

Die Dekonvolution als Methode zur Quantifizierung überlagerter chromatographischer Peaks

Mike Hillebrandt (1), Hans-Joachim Kuss (2), Stavros Kromidas (3)

In der chromatographischen Methodenentwicklung ist es bei komplexen Proben und/oder Matrices oft nicht möglich, Peaks basisliniengetrennt zu eluieren, sie können sich überlagern. Dies führt dazu, dass die Einzelkomponenten nicht mehr als Einzelpeaks quantifizierbar sind und daher erst separiert werden müssen. Nun steht der Analytiker vor der Entscheidung, welche Methode er zur Trennung verwenden soll. Nachfolgend wird eine Möglichkeit aufgezeigt, wie man auch in schwierigen Situationen dennoch zur „richtigen“ Integration kommen kann.

Bemerkung

Unter „Trennung“/„Abtrennung“ ist in vorliegender Arbeit nicht die chromatographische Abtrennung von Substanzen gemeint, vielmehr wird unter „Trennung“ das rechnerische Auseinanderdividieren von chromatographisch nicht-aufgelösten Peaks verstanden.

Zur Abtrennung von überlagerten Peaks in Integrationssystemen kommen nur wenige Methoden zur Anwendung. Die in der Praxis am häufigsten verwendeten sind die Lotfällung („Drop“) sowie die tangentielle Abtrennmethode (Tangential Skim“), die allerdings nur in Spezialfällen anwendbar ist. Manche Integrationssysteme erlauben zusätzlich die exponentielle („Exponential Skim“) und die Gaussabtrennmethode („Gaussian Skim“). Diese Abtrennmethoden liefern je nach Grad der Überlagerung und Anwendung enorm große Abweichungen zur „wahren“ Peakfläche. Um den gemachten Fehler einschätzen zu können, besteht die Möglichkeit mit MS-EXCEL eine Simulation des vorhandenen Chromatogramms anzufertigen, bei welchem die Sollflächen jeder Komponente bekannt sind [1]. Diese kann dann in ein Dateiformat umgewandelt werden, die eine Bearbeitung im Chromatographie-Daten-System erlaubt.

Eine wirkliche Möglichkeit zur Trennung von überlagerten Peaks bietet die Dekonvolution. Die Form basisliniengetrennt eluierender Peaks ist bekannt. Diese kann abhängig von der Peaksymmetrie durch verschiedene theoretische Modelle beschrieben werden. Am Gängigsten sind das Gausspeakmodell [2] für symmetrische sowie das Exponentially Modified Gaussmodell (EMG-Modell) [2,3] für asymmetrische Peaks. Es existiert noch eine Vielzahl weiterer, auf die jedoch hier nicht weiter eingegangen wird. Da das Chromatogramm bei überlagerten Peaks eine Addition von Einzelpeaks darstellt, ist die Anwendung der Dekonvolution nahe liegend. Unter Dekonvolution versteht man, bezogen auf überlagerte Peaks, eine Kurvenapproximation über ein mathematisches Modell. Dies bedeutet, dass die Summenkurve eines Chromatogramms unter Zuhilfenahme theoretischer Peakmodelle wieder in die einzelnen Summanden, d.h. Einzelpeaks der Komponenten, zerlegt wird.

Zur Veranschaulichung wird nachfolgend ein von A.W. Westerberg im Jahre 1969 veröffentlichter Report eines chromatographischen Laufs [4] in eine Simulation überführt und anschließend durch die Lotfällung sowie mittels Dekonvolution ausgewertet. Anschließend werden die Ergebnisse mit einander verglichen.

In der verwendeten Arbeit beschreibt A.W. Westerberg schon vor nahezu 40 Jahren die Nachteile der Lotfällung bei überlagerten Peaks und empfiehlt eine Kurvenanpassung.

Zur Simulation werden die Retentionszeit, die Standardabweichung der Retentionszeit als Peakbreitenparameter und die Fläche benötigt. Die zur Simulation erforderliche Retentionszeit kann direkt aus dem Report entnommen werden. Über die Fläche A und Höhe H kann man unter Verwendung von Gleichung 1, die zur Simulation benötigte Standardabweichung s_p der Peaks berechnen.

$$s_p = \frac{A}{H \cdot \sqrt{2\pi}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Um den Peakflächenfaktor in $\mu\text{V min}$ zu erhalten, wird die Fläche, welche in V s vorliegt, erst in $\mu\text{V s}$ umgerechnet und dann durch 60 dividiert. Die erhaltenen Parameter werden in die Matrix der EXCEL-Simulationstabelle (detaillierte Anleitung zur Erstellung bzw. auf beiliegender CD siehe [5]), eingegeben und ein Rauschen von $10 \mu\text{V}$ zugefügt. Um die zu empfohlene Anzahl von 100 Datenpunkten für überlagerte Peaks [5] zu erhalten, sollte die Datensammelrate hier auf mindestens 5 Hz festgelegt werden. Man erhält eine Simulation, welche bei ähnlicher Skalierung, dem von A.W. Westerberg publizierten Chromatogramm praktisch identisch ist (siehe Abbildung 1).

