



Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition

Referenz zu Funktionsprinzipien

Hinweise

Handbuch-Teilenummer

M8301-92029 Rev. C
Ausgabe 04/2019

Gedruckt in Deutschland

Copyright

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2019

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

Microsoft[®] - Microsoft is a U.S. registered trademark of Microsoft Corporation.

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

Dieses Handbuch ist gültig für Version C.01.10 der Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition.

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.

Technologielizenzen

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.

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 CDS ChemStation Edition zuständig sind. Es enthält Referenzinformationen zu den Funktionsprinzipien, Berechnungen und Datenanalysealgorithmen, die in Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition 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.

- Für Konzepte der OpenLab CDS ChemStation Edition, neue Funktionen und Arbeitsabläufe: das Handbuch *OpenLab CDS ChemStation Edition, Grundlegende Konzepte und Arbeitsabläufe*.
- Kontextspezifische Informationen zu Aufgaben („How To“), ein Lernprogramm, Referenzen zur Benutzeroberfläche und Hilfe zur Fehlerbehebung: die ChemStation Online-Hilfe.
- Details zur Systeminstallation und Standortvorbereitung: das *Agilent OpenLab CDS Workstation Installationshandbuch*.
- Details zu Prinzipien und Aufgaben der Systemadministration: das *Agilent OpenLab CDS Administrationshandbuch*.

1 Datenerfassung

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte von Datenerfassung, Datendateien, Logbüchern usw.

2 Integration

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte der Integration und den Integrationalgorithmus der ChemStation. Es beschreibt den Integrationsalgorithmus, die Integration und die manuelle Integration.

3 Peakidentifizierung

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte der Peakidentifizierung.

4 Kalibrierung

Dieses Kapitel beschreibt die Kalibrierungsprinzipien in der ChemStation-Software.

5 Quantifizierung

Dieses Kapitel beschreibt die Quantifizierung mit der ChemStation. Berechnungen von Fläche%, Höhe%, Norm%, ESTD und ISTD sowie die Quantifizierung nicht identifizierter Peaks werden ausführlich beschrieben.

6 Systemeignungsevaluierung

In diesem Kapitel wird beschrieben, welche Funktionen die ChemStation ausführen kann, um die Leistung des Analysengeräts vor seiner Verwendung für die Probenanalyse sowie der Analysenmethode vor ihrer routinemäßigen Verwendung zu bewerten. Außerdem wird beschrieben, wie die Leistung der Analysensysteme vor und während der routinemäßigen Analyse überprüft werden kann.

7 CE-spezifische Berechnungen

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

8 Datenprüfung, erneute Verarbeitung und Batchüberprüfung

In diesem Kapitel werden die Möglichkeiten zur Datenprüfung und zur erneuten Verarbeitung von Sequenzen beschrieben. Darüber hinaus werden die Grundlagen zu Batchüberprüfung, Batchkonfiguration, Überprüfungsfunktionen und Batchreporterstellung dargestellt.

9 Reportausgabe

OpenLab CDS ChemStation Edition bietet zwei Arten der Reportausgabe: die klassische ChemStation-Reportausgabe, die gegenüber der ChemStation B-Reportausgabe unverändert ist, oder die neuartige Intelligente Reportausgabe. In diesem Thema wird das ACAML-Schema erläutert, das bei der intelligenten Reportausgabe verwendet wird. Außerdem wird eine Referenz zum ACAML-Schema angegeben.

10 Überprüfung des Systems

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

Inhalt

1 Datenerfassung	8
Was ist eine Datenerfassung?	9
Statusinformationen	11
2 Integration	14
Was ist eine Integration?	16
Integrationsalgorithmen der ChemStation	18
Funktionsprinzip	24
Peakerkennung	25
Basislinienbestimmung	32
Peakflächenberechnung	47
Integrationsereignisse	50
Manuelle Integration	59
3 Peakidentifizierung	62
Was ist eine Peakidentifizierung?	63
Regeln zur Peakübereinstimmung	64
Methoden der Peakidentifizierung	65
Absolute Retentions-/Migrationszeit	67
Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten	69
Peak-Qualifier	71
Identifizierungsprozess	74
4 Kalibrierung	76
Kalibrierungskurve	77
Gruppenkalibrierung	79
Optionen für die Rekalibrierung	80

5	Quantifizierung	81
	Was ist eine Quantifizierung?	82
	Berechnungsmethoden in der Quantifizierung	83
	Korrekturfaktoren	84
	Area% und Height%	85
	Kalibrierte Berechnungsverfahren	86
	ESTD-Berechnung	87
	Norm%-Berechnung	89
	ISTD-Berechnung	90
	Quantifizierung nicht kalibrierter Peaks	93
6	Systemeignungsevaluierung	95
	Systemeignungsevaluierung	97
	Bestimmung der Rauschhöhe	100
	Berechnung der Peakasymmetrie und -symmetrie	109
	Formeln und Berechnungsmethoden zur Beurteilung der Systemeignung	111
	Allgemeine Definitionen	112
	Leistungstest-Definitionen	113
	Definitionen der Reproduzierbarkeit	123
	Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff	130
7	CE-spezifische Berechnungen	133
	Kalibriertabellen	134
	Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur	137
	Spezielle Reportstile für die Kapillarelektrophorese	143
	Korrigierte Peakflächen	144
	Systemeignungstest für die Kapillarelektrophorese	145
	CE-MSD	146
8	Datenprüfung, erneute Verarbeitung und Batchüberprüfung	147
	Die Navigationstabelle für die Datenanalyse	148
	Was versteht man unter Batchüberprüfung?	154

Aktivieren der Batchüberprüfungsfunktion bei Verwendung von ChemStation mit ECM 155
Batchkonfiguration 156
Funktionen für die Überprüfung 158
Batch-Reports 160

9 Reportausgabe 161

Was ist ACAML? 162
Das ACAML-Schema 163
Reportausgabe der Faktoren des Arzneimittelbuchs in ChemStation 164

10 Überprüfung des Systems 166

Ansichten für Funktionsprüfung und Fehlerdiagnose 167
Das Register „GLPsave“ 170
Funktion „DAD Test“ (DAD-Test) 172

1

Datenerfassung

Was ist eine Datenerfassung?	9
Datendateien	9
Online-Monitore	10
Logbuch	10
Statusinformationen	11
Statusanzeige der ChemStation	11
Statusleiste	11
Systemübersicht	12

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte von Datenerfassung, Datendateien, Logbüchern usw.

Was ist eine Datenerfassung?

Während der Datenerfassung werden alle analogen Signale im Analysengerät in digitale Signale konvertiert. Das digitale Signal wird elektronisch an die ChemStation übertragen und in der Signaldatendatei gespeichert.

Datendateien

Eine Datendatei besteht aus einer Gruppe von Dateien, die im Verzeichnis DATA oder einem Unterordner dieses Ordners als Unterverzeichnis mit einem Datensatznamen und der Erweiterung „.D“ angelegt werden. Ein Datendateiname kann manuell definiert werden und bis zu 42 Zeichen lang sein (einschließlich der Erweiterung). Jede Datei in dem Verzeichnis folgt einer Namenskonvention (siehe *Dateinamen-Konventionen* im Handbuch *Konzepte und Arbeitsabläufe*). Mithilfe der Einstellungen unter **Preferences** können zusätzliche Datenverzeichnisse hinzugefügt werden.

Tabelle 1 Datendateien

Name	Description
*.CH	Chromatographische/elektropherographische Signaldatendateien. Der Dateiname besteht aus dem Modul- oder Detektortyp, der Modulnummer und einer Identifikationsnummer für das Signal oder den Kanal. Bei einer Beispieldatei ADC1A.CH ist ADC der Modultyp, 1 die Modulnummer und A die Signalidentifikation. Die Erweiterung für Chromatographiedateien lautet ".CH".
*.UV	Dateien mit UV-Spektrendaten. Der Dateiname besteht aus Detektortyp und Gerätenummer (nur bei Diodenarray-Detektor und Fluoreszenzdetektor).
*.ms	Dateien mit LCMS-Spektrendaten
REPORT.TXT, REPORT.PDF	Reportdatendateien für die zugehörigen Signaldatendateien. Hinweis: Der PDF-Dateiname kann anders lauten, wenn Sie die Option für eindeutige PDF-Dateinamen verwenden.
Acq.MACAML	Die Datei enthält Informationen zu der während der Datenakquisition verwendeten Methode. Die Informationen werden im ACAML-Format gespeichert. ACAML-Dateien werden von der intelligenten Reporterstellung verwendet.

Tabelle 1 Datendateien

Name	Description
Sequence.ACAML_	Die Datei enthält die Einzelinjektionsergebnisse. Die Informationen werden im ACAML-Format gespeichert. ACAML-Dateien werden von der intelligenten Reporterstellung verwendet.
SAMPLE.MAC oder SAMPLE.XML	Diese Datei wird zum Speichern von Probenwerten verwendet.
SAMPLE.MAC.BAK oder SAM- PLE.XML.BAK	Sicherungskopie der ursprünglichen Datei sample.mac. Die .bac-Datei wird während der erneuten Auswertung erstellt, wenn die Probenparameter (z. B. Multiplikatoren) zum ersten Mal aktualisiert werden. Darin werden die ursprünglichen Probenwerte gespeichert, die während der Erfassung verwendet wurden.
RUN.LOG	Logbucheinträge, die während eines Analysenlaufs generiert wurden. Das Logbuch zeichnet alle Vorgänge während der Analyse auf. Alle Fehlermeldungen und wichtigen Statusänderungen in ChemStation werden in das Logbuch eingetragen.
LCDIAG.REG	Nur bei LC. Enthält Gerätekurven (Gradienten, Temperaturkurven, Druckwerte usw.), Injektionsvolumina und Lösemittelbeschreibungen.
ACQRES.REG	Enthält Säuleninformationen. Bei GC-Systemen enthält die Datei auch das Injektionsvolumen.
GLPSAVE.REG	Teil der Datendatei, wenn „Save GLP Data“ (GLP-Daten speichern) aktiviert ist.
M_INTEV.REG	Enthält manuelle Integrationsereignisse.

Online-Monitore

Es gibt zwei verschiedene Online-Monitore: einen Online-Monitor für das Signal und einen weiteren für Spektren. Weitere Details finden Sie im Leitfaden ChemStation Konzepte und Arbeitsabläufe.

Logbuch

Das Logbuch zeigt Meldungen an, die vom analytischen System ausgegeben werden. Bei diesen Meldungen kann es sich um Fehlermeldungen, Systemmeldungen oder Ereignismeldungen von einem Modul handeln. Das Logbuch zeichnet diese Ereignisse auf, unabhängig davon, ob sie auf dem Bildschirm angezeigt werden.

Statusinformationen

Statusanzeige der ChemStation

Das Statusfenster der ChemStation zeigt eine Statusübersicht der ChemStation-Software.

Wenn eine einzige Analyse läuft, zeigt sie Folgendes an:

- In der ersten Zeile des Statusfensters der ChemStation wird „Run in Progress“(Analyse läuft) angezeigt.
- In der zweiten Zeile des Statusfensters der ChemStation wird der aktuelle Status der Methode angezeigt.
- In der dritten Zeile wird der Name der Rohdatendatei zusammen mit der aktuellen Laufzeit in Minuten angezeigt (bei einem GC-Instrument werden auch Dateien für den vorderen und den hinteren Injektor angezeigt).

Das Fenster für den Instrumentenstatus bietet Informationen zu den Instrumentenmodulen und Detektoren. Sie zeigen den Status der einzelnen Komponenten und, je nach System, die aktuellen Bedingungen, z. B. Druck, Gradient oder Fluss, an.

Statusleiste

Die grafische Benutzeroberfläche des ChemStation-Systems enthält Symbolleisten und eine Statusleiste in der Methoden- und Laufsteuerungsansicht von ChemStation. Die Statusleiste zeigt den Systemstatus und Informationen über die aktuelle Methode und Sequenz. Wenn diese nach dem Laden geändert wurden, sind sie je nach Gerät mit einem gelben Sternchen oder einem gelben Zahnrad markiert. Ein gelbes EMF-Symbol weist auf Haltbarkeitsgrenzen hin, die die eingestellten Sollwerte für LC-Verbrauchsmaterialien (z. B. die Lampe) überschreiten.

Systemübersicht

Sie können für Ihr ChemStation-System ein grafisches Systemdiagramm aufrufen, wenn dies vom konfigurierten Analysegerät (z. B. von den LC-Modulen der Agilent Infinity-Serie 1200 oder dem Intuvo 9000 GC-System) unterstützt wird. Dies ermöglicht es Ihnen, den Systemstatus mit einem Blick zu überprüfen. Wählen Sie den Befehl **System Diagram** aus dem Menü **View** der Ansicht **Method and Run Control**, um die Übersicht aufzurufen. Sie ist eine grafische Darstellung Ihres ChemStation-Systems. Unter Verwendung des folgenden Farbcodes wird der aktuelle Status angezeigt.



Abbildung 1 Systemübersicht z. B. für eine GC

Tabelle 2 Verwendete Farben zur Statusanzeige des Moduls oder Geräts

Farbe	Status
grau	offline
grün	nicht in Betrieb (betriebsbereit)
orange	nicht bereit
rot	Fehler
türkis	Standby (z. B. Lampen ausgeschaltet)
lila	Vorlaufzeit, Nachlaufzeit
magenta	Injektion läuft
blau	Lauf oder Nachlaufzeit

Zusätzlich können Sie Auflistungen über die aktuellen Einstellungen der Parameter aufrufen. Abgesehen von der Statusübersicht ermöglicht die Darstellung einen schnellen Zugriff auf die Dialogfelder der Parametereinstellungen für jede Komponente des Systems.

Weitere Informationen zum Systemdiagramm finden Sie im Instrumentenabschnitt der Online-Hilfe.

2 Integration

Was ist eine Integration?	16
Integrationsalgorithmen der ChemStation	18
Begriffserläuterung	19
Anfängliche Basislinie definieren	20
Basislinienverfolgung	20
Basislinienbestimmung	21
Identifizierung der Schlüsselpunkte eines Peaks	22
Funktionsprinzip	24
Peakerkennung	25
Peakbreite	25
Peakerkennungsfilter	26
Bündelung	27
Algorithmus der Peakerkennung	28
Überlappende Peaks	30
Schultern	31
Basislinienbestimmung	32
Standard-Basislinienkonstruktion	32
Anfang der Basislinie	33
Ende der Basislinie	33
Basislinienunterschreitung	34
Peak-zu-Tal-Verhältnis	35
Tangentiale Anpassungsmodi	37
Nicht zugeordnete Peaks	44
Peak-Trenncodes	45
Peakflächenberechnung	47
Flächenberechnung	47
Einheiten und Umrechnungsfaktoren	49
Integrationsereignisse	50
Integrationsereignisse für alle Signale	50
Anfangsereignisse	50

Integration

Statusinformationen

Zeitgesteuerte Ereignisse	54
Automatische Integration	57
Manuelle Integration	59
Dokumentation manueller Integrationsereignisse	60

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte der Integration und den Integrationalgorithmus der ChemStation. Es beschreibt den Integrationsalgorithmus, die Integration und die manuelle Integration.

