

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování

Jméno:	
Obor:	datum provedení:

TEORETICKÝ ÚVOD

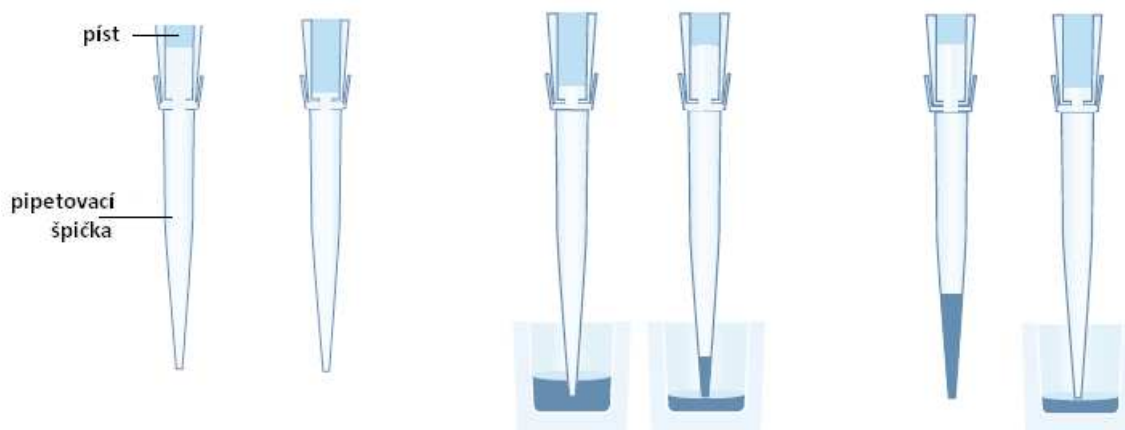
Automatické pipety pracují na principu nasávání a vytlačování vzduchu pomocí pístu pohybujícím se ve válci nebo kapiláře. Tento princip poskytuje velmi přesné dávkování roztoků, i když velmi viskózní roztoky mohou ovlivnit parametry pipetování.

Princip pipety

1. Po nastavení objemu se píst pohne do příslušné pozice.
2. Když se pipeta namáčkne do první pozice, píst vytlačí stejné množství vzduchu, jako je nastavený objem.
3. Po ponoření pipetovací špičky do kapaliny se pipetovací píst uvolní, což vytvoří částečné vakuum, pomocí kterého dojde k nasátí specifického objemu kapaliny do špičky.
4. Když je pipeta poté znovu namáčkuta do první pozice, dojde k vytlačení kapaliny pomocí vzduchu v pipetě. K úplnému vyprázdnění špičky je pipeta domáčkuta o druhé pozice.

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování



Nasátí tekutiny (krok 1-3) Vypuštění tekutiny (krok 4)

V rámci pipetování existují tři základní techniky:

Přímá technika pipetování

- Doporučená pro vodné roztoky jako pufrы, zředěné kyseliny nebo zásady (pipetování reagens do roztoků).

Klidová pozice	1	2	3	4
První pozice	↓	↑	↓	↑
Druhá pozice			↓	↑

Repetitivní technika pipetování

- Doporučená technika pro opakované dávkování stejného objemu (přidávání do zkumavek nebo destiček).

Klidová pozice	1	2	3	4
První pozice	↓	↑	↓	↑
Druhá pozice	↓	↑		

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
PipetováníReverzní technika pipetování

- Doporučená technika pro pipetování vzorků, které se nepřidávají nebo nemíchají s jinými roztoky. Tato technika předchází riziku tvorby pěny a bublin a využívá se tedy pro pipetování viskózních roztoků a roztoků s tendencí pěnit.

Klidová pozice	1	2	3	4	5
První pozice	↓	↑	↓		↑
Druhá pozice	↓	↑		↓	↑

Faktory ovlivňující správnost pipety:

Teplota je jedním z nejdůležitějších faktorů hrajících roli pro správnost pipetovaného objemu. Teplota pipety, pipetované kapaliny a okolního vzduchu by měla být při pipetování přibližně stejná.

Hustota hraje rovněž roli při správnosti pipetování. Hustota kapaliny by měla být přibližně stejná, jako hustota kapaliny, na kterou byla pipeta kalibrována (destilovaná voda).

Nadmořská výška hraje roli při správnosti pipetovaného objemu díky měnícímu se tlaku vzduchu. Jednak tlak vzduchu s nadmořskou výškou klesá a rovněž bod varu blízký laboratorní teplotě dramaticky zvyšuje ztráty způsobené odparem.

