

Die Spitze des Eisbergs: Wie Pipettenspitzen das Versuchsergebnis beeinflussen. Teil 1: Spitzensitz garantiert keine Genauigkeit

MURIEL ART, VINCENT DUFÉY, IOAN GLIGOR, EPPENDORF APPLICATION TECHNOLOGIES S.A., NAMUR, BELGIEN
 ULRIKE GAST, RONJA KUBASCH, EPPENDORF AG, HAMBURG

Zusammenfassung

Die Tatsache, dass Pipettenspitzen auf einen Pipettenkonus passen, lässt keine Rückschlüsse auf die Pipettiergenauigkeit des Systems „Pipette und Spitze“ zu. Um den Einfluss von Pipettenspitzen auf das Dosierergebnis zu ermitteln, wurde eine Studie mit Standardspitzen von 15 Wettbewerbern durchgeführt. Dabei zeigte sich ein dramatischer Einfluss der Spitzen auf das Pipettierergebnis.

Die Norm ISO 8655:2002 [1] empfiehlt, Pipette und Spitze vom selben Hersteller zu verwenden. Unsere Untersuchungsergebnisse belegen die Richtigkeit dieser Empfehlung sowie die Notwendigkeit einer Kalibrierung und gegebenenfalls Justierung, wenn Spitzen anderer Hersteller verwendet werden.

Einleitung

Viele wissenschaftliche Veröffentlichungen können durch andere Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden. Im Allgemeinen wird den im Labor verwendeten Plastikartikeln („Consumables“), wie Pipettenspitzen oder Reaktionsgefäßen, nur wenig Beachtung geschenkt. Die Folge sind durch z.B. inkorrekte Pipettier volumina oder durch Leachables beeinflusste Analyseergebnisse. Dies kann dazu führen, dass Ergebnisse durch andere Arbeitsgruppen, die andere Consumables verwenden, nicht reproduziert werden können.

Bezogen auf die Pipettenspitzen sind einige Probleme offensichtlich, z.B. die Notwendigkeit, Spitzen mit viel Druck aufzustecken, um einen dichten Sitz zu gewährleisten. Andere hingegen bleiben häufig unerkannt, wie z.B. eine verringerte Pipettiergenauigkeit bei Verwendung anderer als der vom Pipettenhersteller empfohlenen Spitzen.

Die ISO 8655:2002 [1] beschreibt Pipette und Spitze als ein System, das eine zusätzliche Kalibrierung benötigt, wenn Spitzen anderer Hersteller verwendet werden sollen. Aber warum legt diese Norm einen so starken Fokus auf ein Produkt, das nach jeder Verwendung entsorgt wird? Die vorliegende Beitragsreihe beantwortet diese Frage. Sie zeigt, dass Pipettenspitzen einen erheblichen Einfluss auf das Dosierergebnis haben, und benennt die wichtigsten Spitzen-seitigen Einflussfaktoren.

Material und Methoden

Allgemeine Materialien

Die Pipetten Eppendorf Xplorer® plus 50–1.000 µL und 0,5–10 µL wurden für die Kalibrierung gesteckter Standardspitzen (10 µL und 1.000 µL) von Eppendorf und 14 anderen Herstellern verwendet. Ausnahmen: Anbieter H bot keine gesteckten 10 µL Standardspitzen an, bei den Herstellern K und N waren nur 1.250 µL Standardspitzen für 1.000 µL Pipetten erhältlich.

Kalibrierung nach gravimetrischem Prüfverfahren

Die Leistungsfähigkeit des Systems „Pipette und Spitze“ wurde durch Kalibrierung gemäß [1] bestimmt, unter Berücksichtigung der unter [1] geforderten Umgebungsbedingungen.

Die Kalibrierung erfolgte unter Verwendung der Analysenwaage XP26PC (Mettler-Toledo®) bei 100 % und 10 % des Nennvolumens, mit je zwei Serien von 10 Pipettierungen. Aus den Messergebnissen wurde die systematische und zufällige Messabweichung bestimmt und mit den nach [1] und [2] zulässigen Grenzwerten verglichen. Für detaillierte Informationen siehe [3].

Ergebnisse und Diskussion

Während das System „Pipette und Spitze“ mit Eppendorf-Spitzen innerhalb der Herstellertoleranzen lag, wurden diese Grenzwerte bei Verwendung von Spitzen anderer Hersteller nicht in allen Fällen eingehalten. Wie in Abb. 1 und 2 dargestellt, wurde das Limit der systematischen Messabweichung bei 1.000 µL bei den Tips von 4 Herstellern und bei 1 µL bei den Tips von 5 Herstellern überschritten. Beachtenswert ist, dass bei 1.000 µL nicht nur die Herstellertoleranzen überschritten wurden, sondern auch die (deutlich größere) maximal zulässige systematische Messabweichung gemäß ISO 8655:2002 [1].

