

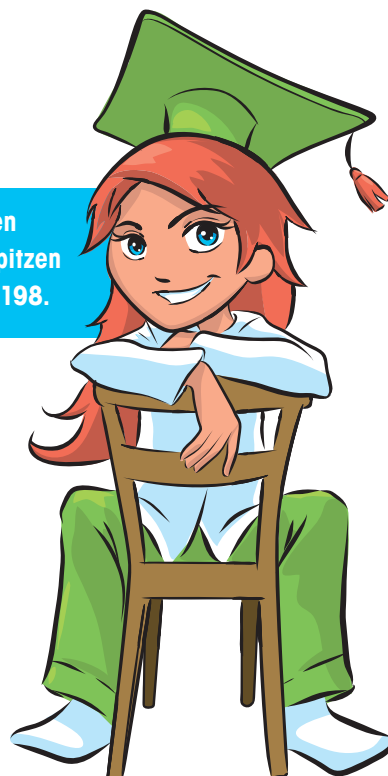
# Die Pipette

## Dosier- und Volumenmessgerät

**Die Pipette** ist das Instrument zum Dosieren von kleinen bis sehr kleinen Volumina, wobei keine Verbindungen zu Vorratsgefäßen besteht.

**Pipettieren** ist eine Methode, um das bestimmte Volumen einer Flüssigkeit von einem Behälter in einen anderen mit höchster Genauigkeit und Präzision zu transferieren. Pipetten arbeiten nach dem Verdrängungsprinzip. Ein beweglicher Kolben verdrängt beim Herunterdrücken die unter ihm liegende Luftsäule bzw. zieht die Luftsäule bei der Aufwärtsbewegung mit sich nach oben. Dadurch wird die zu pipettierende Flüssigkeit in die aufgesteckte Pipettenspitze befördert.

Alles zu unseren  
Pipetten und Spitzen  
gibt's ab Seite 198.

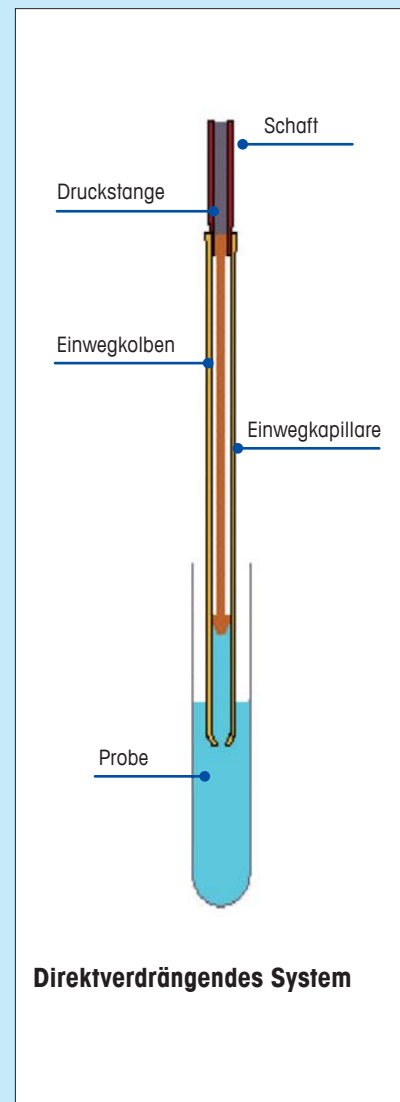
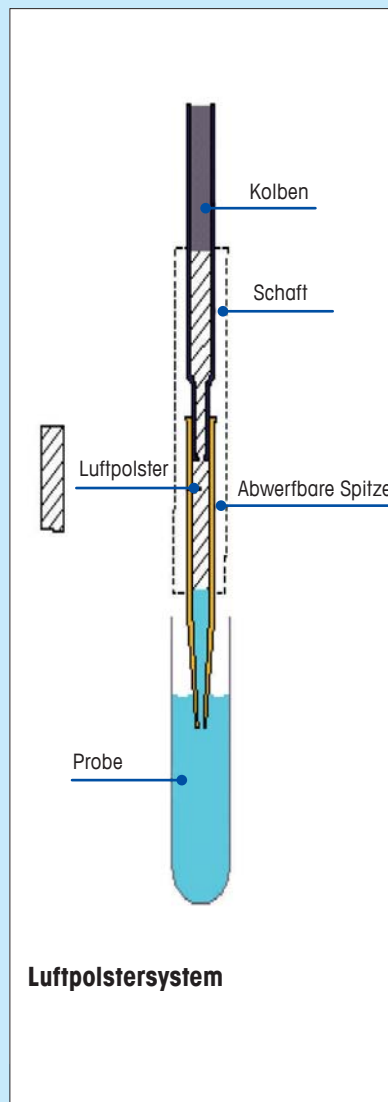


## Luftpolstersystem

Pipetten, die nach dem Prinzip des Luftpolstersystems arbeiten, sind für wässrige, dünnflüssige Lösungen geeignet. Der Kolben ist fester Bestandteil der Pipette.

## Direktverdrängendes System

Pipetten, die nach dem Prinzip der Direktverdrängung arbeiten, benötigen spezielle Pipettenspitzen mit einem eingebauten Kolben, der direkt mit dem Medium in Kontakt kommt und kein fester Bestandteil der Pipette ist. Hierdurch ist das Pipettieren von stark viskosen Lösungen, flüchtigen, radioaktiven oder korrosiven Proben möglich. Durch das Direktverdrängungsprinzip wird mittels Einwegkapillare und -kolben jegliche Kreuzkontamination durch Aerosole, Proben oder der Pipette selbst verhindert.



