



OpenLab ChemStation

## Datenanalyse-Referenzhandbuch

# Hinweise

## Dokumentinformationen

Dokumentnr.: D0013749de Rev. A.1  
Ausgabe: 02/2025

## Copyright

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2025

Die Vervielfältigung, elektronische Speicherung, Anpassung oder Übersetzung dieses Handbuchs ist gemäß den Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes ohne vorherige schriftliche Genehmigung durch Agilent Technologies verboten.

Agilent Technologies –  
Hewlett-Packard-Strasse 8 –  
76337 Waldbronn, Germany

## Softwareversion

Dieses Handbuch ist für Version LTS  
01.11 von Agilent OpenLab ChemStation gültig.

## Gewährleistung

Agilent Technologies behält sich vor, die in diesem Handbuch enthaltenen Informationen jederzeit ohne Vorankündigung zu ändern. Agilent Technologies übernimmt keinerlei Gewährleistung für die in diesem Handbuch enthaltenen Informationen, insbesondere nicht für deren Eignung oder Tauglichkeit für einen bestimmten Zweck. Agilent Technologies übernimmt keine Haftung für Fehler, die in diesem Handbuch enthalten sind, und für zufällige Schäden oder Folgeschäden im Zusammenhang mit der Lieferung, Ingebrauchnahme oder Benutzung dieses Handbuchs. Falls zwischen Agilent und dem Benutzer eine schriftliche Vereinbarung mit abweichenden Gewährleistungsbedingungen hinsichtlich der in diesem Dokument enthaltenen Informationen existiert, so gelten diese schriftlich vereinbarten Bedingungen.

## Technolizenzien

Die in diesem Dokument beschriebene Hardware und/oder Software wird/werden unter einer Lizenz geliefert und dürfen nur entsprechend den Lizenzbedingungen genutzt oder kopiert werden.

## Nutzungsbeschränkungen

Eingeschränkte Rechte der US-Regierung. Rechte an Softwareprogrammen und technischen Daten, die der US-Regierung eingeräumt werden, umfassen nur diejenigen Rechte, die üblicherweise dem Endverbraucher gewährt werden. Agilent gewährt diese übliche gewerbliche Lizenz für das Softwareprogramm und die technischen Daten gemäß FAR 12.211 (Technische Daten) und 12.212 (Computersoftware) sowie für das Verteidigungsministerium gemäß DFARS 252.227-7015 (Technische Daten – Gew-

erbliche Artikel) und DFARS 227.7202-3 (Rechte an gewerblicher Computersoftware oder Computersoftware-Dokumentation).

## Sicherheitshinweise

### VORSICHT

Ein **VORSICHT**-Hinweis macht auf Arbeitsweisen, Anwendungen o. ä. aufmerksam, die bei falscher Ausführung zur Beschädigung des Produkts oder zum Verlust wichtiger Daten führen können. Wenn eine Prozedur mit dem Hinweis **VORSICHT** gekennzeichnet ist, dürfen Sie erst fortfahren, wenn Sie alle angeführten Bedingungen verstanden haben und diese erfüllt sind.

### WARNUNG

Ein **WARNUNG**-Hinweis macht auf Arbeitsweisen, Anwendungen o. ä. aufmerksam, die bei falscher Ausführung zu Personenschäden, u. U. mit Todesfolge, führen können. Wenn eine Prozedur mit dem Hinweis **WARNUNG** gekennzeichnet ist, dürfen Sie erst fortfahren, wenn Sie alle angeführten Bedingungen verstanden haben und diese erfüllt sind.

## In diesem Handbuch...

Dieses Handbuch richtet sich an fortgeschrittene Benutzer, Systemadministratoren und Personen, die für die Validierung von Agilent OpenLab ChemStation zuständig sind. Es enthält Referenzinformationen zu den Funktionsprinzipien, Berechnungen und Datenanalysealgorithmen, die in Version LTS 01.11 der OpenLab ChemStation verwendet werden.

Verwenden Sie dieses Handbuch, um zu überprüfen, ob die Systemfunktionalität Ihren Benutzeranforderungen entspricht, und um die in Ihrem Validierungsplan festgelegten Systemvalidierungsaufgaben zu definieren und auszuführen. Folgende Ressourcen enthalten zusätzliche Informationen.

- Einführende Lernprogramme: Lernmodule, die über die Plattform OpenLab ChemStation User Resources & Learning zugänglich sind.
- Kontextspezifische Informationen zu Aufgaben („How To“), Referenzen zur Benutzeroberfläche und Hilfe zur Fehlerbehebung: Die ChemStation Online-Hilfe.
- Konzepte und Arbeitsabläufe der OpenLab ChemStation: Das Handbuch OpenLab ChemStation Grundlegende Konzepte und Arbeitsabläufe.
- Details zur Systeminstallation und Standortvorbereitung: Das OpenLab ChemStation Workstation-Installationshandbuch bzw. das Installationshandbuch für OpenLab ChemStation Netzwerk-Workstations und verteilte Systeme
- Details zu Prinzipien und Aufgaben der Systemadministration: das OpenLab ChemStation Workstation Administrationshandbuch.

Im Folgenden bezieht sich der Ausdruck ChemStation auf die Agilent OpenLab ChemStation.

### 1 Integration

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte und Integrationsalgorithmen des ChemStation-Integrators.

### 2 Peakidentifizierung

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte der Peakidentifizierung.

### **3 Kalibrierung**

Dieses Kapitel enthält Einzelheiten zu den Berechnungen, die bei der Kalibrierung verwendet werden.

### **4 Quantifizierung**

Dieses Kapitel beschreibt, wie Substanzen quantifiziert werden, und erklärt die für die Quantifizierung verwendeten Berechnungen.

### **5 Systemeignung**

Dieses Kapitel beschreibt, was OpenLab CDS bei der Bewertung der Leistung sowohl des analytischen Geräts als auch der analytischen Methode liefern kann.

### **6 CE-spezifische Berechnungen**

Dieses Kapitel ist nur relevant, wenn Sie die ChemStation zum Steuern von CE-Geräten verwenden.

### **7 Systemfunktionsprüfung**

In diesem Kapitel werden die Verifizierungsfunktionen und die GLP-Verifizierungsfunktionen der ChemStation beschrieben.

# Inhalt

## 1 Integration 7

- Was ist Integration? 8
- Algorithmen des ChemStation-Integrators 10
- Funktionsprinzip 15
- Peakerkennung 16
- Peakflächenberechnung 26
- Basislinienbestimmung 29
- Integrationsereignisse 41
- Manuelle Integration 65

## 2 Peakidentifizierung 68

- Was ist eine Peakidentifizierung? 69
- Regeln zur Peakübereinstimmung 70
- Methoden der Peakidentifizierung 71
- Absolute Retentions-/Migrationszeit 73
- Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten 75
- Peak-Qualifier 77
- Identifizierungsprozess 79

## 3 Kalibrierung 81

- Was ist Kalibrierung? 82
- Kalibrierkurve 83
- Berechnung der Kalibrierkurve 84
- Gruppenkalibrierung 88
- Optionen für die Rekalibrierung 89

## 4 Quantifizierung 90

- Was ist Quantifizierung? 91
- Korrekturfaktoren 92
- Area% und Height% 94

Quantifizierung kalibrierter Substanzen	95
Quantifizierung nicht kalibrierter Peaks	101
Norm%-Berechnung	103

## **5 Systemeignung 104**

Bewertung der Peakleistung	105
Systemeignungsevaluierung	105
Bestimmung der Rauschhöhe	108
Berechnung der Peakasymmetrie und -symmetrie	119
Formeln und Berechnungsmethoden zur Beurteilung der Systemeignung	121
Allgemeine Definitionen	122
Leistungstest-Definitionen	123
Definitionen für die Reproduzierbarkeit	135
Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff	140

## **6 CE-spezifische Berechnungen 143**

Kalibriertabellen	144
Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur	147
Spezielle Reportstile für die Kapillarelektrophorese	153
Korrigierte Peakflächen	154
Systemeignungstest für die Kapillarelektrophorese	155
CE-MSD	156

## **7 Systemfunktionsprüfung 157**

Ansichten für Funktionsprüfung und Fehlerdiagnose	158
Das Register „GLPsave“	161
Funktion „DAD Test“ (DAD-Test)	163

# 1

## Integration

Was ist Integration?	8
Was wird bei der Integration durchgeführt?	8
Integrationsfunktionen	9
Algorithmen des ChemStation-Integrators	10
Überblick	10
Anfängliche Basislinie definieren	11
Basislinienverfolgung	12
Basislinienbestimmung	13
Begriffserläuterung	14
Funktionsprinzip	15
Peakerkennung	16
Peakbreite	16
Peakerkennungsfilter	17
Bündelung	18
Algorithmus der Peakerkennung	19
Überlappende Peaks	21
Schultern	22
Standard-Basislinienkonstruktion	23
Peak-Trenncodes	24
Peakflächenberechnung	26
Flächenberechnung	26
Einheiten und Umrechnungsfaktoren	28
Basislinienbestimmung	29
Anfang der Basislinie	29
Ende der Basislinie	29
Basislinienkorrekturmodi	30
Peak-zu-Tal-Quotient	32
Tangentiale Anpassung	33
Integrationsereignisse	41
Integrationsereignisse für alle Signale	41
Anfangsereignisse	45
Zeitgesteuerte Ereignisse	50
Automatische Integration	63
Manuelle Integration	65
Dokumentation manueller Integrationsereignisse	66

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte und Integrationsalgorithmen des ChemStation-Integrators.

## Was ist Integration?

Bei der Integration werden in einem chromatographischen Signal die Peaks ermittelt und deren Größe berechnet.

Die Integration ist erforderlich für:

- Identifizierung
- Qualifizierung
- Kalibrierung
- Quantifizierung
- Peakreinheitsberechnungen
- Spektrenbibliothekssuche

## Was wird bei der Integration durchgeführt?

Zur Integration eines Signals führt die Software folgende Aktionen aus:

- Sie bestimmt eine Start- und Endzeit für jeden Peak,
- sie ermittelt das Maximum jedes Peaks, d. h. die Retentions-/Migrationszeit,
- sie erzeugt eine Basislinie und
- sie berechnet für jeden Peak die Fläche, Höhe, Peakbreite und Symmetrie.

Dieser Vorgang wird durch die Integrationsereignisse gesteuert.

## Integrationsfunktionen

Der Integrationsalgorithmus beinhaltet die folgenden Schlüsselfunktionen:

- eine Autointegrationsfunktion zur Einstellung anfänglicher Integrationsparameter
- die Fähigkeit, für jedes Chromatographie-/Elektropherographiesignal eine eigene Tabelle mit Integrationsereignissen zu definieren, wenn mehrere Signale oder mehr als ein Detektor verwendet werden
- die interaktive Festlegung von Integrationsparametern, die es dem Anwender ermöglichen, die Zeiten für die Ereignisse graphisch zu bestimmen
- graphische manuelle Integration für Chromatogramme oder Elektropherogramme, die eine spezielle Interpretation erfordern (diese Parameter können auch in die Methode integriert und somit automatisch aufgerufen werden)
- Anmerken von Integrationsergebnissen
- Definition der Integrationsparameter zum Festlegen oder Ändern der grundlegenden Integrationseinstellungen wie Schwellenwert für die Fläche, Schwellenwert für die Höhe, Peakbreite, Steigungsempfindlichkeit, Schultererkennung, Basislinienkorrektur und Erkennung der tangentialen Anpassung auf aufsteigendem/abfallendem Peak
- Parameter zur Kontrolle der Basislinie wie „force baseline“ (Basislinie erzwingen), „hold baseline“ (Basislinie halten), „baseline at all valleys“ (Basislinie bei jedem Tal), „baseline at the next valley“ (Basislinie beim nächsten Tal), „fit baseline backwards from the end of the current peak“ (rückwärtige Anpassung der Basislinie vom Ende des aktuellen Peaks)
- Kontrolle der Flächenaddition
- negative Peakerkennung
- Erkennung der Lösungsmittel-Peakdefinition
- Befehle zur Integratorsteuerung, die Retentions-/Migrationszeitbereiche festlegen, in denen der Integrator wirksam ist
- Schultererkennung bei Peaks durch Verwendung von Berechnungen der zweiten Ableitung
- verbesserte Erfassung von nicht-äquidistanten Datenpunkten für eine bessere Leistung bei DAD-LC-Daten, die aus DAD-Spektren gebildet wurden

# Algorithmen des ChemStation-Integrators

## Überblick

Um ein Chromatogramm/Elektropherogramm zu integrieren, muss der Integrator:

- 1 die anfängliche Basislinie bestimmen,
- 2 die Basislinie ständig verfolgen und aktualisieren,
- 3 die Startzeit eines Peaks identifizieren,
- 4 das Maximum jedes Peaks ermitteln,
- 5 die Endzeit eines Peaks identifizieren,
- 6 eine Basislinie erzeugen und
- 7 die Fläche, Höhe und Peakbreite für jeden Peak berechnen.

Dieser Vorgang wird durch **integration events** gesteuert. Die wichtigsten Ereignisse sind die anfängliche Steigungsempfindlichkeit, Peakbreite, Basislinienkorrektur, Schwellenwert für die Fläche und Schwellenwert für die Höhe. Mithilfe der Software können Sie Anfangswerte für diese und andere Ereignisse festlegen. Die Anfangswerte werden zu Beginn des Chromatogramms aktiviert. Zusätzlich bietet die Funktion für die automatische Integration mehrere Anfangsereignisse, die Sie weiter optimieren können.

In den meisten Fällen liefern die Anfangsereignisse gute Integrationsergebnisse über den gesamten Verlauf des Chromatogramms. Es kann jedoch Situationen geben, in denen Sie eine weitergehende Steuerung des Integrationsverlaufs benötigen.

Die Software ermöglicht eine genaue Steuerung der Integration, indem Sie neue Integrationsereignisse für entsprechende Zeiten im Chromatogramm definieren.

Weitere Informationen hierzu finden Sie in ["Anfangsereignisse"](#) auf Seite 45.

## Anfängliche Basislinie definieren

### Schlüsselpunkte

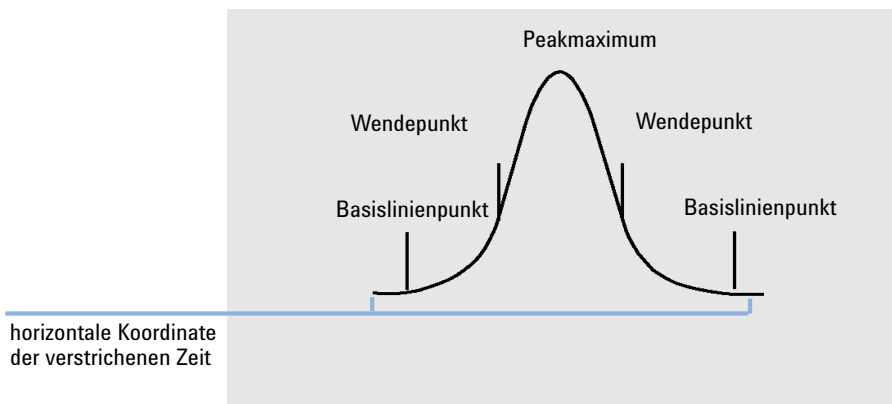


Abbildung 1 Schlüsselpunkte

### Anfängliche Basislinie definieren

Da die Eigenschaften einer Basislinie von der Applikation und dem verwendeten Detektor abhängen, verwendet der Integrator zur Optimierung der Basislinie sowohl Parameter aus den Integrationsereignissen als auch aus der Datendatei.

Bevor der Integrator Peaks integrieren kann, muss er einen **baseline point** festlegen. Zu Beginn der Analyse legt der Integrator eine anfängliche Basislinienebene fest, indem er den ersten Datenpunkt als vorläufigen Basislinienpunkt verwendet. Dann versucht er, diesen anfänglichen Basislinienpunkt durch Mittelwertbildung mit dem Eingangssignal neu zu definieren. Wenn der Integrator keinen neu definierten anfänglichen Basislinienpunkt erhält, behält er den ersten Datenpunkt als potenziellen anfänglichen Basislinienpunkt bei.

### Identifizierung der Schlüsselpunkte eines Peaks

Der Integrator legt einen Peakanfang fest, wenn mögliche Basislinienpunkte außerhalb der Basislinienumhüllung liegen und die Krümmung einen bestimmten Wert, wie er im Integratorparameter „Steigungsempfindlichkeit“ festgelegt ist, überschreitet. Wenn diese Bedingung weiterhin besteht, erkennt der Integrator eine ansteigende Peakflanke und der Peak wird ausgewertet.

## Integration

### Algorithmen des ChemStation-Integrators

#### Start

- 1 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Basislinie prüfen.
- 2 Steigung und Krümmung über Schwellenwert: Möglichkeit eines Peaks.
- 3 Steigung bleibt über Schwellenwert: Peak erkannt, Peakstartpunkt festgelegt.
- 4 Krümmung wird negativ: Wendepunkt der Anstiegsflanke festgelegt.

#### Maximum

- 1 Die Steigung geht durch Null und wird negativ: Peakmaximum, Punkt des Maximums festgelegt.
- 2 Krümmung wird positiv: Wendepunkt der Abstiegsflanke festgelegt.

#### Peakende

- 1 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Peakende erreicht.
- 2 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Peakende festgelegt.
- 3 Integrator kehrt in den Modus zur Basislinienauswertung zurück.

## Basislinienverfolgung

Im weiteren Analysenverlauf sammelt der Integrator die digitalen Daten mit einer Rate, die durch die Anfangspeakbreite oder die berechnete Peakbreite bestimmt wird. Hierbei wird zunächst jeder Datenpunkt als möglicher Basislinienpunkt angenommen.

Der Integrator ermittelt eine *Basislinienhüllkurve* anhand der Steigung der Basislinie unter Verwendung eines Algorithmus zur Basislinienverfolgung, bei dem die Steigung durch die erste Ableitung und die Krümmung durch die zweite Ableitung bestimmt wird. Die Basislinienhüllkurve kann als Kegel dargestellt werden, dessen Spitze auf dem aktuellen Datenpunkt liegt. Die oberen und unteren Zulässigkeitsgrenzen für den Kegel sind:

- + Steigung + Krümmung + Basislinienschwankung müssen kleiner als der Schwellenwert sein,
- - Steigung - Krümmung + Basislinienschwankung müssen positiver (bzw. negativer) als der Schwellenwert sein.

Mit der Aufnahme neuer Datenpunkte bewegt sich der Kegel vorwärts, bis er seine Form verliert.

Ein Datenpunkt muss folgende Bedingungen erfüllen, um als Basislinienpunkt gewertet zu werden:

- Er muss innerhalb der definierten Basislinienhüllkurve liegen.
- Die Krümmung der Basislinie am Datenpunkt (durch die Ableitungsfilter ermittelt) muss unterhalb eines kritischen Werts liegen, der durch die aktuellen Einstellungen der Steigungsempfindlichkeit festgelegt wird.

Der beim Analysenstart festgelegte anfängliche Basislinienpunkt wird laufend mit einer durch die Peakbreite bestimmten Häufigkeit neu auf den sich verschiebenden Mittelwert der Datenpunkte gesetzt, die innerhalb der Basislinienhüllkurve liegen. Der Integrator überprüft die Basislinie laufend und setzt sie gelegentlich neu, um eine Drift auszugleichen, bis ein Peakanstieg festgestellt wird.

## Basislinienbestimmung

Der Integrator ermittelt die chromatographische/elektropherographische Basislinie während der Analyse mit einer Frequenz, die von dem Wert der Peakbreite abhängt. Wenn der Integrator eine bestimmte Anzahl Datenpunkte erfasst hat, setzt er die Basislinie vom ursprünglichen Basislinienpunkt auf den aktuellen Basislinienpunkt. Anschließend fährt der Integrator mit der Verfolgung der Basislinie für den nächsten Satz Datenpunkte fort und setzt dann die Basislinie wieder neu. Dieser Vorgang wird solange fortgesetzt, bis der Integrator einen Peakanfang feststellt.

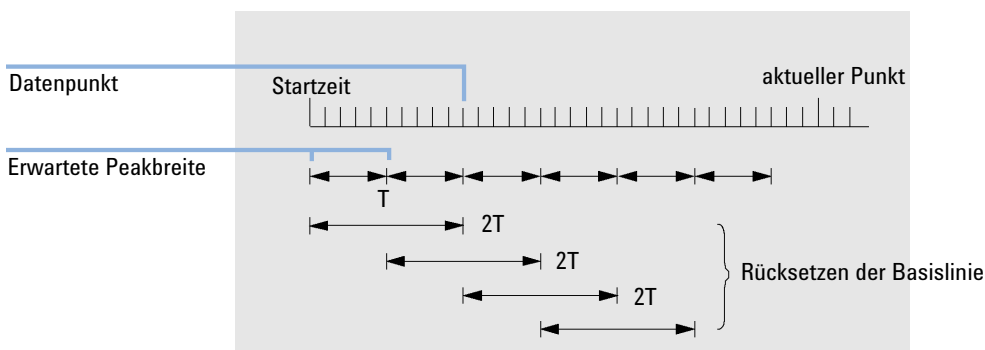


Abbildung 2 Basislinie

Am Anfang des Laufs wird der erste Datenpunkt verwendet. Dieser Basislinienpunkt wird dann regelmäßig nach folgender Formel neu gesetzt:

Die Flächen werden über den Zeitraum  $T$  (erwartete Peakbreite) summiert. Diese Zeit kann niemals kleiner als ein Datenpunkt sein. Dies wird fortgesetzt, solange

die Bedingungen für eine Basislinie gegeben sind. Steigung und Krümmung werden ebenfalls ermittelt. Wenn sowohl die Steigung als auch die Krümmung kleiner als der Schwellenwert sind, werden zwei summierte Flächen addiert und mit der vorherigen Basislinie verglichen. Wenn der neue Wert kleiner als die vorherige Basislinie ist, wird der alte Wert sofort durch den neuen ersetzt. Wenn der neue Wert größer als der vorherige Wert ist, wird er als möglicher neuer Basislinienwert gespeichert und als solcher bestätigt, wenn ein weiterer Wert die Bedingungen von Steigung und Krümmung erfüllt. Diese letztere Begrenzung ist nicht wirksam, wenn negative Peaks zulässig sind. Während der Basislinienermittlung erfolgt auch eine Prüfung auf schnell eluierende Lösungsmittel. Diese sind möglicherweise zu schnell für einen normalen Steigungsnachweis. (Wenn eine Steigung bestätigt ist, ist das Lösungsmittelkriterium nicht mehr gültig.) Zunächst ist der erste Datenpunkt die Basislinie. Sie wird ersetzt durch den 2T-Mittelwert, falls das Signal auf der Basislinie liegt. Die Basislinie wird dann alle T zurückgesetzt (siehe [Abbildung 2](#) auf Seite 13).

## Begriffserläuterung

### Lösungsmittelpeak

Der Lösungsmittelpeak ist normalerweise ein sehr großer Peak ohne analytische Bedeutung und wird i. d. R. nicht integriert. Wenn jedoch kleine, analytisch wichtige Peaks nahe dem Lösungsmittelpeak eluieren, zum Beispiel auf der absteigenden Flanke, können besondere Integrationsbedingungen eingestellt werden, um ihre Flächen um den Anteil des Lösungsmittelpeaks an der absteigenden Flanke zu korrigieren.

### Schulter (Vorderseite, Rückseite)

Schultern bilden sich, wenn zwei Peaks so dicht nebeneinander eluieren, dass kein Tal zwischen ihnen ausgebildet wird und sie somit nicht aufgelöst werden. Schultern können auf der Vorderseite oder auf der Rückseite eines Peaks auftreten. Erkannte Schultern können entweder durch tangentielle Anpassung oder durch eine Basisliniensenkrechte integriert werden.

### Steigung

Die Steigung eines Peaks, die eine Änderung der Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit kennzeichnet, wird zur Bestimmung des Peakanfangs, des Peakmaximums und des Peakendes verwendet.

## Funktionsprinzip

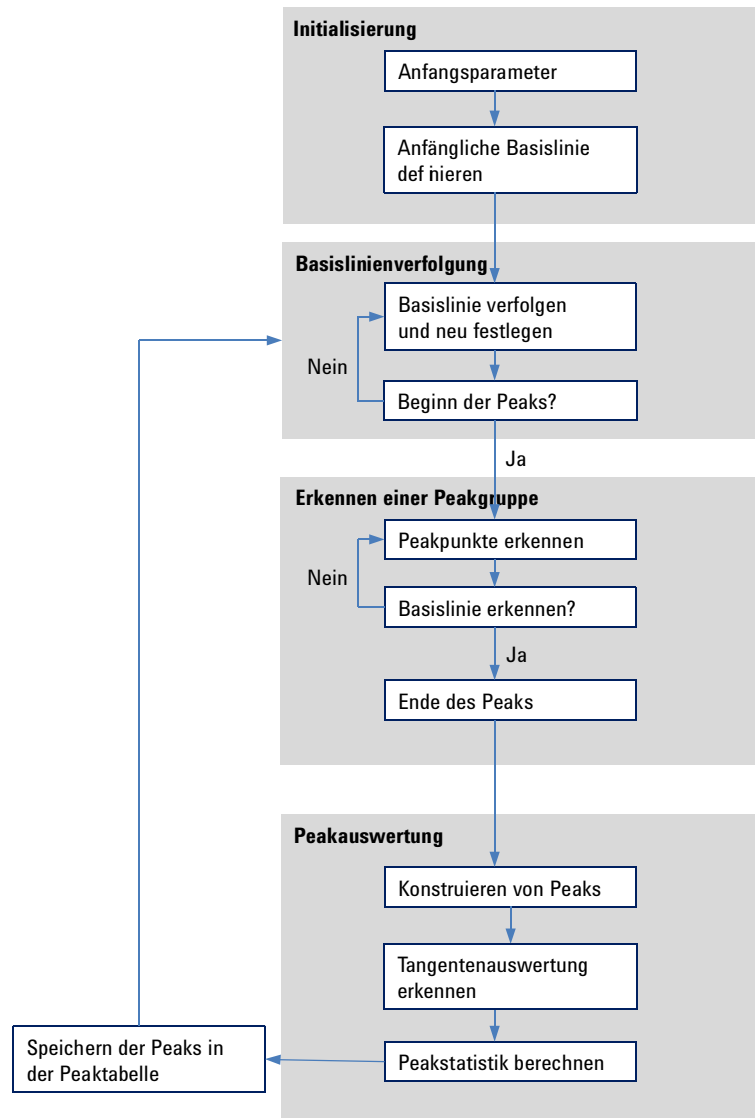


Abbildung 3 Flussdiagramm für den Integrator

## Peakerkennung

Der Integrator verwendet verschiedene Werkzeuge zur Erkennung und Charakterisierung eines Peaks:

- Peakbreite
- Peakerkennungsfilter
- Bündelung
- Peakerkennungsalgorithmus
- Peakmaximum-Algorithmus
- Berechnungen bei Abweichung von der Gauß-Kurve (z. B. Tailing, nicht aufgelöste Peaks)

### Peakbreite

Bei der Integration wird die Peakbreite aus der angepassten Peakfläche und -höhe errechnet:

$$\text{Breite} = \text{angepasste Fläche} / \text{angepasste Höhe}$$

Wenn Wendepunkte verfügbar sind, kann die Berechnung auch aus der Breite zwischen den Wendepunkten erfolgen.

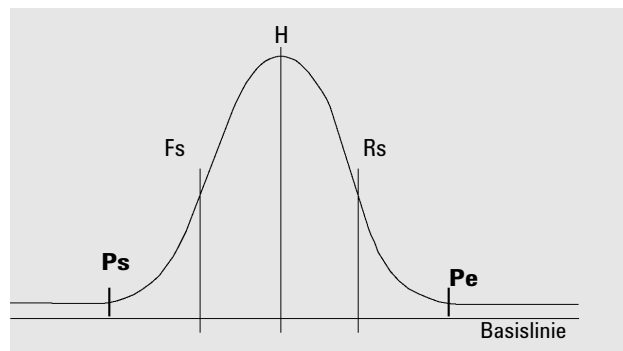


Abbildung 4 Peakbreitenberechnung

In der Abbildung oben ist die Gesamtfläche A die Summe der Flächen vom Peakstart (Ps) bis zum Peakende (Pe), angepasst auf die Basislinie. Fs ist die vordere Steigung am Wendepunkt, Rs ist die hintere Steigung am Wendepunkt.

Die Einstellung der Peakbreite bestimmt die Fähigkeit des Integrators, zwischen Peak und Basislinienrauschen zu unterscheiden. Die Peakbreite sollte für eine gute Leistung ähnlich der tatsächlichen chromatographischen Peakbreite eingestellt sein.

Die Peakbreite kann auf drei Arten geändert werden:

- Sie können vor dem Integrationsvorgang die Anfangspeakbreite bestimmen.
- Während des Integrationsvorgangs aktualisiert der Integrator die Peakbreiten bei Bedarf automatisch, um eine gute Übereinstimmung mit den Peakerkennungsfiltern zu gewährleisten.
- Sie können während des Integrationsvorgangs über zeitgesteuerte Ereignisse die Peakbreite neu festlegen oder ändern.

## Peakerkennungsfilter

Der Integrator verfügt über drei Filter zur Erkennung von Peaks, mit deren Hilfe Änderungen in der Steigung und Krümmung innerhalb einer Gruppe aufeinander folgender Datenpunkte erkannt werden. Diese Filter enthalten die erste Ableitung (für die Steigung) und die zweite Ableitung (für die Krümmung) der vom Integrator untersuchten Datenpunkte. Dies sind die Erkennungsfilter:

- Filter 1** Steigung (Krümmung) von zwei (drei) aufeinander folgenden Datenpunkten
- Filter 2** Steigung von vier aufeinander folgenden Datenpunkten und Krümmung von drei nicht zusammenhängenden Datenpunkten
- Filter 3** Steigung von acht aufeinander folgenden Datenpunkten und Krümmung von drei nicht aufeinander folgenden Datenpunkten

Die Einstellung der Peakbreite bestimmt den tatsächlich verwendeten Filter. Beim Analysenbeginn wird beispielsweise Filter 1 verwendet. Wenn die Peakbreite während der Analyse zunimmt, wechselt der Filter zunächst zu Filter 2 und dann zu Filter 3. Um gute Ergebnisse von den Erkennungsfiltern zu erhalten, muss die Peakbreite nahe der tatsächlichen Peakbreite des chromatographischen/elektropherographischen Peaks liegen. Der Integrator aktualisiert bei Bedarf während des Analysenlaufs die Peakbreite, um die Integration zu optimieren.

Der Integrator berechnet die aktualisierte Peakbreite je nach Gerätekonfiguration auf unterschiedliche Weise.

Für LC/CE-Konfigurationen verwendet die Peakbreitenberechnung standardmäßig eine zusammengesetzte Berechnung:

$$0,3 \times (\text{rechter Wendepunkt} - \text{linker Wendepunkt}) + 0,7 \times \text{Fläche/Höhe}$$

Bei einer GC-Konfiguration verwendet die Peakbreitenberechnung standardmäßig das Verhältnis Fläche zu Höhe. Diese Berechnung führt zu keiner Überbewertung der Peakbreite bei in halber Höhe überlappenden Peaks.

Bei bestimmten Analysen, beispielsweise isothermen GC- und isokratischen LC-Analysen, werden die Peaks im Laufe der Analyse deutlich breiter. Um dies zu kompensieren, aktualisiert der Integrator die Peakbreite automatisch, da sich die Peaks während der Analyse verbreitern. Die automatische Aktualisierung erfolgt nicht, wenn die Aktualisierung durch das zeitgesteuerte Ereignis für die feste Peakbreite deaktiviert wurde.

Die Aktualisierung der Peakbreite wird wie folgt gewichtet:

$$0,75 \times (\text{bestehende Peakbreite}) + 0,25 \times (\text{aktuelle Peakbreite})$$

## Bündelung

Der Integrator bewirkt mittels der Bündelung, dass bei sich verbreiternden Peaks die Peakerkennungsfilter sauber arbeiten und eine gute Selektivität behalten.

Der Integrator kann die Peakbreite für sich verbreiternde Peaks nicht unbegrenzt erhöhen. Die Peaks könnten dann so breit werden, dass sie von den Peakerkennungsfiltern nicht mehr erkannt werden. Um diese Einschränkung zu überwinden, bündelt der Integrator Datenpunkte, was bei gleicher Fläche den Peak effektiv enger macht.

Bei der Datenbündelung werden die Datenpunkte mit einer Potenz von 2 gebündelt, z. B. ungebündelt = 1x, einmal gebündelt = 2x, zweifach gebündelt = 4x usw.

Die Bündelung hängt von der Datenrate und der Peakbreite ab. Der Integrator verwendet diese Parameter zur Einstellung des Bündelungsfaktors, um die entsprechende Anzahl an Datenpunkten zu erhalten (siehe [Tabelle 1](#) auf Seite 19).

Die Bündelung erfolgt mit einer Potenz von 2 im Hinblick auf die erwartete Peakbreite oder auf Erfahrungswerte. Der Bündelungsalgorithmus ist in [Tabelle 1](#) auf Seite 19 zusammengefasst.

**Tabelle 1** Kriterien für die Bündelung

Erwartete Peakbreite	Verwendeter Filter	Bündelung
0 - 10 Datenpunkte	Erster	Keine
8 - 16 Datenpunkte	Zweiter	Keine
12 - 24 Datenpunkte	Dritter	Keine
16 - 32 Datenpunkte	Zweiter	Einfach
24 - 48 Datenpunkte	Dritter	Einfach
32 - 96 Datenpunkte	Dritter, zweiter	Zweifach
64 - 192 Datenpunkte	Dritter, zweiter	Dreifach

## Algorithmus der Peakerkennung

Der Integrator legt den Peakanfang mit einem Basislinienpunkt fest, der durch den Algorithmus der Peakerkennung ermittelt wird. Der Algorithmus der Peakerkennung vergleicht zunächst die Ergebnisse der Peakerkennungsfilter mit dem Wert der anfänglichen Steigungsempfindlichkeit, um den Steigungszähler zu vergrößern oder zu verringern. Der Integrator definiert den Punkt, an dem der Wert des Steigungszählers  $\geq 15$  ist, als den Punkt, an dem der Peak beginnt.

### Peakanfang

In [Tabelle 2](#) auf Seite 20 hängt von der erwarteten Peakbreite ab, welche Filterwerte für Steigung und Krümmung mit der Steigungsempfindlichkeit verglichen werden. Wenn die erwartete Peakbreite beispielsweise klein ist, werden Werte aus Filter 1 zum Steigungszähler addiert. Wenn die erwartete Peakbreite größer wird, werden die Werte von Filter 2 und eventuell Filter 3 verwendet.

Wenn der Wert des Steigungszählers  $\geq 15$  ist, erkennt der Algorithmus, dass ein Peak beginnt.

**Tabelle 2** Erhöhungswerte für den Steigungs-Akkumulator

Ableitungsfilter 1 - 3 Ausgabe gegen Steigungsempfindlichkeit	Filter 1	Filter 2	Filter 3
Steigung > Steigungsempfindlichkeit	+8	+5	+3
Krümmung > Steigungsempfindlichkeit	+0	+2	+1
Steigung < (-) Steigungsempfindlichkeit	-8	-5	-3
Steigung <  Steigungsempfindlichkeit	-4	-2	-1
Krümmung < (-) Steigungsempfindlichkeit	-0	-2	-1

### Peakende

In [Tabelle 3](#) auf Seite 20 hängt von der erwarteten Peakbreite ab, welche Filterwerte für Steigung und Krümmung mit der Steigungsempfindlichkeit verglichen werden. Wenn die erwartete Peakbreite beispielsweise klein ist, werden Werte aus Filter 1 zum Zähler für die abfallende Flanke addiert. Wenn die erwartete Peakbreite größer wird, werden die Werte von Filter 2 und eventuell Filter 3 verwendet.

Wenn der Wert des Zählers für die abfallende Flanke  $\geq 15$  ist, erkennt der Algorithmus, dass ein Peak endet.

**Tabelle 3** Erhöhungswerte für den Abstiegs-Akkumulator

Ableitungsfilter 1 - 3 Ausgabe gegen Steigungsempfindlichkeit	Filter 1	Filter 2	Filter 3
Steigung < (-) Steigungsempfindlichkeit	+8	+5	+3
Krümmung < (-) Steigungsempfindlichkeit	+0	+2	+1
Steigung > Steigungsempfindlichkeit	-11	-7	-4
Steigung >  Steigungsempfindlichkeit	-28	-18	-11
Krümmung > Steigungsempfindlichkeit	-0	-2	-1

Algorithmus für das Peakmaximum

Das Peakmaximum wird als höchster Punkt im Chromatogramm erkannt, indem eine parabolische Anpassung durch die höchsten Datenpunkte konstruiert wird.

