

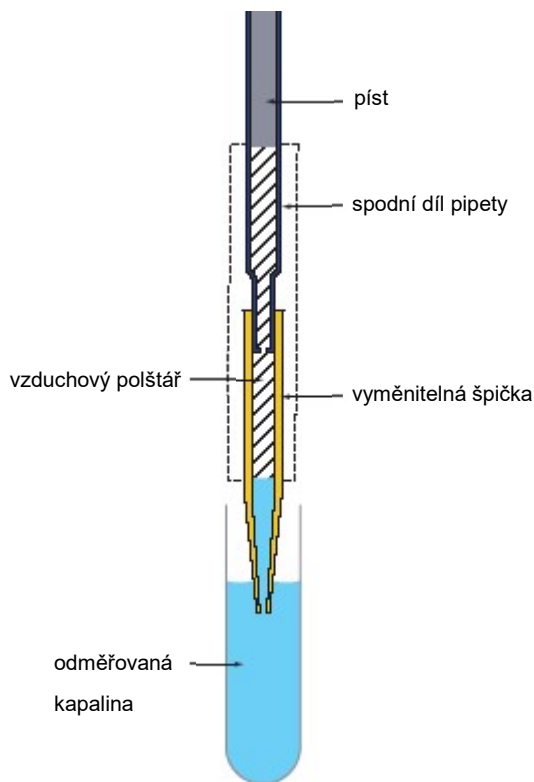
ODMĚŘOVÁNÍ MALÝCH OBJEMŮ KAPALIN

Pipetory

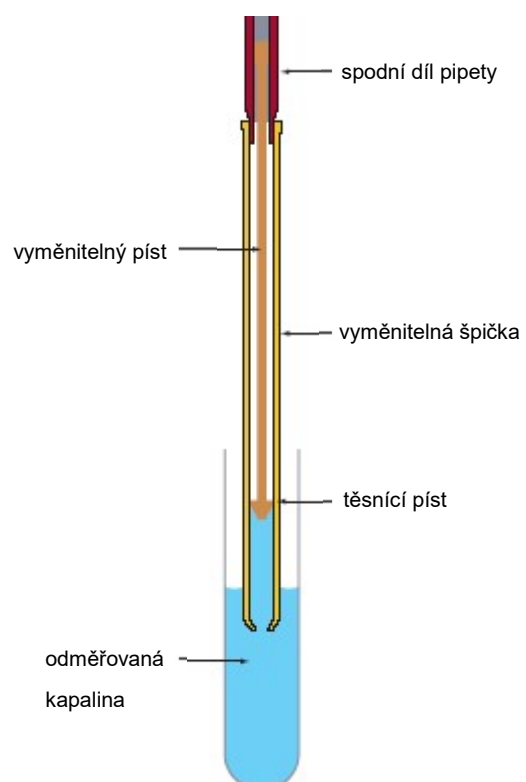
Podle způsobu ovládání rozlišujeme pipetory manuální a elektronické. U **manuálních** pipetorů je pohyb pístu zprostředkovan prostřednictvím ovládacího tlačítka palcem ruky. Správnost a přesnost pipetování je silně ovlivněna zkušenostmi a zručností pracovníka. **Elektronické** pipetory mají pohyb pístu zprostředkovan prostřednictvím elektromotorku. Oproti manuálním pipetorům nabízí navíc naprogramování způsobu pipetování. Podle povahy kapaliny lze zvolit i různou rychlost pístu při nasávání a vytlačování kapaliny.

Pipetory lze podle principu jejich účinku rozdělit na dva základní typy:

a) „Air displacement“ pipetory



b) „Positive displacement“ pipetory

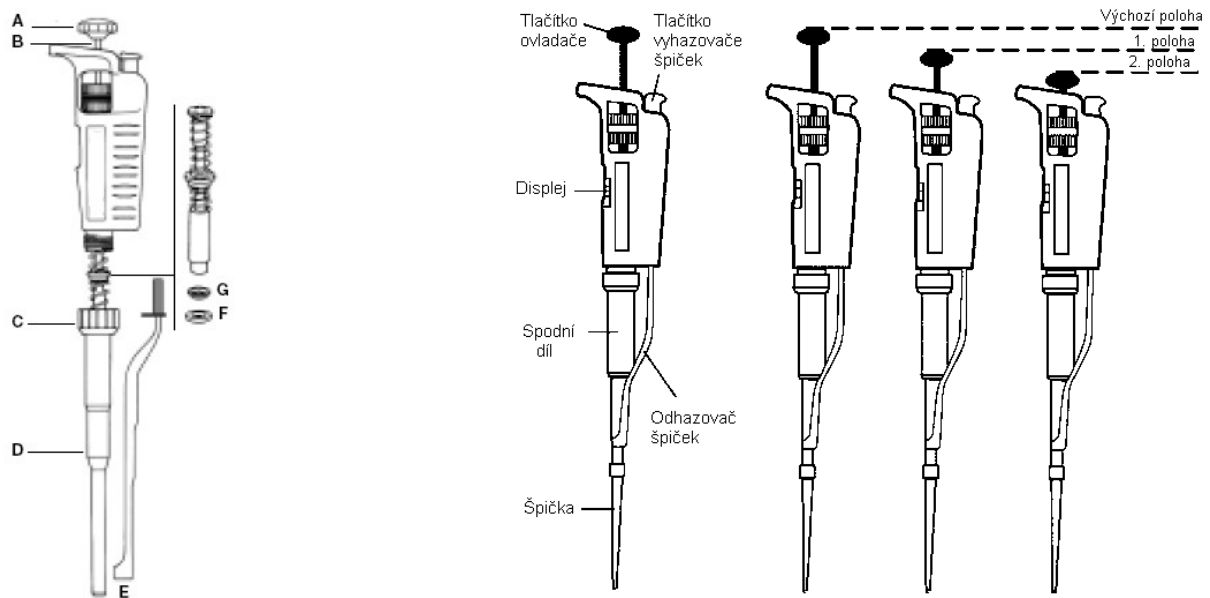


a) „Air displacement“ pipetory využívají principu tzv. vzduchového polštáře. Mezi pístem a kapalinou zůstává vždy určitý objem vzduchu. Objem kapaliny nasátý pipetorem do špičky je však nepatrně menší než objem vzduchu, který byl vytlačen pístem z válce, který je uvnitř pipetoru. Kromě toho, správnost pipetování je ovlivněno atmosférickým tlakem, hustotou a viskozitou odměřované kapaliny. Proto je nutná pravidelná kalibrace pipetoru a případně její seřízení.

