

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition

Справочная информация по
принципам работы
программы



Agilent Technologies

Примечания

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2013, 2014

Согласно законам США и международным законам об авторском праве запрещается воспроизведение любой части данного руководства в любой форме и любым способом (включая сохранение на электронных носителях, извлечение или перевод на иностранный язык) без предварительного письменного разрешения компании Agilent Technologies, Inc.

Microsoft® является товарным знаком корпорации Майкрософт, зарегистрированным в США.

Шифр документа

M8301-98025

Издание

01/2014

Printed in Germany

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Этот продукт может использоваться как компонент лабораторной диагностической системы, если эта система зарегистрирована уполномоченными органами и отвечает требованиям соответствующих нормативных актов. В противном случае он предназначен только для общего лабораторного использования.

Версия ПО

Данное руководство предназначено для версии продукта C.01.06 or higher Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Microsoft® является зарегистрированным товарным знаком корпорации Майкрософт в США.

Гарантия

Материал представлен в документе «как есть» и может быть изменен в последующих изданиях без уведомления. Кроме того, в пределах, допустимых действующим законодательством, компания Agilent отказывается от всех явных или подразумеваемых гарантийных обязательств в отношении данного руководства и любой содержащейся в нем информации, в том числе от подразумеваемой гарантии товарной пригодности и гарантии пригодности для конкретной цели. Компания Agilent не несет ответственности за ошибки, случайные или косвенные убытки, связанные с поставкой и эффективным применением на практике данного документа и любой содержащейся в нем информации. Если между компанией Agilent и пользователем подписано отдельное соглашение, условия гарантии которого не соответствуют условиям гарантий, содержащимся в данном документе, то силу имеют условия отдельного соглашения.

Технологические лицензии

Аппаратура и (или) программное обеспечение, описанные в данном документе, поставляются по лицензии и могут использоваться или копироваться только в соответствии с условиями лицензии.

Предупреждающие сообщения

Внимание

Сообщение **ВНИМАНИЕ** указывает на опасность. Данное сообщение предназначено для привлечения внимания к процедуре, методике и т. п., которые при неправильном выполнении или несоблюдении рекомендаций могут привести к повреждению продукта или потере важных данных. Если в документе встречается сообщение **ВНИМАНИЕ**, не следует продолжать выполнение действий до тех пор, пока указанные условия не будут полностью уяснены и выполнены.

Предупреждение

Сообщение **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ** указывает на опасность. Данное сообщение предназначено для привлечения внимания к процедуре, методике и т. п., которые при неправильном выполнении или несоблюдении рекомендаций могут привести к травме или смерти. Если в документе встречается сообщение **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**, не следует продолжать выполнение действий до тех пор, пока указанные условия не будут полностью уяснены и выполнены..

В данном руководстве...

Данное руководство предназначено для продвинутых пользователей, системных администраторов и лиц, ответственных за аттестацию Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition. Оно содержит справочную информацию о принципах работы, расчетах и алгоритмах анализа данных, используемых в Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Используйте это руководство, чтобы проверить функциональность системы согласно техническим требованиям пользователя, а так же для определения и выполнения задач валидации системы, определенных в плане валидации. Дополнительную информацию можно найти в следующих источниках.

- Для ознакомления с новыми понятиями OpenLAB CDS ChemStation Edition: Руководство *OpenLAB CDS ChemStation Edition, основные сведения и последовательности действий*.
- Для получения информации о зависящей от контекста задаче (как ее решить), учебного пособия, справочной информации о пользовательском интерфейсе и помощи в поиске и устранении неисправностей: сервис онлайн поддержки ChemStation.
- Для получения дополнительной информации по установке системы и подготовке рабочего места: *Инструкция по установке рабочей станции Agilent OpenLAB CDS*.
- Для получения дополнительной информации о принципах и задачах администрирования системы: *Руководство по администрированию Agilent OpenLAB CDS*.

1 Сбор данных

В этом разделе описываются понятия: сбор данных, файлы данных, регистрационный журнал и др.

2 Интегрирование

Этот раздел посвящен понятиям алгоритмов интегрирования ChemStation. Описываются алгоритм интегрирования, программное интегрирование и интегрирование вручную.

3 Идентификация пиков

В этом разделе описываются понятия идентификации пика.

4 Калибровка

В этом разделе описываются принципы калибровки в программном обеспечении ChemStation.

5 Количественный анализ

В этом разделе описывается, как ChemStation производит количественный анализ. Приводится подробная информация о подсчете процентной площади и процентной высоты, подсчете нормализационного процента, расчете по методу внешнего стандарта (ESTD), расчете по методу внутреннего стандарта (ISTD) и количественном подсчете неопознанных пиков.

6 Оценка пригодности системы

В этом разделе описываются возможности ChemStation для оценки пригодности аналитического прибора (до того как он будет использован для анализа образца), аналитического метода (до того как он будет использоваться регулярно) и проверки аналитической системы (до и в течение регулярных анализов).

7 Особые расчеты для капиллярного электрофореза

Этот раздел относится к использованию ChemStation для управления приборами КЭ.

8 Просмотр данных, повторная обработка и просмотр серии образцов

Этот раздел описывает возможности для просмотра данных и то, как переобращивать последовательность данных. Кроме того, описываются понятия просмотра серии образцов, конфигурации серии образцов, функции пересмотра и отчетности.

9 Отчетность

В этом разделе объясняется и предоставляется ссылка на схему ACAML, используемую в программируемом отчете intelligent reporting программного обеспечения OpenLAB CDS.

10 Верификация системы

В этом разделе описываются функции верификации и особенности проверки GLP для ChemStation.

Содержание

1 Сбор данных 9

Что такое сбор данных? 10

Сведения о состоянии 13

2 Интегрирование 15

Что представляет собой интегрирование? 17

Алгоритмы интегрирования ChemStation 19

Принцип действия 25

Распознавание пика 26

Размещение базовой линии 34

Измерение площади пика 48

События интегрирования 51

Интегрирование вручную 60

3 Идентификация пиков 63

Что представляет собой идентификация пика? 64

Правила сопоставления пика 65

Типы идентификации пика 66

Абсолютное время удерживания/миграции 68

Скорректированные времена удерживания/миграции 70

Квалификаторы пика 72

Процесс идентификации 75

4 Калибровка 77

Калибровочная кривая 78

Групповая калибровка 80

Параметры повторной калибровки 81

5 Количественный анализ 83

- Что представляет собой количественный анализ? 84
- Расчеты количественного анализа 85
- Поправочные коэффициенты 86
- Способы подсчета без калибровки 88
- Способы подсчета с калибровкой 89
- Подсчет по методу внешнего стандарта 90
- Процентный подсчет с использованием нормативного состава 93
- Подсчет по методу внутреннего стандарта 95

6 Оценка пригодности системы 99

- Оценка пригодности системы 101
- Определение шума 104
- Расчет симметричности пика 113
- Формулы и расчеты пригодности системы 115
- Общие определения 116
- Определения проверки рабочих характеристик 117
- Определения параметров для воспроизводимости 127
- Доступ к сохраненным в памяти числам с двойным количеством разрядов 132

7 Особые расчеты для капиллярного электрофореза 137

- Таблицы калибровки 138
- Калибровка с помощью коррекции подвижности 141
- Стили особых отчетов для капиллярного электрофореза 147
- Корректировка площадей пиков 148
- Пригодность системы для капиллярного электрофореза 149
- Капиллярный электрофорез с масс-селективным детектором (КЭ-МСД) 150

8 Просмотр данных, повторная обработка и просмотр серии образцов 151

- Таблица навигации в "Data Analysis" (Анализ данных) 152
- Что представляет собой просмотр серии образцов? 158
- Включение функциональной возможности просмотра серии образцов при использовании OpenLAB CDS с ECM 159
- Конфигурация серии образцов 160
- Функции просмотра 163
- Отчетность серии образцов 164

9 Отчетность 165

Что представляет собой ACAML? 166

Схема ACAML 167

Создание отчета для коэффициентов фармакопеи в ChemStation 168

10 Верификация системы 171

Режимы отображения верификации и диагностики 172

Регистр сохранения данных GLP GLPsave 176

Функция тестирования детектора с диодной матрицей 178



1

Сбор данных

Что такое сбор данных?	10
Файлы данных	10
Онлайн-мониторы	12
Регистрационный журнал	12
Сведения о состоянии	13
Состояние ChemStation	13
Строка состояния	13
Схема системы	14

В этом разделе описываются понятия: сбор данных, файлы данных, регистрационный журнал и др.



Что такое сбор данных?

Во время сбора данных все сигналы, получаемые анализатором, преобразуются в детекторе из аналоговых сигналов в цифровые сигналы. Цифровой сигнал передается в электронном виде в систему ChemStation и сохраняется в файле данных сигнала.

Файлы данных

Файл данных составляется из группы файлов, записываемых по умолчанию в директорию DATA или в подкаталог этой папки. При этом ему присваивается имя, состоящее из названия файла данных и расширения .D. Название файлу данных может быть присвоено вручную, используя до 42 знаков (включая расширение). Для каждого файла в директории должны выполняться правила составления имен (см. *File Naming Conventions* в руководстве *Concepts and Workflows*). Дополнительные директории данных можно добавлять, используя настройки **Preferences**.

Таблица 1 Файлы данных

Имя	Description
*.CH	Файлы данных сигналов хроматограмм/электрофореграмм. Название файла составляется из названия блока или типа детектора, номера блока и обозначения сигнала или канала. Например, ADC1A.CH, где ADC (АЦП, аналого-цифровой преобразователь) – тип блока, 1 – номер блока, А – обозначение сигнала, .CH – расширение файла.
*.UV	Файлы спектральных данных (ультрафиолетовый спектр). Название файла составляется из названия типа детектора и номера устройства (только в случае детектора с диодной матрицей и флуориметрического детектора).

Таблица 1 Файлы данных

Имя	Description
REPORT.TXT, REPORT.PDF	Отчетные файлы для соответствующих файлов данных сигналов. Примечание. имя файла PDF может отличаться, если используется уникальное название файла PDF.
Acq.MACAML	Этот файл содержит информацию о методе, используемом во время сбора данных. Информация регистрируется в формате ACAML. Файлы ACAML используются программируемым отчетом Intelligent Reporting.
Sequence.ACAM_	Этот файл содержит результаты единичного ввода пробы. Информация регистрируется в формате ACAML. Файлы ACAML используются программируемым отчетом Intelligent Reporting.
SAMPLE.MAC или Sample.XML	Этот файл используется для сохранения информации об образце.
SAMPLE.MAC.BAC	Резервная копия исходного файла sample.mac. Файл .bac создается при повторной обработке, когда параметры образца (например, множители) обновляются в первый раз. Таким образом, сохраняется исходная информация об образце, которая используется при обработке данных.
RUN.LOG	Данные регистрационного журнала, которые создаются во время анализа. Регистрационный журнал содержит записи хода анализа. Все сообщения об ошибках и важные изменения состояния ChemStation заносятся в регистрационный журнал.
LCDIAG.REG	Только для ВЭЖХ. Содержат графические файлы (градиенты, температуру, давление и т.д.), вводимый объем пробы и описания растворителя.
ACQRES.REG	Содержит информацию о колонках. В случае газового хроматографа так же содержатся данные о вводимом объеме пробы.
GLPSAVE.REG	Часть файла данных, когда выбрана функция Save GLP Data.
M_INTEV.REG	Содержат события при интегрировании вручную.

Онлайн-мониторы

Существуют два типа онлайн-мониторов: онлайн-монитор сигнала и онлайн-монитор спектров.

Онлайн-монитор сигнала

Онлайн-монитор сигнала позволяет в одном и том же окне контролировать несколько сигналов и, если это поддерживается соответствующим прибором, графики рабочих характеристик прибора. В мониторе удобно выбирать сигналы для просмотра и настраивать оси времени и оптической плотности. Для детекторов, поддерживающих эту функцию, доступна кнопка баланса.

В строке сообщений можно отобразить абсолютную характеристику сигнала, перемещая курсор-перекрестие по экрану.

Онлайн-монитор спектров

Онлайн-монитор спектров отображает зависимость оптической плотности от длины волны. Отображаемый диапазон длин волн и шкалу оптической плотности можно настроить.

Регистрационный журнал

В журнале отображаются сообщения, формируемые системой анализа. Это могут быть сообщения об ошибках, системные сообщения или сообщения о событиях из модуля. Эти события фиксируются в журнале независимо от того, отображаются они или нет. Чтобы получить дополнительные сведения о событии в журнале, дважды щелкните соответствующую строку в журнале, и отобразится справочное текстовое описание.

Сведения о состоянии

Состояние ChemStation

В окне состояния ChemStation отображается сводка о состоянии программного обеспечения ChemStation.

При выполнении отдельного анализа:

- в первой строке окна состояния ChemStation отображается выполняемый анализ;
- во второй строке окна состояния отображается текущее состояние метода;
- в третьей строке отображается имя файла необработанных данных вместе с фактическим временем выполнения анализа в минутах (для прибора ГХ всегда отображаются также файлы переднего и заднего инжекторов).

Окна состояния прибора предоставляют сведения о состоянии модулей и детекторов прибора. Кроме того, они показывают состояние отдельных компонентов и, где это уместно, текущие условия, например давление, градиент и поток.

Строка состояния

На экране Method and Run Control (Управление методом и выполнением) графический пользовательский интерфейс системы ChemStation состоит из панелей инструментов и строки состояния. Строка состояния содержит поле состояния системы и сведения о методе и последовательности, загруженных в настоящее время. Если после загрузки в них были внесены изменения, они помечаются значком в виде желтой шестеренки. В случае ЖХ модуля Agilent серии 1100/1200 символ EMF желтого цвета напоминает пользователю, что были превышены сроки использования, установленные для расходных материалов (например, лампы).

Схема системы

На экран можно вывести графическую схему системы ChemStation, если ее поддерживает сконфигурированный анализатор (например, ЖХ-модули Agilent серии 1200 Infinity или ГХ-модули Agilent серии 6890). Это позволяет быстро проверять состояние системы с первого взгляда. Чтобы активировать схему, выберите пункт System Diagram (Схема системы) в меню View (Вид) на экране Method and Run Control (Управление методом и выполнением). Схема в графическом виде изображает систему ChemStation. Каждая составная часть представлена значком. Текущее состояние указывается цветовой маркировкой, описанной ниже.

Таблица 2 Цвета, используемые для указания состояния модуля или прибора

Цвет	Status
темно-серый	автономный
светло-серый	Ожидание (например, лампы отключены)
желтый	не готов
зеленый	готов
фиолетовый	перед выполнением, после выполнения
синий	выполнение
красный	ошибка

Кроме того, можно отображать списки фактических настроек параметров. Схема не только дает общее представление о состоянии, но и предоставляет быстрый доступ к диалоговым окнам для настройки параметров каждой составной части системы.

Дополнительные сведения о схеме системы см. в системе онлайн-справки в части, касающейся прибора.



2 Интегрирование

Что представляет собой интегрирование?	17
Алгоритмы интегрирования ChemStation	19
Определение терминов	20
Выявление исходной базовой линии	21
Отслеживание базовой линии	21
Размещение базовой линии	22
Распознавание ключевых точек пика	24
Принцип действия	25
Распознавание пика	26
Ширина пика	26
Фильтры распознавания пика	27
Группировка	29
Алгоритм распознавания пика	30
Слившиеся пики	32
Уступы	32
Размещение базовой линии	34
Построение базовой линии по умолчанию	34
Начало базовой линии	35
Конец базовой линии	35
Провал базовой линии	35
Отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками	37
Режимы отделения по касательной	39
Невыявленные пики	45
Коды разделения пика	46
Измерение площади пика	48
Определение площади	48
Единицы измерения и коэффициенты пересчета	50



2 Интегрирование

Сведения о состоянии

События интегрирования	51
События интегрирования для всех сигналов	51
Исходные события	51
Временные параметры	55
Автоматическое интегрирование	58
Интегрирование вручную	60

Этот раздел посвящен понятиям алгоритмов интегрирования ChemStation. Описываются алгоритм интегрирования, программное интегрирование и интегрирование вручную.

Что представляет собой интегрирование?

Интегрирование обнаруживает пики на хроматограмме и определяет их размер.

Интегрирование является необходимым шагом для:

- идентификации
- качественного анализа
- калибровки
- количественного анализа
- вычисления чистоты пика и
- поиска по спектральной библиотеке.

Что происходит при интегрировании?

При интегрировании сигнала, программное обеспечение:

- выявляет время начала и окончания для каждого пика
- находит вершину для каждого пика; то есть время удерживания/миграции,
- выстраивает базовую линию и
- рассчитывает площадь, высоту, ширину и симметрию для каждого пика.

Этот процесс контролируется параметрами, называемыми событиями интегрирования.

Возможности интегрирования

Алгоритмы интегрирования включают в себя следующие основные возможности:

2 Интегрирование

Что представляет собой интегрирование?

- возможность автоматического интегрирования, используемая при установке исходных событий интегрирования,
- возможность определять индивидуальные списки параметров интегрирования для каждого сигнала хроматограммы/электрофореграммы, если сигналы многоканальные или используется несколько детекторов,
- интерактивное определение событий интегрирования, которое позволяет пользователю графически подбирать параметры,
- графическое интегрирование хроматограмм или электрофореграмм вручную требует интерпретации пользователем (эти параметры также могут быть записаны в метод и использоваться, как часть автоматического режима),
- аннотации результатов интегрирования,
- определять параметры интегрирования для установки или изменения базовых параметров настройки интегрирования для значений исключаемой площади, исключаемой высоты, ширины пика, чувствительности к наклону, обнаружения уступа, коррекции базовой линии и определений касательных на переднем/заднем склоне пика,
- управление параметрами базовой линии, такими как принудительное установление базовой линии, фиксирование базовой линии, базовая линия по всем минимумам между пиками, базовая линия до следующего минимума, установка базовой линии в обратном направлении из конечной точки текущего пика,
- управление суммированием площадей,
- распознавание отрицательного пика
- управление распознаванием пика растворителя
- управление контрольными командами интегрирования, определяющими зоны времени удерживания/миграции для операции интегрирования.
- выделение уступа на пике с помощью вычислений второй производной,
- улучшенная выборка разноудаленных точек данных, для лучшего представления реконструированных из спектрограмм файлов данных ВЭЖХ с детектором на диодной матрице.

Алгоритмы интегрирования ChemStation

При интегрировании хроматограммы/электрофореграммы интегрирующее устройство:

- 1 определяет исходную базовую линию,
- 2 непрерывно отслеживает и корректирует базовую линию,
- 3 определяет время начала пика,
- 4 находит вершину для каждого пика,
- 5 определяет время окончания пика,
- 6 выстраивает базовую линию и
- 7 рассчитывает площадь, высоту и ширину для каждого пика.

Этот процесс контролируется вкладкой **integration events**. Самыми важными параметрами являются исходная чувствительность к наклону, ширина пика, коррекция базовой линии, исключаемая площадь и исключаемая высота. Программное обеспечение позволяет установить исходные значения для этих и других параметров. Исходные значения начинают действовать с момента старта хроматограммы. Кроме того, функция автоматического интегрирования предусматривает набор исходных параметров, который можно в дальнейшем оптимизировать.

В большинстве случаев, использование исходных параметров дает хорошие результаты для всей хроматограммы, но бывают случаи, когда необходим более полный контроль над процессом интегрирования.

Программное обеспечение позволяет контролировать процесс интеграции посредством включения в программу новых событий интегрирования в установленные временные интервалы на хроматограмме.

Дополнительные сведения “Исходные события” на странице 51

Определение терминов

Ключевые точки



Рисунок 1 Ключевые точки

Пик растворителя

Пик растворителя, который обычно очень большой и не имеет аналитического значения, как правило, не интегрируется. Тем не менее, когда небольшие, представляющие интерес пики, выходят в непосредственной близости к пику растворителя (например находятся на заднем склоне пика растворителя), могут быть установлены специальные условия интегрирования для вычисления их площади, с поправкой на вклад заднего склона пика растворителя.

Уступ (передний, задний)

Уступы возникают, когда два пика выходят настолько близко, что впадины между ними не обнаруживается, и они являются неразрешенными. Уступ может появиться на переднем или на заднем склоне пика. При обнаружении уступов, они могут быть проинтегрированы либо посредством отделяющей касательной, либо по линии проекции.

Склон

Склон пика, который обозначает изменение концентрации компонента со временем, используется для определения начала, вершины и конца пика.

Выявление исходной базовой линии

Поскольку характеристики базовой линии меняются в зависимости от методики и типа детектора, интегрирующее устройство использует установленные значения как из событий интегрирования, так и из файла данных для оптимизации базовой линии.

Перед тем как интегрирующее устройство сможет интегрировать пики, должна быть установлена вкладка **baseline point**. Перед началом анализа интегрирующее устройство устанавливает исходный уровень базовой линии, используя первую точку данных как условную точку базовой линии. Затем происходит уточнение этой точки за счет усреднения входного сигнала. Если интегрирующее устройство не получает уточненную исходную точку базовой линии, то первая точка данных сохраняется в качестве потенциальной начальной точки, принадлежащей базовой линии.

Отслеживание базовой линии

Цифровые данные образцов интегрирования обеспечиваются со скоростью, определяемой посредством начальной или вычисленной ширины пика во время анализа. При этом каждая точка данных принимается точкой потенциально принадлежащей базовой линии.

Интегрирующее устройство определяет *границу базовой линии* по наклону базовой линии, используя алгоритм отслеживания базовой линии. В этом алгоритме наклон вычисляется как первая производная функции в точке базовой линии, а кривизна — как вторая производная. Диапазон базовой линии может быть представлен в виде конуса, вершиной которого является текущая точка данных. Верхние и нижние допустимые уровни конуса определяются следующим образом:

- сумма верхнего наклона, кривизны вогнутости и смещения базовой линии должна быть ниже, чем пороговый уровень,
- сумма нижнего наклона, кривизны выпуклости и смещения базовой линии должна быть более положительной (т.е. менее отрицательной), чем пороговый уровень.

Как только новые данные точек принимаются (обработаны), конус продвигается вперед до тех пор, пока не завершится анализ.

Для того, чтобы точка данных была принята в качестве точки базовой линии, она должна удовлетворять следующим условиям:

- попадать в установленный диапазон базовой линии,
- кривизна базовой линии в этой точке данных (определяемая фильтрами производной), должна быть ниже критического значения, определенного текущим параметром чувствительности к наклону.

Исходная точка базовой линии, установленная в начале анализа, после этого постоянно обновляется со скоростью определяемой параметром ширины пика. Обновление происходит к смещающемуся среднему значению точек данных, лежащих в диапазоне базовой линии за период, определяемый параметром ширины пика. Интегрирующее устройство прослеживает и периодически обновляет базовую линию для компенсации дрейфа до тех пор, пока не будет определен восходящий участок пика.

Размещение базовой линии

Интегрирующее устройство размещает базовую линию хроматограммы/электрофореграммы в течение анализа с частотой определяемой значением ширины пика. После того, как интегрирующее устройство произведет выбор конкретного числа точек данных, происходит обновление исходной точки базовой линии на текущую. Интегрирующее устройство продолжает размещать базовую линию по следующему набору точек данных, и базовая линия обновляется вновь. Этот процесс продолжается до тех пор, пока интегрирующее устройство не обнаружит начало пика.

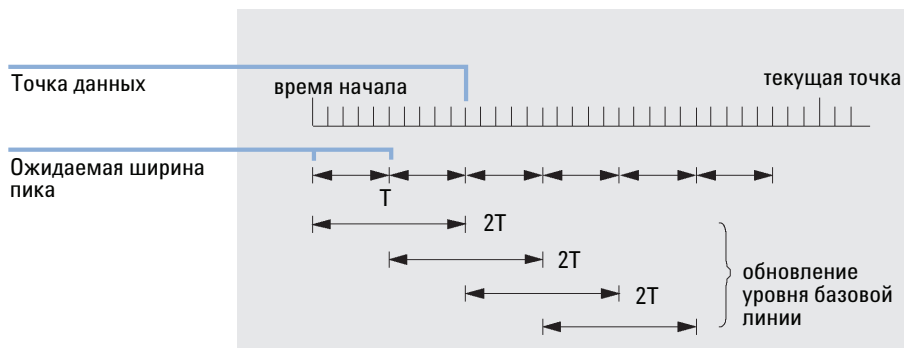


Рисунок 2 Базовая линия

При начале анализа используется первая точка данных. Точка базовой линии периодически обновляется согласно следующей формуле:

Суммируются площади в пределах времени T (ожидаемая ширина пика). Это время никогда не может быть меньше, чем время для одной точки данных. Это продолжается до тех пор, пока выполнятся условие базовой линии. Наклон и кривизна преобразуются так же. Если и наклон и кривизна меньше, чем установленный порог, то две суммированные площади складываются и сравниваются с предыдущей базовой линией. Если новое значение меньше, чем предыдущая базовая линия, то новое значение незамедлительно заменяет старое. Если новое значение оказывается больше предыдущего, оно регистрируется как условно новое значение базовой линии. В случае удовлетворения еще одного значения критерию линейности к наклону и кривизне, это значение подтверждается. Последнее ограничение не действует, если допускаются отрицательные пики. Во время размещения базовой линии должна быть также выполнена проверка для анализа возможного вклада быстро возрастающего фоновых сигнала от используемых растворителей. Это может произойти слишком быстро для обнаружения переднего наклона пика. (Во времени подтверждения переднего склона пика критерий пика растворителя может оказаться уже недействительным.) Сперва базовой линии присваивается первая точка данных. Она заменяется на среднее значение сигнала за интервал времени $2T$, если сигнал остается на базовой линии. После этого базовая линия обновляется каждый интервал времени T (см. Рис. 2 на странице 23).

Распознавание ключевых точек пика

Интегрирующее устройство определяет, что пик может начаться, когда потенциальные точки базовой линии лежат вне диапазона базовой линии и кривизна базовой линии превышает определенное значение, установленное интегрирующим устройством в качестве параметра чувствительности к наклону. Если такое состояние продолжается, то интегрирующее устройство признает, что базовая линия вышла на передний склон пика, и пик обрабатывается.

Начало

- 1 Наклон и кривизна находятся в пределах диапазона: отслеживание базовой линии продолжается.
- 2 Наклон и кривизна выходят за пределы диапазона: возможность появления пика.
- 3 Наклон продолжает выходить за пределы диапазона: пик признается, определяется начальная точка пика.
- 4 Кривизна становится отрицательной: передняя точка перегиба определена.

Вершина

- 1 Наклон проходит через нулевое значение и становится отрицательным: определены вершина и точка вершины пика.
- 2 Кривизна становится положительной: задняя точка перегиба определена.

Конец

- 1 Наклон и кривизна находятся в пределах диапазона: приближается конец пика.
- 2 Наклон и кривизна остаются в пределах диапазона: конец пика определен.
- 3 Интегрирующее устройство возвращается к режиму отслеживания базовой линии.

Принцип действия

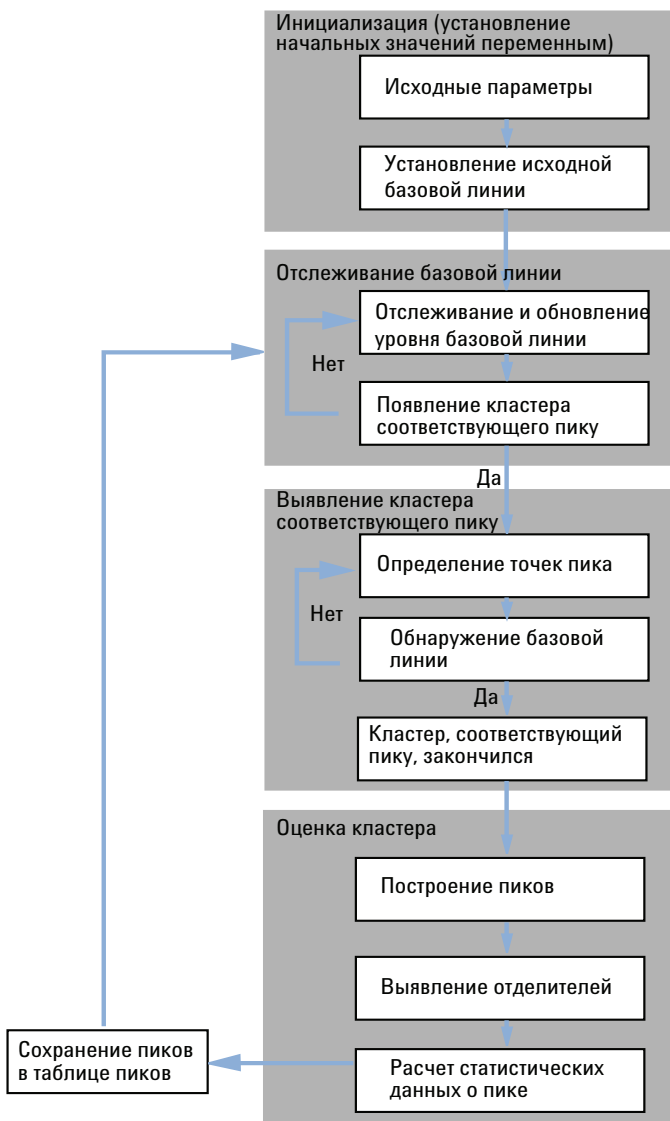


Рисунок 3 Блок-схема интегрирующего устройства

Распознавание пика

Интегрирующее устройство использует несколько параметров, чтобы распознать и охарактеризовать пик:

- ширина пика,
- фильтры распознавания пика,
- группировка,
- алгоритм распознавания пика,
- алгоритм распознавания вершины пика и
- негауссовы вычисления (например для размытых пиков, слившихся пиков).

