

Comparación de métodos para verificar el estado de calibración de pipetas Comparison of methods to verify the calibration status of pipettes

A. Rojas-Hernández ^a, D. S. Guzmán-Hernández ^{b,*}, J. Juárez-Gómez ^a, M. T. Ramírez-Silva ^a

^a Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1era Sección, Alcaldía Iztapalapa, 09310, Ciudad de México, México.

^b CONACYT- Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, 09310, Ciudad de México, México.

Resumen

Se lleva a cabo la verificación de calibración de una pipeta graduada de 5.00 mL utilizando dos métodos. De la forma tradicional se obtiene un volumen de calibración de (5.048 ± 0.010) mL, mientras que a partir de la regresión el volumen de calibración es de (5.042 ± 0.012) mL, ambos valores obtenidos al 95% de nivel de confianza. Se compararon estadísticamente los valores con el algoritmo descrito en la bibliografía de Miller y Miller (2010), obteniendo que las incertidumbres son estadísticamente iguales entre los dos métodos; sin embargo, el valor de la media no. Dado que el procedimiento propuesto para calibrar el material volumétrico a partir de la regresión lineal presenta menos fuentes de incertidumbres podríamos concluir que este último puede ser más confiable.

Palabras Clave: calibración, material volumétrico, estadística.

Abstract

Calibration of a 5.00 mL graduated pipette is performed using two methods. In the traditional way, a calibration volume of (5.048 ± 0.010) mL is obtained, while from the regression the calibration volume is (5.042 ± 0.012) mL, both values obtained at the 95% confidence level. The values were statistically compared with the algorithm described in the book of Miller and Miller (2010), obtaining that the uncertainties are statistically equal between the two methods; however, the mean value is not. Given that the proposed procedure to calibrate the volumetric material from linear regression presents fewer sources of uncertainty, we conclude that the latter may be more reliable.

Keywords: calibration, volumetric material, statistics.

1. Introducción

La verificación del estado de calibración de material de vidrio en general es una práctica común en los laboratorios de química analítica, ya sea en la industria, la investigación o la docencia. Motivo por el cual es importante contar con métodos confiables para llevar a cabo una buena práctica de laboratorio al momento de la verificación del estado de calibración, así como también desarrollar una metodología que permita tener datos confiables. Los instrumentos volumétricos deben entonces verificarse para saber con exactitud y precisión qué volumen se está dispensando o se está almacenando, según sea su función en el laboratorio.

En este trabajo se lleva a cabo la verificación del estado de calibración de una pipeta serológica graduada de 5.00 mL por el método tradicional para calibración marcado en la norma ISO 4787 y se propone un segundo método que es llevar a cabo la verificación a partir del tratamiento de datos de una regresión lineal, donde se grafica el volumen de verificación de calibración en función del volumen nominal y, a partir de la ecuación de la recta, se obtiene el volumen verificado. Es importante resaltar que la propagación de incertidumbre a partir del tratamiento de datos de la regresión lineal incorpora el término de covarianza. Lo cual lo hace una propuesta interesante para ser llevado a cabo como una actividad práctica en la enseñanza de laboratorios de química analítica y/o análisis instrumental.

* Autor para la correspondencia: dsguzman@conacyt.mx

Correo electrónico: suemi918@xanum.uam.mx (Alberto Rojas-Hernández), dsguzman@conacyt.mx (Dafne Sarahia Guzmán-Hernández), elinge85@gmail.com (Jorge Juárez-Gómez), mtrs218@xanum.uam.mx (María Teresa Ramírez-Silva).

2. Metodología.

Se utilizó una pipeta serológica graduada de capacidad igual a 5.00 mL y mínima división de la escala igual a 0.1 mL, con tolerancia a 0.2 mL, tipo A. Para pesar se usó una balanza analítica Ohaus Standard con precisión de 0.1 mg y capacidad de 200 g.

