

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition

Referenz zu Funktionsprinzipien



Agilent Technologies

Hinweise

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2012, 2013

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.

Handbuch-Teilenummer

M8301-92024

Ausgabe

1/2013

Gedruckt in Deutschland

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

Dieses Produkt kann als Komponente eines In-vitro-Diagnosesystems eingesetzt werden, sofern das System bei den zuständigen Behörden registriert ist und den einschlägigen Vorschriften entspricht. Andernfalls ist es nur für den allgemeinen Laborgebrauch vorgesehen.

Softwareversion

Dieses Handbuch gilt für die überarbeitete Version C.01.05 or higher der Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Microsoft[®] ist eine eingetragene Marke der Microsoft Corporation.

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 der 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 Handbuch *Agilent OpenLAB CDS Workstation Installation Guide*.
- 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. Area%-, Height% und Norm%-Berechnungen, ESTD- und ISTD-Berechnungen 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

In diesem Thema wird das ACAML-Schema erläutert, das bei der intelligenten Reportausgabe der OpenLAB CDS-Software 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	9
Was ist Datenerfassung?	10
Statusinformationen	13
2 Integration	15
Was ist Integration?	17
Integrationsalgorithmen der ChemStation	19
Funktionsprinzip	25
Peakerkennung	26
Basislinienbestimmung	34
Peakflächenberechnung	47
Integrationsereignisse	50
Manuelle Integration	59
3 Peakidentifizierung	63
Was ist eine Peakidentifizierung?	64
Regeln zur Peakübereinstimmung	65
Methoden der Peakidentifizierung	66
Absolute Retentions-/Migrationszeit	68
Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten	70
Peak-Qualifier	72
Identifizierungsprozess	75
4 Kalibrierung	77
Kalibrierkurve	78
Gruppenkalibrierung	80
Optionen für die Rekalibrierung	81

5 Quantifizierung 83

- Was ist Quantifizierung? 84
- Berechnungsmethoden in der Quantifizierung 85
- Korrekturfaktoren 86
- Nicht kalibrierte Berechnungsverfahren 88
- Kalibrierte Berechnungsverfahren 89
- ESTD-Berechnung 90
- Norm%-Berechnung 92
- ISTD-Berechnung 93

6 Systemeignungsevaluierung 99

- Systemeignungsevaluierung 101
- Bestimmung der Rauschhöhe 104
- Berechnung der Peaksymmetrie 112
- Formeln und Berechnungsmethoden zur Beurteilung der Systemeignung 114
- Allgemeine Definitionen 115
- Leistungstest-Definitionen 116
- Definitionen der Reproduzierbarkeit 124
- Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff 129

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 OpenLAB CDS mit ECM 155
- Batchkonfiguration 156
- Funktionen für die Überprüfung 159
- Batch-Reports 160

9 Reportausgabe 161

Was ist ACAML? 162

Das ACAML-Schema 163

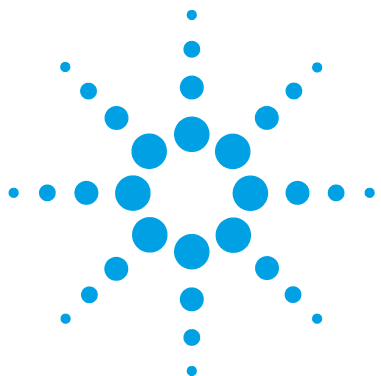
Reportausgabe der Faktoren des Arzneimittelbuchs in ChemStation 164

10 Überprüfung des Systems 167

Ansichten für Überprüfung und Fehlerdiagnose 168

Das Register "GLPsave" 172

Funktion "DAD Test" (DAD-Test) 174



1

Datenerfassung

Was ist Datenerfassung?	10
Datendateien	10
Online-Monitore	12
Logbuch	12
Statusinformationen	13
Statusanzeige der ChemStation	13
Statuszeile	13
Systemübersicht	14

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



Was ist 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	Datendateien mit UV-Spektren. Der Dateiname besteht aus Detektortyp und Gerätenummer (nur bei Diodenarray-Detektor und Fluoreszenzdetektor).
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.

Tabelle 1 Datendateien

Name	Description
Acq.MACAML	Die Datei enthält Informationen zu der während der Datenerfassung verwendeten Methode. Die Informationen werden im ACAML-Format gespeichert. ACAML-Dateien werden von der intelligenten Reporterstellung verwendet.
Sequence.ACAM_	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.BAC	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 Lösungsmittelbeschreibungen.
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.

Online-Monitor für Signale

Der Online-Monitor für Signale ermöglicht es Ihnen, mehrere Signale und, sofern dies vom angeschlossenen Instrument unterstützt wird, eine grafische Darstellung der Instrumentenleistung, im selben Fenster darzustellen. Sie können bequem die gewünschten Signale auswählen, um die Zeit- und Absorptionsachse zu formatieren. Für Detektoren, die diese Funktion unterstützen, gibt es eine Ausgleichschaltfläche.

Wenn Sie den Cursor in der Anzeige bewegen, können Sie den absoluten Signalresponse in der Meldungszeile ablesen.

Online-Monitor für Spektren

Der Online-Monitor zeigt eine Auftragung der Absorption als Funktion der Wellenlänge. Sie können sowohl den angezeigten Wellenlängenbereich als auch die Absorptionsskala einstellen.

Logbuch

Das Logbuch zeigt Meldungen an, die vom analytischen System erzeugt wurden. Diese Meldungen können Fehlermeldungen, Systemmeldungen oder Ereignismeldungen aus einem Modul sein. Im Logbuch werden diese Ereignisse unabhängig davon eingetragen, ob die Meldungen auch auf dem Bildschirm angezeigt werden. Weitere Informationen zu einem Ereignis erhalten Sie, wenn Sie auf die entsprechende Zeile doppelklicken, um den entsprechenden Hilfetext anzuzeigen.

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.

Statuszeile

Die grafische Benutzeroberfläche des ChemStation-Systems enthält Symbolleisten und eine Statusleiste in der Methoden- und Laufsteuerungsansicht von ChemStation. Die Statusleiste enthält den Systemstatus und Informationen über die aktuelle Methode und Sequenz. Wenn diese nach dem Laden geändert wurden, sind sie mit einem gelben Zahnrad markiert. Bei einem LC-Modul der Agilent-Serie 1100/1200 macht ein gelbes EMF-Symbol den Anwender darauf aufmerksam, wenn Haltbarkeitsgrenzen von Verbrauchsmaterialien (z. B. der Lampe) überschritten wurden.

Systemübersicht

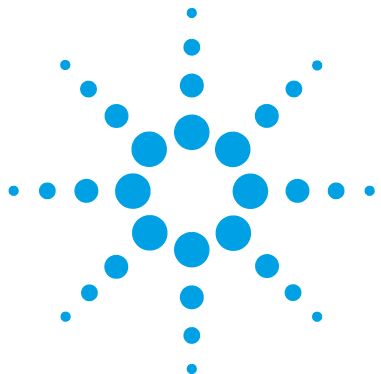
Sie können für Ihr ChemStation-System ein grafisches Systemdiagramm aufrufen, wenn dies vom konfigurierten Analysegerät (z. B. von den LC-Modulen der Agilent Infinity-Serie 1200 oder den GC-Systemen der Agilent-Serie 6890) unterstützt wird. Dies ermöglicht es Ihnen, den Systemstatus mit einem Blick zu überprüfen. Wählen Sie den Befehl „System Diagram“ (Systemdiagramm) aus dem Ansichtsmenü der Ansicht „Method und Run Control“ (Methoden- und Laufsteuerung), um die Übersicht aufzurufen. Sie ist eine grafische Darstellung Ihres ChemStation-Systems. Jeder Bestandteil wird durch ein Symbol repräsentiert. Unter Verwendung des folgenden Farbcodes wird der aktuelle Status angezeigt.

Tabelle 2 Verwendete Farben zur Statusanzeige des Moduls oder Geräts

Farbe	Status
dunkelgrau	offline
hellgrau	Standby (z. B. Lampen aus)
gelb	nicht bereit
grün	bereit
lila	Pre-Run, Post-Run
blau	in Funktion
rot	Fehler

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 Integration?	17
Integrationsalgorithmen der ChemStation	19
Begriffserläuterung	24
Funktionsprinzip	25
Peakerkennung	26
Peakbreite	26
Peakerkennungsfilter	27
Bündelung	28
Algorithmus der Peakerkennung	29
Überlappende Peaks	31
Schultern	32
Basislinienbestimmung	34
Standard-Basislinienkonstruktion	34
Anfang der Basislinie	35
Ende der Basislinie	35
Basislinienunterschreitung	35
Peak-zu-Tal-Verhältnis	37
Tangentiale Anpassung	38
Nicht zugeordnete Peaks	44
Peak-Trenncodes	44
Peakflächenberechnung	47
Flächenberechnung	47
Einheiten und Umrechnungsfaktoren	49



2 Integration

Statusinformationen

Integrationsereignisse	50
Integrationsereignisse für alle Signale	50
Anfangsereignisse	50
Zeitgesteuerte Ereignisse	54
Automatische Integration	57
Manuelle Integration	59

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

Was ist Integration?

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

Die Integration ist erforderlich für:

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

Was wird bei der Integration durchgeführt?

Zur Integration eines Signals führt die Software folgende Aktionen aus:

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

Dieser Vorgang wird durch die Integrationsereignisse gesteuert.

Integrationsfunktionen

Der Integrationsalgorithmus beinhaltet die folgenden Schlüsselfunktionen:

- eine Autointegrationsfunktion zur Einstellung anfänglicher Integrationsparameter

2 Integration

Was ist Integration?

- 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

Überblick

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

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

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

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

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

Weitere Informationen hierzu finden Sie in [“Anfangsereignisse”](#) auf Seite 50.

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:

- $+ \text{Steigung} + \text{Krümmung} + \text{Basislinienschwankung}$ müssen kleiner als der Schwellenwert sein,
- $- \text{Steigung} - \text{Krümmung} + \text{Basislinienschwankung}$ 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 Ableitungsfiler 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.

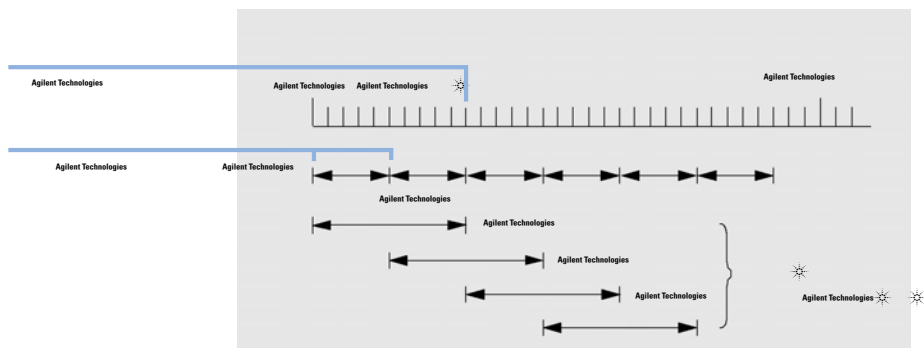


Abbildung 1 Basislinie

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 gül-

tig.) 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 1](#) auf Seite 22).

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.

Begriffserläuterung

Schlüsselpunkte

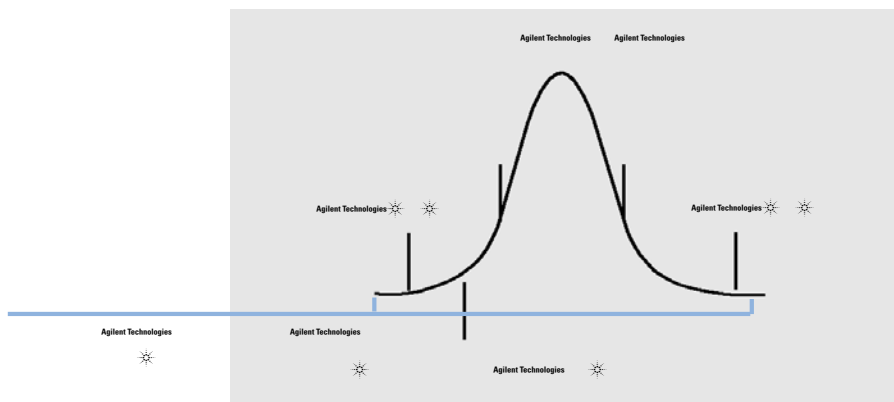


Abbildung 2 Schlüsselpunkte

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 Peakanfangs, des Peakmaximums und des Peakendes verwendet.