Was ist eine 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

Integrationsalgorithmen der ChemStation

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 50.

Begriffserläuterung

Schlüsselpunkte

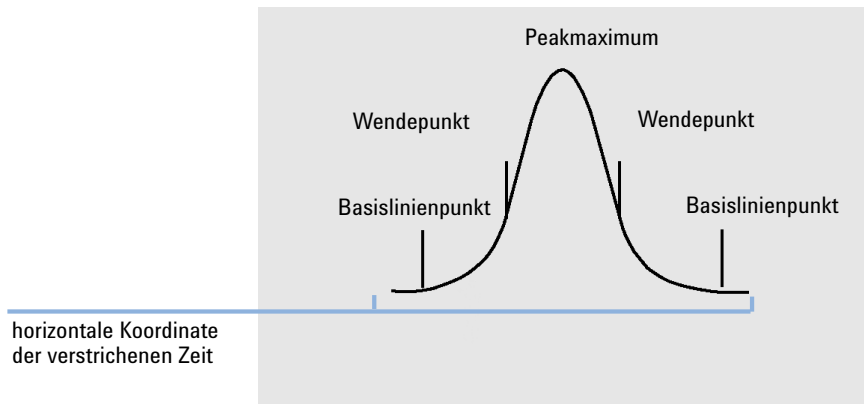


Abbildung 2 Schlüsselpunkte

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 Peakansfangs, des Peakmaximums und des Peakendes verwendet.

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.

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.

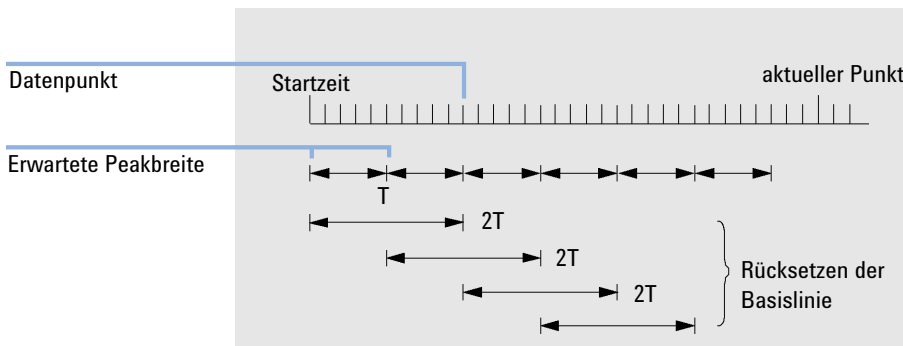


Abbildung 3 Basislinie

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 3](#) auf Seite 21).

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.

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.

Funktionsprinzip

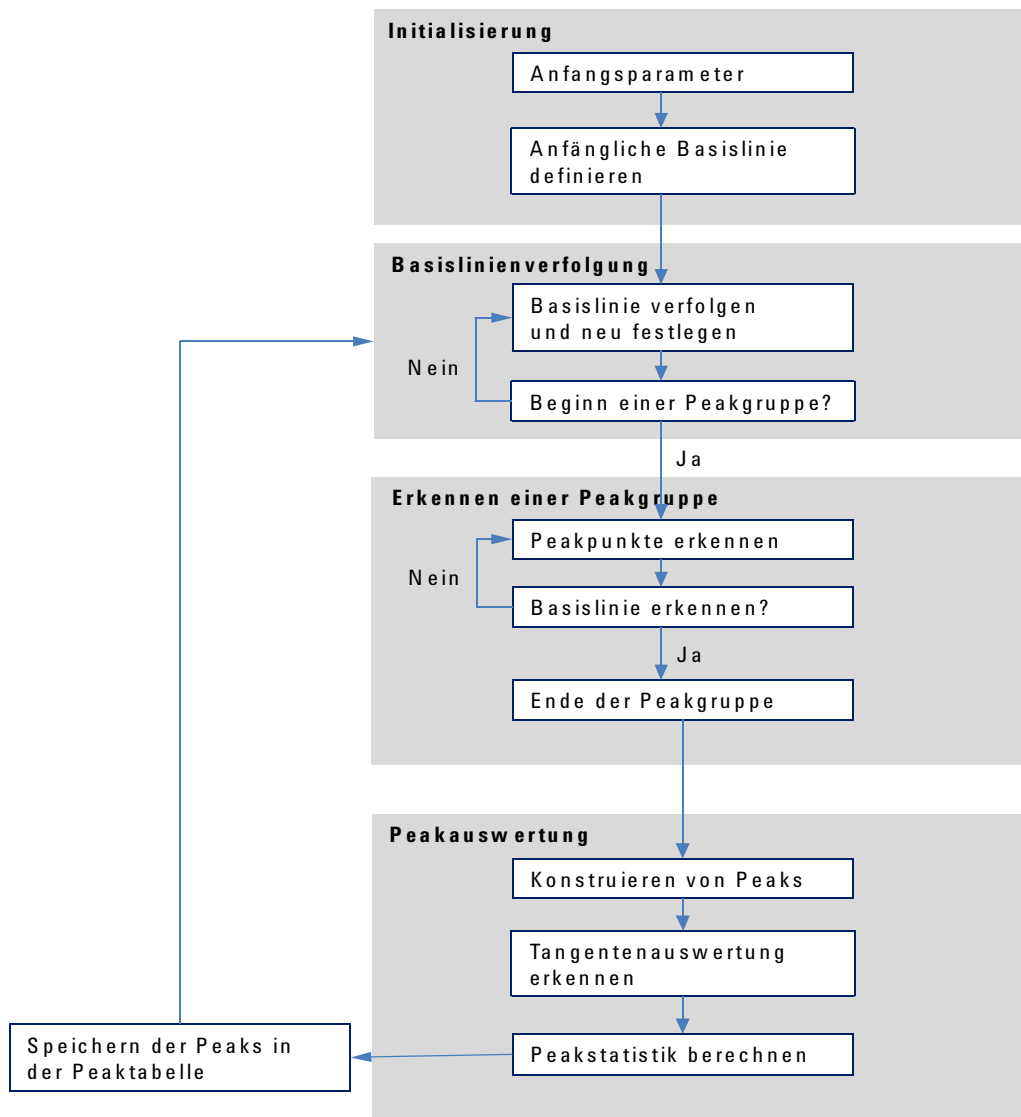


Abbildung 4 Flussdiagramm für den Integrator

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.

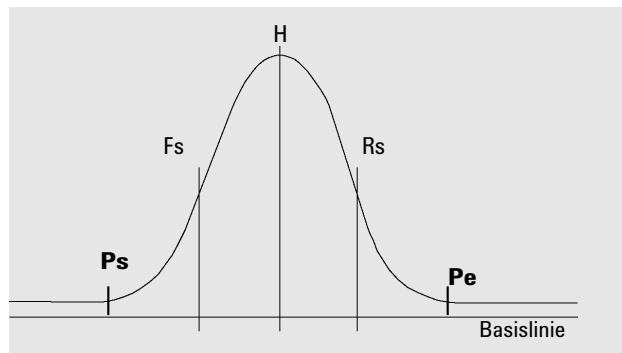


Abbildung 5 Peakbreitenberechnung

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/elektropherographischen Peakbreite eingestellt sein.

Die Peakbreite kann auf drei Arten geändert werden:

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

Die Peakbreitendefinitionen, die bei den Berechnungen zur Systemeignung verwendet werden, finden Sie unter „Systemeignungsevaluierung“ auf Seite 95.

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 3](#) auf Seite 28).

Die Bündelung erfolgt mit einer Potenz von 2 im Hinblick auf die erwartete Peakbreite oder auf Erfahrungswerte. Der Bündelungsalgorithmus ist in [Tabelle 3](#) auf Seite 28 zusammengefasst.

Tabelle 3 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 ≥ 15 ist, als den Punkt, an dem der Peak beginnt.

Peakanfang

In [Tabelle 4](#) auf Seite 29 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 ≥ 15 ist, erkennt der Algorithmus, dass ein Peak beginnt.

Tabelle 4 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 5](#) auf Seite 29 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 ≥ 15 ist, erkennt der Algorithmus, dass ein Peak endet.

Tabelle 5 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.

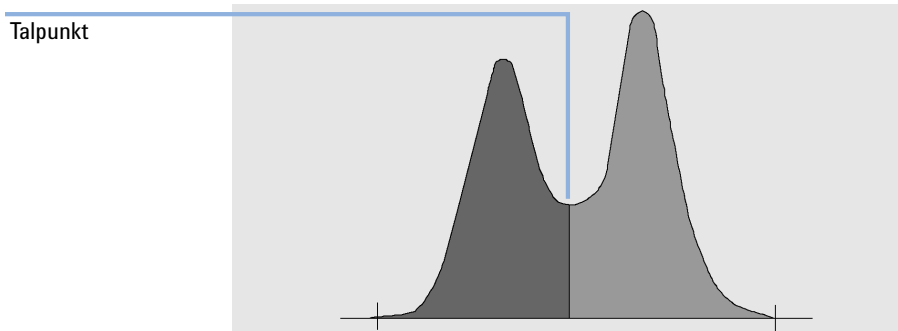


Abbildung 6 Überlappende Peaks

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 Flächensummierung. 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.

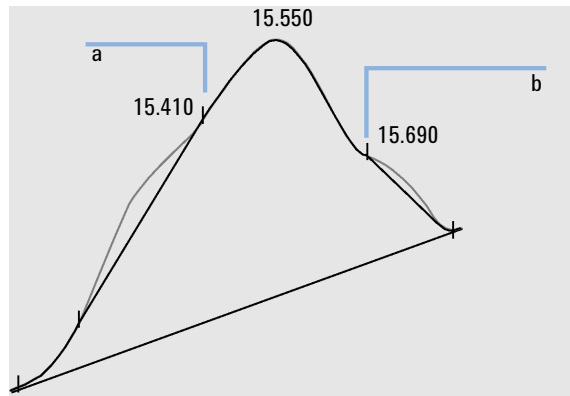


Abbildung 7 Peakschultern

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 7](#) auf Seite 31.

- 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.

Basislinienbestimmung

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.

Standard-Basislinienkonstruktion

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

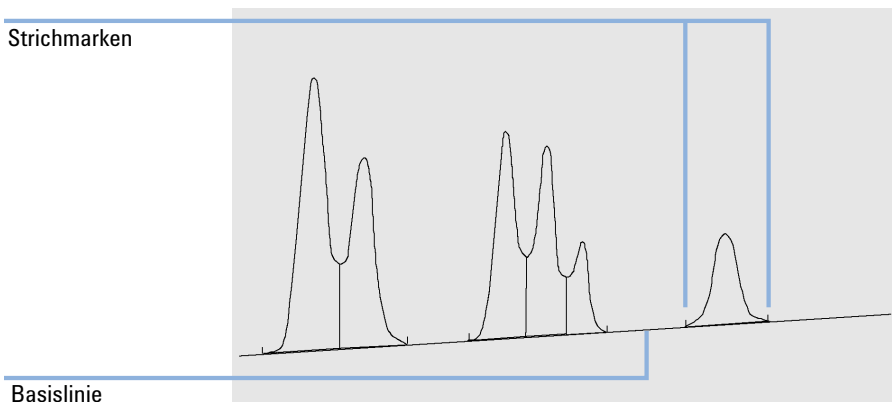


Abbildung 8 Standard-Basislinienkonstruktion

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.

Basislinienunterschreitung

Eine Unterschreitung tritt auf, wenn das Signal unter die konstruierte Basislinie fällt (Punkt [Abbildung 9](#) auf Seite 34).

Wenn eine Basislinienunterschreitung erfolgt, kann der entsprechende Teil der Basislinie rekonstruiert werden, wie durch die Punkte b in [Abbildung 9](#) auf Seite 34 illustriert.

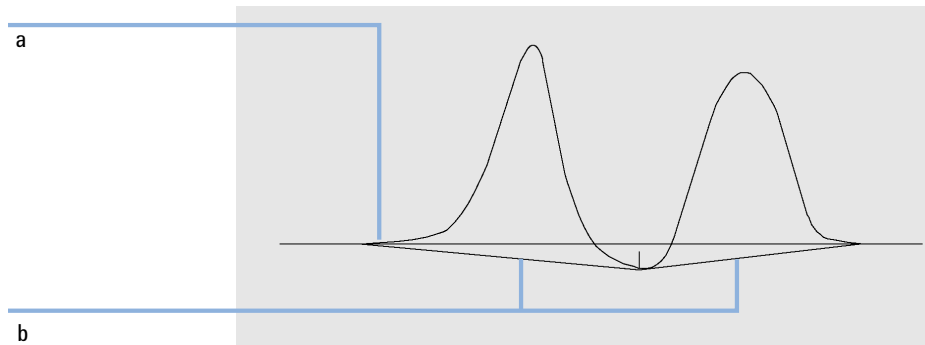


Abbildung 9 Basislinienunterschreitung

Sie können die folgenden Basislinienoptionen verwenden, um alle Basislinienunterschreitungen zu entfernen:

Classical Baseline Tracking (no penetrations)

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 (siehe Basislinien in [Abbildung 9](#) auf Seite 34 und [Abbildung 10](#) auf Seite 35).

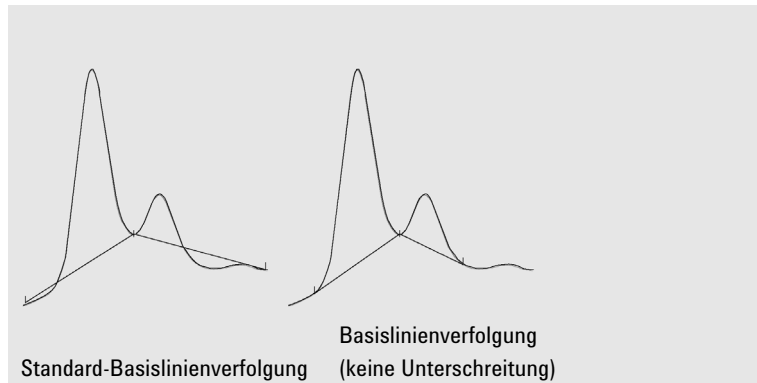


Abbildung 10 Standard-Basislinienverfolgung und Basislinienverfolgung (keine Unterschreitung)

HINWEIS

Die **Baseline tracking (no penetration)** ist für Peaks des Lösemittels sowie deren Nebenpeaks und Schultern nicht verfügbar.

Erweiterte Basislinienverfolgung

Bei der erweiterten Verfolgung des Basislinienverlaufs versucht der Integrator, Peakanfang und Peakende zu optimieren, erstellt die Basislinie für Peakgruppen neu und beseitigt Basislinienunterschreitungen (siehe [Abbildung 10](#) auf Seite 35). In vielen Fällen liefert die erweiterte Basislinienverfolgung eine stabilere Basislinie, die weniger von der Steigungsempfindlichkeit abhängig ist.

