

Metodický postup vyhodnocení obsahů aminokyselin ve standardech a vzorcích
programem CHROMuLAN v 0.56 a výše

S. Kráčmar, P. Píša, P. Porazil

Vydalo:

Pikron s.r.o., Kaňkovského 1235, 182 00 Praha 8, tel. +420 2 96781 671; +420 2 96781 693;
fax +420 2 6884676; e-mail pikron@volny.cz

Ingos s.r.o. – Pikron s.r.o., K Nouzovu 2090, 143 16 Praha 4, tel. +420 2 96781 683

© Pikron s.r.o., 2002

OBSAH

	strana
Obsah	3
Tvorba metody standardu	4
Tvorba metody vzorku	8
Zadání a vyhodnocení vzorku	10
Další možnosti programu	16

Pro hodnocení vzorků na obsah jednotlivých aminokyselin je třeba si vytvořit metody, kterými výpočet provedeme (Metoda standardu a vzorku). Stanovíme velikost píků Area pro danou molaritu a aminokyselinu (Amount) standardu, dále velikost Area (plocha píku), User Peak Coef (molekulová hmotnost) a Response (odezva) pro obsah jednotlivé aminokyseliny ve vzorku.

Metody se tvoří zpravidla při instalaci programu CHROMuLAN a přístroje AAA 400 nebo při zavedení nové metody stanovení aminokyselin a výpočtu jejich obsahu.

Sestavujeme dvě metody:

- METODA STANDARDU
- METODA VZORKU

Metody můžeme vytvořit dvojím způsobem:

- a) využitím již definovaných metod
- b) samostatně nadefinovanou

Ad a)

Členění jednotlivých adresářů a jejich umístění uvádí schéma č.1.

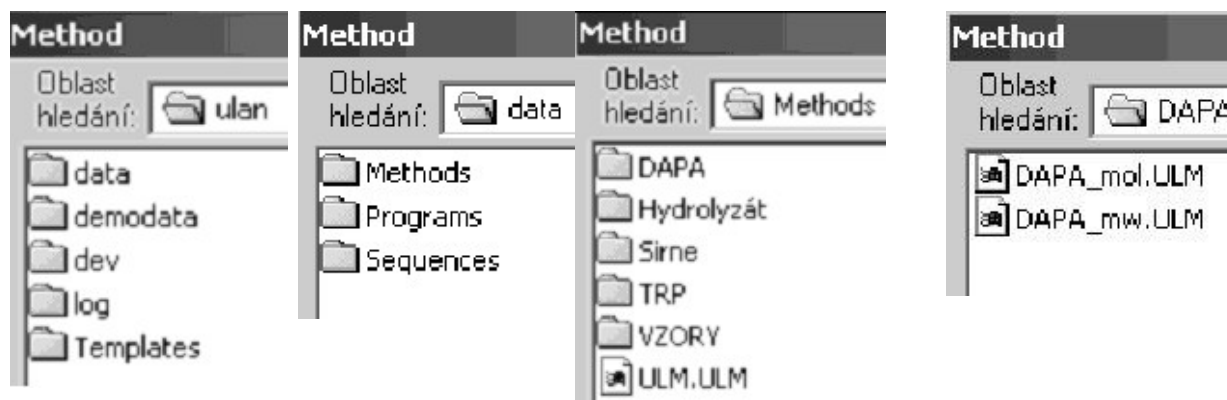
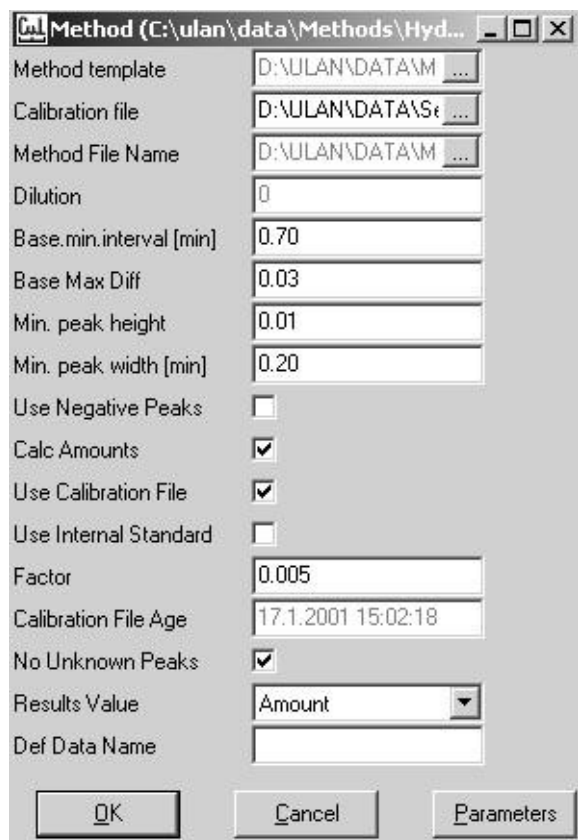


Schéma č.1.

V rámci podadresářů (DAPA, Hydrolyzát, Sirne, TRP...) jsou uvedeny soubory s označením:
xy_mol.ulm - které jsou podkladem pro sestavení **METODA STANDARDU** a
xy_mw.ulm - které slouží pro sestavení **METODY VZORKU**

Po zadání **Method** v technologickém okně \Rightarrow **Open**, vybereme z podadresáře příslušnou metodu, otevřeme soubor **xy_mol.ulm**, popř. **xy_mw.ulm**, po kterých se otevře (schéma č. 2.) dialogové okno:



Metod template – je zadána metoda, údaj se v tabulce nedá změnit

Calibration file – kalibrační soubor, načítá se z podadresáře Sequence

Metod File Name – metoda pro vzorek

Dilution – nezadává se,

Base min.interval [min] – parametr ukazuje, jak dlouhý musí být rovný úsek, aby se považoval za nulovou linii

Base Max Diff – parametr udává maximální šum, který může být na úseku, který se považuje za nulovou linii

Min. peak height – minimální výška píky. Píky, které jsou menší se ignorují

Min. peak width – minimální šířka píky. Píky, které jsou užší se ignorují

Use Negative Peaks – toto políčko se zatrhne, pokud chceme vyhodnocovat negativní píky

Calc Amounts - toto políčko se zatrhne, pokud chceme automaticky počítat množství

Use Internal Standard – políčko označíme, pokud používáme externí standard

Factor – přepočtový faktor při ředění vzorku

Calibration File Age – datum a čas načtení kalibračního souboru

No Unknown Peaks – při označení políčka se vyhodnocují pouze píky definované v metodě

Results Value – používáme Amount, dále je možno vybrat Area, Ratio, Response

Def Data Name -

Schéma 2.