Funktionsprinzip

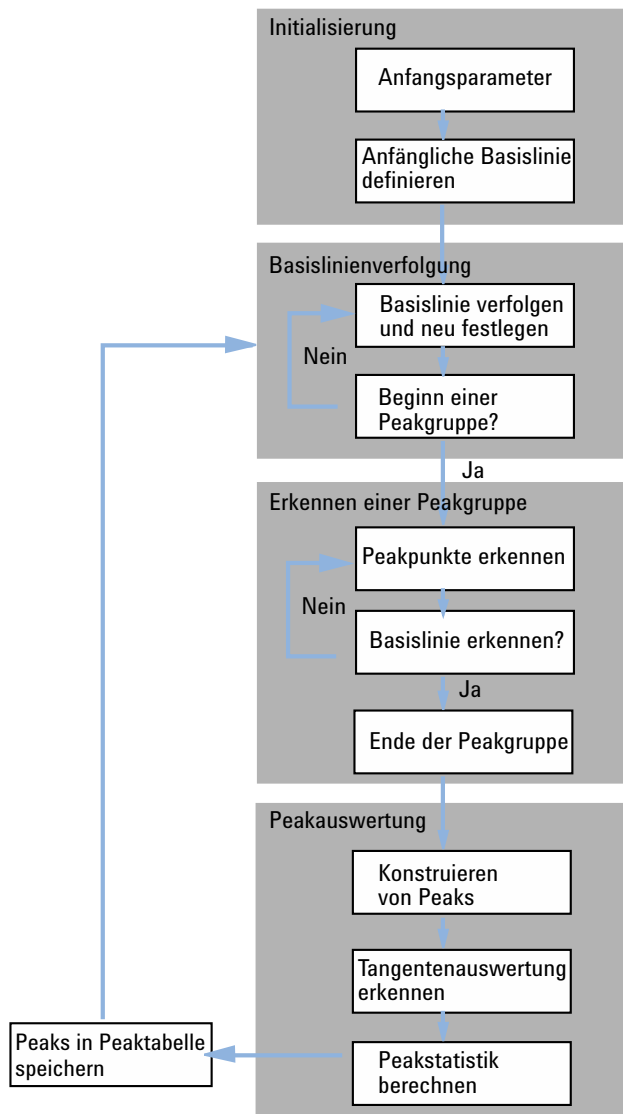


Abbildung 3 Flussdiagramm für den Integrator

Peakerkennung

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

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

Peakbreite

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

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

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

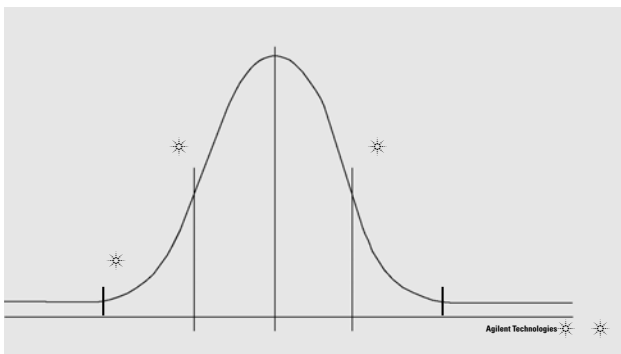


Abbildung 4 Peakbreitenberechnung

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

Die Einstellung der Peakbreite bestimmt die Fähigkeit des Integrators, zwischen Peak und Basislinienrauschen zu unterscheiden. Die Peakbreite sollte für eine gute Leistung ähnlich der tatsächlichen chromatographischen/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 99.

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 Peakerkennungsfiler 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 29.

Die Bündelung erfolgt mit einer Potenz von 2 im Hinblick auf die erwartete Peakbreite oder auf Erfahrungswerte. Der Bündelungsalgorithmus wird in [Tabelle 3](#) auf Seite 29 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 Peakbeginn mit einem Basislinienpunkt fest, der durch den Algorithmus der Peakerkennung ermittelt wird. Der Algorithmus der Peakerkennung vergleicht zunächst die Ergebnisse der Peakerkennungsfiler 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 30 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 31 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.

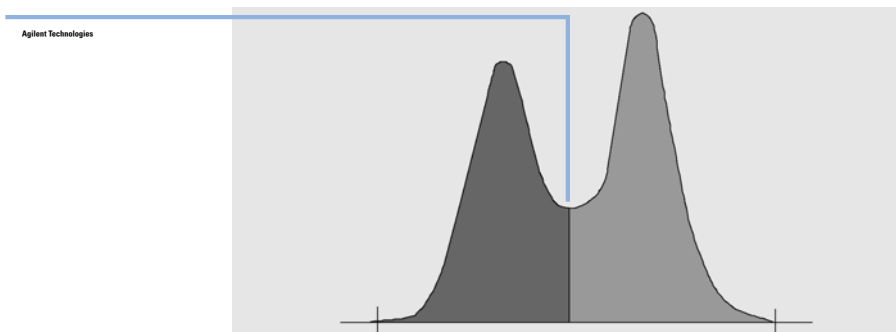


Abbildung 5 Überlappende Peaks

Der Integrator verarbeitet überlappende Peaks wie folgt:

- 1 Er summiert die Fläche des ersten Peaks bis zum Talpunkt.

- 2 Am Talpunkt endet die Summierung für den ersten Peak, und die Summierung für den zweiten Peak beginnt.
- 3 Wenn der Integrator das Ende des zweiten Peaks feststellt, endet die 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.

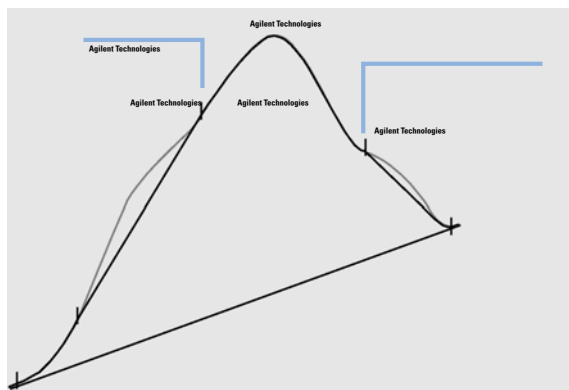


Abbildung 6 Peakschultern

Schultern werden durch die Krümmung des Peaks, also die zweite Ableitung, erkannt. Wenn die Krümmung gegen Null geht, registriert der Integrator einen Wendepunkt, wie beispielsweise die Punkte a und b in [Abbildung 6](#) auf Seite 32.

- Eine mögliche vordere Schulter ist vorhanden, wenn ein zweiter Wendepunkt vor dem Peakmaximum festgestellt wird. Bei Bestätigung einer Schulter wird der Schulterbeginn auf den maximalen positiven Krümmungspunkt 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 Schulterbeginn auf den Zielpunkt vom Startpunkt zur Kurve gelegt.

Als Retentions-/Migrationszeit wird der Zeitpunkt mit der größten negativen Krümmung der Schulter festgelegt. Mit einem programmierten Integrationsereignis kann der Integrator auch Schulterflächen wie normale Peaks durch Basisliniensenkungen an den Wendepunkten der Schulter berechnen.

Die Fläche der Schulter wird von der Fläche des Hauptpeaks subtrahiert. Peakschultern können durch ein zeitgesteuertes Ereignis 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

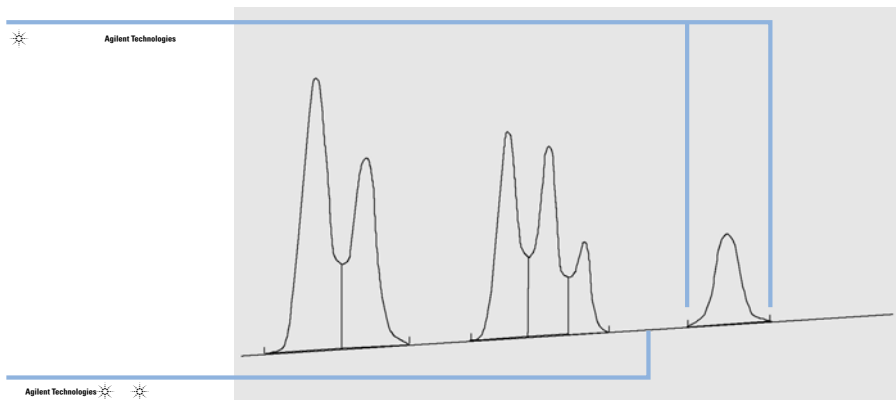


Abbildung 7 Standard-Basislinienkonstruktion

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 geschieht, wenn das Signal unter die konstruierte Basislinie fällt (Punkt a in [Abbildung 8](#) auf Seite 36. Wenn eine Basislinienunterschreitung erfolgt, wird im Allgemeinen dieser Teil der Basislinie wie bei Punkt b in [Abbildung 8](#) auf Seite 36 behandelt.

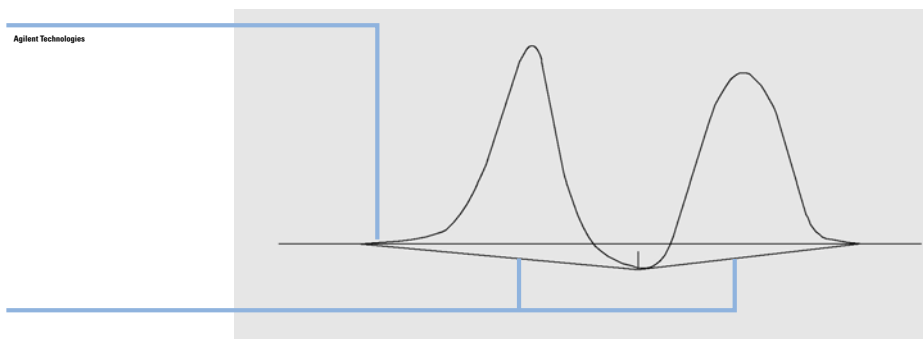


Abbildung 8 Basislinienunterschreitung

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 Anfangs- und Endpunkte der Peaks verschoben, bis keine Unterschreitung mehr vorliegt (siehe Basislinien in [Abbildung 8](#) auf Seite 36 und [Abbildung 9](#) auf Seite 36).

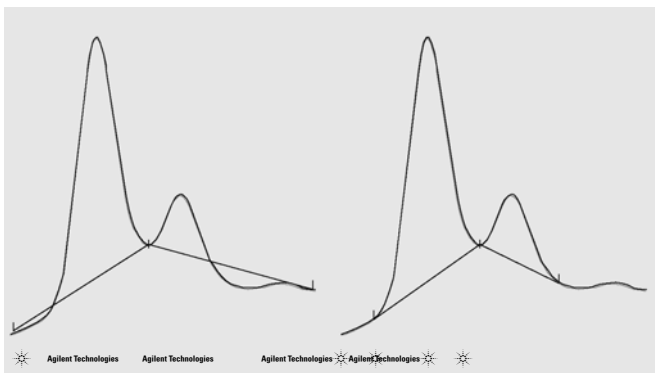


Abbildung 9 Standard-Basislinienverfolgung und Basislinienverfolgung (keine Unterschreitung)

HINWEIS

Baseline tracking (no penetration) [Basislinienverfolgung (ohne Unterschreitung)] ist nicht für Lösungsmittelpeaks, ihre Nebenpeaks und Schultern verfügbar.

Erweiterte Basislinienverfolgung

Bei der erweiterten Verfolgung des Basislinienverlaufs versucht der Integrator, Peakanfang und Peakende zu optimieren, die Basislinie für eine Peakgruppe neu zu erstellen und Basislinienunterschreitungen zu beseitigen (siehe [Abbildung 8](#) auf Seite 36). In vielen Fällen liefert die erweiterte Basislinienverfolgung eine stabilere Basislinie, die weniger von der Steigungsempfindlichkeit abhängig ist.

Peak-zu-Tal-Verhältnis

Der Peak-zu-Tal-Quotient ist ein Qualitätsmaß und gibt an, wie gut die Peaks von anderen Substanzpeaks getrennt sind. Dieser benutzerdefinierte Parameter ist ein Bestandteil der erweiterten Basislinienverfolgung. Er entscheidet, ob zwei Peaks, die keine Basislinientrennung aufweisen, durch eine Basisliniensenkrechte oder eine Tal-Basislinie voneinander getrennt werden. Der Integrator berechnet das Verhältnis zwischen der basislinienkorrigierten Höhe des kleineren Peaks und der basislinienkorrigierten Höhe des Tals. Wenn der Peak-zu-Tal-Quotient kleiner als der benutzerdefinierte Wert ist, wird eine Basisliniensenkrechte verwendet. Ansonsten wird die Basislinie vom Start des ersten Peaks zum Tal gezogen und dann vom Tal zur Basislinie am Ende des zweiten Peaks (vgl. [Abbildung 9](#) auf Seite 36 mit [Abbildung 10](#) auf Seite 37).

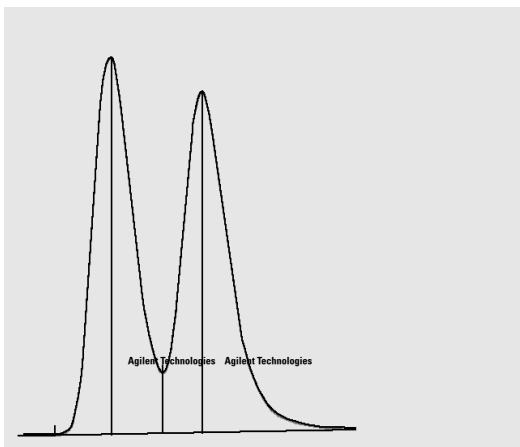


Abbildung 10 Peak-zu-Tal-Verhältnis

Der Peak-Tal-Quotient (JP) und der Peak-Tal-Quotient (EP) werden mit folgenden Gleichungen berechnet:

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

und

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

Abbildung 11 auf Seite 38 zeigt, wie der eingegebene Wert für das Peak-zu-Tal-Verhältnis die Basislinie beeinflusst.

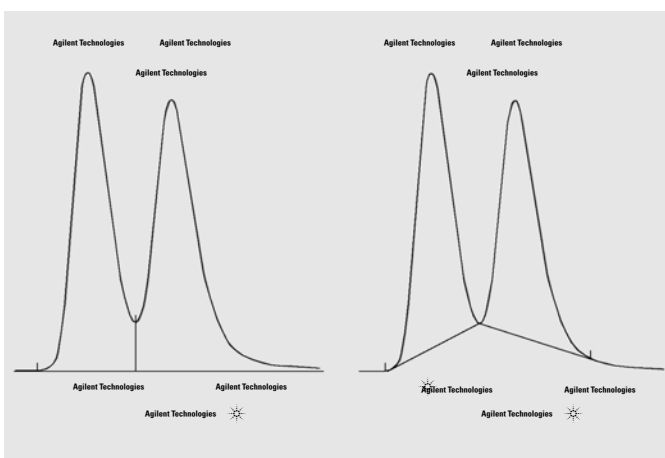


Abbildung 11 Auswirkung des Peak-zu-Tal-Verhältnisses auf die Basislinien

Tangentiale Anpassung

Die tangentiale Anpassung ist eine Möglichkeit der Basislinienkonstruktion für Peaks, die auf der ansteigenden oder abfallenden Flanke eines Peaks erscheinen. Wenn die tangentiale Anpassung aktiviert ist, stehen vier Modelle zur Berechnung der entsprechenden Peakflächen zur Verfügung:

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

Exponentielle Kurvenanpassung

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.

