

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Errores frecuentes en el uso de recipientes volumétricos y micropipetas



Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Disertante:
Tec. Mauricio J. Alberini
Área Metrología Dimensional y Volumen

1. Errores típicos en el uso de instrumentos volumétricos.
2. Interpretación de certificados.

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Errores típicos en el uso de material de vidrio ó plástico.

- Limpieza.
- Ajuste del menisco.
- Enrase del menisco.
- Tiempos de vertido (escurrimiento) y tiempo de espera.
(Solo para instrumentos con ajuste EX.)
- Falta de trazabilidad (calibración).

**Conocer las fuentes de error
nos permite controlarlos!**

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Limpieza

Si el material de vidrio presenta alguna contaminación en su interior, esto puede distorsionar el menisco y provocar un error sensible en la lectura.



Fuente: Información sobre la medición de volumen; F I R S T
C L A S S • B R A N D ; 0402

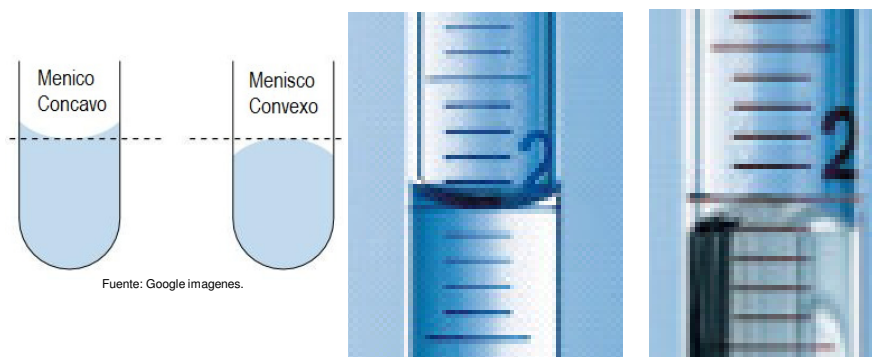
Fuente: Google imágenes.

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Ajuste del menisco

El término menisco se utiliza para describir la curvatura de la superficie del líquido.

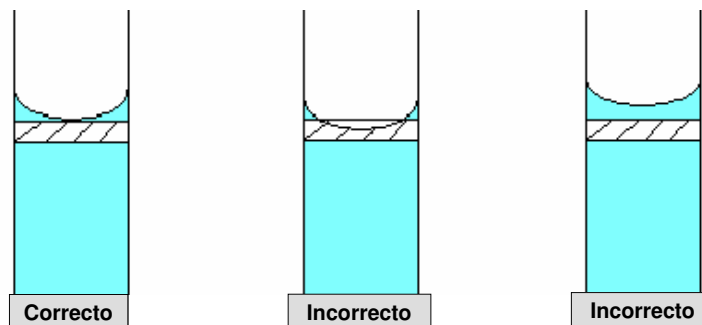
El menisco adopta forma convexa o cóncava. La formación de la depende de la relación entre la fuerza de cohesión y adherencia del líquido.



Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Ajuste del menisco

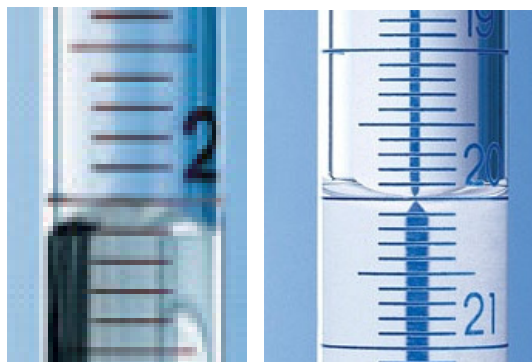
Para el caso de un menisco cóncavo, la lectura se realiza a la altura del punto más bajo de la superficie del líquido. Donde el punto más bajo del menisco debe tocar el borde superior de la división de la escala.



Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Ajuste del menisco

Para el caso de un menisco convexo, la lectura se realiza a la altura del punto más alto de la superficie del líquido. Donde el punto más alto del menisco debe tocar el borde inferior de la división de la escala.