Po zadání dat ⇒ **Parameters** se vytvoří okno se třemi řádky (**Filter**, **Peaks** a **Baseline**) schéma č. 3. Poklepem na **LTM** zamodříme řádek **Peaks**

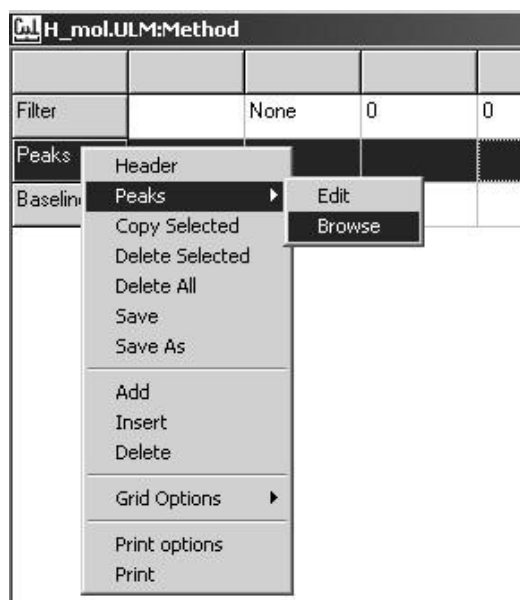


Schéma č. 3.

Peaks je modrá.

Poklepáním **LTM** (levého tlačítka myši) ⇒

Peaks ⇒ **dialogové okno** ⇒ **Peaks** ⇒

Browse se vytvoří schéma:

METODA STANDARDU schéma č. 4.

nebo METODA VZORKU schéma č. 5.

METODA STANDARDU

H_mol.ULM:Method/Peaks								
	X [min]	Name	Area	Usr Peak Co	Response	Amount	Window [min]	Internal Stan
Peak	6.39	kcys	23.1236	1	0	25	2.00	False
Peak	21.00	asp	22.6131	1	0	25	2.00	False
Peak	24.00	mets	26.3599	1	0	25	2.00	False
Peak	26.00	thr	25.4332	1	0	25	2.00	False
Peak	28.50	ser	25.4851	1	0	25	1.80	False
Peak	35.00	glu	24.8214	1	0	25	1.50	False
Peak	36.50	pro	0.728567	1	0	25	1.50	False
Peak	41.00	gly	29.326	1	0	25	1.50	False
Peak	43.00	ala	26.2525	1	0	25	1.50	False
Peak	50.50	val	25.8885	1	0	25	1.50	False
Peak	58.00	ile	25.2803	1	0	25	1.50	False
Peak	60.00	leu	27.6143	1	0	25	1.50	False
Peak	65.50	tyr	24.8516	1	0	25	1.50	False
Peak	67.70	phe	24.4145	1	0	25	1.50	False
Peak	69.60	his	30.8442	1	0	25	1.50	False
Peak	72.50	lys	25.0338	1	0	25	1.50	False
Peak	75.30	NH3	5.75301	1	0	0	1.50	False
Peak	82.50	arg	0	1	0	25	1.50	False

Schéma č. 4.

Pro obě schéma jsou shodná:

X_[min] – retenční čas píku dané aminokyseliny

Name – název aminokyseliny (**pro obě metody musí být stejné názvy**)

Amount – množství aminokyseliny ve standardu – nmol/ml

Response – odezva je vypočtena podle vzorce uvedeného v manuálu, nezadáva se

Window_[min] – velikost okna

Data Name – u Pro se udává **B** (blue – modrá) stanovení při vlnové délce 440 nm

Pro schéma č. 4. METODA STANDARDU je:

Area – nezajímavá

User Peak Coef – udává se **1**

Internal Standard – udává se **FALSE**

Pro schéma 5. METODA VZORKU je:

Area – plocha stanovené aminokyseliny

Usr Peak Coef – udává se molekulová hmotnost aminokyseliny – výpočet v g/kg nebo mg/g, může být také 1 a v tomto případě počítáme obsah v mol.

Internal Standard – udává se **TRUE**

METODA VZORKU

H_mw.ULM:Method/Peaks									
	X [min]	Name	Area	Usr Peak Co	Response	Amount	Window [min]	Internal Stan	Data name
Peak	6.39	kcys	23.1236	170.2	0	25	2.00	False	
Peak	14.30	asp	22.6131	133.1	0	25	2.00	False	
Peak	26.14	mets	26.3599	181.2	0	25	2.00	False	
Peak	16.30	thr	25.4332	119.1	0	25	2.00	False	
Peak	17.78	ser	25.4851	105.1	0	25	1.80	False	
Peak	20.98	glu	24.8214	147.1	0	25	1.50	False	
Peak	26.28	pro	0.728567	115.1	0	25	1.50	False	B
Peak	32.53	gly	29.326	75.1	0	25	1.50	False	
Peak	34.30	ala	26.2525	89.1	0	25	1.50	False	
Peak	42.96	val	25.8885	117.1	0	25	1.50	False	
Peak	56.38	ile	25.2803	131.2	0	25	1.50	False	
Peak	58.12	leu	27.6143	131.2	0	25	1.50	False	
Peak	65.50	tyr	24.8516	181.2	0	25	1.50	False	
Peak	66.55	phe	24.4145	165.2	0	25	1.50	False	
Peak	69.60	his	30.8442	155.2	0	25	1.50	False	
Peak	71.55	lys	25.0338	146.2	0	25	1.50	False	
Peak	75.30	NH3	5.75301	1	0	0	1.50	False	
Peak	76.08	arg	0	174.2	0	25	1.50	False	

Schéma 5.

Metody ukládáme **Method** ⇒ **Save As** – schéma č. 3.

Ad b)

Zadáním **Method** ⇒ **New** na hlavním panelu se vytvoří schéma č. 2. a vyplní se uvedená kritéria ⇒ **OK** a do adresáře **Method** zapíšeme název nové Metody a vše uložíme. Dále **Method** ⇒ **Open** a vybereme nový soubor, opětovně se otevře schéma č. 2 a po zadání **Parameters** na panelu se vytvoří prázdné okno, v něm stiskneme **PTM** a vybereme **Add** ⇒ **Peaks** a vznikne kolonka Peaks. Dále **PTM** ⇒ **Peaks** ⇒ **Browse** při vzniku schéma č. 4 s jedním řádkem, do kterého zadáme příslušné hodnoty. Po uzavření příslušných oken a zadání **OK** se doplněný soubor uloží.

ZADÁNÍ A VYHODNOCENÍ STANDARDU

Otevřeme analýzu standardu. **Graph** v technologickém okně a v **Sequences** vybereme standard.