Ширина пика

Во время интегрирования ширина пика рассчитывается, исходя из скорректированной площади и высоты пика:

$$\text{Ширина} = \text{скорректированная площадь} / \text{скорректированная высота}$$

или, если есть точки перегиба, то исходя из расстояния между этими точками.

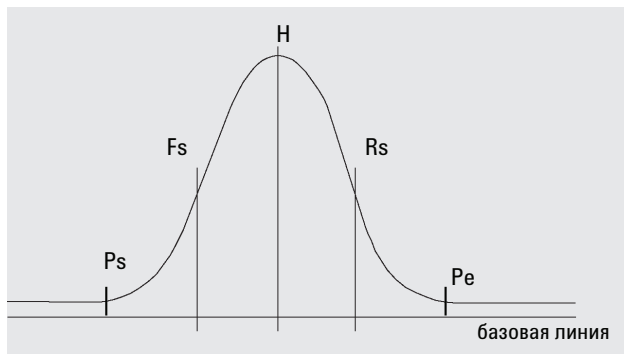


Рисунок 4 Расчет ширины пика

На рисунке, расположенном выше, общей площадью A является сумма площадей от начала (P_s) до конца (P_e) пика с корректировкой на базовую линию. Где F_s – это точка перегиба на переднем склоне пика, а R_s – это точка перегиба на заднем склоне пика.

Параметр ширина пика регулирует способность интегрирующего устройства отличать пики от шума базовой линии. Для получения хорошей производительности ширина пика должна быть установлена достаточно близко к фактической ширине пиков на хроматограмме/электрофореграмме.

Существует три способа изменения ширины пика:

- до начала анализа можно указать исходную ширину пика,
- в процессе анализа интегрирующее устройство автоматически обновляет ширину пика, по мере необходимости, для поддержания хорошего соответствия с фильтрами распознавания пика,
- в процессе анализа, можно обновлять или изменять ширину пика, используя параметр программирования по времени.

Для определения ширины пика используются расчеты пригодности системы, см. [“Оценка пригодности системы”](#) на странице 99.

Фильтры распознавания пика

Интегрирующее устройство имеет три фильтра распознавания пика, которые можно использовать для распознавания пиков путем обнаружения изменений в наклоне и кривизне в пределах непрерывного набора точек данных. Эти фильтры содержат первую производную (для измерения наклона) и вторую производную (для измерения кривизны) точек данных, изучаемых интегрирующим устройством. Фильтрами распознавания пика являются:

- | | |
|-----------------|---|
| Фильтр 1 | Наклон (кривизна) для двух (трех) смежных точек данных |
| Фильтр 2 | Наклон из четырех смежных точек данных и кривизна для трех несмежных точек данных |
| Фильтр 3 | Наклон из восьми смежных точек данных и кривизна для трех несмежных точек данных |

Фактически используемый фильтр определяется установленным значением ширины пика. Например, в начале анализа может быть использован фильтр 1. Если ширина пика увеличивается в ходе анализа, то фильтр будет изменен с первого на Фильтр 2, а затем на Фильтр 3. Для получения хороших результатов от фильтров распознавания, ширина пика должна быть установлена достаточно близко к фактической ширине пиков хроматограмм/электрофореграмм. В ходе анализа интегрирующее устройство обновляет значение ширины пика, по мере необходимости, для оптимизации интегрирования.

Интегрирующее устройство вычисляет обновленное значение ширины пика различными способами, в зависимости от конфигурации прибора:

В случае конфигураций ВЭЖХ/КЭ ширина пика по умолчанию считается используя сложную формулу:

$$0,3 \times (\text{правая точка перегиба} - \text{левая точка перегиба}) + 0,7 \times \text{площадь/высота}$$

В случае ГХ конфигураций ширина пика по умолчанию рассчитывается как отношение площади к высоте пика. Такой расчет не приводит к завышению ширины пика в случае пиков слившихся выше точки половины высоты.

В определенных видах анализа, например для изотермической ГХ и изократической ВЭЖХ, пики с увеличением времени удерживания становятся значительно шире. Чтобы компенсировать это, интегрирующее устройство автоматически обновляет значение ширины пика по мере уширения пиков в ходе анализа. Это делается автоматически до тех пор, пока обновление не будет заблокировано с фиксированием временного параметра ширины пика.

Обновление значения ширины пика устанавливается следующим образом (используется разный вклад "вес" факторов):

$$0,75 \times (\text{имеющаяся ширина пика}) + 0,25 \times (\text{ширина текущего пика})$$

Группировка

Группировка представляет собой средство, с помощью которого интегрирующее устройство сохраняет уширяющиеся пики в пределах эффективного диапазона фильтров распознавания пика для поддержания хорошей селективности.

Интегрирующее устройство не может бесконечно увеличивать значение ширины пика для уширяющихся пиков. В конечном счете, пики становятся настолько широкими, что не могут быть обнаружены с помощью фильтров распознавания пика. Чтобы преодолеть это ограничение, интегрирующее устройство группирует точки данных вместе, эффективно сужая пик при сохранении той же площади.

Когда данные сгруппированы, точки данных объединяются как удвоенные к степени объединения, т.е. группировка не производится = 1x; однократная группировка = 2x; двукратная группировка = 4x и т.д.

Группировка основывается на скорости сбора данных и ширине пика. Интегрирующее устройство использует эти параметры, чтобы установить коэффициент группирования для получения соответствующего числа точек данных Табл. 3 на странице 29.

Группировка осуществляется в степенях числа два, основанных на ожидаемой или экспериментально найденной ширине пика. Алгоритм группировки приводится в Табл. 3 на странице 29.

Таблица 3 Критерии группировки

Ожидаемая ширина пика	Используемые фильтры	Выполнение группировки
0 – 10 точек данных	Первый	Отсутствует
8 – 16 точек данных	Второй	Отсутствует
12 – 24 точек данных	Третий	Отсутствует
16 – 32 точек данных	Второй	Один раз
24 – 48 точек данных	Третий	Один раз
32 – 96 точек данных	Третий, второй	Два раза
64 – 192 точек данных	Третий, второй	Три раза

Алгоритм распознавания пика

Интегрирующее устройство определяет начало пика с точки базовой линии посредством алгоритма распознавания пика. Алгоритм распознавания пика сначала сравнивает выходные данные фильтров распознавания пиков со значением исходной чувствительности к наклону, чтобы увеличить или уменьшить параметр угла наклона восходящего участка пика. Интегрирующее устройство объявляет точку, в которой значение параметра угла наклона восходящего участка становится ≥ 15 , точкой, обозначающей начало пика.

Начало пика

В Табл. 4 на странице 30 ожидаемая ширина пика определяет какие значения фильтра наклона и кривизны сравниваются с чувствительностью к наклону. Например, когда ожидаемая ширина пика мала, числа фильтра 1 добавляются к значению параметра угла наклона восходящего участка. Если ширина ожидаемого пика увеличивается, то используются числа фильтра 2 и в конечном итоге фильтра 3.

Когда значение параметра угла наклона восходящего участка пика ≥ 15 , алгоритм признает, что пик может быть начат.

Таблица 4 Пошаговые значения для параметра переднего наклона

Выходные данные производных фильтров 1 – 3 по сравнению с чувствительностью к наклону	Фильтр 1	Фильтр 2	Фильтр 3
Наклон > чувствительность к наклону	+8	+5	+3
Кривизна > чувствительность к наклону	+0	+2	+1
Наклон < (-) чувствительность к наклону	-8	-5	-3
Наклон < чувствительность к наклону	-4	-2	-1
Кривизна < (-) чувствительность к наклону	-0	-2	-1

Конец пика

В Табл. 5 на странице 31 ожидаемая ширина пика определяет какие значения фильтра наклона и кривизны сравниваются с чувствительностью к наклону. Например, когда ожидаемая ширина пика мала, числа фильтра 1 добавляются к накопителю нисходящего участка. Если ширина ожидаемого пика увеличивается, то используются числа фильтра 2 и в конечном итоге фильтра 3.

Когда значение параметра угла наклона нисходящего участка ≥ 15 , алгоритм признает, что пик может быть закончен.

Таблица 5 Пошаговые значения для параметра заднего наклона

Выходные данные производных фильтров 1 – 3 по сравнению с чувствительностью к наклону	Фильтр 1	Фильтр 2	Фильтр 3
Наклон < (-) чувствительность к наклону	+8	+5	+3
Кривизна < (-) чувствительность к наклону	+0	+2	+1
Наклон > чувствительность к наклону	-11	-7	-4
Наклон > чувствительность к наклону	-28	-18	-11
Кривизна > чувствительность к наклону	-0	-2	-1

Алгоритм распознавания вершины пика

Вершина пика распознается как самая высокая точка хроматограммы (пика) путем построения параболической аппроксимации, которая проходит через самые высокие значения точек данных.

Слившиеся пики

Слившиеся пики появляются, когда новый пик начинается до того, как был обнаружен конец предыдущего пика. Рисунок показывает каким образом интегрирующее устройство обращается со слившимися пиками.

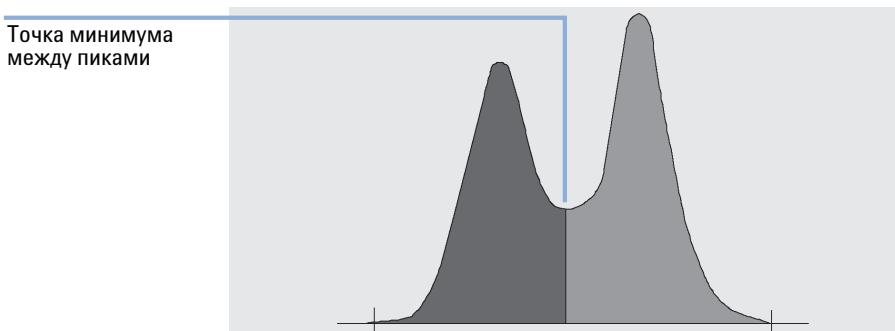


Рисунок 5 Слившиеся пики

Интегрирующая система обрабатывает слившиеся пики следующим образом:

- 1** подсчитывает площадь первого пика до точки минимума между пиками.
- 2** в точке минимума между пиками подсчет площади для первого пика прекращается и начинается подсчет для второго пика.
- 3** когда интегрирующее устройство обнаруживает конец второго пика, подсчет площади прекращается. Этот процесс может быть представлен как разделение слившихся пиков путем опускания перпендикуляра из точки минимума между пиками на базовую линию.

Уступы

Уступами являются неразделенные пики на переднем или заднем склоне большого пика. Уступ наблюдается, когда между пиками нет фактической впадины, то есть перехода отрицательного наклона в положительный. Пик может иметь любое количество уступов как на заднем так и на переднем склонах.

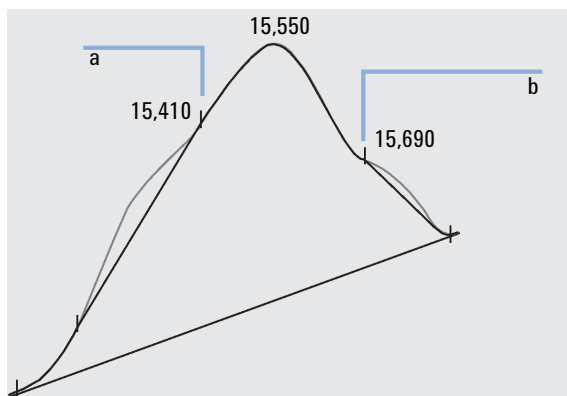


Рисунок 6 Уступы на пике

Изначально уступы определяются по кривизне пика, посредством определения второй производной функции в точке. Когда кривизна достигает нуля, интегрирующее устройство определяет точку перегиба, такие как точки a и b на Рис. 6 на странице 33.

- Потенциальный уступ на переднем склоне определяется, если обнаруживается вторая точка перегиба перед вершиной пика. Если уступ подтверждается, то точкой начала уступа устанавливается точка с максимальной положительной кривизной перед точкой перегиба.
- Потенциальный уступ на заднем склоне определяется, если обнаруживается вторая точка перегиба перед концом пика или минимумом между пиками. Если уступ подтверждается, то точкой начала уступа устанавливается заданная точка от начальной точки кривой.

время удерживания/миграции определяется из точки уступа с максимальной отрицательной кривизной. С помощью программируемого события интегрирования интегрирующее устройство может также подсчитать площади уступов как обычных пиков, используя линии проекции на точки перегиба уступа пика.

Площадь уступа вычитается из площади основного пика.

Уступы на пике могут быть обработаны как обычные пики, используя параметр временного интегрирования.

Размещение базовой линии

После завершения любого кластера, соответствующего пику, и обнаружения базовой линии, интегрирующее устройство запрашивает алгоритм размещения базовой линии, использующий способ "вытягивания веревки между заколоченными колышками", для размещения базовой линии. Чтобы нормализовать и удерживать базовую линию максимально низко, используются трапецевидные зоны и пропорциональные корректировки высоты. Исходные данные алгоритма размещения базовой линии также содержат параметры из метода и файлов данных, определяющих детектор и методику, которую интегрирующее устройство использует для оптимизации своих расчетов.

Построение базовой линии по умолчанию

В самом простом случае интегрирующее устройство создает базовую линию, как серию прямолинейных сегментов между:

- началом базовой линии,
- точками начала, вершины и конца пика,
- базовой линией пика

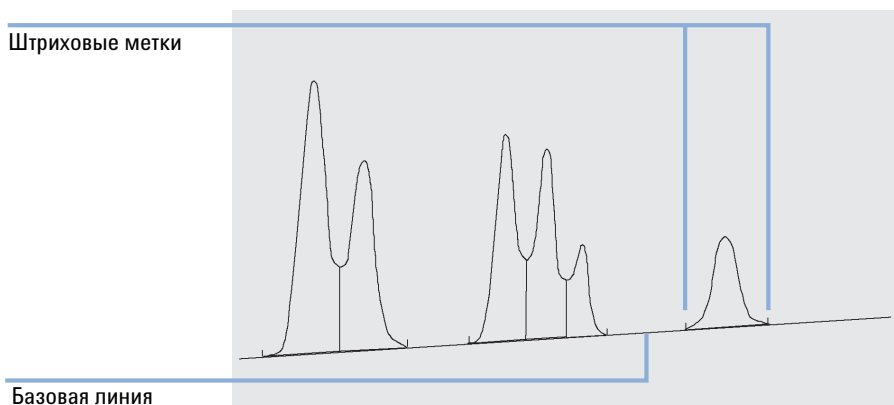


Рисунок 7 Построение базовой линии по умолчанию

Начало базовой линии

Если базовая линия не обнаружена в начале анализа, то начало базовой линии устанавливается одним из следующих способов:

- от момента начала анализа до первой точки базовой линии, если начальная точка ниже, чем первая точка базовой линии,
- от момента начала анализа до первой точки минимума между пиками, если начальная точка ниже, чем первая точка минимума между пиками,
- от момента начала анализа до первой точки минимума между пиками, если первая точка минимума проходит через мысленно начерченную линию от момента начала анализа до первой точки базовой линии,
- от момента начала анализа до горизонтальной базовой линии, продленной к первой точке базовой линии.

Конец базовой линии

Последняя достоверная точка базовой линии используется для обозначения конца базовой линии. В случаях, когда анализ не закончился на базовой линии, конец базовой линии рассчитывается из последней достоверной точки в установленном дрейфе базовой линии.

Если пик закончился на предполагаемой впадине, а следующий пик имеет меньшее значение исключаемой площади установленное пользователем, то базовая линия проектируется от начала пика до следующей достоверной точки базовой линии. Если пик начинается подобным образом, то применяются те же правила.

Провал базовой линии

Провал происходит при снижении сигнала ниже уровня созданной базовой линии (точка а на Рис. 8 на странице 36). Если происходит провал базовой линии, то часть базовой линии обычно перестраивается как показано точками b на Рис. 8 на странице 36.

2 Интегрирование

Размещение базовой линии

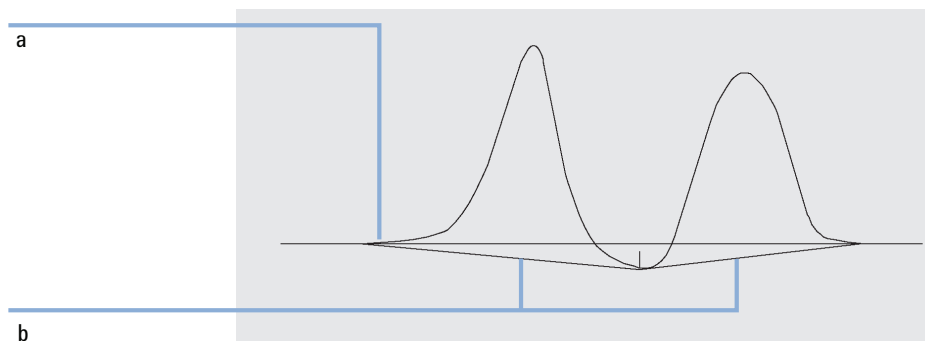


Рисунок 8 Провал базовой линии

Можно использовать следующие варианты наложения базовой линии для удаления всех ее провалов:

Classical Baseline Tracking (no penetrations)

Когда эта опция выбрана, каждый кластер соответствующий пику исследуется на наличие провалов базовой линии. Если провалы обнаружены, то начальная (конечная) или сразу обе точки пика смещаются до тех пор, пока не устранится провал (сравните базовые линии на [Рис. 8](#) на странице 36 и [Рис. 9](#) на странице 36)



Рисунок 9 Стандартное отслеживание базовой линии и отслеживание базовой линии без провала.

Примечание

Вкладка **Baseline tracking (no penetration)** не доступна для пиков растворителя, как и для их пиков-наездников и уступов.

Улучшенное отслеживание базовой линии

При режиме улучшенного отслеживания базовой линии, интегрирующее устройство пытается оптимизировать расположения начала и конца пиков, переустанавливает базовую линию для кластера соответствующего пикам и удаляет провалы базовой линии (см. [Рис. 8](#) на странице 36). Во многих случаях режим улучшенного отслеживания базовой линии дает более стабильную базовую линию, которая менее зависима от чувствительности к наклону.

Отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками

Отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками является количественным параметром, оценивающим, как хорошо пик отделяется от пиков других веществ. Этот устанавливаемый пользователем параметр является частью режима улучшенного отслеживания базовой линии. Он используется для определения того, что должны ли два пика не разделенные базовой линией все же быть разделены линиями проекции или базовой линией, проведенной через точку минимума между пиками. Интегрирующее устройство считает отношение между высотой меньшего пика и высотой впадины, скорректированных базовой линией. Когда отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками меньше значения установленного пользователем, используется линия проекции. В противном случае базовая линия проводится из начальной точки, находящейся на базовой линии первого пика, до точки минимума между пиками и из точки минимума между пиками до конечной точки, находящейся на базовой линии второго пика (сравните [Рис. 9](#) на странице 36 с [Рис. 10](#) на странице 38).

2 Интегрирование

Размещение базовой линии

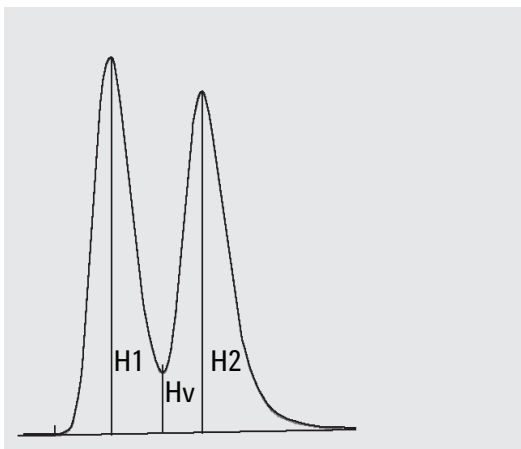


Рисунок 10 Отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками

Отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками (названия данного параметра в Японии и в Европе различаются) рассчитывается, используя следующие уравнения:

$H1 \geq H2$, отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками = $H2/Hv$

и

$H1 < H2$, отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками = $H1/Hv$

Рис. 11 на странице 39 показывает, как установленное пользователем значение отношения высоты пика к высоте точки минимума между пиками влияет на базовую линию.



Рисунок 11 Влияние отношения высоты пика к высоте точки минимума между пиками на базовую линию

Режимы отделения по касательной

Четыре модели доступны для расчета площадей соответствующих пиков, когда возможна отделяющая касательная:

- Экспоненциальная кривая
- Новое экспоненциальное отделение
- Прямолинейное отделение
- Сочетание расчетов экспоненциального и прямолинейного отделений для лучшей аппроксимации (стандартные отделения)

Экспоненциальная кривая

Эта модель отделения, используя экспоненциальное уравнение, проводит кривую через начало и конец пика-наездника. Кривая проходит под каждым пиком-наездником, которые сопровождают основной пик. Площадь под отделяющей кривой отнимается от пиков-наездников и добавляется к площади основного пика.

2 Интегрирование

Размещение базовой линии

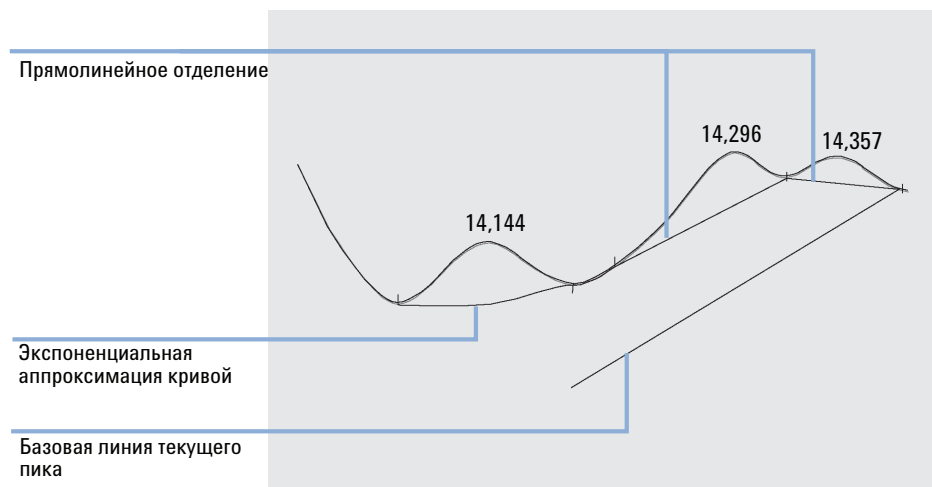


Рисунок 12 Экспоненциальное отделение

Новая экспоненциальная кривая

Эта модель отделения проводит кривую, используя экспоненциальное уравнение приблизительно описывающее передний или задний склон большого пика. Кривая проходит под одним или более пиками, которые сопровождают основной пик (пики-наездники). Площадь под отделяющей кривой отнимается от пиков-наездников и прибавляется к основному пику. При использовании такой экспоненциальной модели можно отделить больше одного пика-наездника. Все пики пика-наездника после первого разделяются линиями проекции, начиная с конца первого пика-наездника и спроецированными только на отделяющую кривую.

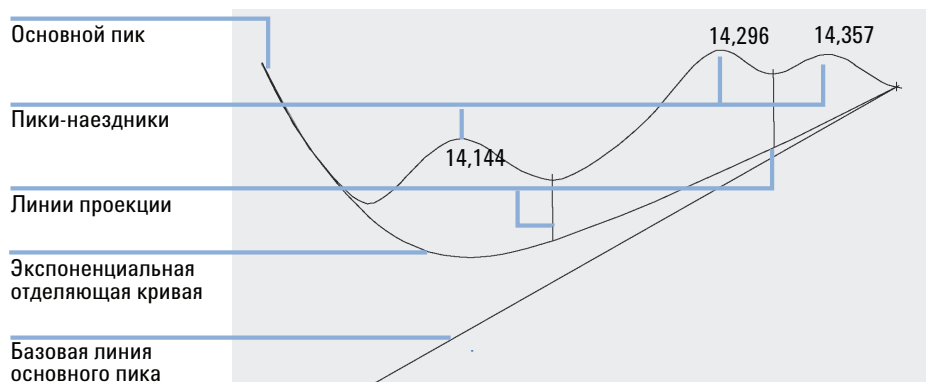


Рисунок 13 Новое экспоненциальное отделение

Прямолинейное отделение

Эта модель отделения проводит прямую линию через начало и конец пика-наездника. Высота начала пика-наездника корректируется с учетом наклона основного пика. Площадь под прямой линией отнимается от пиков-наездников и прибавляется к основному пику.

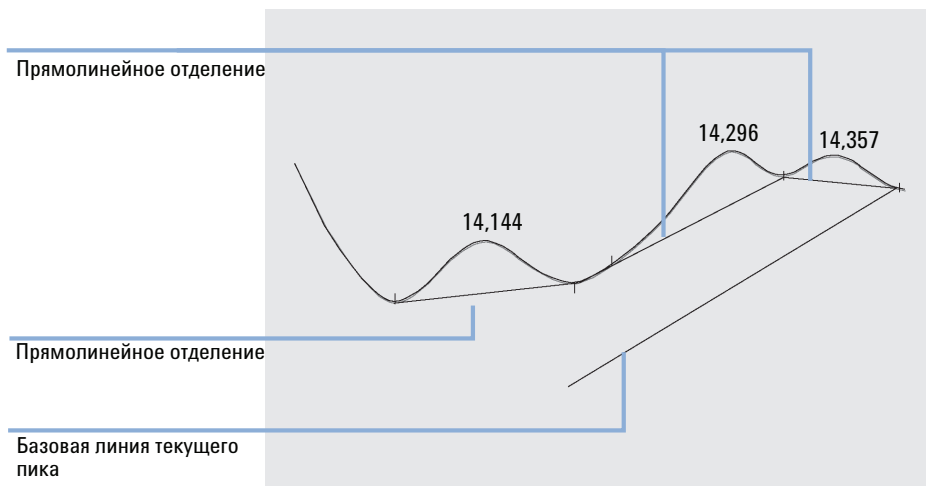


Рисунок 14 Прямолинейное отделение

Стандартные отделения

Этот метод по умолчанию является сочетанием экспоненциального и прямолинейного расчетов для лучшей подгонки.

Переход от экспоненциального на линейный расчет выполняется таким образом, что исключаются резкие разрывы высот или площадей.

- Когда сигнал значительно выше базовой линии, конечные аппроксимирующие вычисления являются экспоненциальными.
- Когда сигнал находится в пределах диапазона базовой линии, конечные аппроксимирующие вычисления являются прямолинейными.

Сочетание расчетов представляется в виде экспоненциального отделения или отделения по касательной.

Критерии отделения

Два критерия определяют какая отделяющая линия используется для расчета площади пика-наездника, выходящего на заднем склоне основного пика:

- тыльное отношение высот основного пика и пика-наездника
- отношение высот пика-наездника и точки впадины

Эти критерии не используются, если временной параметр для экспоненциального распределения является действующим, или основной пик оказывается пиком-наездником. Кодом разделения между основным пиком и пиком-наездником должен быть тип **Valley**.

Tail Skim Height Ratio является отношение высоты основного пика, скорректированного базовой линией (H_p на Рис. 15 на странице 43) к высоте пика-наездника, скорректированного базовой линией (H_c). Это отношение должно быть больше, чем установленное значение для отделения пика-наездника.

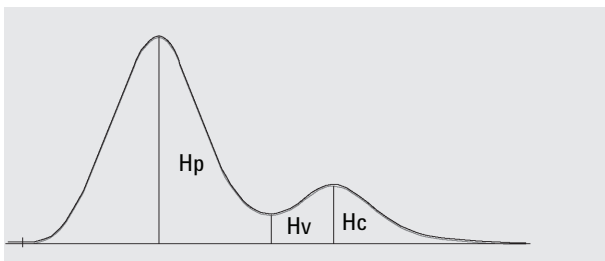


Рисунок 15 Критерии отделения

Можно отключить экспоненциальное отделение на всем протяжении анализа, установив значение отношения высот основного пика и пика-наездника слишком высоким или равным нулю.

Valley Height Ratio является отношение высоты основного пика над базовой линией (H_c на [Рис. 15](#) на странице 43) к высоте пика-наездника над базовой линией (H_v на том же рисунке). Это отношение должно быть меньше, чем установленное значение для отделения пика-наездника.