Franja de Schellbach

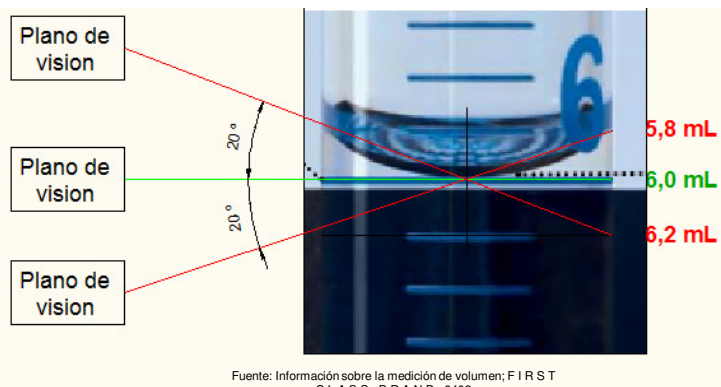
Es una estrecha franja azul en el centro de una franja blanca. Se aplican en la parte posterior de buretas para mejor legibilidad. Debido a la refracción de la luz, la franja azul aparece en forma de dos puntas de flecha a la altura del menisco. La lectura se realiza a la altura del punto de contacto de las dos puntas.

Fuente: Información sobre la medición de volumen; F I R S T
C L A S S • B R A N D ; 0402

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Enrase del menisco

Para evitar el error de paralaje a la hora de enrasar el menisco, el aparato volumétrico debe estar en posición vertical y los ojos del operador deben encontrarse a la altura del menisco. En esta posición, el aforo se visualiza como una línea.



Fuente: Información sobre la medición de volumen; F I R S T
C L A S S • B R A N D ; 0402



Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Tiempos de vertido (escurrimiento) y tiempo de espera. (Solo para instrumentos con ajuste EX.)

El volumen de líquido vertido es siempre un poco menor que el volumen contenido en el aparato.

Esto se debe a que, en la superficie interior del aparato de medición queda una película de líquido retenida. El volumen de esta película de líquido depende del tiempo de vertido, el cual fue tenido en cuenta durante el ajuste del aparato de medición.

El tiempo de vertido (escurrimiento)

Es el período de tiempo para el descenso libre del menisco, desde el aforo superior hasta el aforo inferior de volumen, o hasta la punta del aparato.

El tiempo de espera

El tiempo de espera comienza cuando el menisco permanece quieto a la altura de la marca de volumen inferior o bien a la punta de vertido. En el tiempo de espera se escurren los restos del líquido que puedan quedar adherido a la pared del instrumento.



Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Errores típicos en el uso de micropipetas.

- El uso de las punteras.
- Mantenimiento y la limpieza del instrumento.
- Proceso de pipeteado y el ritmo de pipeteo.
- Ángulo de inclinación de la pipeta.
- Profundidad de inmersión.
- Periodo de espera.
- Falta de trazabilidad (calibración).

**Conocer las fuentes de error
nos permite controlarlos!**

Mejoras respecto al uso de material de vidrio.

- ~~Limpieza~~, las punteras son descartables pero la micropipeta hay que hacerle mantenimiento
- ~~Ajuste del menisco~~.
- ~~Enrase del menisco~~.
- ~~Tiempos de vertido (escurrimiento) y tiempo de espera~~, este ultimo se reduce.

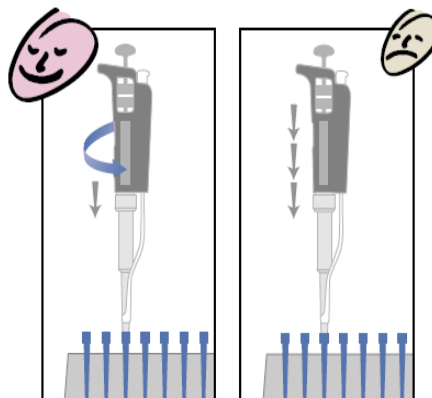
Tolerancias:

- Pipeta aforada de 1 mL $\pm 6 \mu\text{L}$.
- Micropipeta de 1 mL $\pm 8 \mu\text{L}$.
- Pipeta aforada de 10 mL $\pm 20 \mu\text{L}$.
- Micropipeta de 10 mL $\pm 60 \mu\text{L}$.