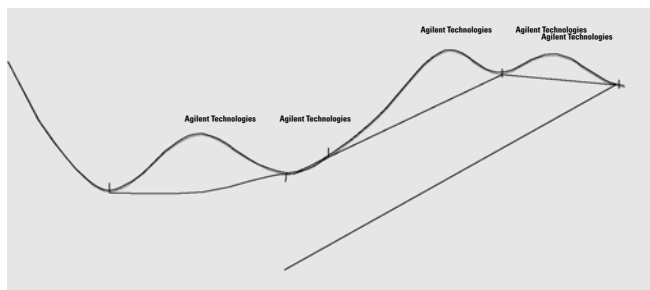


Abbildung 12 Exponentielle Anpassung

Neue exponentielle Kurvenanpassung

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 nur bis zur Anpassungskurve geht.

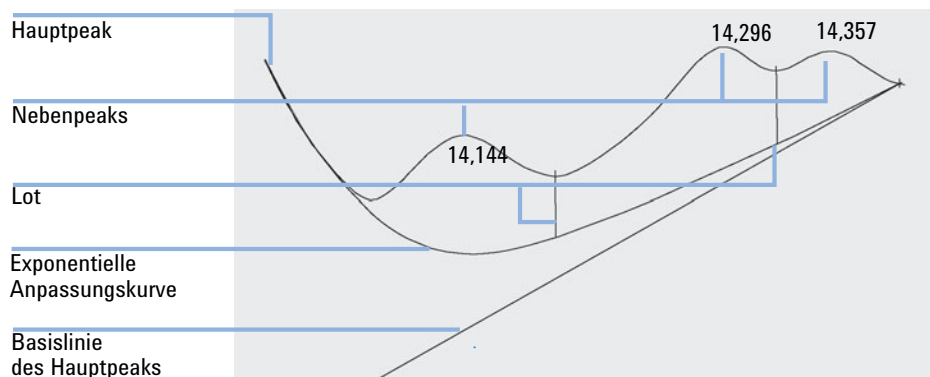


Abbildung 13 Neues Verfahren der exponentiellen Anpassung

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.

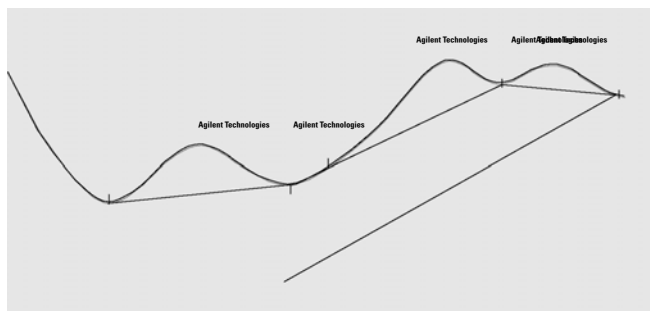


Abbildung 14 Geradenanpassung

Standardanpassungen

Diese Standardmethode ist eine Kombination aus exponentieller und Geradenberechnung für die beste Übereinstimmung.

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 Tailings die Exponentialfunktion verwendet.
- Wenn sich das Signal innerhalb des Basislinienbereichs befindet, wird zur Berechnung des Tailings die Geradenfunktion verwendet.

Die kombinierten Berechnungen gehen in den Report als exponentielle oder tangentielle Anpassung ein.

Anpassungskriterien

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

- Verhältnis Peakhöhe-Hauptpeak zu Peakhöhe-Nebenpeak
- Tal- zu- Höhe-Verhältnis

Diese Kriterien werden nicht verwendet, wenn ein zeitgesteuertes Ereignis für eine exponentielle Anpassung aktiv ist, oder wenn der Hauptpeak selber ein Nebenpeak ist. Der Trenncode zwischen Hauptpeak und Nebenpeak muss vom Typ **Valley** sein.

Tail Skim Height Ratio ist das Verhältnis der basislinienkorrigierten Höhe des Hauptpeaks (H_p in [Abbildung 15](#) auf Seite 41) zur basislinienkorrigierten Höhe des Nebenpeaks (H_c). Dieses Verhältnis muss größer sein als der angegebene Wert für den anzupassenden Nebenpeak.

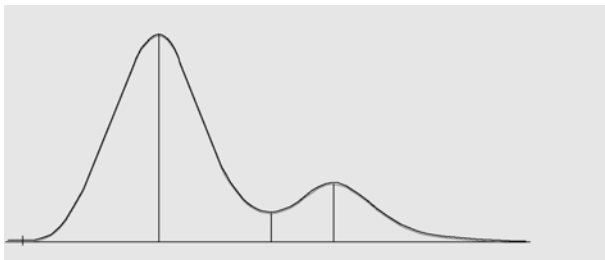


Abbildung 15 Anpassungskriterien

Sie können die exponentielle Anpassung für den ganzen Analysenlauf deaktivieren, indem Sie den Wert des Verhältnisses Peakhöhe-Hauptpeak zu Peakhöhe-Nebenpeak auf einen hohen Wert oder auf Null setzen.

Valley Height Ratio ist das Verhältnis der Höhe des Nebenpeaks über der Basislinie (H_c in [Abbildung 15](#) auf Seite 41) zur Höhe des Tals über der

Basislinie (Hv in gleicher Abbildung). Dieses Verhältnis muss kleiner sein als der angegebene Wert für den anzupassenden Nebenpeak.

Berechnung der exponentiellen Kurvenanpassung für die Anpassungen

Zur Berechnung der exponentiellen Kurvenanpassung wird folgende Gleichung verwendet:

$$H_b = H_o \times \exp(-B \times (Tr - To)) + A \times Tr + C$$

wobei

H_b = Höhe der exponentiellen Anpassung zum Zeitpunkt Tr

H_o = Höhe (oberhalb der Basislinie) zu Beginn der exponentiellen Anpassung

B = Abklingfaktor der Exponentialfunktion

To = Zeit für den Beginn der exponentiellen Anpassung

A = Steigung der Basislinie des Hauptpeaks

C = Offset der Basislinie des Hauptpeaks

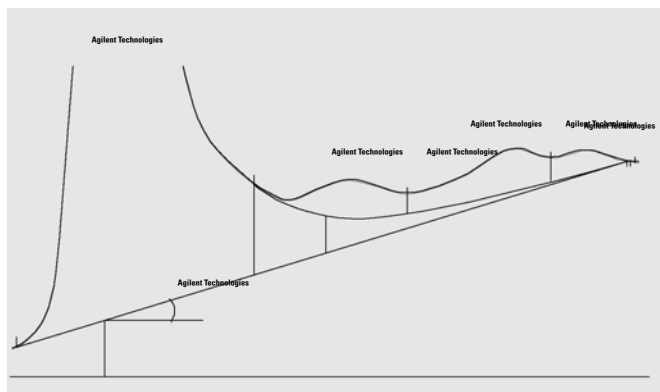


Abbildung 16 Verwendete Werte zur Berechnung der exponentiellen Anpassung

Das exponentielle Verfahren passt sich dem Abschwung des Hauptpeaks an, direkt vor dem ersten Nebenpeak. [Abbildung 17](#) auf Seite 43 zeigt die korrigierte Kurve des Nebenpeaks nach der tangentialen Peakanpassung.

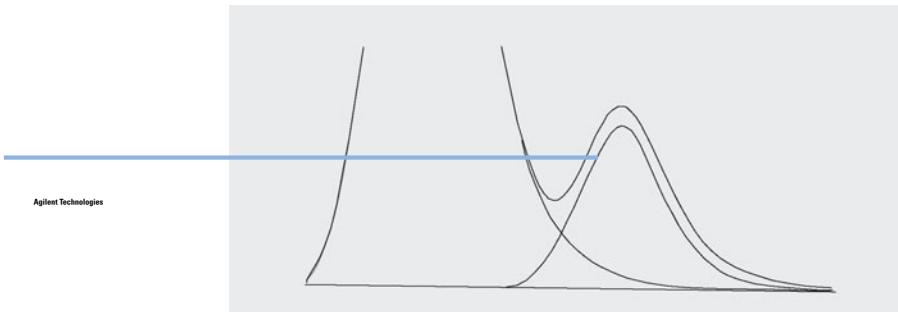


Abbildung 17 Tail-korrigierter Nebenpeak

Peakpassung 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.

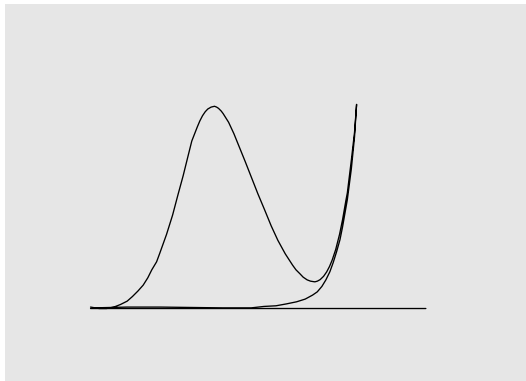


Abbildung 18 Vordere Peakpassung

Die Peakpassung im Anstieg wird genau so behandelt wie die Peakpassung 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.

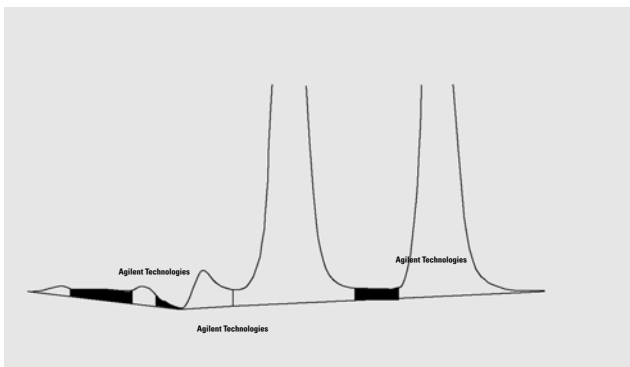


Abbildung 19 Nicht zugeordnete Peaks

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 Peak-Trenncode mit 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.
- D** Der Peak ist verzerrt.
- U** Eine Bereichsunterschreitung ist aufgetreten.
- O** Eine Bereichsüberschreitung ist aufgetreten.

4. Zeichen

Das 4. Zeichen beschreibt den Peaktyp:

- Leerstelle** Dies ist ein normaler Peak.
- S** Dies ist ein Lösungsmittelpeak.

2 Integration

Basislinienbestimmung

- 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** Dies ist ein neu berechneter Peak.
- 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.

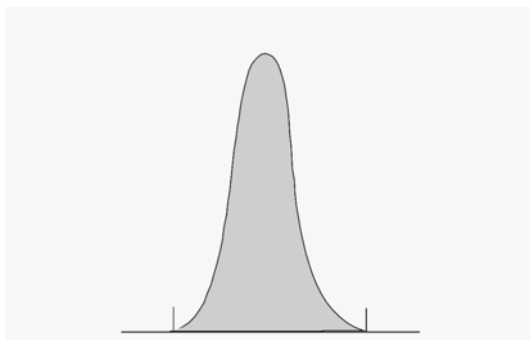


Abbildung 20 Flächenberechnung bei Basislinie-zu-Basislinie-Peaks

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)

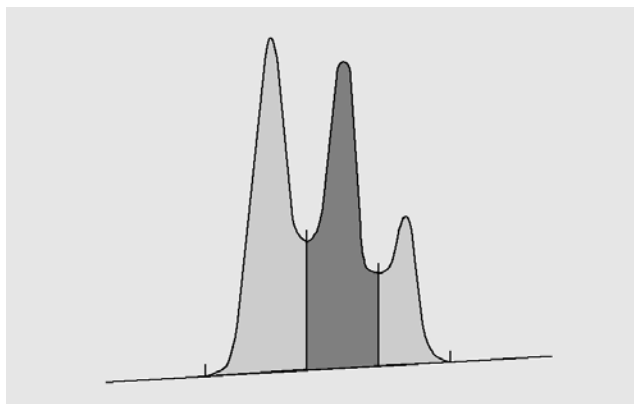


Abbildung 21 Flächenberechnung bei Tal-zu-Tal-Peaks

- 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 49 gezeigt.

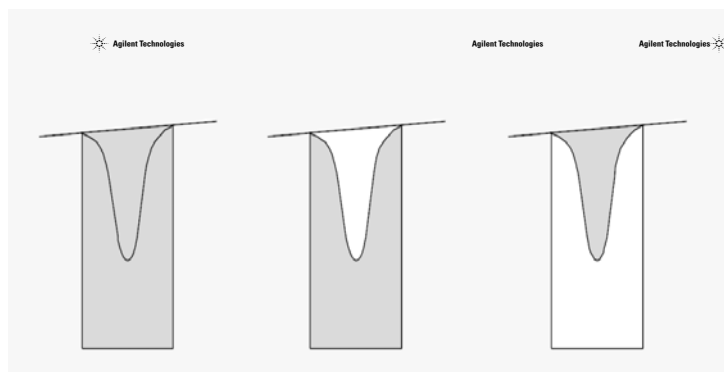


Abbildung 22 Flächenberechnung bei negativen Peaks

Einheiten und Umrechnungsfaktoren

Von außen betrachtet bestehen die Daten aus einer Reihe von Datenpunkten. Dabei kann es sich um gemessene Daten oder integrierte Daten handeln. 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 erfassten 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: *Anzahl x Millisekunden* für die Fläche und *Anzahl* für die 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

- Initial Peak Width** 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 Peaks entspricht (den Lösungsmittelpeak ausgenommen).
- Slope Sensitivity** Die Steigungsempfindlichkeit ist die Einstellung für die Peakempfindlichkeit. Diese Einstellung ändert sich linear.

Height reject	Dieser Wert gibt den Schwellenwert für die Mindesthöhe eines Peaks an. Jeder Peak, der kleiner als dieses Minimum ist, wird nicht als Peak registriert.
Area reject	Dieser Wert gibt den Schwellenwert für die Mindestfläche eines Peaks an. Jeder Peak, der eine kleinere Fläche als dieses Minimum hat, wird nicht als Peak registriert.
Shoulder detection	Wenn die Schultererkennung aktiviert ist, erkennt der Integrator Schultern anhand 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, ist die Schulter identifiziert.

