



OpenLab ChemStation

Guía de referencia de Data Analysis

Avisos

Inf. del documento:

N.º doc.: D0013749es Rev. A.1
Edición: 02/2025

Copyright

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2025

No se permite la reproducción de parte alguna de este manual bajo cualquier forma ni por cualquier medio (incluyendo su almacenamiento y recuperación electrónicos y la traducción a idiomas extranjeros) sin el consentimiento previo por escrito de Agilent Technologies, Inc. según lo estipulado por las leyes de autor locales aplicables al contexto específico.

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn (Alemania)

Revisión de software

Esta guía es aplicable a la versión LTS 01.11 de Agilent OpenLab ChemStation.

Garantía

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

Licencias sobre la tecnología

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

Leyenda sobre derechos restringidos

Derechos restringidos del Gobierno de los Estados Unidos. Los derechos sobre el software y los datos técnicos otorgados al gobierno federal incluyen sólo los derechos que habitualmente se otorgan a los clientes usuarios finales. Agilent proporciona esta licencia comercial habitual en software y datos

técnicos de conformidad con la TFA 12.211 (Datos técnicos) y 12.212 (Software informático) y, para el Departamento de Defensa, DFARS 252.227-7015 (Datos técnicos - Artículos comerciales) y DFARS 227.7202-3 (Derechos sobre software informático comercial o documentación de software informático).

Avisos de seguridad

PRECAUCIÓN

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

ADVERTENCIA

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

En esta guía...

Esta guía está destinada a usuarios avanzados, administradores de sistemas y personas encargadas de la validación del software Agilent OpenLab ChemStation. Contiene información de referencia sobre los principios de funcionamiento, los cálculos y los algoritmos de análisis de datos utilizados en la versión LTS 01.11 de OpenLab ChemStation.

Utilice esta guía para verificar la funcionalidad del sistema con respecto a las especificaciones de requisitos de usuario y para definir y ejecutar las tareas de validación del sistema definidas en su plan de validación. Los siguientes recursos contienen información adicional.

- Para los tutoriales de iniciación: Consulte los módulos de aprendizaje, a los que se puede acceder desde la plataforma de recursos y formación para usuarios de OpenLab ChemStation.
- Para información sobre tareas contextuales específicas (“cómo” hacer algo), referencias a la interfaz de usuario y ayuda para la resolución de problemas: El sistema de ayuda en línea de ChemStation.
- Para conceptos y flujos de trabajo de OpenLab ChemStation: El manual Conceptos básicos y flujos de trabajo de OpenLab ChemStation.
- Para obtener más información sobre la instalación del sistema y el sitio de preparación de instalaciones: La Guía de instalación de la estación de trabajo de OpenLab ChemStation o la Guía de instalación de estaciones de trabajo en red y sistemas distribuidos de OpenLab ChemStation, respectivamente.
- Para obtener más información sobre los principios y tareas de administración del sistema: la Guía del administrador de la estación de trabajo de OpenLab ChemStation.

De aquí en adelante, el término ChemStation hará referencia a Agilent OpenLab ChemStation.

1 Integración

En este capítulo se describen los conceptos y los algoritmos del integrador de ChemStation.

2 Identificación de picos

En este capítulo se describen los conceptos de identificación de picos.

3 Calibración

En este capítulo se detallan los cálculos utilizados en el proceso de calibración.

4 Cuantificación

En este capítulo se describe cómo se cuantifican los compuestos y se explican los cálculos utilizados para la cuantificación.

5 Idoneidad del sistema

En este capítulo se describe qué puede hacer OpenLab CDS para evaluar el rendimiento del instrumento analítico y el método analítico.

6 Cálculos específicos de CE

Este capítulo es importante únicamente si se utiliza ChemStation para controlar instrumentos de CE.

7 Verificación del sistema

En este capítulo se describen la función de verificación y las funciones de verificación GLP de ChemStation.

Contenido

1 Integración 7

Definición de la integración	8
Algoritmos del integrador de ChemStation	10
Principio de funcionamiento	15
Reconocimiento de picos	16
Medida del área de pico	26
Asignación de la línea de base	29
Eventos de integración	41
Integración manual	63

2 Identificación de picos 66

Definición de la identificación de picos	67
Reglas de asignación de picos	68
Tipos de identificación de picos	69
Tiempo de retención o migración absoluto	70
Tiempos de retención/migración corregidos	72
Cualificadores de pico	74
El proceso de identificación	76

3 Calibración 78

Definición de la calibración	79
Curva de calibración	80
Cálculo de la curva de calibración	81
Calibración de grupo	85
Opciones de recalibración	86

4 Cuantificación 87

Definición de la cuantificación	88
Factores de corrección	89
% de área y % de altura	91

Cuantificación de compuestos calibrados 92

Cuantificación de picos no calibrados 97

Cálculo de % Norm 99

5 Idoneidad del sistema 100

Evaluación de rendimiento de pico 101

Evaluación de la idoneidad del sistema 101

Determinación del ruido 104

Cálculo de la asimetría y simetría de pico 115

Fórmulas y cálculos de idoneidad del sistema 117

Definiciones generales 118

Definiciones del test de rendimiento 119

Definiciones de la reproducibilidad 131

Acceso al número de doble precisión almacenado internamente 136

6 Cálculos específicos de CE 139

Tablas de calibración 140

Calibración con corrección de la movilidad 143

Estilos de información especiales de electroforesis capilar 149

Áreas de picos corregidas 150

Idoneidad del sistema para electroforesis capilar 151

CE-MSD 152

7 Verificación del sistema 153

Ventanas de verificación y diagnóstico 154

Registro GLPsave 157

Función del test del DAD 158

1

Integración

Definición de la integración	8
Funciones de la integración	8
Capacidades del integrador	9
Algoritmos del integrador de ChemStation	10
Introducción	10
Definición de la línea de base inicial	11
Seguimiento de la línea de base	12
Asignación de la línea base	13
Definición de términos	14
Principio de funcionamiento	15
Reconocimiento de picos	16
Anchura de pico	16
Filtros de reconocimiento de picos	17
Agrupamiento	18
Algoritmo de reconocimiento de picos	19
Picos solapados	21
Hombros	22
Construcción de la línea de base por defecto	23
Códigos de separación de picos	24
Medida del área de pico	26
Determinación del área	26
Unidades y factores de conversión	28
Asignación de la línea de base	29
Inicio de la línea base	29
Final de la línea base	29
Modos de corrección de la línea de base	30
Relación pico a valle	32
División tangencial	33
Eventos de integración	41
Eventos de integración para todas las señales	41
Eventos iniciales	44
Eventos programados	49
Integración automática	61
Integración manual	63
Almacenamiento de eventos de integración manual	64

En este capítulo se describen los conceptos y los algoritmos del integrador de ChemStation.

Definición de la integración

La integración busca los picos en una señal y calcula su tamaño.

La integración es un paso necesario para:

- Identificación
- cualificación
- calibración
- cuantificación,
- cálculos de pureza de pico y
- búsqueda en bibliotecas de espectros.

Funciones de la integración

Cuando se integra una señal, el software:

- identifica el tiempo de inicio y el tiempo final de cada pico,
- encuentra el máximo de cada pico, es decir, el tiempo de retención o migración,
- construye una línea de base, y
- calcula el área, la altura, la anchura de pico y la simetría correspondientes a cada pico.

Este proceso se controla por medio de parámetros denominados eventos de integración.

Capacidades del integrador

Los algoritmos del integrador incluyen las siguientes capacidades clave:

- posibilidad de integración automática para configurar los parámetros iniciales del integrador,
- la capacidad de definir tablas individuales de eventos de integración para cada señal cromatográfica o electroferográfica si se usan varias señales o más de un detector,
- definición interactiva de eventos de integración que permite a los usuarios seleccionar gráficamente los tiempos de los eventos,
- integración gráfica manual de cromatogramas o electroferogramas que requieren la interpretación humana (estos eventos también se pueden registrar en el método y usarse como parte de la operación automatizada),
- anotación de los resultados de integración,
- definiciones de parámetros del integrador para fijar o modificar los valores básicos de rechazo por área, rechazo por altura, anchura de pico, sensibilidad de pendiente, detección de hombros, corrección de la línea base y detección de división tangencial frontal/de cola,
- parámetros de control de línea base, como forzar línea base, mantener línea base, línea base en todos los valles, línea base en el siguiente valle, ajustar línea base hacia atrás, desde el final al pico actual,
- control de suma del área,
- reconocimiento de picos negativos,
- detección de la definición de picos de disolvente
- comandos de control del integrador que definen los rangos de tiempos de retención o migración para la operación de integración,
- la asignación de hombros de pico mediante el uso de cálculos de segunda derivada,
- muestreo mejorado de puntos de datos no equidistantes para un mejor comportamiento con ficheros de datos LC-DAD reconstruidos a partir de espectros DAD.

Algoritmos del integrador de ChemStation

Introducción

Para integrar un cromatograma o electroferograma, el integrador:

- 1 define la línea base inicial,
- 2 realiza un seguimiento de la línea base y la actualiza continuamente,
- 3 identifica tiempo de inicio para un pico
- 4 encuentra el máximo de cada pico,
- 5 identifica el tiempo final para el pico
- 6 construye una línea base, y
- 7 calcula el área, la altura y la anchura de pico correspondientes a cada pico.

Este proceso se controla por medio de **integration events**. Los eventos más importantes son sensibilidad de pendiente inicial, anchura de pico, corrección de la línea base, rechazo por área y rechazo por altura. El software permite al usuario fijar los valores iniciales de éstos y otros eventos. Los valores iniciales tienen vigencia al comienzo del cromatograma. De forma adicional, la función de integración automática proporciona un conjunto de eventos iniciales que el usuario puede optimizar posteriormente.

En la mayoría de los casos, los eventos iniciales darán buenos resultados de integración en todo el cromatograma, si bien habrá ocasiones en las que el usuario prefiera tener un mayor control sobre el progreso de la integración.

El software permite controlar el modo en que se lleva a cabo una integración mediante la programación de nuevos eventos de integración en determinados momentos del cromatograma.

Para obtener más información, consulte “Eventos iniciales” en la página 44.

Definición de la línea de base inicial

Puntos cardinales

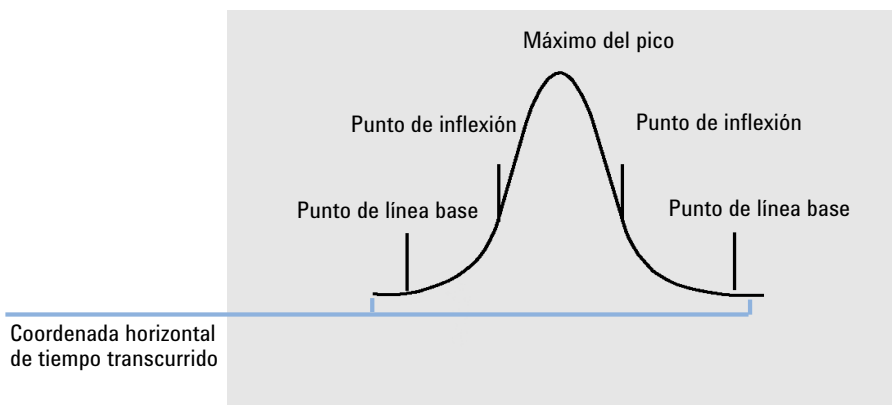


Figura 1 Puntos cardinales

Definición de la línea base inicial

Puesto que las condiciones de la línea base pueden variar en función de la aplicación y el detector, el integrador utiliza parámetros obtenidos de ficheros tanto de eventos de integración como de datos para optimizar la línea base.

Para poder integrar los picos, el integrador debe establecer antes un **baseline point**. Al comienzo del análisis, el integrador establece un nivel de línea base inicial tomando el primer punto de datos como punto de línea base provisional. A continuación trata de redefinir ese punto de línea base inicial utilizando el promedio de la señal de entrada. Si no obtiene un punto de línea base inicial redefinido, mantiene el primer punto de datos como posible punto de línea base inicial.

Identificación de los puntos cardinales de un pico

El integrador determina que puede estar comenzando a producirse un pico cuando los posibles puntos de línea base se encuentran fuera de la zona de línea base y la curvatura de la línea base excede un cierto valor determinado por el parámetro de sensibilidad de la pendiente del integrador. Si esta condición continúa, el integrador reconoce estar en la pendiente ascendente de un pico y éste se procesa.

Integración

Algoritmos del integrador de ChemStation

Iniciar

- 1 Pendiente y curvatura dentro del límite: prosigue el seguimiento de la línea base.
- 2 Pendiente y curvatura por encima del límite: posibilidad de un pico.
- 3 La pendiente permanece por encima del límite: se reconoce un pico, se define el punto de inicio del pico correspondiente.
- 4 La curvatura se hace negativa: se define el punto de inflexión frontal.

Máximo

- 1 La pendiente pasa por cero y se hace negativa: máximo del pico, se define el punto máximo correspondiente.
- 2 La curvatura se hace positiva: se define el punto de inflexión trasero correspondiente.

Final

- 1 Pendiente y curvatura dentro del límite: se aproxima el final del pico.
- 2 La pendiente y la curvatura se mantienen dentro del límite: se define el fin del pico correspondiente.
- 3 El integrador vuelve al modo de seguimiento de la línea base.

Seguimiento de la línea de base

El integrador muestrea los datos digitales a una velocidad determinada por la anchura de pico inicial o por la anchura de pico calculada a medida que progresa el análisis. Considera cada uno de los puntos de datos como posible punto de línea base.

El integrador determina una *zona de línea base* partir de la pendiente de la línea base, utilizando un algoritmo de seguimiento de la línea base en el que la pendiente viene dada por la primera derivada y la curvatura por la segunda derivada. La zona de línea base se puede visualizar como un cono con la punta situada en el punto de datos actual. Los niveles superior e inferior de aceptación del cono se determinan como sigue:

- + pendiente ascendente + curvatura + desviación de la línea base debe dar un resultado inferior al nivel umbral,
- - pendiente ascendente - curvatura + desviación de la línea base debe dar un resultado más positivo (o menos negativo) que el nivel umbral.

Se suman las áreas durante un tiempo T (anchura de pico esperada). Ese tiempo no puede ser inferior a un punto de datos. El proceso continúa mientras exista una condición de línea base. Se adquieren asimismo medidas de pendiente y curvatura. Si tanto la pendiente como la curvatura son inferiores al umbral, se combinan entre sí dos sumas de áreas y se comparan con la línea base previa. Si el nuevo valor es inferior a la línea base previa, pasa a reemplazar inmediatamente al valor antiguo. Si es superior al valor previo, se graba como nuevo valor provisional de la línea base y se confirmará si un valor más cumple los criterios de planaridad de la pendiente y la curvatura. Esta última limitación no tiene efecto cuando se permiten picos negativos. Durante la fase de línea base, es preciso realizar asimismo comprobaciones para examinar disolventes con rápida elevación de la señal; la elevación puede ser demasiado rápida para permitir la detección de una pendiente ascendente (para cuando se confirma la pendiente ascendente, el criterio de disolvente puede no ser ya válido). En el momento inicial, el primer punto de datos constituye la línea base. Ese valor se reemplaza por el promedio calculado sobre $2T$ si la señal está en base. La línea base se restablece entonces a cada intervalo T (consulte [Figura 2](#) en la página 13).

Definición de términos

Pico de disolvente

El pico de disolvente, generalmente un pico de gran tamaño sin relevancia analítica, no suele integrarse. No obstante, cuando hay pequeños picos de interés analítico con elución cercana al pico de disolvente, por ejemplo en la cola del mismo, es posible establecer condiciones de integración especiales para calcular sus áreas corregidas teniendo en cuenta la contribución de la cola del pico de disolvente.

Hombro (frontal, trasero)

Se producen hombros cuando dos picos eluyen tan cerca el uno del otro que no llega a haber un valle entre ellos que permita resolverlos. Los hombros pueden aparecer en el avance del pico (hombro frontal) o en el rastro del mismo (hombro trasero). Cuando se detectan hombros, éstos pueden integrarse bien mediante división tangencial o mediante líneas de caída verticales.

Pendiente

La pendiente de un pico, que denota el cambio de concentración del componente en función del tiempo, se utiliza para determinar el inicio, el máximo y el final del pico.

