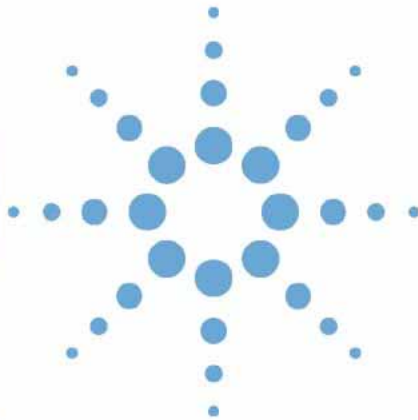


Agilent ChemStation



**Informationen zur
ChemStation für CE-Systeme**



Agilent Technologies

Hinweise

© Agilent Technologies, Inc. 2004, 2005-2008

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

G2172-90024

Ausgabe

07/08

Gedruckt in Deutschland

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

Nur für wissenschaftliche Anwendungen.

Nicht für den Einsatz in medizinischer Diagnostik.

Softwareversion

Dieses Handbuch gilt für die Versionen B.04.xx der Agilent ChemStation Software, wobei xx kleinere Versionsänderungen der Software kennzeichnen, welche die Gültigkeit dieses Handbuchs nicht beeinflussen.

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.

Nutzungsbeschränkungen

Wenn Software für den Gebrauch durch die US-Regierung bestimmt ist, wird sie als „kommerzielle Computer-Software“ gemäß der Definition in DFAR 252.227-7014 (Juni 1955), als „kommerzielle Komponente“ gemäß der Definition in FAR 2.101(a), als „nutzungsbeschränkte Computer-Software“ gemäß der Definition in FAR 52.227-19 (Juni 1987) (oder einer vergleichbaren Agentur- oder Vertragsregelung) ausgeliefert und lizenziert. Nutzung, Vervielfältigung oder Weitergabe von Soft-

ware unterliegt den standardmäßigen Bestimmungen für kommerzielle Lizenzen von Agilent Technologies. US-Regierung und -Behörden (außer Verteidigungsministerium) erhalten keine Rechte, die über die Rechte an „nutzungsbeschränkter Computer-Software“ gemäß FAR 52.227-19(c)(1-2) (Juni 1987) hinausgehen. Zur US-Regierung zählende Benutzer erhalten keine Rechte, die über die Rechte an „nutzungsbeschränkter Computer-Software“ gemäß FAR 52.227-14 (Juni 1987) oder DFAR 252.227-7015 (b)(2) (November 1995) hinausgehen, soweit in irgendwelchen technischen Daten anwendbar.

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

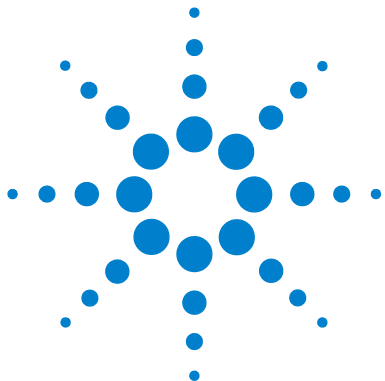
Ein **WARNUNG**-Hinweis macht auf Arbeitsweisen, Anwendungen o.ä. aufmerksam, die bei falscher Ausführung zu Personenschäden, u. U. mit Todesfolge, führen können. Wenn eine Prozedur mit dem Hinweis **WARNUNG** gekennzeichnet ist, dürfen Sie erst fortfahren, wenn Sie alle angeführten Bedingungen verstanden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

Inhaltsangabe

Dieses Handbuch beschreibt spezielle Funktionen der ChemStation für CE-Systeme wie die Tabelle "Vial" (Probenflaschen), auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen, Mobilitätskorrektur, Reportformate und Berechnungen.

