

Henning Wolf

Volumenbestimmung im Mikroliterbereich



ISSN 1434-2391
ISBN 978-89701-662-1

Physikalisch-Technische Bundesanstalt

Thermodynamik und Explosionsschutz

PTB-ThEx-16

Braunschweig, Februar 2001

Henning Wolf

Volumenbestimmung im Mikroliterbereich

Abschlussbericht zum Projekt

Herausgeber:

Physikalisch-Technische Bundesanstalt

ISNI: 0000 0001 2186 1887

Presse und Öffentlichkeitsarbeit

Bundesallee 100

38116 Braunschweig

Telefon: (05 31) 592-93 21

Telefax: (05 31) 592-92 92

www.ptb.de



Volumendosiergeräte zur Dosierung von Flüssigkeiten im Mikroliterbereich

Danksagung

Das Projekt „Volumenbestimmung im Mikroliterbereich“ wurde von Dr. G. Schumann, Institut für Klinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover, Prof. Dr. L. Siekmann, Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn, A. Kessler, Institut für Klinische Biochemie der Universität Bonn, und R. Klauke, Institut für Klinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover, durch Diskussionen und wertvolle Anregungen gefördert sowie durch die Bereitstellung von Humanseren und Kontrollmaterial unterstützt. Besonders hervorzuheben ist der Einsatz von Herrn Klauke, der den größten Teil der Serumproben zusammengestellt und deren analytische Werte ermittelt hat.

Allen Genannten möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Die für die Untersuchungen verwendeten Dosiergeräte wurden von den Firmen

Abimed, Langenberg,
Brand GmbH + Co, Wertheim,
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt,
Hamilton Deutschland GmbH, Darmstadt,
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, und
ILS Innovative Labor Systeme, Stützerbach

zur Verfügung gestellt. Auch diesen Firmen gilt mein Dank für ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Stand der Forschung und Normung	7
2.1	Veröffentlichte Untersuchungen	7
2.2	Stand der Normung	8
3	Zielstellung für die Untersuchung.....	9
3.1	Praktische Durchführung	9
3.2	Auswahl der Flüssigkeiten	12
4	Gravimetrische Messapparatur	14
4.1	Theoretische Grundlagen	14
4.2	Beschreibung der gravimetrischen Apparatur.....	16
4.3	Beschreibung des Dosiervorganges	19
4.4	Auswertung der Messkurven	20
5	Grundlegende Untersuchungen zur Verdunstung	23
5.1	Verdunstung aus Wägegefäßen.....	23
5.2	Einfluss der Verdunstung auf die Temperatur der Vorratsflüssigkeit und des Dosiengerätes.....	28
5.3	Änderung der Luftdichte durch verdunstende Flüssigkeit.....	34
6	Messunsicherheitsbudget für die Messung eines Flüssigkeitsvolumens mit der gravimetrischen Messapparatur	38
7	Vergleich der Dosierung von Wasser, Ethanol und Nonan	45
8	Vergleich der Dosierung von Wasser und Humanserum.....	60
9	Möglichkeiten des Ersatzes von Wasser als Kalibrierflüssigkeit	69
9.1	Stabilität von Serum.....	70
9.2	Kontrollmaterial als Ersatzflüssigkeit für Serum.....	73
10	Die Dichte von Humanserum.....	78
10.1	Serumdichte bei 20 °C	78
10.2	Temperaturabhängigkeit der Serumdichte	86
11	Reproduzierbarkeit von Dosierergebnissen	89
12	Alternative Methode zur Volumenbestimmung: Photometrie	96
12.1	Physikalische Grundlagen der Photometrie	96
12.2	Erstellung der Farbstofflösungen zur Kalibrierung von Volumendosiergeräten	99
12.3	Photometrische Kalibrierung zweier Pipetten.....	102
12.4	Vor- und Nachteile der photometrischen Kalibrierung von Volumendosiergeräten	108
13	Zusammenfassung.....	110
	Verzeichnis der Abbildungen.....	114
	Literatur.....	119
	Anhang 1	121

Liste der verwendeten Symbole

Symbol	Größe
A	Absorbanz einer Farbstofflösung
c	Konzentration einer Farbstofflösung
d	Dicke der Flüssigkeitsschicht
I_a	Intensität der austretenden Strahlung
I_e	Intensität der einfallenden Strahlung
k	Extinktionskoeffizient einer Farbstofflösung
k	Erweiterungsfaktor bei Unsicherheitsangaben
k_B	Boltzmannkonstante
k_c	molarer Extinktionskoeffizient
K_E	Eiweißkonzentration
K_S	Kochsalzkonzentration
m	Masse
M_i	Masse eines Teilchens der Art i
N	Zahl der Teilchen (Gasmoleküle)
N_i	Anzahl der Teilchen der Art i
p	Druck
p_i	Partialdruck der Gasart i
p_L	Luftdruck
T	absolute Temperatur
t	Temperatur in °C
t_L	Lufttemperatur in °C
U	erweiterte Messunsicherheit
u	Messunsicherheitsbeitrag
V	Volumen
W	Wägewert
$\Delta\rho_{\text{Eiweiß}}$	Dichteanteil an der Serumdichte
$\Delta\rho_{\text{NaCl}}$	Dichteanteil an der Serumdichte
$\Delta\rho_{\text{Rest}}$	Dichteanteil an der Serumdichte
φ	relative Luftfeuchte
ρ	Dichte
$\rho_{\text{Bestandteile}}$	Dichteanteil an der Serumdichte
ρ_G	Dichte der Gewichtstücke
ρ_L	Dichte der Luft
ρ_{Serum}	Serumdichte
ρ_{Wasser}	Wasserdichte

1 Einleitung

Eine der wichtigsten Fertigkeiten, die der Chemiker beherrschen muss, ist die Dosierung von Flüssigkeiten. Dabei ist vor allem die Fähigkeit zur genauen Abmessung von Flüssigkeiten, d.h. die Bestimmung der Menge, des Volumens oder der Masse, unerlässlich.

In der chemischen Analytik, z.B. bei chromatographischen Untersuchungen, arbeitet man heute überwiegend mit Flüssigkeitsvolumen im Mikroliterbereich. Solche kleinen Volumen können routinemäßig in diskreten Verfahren mit Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen dosiert werden. Besonders Kolbenhubpipetten sind seit ihrer Einführung im Jahr 1958 in zunehmendem Maße wegen ihrer einfachen Bedienung zur Dosierung von Flüssigkeiten vor allem im Volumenbereich 1 μl bis 1000 μl etabliert.

Bei allen Kolbenhubdosiergeräten wird das abzumessende Flüssigkeitsvolumen zunächst durch das geometrische Volumen des Kolbenhubes bestimmt. Wegen der Wechselwirkung der Flüssigkeit mit dem Gerät und mit der Umgebung des Gerätes sind jedoch Korrekturen an dieser rein geometrischen Betrachtungsweise erforderlich, die umso bedeutender werden, je kleiner das abgemessene Volumen ist. Physikalische Materialparameter, die diese Wechselwirkung beeinflussen, sind thermische Ausdehnung, Dampfdruck, Dichte, Viskosität, Grenz- und Oberflächenspannung. Werden verschiedene Flüssigkeiten dosiert, so können deren unterschiedliche Parameter zu Differenzen im dosierten Volumen und auch in der beizuordnenden Unsicherheit führen. Eine Kalibrierung der Dosiergeräte mit einer bestimmten Flüssigkeit ist darum nicht ohne weiteres für die Dosierung anderer Flüssigkeiten anwendbar.

Für die Akkreditierung von Referenz- und Kalibrierlaboratorien ist die rückgeführte Kalibrierung der verwendeten Messgeräte eine der wichtigsten Anforderungen. Die Frage, ob mit einer Flüssigkeit durchgeführte Kalibrierungen auf die Dosierung anderer Flüssigkeiten übertragbar ist, veranlasste den Beirat für Medizinische Messtechnik an der PTB, der PTB die Einrichtung eines Projekts zur Untersuchung der Rückführbarkeit von Volumenbestimmungen im Mikroliterbereich zu empfehlen [1]. In der Empfehlung wurde besonderes Gewicht auf die Untersuchung der Dosierung von Humanserum gelegt. Humanserum ist die wichtigste zu analysierende Flüssigkeit in der medizinischen Analytik und damit wohl in der Analytik eine der meistdosierten Flüssigkeiten überhaupt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Frage, ob eine Übertragbarkeit der Dosierergebnisse, die mit Wasser erzielt werden, auf andere Flüssigkeiten möglich ist. Besonderer Schwerpunkt ist dabei die Dosierung von Humanserum.

2 Stand der Forschung und Normung

2.1 Veröffentlichte Untersuchungen

Obwohl Kolbenhubpipetten seit mehr als 40 Jahren in zunehmendem Maße zur Dosierung von Flüssigkeiten vor allem im Volumenbereich 1 μl bis 1000 μl eingesetzt werden, wurden bisher nur sehr wenige Untersuchungen über diese Geräte durch unabhängige Institute veröffentlicht. Bis auf die in der Publikation von Lochner et al. (s.u.) behandelte Fragestellung des Einflusses verschiedener Flüssigkeiten auf das Luftpolster von Luftpolsterpipetten befassten sich alle veröffentlichten Untersuchungen mit Wasser als Dosierflüssigkeit. Systematische Untersuchungen zum Dosierverhalten von Kolbenhubpipetten oder Mikroliterspritzen bei der Dosierung unterschiedlicher Flüssigkeiten wurden bisher nicht publiziert.

1978 veröffentlichten R. Belac, W. Gögge, H. Groß und W. Ludwig [2] eine Arbeit, in der u.a. wichtige Hinweise zur richtigen Bedienung einer Kolbenhubpipette gegeben wurden. Als Prüfflüssigkeit wurde Wasser verwendet, die Kolbenhuppipetten waren handelsübliche Geräte. Die Arbeit diente als Grundlage für die Normen DIN 12650-2 und DIN 12650-6.

1983 veröffentlichte S. Mieke [3] einen Vorschlag zur rechnerunterstützten gravimetrischen Pipettenkalibrierung. Das Verfahren ist besonders geeignet, die bei der gravimetrischen Kalibrierung kleiner Dosiervolumen problematische Verdunstung von Flüssigkeit während der Wägung rechnerisch zu erfassen. Dadurch wird eine Kalibrierung von Volumen im Bereich 1 μl bis 10 μl mit kleiner Unsicherheit möglich. Mieke erprobte dieses Verfahren an handelsüblichen Kolbenhubpipetten mit Wasser als Prüfflüssigkeit.

Das gravimetrische Messverfahren ist ebenfalls Gegenstand einer Untersuchung von F. Michel, K. Sommer und F. Spieweck [4]. Die Arbeit ist 1995 erschienen. In ihr wird eine Messapparatur zur Messung kleiner Flüssigkeitsvolumen mit sehr geringer Messunsicherheit beschrieben. Die Verringerung der Flüssigkeitsverdunstung durch den Einsatz einer sogenannten Verdunstungsfalle zur Erhöhung der Luftfeuchte im Wägeraum wird beschrieben. Die Leistungsfähigkeit dieser Apparatur wird mit Messungen zum Einfluss des Abstreifens und der Gerätetemperatur bei Dosiervolumen kleiner als 50 μl demonstriert. Untersucht wurden Kolbenhubpipetten mit und ohne Luftpolster mit Wasser als Prüfflüssigkeit. Auf der Basis der

beschriebenen Apparatur [4] wurde die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete gravimetrische Messapparatur zur Messung kleiner Flüssigkeitsvolumen bei unterschiedlichen Flüssigkeiten aufgebaut.

Eine Untersuchung, in der neben Wasser auch andere Flüssigkeiten betrachtet wurden, haben 1996 K.H. Lochner, T. Ballweg und H.-H. Fahrenkrog publiziert [5]. In dieser Arbeit wurde die Messgenauigkeit von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster untersucht. Schwerpunkt war die Wechselwirkung der Dosierflüssigkeit mit dem Luftpolster der Pipette. Für die Untersuchungen wurde eigens eine Modellpipette konstruiert, an der der Einfluss zahlreicher Parameter wie Neigungswinkel, Art der Vorbefeuchtung des Luftpolsters, Luftdruck und Temperatur experimentell untersucht und mit theoretischen Betrachtungen verglichen wurde. Auch Beeinflussungen des Luftpolsters und daraus resultierende Abweichungen im dosierten Volumen, die sich bei Verwendung von verschiedenen Flüssigkeiten aufgrund der Unterschiede in der Dichte und im Dampfdruck der Flüssigkeiten ergeben, wurden quantitativ angegeben. Als Beispiel wurden Werte für Methanol (großer Dampfdruck) und Schwefelsäure (große Dichte) genannt.

2.2 Stand der Normung

Die Kolbenhubpipetten werden innerhalb der ISO-Normenreihe 8655 (Teil 2) [6] standardisiert (diese Norm ersetzt die auslaufende deutsche Norm: DIN 12650 Teil 2 [7]), für Mikroliterspritzen gibt es derzeit keine Norm. In der Normenreihe 8655 wird eine Kalibrierung der Dosiergeräte durch das gravimetrische Prüfverfahren (Teil 6 der Norm ISO 8655 [8]) oder das photometrische Prüfverfahren (Teil 7 der Norm ISO 8655 [9]) vorgeschrieben. Die entsprechenden auslaufenden deutschen Normen sind DIN 12650 Teil 6 [10] und DIN 12650 Teil 7 [11]. Die ISO-Normenreihe 8655 wird voraussichtlich 2001 verabschiedet werden und als deutsche Norm DIN EN ISO 8655 übernommen.

Als Prüfliquid für das gravimetrische Prüfverfahren ist in der Norm ISO 8655 Teil 6 hochreines Wasser vorgeschrieben. Auf die Dosierung anderer Flüssigkeiten wird nicht eingegangen.

3 Zielstellung für die Untersuchung

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Untersuchung lautet: *„Ist eine Kalibrierung, die Wasser als Kalibrierflüssigkeit verwendet, auf die Dosierung anderer Flüssigkeiten übertragbar?“*

Um eine Antwort auf diese Frage geben zu können, wurden folgende Ziele für eine Untersuchung formuliert:

- Aufbau einer gravimetrischen Normalmessapparatur zur Kalibrierung von Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen im Mikroliterbereich
- Ermittlung und quantitative Beschreibung von Effekten, die die gravimetrische Volumenbestimmung von verschiedenen Flüssigkeiten beeinflussen
- Messung der Differenzen im dosierten Volumen bei der Dosierung verschiedener Flüssigkeiten mit dem Schwerpunkt auf dem Vergleich der Dosierung von Wasser und Humanserum und Ermittlung der physikalischen Effekte, die diese Differenzen bewirken
- Entwicklung von Methoden, die zur Kalibrierung von Dosiergeräten eingesetzt werden können, die für die Dosierung von Humanserum benutzt werden

3.1 Praktische Durchführung

- **Zu untersuchender Volumenbereich: 0,2 µl bis 50 µl**

Die kleinsten mit manuell bedienbaren Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen dosierten Volumen betragen 0,2 µl, in Einzelfällen auch 0,1 µl. 0,2 µl ist deshalb die untere Grenze für den zu untersuchenden Volumenbereich. Es ist zu erwarten, dass physikalische Wechselwirkungen zwischen Flüssigkeit und Gerät mit abnehmendem Volumen stärker sichtbar werden, deshalb ist die Volumenvariation von 50 µl hin zu kleineren Volumen aufschlussreich.

- **Zu untersuchende Volumendosiergeräte: Handelsübliche Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen unterschiedlicher Bauart**

Die Untersuchung soll ein breites Spektrum unterschiedlicher Geräte abdecken, um Aussagen treffen zu können, ob Bauart oder Gerätematerial einen Einfluss auf die Dosierung haben. Um den Messaufwand zu begrenzen, wird von jedem Gerät nur jeweils ein Exemplar untersucht.

- **Bedienung der Dosiergeräte: praxisnahe manuelle Bedienung**

Alle untersuchten Geräte sind manuell zu bedienende Geräte. Bei den Untersuchungen werden sie deshalb auch manuell bedient, um möglichst praxisnah zu sein. Der Nachteil, dass u.U. sehr geringe Unterschiede im Dosierverhalten durch die unzureichende Reproduzierbarkeit bei der manuellen Bedienung der Geräte verdeckt werden, wird in Kauf genommen.

- **Aufbau einer gravimetrischen Messapparatur zur Bestimmung kleiner Flüssigkeitsvolumen**

Als primäre Messmethode wird die gravimetrische Methode ausgewählt. Sie ist die „klassische“ Methode zur Bestimmung kleiner Flüssigkeitsvolumen. Bei dieser Methode wird die Masse des Flüssigkeitsvolumens gravimetrisch bestimmt und mittels der Dichte in Volumen umgerechnet. Die Größe Volumen wird damit auf die Größe Masse zurückgeführt. Die Apparatur soll so konzipiert werden, dass sie als Normalmessapparatur für Volumen im Mikroliterbereich dienen kann.

- **Prüfung der photometrischen Methode auf ihre Eignung zur Volumenmessung**

Eine ebenfalls häufig angewendete Methode zur Volumenbestimmung basiert auf der photometrischen Messung der Absorption von Licht in einer Farbstofflösung. Eine Farbstofflösung mit bekannter Farbstoffkonzentration wird in eine Basisflüssigkeit bekannten Volumens und bekannter Absorption hineindosiert. Aus der nach der Dosierung gemessenen Absorption kann die Farbstoffkonzentration des Gemisches und daraus das Volumen der zudosierten Farbstofflösung bestimmt werden. Diese Methode soll mit der gravimetrischen Methode verglichen werden.

- **Grundlegende Untersuchungen zur Charakterisierung der gravimetrischen Methode**

Hierunter fallen besonders Untersuchungen zum Einfluss der Verdunstung von Flüssigkeit während der Messung, Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und die Erstellung eines Messunsicherheitsbudgets für die gravimetrische Messung.

- **Untersuchungen zur Dosierung von unterschiedlichen Flüssigkeiten**

Zunächst sollen Messungen an einfachen, physikalisch gut bekannten Flüssigkeiten erfolgen. Diese Messungen sollen zeigen, ob es Unterschiede im dosierten Volumen gibt. Die Auswahl dieser Flüssigkeiten ist in Kapitel 3.2 ausführlich begründet.

- **Untersuchungen zur Dosierung von Humanserum**

Nach den Untersuchungen an „einfachen“ Flüssigkeiten soll Humanserum untersucht werden. Eine einfache physikalische Beschreibung durch die Angabe von Dichte, Viskosität und Oberflächenspannung ist für die Charakterisierung von Humanserum mit Blick auf die Dosierbarkeit nicht ausreichend, denn Humanserum ist als „biologische Flüssigkeit“ sehr komplex. Sie besteht zu mehr als 90 % aus Wasser, darin gelöst sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Komponenten. Die Zusammensetzung kann bei verschiedenen Menschen schwanken, bei Serum von kranken Menschen können die Abweichungen von „Normalwerten“ sehr groß werden. Dementsprechend können auch die physikalischen Stoffparameter von verschiedenen Humanseren unterschiedlich sein. Hinzu kommen Veränderungen in der Flüssigkeit, die während der Lagerung durch biochemische Reaktionen hervorgerufen werden können.

- **Ersatzflüssigkeit, die die Dosierbarkeit von Humanserum modelliert**

Die mangelhafte Stabilität von Humanserum erschwert das Sammeln größerer Mengen der Flüssigkeit und den Transport in ein anderes Labor zur rückgeführten Dichtebestimmung. Dies erschwert den Einsatz von Humanserum selbst als Kalibrierflüssigkeit.

Falls die mit Wasser gewonnenen Kalibrierergebnisse nicht auf Humanserum übertragbar sind, soll deshalb eine andere Flüssigkeit gesucht werden, die das Dosierverhalten von Serum gut modelliert und mit der dann die Kalibrierung der

Dosiergeräte vorgenommen werden kann.

Wichtigste zusätzliche Kriterien sind dabei: Verfügbarkeit in genügend großen Mengen und rückgeführte Dichteangaben.

3.2 Auswahl der Flüssigkeiten

Physikalische Stoffparameter der Flüssigkeiten, die die Dosierung beeinflussen können, sind Viskosität, Oberflächen- und Grenzflächenspannungen (und damit verbunden: Kapillarkräfte), Dichte und Dampfdruck.

Die vorliegende Untersuchung soll klären, ob ein Einfluss dieser Stoffparameter auf das dosierte Volumen quantitativ bei direktverdrängenden Kolbenhubpipetten und Mikroliter-spritzen nachweisbar ist. Als Flüssigkeiten wurden Wasser, Ethanol und Nonan ausgewählt. Wasser dient dabei als Referenzflüssigkeit, es repräsentiert zusätzlich die Flüssigkeiten mit großer Oberflächenspannung. Ethanol und Nonan haben beide eine sehr kleine Oberflächen-

Tabelle 1: Materialparameter der untersuchten Flüssigkeiten

Flüssigkeit	Temperatur	Dichte	therm. Volumen-Ausdehnungs-koeffizient	Dampfdruck	dynamische Viskosität	kinematische Viskosität	Oberflächen-spannung
	°C	kg/m ³	1/K	hPa	Pa s	m ² /s	mN/m
Wasser	20	998,20	2,12·10 ⁻⁴	23	1,00·10 ⁻³	1,00·10 ⁻⁶	72,60
Ethanol	20	789,23	1,10·10 ⁻³	51	1,20·10 ⁻³	1,52·10 ⁻⁶	22,40
Nonan	20	718,10	1,08·10 ⁻³	4,8	7,10·10 ⁻⁴	9,90·10 ⁻⁷	22,85
Humanserum	20	1025,7	?	?	?	?	56,2
Humanserum	37	?	?	?	1,12·10 ⁻³	1,15·10 ⁻⁶	?

spannung und eine geringere Dichte als Wasser. Untereinander unterscheiden sie sich vor allem durch ihren Dampfdruck, dieser ist bei Ethanol etwa zehnfach größer als bei Nonan. Alle drei Flüssigkeiten spannen ein Parameterfeld auf, das die Parameter von Humanserum einschließt. Lediglich die Dichte von Humanserum ist geringfügig größer als die von Wasser. Die wichtigsten physikalischen Materialparameter sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Wie bereits erwähnt ist jedoch bei Humanserum zu erwarten, dass es sich einer einfachen Charakterisierung durch die aufgeführten physikalischen Eigenschaften entzieht. Chemisch-biologische Reaktionen mit den Oberflächen der Dosiergeräte bedingen möglicherweise ein von einer „einfachen“ Flüssigkeit abweichendes Verhalten. Hier ist besonders die Neigung des Serums zum „Kleben“ zu nennen, die durch Reaktionen von Serumbestandteilen mit Gefäßwandungen hervorgerufen wird.

4 Gravimetrische Messapparatur

4.1 Theoretische Grundlagen

Als primäre Messmethode zur Bestimmung kleiner Flüssigkeitsvolumen dient eine gravimetrische Methode. Hierbei wird die Masse der Flüssigkeit mit einer Waage bestimmt. Ist die Dichte der Flüssigkeit bekannt, so kann das Volumen direkt über die Beziehung

$$(4-1) \quad V = \frac{m}{\rho}$$

bestimmt werden. Dabei beschreibt V das Volumen, m die Masse und ρ die Dichte der Flüssigkeit. Die Volumenbestimmung ist damit durch eine Massenbestimmung ersetzt, die Rückführung der Messgröße Volumen geschieht auf die SI-Basiseinheit Masse.

Eine Waage misst einen Wägewert W , der mit einer Luftauftriebskorrektur in die Masse m umgerechnet werden muss.

$$(4-2) \quad m = W \cdot \frac{1 - \rho_L / \rho_G}{1 - \rho_L / \rho}$$

Hierbei sind ρ_L die Dichte der Luft und ρ_G die Dichte der Gewichtstücke, mit der die Waage beschickt wird. (Auch bei modernen elektromagnetischen Waagen wird dieser Bezug des angezeigten Wägewertes zu aufgelegten Gewichtstücken beibehalten.)

Somit erfordert die Volumenbestimmung mittels Gravimetrie zusätzlich zur Bestimmung des Wägewertes der Flüssigkeitsmasse noch die Kenntnis der Flüssigkeitsdichte, der Luftdichte und der Dichte der Gewichtstücke. Die Luftdichte lässt sich mittels der Gleichung

$$(4-3) \quad \rho_L = \frac{k_1 p_L + \varphi(k_2 t_L + k_3)}{t_L + t_{L0}}$$

ausdrücken. Dabei sind für p_L der Luftdruck in hPa, für φ die relative Luftfeuchte in % und für t_L die Lufttemperatur in °C einzusetzen. Für die Konstanten k_1 , k_2 , k_3 und t_{L0} sind die Werte $k_1 = 0,34844 \text{ (kg/m}^3) \cdot \text{°C/hPa}$, $k_2 = -0,00252 \text{ kg/m}^3$, $k_3 = 0,020582 \text{ (kg/m}^3) \cdot \text{°C}$ und $t_{L0} = 273,15 \text{ °C}$ einzusetzen. Die Gleichungen (4-1) bis (4-3) sind ausführlich in [12] beschrieben.

In Abb. 1 ist die Verknüpfung der Messgrößen als Flussdiagramm dargestellt.

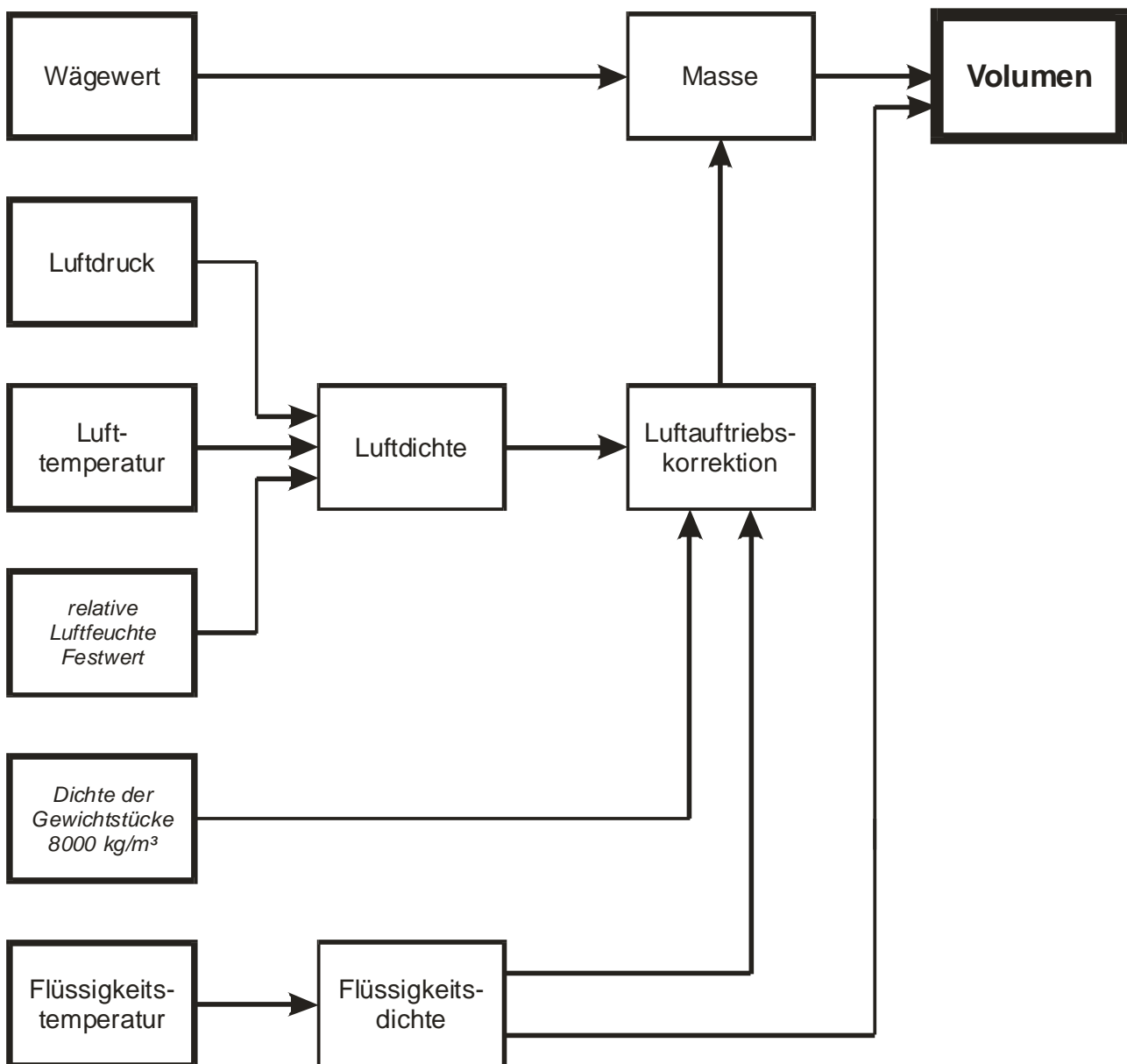


Abb. 1: Flussdiagramm zur Verknüpfung der Messgrößen, die für eine gravimetrische Volumenbestimmung erforderlich sind. In den durch kursive Schrift gekennzeichneten Feldern sind feste Werte eingesetzt, die anstelle von Messwerten benutzt werden.

Der Einfluss der relativen Luftfeuchte auf die Luftdichte und damit auf die Luftauftriebskorrektur ist so gering, dass für Volumenbestimmungen im Mikroliterbereich nicht der exakte Wert ermittelt werden muss. Es kann stattdessen mit einem mittleren Wert gearbeitet werden. (Vgl. hierzu auch die Angaben im Messunsicherheitsbudget und die Ausführungen in Kapitel 4.)

Die Dichte ρ in Abhängigkeit von der Temperatur t kann für einige Flüssigkeiten (z.B. Wasser, Ethanol) aus Tabellen entnommen oder durch eine Zahlenwertgleichung berechnet werden (vgl. hierzu ebenfalls [12]). Da diese Daten aber nur für wenige Flüssigkeiten vorliegen, muss die Dichte im Allgemeinen für den Temperaturbereich, in dem die Dosierungen stattfinden sollen, als Funktion der Temperatur gemessen werden. Weitere Einflüsse, wie die Veränderung der Dichte durch schwankenden Luftdruck oder durch Lösung von Luft in der Flüssigkeit können vernachlässigt werden, so beträgt z.B. der Dichteunterschied zwischen luftgesättigtem und luftfreiem Wasser bei 20 °C etwa $2 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m}^3$, also relativ nur $2 \cdot 10^{-6}$.

4.2 Beschreibung der gravimetrischen Apparatur

Abb. 2 zeigt die gravimetrische Messapparatur. Die Apparatur ist auf einem an einer massiven Wand befestigten Wägetisch aufgebaut. Die Waage selbst befindet sich auf einer schwingungsgedämpft gelagerten, vom Wägetisch entkoppelten Steinplatte. Der Laborraum ist klimatisiert, die Raumtemperatur ist auf $\pm 0,5 \text{ °C}$ stabilisiert.

Die aufgebaute Apparatur besteht aus den folgenden Komponenten:

- Komparatorwaage zur Massebestimmung
Auflösung 100 ng, Höchstlast 5 g.
Es besteht die Möglichkeit zur Befeuchtung der Luft im (geschlossenen) Wägeraum¹ durch eine "Verdunstungsfalle".
Der Wägeraum ist während einer Messreihe nur durch eine Öffnung im Wägeraumdeckel (Durchmesser 10 mm) zugänglich. Diese Öffnung ist mit einem Glasdeckel verschlossen,

¹ Die (nicht eindeutige) Bezeichnung Wägeraum wird in dieser Arbeit für den geschlossenen Teil der Waage verwendet, in dem sich der Wägeteller und das Wägegut befinden. Der Gebäudeteil, in dem sich die gesamte Apparatur befindet, wird als Laborraum bezeichnet.



Abb. 2: Fotografie der Messapparatur
 Links die Waage, bestehend aus Wägeteil, Steuerteil und Netzteil. Auf der freien Fläche in der Mitte des Tisches befindet sich das Vorratsgefäß für die Flüssigkeit, darüber im Stativ das Dosiergerät. Rechts die Digitalohmmeter für die Messung der Thermometerwiderstände und Messgeräte für Luftdruck und Luftfeuchte. Neben dem Messtisch befindet sich ein PC zur Datenerfassung.

der nur entfernt wird, wenn eine Pipette oder Mikroliterspritze zur Dosierung in das Wägegefäß eingeführt werden muss.

- Barometer zur Luftdruckbestimmung
 Auflösung 1 mbar
- Messgerät zur Bestimmung von Raumtemperatur und relativer Luftfeuchte
 Auflösung 0,1 °C und 0,1 % rel. Feuchte
- 2 Thermistoren zur Bestimmung der Flüssigkeitstemperatur und der Wägeraumtemperatur. Die Messung der Thermistorwiderstände erfolgt mit Digitalohmmetern mit einer Auflösung von 0,1 Ω , dies entspricht einer Temperaturentauflösung kleiner als 1 mK (abhängig von der Temperatur, da die Kennlinie der Thermistoren nichtlinear ist).
- Computer zum Einlesen, Aufzeichnen und Verarbeiten der Messdaten

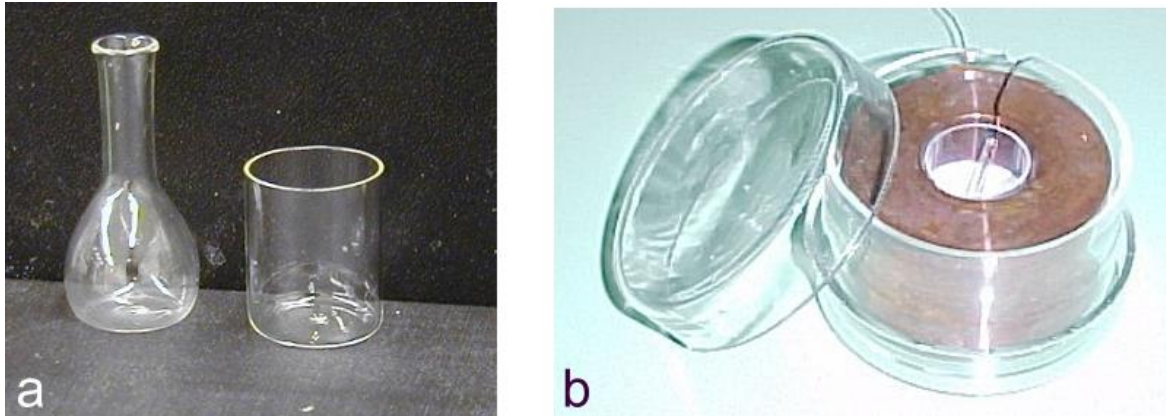


Abb. 3: a) Handgefertigte Glasgefäße, die als Flüssigkeitsvorratsgefäße und als Wägegefäße dienen
 b) Glasgefäß mit Kupferring zur thermischen Stabilisierung des Flüssigkeitsvorratsgefäßes. Im Glasgefäß der zur Temperaturbestimmung verwendete Thermistor.

- Gefäße für die Flüssigkeit

Die Gefäße für die Aufnahme der Flüssigkeit wurden sehr klein gewählt. Dies geschah beim Vorratsgefäß für die zu dosierende Flüssigkeit mit Hinblick auf Untersuchungen an Humanserum und beim Wägegefäß mit Hinblick auf die geringe Höchstlast der Waage. Die Gefäße sind handgefertigte Glasgefäße mit einer Leermasse zwischen 1,5 g und 2,5 g und einem Fassungsvermögen von 3 ml - 5 ml Flüssigkeit. Es wurden verschiedene Gefäßformen erprobt. Zwei dieser Gefäße sind in Abb. 3a gezeigt.

Die kleinen Gefäße reagieren sehr schnell auf Änderungen der Umgebungstemperatur, die wegen der Anwesenheit des Experimentators unvermeidlich sind. Um das Vorratsgefäß gegen solche Temperaturschwankungen zu stabilisieren, wurde es in einen massiven Kupferring (Masse 283 g) gestellt. Dieser Kupferring steht zusammen mit dem Vorratsgefäß in einem weiteren Glasgefäß mit Glasdeckel, das zur zusätzlichen thermischen Entkopplung von der Umgebung dient. Die Anordnung ist in Abb. 3b gezeigt. Der Glasdeckel verringert zusätzlich die Verdunstung von Flüssigkeit aus dem Vorratsgefäß. Damit wird eine Abkühlung der Flüssigkeit durch Verdunstung verhindert. Bei Flüssigkeitsgemischen (in dieser Untersuchung ist Serum als eine solche Flüssigkeit anzusehen) wird damit auch eine Verdunstung der leichtflüchtigen Bestandteile und damit eine Erhöhung der Konzentration der schwer verdunstenden Bestandteile vermieden.

In Abb. 3b ist auch der Thermistor zur Messung der Flüssigkeitstemperatur zu erkennen. Die Temperatur der Flüssigkeit kann mit diesem Fühler laufend kontrolliert werden. Die elektrische Leistung des Thermistors beträgt etwa $1 \mu\text{W}$, eine Erwärmung der Flüssigkeit durch den Thermistor kann vernachlässigt werden.

4.3 Beschreibung des Dosiervorganges

Die Dosierung der Flüssigkeit erfolgt in enger Anlehnung an die in der Norm ISO 8655 Teil 6 [8] beschriebene Prozedur.

Die Vorratsflüssigkeit befindet sich in dem im Kapitel 4.2 beschriebenen Becher innerhalb des Kupferringes (Abb. 3b). Die Flüssigkeit wird mit der Kolbenhubpipette oder Mikroliterspritze aus diesem Vorratsgefäß aufgenommen. Danach wird die Gerätespitze an der Wand des Vorratsgefäßes abgestreift. Die Abstreiflänge beträgt etwa 10 mm, der Anlegewinkel der Spitze etwa 30° . Die gefüllte Kolbenhubpipette oder Mikroliterspritze wird dann durch die Öffnung in der Abdeckung des Wägeraumes in den Wägebecher eingeführt und dort unmittelbar oberhalb des Flüssigkeitsspiegels an der Wand angelegt. Dann wird die Flüssigkeit über den Ausstoßmechanismus ausgestoßen und die Spitze des Dosiergerätes auf einer Länge von etwa 10 mm an der Gefäßwand abgestreift. Der Anlegewinkel beträgt dabei ebenfalls etwa 30° .

Im Wägebecher befindet sich vor der ersten Dosierung eine Flüssigkeitsvorlage von etwa 0,5 ml bis 1 ml. Weitere Dosierungen werden höchstens solange hinzugefügt, bis die nicht von Flüssigkeit bedeckte Wandhöhe ein Abstreifen über 10 mm nicht mehr zulässt. Die Öffnung in der Abdeckung des Wägeraumes wird nach jeder Dosierung mit einem Deckel verschlossen. Dieser Deckel wird erst unmittelbar vor der nachfolgenden Dosierung wieder entfernt.

Im Gegensatz zur in der Norm ISO 8655 Teil 6 [7] beschriebenen Prozedur, die 10 Einzelmessungen vorsieht, besteht eine Messreihe hier aus 15 Einzeldosierungen. Die Einzeldosierungen werden in einem zeitlichen Abstand von je 40 s durchgeführt. Die Gesamtmesszeit beträgt 660 s, dieser Wert ist wegen notwendiger Vor- und Nachlaufzeiten etwas größer als der Wert von 600 s, der sich aus 15mal 40 s ergibt. Während dieser Gesamtmesszeit wird alle 0,4 s die Waagenanzeige aufgezeichnet, es wird also eine Messkurve „Wägewert als Funktion der Zeit“ mit Messpunkten im zeitlichen Abstand von 0,4 s erzeugt. Die Darstellung dieser

Messkurve zeigt einen treppenförmigen Verlauf mit 15 „Treppenstufen“. Dies ist in Abb. 4 beispielhaft an einer Dosierreihe gezeigt, bei der zur besseren Anschaulichkeit auf das Abstreifen verzichtet wurde.

4.4 Auswertung der Messkurven

Im Anschluss an die Messung wird die Messkurve „Wägewert als Funktion der Zeit“ ausgewertet. Ziel ist die Bestimmung der Höhe der einzelnen Stufen, die ein Maß für den Wägewert der jeweils dosierten Flüssigkeit ist.

Die Stufen sind jedoch keine idealen Rechteckstufen, da die Waage eine endliche Einschwingzeit benötigt, bevor sie nach einer Dosierung auf dem neuen Wert stabilisiert. Die Einschwingzeit wird verlängert, weil beim Abstreifen der Gerätespitze an der Wand des Wägegefäßes am Ende der Dosierung eine Kraft auf die Waage ausgeübt wird, die diese kurzzeitig stark belastet. Das Waagensignal schwankt deshalb während der Dosierung stark und gerät teilweise in den Überlastbereich. Die notwendige Erholung verlängert den Einschwingvorgang. Die mechanische Belastung der Waage durch die an der Wand des Wägegefäßes anliegende Gerätespitze ist wegen des manuell durchgeführten Vorgangs nur schlecht reproduzierbar, deshalb variiert auch die Einschwingzeit. Zur Verdeutlichung dieses Effektes sind in Abb. 4 eine Messkurve, bei der während der Dosierung **nicht** abgestreift wurde, also **nicht** nach der üblichen Art dosiert wurde, und in Abb. 5 eine Messkurve, bei der während der Dosierung abgestreift wurde, gezeigt. Während bei der Messreihe ohne Abstreifen nur kurze Einschwingvorgänge, die zu Abrundungen der Stufen führen, zu sehen sind, bewirkt das Abstreifen die oben beschriebenen sehr starken Ausschläge der Waage. Die Erholungszeit der Waage ist deshalb deutlich länger.

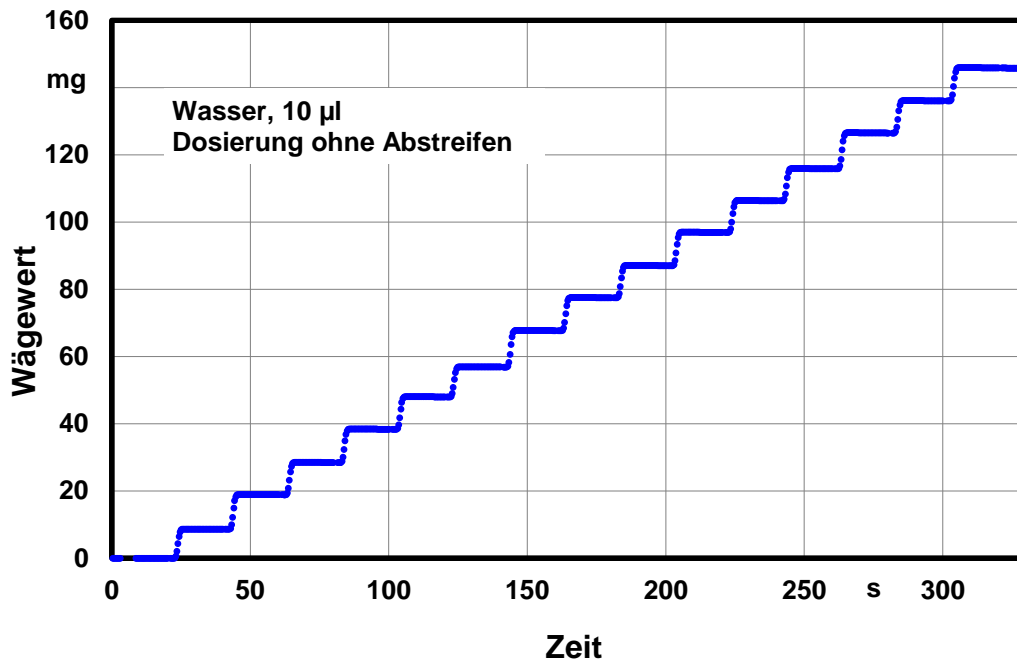


Abb. 4: Wägewert als Funktion der Zeit bei einer 15fachen Dosierung von je 10 µl Wasser **ohne** Abstreifen.
Das Zeitintervall zwischen den Einzeldosierungen ist auf 20 s verkürzt. Die Messpunkte haben einen zeitlichen Abstand von je 0,4 s.