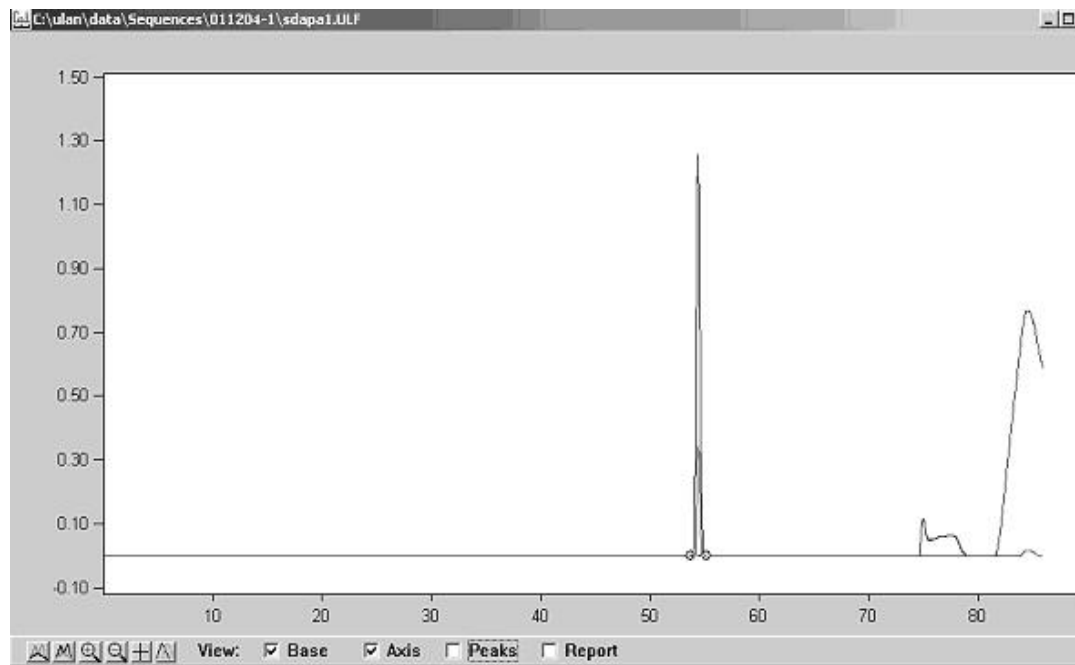


Schéma č. 6.

	ruční vytváření nulové linie		porovnání analýz
	ruční vytváření píků	<input checked="" type="checkbox"/> Base	zobrazení nulové linie
	nastavení výřezu	<input checked="" type="checkbox"/> Axis	zobrazení os
	vrácení předchozího výřezu	<input type="checkbox"/> Peaks	zobrazení popisu píků
	režim zobrazení pozice kurzoru	<input type="checkbox"/> Report	zobrazení reportu

Pokud nebyl standard v sekvenci označen (viz. schéma č. 2 – Use Calibration File) , označíme jej dodatečně a to **PTM** ⇒ **Setup** a v záložce **Header** zatrhneme **Cal Standard** (schéma č. 7.).

Schéma č. 7.

Zadáme **PTM** ⇒ **Metod** ⇒ **Load From** v dialogovém okně otevřeme soubor *xy_mol.ulm* (pro náš příklad *DAPA_mol.ulm*). O tom, že metoda je správně načtena se přesvědčíme zadáním **PTM** ⇒ **Metod** ⇒ **Peaks** ⇒ **Browse** (schéma č. 8.).

C:\ulan\data\Sequences\011204-1\sdapa1:Sample/Method/Peaks								
	X [min]	Name	Area	Usr Peak Co	Response	Amount	Window [min]	Internal Stan
Peak	54.39	DAPA	0	1	1	25	1.00	False

Schéma č. 8.

Zadáme **PTM** ⇒ **Peaks** ⇒ **Autodetect**, při kterém se hledaný pík označí, včetně retenčního času (schéma č. 9.).

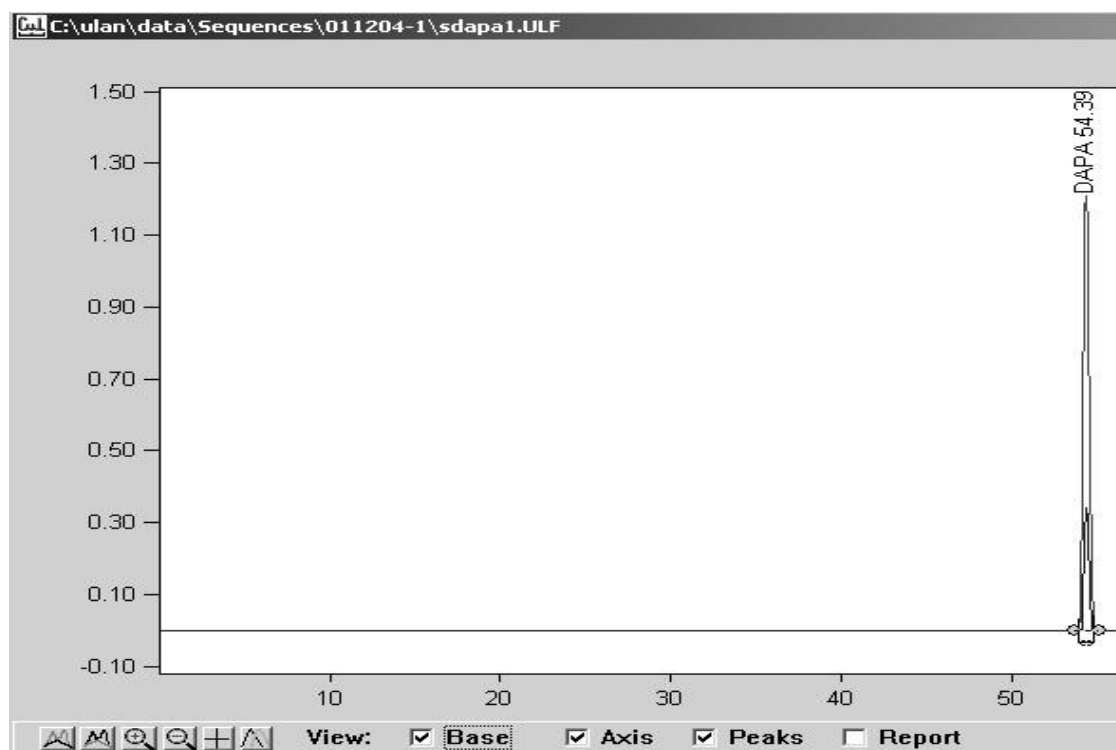


Schéma č. 9.