## Überlappende Peaks

Überlappende Peaks treten auf, wenn ein neuer Peak beginnt, bevor das Peakende des vorherigen Peaks gefunden wurde. Die Abbildung zeigt, wie der Integrator überlappende Peaks behandelt.

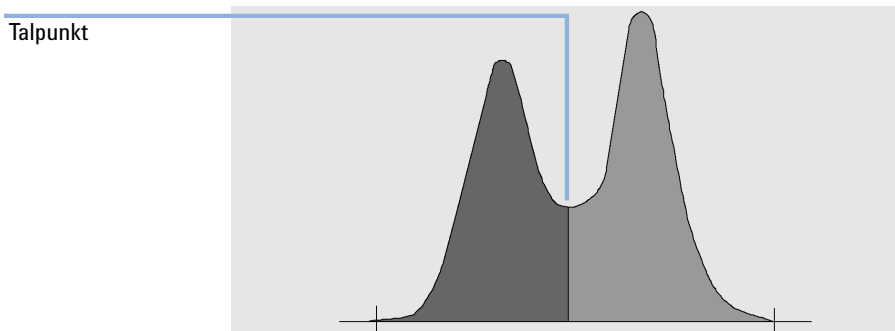


Abbildung 5 Überlappende Peaks

Der Integrator verarbeitet überlappende Peaks wie folgt:

- 1 Er summiert die Fläche des ersten Peaks bis zum Talpunkt.
- 2 Am Talpunkt endet die Summierung für den ersten Peak, und die Summierung für den zweiten Peak beginnt.
- 3 Wenn der Integrator das Ende des zweiten Peaks feststellt, endet die Flächen summierung. Dieser Vorgang kann als Trennung der überlappenden Peaks durch Lotfällung im Talpunkt zwischen den Peaks dargestellt werden.

## Schultern

Schultern sind nicht aufgelöste Peaks auf der ansteigenden oder abfallenden Flanke eines größeren Peaks. Wenn eine Schulter vorhanden ist, gibt es kein wirkliches Tal im Sinne einer negativen Steigung, der eine positive Steigung folgt. Ein Peak kann eine beliebige Anzahl Schultern auf der ansteigenden oder abfallenden Flanke besitzen.

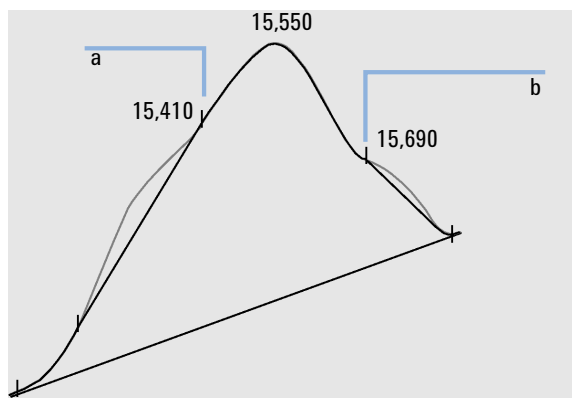


Abbildung 6 Peakschultern

Schultern werden durch die Krümmung des Peaks, also die zweite Ableitung, erkannt. Wenn die Krümmung gegen Null geht, registriert der Integrator einen Wendepunkt, wie beispielsweise die Punkte a und b in **Abbildung 6** auf Seite 22.

- Eine mögliche vordere Schulter ist vorhanden, wenn ein zweiter Wendepunkt vor dem Peakmaximum festgestellt wird. Bei Bestätigung einer Schulter wird der Schulterbeginn auf den Punkt mit maximaler positiver Krümmung vor dem Wendepunkt gelegt.
- Eine mögliche hintere Schulter ist vorhanden, wenn ein zweiter Wendepunkt vor dem Peakende oder Tal festgestellt wird. Bei Bestätigung einer Schulter wird der Startpunkt der Schulter auf den Punkt des ersten Minimums der Steigung nach dem Peakmaximum gelegt.

Die Retentions-/Migrationszeit wird anhand des Punktes der maximalen negativen Krümmung der Schulter festgelegt. Mit einem programmierten Integrationsereignis kann der Integrator auch Schulterflächen wie normale Peaks durch Basisliniensenkrechten an den Wendepunkten der Schulter berechnen.

Die Fläche der Schulter wird von der Fläche des Hauptpeaks subtrahiert.

Peakschultern können mithilfe eines zeitgesteuerten Integratorereignisses wie normale Peaks behandelt werden.

## Standard-Basislinienkonstruktion

Nachdem alle Peakgruppen festgelegt wurden und die Basislinie gefunden wurde, benötigt der Integrator den Algorithmus zur Basislinienbestimmung, der die Basislinie mithilfe einer Pegs-and-Thread-Technik zuordnet. Er verwendet Annäherungen an trapezförmige Flächen und die entsprechenden Höhen, um den Analysenlauf zu normalisieren und die niedrigste Basislinie zu erhalten. In den Algorithmus zur Basislinienbestimmung fließen auch Parameter aus der Methode und der Datendatei ein, die den Detektor und die Applikation beschreiben und zur Optimierung der Berechnung verwendet werden.

Im einfachsten Fall konstruiert der Integrator die Basislinie als Folge gerader Liniensegmente zwischen folgenden Punkten:

- dem Anfang der Basislinie
- Peakstart, Tal, Endpunkten,
- der Peak-Basislinie

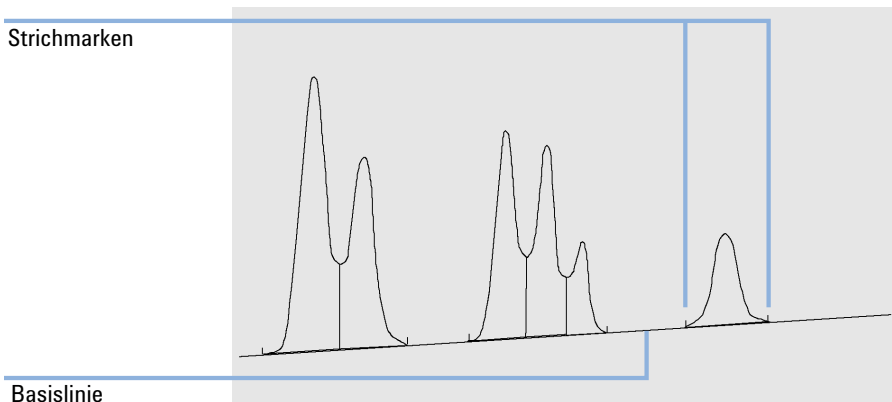


Abbildung 7 Standard-Basislinienkonstruktion

## Peak-Trenncodes

In den Integrationsergebnissen eines Reports wird jedem Peak ein Code aus zwei, drei oder vier Zeichen zugeordnet, der beschreibt, wie die Basislinie des Signals gezogen wurde.

**Tabelle 4** Code aus vier Zeichen

Erstes Zeichen	Zweites Zeichen	Drittes Zeichen	Viertes Zeichen
Basislinie am Anfang	Basislinie am Ende	Fehler/Peakmarkierung	Peaktyp

### Zeichen 1 und 2

Das erste Zeichen beschreibt die Basislinie am Peakanfang, das zweite beschreibt die Basislinie am Peakende.

- B** Der Peak beginnt oder endet auf der Basislinie.
- P** Der Peak beginnt oder endet bei einer Basislinienunterschreitung.
- V** Der Peak beginnt oder endet mit einer Basisliniensenkrechten in einem Tal.
- H** Der Peak beginnt oder endet auf einer erzwungenen horizontalen Basislinie.
- F** Der Peak beginnt oder endet mit einem erzwungenen Punkt.
- M** Der Peak wurde manuell integriert.
- U** Der Peak wurde nicht zugeordnet.

Zusätzliche Markierungen können, nach ihrer Priorität geordnet, hinzugefügt werden.

### 3. Zeichen

Das dritte Zeichen beschreibt einen Fehler oder eine Peakmarkierung:

- A** Die Integration wurde abgebrochen. Z. B. aufgrund des Integrationsereignisses ON/OFF oder aufgrund des Endes der Signalanalysedauer.
- D** Der Peak ist verzerrt (schlechte Peakform).

**Leerstelle** Dies ist ein normaler Peak.

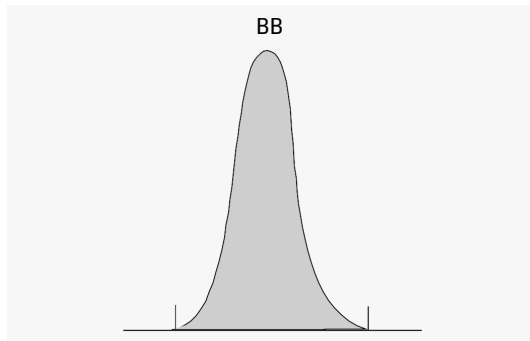
#### 4. Zeichen

Das vierte Zeichen beschreibt den Peaktyp.

- S** Dies ist ein Lösungsmittelpeak.
- N** Dies ist ein negativer Peak.
- +** Dies ist ein flächensummierter Peak.
- T** Peak mit Tangentenauswertung (Standardanpassung).
- X** Peak mit Tangentenauswertung (alte exponentielle Anpassung).
- E** Peak mit Tangentenauswertung (neue exponentielle Anpassung).
- m** Peak mit manuell festgelegter Basislinie.
- n** Negativer Peak mit manuell festgelegter Basislinie.
- t** Peak mit Tangentenauswertung nach manuell festgelegter Basislinie.
- x** Peak mit Tangentenauswertung (exponentielle Anpassung) nach manuell festgelegter Basislinie.
- R** Der Peak ist ein neu berechneter Peak (beispielsweise ein Hauptpeak, siehe ["Tangentiale Anpassungsmodi"](#) auf Seite 36).
- f** Peak nach Tangente an einer Schulter im Anstieg.
- b** Peak nach Tangente an einer Schulter im Abstieg.
- F** Peak nach Lotfällung an einer Schulter im Anstieg.
- B** Peak nach Lotfällung an einer Schulter im Abstieg.
- U** Der Peak ist nicht zugeordnet.

## Peakflächenberechnung

Der letzte Schritt einer Integration ist das Ermitteln der Peakfläche.



**Abbildung 8** Flächenberechnung bei Basislinie-zu-Basislinie-Peaks

Im Falle eines einfachen, isolierten Peaks wird die Peakfläche durch die aufsummierten Flächen oberhalb der Basislinie zwischen Peakanfang und Peakende ermittelt.

## Flächenberechnung

Die Fläche, die der Integrator während der Integration berechnet, ergibt sich wie folgt:

- Bei Basislinie-zu-Basislinie-Peaks (BB) ist dies die Fläche oberhalb der Basislinie zwischen dem Peakanfang und dem Peakende (siehe [Abbildung 8](#) auf Seite 26)
- Bei Tal-zu-Tal-Peaks (VV) ist dies die Fläche oberhalb der Basislinie, eingegrenzt durch vertikal gefällte Linien von den Talpunkten (siehe [Abbildung 9](#) auf Seite 27)

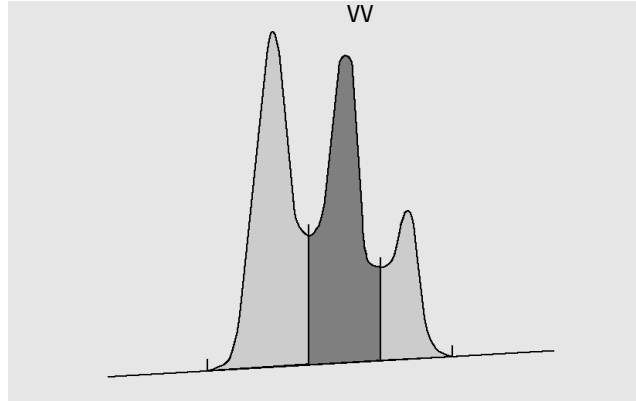


Abbildung 9 Flächenberechnung bei Tal-zu-Tal-Peaks

- Bei Tangentenpeaks (T) die Fläche oberhalb der neu gesetzten Basislinie
- Bei Lösungsmittelpeaks (S) die Fläche oberhalb der horizontalen Verlängerung des letzten Basisliniendpunktes und unterhalb der neu gesetzten Basislinie nach Tangentenpeaks (T) Ein Lösungsmittelpeak kann auch zu langsam ansteigen, um als solcher erkannt zu werden, oder es kann in einem Analysenlauf auch eine Peakgruppe geben, die Sie als Lösungsmittel mit aufgesetzten Peaks behandeln wollen. Dies ist normalerweise eine Gruppe mit überlappenden Peaks, bei denen der erste wesentlich größer als der Rest ist. Eine einfache Basisliniensenkrechte würde die späteren Peaks überbewerten, da sie auf der abfallenden Flanke des ersten Peaks sitzen. Indem der erste Peak als Lösungsmittelpeak deklariert wird, können die restlichen Peaks vom Tail abgetrennt werden.
- Negative Peaks unterhalb der Basislinie erhalten eine positive Fläche, wie in [Abbildung 10](#) auf Seite 27 gezeigt.

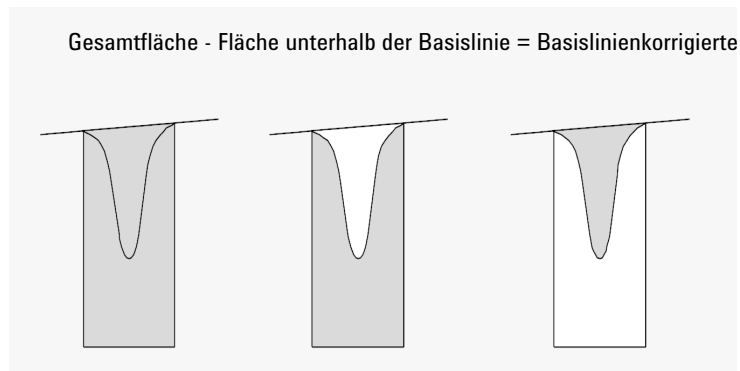


Abbildung 10 Flächenberechnung bei negativen Peaks

## Einheiten und Umrechnungsfaktoren

Nach außen hin enthalten die Daten einen Satz Datenpunkte; diese können entweder gemessene Daten oder integrierte Daten sein. Bei integrierten Daten entspricht jeder Datenpunkt einer Fläche, die als *Höhe x Zeit* angegeben wird. Bei gemessenen Daten entspricht jeder Datenpunkt einer Höhe.

Daher ist im Falle der integrierten Daten die Höhe eine berechnete Größe, die man durch Division der Fläche durch die seit dem letzten Datenpunkt verstrichene Zeit erhält. Im Falle der gemessenen Daten wird die Fläche durch Multiplikation des Messwerts mit der seit dem letzten Datenpunkt verstrichenen Zeit berechnet.

Bei der Integrationsberechnung werden beide Größen verwendet. Im Integrator werden intern folgende Einheiten verwendet: *Detektor-Response x Sekunden* für die Fläche und **detector response** als Höhe. Hierdurch wird bei Bedarf eine gemeinsame Basis für Integerkürzungen geschaffen. Die Messungen von Zeit, Fläche und Höhe werden in echten physikalischen Einheiten ausgewiesen, unabhängig davon, wie sie von der Software gemessen, berechnet und gespeichert werden.

# Basislinienbestimmung

## Anfang der Basislinie

Wenn zu Beginn eines Analysenlaufs keine Basislinie gefunden wird, wird der Anfang der Basislinie auf eine der folgenden Weisen festgelegt:

- Vom Startpunkt der Analyse zum ersten Basislinienpunkt, wenn der Startpunkt der Analyse vor dem ersten Basislinienpunkt liegt
- Vom Startpunkt der Analyse zum ersten Talpunkt, wenn der Startpunkt der Analyse vor dem ersten Tal liegt
- Vom Startpunkt der Analyse zum ersten Talpunkt, wenn das erste Tal eine imaginäre Linie zwischen dem Startpunkt der Analyse und dem ersten Basislinienpunkt schneidet
- Vom Startpunkt der Analyse zu einer horizontalen Basislinie, die zum ersten Basislinienpunkt verlängert wird

## Ende der Basislinie

Der letzte gültige Basislinienpunkt kennzeichnet das Ende der Basislinie. In den Fällen, in denen der Analysenlauf nicht auf der Basislinie endet, wird das Ende der Basislinie anhand des letzten gültigen Basislinienpunkts unter Berücksichtigung der ermittelten Basisliniendrift berechnet.

Wenn ein Peak in einem scheinbaren Tal endet, der folgende Peak aber unterhalb des festgelegten Schwellenwerts für die Fläche liegt, wird die Basislinie vom Peakanfang zum nächsten echten Basislinienpunkt gezogen. Wenn ein Peak auf ähnliche Weise beginnt, gelten die gleichen Regeln.

## Basislinienkorrekturmodi

In der OpenLab ChemStation stehen mehrere Basislinienkorrekturmodi zur Verfügung. Sie werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

### Basislinienkorrekturmodus: Klassisch

Eine Unterschreitung tritt auf, wenn das Signal unter die konstruierte Basislinie fällt (Punkt [Abbildung 11](#) auf Seite 30).

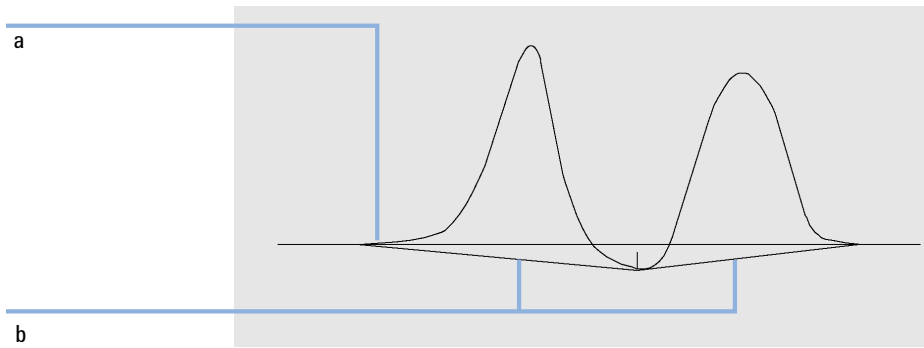


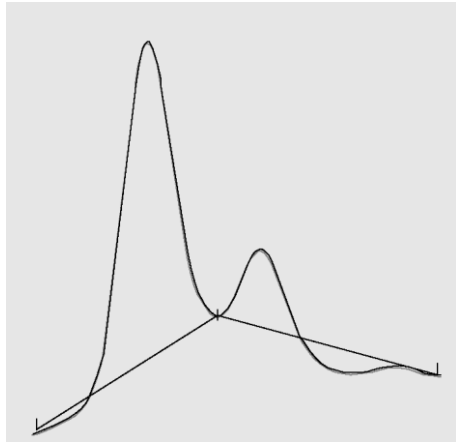
Abbildung 11 Basislinienunterschreitung

Wenn eine Basislinienunterschreitung erfolgt, kann der entsprechende Teil der Basislinie rekonstruiert werden, wie durch die Punkte b in [Abbildung 11](#) auf Seite 30 illustriert. Sie können die folgenden Korrekturmodi verwenden, um alle Basislinienunterschreitungen zu entfernen:

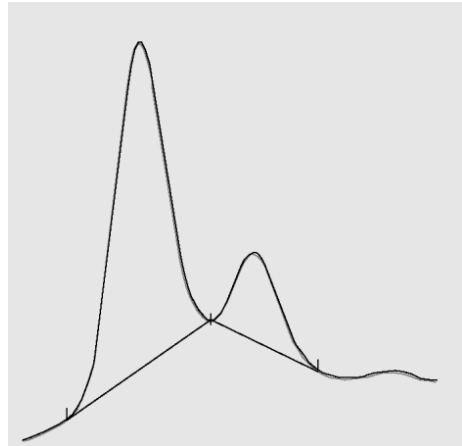
- **No penetration**
- **Advanced**

#### Basislinienkorrekturmodus: Keine Unterschreitung

Bei Auswahl dieser Option wird jede Peakgruppe nach einer Basislinienunterschreitung durchsucht. Wenn Unterschreitungen gefunden werden, werden die Anfangs- und/oder Endpunkte der Peaks verschoben, bis keine Unterschreitung mehr vorliegt.



Basislinienkorrekturmodus **Classical**



Basislinienkorrekturmodus **No penetration**

#### HINWEIS

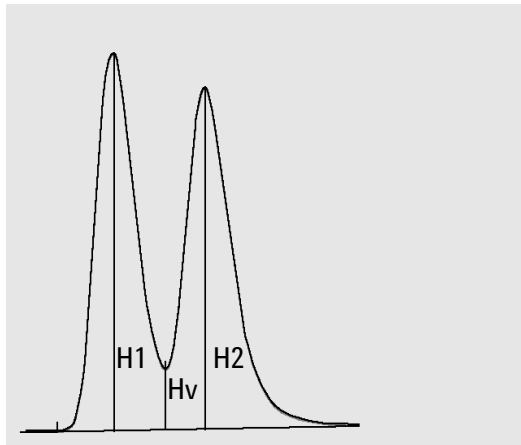
Der Basislinien-Korrekturmodus **No penetration** ist für Peaks des Lösemittels sowie deren Nebenpeaks und Schultern nicht verfügbar.

#### Basislinienkorrekturmodus: Profi

Bei der erweiterten Korrektur der Basislinie versucht der Integrator, Peakanfang und Peakende zu optimieren, erstellt die Basislinie für Peakgruppen neu und beseitigt Basislinienunterschreitungen (siehe ["Basislinienkorrekturmodus: Keine Unterschreitung"](#) auf Seite 31). In vielen Fällen liefert die erweiterte Basislinienkorrektur eine stabilere Basislinie, die weniger von der Steigungsempfindlichkeit abhängig ist.

## Peak-zu-Tal-Quotient

Der Peak-zu-Tal-Quotient ist ein Qualitätsmaß und gibt an, wie gut die Peaks von anderen Substanzpeaks getrennt sind. Dieser benutzerdefinierte Parameter ist ein Bestandteil der erweiterten Basislinienverfolgung. Er entscheidet, ob zwei Peaks, die keine Basislinientrennung aufweisen, durch eine Lötöffnung oder eine Tal-Basislinie voneinander getrennt werden. Der Integrator berechnet das Verhältnis zwischen der basislinienkorrigierten Höhe des kleineren Peaks und der basislinienkorrigierten Höhe des Tals. Ist der Peak-Tal-Quotient kleiner als der benutzerdefinierte Wert, wird eine Basisliniensenkrechte verwendet. Ansonsten wird die Basislinie von der Basislinie bei Beginn des ersten Peaks zum Tal gezogen und dann vom Tal zur Basislinie am Ende des zweiten Peaks (vgl. "Basislinienkorrekturmodus: Keine Unterschreitung" auf Seite 31 mit [Abbildung 12](#) auf Seite 32).



**Abbildung 12** Peak-zu-Tal-Verhältnis

Das Peak-zu-Tal-Verhältnis wird durch folgende Gleichungen ermittelt:

$$H1 \geq H2, \text{ Peak-Tal-Verhältnis} = H2/Hv$$

und

$$H1 < H2, \text{ Peak-Tal-Verhältnis} = H1/Hv$$

[Abbildung 13](#) auf Seite 33 zeigt, wie der benutzerdefinierte Wert für das Peak-Tal-Verhältnis die Basislinie beeinflusst.

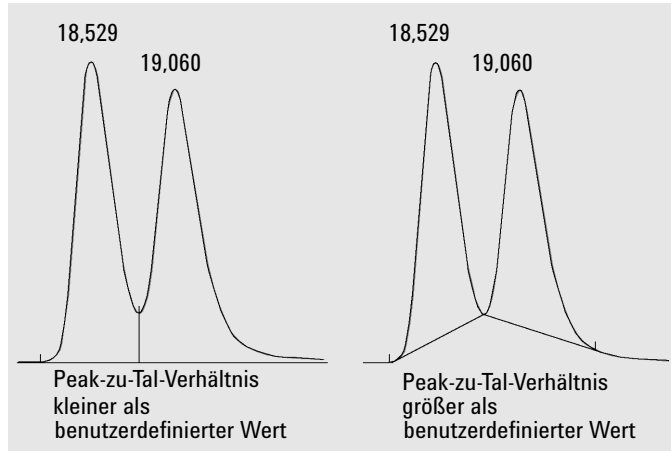


Abbildung 13 Einfluss des Peak-zu-Tal-Verhältnisses auf die Basislinie

## Tangentiale Anpassung

Die tangentiale Anpassung ist eine Möglichkeit der Basislinienkonstruktion für Peaks, die auf der ansteigenden oder abfallenden Flanke eines Peaks erscheinen. Die Voraussetzung hierfür ist, dass die zwei Peaks nicht basisliniengetrennt sind.

Die folgenden Abbildungen illustrieren die Prinzipien der tangentiale Anpassung:

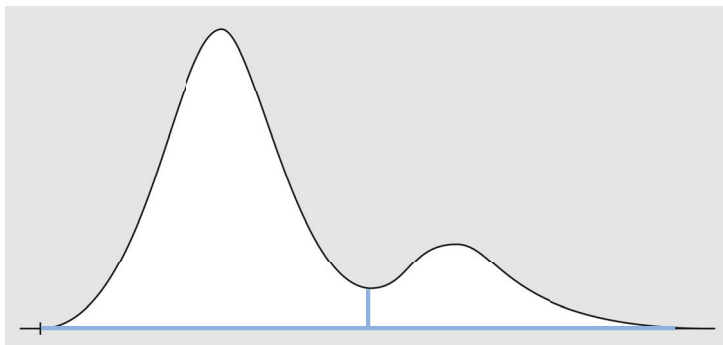


Abbildung 14 Peaks ohne Anpassung, getrennt durch eine Lotfällung

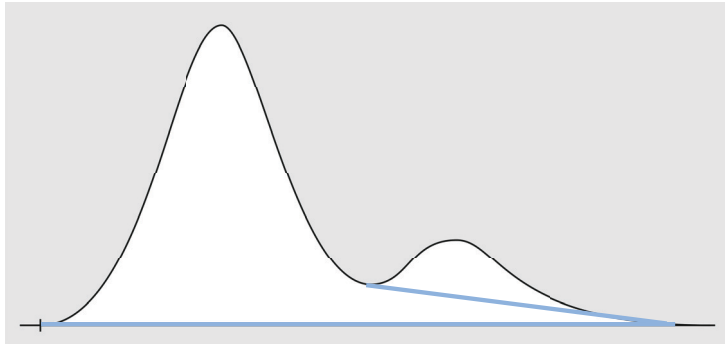


Abbildung 15 Anpassung an der abfallenden Flanke

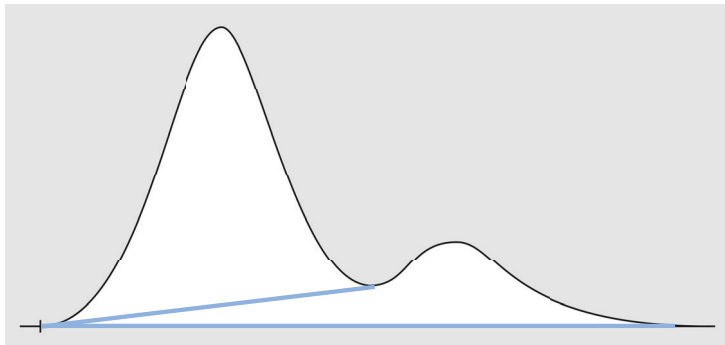


Abbildung 16 Anpassung an der ansteigenden Flanke

## Skimming-Kriterien

Ob zur Berechnung der Fläche des Nebenpeaks auf der ansteigenden oder abfallenden Flanke des Hauptpeaks eine Geradenanpassung verwendet wird, wird durch die folgenden Kriterien festgelegt:

- Skim-Peakhöhen-Verhältnis (**Front skim height ratio** oder **Tail skim height ratio**)
- **Skim valley ratio**

Das *Skim-Peakhöhen-Verhältnis* ist der Quotient zwischen der basislinienkorrigierten Höhe des Hauptpeaks ( $H_p$  in der nachstehenden Abbildung) und der basislinienkorrigierten Höhe des Nebenpeaks ( $H_c$ ). Wenn ein Skimming des Nebenpeaks erfolgen soll, verwenden Sie einen Wert, der kleiner als dieses Verhältnis ist. Möchten Sie die exponentielle Anpassung während der gesamten Analyse deaktivieren, können Sie für diesen Parameter einen hohen Wert oder Null festlegen.

Das *Skim-Talhöhen-Verhältnis* ist das Verhältnis der Höhe des Nebenpeaks über der Basislinie ( $H_c$  in der nachstehenden Abbildung) zur Höhe des Tals über der Basislinie ( $H_v$ ). Wenn ein Skimming des Nebenpeaks erfolgen soll, verwenden Sie einen Wert, der größer als dieses Verhältnis ist.

### HINWEIS

Wird eines dieser Kriterien von einer Gruppe von Nebenpeaks an der abfallenden Flanke des Hauptpeaks nicht erfüllt, erfolgt für alle Nebenpeaks nach dem letzten Nebenpeak, der beide Kriterien erfüllt hat, kein Skimming mehr und es wird eine Basisliniensenkrechte verwendet.

### HINWEIS

Diese Kriterien werden nicht verwendet, wenn ein zeitgesteuertes Ereignis für ein exponentielles Skimming aktiv ist oder wenn der Hauptpeak selber ein Nebenpeak ist. Der Basisliniencode zwischen Hauptpeak und Nebenpeak muss vom Typ **Valley** sein (siehe "Peak-Trenncodes" auf Seite 24).

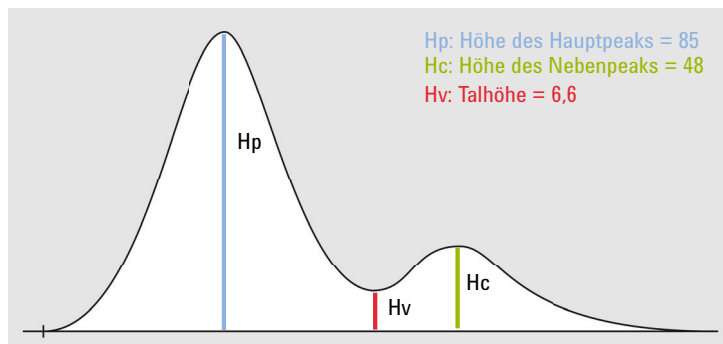


Abbildung 17 Beispiel für die Berechnung der Werte für die Skimming-Kriterien

## Integration

### Basislinienbestimmung

Verhältnis Peakhöhe Hauptpeak zu Peakhöhe Nebenpeak =  $H_p/H_c$

Verhältnis Peakhöhe Nebenpeak zu Talhöhe =  $H_c/H_v$

wobei

$H_p$	Basislinienkorrigierte Höhe des Hauptpeaks
$H_v$	Höhe des Tals über der Basislinie
$H_c$	Basislinienkorrigierte Höhe des Nebenpeaks

**Tail Skimming** Um ein Skimming an der abfallenden Flanke vorzunehmen, legen Sie die Parameter folgendermaßen fest:

- Verhältnis Peakhöhe Hauptpeak zu Peakhöhe Nebenpeak =  $85 / 48 = 1,77$   
Verwenden Sie für die Integrationsereignisse einen Wert  $< 1,77$ .
- Verhältnis Peakhöhe Nebenpeak zu Talhöhe =  $48 / 6,6 = 7,3$   
Verwenden Sie für die Integrationsereignisse einen Wert  $> 7,3$ .

### Front Skimming

Beim Skimming im Anstieg ist der erste Peak der Nebenpeak und der zweite Peak der Hauptpeak. Um ein Skimming im Anstieg vorzunehmen, legen Sie die Parameter folgendermaßen fest:

- Verhältnis Peakhöhe Hauptpeak zu Peakhöhe Nebenpeak im Anstieg =  $48 / 85 = 0,56$   
Verwenden Sie für die Integrationsereignisse einen Wert  $< 0,56$ .
- Verhältnis Peakhöhe Nebenpeak zu Talhöhe =  $85 / 6,6 = 12,9$   
Verwenden Sie für die Integrationsereignisse einen Wert  $> 12,9$ .

### Tangentiale Anpassungsmodi

Wenn die tangentielle Anpassung aktiviert ist, stehen vier Modelle zur Berechnung der entsprechenden Peakflächen zur Verfügung:

- Exponentielle Kurve
- Neue exponentielle Anpassung
- Geradenanpassung
- Kombination aus einer exponentiellen und einer Geradenberechnung für beste Übereinstimmung (Standardanpassungen)

#### Exponentielle Kurve

Dieses Anpassungsverfahren zeichnet eine Kurve mittels einer exponentiellen Gleichung durch den Anfang und das Ende des Nebenpeaks. Die Kurve verläuft unter jedem Nebenpeak, der dem Hauptpeak folgt. Die Fläche unter der Anpassungskurve wird vom Nebenpeak subtrahiert und zum Hauptpeak addiert.

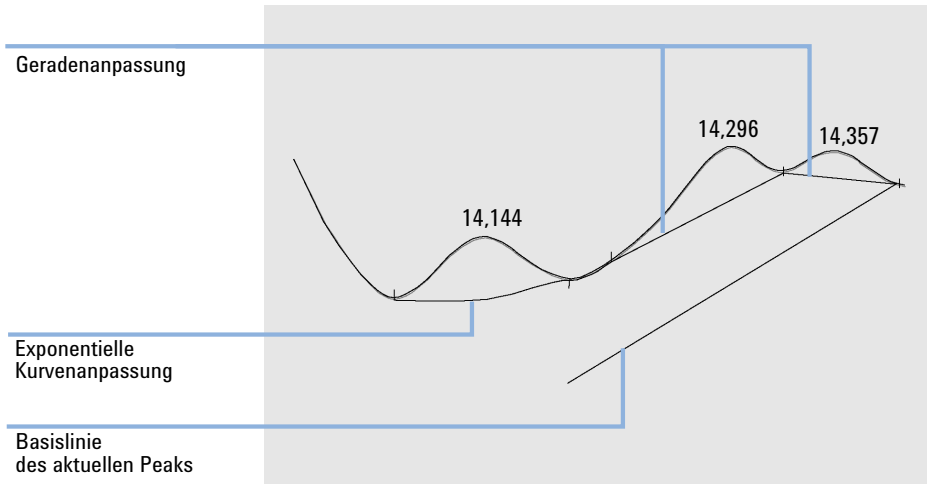


Abbildung 18 Exponentielle Anpassung

Neue exponentielle Kurve

Dieses Anpassungsverfahren zeichnet eine Kurve mittels einer exponentiellen Gleichung durch den ansteigenden Beginn oder das abfallende Ende eines Hauptpeaks. Die Kurve verläuft unter einem oder mehreren Peaks, die dem Hauptpeak folgen (Nebenpeaks). Die Fläche unter der Anpassungskurve wird von den Nebenpeaks subtrahiert und zum Hauptpeak addiert. Es kann mehr als ein Nebenpeak mit dem gleichen exponentiellen Modell angepasst werden. Alle Peaks nach dem ersten Nebenpeak werden mittels Basisliniensenkrechte getrennt, wobei die Senkrechte am Ende des ersten Nebenpeaks beginnt und nur bis zur Anpassungskurve geht.

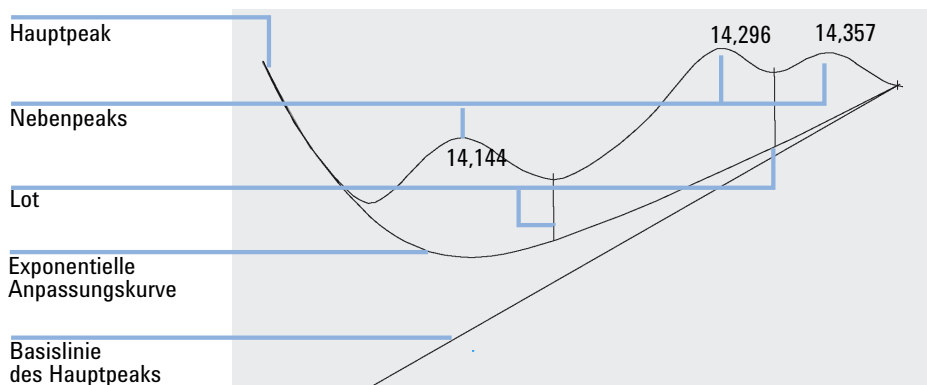


Abbildung 19 Neue exponentielle Anpassung

#### Geradenanpassung

Dieses Anpassungsverfahren zeichnet eine gerade Linie durch Anfang und Ende des Nebenpeaks. Die Höhe zu Beginn des Nebenpeaks wird um die Steigung des Hauptpeaks korrigiert. Die Fläche unter der geraden Linie wird vom Nebenpeak subtrahiert und zum Hauptpeak addiert.

