

# Physikalisch- Technische Bundesanstalt



**DKD**

---

## **Expertenbericht    Analyse der Einflussgrößen auf die DKD-E 8-2            Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster**

Ausgabe 05/2013

<https://doi.org/10.7795/550.20250320>



	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>	DKD-E 8-2	
		Ausgabe:	05/2013
		Revision:	0
		Seite:	2 / 26

## Deutscher Kalibrierdienst (DKD)

Im DKD sind Kalibrierlaboratorien von Industrieunternehmen, Forschungsinstituten, technischen Behörden, Überwachungs- und Prüfinstitutionen seit der Gründung 1977 zusammengeschlossen. Am 03. Mai 2011 erfolgte die Neugründung des DKD als *technisches Gremium* der PTB und der akkreditierten Laboratorien.

Dieses Gremium trägt die Bezeichnung Deutscher Kalibrierdienst (DKD) und steht unter der Leitung der PTB. Die vom DKD erarbeiteten Richtlinien und Leitfäden stellen den Stand der Technik auf dem jeweiligen technischen Fachgebiet dar und stehen der Deutschen Akkreditierungsstelle GmbH (DAkkS) für die Akkreditierung von Kalibrierlaboratorien zur Verfügung.

Die akkreditierten Kalibrierlaboratorien werden von der DAkkS als Rechtsnachfolgerin des DKD akkreditiert und überwacht. Sie führen Kalibrierungen von Messgeräten und Maßverkörperungen für die bei der Akkreditierung festgelegten Messgrößen und Messbereiche durch. Die von ihnen ausgestellten Kalibrierscheine sind ein Nachweis für die Rückführung auf nationale Normale, wie sie von der Normenfamilie DIN EN ISO 9000 und der DIN EN ISO/IEC 17025 gefordert wird.

### Kontakt:

Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB)  
 DKD-Geschäftsstelle  
 Bundesallee 100      38116 Braunschweig  
 Postfach 33 45      38023 Braunschweig  
 Telefon Sekretariat: 0531 592-8021  
 Internet: [www.dkd.eu](http://www.dkd.eu)

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>	DKD-E 8-2	
		Ausgabe:	05/2013
		Revision:	0
		Seite:	3 / 26

*Zitiervorschlag für die Quellenangabe:*

*Expertenbericht DKD-E 8-2 Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster, Ausgabe 05/2013, Revision 0, Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig und Berlin. DOI: 10.7795/550.20250320*

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt und unterliegt der Creative Commons Nutzerlizenz CC by-nc-nd 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>). In diesem Zusammenhang bedeutet „nicht-kommerziell“ (NC), dass das Werk nicht zum Zwecke der Einnahmenerzielung verbreitet oder öffentlich zugänglich gemacht werden darf. Eine Nutzung seiner Inhalte für die gewerbliche Verwendung in Laboratorien ist ausdrücklich erlaubt.



Autoren:

Dr. Karl Heinz Lochner  
 Fraunhofer-Institut für Silicatforschung  
 Außenstelle Bronnbach  
 Bronnbach 28, 97877 Wertheim



Rainer Feldmann  
 Josef Pfohl  
 BRAND GMBH + CO KG  
 Otto-Schott-Str. 25, 97877 Wertheim



Herausgegeben von der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) für den Deutschen Kalibrierdienst (DKD) als Ergebnis der Zusammenarbeit der PTB mit dem Fachausschuss *Chemische Messgrößen und Stoffeigenschaften* des DKD.

	<p>Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster</p> <p><a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a></p>	DKD-E 8-2	
		Ausgabe:	05/2013
		Revision:	0
		Seite:	4 / 26

## Vorwort

DKD-Expertenberichte verfolgen das Ziel Hintergrundinformationen und Hinweise zu geben, die im Zusammenhang mit anderen DKD-Dokumenten stehen, wie z. B. den DKD-Richtlinien, und spezielle Aspekte eingehender behandeln. Sie ersetzen die originären DKD-Dokumente nicht, geben jedoch zahlreiche wissenswerte Zusatzinformationen. In den Expertenberichten wird die Sichtweise der Autoren wiedergegeben, die nicht notwendigerweise in allen Details der Sichtweise des Vorstands oder der Fachausschüsse des DKD entsprechen muss.

Die DKD-Expertenberichte sollen wesentliche Aspekte aus dem Bereich des Kalibrierwesens darstellen und durch die Publikation im Rahmen des DKD der großen Gemeinschaft der Kalibrierlaboratorien national und international zugänglich gemacht werden.

Der vorliegende DKD-Expertenbericht wurde vom Vorstand des DKD im September 2012 genehmigt.

Dr. Karl Heinz Lochner, Fraunhofer-Institut für Silicatforschung, Außenstelle Bronnbach 28, 97877 Wertheim

Rainer Feldmann, Josef Pfohl, Brand GMBH + Co KG, Otto-Schott-Str. 25, 97877 Wertheim

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>	DKD-E 8-2	
		Ausgabe:	05/2013
		Revision:	0
		Seite:	5 / 26

## Inhaltsverzeichnis

1. Funktionsprinzip der Kolbenhubpipette mit Luftpolster .....	6
2. Systemeinflüsse .....	10
3. Spitzenwechsel.....	16
4. Handhabungs-und Geräteeinfluss .....	16
5. Wiederholstandardabweichung .....	20
6. Gravimetrischer Beitrag .....	21
7. Modellgleichung für die Messunsicherheitsbetrachtung .....	21
8. Berechnung der Messunsicherheit .....	22
9. Messunsicherheit bei Teilvolumen (Staffelung) .....	22
10. Angabe der Messunsicherheit .....	22
11. Zusammenfassung .....	23
12. Literatur .....	24
13. Danksagung .....	24
14. Formelzeichen .....	24

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>	DKD-E 8-2	
		Ausgabe:	05/2013
		Revision:	0
		Seite:	6 / 26

## Kurzfassung

Als Erläuterung und in Ergänzung zur DKD-Richtlinie DKD-R 8-1 wird die Wirkungsweise der wichtigsten Einflussgrößen auf die Messunsicherheit von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster dargelegt.

Die thermodynamische Beschreibung des Pipettiervorgangs ermöglicht die Identifizierung von drei systembedingten Einflussgrößen: 1) Temperaturdifferenzen zwischen Medium, Luft und Pipette, 2) äußere Luftfeuchte und 3) Luftdruck. Für die Luftdruckabhängigkeit und den zugehörigen Sensitivitätskoeffizient werden Formeln entwickelt.

Für die Sensitivitätskoeffizienten aus 1) und 2) wurden empirisch ermittelte Werte angegeben.

Weitere Behandlung erfahren Geräte- und Systemeinflüsse wie Neigungswinkel, Wartezeit, Pipettierhythmus, Eintauchtiefe, Betätigungskraft, Reproduzierbarkeit des Kolbenhubs, Zählwerkhysterese, Handwärme. Deren Einfluss wird quantitativ eingeschätzt.

Hinzu treten noch die Wiederholstandardabweichung und die Unsicherheit der gravimetrischen Messmethode. Für die identifizierten Einflussgrößen wird eine Modellgleichung der Messunsicherheit ermittelt.