Zadáním **PTM** ⇒ **Peaks** ⇒ **Browse** se dopočte **Response** a **Area** standardu (schéma č. 10.), toto okno uzavřeme a **VYHODNOCENÍ STANDARDU** uložíme **File** ⇒ **Save As** ⇒ *xy_mol.ulm* ⇒ **Uložit**.

C:\ulan\data\Sequences\011204-1\sdapa1:Sample/Peaks								
	X [min]	Name	Area	Usr Peak Co	Response	Amount	Window [min]	Internal Stan
Peak	54.39	DAPA	29.9914	1	1.19965	25	1.00	False

Schéma č. 10.

Při zadání **PTM** ⇒ **Peaks** ⇒ **Autodetect** se však nemusí příslušný pík načíst a to z důvodu jiného retenčního času uvedeného v **METODĚ STANDARDU**. Potom postupujeme následovně:

Pomocí \boxplus (režim zobrazení pozice kurzoru) ve schématu č. 6. najedeme na pozici píku a zjistíme retenční čas příslušného píku (pro náš příklad 54,39 min.), otevřeme schéma č. 8. a do kolonky $X_{[min]}$ vepíšeme tuto hodnotu a **File** \Rightarrow **Save As** \Rightarrow **xy_mol.ulm** \Rightarrow **Uložit**.

Upozornění: Při použití standardních metod, pufrů, HND, laboratorní teploty, stále stejné práce obsluhy AAA 400 se takto nastavené hodnoty (retenční čas) jednotlivých aminokyselin mění jen velmi nepatrně a velikost oken (Windows [min] tuto skutečnost eliminuje).

ZADÁNÍ A VYHODNOCENÍ VZORKU

Otevřeme analýzu standardu. **Graph** v technologickém okně a v **Sequences** vybereme analýzu vzorku (schéma č. 11.).

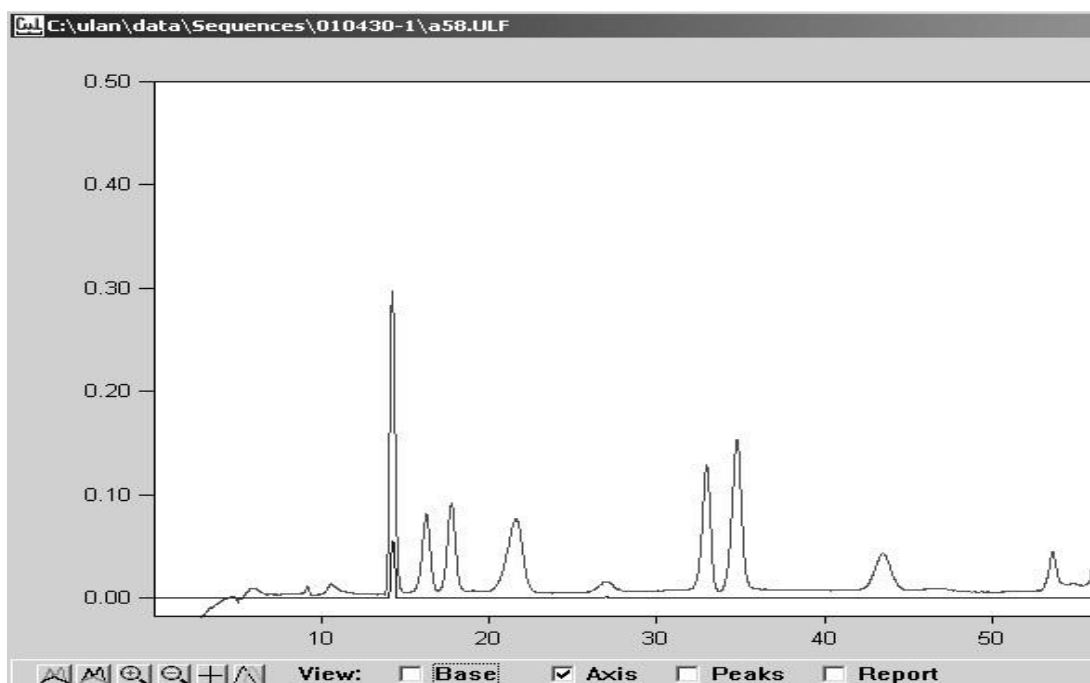


Schéma č. 11.

PTM \Rightarrow **Metod** \Rightarrow **Load From** načteme metodu vyhodnocení obsahu aminokyselin (podle propozice řešitele, či zvyklostí pracoviště – v molech nebo mg resp. g vzorku) xy_?.ulm, pro náš příklad DAPA_mw.ULM a zadáme **Otevřít**. O tom, že máme načtenou správnou metodu se přesvědčíme **PTM** \Rightarrow **Metod** \Rightarrow **Peaks** \Rightarrow **Browse** (schéma č. 12.), v tomto případě je v kolonce **Usr Peak Coef** uvedena molekulová hmotnost aminokyseliny DAPA .

C:\ulan\data\Sequences\010430-1\a58:Sample/Method/Peaks									
	X [min]	Name	Area	Usr Peak Co	Response	Amount	Window [min]	Internal Stan	Data na
Peak	53.18	DAPA	0	190.2	1	25	1.00	False	

Schéma č. 12.

Dále zadáme **PTM** \Rightarrow **Setup** s vytvořením okna se třemi záložkami **Header**, **Method** a **Instrument** (schéma č. 13., 14. a 15.).

Sample (C:\ulan\data\Sequences\010430-1\) a58.ULF

Header Method **Instrument**

Load From [] Data Lines Program

Save To []

Channel Name uLan Default Channe Duration [min] 0.00

Column [] Sampling interval [s] 0

Mobile Phase [] Sequence kind AAA

Flow Rate 0

Flow Rate Unit ML_MIN

Detection []

Temperature 0

Temperature Unit Celsius

Schéma č. 15.

Pomocné údaje, které si může obsluha zaznamenat pro další potřebu

PTM ⇒ **Peaks** ⇒ **Autodetect** se detekují příslušné píky a probíhá výpočet obsahu aminokyselin (schéma č. 16.). Správně detekované píky se označí názvem příslušné aminokyseliny a retenčním časem.