Peak-zu-Tal-Verhältnis

Der Peak-Tal-Quotient ist ein Qualitätsmaß und gibt an, wie gut ein Peak von anderen Substanzpeaks getrennt ist. Dieser benutzerdefinierte Parameter ist ein Bestandteil der erweiterten Basislinienverfolgung. Er entscheidet, ob zwei Peaks, die keine Basislinientrennung aufweisen, durch eine Basisliniensenkrechte oder eine Tal-Basislinie voneinander getrennt werden können. 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. [Abbildung 10](#) auf Seite 35 mit [Abbildung 11](#) auf Seite 36).

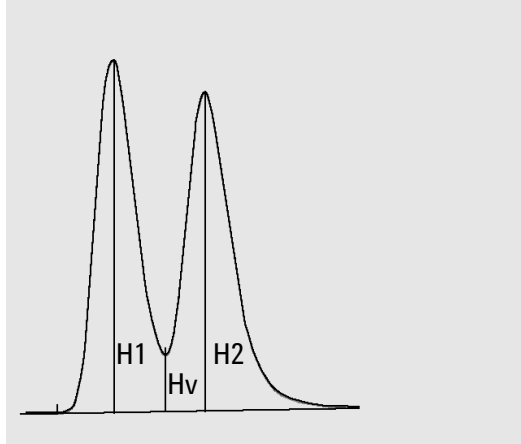


Abbildung 11 Peak-zu-Tal-Verhältnis

Das Peak-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 12 auf Seite 36 zeigt, wie der benutzerdefinierte Wert für das Peak-zu-Tal-Verhältnis die Basislinie beeinflusst.

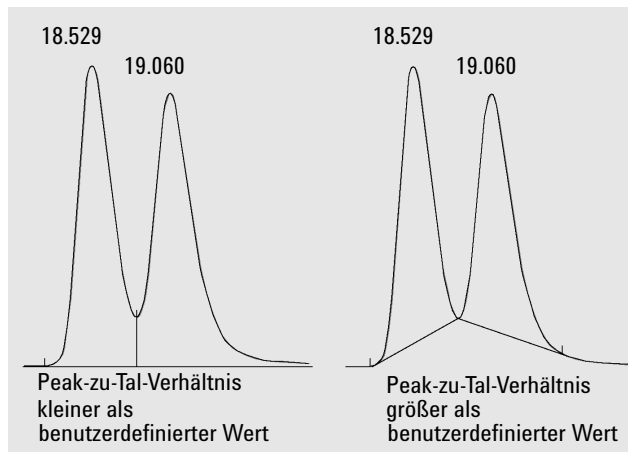


Abbildung 12 Einfluss des Peak-zu-Tal-Verhältnisses auf die Basislinie

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.

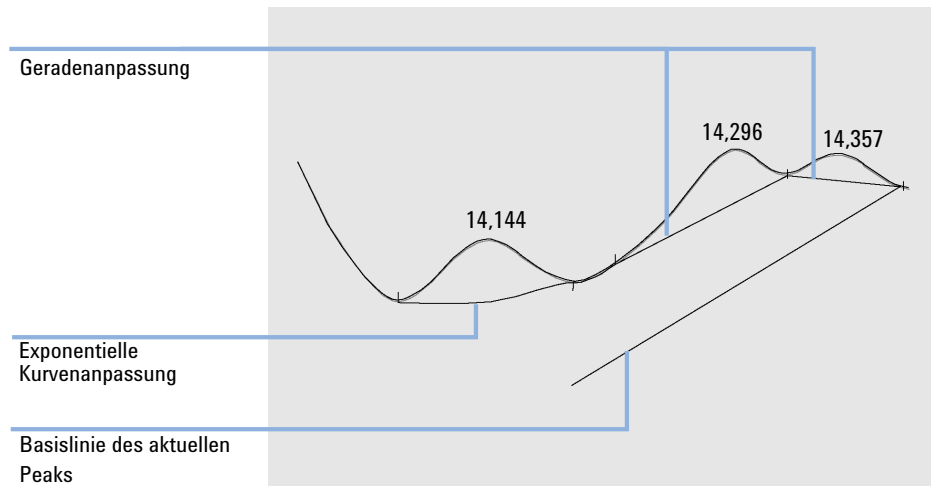


Abbildung 13 Exponentielle Anpassung

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.

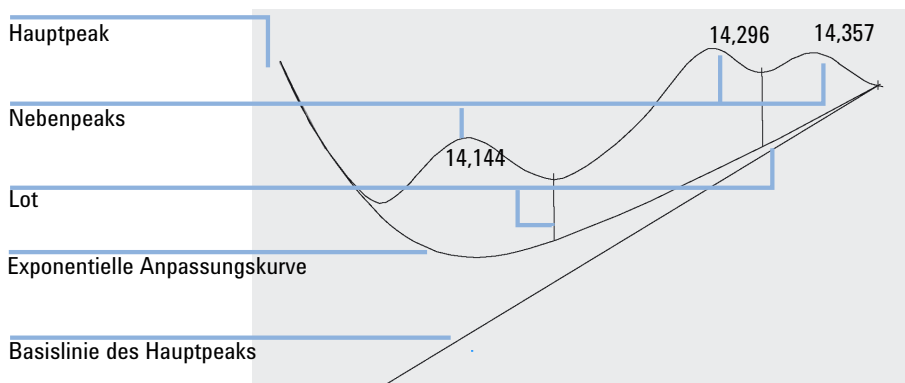


Abbildung 14 Neue exponentielle Anpassung

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.

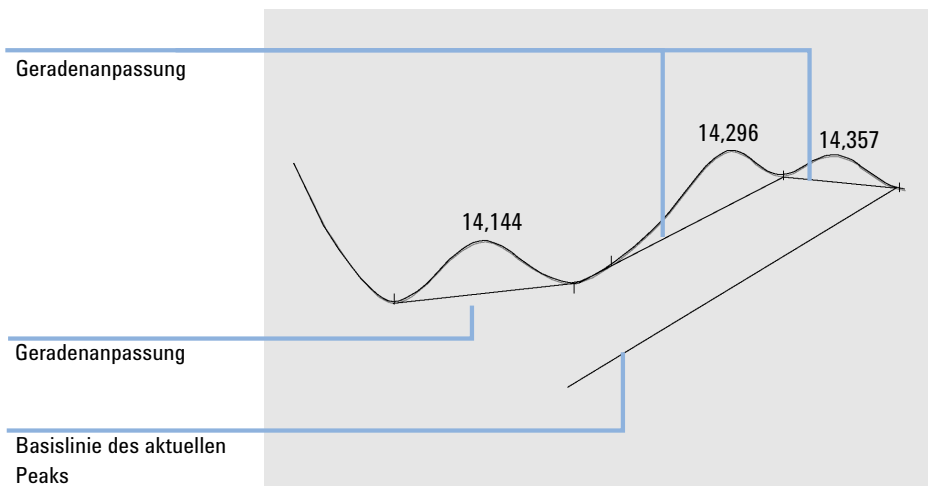


Abbildung 15 Geradenanpassung

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.

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 45).

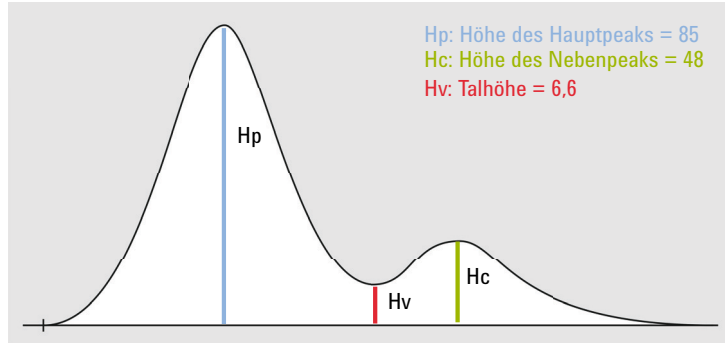


Abbildung 16 Beispiel für die Berechnung der Werte für die Skimming-Kriterien

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

Skimming an der abfallenden Flanke

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 $> 7,3$.

Skimming an der ansteigenden Flanke

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 $> 12,9$.

Berechnung der exponentiellen Kurvenanpassung 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

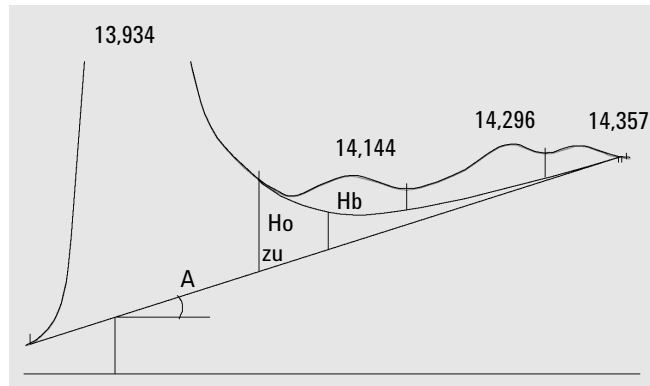


Abbildung 17 Werte für die Berechnung einer exponentiellen Anpassung

Peakanpassung im Anstieg

Wie bei den Nebenpeaks auf der absteigenden Flanke eines Hauptpeaks ist auch eine besondere Integration für Peaks auf der ansteigenden Flanke eines Hauptpeaks erforderlich, siehe [Abbildung 18](#) auf Seite 43.

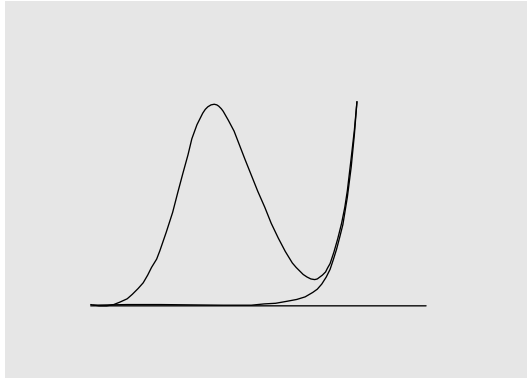


Abbildung 18 Vorderer Peakanpassung

Die Peakanpassung im Anstieg wird genau so behandelt wie die Peakanpassung auf der absteigenden Flanke. Es werden die gleichen Anpassungsmodelle verwendet.

Die Anpassungskriterien sind:

- Verhältnis Peakhöhe Hauptpeak und Peakhöhe Nebenpeak auf der Vorderseite
- Tal-zu-Höhe-Verhältnis

Der Tal-Höhen-Quotient nimmt dieselben Werte bei der Anpassung von ansteigender und absteigender Flanke an (siehe „Tal-Höhen-Quotient“). Der Höhen-Quotient der Anpassung im Anstieg wird ebenso berechnet wie der angepasste Höhen-Quotient (siehe „Höhen-Quotient“), kann aber unterschiedliche Werte annehmen.

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, siehe [Abbildung 19](#) auf Seite 44.

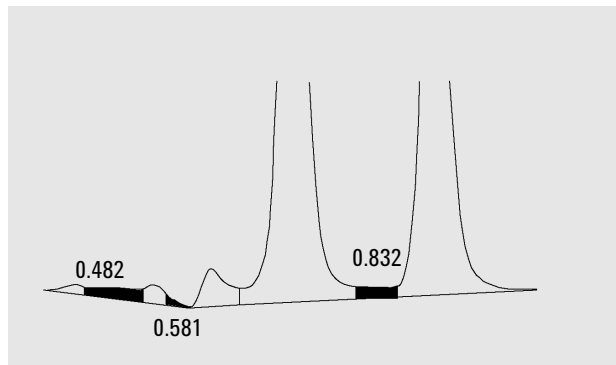


Abbildung 19 Nicht zugeordnete Peaks

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 6 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 Signalanalysezeitdauer.
- 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 37).
- 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.

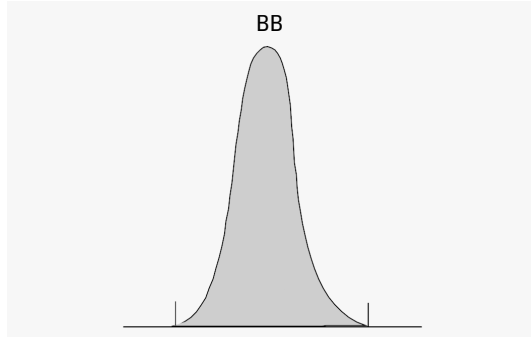


Abbildung 20 Flächenberechnung bei Basislinie-zu-Basislinie-Peaks

Im Falle eines einfachen, isolierten Peaks wird die Peakfläche durch die aufsummierten Flächen oberhalb der Basislinie zwischen Peakanfang und Peakende (gekennzeichnet durch die Strichmarken) 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 20](#) auf Seite 47)
- Bei Tal-zu-Tal-Peaks (VV) ist dies die Fläche oberhalb der Basislinie, eingegrenzt durch vertikal gefällte Linien von den Talpunkten (siehe [Abbildung 21](#) auf Seite 48)

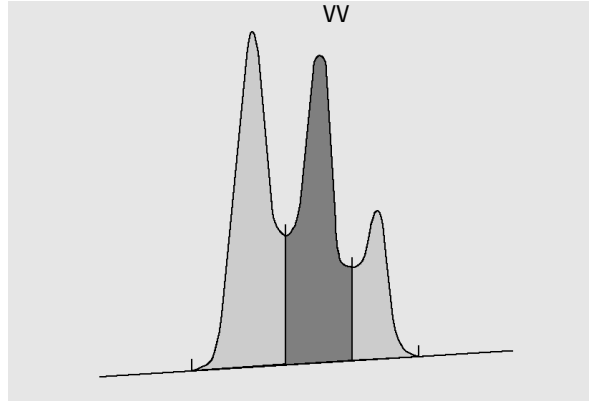


Abbildung 21 Flächenberechnung bei Tal-zu-Tal-Peaks

- Bei Tangentenpeaks (T) die Fläche oberhalb der neu gesetzten Basislinie
- Bei Lösungsmittelpeaks (S) die Fläche oberhalb der horizontalen Verlängerung des letzten Basisliniepunktes 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 22](#) auf Seite 48 gezeigt.

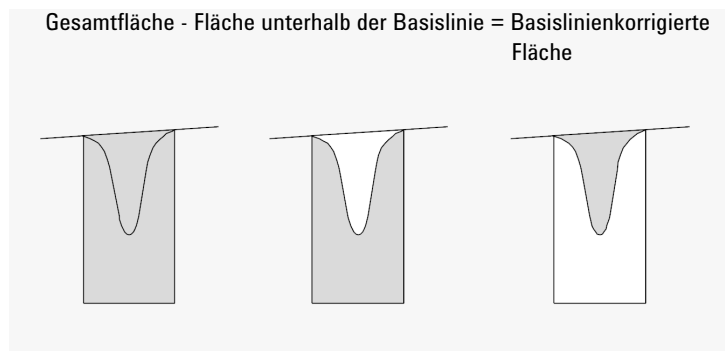


Abbildung 22 Flächenberechnung bei negativen Peaks

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.

