

**INTEGRATION VON PEAKFLÄCHEN
MIT CHROMELEON™ 7.2.**



#1: DIE PEAKDEFINITION

Ein Peak wird mittels einer klaren Unterscheidung des Signal-Rauschens definiert. Im Allgemeinen gilt, dass ein Signal, das dreimal höher ist als das Rauschen (**Limit of Detection**), einen Peak darstellt. Darüber hinaus können Peaks, die mindestens zehnfach höher sind als das Rauschen, verlässlich mittels Integration quantifiziert werden (**Limit of Quantification**). Darüber hinaus muss in jedem Falle auf die Peakbegrenzungen geachtet werden. Ist der Peak symmetrisch und reicht auf beiden Seiten bis zur Basislinie herunter? Gibt es Schultern oder Reiter? Verläuft das Chromatogramm zwischen zwei Peaks tatsächlich bis zur Basislinie oder sind die Peaks nicht eindeutig getrennt? Gerade bei auftretenden Schultern, Reitern oder nicht aufgelösten Peakgruppen bietet Chromeleon viele Möglichkeiten, den Umgang damit automatisiert zu definieren.

#2: DER COBRA-ALGORITHMUS

Mit dem Cobra Algorithmus kann ein repräsentatives Chromatogramm einer Sequenz ausgewertet werden. Dabei sollen die Peaks ausgeschlossen werden, die nicht von Relevanz für die Peak-Integration sind. Die Bestimmung der Integrationsempfindlichkeit erfolgt dabei in 4 Schritten.

- ▶ Festlegen des Zeitraums, in dem integriert werden soll (**Inhibit Integration**)
- ▶ Ermitteln des Bereiches des Basislinienrauschens (**Baseline Noise Range**)
- ▶ Ermitteln der Peakbegrenzungen über die Glättungsbreite (**Smoothing Width**)
- ▶ Einstellen des kleinsten relevanten Flächenwertes (**Minimum Area**)

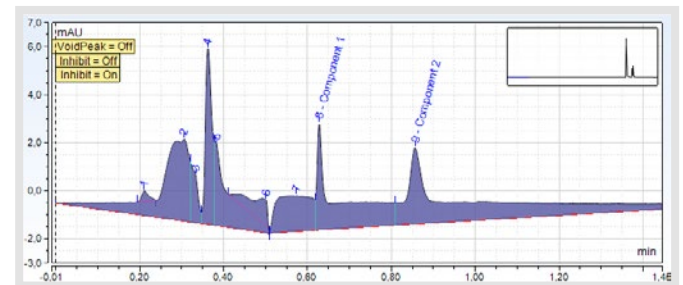


Abbildung 1: Deaktivierte Consider Void Peak Funktion

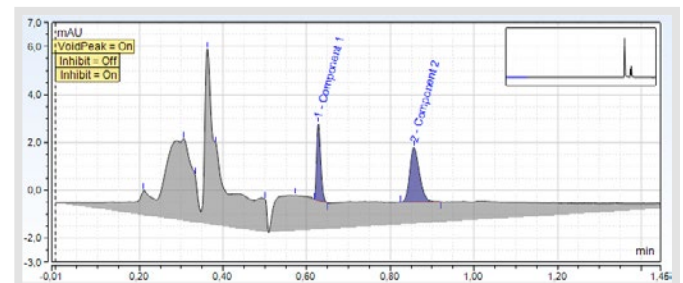


Abbildung 2: Aktivierte Consider Void Peak Funktion.

INTEGRATIONSBEREICH: Über die Start- und Endzeit kann geregelt werden, welche Bereiche nicht integriert werden. So kann ein Injektionspeak oder auch ein durch einen Umspülschritt auftretender Peak von der Integration ausgeschlossen werden, indem die Integration danach startet oder davor endet. Besteht bereits eine Komponententabelle, so kann über die Funktion Consider Void Peak ein negativer Injektionspeak automatisch erkannt und von der Integration ausgeschlossen werden (Abbildung 1 und Abbildung 2).