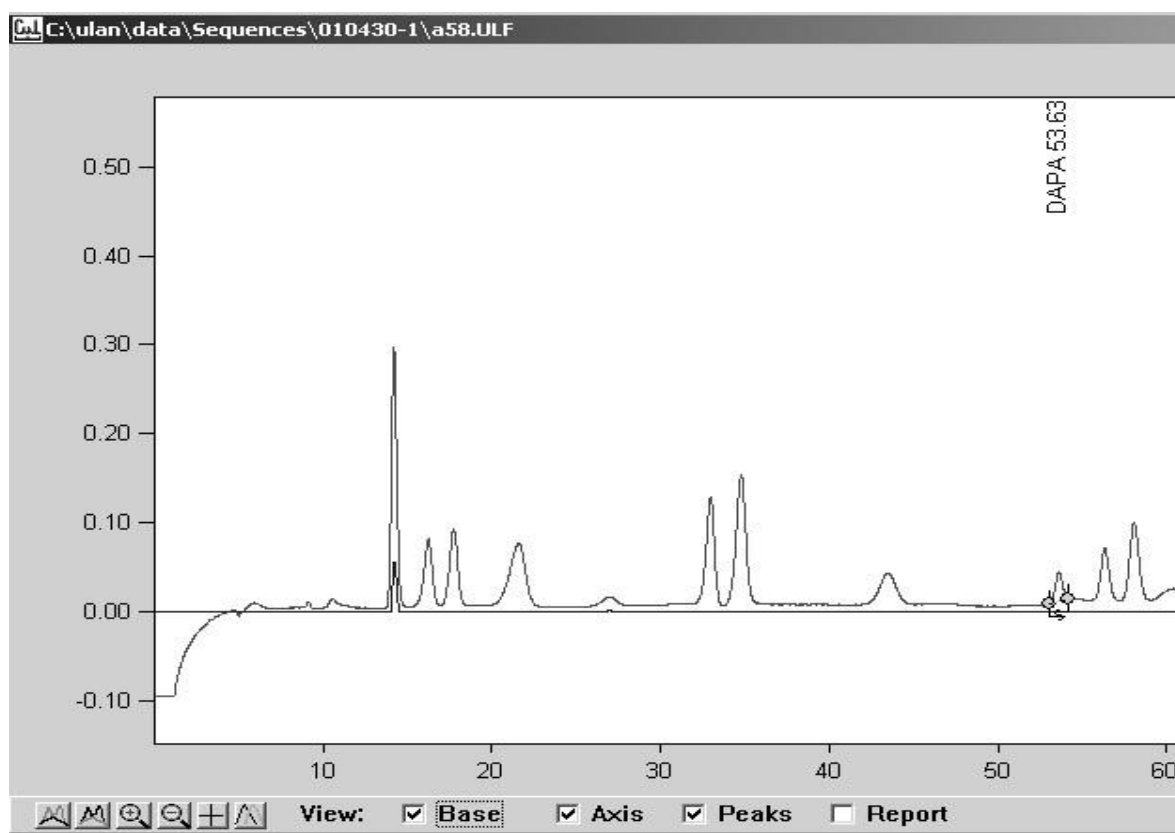


Schéma č. 16.

PTM ⇒ **Peaks** ⇒ **Browse** vytvoříme tabulku výsledků (schéma č. 17.).

C:\ulan\data\Sequences\010430-1\A58:Sample/Peaks									
	X [min]	Name	Area	Usr Peak Co	Response	Amount	Window [min]	Internal Stan	Data na
Peak	53.63	DAPA	0.930681	190.2	1.19965	2.15977	1.00	False	


Schéma č. 17.

Kde **Amount** 2,160 je výsledek stanovení aminokyseliny DAPA v g/kg vzorku.

Téhož dosáhneme při zadání **PTM** ⇒ **Peaks** ⇒ **Calculate amounts** - výpočet obsahu aminokyselin ve vzorku.

Upozornění: Výpočet obsahu aminokyselin probíhá podle názvu aminokyseliny, proto **pozor označení aminokyselin** musí být **shodné** pro obě metody (standard a vzorek).

Po zadání **PTM** ⇒ **Peaks** ⇒ **Autodetect** však nemusí dojít k načtení všech píků (viz. schéma č. 16.) a potom postupujeme následovně:

Pomocí  (ruční vytváření píků) označíme příslušný pík (schéma č. 18.).

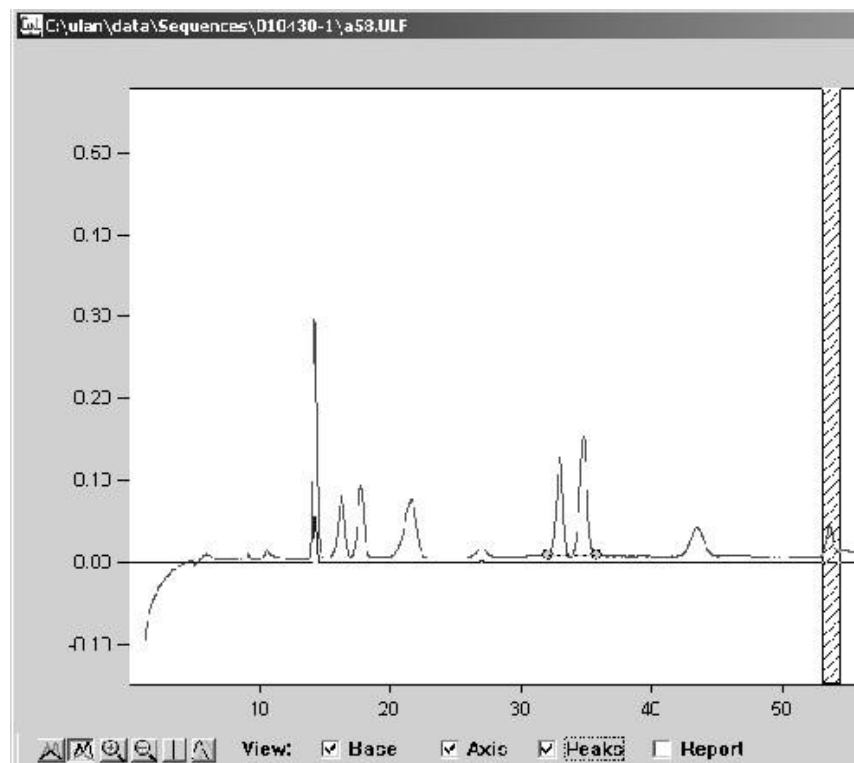


Schéma č. 18.

Po povolení **PTM** se pík označí retenčním časem (schéma č. 19.) a po opětovném zadání **PTM** do retenčního času se vytvoří nabídka (schéma č. 20.) z níž vybereme **Assign method peak** (schéma č. 21.) s názvy aminokyselin a jejich retenčních časů – vychází z **METODY VZORKU**. Po těchto krocích opětovně zadáme **PTM** ⇒ **Peaks** ⇒ **Autodetect** (schéma č. 16.) a **PTM** ⇒ **Peaks** ⇒ **Browse** (schéma č. 17.).

