

INSTRUCTIVO PARA LA VERIFICACIÓN DE PIPETAS

G. Cheminet, C. Zini, M. Núñez Fernandez.

Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP). Medina Allende y Haya de la Torre. Facultad de Ciencias Químicas. Ciudad Universitaria. 5000. Córdoba. Argentina. E-mails: gcheminet@fcq.unc.edu.ar, czini@fcq.unc.edu.ar, mnunez@fcq.unc.edu.ar

RESUMEN. En el contexto del control de la calidad analítica de los métodos de ensayo, la verificación de la metodología y de los elementos utilizados en un laboratorio es una práctica de rutina. Para un laboratorio, la medición de volúmenes es de importancia esencial. Es por ello que las pipetas que se utilizan, deben estar apropiadamente calibradas/ verificadas. Los parámetros precisión y exactitud se evalúan para poder verificar pipetas de vidrio y/o automáticas.

En este caso no se va a utilizar directamente ningún patrón de la magnitud que se desea medir en el proceso de calibración/verificación, sino que se va a pesar el volumen emitido por la pipeta y relacionar esta magnitud con la densidad a una temperatura determinada, para obtener el volumen exacto.

PALABRAS CLAVE. Verificación. Exactitud. Precisión. Pipeta.

1.- Introducción

La medición del volumen de un líquido es parte de la rutina diaria en cada laboratorio y por lo tanto el material volumétrico clásico, como matraces aforados, pipetas, probetas graduadas y buretas, es parte fundamental del equipo de los laboratorios. El material volumétrico cuantifica un volumen determinado mediante una escala impresa, o mediante mecanismos de dosificación. Para la construcción de dicho instrumental no existe un material universal que cumpla las exigencias para la manipulación de los distintos reactivos empleados en el laboratorio. Se utiliza plástico o vidrio, siendo este último el material más empleado. La elección se hace según la aplicación, el tipo de producto a manipular, así como las propiedades específicas de estos materiales y el aspecto económico.

El uso correcto del material volumétrico es esencial para las mediciones analíticas y dichos equipos deben ser adecuadamente mantenidos, verificados y cuando sea necesario, calibrados. En general, deberán verificarse las especificaciones de calidad del material volumétrico a su recepción.

Según la Norma IRAM 301 (ISO/IEC 17025), que establece los Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, los laboratorios deben establecer un programa que controle y demuestre que sus instrumentos de medida se encuentran calibrados/verificados. Además deben estar documentados los procedimientos de calibración/verificación y los

criterios de aceptación, así como informes que contengan datos de las calibraciones/verificaciones efectuadas.

El presente trabajo tiene como objetivo presentar el modelo de verificación de pipetas que se utiliza en el laboratorio para cumplir los requerimientos de dicha Norma.

2.- Pipetas

Las pipetas están diseñadas para trasvasar volúmenes conocidos de un recipiente a otro. Los tipos más comunes de pipetas son: las volumétricas (aforadas), las graduadas y las automáticas. Aquellas pipetas que se utilizan para la dispensación de volúmenes que pudieran afectar, directa o indirectamente, la calidad de los resultados generados en el laboratorio, deben estar calibradas/ verificadas.

2.1.- Pipetas graduadas de vidrio

Para la fabricación de pipetas graduadas se utiliza vidrio transparente, bien templado y con adecuadas propiedades térmicas y químicas que le confieren resistencia química y física. El vidrio debe estar libre de defectos visibles, que puedan influir en la apariencia y el uso de la pipeta. Los vidrios técnicos que se emplean usualmente son el vidrio de soda o el vidrio borosilicato los cuales se adaptan a las altas exigencias del laboratorio. Además son tratados de modo tal que se garantice que con las cargas térmicas el volumen permanezca constante. Es decir el material volumétrico de vidrio se puede calentar en la estufa de secado o de esterilización hasta 250°C, sin que haya que temer una variación de volumen.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que un calentamiento irregular o un cambio brusco de temperatura sobre el material de vidrio podría provocar tensiones térmicas que produzcan la rotura.

2.2.- Pipetas automáticas

Las exigencias cada vez más estrictas respecto a la calidad de los resultados de ensayos y el aumento de las muestras a analizar en los laboratorios requieren aparatos de medición con los cuales puedan realizar lo más eficientemente posible los trabajos de rutina en la preparación de las muestras.

