eppendorf

USERGUIDE No. 20

Der Einfluß von Dosiertechniken auf das Analysenergebnis

Kornelia Ewald, Eppendorf AG, Deutschland

Einleitung

Für Dosiersysteme gibt es entsprechend ihrer Konstruktion optimale Einsatzgebiete, aber auch physikalische Grenzen in der Anwendung. Um die hohen Ansprüche an die Präzision und Richtigkeit zu erfüllen, ist auf der einen Seite ein präzises Gerät mit qualitativ hochwertigen Spitzen notwendig, auf der anderen Seite erfordert die Anwendung aber auch ausreichend praktische Erfahrung, korrekte Handhabung und Sauberkeit der Dosiersysteme.

Dosiertechniken

Die am häufigsten benutzten Dosiertechniken sind das Vorwärtspipettieren, reverses Pipettieren, Dispensieren, Sequentielle Dispensieren und Verdünnen. Während mechanische Pipetten sich nur für das Vorwärts- und reverses Pipettieren eignen, decken elektronische Dosiersysteme häufig alle genannten Funktionen ab. Die Wahl der jeweils geeigneten Dosiertechnik kann sich signifikant auf die Analyseergebnisse auswirken.
Die Technik des Vorwärtspipettierens (Abb. 1) eignet sich für wässrige Lösungen, die geringe Konzentrationen von Protein oder Detergens enthalten können. Das Vorbenetzen der Spitze verbessert das Analyseergebnis.
Für viskose oder schäumende Flüssigkeiten können die Ergebnisse durch reverses Pipettieren (Abb. 2) erheblich verbessert werden. Dabei wird die Flüssigkeit mit Überhub angesaugt und ohne Überhub abgegeben. Ein Rest der Flüssigkeit verbleibt dabei in der Kunststoffspitze und wird anschließend verworfen oder in das Entnahmegefäß zurückgegeben.

Beim Dispensieren wird die aufgenommene Flüssigkeit in definierten Teilschritten abgegeben. Diese Technik findet häufig Anwendung zum Abarbeiten langer Messreihen oder zum Befüllen von Mikrotestplatten.
Beim Sequentiellen Dispensieren werden unterschiedliche Volumina einer Lösung nacheinander in der gewünschten Reihenfolge abgegeben. Diese Technik wird oft beim serologischen Arbeiten oder bei ähnlichen Applikationen angewendet.
Beim Verdünnen von Flüssigkeiten wird zunächst das erste Volumen gefolgt von einer Luftblase und dem zweiten Volumen angesaugt. Beide Volumina werden anschließend in einem Schritt abgegeben. Diese Dosiertechnik erhöht den Durchsatz und reduziert die Ermüdungserscheinungen gegenüber dem zweimaligen Ansaugen und Abgeben mit manuellen Pipetten – speziell bei größeren Volumina und Mehrkanalpipetten.

Pipettiertechniken

Transfer	Vorwärtspipettieren
Flüssigkeitsaufnahme	1. Bedienknopf bis zum 1. Anschlag herunterdrücken 2. Bedienknopf vollständig zurüchgleiten lassen
Flüssigkeitsabgabe	3. Bedienknopf über den 1. Anschlag weiter bis zum 2. Anschlag herunterdrücken
Beobachtung	4. Anschließend befindet sich keine Flüssigkeit in der Spitze

Anwendung wird für Standardlösungen wie Wasser, Puffer, verdünnte Salzlösungen, verdünnte Säuren und Laugen empfohlen.