## 1. Funktionsprinzip der Kolbenhubpipette mit Luftpolster

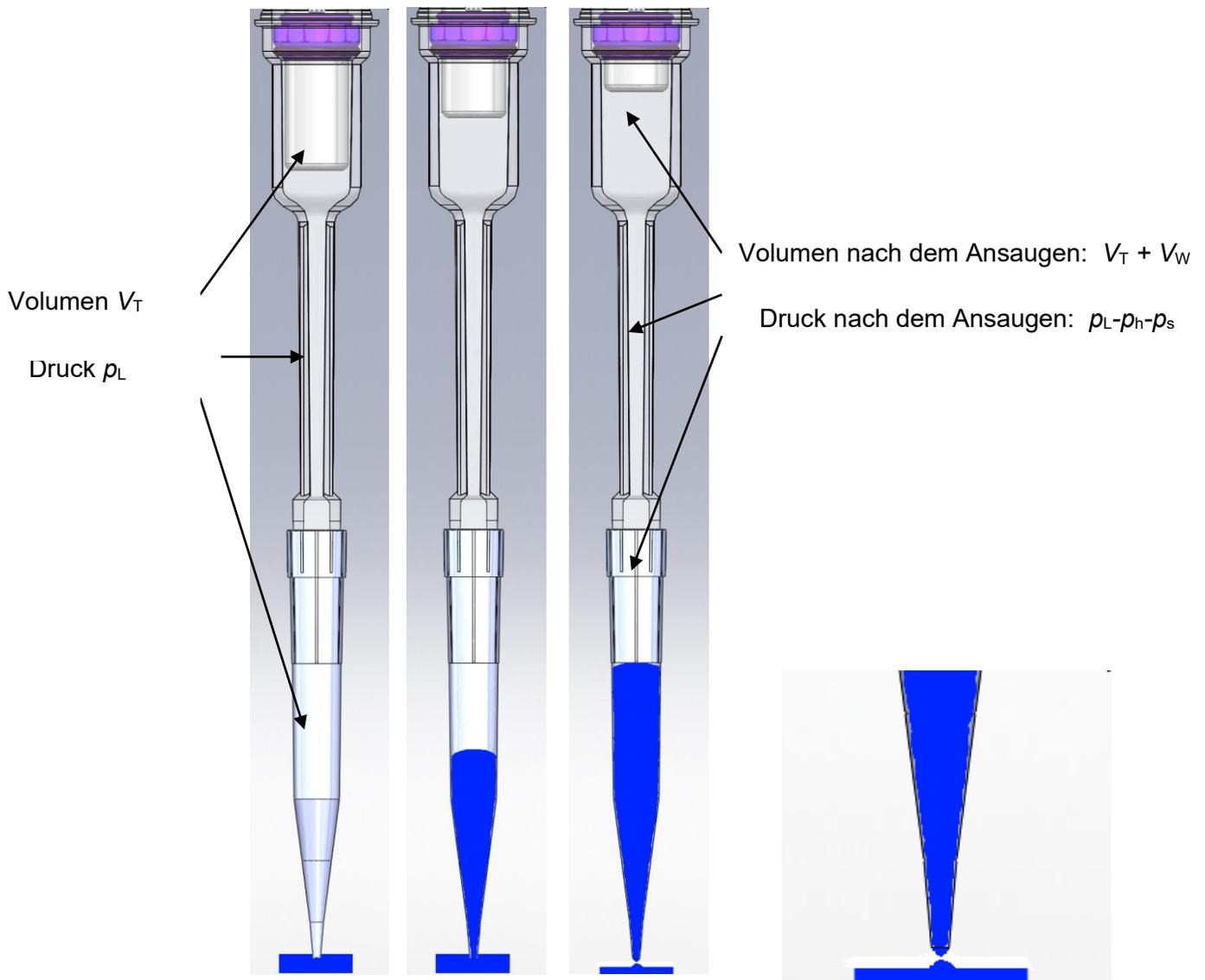
Die Kolbenhubpipette mit Luftpolster ist in Bezug auf ihre Bauart in der ISO 8655, Teil 2 definiert und wird gegen die direkt verdrängende Kolbenhubpipette abgegrenzt. Funktionell stellt die direkt verdrängende Kolbenhubpipette den Grenzfall einer solchen mit Luftpolster dar, bei der die Größe des Luftpolsters annähernd gegen Null geht. Da die noch zu besprechenden systembedingten Einflussgrößen (Kapitel 2) unmittelbar oder mittelbar über das Luftpolster einwirken, treten diese bei direkt verdrängenden Kolbenhubpipetten nicht auf. Daher unterscheidet sich die Messunsicherheitsberechnung bei Kolbenhubpipetten mit Luftpolster in den wesentlichen Teilen völlig von der bei direkt verdrängenden Kolbenhubpipetten.

### Anmerkung:

Unter „Pipette“ ist im Folgenden immer die Kolbenhubpipette mit Luftpolster gemeint.

### 1.1 Beschreibung der Funktion

Der gegen den Schaft gleitend abgedichtete Kolben wird zunächst in die untere Position (1. Druckpunkt) gebracht. Die ins Medium eingetauchte Pipettenspitze füllt sich, während der Kolben hoch gleitet und seine oberste Position erreicht.



**Abbildung 1:** Ansaugvorgang in der Pipette

Nach Aufsaugen des Mediums und Einhalten der Wartezeit, die bei kleinen und mittleren Pipetten eine Sekunde, bei großvolumigen 3 s betragen sollte (s. Tabelle 1, Kapitel 4.4.), muss die Pipette ruckfrei und anfangs langsam und ohne Berührung der Gefäßwand aus dem Medium geführt werden. An der Austrittsstelle muss die Wasseroberfläche eben sein. Das Volumen ist bestimmt, wenn die Austrittssäule abreißt. Lediglich Verdunstung an der Flüssigkeitsoberfläche im Bereich der Pipettenspitzenmündung und beim Ausstoß in der Pipettenspitze zurückbleibendes Medium können dann noch zu einer Verminderung des abgegebenen Volumens führen. Rückstände in der Spitze müssen jedoch beim Kalibrier-Medium Wasser stets als Fehlfunktion gewertet werden. Dasselbe gilt für Tropfen, die an der Außenseite der Spitze hängen bleiben. Das Auftreten verlangt den Wechsel der Pipettenspitze und/oder den Wechsel des Mediums.

## 1.2. Thermodynamischer Ansatz

Das Ansaugen der Flüssigkeit ist ein dynamischer Vorgang. Näherungsweise lassen sich die Vorgänge im Luftpolster (ohne Störeinflüsse) als isotherme Zustandsänderung idealer Gase beschreiben. Exakt hat man es mit einer polytropen (zwischen isotherm und adiabatisch liegenden) Zustandsänderung realer Gase zu tun. Zur Beschreibung der Messunsicherheitsanteile ist diese Näherung ohne Zweifel zu rechtfertigen.

Betrachtet wird nun die Zustandsänderung, die sich vom Moment des Eintauchens an bis zum Austausch aus dem Medium ergibt.

Vor dem Eintauchen liegt der atmosphärische Luftdruck  $p_L$  im Luftpolster  $V_T$  vor. Im Moment des Medienabrisses beim Austauschen ist der Druck im System um den hydrostatischen Druck  $p_W$  der Flüssigkeitssäule und den Binnendruck  $p_S$  des Meniskus vermindert. Der Binnendruck ist nach unten gerichtet, wenn Polypropylenspitzen und das Medium Wasser verwendet werden. Das Luftpolster  $V_T$  wird durch den entstehenden Unterdruck um den Betrag  $V_W$  vergrößert.  $V$  ist das in der Spitze befindliche Flüssigkeitsvolumen. Dieses ist also um den Betrag  $V_W$  kleiner als das Hubvolumen des Kolbens  $V_{Hub}$ . Es gilt  $V = (V_{Hub} - V_W)$ , bzw.  $V_W = (V_{Hub} - V)$ .

$$p_L \cdot V_T = (p_L - p_h - p_S) \cdot (V_T + V_{Hub} - V). \quad (1)$$

Der hydrostatische Druck  $p_h$  des Wassers wird als Produkt aus Dichte des Mediums  $\rho_W$ , der Fallbeschleunigung  $g$  und der Steighöhe  $h_W$  berechnet:

$$p_h = \rho_W \cdot g \cdot h_W$$

Einsetzen in (1) ergibt:

$$p_L \cdot V_T = (p_L - \rho_W \cdot g \cdot h_W - p_S) \cdot (V_T + V_{Hub} - V). \quad (2)$$

Gleichung (2) ermöglicht u. a. die Berechnung der Auswirkung einer Luftdruckänderung (siehe 2.3.) sowie des Neigungswinkels (4.1.) beim Aufziehen der Flüssigkeit und Änderungen in der Dichte des Mediums und der Fallbeschleunigung u. a. Hierzu löst man Gleichung (2) nach dem angesaugten Volumen  $V$  auf und erhält:

$$V = V_{Hub} - V_T \cdot \frac{\rho_W \cdot g \cdot h_W + p_S}{p_L - \rho_W \cdot g \cdot h_W - p_S} = V_{Hub} - \Delta V_W . \quad (3)$$

Um die Gleichung anzuwenden, müssen die Steighöhe  $h_W$  der Flüssigkeit in der Spitze und das Luftpolstervolumen gemessen werden.

An der Gleichung (3) ist zu sehen, dass das Kolbenhubvolumen  $V_{Hub}$  etwas größer als das Flüssigkeitsvolumen  $V$  ist. Diese Differenz  $V_W$  entspricht der Dehnung des Luftpolsters, erzeugt durch den hydrostatischen Druck und den Binnendruck des Mediums.

Eine Reihe wichtiger Störeinflüsse können nun durch zusätzliche Summanden berücksichtigt werden. Mit der daraus erhaltenen Gleichung (aus [2] und [3], leicht modifiziert) können die physikalischen Vorgänge beim Pipettieren mit einer Kolbenhubpipette mit Luftpolster mathematisch beschrieben werden:

$$V = V_{Hub} - V_T \cdot \frac{\rho_W \cdot g \cdot h_W + p_S}{p_L - \rho_W \cdot g \cdot h_W - p_S} + A_{fl} \cdot p_d \cdot (1 - S) \cdot k \cdot t_{AnsW} + V_{eff} \cdot \frac{\Delta T}{T} . \quad (4)$$

1) Kolbenhubvolumen 2) Dehnung Luftpolster 3) Verdunstung in der Spitze 4) Temperatureffekte

$A_{fl}$  Oberfläche des Mediums gegen das Luftpolster  
 $p_d$  Dampfdruck des Mediums  
 $S$  Feuchte- Sättigungsgrad des Luftpolsters (% rel. Luftfeuchte / 100%)  
 $t_{AnsW}$  Ansaug- plus Wartezeit  
 $k$  Verdunstungsfaktor (Volumen pro Fläche, Dampfdruck und Zeit)  
 $V_{eff}$  Wirksamer Teil des Luftpolsters  
 $\Delta T/T$  Relative Temperaturänderung im Luftpolster

Man sieht, dass im dritten und vierten Summanden  $V_T$  nicht direkt vorkommt.