Pipetory tohoto typu rozlišujeme dle provedení jako **jednokanálové** (určené pro pipetování jednoho objemu dané kapaliny v čase) nebo jako **multikanálové** (8-, resp. 12-kanálové) určené pro současné pipetování stejného objemu dané kapaliny do více jamek např. v mikrotitrační destičce (což je převážně 96 mikrozkuvek, vylisovaných většinou v polystyrenu ve formátu 8 × 12 jamek). Každý kanál u multikanálových pipetorů má svůj vlastní píst, proto není nutné využít všech kanálů v daném okamžiku (je možné připojit méně než 8, resp. 12 špiček).

Mikropipetory jsou konstruovány buď pro jeden **fixní** objem, nebo jsou **nastavitelné** na více objemů. Změna nastavení objemu může být **diskrétní** (provádí se výměnou zásuvných modulů) nebo **kontinuální** v určitém rozmezí (např. 10–100 μl) pomocí nastavovacího šroubu nebo knoflíku. Mikropipetory mají na spodním konci odnímatelnou špičku a na horním konci dvoupolohové tlačítko, pomocí kterého se ovládá píst, který se zasouvá do válce uvnitř pipetoru.

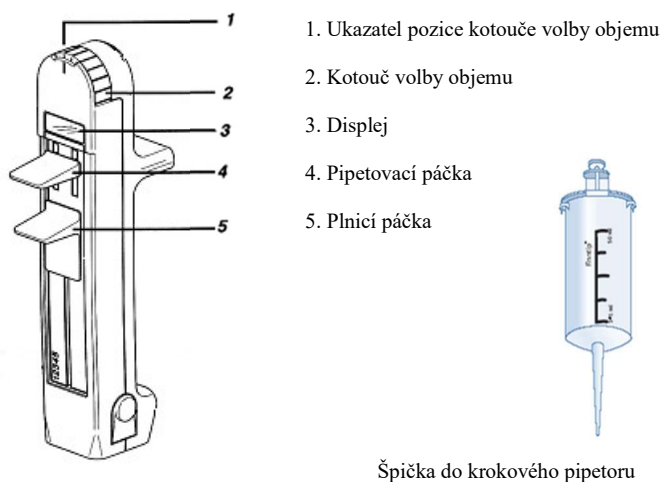
Ukázka a popis jednonábové nastavitelné pipety:



b) „Positive displacement“ pipetory nasávají kapalinu do špičky přímo bez vytvoření vzduchového polštáře, tj. píst je v přímém kontaktu s odměřovanou kapalinou. Kapalina nasátá do špičky (bez vzduchové bubliny) se vypustí ven najednou (typ stříkačky) nebo po krocích ve stejném objemu (u elektronických pipetorů i v různých objemech).

Tento typ pipetorů je výhodné používat pro **vysoce viskózní** nebo **těkavé kapaliny** anebo pro **opakující se** pipetování (viz dále).

Ukázka krokového dávkovače a špičky s pístem:



Hlavní faktory ovlivňující správnost pipetování s „air displacement“ pipetory

Teplota

Největší vliv teploty na přesnost pipetování se projeví při různé teplotě pipetoru a odměřované kapaliny (vzduchová mezera mezi pístem a povrchem kapaliny mění svůj objem v závislosti na teplotě).

Hustota roztoku

Pipetory jsou kalibrovány na destilovanou vodu. Při nasávání kapalin s nižší hustotou než voda je do špičky nasát větší objem než odpovídá nastavené hodnotě a naopak, u kapalin s vyšší hustotou nasajeme menší objem než je nastavený.

Atmosférický tlak

Atmosférický tlak klesá s **nadmořskou** výškou, čímž klesá rovněž konverzní faktor Z (viz úkol kalibrace pipet). Naproti tomu s rostoucí nadmořskou výškou se zvyšuje tenze par kapaliny, čímž zvyšuje jejich těkavost.

Poloha pipety při nasávání kapaliny

Největší správnosti při pipetování je dosaženo při kolmém držení pipetoru při nasávání. Rovněž hloubka ponoření špičky pod hladinu odměřované kapaliny velmi ovlivňuje přesnost a správnost pipetování. Jak moc ponořit špičku do kapaliny závisí na odměřovaném objemu:

Objem pipety (μl)	Hloubka ponoru špičky (mm)
0,1–1	1
1–100	2–3
101–1 000	2–4
1001–10 000	3–6

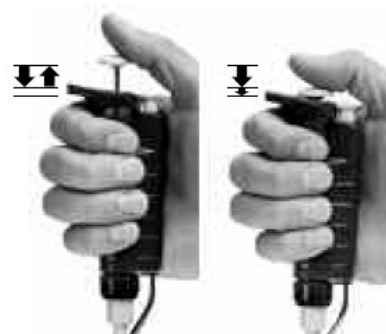
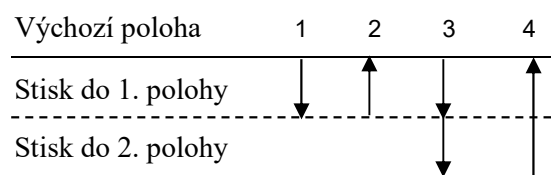
ZPŮSOBY POUŽITÍ PIPETORŮ

a) Přímé pipetování

Při přímém pipetování je do špičky nejdříve přesně nasán objem kapaliny nastavený na dávkovači a v dalším kroku je ze špičky kompletně vytlačen do zvolené nádoby. Po pipetování nesmí zůstat ve špičce žádná kapalina.

