

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování a vážení

Jméno:		
Obor:	datum provedení:	

TEORETICKÝ ÚVOD

Pipetování

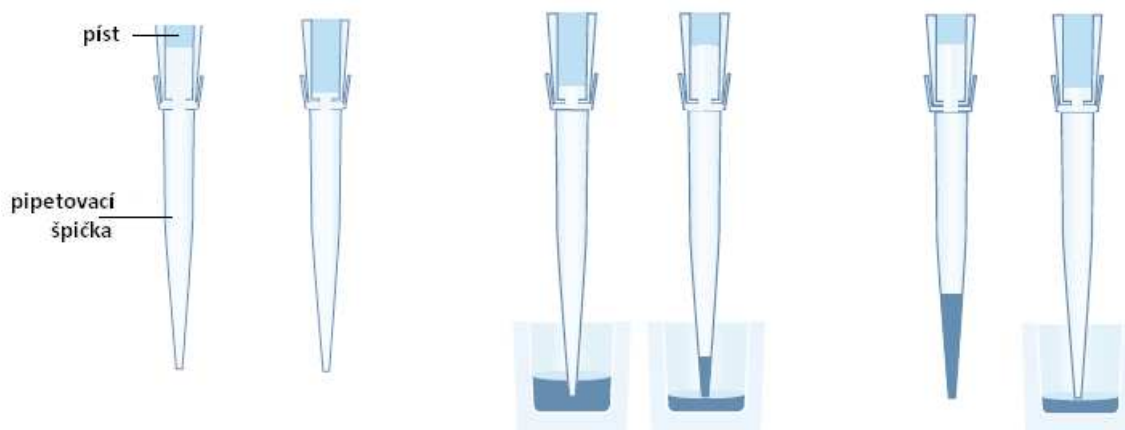
Automatické pipety pracují na principu nasávání a vytlačování vzduchu pomocí pístu pohybujícím se ve válci nebo kapiláře. Tento princip poskytuje velmi přesné dávkování roztoků, i když velmi viskózní roztoky mohou ovlivnit parametry pipetování.

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 a vážení



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
Pipetování a váženíReverzní 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.

Vážení

Jednou ze základních operací v biochemické laboratoři je vážení. Ve většině případů právě přesnost a správnost navažovaného množství látky má vliv na výsledek celého experimentu. Váhy jsou citlivá zařízení, a proto s nimi musíme pracovat správně a udržovat je v čistotě. Z tohoto důvodu většinou váhy umísťujeme na speciální váhový stolek mající

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování a vážení

kamennou vážící desku. Na základě váživosti a citlivosti můžeme laboratorní váhy rozdělit do dvou základních typů – předvážky a analytické váhy.

Předvážky jsou zpravidla váhy s váživostí do 200-400 g s přesností na 0.01g. Tyto váhy jsou primárně určeny k navažování výchozích látek pro přípravu roztoků nebo v některých případech k vážení meziproductů a preparátů.

Analytické váhy jsou váhy s váživostí do 200 g a s přesností na 0.0001g. Tyto váhy používáme pro velmi přesná navažování látek nebo pro navažování velmi malých množství látek (<0.1g).



Ukázka předvážek (A) a analytických vah (B)

V současné době se již v laboratoři převážně setkáváme s elektronickými vahami, jejichž hlavní výhodou oproti klasickým mechanickým je snadná obsluha a nenáročná údržba. Elektronické váhy jsou vybaveny buď externí nebo interní kalibrací a kromě standardních funkcí zahrnujících táru, vážení v hmotnostních procentech nebo postupné dovažování obsahují i funkce jako počítání kusů, volitelné váhové jednotky anebo statistické výpočty. Základními vlastnostmi vah jsou:

- **Váživost** – udává maximální dovolené zatížení vah
- **Přesnost** – udává nejmenší váhový rozdíl, který může být vahami přesně a správně stanoven
- **Citlivost** – udává poměr výchylky ukazatele vah k přivažku, který výchylku způsobil

Pro vážení látek na vahách musíme používat pomůcky určené k navažování - hodinové sklo – pouze na vážení na předvážkách, skleněná nebo porcelánové lodička a váženka. Váženou látku nabíráme laboratorní lžičkou (předvážky) nebo špachtlí na práškové materiály (analytické váhy).

