

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition

Familiarización con el
módulo de espectros



Agilent Technologies

Avisos

© Agilent Technologies, Inc. 1994-2012, 2013

No se permite la reproducción de parte alguna de este manual bajo cualquier forma ni por cualquier medio (incluido su almacenamiento y recuperación electrónicos y la traducción a idiomas extranjeros) sin el consentimiento previo por escrito de Agilent Technologies, Inc. según lo estipulado por las leyes de derechos de autor estadounidenses e internacionales.

Microsoft[®] es una marca comercial registrada en EE. UU. de Microsoft Corporation.

Número de referencia del manual

G2180-95023

Edición

01/13

Impreso en Alemania

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

Revisión de software

Esta guía es válida para las revisiones C.01.xx del software Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, donde xx hace referencia a revisiones menores del software que no afectan a la exactitud técnica de la guía.

Garantía

El material contenido en este documento se proporciona “tal como es” y está sujeto a modificaciones, sin previo aviso, en ediciones futuras. Además, hasta el máximo permitido por la ley aplicable, Agilent rechaza cualquier garantía, expresa o implícita, en relación con este manual y con cualquier información contenida en el mismo, incluyendo, pero no limitado a, las garantías implícitas de comercialización y adecuación a un fin determinado. En ningún caso Agilent será responsable de los errores o de los daños incidentales o consecuentes relacionados con el suministro, utilización o uso de este documento o de cualquier información contenida en el mismo. En el caso que Agilent y el usuario tengan un acuerdo escrito separado con condiciones de garantía que cubran el material de este documento y que estén en conflicto con estas condiciones, prevalecerán las condiciones de garantía del acuerdo separado.

Licencias sobre la tecnología

El hardware y/o software descritos en este documento se suministran bajo una licencia y pueden utilizarse o copiarse únicamente de acuerdo con las condiciones de tal licencia.

Avisos de seguridad

PRECAUCIÓN

Un aviso de **PRECAUCIÓN** indica un peligro. Llama la atención sobre un procedimiento de operación, una práctica o similar que, si no se realizan correctamente o no se ponen en práctica, pueden provocar daños en el producto o pérdida de datos importantes. No continúe utilizando el producto si percibe un aviso de **PRECAUCIÓN** hasta que se entiendan y se cumplan completamente las condiciones indicadas.

ADVERTENCIA

Un aviso de **ADVERTENCIA** indica un peligro. Llama la atención sobre un procedimiento de operación, una práctica o similar que, si no se realizan correctamente o no se ponen en práctica, pueden provocar daños personales o la muerte. No continúe utilizando el producto si percibe un aviso de **ADVERTENCIA** hasta que se entiendan y se cumplan completamente las condiciones indicadas.

En esta guía...

Este manual describe los conceptos en los que se basa el módulo de espectros de la Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition revisión C.01.0x. Complementa la información del manual *Conceptos y flujos de trabajo* con los conceptos sobre espectros especiales aplicables a la Agilent ChemStation para sistemas LC 3D, CE y la sección de UV-visible de la Agilent ChemStation para MSD.

1 Familiarización con el análisis espectral

En este capítulo se tratan los aspectos siguientes:

- ¿Qué es el análisis espectral?
- Determinación de la longitud de onda óptima de detección.
- Estilos de informes espectrales.

2 Bibliotecas de espectros

Los sistemas tradicionales cuantifican compuestos detectados mediante correlaciones basadas en tiempos de retención. Esto puede llevar a errores, si:

- compuestos distintos a los calibrados aparecen en la ventana de tiempo de retención especificada,
- aparece más de un pico en la ventana de tiempo de retención especificada, o
- el compuesto es retenido más tiempo en la columna más del que se especifica en la ventana, debido a cambios en el flujo de disolventes o, más frecuentemente, por cambios en las características de la columna.

Un modo de evitar tales errores consiste en utilizar cualificadores de pico como se describe en el manual Referencia para los principios de funcionamiento.

Con el detector de diodos, también pueden evitarse: el espectro visible mediante UV puede confirmar la identidad de un pico. Los espectros patrón se adquieren de una muestra referencia bajo condiciones cromatográficas bien definidas y se almacenan en una base de datos (biblioteca de espectros). Pueden compararse los espectros de los picos de una muestra desconocida con los almacenados en una o más bibliotecas. Los espectros pueden superponerse para establecer y calcular, por comparación visual, la similitud entre espectros patrón y muestra.

La ChemStation puede automatizar este proceso para todos los picos en un cromatograma y para todos los cromatogramas en una secuencia. Además de confirmar picos, el software puede realizar un control de pureza, utilizando los parámetros del cuadro de diálogo Purity Preferences.

Estos resultados cualitativos pueden ser combinados con los resultados cuantitativos en un solo informe. Este informe contiene toda la información que necesita un analista para cada pico de un análisis, como:

- nombre del compuesto,
- cantidad,
- tiempo de retención,
- factor de coincidencia de identidad y
- factor de coincidencia de pureza.

En este capítulo se describen los conceptos de búsqueda en la biblioteca de espectros. Para obtener más información sobre cómo realizar búsquedas en bibliotecas, consulte el sistema de ayuda en línea y la guía práctica.

3 Evaluación de la pureza de pico

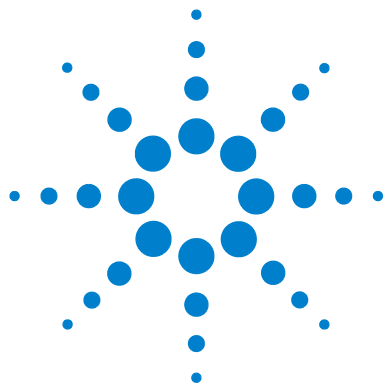
En este capítulo se describe la evaluación de la pureza de pico.

Contenido

1	Familiarización con el análisis espectral	7
	¿Qué es el análisis espectral?	8
	Determinación de la longitud de onda óptima de detección	10
	Estilos de informe espectral	12
2	Bibliotecas de espectros	13
	Modos de búsqueda	14
	Descripción de informe	17
	Marca de pureza	17
	Marca de coincidencia en biblioteca	18
	Marca del nombre del compuesto	18
	Marca de cantidad	18
3	Evaluación de la pureza de pico	19
	Comprobación de la pureza de pico	20
	¿Qué es la comprobación de la pureza de pico?	20
	El factor de coincidencia	21
	Corrección de fondo mediante la selección de un espectro de referencia	23
	Técnicas de pureza de pico	24
	Visualización de la pureza de pico	25
	Ventana de espectros	25
	Normalización espectral	25
	Ventana Purity	26
	Curvas de similitud de espectros	28
	Curva de umbral	29
	Utilización de espectros objetivo específicos	31

Contenido

Cálculo y visualización de la pureza	32
Clasificación de un pico como puro o impuro	34
Información sobre la pureza de pico	35
Opciones avanzadas de la pureza de pico	37
Utilización del análisis de pureza de pico	39
Adquisición de espectros	39
Establecer las opciones de la pureza del pico	40
Pureza de pico del espectro de masas	42
Cálculos de pureza del espectro de masa	43
Ventana de pureza del espectro de masas	44
Índice	47



1

Familiarización con el análisis espectral

¿Qué es el análisis espectral? 8

Determinación de la longitud de onda óptima de detección 10

Estilos de informe espectral 12



¿Qué es el análisis espectral?

El análisis espectral permite procesar datos espectrales adquiridos a partir del detector de diodos visible mediante UV o del detector de fluorescencia.

El análisis espectral añade una tercera dimensión a los datos analíticos cuando se utiliza junto con datos cromatográficos (consulte la [Figura 1](#)).

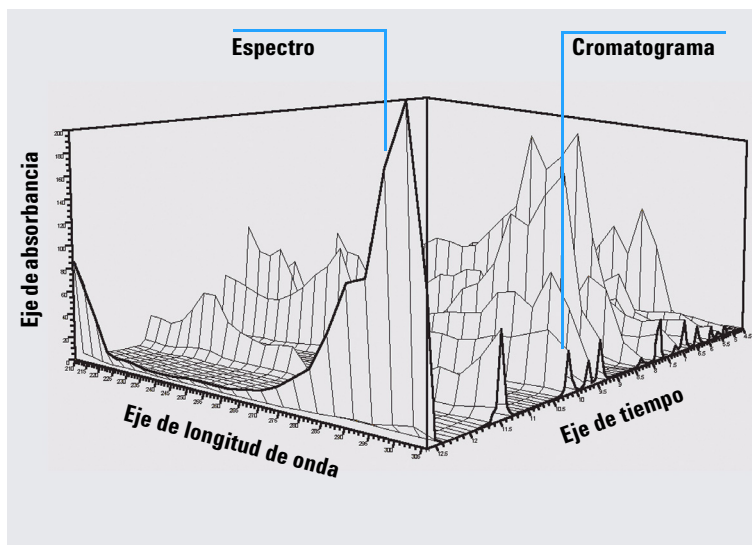


Abbildung 1 Información espectral

Detector de diodos visibles mediante UV

El detector de diodos visibles mediante UV permite adquirir espectros continuamente en la región visible mediante UV del espectro; debido a que el detector de diodos adquiere todas las longitudes de onda simultáneamente, no hay pérdida de sensibilidad durante la adquisición de espectros.

Detector de fluorescencia

El detector de fluorescencia permite recopilar datos espectrales de tres formas distintas:

- Puede seleccionar una longitud de onda de activación fija y recopilar espectros de emisión.
- Puede seleccionar una longitud de onda de emisión fija y recopilar espectros de activación.
- Puede adquirir un barrido de fluorescencia, en el que ambas longitudes de onda: de activación y de emisión se varían para dar una caracterización tridimensional de la muestra.

Los espectros de excitación y emisión pueden adquirirse durante la cromatografía, pero debido a que el detector de fluorescencia es un detector de barrido, cuantas más longitudes de onda se adquieren (más amplio rango de barrido), menor sensibilidad tiene el análisis. El barrido de fluorescencia tridimensional debe adquirirse bien en el modo de flujo nulo o fuera de línea, ya que requiere una concentración constante de muestra en la célula a lo largo del análisis.

Procesamiento de espectros

Los datos espectrales se pueden procesar de muchas maneras. Por ejemplo, es posible:

- Extraer señales cromatográficas de los datos espectrales para determinar la longitud de onda óptima de cada pico.
- Realizar búsquedas en bibliotecas espectrales para obtener una identificación cualitativa.
- Calcular relaciones entre las señales para determinar la pureza del pico.
- Realizar un control de pureza de pico.

Determinación de la longitud de onda óptima de detección

Después de haber desarrollado las condiciones apropiadas para la separación de picos, el paso siguiente en el desarrollo del método consiste en determinar la longitud de onda de detección óptima de cada pico.

Una técnica consiste en presentar la intensidad del pico (absorbancia o luminiscencia), longitud de onda y tiempo como un mapa de contorno conocido como gráfico de isoabsorbancia. En esta técnica, la información espectral se representa como una serie de líneas concéntricas isoabsorbantes en el plano de longitud de onda y tiempo. Esto nos permite que toda la información espectral se presente y revise al mismo tiempo. Consulte el segundo gráfico de la [Figura 2](#).

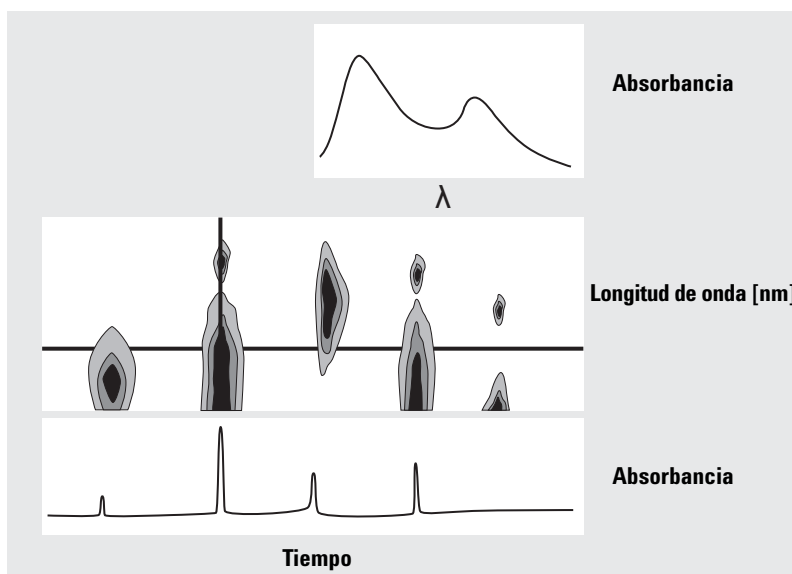


Abbildung 2 Gráfico de isoabsorbancia

Esta técnica es muy útil en el desarrollo del método para encontrar la longitud de onda óptima de cada pico separado. La longitud de onda corresponde a la posición horizontal del cursor en el gráfico de isoabsorbancia.

Cuando el cursor se desplaza a lo largo del eje de la longitud de onda, el cromatograma se reconstruye en la ventana inferior. Consulte la [Figura 2](#) en la página 10.

Para encontrar la longitud de onda óptima de un pico, es necesario realizar el procedimiento siguiente:

- Seleccione Quick View en el campo Cursor y mueva el cursor horizontal en el gráfico central hasta que la absorbancia del pico de interés sea lo más alta posible y aparezca una buena separación cromatográfica en el gráfico inferior.
- Seleccione Signal en el campo Cursor y optimice el ancho de banda para incrementar la relación entre la señal y el ruido con objeto de obtener la longitud de onda óptima para la detección. Para transferir la señal seleccionada y el ancho de banda a la ventana de la señal en la vista de análisis de datos, haga clic en el botón Copy. Así, la señal y el ancho de banda podrán utilizarse para realizar pruebas de los procesos de integración, identificación y cuantificación.

La optimización de la longitud de onda con el detector de fluorescencia generalmente requiere dos análisis:

- Establezca una longitud de onda de excitación en el rango bajo de UV (230–250 nm) y recopile espectros de emisión. Para cada pico del cromatograma, determine la longitud de onda de emisión óptima utilizando el gráfico de isoabsorbancia.
- Prepare un tabla de tiempos para establecer la longitud de onda de emisión óptima de cada pico mientras éste se eluye, y recopile los espectros de excitación.

Espectro de fluorescencia

El gráfico de isoabsorbancia tridimensional se utiliza para mostrar los espectros obtenidos a partir de barridos de fluorescencia solamente. En este caso, la información espectral se presenta en el plano de longitud de onda de emisión o de longitud de onda de excitación. No existe ningún eje de tiempo, puesto que el barrido de fluorescencia se adquiere mediante un modo de flujo nulo o fuera de línea. A partir del gráfico iso, es posible extraer espectros de excitación o emisión a cualquier longitud de onda; los espectros de excitación se muestran encima del gráfico iso (cursor vertical), los espectros de emisión se muestran bajo el gráfico iso (cursor horizontal).

Estilos de informe espectral

Los siguientes estilos de informe están disponibles en el módulo espectral:

- Búsqueda en bibliotecas

Genera un informe calibrado, en el que se incluyen los resultados de la búsqueda en bibliotecas. Los números de los picos, los tiempos de retención, factores de coincidencia de los resultados de búsqueda, las cantidades y los nombres de los compuestos se imprimen según los parámetros especificados en el cuadro de diálogo Automated Library Search. Para obtener más información, consulte [“Descripción de informe”](#) en la página 17.

- Short + Spectrum

Comprende las condiciones del instrumento, el cromatograma, los resultados cuantitativos e información sobre la pureza de pico.

- Detail + Spectrum

Consta de la cabecera, las condiciones del instrumento, el cromatograma, los resultados cuantitativos, las curvas de calibración e información sobre la pureza de pico. La cabecera está grabada en un fichero RPTHEAD.TXT en el directorio de métodos. La cabecera puede modificarse mediante un editor de textos para que incluya un texto específico de método.

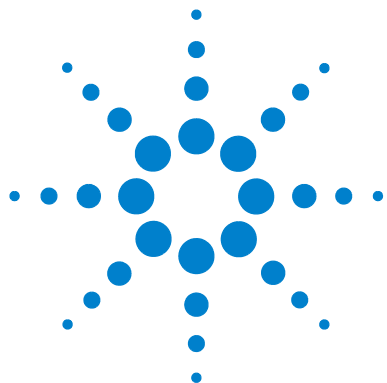
- Performance + Lib. Search

Combina los estilos Performance y Library Search.

Información sobre la pureza de pico

La información sobre la pureza de pico se refiere a la evaluación de los espectros de los picos que tiene como resultado gráficos de pureza para cada compuesto. Estos gráficos comprenden espectros superpuestos y normalizados, así como señales simples y superpuestas. Los gráficos de pureza pueden también incluir el umbral y curvas de similitud, según los valores de Purity Preferences para el método.

Los cálculos numéricos incluyen el factor de pureza, una medida de la similitud en la forma de los espectros. Para obtener más información sobre la pureza de picos, consulte el [Capítulo 3](#), “Evaluación de la pureza de pico”.



2 Bibliotecas de espectros

- Modos de búsqueda 14
- Descripción de informe 17
- Marca de pureza 17
- Marca de coincidencia en biblioteca 18
- Marca del nombre del compuesto 18
- Marca de cantidad 18



Modos de búsqueda

En una biblioteca de espectros se pueden utilizar tres modos de búsqueda. Tanto la tabla de calibración *como* la biblioteca de espectros son requisitos previos para los tres métodos. Opcionalmente, puede añadirse un control de pureza de pico.

- Identificación mediante búsqueda en biblioteca de espectros.

Este es el método de búsqueda más general. La ChemStation utiliza el cromatograma como base para la búsqueda en bibliotecas. Compara los espectros pico de *todos los picos que ha encontrado el integrador* y que se caracterizan por sus tiempos de retención con espectros de hasta cuatro bibliotecas especificadas. Para acelerar el proceso o aumentar su fiabilidad, la búsqueda puede restringirse en los espectros que se encuentren dentro de una determinada ventana de tiempo de retención utilizando la plantilla de búsqueda en biblioteca, consulte la [Figura 3](#).

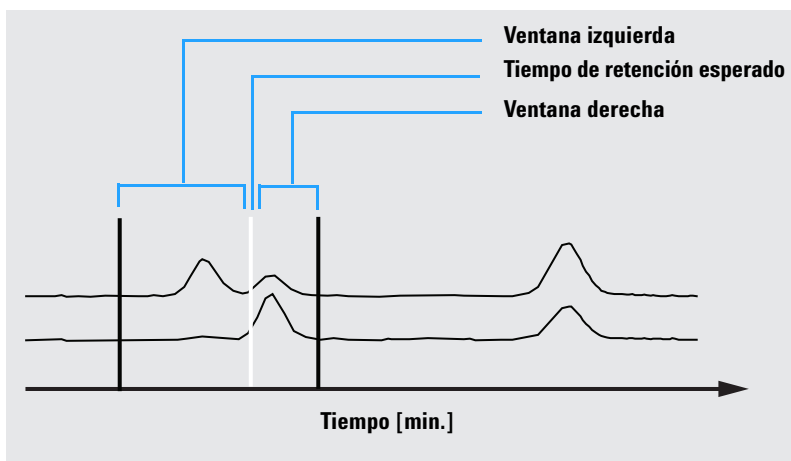


Abbildung 3 Ventana de tiempo de retención

Al pico se le asigna el nombre del compuesto que presenta más coincidencias. Se puede especificar cuál debe ser el grado de coincidencia mediante el valor del umbral. Si se encuentra una mayor coincidencia

que la del umbral, el pico se califica como *identificado*. A continuación, la ChemStation consulta la tabla de calibración en busca de una entrada con el mismo nombre. Si se encuentra alguna, los datos se emplean para calcular e indicar la cantidad.

Si no se encuentra en la tabla de calibración un nombre que coincida, se da la identidad del pico, pero como el método no está calibrado para ese compuesto, la cantidad no se calcula.

Este modo se recomienda para buscar compuestos desconocidos en un análisis. Es más eficaz cuando el número de compuestos en el cromatograma es bajo en comparación con el de entradas en la biblioteca.

- Análisis de un compuesto objetivo mediante una tabla de calibración.

Este modo de búsqueda está destinado sólo a compuestos para los que el método está calibrado. La ChemStation compara los espectros de los picos *sólo para compuestos calibrados* con espectros de hasta cuatro bibliotecas especificadas. Los picos se califican como identificados sólo si se confirman mediante comparación espectral. Los nombres de los compuestos definidos en la tabla de calibración deben ser idénticos a los definidos en la biblioteca.

Puede especificarse una ventana objetivo de tiempos de retención como parte del método de búsqueda. En el proceso de identificación, sólo se utilizan los picos cuyo tiempo de retención se ajuste a la ventana. La mayor coincidencia se califica como identificada sólo cuando ésta supera el umbral fijado.

Se recomienda este modo para la búsqueda de compuestos calibrados específicos en el cromatograma. Es preferible al primer modo de búsqueda si el cromatograma contiene muchos compuestos pero sólo unos cuantos, los de interés, están calibrados.

- Análisis del compuesto objetivo mediante una biblioteca de espectros.

Este modo de búsqueda sirve para todas las entradas de biblioteca, no sólo las que contiene la tabla de calibración. La ChemStation utiliza la biblioteca como base. Compara *todos los espectros de la biblioteca* con los de los picos del cromatograma e intenta identificar todos los picos localizados por el integrador, que estén dentro de la ventana de tiempo de retención especificada para las entradas de biblioteca y en la plantilla de búsqueda en biblioteca. En el proceso de identificación, sólo se utilizan los picos cuyo tiempo de retención se ajuste a la ventana. Cuando se encuentra una coincidencia que excede el umbral, el pico se califica como

identificado. La cuantificación continúa según el nombre de ese compuesto en la tabla de calibración. Si el compuesto figura tanto en la biblioteca como en la tabla de calibración, se califica como calibrado e identificado. Si el compuesto no está incluido en la tabla de calibración, se califica como no calibrado.

Este modo se recomienda cuando se han configurado bibliotecas que contienen grupos de compuestos específicos. Por ejemplo, una biblioteca con vitaminas hidrosolubles y otra con vitaminas liposolubles. De este modo, se pueden realizar búsquedas de estos compuestos en particular en el cromatograma. Si el cromatograma contiene muchos compuestos y la biblioteca sólo algunos, este modo es preferible al primero.

- Control de pureza de pico

El control de pureza de pico es opcional. Se recomienda realizar un control de pureza de pico antes de la búsqueda en biblioteca, puesto que la coincidencia sólo es fiable en función de la calidad de la separación. La ChemStation compara la consistencia de los espectros en diferentes secciones de cada pico. Calcula e informa del factor de pureza. Ésta se puede definir mediante un umbral, en el que los resultados cuestionables se marcan con una x en el informe. Para obtener más información sobre la pureza de picos, consulte el [Capítulo 3](#), “Evaluación de la pureza de pico”.

Descripción de informe

Un informe típico generado por una búsqueda en biblioteca de espectros incluye:

- un cromatograma/electroferograma anotado con los tiempos de retención/migración,
- una cabecera con información sobre los nombres de los ficheros y los parámetros de búsqueda,
- una descripción de la señal del detector y dos tablas de análisis,
- tiempos de retención de los picos encontrados en los análisis,
- tiempos de retención de los candidatos de coincidencia en biblioteca,
- tiempos de retención registrados en la tabla de calibración y
- cantidades de compuestos y su factor de pureza (si se selecciona), además de:

un número de entrada de la biblioteca,
un factor de coincidencia en biblioteca y
un nombre de compuesto.

En las columnas del informe de búsqueda en biblioteca, se utilizan ciertas marcas para señalar la pureza del compuesto, su coincidencia y su nombre.

Estas marcas se pueden interpretar como se describe en los pasos siguientes.

Marca de pureza

En compuestos impuros, los espectros en la pendiente ascendente y descendente del pico son, normalmente, distintos y por ello se utilizan ambos para búsqueda en biblioteca.

- u:** Compuesto impuro, se utilizó para su identificación el espectro en la pendiente ascendente.
- d:** Compuesto impuro, se utilizó para su identificación el espectro en la pendiente descendente.

Marca de coincidencia en biblioteca

x: Factor de coincidencia por debajo del umbral indicado.

Marca del nombre del compuesto

?: Compuesto identificado con factor de coincidencia por debajo del umbral.

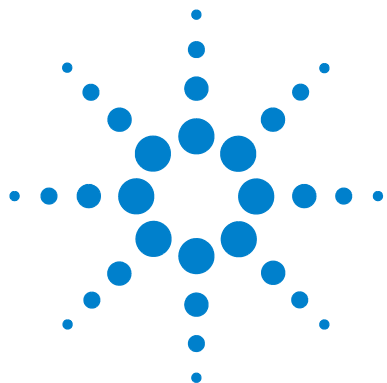
??: Compuesto identificado con un nombre ya asignado a otro compuesto con una mayor coincidencia. Para este compuesto específico, puede que no se encuentre una coincidencia mayor con un único nombre.

Marca de cantidad

+: Cantidad individual alta: se ha superado la cantidad límite establecida en Compound Details.

-: Cantidad individual baja: se ha superado la cantidad límite establecida en Compound Details.

Los picos que no tienen asignada ninguna entrada en la tabla de calibración aparecen en una tabla por separado denominada Uncalibrated Compounds.



3

Evaluación de la pureza de pico

Comprobación de la pureza de pico	20
¿Qué es la comprobación de la pureza de pico?	20
El factor de coincidencia	21
Corrección de fondo mediante la selección de un espectro de referencia	23
Técnicas de pureza de pico	24
Visualización de la pureza de pico	25
Ventana de espectros	25
Normalización espectral	25
Ventana Purity	26
Curvas de similitud de espectros	28
Curva de umbral	29
Utilización de espectros objetivo específicos	31
Cálculo y visualización de la pureza	32
Clasificación de un pico como puro o impuro	34
Información sobre la pureza de pico	35
Opciones avanzadas de la pureza de pico	37
Utilización del análisis de pureza de pico	39
Adquisición de espectros	39
Establecer las opciones de la pureza del pico	40
Pureza de pico del espectro de masas	42
Cálculos de pureza del espectro de masa	43
Ventana de pureza del espectro de masas	44

En esta sección se describen los distintos métodos que se pueden utilizar para evaluar la pureza de un pico.



Comprobación de la pureza de pico

Una cuestión importante en cualquier análisis cromatográfico es saber si el pico contiene uno o más componentes. En control de calidad, las impurezas que se esconden detrás del pico de interés pueden falsear los resultados. En el análisis de investigación, un componente escondido y no detectado puede llevar a una pérdida de información esencial.

¿Qué es la comprobación de la pureza de pico?

Una comprobación de la pureza de pico evalúa si un pico contiene impurezas. Esta valoración se basa en la comparación de espectros registrados durante la elución del pico. Para valorar la pureza, se emplean cinco espectros por pico: dos espectros en cada subida y bajada de pico y uno en la cima (cima o espectro máximo). Se hace la media de los cinco espectros y se comparan con todos los espectros registrados en el pico.

Si los espectros del pico no son idénticos al espectro medio, el pico teóricamente contiene una impureza espectral. Esta impureza puede deberse a uno o más compuestos, picos no separados en la línea de base, o a la absorción de fondo.

NOTA

Aunque los espectros sean idénticos, el pico puede contener impurezas. Este puede ser el caso si la absorción espectral es pequeña respecto al compuesto principal, o si la impureza y el compuesto principal tienen el mismo o casi el mismo espectro, con tiempos de elución similares.

La ventana Spectra contiene los espectros del pico que comprenden la comparación (promedio) de los espectros dibujados en modo normalizado y superpuesto. La ventana Purity contiene las señales con información superpuesta sobre la pureza. El factor de pureza es una medida de la similitud en la forma de los espectros.

La impureza del pico puede ser detectada incluso si existe una absorción de fondo en el sistema, que puede ser corregida. Generalmente, la absorción de fondo no afecta a la cuantificación del pico, ya que también influye en

la altura al principio y al final del pico, que es eliminada por la corrección de la línea de base. Las absorciones de fondo pueden cambiar utilizando disolventes o mezclas de disolventes distintos en un análisis.

El factor de coincidencia

La detección de la impureza por comparación espectral visual lleva tiempo y no es apropiada para operaciones automatizadas. Pueden utilizarse varias técnicas estadísticas para la comparación automatizada de los espectros. Una técnica es una comparación matemática entre dos espectros, que calcula un factor de coincidencia que representa el grado de similitud entre los espectros.

La comparación de dos espectros indica el factor de coincidencia, que se define del modo siguiente:

$$\text{Match Factor} = \frac{10^3 \times \left\{ \sum x \times y - \left(\frac{\sum x \times \sum y}{n} \right) \right\}^2}{\left\{ \sum x^2 - \left(\frac{\sum x \times \sum x}{n} \right) \right\} \times \left\{ \sum y^2 - \left(\frac{\sum y \times \sum y}{n} \right) \right\}}$$

Los valores x e y son absorbancias medidas en el primer y segundo espectro respectivamente, en la misma longitud de onda; n es el número de puntos de datos y Σ la suma de los datos. Un factor de coincidencia 0 indica que no hay coincidencia y 1000 indica espectros idénticos. Generalmente, los valores por encima de 990 indican que los espectros son similares. Los valores entre 900 y 990 indican que hay alguna similitud, pero el resultado debe interpretarse con precaución. Todos los valores por debajo de 900 indican que los espectros son distintos.

El factor de coincidencia está influenciado por un número de parámetros, que están determinados por la muestra y el método de separación. Éstos incluyen la especificidad del compuesto, la absorción espectral de los compuestos de la matriz y nivel de ruido espectral, así como la absorción de fondo y los cambios espectrales ocasionados por disolventes o distintos instrumentos (calibraciones a distinta longitud de onda).

Suavizado de espectros

La fiabilidad de la comprobación de la pureza de pico es limitada cuando el ruido espectral es del mismo orden que el espectro. El suavizado de espectros funciona del modo siguiente:

- 1 Para un número definido de puntos de datos, por ejemplo 5, también conocido como filtro, se utiliza una regresión cúbica para determinar un punto de datos nuevo.
- 2 Entonces, el filtro se mueve un punto hacia delante, tomando al menos 4 de los puntos ya utilizados y uno adicional y el proceso se repite.

Mediante el algoritmo de suavizado puede reducirse el ruido estadístico, que hace más fiable la identificación del espectro suavizado.

NOTA

El algoritmo de suavizado puede cambiar el perfil de un espectro, según la longitud del filtro, es decir, el número de puntos de datos utilizados en el algoritmo de suavizado a la vez. Se recomienda suavizar todos los espectros con el mismo filtro antes de realizar las comparaciones.

Interpolación de espectros

Si se han adquirido espectros con baja resolución, puede utilizar la función de interpolación para que el espectro se parezca más a una línea curva que a un polígono. Para ello, calcule los puntos de datos adicionales entre los puntos de datos originales del espectro mediante funciones trigonométricas. Cuando se interpolan espectros, se conservan los puntos de datos originales.

Espectros logarítmicos

Los espectros logarítmicos comprimen la escala de absorbancia. Pueden ser útiles cuando las absorbancias cubren un rango muy amplio.

Derivadas de espectros

Las derivadas de los espectros revelan más detalles específicos que los espectros originales cuando se comparan distintos compuestos. Las pequeñas diferencias en los espectros son más obvias y fáciles de identificar visualmente. Sin embargo, el ruido se incrementa, lo que limita el uso de las derivadas de espectros.

Corrección de fondo mediante la selección de un espectro de referencia

Existen varios tipos de corrección disponibles para extraer los espectros del pico del fichero de datos para las correcciones del fondo:

Selección de referencia manual

Cuando se selecciona un espectro de referencia, en un tiempo especificado, éste se toma desde el fichero de datos y se resta de cada espectro del pico. Esta corrección no se puede usar si la absorción de fondo es variable.

Cuando se seleccionan dos espectros de la línea de base, se realiza una interpolación lineal entre los dos espectros. Un espectro de referencia reconstruido basado en la interpolación lineal se resta de cada espectro del pico. Esta corrección puede emplearse para compensar una absorción del fondo que varía lentamente.

Selección de referencia automática

En una selección de referencia automática, los espectros de referencia seleccionados dependen del modo de almacenamiento de los espectros en el fichero de datos.

Todos los espectros: Los espectros inicial y final del pico integrado del pico seleccionado se toman como espectros de referencia y se interpolan linealmente para la selección de referencia manual con dos espectros de referencia.

Espectros controlados mediante pico: El espectro más próximo a la línea de base se toma como espectro de referencia y se extrae para la selección de referencia manual con un espectro de referencia.

Técnicas de pureza de pico

Las técnicas de pureza de pico sólo se pueden utilizar en picos con una separación en la línea de base. Si los picos no están separados en la línea de base, entonces la pureza de pico se complica ya que cada pico contiene los picos próximos como impurezas.

La pureza puede ser determinada de forma interactiva pico a pico para todos los picos de un determinado fichero de datos o automáticamente como parte del método, al final de cada análisis, cuando se utiliza un estilo de informe espectral, como detail+spectrum.

Par optimizar la exactitud o el rendimiento del procesamiento de la pureza de pico, establezca las opciones relacionadas con los elementos siguientes:

- Rango de longitud de onda utilizado para la determinación de la pureza
- Espectros de referencia
- Umbral de pureza
- Procesamiento espectral, incluidos logaritmos, factores de suavizado e interpolación y orden de derivada
- Componentes de pureza calculados y mostrados (incluyen los espectros, las diferencias espectrales, las señales, las curvas de similitud y de umbral)

Las técnicas que se pueden utilizar para juzgar la pureza de un pico, que se describen en las siguientes secciones, incluyen:

- Normalización espectral

Comparación entre espectros normalizados de diferentes secciones de pico

- Curva de similitud

Comparación de un espectro medio o seleccionado con el resto de espectros tomados a medida que se eluye el pico.

Visualización de la pureza de pico

Ventana de espectros

La ventana de espectros muestra los cinco espectros que se utilizan para calcular el espectro medio que se utiliza en el cálculo de la pureza. Puede utilizar las manipulaciones gráficas de Agilent ChemStation para examinar los espectros de pico con más detalle.

Normalización espectral

Una técnica común de pureza de pico consiste en la normalización y la comparación de los espectros tomados a través del pico. La normalización compensa la concentración variable del componente que pasa a través de la celda del detector mientras se eluye el pico. Esta función está disponible como parte de las capacidades de visualización de espectros de la Agilent ChemStation.

Los espectros se adquieren, por ejemplo, en los puntos de inflexión y en el máximo del pico. Los espectros se normalizan y se superponen para la representación gráfica. Esta técnica es muy útil para realizar una evaluación interactiva de datos y puede incluso adaptarse para análisis rutinarios automatizados.

Si, de modo alternativo, se prefiere un factor numérico, los espectros de los puntos de inflexión pueden compararse matemáticamente y los factores de pureza se pueden imprimir para cada pico junto con el tiempo de retención.

La [Figura 4](#) muestra un ejemplo en el que los espectros han sido adquiridos en los puntos de inflexión y en el máximo de los picos y normalizados. Tanto la comparación visual como el factor de pureza calculados por el software muestran claramente la diferencia entre el pico puro y el impuro.

3 Evaluación de la pureza de pico

Visualización de la pureza de pico

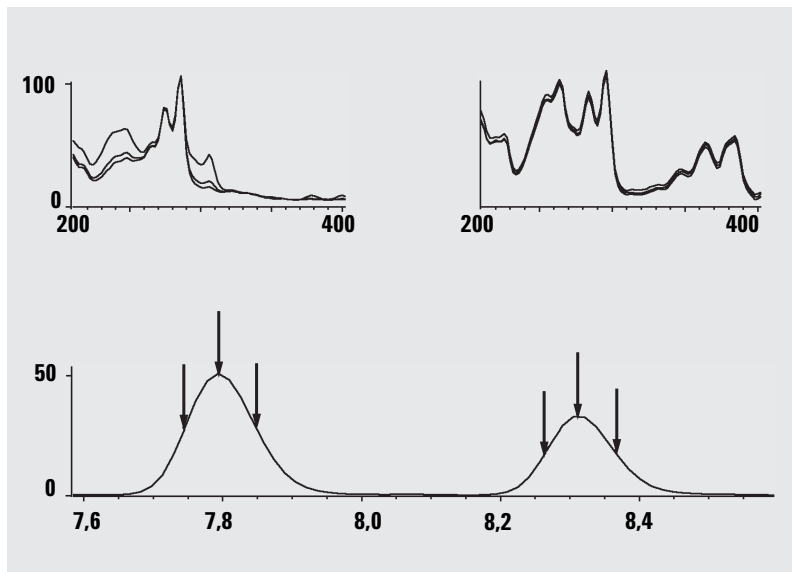


Abbildung 4 Control de pureza de pico por superposición de espectros

Ventana Purity

El contenido de la ventana Purity depende de los parámetros de pureza seleccionados. La ventana por defecto es Purity Ratio, que muestra las señales con curvas de similitud y umbral superpuestas (consulte la [Figura 5](#)). Las bandas verde y roja bajo la pantalla muestran el umbral de pureza definido por el usuario. El valor de pureza calculado para cada espectro del pico se muestra como un punto negro; si el punto negro se encuentra dentro de la banda verde, la pureza del espectro está dentro de la definición de pureza aceptable.

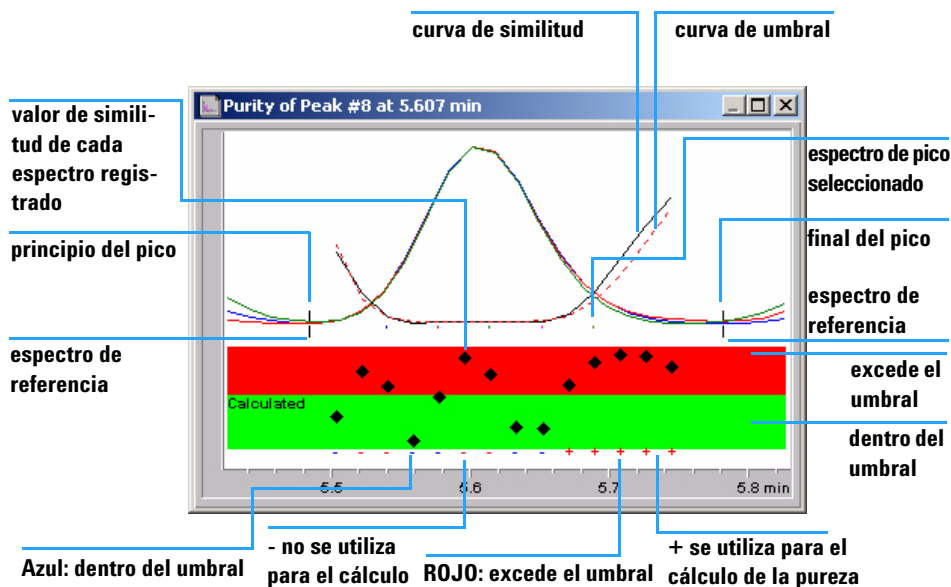


Abbildung 5 Ventana Purity

Curvas de similitud de espectros

Las curvas de similitud de espectros se muestran en la ventana Purity de la pantalla Spectra (consulte la [Figura](#) en la página 42).

Si los detalles no están claros, puede ampliarlos presionando el botón izquierdo del ratón mientras lo mueve. Aparecerá dibujada un área en la pantalla que muestra la zona que se va a aumentar. Para volver a la pantalla original, presione dos veces el botón izquierdo del ratón.

Las curvas de similitud de espectros dan la información más detallada sobre la pureza o impureza de un pico. Todos los espectros de un pico se comparan con uno o más espectros, por defecto un espectro medio. El grado de coincidencia o *similitud de espectros* se presenta durante la elución. Un perfil ideal para un pico puro es una línea plano en un valor 1.000, como se muestra en la [Figura 6](#) (a).

Al principio y al final de cada pico, donde la relación señal-ruido disminuye, la contribución del ruido espectral de fondo a los espectros del pico llega a ser significativa. La contribución del ruido a la curva de similitud se muestra en la [Figura 6](#) (b).

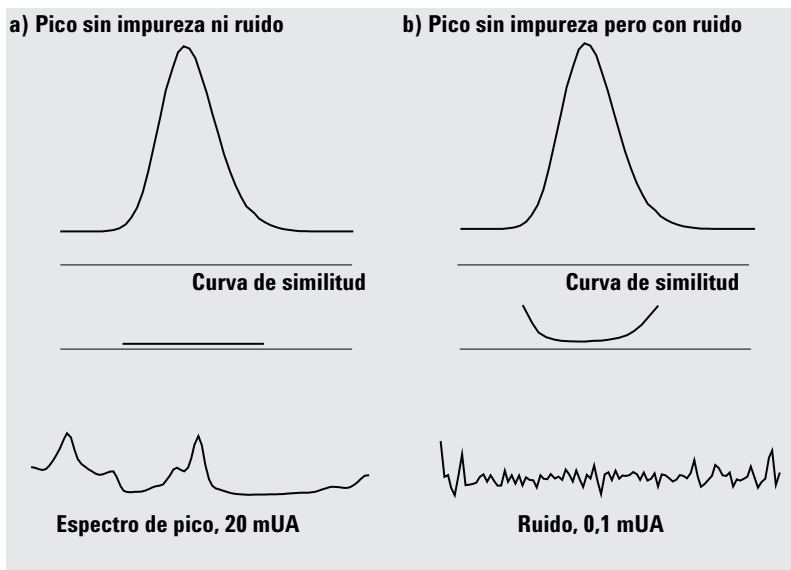


Abbildung 6 Curvas de similitud para un pico puro con y sin ruido representadas en relación con el factor de similitud ideal (1.000) y el umbral definido por el usuario (980)

Curva de umbral

La curva de umbral muestra el efecto del ruido en una curva de similitud. El efecto se incrementa rápidamente hacia el principio y el final del pico. En esencia, una curva de umbral es una curva de similitud de un pico puro con un componente de ruido de fondo.

La influencia del ruido puede verse en la [Figura 7](#). El factor de similitud se reduce al disminuir la relación señal-ruido o el nivel de ruido constante al disminuir el rango de absorbancia.

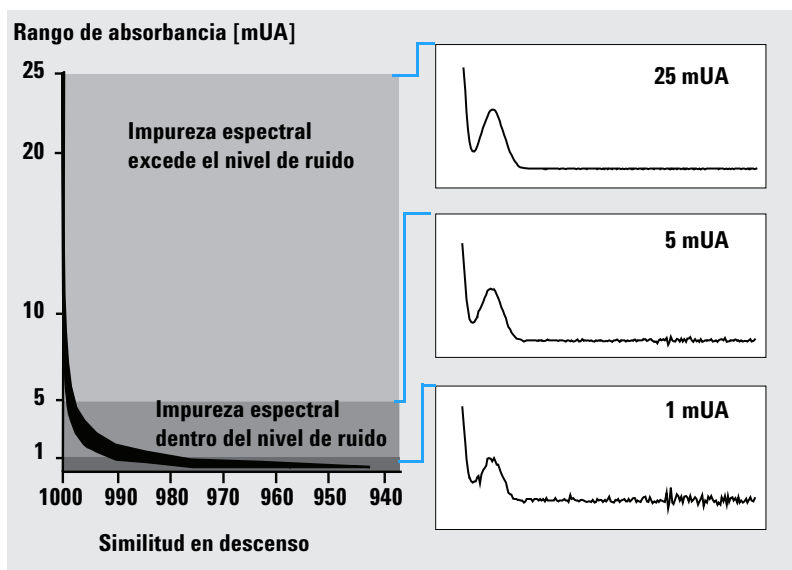


Abbildung 7 Factor de similitud como función del nivel de ruido

3 Evaluación de la pureza de pico

Visualización de la pureza de pico

La Figura 8 (a) muestra ambas curvas, de umbral y de similitud, para un pico puro con ruido; la Figura 8 (b) para un pico impuro.

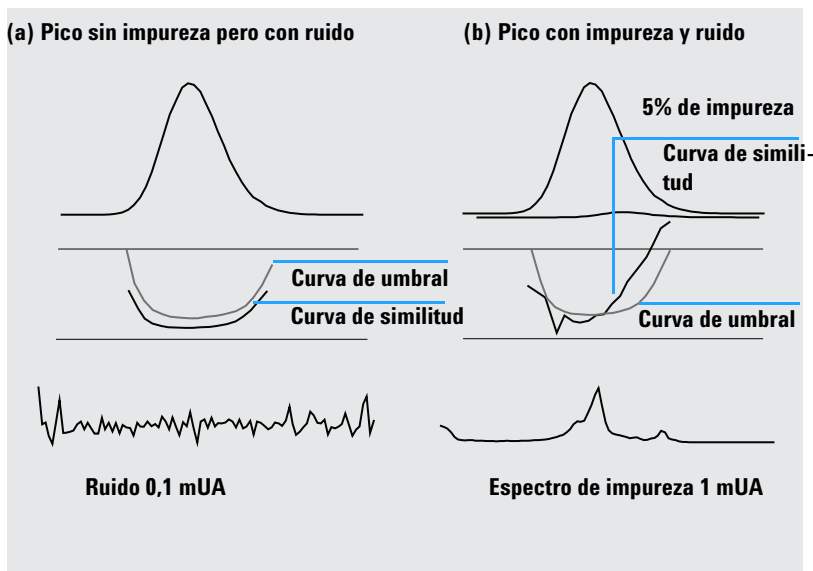


Abbildung 8 Efecto de impureza y ruido en las curvas de similitud y de umbral

El umbral de ruido se determina automáticamente, según la desviación estándar de espectros puros a un tiempo determinado, por defecto, 14 espectros al comienzo de un análisis (es decir, a los 0 minutos).

La curva de umbral, representada por la línea de trazos, da el rango para el cual la impureza espectral se sitúa dentro del límite de ruido. Por encima de este umbral, la impureza espectral excede el ruido de fondo y la curva de similitud se interseca con la curva de umbral e indica una impureza (siempre y cuando los parámetros de ruido y referencia hayan sido elegidos con sentido).

Utilización de espectros objetivo específicos

La Agilent ChemStation permite realizar cálculos del factor de pureza y de las curvas de similitud relativos a diferentes espectros objetivo, como se muestra en la [Figura 9](#). Como regla general, la comparación por defecto con el espectro medio proporciona la información más valiosa para la mayoría de las impurezas desconocidas. La flexibilidad para poder seleccionar un espectro objetivo específico es valiosa en aquellos casos en los que el analista debe suponer dónde está la impureza o se necesita mejorar la sensibilidad de la evaluación de pureza. Un ejemplo puede ayudar a mostrar cómo puede aplicarse este principio: si se supone que la impureza está en la cola del pico, al seleccionar el espectro cola o máximo para compararlo con el resto de los espectros, será cuando se obtenga, en este caso, la información más significativa.

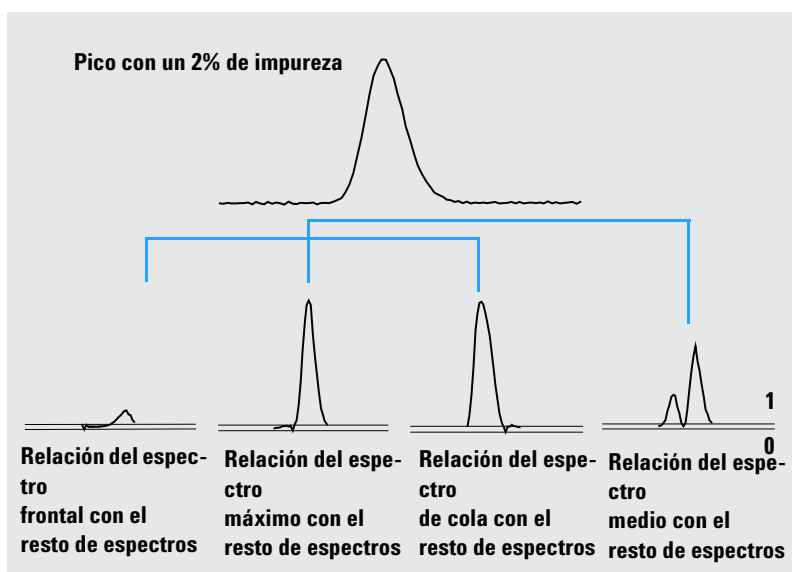


Abbildung 9 Curvas de relación de distintos espectros objetivo del mismo pico

La [Figura 9](#) muestra la relación de la curva para los espectros frontal, máximo, de cola y medio de un pico con una impureza después del máximo.

El **espectro frontal** muestra una pequeña impureza espectral al final del pico. La desviación en esta primera curva de relación es pequeña ya que el espectro frontal ha absorbido poco (y ha generado una curva umbral relativamente alta).

El **espectro máximo** muestra una pequeña impureza en el frontal del pico (el espectro máximo contiene sólo una cantidad muy pequeña de la impureza) y mucha impureza en la cola.

El **espectro de cola** (con un alto nivel de impureza) muestra una impureza espectral en el frontal del pico.

El **espectro medio** (media de los cinco espectros del pico seleccionados) indica impureza espectral en todo el pico. Este espectro medio contiene la contribución espectral de la impureza. En este caso, el medio contiene mayor contribución que el espectro máximo, con lo que muestra una mayor impureza espectral en la elución o parte frontal de migración y menor impureza en la cola, comparada con la curva de relación del espectro máximo.

El perfil de las curvas de similitud, umbral y relaciones depende de la posición, el nivel y las diferencias espectrales de la impureza y, como tal, no se puede generalizar acerca de la forma. El perfil variará dependiendo de la situación.

Cálculo y visualización de la pureza

El factor de pureza no es una medida absoluta de la pureza de pico. Es una función de los parámetros utilizados en los cálculos, especialmente del umbral de pureza. Por lo tanto, los resultados deben ser interpretados considerando el umbral. Para picos puros, se generan resultados comparables para diferentes configuraciones de parámetros. Para picos impuros, se realiza el análisis del peor caso. Sólo se consideran para el cálculo los datos de puntos que se hacen referencia a una impureza, por ejemplo, espectros por debajo del umbral, por lo tanto, un cambio en el valor del umbral puede influir en gran medida en el factor de pureza de un pico impuro. Consulte la información siguiente para obtener más detalles sobre estos cálculos. Para obtener una descripción detallada de las curvas de similitud de la Agilent ChemStation, consulte [“Curvas de similitud de espectros”](#) en la página 28.

Todos los espectros

- 1 Todos los espectros de referencia registrados para el pico que está por encima del umbral definido por el usuario se usan para los cálculos de las curvas de pureza y umbral; cinco de estos espectros se muestran en la ventana Spectra.
- 2 Los factores de coincidencia se calculan entre cada espectro y la media de los cinco espectros mostrados en la ventana Spectra; se representan como puntos aislados en la pantalla Purity.
Para el umbral definido por el usuario, la curva de similitud está superpuesta en la gráfica Purity.

Para el umbral calculado, el valor se calcula para cada espectro; los valores de pureza de los espectros se definen como una relación entre el valor del umbral y el de similitud que dan una línea recta. De este modo se obtiene una indicación mejor de los datos puros e impuros. Las curvas de similitud y de umbral están superpuestas en la gráfica de pureza.

Espectros de pico controlado

- 1 Todos los espectros de referencia registrados para el pico que están por encima del umbral definido por el usuario se usan para los cálculos y se muestran en la ventana Spectra.
- 2 Los factores de coincidencia se calculan entre cada espectro mostrado en la ventana Spectra y la media de estos espectros; éstos se representan como puntos aislados en la pantalla Purity.
- 3 El valor de pureza se calcula como el valor medio de todos los factores de coincidencia calculados.

Clasificación de un pico como puro o impuro

El nivel de pureza calculado se emplea para generar el informe de pureza que se muestra en la pantalla. Si el factor de pureza está dentro del valor del umbral, (establecido manualmente o calculado desde la curva), se califica al pico de puro. Si el factor de pureza excede el valor de umbral, se califica como impuro.

NOTA

La impureza detectada es una impureza *espectral*, lo cual no indica necesariamente una impureza en el compuesto. Las impurezas espectrales pueden deberse a cambios en la composición del disolvente (gradientes) u ocurrir en picos que no estén separados en la línea de base.

Información sobre la pureza de pico

Factor de pureza

El factor de pureza proporciona un valor numérico de la pureza del pico.

- Si el pico se ha clasificado como puro, el factor de pureza es el valor medio de todos los espectros que están *dentro* del valor del umbral.
- Si el pico se ha clasificado como impuro, el factor de pureza es el valor medio de todos los espectros que *exceden* el valor del umbral.

En ambos casos, se especifican el número de espectros usados para el cálculo del factor de pureza y la base para el cálculo.

Umbral

Para un umbral calculado, éste es el valor medio de todos aquellos espectros utilizados en el cálculo del factor de pureza. Para el umbral definido por el usuario, éste es el valor que se fija en las opciones Purity.

Espectros del pico

Los espectros del pico muestran los detalles de los cinco espectros seleccionados para los cálculos de pureza. También se puede mostrar

- Espectros de diferencias

Espectros calculados como la diferencia entre el espectro medio y los espectros seleccionados individuales. Los picos puros muestran sólo el ruido en los espectros de diferencia.

- Espectro comparado

El espectro medio utilizado para cálculos de pureza.

- Todos los espectros registrados

Todos los espectros registrados a través del pico.

- Espectros de referencia

El espectro o espectros utilizados para la corrección de fondo.

Cálculos de la pureza y del ruido

La información sobre los cálculos de pureza muestra el número de espectros registrados y el número de los que están dentro del umbral o lo exceden que se han utilizado para calcular el factor de pureza.

La información sobre el cálculo del ruido muestra los espectros que se han usado para calcular el umbral del ruido y los resultados de este cálculo. Puede mostrar los espectros del ruido como un gráfico de las estadísticas del ruido. También se pueden cambiar los parámetros para el cálculo del ruido.

NOTA

El cambio de los parámetros para el cálculo del ruido de fondo pueden tener un efecto mayor en los resultados del cálculo de la pureza. Antes de realizar cualquier cambio, asegúrese de que entiende la información que se ofrece en [“Opciones avanzadas de la pureza de pico”](#) en la página 37.