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

Die folgenden Ereignisse werden für alle Signale bereitgestellt:

- Tangentialer Anpassungsmodus
- Verhältnis Peakhöhe Hauptpeak zu Peakhöhe Nebenpeak
- Verhältnis Peakhöhe Hauptpeak und Peakhöhe Nebenpeak auf der Vorderseite
- Höhenverhältnis vom Trennungstal zum Skimmer
- Basislinienkorrektur
- Peak-zu-Tal-Quotient

Anfangsereignisse

Anfangspeakbreite

Die Anfangspeakbreite stellt die interne Peakbreite des Integrators für den Analysenstart auf diesen Wert ein. Diese Anfangspeakbreite dient dazu, die Größe des Steigungszählers für die Erkennung von Peaksteigung, Peakabfall und Tailing festzulegen. Der Integrator kann diesen Wert im Laufe der Analyse aktualisieren, um die Integration zu optimieren. 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).

Steigungsempfindlichkeit

Die Steigungsempfindlichkeit ist die Einstellung für die Peakempfindlichkeit. Diese Einstellung ändert sich linear.

Schwellenwert für die Höhe

Dieser Wert gibt den Schwellenwert für die Mindesthöhe eines Peaks an. Jeder Peak, der diese Mindesthöhe nicht erreicht, wird nicht als Peak registriert.

Schwellenwert für die Fläche

Dieser Wert gibt den Schwellenwert für die Mindestfläche eines Peaks an. Jeder Peak, dessen Fläche kleiner ist als diese Mindestfläche, wird nicht als Peak registriert.

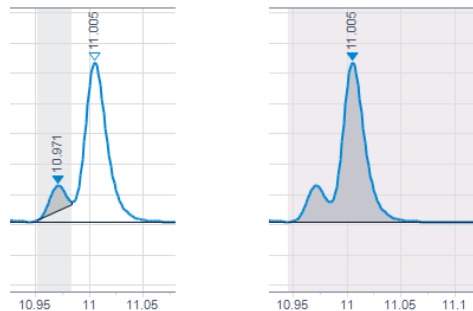
Schwellenwert für die Fläche in %

Dieser Wert gibt den Schwellenwert für die Mindestfläche des kleinsten interessierenden Peaks in % an.

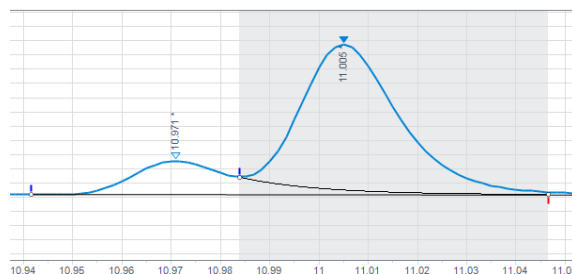
Jeder Peak, dessen Fläche in % kleiner ist als diese Mindestfläche, wird nicht als Peak registriert. Der Integrator weist alle Peaks zurück, deren Mindestfläche in % nach Basislinienkorrektur kleiner ist als dieser angegebene Wert.

Geben Sie die Mindestfläche in % des kleinsten erwarteten Peaks ein. Sie erhalten diese Information, indem Sie zunächst die Datendatei integrieren, während die Schwellenwerte für Fläche und Höhe auf Null (0) gesetzt sind. Wählen Sie in der Spalte **Area%** der Integrationsergebnisse einen geeigneten Mindestwert aus.

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.



Shoulder detection

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.

Peak Width

Die Einstellung der Peakbreite bestimmt die Selektivität des Integrators, um zwischen Peaks und Basislinienrauschen zu unterscheiden. Für eine optimale Leistung muss die eingestellte Peakbreite etwa der tatsächlichen Breite in halber Höhe der Peaks entsprechen. Der Integrator kann diesen Wert im Laufe der Analyse aktualisieren, um die Integration zu optimieren.

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 Peak nehmen Sie die Peakbreite in Zeiteinheiten 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.

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:

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

Height Reject und Peak Width

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.

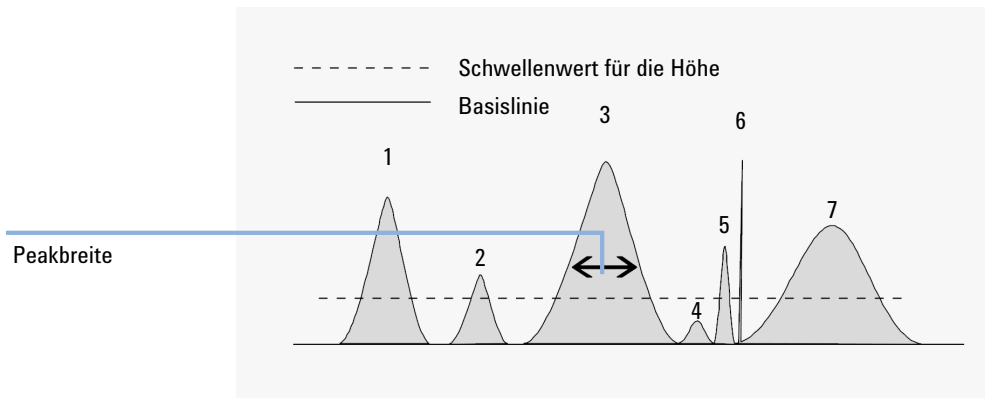


Abbildung 23 Anfangsereignisse verwenden

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, 5 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 7 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

OpenLab CDS ChemStation Edition bieten 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. Weitere Informationen über Integrationsereignisse finden Sie unter „Anfangsereignisse“ auf Seite 50

Flächenaddition

- Flächensumme** setzt Punkte fest, zwischen denen der Integrator die Flächen zwischen der Ein- und Ausschaltzeit der Flächensumme summiert.
- Summe des Flächenabschnitts** Dieses Ereignis ist ähnlich der **Area Sum**. Ohne den Verlust von Zeitintervallen können hiermit aufeinanderfolgende Zeitabschnitte des Chromatogramms integriert werden.

Mit der Funktion Flächensumme können Sie eine benutzerdefinierte Langzeit-Basislinie verfolgen und eine Integration über eine Peakgruppe ausführen, indem Sie ein Intervall festlegen. Die Flächenaddition summiert für dieses Intervall die Flächen unter den Peaks. Das System definiert die Retentionszeit der Flächensumme als Mittelpunkt des Zeitintervalls der aufsummierten Fläche. Die Genauigkeit des definierten Mittelpunkts variiert zwischen 0,001 min bei hoher Datenrate und 0,1 min bei niedriger Datenrate.

Wenn ein Schnitt einen Peak mit einer Fläche oder Höhe enthält, die geringer ist als ein vorgegebener Schwellenwert (minimale Fläche oder Höhe), wird er trotzdem aufgelistet, um das Fehlen von Schnitten zu vermeiden.

Basislinie Ereignisse

- Basislinie jetzt** liegt einen (Zeit-) Punkt fest, an welchem der Integrator die Basislinie auf die aktuelle Höhe des Datenpunkts neu einstellt, wenn das Signal auf einem Peak ist.
- Basislinie bei Talpunkten** Legt Punkte fest (Ein/Aus), zwischen denen der Integrator die Basislinie in jedem Tal zwischen Peaks neu festlegt.
- 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.

Die folgenden Ereignisse können in komplexen Chromatogrammen mit der Funktion **Area Sum Slice** für die Flächenaddition verwendet werden. Hiermit lässt sich automatisch die beste Basisliniendefinition finden und manuelle Eingriffe werden unnötig. Dies ist vor allem für die Analyse von GC-Ergebnissen nützlich. Die Basislinie wird mithilfe statistischer Schätzungen auf Basis eines Zeitintervalls berechnet.

- Set Baseline from Range (Festlegen der Basislinie eines Bereichs)** Definiert den Bereich des Chromatogramms, der zur Abschätzung der neuen Basislinie verwendet wird. Der Bereich der Datenpunkte wird zur Berechnung eines statistisch wichtigen Basislinienpunktes im Mittelpunkt des Zeitbereichs verwendet. Dieser Algorithmus ignoriert auf intelligente Art Spitzenabweichungen oder unerwartete Peaks, die in diesem Intervall über eine zweistufige statistische Eliminierungsfunktion. Dadurch werden zuverlässigere Ergebnisse für die Abschätzung der Basislinie gewährleistet.

Zwei Ereignisse **Set Baseline from Range** sind durch eine gerade Linie zwischen ihren Mittelpunkten miteinander verbunden. [Abbildung 24](#) auf Seite 56 veranschaulicht die Einstellung des Intervalls des Basislinienbereichs, das als grau schattierter Bereich dargestellt wird.

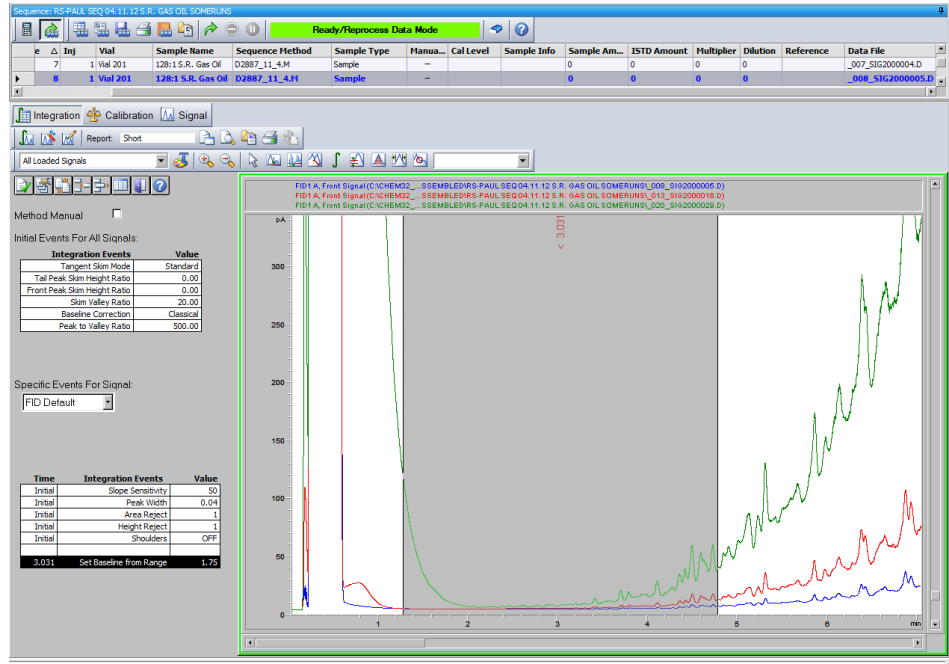


Abbildung 24 „Set Baseline from Range“ (Festlegen der Basislinie eines Bereichs): Das Intervall des Basislinienbereichs wird durch eine Grauschattierung dargestellt

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

Ähnlich wie **Set Baseline from Range**, mit reduziertem Wert, um die Basislinienunterschreitung möglichst gering zu halten. **Set Low Baseline from Range** wird berechnet durch eine Subtraktion von zwei Sigma (Standardabweichung des Rauschens) vom y-Wert des **Set Baseline from Range**.

Use Baseline from Range
(Basislinie eines Bereichs verwenden)

Hiermit kann der Basislinienwert auf eine spätere oder frühere Zeit projiziert werden. Ferner können hiermit Basislinienkurven konstruiert werden, die die Steigung unter einer Peakgruppe verändern.

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 Algorithmus 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.

Integration

Integrationsereignisse

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 **manuelle 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:

- Basislinie zeichnen** 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.
- Tangentiales Skimming** Es werden die Flächen von Peaks bestimmt, indem sie durch tangentiales Skimming von der Flanke eines Hauptpeaks abgetrennt werden. Die Fläche des tangential abgetrennten Peaks wird von der Fläche des Hauptpeaks subtrahiert.
- Peak splitten** Angabe des Punktes, an dem ein Peak durch Lotfällung abgetrennt wird.
- Peak(s) löschen** 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 signalspezifischer 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.

3 Peakidentifizierung

Was ist eine Peakidentifizierung?	63
Regeln zur Peakübereinstimmung	64
Methoden der Peakidentifizierung	65
Absolute Retentions-/Migrationszeit	65
Relative Retentionszeit	65
Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten	65
Peak-Qualifier	65
Mengenbegrenzungen	66
Absolute Retentions-/Migrationszeit	67
Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten	69
Einzelne Referenzpeaks	69
Mehrere Referenzpeaks	69
Peak-Qualifier	71
Signalkorrelation	72
Überprüfung der Qualifier	72
Berechnung des Qualifier-Verhältnisses	72
Identifizierungsprozess	74
Erkennen des Referenzpeaks	74
Erkennen der ISTD-Peaks	74
Erkennen aller verbleibenden kalibrierten Peaks	75
Klassifizierung nicht identifizierter Peaks	75

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte der Peakidentifizierung.

Was ist eine Peakidentifizierung?

Die Peakidentifizierung ist die Identifizierung von Substanzen in einer unbekanntem Probe aufgrund ihrer chromatographischen/elektropherographischen Eigenschaften 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 untersuchten 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 Zeitreferenzpeaks 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 Verhältnissen.

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 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 25 auf Seite 67 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.

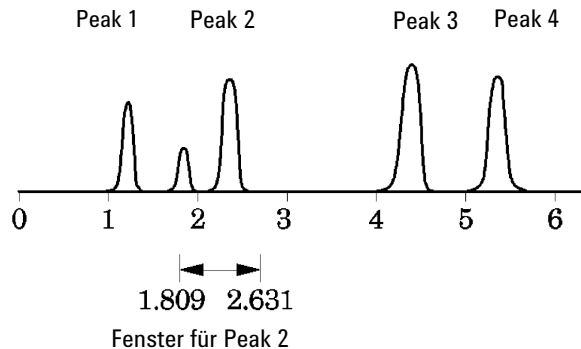


Abbildung 25 Retentions-/Migrationszeitfenster

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 26](#) auf Seite 71 λ_1 .

Die beiden anderen detektierten Wellenlängen können zur Bestätigung des Peaks dienen. In der Abbildung sind dies λ_2 und λ_3 .

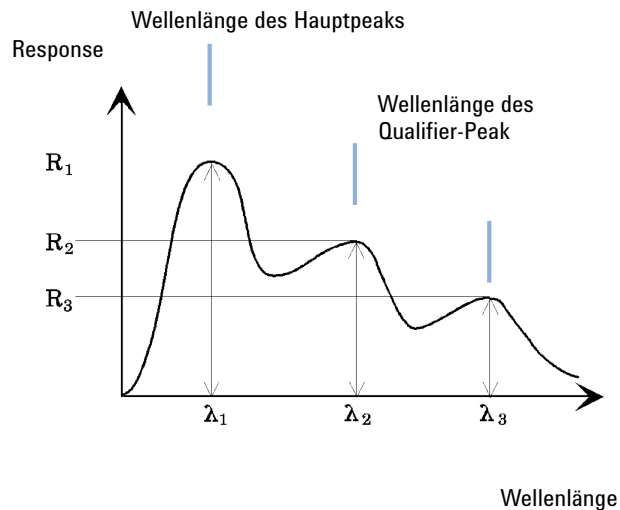


Abbildung 26 Peak-Qualifier

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 λ_1 und dem Qualifier-Peak, z. B. λ_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 Datentypen 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.