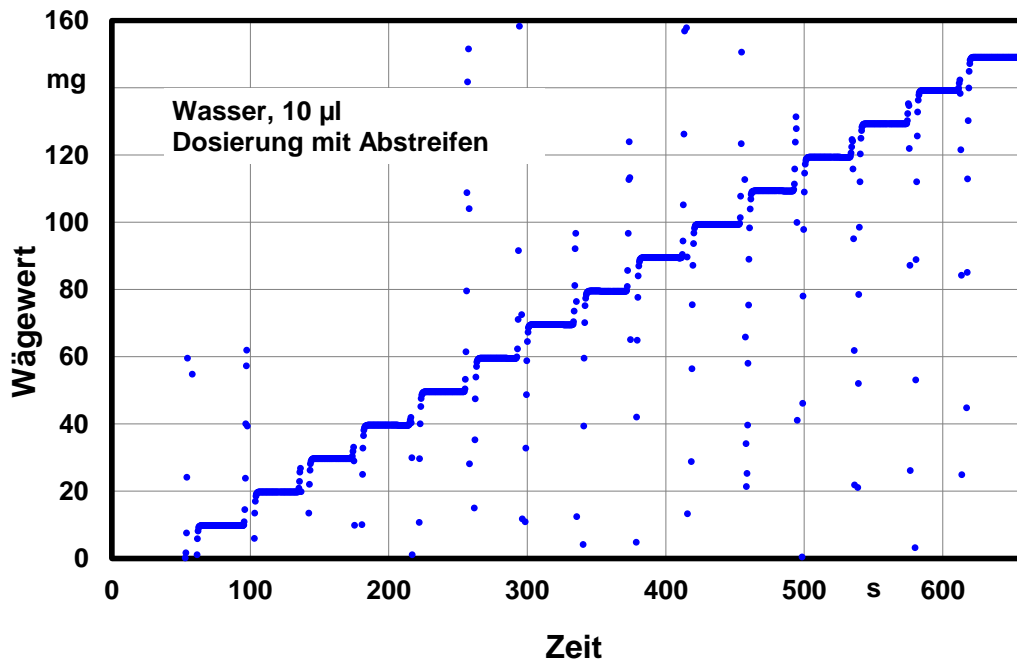


Abb. 5: Wägewert als Funktion der Zeit bei einer 15fachen Dosierung von je 10 µl Wasser **mit** Abstreifen.
Das Zeitintervall zwischen den Einzeldosierungen beträgt 40 s. Die Messpunkte haben einen zeitlichen Abstand von je 0,4 s. Die Streuung der Messwerte unmittelbar nach jeder Einzeldosierung ist im Text erklärt.

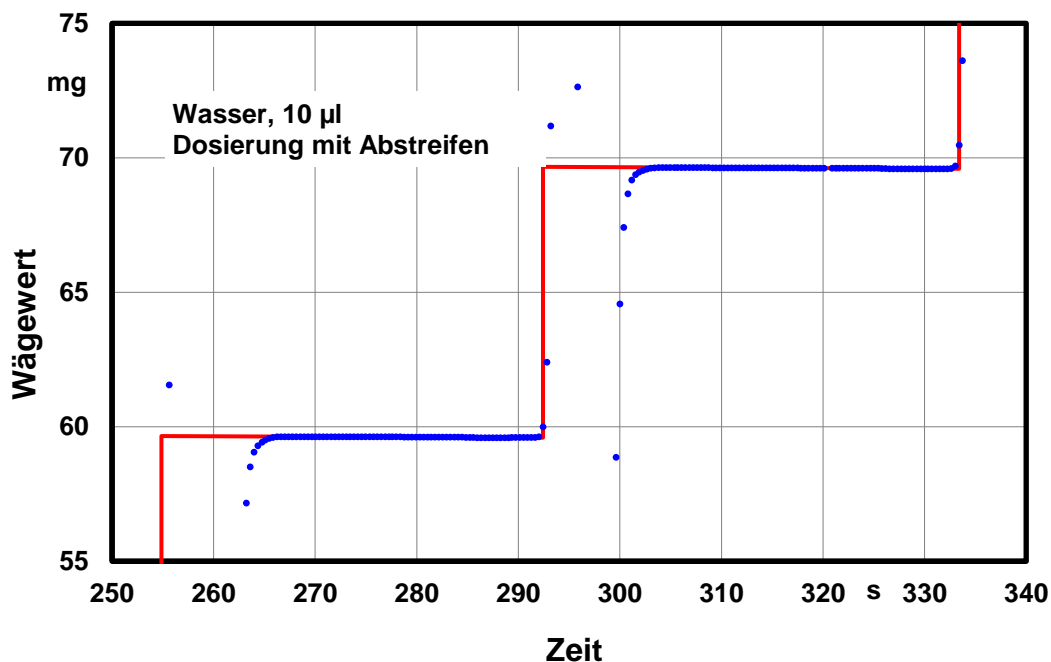


Abb. 6: Ausschnitt aus Abb. 5 mit Anpassgeraden. Die Höhe der senkrechten Abschnitte ist ein Maß für den Wägewert der dosierten Flüssigkeit. Deutlich ist die Erholungszeit der Waage zu sehen, über die extrapoliert werden muss.

Da die Masse der dosierten Flüssigkeit während dieser Erholungszeit wegen der nicht völlig vermeidbaren Verdunstung abgenommen hat, ist eine Extrapolation des Wägewertes auf den Zeitpunkt der Dosierung erforderlich.

Ein Beispiel für eine Extrapolation ist in Abb. 6 grafisch dargestellt. Die Extrapolation erfolgt, indem jeweils Geraden an die Wägewerte in den Bereichen mit einer stabilen Anzeige unterhalb und oberhalb des Dosierzeitpunktes angepasst werden. Diese werden auf den Dosierzeitpunkt verlängert, die Differenz zwischen den Geraden am Dosierzeitpunkt ist die gesuchte Stufenhöhe, die den Wägewert der dosierten Flüssigkeit wiedergibt. Als Zeitpunkt der Dosierung gilt der Beginn der Dosierung, also das Anlegen des Dosiergerätes an die Wand des Wägegefäßes. Die Dosierung mit anschließendem Abstreifen dauert etwa 2 s bis 3 s. Beide Geraden sind aber nahezu parallel, eine durch eine Verschiebung des „Dosierzeitpunktes“ um 2 s, also um die Dauer der Dosierung, bewirkte Änderung der Stufenhöhe kann deshalb vernachlässigt werden. Dass die lineare Extrapolation eine zulässige Vereinfachung ist, wird in Kapitel 5.1 näher dargelegt.

5 Grundlegende Untersuchungen zur Verdunstung

Die Dosierung von Flüssigkeit mittels Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen ist immer mit der Existenz offener Flüssigkeitsoberflächen verbunden. Von solchen Flüssigkeitsoberflächen aus findet Verdunstung statt. Dieser Prozess beeinflusst und begrenzt die Messgenauigkeit bei einer Dosierung in dreifacher Weise.

- Durch Verdunstung wird die Masse der Flüssigkeit im Wägegefäß verringert.
- Die mit der Verdunstung einhergehende Kühlung verringert die Temperatur des Vorratsgefäßes, des Wägegefäßes und auch des Dosiergerätes.
- Die verdunstete Flüssigkeit verbleibt gasförmig in der Luft über der Flüssigkeitsoberfläche und beeinflusst die Luftdichte, die wiederum in die Luftauftriebskorrektur eingeht.

5.1 Verdunstung aus Wägegefäßen

Die Verdunstung von Flüssigkeit verringert die im Wägegefäß befindliche Flüssigkeitsmasse. Der von der Waage angezeigte Wägewert ist deshalb nicht stabil, die Anzeige driftet, die angezeigten Werte müssen auf den Zeitpunkt der Dosierung zurückextrapoliert werden.

Die Verdunstung von Flüssigkeit kann durch eine Erhöhung des Flüssigkeitsdampfanteils in der Luft im Wägeraum verringert werden. Dies geschieht durch eine sogenannte Verdunstungsfalle, wie sie unten beschrieben ist. Eine weitere Maßnahme zur Verringerung der Verdunstung ist die geeignete Wahl des Wägegefäßes.

Die Verdunstung wurde verringert, indem mit einem ringförmigen, flüssigkeitsgefüllten Gefäß im Wägeraum, einer Verdunstungsfalle, die Luft im Wägeraum künstlich mit Flüssigkeitsdampf angereichert wurde. Bei Verwendung von Wasser kann auf diese Weise die relative Luftfeuchte im Wägeraum durch Anreicherung mit Wasserdampf auf 70 % bis 85 % erhöht werden. Eine weitere Sättigung ist nicht möglich, weil der Wägeraum nicht hermetisch geschlossen ist und zusätzlich für jede neue Dosierung geöffnet werden muss. Bei Verwendung anderer Dosierflüssigkeiten ist die Verdunstungsfalle entsprechend mit dieser Flüssigkeit zu

füllen. Auch hier wird die Sättigung in der Regel nicht erreicht (der Grad der Sättigung kann nur bei Wasser durch eine einfache Messung mit einem Hygrometer bestimmt werden), eine deutliche Senkung der Verdunstungsrate ist aber zu beobachten.

Die Bedeutung der Verdunstungsfalle für die Flüssigkeit Wasser kann demonstriert werden, indem Verdunstungsraten bei verschiedenen relativen Luftfeuchten im Wägeraum gemessen werden. Die im Folgenden genannten Werte wurden an einem Becher gemessen. Bei geschlossenem Wägeraum, aber ohne Verdunstungsfalle, beträgt die Verdunstungsrate beim Dosieren $38 \cdot 10^{-7}$ g/s. Bei Benutzung einer Verdunstungsfalle und einer damit erreichten relativen Luftfeuchte von etwa 90 % sinkt dieser Wert auf $6 \cdot 10^{-7}$ g/s. Wenn die Einführungsöffnung für die Pipetten in der Wägeraumabdeckung (ca. 10 mm Durchmesser) geöffnet wird, steigt die Verdunstungsrate auf $14 \cdot 10^{-7}$ g/s. Bei völlig entfernter Wägeraumabdeckung steigt dieser Wert auf $46 \cdot 10^{-7}$ g/s, ist also noch größer als bei einem Betrieb ohne Verdunstungsfalle, aber mit geschlossenem Wägeraum. Ursache für diese starke Vergrößerung ist Konvektion.

Die sicherste Maßnahme zur Verringerung der Verdunstung aus dem Wägegefäß ist die Schließung des Wägegefäßes durch einen Deckel. Dieser Deckel muss jedoch bei jeder Dosierung geöffnet und danach wieder geschlossen werden. Durch die damit einhergehenden manuellen Tätigkeiten im Wägeraum und am Wägegefäß werden aber Konvektion der Luft und Temperaturschwankungen erzeugt, die das Wägeregebnis verfälschen können. Längere Wartezeiten, die eingehalten werden, um stabile Bedingungen im Wägeraum zu erzeugen, ermöglichen zum einen eine größere Nullpunktdrift der Waage und können auf diesem Wege ebenfalls zu einer Verfälschung des Wägeregebnisses führen, zum anderen widersprechen sie der in der Norm ISO 8655-6 erhobenen Forderung, dass Dosierungen mit einem Zeittakt von weniger als 60 s durchgeführt werden sollen.

Auch das Abnehmen des Wägegefäßes vom Wägeteller während der Dosierungen hat ähnliche Auswirkungen. Diese Verfälschungen sind bei sehr kleinen Flüssigkeitsvolumen nicht mehr zu vernachlässigen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde deshalb mit einem offenen, fest auf dem Wägeteller montierten Wägegefäß gearbeitet.

Einfluss auf die Verdunstungsrate hat auch die Form des Wägegefäßes. Gefäße mit kleiner Öffnung haben eine geringere Verdunstungsrate als Gefäße mit größerer Öffnung (dies wird bereits von Michel et al. [4] für den Fall, dass die Gefäße in einem Gleichgewichtszustand sind,

beschrieben). Bei einem Kolben mit langem Hals wird eine kleinere Verdunstungsrate erwartet als bei einem Becher.

In der vorliegenden Untersuchung wurde zunächst überprüft, ob das bei Michel et al. [4] beschriebene Verhalten auch im Nichtgleichgewichtszustand, wie er bei einer Dosierung wegen des Öffnens des Wägeraumes und des Einführens eines Dosiergerätes vorliegt, weiterhin gültig ist. Dazu wurde die Verdunstung von Wasser in einem Enghalskolben und in einem Becher, wie sie in Abb. 3a gezeigt sind, gemessen.

Die im Gleichgewicht gemessene Verdunstungsrate im Enghalskolben beträgt $5 \cdot 10^{-8}$ g/s, beim Becher beträgt dieser Wert $6 \cdot 10^{-7}$ g/s, ist also 12mal größer. Gleichgewichtsbedingungen wurden erreicht, indem der Wägeraum für mindestens 20 min geschlossen blieb. Der Wägeraum war bei diesen Messungen mit Luftfeuchte fast gesättigt (rel. Luftfeuchte ca. 90 %). Bei Dosiervorgängen wird dieses Gleichgewicht gestört, weil der Wägeraum geöffnet werden muss, um die Pipette oder Spritze in das Wägegefäß einführen zu können. Dabei findet Konvektion sowohl durch das Abnehmen des Wägeraumverschlusses als auch durch die Bewegung der Pipette im Wägeraum statt. Dieser Einfluss ist im Hals des Wägekolbens besonders ausgeprägt. Bei Pipettenspitzen, deren Durchmesser nur geringfügig kleiner ist als der Innendurchmesser des Kolbenhalses, wird beim Einführen in den Kolben nahezu die gesamte Luft im Kolbenhals verdrängt und beim Zurückziehen der Pipettenspitze durch Luft mit geringerem Sättigungsgrad ersetzt. Die Verdunstungsrate steigt deshalb stark an. Der Effekt ist beim Wägekolben stärker als beim Wägebecher, bei dem wegen seiner weiten Öffnung nur ein kleinerer Bruchteil der im oberen Teil des Wägegefäßes befindlichen Luft ausgetauscht wird. Die Messergebnisse bestätigen dies. Die gemessenen Verdunstungsraten nach simulierten Dosiervorgängen stiegen bei beiden Wägegefäßen auf den gleichen Wert von $7 \cdot 10^{-7}$ g/s. Bei dieser Simulation wurde dabei nur der Ablauf eines Dosiervorganges durchgeführt, ohne Flüssigkeit zu dosieren, um zu verhindern, dass die dosierte Flüssigkeit das Ergebnis beeinflusst.

Beim Dosieren sind beide Gefäße also gleichwertig, obwohl der Wägebecher eine etwa zehnfach größere Öffnung hat als der Wägekolben. Der Wägebecher ist deshalb dem Wägekolben vorzuziehen, weil die Störung des Gleichgewichtes durch den Dosiervorgang wesentlich geringer ist und eine zuverlässigere Messung erwartet werden kann.

Wegen dieses Ergebnisses wurde für die weiteren Untersuchungen der Wägebecher verwendet. Die große Öffnung des Wägebechers erleichtert darüber hinaus das Einführen der Pipetten und ein schräges Ansetzen der Pipettenspitze an der Gefäßwand zum Abstreifen der Flüssigkeit.

Die Verdunstungsrate hängt neben diesen technischen Parametern auch von der Temperatur und vom Dampfdruck der Flüssigkeit ab. So beträgt die Verdunstungsrate bei Ethanol $2 \cdot 10^{-5}$ g/s (Dampfdruck 52 mbar), bei Nonan $2 \cdot 10^{-6}$ g/s (Dampfdruck 5 mbar). Beide Werte wurden bei $t = 20$ °C während des Dosierens gemessen. Die Dosierung erfolgte in den Wägebecher, es war keine Verdunstungsfalle eingebaut, der Wägeraum wurde unmittelbar nach der Dosierung geschlossen.

Ein weiterer Effekt vergrößert die Verdunstungsrate zusätzlich. Der Dosiervorgang erfordert ein Abstreifen der Flüssigkeit an der Gefäßwand. Hierdurch wird zusätzliche Flüssigkeitsoberfläche geschaffen, die Verdunstungsrate ist deshalb gegenüber dem Gleichgewichtszustand erhöht, solange sich Flüssigkeit an der Gefäßwand oberhalb der Vorlage befindet.

Die Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche wird sowohl von der Oberflächen- und Grenzflächenspannung der Flüssigkeit als auch von der Form der Spitze des Dosiergerätes und vom Volumen der ausgestoßenen Flüssigkeit beeinflusst. Deshalb ist zu erwarten, dass die Verdunstungsrate nicht nur für verschiedene Flüssigkeiten, sondern auch für verschiedene Geräte und für verschiedene Volumina unterschiedlich ist. Kleinere Volumina und kleinere Spitzendurchmesser führen zu kleineren benetzten Gefäßwandflächen und damit zu geringerer Erhöhung der Verdunstungsraten. Die Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche liegt zwischen 10 % und 50 % der Grundfläche (der Querschnittsfläche des Wägebechers).

Um den Effekt der Erhöhung der Verdunstungsrate deutlich zeigen zu können, wurde er bei einer Messung überbetont. Als Flüssigkeit wurde Ethanol verwendet, weil hier wegen des hohen Dampfdruckes die Verdunstungsrate besonders groß ist. Die Flüssigkeit wurde beim Dosieren gegen die Gefäßwand gespritzt, um eine besonders starke Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche zu erreichen. Das Ergebnis dieser Demonstrationsmessung ist in Abb. 7 gezeigt. Verglichen wird die Abnahme des Wägewertes, wenn die Flüssigkeit direkt in die Vorlage dosiert wird, ohne die Wägegefäßwand zu benetzen, wenn also die Flüssigkeitsoberfläche nicht vergrößert wird (rote Punkte und rote Gerade), mit der Abnahme des Wägewertes, wenn die Flüssigkeit beim Dosieren gegen die Gefäßwand gespritzt wurde (blaue Punkte und blaue Gerade).

Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, sind die beiden Messkurven so gegeneinander verschoben, dass sie am Ende der Messung übereinander liegen. Deutlich ist die größere Steigung, also größere Verdunstungsrate, der blauen Kurve zu Beginn der Messung zu sehen, die nach einiger Zeit in die Steigung der roten Kurve, die die Dosierung ohne Oberflächenvergrößerung darstellt, übergeht. Die Verdunstungsrate ist hier zu Beginn etwa doppelt so groß wie nach 100 s. Von diesem Zeitpunkt ab haben beide Kurve dieselbe Steigung².

Eine Linearisierung der Kurve, wie sie schon in Abb. 6 gezeigt ist, ist aber für kleine Zeiten mit

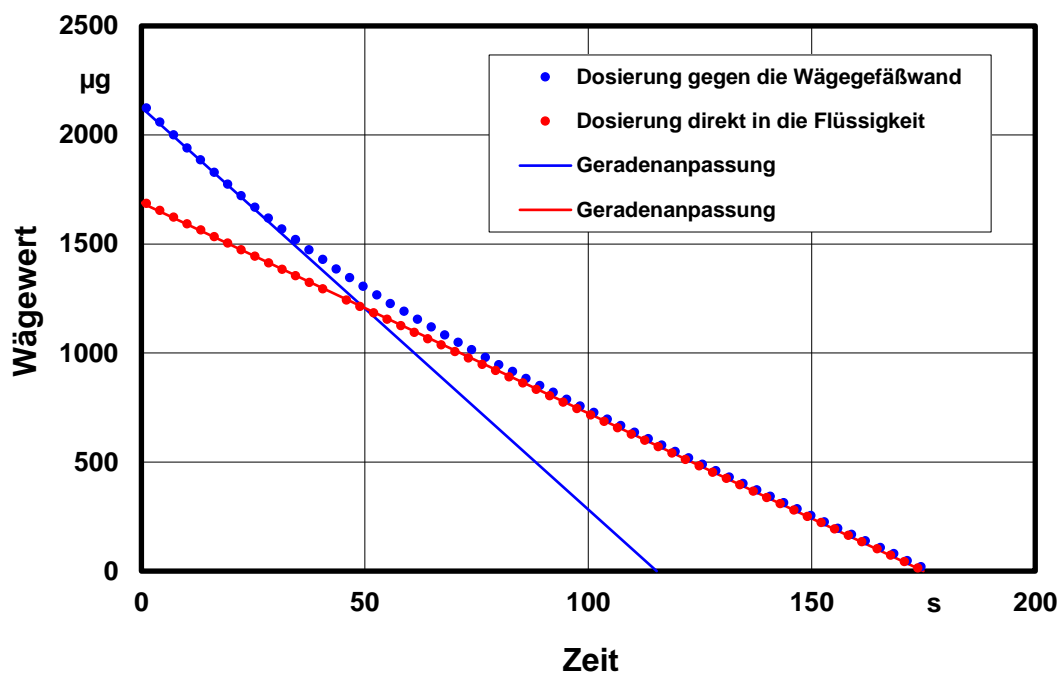


Abb. 7: Verdunstung von Ethanol
Die Abbildung vergleicht die Abnahme des Wägewertes bei einer Dosierung direkt in eine Flüssigkeitsvorlage (ohne Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche) mit einer Dosierung gegen die Gefäßwand (mit Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche).

hinreichender Genauigkeit möglich, so dass eine Extrapolation der Messwerte auf den Dosierzeitpunkt ebenfalls möglich ist³. Dies ist in Abb. 7 durch die blaue Gerade gezeigt. Da die Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche bei realen Messungen deutlich geringer ist als bei

² Der bei den Messungen zur Volumenbestimmung verwendete Zeittakt betrug 40 s, während der Messung wird also für die Verdunstung kein Gleichgewichtszustand erreicht.

³ Eine direkte Messung zum Zeitpunkt der Dosierung ist wegen der Einschwingzeit der Waage nicht möglich (vgl. Kapitel 4.4).

dieser Demonstrationsmessung, ist auch die lineare Extrapolation für diese Messungen zuverlässiger als bei dem gezeigten Beispiel.

5.2 Einfluss der Verdunstung auf die Temperatur der Vorratsflüssigkeit und des Dosiergerätes

Eine der Größen, die während einer Messung konstant gehalten werden soll, ist die Temperatur der beteiligten Komponenten. Dies sind die Vorratsflüssigkeit, das Dosiergerät, und die Flüssigkeit im Wägegefäß. Eine Änderung der Temperatur führt wegen der thermischen Ausdehnung zu Änderungen in der Dichte bzw. im Volumen und verändert darum die Messergebnisse.

Die Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die genannten Komponenten werden deshalb zunächst genügend lange (mindestens eine Stunde) im Laborraum gelagert, damit sie Raumtemperatur annehmen können. Alle drei Komponenten haben aber Flüssigkeitsoberflächen in Kontakt mit der Umgebungsluft, von denen aus Verdunstung stattfindet. Diese Verdunstung ist mit einer Kühlung der Komponenten verbunden, deshalb muss die Verdunstung minimiert werden.

5.2.1 Vorratsflüssigkeit

Bei der Vorratsflüssigkeit geschieht die Verringerung der Verdunstung, indem der Becher mit der Flüssigkeit mit einem Deckel abgedeckt wird. Dieser Deckel wird nur geöffnet, wenn Flüssigkeit aus dem Becher entnommen wird. Ohne die Ankopplung an den Kupferring würde aufgrund der verbleibenden Restverdunstung trotzdem eine leichte Abkühlung um 0,2 K bis 0,4 K stattfinden. Dem entgegen wirkt eine Erwärmung, die durch die Körperwärme (Handwärme) des Bedieners hervorgerufen wird, wenn er die Abdeckung öffnet oder schließt und wenn er die Pipette füllt. Diese Erwärmung ist in der Größenordnung von 1 K bis 2 K, so dass als Resultat eine Erwärmung der Vorratsflüssigkeit auftritt. Beide Effekte werden durch die Ankopplung an den Kupferring (vgl. Kapitel 4.2) stark verringert. Dennoch sind Temperaturdriften während einer Messung, die ca. 11 min dauert, nicht völlig zu verhindern. Als Grenzwert wurde bei diesen Untersuchungen eine Erwärmung von maximal 0,2 K akzeptiert. Wurde dieser Wert überschritten, so wurde die Messung verworfen. Zur

Vereinfachung wurde die Temperatur der Vorratsflüssigkeit nur zu Beginn und nach Beendigung einer Messung aufgezeichnet. Jeder der 15 Einzeldosierungen einer Messung lässt sich durch lineare Interpolation zwischen Anfangs- und Endtemperatur eine Temperatur zuweisen. Da nicht durch Messergebnisse abgesichert ist, dass die Temperaturdrift zwischen Anfangs- und Endtemperatur zeitlich konstant ist, wird die maximale Abweichung der Flüssigkeitstemperatur zum Zeitpunkt der Dosierung vom interpolierten Wert als 0,1 K angenommen.

5.2.2 Flüssigkeit im Wägegefäß

Die Flüssigkeit im Wägegefäß kühlt ebenfalls durch Verdunstung ab. Dieser Effekt wirkt sich aber auf die Bestimmung des dosierten Volumens nur indirekt aus. Die Änderung der Temperatur der Flüssigkeit im Wägegefäß hat keinen Einfluss auf ihre Masse, lediglich die Dichte und damit der Luftauftrieb und die Luftauftriebskorrektur verändern sich⁴. Dieser Effekt ist bezogen auf den Wägewert von der Größenordnung 10^{-6} und deshalb vernachlässigbar gering.

Eine Änderung der Temperatur des Wägeraumes findet durch die Abkühlung des Wägegefäßes ebenfalls statt, sie wird noch verstärkt von der durch die Verdunstung in der Verdunstungsfalle hervorgerufene Abkühlung. Die Temperatur im Wägeraum wird deshalb direkt gemessen, um den Einfluss dieser Temperaturveränderungen auf die Luftauftriebskorrektur erfassen zu können. Die Temperaturänderung im Wägeraum aufgrund der angeführten Effekte liegt bei wenigen Zehntel Kelvin.

5.2.3 Dosiergerät

Durch eine genügend lange Temperierzeit vor der Messung wird auch die Temperatur des Dosiergerätes an die Raumtemperatur angeglichen. Der Einfluss der Handwärme auf das Gerät während der Benutzung wird durch konstruktive Maßnahmen des Herstellers (isolierende

⁴ Dies ungeachtet der Tatsache, dass die Ursache für die Temperaturänderung natürlich Verdunstung, also Massenabnahme, ist.

Kunststoffteile, großer Abstand zwischen Handgriff und temperaturkritischen Teilen) und Maßnahmen des Bedieners (Ablegen des Gerätes zwischen einzelnen Dosierungen) verringert.

Eine unvermeidliche Abkühlung geschieht aber an der Spitze des Dosiergerätes. Das Dosiergerät wird zum Befüllen mit der Spitze in Flüssigkeit eingetaucht. Beim Herausnehmen aus der Flüssigkeit bleibt trotz des Abstreifens ein dünner Flüssigkeitsfilm auf der Außenseite der Spitze zurück, der verdunsten kann. Zusätzlich gibt es an der Öffnung der Spitze eine freie Flüssigkeitsoberfläche, von der aus ebenfalls Verdunstung stattfindet. Nach dem Ausstoßen der Flüssigkeit ist auch die Innenseite der Spitze, an der ebenfalls ein Flüssigkeitsfilm haftet, betroffen. Diese Verdunstung führt wegen der kleinen Wärmekapazität der Spitzen zu einer deutlichen Abkühlung.

Um die Größe dieses Einflusses zu messen, wurde die Temperatur einer Pipettenspitze durch ein Kupfer-Konstantan-Thermoelement bestimmt. Als Testpipette diente eine direktverdrängende Pipette mit 100 µl Nennvolumen. Das Thermoelement wurde so an der Einspannstelle der Pipettenspitze in die Spitze eingeführt, dass die Kupfer-Konstantan-Kontaktstelle

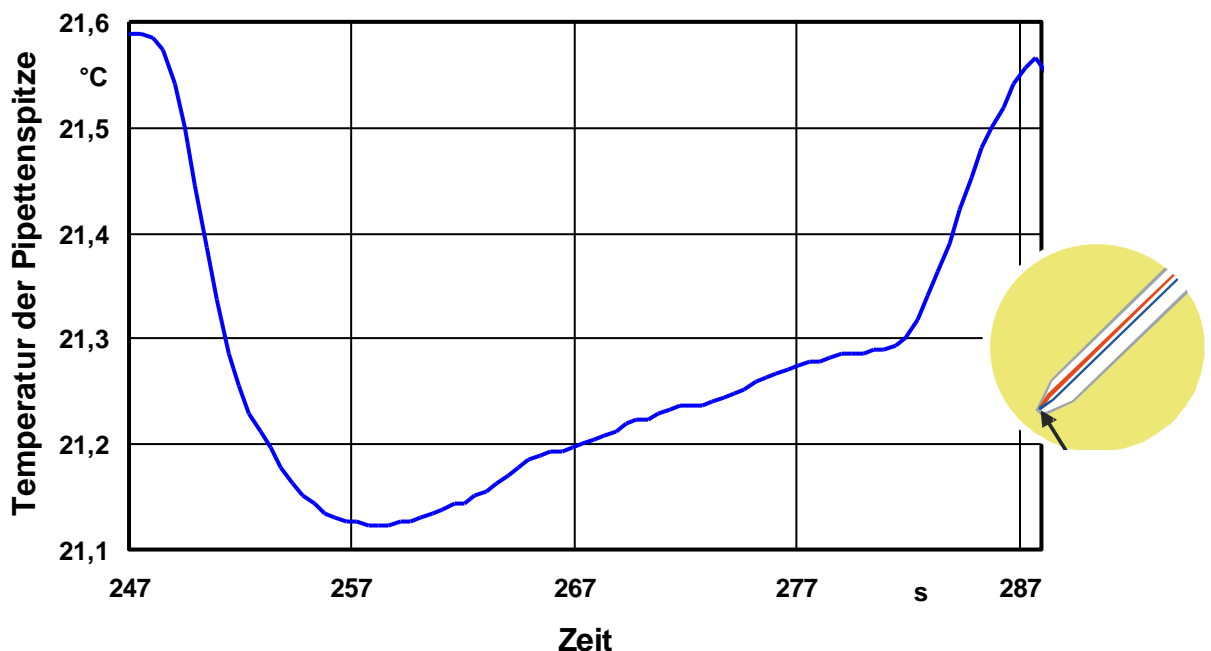


Abb. 8: Temperaturverhalten einer Pipettenspitze nach dem Befüllen mit Wasser und anschließendem Ausfließen der Flüssigkeit
Der Einsatz rechts zeigt schematisch die Anordnung des Temperaturfühlers in der Pipettenspitze

innerhalb der Spitze nahe der Auslassstelle liegt (s. Schemazeichnung in Abb. 8). Der Kolben musste dazu entfernt werden, die Spitze ist wegen der Thermoelementleitungen nicht luftdicht auf die Pipette aufgesteckt. Die Pipette kann deshalb in dieser Konfiguration nicht zum Dosieren verwendet werden, lässt sich aber wie ein reales System befüllen und entleert sich wegen des nicht luftdichten Anschlusses selbständig. Mit dieser Konfiguration wurden mehrere Temperaturverläufe aufgezeichnet.

Ein Beispiel für den Temperaturverlauf bei einer Befüllung und anschließenden Entleerung ist in Abb. 8 gezeigt. Das Thermoelement zeigt zu Beginn der Messung die Temperatur der Vorratsflüssigkeit, in die die Spitze zum Befüllen eingetaucht ist. Nach der Entnahme aus der Vorratsflüssigkeit und dem Auslaufen der Flüssigkeit aus der Pipettenspitze nimmt die Temperatur innerhalb weniger Sekunden stark ab. Die Temperaturenniedrigung beträgt etwa 0,5 K, wenn Wasser als Flüssigkeit verwendet wird. Nachdem der für die Abkühlung verantwortliche Wasserfilm verdunstet ist, steigt die Spitzentemperatur langsam wieder an. Im gezeigten Fall wurde ein realer Dosierzyklus simuliert, deshalb wurde die Spitze nach 35 s wieder in die Vorratsflüssigkeit eingetaucht. Ein Temperatúrausgleich auf die Temperatur der Vorratsflüssigkeit erfolgt in 4 s bis 5 s.

Der Abkühlvorgang der Pipettenspitze ist gut reproduzierbar. In Abb. 9 ist das Temperaturverhalten einer Pipettenspitze während eines vollständigen Messzyklus mit 14 Einzeldosierungen gezeigt. Gut erkennbar ist das schnelle Abkühlen um etwa 0,5 K und das langsamere Wiedererwärmen der Pipettenspitze an Luft sowie das anschließende schnelle Erwärmen beim Wiedereintauchen in die Vorratsflüssigkeit. Die Unterschiede im Temperaturzyklus sind auf unterschiedlich große Wasserrückstände nach dem Abstreifen zurückzuführen. Einige Temperaturabfälle zeigen einen etwas anderen zeitlichen Verlauf und eine etwas größere Temperaturdifferenz. Dies ist besonders ausgeprägt bei der Messzeit 380 s. Diese Abweichungen sind möglicherweise auf kleine Wassertropfen zurückzuführen, die unvollständig abgestreift wurden.

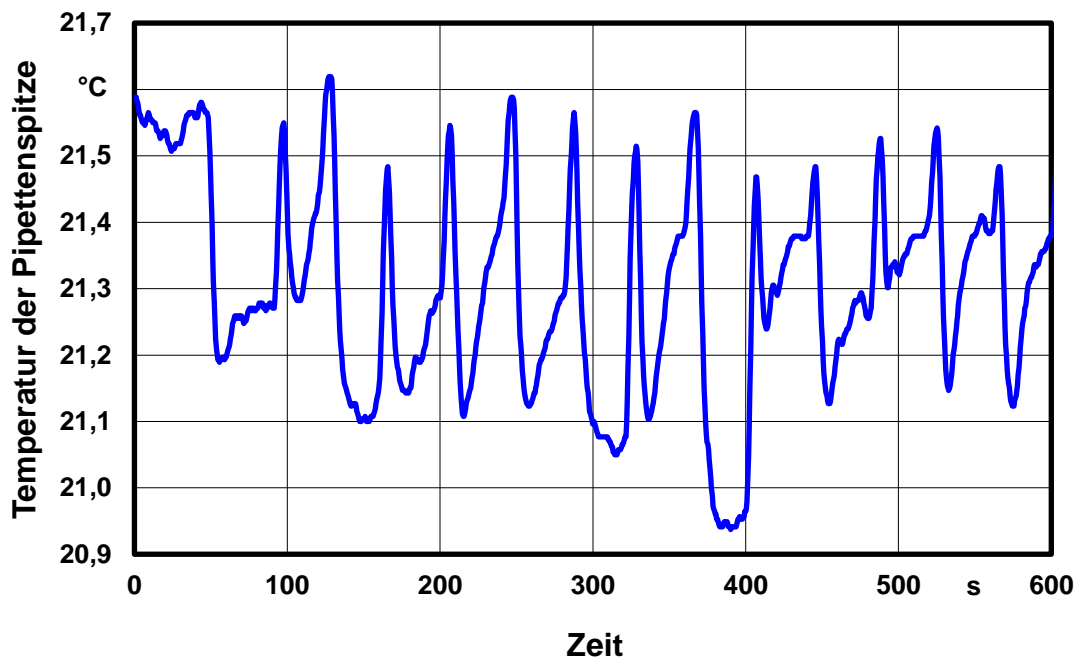


Abb. 9: Temperaturverhalten einer Pipettenspitze nach dem Befüllen mit Wasser und anschließendem Ausfließen der Flüssigkeit, Zyklus über 14 Einzeldosierungen.

Bei der Verwendung anderer Flüssigkeiten kann die Abkühlung durch Verdunstung deutlich größer werden als bei Wasser. In Abb. 10 ist ein mit Abb. 9 zu vergleichendes Ergebnis gezeigt, das mit Ethanol anstelle von Wasser als Flüssigkeit erzielt wurde. Das Temperaturverhalten der Pipettenspitze ist hier grundsätzlich ähnlich dem bei der Verwendung von Wasser, die einzelnen Abschnitte, die durch eine schnelle Abkühlung, eine langsame Erwärmung und eine anschließende schnelle Erwärmung gekennzeichnet sind, sind jedoch nicht so stark ausgeprägt. Wegen der stärkeren Verdunstungsrate von Ethanol ist die Temperaturniedrigung etwa zehnfach größer, sie beträgt etwa 5 K.

Die Zeitkonstanten für die Abkühlung und Wiederaufwärmung sowie die Größe der Abkühlung hängen natürlich von der Wärmekapazität der verwendeten Pipettenspitze ab. Die hier gezeigten Werte sind deshalb als Richtwerte zu sehen. Aufgrund der genannten Werte sollte eine mehrfach benutzte Pipettenspitze mehrere Sekunden in die Vorratsflüssigkeit eintauchen, um deren Temperatur anzunehmen. Die gilt besonders für Spitzen von Luftpolsterpipetten, die üblicherweise vor der eigentlichen Dosierung vorbefeuchtet werden, indem einmal Flüssigkeit eingezogen und anschließend verworfen wird.

Bei Luftpolsterpipetten ergibt sich ein zusätzliches Problem. Mit der Spitze kühlt sich auch das Luftpolster zumindest im unteren Teil der Spitze ab. Nach dem Wiedereintauchen in die Vorratsflüssigkeit ist das unterkühlte Luftpolster durch die Flüssigkeit von der Außenluft abgekoppelt. Bei der folgenden Erwärmung steigt der Druck im Luftpolster, es kann aber wegen der Abkopplung durch die Flüssigkeit keinen Druckausgleich mit der Raumluft geben. Als Folge wird beim Aufnehmen neuer Flüssigkeit zu wenig Flüssigkeit angesaugt. Dieser Effekt tritt zusammen mit der bei Lochner et al. [5] beschriebenen Vergrößerung des Luftpolstervolumens durch Aufnahme von Flüssigkeitsdampf auf und ist experimentell schwer davon zu trennen. Eine entsprechende Untersuchung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden. Ein Ausweg könnte sein, die Vorbefeuchtungsprozedur dahingehend zu ändern, dass zum Vorbefeuchten nicht Flüssigkeit in die Pipettenspitze gesogen wird, sondern mit Dampf gesättigte Luft.

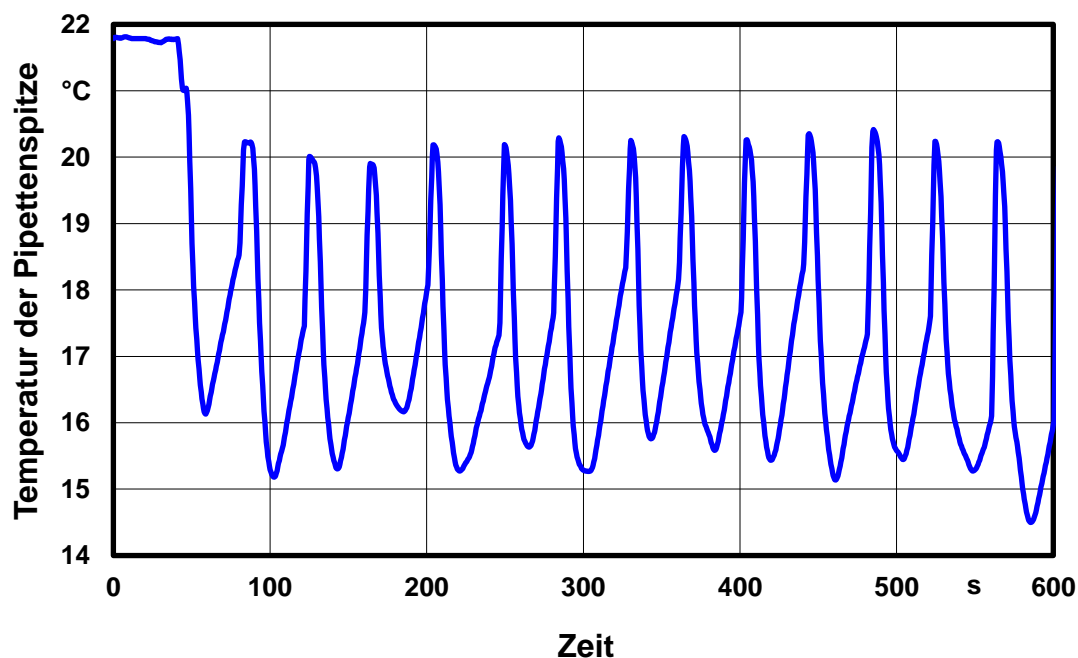


Abb. 10: Temperaturverhalten einer Pipettenspitze nach dem Befüllen und anschließendem Ausfließen der Flüssigkeit bei der Verwendung von Ethanol, Zyklus über 14 Einzeldosierungen.

5.3 Änderung der Luftdichte durch verdunstende Flüssigkeit

Der dritte Einfluss der Verdunstung auf die Ergebnisse betrifft lediglich die Messung mit der gravimetrischen Methode und deren Auswertung.

Die verdunstende Flüssigkeit verändert den Flüssigkeitsdampfgehalt der Luft im Wägeraum. Als Folge wird die Dichte der Luft und demzufolge der Luftauftrieb beeinflusst. Bei gleichbleibender Masse wird sich dann der von der Waage angezeigte Wägewert ändern (vgl. Gl. (4-2)).

Um die entsprechend geänderte Luftauftriebskorrektur durchführen zu können, ist die Kenntnis der geänderten Luftdichte erforderlich. Bereits in Kapitel 4.1 wurde ausgeführt, dass der Einfluss der Luftfeuchte auf die Luftauftriebskorrektur vernachlässigbar ist. Durch die folgende Abschätzung soll gezeigt werden, dass dies auch für andere Flüssigkeiten gilt.

Dazu soll ein Gasgemisch aus mehreren Gasarten betrachtet werden. Druck, Volumen, Temperatur und Zahl der Gasmoleküle seien konstant. Die Gasmoleküle sollen nicht miteinander wechselwirken, das System kann deshalb durch die allgemeine Zustandsgleichung

$$(5-1) \quad pV = Nk_B T$$

beschrieben werden. Die Masse des Gases im Volumen V ist durch

$$(5-2) \quad m = \sum_i N_i M_i \quad , \quad N = \sum_i N_i = \text{const}$$

gegeben.

Dabei sind

p	Druck
V	Volumen
N	Zahl der Teilchen (Gasmoleküle)
k_B	Boltzmannkonstante
T	absolute Temperatur
m	Masse
N_i	Anzahl der Teilchen der Art i
M_i	Masse eines Teilchens der Art i

Mit (4-1), (5-1) und (5-2) lässt sich für die Dichte des Gases die Formel

$$(5-3) \quad \rho = \frac{m}{V} = \frac{p}{k_B T} \sum_i \frac{N_i M_i}{N} = \frac{p}{k_B T} \sum_i \frac{p_i M_i}{p} = \frac{1}{k_B T} \sum_i p_i M_i$$

angeben. p_i ist der Partialdruck der Gasart i , $p = \sum_i p_i = \text{const}$, $\frac{p_i}{p} = \frac{N_i}{N}$.

Die Dichte eines Gasgemisches wird also nur von der Summe der Produkte der Partialdrücke und der Molekülmassen bestimmt, wenn Druck, Volumen und Temperatur konstant sind. Noch einfacher wird diese Beziehung, wenn das Verhältnis der Dichten zweier Gasgemische betrachtet wird.

$$(5-4) \quad \frac{\rho_{Gas1}}{\rho_{Gas2}} = \frac{\sum_i p_{i,1} M_{i,1}}{\sum_j p_{j,2} M_{j,2}}$$

Speziell für den Vergleich der Dichten von mit Flüssigkeitsdampf gesättigter Luft und Flüssigkeitsdampf-freier Luft (im Folgenden als trockene Luft bezeichnet) gilt:

$$(5-5) \quad \rho_{rel} \equiv \frac{\rho_{Luft, gesättigt}}{\rho_{Luft, trocken}} = \frac{p_{Dampf} M_{Dampf} + p_{Luft} M_{Luft}}{p_{Luft, trocken} M_{Luft}}$$

und

$$(5-6) \quad p_{Luft, trocken} = p_{Dampf} + p_{Luft} = \text{const}$$

Für die anschließende Betrachtung werden die Molmassen der Gase verwendet⁵:

$M_{Luft} = 28,8 \text{ g}$ (Gemisch aus 80 % Stickstoff und 20 % Sauerstoff)

$M_{Wasser} = 16 \text{ g}$

$M_{Ethanol} = 60 \text{ g}$

$M_{Nonan} = 128 \text{ g}$

$p_{Luft, trocken}(20^\circ\text{C}) = 1013 \text{ hPa}$ (Normaldruck)

$p_{Dampf, Wasser}(20^\circ\text{C}) = 23 \text{ hPa}$ (Dampfdruck bei 20 °C)

$p_{Dampf, Ethanol}(20^\circ\text{C}) = 51 \text{ hPa}$ (Dampfdruck bei 20 °C)

$p_{Dampf, Nonan}(20^\circ\text{C}) = 4,8 \text{ hPa}$ (Dampfdruck bei 20 °C)

Die Dichte trockener Luft bei Normalbedingungen (1013 hPa, 20 °C) beträgt nach (4-3) 1,204 kg/m³.

⁵ Da relative Größen bestimmt werden, können die Einheiten willkürlich gewählt werden.