Principio de funcionamiento

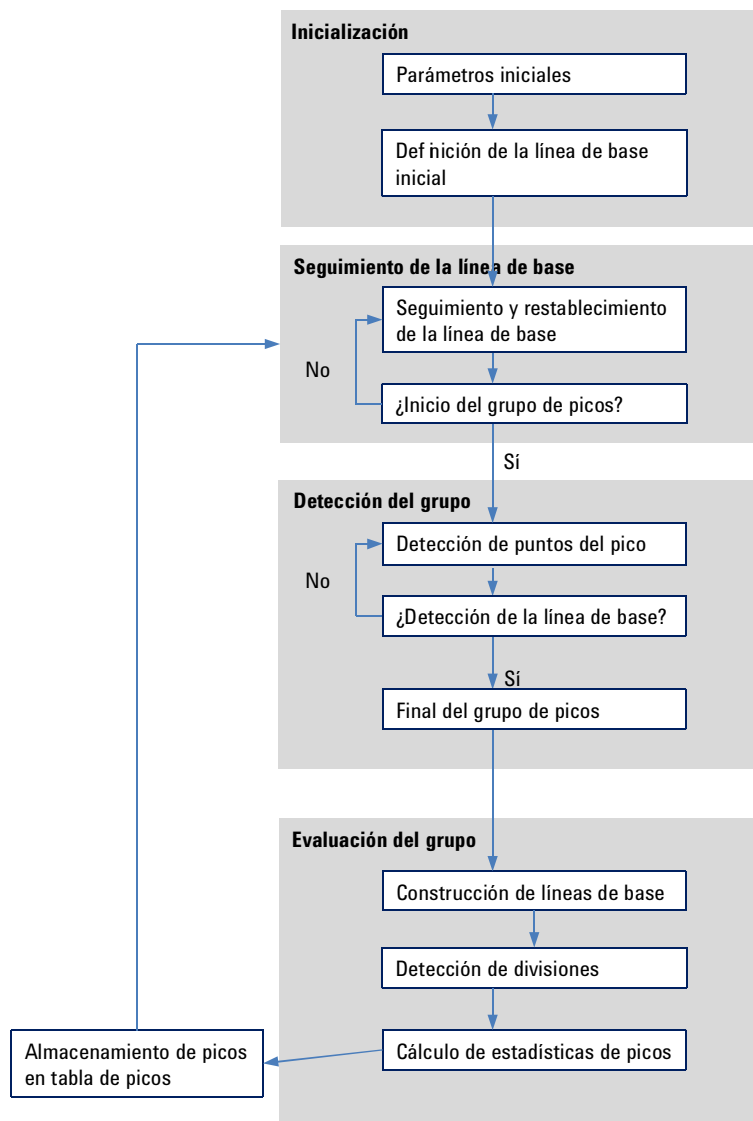


Figura 3 Diagrama de flujo del integrador

Reconocimiento de picos

El integrador utiliza varias herramientas para reconocer y caracterizar un pico:

- anchura de pico;
- filtros de reconocimiento de picos;
- agrupamiento;
- algoritmo de reconocimiento de picos;
- algoritmo de determinación del vértice del pico; y,
- cálculos de efectos no gaussianos (por ejemplo, colas de pico o picos solapados).

Anchura de pico

Durante la integración, se calcula la anchura de pico a partir del área y la altura del pico ajustados:

$$\text{Anchura} = \text{Área ajustada} / \text{Altura ajustada}$$

o, si los puntos de inflexión están disponibles, a partir de la anchura entre los puntos de inflexión.

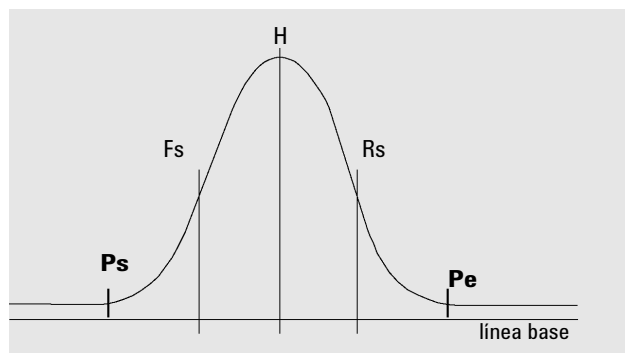


Figura 4 Cálculo de la anchura de pico

En la figura anterior, el área total, A , es la suma de las áreas del inicio del pico (P_s) al fin del pico (P_e), ajustada para la línea de base. F_s es la pendiente frontal en el punto de inflexión, y R_s es la pendiente trasera en el punto de inflexión.

El parámetro de anchura de pico controla la capacidad del integrador para distinguir los picos del ruido de la línea base. Para obtener buenos resultados, la anchura de pico debe ser cercana a la anchura de los picos cromatográficos reales.

Hay tres modos de cambiar la anchura de pico:

- Antes del proceso de integración, el usuario puede especificar la anchura de pico inicial.
- Durante el proceso de integración, el integrador actualiza automáticamente la anchura de pico como corresponda para que coincida con los filtros de reconocimiento de picos.
- Durante el proceso de integración, el usuario puede restablecer o modificar la anchura de pico utilizando un evento programado en el tiempo.

Filtros de reconocimiento de picos

El integrador cuenta con tres filtros de reconocimiento de picos que puede utilizar para reconocer picos mediante la detección de cambios en los valores de pendiente y curvatura dentro de un conjunto de puntos de datos contiguos. Los filtros contienen la primera derivada (para medir la pendiente) y la segunda derivada (para medir la curvatura) de los puntos de datos examinados por el integrador. Los filtros de reconocimiento son los siguientes:

- Filter 1** Pendiente (curvatura) de dos (tres) puntos de datos contiguos
- Filter 2** Pendiente de cuatro puntos de datos contiguos y curvatura de tres puntos de datos no contiguos
- Filter 3** Pendiente de ocho puntos de datos contiguos y curvatura de tres puntos de datos no contiguos

El filtro que se utiliza viene determinado por el valor del parámetro de anchura de pico. Por ejemplo: al comienzo del análisis puede utilizarse el Filtro 1. Si la anchura de pico aumenta durante el análisis, se pasará primero al Filtro 2 y en último término al Filtro 3. Para obtener buenos resultados del uso de los filtros de reconocimiento, los valores fijados para la anchura de pico deben ser cercanos a la anchura de los picos cromatográficos o electroferográficos reales. Durante el análisis, el integrador actualiza la anchura de pico como sea necesario para optimizar la integración.

El integrador calcula la anchura de pico actualizada de distintos modos según la configuración del instrumento:

Integración

Reconocimiento de picos

Para configuraciones LC/CE, el cálculo de anchura de pico por defecto utiliza un cálculo compuesto:

$$0,3 \times (\text{punto de inflexión derecho} - \text{punto de inflexión izquierdo}) + 0,7 \times \text{Área/Altura}$$

Para configuraciones GC, el cálculo de anchura de pico por defecto utiliza el área/la altura. Este cálculo no sobreestima la anchura cuando los picos están solapados por encima del punto de media altura.

En determinados tipos de análisis, por ejemplo análisis GC isotérmicos y LC isocráticos, los picos se ensanchan de forma significativa a medida que progresa el análisis. Para compensar ese efecto, el integrador actualiza automáticamente la anchura de pico a medida que los picos se ensanchan durante el análisis. Lo hace de forma automática salvo que se haya deshabilitado la función de actualización con la anchura de pico fijado por medio de un evento programado.

La actualización de la anchura de pico se pondera del modo siguiente:

$$0,75 \times (\text{anchura de pico existente}) + 0,25 \times (\text{anchura de pico de actual})$$

Agrupamiento

El agrupamiento es el medio que el integrador utiliza para ensanchar continuamente los picos dentro del rango de efecto de los filtros de reconocimiento de picos con el fin de mantener una buena selectividad.

Cuando los picos se ensanchan, el integrador no puede continuar aumentando la anchura de pico de forma indefinida. Llegaría un momento en que los picos fueran tan anchos que no pudieran ser identificados por los filtros de reconocimiento. Para superar esa limitación, el integrador agrupa los puntos de datos entre sí, estrechando en términos prácticos el pico sin que el área se vea alterada.

Cuando se agrupan datos, los puntos de datos se agrupan en dos elevado a la potencia de agrupamiento, o sea, sin agrupar = x1, agrupamiento realizado una vez = x2, realizado dos veces = x4, etc.

El agrupamiento se realiza basándose en la velocidad de datos y la anchura de pico. El integrador utiliza esos parámetros para fijar el factor de agrupamiento de modo que se obtenga el número de puntos de datos apropiado (consulte [Tabla 1](#) en la página 19).

El agrupamiento se realiza en potencias de dos en función de la anchura de pico esperada u obtenida. El algoritmo de agrupamiento se resume en [Tabla 1](#) en la página 19.

Tabla 1 Criterios de agrupamiento

Anchura de pico esperada	Filtro(s) utilizado(s)	Agrupamiento realizado
0 - 10 puntos de datos	Primero	Ninguno
8 - 16 puntos de datos	Segundo	Ninguno
12 - 24 puntos de datos	Tercero	Ninguno
16 - 32 puntos de datos	Segundo	Una vez
24 - 48 puntos de datos	Tercero	Una vez
32 - 96 puntos de datos	Tercero, segundo	Dos veces
64 - 192 puntos de datos	Tercero, segundo	Tres veces

Algoritmo de reconocimiento de picos

El integrador identifica el inicio del pico con un punto de la línea de base determinado por el algoritmo de reconocimiento de picos. El algoritmo de reconocimiento de picos compara en primer lugar los valores de salida de los filtros de reconocimiento de picos con el valor de la sensibilidad de pendiente inicial para aumentar o reducir el valor del acumulador de pendiente ascendente. El integrador define el punto en el que el valor del acumulador de pendiente ascendente es ≥ 15 como el punto que indica el inicio de un pico.

Inicio del pico

En la [Tabla 2](#) en la página 20, la anchura de pico esperada determina el filtro cuyos valores de pendiente y curvatura se comparan con la sensibilidad de pendiente. Por ejemplo, cuando la anchura de pico esperada es pequeña, los valores del filtro 1 se añaden al acumulador de pendiente ascendente. Si la anchura de pico esperada aumenta, se utilizan entonces los valores correspondientes al filtro 2 y, en última instancia, al filtro 3.

Cuando el valor del acumulador de pendiente ascendente es ≥ 15 , el algoritmo reconoce que se puede estar iniciando un pico.

Tabla 2 Valores de incremento del acumulador de pendiente ascendente

Valores de salida de filtros de derivadas de 1 a 3 frente a sensibilidad de pendiente	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3
Pendiente > Sensibilidad de pendiente	+8	+5	+3
Curvatura > Sensibilidad de pendiente	+0	+2	+1
Pendiente < (-) Sensibilidad de pendiente	-8	-5	-3
Pendiente < Sensibilidad de pendiente	-4	-2	-1
Curvatura < (-) Sensibilidad de pendiente	-0	-2	-1

Fin del pico

En la [Tabla 3](#) en la página 20, la anchura de pico esperada determina el filtro cuyos valores de pendiente y curvatura se comparan con la sensibilidad de pendiente. Por ejemplo, cuando la anchura de pico esperada es pequeña, los valores del filtro 1 se añaden al acumulador de pendiente descendente. Si la anchura de pico esperada aumenta, se utilizan entonces los valores correspondientes al filtro 2 y, en última instancia, al filtro 3.

Cuando el valor del acumulador de pendiente descendente es ≥ 15 , el algoritmo reconoce que puede estar finalizando un pico.

Tabla 3 Valores de incremento del acumulador de pendiente descendente

Valores de salida de filtros de derivadas de 1 a 3 frente a sensibilidad de pendiente	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3
Pendiente < (-) Sensibilidad de pendiente	+8	+5	+3
Curvatura < (-) Sensibilidad de pendiente	+0	+2	+1
Pendiente > Sensibilidad de pendiente	-11	-7	-4
Pendiente > Sensibilidad de pendiente	-28	-18	-11
Curvatura > Sensibilidad de pendiente	-0	-2	-1

Algoritmo de determinación del máximo de pico

El máximo del pico se corresponde con el punto más alto del cromatograma, determinado mediante la construcción de una curva de ajuste parabólica que pase por los puntos de datos más altos.

Picos solapados

Los picos solapados se producen cuando un pico nuevo comienza antes de encontrar el final de otro pico. La figura ilustra cómo trata el integrador los picos solapados.

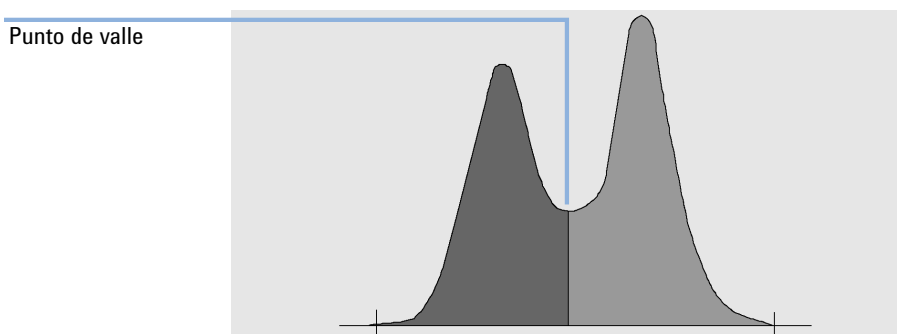


Figura 5 Picos solapados

El integrador procesa los picos solapados como sigue:

- 1 suma el área del primer pico hasta el punto de valle;
- 2 en el punto de valle, termina la suma del área correspondiente al primer pico e inicia la correspondiente al segundo pico;
- 3 cuando el integrador localiza el final del segundo pico, se detiene la suma del área. Este proceso se puede visualizar como la separación de los picos solapados trazando una perpendicular desde el punto de valle entre ambos picos.

Hombros

Los hombros son picos no resueltos ubicados en el avance o el rastro de un pico más grande. Cuando hay un hombro presente, no existe un verdadero valle en el sentido de una pendiente negativa seguida por otra positiva. Un pico puede tener cualquier número de hombros frontales y/o traseros.

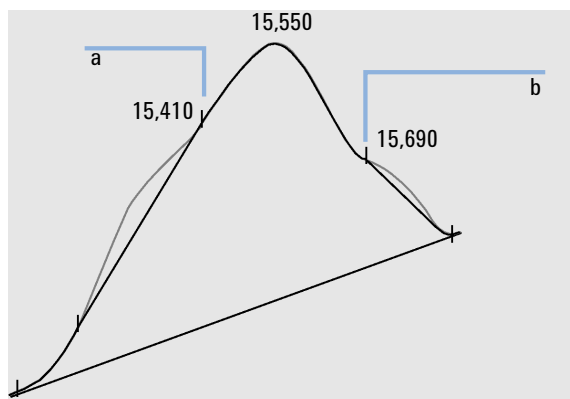


Figura 6 Hombros de pico

Los hombros se detectan a partir de la curvatura del pico, que viene dada por la segunda derivada. Cuando la curvatura cae a cero, el integrador identifica un punto de inflexión, como los puntos a y b en [Figura 6](#) en la página 22.

- Existe un posible hombro frontal cuando se detecta un segundo punto de inflexión antes del máximo del pico. Si se confirma la presencia de un hombro, el punto de inicio del mismo se fija en el punto de máxima curvatura positiva previo al punto de inflexión.
- Existe un posible hombro trasero cuando se detecta un segundo punto de inflexión antes del final o el valle del pico. Si se confirma la presencia de un hombro, el punto de inicio del mismo se fija en el punto del primer mínimo de la pendiente después del vértice del pico.

El tiempo de retención o migración se determina a partir del punto de máxima curvatura negativa del hombro. Con un evento de integración programado, el integrador puede calcular también áreas de hombro como picos normales con líneas de caída verticales en los puntos de inflexión del pico que presenta el hombro.

El área del hombro se resta del pico principal.

Los picos en el hombro pueden tratarse como picos normales utilizando un parámetro de integración programado.

Construcción de la línea de base por defecto

Una vez completado un grupo de picos y encontrada la línea de base, el integrador solicita al algoritmo de asignación de la línea de base la asignación de esta mediante una técnica de "jalnamiento". El algoritmo utiliza correcciones de área trapezoidal y altura proporcional para normalizar la línea de base y mantenerla lo más baja posible. Entre los valores de entrada del algoritmo de asignación de la línea de base se incluyen también parámetros obtenidos de los archivos de método y datos que identifican el detector y la aplicación, y que el integrador utiliza para optimizar los cálculos.

En el caso más sencillo, el integrador construye la línea de base como una serie de segmentos rectos entre:

- el inicio de la línea base,
- inicio del pico, valle, puntos finales,
- la línea base de pico

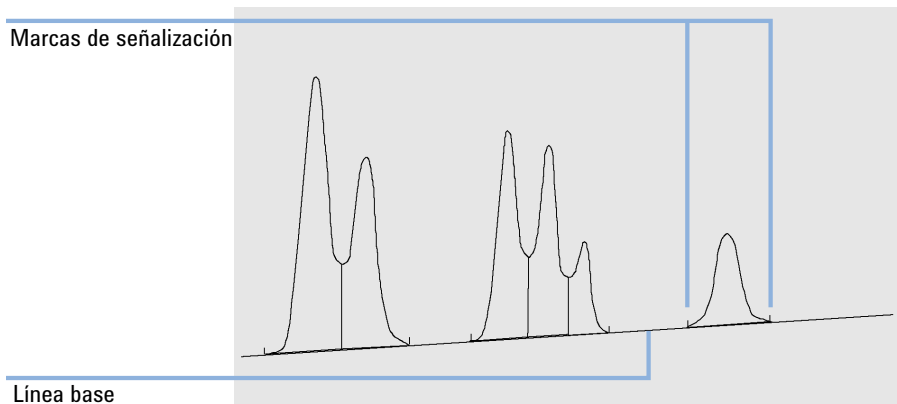


Figura 7 Construcción de la línea base por defecto

Códigos de separación de picos

En los resultados de integración de un informe, a cada pico se le asigna un código de dos, tres o cuatro caracteres que describe cómo se trazó la línea base de la señal.

