

Univerzita Karlova Praha

1. lékařská fakulta

Zdravotnická technika



Srovnání ruční a automatické kalibrace pro účely chemické analýzy

Bakalářská práce

Autor: Matěj Suchý

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2008

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly, Dr., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze dne 1. 6. 2008

Poděkování:

Rád bych poděkoval mému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za jeho pomoc, trpělivost a rady poskytnuté během měření a vypracování této bakalářské práce. Velké díky patří Mgr. Lucii Řimnáčové za pomoc při obsluze přístrojů a při zvládnutí teoretické části. Za ochotu bych rád poděkoval Prof. MUDr. Vladimíru Benckovi, DrSc. Dále bych rád poděkoval celé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

OBSAH

1. Souhrn	5
2. Summary	6
3. Teoretická část	7
3.1. Úvod	7
3.2. Kalibrace.....	7
3.3. Ftaláty	7
3.4. Plynová chromatografie.....	9
3.5. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)	10
3.6. Spektrofotometre ve viditelné oblasti spektra	12
3.6.1. Obecné základy	12
3.6.2. Absorpční spektrofotometr	14
4. Experimentální část.....	16
4.1. Chemikálie.....	16
4.2. Přístrojové vybavení	16
4.3. Softwarové vybavení	19
5. Výsledky	20
5.1. Výsledky měřené na spektrofotometru.....	20
5.2. Výsledky získané z plynového chromatografu při split nástřiku	22
5.3. Výsledky měřené na plynovém chromatografu při splitless nástřiku.....	29
6. Závěr	33
7. Seznam použité literatury	35
8. Citace	35
9. Přílohy	36

1. SOUHRN

V této bakalářské práci se zabývám srovnáním přípravy ruční a automatické kalibrace pro účely chemické analýzy. Tato práce obsahuje teoretickou část, která nás seznámí s obecnými vlastnostmi použitých chemikálií a vyhodnocovacích postupů, a praktickou část, kde se seznámíme s výsledky měření.

Kalibrační řady pro dimethylftalát a manganistan draselný jsme nejprve připravili ručně pomocí poloautomatických pipet a následně jsme stejné koncentrace nechali připravit automatickým injektorem. Napipetované roztoky dimethylftalátu jsme nechali změřit na plynovém chromatografu ve split i splitless módu. Roztoky KMnO_4 jsme z důvodů kontroly automatického injektoru měřili také na spektrofotometru.

Cílem naší práce je zjistit, zda automatický injektor dosahuje při přípravě kalibrační řady stejné nebo vyšší přesnosti než člověk.

2. SUMMARY

The aim of this work is the comparison of manually and automatically prepared calibration for the purposes of chemical analysis. The theoretical part includes description of used chemicals and evaluation methods. In the practical part results of experimental measurement are presented.

First, calibration sequences were manually prepared by the use of halfautomatic pipettes and, second, the same sequences were prepared by the automatic injector. All prepared dimethylphthalate solutions were measured by gas chromatograph in both split- and splitless mode. Calibration KMnO_4 solutions were also measured by spectrophotometr as control of automatic injector functoins.

The results should reveal if the automatic injector is more or less precise than manual preparation of calibration.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Úvod

Prakticky ve všech odvětvích průmyslu a zdravotnictví stroje nahrazují lidi. Je to způsobeno zefektivňováním, zrychlením a zkvalitněním výroby. Otázkou zůstává, zda v oborech, kde se pracuje s velkou přesností může stroj konkurovat lidské ruce.

3.2. Kalibrace

Kalibrace zjišťuje závislost měřené veličiny y na koncentraci analytu c_a , při porovnání daného a nalezeného množství a při porovnání výsledků získaných dvěma odlišnými metodami.

Vyhodnocování analytického signálu vychází z kalibrační závislosti $y = f(c_a)$, kterou pokládáme za regresní závislost. Při konstrukci kalibrační křivky se zjišťuje závislost signálu na obsahu analytu pomocí vhodných standardních vzorků a není podstatné, zda se tato závislost znázorňuje graficky, či zda se vyjádří numericky.

Kalibrace je velmi důležitá operace, na níž závisí přesnost a správnost výsledků instrumentálních analýz.

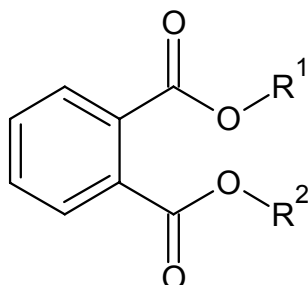
Nejpoužívanějším kalibračním grafem je kalibrační přímka $y = a + bc_A$, kde a je úsek vytyčený na ose signálu a b je směrnice kalibrační přímky.

3.3. Ftaláty

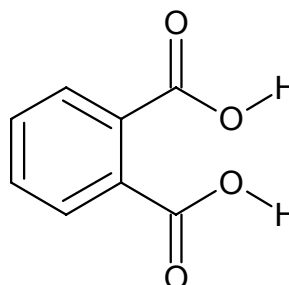
Ftaláty (Obrázek 1) jsou diestery kyseliny ftalové, což je kyselina-1,2-dikarboxylová (Obrázek 2), a patří mezi často sledované organické polutanty. Od roku 1930 se používají jako přísady do průmyslových produktů. Jsou to obvykle bezbarvé nebo mírně nažloutlé olejovité kapaliny bez zápachu, jen mírně rozpustné ve vodě a snadno rozpustné v organických rozpouštědlech. Jsou vysoce lipofilní a s rostoucí délkou bočního řetězce roste jejich rozpustnost v tucích a teplota varu. V průmyslovém odvětví se hojně využívají například jako změkčovadlo při výrobě plastů, zejména pro polyvinylchlorid (PVC), estery celulózy a syntetické elastomery, v barvářském průmyslu (náhrada PCB v některých nátěrových hmotách), v lékařské zařízení atd. Protože ftaláty nejsou v plastech vázány kovalentně, ale pouze fyzikálními silami, jsou uvolňovány z plastových produktů do prostředí a díky tomu jsou hojně obsaženy v životním prostředí. K zásadním únikům

změkčovadel ftalátového typu do ovzduší dochází hlavně při konečné tepelné úpravě výrobků. Ftaláty se vyrábějí synteticky, nebo zpracováním černouhelného dehtu.

Obrázek 1: Obecný vzorec ftalátů



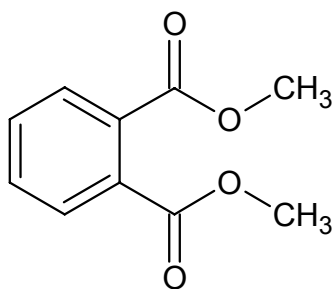
Obrázek 2: Vzorec kyseliny 1, 2-dikarboxylové



Akutní toxicita ftalátů je velmi nízká. Při krátkém vystavení mohou způsobovat podráždění kůže, očí a sliznic ústních a nosních dutin, individuálně se může objevit alergická reakce a při inhalaci astma a podráždění plic. Mnohem významnější než akutní toxicita je u ftalátů toxicita chronická. Početné pokusy na hlodavcích ukázaly nepříznivé účinky ftalátů na reprodukční systém a na nitroděložní vývoj plodu, přičemž ze studií také vyplývá, že při vystavení ftalátům během těhotenství u samic krys v dávkách kolem 500 mg/kg tělesné hmotnosti, je zvýšený výskyt mrtvého plodu, nižší váha potomstva při narození a je možná deformace plodu, například rozštěp patra, kostní znetvoření atd. U samců krys byly při dlouhodobé expozici ftalátům prokázány vrozené defekty a poruchy na rozmnožovacích orgánech. Ačkoliv není pochyb o nepříznivých účincích ftalátů na reprodukci a rozvoj hlodavců, efekty na lidech nebyly doposud uspokojivě objasněny, protože je přístupno jen velmi málo studií o působení ftalátů na člověka. „Ftaláty se dostávají do těla potravou, inhalací nebo vstřebáváním kůží. Podle agentury pro ochranu životního prostředí v USA (EPA) je určen maximální příjem ftalátů 20 µg/kg tělesné hmotnosti denně, kdežto tolerovaný denní příjem v EU je stanoven na 37 µg/kg tělesné hmotnosti denně. Vyšším dávkám se vystavují pracovníci na rizikových místech (až 700 µg/kg tělesné hmotnosti denně) a v lékařství při použití plastových hadiček (až 457 µg/kg tělesné hmotnosti denně při hemodialýze).“¹

Molární hmotnost DMP je 194,19 g/mol, bod tání je 5,5 - 6 °C a bod varu je 283,7 - 284 °C. Dimethylftalát může po dlouhodobé inhalaci způsobovat závratě dezorientaci a ztrátu koordinace. Studie na zvířatech ukazují, že podráždění nastává při koncentraci 2 mg/m smrt při koncentraci 9 mg/m po 6,5 hodinách.