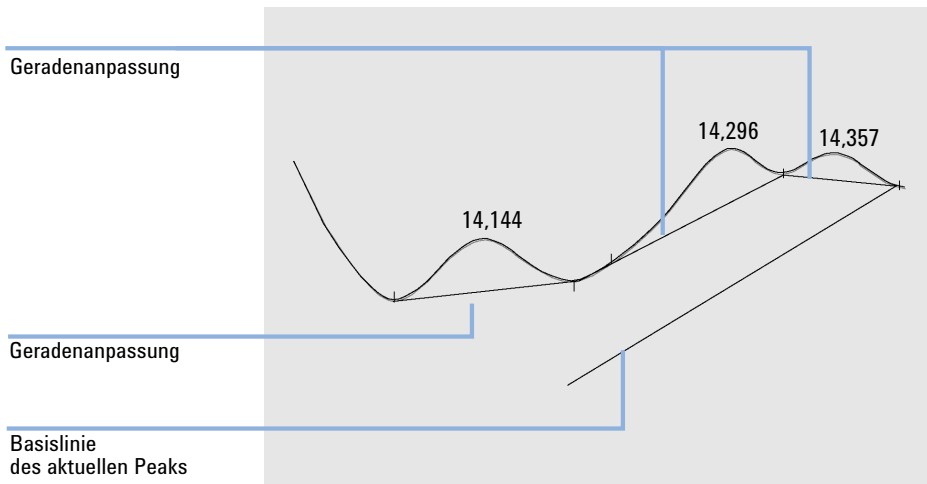


Abbildung 20 Geradenanpassung

#### Standard-Skimming

Bei dieser Standardmethode werden exponentielle und Geradenberechnung kombiniert, um die beste Anpassung zu erzielen.

Der Wechsel von der exponentiellen zur Geradenberechnung wird so vollzogen, dass eine plötzliche Diskontinuität der Höhen oder Flächen ausgeschlossen ist.

- Wenn ein Signal weit über der Basislinie liegt, wird zur Berechnung des Tails die Exponentialfunktion verwendet.
- Wenn sich das Signal innerhalb des Basislinienbereichs befindet, wird zur Berechnung des Tails die Geradenfunktion verwendet.

Die kombinierten Berechnungen gehen als tangentielle Anpassung mit exponentieller oder Geradenberechnung in den Report ein.

## Integration

### Basislinienbestimmung

Berechnung der exponentiellen Kurve für die Anpassungen

Zur Berechnung eines exponentiellen Skimmings wird folgende Gleichung verwendet:

$$H_b(t_R) = H_0 * \exp(-B * (t_R - t_0)) + A * t_R + C$$

wobei

$H_b$	Höhe des exponentiellen Skims zum Zeitpunkt $t_R$
$H_0$	Höhe (oberhalb der Basislinie) zu Beginn der exponentiellen Anpassung
$B$	Abklingfaktor der Exponentialfunktion
$t_0$	Zeitpunkt des Beginns des exponentiellen Skims
$t_R$	Retentionszeit
$A$	Steigung der Basislinie des Hauptpeaks
$C$	Offset der Basislinie des Hauptpeaks

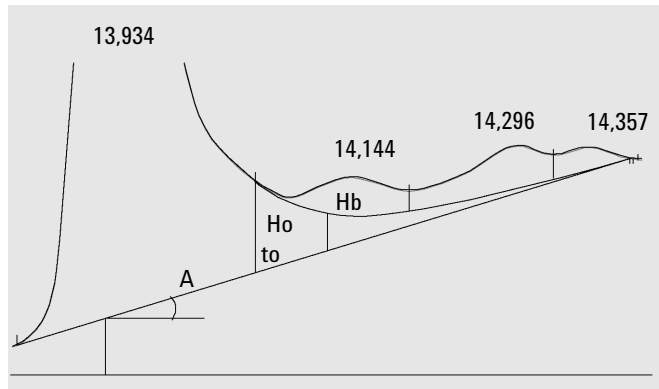


Abbildung 21 Werte für die Berechnung einer exponentiellen Anpassung

## Integrationsereignisse

Der Integrator stellt dem Benutzer mehrere anfängliche und zeitgesteuerte Integratorereignisse zur Verfügung. Viele Ereignisse sind Ein/Aus- und Start/Stop-Paare.

### Integrationsereignisse für alle Signale

#### **Tangentiale Anpassungsmodus**

Legen Sie die Art der Basislinienkonstruktion für Peaks, die auf der ansteigenden oder abfallenden Flanke eines Peaks erscheinen, fest. Siehe ["Tangentiale Anpassungsmodi"](#) auf Seite 36.

<b>Exponential</b>	Erstellt eine Exponentialkurve durch den höhenkorrigierten Anfang und das entsprechende Ende jedes Nebenpeaks.
<b>New Exponential</b>	Erstellt eine Exponentialkurve zur Anpassung des abfallenden Endes eines Hauptpeaks.
<b>Standard</b>	Kombiniert die Berechnung von Exponentialkurve und Gerade für beste Übereinstimmung.
<b>Straight</b>	Erstellt eine gerade Linie durch den höhenkorrigierten Anfang und das entsprechende Ende jedes Nebenpeaks.

**Verhältnis  
Peakhöhe  
Hauptpeak zu  
Peakhöhe  
Nebenpeak auf  
der Rückseite**

In Verbindung mit dem **Skim valley ratio** werden die Bedingungen für die tangentielle Anpassung eines kleinen Peaks auf der Rückseite eines Lösemittelpeaks oder eines anderen großen Peaks festgelegt. Siehe "Skimming-Kriterien" auf Seite 35.

Es ist das Verhältnis der Höhe des basislinienkorrigierten Hauptpeaks ( $H_p$ ) zur Höhe des basislinienkorrigierten Nebenpeaks ( $H_c$ ). Ist das Verhältnis größer als der definierte Wert, ist eine Anpassung möglich.

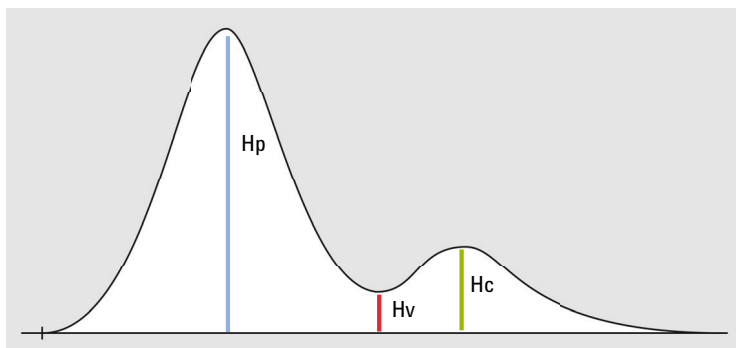


Abbildung 22 Beispiel: Peak mit Anpassung an der abfallenden Flanke

**Verhältnis  
Peakhöhe  
Hauptpeak zu  
Peakhöhe  
Nebenpeak auf  
der Vorder-  
seite**

In Verbindung mit dem **Skim Valley Ratio** werden die Bedingungen für die tangentielle Anpassung eines kleinen Peaks auf der Vorderseite eines Lösemittelpeaks oder eines anderen großen Peaks festgelegt. Siehe "Skimming-Kriterien" auf Seite 35.

Es ist das Verhältnis der Höhe des basislinienkorrigierten Hauptpeaks ( $H_p$ ) zur Höhe des basislinienkorrigierten Nebenpeaks ( $H_c$ ). Ist das Verhältnis größer als der definierte Wert, ist eine Anpassung möglich.

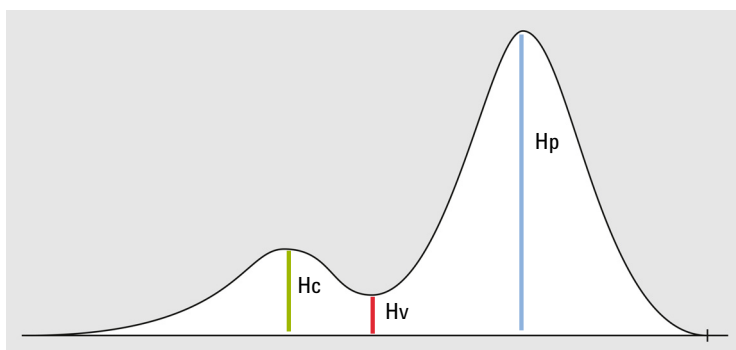


Abbildung 23 Beispiel: Peak mit Anpassung an der ansteigenden Flanke

#### Verhältnis Peakhöhe Nebenpeak zu Talhöhe

In Verbindung mit dem **Tail Skim Height Ratio** oder dem **Front Skim Height Ratio** werden die Bedingungen für die tangentielle Anpassung eines kleinen Peaks auf der Vorder- oder Rückseite eines Lösemittelpeaks oder eines anderen Peaks festgelegt. Siehe "Skimming-Kriterien" auf Seite 35.

Es ist das Verhältnis der Höhe des basislinienkorrigierten Nebenpeaks ( $H_c$ ) zur Höhe des basislinienkorrigierten Tals ( $H_v$ ). Ist das Verhältnis kleiner als der definierte Wert, ist eine Anpassung möglich.

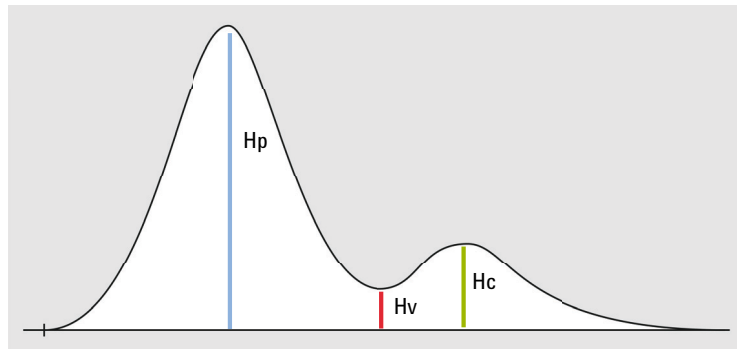


Abbildung 24 Beispiel: Peak mit Anpassung an der abfallenden Flanke

#### Basislinien- korrektur

Legt die Art der Basislinienkorrektur fest. Siehe "Basislinienkorrekturmodi" auf Seite 30.

Sie können unter folgenden Parametern auswählen:

<b>Classical</b>	Akzeptiert Basislinienunterschreitung.
<b>No penetrations</b>	Beseitigt Basislinienunterschreitungen durch erneute Basislinienkonstruktion.
<b>Advanced</b>	Der Integrator versucht, Peakanfang und Peakende zu optimieren, erstellt die Basislinie für Peakgruppen neu und beseitigt Basislinienunterschreitungen.

#### Peak-zu-Tal-Quotient

Wird verwendet, um zu entscheiden, ob zwei Peaks, die keine Basislinientrennung aufweisen, durch eine Lotfällung oder durch eine Tal-Basislinie voneinander getrennt werden. Es ist der Quotient von basislinienkorrigierter Höhe des kleineren Peaks durch die basislinienkorrigierte Höhe des Tals. Siehe "Peak-zu-Tal-Quotient" auf Seite 32.

Ist der Peak-zu-Tal-Quotient kleiner als der definierte Wert, wird eine Lotfällung verwendet (A). Ansonsten wird die Basislinie von der Basislinie bei Beginn des ersten Peaks zum Tal gezogen und dann vom Tal zur Basislinie am Ende des zweiten Peaks (B).

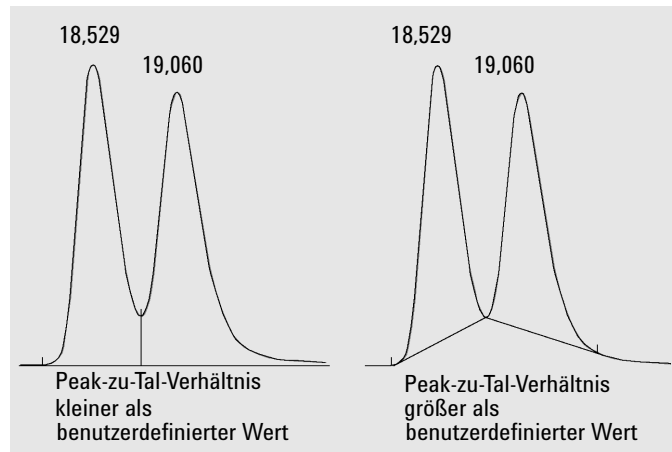


Abbildung 25 Einfluss des Peak-zu-Tal-Verhältnisses auf die Basislinie

## Anfangsereignisse

**Slope Sensitivity**

Die Steigungsempfindlichkeit ist die Einstellung für die Peakempfindlichkeit. Übersteigt die Signalsteigung den Wert für die **Slope Sensitivity**, wird ein Peak-Startpunkt festgelegt. Fällt die Signalsteigung unter den Wert für die **Slope Sensitivity**, wird ein Peak-Endpunkt festgelegt.

**Peak Width**

Bestimmt die Selektivität des Integrators bei der Unterscheidung zwischen Peaks und Basislinienrauschen. Die Peakbreite wird vom Benutzer als die Anzahl an Zeiteinheiten angegeben, die der Peakbreite auf halber Höhe des ersten erwarteten Peaks entspricht (den Lösungsmittelpeak ausgenommen).

Der Integrator kann die Peakbreite im Laufe der Analyse aktualisieren, um die Integration zu optimieren:

Wenn die gewählte Anfangspeakbreite zu klein ist, kann Rauschen als Peaks interpretiert werden. Wenn breite und schmale Peaks vermischt auftreten, können Sie durch die Programmierung von laufzeitgesteuerten Ereignissen die Peakbreite für bestimmte Peaks festlegen. Gelegentlich können die Peaks im Analysenverlauf deutlich breiter werden, beispielsweise bei der isothermen GC- und der isokratischen LC-Analyse. Um dies auszugleichen, vergibt der Integrator automatisch neue Werte für die Peakbreite, während die Peaks im Verlauf einer Analyse breiter werden, es sei denn, die Funktion wurde mit einem zeitgesteuerten Ereignis deaktiviert.

Die Aktualisierung der Peakbreite wird wie folgt gewichtet:

$$0,75 \times (\text{bestehende Peakbreite}) + 0,25 \times (\text{aktuelle Peakbreite})$$

**Area reject**

Legt die Mindestfläche fest, die ein interessierender Peak aufweisen muss.

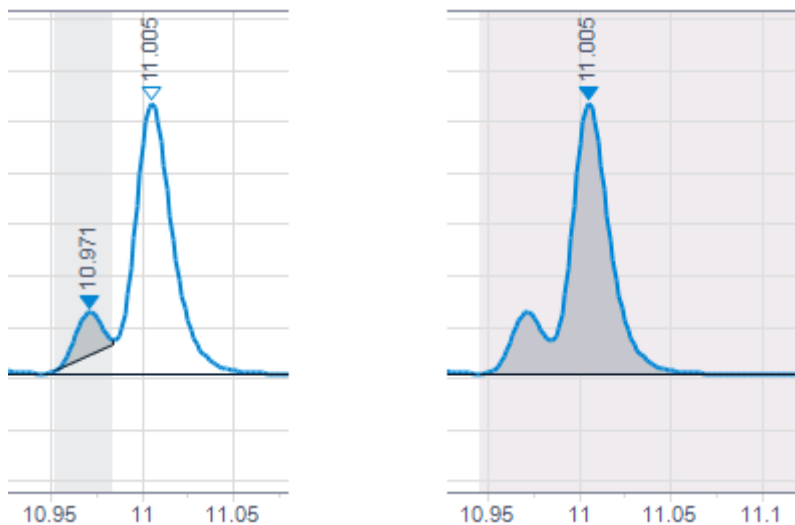
Jeder Peak, dessen Fläche kleiner ist als diese Mindestfläche, wird nicht als Peak registriert: Der Integrator weist alle Peaks zurück, die nach Basislinienkorrektur kleiner sind als der **Area Reject**. Der **Area Reject** muss größer oder gleich Null sein.

#### Area Percent reject

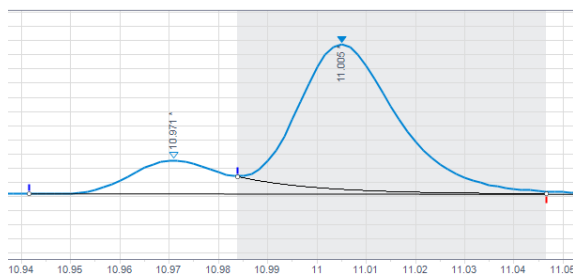
Legt den prozentualen Mindestanteil der Fläche fest, die ein interessierender Peak aufweisen muss.

Jeder Peak, dessen Fläche in % kleiner ist als dieser prozentuale Mindestanteil, wird nicht als Peak registriert. Der Integrator weist alle Peaks zurück, deren Mindestfläche in % nach Basislinienkorrektur kleiner ist als dieser angegebene Wert.

Wenn ein Peak, der aufgrund eines niedrigen Schwellenwerts für die Fläche in % nicht integriert wird, ein aufgesetzter Peak ist, wird er mit dem Hauptpeak zusammengeführt.



Wenn die Fläche des Hauptpeaks unter dem Schwellenwert für die Fläche in % liegt, die Fläche des aufgesetzten Peaks jedoch darüber, wird der Hauptpeak beibehalten, weil sich anderenfalls die Berechnung und Basislinienkonstruktion auf einen ausgeschlossenen Peak beziehen würden.



#### Height reject

Legt die Mindesthöhe fest, die ein interessierender Peak aufweisen muss.

Jeder Peak, der diese Mindesthöhe nicht erreicht, wird nicht als Peak registriert. Der Integrator weist alle Peaks zurück, die nach Basislinienkorrektur niedriger sind als der **Height Reject**.

**Shoulders** Legt die Anfangsmethode zur Erkennung von Schultern an Peaks fest.

Wenn die Schultererkennung aktiviert ist, erkennt der Integrator Schultern an der Krümmung des Peaks, die durch die zweite Ableitung gegeben ist. Wenn die Krümmung gegen Null geht, wertet der Integrator diesen Wendepunkt als möglichen Anfang einer Schulter. Wenn der Integrator vor dem Peakmaximum einen weiteren Wendepunkt findet, wurde eine Schulter erkannt.

Sie haben die Wahl zwischen:

- Aus  
Schultern werden nicht erkannt.
- Lotfällung  
Schultern werden mit einer Lotfällung integriert.
- Tangentiale Basislinie  
Schultern werden mit einer tangentialen Basislinie integriert. Weitere Informationen zur tangentialen Anpassung finden Sie unter ["Tangentiale Anpassung"](#) auf Seite 33. Sie können bei der Verwendung einer tangentialen Basislinie zwischen unterschiedlichen Modi auswählen (siehe ["Tangentiale Anpassungsmodi"](#) auf Seite 36).

#### Peakbreite auswählen

Wählen Sie die Einstellung so, dass möglichst kein Rauschen als Peak interpretiert wird, ohne dass ein Informationsverlust auftritt.

- Zur Auswahl einer akzeptablen Anfangspeakbreite für einen einzelnen interessierenden Peak nehmen Sie die Peakbreite in Zeiteinheiten an der Basis als Ausgangspunkt.
- Zur Auswahl einer akzeptablen Anfangspeakbreite bei mehreren Peaks nehmen Sie für eine optimale Peakselektivität einen Wert, der gleich oder kleiner als die kleinste Peakbreite ist.

#### Schwellenwert für die Höhe und Peakbreite

Sowohl die **peak width** als auch der **height reject** sind für den Integrationsvorgang sehr wichtig. Sie können durch Veränderung dieser Werte unterschiedliche Ergebnisse erhalten.

- Erhöhen Sie den Schwellenwert für die Höhe und die Peakbreite, wenn Sie Hauptbestandteile in einer stark verrauschten Umgebung bestimmen müssen. Eine größere Peakbreite verbessert die Filterung des Rauschens und ein größerer Schwellenwert für die Höhe unterdrückt zufälliges Rauschen.
- Verringern Sie den Schwellenwert für die Höhe und die Peakbreite, um Spurenkomponenten zu bestimmen, deren Höhe im Bereich des Rauschens liegt. Eine Verringerung der Peakbreite vermindert die Signalfilterung, während die Verringerung des Schwellenwerts für die Höhe sicherstellt, dass kleine Peaks nicht wegen geringer Höhe zurückgewiesen werden.
- Wenn eine Analyse Peaks mit unterschiedlichen Peakbreiten enthält, stellen Sie die Peakbreite nach dem engsten Peak ein und reduzieren Sie den Schwellenwert für die Höhe so, dass die breiten Peaks nicht wegen ihrer geringeren Höhe ignoriert werden.

#### Optimierung der Integration

Es ist oftmals hilfreich, die Werte für Steigungsempfindlichkeit, Peakbreite und die Schwellenwerte für die Höhe und Fläche zu ändern, um eine benutzerdefinierte Integration durchzuführen. Die Abbildung unten zeigt, wie diese Parameter die Integration von fünf Peaks im Signal beeinflussen.

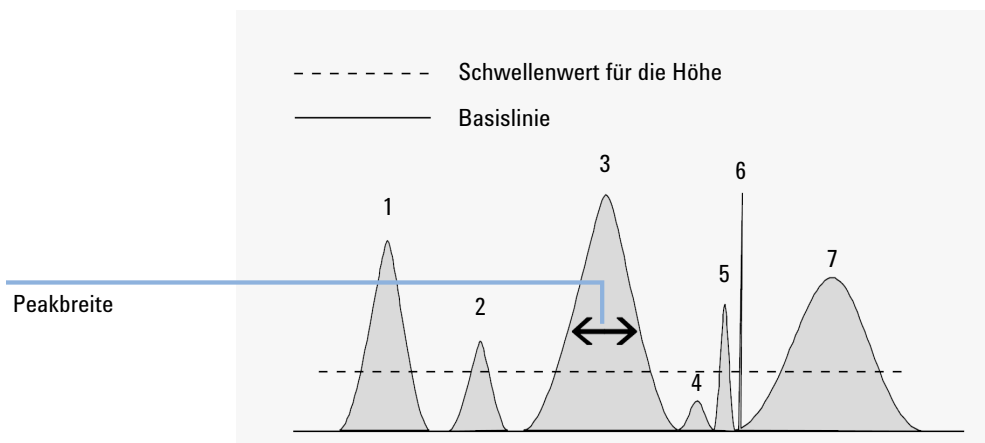


Abbildung 26 Anfangsereignisse verwenden

Ein Peak wird nur integriert, wenn die Bedingungen von allen vier Integrationsparametern erfüllt sind. Mit der Peakbreite für Peak 3, dem Schwellenwert für die Fläche und der angezeigten Steigungsempfindlichkeit werden nur die Peaks 1, 3 und 7 integriert.

- Peak 1** wird integriert, da alle vier Integrationsparameter zutreffen.
- Peak 2** wird nicht integriert, da die Fläche kleiner als der Schwellenwert für die Fläche ist.
- Peak 3** wird integriert, da alle vier Integrationsparameter zutreffen.
- Peak 4** wird nicht integriert, da die Peakhöhe kleiner als der Schwellenwert für die Höhe ist.
- Peak 5** wird nicht integriert, da die Fläche kleiner als der Schwellenwert für die Fläche ist.
- Peak 6** wird nicht integriert, da Filtereinstellung und Bündelung den Peak unsichtbar machen.
- Peak 7** wird integriert.

Tabelle 5 Schwellenwerte für die Höhe und Fläche

Integrationsparameter	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 7
Schwellenwert für die Höhe	Darüber	Darüber	Darüber	Darunter	Darüber	Darüber
Schwellenwert für die Fläche	Darüber	Darunter	Darüber	Darunter	Darunter	Darüber
Peak integriert	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein	Ja

## Zeitgesteuerte Ereignisse

ChemStation bietet einen Satz zeitgesteuerter Ereignisse zur Wahl zwischen den Integratormodi der internen Algorithmus-Basisliniendefinition und der Definition des Benutzers. Diese zeitgesteuerten Ereignisse können verwendet werden, um die Konstruktion der Basislinie mit zeitabhängigen Integrationsparametern zu optimieren, wenn die standardmäßige Konstruktion nicht ausreicht. Der Benutzer kann z.B. einen neuen Ereignistyp Flächensumme erstellen, der die Ergebnisse der standardmäßigen AreaSum nicht verändert. Diese Ereignisse können bei der Summierung von Peakflächen und zur Korrektur kurzfristiger und langfristiger Basislinienabweichungen sinnvoll sein.

### Schwellenwert für die Fläche

Siehe "Anfangsereignisse" auf Seite 45.

### Flächensumme

Legt Punkte fest (Ein/Aus), zwischen denen der Integrator die Flächen aufsummiert.

Die Retentions-/Migrationszeit eines Peaks, der durch die Flächensumme erstellt wurde, ist der Durchschnitt von Start- und Endzeit. Tritt nach dem Beginn, aber vor dem Scheitelpunkt des Peaks das Ereignis **Area sum on** auf, wird der gesamte Peak in die Summe einbezogen. Tritt das Ereignis nach dem Scheitelpunkt, aber vor dem Ende des Peaks auf, wird der Peak abgeschnitten und die Flächensumme beginnt sofort.

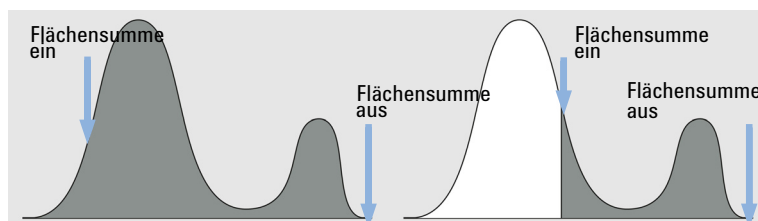


Abbildung 27 Ereignis Area sum on nach dem Scheitelpunkt, aber vor dem Ende des Peaks

Tritt nach dem Beginn, aber vor dem Scheitelpunkt des Peaks das Ereignis **Area sum off** auf, endet die Flächensumme sofort. Der Punkt des Signals, an dem das Ereignis eintritt, wird zum Talpunkt. Tritt das Ereignis **Area sum off** nach dem Scheitelpunkt des Peaks auf, wird das Ereignis nach hinten verschoben, bis das Peakende erreicht ist.

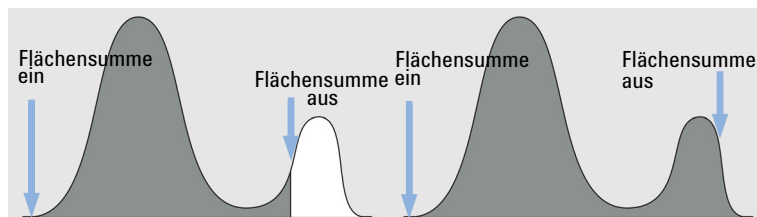


Abbildung 28 Ereignis Area sum off nach dem Beginn, aber vor dem Scheitelpunkt des Peaks

#### Summe des Flächenabschnitts

Mit diesem Ereignis können aufeinander folgende Flächensummenintervalle ohne Flächenverluste oder Verluste von Zeitintervallen festgelegt werden.

Dieses Ereignis ist ähnlich wie der Ereignistyp **Area Sum**. Mit diesem Ereignis können jedoch aufeinander folgende Flächensummenintervalle ohne Verluste von Zeitintervallen oder integrierten Peakflächen definiert werden. Ein Peak wird an dem Punkt aufgeteilt, an dem dieses Ereignis definiert ist. Die Flächensummierung startet und endet genau da, wo die Intervalle für die **Area Sum Slice** definiert sind.

Die Retentionszeit des Peaks aus der Summe des Flächenabschnitts ist die Mitte des entsprechenden Zeitintervalls. Die Retentionszeit ändert sich nicht durch Peakzuordnung oder Neukalibrierung. Sie kann nur wenig verschoben werden, da der Integrator erst mit dem Ereignis Start der Summe des Flächenabschnitts damit beginnt, Datenpunkte aufzunehmen, und mit dem Ereignis Ende der Summe des Flächenabschnitts damit aufhört. Daher kann die Retentionszeit höchstens um die Zeit zwischen zwei Datenpunkten variieren.

Verwenden Sie den Parameter **Start**, um die Startzeiten für jede Summe des Flächenabschnitts zu definieren. Die nächste Startzeit wird als Endzeit des vorhergehenden Zeitabschnitts verwendet, sodass Sie mehrere Start-Ereignisse nacheinander definieren können.

Der Parameter **Start-negA** definiert den Start der Integration eines Zeitabschnitts, in dem alle negativen Flächen (unterhalb der festgelegten Basislinie) von der Fläche des Zeitabschnitts subtrahiert werden.

Der Parameter **End** definiert das Ende des letzten Zeitabschnitts. Die Fläche des Zeitabschnitts wird ohne Berücksichtigung jeglicher Flächen unterhalb der festgelegten Basislinie berechnet. Folgt kein weiteres Ereignis Summe des Flächenabschnitts, nimmt der Integrator die reguläre Peakerkennung wieder auf.

In dem Bereich zwischen einem Ereignis **Start** und dem nächsten Ereignis **End** ist die Basislinie immer eine gerade Linie ohne Richtungsänderung dazwischen. Erst nach dem Endpunkt (mindestens 0,001 min später) können langfristige Basislinienänderungen wieder angewandt werden, indem die Ereignisse **Set Baseline**

from Range, Set Low Baseline from Range oder Use Baseline from Range verwendet werden.

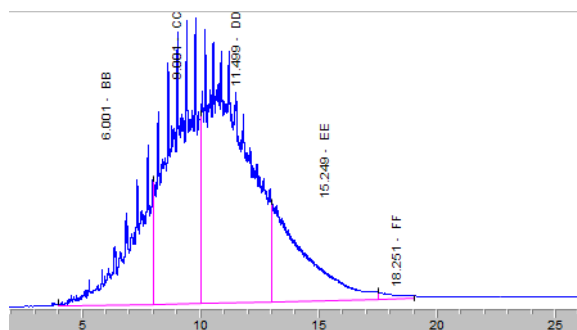


Abbildung 29 Beispiel: Summe des Flächenabschnitts

Die vorausgehende Abbildung zeigt ein Beispiel mit den folgenden zeitgesteuerten Ereignissen:

Tabelle 6 Basislinienkonstruktion

Zeit	Ereignis	Parameter
4 min	Festlegen der Basislinie eines Bereichs	±2 min
22 min	Festlegen der Basislinie eines Bereichs	±4 min

Tabelle 7 Summe des Flächenabschnitts

Zeit	Ereignis	Parameter
4 min	Summe des Flächenabschnitts	Start
8 min	Summe des Flächenabschnitts	Start
10 min	Summe des Flächenabschnitts	Start
13 min	Summe des Flächenabschnitts	Start
17,5 min	Summe des Flächenabschnitts	Start
19 min	Summe des Flächenabschnitts	Ende

#### Automatische Peakbreite

Schaltet die automatische Aktualisierung der Peakbreite für die nächsten Peaks ein. Die Funktion arbeitet mit der Peakbreite weiter, die zu diesem Zeitpunkt festgelegt ist, und mit der Peakbreitenverfolgung, die auf den zuvor gefundenen Peakbreiten basiert.

#### Basislinie bei Talpunkten

Legt Punkte fest (Ein/Aus), zwischen denen der Integrator die Basislinie in jedem Tal zwischen Peaks neu festlegt.

Die wiederholte Neufestlegung der Basislinie kann Teile von Peaks abschneiden. Solche abgeschnittenen Teile werden negative Flächen und reduzieren die berechneten Peakflächen.

Diese Funktion ist nützlich, wenn Peaks auf einem breiten, niedrigen Peak sitzen und Sie die Basislinie entlang aller Talpunkte führen möchten.

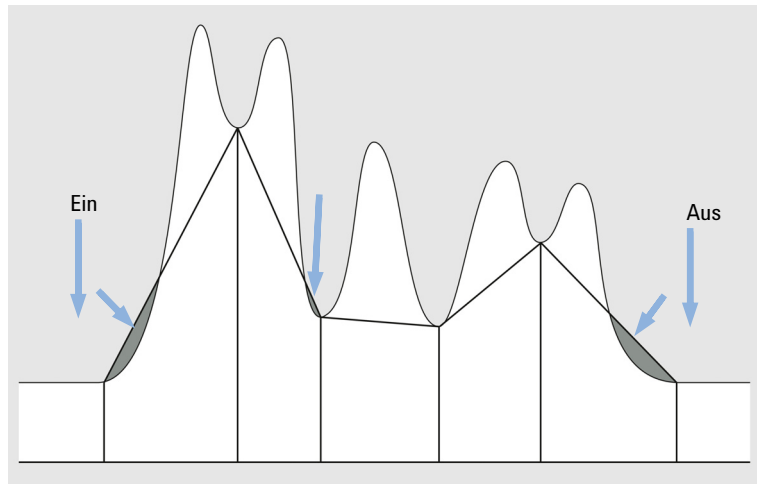


Abbildung 30 Ereignis Baseline at valleys

#### Rückwärtige Anpassung der Basislinie

Legt einen Punkt fest, an dem der Standard-Integrator die Basislinie vom festgelegten Basislinienpunkt zu diesem Punkt horizontal nach hinten weiterführt.

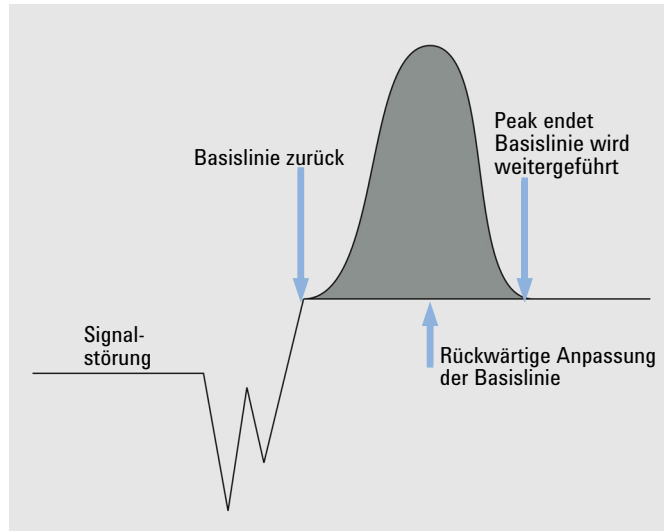


Abbildung 31 Ereignis **Baseline backwards**

#### Basislinie halten

Zwischen dem Einschalten des Ereignis „Basislinie halten“ und dem Ausschalten des Ereignis „Basislinie halten“ wird eine horizontale Basislinie auf der Höhe der festgelegten Basislinie gezeichnet.

#### Basislinie beim nächsten Tal

Legt einen Punkt fest, an dem der Integrator die Basislinie im nächsten Tal zwischen Peaks neu festlegt und diese Funktion dann automatisch aufhebt.

Diese Funktion ist in Gruppen von überlappenden Peaks nützlich, von denen Sie annehmen, dass sie auf anderen Peaks sitzen, oder die in getrennten Gruppen dicht aufeinander folgen. Die Funktion bleibt bei der Flächensummierung unberücksichtigt.

#### Basislinie jetzt

Legt einen Punkt (Zeit-) fest, an welchem der Integrator die Basislinie auf die aktuelle Höhe des Datenpunkts neu einstellt, wenn das Signal auf einem Peak ist.

#### Schultern erkennen

Legt Punkte fest (Ein/Aus), zwischen denen der Integrator die Schultererkennung startet und stoppt.

Ist das Signal auf der Basislinie, bleibt die Funktion unberücksichtigt und die erkannte Basislinie wird verwendet.

Schultern werden entsprechend dem festgelegten Schultermodus erkannt. Siehe „Anfangsereignisse“ auf Seite 45.

## Integration

### Integrationsereignisse

**Feste Peakbreite** Legt die Peakbreite fest und schaltet die automatische Aktualisierung der Peakbreite für die nächsten Peaks aus. Für eine optimale Leistung legen Sie die Peakbreite so fest, dass sie etwa der tatsächlichen Breite in halber Höhe der Peaks entspricht.

