

Calibración y ajuste de sistemas de dispensación en el laboratorio

La calibración de pipetas y dispensadores implica que en determinadas condiciones ambientales la dispensación de un volumen conocido de agua debe tener un cierto peso. Para ser más precisos, hablamos de determinar la correlación entre el volumen dispensado y el volumen nominal o volumen seleccionado en un sistema de dispensación.

Departamento de Servicio Técnico de **Eppendorf**

La normativa más usada para la calibración de pipetas y dispensadores es el estándar DIN EN ISO 8655. Este estándar establece los máximos errores sistemáticos y aleatorios permitidos para los diferentes sistemas de manejo de líquidos. El límite de error que se especifica siempre se refiere al

sistema de dispensación y los accesorios implicados, como por ejemplo la punta de pipeta. La conformidad con los límites de error debe ser chequeada por el usuario que controla el proceso de inspección, mediciones y equipamiento al menos una vez al año, aunque se pueden establecer intervalos de inspección más cortos dependiendo del número de

usuarios de los sistemas o la agresividad del líquido con el que se trabaja.

Importancia de diferenciar entre error aleatorio y error sistemático

El error aleatorio, también conocido como imprecisión, es una medida de la variación de valores medidos individualmente. La imprecisión es muy pequeña cuando existe solo una mínima variación entre las medidas repetidas. Para conseguir una imprecisión despreciable, es necesario no solo que los equipos utilizados sean precisos, sino que también haya un procedimiento adecuado, limpieza y experiencia práctica.

El error sistemático también conocido como inexactitud, es una medida de la desviación entre el valor medido y el valor nominal. Una menor inexactitud se aprecia cuando la desviación entre el valor medido y el valor nominal es pequeña.

En la Figura 2 se muestra la distribución de los valores medidos en una serie de mediciones con diferentes errores sistemáticos y aleatorios.

La exactitud de un sistema de dispensación se puede

comprobar mediante un método gravimétrico, fotométrico o por titración.

Procedimiento gravimétrico

El requisito más importante para realizar un test gravimétrico es contar con una balanza analítica adecuada. El rango de medición debe corresponder con el volumen seleccionado del sistema de dispensación a examinar. Además, para minimizar las pérdidas por evaporación, especialmente para volúmenes por debajo de 50 μL , es necesario contar con un vaso de medida y una trampa anti-evaporación.

Durante el proceso de calibración gravimétrica se deben tener en cuenta, además, estas condiciones:

- La sala donde se realice el proceso debe estar libre de corrientes
- La humedad relativa debe estar por encima del 50% con una temperatura constante entre 15 y 30°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$)
- Previamente el sistema de dispensación y accesorios, así como el líquido, deben haber permanecido en la misma sala al menos durante dos horas para que haya

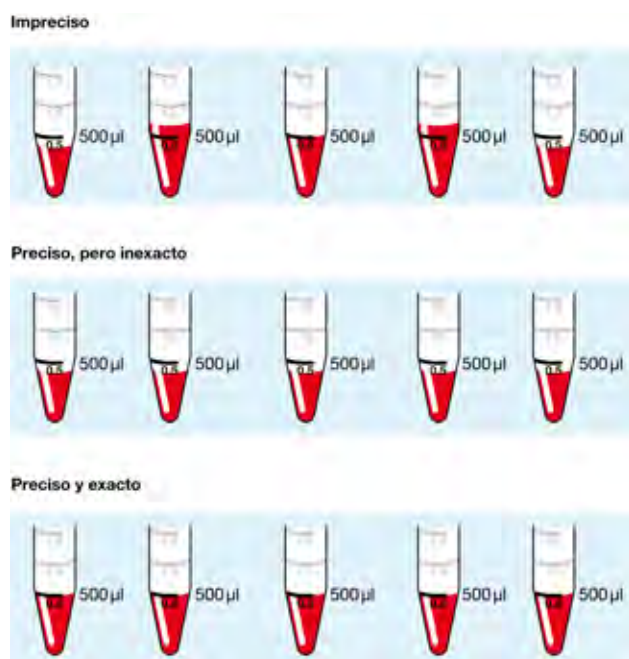


Figura 1. Representación simple de error sistemático (inexactitud) y error aleatorio (imprecisión) para un valor nominal de 500 μL .

equilibrio con las condiciones de la sala

- Los ciclos de medida deben ser uniformes: es importante que el tiempo de medida sea idéntico entre ciclo y ciclo para compensar los posibles efectos por la evaporación
- El líquido para realizar el test debe ser agua destilada y desgasificada, o libre de iones
- En el caso de pipetas de volumen variable se deben testar tres volúmenes: volumen nominal (máximo volumen que puede alcanzar el sistema), el 50% del volumen nominal y el 10% del volumen nominal (volumen mínimo que puede alcanzar el sistema).