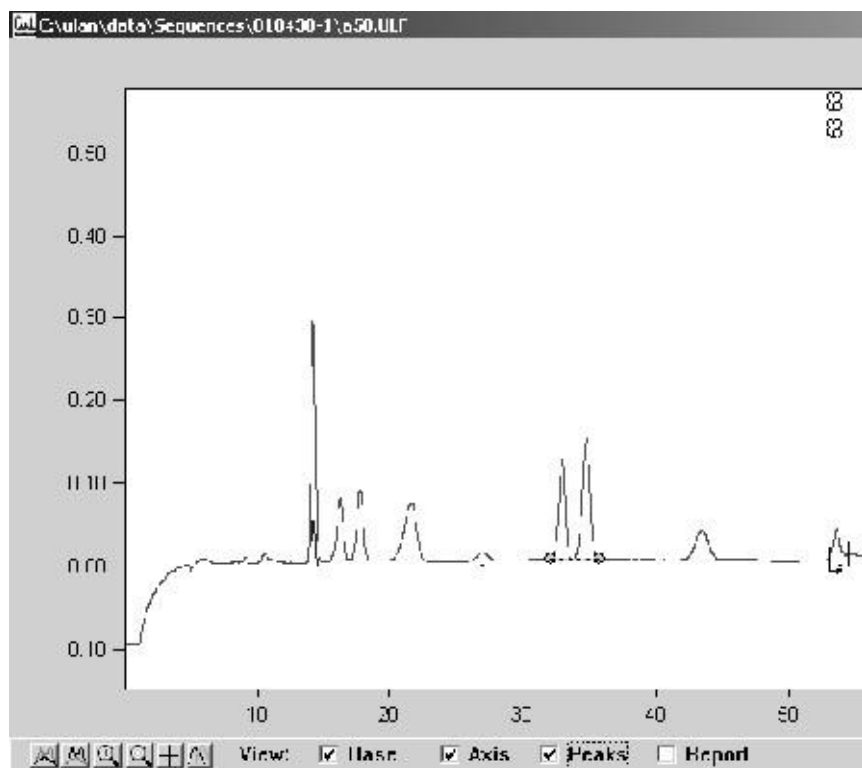


Schéma č. 19.

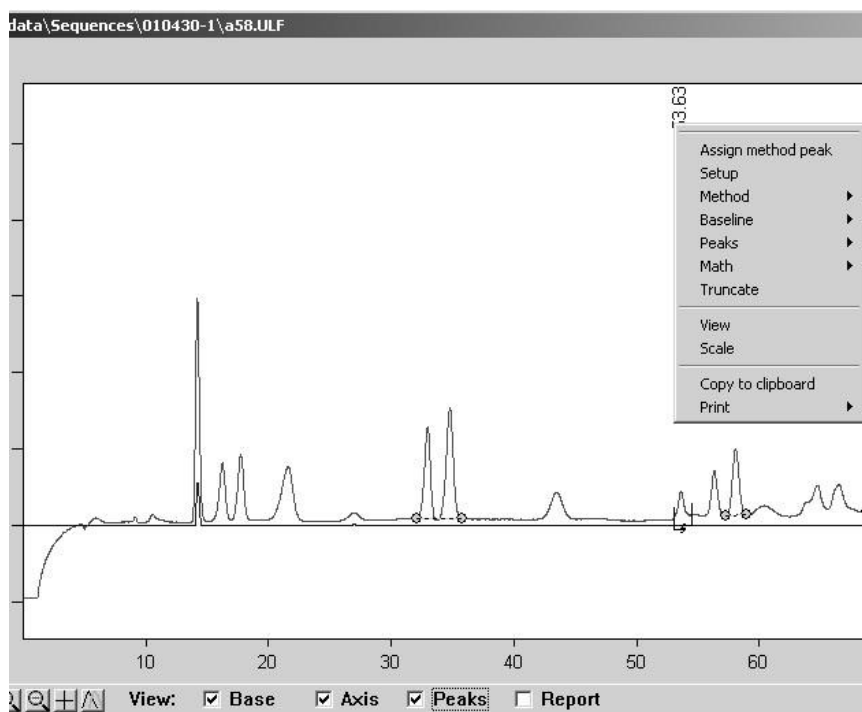


Schéma č. 20.

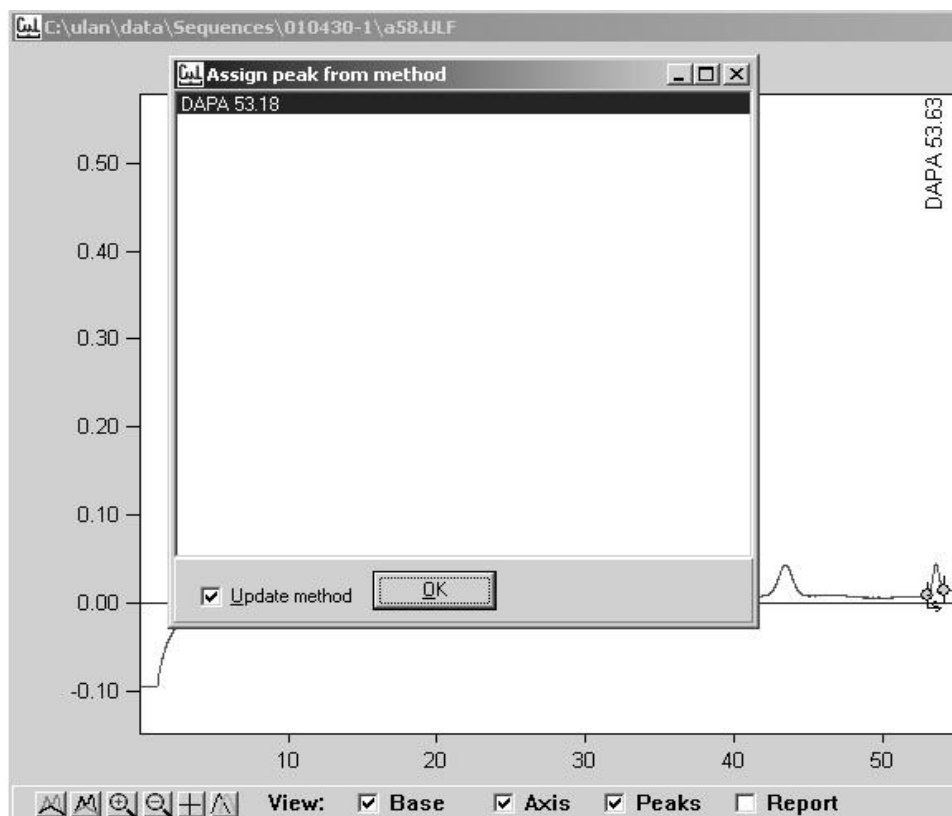


Schéma č. 21.