BASELINE NOISE RANGE: Der Cobra Algorithmus bietet die Möglichkeit, den im Chromatogramm gewählten Bereich zur Bestimmung des Basislinienrauschens entweder manuell oder automatisch festzulegen. Wird der Bereich manuell eingestellt, so gilt der gewählte Bereich für alle Injektionen der Sequenz, welche mit der aktuellen Processing Method verbunden sind. Wird der automatische Bereich gewählt, wird von Cobra in jedem Chromatogramm der Bereich zur Bestimmung des Basislinienrauschens genommen, in dem das Rauschen besonders klein ist. Bei manueller Auswahl ist zu beachten, dass das Rauschen charakteristisch sein sollte. Dabei ist insbesondere wichtig, dass nicht aus Versehen ein Peak im Bereich enthalten ist (Abbildung 3).

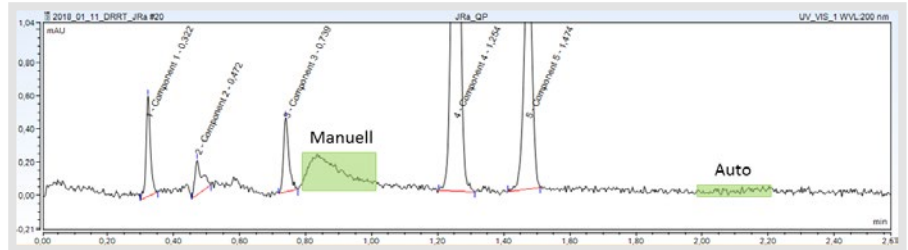


Abbildung 3: Baseline Noise Range über die Auto-Bestimmung und über die manuelle Bestimmung.

GLÄTTUNGSBREITE (SMOOTHING WIDTH): Dieser Parameter ist entscheidend für die korrekte Bestimmung von Peakstart und -ende. Dabei gibt es drei Möglichkeiten: Es kann der von Cobra automatisch ermittelte Wert übernommen werden, es kann manuell ein Wert eingegeben werden oder es kann interaktiv ein Peak angeklickt werden. Dann wird der Wert der halben Peakbreite bei 50% Peakhöhe übernommen. Es sollte grundsätzlich in etwa die halbe Peakbreite bei 50% Peakhöhe des schmalsten Peaks von Interesse als Richtwert angelegt werden, da andernfalls die Integration zu empfindlich oder unempfindlich ist.

MINIMUM AREA: Über die Minimum Area wird der kleinste Flächenwert bestimmt, der für die Datenauswertung von Interesse ist. Dies stellt die erste Filteroption der anhand von Glättungsbreite und Rauschen integrierten Peaks dar. Auch bei der Ermittlung der Minimum Area gibt es drei Möglichkeiten: Es kann der von Cobra automatisch ermittelte Wert übernommen werden, es kann manuell ein Wert eingegeben werden oder es kann interaktiv ein Peak angeklickt werden. Dann wird der Flächenwert des angeklickten Peaks als Minimum Area übernommen.

#3: DER SMART PEAKS INTEGRATION ASSISTANT

Der Smart Peaks Integration Assistant bietet die Möglichkeit über definierte Zeiträume des Chromatogramms zu bestimmen, wie mit nicht aufgelösten Peakgruppen oder Reitern umgegangen werden soll.

Je nach Komplexität des Problems gibt es dabei zwei bis fünf Möglichkeiten, die zur Auswahl stehen:

- ▶ Lotfällung (**Drop Perpendicular**) (Abbildung 4): Bei der Lotfällung wird am Minimum zwischen zwei Maxima das Lot gefällt. Die Empfindlichkeit hängt direkt von der Minimum Area ab. Je nach Einstellung der Glättungsbreite können Schultern, bei denen kein Minimum vorliegt, mitunter trotzdem über die Lotfällung abgetrennt werden. Die Lotfällung stellt das Worst Case Szenario dar.
- ▶ Tal zu Tal (**Valley to Valley**) (Abbildung 5): Bei dieser Variante wird die Basislinie zu jedem vorhandenen Minimum gezogen, sofern die entstehende Fläche größer ist als die Minimum Area. Mit diesem Parameter können z. B. Peaks in einer Drift automatisiert gut integriert werden.
- ▶ Tangentielle Reiterabtrennung am unteren Peakende (**Tangential Rider Skim at lower Peak End**) (Abbildung 6): Bei dieser tangentiellen Reiterabtrennung wird die Tangente am niedrigeren Peakende angelegt und zum Minimum auf der anderen Seite des Peaks geführt.
- ▶ Tangentielle Reiterabtrennung an beiden Peakenden (**Tangential Rider Skim at both Peak Ends**) (Abbildung 7): Diese Variante legt an beiden Peakenden die Tangente an. Die Flächen der Reiter oder Schultern sind bei dieser Variante zumeist größer als bei der zuvor aufgeführten tangentiellen Variante. Generell sind die Peakflächen des kleineren Peaks bei den tangentiellen Varianten immer kleiner als der reale Wert, bei der Lotfällung (Abbildung 4) hingegen sind die Werte zu groß.

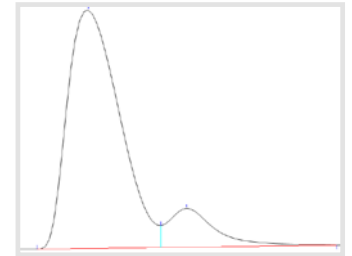


Abbildung 4: Lotfällung.

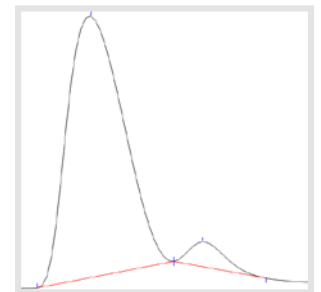


Abbildung 5: Tal zu Tal.

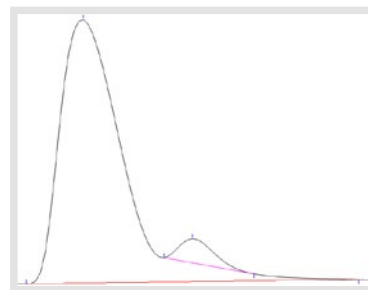


Abbildung 6: Tangentiell am unteren Peakende.

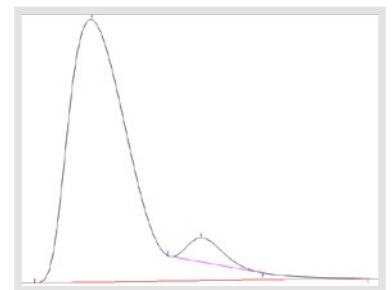


Abbildung 7: Tangentiell an beiden Peakenden.

- › Exponentielle Reiterabtrennung (**Exponential Rider Skim**) (Abbildung 8) Bei der exponentiellen Reiterabtrennung wird bei dem als Main Peak behandelten Peak ein exponentieller Verlauf der Peaklinie zur Basislinie zugrunde gelegt. Die restliche Fläche wird dann dem Reiter oder der Schulter zugeordnet. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die aufgesetzten Peaks den Bezugspeak von der Peakhöhe her anheben und somit auch das Peakmaximum verschieben können. Grundsätzlich lässt sich jedoch festhalten, dass gemessen an wissenschaftlichen Standards die exponentielle Variante den geringsten Fehler aufweist und somit den echten Peakflächen vom Ergebnis her am nächsten kommt.