Normalmente se realizan 10 medidas por cada volumen, pero el usuario puede alterar este número dependiendo de sus necesidades. En el caso de pipetas multicanal el proceso se debe repetir en cada uno de los canales, por tanto si se realizan 10 mediciones para cada uno de los 3 volúmenes, el usuario deberá realizar 30 mediciones en cada uno de los canales, en el caso de una pipeta de 8 canales hablaríamos de 240 medidas.

Una vez que se tienen en cuenta todos los factores que debe tener la sala, los instrumentos de medida y los dispositivos a testar, se debe seguir un procedimiento establecido de medida donde por ejemplo es importante que haya un control continuo de la temperatura, la presión del aire y la humedad de la sala. Se deben usar puntas de pipeta adecuadas, preferiblemente del mismo fabricante que la pipeta. En el caso de no usar las puntas y pipetas del mismo fabricante, las pipetas deben ser calibradas cada vez que se cambie de fabricante de punta o de lote. La punta se debe pre-humectar y se debe realizar un pipeteo directo. Además, es importante la posición de la mano, la velocidad y la inmersión de la punta en el líquido.

Tipo de error predominante	a y b	a	b	—
a) error aleatorio				
b) error sistemático				
Desviación aleatoria de la medida	malo	malo	muy bueno	bueno
Desviación sistemática de la medida	malo	bueno	malo	bueno

Figura 2



Figura 3.

Tras las medidas se pasa al análisis estadístico de los resultados, donde se realizará el cálculo del error aleatorio y el error sistemático.

Los laboratorios que trabajan en áreas de diagnóstico e investigación son extremadamente exigentes con la precisión y exactitud de sus sistemas de dispensación. Las indicaciones de las normas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) establecen un control regular de los lími-

tes de error. Las pipetas y otros sistemas de dispensación se pueden usar sin unas reglas de mantenimiento y control fijas, pero se pueden producir fugas que si son detectadas a tiempo afectarán menos a nuestros procesos en el laboratorio.

Ajuste de las pipetas con cámara de aire

El reajuste de la pipeta debe ser siempre la última posibilidad. A menudo un volumen que es

demasiado bajo en comparación al volumen que queremos dispensar es un signo inequívoco de fugas en el sistema. Antes de llegar, por tanto, a la conclusión de que una pipeta necesita ser reajustada, es importante estar seguros de que no hay fugas. Para ello podemos realizar un sencillo test de fugas con nuestra pipeta, que siempre se debe realizar a 20-25 °C, con una humedad relativa superior al 50% y con todos

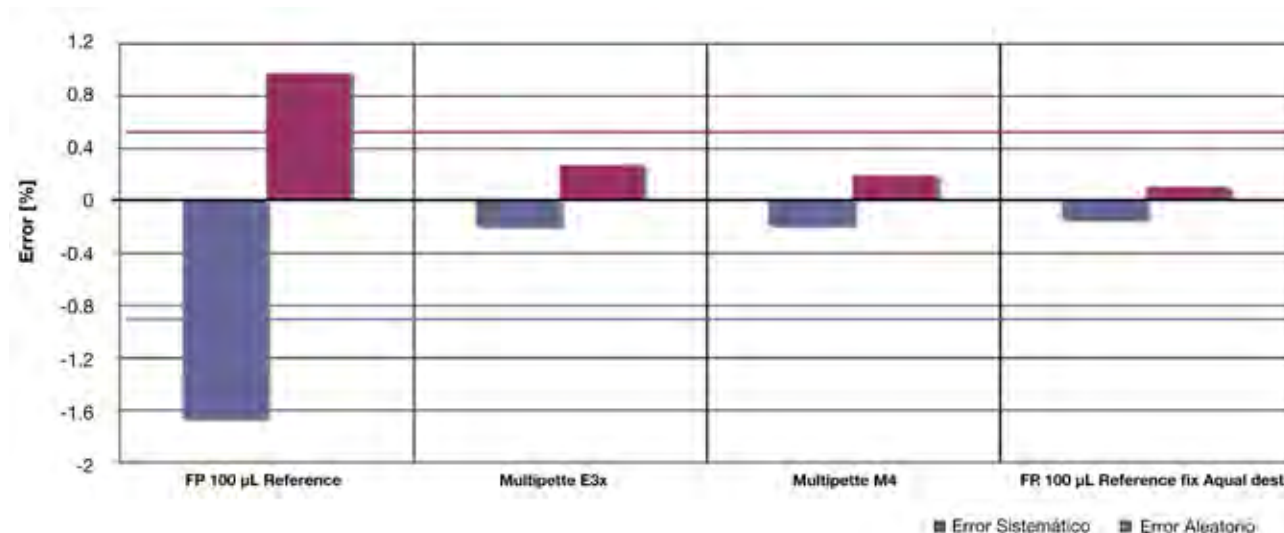


Figura 4.

