

COMPATIBILIDAD DE VOLÚMENES DOSIFICADOS CON MICROPIPETA POR PARTICIPANTES DEL CURSO DE METROLOGÍA DE MICROVOLÚMENES

Mauricio Javier Alberini
Área Metrología de INTI-Rafaela.
alberini@inti.gob.ar

1. OBJETIVO

Determinar el grado de compatibilidad, mediante el uso del error normalizado, de los volúmenes dosificados con una micropipeta por los participantes de la capacitación en Metrología de Microvolúmenes, y de esta forma evaluar la eficacia del curso, en la medida en que los participantes mejoren la manera de dosificar.

2. INTRODUCCIÓN

En el curso de "Metrología de Microvolumen", organizado por el INTI Rafaela en de noviembre de 2016. En dicho curso se abordó, entre otros temas, el correcto uso de instrumentos a pistón, como son las micropipetas, y donde participaron un total de 13 personas de distintas empresas de la zona. En este sentido, vale aclarar que cada persona tiene distintas formas de dosificar: ya sea por el ritmo de pipeteo, la habilidad con la micropipeta, la experiencia con el instrumento, o la falta de ella.

Este artículo se pretende determinar si los volúmenes dosificados por cada participante del curso, utilizando una misma micropipeta, resultan son compatibles entre sí al finalizar el curso.

Por este motivo, al comienzo del curso se solicitó a cada uno de los asistentes que realizara una serie de dosificaciones. Una vez finalizado el mismo se repitió la consigna (proceso de dosificación). De esta forma se pudo determinar el índice de compatibilidad de los participantes entre los valores dosificados al inicio y los valores dosificados al final. Del mismo modo, se pudo determinar el índice de compatibilidad de los participantes contra un valor de referencia.

3. METODOLOGÍA

Para poder llevar adelante la actividad se utilizaron los siguientes equipos:

Tabla 1: Equipos

Variable	Instrumento	Rango	Resolución
Volumen (V)	Micropipeta	(100 a 1 000) μL	1 μL
Masa (M)	Balanza	(0 a 210) g	0,1 mg
Temp. Aire (t_A) / Humedad Rel. (H)	Termo higrómetro	(-10 a 60) $^{\circ}\text{C}$ / (10 a 99) %	0,1 $^{\circ}\text{C}$ / 1 %
Temp. Agua (t_W)	Termómetro	(-10 a 100) $^{\circ}\text{C}$	0,1 $^{\circ}\text{C}$
Presión Atmosférica (P_{atm})	Barómetro	(920 a 1 050) hPa	0,5 hPa

Es importante aclarar que todos los instrumentos utilizados durante la capacitación se encuentran

calibrados y confirmados metrologicamente. Sus errores e incertidumbres se tuvieron en cuenta para el cálculo de la incertidumbre de dosificación. La balanza se verificó en el lugar donde se instaló y la micropipeta se calibró luego de la finalización del curso.

La metodología utilizada fue la siguiente:

- El volumen dosificado (V_D) se definió como el promedio de 5 (cinco) dosificaciones.
- La balanza se puso a "0" (cero) antes de cada dosificación.
- temperatura de referencia de 20 $^{\circ}\text{C}$.
- Cada participante dosificó al inicio (V_{Dinicial}) y al final del curso (V_{Dfinal}).
- Todos los participantes dosificaron con la misma micropipeta en 1 000 μL .
- Se registraron las condiciones ambientales (temperatura del aire, temperatura del agua, humedad relativa, presión atmosférica) y la indicación de la balanza.
- El error aleatorio (E_A) se definió como el desvío estándar de 5 dosificaciones.
- La conversión de la masa en volumen se realizó por el método gravimétrico.
- Cálculo de incertidumbre de medición.

Cada participante dosificó según su experiencia y conveniencia. En el transcurso de la jornada de capacitación, se presentaron los modos, recomendaciones y técnicas de dosificación. La mayoría de los participantes tenían experiencia en uso de micropipeta (industria láctea, control de calidad, etc.), 2 de los participantes nunca utilizaron micropipetas y solo 1 participante solo desarrolla actividades de calibración.

3.1 Método gravimétrico

Para convertir la masa en volumen se utilizó el método gravimétrico, mediante la siguiente ecuación:

$$V_{D20} = M \cdot Z \quad (1)$$

Donde:

$$M = (m_F - m_I - m_E).$$

m_F = lectura final en la balanza.

m_I = lectura inicial en la balanza.

m_E = lectura en la balanza de la evaporación durante la medición.