Tabla 4 Código de cuatro caracteres

Primer carácter	Segundo carácter	Tercer carácter	Cuarto carácter
Línea base al inicio	Línea base al final	Marca de error/pico	Tipo de pico

Caracteres 1 y 2

El primer carácter describe la línea de base al inicio del pico y el segundo carácter describe la línea de base al final del pico.

- B** El pico se inició o se detuvo en la línea de base.
- P** El pico se inició o se detuvo al traspasar la línea de base.
- V** El pico se inició o se detuvo con una línea de caída en forma de valle.
- H** El pico se inició o se detuvo en una línea de base horizontal forzada.
- F** El pico se inició o se detuvo en un punto forzado.
- M** El pico se integró de forma manual.
- U** El pico no se asignó.

También se pueden añadir marcas adicionales (por orden de prioridad).

Carácter 3

El tercer carácter describe una marca de error o de pico:

- A** La integración se abortó. Por ejemplo, debido a eventos de integración de tipo activado/desactivado o a que se alcanzó el final del tiempo de análisis de la señal.
- D** El pico se distorsionó (forma de pico incorrecta).

Espacio en blanco

El pico es un pico normal.

Carácter 4

El cuarto carácter describe el tipo de pico.

- S** El pico es un pico de disolvente.
- N** El pico es un pico negativo.
- +** El pico es un pico de área sumada.
- T** Pico con división tangencial (división estándar).
- X** Pico con división tangencial (división exponencial con el modo antiguo).
- E** Pico con división tangencial (división exponencial con el nuevo modo).
- m** Pico definido por una línea base manual.
- n** Pico negativo definido por una línea base manual.
- t** Pico con división tangencial definido por una línea base manual.
- x** Pico con división tangencial (división exponencial) definido por una línea base manual.
- R** El pico es un pico recalculado (por ejemplo, un pico principal, véase ["Modos de división tangencial"](#) en la página 36).
- f** Pico definido por una tangente de hombro frontal.
- b** Pico definido por una tangente de hombro trasero.
- F** Pico definido por una caída vertical de hombro frontal.
- B** Pico definido por una caída vertical de hombro trasero.
- U** Pico no asignado.

Medida del área de pico

El paso final de la integración de picos es determinar el área final del pico.

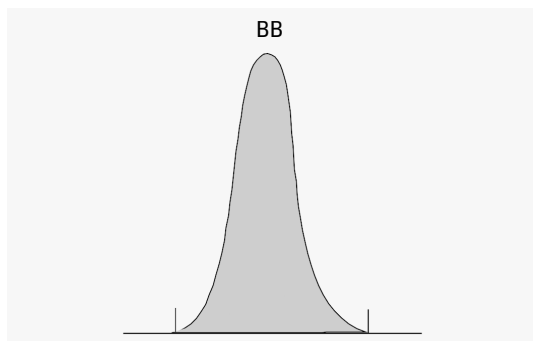


Figura 8 Medida del área de pico de línea base a línea base

En el caso de un simple pico aislado, el área de pico viene determinada por el área acumulada por encima de la línea de base entre el inicio y el final del pico.

Determinación del área

El área que el integrador calcula durante la integración se determina como sigue:

- para picos de línea base a línea base (BB), el área por encima de la línea base entre el inicio de pico y el fin de pico, como se muestra en [Figura 8](#) en la página 26,
- para picos de valle a valle (VV), el área por encima de la línea base segmentada con líneas de caída verticales trazadas a partir de los puntos valle, como se muestra en [Figura 9](#) en la página 27,

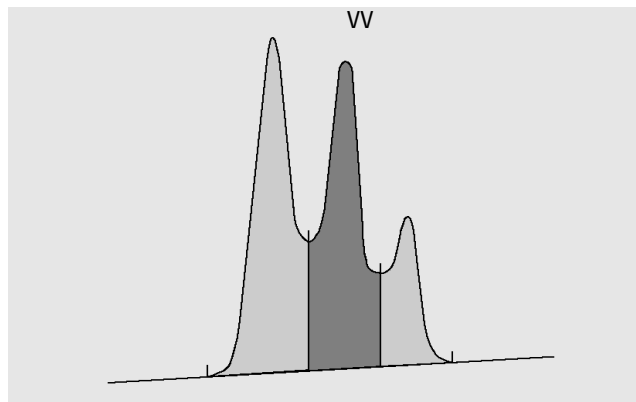


Figura 9 Medida del área para picos de valle a valle

- para picos tangenciales (T), el área por encima de la línea base restablecida,
- para picos de disolvente (S), el área por encima de la extrapolación horizontal desde el último punto de línea base encontrado y por debajo de la línea base restablecida asignada a picos tangenciales (T). Es posible que un pico de disolvente produzca una elevación de la señal demasiado lenta para el reconocimiento del pico o que en medio del análisis aparezca un grupo de picos que el usuario considere que deben ser tratados como un disolvente con una serie de picos montados. Ése suele ser el caso de un grupo de picos solapados en el que el primer pico es mucho mayor que el resto. El tratamiento más simple, el de la línea de caída vertical, exageraría los picos posteriores al estar éstos en realidad sobre la cola del primero. Forzando el reconocimiento del primer pico como pico de disolvente, es posible dividir de la cola el resto del grupo,
- los picos negativos que se dan bajo la línea base tienen un área positiva, como se muestra en [Figura 10](#) en la página 27.

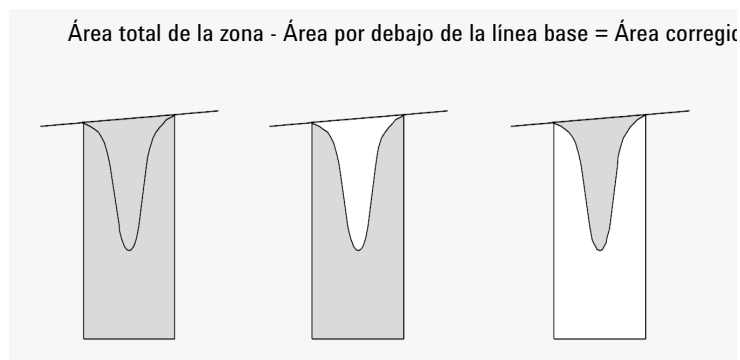


Figura 10 Medida del área para picos negativos

Unidades y factores de conversión

Externamente, los datos contienen un conjunto de puntos de datos, que pueden ser muestreados o integrados. En el caso de los datos integrados, cada punto de datos corresponde a un área, que se expresa como *Altura* \times *Tiempo*. En el caso de los datos muestreados, cada punto de datos corresponde a una altura.

Por lo tanto, en el caso de los datos integrados, la altura es una entidad calculada, obtenida dividiendo el área por el tiempo transcurrido desde el punto de datos previo. En el caso de los datos muestreados, el área se calcula multiplicando el dato por el tiempo transcurrido desde el punto de datos previo.

El cálculo de integración hace uso de ambas entidades. Las unidades que el integrador utiliza internamente son las siguientes: *respuesta en el detector* \times *segundos* para el área y **detector response** para la altura. Esto se hace así con el fin de proporcionar una base común para los truncamientos a enteros cuando sea necesario. Las medidas de tiempo, área y altura se muestran en unidades físicas reales, con independencia de cómo se midan, calculen y almacenen en el software.

Asignación de la línea de base

Inicio de la línea base

Si no se localiza una línea base al comienzo del análisis, el inicio de la línea base se establece de uno de los modos siguientes:

- desde el inicio del análisis al primer punto de línea base, si el punto de inicio del análisis es inferior al primer punto de línea base,
- desde el inicio del análisis al primer punto de valle, si el punto de inicio del análisis es inferior al primer valle,
- desde el inicio del análisis al primer punto de valle, si el primer valle penetra una línea imaginaria trazada desde el inicio del análisis a la primera línea base,
- desde el inicio del análisis a una línea base horizontal extrapolada al primer punto de línea base.

Final de la línea base

El último punto de línea base válido se utiliza para designar el final de la línea base. En los casos en que un análisis no termine en la línea base, el final de la línea base se calcula desde el último punto de línea base válido a la deriva de línea base establecida.

Si un pico termina en lo que parece ser un valle pero el siguiente pico está por debajo del valor establecido para el rechazo por área, la línea base se proyecta desde el comienzo del pico al siguiente punto de línea base verdadero. Cuando un pico comience de modo similar, se aplicará la misma regla.

Modos de corrección de la línea de base

En OpenLab ChemStation, hay disponibles varios modos de corrección de la línea de base. Se describen en las secciones incluidas a continuación.

Modo de corrección de la línea de base: Clásico

Se produce una penetración cuando la señal cae por debajo de la línea base construida (punto a en [Figura 11](#) en la página 30).

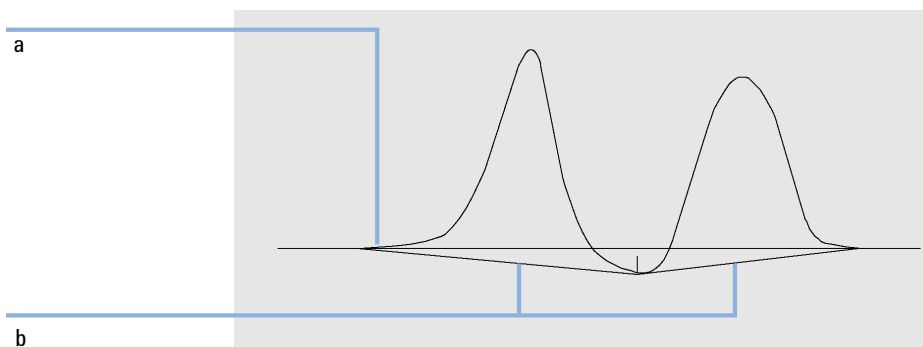


Figura 11 Penetración de la línea base

En caso de penetración, por lo general se reconstruye esa parte de la línea base, tal como muestran los puntos b en [Figura 11](#) en la página 30. El usuario puede utilizar los siguientes modos de corrección para eliminar todas las penetraciones de la línea de base:

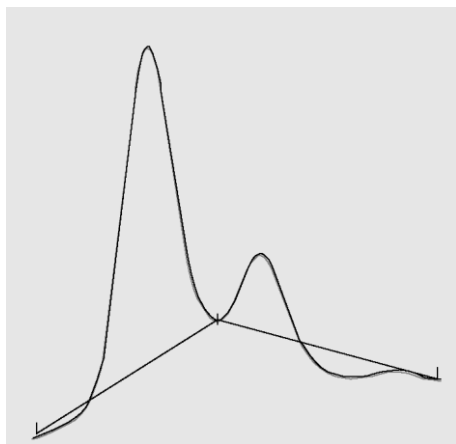
- **No penetration**
- **Advanced**

Modo de corrección de la línea de base: Sin penetración

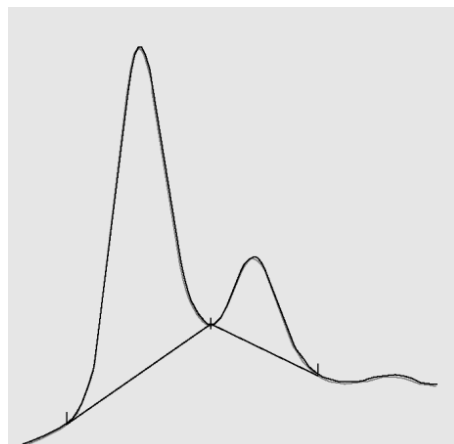
Cuando se selecciona esta opción, cada grupo de picos se examina en busca de posibles penetraciones de la línea de base. Si se encuentran penetraciones, se desplazan los puntos de inicio y/o final del pico hasta eliminarlas por completo.

Integración

Asignación de la línea de base



Modo **Classical** de corrección de la línea de base



Modo **No penetration** de corrección de la línea de base

NOTA

El modo de corrección de la línea de base **No penetration** no está disponible para los picos de disolvente, con sus hombros y picos secundarios.

Modo de corrección de la línea de base: Avanzado

En el modo Avanzado de corrección de la línea de base, el integrador trata de optimizar la ubicación del inicio y el final de los picos, restablece la línea de base para un grupo de picos y elimina las penetraciones de la línea de base (consulte “[Modo de corrección de la línea de base: Sin penetración](#)” en la página 30). En muchos casos, con el modo Avanzado de corrección se consigue una línea de base más estable, menos dependiente de la sensibilidad de la pendiente.

Relación pico a valle

La relación pico/valle es una medida de la calidad, que indica cuán bien se separa el pico de otros picos de sustancias. Este parámetro especificado por el usuario forma parte del modo de seguimiento avanzado de la línea base. Se utiliza para decidir si dos picos que no muestran separación a nivel de la línea base deben separarse utilizando una línea de caída vertical o una línea base de valle. El integrador calcula la relación entre la altura corregida por la línea base del menor de los picos y la altura corregida por la línea base del valle. Cuando la relación pico/valle es inferior al valor especificado por el usuario, se utiliza una línea de caída vertical; de lo contrario, se traza una línea base desde la línea base del inicio del primer pico al valle y desde el valle a la línea base del final del segundo pico (vea la comparativa “Modo de corrección de la línea de base: Sin penetración” en la página 30 con Figura 12 en la página 32).

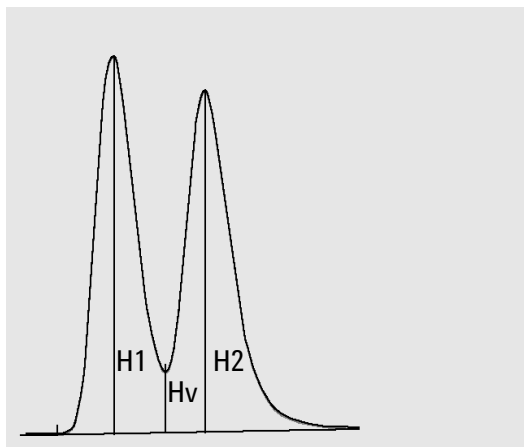


Figura 12 Relación pico/valle

La relación pico/valle se calcula por medio de las ecuaciones siguientes:

$$H1 \geq H2, \text{ Relación pico/valle} = H2/Hv$$

y

$$H1 < H2, \text{ Relación pico/valle} = H1/Hv$$

Figura 13 en la página 33 muestra cómo el valor especificado por el usuario de la relación pico/valle influye en las líneas base.

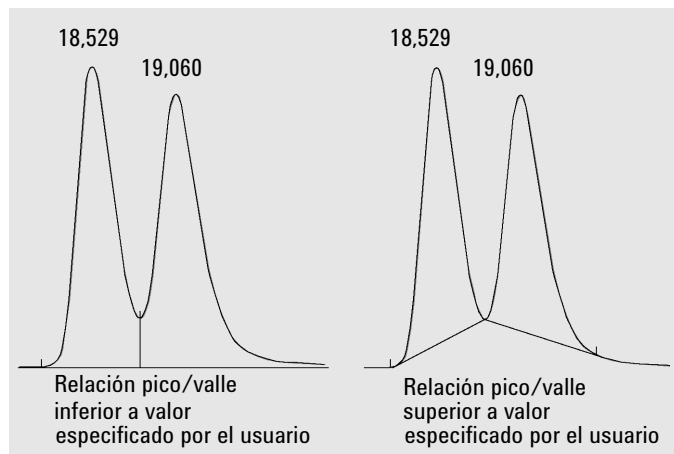


Figura 13 Efecto de la relación pico/valle sobre las líneas base

División tangencial

La división tangencial es una forma de línea de base construida para picos que se encuentran en las pendientes ascendente o descendente de otro pico. El requisito previo es que los dos picos no estén separados por la línea de base.

