

Tutorial zur UVWinLab 6.4: Wavelength Quant: Gehaltsbestimmung

Inhaltsverzeichnis

Was macht „Wavelength Quant“?.....	1
Unterschied zu „Scanning Quant“	2
Generelles.....	2
Arbeiten unter Simulation	3
Weitere Voraussetzungen.....	3
Erstellen einer neuen Wavelength Quant –Methode.....	4
Seite „Datenaufnahme“	4
Seite „Proben-information“	6
Standards eintragen	6
Seite „Quantmethode nach dem Gesetz von Beer“	9
„Grenzwerte“ auf der Seite „Quantmethode nach dem Gesetz von Beer“	12
Seite „Parameters“	14
Basislinien-Korrektur	14
Seite „Kalibration“	15
Seite „Daten-verarbeitung“	15
Starten der Methode	16
Abspeichern der Methode + Kalibrierung.....	17
Ergebnis-Seite	17
Kalibration.....	18
Seite „Datenausgabe“	20
Reportvorlage	20
Ausdruck	21

Was macht „Wavelength Quant“?

Mit diesem Methoden-Typ bestimmen Sie die Konzentration (Gehalt) einer unbekannten Probe. Dazu wird in der Regel eine so genannte Standardreihe (Kalibrierprobenreihe) erstellt und vermessen, d.h. Sie präparieren eine Probenreihe mit bekannten Konzentrationen und messen diese mit dem Spektrometer. Diese Werte („Kalibration“) können mit der Methode abgespeichert werden. Beim Start der Methode kann dann z.B. nur noch die unbekannte Probe gemessen werden und man erhält als Ergebnis die Konzentration (Gehalt) dieser Probe.

Unterschied zu „Scanning Quant“

In vergleichsweise seltenen Fällen ist der Extinktions-Peak unserer Probe nicht konstant bei einer Wellenlänge, sondern verschiebt sich je nach Matrix oder Konzentration. Dann bietet der Methodentyp „Scanning Quant“ die Möglichkeit wandernde „Peakmaxima“ (statt einer festen Wellenlänge im „Wavelength Quant“) in Bezug zur Konzentration zu setzen.

Generelles

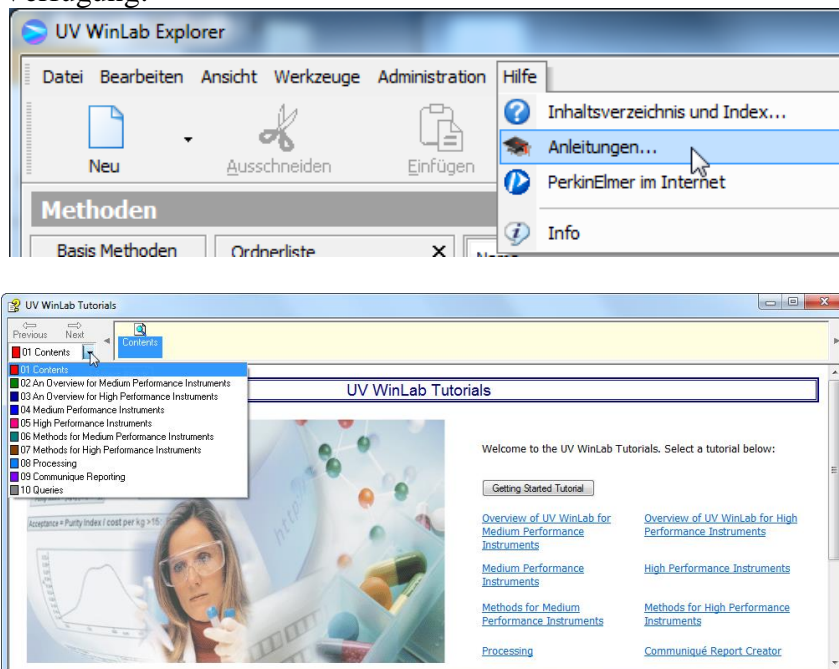
Deutsche Hilfen

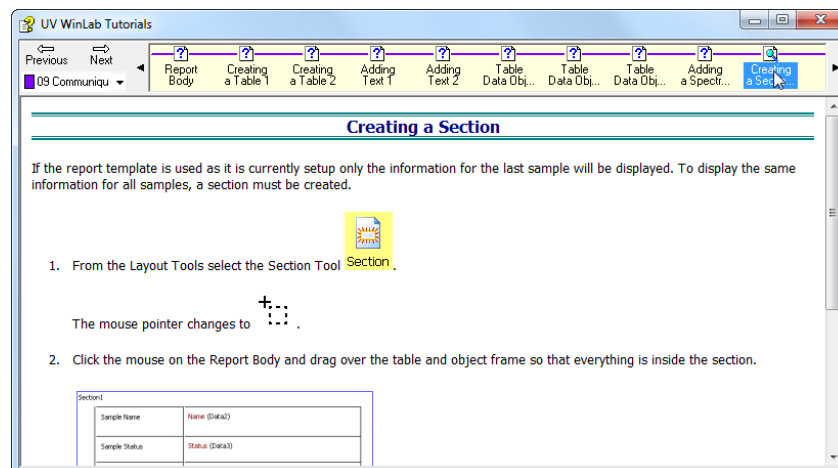
Diese Schnellanleitung **ersetzt nicht** die ausführlicheren offiziellen Dokumente (Manuals, Release Notes, Tutorials), die auf den Installations-CDs mitgeliefert sind. Sie dient nur dem schnellen Verständnis der Software, bleibt aber an vielen Stellen ungenau.

Deutschsprachige Hilfen für UVWinLab werden Ihnen auf Wunsch gerne zugesandt.

Englische Hilfen

Nach der Installation der Original UVWinLab steht Ihnen eine ausführliche englischsprachige **Online-Hilfe** (Taste F1 drücken) samt vieler **Tutorials** (Unter dem Menüpunkt „Help“) zur Verfügung:





Interessant ist auch das „Getting Started“ Video in den Tutorials.

Auf der Installations-CD befindet sich zudem ein Handbuch in Form einer PDF-Datei, die auf der Online-Hilfe basiert.

Dieses Dokument anschauen	Falls Sie dieses Dokument in MS Word anschauen, so empfiehlt sich Ansicht > Navigationsbereich zu verwenden. Dadurch haben Sie links alle Überschriften und können mit einem Klick darauf leicht im Dokument navigieren. Eine vergleichbare Ansicht kann auch für das *.pdf-Dokument gewählt werden
Vorbereitung	UVWinLab muss installiert sein. Ein Bediener mit Benutzer-Rechten (UVWinLab Standard) bzw. Developer-Rechten (UVWinLab ES). Bitte beachten Sie dazu das entsprechende Tutorial.
Arbeiten unter Simulation	Falls im Simulationsmodus gearbeitet werden soll, so empfiehlt sich das Dokument „ Tipp Methodenentwicklung mit Simulation “.