Pipetten gibt es mit fest eingestelltem oder variablem, einstellbarem Volumen. Man unterscheidet zwischen manuellen Ein- und Mehrkanal- sowie elektronisch gesteuerten Ein- und Mehrkanalpipetten. Die Auswahl der richtigen Pipette ist durch den Anwendungsbereich sowie das Pipettierverhalten bedingt. Manuelles, regelmäßiges Pipettieren erfordert Kraftaufwand durch die aufzubringenden Kolben- und Spitzenabwurfkräfte.

Mehrkanalpipetten verfügen über 8 oder 12 gleichzeitig betriebene Kanäle. Die Kanäle sind im Raster von Mikrotiterplatten (8 Reihen mal 12 Spalten) angeordnet, sodass sich diese schnell bearbeiten lassen. Elektronische Pipetten sind besonders für repetitive Arbeiten geeignet, da sie die Dauerbelastung der Hand auf ein Minimum reduzieren und ultimative Präzision gewährleisten können.



## Spitzenabwurfssysteme

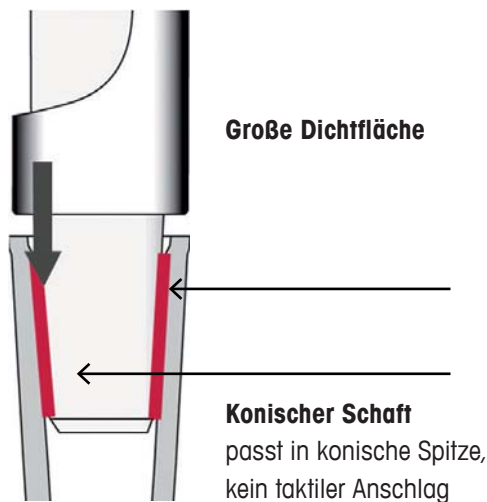
### Traditioneller Schaft Tips und Schaft sind konisch

- **Undefinierte Dichtungsfläche**
- **Dickwandige Tips**
- **Hohe Abwurfkräfte**
  - Aufstecken mit ganzem Arm
  - Abwurf mit Daumenkraft

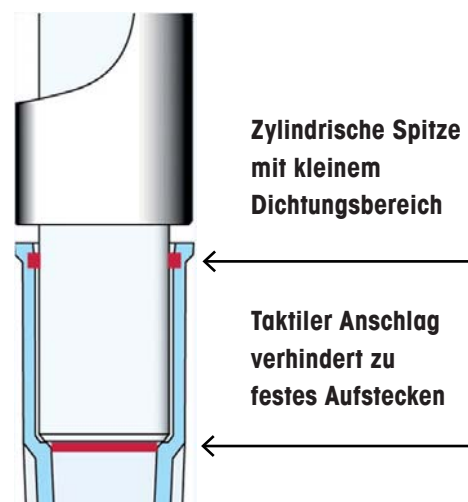
### Lite Touch Tip-Abwurf-System (LTS™) Effizienz durch zylindrische Tips und Schäfte

- **Effizient definierte Abdichtung**
  - Sicherheit bei kleinen Volumina
- **Tip-Anschlagring**
  - Geringe Abwurfkräfte

#### Traditioneller Schaft Typische herkömmliche Spitzenabwurfkräfte



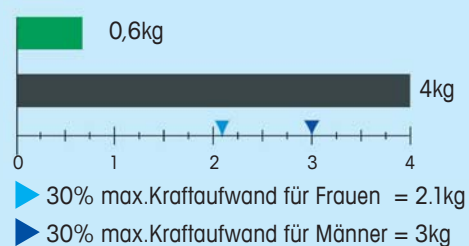
#### Zylindrisches LTS- Schaft-/Spitzensystem



### Spitzenabwurfkräfte

Zylindrisches LTS-Spitzen-  
und Schaftdesign  
Herkömmliches konisches  
Spitzen- und Schaftdesign

**Daumenkräfte (kg)**  
(empfohlen)

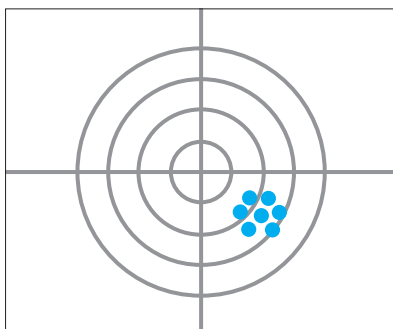


# Pipettierqualität

## Richtigkeit Systematische Messabweichung\*

ist die Abweichung des dosierten Volumens vom Nennvolumen o. vom gewählten Volumen.

\*ISO/FDIS 8655

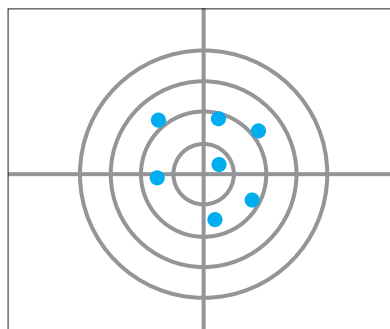


präzise, aber nicht richtig

## Präzision Zufällige Messabweichung\*

ist die Streuung der dosierten Volumina um den Mittelwert der dosierten Volumina.

\*ISO/FDIS 8655



richtig, aber nicht präzise



richtig und präzise

### Richtigkeit:

Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert sollte ca. 1% nicht überschreiten.

