

# Physikalische Einflüsse beim Pipettieren mit Luftpolsterpipetten

Kornelia Ewald, Eppendorf AG, Deutschland

## Einleitung

Physikalische Einflüsse spielen beim Dosieren mit Luftpolsterpipetten eine wichtige Rolle. Die Pipettierergebnisse werden direkt von der Dichte der pipettierten Flüssigkeit beeinflusst.

Aber auch Faktoren wie Dampfdruck, Viskosität und Temperaturunterschiede müssen berücksichtigt werden.

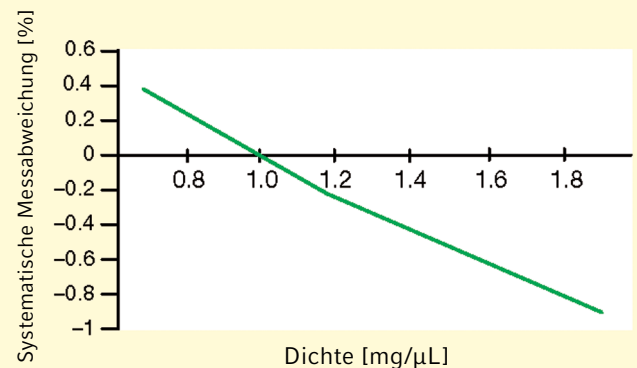
## Flüssigkeitsdichte

Weil Kolbenhubpipetten hauptsächlich zum Pipettieren wässriger Lösungen verwendet werden, erfolgt ihre Justierung mit destilliertem Wasser als Prüfmedium. Je nach Dichte der Flüssigkeit (Tab. 1) dehnt sich das Luftvolumen über der Flüssigkeit unterschiedlich aus. Daher wird bei Pipettierungen von Flüssigkeiten, die schwerer als Wasser sind, zu wenig Flüssigkeitsvolumen in die Spitze aufgenommen (Abb. 1).

Weil sich bei einem Wechsel der Flüssigkeit neben der Dichte auch der Dampfdruck der Flüssigkeit ändert, kann der alleinige Einfluss der Dichte nur theoretisch abgeschätzt werden. Bei einer Pipette mit einem Nennvolumen von z.B. 1000  $\mu\text{L}$  ergibt sich für Methanol ( $r = 0,79 \text{ mg}/\mu\text{L}$ ) eine Abweichung von +2,022  $\mu\text{L}$  (+0,2%) und für konzentrierte Schwefelsäure ( $r = 1,84 \text{ mg}/\mu\text{L}$ ) eine Abweichung von -7,810  $\mu\text{L}$  (-0,78%) [1]. Diese Abweichung hängt vom hydrostatischen Druck der Flüssigkeit (Höhe der Flüssigkeitssäule) und vom Totvolumen ab. Bei kleineren Pipettier volumina ergeben sich infolge der Vergrößerung des Totvolumens größere relative Abweichungen, sodass z.B. bei einer 100- $\mu\text{L}$ -Pipette der relative Fehler bei 10  $\mu\text{L}$  Pipettier volumen größer ist als bei 100  $\mu\text{L}$ . Bei wässrigen Lösungen kann dieser Einfluss vernachlässigt werden.

Schwere Flüssigkeiten können mit variablen Pipetten dann richtig dosiert werden, wenn der Dichtefehler z.B. durch eine bewusste Korrektur der Zählwerkseinstellung ausgeglichen wird (siehe Umjustieren bei Flüssigkeiten mit anderer Dichte als Wasser.). Diese Korrektur gilt dann nur für diesen einzelnen Wert und nicht über den gesamten Verstellbereich der Pipette.

In der Praxis sind diese dargestellten Abweichungen meist unproblematisch. Häufig wird auf Dosiersysteme mit Direktverdrängung ausgewichen oder die Abweichungen sind für die Methode oder Dosieraufgabe tolerierbar.



**Abbildung 1:** Systematische Messabweichung bei unterschiedlichen Flüssigkeitsdichten, Kalibrierung mit destilliertem Wasser