Der dritte Summand beschreibt die Einflüsse der Verdunstung im Luftpolster während des Ansaugens. Das verdunstete Medium vergrößert das Luftpolstervolumen  $V_T$  und verdrängt dadurch Medium aus der Spitze (Kapitel 2.2.). Im Fall von Wasser als Medium werden unter Normalbedingungen aus einem Nanoliter verdunstetem Wasser ca. 1300 Nanoliter Dampf, also das 1300-fache Volumen.

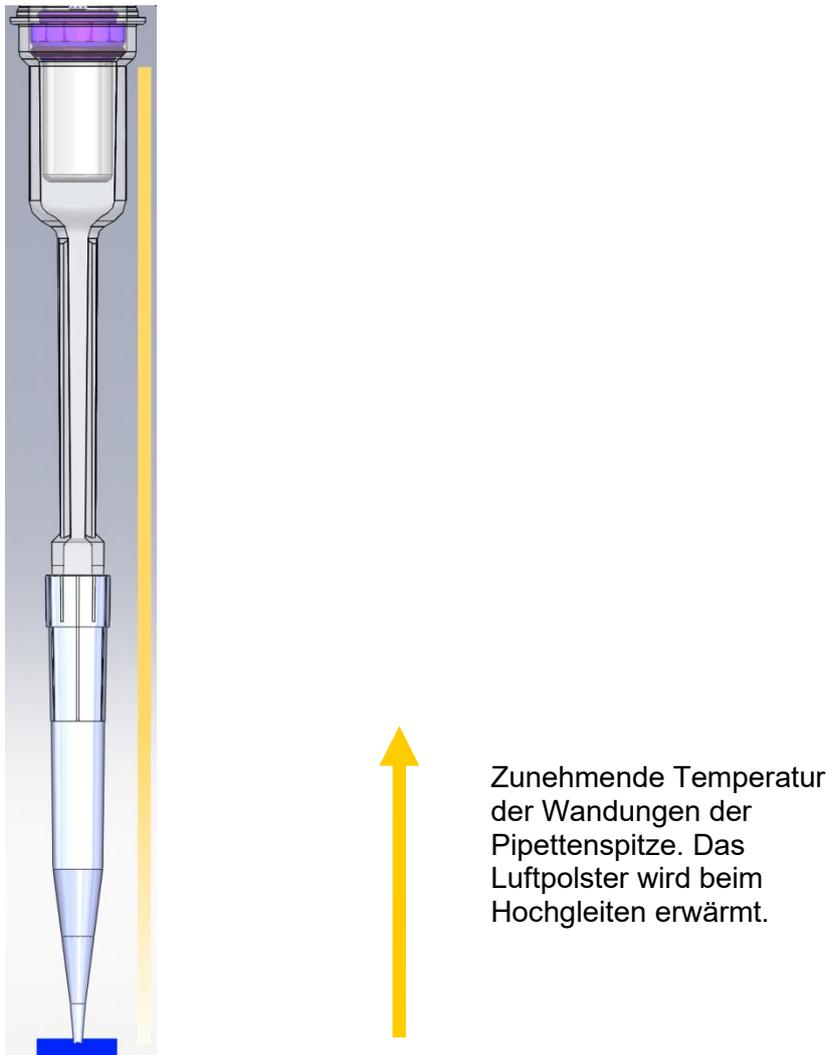
Der vierte Summand beschreibt den Einfluss von Temperaturänderungen im Luftpolster während des Ansaugens. Ein Teil des Luftpolsters  $V_{eff}$  unterliegt dabei einer relativen Temperaturänderung  $\Delta T/T$ . Diese führt zu einer Volumenänderung im Luftpolster und dadurch zu einer Änderung des eingesaugten Volumens des Mediums (Kapitel 2.1.).

Da einige dieser Größen ( $S$ ,  $k$ ,  $V_{eff}$ ,  $T$ ) nur ungenau bekannt sind, ist eine Berechnung der Einflüsse nur näherungsweise möglich. Der Einfluss wird daher experimentell bestimmt.

## 2. Systemeinflüsse

Die aus dem thermodynamischen Ansatz resultierenden Einflussgrößen bezeichnet man als Systemeinflüsse. Diese sind: Temperaturdifferenzen, Luftfeuchte und Vorbefeuchten des Luftpolsters sowie der Luftdruck.

### 2.1. Temperaturdifferenzen



**Abbildung 2:** Pipettieren von kaltem Medium

Experimentell hat sich gezeigt, dass das absolute Temperaturniveau nur wenig Auswirkung auf das Volumen hat (siehe Kapitel 2.4.). Dagegen ist der Einfluss durch Temperaturdifferenzen umso größer. Weicht die Lufttemperatur von der gemeinsamen Temperatur von Pipette und Wasser ab, so ist der Effekt noch relativ klein. Etwa dreimal so groß ist er dagegen, wenn die Temperatur der Pipette von der gemeinsamen Temperatur des Wassers und der Luft abweicht. Ähnlich groß – und leicht experimentell nachzuprüfen – ist der Effekt, wenn die Wassertemperatur von der gemeinsamen Temperatur von Luft und Pipette abweicht. Siehe hierzu besonders [2].

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>		DKD-E 8-2	
			Ausgabe:	05/2013
			Revision:	0
			Seite:	11 / 26

Für den letzten Fall folgende Erklärung im Detail (siehe Abbildung 2):

Das Medium sei kühler gegenüber der gemeinsamen Temperatur der Pipette und der Luft. Beim Pipettieren bzw. Vorbefeuchten kühlt sich die Pipettenspitze im medienberührenden Teil ab.

Um Medium anzusaugen, wird der Kolben zunächst nach unten gefahren. Dann erfolgt Eintauchen. Die Luft wird im abgekühlten Teil im Inneren der Pipettenspitze währenddessen kälter. Beim darauf folgenden Füllen der Pipettenspitze verlagert sich das Luftpolster in weiter oben liegende Teile der Pipettenspitze, die ihre ursprüngliche Temperatur behalten haben und die Luft erwärmt sich. Schon eine minimale Temperaturerhöhung führt zu einer erheblichen Änderung des Luftpolstervolumens. Das angesaugte Volumen an Medium ist dann um den Betrag der Luftpolsterzunahme vermindert.

Anmerkung: Nach [2] kommt es bei nicht vorbefeuchteten Pipettenspitzen bei der ersten Ansaugung zu einer Volumenzunahme, da sich das Luftpolster beim Kontakt mit dem kühleren Medium zusammenzieht und somit mehr Medium in die Spitze gesaugt wird.

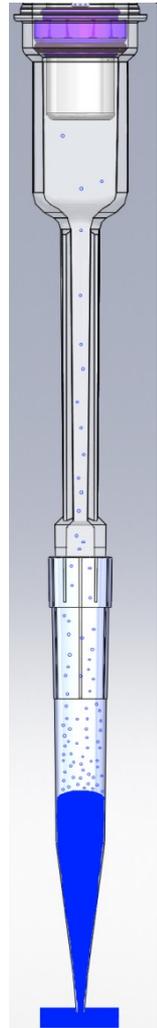
Derzeit ergaben die Messungen bei Pipetten mit Nennvolumen 1000 µl und 100 µl einen Sensitivitätskoeffizienten  $c_{TDif}$  von ca. 0,22 % Änderung des angesaugten Volumens  $V$  pro 1 K Temperaturdifferenz zwischen Wasser und Pipette/Luft. Beim Nennvolumen 10 µl sind ca. 0,19 % pro 1 K anzusetzen. Bei anderen Pipettengrößen sind die Koeffizienten etwas verschieden, doch nicht sehr.

Auch durch Handwärmeübertrag können Temperaturdifferenzen in der Pipette entstehen, die immer zu einer Abnahme des Volumens führen. Das Ausmaß hängt von der Bauart der Pipette sowie von der Temperatur, dem Wärmeübergang und der Größe der Hand des Anwenders ab. Der Handwärmeeinfluss zeigt sich typischerweise in einer Drift der Messwerte nach unten und/oder in einer stärkeren Absenkung der Volumenwerte beim Nennvolumen gegenüber den Teilvolumen. Tritt Handwärmeeinfluss auf, so muss dieser in die Messunsicherheit mit einbezogen werden.

Die Temperatureffekte wirken in Bezug auf Teilvolumen näherungsweise proportional zum aufgenommenen Volumen. Je weniger Luft verschoben wird, desto geringer der Effekt.