Obrázek 3: Vzorec dimethylftalátu

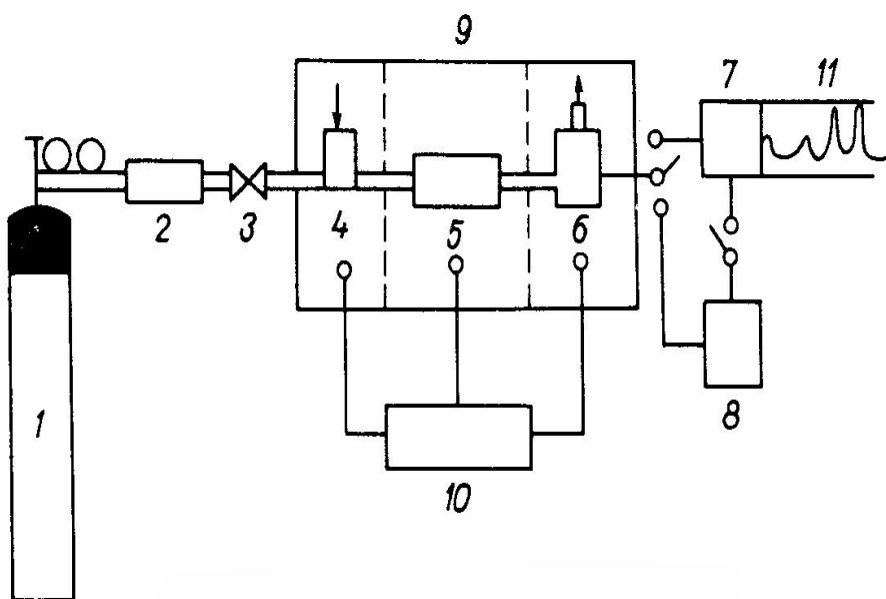


3.4. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je jednou z nejrozšířenějších separačních metod analytické chemie. V současné době se podílí nejméně z 50% na řešení všech analytických úkolů v odvětvích, jako je zpracování ropy, petrochemie a analýza plynů. Významné je její pronikání do oblasti biologie a do různých disciplín, které řeší ochranu životního prostředí.

Nejdůležitější fází chromatografického postupu jsou děje probíhající na koloně. Z tohoto hlediska definujeme plynovou chromatografii jako fyzikálně chemickou metodu separace látek ze směsi.

Důležité součásti plynového chromatografu (obrázek 4) jsou: zdroj a regulace proudu nosného plynu, dávkovací systém, kolona, detekční zařízení, kolona, termostaty pro dávkovač, kolonu a detektor, zapisovač a vyhodnocovací systém.



Obrázek 4: Blokové schéma plynového chromatografu

1 – Zdroj nosného plynu, 2 – Čistící zařízení, 3 – Regulační zařízení, 4 – Dávkoč, 5 – Kolona, 6 – Detektor, 7 – Zapisovač, 8 – Vyhodnocovací zařízení, 9, 10 – Termostat a regulace teploty, 11 – Chromatogram

Ze zdroje plynu, kterým bývá většinou tlaková nádoba (1), prochází plyn systémem čistícího (2) a regulačního zařízení (3), které zbavuje plyn nežádoucích příměsí a zajišťuje jeho konstantní průtok kolonu. Dávkočem (4) se vzorek vpraví do proudu nosného plynu a spolu s ním vstupuje do kolony (5). Za vhodných podmínek dochází v koloně k rozdělení směsi na jednotlivé složky. Tyto složky jsou proudem nosného plynu převáděny z kolony do detektoru (6), který bývá spojen přímo se zapisovačem (7). Součástí moderních přístrojů je vyhodnocovací zařízení (8)- počítač. Dávkoč, kolona a detektor vyžadují termostatování (9), (10) na různé teploty.

Výsledkem separačního pochodu (chromatografie) je grafický záznam, chromatogram (11).

Split nástřik

„Vzorek se po zplynění smísí s nosným plynem a zavede do děliče, v němž se směs pomocí pomocného pneumatického odporu rozdělí na dvě části tak, že pouze malá část vstupuje do kolony, zatímco většina analyzovaného vzorku přechází do atmosféry.“²

Splitless nástřik

„Podmínkou pro úspěšnou analýzu v uvedeném systému je volba vhodné počáteční teploty, kdy teplota kolony je zpravidla 10 až 30 °C pod bodem varu použitého rozpouštědla, zatímco teplota injektoru je o 10 až 30 °C nad bodem varu nejméně těkavé složky vzorku. Dávkování vede k tomu, že se celý vzorek odpaří a analyzované složky se zachytí na chladném počátku kolony, kde zkondenzované rozpouštědlo vytvoří téměř ideální úzkou zónu. Po oddělení rozpouštědla a nakoncentrování stopových složek se při rychlém zvýšení teploty provede vlastní analýza.“²

3.5. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)

Pro přesné a správné určení meze detekce (limit of detection, *LOD*) a meze stanovitelnosti (limit of quantitation, *LOQ*) je nezbytná znalost složek signálu měřícího zařízení. Signál měřícího zařízení *S* je tvořen příspěvkem analytu, matrice vzorku a

instrumentace GC. Pro signál analytu S_i platí, že je úměrný koncentraci analytu c_i , koeficientu linearit l a citlivosti měřícího zařízení. Citlivost je vyjádřena jako součin konstrukčních vlastností K a specifických vlastností analytu a_i . Nezbytnou podmínkou správné kalibrace měřícího zařízení je neměnnost jeho citlivosti v použitém koncentračním intervalu analytu. Vztah mezi signálem, citlivostí, linearitou a koncentrací analytu lze pak vyjádřit vztahem:

$$S_i = (K \cdot a_i) \cdot c_i^l \quad (V1)$$

Linearita výstupu měřícího zařízení je vyjádřena třemi parametry, které se nazývají koeficient linearit, lineární dynamický rozsah a chyba linearit.

Koeficient linearit l je definován jako směrnice funkční závislosti $\log S = f(\log c_i)$ a lze ho vypočítat ze zlogaritmované formy rovnice (V1).

$$\log S_i = \log(K \cdot a_i) + l \cdot \log c_i \quad (V2)$$

$$l = \frac{\log S_i - \log(K \cdot a_i)}{\log c_i} \quad (V3)$$

Jako lineární je označováno měřící zařízení, jehož koeficient linearit je blízký jedné ($l = 1$). Koeficient linearit nejvýznamněji ovlivňuje signál detektoru a měl by být znám pro použité měřící zařízení a rozsah množství daného analytu. Jelikož koeficient linearit je mocninou, mění významně velké hodnoty signálu oproti signálům malým. Koeficient linearit tedy výrazně ovlivňuje tvar elučního píku, a tak i chromatografická vyhodnocení šířky píku, účinnosti, polohy údolí částečně rozlišených píků atd.

Lineární dynamický rozsah je rozsah množství analytu, v němž je citlivost detektoru konstantní v rámci zvolené chyby linearit, proto pro měřící zařízení může existovat několik lineárních dynamických rozsahů.

Chyba linearit představuje předem dohodnutou akceptovatelnou míru odchylek od konstantní hodnoty citlivosti při zachování konstantní hodnoty koeficientu linearit.

Výpočet LOD a LOQ

V případě hodnoty koeficientu linearitě blízkému jedné mohou být mez detekce a mez stanovitelnosti vypočítány ze společné směrodatné odchylky regrese, $s_{y,x}$, kterou získáme lineární regresi závislosti signálu na koncentraci.

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{n - 2}} \quad (\text{V4})$$

Zde je y_i experimentálně naměřená hodnota signálu pro danou koncentraci a Y_i je hodnota signálu vypočteného z regresní rovnice pro totéž x .

Pro výpočet LOD je pak brána hodnota signálu rovna 3 x SDR a pro LOQ hodnota 10 x SDR. Dosadíme-li za nejmenší signál trojnásobek SDR a za koncentraci LOD do rovnice (V1), pak pro $l \sim 1$ dostaneme:

$$LOD = \frac{3 \cdot SDR}{(K \cdot a_i)} \quad (\text{V5})$$

Obdobně, dosadíme-li za nejmenší signál pro kvantifikaci desetinásobek SDR a za koncentraci LOQ do rovnice (V1), pak pro $l \sim 1$ dostaneme:

$$LOQ = \frac{10 \cdot SDR}{(K \cdot a_i)} \quad (\text{V6})$$

V případě, kdy l se odlišuje od jedné, je potřeba použít jiný postup výpočtu LOD a LOQ uvedený v práci [2]

3.6. Spektrofotometre ve viditelné oblasti spektra

3.6.1. Obecné základy

Molekuly mají schopnost pohlcovat elektromagnetické záření pouze určitých vlnových délek. Je to dáno tím, že mohou existovat v určitých kvantových stavech, které se liší obsahem energie. Jestliže má molekula přejít ze stavu s nižší energií do stavu s energií vyšší, musí absorbovat záření o frekvenci ν , která právě odpovídá rozdílu energií mezi

energetickými hladinami E_p a E_q obou kvantových stavů podle Bohrovy frekvenční podmínky:

$$\Delta E = E_p - E_q = h \nu = h c / \lambda \quad (\text{V7})$$

kde c je rychlost světla, λ vlnová délka a h je Planckova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J s); podle konvence je excitovaná hladina označena indexem p , základní indexem q .

Energeticky nejnáročnější jsou přechody mezi elektronovými energetickými hladinami. Běžně jsou způsobeny absorpcí ultrafialového (190 až 400 nm) a viditelného záření (400 až 800 nm). Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které nazýváme absorpční spektrofotometry.