**Tabelle 1:** Physikalische Daten von Flüssigkeiten (relevante Beispiele)

Substanz	Formel	Siedepunkt [°C]	Dichte bei 20 °C [mg/μL]	Dampfdruck bei 20 °C [hPa]	Viskosität bei 20 °C [mPas]
2-Propanol (Isopropanol)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH	82,4	0,78	42,5	2,2
Aceton	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	56,5	0,79	233	0,32
Ameisensäure	HCOOH	100,7	1,23	42	1,8
Ammoniak 25%	NH <sub>3</sub>	37,7	0,91	500	
Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	117,2	0,81	6,7	
Chloroacetic acid	CH <sub>2</sub> ClCOOH	189	1,6		
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	61,7	1,47	213	
Essigsäure	CH <sub>3</sub> COOH	118	1,06	15,4	1,53 (25 °C)
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	78,5	0,79	59	1,2
Flußsäure	HF	112	1,13		
Glycerin	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	290	1,26		
Kalilauge	KOH		1,29		
Methanol	CH <sub>3</sub> OH	65	0,79	128	0,597
Natronlauge	NaOH		1,33		19
Phenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	181,4	1,06		1,099 (100 °C)
Phosphorsäure	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		1,71	2	
Salpetersäure	HNO <sub>3</sub>	121,8	1,41	9	1,49 (40 °C)
Salzsäure	HCl		1,15	213	2
Schwefelsäure	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1,84	0,0016	26,9
Trichloressigsäure	CCl <sub>3</sub> COOH	196	1,62		

## Viskosität

Schwieriges Benetzungs- und Fließverhalten macht sich bei der Flüssigkeitsabgabe in Form von Tröpfchenbildung bemerkbar. Dadurch kann ein erheblicher Volumenanteil in der Spitze hängen bleiben. Neben hoher Viskosität (z.B. Glycerin) sind auch oberflächenaktive Substanzen (z.B. Tenside, Proteine) für solche Probleme verantwortlich. In diesen Fällen kommt häufig noch Schaumbildung als weiteres Problem hinzu. Die wichtigsten Gegenmaßnahmen sind eine sehr langsame Ansaug- und Abgabegeschwindigkeit sowie reverses Pipettieren.

## Vorbenetzen (Vorbefeuchten)

Durch Vorbenetzen (Füllen und Entleeren) der Spitze wird beim Pipettieren von Wasser oder wässrigen Lösungen eine Zunahme des Wasserdampf-sättigungsgrads der Luft in der Spitze und im Pipetteninnenraum bewirkt [1]. Nach dem Start einer Messreihe ohne vorheriges Benetzen der Spitze steigen die abgegebenen Volumina im Verlauf der Messreihe bis zum Erreichen eines Gleichgewichtswerts an.

Verantwortlich für diesen Anstieg ist die Zunahme der relativen Feuchtigkeit in der Spitze und im Pipetteninnenraum mit der Zahl der Pipettierungen. Um den Pipetteninnenraum mit Feuchtigkeit anzureichern, sollte zu Beginn einer Messreihe die erste Spitze mehrmals vorbenetzt werden. Bei nachfolgendem Spitzenwechsel genügt im Fall von wässrigen Lösungen dann ein einmaliges Vorbenetzen der neuen Spitze, um die Verdunstung gering zu halten.

## Relative Luftfeuchtigkeit

Trotz des Vorbefeuchtens der Pipettenspitze besteht für das pipettierte Volumen eine deutliche Abhängigkeit von der Feuchtigkeit der Raumluft [1]. Bei einer Änderung der relativen Feuchtigkeit der Raumluft von 80% auf 20% sinkt das abgegebene Volumen um

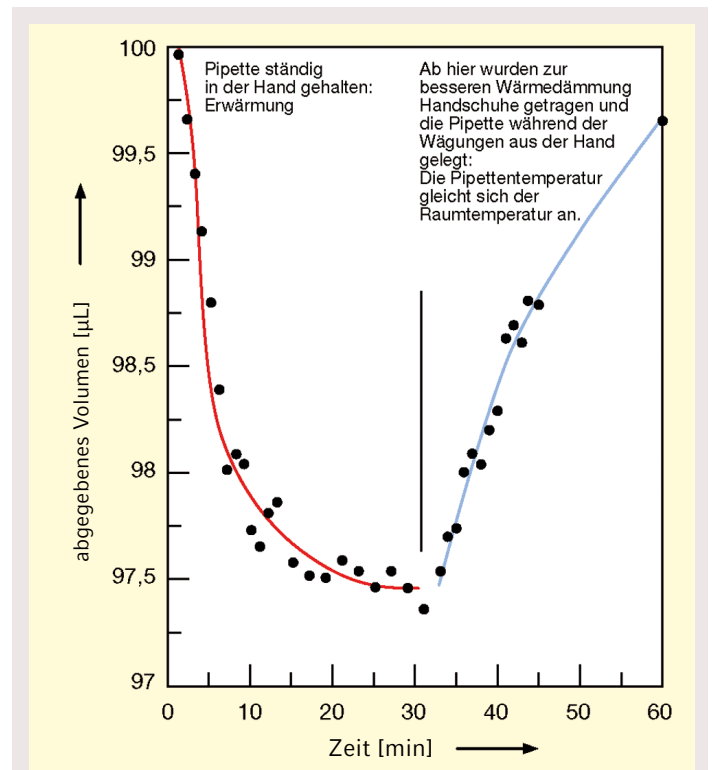
- > 2,1 bis 3,5% bei 10-μL-Pipetten
- > 0,3 bis 0,6% bei 200-μL-Pipetten mit gelber Pipettenspitze (kleines Totvolumen)
- > 0,9 bis 1,2% bei 200-μL-Pipetten mit blauer Pipettenspitze (großes Totvolumen).