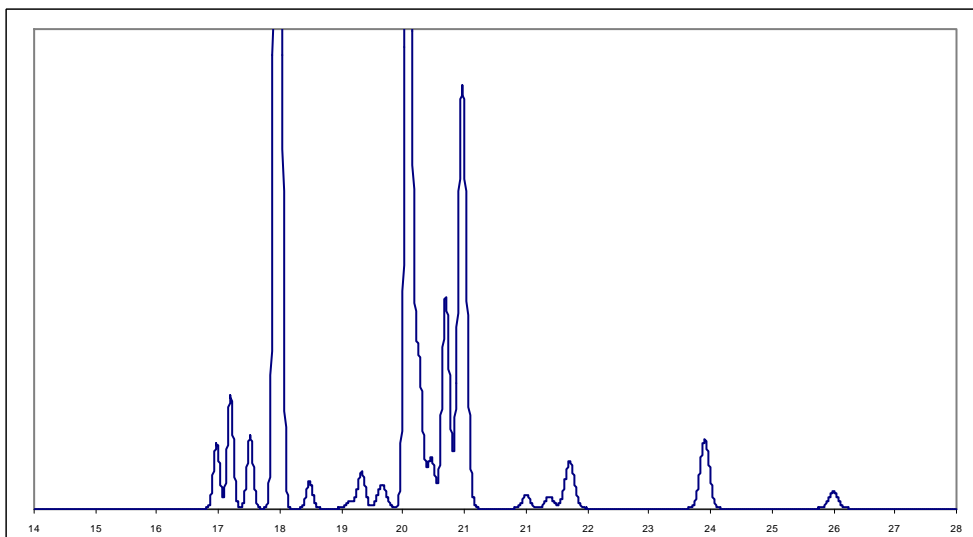


Abbildung 1: Simulation des Reports von A.W. Westerberg [4] mittels MS-Excel

Das erhaltene xy-Diagramm der Simulation wird nun in ein cdf-File (AIA-Format) umgewandelt (detaillierte Vorgehensweise [5]), um es in ein Chromatographie-Daten-System einlesen zu können. Die Bearbeitung der Simulation mit der Lotfällung wurde mit Empower2 (Fa. Waters) und dem ApexTrack-Integrationsmodus mit Detect Shoulders durchgeführt.

Die heutigen chromatographischen Auswertungsprogramme, welche auch die Namenhaftesten und Teuersten einschließt, besitzen die Anwendungsmöglichkeit der Dekonvolution nicht. Dies ist umso erstaunlicher, wenn man bedenkt, dass die Möglichkeiten der Dekonvolution seit Jahrzehnten bekannt sind. Ebenfalls scheint es so zu sein, dass die von den HPLC-Anbietern verwendeten Algorithmen seit Jahrzehnten kaum verändert worden sind. Das Programm PeakFit, das von der Firma Systat Software Inc. vertrieben wird, bietet die Möglichkeit der Detektion und Separation von Peaks, sowie eine Kurvenapproximation. Die Detektion der Peaks wurde - ähnlich dem Prinzip bei ApexTrack -, über die Verwendung der 2. Ableitung

der Summenkurve durchgeführt. Die Dekonvolution beruht auf dem Gausspeakmodell.