## 2.2. Luftfeuchte, Vorbefeuchten

Während des Ansaugens verdunstet Flüssigkeit von der Oberfläche des Mediums ins Luftpolster hinein. Bereits kleinste verdunstete Mengen führen zu einem enormen Verdrängungsvolumen (siehe Kapitel 1.2.).



Der entstandene Dampf verdrängt das Medium während des Ansaugens und der Wartezeit und führt daher zu einer Volumenabnahme.

Je größer die Dampfsättigung im Luftpolster, desto weniger kann während des Ansaugens verdunsten.

Nach dem Abgeben des Mediums lässt man den Kolben in die Ausgangsposition zurück gleiten, bevor wieder neu pipettiert wird.

Dadurch gelangt Außenluft in die Pipette und vermischt sich mit der im Luftpolster befindlichen Luft.

Somit wird die rel. Luftfeuchte des Luftpolsters stark von der Luftfeuchte der Umgebungsluft beeinflusst.

Dies bedeutet: hohe Umgebungsluftfeuchte führt zu höherem Volumen und umgekehrt.

Bei einer Pipette mit Nennvolumen 1000  $\mu\text{l}$  und 100  $\mu\text{l}$  ergibt sich nach derzeitigen Messungen ein Sensitivitätskoeffizient  $c_\phi$  von ca. 0,07 % Änderung des angesaugten Volumens  $V$  pro 10 %rH Feuchteänderung. Beim Nennvolumen 10  $\mu\text{l}$  sind ca. 0,1 % pro 10 %rH Feuchteänderung anzusetzen.

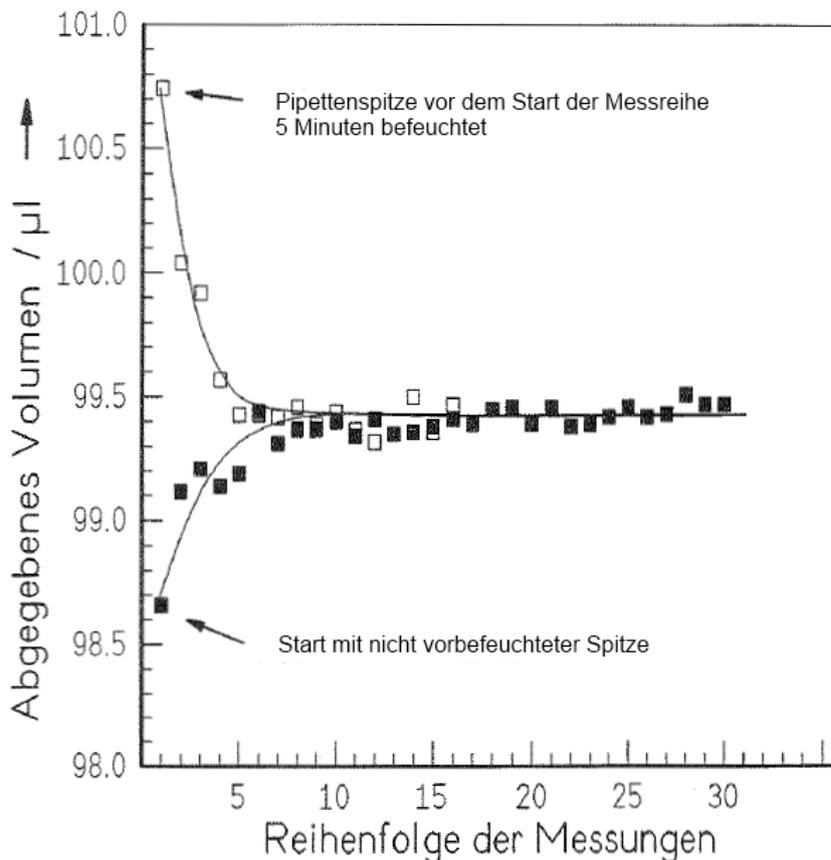
Entsprechend sind die Auswirkungen, wenn mit einer Pipettenspitze ohne vorheriges Befeuchten pipettiert wird. Das abgegebene Volumen ist zunächst deutlich niedriger und steigt während der folgenden Pipettierungen auf einen Gleichgewichtswert an, der nach 4 bis 5 Pipettierungen erreicht ist. Daher muss jede neu aufgesetzte Spitze erst 4 bis 5 Mal Vorbefeuchtet werden. Dies geschieht durch 4 bis 5 maliges Pipettieren, wobei das abgegebene Volumen verworfen wird.

**Abbildung 3:** Verdampfen des Mediums während des Ansaugens

Anmerkung: Der oft gebrauchte Begriff „Vorbenetzen“ ist nicht zutreffend, da die Pipettenspitze nicht benetzt wird, vielmehr erfolgt eine Befeuchtung des Luftpolsters.

Wird die Pipette mit einer gefüllten Spitze längere Zeit gelagert, sodass sich das Luftpolster mit Dampf sättigt, so ist das abgegebene Volumen der darauf folgenden Pipettierung sehr hoch, dann sinkt es während der folgenden 4 bis 5 Pipettierungen rasch auf den Gleichgewichtswert ab.

Der Verlauf solcher Wägungen ist aus [2] entnommen:



**Abbildung 4:** Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf das abgegebene Volumen am Beispiel zweier Pipettierserien ohne Spitzenwechsel. Beim Start ohne Vorbefeuchten steigen die abgegebenen Volumina, beim Start mit besonders lang vorbefeuchteter Spitze fallen die abgegebenen Volumina im Verlauf der Serie in Richtung auf einen gemeinsamen Gleichgewichtswert. Raumtemperatur: 20,2 °C, Wassertemperatur: 19,5 °C. Pipette mit Nennvolumen 100 µl.

Anmerkungen zum Spitzenwechsel werden in einem eigenen Abschnitt (Kapitel 3) vorgenommen.

### 2.3. Luftdruck

Geringerer Luftdruck bewirkt, dass das Luftpolster eine größere Kompressibilität besitzt. Zur Erzeugung des Unterdruckes, der die Flüssigkeitssäule in der Pipettenspitze im Gleichgewicht hält, muss das Luftpolster bei niedrigerem Außendruck mehr gedehnt werden. Das bedeutet, dass ein kleineres Volumen in die Spitze aufgesogen wird.

Der Effekt ist mit Hilfe von Gleichung (3) erchenbar. Dabei wurde der Binnendruck gegenüber dem hydrostatischen Druck vernachlässigt. Man erhält beim Wechsel vom Luftdruck  $p_{L,X1}$  an Ort X1 zum Luftdruck  $p_{L,X2}$  an Ort X2 die Volumendifferenz  $\Delta V$ :

$$\Delta V \approx -V_T \cdot \rho_W \cdot g \cdot h_W \cdot \left( \frac{1}{p_{L,X2} - \rho_W \cdot g \cdot h_W} - \frac{1}{p_{L,X1} - \rho_W \cdot g \cdot h_W} \right). \quad (5)$$

Aus (5) lässt sich durch Differenzieren der Sensitivitätskoeffizient  $c_{pL}$  berechnen:

$$\frac{\partial \Delta V}{\partial p_{L,X2}} \cdot dp_L \approx V_T \cdot \rho_W \cdot g \cdot h_W \cdot \left( \frac{1}{p_{L,X2} - \rho_W \cdot g \cdot h_W} \right)^2 \cdot dp_L \approx V_T \cdot \frac{\rho_W \cdot g \cdot h_W}{p_{L,X2}} \cdot \frac{dp_L}{p_{L,X2}} = c_{pL} \cdot dp_L \quad (6)$$

Da der hydrostatische Druck gegenüber dem Luftdruck sehr viel kleiner ist, konnte er im Nenner der Gleichung vernachlässigt werden.

Es zeigt sich, dass sich die Unsicherheit multiplikativ aus dem Luftpolstervolumen, dem Quotienten aus hydrostatischem Druck und Luftdruck und der relativen Druckänderung zusammensetzt.

Für eine Pipette der Größe 1000  $\mu$ l bekommt man als Beispiel für das Nennvolumen (Steighöhe 50 mm) bei einem Luftdruck von 1008 hPa und einem Luftpolster von 2700  $\mu$ l einen Sensitivitätskoeffizienten von  $c_{pL} = 0,014 \mu$ l/hPa.

Für eine Pipette mit einem Nennvolumen von 100  $\mu$ l ergeben sich mit den zugehörigen typischen Pipettendaten  $c_{pL} = 0,0012 \mu$ l/hPa und für eine Pipette mit einem Nennvolumen von 10  $\mu$ l  $c_{pL} = 0,0003 \mu$ l/hPa.

Durch die Abhängigkeit vom Luftdruck hat auch die Höhenlage des Kalibrierortes einen Einfluss, wie unmittelbar aus Gleichung (6) hervorgeht, da sich der Luftdruck mit der Höhe erheblich ändert. Siehe hierzu insbesondere [6].