En las figuras siguientes se ilustra el principio de la división tangencial:

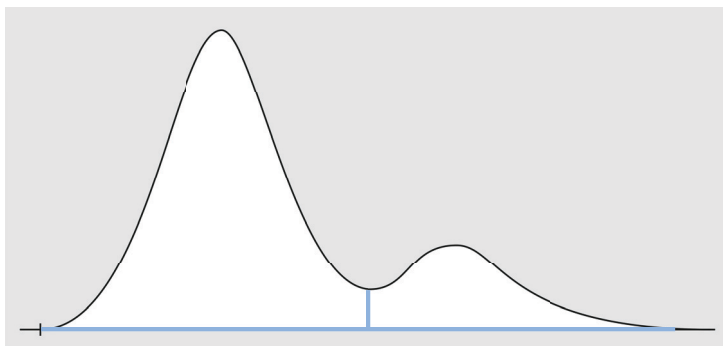


Figura 14 Picos sin división, separados por una línea de caída vertical

Integración

Asignación de la línea de base

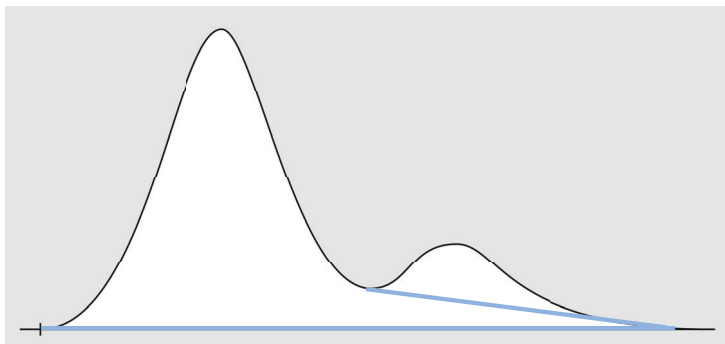


Figura 15 División de cola

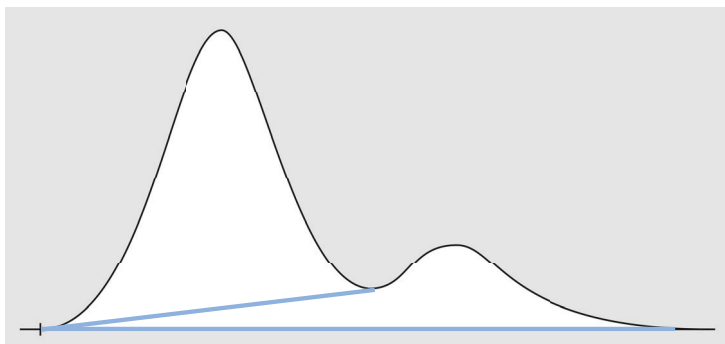


Figura 16 División frontal

Criterios de división

Los siguientes criterios determinan si se va a utilizar una línea de división para calcular el área de un pico secundario que eluye en el rastro de otro principal:

- Relación de alturas para división (**Front skim height ratio** o **Tail skim height ratio**).
- **Skim valley ratio**.

La *relación de alturas para división* es la relación de la altura corregida por la línea base del pico principal (H_p en la siguiente figura) con la altura corregida por la línea base del pico secundario (H_c). Para que se divida el pico secundario, utilice un valor inferior a esta relación. Para deshabilitar la división exponencial durante un análisis, puede fijar este parámetro en un valor alto o en cero.

La *relación de división de valle* es la relación de la altura del pico secundario por encima de la línea base (H_c en la figura siguiente) con la altura del valle por encima de la línea base (H_v). Para que se divida el pico secundario, utilice un valor superior a esta relación.

NOTA

Si no se cumple uno de estos criterios para un conjunto de picos secundarios en la cola del pico principal, todos los picos secundarios situados a continuación del pico secundario que cumple ambos criterios no se dividen, sino que usan una línea de caída

NOTA

Estos criterios no se utilizan si se está aplicando un evento programado para un cálculo exponencial o si el pico principal es en sí mismo un pico secundario de otro. El código de separación entre el pico principal y el secundario debe ser de tipo **Valley** (consulte “Códigos de separación de picos” en la página 24).

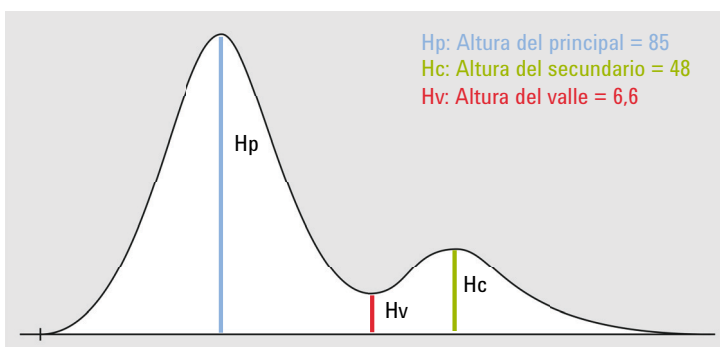


Figura 17 Ejemplo para calcular los valores de los criterios de división

$$\text{Relación de alturas para división} = H_p / H_c$$

$$\text{Relación de división de valle} = H_c / H_v$$

Integración

Asignación de la línea de base

donde:

Hp	Altura del pico principal corregida por la línea base
Hv	Altura del valle por encima de la línea base
Hc	Altura del pico secundario corregida por la línea base

Tail Skimming Para usar la división de cola, se deben definir los parámetros como sigue:

- Relación de alturas para división de cola = $85 / 48 = 1,77$
En los eventos de integración, use un valor $< 1,77$.
- Relación de división de valle = $48 / 6,6 = 7,3$
En los eventos de integración, use un valor $> 7,3$.

Front Skimming

Con la división frontal, el primer pico es el secundario y el segundo, el principal. En consecuencia, para usar la división frontal se deben configurar los parámetros como sigue:

- Relación de alturas para división frontal = $48 / 85 = 0,56$
En los eventos de integración, use un valor $< 0,56$.
- Relación de división de valle = $85 / 6,6 = 12,9$
En los eventos de integración, use un valor $> 12,9$.

Modos de división tangencial

Cuando la división tangencial está habilitada, existen cuatro modelos disponibles para calcular las áreas de pico adecuadas:

- Ajuste a una curva exponencial.
- Nueva división exponencial.
- División mediante línea recta.
- Cálculos de recta y exponencial combinados para obtener el mejor ajuste (división estándar).

Ajuste a una curva exponencial

Este modelo de división traza una curva utilizando una ecuación exponencial a través de los puntos inicial y final del pico secundario. La curva pasa bajo cada uno de los picos secundarios que siguen al principal; el área que queda por debajo de la curva de división se resta de los picos secundarios y se añade al pico principal.

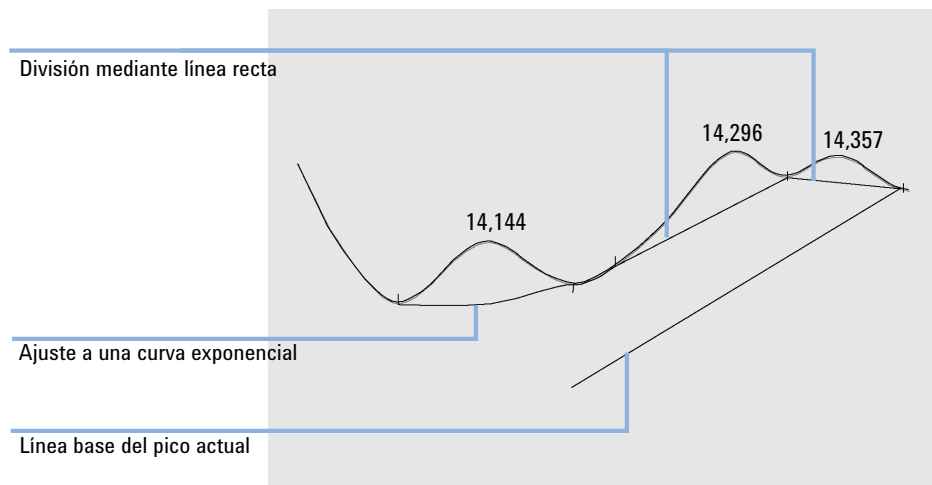


Figura 18 División exponencial

Integración

Asignación de la línea de base

Nueva curva exponencial

Este modelo de división traza una curva mediante una ecuación exponencial para aproximar los flancos anterior y posterior del pico principal. La curva pasa por debajo de uno o más picos que siguen al pico principal (picos secundarios). El área que queda por debajo de la curva de división se resta de los picos secundarios y se suma al pico principal. Esto permite dividir más de un pico secundario con un mismo modelo exponencial; todos los picos posteriores al primer pico secundario se separan mediante líneas verticales, comenzando al final del primer pico secundario, y se proyectan únicamente hasta la curva de división.

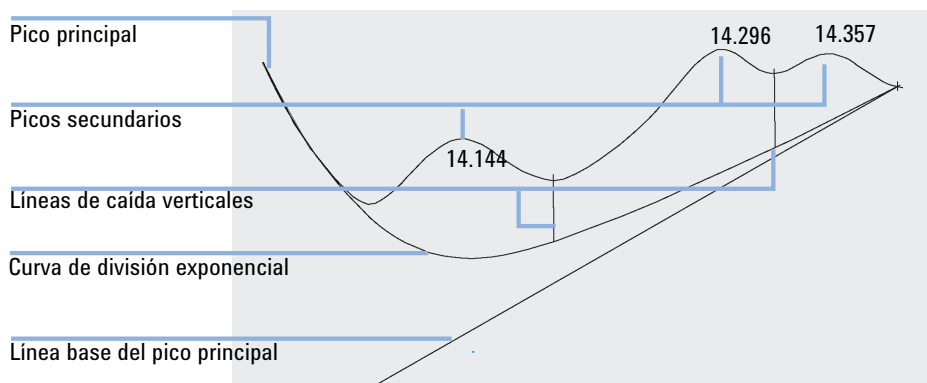


Figura 19 Nueva división exponencial

División mediante línea recta

Este modelo de división traza una línea recta a través de los puntos inicial y final del pico secundario. La altura del inicio del pico secundario se corrige de acuerdo con la pendiente del pico principal. El área que queda bajo la línea recta se resta del pico secundario y se añade al pico principal.

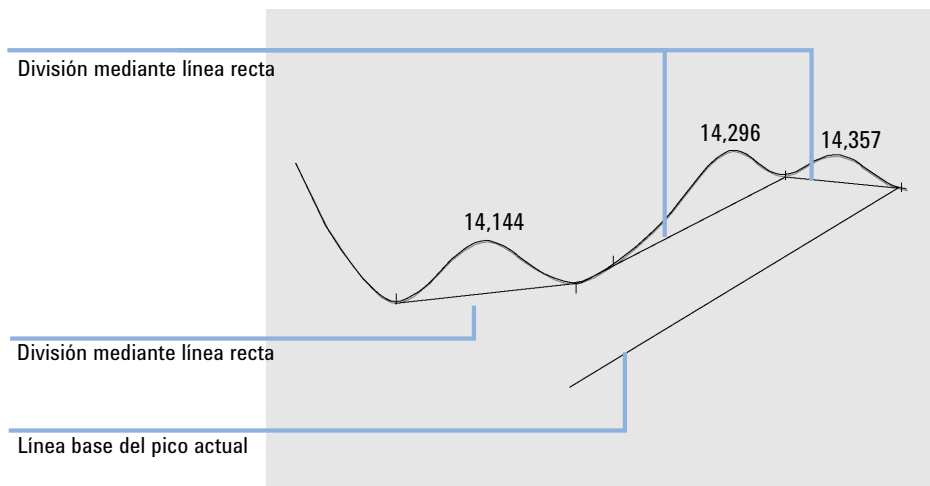


Figura 20 División mediante línea recta

Divisiones estándar

Este método predeterminado es una combinación de cálculos de recta y exponenciales pensada para obtener un ajuste óptimo.

El paso del cálculo exponencial al cálculo lineal se realiza de modo que no se produzcan discontinuidades abruptas en las alturas o las áreas.

- Cuando la señal se encuentra apreciablemente por encima de la línea base, el cálculo para ajustar la cola es exponencial.
- Cuando la señal se encuentra en la zona de línea base, el cálculo para ajustar la cola es una línea recta.

Los cálculos combinados se muestran como divisiones tangenciales exponenciales o rectas.

Integración

Asignación de la línea de base

Cálculo de la curva exponencial de ajuste para divisiones

Para calcular una división exponencial se utiliza la ecuación siguiente:

$$H_b(t_R) = H_0 * \exp(-B * (t_R - t_0)) + A * t_R + C$$

donde:

H_b	Altura de la división exponencial en el momento t_R
H_0	Altura (por encima de la línea base) del inicio de la división exponencial
B	Factor de deterioro de la función exponencial
t_0	Tiempo correspondiente al inicio de la división exponencial
t_R	Tiempo de retención
A	Pendiente de la línea base del pico principal
C	Desplazamiento de la línea base del pico principal

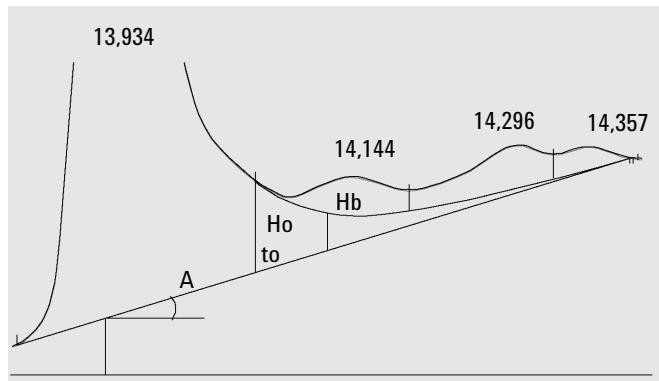


Figura 21 Valores utilizados para calcular una división exponencial

Eventos de integración

El integrador proporciona al usuario una serie de eventos de integración tanto iniciales como programados. Muchos eventos son parejas de tipo activado/desactivado o iniciar/detener.

Eventos de integración para todas las señales

**Modo de
división
tangencial**

Define el tipo de construcción de la línea de base para picos que se encuentran en las pendientes ascendente o descendente de otro pico. Consulte "[Modos de división tangencial](#)" en la página 36.

Exponential	Traza una curva exponencial a través de los puntos inicial y final corregidos por la altura de cada pico secundario.
New Exponential	Traza una curva exponencial para aproximar el flanco posterior del pico principal.
Standard	Combina los cálculos de las opciones Exponencial y Recta para obtener el mejor ajuste posible.
Straight	Traza una línea recta a través de los puntos inicial y final corregidos por la altura de cada pico secundario.

Relación de alturas para división de pico de cola

Junto con la **Skim valley ratio**, establece las condiciones para la división tangencial de un pico pequeño situado en la cola del pico de un disolvente o de otro pico más grande. Consulte "[Criterios de división](#)" en la página 35.

Es la relación entre la altura del pico principal corregida por la línea de base (H_p) y la altura del pico secundario corregida por la línea de base (H_c). Las relaciones superiores al valor especificado activarán la división.

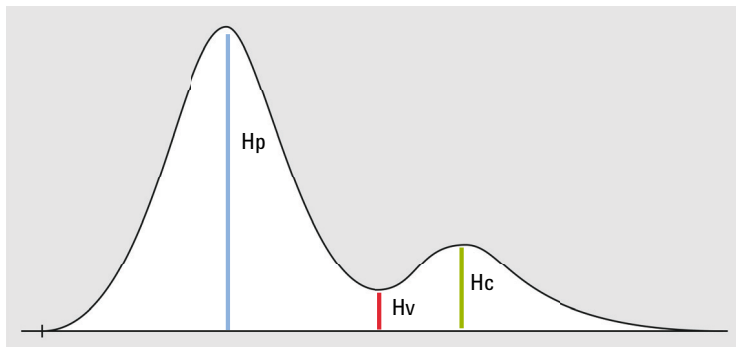


Figura 22 Ejemplo: pico con división de cola

Relación de alturas para división de pico frontal

Junto con la **Skim Valley Ratio**, establece las condiciones para la división tangencial de un pico pequeño situado en la zona frontal del pico de un disolvente o de otro pico más grande. Consulte "[Criterios de división](#)" en la página 35.

Es la relación entre la altura del pico principal corregida por la línea de base (H_p) y la altura del pico secundario corregida por la línea de base (H_c). Las relaciones superiores al valor especificado activarán la división.

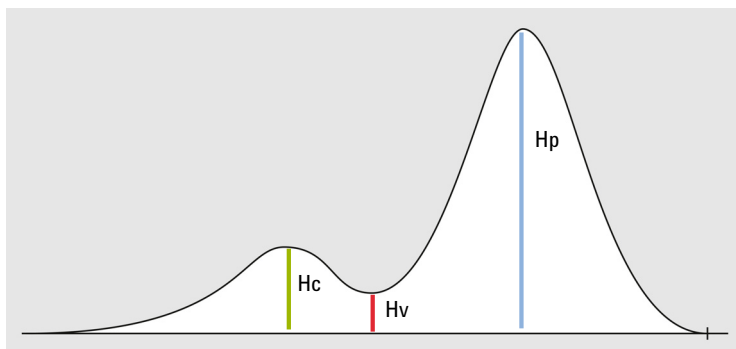


Figura 23 Ejemplo: pico con división frontal

Relación de división de valle

Junto con la **Tail Skim Height Ratio** o la **Front Skim Height Ratio**, establece las condiciones para la división tangencial de un pico pequeño situado en la cola o la zona frontal del pico de un disolvente o de otro pico más grande. Consulte [“Criterios de división”](#) en la página 35.

Es la relación entre la altura del pico secundario corregida por la línea de base (H_c) y la altura del valle corregida por la línea de base (H_v). Las relaciones inferiores al valor especificado activarán la división.