Weitere Voraussetzungen

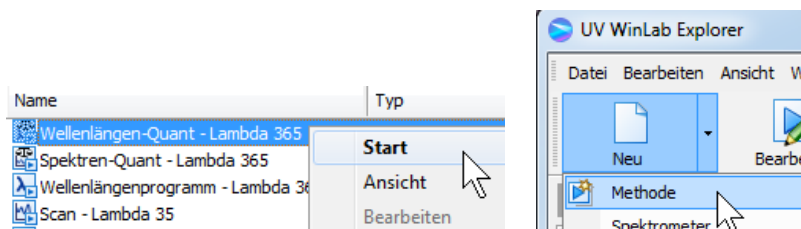
Das Tutorial „**Methode Scan + Auswertung + Report**“ wird vorausgesetzt.

Erstellen einer neuen Wavelength Quant – Methode

Erstellen einer Methode

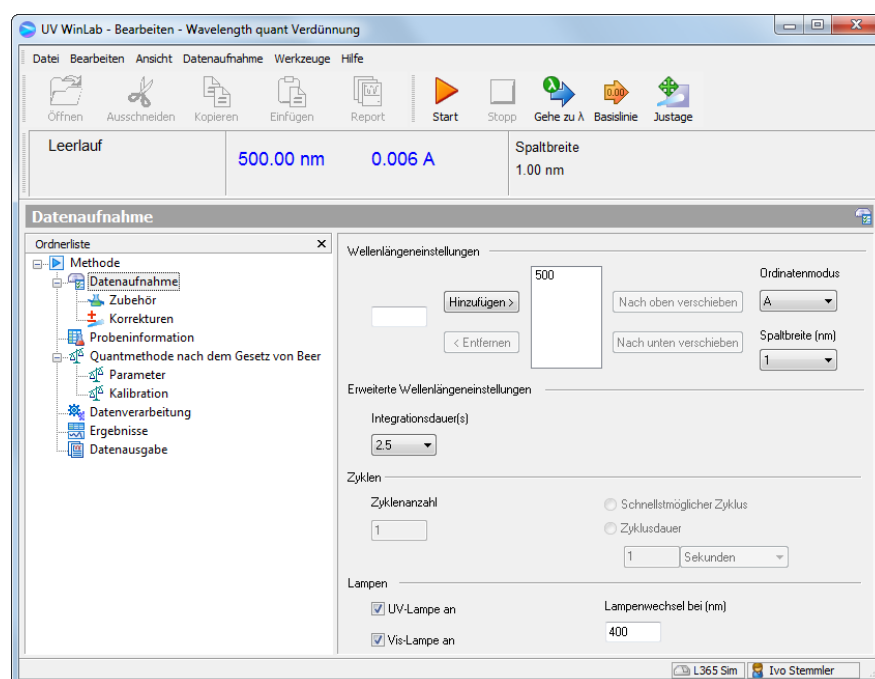
In UVWinlab ab V6 verwendet man am besten die vordefinierte Methoden, z.B. „Wellenlängen Quant – Lambda 365“.

Alternativ kann man über Neu > Methode zum gleichen Ziel kommen.



Hinweis: Es empfiehlt sich, die Methode **gleich** unter passendem Namen abzuspeichern, zu **schließen** und **mit Edit wieder zu öffnen**. Damit haben Sie von Anfang an alle Optionen offen.

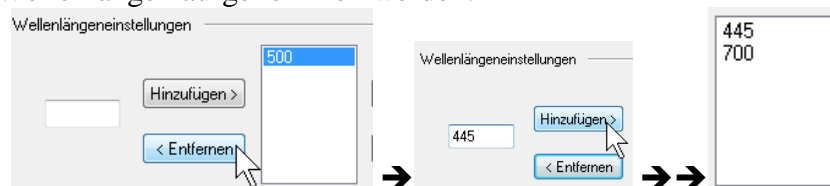
Seite „Datenaufnahme“



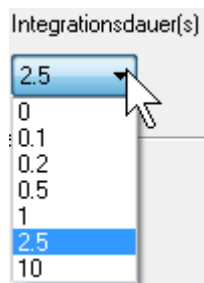
Wellenlängen ändern

Für diese Methode können bis zu drei Wellenlängen Sinn machen, wovon eine die analytische Wellenlänge ist (s.u.). Durch Auswahl der Wellenlängen rechts (z.B. „500“) und dem Button **< Entfernen** können die vorgeschlagenen Wellenlängen entfernt werden. Auf der linken Seite kann jeweils eine Wellenlänge eingetragen werden

und mit dem Button **Hinzufügen >** in die Liste der zu messenden Wellenlängen aufgenommen werden:



Integrationsdauer



Ein weiterer Parameter ist verschieden von der Scan-Methode: „**Integrationsdauer** (s)“.

Das ist die Zeit in Sekunden, über die für jeden Messwert gemittelt wird. „0“ wäre so schnell wie möglich. Wir wählen einen Wert von „1“ aus, damit werden die Werte weniger verrauscht und somit zuverlässiger.

Hinweis: Wer die Auswirkung der Response-Dauer für die Messungen genauer untersuchen möchte, kann dies am besten mit dem Methodentyp „**Timedrive**“ (Kinetik) untersuchen, wo man den Wert in Abhängigkeit der Zeit beobachten kann.

Seite „Proben- information“

Diese Seite ist fast identisch zur Scan-Methode (s.u.)

Standards eintragen

Hier gibt es einen „kleinen“ Unterschied zur Scan Methode (und zu UVWinLab V5): Es können bzw. müssen nun **hier die Standards eingetragen und Ihre Konzentration** werden.

Dazu wird einfach in der Spalte Type für die jeweilige Probe Standard ausgewählt. Dadurch haben Sie auch die Möglichkeit, Standards und Proben in beliebiger Reihenfolge zu messen.