4

Kalibrierung

Kalibrierungskurve 77

Gruppenkalibrierung 79

Optionen für die Rekalibrierung 80

Dieses Kapitel beschreibt die Kalibrierungsprinzipien in der ChemStation-Software.

Kalibrierungskurve

Bei einer Kalibrierungskurve handelt es sich um eine grafische Darstellung von Mengen- und Responseedaten 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 27](#) auf Seite 77.

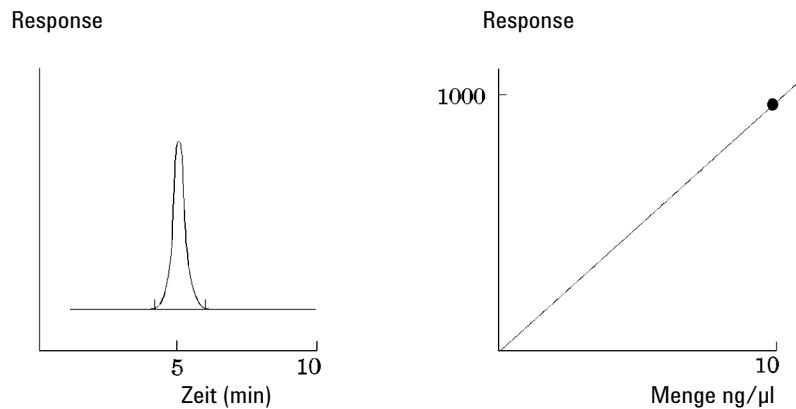


Abbildung 27 Kalibrierprobe (10 ng/µl) Signal und Kalibrierkurve

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

Es gilt Folgendes:

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.

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

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

Es gilt Folgendes:

relRES = relativer Residualwert in Prozent

Die errechnete Response steht für den Punkt auf der Kalibrierungskurve.

Die *residuale Standardabweichung*, die auf einigen Reports ausgedruckt ist, wird bei Auswahl von „Kalibrierungstabelle und Kurven Drucken“ mithilfe der folgenden Formel errechnet:

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

Es gilt Folgendes:

ResSTD = residuale Standardabweichung

Resp_{calibratedi} = kalibrierte Response für den Punkt i

Resp_{calculatedi} = 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.

5

Quantifizierung

Was ist eine Quantifizierung?	82
Berechnungsmethoden in der Quantifizierung	83
Korrekturfaktoren	84
Absoluter Responsefaktor	84
Multiplikator	84
Verdünnungsfaktor	84
Probenmenge	84
Area% und Height%	85
Kalibrierte Berechnungsverfahren	86
ESTD-Berechnung	87
Norm%-Berechnung	89
ISTD-Berechnung	90
Analysenlauf 1: Kalibrierung	91
Analysenlauf 2: Unbekannte Probe	92
ISTD-Berechnung für kalibrierte Peaks	92
Quantifizierung nicht kalibrierter Peaks	93
Indirekte Quantifizierung mit einer kalibrierten Verbindung	93
Quantifizierung mit einem manuellen Faktor	93

Dieses Kapitel beschreibt die Quantifizierung mit der ChemStation. Berechnungen von Fläche in %, Höhe in %, Norm in %, ESTD und ISTD sowie die Quantifizierung nicht identifizierter Peaks werden ausführlich beschrieben.

Was ist eine 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 unbekanntem 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 Responsefaktor

Der absolute Responsefaktor einer Substanz ist definiert als Quotient der Substanzmenge und der gemessenen Fläche oder Höhe des Substanzpeaks bei der Analyse einer Kalibriermischung. 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 Mengewerte umzurechnen.

Verdünnungsfaktor

Der Verdünnungsfaktor ist eine Zahl, mit der alle Ergebnisse multipliziert werden, bevor der Report gedruckt wird. Sie können den Verdünnungsfaktor zur Einheitenumrechnung 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.

Kalibrierte Berechnungsverfahren

Die Methoden Externer Standard (ESTD), Normalisierung und Interner Standard (ISTD) erfordern Responsefaktoren 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.

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:

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.

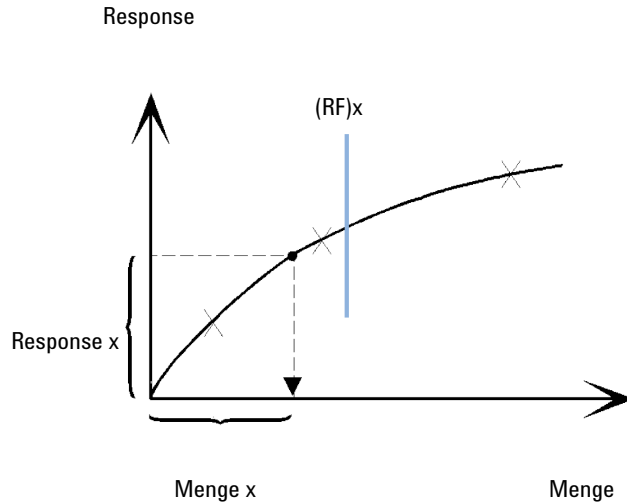


Abbildung 28 Responsefaktor

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

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.

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

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.

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 Response-Verhältnis 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 Response-Verhältnis 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“ (Kalibriereinstellungen) oder „Calibration Curve“ (Kalibrierkurve) angegeben ist.

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

Response-Verhältnis

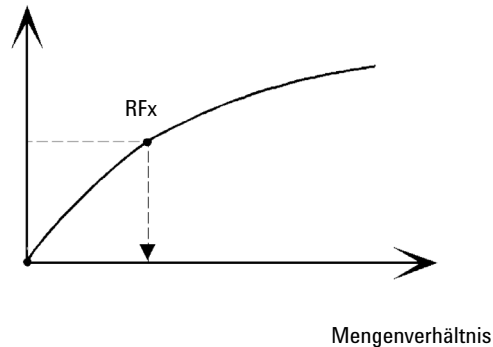


Abbildung 29 Mengenverhältnis

Analysenlauf 2: Unbekannte Probe

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

ISTD-Berechnung für kalibrierte Peaks

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 Responsefaktor für Substanz x ist.

Die tatsächliche Menge des internen Standards in der Probe (*Tats. Menge*) ist der Wert, der im Dialogfeld „Probeninformationen“ (Kalibriereinstellungen) oder „Probeninformationen“ eingegeben wurde.

M ist der Multiplikator.

D ist der Verdünnungsfaktor.

Ist der Reporttyp ISTD% ausgewählt, wird die relative Menge (in %) der Menge 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

Quantifizierung

Quantifizierung nicht kalibrierter Peaks

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**:

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

6

Systemeignungsevaluierung

Systemeignungsevaluierung	97
Bestimmung der Rauschhöhe	100
Bestimmung des Rauschens als sechsfache Standardabweichung	101
Bestimmung des Rauschens nach der Peak-zu-Peak-Berechnung	101
Rauschbestimmung nach der ASTM-Methode	103
Signal-zu-Rausch-Berechnung	104
Drift und Wanderung	108
Berechnung der Peakasymmetrie und -symmetrie	109
Formeln und Berechnungsmethoden zur Beurteilung der Systemeignung	111
Allgemeine Definitionen	112
Totvolumen	112
Retentionszeit einer nicht retardierten Substanz t (m) [min]	112
Leistungstest-Definitionen	113
Statistische Momente	113
Statistische Momente, Schräge und Exzess	114
Tatsächliche Peakbreite W_x [min]	115
Kapazitätsfaktor (USP), Kapazitätsverhältnis (ASTM) k'	115
Tailingfaktor (USP) t	116
Anzahl der theoretischen Trennböden pro Säule n	117
Anzahl theoretischer Böden pro Meter N [1/m]	118
Leistungstest-Definitionen	113
wobei Auflösung (USP, ASTM) R	119
Auflösung (EP/JP) R_s	120
Auflösung (ChemStation klassische Definitionen)	120
Peak-Tal-Verhältnis (EP/JP)	121
Definitionen der Reproduzierbarkeit	123
Probenmittelwert M	123
Proben-Standardabweichung S	123
Relative Standardabweichung RSD[%] (USP)	124
Standardabweichung des Mittelwerts SM	124

Konfidenzintervall CI	124
Definitionen der Reproduzierbarkeit	123
Korrelationskoeffizient	128
Standardabweichung (S)	129
Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff	130

In diesem Kapitel wird beschrieben, welche Funktionen die ChemStation ausführen kann, um die Leistung des Analysengeräts vor seiner Verwendung für die Probenanalyse sowie der Analysenmethode vor ihrer routinemäßigen Verwendung zu bewerten. Außerdem wird beschrieben, wie die Leistung der Analysensysteme vor und während der routinemäßigen Analyse überprüft werden kann.

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 Datenpunktwerten eines ausgewählten Zeitbereichs eines Signals 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.

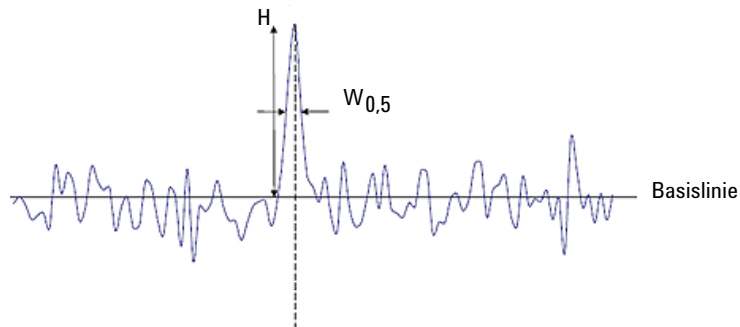


Abbildung 30 Chromatogramm mit Peaksignal und Rauschen

H	Peakhöhe von Spitze bis Basislinie (beste gerade Linie durch das Rauschen)
W _{0,5}	Halbwertbreite des Peaks

Bestimmung des Rauschens als sechsfache Standardabweichung

Die lineare Regression wird mit Hilfe aller Datenpunkte des gegebenen Zeitbereiches bestimmt (siehe „Lineare Kurvenanpassung“ auf Seite 125). Das Rauschen ergibt sich nach folgender Formel:

$$N = 6 \times Std$$

wobei

N das Rauschen gemäß der sechsfachen Standardabweichung und

Std die Standardabweichung der linearen Regression aller Datenpunkte in dem Zeitbereich ist.

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

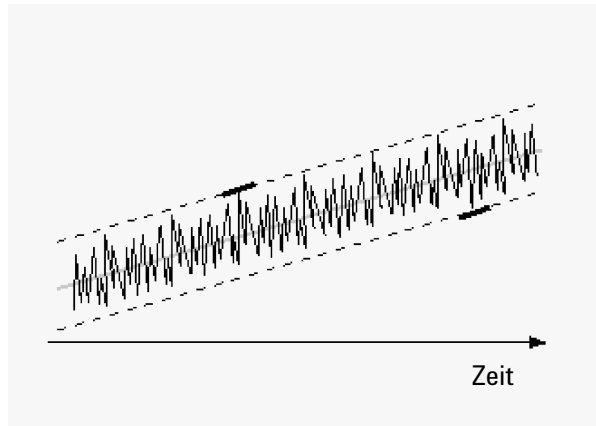


Abbildung 31 Illustration des Peak-zu-Peak-Rauschens mit Drift

Zunächst wird die Drift durch Bestimmung der linearen Regression mithilfe aller Datenpunkte in dem Zeitbereich ermittelt (siehe „Lineare Kurvenanpassung“ auf Seite 125). Zur Ermittlung des Drift-korrigierten Signals wird die lineare Regressionslinie von allen Datenpunkten des Zeitbereichs abgezogen.

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

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

wobei

N das Peak-zu-Peak-Rauschen ist,

I_x die mit der LSQ-Formel berechneten Datenpunkte sind, wobei

I_{\max} der größte Intensitätspeak, und

I_{\min} der kleinste Intensitätspeak in dem Zeitbereich ist.

Bei Berechnungen für das Europäische Arzneibuch wird das Peak-zu-Peak-Rauschen mit dem Blindwertsignal einer Referenz auf jeder Peakflanke über einen Bereich von -10 und +10 mal $W_{0,5}$ berechnet. Dieser Bereich kann symmetrisch zu dem relevanten Signal sein. Falls erforderlich, kann er aber auch aufgrund von Matrixsignalen unsymmetrisch sein.

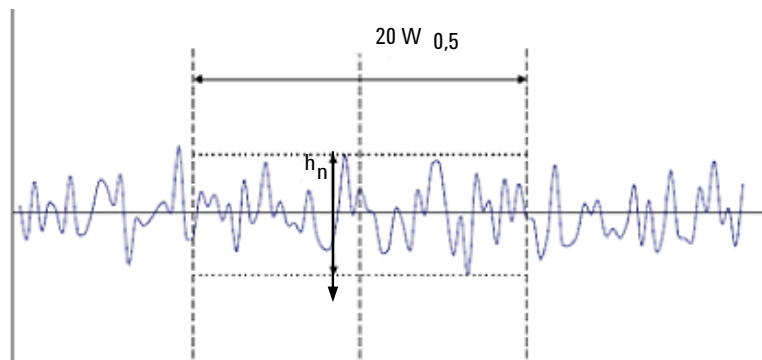


Abbildung 32 Bestimmung des Rauschens mithilfe des Chromatogramms einer Blindprobe

wobei

$20 W_{0,5}$ dem Bereich des 20-fachen von $W_{0,5}$ entspricht.

h_n die maximale Amplitude des Basislinienrauschens im Bereich des 20-fachen $W_{0,5}$ -Werts ist.

Rauschbestimmung 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-to-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.

Bestimmung der Zyklenanzahl, n

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

wobei t die Zykluszeit und t_{tot} der gesamte Zeitraum ist, für den das Rauschen berechnet wird.

Berechnung des Peak-to-Peak Rauschens in jedem Zyklus

Es wird zunächst die Abweichung errechnet. Hierzu bestimmt man die lineare Regression unter Verwendung aller Datenpunkte innerhalb des Zeitbereichs (siehe „Lineare Kurvenanpassung“ auf Seite 125). Die lineare Regressionslinie wird von allen Datenpunkten innerhalb des Zeitbereichs abgezogen, um somit das um die Abweichung (Drift) korrigierte Signal zu erhalten. Daraufhin wird mit Hilfe der folgenden Formel das Peak-to-Peak Rauschen ermittelt:

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

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

Berechnung des ASTM-Rauschens

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

wobei N_{ASTM} das mit der ASTM-Methode berechnete Rauschen ist.