### Präzision:

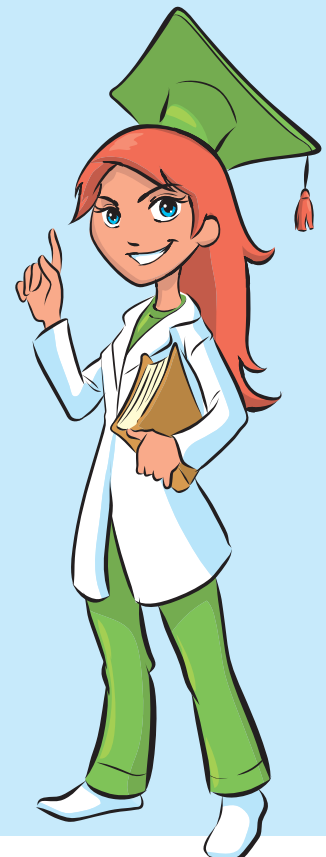
Streuung einzelner Messwerte um den Mittelpunkt sollte ca. 0,5% nicht überschreiten.

## Toleranzen nach DIN/EN/ISO 8655

Nennvolumen $\mu\text{l}$	Fehlergrenzen für syst. Messabweichung +/-		zufäll. Messabweichung +/-		
	%	$\mu\text{l}$	%	+/-	$\mu\text{l}$
2	4,0	0,08	2,0		0,04
10	1,2	0,12	0,8		0,008
200	0,8	1,6	0,3		0,6
1000	0,8	8,0	0,3		3,0

### ■ Für Mehrkanalpipetten gelten verdoppelte Fehlertoleranzen

Die auf das Nennvolumen bezogenen Fehlergrenzen gelten für das gesamte Nutzvolumen der Pipette, d.h., bei einem Nutzbereich von 10–100  $\mu\text{l}$  beträgt die Fehlergrenze für die system. Messabweichung +/- 0,8  $\mu\text{l}$  bei jedem gemessenen Volumen.



## Pipettenspitzen

Pipetten besitzen auswechselbare Kunststoffpipettenspitzen und eignen sich ideal für Arbeiten mit häufig wechselnden Proben oder Substanzkonzentrationen.

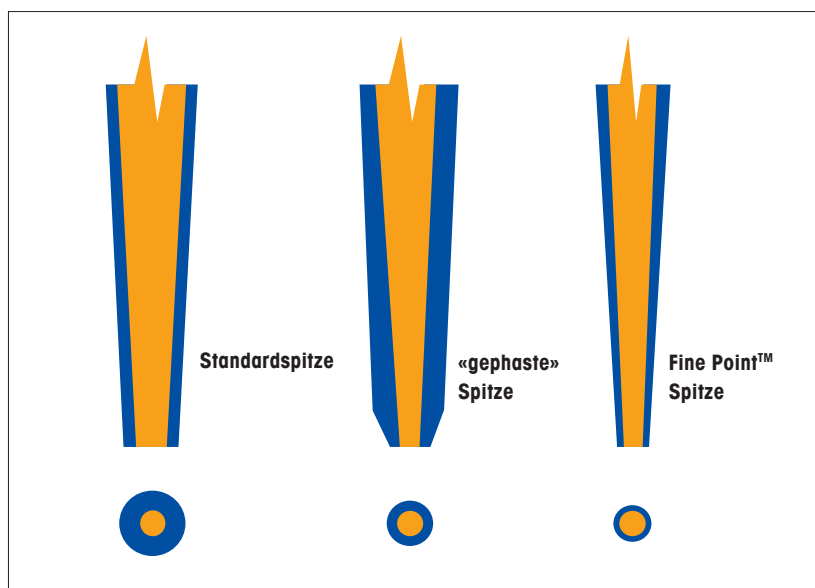
Die Wahl der Pipettenspitze entscheidet über das Messergebnis. Besonders in der Life-Science-Forschung muss für die Spitzenherstellung hochreines Polypropylen verwendet werden. Das Material muss frei von

jedlichen bioaktiven Bestandteilen sein, um Messergebnisse nicht negativ zu beeinflussen. Spitzen, die mit Proben in Kontakt kommen, müssen frei von RNase, DNase, Pyrogen und Adenosinriphosphat (ATP) sein. Die Auswahl des Rohstoffes, die Produktion unter Reinraumbedingungen sowie umfangreiche Prüfungen in jedem Prozessstadium sprechen für die Qualität der Spitze.

### Folgende Spitzenarten sind erhältlich:

- nicht steril
- steril (durch Bestrahlung)
- Filterspitze
- DNase- RNase-frei (Schutz für DNA und RNA)
- DNA- RNA-frei (wichtig für PCR)
- Pyrogenfrei (leicht entzündlich)
- ATP-frei (wichtig für Pyrogentests)

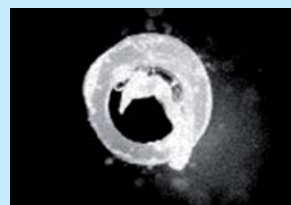
## Spitzenformen



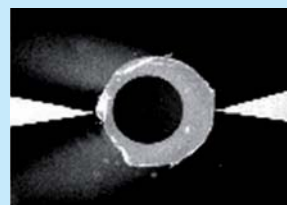
Die Spitzenqualität ist ebenso stark von der Oberflächenbeschaffenheit abhängig. Eine raue Oberfläche, eine unregelmäßige Öffnung, überschüssiges Plastikmaterial oder Materialablagerungen beeinträchtigen die Präzision erheblich.