Die Steighöhe  $h_W$  wurde in Gleichung (6) näherungsweise als unabhängig vom Luftdruck bzw. der Höhenlage angenommen, da die Abhängigkeit gering ist und zum Zwecke der vorgenommenen Unsicherheitsabschätzungen vernachlässigt werden kann.

Mit Hilfe der Gleichung (6) kann eine Korrektur des gemessenen Volumens auf einen Normdruck (z. B. 1013 hPa, entsprechend Meereshöhe) im Kalibrierschein vorgenommen werden. Eine Reihe von Gründen sprechen jedoch dagegen, dies zu tun:

Zum einen muss auch dieser Korrektur eine gewisse Unsicherheit zugeordnet werden, d. h. die Messunsicherheit erhöht sich. Weiter ist es so, dass das Labor des Anwenders und das Kalibrierlabor häufig auf gleicher oder ähnlicher Höhenlage sind und die Umrechnung auf einen Normdruck die Vergleichbarkeit eher erschwert.

Schließlich bedeutet diese Korrektur einen Nachteil für Laboratorien, die nicht auf Meereshöhe liegen.

Meteorologische Schwankungen des Luftdrucks sollten in der Messunsicherheit berücksichtigt werden, da der Beitrag zur Messunsicherheit nicht allzu groß ist. Berücksichtigt man diesen Beitrag nicht, so gälte der Kalibrierschein streng nur für einen bestimmten Luftdruck und kein Schein wäre mit dem anderen unmittelbar vergleichbar.

Die rechnerische Korrektur der Höhenlage sollte beim Anwender außerhalb des Kalibrierscheines erfolgen, z. B. für Ringversuche.

Bei elektronischen Pipetten mit Höhenkorrektur soll der eingestellte Wert der Höhenkorrektur der Höhenlage des Kalibrierlabors entsprechen. Auf dem Kalibrierschein muss angegeben werden, welcher Korrekturwert bei der Kalibrierung eingestellt war.

Liegen keine spezifischen Daten über Steighöhe und Luftpolster vor, so können typischerweise für marktübliche Pipetten folgende maximale Werte für das Volumen des Luftpolsters

und die Steighöhe in der Pipettenspitze zur Berechnung des Messunsicherheitsanteils der meteorologischen Luftdruckschwankungen angenommen werden:

Nennvolumen / $\mu\text{l}$	Steighöhe /mm	Luftpolster / $\mu\text{l}$
>5 000 - 10 000	150	20000
> 1 000 - 5 000	130	10000
> 300 - 1 000	55	3000
>100 - 300	45	1000
> 10 - 100	30	500
1 - 10	19	100

**Tabelle 1:** Maximalwerte für Steighöhe und Luftpolster

Da dies typische maximale Werte sind, muss im Einzelfall geprüft werden, ob diese Werte gerechtfertigt sind.

Die Volumenänderung, die sich bei der Kalibrierung auf verschiedenen Höhenlagen wegen des jeweiligen Luftdrucks ergibt, kann mit diesen Maximalwerten nicht mit ausreichender Genauigkeit errechnet werden. Die Werte in Tabelle 1 dienen zur Abschätzung des maximalen Messunsicherheitsbeitrags durch Luftdruckänderungen.

## 2.4. Absolutes Temperaturniveau

Wenn die Temperaturen von Pipette und Wasser an die Lufttemperatur angeglichen sind, so konnte bisher experimentell nicht nachgewiesen werden, dass eine Änderung des gemeinsamen Temperaturniveaus einen Einfluss auf das abgegebene Volumen hat.

Die Wärmeausdehnung von Kolben und der Distanz der Hubanschläge führt zu einer Volumenerhöhung. Aufgrund der verschiedenen Bauarten der Pipetten und der verwendeten Werkstoffe kann jedoch kein allgemeingültiger Wert angegeben werden.

Im Fall von Kunststoffkolben und einem Kunststoff-Hubmechanismus erhält man typischerweise einen kubischen Ausdehnungskoeffizienten für das Kolbenverdrängungsvolumen von ca.  $150 \cdot 10^{-6} K^{-1}$ . Er setzt sich zusammen aus der Ausdehnung des Kolbenquerschnitts und der Distanz der Hubanschläge. Das entspricht einer Volumenänderung von 0,15 % pro 10 K Temperaturänderung.

Durch Änderung des Temperaturniveaus ergibt sich wegen der thermischen Ausdehnung von Pipettenspitze und Pipettenschaft eine Änderung des Luftpolstervolumens  $V_T$ . Bei höherer Temperatur führt dies zu einer Volumenabnahme, da ein vergrößertes Luftpolster erhöhte Kompressibilität aufweist. Allerdings sinkt auch die Steighöhe des Mediums in der im Volumen vergrößerten Pipettenspitze, was eine Erhöhung des pipettierten Volumens bewirkt.

Ein weiterer Effekt ist die bei höherer Temperatur geringer werdende Dichte des Mediums. Hierdurch ergibt sich eine Erhöhung des Volumens.

Schwierig quantitativ zu erfassen ist die Auswirkung der Temperatur auf den Dampfdruck des Mediums und die Diffusionskonstante, welche die Diffusionsgeschwindigkeit des Dampfes im Luftpolster beschreibt. Ein höherer Dampfdruck bewirkt erfahrungsgemäß eine

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>		DKD-E 8-2	
			Ausgabe:	05/2013
			Revision:	0
			Seite:	16 / 26

Volumenerniedrigung (Alkohole, siehe [2]), da mehr Medium während des Ansaugens und der Wartezeit verdampft.

In Summe kann wegen des unsicheren Einflusses des Dampfdrucks und der Diffusionskonstante derzeit noch keine Aussage getroffen werden, welcher Effekt dominiert.

### 3. Spitzenwechsel

In ISO 8655 Teil 6 ist der Wechsel der Pipettenspitze nach jeder Wägung vorgesehen. Jede neu aufgesetzte Spitze ist vor der Wägung einmal vorzubefeuchten.

Begründet wurde dies damit, dass es sich um eine Einmalspitze handelt, in der Regel also ein Wechsel beim Anwender erfolgt. Außerdem könnten bei längerem Pipettieren Tröpfchen in der Spitze bleiben, was dann einen Wechsel erfordert.

Allerdings stellt der Wechsel der Spitze eine Störung des Feuchteklimas in der Pipette dar. Ohne Spitzenwechsel arbeitet eine Pipette stabiler. Qualitäts-Pipettenspitzen zeigen auch nach vielen Pipettierungen keine Rückstände des Mediums. Daher brauchen sie während einer Kalibrierung mit 10 Einzelmessungen nicht gewechselt zu werden.

Die Arbeit ohne Spitzenwechsel bei der Kalibrierung bringt dagegen einen großen Vorteil an Ergonomie und geringere Messunsicherheit.

Wenn man Spitzenwechsel durchführt, so entspricht auch dies nicht dem typischen Verfahren im Labor. Somit lässt sich gut begründen, dass die Kalibrierung ohne Spitzenwechsel erfolgen soll.

Zunächst ist 4 bis 5 Mal durch Pipettieren vorzubefeuchten, erst danach zu kalibrieren. Falls eine Pipettenspitze Benetzung, Tröpfchen o. ä. zeigt, so ist sie zu wechseln. Die neue Spitze ist dann ebenfalls 4 bis 5 Mal vorzubefeuchten.

## 4. Handhabungs- und Geräteeinfluss

### 4.1. Neigungswinkel

Wird die Pipette beim Aufziehen der Flüssigkeit nicht exakt senkrecht gehalten, ist das pipettierte Volumen größer, da der hydrostatische Druck der Wassersäule proportional dem Kosinus des Neigungswinkels ist. Die Abweichung von der Vertikalen sollte maximal 10° betragen.

### 4.2. Wartezeit

Das Kalibrierverfahren nach ISO 8655 verlangt eine Wartezeit von 1 bis 2 Sekunden während der die Pipette nach dem Aufziehen des Mediums in diesem verharren soll. Bei kleineren Pipetten ist eine Sekunde angemessen, bei Pipetten über 1000 µl Nennvolumen ist in Abweichung zur ISO 8655 eine längere Wartezeit von 3 Sekunden notwendig, um sicherzustellen, dass der Ansaugvorgang vollständig abgeschlossen ist. Bei längerem Verharren bewirkt die Verdunstung in das Luftpolster eine Abnahme des Volumens. Daher ist eine möglichst genaue Einhaltung der Wartezeit nötig.

Die Abweichung von der geforderten Wartezeit ergibt einen Unsicherheitsbeitrag. Als Erfahrungswert kann man von einer Abweichung von 0,5 Sekunden ausgehen.