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Punteras descartables (Tip).

- Las micropipetas están equipadas con algún tipo de punta reemplazable para minimizar el riesgo de contaminación cruzada. A pesar de que son genéricas, es buena la práctica de utilizar sólo puntas que recomienda el fabricante, ya que pueden adaptarse mejor a la pipeta y tener el volumen interno correcto.
- Se recomienda siempre prehumedecerlas puntas de las pipetas.
- Elegir correctamente la puntera en función del volumen nominal de la micropipeta.
- Están destinados para un solo uso. Se desaconseja cualquier intento de limpiar y volver a usarlos.**

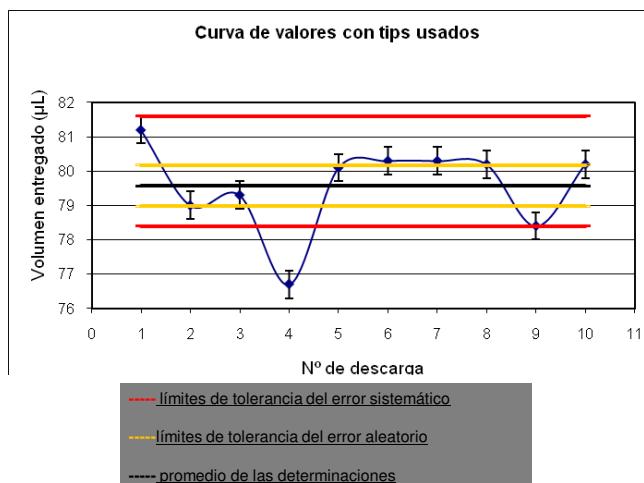


Presione hacia abajo con un movimiento de rotación Evite clavar la puntera en la micropipeta

Fuente: Selecting the right tip for your pipette; GILSON

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Punteras descartables (Tip).



Micropipeta de 100 µL

Valores hallados.

Error sistemático.

Hallado: -0,2 µL ; U = 0,8 µL

Permitido: 0,8 µL

Error aleatorio.

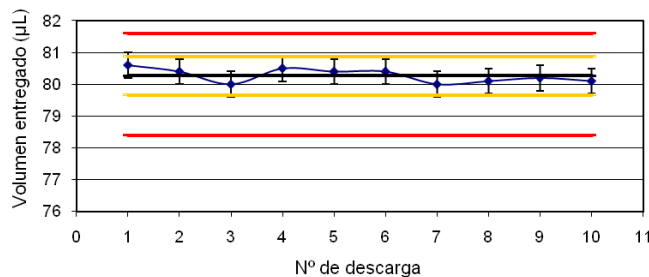
Hallado: 0,6 µL

Permitido: 0,3 µL

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Punteras descartables (Tip).

Curva de valores con tips nuevos



----- límites de tolerancia del error sistemático
 ----- límites de tolerancia del error aleatorio
 ----- promedio de las determinaciones

Micropipeta de 100 µL

Valores hallados.

Error sistemático.

Hallado: 0,1 µL ; U = 0,3 µL

Permitido: 0,8 µL

(Error_S : -0,2 µL ; U = 0,8 µL)

Error aleatorio.

Hallado: 0,1 µL

Permitido: 0,3 µL

(Error_A : 0,6 µL)

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Mantenimiento y la limpieza del instrumento.