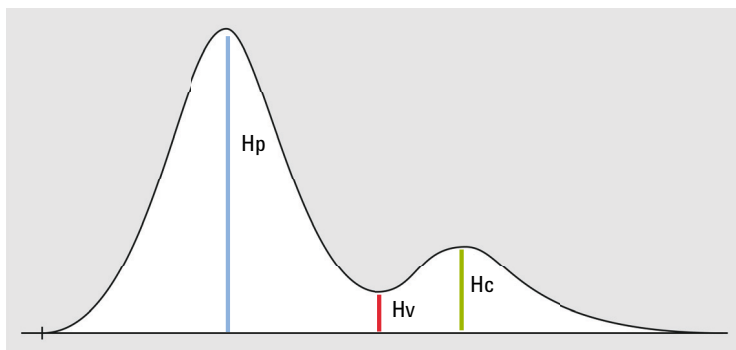


Figura 24 Ejemplo: pico con división de cola

Corrección de la línea de base

Establece el tipo de corrección de la línea de base. Consulte [“Modos de corrección de la línea de base”](#) en la página 30.

Puede elegir entre los siguientes parámetros:

Classical	Admite penetraciones de la línea de base.
No penetrations	Elimina las penetraciones mediante la reconstrucción de la línea de base.
Advanced	El integrador trata de optimizar la ubicación del inicio y el final de los picos, restablece la línea de base para un grupo de picos y elimina las penetraciones de la línea de base.

Relación pico/valle

Se utiliza para decidir si dos picos que no muestran separación a nivel de la línea de base deben separarse mediante una línea de caída vertical o una línea de base de valle. Es la relación entre la altura corregida por la línea de base del menor de los picos y la altura corregida por la línea de base del valle. Consulte “Relación pico a valle” en la página 32.

Cuando la relación pico/valle es inferior al valor especificado por el usuario, se utiliza una línea de caída vertical (A); de lo contrario, se traza una línea de base desde la línea de base del inicio del primer pico al valle y desde el valle a la línea de base del final del segundo pico (B).

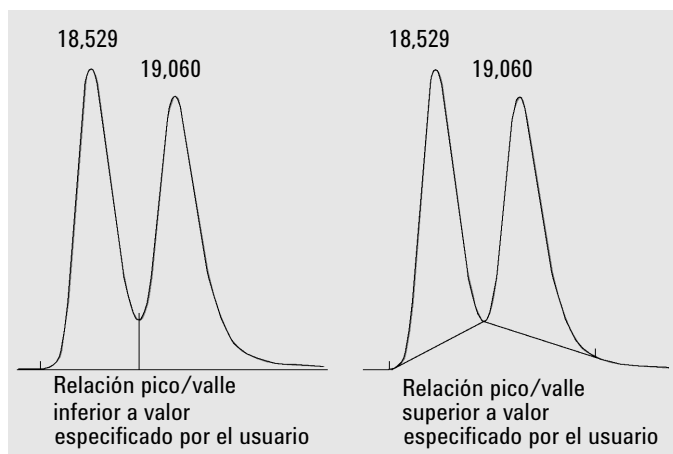


Figura 25 Efecto de la relación pico/valle sobre las líneas base

Eventos iniciales

Slope Sensitivity

La sensibilidad de pendiente establece el nivel de sensibilidad para la detección de picos. Cuando la pendiente de una señal supera el valor de **Slope Sensitivity**, se establece el punto inicial del pico; en el momento en que la pendiente es menor que el valor de **Slope Sensitivity**, se establece el punto final del pico.

Peak Width

Controla la selectividad del integrador para distinguir los picos del ruido de la línea de base. El usuario especifica la anchura de pico en unidades de tiempo correspondientes a la anchura a media altura del primer pico esperado (excluido el pico del disolvente).

El integrador actualiza la anchura de pico como sea necesario durante el análisis para optimizar la integración.

Si la anchura de pico inicial seleccionada es demasiado reducida, puede darse el caso de que el ruido se interprete como picos. Si hay una mezcla de picos anchos y estrechos, puede ser conveniente utilizar eventos programados en función del tiempo de análisis para ajustar la anchura para determinados picos. En ocasiones, los picos se ensanchan de forma significativa a medida que el análisis progresa, como ocurre por ejemplo con los análisis GC isotérmicos y LC isocráticos. Para compensar ese efecto, el integrador actualiza automáticamente el valor de anchura de pico a medida que los picos se ensanchan durante el análisis salvo que se haya deshabilitado por medio de un evento programado.

La actualización de la anchura de pico se pondera del modo siguiente:

$$0,75 \times (\text{anchura de pico existente}) + 0,25 \times (\text{anchura de pico actual})$$

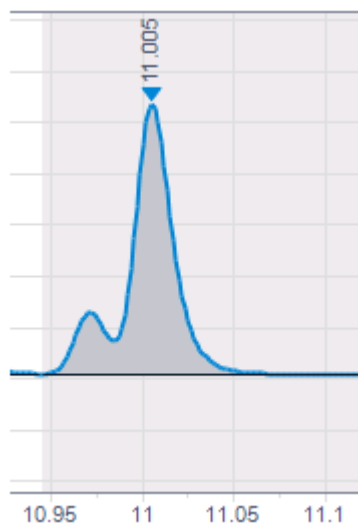
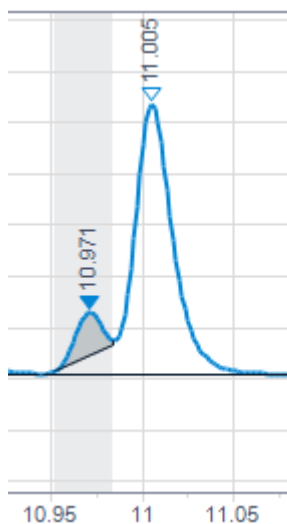
Area reject Establece el área mínima del pico de interés.

Los picos con un área inferior al valor fijado como mínimo aceptable no se muestran. El integrador rechaza los picos que estén por debajo del valor de **Area Reject** después de la corrección de la línea de base. El valor de **Area Reject** debe ser igual o superior a cero.

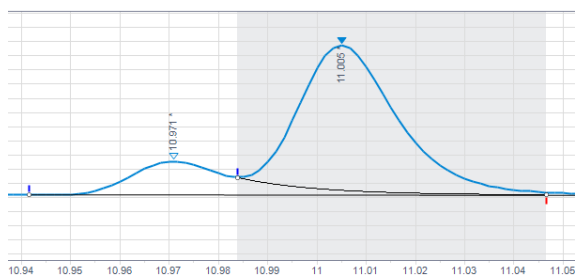
Area Percent reject Establece el área mínima (%) del pico de interés.

Los picos con % área inferior al valor fijado como mínimo aceptable no se muestran. El integrador rechaza los picos que estén por debajo del valor de rechazo por % área después de la corrección de la línea de base.

Si un pico que no está integrado debido a tener un % área bajo es un pico montado, se combinará con el pico principal.



Si el pico principal se encuentra por debajo del umbral de % de área, pero el pico montado se encuentra por encima de dicho umbral, se conservará el pico principal, pues de lo contrario el cálculo del pico montado y la construcción de la línea base se basarían en un pico excluido.



Height reject Establece la altura mínima del pico de interés.

Los picos con una altura inferior al valor fijado como mínimo no se muestran. El integrador rechaza los picos que estén por debajo del valor de **Height Reject** después de la corrección de la línea de base.

Shoulders Establece el método inicial de detección de hombros en los picos.

Cuando la detección de hombros está habilitada, el integrador detecta los posibles hombros utilizando la curvatura del pico dada por la segunda derivada. Cuando la curvatura se hace cero, el integrador identifica ese punto de inflexión como un posible hombro. Si el integrador identifica otro punto de inflexión antes del máximo del pico, se ha detectado un hombro.

Puede seleccionar entre:

- Desactivado
No se detectan los hombros.
- Línea de base con línea de caída vertical
Los hombros se integran con una línea de caída vertical.
- Línea de base tangencial

Los hombros se integran con una línea de base tangencial. Para obtener más información sobre la división tangencial, consulte ["División tangencial"](#) en la página 33. Si utiliza una línea de base tangencial, podrá elegir entre diferentes modos (consulte ["Modos de división tangencial"](#) en la página 36).

Selección de la anchura de pico

Debe elegirse el valor que proporcione el nivel de filtro justo y suficiente para evitar interpretar el ruido como picos pero sin llegar a distorsionar la información que porta la señal.

- Para seleccionar una anchura de pico inicial adecuada para un determinado pico de interés, utilice como referencia la anchura de pico en la base, expresada en unidades de tiempo.
- Para seleccionar una anchura de pico inicial adecuada cuando hay varios picos de interés, fije la anchura de pico inicial en un valor igual o inferior a la anchura del pico más estrecho con el fin de obtener una selectividad de pico óptima.

Rechazo por altura y anchura de pico

Ambos parámetros, **peak width** y **height reject**, son sumamente importantes en el proceso de integración. Modificando estos valores se pueden obtener distintos resultados.

- Eleve los valores de ambos parámetros, rechazo por altura y anchura de pico, cuando deban detectarse y cuantificarse componentes relativamente dominantes en un entorno de alto ruido. Una mayor anchura de pico mejora el filtrado del ruido y un mayor rechazo por altura asegura que se ignore el ruido aleatorio.
- Reduzca los valores de los parámetros rechazo por altura y anchura de pico para detectar y cuantificar componentes traza, cuyas alturas se aproximan a la del propio ruido. La disminución de la anchura de pico tiene como efecto un menor filtrado de la señal, mientras que la disminución del rechazo por altura asegura que no se rechacen picos pequeños por no tener la altura suficiente.
- Cuando un análisis incluya picos de distintas anchuras, fije el valor de la anchura de pico para los más estrechos y reduzca el valor del rechazo por altura para asegurar que no se ignoren los picos anchos debido a su reducida altura.

Ajuste de la integración

Con frecuencia resulta útil modificar los valores de sensibilidad de pendiente, anchura de pico, rechazo por altura y rechazo por área para personalizar así la integración. La siguiente figura muestra cómo afectan esos parámetros a la integración de cinco picos de una señal.

Eventos programados

ChemStation ofrece un conjunto de eventos programados, que permite elegir entre los modos del integrador de la definición de la línea de base del algoritmo interno y la definición del usuario. Estos eventos programados pueden usarse para personalizar la construcción de la línea de base de la señal cuando la construcción predeterminada no es adecuada. Por ejemplo, el usuario puede crear un tipo nuevo de evento de suma de área que no alterará los resultados de la suma de área predeterminada. Dichos eventos pueden resultar útiles para sumar áreas de pico finales y para corregir aberraciones a corto y largo plazo de la línea base.

Rechazo por área

Consulte “Eventos iniciales” en la página 44.

Suma de área

Establece puntos (de activación/desactivación) entre los cuales el integrador suma las áreas.

El tiempo de retención o migración de un pico creado mediante la suma de área es la media de los tiempos inicial y final. Si tiene lugar un evento **Area sum on** después del comienzo de un pico, pero antes de que se alcance el máximo, todo el pico se incluirá en la suma. Si se produce después del vértice del pico, pero antes del final del pico, el pico se truncará y la suma de área comenzará inmediatamente.

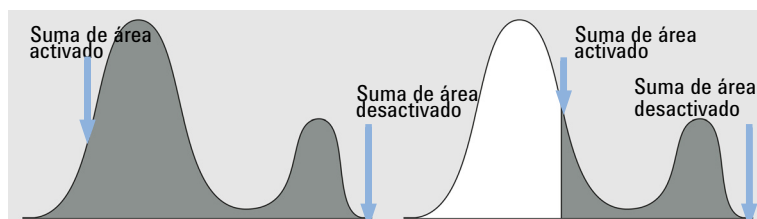


Figura 27 Evento Area sum on después del vértice del pico, pero antes del final del pico

Si tiene lugar un evento **Area sum off** después del comienzo de un pico, pero antes de que se alcance el máximo, la suma de área finalizará de inmediato. El punto de la señal donde esto se produzca tendrá la consideración de punto valle. Si el evento **Area sum off** se produce después del máximo, el evento se pospondrá hasta el final del pico.

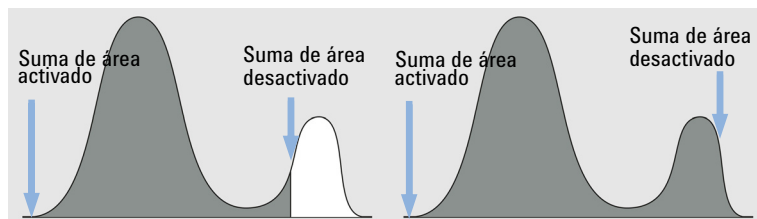


Figura 28 Evento Area sum off después del comienzo del pico, pero antes del máximo

Segmento de suma de área

Este evento permite definir intervalos consecutivos de suma de área sin ningún tipo de pérdida de intervalos de área o tiempo.

Este evento es similar al evento **Area Sum**. Sin embargo, este evento permite definir intervalos de suma de áreas contiguas sin ningún tipo de pérdida de intervalos de tiempo y áreas de pico integradas. El pico se dividirá en el punto en el que el usuario defina este evento; la suma de área comenzará y finalizará exactamente según los intervalos de **Area Sum Slice** especificados.

El tiempo de retención del pico del segmento de suma de área es el punto central del intervalo de tiempo del segmento. El tiempo de retención no variará con la identificación o la recalibración. Puede que presente un ligero desplazamiento, ya que el integrador únicamente comenzará a tomar puntos de datos con el evento de inicio del segmento de suma de área y dejará de hacerlo con el evento de fin del segmento de suma de área. Por lo tanto, el tiempo de retención puede variar, como máximo, el tiempo que transcurra entre dos puntos de datos.

Utilice el parámetro **Start** para definir el tiempo inicial de cada segmento de suma de área. Cada tiempo inicial se utilizará como tiempo final del segmento de tiempo anterior; es decir, puede configurar varios eventos de inicio, uno tras otro.

El parámetro **Start-negA** define el inicio de la integración de un segmento de tiempo en el que se restará cualquier área negativa (por debajo de la línea de base definida) del área del segmento de tiempo.

El parámetro **End** define el final del último segmento de tiempo. El área del segmento de tiempo se calculará ignorando el área que quede por debajo de la línea de base definida. Si no existe ningún otro evento posterior de segmento de suma de área, el integrador volverá a realizar la detección de picos de la forma habitual.

Dentro del rango entre un evento **Start** y el siguiente evento **End**, la línea de base siempre será una línea recta, sin cambios de dirección entre ambos puntos. Únicamente después del punto final (como mínimo, 0,001 min después) se podrán volver a aplicar cambios en la línea de base usando los eventos **Set Baseline from Range**, **Set Low Baseline from Range** o **Use Baseline from Range**.

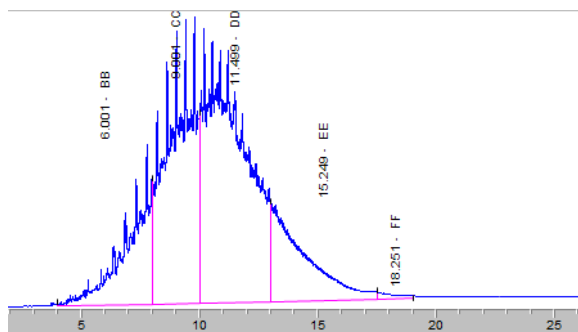


Figura 29 Ejemplo: Segmento de suma de área

La figura anterior muestra un ejemplo con los siguientes eventos programados:

Tabla 6 Construcción de la línea de base

Tiempo	Evento	Parámetro
4 min	Fijar línea de base a partir de rango	± 2 min
22 min	Fijar línea de base a partir de rango	± 4 min

Tabla 7 Segmento de suma de área

Tiempo	Evento	Parámetro
4 min	Segmento de suma de área	Inicio
8 min	Segmento de suma de área	Inicio
10 min	Segmento de suma de área	Inicio
13 min	Segmento de suma de área	Inicio
17,5 min	Segmento de suma de área	Inicio
19 min	Segmento de suma de área	Fin

Anchura de pico automática

Activa la actualización automática de la anchura de pico para los picos siguientes. Reanuda el proceso con la anchura de pico existente en ese momento, así como el seguimiento de la anchura de pico en función de las anchuras de pico detectadas anteriormente.

Línea base en valles

Define puntos (activado/desactivado) entre los que el integrador restablece la línea base en cada valle entre picos.

El reajuste repetido de la línea de base puede provocar el recorte de las esquinas de los picos. Esas esquinas se convertirán en áreas negativas y reducirán el área total medida para los picos.

Esta función resulta útil cuando hay picos superpuestos en la parte posterior de un pico bajo y ancho y el usuario desea restablecer la línea de base en todos los puntos valle.