Inhalt

1	Spezifische CE-Funktionen der Agilent ChemStation in der Ansicht "Method and Run Control" (Methoden- und Analysenlaufsteuerung)	5
	Tabelle "Vial" (Probenflasche)	6
	Tabelle "Method Conflict" (Methodenkonflikt)	8
	Tabelle "Sequence Conflict" (Sequenzkonflikt)	9
	Methodensimulation	10
2	Peakspitzentyp	11
3	Kalibriertabellen	13
	Kalibrierarten	14
	Auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen	17
4	Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur	19
	Einleitung	20
	Berechnungen der effektiven Mobilität	21
	Berechnungen der relativen Mobilität	25
5	Andere CE-spezifische Funktionen	27
	Spezielle Reportstile für die Kapillarelektrophorese	28
	Korrigierte Peakflächen	29
	Systemeignungstest für die Kapillarelektrophorese	30
	CE-MSD	31
	Methoden-Unterverzeichnisse für unterschiedliche CE-Modi	32



1 Spezifische CE-Funktionen der Agilent ChemStation in der Ansicht "Method and Run Control" (Methoden- und Analysenlaufsteuerung)

Tabelle "Vial" (Probenflasche) 6

Tabelle "Method Conflict" (Methodenkonflikt) 8

Tabelle "Sequence Conflict" (Sequenzkonflikt) 9

Methodensimulation 10



1 Spezifische CE-Funktionen der Agilent ChemStation in der Ansicht "Method and Run Control" (Methoden- und Analysenlaufsteuerung)

Tabelle "Vial" (Probenflasche)

Tabelle "Vial" (Probenflasche)

HINWEIS

Die Funktion **Vial Table** steht nur in der Online-Sitzung der ChemStation zur Verfügung.

Die **Vial Table** ist eine Tabelle, welche die Probenflaschen im Probenteller nicht nur mit Proben, sondern auch mit aufgabenspezifischen Probenflaschen, z. B. Puffer, Spülflaschen, Probenflaschen für saubere Röhrchen und Auffanggefäß, verknüpft. Die **Vial Table** ist mit der Sequenztabelle verknüpft. Beim Laden einer Sequenz werden die Informationen aus der Sequenztabelle in die Tabelle "Vial" (Probenflasche) kopiert. Die Einträge in der Tabelle "Vial" (Probenflasche) werden jedoch nicht in die Sequenztabelle zurück übertragen. Das Dialogfeld **Vial Table Advanced Settings** wird angezeigt, wenn Sie in **Vial Table** auf die Schaltfläche **Advanced** klicken. In diesem Dialogfeld können Sie Warnmeldungen zu Konflikten zwischen der **Vial Table** und der Methode oder Sequenz und die Verwendung symbolischer Namen aktivieren. Um zu überprüfen, ob zwischen der **Vial Table** und der Methode und Sequenz Konflikte bestehen, müssen Sie die Option **Enable vial table checks and warnings** wählen.

Beim Laden einer Methode oder Sequenz werden die Zuordnungen der Probenflaschen in der **Vial Table** und die Zuordnungen in der Methode oder Sequenz auf Übereinstimmung hin überprüft. Wenn zwischen den Zuordnungen der Probenflaschen Konflikte vorhanden sind, können diese mit Hilfe der Tabellen **Conflict** leicht behoben werden.

HINWEIS

Position 49 im Probenteller wird für die Nadel-Waschflasche verwendet und Position 50 bleibt leer, um die Hebevorrichtung in die Ausgangsposition zurückzufahren. Diese Positionen sind in der **Vial Table** nicht enthalten.

Die Spalte **Used in** der Tabelle "Vial" (Probenflasche) ermöglicht die Verwendung der angegebenen Probenflasche. Für die Felder **Used in** gibt es fünf gültige Einträge:

- Don't Care** Keine Prüfung auf Übereinstimmung erfolgt
- Method** Die Probenflasche ist in der Methode aufgeführt

Spezifische CE-Funktionen der Agilent ChemStation in der Ansicht "Method and Run Control" (Methoden- und Analysenlaufsteuerung)¹

Tabelle "Vial" (Probenflasche)