Konstruktivně se spektrofotometry dělí na jednopaprskové a dvoupaprskové. V laboratoři používáme jednopaprskový spektrofotometr, který měří pouze vystupující tok záření. Proto je třeba provést dvě měření: vedle měření vzorku (Φ) ještě srovnávací pokus (Φ_0), při kterém se měří slepý vzorek, kde dochází ke korekci měřené absorpce na pozadí. Z naměřených intenzit světla Φ a Φ_0 se vypočítává veličina nazývaná absorbance A , která je definována následovně:

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad (\text{V8})$$

Závislost absorbance na vlnové délce (frekvenci) nazýváme absorpční spektrum. Absorpční spektrum je tvořeno absorpčními pásy. Absorpční pás charakterizujeme polohou jeho maxima, absorbancí v maximu a tvarem. Absorpční spektrum slouží k identifikaci sloučenin, zejména organických, s chromoforními skupinami, jako např. C = O, N = N, N = O, konjugovanými dvojnými vazbami apod. Velká většina kationtů ve zředěných vodných roztocích vykazuje jen nepatrnou vlastní absorpci. Kationty se proto převádějí do barevných stabilních komplexů reakcí s komplexotvornými činidly obsahujícími chromoforní skupiny. Vznik komplexu obvykle vyžaduje prostředí o vhodné hodnotě pH apod.

Těžiště aplikací absorpční spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra je v kvantitativní analýze. Kvantitativní analýza je založena na Lambertově-Beerově zákoně, podle kterého je hodnota absorbance A při vlnové délce λ přímo úměrná látkové koncentraci c (mol l^{-1}). V případě jediné absorbující látky platí:

$$A_{\lambda,i} = \epsilon_{\lambda} \cdot b \cdot c_i = k \cdot c_i \quad (\text{V9})$$

Konstantou úměrnosti je součin tloušťky vrstvy b (cm) a molárního absorpčního koeficientu při dané vlnové délce ϵ_{λ} , který má rozměr $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Z uvedeného vztahu dále vyplývá, že součin $\epsilon_{\lambda}.b$ je pro měření stejného analytu při stejné vlnové délce a ve stejné kyvetě konstantní a může být nahrazen konstantou k .

Lambertův-Beerův zákon platí pro monochromatické elektromagnetické záření a obor nízkých koncentrací, řádově menších než $10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$. Pro kvantitativní analýzu je nutné vybrat takovou vlnovou délku, při níž stanovovaná látka silně absorbuje (nejlépe maximum absorpčního pásu) a případné interferující látky mají absorpci minimální. Při postupu se změří absorbance několika kalibračních roztoků o různých koncentracích, samozřejmě v téže kyvetě a při stejné vhodně zvolené vlnové délce. Z průběhu získané závislosti absorbance na koncentraci, tj. z kalibrační křivky lze ověřit platnost Lambertova-Beerova zákona. Výsledná závislost by měla být přímka procházející počátkem a nazýváme ji kalibrační přímkou

3.6.2. Absorpční spektrofotometr

Základními částmi absorpčního spektrofotometru

Absorpční spektrofotometr je tvořen čtyřmi základními částmi: 1. zdrojem záření, 2. monochromátorem, 3. absorpčním prostředím a 4. detekčním systémem.

1. Zdrojem spojitého elektromagnetického záření pro viditelnou oblast je běžně wolframová nebo halogenová žárovka.
2. Monochromátor je tvořen vstupní a výstupní štěrbinou, rozkladným prvkem a zrcadlovou nebo čočkovou soustavou. Rozkladným prvkem může být hranol nebo reflexní mřížka. Pro viditelnou oblast spektra, tj. 400 - 800 nm, je hranol ze skla. Natáčením rozkladného prvku se postupně zobrazují jednotlivé monochromatické obrazy vstupní štěrbinu na štěrbinu výstupní.
3. Absorpční prostředí tvoří kyveta s měrným, příp. srovnávacím roztokem. Materiál kyvet se řídí měřenou oblastí spektra. Pro viditelnou oblast jsou okénka kyvety ze skla. Absorpční prostředí tvoří většinou roztok látky ve vhodném rozpouštědle. Nejběžnějším rozpouštědlem pro viditelnou oblast spektra je destilovaná voda.
4. Detekční systém je složen z detektoru záření a elektronického zařízení na zpracování jeho odezvy. Detektor převádí zářivý tok na elektrický signál. Pro detekci záření ve viditelné oblasti se používají fotonky nebo fotonásobiče, selénové hradlové fotočlánky, fotoodpory apod. Signál z detektoru se zpracovává v zesilovači a jeho výstup se zobrazí na číslicovém displeji.

Svazek polychromatického záření vycházející ze zdroje dopadá na vstupní štěrbinu monochromátoru. Po rozkladu na reflexní mřížce nebo hranolu vychází z výstupní štěrbině svazek přibližně monochromatického záření, které je charakterizováno intervalem vlnových délek, které projdou výstupní štěrbinou. Střední hodnotou tohoto intervalu je nastavená vlnová délka. Velikost intervalu je závislá na konstrukci přístroje. Po průchodu absorpčním prostředím dopadá monochromatické záření na fotoelektrický detektor a vzniklý fotoproud se převádí na digitální výstup.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie

Dimethylftalát- DMP (99%, Aldrich)

(Obrázek 3)

Manganistan draselný- KMnO_4 (čistota p.a., Merck)

Methylalkohol (redestilovaný, Penta)

Destilovaná voda

4.2. Přístrojové vybavení

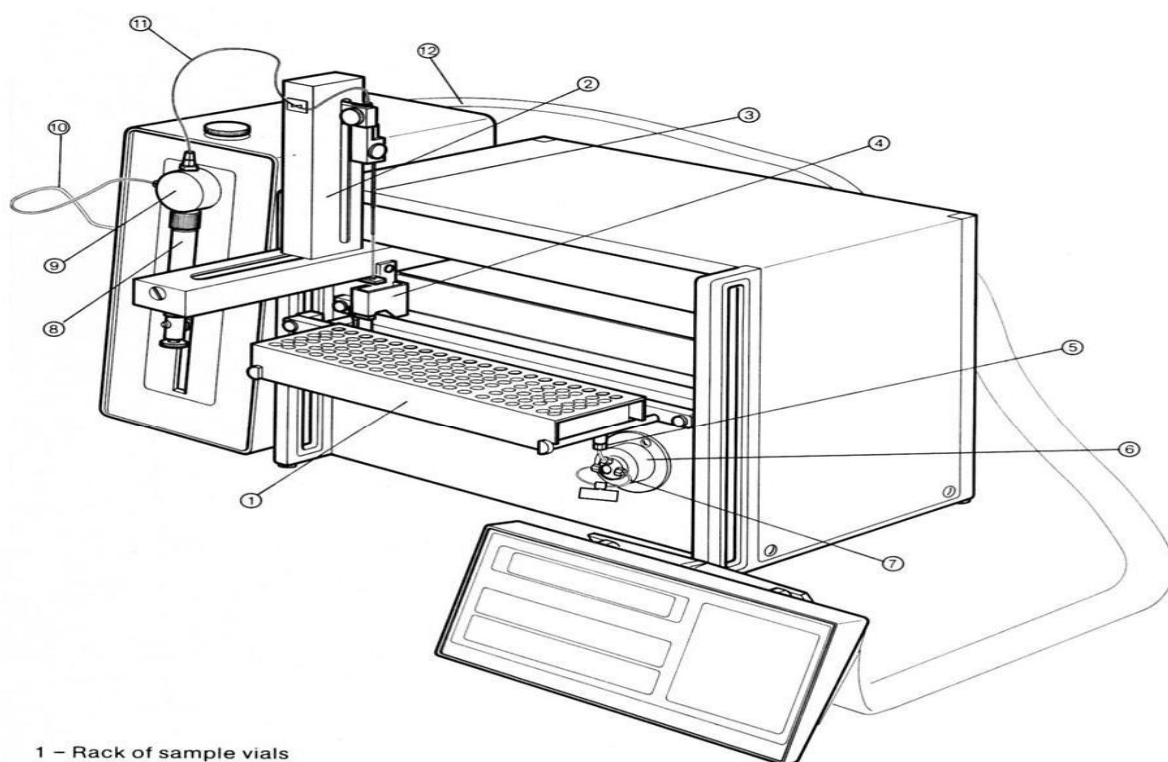
Automatické pipety

100 – 1000 μl , 10 - 100 μl (obě Biohit, Helsinky, Finsko), 50 – 250 μl (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Automatický injektor

Typ 231-401, (Gilson Medical Electronics, Software V 3.2, Francie)

Injektor používá stříkačku o objemu 500 μl a dávkovací smyčku o objemu 200 μl .



- 1 – Rack of sample vials
- 2 – Vertical arm
- 3 – Needle
- 4 – Rinsing station
- 5 – Loop filler port
- 6 – 7010 Rheodyne injection valve
- 7 – Sample loop
- 8 – 401 syringe
- 9 – 401 valve
- 10 – Carrier solvent inlet tubing
- 11 – Transfer tubing for hydraulic connection between the two modules
- 12 – GSIOC cable for digital connection between the two modules.

Obrázek 5: Schéma 231-401 Autosampler injector

Plynový chromatograf

Plynový chromatograf GC-2010 (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s plamenově iozinačním detektorem (FID) byl opatřen autosamplerem AOC-20i (Shimadzu). Kolona použitá k separaci byla DB-5MS (Agilent Technologies, USA) o vnitřním průměru 0,25 mm, tloušťce vrstvy 0,25 μm a délce 30 m. Použité plyny: nosný plyn dusík (99,997%, Linde Technoplyn), vodík (99,97%, Linde) a vzduch (GA 230, Linde Technoplyn). Průtoková rychlost nosného plynu 1,3 ml/min (odpovídá lineární rychlosti 30 cm/s), průtoková rychlost vodíku 40 ml/min a vzduchu 300 ml/min. Teplota nástřiku byla 250 °C a teplota detektoru 300 °C. Plynový chromatograf byl řízen počítačem. Sběr dat a zpracování výsledků bylo provedeno v programu LabSolution (GC Solution, verze 2.21.00, Shimadzu).