Vergleich von mit Wasserdampf gesättigter Luft und trockener Luft:

$$\rho_{rel}(\text{Wasser}, 20^{\circ}\text{C}) = \frac{990 \text{ hPa} \cdot 28,8 \text{ g} + 23 \text{ hPa} \cdot 16 \text{ g}}{1013 \text{ hPa} \cdot 28,8 \text{ g}} = 0,9899$$

Vergleich von mit Ethanoldampf gesättigter Luft und trockener Luft:

$$\rho_{rel}(\text{Ethanol}, 20^{\circ}\text{C}) = \frac{962 \text{ hPa} \cdot 28,8 \text{ g} + 51 \text{ hPa} \cdot 60 \text{ g}}{1013 \text{ hPa} \cdot 28,8 \text{ g}} = 1,0545$$

Vergleich von mit Nonandampf gesättigter Luft und trockener Luft:

$$\rho_{rel}(\text{Nonan}, 20^{\circ}\text{C}) = \frac{1008,2 \text{ hPa} \cdot 28,8 \text{ g} + 4,8 \text{ hPa} \cdot 128 \text{ g}}{1013 \text{ hPa} \cdot 28,8 \text{ g}} = 1,0163$$

Mit Wasserdampf gesättigte Luft hat eine kleinere Dichte als trockene Luft! Grund ist die geringere Molmasse von Wasser verglichen mit Stickstoff und Sauerstoff.

Die Dichte von mit Ethanoldampf gesättigter Luft ist 5,5 % größer als die trockener Luft. Mit Nonandampf gesättigte Luft hat eine um 1,6 % größere Dichte als trockene Luft.

Einsetzen in die Gleichung (4-2) für die Luftauftriebskorrektur ergibt folgende Werte

Wasser in trockener Luft: $m/W = 1,001057$

Wasser in mit Wasserdampf gesättigter Luft: $m/W = 1,001046$

Ethanol in trockener Luft: $m/W = 1,001377$

Ethanol in mit Ethanoldampf gesättigter Luft: $m/W = 1,001452$

Nonan in trockener Luft: $m/W = 1,001529$

Nonan in mit Nonandampf gesättigter Luft: $m/W = 1,001554$

Die jeweiligen Unterschiede zwischen den Luftauftriebskorrekturen in „trockener“ und in mit dem jeweiligen Dampf gesättigter Luft betragen⁶:

Abweichung bei Wasser: $-1,1 \cdot 10^{-5}$

Abweichung bei Ethanol: $+7,5 \cdot 10^{-5}$

⁶ Absolut und relative Unterschiede sind in diesem Fall gleich, da die Werte sehr nahe bei 1 liegen.

Abweichung bei Nonan: $+2,5 \cdot 10^{-5}$

Da in der Praxis keine vollständige Sättigung der Luft im Wägeraum mit Flüssigkeitsdampf erreicht werden kann (aus den Erfahrungen mit Wasser kann ein Sättigungsgrad von 70 % angenommen werden), ist die reale Abweichung entsprechend geringer.

Aufgrund dieser Abschätzungen kann eine Vernachlässigung der Dichteveränderung der Luft durch verdunstende Flüssigkeit also zu relativen Abweichungen der Größenordnung $5 \cdot 10^{-5}$ führen. Diese Abweichungen sind tolerierbar, sie müssen jedoch als Messunsicherheitsbeitrag in das Messunsicherheitsbudget aufgenommen werden.

6 Messunsicherheitsbudget für die Messung eines Flüssigkeitsvolumens mit der gravimetrischen Messapparatur

Bei der Aufstellung eines Messunsicherheitsbudgets muss unterschieden werden zwischen der Messunsicherheit, die der gravimetrischen Bestimmung eines sich auf der Waage befindlichen Flüssigkeitsvolumens beizuordnen ist, und der Messunsicherheit, die der Abmessung dieses Flüssigkeitsvolumens durch das Dosiergerät beizuordnen ist. Ziel beim Aufbau einer Messapparatur muss sein, die Unsicherheit bei der Volumenbestimmung mit dieser Apparatur deutlich geringer zu halten, als es die Unsicherheit bei der Dosierung dieses Volumens mit dem Dosiergerät ist. Die Messunsicherheit der aufgebauten Normalmessapparatur sollte deshalb ein Zehntel der in Normen genannten Fehlergrenzen für die Dosiergeräte nicht überschreiten.

Das Messunsicherheitsbudget erfasst Unsicherheitsbeiträge, die der Wägung, der Bestimmung der Luftauftriebskorrektur und der Flüssigkeitsdichtebestimmung beigeordnet sind. Der der Wägung beigeordnete Unsicherheitsbeitrag kann, soweit vorhanden, dem der Waage beiliegenden Kalibrierschein entnommen werden. Um einen besseren Vergleich der einzelnen Unsicherheitsbeiträge zu ermöglichen, werden hier alle Einzelbeiträge zur Messunsicherheit aufgelistet.

Die der Wägung beigeordnete Messunsicherheit setzt sich aus Beiträgen für die Ablesbarkeit (kleinster Digitalisierungsschritt), die Reproduzierbarkeit, die Nichtlinearität und die Empfindlichkeitsdrift zusammen. Moderne Waagen führen eine Selbstkalibrierung durch, die das Wägeregebnis auf eingebaute Kalibriergewichte zurückführt. Diese kompensiert auch Einflüsse des Ortes, an dem die Waage aufgestellt ist (ortsabhängige Erdanziehung), und Einflüsse der Umgebungstemperatur (hier bleibt als Unsicherheitsbeitrag die Drift der Umgebungstemperatur während der Messung). Das Messunsicherheitsbudget enthält als Unsicherheitsbeitrag die Kalibrierunsicherheit der Masse dieser Kalibriergewichte.

Eine Wägung besteht immer aus der Wägung des Wägegefäßes vor und nach der Dosierung der zu messenden Flüssigkeit (Tarawägung und Bruttowägung), also aus zwei Wägungen. Das Wägeregebnis ist die Differenz der Wägewerte dieser beiden Wägungen. Dies gilt auch, wenn die Tarawägung durch eine Nullpunktseinstellung ersetzt wird, hier wird lediglich der Wert der Tarawägung von allen weiteren Werten subtrahiert. Deshalb sind bei einer Messunsicherheitsbetrachtung die Beiträge für Reproduzierbarkeit und Ablesbarkeit zweimal

aufzuführen. Die Empfindlichkeitsdrift umfasst nur die Drift der Umgebungstemperatur während der Messung (siehe oben). Die für die Waage spezifizierte Nichtlinearität gilt für den Fall, dass bei der Wägung ein großer Teil des Messbereiches der Waage ausgenutzt wird. Ist die Wägewertdifferenz sehr viel kleiner als der Messbereich der Waage, so wirkt sich eine Nichtlinearität auf beide Wägewerte nahezu gleich aus, wird also durch die Differenzbildung auch nahezu vollständig kompensiert. Deshalb kann der Wert für die Nichtlinearität durch einen im Verhältnis Wägewertdifferenz zu Messbereich verringerten Wert beschrieben werden, wenn diese Differenz klein gegen den Messbereich ist. Dies ist bei den vorliegenden Wägungen der Fall.

Beiträge zur Messunsicherheit durch die Luftauftriebskorrektur resultieren aus Unsicherheiten bei der Bestimmung der Lufttemperatur, des Luftdruckes und der relativen Luftfeuchte sowie aus der Unsicherheit, die der Berechnungsformel für die Luftdichte beigeordnet ist. Die Änderung der Luftdichte durch den Flüssigkeitsdampf der dosierten Flüssigkeiten wurde in Kapitel 5.3 abgeschätzt, die Werte dieser Abschätzung werden nicht in die Luftauftriebskorrektur aufgenommen, sondern als Unsicherheitsbeiträge in das Messunsicherheitsbudget übernommen.

Unsicherheitsbeiträge zur Dichtebestimmung der verwendeten Messflüssigkeit resultieren aus Unsicherheiten bei der Temperaturbestimmung und aus der Unsicherheit der Gleichung, die die Abhängigkeit der Dichte von der Temperatur beschreibt. Weitere Einflüsse, wie Gasgehalt der Flüssigkeit und Einfluss des Luftdruckes auf die Flüssigkeitsdichte, sind vernachlässigbar gering (kleiner $5 \cdot 10^{-6}$) und werden deshalb nicht berücksichtigt.

Die in Kapitel 5 dargelegten Einflüsse der Verdunstung erfordern einen zusätzlichen Beitrag im Messunsicherheitsbudget für die Extrapolation des Wägewertes auf den Zeitpunkt der Dosierung, die wegen der Abnahme der Flüssigkeitsmasse im Wägegefäß erforderlich wird. Der Einfluss der Temperaturänderung aufgrund von Verdunstung im Vorratsgefäß wird durch die Temperaturmessung direkt erfasst. Der Einfluss der Temperaturänderung im Wägegefäß kann vernachlässigt werden. Der Einfluss der Temperaturänderung der Pipettenspitzen wirkt sich nicht auf die Messunsicherheit der Messung mit der gravimetrischen Apparatur aus, sondern auf das dosierte Volumen, ist also ein Teil des Messergebnisses, nicht ein Beitrag zur Messunsicherheit der Messung mit der gravimetrischen Apparatur.

Die Empfindlichkeitskoeffizienten, die die Umrechnung der Messunsicherheiten von den Einheiten der jeweiligen Messgröße in die Einheit für das Volumen beschreiben, sind teilweise selbst volumenabhängig. Sie enthalten als Parameter auch die Dichte der Flüssigkeit, ändern sich also mit der Temperatur und bei einem Wechsel der Flüssigkeit. Das Messunsicherheitsbudget ist deshalb nur für die angegebene Flüssigkeit, das angegebene Volumen und die angegebene Temperatur gültig.

In Tabelle 2 sind beispielhaft das Messunsicherheitsbudget für die Messung von 1 μl Wasser und in Tabelle 3 das Messunsicherheitsbudget für die Messung von 50 μl Ethanol dargestellt. Ein ausführliches Messunsicherheitsbudget für die Messung von 20 μl Wasser mit der gravimetrischen Messapparatur ist in Anhang 1 dargestellt.

In Abb. 11 sind die erweiterten Messunsicherheiten, die der Messung von Flüssigkeitsvolumen mit der gravimetrischen Apparatur beizuordnen sind, für Wasser, Nonan und Ethanol im Volumenbereich zwischen 1 μl und 100 μl zusammengefasst. Die Abbildung zeigt, dass die Messunsicherheit für kleine Volumen nahezu konstant ist und erst bei Volumen größer als 10 μl anwächst. Werte für Volumen kleiner 1 μl sind deshalb nicht aufgeführt. Die konstante Unsicherheit bei kleinen Volumen wird durch die volumenunabhängigen Unsicherheitsbeiträge hervorgerufen. Bei Wasser und Nonan sind dies vor allem die Unsicherheit in der Reproduzierbarkeit der Waage und die Unsicherheit bei der rechnerischen Kompensation der Verdunstung. Die Messunsicherheit bei der Volumenbestimmung von Ethanol wird durch die Unsicherheit bei der rechnerischen Kompensation der Verdunstung beherrscht. Bei großen Volumen trägt auch die Unsicherheit in der Dichtebestimmung deutlich zur Messunsicherheit bei. Dieser Anteil ist volumenabhängig, er ist bei Wasser wegen des geringeren Ausdehnungskoeffizienten geringer als bei den anderen Flüssigkeiten. Die Unsicherheit in der Dichtebestimmung bei Ethanol trägt bei größeren Volumen stark zur Gesamtunsicherheit bei, bei 50 μl erreicht sie einen Anteil von 30 %, bei einem Volumen von 100 μl wird bereits ein Anteil von etwa 50 % erreicht⁷.

⁷ Dieser Anteil ist als Quadrat des Unsicherheitsbeitrages dividiert durch das Quadrat der Gesamtunsicherheit, also als Quotient von Varianzen, berechnet.

Tabelle 2: Messunsicherheitsbudget für die Messung von 1 µl Wasser

	Parameter	Wert	Standardmess- unsicherheit	Sensitivitäts- koeffizient	Unsicherheits- beitrag
Waage	Ablesbarkeit für W_1	0,0 kg	$28,9 \cdot 10^{-12}$ kg	$-1,0 \cdot 10^9$ nl/kg	$-29 \cdot 10^{-3}$ nl
	Ablesbarkeit für W_2	0,0 kg	$28,9 \cdot 10^{-12}$ kg	$1,0 \cdot 10^9$ nl/kg	$29 \cdot 10^{-3}$ nl
	Reproduzier- barkeit für W_1	0,0 kg	$577 \cdot 10^{-12}$ kg	$-1,0 \cdot 10^9$ nl/kg	$-580 \cdot 10^{-3}$ nl
	Reproduzier- barkeit für W_2	0,0 kg	$577 \cdot 10^{-12}$ kg	$1,0 \cdot 10^9$ nl/kg	$580 \cdot 10^{-3}$ nl
	Nichtlinearität für $W_2 - W_1$	0,0 kg	$23,1 \cdot 10^{-12}$ kg	$1,0 \cdot 10^9$ nl/kg	$23 \cdot 10^{-3}$ nl
	Kalibrierung der internen Gewichte	1	$577 \cdot 10^{-9}$	$1,0 \cdot 10^3$ nl	$580 \cdot 10^{-6}$ nl
	Empfindlichkeits- drift	0,0 °C	$289 \cdot 10^{-3}$ °C	$1,0 \cdot 10^{-3}$ nl/°C	$290 \cdot 10^{-6}$ nl
	Verdunstungs- korrektur	0,0 kg	$1,15 \cdot 10^{-9}$ kg	$1,0 \cdot 10^9$ nl/kg	$870 \cdot 10^{-3}$ nl
Flüssigkeits-	Temperatur t_F	20 °C	$57,7 \cdot 10^{-3}$ °C	$210 \cdot 10^{-3}$ nl/°C	$12 \cdot 10^{-3}$ nl
dichte	Approximations- formel	0,0 kg/m ³	$5,77 \cdot 10^{-3}$ kg/m ³	$-1,0$ nl·m ³ /kg	$-5,8 \cdot 10^{-3}$ nl
Luftdichte	Temperatur t_L	20 °C	$57,7 \cdot 10^{-3}$ °C	$-8,3 \cdot 10^{-3}$ nl/°C	$-480 \cdot 10^{-6}$ nl
	Druck p_L	$1,013 \cdot 10^3$ hPa	1,15 hPa	$2,1 \cdot 10^{-3}$ nl/hPa	$2,4 \cdot 10^{-3}$ nl
	relative Luft- feuchte φ	70,0 %	11,5 %	$-180 \cdot 10^{-6}$ nl/%	$-2,1 \cdot 10^{-3}$ nl
	Einfluss anderer Flüssigkeiten auf die Luftdichte	1,0	0,0	0,0 nl	0,0 nl
Volumen			1,20 nl		

Erweiterte Messunsicherheit: 2,4 nl, Erweiterungsfaktor: 2

Tabelle 3: Messunsicherheitsbudget für die Messung von 50 µl Ethanol

	Parameter	Wert	Standardmess- unsicherheit	Sensitivitäts- koeffizient	Unsicherheits- beitrag
Waage	Ablesbarkeit für W_1	0,0 kg	$28,9 \cdot 10^{-12}$ kg	$-1,3 \cdot 10^9$ nl/kg	$-37 \cdot 10^{-3}$ nl
	Ablesbarkeit für W_2	0,0 kg	$28,9 \cdot 10^{-12}$ kg	$1,3 \cdot 10^9$ nl/kg	$37 \cdot 10^{-3}$ nl
	Reproduzier- barkeit für W_1	0,0 kg	$577 \cdot 10^{-12}$ kg	$-1,3 \cdot 10^9$ nl/kg	$-730 \cdot 10^{-3}$ nl
	Reproduzier- barkeit für W_2	0,0 kg	$577 \cdot 10^{-12}$ kg	$1,3 \cdot 10^9$ nl/kg	$730 \cdot 10^{-3}$ nl
	Nichtlinearität für $W_2 - W_1$	0,0 kg	$23,1 \cdot 10^{-12}$ kg	$1,3 \cdot 10^9$ nl/kg	$29 \cdot 10^{-3}$ nl
	Kalibrierung der internen Gewichte	0,0 °C	$289 \cdot 10^{-3}$ °C	$51 \cdot 10^{-3}$ nl/kg	$15 \cdot 10^{-3}$ nl
	Empfindlichkeits- drift	1	$577 \cdot 10^{-9}$	$51 \cdot 10^3$ nl	$29 \cdot 10^{-3}$ nl
	Verdunstungs- korrektur	0,0 kg	$5,77 \cdot 10^{-9}$ kg	$1,3 \cdot 10^9$ nl/kg	4,4 nl
Flüssigkeits-	Temperatur t_F	20 °C	$57,7 \cdot 10^{-3}$ °C	-51 nl/°C	-2,9 nl
dichte	Approximations- formel	0,0 kg/m ³	$57,7 \cdot 10^{-3}$ kg/m ³	-65 nl·m ³ /kg	-3,7 nl
Luftdichte	Temperatur t_L	20°C	$57,7 \cdot 10^{-3}$ °C	$-550 \cdot 10^{-3}$ nl/°C	$-32 \cdot 10^{-3}$ nl
	Druck p_L	$1,013 \cdot 10^3$ hPa	1,15 hPa	$140 \cdot 10^{-3}$ nl/hPa	$160 \cdot 10^{-3}$ nl
	relative Luft- feuchte φ	70,0 %	11,5 %	$-12 \cdot 10^{-3}$ nl/%	$-140 \cdot 10^{-3}$ nl
	Einfluss anderer Flüssigkeiten auf die Luftdichte	1,0270	$15,6 \cdot 10^{-3}$	70 nl	1,1 nl
Volumen			6,65 nl		

Erweiterte Messunsicherheit: 13 nl, Erweiterungsfaktor: 2

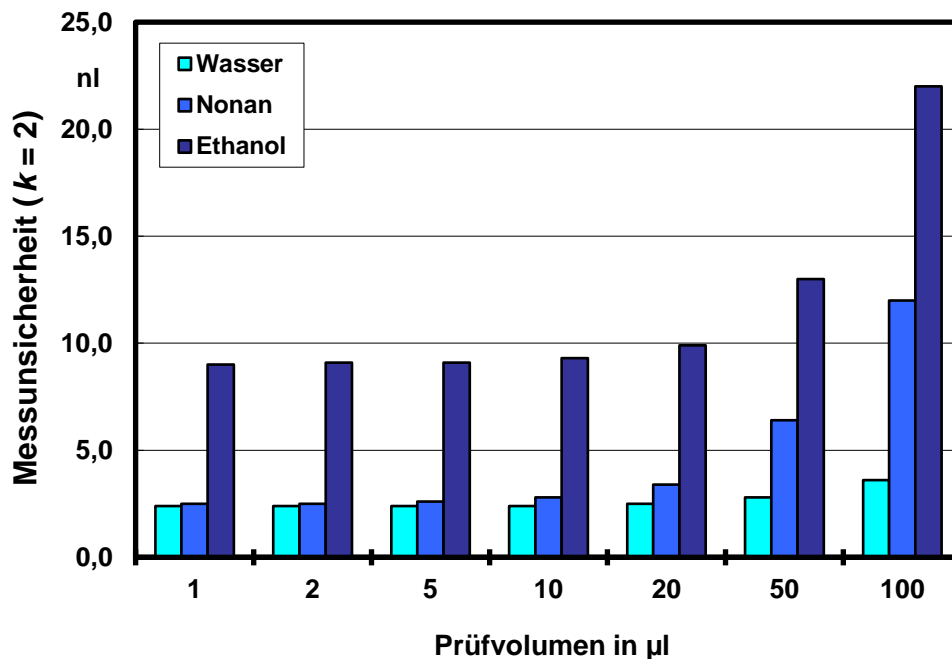


Abb. 11: Erweiterte Messunsicherheit ($k = 2$) für die Messung von Flüssigkeitsvolumen mit der gravimetrischen Messapparatur bei ausgewählten Prüfvolumen. Die Messunsicherheit ist bei Prüfvolumen kleiner 10 µl nahezu volumenunabhängig.

Die der gravimetrischen Bestimmung des Volumens beigeordnete Messunsicherheit ist in Tabelle 4 mit den in der Norm 8655 Teil 2 spezifizierten Fehlergrenzen verglichen.

Die Tabelle zeigt, dass die zu Anfang dieses Kapitels erhobene Forderung, dass die Messunsicherheit der Messung mit der gravimetrischen Messapparatur ein Zehntel der Fehlergrenzen nicht überschreiten soll, für Wasser deutlich übertroffen wird. Die Werte für Nonan sind diesen sehr ähnlich und deshalb in der Tabelle nicht aufgeführt. Bei Ethanol ist diese Forderung nicht ganz erfüllt. Bei Volumen von 1 µl und 2 µl liegt die Unsicherheit der Messung mit der gravimetrischen Apparatur bei einem Fünftel der Fehlergrenzen. Für die Fehlergrenze der systematischen Fehler wird die obige Forderung nach einem Zehntel erst bei 5 µl und größeren Volumen erfüllt, für die Fehlergrenze der zufälligen Fehler erst bei Volumen ab 20 µl. Die üblicherweise gestellte schwächere Anforderung, dass das Verhältnis Messunsicherheit zu Fehlergrenze ein Drittel nicht überschritten werden soll, wird für alle Volumen erfüllt.

Tabelle 4: Vergleich der Messunsicherheiten, die der Messung mit der gravimetrischen Messapparatur beizuordnen sind, mit der Norm 8655 Teil 2⁸

Prüfvolumen	Messunsicherheit ($k = 2$) der Messung mit der gravi- metrischen Messapparatur		Fehlergrenzen für die Messabweichung nach ISO 8655 Teil 2	
	Wasser	Ethanol	systematisch	zufällig
1 μl	2,4 nl	9,0 nl	50 nl	50 nl
2 μl	2,4 nl	9,1 nl	80 nl	40 nl
5 μl	2,4 nl	9,1 nl	125 nl	75 nl
10 μl	2,4 nl	9,3 nl	120 nl	80 nl
20 μl	2,5 nl	9,9 nl	200 nl	100 nl
50 μl	2,8 nl	13,0 nl	500 nl	200 nl
100 μl	3,6 nl	22,0 nl	800 nl	300 nl

⁸ Der Vergleich ist für Prüfvolumen von 0,2 μl nicht durchgeführt worden, weil in der Norm für dieses Volumen keine Fehlergrenzen angegeben sind.

7 Vergleich der Dosierung von Wasser, Ethanol und Nonan

Um die in Kapitel 3 gestellte Frage „Ist eine Kalibrierung, die Wasser als Kalibrierflüssigkeit verwendet, auf die Dosierung anderer Flüssigkeiten übertragbar?“ beantworten zu können, wurden zunächst Messungen mit den Flüssigkeiten Wasser, Ethanol und Nonan durchgeführt. Der untersuchte Volumenbereich reichte von 0,2 µl bis 50 µl. Die für diesen Vergleich verwendeten Dosiergeräte waren handelsübliche direktverdrängende Kolbenhubpipetten (im Folgenden auch als Direktverdränger bezeichnet) und Mikroliterspritzen verschiedener Hersteller. Es wurden sowohl Geräte mit fest eingestelltem Volumen als auch Geräte mit variablem Volumen verwendet. Mikroliterspritzen und Kolbenhubpipetten mit variablem Volumen wurden zum Teil bei mehreren Prüfvolumen gemessen, sie wurden dabei in einem Bereich von 5 % bis 100 % ihres Nennvolumens⁹ eingesetzt.

Die verwendeten Dosiergeräte unterschieden sich in ihrer Konstruktion und in den Materialien, aus denen die Verdrängerkolben und die Zylinder (Zylinder aus Kunststoff werden, besonders bei Luftpolsterpipetten, als „Spitzen“ bezeichnet) gefertigt waren. Es wurden

4 Kolbenhubpipetten mit Glaszylinder und Stahlkolben (5 Prüfvolumen)

2 Kolbenhubpipetten mit Glaszylinder und Stahlkolben mit zusätzlicher Kunststoffdichtung (3 Prüfvolumen)

4 Kolbenhubpipetten mit Kunststoffzylinder und Kunststoffkolben (9 Prüfvolumen)
und

4 Mikroliterspritzen mit Stahlzylinder und Stahlkolben (4 Prüfvolumen)

miteinander verglichen. Soweit möglich, wurden dabei Geräte mehrerer Hersteller verwendet. Wegen der großen Zahl der Messungen wurde von jedem Gerätetyp nur jeweils ein Exemplar untersucht. In den nachfolgenden Abbildungen sind die verschiedenen Typen der direktverdrängenden Kolbenhubpipetten als Direktverdränger Glas/Stahl, Direktverdränger Glas/Stahl mit Kunststoffdichtung und Direktverdränger Kunststoff/Kunststoff bezeichnet. Für alle Geräte wurde der Vergleich des dosierten Volumens von Wasser, Ethanol und Nonan durchgeführt, ohne die Pipettenspitzen zu wechseln, um den Einfluss unterschiedlicher Spitzen auf das Dosierergebnis auszuschließen.

⁹ **Nennvolumen** ist das vom Hersteller angegebene maximal nutzbare Volumen eines Volumendosiergerätes, das für die Messung eingestellte Volumen wird in der vorliegenden Arbeit wie in ISO 8655-6 als **Prüfvolumen** bezeichnet. Bei Geräten mit fest eingestelltem Volumen sind Nennvolumen und Prüfvolumen gleich.

Für eine Vergleichsmessung wurden, wie in Kapitel 4.3 und 4.4 beschrieben, jeweils 15 Einzeldosierungen durchgeführt und davon die Einzeldosierungen 3 bis 12 ausgewertet und für eine Mittelwertbestimmung und die Bestimmung der Wiederholstandardabweichung herangezogen. Diese Messungen wurden mit jedem Dosiergerät für die genannten Flüssigkeiten durchgeführt und dann miteinander verglichen.

Beispiele für diese Dosierungen sind in Abb. 12 bis Abb. 15 (S. 50ff) für verschiedene Prüfvolumen gezeigt. In jeder Abbildung sind Dosierungen von Wasser, Ethanol und Nonan dargestellt. In Abb. 12 ist die Dosierung von 50 μl mit einer 100- μl -Kolbenhubpipette mit variablem Volumen gezeigt. Spitze und Kolben sind bei diesem Gerät aus Kunststoff. Abb. 13 zeigt die Dosierung von 10 μl mit einer Fixvolumen-Pipette mit Glaszylinder und Stahlkolben, Abb. 14 die Dosierung von 1 μl mit einer 20- μl -Pipette mit variablem Volumen, wie bei Abb. 12 ein System mit Kolben und Spitze aus Kunststoff. In Abb. 15 ist die Dosierung von 0,2 μl mit einer 0,5- μl -Mikroliterspritze mit Metallzylinder und -kolben gezeigt.

Diese Abbildungen zeigen gut die Kapitel 5.1 postulierte Abhängigkeit der Verdunstungsrate auch vom Prüfvolumen und vom Dosiergerät. Wie dort beschrieben, hängen die Verdunstungsverluste außer vom Dampfdruck auch von der durch das Abstreifen zusätzlich erzeugten Oberfläche und damit sowohl von der Oberflächenspannung der Flüssigkeit als auch von der Form der Spitze des Dosiergerätes und vom Volumen der ausgestoßenen Flüssigkeit ab. Deshalb ist die Verdunstungsrate für verschiedene Geräte und Volumina unterschiedlich. Kleinere Volumina und kleinere Spitzendurchmesser führen zu kleineren benetzten Gefäßwandflächen und damit zu geringerer Erhöhung der Verdunstungsraten gegenüber dem stationären Wert, der erreicht wird, wenn sich keine zusätzliche Flüssigkeit mehr an den Gefäßwänden befindet.

Diese Unterschiede treten auch in den in Abb. 12 bis Abb. 15 gezeigten Messungen auf. In Tabelle 5 sind die aus den Abbildungen ermittelten Verdunstungsverluste für diese Messungen aufgelistet. Angegeben sind hier die Flüssigkeitsvolumina, die in einem Zeitraum von 40 s, also im Zeitraum zwischen zwei Dosierungen, verdunsten. In den grau unterlegten Spalten neben diesen Werten ist vermerkt, ob der Flüssigkeitsdampfgehalt der Luft im Wägeraum durch eine Verdunstungsfalle erhöht wurde. Dies war bei Wasser immer der Fall, bei Ethanol nur bei kleinen Prüfvolumina. Nonan ist (sehr schwach) toxisch, es wurde deshalb auf die Benutzung einer Verdunstungsfalle verzichtet.

Tabelle 5: Aus dem Wägebecher während des Zeitraumes zwischen zwei Dosierungen verdunstetes Flüssigkeitsvolumen¹⁰. In den grau unterlegten Spalten ist aufgeführt, ob eine Verdunstungsfalle eingesetzt wurde.

Prüf- volumen	Flüssigkeit					
	Verwendung einer Verdunstungsfalle					
	Wasser		Ethanol		Nonan	
0,2 µl	19 nl	ja	304 nl	ja	76 nl	nein
1 µl	17 nl	ja	279 nl	ja	72 nl	nein
10 µl	46 nl	ja	720 nl	nein	92 nl	nein
50 µl	68 nl	ja	913 nl	nein	139 nl	nein

Bei den Prüfvolumen 1 µl, 10 µl und 50 µl steigt das verdunstete Flüssigkeitsvolumen mit steigendem Prüfvolumen an, wie es erwartet wurde. Bei einem Prüfvolumen von 0,2 µl ist es jedoch größer als bei einem Prüfvolumen von 1 µl. Hier zeigt sich das unterschiedliche Abstreifverhalten der beiden verwendeten Dosiergeräte. Bei 0,2 µl wurde eine Mikroliterspritze verwendet, die einen sehr dünnen, flexiblen Stahlzylinder mit sehr kleiner Austrittsöffnung besitzt. Dieser Stahlzylinder stößt aber beim Abstreifen nicht starr gegen die Gefäßwand, sondern verbiegt sich und hat deshalb einen sehr kleinen Anlagewinkel und darum möglicherweise ein anderes Abstreifverhalten. Die bei dem Prüfvolumen 10 µl verwendete Kolbenhubpipette hat einen starren Kunststoffzylinder, der sich beim Abstreifen nicht verbiegt.

Obwohl der Dampfdruck und damit die Verdunstungsrate von Nonan sehr gering sind, ist das verdunstete Volumen größer als bei Wasser, dies liegt an der wegen der geringeren Oberflächenspannung größeren benetzten Fläche.

Das unterschiedliche Verdunstungsverhalten führt dazu, dass die vier Abbildungen nicht „skalieren“. So liegt die Kurve für Ethanol wegen der größeren Dichte des Ethanols beim

¹⁰ Die durch Verdunstung hervorgerufenen Verluste werden rechnerisch kompensiert, die angegebenen Werte sind allein also **kein** Maß für die durch Verdunstung hervorgerufenen Messunsicherheitsbeiträge.

Prüfvolumen 50 µl über der von Nonan. Beim Prüfvolumen 10 µl wirkt sich die höhere Verdunstungsrate bereits so aus, dass beide Kurven sehr nahe beieinander liegen. Bei kleineren Prüfvolumen liegen die Messwerte für Ethanol unter denen von Nonan. Besonders bemerkenswert ist die Messung bei dem Prüfvolumen 0,2 µl. Bei Ethanol ist das verdunstete Volumen größer als das zudosierte Volumen, d.h. die Menge an Flüssigkeit im Wägegefäß nimmt trotz des Zudosierens ab. Die Verdunstungsrate ist auch nicht zeitlich konstant, die Kurve weist eine leichte Krümmung auf. Dennoch ist eine Auswertung mit gutem Erfolg möglich, wenn die Verdunstungsverluste gemessen und rechnerisch kompensiert werden. Die aus der gezeigten Kurve errechneten dosierten Volumen haben einen Variationskoeffizienten von nur 3 %.

Der Vergleich der dosierten Volumen von Wasser und von Ethanol ist in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt. In diesen Abbildungen ist jeweils die Differenz der aus 10 Einzeldosierungen gebildeten Mittelwerte zwischen Wasser und Ethanol dargestellt. Da der gemessene Volumenbereich mehr als zwei Dekaden umfasst, ist zusätzlich zur Differenz in Abb. 16 zum besseren Vergleich auch die relative Abweichung in Abb. 17 gezeigt. Die ebenfalls eingezeichneten Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz für den Erweiterungsfaktor $k = 2$ an.

Das dosierte Ethanol-Volumen ist mit einer Ausnahme etwas kleiner als das damit zu vergleichende Wasservolumen. Für Volumen von 2 µl und größer liegt diese Unterdosierung für alle Geräte zwischen 0,5 % und 1,5 % (hier gibt es ebenfalls eine Ausnahme). Bei kleineren Volumen wurden Unterschiede von mehr als 10 % gefunden. Ein wesentlicher Grund für die Unterdosierung ist in der großen Verdunstungsrate schon auf dem Weg vom Vorratsgefäß zum Wägebecher zu sehen. Dabei verdunstet die Flüssigkeit auf der Außenseite der Pipettenspitze, aber auch Flüssigkeit aus der Öffnung der Pipettenspitze heraus. Diese Verdunstung aus der Öffnung der Pipettenspitze heraus ist bei Ethanol so groß, dass sie unter dem Mikroskop visuell erkennbar ist.

Die Unterschiede zwischen den Dosierungen von Wasser und Nonan sind in den Abb. 18 und Abb. 19 gezeigt. Wieder ist zusätzlich zur absoluten Differenz in Abb. 18 auch die relative Abweichung in Abb. 19 dargestellt. Die dosierten Volumen von Nonan sind überwiegend geringer als Wasser. Im Gegensatz zu Ethanol treten jedoch auch Abweichungen zur anderen Seite auf, das mit Nonan dosierte Volumen ist in einigen Fällen größer als das mit Wasser

dosierte Volumen. Die Abweichungen im dosierten Volumen von Wasser und Nonan haben in vielen Fällen eine vergleichbare Größe wie die Messunsicherheit, die quantitative Angabe der Abweichungen ist deshalb wenig zuverlässig und nicht auf andere Geräte übertragbar. Der Einfluss der Verdunstung von Flüssigkeit aus der Gerätespitze heraus ist, wie wegen des wesentlich geringeren Dampfdruckes gegenüber Ethanol auch zu erwarten, hier nicht zu sehen.

Mit einer Ausnahme lassen die Ergebnisse sowohl bei Ethanol als auch bei Nonan keine Rückschlüsse darauf zu, dass ein Gerätetyp besonders gut oder weniger gut zur Dosierung geeignet ist. Unterschiede beruhen mehr auf den individuellen Eigenschaften der Geräte, nicht auf allgemeinen Konstruktionseigenschaften. Die Ausnahme sind Kolbenhubpipetten mit Glaszylinder und Stahlkolben mit Kunststoffdichtung. Dieser Gerätetyp ist für „größere“ Volumen konzipiert, in der vorliegenden Untersuchung wurden ein Gerät bei 10 µl und 20 µl und ein weiteres bei 50 µl geprüft. Das Gerät für 10 µl und 20 µl zeigt bei Ethanol keine Auffälligkeiten, die Abweichungen im dosierten Volumen sind vergleichbar den Werten anderer Geräte. Das Gerät für 50 µl zeigt dagegen eine deutlich größere Abweichung. Bei Nonan zeigen beide Geräte eine deutliche Unterdosierung. Eine visuelle Kontrolle der Geräte ergab, dass Flüssigkeit an den Dichtungen vorbei in den Bereich oberhalb der Dichtungen gelangt war. Die Geräte waren nach den Messungen deutlich schwergängiger als vorher. Hier sind die Dichtmaterialien offensichtlich von den organischen Flüssigkeiten angegriffen worden, die Dichtwirkung war nicht mehr gegeben. Möglicherweise sind die Dichtungen dabei aufgequollen. Der Effekt war bei Nonan deutlich größer als bei Ethanol. Da aber die Messungen mit Nonan immer nach denen mit Ethanol durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, dass hierfür eine Vorschädigung der Dichtungen durch Ethanol verantwortlich ist¹¹. Wegen der Schädigungen wurden diese Geräte im Folgenden nicht weiter untersucht.

¹¹ Es sei daran erinnert, dass alle Messungen ohne Wechsel von Kolben und Zylinder durchgeführt wurden.

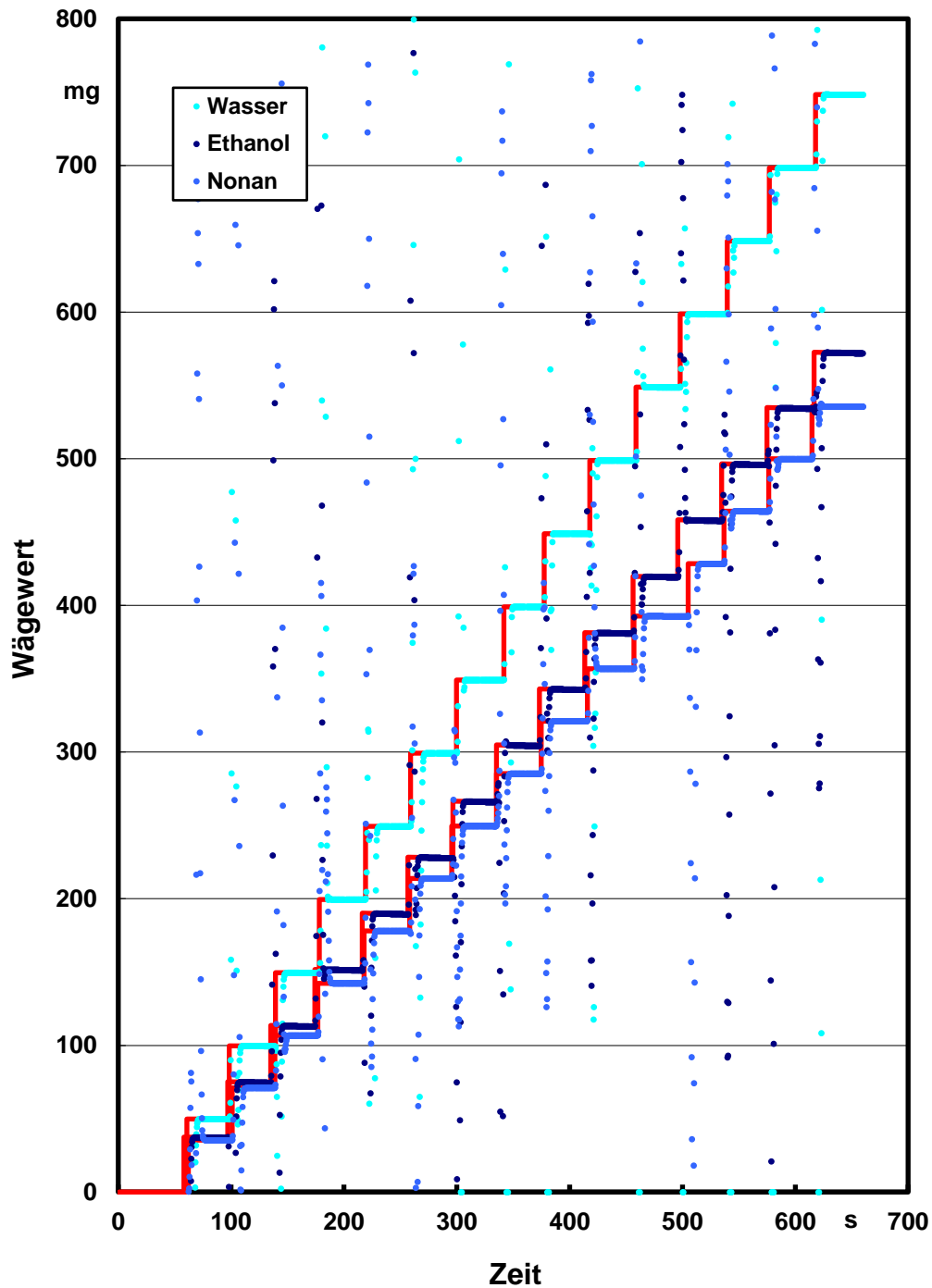


Abb. 12: Wägewert bei je 15maliger Dosierung von 50 μl Wasser, Ethanol und Nonan mit einer direktverdrängenden Kolbenhubpipette mit Kunststoffkolben und -zylinder. Die durchgezogenen Treppenkurven sind aus den Anpassungsgeraden zusammengesetzt. Der Sprung auf die nächste Gerade erfolgt zum jeweiligen Zeitpunkt der Dosierung. Die Höhe der Stufen ist ein Maß für den jeweiligen Wägewert des dosierten Volumens.

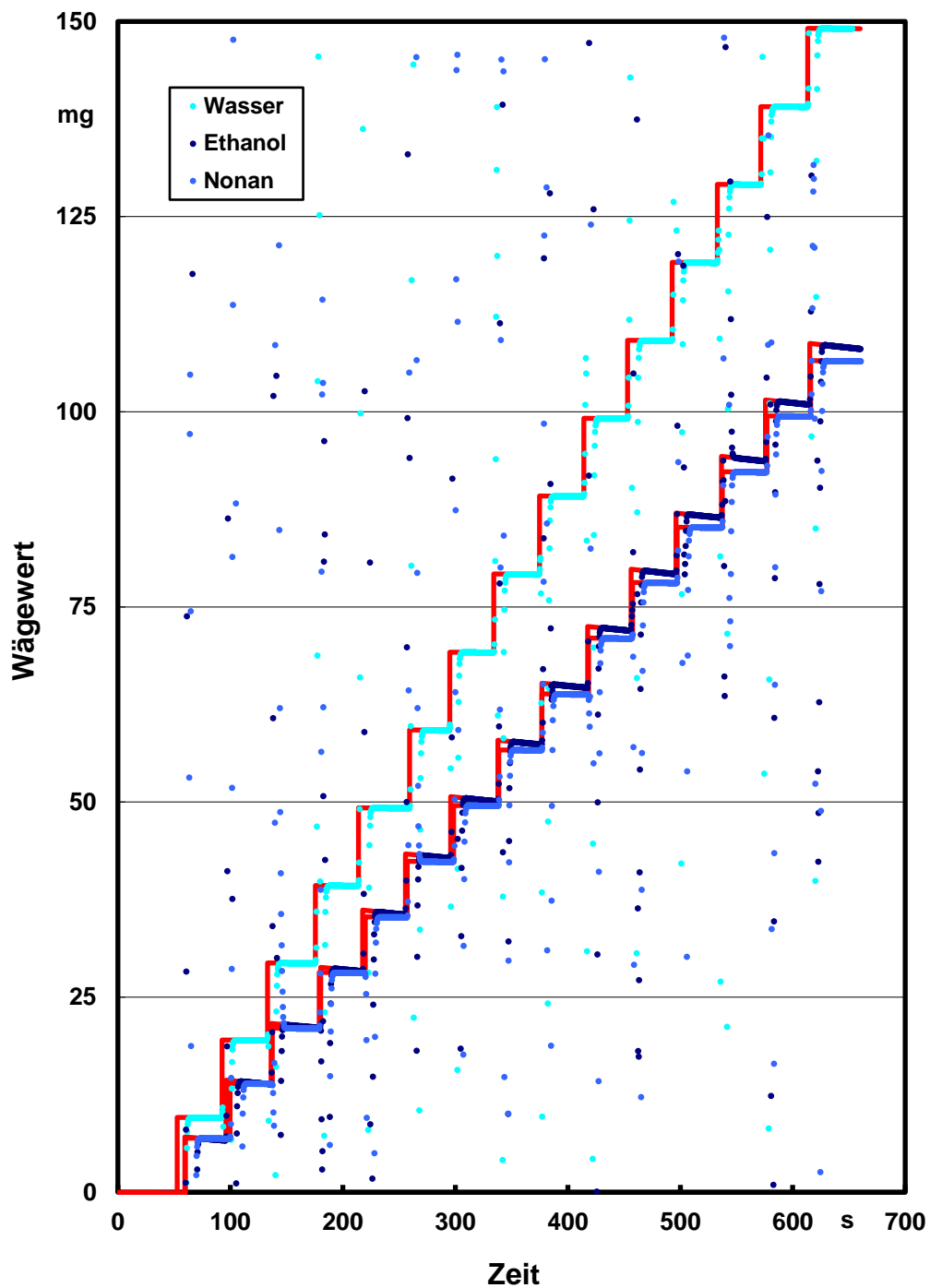


Abb. 13: Wägewert bei je 15maliger Dosierung von 10 μl Wasser, Ethanol und Nonan mit einer direktverdrängenden Kolbenhubpipette mit Stahlkolben und Glaszylinder. Die durchgezogenen Treppenkurven sind aus den Anpassungsgeraden zusammengesetzt. Der Sprung auf die nächste Gerade erfolgt zum jeweiligen Zeitpunkt der Dosierung. Die Höhe der Stufen ist ein Maß für den jeweiligen Wägewert des dosierten Volumens.