Sequence	Die Probenflasche ist in der Sequenztabelle aufgeführt
System	<p>Dies ist eine spezielle Probenflasche, die zur Systemkonfiguration gehört. Der Name muss einer der folgenden symbolischen Namen sein:</p> <ul style="list-style-type: none">• @INLET die Einlass-Probenflasche• @OUTLET die Auslass-Probenflasche• @FLUSH die Wasch-Probenflasche• @WASTE das Auffanggefäß• @clean tubes die Probenflasche, die für das Reinigen der Auffüllleitungen verwendet wird• @USER X (wobei X ein Wert zwischen 1 und 10 sein kann) als Sequenz-Platzhalter <p>Diese Option ermöglicht die Angabe einzelner Probenflaschennummern für die symbolischen Namen, die in der Methode verwendet werden. Auf diese Weise kann der Benutzer unterschiedliche Probenflaschen für "Inlet Home" (Einlass-Ausgangsposition), "Outlet Home" (Auslass-Ausgangsposition), "Replenishment" (Auffüllen), "Preconditioning" (Vorbereitung), "Postconditioning" (Nachbereitung) usw. für jede Zeile in der Sequenz angeben.</p>
Not Used	An dieser Position ist keine gültige Probenflasche vorhanden.

1 Spezifische CE-Funktionen der Agilent ChemStation in der Ansicht "Method and Run Control" (Methoden- und Analysenlaufsteuerung)

Tabelle "Method Conflict" (Methodenkonflikt)

Tabelle "Method Conflict" (Methodenkonflikt)

Die **Method Conflict Table** wird angezeigt, wenn Sie eine Methode laden, in der Probenflaschen definiert sind, die einen Konflikt mit den in der Tabelle "Vial" (Probenflasche) definierten Probenflaschen verursachen. Die **Method Conflict Table** ist in zwei Hälften aufgeteilt. Die linke Hälfte enthält ein Abbild der **Vial Table** und die rechte Hälfte zeigt die Konflikt verursachenden Probenflaschen.

Zum Beheben dieser Konflikte können Sie die Probenflasche entweder ersetzen (Einzelpfeil) oder sie aus der Methode an die nächste freie Position in der **Vial Table** verschieben (Doppelpfeil). Dieser Vorgang kann für jede Probenflasche in der Tabelle ausgeführt werden, die einen Konflikt verursacht

Wenn benutzerdefinierte Probenflaschen (mit symbolischen Namen wie @User1, @User2) verwendet werden, kann der Konflikttest für diese Probenflaschen nicht ausgeführt werden, da ohne die Sequenzinformationen nicht ermittelt werden kann, ob ein Konflikt vorhanden ist oder nicht. []

Tabelle "Sequence Conflict" (Sequenzkonflikt)

Die **Sequence Conflict Table** wird angezeigt, wenn Sie eine Methode einrichten oder laden, in der Probenflaschen definiert sind, die einen Konflikt mit den in der Probenflaschentabelle definierten Probenflaschen verursachen. Die **Sequence Conflict Table** ist in zwei Hälften aufgeteilt. Die linke Hälfte enthält ein Abbild der **Vial Table** und die rechte Hälfte zeigt die Konflikt verursachenden Probenflaschen.

Zum Beheben der Konflikte können Sie die Informationen in der **Vial Table** mit den Informationen aus der **Sequence Table** überschreiben. Wenn der Konflikt von einem Systemeintrag verursacht wird, kann der Eintrag nicht überschrieben werden. Sie können die **Sequence Conflict Table** auch schließen, ohne die Konflikte zu lösen.

Wenn benutzerdefinierte Probenflaschen (in den Spalten @User1, @User2 usw.) verwendet werden, kann der Konflikttest für diese Probenflaschen nicht ausgeführt werden, da ohne die Methodeninformationen nicht ermittelt werden kann, ob ein Konflikt vorhanden ist oder nicht.

1 Spezifische CE-Funktionen der Agilent ChemStation in der Ansicht "Method and Run Control" (Methoden- und Analysenlaufsteuerung)

Methodensimulation

Methodensimulation

Zum Überprüfen der Methode können Sie die Simulationsfunktion verwenden. Während der Simulation reflektiert das Diagramm die Aktionen, die für die Methode ausgeführt würden, d. h., die in der Methode angegebenen Probenflaschen werden für die Hebevorgänge angezeigt und Strom und Spannung werden so angezeigt, wie sie in einem tatsächlichen Analysenlauf angewendet werden würden. Die Simulation ist schneller als eine Analyse: Jeder Schritt dauert ca. 3 Sekunden. Ein Schritt entspricht einer Änderung im CE-Diagramm.