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování a vážení

Při vážení můžeme použít dva základní způsoby, **přímé vážení** nebo tzv. **diferenční vážení**. Přímý způsob vážení je vhodný pro látky na vzduchu stabilní a používá se vždy při přípravě roztoků o přesné koncentraci. Při diferenčním vážení se látka naváží přesně na čtyři desetinná místa, ale její množství se může pohybovat v určitém rozmezí.

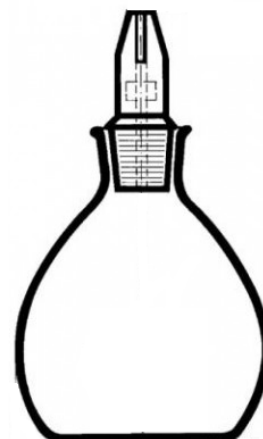
Hustota ρ homogenní látky je definována jako podíl její hmotnosti m a jejího objemu V :

$$\rho = \frac{m}{V} \text{ (kg.m}^{-3}\text{)} \quad (1)$$

Hustota látek závisí na teplotě a tlaku, avšak u látek kapalných se uvažuje pouze vliv teploty, protože vliv tlaku je vzhledem k malé stlačitelnosti těchto látek zanedbatelný. Pokud chceme stanovit hustotu látky podle vzorce (1), musíme stanovit její přesnou hmotnost a objem. Hmotnost látky stanovujeme vždy vážením a objem u kapalných látek můžeme určit přímým měřením jejich objemů v kalibrovaných nádobách. Přímé měření objemu bývá však často málo přesné a proto se častěji pro zjištění objemu používá nepřímých metod stanovující objem kapaliny vážením látky o známé hustotě. Stejnost objemů se u kapalin realizuje pomocí pyknometru.

Princip pyknometru je založen na tom, že při úplném naplnění a uzavření zátkou s kapilárou pojme vždy stejný, snadno reprodukovatelný objem kapaliny. Přesná reprodukovatelnost

objemu kapaliny v pyknometru je dána jednak velmi úzkou kapilárou v zátce pyknometru a jednak tím, že se pyknometr plní nadbytečným množstvím kapaliny, přičemž kapalina přebývající nad požadovaný výsledný objem z pyknometru po uzavření vyteče.



Pyknometr podle
Gay-Lussaca

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 1.0 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
Pipetování a vážení

Výsledky:

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 l

Postup práce:

1. Do sady mikrozkušavek 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 zkumavkách.
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 a vážení

- Pro tabulku č. 2 sestrojte 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) $K_3[Fe(CN)_6]$	$\bar{\epsilon}$ c (mmol.l ⁻¹)	s
	30 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ [μ l]	destilovaná voda [μ l]				
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 a vážení

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 $K_3[Fe(CN)_6]$ [μ l]	destilovaná voda [μ l]				
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 a vážení

Tabulka 3.

zkumavka č.	pipetovaný objem		A_{420}	c (mmol.l ⁻¹) $K_3[Fe(CN)_6]$	$\emptyset c$ (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 a vážení

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:

||

D. Stanovení hustoty kapalné látky

Postup práce:

1. Zvážíme prázdný suchý pyknometr (hmotnost m_1).
2. Pyknometr naplníme až po okraj destilovanou vodou a zazátkujeme, přičemž přebytečná kapalina vystříkne otvorem v zátce. Pyknometr velice pečlivě osušíme tamponem a zvážíme (hmotnost m_2).
3. Z pyknometru vylijeme destilovanou vodu a propláchneme pyknometr kapalinou o neznámé hustotě (ρ_k).
4. Pyknometr naplníme až po okraj kapalinou o neznámé hustotě a zazátkujeme, přičemž přebytečná kapalina vystříkne otvorem v zátce. Pyknometr velice pečlivě osušíme tamponem tak, abychom neodsáli roztok z kapiláry, a zvážíme (hmotnost m_3).
5. Hustotu měřené kapaliny získáme pomocí vztahu (2), kdy teploty měřené a srovnávací kapaliny se nesmějí lišit více než o 2 °C. Hustota destilované vody při 20°C je 998,205 kg.m⁻³(ρ_v).