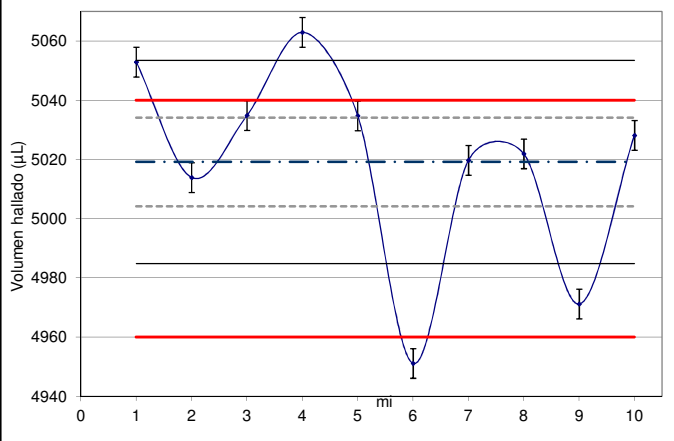
Es fundamental que se realicen actividades de mantenimiento y limpieza del equipo, no solo para prolongar su vida útil , sino porque esta actividad asegura la correcta dosificación del volumen elegido.

En muchos casos, dependiendo mas que nada de cada marca de micropipetas, cuando se realizan las actividades de limpieza y mantenimiento como indica el fabricante, estas acciones no alteran la calibración.

**PARA PODER REALIZAR ESTOS PASOS ES
FUNDAMENTAL LA LECTURA DEL MANUAL
DEL EQUIPO.**

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Mantenimiento y la limpieza del instrumento.



Micropipeta de 5 000 µL

Valores hallados.

Error sistemático.

Hallado: 19 µL ; U = 25 µL

Permitido: 40 µL

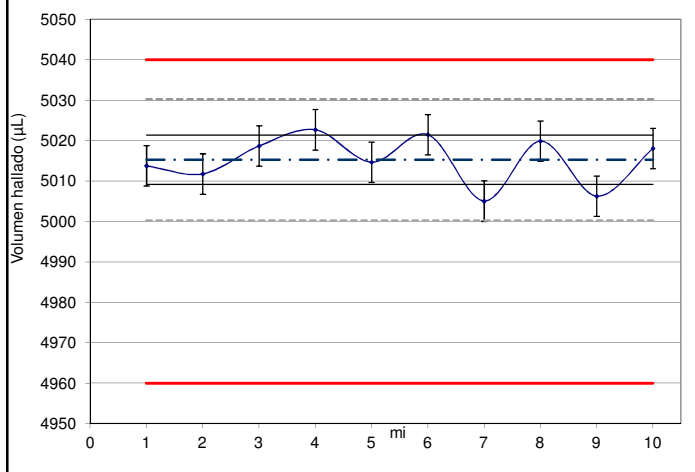
Error aleatorio.

Hallado: 34 µL

Permitido: 15 µL

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Mantenimiento y la limpieza del instrumento.



Micropipeta de 5 000 µL

Valores hallados.

Error sistemático.

Hallado: 15 µL ; U = 4 µL

Permitido: 40 µL

(E_S : 19 µL ; U = 25 µL)

Error aleatorio.

Hallado: 6 µL

Permitido: 15 µL

(E_A : 34 µL)

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Proceso de pipeteado y el ritmo de pipeteo.

Se debe realizar de una manera suave y regular.

Los movimientos del pistón demasiado rápido en la aspiración pueden hacer ingresar líquido dentro de la cámara de aire de la micropipeta y movimientos rápidos cuando se entrega líquido pueden dar lugar a la introducción de burbujas de aire.

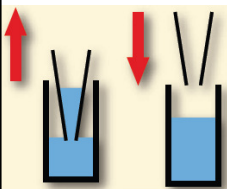
Para mejorar la exactitud, lo que se recomienda es pipetear varias veces con el líquido que se dosifica. Esto permite que la humedad entre el volumen de aire muerto y líquido se estabilice.

Se recomienda siempre el uso el método de pipeteo directo o estándar

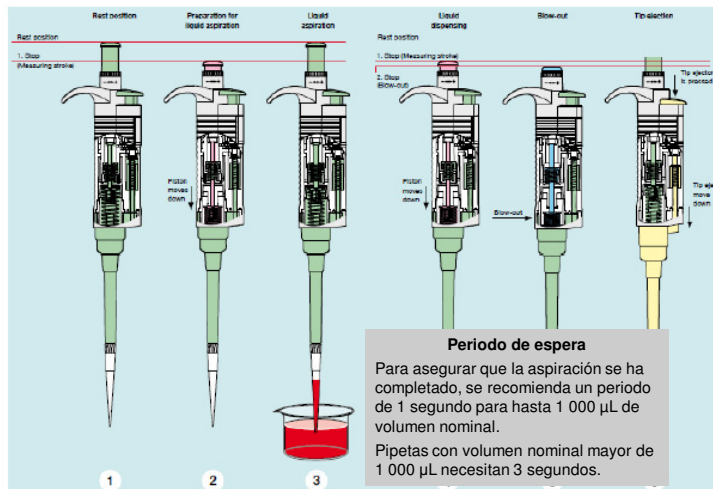
Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Proceso de pipeteado y el ritmo de pipeteo.

Se recomienda como paso previo al proceso de pipeteado prehumedecer la punta de la pipeta.



Fuente: Eppendorf AG, User guide Liquid handling N 20: Impact of pipetting techniques on precision and accuracy.

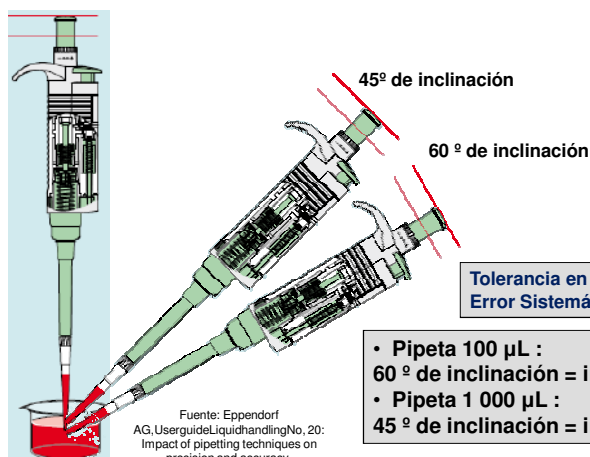


Fuente: Eppendorf AG, User guide Liquid handling N 20: Impact of pipetting techniques on precision and accuracy.

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Ángulo de inclinación de la pipeta.

Si una pipeta no se mantiene vertical durante la aspiración, corre el riesgo de pipetear un volumen mayor. (dependiendo del ángulo de inclinación)



Tolerancia en 100 μL y 1 000 μL :
Error Sistemático = 0,8 % del Volumen nominal

- Pipeta 100 μL :
60° de inclinación = incremento 0.53 % en Volumen
- Pipeta 1 000 μL :
45° de inclinación = incremento 0.29% en Volumen

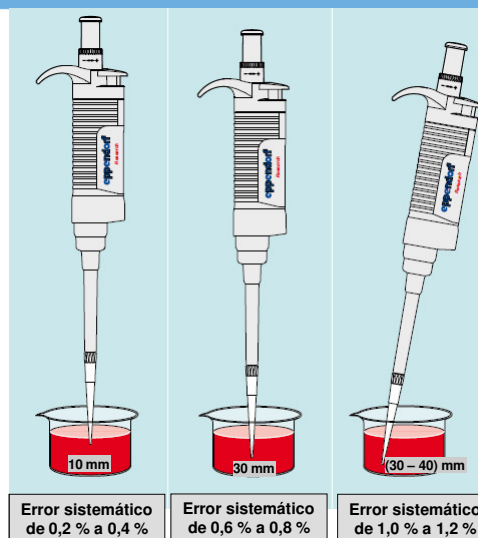
Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Profundidad de inmersión

Muchas veces que dos personas no pipeteen exactamente el mismo volumen usando la misma pipeta se explica por factores tales como diferentes ángulos de inclinación cuando se aspira el líquido, o la profundidad de inmersión de la punta de la pipeta.

| Volumen nominal [μL] | Profundidad de inmersión optima [mm] |
|--------------------------------------|--|
| 0,1 a 1 | 1 |
| 1 a 100 | 2 a 3 |
| 101 a 1 000 | 2 a 4 |
| 1 001 a 10 000 | 3 a 6 |

Fuente: Eppendorf AG, UserguideLiquidhandlingNo. 20: Impact of pipetting techniques on precision and accuracy.