Para nuestro caso, siempre se utilizó en "0" la balanza antes de la dosificación. La masa evaporada no se tuvo en cuenta para la determinación de masa, pero sí para el cálculo de incertidumbre. Por lo tanto:

$$M = m_F$$

Z: Es el factor combinado para la corrección del empuje, la corrección por expansión térmica del instrumento y la conversión de masa a volumen. Para

la determinación del valor Z se le proporcionó una tabla a cada participante.

3.2 Incertidumbre

Para la estimación de la incertidumbre se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$u_{V20} = u_M + u_Z + u_{Evap} + u_{EA} + u_{TW} + u_{TA} + u_H + u_{Patm} + u_{Res} + u_{TAwp} + u_{H\ camara} + u_{tdisp} \quad (2)$$

u_{V20} : Incertidumbre de la dosificación.

u_M : Aporte por incertidumbre balanza.

u_Z : Aporte por el factor Z, se considera el 0,5 % de Z.

u_{Evap} : Aporte por evaporación.

u_{EA} : Aporte estadístico, se utilizó el valor máximo del error aleatorio tolerado para la micropipeta ($E_A = 3 \mu\text{L}$).

u_{TW} : Aporte por temperatura del agua.

u_{TA} : Aporte por temperatura del aire.

u_H : Aporte por humedad relativa.

u_{Patm} : Aporte por presión atmosférica.

u_{Res} : Aporte por la resolución de la micropipeta.

u_{TA-w-p} : Aporte el efecto en el volumen del colchón de aire de la pipeta debido a la diferencia de temperatura entre el agua, la pipeta y el aire.

$u_{H\ camara}$: Aporte el efecto en la humedad del aire exterior respecto de la humedad del aire en el colchón de aire de la pipeta.

$u_{tdispositivo}$: Aporte por temperatura del dispositivo. Se asume que la temperatura del dispositivo es igual a la temperatura del agua y su aporte de incertidumbre es el gradiente de temperatura entre el agua y el aire.

3.3 Error normalizado

Una manera de evaluar la compatibilidad de los valores de cada participante es mediante el uso del error normalizado con respecto a las incertidumbres de las mediciones. El cálculo del error normalizado es realizado por el uso de la siguiente ecuación:

$$E_n = \frac{|valor_x - valor_y|}{\sqrt{(u_{valor_x})^2 + (u_{valor_y})^2}} \quad (3)$$

Donde:

E_n : Error normalizado.

$valor_x$: Resultado de medición del participante x.

$valor_y$: Resultado de medición del participante y.

u_{valor_x} : Incertidumbre expandida del participante x.

u_{valor_y} : Incertidumbre expandida del participante y.

Si el valor del error normalizado (E_n) es menor o igual que 1, esto indica que ambos valores son compatibles.

En este artículo se exponen 2 casos para el cálculo del error normalizado, los mismos se describen a continuación:

1º caso:

Determinar el grado de compatibilidad entre cada participante respecto de los volúmenes dosificados al

inicio del curso ($V_{Dinicial-X}$ y $V_{Dinicial-Y}$) y los volúmenes dosificados al final del mismo ($V_{Dfinal-X}$ y $V_{Dfinal-Y}$).

2º caso:

Determinar el grado de compatibilidad del valor de referencia respecto de los volúmenes dosificados al inicio del curso (Val_{Ref} vs $V_{Dinicial-X}$) y los volúmenes dosificados al final del mismo (Val_{Ref} vs $V_{Dfinal-X}$).

3.4 Valor de referencia

Como valor de referencia se estableció el valor hallado en la última calibración de la micropipeta: 7 de diciembre de 2016. El valor es el siguiente:

$$Val_{Ref} = 0,998 \text{ mL } U_{95\%} = 0,004 \text{ mL}$$

4. RESULTADOS

A continuación se muestra los resultados hallados:

4.1 Volumen dosificado

En las siguientes tablas y gráficos se exponen los valores convertidos de masa a volumen mediante (1). Tanto para los volúmenes dosificados al inicio como al final, el factor Z fue el mismo con un valor de 1,002 8 mL / g .