Über den Button „Probentabelle formatieren > Spalten“ kann man auch Einheit und Nachkommastellen für der Spalte „Konzentration“ einstellen und auch, ob die Eingabe „Zwingend“ sein soll. Bei dieser Gelegenheit kann man sie auch eindeutschen:

Am Ende könnte die Liste z.B. so aussehen:

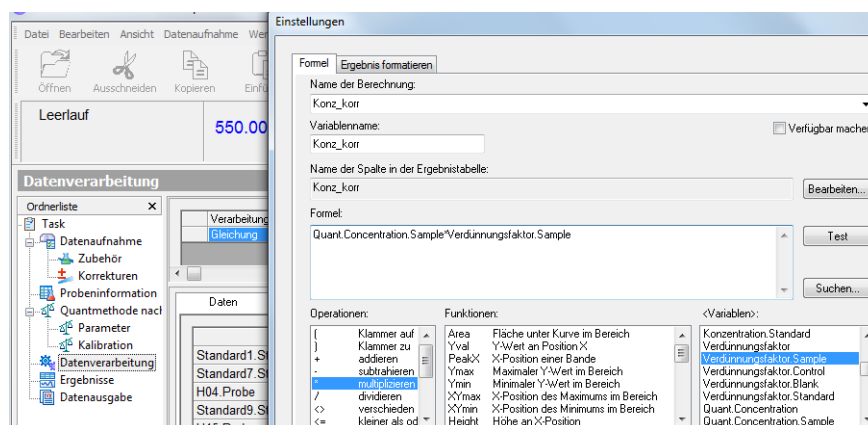
Proben-ID	Beschreibung	Typ	Konzentration (mg/mL)
1	Standard1	Standard	1.000
2	Standard7	Standard	7.000
3	H04	Probe	
4	Standard9	Standard	9.000
5	H15	Probe	

Verdünnungsfaktor

Möchte man einen Verdünnungsfaktor für eine Probe einführen, so empfiehlt sich die Erstellung einer neuen Spalte in der Probentabelle:

Die Spalte taucht sofort in der Probentabelle auf und mit ihr kann im Processing gerechnet werden, da sie auf „Nur Ziffern“ gesetzt wurde. Weiter unten im Programm würde man dann im

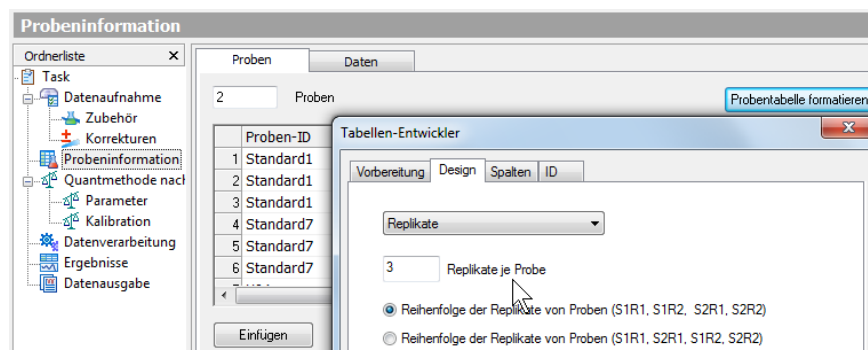
Datenverarbeitung eine Gleichung einfügen, die aus der Kalibrierung errechnete Konzentration und Verdünnung die korrigierte Konzentration berechnet (hier nur der Proben, nicht von den Standards):



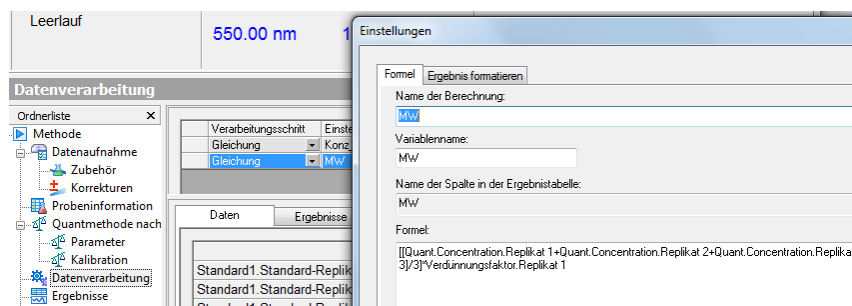
„Quant.Concentration.Sample*Verdünnungsfaktor.Sample“

Replikate

Sollen von Standards und Proben Replikate gemessen werden, so wird auch dies in der Sample Info eingestellt.



Außerdem kann man in der Datenverarbeitung mit den Replikaten (Replicates) rechnen, z.B. den Mittelwert als Rechnung in einer Gleichung:



„((Quant.Concentration.Replikat 1+Quant.Concentration.Replikat 2+Quant.Concentration.Replikat 3)/3)*Verdünnungsfaktor.Replikat 1“

Diese Spalte erscheint dann in der Ergebnistabelle

Seite „Quantmethode nach dem Gesetz von Beer“

Bezeichnung des
Analyts
(„Komponente“)

Unter der Rubrik „**Berechnung**“ kann die Bezeichnung der Spaltenüberschrift in der Results Table für die Konzentration der unbekannten Probe geändert werden. „Komponente“ haben wir z.B. in „**Toximed**“ geändert. Diese Spalte kann dann in der Ergebnistabelle aktiviert werden:

Proben-ID	Beschreibung	Konzentration (mg/mL)	Ordinate (A)	Toximed (mg/mL)
1	Standard1 Star	1.0000		

Kalibrierfunktion
„Single Standard“

Unter der Rubrik „**Kalibration**“ können verschiedene Modi ausgewählt werden. Damit ändert sich gleichzeitig die ganze Seite:

Bei „**Ein-Punkt-Kalibration**“ besteht die Standard-Reihe aus einem einzigen Standard. Die Beziehung von Extinktion (A) zu Konzentration der Probe ist eine Gerade, die durch Null und den Messwert des Standards geht. Diese Kalibrierung wird gerne für einen „schnellen Schuss“ verwendet, wo es nicht auf höchste Sicherheit ankommt und die Probe samt Matrix gut bekannt ist.

Kalibrierfunktion
„Benutzerdefinierter
Faktor“

Bei „**Benutzerdefinierter Faktor**“ wird die Steigung angegeben:

$$\text{Extinktion} = \text{Faktor} * \text{Konzentrationsseinheit}$$

Dieses Verfahren kann z.B. bei kommerziell erhältlichen Schnelltests nützlich sein.

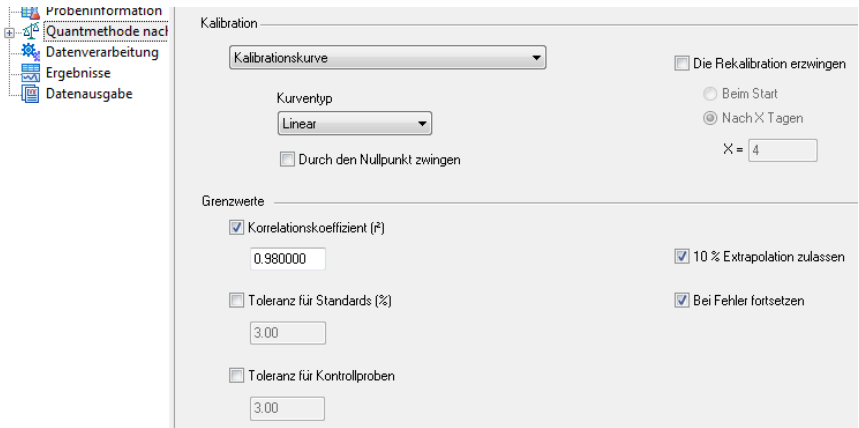
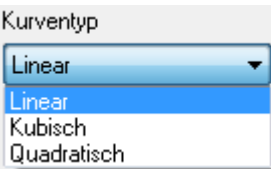
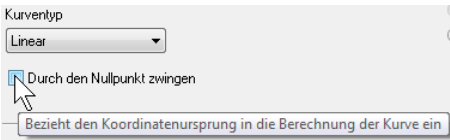
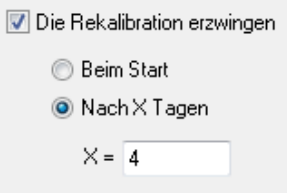
Kalibrierfunktion
„Benutzerdefinierte
Kurve“