Um die Simulation zu starten, laden Sie die zu simulierende Methode und wählen Sie **Simulation** im Menü **Instrument**.



2 Peakspitzentyp

Anders als LC-, GC- oder MS-Peaks können CE-Peaks durchaus asymmetrisch sein. Daher ist die Möglichkeit, Integrationsparameter auszuwählen, um die höchste Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu erzielen, sehr wichtig für die quantitativen Ergebnisse.

Die folgenden Peakspitzentypen sind verfügbar, wenn Sie im Dropdown-Menü **Integration** die Option **Peak Top Type** wählen:

Highest Point (Höchster Punkt)

- wird ausgewählt, wenn der Peak dreieckig ist
- wenn unterschiedliche Konzentrationen verwendet werden

Parabolic Interpolation (Parabolische Interpolation)

- wird für das Tailing nicht getrennter Peaks verwendet

Center of Gravity (Schwerpunkt)

- bietet genauere Berechnungen bei dreieckigen Peaks
- Proben mit ähnlichen Konzentrationen

Gauss Fit (Gauß-Anpassung)

- wird für symmetrische Peaks verwendet



2 Peakspitzentyp

Methodensimulation



3 Kalibriertabellen

Kalibrierarten 14

Auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen 17



Kalibrierarten

In der Dropdown-Liste für die Kalibriertabelle sind vier unterschiedliche Kalibrierarten verfügbar.

- **Standard Calibration**
- **Protein Molecular Weight Calibration**
- **DNA Base-Pair Calibration**
- **Capillary Isoelectric Focusing Calibration**

Standardkalibrierung

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

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

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

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

Quantifizierungsaufgaben können nun 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

3 Kalibriertabellen Kalibrierarten

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

Kalibrierung der Kapillar-isoelektrischen 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).

Auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen

Auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen in einer Sequenz verwenden

Auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen und Neukalibrierungen können in eine Sequenz einbezogen werden. Es werden jedoch nur explizite Kalibrierungen und zyklische Neukalibrierungen unterstützt. Umschließende Neukalibrierungen werden nicht unterstützt. Für auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen ist kein Sequenz-Übersichtsreport verfügbar.

Reportstile für auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen

Die für auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen verfügbaren Reportstile sind auf **Short** (quantitative Testergebnisse) und **Full Reports** (Kopfzeile, Probeninformationen, Instrumentenbedingungen, Logbuch, quantitative Ergebnisse und Peakreinheitsdiagramm) begrenzt.

3 Kalibriertabellen

Auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen



4 Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

Einleitung 20

Berechnungen der effektiven Mobilität 21

Berechnungen der relativen Mobilität 25



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 1 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.

4 Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

Berechnungen der effektiven Mobilität

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

Allgemein

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

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

wobei

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

L die Gesamtlänge der Kapillare ist

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

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

Wenn $t < t_R$, dann

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

Wenn $t > t_R$, dann

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

wobei

t die Migrationszeit des Referenzpeaks ist

t_R die Anstiegszeit ist

V die Endspannung ist

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

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

Die relative oder scheinbare Mobilität ist dann

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

Die effektive oder tatsächliche Mobilität ist

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

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.

4 Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

Berechnungen der effektiven Mobilität

Neukalibrierung

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

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

Anschließend wird die erwartete Migrationszeit der einzelnen Peaks angepasst:

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

Dann werden die Mobilitätswerte aktualisiert:

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

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

Berechnungen der relativen Mobilität

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

Allgemein

Genau wie bei Berechnungen der effektiven Mobilität wird der Koeffizient

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

4 Kalibrierung unter Verwendung der Mobilitätskorrektur

Berechnungen der relativen Mobilität

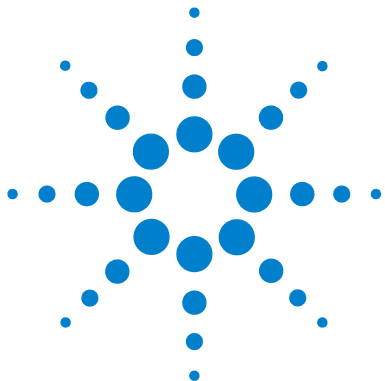
Mobilitätsberechnung

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

$$t_{new\exp N} = \frac{k(t_{old\exp N})}{(k(t_{exp\cal N})/t_{exp\cal N} - k(t_{ref\cal})/t_{ref\cal}) + k(t_{refact})/t_{refact}}$$