Расчет экспоненциальной аппроксимации кривой для отделений

Следующее уравнение используется для расчета экспоненциального отделения:

$$H_b(T_r) = H_0 * \exp(-B * (T_r - T_0)) + A * T_r + C$$

где:

H_b	Высота экспоненциального отделения в период времени T_r
H_0	Высота (над базовой линией) начала экспоненциального отделения
B	Коэффициент ослабления экспоненциальной функции
T_0	Время, соответствующее началу экспоненциального отделения
T_r	Время удерживания
A	Наклон базовой линии основного пика
C	Смещение базовой линии основного пика

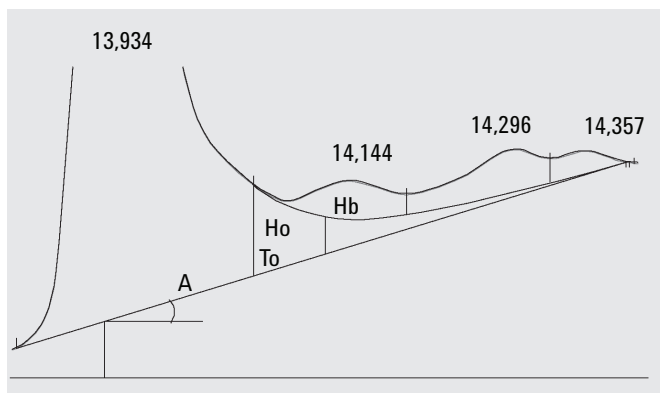


Рисунок 16 Значения, используемые для подсчета экспоненциального отделения

Отделение переднего склона пика

Как и для пиков-наездников на хвосте основного пика, требуется особое интегрирование для некоторых пиков на переднем склоне пика, см. Рис. 17 на странице 44.

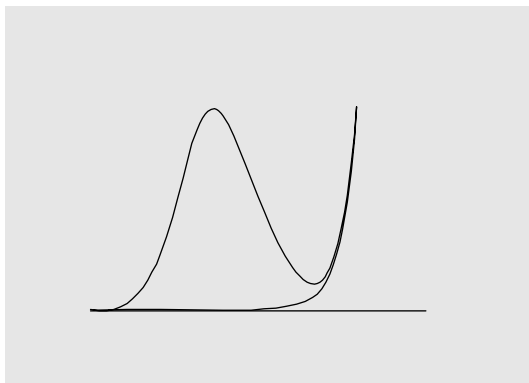


Рисунок 17 Отделение переднего склона пика

Отделение переднего склона пика производится таким же способом как отделение заднего склона пика, используя те же модели отделения.

Критериями отделения пика являются:

- фронтальное отношение высот основного пика и пика-наездника

- отношение высот пика-наездника и точки впадины

Отношение высот пика-наездника и точки впадины имеют одинаковое значение для отделения переднего и заднего склонов (см. "Отношение высот пика-наездника и точки минимума между пиками"); Фронтальное и тыльное отношение высот основного пика и пика-наездника рассчитываются одинаково (см. "Отношение высот основного пика и пика-наездника"), но могут иметь различные значения.

Невыявленные пики

В некоторых случаях построения базовой линии существуют небольшие площади, которые находятся над базовой линией и ниже сигнала, но не являются частью какого-либо из распознанных пиков. Как правило такие площади не измеряются и не включаются в отчет. Если невыявленные пики включены, то эти площади измеряются и включаются в отчет, как невыявленные пики. Временем удерживания/миграции для таких площадей является средняя точка между началом и концом площади, как показано на Рис. 18 на странице 45.

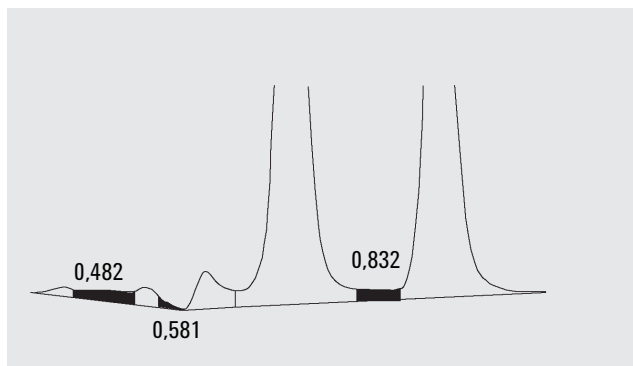


Рисунок 18 Невыявленные пики

Коды разделения пика

В результатах отчета интегрирования каждому пику присваивается двух-, трех- или четырехзначный код, который описывает, как был проведен сигнал базовой линии.

Таблица 6 Поле кодов из четырех символов

Первый знак	Второй знак	Третий знак	Четвертый знак
Базовая линия в начале	Базовая линия в конце	Ошибка/метка пика	Тип пика

Первый и второй знаки

Первый знак описывает базовую линию в начале пика, а второй знак описывает базовую линию в конце пика.

- B** Пик начался или закончился на базовой линии.
- P** Пик начался или закончился, когда базовая линия находилась в провале.
- V** Пик начался или закончился на линии проекции с точки впадины.
- N** Пик начался или закончился на принудительно установленной горизонтальной базовой линии.
- F** Пик начался или закончился на принудительной точке.
- M** Пик был проинтегрирован вручную.
- U** Пик не был выявлен.

Дополнительные метки могут также быть добавлены (в порядке приоритета):

Третий знак

Третий знак описывает ошибки или метку пика:

- A** Интегрирование было прервано.
- D** Пик был искажен.
- U** Попадание параметра ниже диапазона.

- O** Попадание параметра выше диапазона.
- Пробел** Пик является обычным пиком.

Четвертый знак

Четвертый знак описывает тип пика:

- S** Пик является пиком растворителя.
- N** Пик является отрицательным пиком.
- +** Пик является областью просуммированных пиков.
- T** Пик с отделяющей касательной (стандартное отделение).
- X** Пик с отделяющей касательной (старая модель экспоненциального отделения).
- E** Пик с отделяющей касательной (новая модель экспоненциального отделения).
- m** Пик определен путем наложения базовой линии вручную.
- n** Отрицательный пик определен путем наложения базовой линии вручную.
- t** Пик с отделяющей касательной определен путем наложения базовой линии вручную.
- x** Пик с отделяющей касательной (экспоненциальное отделение) определен путем наложения базовой линии вручную.
- R** Пик является пересчитанным пиком.
- f** Пик определен по касательной переднего уступа.
- b** Пик определен по касательной заднего уступа.
- F** Пик определен по линии проекции на передний уступ.
- B** Пик определен по линии проекции на задний уступ.
- U** Пик является невыявленным.

Измерение площади пика

Финальным шагом в интегрировании пика является определение окончательной площади пика.

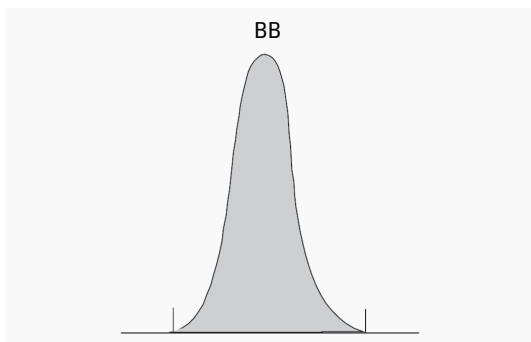


Рисунок 19 Измерение площади для пиков, начинающихся и заканчивающихся на базовой линии.

В случае простого или изолированного пика, площадь пика определяется суммарной площадью над базовой линией между началом и концом пика (обозначенными метками).

Определение площади

Площадь, которую интегрирующее устройство рассчитывает в процессе интегрирования, определяется следующими способами:

- для пиков начинающихся и заканчивающихся на базовой линии (BB), как площадь над базовой линией между началом и концом пика, как на [Рис. 19](#) на странице 48,
- для пиков начинающихся и заканчивающихся на впадине (VV), как площадь над базовой линией, выделенная вертикальными линиями проекции из точек минимума между пиками, как на [Рис. 20](#) на странице 49,

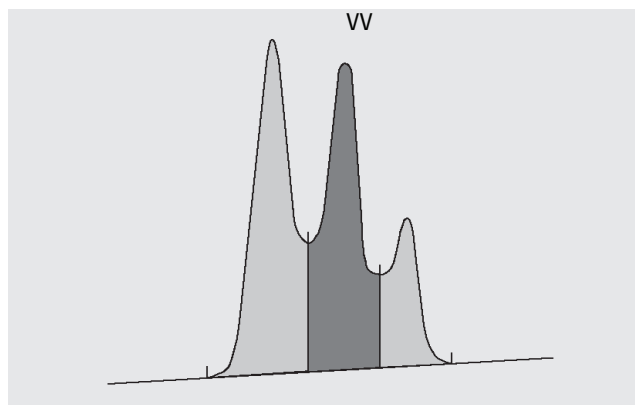


Рисунок 20 Измерение площади для пиков, начинающихся и заканчивающихся на точках минимумов между пиками.

- для пиков выявленных по касательной (T), как площадь над обновленной базовой линией,
- для пиков растворителя (S), как площадь над горизонтальным продлением из последней обнаруженной точки базовой линии и под обновленной базовой линией, полученной для пиков выявленных по касательной (T). Пик растворителя может увеличиваться слишком медленно чтобы быть распознанным, или же в ходе анализа возможно появление группы пиков, которую следует обрабатывать как пик растворителя с множеством наездников. Обычно такой пик включает группу слившихся пиков, где один гораздо больше, чем остальные. Простая разметка линией проекции будет завышать результаты обработки последующих пиков, так как они, на самом деле, находятся на заднем склоне первого пика. При принудительном распознавании первого пика как пик растворителя, остальная часть группы отделяется от заднего склона,
- отрицательные пики, которые встречаются ниже базовой линии, имеют положительную площадь, как показано на [Рис. 21](#) на странице 50.

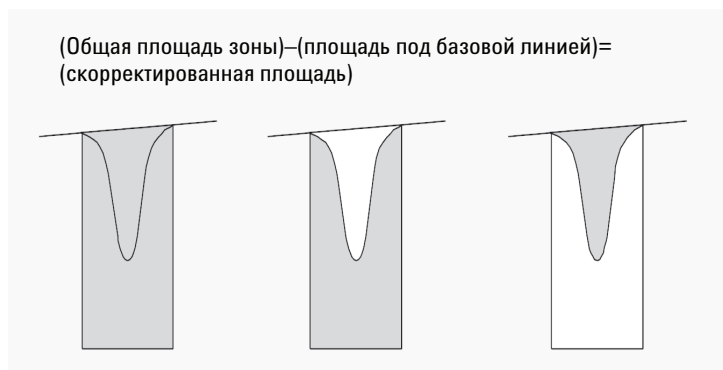


Рисунок 21 Измерение площади отрицательных пиков

Единицы измерения и коэффициенты пересчета

Внешние данные содержат набор точек данных, они могут быть либо выборочными данными, либо данными интегрирования. В случае данных интегрирования каждая точка данных соответствует площади, которая выражается как *Высота × Время*. В случае выборочных данных, каждая точка данных соответствует высоте.

Таким образом, в случае данных интегрирования, высота рассчитывается как величина, полученная делением площади на время, прошедшее с предшествующей точки данных. В случае выборочных данных, площадь рассчитывается путем умножения данных на время, прошедшее после предыдущей точки данных.

Расчеты интегрирования используют оба понятия. Интегрирующее устройство использует следующие единицы: *единицы поглощения сигнала × миллисекунды* для площади и *единицы поглощения сигнала* для высоты. Это сделано, чтобы обеспечить общую базу для единого округления (когда это необходимо). Вычисление времени, площади и высоты выдаются в отчете в реальных физических единицах, независимо от того, как они измеряются, рассчитываются и регистрируются в программном обеспечении.

События интегрирования

Интегрирующее устройство предоставляет ряд исходных и параметров временного интегрирования. Многие события являются парами включения/выключения или запуска/остановки.

События интегрирования для всех сигналов

Следующие события предусмотрены для всех сигналов:

- Режим отделения по касательной
- Тыльное отношение высот основного пика и пика-наездника
- Фронтальное отношение высот основного пика и пика-наездника
- Отношение высоты отделенного пика к высоте точки минимума между пиками
- Коррекция базовой линии
- Отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками

Исходные события

Initial Peak Width Начальная ширина пика устанавливает внутреннюю ширину пика для интегрирующего устройства к этому значению для начала анализа. Эта начальная ширина пика используется для масштабирования параметра угла наклона, который обнаруживает восходящий участок, нисходящий участок и размывание пика. В ходе анализа интегрирующее устройство обновляет значение ширины пика, по мере необходимости, для оптимизации интегрирования. Следует указывать ширину пика в единицах времени, которое соответствует ширине пика на половине высоты первого ожидаемого пика (за исключением пика растворителя).

Slope Sensitivity	Чувствительность к наклону является настройкой чувствительности к пику. Это параметр, который изменяется по линейной шкале.
Height reject	Исключаемая высота устанавливает исключение пика по конечной высоте. Любые пики, которые имеют высоту меньше, чем минимальная высота, не выявляются.
Area reject	Исключаемая площадь устанавливает исключение пика по конечной площади. Любые пики, которые имеют площадь меньшую, чем минимальная площадь, не выявляются.
Shoulder detection	При включенном выявлении уступов, интегрирующее устройство обнаруживает уступ, используя кривизну пика, посредством определения второй производной. Когда кривизна достигает нуля, интегрирующее устройство определяет эту точку перегиба как возможный уступ. Если интегрирующее устройство определяет другую точку перегиба до вершины пика, то уступ считается обнаруженным.

Peak Width

Параметр ширина пика регулирует селективность интегрирующего устройства на отличие пиков от шума базовой линии. Для получения хорошей производительности, ширина пика должна быть установлена достаточно близко к фактической ширине пиков на уровне половине высоты. В ходе анализа интегрирующее устройство обновляет значение ширины пика, по мере необходимости, для оптимизации интегрирования.

Выбор ширины пика

Выберите значение, которое обеспечивает достаточную фильтрацию для предотвращения шума принимаемого за пик, без искажения информации в сигнале.

- Чтобы выбрать подходящую исходную ширину пика для интересующего одиночного пика, используйте время ширины пика как основное, так и как рекомендованное.
- Чтобы выбрать подходящую исходную ширину пика, когда есть несколько интересующих пиков, установите исходную ширину пика до величины, равной или меньшей, чем самая узкая ширина пика для получения оптимальной селективности пика.

Если выбранная исходная ширина пика является слишком маленькой, шум может быть интерпретирован как пики. Если широкие и узкие пики присутствуют одновременно, то можно принять решение использовать параметры, программируемые по времени, чтобы настроить ширину пика для определенных пиков. Иногда пики становятся значительно шире в ходе анализа, например в режимах изотермической ГХ и изократической ВЭЖХ. Чтобы это компенсировать, интегрирующее устройство автоматически обновляет значение ширины пика, так как пики уширяются в ходе анализа, если не отключить временный параметр.

Обновление значения ширины пика устанавливается следующим образом (используется разный вклад "вес" факторов):

$$0,75 \times (\text{имеющаяся ширина пика}) + 0,25 \times (\text{ширина текущего пика})$$

Height Reject и Peak Width

Как **peak width**, так и **height reject** являются очень важными параметрами в процессе интегрирования. Можно достигнуть разных результатов, изменяя эти значения.

- Увеличивайте как исключаемую высоту, так и ширину пика, когда должны быть определены и измерены относительно преобладающие компоненты на фоне высокого шума. Увеличение ширины пика улучшает фильтрацию шумов, а увеличение исключаемой высоты гарантирует, что игнорируются случайные шумы.
- Уменьшайте исключаемую высоту и ширину пика для выявления и измерения следовых компонентов, высота которых приближается к уровню шума. Снижение ширины пика уменьшает фильтрацию сигнала, в то время как уменьшение исключаемой высоты гарантирует, что небольшие пики не будут исключены, поскольку имеют недостаточную высоту.
- Когда при анализе имеются пики с различной шириной пиков, установите ширину пика для самых узких пиков и уменьшите исключаемую высоту для обеспечения того, что широкие пики не будут проигнорированы из-за их сниженной высоты.

Настройка интегрирования

Часто бывает полезно изменить значения для параметров чувствительности к наклону, ширины пика, исключаемой высоты и

исключаемой площади, чтобы настроить интегрирование. Рисунок ниже показывает, как эти параметры влияют на интегрирование пяти пиков на сигнале.

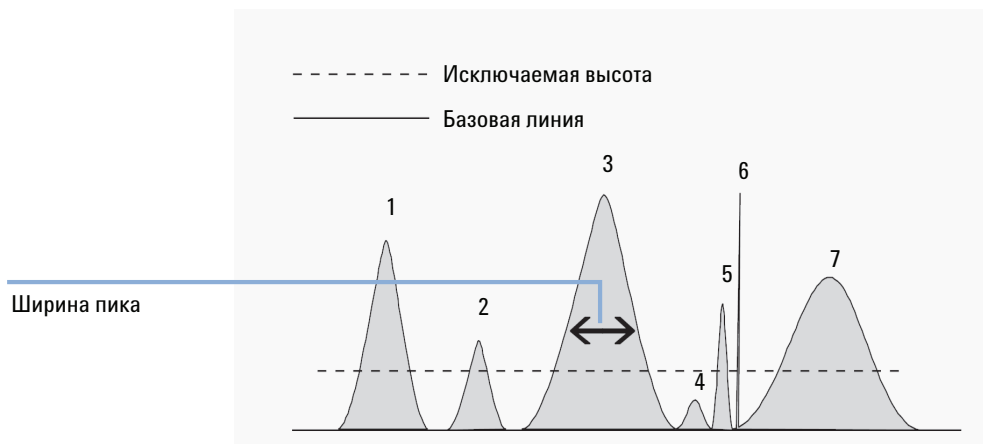


Рисунок 22 Использование исходных параметров

Пик интегрируется только при удовлетворении всех четырех параметров интегрирования. Используя ширину пика для 3 пика, исключаемую площадь и чувствительность к наклону, как показано, только пики 1, 3, 5 и 7 окажутся проинтегрированными.

- Пик 1** интегрируется, так как удовлетворяются все четыре параметра интегрирования.
- Пик 2** исключается, поскольку площадь ниже установленного значения исключаемой площади.
- Пик 3** интегрируется, так как удовлетворяются все четыре параметра интегрирования.
- Пик 4** не интегрируется, поскольку высота пика ниже исключаемой высоты.
- Пик 5** исключается, поскольку площадь ниже установленного значения исключаемой площади.
- Пик 6** не интегрируется, фильтрация и группировка делают пик невидимым.
- Пик 7** интегрируется.

Таблица 7 Значения исключаемой высоты и площади

Параметр интегрирования	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5	Пик 7
Исключаемая высота	Выше	Выше	Выше	Ниже	Выше	Выше
Исключаемая площадь	Выше	Ниже	Выше	Ниже	Ниже	Выше
Пик интегрируется	Да	Нет	Да	Нет	Нет	Да

Временные параметры

OpenLAB CDS ChemStation Edition предлагает набор временных параметров, которые позволяют выбрать между режимом интегрирующего устройства внутреннего алгоритма определения базовой линии и режимом определения пользователем. Эти временные параметры могут быть использованы для настройки построения сигнала базовой линии, когда построение по умолчанию не подходит. Например, пользователь может создать новый тип параметра суммирования площадей, который не меняет результаты суммирования площадей, установленных по умолчанию. Эти параметры могут быть полезны для суммирования конечных площадей пика и для коррекции краткосрочных и длительных отклонений базовой линии. Для получения дополнительной информации о параметрах интегрирования см. также [“Исходные события”](#) на странице 51

Подсчет площади

Подсчет площади

Устанавливает точки, между которыми интегрирующее устройство подсчитывает площади между включенным подсчетом площади и отключенным подсчетом площади по времени.

Частичный подсчет площади

Этот параметр похож на **Area Sum**. Он позволяет интегрировать смежные временные части хроматограммы без потери временных интервалов.

Функция подсчета площади позволяет следить за долгосрочной базовой линией, определенной пользователем, чтобы интегрировать по

кластеру пиков, установив какой-либо интервал. Подсчет площади суммирует площади под пиками для этого интервала. Система определяет время удерживания подсчета площади как центральную точку временного интервала, на которой площадь суммируется. Точность определения центральной точки варьируется 0,001 min при высокой скорости передачи данных и 0,1 min при низкой скорости передачи данных.

Параметры базовой линии

Действующая базовая линия	Устанавливает точку (времени) при которой интегрирующее устройство обновляет базовую линию до текущей высоты точки данных, если сигнал находится на пике.
Базовая линия на минимумах между пиками	Устанавливает точки (включено/выключено) между которыми интегрирующее устройство обновляет базовую линию в каждом минимуме между пиками.
Удерживание базовой линии	Горизонтальная базовая линия проводится на высоте установленной базовой линии от того момента, где параметр удерживания базовой линии включен до того, где параметр удерживания базовой линии выключен.
Базовая линия на следующем минимуме между пиками	Устанавливает точку, при которой интегрирующее устройство обновляет базовую линию на следующем минимуме между пиками и затем отменяет эту функцию автоматически.

Следующие параметры могут быть использованы для подсчета площади с **Area Sum Slice** в сложных хроматограммах. Они помогают найти лучшее положение базовой линии автоматически, что делает ручные настройки излишними. Это особенно полезно для анализа результатов ГХ. Базовая линия рассчитывается на основе временного интервала, с использованием статистических оценок.

Установление базовой линии из диапазона	Определяет диапазон хроматограммы используемый для оценки новой базовой линии. Диапазон точек данных используется для расчета статистически значимых точек базовой линии в середине временного диапазона. Этот алгоритм разумно игнорирует всплесковые помехи или неожиданные пики, происходящие в этом интервале посредством двухступенчатой статистической функции исключения. Это обеспечивает более надежные результаты для оценки базовой линии.
--	---

Два параметра **Set Baseline from Range** связываются с прямой линией между их центральными точками. Рис. 23 на странице 57 показывает настройку интервала диапазона базовой линии, которая показана как затененная серым областью.

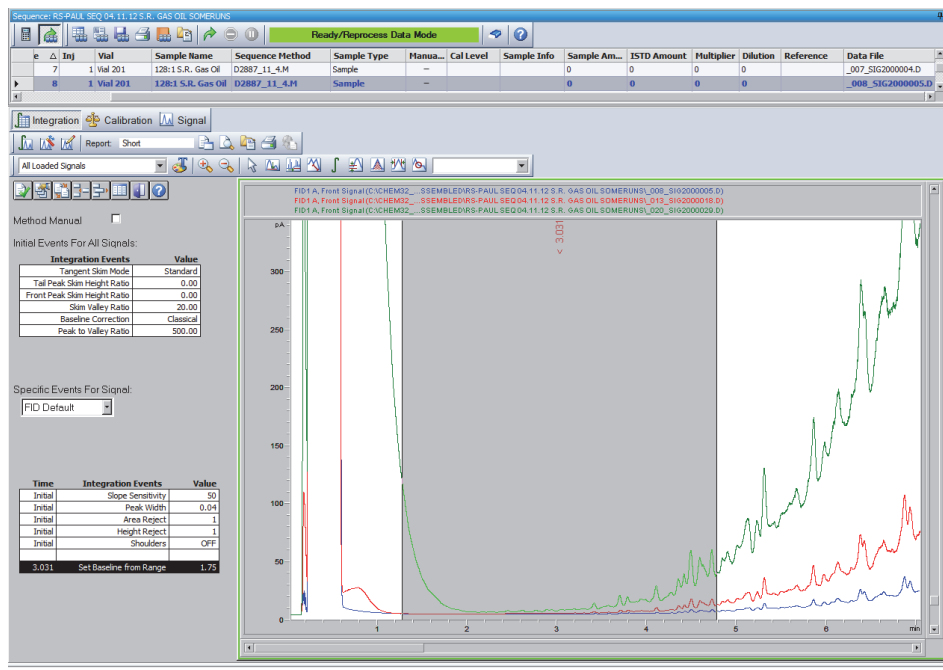


Рисунок 23 "Установление базовой линии из диапазона" : Интервал диапазона базовой линии указывается серым оттенком

Установление минимума базовой линии из диапазона

Аналогичен **Set Baseline from Range**, но снижает его значение для того, чтобы свести к минимуму провал базовой линии. **Set Low Baseline from Range** рассчитывается путем вычитания двух сигма (стандартное отклонение шума) из **Set Baseline from Range** значения y .

Использование базовой линии из диапазона

Позволяет проецировать значение базовой линии на более позднее или раннее время. Она также позволяет построить кривые базовой линии, которые изменяют наклон под поверхностью кластера пиков.

Автоматическое интегрирование

Функция **Autointegrate** является отправной точкой для установки исходных параметров. Это особенно полезно, когда разрабатывается новый метод. Начните с таблицы параметров интегрирования по умолчанию, не содержащих временных параметров, затем можно оптимизировать параметры предлагаемые функцией автоматического интегрирования для общего использования.

Принципы действия

Функция **Autointegrate** считывает данные хроматограммы и рассчитывает оптимальные значения для исходных параметров интегрирования для каждого сигнала на исследуемой хроматограмме.

Алгоритм анализирует 1% от начала и конца хроматограммы и определяет уровень шума и наклон для этого участка. Шум определяется как трехкратное стандартное отклонение линейной регрессии деленное на квадратный корень из процентного числа точек, используемых в регрессии. Эти значения используются для присвоения соответствующих значений исключаемой площади и чувствительности к наклону при интегрировании. Затем алгоритм присваивает временное значение ширины пика, зависящее от продолжительности хроматограммы, используя 0,5% для ВЭЖХ и от 0,3% до 0,2% для ГХ. Исходная исключаемая площадь устанавливается на нуль, и выполняется пробное интегрирование. Если необходимо, пробное интегрирование повторяется несколько раз, корректируя параметры каждый раз, пока по крайней мере 5 пиков не будут обнаружены, или интегрирование выполнится с исходной исключаемой высотой равной нулю. Пробное интегрирование прекращается, если вышеуказанные условия не будут выполнены после 10 испытаний.

Результаты интегрирования оцениваются, и ширина пика корректируется на основе ширины обнаруженных пиков, смещая расчет к исходным пикам. Симметричность обнаруженных пиков используется для учета только пиков с симметрией в диапазоне между 0,8 и 1,3 в расчетах ширины пика. Если не обнаружены достаточно симметричные пики, то это ограничение опускается до *минимальная симметрия/1,5* и *максимальная симметрия/1,5*. Затем базовая линия между пиками оценивается для уточнения более ранних значений исключаемой высоты и чувствительности к наклону. Исключаемая

площадь устанавливается равной 90% от минимальной площади самого симметричного пика, обнаруженного в ходе пробного интегрирования.

Хроматограмма повторно интегрируется, используя эти окончательные значения параметров интегрирования, и результаты интегрирования сохраняются.

Параметры автоматического интегрирования

Следующие параметры устанавливаются с помощью функции автоматического интегрирования:

- исходная чувствительность к наклону
- исходная высота
- начальная ширина пика
- исходная исключаемая площадь

Интегрирование вручную

Этот тип интегрирования позволяет интегрировать выбранные пики или группы пиков. За исключением исходного значения исключаемой площади, события интегрирования программного обеспечения игнорируются в пределах нормативных диапазонов интегрирования вручную. Если один или несколько пиков в результате интегрирования вручную окажутся ниже порога исключаемой площади, то они отбрасываются. Параметры интегрирования вручную используют абсолютные значения времени. Они не учитывают дрейф сигнала.

Вкладка **Manual Integration** позволяет определить начальную и конечную точку пика, и затем включить пересчитанные площади в количественный анализ и в отчет. Каждая из этих точек обозначается в отчетах кодом разделения пика М.

Интегрирование вручную предоставляет следующие функции:

- | | |
|-----------------------|--|
| Draw Baseline | определяет где базовая линия должна быть проведена для пика или группы пиков. Во вкладке меню Integration > all valleys также можно указать, будут ли пики в данном диапазоне автоматически разделены во всех точках минимума. |
| Negative Peaks | определяет, когда обрабатывать любую площадь ниже базовой линии, как отрицательный пик. Также можно указать, будут ли пики в данном диапазоне автоматически разделены во всех точках минимума между пиками. |
| Tangent Skim | рассчитывает площади пиков, отделенных касательной от основного пика. Площадь отделенного по касательной пика вычитается из площади основного пика. |
| Split Peak | указывает точку, где разделение пика происходит по линии проекции. |
| Delete Peak(s) | удаляет один или несколько пиков из результатов интегрирования. |

Коды разделения пиков для пиков, проинтегрированных вручную

Проинтегрированные вручную пики обозначены в отчете интегрирования кодом пика **ММ**.

Если перед пиком, проинтегрированным вручную, имеется пик, и конечная точка этого пика изменилась из-за интегрирования вручную,

то ему присваивается код F (принудительно). Когда обнаружены точки минимума между пиками, им устанавливается код V .

Пик растворителя на основном пике, на который повлияли интегрированием вручную, например выборкой по касательной, обозначается R (пересчитанный пик растворителя).

Сохранение параметров интегрирования вручную

Параметры интегрирования вручную (например, проведение базовой линии вручную) являются в большей степени файловыми данными и особенностями сигнала, чем параметрами интегрирования по времени. В случае сложных хроматограмм крайне желательно иметь возможность использовать эти события для повторной обработки. Поэтому события интегрирования вручную могут храниться непосредственно в файле данных, нежели в методе.

Каждый раз, когда файл данных будет пересмотрен или переобработан, события интегрирования вручную в файле данных будут применяться автоматически. Анализ, содержащий события интегрирования вручную, отмечается в **Navigation Table** в соответствующей колонке.

В дополнение к инструментам проведения базовой линии и удаления пика вручную в пользовательском интерфейсе доступны три дополнительных инструмента

- сохранение событий интегрирования вручную отображаемых на данный момент хроматограмм в файле данных,
- удаление всех параметров из отображаемых на данный момент хроматограмм,
- отмена последних событий интегрирования вручную (доступно до того, как параметры будут сохранены).

При переходе к следующему файлу данных в ходе проверки в **Navigation Table**, ChemStation будет проверять несохраненные события интегрирования вручную и спросит пользователя, нужно ли сохранять события.

События интегрирования вручную, записанные в файл данных, в ходе проверки в **Navigation Table** не искажают события интегрирования вручную, записанные в режиме **Batch**. Эти два способа просмотра

полностью независимы по отношению к событиям интегрирования вручную файла данных.

В версиях ChemStation до B.04.01, события интегрирования вручную записывались в метод вместо отдельного файла данных. В версии B.04.01 этот рабочий процесс по-прежнему доступен. Меню **Integration** во вкладке **Data Analysis** предоставляет следующие пункты для того, чтобы регулировать события интегрирования вручную в методе:

- **Update Manual Events of Method:** Сохранение заново отобранных событий интегрирования вручную в метод.
- **Apply Manual Events from Method:** Применение текущих событий интегрирования вручную, на текущий момент сохраненные в методе, для загруженного в настоящее время файла данных.
- **Remove Manual Events from Method:** Удаляет события интегрирования вручную из метода.

Для того, чтобы преобразовать события интегрирования вручную, записанные в метод для сохранения в файл данных, примените события из метода и сохраните результаты в файл данных. При желании удалите события из метода.

В случае, если флажок в вкладке **Manual Events** в **Integration Events Table** метода включен, то события интегрирования вручную метода всегда применяются при загрузке файла данных, используя этот метод. Если файл данных содержит дополнительные события интегрирования вручную, то они применяются после событий установленных в методе. Когда флажок в вкладке **Manual Events** включен, пользователя никогда не попросят сохранить события в файле данных.

Для того, чтобы преобразовать события интегрирования вручную, записанные в метод для сохранения в файл данных, примените события из метода и сохраните результаты в файл данных. Теперь можно удалить события из метода.

В случае, если флажок в вкладке **Manual Events** в **Integration Events Table** метода включен, то события интегрирования вручную метода всегда применяются при загрузке файла данных, используя этот метод. Если файл данных содержит дополнительные события интегрирования вручную, то они применяются после событий установленных в методе. Когда флажок в вкладке **Manual Events** включен, пользователя никогда не попросят сохранить события в файле данных.



3 Идентификация пиков

Что представляет собой идентификация пика?	64
Правила сопоставления пика	65
Типы идентификации пика	66
Абсолютное время удерживания/миграции	66
Относительное время удерживания	66
Скорректированное время удерживания/миграции	66
Квалификаторы пика	67
Количественные ограничения	67
Абсолютное время удерживания/миграции	68
Скорректированные времена удерживания/миграции	70
Одиночные контрольные пики	70
Множественные контрольные пики	71
Квалификаторы пика	72
Соотнесение сигнала	73
Уточняющая верификация	73
Расчет уточняющего коэффициента	74
Процесс идентификации	75
Обнаружение контрольных пиков	75
Обнаружение пиков внутреннего стандарта	75
Поиск оставшихся калибровочных пиков	76
Классификация неопознанных пиков	76

В этом разделе описываются понятия идентификации пика.



Что представляет собой идентификация пика?

Идентификация пика устанавливает компоненты в неизвестной пробе на основе характеристик хроматограмм/электрофореграмм, определенных в ходе анализа хорошо известного калибровочного образца.

Распознавание этих компонентов является необходимым шагом определения количества, если аналитический метод требует количественного анализа. Характеристики сигнала каждого интересующего компонента записываются в таблицу калибровки метода.

Функция процесса распознавания пика заключается в сравнении каждого пика в сигнале с пиками, записанными в таблицу калибровки.

Таблица калибровки содержит ожидаемые времена удерживания/миграции интересующих компонентов. Пик, который соответствует времени удерживания/миграции пика в таблице калибровки, приписываются характеристики того компонента, например, название и коэффициент отклика. Пики, которые не соответствуют ни одному из пиков в таблице калибровки, классифицируются как неизвестные. Этот процесс контролируется посредством:

- времени удерживания/миграции в таблице калибровки для пиков, обозначенных как контрольные временные пики,
- интервалами времени удерживания/миграции, предназначенным для контрольных пиков,
- временами удерживания/миграции в таблице калибровки для калибровочных пиков, которые не являются контрольными временными пиками,
- интервалом времени удерживания/миграции предназначенным для этих пиков, которые не являются контрольными, и
- наличием каких-либо дополнительных уточняющих пиков в точными соотношениями.

Правила сопоставления пика

Следующие правила применяются в процессе сопоставления пика:

- если пик образца соответствует интервалу сопоставления пика вещества из таблицы калибровки, то пику приписываются характеристики этого вещества,
- если более чем один пик образца соответствует интервалу сопоставления пика, то тогда пик, наиболее близкий к ожидаемому времени удерживания/миграции, определяется как это вещество,
- если пик является контрольным временным пиком или внутренним стандартом, то самый большой пик в интервале определяется как вещество,
- если также используются квалификаторы пика, тогда соотношение пика используется в комбинации с пиком соответствующим интервалу для идентификации пика вещества,
- если пик является уточняющим пиком, то измеренный пик наиболее близкий к основному пику соединения определяется, и
- если пик образца не попадает ни в какой интервал сопоставления пика, то он указывается как неизвестный компонент.

Типы идентификации пика

Есть различные методы, которые могут использоваться для сопоставления пиков образца с пиками из таблицы калибровки программного обеспечения ChemStation.

Абсолютное время удерживания/миграции

Время удерживания/миграции пика образца сравнивается с ожидаемым временем удерживания/миграции, указанным для каждого вещества в таблице калибровки.

Относительное время удерживания

Система рассчитывает относительное время удерживания (согласно требованиям Европейской Фармакопеи и Фармакопеи США) как ($Rt = t_2/t_1$), как для калиброванных пиков, так и для некалиброванных пиков.

Скорректированное время удерживания/миграции

Ожидаемое время удерживания/миграции пиков вещества корректируется с использованием фактического времени удерживания/миграции одного или нескольких контрольных пиков, и процесс сопоставления осуществляется с помощью этих скорректированных (относительных) времен удерживания/миграции. Эталонный пик или пики должны быть указаны в таблице калибровки.

Квалификаторы пика

В дополнение к идентификации пиков по времени удерживания/миграции можно использовать квалификаторы пиков, чтобы обеспечить более точный результат. Если более чем один пик попадает в интервал времени удерживания/миграции, тогда квалификаторы должны быть использованы для идентификации правильного соединения.

Количественные ограничения

Ограничения по количествам, указанные в диалоговом окне "Сведения о соединении" используются для уточнения распознавания пика. Если количество выявленного соединения попадает в количественные ограничения, распознавание пика указывается в отчете.

Абсолютное время удерживания/миграции

Интервал времени удерживания/миграции используется в процессе сопоставления пика. Интервал времени удерживания/миграции это интервал, который центрирован на времени удерживания/миграции для ожидаемого пика. Любой пик образца, который находится в пределах этого интервала, может рассматриваться в качестве кандидата для идентификации вещества.

Рис. 24 на странице 68 показывает интервал времени удерживания/миграции для пика 2, который находится между 1,809 и 2,631 мин., где ожидаемое время удерживания/миграции составляет 2,22 мин. Есть две варианта для пика 2. Время первого – 1,85 мин, второго – 2,33 мин. Если ожидаемый пик не является эталонным пиком, то будет выбран пик с ожидаемым временем удерживания/миграции наиболее близким к 2,22 мин.

Если ожидаемый пик является контрольным временным пиком или внутренним стандартом, то будет выбран самый большой пик в интервале.

В обоих случаях ChemStation выберет пик на 2,33 мин. Если два пика были одинакового размера, то будет выбран пик, наиболее близкий к центру интервала.

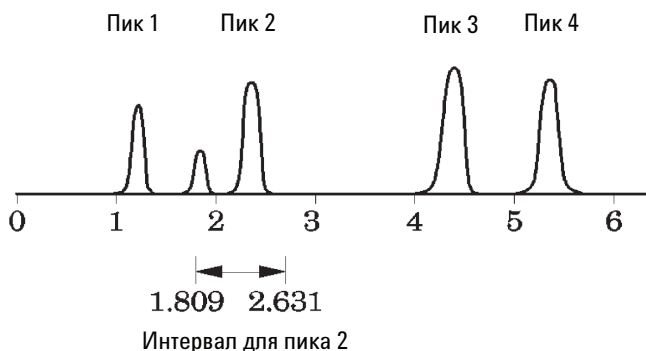


Рисунок 24 Интервалы времени удерживания/миграции

При попытке определения пиков используются три типа интервалов .

- интервал эталонного пика, который применяется только к контрольным пикам,
- интервал неэталонного пика, который применяется ко всем другим калиброванным пикам, и
- специфичные значения интервала для индивидуальных компонентов, которые устанавливаются в диалоговом окне **Compound Details**.

Значения по умолчанию для этих интервалов вводятся в диалоговом окне Настройки калибровки. Ширина по обе стороны от времени удерживания/миграции, которая определяет интервал сопоставления пика, является суммой абсолютного и процентного интервалов.

Интервал 5 % означает, что пик должен иметь время удерживания/миграции в диапазоне 2,5 % в обе стороны от времени удерживания/миграции калиброванного пика. Например, пик с временем удерживания/миграции 2,00 мин при калибровочном анализе должен оказаться в интервале между 1,95 и 2,05 мин при последующих анализах.

Например, абсолютный интервал 0,20 мин и относительный интервал в 10 % дают интервал времени удерживания/миграции между 1,80 и 2,20 мин.

$1,80 \text{ мин} = 2,00 \text{ мин} - 0,10 \text{ мин} (0,20 \text{ мин} / 2) - 0,10 \text{ мин} (10 \% \text{ от } 2,00 \text{ мин}).$

$2,20 \text{ мин} = 2,00 \text{ мин} + 0,10 \text{ мин} (0,20 \text{ мин} / 2) + 0,10 \text{ мин} (10 \% \text{ от } 2,00 \text{ мин}).$

Скорректированные времена удерживания/миграции

Сопоставление пиков по абсолютным временам удерживания/миграции может оказаться проще, но это не всегда надежно. Индивидуальные времена удерживания/миграции могут незначительно отличаться из-за небольших изменений условий или метода. В результате пики могут не попасть в интервал сопоставления пика и, следовательно, не быть идентифицированы.

Методикой борьбы с неизбежными колебаниями, которые происходят в абсолютных временах удерживания/миграции является указание времен удерживания/миграции вещества относительно одного или нескольких контрольных пиков.

Контрольные пики определяются в таблице калибровки при записи в столбце эталон для этого пика. Способ относительного сопоставления пика использует эталонный пик или пики, чтобы корректировать положение интервалов сопоставления пика, в целях компенсации сдвигов во времени удерживания/миграции пиков образца.

Если нет эталонных пиков, указанных в методе, или ChemStation не может установить, по крайней мере, один контрольный пик во время анализа, то программное обеспечение для идентификации будет использовать абсолютные времена удерживания/миграции.

Одиночные контрольные пики

Интервал времени удерживания/миграции для эталонного пика создается вокруг его времени удерживания/миграции. Самый большой пик, попадающий в этот интервал, идентифицируется как эталонный пик. Ожидаемые времена удерживания/миграции всех других пиков в таблице калибровки корректируются пропорционально отношению ожидаемого времени удерживания/миграции к фактическому времени удерживания/миграции эталонного пика.

Множественные контрольные пики

Скорректированные времена удерживания/миграции с одиночным эталонным пиком основываются на предположении, что отклонение фактического времени удерживания/миграции от ожидаемых времен удерживания/миграции изменяется равномерно и линейно на протяжении анализа. Часто в течение длительного анализа время удерживания/миграции изменяется неравномерно. В таких случаях лучшие результаты можно получить, используя множественные контрольные пики, расположенные с определенными интервалами в течение анализа. Это разделяет сигнал на отдельные зоны. Предполагается, что отклонения между временами удерживания/миграции в каждой зоне изменяются линейно, но скорость изменения определяется отдельно для каждой зоны.

Примечание

Алгоритм коррекции времени может не сработать, если времена удерживания нескольких контрольных пиков расположены слишком близко друг к другу и не распределены вдоль общего времени анализа.

Квалификаторы пика

Вещество может быть обнаружено более чем одним сигналом. Несмотря на то что, использование нескольких детекторов или многоканальных детекторов применимо во всех видах хроматографии, многоканальная регистрация в большинстве случаев используется в жидкостной хроматографии с многоволновыми детекторами или детекторами с диодной матрицей. Такие детекторы, как правило, настроены так, что длина волны, самая близкая к наибольшему поглощению (площади), используется для определения основного пика в таблице калибровки. В Рис. 25 на странице 72 это λ_1 .

Две другие длины волн, которые были обнаружены в качестве сигналов, могут быть использованы в качестве подтверждающих пиков. На рисунке это λ_2 и λ_3 .

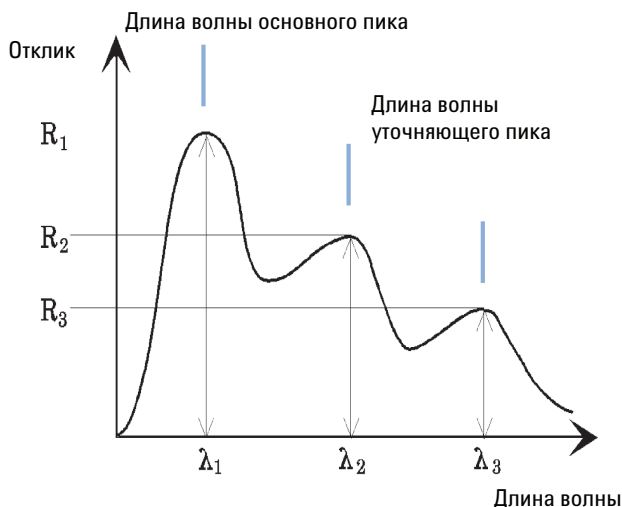


Рисунок 25 Квалификаторы пика

Пики соединения имеют постоянное отношение откликов на разных длинах волн.

Отклик уточняющего пика составляет определенный процент от отклика основного пика. Ограничения, которые определяют допустимый диапазон для ожидаемого отклика, могут быть установлены в таблице калибровки, когда выбран режим Элементы идентификации. Если отношение между основным уточняющим пиком λ_1 и уточняющим пиком, например, λ_3 находится в допустимых пределах, то подлинность соединения может быть подтверждена.

Соотнесение сигнала

Соотнесение сигнала означает, что два пика, проанализированные в различных сигналах детектора в течение определенного интервала времени, присвоены одному и тому же соединению. Интервал соотнесения сигнала может контролироваться параметром **SignalCorrWin** в таблице **QuantParm** регистра **_DaMethod**. Соотнесение сигнала отключено при установке интервала соотнесения сигнала на 0,0 минут (см. *Руководство по пользованию макрокомандами* для более подробной информации). Когда соотнесение сигнала выключено, пики, вымываемые при том же самом времени удерживания/миграции в различных сигналах детекторов, обрабатываются как разные соединения.

Интервал соотнесения сигнала по умолчанию для данных ВЭЖХ, КЭ, КЭ/МС и ВЭЖХ/МС является 0,03 минуты и 0,0 минут для данных ГХ.

Уточняющая верификация

Если соотнесение сигнала включено, уточняющая верификация активна для всех типов файла данных по умолчанию. Она может быть отключена установкой флажка **UseQualifiers** в таблице **Quantification Parameters** метода. Уточняющая верификация при выключенном соотнесении сигнала также отключается.

Расчет уточняющего коэффициента

Когда уточняющая верификация включена для соединения, отношение размеров уточняющего к основному пику сопоставляются с калибруемыми ограничениями. В качестве размера может выступать высота или площадь в соответствии с настройкой основы для расчетов в Установках отчета.

Уточняющие пики могут быть откалиброваны таким же образом, как и целевые соединения. Пользователю не нужно указывать ожидаемый уточняющий коэффициент. Ожидаемый уточняющий коэффициент рассчитывается автоматически:

оба отклика измеряются во время удерживания соединения.

Параметр "QualTolerance" (Уточняющий допуск) определяет допустимый диапазон уточняющего коэффициента, например $\pm 20\%$.

Допуск может быть установлен в таблице калибровки пользовательского интерфейса (Элементы идентификации) и указывается в абсолютных процентах.

Для многоуровневых калибровок ChemStation вычисляет минимальный уточняющий допуск на основе измеренных уточняющих коэффициентов для каждого уровня калибровки. Минимальный уточняющий допуск рассчитывается по следующему уравнению:

$$\text{minimum qualifier tolerance} = \frac{\sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})}{\bar{q} \times i} \times 100$$

где q_i – измеренный уточняющий коэффициент для уровня i .

Процесс идентификации

При попытке распознать пики программное обеспечение просматривает данные интегрирования в три этапа.

Обнаружение контрольных пиков

На первом этапе определяются контрольные временные пики. Программное обеспечение ищет времена удерживания/миграции пика из анализа для сопоставления с интервалами удерживания/миграции контрольных пиков в таблице калибровки. Пик из анализа определяется как эталонный пик в таблице калибровки, если время удерживания/миграции для этого пика попадает в интервал, созданный для пика таблицы калибровки.

Если обнаружилось, что в интервал попадает несколько пиков, то пик с самой большой площадью или высотой, с последующим положительным сопоставлением уточняющего сигнала (если такая проверка установлена), выбирается в качестве эталонного пика.

После каждого обнаружения эталонного пика, различия между его временем удерживания/миграции и временем приведенным в таблице калибровки, используются для корректировки ожидаемых времен удерживания/миграции всех других пиков в Таблице калибровки.

Обнаружение пиков внутреннего стандарта

На втором этапе определяются любые заданные пики внутреннего стандарта. Если они еще не были определены как пики внутреннего стандарта, то могут быть идентифицированы как контрольные временные пики. Пики внутреннего стандарта идентифицируются по интервалам времени удерживания/миграции пика и по подтверждающим пикам. Если более чем один пик находится в том же интервале пиков внутреннего стандарта, то выбирается самый большой пик.

Поиск оставшихся калибровочных пиков

На третьем этапе определяются все остальные пики, перечисленные в таблице калибровки. Неконтрольные пики в таблице калибровки сопоставляются с оставшимися пиками анализа, используя их интервал времени удерживания.

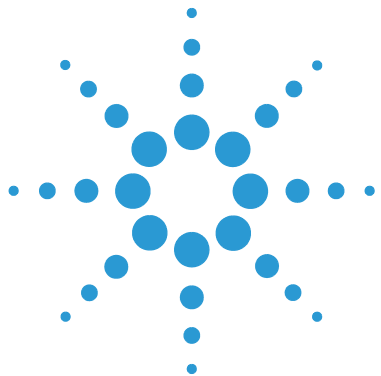
Каждый неконтрольный калибровочный пик имеет собственное время удерживания/миграции в таблице калибровки. Это время является скорректированным для отдельно взятого анализа на основе предварительного времени контрольных пиков. Интервал времени удерживания/миграции калибровочного пика корректируется на основании исправленного времени удерживания/миграции калибровочного пика.

Если более чем один пик обнаружится в том же интервале, то будет выбран пик с временем удерживания/миграции наиболее близкий к ожидаемому времени удерживания/миграции, а также удовлетворяющий выбранным дополнительным уточняющим требованиям.

Классификация неопознанных пиков

Если есть оставшиеся пики, которые до сих пор не определены, они классифицируются как неизвестные. ChemStation пытается сгруппировать неизвестные пики, которые принадлежат к тем же самым соединениям. Если пик был обнаружен в более чем одном сигнале, то пики с тем же временем удерживания/миграции в каждом сигнале группируются, как соответствующие одному соединению.

Неизвестный пики включаются в отчет, если соответствующий выбор был сделан в диалоговом окне "Настройки калибровки".



4 Калибровка

Калибровочная кривая	78
Групповая калибровка	80
Параметры повторной калибровки	81

В этом разделе описываются принципы калибровки в программном обеспечении ChemStation.



Калибровочная кривая

Калибровочная кривая является графическим представлением данных о количестве и отклике для одного соединения, полученных от одного или нескольких калибровочных образцов.

Обычно вводится аликвота калибровочного образца, поступает сигнал, и отклик определяется из расчета площади или высоты пика, как показано на Рис. 26 на странице 78.

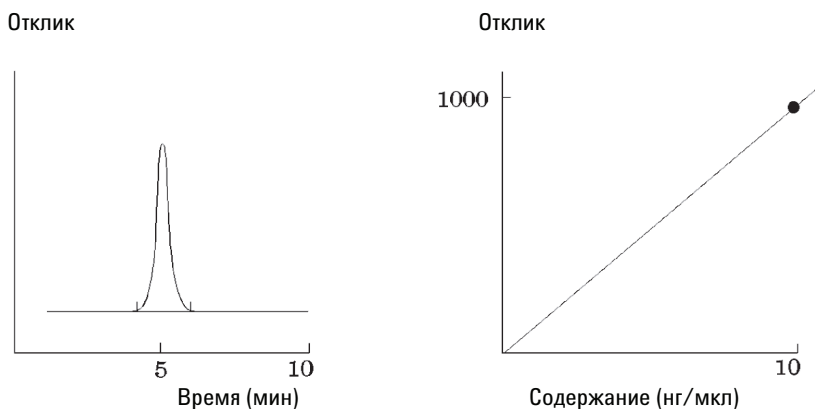


Рисунок 26 Сигнал калибровочного образца (10 нг/мкл) и калибровочная кривая

Коэффициент корреляции отображается с изображением графика калибровочной кривой. Коэффициент корреляции равен квадратному корню из коэффициента регрессии и дает величину подгонки калибровочной кривой между точками данных. Значение коэффициента дается до трех знаков после запятой в диапазоне:

от 0,000 до 1,000

где:

0,000 = подгонки нет

1,000 = идеальная подгонка

Для каждого уровня калибровки показывается *Относительный остаток*. Он рассчитывается по следующей формуле:

$$relRES = \frac{Response_{calibrated} - Response_{calculated}}{Response_{calculated}} \cdot 100$$

где:

relRES = относительный остаток в процентах

Подсчитанный отклик представляет собой точку на калибровочной кривой.

Стандартное отклонение остатка, который печатается в некоторых отчетах и, при выборе Print (печать) таблицы калибровки и кривых, рассчитывается по следующей формуле:

$$ResSTD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Resp_{calibratedi} - Resp_{calculatedi})^2}{n - 2}}$$

где:

ResSTD = стандартное отклонение остатка

Resp_{calibratedi} = калибровочный отклик для точки i

Resp_{calculatedi} = подсчитанный отклик для точки i

n = число калибровочных точек

Групповая калибровка

Групповая калибровка может быть применена для соединений, в которых отдельные концентрации не известны, но сумма концентраций для группы соединений известна. Примером являются изомеры. Калибруется вся группа соединений. Используются следующие формулы:

Калибровка

$$Conc_{AB} = RF_A \cdot Response_A + RF_B \cdot Response_B$$

где:

$Conc_{AB}$ – это концентрация группы соединений, состоящей из соединений А и В

$Response_A$ – это площадь (или высота) соединения А

RF_A – это коэффициент отклика

Для соединений, входящих в группу соединений, предполагается равенство коэффициентов отклика:

$$RF_A = RF_B$$

Таким образом, концентрация соединения, входящего в группу соединений, рассчитывается следующим образом:

$$Conc_A = \frac{Conc_{AB} \cdot Resp_A}{Resp_A + Resp_B}$$

Параметры повторной калибровки

Имеются несколько способов обновления откликов в таблице калибровки с новыми данными калибровки.

Average

Усреднение для всех калибровочных разгонок рассчитывается по следующей формуле

$$Response = \frac{n \cdot Response + MeasResponse}{n + 1}$$

Floating Average

Подсчитывается взвешенное среднее для всех калибровочных разгонок. Обновленное значение записывается в диалоговое окно **Recalibration Settings**.

$$Response = \left(1 - \frac{Weight}{100}\right) \cdot Response + \left(\frac{Weight}{100}\right) \cdot MeasResponse$$

Replace

Новые значения отклика заменяют старые значения.

4 Калибровка

Параметры повторной калибровки



5 Количественный анализ

Что представляет собой количественный анализ?	84
Расчеты количественного анализа	85
Поправочные коэффициенты	86
Абсолютный коэффициент отклика	86
Множитель	86
Коэффициент разбавления	87
Количество образца	87
Способы подсчета без калибровки	88
Подсчет по проценту площади и высоты	88
Способы подсчета с калибровкой	89
Подсчет по методу внешнего стандарта	90
Процентный подсчет с использованием нормативного состава	93
Подсчет по методу внутреннего стандарта	95
Первый анализ: Калибровка	96
Второй анализ: Неизвестная проба	97
Подсчет по методу внутреннего стандарта калиброванных пиков	97
Подсчет по методу внутреннего стандарта некалиброванных пиков	98

В этом разделе описывается, как ChemStation производит количественный анализ. Приводится подробная информация о подсчете процентной площади и процентной высоты, подсчете нормализационного процента, расчете по методу внешнего стандарта (ESTD), расчете по методу внутреннего стандарта (ISTD) и количественном подсчете неопознанных пиков.



Что представляет собой количественный анализ?

После того, как пики были проинтегрированы и определены, следующим шагом в анализе является количественный анализ. Количественный анализ использует площадь пика или высоты для определения концентрации соединения в образце.

Количественный анализ включает много этапов, которые могут быть кратко сформулированы следующим образом:

- Распознавание анализируемого соединения.
- Создание метода для анализа образцов, содержащих это соединение.
- Анализ одного или нескольких образцов с известной концентрацией соединения для определения отклика соответствующего этой концентрации.

Имеется также возможность анализа ряда таких образцов с различными концентрациями интересующих соединений, если детектор имеет нелинейный отклик. Этот процесс называется *многоуровневой калибровкой*.

- Анализ образца с неизвестной концентрацией соединения для получения отклика соответствующего этой концентрации.
- Сравнение отклика неизвестной концентрации с откликом известной концентрации для определения фактического количества соединения.

Для получения корректного сравнения откликов неизвестной пробы к известному образцу, сопоставляемые данные должны быть получены и обработаны в одинаковых условиях.

Расчеты количественного анализа

ChemStation предлагает следующие процедуры расчета для определения концентрации каждого компонента, присутствующего в смеси:

- Процентный
- Нормализация
- С использованием внешнего стандарта (ESTD)
- Процентный, с использованием внешнего стандарта (ESTD%)
- С использованием внутреннего стандарта (ISTD)
- Процентный, с использованием внутреннего стандарта (ISTD%)

Расчеты, используемые для определения концентрации соединения в неизвестной пробе, зависят от типа количественного анализа. Каждая методика расчета использует площадь пика или высоту для расчета, но формирует различные типы отчетов.

Поправочные коэффициенты

При расчетах количественного анализа используются четыре поправочных коэффициента: *абсолютный коэффициент отклика*, *коэффициент умножения*, *коэффициент разбавления* и *количество образца*. Эти коэффициенты используются в процессе калибровки для компенсирования изменений в отклике детектора на различные компоненты образца, концентрации, разбавления образца, количества образца и для преобразования единиц.

Абсолютный коэффициент отклика

Абсолютный коэффициент отклика для компонента образца представляет собой количество компонента, деленное на измеренную площадь или высоту пика компонента, при анализе калибровочной смеси. Абсолютный коэффициент отклика, который используется каждой калибровочной методикой расчета, корректирует отклик детектора к отдельным компонентам образца.

Множитель

Множитель используется в каждой расчетной формуле для умножения результата для каждого компонента. Множитель может быть использован для преобразования единиц в количественных выражениях .

Коэффициент разбавления

Коэффициент разбавления является числом, на которое все рассчитанные результаты умножаются до распечатки отчета. Можно использовать коэффициент разбавления для изменения шкалы представления результатов или скорректировать изменения в составе образца в ходе предварительного анализа работы. Можно также использовать коэффициент разбавления для любых других целей, требующих использования постоянного коэффициента.