Die „Benutzerdefinierte Kurve“ bringt zusätzlich noch den Achsenabschnitt ein:

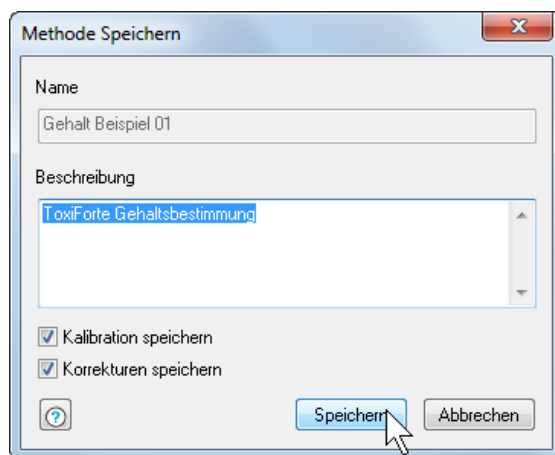
$$\text{Extinktion} = \text{Steigung} * \text{Konzentrationsseinheit} + \text{Ordinatenabschnitt}$$

Kalibrierfunktion
„Kalibrationskurve“

Dies ist die beste Art, um die Konzentration einer unbekannten Probe sicher zu ermitteln:

	
<p>Linear oder quadratisch?</p>	<p>Der Zusammenhang von Extinktion zu Konzentration muss nicht zwangsläufig linear sein, auch wenn dies fast immer der Fall ist. Für diese Fälle kann auch eine quadratische oder kubische Funktion verwendet werden.</p> 
<p>Durch den Nullpunkt?</p>	<p>Die Kurve kann durch den Nullpunkt gezwungen werden:</p>  <p>Das macht Sinn, falls für eine Lösung ohne Probe tatsächlich die Extinktion Null gemessen wird. Auch dies trifft meist zu. Nämlich immer dann, wenn für die Basislinie (Autozero) eine Lösung verwendet werden kann, die ALLES enthält bis auf die Probe.</p> <p>Hinweis: Das Anklicken dieser Funktion kann in diesem Fall die Genauigkeit für die Bestimmung einer Probe mit kleiner Konzentration verbessern, da sich eine Abweichung der Ausgleichsgeraden hier prozentual sehr stark auswirken würde.</p>
<p>Wie oft die Standards messen?</p>	<p>Falls die Kalibrierung nicht nur einmal beim Erstellen der Methode vorgenommen werden soll, muss über „Die Rekalibration erzwingen“ festgelegt werden, wann eine neue Standardreihe (Kalibrierung) vom Bediener gemessen werden muss.</p>  <p>Dazu wird das Häkchen gesetzt und gewählt, ob sie „Beim Start“, also beim Start der Methode oder jeweils nach X Tagen neu gemessen werden muss.</p>
<p>Standards mit Methode abspeichern</p>	<p>Die gemessenen Standards können mit der Methode abgespeichert werden. Dazu wird im Dialog beim Speichern der Methode das</p>

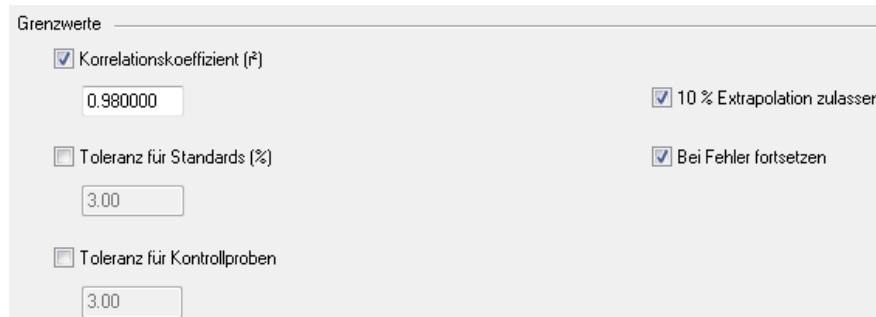
entsprechende Häkchen gesetzt:



Allerdings wird die Auswahl „Kalibration speichern“ erst angezeigt, wenn bereits Standards gemessen wurden.

Die Option „Korrekturen speichern“ speichert zusätzlich noch die Basislinien (Autozero) ab.

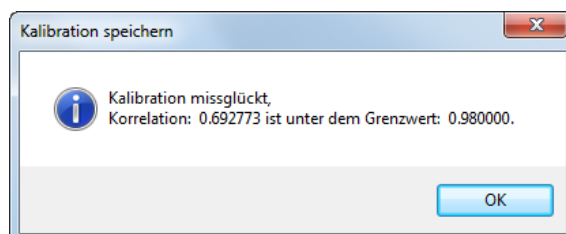
„Grenzwerte“ auf der Seite „Quantmethode nach dem Gesetz von Beer“



Die „Grenzwerte“ bestimmen u.a., wann eine Standard-Reihe erfolgreich ist:

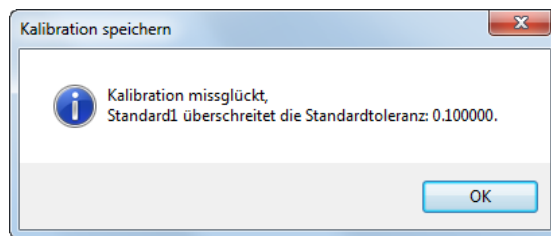
„Korrelationskoeffizient (r^2)“

Der hier spezifizierte Korrelationskoeffizient gibt an, wie hoch die Güte der Kalibriergeraden sein soll, damit sie erfolgreich ist. Es erscheint eine Warnmeldung, falls der erreichte Korrelationskoeffizient kleiner als der hier angegebene ist, z.B.