$$\rho = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \rho_v \quad (2)$$

Výsledky:

m_1 (g)	m_2 (g)	m_3 (g)	ρ_k (kg.m ⁻³)	Kapalina ^a

^a Na základě známých hustot uveďte, o kterou kapalinu se jedná

E. Kalibrace Pipet

Pokud se běžná laboratorní pipeta používá správně, měla by dávkovat kapaliny s dobrou přesností a správností. V rámci tohoto experimentu zjistíme přesnost a správnost pipet pro objemy 10-100 ul a 100-1000 ul. Všechny zmíněné parametry pipety budeme stanovovat pomocí analytických vah, kdy budeme stanovovat přesnou hmotnost dávkované kapaliny. Na základě známé hustoty destilované vody ($998,205 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) následně určíme dávkované objemy. Kalibrace pipety se provádí při třech různých dávkovaných objemech:

- Nejmenším možným dávkovaném objemu (10 ul respektive 100 ul)
- Nejvyšším možným dávkovaném objemu (100 ul respektive 1000 ul)
- Středním dávkovaném objemu (50 ul respektive 500 ul)

Každé měření provádíme 5x, kdy z naměřených hodnot následně vypočteme chybu pipety a směrodatnou odchylku v jednotlivých dávkovaných objemech.

Postup práce:

1. Vezměte čistou a suchou váženku a položte ji na misku analytických vah.
2. Váhy vytárujte.
3. Na váženku napipetujte stanovované množství destilované vody a zvažte ho s přesností na desetiny miligramu (± 0.0001).
4. Váhy vytárujte a na váženku znovu napipetujte stejné množství destilované vody jako v bodě 3. a zvažte ho s přesností na desetiny miligramu (± 0.0001).
5. Opakujte bod 4, dokud nedostanete tři hodnoty.
6. Poté váženku omyjte, vysušte a pokračujte od bodu 1 s dalším stanovovaným množstvím destilované vody.

Výpočty:

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování a vážení

Objem můžete vypočítat ze známé hustoty vody ($998,205 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$). Abyste dostali zcela přesné hodnoty, musíme ještě provést korekci naměřené váhy na vztlak vzduchu působící na kapalinu během vážení. V případě destilované vody činí tento koeficient 1.06 mg na každý navážený gram.

1. Vypočítejte průměry z pěti naměřených hodnot (V_i) a proveďte korekci na vztlak vzduchu.
2. Pomocí vztahu (1) vypočítejte průměrné objemy (\bar{V}).
3. Okomentujte správnost pipety na základě zjištěných hodnot.
4. Následně pro určení přesnosti pipety vypočítejte směrodatnou odchylku dle vztahu (3).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (V_i - \bar{V})^2}{N-1}} \quad (3)$$

Výsledky:

Objem (ul)	$m_{\text{vody}}/\text{mg}$	V_i vody (ul)	\bar{V} (ul)	$V_i - \bar{V}$ (ul)	$(V_i - \bar{V})^2$	s
Pipeta 10-100 ul						
10						
50						

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování a vážení

100						

Objem (ul)	$m_{\text{vody}}/\text{mg}$	$V_i \text{ vody (ul)}$	$\bar{V} \text{ (ul)}$	$V_i - \bar{V} \text{ (ul)}$	$(V_i - \bar{V})^2$	s
Pipeta 100-1000 ul						
100						
500						
1000						

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.1
Pipetování a vážení

Okomentujte správnost a přesnost pipet: