

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition

スペクトルモジュールの
理解



Agilent Technologies

注意

© Agilent Technologies, Inc. 1994-2012, 2013, 2007

本マニュアルは米国著作権法および国際著作権法によって保護されており、Agilent Technologies, Inc. の書面による事前の許可なく、本書の一部または全部を複製することはいかなる形式や方法（電子媒体による保存や読み出し、外国語への翻訳なども含む）においても、禁止されています。

Microsoft® は、Microsoft Corporation の米国登録商標です。

マニュアル番号

M8301-96170

エディション

01/13

Printed in Germany

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

本製品は、システムが適切な規制機関で登録を受け関連する規制に準拠している場合、ビトロ診断システムのコンポーネントとして使用できます。それ以外の場合は、一般的な実験用途でのみ使用できます。

ソフトウェアリビジョン

本書の内容は Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition のリビジョン C.01.0x に対応しています。

保証

このマニュアルに含まれる内容は「現状のまま」提供されるもので、将来のエディションにおいて予告なく変更されることがあります。また、Agilent は、適用される法律によって最大限に許可される範囲において、このマニュアルおよびそれに含まれる情報に関して、商品性および特定の目的に対する適合性の暗黙の保証を含みそれに限定されないすべての保証を明示的か暗黙的かを問わず一切いたしません。Agilent は、このマニュアルまたはそれに含まれる情報の所有、使用、または実行に付随する過誤、または偶然的または間接的な損害に対する責任を一切負わないものとします。Agilent とお客様の間に書面による別の契約があり、このマニュアルの内容に対する保証条項がこの文書の条項と矛盾する場合は、別の契約の保証条項が適用されます。

技術ライセンス

このマニュアルで説明されているハードウェアおよびソフトウェアはライセンスに基づいて提供され、そのライセンスの条項に従って使用またはコピーできます。

安全に関する注意

注意

注意は、危険を表します。これは、正しく実行しなかったり、指示を順守しないと、製品の損害または重要なデータの損失にいたるおそれがある操作手順や行為に対する注意を喚起します。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、**注意**を無視して先に進んではなりません。

警告

警告は、危険を表します。これは、正しく実行しなかったり、指示を順守しないと、人身への傷害または死亡にいたるおそれがある操作手順や行為に対する注意を喚起します。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、**警告**を無視して先に進んではなりません。

本ガイドでは

本ハンドブックでは、Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition リビジョン C.01.0x のスペクトルモジュールのコンセプトを説明します。これにより、LC 3D および CE システム用の Agilent ChemStation に適用できる特別なスペクトルおよび MSD 用の Agilent ChemStation の UV 可視部を用いて、『コンセプトとワークフロー』マニュアルの情報を補完します。

LC 2D システム用 Agilent ChemStation へのスペクトルモジュールのインストールおよびコンフィグレーションの詳細に関しては、『ワークステーションインストールガイド』マニュアルを参照してください。

1 スペクトル分析の理解

この章では、以下の内容が対象となっています。

- スペクトル分析とは何か？
- 最適検出波長の決定
- スペクトルレポートスタイル

2 スペクトルライブラリ

従来のデータシステムにより、リテンションタイムに基づく相関により検出された化合物が定量されます。以下の場合、誤った同定に至る可能性があります。

- キャリブレーションされた化合物以外の化合物が、指定されたリテンションタイムウィンドウに表示される場合
- 1 つ以上のピークが、指定されたリテンションタイムウィンドウに表示される場合
- 溶媒流量の変化、またはさらに一般的なカラム特性が変化しているために、化合物が指定ウィンドウより長くカラムに保持される場合

このようなエラーを回避するための 1 つの方法として、『*Agilent ChemStation* マニュアルの理解』のマニュアルで説明されているように、ピーククオリファイアの使用があります。

ピークの同定を確認するために UV 可視スペクトルを使用できるため、ダイオードアレイ検出器を使用して、そのようなエラーを回避できます。標準スペクトルは、上手く定義されたクロマトグラム条件の下でリファレンスサンプルから取り込まれ、そしてデータベースに保存されます（スペクトルライブラリ）。未知サンプルのピークスペクトルを 1 つ以上のライブラリに保存され

たスペクトルと比較できます。視覚的比較のためにスペクトルを重ね合わせることが可能で、そして標準スペクトルおよびサンプルスペクトルの類似度を計算できます。

ChemStation により、クロマトグラム内のすべてのピークの解析、およびシーケンス内のすべてのクロマトグラムの解析を自動化できます。そのようなピーク確認に加えて、純度優先ダイアログボックスでの設定を使用して、ソフトウェアによりピーク純度確認を行えます。

これらの定性的な結果を、定量的結果を 1 つのレポートに組み合わせることが可能です。このレポートには、以下のような分析者が分析からの各ピークのために必要とするすべての情報が含まれます。

- 化合物名
- アマウント
- リテンションタイム
- 同一性マッチファクタ
- 純度マッチファクタ

この章では、スペクトルライブラリサーチのコンセプトを説明します。ライブラリサーチの実行方法に関する情報については、オンラインヘルプシステムおよび統合チュートリアルを参照してください。

3 ピーク純度の評価

この章では、ソフトウェアの C.01.0x リビジョンに対するピーク純度評価を説明します。

目次

1	スペクトル分析の理解	7
	スペクトル分析とは何ですか？	8
	最適検出波長の決定	10
	スペクトルレポートスタイル	12
2	スペクトルライブラリ	13
	検索モード	14
	レポート内容	17
	純度マーカー	17
	ライブラリマッチマーカー	18
	化合物名マーカー	18
	アmountマーカー	18
3	ピーク純度の評価	19
	ピーク純度の確認	20
	ピーク純度チェックとは何か？	20
	マッチファクタ	21
	リファレンススペクトルの選択にするバックグラウンド補正	23
	ピーク純度法	24

目次

ピーク純度表示	25
スペクトルウィンドウ	25
スペクトル標準化	26
純度ウィンドウ	27
スペクトルシミラリティカーブ	28
スレッショルドカーブ	29
固有ターゲットスペクトルの使用	31
純度計算および表示	32
ピークを純粋または不純に分類	33
ピーク純度情報	34
拡張ピーク純度オプション	36
ピーク純度分析の使用	38
スペクトル取込	38
ピーク純度の設定オプション	39
マススペクトルピーク純度	41
マススペクトル純度計算	42
マススペクトル純度表示	43
索引	45



1

スペクトル分析の理解

スペクトル分析とは何ですか？ 8

最適検出波長の決定 10

スペクトルレポートスタイル 12



1 スペクトル分析の理解

スペクトル分析とは何ですか？

スペクトル分析とは何ですか？

スペクトル分析により、UV 可視ダイオードアレイ検出器または蛍光検出器から取り込まれたスペクトルデータを解析できるようになります。

スペクトルデータの分析では、クロマトグラムデータを使用している場合、分析データに第三次元が追加されます (e} 1 を参照してください)。

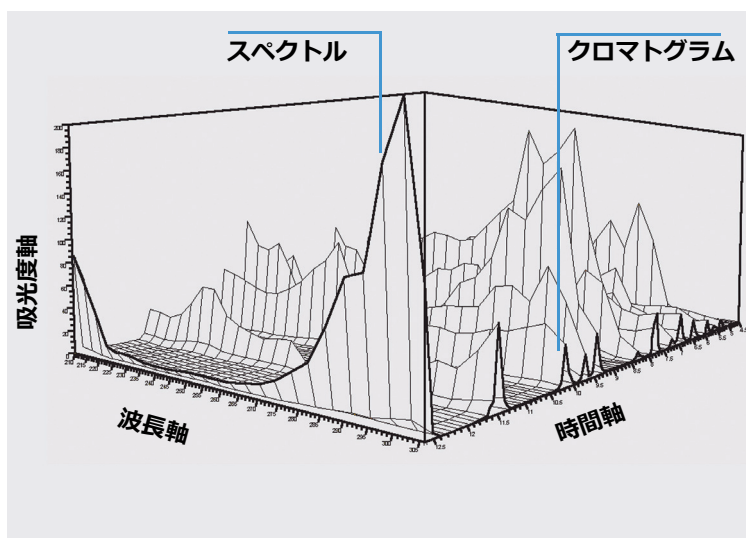


図 1 スペクトル情報

UV 可視ダイオードアレイ検出器

UV 可視ダイオードアレイ検出器により、スペクトルの UV 可視領域のスペクトルを連続的に取り込めるようになります。これは、ダイオードアレイ検出器にすべての波長が同時に取り込まれ、スペクトル取込中に感度の損失がないためです。

蛍光検出器

蛍光検出器により、以下の 3 つの異なるモードでスペクトルデータを収集できるようになります。

- 固定励起波長の設定および蛍光スペクトルの収集ができます。
- 固定蛍光波長の設定および励起スペクトルの収集ができます。
- サンプルの三次元特徴付けするために変更される励起波長と蛍光波長の両方で蛍光スキャンを取り込みます。

クロマトグラフ中に励起スペクトルおよび蛍光スペクトルを取り込みますが、蛍光検出器は検出器をスキャンしているため、より多くの波長が取り込まれると（スキャン範囲が広くなると）、分析の感度は低くなります。分析の間中、セル中のサンプルの濃度が一定である必要があるため、フローモードを停止するか、オフラインのどちらかで、三次元蛍光スキャンを取り込む必要があります。

スペクトル解析

多くの方法でスペクトルデータを解析できます。たとえば、次のことができます。

- スペクトルデータからクロマトグラフシグナルを抽出して、各ピークの最適な検出波長を決定します。
- スペクトルライブラリサーチを行い、定性的な同定を入手します。
- クロマトグラフシグナルの比率を計算して、ピーク純度を決定します。
- ピーク純度チェックを行い、（隠れた）不純物を発見します。

最適検出波長の決定

ピーク分離のために適切な条件を作成した後、メソッド作成での次のステップは、各ピークに対する最適検出波長を決定することです。

1 つの方法は、ピーク強度（吸光度または発光）、波長、および時間を、単吸光度プロットと呼ばれる等高線として存在させることです。この方法では、一連の単吸光の同心性の線としてスペクトル情報が波長及び時間の平面座標にプロットされます。これにより、すべてのスペクトル情報が同時に存在および点検されるようにできます。e} 2 の中央の表示を参照してください。

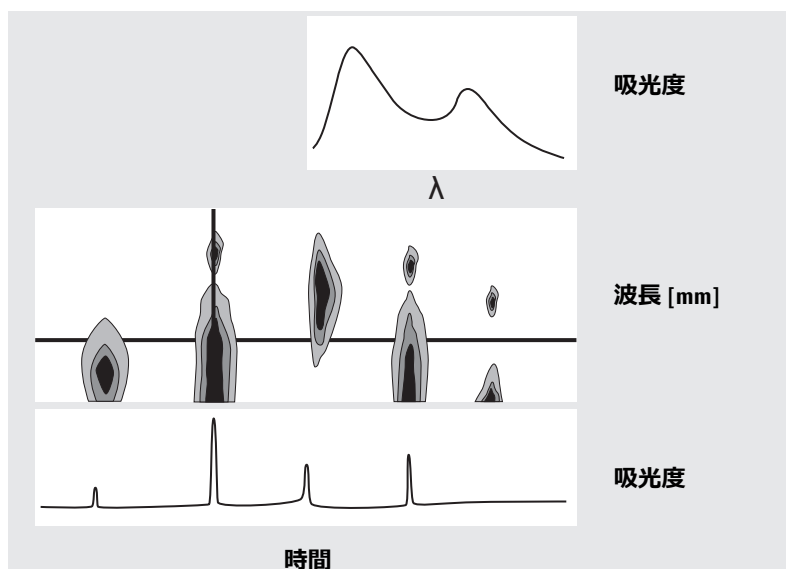


図 2 単吸光度プロット

この方法は、各分離ピークの最適検出波長を見つけるためのメソッド作成で有用です。波長は、単吸光度プロットの水平カーソルの位置に対応しています。波長軸に沿ってカーソルを動かした場合、クロマトグラムは下のウィンドウに再現されます。10ÉyÀ[ÉWÇÄe} 2 を参照してください。

ピークの最適検出波長を見つけるには、以下の事を行う必要があります。

- カーソルフィールドからクイックビューを選択して、対象ピークの吸光度が可能な限り高くなるまで中央の表示の水平カーソルを動かします。すると、下の表示ではクロマトグラフが上手く分離されます。
- カーソルフィールドからシグナルを選択し、バンド幅を最適化して、S/N比を増やして、検出のための最適波長を入手します。コピーボタンをクリックすることで、選択されたシグナルおよびバンド幅をデータ解析ビューのシグナルウィンドウに転送できます。その後、シグナルおよびバンド幅を、積分、同定、および定量解析をテストするために使用できます。

蛍光検出器での波長最適化には、一般的に 2 回の分析が必要です。

- 低い UV 領域 (230 ~ 250 nm) の励起波長を設定して、蛍光スペクトルを収集します。クロマトグラムの各ピークに対して、単吸光度プロットを使用して最適蛍光波長を決定します。
- タイムテーブルを用意して、溶出時の各ピークの最適蛍光波長を設定して、励起スペクトルを収集します。

蛍光スペクトル

蛍光スキャンだけから入手されたスペクトルを表示するために、三次元等高線表示が使用されます。この場合、スペクトル情報は励起波長 / 蛍光波長次の λ 平面座標にプロットされます。蛍光スキャンは停止されたフローモードまたはオフラインのどちらかで取り込まれるため、時間軸はありません。等高線表示から、任意の波長で励起スペクトルまたは蛍光スペクトルを抽出でき、励起スペクトルは等高線表示（垂直カーソル）の上に示され、蛍光スペクトルは等高線表示（水平カーソル）の下に表示されます。

スペクトルレポートスタイル

以下のレポートスタイルは、スペクトルモジュールで使用可能です。

- ライブラリサーチ

ライブラリサーチ結果を含むキャリブレーションされたレポートを生成します。ピーク番号、リテンション、ライブラリサーチ一致ファクター、アマウント、および化合物名は、自動ライブラリサーチダイアログボックスで指定されたパラメータに従って印刷されます。詳細情報は、17 ページの「[レポート内容](#)」を参照してください。

- 簡易 + スペクトル

装置条件、クロマトグラム、定量結果、およびピーク純度プロット情報から構成されています。

- 詳細 + スペクトル

ヘッダー、装置条件、クロマトグラム、定量結果、検量線、およびピーク純度情報から構成されています。ヘッダは、メソッドディレクトリの RPTHEAD.TXT と呼ばれるファイルに保存されます。メソッド固有のテキストを入れるために、テキストエディタを使用してヘッダーを変更できます。

- パフォーマンス + ライブラリサーチ

パフォーマンスとライブラリサーチスタイルを組み合わせます。

ピーク純度情報

ピーク純度情報では、各化合物の純度プロットを生じさせるピークの全域でのスペクトル評価について言及します。これらのプロットは、重ね書きおよび標準化されスペクトル、そしてシングルおよび重ね書きされたシグナルから構成されています。メソッドの純度優先設定に応じて、純度プロットにはスレッショルドおよびシミュリティカーブも含めることができます。

数値計算には、純度ファクタ、スペクトル形状の類似度の測定が含まれます。ピーク純度についての詳細情報は、[3 章](#)、「ピーク純度の評価」を参照してください。



2

スペクトルライブラリ

検索モード	14
レポート内容	17
純度マーカー	17
ライブラリマッチマーカー	18
化合物名マーカー	18
アmountマーカー	18



検索モード

スペクトルライブラリサーチでは、これらの検索モードの 1 つを使用できます。スペクトルライブラリおよびキャリブレーションテーブルは、3 つのモードすべての必須条件です。オプションとして、ピーク純度チェックを追加できます。

- スペクトルライブラリサーチで同定します。

このモードは、最も一般的な検索モードです。ChemStation では、ライブラリサーチの基準としてクロマトグラムが使用されます。最大 4 つまでの指定されたライブラリのスペクトルで、インテグレータで発見されたすべてのピークのピークスペクトルとリテンションタイムで特性を示されたピークスペクトルを比較しています。処理を早めるため、または信頼性を高めるため、ライブラリサーチテンプレートを使用して特定のリテンションタイムウィンドウ内で落ちるスペクトルに検索を絞ることができます。図 3 を参照してください。

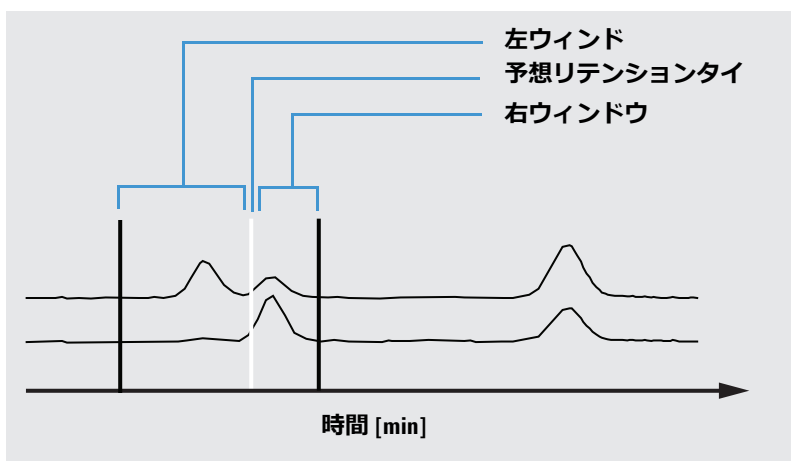


図 3 リテンションタイムウィンドウ

最も一致した化合物の名前が、ピークに割り当てられます。これが所有するスレッシュホールド値にどの程度良く一致するかを指定できます。スレッシュホールドより良い一致ファクタが発見されると、ピークは「同定」されているとレ

ポートされます。その後、ChemStation は同一に記名されたエントリに関して、キャリブレーションテーブルを参照します。このようなエントリが発見されると、データは計算に使用され、アmountをレポートします。

キャリブレーションテーブルに一致する名前が発見されない場合、ピークの同定は与えられますが、メソッドが化合物に対してキャリブレーションされていないため、アmountは計算されません。

分析で未知化合物を検索する場合、このモードを推奨します。クロマトグラム中の化合物数が、ライブラリ中のエントリ数と比較して少ない場合、最も有効です。

- キャリブレーション テーブルを使用するターゲット化合物分析。

この検索モードは、メソッドがキャリブレーションされている化合物に対してだけです。ChemStation は、キャリブレーションされた化合物に対してだけのピークスペクトルと、最大 4 つまでの指定ライブラリのスペクトルを比較します。スペクトル比較で確認される場合、ピークは同定されたとしてレポートされるだけです。キャリブレーションテーブルで定義された化合物名は、ライブラリで定義された化合物名と同一である必要があります。

リテンションタイムのターゲットウィンドウを、検索メソッドの一部として指定できます。ターゲットウィンドウに合うリテンションタイムを持つピークだけが、同定処理で使用されます。一致が設定したスレッシュホールドを超える場合にだけ、最高の一致が同定されているとしてレポートされます。

このモードは、クロマトグラム中の特定のキャリブレーションされた化合物の検索に推奨します。クロマトグラムが多くの化合物を含むが、対象の化合物で、キャリブレーションされている物が少ない場合、第一検索モードが望ましい。

- 1 つのスペクトルライブラリを使用したターゲット化合物分析。

この検索モードはすべてのライブラリエントリに対してで、キャリブレーションテーブルにも含まれるライブラリだけではありません。ChemStation では、基礎としてスペクトルライブラリが使用されます。すべてのスペクトルをクロマトグラムのピークスペクトルと比較し、ライブラリエントリのために、ライブラリサーチテンプレートで指定されたりリテンションタイムウィンドウの中に入るインテグレータにより発見されたすべてのピークの同定を試みます。ターゲットウィンドウに合うリテンションタイムを持つピークだけが、同定処理で使用されます。設定したスレッシュホールドを超える一致が発見されると、ピークは同定されたとしてレポートされます。同定は、キャリブレーションテーブルの化合物の名前に基づいて進められます。化合物がライブラリとキャリブレーションテーブル両方に存在する場合、キャリブレーション

2 スペクトルライブラリ

検索モード

ションされ、同定されたとレポートされます。化合物がキャリブレーションテーブルに含まれない場合、キャリブレーションされていないとレポートされます。

特定の化合物グループを含むライブラリを設定した場合、このモードを推奨します。たとえば、水溶性ビタミンを含む 1 つのライブラリおよび脂溶性ビタミンを含むもう 1 つのライブラリを持つことができます。その後、これら特定化合物に対して、クロマトグラムを検索できます。クロマトグラムに多くの化合物が含まれ、ライブラリに少しの化合物しか含まれていない場合、このモードは最初の検索モードより好ましくなります。

- ピーク純度チェック

ピーク純度チェックはオプションです。一致は分離の質だけを頼りにしているため、ライブラリサーチ前にピーク純度チェックを使用することを推奨します。ChemStation では、各ピークの別の部分のスペクトルの一貫性が比較されます。純度ファクタが計算およびレポートされます。純度をスレッショルドで定義でき、その値以下の不確かな結果はレポートで x のタグが付けられます。ピーク純度についての詳細情報は、3 章、「ピーク純度の評価」を参照してください。

レポート内容

スペクトルライブラリサーチにより作成される代表的なレポートには、以下の内容が含まれます。

- リテンションタイム / マイグレーションタイムで注釈の付いたクロマトグラム / エレクトロフェログラム
- ファイル名および検索パラメータに関する情報のある見出し
- 検出器のシグナルの説明および 2 つの分析テーブル
- 分析で発見されたピークのリテンションタイム
- ライブラリー一致候補物質のリテンションタイム
- キャリブレーションテーブルに記録されたリテンションタイム
- 化合物アマウントおよびその純度ファクタ（選択されている場合）、次の物と一緒に

ライブラリエントリ数、
ライブラリー一致ファクタ、そして
化合物名。

ライブラリサーチレポートの別の列には、化合物純度、化合物一致、および化合物の名前を表示するために、特定のマーカーが使用されます。

これらのマーカーを、次のステップで説明されている通りに解釈できます。

純度マーカー

不純な化合物に対して、ピークのアップスロープおよびダウンスロープにあるスペクトルは一般的に異なり、したがって両方のスペクトルがライブラリサーチに使用されます。

- u: 不純な化合物および同定に使用されたアップスロープにあるスペクトル
- d: 不純な化合物および同定に使用されたダウンスロープにあるスペクトル

ライブラリマッチマー

- x: 一致スレシヨルドの下の一一致ファクター。

化合物名マーカ

- ?: 一致スレシヨルドの下の一一致ファクターで同定された化合物。
- ?: すでにより優れた一致によって別の化合物に割り当てられた名前でも同定された化合物。この固有の化合物については、一意の名前ではよりよい一致が見つかりません。

アマウントマーカ

- +: 個別アマウント高 - [化合物詳細] で設定されたアマウントリミット値を超えています。
- : 個別アマウント低 - [化合物詳細] で設定されたアマウントリミット値を超えています。
キャリブレーションテーブルのエントリに一致しないピークが、[キャリブレーションされていない化合物] とラベルの付いた個別のテーブルにリストアップされます。



3

ピーク純度の評価

ピーク純度の確認	20
ピーク純度チェックとは何か？	20
マッチファクタ	21
リファレンススペクトルの選択にするバックグラウンド補正	23
ピーク純度法	24
ピーク純度表示	25
スペクトルウィンドウ	25
スペクトル標準化	26
純度ウィンドウ	27
スペクトルシミラリティカーブ	28
スレッショルドカーブ	29
固有ターゲットスペクトルの使用	31
純度計算および表示	32
ピークを純粋または不純に分類	33
ピーク純度情報	34
拡張ピーク純度オプション	36
ピーク純度分析の使用	38
スペクトル取込	38
ピーク純度の設定オプション	39
マススペクトルピーク純度	41
マススペクトル純度計算	42
マススペクトル純度表示	43

このセクションでは、ピークの純度を評価するために使用できる種々のメソッドを説明します。



ピーク純度の確認

クロマトグラフ分析での重要な問題として、ピークが 1 つ以上の化合物から構成されているかということがあります。品質管理において、対象ピークの陰に隠れた不純物が結果を偽る可能性があります。探索分析において、隠れて検出されなかった化合物により、探索作業にとって絶対不可欠な値の情報を失う恐れがあります。

ピーク純度チェックとは何か？

ピーク純度チェックでは、ピークが純粋か、または不純物を含むかが評価されます。この評価は、ピークの溶出中に記録されたスペクトルの比較に基づきます。ピーク当たり 5 つのスペクトルが、純度を評価するために使用されます。アップスロープおよびダウンスロープのそれぞれで 2 つのスペクトルと上部での 1 つのスペクトルです（上部、または頂点スペクトル）。5 つのスペクトルは平均され、ピークで記録されたすべてのスペクトルと比較されます。

ピークスペクトルが平均スペクトルと一致しない場合、理論上ピークにはピーク不純物が含まれています。スペクトル不純物は、1 つ以上の化合物、非ベースライン分離ピーク、またはバックグラウンド吸収が原因の可能性があります。

備考

スペクトルが一致する場合でも、ピークにまだ不純物が含まれている可能性があります。これは、スペクトル吸収が主要化合物と比較して小さい場合や、不純物および主要化合物が同様の溶出時間で同じかほとんど同じスペクトルを持つ場合に起こり得ます。

スペクトルウィンドウには、標準化および重ね書きモードで描かれる比較（平均）スペクトルから構成されるピークスペクトルが含まれます。純度ウィンドウには、重ね合わされた純度情報を持つシグナルが含まれます。純度ファクタは、スペクトル形状での類似度の指標です。

システムにバックグラウンド吸収がある場合でも、ピーク不純物を検出でき、補正できます。バックグラウンド吸収は、ベースライン補正で記録されるピーク開始および終了の高さに影響を及ぼすため、通常バックグラウンド吸収はピークの定量を妨げません。1 つの分析で異なる溶媒または溶媒組成を使用することで、バックグラウンド吸収が変わる可能性があります。

マッチファクタ

視覚スペクトル比較によるピーク不純物検出は、時間が掛かり、自動操作には適していません。スペクトルの自動比較に、いくつかの統計的方法を使用可能です。1 つの方法として、2 つのスペクトル間の数学的比較があります。スペクトル間の類似度の程度を表すマッチファクタを計算します。

2 つのスペクトルの比較から、マッチファクタが与えられ、次のように定義されます。

$$\text{マッチファクタ} = \frac{10^3 \times \left\{ \sum x \times y - \left(\frac{\sum x \times \sum y}{n} \right) \right\}^2}{\left\{ \sum x^2 - \left(\frac{\sum x \times \sum x}{n} \right) \right\} \times \left\{ \sum y^2 - \left(\frac{\sum y \times \sum y}{n} \right) \right\}}$$

値 x および y は、1 番目と 2 番目のスペクトルそれぞれの測定された吸光度で、同じ波長で、 n は、データポイントの数で、 Σ は、データの合計です。極端な場合、0 のマッチファクタは、一致しないことを示し、1000 は一致スペクトルを示します。一般的に、990 以上の値は、スペクトルが類似していることを示します。900 から 990 の間の値は、いくつかの類似点がありますが、結果の解釈には注意が必要です。900 より低い値はすべて、スペクトルが異なることを示します。

マッチファクタは、パラメータの数の影響を受け、このパラメータはサンプルおよび分離メソッドにより決定されます。パラメータには、化合物特異性、基質化合物のスペクトル吸収、およびスペクトルノイズレベルのほか、溶媒または異なる装置（異なる波長キャリブレーション）が原因のバックグラウンド吸収およびスペクトルシフトも含まれます。

スペクトルのスムージング

ノイズがスペクトルと同位の場合、純度チェックの信頼性は限定されます。スペクトルのスムージングは、以下の方法で動作します。

- 1 データポイントの定義数に関して、たとえば 5 はフィルタとして参照され、新しいデータポイントを決めるために三次回帰が使用されます。
- 2 次に、フィルタは、既に使用されているデータポイントの最後の 4 つおよび追加ポイントを取得しながら、更に 1 ポイントに移動し、解析が繰り返されます。

スムージングアルゴリズムを使用することで、統計ノイズを低減でき、これによりスムージングされたスペクトルの同定はより信頼性が高くなります。

備考

フィルタの長さ、つまり一度にスムージングアルゴリズムで使用するデータポイントの数に応じて、スムージングアルゴリズムによりスペクトルの輪郭の変更もできます。比較する前に、同じフィルタを用いて、すべてスペクトルをスムージングすることを推奨します。

スペクトルのスプラインニング

低分解能のスペクトルを取り込んだ場合、スペクトルを多角形よりも曲線に見えるようにするために、スプラインニングを使用できます。三角関数機能を使用して、スペクトルのオリジナルデータポイント間の追加データポイントを計算することで、これを行います。スペクトルをスプラインニングしている時、オリジナルデータポイントは保存されます。

対数スペクトル

対数スペクトルにより、吸光度スケールは圧縮されます。これは、吸光度が極めて広い範囲に及ぶ場合に有用です。

微分スペクトル

別の化合物と比較した場合に、微分スペクトルにより、オリジナルスペクトルより具体的な詳細が明らかにされます。スペクトルでの小さな差異が、より明白で視覚的に同定し易くなります。しかしノイズが増えるため、微分スペクトルの使用は限られます。

リファレンスペクトルの選択にするバックグラウンド補正

バックグラウンド補正用に、データファイルからピークスペクトルを抽出するために、種々のタイプの補正が使用可能です。

手動リファレンス選択

1 つのリファレンスペクトルが選択される場合、指定時間の選択されたスペクトルは、データファイルから取得され、各ピークスペクトルから減算されます。バックグラウンド吸収を変更するために、この補正を使用できません。

2 つのベースラインスペクトルが選択される場合、2 つのスペクトル間で線形補間されます。線形補間に基づく再構成されたリファレンスペクトルは、各ピークスペクトルから減算されます。バックグラウンド吸収をゆっくりとした変更を補正するために、この補正を使用できません。

自動リファレンス選択

自動リファレンス選択では、選択されたリファレンスペクトルは、データファイルのスペクトルの保存モードに応じて異なります。

全スペクトル：積分されたピークの開始および選択されたピークの終了スペクトルが、リファレンスペクトルとして取得され、そして 2 つのリファレンスペクトルを用いた手動リファレンス選択用として線形補間されます。

ピーク制御されたスペクトル：最も近いベースラインスペクトルがリファレンスペクトルとして取得され、1 つのリファレンスペクトルを用いた手動リファレンス選択用として減算されます。

ピーク純度法

ピーク純度法は、ベースライン分離したピークとだけ使用できます。ピークがベースライン分離されていない場合、ピークには不純物として隣のピークが含まれるため、ピーク純度はより複雑になります。

特定のデータファイルのすべてのピークに対して、ピークごとに対話式でピーク純度を決定できます。あるいは、[詳細 + スペクトル] などのスペクトルレポートスタイルを使用する場合、メソッドの一部として各分析の終わりに自動的に決定できます。

以下の内容に関連するオプションを設定することで、精度または性能のためにピーク純度解析を最適化できます。

- 純度決定のために使用される波長範囲
- リファレンススペクトル
- 純度スレッシュホールド
- 対数、スムージングファクタ、スプラインニングファクタ、および微分次数を含む、スペクトル解析
- 計算および表示される純度コンポーネント (これらには、スペクトル、スペクトルの差異、シグナル、類似度、およびスレッシュホールド曲線が含まれます)。

以下のセクションで説明されるピークの純度を判断するために使用できる方法には、以下の内容が含まれます。

- スペクトル標準化

異なるピーク部分からの標準化されたスペクトルの比較。

- シミラリティカーブ

溶出したピークとして取得されたその他すべてのスペクトルを用いた、平均または選択されたスペクトルの比較。

ピーク純度表示

スペクトルウィンドウ

スペクトルウィンドウには、純度計算で使用する平均スペクトルを計算するために使用される 5 つのスペクトルが表示されます。詳細にピークスペクトルを調べるために、Agilent ChemStation のグラフィック操作を使用できます。

スペクトル標準化

一般的なピーク純度法には、ピークの全域で取得された標準化スペクトルおよび比較スペクトルを伴います。溶出したピークとして検出器セルを通り過ぎるコンポーネントの濃度を変更するために、標準化により補正されます。この機能は、Agilent ChemStation のスペクトル表示機能の一部として使用可能です。

スペクトルは、ピークのアップスロープ、頂点、およびダウンスロープなどで取り込まれます。スペクトルは、グラフィック表示のために標準化および重ね書きされます。この方法は、対話式データ評価のために非常に良いもので、自動ルーチン分析に適合させることもできます。

もう 1 つの方法として、数値ファクタが好ましい場合、アップスロープスペクトルおよびダウンスロープスペクトルを数学的に比較でき、各ピークに対してリテンションタイムと一緒に純度ファクタを印刷できます。

図 4 は、スペクトルがピークのアップスロープ、頂点、およびダウンスロープで取り込まれ、標準化された例を表示します。視覚的比較およびソフトウェアにより計算された純度ファクタの両方により、純粋なピークと不純なピークの間の違いをはっきりと表示されます。

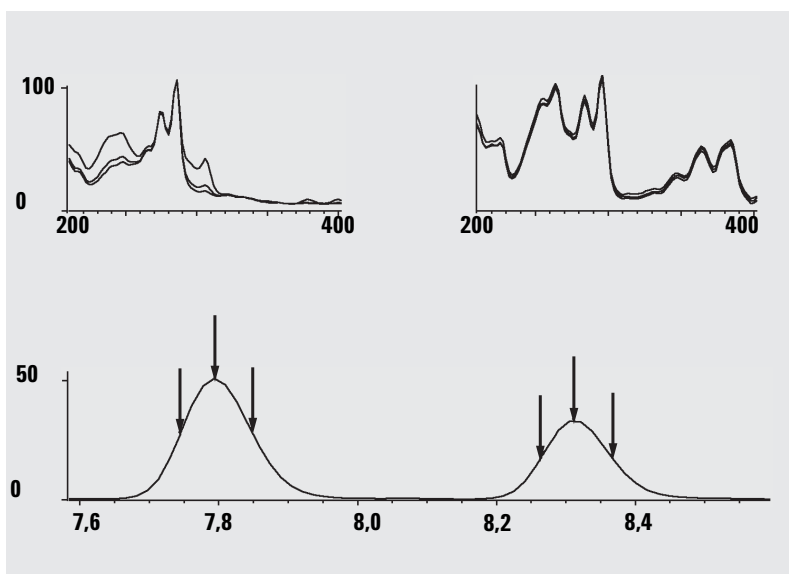


図 4 スペクトルの重ね書きによるピーク純度チェック

純度ウィンドウ

純度ウィンドウの内容は、選択された純度パラメータに応じて異なります。デフォルト表示は純度比率で、重ね合わせされた類似度およびスレッショルド曲線でシグナルを表示します（図 5 を参照してください）。緑色の帯および赤色の帯には、ユーザー定義された純度スレッショルドが表示されます。ピークの各スペクトルの計算された純度値は、黒色の点として表示され、緑色の帯の中に黒色の点がある場合、スペクトルの純度は許容純度定義内にあります。

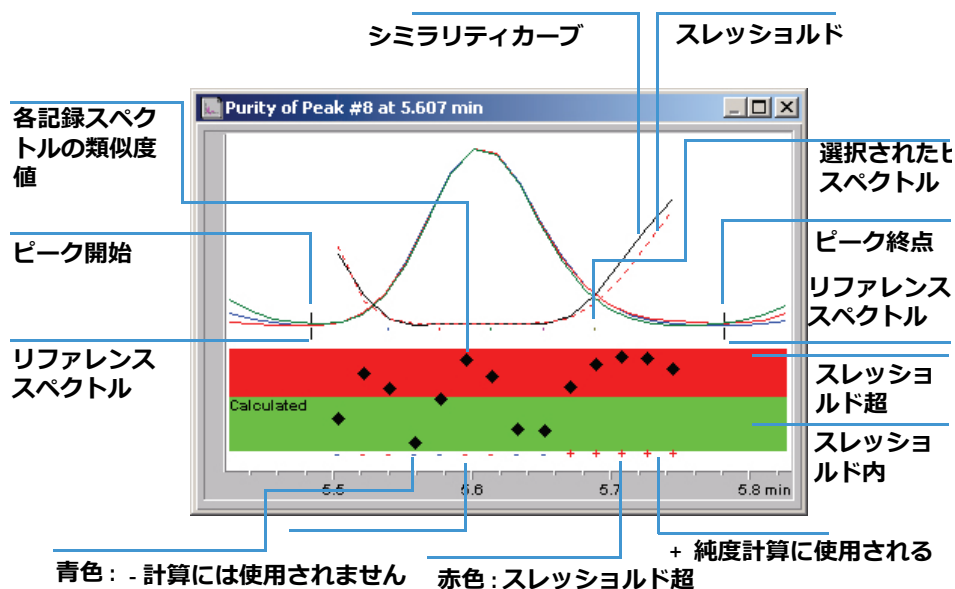


図 5 純度ウィンドウ

スペクトルシミラリティカーブ

スペクトルシミラリティカーブは、スペクトル表示の純度ウィンドウに表示されます (41 ページの [図](#) を参照してください)。

詳細が表示内で明瞭ではない場合、マウスを動かしながら左クリックすることで拡大できます。マウスを動かす時に画面に範囲が描かれ、拡大範囲を表示します。オリジナルの表示に戻すには、マウスの左ボタンをダブルクリックします。

スペクトルシミラリティカーブによって、ピークの純度または不純物について最も詳細な情報が提供されます。ピークからのすべてのスペクトルは、デフォルトの平均スペクトルにより、1 つ以上のスペクトルと比較されます。一致の度合またはスペクトル類似度は、溶出中にプロットされます。純度ピークの理想的な輪郭は、[図 6](#) (a) に示されているように、1,000 で平らなラインになっています。

各ピークの始まりと終わりで、S/N 比が減少して、ピークのスペクトルに対するスペクトルバックグラウンドノイズの寄与は大きくなります。シミラリティカーブに対するノイズの寄与は、[図 6](#) (b) に示された通りです。

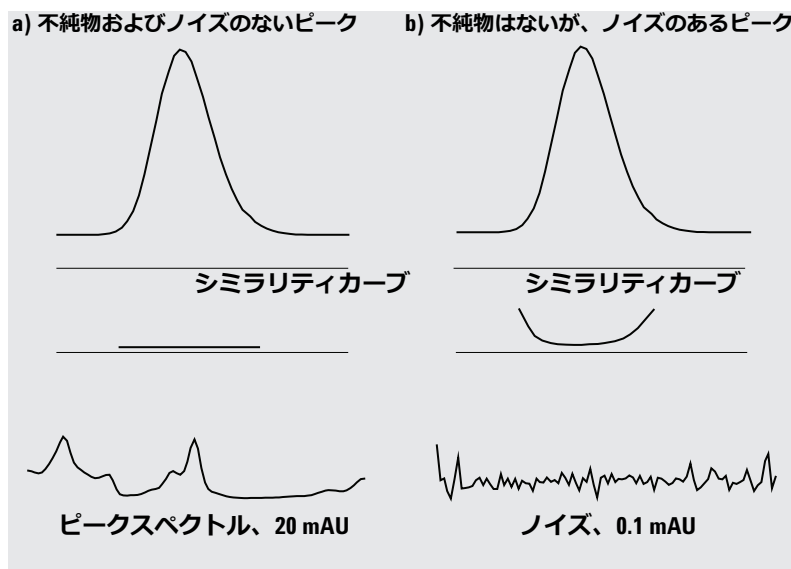


図 6 理想的な類似度ファクタ (1,000) およびユーザー定義スレッショルド (980) との関係でのノイズプロットされている、およびされていない純度ピークのシミラリティカーブ

スレッシュホールドカーブ

スレッシュホールドカーブによって、所定のシミュリティカーブ上のノイズの影響が表示されます。影響は、ピークの始点および終点の方へ速やかに増加します。基本的に、スレッシュホールドカーブは、バックグラウンドノイズコンポーネントのある純粋なピークのシミュリティカーブの 1 つです。

ノイズの影響は、図 7 で見るすることができます。類似度ファクターは、S/N 比が減少すると減少し、吸光度レンジが減少するとコンスタントノイズレベルで減少します。

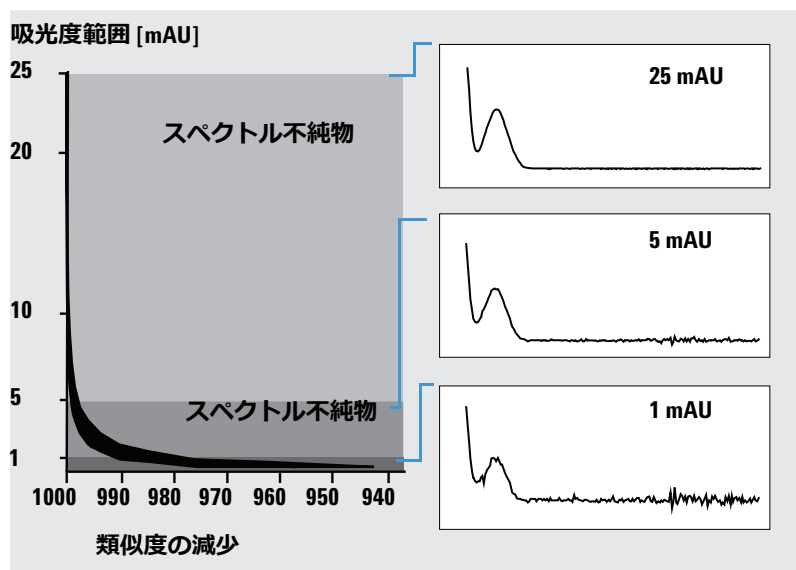


図 7 ノイズレベルの関数としての類似度ファクタ

3 ピーク純度の評価 ピーク純度表示

図 8 では、(a) ノイズのある純粋なピークの、そして 図 8 (b) 不純なピークのシミラリティカーブとスレッショルドカーブの両方が示されています。

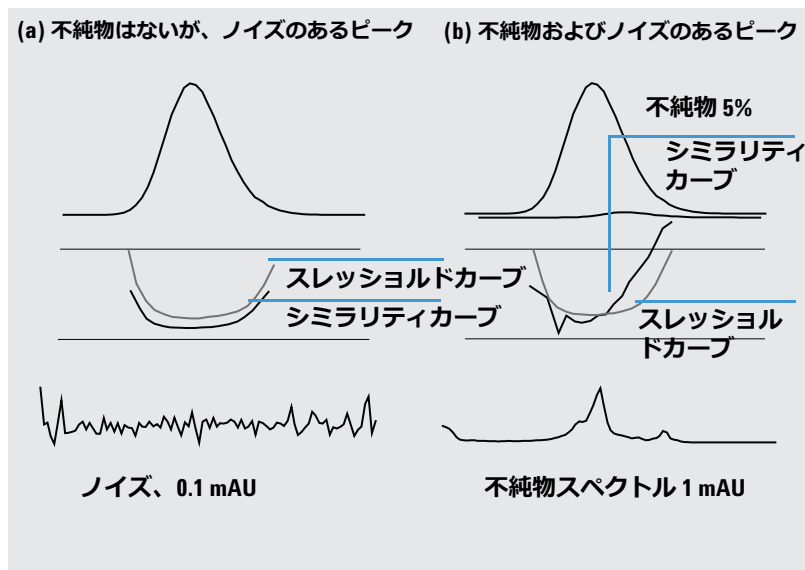


図 8 シミラリティカーブおよびスレッショルドカーブ上の不純物およびノイズの影響

ノイズスレッショルドは、分析の始まりに（つまり 0 分に）、デフォルトの 14 個のスペクトルで、指定された時間の純粋なノイズスペクトルの標準偏差に基づき自動的に決定されます。

分割された線によって代表されるスレッショルドカーブにより、スペクトル不純物がノイズリミット値内にある範囲が与えられます。このスレッショルドより上では、スペクトル不純物はスペクトルバックグラウンドノイズを超え、そして不純物（上手く選択したリファレンスおよびノイズパラメータを提供した）を示しながら、シミラリティカーブはスレッショルドカーブと交差します。

固有ターゲットスペクトルの使用

Agilent ChemStation により、図 9 に示されたように、異なるターゲットスペクトルに対する純度ファクタおよびシミュリティカーブの計算が可能になります。一般的な規則として、平均スペクトルとのデフォルトの比較により、大部分の未知不純物の最も価値のある情報が提供されます。固有ターゲットスペクトルの選択を可能にする柔軟性は、分析者が不純物のある場所を想定する必要がある場合、または純度評価の感度を改善する必要がある場合に価値があります。この原理がどのように適用されるのかを示すのに役立つ例があります。不純物がピークのテールにあると想定される場合、すべての他のスペクトルと比較されるテールスペクトルまたは頂点スペクトルを選択することで、この場合の最も大きな情報が提供されます。

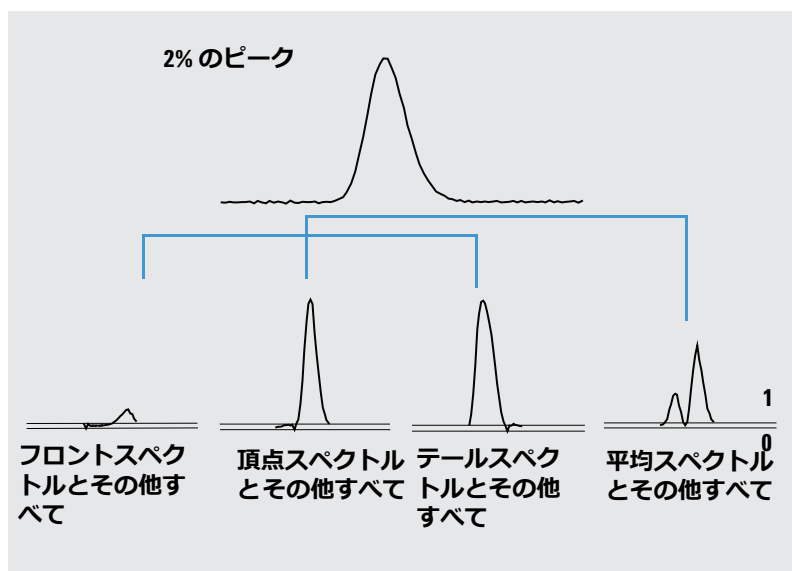


図 9 同じピークからの異なるターゲットスペクトルの比率曲線

図 9 により、レスポンス最大値（頂点）の後に不純物を含むピークのフロント、頂点、および平均スペクトルに対する比率曲線が与えられます。

フロントスペクトルにより、ピークの終わりでの小さなスペクトル不純物が与えられます。フロントスペクトルはほとんど吸収されないため（かなり高いスレッシュホールドカーブを与えながら）、この最初の比率曲線での偏差は小さくなります。

3 ピーク純度の評価 ピーク純度表示

頂点スペクトルにより、ピークのフロントに低い不純物（頂点スペクトルには、非常に小さなアmountの不純物だけが含まれます）、そしてテールに高い不純物が与えられます。

テールスペクトル（高いレベルの不純物のある）により、ピークのフロントにスペクトル不純物が与えられます。

平均スペクトル（5 つの選択したピークスペクトルの平均）により、トータルピークにスペクトル不純物が示されます。この平均スペクトルには、不純物のスペクトル寄与が含まれます。この場合、頂点スペクトルの比率曲線と比較して、溶出またはマイグレーションフロントに高いスペクトル不純物を示しながら、そしてテールに低い不純物を示しながら、平均には頂点スペクトルより多い不純物からの分担が含まれます。

シミラリティ、スレッショルド、および比率カーブの輪郭は、不純物の位置、レベル、およびスペクトルの違いに応じて異なり、そしてそういうものとして、一般的なステートメントを形にはできません。輪郭が状況ごとに異なることを期待します。

純度計算および表示

純度ファクタは、ピーク純度の絶対的な指標ではありません。計算、特に純度スレッショルドで使用されるパラメータの関数です。そのため、スレッショルドセットと一緒に結果を解釈する必要があります。純粋なピークに対して、異なるパラメータ設定の類似の結果が作成されます。不純なピークに対して、最悪の場合の分析が行われます。スレッショルド下にあるスペクトルなどの不純物を参照するデータポイントだけが、計算で検討されます。そのため、スレッショルド値の変化が不純なピークの純度ファクタに劇的な影響を及ぼす可能性があります。これらの計算の詳細に関しては、下記を参照してください。

Agilent ChemStation シミラリティカーブの詳細説明に関しては、28 ページの「**スペクトルシミラリティカーブ**」を参照してください。

全スペクトル

- 1 ユーザー定義スレッショルドより上のピークに対して記録されたりファレンス補正スペクトルのすべてが、純度およびスレッショルドカーブの計算に使用され、これらのスペクトルの中の 5 つがスペクトルウィンドウに表示されます。

- 2 各スペクトルとスペクトルウィンドウに表示される 5 つのスペクトルの平均の間でマッチファクタが計算され、これらは純度表示にシングルポイントとしてプロットされます。
ユーザー定義スレッショルドに対して、シミュリティカーブが純度プロット上に重ね合わされます。

計算されたスレッショルドに対して、各スペクトルに対してスレッショルド値が計算され、スレッショルド値と直線を与える類似度値の比率としてスペクトルの純度値が定義されます。これにより、純粋および不純なデータポイントを上手く同定できます。シミュリティカーブおよびスレッショルドカーブが、純度プロット上に重ね合わされます。

ピーク制御されたスペクトル

- 1 ユーザー定義スレッショルドより上のピークに対して記録されたリファレンス補正スペクトルのすべてが、計算で使用され、スペクトルウィンドウに表示されます。
- 2 スペクトルウィンドウに表示される各スペクトルとこれらのスペクトルの平均の間でマッチファクタが計算され、これらは純度表示にシングルポイントとしてプロットされます。
- 3 計算されたマッチファクタすべての平均値として、純度値が計算されます。

ピークを純粋または不純に分類

計算された純度レベルは、画面に表示される純度ステートメントの作成に使用されます。純度ファクタがスレッショルド値内の場合、(手動で設定、またはスレッショルドカーブから計算される) ピークは純粋と分類されます。純度ファクタがスレッショルド値を超える場合、ピークは不純と分類されます。

備考

検出された不純物は、必ずしも化合物不純物を意味しないスペクトル不純物です。スペクトル不純物は、溶媒組成の変化 (グラジエント) が原因の可能性があり、またベースライン分離されていないピークで起こる可能性があります。

ピーク純度情報

純度ファクター

純度ファクタにより、ピークの純度に対する数値が得られます。

- ピークが純粋と分類された場合、純度ファクタはスレッシュホールド内のすべてのスペクトルの平均値です。
- ピークが不純と分類された場合、純度ファクタはスレッシュホールド超のすべてのスペクトルの平均値です。

どちらか一方の場合で、純度ファクタの計算に使用されるスペクトル数および計算の基礎が指定されます。

スレッシュホールド

計算されたスレッシュホールドに対して、これは、純度ファクタの計算で使用されるそれらすべてのスペクトルの平均値です。ユーザー定義スレッシュホールドに対して、これは純度オプションで設定する値です。

ピークスペクトル

ピークスペクトルには、純度計算のために選択された 5 つのスペクトルの詳細が表示されます。以下の内容も表示できます。

- 相違スペクトル
平均されたスペクトルと個別に選択されたスペクトルの相違と計算されたスペクトル。純粋なピークには、相違スペクトルのノイズだけが表示されます。
- 比較されるスペクトル
純度計算のために使用される平均スペクトル。
- すべての記録されるスペクトル
ピーク全域で記録されるすべてのピーク。
- リファレンススペクトル
バックグラウンド補正のために使用されるスペクトル。

純度およびノイズ計算

純度計算についての情報には、記録されたスペクトルの数、および純度ファクタを計算するために使用されたスレッシュホールド内またはスレッシュホールドを超えている記録されたスペクトルの数が表示されます。

ノイズ計算についての情報には、ノイズスレッシュホールドを計算するために使用されたスペクトル、および計算結果が表示されます。ノイズスペクトルのほか、ノイズ統計値のグラフも表示できます。ノイズ計算のためのパラメータも変更できます。

備考

バックグラウンドノイズの計算のためのパラメータを変更することで、純度計算の結果に大きな影響を及ぼす可能性があります。変更を行う前に、36 ページの「[拡張ピーク純度オプション](#)」で提供される情報を必ず理解するようにしてください。

純度カーブ

純度カーブ情報には、ピークの各スペクトルと平均スペクトルとの比較結果が表示されます。異なる列の値は、純度列での値とスレッシュホールド列での値の算術的な相違を表します。どのスペクトルがピークの純度ファクタおよびスレッシュホールド値の計算で使用されるか決定するために、相違値が使用されます。

純度カーブの詳細

純度カーブの詳細の情報には、平均スペクトルを使用した結果に加えて、フロント、頂点、およびテールスペクトルを使用した純度計算の結果が表示されます (31 ページの「[固有ターゲットスペクトルの使用](#)」を参照してください)。任意またはすべてのこれらの計算のシミュリティカーブを表示するよう選択できます。純度計算のパラメータおよび結果が表示される方法も変更できます。

備考

純度計算のためのパラメータを変更することで、純度結果に大きな影響を及ぼす可能性があります。変更を行う前に、36 ページの「[拡張ピーク純度オプション](#)」で提供される情報を必ず理解するようにしてください。

拡張ピーク純度オプション

拡張ピーク純度オプションで行われ変更は、純度結果に大きな影響を及ぼす可能性があります。変更が結果に及ぼす影響を理解しない限り、変更を行わないことを推奨します。

純度計算

デフォルトによる純度計算では、ピーク全域のスペクトルの平均が使用されますが (20 ページの「[ピーク純度チェックとは何か ?](#)」を参照してください)、計算の基礎として以下のその他のスペクトルも使用できます。

すべてのスペクトルでは、5 つの選択したスペクトルのそれぞれ使用され、同じウィンドウに表示される 5 組の結果を生成します。

頂点スペクトル、フロントスペクトル、およびテールスペクトルでは、純度分析の感度を改良できる可能性のある特定のスペクトルが使用されます (31 ページの「[固有ターゲットスペクトルの使用](#)」を参照してください)。

フロントおよびテールスペクトルでは、純度計算の基礎としてフロントおよびテールスペクトルを使用して生成された 2 組の結果が表示されます。

ピーク純度のデフォルト表示は、27 ページの [図 5](#) に示されている通り純度比率ですが、シミラリティカーブおよびスレッシュホールドカーブとして純度結果も表示できます。

Agilent ChemStation には、シミラリティカーブおよびスレッシュホールドカーブを表示するために以下の 3 つのモードが装備されています。

- 1 いずれの変換もなし、37 ページの [図 10 \(a\)](#) を参照してください。
- 2 自然対数として、 $\ln$ 、グラフ下部のピーク頂点の詳細の利点と共に、37 ページの [図 10 \(b\)](#) を参照してください。
- 3 比率として：比率 = $\frac{1000 - \text{シミラリティ}}{1000 - \text{スレッシュホールド}}$ 、37 ページの [図 10 \(c\)](#) を参照してください。

スペクトルの純粋ピークに対して、比率値は 1 未満で、スペクトルの不純ピークに対して、値は 1 超です。作成された比率の利点は、1 行だけが表示されることで、簡単な解釈につながります。

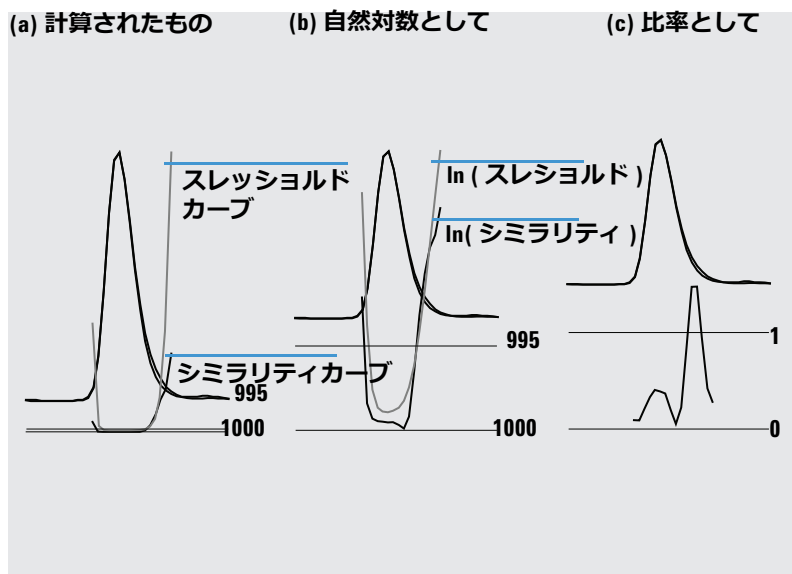


図 10 スレッシュホールドカーブおよびシミラリティカーブ
(a) 計算されたものとして
(b) $\ln$ (スレッシュホールド) および $\ln$ (シミラリティ)
(c) 比率として

ノイズスレッシュホールド

デフォルトにより、分析の始まり (0 分) での 14 個の純粋ノイズスペクトルの標準偏差を使用して、ノイズスレッシュホールドが自動的に決定されます。計算されるノイズの標準偏差からのスペクトルの時間および数を変更でき、あるいは標準偏差に固定値を入力できます (デフォルト値 0.1)。標準偏差が特定のスキャン数から計算される場合に、最高精度が達成されます。

ピーク純度分析の使用

このセクションでは、ピーク純度分析に適したデータ取込およびピーク純度オプションの設定に関する実用的なヒントが含まれています。

スペクトル取込

ピーク純度テストは、ピーク全域のスペクトルの比較に基づいています。比較に十分なスペクトルが入手可能か、そしてスペクトルの質が高いかを確認します。検出器がよく保守されているか、ランプ強度が強いのか、そして適切なフローセルとスリットを選択しているかを確認します。幅広い波長範囲一面にスペクトルの小さなシフトさえも表現されるため、そして分解能は通常それほど重要ではないため、一般的に分解能よりも感度を最適化しなければなりません。

すべての保存スペクトルを使用して、連続的にスペクトルを収集します。ピークが検出される時に連続的にスペクトルを収集する、そして加えて純度分析のためのベースラインノイズ決定で使用するための分析の開始時の約 20 個のスペクトルを保存するピークモードのすべてに、最新の検出器は対応しています。

ダイオードアレイ検出器画面上のピーク幅を、分析での最も狭い対象ピークの幅に設定します。

サンプル濃度が検出器の線形操作範囲に適切かどうか確認します。コンポーネントが濃縮されすぎると、検出器は最高吸光度の波長での線形範囲外で運転する一方、その他の波長では線形を維持します。これにより、スペクトルの形状の濃度による変化が生じ、コンポーネントは不純である可能性があるとしてレポートされます。コンポーネント濃度が低すぎると、スペクトルの S/N 比は悪くなり、純度分析の感度は低下されます。最も正確で感度の良い純度分析は、高さ 250 から 800 mAU の間のピークに対してです。

ピーク純度を確認するために、デフォルト設定を使用します。疑わしい不純物が検出されると、不純物を確認および詳しい特徴付けをするために、結果をより批判的に調べることができます。

ピーク純度の設定オプション

スペクトルオプションダイアログボックスの適切なタブの以下の設定を設定します。

波長範囲

この設定を使用して、純度分析に使用される波長範囲の一部を制御します。移動相の吸光度が過剰なノイズを生じる波長を除外するなどの下限値を設定できます。対象化合物が吸収されない高い波長を除外するために、上限値を設定できます。

スペクトル解析

スペクトル解析を使用して、スペクトルの変換、スムージング、またはスプラインするために数学的計算を行います。実際には、スペクトルの小さな相違を強調することにより（微分）ノイズも強調される一方、ノイズを減らすことにより（スムージング）小さなスペクトルの感度を変更されます。

吸光度スレッシュホールド

吸光度スレッシュホールドは、分析に含まれる可能性の有る最小のスペクトル強度に設定されます。通常、スレッシュホールドは 1 ~ 2 mAU に設定され、ピーク先端のスペクトルがピークチェックに含まれるようにします。

リファレンススペクトル

リファレンススペクトルは、バックグラウンド吸光度を補正するために使用されるベースラインスペクトルです。常にリファレンススペクトルを使用することを推奨します。推奨設定は自動です。このモードを使用して、積分の開始および終了に近いベースラインからスペクトルが取得されます。ピーク全域の各スペクトルを補正するために、これら 2 つのスペクトルの直線外挿が使用されます。これは 2 点のリファレンスのため、グラジエントを使用して、検出器ドリフトおよび移動相組成の変化の補正をできます。以前のソフトウェアとの下位互換性のために、そして少しのスペクトルが収集された場合にいくつかの純度情報を入手できるようにするために、その他のリファレンスモードを使用可能です。

2 つのピークが完全にベースライン分離されていない場合、自動リファレンス選択を使用したリファレンススペクトルの自動選択は、2 つのピーク間の谷から選択されているリファレンススペクトルに至る可能性があります。分離され

3 ピーク純度の評価

ピーク純度分析の使用

ていないピークは純粋に成り得ません。この場合、その他の隠れた化合物を探すために、純度テストを使用できます。手動リファレンス選択を使用して、ピークの集合の前後からリファレンススペクトルを選択します。

純度スレッシュホールド

ピーク制御スペクトルによりデータが収集された場合、値を純度スレッシュホールドに入力する必要があります。一般的に、990 のデフォルト値により、許容可能な結果が出ます。

すべてのスペクトルを取り込むことで、またはピーク中のすべてでデータが収集された場合、Agilent ChemStation による個別の S/N 比に基づく各スペクトルのスレッシュホールドの計算を可能にすることで、最善の結果が出されます。別の方法として、ピークのすべてのスキンの固定スレッシュホールドを設定できますが、これは推奨しません。固定スレッシュホールドを使用する場合、995 ～ 998 などのピーク制御スペクトルに対する値より高い値を使用します。

マススペクトルピーク純度

LC/MS で、MSD 中のコンポーネントの濃度が最大になる場合、化合物を特徴付けるイオンの存在度は特定のリテンションタイムで最大になります。クロマトグラフの状態およびスキャンサイクルタイムに応じて、近くで溶出しているピークのリテンションタイムはお互いに非常に近くなることがあり、複数のコンポーネントが 1 つのピークまたは歪みのある（ショルダなど）ピークとして全イオンクロマトグラム (TIC) に表示されます。個々のイオンが最大になるリテンションタイムを調べることで、同じ利点書タイムで最大になるイオンのクラスタを一緒にまとめる事が可能で、その後これらのイオンはすべて同じコンポーネントに属すると想定されます。同じクロマトグラフピーク包絡線の異なるリテンションタイムで 1 つ以上のイオンのクラスタが最大になる場合、ピークは不純とすることができ、イオンの個々のクラスタを決定できます。

この分析で、以下のいくつかの想定がなされます。

- マススペクトルまたはリテンションタイムのどちらかで、他成分混合物のコンポーネントを分離できます。混合物の各コンポーネントが独特の m/z 値を持つ特色のあるマススペクトルを持つか、複数の最高値を決定できるようにするために化合物が十分に上手く分離されるかのどちらかです。
- S/N 比は、実際の最大値を明らかに同定できるようにするために十分高くなります。
- コンポーネントリテンションタイムを計算するための基礎として使用されるイオンリテンションタイムは、正確で典型的です。

ほんの少しの例外だけで、イオン源衝突誘起解離 (CID) がフラグメントを生成するために使用されていない限り、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) により分子イオンだけが生成されます。これは、2 つの独特な 1 価イオンが一連のスペクトルとして発見される場合（共通に溶出する場合でも）、それらのイオンを同定および定量することが可能なことを意味します。予想される $[M+H]^+$ または $[M+H]^-$ イオンに加えて、正イオンおよび負イオンがイオンを生成する可能性があるため。これを行う場合、注意する必要があります。大気圧化学イオン化 (APCI) により分子イオンも生成されますが、サーマルフラグメントはエレクトロスプレーより APCI でより一般的です。

さらに、マススペクトルには同定および純度評価に役立てるために使用できる同位体情報が含まれます。

3 ピーク純度の評価 マススペクトルピーク純度

スペクトルおよび時間の相違がある場合、ピーク純度アルゴリズムにより不純なピークだけが同定されます。手動での解釈では、そのリミット値を超えることができます。UV データと違い、異なるイオンを持つ「化合物」と同じぐらいの長さの不純なピークを定量するために、MS データは使用できます。ピーク純度は、一般的にスキャンデータを必要としますが、SIM データは必要なく好都合です。

マススペクトル純度計算

ピークの積分された範囲に及び TIC の範囲は、選択した m/z 値の組を使用して検索され、そして各 m/z 値の最大存在量が決定されます。発見された各最大値に対して、放物近似を使用して補間リテンションタイム（スキャン数）が計算されます。最大値のリテンションタイムは、クラスタに分けられ、その後範囲内に存在する化合物を用いて同定されます。化合物の数についての情報、各化合物のリテンションタイム（スキャン数）、およびクラスタの最大 m/z 値がレポートされます。

スキャン（ベースピーク）中の最大存在量の 1% より大きな存在量を持つすべての m/z 値を使用して、積分されたピーク時間範囲の 25%、50%、および 75% でのスキャンを調べることで、選択された m/z 値の組が入手されます。各選択された m/z 値に対して、時間範囲の最初および最後のスキャンの平均存在量が、クラスタが決定される前にバックグラウンド補正のために使用されます。

組の中の各 m/z 値は、時間範囲でスキャンごとに調べられ、最大存在量はどちらか 1 つの側の最大値の存在量と一緒に保存されます。 m/z 値あたりに 1 つの最大値だけが保存されます。保存された最大値それぞれは、最初および最後のスキャンで発生しないこと、そしてどちらか 1 つの側にゼロの存在量を持たないことを確認することで検証されます。

m/z 値のために補間スキャン数が計算され、そしてバックグラウンド補正が行われた後、 m/z 値、存在量、および補間スキャン数が、補間スキャン数の順番で含まれるテーブルが生成されます。

クラスタは、スキャン数が増える順になっているリスト中の最大存在量を調べることで決定されます。一旦クラスタが登録されると、クラスタ中の m/z 値の平均補間スキャン数が計算され、検討中の次のポイントがスキャンの半分以上平均から外れている場合、新しいクラスタが開始されます。

発見されたクラスタの数は、化合物の数としてレポートされ、平均補間スキャン数はレポートされたスキャン数で、クラスタの中に 2 つの最大存在量を持つ m/z 値はイオンとしてレポートされます。

1 つ以上のクラスタを含む積分されたピークは、不純とレポートされます。

マススペクトル純度表示

ピークウィンドウ中のイオン

ピークウィンドウのイオンには、各クラスタに最大存在量を持つ 2 つの m/z 値が表示されます。単独化合物ピークには、同じリテンションタイムで最大になっている 2 つのイオンが表示され、複数化合物ピークには、同じリテンションタイムで最大になっている 1 組のイオンが表示されます。各イオンの組は、不純ピークに化合物を表示します。詳細にイオンを調べるために、Agilent ChemStation のグラフィック操作を使用できます。

MS ピーク純度結果ウィンドウ

MS ピーク純度結果ウィンドウには、ピーク純度分析のテーブル形式の結果が含まれます。テーブルの各行には、以下のような 1 つの化合物に対する情報が含まれます。平均補間スキャン数および 2 つの最も感度の高いイオン。

3 ピーク純度の評価

マススペクトルピーク純度

索引

C

COMPARE コマンド, 21

か

化合物名マーカー, 17

蛍光スペクトル, 11

決定

最適波長, 10

さ

最適波長, 10

自動スペクトルライブラリサーチ

ターゲット化合物分析, 15

概観, 3

検索モード, 14

標準検索, 14

ピーク純度, 16

純度

ピーク, 20

純度計算

スレッシュホールドカーブ, 29, 34

マススペクトル, 43

純度表示

マススペクトル, 44

スペクトル

スムース, 21

対数, 22

標準化, 26

微分, 22

補正, 22

リファレンス, 40

スペクトル、蛍光, 11

スペクトルシミュリティカーブ
, 28

スペクトル操作

比較, 26

標準化, 26

スペクトル取込, 39

スペクトル分析

何ですか?, 8

スムーススペクトル, 21

スレッシュホールドカーブ, 29, 34, 37

表示モード, 31

線形範囲, 39

た

ターゲットスペクトル, 32

対数スペクトル, 22

単吸光度プロット, 10

第三次元, 8

頂点 スペクトル, 33

テールスペクトル, 33

等高線

図, 10

線, 10

は

波長

最適化, 10

バックグラウンド

吸着, 20

バックグラウンド補正, 22

比較

スペクトル, 26

標準化

スペクトル, 26

微分スペクトル, 22

ピーク

純度, 20

不純物, 20

ピークシグナルウィンドウ, 28

ピーク純度

意味, 20

固有ターゲットスペクトルの使用, 32

スペクトルシミュリティカーブ
, 28

スレッシュホールドカーブ, 29, 37

マススペクトル, 42

ヒント, 39

不純物, 20

フロントスペクトル, 32

平均スペクトル, 33

ベースライン

補正, 23

ま

マススペクトルピーク純度, 42

マッチファクタ, 21

ら

ライブラリマッチマーカー, 17

リファレンススペクトル, 40

バックグラウンド補正, 22

レポート

スペクトル, 12

ピーク純度, 12

ライブラリサーチ, 12

本書では

このハンドブックでは、Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition リビジョン C.01.0x のスペクトルモジュールのコンセプトを説明します。これにより、LC 3D および CE システム用の Agilent ChemStation に適用できる特別なスペクトルおよび MSD 用の Agilent ChemStation の UV 可視部を用いて、『コンセプトとワークフロー』マニュアルの情報を補完します。

© Agilent Technologies 1994-2012, 2013

Printed in Germany
01/13



M8301-96170



Agilent Technologies