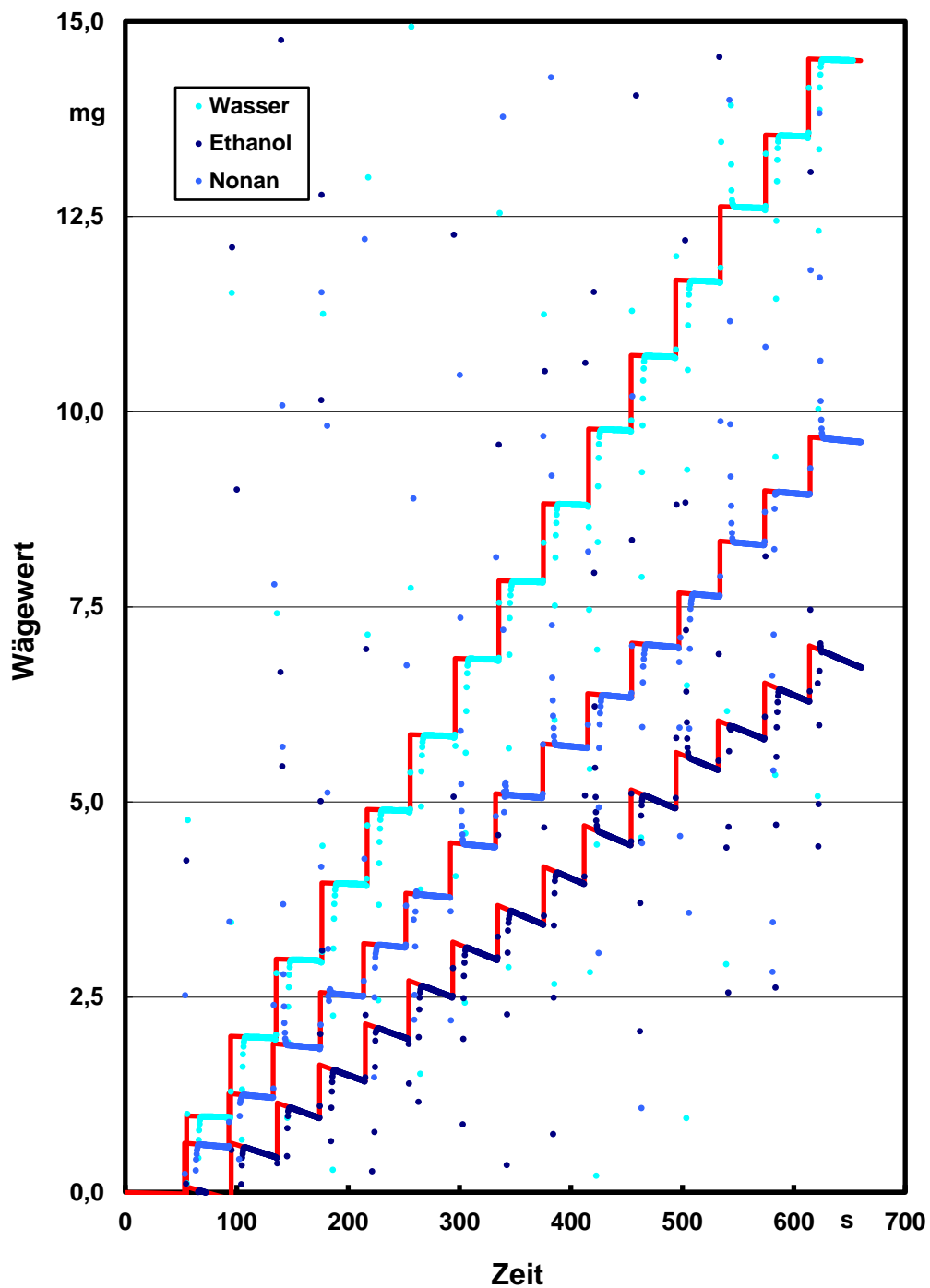


Abb. 14: Wägewert bei je 15maliger Dosierung von 1 μl Wasser, Ethanol und Nonan mit einer direktverdrängenden Kolbenhubpipette mit Kunststoffkolben und -zylinder. Die durchgezogenen Treppenkurven sind aus den Anpassungsgeraden zusammengesetzt. Der Sprung auf die nächste Gerade erfolgt zum jeweiligen Zeitpunkt der Dosierung. Die Höhe der Stufen ist ein Maß für den jeweiligen Wägewert des dosierten Volumens.

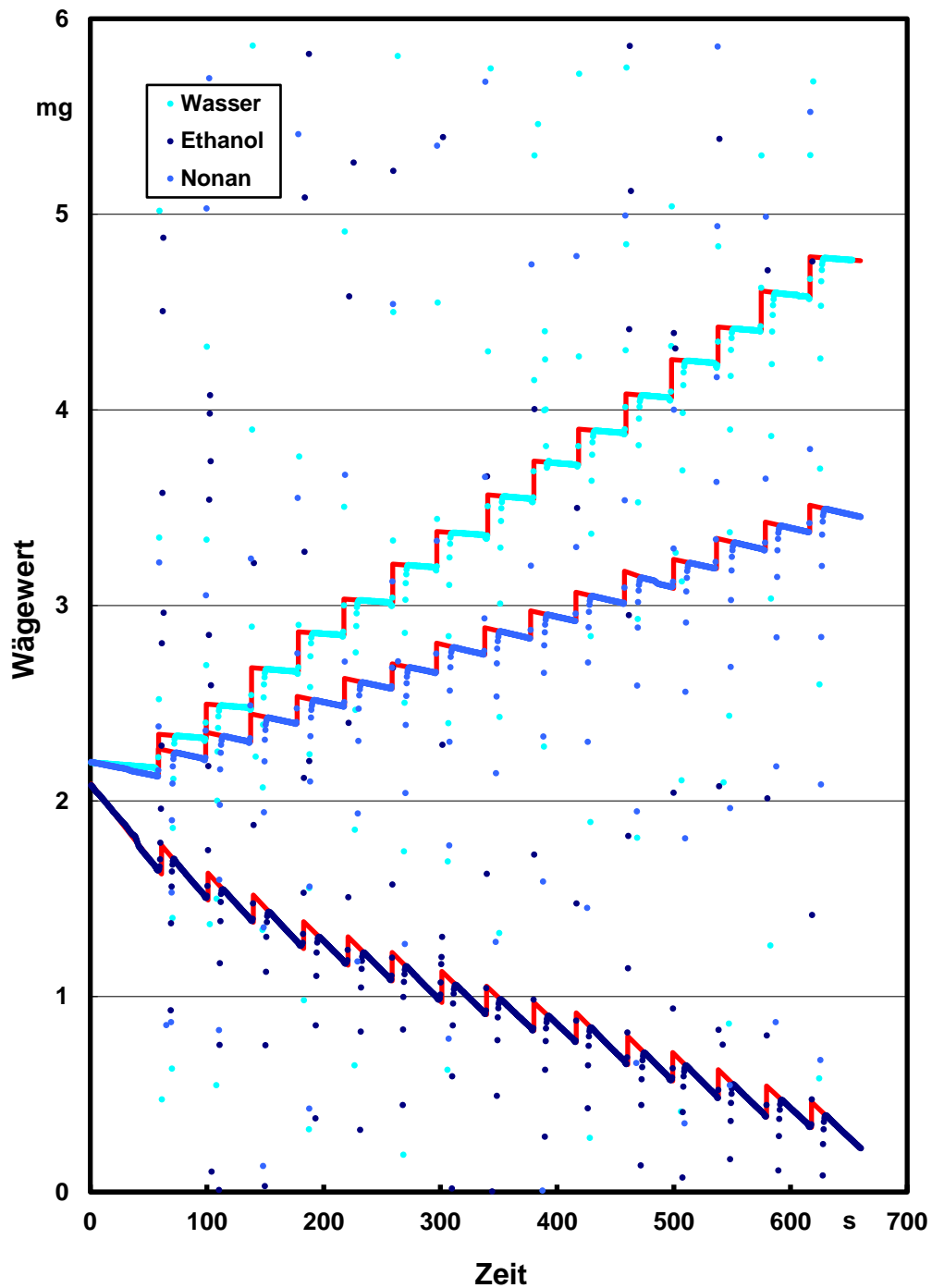


Abb. 15: Wägewert bei je 15maliger Dosierung von 0,2 μl Wasser, Ethanol und Nonan mit einer Mikroliterspritze. Die durchgezogenen Treppenkurven sind aus den Anpassungsgeraden zusammengesetzt. Der Sprung auf die nächste Gerade erfolgt zum jeweiligen Zeitpunkt der Dosierung. Die Höhe der Stufen ist ein Maß für den jeweiligen Wägewert des dosierten Volumens.

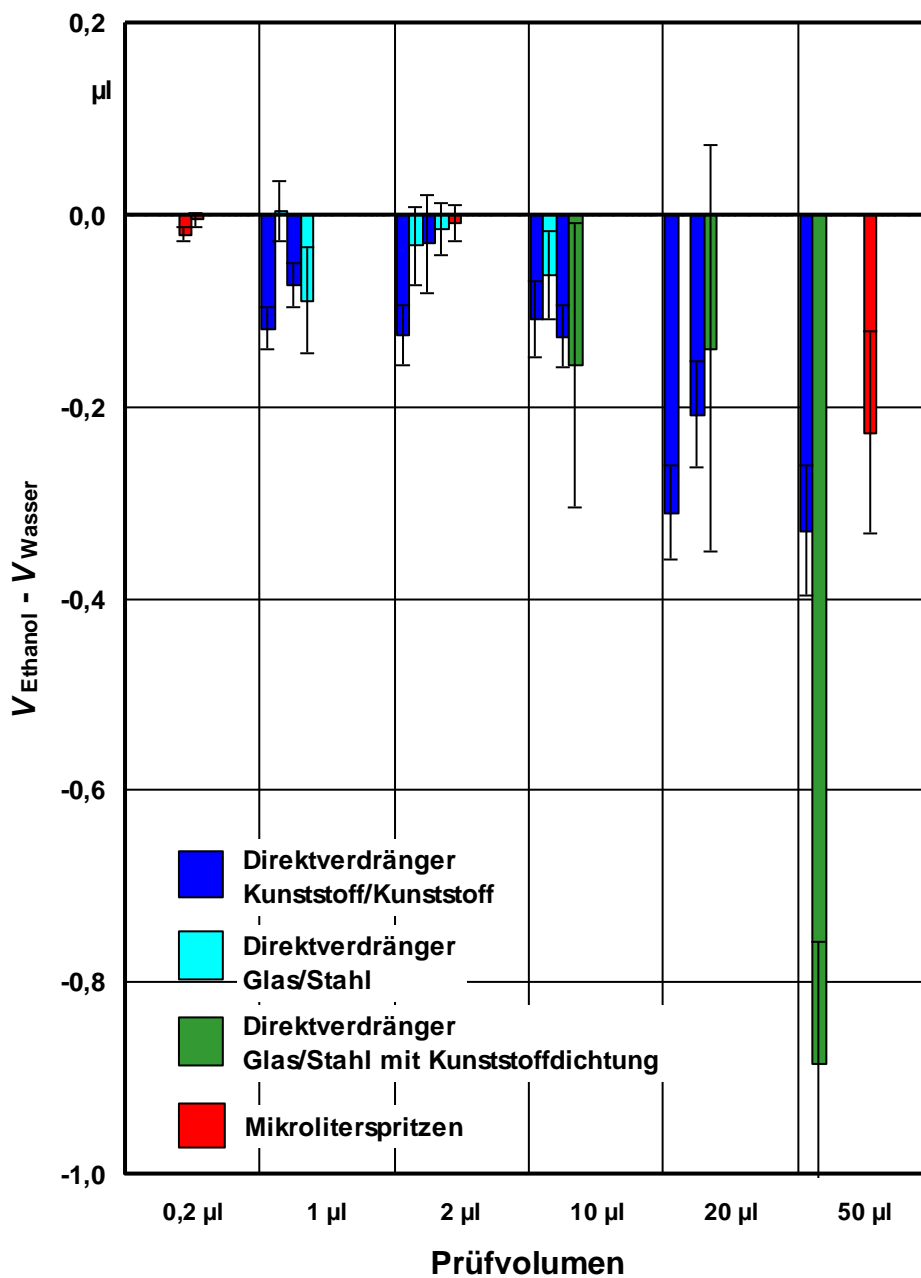


Abb. 16: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Ethanol. Dargestellt ist die absolute Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Ethanol. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

Um einen Vergleich der einzelnen Dosiergeräte bei der Betrachtung verschiedener Flüssigkeiten zu ermöglichen, wurden die Positionen der einzelnen Geräte in diesem und den folgenden Diagrammen beibehalten. Aus diesem Grund bleiben Positionen im Diagramm leer, wenn für das entsprechende Gerät und Volumen keine Messungen vorliegen.

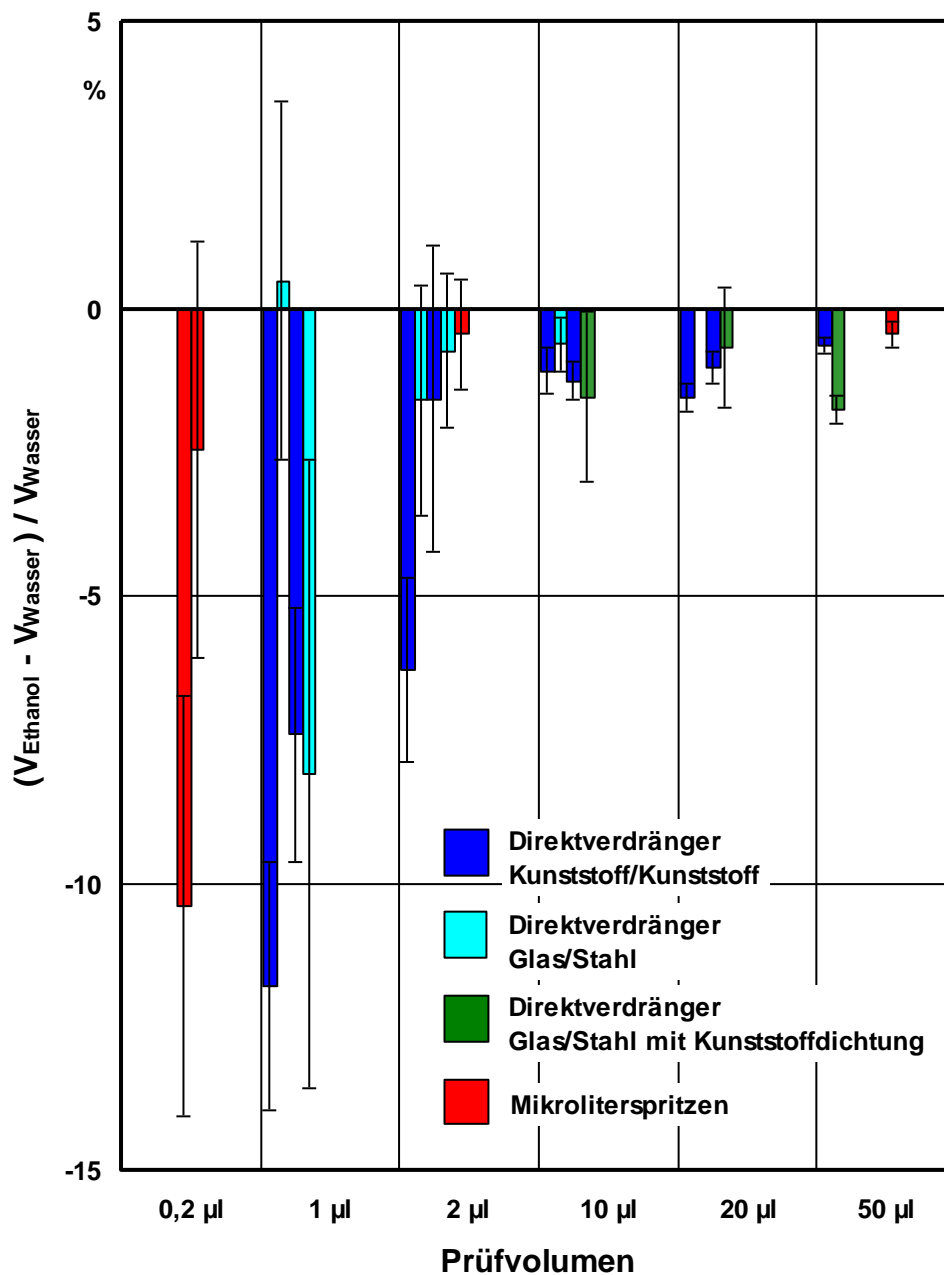


Abb. 17: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Ethanol. Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Ethanol. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

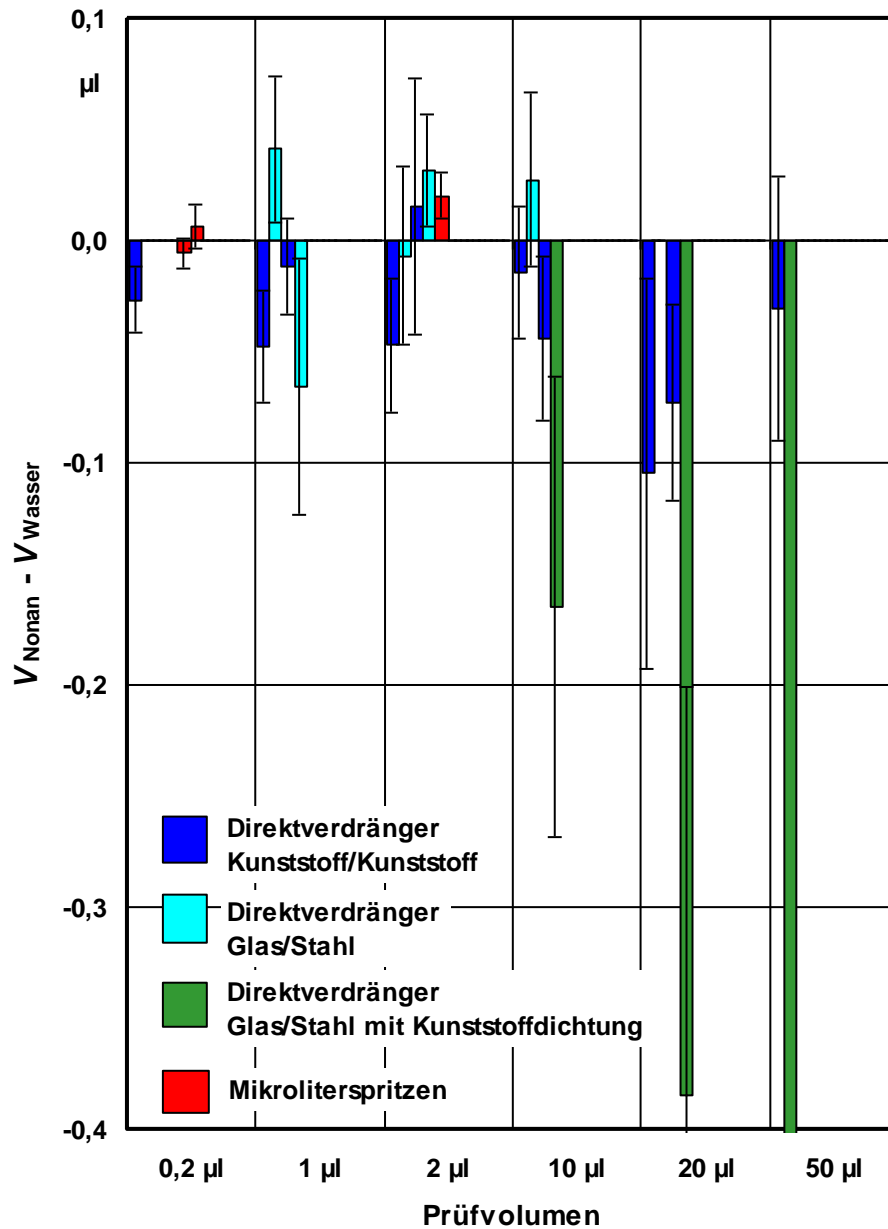


Abb. 18: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Nonan. Dargestellt ist die absolute Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Nonan. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

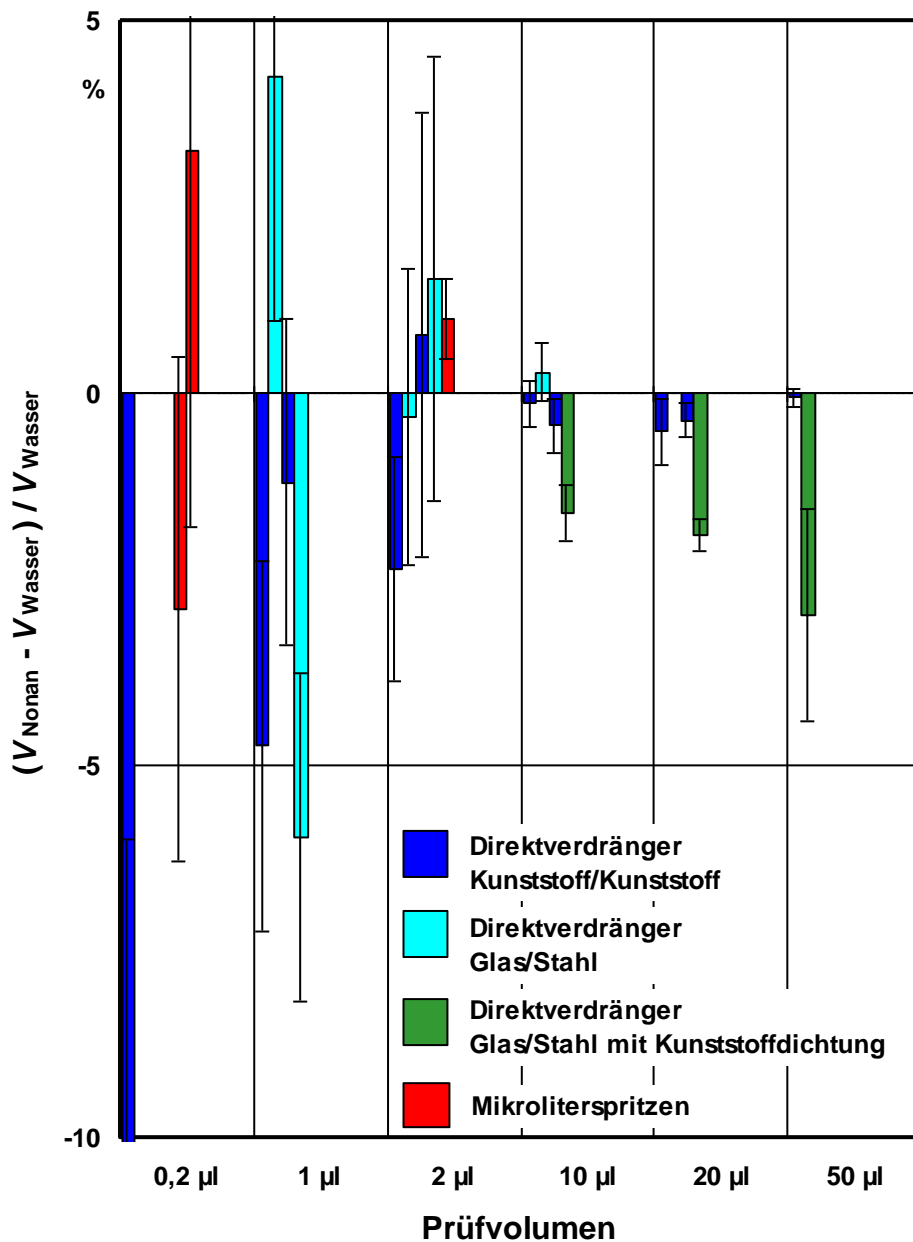


Abb. 19: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Nonan. Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Nonan. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

Wasser und die beiden organischen Flüssigkeiten Ethanol und Nonan unterscheiden sich besonders deutlich in ihrem Dampfdruck. Der hohe Dampfdruck wurde bereits als Grund für die Unterdosierung bei Ethanol angeführt. Bei Nonan tritt dieser Effekt nicht auf, der Dampfdruck ist geringer als der von Wasser (vgl. Tabelle 1). Ein weiterer sehr großer Unterschied besteht in der Oberflächenspannung. Die Oberflächenspannung von Wasser ist mehr als dreimal so groß wie die von Ethanol und Nonan, die wiederum fast gleiche Werte haben. Dies führt zu einem völlig anderen Benetzungsverhalten der Zylinder durch Ethanol und Nonan. Während Wasser die Außenseite des Gerätezylinders kaum benetzt, kriechen die beiden anderen Flüssigkeiten an der Außenseite hinauf und benetzen einen größeren Bereich. Die

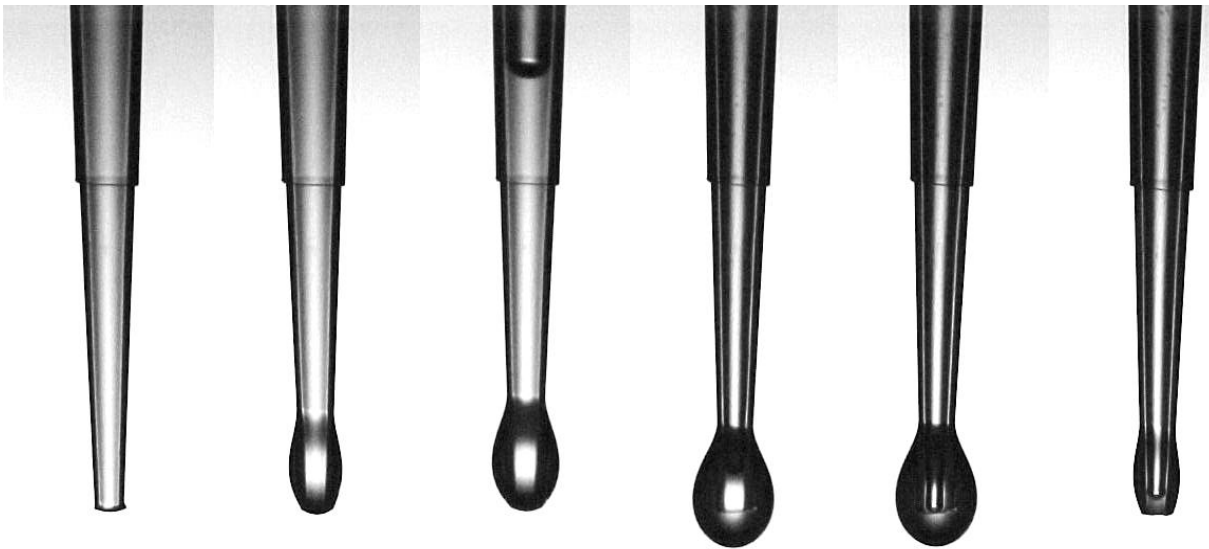


Abb. 20: Benetzung der Pipettenspitze beim Ausstoßen von Nonan
Die Pipettenspitze ist für die Herstellung dieser Fotos nicht an die Gefäßwand angelegt.

Benetzung der Außenseite der Pipette ist in Abb. 20 demonstriert. Die Abbildung zeigt eine Schattenprojektion einer mit Nonan gefüllten Pipettenspitze beim Ausstoßen der Flüssigkeit. Für die Herstellung dieser Fotos wurde als Dosiergerät eine Luftpilsterpipette verwendet, es ist also kein Kolben zu sehen, an die Stelle des Zylinders tritt die Pipettenspitze.

In der Bildfolge ist zu sehen, wie Flüssigkeit aus der Spitze der Pipette austritt und zunächst die Außenseite der Pipette benetzt, bis sich ein Tropfen bildet, der schwer genug ist, um abzureißen. Danach wiederholt sich dieser Vorgang. Die Steighöhe der Flüssigkeit auf der Außenseite

beträgt mehrere Millimeter¹². Die verbleibenden Flüssigkeitsanteile müssen durch einen Abstreifvorgang in das Wägegefäß gebracht werden. Dies ist ein Vorgang, der nur unzureichend gelingt, weil die Flüssigkeit die Spitze an allen Seiten benetzt. Erheblichen Einfluss auf den Erfolg des Abstreifprozesses haben Rauigkeiten auf der Außenseite des Gerätezylinders sowie Grate und unsaubere Schnittflächen an der Zylinderspitze¹³. An diesen Stellen ist der Abfluss der Flüssigkeit behindert, die Flüssigkeit bleibt haften. Hier sind ganz wesentliche Gründe für die Abweichungen im dosierten Volumen von Wasser einerseits und Ethanol und Nonan andererseits zu sehen. Wasser benetzt beim Ausstoßen die Außenseite der Spitze kaum, es verbleibt deshalb auch kein Wasser auf der Außenseite.

Eine entsprechende Benetzung findet natürlich auch beim Befüllen der Geräte statt und kann ebenfalls nur teilweise durch Abstreifen wieder entfernt werden. Hier ist ein Unterschied zwischen Ethanol und Nonan zu erwarten. Während Ethanol auf der Außenseite beim Bewegen des Dosiergerätes vom Vorratsgefäß zum Wägegefäß wegen des hohen Dampfdruckes weitgehend verdunstet, bleibt Nonan erhalten. Dies führt dazu, dass das dosierte Volumen bei Verwendung von Nonan größer ist als bei Verwendung von Ethanol, teilweise auch größer als bei Verwendung von Wasser.

¹² Vgl. hierzu die Fotos in Abb. 21, die das Ausstoßverhalten von Wasser zeigen.

¹³ Solche unsaubere Schnittfläche mit Graten ist in Teilbild 1 in Abb. 20 zu erkennen.

8 Vergleich der Dosierung von Wasser und Humanserum

In der gleichen Weise wie in Kapitel 7 beschrieben, wurde das dosierte Volumen bei der Dosierung von Wasser mit dem dosierten Volumen bei der Dosierung von Humanserum verglichen. Serum besteht zu mehr als 90 % aus Wasser, viele physikalische Eigenschaften von Serum sind deshalb denen des Wassers ähnlich. So ist die Dichte lediglich 2 % bis 3 % größer, die Viskosität etwa 15 % größer als die des Wassers, auch der Dampfdruck wird durch den Dampfdruck des Wassers bestimmt. Die Oberflächenspannung ist jedoch gegenüber Wasser deutlich herabgesetzt, sie beträgt lediglich etwa 56 mN/m, es ist deshalb eine bessere Benetzung der Gerätespitzen zu erwarten. Ein deutlicher Unterschied entsteht durch das biologisch-chemische Verhalten von Serum. Besonders die in Serum enthaltenen Eiweiße bewirken ein „klebriges“ Verhalten, dadurch verbleibt beim Abfließen von Serum ein schwer zu entfernender Flüssigkeitsfilm an den Gefäßwänden zurück.

Die Untersuchungen mit Humanserum wurden außer an den in Kapitel 7 verwendeten Dosiergeräten auch an Kolbenhubpipetten mit Luftpolster durchgeführt. Die Unterschiede im Verhalten der Flüssigkeiten beim Dosieren von Serum und Wasser sind in Abb. 21 und Abb. 22 demonstriert. Wie in Abb. 20 zeigen die Abbildungen die Schattenprojektion einer gefüllten Pipettenspitze beim Ausstoßen der Flüssigkeit. Das verwendete Gerät ist eine Luftpolsterpipette, das dosierte Prüfvolumen beträgt 2 μ l.

Die drei Einzelfotos in Abb. 21 zeigen für die Flüssigkeit Wasser die Zeitpunkte vor dem Ausstoßen der Flüssigkeit, nach dem Betätigen des Normalhubes und nach dem Betätigen des Überhubes. Vor dem Ausstoßen ist die Pipette mit Wasser gefüllt, die Flüssigkeit ist in dieser Schattenprojektion hell zu sehen. Das zweite Teilbild zeigt die Pipettenspitze unmittelbar nach dem Betätigen des Normalhubes, die Flüssigkeit ist ausgestoßen, der letzte Tropfen hängt noch an der Pipettenspitze. Die Benetzung der Pipettenspitze durch das Wasser ist minimal. Sie kann jedoch durch Unsauberkeit der Spitze und durch Rauigkeiten und Grate größer sein. Im dritten Teilbild wurde der Überhub betätigt, der das Luftpolster der Pipette weiter nach unten bewegt, um Flüssigkeitsreste auszustoßen. Dadurch wird der letzte Wassertropfen von der Spitze entfernt. Die Spitze ist bis auf einen Wasserfilm im Inneren vollständig entleert.

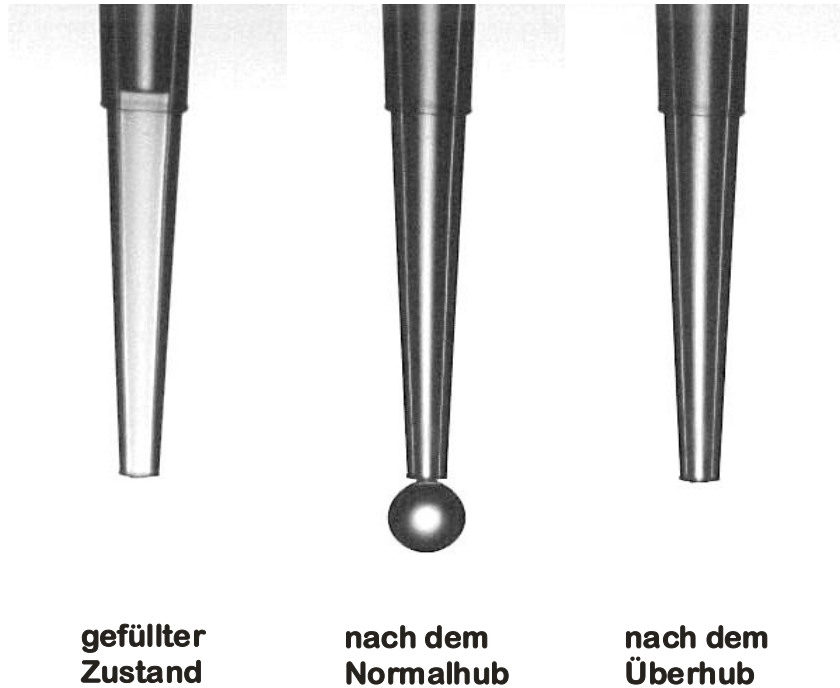


Abb. 21: Bildfolge, die das Entleeren einer mit **Wasser** gefüllten Spitze einer Luftpolsterpipette zeigt. Die Flüssigkeitsmenge beträgt 2 μl . Die Pipettenspitze ist für die Herstellung dieser Fotos nicht an die Gefäßwand angelegt.

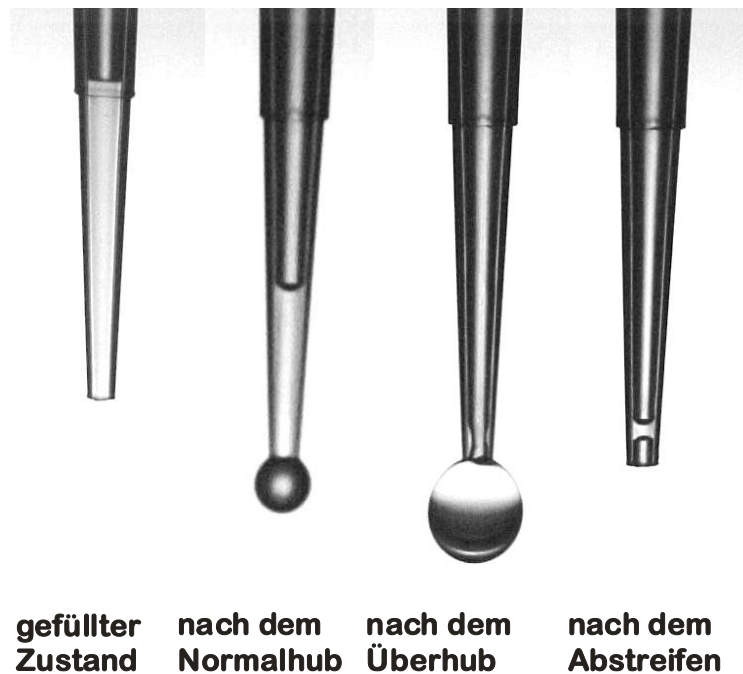


Abb. 22: Bildfolge, die das Entleeren einer mit **Serum** gefüllten Spitze einer Luftpolsterpipette zeigt. Die Flüssigkeitsmenge beträgt 2 μl . Die Pipettenspitze ist für die Herstellung dieser Fotos nicht an die Gefäßwand angelegt.

Völlig anders ist das Ausstoßverhalten bei der Verwendung von Humanserum als Dosierflüssigkeit. Abb. 22 zeigt zunächst die gleiche Bildfolge wie Abb. 21. Das erste Teilbild zeigt die mit Serum gefüllte Pipettenspitze. Im zweiten Teilbild ist der Zustand nach der Betätigung des Normalhubes zu sehen. Die Haftung der Flüssigkeit in der Spitze ist so groß, dass sie nur wenig nach unten gedrückt wird. Erst die Betätigung des Überhubes bringt die Flüssigkeit aus der Pipettenspitze hinaus. Am Auslass der Spitze bildet sich eine teilweise mit Luft gefüllte Serumblase (in Schattenbild ist der mit Luft gefüllte Bereich der Blase hell zu sehen). Im Inneren der Spitze ist im unteren Bereich noch Serum zu sehen. Die Serumblase lässt sich durch Abstreifen an einer Gefäßwand (viertes Teilbild) entfernen. Die in der Spitze verbliebene Flüssigkeit zieht sich zu einer Flüssigkeitsmembran zusammen. Diese Membran kann nicht mehr ausgestoßen werden, d.h. ein Flüssigkeitsrest verbleibt in der Pipettenspitze.

Wie in Abb. 23 gezeigt wird, ist der in der Pipettenspitze verbleibende Flüssigkeitsrest nicht gut reproduzierbar. Eine kleine Verringerung dieses Restes lässt sich durch Anlegen an die

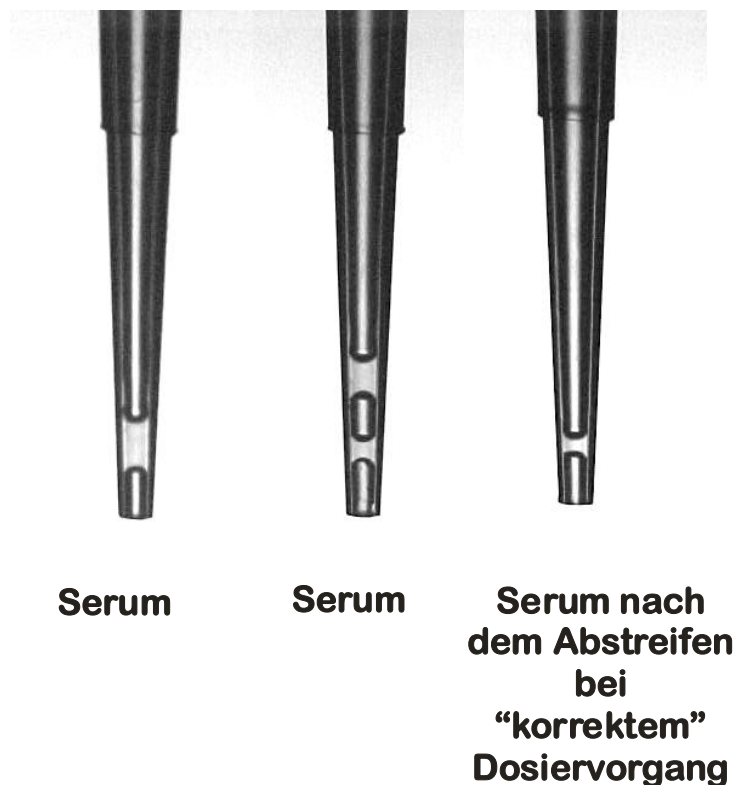


Abb. 23: In der Pipettenspitze verbleibendes Serum nach dem Dosiervorgang. Die Ausgangs-Flüssigkeitsmenge betrug 2 µl. Die Pipettenspitze war im rechten Bild während der Dosierung an die Gefäßwand angelegt, im linken und mittleren Foto nicht.

Gefäßwand und Abstreifen während des Flüssigkeitsausstoßens erreichen (drittes Teilbild in Abb. 23).

Die in der Pipettenspitze verbleibende Serummenge verringert das dosierte Volumen bei Luftpolsterpipetten beträchtlich. Dagegen kann dieser Dosierverlust bei Direktverdrängern wegen des erzwungenen Ausstoßens der Flüssigkeit durch den Kolben ganz vermieden oder zumindest deutlich verringert werden.

Die Benetzung der Außenseite der Spitze ist größer als bei Wasser, allerdings nicht so groß wie bei Nonan¹⁴. Dieser Effekt ist sowohl bei Luftpolstergeräten als auch bei Direktverdrängern zu erwarten, er hat aber wesentlich geringeren Einfluss auf das dosierte Volumen als die in den Spitzen der Luftpolstergeräte verbleibende Flüssigkeitsmenge.

Der Vergleich der dosierten Volumen von Wasser und Serum ist für Direktverdränger und Mikroliterspritzen in Abb. 24 bis Abb. 27 gezeigt. Da es bei verschiedenen Dosiergeräten beträchtliche Unterschiede zwischen den Differenzen im dosierten Volumen gibt, sind in Abb. 24 und in Abb. 25 in einem vergrößerten Ausschnitt aus Abb. 26 und Abb. 27 nur Prüfvolumen von 10 µl bis 50 µl dargestellt. Die Abweichungen zwischen den dosierten Volumen von Wasser und Serum sind hier sehr gering, sie liegen häufig unter 0,1 %, bei zwei Geräten wurden Abweichungen von 0,14 % und 0,29 % gemessen. Lediglich eine Mikroliterspritze zeigt eine auffällige Abweichung von 1 %. Ein Trend zu Über- oder Unterdosierung ist nicht auszumachen, beide Richtungen sind etwa gleich häufig vertreten. In diesem Volumenbereich und für die geprüften Geräte kann eine Kalibrierung mit Wasser also recht gut auf die Dosierung von Serum übertragen werden. Eine Verallgemeinerung dieser Aussage auf beliebige Geräte ist nicht möglich, die Abweichung bei einer Spritze von gut 1 % zeigt jedoch, dass eine Einzelüberprüfung jedes Gerätes sinnvoll ist.

In Abb. 26 und in Abb. 27 sind zusätzlich die Werte für Luftpolsterpipetten und auch die Prüfvolumen von 0,2 µl, 1 µl und 2 µl gezeigt. Die relativen Abweichungen für Direktverdränger und Mikroliterspritzen sind bei den kleinen Prüfvolumen deutlich größer als bei Prüfvolumen oberhalb 10 µl. Sie steigen an bis auf 2 %, in einem Fall auf 3,6 %. Eine

¹⁴ Die Oberflächenspannung von Nonan ist mit etwa 22 mN/m noch wesentlich geringer als die von Serum mit etwa 56 mN/m. Es sei jedoch angemerkt, dass hier nicht nur Oberflächenspannungen, sondern auch (nicht quantitativ bekannte) Grenzflächenspannungen zu betrachten sind.

bemerkenswert gute Übereinstimmung findet man für zwei Mikroliterspritzen bei einem Prüfvolumen von 0,2 µl. Die Abweichungen liegen unter 2 %!

Bei den Luftpolsterpipetten treten die erwarteten großen Abweichungen auf. Die Werte variieren zwischen 3,4 % und 10,5 % Unterdosierung bei allen Prüfvolumen oberhalb 1 µl. Pauschal lässt sich eine mittlere Unterdosierung von 5 % angeben. Bei Prüfvolumen von 0,2 µl wurden dagegen Abweichungen von mehr als 30 % gefunden, hier sind Luftpolsterpipetten auf keinen Fall mehr für die Serumdosierung einsetzbar.

Aber auch bei größeren Volumen sollte bei der Serumdosierung auf den Einsatz von Luftpolsterpipetten verzichtet werden, wenn eine quantitativ genau spezifizierte Dosierung gefordert ist. Grund für die Unterdosierung ist, wie oben in diesem Kapitel beschrieben, der an der Spitzenwand verbleibende Flüssigkeitsrest. Der Ausstoß der Flüssigkeit ist schlecht reproduzierbar, so dass selbst eine Kalibrierung der Luftpolsterpipette mit Serum als Kalibrierflüssigkeit keine zuverlässigen Ergebnisse liefert. Wenn der Wechsel der Pipettenspitze erforderlich ist, kann statt auf Luftpolsterpipetten auf die direktverdrängenden Kolbenhubpipetten mit Wechselkolben und -zylindern zurückgegriffen werden. Untersuchte Systeme dieses Typs sind die in Abb. 24 und folgenden mit „Direktverdränger Kunststoff/Kunststoff“ bezeichneten Geräte. Direktverdrängende Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen sind gut für die Dosierung von Serum geeignet. Auch die Kalibrierung dieser Geräte mit Wasser ist bedingt auf die Dosierung von Serum übertragbar. Da aber bei einigen Geräten deutliche Abweichungen im Dosierverhalten von Wasser und Serum beobachtet wurden, ist eine Kalibrierung mit Serum zu empfehlen.