Eine Rauschbestimmung nach der ASTM-Methode wird nur dann vorgenommen, wenn der ausgewählte Zeitbereich über einer Minute liegt. Wenn der ausgewählte 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 Rauschbestimmung überlappen um 10 %.

Signal-zu-Rausch-Berechnung

ChemStation bietet die folgenden Optionen zur Berechnung des Rauschens für das Signal-zu-Rausch-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-zu-Rausch-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-zu-Rausch-Verhältnisses wird für jeden Peak im Signalverlauf berechnet. Kann kein Rauschen-Wert gefunden werden, wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im Bericht als "-" angegeben.

Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wird dann nach folgender Formel berechnet:

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

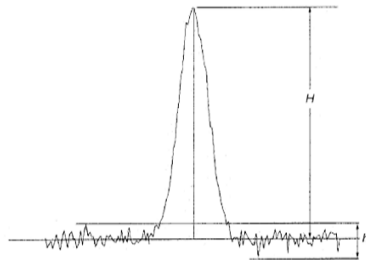


Abbildung 33 Signal-zu-Rausch-Verhältnis

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

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (S/N) kann gemäß der Definition im Europäischen Arzneibuch berechnet werden. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnisses 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 101).

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-zu-Rausch-Verhältnisses für die Peaks in diesem speziellen Signal nicht berechnet.

Bestimmung des Rausch-Bereichs

Der Rausch-Bereich im Referenzsignal wird nach einem der folgenden Algorithmen bestimmt

- Wenn das Referenzsignal nicht lang genug ist: $StartZeit - EndZeit < 20 * W_{0,5}$
 - $StartZeit = Startzeit (des Referenzsignals)$ und
 - $EndZeit = Endzeit (des Referenzsignals)$
- Wenn das Referenzsignal lang genug, jedoch der Peak so platziert ist, dass $(RT - 10 * W_{0,5})$ kleiner als der Startpunkt des Referenzsignals ist
 - $StartZeit = Startzeit (des Referenzsignals)$ und
 - $EndZeit = StartZeit + 20 * W_{0,5}$
- Wenn das Referenzsignal lang genug, der Peak aber so platziert ist, dass RT oder $RT + 10 * W_{0,5}$ größer als der Endpunkt des Referenzsignals ist

Systemeignungsevaluierung

Bestimmung der Rauschhöhe

- $EndZeit = Endzeit$ (des Referenzsignals) und
- $StartZeit = EndZeit - 20 * W_{0,5}$
- Wenn der Peak so platziert ist, dass RT oder $RT + 10 * W_{0,5}$ größer als der Endpunkt des Referenzsignals ist
 - $StartZeit = RT - 10 * W_{0,5}$ und
 - $EndZeit = RT + 10 * W_{0,5}$

Wobei:

RT die Retentionszeit und

$W_{0,5}$ die Peakbreite bei halber Höhe ist.

Drift und Wanderung

Die Drift wird als Steigung der linearen Regression definiert. Zunächst wird die Drift durch Bestimmung der linearen Regression aller Datenpunkte in dem Zeitbereich ermittelt (siehe „Lineare Kurvenanpassung“ auf Seite 125). Zur Ermittlung des Drift-korrigierten Signals wird die lineare Regressionslinie von allen Datenpunkten des Zeitbereichs abgezogen.

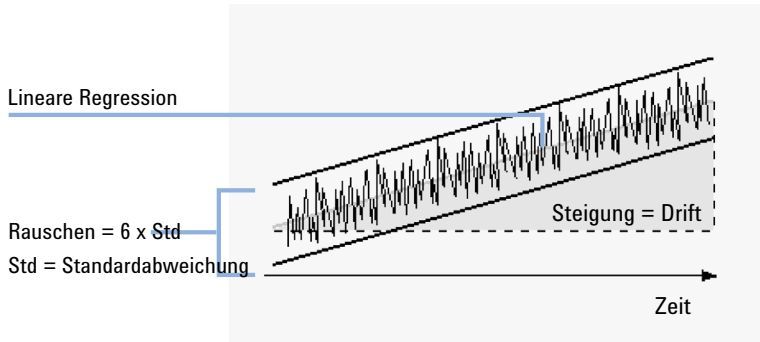


Abbildung 34 Drift für Rauschen als das Sechsfache der Standardabweichung

Wanderung wird als Peak-zu-Peak Rauschen der Mittelwerte in den ASTM-Rauschzyklen bestimmt, siehe „Rauschbestimmung nach der ASTM-Methode“ auf Seite 103.

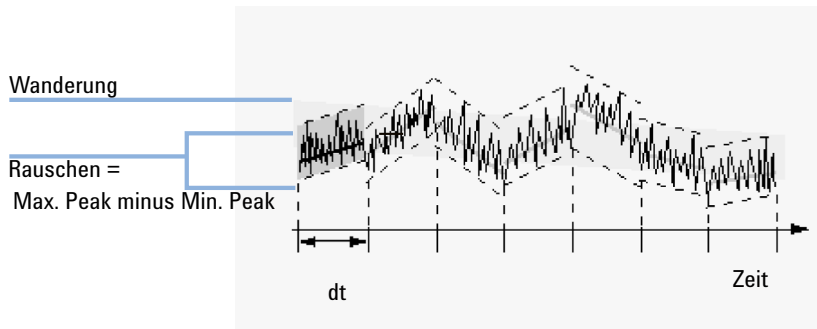


Abbildung 35 Wanderung des Rauschens gemäß Definition in der ASTM-Methode

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 116) 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

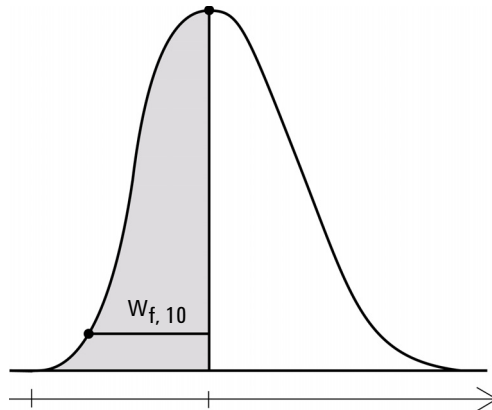


Abbildung 36 Berechnung der Peakasymmetrie

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:

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

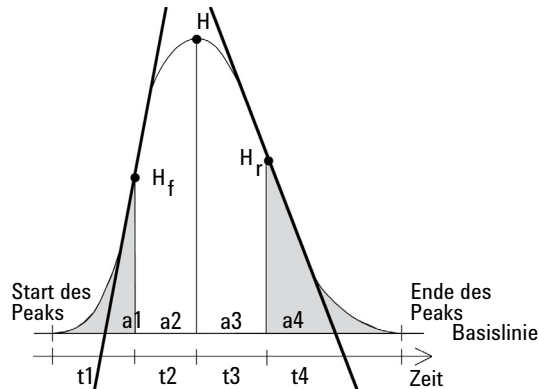


Abbildung 37 Berechnung des Peakasymmetriefaktors

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 unter Verwendung der Berichtvorlagen **Performance**, **Performance+Noise**, **Performance+LibSearch** und **Extended Performance** angegeben.

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

Die in diesem Zusammenhang verwendeten Referenzen sind:

- *ASTM: Abschnitt E 682 – 93, Jahrbuch der ASTM Standards, Band.14.01*
- *USP: The United States Pharmacopeia, XX. Revision, S. 943 - 946*
- *EP: Europäisches Arzneimittelbuch, 7. Auflage*
- *JP: Japanese Pharmacopoeia, 15. Auflage*

Allgemeine Definitionen

Totvolumen

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

wobei

d	Durchmesser der Säule [cm]
π	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

Statistische 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

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

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

Statistische Momente, Schräge und Exzess

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.

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 (Sigmabreite 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).

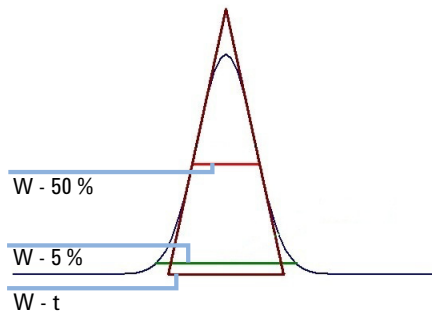


Abbildung 38 Peakbreite bei x % der Höhe

Kapazitätsfaktor (USP), Kapazitätsverhältnis (ASTM) k'

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

Es gilt Folgendes:

t_R = Retentionszeit des Peaks [min]

t_0 = Totzeit [min]

Tailingfaktor (USP) t

HINWEIS

Symmetriefaktor (JP) und Symmetriefaktor (EP) S sind identisch mit Tailingfaktor (USP) In Intelligente Reporterstellung stehen alle als „Peak_TailFactor“ zur Verfügung. Siehe auch „Reportausgabe der Faktoren des Arzneimittelbuchs in ChemStation“ auf Seite 164.

$$t = \frac{W_{5,0}}{t_w \cdot 2}$$

wobei

t_w = Abstand in Minuten zwischen der Peakfront und T_R , gemessen bei 5% der Peakhöhe

$W_{5,0}$ = Peakbreite bei 5% der Peakhöhe [min]

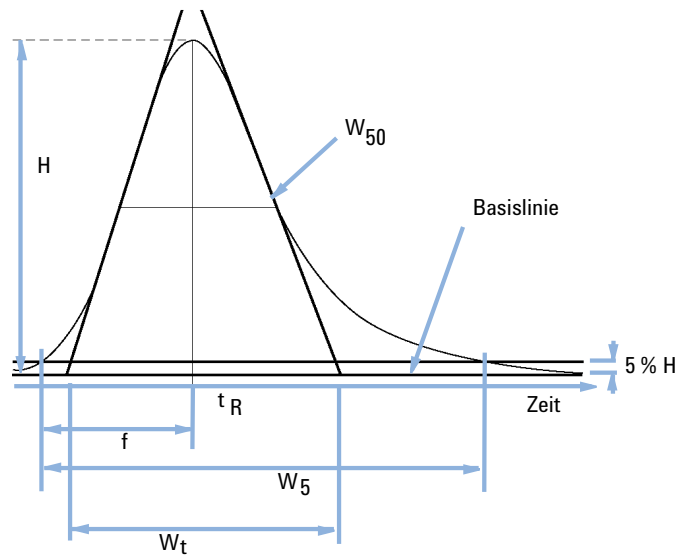


Abbildung 39 Leistungsparameter

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_B	Basisbreite [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 (USP, ASTM), Selektivität Alpha

HINWEIS

Relative Retention (USP) steht der Reporterstellung als „Selectivity“ oder „Peak_Selectivity“ zur Verfügung

(Bezogen auf zwei Peaks a und b, T_R des Peaks a < T_R des Peaks b)

$$\alpha = \frac{k'_{(b)}}{k'_{(a)}}, \alpha \geq 1$$

wobei:

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

Relative Retention (EP, JP)

Relative Retention (angepasst) nach EP und der Trennfaktor nach JP werden mit der gleichen Formel berechnet:

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

wobei

t_{Ri} = Retentionszeit des relevanten Peaks

t_{Rst} = Retentionszeit des Referenzpeaks

t_M = Totzeit

Relative Retention (angepasst, EP) und Trennfaktor (JP) stehen in der intelligenten Reporterstellung als „RelativeRetTime_EP“ und in der klassischen Reporterstellung als „Selectivity“ zur Verfügung.

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_R von Peak 1 < t_R von Peak 2; t_R 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

Halbwertsbreitenmethode (Auflösung wird in Leistungsbericht verwendet):

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

Die Definition von Auslösung in USP unterscheidet sich von der Definition im Europäischen (EP) und im Japanischen (JP) Arzneimittelbuch. EP- und JP-Berechnungen stehen seit ChemStation Edition C.01.04 zur Verfügung.

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 „Reportausgabe der Faktoren des Arzneimittelbuchs in ChemStation“ auf Seite 164

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 „Statistische Momente“ auf Seite 113)

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.

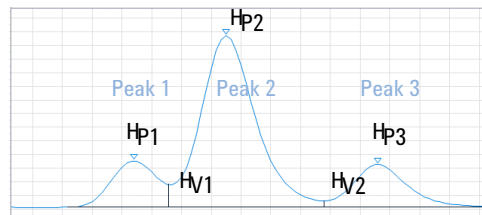
HINWEIS

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 _F	Peak-Tal-Verhältnis, Vorderflanke
PV _T	Peak-Tal-Verhältnis, Hinterflanke
H _{Px}	Höhe von Peak x
H _{Vx}	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:

- Seine Höhe und Zeit werden von zwei aufeinander folgenden Peaks geteilt.
- Seine Basislinie wird von zwei aufeinander folgenden Peaks geteilt.
- Die absolute Basislinienhöhe ist größer als 10⁻⁵.

Definitionen der 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

Proben-Standardabweichung 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 des Mittelwerts S_M

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.

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 α

Für die erweiterte Statistik im Sequenzübersichtsreport kann das 95%ige 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%iges 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:

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

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.

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 ($A^T A x = A^T y$) 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:

$$\text{Norm} = \sum(x)$$

$$x = x / \text{Norm}$$

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:

$$\begin{vmatrix} W & XW & X2W \\ XW & X2W & X3W \\ X2W & X3W & X4W \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} a \\ b \\ c \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} YW \\ XYW \\ X2YW \end{vmatrix}$$

Zerlegung nach Crout:

$$\begin{vmatrix} W & XW & X2W \\ XW & X2W & X3W \\ X2W & X3W & X4W \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} L11 & & \\ L21 & L22 & \\ L31 & L32 & L33 \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} 1 & U12 & U13 \\ & 1 & U23 \\ & & 1 \end{vmatrix}$$

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:

$$a = a'$$

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

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

Korrelationskoeffizient

Der Korrelationskoeffizient (r) ist ein Maß für die Anpassung der Kalibrierungskurve zwischen den Datenpunkten. Er wird mit folgender Gleichung berechnet:

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

wobei

r	Korrelationskoeffizient
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
\bar{Y}	Mittelwerte der vorhergesagten Responses oder Mengen
Y_i	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.