Количество образца

Если выбран процентный подсчет с использованием внешнего стандарта (ESTD%) или процентный подсчет с использованием внутреннего стандарта (ISTD%), то отчеты ESTD и ISTD дают относительные величины, а не абсолютные значения, то есть количество каждого компонента выражается в процентах от количества образца. Количество образца используется в отчетах ESTD% и ISTD% для преобразования абсолютного количества проанализированных компонентов в относительные значения путем деления на указанное значение.

Способы подсчета без калибровки

Способы подсчета без калибровки не требуют таблицы калибровки.

Подсчет по проценту площади и высоты

Способ расчета по **Area%** сообщает площадь каждого пика в анализе, как процент от общей площади всех пиков анализа. **Area%** не требует предварительной калибровки и не зависит от введенного количества образца в диапазоне детектора. При этом не используются коэффициенты отклика. Если все компоненты дают одинаковый отклик в детекторе, тогда подсчет по **Area%** обеспечивает пригодную оценку относительных количеств компонентов.

Подсчет по **Area%** используется регулярно там, где качественные результаты представляют интерес, и чтобы получить информацию для создания таблицы калибровки, которая требуется для других калибровочных процедур.

Способ расчета по **Height%** сообщает высоту каждого пика в анализе, как процент от общей высоты всех пиков в анализе.

Множитель и коэффициент разбавления из **Calibration Settings** диалогового окна **Sample Information** или из **Sequence Table** не применяются в расчетах по проценту площади или высоты.

Способы подсчета с калибровкой

Для способов расчета по методу внешнего стандарта (ESTD), нормализации и по методу внутреннего стандарта (ISTD) требуются коэффициенты отклика и, поэтому, используют таблицу калибровки. Таблица калибровки предусматривает преобразование откликов в выбранные единицы в соответствии с намеченной процедурой.

Подсчет по методу внешнего стандарта

Метод внешнего стандарта ESTD является основным методом количественного анализа, при котором как калибровочные, так и исследуемые образцы анализируются при одинаковых условиях. Для подсчета количества в неизвестной пробе сравниваются результаты, полученные для исследуемого и калибровочного образцов.

В отличие от метода внутреннего стандарта, метод внешнего стандарта использует абсолютные коэффициенты отклика. Коэффициенты отклика определяются из калибровки и затем записываются. В последующих разгонках образцов количества веществ подсчитываются уже путем применения этих коэффициентов отклика для проанализированных количеств образцов. Убедитесь, что размер вводимой пробы воспроизводится от анализа к анализу, так как в образце нет стандарта, с помощью которого можно было скорректировать изменения введенной пробы или пробоподготовку.

При подготовке отчета ESTD расчет количества отдельного соединения в неизвестной пробе происходит в два этапа:

- 1** По калибровочным точкам данного соединения рассчитывается уравнение для калибровочного графика, при этом используется тип подгонки указанный в диалоговом окне "Настройки калибровки" или "Калибровочная кривая".
- 2** Количество вещества в неизвестном соединении рассчитывается по уравнению описанному ниже. Это количество может появиться в отчете, или, до включения в отчет, может быть использовано в дополнительных требующихся расчетах при помощи коэффициента умножения, коэффициента разбавления или количества образца.

Если был выбран отчет ESTD, то применяется уравнение для вычисления абсолютного количества компонента x :

$$\text{Absolute Amt of } x = \text{Response}_x \cdot RF_x \cdot M \cdot D$$

где:

Response_x — отклик пика x ;

RF_x — коэффициент отклика для вещества x , рассчитывается как:

$$RF_x = \frac{\text{Amount}_x}{\text{Response}_x}$$

M — коэффициент умножения.

D — коэффициент разбавления.

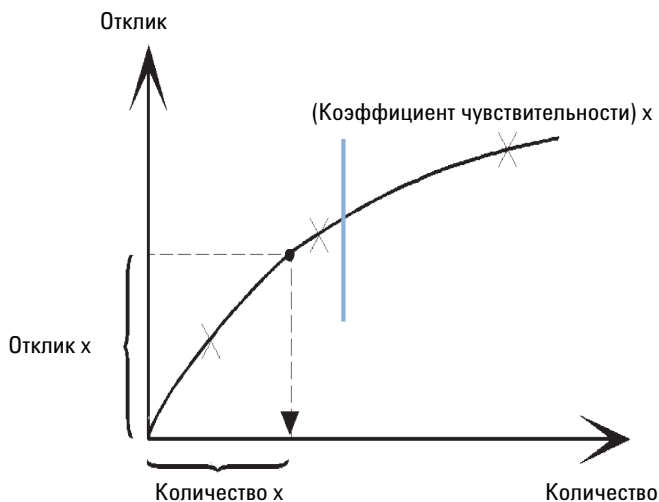


Рисунок 27 Коэффициент отклика

Множитель и коэффициент разбавления считываются из диалогового окна **Calibration Settings** или **Sample Information**.

Если выбран отчет по процентному подсчету с использованием внешнего стандарта, и количество пробы не равно нулю, относительное количество (в %) вещества x рассчитывается, как показано ниже:

$$\text{Relative Amt of } x = \frac{\{\text{Absolute Amt of } x\} \cdot 100}{\text{Sample Amount}}$$

где:

Absolute amount of x рассчитывается как и в расчете по методу внешнего стандарта;

Sample amount берется из ячейки "Информация о пробе" или из диалогового окна "Настройки калибровки" для одиночных анализов. Если количество образца равно нулю, расчет ведется по методу внешнего стандарта.

Процентный подсчет с использованием нормативного состава

В методе нормализации коэффициенты отклика применяются к площади пиков (или высот), чтобы компенсировать изменения, которые происходят в чувствительности детектора для различных компонентов образца.

Отчет по процентному подсчету с использованием нормативного состава рассчитывается таким же образом, как и отчет ESTD, за исключением того, что есть дополнительная стадия для расчета относительных, а не абсолютных количеств соединений.

Отчет по процентному подсчету с использованием нормативного состава имеет те же недостатки, что и отчеты по проценту площади и высоты. Любые изменения, которые влияют на общую площадь пика, будут влиять на подсчет концентрации каждого пика. Отчет нормализации следует использовать только в том случае, если все интересующие компоненты вымываются и интегрируются. Исключение выбранных пиков из отчета нормализации изменит представленные результаты в образце.

Уравнение используемое для подсчета **Norm%** вещества **x**:

$$\text{Norm\% of } x = \frac{\text{Response}_x \cdot RF_x \cdot 100 \cdot M \cdot D}{\sum \{\text{Response} \cdot RF\}}$$

где:

Response_x	является площадью (или высотой) пика x ,
RF_x	является коэффициентом отклика,
$\sum(\text{Response} \cdot RF)$	является суммой всех результатов $(\text{Response} \cdot RF)$ для всех пиков, включая пик x ,
M	является коэффициентом умножения.
D	является коэффициентом разбавления.

Множитель и коэффициент разбавления считываются либо из **Quantitation Settings** доступных в диалоговом окне **Specify Report**, либо из Таблицы последовательности.

Подсчет по методу внутреннего стандарта

Метод внутреннего стандарта устраняет недостатки метода внешнего стандарта путем добавления известного количества вещества, которое служит в качестве нормализующего фактора. Это вещество, *внутренний стандарт*, добавляется как в калибровочные так и в исследуемые образцы.

Программное обеспечение пользуется записанными в методе соответствующими коэффициентами отклика, полученными от предыдущей калибровки. Используя концентрацию внутреннего стандарта и площадь пика (или высоту) из анализа, программное обеспечение вычисляет концентрации веществ.

Соединение, используемое в качестве внутреннего стандарта, должно быть похоже на калибруемое соединение, как химически, так и по времени удерживания/миграции, но должно быть хроматографически различимо.

Таблица 8 Метод внутреннего стандарта

Достоинства	Недостатки
Изменение объема пробы не критично.	Внутренний стандарт должен добавляться к каждому образцу.
Дрейф показаний прибора компенсируется внутренним стандартом.	
Влияние способов подготовки образца сведено к минимуму, если химические свойства внутреннего стандарта и исследуемого вещества схожи.	

Если метод внутреннего стандарта используется для калибровок с нелинейными характеристиками, следует остерегаться того, чтобы ошибки, которые вытекают из метода подсчета, не привели к систематическим ошибкам. В случае нелинейного калибровочного графика соединения при многоуровневой калибровке, количество вещества внутреннего стандарта должно оставаться постоянным, т.е. тем же самым для всех уровней.

При анализах внутреннего стандарта количество интересующего вещества соотносится с количеством вещества внутреннего стандартного компонента путем отношения откликов двух пиков.

При подсчете по методу внутреннего стандарта по двум анализам, подсчет скорректированного отношения количеств отдельного соединения в неизвестной пробе происходит по следующим этапам:

Первый анализ: Калибровка

- 1 Калибровочные точки строятся путем расчета отношения количеств и отношения откликов для каждого уровня отдельного пика в таблице калибровки.

Отношение количеств - это количество соединения, деленное на количество внутреннего стандарта на этом уровне.

Отношение откликов — это площадь соединения, деленная на площадь или высоту внутреннего стандарта на этом уровне.

- 2 Уравнение кривой, проходящей через калибровочные точки рассчитывается, используя тип подгонки кривой, указанной в диалоговом окне "Настройки калибровки" или "Калибровочная кривая".

$$RF_x = \frac{\text{Amount Ratio}}{\text{Response Ratio}}$$

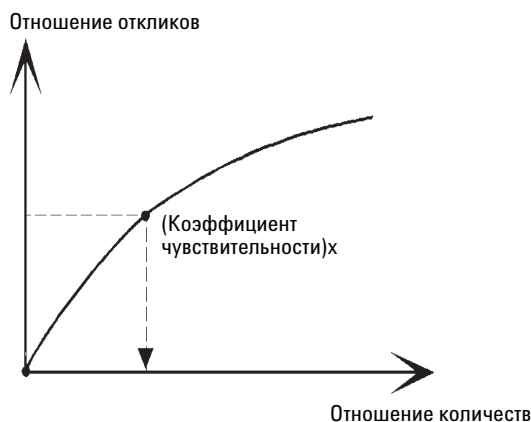


Рисунок 28 Отношение количеств

Второй анализ: Неизвестная проба

- 1 Для получения отношения откликов для неизвестной пробы, отклик соединения делится на отклик внутреннего стандарта, полученные для исследуемого образца.
- 2 Отношение количеств для исследуемого образца подсчитывается, используя уравнение для калибровочного графика, определенное во 2 шаге ранее и фактическое количество внутреннего стандарта в образце.

Подсчет по методу внутреннего стандарта калиброванных пиков

Уравнения, используемые для расчета фактического количества калиброванного вещества x при одноуровневой калибровке:

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Response}_x}{\text{Response}_{\text{ISTD}}}$$

$$\text{Actual Amount of } x = RF_x \cdot \{\text{Response Ratio}\}_x \cdot \text{Actual Amount of ISTD} \cdot M \cdot D$$

где:

RF_x — это коэффициент отклика соединения x ;

Фактическим количеством (*Actual Amt*) внутреннего стандарта является значение, указанное в диалоговом окне Настройки калибровки или Информация о пробе для внутреннего стандарта добавленного к неизвестной пробе;

M — коэффициент умножения.

D — коэффициент разбавления.

Если был выбран тип отчета по процентному методу внутреннего стандарта, следующее уравнение используется для расчета относительного (%) количества вещества x :

$$\text{Relative Amt of } x = \frac{\{\text{Absolute Amt of } x\} \cdot 100}{\text{Sample Amount}}$$

Подсчет по методу внутреннего стандарта некалиброванных пиков

Есть два способа определить коэффициент отклика, который используется для расчета количества неопознанных пиков.

- 1 Используется фиксированный коэффициент отклика, установленный в ячейке **With Rsp Factor** диалогового окна **Calibration Settings**. Можно выбрать для большей точности фиксированный коэффициент отклика, указав коррекцию по методу внутреннего стандарта.

$$\text{Actual Amount of } x = RF_x \cdot \{\text{Response Ratio}\}_x \cdot \text{Actual Amount of ISTD} \cdot M \cdot D$$

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Response}_x}{\text{Response}_{\text{ISTD}}}$$

RF_x — коэффициент отклика, установленный в диалоговом окне **Calibration Settings**.

Как видно из этих формул, отличия в отклике по методу внутреннего стандарта используются для коррекции количественного анализа исследуемого вещества.

- 2 Используется калиброванный пик. Это гарантирует, что тот же коэффициент отклика используется для количественного анализа всех пиков. Коэффициент отклика выбранного соединения и некалиброванных пиков корректируется в течение всех повторных калибровок. Если коэффициент отклика калиброванного пика изменяется, то на то же самое значение изменяется коэффициент отклика неопознанных пиков. Если таблица калибровки уже составлена, можно выбрать соединение из комбинированной ячейки **Using Compound** в диалоговом окне **Calibration Settings**.

Уравнения, используемые для расчета фактического количества некалиброванного пика x , приведены выше.



6

Оценка пригодности системы

Оценка пригодности системы 101

Определение шума 104

Подсчет шума, используя шестикратное стандартное отклонение 105

Подсчет шума, используя формулу полного размаха шума 105

Подсчет шума по методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM) 107

Расчет отношения сигнал-шум 109

Дрейф и блуждание базовой линии 112

Расчет симметричности пика 113

Формулы и расчеты пригодности системы 115

Общие определения 116

Мертвый объем 116

Время удерживания инертного соединения $t(m)$ [мин] 116

Определения проверки рабочих характеристик 117

Статистические моменты 117

Статистические моменты, перекося и избыточность 118

Фактическая ширина пика W_x [мин] 119

Коэффициент емкости, коэффициент удерживания (имеет разные терминологические обозначения согласно требованиям Фармакопеи США и Американского общества по испытанию материалов) k' 120

Коэффициент размывания t (согласно требованиям Фармакопеи США) 120

Число теоретических тарелок на колонку n 121

Число теоретических тарелок на метр N [1/м] 123

Определения проверки рабочих характеристик 117



Разрешающая способность (Согласно требованиям Фармакопеи США и Американского общества по испытанию материалов) R	124
Разрешающая способность (согласно требованиям Европейской и Японской Фармакопеи) Rs	125
Разрешающая способность (классические определения ChemStation)	125
Определения параметров для воспроизводимости	127
Средняя выборка M	127
Стандартное отклонение выборки S	128
Относительное стандартное отклонение согласно требованиям Фармакопеи США RSD[%]	128
Стандартное отклонение среднего SM	128
Доверительный интервал CI	129
Регрессионный анализ	130
Коэффициент регрессии	131
Стандартное отклонение (S)	131
Доступ к сохраненным в памяти числам с двойным количеством разрядов	132

В этом разделе описываются возможности ChemStation для оценки пригодности аналитического прибора (до того как он будет использован для анализа образца), аналитического метода (до того как он будет использоваться регулярно) и проверки аналитической системы (до и в течение регулярных анализов).

Характеристики пика могут быть рассчитаны для любого проинтегрированного пика из загруженных данных, а также для новых проинтегрированных вручную пиков. Инструмент Интерактивной характеристики пика рассчитывает характеристики пика и отображает их на пользовательском интерфейсе.

Оценка пригодности системы

Оценка пригодности как аналитического прибора (до того, как он будет использован для анализа образца), так и аналитического метода (до того, как он будет использоваться регулярно) является хорошей аналитической практикой. Также полезно проводить проверку пригодности аналитических систем до, и в течение рутинных анализов. Программное обеспечение ChemStation предоставляет набор инструментов, чтобы эти три этапа проверки производились автоматически. Проверка прибора может включать проверку чувствительности детектора, воспроизводимости времен удерживания/миграции и площадей пиков. Проверка метода может включать оценку точности воспроизводимости времен удерживания/миграции, определения количеств, селективности и эксплуатационной надежности метода при ежедневных различиях в эксплуатации. Проверка системы может включать проверку воспроизводимости количеств, разрешения между двумя конкретными пиками и размытия тыла пиков.

Лаборатории, которые должны соответствовать:

- Правилам организации работ в лаборатории (GLP),
- Правилам организации работ на производстве (GMP) и действующим Правилам работы на производстве (cGMP), и
- Требованиям к автоматизации работ в лаборатории.

Таким лабораториям рекомендуется выполнять эти проверки и подробно документировать результаты. Лаборатории, которые являются частью системы контроля и обеспечения качества, например, в соответствии с сертификатом ISO9000, должны будут предоставить надлежащие эксплуатационные характеристики своих приборов.

ChemStation обобщает результаты из нескольких анализов и проводит их статистическую оценку в отчете сводной информации о последовательности.

Результаты проверок документируются в формат, который, как правило, принимается контролирующими органами и независимыми аудиторами. Статистические данные включают:

- время удерживания/миграции пика,
- площадь пика,
- количество,
- высоту пика
- ширину пика на половине высоты,
- симметричность пика,
- размывание тыла пика,
- коэффициент емкости (k_f),
- числа теоретических тарелок,
- степень разделения между пиками,
- селективность относительно предыдущего пика,
- перекося и
- избыточность.

Рассчитывается среднее значение, стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал. Для каждого из этих параметров можно установить ограничения. В случае, если значения превысят эти ограничения, в отчет попадает отметка предупреждающая об этом.

Качество аналитических данных может быть доказано используя сохраненные записи фактических условий на время проведения измерений. Регистрационный журнал ChemStation записывает состояние прибора до и после анализа. Эта информация хранится с данными и сообщается вместе с данными пробы. Графики рабочих характеристик прибора записываются в течение всех анализов как и прочие сигналы и сохраняются в файле данных. Если такие записи поддерживаются прибором, то они совмещаются с хроматограммой и могут быть запрошены по требованию, например, во время аудита.

Шум базовой линии и смещение могут быть измерены автоматически. Минимальный обнаруживаемый уровень может быть рассчитан по данным высоты пика для каждого калиброванного соединения в методе.

И, наконец, в каждый напечатанный отчет могут быть включены: конфигурация прибора, серийные номера прибора, сведения о колонке/капилляре и собственные комментарии.

Расширенные результаты измерения рабочих характеристик рассчитываются только для калиброванных соединений в методе, обеспечивающим идентификацию с помощью времен удерживания/миграции и названий веществ.

Типичное сообщение о проверке рабочих характеристик системы содержит результаты следующих показателей:

- сведения о приборах,
- сведения о колонке/капилляре,
- аналитический метод,
- информация о пробе,
- сбор и накопление информации,
- описание сигнала и определение шума базовой линии, и
- аналитический сигнал с обозначениями либо времен удерживания/миграции либо названий соединений.

Кроме того, следующая информация сообщается для каждого калиброванного соединения на хроматограмме:

- время удерживания/миграции,
- k'_f ,
- симметричность,
- ширина пика,
- число теоретических тарелок,
- разрешение,
- соотношение сигнал-шум и
- название соединения.

Определение шума

Шум может быть определен по значениям точки данных из выбранного диапазона времени сигнала. Шум обрабатывается тремя различными способами:

- как шестикратное стандартное отклонение (sd) линейной регрессии дрейфа базовой линии,
- способом полного размаха шума (бездрейфовый) и
- согласно методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM E 685-93).

Шум может быть рассчитан для нескольких зон сигнала (до семи), при этом зоны указываются как часть настройки пригодности системы в параметрах отчета.

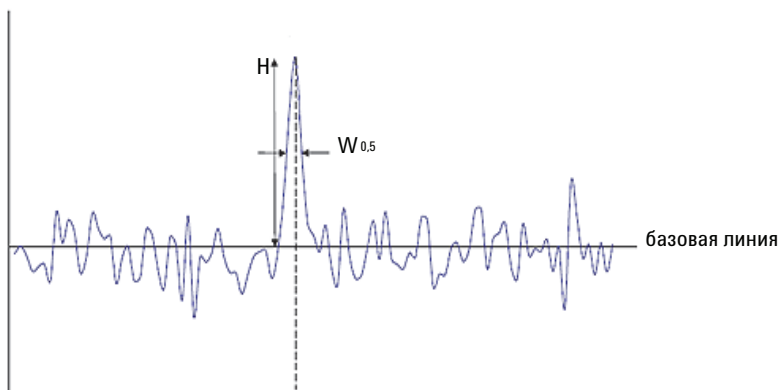


Рисунок 29 Хроматограмма с сигналом пика и шумом базовой линии

H	Высота пика от вершины до базовой линии (аппроксимирующая прямая по точкам шума)
$W_{0,5}$	Ширина пика на половине высоты

Подсчет шума, используя шестикратное стандартное отклонение

Линейная регрессия рассчитывается с использованием всех точек данных в пределах данного диапазона времени (см. “Регрессионный анализ” на странице 130). Шум определяется по формуле:

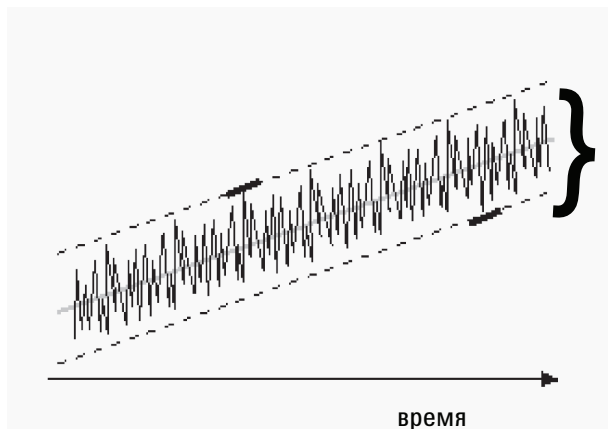
$$\text{Шум} = 6 \times \text{Std}$$

где

Шум — это уровень шума, основанный на методе шестикратного стандартного отклонения, а

Std — это стандартное отклонение линейной регрессии всех точек данных в выбранном диапазоне времени.

Подсчет шума, используя формулу полного размаха шума



шум = разница
между максимальной
и минимальной
величиной пиков

Рисунок 30 Шум полного размаха от максимальной точки пика до минимальной точки пика (расстояние)

Сначала рассчитывается дрейф путем определения линейной регрессии с использованием всех точек данных в диапазоне времени (см. “Регрессионный анализ” на странице 130). Прямая линейной регрессии вычитается из всех точек данных внутри интервала времени для получения бездрейфового скорректированного сигнала.

Затем шум полного размаха рассчитывается по формуле:

$$\text{Шум} = \text{Интенсивность}_{\max} - \text{Интенсивность}_{\min}$$

где

Шум — шум полного размаха,

Интенсивность_x — являются расчетными точками данных, найденных с помощью метода наименьших квадратов (LSQ), где

Интенсивность_{max} — это самая высокая (максимальная) интенсивность пика, а

Интенсивность_{min} — это самая низкая (минимальная) интенсивность пика в диапазоне времени.

Согласно требованиям Европейской фармакопеи, шум полного размаха рассчитывается с использованием пустого сигнала фонового шума в диапазоне до 10 значений ширины пиков (шумов базовой линии) на половине высоты ($W_{0,5}$) по обе стороны от каждого пика. Эта область может быть симметричной относительно представляющего интерес сигнала или асимметричной, если потребуется из-за матричных сигналов.

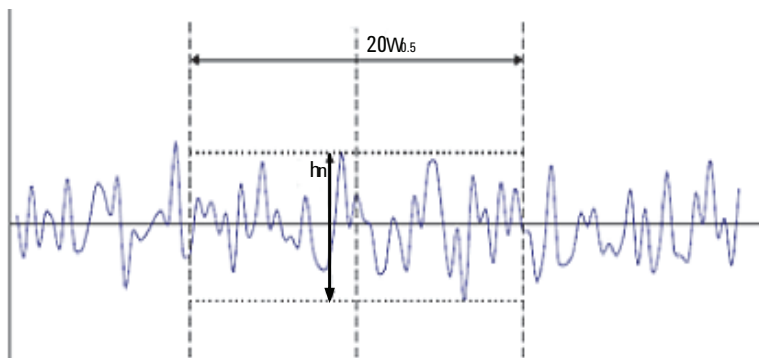


Рисунок 31 Определение шума по хроматограмме холостой пробы

Где

$20 W_{0,5}$ является областью, соответствующей 20 значениям ширины пика на половине высоты ($W_{0,5}$).

h_n является максимальной амплитудой шума базовой линии в области 20 значений ширины пика на половине высоты ($W_{0,5}$).

Подсчет шума по методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM)

Определение шума по методу (ASTM E 685-93) основано на положениях стандарта Американского общества по испытаниям и материалам, для проверки переменной длины волны фотометрических детекторов, используемых в жидкостной хроматографии. В зависимости от размера временного диапазона можно выделить три различных типа шума. Определение шума основывается на измерении шума полного размаха в пределах определенных временных диапазонов.

Продолжительность цикла, t

Долговременный шум — это максимальная амплитуда для всех случайных изменений сигнала детектора с частотой от 6 до 60 циклов в час. Долговременный шум определяется, когда выбранный диапазон времени превышает один час. Диапазон времени для каждого цикла (dt) устанавливается на 10 минут, что дает по крайней мере шесть циклов в пределах выбранного интервала времени.

Кратковременный шум — это максимальная амплитуда для всех случайных изменений сигнала детектора частотой свыше одного цикла в минуту. Кратковременный шум определяется при выбранном диапазоне времени от 10 до 60 мин. Диапазон времени для каждого цикла (dt) устанавливается на 1 минуту, что дает не менее 10 циклов в пределах выбранного интервала времени.

Мгновенный шум (не является частью метода ASTM E 685-93) — этот термин введен для описания максимальной амплитуды для всех случайных изменений сигнала детектора с частотой свыше одного цикла за 0,1 мин.

Мгновенный шум определяется при выбранном диапазоне времени от 1 до 10 минут. Диапазон времени для каждого цикла (dt) устанавливается на 0,1 мин, что дает не менее 10 циклов в пределах выбранного интервала времени.

Определение числа циклов, n

$$n = \frac{t_{tot}}{t}$$

где t — это продолжительность цикла, а t_{tot} — это общее время, в течение которого рассчитывается шум.

Подсчет полного размаха шума для каждого цикла

Сначала рассчитывается дрейф путем определения линейной регрессии с использованием всех точек данных в диапазоне времени (см. “Регрессионный анализ” на странице 130). Прямая линейной регрессии вычитается из всех точек данных внутри интервала времени для получения бездрейфового скорректированного сигнала. Затем шум полного размаха рассчитывается по формуле:

$$\text{Шум} = \text{Интенсивность}_{\max} - \text{Интенсивность}_{\min}$$

где Шум — это шум полного размаха, $\text{Интенсивность}_{\max}$ — это самая высокая (максимальная) интенсивность пика, а $\text{Интенсивность}_{\min}$ — это самая низкая (минимальная) интенсивность пика в диапазоне времени.

Подсчет шума согласно требованиям Американского общества по испытанию материалов (ASTM)

$$N_{\text{ASTM}} = \frac{\sum_{i=1}^n N}{n}$$

где N_{ASTM} — уровень шума по методу ASTM.

Определение шума по методу ASTM не производится, если выбранный диапазон времени менее одной минуты. В зависимости от диапазона, если выбранный интервал времени больше или равен одной минуте, шум определяется с помощью одного из методов ASTM, описанных ранее. То есть в расчетах используется по меньшей мере семь точек данных за цикл. При автоматизированном определении шума циклы перекрываются на 10%.

Расчет отношения сигнал-шум

ChemStation предусматривает два способа подсчета отношения сигнал-шум:

- Для подсчета шума используется "шестикратное стандартное отклонение (sd)" линейной регрессии дрейфа базовой линии.
или
- В соответствии с определением Европейской фармакопеи: рассчитывается на основании пустого сигнала фонового шума и шума, рассчитанного по временному диапазону содержащему пик (для которого и вычисляется отношение сигнал-шум).

Расчет отношения сигнал-шум без базового контрольного сигнала

Выбирается самый близкий диапазон к пику из диапазона, который указан в настройках пригодности системы. Для подсчета шума используется "шестикратное стандартное отклонение (sd)" линейной регрессии дрейфа базовой линии.

Отношение сигнал-шум подсчитывается для каждого пика в сигнале. Если ChemStation не может определить величину шума, отношение сигнала к шуму представляется в отчете как "-".

Отношение сигнал-шум рассчитывается по формуле:

$$\text{Signal-to-Noise} = \frac{\text{Height of the peak}}{\text{Noise of closest range}}$$

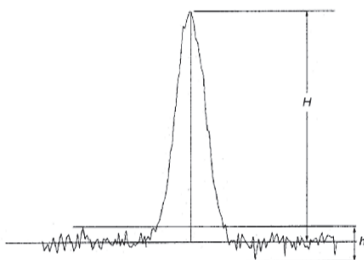


Рисунок 32 Соотношение сигнал-шум

Подсчет отношения сигнал-шум в соответствии с определением Европейской фармакопеи

Отношение сигнал-шум (Сиг/Шум) может быть рассчитано в соответствии с определением Европейской фармакопеи. Отношение Сиг/Шум рассчитывается по уравнению:

$$Sig/Шум = 2H/h$$

Где:

H — высота пика, соответствующая рассматриваемому компоненту на хроматограмме, полученная от заданного стандартного раствора,

h — абсолютное значение самого большого колебания шума от базовой линии на хроматограмме, полученной после холостого ввода, и наблюдаемое в диапазоне равном 20 значений ширины пиков (шумов базовой линии) на половине высоты на хроматограмме, полученной от заданного стандартного раствора, и расположенное равноудаленно вокруг места, где этот пик будет найден.