Podmínky měření na GC ve split módu

Teplotní program: 150 °C (5 min), 5 °C/min do 220 °C, 3 °C/min do 275 °C

Podmínky měření na GC ve splitless módu

Teplotní program: 45 °C (2 min), 12,5 °C/min do 220 °C, 5 °C/min do 275 °C (3 min)



Obrázek 6: Plynový chromatograf GC-2010

Spektrofotometr Agilent 8453

Spektrofotometr Agilent 8453 je moderní přístroj určený ke spektrofotometrickým měřením roztoků ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra v rozsahu 190 - 1100 nm s přesností 1 nm. Spektrofotometr je plně řízen osobním počítačem pomocí ovládacího programu UV-Visible ChemStation, ver. 9.01.



Obrázek 7: Spektrofotometr Agilent 8453

4.3. Softwarové vybavení

Operační systém Windows XP Professional	Microsoft
Microsoft Office Word 2003	Microsoft
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft
LabSolution (GC Solution, verze 2.21.00)	Shimadzu
UV-Visible ChemStation, ver. 9.01	Shimadzu

5. VÝSLEDKY

Byla připravena kalibrační řada pro DMP v rozmezí koncentrací 10 – 100 µg/ml a následně proměřena na GC-FID. Kalibrace mohou být konstruovány z ploch nebo výšek píku. Obě kalibrace se mohou vzájemně lišit, protože plocha píku může být silně ovlivněna jeho asymetrií zatímco jeho výška daleko méně. Pokud použijeme ke kalibraci jednu z uvedených veličin, používáme často druhou z nich pro kontrolu. Výsledky měření byly vyhodnoceny v programu LabSolution. Tento program je schopen vyhodnocovat mnoho parametrů, ale pro naše měření stačilo, když jsme sledovali pouze plochu a výšku píku pro DMP. Každý vzorek kalibrační řady byl pro větší přesnost výsledků změřen třikrát. Z naměřených hodnot byly spočítány průměry a směrodatné odchylky, které byly následně vyneseny do grafu.

Pro měření na spektrofotometru byla připravena kalibrační řada manganistanu draselného v rozmezí koncentrací 7,9 - 78,7 µg/ml. Manganistan draselný jsme použili, protože je intenzivně barevný a dostatečně stálý.

5.1. Výsledky měření na spektrofotometru

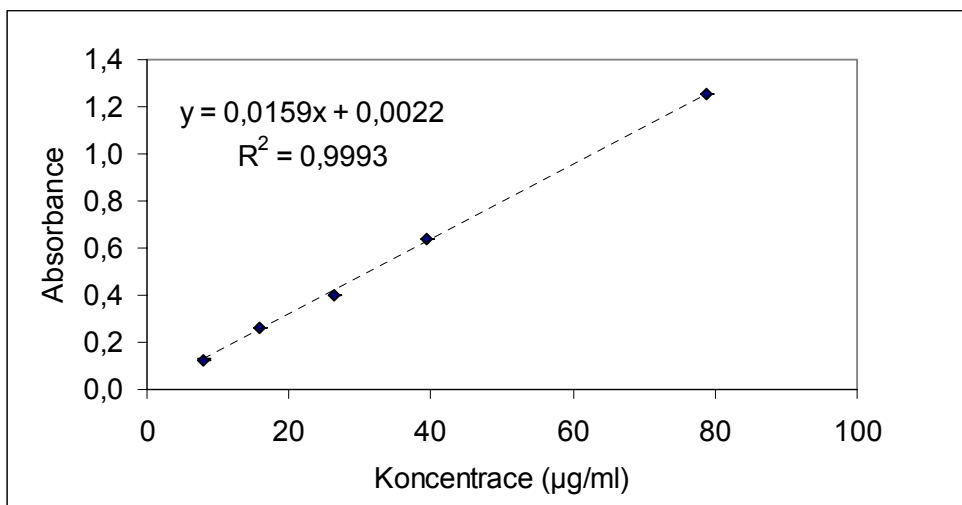
V tabulce 1 jsou uvedené hodnoty absorbance ručně připravované kalibrační řady a statisticky vypočtené hodnoty pro vytvoření grafu.

Tabulka 1: Naměřené a vypočtené hodnoty výsledků ručně připravené kalibrační řady KMnO_4

Koncentrace (µg/ml)	Absorbance				Směrodatná odchylka	RSD (%)
	1	2	3	Průměr		
7,9	0,12867	0,12413	0,12550	0,12610	0,00190	1,50
15,7	0,26139	0,26132	0,26141	0,26137	0,00004	0,01
26,3	0,40141	0,40202	0,40264	0,40202	0,00050	0,12
39,4	0,63867	0,64091	0,64082	0,64013	0,00104	0,16
78,7	1,25190	1,25210	1,25350	1,25250	0,00071	0,05

Nízké hodnoty RSD absorbancí ukazují na vynikající opakovatelnost měření.

Graf 1 znázorňuje závislost absorbance na koncentraci roztoku. Závislost vykazuje vysokou linearitu a korelaci vzhledem k hodnotě $R^2 = 0,9993$, což vypovídá o velmi přesném pipetování a měření.



Graf 1: Závislost absorbance na koncentraci roztoku KMnO_4 pro ručně připravenou řadu

Přesnost měření je taková, že chybové úsečky jsou zakryty datovými body.

Z grafu č. 1 byly vypočteny následující hodnoty: LOD = 2,4 µg/ml, LOQ = 8,4 µg/ml.

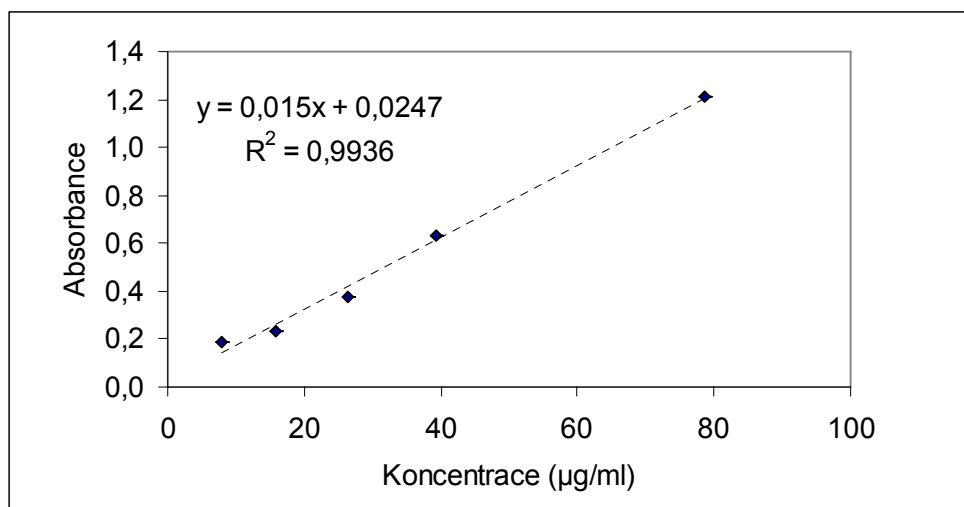
V tabulce 2 jsou uvedeny naměřené absorbance a statisticky vypočtené hodnoty pro strojově napipetovanou kalibrační řadu.

Tabulka 2: Naměřené a vypočtené hodnoty výsledků strojově připravené kalibrační řady KMnO_4

Koncentrace (µg/ml)	Absorbance				Směrodatná odchylka	RSD (%)
	1	2	3	Průměr		
7,9	0,18532	0,18605	0,18638	0,18592	0,00044	0,24
15,7	0,23380	0,23445	0,23548	0,23458	0,00069	0,29
26,3	0,37809	0,37812	0,37822	0,37814	0,00006	0,01
39,4	0,63144	0,63069	0,62939	0,63051	0,00085	0,13
78,7	1,20800	1,21050	1,21010	1,20953	0,00110	0,09

Nízké hodnoty RSD absorbancí ukazují na vynikající opakovatelnost měření.

Graf 2 znázorňuje závislost absorbance na koncentraci roztoku. Závislost se jeví lineární. Hodnota $R^2 = 0,9936$ vypovídá o drobných nepřesnostech při pipetování, ale celkově se stále jedná o vysokou míru korelace. Body, které odpovídají koncentracím 7,85 a 26,29 $\mu\text{g/ml}$ jsou lehce vychýlené od regresní přímky.



Graf 2: Závislost absorbance na koncentraci roztoku KMnO_4 pro strojově připravenou řadu

Z grafu 2 byli spočteny tyto hodnoty: LOD = 4,0 $\mu\text{g/ml}$, LOQ = 17,3 $\mu\text{g/ml}$

Výsledky naměřené spektrofotometrem nám ukázaly, že ručně připravená a měřená kalibrační řada byla přesnější než automaticky připravená kalibrační řada.

