

## **Praktyczne ćwiczenie technik pipetowania**

### **Wprowadzenie**

Pipety automatyczne są jednym z podstawowych narzędzi odmierzania objętości w laboratorium bioanalitycznym, szczególnie przy pracach w skali mikro. Zasada działania pipet automatycznych polega na zastosowaniu tłoka z kontrolowanym i regulowanym przesuwem, którego ruch powoduje zassanie cieczy w miejsce wypychanego wcześniej powietrza. Tłok jest uszczelniany uszczelką O-ring, aby zapobiec wyciekowi pipetowanej cieczy. Stan uszczelki decyduje o poprawnej pracy pipety i powtarzalności wyników, stąd konieczność okresowego sprawdzania i serwisowania pipet automatycznych.

### ***Podstawowe wskazówki gwarantujące poprawną pracę pipet automatycznych***

#### ***Zawsze***

- ✓ Zawsze obchodź się delikatnie z autopipetą – w przeciwnym razie pipeta traci kalibrację.
- ✓ Zawsze upewnij się, że jednorazowa końcówka jest poprawnie zamocowana na końcu pipety.
- ✓ Zawsze trzymaj pipetę pionowo w trakcie napełniania lub opróżniania końcówki.
- ✓ Zawsze zwalnij tłok powoli i równomiernie w trakcie napełniania pipety.
- ✓ Zawsze w trakcie dozowania cieczy dotykaj końcówką ścianki probówki (lub dna pustego naczynia) do której ciecz jest dozowana i pozwól na całkowite opróżnienie końcówki (1-2 sek).
- ✓ Zawsze używaj świeżej końcówki dla nowego odczynnika lub próbki.

#### ***Nigdy***

- ✓ Nigdy nie nastawiaj objętości poza skalą regulacji pipety.
- ✓ Nigdy nie używaj pipety bez poprawnie założonej końcówki.
- ✓ Nigdy nie odkładaj pipety z końcówką napełnioną cieczą – ciecz może zalać uszczelnienie tłoka, co spowoduje rozszczelnienie.
- ✓ Nigdy nie zwalnij tłoka gwałtownie podczas napełniania końcówki.
- ✓ Nigdy nie zanurzaj korpusu pipety w cieczy dozowanej.
- ✓ Nigdy nie spaceruj po laboratorium z napełnioną pipetą.

- ✓ Nigdy nie zanurzaj pełnej końcówki (w trakcie dozowania) pod powierzchnię cieczy znajdującej się w probówce.

### ***Nastawianie objętości pipetowania***

Obracaj pierścień skali zgodnie z kierunkiem wskazówek zegara, aby zwiększyć objętość lub niezgodnie z tym kierunkiem, aby zmniejszyć objętość pipetowanej cieczy.

### **Techniki pipetowania**

Pipety automatyczne mogą być używane w dwojaki sposób: albo według techniki “*pipetowanie normalne*”, albo stosując technikę “*pipetowanie różnicowe*”.

#### ***Pipetowanie normalne***

1. Wciśnij tłok do pierwszego oporu, a następnie zanurz końcówkę pipety pionowo 2-3 mm pod powierzchnię pipetowanej cieczy.
2. Zwalniaj tłok powoli zapewniając gładki jego przesuw i zassanie cieczy do końcówki.
3. Czekaj 2-3 sekundy i wyciągnij końcówkę z cieczy przesuując po ściance naczynia (pionowo).
4. Przenieś pipetowaną ciecz do naczynia docelowego – dotykając końcówką ścianki lub dna naczynia, powoli naciśnij tłok do pierwszego oporu.
5. Dociśnij tłok do drugiego oporu – “wydmuchnij” z końcówki ewentualne pozostałości pipetowanej cieczy.

#### ***Pipetowanie różnicowe***

1. Wciśnij tłok do drugiego oporu, a następnie zanurz końcówkę pipety pionowo 2-3 mm pod powierzchnię pipetowanej cieczy.
2. Zwalniaj tłok powoli zapewniając gładki jego przesuw i zassanie cieczy do końcówki.
3. Czekaj 2-3 sekundy i wyciągnij końcówkę z cieczy przesuując po ściance naczynia (pionowo).
4. Przenieś pipetowaną ciecz do naczynia docelowego – dotykając końcówką ścianki lub dna naczynia, powoli naciśnij tłok do pierwszego oporu. Część cieczy pozostanie w końcówce.
5. Nie zwalniając nacisku na tłok (pierwszy opór), przenieś pipetę do naczynia wyjściowego z dozowaną cieczą i opróżnij końcówkę poprzez dociśnięcie tłoka do drugiego oporu.

### **Precyzja i dokładność:**

Precyzja opisuje powtarzalność wyników w serii pomiarowej; dokładność to zgodność wartości mierzonej z wartością rzeczywistą.

### **Cel ćwiczenia:**

*Ćwiczenie ma na celu praktyczną naukę technik pipetowania (pipetowanie normalne i różnicowe) z użyciem pipet automatycznych oraz analizę precyzji obu technik. Dodatkowo, ćwiczenie zapoznaje z podstawami pomiarów spektrofotometrycznych.*

### **Ćwiczenie 1**

#### **Sprzęt i odczynniki**

- 2 Autopipety: 0.5-10  $\mu\text{L}$  oraz 10 - 100  $\mu\text{L}$ , stojak do probówek typu eppendorf,
- 6 Probówek typu eppendorf o poj. 1.5 mL (na studenta),
- Roztwory barwników I, II, III & IV,
- Bezbarwne (0.5-10  $\mu\text{L}$ ) oraz żółte końcówki (10-200  $\mu\text{L}$ ),
- Wyrząsarka typu Vortex.