Porovnávání analýz umožňuje vložit několik analýz do jednoho grafu. Načteme **Graph** ⇒ **Soubor** ⇒ (porovnání analýz) ⇒ **File** ⇒ **Open** otevřeme další analýzu a grafy se vzájemně proloží (schéma č. 22.).

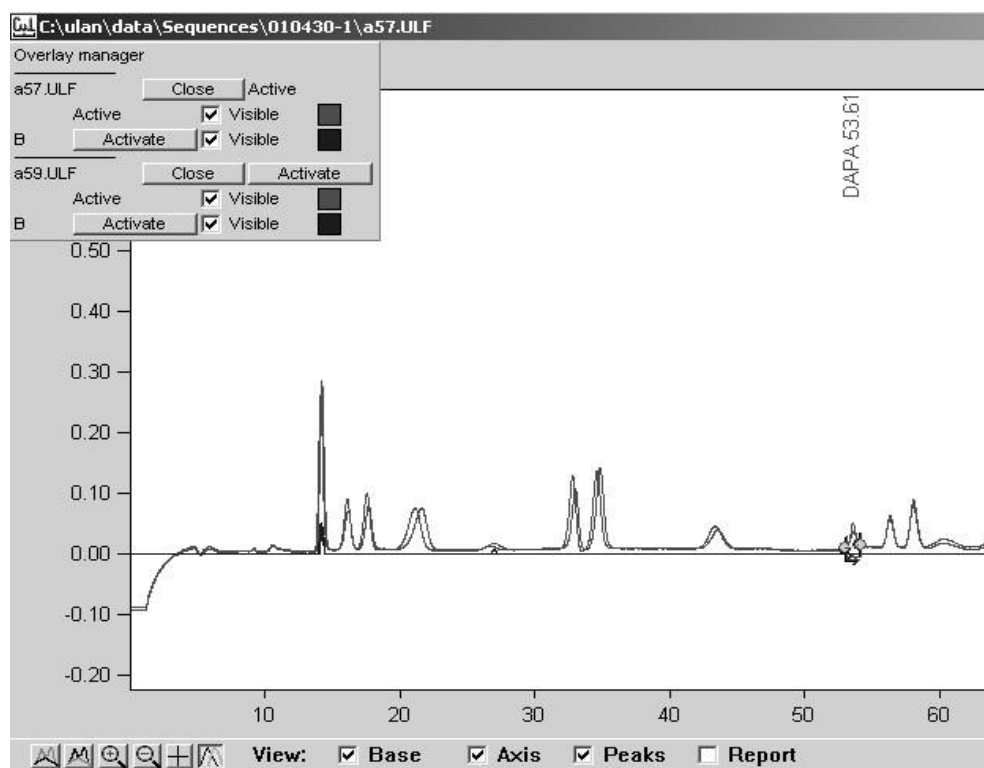


Schéma č. 22.

Pomocí **Overlay manager** si můžeme upravovat grafy a to tím, že zatržením aktivujeme či potlačujeme barevné chromatogramy (horní – zelená barva – vlnová délka 570 nm – všechny aminokyseliny, vyjma Pro; modrá barva - Pro [B] vlnová délka 440 nm.).

DALŠÍ MOŽNOSTI PROGRAMU

PTM ⇒ Peaks ⇒ Math zadáváme kritéria pro píky a chromatogram

PTM ⇒ Peaks ⇒ Truncate – zadáním času v minutách vymežíme chromatogram od 0 do xyz minut

PTM ⇒ Peaks ⇒ View – zatržením políček vymežíme data na chromatogramu

PTM ⇒ Peaks ⇒ Scale – vymežíme hodnoty velikosti okna chromatogramu

PTM ⇒ Peaks ⇒ Copy to clipboard – uložíme chromatogram do paměti PC a můžeme přenést do jiných programů (Word, Excel apod.).

PTM ⇒ Peaks ⇒ Print ⇒ Report – viz. schéma č. 23.