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 Peak-

breite, 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.

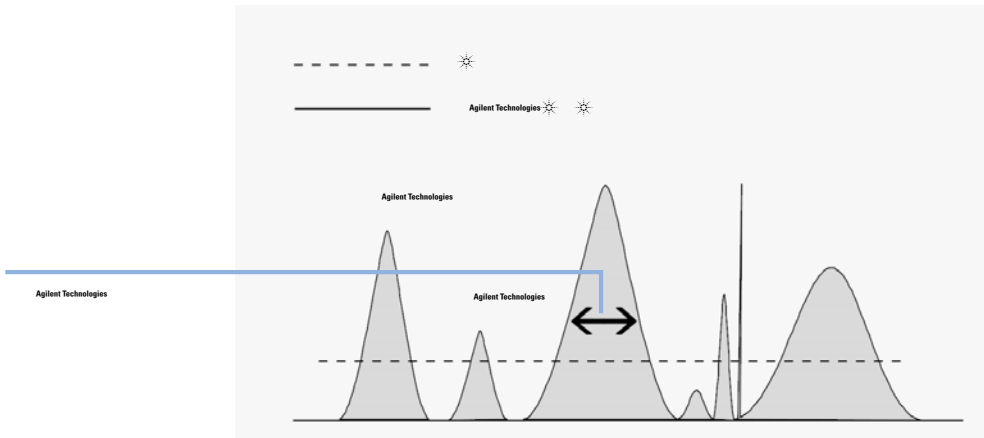


Abbildung 23 Anfangsereignisse verwenden

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 vari-

iert zwischen 0,001 min bei hoher Datenrate und 0,1 min bei einer niedrigen Datenrate.

Basislinie Ereignisse

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

2 Integration

Integrationsereignisse

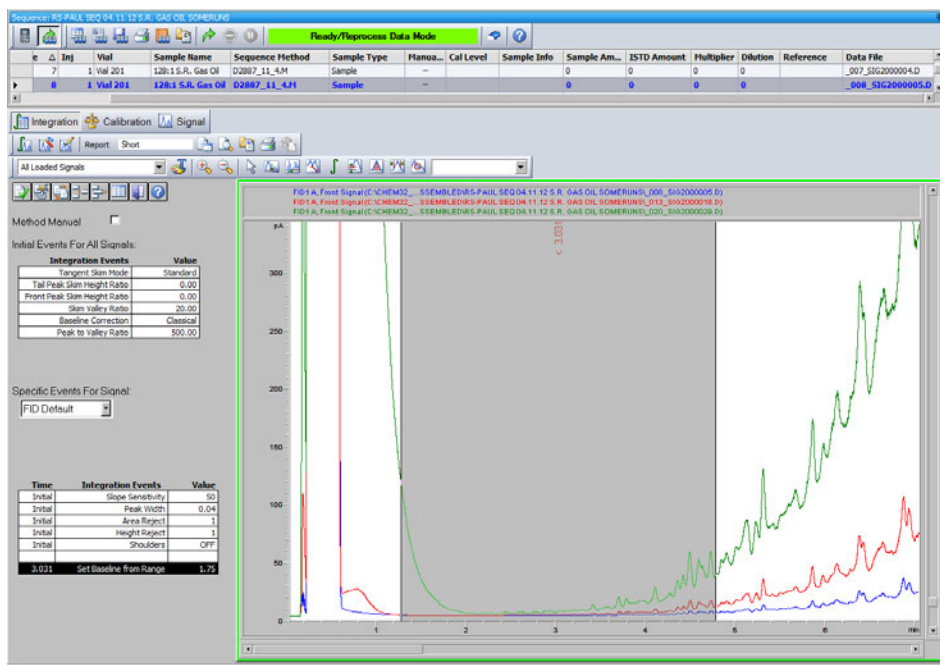


Abbildung 24 "Set Baseline from Range" (Festlegen der Basislinie eines Bereichs): Das Intervall des Basislinienbereichs wird durch eine Grauschattierung dargestellt

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

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

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.

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

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

Für die manuelle Integration stehen folgende Optionen zur Verfügung:

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

Peak-Trenncodes für manuell integrierte Peaks

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

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

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

Dokumentation manueller Integrationsereignisse

Manuelle Integrationsereignisse, z. B. eine manuell eingezeichnete Basislinie, sind noch datendatei- und 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).

Bei der weiteren Überprüfung der nächsten Datendatei in der **Navigation Table** prüft die ChemStation auf ungesicherte manuelle Integrationsergebnisse 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** gespei-

chert wurden. Diese beiden Verfahren zur Überprüfung sind bezüglich der manuellen Ereignisse der Datendatei vollständig getrennt.

In den ChemStation Versionen vor B.04.01 sind die manuellen Integrationsereignisse in den Methoden und nicht in den jeweiligen Datendateien gespeichert. In der Version B.04.01 kann diese Arbeitsweise 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 manuellen Ereignisse von der Speicherung in der Methode in die Speicherung in der Datendatei umzuwandeln, müssen die Ereignisse aus der Methode angewendet und die Ergebnisse in der Datendatei gespeichert werden. Bei Bedarf können die Ereignisse dann in der Methode gelöscht werden.

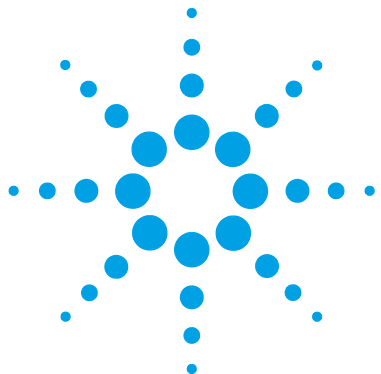
Falls das Kontrollkästchen **Manual Events** in der **Integration Events Table** der Methode ausgewählt ist, werden die manuellen Ereignisse der Methode immer angewendet, wenn eine Datendatei mit dieser Methode geladen wird. Wenn die Datendatei zusätzliche manuelle Ereignisse enthält, werden diese nach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

2 Integration

Manuelle Integration



3 Peakidentifizierung

Was ist eine Peakidentifizierung?	64
Regeln zur Peakübereinstimmung	65
Methoden der Peakidentifizierung	66
Absolute Retentions-/Migrationszeit	66
Relative Retentionszeit	66
Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten	66
Peak-Qualifier	67
Mengenbegrenzungen	67
Absolute Retentions-/Migrationszeit	68
Korrigierte Retentions-/Migrationszeiten	70
Einzelne Referenzpeaks	70
Mehrere Referenzpeaks	71
Peak-Qualifier	72
Signalkorrelation	73
Überprüfung der Qualifier	73
Berechnung des Qualifier-Verhältnisses	73
Identifizierungsprozess	75
Erkennen des Referenzpeaks	75
Erkennen der ISTD-Peaks	75
Erkennen aller verbleibenden kalibrierten Peaks	76
Klassifizierung nicht identifizierter Peaks	76

Dieses Kapitel beschreibt die Konzepte der Peakidentifizierung.



Was ist eine Peakidentifizierung?

Die Peakidentifizierung ist die Identifizierung von Substanzen in einer unbekannten 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 Grenzwerte für die Mengenangaben werden im Dialogfeld "Compound Details" (Substanzdetails) definiert und zur Qualifizierung der Peakidentifizierung benutzt. Wenn die Mengenangabe einer identifizierten Substanz im vorgegebenen Bereich liegt, wird die Peakidentifizierung im Report aufgeführt.

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 zur Identifizierung dieser Substanz herangezogen.

Abbildung 25 auf Seite 68 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 sind nur zwei Möglichkeiten verfügbar. Eine ist bei 1,85 Minuten und die andere 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 genommen.

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.

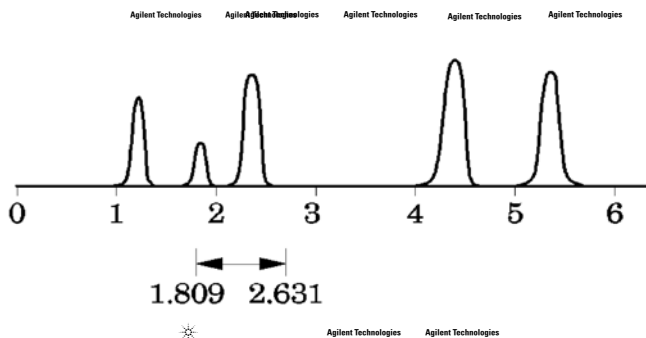


Abbildung 25 Retentions-/Migrationszeitfenster

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“ (Kalibriereinstellungen) eingegeben. Der Zeitraum vor und nach der Retentions-/Migrationszeit, die für die Peakübereinstimmung verwendet wird, ist die Summe aus absolutem und prozentuell angepasstem Zeitfenster.

Ein Fenster von 5 % bedeutet, dass die Retentions- bzw. Migrationszeit des Peaks innerhalb eines Rahmens von plus/minus 2,5 % der kalibrierten Retentions-/Migrationszeit des Peaks liegt. Beispielsweise muss ein Peak mit einer Retentions-/Migrationszeit von 2,00 Minuten im Kalibrierlauf 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.

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

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

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 72 λ_{1} .

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

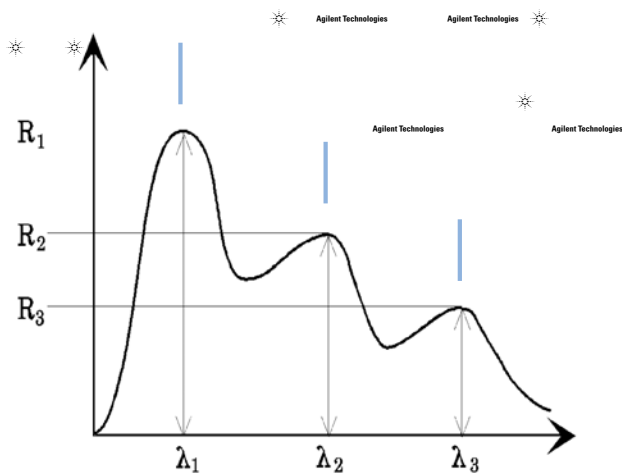


Abbildung 26 Peak-Qualifier

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" (Identi-

fizierungsdetails) 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

Unter Signalkorrelation versteht man, 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 gestellt ist, ist die Signalkorrelation ausgeschaltet (weitere Informationen finden Sie im *Makroprogrammierungshandbuch*). Wenn die Signalkorrelation deaktiviert ist, werden Peaks, die zur selben Retentions-/Migrationszeit von zwei unterschiedlichen Detektoren erfasst werden, als unterschiedliche Substanzen behandelt.

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

Überprüfung der Qualifier

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

Berechnung des Qualifier-Verhältnisses

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

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

Beide werden zur Retentionszeit der Substanz bestimmt.

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

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

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

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

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

Identifizierungsprozess

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

Erkennen des Referenzpeaks

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

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

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

Erkennen der ISTD-Peaks

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

Erkennen aller verbleibenden kalibrierten Peaks

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

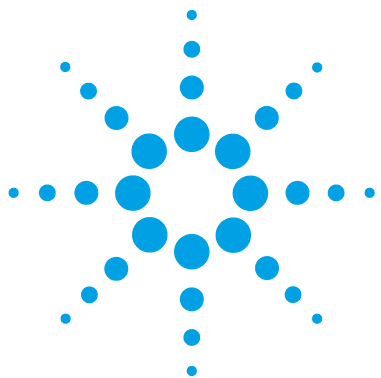
Jeder kalibrierte Nicht-Referenzpeak ist in der Kalibriertabelle mit seiner eigenen Retentions-/Migrationszeit angegeben. Diese wird für den entsprechenden Lauf basierend auf der Voridentifizierung der Zeitreferenzpeaks angepasst. Das Retentions-/Migrationszeitfenster des kalibrierten Peaks wird entsprechend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

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

Klassifizierung nicht identifizierter Peaks

Falls nicht identifizierte Peaks vorhanden sind, werden diese als unbekannt klassifiziert. Die ChemStation versucht, die unbekannten 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 im Report aufgenommen, wenn die entsprechende Vorgabe im Dialogfeld "Calibration Settings" (Kalibriereinstellungen) eingestellt wurde.



4 Kalibrierung

Kalibrierkurve 78

Gruppenkalibrierung 80

Optionen für die Rekalibrierung 81

Dieses Kapitel beschreibt die Kalibrierungsprinzipien in der ChemStation-Software.



Kalibrierkurve

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

In der Regel wird ein Aliquot der Kalibrierprobe injiziert. Dies führt zu einem Signal und man kann die Response mit Hilfe der Berechnung der Peakfläche oder Peakhöhe bestimmen, ähnlich der [Abbildung 27](#) auf Seite 78.

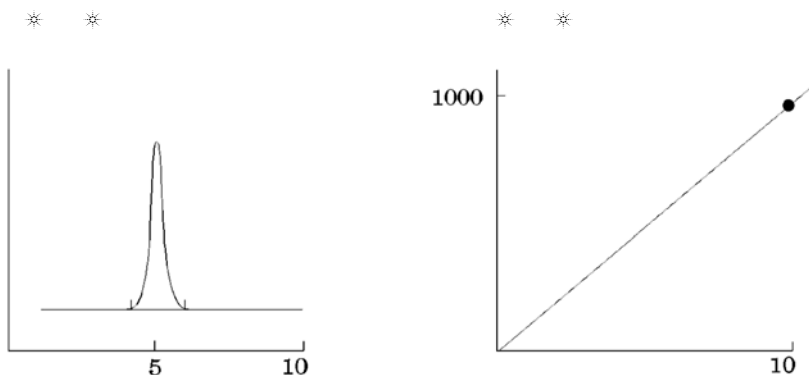


Abbildung 27 Kalibrierprobe (10 ng/µl) Signal und Kalibrierkurve

Im Zusammenhang mit der Darstellung der Kalibrierkurve wird auch ein *Korrelationskoeffizient* angezeigt. Beim Korrelationskoeffizient handelt es sich um die Quadratwurzel des Regressionskoeffizienten. Er bietet ein Maß für die Passform der Kalibrierkurve zwischen den Datenpunkten. Der Wert des Koeffizienten wird bis zu drei Stellen nach dem Komma angegeben und befindet sich im folgenden Wertebereich:

0,000 bis 1,000

wobei

0,000 = keine Passform

1,000 = perfekte Passform

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

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

wobei:

relRES = relativer Residualwert in Prozent

Die errechnete Response steht für den Punkt auf der Kalibrierkurve.