5.2. Výsledky získané z plynového chromatografu při split nástříku

V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty signálu ploch a výšek kalibrační řady pro DMP, kterou nařadila zkušební laborantka, a v následující tabulce 4 jsou vypočtené statistické hodnoty, které byly zaneseny do grafu. Hodnota RSD udává procentuální chybu průměru.

Tabulka 3: Hodnoty ploch a výšek píků DMP z ručně připravené kalibrační řady měřené na GC ve split módu

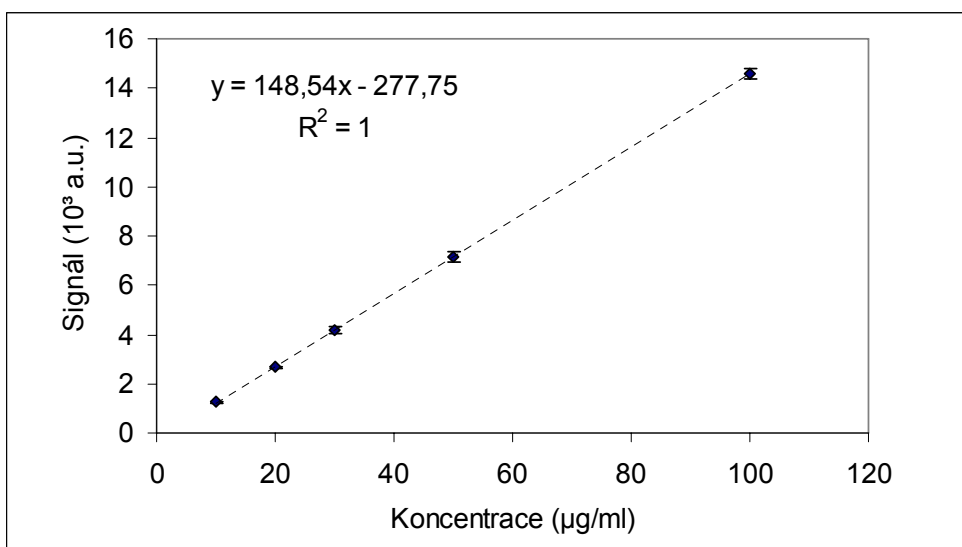
Měření	1		2		3	
c ($\mu\text{g/ml}$)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)
10	1224,2	349	1319,9	369,8	1196,4	349,6
20	2635,2	791,8	2662,1	798,2	2697,1	789,7
30	4003,5	1190,7	4140,8	1222,2	4343,1	1272,9
50	7387,3	2259,1	7221,4	2174,4	6829,9	2087,2
100	14422,9	4486,2	14845,9	4623,1	14483,8	4447,8

Tabulka 4: Statistické vyhodnocení hodnot ručně připravované kalibrační řady měřené na GC ve split módu

c ($\mu\text{g/ml}$)	Průměr plochy (a.u.)	Průměr výšky (a.u.)	Směr. odchylka plochy (a.u.)	RSD (%)	Směr. odchylka výšky (a.u.)	RSD (%)
10	1246,8	356,1	52,9	4,2	9,7	2,7
20	2664,8	793,2	25,3	1,0	3,6	0,5
30	4162,5	1228,6	139,5	3,4	33,9	2,8
50	7146,2	2173,6	233,7	3,3	70,2	3,2
100	14584,2	4519,0	186,7	1,3	75,2	1,7

Srovnání hodnot RSD pro jednotlivá opakovaná měření v tabulkách 1, 2 a 4 ukazují, že opakovatelnost měření je u spektrofotometru větší. Důvodem tohoto rozdílu je skutečnost, že u spektrofotometru provádíme tři opakovaná měření po jedné manipulaci se vzorkem, zatímco u plynové chromatografie se provádí dávkování vzorku pro každé měření.

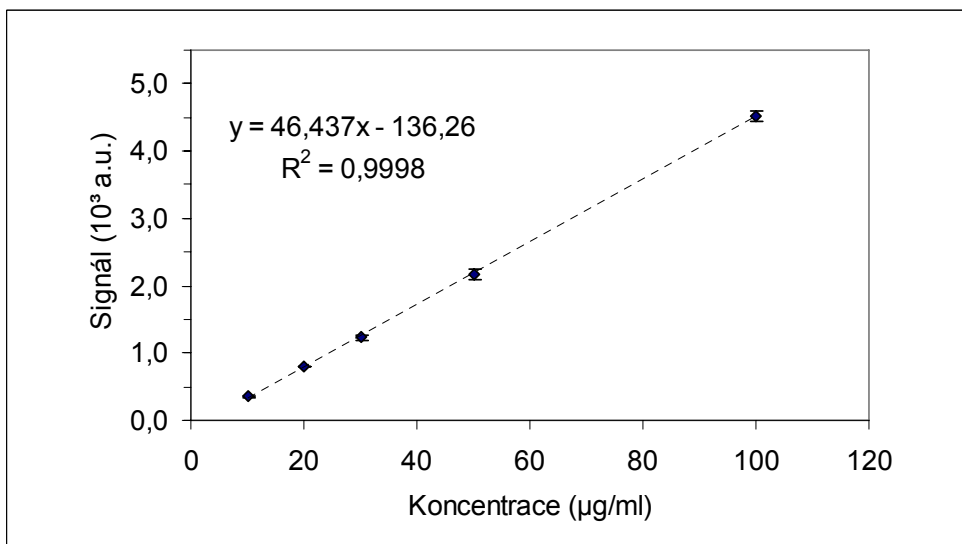
Graf 3 zobrazuje závislost naměřené plochy píku na koncentraci roztoku. Na první pohled je patrné, že jde o závislost velmi blízkou lineární. To znamená, že koncentrace je přímo úměrná ploše píku. V grafu je zobrazena rovnice regrese a hodnota druhé mocniny korelačního koeficientu R. V tomto měření je $R^2 = 1$, což vypovídá o vysoké přesnosti této ručně připravené kalibrační řady. Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku jednotlivých hodnot. Na vyhodnocení LOD a LOQ byli použity pouze hodnoty ploch.



Graf 3: Závislost plochy píku na koncentraci ručně připravené řady DMP měřené na GC ve split módu

Z grafu byly spočteny následující hodnoty LOD a LOQ: LOD = 2,5 $\mu\text{g/ml}$,
 LOG = 3,9 $\mu\text{g/ml}$

Graf 4 zobrazuje závislost naměřené výšky píku na koncentraci roztoku. Závislost se jeví lineární a $R^2 = 0,9998$, což potvrzuje předchozí závěr, že tato kalibrace byla velmi přesná.



Graf 4: Závislost výšky píku na koncentraci ručně připravené kalibrační řady DMP měřené na GC ve split módu

V tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty signálu ploch a výšek kalibrační řady pro DMP, kterou jsem napipetoval osobně a v další tabulce 6 jsou statisticky spočtené hodnoty.

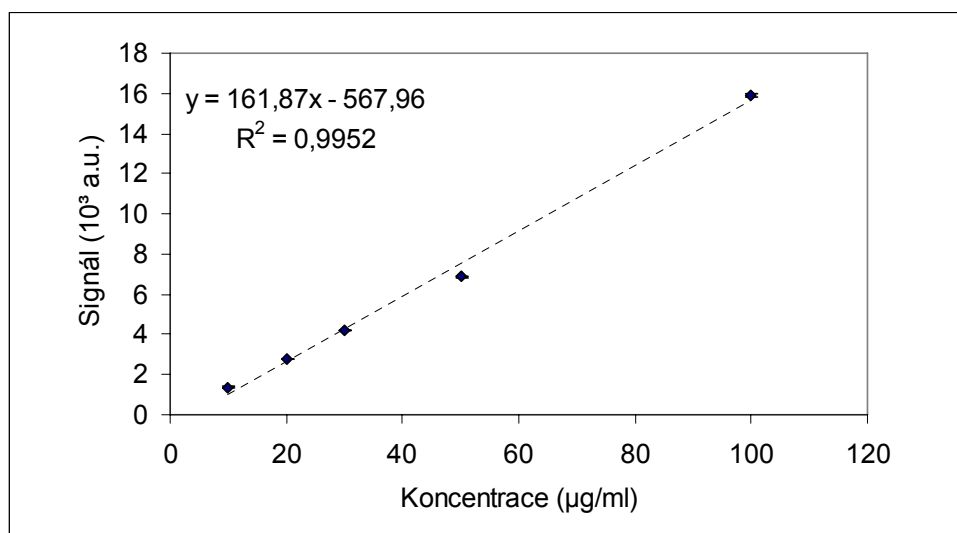
Tabulka 5: Hodnoty ploch a výšek píků DMP z ručně připravené kalibrační řady měřené na GC ve split módu

Měření	1		2		3	
c ($\mu\text{g/ml}$)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)
10	1302	391	1411,3	393,9	1435,7	390
20	2762,6	810,7	2807,6	820,7	2756,4	815,2
30	4227,6	1268,5	4150	1244,6	4238,4	1259,7
50	6792,7	2089,3	6905,1	2115,8	6923,4	2109,7
100	16028,1	5039,6	15842,1	4989,3	15876,1	4988,2

Tabulka 6: Statistické vyhodnocení hodnot ručně připravované kalibrační řady měřené na GC ve split módu

c ($\mu\text{g/ml}$)	Průměr plochy (a.u.)	Průměr výšky (a.u.)	Směr. odchylka plochy (a.u.)	RSD (%)	Směr. odchylka výšky (a.u.)	RSD (%)
10	1383,0	391,6	58,1	4,2	1,7	0,4
20	2775,5	815,5	22,8	0,8	4,1	0,5
30	4205,3	1257,6	39,4	0,9	9,9	0,8
50	6873,7	2104,9	57,8	0,8	11,3	0,5
100	15915,4	5005,7	80,9	0,5	24,0	0,5