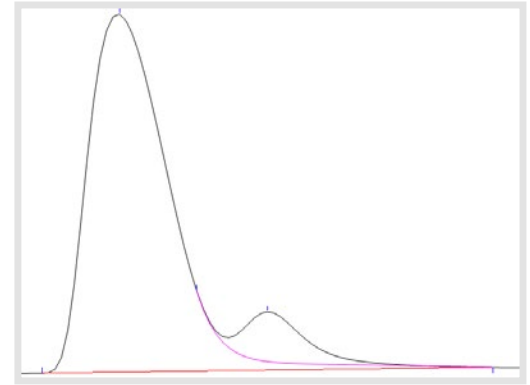


Abbildung 8: Exponentiell.

#4: WEITERE DETEKTIONSPARAMETER

Das Einfügen weiterer Parameter ermöglicht es darüber hinaus, zusätzliche weitere Einstellungen vorzunehmen. Es gibt über 25 Parameter, die angewendet werden können. Im Folgenden sollen drei davon etwas näher erläutert werden: **Baseline Point**, **Peak Group** und **Snap Baseline**.

Der Parameter **Baseline Point** fügt exakt an der gewählten Position einen Basislinienpunkt ein. Das heißt, dass an dieser Stelle imaginärer Verlauf der Basislinie und Basislinie zusammengeführt werden. So kann über diesen Parameter zum Beispiel ein Peakende oder -beginn genau festgelegt werden. Auch ist es möglich so beispielsweise die Integration eines starken Driftes zu eliminieren (Abbildung 9).

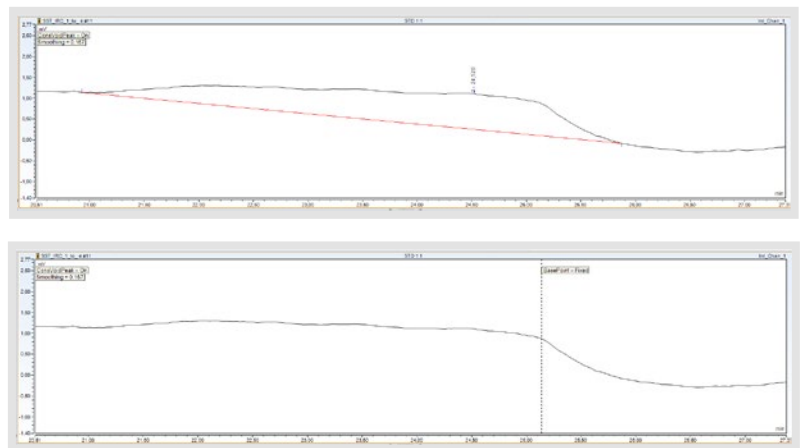


Abbildung 9: Integration der Drift ohne eingefügten Parameter (oben) und keine Integration mit eingefügtem Parameter (unten).

Über den Parameter **Peakgroup** kann Beginn und Ende einer Gruppe von Peaks festgelegt werden, die dann als eine Fläche integriert und ausgewertet werden (Abbildung 10). Dabei kann als Option die Funktion Auto gewählt werden oder Fixed. Bei der Option Fixed wird der Beginn/das Ende der Peakgruppe exakt dort gesetzt, wo der Parameter gesetzt wurde. Im Falle der Option Auto wird von Chromeleon ein geeigneter Start/Ende der Integration gesetzt.

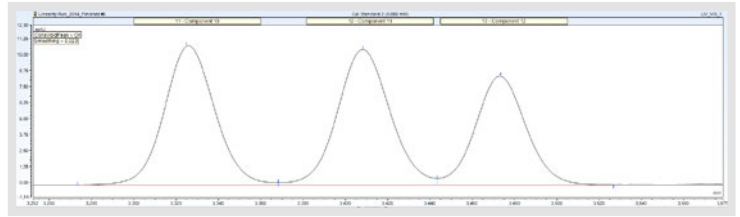


Abbildung 10: Integration der 3 Peaks als eine Peakgruppe mit einer ausgegebenen Fläche.