Standardabweichung (S)

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

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 und Erweiterter Leistungstest)
- Tailingfaktor (Leistungstest und Erweiterter Leistungstest)
- Selektivität (Leistungstest und Erweiterter Leistungstest)
- K' (Erweiterter Leistungstest)
- Tangenten-Peakbreite (Erweiterter Leistungstest)
- Schräge (Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden - Halbe Breite (Leistungstest und Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden - Tangente (Erweiterter Leistungstest)

- Theoretische Trennböden – 5 Sigma (Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden - Statistisch (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - Halbe Breite (Leistungstest und 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"
```

7

CE-spezifische Berechnungen

Kalibriertabellen	134
Standardkalibrierung	134
Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts	135
Kalibrierung des DNA-Basenpaars	135
Kapillar-isoelektrische Fokussierung	136
Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur	137
Einleitung	137
Berechnungen der effektiven Mobilität	138
Berechnungen der relativen Mobilität	141
Spezielle Reportstile für die Kapillarelektrophorese	143
Korrigierte Peakflächen	144
Systemeignungstest für die Kapillarelektrophorese	145
Kapazitätsfaktor k'	145
CE-MSD	146
Hintergrundsubtraktion	146

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:

Korrektur der effektiven Mobilität

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.

Korrektur der relativen Mobilität

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 9 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 Kalibriertabelle 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.

CE-spezifische Berechnungen

Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

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

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

wobei

CE-spezifische Berechnungen

Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

μ_{app} die scheinbare Mobilität eines beliebigen Peaks ist

μ_{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 (μ_{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 μ_{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 μ_{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:

CE-spezifische Berechnungen

Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

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

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

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.

CE-spezifische Berechnungen

Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

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 OpenLab CDS ChemStation Edition 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:

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

Es gilt Folgendes:

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 138) 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

Hintergrundsubtraktion

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 Bedieneintrag 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.

8 Datenprüfung, erneute Verarbeitung und Batchüberprüfung

Die Navigationstabelle für die Datenanalyse	148
Konfiguration der Navigationstabelle	148
Symbolleiste der Navigationstabelle	150
Datenprüfung mithilfe der Navigationstabelle	151
Erneutes Verarbeiten der Sequenz mithilfe der Navigationstabelle	152
Was versteht man unter Batchüberprüfung?	154
Aktivieren der Batchüberprüfungsfunktion bei Verwendung von ChemStation mit ECM	155
Batchkonfiguration	156
Batch-Tabelle	156
Substanztabelle	156
Batch-Report	157
Benutzeroberfläche	157
Funktionen für die Überprüfung	158
Kalibrierung in der Batchüberprüfung	158
Batch-Reports	160
Batch-Historie	160

In diesem Kapitel werden die Möglichkeiten zur Datenprüfung und zur erneuten Verarbeitung von Sequenzen beschrieben. Darüber hinaus werden die Grundlagen zu Batchüberprüfung, Batchkonfiguration, Überprüfungsfunktionen und Batchreporterstellung dargestellt.

Die Navigationstabelle für die Datenanalyse

Die **Data Analysis**-Ansicht schließt eine Navigationstabelle mit ein, die die Navigation durch die Datendateien erleichtern soll. Die Navigationstabelle zeigt die Läufe eines ausgewählten Daten- bzw. Sequenzdatenunterverzeichnisses an. Sie können die **Navigation Table** verwenden, um individuelle Läufe zu laden oder automatisch zwischen den geladenen Signalen zu blättern. Weitere Details finden Sie im Handbuch *OpenLab CDS ChemStation Edition, Grundlegende Konzepte und Arbeitsabläufe*

Konfiguration der Navigationstabelle

Die Navigationstabelle zeigt in Abhängigkeit der verfügbaren Datensätze die Informationen zu einer Datendatei an. Die Navigationstabelle ist schreibgeschützt, die in ihr enthaltenen Werte können nicht überschrieben werden.

Tabelle 10 Spalten der Navigationstabelle

Spalten für einzelne Analysenläufe	Spalten für Sequenzläufe
Überlagern	Überlagern
ECM	ECM
TYP	TYP
Datum/Zeit	Zeile
Bediener	Inj (Injektion)
Probenflasche	Probenflasche
Datendatei	Probenname
Probenname	Methodenname
Methodenname	Probentyp
Manuelle Ereignisse	Manuelle Ereignisse
Probeninfo	Kalibrierstufe
Probenmenge	Probeninfo
ISTD-Menge	Probenmenge

Tabelle 10 Spalten der Navigationstabelle

Spalten für einzelne Analysenläufe	Spalten für Sequenzläufe
Multiplikator	ISTD-Menge
Verdünnung	Multiplikator
---	Verdünnung
---	Datendatei

Die Navigationstabelle enthält Standardfunktionen für die Tabellenkonfiguration, wie beispielsweise Sortier- und Drag-and-Drop-Optionen, um Spalten zu verschieben. Sie haben die Möglichkeit, die Spalten, die in der Navigationstabelle angezeigt werden auszuwählen.

Zudem besteht die Möglichkeit, spaltenspezifische Gruppen anzulegen, so können zum Beispiel Einzelläufe eines bestimmten Bedieners durch Gruppieren der geladenen Dateien in der Spalte **operator** angezeigt werden.

Die Navigationstabelle bietet Rechtsklick-Funktionen (der Maus), um unter anderem Signale zu laden, Daten zu exportieren, Reports auszudrucken und Erfassungsmethodenparameter anzuzeigen. Jede Zeile der Navigationstabelle kann durch Anklicken des + (Plus)-Zeichens, das sich auf der linken Seite der Zeile befindet, zur Konfiguration signalspezifischer Optionen erweitert werden:

- **Signal:** Erstellt eine Liste der gemessenen Signale und ermöglicht Ihnen, die Signale zu bestimmen, die geladen werden sollen. Die Auswahl der Signalanzeige wird auf jeden Lauf individuell angewendet.
- **General Info:** Erfasst die Überschriftdetails des Laufs.
- **Instrument curves:** Ermöglicht Ihnen, die Gerätedatenkurven auszuwählen, die zusammen mit dem Chromatogramm/Elektropherogramm am Bildschirm und in der Druckausgabe angezeigt werden sollen.

Symbolleiste der Navigationstabelle

Die **Navigation Table** enthält zwei Werkzeugleisten, mit denen Sie entweder die Daten eines einzelnen Analysenlaufs bzw. einer Sequenz anzeigen oder die Sequenzdaten erneut verarbeiten können.

Werkzeugleiste zur Datenprüfung


Die Überprüfungsfunktionalität der Navigationstabelle ermöglicht Ihnen, die geladenen Signale automatisch oder manuell zu überprüfen. Je nach Auswahl unter **Preferences / Signal/Review** kann das System die Signale automatisch integrieren und für jede geladene Datei einen Report drucken. Die auf die Datendatei angewandte Methode wird im oberen Menü angezeigt.

Werkzeugleiste für die erneute Sequenzverarbeitung

Die Werkzeugleiste für das erneute Verarbeiten von Sequenzen ist nur verfügbar, wenn eine Sequenz geladen wird, die mit ChemStation B.02.01 oder höher und mit aktivierter Option **Unique Folder Creation** erfasst wurde. Es ist möglich, das erneute Verarbeiten der Sequenz zu starten, zu stoppen oder anzuhalten. Ferner bietet die Symbolleiste Zugriff auf die folgenden Dialogfelder, in denen Sie die Parameter für das erneute Verarbeiten und Drucken von Sequenzen festlegen können:

- **Sequence Table** (eine Kopie der ursprünglichen *.s-Vorlage, die sich im Sequenzdatencontainer befindet)
- Dialogfeld **Sequence Parameters**
- Dialogfeld **Sequence Output**
- Dialogfeld **Sequence Summary Parameters**
- Dialogfeld **Extended Statistic Parameters**
- **Save Current Sequence**
- **Print Current Sequence**

Datenprüfung mithilfe der Navigationstabelle

Die Daten werden im Neuberechnungsmodus geprüft, der durch Klicken auf  in der Symbolleiste der Navigationstabelle aktiviert werden kann. Dies öffnet die Werkzeugleiste für den Neuberechnungsmodus. Sie können je nach erforderlichem Arbeitsablauf die Daten auf eine der folgenden Weisen überprüfen:

- 1 Prüfen Sie die Daten mit der Datenanalysemethode, die mit jeder Datendatei gespeichert ist (Sequenzdaten B.02.01 oder höher): Wählen Sie **Start Autostepping** im Menü **Recalculate** des Modus **Data Analysis**, damit das System vor dem Laden der Daten die einzelnen Datenanalysemethoden lädt, die mit der Datendatei gespeichert sind. Da während der Datenprüfung auf jede Zeile in der Navigationstabelle zugegriffen wird, wird die verknüpfte Methode für die ausgewählte Datendatei geladen und für das Überprüfen der Daten und zum Generieren des Reports verwendet.
- 2 Prüfen Sie die Daten mit einer anderen Methode. Wenn Sie eine andere Methode zum Prüfen der Daten verwenden möchten als die Methode, die mit der Datendatei gespeichert ist, wählen Sie **With method** im Menü **Recalculate** des Modus **Data Analysis**. In diesem Fall wählen Sie die Methode und Reportvorlage im Dialogfeld **Recalculate with Method** aus. Sie können auch ein **Autostep interval** und ein Report-**Destination** angeben. Die in diesem Dialogfeld ausgewählten Werte überschreiben vorübergehend die Werte der Registerkarte **Signal/Review Options** des Dialogfelds **Preferences** und werden zurückgesetzt, wenn die ChemStation-Sitzung beendet wird. Die ausgewählte Methode wird geladen und zum Berechnen der Ergebnisse aus allen Datendateien im Ergebnissatz verwendet.
- 3 Prüfen Sie Ihre Daten mit der Methode, die zuletzt zum Berechnen der Ergebnisse verwendet wurde. Wählen Sie **Last Result Mode** im Menü **Recalculate** des Modus **Data Analysis**. Dieser Modus lädt die Methode, die zuletzt zum Berechnen der Ergebnisse für die Datendatei verwendet wurde. Wenn die Datendatei keine entsprechende Datenanalysemethode enthält, wird sie während des Autostepping übersprungen. Dieser Modus wirkt sich auf das Autostepping und das manuelle Laden von Datendateien aus.

Erneutes Verarbeiten der Sequenz mithilfe der Navigationstabelle

HINWEIS

Sequenzdaten, die mit ChemStation-Versionen bis B.01.03 erfasst wurden, müssen mit der Option **reprocess** in der Ansicht **Method and Run Control** erneut verarbeitet werden. Dasselbe gilt für Daten, die bei deaktivierter **Unique Folder Creation** mit der Version B.03.01 oder höher erfasst wurden.

Sequenzdaten, die mit der ChemStation-Version B.02.01 oder einer höheren Version erfasst wurden, müssen mit der Werkzeugleiste für die erneute Verarbeitung in der Navigationstabelle **Data Analysis** erneut verarbeitet werden.

Für das erneute Verarbeiten mithilfe der Navigationstabelle in der **Data Analysis** sind alle erforderlichen Dateien im Sequenzdatencontainer vorhanden:

- Sequenzdatendateien (*.d)
- Alle während der Sequenz verwendeten Methodendateien (*.m)
- Kopie der ursprünglichen Sequenzvorlage (*.s)
- Sequenzspezifische Batchdatei (*.b)
- Sequenzspezifisches Logbuch (*.log)

Während der erneuten Verarbeitung werden die einzelnen Methoden (DA.M) für die Datendateien und die Batchdatei (*.b) aktualisiert.

Mit den Funktionen für das erneute Verarbeiten der **Data Analysis** ist es möglich, die Sequenzvorlage (*.s) im Datencontainer zu ändern, um den Multiplikator, die Verdünnung usw. zu ändern oder um eine andere Methode für die erneute Verarbeitung auszuwählen. Standardmäßig ist der Sequenzparameter **parts of method to run** für das erneute Verarbeiten der Datenanalyse auf **Reprocessing only** gesetzt und die Option **Use Sequence Table Information** ist aktiviert. Mithilfe dieser vordefinierten Werte können Sie die Parameter in der Sequenzvorlage ändern und eine erneute Analyse durchführen, ohne die Sequenzparameter der **Data Analysis** erneut bearbeiten zu müssen.

Wenn Sie die Methode in der Sequenzvorlage nicht explizit geändert haben, verwendet das System die im Sequenzdatencontainer gespeicherten Sequenzmethoden, um die Sequenz erneut zu verarbeiten. Bei diesen Methoden handelt es sich um die ursprünglich während der Datenerfassung verwendeten Methoden. Wenn bestimmte Methodenparameter geändert werden müssen, z. B. um Daten in eine *.xls-Datei auszugeben, müssen die Methoden im Sequenzcontainer geändert und gespeichert werden. Diese allgemeine Änderung wird anschließend während der erneuten Verarbeitung auf alle Datendateien angewendet.

Wenn Sie nun die aktualisierte Sequenzcontainermethode für die weitere Datenerfassung verwenden möchten, müssen Sie diese Methode aus dem Sequenzdatencontainer in einen der definierten Methodenpfade kopieren. Die neue/aktualisierte Methode ist dann im ChemStation-Explorer in der Methodenansicht als Mustermethode verfügbar.

Was versteht man unter Batchüberprüfung?

Unter Batchüberprüfung versteht man die Möglichkeit, schnell einen ersten Überblick über die Ergebnisse einer Sequenz oder einer Auswahl von Analysenläufen zu erhalten. Dies ist vor allem bei großen Probenzahlen sehr zeitsparend. Immer wenn eine Sequenz ausgeführt wird, wird automatisch eine Batch-Datei (mit der Dateinamenerweiterung ".b") erstellt und mit den Datensätzen im Datenverzeichnis abgelegt. Diese Batch-Datei enthält Zeiger auf die entsprechenden Datensätze der Batchüberprüfung. Um einen Batch zu laden, muss der Anwender nur eine Methode für den Batch auswählen und dann die einzelnen Datendateien aussuchen, die innerhalb des Batches bearbeitet werden sollen. Sie können die Genauigkeit der Kalibrierung, die Leistungsfähigkeit des Instruments und die einzelnen Integrationen überprüfen, ehe Sie die Ergebnisse verbessern. Alle für ein Chromatogramm spezifischen Integrationsparameter sowie ihre Änderungen werden aus Gründen der Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse mit der Datendatei gespeichert. Diese interaktive Umgebung bietet auch vollen Zugriff auf alle anderen Funktionen der Datenanalyse, wie die Überprüfung der Peakreinheit, die Bibliothekssuche usw.

Die Batchüberprüfung verwendet dieselben Register für die Datenanalyse („ChromReg“ und „ChromRes“) wie die Standarddatenanalyse und sollte daher nicht innerhalb einer Online-Sitzung zum Einsatz kommen, in der gerade Analysen durchgeführt werden.

Aktivieren der Batchüberprüfungsfunktion bei Verwendung von ChemStation mit ECM

Wenn Sie OpenLab ChemStation Edition mit ECM verwenden, ist die Funktion zur Batchüberprüfung standardmäßig nicht verfügbar. Um die Batchüberprüfung zu benutzen, muss diese Funktion durch einen Eintrag im Abschnitt [PCS] der Datei ChemStation.ini aktiviert werden. Diese Datei befindet sich im Windows-Verzeichnis C:\WINDOWS.