Tabla 2: Condiciones ambientales al inicio.

	t_w / °C	t_a / °C	H / %	P_{atm} / hPa
Mínimo	22,7	24,4	58	1 000
Máximo	23,1	25,3	61	1 000
Promedio	22,9	24,9	59	1 000

Tabla 3: Condiciones ambientales al final.

	t_w / °C	t_a / °C	H / %	P_{atm} / hPa
Mínimo	24	25,3	46	1 002
Máximo	24,2	25,8	49	1 003
Promedio	24,1	25,5	48	1 002

Tabla 4: Volumen dosificado por cada participante (n)

n	Vol. Dosificado / mL		Error Aleatorio / mL		$U_{95\%}$ / mL	
	$V_{Dinicial}$	V_{Dfinal}	$E_{Ainicial}$	E_{Afinal}	$U_{inicial}$	U_{final}
1	0,981	0,995	0,027	0,003	0,007	0,007
2	0,994	0,994	0,002	0,003	0,007	0,007
3	0,988	0,997	0,011	0,004	0,007	0,007
4	0,999	0,996	0,007	0,002	0,007	0,007
5	1,002	0,994	0,005	0,002	0,007	0,007
6	0,996	0,998	0,002	0,002	0,007	0,007
7	0,995	0,998	0,002	0,004	0,007	0,007
8	0,992	0,998	0,005	0,002	0,007	0,007
9	0,991	0,998	0,002	0,003	0,007	0,007
10	0,993	1,000	0,001	0,002	0,007	0,007
11	0,995	1,003	0,001	0,001	0,007	0,007
12	0,994	0,993	0,001	0,001	0,007	0,007
13	0,997	0,996	0,001	0,000	0,007	0,007

Gráfico 1: Volumen dosificado (V_D) (círculos valores al inicio y cuadrados valores al final) sin incertidumbre.

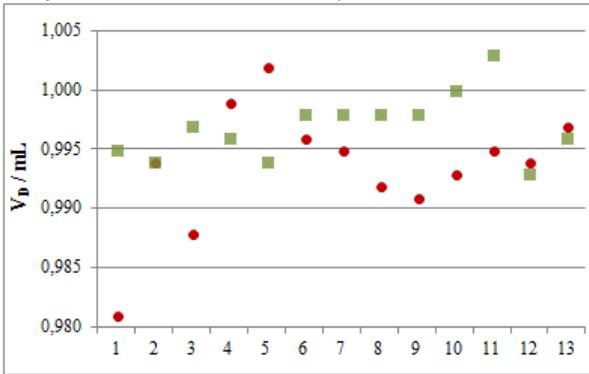


Gráfico 2: Volumen dosificado ($V_{D\text{inicial}}$) (círculos valores al inicio) con incertidumbre (barras verticales).

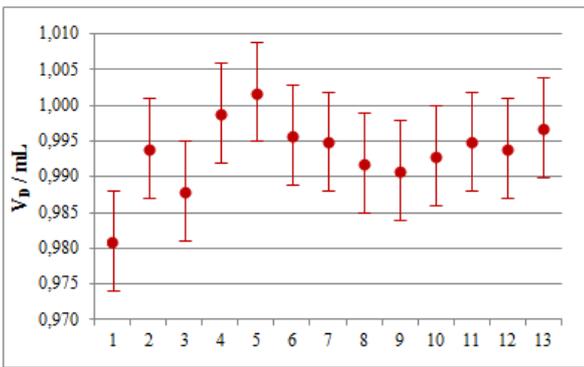


Gráfico 3: Volumen dosificado ($V_{D\text{final}}$) (cuadrados valores al final) con incertidumbre (barras verticales).

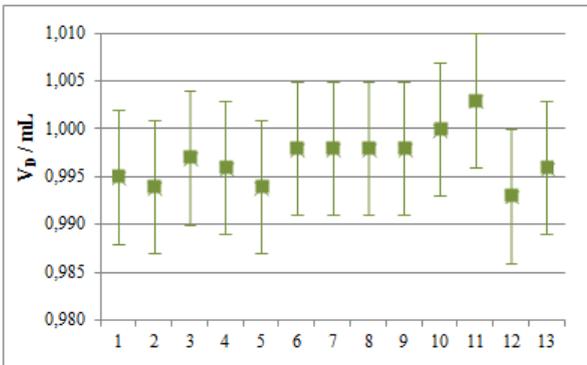
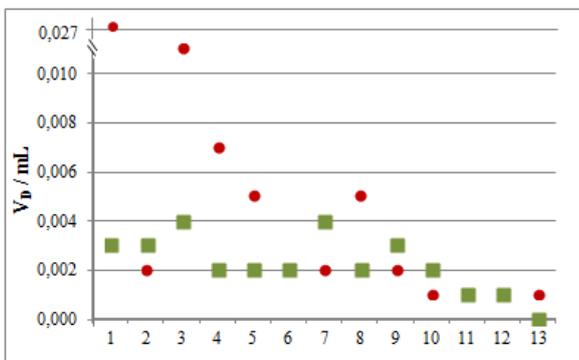