„Toleranz für Standards (%)“

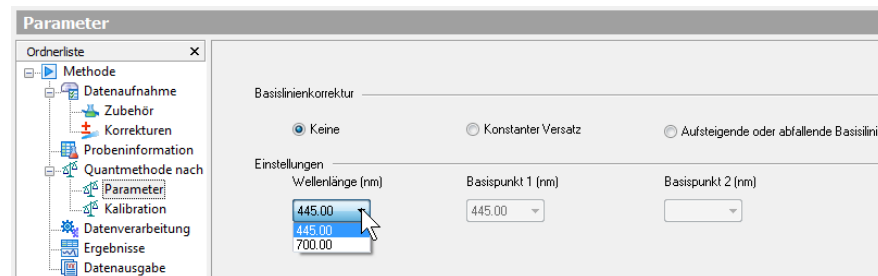
Gleiches gilt auch für die Abweichung der angegebenen Konzentration eines Standards zu derjenigen, die aus der gemessenen Extinktion und der Kalibrierfunktion ermittelt wird. Ist die erlaubte prozentuale Abweichung kleiner, als die tatsächlich erreichte, dann erscheint eine entsprechende Fehlermeldung.



„Toleranz für Kontrollproben (%)“	Statt normaler Proben (vom Typ „Probe“) lassen sich in der Probentabelle auch Proben vom Typ „Kontrollprobe“ definieren. Im Feld „Toleranz für Kontrollproben (%)“ geben Sie die zulässige Abweichung von der spezifizierten Konzentration an. Diese Funktion findet Anwendung bei automatischen Küvettenwechslern bzw. dem Autosampler.
„10% Extrapolation zulassen“	Falls diese Option nicht gesetzt ist, wird eine Warnung ausgegeben, wenn der mit den Standards abgedeckte Konzentrationsbereich um 10% über- oder unterschritten wird.
„Bei Fehler fortsetzen“	Bei allen vorgenannten Optionen der Grenzwerte entscheidet sich hier, ob Sie die Analyse automatisch abbrechen lassen oder sich nur mit einem Warnhinweis begnügen. Die Analyse kann dann fortgesetzt werden, falls das Häkchen hier gesetzt wird.

Seite „Parameters“

Nachdem unter „Datenaufnahme“ die passenden Wellenlängen gewählt wurden, sieht die Seite nun so aus:



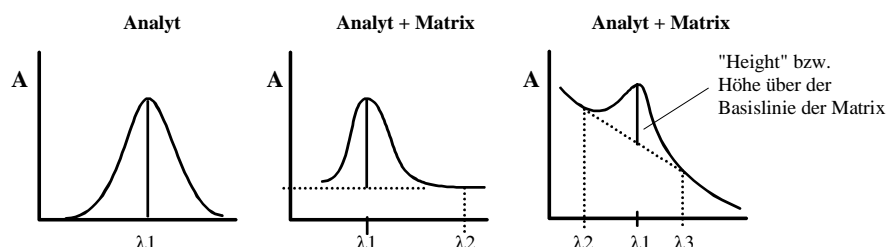
Unter „**Wellenlänge (nm)**“ wird die analytische Wellenlänge aus den gemessenen ausgewählt. Das ist die Wellenlänge, die in Beziehung zur Konzentration gebracht wird.

Basislinien-Korrektur

Falls als Extinktion der unbekannten Probe bei Konzentration Null auch Null Extinktionen gemessen werden, dann wird die Option „**Keine**“ gewählt. Dies ist der **Normalfall**.

Falls sich eine Extinktion der unbekannten Probe auch für die Konzentration Null nicht vermeiden lässt, so wird häufig eine Basislinienkorrektur eingesetzt. Eine solcher „Offset“ der Basislinie kann z.B. durch die *reale Matrix* hervorgerufen werden, d.h. durch Stoffe, die absorbieren, aber nicht in den Standards enthalten waren. Für einen einfachen Offset wird die Funktion „**Konstanter Versatz**“ gewählt. Zusätzlich muss dann unter „**Basispunkt 1 (nm)**“ die gemessene Wellenlänge angegeben werden, bei der unser Analyt nicht absorbiert (s. Bild unten).

Stellt die Matrix selbst nicht nur einen Offset, sondern eine Flanke dar (oft zum UV hin ansteigend), dann werden häufig die Wellenlängen links und rechts von dem Peak unseres Analyts angegeben. Es müssten dann 3 Wellenlängen gemessen werden und eine Basislinienkorrektur „**Aufsteigende oder abfallende Basislinie**“ verwendet werden:

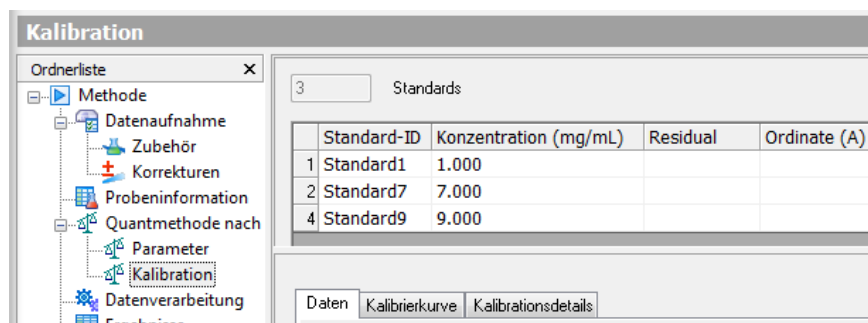


Wir lassen die gesamte Seite „Quantmethode nach dem Gesetz von Beer“ dieses Mal unverändert.

Wo stehen die korrigierten Werte?

Diese korrigierten Extinktionen stehen dann in der **Ergebnis-Tabelle** unter „**Ordinate**“. Die Roh-Extinktionen aller Wellenlängen stehen in der „**Daten Tabelle**“ (Ergebnisse > Daten).

Seite „Kalibration“

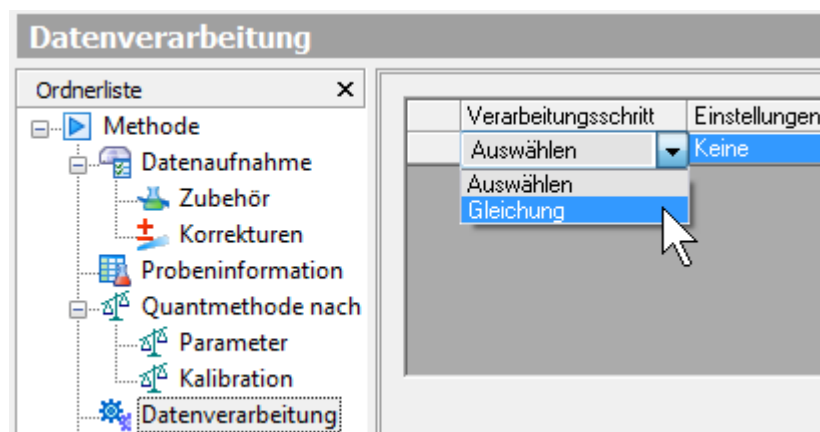


Diese Seite dient in UVWinLab ab V6 der Zusammenfassung der Standards. Neue Standards können hier nicht definiert werden, da nicht klar wäre, wann sie gemessen werden sollen. Die Eingabe weiterer Standards erfolgt daher prinzipiell in der „Probeninformation“. Eine Bearbeitung an dieser Stelle ist prinzipiell möglich. Nach der Messung der Standards finden sich hier auch die Messwerte, Graphen und Zusammenfassung der Kalibrierung.