Doporučeno pro pipetování vodných roztoků, pufřů, zředěných kyselin a zásad.

Schéma pipetování:

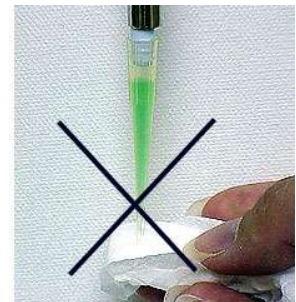
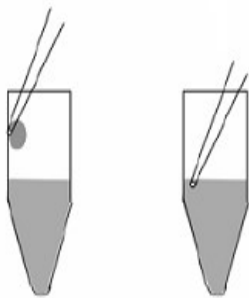


Postup:

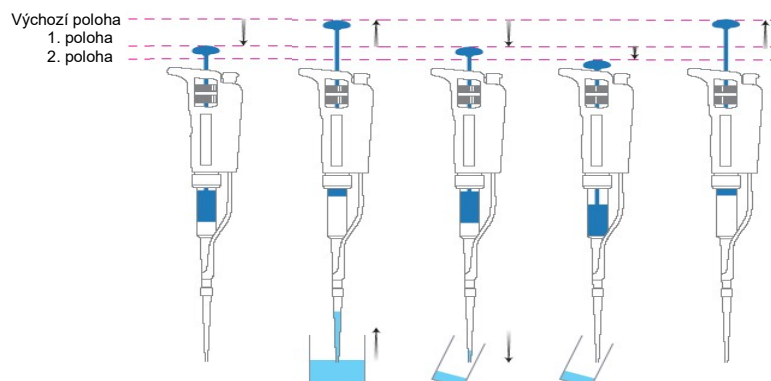
1. Nasadíte na dávkovač špičku. Stiskněte tlačítko ovladače do první polohy (nutno překonat malý odpor při stisku tlačítka).
2. Ponořte špičku dávkovače asi 2–3 mm pod hladinu roztoku. Pomalou povolujte stisknuté tlačítko ovladače za současného nasátí vzorku do špičky.

Pomalým nasátím kapaliny do špičky se omezí možný vznik turbulence, která může vyvolat vznik aerosolu a bublinek plynu, vycházejících z kapaliny. Optimální rychlost nasávání závisí na vlastnostech kapaliny (na její hustotě, tenzi par a viskozitě).

- Vždy sledujte, zda do špičky nevnikly bublinky vzduchu (např. při prudším povolání pístu ovladače nebo špatně nasazené špičce).
- Vyšší přesnosti při pipetování dosáhnete, když úplně sundáte palec z tlačítka ovladače, jakmile dosáhne výchozí polohy.
- Pomalou vytáhněte špičku z kapaliny. Při rychlém vytažení se může ztratit část obsahu špičky. Před vytažením špičky z kapaliny počkejte, hlavně u větších pipetorů 500–5000 μl , asi 1–3 vteřiny.
- Je-li potřeba, buničinou lehce z boku pohybem shora dolů otřete kapky, které ulpěly na vnější stěně špičky. Nikdy se nedotýkejte špičky zezdola, abyste neodsáli z obsahu špičky.



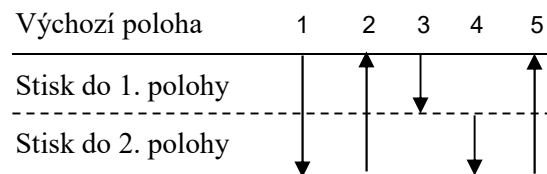
3. Při vytlačování daného objemu kapaliny držte špičku v mírném úhlu proti stěně nádoby (10–45°), těsně nad roztok již přítomný a plynule stiskněte tlačítko ovladače palcem do první polohy. Vyčkejte asi 1 vteřinu a pokračujte v rychlém stisku tlačítka ovladače až do druhé polohy (pocítíte větší odpor při stisku). Dbejte na to, aby nezůstaly kapičky kapaliny ve špičce nebo nebyly rozstříknuté na stěnách nádoby.
4. Podržte tlačítko ovladače zmáčknuté a vytáhněte špičku podél stěny nádoby ven. Nyní povolte tlačítko ovladače.



b) Reverzní pipetování

Při reverzním pipetování do špičky nasajeme větší objem kapaliny, než který chceme odměřit, a v dalším kroku vytlačíme ze špičky objem nastavený na dávkovači. Tento způsob pipetování poskytuje lepší výsledky při odměřování viskózních nebo vysoce těkavých kapalin, kapalin silně smáčivých, biologických a pěnících kapalin, nebo velmi malých objemů. Po pipetování zůstane ve špičce vždy zbytek kapaliny, kterou lze vytlačit do původního roztoku nebo do odpadu před vlastním odstraněním špičky.

Schéma pipetování:



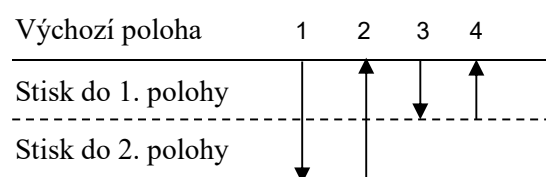
Postup:

1. Stiskněte tlačítko až do druhé polohy (pocítíte nejdříve slabý a poté velký odpor pístu při stisku tlačítka ovladače).
2. Ponořte špičku dávkovače asi 2–5 mm pod hladinu roztoku. Pomalou povolujte píst za současného nasátí vzorku do špičky. Pomalou vytáhněte špičku z kapaliny a odstraňte kapky ulpěné na vnější stěně špičky dotekem špičky proti okraji nádoby.
3. Při vytlačování daného objemu kapaliny držte špičku v mírném úhlu proti stěně nádoby těsně nad roztokem již přítomným a pomalou plynule stiskněte palcem tlačítko ovladače do první polohy. Držte tlačítko ovladače zmáčknuté v této poloze a vytáhněte špičku z nádoby ven.
4. Část kapaliny, která zůstane ve špičce, vytlačte stiskem tlačítka ovladače do druhé polohy zpět do původní nádoby nebo do odpadu.
5. Podržte tlačítko ovladače zmáčknuté a vytáhněte špičku z kapaliny ven a pak povolte tlačítko ovladače.

c) Opakující se pipetování

Tento způsob pipetování je určen pro opakované pipetování stejného objemu, např. pro přidávání činidla do série zkumavek nebo do jamek v mikrotitrační destičce. Jedná se vlastně o opakující se reverzní pipetování. Po nasátí kapaliny do špičky se opakují kroky 3 a 4.