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

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

wobei:

ResSTD = Residuale Standardabweichung

Resp_{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.

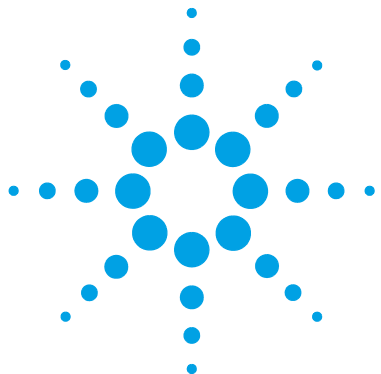
$$Response = \left(1 - \frac{Weight}{100}\right) \cdot Response + \left(\frac{Weight}{100}\right) \cdot MeasResponse$$

Replace

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

4 Kalibrierung

Optionen für die Rekalibrierung



5 Quantifizierung

Was ist Quantifizierung?	84
Berechnungsmethoden in der Quantifizierung	85
Korrekturfaktoren	86
Absoluter Responsefaktor	86
Multiplikator	86
Verdünnungsfaktor	86
Probenmenge	87
Nicht kalibrierte Berechnungsverfahren	88
Area% und Height%	88
Kalibrierte Berechnungsverfahren	89
ESTD-Berechnung	90
Norm%-Berechnung	92
ISTD-Berechnung	93
Analysenlauf 1: Kalibrierung	94
Analysenlauf 2: Unbekannte Probe	95
ISTD-Berechnung für kalibrierte Peaks	95
ISTD-Berechnung nicht kalibrierter Peaks	96

Dieses Kapitel beschreibt die Quantifizierung mit der ChemStation. Area%-, Height% und Norm%-Berechnungen, ESTD- und ISTD-Berechnungen sowie die Quantifizierung nicht identifizierter Peaks werden ausführlich beschrieben.



Was ist Quantifizierung?

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

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

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

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

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

Für einen korrekten Vergleich der Responsewerte der unbekannten 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 unbekannten 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 Probenge-samtmenge 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.

Nicht kalibrierte Berechnungsverfahren

Für nicht kalibrierte Berechnungsverfahren wird keine Kalibriertabelle benötigt.

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, bei dem Standards und Proben unter identischen Bedingungen analysiert werden. Die Ergebnisse der unbekannten Probe werden mit der Kalibriertabelle verglichen. So wird die Menge der unbekannten Substanz in der Probe errechnet.

Das ESTD-Verfahren verwendet absolute Responsefaktoren und unterscheidet sich damit vom ISTD-Verfahren. Die Responsefaktoren werden in einer Kalibrierung gewonnen und gespeichert. In den nachfolgenden Probenläufen werden die Substanzmengen durch Anwendung dieser Responsefaktoren auf die gemessenen Mengen errechnet. Stellen Sie sicher, dass die aufgegebene Probenmenge von Analysenlauf zu Analysenlauf reproduzierbar ist, da sich in der Probe kein Standard zur Korrektur bei Abweichungen in der Probenmenge oder Probenaufbereitung befindet.

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

- 1 Für die Substanz wird eine Gleichung für die Kurve durch die Kalibrierpunkte ermittelt, die mit den Werten aus dem Dialogfeld „Calibration Settings“ (Kalibriereinstellungen) oder „Calibration Curve“ (Kalibrierkurve) angepasst wird.
- 2 Die Menge der Substanz in der unbekannten Probe wird mit der unten beschriebenen Gleichung berechnet. Diese Menge kann im Report angegeben werden, oder zuvor durch Anwendung von Multiplikator, Verdünnungsfaktor oder Probenmenge weiter bearbeitet werden, bevor sie im Report erscheint.

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

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

wobei

Response_x ist der Response der Substanz im Peak x;

RF_x ist der Responsefaktor der Substanz x, gemäß:

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

M ist der Multiplikator.

D ist der Verdünnungsfaktor.

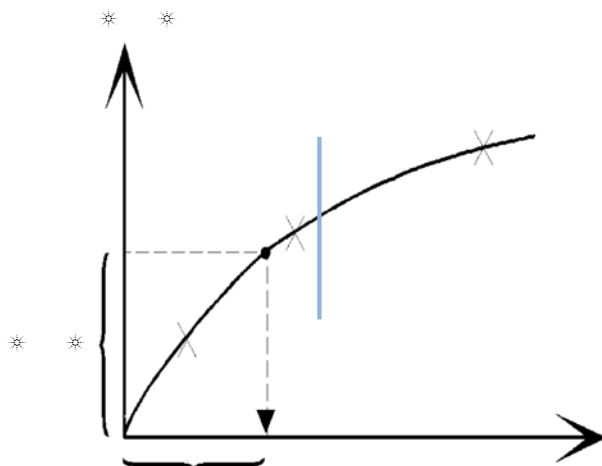


Abbildung 28 Responsefaktor

Multiplikations- und Verdünnungsfaktor werden den Dialogfeldern **Calibration Settings** oder **Sample Information** entnommen.

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

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

wobei

Absolute Amount of x (Absolute Menge von x) analog zur oben gezeigten ESTD-Methode berechnet wird;

Sample Amount (Probenmenge) dem Dialogfeld „Sample Information“ (Probeninformationen) oder „Calibration Settings“ (Kalibriereinstellungen) aus Einzelanalysen entnommen wird. 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 Sequenztafel 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 unbekannten 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 unbekannten Probe einander ähnlich sind.	

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

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

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

Analysenlauf 1: Kalibrierung

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

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

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

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

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

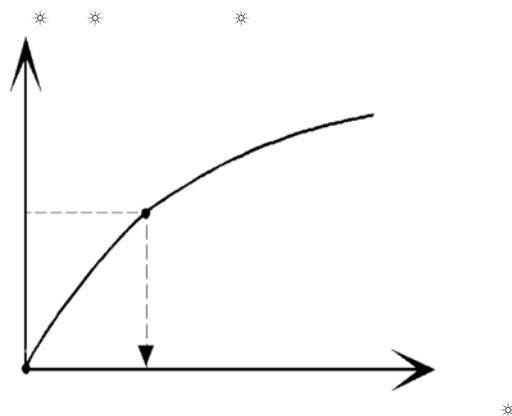


Abbildung 29 Mengenverhältnis

Analysenlauf 2: Unbekannte Probe

- 1 Zur Ermittlung des Responseverhältnisses der unbekannten Probe wird der Response der Substanz in der unbekannten Probe durch den Response des internen Standards in der unbekannten Probe dividiert.
- 2 Das Mengenverhältnis für die unbekannte 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:

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

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

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:

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

ISTD-Berechnung nicht kalibrierter Peaks

Zur Definition des Responsefaktors nicht identifizierter Peaks gibt es zwei Möglichkeiten.

- 1 Verwendung eines festen Responsefaktors, der im Feld **With Rsp Factor** (Mit Rsp-Faktor) des Dialogfelds **Calibration Settings** (Kalibriereinstellungen) angegeben ist. Sie können einen festen Responsefaktor durch Angabe einer ISTD-Korrektur korrigieren.

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

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

RF_x ist der Responsefaktor aus dem Dialogfeld **Calibration Settings** (Kalibriereinstellungen).

Sie können an diesen Formeln sehen, dass die Variationen des ISTD-Response zur Korrektur der Quantifizierung der unbekannten Substanz benutzt werden.

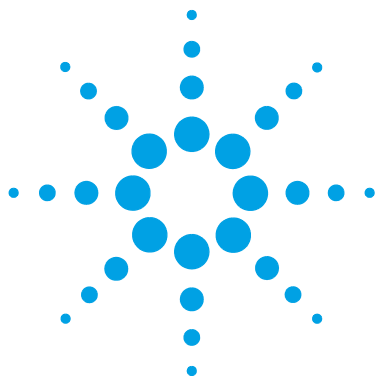
- 2 Verwendung eines kalibrierten Peaks. Damit wird sichergestellt, dass zur Quantifizierung aller Peaks derselbe Responsefaktor benutzt wird. Der Responsefaktor der ausgewählten Substanz und der nicht kalibrierte Peak werden durch Neukalibrierungen korrigiert. Änderungen des Responsefaktors des kalibrierten Peaks führen zur gleichen Änderung

des Responsefaktors des unbekannten Peaks. Falls eine Kalibriertabelle erstellt wurde, können Sie unter **Using Compound** (Substanz verwenden) im Dialogfeld **Calibration Settings** (Kalibriereinstellungen) eine Substanz auswählen.

Die Gleichungen zur Berechnung der Menge einer Substanz eines nicht kalibrierten Peaks x sind oben aufgeführt.

5 Quantifizierung

ISTD-Berechnung



6 Systemeignungsevaluierung

Systemeignungsevaluierung	101
Bestimmung der Rauschhöhe	104
Bestimmung des Rauschens als sechsfache Standardabweichung	105
Bestimmung des Rauschens nach der Peak-zu-Peak-Berechnung	105
Rauschbestimmung nach der ASTM-Methode	106
Signal-Rausch Berechnung	108
Drift und Wanderung	111
Berechnung der Peaksymmetrie	112
Formeln und Berechnungsmethoden zur Beurteilung der Systemeignung	114
Allgemeine Definitionen	115
Totvolumen	115
Retentionszeit einer nicht retardierten Substanz T (m) [min]	115
Leistungstest-Definitionen	116
Statistische Momente	116
Statistische Momente, Schräge und Exzess	117
Tatsächliche Peakbreite W_x [min]	118
Kapazitätsfaktor (USP), Kapazitätsverhältnis (ASTM) k'	118
Tailingfaktor (USP) t	118
Anzahl der theoretischen Trennböden der Säule n	119
Anzahl theoretischer Trennstufen pro Meter N [1/m]	121
Leistungstest-Definitionen	116
wobei Auflösung (USP, ASTM) R	122
Auflösung (EP/JP) R_s	122
Auflösung (ChemStation klassische Definitionen)	123



Definitionen der Reproduzierbarkeit	124
Probenmittelwert M	124
Proben-Standardabweichung S	124
Relative Standardabweichung RSD[%] (USP)	125
Standardabweichung des Mittelwerts SM	125
Konfidenzintervall CI	126
Regressionsanalyse	127
Regressionskoeffizient	127
Standardabweichung (S)	128
Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff	129

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, ebenso auch für neue, manuell integrierte Peaks. Das interaktive Tool Peakleistung berechnet die Peakeigenschaften und zeigt dies in der UI an

Systemeignungsevaluierung

Die Evaluierung der Leistungsfähigkeit sowohl von Analysengeräten vor deren Einsatz für die Probenanalyse als auch von Analysenmethoden vor deren routinemäßigem Einsatz 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 Detektorempfindlichkeit, die Präzision der Retentionszeit bzw. Migrationszeit der Peaks sowie die Präzision von Peakflächen umfassen. Ein Methodentest kann die Präzision der Retentionszeit bzw. Migrationszeit sowie Menge, Selektivität und Robustheit der Methode bezüglich täglicher Abweichung während des Betriebs umfassen. Ein Systemtest kann die Präzision von Mengen, die Auflösung zwischen zwei spezifischen Peaks und das Peak-Tailing umfassen.

Labors, für die folgende Bestimmungen gelten:

- GLP (Good Laboratory Practice)
- GMP (Good Manufacturing Practice) und cGMP (Current Good Manufacturing Practice)
- GALP (Good Automated Laboratory Practice)

Labors wird empfohlen, diese Tests durchzuführen und sorgfältig zu dokumentieren. Labors, 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 Sequenzübersichtsreport.

Die Tests werden in einem Format dokumentiert, das von Aufsichtsbehörden und unabhängigen Prüfern allgemein akzeptiert werden. Die Statistiken umfassen:

- 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 gestützt werden, indem Berichte zu den Bedingungen zum Zeitpunkt der Messung geführt werden. Das Logbuch der ChemStation verzeichnet die Gerätebedingungen vor und nach dem Lauf. Diese Information wird mit den Daten gespeichert und mit den Probandaten gemeldet. Geräteleistungskurven werden während der gesamten Analyse als Signale aufgezeichnet und in der Datendatei gespeichert. Sofern die Geräte diese Funktion unterstützen, können diese Berichte zum Chromatogramm eingeblendet, auf Wunsch 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-/Kapillari-identifikation 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 bezüglich der 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-/Migrationszeiten oder mit Namen der Verbindung

Zusätzlich wird folgende Information für jede kalibrierte Verbindung im Chromatogramm generiert:

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

Bestimmung der Rauschhöhe

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

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

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

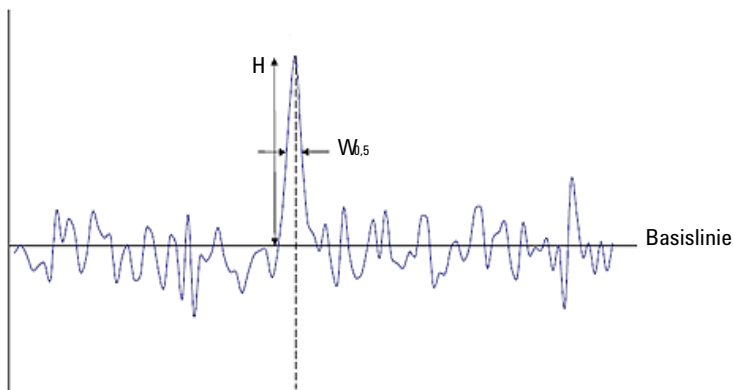


Abbildung 30 Chromatogramm mit Peaksignal und Rauschen

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 [“Regressionsanalyse”](#) auf Seite 127). 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

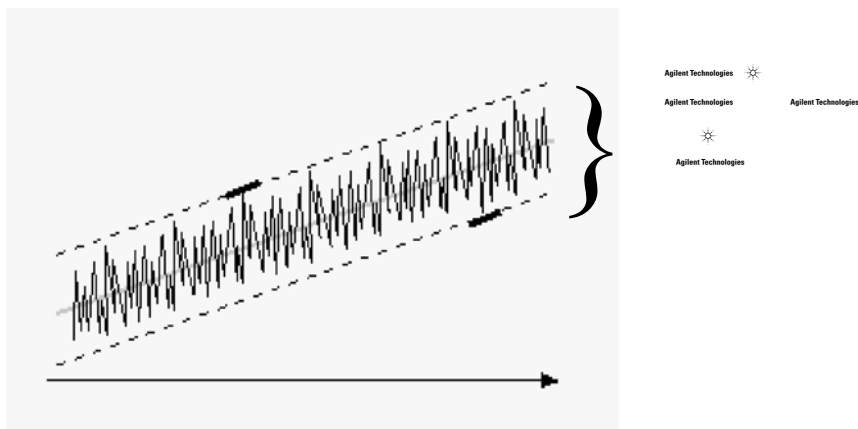


Abbildung 31 Rauschen als Abstand zwischen maximalem Peak und minimalem Peak

Zunächst wird die Drift durch Bestimmung der linearen Regression aller Datenpunkte in dem Zeitbereich ermittelt (siehe [“Regressionsanalyse”](#) auf Seite 127). Zur Ermittlung des Drift-korrigierten Signals wird die lineare Regressionslinie von allen Datenpunkten des Zeitbereichs abgezogen.