Se siguieron dos procedimientos para calibrar la pipeta volumétrica de 5.00 mL.

Procedimiento 1. Es el de la norma ISO 4787:2021 (E) para calibración de material volumétrico. Consiste en tomar 5.00 mL de agua y pesar el volumen de agua dispensado con la pipeta en una balanza analítica. Se anota el valor de la masa correspondiente al volumen que se dispensa, posteriormente se tara la balanza para dispensar los siguientes 5.00 mL de agua. Se toma la medida de 10 valores de masa del volumen dispensado con la pipeta.

Procedimiento 2. Consiste en tomar el valor de la masa dispensado con la pipeta graduada de 5.00 mL de agua, posteriormente se adicionan 5.00 mL de agua sin tarar la balanza, de tal manera que el valor de masa es acumulativo. El procedimiento se repite 10 veces.

Para dispensar el volumen de la pipeta en ambos procedimientos se ejecutó como lo indica el estándar internacional ISO 4787:2021 (E). La descarga en el recipiente receptor tarado se hace mientras la punta del chorro está en contacto con la superficie del recipiente receptor inclinado en un ángulo de unos 30°.

3. Resultados y discusión.

Los resultados del procedimiento 1, siguiendo la norma ISO 4787, se presentan en la Tabla 1. Mediante los valores de masa obtenidos se calcularon los volúmenes de verificación de calibración (V_{cal}) con ayuda de la Ecuación 1, donde el volumen dispensado por una pipeta calibrada a 20°C, midiendo la masa en una balanza analítica a una temperatura dada, es:

$$V_{cal} = m_{al} \left(\frac{1}{d_{agua} - d_{aire}} \right) \left(1 - \frac{d_{aire}}{d_{pesas}} \right) (1 - \gamma(t - 20^\circ C)) = m_{al} V_{esp,corr} \quad (1)$$

Donde: d_{agua} , d_{aire} , d_{pesas} , son las densidades del agua (líquido con el que normalmente se hace la calibración), del aire y del material del que están hechas las pesas de calibración de la balanza (normalmente latón o acero, con $d_{pesas} = 8.73 \text{ g/mL}$). El símbolo γ en el último factor (entre los signos de igualdad de la ecuación 1) es el factor de expansión del material del que está hecho el instrumento de medición de volumen (que tiene un valor del orden de $9 \times 10^{-6} (\text{°C})^{-1}$ para vidrio a base de borosilicatos) y el segundo y tercer factores son correcciones debidas al empuje del aire por hacer las pesadas en ese medio. Finalmente, el segundo, tercero y cuarto factores (en el centro de la Ecuación 1) se asimilan en un solo factor de corrección sobre la densidad del agua (o su volumen específico), que se simboliza como $V_{esp,corr}$.

En la Tabla 2 se observa el volumen específico corregido ($V_{esp,corr}$) a una temperatura dada (T) y 20°C. Estos valores se utilizaron para obtener el V_{cal} .

La densidad del aire (que aparece en la Ecuación 1) depende de la temperatura y se obtiene de ecuaciones como las que se

muestran en el artículo de Davis, R. S. (2008). Para 20°C la densidad del aire seco a una presión de 1 atm sería 0.001204 g/mL. La densidad del aire seco a 1 atm y diferentes temperaturas, en g / mL, se obtiene mediante la Ecuación 2.

Tabla 1: Valores de masa obtenidos en la balanza analítica para cada volumen de alícuota dispensado con la pipeta de 5.00 mL, temperatura, $V_{esp,corr}$ y V_{cal} .

