismo equipo de medición, en el mismo laboratorio, bajo las siguientes condiciones ambientales, que cumplen las especificaciones de ISO 8655-6: temperatura del aire  $20,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , presión atmosférica  $81\ 500\ \text{Pa} \pm 100\ \text{Pa}$ , Humedad relativa  $55\ \% \pm 5\ \%$  (con excepción de las mediciones del punto 3.4, en

donde a propósito se mantuvo la humedad por abajo del 50 % para analizar su efecto).

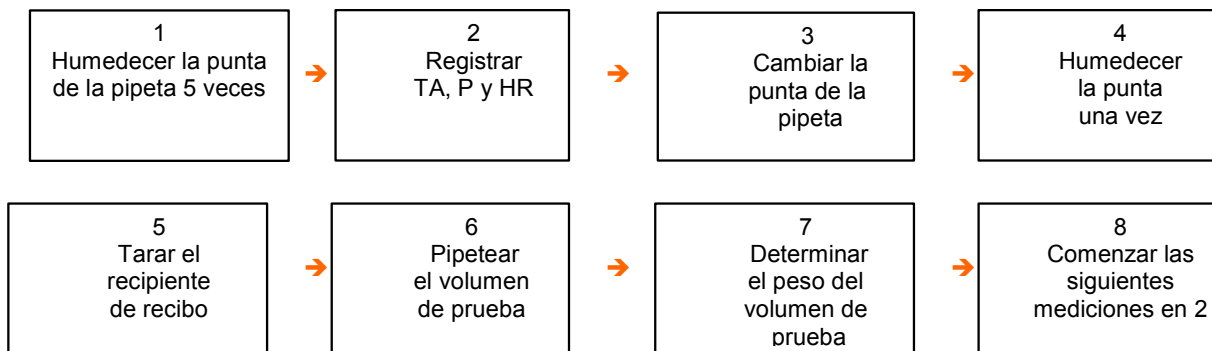
Para las mediciones se utiliza una pipeta de pistón de volumen variable (100 - 1 000) µL, que ha sido calibrada previamente en 10%, 50% y 100% del volumen nominal (volúmenes de calibración que recomienda la norma). La balanza utilizada para la calibración y durante las mediciones tiene un alcance de 400 g, con resolución de 0,1 mg e incertidumbre de ± 0,2 mg con k = 2

**3. DESARROLLO**

**3.1 Mediciones de acuerdo a la norma ISO 8655-6 (2002)**

En primer lugar, se hicieron las mediciones de referencia, es decir, con cada uno de los volúmenes seleccionados se efectuó una serie de 10 mediciones de acuerdo al procedimiento (ver figura 1) y a las condiciones establecidas en la norma:

- a) Utilización de las puntas sólo una vez.
- b) Pre-humedecimiento de cada una de las puntas antes de la medición.



**Fig.1** Secuencia de medición para pipetas de pistón con punta desechable

**3.4 Mediciones realizadas en el laboratorio con humedad relativa menor de 50%**

Se hicieron 10 mediciones en cada uno de los volúmenes de 100, 500 y 1000 µL, variando solamente la condición c. Las mediciones se realizaron con una humedad relativa dentro del laboratorio de 35 % ± 5 %

**4. CALCULO DEL VOLUMEN**

La determinación del volumen entregado se calculó por el método gravimétrico, de acuerdo con ISO 8655-6 (2002), con la siguiente ecuación:

- c) La humedad relativa dentro del laboratorio fue de 55 %.

Todo esto con el fin de tener un parámetro con el cual comparar los valores de las mediciones cuando se varía cada una de las tres condiciones motivo de este estudio.

**3.2 Mediciones con puntas sin prehumedecer.**

Se hicieron 10 mediciones para cada uno de los volúmenes de 100, 500 y 1000 µL, variando la condición b mientras a y c se mantienen constantes. Es decir, las puntas no se humedecieron antes de realizar las mediciones.