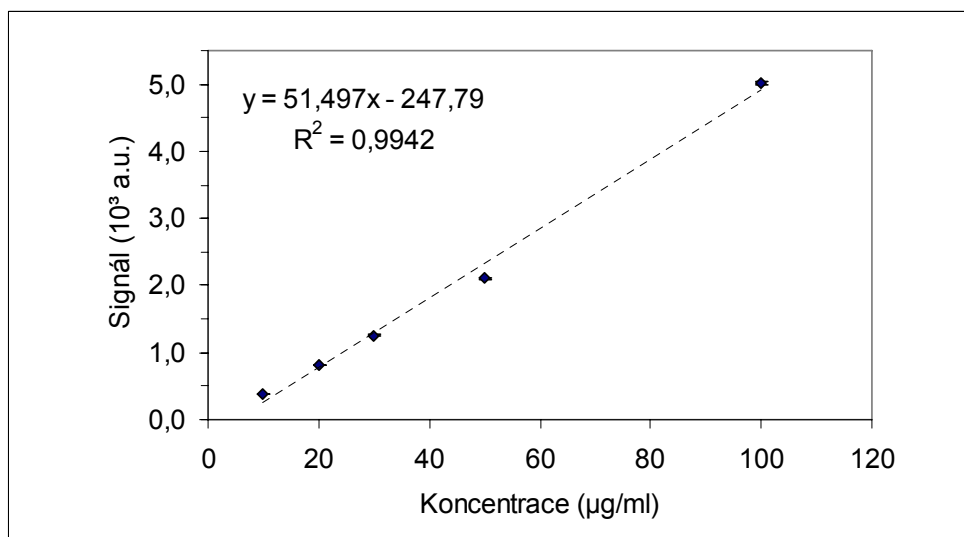
V grafu 5 je znázorněna závislost plochy píku na koncentraci roztoků. Závislost se jeví lineární. Bod v grafu, který odpovídá koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, neleží na regresní přímce, z čehož s největší pravděpodobností vyplývá, že jsem udělal chybu při pipetování. Hodnota R^2 je nižší než u předchozího měření a je rovna 0,9952. Srovnání hodnot RSD s hodnotami v předchozí tabulce ukazuje, že opakovatelnost jednotlivých měření je srovnatelná s měřeními na spektrofotometru. Důvod, proč je opakovatelnost měření této kalibrační řady, není jasný, protože dávkování vzorků je prováděno automatickým dávkovačem plynového chromatografu.



Graf 5: Závislost plochy píku na koncentraci ručně naměřené kalibrační řady DMP

Z grafu byly spočteny následující hodnoty LOD a LOQ: LOD = 12,1 µg/ml, LOG = 32,1 µg/ml

Graf 6 zobrazuje závislost výšky píku na koncentraci roztoku. Stejně jako u grafu 5, bod, který odpovídá 50 µg/ml, leží mimo regresní přímku a hodnota $R^2 = 0,9942$ je taktéž nižší, což potvrzuje předchozí domněnku o chybě při pipetování.



Graf 6: Závislost výšky píku na koncentraci ručně připravené kalibrační řady DMP

V tabulce 7 jsou uvedeny hodnoty naměřené pro roztoky, které připravil automatický injektor. Přístroj je před použitím nutné naprogramovat tak, aby napipetoval požadované hodnoty objemů do připravených vialek. Program s vysvětlivkami je uveden v

příloze 1. Tabulka 8 udává statisticky vypočtené hodnoty z tabulky 7 a z těchto hodnot jsem vytvořil grafy 7 a 8.

Tabulka 7: Hodnoty ploch a výšek píků DMP ze strojově připravené kalibrační řady měřené na GC ve split módu

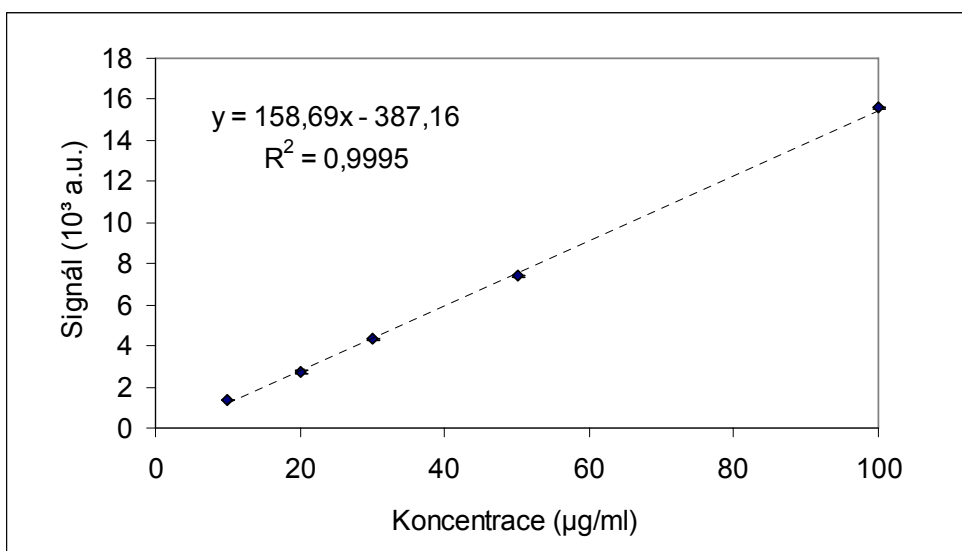
c ($\mu\text{g/ml}$)	1		2		3	
	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)
10	1360,6	389,4	1356,5	389,5	1355,1	394,2
20	2635	782,7	2821,6	847,9	2836,1	859,2
30	4265,8	1321,2	4287,4	1309,5	4376,4	1322,3
50	7420,1	2269,8	7379,7	2260,8	7364,5	2267,3
100	15587,6	4880,9	15632,4	4905,5	15486,5	4861,1

Tabulka 8: Statistické vyhodnocení hodnot strojově připravované kalibrační řady měřené na GC ve split módu

c ($\mu\text{g/ml}$)	Průměr plochy (a.u.)	Průměr výšky (a.u.)	Směr. odchylka plochy (a.u.)	RSD (%)	Směr. odchylka výšky (a.u.)	RSD (%)
10	1357,4	391,0	2,3	0,2	2,2	0,6
20	2764,2	829,9	91,6	3,3	33,7	4,1
30	4309,9	1317,7	47,9	1,1	5,8	0,4
50	7388,1	2266,0	23,5	0,3	3,8	0,2
100	15568,8	4882,5	61,0	0,4	18,2	0,4

Opakovatelnost dávkování vzorku připravených ručně nebo autosamplerem je srovnatelná.

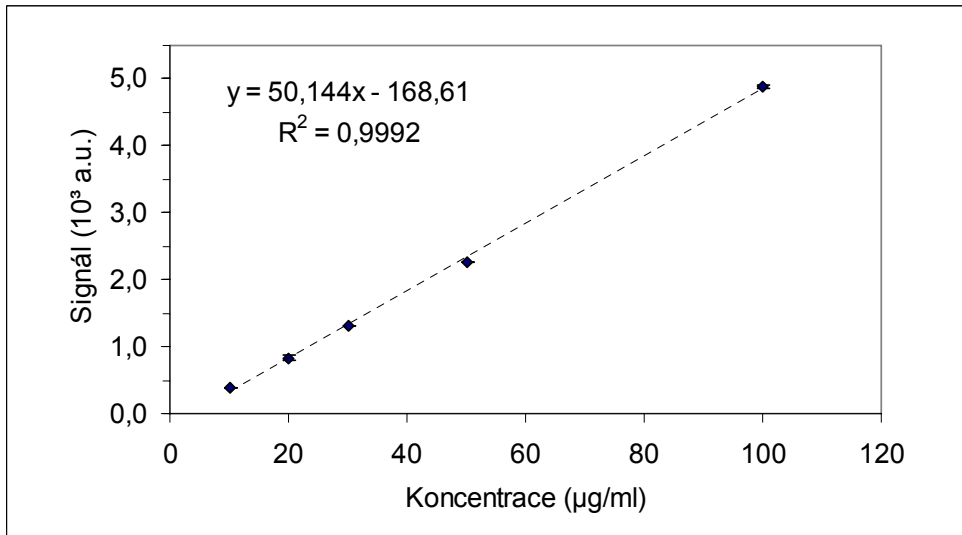
Graf 7 znázorňuje závislost plochy píku na koncentrací roztoku strojově připravené kalibrační řady DMP. Závislost prokazuje značnou linearitu a hodnota R^2 je 0,9995, což vypovídá o velmi dobré přesnosti pipetování. Vypočtené hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny pod grafem.



Graf 7: Závislost plochy píku na koncentraci strojově připravené kalibrační řady DMP

Z grafu byly spočteny následující hodnoty LOD a LOQ: LOD = 5,2 µg/ml,
 LOG = 29,7 µg/ml

Graf 8 znázorňuje závislost výšky píku na koncentraci analytu strojově naředěné kalibrační řady a hodnota R^2 je rovna 0,9992.