Используемое значение шума рассчитывается с использованием метода "полного размаха шума" (см. ["Подсчет шума, используя формулу полного размаха шума"](#) на странице 105).

Значения *Сигнал-шум* сообщаются в отчете для всех пиков, присутствующих в сигнале хроматограммы, при условии, что существует соответствующий базовый контрольный сигнал. Для конкретного сигнала хроматограммы базовый контрольный сигнал присваивается автоматически, если указана ссылка на файл данных. Если никакой базовый контрольный сигнал нельзя отнести к сигналу хроматограммы, то отношение сигнал-шум в этом сигнале не будет подсчитываться.

Определение уровня шума

Диапазон шума в базовом контрольном сигнале определяется по одному из следующих алгоритмов

- Если базовый контрольный сигнал недостаточно продолжительный:
*Время начала – Время окончания < 20*Ширина пика на половине высоты ($W_{0,5}$)*
 - *Время начала = время начала базового контрольного сигнала, и*
 - *Время окончания = время окончания базового контрольного сигнала*

- Если базовый контрольный сигнал не достаточно продолжительный, а пик расположен так, что *Время удерживания* - $10 \cdot \text{Ширина пика на половине высоты } (W_{0,5})$ меньше, чем начальная точка базового контрольного сигнала
 - *Время начала* = время начала базового контрольного сигнала, и
 - *Время окончания* = *Время начала* + $20 \cdot \text{Ширина пика на половине высоты } (W_{0,5})$
- Если базовый контрольный сигнал недостаточно продолжительный, а пик расположен так, что *Время удерживания* или *Время удерживания* + $10 \cdot \text{Ширина пика на половине высоты } (W_{0,5})$ больше, чем конечная точка базового сигнала
 - *Время окончания* = время окончания базового контрольного сигнала, и
 - *Время начала* = *Время окончания* - $20 \cdot \text{Ширина пика на половине высоты } (W_{0,5})$
- Если пик расположен так, что *Время удерживания* или *Время удерживания* + $10 \cdot \text{Ширина пика на половине высоты } (W_{0,5})$ больше, чем конечная точка базового контрольного сигнала
 - *Время начала* = *Время удерживания* - $10 \cdot \text{Ширина пика на половине высоты } (W_{0,5})$, и
 - *Время окончания* = *Время удерживания* + $10 \cdot \text{Ширина пика на половине высоты } (W_{0,5})$

Где:

RT — это время удерживания, а

$W_{0,5}$ — это ширина пика на половине высоты.

Дрейф и блуждание базовой линии

Дрейф определяется как наклон линейной регрессии. Сначала рассчитывается дрейф, путем определения линейной регрессии с использованием всех точек данных в диапазоне времени (см. “Регрессионный анализ” на странице 130). Прямая линейной регрессии вычитается из всех точек данных внутри интервала времени для получения бездрейфового скорректированного сигнала.

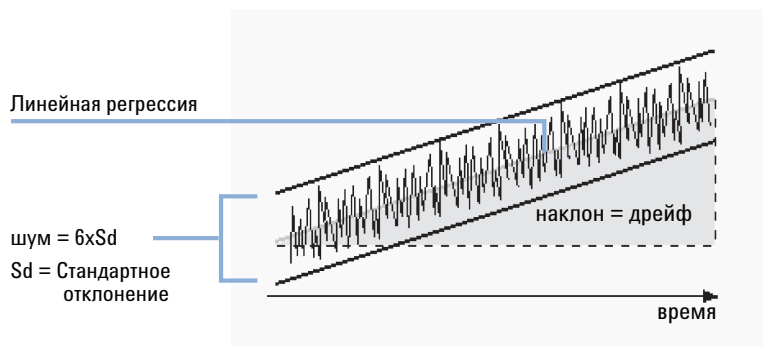


Рисунок 33 Определение дрейфа для шума, используя шестикратное стандартное отклонение

Отклонение определяется как шум полного размаха по средним значениям данных в циклах шума по методу ASTM, см. “Подсчет шума по методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM)” на странице 107.

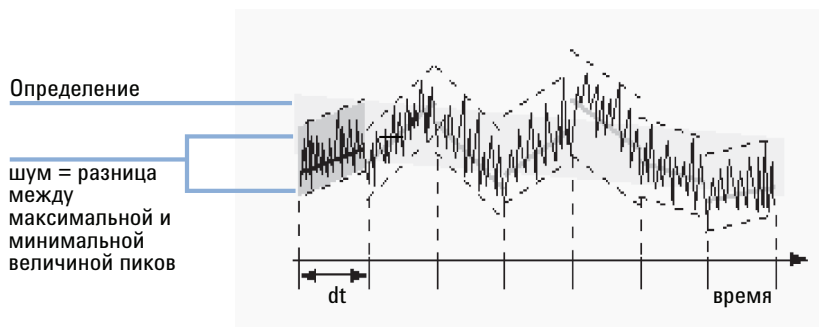


Рисунок 34 Определение отклонения шума по методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM)

Расчет симметричности пика

ChemStation не определяет коэффициент асимметрии пика, обычно определяемый сравнением половин ширины пика на уровне высоты 10%; или, в соответствии с рекомендациями Управления по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств при министерстве торговли США (FDA), на уровне высоты 5%.

Симметричность пика рассчитывается интегрирующим устройством как псевдомомент с использованием следующих уравнений для определения момента:

$$m_1 = a_1 \left(t_2 + \frac{a_1}{1.5H_f} \right)$$

$$m_2 = \frac{a_2^2}{0.5H_f + 1.5H}$$

$$m_3 = \frac{a_3^2}{0.5H_r + 1.5H}$$

$$m_4 = a_4 \left(t_3 + \frac{a_4}{1.5H_r} \right)$$

$$\text{Peak symmetry} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{m_3 + m_4}}$$

Если точки перегиба не будут найдены, или только одна точка перегиба попадет в отчет, то симметричность пика рассчитывается следующим образом:

$$\text{Peak symmetry} = \frac{a_1 + a_2}{a_3 + a_4}$$

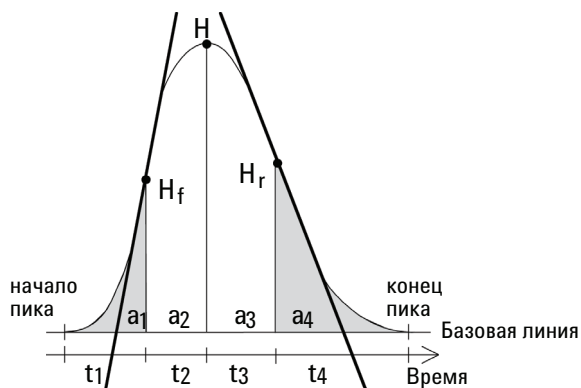


Рисунок 35 Расчет коэффициента симметричности пика

где:

a_i = площадь сектора

t_i = продолжительность сектора

H_f = высота передней точки перегиба

H_r = высота задней точки перегиба

H = высота вершины

Формулы и расчеты пригодности системы

ChemStation использует следующие формулы для получения результатов для различных проверок пригодности системы. Результаты представляются при использовании следующих вариантов отчета: **Performance**, **Performance+Noise**, **Performance+LibSearch**, и **Extended Performance**.

Когда Американское общество по испытанию материалов (ASTM) или Фармакопея США (USP) установлены для данного определения, то оно согласуется с соответствующими контрольными документами, изданными этими организациями. Однако, обозначения, используемые здесь, могут не совпадать с теми, которые используются в контрольных документах.

Список контрольных документов:

- *Американское общество по испытанию материалов: Раздел E 682 – 93, Ежегодная книга по стандартам Американского общества по испытанию материалов, том.14.01*
- *Фармакопея США Фармакопея Соединенных Штатов Америки, XX. Редакция, стр. 943 - 946*
- *Европейская Фармакопея: Европейская Фармакопея, седьмое издание*
- *Японская Фармакопея: Японская Фармакопея, пятнадцатое издание*

Общие определения

Мертвый объем

$$V = d^2 \pi l (f/4)$$

где:

d = диаметр колонки [см]

π = константа, отношение длины окружности к диаметру круга

l = длина колонки [см]

f = часть объема колонки, которая не занята неподвижной фазой, но доступная для подвижной фазы; значение по умолчанию f = 0,68 (для Hypersil)

Время удерживания инертного соединения t (m) [мин]

(Также упоминается как мертвое время или недействительное время)

$$T_m = V/F$$

где:

F = расход для ВЭЖХ [мл/мин]

Определения проверки рабочих характеристик

Характеристики пика могут быть рассчитаны для любого проинтегрированного пика из загруженных данных, а также для новых проинтегрированных вручную пиков. Инструмент Интерактивной характеристики пика рассчитывает характеристики пика и отображает их на пользовательском интерфейсе.

Статистические моменты

$$M0 = d_t \cdot X$$

$$M1 = t_0 + d_t \cdot \frac{X}{Y}$$

$$M2 = \frac{d_t^2}{X} \cdot \sum_{i=1}^N \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^2 \cdot A_i \right)$$

$$M3 = \frac{d_t^3}{X} \cdot \sum_{i=1}^N \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^3 \cdot A_i \right)$$

$$M4 = \frac{d_t^4}{X} \cdot \sum_{i=1}^N \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^4 \cdot A_i \right)$$

где:

N = число секторов площадей

A_i = значение (отклик) сектора площади, которому присвоен индекс i

d_t = временной интервал между соседними секторами площади

t₀ = время первого сектора площади

$\sum_{i=1}^N$ = сумма от начального индекса 1 до конечного индекса N для дискретных результатов измерения

$$X = \sum_{i=1}^N (A_i)$$

$$Y = \sum_{i=1}^N ((i-1)A_i)$$

Статистические моменты, перекося и избыточность

Статистические моменты рассчитываются как альтернативные, чтобы описать асимметричную форму пика. Существует бесконечное число моментов характеризующих пик, но только первые пять используются в связи с хроматографическими пиками. Они называются 0^{ой} Момент, 1^{ый} Момент, ... 4^{ый} Момент.

0^{ой} Момент представляет собой площадь пика.

1^{ый} Момент означает среднее время удерживания или время удерживания, измеренное в центре тяжести пика. Если пик не симметричен, хроматографическое время удерживания отличается от времени удерживания, измеренного на вершине пика.

2^{ой} Момент — это дисперсия пика, которая является мерой горизонтального расширения. Он является суммой дисперсий вносимых различными частями системы прибора.

3^{ий} Момент описывает вертикальную симметрию или перекося. Он является мерой отклонения формы пика от нормального распределения по Гауссу. Перекося указывается дополнительно в отчете "Performance & Extended" (Расширенные Эксплуатационные параметры) в безразмерной форме. Симметричный пик имеет перекося равный нулю. Пики с размытым тылом имеют положительный перекося и их первый Момент больше времени удерживания. Пики с

размытым фронтом имеют отрицательный перекося и их первый Момент меньше времени удерживания.

4-ый Момент или избыточность является мерой сжатия или растяжения пика вдоль вертикальной оси по сравнению с нормальным распределением по Гауссу, для которого четвертый Момент равен нулю. Он может быть представлен сжатием или растяжением сторон гауссового пика, при котором площадь пика остается постоянной. Если пик сжимается или сдвигается вниз, то его избыточность отрицательна. Если пик вытягивается, то его избыточность положительна. Также избыточность указывается в отчетах "Performance & Extended" (Расширенные Эксплуатационные параметры и Эксплуатационные параметры) в безразмерной форме.

Фактическая ширина пика W_x [мин]

W_x = width of peak at height x % of total height

W_B	ширина основания пика, 4 сигма, полученная при пересечении касательных проведенных через точки перегиба с базовой линией (ширина пика по касательной)
$W_{4,4}$	ширина пика на уровне 4,4% высоты (ширина 5 сигма)
$W_{5,0}$	ширина пика на уровне 5% высоты (ширина пика с размытым тылом), используемая для коэффициента размытия, по требованиям Фармакопеи США
$W_{50,0}$	ширина пика на уровне 50% высоты (точная ширина пика на половине высоты или 2,35 сигма).

Коэффициент емкости, коэффициент удерживания (имеет разные терминологические обозначения согласно требованиям Фармакопеи США и Американского общества по испытанию материалов) k'

$$k' = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

где:

T_R = время удерживания пика [мин]

T_0 = недействительное (мертвое) время [мин]

Коэффициент размывания t (согласно требованиям Фармакопеи США)

Примечание

Коэффициент симметричности (согласно требованиям Японской Фармакопеи и Европейской Фармакопеи) S идентичен коэффициенту размывания (согласно требованиям Фармакопеи США). В программируемом отчете Intelligent Reporting они все предоставлены как "Peak_TailFactor" (Коэффициент размывания пика). См. также "Создание отчета для коэффициентов фармакопеи в ChemStation" на странице 168.

$$t = \frac{W_{5,0}}{t_w \cdot 2}$$

где:

t_w = расстояние между началом пика и T_R , измеренным на уровне 5% высоты пика

$W_{5,0}$ = ширина пика на уровне 5% высоты пика [мин]

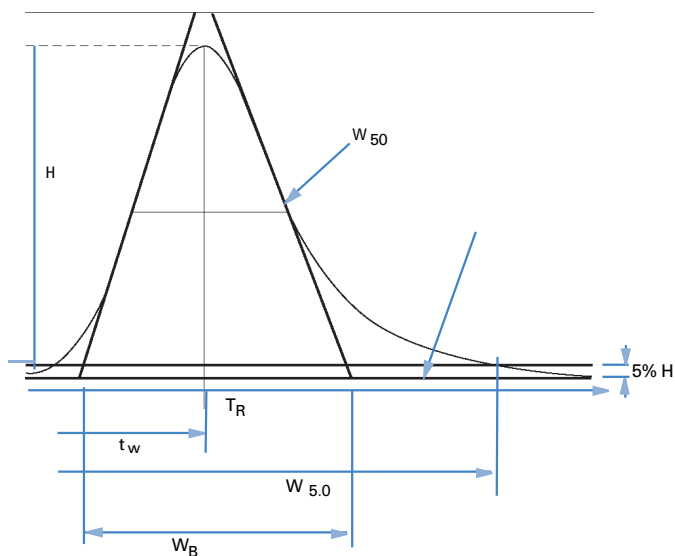


Рисунок 36 Параметры эффективности

Число теоретических тарелок на колонку n

Метод расчета с помощью касательной (согласно требованиям Фармакопеи США и Американского общества по испытанию материалов):

$$n = 16 \left(\frac{T_R}{W_B} \right)^2$$

где:

W_B = ширина на базовой линии [мин]

Метод расчета на уровне половины высоты (согласно требованиям Американского общества по испытанию материалов, Европейской и Японской Фармакопеи):

$$n = 5.54 \left(\frac{T_R}{W_{50}} \right)^2$$

где:

W_{50} = ширина пика на уровне половины высоты [мин]

Метод расчета по 5 сигма:

$$n = 25 \left(\frac{T_R}{W_{4.4}} \right)^2$$

где:

$W_{4.4}$ = ширина пика на уровне 4,4% высоты пика [мин]

Статистический метод:

$$n = \frac{M1^2}{M2}$$

где:

Mx = x ^{овый} статистический момент

Метод Фоли-Дорси

Уравнение Фоли-Дорси используется для асимметричных пиков. Оно корректирует число теоретических тарелок при размывании тыла и расширении пика.

$$N_{sys} = \frac{41.7 (T_R / W_{10})^2}{A/B + 1.25}$$

Где

- W_{10} = ширина пика на уровне 10% высоты пика
- A/B = эмпирический коэффициент асимметрии, при $A+B = W_{10}$, где A является фронтальной а B тыловой составляющими ширины несимметричного пика

Число теоретических тарелок на метр N [1/м]

$$N = 100 \times \frac{n}{l}$$

где:

n = число теоретических тарелок

l = длина колонки [см]

Относительное удерживание (согласно требованиям Фармакопеи США и Американского общества по испытанию материалов), селективность альфа

Примечание

Относительное удерживание (согласно терминам Фармакопеи США) в отчетности предоставлены как "Selectivity" (Селективность) или "Peak_Selectivity" (Селективность_пика).

(Относится к пикам a и b, T_R пика a < T_R пика b)

$$\alpha = \frac{k'_{(b)}}{k'_{(a)}}, \alpha \geq 1$$

где:

$k'_{(x)}$ = коэффициент емкости для пика x: $t_{Rx}-t_0/t_0$

Относительное удерживание (согласно требованиям Европейской и Японской Фармакопеи)

Относительное удерживание (скорректированное) согласно терминам Европейской Фармакопеи и коэффициент разделения согласно терминам Японской Фармакопеи рассчитываются по одинаковой формуле:

$$r = \frac{t_{Ri} - t_M}{t_{Rst} - t_M}$$

Где

t_{Ri} = время удерживания интересующего пика

t_{Rst} = время удерживания эталонного пика

t_M = время задержки

Относительное удерживание (скорректированное, согласно терминам Европейской Фармакопеи) и коэффициент разделения (согласно терминам Японской Фармакопеи) в программируемом отчете Intelligent Reporting представлены как "RelativeRetTime_EP" (Относительное время удерживания_ЕФ) в программируемом отчете "Intelligent Reporting" и как "Selectivity" ("Селективность") в классическом отчете.

Относительное удерживание (без корректировок), согласно требованиям Европейской Фармакопеи, рассчитывается как

$$r_G = t_{Ri} / t_{Rst}$$

Разрешающая способность (Согласно требованиям Фармакопеи США и Американского общества по испытанию материалов) R

(Относится к пикам a и b, T_R пика a < T_R пика b; T_R измеряется в минутах)

Метод расчета с помощью касательной (согласно требованиям Фармакопеи США и Американского общества по испытанию материалов):

$$R = \frac{2(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{B(b)} + W_{B(a)}}$$

Разрешающая способность (согласно требованиям Европейской и Японской Фармакопеи) Rs

Метод определения разрешающей способности по ширине пика на уровне половины высоты (разрешающая способность, используемая в отчете "Performance Report" (Эксплуатационные параметры)):

ChemStation вычисляет разрешающую способность (согласно требованиям Европейской и Японской Фармакопеи) по следующему уравнению:

$$R_s = 1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0,5h1} + W_{0,5h2})$$

Примечание

Определение разрешающей способности согласно требованиям Фармакопеи США (USP) отличается от требований, предписанных Европейской (EP) и Японской (JP) Фармакопеями. Подсчеты предписанные Европейской (EP) и Японской (JP) Фармакопеями доступны, начиная с издания ChemStation Edition C.01.04.

Кроме того, Классическая разрешающая способность $(2,35 / 2) \cdot \dots$ доступна для программируемого отчета Intelligent Reporting, как "Peak_Resolution_Classic" (Классическая разрешающая способность_пика). Для получения полного списка значений см. "Создание отчета для коэффициентов фармакопеи в ChemStation" на странице 168

Разрешающая способность (классические определения ChemStation)

Метод определения разрешающей способности по ширине пика на уровне половины высоты:

$$R = \frac{(2,35/2)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$$

Метод расчета по 5 сигма:

$$R = \frac{2.5(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{4.4(b)} + W_{4.4(a)}}$$

Статистический метод:

$$R = \frac{M1_{(b)} - M1_{(a)}}{W_{S(b)} + W_{S(a)}}$$

где:

$M1_{(x)}$ = время удерживания для пика x (первый статистический момент) [мин]

$W_{B(x)}$ = ширина пика x по базовой линии [мин]

$W_{4.4(x)}$ = ширина пика x на уровне 4,4% высоты [мин]

$W_{50(x)}$ = ширина пика x на уровне 50% высоты [мин]

$W_S(x)$ = ширина, полученная через статистические моменты = $\sqrt{(M2)}$ для пика x [мин] (см. также “Статистические моменты” на странице 117)

Определения параметров для воспроизводимости

Для статистического обзора аналитических данных, с точки зрения воспроизводимости, последовательность рассматривается как небольшая случайная выборка, взятая из бесконечного числа возможных результатов эксперимента. Для достижения полного набора результатов, потребуется неограниченное количество времени и материала образца. Точные статистические данные можно выбрать только из полного независимого набора или совокупности данных. Поэтому необходимым условием для такой обработки является то, что выбранный образец можно считать типичным для всех данных.

Средняя выборка М

Среднее значение М случайной выборки, состоящее из N измерений, рассчитывается, исходя из этого ограниченного набора N единичных наблюдаемых значений X_i , индексируемых по последовательному подсчету i по формуле:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$$

где:

N = число отдельных результатов измерения

X_i = значение отдельных результатов измерения с индексом i

Стандартное отклонение выборки S

Рассматривается случайная выборка размером N. Стандартное отклонение выборки S для определенного конечного набора, выведенного из большого числа данных, определяется

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - M)^2}{N - 1}}$$

Стандартное отклонение выборки S отличается от стандартного отклонения s для всей популяции в двух моментах:

- вместо реального среднего значения используется только среднее значение выборки M и
- делением на N-1, а не на N.

Относительное стандартное отклонение согласно требованиям Фармакопеи США RSD[%]

Относительное стандартное отклонение определяется как

$$RSD = 100 \frac{S}{M}$$

Стандартное отклонение среднего S_M

Пусть M — это средняя выборка, а S — выборочное среднеквадратичное отклонение [для N или (N-1) измерений]. Стандартное отклонение S_M средней выборки M определяется

$$S_M = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

Это может быть проиллюстрировано на примере:

Притом, что время удерживания определенного соединения от расчетного среднего значения в течение одной последовательности

может несильно отличаться, данные из другой последовательности могут отличаться гораздо больше, например, из-за изменения температуры окружающей среды, разрушения материала колонки с течением времени и т.д. Для определения этого отклонения может быть рассчитано выборочное среднеквадратичное отклонение S_M по приведенной выше формуле.

Доверительный интервал CI

Доверительный интервал рассчитывается для того, чтобы получить информацию о том на сколько хороша оценка среднего значения, при применении ее для всей популяции данных, а не только для выборки.

$100 \times (1 - \alpha) \%$ доверительный интервал для общего среднего определяется как

$$CI = t_{(\alpha/2); N-1} \cdot S_M$$

где:

$$t_{(\alpha/2); N-1}$$

процентная точка таблицы распределения t при вероятности риска α

Для расширенных статистик в отчете сводной информации о последовательности может использоваться 95% доверительного интервала ($\alpha = 0,05$).

Распределение t (или 'распределение Стьюдента') используется только для небольшой выборки. В случае больших объемов выборки результаты для распределения t и нормального (гауссовского) распределении перестанут отличаться. Поэтому в случае 30 или более образцов вместо распределения Стьюдента может использоваться нормальное распределение (будет очень сложно вычислить распределение t для больших чисел, тогда как нормальное распределение даст лучшие результаты).

95% доверительный интервал для 6 образцов:

$$1 - \alpha = 0,95$$

$$N = 6$$

Правильное значение для t должно быть взято из таблицы распределения t для 5 (N-1) степеней свободы и для значения $\alpha/2$, равное 0,025. Это приведет к следующей формуле расчета для доверительного интервала CI:

$$CI = 2.571 \cdot \frac{1}{\sqrt{6}} \cdot S_M$$

Регрессионный анализ

Пусть

N = число отдельных результатов измерения

X_i = независимая переменная, $i^{\text{того}}$ измерения

Y_i = зависимая переменная, $i^{\text{ого}}$ измерения

Линейная функция:

$$y_{(X)} = a + bX$$

Коэффициенты:

$$a = \frac{1}{\Delta_X} \left(\sum_{i=1}^N X_i^2 * \sum_{i=1}^N Y_i - \left(\sum_{i=1}^N X_i * \sum_{i=1}^N X_i Y_i \right) \right)$$

$$b = \frac{1}{\Delta_X} \left(N * \sum_{i=1}^N X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^N X_i * \sum_{i=1}^N Y_i \right) \right)$$

где:

$$\Delta_X = N * \sum_{i=1}^N X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N X_i \right)^2$$

Коэффициент регрессии

$$r = \frac{\left(N * \sum_{i=1}^N X_i Y_i - \sum_{i=1}^N X_i * \sum_{i=1}^N Y_i \right)}{\sqrt{\Delta_x * \Delta_y}}$$

где:

$$\Delta_y = N * \sum_{i=1}^N Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N Y_i \right)^2$$

Стандартное отклонение (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - a - bX_i)^2}{N - 2}}$$

Доступ к сохраненным в памяти числам с двойным количеством разрядов

Для целей валидации может появиться необходимость ручного пересчета результатов полученных ChemStation (таких как калибровочные кривые, коэффициенты корреляции, теоретические тарелки и т.д.). При этом должен быть принят во внимание числовой формат, используемый в ChemStation.

Для всех чисел записанных в памяти ChemStation, используется удвоенный тип данных "С". Это означает, что для каждого числового значения записываются 14 значащих цифр. Применение такого типа данных придерживается стандарта Microsoft IEEE (Института инженеров по электротехнике и радиоэлектронике) для типа данных "С" и соответствующих правил округления (см. документы Microsoft Q42980, Q145889 и Q125056).

В связи с неограниченным числом параметров, которые могут быть использованы для расчета таблицы калибровки, невозможно точно вычислить ошибку, возникающую из-за распространения и накопления ошибок округления. Однако тщательные проверки с различными конструкциями калибровочного графика показали, что системой может быть гарантирована точность до 10 знаков. Исходя из того, что воспроизводимость площади, высоты и времени удерживания хроматографических анализов обычно имеет 3 значащие цифры, то 10 значащих цифр в таких расчетах вполне достаточно. По этой причине калибровочные и другие таблицы показывают не более 10 значащих цифр.

Если для валидации требуется внешний (ручной) расчет, то рекомендуется, чтобы все цифры, используемые для внутренних расчетов, были использованы. Использование отображаемых и/или округленных данных для внешних расчетов может дать результаты отличающиеся от результатов ChemStation из-за ошибок округления.

В следующем абзаце описано как получить доступ ко всем сохраненным в памяти знакам чисел, обычно требуемых для ручных расчетов. Во всех случаях до выполнения перечисленных команд, файл данных должен быть загружен и зарегистрирован с

соответствующим стилем отчета. Все команды вводятся через командную строку ChemStation, которая может быть включена в меню "view" (вид). Информация в файле "C:\CHEM32\TEMP.TXT" может быть просмотрена с помощью блокнота или надлежащего текстового редактора.

Информация о необработанном пике:

- Время удерживания
- Площадь
- Высота
- Ширина (интегрирующее устройство)
- Симметричность
- Время начала пика
- Время окончания пика

Используйте следующую запись в командной строке:

DUMPTABLE CHROMREG, INTRESULTS, "C:\CHEM32\1\TEMP\INTRES.TXT"

Информация о обработанном пике:

- Измеренное время удерживания
- Ожидаемое время удерживания
- Площадь
- Высота
- Ширина (интегрирующее устройство)
- Симметричность
- Ширина пика на половине высоты ("Performance & Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры и Эксплуатационные параметры))
- Коэффициент размывания ("Performance & Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры и Эксплуатационные параметры))
- Селективность ("Performance & Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры и Эксплуатационные параметры))

- Коэффициент емкости K' ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))
- Ширина пика по касательной ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))
- Перекос ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))
- Количество теоретических тарелок на половине высоты ("Performance & Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры и Эксплуатационные параметры))
- Количество теоретических тарелок найденное по касательной ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))
- Количество теоретических тарелок найденное по 5? ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))
- Количество теоретических тарелок найденное статистически ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))
- Разрешающая способность на половине высоты ("Performance & Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры и Эксплуатационные параметры))
- Разрешающая способность, найденная по касательной ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))
- Разрешающая способность, найденная по 5? ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))
- Разрешающая способность, найденная статистически ("Extended Performance" (Расширенные Эксплуатационные параметры))

Используйте следующую запись в командной строке:

DUMPTABLE CHROMRES, PEAK,"C:\CHEM32\1\TEMP\PEAK.TXT"

Информация о обработанном соединении:

- Подсчитанное количество

Используйте следующую запись в командной строке:

DUMPTABLE CHROMRES, COMPOUND,"C:\CHEM32\1\TEMP\COM-
POUND.TXT"

Информация таблицы калибровки:

- Номер уровня
- Количество
- Площадь
- Высота

Используйте следующую запись в командной строке:

DUMPTABLE _DAMETHOD, CALPOINT, "C:\CHEM32\1\TEMP\CALIB.TXT"

Информация о линейной регрессии:

- Пересечение с осью Y (1 параметр графика)
- Наклон (2 параметр графика)
- Коэффициент корреляции

Используйте следующую запись в командной строке:

DUMPTABLE _DAMETHOD, PEAK, "C:\CHEM32\1\TEMP\REGRESS.TXT"

6 Оценка пригодности системы

Доступ к сохраненным в памяти числам с двойным количеством разрядов



7 Особые расчеты для капиллярного электрофореза

Таблицы калибровки	138
Стандартная калибровка	138
Калибровка по молекулярному весу белка	139
Калибровка по паре оснований ДНК	139
Изоэлектрические точки в капиллярном электрофорезе	140
Калибровка с помощью коррекции подвижности	141
Введение	141
Расчеты эффективной подвижности	142
Расчеты относительной подвижности	145
Стили особых отчетов для капиллярного электрофореза	147
Корректировка площадей пиков	148
Пригодность системы для капиллярного электрофореза	149
Коэффициент емкости k'	149
Капиллярный электрофорез с масс-селективным детектором (КЭ-МСД)	150
Вычитание фона	150

Этот раздел относится к использованию ChemStation для управления приборами КЭ.