**3.3 Mediciones con puntas reutilizadas**

Se hicieron 10 mediciones en cada uno de los volúmenes de 100, 500 y 1000 µL, variando solamente la condición a. Las puntas usadas en el punto 3.1 se guardaron sin ser sometidas a ninguna operación de limpieza o secado después de las mediciones y se utilizaron para efectuar las mediciones de este punto 3.3

$$V_{20} = Ma \cdot \left( \frac{1}{\rho_A - \rho_a} \right) \cdot \left( 1 - \frac{\rho_a}{\rho_B} \right) \cdot (1 - \alpha \cdot (T_A - 20)) \quad (1)$$

Donde:

**V<sub>20</sub>** Es el volumen de agua entregado por la pipeta a la temperatura de referencia de 20 °C, [µL].

**Ma** Representa la diferencia de lecturas (final menos inicial) correspondientes al recipiente auxiliar lleno y vacío, respectivamente, [mg].

- $\rho_A$  Es la densidad del agua que se usa en la calibración, y se calcula con la ecuación de Kell [4], [mg/ $\mu$ L].
- $\rho_a$  Es la densidad del aire a las condiciones ambientales del laboratorio, y se calcula con la ecuación propuesta por el CIPM, [5], [mg/ $\mu$ L].
- $\rho_B$  Es la densidad de las pesas usadas para calibrar la balanza (de acuerdo con OIML R33,  $\rho_B = 8000 \text{ kg/m}^3$ ), [6].
- $\alpha$  Coeficiente de expansión cúbica del polipropileno ( $= 2,40 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ , [3]).
- $T_A$  Es la temperatura del agua, medida durante la calibración, [ $^{\circ}$ C].

El método gravimétrico consiste en estimar la masa de agua entregada por la pipeta, realizando las siguientes correcciones: 1) una corrección por el efecto del empuje del aire sobre el agua, 2) el efecto del empuje de aire sobre las pesas usadas y 3) la corrección para expresar el volumen entregado por la pipeta a una temperatura de referencia (normalmente 20  $^{\circ}$ C). El método de pesada para determinar la masa de agua es conocido como *pesada directa*.

La incertidumbre de medición se estima de acuerdo a la "Guía para la expresión de la incertidumbre en las mediciones" GUM [5] y a ISO/TR 20461 [6], considerando que todos los resultados de medición tienen trazabilidad a los Patrones Nacionales de Medición.

Volumen	Error máx. permisible <sup>(1)</sup>		Mediciones de acuerdo a ISO 8655-6				Puntas sin prehumedecer		
	$e_s$ <sup>(2)</sup> (%)	$s_r$ <sup>(3)</sup> (%)	$V_{20}$ ( $\mu$ L)	$e_s$ (%)	$s_r$ (%)	$U$ ( $k=2$ ) (%)	$V_{20}$ ( $\mu$ L)	$U$ ( $k=2$ ) (%)	Diferencia volumen vs. ISO8655 %
1000 $\mu$ L	0,8	0,3	999,275	0,1	0,05	0,03	1001,020	0,02	0,17
500 $\mu$ L	0,8	0,3	498,048	0,4	0,05	0,06	498,784	0,06	0,15
100 $\mu$ L	0,8	0,3	99,473	0,5	0,06	0,3	99,644	0,3	0,17
Volumen	Puntas Reutilizadas						HR $\approx$ 35 %		
	$V_{20}$ ( $\mu$ L)	$U$ ( $k=2$ ) (%)	Diferencia volumen vs. ISO 8655-6 %		$V_{20}$ ( $\mu$ L)	$U$ ( $k=2$ ) (%)	Diferencia volumen vs. ISO 8655-6 %		
1000 $\mu$ L	997,686	0,03	0,16		997,532	0,03	0,17		
500 $\mu$ L	497,418	0,04	0,13		497,250	0,06	0,16		
100 $\mu$ L	99,613	0,23	0,14		99,338	0,5	0,14		

(1) Errores máximos permisibles, de acuerdo a ISO 8655-2 (2002) [2].  
 (2)  $e_s$ : Error sistemático, expresado como la desviación de la media de una serie 10 mediciones, del volumen seleccionado [2].  
 (3)  $s_r$ : Error aleatorio, expresado como la desviación estándar de la repetibilidad de una serie de 10 mediciones [2].