PRAKTICKÁ ČÁST

A. Příprava 3.0 mM roztoku hexakvanoželezitanu draselného

Postup práce:

1. Do 25 ml odměrné baňky napipetujte 2.5 ml zásobního roztoku 30 mmol.l⁻¹ hexakvanoželezitanu draselného, doplňte destilovanou vodou po značku a dobře promíchejte.
2. Zředěný roztok hexakvanoželezitanu draselného přelijte do kádinky a označte.

B. Příprava 1.2 mM roztoku hexakvanoželezitanu draselného

Postup práce:

1. Do 25 ml odměrné baňky napipetujte 2.5 ml zásobního roztoku 30 mmol.l⁻¹ hexakvanoželezitanu draselného, doplňte destilovanou vodou po značku a dobře promíchejte.
2. Zředěný roztok hexakvanoželezitanu draselného přelijte do kádinky a označte.
3. Z Lambert-Beerova zákona (1) vypočítejte molární absorpční koeficient (ϵ) pro hexakvanoželezitan draselný.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

A - absorbance látky; ϵ - molární absorpční koeficient [l.mol⁻¹.cm⁻¹]; c - koncentrace látky v měřeném roztoku [mol.l⁻¹]; l - délka optické dráhy v kyvetě

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
PipetováníVýsledky:

A_{420}	c (mmol.l ⁻¹) zředěný roztok K ₃ [Fe(CN)] ₆	ϵ (l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)

C. Použití pipet s nastavitelným objemem 1-10 μ l, 10-100 μ l a 100-1000 μ lPostup práce:

1. Do sady mikrozku mávek pipetujte reagentie podle rozpisu v tabulkách 1, 2 a 3. Použijte přímou techniku pipetování.
2. Vzorky promíchejte na vortexu.
3. Změřte jejich absorbanci při vlnové délce 420 nm. Jako slepý vzorek použijte destilovanou vodu.

Výpočty:

1. Na základě známého extinkčního koeficientu hexakynoželezitanu zjištěného v předchozí části úlohy vypočítejte dle naměřených absorbancí koncentrace hexakynoželezitanu draselného ve zkuševkách.
2. Vypočtete průměry ze tří naměřených hodnot.
3. Následně pro určení přesnosti vaší práce vypočítejte směrodatnou odchylku dle vztahu (2).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (c_i - \bar{c})^2}{N-1}} \quad (2)$$

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování

- Pro tabulku č. 2 sestojte graf závislosti A_{420} na koncentraci $K_3[Fe(CN)_6]$ ve zkumavce (například v programu MS Excel použijte XY bodový graf a body proložte lineární spojnici trendu). Vzhledem k tomu, že jste vynulováním na slepý vzorek přiřadili nulové koncentraci $K_3[Fe(CN)_6]$ nulovou absorbanci, musí přímka procházet počátkem grafu [0;0] (v programu MS Excel: Formát spojnice trendu/Možnosti/Hodnota Y=0).
- Z rovnice přímky, kterou zobrazíte v grafu, následně na základě Lambert-Beerova zákona (1) určete molární absorpční koeficient ϵ a uveďte jeho fyzikální rozměr.

Výsledky:

Tabulka 1.

zkumavka č.	pipetovaný objem		A_{420}	c (mmol.l ⁻¹) $K_3[Fe(CN)_6]$	\emptyset c (mmol.l ⁻¹)	s
	30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ [μl]	destilovaná voda [μl]				
1	5	995				
2	5	995				
3	5	995				
4	10	990				
5	10	990				
6	10	990				
7	15	985				
8	15	985				
9	15	985				
10	20	980				

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování

11	20	980				
12	20	980				

Tabulka 2.

zkumavka č.	pipetovaný objem		A_{420}	c (mmol.l ⁻¹) $K_3[Fe(CN)_6]$	\bar{c} (mmol.l ⁻¹)	s
	3 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ [μl]	destilovaná voda [μl]				
1	50	950				
2	50	950				
3	50	950				
4	100	900				
5	100	900				
6	100	900				
7	150	850				
8	150	850				
9	150	850				
10	200	800				
11	200	800				
12	200	800				

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování

Tabulka 3.

zkumavka č.	pipetovaný objem		A_{420}	c (mmol.l ⁻¹) K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ø c (mmol.l ⁻¹)	s
	1.2 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] [µl]	destilovaná voda [µl]				
1	150	850				
2	150	850				
3	150	850				
4	300	700				
5	300	700				
6	300	700				
7	450	550				
8	450	550				
9	450	550				
10	600	400				
11	600	400				
12	600	400				

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování

Okomentujte přesnost vaší práce:

Vložte graf závislosti A_{420} na koncentraci $K_3[Fe(CN)_6]$ ve zkumavce (nezapomeňte uvést jednotky a popisy os!) a srovnajte molární extinkční koeficient určený na základě odečtu z rovnice přímky s tím, určeným v první části úlohy: