



AUTOMATICKÝ ANALYZÁTOR AMINOKYSELIN

AAA 400

Návod k programu ChromuLan

Výrobce : INGOS s.r.o divize laboratorních přístrojů

Vývoj a konstrukce : PiKRON s.r.o

Chemický systém : V. Havlíček - ZMBD chemik

Dodavatel a servis : INGOS s.r.o
K Nouzovu 2090
14316 PRAHA 4

Tel: +420 296 781 683

+420 296 781 692

Fax: +420 244 403 051

e-mail:pristroje@ingos.cz



(c) INGOS 2006

ÚVOD

1

ŘÍZENÍ

2

VYHODNOCOVANÍ

3

OBSAH

4

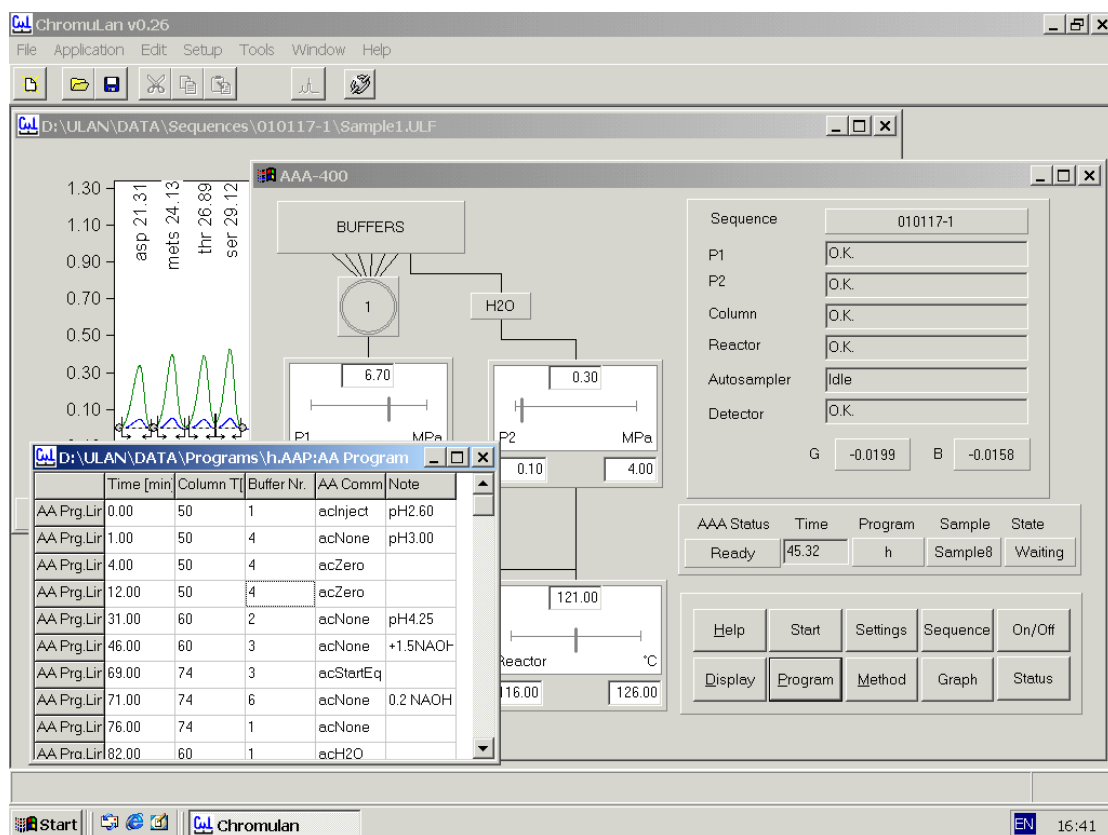
1. ÚVOD

1

Jedná se o volně šiřitelný software pro řízení sestav přístrojů a následné vyhodnocování výsledků. Projekt je inicializován a dotován firmou PiKRON jejíž přístroje podporují komunikaci a řízení přes komunikační protokol uLAN.

V současné době je systém vyvíjen v prostředí DELPHI pro WINDOWS NT nebo WINDOWS 2000 a předpokládá se rozšíření pro LINUX.

Tento návod pojednává o použití programu ChromuLan pro analyzátor aminokyselin AAA 400. V tomto případě se z programu používá standardní vyhodnocování a speciální programový modul pro řízení analyzátoru aminokyselin.



Obr. 1. ChromuLan

Program je koncipován tak, aby celé zařízení mohlo pracovat plně automaticky. V programu se nastaví sekvence, kde se každému vzorku přiřadí analytický program a vyhodnocovací metoda. Přístroj automaticky zpracuje vzorky, zajistí ekvilibraci kolony při přechodu mezi analytickými programy a výsledky automaticky vyhodnotí podle nastavené metody.

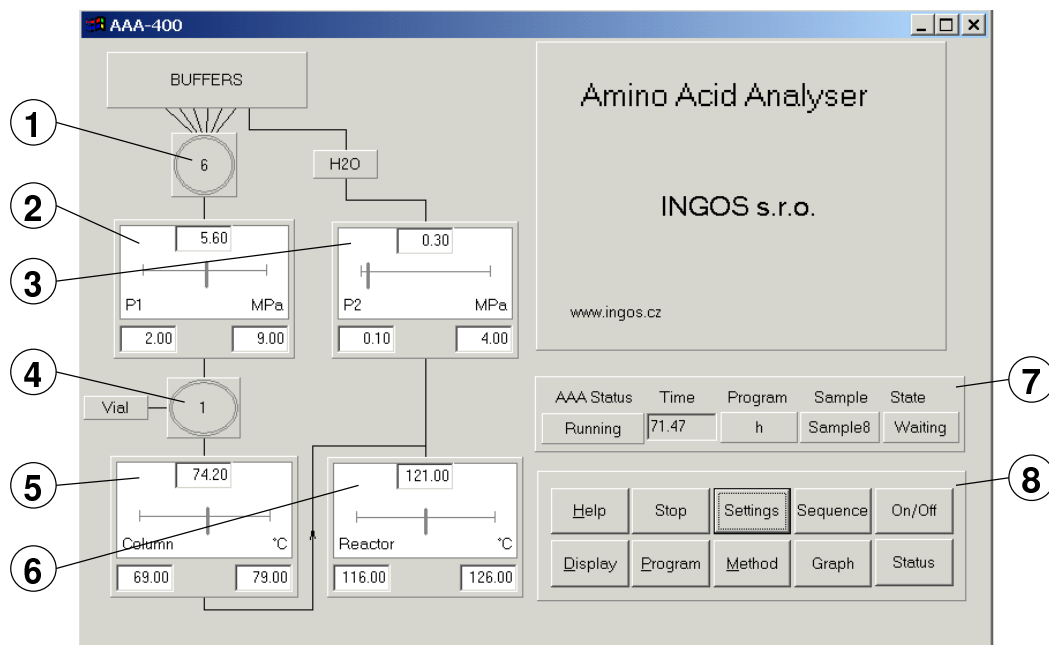
1.1 Verze 0.70

V CHROMuLANu verze 0.70 přibyla možnost průměrování standardů pomocí kalibračních souborů viz kapitola 3.6. Dále bylo pro zjednodušení práce přidáno do okna chromatografu několik funkcí (kapitola 3.2).

1

2. ŘÍZENÍ

Řídicí modul pro AAA 400 se spustí funkcí **Application** ⇒ **Amino Acid Analyser**. Současně se spuštěním řídicího modulu se otevře technologické okno analyzátoru (obr. 2).



1. Ukazatel čísla aktuálního pufru
2. Ukazatel tlaku pumpy 1
3. Ukazatel tlaku pumpy 2
4. Ukazatel čísla zkumavky aktuálního vzorku
5. Ukazatel teploty kolony
6. Ukazatel teploty reaktoru
7. Stavový řádek viz kapitola 2.5
8. Panel řídicích tlačítek

Obr. 2. Technologické okno

V levé části technologického okna je schéma analyzátoru ve kterém je zobrazen stav jednotlivých přístrojů. V pravé spodní části jsou tlačítka sloužící k ovládání jednotlivých funkcí.

2.1 Spuštění analyzátoru

1. Zkontrolujeme přístroj a provozní chemikálie (návod k obsluze AAA 400 kapitola UVEDENÍ DO PROVOZU)
2. Zkontrolujeme nastavení paramerů (2.2).
3. Tlačítkem **On/Off** v technologickém okně zapneme přístroj.
4. Vložíme vzorky do dávkovacího kotouče a připravíme sekvenci (2.4).
5. Počkáme dokud není přístroj připraven (2.5).
6. Tlačítkem **Start** spustíme sekvenci.

2.2 Nastavení

Stiskem tlačítka **Setting** se vyvolá dialog pro nastavení základních parametrů programu a startovacích parametrů přístroje.

Sequences directory	Adresář ve kterém jsou uloženy sekvence.
Programs directory	Adresář ve kterém jsou uloženy analytické programy.
Methods directory	Adresář ve kterém jsou uloženy vyhodnocovací metody.
Current Sequence	Jméno aktuální sekvence (2.4).
Default Prog. Name	Jméno programu který se nastaví do hlavičky při vytvoření nové sekvence (2.4.1).
Default method for new seq	Jméno metody která se nastaví do hlavičky při vytvoření nové sekvence (2.4.1).
P1 Flow [ml/min]	Průtok pumpy 1 [0.3].
P1 Press Min [MPa]	Dolní limit tlaku pumpy 1 [2.0].
P1 Press Max [MPa]	Horní limit tlaku pumpy 1 [9.0].
P1 Deviation [%]	Povolené kolísání tlaku pumpy 1 [50].
P2 Flow [ml/min]	Průtok pumpy 2 [0.2].
P2 Press Min [MPa]	Dolní limit tlaku pumpy 2 [0.1].
P2 Press Max [MPa]	Horní limit tlaku pumpy 2 [3.0].
P2 Deviation [%]	Povolené kolísání tlaku pumpy 2 [80].
Column Temp. [C]	Teplota kolony [60].
Col. Temp. Min Dif [C]	Maximální povolený pokles teploty kolony [5].
Col. Temp. Max Dif [C]	Maximální povolený vzestup teploty kolony [5].
Colum Temp. Dev. [%]	Povolené kolísání teploty kolony [10].
React. Temp. [C]	Teplota reaktoru [121].
React. Temp. Min Dif [C]	Maximální povolený pokles teploty reaktoru [5].
React. Temp. Max Dif [C]	Maximální povolený vzestup teploty reaktoru [5].
React. Temp. Dev. [%]	Povolené kolísání teploty reaktoru [10].

2.3 Analytický program

Analytický program slouží k řízení přístroje během analýzy vzorku. Každý řádek programu definuje činnost přístroje v daném čase.

Stiskem tlačítka **Program** v technologickém okně vyvoláme menu které má tři položky:

New	Vyvolá okno editace nového programu.
Open	Vyvolá nabídku pro otevření programu.
Edit	Vyvolá okno editace posledně editovaného programu.

Okno editace programu je na obr. 3. Řádky programu jsou automaticky řazeny podle času. Vkládání nových řádek a mazání řádek je možno provádět klávesami **Insert** a **Delete**, nebo z menu které se vyvolá pravým tlačítkem myši.

Vzhledem k automatickému řazení řádků je možné, že se při změně času řádek přesune na jinou pozici. Při úpravách programu je potřeba dát na tuto funkci pozor a vždy po změně času zkontrolovat zda editujeme správný řádek.

Ve sloupci AA Command můžou být následující příkazy:

	Time [min]	Column T[°C]	Buffer Nr.	AA Command	Note
AA Prg.Lir	0.00	50	1	acInject	pH2.60
AA Prg.Lir	1.00	50	4	acNone	pH3.00
AA Prg.Lir	4.00	50	4	acZero	
AA Prg.Lir	12.00	50	4	acZero	
AA Prg.Lir	31.00	60	2	acNone	pH4.25
AA Prg.Lir	46.00	60	3	acNone	+1.5NAOH
AA Prg.Lir	69.00	74	3	acStartEquil	
AA Prg.Lir	71.00	74	6	acNone	0.2 NAOH
AA Prg.Lir	76.00	74	1	acNone	
AA Prg.Lir	82.00	60	1	acH2O	
AA Prg.Lir	85.00	60	1	acLoad	
AA Prg.Lir	85.50	50	1	acAcqStop	
AA Prg.Lir	89.00	50	1	acNHD	
AA Prg.Lir	93.00	50	1	acNone	

1. Čas
2. Teplota kolony
3. Číslo pufru
4. Příkaz
5. Poznámka

2

Obr. 3. Okno editace programu

Inject	Nadávkuje vzorek ze smyčky. Tento příkaz by měl být vždy v čase 0.
Zero	Vynuluje detektor. Tento příkaz se dává do místa, kde je s jistotou nulová linie.
StartEquil	Od tohoto příkazu začíná ekvilibrační analýza (2.4.2).
H2O	Přepne vstup pumpy 2 na vodu.
NHD	Přepne vstup pumpy 2 na ninhydrin.
StopAcq	Ukončí záznam dat.
Load	Připraví další vzorek do smyčky.
None	Neprovádí se žádná akce.

Po úpravě je nutno program uložit. Uložení se provede příkazem **Save** z menu které vyvoláme pravým tlačítkem. Pokud opravujeme program za běhu analýzy, uplatní se změny až při dalším vzorku.

2.4 Sekvence

Sekvence určuje posloupnost vzorků při zpracování. Každý řádek sekvence odpovídá jednomu vzorku. Sekvence je automaticky pojmenována podle data vytvoření. Zároveň s vytvořením sekvence se na disku vytvoří adresář stejného jména do kterého se ukládají jednotlivé analýzy.

Stiskem tlačítka **Sequence** v technologickém okně vyvoláme menu které má tři položky:

- New** Umožňuje založit novou sekvenci. Před vlastní editací je nutno nejprve vyplnit hlavičku sekvence (2.4.1).
- Open** Vyvolá nabídku pro otevření a editaci dříve uložené sekvence. Zároveň tuto sekvenci nastaví jako aktuální.
- Edit** Vyvolá okno pro editaci aktuální sekvence.

Pokud je sekvence prováděna, vyvolá se rovnou editace aktuální sekvence. V prováděné sekvenci lze měnit pouze vzorky které jsou ve stavu Waiting.

Okno editace sekvence je na obr. 4. Jednotlivé sloupce mají následující význam:

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Sample Name	Vial Nr.	Sample Desc.	User Name	File name	Program name	State	Method name
Sample	Sample1	1	Test1	V.H.	Sample1	s.AAP	sasDone	s.ULM
Sample	Sample2	2	Test2	V.H.	Sample2	s.AAP	sasDone	s.ULM
Sample	Sample3	3	Test3	V.H.	Sample3	s.AAP	sasDone	s.ULM
Sample	Sample4	4	Test4	V.H.	Sample4	s.AAP	sasDone	s.ULM
Sample	Sample5	5	Test5	V.H.	Sample5	h.AAP	sasDone	h.ULM
Sample	Sample6	21	Test6	V.H.	Sample6	h.AAP	sasDone	h.ULM
Sample		22	Test7	V.H.	Sample7	h.AAP	sasError	h.ULM
Sample		8	Test8	V.H.	Sample8	h.AAP	sasWaiting	h.ULM
Sample		11	Test9	V.H.	Sample9	h.AAP	sasWaiting	h.ULM
Sample		12	Test10	V.H.	Sample10	h.AAP	sasWaiting	h.ULM
Sample		13	Test11	V.H.	Sample11	h.AAP	sasWaiting	h.ULM
Sample		15	Test12	V.H.	Sample12	h.AAP	sasWaiting	h.ULM

1. Jméno vzorku
2. Číslo zkumavky
3. Popis vzorku
4. Jméno uživatele který vzorek analyzoval
5. Jméno souboru
6. Jméno analytického programu
7. Stav zpracování vzorku
8. Jméno metody

Obr. 4. Okno editace sekvence

- Sample name** Jméno vzorku. Pokud zůstane nevyplněno doplní se automaticky jméno souboru.
- Vial Nr.** Číslo zkumavky ze které se daný vzorek nabere. Musí být vyplněno. Při přidání vzorku se automaticky doplní číslo které je o jedničku vyšší než nejvyšší použité číslo.
- Sample Desc.** Popis vzorku. Není povinný.
- User name** Jméno uživatele který vzorek analyzoval
- File name** Jméno souboru na disku. Je povinné, při přidání vzorku se automaticky vyplní jako "Sample" a pořadové číslo.
- Program name** Jméno analytického programu. Je povinné. Při přidání vzorku se automaticky doplní jméno programu z hlavičky sekvence (2.4.1).
- State** Stav zpracování vzorku. Jednotlivé stavy jsou pro rychlou orientaci označeny barevně.

Error	Chybový stav. Při analýze vzorku došlo k chybě.
Done	Vzorek byl v pořádku zpracován.
Running	Vzorek je v současné době zpracováván.
InLoop	Vzorek je připraven ve smyčce.
Waiting	Vzorek čeká na zpracování.
Method name	Jméno metody která bude použita k vyhodnocení vzorku (3.3). Je povinné, ale při vyhodnocování lze metodu dodatečně měnit (3.3). Při přidání vzorku se automaticky doplní jméno metody z hlavičky sekvence (2.4.1).

Vkládání nových řádek a mazání řádek je možno provádět klávesami **Insert** a **Delete**, nebo z menu které se vyvolá pravým tlačítkem myši.

2.4.1 Hlavička sekvence

Hlavička sekvence slouží pro zadání parameterů společných pro celou sekvenci. Dialog pro její editaci se vyvolá automaticky při zakládání nové sekvence, nebo jej lze otevřít příkazem **Header** v menu, které se vyvolá pravým tlačítkem v okně sekvence.

V případě Analyzátoru aminokyselin se z hlavičky sekvence využívají pouze položky Program a Method.

2.4.2 Ekvilibrační analýza

Při zpracování sekvence se na začátek a při každé změně analytického programu automaticky zařadí ekvilibrační analýza. Tato analýza slouží k vyčištění a stabilizaci kolony.

Ekvilibrační analýza probíhá podle programu následující analýzy. Nezačíná v čase nula, ale v místě kde je v programu příkaz StartEquil (2.3).

2.4.3 Hromadné zobrazení výsledků

V okně sekvence je možno provádět hromadné zobrazení výsledků několika vzorků. Vzorky které chceme zobrazit označíme a funkcí **Show result for sel.** z menu pod pravým tlačítkem myši, vyvoláme okno výsledků.

2.5 Stavová informace

V pravé části technologického okna je stavový řádek viz obr. 5.

Další informace o stavu přístroje je možno vyvolat stiskem tlačítka **Status** viz obr. 6.

AAA Status	Time	Program	Sample	State
Ready	27.42	h	Sample8	Waiting

①
②
③
④
⑤

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| 1. Stav přístroje | 4. Jméno aktuálního vzorku |
| 2. Čas analýzy | 5. Stav aktuálního vzorku |
| 3. Jméno aktuálního programu | |

Obr. 5. Stavový řádek

3

Sequence	010117-1	①	1. Aktuální sekvence
P1	O.K.	②	2. Stav pumpy 1
P2	O.K.	③	3. Stav pumpy 2
Column	O.K.	④	4. Stav kolony
Reactor	O.K.	⑤	5. Stav reaktoru
Autosampler	Idle	⑥	6. Stav dávkovače
Detector	O.K.	⑦	7. Stav detektoru
G	-0.0003	⑧	8. Hodnoty absorbance
B	0.0010		

Obr. 6. Stavová informace

3. VYHODNOCOVÁNÍ

Pro AAA400 se používá vyhodnocení pomocí standardu. Vzhledem k tomu, že chemie použitá v analyzátoru se časem mění (stárne NHD), je nutno zařadit po každých 5 až 10 vzorcích standard.

Pro vyhodnocení je možno použít i vnitřní standard. Používá se především k eliminaci chyby vzniklé při přípravě vzorku.

3.1 Postup vyhodnocení

Otevřeme sekvenci kterou chceme vyhodnotit. Pokud je to aktuální sekvence stačí stisknout tlačítko **Sequence**. Pokud vyhodnocujeme starší sekvenci použijeme funkci **File** ⇒ **Open** Nastavíme *Typ souboru* na *Sequence (.ULS)*. V adresáři *Sequences* vybereme sekvenci pro vyhodnocování.

Nejprve je nutno připravit standard. Postup je následující:

1. Otevřeme analýzu standardu. Buďto dvojitým kliknutím na řádku standardu, nebo označením standardy a funkcí **Open selected in one window**.
2. Pokud jsme standard neoznačili v sekvenci (ve sloupci *Cal.* standard nastavit *True*), označíme jej dodatečně, v hlavičce (funkce **Setup**) označíme políčko *Cal. Standard*.

3. Pokud jsme neměli v sekvenci (2.4) správně nastavenou metodu, načteme funkcí **Method** ⇒ **Load From** správnou metodu pro standard viz 3.3.3 a spustíme funkci **Peak** ⇒ **Autodetect**.
4. Zkontrolujeme zda se identifikovaly všechny píky. Pokud ne, opravíme nesprávně identifikované píky. Kliknutím pravým tlačítkem na retenční čas píku a vybráním funkce **Assign metod peak** vyvoláme seznam píků, z kterého můžeme vybrat odpovídající pík.
5. Uložíme standard funkcí **File** ⇒ **Save**, nebo zavřením okna a potvrzením dotazu zda se má soubor uložit.

Pokud máme v sekvenci více standardů, opakujeme postup pro všechny standardy které chceme použít při vyhodnocování vzorků.

Podle následujícího postupu vyhodnotíme vzorky.

1. Otevřeme analýzu vzorku. Buďto dvojitým kliknutím na danou řádku, nebo označením řádky a funkcí **Open selected in one window**.
2. Pokud jsme neměli v sekvenci (2.4) správně nastavenou metodu, načteme funkcí **Method** ⇒ **Load From** správnou metodu pro analýzu viz 3.3.4 a spustíme funkci **Peak** ⇒ **Autodetect**.
3. Zkontrolujeme zda se identifikovaly všechny píky. Pokud ne, opravíme nesprávně identifikované píky. Kliknutím pravým tlačítkem na retenční čas píku a vybráním funkce **Assign metod peak** vyvoláme seznam píků, z kterého můžeme vybrat odpovídající pík.
4. Přiřadíme danému vzorku standard funkcí **Method** ⇒ **Select Calibration File** a spustíme funkci **Peak** ⇒ **Calculate Amounts**.
5. Vyvoláme tabulku píků (obr. 9) **Peak** ⇒ **Browse**, kde si prohlédneme výsledky, případně funkcí **Print** ⇒ **Report** je vytiskneme.

Pokud máme problémy s identifikací píků můžeme použít překrytí analýz. Označíme vzorek a standard které chceme porovnat a spustíme funkci **Open selected in one window**. Stlačením tlačítka pro porovnání analýz (viz 3.2) otevřeme dialog, kde je možno zapínat a vypínat jednotlivé křivky, nastavit jim barvu případně aktivovat analýzu kterou chceme modifikovat.

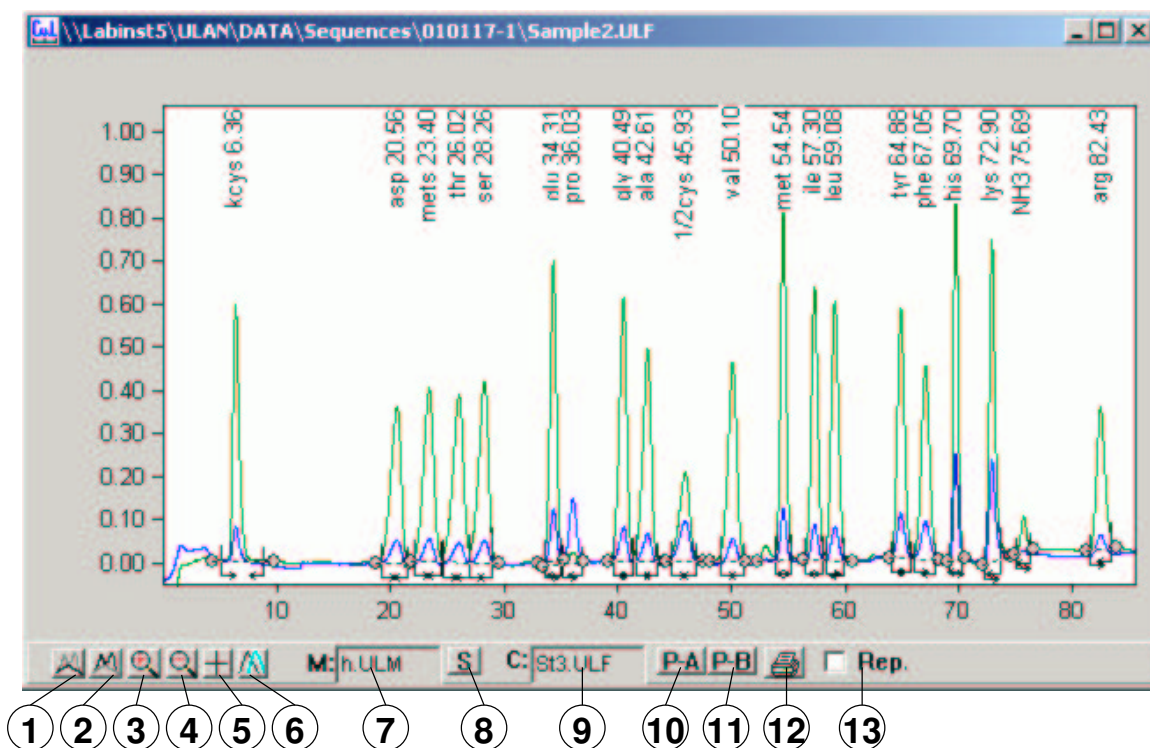
3.2 Okno chromatogramu

Okno chromatogramu můžeme otevřít dvěma způsoby. Stiskem tlačítka **Graph** v technologickém okně, nebo z menu příkazem **File** ⇒ **Open**.

Základní operace s grafem můžeme provádět pomocí tlačítek ve spodní části okna viz obr. 7. Stiskem tlačítka současně s klávesou **Shift** můžeme danou funkci použít opakovaně.

Stiskem pravého tlačítka myši v tomto okně vyvoláme menu chromatogramu které má tyto položky:

Setup	- nastavení parametrů anlyzy
Method	- submenu metody
Baseline	- submenu nulové linie
Peaks	- submenu píků
Math	- submenu přepočtů, využívá se při překrývání analýz viz 3.5



1. Ruční vytváření nulové linie (3.2.1)
2. Ruční vytváření píků (3.2.1)
3. Nastavení výřezu
4. Vrácení předchozího výřezu
5. Režim zobrazení pozice kursoru
6. Porovnávání analýz viz 3.5
7. Aktuální metoda, kliknutím možno změnit (**Method** ⇒ **Load From**)
8. Uložení metody (**Method** ⇒ **Save To**)
9. Aktuální standard, kliknutím možno změnit (**Method** ⇒ **Load Calibration File**)
10. Autodetekce píků (**Peak** ⇒ **Autodetect**)
11. Zobrazení tabulky píků (**Peak** ⇒ **Browse**)
12. Tisk reportu (**Print** ⇒ **Report**)
13. Zapínání zobrazení reportu

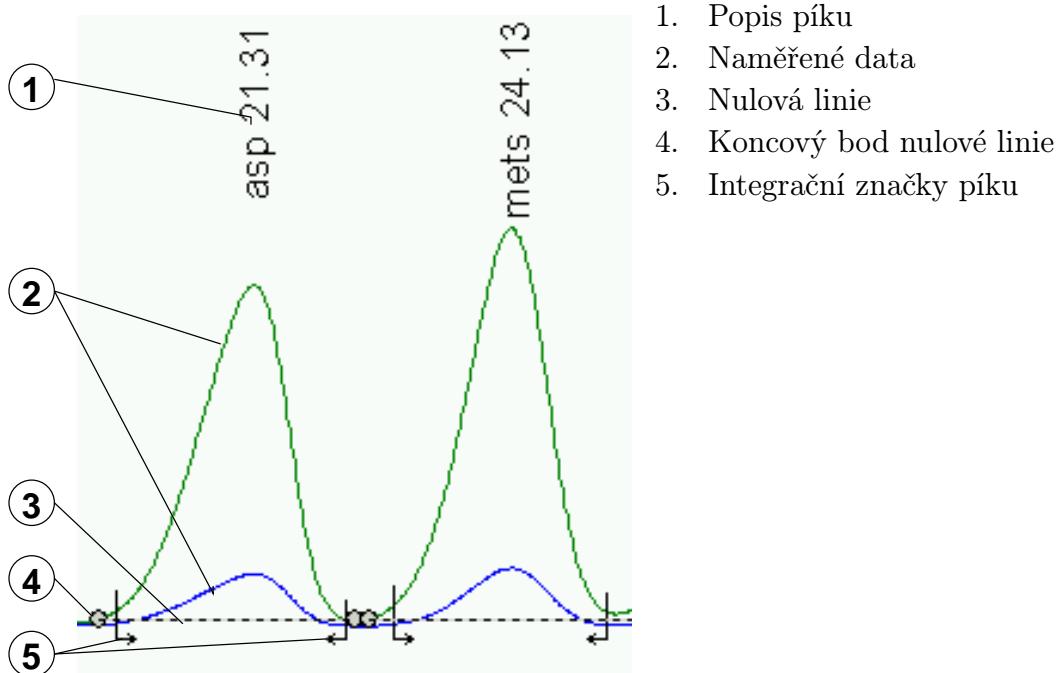
Obr. 7. Okno chromatogramu

- View** - nastavení viditelných položek (osy, popis píků, nulová linie a jiné)
- Scale** - základní měřítko
- Copy to clipboard** - kopírování grafu do jiných aplikací
- Print** - tisk

3.2.1 Editace píků

Parametry píků můžeme editovat přímo v grafu, nebo v tabulce píků. V grafu můžeme editovat také nulovou linii a integrační značky píků viz obr. 8.

Parametry píku v grafu editujeme tak, že označíme pík kliknutím na popis a dalším kliknutím na popis vyvoláme dialog pro editaci parametrů píku. Polohu koncových bodů nulové linie a integračních značek můžeme měnit přímo myší.



Obr. 8. Editace píku

Přidávání dalších píků a useků nulové linie provádíme pomocí tlačítek ve spodní části okna chromatogramu (3.2).

Tabulku píků vyvoláme funkcí **Peak** ⇒ **Browse** viz obr. 9

3.3 Metoda

Metoda obsahuje informace pro vyhodnocení analýzy. Metoda je součástí každé analýzy. Ale je možno ji uložit i do samostatného souboru a z tohoto souboru ji opět načíst. K tomu slouží funkce **Method** ⇒ **Save To** a **Method** ⇒ **Load From**.

V případě analyzátoru aminokyselin je do analýzy automaticky vložena metoda nastavená v sekvenci viz 2.4.

Data v metodě můžeme rozdělit na tři části: Hlavičku metody, popis píků a popis nulové linie.

3.3.1 Halvička metody

Hlavičku metody vyvoáme funkcí **Method** ⇒ **Edit** viz obr. 10. Význam jednotlivých položek je následující.

<i>Method Template</i>	Jméno souboru z kterého vznikla metoda
<i>Calibration File</i>	Jméno standardu
<i>Calibration File</i>	Jméno souboru metody
<i>Duration</i>	Tento parametr se zatím nepoužívá
<i>Base min. interval</i>	Používá se při autodetekci nulové linie, říká jak dlouhý musí být rovný úsek, aby se považoval za nulovou linii.
<i>Base max. diff</i>	Udává maximální šum který může být na úseku, který se považuje za nulovou linii.

	X [min]	Area	Name	Amount	Usr Peak Coef	Window [min]	Response	Data name
Peak	6.36	22.11	kcys	25	1	1.00	0.9222	
Peak	21.32	23.03	asp	24.11	1	2.00	0.9553	
Peak	24.13	25.28	mets	23.7	1	2.00	1.066	
Peak	26.88	25.42	thr	23.74	1	2.00	1.071	
Peak	29.12	25.7	ser	23.9	1	2.00	1.075	
Peak	34.85	28.58	glu	24.83	1	1.00	1.151	
Peak	36.58	6.803	pro	239.1	1	1.00	0.02845	B
Peak	41.07	28.22	gly	23.52	1	1.00	1.2	

1. Retenční čas
2. Plocha píku
3. Jméno píku
4. Množství aminokyseliny
5. Koeficient pro výpočet množství viz 3.3.4 a 3.4
6. Okno pro přiřazení píků metody viz 3.3.2
7. Odezva viz 3.4
8. Jméno linie z které se pík vyhodnocuje. Pokud je políčko prázdné vyhodnocuje se podle zelené, písmeno B značí že se vyhodnocuje z modré.