Qualitätsspitze



Materialeinlagerung im Querschnitt



Koaxiale Verformung



Fehlerhafter Spritzvorgang

## Typische Kontamination der Spitzen

### Durch Prozesskontamination:

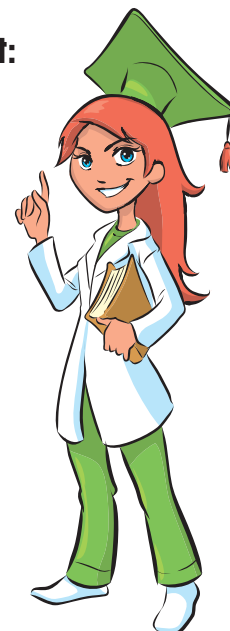
#### ■ Vom Schmelz-/Spritzprozess

- Trennmittel
- Detergent
- Metalle

### Kontamination aus der Luft:

#### ■ Vom Verpackungsprozess

- Menschlich (bakteriell), Pilze, Viren
  - DNA
  - DNase, RNase
  - Pyrogene



## Typische Kontaminationen und ihre möglichen Auswirkungen

Kontamination	Molekül	Quelle	Auswirkung	Ergebnis
DNase	Enzyme	Menschlicher Kontakt, Speichel	Zerlegt DNA	Zerlegt DNA in kleine Fragmente. Kann falsche positive und/oder falsche negative Resultate produzieren.
RNase	Enzyme	Menschlicher Kontakt, Öle von Händen, vom Gesicht, von Armen und vom Haar	Zerstört RNA	RNA existiert nur kurz, RNase zerlegt RNA – falsche negative Resultate.
DNA	Nucleinsäure	Alle lebenden Organismen	Fügt DNA zur Reaktion hinzu	Kann falsche positive und/oder falsche negative Resultate produzieren.
Pyrogen	Lipo-polysaccharid	Zellwand-Toxin von Bakterien, aus Luft, Wasser, Erde und menschlichem Kontakt	Fügt Toxin zur Reaktion hinzu	Toxin kann einzelne Zellen blockieren, v.a. in cell based assays.
ATP (Adenosine triphosphate)	Nucleotid	Alle lebenden Organismen	Fügt ATP zur Reaktion hinzu	ATP-Kontamination gibt falsche positive Resultate in Kinase und kann übermäßig ATP zu PCR-Reaktionen hinzufügen.
Spuremetalle	Metall	Originale Polymere, Fabrikation/Formpressen	Hemmt Enzym-Reaktionen	Kann spezifische Enzyme blockieren und negative Resultate produzieren.
Organische Spurenelemente	Verschiedene organische Stoffe	Fabrikationsprozess	Hemmt spezifische Reaktionen	Kann ein spezifisches Enzym blockieren und falsche negative Resultate produzieren.

## BioClean™ Spitzen – was bedeutet das?

Für zuverlässige Ergebnisse müssen Pipettenspitzen absolut inert, d.h. reaktionsträge sein und somit keinen störenden Einfluss auf die Probe haben. Sie müssen nicht nur kontaminationsfrei, sondern auch frei von jeglichen bioaktiven Bestandteilen sein. Dieser Zustand wird als BioClean™ bezeichnet. Viele auf dem Markt befindlichen Spitzen werden als zu 100% kontaminationsfrei und steril beworben, doch Tests haben gezeigt, dass dem nicht immer so ist.

### BioClean Spitzen sind:



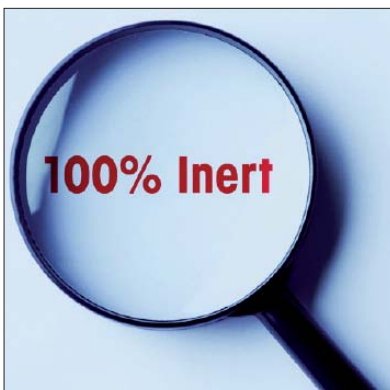
## Rein

durch exzellente Auswahl des Rohstoffes  
(hochreines Polypropylen)



## Sauber

Produktion und Verpackung unter  
Reinraumbedingungen



## Getestet

Gewährleistung größter Prüfsorgfalt

# BioClean

Mehr zu BioClean™  
ab Seite 200.



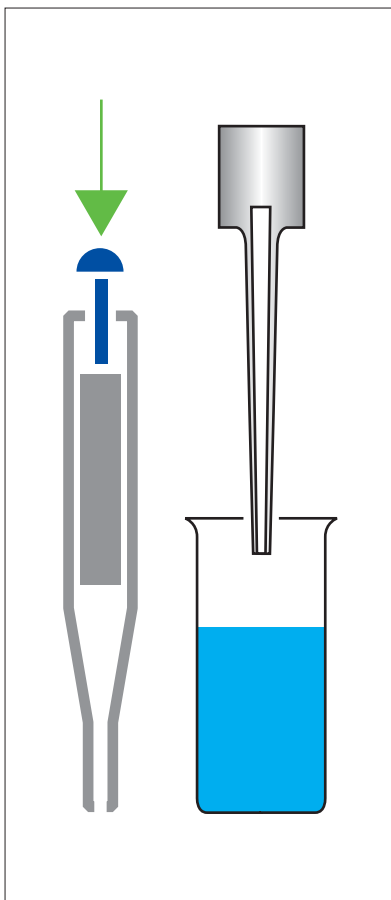


## Pipettiertechniken

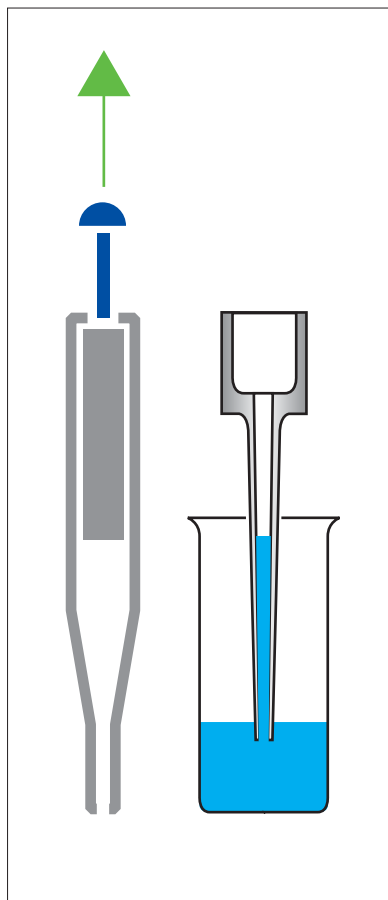
### Für dünnflüssige Lösungen → Vorwärtspipettieren

Für Standardlösungen wie Wasser, Pufferlösungen, verdünnte Salzlösungen oder verdünnte Säuren und Basen empfiehlt sich das so genannte «Vorwärtspipettieren». Dazu betätigt man den Pipettierknopf bis zum ersten Anschlag, taucht dann die Spitze wenige Millimeter ein und lässt den Knopf zurückgleiten. Abgegeben wird die Flüssigkeit in der Spitze durch Drücken bis zum ersten Anschlag. Beim Durchdrücken bis zum zweiten Anschlag wird alle Flüssigkeit abgegeben.

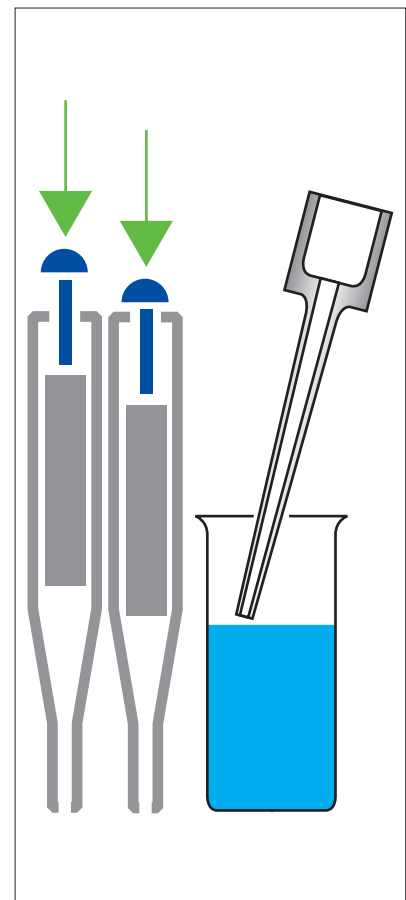
**Pipettierknopf bis zum ersten Anschlag betätigen**



**Spitze eintauchen, Pipettierknopf zurückgleiten lassen**



**Flüssigkeit abgeben, Überhub betätigen**



**Vorwärtspipettieren**

## Für viskose Lösungen → Rückwärtspipettieren

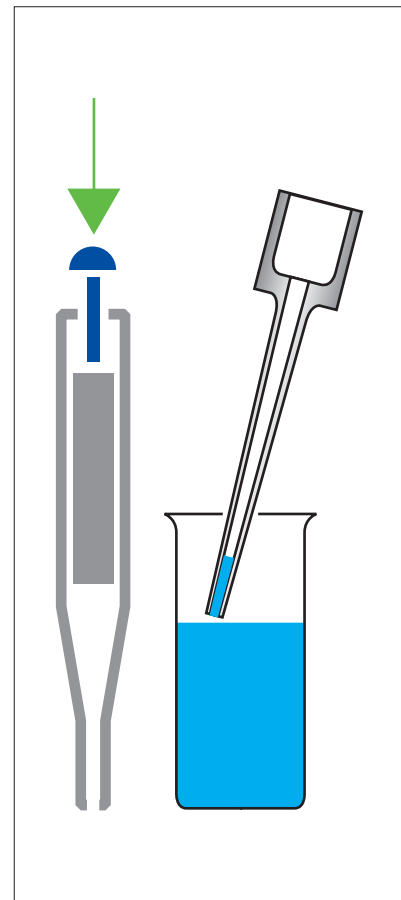
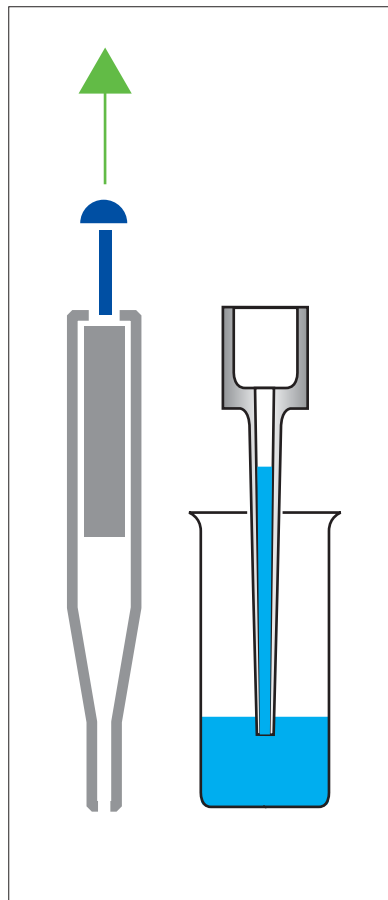
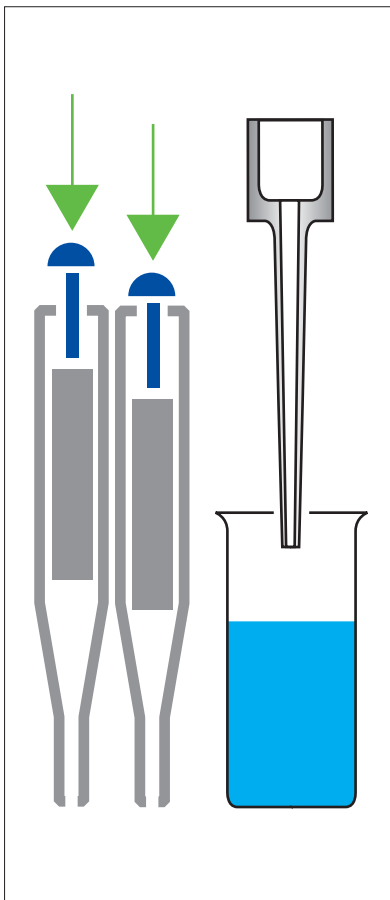
Das «Rückwärtspipettieren» wird bei viskosen Lösungen, Lösungen mit hohem Dampfdruck oder bei stark benetzenden Flüssigkeiten empfohlen. Der Pipettenknopf wird bis zum zweiten Anschlag betätigt, die Spitze dann wenige Millimeter eingetaucht und der Knopf danach losgelassen. Die Flüssigkeit wird durch Drücken des Knopfes bis zum ersten Anschlag abgegeben.