**Tabla 1.** Resultado de las mediciones con una pipeta de pistón de volumen variable de 1000  $\mu$ l, en los volúmenes de 100  $\mu$ l, 500  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l, variando las condiciones de uso de las puntas desechables y la humedad relativa del laboratorio donde se efectúan las mediciones.

### 5. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los errores sistemáticos y aleatorios máximos permisibles que especifica ISO 8655-2, para las pipetas de pistón con desplazamiento de aire y volumen variable que

tienen un volumen nominal de 1 000  $\mu$ L; así como los resultados de las mediciones descritas en 3.1 realizadas de acuerdo a ISO 8655-6 y los resultados de las mediciones descritas en 3.2, en donde se utilizaron puntas sin prehumedecer. En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados de las

mediciones detalladas en 3.3 y las que se explican en 3.4.

Se presentan también en esta tabla las incertidumbres estimadas de los resultados de medición y el por ciento de diferencia que se encontró en los diferentes volúmenes, comparados con el volumen de las mediciones de acuerdo a ISO 8655-6, es decir, las mediciones de referencia.

Para presentar las fuentes de incertidumbre y su contribución consideradas para la estimación de la incertidumbre de los resultados, se eligió de manera aleatoria el presupuesto de incertidumbre de las mediciones de referencia para el volumen de 100 µL que se muestra en la tabla 2.

**5. DISCUSIÓN**

a) Las mediciones realizadas de acuerdo a ISO 8655-6 (2002), se toman como referencia para comparar los valores de las mediciones de volumen y determinar la influencia de las condiciones de uso de la punta desechable y la humedad relativa del laboratorio. En la tabla 1 se observa que las mediciones de referencia cumplen los errores máximos permisibles que especifica ISO 8655-2.

b) Si se comparan cada uno de los volúmenes de las mediciones descritas en los puntos 3.2, 3.3 y 3.4, presentadas en la tabla 1, con las mediciones de acuerdo a ISO 8655-6, se observa que el % de diferencia es menor que la incertidumbre de medición en los volúmenes de 1 000 y 500 µL. En el caso de los volúmenes de 100 µL, la incertidumbre de medición es siempre mayor que el % de diferencia.

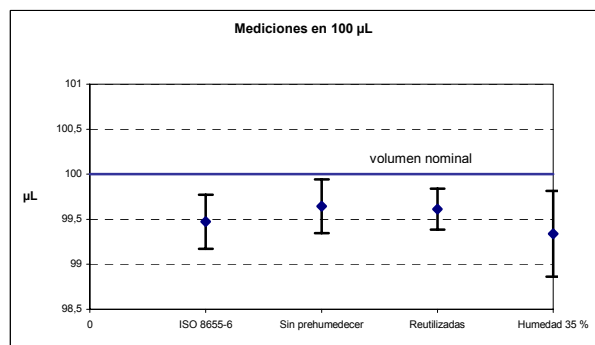
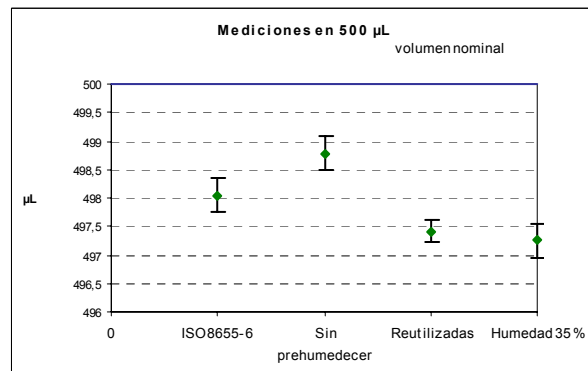
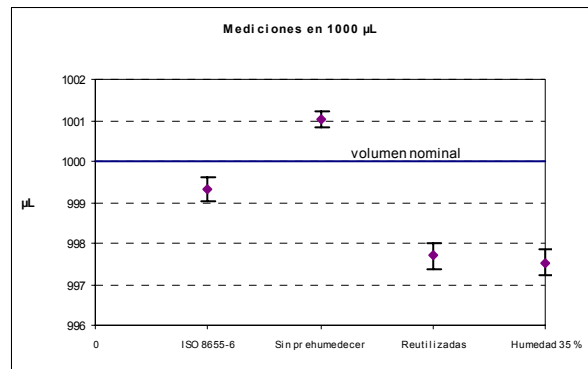
c) En las mediciones de 500 µL (gráfica 2), las mediciones que se realizan con puntas reutilizadas y las que se hacen en un ambiente de 35 % de humedad, no coinciden con las mediciones de referencia.