**Schwellenwert für die Höhe** Siehe "Anfangsereignisse" auf Seite 45.

**Integration** Legt Punkte fest (Ein/Aus), zwischen denen der Integrator die Integration stoppt und startet.

Peaks zwischen den Zeitpunkten, an denen der Integrator aus- und wieder eingeschaltet wird, bleiben unberücksichtigt.

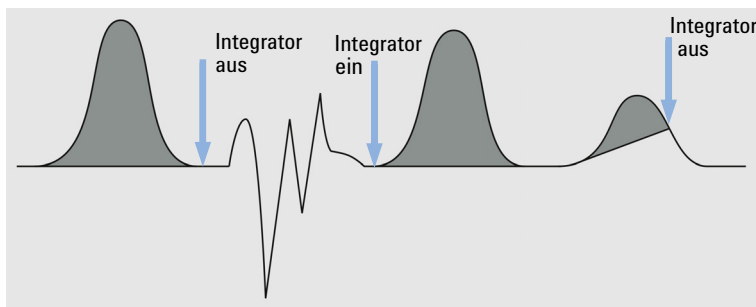


Abbildung 32 Ereignis Integration

Die Basislinie wird vom letzten definierten Punkt aus gezogen, einschließlich Anpassungen für Unterschneidung. Alle anderen Integratorfunktionen sowie die festgelegten Änderungen der Peakbreite, des Schwellenwerts und des Schwellenwerts für die Fläche bleiben unberücksichtigt, wenn der Integrator ausgeschaltet ist. An den Punkten, an denen die Funktion **On-** und **Off**geschaltet wird, wird die Basislinie neu festgelegt.

Wird für den Integrator ein Neustart festgelegt, wird beim aktuellen Signalniveau ein neuer Basislinienpunkt erstellt.

Diese Funktion ist nützlich, um Teile des Chromatogramms/Elektropherogramms unberücksichtigt zu lassen oder Basislinienstörungen zu beseitigen.

#### Maximale Fläche

Legt die größte Fläche fest, die ein interessierender Peak aufweisen darf.

Jeder Peak, dessen Fläche größer ist als diese maximale Fläche, wird nicht als Peak registriert: Der Integrator weist alle Peaks zurück, die nach Basislinienkorrektur größer sind als der für die maximale Fläche angegebene Wert.

Sie können dieses Ereignis beispielsweise dazu verwenden, einen Lösemittelpeak eines Gaschromatogramms von den Integrationsergebnissen auszuschließen, die darauf sitzenden Peaks jedoch zu berücksichtigen.

#### Maximale Höhe

Legt die größte Höhe fest, die ein interessierender Peak aufweisen darf.

Jeder Peak, dessen Höhe größer ist als diese maximale Höhe, wird nicht als Peak registriert: Der Integrator weist alle Peaks zurück, die nach Basislinienkorrektur größer sind als der für die maximale Höhe angegebene Wert.

Sie können dieses Ereignis beispielsweise dazu verwenden, einen Lösemittelpeak eines Gaschromatogramms von den Integrationsergebnissen auszuschließen, die darauf sitzenden Peaks jedoch zu berücksichtigen.

#### Negativer Peak

Legt Punkte fest (Ein/Aus), zwischen denen der Integrator negative Peaks erkennt.

Werden negative Peaks erkannt, legt der Integrator die Basislinie nach einer Unterschreitung nicht länger neu fest. Ab diesem Zeitpunkt wird eine Unterschreitung der Basislinie mit der festgelegten Basislinie als Nullwert integriert. Flächen werden relativ zu dieser Basislinie konstruiert und es wird deren absoluter Wert angegeben.

Die Funktion Negativer Peak kann nur zuverlässig verwendet werden, wenn die Basisliniendrift im Vergleich zur Peakgröße klein ist, da die Basislinie vom festgelegten Basislinienpunkt am Anfang der Peakgruppe bis zum festgelegten Basislinienpunkt am Peakende konstruiert ist.

#### HINWEIS

Die Funktion Flächenaddition ist automatisch deaktiviert, wenn das Ereignis **Negative Peaks On** aktiviert ist.

Die tangentielle Anpassung ist während der Erkennung negativer Peaks ebenfalls deaktiviert. Die Peaks werden durch das Füllen des Lots voneinander getrennt.

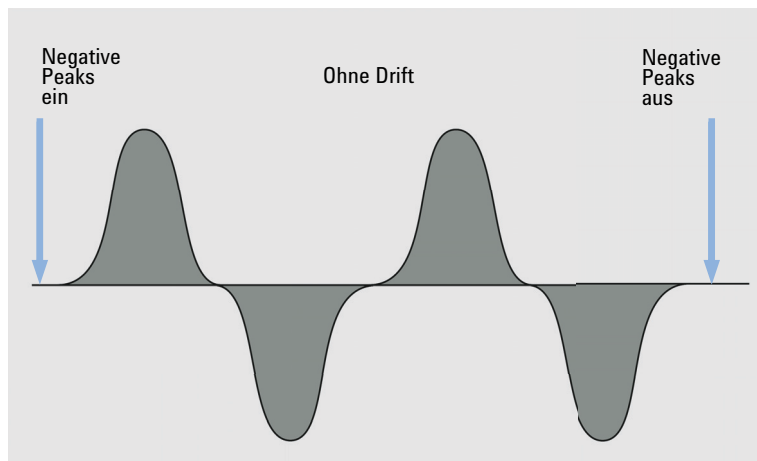


Abbildung 33 Ereignis Negative peak

#### Set Baseline from Range (Festlegen der Basislinie eines Bereichs)

Verwendet einen Bereich von Datenpunkten zur Berechnung eines statistisch wichtigen Basislinienpunktes im Mittelpunkt des Zeitbereichs.

Der Wert, den Sie eingeben, ist das Zeitintervall um einen definierten Zeitpunkt. Er definiert den zu verwendenden Bereich zur Bestimmung des Basislinienpunktes. Weitere Einzelheiten zu statistischen Berechnungen der Basislinie finden Sie unter "Basislinienkorrekturmodi" auf Seite 30.

Setzen Sie den Wert = 0, wird der nächstgelegene Datenpunkt des Chromatogramms als Basislinienpunkt verwendet. Es werden keine statistischen Parameter berechnet. Legen Sie einen negativen Wert fest, bewirkt die Einstellung das Gleiche wie die Einstellung **Use baseline from range=Clear**. Sie bewirkt, dass keine statistischen Algorithmen auf die Basislinie angewandt werden.

Sie können einen beliebigen Bereich des Chromatogramms für die Berechnung der Basislinie festlegen. Idealerweise ist dies ein Bereich, der keinen chemischen Hintergrund, sondern nur Rauschen enthält. [Abbildung 34](#) auf Seite 58 veranschaulicht die Einstellung des Intervalls des Basislinienbereichs, das als grauschattierter Bereich dargestellt wird.

Wenn Sie für **Set Baseline from Range** zwei Punkte festlegen (beispielsweise am Anfang und am Ende eines Chromatogramms), wird die Basislinie zwischen den beiden Punkten mit einer geraden Linie verbunden.

## Integration

### Integrationsereignisse

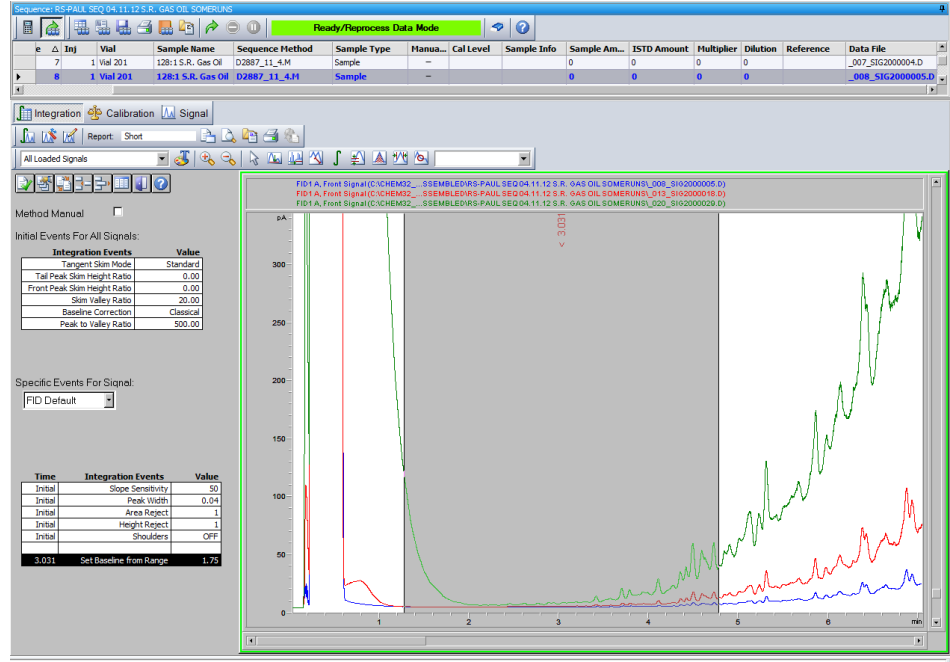


Abbildung 34 „Set Baseline from Range“ (Festlegen der Basislinie eines Bereichs): Das Intervall des Baselinienbereichs wird durch eine Grauschattierung dargestellt

#### Set Low Baseline from Range (Festlegen der niedrigen Basislinie eines Bereichs)

Ähnlich wie die Funktion **Set Baseline from Range**, verwendet aber den niedrigsten wahrscheinlichen Basislinienpunkt, der 30 % mehr Datenpunkte des Rauschens über ihm zulässt. Auf diese Weise wird die Basislinienunterschreitung minimiert.

Der Wert, den Sie eingeben, ist das Zeitintervall um die definierte Zeit des Ereignisses. Er definiert den zu verwendenden Bereich zur Bestimmung des Basislinienpunkts. Weitere Einzelheiten zu statistischen Berechnungen der Basislinie finden Sie unter **“Basislinienkorrekturmodi”** auf Seite 30.

Setzen Sie den Wert = 0, wird der nächstgelegene Datenpunkt des Chromatogramms als Basislinienpunkt verwendet. Es werden keine statistischen Parameter berechnet. Legen Sie einen negativen Wert fest, bewirkt die Einstellung das Gleiche wie die Einstellung **Use baseline from range=Clear**. Sie bewirkt, dass keine statistischen Algorithmen auf die Basislinie angewandt werden.

Sie können einen beliebigen Zeitpunkt oder ein beliebiges Zeitintervall des Chromatogramms für die Berechnung der Basislinie festlegen. Idealerweise sollte es keinen chemischen Hintergrund, sondern nur Rauschen enthalten.

Wenn Sie für **Set Baseline from Range** zwei Punkte festlegen (beispielsweise am Anfang und am Ende eines Chromatogramms), wird die Basislinie zwischen den beiden Punkten mit einer geraden Linie verbunden.

Verwenden Sie **Set Low Baseline from Range** anstelle von **Set Baseline from Range**, wenn der Bereich des Chromatogramms, der für die Berechnung verwendet wird, übermäßig viel chemisches oder elektronisches Rauschen enthält.

#### Schultern

Siehe **“Anfangsereignisse”** auf Seite 45.

#### Steigungsempfindlichkeit

Siehe **“Anfangsereignisse”** auf Seite 45.

#### Lösemittelpeak

Peaks mit einer größeren als der definierten Steigung in mV/s werden als Lösemittelpeaks erkannt, die bei der Analog-zu-digital-Umwandlung nicht berücksichtigt werden.

Für Peaks auf der Rückseite wird automatisch die tangentielle Anpassung angewandt. Sie müssen kein Ereignis Tangentiale Anpassung festlegen.

Ist die Erkennung eines Lösemittelpeaks deaktiviert, werden von dem Peak auf der Rückseite Lote gefällt und nicht Tangenten gezogen.

**Peak teilen** Definiert einen Punkt, an dem ein Peak durch Lotfällung abgetrennt wird.

**HINWEIS**

Die Funktion **Split Peak** kann nicht verwendet werden, während die Funktion **Area Sum** aktiviert ist. Um einen Peak zu teilen, während die Funktion **Area Sum** aktiviert ist, verwenden Sie das Ereignis Manuelle Integration.

Angepasste Peaks können nicht mit dem Ereignis **Split Peak** geteilt werden.

**Tangentiale  
Anpassung auf  
der Rückseite**

Definiert, wo die tangentielle Anpassung beginnt oder endet.

**On**

Definiert einen Punkt, an dem der Integrator eine tangentielle Anpassung für die Rückseite des nächsten Peaks festlegt. Alle Peaks oberhalb der Tangente werden bis zur neu festgelegten Basislinie integriert. Die Tangente wird vom Tal vor dem kleinen Peak bis zu dem Punkt gezogen, an dem der Gradient des Detektorsignals gleich dem Gradienten der Tangente ist. Der Zeitpunkt für das Ereignis Tangentielle Anpassung kann zu einem beliebigen Zeitpunkt während des Peaks eingegeben werden. Dies kennzeichnet den Peak auch als Lösemittelpeak.

**Off**

Beendet die tangentielle Anpassung nach dem Abschluss des aktuellen Peaks oder, wenn im gekennzeichneten Intervall keine Peaks gefunden werden (und ein Lösemittel wird in der nächsten Gruppe nicht zwingend als solches gekennzeichnet).

**Tangentiale  
Anpassungs-  
modus**

Folgende Modelle zur Berechnung der entsprechenden Peakflächen stehen zur Verfügung:

- Exponentielle Anpassung (siehe [Abbildung 18](#) auf Seite 37)
- Neue exponentielle Anpassung (siehe [Abbildung 19](#) auf Seite 38)
- Gerade (siehe [Abbildung 20](#) auf Seite 39)
- Standard (siehe ["Standard-Skimming"](#) auf Seite 39)

#### Nicht zugeordnete Peaks

Einige Basislinienführungen ergeben kleine Flächen zwischen der Basislinie und dem Signal, die jedoch keinem bekannten Peak zugeordnet werden können. Solche Flächen werden normalerweise weder gemessen noch im Report aufgeführt. Wenn die Funktion aktiviert ist, werden diese Flächen gemessen und im Report als „Unassigned Peaks“ (Nicht zugeordnete Peaks) aufgeführt. Als Retentions-/Migrationszeit solcher Flächen wird die Mitte zwischen Anfang und Ende der Fläche angegeben.

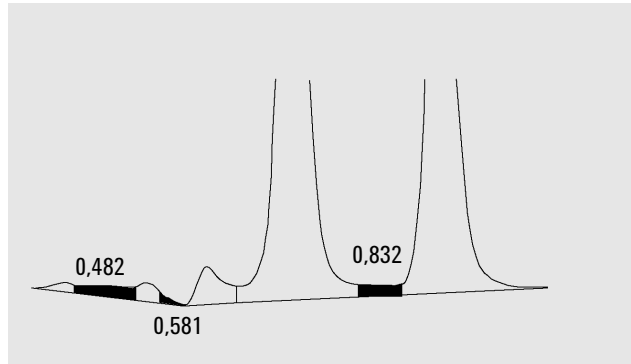


Abbildung 35 Nicht zugeordnete Peaks

#### Peakhöhe aktualisieren

Dieses Ereignis zwingt den Integrator, die absolute Höhe des höchsten Datenpunktes als Peakhöhe zu verwenden. Ohne dieses Ereignis wird das Maximum einer interpolierten Kurve verwendet. Das Ereignis **Update peak height** ist besonders hilfreich bei Signalen mit sehr steilen und eckigen Peaks oder mit Peaks mit vorausgehendem Abfall der Basislinie. Solche Peaks sind für MSD-Signale typisch.

Die Startzeit des Ereignisses **Update peak height** wird nicht ausgewertet. Das Ereignis betrifft immer das ganze Chromatogramm.

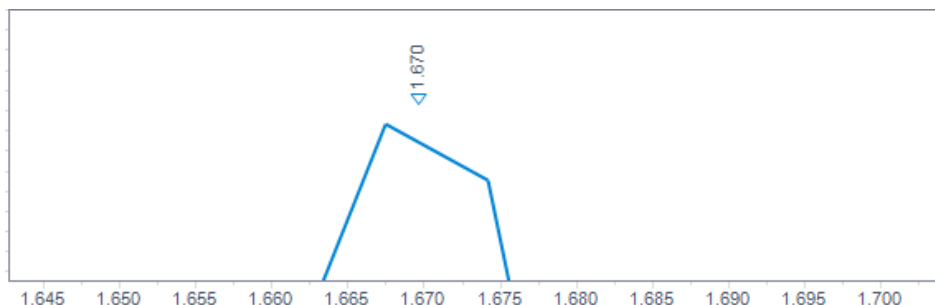


Abbildung 36 Standard-Integration

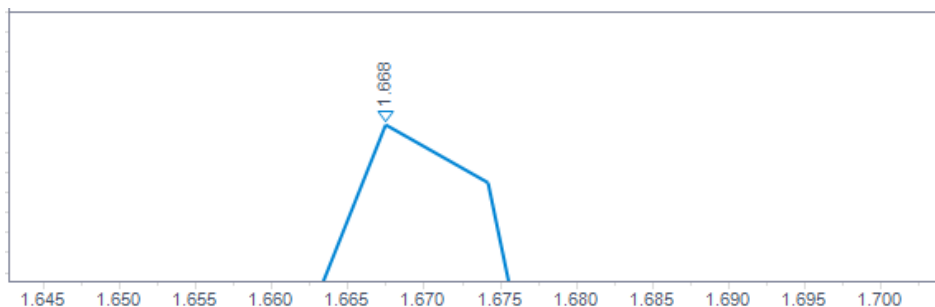


Abbildung 37 Integration mit dem Ereignis Peakhöhe aktualisieren

#### Use Baseline from Range (Basislinie eines Bereichs verwenden)

Hiermit kann der Basislinienwert auf eine spätere oder frühere Zeit projiziert werden, um Basislinienunterschreitungen zu minimieren.

Wird der Wert für **Set Baseline from Range** oder **Set Low Baseline from Range** in einem Bereich ohne chromatographische Peaks berechnet, kann es von Vorteil sein, die berechnete Basislinie auf den Zeitpunkt zu projizieren, direkt bevor der erste interessierende Peak eluiert (oder auf den Zeitpunkt, direkt nachdem der letzte interessierende Peak eluiert ist). Mit dem Ereignis **Use Baseline from Range** können bis zu drei solcher Projektionen in jede Richtung durchgeführt werden.

Die Verwendung dieses Ereignisses ist vorteilhaft, wenn Sie eine ansteigende oder abfallende Basislinie konstruiert haben, da andernfalls die gerade Basislinie unabsichtlich die chromatographische Kurve durchschneiden würde. Der Parameter liefert dem Integrator die Information, von welchem der Basislinienbereiche der Basislinienpunkt gewählt werden und zu welchem Basislinienpunkt im gegebenen Zeitintervall die Basislinie projiziert werden soll.

Es können folgende Parameter verwendet werden:

- **Clear:** Deaktiviert das neue Basislinienverhalten und kehrt von diesem Punkt ab zum herkömmlichen Algorithmus zurück.
- **Left:** Verwendet den Basislinienwert des Basislinienbereichs, der von diesem Zeitpunkt aus links am nächsten liegt.
- **Right:** Verwendet den Basislinienwert des Basislinienbereichs, der von diesem Zeitpunkt aus rechts am nächsten liegt.
- **Range 1–Range 9:** Verwendet den Basislinienwert des gegebenen Basislinienbereichs. Die Basislinienbereiche werden vom Anfang des Chromatogramms aus gezählt.

Ein Beispiel finden Sie auch unter **Area Sum Slice** (Abbildung 29 auf Seite 52).

## Automatische Integration

Die Funktion **Autointegrate** liefert die Anfangswerte für die Anfangsereignisse. Dies ist besonders hilfreich bei der Einführung neuer Methoden. Sie beginnen mit einer Standardtabelle für Integrationsereignisse, die keine zeitgesteuerten Ereignisse enthält. Anschließend können Sie dann mit den von der Funktion zur automatischen Integration vorgeschlagenen allgemeinen Einstellungen weiter optimieren.

### Funktionsprinzip

Die Funktion **Autointegrate** liest die Chromatogrammdaten und berechnet für jedes Signal im Chromatogramm die optimalen Werte für die anfänglichen Integrationsparameter.

Der Algorithmus untersucht 1 % am Anfang und Ende des Chromatogramms und bestimmt das Rauschen und die Steigung für diese Abschnitte. Das Rauschen wird als die 3-fache Standardabweichung der linearen Regression dividiert durch die Wurzel des Prozentanteils bei der Regression der verwendeten Datenpunkte bestimmt. Diese Werte werden für die Zuordnung geeigneter Werte für den Schwellenwert der Höhe und die Steigungsempfindlichkeit verwendet. Der Algo-

## Integration

### Integrationsereignisse

rithmus ordnet dann der Peakbreite einen vorläufigen Wert zu, der abhängig von der Chromatogrammlänge 0,5 % bei LC und 0,3 % bis 0,2 % bei GC beträgt. Der anfängliche Schwellenwert für die Fläche wird auf null gesetzt, und es wird eine Testintegration gestartet. Dieser Test wird bei Bedarf unter Anpassung der Werte mehrere Male wiederholt, bis schließlich 5 Peaks erkannt werden oder eine Integration mit einem anfänglichen Schwellenwert für die Höhe von 0 gestartet wird. Die Testintegration wird beendet, wenn nach 10 Versuchen die obigen Bedingungen erfüllt sind.

Die Ergebnisse der Integration werden geprüft und die Peakbreite wird entsprechend den Peakbreiten der gefundenen Peaks angepasst, wobei die Anfangspeaks bevorzugt werden. Die Peaksymmetrie der ermittelten Peaks wird verwendet, um nur die Peaks mit einer Symmetrie zwischen 0,8 und 1,3 in die Peakbreitenberechnung aufzunehmen. Wenn nicht ausreichend symmetrische Peaks gefunden werden, wird dieser Grenzwert auf  $\text{minSymmetry}/1,5$  und  $\text{maxSymmetry} \times 1,5$  gelockert. Anschließend wird die Basislinie zwischen den Peaks untersucht, um die vorherigen Werte für den Schwellenwert für die Höhe und die Steigungsempfindlichkeit zu verbessern. Der Schwellenwert für die Fläche wird auf 90 % der kleinsten Fläche des bei der Testintegration gefundenen symmetrischsten Peaks eingestellt.

Das Chromatogramm wird dann mit diesen abschließenden Werten für die Integrationsparameter erneut integriert und die Ergebnisse der Integration werden gespeichert.

#### Parameter für die automatische Integration

Die folgenden Parameter werden durch die Funktion zur automatischen Integration festgelegt:

- Anfangssteigungsempfindlichkeit
- Anfangshöhe
- Anfangspeakbreite
- Anfänglicher Schwellenwert für die Fläche

## Manuelle Integration

Dieser Integrationstyp ermöglicht die Integration ausgewählter Peaks oder Peakgruppen. Mit Ausnahme des anfänglichen Schwellenwerts für die Fläche werden im angegebenen Bereich der manuellen Integration die Software-Werte für Integrationsereignisse ignoriert. Wenn ein oder mehrere Peaks nach der manuellen Integration unterhalb des Schwellenwerts für die Fläche liegen, werden sie übergangen. Für die manuellen Integrationsereignisse werden absolute Zeitangaben verwendet. Sie kompensieren keine Signaldrift.

Die **Manual Integration** ermöglicht Ihnen die Definition von Peakstart und Peakende und die Einbeziehung der damit ermittelten Peakflächen in die Quantifizierung und Reportausgabe. Jeder dieser Punkte wird in Reports mit dem Peak-Trenncode M markiert.

Für die manuelle Integration stehen folgende Optionen zur Verfügung:

- Draw Baseline** Es wird festgelegt, wo die Basislinie für einen Peak oder eine Peakgruppe verläuft. Mit dem Menüelement **Integration >all valleys** können Sie außerdem angeben, ob die Peaks in dem gegebenen Bereich automatisch bei allen Talpunkten getrennt werden sollen.
- Negative Peaks** Es wird festgelegt, wann Flächen unterhalb der Basislinie als negative Peaks behandelt werden sollen. Sie können außerdem angeben, ob die Peaks in dem gegebenen Bereich automatisch bei allen Talpunkten getrennt werden sollen.
- Tangent Skim** Es werden die Flächen von Peaks bestimmt, indem sie durch tangenciales Skimming von der Flanke eines Hauptpeaks abgetrennt werden. Die Fläche des tangential abgetrennten Peaks wird von der Fläche des Hauptpeaks subtrahiert.
- Split Peak** Angabe des Punktes, an dem ein Peak durch Lotfällung abgetrennt wird.
- Delete Peak(s)** Löscht einen oder mehrere Peaks aus den Integrationsergebnissen.

### Peak-Trenncodes für manuell integrierte Peaks

Manuell integrierte Peaks werden im Integrationsreport mit dem Peakcode *MM* gekennzeichnet.

Falls vor dem manuell integrierten Peak ein Peak vorhanden ist, dessen Ende durch die manuelle Integration verändert wird, trägt er den Code *F* (für „forced“ = erzwungen). Wenn Talpunkte erkannt werden, werden sie auf den Code *V* (für „Valley“ = Tal) gesetzt.

Ein Lösungsmittel-auf-Hauptpeak, der durch manuelle Integration beeinflusst wurde, zum Beispiel durch tangentielle Anpassung, trägt den Code *R* (für „re-calculated solvent“ = neu berechneter Lösungsmittelpeak).

## Dokumentation manueller Integrationsereignisse

Manuelle Integrationsereignisse, z. B. eine manuell eingezeichnete Basislinie, sind noch datendatei- und signal-spezifischer als zeitgesteuerte Integrationsereignisse. Bei komplizierten Chromatogrammen ist es äußerst wünschenswert, diese Ereignisse für eine erneute Verarbeitung verwenden zu können. Daher können manuelle Integrationsereignisse direkt pro Signal in der Datendatei gespeichert werden statt zusammen mit der Methode.

Bei jeder Überprüfung oder erneuten Verarbeitung der Datendatei werden automatisch diese manuellen Ereignisse aus der Datendatei angewendet. Wenn für einen Analysenlauf manuelle Integrationsereignisse verwendet werden, wird dies in der entsprechenden Spalte der **Navigation Table** gekennzeichnet.

Zusätzlich zu den Funktionen zur manuellen Basislinienerstellung und zum Löschen von Peaks bietet die Benutzeroberfläche drei weitere Funktionen zum

- Speichern manueller Ereignisse des aktuellen Chromatogramms in der Datendatei,
- Entfernen aller Ereignisse aus dem aktuellen Chromatogramm,
- Widerrufen der letzten manuellen Integrationsereignisse (möglich bis zur Speicherung des Ereignisses).

Gehen Sie bei der weiteren Überprüfung zur nächsten Datendatei in der **Navigation Table** über, prüft die ChemStation auf ungesicherte manuelle Integrationsereignisse und fragt, ob der Benutzer diese Ereignisse sichern möchte.

Die manuellen Ereignisse, die bei der Überprüfung mittels der **Navigation Table** in der Datendatei gespeichert wurden, beeinflussen nicht die manuellen Integrationsereignisse, die während der Überprüfung im **Batch**-Modus gespeichert wurden. Diese beiden Verfahren zur Überprüfung sind bezüglich der manuellen Ereignisse der Datendatei vollständig getrennt.

In den ChemStation Versionen vor B.04.01 wurden die manuellen Integrationsereignisse in den Methoden und nicht in den jeweiligen Datendateien gespeichert. Dieser Arbeitsablauf kann weiterhin angewandt werden. Im Menü **Integration** in der Ansicht **Data Analysis** befinden sich zur Bearbeitung der manuellen Integrationsereignisse in der Methode folgende Funktionen:

- **Update Manual Events of Method:** Speichern der neu erstellten manuellen Ereignisse in der Methode.
- **Apply Manual Events from Method:** Anwendung der aktuell gespeicherten manuellen Ereignisse aus der Methode auf die geladene Datendatei.
- **Remove Manual Events from Method:** Löschen der manuellen Ereignisse in der Methode.

Um die in einer Methode gespeicherten manuellen Ereignisse stattdessen in der Datendatei zu speichern, müssen die Ereignisse aus der Methode angewendet und die Ergebnisse in der Datendatei gespeichert werden. Falls gewünscht, können dann die Ereignisse in der Methode gelöscht werden.

Falls das Kontrollkästchen **Manual Events** in der **Integration Events Table** einer Methode markiert ist, werden die manuellen Ereignisse der Methode immer angewendet, wenn eine Datendatei mit dieser Methode geladen wird. Wenn die Datendatei zusätzliche manuelle Ereignisse enthält, werden diese nach den Ereignissen aus der Methode angewendet. Wenn das Kontrollkästchen **Manual Events** markiert ist, werden die Benutzer nicht zur Speicherung der Ereignisse in der Datendatei aufgefordert.

Um die in einer Methode gespeicherten manuellen Ereignisse stattdessen in der Datendatei zu speichern, müssen die Ereignisse aus der Methode angewendet und die Ergebnisse in der Datendatei gespeichert werden. Sie können die Ereignisse nun aus der Methode löschen.

Falls das Kontrollkästchen **Manual Events** in der **Integration Events Table** einer Methode markiert ist, werden die manuellen Ereignisse der Methode immer angewendet, wenn eine Datendatei mit dieser Methode geladen wird. Wenn die Datendatei zusätzliche manuelle Ereignisse enthält, werden diese nach den Ereignissen aus der Methode angewendet. Wenn das Kontrollkästchen **Manual Events** markiert ist, werden die Benutzer nicht zur Speicherung der Ereignisse in der Datendatei aufgefordert.

## 2 Peakidentifizierung

Was ist eine Peakidentifizierung?	69
Regeln zur Peakübereinstimmung	70
Methoden der Peakidentifizierung	71
Absolute Retentions-/Migrationszeit	71
Relative Retentionszeit	71
Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten	71
Peak-Qualifier	71
Mengenbegrenzungen	72
Absolute Retentions-/Migrationszeit	73
Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten	75
Einzelne Referenzpeaks	75
Mehrere Referenzpeaks	76
Peak-Qualifier	77
Signalkorrelation	78
Überprüfung der Qualifier	78
Berechnung des Qualifier-Verhältnisses	78
Identifizierungsprozess	79
Erkennen des Referenzpeaks	79
Erkennen der ISTD-Peaks	80
Erkennen aller verbleibenden kalibrierten Peaks	80
Klassifizierung nicht identifizierter Peaks	80

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte der Peakidentifizierung.

## Was ist eine Peakidentifizierung?

Die Peakidentifizierung ist die Identifizierung von Substanzen in einer unbekannt-ten Probe aufgrund ihrer chromatographischen/elektropherographischen Eigen-schaften durch die Analyse einer bekannten Kalibrierprobe.

Die Identifizierung von Substanzen ist die Voraussetzung zur Quantifizierung, wenn diese erforderlich ist. Das Signalverhalten jeder untersuchten Substanz wird in der Kalibriertabelle der Methode gespeichert.

Die Peakidentifizierung erfolgt durch Vergleich jedes Peaks im Signal mit den Peaks in der Kalibriertabelle.

Die Kalibriertabelle enthält die erwarteten Retentions-/Migrationszeiten der unter-suchten Substanzen. Ein Peak, der mit der Retentions-/Migrationszeit eines Peaks in der Kalibriertabelle übereinstimmt, erhält die Attribute dieser Substanz, z. B. Name und Responsefaktor. Peaks ohne Übereinstimmung mit einem Peak der Kalibriertabelle werden als unbekannt eingestuft. Dieser Vorgang wird durch folgende Elemente gesteuert:

- Retentions-/Migrationszeiten für Peaks in der Kalibriertabelle, die als Zeitrefe-renzpeaks angegeben sind.
- Retentions-/Migrationszeitfenster für Referenzpeaks.
- Retentions-/Migrationszeiten für kalibrierte Peaks der Kalibriertabelle, die keine Zeitreferenzpeaks sind
- Retentions-/Migrationszeitfenster für diese Nicht-Referenzpeaks.
- Vorhandensein weiterer qualifizierender Peaks mit den richtigen Verhältnis-sen.

## Regeln zur Peakübereinstimmung

Folgende Regeln werden zur Feststellung einer Übereinstimmung zwischen Peaks angewandt:

- Wenn ein Probenpeak innerhalb des vorgegebenen Zeitfensters (Peak Matching Window) eines Peaks der Kalibriertabelle liegt, werden diesem die Attribute der Substanz der Kalibriertabelle zugeordnet.
- Wenn mehrere Probenpeaks in das entsprechende Zeitfenster fallen, wird der Peak mit der geringsten Abweichung von der vorgegebenen Retentions-/Migrationszeit als diese Substanz identifiziert.
- Wenn ein Peak als Zeitreferenz oder interner Standard dient, wird der größte Peak im Zeitfenster als diese Substanz identifiziert.
- Wenn Peak-Qualifier verwendet werden, wird das Peakverhältnis in Kombination mit dem vorgegebenen Zeitfenster zur Identifizierung der Substanz benutzt.
- Wenn der Peak ein Peak-Qualifier ist, wird der gemessene Peak identifiziert, der dem Hauptpeak der Substanz am nächsten ist.
- Wenn ein Probenpeak nicht in eines der vorgegebenen Zeitfenster fällt, wird er als unbekannte Substanz aufgelistet.

## Methoden der Peakidentifizierung

Eine Übereinstimmung von Probenpeaks mit den Peaks in der Kalibriertabelle der ChemStation-Software kann anhand verschiedener Methoden festgestellt werden.

### **Absolute Retentions-/Migrationszeit**

Die Retentions-/Migrationszeit des Probenpeaks wird mit den erwarteten Retentions-/Migrationszeiten für jede Substanz in der Kalibriertabelle verglichen.

### **Relative Retentionszeit**

Das System berechnet die Relative Retentionszeit (EP) und die Relative Retentionszeit (USP) als  $(R_r = t_2/t_1)$  sowohl für kalibrierte Peaks als auch für nicht kalibrierte Peaks.

### **Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten**

Die erwarteten Retentions-/Migrationszeiten der Substanzpeaks werden mit den aktuellen Retentions-/Migrationszeiten eines oder mehrerer Referenzpeaks korrigiert. Der Vergleich erfolgt dann mit diesen korrigierten (relativen) Retentions-/Migrationszeiten. Der bzw. die Referenzpeaks müssen in der Kalibriertabelle enthalten sein.

### **Peak-Qualifier**

Zusätzlich zur Peakidentifizierung mittels Retentions-/Migrationszeiten können Peak-Qualifier zur Erzielung genauerer Ergebnisse verwendet werden. Wenn mehr als ein Peak im Retentions-/Migrationszeitfenster liegt, sollte die richtige Substanz über Qualifier ermittelt werden.

## Mengenbegrenzungen

Die im Dialogfeld Verbindungsdetails angegebenen Mengenbegrenzungen werden verwendet, um die Peakerkennung zu qualifizieren. Wenn die Menge der identifizierten Verbindung innerhalb der Mengenbegrenzungen liegt, wird die Peakerkennung im Report angegeben (nur klassische Reporterstellung, nicht intelligente Reporterstellung).

## Absolute Retentions-/Migrationszeit

Zur Feststellung einer Peakübereinstimmung wird ein Retentions-/Migrationszeitfenster verwendet. Dieses Zeitfenster wird um die erwartete Retentions-/Migrationszeit für einen erwarteten Peak zentriert. Jeder Probenpeak, der innerhalb dieses Fensters liegt, wird als Kandidat für die Identifizierung der entsprechenden Substanz betrachtet.

Abbildung 38 auf Seite 73 zeigt ein Retentions- bzw. Migrationszeitfenster für Peak 2 zwischen 1,809 und 2,631 Minuten, die erwartete Retentions-/Migrationszeit beträgt 2,22 Minuten. Für Peak 2 gibt es zwei Möglichkeiten: bei 1,85 Minuten sowie bei 2,33 Minuten. Wenn der erwartete Peak kein Referenzpeak ist, wird der Peak gewählt, der am nächsten an der Retentions-/Migrationszeit von 2,22 Minuten liegt.

Wenn der erwartete Peak ein Zeitreferenzpeak oder ein interner Standard ist, wird der größte Peak im Fenster gewählt.

In beiden Fällen wählt die ChemStation den Peak bei 2,33 Minuten. Wenn die Peaks gleich groß wären, würde der Peak, der dem Mittelpunkt des Zeitfensters am nächsten liegt, gewählt.