Таблицы калибровки

Четыре различных типа калибровки доступны в раскрывающемся списке для таблицы калибровки.

Стандартная калибровка

Стандартная калибровка основывается на площади или высоте пика. При выборе пункта меню **Standard Calibration**, доступны следующие опции: **Calculate Signals Separately** или **Calculate with Corrected Areas**.

Расчет сигналов отдельно выбирается, когда нужно удостовериться, что в отчетах по процентному подсчету с использованием нормативного состава, количество процентов отдельных отчетных сигналов составляет в сумме 100% для каждого сигнала. При снятии выбора с опции **Calculate signals separately**, количество процентов всех сигналов составляет в сумме 100%. Выбор опции **Calculate signals separately** является необходимым условием для сортировки по сигналу в таблице калибровки.

Выбор же опции **Calculate with Corrected Areas** позволяет делать поправку площади пика, основанную на времени миграции. В этом режиме площадь делится по времени миграции, что может улучшить воспроизводимость результатов количественного анализа при неустойчивом времени миграции.

В дополнение к стандартной калибровке существуют 3 особые калибровки капиллярного электрофореза, для которых время миграции основано на сигнале. Сигнал определяется по описанию сигнала в методе калибровки. Если файл данных содержит многоканальные сигналы, то только один сигнал может быть выбран и извлечен из файла данных. Формат таблицы калибровки зависит от выбранного типа калибровки.

Количественные задачи могут решаться на основе калибровки размера биополимера (график Фергюсона) для белка обработанного додецилсульфатом натрия (SDS).

Калибровка по молекулярному весу белка

Protein molecular weight calibration требует калибровочного стандарта с компонентами известной молекулярной массы и эталонного пика. Уравнение калибровки:

$$\log(MW) = k_1 \cdot (t_{ref}/t) + k_0$$

где:

MW — молекулярный вес белка.

t_{ref} — время миграции эталонного пика

t — время миграции

k_0 and k_1 — коэффициенты линейного уравнения

Таблица калибровки содержит название, время миграции, t_{ref}/t (относительное время миграции), молекулярный вес и $\log(MW)$ для каждого вещества.

Калибровка по паре оснований ДНК

DNA base-pair calibration схожа с **protein molecular weight calibration**, но производится без эталонного пика, и для нее требуется калибровочный стандарт с известным числом пар оснований. Уравнение калибровки:

$$\log(\#BP) = k_1 \cdot 1/t + k_0$$

где:

$\#BP$ — число пар оснований

t — время миграции

k_0 and k_1 являются коэффициентами линейного уравнения

Таблица калибровки содержит название, время миграции, $1/t$, пары оснований и $\log(\text{числа пар оснований})$ для каждого вещества.

Изоэлектрические точки в капиллярном электрофорезе

capillary isoelectric focusing calibration (cIEF) требует калибровочный стандарт из стандартных белков с известными изоэлектрическими точками (pI). Уравнение калибровки:

$$pI = k_1 \cdot t + k_0$$

где:

pI — изоэлектрическая точка

t — время миграции

k_0 and k_1 являются коэффициентами линейного уравнения

Таблица калибровки содержит название, время миграции, *pI* (изоэлектрические точки) для каждого вещества.

Калибровка с помощью коррекции подвижности

Введение

Незначительные изменения состава буферной смеси, температуры при выполнении анализа или вязкости, как и адсорбция на стенках капилляра, могут повлиять на электроосмотический поток (ЭОП) или сделать его нестабильным. Получающееся в результате изменение ЭОП может привести к довольно высокому стандартному отклонению времен миграции. Поправки на подвижность могут значительно снизить влияние смещений времени миграции между выполнениями анализа благодаря отслеживанию времени миграции эталонного пика подвижности и, как следствие, значительному повышению воспроизводимости времени миграции.

При выборе эталонного пика подвижности следует руководствоваться следующими приоритетами.

- Выберите пик с самым высоким сигналом.
- Выберите самый изолированный пик.
- В качестве эталонного пика подвижности можно также использовать маркер ЭОП или внутренний стандарт.
- Всегда разворачивайте окно поиска, когда ищете эталонный пик подвижности.
- Если в окно поиска попадают несколько пиков, то пик с наивысшим сигналом автоматически выбирается в качестве эталонного пика подвижности.

Доступны два типа коррекции подвижности:

**коррекция
эффективной
подвижности.**

Effective Mobility Correction использует эффективные подвижности всех пиков и требует наличия данных линейного изменения напряжения наряду с электрофореграммой. Кроме того, применение коррекции эффективной подвижности позволяет определять истинные эффективные подвижности для всех компонентов пробы;

**коррекция
относительной
подвижности**

Relative Mobility Correction может осуществляться в отсутствие данных о напряжении и поэтому предполагает постоянное напряжение для всех измерений.

Расчеты эффективной подвижности

Требования для эффективной коррекции подвижности, в дополнение к эталонному пику, включают нейтральное маркирующее вещество, скорость миграции которого соответствует скорости электроосмотического потока (EOF). Некоторые из часто используемых маркирующих веществ и связанные с ними длины волн:

Таблица 9 Часто используемые маркеры EOF

Соединение	Длина волны
н-пропиловый спирт	210нм
Ацетон	330нм
Ацетонитрил	190нм
Бензол	280нм
Гуанозин	252нм
Оксид мезитила	253нм
Метанол	205нм
Фенол	218нм
Пиридин	315нм
Тетрагидрофуран	212нм
Урацил	259нм

Данные напряжения в течение времени и размеры капилляра либо сохраняются в файле данных, или могут быть введены вручную в течении установки таблицы калибровки. Сохранение данных напряжения во время анализа делает этот процесс более точным. Убедитесь в сохранении размеров капилляра в методе. Для переобработки сигналов, которые были получены без (данных напряжения)/(размеров капилляра), введите вручную напряжение и время выхода на рабочий режим в группу диалогового окна "Voltage and Capillary Dimensions" (Напряжение и размеры капилляра).

Из данных определяется эффективная подвижность для каждого компонента.

Общие положения

Выявленная подвижность пика образца определяется по уравнению:

$$\mu_{app} = (l \cdot L) / (t \cdot V(t))$$

где

l — эффективная длина капилляра (длина от точки ввода до точки детектирования)

L — общая длина капиллярной колонки

$V(t)$ — среднее напряжение за время от 0 до времени миграции t пика

Среднее напряжение рассчитывается как от измеренного напряжения или указанного в методе линейного изменения напряжения, используя следующие уравнения:

Если $t < t_R$, то

$$V(t) = V / (2 \cdot t_R) \cdot t$$

Если $t > t_R$, то

$$V(t) = V \cdot (1 - t_R / (2 \cdot t))$$

где

t — время миграции пика

t_R — время выхода на рабочий режим

V — конечное напряжение

Уравнение для подвижности может быть упрощено, путем введения коэффициента:

$$k(t) = (l \times L) / V(t)$$

Относительная или выявленная подвижность тогда

$$\mu_{app} = k(t) / t$$

Эффективная или фактическая подвижность

$$\mu_{\text{real}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{EOF}}$$

где

μ_{app} — выявленная подвижность любого пика

μ_{EOF} выявленная подвижность нейтрального маркирующего вещества

Вещества с меньшей скоростью, чем EOF (обычно анионы) приведут к отрицательным значениям для эффективной подвижности.

Калибровка

Фактическая подвижность пика образца, используемая в качестве подвижности эталонного пика в следующих измерениях, рассчитывается с использованием времени миграции нейтрального маркирующего вещества (μ_{EOF}):

$$\mu_{\text{realref}} = \mu_{\text{appref}} - \mu_{\text{EOF}} = k(t_{\text{ref}})/t_{\text{ref}} - k(t_{\text{EOF}})/t_{\text{EOF}}$$

Затем эффективные подвижности всех пиков рассчитываются и сохраняются, как ожидаемые подвижности:

$$\mu_{\text{realN}} = \mu_{\text{appN}} - \mu_{\text{EOF}} = k(t_{\text{N}})/t_{\text{N}} - k(t_{\text{EOF}})/t_{\text{EOF}}$$

После этого таблица калибровки содержит измеренное время миграции и расчетную фактическую подвижность для каждого соединения в колонках для ожидаемого времени миграции и ожидаемой подвижности.

Расчет подвижности

Фактическое значение μ_{EOF} рассчитывается с использованием подвижности эталонного пика:

$$\mu_{\text{EOFact}} = \mu_{\text{appref}} - \mu_{\text{realref}} = k(t_{\text{ref}})/t_{\text{ref}} - \mu_{\text{realref}}$$

После этого ожидаемое время миграции для каждого пика вычисляется как:

$$t_{\text{newexpN}} = k(t_{\text{oldexpN}})/(\mu_{\text{realN}} + \mu_{\text{EOFact}})$$

Расчетные значения используются для идентификации пиков и замены значений в таблице калибровки.

Повторная калибровка

Время миграции подвижности эталонного пика используется для расчета фактического значения μ_{EOF} :

$$\mu_{EOFact} = \mu_{appref} - \mu_{realref} = k(t_{ref})/t_{ref} - \mu_{realref}$$

Ожидаемое время миграции для каждого пика вычисляется как:

$$t_{newexpN} = k(t_{oldexpN})/(\mu_{realN} + \mu_{EOFact})$$

и подвижности обновляются:

$$\mu_{realN} = \mu_{appN} - \mu_{EOFact}$$

Во время калибровочного анализа ожидаемые значения для времени миграции, а также фактические значения подвижности обновляются в таблице калибровки.

Расчеты относительной подвижности

Корректировка времени миграции на основе относительных подвижностей также может быть выполнена. В этом случае не нужно ни маркирующего вещества EOF, ни напряжения, ни размеров капилляра. Программное обеспечение по-прежнему корректирует сдвиги времени миграции, но не отображает значения подвижности.

Общие положения

Как и в расчетах эффективной подвижности, коэффициент

$$k(t) = (l \cdot L)/V(t)$$

используется в расчетах относительной подвижности для описания отношений между подвижностью и временем миграции:

$$\mu_{app} = k(t)/t$$

Разница в том, что в уравнениях для относительной подвижности появляется k в числителе и знаменателе дроби, это значит, что размеры капилляра могут быть опущены. Коэффициент k рассчитывается как Коэффициент k рассчитывается как

7 Обычные расчеты для капиллярного электрофореза

Калибровка с помощью коррекции подвижности

$$k(t) = 1/V(t)$$

где $V(t)$ – среднее напряжение от нулевого времени до времени миграции пика.

Когда параметр напряжения установлен на **Ignore**, k является постоянным и может быть исключен из уравнений для ожидаемого времени миграции (см. ниже).

Следующее уравнение описывает общий случай для $k = k(t)$, хотя программное обеспечение рассматривает все случаи при расчете k .

Калибровка

Определяется подвижность эталонного пика и записывается его время миграции (t_{refcal}). Сохраняются ожидаемые времена миграции ($t_{expcalN}$) всех других пиков.

Расчет подвижности

После определения эталонного пика, ожидаемое время миграции для каждого пика корректируется, в зависимости от фактического времени миграции подвижности контрольного пика:

$$t_{newexpN} = \frac{k(t_{oldexpN})}{(k(t_{expcalN})/t_{expcalN} - k(t_{refcal})/t_{refcal} + k(t_{refact})/t_{refact})}$$

После этого время миграции эталонного пика последнего калибровочного анализа обновляется:

$$t_{refcal} = t_{refact}$$

Стили особых отчетов для капиллярного электрофореза

Следующий стиль отчета был добавлен ??в Agilent ChemStation для системы КЭ:

Подвижность КЭ **CE Mobility** включает текстовые результаты количественного анализа, особенно выявленную подвижность. Чтобы использовать этот стиль отчета, перед сбором данных необходимо указать информацию об используемом капилляре и сохраненный сигнал напряжения. Выявленная подвижность рассчитывается по следующей формуле.

$$\mu_{app} = \frac{l \cdot L}{t \cdot V}$$

Где

l — эффективная длина капиллярной колонки (см)

L — общая длина капиллярной колонки (см)

t — время миграции (мин)

V — напряжение (кВ)

Если эффективная коррекция подвижности (см. [“Расчеты эффективной подвижности”](#) на странице 142) активирована, столбец "peak type" (тип пика) в простых отчетах (например, внешние стандартные отчеты) заменяется на столбец "mobility" (подвижность). В отчете подвижности КЭ печатаются эффективные подвижности вместо выявленных.

Корректировка площадей пиков

Agilent ChemStation для системы КЭ позволяет использовать исправленные площади пика вместо обычных расчетов площади. Эти площади используются в стандартной калибровке и отчетах.

Чтобы активировать эту функцию, следует выбрать режим **Calculate with Corrected Areas**, что сделает поправку площади пика на основании времени миграции. В этом режиме площадь делится по времени миграции, что может улучшить воспроизводимость результатов количественного анализа при неустойчивом времени миграции.

Скорректированная площадь рассчитывается по следующей формуле:

$$A_c = \frac{A}{60 \cdot t}$$

Где

A_c — скорректированная площадь пика (mAU)

A — площадь пика (mAU·sec)

t — время миграции (мин)

Эту скорректированную площадь иногда также называют нормированной площадью.

Пригодность системы для капиллярного электрофореза

Коэффициент емкости k'

В капиллярном электрофорезе значение коэффициента емкости k' не может быть рассчитано автоматически для всех режимов работы. Обратитесь к руководству *Высокоэффективный капиллярный электрофорез: Учебник соответствующих формул*. Значения, приведенные в отчетах действительны только для Agilent ChemStation для ВЭЖХ 3D систем, так как Agilent ChemStation для систем КЭ использует те же алгоритмы как и для Agilent ChemStation для ВЭЖХ 3D систем.

Капиллярный электрофорез с масс-селективным детектором (КЭ-МСД)

Вычитание фона

При выборе пункта меню **Subtract Background BSB**) из каждой точки текущей электрофореграммы вычитается масс-спектр, выбранный в последний раз. Получающиеся в результате данные сохраняются в том же каталоге и под тем же именем, что и исходный файл данных, но расширение файла меняется на .BSB.

Новый файл данных становится текущим файлом данных, отображается электрофореграмма с вычтенным фоном. В пункте Operator (Оператор) заголовка файла данных ведется учет числа выполненных вычитаний фона.

При просмотре распечатки данных BSB в табличном виде можно заметить различия, обусловленные точностью представления данных.

Примечание

Текстовые файлы СПРАВКИ в программном обеспечении ЖХ/МСД относятся только к параметрам ЖХ, но не к КЭ. Некоторые функции, доступные в программном обеспечении ЖХ/МСД, отсутствуют или неприменимы к приложениям КЭ/МСД, однако могут использоваться в ЖХ. Функция **peak matching** неприменима для КЭ-МС и поэтому неактивна. В КЭ-МС, УФ и МС обнаружение происходит при различных эффективных длинах разделения капилляра. Из-за разного разрешения на различных эффективных длинах сопоставление пиков невозможно.



8 Просмотр данных, повторная обработка и просмотр серии образцов

Таблица навигации в "Data Analysis" (Анализ данных)	152
Структура таблицы навигации	152
Панель инструментов таблицы навигации	154
Просмотр данных, используя таблицу навигации	155
Повторная обработка последовательности, используя таблицу навигации	156
Что представляет собой просмотр серии образцов?	158
Включение функциональной возможности просмотра серии образцов при использовании OpenLAB CDS с ECM	159
Конфигурация серии образцов	160
Таблица для серии образцов	160
Таблица соединения	161
Отчет серии образцов	161
Интерфейс пользователя	162
Функции просмотра	163
Калибровка в просмотре серии образцов	163
Отчетность серии образцов	164
Архив серии образцов	164

Этот раздел описывает возможности для просмотра данных и то, как переобработать последовательность данных. Кроме того, описываются понятия просмотра серии образцов, конфигурации серии образцов, функции пересмотра и отчетности.



Таблица навигации в "Data Analysis" (Анализ данных)

Вкладка **Data Analysis** содержит Navigation Table (Таблица навигации), которая предназначена для облегчения ориентирования по файлам данных. Таблица навигации отображает анализы, содержащиеся в подзаголовке выбранных данных или данных последовательности. Можно использовать **Navigation Table** для загрузки отдельных анализов или автоматически просматривать путем прокрутки загруженные сигналы. Для более подробной информации см. инструкцию *OpenLAB CDS ChemStation Edition, основные сведения и последовательности действий*.

Структура таблицы навигации

Таблица навигации отображает информацию файла данных, в зависимости от имеющегося набора данных. Таблица навигации доступна только для чтения, и значения в таблице навигации не могут быть перезаписаны.

Таблица 10 Столбцы таблицы навигации

Столбцы одиночных разгонок	Столбцы последовательности разгонок
Наложение	Наложение
ЕСМ	ЕСМ
ТИП	ТИП
Дата / Время	Строка
Оператор	Введение пробы
Виала	Виала
Файл данных	Наименование пробы
Наименование пробы	Имя метода
Имя метода	Тип пробы

Таблица 10 Столбцы таблицы навигации

Столбцы одиночных разгонок	Столбцы последовательности разгонок
Параметры интегрирования	Параметры интегрирования вручную
Информация о пробе	Cal Level (Уровень калибровки)
Количество образца	Информация о пробе
Количество внутреннего стандарта	Количество образца
Множитель	Количество внутреннего стандарта
Разбавление	Множитель
---	Разбавление
---	Файл данных

Таблица навигации включает стандартный инструментарий для конфигурации таблицы, такой как сортировка и графическое перетаскивание для перемещения столбцов в разные места. Кроме того, можно выбирать столбцы, которые отображаются в таблице навигации.

Кроме того, возможна специфичная группировка столбцов, например, одиночные разгонки конкретного оператора могут быть отображены с помощью группировки загруженных файлов в столбце **operator**.

Таблица навигации предлагает функции правой кнопки мыши для загрузки сигнала, наложения сигнала, экспорта данных, печати отчетов, просмотра параметров выбранного метода и т.д. Каждую строку таблицы навигации можно развернуть, нажав кнопку + (плюс) в левой части строки для настройки особенностей сигнала:

- **Signal:** Перечисляются полученные сигналы и предоставляется возможность определить сигналы, которые будут загружены. Выбор отображения сигнала применяется для каждого анализа отдельно.
- **General Info:** Показываются подробные сведения о анализе.
- **Instrument curves:** Позволяет выбрать графики данных прибора, которые будут отображаться вместе с хроматограммой/электрофореграммой на экране и в распечатке.

Панель инструментов таблицы навигации

Navigation Table включает две группы инструментов, которые позволяют либо просмотреть данные (одиночного анализа)/(последовательности анализов) или повторно обработать данные последовательности.

Инструмент просмотра данных


Функциональные возможности просмотра таблицы навигации позволяют переходить автоматически или вручную по загруженным сигналам. В зависимости от выбора указанного в опциях **Preferences / Signal/Review**, система может автоматически проинтегрировать сигнал и распечатать отчет для каждого файла, который будет загружен. Метод, применяемый к файлу данных, отображается в верхнем меню.

Инструмент повторной обработки последовательности

Инструмент повторной обработки последовательности доступен только при загрузке последовательности, полученной в версии ChemStation B.02.01 или выше, при включенной опции **Unique Folder Creation**. Можно запустить, остановить и приостановить переобработку последовательности. Кроме того, для изменения параметра для переобработки последовательностей и распечатки, панель инструментов дает доступ к следующим диалоговым окнам:

- **Sequence Table** (копия оригинального шаблона *.s, расположенная в хранилище данных последовательности)
- диалоговое окно **Sequence Parameters**
- диалоговое окно **Sequence Output**
- диалоговое окно **Sequence Summary Parameters**
- диалоговое окно **Extended Statistic Parameters**
- **Save Current Sequence**
- **Print Current Sequence**

Просмотр данных, используя таблицу навигации

Просмотр данных в "Recalculate Mode" (Режим пересчета) доступен при нажатии элемента , расположенного на панели инструментов Таблицы навигации. При этом открывается набор инструментов Режима пересчета. В зависимости от решаемой задачи, можно просмотреть данные одним из трех способов:

- 1 Просмотр данных, используя метод анализа данных, сохраненного в каждом файле данных (данные последовательности версии B.02.01 или выше). При выборе пункта **Start Autostepping** из меню **Recalculate** в режиме **Data Analysis** система загрузит индивидуальный метод анализа данных, сохраненный в файле данных перед его загрузкой. Поскольку каждая строка в Таблице навигации доступна в ходе процесса просмотра данных, то метод, связанный с выбранным файлом данных, загружается и используется для анализа и создания отчета.
- 2 Просмотр данных с помощью другого метод. Можно использовать другой метод для просмотра данных, а не метод, сохраненный с файлом данных, для этого выберите пункт **With method** из меню **Recalculate** в режиме **Data Analysis**. В этом случае следует выбрать метод и шаблон отчета из диалогового окна **Recalculate with Method**. Также можно указать **Autostep interval** и отчет **Destination**; значения, выбранные в этом диалоговом окне, временно отключают значения во вкладке **Signal/Review Options** в диалоговом окне **Preferences** и, при завершении работы ChemStation, сбрасываются. Выбранный метод загружается и используется для расчета результатов всех файлов данных в наборе результатов.
- 3 Просмотр данных с помощью метода, который применялся последним для вычисления результатов. Следует выбрать пункт **Last Result Mode** из меню **Recalculate** в режиме **Data Analysis**. Этот режим загружает метод, который последним был использован для вычисления результатов для файла данных. Заметим, что если файл данных не имеет соответствующего метода анализа данных, он пропускается в ходе автоматического перешагивания. Этот режим влияет как на автоматическое перешагивание, так и на ручную загрузку файлов данных.

Повторная обработка последовательности, используя таблицу навигации

Примечание

Данные последовательности, полученные версиями ChemStation выше V.01.03, требуют переобработки, используя опцию **reprocess** во вкладке **Method and Run Control**. То же самое относится к данным, полученным в версии V.03.01 или более поздней версии программного обеспечения, при выключенной опции **Unique Folder Creation**.

Данные последовательности, полученные версиями ChemStation V.02.01 и выше, требуют переобработки, используя набор инструментов повторной обработки в пункте меню Таблицы навигации **Data Analysis**.

Все необходимые файлы присутствуют в хранилище данных последовательности для переобработки с помощью Таблицы навигации во вкладке **Data Analysis**:

- файлы данных последовательности (*.d)
- файлы всех методов (*.m), используемые в ходе последовательности
- копия исходного шаблона последовательности (*.s)
- командный файл связанной последовательности (*.b)
- файл регистрационного журнала связанной последовательности (*.log)

Во время переобработки происходит обновление файлов данных отдельных методов DA.M и файл командного файла (*.b).

С помощью функций пересчета вкладки **Data Analysis** можно изменить шаблон последовательности (*.s) в хранилище данных для того, чтобы изменить коэффициент умножения, разбавление и т.д. или чтобы использовать другой метод для переобработки. По умолчанию параметр повторной обработки последовательности **parts of method to run** вкладки **Анализа данных** установлен на значение **Reprocessing only**, выбрана опция **Use Sequence Table Information**. Эти определенные по умолчанию значения позволяют изменять параметры в шаблоне последовательности и запустить переобработку без нового редактирования параметров последовательности во вкладке **Data Analysis**.

Если в метод в шаблоне последовательности не было внесено явных изменений, система использует методы последовательности, сохраненные в хранилище данных последовательности для переобработки последовательности. Эти методы являются исходными методами, которые используются во время сбора данных. Если конкретные параметры метода должны быть изменены (например, необходимо задать печать в формате *.xls), то методы в хранилище последовательности должны быть изменены и сохранены. Это общее изменение затем применяется ко всем файлам данных во время переобработки.

Если теперь нужно использовать обновленный метод из хранилища последовательности для дальнейшего сбора данных, необходимо скопировать этот метод из хранилища данных последовательности в одно из определенных для метода мест. Новый/обновленный метод становится доступным в окошке просмотра метода ChemStation Explorer как главный метод.

Что представляет собой просмотр серии образцов?

Просмотр серии образцов является возможностью анализа данных, разработанной, чтобы помочь аналитику выполнить "первый просмотр" результатов последовательности или легко и быстро выбрать нужные анализы. Это экономит время, особенно при переобработке большого количества образцов. Всякий раз, когда последовательность анализируется, командный файл (с расширением .b) создается автоматически и помещается в папку данных вместе с файлами данных. Этот командный файл содержит указатели заложенных в серии образцов файлов данных. При загрузке серии образцов аналитику надо всего лишь выбрать метод, используемый для серии образцов, а затем индивидуально выбирать нужные файлы данных для анализа из серии образцов. Можно проверить точность калибровки, пригодность прибора и отдельные интеграции до утверждения результатов. Любые параметры интегрирования специфичных хроматограммы, которые будут модифицированы, могут быть сохранены в файле данных для отслеживания данных. А также эта интерактивная среда обеспечивает полный доступ ко всем другим возможностям анализа данных, таких как чистота пика, библиотечный поиск и т.д.

При просмотре серии образцов используются те же регистры анализа данных (ChromReg and ChromRes), как и стандартный анализ данных и, поэтому, просмотр не может быть использован в ходе проведения анализа, т.е. в режиме онлайн.

Включение функциональной возможности просмотра серии образцов при использовании OpenLAB CDS с ECM

При использовании OpenLAB CDS с ECM, функциональная возможность Просмотра серии образцов по умолчанию является не доступной. Для того, чтобы использовать функцию "Просмотр серии образцов", эта функциональная возможность должна быть включена в секции [PCS] ChemStation.ini file. Файл находится в директории windows c:\ WINDOWS.

[PCS]

_BatchReview=1

По умолчанию установлено _BatchReview=0, что означает выключенную функциональную возможность.

Конфигурация серии образцов

Серия образцов — выбранная пользователем серия файлов данных, которые обрабатываются с помощью определенного пользователем метода. Все файлы данных в серии образцов обрабатываются с помощью одинакового метода. Могут быть выбраны этапы обработки для каждого нового вызываемого образца, загруженного для просмотра (интегрирование, качественный/количественный анализ, отчетность).

Все калибровочные разгонки в серии образцов используются для создания одной таблицы калибровки с использованием усредненных коэффициентов отклика, которые затем используются для количественного анализа.

Таблица для серии образцов

Анализы отображаются в настраиваемой пользователем таблице для серии образцов:

- может быть назначено количество и содержание столбцов таблицы;
- разгонки могут быть отсортированы по
 - индексу анализа (порядковый номер проведения анализа), независимо от любых других критериев,
 - типу образца (сначала контрольные образцы, затем калибровочные образцы, затем обычные образцы), затем по индексу анализа в пределах каждого типа образца,
 - методу (если свыше одного метода было использовано для проведения анализов), затем по индексу анализа в пределах каждого метода;
- образцам, при этом калибровочные образцы и контрольные образцы могут быть отображены в таблице или скрыты.

Каждый выбранный анализ занимает строку в таблице серии образцов. Можно исключить анализ в таблице серии образцов (например из калибровки) путем изменения типа образца на Removed (Удаленный).

Таблица соединения

Результаты обнаруженных соединений отображаются в настраиваемой пользователем таблице соединений, но содержание таблицы соединений зависит от типа образцов в таблице серии образцов:

- список соединений содержит перечень всех соединений, которые содержатся в загруженном для просмотра серии образцов методе.
- если калибровочные образцы отображаются только в таблице серии образцов (образцы и контрольные образцы скрыты), в таблице соединения отображаются дополнительные столбцы для информации связанной с калибровкой (ожидаемое количество, относительная ошибка и абсолютная ошибка).
- если только контрольные анализы отображаются в таблице серии образцов (образцы и калибровочные образцы скрыты), то в таблице соединений отображаются дополнительные столбцы для любых установленных требований контроля.

Для столбцов, содержащих информацию о конкретных соединениях, можно указать название соединения в заголовке таблицы, добавляя %s к спецификации столбца.

Отчет серии образцов

Отчет серии образцов содержит две таблицы, которые в целом аналогичны таблице серии образцов и таблице соединения, причем эти таблицы также могут настраиваться пользователем.

Для столбцов, содержащих информацию о конкретных соединениях, можно указать название соединения в заголовке таблицы, добавляя %s к спецификации столбца. Есть возможность использования многострочных заголовков, для этого в месте, где нужно прервать строку вставляется символ ‘|’ .