Der Parameter **Snap Baseline** ist direkt mit der **Minimum Area** verknüpft, die bereits bei der Cobra Detektion behandelt wurde. Ist die Minimum Area auf den Wert 0 gesetzt, so hat der Parameter Snap Baseline sowohl „On“ als auch „Off“ den gleichen Einfluss. Dabei wird die Basislinie auf dem Level, bei dem der Parameter gesetzt wurde, gelockt und alle Peaks auf diese virtuelle Basislinie mit Lotfällung integriert (Abbildung 11).

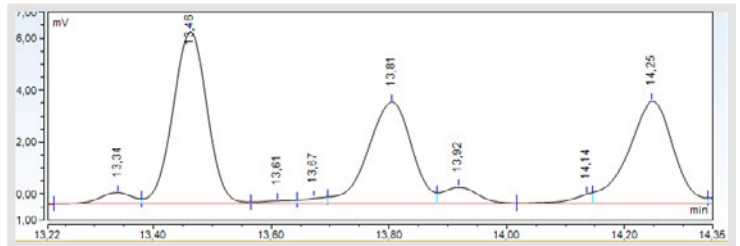


Abbildung 11: Integration mit einer Minimum Area von 0 und eingefügtem Snap Baseline Parameter.

Wird die Minimum Area auf einen höheren Wert gesetzt und für Snap Baseline „On“ gewählt, so werden alle Peaks mit einer ausreichend großen Peakfläche mit dem Valley to Valley Algorithmus integriert (Abbildung 12).

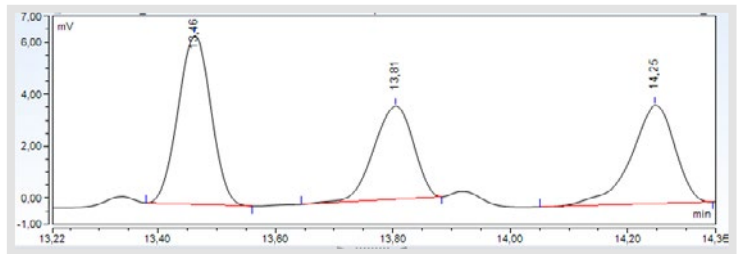


Abbildung 12: Integration mit einer Minimum Area größer 0 und Snap Baseline auf „On“.

Wird dabei der Parameter Snap Baseline auf „Off“ gesetzt, so wird das ursprüngliche Level der Basislinie wieder angewendet und alle Peaks mit ausreichend großer Peakfläche auf dieses Niveau mit Lotfällung integriert (Abbildung 13).

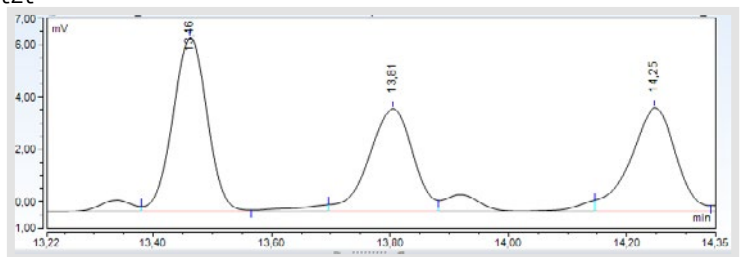


Abbildung 13: Integration mit einer Minimum Area größer 0 und Snap Baseline auf „Off“.

DR. JULIAN RAMCKE

Life Science Consultant, Qpliance GmbH

Julian Ramcke hat Chemie an der Universität Hamburg studiert und nach abgeschlossener Promotion zunächst im Bereich Korrosionsschutz und Schmierstoffe gearbeitet. Seit November 2017 ist er bei der Qpliance GmbH beschäftigt. Hier befasst er sich mit den Themen Consulting, GMP sowie Validierungsdokumentation und ist von Thermo Fisher zertifizierter Chromeleon Trainer.

E-Mail: julian.ramcke@qpliance.com

www.qpliance.com





Qpliance GmbH

Marie-Curie-Str. 3 | 14656 Brieselang

Tel.: +49 (0) 3 32 32 46 47 43

Mobil: +49 (0) 163 2 04 49 22

info@qpliance.com

www.qpliance.com