Para atender a esta necesidad, los fabricantes de equipamiento de laboratorio han desarrollado las pipetas automáticas o semi-automáticas. Éstas son el perfeccionamiento de los aparatos volumétricos en vidrio y plástico y posibilitan un trabajo racional con un máximo de

precisión y confort de manejo.

Los aparatos de la mayoría de los fabricantes funcionan según un principio similar, utilizando el desplazamiento del aire producido por un pistón al accionar el botón para dosificar las pequeñas cantidades de líquido, sin que éste entre en contacto con la pipeta, sólo entrará en contacto con las puntas de plástico desechables.

Algunas de estas pipetas tienen acoplado un dispositivo que permite expulsar la punta. En el caso de que trabajemos con materiales que ataquen al plástico hay pipetas que tienen la punta de vidrio.

3.- Definiciones y siglas

Error aleatorio: es el resultado de una medición menos la media que resultará de un número infinito de mediciones del mismo mensurando realizadas bajo condiciones de repetibilidad. Su valor es igual al coeficiente de variación de un conjunto de resultados obtenidos al medir repetidamente un mensurando con un mismo procedimiento de medida. Se calcula como:

$$CV\% = \frac{s}{x} \times 100$$

Siendo s el valor de la desviación estándar y x el valor de la media.

Error máximo permitido: valor máximo permitido para la desviación del volumen dispensado a partir del volumen nominal o el volumen seleccionado de un aparato volumétrico.

Error sistemático: se calcula como la diferencia absoluta entre el valor medio de los volúmenes dispensados y el volumen nominal o volumen seleccionado de un aparato volumétrico accionado mediante pistón:

$$E5\% = \frac{Vm - Vn}{Vn} \times 100$$

Siendo Vm el valor medio medido y Vn el valor nominal o volumen seleccionado.

Error total: es el resultado de una medición menos el valor verdadero del mensurando. Es igual a la suma del error sistemático más el error aleatorio.

Volumen Nominal: máximo valor numerado en la escala de volumen que muestra la pipeta.

4.- Verificación

La verificación es la confirmación mediante la aportación de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos establecidos. El proceso de verificación proporciona un medio para comprobar si las desviaciones individuales obtenidas por un instrumento y los valores conocidos de una magnitud medida son menores que el máximo error definido en una norma, reglamento o especificación

particular. El resultado de las verificaciones proporciona la base para tomar una decisión, ya sea la de volver a poner el equipo en servicio, realizar ajustes, repararlo, ponerlo fuera de servicio o declararlo obsoleto.

Las pipetas que hayan sido sometidas a una sobrecarga o a un uso inadecuado, que den resultados dudosos, o se haya demostrado que son defectuosos o que están fuera de los límites especificados, como así también aquellas que sean nuevas, deben ser sometidas a verificación.

En el presente procedimiento se establecen como parámetros a ser evaluados en el proceso de verificación, la precisión y exactitud.

La precisión es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas. Depende sólo de la distribución de los errores aleatorios y no los relaciona al valor verdadero o especificado. La medida de precisión generalmente se expresa en términos de imprecisión y es calculada como una desviación estándar.

La exactitud es la proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el resultado del valor de referencia aceptado. Su valor depende de la distribución de los valores sistemáticos.

Los conceptos de precisión y exactitud son independientes entre sí, por lo cual se pueden presentar distintas situaciones al analizar los valores obtenidos en una medición. La situación ideal se ejemplifica en la Fig 1 en donde los valores obtenidos son exactos y precisos.

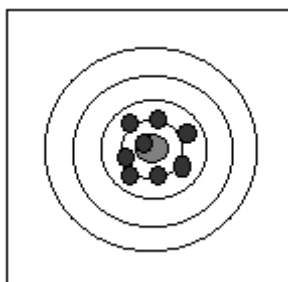


Fig 1: Datos con buena precisión y buena exactitud

En la Fig 2 se ilustran situaciones en las que estos parámetros se desvían de esta situación ideal, afectando la precisión, la exactitud o ambas.