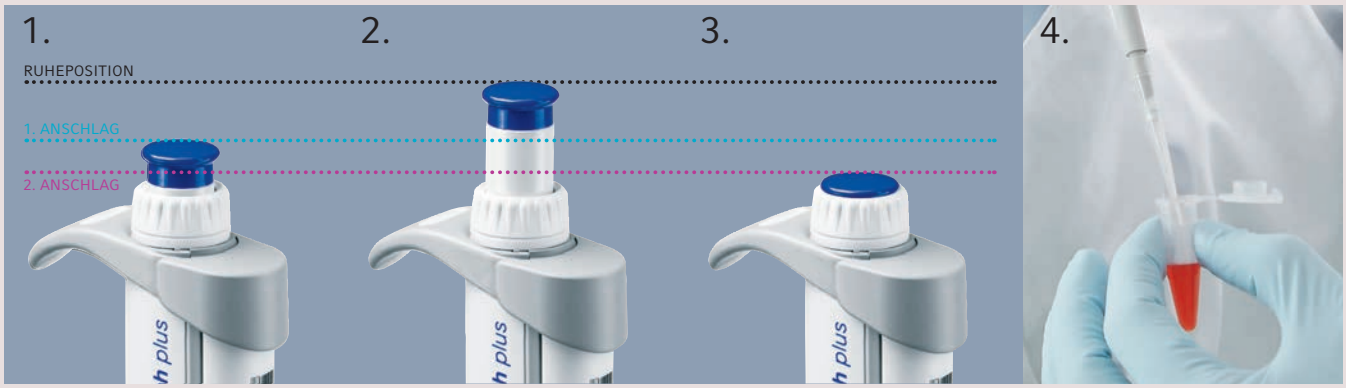

Abbildung 1: Vorwärtspipettieren

Transfer	Reverses Pipettieren
Flüssigkeitsaufnahme	1. Bedienknopf bis zum 2. Anschlag herunterdrücken 2. Bedienknopf vollständig zurüchgleiten lassen
Flüssigkeitsabgabe	3. Bedienknopf bis zum 1. Anschlag herunterdrücken
Beobachtung	4. Anschließend befindet sich noch Flüssigkeit in der Spitze (Überhubvolumen)

Anwendung wird für viskose Lösungen, Lösungen mit hohem Dampfdruck, stark benetzende Lösungsmittel empfohlen.

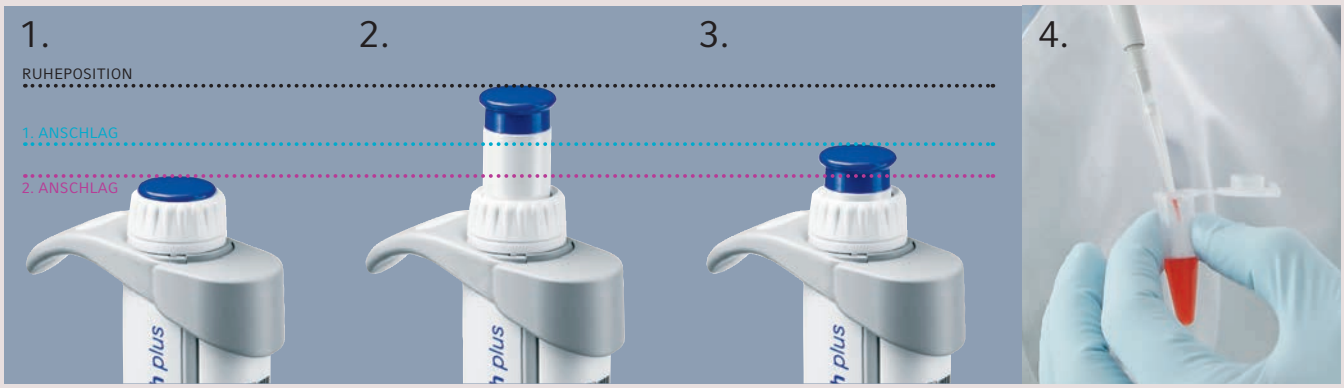

Abbildung 2: Reverses Pipettieren

Optimale Handhabung manueller Pipetten

Unabhängig von der jeweiligen Dosiertechnik sollten während des Pipettierens folgende Punkte beachtet werden:

> Im Fall von Luftpolsterpipetten sollte die Pipettenspitze so gewählt werden, dass das Luftpolster zwischen dem Pipettenkolben und der Flüssigkeitsoberfläche so klein wie möglich ist. Je kleiner die Spitze ist, desto kleiner ist das Luftvolumen und desto höher ist die Richtigkeit der Ergebnisse.

> Zum Ansaugen der Flüssigkeit sollte die Spitze nur wenige Millimeter in das Medium eintauchen (Tab. 1, Abb. 3).

> Die gefüllte Spitze sollte an der Gefäßwand abgestreift werden, um Flüssigkeitsreste an der Außenfläche der Spitze zu vermeiden.

> Das zwei- bis dreimalige Vorbenetzen der Spitze verbessert die Richtigkeit und Präzision der Ergebnisse.

> Die Flüssigkeitsaufnahme sollte langsam und gleichmäßig erfolgen.

> Eine Wartezeit von 1 bis 3 s für das Aufsteigen der Flüssigkeit in die Spitze sollte berücksichtigt werden.