Obr. 9. Tabulka píků

Method template	Sample1
Calibration file	D:\ULAN\DATA\S...
Method File Name	h.ULM
Dilution	0
Base.min.interval [min]	0.30
Base Max Diff	0.006
Min. peak height	0.01
Min. peak width [min]	0.20
Use Negative Peaks	<input type="checkbox"/>
Calc Amounts	<input checked="" type="checkbox"/>
Use Calibration File	<input checked="" type="checkbox"/>
Use Internal Standard	<input type="checkbox"/>
Factor	1
Calibration File Age	22.1.2001 13:40:02
No Unknown Peaks	<input checked="" type="checkbox"/>

Obr. 10. Hlavička metody

- Min. peak height* Minimální výška píku. Píky které jsou menší se při autodetekci ignorují.
- Min. peak width* Minimální šířka píku. Píky které jsou užší se při autodetekci ignorují.

<i>Use negative peaks</i>	Políčko označíme pokud chceme vyhodnocovat negativní píky. U analyzátoru aminokyselin se nepoužívá.
<i>Calc Amounts</i>	Políčko označíme pokud chceme automaticky počítat množství. U analyzátoru aminokyselin je vždy označeno.
<i>Use Calibration File</i>	Políčko označíme pokud chceme použít standard. U analyzátoru aminokyselin je vždy označeno.
<i>Use Internal Standard</i>	Políčko označíme pokud chceme použít vnitřní standard.
<i>Factor</i>	Přepočtový faktor viz 3.4 .
<i>Calibration File Age</i>	Datum a čas načtení kalibračního souboru. Při výpočtu se kontroluje zda nebyl kalibrační soubor upraven po tomto datu. V případě že byl, provede se jeho nové načtení.
<i>No Unknown Peak</i>	Pokud označíme toto políčko, vyhodnocují se pouze píky které jsou definovány v metodě.

3.3.2 Píky metody

Funkcí **Method** ⇒ **Peaks** ⇒ **Browse** vyvoláme tabulku píků metody. Tato tabulka je stejná jako tabulka píků (obr. 9). Píky do této tabulky můžeme přidávat klávesou **Insert**, nebo můžeme zkopírovat označené píky z analýzy příkazem **Peaks** ⇒ **Copy Selected To Method**.

Píky metody se přiřazují k naměřeným píků pomocí retenčního času a okna. Pokud se píků nepřidá správně změním v tabulce píků metody retenční čas, nebo zvětším okno. Při změně okna musíme dbát na to, aby se okna nepřekrývaly.

3.3.3 Metoda pro standard

Metoda pro standard musí mít v hlavičce (3.3.1) nastaven *Faktor*=1. Dále v tabulce píků metody musí být nasataveny ve sloupci *Amount* množství jednotlivých aminokyselin ve standardu. Ve sloupci *UsrPeakCoef* musí být 1.

Také *Multiply Factor* a *DivideFactor* v sekvenci musí být nastaven na 1.

3.3.4 Metoda pro vzorek

Pokud chceme výsledky v gramech musíme v tabulce píků metody ve sloupci *UsrPeakCoef* nastavit molární hmotnosti jednotlivých aminokyselin.

Pokud používáme konstantní navážku a ředění zahrneme toto do *Faktoru* v hlavičce metody, pokud ne využijeme *Multiply Factor* a *DivideFactor* v sekvenci.

Jména píků v metodě pro vzorek a v metodě pro standard musí být stejná, jinak se daný píků nevyhodnotí.

3.4 Výpočet

U analyzátoru aminokyselin se vždy používá výpočet se standardem. Tento výpočet probíhá podle následujícího vzorce:

$$Amount = \frac{Area}{Response} * UsrPeakCoef * Faktor * \frac{MutiplyFactor}{DivideFactor}$$

kde: Area je plocha píků, UsrPeakCoef je koeficient z tabulky píků. Faktor se nastává v hlavičce metody a je stejný pro všechny píky a pro všechny vzorky vyhodnocené

danou metodou. *MultiplyFactor* a *DivideFactor* se nastavují pro každý vzorek zvlášť v sekvenci nebo v hlavičce vzorku, jsou stejné pro všechny píky. *Response* se vypočítá ze standardu podle vzorce:

$$Response = \frac{Area_{std}}{Amount_{std}} * UsrPeakCoef_{std} * Factor_{std} * \frac{MultiplyFactor_{std}}{DivideFactor_{std}}$$

Význam jednotlivých členů je stejný pouze se berou ze standardu.

3.5 Porovnávání analýz

Program umožňuje vložit několik analýz do jednoho grafu. Toto se provede tak, že se stiskne tlačítko pro porovnávání analýz viz obr. 7 a pak se otevře další analýza funkcí **File** ⇒ **Open**. Jednotlivé analýzy je možno posouvat a zvětšovat funkcemi ze submenu **Math** v menu chromatogramu.