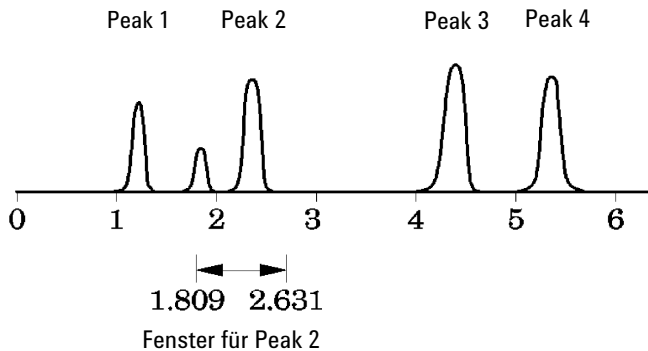


Abbildung 38 Retentions-/Migrationszeitfenster

## Peakidentifizierung

### Absolute Retentions-/Migrationszeit

Zum Auffinden von Peaks werden drei Zeitfenstertypen benutzt:

- Zeitfenster für Referenzpeaks, die nur auf Referenzpeaks angewendet werden,
- Zeitfenster für Nicht-Referenzpeaks, die auf alle anderen kalibrierten Peaks angewendet werden,
- spezielle Zeitfenster mit Werten für einzelne Substanzen, die im Dialogfeld **Compound Details** festgelegt werden.

Die Standardwerte für diese Zeitfenster werden im Dialogfeld „Calibration Settings“ (Kalibrierungseinstellungen) eingegeben. Der Zeitraum vor und nach der Retentions-/Migrationszeit, der die Breite des Fensters für die Peakübereinstimmung definiert, ist die Summe aus absolutem und prozentuell angepasstem Zeitfenster.

Ein Fenster von 5 % bedeutet, dass die Retentions- bzw. Migrationszeit eines Peaks innerhalb eines Bereichs von plus/minus 2,5 % der kalibrierten Retentions-/Migrationszeit des Peaks liegen muss. Beispielsweise muss ein Peak mit einer Retentions-/Migrationszeit von 2,00 Minuten im Kalibrierungslauf in den nachfolgenden Analysen nach Ablauf von 1,95 bis 2,05 Minuten erscheinen.

Ein Fenster mit der Absolutbreite von 0,20 Minuten und einer relativen Anpassung von 10 % ergibt also ein Retentions-/Migrationszeitfenster zwischen 1,80 und 2,20 Minuten.

$1,80 \text{ min} = 2,00 \text{ min} - 0,10 \text{ min} (0,20 \text{ min} / 2) - 0,10 \text{ min} (5\% \text{ von } 2,00 \text{ min}).$

$2,20 \text{ min} = 2,00 \text{ min} + 0,10 \text{ min} (0,20 \text{ min} / 2) + 0,10 \text{ min} (5\% \text{ von } 2,00 \text{ min}).$

## Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten

Die Übereinstimmung von Peaks auf der Grundlage absoluter Retentions-/Migrationszeiten ist leicht anwendbar, aber nicht immer zuverlässig. Einzelne Retentions-/Migrationszeiten können leichte Abweichungen aufgrund schwankender chromatographischer Bedingungen oder Methoden aufweisen. Als Folge davon können die Peaks außerhalb des Zeitfensters liegen und werden somit nicht identifiziert.

Unvermeidlichen Schwankungen der absoluten Retentions-/Migrationszeiten lassen sich durch die Festlegung einer Retentions-/Migrationszeit relativ zu einem oder mehreren Referenzpeaks vermeiden.

Referenzpeaks werden in der Kalibriertabelle mit einem Eintrag in der Referenzspalte für diesen Peak identifiziert. Die Methode einer relativen Peakübereinstimmung verwendet einen oder mehrere Referenzpeaks zur Positionsanpassung des Vergleichsfensters, um Verschiebungen der Retentions-/Migrationszeiten von Probenpeaks zu kompensieren.

Falls in der Methode kein Referenzpeak definiert ist oder die ChemStation nicht mindestens einen Referenzpeak während des Analysenlaufs erkennen kann, werden von der Software die absoluten Retentions-/Migrationszeiten zur Identifizierung verwendet.

### Einzelne Referenzpeaks

Für den Referenzpeak wird um die erwartete Retentions-/Migrationszeit ein Retentions-/Migrationszeitfenster erzeugt. Der größte Peak in diesem Fenster wird als Referenzpeak identifiziert. Die erwarteten Retentions-/Migrationszeiten aller anderen Peaks in der Kalibriertabelle werden mit dem Verhältnis der erwarteten Retentions-/Migrationszeit zur tatsächlichen Retentions-/Migrationszeit des Referenzpeaks korrigiert.

## Mehrere Referenzpeaks

Die Korrektur der Retentions-/Migrationszeiten mit einem einzelnen Referenzpeak basiert auf der Annahme, dass die Abweichungen der aktuellen zu den erwarteten Retentions-/Migrationszeiten gleichmäßig und linear über den ganzen Analysenlauf verlaufen. Oftmals ändern sich bei langen Analysenzeiten die Retentions-/Migrationszeiten jedoch nicht einheitlich. In solchen Fällen können bessere Ergebnisse erzielt werden, wenn mehrere Referenzpeaks in geeigneten Abständen im Analysenlauf eingesetzt werden. Dadurch wird das Signal in separate Zonen aufgeteilt. Innerhalb jeder Zone wird dann eine lineare Abweichung der Retentions-/Migrationszeiten angenommen und getrennt für jede Zone ermittelt.

### HINWEIS

Der Algorithmus für die Zeitkorrektur kann scheitern, wenn die Retentionszeiten der Referenzpeaks zu eng beieinander liegen und nicht über den gesamten Analysenlauf verteilt sind.

## Peak-Qualifier

Viele Substanzen können mit mehreren Signalen detektiert werden. Grundsätzlich ist diese Methode auf alle Arten der Chromatographie anwendbar, die mit mehreren Detektoren oder mit Detektoren arbeiten, die über mehrere Signalausgänge verfügen. Sie wird aber hauptsächlich in der LC mit Multiwellenlängendetektoren oder Diodenarray-Detektoren eingesetzt. Diese Detektoren werden normalerweise so eingestellt, dass eine Wellenlänge nahe der maximalen Absorption des Hauptpeaks in der Kalibriertabelle eingesetzt wird. Dies ist in [Abbildung 39](#) auf Seite 77  $\lambda_{1}$ .

Die beiden anderen detektierten Wellenlängen können zur Bestätigung des Peaks dienen. In der Abbildung sind dies  $\lambda_{2}$  und  $\lambda_{3}$ .

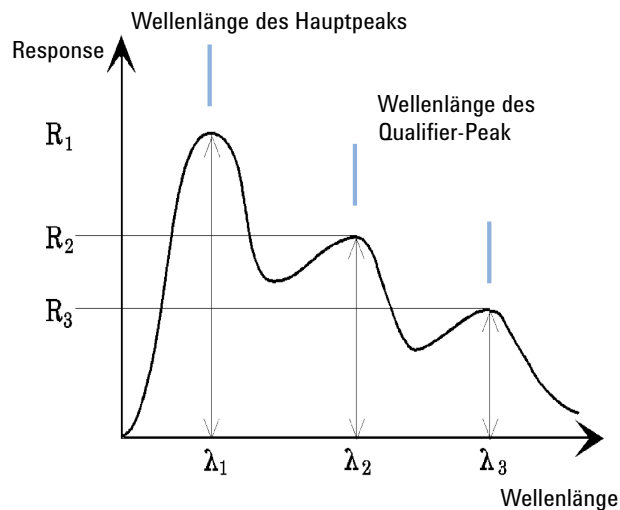


Abbildung 39 Peak-Qualifier

Peaks ohne Verunreinigungen weisen ein konstantes Verhältnis des Response über verschiedene Wellenlängen auf.

Der Peak-Qualifier weist einen anteiligen Response des Hauptpeaks auf. Die akzeptierten Grenzen des Response-Bereichs können in der Kalibriertabelle eingestellt werden, wenn die Option "Identification Details" (Identifizierungsdetails) aktiviert ist. Wenn das Verhältnis zwischen dem Hauptpeak-Qualifier  $\lambda_{1}$  und dem Qualifier-Peak, z. B.  $\lambda_{3}$ , innerhalb vorgegebener Grenzen liegt, ist die Substanzidentität bestätigt.

## Signalkorrelation

Signalkorrelation bedeutet, dass zwei Peaks, die von unterschiedlichen Detektoren innerhalb eines bestimmten Zeitfensters gemessen wurden, derselben Substanz zugeordnet werden. Das Fenster für die Signalkorrelation kann mit dem Parameter **SignalCorrWin** in der Tabelle **QuantParm** des Registers **\_DaMethod** gesteuert werden. Wenn das Fenster für die Signalkorrelation auf 0,0 Minuten gesetzt ist, ist die Signalkorrelation deaktiviert (weitere Informationen finden Sie in der Online-Hilfe). Wenn die Signalkorrelation deaktiviert ist, werden Peaks, die zur selben Retentions-/Migrationszeit von zwei unterschiedlichen Detektoren erfasst werden, als unterschiedliche Substanzen behandelt.

Standardmäßig ist das Fenster für die Signalkorrelation für LC-, CE-, CE/MS- und LC/MS-Daten auf 0,03 Minuten und für GC-Daten auf 0,0 Minuten eingestellt.

## Überprüfung der Qualifier

Wenn die Signalkorrelation aktiviert ist, werden standardmäßig die Qualifier für alle Datendateitypen überprüft. Diese Option kann abgestellt werden, indem man in der Methode innerhalb der Tabelle **Quantification Parameters** die **UseQualifiers** Flag setzt. Die Überprüfung der Qualifier wird auch dann deaktiviert, wenn die Signalkorrelation deaktiviert ist.

## Berechnung des Qualifier-Verhältnisses

Wenn die Überprüfung der Qualifier für eine Substanz aktiviert ist, wird das Größenverhältnis des Qualifiers zum Hauptpeak gegenüber den kalibrierten Grenzwerten überprüft. Je nach der Einstellung unter "Specify Report" (Reporttyp auswählen) kann die Größe über die Höhe oder die Fläche ermittelt werden.

Die Peak-Qualifier können genauso kalibriert werden wie die Zielsubstanzen. Der Anwender muss die erwarteten Qualifier-Verhältnisse nicht angeben. Sie werden automatisch berechnet:

Beide werden zur Retentionszeit der Substanz bestimmt.

Der Parameter "QualTolerance" definiert den akzeptablen Bereich des Qualifier-Verhältnisses, z. B.  $\pm 20\%$ .

Die Toleranz kann in der Kalibriertabelle in der Benutzeroberfläche ("Identification Details", Identifizierungsdetails) festgelegt werden und wird in absoluten Prozentwerten angegeben.

Bei einer mehrstufigen Kalibrierung berechnet die ChemStation eine minimale Qualifier-Toleranz aufgrund der gemessenen Qualifier-Verhältnisse auf jeder Kalibrierstufe. Die minimale Qualifier-Toleranz wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{minimum qualifier tolerance} = \frac{\sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})}{\bar{q} \times i} \times 100$$

wobei  $q_i$  das gemessene Qualifier-Verhältnis auf der Stufe  $i$  ist.

## Identifizierungsprozess

Beim Versuch der Peakidentifizierung durchläuft die Software die integrierten Daten dreimal.

### Erkennen des Referenzpeaks

Beim ersten Durchgang werden die Zeitreferenzpeaks identifiziert. Die Software sucht im Analysenlauf nach Retentions-/Migrationszeiten, die mit denen der Referenzpeaks in der Kalibriertabelle übereinstimmen. Ein Peak eines Analysenlaufs wird als Referenzpeak der Kalibriertabelle identifiziert, wenn dessen Retentions-/Migrationszeit innerhalb des angegebenen Fensters des Peaks aus der Kalibriertabelle liegt.

Werden in diesem Fenster mehrere Peaks gefunden, wird der Peak mit der größten Fläche oder Höhe, gegebenenfalls mit einer positiven Übereinstimmung der Peak-Qualifier, als Referenzpeak gewählt.

Für jeden gefundenen Zeitreferenzpeak wird die Abweichung zwischen der gefundenen Retentions-/Migrationszeit und der in der Kalibriertabelle ermittelt. Alle anderen erwarteten Retentions-/Migrationszeiten in der Kalibriertabelle werden danach angepasst.

## Erkennen der ISTD-Peaks

Im zweiten Durchgang werden alle ISTD-Peaks identifiziert. Falls sie nicht bereits als ISTD identifiziert wurden, können sie als Zeitreferenzpeaks identifiziert werden. ISTD-Peaks werden durch ihre Retentions-/Migrationszeitfenster und durch Peak-Qualifier identifiziert. Werden in demselben ISTD-Fenster mehrere Peaks gefunden, wird der größte Peak gewählt.

## Erkennen aller verbleibenden kalibrierten Peaks

Im dritten Durchgang werden alle anderen Peaks aus der Kalibriertabelle gesucht. Diese Nicht-Referenzpeaks der Kalibriertabelle werden über ihre Retentions- bzw. Migrationszeitfenster auf Übereinstimmung mit den Peaks des Analysenlaufs untersucht.

Jeder kalibrierte Nicht-Referenzpeak ist in der Kalibriertabelle mit seiner eigenen Retentions-/Migrationszeit angegeben. Diese wird für den entsprechenden Lauf basierend auf der Voridentifizierung der Zeitreferenzpeaks angepasst. Das Retentions-/Migrationszeitfenster des kalibrierten Peaks wird entsprechend der korrigierten Retentions-/Migrationszeit des kalibrierten Peaks angepasst.

Werden mehrere Peaks im selben Fenster gefunden, wird der Peak mit der Retentions-/Migrationszeit gewählt, der am nächsten an der erwarteten Retentions-/Migrationszeit liegt und der auch den Vorgaben des Qualifiers entspricht.

## Klassifizierung nicht identifizierter Peaks

Falls nicht identifizierte Peaks vorhanden sind, werden diese als unbekannt klassifiziert. Die ChemStation versucht, die unbekannt Peaks derselben Substanz zu einer Gruppe zusammenzufassen. Wenn ein Peak in mehreren Signalen entdeckt wurde, werden die Peaks mit derselben Retentions-/Migrationszeit in jedem Signal einer einzelnen Substanz zugeordnet.

Unbekannte Peaks werden in der klassischen Reportausgabe erfasst, wenn die entsprechende Vorgabe im Dialogfeld **Specify Report** eingestellt wurde.

# 3

## Kalibrierung

Was ist Kalibrierung?	82
Kalibrierkurve	83
Berechnung der Kalibrierkurve	84
Lineare Kurvenanpassung	84
Quadratische Kurvenanpassung	84
Relative Residualwerte	87
Gruppenkalibrierung	88
Optionen für die Rekalibrierung	89

Dieses Kapitel enthält Einzelheiten zu den Berechnungen, die bei der Kalibrierung verwendet werden.

## Was ist Kalibrierung?

Nach Integration und Identifizierung der Peaks ist die Kalibrierung der nächste Schritt der quantitativen Analyse. Die Menge und die Response sind selten direkt proportional zur tatsächlichen Masse einer zu analysierenden Probe. Dies erfordert eine Kalibrierung mit Referenzmaterialien. Bei der Quantifizierung wird mithilfe der Peakfläche oder Peakhöhe die Menge einer Substanz in einer Probe ermittelt.

Eine quantitative Analyse besteht aus mehreren Schritten, die wie folgt zusammengefasst werden können:

- Die zu analysierende Substanz muss bekannt sein.
- Eine Methode zur Analyse von Proben, die eine bekannte Menge dieser Substanz enthalten und die Kalibrierprobe oder Kalibrierungsstandard genannt werden, muss erstellt werden.
- Die Kalibrierprobe muss analysiert werden, um die Response zu ermitteln, die dieser Menge entspricht.

Alternativ können auch mehrere Standards mit unterschiedlichen Mengen der untersuchten Substanzen analysiert werden, falls Ihr Detektor eine nicht lineare Response aufweist. Dieser Vorgang wird als *mehrstufige Kalibrierung* bezeichnet.

Mit den folgenden Kalibriermethoden können Quantifizierungen durchgeführt werden:

- Substanzspezifische Kalibrierung (ESTD, ISTD)
- Indirekte Quantifizierung mit der Kalibrierung oder dem Response-Faktor einer anderen Substanz oder Gruppe
- Fester Response-Faktor (**Manual Factor**)

Die ESTD-Kalibrierkurven und -Berechnungen basieren auf gemessenen Responses (Fläche oder Höhe) gegebener Mengen. Die ISTD-Kalibrierkurven und -Berechnungen basieren auf relativen Responses und relativen Mengen.

## Kalibrierkurve

Bei einer Kalibrierkurve handelt es sich um eine grafische Darstellung von Mengen- und Responsedaten einer Substanz, die von einer bzw. mehreren Kalibrierprobe(n) erhalten wurden.

In der Regel wird ein Aliquot der Kalibrierprobe injiziert. Dies führt zu einem Signal und man kann die Response mithilfe der Berechnung der Peakfläche oder Peakhöhe bestimmen, ähnlich der [Abbildung 40](#) auf Seite 83.

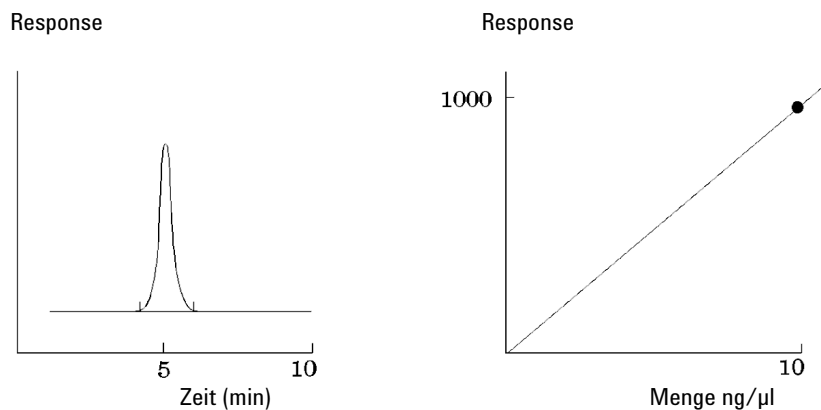


Abbildung 40 Kalibrierprobe (10 ng/μl) Signal und Kalibrierkurve

## Berechnung der Kalibrierkurve

### Lineare Kurvenanpassung

N = Anzahl der einzelnen Beobachtungen

$X_i$  = unabhängige Variable, i-te Beobachtung

$Y_i$  = abhängige Variable, i-te Beobachtung

Funktion:

$$y(x) = a + bX$$

Koeffizienten:

$$a = \frac{1}{\Delta x} \left( \sum_{i=1}^N X_i^2 * \sum_{i=1}^N Y_i - \left( \sum_{i=1}^N X_i * \sum_{i=1}^N X_i Y_i \right) \right)$$

$$b = \frac{1}{\Delta x} \left( N * \sum_{i=1}^N X_i Y_i - \left( \sum_{i=1}^N X_i * \sum_{i=1}^N Y_i \right) \right)$$

wobei:

$$\Delta x = N * \sum_{i=1}^N X_i^2 - \left( \sum_{i=1}^N X_i \right)^2$$

### Quadratische Kurvenanpassung

Quadratische Funktion:

$$y = a + (b * x) + (c * x^2)$$

Für die quadratische Kurvenanpassung sind mindestens drei Kalibrierungspunkte erforderlich. Wenn der Ursprung eingeschlossen wird oder bei forciertem Nulldurchgang sind zwei Punkte nötig.

## Kalibrierung

### Berechnung der Kalibrierkurve

Berechnung der Koeffizienten für die quadratische Kurvenanpassung

Die Koeffizienten ergeben sich aus dem nachstehenden simultanen linearen Gleichungssystem. Zur Lösung der entsprechenden Normalgleichungsmatrix wird der Crout-Algorithmus ( $A^T Ax = A^T y$ ) angewendet. In der angegebenen Formel werden die Summen folgendermaßen abgekürzt:

$$\begin{aligned} W &= \sum(wt) \\ XW &= \sum(x * wt) \\ X^2W &= \sum(x^2 * wt) \\ X^3W &= \sum(x^3 * wt) \\ X^4W &= \sum(x^4 * wt) \\ YW &= \sum(y * wt) \\ XYW &= \sum(x * y * wt) \\ X^2YW &= \sum(x^2 * y * wt) \end{aligned}$$

Um Überschreitung zu vermeiden, werden die x-Werte normalisiert, bevor sie in die Gleichung eingeführt werden:

$$\begin{aligned} \text{Norm} &= \sum(x) \\ x &= x / \text{Norm} \end{aligned}$$

Normalgleichungen für die quadratische Funktion:

$$\begin{aligned} \sum(wt) * a + \sum(x * wt) * b + \sum(x^2 * wt) * c &= \sum(y * wt) \\ \sum(x * wt) * a + \sum(x^2 * wt) * b + \sum(x^3 * wt) * c &= \sum(x * y * wt) \\ \sum(x^2 * wt) * a + \sum(x^3 * wt) * b + \sum(x^4 * wt) * c &= \sum(x^2 * y * wt) \end{aligned}$$

Als Matrixgleichung ausgedrückt:

$$\begin{vmatrix} W & XW & X^2W \\ XW & X^2W & X^3W \\ X^2W & X^3W & X^4W \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} a \\ b \\ c \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} YW \\ XYW \\ X^2YW \end{vmatrix}$$

Zerlegung nach Crout:

$$\begin{vmatrix} W & XW & X^2W \\ XW & X^2W & X^3W \\ X^2W & X^3W & X^4W \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} L11 & & \\ L21 & L22 & \\ L31 & L32 & L33 \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} 1 & U12 & U13 \\ & 1 & U23 \\ & & 1 \end{vmatrix}$$

Mit Abkürzungen für die Werte:

$$L11 = W$$

$$U12 = \frac{XW}{L11}$$

$$L21 = XW$$

$$U13 = \frac{X2W}{L11}$$

$$L31 = X2W$$

$$L22 = X2W - L21 * U12$$

$$U23 = \frac{X3W - L21 * U13}{L22}$$

$$L32 = X3W - L31 * U12$$

$$L33 = X4W - (L31 * U13) - (L32 * U23)$$

$$z0 = \frac{YW}{L11}$$

$$z1 = \frac{XYW - (L21 * z0)}{L22}$$

$$z2 = \frac{X2YW - (L31 * z0) - (L32 * z1)}{L33}$$

$$c' = z2$$

$$b' = z1 - (U23 * c')$$

$$a' = z0 - (U12 * b') - (U13 * c')$$

Schließlich muss die Normalisierung aufgehoben werden:

$$a = a'$$

$$b = \frac{b'}{\text{Norm}}$$

$$c = \frac{c'}{\text{Norm}^2}$$

## Relative Residualwerte

Für jede Kalibrierstufe wird ein *relativer Residualwert* angezeigt. Er wird mit folgender Formel errechnet:

$$relRES = \frac{Response_{calibrated} - Response_{calculated}}{Response_{calculated}} \cdot 100$$

wobei:

relRES = relativer Residualwert in Prozent

Die errechnete Response steht für den Punkt auf der Kalibrierkurve.

Die *Residuale Standardabweichung*, die auf einigen Reports ausgedruckt ist, wird bei Auswahl von „Kalibriertabelle und Kurven Drucken“ mit Hilfe der folgenden Formel errechnet:

$$ResSTD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Resp_{calibratedi} - Resp_{calculatedi})^2}{n - 2}}$$

wobei

ResSTD = Residuale Standardabweichung

Resp<sub>calibratedi</sub> = kalibrierte Response für den Punkt i

Resp<sub>calculatedi</sub> = berechnete Response für den Punkt i

n = Anzahl der Kalibrierpunkte

## Gruppenkalibrierung

Gruppenkalibrierungen können für Substanzen verwendet werden, bei denen nur die Konzentrationen einer Gruppe von Substanzen, nicht aber die einzelnen Konzentrationen bekannt sind. Ein Beispiel dafür sind Isomere. Es werden vollständige Substanzgruppen kalibriert. Folgende Formel wurde benutzt:

Kalibrierung

$$Conc_{AB} = RF_A \cdot Response_A + RF_B \cdot Response_B$$

wobei

$Conc_{AB}$  die Konzentration der Substanzgruppe ist, die aus Substanz A und B besteht.

$Response_A$  die Fläche (oder Höhe) der Substanz A ist

$RF_A$  der Responsefaktor ist

Dabei werden für die Substanzen einer Gruppe dieselben Responsefaktoren vorausgesetzt:

$$RF_A = RF_B$$

Folglich wird die Konzentration einer Substanz aus einer Substanzgruppe wie folgt berechnet:

$$Conc_A = \frac{Conc_{AB} \cdot Resp_A}{Resp_A + Resp_B}$$

## Optionen für die Rekalibrierung

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Werte für den Response in der Kalibriertabelle durch neue Kalibrierdaten zu ersetzen.

### **Average**

Der Mittelwert aus allen Ergebnissen der Kalibrierläufe wird nach folgender Formel berechnet

$$Response = \frac{n \cdot Response + MeasResponse}{n + 1}$$

### **Floating Average**

Aus allen Kalibrierläufen wird ein gewichteter Mittelwert berechnet. Die neue Gewichtung wird im Dialogfeld **Recalibration Settings** eingetragen.

$$Response = \left(1 - \frac{Weight}{100}\right) \cdot Response + \left(\frac{Weight}{100}\right) \cdot MeasResponse$$

### **Replace**

Die alten Werte für den Response werden durch die neuen Werte ersetzt.

# 4

## Quantifizierung

Was ist Quantifizierung?	91
Berechnungsmethoden in der Quantifizierung	92
Korrekturfaktoren	92
Absoluter Response-Faktor	92
Multiplikator	93
Verdünnungsfaktor	93
Probenmenge	93
Area% und Height%	94
Quantifizierung kalibrierter Substanzen	95
ESTD-Berechnung	95
ISTD-Berechnung	97
Quantifizierung nicht kalibrierter Peaks	101
Indirekte Quantifizierung mit einer kalibrierten Verbindung	101
Quantifizierung mit einem manuellen Faktor	102
Norm%-Berechnung	103

Dieses Kapitel beschreibt, wie Substanzen quantifiziert werden, und erklärt die für die Quantifizierung verwendeten Berechnungen.

# Was ist Quantifizierung?

Nach Integration und Identifizierung der Peaks ist die Quantifizierung der nächste Analysenschritt. Bei der Quantifizierung wird mithilfe der Peakfläche oder Peakhöhe die Konzentration einer Substanz in einer Probe ermittelt.

Eine quantitative Analyse besteht aus mehreren Schritten, die wie folgt zusammengefasst werden können:

- Die zu analysierende Substanz muss bekannt sein.
- Es muss eine Methode zur Analyse von Proben mit dieser Substanz vorhanden sein.
- Es müssen eine oder mehrere Proben mit bekannter Konzentration dieser Substanz analysiert werden, um deren Response zu ermitteln.

Alternativ können auch mehrere Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen der untersuchten Substanzen analysiert werden, falls Ihr Detektor einen nicht linearen Response aufweist. Dieser Vorgang wird als *mehrstufige Kalibrierung* bezeichnet.

- Es wird eine Probe mit der unbekanntem Konzentration der Substanz analysiert, um einen der Konzentration entsprechenden Response zu erhalten.
- Der Vergleich der Responsewerte der unbekanntem Konzentration mit den Responsewerten der bekannten Konzentration ergibt die Konzentration der Substanz in der unbekanntem Probe.

Für einen korrekten Vergleich der Responsewerte der unbekanntem Probe mit der bekannten Probe müssen die Daten unter identischen Bedingungen erfasst und verarbeitet werden.

## Berechnungsmethoden in der Quantifizierung

Die ChemStation bietet folgende Berechnungsmöglichkeiten zur Konzentrationsbestimmung der Substanz einer Mischung:

- Prozentualer Anteil
- Normalisierung
- Externer Standard (ESTD)
- ESTD%
- Interner Standard (ISTD)
- ISTD%

Die Berechnungen zur Konzentrationsbestimmung einer Substanz in einer unbekannt Probe hängen vom Typ der Quantifizierung ab. Jede Berechnungsmethode verwendet Peakfläche oder Peakhöhe, erzeugt jedoch einen unterschiedlichen Report.

## Korrekturfaktoren

Zur quantitativen Berechnung werden vier verschiedene Korrekturfaktoren eingesetzt: *absoluter Responsefaktor*, *Multiplikator*, *Verdünnungsfaktor* und *Probenmenge*. Diese Faktoren werden bei Kalibrierungen zur Korrektur von Detektorresponse-Abweichungen bei unterschiedlichen Probensubstanzen, Konzentrationen, Probenverdünnungen und Probenmengen sowie zur Umrechnung von Konzentrationseinheiten verwendet.

## Absoluter Response-Faktor

Der absolute Responsefaktor einer Substanz ist definiert als Quotient der Substanzmenge und der gemessenen Fläche oder Höhe des Substanzpeaks bei der Analyse einer Kalibrier Mischung. Der absolute Responsefaktor wird stets bei Kalibrierberechnungen verwendet und korrigiert den Detektorresponse für einzelne Probenbestandteile.

## Multiplikator

Der Multiplikator wird in jeder Berechnungsformel zur Multiplikation des Ergebnisses für jede Komponente verwendet. Multiplikatoren können dazu eingesetzt werden, Konzentrationseinheiten in Mengenwerte umzurechnen.

## Verdünnungsfaktor

Der Verdünnungsfaktor ist eine Zahl, mit der alle Ergebnisse multipliziert werden, bevor der Report gedruckt wird. Sie können den Verdünnungsfaktor zur Einheitsumrechnung der Ergebnisse oder zur Korrektur von Konzentrationsänderungen bei der Probenvorbereitung verwenden. Er kann auch in allen anderen Berechnungen verwendet werden, die einen konstanten Faktor erfordern.

## Probenmenge

Bei ESTD%- oder ISTD%-Berechnungen werden in den ESTD- und ISTD-Reporten relative statt absoluter Werte angegeben. Das bedeutet, dass die Menge jeder Substanz als prozentualer Anteil an der Probengesamtmenge angegeben wird. Die Probenmenge dient in ESTD%- und ISTD%-Reporten zur Umrechnung der absoluten Menge der analysierten Substanzen in relative Werte. Dies geschieht mit einer Division durch den angegebenen Wert.

## Area% und Height%

Die Berechnungsart **Area%** berechnet die Fläche jedes Peaks der Probe als prozentualen Anteil an der Gesamtfläche aller Peaks eines Analysenlaufes. Die **Area%**-Berechnung erfordert keine vorherige Kalibrierung und hängt in bestimmten Grenzen des Detektors nicht von der injizierten Probenmenge ab. Es werden keine Responsefaktoren berücksichtigt. Falls alle Substanzen identische Responsefaktoren aufweisen, kann die Angabe **Area%** eine Näherung für die vorhandenen Mengen der Substanzen darstellen.

**Area%** wird routinemäßig dort eingesetzt, wo qualitative Ereignisse gewünscht sind, und um Kalibriertabellen für andere Kalibrierverfahren zu erstellen.

Die Angabe **Height%** berechnet die Höhe jedes Peaks der Probe als prozentualen Anteil an der Gesamthöhe aller Peaks eines Analysenlaufes.

Der Multiplikator und der Verdünnungsfaktor aus den **Calibration Settings**, aus dem Dialogfeld **Sample Information** oder aus der **Sequence Table** werden bei der Area%- oder Height%-Berechnung nicht berücksichtigt.

## Quantifizierung kalibrierter Substanzen

Die Methoden Externer Standard (ESTD), Normalisierung und Interner Standard (ISTD) erfordern Response-Faktoren und daher eine Kalibriertabelle. In der Kalibriertabelle ist die Konvertierung von Responsewerten in die Einheiten festgelegt, die für das gewählte Verfahren benötigt werden.

### ESTD-Berechnung

Das ESTD-Verfahren ist das grundlegende Quantifizierungsverfahren, mit dem Standards und Proben unter identischen Bedingungen analysiert werden. Die Ergebnisse der unbekannt Probe werden mit der Kalibrierungstabelle verglichen, um die Menge einer unbekannt Substanz in der Probe zu errechnen.

Beim ESTD-Verfahren werden absolute Responsefaktoren verwendet; es unterscheidet sich damit vom ISTD-Verfahren. Die Responsefaktoren werden in einer Kalibrierung ermittelt und gespeichert. In den nachfolgenden Probenläufen werden die Substanzmengen durch Anwendung dieser Responsefaktoren auf die gemessenen Probenmengen errechnet. Stellen Sie sicher, dass die aufgegebene Probenmenge von Analysenlauf zu Analysenlauf reproduzierbar ist, da die Probe keinen Standard zur Korrektur bei Variationen in der Probenmenge oder der Probenaufbereitung enthält.

Bei der Erstellung eines ESTD-Berichts erfolgt die Berechnung der Menge einer bestimmten Substanz in einer unbekannt Probe in zwei Schritten:

- 1 Für die Substanz wird eine Gleichung für die Kurve durch die Kalibrierungspunkte ermittelt, die mit dem im Dialogfeld „Calibration Settings“ (Kalibrierungseinstellungen) oder „Calibration Curve“ (Kalibrierungskurve) angegebenen Anpassungsverfahren berechnet wird.
- 2 Die Menge der Substanz in der unbekannt Probe wird mit der unten beschriebenen Gleichung berechnet. Diese Menge kann im Bericht angegeben werden oder zuvor durch Anwendung von Multiplikator, Verdünnungsfaktor oder Probenmenge weiter bearbeitet werden, bevor sie im Bericht erscheint.

## Quantifizierung

### Quantifizierung kalibrierter Substanzen

Die Formel des ESTD-Verfahrens zur Berechnung der absoluten Menge der Substanz  $x$  lautet:

$$\text{Absolute Amt of } x = \text{Response}_x \cdot RF_x \cdot M \cdot D$$

Es gilt Folgendes:

$\text{Response}_x$  ist die Response von Peak  $x$ ;

$RF_x$  ist der Responsefaktor von Komponente  $x$ , berechnet als:

$$RF_x = \frac{\text{Amount}_x}{\text{Response}_x}$$

$M$  ist der Multiplikator.

$D$  ist der Verdünnungsfaktor.

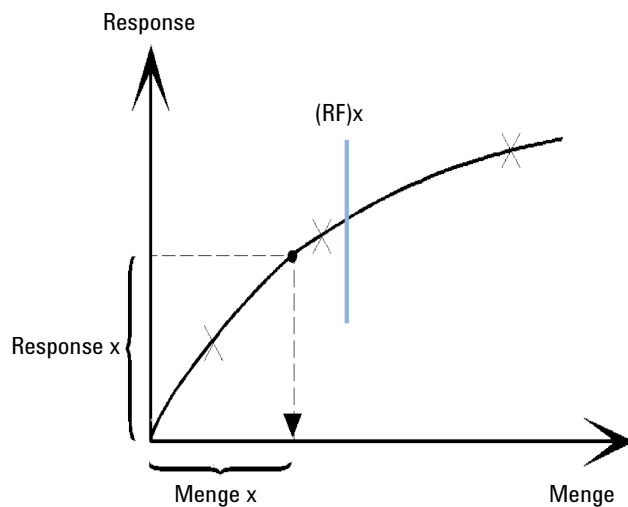


Abbildung 41 Responsefaktor

Multiplikator und Verdünnungsfaktor werden dem Dialogfeld **Calibration Settings** oder **Sample Information** entnommen.

## Quantifizierung

### Quantifizierung kalibrierter Substanzen

Wenn ESTD%-Bericht gewählt wird und die Probenmenge nicht Null ist, wird die relative Menge (in %) einer Substanz x wie folgt berechnet:

$$\text{Relative Amt of x} = \frac{\{\text{Absolute Amt of x}\} \cdot 100}{\text{Sample Amount}}$$

Es gilt Folgendes:

Die *Absolute Menge von x* wird analog zur oben gezeigten ESTD-Methode berechnet.

Die *Probenmenge* wird dem Dialogfeld „Sample Information“ (Probeninformationen) oder „Quantitation Settings“ (Kalibrierungseinstellungen) aus Einzelanalysen entnommen. Wenn die Probenmenge Null ist, wird der ESTD berechnet.

## ISTD-Berechnung

Die ISTD-Berechnung eliminiert die Nachteile des ESTD-Verfahrens durch Hinzufügen einer bekannten Menge einer Substanz als Normalisierungsfaktor. Diese Substanz, der *interne Standard*, wird sowohl zu Kalibrier- als auch zu unbekanntem Proben hinzugefügt.