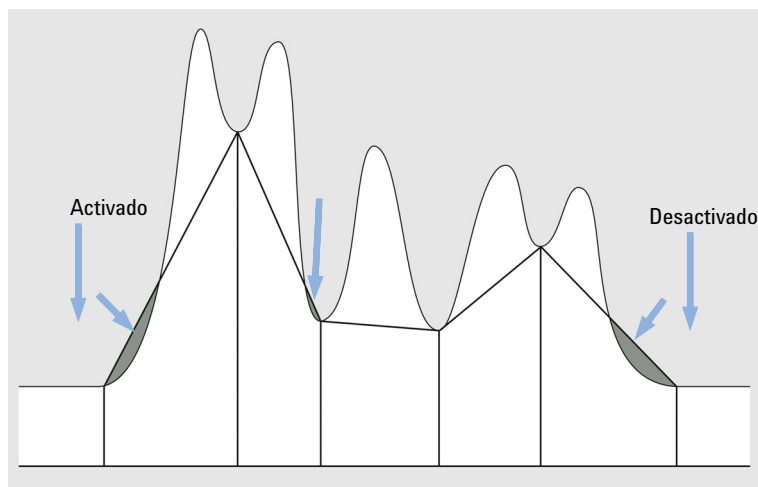


Figura 30 Evento Baseline at valleys

Línea de base hacia atrás

Define un punto y el integrador estándar alarga la línea de base horizontalmente y hacia atrás desde el punto especificado de la línea de base hasta ese punto.

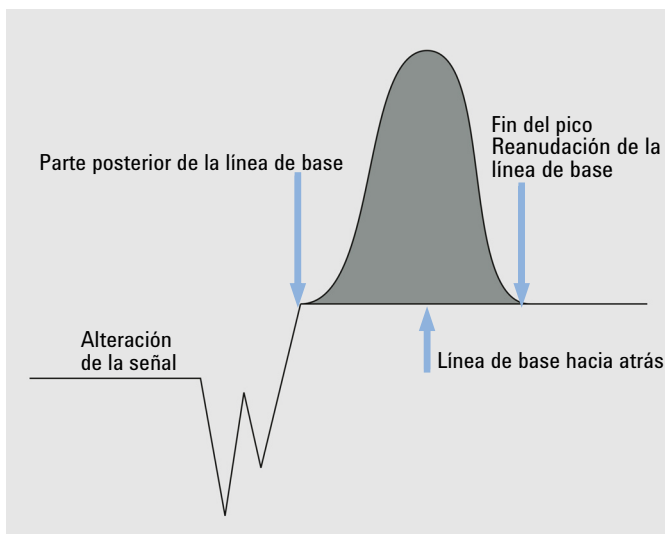


Figura 31 Evento Baseline backwards

Mantener línea base

Se traza una línea base horizontal a la altura de la línea base establecida, a partir de la cual se activa el evento mantener línea base hasta donde se desactiva el evento mantener línea base.

Línea base en valle siguiente

Define un punto en el que el integrador restablece la línea base en el siguiente valle entre picos y luego cancela esta función automáticamente.

Esta función resulta útil en grupos de picos solapados en los que el usuario suponga que se superponen a la parte posterior o forman grupos independientes próximos entre ellos. La función no se aplicará durante la suma de área.

Línea base ahora

Define un punto (tiempo) en el que el integrador restablece la línea de base a la altura actual del punto de datos, si la señal está sobre un pico.

Detectar hombros

Define puntos (de activación/desactivación) entre los cuales el integrador inicia y detiene la detección de hombros.

Si la señal está situada en la línea de base, la función no se aplicará y se utilizará la línea de base detectada.

Los hombros se detectarán conforme al modo de hombros especificado. Consulte "Eventos iniciales" en la página 44.

Anchura de pico fija

Establece la anchura de pico y desactiva la actualización automática de la anchura de pico para los picos siguientes. Para obtener buenos resultados, establece una anchura de pico cercana a la anchura a media altura de los picos reales.

Rechazo por altura

Consulte “Eventos iniciales” en la página 44.

Integración

Define puntos (de activación/desactivación) entre los cuales el integrador detiene e inicia la integración.

Los picos entre los tiempos de desactivación y activación del integrador se ignorarán.

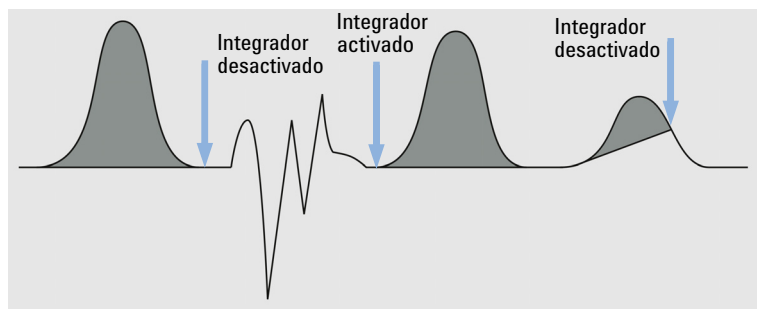


Figura 32 Evento Integration

La línea de base se trazará desde el último punto definido, incluido cualquier restablecimiento por penetración. Las demás funciones del integrador, así como los cambios definidos para la anchura de pico, el umbral y el rechazo por área, se ignorarán cuando el integrador esté desactivado. En los puntos en los que la integración esté **On** y **Off**, se restablecerá el punto de la línea de base.

Cuando se configure el reinicio del integrador, se restablecerá un nuevo punto de línea de base conforme al nivel de la señal en ese momento.

Esta función resulta útil para omitir partes del cromatograma/electroferograma o eliminar alteraciones de la línea de base.

Área máxima Establece el área máxima del pico de interés.

Los picos con un área superior al valor fijado como máximo no se muestran. El integrador rechaza los picos que estén por encima del valor máximo del área después de la corrección de la línea de base.

Puede utilizar este evento, por ejemplo, para excluir el pico de disolvente de un cromatograma obtenido por GC de los resultados de integración y, a la vez, incluir los picos montados.

Altura máxima Establece la altura máxima del pico de interés.

Los picos con una altura superior al valor fijado como máximo no se muestran. El integrador rechaza los picos que estén por encima del valor máximo de altura después de la corrección de la línea de base.

Puede utilizar este evento, por ejemplo, para excluir el pico de disolvente de un cromatograma obtenido por GC de los resultados de integración y, a la vez, incluir los picos montados.

Pico negativo Define puntos (de activación/desactivación) entre los cuales el integrador detecta picos negativos.

Si se detectan picos negativos, el integrador dejará de restablecer automáticamente la línea de base tras la penetración. Desde ese momento, cualquier penetración de la línea de base se integrará utilizando la línea de base establecida como cero. Las áreas se calcularán conforme a esta línea de base y se proporcionarán como valores absolutos.

La función de pico negativo solamente se puede utilizar de forma fiable cuando la deriva de la línea de base es pequeña en comparación con el tamaño del pico, ya que la línea de base se construye a partir del punto de la línea de base declarada al inicio del grupo de picos y hasta la línea de base establecida al final del pico.

NOTA

La suma de área se desactivará automáticamente si está activado el evento **Negative Peaks On**.

La división tangencial también se desactivará durante la detección de picos negativos; esos picos estarán separados por una línea de caída vertical.

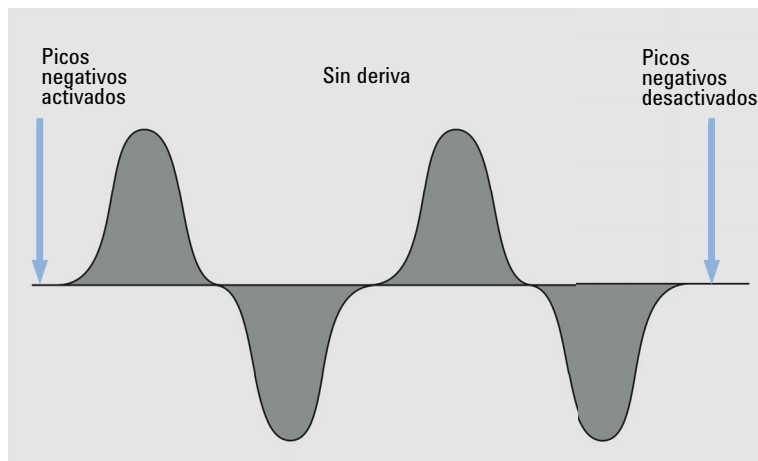


Figura 33 Evento Negative peak

Fijar línea base a partir de rango

Utiliza un rango de puntos de datos para calcular un punto de la línea de base significativo estadísticamente en el punto medio del rango de tiempo.

El valor que el usuario proporciona es el intervalo de tiempo en torno a un punto temporal específico. Define el rango que debe utilizarse para determinar el punto de la línea de base. Consulte ["Modos de corrección de la línea de base"](#) en la página 30 para obtener más información sobre los cálculos estadísticos de la línea de base.

Si establece un valor igual a 0, se utilizará el punto de datos más próximo del cromatograma como punto de la línea de base; no se realizarán cálculos estadísticos. Si establece un valor negativo, ese ajuste tendrá el mismo efecto que **Use baseline from range=Clear**. Detendrá el uso del algoritmo estadístico de la línea de base.

Puede especificar cualquier área del cromatograma para el cálculo de la línea de base. Lo ideal es que sea un área que no presente ningún tipo de ruido químico, sino que solo contenga ruido de fondo. La [Figura 34](#) en la página 57 ilustra la configuración del intervalo del rango de la línea de base, que se muestra como un área sombreada en color gris.

Si especifica dos puntos para **Set Baseline from Range** (por ejemplo, al principio y el final de un cromatograma), la línea de base entre ambos será una línea recta.

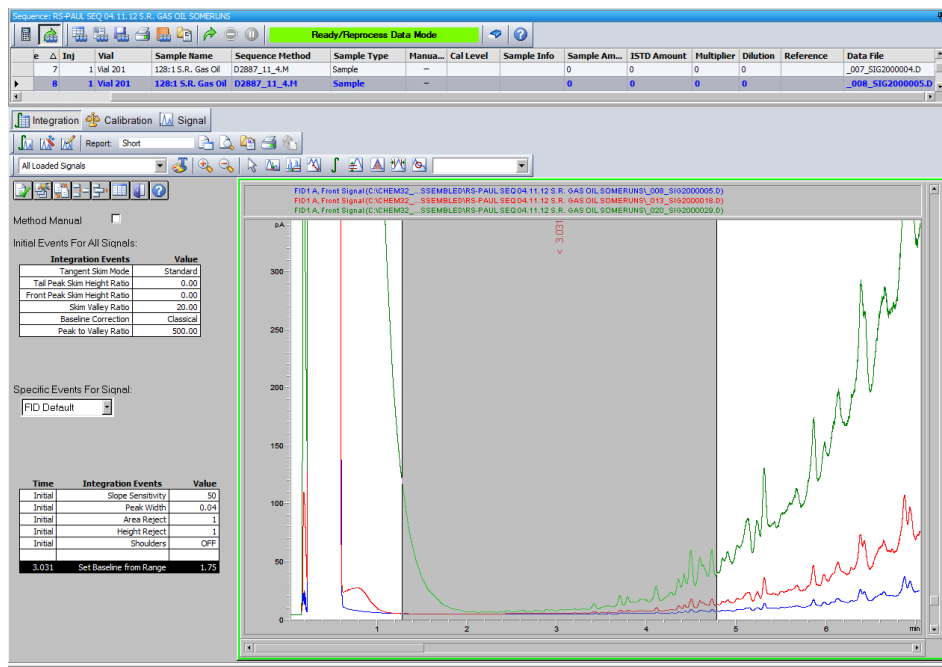


Figura 34 "Fijar línea base a partir de rango": el intervalo del rango de la línea base se indica con un sombreado gris.

Fijar línea base baja a partir de rango

Es similar a la opción **Set Baseline from Range**, pero utiliza el punto más bajo probable de la línea de base, lo que permite que haya un 30 % más de puntos de datos de ruido por encima de ella. Esto minimiza la penetración de la línea de base.

El valor proporcionado será el intervalo de tiempo en torno al momento específico del evento. Define el rango que debe utilizarse para determinar el punto de la línea de base. Consulte "[Modos de corrección de la línea de base](#)" en la página 30 para obtener más información sobre los cálculos estadísticos de la línea de base.

Si establece un valor igual a 0, se utilizará el punto de datos más próximo del cromatograma como punto de la línea de base; no se realizarán cálculos estadísticos. Si establece un valor negativo, ese ajuste tendrá el mismo efecto que **Use baseline from range=Clear**. Detendrá el uso del algoritmo estadístico de la línea de base.

Puede especificar cualquier tiempo e intervalo del cromatograma para el cálculo de la línea de base. Lo ideal es que sea un área que no presente ningún tipo de ruido químico, sino que solo contenga ruido de fondo.

Integración

Eventos de integración

Si especifica dos puntos para **Set Baseline from Range** (por ejemplo, al principio y el final de un cromatograma), la línea de base entre ambos será una línea recta.

Use **Set Low Baseline from Range** en vez de **Set Baseline from Range** cuando el área del cromatograma utilizado para el cálculo contenga un ruido químico excesivo o picos de ruido electrónico.

Hombros Consulte “Eventos iniciales” en la página 44.

Sensibilidad de pendiente Consulte “Eventos iniciales” en la página 44.

Pico de disolvente Los picos cuya pendiente sea superior a un valor específico, expresado en mV/s, se detectarán como picos de disolvente situados fuera del rango de la conversión analógica-digital.

Para los picos con cola se aplicará automáticamente la división tangencial; no es necesario activar el evento de división tangencial.

Si la detección de picos de disolvente está desactivada, se trazarán líneas de caída verticales desde el pico con cola, en lugar de tangentes.

Pico dividido Especifica el punto donde dividir un pico con una línea de caída vertical.

NOTA

No se puede usar **Split Peak** mientras el evento **Area Sum** esté activado. Para dividir un pico con el evento **Area Sum** activado, utilice el evento correspondiente de integración manual.

No se pueden dividir picos previamente divididos mediante el evento **Split Peak**.

División tangencial de cola Especifica dónde iniciar o finalizar la división tangencial.

On

Define un punto desde el cual el integrador establece una división tangencial en el borde posterior del pico siguiente. Todos los picos situados por encima de la tangente están integrados en la línea de base restablecida. La tangente se traza entre el valle ubicado antes del pico pequeño y el punto posterior en el que el gradiente de la señal del detector es igual al gradiente de la tangente. El tiempo del evento de división tangencial puede introducirse en cualquier momento durante el pico. Además, esto designa el pico como un pico de disolvente.

Off

Finaliza la división tangencial una vez completado el pico actual o si no se detectan picos en el intervalo designado (y no se designa un disolvente de forma involuntaria en el grupo siguiente).

Modo de división tangencial

Están disponibles los siguientes modelos para calcular áreas de pico adecuadas:

- Exponencial (consulte [Figura 18](#) en la página 37)
- Exponencial nueva (consulte [Figura 19](#) en la página 38)
- Recta (consulte [Figura 20](#) en la página 39)
- Estándar (consulte “Divisiones estándar” en la página 39)

Picos no asignados

Con algunas construcciones de línea de base, hay pequeñas áreas que quedan por encima de la línea de base y por debajo de la señal, pero no forman parte de ningún pico reconocido. Por lo general, estas áreas ni se miden ni se notifican. Si se habilita la función de picos no asignados, dichas áreas se miden y se notifican como picos no asignados. El tiempo de retención o migración correspondiente a tales áreas es el punto medio entre el inicio y el final del área.

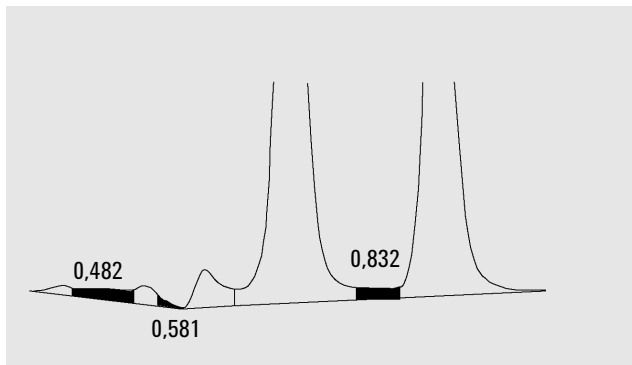


Figura 35 Picos no asignados

Actualizar altura de pico

Este evento obliga al integrador a usar la altura absoluta del punto de datos más alto como altura de pico. Sin este evento, se utiliza el máximo de una curva interpolada. El evento **Update peak height** resulta especialmente útil para señales con picos extremadamente pronunciados y estrechos o picos precedidos por una bajada. Los picos como estos son habituales en las señales de MSD.

El momento inicial del evento **Update peak height** no se evalúa. Este evento siempre afecta al cromatograma completo.

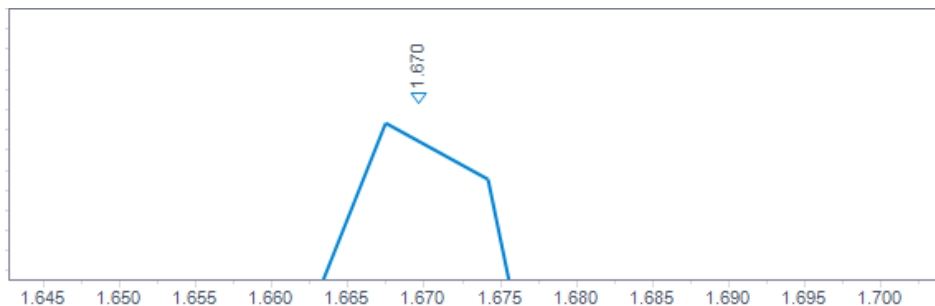


Figura 36 Integración predeterminada

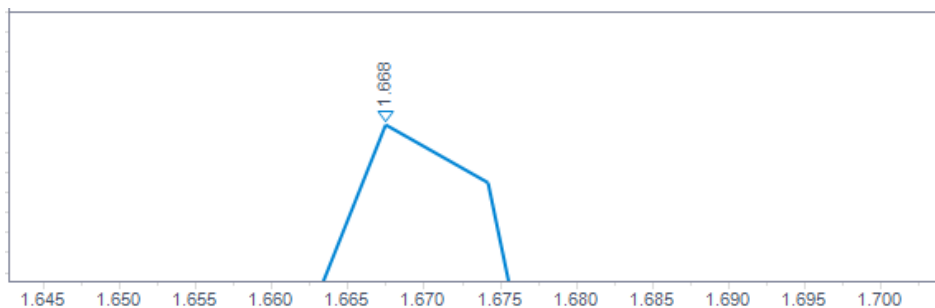


Figura 37 Integración con el evento Actualizar altura de pico

Usar línea base a partir de rango

Permite proyectar un valor de la línea de base a un momento posterior o anterior para minimizar las penetraciones de la línea de base.

Si el valor **Set Baseline from Range** o **Set Low Baseline from Range** se calcula en un área en la que no haya picos cromatográficos, puede resultar útil proyectar la línea de base calculada hasta el punto temporal inmediatamente anterior a la elución del primer pico de interés (o hasta el tiempo inmediatamente posterior a la elución del último pico de interés). **Use Baseline from Range** permite efectuar hasta tres proyecciones en cualquier dirección.

Este evento puede resultar útil si se ha construido una línea de base con pendiente ascendente o descendente; de lo contrario, si la línea de base fuera recta, podría cortar por accidente la curva del cromatograma. Este parámetro indica al integrador los rangos de línea de base de los que debe elegir el punto de la línea de base y proyectarla hasta el punto de la línea de base del intervalo de tiempo especificado.

Puede usar los parámetros siguientes:

- **Clear:** borra el nuevo comportamiento de la línea de base y recupera el algoritmo convencional a partir de ese punto.

Integración

Eventos de integración

- **Left:** utiliza el valor de la línea de base del rango de línea de base más próximo a ese punto temporal por la izquierda.
- **Right:** utiliza el valor de la línea de base del rango de línea de base más próximo a ese punto temporal por la derecha.
- **Range 1-Range 9:** utiliza el valor de la línea de base del rango de línea de base especificado. Los rangos de línea de base se empiezan a contar desde el inicio del cromatograma.

Consulte también el ejemplo del evento **Area Sum Slice** (Figura 29 en la página 51).

Integración automática

La función **Autointegrate** proporciona un punto de partida para el establecimiento de valores de los eventos iniciales. Eso resulta particularmente útil durante la implantación de un nuevo método. El usuario parte de una tabla de eventos de integración por defecto que no contiene eventos programados y optimiza entonces los parámetros propuestos para uso general por la función Integración automática.

Principios de funcionamiento

La función **Autointegrate** lee los datos cromatográficos y calcula los valores óptimos de los parámetros de integración iniciales para cada señal del cromatograma.

El algoritmo examina un 1 % al inicio y el final del cromatograma y determina el ruido y la pendiente de esas zonas. El ruido se determina como 3 veces la desviación estándar de la regresión lineal dividida por la raíz cuadrada del porcentaje de puntos utilizados en la regresión. Los resultados se utilizan para asignar valores apropiados de los parámetros de rechazo por altura y sensibilidad de pendiente para la integración. El algoritmo asigna entonces un valor temporal de anchura de pico dependiendo de la longitud del cromatograma, utilizando un 0,5 % para LC y del 0,3 % al 0,2 % para GC. Se fija en cero el parámetro de rechazo por área inicial y se lleva a cabo una integración de prueba. La prueba se repite varias veces si es necesario, ajustándose en cada intento los valores de los parámetros hasta conseguir detectar al menos 5 picos o hasta que la integración se lleve a cabo con un valor de rechazo por altura inicial de 0. De no cumplirse las condiciones citadas después de 10 intentos, se da por terminada la integración de prueba.

Integración

Eventos de integración

Se examinan los resultados de la integración y se ajusta la anchura de pico en función de las anchuras de los picos detectados, sesgándose el cálculo a favor de los picos iniciales. Se utiliza la simetría de los picos detectados para incluir en el cálculo de la anchura de pico únicamente aquellos picos con simetría entre 0,8 y 1,3. Si no se encuentran suficientes picos simétricos, esos límites se relajan para permitir una *simetría mínima*/1,5 y una *simetría máxima*×1,5. Se examina entonces la línea base entre los picos para refinar los valores previos de rechazo por altura y sensibilidad de pendiente. El rechazo por área se fija en el 90 % del área mínima del pico más simétrico de los detectados durante la integración de prueba.

El cromatograma se integra nuevamente utilizando esos valores finales de los parámetros de integración y los resultados de la integración se almacenan.

Parámetros de la integración automática

La función Integración automática establece valores para los siguientes parámetros:

- Sensibilidad de pendiente inicial
- Altura inicial
- Anchura de pico inicial
- Rechazo por área inicial

Integración manual

Este tipo de integración permite al usuario integrar determinados picos o grupos de picos. A excepción del valor de rechazo por área inicial, los eventos de integración del software se ignoran dentro del rango especificado para la integración manual. Si uno o varios de los picos resultantes de la integración manual están por debajo del umbral de rechazo por área, esos picos se desechan. Los eventos de integración manual utilizan valores de tiempo absoluto. No se ajustan por la deriva de la señal.

La **Manual Integration** permite al usuario definir los puntos de inicio y final del pico para después incluir las áreas recalculadas en las rutinas de cuantificación e informes. Cada uno de estos puntos se etiqueta en los informes con el código de separación de picos M.

La integración manual ofrece las siguientes funciones:

- Draw Baseline** especifica dónde se van a trazar las líneas base para un pico o un conjunto de picos. Con el elemento de menú **Integration > all valleys** puede especificar también si se debe producir o no la separación automática en los puntos de valle de los picos incluidos en el rango dado.
- Negative Peaks** especifica cuándo considerar las áreas por debajo de la línea base como picos negativos. El usuario puede especificar también si se debe producir o no la separación automática en los puntos de valle de los picos incluidos en el rango dado.
- Tangent Skim** calcula las áreas de picos divididos tangencialmente de un pico principal. El área del pico dividido tangencialmente se resta del área del pico principal.
- Split Peak** especifica el punto donde dividir un pico con una línea de caída vertical.
- Delete Peak(s)** elimina uno o más picos de los resultados de integración.

Códigos de separación de picos para picos integrados manualmente

Los picos integrados manualmente se etiquetan en los informes de integración con el código de picos *MM*.

Si hay algún otro pico antes del integrado manualmente y el final de ese pico cambia como consecuencia de la integración manual, el pico modificado recibe el código *F* (forzado). Cuando se detectan los puntos valle, se ajustan al código *V*.

Un pico de disolvente en el pico principal afectado por la integración manual, por ejemplo por una división tangencial, se etiqueta como *R* (disolvente recalculado).

Almacenamiento de eventos de integración manual

Los eventos de integración manual, por ejemplo, una línea base trazada manualmente, son todavía más específicos de cada fichero de datos y señal que los eventos de integración cronometrados. En el caso de cromatogramas complejos, es muy recomendable poder utilizar estos eventos para el reprocesamiento. Por lo tanto, los eventos de integración manual pueden almacenarse directamente en el fichero de datos en lugar del método.

Cada vez que se recibe o reprocesa el fichero de datos, los eventos manuales del fichero de datos se aplican de forma automática. Los análisis que contienen eventos de integración manual se marcan en la columna correspondiente de la **Navigation Table**.

Además de las herramientas para dibujar una línea base y eliminar manualmente un pico, existen tres herramientas adicionales disponibles en la interfase de usuario para:

- Guardar en el fichero de datos eventos manuales de los cromatogramas que se están visualizando;
- quitar todos los eventos de los cromatogramas que se están visualizando;
- deshacer los últimos eventos de integración manual (disponibles hasta que se guarda el evento).

Al continuar con el siguiente fichero de datos durante una revisión en la **Navigation Table**, ChemStation realizará una revisión en busca de eventos de integración manual sin guardar y preguntará al usuario si desea guardarlos.

Los eventos manuales guardados en el fichero de datos durante una revisión en la **Navigation Table** no interfieren con los eventos de integración manual almacenados durante una revisión en el modo **Batch**. Estas dos formas de revisión son completamente independientes con respecto a los eventos manuales de un fichero de datos.

En las revisiones de ChemStation anteriores a B.04.01, los eventos de integración manual se guardaban en el método en lugar de en cada fichero de datos. Todavía se puede utilizar este flujo de trabajo. El menú **Integration** de la vista **Data Analysis** proporciona los siguientes elementos para gestionar eventos de integración manual con el método:

- **Update Manual Events of Method**: Guardar eventos manuales extraídos recientemente en el método.

- **Apply Manual Events from Method:** Aplicar los eventos manuales guardados actualmente en el método al fichero de datos cargado en ese momento.
- **Remove Manual Events from Method:** Eliminar los eventos manuales del método.

Para convertir eventos manuales almacenados en un método para guardarlos en el fichero de datos, aplique los eventos del método y guarde los resultados en el fichero de datos. Si lo desea, quite los eventos del método.

En el caso de que la casilla **Manual Events** de la **Integration Events Table** de un método esté marcada, los eventos manuales del método se aplican siempre al cargar un fichero de datos utilizando este método. Si el fichero de datos contiene eventos manuales adicionales, éstos se aplican después de los eventos del método. Cuando la casilla **Manual Events** está marcada, nunca se le pide al usuario que guarde los eventos en el fichero de datos.

Para convertir eventos manuales almacenados en un método para guardarlos en el fichero de datos, aplique los eventos del método y guarde los resultados en el fichero de datos. Si lo desea, quite ahora los eventos del método.

En el caso de que la casilla **Manual Events** de la **Integration Events Table** de un método esté marcada, los eventos manuales del método se aplican siempre al cargar un fichero de datos utilizando este método. Si el fichero de datos contiene eventos manuales adicionales, éstos se aplican después de los eventos del método. Cuando la casilla **Manual Events** está marcada, nunca se le pide al usuario que guarde los eventos en el fichero de datos.

2

Identificación de picos

Definición de la identificación de picos	67
Reglas de asignación de picos	68
Tipos de identificación de picos	69
Tiempo de retención o migración absoluto	69
Tiempo de retención relativo	69
Tiempo de retención o migración corregido	69
Cualificadores de pico	69
Límites de cantidad	69
Tiempo de retención o migración absoluto	70
Tiempos de retención/migración corregidos	72
Picos de referencia sencillos	72
Picos de referencia múltiples	73
Cualificadores de pico	74
Correlación de la señal	75
Verificación del cualificador	75
Cálculo de la relación de cualificadores	75
El proceso de identificación	76
Búsqueda de los picos de referencia	76
Búsqueda de los picos ISTD	77
Búsqueda de los picos calibrados restantes	77
Clasificación de picos no identificados	77

En este capítulo se describen los conceptos de identificación de picos.

Definición de la identificación de picos

Esta función identifica a los componentes de una muestra desconocida basándose en sus características cromatográficas o electroferográficas, determinadas por el análisis de una muestra de calibración bien definida.

La identificación de estos componentes es un paso necesario en la cuantificación si el método analítico la requiere. Las características de la señal de cada componente de interés se guardan en la tabla de calibración del método.

La función del proceso de identificación de picos es comparar cada pico de la señal con los picos guardados en la tabla de calibración.

La tabla de calibración contiene los tiempos de retención o migración esperados de los componentes de interés. Un pico que coincida con el tiempo de retención o migración de uno de los picos de la tabla de calibración recibe los atributos de ese componente, por ejemplo, el nombre y el factor de respuesta. Los picos que no coinciden con ninguno de los picos de la tabla de calibración se clasifican como desconocidos. El proceso se controla mediante:

- el tiempo de retención o migración en la tabla de calibración para los picos designados como picos de referencia de tiempo,
- las ventanas del tiempo de retención o migración especificadas para los picos de referencia,
- los tiempos de retención o migración en la tabla de calibración para los picos calibrados que no son picos de referencia de tiempo,
- la ventana del tiempo de retención o migración especificada para estos picos que no son de referencia, y
- la presencia de otros picos de cualificación en la relación correcta.

Reglas de asignación de picos

Al proceso de asignación de picos se aplican las siguientes reglas:

- si el pico de la muestra aparece dentro de la ventana de asignación de picos de un componente de la tabla de calibración, al pico se le asignan los atributos de ese componente,
- si dentro de la ventana de asignación de picos aparece más de un pico de la muestra, entonces el pico más cercano al tiempo de retención o migración esperado es el identificado como ese componente,
- si un pico es una referencia de tiempo o un patrón interno, el mayor pico de la ventana se identifica como ese componente,
- si también se utilizan cualificadores de picos, se usa la relación del pico combinada con la ventana de asignación de picos para identificar el pico del componente,
- si el pico es un pico cualificador, se identifica el pico medido más próximo al pico principal del compuesto, y
- si un pico de muestra no aparece en ninguna ventana de asignación de picos, se presenta como componente desconocido.

Tipos de identificación de picos

Se pueden utilizar diferentes técnicas para asignar picos de muestras a los de la tabla de calibración del software ChemStation.

Tiempo de retención o migración absoluto

Se compara el tiempo de retención o migración del pico de muestra con el tiempo de retención o migración esperado especificado para cada componente en la tabla de calibración.

Tiempo de retención relativo

El sistema calcula el Tiempo de retención relativo (EP) y el Tiempo de retención relativo (USP) como $R_r = t_2/t_1$, ambos para picos calibrados y sin calibrar.

Tiempo de retención o migración corregido

Los tiempos de retención o migración esperados de los picos de los componentes se corrigen utilizando los valores de tiempo de retención o migración reales de uno o varios picos de referencia, y el proceso de asignación se realiza utilizando estos tiempos corregidos (relativos). Los picos de referencia deben estar especificados en la tabla de calibración.

Cualificadores de pico

Además de identificar picos por su tiempo de retención o migración, pueden utilizarse cualificadores de picos para obtener resultados más precisos. Si más de un pico aparece en una ventana de tiempo de retención o migración, deben utilizarse los cualificadores para identificar el compuesto correcto.

Límites de cantidad

Los límites de cantidad definidos en el cuadro de diálogo Detalles de compuesto se utilizan para cualificar la identificación de picos. Si la cantidad de compuesto identificado está dentro de las cantidades límite, la identificación de picos se indica en el informe (solamente en el informe clásico, no en el informe inteligente).

Tiempo de retención o migración absoluto

En el proceso de asignación de picos se utiliza una ventana de tiempo de retención o migración. La ventana de tiempo de retención o migración está centrada en el tiempo de retención o migración de un pico esperado. Cualquier pico de muestra que aparezca en esta ventana se puede considerar candidato para la identificación del componente.

Figura 38 en la página 70 muestra una ventana de tiempo de retención o migración para el pico 2 que está entre 1,809 y 2,631 minutos, cuando el tiempo de retención o migración esperado es de 2,22 minutos. Hay dos posibilidades para el pico 2. Uno es en 1,85 minutos y otro en 2,33 minutos. Si el pico esperado no es de referencia, se selecciona el pico más cercano al tiempo de retención o migración esperado de 2,22 minutos.

Si el pico esperado es una referencia de tiempo o un patrón interno, se selecciona el mayor pico de la ventana.

En ambos casos, ChemStation selecciona el pico en 2,33 minutos. Si los dos picos tuvieran el mismo tamaño, se elige el pico más próximo al centro de la ventana.

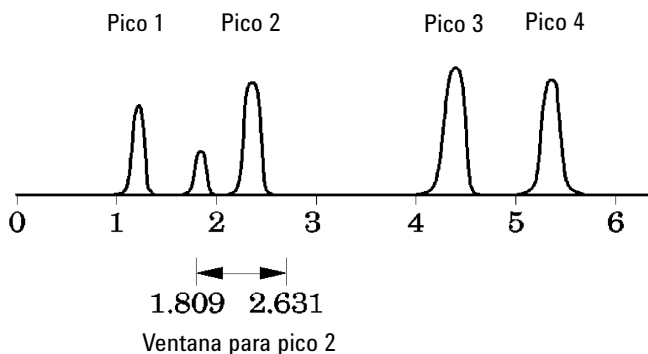


Figura 38 Ventanas de tiempo de retención o migración

Para tratar de localizar picos se utilizan tres tipos de ventanas:

- ventanas de picos de referencia, que se aplican sólo a los picos de referencia,
- ventana de picos que no son de referencia, que se aplican a todos los demás picos calibrados, y
- valores de ventana específicos para componentes individuales que se establecen en el cuadro de diálogo **Compound Details**.