Pipettierergebnisse können sehr leicht durch die Technik des Anwenders beeinflusst werden. Um die besten Resultate zu erzielen, ist eine gute Pipettiertechnik unabdingbar.

**Pipettierknopf bis zum zweiten Anschlag betätigen**

**Spitze eintauchen, Pipettierknopf zurückgleiten lassen**

**Flüssigkeit bis zum ersten Anschlag abgeben**



**Rückwärtspipettieren**

## Gute Pipettierpraxis

### Gleichmäßigkeit

Halten Sie beim Drücken und Loslassen des Kolbens Rhythmus, Geschwindigkeit und Technik konstant. Übermäßig schnelle Probenaufnahme kann zu Verunreinigungen von Schaft und Kolben durch Spritzer und Aerosole führen und sogar den Verlust des Probenvolumens zur Folge haben. Durch gleichmäßiges Handling kann die Genauigkeit der Ergebnisse um bis zu 5 % erhöht werden.

### Korrektes Füllen der Spitzen

Auch wenn Spitzen für gewöhnlich einen empfohlenen (nominalen) Volumenbereich von 10 bis 100 % des maximalen Fassungsvermögens (nominalen Volumens)

der Spitze haben, werden die besten Ergebnisse im begrenzteren, effektiveren Volumenbereich von 35 bis 100 % erzielt. Die besten Resultate werden bei 50 % des nominalen Volumens erzielt.

### Haltung und Volumeneinstellung Das richtige Aufsaugen und Ausstoßen

Die Pipette sollte beim Aufsaugen immer senkrecht gehalten werden, da sonst die Flüssigkeitssäule niedriger als bei der Kalibrierung ist und somit zu viel Flüssigkeit aufgesogen wird. Beim Ausstoßen empfiehlt es sich, die Pipette etwas schräg an den Gefäßrand zu halten, um ein gutes Abfließen zu gewährleisten.

### Eintauchwinkel der Spitze



falscher Winkel



richtiger Winkel

Senkrecht arbeiten mit der Pipette erhöht die Richtigkeit um 1 - 5%.

## Eintauchtiefe und Dispensieren Nicht zu tief und nicht zu wenig

Die Eintauchtiefe ist vor allem bei Mikrovolumenpipetten wichtig. Zu tiefes Eintauchen erhöht den Druck in der Spitze und Flüssigkeit kann schon vor dem eigentlichen Pipettieren in die Spitze eindringen. Je tiefer, desto mehr «Verschleppung» auch an der Spitzenaußenseite. Bei zu geringem Eintauchen kann Luft angesaugt werden. Blasen in der Probe und falsches Volumen sind die Folge.

Pipettengröße	Eintauchtiefe
2 und 10 µl	1 mm
20 und 100 µl	2 - 3 mm
200 und 1000 µl	3 - 6 mm
5000 µl und 10 ml	6 - 10 mm

Die vorgegebene Eintauchtiefe erhöht die Richtigkeit um 1 - 3%



## Sauber Dispensieren



In den meisten Anwendungen empfiehlt sich ein Dispensieren schräg an die Gefäßwand. Ein gutes Abfließen der Probe ist gewährleistet und ungewolltes Aufnehmen nach dem Ausstoßen der Probe wird vermieden. Dispensieren kann auch direkt auf die Probenflüssigkeitsoberfläche erfolgen. Die Verwendung einer dünnwandigen Spitze, ist hier wichtig. Soll Dispensieren direkt in die Probenflüssigkeit erfolgen, empfiehlt sich das reverse Pipettieren, damit keine Flüssigkeit zurückfließt.

### Konstante Raumtemperatur

Es empfiehlt, sich bei konstanten Raumtemperaturen zu pipettieren, am besten um  $\pm 21.5^\circ\text{C}$  entsprechend der Temperatur bei der Kalibrierung. Große und schnelle Temperaturwechsel möglichst vermeiden, da die Luft in der Pipette sich nicht schnell anpassen kann und sich somit das Volumen der Probe verändert (bis 5 % bessere Messergebnisse).

### Stellen, nicht legen

Pipetten nicht in Schubladen lagern oder auf der Arbeitsfläche ablegen. Dies kann zu Kratzern auf dem Schaft führen und die Dichtigkeit der Spitze beeinträchtigen. Außerdem kann Restflüssigkeit in den Schaft fließen und die Pipette verunreinigen. Durch richtiges Lagern der Pipetten in dafür konzipierten Ständern werden unkalkulierbare Fehler vermieden und das Arbeitsgerät geschont.