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>	DKD-E 8-2	
		Ausgabe:	05/2013
		Revision:	0
		Seite:	17 / 26

### 4.3. Pipettierrhythmus

Neben unbeabsichtigten Schwankungen der Wartezeit kann auch der Zeitraum zwischen Flüssigkeitsabgabe und neuem Aufziehen des Mediums variieren. Tritt hier eine Verzögerung auf, so wird die im Luftpolster herrschende erhöhte Luftfeuchte nach außen dringen und im Luftpolster abnehmen. Durch die geringer gewordene Feuchte im Luftpolster entsteht bei der folgenden Pipettierung eine Volumenverminderung.

### 4.4. Eintauchtiefe

Das in der Pipettenspitze verbleibende Volumen stellt sich endgültig bei Abriss der Flüssigkeitssäule ein (Kapitel 1.1.). Zu diesem Zeitpunkt steht die Spitze sogar schon etwas über der Medienoberfläche. Daher bestimmt die Eintauchtiefe das Volumen nicht direkt, jedoch existieren indirekt wirksame Effekte, die zu einem Einfluss führen, der jedoch deutlich unter 0,02 % Richtigkeit pro Millimeter abweichender Eintauchtiefe beträgt. Bei Teilvolumen und kleinen Pipettengrößen können aber auch deutlich höhere Werte auftreten.

Abhängig vom Nennvolumen muss daher eine bestimmte Eintauchtiefe eingehalten werden.

Volumenbereich	Eintauchtiefe in mm	Wartezeit in s
0,1 µl – 1 µl	1 – 2	1
> 1 µl – 100 µl	2 – 3	1
> 100µl – 1000 µl	2 – 4	1
> 1000 µl	3 – 6	3

**Tabelle 2:** Eintauchtiefe und Wartezeit

### 4.5. Betätigungskraft

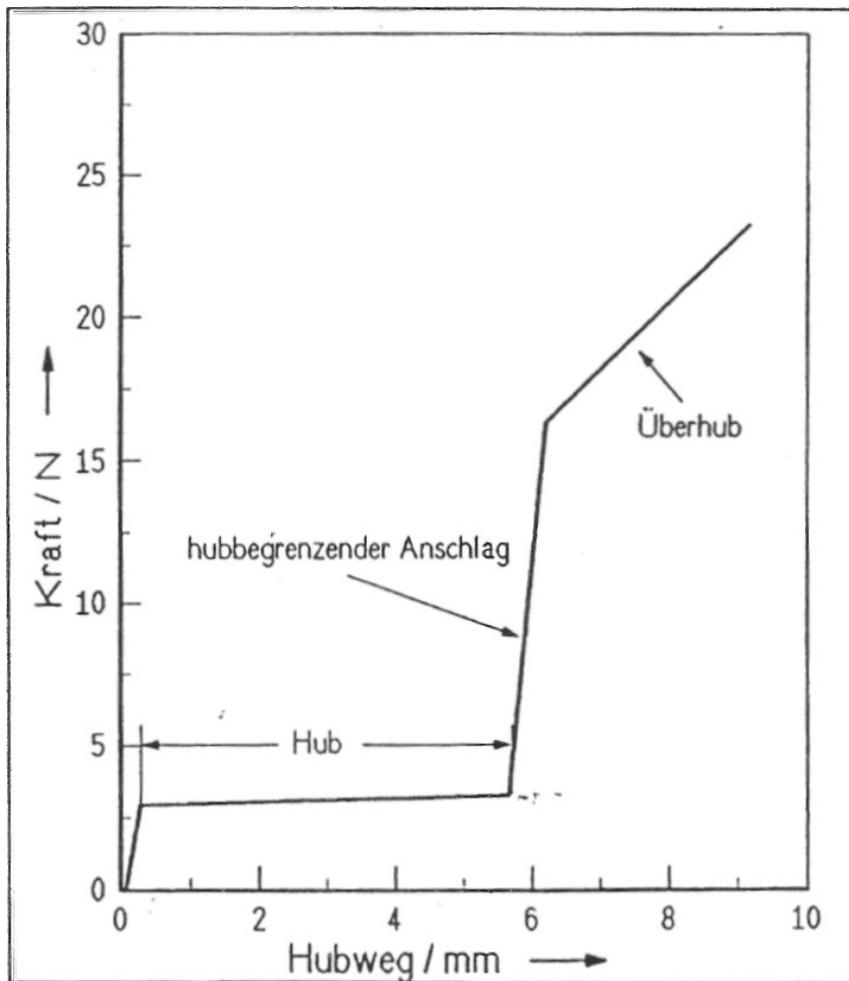
Die Betätigungskraft gegen den 1. Hubanschlag durch den Bediener unterliegt Schwankungen. Je nach Pipettenkonstruktion führt dies zu mehr oder weniger großen Hubveränderungen.

Unterschiede bestehen sowohl zwischen unterschiedlichen Bedienern (siehe [2] und [3]) als auch bei demselben Bediener zu ganz unterschiedlichen Zeitpunkten.

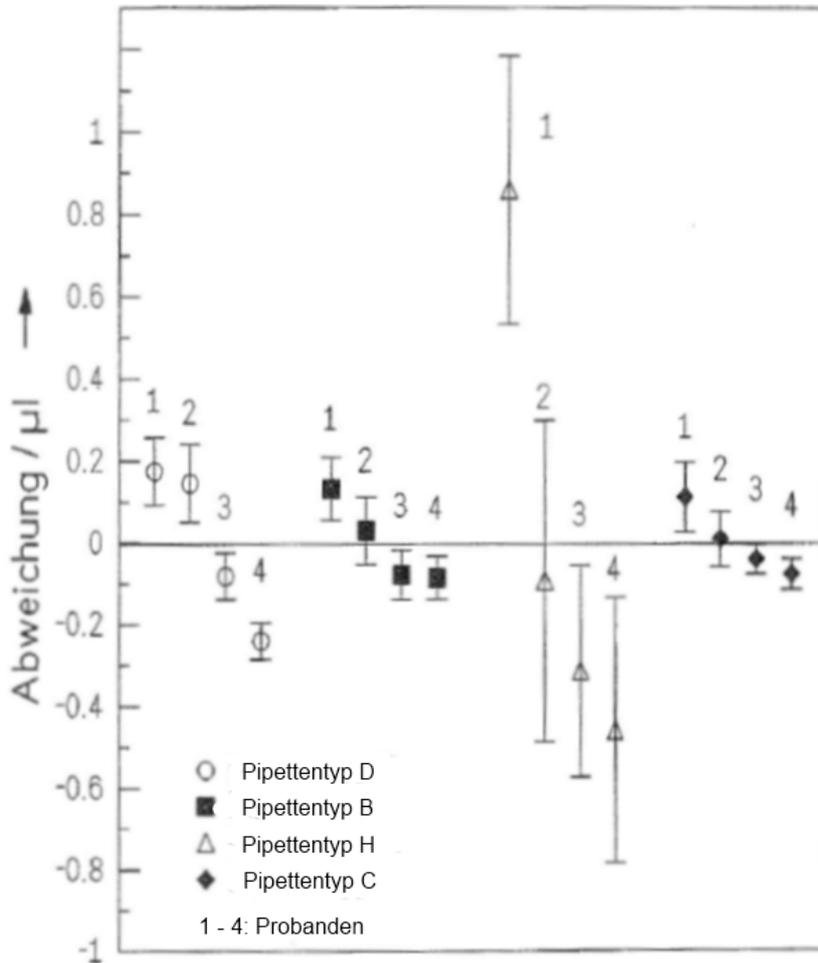
Auch innerhalb der 10 Einzelwägungen treten Schwankungen der Betätigungskraft auf, die sich auf die Wiederholstandardabweichung (Kapitel 5) auswirken.

Die Präzision der Hubanschläge in Bezug auf die Kraftabhängigkeit ist pipettenspezifisch (siehe [2] und [3]). Erfahrungsgemäß erreicht gut trainiertes Personal gleichmäßigere Hubwerte (kleinere Wiederholstandardabweichung) als untrainiertes.

In nachfolgender Grafik (aus [3] entnommen) sieht man die schematische Darstellung des typischen Kraft-Hub-Verlaufes in einer Pipette.



**Abbildung 5:** Typische Kraft-Hub-Charakteristik einer 200 µl-Pipette



**Abbildung 6 aus [2]:** Volumenabweichung verursacht durch die individuell unterschiedliche Betätigungskraft von 4 Probanden mit den zugehörigen Streubreiten an 4 Pipettentypen mit Nennvolumen 200 µl. Die Betätigungskraft, die die einzelnen Probanden bei der Betätigung ausübten, sank in der Reihenfolge von Proband 1 zu Proband 4.

Bei motorbetriebenen Pipetten fällt diese Einflussgröße weg.

Insgesamt muss eine Standardmessunsicherheit von mindestens 0,014 % des Nennvolumens eingerechnet werden.

#### 4.6. Reproduzierbarkeit des Kolbenhubes

Auch unabhängig von der Betätigungskraft hat der Hub des Kolbens eine mechanisch bedingte Unsicherheit. Man rechnet mit einer Reproduzierbarkeit von 0,02 % des Nennvolumens als Standardmessunsicherheit.