Интерфейс пользователя

Просмотр серии образцов предоставляет на выбор два пользовательских интерфейса:

- стандартный интерфейс, который содержит панель кнопок, большинство из которых повторяет кнопки пунктов из меню "Серия образцов", а так же таблицу серии образцов и таблицу соединения;
- минимальный интерфейс, который содержит панель кнопок похожую на панель стандартного интерфейса, но заменяет таблицу серии образцов и таблицу соединения списком, который содержит только информацию, определенную для таблицы серии образцов. Панель кнопок минимального интерфейса не содержит кнопок таблицы, связанной с серией образцов или таблицы, связанной с соединением.

Функции просмотра

Файлы данных могут просматриваться одним из двух способов:

- вручную, путем выбора анализа из таблицы для отображения,
- автоматически, с заданным интервалом между каждым файлом данных. Во время автоматического отображения показываются только те типы образцов, которые указаны в таблице. Анализы же отображаются в том порядке, в котором они появляются в таблице. Автоматический просмотр можно приостановить, возобновить после приостановки или выключить.

При просмотре серии образцов доступны стандартные функции, предоставляемые ChemStation. К таким функциям относятся калибровка, ручная обработка хроматограмм, например, сглаживание или интегрирование вручную. Любые изменения, внесенные в файл данных, могут быть отмечены и сохранены с файлом серии образцов. Хроматограммы, которые были рассмотрены, отмечаются звездочкой в таблице серии образцов. Также можно отменить изменения, произведенные только в текущей хроматограмме или все изменения во всех хроматограммах в серии образцов.

При загрузке анализа, выбранные параметры обработки выполняются. В том случае, если анализ уже был обработан, и изменения были сохранены, то будет загружен уже обработанный анализ. Это происходит быстрее, чем процесс загрузки необработанных анализов, так как не требуется затрат на обработку.

Калибровка в просмотре серии образцов

Калибровка в просмотре серии образцов работает независимо от параметров повторной калибровки в таблице последовательности. Первым шагом в калибровке серии образцов всегда является замена отклика и времени удерживания, указанных в таблице калибровки. Для следующих калибровочных стандартов значения отклика и времени удерживания усредняются.

Отчетность серии образцов

Настраиваемая пользователем “Таблица для серии образцов” на странице 160, может быть напечатана непосредственно на принтере, отображена на экране или распечатана в файл, с указанным пользователем префиксом, в одном из следующих форматов:

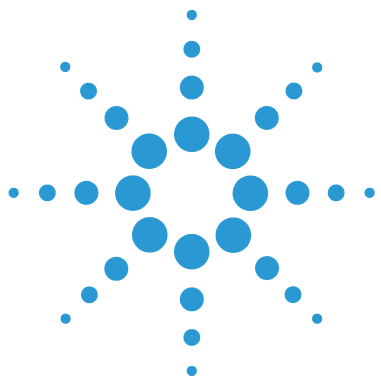
- текстовый файл с расширением .TXT формата UNICODE
- Формат обмена данных с расширением .DIF
- Формат значений, разделенных запятыми, с расширением .CSV
- Формат Microsoft Excel с расширением .XLS.

Варианты отчетности также дают возможность сортировки образцов (по Индексу анализа, Типу образца или Методу) независимо от метода сортировки в таблице серии образцов. Приоритеты сортировки аналогичны, описанным в “Таблица для серии образцов” на странице 160.

Архив серии образцов

Просмотр серии образцов поддерживает журнал всех действий, связанных с текущей серией образцов. Любое действие, которое изменяет серию образцов (например, изменение отображаемой хроматограммы, изменение типа образца, загрузки и сохранение серии образцов), добавляет строку к архиву серии образцов с отметками даты и времени, текущего имени оператора и описание события.

Можно также добавлять собственные комментарии к архиву серии образцов. Существующие записи архива серии образцов не могут быть изменены, и список архива не может быть доступен кроме как через вызов пункта меню Архив серии образцов.



9 Отчетность

Что представляет собой ACAML? [166](#)

Схема ACAML [167](#)

Создание отчета для коэффициентов фармакопеи в ChemStation [168](#)

В этом разделе объясняется и предоставляется ссылка на схему ACAML, используемую в программируемом отчете intelligent reporting программного обеспечения OpenLAB CDS.



Что представляет собой ACAML?

ACAML, *Agilent Common Analytical Markup Language* (Общий язык разметки аналитических данных Agilent) является языком разметки для сбора и описания аналитических данных в домене хроматографии и спектрометрии. ACAML разработан для описания всех типов данных в аналитических средах. ACAML ориентирован на обеспечение общего стандарта Agilent, что позволяет беспрепятственно обмениваться информацией между различными платформами и приложениями.

Подход заключается в определении независимых методик и приложений единой языковой схемы данных. ACAML может быть использован для описания аналитических данных в общем виде, без каких-либо специальных особенностей (например, результаториентированного представления данных): начиная с описания одного прибора или метода до сложных постановок задачи с несколькими приборами, методами, пользователями и сотнями или тысячами образцов.

Никаких дополнительных приложений (вроде специального ACAML-валидатора) не требуется для обработки и проверки документа формата ACAML. Исходная версия ACAML поддерживает только хроматографические данные (ВЭЖХ, ГХ).

Более подробную информацию о ACAML можно найти в руководстве по проектированию на диске поддержки пользователя OLIR designer manual OpenLAB CDS Support DVD (диск номер 6).

Схема ACAML

Основой схемы ACAML является промышленный стандарт XML.

ACAML-схема является строго типизированной:

- для поддержки концепции стандартизированного обмена данными, и
- для того, чтобы избежать неконтролируемого роста самоопределяемых типов, что делает автоматизацию дальнейшей обработки очень сложной или невозможной.

Четкость схемы гарантирует, что каждый документ этого формата хорошо определен, а целостность ссылок между всеми объектами гарантирована. Никаких дополнительных приложений (вроде специального ACAML-валидатора) не требуется для обработки и проверки документа формата ACAML.

Определение схемы последней версии можно найти на DVD-диске поддержки пользователя OpenLAB CDS Support DVD (диск номер 6).

Создание отчета для коэффициентов фармакопеи в ChemStation

Коэффициенты из таблицы пика, согласно требованиям Фармакопеи США, Европейской и Японской Фармакопеи, доступны для использования в отчетах ChemStation. В таблице ниже представлен обзор имеющихся коэффициентов, их определения и значение названий. Для более подробной информации о расчетах, следует обратиться к соответствующим разделам данного руководства.

Таблица 11 Учет терминов фармакопеи при составлении отчета ChemStation

Фармако- пея США	Европей- ская Фар- макопея:	Японская Фарма- копея:	Уравнение	классическое создание отчета (RLE)	программируемое создание отчета intelligent reporting (RTE)
Коэф- фициент размыв- ания	Коэффи- циент симмет- ричности	Коэф- фициент симмет- ричности	$S = W_{0,05h}/2f$	USP Tailing	Peak_TailFactor
-	Относи- тельное удержива- ние (скор- ректирова- нное)	Коэф- фициент раздел- ения	$r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$		RelativeRetTime_EP
Относите- льное удержива- ние	-	-	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ T_R пика a < T_R пика b	Selectivity (Селективность)	Peak_Selectivity
-	Разреше- ние	Разреш- ение	$R_s = 1,18 \Psi(t_{R2}-t_{R1}) / (W_{0,5h1}+W_{0,5h2})$	Resolution (EP) Resolution (JP)	Peak_Resolution_EP Peak_Resolution_JP
-	-	-	$R = \frac{(2.35/2)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Resolution (Разрешение)	Peak_Resolution_Classic
Разреш- ение	-	-	$R_s = 2,0 \Psi(t_{R2}-t_{R1}) / (W_1-W_2)$	-	Peak_Resolution_USP

Таблица 11 Учет терминов фармакопеи при составлении отчета ChemStation

Фармако- пея США	Европей- ская Фар- макопея:	Японская Фарма- копея:	Уравнение	классическое создание отчета (RLE)	программируемое создание отчета intelligent reporting (RTE)
Эффек- тивность			$N = 16\chi(t/W)^2$	Plates Tangent method	Peak_TheoreticalPlates_ USP
-	Эффе- ктивность	Эффе- ктивность	$N = 5,54\chi t_R^2 / W_{0,5h}^2$	Plates halfheight method	Peak_TheoreticalPlates_ EP
Относите- льное время удержива- ния	Относите- льное время удержива- ния		$Rr = t_2/t_1$	-	Peak_RelativeRetTime
	Отноше- ние Сиг/Шум	Отно- шение Сиг/Шум	$Сиг/Шум = 2H/h$	-	Peak_SignalToNoise_EP
Отно- шение высоты пика к высоте точки впадины	Отношени- е высоты пика к высоте точки впадины		$p/v = H_p/H_v$	PeakValleyRatio	Peak_PeakValleyRatio

9 Отчетность

Создание отчета для коэффициентов фармакопеи в ChemStation



10 Верификация системы

- Режимы отображения верификации и диагностики 172
 - Верификация системы 172
- Регистр сохранения данных GLP GLPsave 176
- Функция тестирования детектора с диодной матрицей 178
 - Обзор функции тестирования детектора с диодной матрицей 178

В этом разделе описываются функции верификации и особенности проверки GLP для ChemStation.



Режимы отображения верификации и диагностики

ChemStation содержит два дополнительных режима отображения для выполнения задач верификации и диагностики, если они проводятся с помощью настроенного прибора, например, модулей для ВЭЖХ Agilent серии 1100/1200. Для получения дополнительной информации следует обратиться к сервису онлайн поддержки ChemStation.

Верификация системы

Верификация системы является базовой составляющей повседневного использования аналитических приборов в сертифицированной лаборатории. Сервисы верификации GLP ChemStation разработаны, чтобы помочь в подтверждении того, что программное обеспечение или соответствующие элементы программного обеспечения функционируют или функционировали корректно во время конкретного анализа.

Функция проверки ChemStation позволяет верифицировать корректность работы программного обеспечения ChemStation. Это можно сделать путем переобработки файлов данных с использованием специфичных методов и сравнения полученных результатов с заранее определенным стандартом. Функция верификации является особенно важной для проверки достоверности результатов интегрирования и количественного анализа.

Можно использовать стандартный тест верификации или установить собственные тесты с использованием собственного метода и файлов данных, для проверки наборов алгоритмов программного обеспечения, используемых методами анализа. Тест верификации является защищенным файлом и не может быть изменен или удален.

Пункт "Verification" (Верификация) в режиме "Data Analysis" (Анализ данных) позволяет выбрать любой из следующих вариантов:

- анализ теста верификации из базы данных,
- установить новый тест верификации и добавить его в базу данных, и

- удалить тест верификации из базы данных.

Раздел "How To" (Как сделать?) сервиса онлайн поддержки ChemStation описывает как выполнить эти задачи. При выполнении теста верификации ChemStation можно выбрать, следует ли полностью выполнить проверку или использовать определенный набор ее составляющих.

Результаты теста верификации сохраняются по умолчанию в двоичном формате в подкаталог: c:\CHEM32\1\Verify, вместе с методом и файлами данных. Подкаталог Verify (Проверка) находится на том же уровне, что и подкаталоги последовательности, методов и данных. Результаты можно отправить на принтер или сохранить в файл. Результаты теста, включающие в себя объединенный результат теста верификации, оцениваются как удовлетворительные либо неудовлетворительные.

Доступны следующие компоненты теста верификации:

Цифровая электроника (только для диодно-матричных детекторов Agilent серии 1100/1200)

Тестовая хроматограмма хранится в детекторе с диодной матрицей. Эта хроматограмма передается ChemStation после того, как прошла через те же этапы, как и обычные необработанные данные от фотодиодов. Полученные данные сравниваются с данными исходных результатов, записанных в ChemStation для этой тестовой хроматограммы. Если обнаруживается несоответствие, то тест признается неудовлетворительным. Этот тест гарантирует, что электроника детектора с диодной матрицей, которая совершает предварительную обработку данных, работает корректно. Так как используется записанная тестовая хроматограмма, лампа или диодная матрица не являются частью этого теста. Они могут быть проверены, используя ["Функция тестирования детектора с диодной матрицей"](#) на странице 178.

Интегрирование пика

Файл данных интегрируется снова, используя исходный метод. Результаты сравниваются с исходными результатами интегрирования, записанными в регистре верификации. Если обнаруживается несоответствие, то тест признается неудовлетворительным.

Количественный анализ соединения

Вещества в файле данных снова подвергаются количественному анализу. Результаты сравниваются с исходными результатами количественного анализа, записанными в регистр верификации. Если обнаруживается несоответствие, то тест признается неудовлетворительным.

Печать отчета

Исходный отчет печатается снова.

На следующей странице показан пример успешно выполненного теста верификации.

ChemStation Verification Test Report

Tested Configuration:

Component	Revision
ChemStation for LC 3D ChemStation	B.01.01
Microsoft Windows	Microsoft Windows XP
Processor	Processor_Architecture_Intel
CoProcessor	yes

ChemStation Verification Test Details:

Test Name : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL
 Data File : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL\VERIFY.D
 Method : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL\VERIFY.M
 Original Datafile : VERIFY.D
 Original Acquisition Method : VERIFY.M
 Original Operator : Hewlett-Packard
 Original Injection Date : 4/16/93 11:56:07 AM
 Original Sample Name : Isocratic Std.

Signals Tested:

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=450,80 of VERIFY.D

ChemStation Verification Test Results:

Test Module	Selected	For Test	Test Result
Digital electronics test	No		N/A
Integration test	yes		Pass
Quantification test	yes		Pass
Print Analytical Report	No		N/A

ChemStation Verification Test Overall Results: Pass

Регистр сохранения данных GLP GLPsave

Регистр сохранения данных GLP сохраняется в конце каждого анализа при выборе его в контрольном списке во время разгонки. Он содержит следующую информацию:

- сигналы,
- регистрационный журнал,
- таблицу результатов интегрирования,
- таблицу результатов количественного анализа,
- данные о режиме работы прибора и
- метод анализа данных.

Этот регистр полностью защищен от изменений, накопленных во время анализа. Можно вызывать его в любое время в будущем, как доказательство точности аналитических методов.

Вкладка GLPsave Register (Регистр сохранения данных GLP) в режиме отображения "Data Analysis" (Анализ данных) позволяет просматривать файл регистра сохранений GLP в любое время. Файл защищен по контрольной сумме и записан в виде двоичного кода, для того чтобы он не был изменен.

В диалоговом окне используемом для просмотра регистра сохранений GLP, можно выбрать следующие варианты просмотра:

- загрузить исходный метод,
- загрузить исходные сигналы,
- загрузить данные о режиме работы прибора,
- распечатать исходный метод,
- распечатать исходные результаты интегрирования,
- распечатать исходные результаты качественного анализа и
- сформировать исходный отчет из исходного метода и сигналов.

Можно использовать функцию просмотра GLP, чтобы показать, что хроматографические данные являются подлинными, доказать качество анализа из данных о режиме работы прибора и продемонстрировать подлинность интерпретации данных.

Например, можно:

- перезагрузить и перепечатать часть анализа данных метода, используемого во время анализа образца, чтобы доказать, что оценка данных, представленная как результаты анализа, не была изменена никаким образом и
- просмотреть без пересчета результаты интегрирования и количественных анализов, чтобы доказать подлинность отчета.

Функция тестирования детектора с диодной матрицей

Тестирование детектора может быть использовано как этап в рутинной процедуре валидации системы аналитического прибора в сертифицированной лаборатории.

Тест детектора с диодной матрицей оценивает эксплуатационные характеристики детектора. При выборе пункта DAD test (Тест детектора с диодной матрицей) из меню Instrument (Прибор) (только для ЗДЖХ и КЭ), прибор проверяется по интенсивности и калибровке длин волн. При нажатии кнопки Save (Сохранить), результаты тестирования автоматически сохраняются в базу данных Тест детектора с диодной матрицей, файл регистра, названный DADTest.Reg размещается по умолчанию в папке прибора.

Обзор функции тестирования детектора с диодной матрицей

Функция **Review DAD Test** в анализе данных меню View (Вид) позволяет просматривать файл DADTest.Reg в любой момент времени. Файл защищен по контрольной сумме и записан в виде двоичного кода, для того, чтобы он не был изменен.

Можно выбрать любые из следующих сведений теста детектора с диодной матрицей для просмотра:

Show Holmium Spectra	Участки всех спектров гольмия перечислены в таблице просмотра тестирования DAD. Активный спектр помечается.
Show Intensity Spectra	Участки всех спектров интенсивности перечислены в таблице просмотра тестирования DAD. Активный спектр помечается.
Save as New Database	При замене лампы в детекторе с диодной матрицей, можно обновить Тест детектора с диодной матрицей, удалив нежелательные результаты тестирования из таблицы, а затем, с помощью этой функции, сохранить как новую базу данных.
Show Selected Spectra	Отображаются только выбранные в таблице спектры.

**Show Intensity
Graph**

Можно начертить график интенсивности, чтобы указать срок службы лампы в детекторе с диодной матрицей. График отображает функцию максимальной интенсивности лампы в зависимости от времени.

Словарь элементов интерфейса

A

all valleys
Все минимумы между пиками

Apply Manual Events from Method
Применение событий интегрирования вручную в методе

Area reject
Исключаемая площадь

Area Sum
Подсчет площади

Area Sum Slice
Частичный подсчет площади

Area%
процент от площади

Autointegrate
Автоматическое интегрирование

Autostep interval
Интервал автоматического шага

Average
Усреднение

B

baseline point
Точка базовой линии

Baseline tracking (no penetration)
Наложение базовой линии (без провала)

Batch
Группа

C

Calculate signals separately
Расчет сигналов отдельно

Calculate Signals Separately
Расчет сигналов отдельно

Calculate with Corrected Areas
Расчет с исправленными площадями

Calibration Settings
Настройки калибровки

capillary isoelectric focusing calibration
Калибровка капиллярного электрофореза по изоэлектрическим точкам

CE Mobility
Подвижность КЭ

Classical Baseline Tracking (no penetrations)
Классическое отслеживание базовой линии (без провалов)

Compound Details
Сведения о соединении

D

Data Analysis
Анализ данных

Delete Peak(s)
Удаление пика(ов)

Description
Описание

Destination
Назначение

DNA base-pair calibration
Калибровка по паре оснований ДНК

Draw Baseline
Проведение базовой линии

E

Effective Mobility Correction
Коррекция эффективной подвижности

Extended Performance
Расширенные эксплуатационные параметры

Extended Statistic Parameters
Расширенные статистические параметры

F

Floating Average
Плавающее среднее значение

G

General Info
Общая информация

H

height reject
Исключаемая высота

Height reject
Исключаемая высота

Height Reject
Исключаемая высота

Height%
проценту от высоты

I

Ignore
Пропуск

Initial Peak Width
Начальная ширина пика

Instrument curves

Графики прибора

Integration

Интегрирование

integration events

События интегрирования

Integration Events Table

Таблица событий интегрирования**L**

Last Result Mode

Режим последнего результата**M**

Manual Events

**События интегрирования
вручную**

Manual Integration

Интегрирование вручную

Method and Run Control

Метод и Контроль анализа**N**

Navigation Table

Таблицы навигации

Negative Peaks

Отрицательные пики

Norm%

**Процентного с использованием
нормативного состава****O**

operator

оператор**P**

parts of method to run

части метода анализа

peak matching

сопоставления пиков

peak width

Ширина пика

Peak Width

Ширина пика

Performance

Эксплуатационные параметры

Performance+LibSearch

**Эксплуатационные
параметры+Библиотечный поиск**

Performance+Noise

**Эксплуатационные
параметры+Уровень шума**

Preferences

Предпочтения

Preferences / Signal/Review

**Предпочтения /
Сигнал/Просмотр**

Print Current Sequence

**Распечатка текущей
последовательности**

protein molecular weight calibration

**калибровкой по молекулярному
весу белка**

Protein molecular weight calibration

**Калибровка по молекулярному
весу белка****Q**

Quantification Parameters

Количественные параметры

Quantitation Settings

**Настроек количественного
анализа**

QuantParm

Количественные параметры**R**

Recalculate

Пересчет

Recalculate with Method

Пересчет на основе метода

Recalibration Settings

**Параметры повторной
калибровки**

Relative Mobility Correction

**Коррекция относительной
подвижности**

Remove Manual Events from Method

**Удаление событий
интегрирования вручную из
метода**

Replace

Замена

reprocess

переобработка

Reprocessing only

Только повторная обработка

Review DAD Test

**Обзор функции тестирования
детектора с диодной матрицей****S**

Sample Information

Информация о пробе

Save as New Database

Сохранение новой базы данных

Save Current Sequence

**Сохранение текущей
последовательности**

Sequence Output

**Вывод результатов
последовательности**

Sequence Parameters

Параметры последовательности

Sequence Summary Parameters
Сводные данные параметров
последовательности

Sequence Table
Таблица последовательности

Set Baseline from Range
Установление базовой линии из
диапазона

Set Low Baseline from Range
Установление минимума
базовой линии из диапазона

Shoulder detection
Выявление уступов

Show Holmium Spectra
Показ спектра гольмия

Show Intensity Graph
Показ графика интенсивности

Show Intensity Spectra
Показ спектров интенсивности

Show Selected Spectra
Показ выбранных спектров

Signal
Сигнал

Signal/Review Options
Опции сигнал/просмотр

SignalCorrWin
Интервал соотношения сигнала

Slope Sensitivity
Чувствительность к наклону

Specify Report
Установки отчета

Split Peak
Разделитель пика

Standard Calibration
Стандартная калибровка

Start Autostepping
Начать автоматическое
перешагивание

Status
Состояние

Subtract Background
Вычитание фона

T

Tail Skim Height Ratio
Отношение высот основного пика
и пика-наездника

Tangent Skim
Отделение касательной

U

Unique Folder Creation
Создание уникальной папки

Update Manual Events of Method
Обновление событий
интегрирования метода вручную

Use Sequence Table Information
Использование информации
таблицы последовательности

UseQualifiers
Использование уточнений

Using Compound
Используемое вещество

V

Valley
Впадина

Valley Height Ratio
Отношение высот
пика-наездника и точки впадины

W

With method
На основе метода

Индекс

А

абсолютное
время удерживания 66, 68
абсолютный
коэффициент отклика 86
автоматический
просмотр серии образцов 163
автоматическое интегрирование 58
аналоговый сигнал 10

В

верификация системы 172
верификация 172
вершина пика 24, 31
вершина 19
внешний стандарт 90
метод 90
подсчет 90
внутренний стандарт 95
метод 95
обнаружение пиков 75
подсчет 95
временной интервал
удерживание/миграция 68
временные параметры 55
время начала 19
время окончания 19
время удерживания
абсолютное 66, 68
относительное 66
скорректированное 66
скорректированное 70
выявление уступов 52

Г

график
калибровка 78
группировка 29

Д

доверительный интервал (CI) 129
доверительный интервал 129

Ж

журнал 12

И

идентификация пика
что это? 64
типы 66
интегрирование вручную 60
интегрирование 17
вручную 60
исходные события 51
интервал идентификации 69
интервалы времени
удерживания 69
исключаемая высота 52, 53
исключаемая площадь 52
исходная базовая линия 19, 21

К

калибровка
график 78
настройки 98
калибровочная кривая
описание 78

что это? 78

квалификаторы 72
ключевые точки 24
коды разделения пика 46
количественные ограничения 67
количественный анализ
метод внешнего стандарта 90
метод внутреннего
стандарта 95
расчеты 85
что это? 84
конец пика 24, 31
контрольные пики
использование 70
множественные 72
обнаружение 75
одиночные 70
коэффициент емкости 120
коэффициент отклика
абсолютный 86
коэффициент разбавления 87, 91, 94
коэффициент размывания t 120
коэффициент размывания по
требованиям Фармакопеи
США 120
коэффициент симметричности
Европейская Фармакопея 120
Японская Фармакопея 120
коэффициент удерживания 120
коэффициент умножения 91
критерии отделения 42

М

мертвое время 116

мертвый объем 116
 метод
 состояние 14
 многоуровневые калибровки 95
 множественные
 контрольные пики 72
 множитель 86, 94
 монитор
 сигнал 12
 состояние прибора 14

Н

настройка интегрирования 53
 начало пика 24, 30
 начальная ширина пика 51
 не выявленные пики 45
 недействительное время 116
 неопознанные пики
 классификация 76
 нормализующий фактор 95

О

образец
 количество 87
 одиночные контрольные пики 70
 онлайн
 мониторы 12
 определение шума по методу
 Американского общества по
 испытанию материалов
 (ASTM) 107
 определение шума 104
 Американское общество по
 испытанию материалов
 (ASTM) 107
 определения
 воспроизводимости 127
 определения линейности
 проверки 127

остаток
 относительный 79
 стандартное отклонение 79
 отделение переднего склона
 пика 44
 отделяющая касательная
 режимы отделения 39
 отклик
 отношение 73
 относительное
 время удерживания 66
 относительное удерживание 123
 отношение высоты пика к высоте
 точки минимума между пиками 37
 Отношение сигнал-шум
 Европейская фармакопея 110
 отрицательный пик 23
 отслеживание базовой линии 21,
 36, 37
 отчетность серии образцов
 выходные форматы 164

П

перекося 118
 пик растворителя 49
 пик
 время удерживания 70
 высота 88
 идентификация 64
 интервал времени
 удерживания 69
 квалификаторы 72, 67, 65
 количественный анализ 84
 отклик 73
 правила сопоставления 65
 процесс идентификации 75
 симметричность 113
 характеристика 99, 117
 площадь пика 26, 48
 подсчет отношения сигнал-шум

без базового контрольного
 сигнала 109
 подсчет
 с калибровкой 89
 без калибровки 88
 внешний стандарт 90
 внутренний стандарт 95
 подсчеты без калибровки 88
 поправочные коэффициенты 86
 построение базовой линии 34
 Правила организации работ в
 лаборатории 101
 Правила организации работ на
 производстве 101
 прибор
 состояние 14
 пригодность системы
 включенная статистика 101
 ограничения 102
 провал базовой линии 35
 производная 21, 27
 просмотр серии образцов
 автоматический 163
 архив 164
 вручную 163
 интерфейс пользователя 162
 процент от высоты
 подсчет 88
 процент от площади
 подсчет 88
 процентный расчет 88
 процентный с использованием
 нормативного состава
 отчет 93
 подсчет 93

Р

рабочие характеристики
 определения проверки 117
 размещение базовой линии 22, 34

разрешающая способность
 Фармакопея США 124
 распознавание пика 30
 фильтр 27
 распределение t 129
 расчет
 количественный анализ 85
 симметричность пика 113
 регрессионный анализ 130
 регрессия
 коэффициент регрессии 131

С

сбор данных 10
 селективность 123
 серия образцов
 конфигурация 160
 отчет 161
 таблица соединения 161
 сигнал 10
 монитор 12
 система
 состояние 13
 системные
 сообщения 12
 склон 20
 скорректированное время
 удерживания 66, 70
 события интегрирования 19, 51
 события
 интегрирование 51
 создание отчета
 термины фармакопеи 168
 сообщения о событиях 12
 сообщения об ошибке 12
 состояние
 прибор 14
 стандартное отклонение
 выборка 128

определение 131
 остаток 79
 относительное 128
 среднего 128
 стандарт
 внешний 90
 внутренний 95
 статистические моменты 118

Т

таблица для серии образцов
 конфигурация 160
 таблица калибровки 64
 таблица серии образцов
 отчетность 164
 удаленный тип образца 160
 таблица соединения 161
 термины фармакопеи 168
 точность
 числовой формат 132
 Требования к автоматизации работ в
 лаборатории. 101
 требования контроля 161

У

уступ 20, 32

Ф

файл данных 10
 файлы данных 160
 фильтр
 распознавание пика 27
 форматы файла
 отчет серии образцов 164
 формулы пригодности системы
 время удерживания 116
 коэффициент емкости 120
 коэффициент размывания,
 Фармакопея США 120

коэффициент регрессии 131
 коэффициент
 симметричности 120
 мертвое время 116
 мертвый объем 116
 недействительное время 116
 относительное стандартное
 отклонение 128
 относительное
 удерживание 123
 разрешающая способность 124
 регрессионный анализ 130
 среднее значение 127
 стандартное отклонение 131,
 128
 число теоретических
 тарелок 121
 ширина пика 119
 формулы
 общие определения 116
 определения проверки рабочих
 характеристик 117

Ц

цветовая маркировка 14
 цифровой сигнал 10

Ч

число теоретических тарелок 121
 чувствительность к наклону 52

Ш

ширина пика 26, 52
 x% от высоты 119
 касательная 119

В этой книге

Данное руководство содержит справочную информацию о принципах работы, расчетах и алгоритмах анализа данных, используемых в Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition.

Информация, содержащаяся в данном документе, может быть использована специалистами по валидации для планирования и выполнения задач проверки системы.

© Agilent Technologies 2010-2013, 2014

Printed in Germany
01/2014



M8301-98025



Agilent Technologies