```
[PCS] _BatchReview=1
```

Beim Standardeintrag _BatchReview=0 ist die Funktion ausgeschaltet.

Batchkonfiguration

Als Batch bezeichnet man eine individuelle Auswahl von Datendateien, die mit einer benutzerdefinierten Methode verarbeitet werden. Dabei wird für alle Datendateien innerhalb eines Batches dieselbe Methode verwendet. Die Verarbeitungsschritte, die für jede zu bearbeitende Probe durchgeführt werden sollen, sind frei wählbar (Integration, Identifizierung/Quantifizierung, Reporterstellung).

Die Ergebnisse aller Kalibrierläufe eines Batches gehen über gemittelte Responsefaktoren in eine Kalibriertabelle ein, die dann zur Quantifizierung verwendet wird.

Batch-Tabelle

Die Läufe werden in einer frei definierbaren Batch-Tabelle angezeigt:

- Die Anzahl und der Inhalt der Tabellenspalten können festgelegt werden.
- Die Läufe können folgendermaßen sortiert werden:
 - nach dem Laufindex (in der Reihenfolge, in der sie erfasst wurden) unabhängig von allen anderen Kriterien,
 - nach dem Probenotyp (zuerst Kontrollproben, dann Kalibrierproben, dann normale Proben) und innerhalb des Probenotyps nach dem Laufindex,
 - nach der Methode (wenn mehrere Methoden zur Datenerfassung verwendet wurden) und innerhalb jeder Methode nach dem Laufindex;
- Proben, Standards und Kontrollen können in der Tabelle angezeigt oder ausgeblendet werden.

Jeder Lauf entspricht einer Zeile der Batch-Tabelle. Sie können einen Analysenlauf aus der Batch-Tabelle (z. B. für die Kalibrierung) ausblenden, indem Sie den Probenotyp in „Removed“ (Entfernt) ändern.

Substanztabelle

Die Ergebnisse für die Substanzen werden in einer individuell definierbaren Substanztabelle dargestellt, deren Inhalt von den Probenotypen der Batch-Tabelle abhängt:

- Die Substanzliste enthält alle Substanzen, die in der Methode aufgeführt wurden, die in der Batchüberprüfung zum Einsatz kam.
- Wenn nur Kalibrierproben in der Batch-Tabelle angeführt sind (Proben und Kontrollen also versteckt sind), enthält die Substanztabelle zusätzliche Spalten für weitere Informationen für die Kalibrierung (erwartete Menge, relativer und absoluter Fehler).
- Wenn nur Kontrollläufe in der Batch-Tabelle angeführt sind (wenn die Proben und Standards also versteckt sind), enthält die Substanztabelle zusätzliche Spalten für mögliche Grenzwerte.

Für Spalten, die substanzspezifische Informationen enthalten, können Sie den Namen der Substanz in den Titel der Tabelle aufnehmen, indem Sie %s in die Spaltenbedingungen aufnehmen.

Batch-Report

Der Batch-Report enthält zwei Tabellen, die im Allgemeinen der Batch- und der Substanztabelle entsprechen. Auch diese Tabellen sind individuell definierbar.

Für Spalten, die substanzspezifische Informationen enthalten, können Sie den Namen der Substanz in den Titel der Tabelle aufnehmen, indem Sie %s in die Spaltenbedingungen aufnehmen. Auch mehrzeilige Kopfzeilen sind erlaubt; über Eingabe des Zeichens '|' erfolgt ein Zeilenumbruch an dieser Stelle.

Benutzeroberfläche

Die Batchüberprüfung ermöglicht die Auswahl zwischen zwei Benutzeroberflächen:

- Die Standardoberfläche enthält eine Leiste mit Schaltflächen, die den Zugriff auf die meisten Batch-Menüeinträge ermöglichen, einschließlich der Batch- und Substanztabelle.
- Eine minimale Benutzeroberfläche bietet eine ganz ähnliche Symbolleiste, wobei allerdings die Batch- und die Substanztabelle durch ein Feld ersetzt sind, das nur die Information für die festgelegte Batch-Tabelle enthält. Die Symbolleiste für die minimale Benutzeroberfläche enthält keine direkte Schaltflächen für die Batch- oder die Substanztabelle.

Funktionen für die Überprüfung

Datendateien können auf zwei unterschiedliche Arten dargestellt werden:

- manuell, indem aus der Tabelle ein darzustellender Lauf ausgewählt wird,
- automatisch, mit festgelegten Intervallen zwischen den einzelnen Datendateien. Bei der automatischen Darstellung werden nur die Probentypen dargestellt, die auch in der Tabelle zu sehen sind. Die Läufe werden entsprechend der Reihenfolge, in der sie in der Tabelle aufgeführt sind, angezeigt. Die automatische Überprüfung kann angehalten und später fortgesetzt oder ganz gestoppt werden.

Die Standardfunktionen der ChemStation sind auch in der Batchüberprüfung verfügbar. Sie umfassen die Kalibrierung und die manuelle Änderung von Chromatogrammen, z. B. Glättung oder manuelle Integration. Alle an einer Datendatei vorgenommenen Änderungen lassen sich kennzeichnen und mit der Batch-Datei speichern. Chromatogramme, die nachbearbeitet wurden, werden in der Batch-Tabelle mit einem Sternchen markiert. Sie können auch die Änderungen des aktuellen Chromatogramms oder die Änderungen aller Chromatogramme des Batches wieder rückgängig machen.

HINWEIS

Die Batchüberprüfung ermöglicht es, manuelle Integrationsereignisse pro Lauf zu speichern. Manuelle Ereignisse können auch mit der Datendatei außerhalb der Batchüberprüfung gespeichert werden. Um Konflikte mit zwei Datensätzen manueller Integrationen zu vermeiden, werden bei der Batchüberprüfung keine manuellen Ereignisse berücksichtigt, die mit der Datendatei gespeichert wurden.

Wenn ein Analysenlauf aufgerufen wird, werden die ausgewählten Verarbeitungsschritte durchgeführt. Wenn der Lauf bereits verarbeitet und mit den Änderungen gespeichert wurde, wird er in seiner nachbearbeiteten Form aufgerufen. Dies geht natürlich schneller, da die Verarbeitungsschritte nicht mehr durchgeführt werden müssen.

Kalibrierung in der Batchüberprüfung

Die Kalibrierung in der Batchüberprüfung arbeitet unabhängig von den Neukalibrierungseinstellungen der Sequenztafel. Der erste Schritt bei der Batchkalibrierung ersetzt stets die Einträge der Kalibriertabelle für Response und Retentionszeit. Bei den folgenden Kalibrierstandards werden Response und Retentionszeit gemittelt.

Wenn Sie in die Symbolleiste der Batchüberprüfung klicken, wird das System mit allen Kalibrierungsläufen in dem Batch neu kalibriert, und es wird eine neu kalibrierte Kalibrierungstabelle erstellt. Durch Klicken in die Symbolleiste der Batchüberprüfung werden dann die Mengen jeder kalibrierten Verbindung neu berechnet. Auf Grundlage der neu kalibrierten Kalibrierungstabelle werden die Mengen aller Proben berechnet.

Batch-Reports

Die benutzerkonfigurierbare „Batch-Tabelle“ auf Seite 156 kann direkt auf dem Drucker, auf dem Bildschirm oder in einer Datei ausgegeben werden. Der Dateiname enthält ein frei wählbares Präfix, und die Datei kann in einem der folgenden Formate abgelegt werden:

- als ASCII-Textdatei mit der Dateinamenerweiterung .TXT
- im Data Interchange Format mit der Dateinamenerweiterung .DIF
- als kommagetrennte Datei mit der Dateinamenerweiterung .CSV
- im Microsoft Excel-Format mit der Dateinamenerweiterung .XLS

Die Optionen für die Reporterstellung ermöglichen es auch, die Proben unabhängig von der Reihenfolge in der Batch-Tabelle zu sortieren (über den Laufindex, der Probenart oder die Methode). Die Sortierprioritäten lauten wie für die „Batch-Tabelle“ auf Seite 156.

Batch-Historie

Die Batchüberprüfung zeichnet alle Aktionen für den aktuellen Batch auf. Aktionen, die zu Änderungen des Batches führen (z. B. eine Änderung des dargestellten Chromatogramms, eine Änderung des Probenartst, Laden und Speichern des Batches) erweitern die Batch-Historie um eine Zeile mit Datum- und Zeitangabe, dem Namen des derzeitigen Anwenders sowie einer Beschreibung des Vorgangs.

Sie können der Batch-Historie auch eigene Kommentare hinzufügen. Vorhandene Einträge in der Batch-Historie lassen sich nicht ändern. Die Auflistung kann nur über den Menüeintrag „Batch History“ (Batch-Historie) aufgerufen werden.

9

Reportausgabe

Was ist ACAML? 162

Das ACAML-Schema 163

Reportausgabe der Faktoren des Arzneimittelbuchs in
ChemStation 164

OpenLab CDS ChemStation Edition bietet zwei Arten der Reportausgabe: die klassische ChemStation-Reportausgabe, die gegenüber der ChemStation B-Reportausgabe unverändert ist, oder die neuartige Intelligente Reportausgabe. In diesem Thema wird das ACAML-Schema erläutert, das bei der intelligenten Reportausgabe verwendet wird. Außerdem wird eine Referenz zum ACAML-Schema angegeben.

Was ist ACAML?

ACAML, *Agilent Common Analytical Markup Language*, ist eine Auszeichnungssprache zur Erfassung und Beschreibung analytischer Daten in der Chromatographie- und Spektrometriedomäne. ACAML dient der Beschreibung aller Datentypen in Analyseumgebungen. ACAML bietet einen gemeinsamen Standard von Agilent, der den problemlosen Austausch von Informationen zwischen verschiedenen Plattformen und Applikationen ermöglicht.

Der Ansatz besteht darin, eine technik- und applikationsunabhängige einheitliche Schemasprache zu definieren. Mit ACAML können analytische Daten auf allgemeine Weise beschrieben werden, d. h. ohne spezielle Aspekte (z. B. ergebnisorientierte Perspektive): ausgehend von einem einzelnen Gerät oder einer einzelnen Methode bis hin zu einem komplexen Szenario mit mehreren Geräten, Methoden, Benutzern und Hunderten oder Tausenden von Proben.

Es sind keine weiteren Applikationen (wie z. B. ein spezieller ACAML-Validierer) erforderlich, um ACAML-Instanzdokumente zu verarbeiten und zu validieren. In der ersten Version unterstützt ACAML nur Chromatographiedaten (LC, GC).

Das ACAML-Schema

Die Basis des ACAML-Schemas ist der XML-Industriestandard.

Das ACAML-Schema ist streng typisiert:

- um den Ansatz des standardisierten Datenaustauschs zu unterstützen und
- um unkontrolliertes Wachstum selbstdefinierter Typen zu verhindern.

Die Schemadefinition stellt sicher, dass jedes Instanzdokument ordnungsgemäß definiert und die referentielle Integrität zwischen allen Objekten gewährleistet ist.

Es sind keine weiteren Applikationen (wie z. B. ein spezieller ACAML-Validierer) erforderlich, um ACAML-Instanzdokumente zu verarbeiten und zu validieren.

Reportausgabe der Faktoren des Arzneimittelbuchs in ChemStation

Faktoren aus der Peaktafel 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 11 Werte aus dem Arzneibuch in der ChemStation-Reporterstellung

USP	EP	JP	Definition	Klassische Report-erstellung (RLE)	Intelligente Report-erstellung (RTE)
Tailing-Faktor	Symmetriefaktor	Symmetriefaktor	$S = W_{0,05h}/2f$	Tailing, USP	Peak_TailFactor
-	-	-	$S = W_{0,10h}/2f$	USP-Asymmetrie bei 10 % Höhe	Peak_Asymmetry_10Perc
-	Relative Retention (angepasst)	Trennfaktor	$r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$		RelativeRetTime_EP
Relative Retention	-	-	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ T_R von Peak a < T_R von Peak b	Selektivität	Peak_Selectivity
-	Auflösung	Auflösung	$R_s = 1,18 \times (t_{R2}-t_{R1}) / (W_{0,5h1} + W_{0,5h2})$	Auflösung (EP) Auflösung (JP)	Peak_Resolution_EP Peak_Resolution_JP
-	-	-	$R = \left(\frac{2,35}{2} \right) \frac{T_{R(b)} - T_{R(a)}}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Auflösung	Peak_Resolution_Classic
Auflösung	-	-	$R_s = 2,0 \times (t_{R2}-t_{R1}) / (W_1 - W_2)$	-	Peak_Resolution_USP
Effizienz			$N = 16 \times (t/W)^2$	Tangentenmethode für Trennböden	Peak_TheoreticalPlates_USP
-	Effizienz	Effizienz	$N = 5,54 \times t_R^2 / W_{0,5h}^2$	Halbhöhenmethode für Trennböden	Peak_TheoreticalPlates_EP

Tabelle 11 Werte aus dem Arzneibuch in der ChemStation-Reporterstellung

USP	EP	JP	Definition	Klassische Report-erstellung (RLE)	Intelligente Report-erstellung (RTE)
Relative Retentionszeit	Relative Retentionszeit		$R_r = t_2/t_1$	-	Peak_RelativeRetTime
	Signal-Rauschen-Verhältnis	Signal-Rauschen-Verhältnis	Signal-Rauschen-Verhältnis = $2H/h$ Rauschen: Peak-zu-Peak-Berechnung; Blindwert als Referenzsignal; Zeitintervall entsprechend dem 20-Fachen der Peakbreite.	-	Peak_SignalToNoise_EP
	Signal-Rauschen-Verhältnis		Signal-Rauschen-Verhältnis = $2H/h$ Rauschen: Peak-zu-Peak-Berechnung; Zeitintervall im aktuellen Signal.		Peak_SignalToNoise_USP
			Signal-Rauschen-Verhältnis = $2H/h$ Rauschen: 6-Sigma-Berechnung; Zeitintervall im aktuellen Signal.		Peak_SignalToNoise_6Sigma
Peak-zu-Tal-Verhältnis	Peak-zu-Tal-Verhältnis		$p/v = H_p/H_v$	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	-

10

Überprüfung des Systems

Ansichten für Funktionsprüfung und Fehlerdiagnose	167
Systemfunktionsprüfung	167
Das Register „GLPsave“	170
Funktion „DAD Test“ (DAD-Test)	172
Funktion „DAD-Test prüfen“	172

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 172 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.

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:

- | | |
|-------------------------------|---|
| Show Holmium Spectra | Stellt alle in der Anzeigetabelle des DAD-Tests angeführten Holmiumspektren dar. Das aktive Spektrum ist markiert. |
| Show Intensity Spectra | Stellt alle in der Anzeigetabelle des DAD-Tests angeführten Intensitätsspektren dar. Das aktive Spektrum ist markiert. |
| Save as New Database | Wenn Sie die Lampe Ihres DAD austauschen, 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. |
| Show Selected Spectra | Stellt nur die in der Tabelle ausgewählten Spektren dar. |
| Show Intensity Graph | 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. |

Inhalt dieses Handbuchs

Dieses Handbuch enthält Referenzinformationen zu den Funktionsprinzipien, Berechnungen und Datenanalysealgorithmen, die in Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition verwendet werden.

Diese Informationen können von Validierungsspezialisten für die Planung und Ausführung von Systemvalidierungsaufgaben verwendet werden.

www.agilent.com

© Agilent Technologies 2010-2019

Gedruckt in Deutschland
04/2019



M8301-92029 Rev. C