Gráfico 4: Error aleatorio (E_A) (Círculos error aleatorio al inicio en rojo y cuadrados error aleatorio al final).



4.2 Incertidumbre

El cálculo de incertidumbre de la dosificación se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5: Estimación de incertidumbre.

	$u(x_i)$	Distribución	$u(V_{D20}) / \text{mL}$	%
u_M	0,001 0 g	Normal, $k = 2$	0,000 5	2,1
u_Z	0,005 mL/g	Rectangular, $2a$	0,001 4	17,5
u_{Evap}	0,000 5 g	Rectangular, a	0,000 3	0,7
$u_{E A}$	0,003 mL	Normal, $k = 1$	0,003 0	75,0
u_{t_w}	0,7 °C	Normal, $k = 2$	0,000 1	0,1
u_{t_A}	1,5 °C	Normal, $k = 2$	$-3,0 \cdot 10^{-6}$	0,0
u_H	10 %	Normal, $k = 2$	$-1,0 \cdot 10^{-6}$	0,0
u_P	4,5 hPa	Normal, $k = 2$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	0,0
u_{res}	0,001 mL	Rectangular, $2a$	0,000 3	0,7
$u_{t_{\text{Awp}}}$	1 °C	Rectangular, $2a$	0,000 6	3,4
$u_{H \text{ cam}}$	10 %	Rectangular, $2a$	0,000 2	0,3
$u_{t_{\text{disp}}}$	2,5 °C	Rectangular, $2a$	-0,000 2	0,3
Incertidumbre combinada		u_c	0,003 5 mL	
Incertidumbre Expandida		$U_{95\%}$	0,007 mL	

4.3 Error normalizado

A continuación se presentan los errores normalizados para cada caso.

1º caso: Compatibilidad entre los participantes con sus valores al inicio y al final.

Tabla 6: Error normalizado (E_n) para el vol. dosificado inicial ($V_{D\text{inicial}}$).

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0,0	1,3	0,7	1,8	2,1	1,5	1,4	1,1	1,0	1,2	1,4	1,3	1,6
2	1,3	0,0	0,6	0,5	0,8	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,0	0,3
3	0,7	0,6	0,0	1,1	1,4	0,8	0,7	0,4	0,3	0,5	0,7	0,6	0,9
4	1,8	0,5	1,1	0,0	0,3	0,3	0,4	0,7	0,8	0,6	0,4	0,5	0,2
5	2,1	0,8	1,4	0,3	0,0	0,6	0,7	1,0	1,1	0,9	0,7	0,8	0,5
6	1,5	0,2	0,8	0,3	0,6	0,0	0,1	0,4	0,5	0,3	0,1	0,2	0,1
7	1,4	0,1	0,7	0,4	0,7	0,1	0,0	0,3	0,4	0,2	0,0	0,1	0,2
8	1,1	0,2	0,4	0,7	1,0	0,4	0,3	0,0	0,1	0,1	0,3	0,2	0,5
9	1,0	0,3	0,3	0,8	1,1	0,5	0,4	0,1	0,0	0,2	0,4	0,3	0,6
10	1,2	0,1	0,5	0,6	0,9	0,3	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1	0,4
11	1,4	0,1	0,7	0,4	0,7	0,1	0,0	0,3	0,4	0,2	0,0	0,1	0,2
12	1,3	0,0	0,6	0,5	0,8	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,0	0,3
13	1,6	0,3	0,9	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5	0,6	0,4	0,2	0,3	0,0

2º caso: Compatibilidad entre los participantes con sus valores al inicio y al final, respecto del valor de referencia.