Die Software übernimmt die entsprechenden Responsefaktoren aus einer früheren Kalibrierung, die in der Methode gespeichert ist. Mit der Konzentration des internen Standards und den Peakflächen oder -höhen des Analysenlaufs berechnet die Software die Konzentration unbekannter Substanzen.

Die als interner Standard eingesetzte Substanz sollte ein ähnliches Verhalten wie die kalibrierte Substanz aufweisen, sowohl chemisch als auch bezüglich der Retentions-/Migrationszeit, muss aber chromatographisch unterscheidbar sein.

**Tabelle 8 ISTD-Verfahren**

Vorteile	Nachteile
Schwankungen der Probengröße sind unproblematisch.	Der interne Standard muss jeder Probe hinzugefügt werden.
Instrumentendrift wird durch den internen Standard kompensiert.	
Die Effekte der Probenvorbereitung werden minimiert, wenn das Verhalten des internen Standards und der unbekanntem Probe einander ähnlich sind.	

Wenn das ISTD-Verfahren für Kalibrierungen mit nicht-linearer Charakteristik verwendet wird, muss sichergestellt werden, dass die Rechenmethode keine systematischen Fehler erzeugt. Bei mehrstufigen Kalibrierungen muss die Menge des internen Standards konstant gehalten werden, das heißt, auf jeder Kalibrierstufe muss dieselbe Menge enthalten sein, wenn die Kalibrierkurve nicht linear ist.

Bei einer Analyse mit internem Standard wird die Menge der relevanten Substanz über das Responseverhältnis der beiden Peaks auf die Menge an internem Standard bezogen.

Bei einer ISTD-Kalibrierung mit zwei Analysenläufen erfolgt die Berechnung des korrekten Mengenverhältnisses einer bestimmten Substanz in einer unbekanntem Probe in den folgenden Phasen:

### Analysenlauf 1: Kalibrierung

- 1 Die Kalibrierpunkte werden erstellt, indem für jede Stufe eines bestimmten Peaks in der Kalibriertabelle ein Mengenverhältnis und ein Responseverhältnis berechnet werden.

Das Mengenverhältnis ist die Menge der Substanz dividiert durch die Menge des internen Standards für diese Kalibrierstufe.

Das Responseverhältnis ist die Peakfläche der Substanz dividiert durch die Peakfläche oder -höhe des internen Standards für diese Kalibrierstufe.

- 2 Die Gleichung der Kurve durch die Kalibrierpunkte wird auf der Basis der Anpassung (Fit) berechnet, die im Dialogfeld "Calibration Settings" (Kalibrier-einstellungen) oder "Calibration Curve" (Kalibrierkurve) angegeben ist.

$$RF_x = \frac{\text{Amount Ratio}}{\text{Response Ratio}}$$

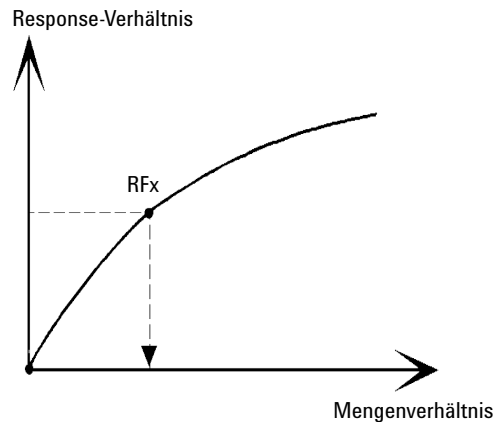


Abbildung 42 Mengenverhältnis

### **Analysenlauf 2: Unbekannte Probe**

- 1 Zur Ermittlung des Responseverhältnisses der unbekanntes Probe wird der Response der Substanz in der unbekanntes Probe durch den Response des internen Standards in der unbekanntes Probe dividiert.
- 2 Das Mengenverhältnis für die unbekanntes Probe wird mit der Kurvenanpassung aus Schritt 2 oben und der Menge an internem Standard in der Probe ermittelt.

### **ISTD-Berechnung kalibrierter Substanzen**

Die Gleichungen zur Berechnung der Menge einer kalibrierten Substanz x für eine Einpunktkalibrierung lauten:

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Response}_x}{\text{Response}_{\text{ISTD}}}$$

$$\text{Actual Amount of } x = RF_x \cdot \{\text{Response Ratio}\}_x \cdot \text{Actual Amount of ISTD} \cdot M \cdot D$$

wobei

$RF_x$  der Response-Faktor für Substanz x ist.

Die tatsächliche Menge (*Actual Amt*) des internen Standards ist der Wert, der im Dialogfeld Calibration Settings (Kalibriereinstellungen) oder im Dialogfeld Sample Info (Probeninfo) für den internen Standard, der zur unbekanntes Probe zugegeben wurde, eingetragen wurde.

M ist der Multiplikator.

D ist der Verdünnungsfaktor.

Ist der Reporttyp ISTD% ausgewählt, wird die relative Menge (in %) der Komponente x in der Probe mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Relative Amt of } x = \frac{\{\text{Absolute Amt of } x\} \cdot 100}{\text{Sample Amount}}$$

## Quantifizierung nicht kalibrierter Peaks

Nicht kalibrierte Peaks können entweder mit einem festen Umrechnungsfaktor (Responsefaktor) oder mithilfe der Kalibrationsdaten einer kalibrierten Verbindung quantifiziert werden. Die Quantifizierung mit einem festen Responsefaktor oder Daten einer kalibrierten Verbindung ist signalspezifisch. Wenn die kalibrierte Verbindung mit einer ISTD-Methode kalibriert worden ist, müssen die unbekannt Peaks mit der gleichen ISTD-Methode untersucht werden wie die kalibrierte Verbindung.

### Indirekte Quantifizierung mit einer kalibrierten Verbindung

Sollen Kalibrationsdaten einer kalibrierten Verbindung verwendet werden, wird die entsprechende kalibrierte Verbindung aus der Dropdown-Liste **Using Compound** im Dialogfeld **Calibration Settings** gewählt. Die Berechnungen entsprechen jenen für die kalibrierten Verbindungen. Wenn die Referenzverbindung mit einer ISTD-Methode quantifiziert worden ist, muss die nicht kalibrierte Verbindung mit der gleichen ISTD-Methode untersucht werden wie die Referenzverbindung.

Fehlt der Referenzpeak, ergibt die Berechnung des Peaks der nicht kalibrierten Verbindung die Menge „0“.

## Quantifizierung mit einem manuellen Faktor

Die Software erlaubt die Quantifizierung einer identifizierten Verbindung auf Grundlage eines fixen Umrechnungsfaktors (**With Rsp Factor** im Dialogfeld **Calibration Settings**). In diesem Fall wird die Menge der Verbindung mit dem festen Responsefaktor berechnet:

$$\text{Menge} = \text{Response} * \text{Responsefaktor} * M * D$$

wobei

Manueller Responsefaktor      Fester Responsefaktor

Response      „Response“ bezieht sich auf die Signalfäche oder -höhe

Verwendung eines manuellen Faktors mit einer ISTD-Methode

Wird die Menge der Verbindung mit einem festen Responsefaktor und ISTD quantifiziert, gilt folgende Formel:

$$\text{Flächenverhältnis} = \text{Fläche} / \text{Fläche}_{\text{ISTD}}$$

oder

$$\text{Höhenverhältnis} = \text{Höhe} / \text{Höhe}_{\text{ISTD}}$$

Die Menge wird dann wie folgt berechnet:

$$\text{Menge} = \text{Flächenverhältnis} * \text{manueller Faktor} * \text{Menge}_{\text{ISTD}}$$

oder

$$\text{Menge} = \text{Höhenverhältnis} * \text{manueller Faktor} * \text{Menge}_{\text{ISTD}}$$

Abhängigkeit des manuellen Faktors und Responsefaktors (RF)

Wird der RF definiert als **Response per amount** (StandardEinstellung):

$$\text{RF} = 1 / \text{manueller Faktor}$$

Mit RF definiert als **Amount per response**:

$$\text{RF} = \text{manueller Faktor}$$

## Norm%-Berechnung

Bei der Normalisierungsmethode werden Responsefaktoren auf die Peakflächen oder -höhen angewendet, um Schwankungen der Detektorempfindlichkeit für verschiedene Probenbestandteile auszugleichen.

Der Norm%-Report wird genauso berechnet wie der ESTD-Report, außer dass über einen zusätzlichen Rechenschritt die relativen Mengen anstelle der absoluten Mengen der Substanzen berechnet werden.

Der Norm%-Report hat dieselben Nachteile wie die Area%- und Height%-Reports. Jede Änderung mit einem Einfluss auf die Gesamtpeakfläche hat auch Einfluss auf die berechneten Konzentrationen der Einzelpeaks. Der Normalisierungsreport sollte nur dann verwendet werden, wenn alle relevanten Substanzen eluiert und integriert wurden. Der Ausschluss ausgewählter Peaks aus einem Normalisierungsreport verändert die Ergebnisse dieser Probe im Report.

Die Gleichung zur Berechnung des **Norm%**-Werts einer Substanz x lautet:

$$\text{Norm\% of } x = \frac{\text{Response}_x \cdot RF_x \cdot 100 \cdot M \cdot D}{\sum (\text{Response} \cdot RF)}$$

wobei

$\text{Response}_x$	die Fläche (oder Höhe) von Peak x ist,
$RF_x$	der Responsefaktor ist,
$\sum (\text{Response} \cdot RF)$	ist die Gesamtsumme aller $(\text{Response} \cdot RF)$ -Produkte aller Peaks einschließlich Peak x,
$M$	ist der Multiplikator.
$D$	ist der Verdünnungsfaktor.

Der Multiplikator und der Verdünnungsfaktor werden den **Quantitation Settings** im Dialogfeld **Specify Report** oder der Sequenztabelle entnommen.

## 5

# Systemeignung

Bewertung der Peakleistung	105
Systemeignungsevaluierung	105
Bestimmung der Rauschhöhe	108
Bestimmung des Rauschens als sechsfache Standardabweichung	109
Bestimmung des Rauschens nach der Peak-zu-Peak-Berechnung	110
Rauschbestimmung nach der ASTM-Methode	111
Signal-Rauschen-Berechnung	114
Drift und Wanderung	117
Berechnung der Peakasymmetrie und -symmetrie	119
Formeln und Berechnungsmethoden zur Beurteilung der Systemeignung	121
Allgemeine Definitionen	122
Totvolumen Totvolumen	122
Retentionszeit einer nicht retardierten Substanz $t_r$ [min]	122
Leistungstest-Definitionen	123
Überblick über Leistungstests	123
Statistische Momente, Schräge und Überschuss	125
Tatsächliche Peakbreite $W_x$ [min]	127
Kapazitätsfaktor (USP)	127
Tailingfaktor (USP) $t$	128
Anzahl der theoretischen Trennböden pro Säule $n$	129
Anzahl theoretischer Böden pro Meter $N$ [1/m]	130
Relative Retention, Selektivität	131
wobei Auflösung (USP, ASTM) $R$	132
Auflösung (EP/JP) $R_s$	132
Auflösung (ChemStation klassische Definitionen)	132
Peak-Tal-Verhältnis (EP/JP)	133
Definitionen für die Reproduzierbarkeit	135
Probenmittelwert $M$	135
Standardabweichung der Probe (S)	136
Relative Standardabweichung RSD[%] (USP)	136
Standardabweichung $S$ des Mittelwerts	136
Standardabweichung (S)	137
Konfidenzintervall CI	137
Korrelationskoeffizient	138
Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff	140

Dieses Kapitel beschreibt, was OpenLab CDS bei der Bewertung der Leistung sowohl des analytischen Geräts als auch der analytischen Methode liefern kann.

## Bewertung der Peakleistung

Die Peakleistung kann für jeden integrierten Peak der geladenen Daten berechnet werden, sowie auch für neue, manuell integrierte Peaks. Mit dem interaktiven Tool *Peakleistung* werden die Peakeigenschaften berechnet und auf der Anwenderoberfläche angezeigt. Das Tool *Peakleistung* nutzt die tatsächliche Peakleistung bei verschiedenen Höhen sowie eine von einem Peak-Modellierungsalgorithmus ermittelte Retentionszeit. Diese Werte werden ausschließlich in der Anwenderoberfläche für das Tool *Peakleistung* angezeigt. Sie können abhängig von den Integratorwerten, die in den Berichten angezeigt werden, leicht variieren.

## Systemeignungsevaluierung

Die Evaluierung der Leistungsfähigkeit sowohl von Analysengeräten vor deren Einsatz für die Probenanalyse als auch von analytischen Methoden vor deren routinemäßiger Anwendung sind Bestandteil der guten Analysenpraxis. Es empfiehlt sich auch, die Leistungsfähigkeit von Analysensystemen vor und während Routineanalysen zu überprüfen. Die ChemStation-Software bietet Werkzeuge an, welche eine automatische Durchführung dieser drei Arten von Tests ermöglichen. Ein Gerätetest kann die Prüfung der Detektorempfindlichkeit, der Präzision der Retentionszeit bzw. Migrationszeit der Peaks sowie der Präzision von Peakflächen umfassen. Ein Methodentest kann die Prüfung der Präzision von Retentionszeit bzw. Migrationszeit und Mengen, der Selektivität sowie der Robustheit der Methode bezüglich täglicher Abweichungen während des Betriebs umfassen. Ein Systemtest kann die Prüfung der Präzision von Mengen, der Auflösung zwischen zwei spezifischen Peaks und des Peak-Tailings umfassen.

Labore müssen folgende Bestimmungen einhalten:

- Gute Laborpraxis (GLP),
- Gute Herstellungspraxis (GMP) und Aktuelle Gute Herstellungspraxis (cGMP),
- Gute Praxis für automatisierte Labore (GALP)

Laboren wird empfohlen, diese Tests durchzuführen und sorgfältig zu dokumentieren. Labore, die Teil eines Qualitätskontrollsystems sind und z. B. die Norm ISO 9000 einzuhalten haben, müssen die einwandfreie Leistungsfähigkeit ihrer Geräte nachweisen.

Die ChemStation vergleicht Ergebnisse aus unterschiedlichen Läufen und evaluiert diese statistisch im Sequenzübersichtsbericht.

Die Tests werden in einem Format dokumentiert, das von Aufsichtsbehörden und unabhängigen Prüfern allgemein akzeptiert wird. Die statistische Evaluation umfasst:

- Retentions-/Migrationszeit der Peaks
- Peakfläche
- Menge
- Peakhöhe
- Halbwertbreite des Peaks
- Peak-Symmetrie
- Peaktailing
- Kapazitätsfaktor ( $k'$ )
- Bodenzahlen
- Auflösung zwischen Peaks
- Selektivität gegenüber vorangehenden Peaks
- Schräge
- Überschuss

Der Mittelwert, die Standardabweichung, die relative Standardabweichung und das Konfidenzintervall werden berechnet. Sie können wahlweise Grenzen für die Standardabweichung, die relative Standardabweichung oder das Konfidenzintervall für jeden dieser Parameter einstellen. Sollten die Werte die von Ihnen festgelegten Grenzen überschreiten, wird der Bericht markiert, um Sie darauf aufmerksam zu machen.

Die Qualität der Analysendaten kann sichergestellt werden, indem die Bedingungen zum Zeitpunkt der Messung aufgezeichnet werden. Diese Informationen werden mit den Daten gespeichert und mit den Probandaten im Bericht aufgeführt. Geräteleistungskurven werden während der gesamten Analyse als Signale aufgezeichnet und in der Datendatei gespeichert. Sofern das Geräte diese Funktion unterstützt, können diese Berichte dem Chromatogramm überlagert und nach Wunsch, z. B. während eines Audits, abgerufen werden.

Basislinienrauschen und Drift können automatisch gemessen werden. Eine untere Detektionsgrenze kann ausgehend von den Daten zur Peakhöhe für jede kalibrierte Verbindung in der Methode berechnet werden.

Die Gerätekonfiguration, die Geräte-Seriennummer, die Säulen-/Kapillaridentifikation und Anmerkungen des Benutzers können in jeden gedruckten Bericht mit einbezogen werden.

Erweiterte Ergebnisse zur Leistungsfähigkeit werden nur für kalibrierte Verbindungen innerhalb der Methode berechnet; dadurch wird sichergestellt, dass die Charakterisierung über Retentions-/Migrationszeiten und Namen der Verbindungen erfolgt.

Ein typischer Testbericht zur Systemleistung enthält die folgenden Ergebnisse zur Leistungsfähigkeit:

- Angaben zum Gerät
- Angaben zu Säulen/Kapillaren
- Analysenmethode
- Informationen zur Probe
- Informationen zur Datenerfassung
- Signalbeschreibung und Bestimmung des Basislinienrauschens
- Signal, gekennzeichnet entweder mit Retentions-/Migrationszeit oder mit dem Namen der Verbindung

Zusätzlich werden folgende Informationen für jede kalibrierte Verbindung im Chromatogramm erfasst:

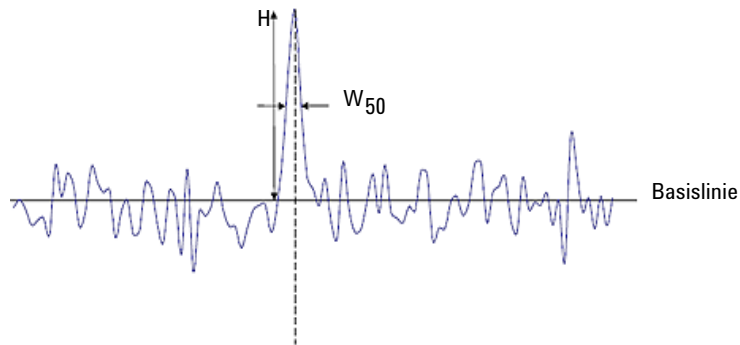
- Retentions-/Migrationszeit
- $k'$
- Symmetrie
- Peakbreite
- Bodenzahl
- Auflösung
- Signal/Rausch-Verhältnis
- Name der Verbindung

## Bestimmung der Rauschhöhe

Die Rauschhöhe wird aus den Daten eines Zeitintervalls im Chromatogramm/Elektropherogramm bestimmt. Rauschen kann auf drei Arten beschrieben werden:

- Als sechsfache Standardabweichung aus der linearen Regression der Drift
- Als Peak-zu-Peak Wert (mit Driftkorrektur)
- Durch Bestimmung mit der ASTM-Methode (ASTM E 685-93).

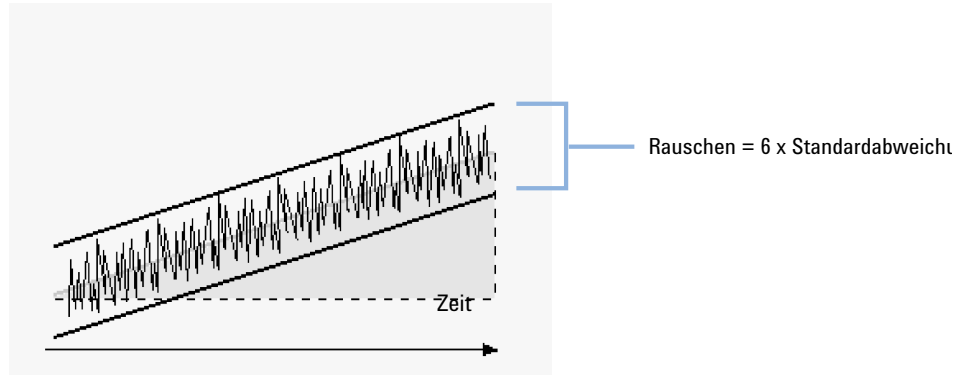
Das Rauschen kann für bis zu sieben Bereiche des Signals berechnet werden; die Bereiche werden als Teil der Einstellungen zur Systemeignung bei den Reportparametern festgelegt.



**Abbildung 43 Chromatogramm mit Peaksignal und Rauschen**

H	Peakhöhe von Spitze bis Basislinie (beste gerade Linie durch das Rauschen)
W <sub>50</sub>	Halbwertbreite des Peaks

## Bestimmung des Rauschens als sechsfache Standardabweichung



Die lineare Regression wird mit Hilfe aller Datenpunkte des Zeitbereiches des aktuellen Signals bestimmt. Das Rauschen ergibt sich nach folgender Formel:

$$N = 6 \times Std$$

wobei

N	Rauschen gemäß der sechsfachen Standardabweichung
Std	Standardabweichung der linearen Regression aller Datenpunkte im ausgewählten Zeitbereich

## Bestimmung des Rauschens nach der Peak-zu-Peak-Berechnung

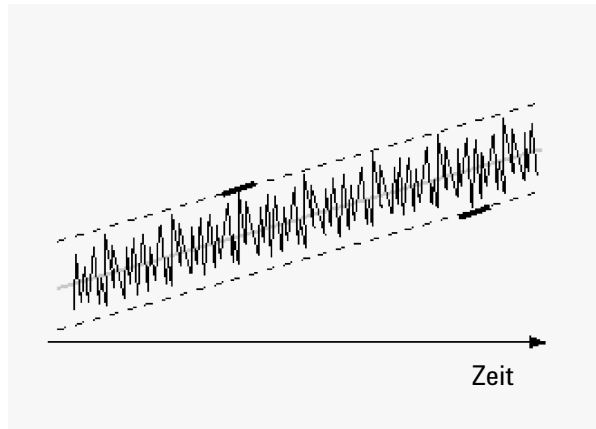


Abbildung 44 Illustration des Peak-zu-Peak-Rauschens mit Drift

Zunächst wird die Drift durch Bestimmung der linearen Regression mithilfe aller Datenpunkte im Zeitbereich eines Peaks ermittelt. Zur Ermittlung des Drift-korrigierten Signals wird die lineare Regressionslinie von allen Datenpunkten des Zeitbereichs abgezogen.

Daraufhin wird mit Hilfe der folgenden Formel das Peak-zu-Peak-Rauschen ermittelt:

$$N = I_{\max} - I_{\min}$$

wobei

N	Peak-zu-Peak-Rauschen
$I_{\max}$	Höchster (maximaler) Wert für $I_x$ im Zeitbereich
$I_{\min}$	Kleinster (minimaler) Wert für $I_x$ im Zeitbereich
$I_x$	Signalintensität, um die Drift korrigiert (Drift wird mit der LSQ-Formel berechnet)

## Systemeignung

### Bestimmung der Rauschhöhe

Bei Berechnungen für das Europäische Arzneimittelbuch wird das Peak-zu-Peak-Rauschen mit dem Blindwertersignal einer Referenz auf jeder Peakflanke über einen Bereich von -10- und +10 mal  $W_{50}$  berechnet. Dieser Bereich kann symmetrisch zu dem relevanten Signal sein. Falls erforderlich, kann er aber auch infolge von Matrixsignalen unsymmetrisch sein.

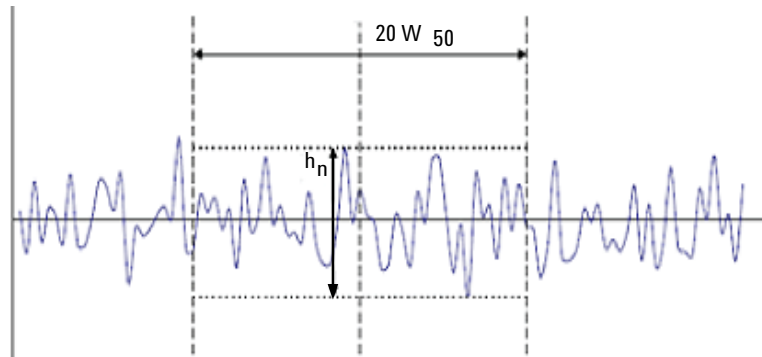


Abbildung 45 Bestimmung des Rauschens mithilfe des Chromatogramms einer Blindprobe

wobei

$20 W_{50}$  dem Bereich des 20-fachen von  $W_{50}$  entspricht.

$h_n$  die maximale Amplitude des Basislinienrauschens im Bereich des 20-fachen  $W_{50}$  Werts ist.

## Rauschbestimmung nach der ASTM-Methode

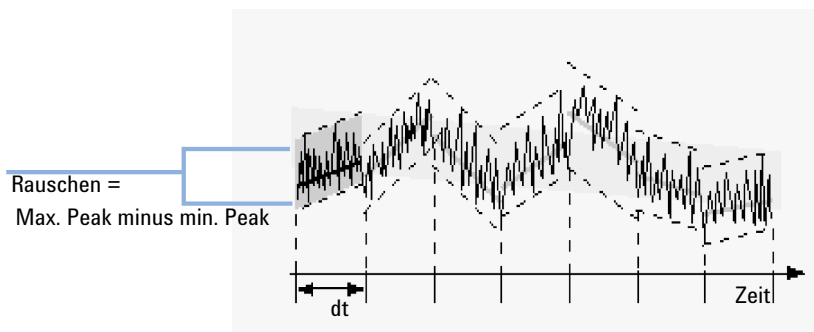


Abbildung 46 Bestimmung der Rauschhöhe nach der ASTM-Methode

Die ASTM Rauschbestimmung (ASTM E 685-93) basiert auf dem von der American Society for Testing and Materials definierten Standardverfahren für Tests von Photometer-Detektoren mit variabler Wellenlänge, die in der Flüssigkeitschromatographie eingesetzt werden. In Abhängigkeit von der Größe des Zeitbereichs unterscheidet man drei verschiedene Arten von Rauschen. Die Rauschbestimmung basiert auf einer Peak-zu-Peak-Messung innerhalb eines festgelegten Zeitbereichs.

- *Zykluszeit, t*

*Langzeitrauschen*, die maximale Amplitude aller Zufallsvariationen des Detektorsignals bei Frequenzen zwischen 6 und 60 Zyklen pro Stunde. Das Langzeitrauschen wird bestimmt, wenn der ausgewählte Zeitbereich über einer Stunde liegt. Der Zeitbereich wird auf 10 Minuten pro Zyklus (dt) eingestellt. Dies führt zu mindestens sechs Zyklen innerhalb des ausgewählten Zeitbereichs.

*Kurzzeitrauschen*, die maximale Amplitude aller Zufallsvariationen des Detektorsignals einer Frequenz, die über einem Zyklus pro Minute liegt. Das Kurzzeitrauschen wird für einen ausgewählten Zeitbereich zwischen 10 und 60 Minuten bestimmt. Der Zeitbereich wird auf eine Minute pro Zyklus (dt) eingestellt. Dies führt zu mindestens 10 Zyklen innerhalb des ausgewählten Zeitbereichs.

*Sehr kurzfristiges Rauschen (nicht Bestandteil des ASTM E 685-93)*, dieser Begriff wurde eingeführt, um die maximale Amplitude aller Zufallsvariationen des Detektorsignals einer Frequenz beschreiben zu können, die größer als einen (1) Zyklus pro 0,1 Minuten ist.

Das sehr kurzfristige Rauschen wird für einen ausgewählten Zeitbereich zwischen 1 und 10 Minuten bestimmt. Der Zeitbereich wird auf 0,1 Minute pro Zyklus (dt) eingestellt. Dies führt zu mindestens 10 Zyklen innerhalb des ausgewählten Zeitbereichs.

- *Zyklusanzahl, n*

Die Zyklusanzahl wird wie folgt berechnet:

$$n = \frac{t_{\text{tot}}}{t}$$

wobei t die Zykluszeit und  $t_{\text{tot}}$  die Gesamtzeit ist, während der das Rauschen ermittelt wird.

## Systemeignung

### Bestimmung der Rauschhöhe

- *Peak-zu-Peak-Rauschen in jedem Zyklus*

Zunächst wird die Drift durch Bestimmung der linearen Regression mithilfe aller Datenpunkte in dem Zeitbereich ermittelt. Zur Ermittlung des Drift-korrigierten Signals wird die lineare Regressionslinie von allen Datenpunkten des Zeitbereichs abgezogen. Daraufhin wird mit Hilfe der folgenden Formel das Peak-zu-Peak-Rauschen ermittelt:

$$N = I_{\max} - I_{\min}$$

wobei N das Peak-zu-Peak-Rauschen ist,  $I_{\max}$  der höchste (maximale) Peak und  $I_{\min}$  der niedrigste (minimale) Peak innerhalb des Zeitbereichs.

- *Rauschen nach ASTM*

Das Rauschen nach ASTM wird wie folgt berechnet:

$$N_{\text{ASTM}} = \frac{\sum_{i=1}^n N}{n}$$

wobei  $N_{\text{ASTM}}$  das Rauschen nach der ASTM-Methode ist.

Eine Rauschbestimmung nach der ASTM-Methode wird nur dann vorgenommen, wenn der ausgewählte Zeitbereich über einer Minute liegt. Wenn der gewählte Zeitbereich höher oder gleich einer Minute ist, wird in Abhängigkeit des Bereichs das Rauschen mithilfe einer der vorher beschriebenen ASTM-Methoden bestimmt. Bei der Berechnung fließen mindestens sieben Datenpunkte pro Zyklus mit ein. Die Zyklen in der automatisierten Rausch-Bestimmung überlappen um 10 %.

## Signal-Rauschen-Berechnung

ChemStation bietet die folgenden Optionen zur Berechnung des Rauschens für das Signal-Rauschen-Verhältnis:

- *6 Sigma*: Das Rauschen wird berechnet als sechsfache Standardabweichung aus der linearen Regression (6 Sigma). Die Daten für die Berechnung des Rauschens werden einem bestimmten Zeitintervall des aktuellen Signals entnommen. Wenn Sie mehrere Zeitintervalle definiert haben, wird das dem Peak am nächsten gelegene verwendet.
- *USP* (entsprechend der Definition in der United States Pharmacopoeia): Das Rauschen wird anhand der Peak-zu-Peak-Formel berechnet. Die Daten für die Berechnung des Rauschens werden einem bestimmten Zeitintervall des aktuellen Signals entnommen. Wenn Sie mehrere Zeitintervalle definiert haben, wird das dem Peak am nächsten gelegene verwendet.
- *EP* (entsprechend der Definition im Europäischen Arzneibuch): Das Rauschen wird anhand der Peak-zu-Peak-Formel berechnet. Die Daten für die Berechnung des Rauschens werden einem Blindwert entnommen. Der Zeitbereich für die Berechnung des Rauschens ist ein Zeitintervall, das das 20-Fache der Peakbreite beträgt, zentriert um die Retentionszeit des Peaks.

Berechnung des Signal-Rauschen-Verhältnisses ohne Referenzsignal (6 Sigma, USP)

Der dem Peak nächste Bereich wird aus den Bereichen gewählt, die in den Einstellungen für die Systemeignung vorgegeben sind.

Das Rauschen wird entweder als sechsfache Standardabweichung aus der linearen Regression oder anhand der Peak-zu-Peak-Formel (USP) berechnet.

Das Signal-Rauschen-Verhältnis wird für jeden Peak im Signalverlauf berechnet. Kann kein Rauschen-Wert gefunden werden, wird das Signal-Rauschen-Verhältnis im Bericht als "-" angegeben.

## Systemeignung

### Bestimmung der Rauschhöhe

Das Signal-Rauschen-Verhältnis wird dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Signal - to - Noise} = \frac{\text{Height of the peak}}{\text{Noise of closest range}}$$

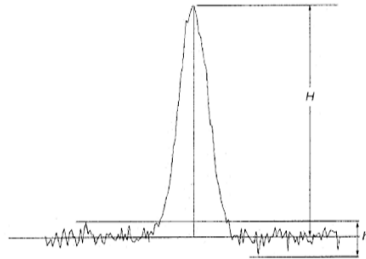


Abbildung 47 Signal-zu-Rausch Verhältnis

Berechnung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses gemäß der EP-Definition

Das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) kann gemäß der Definition im Europäischen Arzneimittelbuch berechnet werden. Das Signal-Rausch Verhältnis wird nach folgender Formel berechnet:

$$S/N = 2H/h$$

Wobei:

$H$  die Höhe des Peaks der entsprechenden Komponente des Chromatogramms der vorgeschriebenen Referenzlösung ist,

$h$  der Absolutwert der größten Rauschen-Fluktuation der Basislinie in einem Chromatogramm ist, das nach Injektion einer Blindprobe erhalten wurde. Dieses Chromatogramm deckt die 20-fache Breite der Peakbreite bei halber Höhe des Chromatogramms der vorgeschriebenen Referenzlösung ab, und ist symmetrisch um die Position platziert, wo dieser Peak zu finden wäre.

Der Rauschen-Wert wird mit der „Peak-zu-Peak“-Methode berechnet (siehe [„Bestimmung des Rauschens nach der Peak-zu-Peak-Berechnung“](#) auf Seite 110).

S/N wird für alle im Chromatogrammsignal vorhandenen Peaks angegeben, vorausgesetzt es existiert ein entsprechendes Referenzsignal. Wenn Sie die Referenzdatendatei angeben, wird das Referenzsignal für ein spezielles Chromatogrammsignal automatisch zugeordnet. Kann einem Chromatogrammsignal kein Referenzsignal zugeordnet werden, dann wird das Signal-Rausch-Verhältnis für die Peaks in diesem speziellen Signal nicht berechnet.

Bestimmung des Rauschbereichs

Der Rauschbereich im Referenzsignal wird nach einem der folgenden Algorithmen bestimmt

- Falls das Referenzsignal nicht lang genug ist:  $StartZeit - EndZeit < 20 * W_{50}$ 
  - $StartZeit = Startzeit$  (des Referenzsignals) und
  - $EndZeit = Endzeit$  (des Referenzsignals)
- Wenn das Referenzsignal lang genug, jedoch der Peak so platziert ist, dass  $(RT - 10 * W_{50})$  kleiner als der Startpunkt des Referenzsignals ist
  - $StartZeit = Startzeit$  (des Referenzsignals) und
  - $EndZeit = StartZeit + 20 * W_{50}$
- Ist das Referenzsignal lang genug, der Peak ist aber so platziert, dass  $RT$  oder  $RT + 10 * W_{50}$  größer als der Endpunkt des Referenzsignals ist
  - $EndZeit = Endzeit$  (des Referenzsignals) und
  - $StartZeit = EndZeit - 20 * W_{50}$
- Ist der Peak so platziert, dass  $RT$  oder  $RT + 10 * W_{50}$  größer als der Endpunkt des Referenzsignals ist
  - $StartZeit = RT - 10 * W_{50}$  und
  - $EndZeit = RT + 10 * W_{50}$

Wobei:

$RT$  die Retentionszeit und

$W_{50}$  die Peakbreite bei halber Höhe ist.

## Drift und Wanderung

Drift und Wanderung werden berechnet, wenn **Signal to noise** in der Auswertungsmethode ausgewählt ist. Die Parameter werden berechnet, unabhängig davon, welche Berechnungsmethode für das Rauschen ausgewählt ist.

**Drift** Die Drift wird als Steigung der linearen Regression definiert. Zunächst wird die Drift durch Bestimmung der linearen Regression mithilfe aller Datenpunkte in dem Zeitbereich ermittelt. Zur Ermittlung des Drift-korrigierten Signals wird die lineare Regressionslinie von allen Datenpunkten des Zeitbereichs abgezogen.

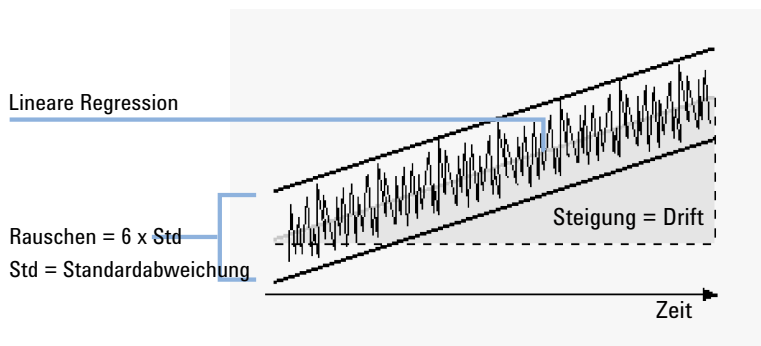


Abbildung 48 Drift für Rauschen als das Sechsfache der Standardabweichung

Funktion:

$$y(x) = a + bX$$

wobei

N	Anzahl der einzelnen Beobachtungen
$X_i$	Unabhängige Variable, i-te Beobachtung
$Y_i$	Abhängige Variable, i-te Beobachtung

Koeffizienten:

$$a = \frac{1}{\Delta X} \left( \sum_{i=1}^N X_i^2 * \sum_{i=1}^N Y_i - \left( \sum_{i=1}^N X_i * \sum_{i=1}^N X_i Y_i \right) \right)$$

$$b = \frac{1}{\Delta X} \left( N * \sum_{i=1}^N X_i Y_i - \left( \sum_{i=1}^N X_i * \sum_{i=1}^N Y_i \right) \right)$$

$$\Delta X = N * \sum_{i=1}^N X_i^2 - \left( \sum_{i=1}^N X_i \right)^2$$

**Wanderung** Wanderung wird als Peak-zu-Peak-Rauschen der Mittelwerte in den ASTM-Rauschzyklen bestimmt, siehe "Bestimmung des Rauschens als sechsfache Standardabweichung" auf Seite 109.