V_{al} / mL	m/g	$T/^\circ\text{C}$	$V_{esp,corr} / \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	V_{cal} / mL
5.00	5.028	26.8	1.0045	5.0506
5.00	5.020	26.8	1.0045	5.0423
5.00	5.029	26.6	1.0045	5.0516
5.00	5.027	26.6	1.0045	5.0496
5.00	5.028	26.6	1.0045	5.0506
5.00	5.029	26.4	1.0042	5.0501
5.00	5.025	26.4	1.0042	5.0461
5.00	5.007	26.2	1.0042	5.0280
5.00	5.046	26.2	1.0042	5.0672
5.00	5.015	26.2	1.0042	5.0361

$$d_{aire} = \frac{0.348444(1013.25)}{1000(273.15+t)} \quad (2)$$

Utilizando los resultados mostrados en la Tabla 1 se lleva a cabo la estadística descriptiva para los cálculos del V_{cal} . Toda la estadística que se presenta en este trabajo se sigue según Miller y Miller (2010). Se construye el intervalo de confianza para el volumen de calibración al 95 % de nivel de significancia, para ello se usa la distribución t -Student, con un valor de $t_{crit(0.05,9)} \approx 2.262$. Por lo que el volumen de calibración que toma en cuenta las 10 mediciones repetidas puede escribirse, de acuerdo con la Ecuación 3. como:

$$\begin{aligned} V_{cal} &= \left(\bar{V}_{cal} \pm t_{crit(0.05,9)} \frac{S_{V_{cal}}}{\sqrt{n}} \right) \\ &\approx \left(5.0475 \pm 2.262 \frac{0.0103}{\sqrt{10}} \right) \text{mL} \\ &= (5.0475 \pm 0.0074) \text{mL} \end{aligned} \quad (3)$$

Para llevar a cabo la comparación estadística del estimador del valor promedio obtenido con respecto al valor de referencia dado por el fabricante de $(5.00 \pm 0.05) \text{ mL}$ siguiendo la Ecuación 4.

$$\begin{aligned} t_{calc} &= \frac{|\bar{V}_{cal} - V_{ref}|}{S_{V_{cal}}} \sqrt{n} \approx \frac{|5.0475 - 5.00|}{0.0103} \sqrt{10} = 14.523 \\ &> 2.262 = t_{crit(0.05,9)} \end{aligned} \quad (4)$$

Como se muestra en la Ecuación 4 la t_{calc} es mayor que la t_{crit} por lo que se rechaza la hipótesis nula de que son iguales y se puede decir que el volumen que la pipeta dispensa ya no es igual a 5.00 mL, sino a $(5.0475 \pm 0.0074) \text{ mL}$ con un 95 % de nivel de significancia.

En la Tabla 3 se presentan los valores de masa obtenidos para la calibración de la pipeta graduada de 5.00 mL siguiendo el segundo procedimiento donde el valor de la masa es acumulativo

Tabla 2: Densidades y volúmenes de 1.0000 g de agua a la temperatura T y a 20°C.

T (°C)	d _{agua} (g/mL)	Volumen de 1.00 g de agua (mL)	
		(Ecuaciones 1 y 2)	
		V _{esp,corr a T*}	V _{esp,corr a 20°C**}
10	0.9997	1.0014	1.0015
11	0.99961	1.0015	1.0016
12	0.9995	1.0016	1.0017
13	0.99938	1.0017	1.0018
14	0.99925	1.0018	1.0019
15	0.9991	1.002	1.002
16	0.99895	1.0021	1.0021
17	0.99878	1.0023	1.0023
18	0.9986	1.0025	1.0025
19	0.99841	1.0027	1.0027
20	0.99821	1.0029	1.0029
21	0.998	1.0031	1.0031
22	0.99777	1.0033	1.0033
23	0.99754	1.0035	1.0035
24	0.9973	1.0038	1.0038
25	0.99705	1.0040	1.0040
26	0.99679	1.0043	1.0042
27	0.99652	1.0045	1.0045
28	0.99624	1.0048	1.0047
29	0.99595	1.0051	1.005
30	0.99565	1.0054	1.0053

* sólo se usa la corrección por el empuje del aire, que está a la misma temperatura de la medición en la Ecuación 1

** se usan la corrección por el empuje del aire y la expansión del material del que está hecho el material volumétrico, referido a 20°C.