Die Pipette sollte während des Ansaugens senkrecht gehalten werden. Mit zunehmendem Neigungswinkel der Pipette beim Aufziehen der Flüssigkeit sinkt der hydrostatische Druck der Flüssigkeitssäule in der Spitze und es wird ein größeres Volumen angesaugt [1]. Die Volumenabweichung lässt sich für beliebige Pipettenvolumina und Neigungswinkel abschätzen. Bei einem Winkel von 45° gegenüber der Senkrechten beträgt das Mehrvolumen bei einer 1000-µL-Pipette 2,9 µL oder 0,29%. Für eine 100-µL-Pipette bei einem Winkel von 60° ergibt sich ein Mehrvolumen von 0,53 µL oder 0,53% (Abb. 3).
Die Tatsache, dass verschiedene Personen mit ein und derselben Pipette nicht genau dasselbe Volumen pipettieren, lässt sich unter anderem auch auf unterschiedliche Neigungswinkel beim Aufziehen der Flüssigkeit zurückführen. Obwohl die Auswirkung im Einzelnen klein ist, kann der Fehler in Verbindung mit anderen Versäumnissen insgesamt wesentlich größer sein.

Tabelle 1

Volumen [µL]	Optimale Eintauchtiefe [mm]
0,1 - 1	1
1 - 100	2 - 3
101 - 1000	2 - 4
1001 - 10000	3 - 6

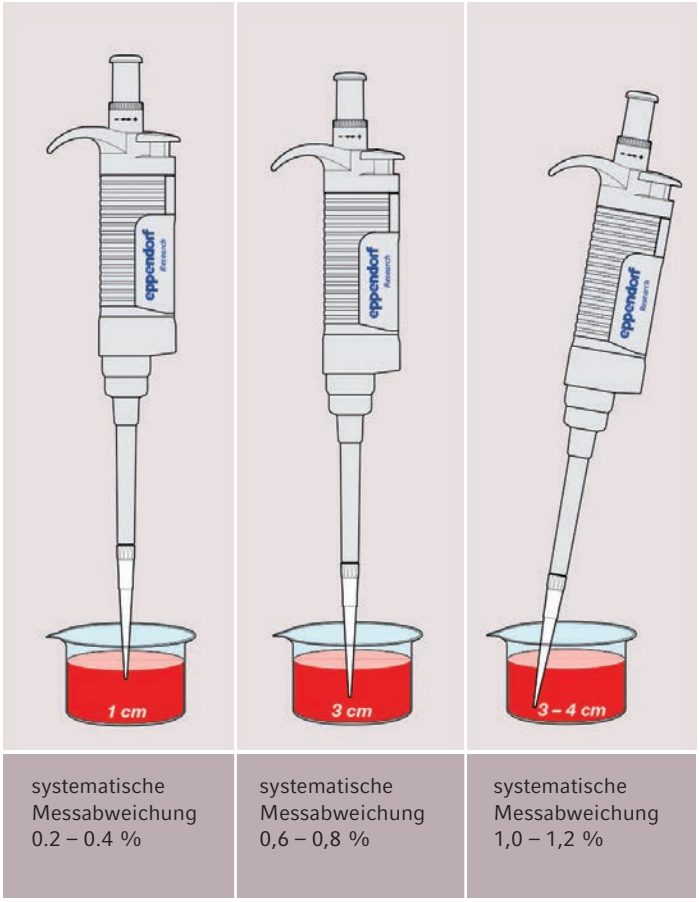

Abbildung 3: Der Einfluss der Eintauchtiefe und des Haltewinkels der Pipette während der Flüssigkeitsaufnahme
1. Pipette vertikal, Eintauchtiefe der Spitze in die Flüssigkeit ca. 1 cm
2. Pipette vertikal, Eintauchtiefe der Spitze in die Flüssigkeit ca. 3 cm
3. Pipette bei einem Haltewinkel von 30° bis 40°, Eintauchtiefe der Spitze in die Flüssigkeit ca. 3 bis 4 cm

Literatur

[1] Lochner, K. H.; Ballweg, T.; Fahrenkrog, H.-H.: Untersuchungen zur Messgenauigkeit von Kolbenhubpipetten mit Luftpolster. In: Lab Med 20 (1996), Nr. 7/8, S. 430–440.

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact
Eppendorf AG · Barkhausenweg 1 · 22331 Hamburg · Germany
eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

Eppendorf®, the Eppendorf Brand Design and Eppendorf Research® are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany.
U.S. Design Patents are listed on www.eppendorf.com/ip. All rights reserved, incl. graphics and images.
Order No: AU020 010/DE3/1T/1017/NW/STEF · Copyright © 2017 by Eppendorf AG, Germany.