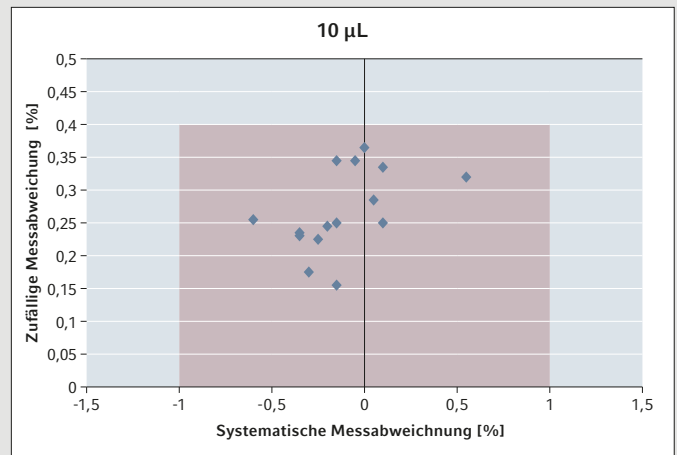
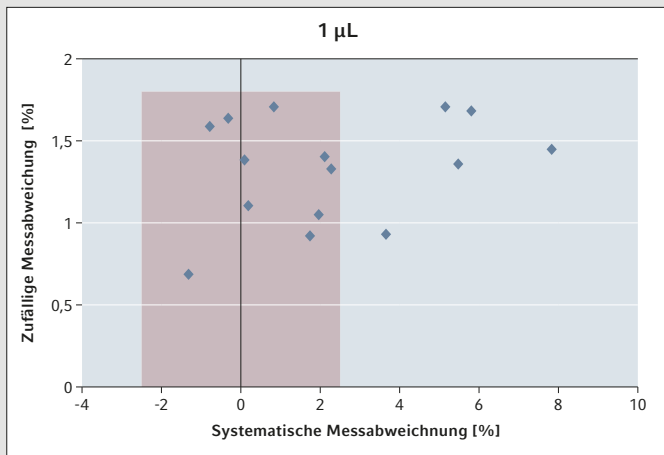


Abb. 1: Kalibrierergebnisse mit 10 µL Spitzen verschiedener Hersteller. Die rosa gefärbte Fläche gibt die Breite der Herstellertoleranzen für das System „Pipette und Spitze“ wieder. Alle Datenpunkte innerhalb dieser Fläche lagen innerhalb der Grenzwerte.

Die Spitze des Eisbergs: Wie Pipettenspitzen das Versuchsergebnis beeinflussen. Teil 1: Spitzensitz garantiert keine Genauigkeit

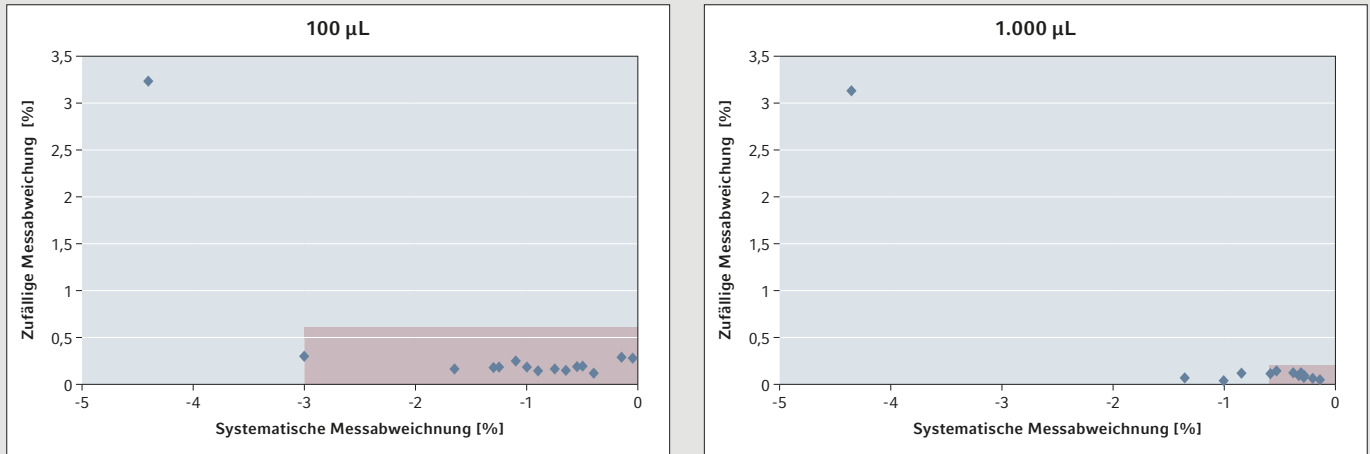


Abb. 2: Kalibrierergebnisse mit 1.000 µL Spitzen verschiedener Hersteller. Die rosa gefärbte Fläche gibt die Breite der Herstellertoleranzen für das System „Pipette und Spitze“ wieder. Alle Datenpunkte innerhalb dieser Fläche lagen innerhalb der Grenzwerte.