De la Tabla 3 se obtiene un gráfico de V_{cal} en función del V_{nominal} = V_{nom} (ver Figura 1), y se lleva a cabo la regresión lineal de los datos para ver si se puede verificar que la ordenada al origen es igual a 0 y la pendiente es igual a 1.

La ecuación de la recta de la Figura 1 sería:

$$\hat{y} = \hat{m}x + \hat{b}; \text{ o bien, } V_{cal} = \hat{m}V_{nom} + \hat{b} \quad (5)$$

donde x se identifica con V_{nom} y y con V_{cal} (ver Figura 1).

Los estimadores de la pendiente (\hat{m}) y de la ordenada al origen (\hat{b}) de la regresión pueden calcularse a partir del Conjunto de Ecuaciones 6:

$$\begin{aligned} \bar{x} &= \frac{\sum_{i=1}^{10}(x_i)}{10} =; \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{10}(y_i)}{10}; \\ \bar{x} &= \frac{\sum_{i=1}^{10}(x_i)}{10} = 27.5 \text{ mL}; \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^{10}(y_i)}{10} = 27.66168 \text{ mL} \\ S_{xx} &= \sum_{i=1}^{10} (x_i - \bar{x})^2 = 2062.5 \text{ mL}^2; \\ S_{xy} &= \sum_{i=1}^{10} (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 2073.5085 \text{ mL}^2 \\ \hat{m} &= \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \approx 1.0533745; \hat{b} = \bar{y} - \hat{m}\bar{x} \approx 0.0149 \text{ mL} \quad (6) \end{aligned}$$

Tabla 3: Mediciones de masa (m_{nom}) correspondientes a volúmenes nominales acumulados (V_{nom}) tomados con la pipeta graduada de 5.00 mL, de acuerdo con el procedimiento 2.

V _{nom} /mL*	m/g	T/°C	V _{esp,corr} /mL·g ⁻¹	V _{cal} /mL
5	5.005	26.4	1.0042	5.0260
10	10.011	26.4	1.0042	10.0530
15	15.026	26.4	1.0042	15.0891
20	20.050	25.8	1.0042	20.1342
25	25.070	25.8	1.0042	25.1753
30	30.096	25.6	1.0042	30.2224
35	35.035	25.8	1.0042	35.1821
40	40.046	25.8	1.0042	40.2142
45	45.057	26.0	1.0042	45.2462
50	50.064	26.0	1.0042	50.2743

* el volumen en esta columna es el volumen acumulado de las alícuotas en el vaso utilizado para recibirlas

Aplicando ahora la ecuación de la recta con fines de la verificación de calibración de la pipeta volumétrica de 5.00 mL se puede escribir:

$$\begin{aligned} V_{cal(5)} &= \hat{m}V_{nom(5)} + \hat{b} \approx \\ &\approx 1.0053374(5.00\text{mL}) + 0.0149\text{mL} \approx 5.042 \text{ mL} \quad (7) \end{aligned}$$

Como la medición del volumen de calibración en este segundo procedimiento es indirecta, la desviación estándar de V_{cal} debe obtenerse con base en la expresión algebraica de la incertidumbre combinada, o la propagación de incertidumbre:

$$s_{V_{cal}}^2 = \left(\frac{\partial V_{cal}}{\partial \hat{m}}\right)^2 s_{\hat{m}}^2 + \left(\frac{\partial V_{cal}}{\partial \hat{b}}\right)^2 s_{\hat{b}}^2 + 2\left(\frac{\partial V_{cal}}{\partial \hat{m}}\right)\left(\frac{\partial V_{cal}}{\partial \hat{b}}\right) s_{\hat{m}\hat{b}} \quad (8)$$