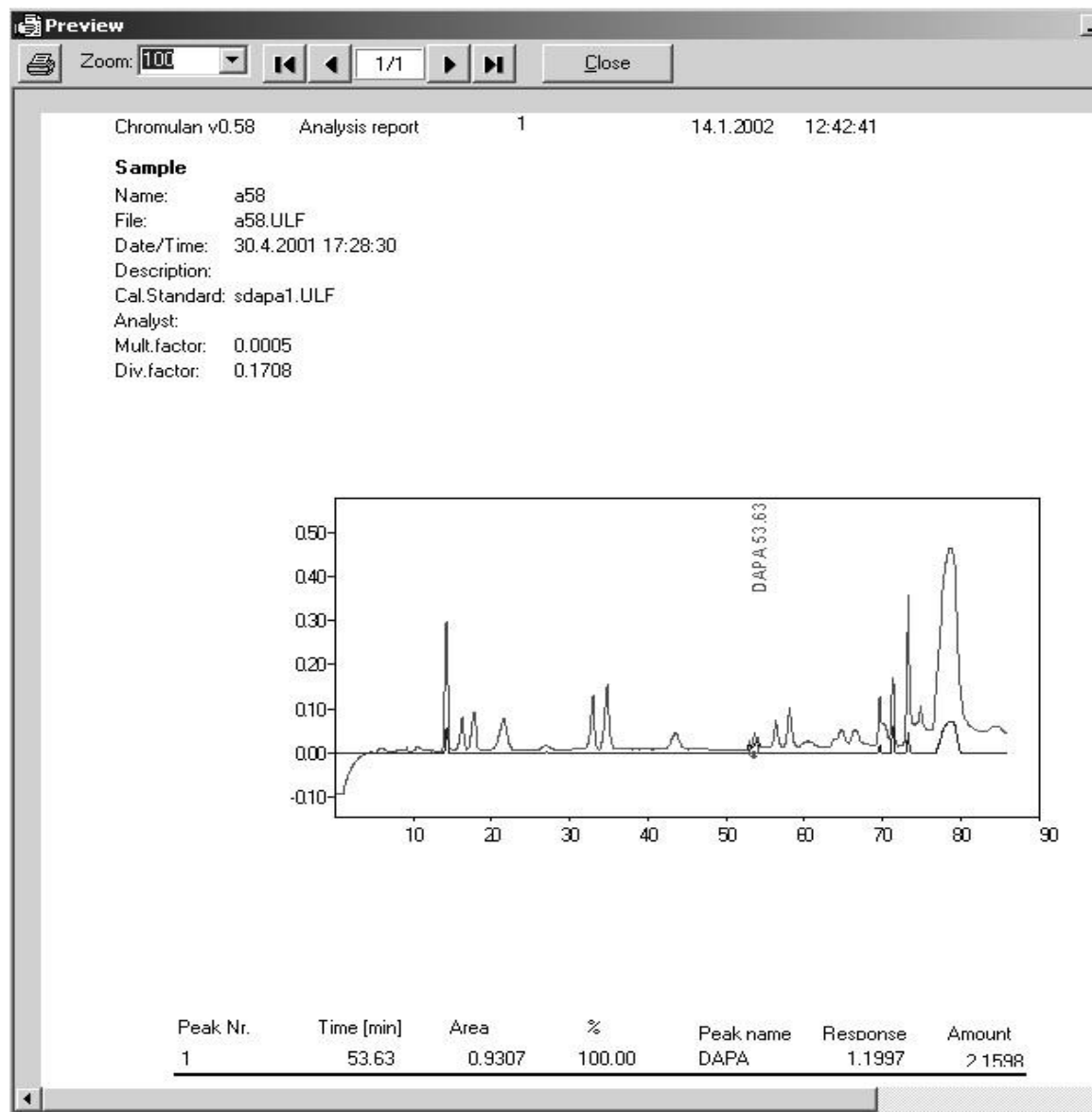
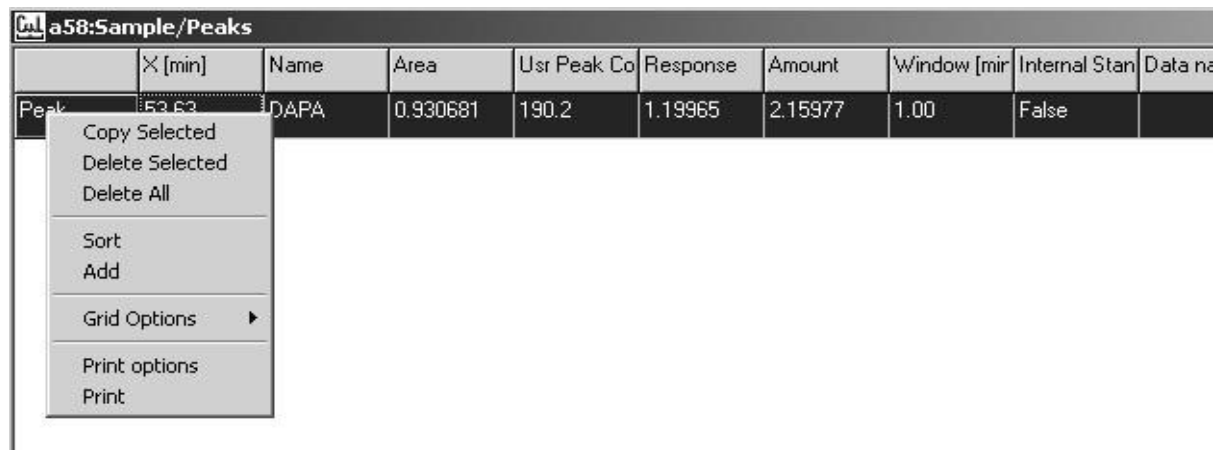


Schéma č. 23.

PTM ⇒ **Peaks** ⇒ **Print** ⇒ **Window** – tisk do okna bez dat

Poklepen na **Peak** ve schéma č. 17. **LTM** se řádek zamodří – schéma č. 24. a **PTM** vyvoláme submenu kde:



	X [min]	Name	Area	Usr Peak Co	Response	Amount	Window [min]	Internal Stan	Data na
Peak	53.63	DAPA	0.930681	190.2	1.19965	2.15977	1.00	False	

- Copy Selected
- Delete Selected
- Delete All
- Sort
- Add
- Grid Options ▶
- Print options
- Print

Schéma č. 24.

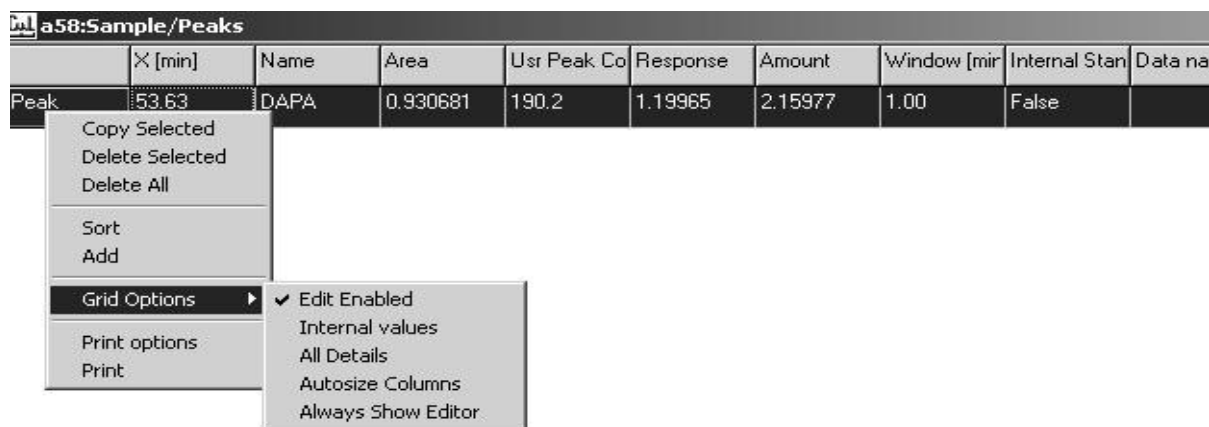
Copy selected – data se uloží do paměti PC

Delete selected – modře označené řádky se odstraní

Delete all – všechna data se odstraní

Add – přidání další řádky

Grid option – schéma č. 25. kde:



	X [min]	Name	Area	Usr Peak Co	Response	Amount	Window [min]	Internal Stan	Data na
Peak	53.63	DAPA	0.930681	190.2	1.19965	2.15977	1.00	False	

- Copy Selected
- Delete Selected
- Delete All
- Sort
- Add
- Grid Options ▶
 - ✓ Edit Enabled
 - Internal values
 - All Details
 - Autosize Columns
 - Always Show Editor
- Print options
- Print

Schéma č. 25

Edit Enabled – editace povolena

Internal values – mezinárodní hodnoty

All details – podrobné informace

Automize Columns – stejná velikost kolonek

Always Show Editor - ????

Print options – volba tisku

Print – náhled na tisk dat – přizpůsobení potřebám obsluhy je podle **Print options**

POZOR při ukončení práce s každým vzorkem jste dotázáni zdali chcete data uložit, nebo ne. Při zadání **Yes** – **Ano** se data uloží, proces již **nelze zvrátit**. V případě, že chceme vzorek vyhodnotit jinou metodou, musíme opětovně zadat všechna požadovaná data.