Graf 8: Závislost výšky píku na koncentraci analytu strojově připravené řady

Výsledky, měřené na plynovém chromatografu ve split nástřiku, nám ukázaly, že nejpřesněji pipetovala laborantka, která dosáhla nejvyšší přesnosti. Automatický injektor pracoval s minimální odchylkou a nejméně přesně jsem naměřil kalibrační řadu já. Přisuzuji to malé zkušenosti s prací s automatickými pipetami.

5.3. Výsledky měření na plynovém chromatografu při splitless nástřiku

V tomto režimu nástřiku jsme se rozhodli pro měření kalibračních řad připravených laborantkou a autosamplerem. Kalibrační řada pipetovaná mnou nebyla dostatečně přesná, jak ukázalo předchozí vyhodnocení v režimu split.

V tabulce 9 jsou uvedeny koncentrace analytu kalibrace, kterou připravovala laborantka a v následující tabulce 10 jsou uvedeny statistické hodnoty, z kterých jsou vytvořeny grafy 9, 10.

Tabulka 9: Hodnoty ploch a výšek píků DMP z ručně připravené kalibrační řady měřené na GC ve splitless módu

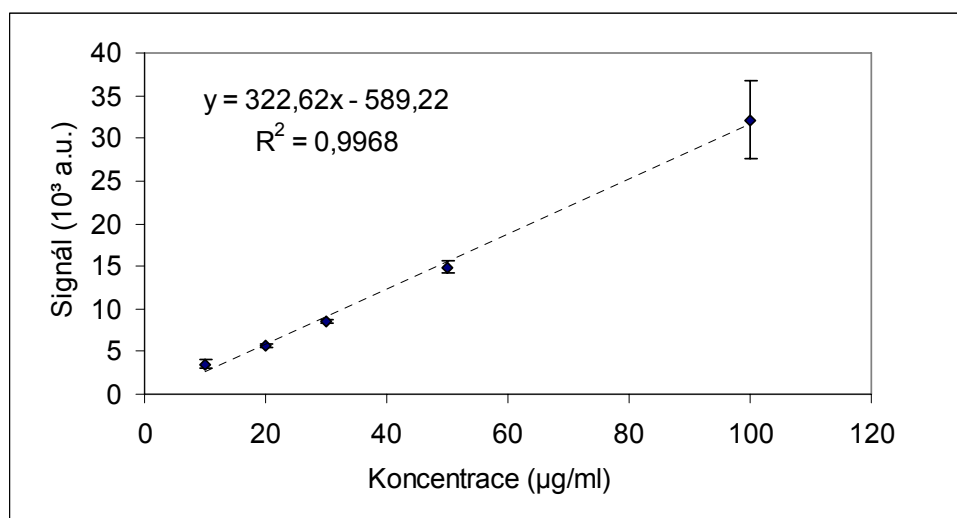
Měření	1		2		3	
	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)
10	3345,1	813,9	3078,2	767,1	4185,5	1036
20	5507,2	1530,5	5631,9	1386,4	6037,2	1513,5
30	8502,7	2173,9	8754	2381,6	8401,7	2261,9
50	14002	3976,8	15764	4747,7	14917	4329,9
100	26476	8552	37684	12202	32125	10113

Tabulka 10: Statistické vyhodnocení hodnot ručně připravované kalibrační řady měřené na GC ve splitless módu

c (µg/ml)	Průměr plochy (a.u.)	Průměr výšky (a.u.)	Směr. odchylka plochy (a.u.)	RSD (%)	Směr. odchylka výšky (a.u.)	RSD (%)
10	3536,3	872,3	471,8	13,3	117,3	13,4
20	5725,4	1476,8	226,3	4,0	64,3	4,4
30	8552,8	2272,5	148,1	1,7	85,1	3,7
50	14894,3	4351,5	719,4	4,8	315,1	7,2
100	32094,7	10288,8	4575,5	14,3	1495,2	14,5

Srovnání RSD pro split a splitless mód dokazuje, že opakovatelnost splitless nástřiku je menší oproti split módu, přesně podle teorie. Opakovatelnost je zde ve srovnání s předešlými případy nejnižší.

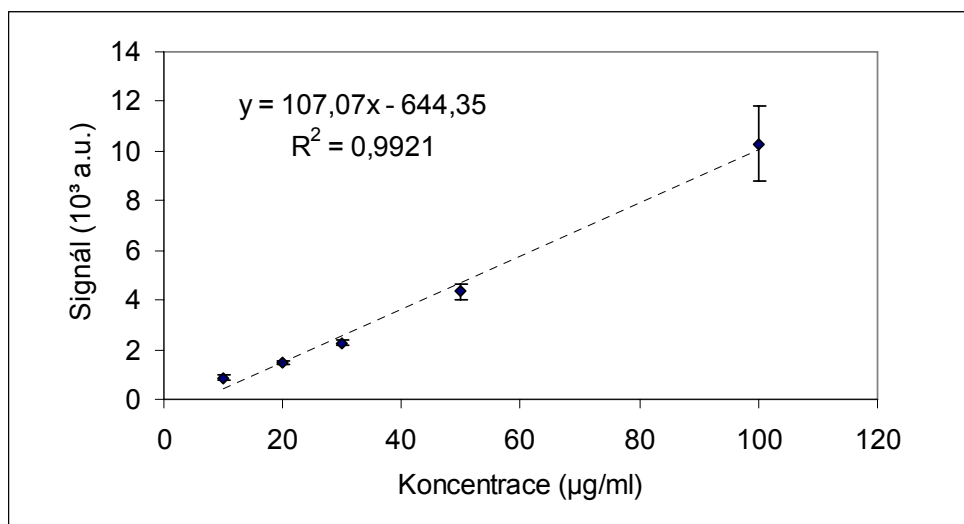
Graf 9 zobrazuje závislost plochy píku na koncentraci roztoku. Závislost grafu se jeví lineární a hodnota $R^2 = 0,9968$.



Graf 9: Závislost plochy píku na koncentraci analytu ručně připravené kalibrace

Z grafu 9 byly spočteny tyto hodnoty LOD = 8,9 µg/ml a LOQ = 25,3 µg/ml.

Graf 10 zobrazuje závislost výšky píku na koncentraci roztoku. Závislost vykazuje vysokou linearitu a hodnota R^2 je 0,9664. U bodů odpovídajících koncentraci 10, 50 a 100 µg/ml můžeme sledovat odchylky od regresní přímky.



Graf 10: Závislost výšky píku na koncentraci ručně připravené kalibrační řadě

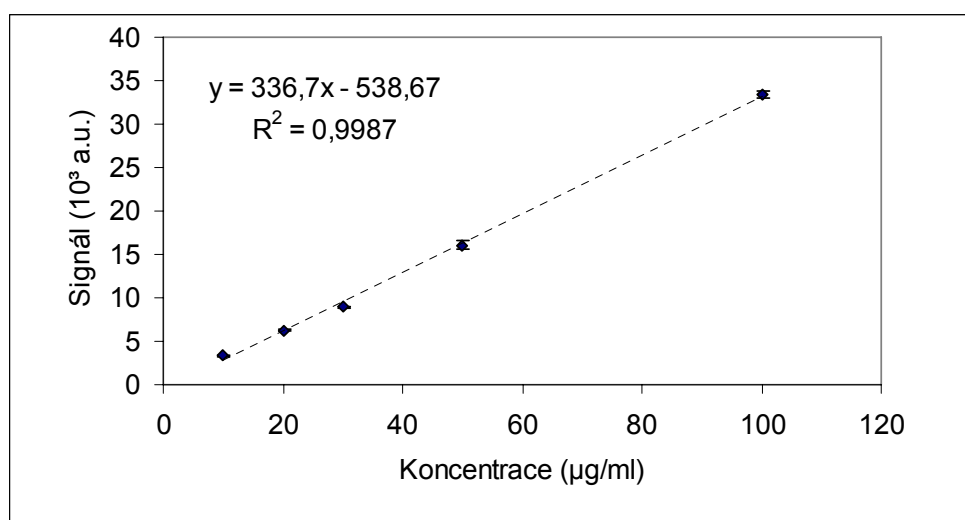
V tabulce 11 jsou uvedeny hodnoty signálu analytu, které připravoval automatický injektor a v tabulce 12 jsou statisticky spočtené hodnoty, z jejichž hodnot jsou utvořeny grafy 11 a 12. Vypočtené hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny pod grafem.