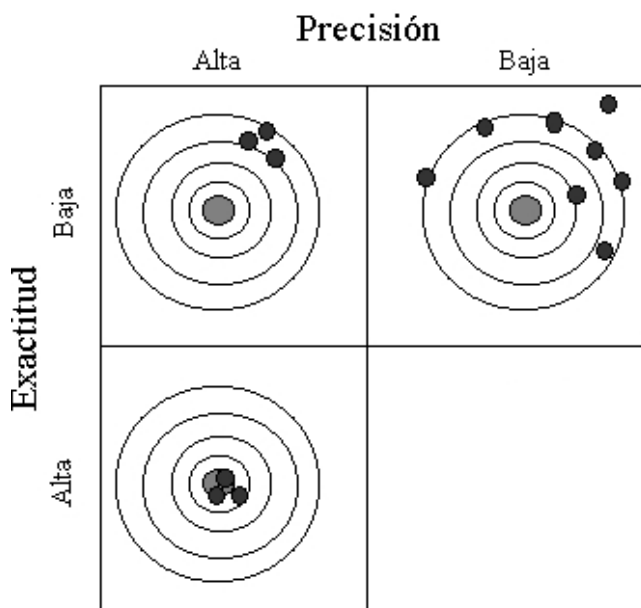


Fig 2: Conceptos gráficos de exactitud y precisión

El parámetro de precisión es reflejado a través del error aleatorio y el de exactitud por el error sistemático. La suma de estos representa el error total, que debe compararse con el error máximo permitido para poder concluir si la pipeta está o no en condiciones aptas para su uso.

5.- Desarrollo

La verificación de las pipetas se realiza comparando el volumen real de agua emitida, determinado por método gravimétrico a una dada temperatura, con el volumen nominal en el instrumento.

El proceso de verificación de las pipetas permite obtener evidencia objetiva de que, cuando se utiliza el instrumento para dispensar un volumen determinado, no se cometen errores inadmisibles, esto es, superiores el error máximo permitido.

Es posible que, en el caso de las pipetas de volumen variable, se obtengan resultados insatisfactorios en alguno de los puntos de verificación (por ejemplo en el volumen de valor más bajo). Sin embargo, la pipeta puede utilizarse restringiendo su intervalo de medida a aquellos volúmenes en los que la verificación ha sido aceptable.

5.1.- Requisitos generales

Para realizar la verificación se requiere: agua destilada, recipiente de pesada, boquilla, termómetro verificado y una balanza analítica calibrada.

El material a verificar deberá estabilizarse a una temperatura que deberá ser registrada y considerada al efectuar los cálculos y establecer los correspondientes factores de corrección.

Cada pipeta debe ser verificada al menos a un volumen, según el uso y los volúmenes utilizados frecuentemente.

Los cálculos de los volúmenes calculados se pueden

realizar de diferentes maneras, según los factores de corrección que se considere necesario incluir, lo que dependerá del uso que se le dé a la pipeta y los requerimientos particulares en cuanto a la precisión y exactitud de los métodos de ensayo en los que serán utilizadas.

Si las correcciones que introducen la densidad del aire y el coeficiente de dilatación del vidrio se consideran **no significativas** el cálculo que se utiliza es el siguiente:

$$\text{Volumen calculado} = \text{Peso del volumen de agua dispensado} / \text{densidad del agua (a la } T^{\circ} \text{ indicada)}$$

Si las correcciones que introducen la densidad del aire y el coeficiente de dilatación del vidrio se consideran **significativas**, se realiza el tratamiento analítico de los datos para obtener el volumen real del líquido emitido por la pipeta a 20 °C (temperatura estándar), de manera que el valor de estos parámetros sea constante y los volúmenes comparables, teniendo en cuenta la densidad del agua a la temperatura durante la medición.

El cálculo que se utiliza es el siguiente:

$$\text{Volumen calculado} = \text{volumen agua} \times (1 - \text{coef.dilat.vidrio} \times (\text{temperatura} - 20))$$

Para poder utilizar esta fórmula es necesario calcular además los siguientes parámetros:

$$\text{Masa corregida} = \text{masa agua} \times (1 - (\delta_{\text{aire}}/\delta_{\text{agua}}))$$

$$\text{Volumen calculado} = \text{masa corregida}/\delta_{\text{agua}}$$

5.2.- Verificación de pipetas automáticas

Para la verificación de pipetas automáticas se recomienda humectar cada nueva boquilla aspirando y expulsando líquido unas dos o tres veces. Este procedimiento se realiza para mejorar la precisión y exactitud de los resultados, compensando las propiedades del líquido, ya que los líquidos humectantes forman una fina película en la pared interior de la boquilla y como consecuencia se dispensaría un volumen inferior.