donde s_{m̂b̂} es la covarianza de la pendiente y la ordenada al origen, que no se anula porque son parámetros correlacionados al obtenerse del mismo conjunto de datos. Usando su expresión algebraica se calcula en el Conjunto de Ecuaciones 9:

$$\begin{aligned} s_{\hat{m}\hat{b}} &= -\frac{\bar{x}(s_y)^2}{S_{xx}} \approx -7.27 \times 10^{-6} \text{ mL}^2; \\ s_y &= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10}(y_i - \bar{y})^2}{n-2}} \approx 0.02334708 \text{ mL}; ; \\ s_{\hat{m}} &= \frac{s_y}{\sqrt{S_{xx}}} \approx 0.00051; s_{\hat{b}} = s_y \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10}(x_i^2)}{10S_{xx}}} \approx 0.0159 \text{ mL} \quad (9) \end{aligned}$$

Así, para conocer la desviación estándar del volumen calibrado (V_{cal}) se necesita establecer las derivadas parciales en la Ecuación 8, determinadas a partir de la Ecuación 5. Así se obtienen los valores de la Ecuación 10.

$$\frac{\partial V_{cal}}{\partial \bar{m}} = V_{nom} \quad y \quad \frac{\partial V_{cal}}{\partial b} = 1 \quad (10)$$

Sustituyendo los valores del Conjunto de Ecuaciones 9 y la Ecuación 10 en la Ecuación 8, se obtiene la varianza del volumen de calibración para el volumen nominal de 5.00 mL ($s_{V_{cal(5)}}^2$) en la Ecuación 11.

$$s_{V_{cal(5)}}^2 \approx (5 \text{ mL})^2(0.00051)^2 + (1)^2(0.0159 \text{ mL})^2 + 2(5 \text{ mL})(1)(-7.27 \times 10^{-6} \text{ mL}) \approx 1.87 \times 10^{-4} \text{ mL}^2 \quad (11)$$