Fuente: Eppendorf AG, UserguideLiquidhandlingNo. 20: Impact of pipetting techniques on precision and accuracy.

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

¿Que hacer con estos errores de uso?

El efecto puede ser pequeño en cada caso, pero los errores se van sumando y el error total puede llegar a ser considerable.

Estos errores hacen que **la incertidumbre de medición** aumente significativamente.

Recordar: **La incertidumbre representa la calidad de las mediciones.**

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Interpretación de certificados de calibración


Cuando se compra material volumétrico algunos fabricantes ofrecen, con un costo extra, enviar los instrumentos ya calibrados.

Estos pueden tener dos clases de certificados:


- Certificado de lote: indica que el instrumento adquirido cuenta con una verificación en el lote de instrumentos fabricados.
- Certificado individual: indica que el instrumento adquirido fue calibrado.

Datos que deben constar en el certificado de calibración:

- Identificación única del instrumento, ej.: N° Serie
- Fecha de calibración y fecha de emisión del certificado
- Metodología aplicada para la calibración, ej.: Procedimiento N° 64.
- Normativa utilizada o procedimiento, ej.: ASTM E287
- Resultado hallado, se puede informar un resultado promedio o el error hallado o ambos, ej.: • Valor hallado: 200,01 mL • Error hallado 0,01 mL
- Incertidumbre de calibración, ej.: $U = \pm 0,03 \text{ mL}$, con $k = 2$.
- Ente acreditador, si corresponde.



Ministerio de Industria
Presidencia de la Nación



Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Interpretación de certificados de calibración

Certificado de calibración / medición

OT Nº RAF-105-YYYY Parcial Único
Nº de páginas del certificado: 5

Objeto Micropipeta automática de pistón de volumen variable y rango 100 µL a 1000 µL...

Fabricante / Marca --- / XXXX


Modelo / Número de serie Adjustable volume pipette / X01

Determinaciones requeridas Calibración


Fecha de calibración 01 de septiembre de 2010

Solicitante INTI

Rafaela, 06 de septiembre de 2010



Ministerio de Industria
Presidencia de la Nación



Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

Interpretación de certificados de calibración

Metodología empleada
Procedimiento de calibración: INTI RAFAELA - PE - 64
Patrones empleados:
Pesas patrones clase F1

OT Nº RAF-105-YYYY Parcial Único
Página 2

Estas tolerancias e incertidumbres son de calibración, cada usuario tiene que definir **sus tolerancias** para cada técnica de medición, como así su **incertidumbre de medición**.
Tanto la tolerancia de la técnica y la incertidumbre de medición serán mayores que las de calibración.

Resultados

| Volumen nominal [mL] | Valor hallado [mL] | Error hallado [mL] | Tolerancia [mL] | Incertidumbre [mL] |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| 10 mL | 10,08 | 0,08 | ± 0,1 | ± 0,03 |
| 100 mL | 99,98 | -0,02 | ± 0,1 | ± 0,03 |
| 200 mL | 199,95 | -0,05 | ± 0,1 | ± 0,03 |

10 mL [0,08] mL + 0,03 mL ≤ 0,11 mL

por el factor de cobertura k = 2,11, que corresponde a una probabilidad de cobertura aproximada del 95% para una distribución t con Veff = 45 grados de libertad efectivos. La incertidumbre típica de la medida se ha determinado de acuerdo con la guía ISO – BIPM – IEC – IFCC – IUPAP – IUPAC – OIML "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", traducción de INTI – FÍSICA Y METROLOGÍA.