d) En la gráfica 3 se observa que todas las mediciones de 100 µL presentan coincidencia entre si y pueden ser equivalentes a las mediciones de referencia. El motivo de esta coincidencia es el tamaño de las incertidumbres, ya que si se examinan, se advierte que en 100 µL las incertidumbres son grandes en comparación con las que se obtiene en los volúmenes de 1 000 µL y 500 µL.

e) Los volúmenes entregados con puntas que no se humedecen de acuerdo a lo que establece la norma son mayores para 1 000 µL y 500 µL, según se muestra en las gráficas 1, 2 y 3.

f) Los volúmenes entregados con puntas de re-uso pueden ser mayores sin observarse una tendencia definida, como se muestra en las gráficas 1, 2 y 3

g) En las gráficas 1, 2 y 3 se puede observar que los volúmenes entregados cuando la humedad relativa es de 35 %, siempre son menores.



**Gráficas 1, 2 y 3** Mediciones en 1000 µL, 500 µL y 100 µL con una pipeta de pistón donde se varían las condiciones de uso de la punta desechable.

**7. CONCLUSIONES**

1. La exactitud en la entrega del volumen de las pipetas de pistón depende significativamente de seguir el procedimiento y las condiciones descritas en ISO 8655 partes 6 y 2.
2. La variación de las condiciones de uso de las puntas desechables durante las mediciones y el hecho de trabajar en un ambiente de baja humedad relativa, puede causar una diferencia en la entrega del volumen de 0,1 % ó mayor. Esta diferencia es significativa cuando se trabaja con incertidumbres de medición pequeñas.
4. Las mediciones con 100 µL presentaron incertidumbres de medición grandes debido a la baja repetibilidad de las mediciones.

5. La baja repetibilidad de las mediciones de 100 µL es típica de las mediciones de volúmenes muy pequeños y se debe a las características propias de la pipeta, en conjunto con la evaporación que ocurre durante cualquier medición de volumen, pero que se refleja claramente cuanto más pequeño es el volumen.

6. El error en el volumen, cuando se trabaja en un ambiente con humedad relativa de 35 % (por debajo de lo recomendado por la norma), en los volúmenes de 100 µL, 500 µL y 1 000 µL fue de hasta 0,17 %. Este valor podría incrementarse o disminuir, dependiendo de la humedad relativa y de los volúmenes que se miden.