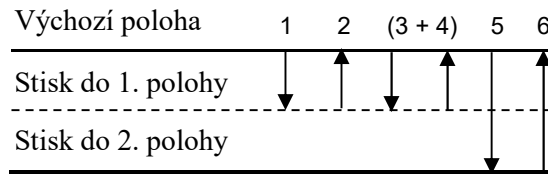
Schéma pipetování:



d) Pipetování heterogenních vzorků

Tento způsob je vhodné použít při pipetování heterogenních vzorků jako je krev, kdy není snadný proplach špičky před pipetováním.

Schéma pipetování:



Postup:

1. Stiskněte tlačítko do první polohy a ponořte špičku dávkovače asi 2–5 mm pod hladinu roztoku.
2. Pomalou povolujte píst za současného nasátí vzorku do špičky. Pomalou vytáhněte špičku z kapaliny a odstraňte kapky roztoku ulpěné na vnější stěně špičky vytažením špičky podél stěny nádoby. Ponořte špičku dávkovače do cílového roztoku.
- 3.+ 4. Stiskněte ovládací tlačítko do první polohy a pak ho pomalu povolte do původní polohy. Tím dojde k nasátí roztoku do špičky. Špičku nevyndávejte z roztoku a opakujte tento krok, dokud vnitřní stěna špičky není čistá.
5. Vyprázdněte špičku stiskem tlačítka ovladače do druhé polohy.
6. Podržte tlačítko ovladače zmáčknuté a vytáhněte špičku z kapaliny podél stěny nádoby ven a pak povolte tlačítko ovladače.

f) Zředování

Současné odměřování dvou různých kapalin v různých objemech. Nejdříve je do špičky nasáta jedna kapalina, potom vzduch a nakonec druhá kapalina. Vzduch vytváří mezeru mezi oběma kapalinami. Obě dvě kapaliny jsou vytlačeny ze špičky najednou v jednom kroku.

g) Sekvenční pipetování

Elektronické pipetory umožňují v tzv. režimu „stepper“ nebo „dispensing“ v závislosti na typu pipetoru vytlačovat kapalinu ze špičky v definovaných menších, ale *stejných* objemových alikvotních částech. Některé modely elektronických pipetorů umožňují kapalinu vytlačovat v naprogramované posloupnosti v *různých* objemech (tzv. sequential dispensing). Sekvenčním pipetováním se snižuje riziko kontaminace, urychluje sériové pipetování, snižuje spotřeba špiček a v neposlední řadě též riziko vzniku syndromu karpálního tunelu.

h) Míchání

Při ředění kapalin se často používá míchání. Lze použít manuální i elektronické pipetory.

ZÁSADY PŘI PIPETOVÁNÍ

a) objemů větších než 10 μl

Po vypuzení kapaliny ze špičky ulpí na vnitřní stěně špičky tenký film kapaliny, který není prostým okem viditelný. Pro dosažení vysoké správnosti pipetování se doporučuje zvlhčit vnitřní stěny špičky odměřovanou kapalinou (na povrchu ulpí slabý film kapaliny) tak, že 2–3krát kapalinu nasajeme a vypustíme.

Propláchnutí špičky je nutné pokaždé, kdy pipetujeme kapaliny s vysokou tenzí par nebo vysokou viskozitou anebo hydrofobní kapaliny. Smáčivé kapaliny (sérum, detergent) vytvoří na stěně špičky tenký film, který se následně již nepodaří vypustit. Bez předchozího smočení špičky by odměřovaný objem byl menší než požadovaný.

b) objemů menších než 10 μl

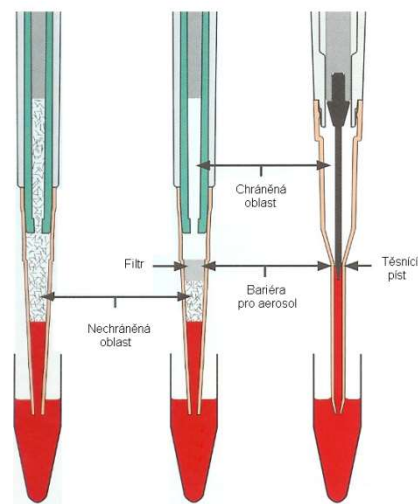
Pipetory pro objemy menší než 10 μl bývají zpravidla kalibrovány bez předchozího proplachu špičky, tzn., počítá se s tím, že na vnitřní stěně špičky ulpí část odměřované kapaliny. Špičky se proto nemusí proplachovat, ale musí se vyměřovat mezi jednotlivými vzorky.

c) infekčního materiálu

Při pipetování infekčního materiálu (např. krev, sérum, moč) musí být použity pipetory s odhazovačem špiček. Použité pipetory je nutné sterilizovat pomocí autoklávnování (121 $^{\circ}\text{C}$, 100 kPa, 20 min). Některé typy pipetorů lze autoklávnovat celé, jiné lze rozebrat a autoklávnovat pouze spodní díl. Po každém autoklávnování je třeba provést kontrolní kalibraci.

d) za sterilních podmínek

Pro sterilní pipetování se používají pipetory rovněž s vyhazovačem špiček, sterilní *špičky s integrovaným filtrem* (zabránění kontaminace z pipetoru), které jsou již naskládány v boxech (aby se na ně nemuselo sahat).