los componentes implicados (pipeta, punta y líquido) a la misma temperatura (Fig. 3).

En el caso de que haya desviaciones positivas o negativas sin presencia de fugas, se deben chequear todas las condiciones de medida y tener en cuenta los siguientes factores:

- Puntas utilizadas y ajuste en la pipeta
- Temperatura del líquido
- Temperatura de la pipeta
- Temperatura del aire
- Correcta conversión de mg a µL

Solo cuando se hayan comprobado todos estos factores podemos concluir que la pipeta necesita ser reajustada.

Para reajustar una pipeta, se debe usar la punta adecuada y esta debe tener la misma temperatura que el líquido (entre 15 y 30° C ±0,5 °C). El ajuste se debe realizar de acuerdo a las instrucciones del fabricante con las herramientas proporcionadas, tras el ajuste del valor de la pipeta mostrado en el *display* se debe establecer en el valor nominal, si el valor nominal no se corresponde con el resultado de las medidas, se tiene que repetir el proceso de nuevo. Cualquier ajuste realizado en una pipeta afecta a todo el rango de medida,

Para mayor tranquilidad en el laboratorio se deben seguir las recomendaciones de la DIN ISO 8655 en cuanto al proceso de test y calibración de pipetas

por ello todos los volúmenes especificados en las especificaciones técnicas se deben testar (normalmente el 10%, el 50% y el 100% del volumen nominal).

Las pipetas que se hayan reajustado deben ser identificadas de forma visible de acuerdo a la norma DIN EN ISO 8655.

También es posible reajustar las pipetas con cámara de aire para trabajar con un volumen específico para un líquido determinado que tenga por ejemplo una densidad diferente a la del agua. En este caso el resto del rango de volumen queda inservible, y el sistema ya se encuentra solo ajustado para un volumen determinado

convirtiendo a una pipeta de volumen variable en una pipeta de volumen fijo.

Cuando se trabaja con otro tipo de líquidos, como por ejemplo líquidos con alta presión de vapor (disolventes orgánicos), los errores de pipeteo no se pueden compensar con un reajuste de la pipeta. En ese caso, el uso de sistemas de desplazamiento positivo es lo más recomendable.

En el caso de trabajar con líquidos altamente viscosos, también es recomendable el uso de sistemas de desplazamiento positivo en lugar de pipetas con cámara de aire.

Cuando se usa una pipeta con cámara de aire para dispensar líquidos con alta viscosidad o alta presión de vapor, se producen considerables errores en la dispensación, aunque la pipeta esté perfectamente ajustada y calibrada o que usemos técnicas de pipeteo específicas como la baja velocidad o el pipeteo reverso. En contraste, cuando se usa un sistema de desplazamiento directo, la ausencia de cámara de aire y el pistón integrado en la punta permiten una dispensación precisa, así como previenen la retención de líquido en el interior de la punta.

Para demostrar la conveniencia de los sistemas de desplazamiento positivo o directo frente a las pipetas tradicionales en el trabajo con líquidos complicados, se procedió a realizar diversas dispensaciones de glicerol y agua con la pipeta manual Eppendorf Reference y con los dispensadores de desplazamiento positivo Multipipette 4 y Multipipette E₃x (versión electrónica). Los resultados se muestran en la Figura 4.

En definitiva, a la hora de realizar series de pipeteo, es importante estar seguros de que el sistema de dispensación de su elección es el adecuado, teniendo en cuenta las características físico-químicas del líquido. Para mayor tranquilidad en el laboratorio se deben seguir las recomendaciones de la DIN ISO 8655 en cuanto al proceso de test y calibración de pipetas. Por último, antes de realizar cualquier reajuste de la cámara del pistón, es esencial estar seguros de que el problema de dispensación requiere de un reajuste y no viene motivado por otras causas, como uso de puntas que no encajan, fugas, diferencias de temperatura o mala elección del sistema de dispensación ◀◀