#### **Wykonanie ćwiczenia**

##### **• Zadanie 1A**

Wykonaj poniższe zadanie stosując technikę „pipetowanie normalne”

1. Oznacz trzy 1.5 mL probówki literami ‘A’, ‘B’ i ‘C’ (wodoodporny marker).
2. Dodaj odpowiednie objętości roztworów I – IV zgodnie z Tabelą 1.

*Tabela 1: Objętości pipetowanych roztworów w ćwiczeniu 1A i 1B.*

<b>Probówka</b>	<b>Roztwór I</b>	<b>Roztwór II</b>	<b>Roztwór III</b>	<b>Roztwór IV</b>
<b>A</b>	25 $\mu\text{l}$	35 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	-
<b>B</b>	25 $\mu\text{l}$	35 $\mu\text{l}$	-	10 $\mu\text{l}$
<b>C</b>	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$

3. Zamknij probówki i wymieszaj ich zawartość poprzez wstrząsanie (delikatne uderzenie dnem probówki o blat stołu).

4. Umieść probówki na wytrząsarce typu Vortex i uruchom ją na kilka sekund (załączenie przez nacisk).

5. W każdej probówce powinno się znajdować 70  $\mu\text{l}$  roztworu. Aby sprawdzić, czy Twoje pipetowanie było dokładne i precyzyjne, nastaw na autopipecie objętość 70  $\mu\text{l}$  i bardzo ostrożnie, kolejno pobierz roztwór z każdej probówki. Czy w którejkolwiek z probówek pozostały resztki roztworu? Czy w końcówce pipety pojawił się pęcherz powietrza?

6. Jeśli finalne objętości roztworów różnią się istotnie, powtarzaj eksperyment do uzyskania precyzyjnych i dokładnych wyników.

#### • **Zadanie 1B**

Powtórz Zadanie 1A stosując technikę “różnicowe pipetowanie”.

Porównaj wyniki uzyskane za pomocą obu technik i sformułuj wnioski końcowe.

### *Ćwiczenie 2*

#### **Sprzęt i odczynniki**

- Spektrofotometr UV-Vis SP-830 *PLUS* firmy Metertech lub Spectroquant<sup>®</sup>Pharo 100/300,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800  $\mu\text{l}$ ) do pomiarów spektrofotometrycznych ( $d = 10 \text{ mm}$ ),
- 2 Autopipety: 10 - 100  $\mu\text{L}$  i 100 - 1000  $\mu\text{L}$ ,
- Żółte (10-200  $\mu\text{L}$ ) i niebieskie (100 - 1000  $\mu\text{L}$ ) końcówki do pipet,
- 8 probówek o poj. 10 mL,
- Roztwór dichromianu (VI) potasu (1g/L).

#### **Wykonanie ćwiczenia**

##### • **Zadanie 2A** (Zastosuj pipetowanie normalne)

1. Przenieś 100  $\mu\text{l}$  roztworu dichromianu potasu do probówki oznaczonej literą T (Test).
2. Do innej probówki oznaczonej literą O (próba Odniesienia) przenieś 100 $\mu\text{l}$  wody destylowanej.
3. Do obu probówek dodaj po 2 ml wody destylowanej i dobrze wymieszaj ich zawartość.

4. Zmierz absorbancję roztworu T przy długości fali 350 nm, stosując roztwór O jako odnośnik.

Jeśli zmierzona absorbancja nie mieści się w zakresie  $0,590 \pm 0,050$ , należy powtarzać zadanie 2A aż do uzyskania zadowalającej dokładności. Końcową wartość absorbancji zapisz w Tabeli 2.

• **Zadanie 2B** (Zastosuj pipetowanie normalne)

1. Do próbki oznaczonej literą O (próba Odniesienia) przenieś 100µl wody destylowanej.

2. Do pięciu próbek oznaczonych (T1, T2, T3, T4, T5) przenieś po 100µl roztworu dichromianu potasu.

3. Do wszystkich próbek dodaj po 2 ml wody destylowanej i dobrze wymieszaj ich zawartość.

4. Zmierz absorbancję roztworów testowych przy długości fali 350 nm, stosując roztwór O jako odnośnik, podobnie jak w poprzednim zadaniu.

5. Zapisz wyniki pomiarów w Tabeli 2.

• **Zadanie 2C** (Zastosuj pipetowanie różnicowe)

Powtórz Zadanie 2B stosując technikę “pipetowanie różnicowe”.

**Opracowanie wyników**

*Tabela 2. Wyniki pomiaru absorbancji dla Ćwiczeń 2A, 2B i 2C.*

<i>Wyniki pomiaru absorbancji</i>			
<b>Ćwiczenie 2A</b>	<b>Probówka</b>	<b>Ćwiczenie 2B</b>	<b>Ćwiczenie 2C</b>
	T1		
	T2		
	T3		
	T4		
	T5		
	Średnia		
	SD		
	%CV		

Porównaj wyniki uzyskane za pomocą obu technik i sformułuj wnioski końcowe dotyczące precyzji.

**Zagadnienia:**

1. Precyzja i dokładność.
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).

**Literatura uzupełniająca:**

1. W. Szczepaniak, Metody instrumentalne w analizie chemicznej, PWN Warszawa 1996.