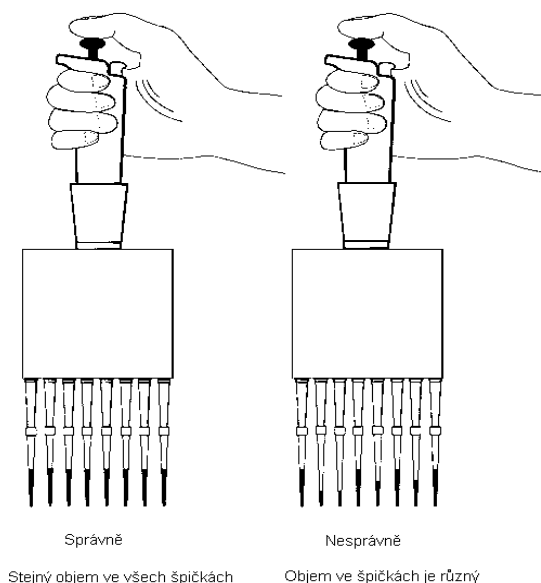


e) kyselin a zásad

Abychom zabránili případné korozi uvnitř pipety, použijeme špičky s filtrem, který zabrání vzniku aerosolu, který vniká do vnitra pipetoru.

f) multikanalovými pipetory

Při používání multikanalových pipetorů je velmi důležité správné nasazení všech špiček. Pro tento účel jsou špičky dodávány narovnané přímo ve skladovacích uzavíratelných krabičkách pro 96 špiček (8 x 12 pozic). Pro snadné nasazení prostředních špiček u multikanalového pipetoru bývá vlastní držák špiček v krabičce prohnut do oblouku \cap . Špičky se pak nasadí snadno kývavým pohybem ze strany na stranu.



Doporučené pipetování vybraných roztoků

Roztok/kapalina	Příklad	Technika pipetování	Poznámka
Vodné roztoky	Pufry, zředěné roztoky solí	Přímé	
Viskózní roztoky	Roztoky proteinů, nukleových kyselin, glycerol	„Positive displacement“ nebo reverzní	Pipetovat pomalu (jinak tvorba bublin)
Těkavé kapaliny	Methanol, hexan	Reverzní nebo „positive displacement“	Pipetovat rychle (odpařování), použít špičky s uhlíkovým filtrem
Tělesné tekutiny	Plná krev, sérum	Viz pipetování heterogenních roztoků	Nutno odstranit kapičky z vnějšího povrchu špičky otřením o okraj nádoby.
Zředěné kyseliny / zásady	HNO ₃ , HCl, NaOH	Přímé	Špičky s filtrem
Roztoky s hustotou větší než je hustota vody	H ₂ SO ₄ , H ₃ PO ₄ , NaOH	Reverzní	Pipetovat pomalu
Toxické látky		Přímé/reverzní	Špičky s filtrem

Shrnutí zásad správného postupu při pipetování „air displacement“ mikropipetami

- Používat špičky specifikované výrobcem dávkovače.
- Špičky jsou určeny pro jedno použití.
- Vytemperovat odměřovanou kapalinu na stejnou teplotu, jako je teplota mikropipetoru.
- Při manipulaci vždy držet mikropipetu s naplněnou špičkou ve svislé poloze.
- Propláchnout vždy špičky (2–5krát) odměřovanou kapalinou před vlastním pipetováním.
- Při nasávání kapaliny ponořit špičku 2–5 mm pod hladinu odměřované kapaliny.
- Vytemperovat mikropipetu na stejnou teplotu, jako byla teplota kalibrace (většinou pokojová).
- Při výměně špiček používat odhazovač špiček.
- Měnit špičku vždy, když na konci nebo uvnitř špičky zůstává vzorek po předchozím pipetování.
- Skladovat mikropipetu vždy ve svislé poloze.
- Při používání manuálních mikropipet ovládat píst pomalu a plynule palcem.
- Při používání elektronických mikropipet zvolit správnou rychlost pipetování dle typu kapaliny.
- U nastavitelných pipet nejprve nastavit poněkud vyšší objem a pak jej snížit na požadovaný nižší.
- Používat stejný postup nastavení objemu, rychlost pipetování, typ špiček v dané sérii pipetování.
- Pravidelně kalibrovat mikropipetu.
- Po každém prudším nárazu nebo povolení jednotlivých dílů mikropipetoru překalibrovat.
- Po pipetování kyselin nebo jiných korozivních kapalin, které uvolňují páry, rozeberte držák špiček a omyjte píst a O-kroužek destilovanou vodou.
- Nepipetujte kapaliny, které mají teplotu nad 70°C a pod 4°C.

Podle zásad správné laboratorní praxe odměrný materiál, včetně mikropipet, musí být pravidelně udržován, testován a kalibrován.