Auch Motorpipetten zeigen mechanisch bedingte Schwankungen der Reproduzierbarkeit des Kolbenhubes. Für diese liegen noch keine Zahlenwerte auf eine genauere Einhaltung des Hubes vor.

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>		DKD-E 8-2	
			Ausgabe:	05/2013
			Revision:	0
			Seite:	20 / 26

Der genannte Wert ist nicht unbedeutend, doch muss man bedenken, dass es sich hier nur um einen Hubfehler von 2 bis 4 µm handelt, der sich schon durch geringe Störeffekte ergeben kann.

#### 4.7. Zählwerkhysterese

Bei variablen mechanischen Pipetten ist der Hub davon abhängig, von welcher Richtung aus das Zählwerk eingestellt wurde. Meist ist der Einfluss gering, er kann aber – bei bestimmten Pipettenmodellen – auch größere Werte annehmen. Der Effekt fällt zwar weg, wenn man das Volumen immer von der gleichen Richtung einstellt. Trotzdem gibt es bei Pipetten mit variablem Volumen im Gegensatz zu Fixvolumenpipetten einen Volumeneinstellfehler.

#### 4.8 Handwärme

Als weiterer Einfluss ist auch die Handwärme zu berücksichtigen, die individuell vom Prüfer und von der Bauart der Pipette abhängig ist.

Durch die Position des Hubkolbens in der Kolbenhubpipette wirkt sich die Handwärme am stärksten beim Nennvolumen aus. Zur Minimierung der Einflussgröße „Handwärme“ ist der direkte Kontakt mit der Pipette so gering und so kurz wie möglich zu halten. Die Handwärme bewirkt eine Abnahme des Volumens (zeitliche Drift). Tritt bei einer Kalibrierung ein Handwärmeeinfluss auf, so ist dieser abzuschätzen und in der Messunsicherheit zu berücksichtigen.

#### 4.9 Bilanz Handhabungs- und Geräteeinfluss

Insgesamt ergibt sich aus den in 4.1. bis 4.8. beschriebenen Einflussgrößen eine Standard-Messunsicherheit von ca. 0,04 % bis 0,06 % des Nennvolumens. Den geringeren Wert setzt man für Fixvolumenpipetten, den höheren für variable Pipetten an.

### 5. Wiederholstandardabweichung

Aus der zufälligen Messabweichung  $s$  der in [1] festgelegten 10 Einzelmessungen ergibt sich für den Volumenmittelwert eine Standard-Unsicherheit von  $u_{\text{Wdh}} = \frac{s}{\sqrt{10}}$ .

Die zufällige Messabweichung  $s$  kann aus der entsprechenden Hersteller-Toleranz für den Variationskoeffizienten (Coefficient of variation) CV abgeschätzt werden. Aus der Praxis ist bekannt, dass der gemessene CV bei einer Kalibrierung meist zwischen 1/6 und 1/3 dieser Toleranz liegt.

$$s \approx \left( \frac{1}{6} \text{ bis } \frac{1}{3} \right) \cdot CV$$

Das so erhaltene  $s$  ist prozentual auf den Volumenmittelwert der Messung bezogen.

Da Mehrkanalpipetten in aller Regel eine höhere Toleranzangabe für den CV haben, ergibt sich für diese ein höherer Beitrag als bei Einkanalpipetten.

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>	DKD-E 8-2	
		Ausgabe:	05/2013
		Revision:	0
		Seite:	21 / 26

## 6. Gravimetrischer Beitrag

Der gravimetrische Beitrag der Messunsicherheit wird nach ISO TR 20 461 berechnet (siehe [4]).

Hinzu tritt die Verdunstung aus dem Wägegefäß, die man für Pipetten mit Nennvolumen 1000 µl mit 20 µg, für Nennvolumen 100 µl mit 15 µg und für Nennvolumen von 10 µl mit 10 µg pro Pipettierung abschätzt.

Der gravimetrische Beitrag hat zusammen mit dem Verdunstungsfehler im Volumenbereich um 1000 µl eine Standardunsicherheit von lediglich  $u_{\text{grav}} = 0,0035\%$ .

Das ist nur ein Bruchteil der Anteile aus den Kapiteln 2 und 4 und ist damit nicht bestimmend.

## 7. Modellgleichung für die Messunsicherheitsbetrachtung

Für die Berechnung des Volumens  $V_{20}$  zur Bezugstemperatur  $T_{M20}$  ergibt sich folgende Modellgleichung (7):

$$V_{20} = \frac{(W_1 - W_0)}{\rho_W - \rho_L} \cdot \left( 1 - \frac{\rho_L}{\rho_G} \right) \cdot (1 - \gamma \cdot (T_M - T_{M20})) + \Delta V_{\text{verd}} + \Delta V_{\text{Wdh}} + \Delta V_{\text{TDif}} + \Delta V_{\Phi} + \Delta V_{\rho L} + \Delta V_{\text{Hand}}$$

Der erste und zweite Summand ( $\Delta V_{\text{verd}}$ : Volumenfehler durch die Verdunstung) resultieren aus der gravimetrischen Messmethode (Kapitel 6), siehe [4].

Die weiteren Summanden resultieren aus den oben beschriebenen Einflüssen in den Kapiteln 2, 4 und 5:

$\Delta V_{\text{Wdh}}$ :	Volumenfehler der Wiederholstandardabweichung
$\Delta V_{\text{TDif}}$ :	Volumenfehler Temperaturdifferenz
$\Delta V$ :	Volumenfehler Feuchte
$\Delta V_{\rho L}$ :	Volumenfehler Luftdruck
$\Delta V_{\text{Hand}}$ :	Volumenfehler Handhabung und Pipetteneinfluss
$\gamma$ :	Temperaturgang $\gamma$ , zusammengesetzt aus den Komponenten aus Kapitel 2.4.

Wenn man die Bezugstemperatur gleich der gemeinsamen Temperatur von Medium/Pipette/Luft wählt, dann fällt der  $\gamma$  enthaltende Klammerterm weg.

Zur einfacheren Darstellung in diesem Bericht fasst man die in [4] beschriebene gravimetrische Messunsicherheit formal zusammen zu  $\Delta V_{\text{Grav}}$ .

$$V_{20} = V_S + \Delta V_{\text{Grav}} + \Delta V_{\text{Wdh}} + \Delta V_{\text{TDif}} + \Delta V_{\Phi} + \Delta V_{\rho L} + \Delta V_{\text{Hand}} \quad (8)$$

$V_S$  ist das gewählte Volumen.

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>	DKD-E 8-2	
		Ausgabe:	05/2013
		Revision:	0
		Seite:	22 / 26

## 8. Berechnung der Messunsicherheit

Aus Gleichung (8) kann nun nach den Regeln der Fehlerfortpflanzung die Messunsicherheit für das Nennvolumen berechnet werden.

Man erhält für das Quadrat der kombinierten Standardmessunsicherheit  $u^2$  den Ausdruck:

$$u^2 = (V_S \cdot u_{Grav})^2 + (V_S \cdot u_{Wdh})^2 + (c_{TDif} \cdot V_S \cdot u_{TDif}(T_W - T_M))^2 + (c_\Phi \cdot V_S \cdot u_\Phi(\Phi))^2 + (c_{pL} \cdot V_S \cdot u_{pL}(p_L))^2 + (V_S \cdot u_{Hand})^2.$$

Anmerkung: die Standardmessunsicherheiten und Sensitivitätskoeffizienten wurden in Prozent des Nennvolumens angegeben. Daher wurde in den einzelnen Termen immer mit dem gewählten Volumen  $V_S$  multipliziert.

Bedeutung der Formelzeichen:

- $u$ : Kombinierte Standardmessunsicherheit
- $u_{Grav}$ : Standardmessunsicherheit der gravimetrischen Volumenbestimmung
- $u_{Wdh}$ : Standardmessunsicherheit des Volumenmittelwerts
- $u_{TDif}$ : Standardmessunsicherheit Temperaturdifferenz Wasser – Pipette/Luft
- $u_\Phi$ : Standardmessunsicherheit der rel. Raumfeuchte
- $u_{pL}$ : Standardmessunsicherheit der Luftdruckschwankungen
- $u_{Hand}$ : Standardmessunsicherheit Handhabung und Pipetteneinfluss

## 9. Messunsicherheit bei Teilmengen (Staffelung)

Es gibt Einflussgrößen, die unabhängig vom Volumen sind und einen bestimmten absoluten Wert haben (z. B. Hubfehler).

Andere Einflussgrößen sind etwa proportional zum eingestellten Volumen (alle Temperatureffekte und Effekte, bei denen die Steighöhe direkt einght).

Einflussgrößen, die mit der Feuchte zu tun haben, nehmen eine Zwischenstellung ein.