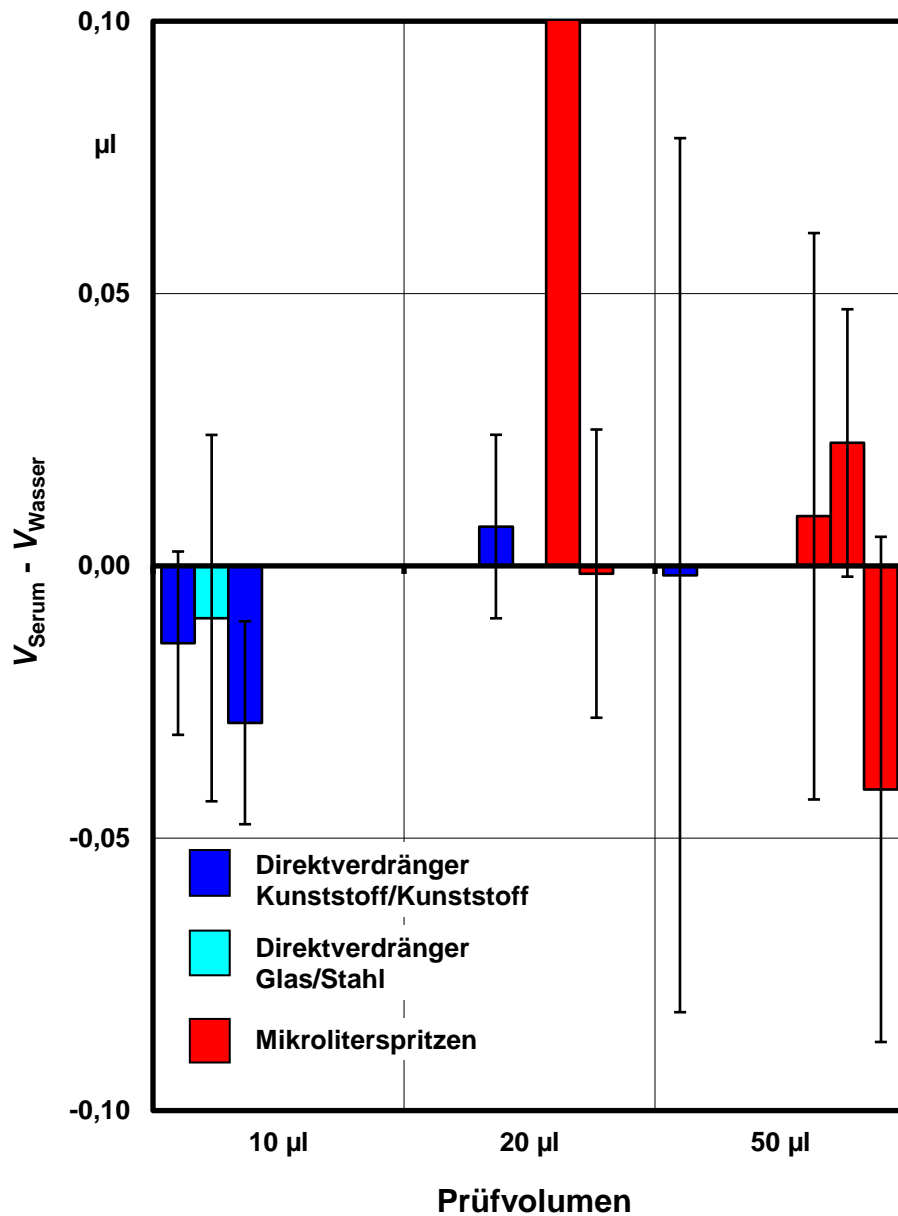


Abb. 24: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Serum für Prüfvolumen von 10 μl , 20 μl und 50 μl . Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

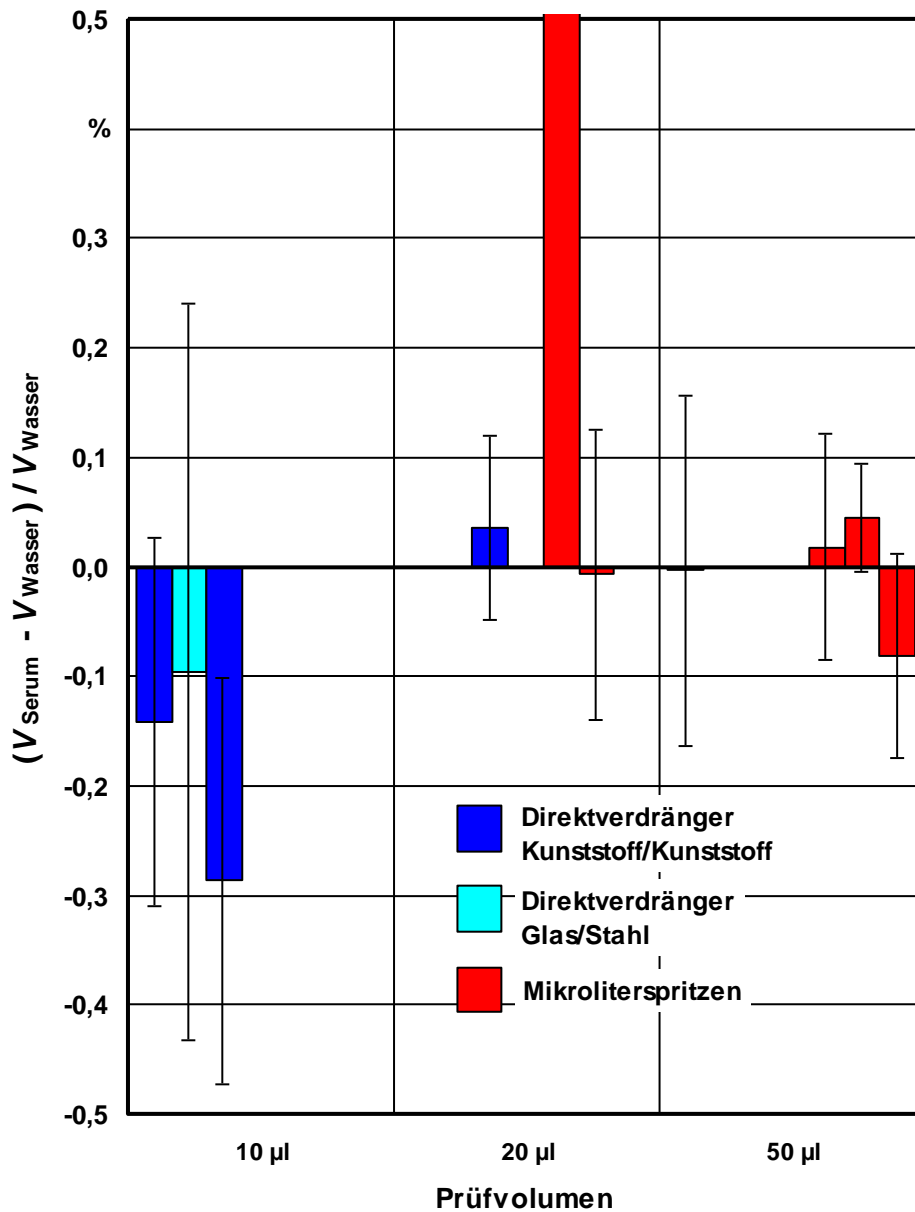


Abb. 25: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Serum für Prüfvolumen von 10 µl, 20 µl und 50 µl. Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

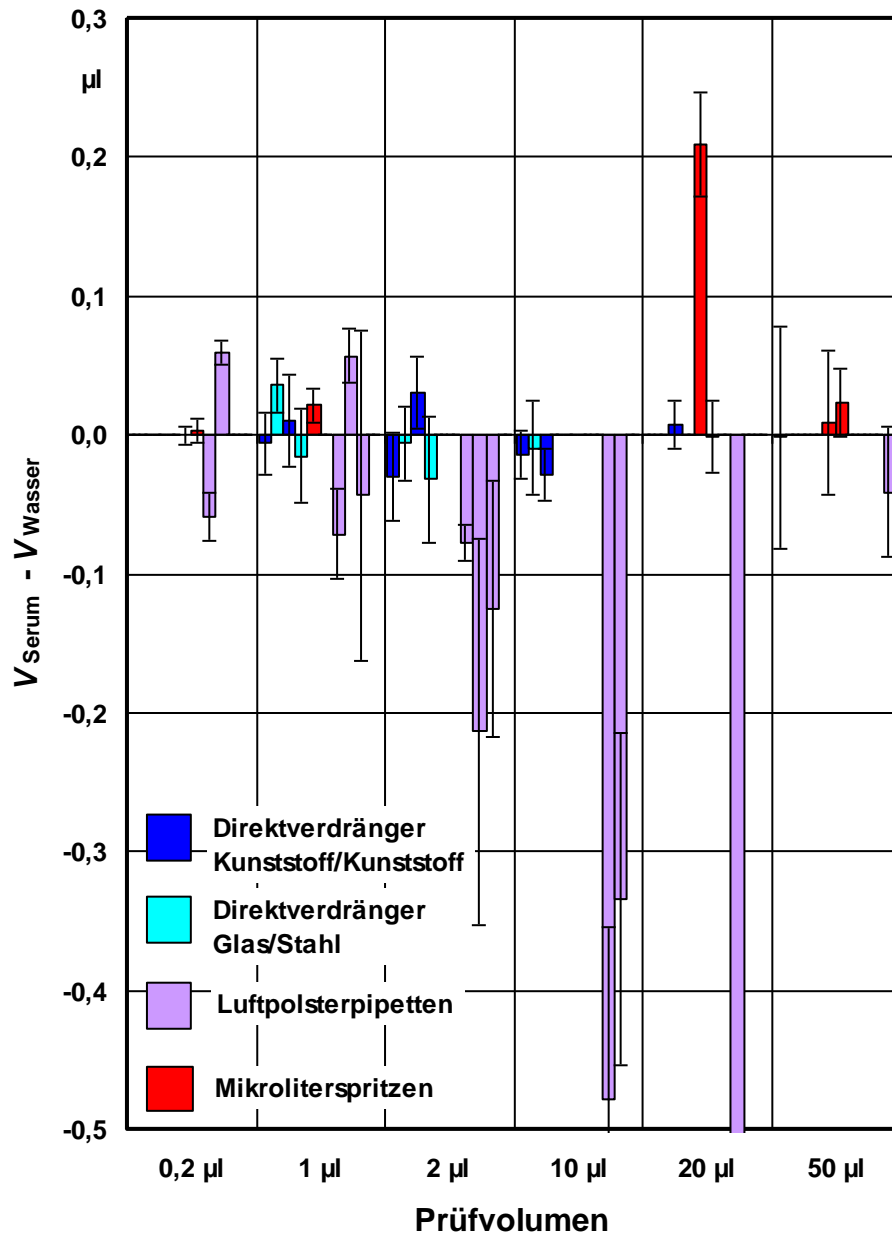


Abb. 26: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Serum für Prüfvolumen von 0,2 µl bis 50 µl. Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

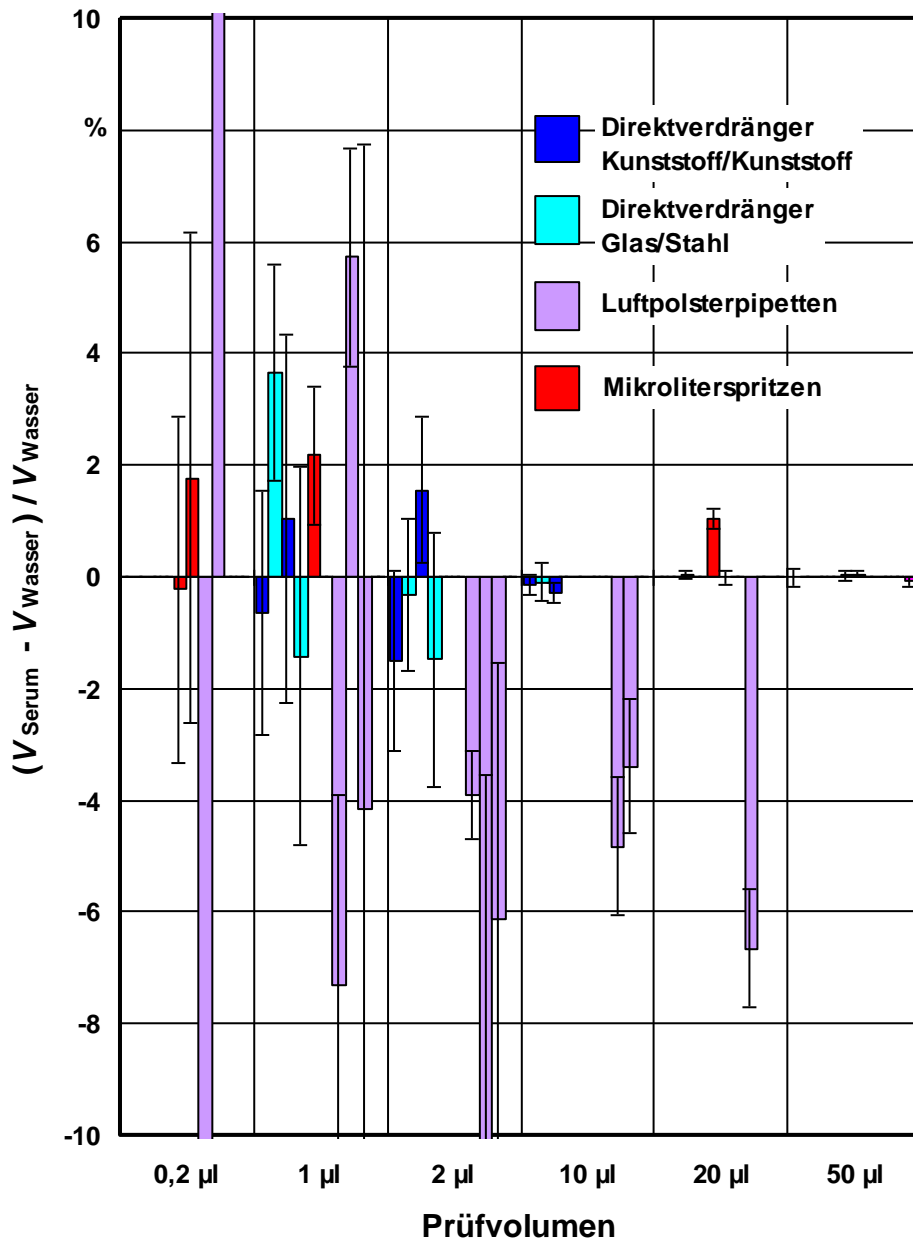


Abb. 27: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Serum für Prüfvolumen von 0,2 µl bis 50 µl. Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

9 Möglichkeiten des Ersatzes von Wasser als Kalibrierflüssigkeit

Die in Kapitel 7 und 8 beschriebenen Resultate zeigen, dass die Ergebnisse einer Kalibrierung von Flüssigkeitsdosiergeräten mit Wasser nicht immer auf andere Flüssigkeiten übertragbar sind. Eine Kalibrierung mit der später auch verwendeten Flüssigkeit ist zuverlässiger. Im Falle des Humanserums ist also eine Kalibrierung mit Humanserum wünschenswert. Eine gravimetrische Kalibrierung scheitert aber in der Regel daran, dass die Dichte des Serums nicht mit genügender Genauigkeit bekannt ist. Eine Dichtebestimmung nach klassischer Methode mit einem Pyknometer ist experimentell sehr aufwendig, besonders das luftblasenfreie Füllen des Pyknometers ist mit dem zum Schäumen neigenden Serum sehr schwierig. Die Messung erfordert auch mehr Serum, als normalerweise zur Verfügung steht. Die Dichtebestimmung mit einem Dichtemessgerät nach dem Schwingerprinzip, die etwa 1,5 ml Serum erfordert, ist wegen der hohen Kosten für solche Geräte in vielen Laboratorien nicht durchführbar. Das Versenden von Serum an ein anderes Laboratorium zur Dichtebestimmung birgt die Gefahr, dass das Serum sich während des Transports verändert, da eine ununterbrochene Kühlung häufig nicht gewährleistet werden kann.

Es müssen deshalb Wege gefunden werden, die eine Dichtebestimmung an der Kalibrierflüssigkeit ohne die durch den Transport bedingten Veränderungsgefahren zulassen oder die eine zuverlässige, aber kostengünstige Dichtebestimmung im Kalibrierlaboratorium selbst ermöglichen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden beide Wege beschritten. Der erste Weg verwendet zur Kalibrierung sogenanntes Kontrollmaterial als Ersatzflüssigkeit, er ist in Kapitel 9.2 beschrieben. Im zweiten Weg wird eine Möglichkeit zur Dichtebestimmung von Serum aus Analysedaten beschrieben. Dieser Weg ist in Kapitel 10 dargestellt. Vor diesen Darstellungen wird in Kapitel 9.1 über Untersuchungen zur Stabilität von Serum berichtet. Aus den Stabilitätsuntersuchungen lässt sich eine Angabe für die notwendige Genauigkeit ableiten, mit der die Serumdichte und die Dichte von Ersatzflüssigkeiten bestimmt werden muss.

9.1 Stabilität von Serum

Ein wichtiger Gesichtspunkt für die Genauigkeit, mit der die Dichte bestimmt werden muss, ist die Stabilität der Dichte von Serum. Um hierfür Bezugswerte zu erhalten, wurde sowohl die Kurzzeitstabilität der Dichte von Serum als auch die Langzeitstabilität von eingefrorenem Serum untersucht.

Die für diese Untersuchungen durchgeführten Dichtebestimmungen wurden mit einem Dichtemessgerät nach dem Schwingerprinzip ausgeführt. Das für eine Messung benötigte Flüssigkeitsvolumen beträgt etwa 1,5 ml. Die Messunsicherheit des Gerätes ist kleiner als $5 \cdot 10^{-2} \text{ kg/m}^3$, die Reproduzierbarkeit ist besser als $1 \cdot 10^{-2} \text{ kg/m}^3$. Das Gerät ermöglicht die Messung der Temperaturabhängigkeit der Dichte. Die Unsicherheit in der Bestimmung der Temperatur beträgt 10 mK. Während der Dichtebestimmung befindet sich die Flüssigkeit im Messrohr des Gerätes nahezu abgeschlossen von der Umgebungsluft, Verdunstung von Flüssigkeitsbestandteilen in die Umgebung kann deshalb vernachlässigt werden.

Die Kurzzeitstabilität der Serumdichte lässt sich für zwei Fälle untersuchen. Im einen Fall wird das Serum in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrt, im anderen Fall erfolgt die Lagerung in einem offenen Gefäß. In der Realität wird beim Dosieren eine Mischform dieser beiden Fälle erreicht. Das Serum befindet sich zwar in im geschlossenen Vorratsgefäß, während die Dosierungen durchgeführt werden, dieses Gefäß muss aber zum Befüllen des Dosiergerätes geöffnet werden.

Zur Bestimmung der Kurzzeitstabilität in einem geschlossenen Gefäß stehen die Messungen zur Verfügung, die zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Dichte durchgeführt wurden. Wie oben erwähnt, ist das Serum während der Messzeit praktisch von der Umgebung abgekoppelt, es findet keine Verdunstung statt. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden immer zwei entgegengesetzte Temperaturverläufe gemessen, d.h. die Temperatur wurde zunächst schrittweise von der kleinsten Messtemperatur auf die größte erhöht, anschließend wurde ein Temperaturverlauf gemessen, bei dem die Temperatur schrittweise von der größten Messtemperatur auf die kleinste erniedrigt wurde. Die Abweichungen der so gewonnenen Daten sind deutlich kleiner als $1 \cdot 10^{-2} \text{ kg/m}^3$, liegen also im Bereich der Reproduzierbarkeit des Messgerätes. Die Messung einer Temperaturabhängigkeit der Dichte dauert bis zu 2 h.

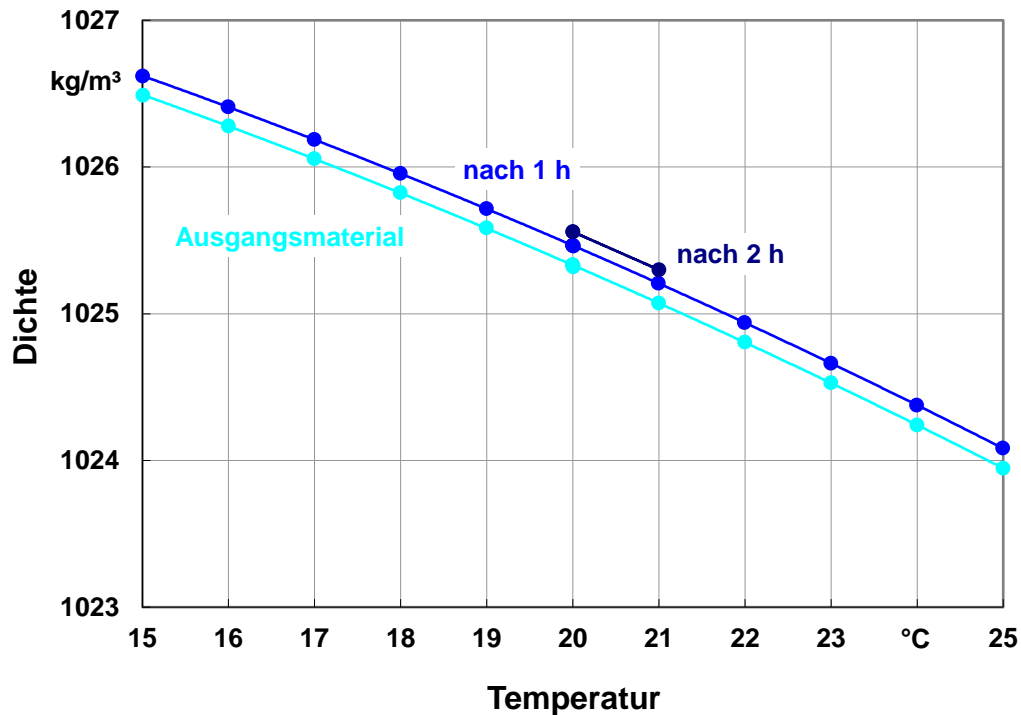


Abb. 28: Kurzzeitverhalten der Dichte von Serum
 Die Flüssigkeit (ca. 3 ml) wurde zwischen den Dichtebestimmungen in einem offenen Becher, wie er in Abb. 3 gezeigt ist, bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Innerhalb dieses Zeitraumes ist die Serumdichte also stabil, wenn das Serum sich in einem geschlossenen Gefäß befindet.

Der zweite Fall wurde an Serum gemessen, das zwischen den Dichtemessungen in einem offenen Becher bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde. Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 28 gezeigt. In der Abbildung sind die Abweichungen für mehrere Temperaturen dargestellt, um die Zuverlässigkeit dieser Messung zu unterstreichen. Serum ist ein Mehrkomponentengemisch. Bedingt durch Verdunstung ändert sich die Zusammensetzung des Gemisches und damit auch die Dichte. Im Falle des Serums wird hauptsächlich Wasser verdunstet, dies führt zu einem Anstieg der Dichte. Dieser Anstieg betrug bei der vorliegenden Messung $0,13 \text{ kg/m}^3$ nach offener Lagerung für 1 h und weitere $0,10 \text{ kg/m}^3$ nach einer weiteren Stunde.

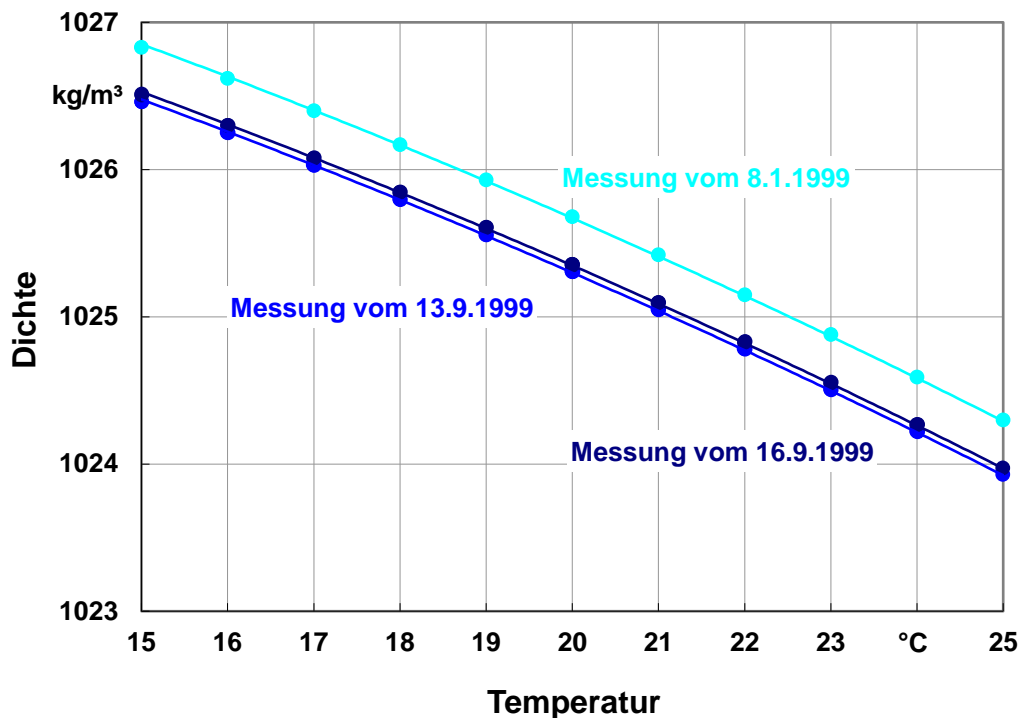


Abb. 29: Langzeitverhalten der Dichte von Serum
 Die Flüssigkeit wurde zwischen den Dichtebestimmungen in einem Gefrierschrank bei -18 °C gelagert. Die Dichte wurde jeweils unmittelbar nach dem Auftauen bestimmt.

Bei der Durchführung von Dosierungen wird, wie oben angeführt, die Dichteänderung durch Verdunstung durch die Abdeckung des Vorratsgefäßes verringert. Die Dichteänderung des Serums während der Dosierungen wird deshalb auf maximal 0,05 kg/m³ abgeschätzt.

Serum als biologisch aktive Flüssigkeit ist selbst bei Kühlung nicht sehr lange haltbar. Das Material wurde deshalb zur Lagerung tiefgefroren und bei -18 °C gelagert. Auch bei dieser Art der Lagerung treten Dichteänderungen auf. Dies ist in Abb. 29 gezeigt. Dargestellt sind zwei Dichtemessungen mit 8 Monaten Zeitabstand und eine dritte Messung, die nur 3 Tage nach der zweiten Messung stattfand. Während zwischen den ersten beiden Messungen ein deutlicher Unterschied sichtbar ist – die Dichte ist um 0,37 kg/m³ gesunken – ist die Abweichung zwischen den letzten beiden Messungen von der Größe der Messgenauigkeit des Dichte-Messgerätes, also nicht als signifikant anzusehen. Eine Erklärung für die Dichteabnahme während der 8monatigen Einfrierdauer ist nicht bekannt. Der Einfrier- und Auftauprozess ist offenbar nicht

an der Änderung beteiligt, ein solcher Einfluss wäre auch bei den im Abstand von 3 Tagen durchgeführten Messungen sichtbar geworden, da auch hier das Serum in der Zwischenzeit eingefroren war.

Im Kurzzeitbereich sollte damit die mögliche Änderung der Dichte von Serum, bedingt durch Einfrieren, Auftauen, Umfüllen in andere Gefäße und Verdunstung auf etwa $0,1 \text{ kg/m}^3$ abgeschätzt werden. Eine Dichteangabe für Serum ist deshalb auch nur auf $0,1 \text{ kg/m}^3$ genau notwendig.

9.2 Kontrollmaterial als Ersatzflüssigkeit für Serum

Sogenanntes „Kontrollmaterial“ ist ein von pharmazeutischen Unternehmen angebotenes serumähnliches Produkt, das in der medizinischen Analytik zur Kontrolle von Analyseergebnissen verwendet wird. Es ist in medizinischen Analyselaboratorien ein Standardprodukt. Das Material wird aus Humanserum gewonnen. Dem Serum wird eine Salzlösung zur Stabilisierung zugesetzt, eventuell kann eine Anreicherung mit Serumbestandteilen erfolgen, um bestimmte Konzentrationen einzustellen. Kontrollmaterial wird sowohl mit Konzentrationen im Normalbereich als auch im pathologischen Bereich angeboten. Die Konzentrationen der Einzelbestandteile werden von mehreren Laboratorien bestimmt, dem Material wird eine Liste dieser Ergebnisse beigelegt.

Das Material wird aus einem Serumpool (eine Charge hat eine Größenordnung von etwa 1 m^3) gewonnen, dadurch ist gewährleistet, dass eine große Menge gleichen Materials zur Verfügung steht. Der Pool wird als lyophilisiertes (gefriergetrocknetes) Pulver in Flaschen abgegeben. Üblich sind Flaschengrößen, die mit 5 ml Wasser rekonstituiert werden müssen. Die Lagerung und der Transport als lyophilisiertes Material garantieren eine hohe Beständigkeit gegen Alterung. Erst vom Zeitpunkt der Rekonstitution mit Wasser ist das Material chemisch-biologisch aktiv wie Serum.

Das Material kann im rekonstituierten Zustand zur Kalibrierung von Dosiergeräten verwendet werden. Die Herstellung auf der Basis von Serum lässt ein dem Serum sehr ähnliches Dosierverhalten erwarten. Da in einer Charge ein Pool von etwa 1 m^3 zur Verfügung steht, ist es

möglich, genügend Kontrollmaterial derselben Charge zu bevorraten, um auch häufige Kalibrierungen durchführen zu können.

Die Dichtebestimmung kann einmalig durch ein dazu befähigtes Laboratorium erfolgen. Die Rekonstituierung für die Dichtebestimmung kann vor Ort erfolgen, so dass kein Transport der rekonstituierten Flüssigkeit erforderlich ist. Sicherzustellen ist lediglich, dass bei der Rekonstituierung immer Material der gleichen Dichte hergestellt wird. Dies wurde an mehreren Proben überprüft. In Abb. 30 sind 3 rekonstituierte Proben, deren Material aus der gleichen Charge stammt, verglichen. Die Dichten der 3 Proben bei 20 °C betragen 1029,377 kg/m³, 1029,392 kg/m³ und 1029,440 kg/m³. Bei 20 °C beträgt der maximale relative Unterschied zwischen den 3 Proben $6 \cdot 10^{-5}$. Damit kann die Reproduzierbarkeit der Dichte von Kontrollmaterial mit einem Wert 0,1 kg/m³ angegeben werden, wenn Material gleicher Charge (aus dem gleichen Serumpool) verwendet wird. Entsprechende Vergleiche, bei denen Kontrollmaterial aus verschiedenen Chargen verwendet wurde, zeigen etwas größere Abweichungen. Die Reproduzierbarkeit in der Dichte kann hier mit einem Wert von 1 kg/m³ angegeben werden.

Die Reproduzierbarkeit der Dichte von Kontrollmaterial gleicher Charge gleicht dem Wert, der für die Kurzzeitstabilität der Dichte von Serum angegeben wurde. Da für Kontrollmaterial die gleiche Kurzzeitstabilität wie für Serum angenommen werden kann, ist diese Reproduzierbarkeit in der Dichte von Kontrollmaterial also ausreichend für die Verwendung zur gravimetrischen Kalibrierung.

Der Vergleich der dosierten Volumen von Kontrollmaterial und Serum ist in Abb. 31 und Abb. 32 gezeigt. Dabei ist die gleiche Darstellung wie in Abb. 26 und Abb. 27 gewählt. Die Ergebnisse des Vergleichs zeigen häufig eine geringere Abweichung gegenüber dem Vergleich von Serum und Wasser, dies ist jedoch nicht durchgängig der Fall. Das Ergebnis ist deshalb nicht befriedigend. Da die Dosiereigenschaften von Serum und Kontrollflüssigkeit wegen der großen Verwandtschaft der beiden Flüssigkeiten als sehr ähnlich vermutet werden und deshalb keine Unterschiede im dosierten Volumen zu erwarten sind, sind andere Ursachen für die Abweichungen wahrscheinlicher.

Ein Indiz für die Signifikanz der gemessenen Abweichung ist der Vergleich der Abweichung mit der Messunsicherheit. Bei dem Vergleich von Serum mit Wasser schneiden die Messunsicherheitsbalken häufig die Nulllinie nicht, es liegen also deutlich messbare, von Null

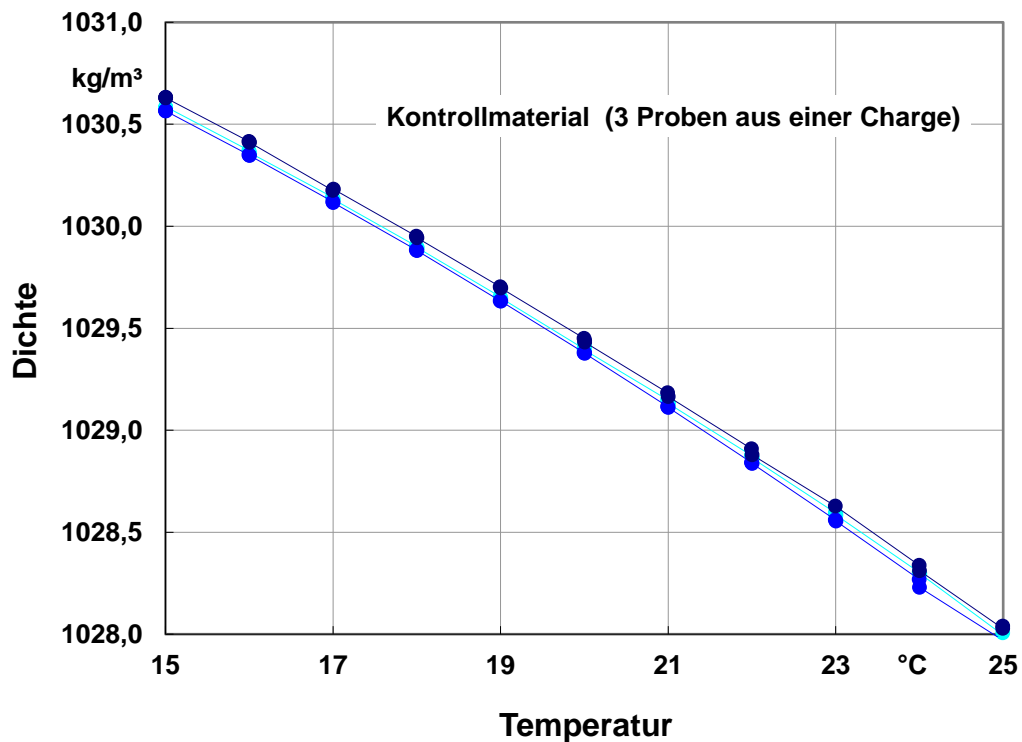


Abb. 30: Temperatur-Dichte-Verlauf für 3 aus Material derselben Charge (desselben Pools) rekonstituierte Kontrollmaterialien

abweichende Differenzen im dosierten Volumen von Serum und Wasser vor. Bei dem Vergleich von Kontrollflüssigkeit mit Serum dagegen schneiden die Messunsicherheitsbalken abgesehen von wenigen Ausnahmen die Nulllinie. Für die Differenz im dosierten Volumen von Kontrollflüssigkeit und Serum ist also im Rahmen der Messunsicherheit der Wert Null möglich. Die tatsächlich gemessenen Abweichungen sind dann durch die mangelnde Reproduzierbarkeit der Dosierung von Serum oder Kontrollflüssigkeit hervorgerufen. Speziell bei den Luftpilsterpipetten wurde in Kapitel 8 auf die sehr schlechte Reproduzierbarkeit der in der Spitze verbleibenden Serummengemenge hingewiesen. Dies ist als ein wesentlicher Grund für die verbleibenden Abweichungen zu sehen.

Die dennoch nicht befriedigende Übereinstimmung der Ergebnisse von Serum und Kontrollmaterial führt zu der Frage, ob die hier benutzte Zahl von 10 für die Mittelung herangezogenen Einzeldosierungen ausreichend ist. Hierauf wird in Kapitel 11 eingegangen.

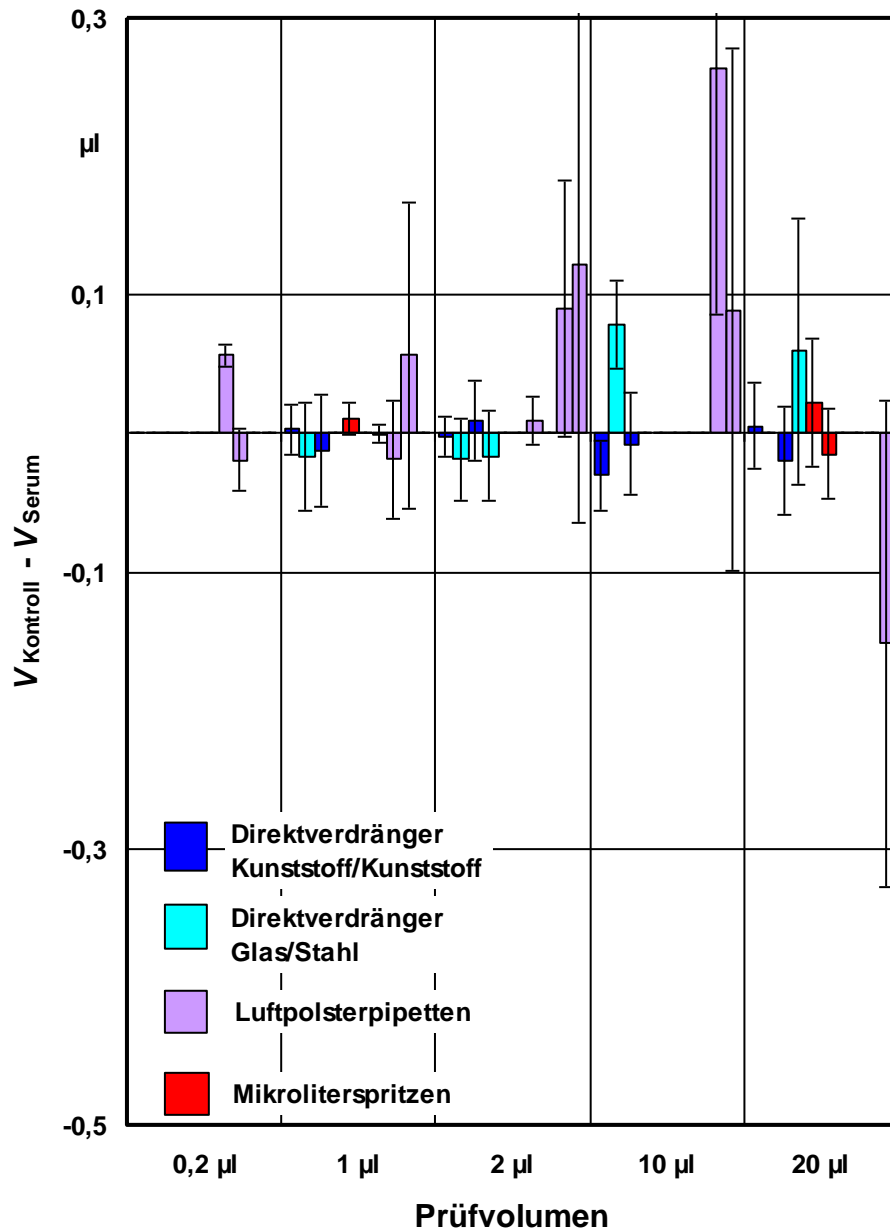


Abb. 31: Unterschied im dosierten Volumen von Kontrollmaterial und Serum für Prüfvolumen von 0,2 μl bis 20 μl . Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

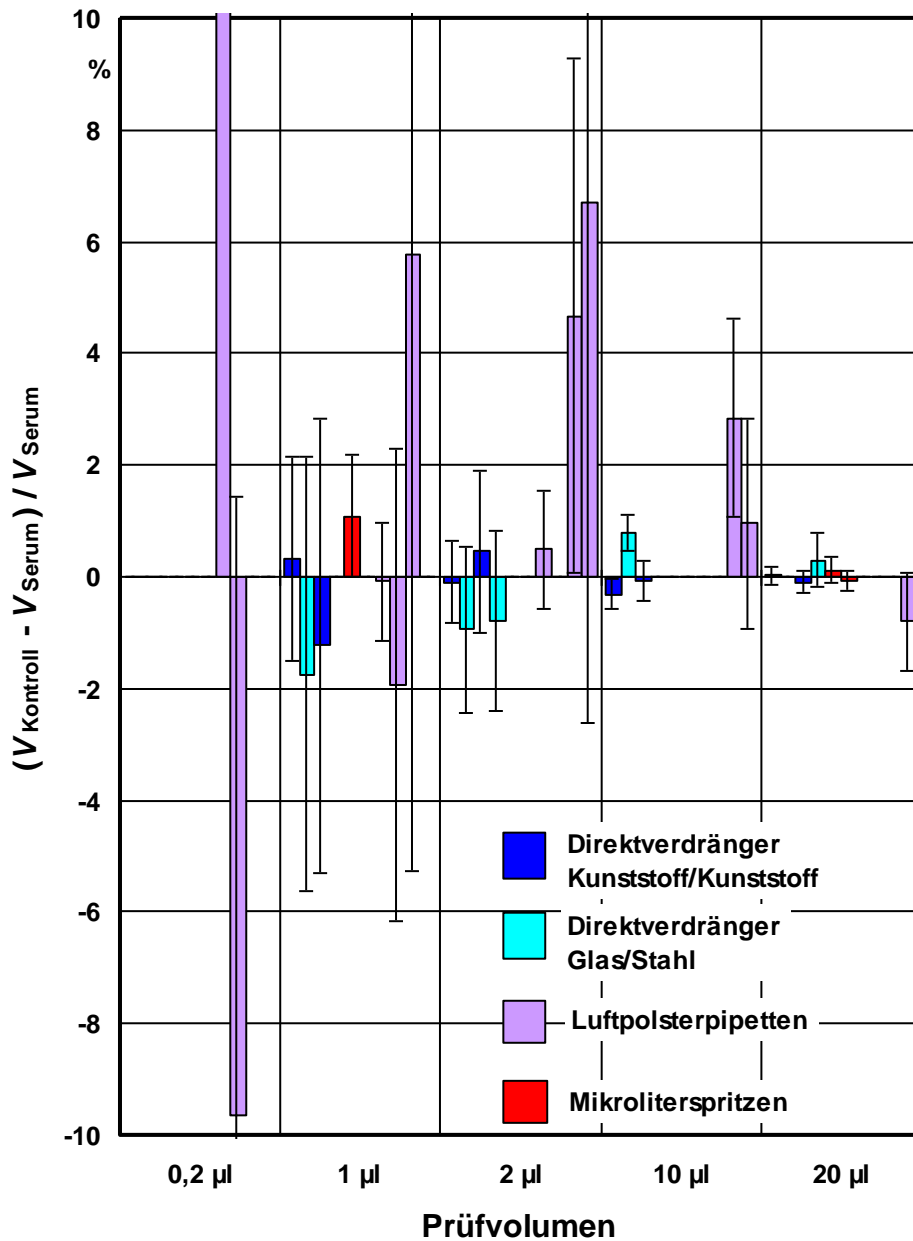


Abb. 32: Unterschied im dosierten Volumen von Kontrollmaterial und Serum für Prüfvolumen von 0,2 µl bis 20 µl. Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).

10 Die Dichte von Humanserum

10.1 Serumdichte bei 20 °C

In der Einleitung zu Kapitel 9 wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Dichte der biologischen Flüssigkeit Humanserum nicht genau genug bekannt ist, um diese Flüssigkeit für gravimetrische Kalibrierungen einsetzen zu können. Andererseits ist die Dichtebestimmung vor Ort mit klassischen Methoden (Pyknometer, Dichtemessgerät nach dem Schwingerprinzip) zu aufwendig oder zu kostenintensiv.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde deshalb die Dichte von 69 Einzelproben bestimmt. Der Terminus Einzelprobe bedeutet hier: Serum von einem einzelnen Menschen, das bei nur einer Blutentnahme gewonnen wurde. Die Messungen wurden mit einem Dichtemessgerät nach dem Schwingerprinzip wie in Kapitel 9.1 beschrieben durchgeführt.