VYJÁDŘENÍ SPRÁVNOSTI A PŘESNOSTI

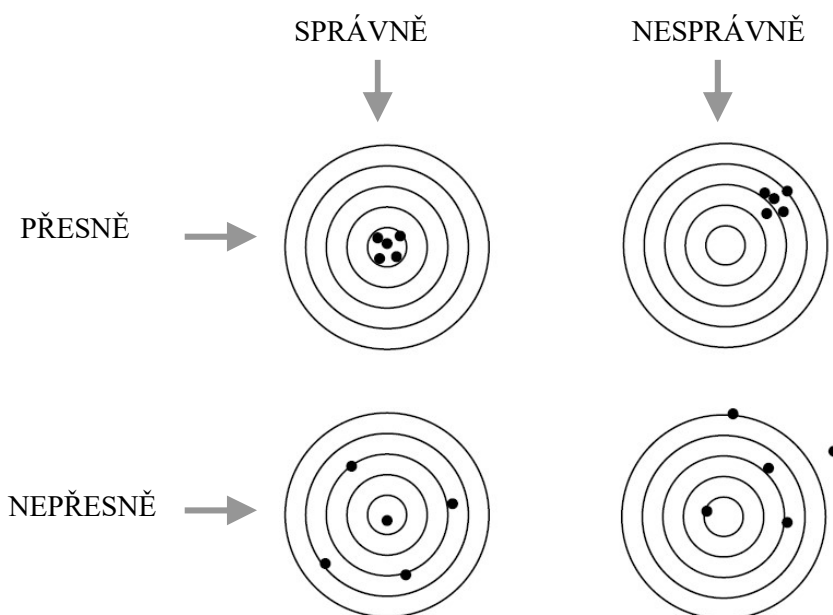
Každé měření určité fyzikální vlastnosti (např. odměřování objemu, vážení) či obecně laboratorní vyšetření je ovlivněno třemi druhy chyb – *hrubou* (výsledek značně odchylený od průměrné hodnoty), *systematickou* (výsledek je odchylený vždy jedním směrem od skutečné hodnoty) a *náhodnou* (rozptýl získaných hodnot kolem průměrné hodnoty).

Výsledky zatížené hrubými chybami se projeví jako odlehlé hodnoty z daného souboru výsledků a lze je identifikovat a vyloučit statistickými testy pro odlehlé výsledky. Výsledky zatížené systematickými chybami lze prokázat jejich porovnáním s výsledky nezatíženými systematickou chybou nebo jejich porovnáním se známou skutečnou hodnotou pomocí testů shodnosti. Výsledky zatížené náhodnými chybami vedou k jejich určitému rozdělení. Pod pojmem rozdělení výsledků rozumíme závislost pravděpodobnosti výskytu daného výsledku na jeho hodnotě. Převážná část souborů analytických výsledků má jednovrcholové rozdělení, které se blíží normálnímu neboli Gaussovu rozdělení.

Přesnost metody je právě charakterizována tímto jednovrcholovým rozdělením získaných výsledků. Každé jednovrcholové rozdělení hodnot lze popsat dvěma na sobě nezávislými parametry. První z nich se nazývá parametr centrální tendence, který charakterizuje *správnost* výsledků, a vyjadřujeme jej střední hodnotou souboru analytických výsledků, např. aritmetickým průměrem. Druhým z nich je parametr variability, jenž charakterizuje shodnost analytických výsledků, a vyjadřujeme jej rozptylem, popřípadě druhou odmocninou rozptylu nazývanou směrodatná odchylka.

Paralelní výsledky, které jsou zatíženy pouze malými náhodnými chybami, tedy *shodné*, a které nejsou zároveň zatíženy systematickou chybou, tedy *správné*, označujeme jako *přesné výsledky*.

Při validaci pipetorů se používají pojmy přesnost a správnost, resp. nepřesnost a nesprávnost. Správnost a přesnost lze snadno vysvětlit pomocí schématu terčů při střelbě:



Průměrnou hodnotu měřené veličiny (zjištěnou z n měření) lze vyjádřit aritmetickým průměrem:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_{n-1} + x_n}{n}$$

Nesprávnost lze vyjádřit pomocí **systematické chyby** (špatně nakalibrovaný přístroj/pipetor):

absolutní systematická chyba e_s (např. v μl): $e_s = \bar{x} - x_{\text{nominální}}$

relativní systematická chyba e_s (%): $e_s = \frac{\bar{x} - x_{\text{nominální}}}{x_{\text{nominální}}} \times 100$

Nepřesnost vyjadřuje **náhodná chyba**, kterou charakterizuje směrodatná odchylka nebo variační koeficient:

směrodatná odchylka s (např. v μl): $s = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_{n-1} - \bar{x})^2 + (x_n - \bar{x})^2}{n - 1}}$

variační koeficient VK (%): $VK = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$

Pozn.: směrodatná odchylka nebo její násobek vyjadřuje pouze hranici, kterou může výsledek s určitou pravděpodobností překročit, nikoliv hodnotu náhodné chyby.

PRAKTICKÁ ČÁST

Úkol 2.1 Způsoby použití pipetorů a zásady správného postupu

Materiál: Nastavitelné pipety, špičky, mikrozkmavky, erlenka s detilovanou vodou, lékovka s glycerolem, roztok proteinů, lékovka s acetonem.

Provedení:

- Nastavte na pipetoru 50 % jeho nominálního objemu.
- Dle pokynů vyučujícího procvičte různé způsoby pipetování pomocí pipetorů (přímé a reverzní pipetování, pipetování heterogenních roztoků, míchání).

- ✍ 1. Pokuste se na základě uvedených fyzikálních vlastností kapalin a roztoků zvolit správný způsob pipetování a svoji volbu zdůvodněte zakroužkováním limitující fyzikální veličiny.

Fyzikální vlastnosti vybraných kapalin/roztoků při 20 °C

Kapalina/Roztok	Hustota (kg dm ⁻³)	Tenze par* (kPa)	Viskozita* (mPa s)	Doplňte způsob pipetování ⁺
Voda	1,00	2,3	1,0 (1,3)	
Krevní plazma	1,03	-	1,5–2	
Plná krev (37 °C)	1,06	-	3–4	
Glycerol	1,26		1470	
Methanol (100 %)	0,79	12,8	1,2	
Hydroxid sodný (30 %)	1,33			
Kyselina fosforečná (85 %)	1,69			

*s klesající teplotou klesá tenze par, ale roste viskozita kapaliny; ⁺Způsob pipetování: a) použít upravený pipetor na odlišnou hustotu než voda; b) přímé pipetování; c) reverzní pipetování; d) několikrát propláchnout špičku roztokem před vlastním pipetováním; e) nelze použít pipetor využívající principu „vzduchového polštáře“.