### Vorbenetzung und Ausnahmen

Pipettenspitzen idealerweise zweimal vorspülen. Dies gleicht den Flüssigkeitsfilm aus, der an der Spitzeninnenseite haftet. Das Vorspülen hilft, die Kapillareffekte bei Mikrovolumenpipetten zu neutralisieren und – wichtig bei Makrovolumenpipetten – die Luft innerhalb der Pipette an die Probenoberfläche anzugleichen.

Das Vorspülen sorgt dafür, dass die Kontaktfläche bei allen Proben identisch ist.

Bei wasserartigen Flüssigkeiten steigert schon zweimal Vorspülen die Genauigkeit um bis zu 0,2 %.

## Ausnahmen beim Vorspülen

Ausnahmefälle, wenn ein Vorspülen nicht empfehlenswert ist:

- Pipettieren von sehr kalten Lösungen (z.B. Eisbad)
- Pipettieren von warmen Lösungen (37°C oder mehr)

## Eintauchzeit

Beim Aufsaugen der Probe ist die Eintauchzeit ein entscheidender Faktor für eine gute Pipettiertechnik. Nachdem Sie den Kolbenknopf langsam losgelassen haben, warten Sie kurz, bevor Sie die Spitze aus der Probe ziehen, um sicherzustellen, dass das gesamte Probenvolumen in die Spitze eingezogen wurde. Bei größeren Proben sowie auch bei viskosen Substanzen ist es von Vorteil, etwas länger zu warten, da der Druckausgleich in der Luftkammer der Pipette zirka eine Sekunde in Anspruch nehmen kann.

## Aspirationsrate

Die Aufnahmezeit einer Pipette kann variieren und die Präzision und Genauigkeit der Resultate deshalb stark beeinflussen. Sie sollten daher den Kolbenknopf der Pipette stets sanft und auf kontrollierte Weise loslassen. Die wohl häufigste Folge eines zu schnell losgelassenen Kolbenknopfes ist, dass Aerosole in den Pipettenschaft gelangen und dort Teile der Pipette beschädigen können. Noch gravierender ist es, wenn Flüssigkeit hochspritzt; ist diese korrosiv, kann sie den Pipettenschaft beschädigen und folglich die Proben durch Kreuzkontamination verunreinigen.

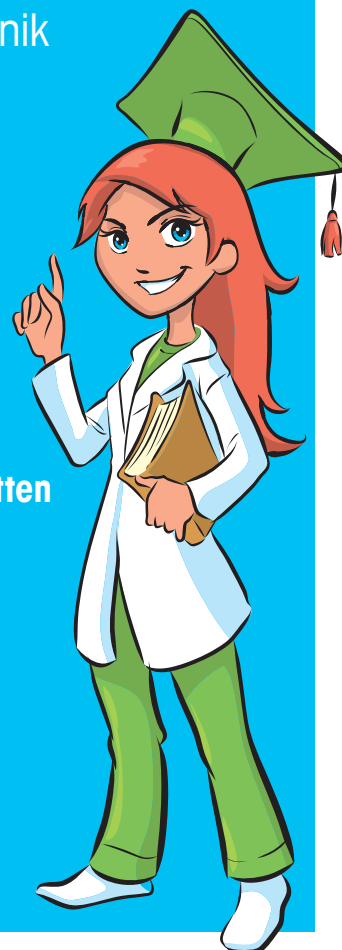
## Reverses Pipettieren

Die genaue und präzise Aufnahme und Abgabe von viskosen oder sehr dichten Flüssigkeiten mit einer Pipette hat Forschern seit jeher Probleme bereitet. Das reverse Pipettieren ist eine gute Alternative: Bei der Probenaufnahme wird der Kolben bis zur Ausstoßposition nach unten gedrückt. Das gewünschte Volumen plus eine geringe Menge überschüssige Flüssigkeit werden in die Pipettenspitze eingezogen. Dann wird beim Dispensieren der Kolben nur bis zur Ausgangsposition gedrückt. Auf diese Weise bleibt die Flüssigkeit beim Dispensieren in der Spitze. Bei biologischen, viskosen oder schäumenden Flüssigkeiten werden die Resultate durch das reverse Pipettieren verbessert.

## Zusammenfassung → Einflussgrößen beim Pipettieren

- Optimaler Volumenbereich
- Volumeneinstellung
- Eintauchwinkel und -tiefe
- Vorspülen
- Ansauggeschwindigkeit
- Temperaturunterschiede
- Arbeitsweise, Ergonomie
- Abstreiftechnik

Mehr zu  
unseren Pipetten  
ab Seite 198



## Genauigkeit und Zuverlässigkeit

### Richtlinien und internationale Normen verlangen die Überprüfung von Pipetten

Regelmäßige Pipettenwartung ist die Voraussetzung für korrekte Messdaten.

#### ■ Wöchentlich / 4-wöchentlich (durch Laborpersonal)

- Reinigung und Pflege der Pipetten durch das Laborpersonal
- Überprüfung der Richtigkeit der Flüssigkeitsaufnahme mit graduierten Spitzen

#### ■ Jährlich (durch externen Service)

- Inspektion der Pipette auf funktionelle Fehler
- Ersatz der Dichtung
- Kalibration nach Herstellerspezifikationen bzw. SOPs (Standard Operating Procedures)

#### ■ Alle 3–5 Jahre (durch externen Service)

- Ersatz des Kolbens
- Ersatz des Schafftes

### Um die Zuverlässigkeit der Pipette zu garantieren sind Kalibration und Präventivwartung ein Muss

Kalibrierung nach ISO 8655 bedeutet die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem dosierten Volumen und dem Nennvolumen oder gewählten Volumen des Gerätes. Die Kalibrierung erfordert keine Eingriffe, die das Gerät verändern. Der Kalibrierschein bestätigt entsprechend das Kalibrierresultat. GxP-Standards verlangen von Benutzern von Instrumenten im Zusammenhang mit Nahrungs- und Arzneimitteln sowie medizinischen und biologischen Produkten, ihre Geräte in angemessen Abständen zu kalibrieren, zu reinigen und zu unterhalten.