Curva de pureza

La información de la curva de pureza muestra los resultados de la comparación de cada espectro en el pico con el espectro medio. Los valores en la columna Difference representan la diferencia aritmética entre los valores en la columna Purity y aquellos en la columna Threshold. El valor Difference se usa para determinar los espectros que se utilizan en el cálculo del factor Purity y en el valor Threshold para el pico.

Más curvas de pureza

La información para más curvas de pureza muestra los resultados de los cálculos de pureza usando los espectros frontal, máximo y de cola además del espectro medio (consulte [“Utilización de espectros objetivo específicos”](#) en la página 31). Se pueden mostrar las curvas de similitud de algunos o de todos estos cálculos. También se pueden cambiar los parámetros del cálculo de la pureza y cómo se mostrarán los resultados.

NOTA

El cambio de los parámetros para el cálculo de la pureza pueden tener un efecto mayor en los resultados de la pureza. Antes de realizar cualquier cambio, asegúrese de que entiende la información que se ofrece en [“Opciones avanzadas de la pureza de pico”](#) en la página 37.

Opciones avanzadas de la pureza de pico

Los cambios realizados en las opciones avanzadas de la pureza del pico pueden tener un efecto mayor en los resultados de la pureza. Se recomienda que no realice ningún cambio a menos que entienda el efecto que estos cambios pueden tener en los resultados.

Cálculo de la pureza

El cálculo de la pureza por defecto utiliza la media de los cinco espectros a través del pico (consulte “¿Qué es la comprobación de la pureza de pico?” en la página 20), pero también puede utilizar otros espectros como base del cálculo:

Todos los espectros del pico utilizan cada uno de los cinco espectros seleccionados para producir cinco tipos de resultados que se muestran en la misma ventana.

El espectro máximo, espectro frontal y espectro de cola utilizan espectros específicos que pueden permitir mejorar la sensibilidad del análisis de pureza (consulte “Utilización de espectros objetivo específicos” en la página 31).

Los **espectros frontal y de cola** muestran los dos tipos de resultados generados utilizando los espectros frontal y de cola como base para el cálculo de la pureza.

La pantalla por defecto de la pureza de pico es Purity Ratio, como se muestra en la **Figura 5** en la página 27, pero también se pueden mostrar los resultados de la pureza como curvas de similitud y de umbral.

La Agilent ChemStation proporciona tres modos para visualizar las curvas de similitud y de umbral:

- 1 Sin transformación alguna, consulte la **Figura 10** en la página 38 (a);
- 2 Como el logaritmo natural, $\ln$, consulte la **Figura 10** en la página 38 (b), con la ventaja de mayor detalle para el máximo del pico en la parte inferior del gráfico;
- 3 Como una relación: $\text{ratio} = \frac{1000 - \text{similarity}}{1000 - \text{threshold}}$, consulte la **Figura 10** en la página 38 (c).

3 Evaluación de la pureza de pico

Visualización de la pureza de pico

Para picos espectralmente puros, los valores de la relación están por debajo de 1 y para picos espectralmente impuros, por encima de 1. La ventaja del modo de relación es que sólo se muestra una línea, con lo que se simplifica la interpretación.

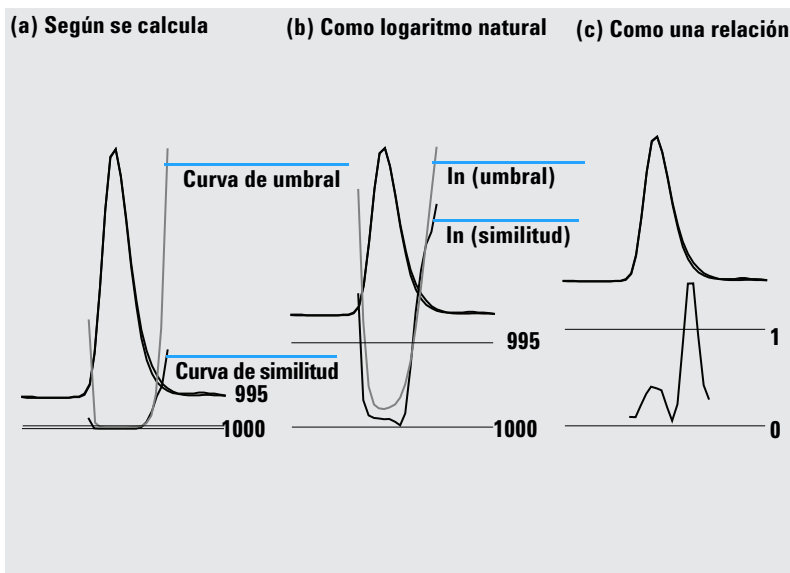


Abbildung 10 Curvas de umbral y de similitud,
(a) según se calculan,
(b) I_n (Umbral) y I_n (Similitud), y
(c) como una relación

Umbral del ruido

Por defecto, el umbral del ruido se determina automáticamente, utilizando la desviación estándar de 14 espectros de ruido puros al comienzo de un análisis (0 minutos). Puede cambiar el tiempo y el número de los espectros de los que se van a calcular la desviación estándar del ruido, o puede introducir un valor fijo para la desviación estándar (valor por defecto 0,1). Se obtiene una mejor precisión cuando la desviación estándar se calcula para un número específico de barridos.

Utilización del análisis de pureza de pico

En esta sección se incluyen recomendaciones prácticas para la adquisición de datos para el análisis de pureza de pico y fijar los valores apropiados.

Adquisición de espectros

La prueba de pureza de pico se basa en la comparación de espectros a lo largo de un pico. Asegúrese de disponer de suficientes espectros para la comparación y de que su calidad sea elevada. También de que el detector se mantiene adecuadamente, la intensidad de la lámpara es fuerte y que se ha elegido la celda de flujo y la rendija apropiadas. En general, debe optimizarse la sensibilidad sobre la resolución, ya que incluso pequeñas variaciones en los espectros se ven en rangos de longitud de onda más amplios y la resolución, generalmente, no es tan importante.

Utilice la opción All spectra para recopilar todos los espectros continuamente. Los detectores más nuevos admiten el modo All in Peak, que recopila continuamente todos los espectros cuando se detecta un pico y, además, almacena unos 20 espectros al principio del análisis para utilizarlos en la determinación del ruido de la línea de base para el análisis de la pureza.

Fije el valor del ancho de pico en la pantalla del detector de diodos en la anchura del pico más estrecho de interés del análisis.

Asegúrese de que la concentración de la muestra es apropiada para el rango lineal del detector. Si un componente es muy concentrado, el detector funcionará fuera de su rango lineal en las longitudes de onda de la absorbancia más alta, mientras que permanecerá lineal en otras. Esto causará que cambie la forma de los espectros al cambiar la concentración, y el componente será calificado como posiblemente impuro. Si la concentración del componente es muy baja, las relaciones señal/ruido para los espectros serán pobres y se reducirá la sensibilidad de los análisis de pureza. El análisis de pureza más exacto y sensible se utiliza para picos entre, aproximadamente, 250 y 800 mUA de altura.

Para el control de pureza, use los parámetros por defecto. Si se detecta una posible impureza, debe realizar una observación más profunda de los resultados para confirmar la impureza y obtener más características de ésta.

Establecer las opciones de la pureza del pico

Seleccione los siguientes valores en los paneles apropiados del cuadro de diálogo Spectral Options.

Rango de longitud de onda

Utilice esta opción para controlar el rango de longitud de onda utilizado para el análisis de pureza. Puede fijarse un límite bajo, por ejemplo, para excluir las longitudes de onda a las que la absorbancia de la fase móvil causa un ruido excesivo. Puede fijarse un límite elevado para eliminar las longitudes de onda más altas a las que el compuesto de interés no absorbe.

Procesamiento de espectros

Utilice el procesamiento de espectro para realizar cálculos matemáticos para transformar, suavizar o interpolar los espectros. En la práctica, cualquier opción que aumente las pequeñas diferencias entre los espectros (derivadas) aumenta el ruido, mientras que cualquier opción que reduzca el ruido (suavizado) disminuye la sensibilidad para los pequeños cambios espectrales.

Umbral de absorbancia

El umbral de absorbancia fija una intensidad menor del espectro que se puede incluir en el análisis. Normalmente, el umbral se fija en 1-2 mUA para asegurar que los espectros en los extremos del pico se incluyen en la comprobación de la pureza.

Espectro de referencia

Éstos son espectros de línea de base utilizados para corregir la absorbancia de fondo. Se recomienda utilizar siempre un espectro de referencia. El parámetro recomendado es Automatic. Con este modo, se toma un espectro en la línea de base cerca del principio y el final de la integración. Para corregir los espectros a lo largo del pico, se utiliza una extrapolación lineal

de estos dos espectros. Puesto ésta es una referencia de dos puntos, puede compensar la deriva del detector y los cambios en la fase móvil al utilizar gradientes. El resto de los modos de referencia pueden utilizarse para la compatibilidad con software previos, de manera que puede obtenerse alguna información de pureza incluso si se han recopilado pocos espectros.

Si dos picos no están completamente separados, la selección automática de los espectros de referencia que utilizan la selección de referencia automática puede llevar a elegir un espectro de referencia en el valle entre los dos picos. Un pico no resuelto no puede ser puro. En este caso, la prueba de pureza puede utilizarse para buscar otros componentes ocultos. Realice una selección de referencia manual para seleccionar los espectros de referencia anteriores y posteriores al grupo de picos.