Úkol 2.2 Gravimetrická kalibrace mikropipetoru

Kalibrací je míněno srovnání aktuálně odměřovaného objemu s objemem, který je nastavený na pipetoru (tzv. nominální objem). Objem aktuálně odměřovaný pipetorem se zjišťuje buď gravimetricky (vážením) nebo fotometricky. U nastavitelných pipetorů se testuje správnost pipetování při 10 %, 50 % a 100 % jeho nominálního objemu (min. 10krát pro každý objem; podrobně je popsáno v normě EN ISO 8655). Při kalibraci pipetoru je nutno použít typ špiček, který se bude dále používat při pipetování v provozu!

Kalibrace by se měla provádět minimálně jednou za 3 měsíce, pokud se pipetor používá denně, a vždy po výměně jednotlivých komponent, po každém vnitřním čištění pipetoru a vždy zjistí-li se při pravidelné vizuální kontrole jakéhokoliv poškrábání, poškození spodního dílu, uvolnění spojení jednotlivých dílů nebo při mechanickém nárazu pipetoru (např. spadnutí na zem).

Vyhodnocení a posouzení kalibrace se provádí zjištěním **nesprávnosti** (relativní systematické chyby) a **nepřesnosti** pro daný objem (náhodné chyby – variačního koeficientu).

Pokud **nesprávnost** pipetování překračuje deklarovanou hodnotu, je možné pipetor seřídít pomocí seřizovacího šroubu. **Seřízení (nastavení) pipetoru** spočívá v několika kalibracích (nejméně jedné před a jedné po seřízení) a otáčení kalibračního šroubu, pomocí kterého se mění nominální objem. Seřízením pipetoru lze ovlivnit pouze správnost pipetování.

Seřízení pipetoru se používá též pro adaptaci pipetoru na pravidelně odměřovanou kapalinu, která se výrazně odlišuje hustotou od hustoty vody (např. koncentrované roztoky solí).

Naproti tomu pokud bude příliš vysoká **nepřesnost** pipetování, tak je potřeba pipetor nejdříve opravit a pak provést novou kalibraci a případně i seřízení pipetoru.

V praktickém cvičení budete z časových důvodů provádět pouze orientační kalibraci nastavitelného pipetoru pro maximální nominální objem.

Materiál: Nastavitelné pipetory 100–1000 μl , špičky, analytické váhy s přesností na desetiny mg, odplyněná destilovaná voda, kádinky 50 ml, plastové váženky, teploměr, statistický program nebo tabulkový procesor, fén, tampóny buničiny, nádoba na odpad.

Provedení:

- Nastavte pipetor na maximální nominální objem ($V_{\text{set}} = 1000 \mu\text{l}$).
- Proveďte **test těsnosti**. Do špičky nasajte *odplyněnou* destilovanou vodu. Pipetor držte ve svislé poloze a špičkou se dotkněte hladiny vody (nebo ji ponořte nepatrně cca 1 mm pod hladinu). Po dobu minimálně 1 min by ze špičky neměla ubývat voda.
- Změřte a zaznamenejte teplotu vzduchu a teplotu destilované vody.
- Vytárujte váženku na analytických vahách (*návod k použití vah bude přiložen*).
- Pipetujte nastavený objem 1000 μl destilované vody do vytárované váženky.
- Změřte s přesností na desetiny miligramů hmotnost odměřené vody (m_1).
- Obsah váženky vylijte do odpadu a váženku osušte pomocí tampónů a krátkým ofukem z fénu.

- Opakujte předchozí 4 kroky ještě 4krát s použitím vždy **suché** váženky (získáte hodnoty m_2 , m_3 , m_4 , m_5).
- Vypočtete aritmetický průměr hmotnosti (mg) z pěti měření ($n = 5$):

$$\bar{m} = \frac{m_1 + m_2 + m_3 + m_4 + m_5}{n}$$

- V tabulce (*bude přiložena*) naleznete podle změřené teploty vody konverzní faktor Z (jedná se o převrácenou hodnotu hustoty vody) a převed'te průměrnou hmotnost na objem (μl):

$$\bar{V} = \bar{m} \times Z$$

- Vypočtete nesprávnost pipetování, tj. relativní systematickou chybu měření (%):

$$e_s = \frac{\bar{V} - V_{\text{set}}}{V_{\text{set}}} \times 100$$

- Vypočtete nepřesnost pipetování, tj. náhodnou chybu měření jako variační koeficient (%):

$$VK = \frac{\sqrt{\frac{(m_1 - \bar{m})^2 + (m_2 - \bar{m})^2 + (m_3 - \bar{m})^2 + (m_4 - \bar{m})^2 + (m_5 - \bar{m})^2}{n - 1}}}{V_{\text{set}}} \times Z \times 100$$

✍

2. Všechny naměřené a získané údaje zaznamenejte do tabulky:

Hmotnost	m_1	m_2	m_3	m_4	m_5
Naměřené hodnoty (mg)					
\bar{m} (mg)					
Teplota vody ($^{\circ}\text{C}$)			Z ($\mu\text{l}/\text{mg}$)		
\bar{V} (μl)			VK (%)		
e_s (μl)			e_s (%)		
Max. e_s (%) dle ISO 8655			Max. VK (%) dle ISO 8655		

✍

3. Srovnajte vypočtenou nesprávnost a nepřesnost pipetování s maximálními přípustnými hodnotami dle ISO 8655 (*viz příloha v praktickém cvičení*). Pokud vypočtené hodnoty budou přesahovat toleranční limit, zhodno'te, zda analytické váhy opravdu správně váží a zda jsou podmínky v místnosti dostatečné pro vážení (průvan, přímé sluneční světlo na váhy).

Úkol 2.3 Ověření přesnosti opakovaného pipetování

Při vyloučení hrubých chyb dochází při opakovaném aditivním procesu (např. odměření objemu 200 μl získaného dvojím pipetováním 100 μl) k šíření chyb jak systematických (absolutní hodnoty systematických chyb jednotlivých kroků se sčítají), tak i náhodných (sčítají se hodnoty rozptylů s^2 , resp. VK^2 jednotlivých kroků).