Fuente	Valor, xi	Fuente de información	Incert. Original	Tipo Distrib	Incert. Estandar, u(xi)	Coef. de sensibilidad, ci	Contribución, ui(y)	(ui(y)) <sup>2</sup>	Grados de libertad, v	
Ma (mg)	99,209									
Repetibilidad		Mediciones	0,414 9 mg	A, normal k=1	0,131 2 mg	1,002 59 µL/mg	1,32x10 <sup>-1</sup> µL	1,73 x10 <sup>-02</sup>	9	
resolución		División escala	0,000 1 mg	B, rect.	3,0x10 <sup>-4</sup> mg	1,002 59 µL/mg	3,01x10 <sup>-5</sup> µL	9,05 x10 <sup>-10</sup>	100	
Calibración		Certificado Calibración	0,000 2 mg	B, normal k=2	1,0x10 <sup>-3</sup> mg	1,002 59 µL/mg	1,00x10 <sup>-4</sup> µL	1,01 x10 <sup>-08</sup>	50	
Densidad Agua f(T) (mg/µL)	0,998 265	calculada ver Ref [9]			1,55x10 <sup>-5</sup> mg/µL	-99,735 µL <sup>3</sup> /mg	-1,55x10 <sup>-3</sup> µL	2,39 x10 <sup>-06</sup>	100	
Densidad aire (mg/µL)	0,000 961	Calculada ver Ref [10]			8,2x10 <sup>-7</sup> mg/µL	-112,169 µL <sup>3</sup> /mg	-9,23x10 <sup>-05</sup> µL	8,52 x10 <sup>-09</sup>	100	
Densidad masas (mg/µL)	8	Referencia	± 0,16 mg/µL	B, rect.	4,6x10 <sup>-2</sup> mg/µL	0,001 µL <sup>3</sup> /mg	4,62x10 <sup>-5</sup> µL	2,13 x10 <sup>-09</sup>	100	
Coefficiente alfa (K <sup>-1</sup> )	2,4x10 <sup>-4</sup>	Referencia	5,0x10 <sup>-5</sup> K <sup>-1</sup>	B, rect.	2,89x10 <sup>-5</sup> K <sup>-1</sup>	29,839 5 µL ·K	8,59x10 <sup>-4</sup> µL	7,39 x10 <sup>-07</sup>	100	
Temperatura (°C)	19,7									
Resoluc. termómetro		División escala	0,1 °C	B, rect.	2,8x10 <sup>-2</sup> °C	-0,023 8 µL/°C	-6,92x10 <sup>-4</sup> µL	4,79 x10 <sup>-07</sup>	100	
Calibración termómetro		Certificado Calibración	0,1 °C	B, normal k=2	5,0x10 <sup>-2</sup> °C	-0,023 8 µL/°C	-1,19x10 <sup>-3</sup> µL	1,42 x10 <sup>-06</sup>	50	
Estabilidad temperatura		Observación en pruebas	± 0,5 °C	B, rect	0,289 °C	-0,023 8 µL/°C	-6,90x10 <sup>-3</sup> µL	4,79 x10 <sup>-05</sup>	100	
Incertidumbre estándar combinada								0,132	µL	
grados efectivos de libertad								v ef =	9,04	
Incertidumbre expandida								U(V20) =	0,30	µL

**Tabla 2. Presupuesto de Incertidumbres de las mediciones de referencia en el volumen de 100 µL.**

**REFERENCIAS**

- [1] ISO ISO 8655-6, "Piston-operated volumetric apparatus – Part 6: Gravimetric methods for the determination of measurement error (2002)"
- [2] ISO ISO 8655-2 "Piston-operated volumetric apparatus – Part 2 Piston pipettes (2002)"
- [3] ISO 4787, "Laboratory glassware – Volumetric glassware – Methods for use and testing of capacity", (1984)
- [4] Jones F. E. "ITS-90 Density of water formulation for volumetric standards calibration", JR-NIST, 97, 1992.
- [5] Davis R. S., "Equation for the determination of the density of moist air (1981/91)",
- [6] OIML International "Recommendation No.33. Conventional value of the result of weighings in air", Reportig-Secretariat: OIML, (1973)
- [7] ISO, "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAP, IUPAC, OIML (1995).
- [8] ISO/TR 20461, "Determination of uncertainty for volume measurements made using the gravimetric method (2000)"
- [9] Trujillo Juárez S., Arias Romero R. "Incertidumbre en la calibración de un matraz volumétrico", CENAM (2002).
- [10] Becerra Santiago L. O., Guardado González M. A. "Estimación de la incertidumbre en la determinación de la densidad del aire", CENAM, (2002).