Umbral de pureza

Si los datos se han recopilado adquiriendo espectros de pico controlado, deberá introducir un valor para el umbral de pureza. Generalmente, el valor por defecto 990 ofrece resultados aceptables.

Si los datos se han recopilado adquiriendo todos los espectros o todos en pico, los mejores resultados se obtendrán dejando que la Agilent ChemStation calcule el umbral para cada espectro basado en su relación individual señal/ruido. Como alternativa, puede establecer un umbral fijado para todos los barridos en el pico, aunque no se recomienda. Si desea utilizar un umbral fijado, utilice un valor mucho más elevado que para los espectros de pico controlado, por ejemplo, entre 995 y 998.

Pureza de pico del espectro de masas

En LC/MS, las abundancias de los iones que caracterizan un compuesto se maximizan en un tiempo de retención en particular, cuando la concentración de ese componente en el MSD es máxima. Según las condiciones de la cromatografía y el momento del ciclo de barrido, los tiempos de retención de picos de elución próximos pueden ser muy cercanos y pueden aparecer múltiples componentes como un pico o como un pico con distorsiones (por ejemplo, salientes) en el cromatograma del ion total (TIC). Examinando los tiempos de retención en los que los iones individuales se maximizan, es posible reunir grupos de iones que se maximicen en el mismo tiempo de retención; de este modo, se asume que todos estos iones pertenecen al mismo componente. Si más de un grupo de iones se maximizan en diferentes tiempos de retención bajo el mismo pico cromatográfico, el pico se puede definir como impuro y se pueden determinar los grupos individuales de iones.

En el análisis, se realizan varias suposiciones:

- Los componentes de una mezcla de varios componentes se pueden separar por sus espectros de masa o bien por sus tiempos de retención. Cada componente de la mezcla tiene un espectro de masa distintivo con unos valores m/z únicos, o bien los componentes están suficientemente bien separados para permitir que se determinen múltiples máximos.
- La relación señal-ruido es demasiado alta para permitir que los máximos reales se identifiquen sin ambigüedad.
- Los tiempos de retención del ion que se han utilizado como base para el cálculo de los tiempos de retención de los componentes son precisos y representativos.

Sólo con una rara excepción, la ionización por electrospray (ESI) únicamente genera iones moleculares a menos que la fuente de iones de disociación de colisión inducida (CID) se utilice para producir fragmentos. Esto significa que si dos iones cargados distintos se encuentran en una serie de espectros (incluso si están coeluidos), es posible identificar y contar estos iones. Esta operación se debe llevar a cabo cuidadosamente, ya que los aductos catión y anión pueden generar iones además de los esperados $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$.

La ionización química de la presión atmosférica (APCI) también produce iones moleculares, pero los fragmentos térmicos son más comunes en APCI que en el electrospray.

Además, un espectro de masa contiene información de isótopos que se puede utilizar para facilitar la identificación y la evaluación de la pureza.

El algoritmo de la pureza de pico sólo identificará un pico impuro si existen diferencias de espectros y de tiempo. La interpretación manual puede ir más allá de ese límite. a diferencia de los datos UV, los datos MS se pueden utilizar para contar los picos impuros siempre y cuando los “compuestos” tengan iones diferentes. Generalmente, para que la pureza de pico sea útil, requiere datos de barrido, no datos SIM.

Cálculos de pureza del espectro de masa

Se busca un rango del TIC que cubre el área integrada del pico mediante un conjunto seleccionado de valores m/z y se determina la abundancia máxima para cada valor m/z . Para cada máximo encontrado, se calcula un tiempo de interpolación (número de barrido) utilizando un ajuste parabólico. El tiempo de retención de los máximos se agrupa en conjuntos, que se identificarán con los componentes que están presentes en el rango. Se ofrece información sobre la cantidad de componentes, los tiempos de retención (número de barridos) de cada componente y los valores m/z mayores del conjunto.

El conjunto seleccionado de valores m/z se obtiene examinando los barridos al 25, 50 y 75% del rango de tiempo del pico integrado, utilizando todos los valores m/z que tengan una abundancia mayor que el 1% de la abundancia máxima en el barrido (pico base). Para cada valor m/z seleccionado, se utiliza la abundancia media del primer y el último barrido en el rango de tiempo para la corrección del fondo antes de que los conjuntos se determinen.

Cada valor m/z del conjunto se examina en cada barrido en el rango de tiempo y la abundancia máxima se almacena de acuerdo con las abundancias a cada lado del máximo. Sólo se almacena un máximo por cada valor m/z . Cada máximo almacenado se verifica comprobando que no se ha producido en el primer ni el último barrido y que no tiene abundancia cero en cada lado.

Una vez calculado el número de barridos interpolados para el valor m/z y realizada la corrección de fondo, se genera una tabla que contiene los valores m/z , la abundancia y los números de barrido interpolados, ordenada por el número de barridos interpolados.

Los grupos se determinan examinando las abundancias mayores de la lista en orden creciente del número de barridos. Una vez que se ha registrado un grupo, se calcula el número de barridos interpolados medio de los valores m/z del grupo; si el punto siguiente que se toma en consideración está más de medio barrido alejado de la media, se inicia un grupo nuevo.

El número de grupos encontrados se registra como el número de componentes; el número de barridos interpolado medio es el número de barridos registrado y los valores m/z con las dos abundancias mayores en el grupo se registran como los iones.

Un pico integrado que contenga más de un grupo se registra como impuro.

Ventana de pureza del espectro de masas

Ventana Ions for Peak

La ventana Ions for Peak muestra los dos valores m/z con las abundancias mayores en cada grupo. Los picos del componente simple muestran los dos iones que se maximizan en el mismo tiempo de retención; los picos del componente múltiple muestran pares de iones que se maximizan en el mismo tiempo de retención. Cada par de iones indica un componente en el pico impuro. Puede utilizar las manipulaciones gráficas de la Agilent ChemStation para examinar los iones con más detalle.

Ventana MS Peak Purity Results

La ventana MS Peak Purity Results contiene los resultados en tablas de los análisis de pureza del pico. Cada línea de la tabla contiene la información de un componente: el número de barridos interpolado medio y los dos iones de mayor abundancia.

3 Evaluación de la pureza de pico

Pureza de pico del espectro de masas

Índice

A

adquisición de espectros, 39
análisis espectral
 ¿qué es?, 8

B

búsqueda automatizada en bibliotecas de
 espectros
 análisis de compuestos objetivo, 15
 búsqueda estándar, 14
 descripción general, 3
 modos de búsqueda, 14
 pureza de pico, 16

C

cálculos de pureza
 curva de umbral, 29, 33
 espectros de masas, 43
comando COMPARE, 21
comparar
 espectros, 25
contorno
 líneas, 10
 mapa, 10
corrección de fondo, 23
curva de umbral, 29, 33, 37
 modo de visualización, 30
curvas de similitud de espectros, 28

D

derivadas de espectros, 22
determinar
 longitud de onda óptima, 10

E

espectro
 corrección, 23
 referencia, 40
espectro de cola, 32
espectro de fluorescencia, 11
espectro de referencia, 40
 corrección de fondo, 23
espectro frontal, 32
espectro máximo, 32
espectro medio, 32
espectro, fluorescencia, 11
espectros
 derivadas, 22
 logarítmicos, 22
 normalizar, 25
 suavizar, 22
espectros logarítmicos, 22
espectros objetivo, 31

F

factor de coincidencia, 21
fondo
 absorciones, 20

I

impureza, 20
informe
 búsqueda en bibliotecas, 12
 espectral, 12
 pureza de pico, 12
isoabsorbancia, gráfico, 10

L

línea de base
 corrección, 23
longitud de onda
 optimización, 10
longitud de onda óptima, 10

M

marca de coincidencia en biblioteca, 17,
 18
marca del nombre del compuesto, 18

N

normalizar
 espectros, 25

O

operaciones espectrales
 comparar, 25
 normalizar, 25

P

pico
 impureza, 20
 pureza, 20
pureza
 pico, 20
pureza de pico
 ¿qué es?, 20
 curva de umbral, 29, 37
 curvas de similitud de espectros, 28
 espectros de masas, 42
 utilización de espectros objetivo
 específicos, 31
pureza de pico del espectro de masas, 42

Índice

R

rango lineal, [39](#)

recomendaciones, [39](#)

S

suavizar espectros, [22](#)

T

tercera dimensión, [8](#)

V

ventana de pureza

espectros de masas, [44](#)

ventana de señales de pico, [28](#)

En este manual

Este manual describe los conceptos en los que se basa el módulo de espectros de la OpenLAB CDS ChemStation Edition Agilent revisión C.01.0x. Complementa la información del manual *Conceptos y flujos de trabajo* con los conceptos sobre espectros especiales aplicables a la Agilent ChemStation para sistemas LC 3D y CE y la sección de UV-visible.

Para detalles sobre la instalación y configuración del módulo de espectros con una Agilent ChemStation para sistemas LC 2D, consulte el manual Guía de instalación de la estación de trabajo.

© Agilent Technologies 1994-2012, 2013

Impreso en Alemania
01/13



M8301-95170



Agilent Technologies