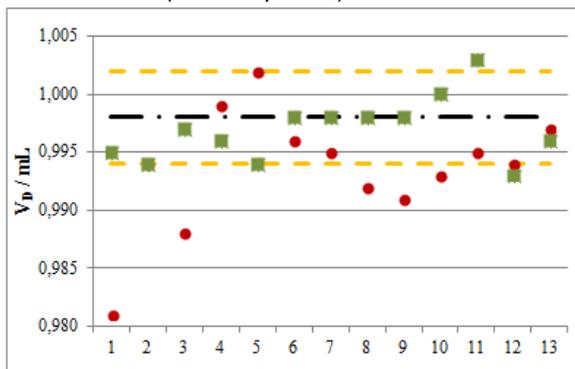
Tabla 7: Error normalizado (En) para el vol. dosificado final (V_{Dfinal}).

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,8	0,2	0,1
2	0,1	0,0	0,3	0,2	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,9	0,1	0,2
3	0,2	0,3	0,0	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,6	0,4	0,1
4	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,7	0,3	0,0
5	0,1	0,0	0,3	0,2	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,9	0,1	0,2
6	0,3	0,4	0,1	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,5	0,2
7	0,3	0,4	0,1	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,5	0,2
8	0,3	0,4	0,1	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,5	0,2
9	0,3	0,4	0,1	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,5	0,2
10	0,5	0,6	0,3	0,4	0,6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	0,3	0,7	0,4
11	0,8	0,9	0,6	0,7	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,0	1,0	0,7
12	0,2	0,1	0,4	0,3	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	1,0	0,0	0,3
13	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,7	0,3	0,0

Tabla 8: Error normalizado (En) entre volumen inicial ($V_{Dinicial}$) y el final (V_{Dfinal}) con respecto al valor de referencia (Val_{Ref}).

Participante	En	
	$V_{Dinicial}$ y Val_{Ref}	V_{DFinal} y Val_{Ref}
1	2,1	0,4
2	0,5	0,5
3	1,2	0,1
4	0,1	0,2
5	0,5	0,5
6	0,2	0,0
7	0,4	0,0
8	0,7	0,0
9	0,9	0,0
10	0,6	0,2
11	0,4	0,6
12	0,5	0,6
13	0,1	0,2

Gráfico 5: Volumen dosificado (círculos valores al inicio y cuadrados valores al final) sin incertidumbre. Valor de Referencia (en línea de trazo y punto). Valor de referencia con incertidumbre (línea de puntos).



5. CONCLUSIONES

Como se puede apreciar en la tabla 7, al finalizar la capacitación el error normalizado de todos los participantes resulta menor o igual 1, lo cual nos indica

que los resultados son compatibles entre sí. A diferencia de lo que se puede apreciar en la tabla 6 en donde parte de los valores son mayor a 1 y no resultan compatibles entre sí.

En la tabla 8 se aprecia que en los volúmenes dosificados al inicio, hay 2 valores que no resultan compatibles con el valor de referencia. Por otra parte, todos los volúmenes dosificados al finalizar el curso son compatibles con el valor de referencia.

En el gráfico 4 se observa que la mayoría de los participantes disminuyeron su error aleatorio, y todos los errores aleatorios resultan menores o iguales a 0,004 mL .

6. REFERENCIAS

- [1] ISO, "Piston-operated volumetric apparatus," ISO 8655, 2002.
- [2] JCGM, "Evaluation of measurement data - Guide to expression of uncertainty in measurement," JCGM 100, 2008.
- [3] JCGM, "International Vocabulary of Metrology — Basic and general concepts and associated terms," JCGM 200, 3rd ed., 2008.
- [4] N. Almeida, E. Batista, and E. Filipe, "Performance studies in micropipette calibration," in 16th International Congress of Metrology, p. 06010, EDP Sciences, 2013.
- [5] German Calibration Service (DKD), "Calibration of piston operated pipettes with air cushion," DKD-R 8-1, 2011.
- [6] M. Tanaka, G. Girard, R. Davis, A. Peuto and N. Bignell, Recommended table for the density of water between 0 °C and 40 °C based on recent experimental reports, Metrología, Vol. 38, 2001, 301-309.
- [7] ISO, "Determination of uncertainty for volume measurements made using the gravimetric method", ISO/TR 20461, 2000.
- [8] ISO, "Proficiency testing by interlaboratory Comparisons - Guidelines", ISO/IEC Guide 43-1,1997.