## Techniken der Pipettenüberprüfung

### Gravimetrische Prüfung

- Berechnung des Volumens aus dem Gewicht und der Dichte der pipettierten Flüssigkeit
- ISO 8655 Teil 6 und DIN 12650 Teil 6 beschreiben diese Methode

### Fotometrische Überprüfung

- Pipettieren eines absorbierenden Reagens in eine Küvette und Berechnung des Volumens aus der Absorptionsdifferenz
- Geeignet v.a. für sehr kleine Volumina, recht teuer
- ISO 8655 Teil 7 und NCCLS

Wichtiges zur Kalibrierung  
von Pipetten finden Sie  
auf den Seiten:  
116–121, 157  
und 292–295



Pipette ID	Type	Description	P.Channels
098733	Eppendorf Research		8
123456	Rainin EDP3-Plus LTS E12:1200		12
5678976	Eppendorf Varipette 4720 and Varip.P		1
A23452	Rainin Pipet-Like SL-1000		1

Due Date	Status	Schedule	Pipette ID	Type	Method	Last name
	OK		A23452	Rainin Pipet-Like SL-1000	ISO type A 1 ml	Mettler Toledo
	OK		098733	Eppendorf Research	Eppendorf Research	Mettler Toledo
	OK		5678976	Eppendorf Varipette 4720 and Vari	Eppendorf Varipette 4720 ar	Mettler Toledo

### Prüfberichterstellung mit Softwareunterstützung

# Vorgehen zur Überprüfung

## Prüfflüssigkeit

Destilliertes oder deionisiertes Wasser der Qualität 3 nach ISO 3696, entgast oder im Gleichgewicht mit Luft.

Vor der Prüfung müssen das zu prüfende Gerät und die Prüfflüssigkeit mindestens 2 Stunden im Prüfraum gestanden haben, um Gleichgewicht mit den Raumbedingungen zu erreichen (8655-6 6.2).

## Prüfvolumen

Bei Geräten mit variablem Volumen müssen drei Volumina geprüft werden.

1. Nennvolumen
2. 50% des Nennvolumens
3. Die untere Grenze des Nutzvolumens (zumeist 10%)

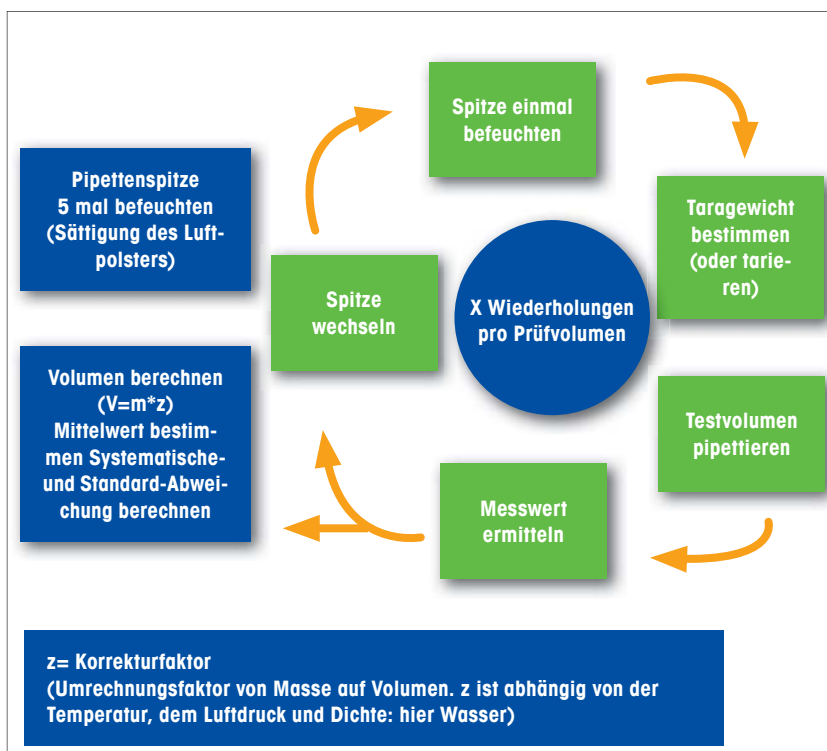
## Anzahl der Messungen

Als Konformitätsprüfung oder Baumusterprüfung müssen 10 Messungen je Prüfvolumen durchgeführt werden.

Die Zeitintervalle/Häufigkeit der Überprüfungen sind abhängig von:

- Gebrauchshäufigkeit
- Anzahl der Benutzer des Kolbenhubgerätes
- Aggressivität der zu dosierenden Flüssigkeit
- den vom Anwender festgelegten Fehlergrenzen

## Durchführung der Überprüfung



## Vorbeugende Wartung

- Pipetten nie überdrehen
- Kolben regelmäßig prüfen und reinigen
- Nach versehentlichem Aufsaugen von Flüssigkeit sofort reinigen
- Nach Herstellerangaben neu fetten
- Dichtungen jährlich wechseln
- Kolben und Schaft alle drei Jahre wechseln