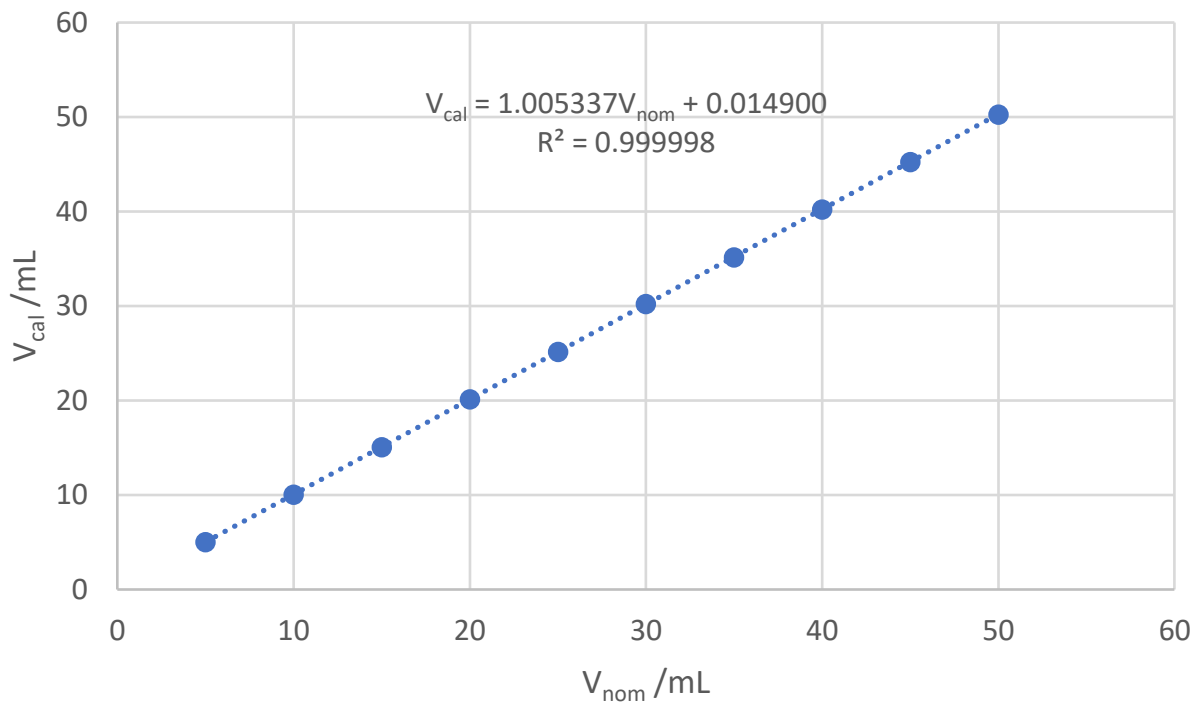


Figura 1: Gráfico del volumen de verificación de la calibración (V_{cal}) como función del volumen nominal (V_{nom}).

La desviación estándar del volumen de calibración para el volumen nominal de 5.00 mL ($s_{V_{cal(5)}}$) se encuentra a partir de la Ecuación 11, de manera que:

$$s_{V_{cal(5)}} \approx \sqrt{1.87 \times 10^{-4} \text{ mL}^2} \approx 0.014 \text{ mL} \quad (12)$$

Finalmente, el volumen de calibración para el volumen nominal de 5.00 mL, obtenido mediante el procedimiento 2, se muestra en la Ecuación 13.

$$V_{cal(5)} = (5.042 \pm 0.014) \text{ mL} \quad (13)$$

Para construir el intervalo de confianza al 95 % de nivel de significancia se usa la distribución t -Student, con un valor de $t_{crit(0.05,8)} \approx 2.306$. Por lo que el volumen de calibración que toma en cuenta los 10 puntos de la recta de regresión se tiene:

$t_{crit(0.05,8)} \approx 2.306$. Por lo que el volumen de calibración que toma en cuenta los 10 puntos de la recta de regresión se tiene:

$$V_{cal} = \left(V_{cal} \pm t_{crit(0.05,8)} \frac{S_{V_{cal}}}{\sqrt{n}} \right) \approx \left(5.042 \pm 2.306 \frac{0.014}{\sqrt{10}} \right) = (5.042 \pm 0.010) \text{ mL} \quad (14)$$

Para llevar a cabo la comparación estadística del estimador del valor promedio obtenido con respecto al valor de referencia de 5.00 mL se sigue la Ecuación 15.

$$t_{calc} = \frac{|\bar{V}_{cal} - V_{ref}|}{S_{V_{cal}}} \sqrt{n} \approx \frac{|5.042 - 5.000|}{0.014} \sqrt{10} = 9.487 > 2.306 = t_{crit(0.05,8)} \quad (15)$$

Ya que en la Ecuación 15 la $t_{calc} > t_{crit}$, se rechaza la hipótesis nula de que son iguales y se puede decir que el volumen que esa pipeta dispensa ya no es igual a 5.00 mL, sino a $(5.042 \pm 0.010) \text{ mL}$ con un 95 % de nivel de significancia.

En la Tabla 4 se presentan los parámetros V_{cal} , desviación estándar del volumen verificado ($s_{V_{cal}}$), número de repeticiones para cada procedimiento y el número de grados de libertad obtenido con la finalidad de llevar a cabo la comparación estadística del volumen de calibración obtenido con los dos procedimientos.

Tabla 4: Comparación de parámetros estadísticos obtenidos por los procedimientos 1 y 2 para la verificación del estado de calibración de una pipeta de 5.00 mL.