Daraufhin wird mit Hilfe der folgenden Formel das Peak-to-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 Peak in dem Zeitbereich ist.

Bei Berechnungen für das Europäische Arzneimittelbuch 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 infolge von Matrixsignalen unsymmetrisch sein.

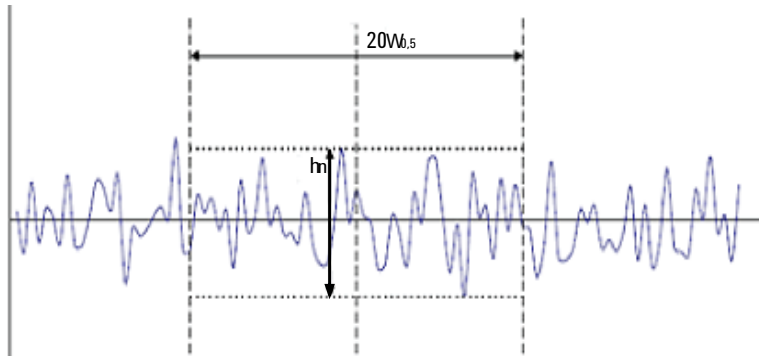


Abbildung 32 Bestimmung des Rauschens mithilfe des Chromatogramms einer Blindprobe

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 Minuten pro Zyklus (dt) eingestellt. Dies führt zu mindestens 10 Zyklen innerhalb des ausgewählten Zeitbereichs.

Bestimmung der Zyklenanzahl, n

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

wobei t die Zykluszeit und t_{tot} die Gesamtzeit ist, während der das Rauschen ermittelt 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 **“Regressionsanalyse”** auf Seite 127). 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 Rauschen nach der ASTM-Methode ist.

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

Signal-Rausch Berechnung

ChemStation verfügt über zwei Optionen für die Signal-Rausch Berechnung:

- Die sechsfache Standardabweichung aus der linearen Regression des Drifts zum Berechnen des Rauschens
oder
- Gemäß der Definition im Europäischen Arzneimittelbuch: berechnet gegen ein Blindwertsignal einer Referenz, und ein Rauschen berechnet über einen Zeitbereich, in dem sich der Peak befindet, dessen Signal-Rausch-Verhältnis berechnet wird.

Signal-Rausch-Berechnung ohne Referenzsignal

Der dem Peak nächste Bereich wird aus den Bereichen gewählt, die in den Einstellungen für die Systemeignung vorgegeben sind. Die sechsfache Standardabweichung aus der linearen Regression des Drifts wird zum Berechnen des Rauschens verwendet.

Das Signal-Rausch Verhältnis wird für jeden Peak im Signalverlauf berechnet. Wenn die ChemStation keinen Rauschwert ermitteln kann, wird das Signal-Rausch Verhältnis mit “-” gekennzeichnet.

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

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

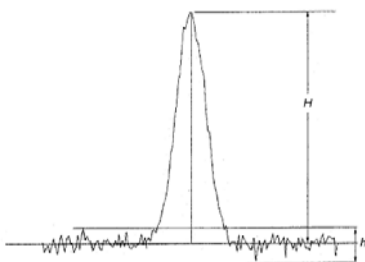


Abbildung 33 Signal-zu-Rausch Verhältnis

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

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

$$\text{Signal/Rausch-Verhältnis} = 2H/h$$

Wobei:

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

h der Absolutwert der größten Rauschfluktuation der Basislinie in einem Chromatogramm ist, das nach Injektion einer Blindprobe erhalten wurde. Dieses Chromatogramm deckt die 20-fache Breite der Peakbreite bei hal-

ber Höhe des Chromatogramms der vorgeschriebenen Referenzlösung ab, und ist symmetrisch um die Position platziert, wo dieser Peak zu finden wäre.

Der Rauschwert wird mit der "Peak-to-Peak"-Methode berechnet (siehe ["Bestimmung des Rauschens nach der Peak-zu-Peak-Berechnung"](#) auf Seite 105).

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

Bestimmung des Rauschbereichs

Der Rauschbereich im Referenzsignal wird nach einem der folgenden Algorithmen bestimmt

- Falls das Referenzsignal nicht lang genug ist: $StartZeit - EndZeit < 20 * W_{0,5}$
 - $StartZeit = Startzeit \text{ (des Referenzsignals)}$, und
 - $EndZeit = Endzeit \text{ (des Referenzsignals)}$
- Ist das Referenzsignal nicht lang genug, der Peak ist aber so platziert, dass $(RT - 10 * W_{0,5})$ kleiner als der Startpunkt des Referenzsignals ist
 - $StartZeit = Startzeit \text{ (des Referenzsignals)}$, und
 - $EndZeit = StartZeit + 20 * W_{0,5}$
- Ist das Referenzsignal lang genug, der Peak ist aber so platziert, dass RT oder $RT + 10 * W_{0,5}$ größer als der Endpunkt des Referenzsignals ist
 - $EndZeit = Endzeit \text{ (des Referenzsignals)}$ und
 - $StartZeit = EndZeit - 20 * W_{0,5}$
- Ist der Peak so platziert, 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 ["Regressionsanalyse"](#) auf Seite 127). Zur Ermittlung des Drift-korrigierten Signals wird die lineare Regressionslinie von allen Datenpunkten des Zeitbereichs abgezogen.

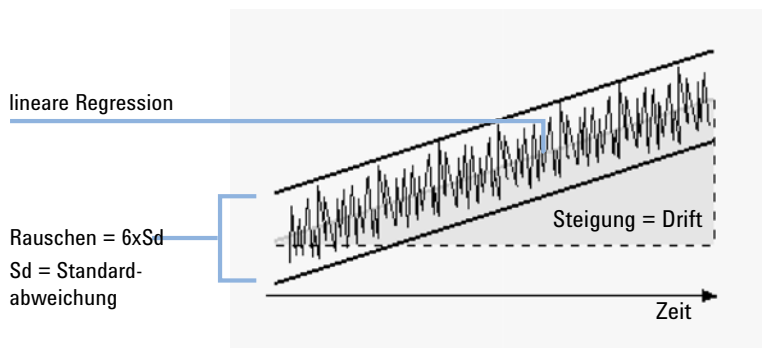


Abbildung 34 Drift für Rauschen als das Sechsfache der Standardabweichung

Wanderung wird als Peak-zu-Peak Rauschen der Mittelwerte in den ASTM-Rauschzyklen bestimmt, siehe ["Rauschbestimmung nach der ASTM-Methode"](#) auf Seite 106.

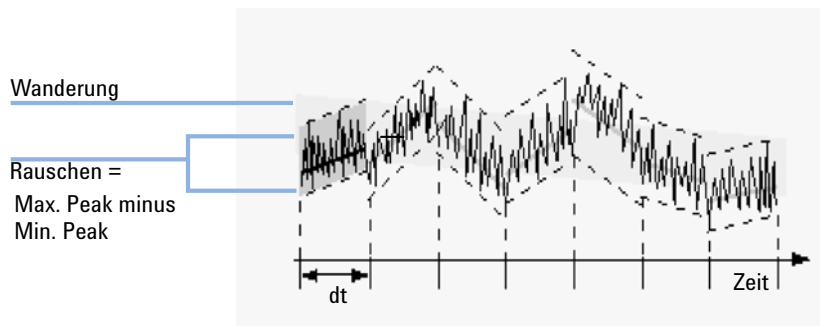


Abbildung 35 Wanderung des Rauschens gemäß Definition in der ASTM-Methode

Berechnung der Peaksymmetrie

Die ChemStation führt keine Bestimmung der Peakasymmetrie durch Vergleich der halben Peakbreiten in 10 %, oder wie von der FDA empfohlen, in 5 % der Peakhöhe durch.

Die Peaksymmetrie wird vom Integrator als Pseudomoment mit folgenden Gleichungen berechnet:

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

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

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

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

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

Wenn nur ein Wendepunkt oder keine Wendepunkte gefunden werden, dient folgende Formel zur Berechnung der Peaksymmetrie:

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

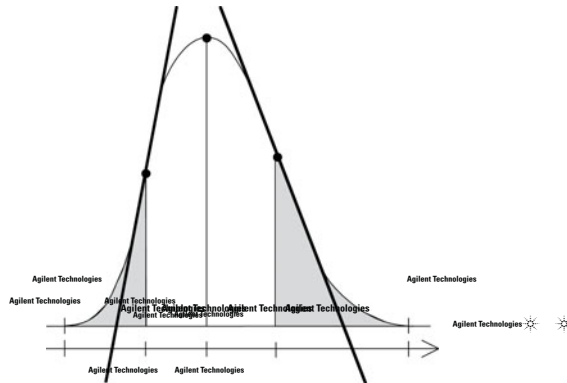


Abbildung 36 Berechnung des Peaksymmetriefaktors

wobei

a_i = Flächenwert des Abschnitts

t_i = Zeit des Abschnitts

H_f = Höhe des vorderen Wendepunkts

H_r = Höhe des hinteren Wendepunkts

H = Höhe im Maximum

Formeln und Berechnungsmethoden zur Beurteilung der Systemeignung

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

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

Die in diesem Zusammenhang verwendeten Referenzen sind:

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

Allgemeine Definitionen

Totvolumen

$$V = d^2 \pi l (f/4)$$

wobei

d = Durchmesser der Säule [cm]

π = Konstante, Verhältnis von Umfang zu Durchmesser eines Kreises

l = Säulenlänge [cm]

f = Anteil am Säulenvolumen, das nicht durch die stationäre Phase ausgefüllt wird und mobile Phase aufnehmen kann; Standardwert beträgt: f = 0,68 (für Hypersil)

Retentionszeit einer nicht retardierten Substanz T (m) [min]

(Andere Bezeichnung Totzeit oder Nullzeit)

$$T_m = V/F$$

wobei

F = LC-Flussrate [ml/min]

Leistungstest-Definitionen

Die Peakleistung kann für jeden integrierten Peak der geladenen Daten berechnet werden, ebenso auch für neue, manuell integrierte Peaks. Das interaktive Tool Peakleistung berechnet die Peakeigenschaften und zeigt dies in der UI an

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

t₀ = Zeit des ersten Flächenschnitts

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

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

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

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 Peak Schwerpunkt 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 Peakverbreiterung 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 = width of peak at height x % of total height

W_B Basisbreite, 4 Sigma, wird erhalten, indem Tangenten durch die Wendepunkte gelegt werden, die die Basislinie schneiden (Tangentenpeakbreite).

$W_{4,4}$ Breite bei 4,4 % der Höhe (Sigmabreite 5)

$W_{5,0}$ Breite bei 5 % der Höhe (Tailing-Peakbreite), wird für den USP-Tailingfaktor verwendet

$W_{50,0}$ Breite bei 50 % der Höhe (wahre Peakbreite bei halber Höhe oder 2,35 Sigma).

Kapazitätsfaktor (USP), Kapazitätsverhältnis (ASTM) k'

$$k' = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

wobei

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) t . 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]

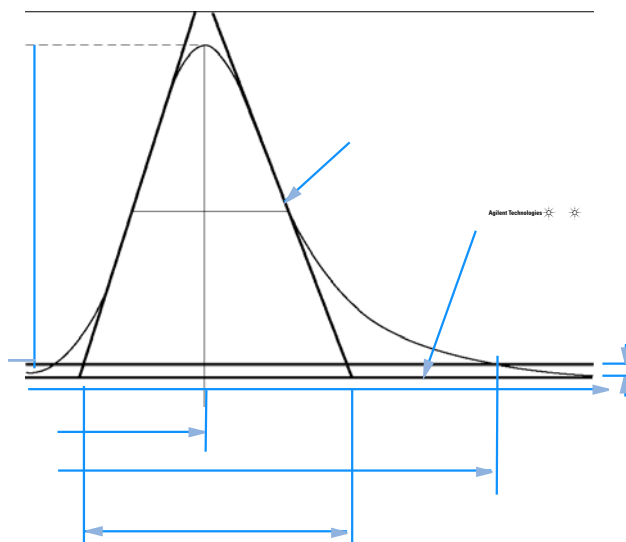


Abbildung 37 Leistungsparameter

Anzahl der theoretischen Trennböden der Säule n

Tangentenmethode (USP, ASTM):

$$n = 16 \left(\frac{T_R}{W_B} \right)^2$$

wobei

W_B = Basisbreite [min]

Halbwertsbreitenmethode (ASTM, EP, JP):

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

wobei

W_{50} = Peakbreite in halber Peakhöhe [min]

5 Sigma-Methode

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

wobei

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

Statistische Methode:

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

wobei

Mx = $x \cdot$ statistisches Moment

Foley-Dorsey-Methode

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

$$N_{\text{sys}} = \frac{41.7 \cdot T_R / W_{10}}{A/B + 1.25}$$

wobei

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

Anzahl theoretischer Trennstufen pro Meter N [1/m]

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

wobei

n = Anzahl theoretischer Trennböden

l = Säulenlänge [cm]

Relative Retention (USP, ASTM), Selektivität Alpha

HINWEIS

Relative Retention (USP) steht in Reportausgabe 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: $t_{Rx} - t_0 / t_0$

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 = Rückhaltezeit

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

Relative Retention (nicht angepasst) nach EP wird berechnet als

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

wobei Auflösung (USP, ASTM) R

(Bezogen auf Peaks a und b, T_R des Peaks a < T_R des Peaks b; T_R in min)

Tangentenmethode (USP, ASTM):

$$R = \frac{2(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{B(b)} + W_{B(a)}}$$

Auflösung (EP/JP) Rs

Methode der Halbwertsbreite (Auflösung wird in Leistungsreport verwendet)

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

$$Rs = 1,18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0,5h1} + W_{0,5h2})$$

HINWEIS

Die Definition von Auflösung 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

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

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 116)

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-%-Konfidenzintervall verwendet werden ($\alpha = 0.05$).