Hinweis: Möglicherweise muss in dieser Tabelle die Spalte „Konzentration“ nochmals gleich wie in der „Probeninformation“ formatiert werden.

Seite „Daten- verarbeitung“

Im Gegensatz zur Scan-Methode können hier nur „**Gleichungen**“ ausgewählt werden, da Funktionen wie „Smooth“ usw. bei einzelnen Wellenlängen keinen Sinn machen.

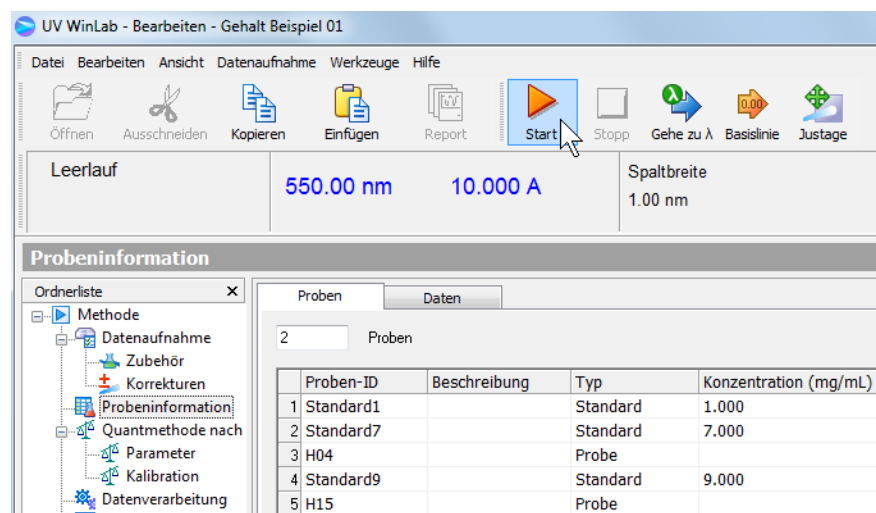


Die Gleichungen haben den gleichen Aufbau wie bei den Scan-Methoden und sollen deshalb hier nicht weiter beachtet werden. Die wichtigste Funktion dürfte vermutlich die „**Yval**“ sein, mit der Sie auch hier die Extinktion der Probe auslesen können. Beispiel: Eine Gleichung mit der Funktion „**Yval(All;445)**“ bringt die Extinktion bei 445 nm für alle Proben der Probentabelle in die Ergebnistabelle. Diese stehen allerdings in UVWinLab 5 schon automatisch in der Spalte „Ordinate“, da wir diese Wellenlänge als analytische Wellenlänge definiert hatten.

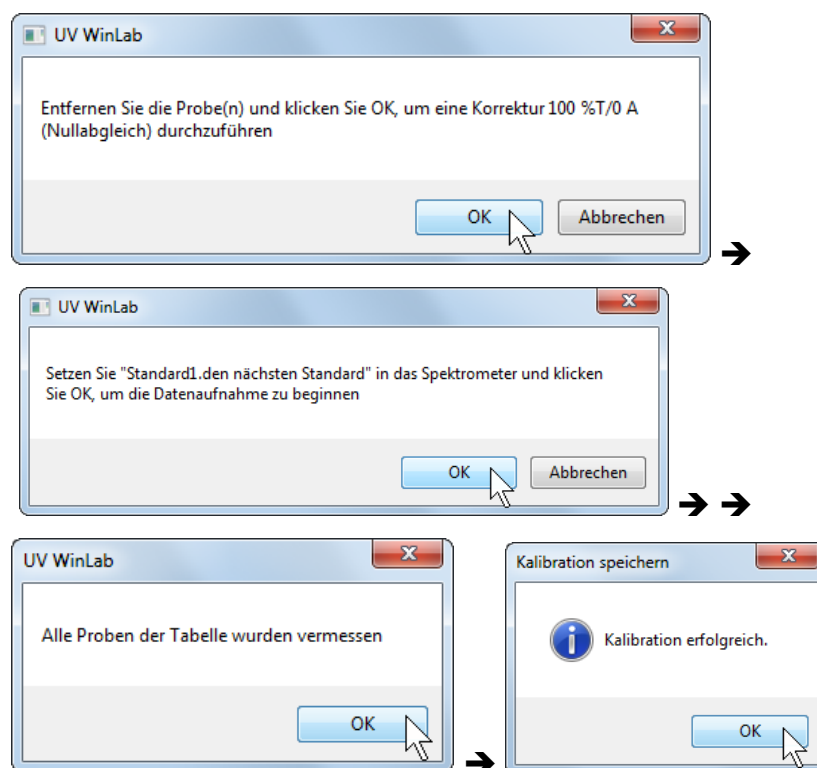
Wir lassen die Datenverarbeitung also dieses Mal leer.

Starten der Methode

Natürlich erst mal **Speichern** über „Datei > Einstellungen speichern > Zur Methode“. Anschließend auf **Start** klicken:

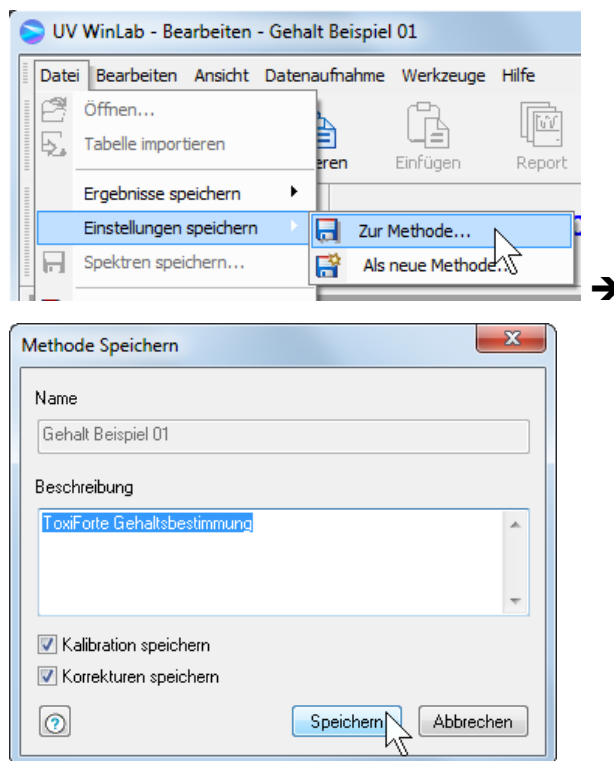


Dialoge während der Messung



Die letzte Meldung zeigt an, ob die Kalibrierung innerhalb der von uns gewählten „Grenzwerte“

Abspeichern der Methode + Kalibrierung



Das Häkchen bei „**Kalibration speichern**“ sorgt dafür, dass die Kalibrierung (Messung der Standards) beim nächsten Aufruf der Methode zur Verfügung steht.