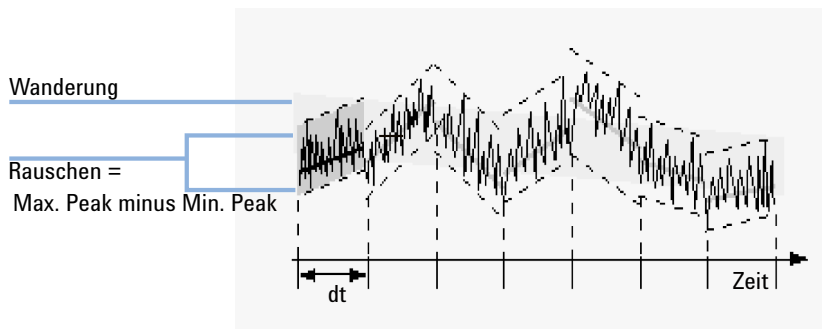


Abbildung 49 Wanderung des Rauschens gemäß Definition in der ASTM-Methode

## Berechnung der Peakasymmetrie und -symmetrie

**Asymmetrie** Die ChemStation bestimmt das Asymmetrieverhältnis eines Peaks durch Vergleich der halben Breite des Peaks bei 5 % (siehe "Tailingfaktor (USP) t" auf Seite 128) oder 10 % (siehe nachstehende Gleichung) der Peakhöhe.

$$A_s = \frac{W_{10}}{2 W_{f,10}}$$

wobei

$A_s$	Asymmetrie 10 %
$W_{10}$	Peakbreite bei 10 % der Peakhöhe
$W_{f,10}$	Vordere Hälfte der Peakbreite bei 10 % der Peakhöhe

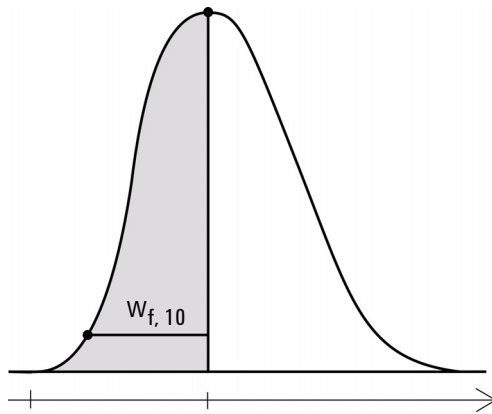


Abbildung 50 Berechnung der Peakasymmetrie

**Symmetrie** Die Peakasymmetrie wird vom Integrator unter Verwendung der nachstehenden Gleichungen für das Moment als Pseudomoment berechnet:

$$m_1 = a_1 \left( t_2 + \frac{a_1}{1.5 H_f} \right)$$

$$m_2 = \frac{a_2^2}{0.5 H_f + 1.5 H}$$

$$m_3 = \frac{a_3^2}{0.5 H_f + 1.5 H}$$

$$m_4 = a_4 \left( t_3 + \frac{a_4}{1.5 H_f} \right)$$

$$\text{Peak symmetry} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{m_3 + m_4}}$$

Wird kein Wendepunkt gefunden oder nur ein Wendepunkt berichtet, wird die Peakasymmetrie folgendermaßen berechnet:

$$\text{Peak symmetry} = \frac{a_1 + a_2}{a_3 + a_4}$$

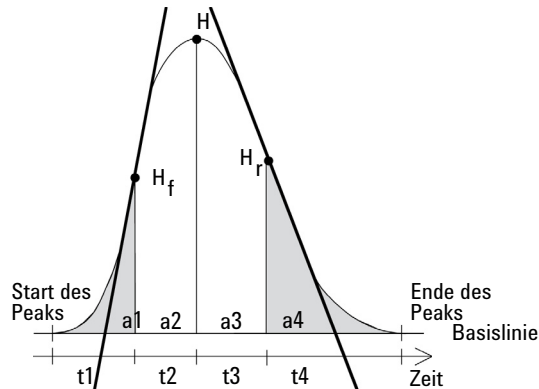


Abbildung 51 Berechnung des Peakasymmetriefaktors

wobei:

$a_i$  = Fläche des Schnitts

$t_i$  = Zeitpunkt des Schnitts

$H_f$  = Höhe des vorderen Wendepunkts

$H_f$  = Höhe des hinteren Wendepunkts

$H$  = Höhe am Maximum

## Formeln und Berechnungsmethoden zur Beurteilung der Systemeignung

Die ChemStation verwendet die folgenden Formeln zur Berechnung der verschiedenen Testergebnisse zur Systemeignung. Die Ergebnisse werden mithilfe der Reportvorlagen **Performance** (Leistung), **Performance+Noise** (Leistung + Rauschen), **Performance+LibSearch** (Leistung BibSuche), und **Extended Performance** (Erweiterte Leistung) angegeben.

Wenn in einer gegebenen Definition ASTM oder USP angegeben wird, dann entsprechen die Definitionen denen in der jeweiligen Referenz. Es ist jedoch zu beachten, dass die hier verwendeten Symbole von jenen der Referenz abweichen können.

Die in diesem Zusammenhang verwendeten Referenzen sind:

- *ASTM: Section E 685–93 (2021)*
- *USP: The United States Pharmacopeia, First Supplement to USP 37-NF32*
- *EP: Europäisches Arzneibuch, 11. Ausgabe*
- *JP: Japanese Pharmacopoeia, 18th Edition*

### HINWEIS

Beginnend mit USP 2022 wurden mehrere Höchstleistungsparameterberechnungen mit EP und JP harmonisiert. Einzelheiten darüber, welche EP-/JP-Formel Sie verwenden müssen, um Konformität mit USP 2022 zu gewährleisten, finden Sie in der ChemStation Online-Hilfe.

## Allgemeine Definitionen

### Totvolumen Totvolumen

$$V = d^2 \pi l \left( \frac{f}{4} \right)$$

wobei

d	Durchmesser der Säule [cm]
$\pi$	Konstante, Verhältnis des Umfangs zum Durchmesser eines Kreises
l	Länge der Säule [cm]
f	Fraktion des Säulenvolumens, das nicht mit stationärer Phase ausgefüllt sondern für die mobile Phase verfügbar ist; Standardwert für f = 0,68 (für Hypersil)

### Retentionszeit einer nicht retardierten Substanz t (m) [min]

(Auch als Totzeit oder Nullzeit bezeichnet)

$$T_m = \frac{V}{F}$$

wobei

F	LC-Flussrate [ml/min]
---	-----------------------

## Leistungstest-Definitionen

### Überblick über Leistungstests

Faktoren aus der Peaktabelle gemäß Definition nach USP, EP und JP stehen zur Verwendung in ChemStation Reports zur Verfügung. Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die zur Verfügung stehenden Faktoren, ihre Definitionen und die Namen der jeweiligen Werte. Weitere Details über die Berechnung finden Sie in den entsprechenden Abschnitten in diesem Handbuch.

**Tabelle 9** Werte aus dem Arzneimittelbuch in der Reportausgabe der ChemStation

USP	EP	JP	Definition	Klassische Reporterstellung (RLE)	Intelligente Reporterstellung (RTE)
Symmetriefaktor oder Tailing-Faktor	Symmetriefaktor	Symmetriefaktor	$S = W_5/2f$	Tailing, USP	Peak_TailFactor
-	-	-	$S = W_{10}/2f$	USP-Asymmetrie bei 10 % Höhe	Peak_Asymmetry_10Perc
Trennfaktor	-	Trennfaktor	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ $T_R$ von Peak a < $T_R$ von Peak b	Selektivität	Peak_Selectivity
Relative Retention	Relative Retention	-	Mit RRT-Substanzen: $r = (t_{R2} - t_0)/(t_{R1} - t_0)$	-	Peak_RelativeRetTime_EP
Relative Retentionszeit (RRT)	Nicht angepasste relative Retention	Nicht angepasste relative Retention	$R_r = t_2/t_1$	-	Peak_RelativeRetTime
-	Auflösung	Auflösung	$R_s = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$	Auflösung (EP) Auflösung (JP)	Peak_Resolution_EP Peak_Resolution_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right) (T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Auflösung	Peak_Resolution_Classic
Auflösung	-	-	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t(2)} + W_{t(1)}}$	-	Peak_Resolution_USP

**Tabelle 9 Werte aus dem Arzneimittelbuch in der Reportausgabe der ChemStation**

USP	EP	JP	Definition	Klassische Reporterstellung (RLE)	Intelligente Reporterstellung (RTE)
Anzahl der theoretischen Böden (Effizienz)			$n = 16 \left( \frac{t_R}{W_t} \right)^2$	Tangentenmethode für Trennböden	Peak_TheoreticalPlates_USP
-	Trennstufenzahl (Effizienz)	Trennstufenzahl (Effizienz)	$N = 5,54 \times t_R^2 / W_{50}^2$	Halbhöhenmethode für Trennböden	Peak_TheoreticalPlates_EP Peak_TheoreticalPlates_JP
	Signal/Rausch-Verhältnis	Signal/Rausch-Verhältnis	Signal/Rausch-Verhältnis = 2H/h Rauschen: Peak-zu-Peak-Berechnung; Blindwert als Referenzsignal; Zeitintervall entsprechend dem 20-Fachen der Peakbreite.	-	Peak_SignalToNoise_EP
	Signal/Rausch-Verhältnis		Signal/Rausch-Verhältnis = 2H/h Rauschen: Peak-zu-Peak-Berechnung; Zeitintervall im aktuellen Signal.		Peak_SignalToNoise_USP
			Signal/Rausch-Verhältnis = 2H/h Rauschen: 6-Sigma-Berechnung; Zeitintervall im aktuellen Signal.		Peak_SignalToNoise_6Sigma
Peak-zu-Tal-Quotient	Peak-zu-Tal-Quotient	Peak-zu-Tal-Quotient	$p/v = H_p/H_v$	Peak-zu-Tal-Verhältnis (Front und Tail)	Peak_PeakValleyRatio
-	-	-	$S = B/A$	Foley-Dorsey-Asymmetrie bei 10 % Höhe	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7 (T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A, B) / \min(A, B))}$	Foley-Dorsey-Trennböden	-

## Statistische Momente, Schräge und Überschuss

Die statistischen Momente werden alternativ zur Beschreibung asymmetrischer Peakformen verwendet. Es existiert eine unendliche Anzahl statistischer Momente zu einem Peak, es werden jedoch nur die ersten fünf zur Beschreibung chromatographischer Peaks verwendet. Diese werden „0. Moment“, „1. Moment“, ... „4. Moment“ genannt.

Das 0. Moment stellt die Peakfläche dar.

Das 1. Moment stellt die mittlere Retentionszeit gemessen am Peakschwerpunkt dar. Diese unterscheidet sich von der chromatographischen Retentionszeit, die am Peakmaximum gemessen wird, vorausgesetzt es handelt sich um einen symmetrischen Peak.

Das 2. Moment stellt die Peakvarianz dar, die ein Maß für die Peakerweiterung ist. Es ist eine Summe der Varianzen aus verschiedenen Beiträgen des Gerätesystems.

Das 3. Moment beschreibt die vertikale Symmetrie oder Schräge. Es ist ein Maß für die Abweichung der Peakform von der idealen Gaußform. Die Schräge wird im Report „Leistung + Erweitert“ zusätzlich dimensionslos angegeben. Ein symmetrischer Peak hat eine Schräge von Null. Peaks mit Tailing haben eine positive Schräge mit einem 1. Moment, das größer als die Retentionszeit ist. Peaks mit Fronting haben eine negative Schräge und ihr 1. Moment ist kleiner als die Retentionszeit.

Das 4. Moment oder der Exzess ist ein Maß für die Stauchung oder Zerrung eines Peaks längs einer vertikalen Achse als Vergleich zur idealen Gaußform, die ein 4. Moment von Null aufweist. Eine visuelle Vergleichsdarstellung wäre das Verschieben der Seiten eines Gaußpeaks bei konstanter Fläche. Wenn ein Peak in diesem Vergleich „komprimiert“ wird, weist er einen negativen Exzess auf. Wenn er höher und schmaler wird, ist der Exzess positiv. Der Wert des Exzesses wird im Report „Leistung + Erweitert“ als dimensionsloser Wert präsentiert.

### Berechnung statistischer Momente

$$M0 = d_t \cdot X$$

$$M1 = t_0 + d_t \cdot \frac{X}{Y}$$

$$M2 = \frac{d_t^2}{X} \cdot \sum_{i=1}^N \left( \left( i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^2 \cdot A_i \right)$$

$$M3 = \frac{d_t^3}{X} \cdot \sum_{i=1}^N \left( \left( i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^3 \cdot A_i \right)$$

$$M4 = \frac{d_t^4}{X} \cdot \sum_{i=1}^N \left( \left( i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^4 \cdot A_i \right)$$

wobei

N = Anzahl der Flächenschnitte

$A_i$  = Wert (Response) des Flächenschnitts mit dem Index i

$d_t$  = Intervall zwischen benachbarten Flächenschnitten

$t_0$  = Zeit des ersten Flächenschnitts

$\sum_{i=1}^N$  = Summe über die Einzelbeobachtungen mit einem Laufindex vom Startwert 1 bis zum Endwert N

$$X = \sum_{i=1}^N (A_i)$$

$$Y = \sum_{i=1}^N ((i-1) \cdot A_i)$$

## Tatsächliche Peakbreite $W_x$ [min]

$W_x$  = Peakbreite bei einer Höhe von x % der Gesamthöhe

wobei

$W_t$	Tangenten-Peakbreite, 4 Sigma, gegeben durch die Schnittpunkte der Tangenten durch die Wendepunkte mit der Basislinie
$W_{4,4}$	Breite bei 4,4 % der Höhe (Sigtabreite 5)
$W_5$	Breite bei 5 % der Höhe (Tailing-Peakbreite), wird für den USP-Tailingfaktor verwendet
$W_{10}$	Breite bei 10 % der Höhe
$W_{50}$	Breite bei 50 % der Höhe (wahre Peakbreite bei halber Höhe oder 2,35 Sigma).

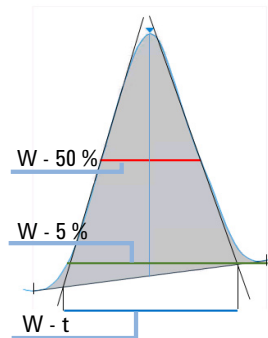


Abbildung 52 Peakbreite bei x % der Höhe

## Kapazitätsfaktor (USP)

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Es gilt Folgendes:

$t_R$  = Retentionszeit des Peaks [min]

$t_0$  = Totzeit [min]

## Tailingfaktor (USP) t

### HINWEIS

Der Symmetriefaktor (USP, EP, JP) ist mit dem Tailing-Faktor (USP) identisch. In Intelligente Reporterstellung stehen beide als „Peak\_TailFactor“ zur Verfügung. Siehe auch ["Überblick über Leistungstests"](#) auf Seite 123.

$$S = \frac{W_5}{2f}$$

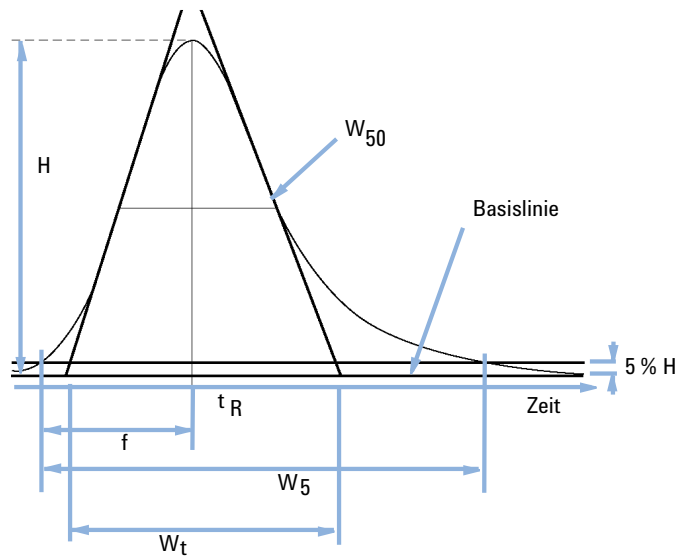


Abbildung 53 Leistungsparameter

S	Symmetriefaktor, Tailing-Faktor (USP)
H	Peakhöhe
$t_R$	Retentionszeit
f	Abstand in Minuten zwischen der Peakfront und $t_R$ , gemessen bei 5% der Peakhöhe
$W_{50}$	Peakbreite bei 50% der Peakhöhe [min]
$W_5$	Peakbreite bei 5% der Peakhöhe [min]
$W_t$	Peakbreite mit Tangentenmethode

## Anzahl der theoretischen Trennböden pro Säule n

Tangentenmethode (USP, ASTM):

$$n = 16 \left( \frac{t_R}{W_t} \right)^2$$

wobei

$T_R$	Retentionszeit
$W_t$	Peakbreite mit Tangentenmethode [min]

Halbwertsbreitenmethode (ASTM, EP, JP):

$$n = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{50}} \right)^2$$

wobei

$T_R$	Retentionszeit
$W_{50}$	Peakbreite in halber Peakhöhe [min]

5 Sigma-Methode:

$$n = 25 \left( \frac{T_R}{W_{4.4}} \right)^2$$

wobei

$T_R$	Retentionszeit
$W_{4.4}$	Peakbreite bei 4,4 % der Peakhöhe [min]

Statistische Methode:

$$n = \frac{M1^2}{M2}$$

wobei

$M_x = x \cdot$  statistisches Moment

#### Foley-Dorsey-Methode

Bei asymmetrischen Peaks wird die Foley-Dorsey-Gleichung verwendet. Sie korrigiert bei der Berechnung der Bodenzahl das Peaktailing und die Verbreiterung.

$$N_{\text{sys}} = \frac{41.7 (T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A, B) / \min(A, B))}$$

wobei

- $W_{10}$  = Peakbreite bei 10 % der Peakhöhe
- A: Fronting und B: Tailing, mit  $A + B = W_{10}$

## Anzahl theoretischer Böden pro Meter N [1/m]

$$N = 100 \cdot \frac{n}{l}$$

wobei

n

Anzahl der theoretischen Böden

l

Säulenlänge [cm] (wie in der Auswertungsmethode gegeben)

## Relative Retention, Selektivität

**Selektivität** Die Selektivität berechnet den Wert für Alpha für alle Signalpeaks außer für den ersten Peak. Für jedes Paar benachbarter Peaks (Peak 1 und 2,  $t_{R1}$  von Peak 1 <  $t_{R2}$  von Peak 2) wird die Selektivität wie folgt berechnet:

$$\alpha = \frac{k'_{2}}{k'_{1}} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}, \alpha > 1$$

wobei

$k'_{(x)}$  Kapazitätsfaktor für Peak x:  $(t_{Rx} - t_0)/t_0$

**Relative Retention (EP)** Die relative Retention (angepasst) nach EP kann nur berechnet werden, wenn ein Referenzpeak für das RT-Verhältnis definiert und identifiziert wurde. *Alpha*-Werte sind < 1, wenn der Peak links des Referenzpeaks ist, und > 1, wenn der Peak rechts des Referenzpeaks ist.

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

wobei

$t_{Ri}$  = Retentionszeit des interessierenden Peaks

$t_{Rst}$  = Retentionszeit des Referenzpeaks

$t_M$  = Rückhaltezeit

Relative Retention (nicht angepasst) nach EP wird berechnet als

$$r_G = t_{Ri} / t_{Rst}$$

## wobei Auflösung (USP, ASTM) R

Tangentenmethode (bezogen auf Peaks 1 und 2,  $t_{R1}$  von Peak 1 <  $t_{R2}$  von Peak 2;  $t_{R1}$  in min)

$$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t(2)} + W_{t(1)}}$$

wobei

$t_R$  Retentionszeit

$W_t$  Tangentenbreite [min]

## Auflösung (EP/JP) Rs

Auflösung (JP) und Auflösung (EP) werden gemäß der folgenden Definition berechnet:

$$R_s = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$$

### HINWEIS

Zusätzlich gibt es in der Intelligenten Reporterstellung auch Classic Resolution  $(2.35/2)^*$  als Peak\_Resolution\_Classic. Eine vollständige Liste der Werte finden Sie unter ["Überblick über Leistungstests"](#) auf Seite 123

## Auflösung (ChemStation klassische Definitionen)

Methode der Halbwertsbreite

$$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right) (T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$$

5 Sigma-Methode

$$R = \frac{2.5(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{4.4(b)} + W_{4.4(a)}}$$

Statistische Methode:

$$R = \frac{M1_{(b)} - M1_{(a)}}{W_{S(b)} + W_{S(a)}}$$

wobei

$M1_{(x)}$  = Mittlere Retentionszeit für Peak x (1. statistisches Moment) [min]

$W_{B(x)}$  = Basisbreite für Peak x [min]

$W_{4.4(x)}$  = Breite bei 4,4 % Höhe für Peak x [min]

$W_{50(x)}$  = Breite bei 50% Höhe für Peak x [min]

$W_S(x)$  = Breite abgeleitet von statistischen Momenten =  $\sqrt{(M2)}$  für Peak x [min]  
(siehe auch "Berechnung statistischer Momente" auf Seite 126)

## Peak-Tal-Verhältnis (EP/JP)

Das Peak-Tal-Verhältnis (**p/v ratio** in den Injektionsergebnissen) wird berechnet, um die Qualität der Peak-Trennung zu beurteilen. Es wird gemäß der europäischen und japanischen Pharmakopöe (EP, JP) berechnet.

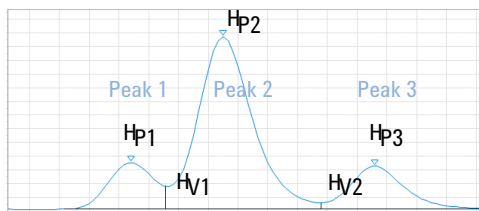
### HINWEIS

Dieser Wert wird je nach Schwellenwert, der für die Peak-Trennung auf der erweiterten Basislinie vom Integrator benutzt wird, unterschiedlich berechnet.

Das Peak-Tal-Verhältnis wird für Peaks berechnet, die von einem Tal voneinander getrennt sind:

$$PV = \text{Peakhöhe} / \text{Talhöhe}$$

Befindet sich sowohl links als auch rechts neben dem Peak ein Tal, wird das Peak-Tal-Verhältnis für die vordere und für die hintere Flanke berechnet. Im Rahmen der intelligenten Berichterstellung wird dann das P/V-Mindestverhältnis angezeigt. Im Rahmen der klassischen Berichterstellung zeigt der Bericht *Classic extended performance* (Erweiterter klassischer Leistungsbericht) beide Werte an.



Für Peak 1:

$$PV = \frac{H_{P1}}{H_{V1}}$$

Für Peak 2:

$$PV_F = \frac{H_{P2}}{H_{V1}}$$

$$PV_T = \frac{H_{P2}}{H_{V2}}$$

Für Peak 3:

$$PV = \frac{H_{P3}}{H_{V2}}$$

wobei

PV	Peak-Tal-Verhältnis
PV <sub>F</sub>	Peak-Tal-Verhältnis, Vorderflanke
PV <sub>T</sub>	Peak-Tal-Verhältnis, Hinterflanke
H <sub>Px</sub>	Höhe von Peak x
H <sub>Vx</sub>	Höhe von Tal x

Wenn ein Peak mehrere Schultern hat, die von einem Tal getrennt werden, dann wird für jede Schulter ein Peak-Tal-Verhältnis berechnet.

Definition eines Tals:

- Die Höhe und die Zeit eines Tals werden von zwei aufeinander folgenden Peaks geteilt.
- Seine Basislinie wird von zwei aufeinander folgenden Peaks geteilt.
- Die absolute Basislinienhöhe ist größer als 10<sup>-5</sup>.

## Definitionen für die Reproduzierbarkeit

Für die statistische Betrachtung der Analysendaten mit Blick auf die Reproduzierbarkeit wird die Sequenz als eine kleine, zufällig aus einer unendlichen Anzahl möglicher experimenteller Ergebnisse ausgewählte Probe betrachtet. Um einen vollständigen Ergebnissatz zu erhalten, bräuchte man eine unbegrenzte Menge Probenmaterial und Zeit. Genaue statistische Daten beziehen sich ausschließlich auf einen kompletten, in sich selbst geschlossenen Satz oder eine Datenpopulation. Aus diesem Grund ist die Voraussetzung für solch eine Datenbehandlung, dass die ausgewählte Probe als repräsentativ für alle Daten betrachtet werden kann.

### Probenmittelwert M

Der Mittelwert M einer zufällig ausgewählten Probe, die N mal gemessen wurde, wird aus diesem begrenzten Satz von N einzeln ermittelten Werten  $X_i$  (mit dem Index i als fortlaufendem Zähler) anhand folgender Formel berechnet:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$$

wobei

N = Anzahl der Einzelbeobachtungen

$X_i$  = Wert der Einzelbeobachtungen mit dem Index i

## Standardabweichung der Probe (S)

Eine zufällige Probe der Größe N wird angenommen. Die Proben-Standardabweichung S für die ausgewählte begrenzte Probe aus der großen Datenpopulation wird ermittelt durch

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - M)^2}{N - 1}}$$

Die Proben-Standardabweichung S unterscheidet sich in zwei Punkten von der Standardabweichung s für die gesamte Population:

- Anstelle des wirklichen Mittelwertes wird nur der Proben-Mittelwert M verwendet und
- die Division erfolgt durch N-1 anstelle von N.

## Relative Standardabweichung RSD[%] (USP)

Die relative Standardabweichung ist definiert als

$$RSD = 100 \frac{S}{M}$$

## Standardabweichung S des Mittelwerts

M stellt den Probenmittelwert dar und S die Proben-[oder (N-1)]-Standardabweichung. Die Standardabweichung  $S_M$  vom Probenmittelwert M wird folgendermaßen ermittelt

$$S_M = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

Dies kann durch ein Beispiel verdeutlicht werden:

Während die Retentionszeit einer bestimmten Substanz in einer Sequenz leicht vom berechneten Mittelwert abweichen kann, können sich die Daten aus einer anderen Sequenz, z. B. durch Änderungen in der Umgebungstemperatur, Degradation des Säulenmaterials mit der Zeit usw., deutlich unterscheiden. Um diese Abweichung zu ermitteln, kann die Standardabweichung des Probenmittelwerts  $S_M$  gemäß der obigen Formel berechnet werden.

## Standardabweichung (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - a - bX_i)^2}{N-2}}$$

## Konfidenzintervall CI

Das Konfidenzintervall wird berechnet, um Informationen über die Güte der Schätzung des Mittelwerts zu erhalten, wenn dieser auf die ganze Population und nicht nur auf eine Probe angewandt wird.

Das  $100 \times (1 - \alpha) \%$  Konfidenzintervall für den Gesamtmittelwert ist gegeben durch

$$CI = t_{(\alpha/2);N-1} \cdot S_M$$

wobei

$$t_{(\alpha/2);N-1}$$

Prozentpunkt der t-Verteilungstabelle bei einer Risikowahrscheinlichkeit von  $\alpha$

Für die erweiterte Statistik im Sequenzübersichtsreport kann das 95%-Konfidenzintervall verwendet werden ( $\alpha = 0.05$ ).

Die t-Verteilung (oder „Student-Verteilung“) muss bei kleiner Probenanzahl verwendet werden. Im Falle großer Probenanzahl differieren die Ergebnisse für die t-Verteilung und die Normalverteilung (Gauß) nicht mehr. Deshalb kann bei 30 oder mehr Proben stattdessen die Normalverteilung verwendet werden. (Es wäre sehr schwierig, die t-Verteilung für eine große Probenanzahl zu berechnen; die Normalverteilung ist die beste Annäherung.)

95%-Konfidenzintervall für 6 Proben:

$$1 - \alpha = 0.95$$

$$N = 6$$

Der korrekte Wert für t muss aus der t-Verteilungstabelle für 5 (N-1) Freiheitsgrade und für den Wert  $\alpha/2$ , d. h. 0,025, genommen werden. Daraus ergibt sich die folgende Berechnungsformel für CI:

$$CI = 2.571 \cdot \frac{1}{\sqrt{6}} \cdot S_M$$

## Korrelationskoeffizient

Im Zusammenhang mit der Darstellung der Kalibrierungskurve wird auch ein *Korrelationskoeffizient* angezeigt. Der Korrelationskoeffizient (r) ist ein Maß für die Anpassung der Kalibrierungskurve zwischen den Datenpunkten. Für Kalibrierungskurven mit positiver Steigung wird der Wert des Koeffizienten mit fünf Dezimalstellen angegeben:

0,00000 bis 1,00000

wobei

0,00000 = keine Passform

1,00000 = perfekte Passform

### HINWEIS

Der Korrelationskoeffizient korreliert nicht direkt mit einer guten Genauigkeit und Präzision der analytischen Methode. Er sollte hauptsächlich dafür verwendet werden, den besten Kurventyp zu bestimmen.

Bei der Evaluierung eines Kurventyps müssen Sie mit genügend vielen Kalibrierstufen arbeiten, um eine ausreichende statistische Relevanz zu erhalten.

Der Korrelationskoeffizient (r) wird nach folgender Formel berechnet:

$$r = \frac{\sum (y_i - \bar{y}) * (Y_i - \bar{Y}) * wt_i}{(\sum (y_i - \bar{y})^2 * wt_i) * \sum (Y_i - \bar{Y})^2 * wt_i)^{\frac{1}{2}}}$$

wobei

r	Korrelationskoeffizient
wt <sub>i</sub>	Gewichtung des Datenpunktes
$\bar{y}$	Mittelwerte der gemessenen Responses oder Mengen Wird der Verlauf der Kalibrierungskurve durch den Nullpunkt erzwungen ( <b>Origin=Force</b> in der Auswertungsmethode), berechnet OpenLab ChemStation das unzentrierte Bestimmtheitsmaß. In diesem Fall wird $\bar{y}$ weggelassen.
y <sub>i</sub>	Gemessene Response, (Fläche, AreaRatio (ISTD-Methode), Höhe oder HeightRatio (ISTD-Methode) oder Menge (Menge, AmountRatio (ISTD-Methode)), je nach Kalibrierungsmethode
$\bar{Y}$	Mittelwerte der vorhergesagten Responses oder Mengen
Y <sub>i</sub>	Vorhergesagte Response oder Menge (unter Verwendung der Kalibrierungskurve)

$\bar{y}$  und  $\bar{Y}$  die Mittelwerte der gemessenen und vorhergesagten Responses oder Mengen sind, die folgendermaßen berechnet werden:

$$\bar{y} = \frac{\sum(y_i * wt_i)}{\sum(wt_i)}$$

wobei

$wt_i$	Gewichtung des Datenpunktes
$\bar{y}$	Mittelwerte der gemessenen Responses oder Mengen
$y_i$	Gemessene Response, (Fläche, AreaRatio (ISTD-Methode), Höhe oder HeightRatio (ISTD-Methode) oder Menge (Menge, AmountRatio (ISTD-Methode))), je nach Kalibrierungsmethode

und

$$\bar{Y} = \frac{\sum(Y_i * wt_i)}{\sum(wt_i)}$$

wobei

$wt_i$	Gewichtung des Datenpunktes
$\bar{Y}$	Mittelwerte der vorhergesagten Responses oder Mengen
$Y_i$	Vorhergesagte Response oder Menge (unter Verwendung der Kalibrierungskurve)

Bei einem **Forced Origin** wird angenommen, dass die Punkte um Null zentriert sind (gespiegelt zum dritten Quadranten) und die Mittelwerte durch Null ersetzt werden.

Der Korrelationskoeffizient ist bei perfekter Anpassung oder wenn die Punkte symmetrisch um die Kurve verteilt sind gleich 1. Wenn die Punkte weniger symmetrisch verteilt sind, wird er kleiner. Die Werte liegen typischerweise zwischen 0,99 und 1. Der Korrelationskoeffizient ist kein sonderlich empfindliches Maß für die Qualität einer Kurve.

## Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff

Für Validierungszwecke kann eine manuelle Neuberechnung der ChemStation-Ergebnisse wie Kalibrierungskurven, Korrelationskoeffizienten, theoretische Trennböden usw. notwendig sein. Dabei muss das in der ChemStation verwendete Zahlenformat berücksichtigt werden.

Für alle in der ChemStation intern gespeicherte Zahlen wird der „C“ Datentyp DOUBLE verwendet. Dies bedeutet, dass für jede Zahl 14 signifikante Stellen gespeichert werden. Die Implementierung dieses Datentyps folgt der Microsoft-Implementierung des IEEE-Standards für den Datentyp „C“ und die damit verbundenen Rundungsregeln (siehe Microsoft-Dokumentationen Q42980, Q145889 und Q125056).

Entsprechend der unbegrenzten Zahl von Parametern, die für die Berechnung der Kalibrierungstabelle verwendet werden können, ist es nicht möglich, den exakten Fehler zu berechnen, der sich durch die Fortpflanzung und Aufaddierung von Rundungsfehlern ergibt. Gründliches Testen mit verschiedenen Kalibrierungskurven-Konstruktionen hat jedoch gezeigt, dass eine Genauigkeit auf bis zu 10 Stellen garantiert werden kann. Da die Wiederholbarkeit von chromatographischen Analysen die Fläche, Höhe und Retentionszeit betreffend auf 3 signifikante Stellen genau angegeben wird, ist die Verwendung von 10 signifikanten Stellen während der Berechnung ausreichend. Aus diesem Grund werden bei der Kalibrierungstabelle und anderen Tabellen maximal 10 signifikante Stellen angegeben.

Wird für die Validierung eine externe (manuelle) Berechnung benötigt, so wird empfohlen, alle für die interne Berechnung verwendeten Stellen zu benutzen. Die Verwendung der angezeigten und/oder gerundeten Daten bei der externen Berechnung kann durch Rundungsfehler zu anderen Ergebnissen führen, als die ChemStation ermittelt hat.

Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, wie Sie Zugang zu allen intern gespeicherten Zahlen, die typischerweise für manuelle Berechnungen benötigt werden, erhalten. In allen Fällen muss vor der Eingabe der aufgelisteten Befehle eine Datendatei geladen und ein Bericht mit der geeigneten Berichtvorlage erstellt werden. Alle Befehle werden in der ChemStation-Befehlszeile eingegeben, die vom Menü Ansicht aus verfügbar gemacht werden kann.

In den folgenden Beispielen wird eine .TXT-Datei im Ordner Öffentliche Geräte erstellt (z. B. C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1). Um die genaue

Pfadbezeichnung zu erhalten, verwenden Sie den Befehlszeileneintrag `print _instpath$`. Benutzen Sie andere Datei- und Ordnernamen je nach Bedarf. Die Informationen in dieser Datei können mit NOTEPAD oder einem geeigneten Texteditor angezeigt werden.