## Dampfdruck

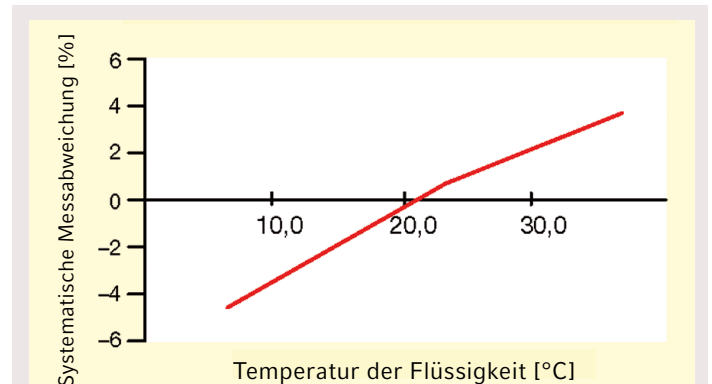
Flüssigkeiten mit hohem Dampfdruck wie z.B. Lösungsmittel (siehe Tab. 1) lassen sich mit Luftpilsterpipetten nicht mit der für destilliertes Wasser spezifizierten Richtigkeit und Präzision dosieren. Beim Pipettieren dieser Flüssigkeiten treten Verdunstungseinflüsse aus folgenden Gründen besonders stark hervor: Der Dampfdruck ist höher als bei Wasser und das in der Spitze vorhandene Luftvolumen ist zu Beginn noch völlig ungesättigt [1]. Um einen möglichst hohen Sättigungsgrad des Pipetteninnenraums mit der Dampfphase zu erreichen, sollte die Spitze sehr lange (1 min oder länger) vorbenetzt werden. Dennoch wird das pipettierte Volumen stets kleiner als das Sollvolumen sein.

## Systemtemperatur, Temperaturunterschiede und Temperaturgradienten

Das abgegebene Volumen ist nahezu unabhängig von der Systemtemperatur, solange innerhalb des Systems Pipette-Flüssigkeit-Raumluft kein Temperaturunterschied besteht [1]. Infolge des hohen thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Luft können hingegen schon kleine Temperaturänderungen des Luftpilsters während des Zeitraums, in dem die Pipettenspitze in die Flüssigkeit eintaucht, relativ große Fehler bewirken. Solche Temperaturänderungen werden durch unterschiedliche Temperaturen der Pipette, der zu pipettierenden Flüssigkeit und der Raumluft verursacht. Ist die Pipette wärmer als die Flüssigkeit und die Raumluft, wird die beim Aufziehen der Flüssigkeit eingesaugte Luft durch den Kontakt mit der wärmeren Pipette erwärmt und dehnt sich dabei aus. Während des Zeitraums, in dem die Pipette in die Flüssigkeit eingetaucht ist, wird Flüssigkeit aus der Spitze verdrängt, sodass sich letztlich das aufgenommene und damit auch das abgegebene Volumen verringern. Umgekehrt wird im Fall eines gegenläufigen Temperaturgradienten ein größeres Volumen festgestellt. Da eine Erhöhung der Pipettentemperatur eine drastische Verkleinerung des abgegebenen Volumens zur Folge haben könnte, muss die Wärmeübertragung von der Hand auf den Pipettenkolben mittels konstruktiver Maßnahmen verhindert werden. Durch entsprechende räumliche Distanz zwischen dem Kolben und dem Handgriff sowie eine thermische Abschirmung bzw. Isolierung ist dieses Problem bei den heutigen Pipetten weitgehend gelöst (Abb. 2). Mit steigender Raumtemperatur bei konstant gehaltener Pipetten- und Flüssigkeitstemperatur nimmt das pipettierte Volumen zu. Der Effekt ist aber deutlich geringer als bei der Variation der Pipettentemperatur.