Für die Untersuchung wurden Seren von der Medizinischen Hochschule Hannover und von der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Diese Seren sind überzähliges Material, das bei den Untersuchungen in den chemischen Zentrallabors der Kliniken nicht mehr benötigt wurde. Es

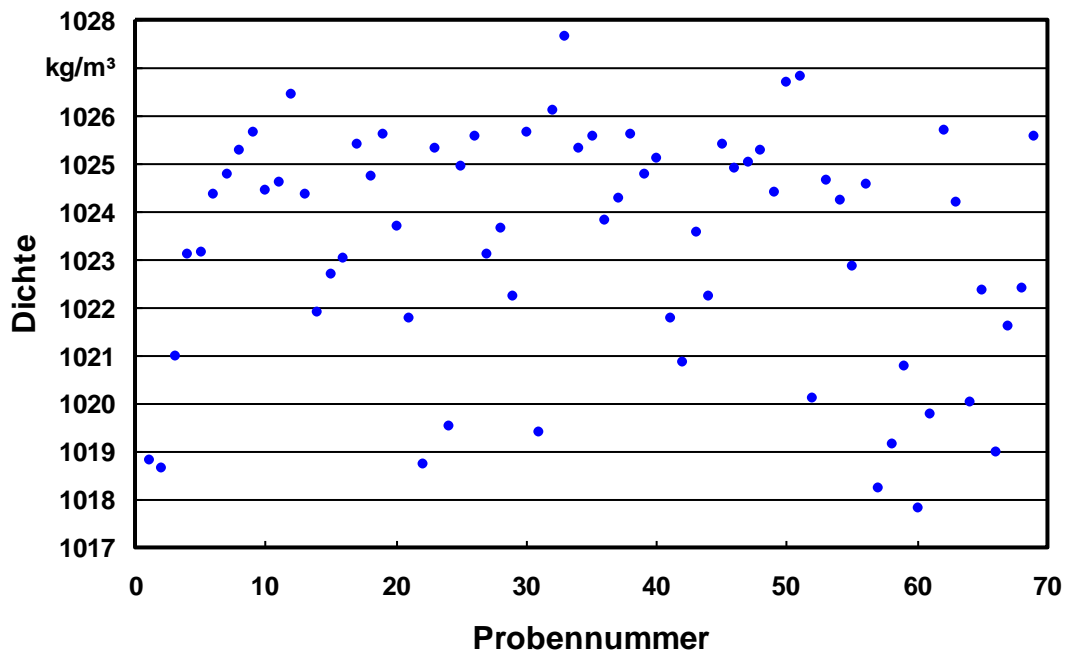


Abb. 33: Gemessene Dichte von 69 Serum-Einzelproben

wurde keine weitere Auswahl des Materials durchgeführt. Die Proben sind deshalb repräsentativ, sie umfassen möglicherweise auch Seren von Menschen, deren Blut krankheitsbedingt verändert wurde.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 33 gezeigt. Die Dichte der untersuchten Proben variiert zwischen 1017 kg/m^3 und 1028 kg/m^3 . Es ist eine Häufung im Bereich um 1025 kg/m^3 festzustellen. Eine vereinfachte Angabe für die Serumdichte, die diese Häufung nicht berücksichtigt, ist die Angabe des Intervalls $(1022 \pm 6) \text{ kg/m}^3$.

Serum besteht zu mehr als 90 % aus Wasser und hat deshalb eine Dichte nahe am Wert des Wassers. Die Dichteänderungen durch die weiteren Bestandteile des Serums betragen nur etwa 2,5 %. Eine vereinfachende Aufspaltung der Serumdichte in eine Dichte von Wasser und eine Dichte der weiteren Bestandteile ergibt:

$$(10-1) \quad \rho_{\text{Serum}} = \rho_{\text{Wasser}} + \rho_{\text{Bestandteile}} = 998,2 \text{ kg/m}^3 + (24 \pm 6) \text{ kg/m}^3 .$$

Die Bandbreite des Intervalls, in dem alle Serumdichten liegen, beträgt also 50 % des durch die weiteren Bestandteile verursachten zusätzlichen Dichteanteils. Wegen des Bezugs auf die Gesamtdichte, die den Wasseranteil beinhaltet, ist jedoch der im vorigen Absatz genannte Wert mit der Angabe einer recht geringen Unsicherheit von 0,6 % möglich.

Eine genauere Beschreibung der Serumdichte erfordert eine detaillierte Betrachtung aller Serumbestandteile. In Tabelle 6 sind die neben Wasser wichtigsten Serumbestandteile aufgelistet (lediglich diese werden im Folgenden als Serumbestandteile bezeichnet, dabei wird ignoriert, dass Wasser der Hauptbestandteil von Serum ist). Die in der Tabelle angegebenen Grenzen umfassen den sogenannten Referenzbereich der Konzentration, die minimale und maximale Konzentration dieser Bestandteile im Serum eines gesunden Menschen. Die Werte wurden einer Broschüre der Medizinischen Hochschule Hannover [15] entnommen.

Die Tabelle zeigt, dass sich die Betrachtung der Serumbestandteile, die Einfluss auf die Dichte nehmen können, auf wenige Komponenten reduziert. Es sind dies die Eiweiße, die etwa 80 % der Serumbestandteile betragen, sowie das Kochsalz, das etwa 10 % der Serumbestandteile umfasst. Wird Kochsalz, das eine polare Substanz ist, in Wasser gelöst, so nimmt das Volumen des entstehenden Salzwassers nicht um das Volumen des gelösten Salzes zu, sondern nur um einen wesentlich kleineren Betrag. Die Dichtezunahme bei der Lösung von Kochsalz in Wasser ist deshalb sehr groß.

Tabelle 6: Serumbestandteile nach [15]

Bestandteil	Referenzbereich der Konzentration		Dichte des reinen Stoffes
	min	max	
	kg/m ³	kg/m ³	kg/m ³
Gesamteiweiß	65,0	80,0	?
NaCl	8,1	8,6	2160
Cholesterin C ₂₇ H ₄₆ O	1,2	3,1	1070
Triglyceride	0,5	5,4	900
Glucose	0,7	1,0	1525
Harnstoff	0,2	0,4	1340
KCl	0,3	0,4	1980
CaCl ₂	0,2	0,3	2150
MgCl ₂	0,1	0,1	2320

Die weiteren Serumbestandteile Cholesterin und Triglyceride haben deutlich geringere Anteile und Dichten, die selbst nahe der Dichte von Wasser liegen. Da beide keine polaren Komponenten sind, ist zu erwarten, dass sie sich nicht ohne Volumenzunahme lösen, deshalb ist ihr Einfluss auf die Dichte des Serums sehr gering (diese Serumbestandteile lösen sich nicht in reinem Wasser). Glucose und Harnstoff haben Dichten, die sich von der des Wassers deutlich unterscheiden, sie sind aber nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Dies gilt auch für alle weiteren Bestandteile des Serums. Die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bestandteilen sind sehr komplex, der Einfluss auf die Dichte kann jedoch wegen der geringen Konzentrationen der meisten Komponenten ebenfalls vernachlässigt werden.

Ein Ansatz zur Rückführung der Serumdichte auf die Konzentrationen der Serumbestandteile kann sich also auf die Komponenten Eiweiß und Kochsalz beschränken. Auch hier wird die Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten vernachlässigt. Die Serumdichte ρ_{Serum} wird deshalb als lineare Funktion der Dichteanteile der drei Komponenten Wasser (ρ_{Wasser}), Kochsalz ($\Delta\rho_{\text{NaCl}}$) und Eiweiß ($\Delta\rho_{\text{Eiweiß}}$) betrachtet. Dem Einfluss der vernachlässigten Serumbestandteile und dem möglichen Einfluss von Wechselwirkungen wird durch Einführung eines konstanten Terms $\Delta\rho_{\text{Rest}}$ Rechnung getragen. Es ergibt sich somit eine Gleichung

$$(10-2) \quad \rho_{\text{Serum}} = \rho_{\text{Wasser}} + \Delta\rho_{\text{NaCl}} + \Delta\rho_{\text{Eiweiß}} + \Delta\rho_{\text{Rest}}$$

Die Dichteänderung von Wasser durch Zugabe von Kochsalz ist leicht messbar, sie wurde experimentell mit einem Dichtemessgerät nach dem Schwingerprinzip zu

$$(10-3) \quad \Delta\rho_{\text{NaCl}} = (0,7132 \pm 0,0036) \cdot K_S$$

bestimmt. K_S ist die Kochsalzkonzentration in kg/m^3 . Die maximale Unsicherheit in der Dichte aufgrund der in (10-3) angegebenen Unsicherheit beträgt $0,03 \text{ kg/m}^3$. Diese Unsicherheit wird im Folgenden vernachlässigt.

Zur Bestimmung des unbekanntes Einflusses der Eiweißkonzentration und des additiven Restterms auf die Dichte kann die folgende Gleichung ausgewertet werden:

$$(10-4) \quad \rho_{\text{Messwert}} - \rho_{\text{Wasser}} - \Delta\rho_{\text{NaCl}} = \rho_{\text{Diff}} = \Delta\rho_{\text{Eiweiß}} + \Delta\rho_{\text{Rest}}$$

Hierzu müssen die (gemessene) Dichte der Probe, ihre Kochsalz-Konzentration und ihre Eiweiß-Konzentration bekannt sein. Zu einer Auswertung nach Gleichung (10-4) wurden 27 Poolseren hergestellt. Jedes der Poolseren setzte sich aus 10 Einzeleren zusammen. Die Pools wurden so gewählt, dass ein breiter Bereich von Eiweißkonzentrationen abgedeckt wurde. Insbesondere wurden ein Pool mit extrem geringer und ein Pool mit extrem großer Eiweißkonzentration hergestellt. Umgekehrt wurde bei der Auswahl der Einzeleren darauf

Tabelle 7: Spanne der Konzentrationen der Serumbestandteile in den untersuchten Poolseren

	Eiweiß	Natrium	Cholesterin	Triglyceride
maximale Konzentration in kg/m^3	82,9	8,85	2,21	2,05
minimale Konzentration in kg/m^3	46,3	7,94	1,75	1,34
mittlere Konzentration in kg/m^3	66,1	8,26	2,07	1,58
Standardabweichung in kg/m^3	6,7	0,17	0,11	0,19

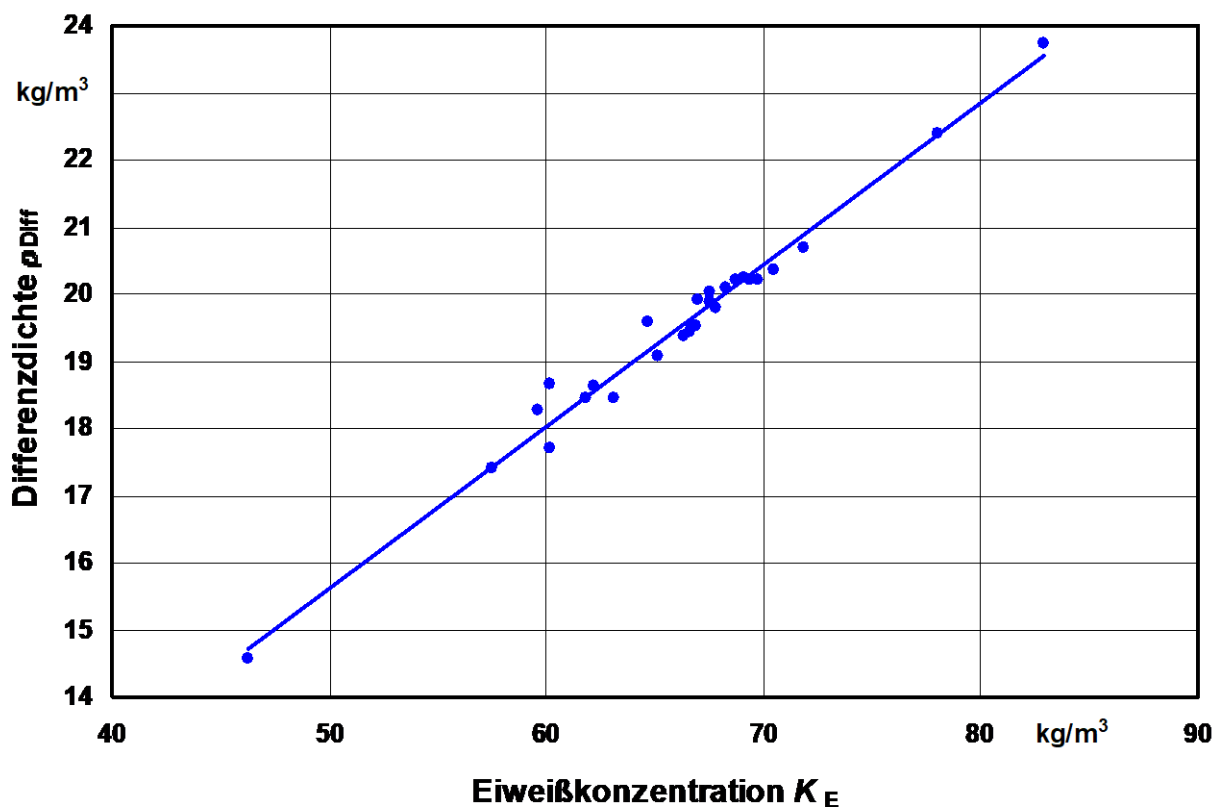


Abb. 34: Dichtedifferenz ρ_{Diff} der untersuchten Poolseren als Funktion der Eiweißkonzentration und daran angepasste Gerade. Zur Unsicherheit der Geraden siehe Text.

geachtet, dass die Konzentrationen von Cholesterin und Triglycerid in einem mittleren Bereich lagen, um den Einfluss der zu einem Rest zusammengefassten Komponenten möglichst wenig zu variieren. Durch die Poolbildung wurde hier eine weitere Mittelung erreicht, so dass Proben vorlagen, die mittlere Konzentrationen in allen Serumbestandteilen außer Eiweiß hatten.

Die Konzentrationen der wichtigsten Serumbestandteile wurden sowohl in den Einzelseren als auch in den daraus gebildeten Poolseren bestimmt. Die minimalen und maximalen Konzentrationen dieser Serumbestandteile in den Poolseren sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Unsicherheit bei der analytischen Bestimmung der Eiweiß- und Natrium-Konzentration¹⁵ beträgt etwa 1 % bis 1,5 %. Diese Unsicherheit kann bei der vorliegenden Betrachtung vernachlässigt werden.

¹⁵ Bei der Analyse wird üblicherweise der Natriumgehalt angegeben. Es wird hier angenommen, dass dieser vollständig vom Kochsalzgehalt herrührt.

Die gemessenen Dichten der Poolseren sind in Abb. 34 als Funktion der Eiweißkonzentration dargestellt. Die ebenfalls eingezeichnete Gerade bestätigt, dass die lineare Näherung mit guter Genauigkeit anwendbar ist. Sie wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Auch die Seren mit extremer Eiweißkonzentration lassen sich durch diese Gerade beschreiben. Die Steigung der Geraden¹⁶ beträgt 0,2417, der Wert des Achsenabschnittes ist 3,508 kg/m³.

Damit gilt:

$$(10-5) \quad \rho_{\text{Diff}} = 0,2417 \cdot K_E + 3,508, \quad K_E: \text{Eiweißkonzentration in kg/m}^3$$

Eine Unsicherheitsbetrachtung muss sowohl die Unsicherheit in der Steigung als auch im Achsenabschnitt der Geraden einschließen. Bei einer Geradenanpassung sind Achsenabschnitt und Steigung im Allgemeinen korrelierte Größen, eine Unsicherheitsangabe muss dies berücksichtigen. Durch eine einfache mathematische Transformation lässt sich die Angabe der Unsicherheit jedoch stark vereinfachen. Achsenabschnitt und Steigung sind dann unkorreliert, wenn die Summe über alle x-Werte (hier K_E) Null wird. Dies lässt sich erreichen, indem die x-Werte der Datenpaare um den Mittelwert aller x-Werte $x_{\text{mittel}} = \sum_i x_i$ verschoben werden ($\sum_i (x_i - x_{\text{mittel}}) = 0$) (vgl. hierzu [15], Anhang H3).

Im vorliegenden Fall ergibt sich als Mittelwert aller Eiweißkonzentrationen 66 kg/m³ und als Unsicherheit für die entsprechend verschobenen Messwertepaare:

$$u(\text{Achsenabschnitt}) = 0,044 \text{ kg/m}^3$$

$$u(\text{Steigung}) = 0,0067$$

Damit erhält man als Gleichung für die Unsicherheit

$$(10-6) \quad u^2(\rho_{\text{Diff}}) = (0,044 \text{ kg/m}^3)^2 + (K_E - 66 \text{ kg/m}^3) \cdot (0,0067)^2$$

oder mit dem Erweiterungsfaktor $k = 2$

$$(10-7) \quad U(\rho_{\text{Diff}}) = 2 \cdot \{(0,044 \text{ kg/m}^3)^2 + (K_E - 66 \text{ kg/m}^3) \cdot (0,0067)^2\}^{1/2}, \quad k = 2.$$

¹⁶ Die Einheit der Steigung ist 1, weil Dichte und Konzentration formal die gleiche Einheit kg/m³ haben.

Die vollständige Gleichung zur Berechnung der Serumdichte aus den Analysewerten von Kochsalz und Eiweiß lautet damit

$$(10-8) \quad \rho_{\text{Poolserum}} = \rho_{\text{Wasser}} + \Delta\rho_{\text{NaCl}} + \Delta\rho_{\text{Eiweiß}} + \Delta\rho_{\text{Rest}}$$

$$\rho_{\text{Poolserum}} = 998,2 \text{ kg/m}^3 + 0,7132 \cdot K_S + 0,2417 \cdot K_E + 3,508 \text{ kg/m}^3$$

$$U(\rho_{\text{Poolserum}}) = 2 \cdot \{(0,044 \text{ kg/m}^3)^2 + (K_E - 66 \text{ kg/m}^3)^2 \cdot (0,0067)^2\}^{1/2}, k = 2$$

K_S : Kochsalzkonzentration in kg/m^3 , K_E : Eiweißkonzentration in kg/m^3

Einige Unsicherheitswerte für die Bestimmung von ρ_{Serum} aus den Analysewerten sind in Tabelle 8 dargestellt. Wie bereits im vorangehenden Text erwähnt, sind dabei Unsicherheiten, die der analytischen Bestimmung der Kochsalz- und der Eiweißkonzentration beizuordnen sind, vernachlässigt. Auch die Unsicherheit der Gleichung, die die Umrechnung der Kochsalzkonzentration in einen Dichteanteil beschreibt, ist vernachlässigt.

Als vereinfachter Wert kann für die Bestimmung von $\rho_{\text{Poolserum}}$ aus den Analysewerten die erweiterte Unsicherheit $u(\rho_{\text{Normal-Poolserum}}) = 0,2 \text{ kg/m}^3$ ($k = 2$) angegeben werden, wenn die Eiweißkonzentration des Serums im Normalbereich von 65 kg/m^3 bis 80 kg/m^3 liegt. Die relative erweiterte Unsicherheit ist für diesen Bereich also $2 \cdot 10^{-4}$.

Damit ist dem analytischen Laboratorium ein Werkzeug gegeben, mit dem die Serumdichte aus Daten bestimmt werden kann, die diesem Laboratorium leicht zugänglich sind. Die gravimetrische Kalibrierung von Volumendosiergeräten wird hiermit im analytischen Laboratorium selbst möglich. Die für die Serumdichte angegebene Unsicherheit ist bei Eiweißkonzentrationen im Bereich von 60 kg/m^3 bis 70 kg/m^3 etwa gleich der Unsicherheit, die wegen

Tabelle 8: Unsicherheiten bei der Bestimmung der Poolserumdichte

Eiweißkonzentration in kg/m^3	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85
$U(\rho_{\text{Poolserum}})$ ($k = 2$) in kg/m^3	0,36	0,29	0,23	0,17	0,12	0,09	0,10	0,15	0,21	0,27

Tabelle 9: Variation der Konzentrationen der Serumbestandteile in den untersuchten Einzelseren

	Eiweiß	Natrium	Cholesterin	Triglyceride
maximale Konzentration in kg/m^3	80,0	8,42	3,10	1,55
minimale Konzentration in kg/m^3	56,0	7,71	1,50	0,70
mittlere Konzentration in kg/m^3	70,3	8,17	2,13	1,16
Standardabweichung in kg/m^3	6,2	0,17	0,47	0,27

der Veränderungen der Serumdichte durch Lagerung und Verdunstung (vgl. Kapitel 9.1) angenommen werden muss, sie ist für die Kalibrierung also ausreichend gering.

Die gezeigten Ergebnisse wurden an Poolserum gewonnen. In Abb. 35 sind die Dichtewerte von Einzelseren als Funktion der Eiweißkonzentration mit den Poolwerten verglichen. Dargestellt ist hier die Differenz zwischen der gemessenen Dichte und der aus Gleichung (10-8) berechneten Dichte. Die Standardabweichung der Poolseren von dieser Gerade beträgt $0,22 \text{ kg/m}^3$, die der Einzelseren $0,46 \text{ kg/m}^3$, ist also etwa doppelt so groß. Hier wird deutlich, dass die Einzelseren, die für die Poolbildung ausgewählt wurden, in ihren Parametern nur wenig von mittleren Werten abwichen. Bei den hier als Vergleich gezeigten Einzelseren ist die Streuung der Konzentrationen der wichtigsten Serumbestandteile deutlich größer. Die maximalen und minimalen Konzentrationen von Eiweiß, Na, Cholesterin und Triglyceriden sind für die Einzelseren in Tabelle 9 aufgelistet.

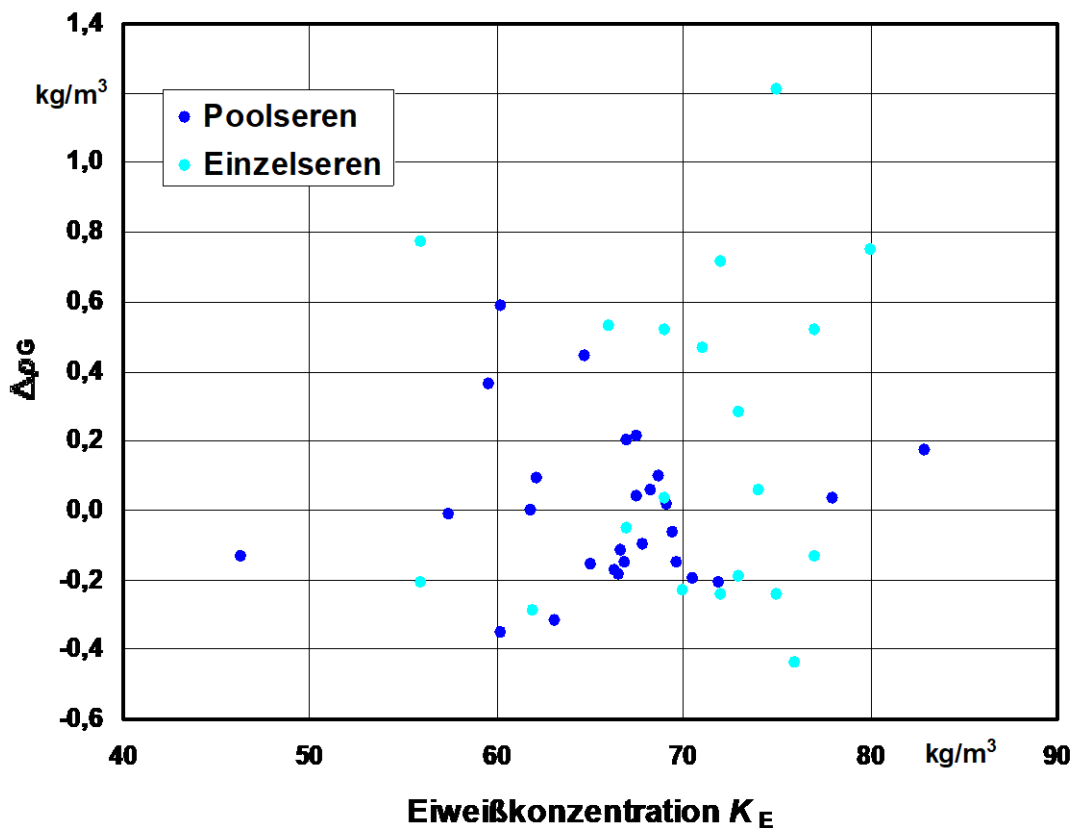


Abb. 35: Vergleich der Dichte von Einzeleren und Poolseren
 Das Diagramm zeigt die Differenz $\Delta\rho_G$ zwischen gemessener Dichte und der durch Gleichung (10-8) berechneten Dichte. Der Vergleich von Einzel- und Poolseren zeigt die größere Streuung der Dichte der Einzeleren.

10.2 Temperaturabhängigkeit der Serumdichte

Bei der Bestimmung der Serumdichte wurde an mehreren Serumproben auch die Temperaturabhängigkeit der Dichte gemessen. Dabei wurden 6 Proben im Temperaturbereich 15 °C bis 25 °C, die 7. Probe im Temperaturbereich 15 °C bis 40 °C mit Temperaturschritten von jeweils 1 °C gemessen. Es liegen also pro Messreihe mindestens 11 Messwerte-Paare $\rho(t_i)$ vor, bei der Messreihe bis 40 °C 26 Messwerte-Paare. Die Eiweißkonzentration der untersuchten Proben variierte von 56 kg/m³ bis 76 kg/m³. In Abb. 36 ist ein Beispiel für die Temperaturabhängigkeit der Serumdichte von Probe E25, einem Einzelerum mit einer Eiweißkonzentration von 69 kg/m³, gezeigt.

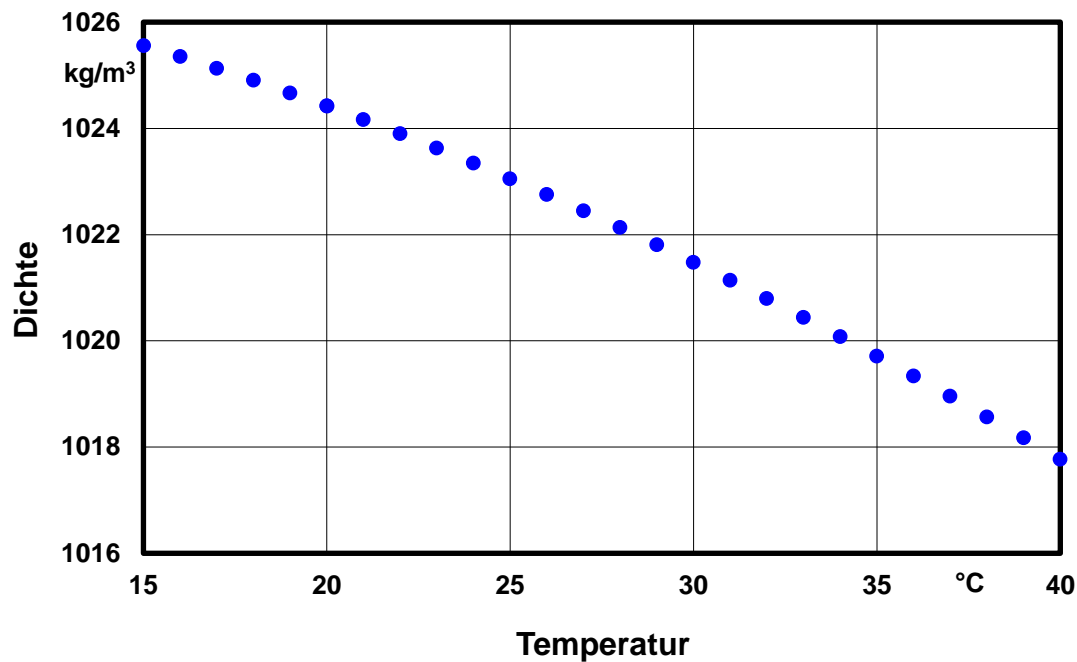


Abb. 36: Temperaturabhängigkeit der Dichte von Humanserum. Der Kurvenverlauf ist in Gleichung (10-10) quantitativ beschrieben.

Für jede Messreihe erfolgte die Anpassung eines quadratischen Polynoms nach der Methode der kleinsten Quadrate an die Messdaten. Um einen einfachen Vergleich der Kurven zu ermöglichen, wurde eine Gleichung der Form

$$(10-9) \quad \rho_{\text{Serum}}(t) = \rho_{\text{Serum}}(20 \text{ °C}) \cdot (1 + a_1 \cdot (t - 20 \text{ °C}) + a_2 (t - 20 \text{ °C})^2)$$

gewählt.

Da sich die Koeffizienten bei verschiedenen Seren nicht signifikant unterschieden, wurden anschließend die Anpasskoeffizienten aller 7 Polynome gemittelt.

$$(10-10) \quad \rho_{\text{Serum}}(t) = \rho_{\text{Serum}}(20 \text{ °C}) \cdot (1 - 2,438 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1} \cdot (t - 20 \text{ °C}) - 4,460 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-2} (t - 20 \text{ °C})^2)$$

Die Standardabweichung aller Messdaten von der auf diese Weise gewonnenen Funktion (10-10) beträgt $8 \cdot 10^{-6}$ im Temperaturbereich 15 °C bis 25 °C (da die Funktionswerte nahe 1 sind, ist dieser Zahlenwert sowohl absolut als auch relativ zu verwenden). Es ist keine Temperaturabhängigkeit der Standardabweichung zu erkennen. Die Gleichung ist auch auf den Bereich 25 °C bis 40 °C anwendbar. Hier steigt die Abweichung der Messwerte von der

Funktion (10-10) von $8 \cdot 10^{-6}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ stetig mit der Temperatur auf $1,7 \cdot 10^{-4}$ bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Eine statistische Aussage ist hier wenig aussagekräftig, weil nur eine Messreihe vorliegt.

11 Reproduzierbarkeit von Dosiererergebnissen

In der vorliegenden Untersuchung wurden viele Messungen mehrmals durchgeführt. Dabei wurden teilweise Umgebungsparameter wie z.B. die relative Luftfeuchte im Wägeraum variiert. Häufig wurden jedoch auch mehrere Messungen unter Wiederholbedingungen mit sehr kurzer Zeitspanne zwischen den Messungen durchgeführt.

Viele dieser wiederholten Messungen liefern im Rahmen der Messunsicherheit nicht übereinstimmende Messergebnisse, d.h. die Abweichung dieser Ergebnisse voneinander ist größer als die Messunsicherheit.

Ein quantitatives Kriterium zur Analyse von Messergebnissen ist in der EA 2-03 [14] im Anhang H gegeben. Danach wird die Abweichung zweier Messergebnisse auf die Messunsicherheit normiert.

$$(11-1) \quad E_n = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{U_1^2 - U_2^2}}$$

wobei x_1 und x_2 die Messergebnisse, hier die Mittelwerte aus 10 Dosierungen, und U_1 und U_2 die zugehörigen mit dem Erweiterungsfaktor $k = 2$ versehenen Unsicherheiten sind. Ist der normierte Wert E_n kleiner 1, so sind beide Ergebnisse x_1 und x_2 akzeptierbar.

Dieses Kriterium ist bei vielen Messungen nicht erfüllt.

Ein Ergebnis mit einer Messunsicherheit, die als erweiterte Unsicherheit mit dem Erweiterungsfaktor $k = 2$ angegeben wird, besitzt eine Überdeckungswahrscheinlichkeit für das entsprechende Messwerteintervall von 95 %. Es ist also aus statistischen Gründen möglich, dass 5 % der Messergebnisse nicht in diesem Intervall liegen und dann auch das Kriterium (11-1) nicht erfüllen. Bei den Messungen an Kolbenhubpipetten tritt dies jedoch häufiger (in 10 % bis 20 % der Messungen) auf. Die Häufigkeit ist von Gerät und Flüssigkeit abhängig. Dies deutet darauf hin, dass schlecht reproduzierte Parameter oder nicht erkannte zusätzliche Einflüsse eine Rolle spielen. Um einen solchen Einfluss zu überprüfen, wurden zwei Messreihen durchgeführt, die statt der üblichen 10 Einzelmessungen je 100 Einzelmessungen umfassten. Eine Messung wurde mit Wasser als Dosierflüssigkeit, die andere mit Serum durchgeführt. Als Dosiergerät wurde eine direktverdrängende Kolbenhubpipette verwendet, das Prüfvolumen für die Dosierung betrug 10 μl . Die Pipettenspitze wurde während der

Messungen nicht gewechselt, um einen Einfluss auf das Messergebnis durch unterschiedliche Spitzen auszuschließen.

Die Einzelmessungen erfolgten nach dem gleichen Schema wie bei einer zehnmaligen Messung: alle Randparameter wurden möglichst konstant gehalten (Dosierprozedur, zeitlicher Abstand der Einzeldosierungen, Raumtemperatur, Flüssigkeitstemperatur). Der Zeittakt zwischen zwei aufeinanderfolgenden Dosierungen betrug wie bei den zehnmaligen Messungen 40 s, die gesamte Messzeit für eine Serie also 4000 s. Das Ergebnis der Messreihe mit Wasser als Dosierflüssigkeit ist in Abb. 37 dargestellt. Dabei ist für jeden Messwert die Differenz des gemessenen Volumens vom Mittelwert aller 100 Messungen aufgetragen. Zusätzlich sind als gestrichelte und als durchgezogene Gerade die Wiederholstandardabweichung für die Erweiterungsfaktoren $k = 1$ und $k = 2$ gezeigt. Die Einzelwerte dieser Messreihe streuen um den Mittelwert, 31 der 100 Werte liegen außerhalb des Intervalls für die Wiederholstandardabweichung mit $k = 1$, vier Werte außerhalb des Intervalls für $k = 2$. Die Statistik dieses Ergebnisses ist also so, wie man es für eine Messreihe mit normalverteilten Werten erwartet.

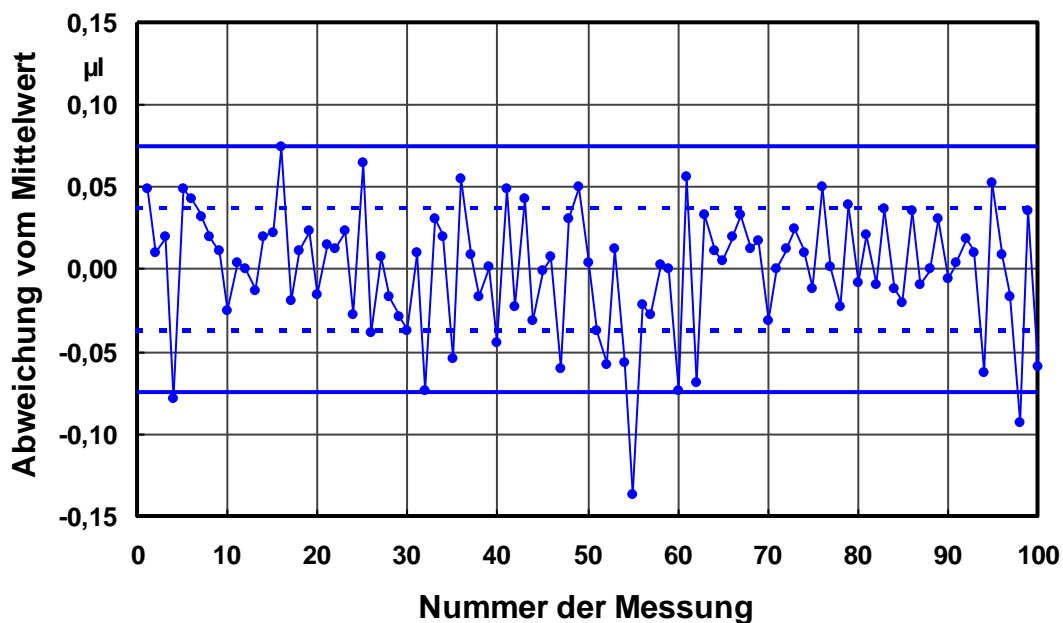


Abb. 37: Hundertmalige Dosierung von Wasser. Direktverdrängende Kolbenhubpipette mit einem Prüfvolumen von 10 µl. Dargestellt ist die Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert aller Messungen. Die gestrichelte Linie zeigt die für alle 100 Messwerte ermittelte einfache Standardabweichung ($k = 1$), die durchgezogene Linie die erweiterte Standardabweichung ($k = 2$).

Es gibt jedoch einige Auffälligkeiten:

Bei den Messwerten 5 bis 12 ist eine Drift im Volumen hin zu kleineren Volumina zu beobachten. Diese Drift ist größer als die Wiederholstandardabweichung.

Die ersten 25 Ergebnisse liegen überwiegend oberhalb des Mittelwertes, ebenso die letzten 40 Ergebnisse.

Die Werte zwischen Messung 25 und 50 streuen um den Mittelwert, die Werte zwischen Messung 50 und 60 liegen unterhalb des Mittelwertes. Hier finden also „Änderungen“ statt, die über einen „Zeitraum“ von mehr als 10 Messungen Bestand haben können, dann aber rückgängig gemacht werden.

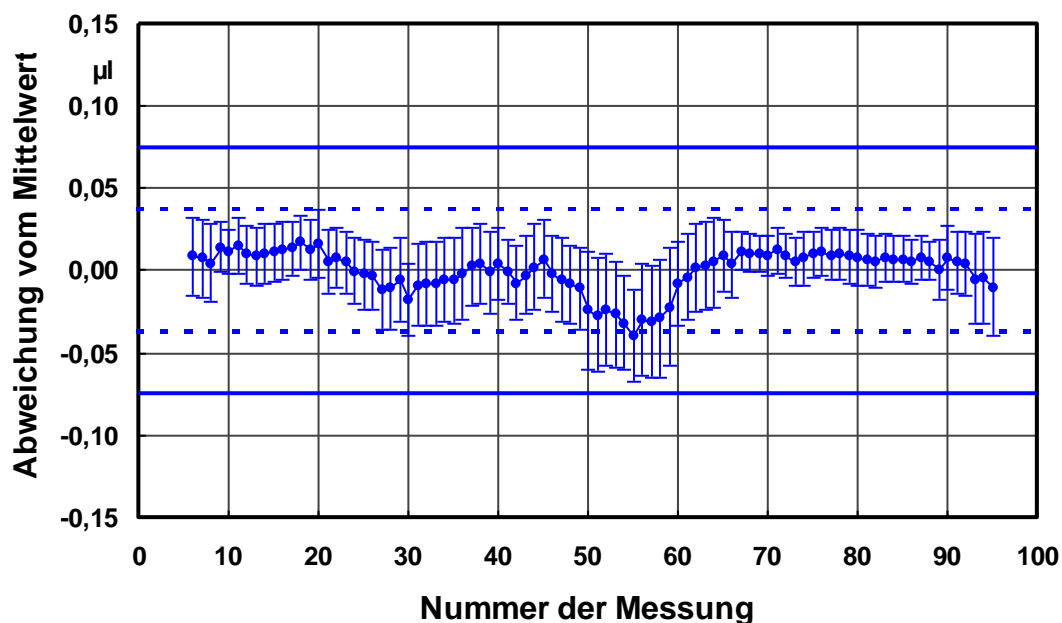


Abb. 38: Hundertmalige Dosierung von Wasser. Gleitender Mittelwert mit Mittelung über jeweils 10 Einzeldosierungen. Dargestellt ist die Abweichung der 10er-Mittelwerte vom Mittelwert aller Messungen. Die Daten der Einzelmessungen sind in Abb. 37 dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die für alle 100 Messwerte ermittelte einfache Standardabweichung ($k = 1$), die durchgezogene Linie die erweiterte Standardabweichung ($k = 2$).

Diese Ergebnisse bewegen sich zwar bei einer Messreihe mit 100 Einzelmessungen im von der üblichen Statistik erlaubten Bandbreite. Wenn jedoch nur die üblichen 10 Einzelmessungen durchgeführt werden – dies entspricht der willkürlichen Auswahl von 10 aufeinanderfolgenden

Messwerten aus dieser Hunderter-Serie – so können sich für diese Zehner-Serien Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben, die das erwähnte Kriterium (11-1) nicht erfüllen. Dies ist in Abb. 38 gezeigt. Hier ist der gleitende Mittelwert über jeweils 10 aufeinanderfolgende Messwerte der in Abb. 37 gezeigten Messung gebildet, also der Mittelwert über Messwert 1 - 10, dann über Messwert 2 - 11, 3 - 12, usw. Als Unsicherheitsbalken ist die aus der Wiederholstandardabweichung der jeweiligen 10 Werte berechnete Unsicherheit des Mittelwertes (Erweiterungsfaktor $k = 2$) eingezeichnet¹⁷. In dieser Darstellung sind die oben beschriebenen Auffälligkeiten deutlicher zu erkennen. Besonders der Bereich in der Mitte der Messreihe, in dem die 10er-Mittelwerte deutlich unter dem Gesamtmittelwert liegen, fällt auf. Diese Unterschreitung des Gesamtmittelwertes in diesem Bereich ist **nicht nur** auf den sehr kleinen Messwert Nr. 55 zurückzuführen, es liegen in diesem Bereich alle Messwerte zu niedrig.

Mittelwerte aus diesem Bereich sind nicht in Übereinstimmung mit Werten aus anderen Bereichen der 100er-Serie. Dies ist bereits durch einen Blick auf Abb. 38 zu erkennen, die Überlappung der Messunsicherheitsbalken ist nicht immer gegeben. Das Kriterium (11-1) ist noch schärfer, da in (11-1) die Messunsicherheiten quadratisch aufsummiert werden, während bei der „optischen Kontrolle“ in Abb. 38 eine lineare Summation der Messunsicherheiten erfolgt.

Eine Erklärung für diese Abweichungen kann nicht gegeben werden. Änderungen der Mess- und Umgebungsparameter oder ein Einfluss des Bedieners konnten nicht gefunden werden. Eine Möglichkeit sind Verunreinigungen der Luft (Staub), die sich an der feuchten Spitze der Pipette anlagern und die Dosierung beeinflussen. Diese sind aber zu klein, um mit dem Auge erkannt zu werden. Solche Anlagerungen werden möglicherweise erst nach mehreren Dosiervorgängen wieder abgestreift. Eine „Erholungszeit“, in der der Einfluss solcher Effekte wieder ausgeglichen wird, liegt bei etwa 20 bis 30 Einzelmessungen.

In Abb. 39 sind die Ergebnisse der zweiten Messreihe, die mit Serum als Dosierflüssigkeit durchgeführt wurde, gezeigt. Die Streuung der Ergebnisse der Einzeldosierungen ist deutlich größer als bei der Messung mit Wasser als Dosierflüssigkeit. Mehr Einzelwerte fallen aus den durch die Wiederholstandardabweichung mit den Erweiterungsfaktoren $k = 1$ und $k = 2$

¹⁷ Es sei daran erinnert, dass die Messunsicherheitsbeiträge, die von der Messung des Volumens mit der gravimetrischen Apparatur herrühren, vernachlässigbar sind.

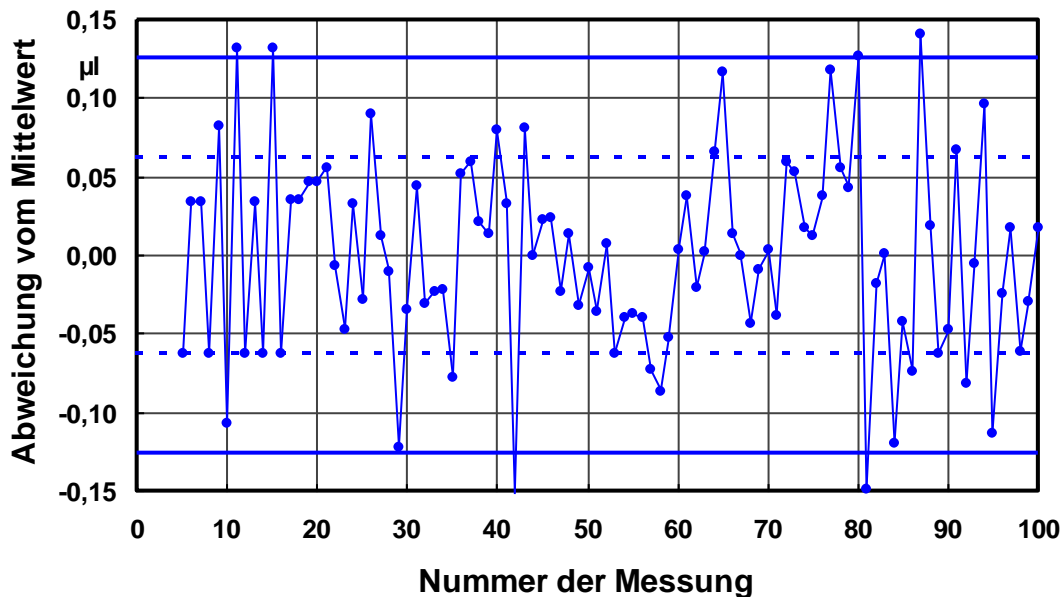


Abb. 39: Hundertmalige Dosierung von Serum. Direktverdrängende Kolbenhubpipette mit einem Prüfvolumen von 10 μl . Dargestellt ist die Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert aller Messungen. Die gestrichelte Linie zeigt die für alle 100 Messwerte ermittelte einfache Standardabweichung ($k = 1$), die durchgezogene Linie die erweiterte Standardabweichung ($k = 2$).

gegebenen Intervallen um den Mittelwert heraus. Die Unterschiede zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen sind größer als bei Wasser. Von Messwert 40 bis 60 ist eine Drift zu kleineren Werten, zwischen Messwert 60 und 80 eine Drift zu größeren Messwerten zu erkennen. Ebenso sind größere Bereiche vorhanden, in denen alle Messwerte oberhalb oder unterhalb des Mittelwertes liegen.