Die zufällige Messabweichung war in diesen Fällen jeweils erhöht, lag jedoch innerhalb der zulässigen Grenzwerte.

Werden die Kalibrierergebnisse mit Ergebnissen der Dimensionsbestimmung [3] verglichen, wird klar, dass bei den 1.000 µL Spitzen das Luftpolstervolumen der größte Einflussfaktor ist: Die Spitzen, die die Leistungsfähigkeit des Systems außerhalb der Grenzwerte verschoben haben, wiesen bei vergleichbarem inneren Durchmesser die größte Länge auf – und damit das größte Luftpolster. Da Luftpolsterpipetten vom Hersteller auf eine bestimmte Luftpolstergröße justiert werden, hat eine Vergrößerung des Luftpolsters vor allem bei größeren Nominalvolumina einen negativen Effekt auf die Pipettiergenauigkeit.

Dieser Zusammenhang ist Pipetten-unabhängig, die Kalibrierung wurde auf einer Pipette eines anderen Herstellers wiederholt und die Ergebnisse reproduziert (nicht dargestellt).

Im Gegensatz zu den Erkenntnissen bei 1.000 µL Spitzen spielt der Einflussfaktor „Luftpolstergröße“ bei 10 µL Spitzen eine untergeordnete Rolle. Hier sind andere Einflussfaktoren, wie die Geometrie und Qualität der Spitzenöffnung, wichtiger. Diese Einflussfaktoren werden in der nächsten Ausgabe der BioNews sowie in [3] detailliert beleuchtet.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass Vorsicht geboten ist, wenn Spitzen verwendet werden sollen, deren Design sich von den empfohlenen Spitzen unter-

scheidet. Verlängerte Spitzen sind ein Beispiel. Die Eppendorf-Bedienungsanleitung weist in entsprechenden Fällen auf die Notwendigkeit einer Justierung der Pipette hin. Im Falle der Verwendung einer manuellen Pipette ist dies im Rahmen der Anwenderjustierung einfach umzusetzen. Noch bequemer ist die Justierung bei der elektronischen Xplorer-Pipette durch einfache Auswahl der Spitze im Menü. Die meisten Nicht-Systemanbieter informieren über die Passfähigkeit ihrer Pipettenspitzen auf unterschiedlichen Pipetten.

Der Anwender sollte jedoch bedenken, dass die Information bezüglich der Passfähigkeit einer Spitze keine Aussage über die Genauigkeit des Pipettiersystems ermöglicht. Es obliegt dem Anwender, durch Kalibrierung zu überprüfen, ob das Pipettiersystem innerhalb zulässiger Grenzwerte arbeitet.

Diese Erkenntnis wird durch die Norm [1] bestätigt, die generell die Verwendung der vom Pipettenhersteller empfohlenen Spitzen befürwortet. Sollte dies nicht möglich sein, fordert diese Norm: 1. eine Kalibrierung mit den empfohlenen Spitzen („Konformitätsprüfung“ um sicherzustellen, dass das System in Ordnung ist) und 2. eine Kalibrierung mit den nicht empfohlenen Spitzen.

Fazit

Dass eine Spitze physisch auf eine Pipette passt, heißt nicht, dass das Pipettiersystem innerhalb der zulässigen Grenz-

werte arbeitet. Wir haben für 1.000 µL und 10 µL gezeigt, dass die Leistungsfähigkeit des Systems durch die Pipettenspitze deutlich beeinflusst werden kann.

Pipetten werden vom Hersteller auf eine bestimmte Luftpolstergröße justiert. Das Design von Spitzen beeinflusst jedoch die Luftpolstergröße direkt. Besonders bei größeren Volumina wie 1.000 µL ist dieser Faktor so einflussreich, dass die Pipettiergenauigkeit beeinträchtigt wird. Bei kleinen Volumina treten andere Einflussfaktoren in den Vordergrund, die in der nächsten Ausgabe der BioNews dargestellt und diskutiert werden.

Literatur

[1] DIN EN ISO 8655:2002, Teile 1, 2, 6. Volumenmessgeräte mit Hubkolben. Beuth-Verlag, Berlin.

[2] Eppendorf Xplorer® plus Bedienungsanleitung. www.eppendorf.com/manuals

[3] Application Note No. 354: The tip of the iceberg: How pipette tips influence results. www.eppendorf.com/applications

Leserservice

Eppendorf Liquid-Handling-Verbrauchsartikel • Kennziffer 288