Informationen zu Rohpeaks:

- Retentionszeit
- Fläche
- Höhe
- Breite (Integrator)
- Symmetrie
- Peak Startzeit
- Peak Endzeit

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE CHROMREG, INTRESULTS, _instpath$ + "INTRES.TXT"
```

Informationen zu verarbeiteten Peaks:

- Gemessene Retentionszeit
- Erwartete Retentionszeit
- Fläche
- Höhe
- Breite (Integrator)
- Symmetrie
- Halbe Breite - Halbe Peakhöhe (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- Tailingfaktor (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- Selektivität (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- $K'$  (Erweiterter Leistungstest)
- Tangenten-Peakbreite (Erweiterter Leistungstest)
- Schräge (Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden - Halbe Breite (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden - Tangente (Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden – 5 Sigma (Erweiterter Leistungstest)

## Systemeignung

### Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff

- Theoretische Trennböden - Statistisch (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - Halbe Breite (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - Tangente (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung – 5 Sigma (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - Statistisch (Erweiterter Leistungstest)

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE CHROMRES, PEAK, _instpath$ + "PEAK.TXT"
```

Informationen zu verarbeiteten Substanzen:

- Berechnete Menge

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE CHROMRES, COMPOUND, _instpath$ + "COMPOUND.TXT"
```

Informationen zur Kalibrierungstabelle:

- Stufenzahl
- Menge
- Fläche
- Höhe

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, CALPOINT, _instpath$ + "CALIB.TXT"
```

Informationen zur linearen Regression:

- Y-Achsenabschnitt (CurveParm1)
- Steigung (CurveParm2)
- Korrelationskoeffizient

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, PEAK, _instpath$ + "REGRESS.TXT"
```

## 6

# CE-spezifische Berechnungen

Kalibriertabellen	144
Standardkalibrierung	144
Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts	145
Kalibrierung des DNA-Basenpaars	145
Kapillar-isoelektrische Fokussierung	146
Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur	147
Einleitung	147
Berechnungen der effektiven Mobilität	148
Berechnungen der relativen Mobilität	151
Spezielle Reportstile für die Kapillarelektrophorese	153
Korrigierte Peakflächen	154
Systemeignungstest für die Kapillarelektrophorese	155
Kapazitätsfaktor $k'$	155
CE-MSD	156
Untergrundsubtraktion	156

Dieses Kapitel ist nur relevant, wenn Sie die ChemStation zum Steuern von CE-Geräten verwenden.

## Kalibriertabellen

Es stehen Ihnen zur Erstellung Ihrer Kalibriertabelle vier verschiedene Kalibrierarten in der Dropdown-Liste zur Verfügung.

### Standardkalibrierung

Die Standardkalibrierung basiert auf der Peakfläche oder -höhe. Wenn Sie **Standard Calibration** wählen, können Sie die Option **Calculate Signals Separately** oder **Calculate with Corrected Areas** wählen.

Sie wählen die Option "Signale separat berechnen", wenn Sie sicherstellen möchten, dass in der Berechnung von Norm%-Reporten das Mengenprozent separat aufgezeichneter Signale für jedes Signal 100 % ergibt. Wenn Sie die Option **Calculate signals separately** deaktivieren, ergibt das Mengenprozent aller Signale 100 %. Die Auswahl der Option **Calculate signals separately** ist eine Voraussetzung für das Sortieren der Signale in der Kalibriertabelle.

Wählen Sie **Calculate with Corrected Areas**, um eine Korrektur an der Peakfläche basierend auf der Migrationszeit vorzunehmen. In diesem Modus wird die Fläche durch die Migrationszeit dividiert, was die Reproduzierbarkeit in der quantitativen Analyse verbessern kann, wenn die Migrationszeiten instabil sind.

Zusätzlich zur Standardkalibrierung gibt es drei 3 Kapillarelektrophorese-spezifische Kalibrierungen, die auf der Migrationszeit eines Signals basieren. Das Signal wird durch die Signalbeschreibung in der Kalibrierungsmethode definiert. Wenn die Datendatei mehrere Signale enthält, darf nur ein Signal ausgewählt und aus der Datendatei extrahiert werden. Das Format der Kalibriertabellen ist vom ausgewählten Kalibriertyp abhängig.

Quantifizierungsaufgaben können basierend auf der Kalibrierung der Biopolymer-Größe (Ferguson-Plot) für das SDS-Protein ausgeführt werden.

## Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts

Für die **Protein molecular weight calibration** ist ein Kalibrierstandard mit Komponenten mit bekannten Molekulargewichten und ein Referenzpeak erforderlich. Die Kalibriergleichung lautet wie folgt,

$$\log(MW) = k_1 \cdot (t_{ref}/t) + k_0$$

wobei

$MW$  das Molekulargewicht ist

$t_{ref}$  die Migrationszeit des Referenzpeaks ist

$t$  die Migrationszeit ist

$k_0$  und  $k_1$  die Koeffizienten der linearen Gleichung sind

Die Kalibriertabelle enthält für alle Komponenten den Namen, die Migrationszeit  $t_{ref}/t$  (relative Migrationszeit), das Molekulargewicht und  $\log(MW)$ .

## Kalibrierung des DNA-Basenpaars

Die **DNA base-pair calibration** ist mit der **protein molecular weight calibration** vergleichbar. Sie verwendet jedoch keinen Referenzpeak, sondern erfordert einen Kalibrierstandard mit einer bekannten Anzahl an Basenpaaren. Die Kalibriergleichung lautet wie folgt,

$$\log(\#BP) = k_1 \cdot 1/t + k_0$$

wobei

$\#BP$  die Anzahl der Basenpaare ist

$t$  die Migrationszeit ist

$k_0$  und  $k_1$  die Koeffizienten der linearen Gleichung sind

Die Kalibriertabelle enthält für alle Komponenten den Namen, die Migrationszeit,  $1/t$ , Basenpaare und  $\log(\text{Basenpaare})$ .

## Kapillar-isoelektrische Fokussierung

Die **capillary isoelectric focusing calibration** (cIEF) erfordert einen Kalibrierstandard mit Standardproteinen bekannter isoelektrischer Punkte (pI). Die Kalibriergleichung lautet wie folgt,

$$pI = k_1 \cdot t + k_0$$

wobei

pI der isoelektrische Punkt ist

t die Migrationszeit ist

$k_0$  und  $k_1$  die Koeffizienten der linearen Gleichung sind

Die Kalibriertabelle enthält für alle Komponenten den Namen, die Migrationszeit und den pI (isoelektrischen Punkt).

## Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

### Einleitung

Minimale Abweichungen an der Pufferzusammensetzung, der Temperatur des Analysenlaufs oder der Viskosität sowie der Adsorption an der Kapillarwand können sich auf den EOF auswirken und zu seiner Instabilität führen. Die sich daraus ergebende Änderung des EOF kann zu einer hohen Standardabweichung der Migrationszeit führen. Korrekturen der Mobilitätswerte können die Auswirkungen der Abweichungen der Migrationszeit von Analysenlauf zu Analysenlauf signifikant reduzieren, indem die Migrationszeit eines Referenzpeaks für die Mobilität überwacht wird. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Reproduzierbarkeit der Migrationszeit.

Der Referenzpeak für die Mobilität sollte mit den folgenden Prioritäten ausgewählt werden:

- Wählen Sie den Peak mit dem höchsten Signal
- Wählen Sie den am stärksten isolierten Peak
- Der EOF-Marker oder der interne Standard können ebenfalls als Referenzpeak für die Mobilität verwendet werden
- Vergrößern Sie das Suchfenster, damit der Referenzpeak für die Mobilität immer angezeigt wird
- Wenn im Suchfenster mehrere Peaks angezeigt werden, wird der Peak mit dem höchsten Signal automatisch als Referenzpeak für die Mobilität ausgewählt.

Es sind zwei Korrekturarten für Mobilitätswerte verfügbar:

#### **Effective Mobility Correction**

**Effective Mobility Correction** verwendet die effektiven Mobilitätswerte aller Peaks; hierzu sind die Daten zum Spannungsanstieg und das Elektropherogramm erforderlich. Die Korrektur der effektiven Mobilität ermöglicht zudem, dass die tatsächlichen effektiven Mobilitätswerte für alle Probenkomponenten ermittelt werden können.

#### **Relative Mobility Correction**

Bei der **Relative Mobility Correction** sind keine Spannungsdaten erforderlich, sondern es wird für alle Messungen eine konstante Spannung angenommen.

## Berechnungen der effektiven Mobilität

Zusätzlich zu einem Referenzpeak umfassen die Anforderungen für die Korrektur der effektiven Mobilität einen neutralen Marker, welcher der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses (EOF) entspricht. Im Folgenden sind einige der gängigsten Marker und die dazugehörigen Wellenlängen aufgeführt:

**Tabelle 10** Gängige EOF-Marker

Substanz	Wellenlänge
1-Propanol	210 nm
Aceton	330 nm
Acetonitril	190 nm
Benzen	280 nm
Guanosin	252 nm
Mesityloxid	253 nm
Methanol	205 nm
Phenol	218 nm
Pyridin	315 nm
Tetrahydrofuran	212 nm
Uracil	259 nm

Die Daten der Spannung als Funktion der Zeit und die Kapillarmaße werden entweder mit der Datendatei gespeichert oder können beim Einrichten der Kalibrier-tabelle manuell eingegeben werden. Das Speichern der Spannungsdaten während des Analysenlaufs ist die genaueste Methode. Stellen Sie außerdem sicher, dass zusammen mit der Methode auch die Kapillarmaße gespeichert werden. Um Signale erneut zu verarbeiten, die ohne Spannungsdaten/Kapillarmaße erfasst wurden, geben Sie die Spannungs- und Anstiegszeit manuell im Feld "Voltage and Capillary Dimensions" (Spannung und Kapillarmaße) des Dialogfelds ein.

Aus diesen Daten wird die effektive Mobilität der einzelnen Komponenten ermittelt.

Allgemein

Die scheinbare Mobilität eines Probenpeaks wird durch die nachfolgende Gleichung definiert,

$$\mu_{app} = (l \cdot L) / (t \cdot V(t))$$

wobei

$l$  die effektive Länge der Kapillare ist (die Länge vom Punkt der Injektion bis zum Punkt der Detektion)

$L$  die Gesamtlänge der Kapillare ist

$V(t)$  die durchschnittliche Spannung von der Zeit 0 bis zur Migrationszeit  $t$  des Peaks ist

Die durchschnittliche Spannung wird entweder aus der gemessenen Spannung oder aus dem in der Methode angegebenen Spannungsanstieg ermittelt. Hierzu werden folgende Gleichungen verwendet:

Wenn  $t < t_R$ , dann

$$V(t) = V / (2 \cdot t_R) \cdot t$$

Wenn  $t > t_R$ , dann

$$V(t) = V \cdot (1 - t_R / (2 \cdot t))$$

wobei

$t$  die Migrationszeit des Referenzpeaks ist

$t_R$  die Anstiegszeit ist

$V$  die Endspannung ist

Die Gleichung für die Mobilität kann durch Einführung eines Koeffizienten vereinfacht werden:

$$k(t) = (l \times L) / V(t)$$

Die relative oder scheinbare Mobilität ist dann

$$\mu_{app} = k(t) / t$$

Die effektive oder tatsächliche Mobilität ist

$$\mu_{real} = \mu_{app} - \mu_{EOF}$$

## CE-spezifische Berechnungen

### Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

wobei

$\propto_{app}$  die scheinbare Mobilität eines beliebigen Peaks ist

$\propto_{EOF}$  die scheinbare Mobilität eines neutralen Markers ist

Komponenten mit einer niedrigeren Geschwindigkeit als der des EOF (in der Regel Anionen) führen zu negativen Werten für die effektive Mobilität.

#### Kalibrierung

Die tatsächliche Mobilität eines Probenpeaks, die als Referenzpeak für die Mobilität für zukünftige Messungen verwendet werden soll, wird unter Verwendung der Migrationszeit eines neutralen Markers ermittelt ( $\mu_{EOF}$ ):

$$\mu_{realref} = \mu_{appref} - \mu_{EOF} = k(t_{ref})/t_{ref} - k(t_{EOF})/t_{EOF}$$

Anschließend werden die effektiven Mobilitätswerte aller Peaks berechnet und als erwartete Mobilitätswerte gespeichert:

$$\mu_{realN} = \mu_{appN} - \mu_{EOF} = k(t_N)/t_N - k(t_{EOF})/t_{EOF}$$

Die Kalibriertabelle enthält dann in den Spalten für die erwartete Migrationszeit und die erwartete Mobilität die gemessene Migrationszeit und die berechnete tatsächliche Mobilität für die einzelnen Substanzen.

#### Mobilitätsberechnung

Der tatsächliche Wert von  $\mu_{EOF}$  wird unter Verwendung des Referenzpeaks für die Mobilität ermittelt:

$$\mu_{EOFact} = \mu_{appref} - \mu_{realref} = k(t_{ref})/t_{ref} - \mu_{realref}$$

Anschließend wird die erwartete Migrationszeit der einzelnen Peaks angepasst:

$$t_{newexpN} = k(t_{oldexpN}) / (\mu_{realN} + \mu_{EOFact})$$

Die berechneten Werte werden für die Peakidentifizierung verwendet und ersetzen die Werte in der Kalibriertabelle.

Neukalibrierung

Die Migrationszeit des Referenzpeaks für die Mobilität wird verwendet, um den tatsächlichen Wert von  $\mu_{EOF}$  zu berechnen:

$$\mu_{EOFact} = \mu_{appref} - \mu_{realref} = k(t_{ref})/t_{ref} - \mu_{realref}$$

Anschließend wird die erwartete Migrationszeit der einzelnen Peaks angepasst:

$$t_{newexpN} = k(t_{oldexpN}) / (\mu_{realN} + \mu_{EOFact})$$

Dann werden die Mobilitätswerte aktualisiert:

$$\mu_{realN} = \mu_{appN} - \mu_{EOFact}$$

Während einer Kalibrierung werden die erwarteten Werte für die Migrationszeit sowie die tatsächlichen Mobilitätswerte in der Kalibriertabelle aktualisiert.

## Berechnungen der relativen Mobilität

Korrekturen an der Migrationszeit, die auf den relativen Mobilitätswerten basieren, können ebenfalls ausgeführt werden. In diesem Fall sind EOF-Marker, Spannungswerte oder Kapillardimensionen nicht erforderlich. Die Software korrigiert Migrationszeitverschiebungen, zeigt aber keine Mobilitätswerte an.

Allgemein

Genau wie bei Berechnungen der effektiven Mobilität wird der Koeffizient

$$k(t) = (l \cdot L) / V(t)$$

für Berechnungen der relativen Mobilität verwendet, um die Beziehung zwischen Mobilität und Migrationszeit zu beschreiben:

$$\mu_{app} = k(t) / t$$

Der Unterschied ist, dass bei den Gleichungen für die relative Mobilität  $k$  sowohl als Zähler als auch als Nenner eines Bruchs erscheint, d. h., die Kapillarmaße können ignoriert werden. Der Faktor  $k$  wird wie folgt berechnet:

$$k(t) = 1 / V(t)$$

wobei  $V(t)$  die durchschnittliche Spannung von der Zeit 0 bis zur Migrationszeit  $t$  des Peaks ist

## CE-spezifische Berechnungen

### Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

Wenn der Spannungsparameter auf **Ignore** gesetzt ist, ist  $k$  eine Konstante und kann aus den Gleichungen für die erwartete Migrationszeit entfernt werden (siehe unten).

Die folgenden Gleichungen beschreiben den allgemeinen Fall für  $k = k(t)$ , obwohl die Software bei der Berechnung von  $k$  alle Fälle berücksichtigt.

#### Kalibrierung

Es wird ein Referenzpeak für die Mobilität identifiziert, und dessen Migrationszeit ( $t_{refcal}$ ) wird gespeichert. Die erwarteten Migrationszeiten ( $t_{expcalN}$ ) aller anderen Peaks werden gespeichert.

#### Mobilitätsberechnung

Nach der Erkennung des Referenzpeaks wird die erwartete Migrationszeit für alle Peaks entsprechend der tatsächlichen Migrationszeit des Referenzpeaks für die Mobilität angepasst:

$$t_{newexpN} = \frac{k(t_{oldexpN})}{(k(t_{expcalN})/t_{expcalN} - k(t_{refcal})/t_{refcal} + k(t_{refact})/t_{refact})}$$

Anschließend wird die Migrationszeit des Referenzpeaks aus dem letzten Kalibrierungslauf aktualisiert:

$$t_{refcal} = t_{refact}$$

## Spezielle Reportstile für die Kapillarelektrophorese

**HINWEIS**

CE-spezifische Berechnungen können nur über die *klassische ChemStation-Berichterstellung* berichtet werden.

Die folgende Berichtvorlage ist spezifisch für Agilent ChemStation für CE-Systeme:

**CE-Mobilität** **CE Mobility** umfasst quantitative Resultate in Textform, insbesondere zur apparenten Mobilität. Wenn Sie diese Berichtvorlage verwenden möchten, müssen Sie vor der Akquisition und der Speicherung des Spannungssignals die Informationen auf der Kapillare eingeben. Die apparente Mobilität wird nach folgender Formel berechnet:

$$\mu_{app} = \frac{l \cdot L}{t \cdot V}$$

wobei

$l$  ist die effektive Länge der Kapillare (cm)

$L$  ist die Gesamtlänge der Kapillare (cm)

$t$  ist die Migrationszeit (min)

$V$  ist die Spannung (kV)

Ist die Korrektur der effektiven Mobilität (siehe ["Berechnungen der effektiven Mobilität"](#) auf Seite 148) aktiviert, wird die Spalte Peaktyp in einfachen Berichten (z. B. Berichte über externe Standards) durch eine Spalte für die Mobilität ersetzt. Im Bericht CE-Mobilität werden effektive anstelle von apparenten Mobilitäten ausgedruckt.

## Korrigierte Peakflächen

Mit der Agilent ChemStation für CE-Systeme können Sie an Stelle der normalen Flächenberechnung korrigierte Peakflächen verwenden. Diese Flächen werden bei der Standardkalibrierung und in Reporten verwendet.

Um diese Funktion zu aktivieren, wählen Sie **Calculate with Corrected Areas**, um eine Korrektur der Peakfläche basierend auf der Migrationszeit vorzunehmen. In diesem Modus wird die Fläche durch die Migrationszeit dividiert, was die Reproduzierbarkeit in der quantitativen Analyse verbessern kann, wenn die Migrationszeiten instabil sind.

Die korrigierte Fläche wird gemäß der folgenden Formel berechnet,

$$A_c = \frac{A}{60 \cdot t}$$

wobei

$A_c$  die korrigierte Peakfläche ist (mAU)

$A$  die Peakfläche ist (mAU·s)

$t$  die Migrationszeit ist (min)

Diese korrigierte Fläche wird gelegentlich auch als normalisierte Fläche bezeichnet.

## Systemeignungstest für die Kapillarelektrophorese

### **Kapazitätsfaktor $k'$**

Bei der Kapillarelektrophorese kann der Kapazitätsfaktor  $k'$  nicht in allen Betriebsarten automatisch berechnet werden. Weitere Informationen hierzu finden Sie im Handbuch *High Performance Capillary Electrophoresis*. Einen Primer für die Formeln finden Sie ebenfalls in diesem Handbuch. Die in den Reporten aufgeführten Werte sind nur für die Agilent ChemStation für LC 3D-Systeme gültig, da die Agilent ChemStation für CE-Systeme dieselben Algorithmen wie die Agilent ChemStation für LC 3D-Systeme verwendet.

## CE-MSD

## Untergrundsubtraktion

Wenn Sie die Option **Subtract Background** (BSB) wählen, wird das zuletzt ausgewählte Massenspektrum von den einzelnen Punkten im aktuellen Elektropherogramm subtrahiert. Die resultierenden Daten werden im gleichen Verzeichnis und unter demselben Namen wie die ursprüngliche Datendatei gespeichert, die Dateiendung lautet jedoch .BSB.

Die neue Datendatei wird zur aktuellen Datendatei und das Elektropherogramm mit dem subtrahierten Hintergrund wird angezeigt. Die Anzahl der durchgeführten Hintergrundsubtraktionen wird im Bedienereintrag des Datendatei-Headers festgehalten.

Wenn Sie die BSB-Daten in tabellarischer Form anzeigen, treten aufgrund der Präzision der Datendarstellung möglicherweise Unterschiede auf.

**HINWEIS**

Die HILFE-Textdateien im LC/MS-System beziehen sich nur auf LC- und nicht auf CE-Parameter. Einige Funktionen, die in der LC/MS-Software verfügbar sind, sind in CE/MS-Anwendungen entweder nicht verfügbar oder nicht anwendbar, werden aber in LC verwendet. Die Funktion **peak matching** ist für CE-MS nicht anwendbar und ist daher nicht aktiv. Bei der CE-MS-Analyse findet die UV- und MS-Detektion bei unterschiedlichen effektiven Längen der Trennkapillare statt. Aufgrund der unterschiedlichen Auflösung bei unterschiedlichen effektiven Längen ist die Feststellung der Peakübereinstimmung nicht möglich.

# 7

## Systemfunktionsprüfung

Ansichten für Funktionsprüfung und Fehlerdiagnose	158
Systemfunktionsprüfung	158
Das Register „GLPsave“	161
Funktion „DAD Test“ (DAD-Test)	163
Funktion „DAD-Test prüfen“	163

In diesem Kapitel werden die Verifizierungsfunktionen und die GLP-Verifizierungsfunktionen der ChemStation beschrieben.

## Ansichten für Funktionsprüfung und Fehlerdiagnose

Die ChemStation bietet, wenn die konfigurierten Instrumente dies ermöglichen, zwei zusätzliche Ansichten für die Funktionsprüfung und Fehlerdiagnose. Weitere Informationen finden Sie in der Online-Hilfe.

### Systemfunktionsprüfung

Die Systemfunktionsprüfung ist ein Schlüsselbaustein der Qualitätssicherung beim Routinebetrieb eines Analysesystems in geprüften Laboren. Die Möglichkeiten der ChemStation zur Funktionsprüfung nach GLP sind so ausgelegt, dass Ihnen folgende Hilfen zur Verfügung stehen: Überprüfung der korrekten Funktionsweise der Software oder wichtiger Softwarekomponenten zum jetzigen Zeitpunkt oder zum Zeitpunkt einer bestimmten Analyse.

Die Funktionsprüfung der ChemStation ermöglicht die Prüfung der korrekten Funktion Ihrer ChemStation-Software. Sie können dies durch erneute Verarbeitung Ihrer Datensätze mit speziellen Methoden erreichen und durch Vergleichen der Ergebnisse mit definierten Standards. Die Funktionsprüfung ist besonders wichtig zur Sicherstellung der Zuverlässigkeit der Daten aus Integration und Quantifizierung.

Sie können den Standardtest zur Funktionsprüfung verwenden oder Ihre eigenen Tests mit unterschiedlichen Methoden und Datendateien definieren, um die Kombinationen der bei Ihrer Analysemethode verwendeten Softwarealgorithmen zu prüfen. Die Funktionsprüfung ist eine geschützte Datei, die nicht geändert oder gelöscht werden kann.

Mit dem Befehl „Verification“ (Funktionsprüfung) unter „Data Analysis“ (Datenanalyse) können Sie eine der folgenden Optionen auswählen:

- Durchführung einer Funktionsprüfung der Datenbank,
- Definition eines neuen Funktionsprüfverfahrens und Hinzufügen zur Datenbank und
- Löschen einer Funktionsprüfung aus der Datenbank.

Im Abschnitt „How To“ (So wird's gemacht) des Online-Hilfesystems wird beschrieben, wie diese Aufgaben durchgeführt werden können. Während einer Funktionsprüfung der ChemStation können Sie wählen, ob die gesamte Prüfung oder nur Teile der Prüfung ausgeführt werden sollen.

Die Ergebnisse der Funktionsprüfung werden zusammen mit der Methode und den Datendateien im Binärformat im Standardverzeichnis gespeichert: C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Verify, zusammen mit den Methoden- und Datendateien. Das Unterverzeichnis „Verify“ (Funktionsprüfung) befindet sich auf derselben Ebene wie die Verzeichnisse der Sequenzen, Methoden und Datensätze. Sie können die Ergebnisse in eine Datei oder auf einem Drucker ausgeben. Die Prüfergebnisse einschließlich der Prüfergebnisse für kombinierte Funktionsprüfungen werden mit „pass“ (bestanden) oder „fail“ (nicht bestanden) bewertet.

Für die Funktionsprüfungen stehen folgende Komponenten zur Verfügung:

Digital Electronics (nur Agilent Diodenarray-Detektor der Serie 1100/1200)

Im Diodenarray-Detektor ist ein Testchromatogramm gespeichert. Dieses Chromatogramm wird zur ChemStation geschickt, nachdem es dieselben Bearbeitungsschritte durchlaufen hat wie normale Rohdatensätze von den Photodioden. Die daraus resultierenden Daten werden mit den Ursprungsdaten verglichen, die für dieses Testchromatogramm in der ChemStation abgelegt sind. Wenn die Werte nicht übereinstimmen, gilt der Test als nicht bestanden. Dieser Test stellt sicher, dass die Elektronik des Diodenarray-Detektors, die die Daten bearbeitet, immer noch richtig funktioniert. Es wird ein gespeichertes Testchromatogramm verwendet, d. h. die Lampe und der Diodenarray sind nicht an diesem Test beteiligt. Diese können wie in **„Funktion „DAD Test“ (DAD-Test)“** auf Seite 163 beschrieben geprüft werden.

Peakintegration

Die Datendatei wird nochmals mit der Originalmethode integriert. Die Ergebnisse werden mit den Original-Integrationsergebnissen verglichen, die im Register „Verification“ (Funktionsprüfung) gespeichert sind. Wenn die Werte nicht übereinstimmen, gilt der Test als nicht bestanden.

Quantifizierung der Verbindungen

Die Verbindungen in der Datendatei werden nochmals quantifiziert. Die Ergebnisse werden mit den Original-Quantifizierungsergebnissen verglichen, die im Register „Verification“ (Funktionsprüfung) gespeichert sind. Wenn die Werte nicht übereinstimmen, gilt der Test als nicht bestanden.

Drucken von Berichten

Der Originalreport wird noch einmal gedruckt.

Folgende Seite zeigt ein Beispiel für eine erfolgreich durchgeführte Funktionsprüfung.

```
=====
ChemStation Verification Test Report
=====
```

**Tested Configuration:**

Component	Revision
ChemStation for LC 3D ChemStation	B.01.01
Microsoft Windows	Microsoft Windows XP
Processor	Processor_Architecture_Intel
CoProcessor	yes

ChemStation Verification Test Details:

```
Test Name : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL
Data File : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL\VERIFY.D
Method    : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL\VERIFY.M
Original Datafile      : VERIFY.D
Original Acquisition Method : VERIFY.M
Original Operator      : Hewlett-Packard
Original Injection Date : 4/16/93 11:56:07 AM
Original Sample Name   : Isocratic Std.
```

Signals Tested:

```
Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=450,80 of VERIFY.D
```

ChemStation Verification Test Results:

Test Module	Selected	For Test	Test Result
Digital electronics test	No		N/A
Integration test	yes		Pass
Quantification test	yes		Pass
Print Analytical Report	No		N/A

ChemStation Verification Test Overall Results: Pass

## Das Register „GLPsave“

Das Register "GLPsave" wird am Ende jeder Analyse gespeichert, wenn diese Option in der Runtime-Checkliste ausgewählt ist. Es enthält folgende Informationen:

- Signale
- Logbuch
- Tabelle mit den Integrationsergebnissen
- Tabelle mit den Quantifizierungsergebnissen
- Daten zur Instrumentenleistung
- Datenanalysemethode

Dieses Register ist ein vollständig geschützter Datensatz, der beim Analysenlauf erstellt wird. Sie können es jederzeit aufrufen, wenn Sie Ihre Analysenmethode überprüfen möchten.

Die Option "GLPsave Register" unter "Data Analysis" (Datenanalyse) ermöglicht es Ihnen, die Daten im Register "GLPsave" jederzeit einzusehen. Die entsprechende Datei ist durch eine Prüfsumme geschützt und als Binärcode verschlüsselt, damit sie nicht geändert werden kann.

Im Dialogfeld zur Ansicht des Registers "GLPsave" können Sie folgende Optionen auswählen:

- Laden der Ursprungsmethode
- Laden der Ursprungssignale
- Laden der Daten zur Instrumentenleistung
- Ausdruck der Ursprungsmethode
- Ausdruck der ursprünglichen Integrationsergebnisse
- Ausdruck der ursprünglichen Quantifizierungsergebnisse
- Erstellen eines Originalreports aus Ursprungsmethode und -signalen.

Mithilfe der Funktion zur GLP-Überprüfung können Sie zeigen, dass es sich bei Ihren Chromatogrammen um Originaldaten handelt. Weiterhin lässt sich anhand der Daten zur Instrumentenleistung die Qualität der Analyse unter Beweis stellen und die Berechtigung der Datenbewertung demonstrieren.

## Systemfunktionsprüfung

### Das Register „GLPsave“

Sie können zum Beispiel:

- den Datenanalyseteil der Methode, die zum Zeitpunkt der Probenanalyse verwendet wurde, neu laden und ausdrucken, um nachzuweisen, dass die in den Ergebnissen dargestellte Datenanalyse für die Analyse in keiner Weise verändert wurde;
- die Integrations- und Quantifizierungsergebnisse ohne erneute Berechnung aufrufen, um die Echtheit des Reports unter Beweis zu stellen.

## Funktion „DAD Test“ (DAD-Test)

In einem Labor mit GLP-Standard können Detektortests dazu verwendet werden, routinemäßig Systemüberprüfungen für ein Analyseninstrument durchzuführen.

Der DAD-Test prüft die Funktionen Ihres Diodenarray-Detektors. Wenn Sie im Menü "Instrument" (nur für LC3D und CE) den DAD-Test auswählen, wird das Instrument auf seine Intensität und Wellenlängenkalibrierung geprüft. Wenn Sie "Save" (Speichern) wählen, werden die Testergebnisse automatisch in der DADTest-Datenbank gespeichert. Dabei handelt es sich um ein Datenregister, das mit DADTest.Reg benannt und im Standardverzeichnis für das Instrument gespeichert ist.

### Funktion „DAD-Test prüfen“

Die Funktion **Review DAD Test** im Menü „Ansicht“ der Datenanalyse ermöglicht es Ihnen, die Datei DADTest.Reg jederzeit anzuzeigen. Die Datei wird durch eine Prüfsumme geschützt und als Binärcode verschlüsselt, damit sie nicht geändert werden kann.

Sie können folgende Teile des DAD-Tests zur Ansicht auswählen:

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Show Holmium Spectra</b>   | Stellt alle in der Anzeigetabelle des DAD-Tests angeführten Holmiumspektren dar. Das aktive Spektrum ist markiert.  |
| <b>Show Intensity Spectra</b> | Stellt alle in der Anzeigetabelle des DAD-Tests aufgeführten Intensitätsspektren dar. Das aktive Spektrum ist markiert.   |
| <b>Save as New Database</b>   | Wenn Sie die Lampe Ihres DAD auswechseln, können Sie den DAD-Test zurücksetzen, um unerwünschte Testergebnisse aus der Tabelle zu löschen. Anschließend können Sie diese Funktion zum Speichern als eine neue Datenbank verwenden.        |
| <b>Show Selected Spectra</b>  | Stellt nur die in der Tabelle ausgewählten Spektren dar.  |
| <b>Show Intensity Graph</b>   | Sie können ein Intensitätsdiagramm auf dem Bildschirm anzeigen, um die Lebensdauer der Lampe Ihres Diodenarray-Detektors abschätzen zu können. Das Diagramm liefert eine Funktion der maximalen Lampenintensität gemessen gegen die Zeit. |

### Software-Vokabular

#### A

##### **Advanced**

Profi

##### **all valleys**

Alle Täler

##### **Amount per response**

Menge pro Response

##### **Apply Manual Events from Method**

Manuelle Ereignisse der Methode anwenden

##### **Area Percent reject**

Schwellenwert für den prozentualen Flächenanteil

##### **Area reject**

Schwellenwert für die Fläche

##### **Area Reject**

Schwellenwert für die Fläche

##### **Area Sum**

Flächensumme

##### **Area sum off**

Flächensumme aus

##### **Area sum on**

Flächensumme ein

##### **Area Sum Slice**

Summe des Flächenabschnitts

##### **Autointegrate**

Automatische Integration

##### **Average**

Mittelwert

#### B

##### **Baseline at valleys**

Basislinie bei Talpunkten

##### **Baseline backwards**

Rückwärtige Anpassung der Basislinie

##### **baseline point**

Basislinienpunkt

#### C

##### **Calculate signals separately**

Signale separat berechnen

##### **Calculate Signals Separately**

Signale separat berechnen

##### **Calculate with Corrected Areas**

Mit korrigierten Flächen berechnen

##### **Calibration Settings**

Kalibrierungseinstellungen

##### **capillary isoelectric focusing calibration**

Kapillar-isoelektrische Fokussierung

##### **CE Mobility**

CE-Mobilität

##### **Classical**

Klassisch

##### **Clear**

Deaktivieren

##### **Compound Details**

Substanzdetails

#### D

##### **Data Analysis**

Datenanalyse

##### **Delete Peak(s)**

Peak(s) löschen

##### **detector response**

Detektor-Response

##### **DNA base-pair calibration**

DNA-Basenpaar-Kalibrierung

##### **Draw Baseline**

Basislinie zeichnen

#### E

##### **Effective Mobility Correction**

Korrektur der effektiven Mobilität

##### **End**

Ende

##### **Exponential**

Exponentielle Anpassung

#### F

##### **Floating Average**

Fließender Mittelwert (Floating Average)

##### **Force**

erzwingen

##### **Forced Origin**

forcierten Nulldurchgang

##### **Front skim height ratio**

Skim-Peakhöhen-Verhältnis an der ansteigenden Flanke

##### **Front Skim Height Ratio**

Verhältnis Peakhöhe Hauptpeak zu Peakhöhe Nebenpeak auf der Vorderseite

#### H

##### **height reject**

Schwellenwert für die Höhe

##### **Height reject**

Schwellenwert für die Höhe

##### **Height Reject**

Schwellenwert für die Höhe

#### I

##### **Ignore**

Ignorieren

##### **integration events**

Integrationsereignisse

### Integration Events Table

Tabelle der Integrationsereignisse

## L

### Left

Links

## M

### Manual Events

Manuelle Ereignisse

### Manual Factor

Manueller Response-Faktor

### Manual Integration

manuelle Integration

## N

### Navigation Table

Navigationstabelle

### Negative peak

Negativer Peak

### Negative Peaks On

Negative Peaks Ein

### New Exponential

Neue exponentielle Anpassung

### No penetration

Keine Unterschreitung

### No penetrations

Keine Unterschreitungen

## O

### Off

aus

### On

ein

### Origin

Nullpunkt

## P

### p/v ratio

P/V-Verhältnis

### peak matching

Peakübereinstimmung

### peak width

Peakbreite

### Peak Width

Peakbreite

### protein molecular weight calibration

Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts

### Protein molecular weight calibration

Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts

## Q

### Quantitation Settings

Quantifizierungseinstellungen

## R

### Range 1

Bereich 1

### Range 9

Bereich 9

### Recalibration Settings

Neukalibrierungseinstellungen

### Relative Mobility Correction

Korrektur der relativen Mobilität

### Remove Manual Events from Method

Manuelle Ereignisse in der Methode löschen

### Replace

Ersetzen

### Response per amount

Response pro Menge

### Review DAD Test

DAD-Test prüfen

### Right

Rechts

## S

### Sample Information

Probeninformationen

### Save as New Database

Als neue Datenbank speichern

### Sequence Table

Sequenztable

### Set Baseline from Range

Festlegen der Basislinie eines Bereichs

### Set Low Baseline from Range

Festlegen der niedrigen Basislinie eines Bereichs

### Shoulders

Schultern

### Show Holmium Spectra

Holmiumspektren anzeigen

### Show Intensity Graph

Intensitätsdiagramm anzeigen

### Show Intensity Spectra

Intensitätsspektren anzeigen

### Show Selected Spectra

Ausgewählte Spektren anzeigen

### Signal to noise

Signal-zu-Rausch-Verhältnis

### Skim valley ratio

Skim-Talhöhen-Verhältnis

### Skim Valley Ratio

Verhältnis Peakhöhe Nebenpeak zu Talhöhe

### Slope Sensitivity

Steigungsempfindlichkeit

### **Specify Report**

Bericht spezifizieren

### **Split Peak**

Peak teilen

### **Standard Calibration**

Standardkalibrierung

### **Start-negA.**

Start-negative Fläche

### **Straight**

Gerade

### **Subtract Background**

Hintergrund subtrahieren

## T

### **Tail skim height ratio**

Skim-Peakhöhen-Verhältnis an der abfallenden Flanke

### **Tail Skim Height Ratio**

Verhältnis Peakhöhe Hauptpeak zu Peakhöhe Nebenpeak auf der Rückseite

### **Tangent Skim**

Tangentiales Skimming

## U

### **Update Manual Events of Method**

Manuelle Ereignisse in der Methode aktualisieren

### **Update peak height**

Peakhöhe aktualisieren

### **Use baseline from range**

Basislinie eines Bereichs verwenden

### **Use Baseline from Range**

Basislinie eines Bereichs verwenden

### **Using Compound**

Substanz verwenden

## V

### **Valley**

Tal

## W

### **With Rsp Factor**

Mit Responsefaktor

## Inhalt dieses Buchs

Dieses Handbuch enthält Referenzinformationen zu den Funktionsprinzipien, Berechnungen und Datenanalysealgorithmen, die in der OpenLab ChemStation verwendet werden.

Diese Informationen können von Validierungsspezialisten für die Planung und Ausführung von Systemvalidierungsaufgaben verwendet werden.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

© Agilent Technologies Inc. 2010-2025  
Ausgabe: 02/2025

Dokumentnr.: D0013749de Rev. A.1