Parámetro	Procedimiento 1	Procedimiento 2
\bar{V}_{cal}/mL	5.0475	5.042
$s_{V_{cal}}/mL$	0.0074	0.014
número de repeticiones (n)	10	10
número de grados de libertad	9	8

Así para comparar si las desviaciones estándar (precisión) de cada procedimiento de verificación de calibración son iguales se sigue la Ecuación 16.

$$F_{calc} = \frac{(s_{V_{cal2}})^2}{(s_{V_{cal1}})^2} = \frac{(0.014)^2}{(0.0074)^2} \approx 3.579 < 4.357 \approx F_{crit(0.05,9,8)} \quad (16)$$

De la Ecuación 16 se obtiene que $F_{calc} < F_{crit}$, por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de que las desviaciones estándar de ambos procedimientos sean iguales.

Para comparar las medias (exactitud) de ambos procedimientos de calibración cuando las desviaciones estándar de cada procedimiento de verificación son iguales, se sigue el Conjunto de Expresiones 17, donde para obtener la desviación estándar se utiliza la desviación combinada s_{comb} , la cual incluye el número de grados de libertad combinado v_{comb} .

$$v_{comb} = v_1 + v_2 = 9 + 8 = 17$$

$$s_{comb} = \sqrt{\frac{(s_{V_{cal1}})^2 v_1 + (s_{V_{cal2}})^2 v_2}{v_{comb}}} \approx \sqrt{\frac{(0.0074)^2(9) + (0.014)^2(8)}{17}} \text{ mL} = 0.1025 \text{ mL}$$

$$t_{calc} = \frac{|\bar{V}_{cal1} - \bar{V}_{cal2}|}{s_{comb}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \approx \frac{|5.0475 - 5.042|}{0.0110} \sqrt{\frac{10(10)}{10 + 10}} = 1.118 < 2.11 = t_{crit(0.05,17)} \quad (17)$$

Del Conjunto de Expresiones 17 se obtiene que $t_{calc} < t_{crit}$, por lo que se acepta la hipótesis nula de que los valores de volumen de calibración obtenidos con los dos procedimientos son iguales con un 95 % de nivel de significancia.

4. Conclusiones

Se presenta un método alternativo para la verificación del estado de calibración de pipetas (procedimiento 2) el cual, si bien estadísticamente no presenta diferencias al 95 % de nivel de significancia en los valores de V_{cal} obtenido (con respecto del procedimiento común (procedimiento 1)), presenta menos fuentes de incertidumbre por lo que se podría concluir que es más confiable. Desde el punto de vista de la docencia, es una buena práctica para el aprendizaje de la química analítica, debido a que no sólo deben seguirse buenas prácticas de laboratorio al verificar la calibración de material de vidrio, sino también al llevar los cálculos estadísticos que les permite justificar –de manera adecuada– sus resultados obtenidos. Cabe resaltar que, para el cálculo de la desviación estándar por medio del segundo procedimiento, deben incluir el término de la covarianza que, junto con el método de adiciones estándar (Bruce & Gill, 1999), es uno de los pocos ejemplos prácticos en que forzosamente se aplica este término.

Agradecimientos

DSGH y MTRS agradecen a CONACYT por la cátedra 2159. ARH, DSGH, JIG, y MTRS agradecen al SNI por la distinción otorgada. MTRS agradece a la DCBI de la UAM-Iztapalapa por el año sabático concedido.

Referencias

- Bruce, G.R., Gill, P.S., (1999). Estimates of precision in a standard additions analysis. *Journal of Chemical Education*. 76 (6) 805-807. DOI: 10.1021/ed076p805
- Picard, A., Davis, R. S., Gläser M., Fujii, K., (2008). Revised formula for the density of moist air (CIPM-2007). *Metrologia*, 45, 149-155. DOI: 10.1088/0026-1394/45/2/004
- ISO 4787:2021 Laboratory glass and plastic ware — Volumetric instruments — Methods for testing of capacity and for use. Geneva. <https://www.iso.org/standard/74926.html>
- Miller J, Miller J. (2010), *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson, London. ISBN: 978-0-273-73042-2