Tabulka 11: Hodnoty ploch a výšek DMP ze strojově připravené kalibrační řady měřené na GC

Měření	1		2		3	
c (µg/ml)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)	plocha (a.u.)	výška (a.u.)
10	3734,9	864,6	3086,5	742,9	3233,6	732,8
20	6531,5	1730	6119,8	1546,5	6126,6	1556,6
30	9461,2	2055,2	8734,5	2230,6	8690,1	2323,6
50	17614	5019,9	15272	4029,2	15390	4269,2
100	32654	10572	35198	11409	32191	10445

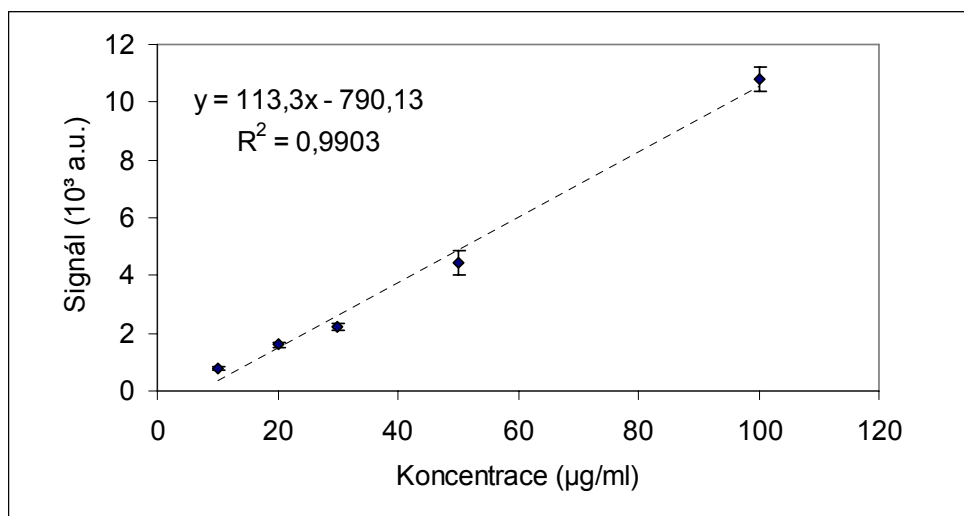
Tabulka 12: Statistické vyhodnocení hodnot strojově připravované kalibrační řady měřené na GC

c (µg/ml)	Průměr plochy (a.u.)	Průměr výšky (a.u.)	Směr. odchylka plochy (a.u.)	RSD (%)	Směr. odchylka výšky (a.u.)	RSD (%)
10	3351,7	780,1	277,6	8,3	59,9	7,7
20	6259,3	1611,0	192,5	3,1	84,2	5,2
30	8961,9	2203,1	353,5	3,9	111,3	5,1
50	16092,0	4439,4	1077,4	6,7	422,0	9,5
100	33348,0	10808,4	1322,0	4,0	427,7	4,0



Graf 11: Závislost plochy píku na koncentraci analytu pro strojově připravenou kalibrační řadu

Z grafu 11 byly spočteny následující hodnoty LOD = 6,0 µg/ml a LOQ = 16,2 µg/ml.



Graf 12: Závislost výšky píku na koncentraci roztoku strojově připravené kalibrační řadě.

Grafy 11 a 12 vykazují dobrou linearitu a podle hodnot R^2 můžeme soudit, že se jedná o velmi přesné měření.

Výsledky měření na plynovém chromatografu v režimu splitless nám ukázaly, že kalibrační řada připravená laborantkou je o trochu méně přesnější, než kalibrační řada připravená autosamplerem. Pořadí přesnosti je tedy opačné oproti split módu.

6. ZÁVĚR

V tabulce 13 jsou shrnuty hodnoty LOD a LOQ jednotlivých měření.

Tabulka 13: Hodnoty LOD a LOQ jednotlivých měření

	Metoda měření	LOD	LOQ
Spektrofotometr	Ruční ředění	2,4	8,4
	Strojové ředění	4,0	17,3
Splitless	Ruční ředění	8,9	25,3
	Strojové ředění	6,0	16,2
Split	Ruční ředění – laborantka	2,5	3,9
	Ruční ředění – já	12,1	32,1
	Strojové ředění	5,2	29,7

Výsledky LOD a LOQ nám ukazují s jakou přesností byly kalibrace provedeny, protože se počítají ze společné směrodatné odchylky regrese, $s_{y,x}$, která je mírou shody experimentálních dat s lineárním modelem kalibrace. Srovnáním hodnot ručně a strojově ředěné kalibrace manganistanu draselného, jsme došli k závěru, že ruční příprava je přesnější. Ke stejnému závěru jsme došli po vyhodnocení kalibrační řady dimethylftalátu při měření v split nástřiku. Naopak v splitless nástřiku nám hodnoty LOD a LOQ ukázaly, že přesněji pracoval automatický injektor.

Rozdíly kalibračních řad připravených zkušeným pracovníkem a automatickým injektorem jsou v podstatě velmi malé, jak je také vidět ze střídajícího se pořadí přesnosti pro jednotlivé metody.

Jedním z důvodů, proč automatický injektor nepracuje přesněji než zkušený laborant je, že používá stříkačku o objemu 500 μl a dávkovací smyčku o objemu 200 μl . V důsledku toho se u něj při pipetování malých objemů musí projevit značná chyba v dávkovaném objemu. Dalším důvodem může být skutečnost, že v přípravě kalibrační řady jsme někdy pipetovali až 500 μl zásobního roztoku a proto jsme museli některé objemy nechat pipetovat opakovaně (maximální objem pro jednotlivé dávkování je 200 μl , tj. objem použité dávkovací smyčky). Tím se mohla chyba injektoru počítat.

Rozdíly mezi lidskou rukou a přístrojem jsou sice patrné z našeho měření, ale výsledky injektoru nejsou natolik odlišné aby nemohl pracovat místo lidí. Při pipetování velkého množství vzorků je výhodou rychlost a samostatnost stroje. Další výhodou je, že s automatickým injektorem může připravovat přesné kalibrační řady i osoba bez zkušeností s pipetováním.

Celkovým závěrem je tedy zjištění, že automatický injektor pracuje v podstatě se stejnou přesností jako zkušený laborant.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VLÁČIL, František; KOLEKTIV.
Příklady z chemické a instrumentální analýzy
Praha: Informatorium, 1991. 451 s. ISBN: 80-85427-04-4
- [2] prof. RNDr. PhMr. ZÝKA, Jaroslav, DrSc., KOLEKTIV
Analytická příručka 1. díl
Praha: SNTL. 1988. 678 s. ISBN: 04-606-88
- [3] ECKSCHLAGER, K; HORSÁK, I.; KODEJŠ, Z.;
Vyhodnocování analytických výsledků a metod
Praha:SNTL. 1980. 223 s. ISBN: 04-610-80
- [4] ŘIMNÁČOVÁ, Lucie. Diplomová práce- Stanovení změkčovadel v biologických vzorcích.
UK. Přírodovědecká fakulta. Katedra analytické chemie.
Praha. 2007. 88 s.

8. CITACE

- 1 KUREČKOVÁ, K.; VENTURA, K.; EISNER, A.; ADAM, M.
Aplikace fluidních extrakcí při izolaci kontaminantů z půdních vzorků.
Chemické listy 95, 415-419 (2001)
- 2 SMOLKOVÁ, Eva, FELTL, Ladislav.
Analýza látek v plynném stavu.
Praha. SNTL, 1991. 478 s. ISBN 80-03-00604

9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Program pro automatický injektor

1	RACK 0	
2	RINSE	Oplach jehly
3	DISP 0/3000/0	Promytí 3000 µl methanolu rychlostí 12ml/min
4	TUBE 1/1	Jehla na pozici 1/1
5	ASPIR 0/200/0	Nasátí 200 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
6	TUBE 2/1	Jehla na pozici 2/1
7	DISP 0/200/0	Vytlačení 200 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
8	TUBE 1/1	Jehla na pozici 1/1
9	ASPIR 0/200/0	Nasátí 200 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
10	TUBE 2/1	Jehla na pozici 2/1
11	DISP 0/200/0	Vytlačení 200 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
12	TUBE 1/1	Jehla na pozici 1/1
13	ASPIR 0/100/0	Nasátí 100 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
14	TUBE 2/1	Jehla na pozici 2/1
15	DISP 0/100/0	Vytlačení 100 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
16	DISP 0/500/2	Vytlačení 500 µl zásobního roztoku rychlostí 0,75 ml/min
17	RINSE	Oplach jehly
18	DISP 0/3000/6	Promytí 3000 µl methanolu rychlostí 12ml/min
19	TUBE 1/1	Jehla na pozici 1/1
20	ASPIR 0/200/0	Nasátí 200 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
21	TUBE 3/1	Jehla na pozici 3/1
22	DISP 0/200/0	Vytlačení 200 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min

23	TUBE 1/1	Jehla na pozici 1/1
24	ASPIR 0/100/0	Nasátí 100 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
25	TUBE 3/1	Jehla na pozici 3/1
26	DISP 0/100/0	Vytlačení 100 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
27	DISP 0/700/2	Vytlačení 700 µl zásobního roztoku rychlostí 0,75 ml/min
28	RINSE	Oplach jehly
29	DISP 0/3000/6	Promytí 3000 µl methanolu rychlostí 12ml/min
30	TUBE 1/1	Jehla na pozici 1/1
31	ASPIR 0/200/0	Nasátí 200 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
32	TUBE 4/1	Jehla na pozici 4/1
33	DISP 0/200/0	Vytlačení 200 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
34	DISP 0/800/2	Vytlačení 800 µl zásobního roztoku rychlostí 0,75 ml/min
35	RINSE	Oplach jehly
36	DISP 0/3000/6	Promytí 3000 µl methanolu rychlostí 12ml/min
37	TUBE 1/1	Jehla na pozici 1/1
38	ASPIR 0/100/0	Nasátí 100 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
39	TUBE 5/1	Jehla na pozici 5/1
40	DISP 0/100/0	Vytlačení 100 µl zásobního roztoku rychlostí 0,18 ml/min
41	DISP 0/900/2	Vytlačení 900 µl zásobního roztoku rychlostí 0,75 ml/min
42	RINSE	Oplach jehly
43	DISP 0/3000/6	Promytí 3000 µl methanolu rychlostí 12ml/min
44	HOME	Konec programu