„**Korrekturen speichern**“ speichert das Autozero (Basislinie) ab.

Ergebnis-Seite

The screenshot shows the 'Ergebnisse' (Results) window in UV WinLab. On the left is a tree view with 'Ergebnisse' selected. The main area displays a table of measurement results. The table has columns: Proben-ID, Beschreibung, Konzentration (mg/mL), ToxiForte (mg/mL), and Ordinate (A). The data is as follows:

Proben-ID	Beschreibung	Konzentration (mg/mL)	ToxiForte (mg/mL)	Ordinate (A)
1	Standard1.Stanc	1.000		1.0021 0.0936
2	Standard7.Stanc	7.000		6.9915 0.6500
3	H04.Probe			4.0141 0.3734
4	Standard9.Stanc	9.000		9.0064 0.8372
5	H15.Probe		14.9008 : Kalibrationsgrenzen übersch	1.3848

Below the main table, there is a 'Daten' (Data) section with a smaller table showing absorbance values at 445 nm and 700 nm for the standards and probe.

	445 nm	700 nm
Standard1 Standard (A)	0.094	-0.000
Standard7 Standard (A)	0.650	0.010
H04.Probe (A)	0.373	0.006
Standard9 Standard (A)	0.837	0.015
H15.Probe (A)	1.385	0.024

Hier sind alle Messwerte zusammengefasst. Die Probe H15 überschreitet den Grenzwert: „**Kalibrationsgrenzen sind überschritten**“.

Kalibration

Rohdaten

Kalibration

Ordnerliste

Methode

Datenaufnahme

Zubehör

Korrekturen

Probeninformation

Quantmethode nach

Parameter

Kalibration

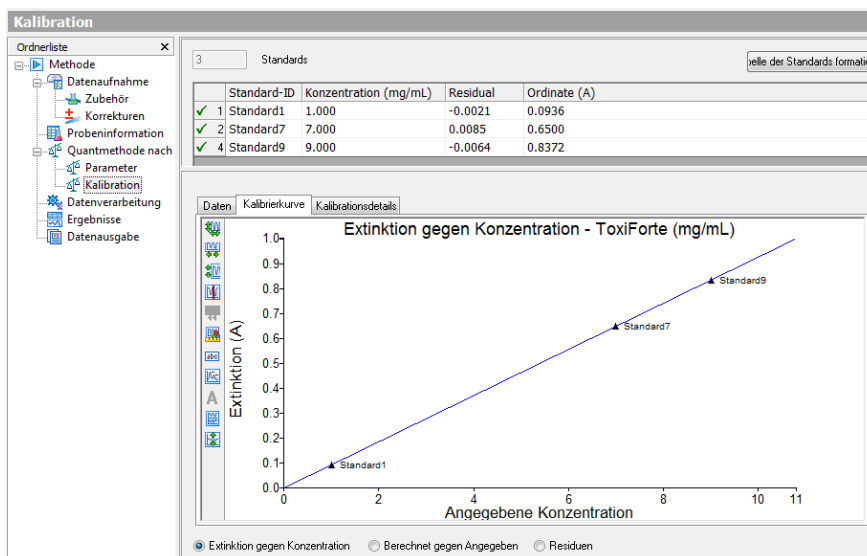
Datenverarbeitung

Ergebnisse

Datenausgabe

Kalibrierkurve:

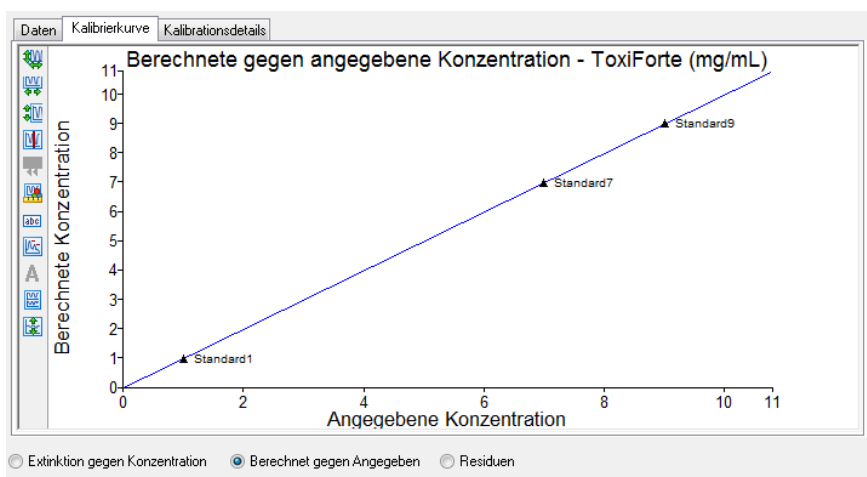
„Extinktion gegen Konzentration“



Dies ist die übliche Darstellung: Die gemessene Extinktion der Standards wird gegen die angegebene Konzentration aufgetragen. Die blaue Linie ist die berechnete Kalibriergerade durch die Standards.

Kalibrierkurve:

„Berechnet gegen Angegeben“

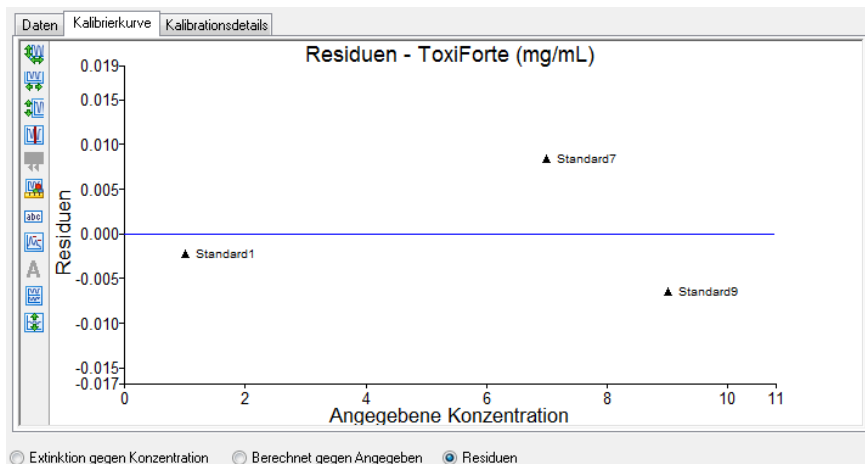


Hier werden die Standards quasi nochmals als Proben betrachtet. Die gemessenen Extinktionen ergeben über die Kalibrierfunktion eine berechnete Konzentration, die der von uns angegebenen

gegenüber gestellt wird.