Materiál: Nastavitelné pipety 100–1000 μl , špičky, analytické váhy s přesností na desetiny mg, odplyněná destilovaná voda, kádinky 50 ml, plastové váženky, teploměr, statistický program nebo tabulkový procesor, fén, tampóny buničiny.

Provedení:

- ✍ 4. Změřte hmotnost 1 ml destilované vody (m') odměřeného pomocí stejného pipetoru jako v předchozím úkolu, nastaveného však na objem 100 μl (do váženky pipetujte 10krát objem 100 μl).
- ✍ 5. Srovnajte získanou hmotnost m' s aritmetickým průměrem \bar{m} z předchozího úkolu.
- ✍ 6. Zvažte, jaký postup při odměřování daného objemu je přesnější, zda pipetovat přímo 1 ml nebo opakovaně 10krát 100 μl . Kterým postupem odměříme správněji požadovaný objem kapaliny?

Úkol 2.4 Fotometrické ověření přesnosti ředění

Při průchodu elektromagnetického záření z oblasti ultrafialové nebo viditelné části spektra měřeným roztokem dochází k jeho absorpci. Velikost absorpce závisí na vlnové délce záření, na koncentraci absorbující látky v roztoku a na tloušťce měřené vrstvy. Při dané vlnové délce záření existuje mezi koncentrací absorbující látky a veličinou nazývanou **absorbance** A přímá úměra. Tuto závislost vyjadřuje Lambertův-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon_{\lambda} c l$$

kde ε_{λ} je molární absorpční koeficient (jeho hodnota odpovídá absorbanci látky o koncentraci 1 mol/l a tloušťce měřené vrstvy 1 cm), c je látková koncentrace (mol/l) a l tloušťka měřené vrstvy (cm).

Daný vztah platí pouze pro monochromatické záření a pro zředěné homogenní roztoky.

Pro měření absorbance se *zpravidla* volí vlnová délka odpovídající absorpčnímu maximu stanovované látky. Absorbance jsou měřeny proti slepému vzorku (činidlo/rozpuštědlo bez měřené látky).

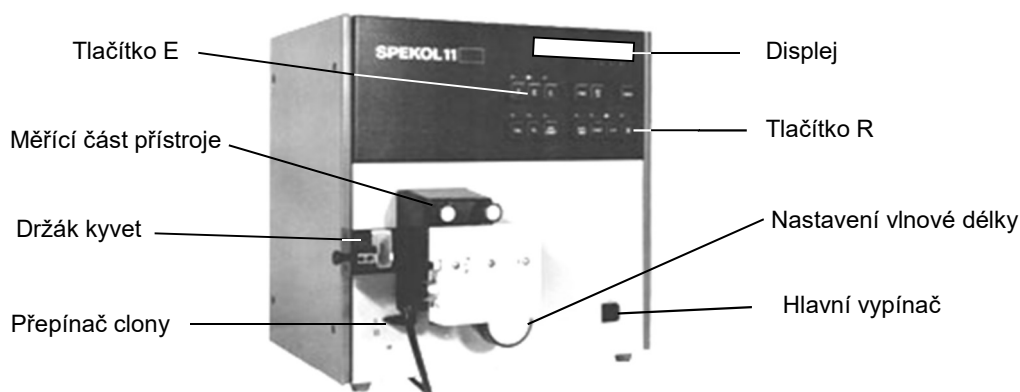
Materiál: Nastavitelné pipety 100–1000 μl , špičky, 10ml zkumavky se zátkami. Zásobní roztok modré skalice (0,5 mol/l). Spektrofotometr, 2 kyvety, stříčka, nádoba na odpad, vatové tampóny, lihový popisovač.

Provedení:

- Odměřte do označených zkumavek dle tabulky pomocí nastavitelného pipetoru nejdříve deionizovanou vodu.
- Potom přidejte dle tabulky požadovaný objem zásobního roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Zkumavky uzavřete zátkou a obsah promíchejte.
- Přesnost postupu ředění roztoku modré skalice ověřte změřením absorbance roztoku při vlnové délce 620 nm proti demi-vodě.

Zjednodušený návod na obsluhu spektrofotometru Spekol 11

- Na spektrofotometru nastavte otočným knoflíkem vlnovou délku 620 nm.
- Nastavte mód měření na absorbanci stisknutím tlačítka **E** (zelená dioda svítí nad tlačítkem).
- Vložte kyvetu naplněnou do cca $\frac{1}{2}$ objemu demi-vodou do držáku a zasuňte do přístroje.
- Nastavte absorbanci na nulu stisknutím tlačítka **R** (čekaňte, dokud se neobjeví na displeji nuly).
- Postupně vložte kyvetu naplněnou do cca $\frac{1}{2}$ objemu měřeným roztokem do druhé pozice v držáku a opatrně zasuňte do měřicí části přístroje.
- Odečtěte hodnotu absorbance roztoku na displeji – doplňte do tabulky níže.
- Po skončení měření vypláchněte kyvetu demi-vodou a uveďte pracovní místo do pořádku.



7. Doplňte tabulku a vynesete na milimetrový papír hodnoty absorbance proti koncentraci penta-hydrátu síranu měďnatého. Získanými body proložte přímkou. Odklon jednotlivých bodů od přímky značí nepřesnost v pipetování anebo měření absorbance. Vyhodnoťte vaše výsledky.

Zkumavka	Koncentrace CuSO ₄ .5H ₂ O (mmol/l)	Zředění*	Zásobní roztok CuSO ₄ .5H ₂ O (μl)	Deionizovaná voda (μl)	Absorbance A ₆₂₀
1	500	1	2 × 1000	0	
2	250	2	600	600	
3			300	600	
4			300	900	
5			250	1000	
6			200	1000	
7			160	960	
8			140	980	
9			120	960	
10			110	990	

* číslo zředění = $V_{\text{celkový}}/V_{\text{zás. roztoku modré skalice}}$