**Abbildung 2:** Einfluss der Handwärme auf das pipettierte Volumen bei einer 100-µL-Pipette mit ungenügender Wärmeisolierung [1]



**Abbildung 3:** Systematische Messabweichung bei unterschiedlichen Flüssigkeitstemperaturen; Kalibrierung bei 22 °C

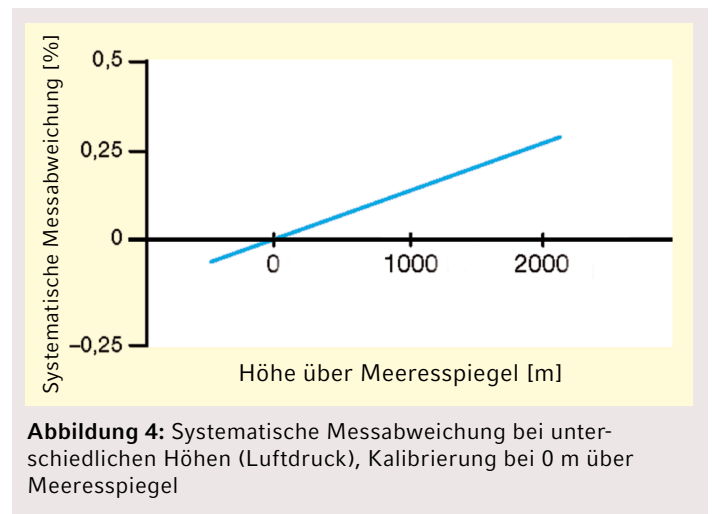
Mit zunehmender Flüssigkeitstemperatur bei konstant gehaltener Pipetten- und Raumtemperatur steigt das pipettierte Volumen an (Abb. 3). Dies scheint zunächst in völligem Widerspruch zu den bisherigen Überlegungen zu stehen.

Eigentlich müsste sich das Luftpolster während des Ansaugens erwärmen, ausdehnen und einen Teil der Flüssigkeit verdrängen. Solange nicht vorbenetzt wurde, ist diese Annahme auch richtig. Während man bei der vorbenetzten Spitze eine Zunahme des abgegebenen Volumens erhält, ist dies bei nicht vorbenetzter Pipettenspitze genau umgekehrt. Um Temperaturänderungen des Luftpolsters beim Pipettieren auszuschließen, sollten die Temperaturen der Pipette und der Flüssigkeit sowie die Raumtemperatur übereinstimmen. Je geringer die Temperaturunterschiede sind, desto genauer sind die Ergebnisse. Der Idealfall, dass die Temperaturen der beteiligten Komponenten identisch sind, stellt in der Laborpraxis aber eher die Ausnahme dar, insbesondere wenn bei klinischen oder biochemischen Anwendungen eiskühle oder körperwarmer Flüssigkeiten pipettiert werden müssen. Es empfiehlt sich, den daraus entstehenden und häufig unvermeidbaren Fehler durch Kontrollmessungen zu ermitteln und bei der Auswertung zu berücksichtigen.

## Luftdruck und Meereshöhe

Der mittlere Luftdruck eines Ortes hängt von seiner jeweiligen Höhe über dem Meeresspiegel ab. Wird eine Pipette z.B. in Hamburg justiert und in München benutzt, so beträgt der Luftdruckunterschied aufgrund der verschiedenen Meereshöhen im Jahresdurchschnitt  $-63$  mbar [1]. Dadurch ergibt sich z.B. für eine  $1000\text{-}\mu\text{L}$ -Pipette ein um  $0,064\%$  kleineres Volumen. Bei einer  $50\text{-}\mu\text{L}$ -Pipette beträgt der Unterschied  $-0,14\%$ .

Schwankt der Luftdruck bei starken Wetteränderungen um  $\pm 25$  mbar, ergibt dies bei einer  $1000\text{-}\mu\text{L}$ -Pipette einen zusätzlichen Unterschied von  $\pm 0,024\%$  und bei der  $50\text{-}\mu\text{L}$ -Pipette von  $\pm 0,056\%$  (Abb. 4). Bei der Überprüfung (Kalibrierung) der Pipetten ist es deshalb wichtig, Luftdruckschwankungen zu berücksichtigen.



## Literatur

- [1] Lochner, K. H.; Ballweg, T.; Fahrenkrog, H.-H.: Untersuchungen zur Messgenauigkeit von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster. In: Lab Med 20 (1996), Nr. 7/8, S. 430–440.  
 [2] Ewald, K.: Dosiersysteme im Labor. München: Verlag Moderne Industrie (2005)

Your local distributor: [www.eppendorf.com/contact](http://www.eppendorf.com/contact)  
 Eppendorf AG · Barkhausenweg 1 · 22331 Hamburg · Germany  
[eppendorf@eppendorf.com](mailto:eppendorf@eppendorf.com) · [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

[www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

Eppendorf® and the Eppendorf Brand Design are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany. U.S. Design Patents are listed on [www.eppendorf.com/ip](http://www.eppendorf.com/ip). All rights reserved, including graphics and images. Order No.: AU021 010/DE3/1T/1017/NW/STEF · Copyright © 2017 by Eppendorf AG.