Die zu Abb. 38 analoge Darstellung in Abb. 40 zeigt dieses Verhalten wieder deutlicher. Es gibt starke Änderungen der gleitenden Mittelwerte. Auch hier überlappen die von Mittelwert und Messunsicherheit gegebenen Intervalle häufig nicht. Die Messunsicherheit ist bis zu dreimal so groß wie die Messunsicherheiten bei der Messung mit Wasser. Bemerkenswert ist die geringe Messunsicherheit im Bereich um Messpunkt 50. Hier ist sowohl bei den Einzelmessungen als auch im Mittelwert eine starke Drift zu bemerken. Dennoch ist die aus der Wiederholstandardabweichung berechnete Messunsicherheit so groß wie die kleinsten Mess-

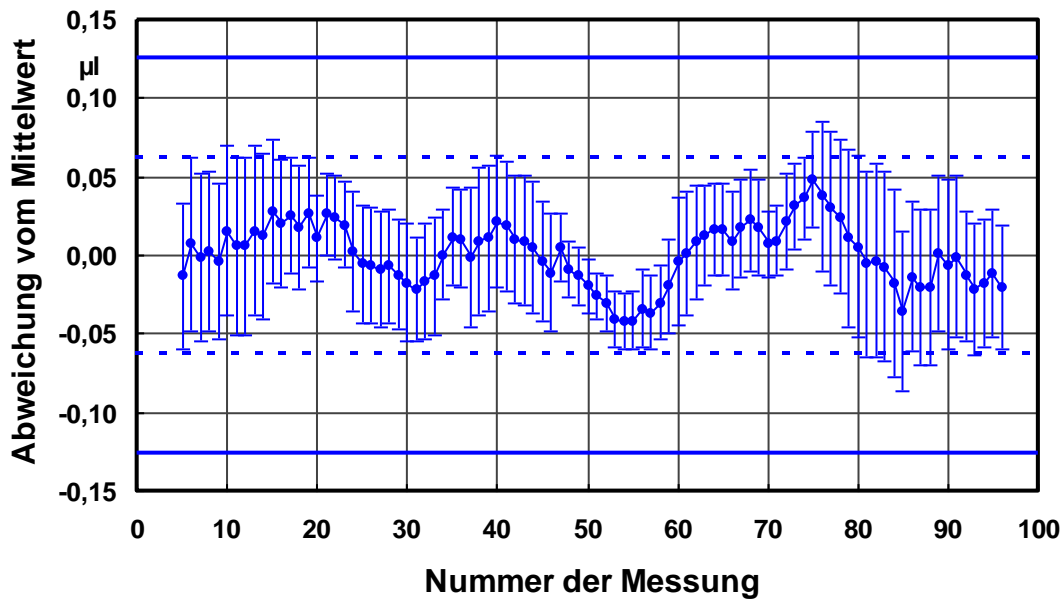


Abb. 40: Hundertmalige Dosierung von Serum. Gleitender Mittelwert mit Mittelung über jeweils 10 Einzeldosierungen. Dargestellt ist die Abweichung der 10er-Mittelwerte vom Mittelwert aller Messungen. Die Daten der Einzelmessungen sind in Abb. 39 dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die für alle 100 Messwerte ermittelte einfache Standardabweichung ($k = 1$), die durchgezogene Linie die erweiterte Standardabweichung ($k = 2$).

unsicherheiten bei der Messung mit Wasser. Die bei der Messung an Wasser erwähnte „Erholungszeit“ beträgt hier etwa 30 Einzelmessungen.

Serum enthält Verunreinigungen in Form von Eiweißausflockungen. Wenn diese sich an der Pipettenspitze festsetzen, so können sie einen ähnlichen Einfluss haben wie Staubteilchen. Das Ergebnis der Messung mit Serum stärkt deshalb die Vermutung, dass an der Pipettenspitze klebende Staubteilchen eine mögliche Ursache für die Abweichungen sind.

Der größte Unterschied in den gleitenden Mittelwerten beträgt bei der Messung mit Wasser $0,056 \mu\text{l}$, bei der Messung mit Serum $0,091 \mu\text{l}$. Unterschiede dieser Größenordnung müssen bei Wiederholmessungen einkalkuliert werden und können deshalb natürlich auch bei Vergleichen der dosierten Volumen an verschiedenen Flüssigkeiten auftreten.

Die in Abb. 31 gezeigten Unterschiede in den Dosierungen von Serum und Kontrollflüssigkeit liegen bis auf drei Ausnahmen unter dieser Spanne von $0,09 \mu\text{l}$. Die Werte für Direktverdränger

und Mikroliterspritzen liegen sogar deutlich darunter, bis auf eine Ausnahme unterschreiten hier alle Differenzen $0,03 \mu\text{l}$. Dieser Vergleich macht deutlich, dass mit der üblichen Messprozedur von 10 Einzelmessungen keine bessere Genauigkeit erreicht werden kann. Berücksichtigt man die oben erwähnte „Erholungszeit“, so scheint eine Serie von mindestens 50 Einzelmessungen zur zuverlässigen Mittelwertbildung erforderlich. Dies entspricht etwa der doppelten „Erholungszeit“¹⁸.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Angabe der Wiederholstandardabweichung auf der Basis einer zehnmaligen Dosierung häufig eine Unsicherheit vortäuscht, die zu klein ist. Die Frage, welche Modifikationen an der Angabe der Unsicherheit durchzuführen sind, um zuverlässigere Angaben zur Unsicherheit zu ermöglichen, lässt sich anhand der vorliegenden zwei Messreihen nicht beantworten.

¹⁸ Dies ist nur für Kalibrierungen mit einer hohen Anforderung an die Genauigkeit erforderlich. Das zeigt ein Vergleich der mit der Dosierflüssigkeit Wasser gewonnenen Messwerte mit den Anforderungen der Norm ISO 8655-2, die für Wasser als Dosierflüssigkeit gelten. Für ein Prüfvolumen von $10 \mu\text{l}$ beträgt die maximale erlaubte systematische Abweichung $0,12 \mu\text{l}$ und die maximale erlaubte Wiederholstandardabweichung $0,08 \mu\text{l}$. Die hier gemessene Differenz zwischen minimalem und maximalem Mittelwert beträgt $0,056 \mu\text{l}$, die maximale Wiederholstandardabweichung beträgt $0,057 \mu\text{l}$ ($k = 1!$). Diese beiden Extremwerte liegen also noch innerhalb der von der Norm gegebenen Grenzen. Die maximale erlaubte Wiederholstandardabweichung wird aber bei der Messung an Serum zum Teil deutlich überschritten.

12 Alternative Methode zur Volumenbestimmung: Photometrie

In Kapitel 3.1 wurde bereits darauf hingewiesen, dass eine ebenfalls häufig angewendete Methode zur Volumenbestimmung auf der photometrischen Messung der Absorption eines Farbstoffes basiert. Bei der photometrischen Methode wird eine Farbstofflösung mit bekannter Farbstoffkonzentration in eine Flüssigkeit bekannten Volumens und bekannter Absorbanz hineindosiert. Aus der gemessenen Absorbanzänderung des Gemisches kann das Volumen der zudosierten Farbstofflösung bestimmt werden.

12.1 Physikalische Grundlagen der Photometrie

Die Absorption von Licht durch eine Farbstofflösung kann als Maß für die Konzentration des Farbstoffes in der Lösung verwendet werden. Für viele Farbstoffe und für nicht zu große Farbstoffkonzentrationen ist der Extinktionskoeffizient (auch als Absorptionskoeffizient bezeichnet) des Lichtes, das die Farbstofflösung durchläuft, proportional zur Farbstoffkonzentration. Diese Beziehung ist als Beersches Gesetz bekannt.

$$(12-1) \quad k = k_c \cdot c$$

k ist der Extinktionskoeffizient der Farbstofflösung, k_c der molare Extinktionskoeffizient, c die Konzentration.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Licht durch eine Flüssigkeit wird das Licht in einem Photometer durch eine Küvette mit der zu prüfenden Flüssigkeit geschickt und das Verhältnis der Intensität von einfallender und ausfallender Strahlung bestimmt. Der Zusammenhang zwischen aus- und einfallender Strahlungsintensität wird durch das Bouguer-Lambertsche Gesetz beschrieben. Das Verhältnis von ausfallender zu einfallender Strahlungsintensität ist exponentiell abhängig von der Schichtdicke der untersuchten Flüssigkeit und von dem die Flüssigkeit charakterisierenden Extinktionskoeffizienten k .

$$(12-2) \quad I_a = I_e \cdot e^{-k \cdot d}$$

I_e, I_a Intensität der einfallenden und austretenden Strahlung

d Dicke der Flüssigkeitsschicht

k Extinktionskoeffizient (Absorptionskoeffizient) der Flüssigkeit

Bei technischen Anwendungen wird häufig eine Gleichung verwendet, die statt der natürlichen Basis e eine dekadische Basis verwendet.

$$(12-3) \quad I_a = I_e \cdot 10^{-k' \cdot d} = I_e \cdot 10^{-A}$$

k' dekadischer Extinktionskoeffizient (Absorptionskoeffizient) der Flüssigkeit

$A = k' \cdot d$ Absorbanz der Flüssigkeit

Messgeräte geben gewöhnlich als Messergebnis die Absorbanz A , das dimensionslose Produkt aus Schichtdicke und dekadischem Extinktionskoeffizient an¹⁹.

$$(12-4) \quad A = k' \cdot d = -\lg(I_a/I_e)$$

Die Schichtdicke der gemessenen Flüssigkeit wird durch die verwendete Küvette bestimmt und ist im Allgemeinen bekannt. Eine Berechnung des Extinktionskoeffizienten aus der Absorbanz ist darum auf einfache Weise möglich, wird aber häufig nicht durchgeführt. Stattdessen werden bei mit Küvetten der gleichen Schichtdicke durchgeführten Vergleichsmessungen die Absorbanzen verglichen.

Die Absorption von Licht durch Farbstoffe ist im Allgemeinen wellenlängenabhängig. Die Messung der Absorbanz sollte deshalb zweckmäßigerweise bei einer Lichtwellenlänge erfolgen, bei der die Absorption ein Maximum erreicht.

Das Beersche Gesetz (Gleichung (12-1)) kann ebenfalls als Beziehung zwischen Farbstoffkonzentration und Absorbanz geschrieben werden.

$$(12-5) \quad c = k_c' \cdot A$$

Bei Kenntnis der durch (12-6) beschriebenen Geraden lässt sich die Konzentration c einer Farbstofflösung durch die Messung der Absorbanz bestimmen.

Um Photometrie zur Kalibrierung von Volumendosiergeräten einsetzen zu können, muss die Kalibrierflüssigkeit mit Farbstoff versetzt werden. Von dieser Ausgangs-Farbstofflösung wird mindestens eine Verdünnung (in Wasser) hergestellt, anhand derer die Steigung der durch (12-7) beschriebenen Geraden, also der Zusammenhang zwischen Absorbanz und Konzentration der Farbstofflösung, bestimmt wird. Wegen der Linearität zwischen

¹⁹ Die Absorbanz ist dimensionslos. Als „Einheit“ wird aber häufig „A“ verwendet.

Farbstoffkonzentration und Absorbanz genügt es, **eine** Verdünnung herzustellen. Zur Überprüfung des Gültigkeitsbereiches des Beerschen Gesetzes sind jedoch **mehrere** unterschiedliche Verdünnungen erforderlich. Die Verwendung mehrerer Verdünnungen verringert auch die Unsicherheit bei der Angabe eines Zahlenwertes für die Steigung. Die Bezugsgröße für die Konzentration der Ausgangs-Farbstofflösung kann dabei willkürlich 1 gesetzt werden²⁰, da sie lediglich als Vergleichswert in weitere Berechnungen eingeht. Die auf diese Weise bestimmte Zahlenwertgleichung wird im Folgenden als Kalibrierkurve bezeichnet.

Die Ausgangs-Farbstofflösung ist auch die Flüssigkeit, die für die Dosierung mit dem zu kalibrierenden Dosiergerät verwendet wird. Diese Dosierung findet direkt in ein Gefäß mit einer Flüssigkeitsvorlage bekannter Absorbanz statt. Die Flüssigkeitsvorlage muss die gleiche Flüssigkeit sein, die auch bei der Messung der Kalibriergeraden als Verdünnung gewählt wurde, im vorliegenden Fall war dies Wasser. Nachdem die dosierte Flüssigkeit und die Vorlage intensiv gemischt sind, kann die Absorbanz der Lösung gemessen werden. Anhand der Kalibrierkurve ist aus der Absorbanzänderung eine Berechnung der Änderung der Farbstoffkonzentration und daraus die Berechnung des zudosierten Volumens möglich.

$$(12-8) \quad c = \frac{c_1 V_1 + c_2 V_2}{V_1 + V_2}$$

$$(12-9) \quad V_2 = V_1 \frac{c_1 - c}{c - c_2}$$

Dabei ist c die Farbstoffkonzentration nach der Dosierung, V_1 das Volumen der Vorlage, c_1 die Farbstoffkonzentration der Vorlage, V_2 das zudosierte (zu bestimmende) Volumen, c_2 die Farbstoffkonzentration des zudosierten Volumens. Bei hier beschriebenen Messungen bestand die Vorlage aus reinem Wasser ohne Farbstoff, deshalb wird $c_1 = 0$ gesetzt. (Die Absorption des Lichtes durch die Luft im Strahlengang und durch die Küvettenwände und das reine Wasser in der Küvette sowie reflektierte Anteile werden vom Messgerät durch den Vergleich mit einer Referenzküvette kompensiert.) Wird bei der Bestimmung der Kalibrierkurve die Konzentration der Ausgangs-Farbstofflösung gleich 1 gesetzt, so gilt $c_2 = 1$. Damit vereinfacht sich (12-9) zu:

$$(12-10) \quad V_2 = V_1 \frac{c}{1 - c}$$

²⁰ Da die Kalibrierkurve direkt gemessen werden soll, ist dies möglich. Soll auf vorhandene Kalibrierdaten zurückgegriffen werden, ist die Angabe der Konzentration in absoluten Stoffmengen-Einheiten notwendig.

Wird eine Kalibrierkurve mit dem Photometer gemessen, mit dem auch die photometrischen Kalibrierungen der Volumendosiergeräte durchgeführt werden, so ist auch eine einfache Rückführbarkeit der photometrischen Messung gegeben, da lediglich eine Vergleichsmessung mit ein und demselben Messgerät durchgeführt wird. Die Vergleichsmessung bewirkt eine Rückführung des zu bestimmenden Volumens V_2 auf andere Volumen. Es sind dies das Volumen V_1 und die Volumen der Ausgangs-Farbstofflösung und der Verdünnung, die bei der Bestimmung der Kalibrierkurve eingesetzt werden. Diese Volumen müssen deshalb rückführbar gemessen werden. Dies geschah bei den hier durchgeführten Messungen durch gravimetrische Volumenbestimmung.

12.2 Erstellung der Farbstofflösungen zur Kalibrierung von Volumendosiergeräten

Die Kalibrierung von Volumendosiergeräten mit dem photometrischen Verfahren erfordert zunächst die Herstellung einer Farbstoffkalibrierlösung und die Überprüfung des Gültigkeitsbereiches des Beerschen Gesetzes. Dazu ist zunächst ein Farbstoff auszuwählen, der sich in der zu dosierenden Flüssigkeit löst. In der vorliegenden Untersuchung wurde der Farbstoff ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) verwendet. Der Farbstoff löst sich sowohl in Wasser als auch in Serum und hat sich in beiden Flüssigkeiten als stabil erwiesen. Eine wässrige Lösung von ABTS ist sehr schwach grün, das Absorptionsmaximum liegt im nahen UV-Bereich bei 340 nm (Abb. 41).

Zur Überprüfung des Gültigkeitsbereiches des Beerschen Gesetzes wurden Lösungen des Farbstoffes in Wasser und in Serum mit unterschiedlicher Farbstoffkonzentration hergestellt. An diesen Lösungen wurde die Absorbanz gemessen. In Abb. 42 und Abb. 43 sind die Ergebnisse gezeigt. Auf der Ordinatenachse ist als „Volumenkonzentration“ die Konzentration der verdünnten Farbstofflösung relativ zur Ausgangs-Farbstofflösung dargestellt. Diese bestand bei der Messung mit Wasser aus 28,6 mg ABTS gelöst in 11,937 g Wasser und bei der Messung mit Serum aus 32 mg ABTS gelöst in 12,07 g Serum. In Abb. 42 ist der lineare Bereich bei kleinen Farbstoffkonzentrationen deutlich zu erkennen. Der Zwischenbereich, in dem die Kalibrierkurve nichtlinear wird, wurde bei den vorliegenden Messungen nicht zur Kalibrierung von Volumendosiergeräten verwendet. Der „Sättigungsbereich“ bei Absorbanzen

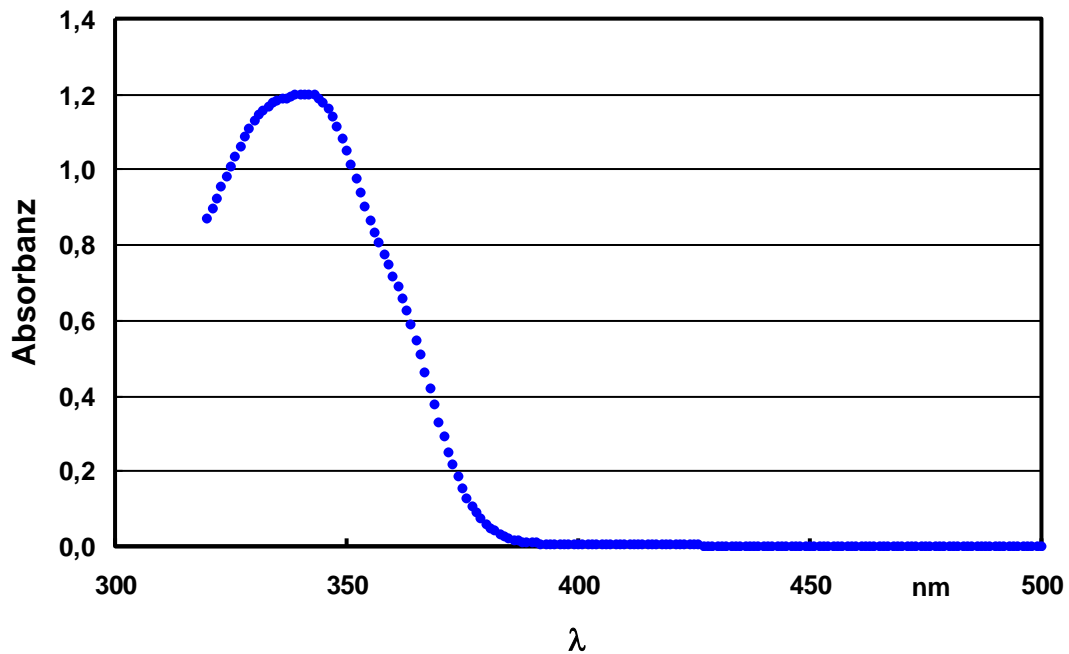


Abb. 41: Absorptionsspektrum des verwendeten Farbstoffes ABTS. Das Absorptionsmaximum liegt bei 340 nm. Diese Wellenlänge wurde für die photometrischen Untersuchungen verwendet.

oberhalb von 4 (dies entspricht einer Intensität des aus der Küvette austretenden Lichtes von weniger als 10^{-4} der Intensität des einfallenden Lichtes) ist ein Artefakt des Messgerätes, das Absorbanzen größer 4 nicht mehr auflösen kann.

Der lineare Bereich lässt sich durch die Zahlenwertgleichung $A = 1,7220 \cdot c$ beschreiben. A ist dabei die Absorbance, c die Konzentration der Farbstofflösung in %. Die aus der linearen Regression bestimmte Unsicherheit dieser Angabe beträgt $2,8 \cdot 10^{-3}$ bei $c = 0$ und $4,4 \cdot 10^{-3}$ bei $c = 1 \%$ (Erweiterungsfaktor $k = 2$). Die minimale Unsicherheit ist für $c = 0,32 \%$ mit $2,0 \cdot 10^{-3}$ gegeben. Die entsprechenden Werte der Kalibrierkurve für ABTS in Serum lauten: Zahlenwertgleichung: $A = 1,8212 \cdot c$, Unsicherheit: $3,2 \cdot 10^{-3}$ bei $c = 0$ und $4,8 \cdot 10^{-3}$ bei $c = 1 \%$. Die minimale Unsicherheit ist für $c = 0,34 \%$ mit $2,2 \cdot 10^{-3}$ gegeben.

Alle Flüssigkeitsvolumen, die für die Erstellung der Kalibriergeraden verwendet wurden, wurden gravimetrisch bestimmt. Ihre Unsicherheiten sind vernachlässigbar.

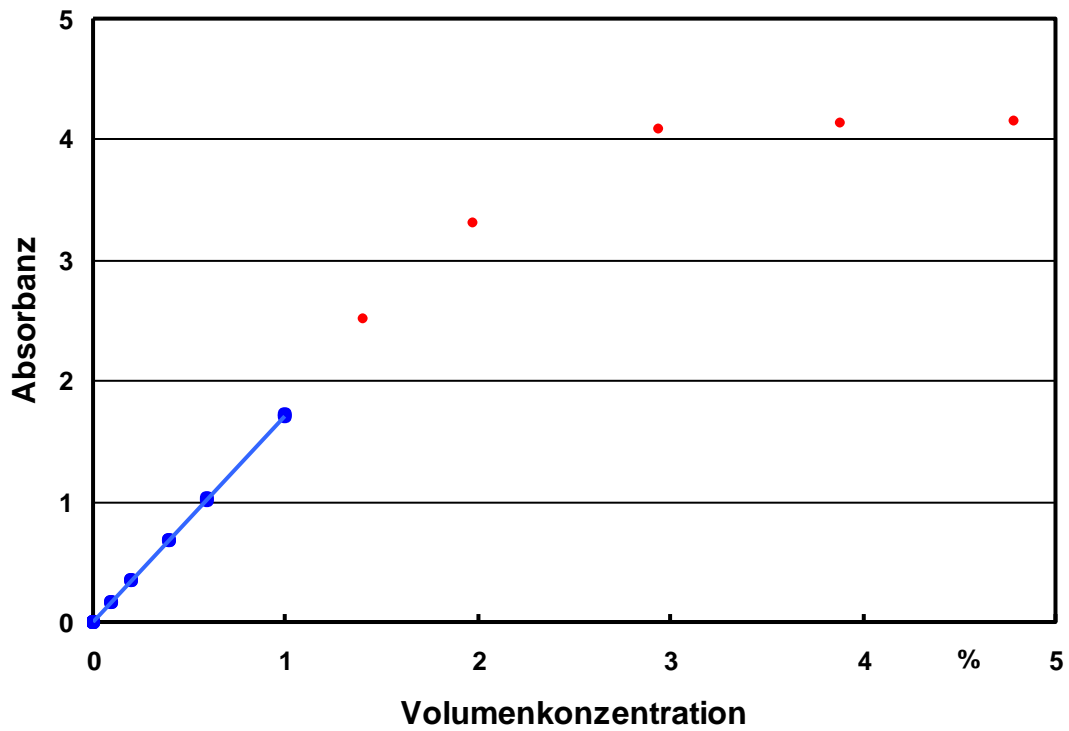


Abb. 42: Kalibrierkurve zur Überprüfung des Beerschen Gesetzes für eine Lösung von ABTS in **Wasser**. Im unteren Bereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorbanz und der Konzentration der Farbstofflösung.

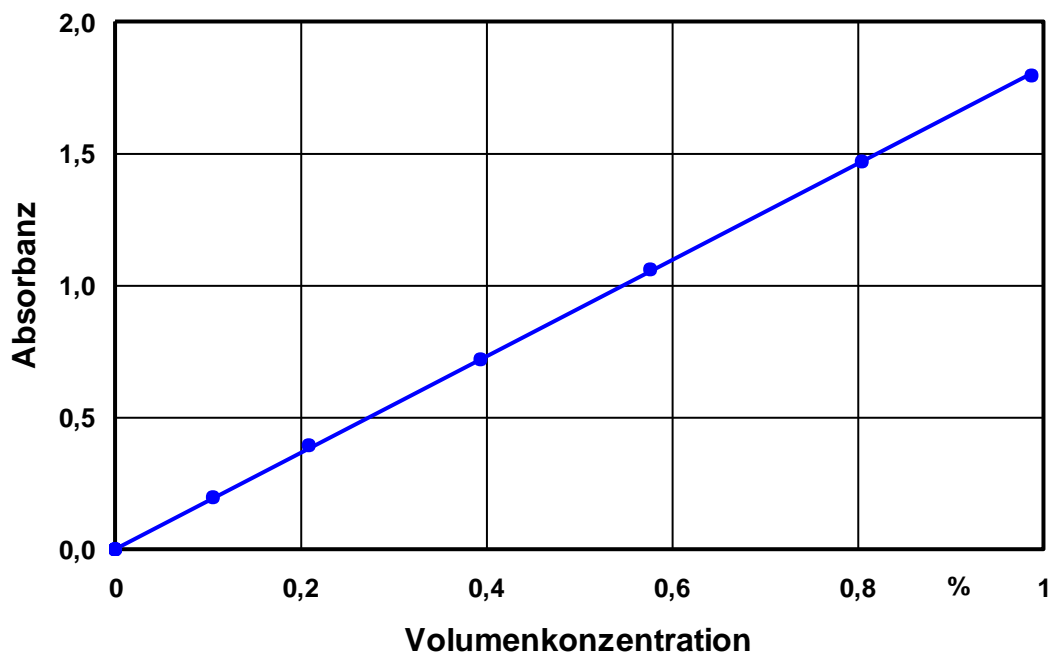


Abb. 43: Kalibrierkurve für eine Lösung von ABTS in **Serum** zur Überprüfung des Beerschen Gesetzes. Dargestellt ist der lineare Bereich, der für Volumenkonzentrationen $c < 1\%$ vorliegt.

12.3 Photometrische Kalibrierung zweier Pipetten

Um einen direkten Vergleich zwischen gravimetrischem und photometrischem Verfahren zu ermöglichen, wurden Kalibrierungen an zwei Pipetten gleichzeitig, d.h. mit denselben dosierten Flüssigkeitsvolumen, sowohl gravimetrisch und als auch photometrisch durchgeführt. Dazu wurde jede Dosierung mit der Farbstofflösung in ein neues Gefäß durchgeführt und zunächst gravimetrisch gemessen. Die Messungen wurden unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wie die in Kapitel 4 beschriebenen gravimetrischen Messungen. Als Gefäße wurden jedoch hier verschließbare Kunststoff-Caps von 1,5 ml Inhalt verwendet. Wegen dieser Änderung wurde auch eine Waage mit größerer Maximallast verwendet. Das Volumen der Flüssigkeitsvorlage in den Caps wurde ebenfalls gravimetrisch bestimmt.

Im Anschluss an die gravimetrische Messung wurden die Flüssigkeitsvorlage und die dazudosierte Farbstofflösung in einem Rüttler gemischt und dann photometrisch gemessen. Vor der photometrischen Messung wurden die Caps zur Temperierung für eine Stunde neben dem

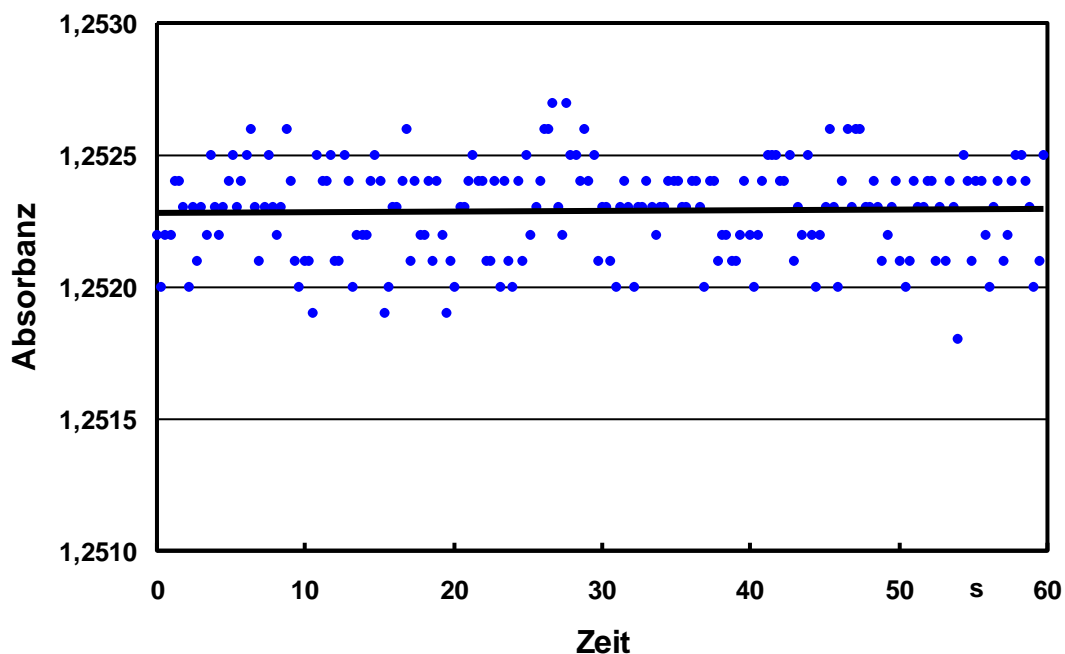


Abb. 44: Gemessene Absorbanz einer Dosierung von 10 μ l Farbstofflösung in 1,3 ml Wasser. Die eingezeichnete Gerade ist durch eine lineare Regression an die Messdaten angepasst. Sie zeigt die zeitliche Drift der Absorbanz von 1,252283 auf 1,252298 nach 60 s. Die Auflösung des Photometers beträgt 0,0001. Die Drift ist deshalb im Rahmen der Messunsicherheit vernachlässigbar.

Photometer gelagert. Zur photometrischen Messung musste die Flüssigkeit in eine Küvette umgefüllt werden. Die Küvette wurde vor jeder neuen Füllung gereinigt. Beim Umfüllen wurde darauf geachtet, dass die Erwärmung der Flüssigkeit durch Handwärme möglichst gering war. Da die Temperatur der Messkammer des Photometers um etwa 5 °C höher war als die Umgebungstemperatur, wurde die Messung unmittelbar nach dem Einsetzen der Küvette in das Photometer durchgeführt. Die Messzeit im Photometer betrug 1 min. Kontrollmessungen über einen Zeitraum von 2 min zeigten, dass die Änderung der Absorbanz in diesem Zeitraum immer geringer ist als 0,002. Eine Messung über 30 min ergab eine Abnahme des Messergebnisses um 0,01 aufgrund der Erwärmung der Flüssigkeit.

Eine photometrische Messung ist in Abb. 44 dargestellt. Die Messung besteht aus 200 Einzelmessungen, die in einem zeitlichen Abstand von 0,3 s gemessen wurden. Die relative Standardabweichung der Messwerte ist für die gezeigte Messung $1,4 \cdot 10^{-4}$, die relative Standardabweichung des Mittelwertes beträgt $1,0 \cdot 10^{-5}$. Die zeitliche Drift des Signales während der Messzeit wurde durch eine lineare Regression ermittelt. Die relative Änderung der

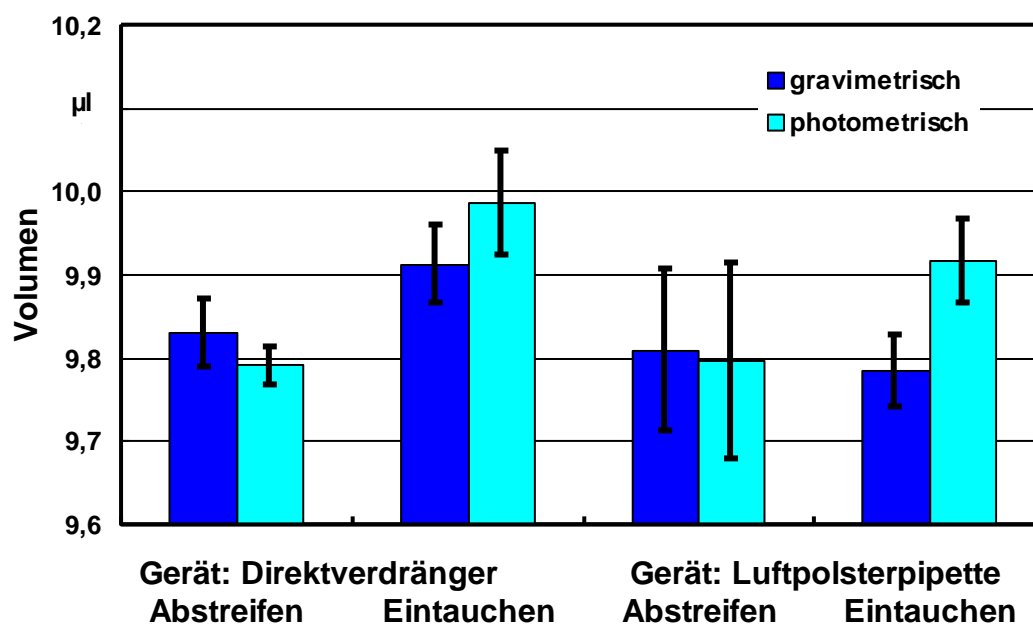


Abb. 45: Vergleich der mit Gravimetrie und Photometrie gemessenen Dosierergebnisse. Die Dosierflüssigkeit ist mit Farbstoff versetztes **Wasser**, das Prüfvolumen beträgt **10 µl**, die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen, die Messunsicherheitsbalken sind aus der Wiederholstandardabweichung ermittelt, der Erweiterungsfaktor ist $k = 2$. Es sind die Dosierungen für eine direktverdrängende Pipette und eine Luftpolsterpipette für die beiden im Text beschriebenen unterschiedlichen Dosierverfahren dargestellt.

Absorbanz beträgt $1,2 \cdot 10^{-5}$ nach der Messzeit von 60 s. Sie ist deshalb im Rahmen der Messunsicherheit vernachlässigbar.

Aus den Absorbanzen wurden nach dem in Kapitel 12.1 beschriebenen Verfahren die dosierten Volumen berechnet. Wie bei der gravimetrischen Methode wurden für eine Kalibrierung 10 Einzelmessungen gemittelt.

Die photometrischen Messungen wurden exemplarisch an einer direktverdrängenden Pipette und an einer Luftpolsterpipette durchgeführt. Als Dosierflüssigkeiten dienten Wasser mit Farbstoff und Serum mit Farbstoff, die dosierten Prüfvolumen waren $10 \mu\text{l}$ und $2 \mu\text{l}$. Darüber hinaus wurden zwei unterschiedliche Dosierverfahren untersucht. Beim ersten Verfahren wurde die Dosierung in ein trockenes Gefäß durchgeführt, die Pipette wurde an der Gefäßwand abgestreift, erst danach wurde die Flüssigkeitsvorlage hinzugefügt. Diese Prozedur entspricht der Dosierprozedur beim gravimetrischen Kalibrierverfahren. Beim zweiten Verfahren wurde

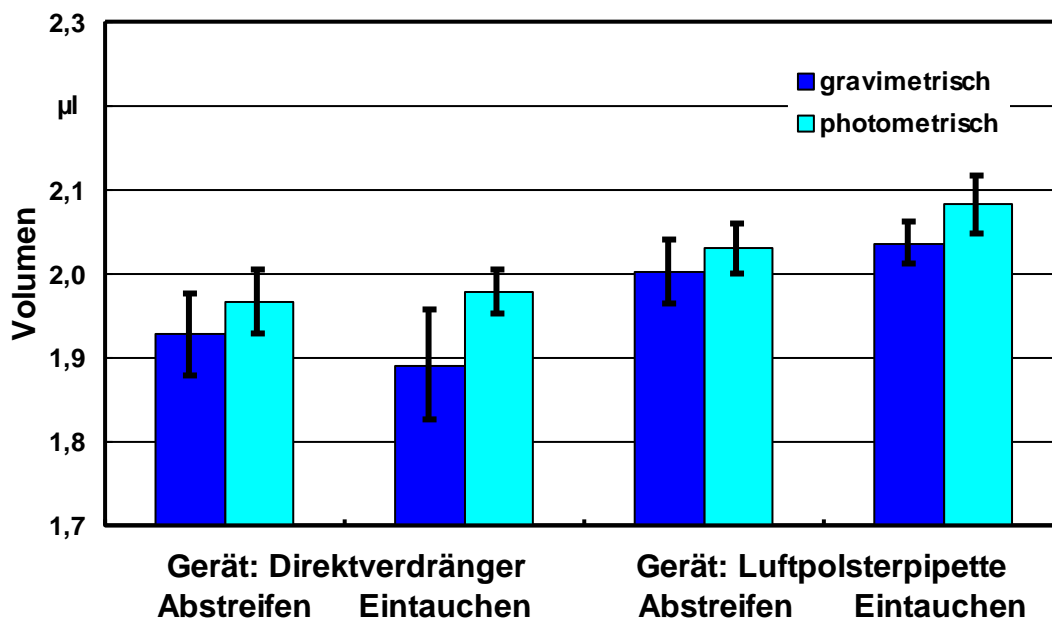


Abb. 46: Vergleich der mit Gravimetrie und Photometrie gemessenen Dosierergebnisse. Die Dosierflüssigkeit ist mit Farbstoff versetztes **Wasser**, das Prüfvolumen beträgt **2 μl** , die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen, die Messunsicherheitsbalken sind aus der Wiederholstandardabweichung ermittelt, der Erweiterungsfaktor ist $k = 2$. Es sind die Dosierungen für eine direktverdrängende Pipette und eine Luftpolsterpipette für die beiden im Text beschriebenen unterschiedlichen Dosierverfahren dargestellt.

erst die Vorlage in das Gefäß gegeben, danach wurde die Farbstofflösung hinzudosiert. Bei diesem zweiten Verfahren wurde die Pipettenspitze beim Dosieren nicht an die Gefäßwand angelegt, sondern in die Vorlage eingetaucht. Nach der Dosierung wurde nicht abgestreift. Diese Prozedur spiegelt die häufig angewendete Handhabung in der analytischen Praxis wider.

In Abb. 45 bis Abb. 47 sind die Messresultate dieses Vergleiches gegenübergestellt. Dargestellt ist der Vergleich einer direktverdrängenden Pipette mit einer Luftpolsterpipette für die zwei oben beschriebenen Dosierverfahren des „Abstreifens“ und des „Eintauchens“. In den drei Abbildungen sind auch die an denselben Dosierungen vorgenommenen gravimetrischen und photometrischen Ergebnisse direkt verglichen.

Abb. 45 vergleicht die Dosierergebnisse für die Dosierung von 10 µl Wasser. Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung der photometrisch gewonnenen Daten mit den gravimetrisch gewonnenen Daten. Die mit dem Eintauchverfahren gemessenen photometrischen Werte sind etwa 1 % größer als die gravimetrischen Werte. Hier findet möglicherweise ein Transfer zumindest eines Teils des Farbstoffes aus der Flüssigkeit, die normalerweise als Rest in der Pipettenspitze bleibt, in die Vorlage statt. Dies kann durch direkten Austausch von Flüssigkeit oder durch Diffusion erfolgen. Die Pipettenspitze ist während der Dosierung etwa 3 s bis 5 s in die Flüssigkeit eingetaucht, diese Zeit ist lang genug für Austausch- und Diffusionsprozesse. Durch einen solchen Vorgang wird ein zu großes dosiertes Volumen vorgetäuscht.

Der Vergleich der Messdaten, die bei einem Prüfvolumen von 2 µl gewonnen wurden, ist in Abb. 46 gezeigt. Die Übereinstimmung der Ergebnisse ist ebenfalls sehr gut. Die photometrischen Werte sind bei den nach dem Abstreifverfahren erhaltenen Ergebnissen etwa 1 % bis 2 % größer als die gravimetrischen Werte. Die Unterschiede bei den mit dem Eintauchverfahren gemessenen Werten sind jedoch doppelt so groß.

Die Vergrößerung des dosierten Volumens, die beim Eintauchverfahren mit dem photometrischen Messverfahren gegenüber dem gravimetrischen Verfahren ermittelt wurde, ist bei allen durchgeführten Messungen von etwa gleicher Größe wie die aus der Wiederholstandardabweichung bestimmte Messunsicherheit. Die Volumenänderung ist jedoch immer eine Vergrößerung. Deshalb ist das Ergebnis als signifikant anzusehen.

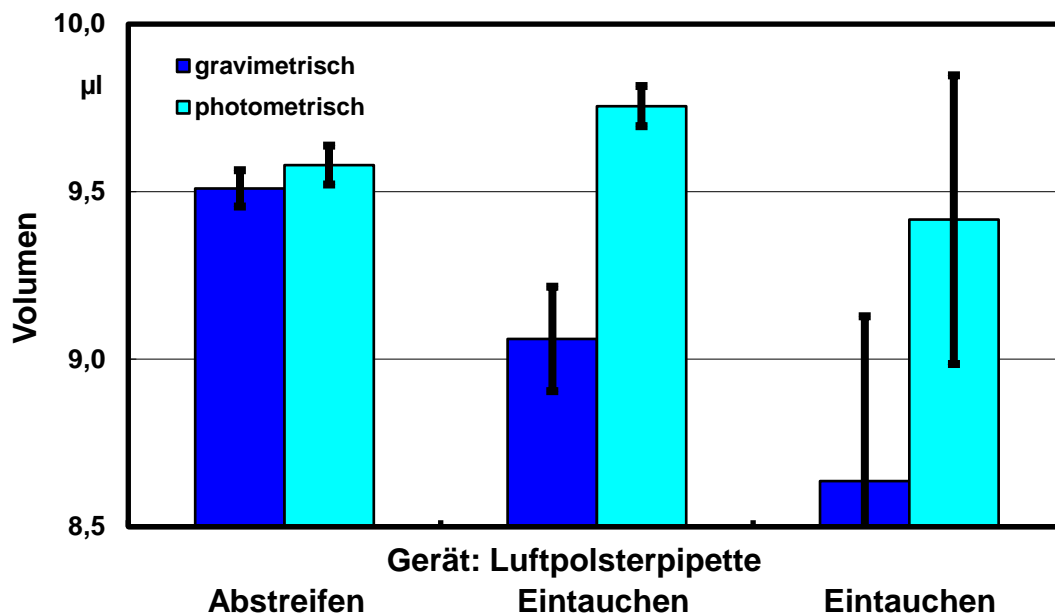


Abb. 47: Vergleich der mit Gravimetrie und Photometrie gemessenen Dosiererergebnisse. Die Dosierflüssigkeit ist mit Farbstoff versetztes **Serum**, das Prüfvolumen beträgt **10 µl**, die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen, die Messunsicherheitsbalken sind aus der Wiederholstandardabweichung ermittelt, der Erweiterungsfaktor ist $k = 2$. Es sind die Dosierungen für eine Luftpolsterpipette für das im Text beschriebene Eintauchverfahren dargestellt.

In Abb. 47 sind drei Messungen mit einem Prüfvolumen von 10 µl Serum gezeigt. Die Messungen wurden nur mit der Luftpolsterpipette durchgeführt, die auch für die Messungen mit der Farbstofflösung in Wasser verwendet wurde. Die nach dem Abstreifverfahren erhaltenen Ergebnisse zeigen eine hervorragende Übereinstimmung zwischen photometrischem und gravimetrischem Ergebnis, beide Ergebnisse bestätigen wieder die schon von den in Kapitel 8 beschriebenen Untersuchungen her bekannte Unterdosierung von 5 %.

Dagegen sind bei den beiden Messungen, die nach dem Eintauchverfahren durchgeführt wurden, deutliche Unterschiede zu erkennen. Die erste Messung nach dem Eintauchverfahren (die mittlere Messung in Abb. 47) bestätigt mit dem photometrischen Wert das mit dem Abstreifverfahren erhaltene Ergebnis. Der Wert ist 1,8 % größer als der Wert nach dem Abstreifverfahren, wie es bereits von den Messungen mit Wasser bekannt ist. Der gravimetrische Wert ist jedoch deutlich geringer als der photometrische Wert und als die mit dem

Abstreifverfahren erhaltenen Werte Der Unterschied beträgt hier 7,7 %. Diese Diskrepanz kann nicht mehr mit Flüssigkeitsaustausch und Farbstoffdiffusion erklärt werden.