Kalibrierkurve:

„Residuen“



Residuen sind Abweichungen. In diesem Fall sind dies die Abweichungen der berechneten von der spezifizierten Konzentration unserer Standards.

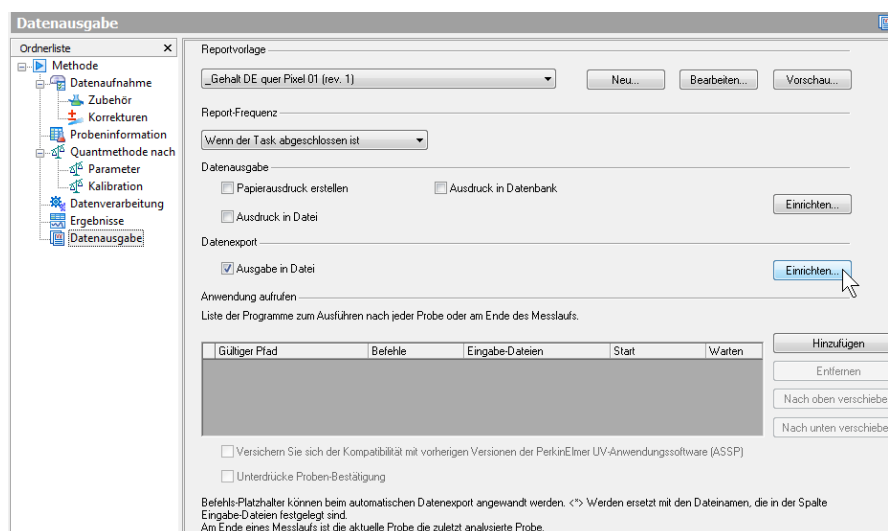
Kalibrationsdetails

Kalibrations-Report				
Kalibrations-Zeitangabe: Donnerstag, 16. März 2017 14:53 Mittteleuropäische Zeit				
Vollständiger Benutzername:				
Komponenten-Name: ToxiForte				
Komponenten-Einheiten: mg/mL				
Kalibration: Kalibrationskurve - Linear ($y=ax+a_0$)				
Basislinienkorrektur: Keine				
Einstellungen (nm): Position: 445.00				
Durch Null zwingen: Nein				
Kalibrationskoeffizienten:				
a0 = 0.000463				
a1 = 0.092905				
Vorgegebener Korrelationskoeffizient: 0.980000				
Berechneter Korrelationskoeffizient: 0.999998				
Standard-ID	Vorgegeben	Berechnet	Residuen	Ordinate
Standard1	1.0000	1.0021	-0.0021	0.0936
Standard7	7.0000	6.9915	0.0085	0.6500
Standard9	9.0000	9.0064	-0.0064	0.8372

Hier befindet sich die Zusammenfassung der Ergebnisse unserer Kalibrierung.

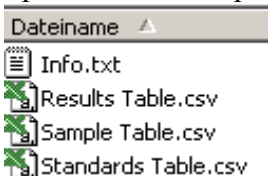
Seite „Datenausgabe“

Daten Ausgeben



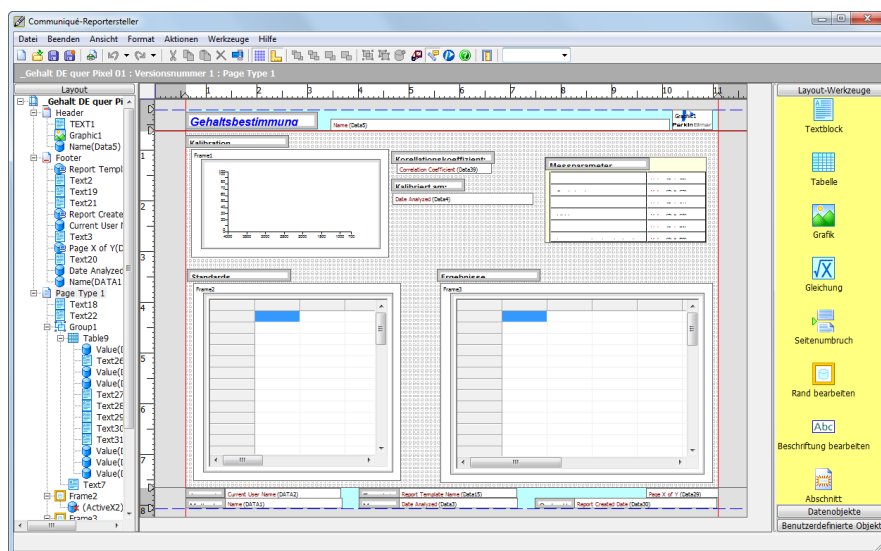
Analog zur Scan-Methode (siehe dort im Tutorial) kann hier z.B. gewählt werden:

- Welches Template für den Report-Ausdruck verwendet wird.
- Wann und wohin der Report gedruckt wird, z.B. beim Abspeichern der Ergebnisse („Wenn der Task abgeschlossen ist“).
- Ob zusätzlich automatisch Dateien (Tabellen im von Excel lesbaren csv-Format) exportiert werden sollen. Speicherort und Spalten einstellbar über Button „Setup“.



Reportvorlage anpassen

Analog zur Scan-Methode (siehe dort im Tutorial) kann hier z.B. gewählt das Report Template (Reportvorlage) angepasst werden





Ausdruck

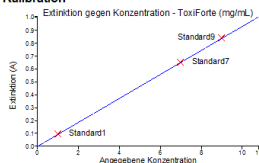
z.B.

Gehaltsbestimmung

Gehalt Beispiel 01 Donnerstag, 16. März 2017 13:24 Mitteleuropäische Zeit



Kalibration



Korrelationskoeffizient:
1.000

Kalibriert am:
2017-03-16 14:53:20

Messparameter

Wellenlänge(n) (nm)	445, 700
Spalt (nm)	
Response Dauer (s)	
UV Lampe	
Via Lampe	
Lampenwechselpunkt (nm)	

Standards

Proben-ID	Konzentration (mg/mL)	Residual	Ordinate (A)
Standard1	1.000	-0.0021	0.0936
Standard7	7.000	-0.0065	0.6500
Standard9	9.000	-0.0084	0.8372

Ergebnisse

Proben-ID	Beschreibung	Konzentration (mg/mL)	ToxiForte (mg/mL)	Ordinate (A)
H04.Probe			4.0141	0.3734
H15.Probe			14.9008	1.3848

Anwender: ho Stemmler
Methode: Gehalt Beispiel 01

Template: _Gehalt DE quer Pixel 01
Messung: 16-Mrz-17 14:53:20

Gedruckt: 16-Mrz-17 15:10:07

Seite 1 von 1