Simulation Report nach A.W. Westerberg

Pk=Gauss Area 18 Peaks

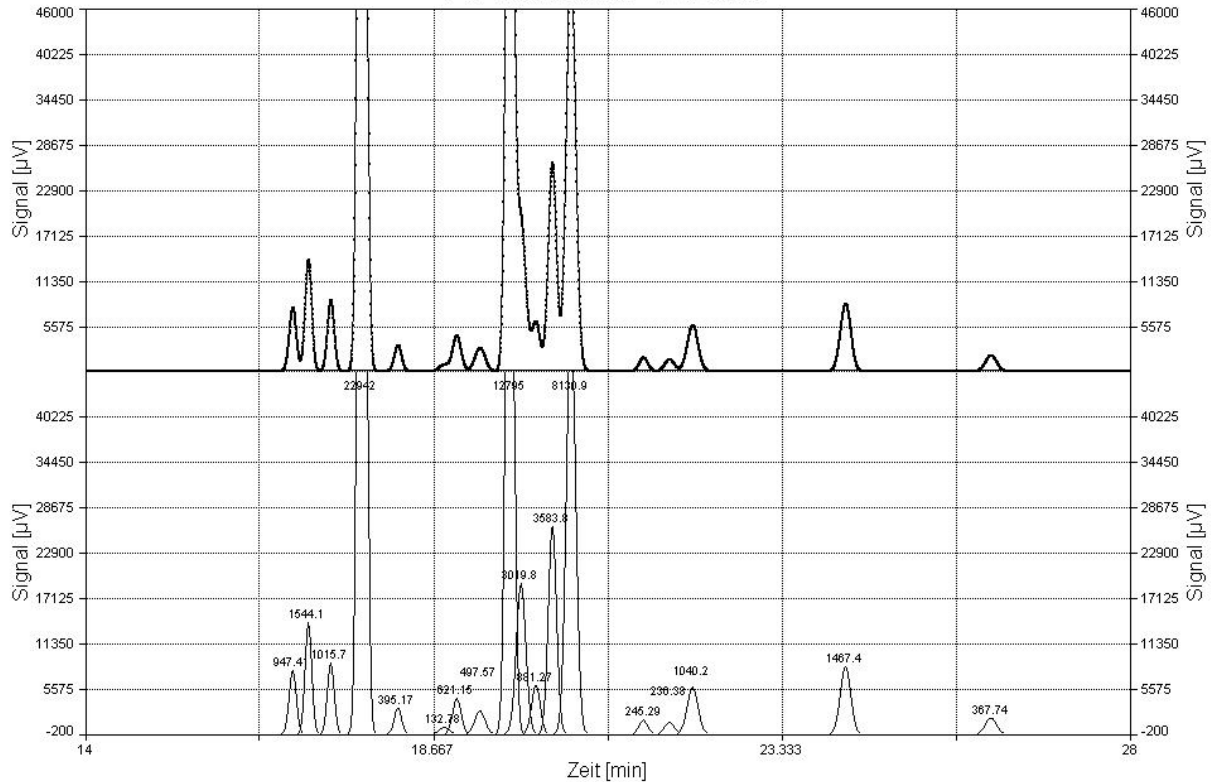


Abbildung 2: Resultat der Dekonvolution mittels PeakFit

Abbildung 2 zeigt graphisch das Resultat der Bearbeitung mittels PeakFit. In der oberen horizontalen Hälfte ist die Summenkurve der Simulation zu sehen. In der unteren Hälfte sind die aus der Approximation ermittelten Einzelpeaks mit angegebenen Peakflächen in $\mu\text{V min.}$ aufgeführt. Nun können die aus dem Report von A.W. Westerberg erhaltenen und als Soll der Simulation verwendeten Flächenwerte mit den Ergebnissen der Lotfällung sowie der Dekonvolution verglichen werden. Diesen Vergleich zeigt Tabelle 1.

Peak	Sollfläche	Lotfällung [Empower 2]	Abweichung zur Sollfläche	Dekonvolution [PeakFit]	Abweichung zur Sollfläche
1	947,35	935,92	-1,21%	947,41	0,01%
2	1544,05	1555,42	0,74%	1544,09	0,00%
3	1015,70	1015,32	-0,04%	1015,74	0,00%
4	22941,67	22941,50	0,00%	22941,59	0,00%
5	395,37	395,15	-0,05%	395,17	-0,05%
6	132,73	112,78	-15,03%	132,78	0,04%
7	621,22	642,32	3,40%	621,15	-0,01%
8	497,73	495,87	-0,38%	497,57	-0,03%
9	12795,50	13661,27	6,77%	12795,46	0,00%
10	3019,67	2223,55	-26,36%	3019,82	0,01%

11	881,40	781,50	-11,33%	881,27	-0,01%
12	3583,83	3555,65	-0,79%	3583,79	0,00%
13	8130,83	8188,82	0,71%	8130,9	0,00%
14	245,20	244,82	-0,16%	245,29	0,04%
15	236,33	237,45	0,47%	236,38	0,02%
16	1040,27	1038,87	-0,13%	1040,23	0,00%
17	1467,47	1467,15	-0,02%	1467,42	0,00%
18	367,75	367,42	-0,09%	367,74	0,00%