Die dritte gezeigte Messung (die rechte in Abb. 47) ist eine Wiederholungsmessung der zweiten Messung. Sie ist weniger zuverlässig, da sie eine „Fehldosierung“ enthält. Dies kommt in den insgesamt niedrigeren Werten und in der sehr großen Messunsicherheit zum Ausdruck. Dennoch ist die nahezu gleiche Diskrepanz (9 %) auch in dieser Messung zu sehen.

Die beiden Messungen nach dem Eintauchverfahren zeigen die Problematik dieses Verfahrens auf, wenn es mit Serum anstelle von Wasser zur gravimetrischen Bestimmung des Volumens eingesetzt wird. Beim Befüllen der Pipette bildet sich auf der Außenseite der Spitze ein dünner Serumfilm. Dieser trocknet auf dem Weg vom Vorratsgefäß zum Dosiergefäß teilweise oder vollständig ein. Beim Eintauchen in die Vorlage nimmt dieser getrocknete Serumfilm Wasser aus der Vorlage auf. Dieses Wasser wird beim Herausziehen der Pipettenspitze aus der Vorlage mitgenommen und verringert die Wassermenge der Vorlage im Dosiergefäß.

Das mitgenommene Wasservolumen wird aus der in Abb. 47 gezeigten Differenz zu $0,7 \mu\text{l}$ abgeschätzt. Dieses Wasservolumen verringert zwar nur das Volumen der Vorlage, führt bei der gravimetrischen Messung aber zu einer entsprechenden deutlichen Verringerung des gemessenen Volumens, weil das gravimetrische Verfahren lediglich die Differenz der Masse des Gefäßes vor und nach dem Dosiervorgang als Messwert für das Volumen erfassen kann. Bei der photometrischen Messung tritt zwar das gleiche Problem auf, hier wirkt sich das mitgenommene Wasservolumen aber nur auf das Volumen der Vorlage aus. Da dieses mit $1300 \mu\text{l}$ sehr groß gegen das mitgenommene Wasservolumen ist, findet eine Änderung des gemessenen Volumens im Verhältnis $0,7 \mu\text{l}$ zu $1300 \mu\text{l}$, also um relativ $5 \cdot 10^{-4}$ statt. Das gemessene Volumen ist in diesem Fall um $5 \cdot 10^{-4}$ zu groß, weil der Farbstoff durch die Abnahme des Vorlagenvolumens aufkonzentriert wird. Die Frage, ob das mitgenommene Wasservolumen aus reinem Wasser oder aus Wasser mit Farbstoff besteht, kann aufgrund dieser Messungen nicht beantwortet werden. Es ist zu vermuten, dass sowohl Wasser als auch Farbstoff mitgenommen werden.

Ein ähnlich problematisches Verhalten kann auch bei anderen gut benetzenden Flüssigkeiten auftreten. Hier liegt ein Fall vor, bei dem die gravimetrische Volumenbestimmung systembedingt ein deutlich zu kleines Ergebnis liefert. Lediglich bei der Verwendung von Wasser ist

wegen der großen Oberflächenspannung und der damit verbundenen schlechten Benetzung der Pipettenspitzenoberfläche dieser Effekt vernachlässigbar.

12.4 Vor- und Nachteile der photometrischen Kalibrierung von Volumendosiergeräten

Das Verfahren der photometrischen Messung zur Kalibrierung von Volumendosiergeräten wird häufig für kleine Volumen als vorteilhaft gegenüber dem gravimetrischen Verfahren dargestellt. Argumente hierfür sind die für kleine Volumen nicht ausreichende Auflösung der Waage und der große Einfluss der Verdunstung auf das Messergebnis bei der gravimetrischen Methode.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die grundsätzliche Einsetzbarkeit des photometrischen Verfahrens. Die Messunsicherheit des photometrischen Verfahrens bewegt sich für kleine Dosiervolumen innerhalb der durch Normen gegebenen Fehlergrenzen. Für Volumen oberhalb 100 μl ist dies aber nicht immer gegeben. Für größere Volumen sollte deshalb immer dem gravimetrischen Verfahren der Vorzug gegeben werden.

Ein weiterer Nachteil des photometrischen Verfahrens ist, dass keine reinen Flüssigkeiten, sondern mit Farbstoff versetzte Flüssigkeiten untersucht werden. Durch die Zugabe von Farbstoff können sich Stoffparameter und damit die Dosiereigenschaften ändern. Bei Wasser ändert sich beim Zusatz von Fremdstoffen vor allem die Oberflächenspannung. Dies kann zu verfälschten Ergebnissen führen und ist bei Kalibrierungen, die mit sehr geringer Messunsicherheit durchgeführt werden sollen, nicht zu tolerieren.

Der häufig als Vorteil des photometrischen Verfahrens dargestellte kurze Zeitaufwand für eine Kalibrierung kann nur genutzt werden, wenn die Kalibrierflüssigkeit von einer externen Quelle bezogen werden kann oder wenn große Mengen der Flüssigkeit benötigt und selbst hergestellt werden und wenn keine eigenen Kalibrierkurven gemessen werden müssen. Außerdem muss eine Dosierung direkt in die Küvette des Photometers mit anschließender Durchmischung möglich sein. Beim Bezug der Flüssigkeit von einer externen Quelle muss für eine geeignete Rückführbarkeit der Farbstofflösung (und für eine rückgeführte Kalibrierung des Photometers)

gesorgt werden, da hier keine Vergleichsmessung vorliegt. Da Farbstofflösungen häufig nicht langzeitstabil sind, ist eine längere Lagerung der Lösungen nicht möglich.

Bei der Kalibrierung mit Flüssigkeiten wie Serum muss die Kalibrierlösung kurzfristig hergestellt und in wenigen Tagen verbraucht werden. Wegen des begrenzten Vorrats an Serum können nur kleine Mengen hergestellt werden. Die Herstellung erfordert eine gravimetrische Einwaage von Flüssigkeit und Farbstoff. Auch die Lösungen unterschiedlicher Konzentration, die zur Messung der Kalibriergeraden benötigt werden, müssen gravimetrisch kontrolliert werden, um die erforderliche Genauigkeit zu erreichen. Das Volumen der Vorlage muss ebenfalls gravimetrisch bestimmt werden, da eine volumetrische Bestimmung mit einem Volumendosiergerät einen sehr großen Unsicherheitsbeitrag liefert. Diese notwendigen gravimetrischen Messungen und die ebenfalls erforderliche Bestimmung der Dichte der Farbstofflösung erhöhen den Zeitaufwand für eine photometrische Messung derart, dass sie um ein mehrfaches länger dauert als eine gravimetrische Messung.

Die eingangs genannten Nachteile des gravimetrischen Verfahrens, eine Waage mit zu geringer Auflösung und Empfindlichkeit und der große Einfluss der Verdunstung bei sehr kleinen Volumen, können durch geeignete Maßnahmen verhindert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich mit der geeigneten Waage und mit einer rechnerischen Verdunstungskorrektur sehr kleine Flüssigkeitsvolumen mit einer erweiterten Unsicherheit von 2,4 nl bestimmen lassen. Experimentell gezeigt wurde dies bei Prüfvolumen von 0,2 μl . Die Unsicherheitsberechnungen lassen erwarten, dass Volumen bis hinab zu 50 nl mit dem klassischen gravimetrischen Verfahren gemessen werden können.

13 Zusammenfassung

Der vorliegende Bericht beschreibt Untersuchungen des Dosierverhaltens von Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen bei der Dosierung von unterschiedlichen Flüssigkeiten. Die dosierten Volumen lagen im Bereich zwischen $0,2 \mu\text{l}$ und $50 \mu\text{l}$, sie wurden mit einer gravimetrischen Messapparatur gemessen. Als Flüssigkeiten wurden Wasser, Ethanol und Nonan verwendet, einen besonderen Schwerpunkt bildete die Untersuchung des Dosierverhaltens von Humanserum. Im Rahmen der Untersuchungen wurde auch das gravimetrische Messverfahren mit dem photometrischen Verfahren experimentell verglichen. Um in Analytik-Laboratorien gravimetrische Kalibrierungen von Volumendosiergeräten mit Humanserum zu ermöglichen, wurde eine einfache Methode zur Dichtebestimmung an Humanserum aus den analytisch bestimmten Kochsalz- und Eiweißkonzentrationen im Serum entwickelt.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass die Volumen von mit Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen dosierten Flüssigkeiten unterschiedlich sein können, wenn unterschiedliche Flüssigkeiten verwendet werden. Die allgemein übliche und durch Normen festgelegte Kalibrierung solcher Dosiergeräte mit Wasser als Dosierflüssigkeit kann Ergebnisse liefern, die nicht auf die Dosierung anderer Flüssigkeiten übertragbar sind. Verantwortliche Stoffparameter für das unterschiedliche Dosierverhalten sind vor allem die Oberflächenspannung und Grenzflächenspannung sowie der Dampfdruck der Flüssigkeiten. Wird Humanserum dosiert, so bewirkt die große Haftung der Flüssigkeit an der Pipetten- oder Mikroliterspitze zusätzliche Abweichungen im dosierten Volumen.

Wasser benetzt die Außenseite von Pipetten- oder Mikroliterspitzen wenig, der Grund ist die große Oberflächen- und Grenzflächenspannung. Flüssigkeiten mit geringer Oberflächen- und Grenzflächenspannung dagegen benetzen die Außenseite sowohl beim Befüllen als auch beim Entleeren des Gerätes. Die zusätzliche Flüssigkeit auf der Außenseite kann durch Abstreifprozeduren nur unvollständig entfernt werden. Ihr Volumen hängt stark von Graten und Kratzern an der Gerätespitze und von der Rauigkeit der Oberfläche ab. Die Abweichung im Dosierergebnis wird also vor allem durch die Gerätespitze beeinflusst, nicht vornehmlich durch das Dosiergerät. Als Richtwert für hierdurch bedingte Abweichungen im dosierten Volumen kann bei Ethanol und Nonan 1 % für Prüfvolumen zwischen $2 \mu\text{l}$ und $50 \mu\text{l}$ angegeben werden. Eine Dosierung mit Wasser kann diesen Einfluss der Außenseite der Gerätespitze nicht zeigen, weil die Benetzung zu gering ist.

Es ist seit längerem bekannt, dass Flüssigkeiten mit großem Dampfdruck nicht mit Luftpolsterpipetten dosiert werden können, weil die Anreicherung des Luftpolsters mit Flüssigkeitsdampf das Luftpolster vergrößert. Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass auch bei direktverdrängenden Kolbenhubpipetten und bei Mikroliterspritzen eine Unterdosierung erfolgt. Als Richtwert für diese Unterdosierung kann bei Ethanol 2 % für Prüfvolumen zwischen 2 μ l und 50 μ l angegeben werden. Ursache ist die Verdunstung der Flüssigkeit aus der Gerätespitze heraus und von der Außenseite der Gerätespitze.

Bei der Dosierung von Humanserum treten diese Einflüsse ebenfalls auf, haben allerdings nicht so große Abweichungen zur Folge wie bei Ethanol oder Nonan. Der Dampfdruck von Serum ist ähnlich dem Dampfdruck von Wasser, aus dem ja Serum zu etwa 90 % besteht. Die Oberflächenspannung ist mit einem Wert von etwa 56 mN/m deutlich größer als die von Ethanol oder Nonan mit je etwa 22 mN/m. Mit Wasser gewonnene Kalibrierergebnisse sind deshalb für direktverdrängende Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen häufig gut auf die Dosierung mit Serum übertragbar. Problematisch bei Serum ist vor allem die große Haftung der Flüssigkeit an den Gefäßwänden. Ist die Außenseite der Gerätespitzen ungünstig konstruiert, kann es deshalb auch bei direktverdrängenden Kolbenhubpipetten und Mikroliterspritzen größere Abweichungen im dosierten Volumen geben. Die gemessenen Abweichungen liegen denn auch im Allgemeinen für Prüfvolumen größer 2 μ l bei etwa 0,1 %, erreichen aber in Einzelfällen 1 % bis 2 %.

Bei Luftpolsterpipetten behindert die große Haftung an den Spitzenwänden das Ausstoßen der Flüssigkeit sehr stark. Ein Ausstoßen ist häufig nur unter Zuhilfenahme des sogenannten Überhubes, eines zusätzlichen Luftpolsters, möglich. Dennoch verbleibt ein großer Flüssigkeitsrest in der Pipette. Als Richtwert für die dadurch bedingte Unterdosierung kann 5 % für Prüfvolumen zwischen 1 μ l und 20 μ l angegeben werden.

Luftpolsterpipetten sollten immer mit der zu dosierenden Flüssigkeit kalibriert werden. Werden bei der Kalibrierung deutlich größere empirische Wiederholstandardabweichungen gefunden als bei der Kalibrierung mit Wasser, sollte der Einsatz von direktverdrängenden Pipetten erwogen werden.

Die Abweichungen im dosierten Volumen bei der Verwendung unterschiedlicher Flüssigkeiten sind bei direktverdrängenden Kolbenhubpipetten von gleicher Größenordnung wie die in Normen genannten Fehlergrenzen. Eine Kalibrierung des Dosiergerätes mit der später dosierten

Flüssigkeit ist deshalb sehr zu empfehlen. Bei Dosierungen, die erhöhte Anforderungen an die Genauigkeit stellen, ist sie unbedingt erforderlich.

Generell erwiesen sich Mikroliterspritzen als weniger anfällig gegen den Wechsel der Dosierflüssigkeit. Der längere Hub in Verbindung mit einem kleineren Spitzendurchmesser und einer kleineren Austrittsöffnung wirkt sich hier positiv auf die Dosiereigenschaften aus. Ein Vergleich mit Fehlergrenzen ist nicht möglich, weil es für Mikroliterspritzen keine Normung gibt. Eine Kalibrierung mit der später dosierten Flüssigkeit ist ebenfalls sehr zu empfehlen.

Ein großes Problem für die gravimetrische Kalibrierung von Volumendosiergeräten mit Humanserum, die nicht gut genug bekannte Dichte des Serums, konnte gelöst werden. Es wurde eine einfache Gleichung gefunden, die die Berechnung der Serumdichte aus Analysedaten für Kochsalz und Eiweiß mit guter Genauigkeit ermöglicht. Als zweiter Weg zur Kalibrierung wurde der Ersatz des Serums durch Kontrollmaterial erprobt. Auch der Einsatz dieser Flüssigkeit anstelle von Humanserum ermöglicht Kalibrierergebnisse, die auf die Dosierung von Serum gut anzuwenden sind.

Neben den Vergleichen zur Dosierung unterschiedlicher Flüssigkeiten wurden in der vorliegenden Arbeit auch weitere Einflüsse untersucht, die das Dosierergebnis verändern können. Es wurde gezeigt, dass sich die Temperatur der Pipettenspitzen beim Dosieren deutlich verändert. Der Einfluss von Flüssigkeitsdampf auf die Luftdichte und damit auf die Luftauftriebskorrektur wurde abgeschätzt. Die Änderung der Flüssigkeitsmenge im Wägegefäß der gravimetrischen Apparatur durch Verdunstung wurde untersucht, zur Kompensation dieses Effektes wurde ein rechnerisches Verfahren sehr erfolgreich angewendet. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Kalibrierungen von Volumendosiergeräten ist auch unter gleichen Messbedingungen häufiger nicht gegeben, als man es aufgrund statistischer Vorhersagen erwarten würde. Eine mögliche Erklärung wurde gegeben. Als Ausweg wurde die Vergrößerung der Zahl der Einzelmessungen von 10 auf 30 bis 50 zumindest für Kalibrierungen höchster Genauigkeit vorgeschlagen.

Die photometrische Kalibrierung wurde als alternatives Verfahren zur gravimetrischen Kalibrierung untersucht. Das Verfahren leidet darunter, dass wegen Flüssigkeitsaustauschvorgängen und Farbstoffdiffusion ein zu großes Flüssigkeitsvolumen erfasst wird, wenn bei einer Dosierung die Gerätespitze direkt in eine Vorlage eingetaucht wird. Das Abstreifen der Flüssigkeit an der Gefäßwand wie beim gravimetrischen Verfahren liefert Messwerte, die

besser mit denen des gravimetrischen Verfahrens vergleichbar sind. Die Messunsicherheit ist größer als die des gravimetrischen Verfahrens, besonders die Stabilität der Farbstofflösung und Anlagerungen des Farbstoffes an Gefäßwänden sind schwer zu erfassen. Das Verfahren ist jedoch für die Kalibrierung von Dosiergeräten gut einsetzbar, wenn Volumen kleiner als 100 μl dosiert werden sollen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist aber das gravimetrische Verfahren auch bei der Messung sehr kleiner Volumen dem photometrischen Verfahren überlegen. Die absolute Messung von kleinen Flüssigkeitsvolumen ist noch bei Prüfvolumen von 100 nl mit einer erweiterten Unsicherheit ($k = 2$) von 2,4 % möglich.

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1: Flussdiagramm zur Verknüpfung der Messgrößen, die für eine gravimetrische Volumenbestimmung erforderlich sind. In den durch kursive Schrift gekennzeichneten Feldern sind feste Werte eingesetzt, die anstelle von Messwerten benutzt werden. 15
- Abb. 2: Fotografie der Messapparatur Links die Waage, bestehend aus Wägeteil, Steuerteil und Netzteil. Auf der freien Fläche in der Mitte des Tisches befindet sich das Vorratsgefäß für die Flüssigkeit, darüber im Stativ das Dosiergerät. Rechts die Digitalohmmeter für die Messung der Thermometerwiderstände und Messgeräte für Luftdruck und Luftfeuchte. Neben dem Messtisch befindet sich ein PC zur Datenerfassung. 17
- Abb. 3: a) Handgefertigte Glasgefäße, die als Flüssigkeitsvorratsgefäße und als Wägegefäße dienen b) Glasgefäß mit Kupferring zur thermischen Stabilisierung des Flüssigkeitsvorratsgefäßes. Im Glasgefäß der zur Temperaturbestimmung verwendete Thermistor. 18
- Abb. 4: Wägewert als Funktion der Zeit bei einer 15fachen Dosierung von je 10 μ l Wasser **ohne** Abstreifen. Das Zeitintervall zwischen den Einzeldosierungen ist auf 20 s verkürzt. Die Messpunkte haben einen zeitlichen Abstand von je 0,4 s. 21
- Abb. 5: Wägewert als Funktion der Zeit bei einer 15fachen Dosierung von je 10 μ l Wasser **mit** Abstreifen. Das Zeitintervall zwischen den Einzeldosierungen beträgt 40 s. Die Messpunkte haben einen zeitlichen Abstand von je 0,4 s. Die Streuung der Messwerte unmittelbar nach jeder Einzeldosierung ist im Text erklärt. 21
- Abb. 6: Ausschnitt aus Abb. 5 mit Anpassgeraden. Die Höhe der senkrechten Abschnitte ist ein Maß für den Wägewert der dosierten Flüssigkeit. Deutlich ist die Erholungszeit der Waage zu sehen, über die extrapoliert werden muss. 22
- Abb. 7: Verdunstung von Ethanol Die Abbildung vergleicht die Abnahme des Wägewertes bei einer Dosierung direkt in eine Flüssigkeitsvorlage (ohne Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche) mit einer Dosierung gegen die Gefäßwand (mit Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche). 27
- Abb. 8: Temperaturverhalten einer Pipettenspitze nach dem Befüllen mit Wasser und anschließendem Ausfließen der Flüssigkeit Der Einsatz rechts zeigt schematisch die Anordnung des Temperaturfühlers in der Pipettenspitze. .30
- Abb. 9: Temperaturverhalten einer Pipettenspitze nach dem Befüllen mit Wasser und anschließendem Ausfließen der Flüssigkeit, Zyklus über 14 Einzeldosierungen. 32
- Abb. 10: Temperaturverhalten einer Pipettenspitze nach dem Befüllen und anschließendem Ausfließen der Flüssigkeit bei der Verwendung von Ethanol, Zyklus über 14 Einzeldosierungen. 33

- Abb. 11: Erweiterte Messunsicherheit ($k = 2$) für die Messung von Flüssigkeitsvolumen mit der gravimetrischen Messapparatur bei ausgewählten Prüfvolumen. Die Messunsicherheit ist bei Prüfvolumen kleiner $10 \mu\text{l}$ nahezu volumenunabhängig.43
- Abb. 12: Wägewert bei je 15maliger Dosierung von $50 \mu\text{l}$ Wasser, Ethanol und Nonan mit einer direktverdrängenden Kolbenhubpipette mit Kunststoffkolben und -zylinder. Die durchgezogenen Treppenkurven sind aus den Anpassungsgeraden zusammengesetzt. Der Sprung auf die nächste Gerade erfolgt zum jeweiligen Zeitpunkt der Dosierung. Die Höhe der Stufen ist ein Maß für den jeweiligen Wägewert des dosierten Volumens. 50
- Abb. 13: Wägewert bei je 15maliger Dosierung von $10 \mu\text{l}$ Wasser, Ethanol und Nonan mit einer direktverdrängenden Kolbenhubpipette mit Stahlkolben und Glaszylinder. Die durchgezogenen Treppenkurven sind aus den Anpassungsgeraden zusammengesetzt. Der Sprung auf die nächste Gerade erfolgt zum jeweiligen Zeitpunkt der Dosierung. Die Höhe der Stufen ist ein Maß für den jeweiligen Wägewert des dosierten Volumens. 51
- Abb. 14: Wägewert bei je 15maliger Dosierung von $1 \mu\text{l}$ Wasser, Ethanol und Nonan mit einer direktverdrängenden Kolbenhubpipette mit Kunststoffkolben und -zylinder. Die durchgezogenen Treppenkurven sind aus den Anpassungsgeraden zusammengesetzt. Der Sprung auf die nächste Gerade erfolgt zum jeweiligen Zeitpunkt der Dosierung. Die Höhe der Stufen ist ein Maß für den jeweiligen Wägewert des dosierten Volumens. 52
- Abb. 15: Wägewert bei je 15maliger Dosierung von $0,2 \mu\text{l}$ Wasser, Ethanol und Nonan mit einer Mikroliterspritze. Die durchgezogenen Treppenkurven sind aus den Anpassungsgeraden zusammengesetzt. Der Sprung auf die nächste Gerade erfolgt zum jeweiligen Zeitpunkt der Dosierung. Die Höhe der Stufen ist ein Maß für den jeweiligen Wägewert des dosierten Volumens. 53
- Abb. 16: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Ethanol. Dargestellt ist die absolute Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Ethanol. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$). 54
- Abb. 17: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Ethanol. Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Ethanol. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$). 55
- Abb. 18: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Nonan. Dargestellt ist die absolute Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Nonan. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$). 56

- Abb. 19: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Nonan. Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Nonan. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).57
- Abb. 20: Benetzung der Pipettenspitze beim Ausstoßen von Nonan. Die Pipettenspitze ist für die Herstellung dieser Fotos nicht an die Gefäßwand angelegt. 58
- Abb. 21: Bildfolge, die das Entleeren einer mit **Wasser** gefüllten Spitze einer Luftpolsterpipette zeigt. Die Flüssigkeitsmenge beträgt 2 μl . Die Pipettenspitze ist für die Herstellung dieser Fotos nicht an die Gefäßwand angelegt. 61
- Abb. 22: Bildfolge, die das Entleeren einer mit **Serum** gefüllten Spitze einer Luftpolsterpipette zeigt. Die Flüssigkeitsmenge beträgt 2 μl . Die Pipettenspitze ist für die Herstellung dieser Fotos nicht an die Gefäßwand angelegt. 61
- Abb. 23: In der Pipettenspitze verbleibendes Serum nach dem Dosiervorgang. Die Ausgangs-Flüssigkeitsmenge betrug 2 μl . Die Pipettenspitze war im rechten Bild während der Dosierung an die Gefäßwand angelegt, im linken und mittleren Foto nicht. 62
- Abb. 24: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Serum für Prüfvolumen von 10 μl , 20 μl und 50 μl . Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$). 65
- Abb. 25: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Serum für Prüfvolumen von 10 μl , 20 μl und 50 μl . Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$). 66
- Abb. 26: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Serum für Prüfvolumen von 0,2 μl bis 50 μl . Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$). 67
- Abb. 27: Unterschied im dosierten Volumen von Wasser und Serum für Prüfvolumen von 0,2 μl bis 50 μl . Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$). 68

Abb. 28:	Kurzzeitverhalten der Dichte von Serum Die Flüssigkeit (ca. 3 ml) wurde zwischen den Dichtebestimmungen in einem offenen Becher, wie er in Abb. 3 gezeigt ist, bei Raumtemperatur aufbewahrt.	71
Abb. 29:	Langzeitverhalten der Dichte von Serum Die Flüssigkeit wurde zwischen den Dichtebestimmungen in einem Gefrierschrank bei -18 °C gelagert. Die Dichte wurde jeweils unmittelbar nach dem Auftauen bestimmt.	72
Abb. 30:	Temperatur-Dichte-Verlauf für 3 aus Material derselben Charge (desselben Pools) rekonstituierte Kontrollmaterialien.	75
Abb. 31:	Unterschied im dosierten Volumen von Kontrollmaterial und Serum für Prüfvolumen von 0,2 µl bis 20 µl. Dargestellt ist die Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).	76
Abb. 32:	Unterschied im dosierten Volumen von Kontrollmaterial und Serum für Prüfvolumen von 0,2 µl bis 20 µl. Dargestellt ist die relative Differenz der Mittelwerte aus je 10 Dosierungen von Wasser und von Serum. Jeder Balken stellt das Ergebnis für ein Dosiergerät dar. Die Messunsicherheitsbalken geben die aus der Wiederholstandardabweichung der Messungen berechnete Unsicherheit der relativen Differenz an (Erweiterungsfaktor $k = 2$).	77
Abb. 33:	Gemessene Dichte von 69 Serum-Einzelproben	78
Abb. 34:	Dichtedifferenz ρ_{Diff} der untersuchten Poolseren als Funktion der Eiweißkonzentration und daran angepasste Gerade. Zur Unsicherheit der Geraden siehe Text.	82
Abb. 35:	Vergleich der Dichte von Einzelseren und Poolseren Das Diagramm zeigt die Differenz zwischen gemessener Dichte und der durch Gleichung (10-8) berechneten Dichte. Der Vergleich von Einzel- und Poolseren zeigt die größere Streuung der Dichte der Einzelseren.	86
Abb. 36:	Temperaturabhängigkeit der Dichte von Humanserum. Der Kurvenverlauf ist in Gleichung (10-10) quantitativ beschrieben.	87
Abb. 37:	Hundertmalige Dosierung von Wasser. Direktverdrängende Kolbenhubpipette mit einem Prüfvolumen von 10 µl. Dargestellt ist die Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert aller Messungen. Die gestrichelte Linie zeigt die für alle 100 Messwerte ermittelte einfache Standardabweichung ($k = 1$), die durchgezogene Linie die erweiterte Standardabweichung ($k = 2$). 90	
Abb. 38:	Hundertmalige Dosierung von Wasser. Gleitender Mittelwert mit Mittelung über jeweils 10 Einzeldosierungen. Dargestellt ist die Abweichung der 10er-Mittelwerte vom Mittelwert aller Messungen. Die Daten der Einzelmessungen sind in Abb. 37 dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die für alle 100 Messwerte ermittelte einfache Standardabweichung ($k = 1$), die durchgezogene Linie die erweiterte Standardabweichung ($k = 2$).	91
Abb. 39:	Hundertmalige Dosierung von Serum. Direktverdrängende Kolbenhubpipette mit einem Prüfvolumen von 10 µl. Dargestellt ist die Abweichung der	

Einzelmessungen vom Mittelwert aller Messungen. Die gestrichelte Linie zeigt die für alle 100 Messwerte ermittelte einfache Standardabweichung ($k = 1$), die durchgezogene Linie die erweiterte Standardabweichung ($k = 2$).
93

- Abb. 40: Hundertmalige Dosierung von Serum. Gleitender Mittelwert mit Mittelung über jeweils 10 Einzeldosierungen. Dargestellt ist die Abweichung der 10er-Mittelwerte vom Mittelwert aller Messungen. Die Daten der Einzelmessungen sind in Abb. 39 dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die für alle 100 Messwerte ermittelte einfache Standardabweichung ($k = 1$), die durchgezogene Linie die erweiterte Standardabweichung ($k = 2$). 94
- Abb. 41: Absorptionsspektrum des verwendeten Farbstoffes ABTS. Das Absorptionsmaximum liegt bei 340 nm. Diese Wellenlänge wurde für die photometrischen Untersuchungen verwendet. 100
- Abb. 42: Kalibrierkurve zur Überprüfung des Beerschen Gesetzes für eine Lösung von ABTS in **Wasser**. Im unteren Bereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorbanz und der Konzentration der Farbstofflösung. 101
- Abb. 43: Kalibrierkurve für eine Lösung von ABTS in **Serum** zur Überprüfung des Beerschen Gesetzes. Dargestellt ist der lineare Bereich, der für Volumenkonzentrationen $c < 1\%$ vorliegt. 101
- Abb. 44: Gemessene Absorbanz einer Dosierung von 10 μl Farbstofflösung in 1,3 ml Wasser. Die eingezeichnete Gerade ist durch eine lineare Regression an die Messdaten angepasst. Sie zeigt die zeitliche Drift der Absorbanz von 1,252283 auf 1,252298 nach 60 s. Die Auflösung des Photometers beträgt 0,0001. Die Drift ist deshalb im Rahmen der Messunsicherheit vernachlässigbar. 102
- Abb. 45: Vergleich der mit Gravimetrie und Photometrie gemessenen Dosierergebnisse. Die Dosierflüssigkeit ist mit Farbstoff versetztes **Wasser**, das Prüfvolumen beträgt **10 μl** , die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen, die Messunsicherheitsbalken sind aus der Wiederholstandardabweichung ermittelt, der Erweiterungsfaktor ist $k = 2$. Es sind die Dosierungen für eine direktverdrängende Pipette und eine Luftpolsterpipette für die beiden im Text beschriebenen unterschiedlichen Dosierverfahren dargestellt. 103
- Abb. 46: Vergleich der mit Gravimetrie und Photometrie gemessenen Dosierergebnisse. Die Dosierflüssigkeit ist mit Farbstoff versetztes **Wasser**, das Prüfvolumen beträgt **2 μl** , die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen, die Messunsicherheitsbalken sind aus der Wiederholstandardabweichung ermittelt, der Erweiterungsfaktor ist $k = 2$. Es sind die Dosierungen für eine direktverdrängende Pipette und eine Luftpolsterpipette für die beiden im Text beschriebenen unterschiedlichen Dosierverfahren dargestellt. 104

Abb. 47: Vergleich der mit Gravimetrie und Photometrie gemessenen Dosierergebnisse. Die Dosierflüssigkeit ist mit Farbstoff versetztes **Serum**, das Prüfvolumen beträgt **10 µl**, die Ergebnisse sind Mittelwerte aus 10 Einzelmessungen, die Messunsicherheitsbalken sind aus der Wiederholstandardabweichung ermittelt, der Erweiterungsfaktor ist $k=2$. Es sind die Dosierungen für eine Luftpolsterpipette für das im Text beschriebene Eintauchverfahren dargestellt. 106

Literatur

- [1] H. Koch
28. Sitzung des Beirats für Medizinische Meßtechnik
PTB-Mitteilungen **108** (1998) 31
- [2] R. Belac, W. Gögge, H. Groß, W. Ludwig
Meßtechnische Untersuchungen an Kolbenhubpipetten
PTB-Mitteilungen **88** (1978) 93-98
- [3] S. Mieke
Rechnergestützte gravimetrische Messung kleiner Flüssigkeitsvolumen (1 µl bis 50 µl) für die Prüfung von Volumenmeßgeräten
PTB-Mitteilungen **93** (1983) 75-79
- [4] F. Michel, K. Sommer, F. Spieweck
Untersuchungen zur Ermittlung der Meßunsicherheit von Kolbenhubpipetten mit Volumina von 1 µl bis 50 µl
PTB-Mitteilungen **105** (1995) 437-444
- [5] K.H. Lochner, T. Ballweg, H.-H. Fahrenkrog:
Untersuchungen zur Meßgenauigkeit von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster
J Lab Med **20** (1996) 430-440
- [6] DIN EN ISO 8655-2, Ausgabe:2000-05
Volumenmessgeräte mit Hubkolben - Teil 2: Kolbenhubpipetten
(ISO/DIS 8655-2:2000); Deutsche Fassung prEN ISO 8655-2:2000
(Norm-Entwurf)
- [7] DIN 12650-2, Ausgabe:1981-10
Mechanische, physikalische und elektrische Laborgeräte; Volumenmeßgeräte mit Hubkolben; Kolbenhubpipetten
- [8] DIN EN ISO 8655-6, Ausgabe:2000-05
Volumenmessgeräte mit Hubkolben - Teil 6: Gravimetrische Prüfverfahren
(ISO/DIS 8655-6:2000); Deutsche Fassung prEN ISO 8655-6:2000
(Norm-Entwurf)

- [9] DIN EN ISO 8655-7
Volumenmessgeräte mit Hubkolben - Teil 7: Photometrische Prüfverfahren (in Bearbeitung)
- [10] DIN 12650-6, Ausgabe:1983-04
Mechanische, physikalische und elektrische Laborgeräte; Volumenmeßgeräte mit Hubkolben; Gravimetrische Prüfung der meßtechnischen Zuverlässigkeit
- [11] DIN 12650-7, Ausgabe:1983-11
Mechanische, physikalische und elektrische Laborgeräte; Volumenmeßgeräte mit Hubkolben; Photometrische, titrimetrische und mit Meßgefäßen durchgeführte Prüfung der meßtechnischen Zuverlässigkeit (Norm-Entwurf)
- [12] F. Spieweck, H. Bettin
Methoden zur Bestimmung der Dichte von Festkörpern und Flüssigkeiten
PTB-Bericht **PTB-W-46**, Braunschweig, Oktober 1991, 2. Nachdruck Februar 1998, ISSN 0341-6739, ISBN 3-89429-132-X
- [13] EAL Interlaboratory Comparisons, **EAL-P7**, Edition 1, März 1996, (neue Bezeichnung EA 2-03)
- [14] Das Blaue Heft, Hinweise für klinisch-chemische Untersuchungen
Herausgeber: Prof. Dr. Dr. J. Büttner, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Klinische Chemie I, 1994
- [15] Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen, Deutsche Übersetzung des „Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement“, Herausgeber: DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag, 1995
- [16] F.E. Jones, G.L. Harris: ITS-90 Density of Water Formulation for Volumetric Standards Calibration
Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology **97** (1992) 335-340

Anhang 1

Messunsicherheitsbudget für eine Messung von 20 µl Wasser mit der gravimetrischen Messapparatur

Modellgleichung:

Umrechnung von Masse in Volumen

$$V = m / \rho_w$$

Luftauftriebskorrektur

$$m = W * (1 - \rho_L / \rho_G) / (1 - \rho_L / \rho_w)$$

Unsicherheiten bei der Bestimmung des Wägewertes

$$W = W_2 - W_1 + w_{Lin} + w_{Verdunst}$$

$$W_1 = (W_{01} + w_{1Abl} + w_{1Rep}) * w_{Kal} * w_{Drift}$$

$$W_2 = (W_{02} + w_{2Abl} + w_{2Rep}) * w_{Kal} * w_{Drift}$$

$$w_{Drift} = 1 + t_{WD} * t_{Drift}$$

Formel zur Bestimmung der Wasserdichte [16]

$$\rho_w = (a_0 + a_1 * t_{Fl} + a_2 * t_{Fl}^2 + a_3 * t_{Fl}^3 + a_4 * t_{Fl}^4) + \delta\rho_{Approx}$$

Formel zur Bestimmung der Luftdichte [12]

$$\rho_L = (k_1 * p_L - \varphi * (k_2 * t_L - k_3)) / (t_L + T_{L0})$$

Liste der Größen:

Symbol	Einheit	Größe
W_{01}	kg	Wägewert der Leermessung (Tara)
W_{02}	kg	Wägewert der Vollmessung (Brutto)
w_{1Abl}	kg	Ablesegenauigkeit (digitale Teilung) der Waage
w_{2Abl}	kg	Ablesegenauigkeit (digitale Teilung) der Waage
w_{1Rep}	kg	Reproduzierbarkeit der Waage
w_{2Rep}	kg	Reproduzierbarkeit der Waage
w_{Lin}	kg	Linearitätsunsicherheit
w_{Kal}		Kalibrierunsicherheit der Waage
t_{WD}	°C	Temperaturschwankung der Waage
t_{Drift}	°C ⁻¹	Driftkonstante der Waage
$w_{Verdunst}$	kg	Unsicherheit aufgrund der Verdunstungskorrektur
t_{Fl}	°C	Flüssigkeitstemperatur
$\delta\rho_{Approx}$	kg/m ³	Unsicherheit in ρ_w durch die Approximationsformel
t_L	°C	Lufttemperatur
p_L	hPa	Luftdruck
φ	%	rel. Luftfeuchte
ρ_G	kg/m ³	Dichte von Stahlgewichten (Konstante: 8000 kg/m ³)
k_1	kg °C/hPa m ³	Konstante k_1 für die Luftdichteformel
k_2	kg/m ³	Konstante k_2 für die Luftdichteformel
k_3	kg °C/m ³	Konstante k_3 für die Luftdichteformel
T_{L0}	°C	Konstante T_{L0} für die Luftdichteformel
a_0	kg/m ³	Konstante a_0 für die Wasserdichteformel
a_1	kg/m ³ /°C	Konstante a_1 für die Wasserdichteformel
a_2	kg/m ³ /°C ²	Konstante a_2 für die Wasserdichteformel
a_3	kg/m ³ /°C ³	Konstante a_3 für die Wasserdichteformel
a_4	kg/m ³ /°C ⁴	Konstante a_4 für die Wasserdichteformel
Skalierung	nl/m ³	Skalierungsfaktor zur Umrechnung von m ³ in nl
Zwischenergebnisse		
m	kg	Masse der Flüssigkeit
ρ_w	kg/m ³	Dichte der Flüssigkeit
ρ_L	kg/m ³	Luftdichte
w_{Drift}		Abweichung des Wägewertes durch Temperaturdrift
W_1	kg	Wägewert mit Unsicherheiten
W_2	kg	Wägewert mit Unsicherheiten
W	kg	Wägewert des Volumens
Endergebnis		
V	nl	gemessenes Volumen

Werte der Größen:

W_{01} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 kg	Halbbreite der Grenzen: 0 kg
W_{02} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: $20,0149 \cdot 10^{-6}$ kg	Halbbreite der Grenzen: 0 kg
w_{1Abl} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 kg	Halbbreite der Grenzen: $5 \cdot 10^{-11}$ kg
w_{2Abl} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 kg	Halbbreite der Grenzen: $5 \cdot 10^{-11}$ kg
w_{1Rep} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 kg	Halbbreite der Grenzen: $1 \cdot 10^{-9}$ kg
w_{2Rep} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 kg	Halbbreite der Grenzen: $1 \cdot 10^{-9}$ kg
w_{Lin} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 kg	Halbbreite der Grenzen: $9 \cdot 10^{-11}$ kg
w_{Kal} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 1	Halbbreite der Grenzen: $1 \cdot 10^{-6}$
t_{WD} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 °C	Halbbreite der Grenzen: 0,5 °C
$w_{Verdunst}$:	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 kg	Halbbreite der Grenzen: $15 \cdot 10^{-10}$ kg
t_{Fl} :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 20 °C	Halbbreite der Grenzen: 0,1 °C
$\delta\rho_{Approx}$:	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 0 kg/m ³	Halbbreite der Grenzen: 0,005 kg/m ³
t_L :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 20 °C	Halbbreite der Grenzen: 0,1 °C
p_L :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 1013 hPa	Halbbreite der Grenzen: 2 hPa
φ :	Typ B Rechteckverteilung	Wert: 70 %	Halbbreite der Grenzen: 20 %
ρ_G :	Konstante	Wert: 8000 kg/m ³	
k_1 :	Konstante	Wert: 0,34844 kg °C/(hPa m ³)	
k_2 :	Konstante	Wert: 0,00252 kg/m ³	
k_3 :	Konstante	Wert: 0,020582 kg °C/m ³	
T_{L0} :	Konstante	Wert: 273,15 °C	
a_0 :	Konstante	Wert: 999,85308 kg/m ³	
a_1 :	Konstante	Wert: $6,32693 \cdot 10^{-2}$ kg/(m ³ °C)	
a_2 :	Konstante	Wert: $-8,523829 \cdot 10^{-3}$ kg/(m ³ °C ²)	
a_3 :	Konstante	Wert: $6,943248 \cdot 10^{-5}$ kg/(m ³ °C ³)	
a_4 :	Konstante	Wert: $-3,821216 \cdot 10^{-7}$ kg/(m ³ °C ⁴)	
t_{Drift} :	Konstante	Wert: $1 \cdot 10^{-6}$ °C ⁻¹	
m :	Zwischenergebnis		
ρ_w :	Zwischenergebnis		
ρ_L :	Zwischenergebnis		
w_{Drift} :	Zwischenergebnis		
W_1 :	Zwischenergebnis		
W_2 :	Zwischenergebnis		
W :	Zwischenergebnis		
V :	Ergebnis		

Messunsicherheitsbudget:

Größe	Wert	Standardmessunsicherheit	Freiheitsgrad	Sensitivitätskoeffizient	Unsicherheitsbeitrag
W_{01}	0,0 kg	0,0 kg	∞	0,0	0,0 nl
W_{02}	$20,0149 \cdot 10^{-6}$ kg	0,0 kg	∞	0,0	0,0 nl
w_{1Abl}	0,0 kg	$28,9 \cdot 10^{-12}$ kg	∞	$-1,0 \cdot 10^9$	$-29 \cdot 10^{-3}$ nl
w_{2Abl}	0,0 kg	$28,9 \cdot 10^{-12}$ kg	∞	$1,0 \cdot 10^9$	$29 \cdot 10^{-3}$ nl
w_{1Rep}	0,0 kg	$577 \cdot 10^{-12}$ kg	∞	$-1,0 \cdot 10^9$	$-580 \cdot 10^{-3}$ nl
w_{2Rep}	0,0 kg	$577 \cdot 10^{-12}$ kg	∞	$1,0 \cdot 10^9$	$580 \cdot 10^{-3}$ nl
w_{Lin}	0,0 kg	$52 \cdot 10^{-12}$ kg	∞	$1,0 \cdot 10^9$	$52 \cdot 10^{-3}$ nl
w_{Kal}	1	$577 \cdot 10^{-9}$	∞	$20 \cdot 10^3$	$12 \cdot 10^{-3}$ nl
t_{WD}	0,0 °C	$289 \cdot 10^{-3}$ °C	∞	$20 \cdot 10^{-3}$	$5,8 \cdot 10^{-3}$ nl
$w_{Verdunst}$	0,0 kg	$866 \cdot 10^{-12}$ kg	∞	$1,0 \cdot 10^9$	$870 \cdot 10^{-3}$ nl
t_{Fl}	20,0 °C	$57,7 \cdot 10^{-3}$ °C	∞	4,2	$240 \cdot 10^{-3}$ nl
$\delta\rho_{Approx}$	0,0 kg/m ³	$2,89 \cdot 10^{-3}$ kg/m ³	∞	-20	$-58 \cdot 10^{-3}$ nl
t_L	20,0 °C	$57,7 \cdot 10^{-3}$ °C	∞	$-83 \cdot 10^{-3}$	$-4,8 \cdot 10^{-3}$ nl
p_L	1013 hPa	1,15 hPa	∞	$21 \cdot 10^{-3}$	$24 \cdot 10^{-3}$ nl
φ	70 %	11,5 %	∞	$-1,8 \cdot 10^{-3}$	$-21 \cdot 10^{-3}$ nl
V	$20,0720 \cdot 10^3$ nl	1,22 nl	∞		

Ergebnis:

Größe: V

Wert: $20,0720 \cdot 10^3$ nl, erweiterte Messunsicherheit: ± 41 nl, Erweiterungsfaktor: 2



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

Die Physikalisch-Technische Bundesanstalt, das nationale Metrologieinstitut, ist eine wissenschaftlich-technische Bundesoberbehörde im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie.



**Physikalisch-Technische Bundesanstalt
Braunschweig und Berlin**
Nationales Metrologieinstitut

Bundesallee 100
38116 Braunschweig

Presse- und Öffentlichkeitsarbeit

Telefon: (0531) 592-93 21
Fax: (0531) 592-30 08
E-Mail: presse@ptb.de
www.ptb.de

Vertrieb:

Fachverlag NW in der
Carl Schünemann Verlag GmbH

Zweite Schlachtpforte 7
28195 Bremen

Telefon: (04 21) 369 03-0
Fax: (04 21) 369 03-63
www.schuenemann-verlag.de