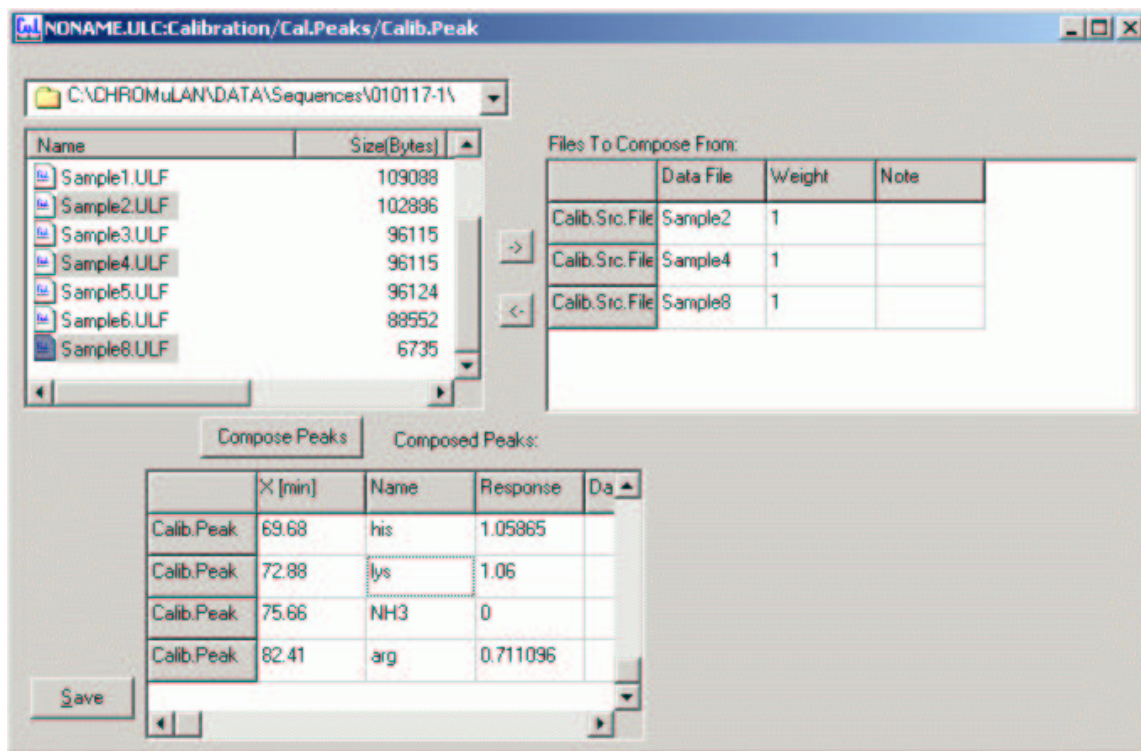
Další možnost zobrazit několik analýz do jednoho grafu je funkcí **Open selected in one window** v menu, které se vyvolá pravým tlačítkem v okně sekvence.

Přepínat aktivní analýzy je možno funkcí **Overlay** z menu chromatogramu.

3.6 Kalibrační soubory

Pokud nám nestačí výpočet s jedním standardem, máme možnost z několika standardů vytvořit kalibrační soubor. To provedeme v sekvenci funkcí **Compose Calibration**. Po vyvolání této funkce se otevře okno kalibračního souboru viz obr. 11. Vlevo nahoře je seznam všech analýz v dané sekvenci. V tomto seznamu označíme požadované standardy a pomocí tlačítka s šipkou je přesuneme do seznamu na pravé straně. V tomto seznamu jsou zobrazeny všechny standardy z kterých bude vytvořena kalibrace. Pro jednotlivé standardy si můžeme ve sloupci **Weight** zvolit váhu. Stiskem tlačítka **Compose Peaks** se spočítá vážený průměr hodnot *Response* pro jednotlivé píky. Výsledek představuje vlastní kalibrační soubor a je zobrazen ve spodní části okna. Abychom mohli tento soubor použít, musíme jej tlačítkem **Save** uložit.

Takto vytvořený kalibrační soubor můžeme použít pro výpočet místo standardu. Při přiřazování standardu změním **Typ souboru** na **Calibration file .ULC**.



4

Obr. 11. Kalibrační soubor

4. OBSAH

1.	ÚVOD	4
1.1	Verze 0.70	5
2.	ŘÍZENÍ	6
2.1	Spuštění analyzátoru	6
2.2	Nastavení	7
2.3	Analytický program	7
2.4	Sekvence	8
2.4.1	Hlavička sekvence	10
2.4.2	Ekvilibrační analýza	10
2.4.3	Hromadné zobrazení výsledků	10
2.5	Stavová informace	10
3.	VYHODNOCOVÁNÍ	11
3.1	Postup vyhodnocení	11
3.2	Okno chromatogramu	12
3.2.1	Editace píků	13
3.3	Metoda	14
3.3.1	Halvička metody	14
3.3.2	Píky metody	16
3.3.3	Metoda pro standard	16

3.3.4 Metoda pro vzorek	16
3.4 Výpočet	16
3.5 Porovnávání analýz	17
3.6 Kalibrační soubory	17
4. OBSAH	18
4.1 Seznam obrázků a tabulek	19

4.1 Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1. ChromuLan	4
Obr. 2. Technologické okno	6
Obr. 3. Okno editace programu	8
Obr. 4. Okno editace sekvence	9
Obr. 5. Stavový řádek	11
Obr. 6. Stavová informace	11
Obr. 7. Okno chromatogramu	13
Obr. 8. Editace píku	14
Obr. 9. Tabulka píků	15
Obr. 10. Hlavička metody	15
Obr. 11. Kalibrační soubor	18