Tabelle 1: Vergleich der Flächenergebnisse der Lotfällung sowie der Dekonvolution in $\mu\text{V min}$

Die in Tabelle 1 rot markierten Peaks sind jene innerhalb der Simulation, die stark überlagert eluieren. So sind Peak Nr. 6 und 10 Schulterpeaks mit einer sehr geringen Auflösung. Dies sind die interessanten Stellen des Chromatogramms zur Anwendung und Beurteilung der Abtrennmethode bzw. der Dekonvolution. Die Abweichungen zur Sollfläche, die über 1% liegen, wurden hellgrau und über 5% dunkelgrau hinterlegt.

Die Abweichung der Peaks, die überwiegend basisliniengetrennt vorliegen, ist bei beiden Methoden nahezu 0%. Die geringe Abweichungen resultieren zum Teil aus dem Einfluss des Rauschens.

Die Lotfällung liefert deutliche Abweichungen, die bis zu 26% bei Peak 10 betragen. Gerade die Schulterpeaks besitzen deutliche Abweichungen. So belegt Peak Nr. 6 Platz 2 mit 15%. Von den neun überlagerten Peaks besitzen sechs höhere Abweichungen als 1%. Von diesen sechs Peaks besitzen wiederum vier Peaks eine Abweichung von über 5%. Diese enormen Fehler nimmt man bei der Quantifizierung über die Lotfällung in Kauf. Weisen überlagerte Peaks zusätzlich noch ein Tailing auf, führt die Integration durch Lotfällung zu Fehlern in der Peakfläche von nicht unter 20-30% [6].

Bei der Dekonvolution mittels Gausspeakmodell besitzen alle Peaks eine Abweichung kleiner 1%. Diese sind sogar nahezu 0%, unabhängig davon, ob die Peaks überlagern oder nicht.

In Bezug auf alle überlagerten Peaks liefert die Dekonvolution somit deutlich geringere Abweichungen als die Lotfällung.

Nun wurde hier die Simulation mittels Gausspeaks erstellt. Oft besitzen Peaks in einem chromatographischen Prozess nicht diese Form. Sie können zum Beispiel tailen. Auch wurden keine weiteren Parameter, welche ein Chromatogramm beeinflussen können, betrachtet. So kann eine Basisliniedrift oder auch ein Gradientenlauf vorliegen. Wie wird die Dekonvolution mit solchen Einflüssen fertig und wie mit realen Chromatogrammen? Auf diese Fragestellungen wird in einer in Vorbereitung sich befindenden Publikation [6] eingegangen und diese dort erläutert. Vorweg zu nehmen sind die überaus positiven Ergebnisse, welche sich unter Anwendung der Dekonvolution erreichen lassen. Gerade im Vergleich zu den vorhandenen Abtrennmethoden wird das hier erzeugte Bild bestätigt und verfestigt.

Interessierte Leser können gerne das verwendete cdf-File der Simulation des veröffentlichten Reports von A.W. Westerberg per Email anfordern, um sich einen eigenen Eindruck verschaffen zu können. Die Firma Systar bietet die Möglichkeit sich unter www.systat.com/downloads/ eine 30 Tage gültige Vollversion von PeakFit herunter zu laden.

[1] H.J. Kuss, S. Kromidas, "Chromatographie-Gespräch, Wie testet man kommerzielle Integrationssysteme für die HPLC und GC?", LABO, 09/2006

[2] N. Dyson, "Chromatographic Integration Methods", The Royal Society of Chemistry, Second Edition, 1998

[3] J.P. Foley, "Equations for Chromatographic Peak Modeling and Calculation of Peak Area", Analytical chemistry, 1987, 59, 1984.

[4] A.W. Westerberg, "Detection and resolution of overlapped peaks for an on-line computer system for gas chromatographs", Analytical chemistry, 1969, 41, 1770.

[5] S. Kromidas, H.-J. Kuss, "Chromatogramme richtig integrieren und bewerten", Wiley-VCH, 2008

[6] H.J. Kuss and S. Kromidas (Eds) „Quantification in LC and GC – A practical guide to Good Chromatographic Data“, Wiley-VCH, 2009, in Vorbereitung

(1) Aventis, Frankfurt

(2) MLU, München

(3) Saarbrücken