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

95-%-Konfidenzintervall für 6 Proben:

$$1 - \alpha = 0.95$$

$$N = 6$$

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

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

Regressionsanalyse

Mit

N = Anzahl der einzelnen Beobachtungen

X_i = unabhängige Variable, i -te Beobachtung

Y_i = abhängige Variable, i -te Beobachtung

Lineare Funktion:

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

Koeffizienten:

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

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

wobei

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

Regressionskoeffizient

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N X_i Y_i - \sum_{i=1}^N X_i * \sum_{i=1}^N Y_i}{\sqrt{\Delta X * \Delta Y}}$$

wobei

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

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 Kalibrierkurven, 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 Kalibriertabelle 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 Kalibrierkurven-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 3 signifikante Stellen besitzt, ist die Verwendung von 10 signifikanten Stellen während der Berechnung ausreichend. Aus diesem Grund werden bei der Kalibrierung 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 alle intern gespeicherten Stellen für Zahlen, die typischerweise für manuelle Berechnungen benötigt werden, erreicht werden können. In allen Fällen muss vor der Eingabe der aufgelisteten Befehle eine Datendatei geladen und ein Report mit der geeigneten Reportvorlage erstellt werden. Alle Befehle werden in der ChemStation-Befehlszeile eingegeben, die vom Menü View aus verfügbar gemacht werden kann. Die Angaben in der Datei „C:\CHEM32\TEMP.TXT“ können mit NOTEPAD oder einem geeigneten Texteditor angezeigt werden.

Rohpeakinformation:

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

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE CHROMREG, INTRESULTS, "C:\CHEM32\1\TEMP\INT-  
RES.TXT"
```

Verarbeitete Peakinformation:

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

- Auflösung - Tangente (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - 5-Sigma (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - Statistisch (Erweiterter Leistungstest)

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE CHROMRES, PEAK,"C:\CHEM32\1\TEMP\PEAK.TXT"
```

Verarbeitete Substanzinformation:

- Berechnete Menge

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE CHROMRES, COMPOUND,"C:\CHEM32\1\TEMP\COM-  
POUND.TXT"
```

Kalibriertabelleninformation:

- Stufenzahl
- Menge
- Fläche
- Höhe

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, CALPOINT,"C:\CHEM32\1\TEMP\CALIB.TXT"
```

Lineare Regressionsinformationen:

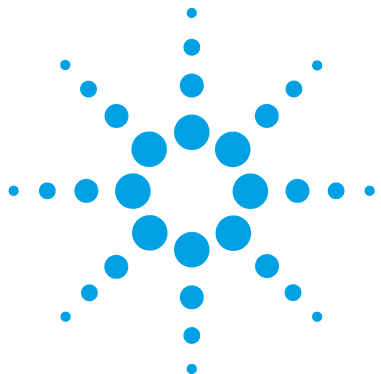
- Y-Achsenabschnitt (CurveParm1)
- Steigung (CurveParm2)
- Korrelationskoeffizient