Observaciones: _____

| Valor nominal µL | Valor hallado µL | Incertidumbre µL |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| 100 | 98 | 1 |
| 500 | 501 | 1 |
| 1.000 | 1.001 | 2 |

| Errores | Error sistemático % | Error sistemático µL | Error aleatorio % | Error aleatorio µL |
|-------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| Permitido | ± 0,8 | ± 8 | 0,3 | 3 |
| Hallado (100 µL) | -0,2 | -2 | 0,1 | 1 |
| Hallado (500 µL) | 0,1 | 1 | 0,1 | 1 |
| Hallado (1000 µL) | 0,1 | 1 | 0,2 | 2 |

E. Sist. 1000 µL | 1 µL + 2 µL ≤ 3 µL

| Errores | Error sistemático % | Error sistemático µL | Error aleatorio % | Error aleatorio µL |
|-------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| Permitido | ± 0,8 | ± 8 | 0,3 | 3 |
| Hallado (100 µL) | -0,2 | -2 | 0,1 | 1 |
| Hallado (500 µL) | 0,1 | 1 | 0,1 | 1 |
| Hallado (1000 µL) | 0,1 | 1 | 0,2 | 2 |

INTI
Instituto Nacional de Tecnología Industrial

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

¿Que hacer con estos errores de calibración informados?

Si corrijo

Error Informado para micropipeta de 1 mL:

Error sistemático hallado en 1 000 μL = + 5 μL ; U = 2 μL

Error Aleatorio hallado en 1 000 μL = 2 μL

Si queremos dosificar 1 000 μL , entonces

Volumen = Volumen deseado – Error hallado

Volumen = 1 000 μL – 5 μL = 995 μL

Suponiendo:
Tolerancia de la técnica = 25 μL .
 $u_{(proc)} = 5 \mu\text{L}$
 $u_{(ins)} = res / \sqrt{12} = 1 \mu\text{L} / \sqrt{12} = 0,3 \mu\text{L}$

Incertidumbre de medición: Esta fuente no se usa en material de vidrio

$$u(m) = \sqrt{u_{(cal)}^2 + u_{(proc)}^2 + u_{(ins)}^2 + u_{(Ea)}^2}$$

$$u(m) = \sqrt{\left(\frac{2 \mu\text{L}}{2}\right)^2 + (5 \mu\text{L})^2 + (0,3 \mu\text{L})^2 + (2 \mu\text{L})^2}$$

$$u(m) = 5,5 \mu\text{L}$$

$$U(m) = u(m) * k = 5,5 \mu\text{L} * 2 = 11 \mu\text{L}$$

Resultado de medición

Volumen = 995 μL ; U = 11 μL
Tol./2 > U

INTI
Instituto Nacional de Tecnología Industrial

Medición de pequeños volúmenes en laboratorios

¿Que hacer con estos errores de calibración informados?

Si no corrijo

Error Informado para micropipeta de 1 mL:

Error sistemático hallado en 1 000 μL = + 5 μL ; U = 2 μL

Error Aleatorio hallado en 1 000 μL = 2 μL

Si queremos dosificar 1 000 μL , entonces

Volumen = Volumen deseado – Error hallado

Volumen = 1 000 μL – 5 μL = 995 μL

Suponiendo:
Tolerancia de la técnica = 25 μL .
 $u_{(proc)} = 5 \mu\text{L}$
 $u_{(ins)} = res / \sqrt{12} = 1 \mu\text{L} / \sqrt{12} = 0,3 \mu\text{L}$

Incertidumbre de medición: Esta fuente no se usa en material de vidrio

$$u(m) = \sqrt{u_{(cal)}^2 + u_{(proc)}^2 + u_{(ins)}^2 + u_{(Ea)}^2}$$

$$u(m) = \sqrt{\left(\frac{2 \mu\text{L}}{2}\right)^2 + (5 \mu\text{L})^2 + (0,3 \mu\text{L})^2 + (2 \mu\text{L})^2}$$

$$u(m) = 5,5 \mu\text{L}$$

$$U(m) = u(m) * k + Es = 5,5 \mu\text{L} * 2 + 5 \mu\text{L} = 16 \mu\text{L}$$

Resultado de medición

Volumen = 995 μL ; U = 16 μL
Tol./2 < U

Ministerio de Industria
Presidencia de la Nación



Ruta Nacional 34 – km 227,6
C.P. S2300 WAC, Rafaela
Santa Fe – Argentina
Tel.: (03492) 440471 / 441401
E-mail: rafaela@inti.gob.ar
Web: www.inti.gob.ar/rafaela