5.2.1.- Verificación para volúmenes de 1 -10 μL

- ✓ Llenar con agua destilada el recipiente de pesada.
- ✓ Pesar en balanza y registrar el peso.
- ✓ Ajustar el volumen que se quiere medir girando el anillo de ajuste en la pipeta.
- ✓ Aspirar el volumen con la pipeta automática y registrar el nuevo peso del recipiente con agua.
- ✓ Repetir no menos de diez veces.
- ✓ Calcular los volúmenes corregidos.
- ✓ Con los diez volúmenes corregidos calcular el error sistemático, error aleatorio en términos de porcentaje y el error total. Comparar estos errores con los límites definidos por el laboratorio.

5.2.2.- Verificación para volúmenes >10 -1000 µL

- ✓ Colocar un pequeño volumen de agua destilada en el recipiente de pesada.
- ✓ Pesar en balanza y registrar el peso.
- ✓ Ajustar el volumen que se quiere medir girando el anillo de ajuste en la pipeta.
- ✓ Aspirar el volumen con la pipeta automática de un segundo recipiente y dispensarlo en el recipiente de pesada. Registrar el nuevo peso.
- ✓ Repetir no menos de diez veces.
- ✓ Calcular los volúmenes corregidos.
- ✓ Con los diez volúmenes corregidos calcular el error sistemático, error aleatorio en términos de porcentaje y el error total. Comparar estos errores con los límites definidos por el laboratorio.

5.3.- Verificación de pipetas de vidrio

- ✓ Llenar la pipeta con agua destilada a temperatura ambiente. El menisco se enrasa de tal forma que el plano horizontal que pasa por el borde superior de la línea de graduación debe ser tangente al menisco en su punto más bajo, quedando la línea visual en el mismo plano. Eliminar con papel absorbente las gotas de agua que estén adheridas al exterior de la pipeta.
- ✓ Transferir el agua a un recipiente previamente tarado dentro de la balanza, procurando que la punta de la pipeta esté dentro del mismo para evitar pérdidas por salpicaduras.
- ✓ Registrar el peso de agua obtenida.
- ✓ Para aquellas pipetas que no sean de doble aforo, es posible elegir un volumen menor a su capacidad nominal para verificarlas, y de esta manera disminuir el error que puede ocasionar la eliminación de las últimas gotas al descargar la pipeta cuando se trabaja con la totalidad de su volumen.
- ✓ Repetir el procedimiento indicado no menos de diez veces.
- ✓ Con los diez volúmenes corregidos calcular el error sistemático, error aleatorio en términos de porcentaje y el error total. Comparar estos errores con los límites definidos por el laboratorio.

5.4.- Criterios de aceptación/rechazo

Para cada pipeta o dispensador del laboratorio deben establecerse las medidas que con dicho instrumento se efectúan y asignarle un error máximo permitido que dependerá del uso para la que fueron asignadas, los requerimientos particulares de los métodos de ensayo en los que serán utilizadas u otras especificaciones que establezcan un límite máximo de error en el volumen dispensado.

El error máximo permitido, definido por el laboratorio, se utilizará como criterio de aceptación/rechazo de las verificaciones que se realicen. Es decir, que el error total obtenido en la verificación deberá ser menor o igual que el error máximo permitido para que la pipeta se considere apta para su uso. En caso de no cumplir con alguno de los

requisitos especificados de aceptación/rechazo se evaluará si el instrumento requiere de ajuste y calibración o si deberá ser puesto fuera de servicio. En este último caso se debe aislar para evitar su uso o se debe rotular o marcar claramente que está fuera de servicio hasta que haya sido reparado y se haya demostrado que funciona correctamente.

6.- Bibliografía

-Norma IRAM 301 (equivalente a Norma ISO/IEC 17025) – *Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y de calibración.*

-*Información sobre la medición del volumen.* First class – Brand.

-*Manual de Instrucciones Eppendorf Reference.*

-*Instrucciones de Trabajo Estándar para Pipetas.* Eppendorf.

-*Standard graduated pipettes for verification officers.* International Organization of Legal Metrology.

-*Métodos Analíticos adecuados a su Propósito. Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Tópicos Relacionados.* Guía Eurachem. Centro Nacional de Metrología. CENAM- MÉXICO.