|  |
| --- |
| **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 namáčknuta do první pozice, dijde k vytlačení kapaliny pomocí vzduchu v pipetě. K úplnému vyprázdnění špičky je pipeta domáčknuta o druhé pozice.



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

V rámci pipetování existují tři základní techniky:

*Přímá technika pipetování*

* Doporučená pro vodné roztoky jako pufry, 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 | ↓ | ↑ |  |  |

*Reverzní 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 hexakyanoželezitanu draselného***

*Postup práce:*

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

***B. Příprava 1.2 mM roztoku hexakyanoželezitanu draselného***

*Postup práce:*

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

A = ε.c.l (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

*Výsledky:*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **A420** | **c (mmol.l-1)****zředěný roztok K3[Fe(CN)]6** | **ε (l.mol-1.cm-1)** |
|  |  |  |

***C. Použití pipet s nastavitelným objemem 1-10l, 10-100 l a 100-1000 l***

*Postup práce:*

1. Do sady mikrozkumavek pipetujte reagencie 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 hexakyanoželezitanu zjištěného v předchozí části úlohy vypočítejte dle naměřených absorbancí koncentrace hexakyanoželezitanu draselného ve zkumavkách.
2. Vypočtěte průměry ze tří naměřených hodnot.
3. Následně pro určení přesnosti vaší práce vypočítejte směrodatnou odchylku dle vztahu (2).

$s=\sqrt{\frac{\sum\_{i=1}^{N}(c\_{i}- c̅)^{2}}{N-1}}$ (2)

1. Pro tabulku č. 2 sestrojte graf závislosti A420 na koncentraci K3[Fe(CN)6] ve zkumavce (například v programu MS Excel použijte XY bodový graf a body proložte lineární spojnicí trendu). Vzhledem k tomu, že jste vynulováním na slepý vzorek přiřadili nulové koncentraci K3[Fe(CN)6] nulovou absorbanci, musí přímka procházet počátkem grafu [0;0] (v programu MS Excel: Formát spojnice trendu/Možnosti/Hodnota Y=0).
2. 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** | **A420** | **c (mmol.l-1)****K3[Fe(CN)6]** | **Ø c (mmol.l-1)** | **s** |
| **30 mM K3[Fe(CN)6] [l]** | **destilovaná voda [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 |  |  |  |  |
| **11** | 20 | 980 |  |  |
| **12** | 20 | 980 |  |  |

Tabulka 2.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **zkumavka****č.** | **pipetovaný objem** | **A420** | **c (mmol.l-1)****K3[Fe(CN)6]** | **Ø c (mmol.l-1)** | **s** |
| **3 mM K3[Fe(CN)6] [l]** | **destilovaná voda [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 |  |  |

Tabulka 3.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **zkumavka****č.** | **pipetovaný objem** | **A420** | **c (mmol.l-1)****K3[Fe(CN)6]** | **Ø c (mmol.l-1)** | **s** |
| **1.2 mM K3[Fe(CN)6] [l]** | **destilovaná voda [l]** |
| **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 |  |  |

**Okomentujte přesnost vaší práce:**

**Vložte graf závislosti A420 na koncentraci K3[Fe(CN)6] ve zkumavce (nezapomeňte uvést jednotky a popisy os!) a srovnejte molární extinkční koeficient určený na základě odečtu z rovnice přímky s tím, určeným v první části úlohy:**