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, PEAK,"C:\CHEM32\1\TEMP\REGRESS.TXT"
```

6 Systemeignungsevaluierung

Interner gespeicherter Doppelpräzisions-Zahlenzugriff



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
Untergrundsubtraktion	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** (Standardkalibrierung) wählen, können Sie die Option **Calculate Signals Separately** (Signale separat berechnen) oder **Calculate with Corrected Areas** (Mit korrigierten Flächen berechnen) 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.

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

7 CE-spezifische Berechnungen

Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

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

wobei

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}):

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

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

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

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:

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

Anschließend wird die erwartete Migrationszeit der einzelnen Peaks angepasst:

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

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:

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

Anschließend wird die erwartete Migrationszeit der einzelnen Peaks angepasst:

$$t_{\text{newexp}N} = k(t_{\text{oldexp}N})/(\mu_{\text{real}N} + \mu_{\text{EOFact}})$$

Dann werden die Mobilitätswerte aktualisiert:

$$\mu_{\text{real}N} = \mu_{\text{app}N} - \mu_{\text{EOFact}}$$

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:

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

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:

7 CE-spezifische Berechnungen

Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

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

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.

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:

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

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

$$t_{\text{refcal}} = t_{\text{refact}}$$

Spezielle Reportstile für die Kapillarelektrophorese

Der Agilent ChemStation für CE-Systeme wurde folgender Reportstil hinzugefügt:

CE Mobility **CE Mobility** enthält quantitative Textergebnisse besonders zur scheinbaren Mobilität. Sie können diesen Reportstil nur verwenden, wenn Sie vor der Erfassung die Informationen zu den verwendeten Kapillaren eingegeben und das Spannungssignal gespeichert haben. Die scheinbare Mobilität wird gemäß der folgenden Formel berechnet,

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

wobei

l die effektive Kapillarlänge (cm) ist

L die Kapillargesamtlänge (cm) ist

t die Migrationszeit ist (min)

V die Spannung ist (kV)

Wird die Korrektur der effektiven Mobilität (siehe ["Berechnungen der effektiven Mobilität"](#) auf Seite 138) aktiviert, wird die Spalte für den Peaktyp in einfachen Reporten (z. B. ESTD-Reporte) durch eine Spalte für die Mobilität ersetzt. Der Bericht "CE Mobility" (CE-Mobilität) enthält an Stelle der scheinbaren Mobilitätswerte die effektiven Mobilitätswerte.

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 Reports aufgeführten Werte sind nur für die Agilent ChemStation für LC 3D-Systeme gültig, da die Agilent ChemStation für CE-Systeme dieselben Algorithmen wie die Agilent ChemStation für LC 3D-Systeme verwendet.

CE-MSD

Untergrundsubtraktion

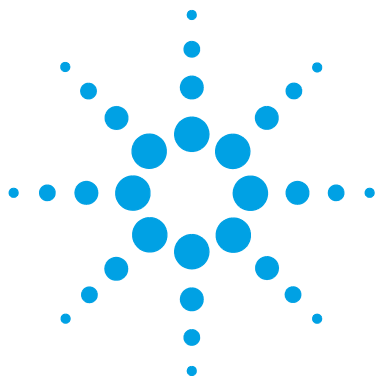
Wenn Sie die Option **Subtract Background** (BSB) wählen, wird das zuletzt ausgewählte Massenspektrum von den einzelnen Punkten im aktuellen Elektropherogramm subtrahiert. Die sich daraus ergebenden Daten werden im selben Verzeichnis und mit demselben Namen wie die ursprüngliche Datendatei gespeichert,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

Die neue Datendatei wird zur aktuellen Datendatei und das Elektropherogramm mit dem subtrahierten Untergrund wird angezeigt. Ein Datensatz der Anzahl der ausgeführten Untergrundsubtraktionen wird im Header der Datendatei gespeichert.

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

HINWEIS

Die Textdateien "HELP" im LC/MSD-System beziehen sich nur auf LC- und nicht auf CE-Parameter. Einige Funktionen, die in der LC/MSD-Software verfügbar sind, sind in CE/MSD-Anwendungen entweder nicht verfügbar oder nicht zutreffend, werden aber in der LC verwendet. Die Funktion **peak matching** ist für CE-MS nicht verfügbar und daher nicht aktiviert. In CE-MS findet die UV- und MS-Erkennung bei unterschiedlichen Längen der Trennkapillare statt. Aufgrund der unterschiedlichen Auflösung bei unterschiedlichen effektiven Längen ist eine Peakzuordnung 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 OpenLAB
CDS mit ECM 155

Batchkonfiguration 156

Batch-Tabelle 156

Substanztabelle 157

Batch-Report 157

Benutzeroberfläche 158

Funktionen für die Überprüfung 159

Kalibrierung in der Batchüberprüfung 159

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

Tabelle 10 Spalten der Navigationstabelle

Spalten für einzelne Analysenläufe	Spalten für Sequenzläufe
Probenmenge	Probeninfo
ISTD-Menge	Probenmenge
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 OpenLAB CDS mit ECM

Wenn Sie OpenLAB CDS 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 Probentypen 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, die manuelle Änderung von Chromatogrammen, z. B. die Glättung oder die manuelle Integration. Alle an einer Datendatei vorgenommenen Änderungen lassen sich kennzeichnen und mit der Datendatei 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 verwerfen.

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 Sequenztabelle. 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.

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:

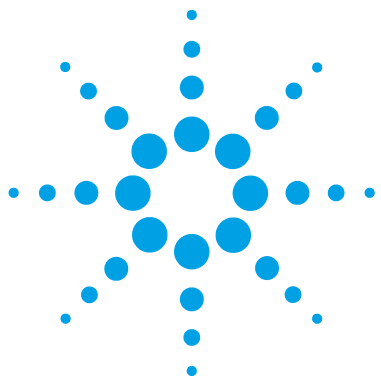
- als ASCII-Textdatei mit der Dateinamenerweiterung .TXT
- im Data Interchange Format mit der Dateinamenerweiterung .DIF
- als kommagetrennte Datei mit der Dateinamenerweiterung .CSV
- im Microsoft Excel-Format mit der Dateinamenerweiterung .XLS

Die Optionen für die Reporterstellung ermöglichen es auch, die Proben unabhängig von der Reihenfolge in der Batch-Tabelle zu sortieren (über den Laufindex, der Probenotyp 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 Probenotyps, 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](#)

In diesem Thema wird das ACAML-Schema erläutert, das bei der intelligenten Reportausgabe der OpenLAB CDS-Software verwendet wird. Außerdem wird eine Referenz zum ACAML-Schema angegeben.



Was ist ACAML?

ACAML, Die *Agilent Common Analytical Markup Language* ist eine Markup-Sprache zum Erfassen und Beschreiben analytischer Daten in der Chromatographie und Spektrometrie. 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. ACAML kann verwendet werden, um analytische Daten auf allgemeine Weise zu beschreiben, d. h. ohne spezielle Aspekte (z. B. ergebnisorientierte Perspektive): 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).

Weitere Informationen zu ACAML finden Sie im OLIR-Designerhandbuch auf der OpenLAB CDS Support-DVD (Datenträger Nr. 6).

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 ein unkontrolliertes Wachstum selbstdefinierter Typen zu verhindern, da dies eine automatisierte Weiterverarbeitung verkomplizieren oder unmöglich machen würde.

Die Schemadefinition stellt sicher, dass jedes Instanzdokument ordnungsgemäß definiert und die Integrität bezüglich Referenzen 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.

Die Schemadefinition der neuesten Version, ACAML.1.4.xsd, ist auf der OpenLAB CDS Support-DVD (Datenträger Nr. 6) enthalten.

Reportausgabe der Faktoren des Arzneimittelbuchs in ChemStation

Mit ChemStation, Edition C.01.04, wurde die Berechnung der Faktoren des Arzneimittelbuchs abgeschlossen. Faktoren aus der Peaktable 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-Reportausgabe

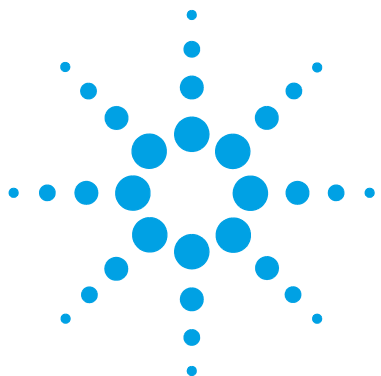
USP	EP	JP	Definition	Klassische Report- erstellung (RLE)	Intelligente Reporterstellung (RTE)
Tailingfaktor	Symmetrie- faktor	Symmetrie- faktor	$S = W_{0,05h} / 2f$	Tailing, USP	Peak_TailFactor
-	Relative Retention (angepasst)	Trennfaktor	$r = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0)$		RelativeRetTime_EP
Relative 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
-	-	-	$R = \frac{(2.35/2)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Auflösung	Peak_Resolution_Classic
Auflösung	-	-	$R_s = 2,0 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 - W_2)$	-	Peak_Resolution_USP
Wirksamkeit			$N = 16 \times (t/W)^2$	Tangentenmethode für Trennböden	Peak_TheoreticalPlates_USP
-	Wirksamkeit	Wirksamkeit	$N = 5,54 \times t_R^2 / W_{0,5h}^2$	Halbhöhenmethode für Trennböden	Peak_TheoreticalPlates_EP

Tabelle 11 Werte aus dem Arzneibuch in der ChemStation-Reportausgabe

USP	EP	JP	Definition	Klassische Report- erstellung (RLE)	Intelligente Reporterstellung (RTE)
Relative Retentions- zeit	Relative Retentions- zeit		$R_r = t_2/t_1$	-	Peak_RelativeRetTime
	Signal/ Rausch-Ver- hältnis	Signal/ Rausch-Ver- hältnis	Signal/Rausch- Verhältnis = $2H/h$	-	Peak_SignalToNoise_EP
Peak-zu-Tal- Quotient	Peak-zu-Tal-Q uotient		$p/v = H_p/H_v$	PeakValleyRatio	Peak_PeakValleyRatio

9 **Reportausgabe**

Reportausgabe der Faktoren des Arzneimittelbuchs in ChemStation



10 Überprüfung des Systems

Ansichten für Überprüfung und Fehlerdiagnose 168

Überprüfung des Systems 168

Das Register "GLPsave" 172

Funktion "DAD Test" (DAD-Test) 174

Funktion „DAD-Test prüfen“ 174

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



Ansichten für Überprüfung und Fehlerdiagnose

Die ChemStation bietet, wenn dies die konfigurierten Instrumente ermöglichen, z. B. die Module der Agilent-Serie 1100/1200, zwei zusätzliche Ansichten für die Überprüfung und Diagnose. Weitere Informationen finden Sie in der Online-Hilfe.

Überprüfung des Systems

Die Systemüberprüfung ist ein Schlüsselbaustein in der Qualitätssicherung des Routinebetriebs eines analytischen Labors. Die Möglichkeiten der ChemStation zur Überprüfung 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 Funktion zur Überprüfung der ChemStation ermöglicht Ihnen die Überprüfung 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 Überprüfung ist besonders wichtig zur Sicherstellung der Zuverlässigkeit der Daten aus Integration und Quantifizierung.

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

Mit dem Befehl "Verification" (Überprüfung) unter "Data Analysis" (Datenanalyse) können Sie eine der folgenden Optionen auswählen:

- Durchführung einer Überprüfung der Datenbank
- Definition eines neuen Verfahrens für eine Überprüfung und Hinzufügen zur Datenbank
- Löschen eines Überprüfungstests aus der Datenbank

Im Abschnitt "How To" des Online-Hilfesystems wird beschrieben, wie diese Aufgaben durchgeführt werden können. Während einer Überprüfung der ChemStation können Sie wählen, ob der gesamte Test oder nur Teile des Test durchlaufen werden sollen.

Die Ergebnisse der Überprüfung werden zusammen mit der Methode und den Datendateien im Binärformat im Standardverzeichnis gespeichert: "C:\CHEM32\1\Verify". Das Unterverzeichnis "Verify" (Überprüfung) steht auf derselben Ebene wie die Verzeichnisse der Sequenzen, Methoden und Datensätze. Sie können die Ergebnisse in eine Datei oder auf einem Drucker ausgeben. Die Testergebnisse einschließlich der Testergebnisse für kombinierte Überprüfungen werden mit "Test bestanden" bzw. "Test nicht bestanden" bewertet.

Für die Überprüfungstests stehen folgende Komponenten zur Verfügung:

Digital Electronics (nur Agilent DAD 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 DAD, die die Daten bearbeitet, richtig funktioniert. Es wird ein gespeichertes Testchromatogramm verwendet, d. h. die Lampe und der Diodenarray sind nicht an diesem Test beteiligt. Sie können wie in ["Funktion "DAD Test" \(DAD-Test\)"](#) auf Seite 174 beschrieben überprüft werden.

Peakintegration

Die Datendatei wird nochmals mit der Originalmethode integriert. Die Ergebnisse werden mit den Original-Integrationsergebnissen verglichen, die im Register "Verification" (Überprüfung) gespeichert sind. Wenn die Werte nicht übereinstimmen, gilt der Test als nicht bestanden.

Quantifizierung der Substanzen

Die Substanzen der Datendatei werden nochmals quantifiziert. Die Ergebnisse werden mit den Original-Integrationsergebnissen verglichen, die im

10 Überprüfung des Systems

Ansichten für Überprüfung und Fehlerdiagnose

Register "Verification" (Überprüfung) gespeichert sind. Wenn die Werte nicht übereinstimmen, gilt der Test als nicht bestanden.

Drucken der Reporte

Der Originalreport wird noch einmal gedruckt.

Folgende Seite zeigt ein Beispiel für einen erfolgreich durchgeführten Verifikationstest.

=====

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 Binärkode 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 aufgeführten Intensitätsspektren dar. Das aktive Spektrum ist markiert. |
| Save as New Database | Wenn Sie die Lampe Ihres DAD auswechseln, können Sie den DAD-Test zurücksetzen, um unerwünschte Testergebnisse aus der Tabelle zu löschen. Anschließend können Sie diese Funktion zum Speichern als eine neue Datenbank verwenden. |
| 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. |

Software-Vokabular

A

all valleys
Alle Täler

Apply Manual Events from Method
Verwenden der manuellen Ereignisse aus der Methode

Area reject
Schwellenwert für die Fläche

Area Sum
Flächensumme

Area Sum Slice
Summe des Flächenabschnitts

Autointegrate
Automatische Integration

Autostep interval
Autostep-Intervall

Average
Mittelwert

B

baseline point
Basislinienpunkt

Batch
Batchverfahren

C

Calculate signals separately
Signale separat berechnen

Calculate with Corrected Areas
Mit korrigierten Flächen berechnen

Calibration Settings
Kalibrierungseinstellungen

capillary isoelectric focusing calibration
Kapillar-isoelektrische Fokussierung

CE Mobility

CE Mobilität

Classical Baseline Tracking (no penetrations)

Klassische Basislinienverfolgung (keine Unterschreitung)

Compound Details

Substanzdetails

D

Data Analysis

Datenanalyse

Delete Peak(s)

Peak(s) löschen

Description

Beschreibung

Destination

Ziel

DNA base-pair calibration

DNA-Basenpaar-Kalibrierung

Draw Baseline

Basislinie zeichnen

E

Effective Mobility Correction

Korrektur der effektiven Mobilität

Extended Statistic Parameters

Erweiterte Statistikparameter

F

Floating Average

Fließender Mittelwert (Floating Average)

G

General Info

Allgemeine Informationen

H

Height reject

Schwellenwert für die Höhe

Height Reject

Schwellenwert für die Höhe

I

Ignore

Ignorieren

Initial Peak Width

Anfangspeakbreite

Instrument curves

Gerätekurven

integration events

Integrationsereignisse

Integration Events Table

Tabelle der Integrationsereignisse

L

Last Result Mode

Letztes-Ergebnis-Modus

M

Manual Events

Manuelle Ereignisse

Manual Integration

manuelle Integration

Method and Run Control

Methoden- und Analysensteuerung

N

Navigation Table
Navigationstabelle

O

operator
Bediener

P

parts of method to run
Auszuführende Methodenteile

peak width
Peakbreite

Peak Width
Peakbreite

peak matching
Peakzuordnung

Preferences
Voreinstellungen

Preferences / Signal/Review
Voreinstellungen/Signal-/Überprüfungsoptionen

Print Current Sequence
Aktuelle Sequenz drucken

protein molecular weight calibration
Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts

Q

Quantitation Settings
Quantifizierungseinstellungen

R

Recalculate
Neuberechnung

Recalculate with Method
Mit Methode neu berechnen

Recalibration Settings
Neukalibrierungseinstellungen

Relative Mobility Correction
Korrektur der relativen Mobilität

Remove Manual Events from Method
Entfernen der manuellen Ereignisse aus der Methode

Replace
Ersetzen

reprocess
Erneut verarbeiten

Reprocessing only
Nur erneute Verarbeitung

Review DAD Test
DAD-Test prüfen

S

Sample Information
Probeninformationen

Save as New Database
Als neue Datenbank speichern

Save Current Sequence
Aktuelle Sequenz speichern

Sequence Output
Sequenzausgabe

Sequence Parameters
Sequenzparameter

Sequence Summary Parameters
Sequenzübersichtparameter

Sequence Table
Sequenztablelle

Shoulder detection
Schulterererkennung

Show Holmium Spectra
Holmiumspektren anzeigen

Show Intensity Graph
Intensitätsdiagramm anzeigen

Show Intensity Spectra
Intensitätsspektren anzeigen

Show Selected Spectra
Ausgewählte Spektren anzeigen

Signal/Review Options
Signal-/Datenprüfungsoptionen

Slope Sensitivity
Steigungsempfindlichkeit

Specify Report
Report angeben

Split Peak
Peak teilen

Start Autostepping
Autostepping starten

Subtract Background
Untergrundsubtraktion

T

Tail Skim Height Ratio
Verhältnis der angepassten Höhen

Tangent Skim
Tangentiale Anpassung

U

Unique Folder Creation
Erstellung eindeutiger Ordner EIN

Update Manual Events of Method
Aktualisierung der manuellen Ereignisse in der Methode

Use Sequence Table Information
Informationen aus Sequenztablelle verwenden

V

Valley Height Ratio
Tal-zu-Höhe-Verhältnis

W

With method
Mit Methode

Index

A

- Ableitung 27
- Absolut
 - Retentionszeit 68
- Analoges Signal 10
- anfängliche Basislinie 19, 20
- Anfangspeakbreite 50
- Anpassungskriterien 41
- Anzahl der Trennböden 119
- Area%
 - Berechnung 88
- Auflösung
 - USP 122
- Automatische Integration 57

B

- Basislinienbestimmung 22, 34
- Basislinienkonstruktion 34
- Basislinienunterschreitung 35
- Basislinienverfolgung 36, 37
- Batch-Reporterstellung
 - Ausgabeformate 160
- Batch-Tabelle
 - Konfiguration 156
 - Probentyp "Removed" (Entfernt) 156
 - Reporterstellung 160
- Berechnung
 - ESTD 90
 - Peaksymmetrie 112
- Bestimmung der Rauschhöhe 104
- Bündelung 28

C

- CI 126

D

- Dateiformate
 - Batch-Report 160
- Datendatei 10
- Datenerfassung 10
- Digitales Signal 10

E

- Endzeit 19
- Ereignisse
 - Integration 50
- ESTD
 - Berechnung 90
 - Verfahren 90
- Externer Standard 90

F

- Farbcodierung 14
- Filter
 - Peakerkennung 27
- Formel für die Systemeignung
 - Peaktailing, USP 118
 - relative Retention 121
 - Symmetriefaktor 118
- Formel für Systemeignung
 - Auflösung 122
 - Kapazitätsfaktor 118
 - Mittelwert 124
 - RSD 125
 - Standardabweichung 124
 - Totvolumen 115

- Formeln für die Systemeignung
 - Peakbreite 118

- Formeln zur Systemeignung
 - Anzahl der Trennböden 119
 - Regressionsanalyse 127

- Formeln
 - Allgemeine Definitionen 115
 - Leistungstest-Definitionen 116

G

- GALP 101
- Gerät
 - Status 14
- GLP 101
- GMP 101

H

- Height%
 - Berechnung 88

I

- Integration
 - Anfangsereignisse 50
 - Manuell 59
- Integrationsereignisse 19, 50

K

- Kalibrier
 - Kurve 78
- Kalibrierkurve
 - Beschreibung einer 78
 - Was ist das? 78
- Kalibrierung
 - Einstellungen 96

Index

Kapazitätsfaktor 118
Kapazitätsverhältnis 118
Konfidenzintervall 126
Kurve
 Kalibrierung 78

L

Leistung
 Testdefinitionen 116
Lösungsmittelpeak 48

M

Manuelle Integration 59
Maximum 19
Mehrere
 Referenzpeaks 72
Methode
 Status 14
Multiplikator 91, 92

N

Negativer Peak 22
Nicht zugeordnete Peaks 44
Norm%
 Berechnung 92
 Report 92

O

Optimierung der Integration 52

P

Peakanfang 30
Peakanpassung im Anstieg 43
Peakbreite
 bei Höhe x% 118
 Tangente 118
Peakende 23, 30
Peakerkennung

Filter 27
Peakfläche 47
Peakmaximum 23, 31
Peak
 Höhe 88
 Leistung 99, 116
 Qualifier 72
 Quantifizierung 84
 Response 72
 Retentionszeitfenster 69
 Symmetrie 112

Peakstart 23
Peak-Trenncodes 44
Peak-zu-Tal-Verhältnis 37
Präzision
 Zahlenformat 129
Prozentuale Berechnung 88

Q

Qualifier 72
Quantifizierung
 ESTD-Verfahren 90
 Was ist das? 84

R

Rauschbestimmung nach ASTM 106
Rauschbestimmung
 ASTM 106
Referenzfenster 69
Referenzpeaks
 mehrere 72
Regressionsanalyse 127
relative Retention 121
relative
 Retentionszeit 66
Reportausgabe
 Werte aus dem
 Arzneimittelbuch 164
Residuale

Standardabweichung 79
Residualwert
 relativer 79
Response
 Verhältnis 72
Retentionszeitfenster 69
Retentionszeit
 Absolut 68
 relative 66

S

Schlüsselpunkte 23
Schräge, 117
Schulterererkennung 51
Schulter 32
Schwellenwert für die Fläche 51
Schwellenwert für die Höhe 51, 52
Selektivität 121
Signal-Rausch-Berechnung
 ohne Referenzsignal 109
Signal 10
Signal-zu-Rausch Verhältnis
 Europäisches Arzneimittelbuch 109
Standardabweichung
 des Mittelwerts 125
 Probe 124
 Relative 125
 Residuale 79
Standard
 Extern 90
Startzeit 19
Statistische Momente 117
Status
 Gerät 14
Steigungsempfindlichkeit 50
Symmetriefaktor
 EP 118
 JP 118
Systemeignung

Grenzen 102
Mit Statistik 101

T

Tailingfaktor t 118
Tangentiale Anpassung 38
Totvolumen 115
t-Verteilung 126

Ü

Überwachung
Gerätestatus 14

U

USP, Tailingfaktor 118

V

Verdünnungsfaktor 91, 92

W

Werte aus dem Arzneimittelbuch 164

Z

Zeitfenster
Retention/Migration 68
zeitgesteuerte Ereignisse 54

Inhalt dieses Buchs

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.

© Agilent Technologies 2010-2012, 2013

Printed in Germany
1/2013



M8301-92024



Agilent Technologies