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

$$t_{ref\cal} = t_{refact}$$



5 Andere CE-spezifische Funktionen

Spezielle Reportstile für die Kapillarelektrophorese	28
Korrigierte Peakflächen	29
Systemeignungstest für die Kapillarelektrophorese	30
Kapazitätsfaktor k'	30
CE-MSD	31
Untergrundsubtraktion	31
Methoden-Unterverzeichnisse für unterschiedliche CE-Modi	32



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

CE-MSD

Untergrundsubtraktion

Wenn Sie die Option **Subtract Background** (BSB) wählen, wird das zuletzt ausgewählte Massenspektrum von den einzelnen Punkten im aktuellen Elektropherogramm subtrahiert. Die 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.

5 Andere CE-spezifische Funktionen

Methoden-Unterverzeichnisse für unterschiedliche CE-Modi

Methoden-Unterverzeichnisse für unterschiedliche CE-Modi

Methoden in CE sind abhängig vom ausgewählten CE-Modus. Daher werden sie im Unterverzeichnis "Method" in unterschiedlichen Unterverzeichnissen gespeichert:

- CE** Enthält Methoden für den CE-Modus
- CEC** Enthält Methoden für den CEC-Modus
- CEp** Enthält Methoden für den Modus CE plus Druck
- CEMS** Enthält Methoden für den Modus CE-MS
- CEMSp** Enthält Methoden für den CE MS plus-Druckmodus

Begiffserklärung

@

@clean tubes
@Leitungsreinigung
@FLUSH
@SPÜL
@INLET
@EINLASS
@OUTLET
@AUSLASS
@USER X
@BEABEITER X
@WASTE
@ABFALL

A

Advanced
Erweitert

C

Calculate Signals Separately
Signale separat berechnen
Calculate with Corrected Areas
Mit korrigierten Flächen berechnen
Capillary Isoelectric Focusing Calibration
Kalibrierung der Kapillar-isoelektrischen Fokussierung
CE Mobility
CE Mobilität
Conflict
Konflikt

D

DNA base-pair calibration
DNA-Basenpaar-Kalibrierung

DNA Base-Pair Calibration
Kalibrierung des DNA-Basenpaars

E

Effective Mobility Correction
Korrektur der effektiven Mobilität
Enable vial table checks and warnings
Überprüfung und Warnmeldungen der Probenflaschentabelle aktivieren

F

Full
vollständige

I

Ignore
Ignorieren

M

Method Conflict Table
Tabelle Methodenkonflikt

P

Peak Top Type
Peakspitzentyp
peak matching
Peakzuordnung
protein molecular weight calibration
Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts
Protein molecular weight calibration
Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts
Protein Molecular Weight Calibration

Kalibrierung des Protein-Molekulargewichts

R

Relative Mobility Correction
Korrektur der relativen Mobilität

S

Sequence Conflict Table
Tabelle Sequenzkonflikt
Sequence Table
Sequenztable
Short
kurze
Standard Calibration
Standardkalibrierung
Standard Calibration
Standardkalibrierung
Subtract Background
Untergrundsubtraktion

U

Used in
Verwendet in

V

Vial Table
Tabelle "Vial" (Probenflasche)
Vial Table Advanced Settings
Erweiterte Einstellungen für die Probenflaschentabelle
Vial Table
Tabelle "Vial" (Probenflasche)

Begiffserklärung

Inhaltsangabe

Die Agilent ChemStation für CE-Systeme verfügt über eine Vielzahl an besonderen Funktionen für CE-Systeme zur Arbeitsoptimierung und Datenanalyse für diese spezielle Analysetechnik.

Dieses Handbuch beschreibt diese Funktionen, darunter die Tabelle "Vial" (Probenflasche), auf Migrationszeit basierende Kalibrierungen, Mobilitätskorrektur, Reportformate und Berechnungen.

© Agilent Technologies 2004, 2005-2008

Printed in Germany
07/08



G2172-90024



Agilent Technologies