Aus einer Vielzahl von Messungen ergibt sich, dass als gesamte Messunsicherheit bei 50 % des Nennvolumens drei Viertel und bei 10 % des Nennvolumens die Hälfte des Wertes, der sich für das Nennvolumen ergibt, angesetzt werden kann.

## 10. Angabe der Messunsicherheit

Um die Abhängigkeit der Messunsicherheit über den ganzen Bereich der Nennvolumen der Kolbenhubpipetten angemessen zu beschreiben, empfiehlt es sich die Messunsicherheit in Prozent Richtigkeit bezüglich des Nennvolumens anzugeben und sinnvoll in Volumengebiete aufzuteilen.

Der Grund hierfür ist, dass über gewisse Nennvolumengebiete hinweg prozentual gesehen ganz ähnliche Messunsicherheiten auftreten. Beispiel: In Anlage A von [5] liegen 0,12 % Messunsicherheit für eine Pipette mit festem Volumen 1000  $\mu\text{l}$  vor. Das Budget für eine

	Analyse der Einflussgrößen auf die Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster <a href="https://doi.org/10.7795/550.20250320">https://doi.org/10.7795/550.20250320</a>		DKD-E 8-2	
			Ausgabe:	05/2013
			Revision:	0
			Seite:	23 / 26

Pipette mit festem Volumen von 100 µl würde in etwa den gleichen prozentualen Wert der Messunsicherheit ergeben.

## 11. Zusammenfassung

Die Funktion der Kolbenhubpipette mit Luftpolster wurde als thermodynamisches System in Form einer Gleichung beschrieben. Es konnten folgende systembedingte Einflussgrößen analysiert werden

- Temperaturdifferenzen zwischen Medium, Pipette und Luft
- Feuchte der Umgebungsluft und Feuchte im Luftpolster
- Luftdruck und damit verbunden die Ortshöhe

Weitere Einflussgrößen ergeben sich aus Einflüssen des Bedieners und/oder der Pipette:

- Neigungswinkel der Pipette
- Wartezeit
- Pipettierrhythmus
- Eintauchtiefe
- Betätigungskraft (fehlt bei motorgetriebenen Pipetten)
- Reproduzierbarkeit des Kolbenhubes
- Zählwerkhysterese (fehlt bei motorgetriebenen Pipetten und Fixvolumenpipetten)
- Handwärme

Daneben muss die Standardabweichung des Volumenmittelwertes aufgrund der Wiederholstandardabweichung der Einzelmessungen berücksichtigt werden.

Die Messunsicherheit, die aus der gravimetrischen Kalibrierung resultiert, ist gegenüber den vorgenannten Einflüssen wesentlich geringer.

Für die Berechnung der Messunsicherheit wurde eine Modellgleichung entwickelt und die Wirkungen der Einflussgrößen konnten hierin quantifiziert werden.

Für die Handhabungseinflüsse (Bediener und Pipette) wurden auf Messungen basierende Abschätzungen getroffen und hieraus ein Pauschalwert ermittelt.

Die ermittelten Unsicherheiten begründen die in den Musterbudgets der Richtlinie DKD-R 8-1 [5] eingesetzten Werte gut.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die Umgebungsbedingungen bei einer Kalibrierung zu überwachen und in engen Grenzen zu halten.

Die Berechnungen basieren bereits auf sehr eng gesetzten Toleranzen der Umgebungsgrößen. Daher kann die in den Musterbudgets der Richtlinie DKD-R 8-1 [5] resultierende Messunsicherheit unter normalen Arbeitsbedingungen nicht unterschritten werden.

## 12. Literatur

- [1] Volumenmessgeräte mit Hubkolben – Teil 2: Kolbenhubpipetten (ISO 8655-2:2002), Volumenmessgeräte mit Hubkolben- Teil 6: Gravimetrische Prüfverfahren zur Bestimmung der Messabweichung (ISO 8655-6:2002)
- [2] K. H. LOCHNER: Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben AIF 9152: „Untersuchung der Messgenauigkeit von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster“  
Ergänzungsrichtlinie
- [3] K. H. LOCHNER, T. BALLWEG, H.H. FAHRENKROG: „Untersuchungen zur Messgenauigkeit von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster“. J. Lab. Med. 20 (7/8), 430-440, 1996
- [4] ISO/TR 20461 „Determination of uncertainty for volume measurements using the gravimetric method“, November 2000
- [5] Richtlinie DKD-R 8-1 „Kalibrierung von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster“ mit Musterbudgets, 12/2011
- [6] C. SPÄLTI, „Einfluss der Höhenlage auf das Volumenergebnis einer Kolbenhubpipette mit Luftpolster“, Expertenbericht DKD-E 8-3, 12/2011

## 13. Danksagung

Die Autoren danken insbesondere folgenden Personen für ihre Hilfe:

Dr. Barbara Werner, Dr. Ulrich Breuel, ZMK-ANALYTIK-GmbH, D-06766 Bitterfeld-Wolfen  
 Christoph Spälti, Spaelti-TS AG, CH-5412 Gebenstorf  
 Uwe Dunker und Michael Bremer, Eppendorf AG, D-22339 Hamburg  
 Harald Gutknecht, Thermo–Electron LED GmbH, D-63505 Langenselbold

## 14. Formelzeichen

$V$	Angesaugtes Istvolumen der Pipette
$V_0$	Nennvolumen der Pipette
$V_S$	Gewähltes Volumen der Pipette
$V_{20}$	Volumen der Pipette bei der Bezugstemperatur 20 °C
$V_T$	Luftpolstervolumen
$V_W$	Volumendehnung des Luftpolsters (durch Wassersäule und Binnendruck)
$V_{Hub}$	Hubvolumen des Kolbens
$W_0$	Ablesung Waage Tarawert
$W_1$	Ablesung Waage
$\rho_W$	Dichte Medium
$\rho_G$	Dichte Kalibriergewichte Waage (8000 kg/m <sup>3</sup> )
$\gamma$	Temperaturgang des pipettierten Volumens
$g$	Fallbeschleunigung
$h_W$	Steighöhe des Mediums in der Pipettenspitze
$p_L$	Luftdruck
$p_{L,X1}$	Luftdruck am Ort X1
$p_{L,X2}$	Luftdruck am Ort X2
$p_d$	Dampfdruck des Mediums

$\rho_h$	Hydrostatischer Druck des Mediums
$\rho_S$	Binnendruck des Mediums
$T_M$	Temperatur Pipette
$T_{M20}$	Bezugstemperatur der Pipette (20°C)
$\phi$	Rel. Feuchte der Umgebungsluft
$\Delta T/T$	Relative Temperaturänderung im Luftpolster
$A_{fl}$	Oberfläche des Mediums gegen das Luftpolster
$S$	Feuchte- Sättigungsgrad des Luftpolsters (% rel. Luftfeuchte / 100 %)
$t_{AnsW}$	Ansaug- plus Wartezeit
$k$	Verdunstungsfaktor (Volumen pro Fläche, Dampfdruck und Zeit)
$V_{eff}$	Wirksamer Teil des Luftpolsters
$\Delta V_{Wdh}$	Volumenfehler der Wiederholstandardabweichung
$\Delta V_{TDif}$	Volumenfehler Temperaturdifferenz
$\Delta V_{\phi}$	Volumenfehler Feuchte
$\Delta V_{pL}$	Volumenfehler Luftdruck
$\Delta V_{Hand}$	Volumenfehler Handhabung und Pipetteneinfluss
$\Delta V_{Verd}$	Volumenfehler durch die Verdunstung
$\Delta V_{Grav}$	Volumenfehler der gravimetrischen Volumenbestimmung
$s$	Zufällige Messabweichung
$CV$	Variationskoeffizient
$R$	Richtigkeit (prozentuale Abweichung des Volumens vom Sollwert in Prozent)
$c_{TDif}$	Sensitivitätskoeffizient für den Einfluss der Temperaturdifferenz
$c_{\phi}$	Sensitivitätskoeffizient für den Einfluss der Luftfeuchte
$c_{pL}$	Sensitivitätskoeffizient für den Einfluss des Luftdrucks
$u$	Kombinierte Standardmessunsicherheit
$u_{Grav}$	Standardmessunsicherheit der gravimetrischen Volumenbestimmung
$u_{Wdh}$	Standardmessunsicherheit des Volumenmittelwerts
$u_{TDif}$	Standardmessunsicherheit Temperaturdifferenz Wasser – Pipette/Luft
$u_{\phi}$	Standardmessunsicherheit der rel. Raumfeuchte
$u_{pL}$	Standardmessunsicherheit der Luftdruckschwankungen
$u_{Hand}$	Standardmessunsicherheit Handhabung und Pipetteneinfluss



Herausgeber:

**Physikalisch-Technische Bundesanstalt**  
Deutscher Kalibrierdienst  
Bundesallee 100  
38116 Braunschweig

[www.dkd.eu](http://www.dkd.eu)  
[www.ptb.de](http://www.ptb.de)