Los valores por defecto de estas ventanas se introducen en el cuadro de diálogo Configuración de calibración. La anchura a ambos lados del tiempo de retención o migración que define la ventana de asignación de picos es la suma de las ventanas absoluta y porcentaje.

Una ventana del 5 % significa que el pico debe tener un tiempo de retención o migración por debajo del 2,5 % y por encima del 2,5 % del tiempo de retención calibrado para ese pico. Por ejemplo, un pico con un tiempo de retención o migración de 2,00 en el análisis de calibración debe aparecer entre 1,95 y 2,05 minutos en los análisis siguientes.

Por ejemplo, una ventana absoluta de 0,20 minutos y una relativa del 10 % producen una ventana de tiempo de retención o migración de entre 1,80 y 2,20 minutos.

$1,80 \text{ min} = 2,00 \text{ min} - 0,10 \text{ min} (0,20 \text{ min}/2) - 0,10 \text{ min} (5 \% \text{ de } 2,00 \text{ min}).$

$2,20 \text{ min} = 2,00 \text{ min} + 0,10 \text{ min} (0,20 \text{ min}/2) + 0,10 \text{ min} (5 \% \text{ de } 2,00 \text{ min}).$

Tiempos de retención/migración corregidos

La asignación de picos por sus tiempos de retención/migración absolutos puede ser sencilla, pero no siempre es fiable. Cada tiempo de retención/migración puede variar ligeramente debido a pequeños cambios en las condiciones o en la técnica. Como resultado, los picos pueden darse fuera de la ventana de asignación de picos y, por tanto, no identificarse.

Una técnica para intentar resolver las inevitables fluctuaciones que ocurren cuando se utilizan los tiempos de retención/migración absolutos, es expresar los tiempos de retención/migración de los componentes en relación a uno o varios picos de referencia.

Los picos de referencia se identifican en la tabla de calibración con una entrada en la columna de referencia de ese pico. La técnica de asignación relativa de picos utiliza el pico o los picos de referencia para modificar la posición de las ventanas de asignación de picos y poder compensar las derivas en los tiempos de retención/migración de los picos de la muestra.

Si no se definen picos de referencia en el método o ChemStation no se puede identificar al menos un pico de referencia durante el análisis, el software utilizará los tiempos de retención/migración absolutos para la identificación.

Picos de referencia sencillos

Se crea una ventana de tiempo de retención o migración para el pico de referencia en torno a su tiempo de retención o migración. El pico mayor que aparece en esta ventana se identifica como el pico de referencia. Se corrigen los tiempos de retención o migración esperados del resto de los picos en la tabla de calibración, en proporción a la relación del tiempo de retención o migración esperado con el tiempo de retención o migración real del pico de referencia.

Picos de referencia múltiples

La corrección de los tiempos de retención o migración con un solo pico de referencia se basa en la suposición de que la desviación del tiempo de retención o migración real respecto a los tiempos de retención o migración esperados cambia de un modo uniforme y lineal según progresa el análisis. A menudo, durante un análisis largo, el tiempo de retención o migración no cambia de manera uniforme. En estos casos se obtienen mejores resultados usando múltiples picos de referencia a intervalos durante el análisis. De esta manera la señal se divide en zonas separadas. Dentro de cada zona se supone que la desviación entre los tiempos de retención o migración cambia linealmente, pero la velocidad del cambio se determina independientemente para cada zona.

NOTA

El algoritmo de corrección del tiempo puede fallar si los tiempos de retención de varios picos de referencia están demasiado próximos entre sí y no se distribuyen en el tiempo total del análisis.

Cualificadores de pico

Puede detectarse un componente con más de una señal. Aunque sea aplicable a todos los formularios de cromatografía con detectores múltiples o detectores capaces de producir señales múltiples, la detección multiseñal se utiliza principalmente en cromatografía de líquidos con varios detectores de longitud de onda y diodo-array. Estos detectores se configuran normalmente de forma que la longitud de onda más próxima al área de absorción mayor se utiliza para definir el pico principal en la tabla de calibración. En [Figura 39](#) en la página 74 es λ_1 .

Las otras dos longitudes de onda adquiridas como señales pueden utilizarse como cualificadores de pico. En la figura, son λ_2 y λ_3 .

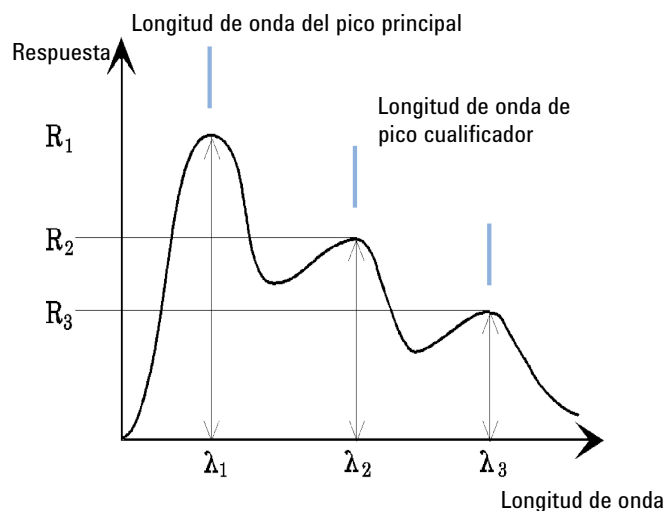


Figura 39 Cualificadores de pico

Los picos de un compuesto tienen una relación de respuesta constante sobre longitudes de onda diferentes.

La respuesta del pico del cualificador es un porcentaje determinado de la respuesta del pico principal. Los límites que determinan el rango aceptable de la respuesta esperada se configuran en la tabla de calibración al seleccionar la opción Detalles de identificación. Si la relación entre el cualificador del pico principal λ_1 y el pico del cualificador, por ejemplo, λ_3 se encuentra entre los límites permitidos, entonces se puede confirmar la identidad del compuesto.

Correlación de la señal

Correlación de la señal significa que dos picos medidos en señales de detector diferentes en una ventana de tiempo definido están asignados al mismo compuesto. La ventana de correlación de la señal se puede controlar con el parámetro **SignalCorrWin** en la tabla **QuantParm** del registro **_DaMethod**. La correlación de la señal se deshabilita cuando se ajusta la ventana de correlación de la señal a 0,0 minutos (para obtener más información, consulte la Ayuda en línea). Cuando está desactivada la correlación de la señal, los picos que eluyen al mismo tiempo de retención/migración se tratan como componentes diferentes.

La ventana de correlación de la señal predeterminada para datos LC, CE, CE/MS y LC/MS es 0,03 minutos y para datos GC es 0,0 minutos.

Verificación del cualificador

Si se habilita la correlación de la señal, la verificación del cualificador está activa por defecto para todos los tipos de fichero de datos. Se puede desactivar al ajustar la marca **UseQualifiers** en la tabla **Quantification Parameters** del método. La verificación del cualificador también se deshabilita al desactivar la correlación de la señal.

Cálculo de la relación de cualificadores

Cuando se habilita la verificación de cualificadores de un compuesto, la relación del tamaño del cualificador y del tamaño del pico principal se verifica en relación a los límites calibrados. El tamaño puede ser la altura o el área en función de los ajustes de la base de cálculo del Informe específico.

Los picos del cualificador pueden calibrarse del mismo modo que los compuestos objetivo. El usuario no necesita especificar la relación de cualificador esperada. La relación de cualificador esperada se calcula de forma automática:

ambos se miden en el tiempo de retención del compuesto.

El parámetro **QualTolerance** define el rango aceptable de la relación del cualificador, por ejemplo, $\pm 20\%$.

La tolerancia es un porcentaje absoluto y puede ajustarse en la interfase de usuario de la tabla de calibración (Detalles de identificación).

Identificación de picos

El proceso de identificación

Para calibraciones multinivel, ChemStation calcula una tolerancia de cualificador mínima basada en las relaciones del cualificador medidas en cada nivel de calibración. La tolerancia mínima del cualificador se calcula con la ecuación siguiente:

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

donde q_i es la relación del cualificador medido en el nivel i .

El proceso de identificación

Cuando intentamos identificar picos, el software realiza tres pasos a través de los datos de integración.

Búsqueda de los picos de referencia

El primer paso identifica los picos de referencia del tiempo. El software busca, en los tiempos de retención/migración de picos del análisis, correspondencias en las ventanas de retención/migración de los picos de referencia de la tabla de calibración. Un pico del análisis se identifica como pico de referencia en la tabla de calibración si el tiempo de retención/migración del pico del análisis está dentro de la ventana construida para el pico de la tabla de calibración.

Si se encuentra más de un pico en una ventana, el pico con mayor área o altura seguido de una asignación de cualificador de la señal positiva, si se configura, se elige como pico de referencia.

Después de encontrar un pico de referencia, la diferencia entre su tiempo de retención/migración y el proporcionado en la tabla de calibración se utiliza para ajustar los tiempos de retención/migración esperados del resto de los picos de la tabla de calibración.

Búsqueda de los picos ISTD

El segundo paso identifica los picos estándar internos definidos. Si un pico no ha sido ya identificado como ISTD, puede serlo como pico de referencia de tiempo. Los picos ISTD son identificados por ventanas de tiempo de retención/migración y cualificadores de picos. Si se encuentra más de un pico en la misma ventana ISTD, se escoge el pico más grande.

Búsqueda de los picos calibrados restantes

El tercer paso identifica todos los picos restantes enumerados en la tabla de calibración. Los picos de no referencia de la tabla de calibración se asignan a los picos de análisis restantes utilizando la ventana RT.

Cada pico calibrado que no sea de referencia tiene su propio tiempo de retención/migración en la tabla de calibración que se ajusta para el análisis concreto en función de la preidentificación de los picos de referencia de tiempo. La ventana de tiempo de retención/migración del pico calibrado se ajusta en función del tiempo de retención/migración corregido del pico calibrado.

Si en la misma ventana se encuentra más de un pico, se escoge aquel con el tiempo de retención/migración más cercano al esperado y que además cumpla las especificaciones del cualificador opcional.

Clasificación de picos no identificados

Si quedan picos sin identificar, hay que clasificarlos como desconocidos. ChemStation intenta agrupar los picos desconocidos que pertenecen a un mismo compuesto. Si se ha detectado un pico en más de una señal, los picos que tengan el mismo tiempo de retención/migración en todas las señales se agrupan en un compuesto.

Se informa sobre los picos desconocidos en el informe clásico si se ha realizado la selección correspondiente en el cuadro de diálogo **Specify Report**.

3

Calibración

Definición de la calibración	79
Curva de calibración	80
Cálculo de la curva de calibración	81
Ajuste lineal	81
Ajuste cuadrático	81
Valores residuales relativos	84
Calibración de grupo	85
Opciones de recalibración	86

En este capítulo se detallan los cálculos utilizados en el proceso de calibración.

Definición de la calibración

Una vez integrados e identificados los picos, el paso siguiente del análisis cuantitativo es la calibración. La cantidad y la respuesta rara vez son proporcionales a la masa real de la muestra que hay que analizar. Esto exige realizar una calibración con materiales de referencia. La cuantificación utiliza el área o la altura de pico para determinar la cantidad de un compuesto que hay en una muestra.

Un análisis cuantitativo incluye varios pasos que se resumen a continuación:

- Conocimiento del compuesto que se analiza.
- Determinación de un método para analizar muestras que contengan una cantidad conocida de ese compuesto, denominadas muestras o patrones de calibración.
- Análisis de la muestra de calibración para obtener la respuesta asociada a esa cantidad.

Alternativamente, se puede analizar una serie de estos patrones con distintas cantidades de los compuestos de interés si el detector genera una respuesta no lineal. Este proceso se conoce como *calibración multinivel*.

Puede realizar la cuantificación mediante los siguientes métodos de calibración:

- Calibración específica del compuesto: patrones externos (ESTD) e internos (ISTD).
- Cuantificación indirecta mediante la calibración o el factor de respuesta de otro compuesto o grupo.
- Factor de respuesta fijo (**Manual Factor**).

Las curvas y los cálculos de calibración con ESTD se basan en las respuestas medidas (áreas o alturas) para determinadas cantidades. Las curvas y los cálculos de calibración con ISTD se basan en respuestas y cantidades relativas.

Curva de calibración

Una curva de calibración es una representación gráfica de los datos de cantidad y respuesta correspondientes a un compuesto obtenidos de una o más muestras de calibración.

Normalmente se inyecta una alícuota de la muestra de calibración, se obtiene una señal y se determina la respuesta calculando el área o la altura del pico, de forma similar a lo que se ilustra en la [Figura 40](#) en la página 80.

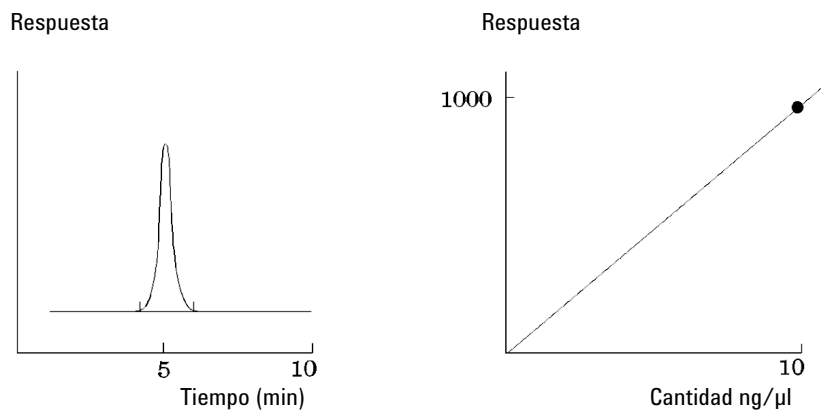


Figura 40 Señal de la muestra de calibración (10 ng/μl) y curva de calibración

Cálculo de la curva de calibración

Ajuste lineal

N = número de observaciones discretas

X_i = variable independiente, i-ésima observación

Y_i = variable dependiente, i-ésima observación

Fórmula de la curva:

$$y(x) = a + bX$$

Coefficientes:

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

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

donde

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

Ajuste cuadrático

Fórmula de la curva cuadrática:

$$y = a + (b * x) + (c * x^2)$$

Se necesitan como mínimo tres puntos de calibración para realizar un ajuste cuadrático. Se necesitan dos puntos si el origen se incluye o está forzado.

Cálculo de los coeficientes de ajuste cuadrático

Los coeficientes son el resultado de las siguientes ecuaciones lineales simultáneas. Se utiliza el algoritmo de Crout para resolver la correspondiente ecuación matricial normal ($A^T A x = A^T y$). En la fórmula dada, las sumas se abrevian como:

$$\begin{aligned} W &= \sum(wt) \\ XW &= \sum(x * wt) \\ X2W &= \sum(x^2 * wt) \\ X3W &= \sum(x^3 * wt) \\ X4W &= \sum(x^4 * wt) \\ YW &= \sum(y * wt) \\ XYW &= \sum(x * y * wt) \\ X2YW &= \sum(x^2 * y * wt) \end{aligned}$$

Para evitar el desbordamiento, los valores de x se normalizan antes de introducirse en el cálculo:

$$\begin{aligned} \text{Norm} &= \sum(x) \\ x &= x / \text{Norm} \end{aligned}$$

Ecuaciones normales de la curva cuadrática:

$$\begin{aligned} \sum(wt) * a + \sum(x * wt) * b + \sum(x^2 * wt) * c &= \sum(y * wt) \\ \sum(x * wt) * a + \sum(x^2 * wt) * b + \sum(x^3 * wt) * c &= \sum(x * y * wt) \\ \sum(x^2 * wt) * a + \sum(x^3 * wt) * b + \sum(x^4 * wt) * c &= \sum(x^2 * y * wt) \end{aligned}$$

O, expresadas como una ecuación matricial:

$$\begin{vmatrix} W & XW & X2W \\ XW & X2W & X3W \\ X2W & X3W & X4W \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} a \\ b \\ c \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} YW \\ XYW \\ X2YW \end{vmatrix}$$

Descomposición de Crout:

$$\begin{vmatrix} W & XW & X2W \\ XW & X2W & X3W \\ X2W & X3W & X4W \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} L11 & & \\ L21 & L22 & \\ L31 & L32 & L33 \end{vmatrix} * \begin{vmatrix} 1 & U12 & U13 \\ & 1 & U23 \\ & & 1 \end{vmatrix}$$

Con las siguientes abreviaturas de valores:

$$\begin{aligned}
 L11 &= W \\
 U12 &= \frac{XW}{L11} \\
 L21 &= XW \\
 U13 &= \frac{X2W}{L11} \\
 L31 &= X2W \\
 L22 &= X2W - L21 * U12 \\
 U23 &= \frac{X3W - L21 * U13}{L22} \\
 L32 &= X3W - L31 * U12 \\
 L33 &= X4W - (L31 * U13) - (L32 * U23)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 z0 &= \frac{YW}{L11} \\
 z1 &= \frac{XYW - (L21 * z0)}{L22} \\
 z2 &= \frac{X2YW - (L31 * z0) - (L32 * z1)}{L33} \\
 c' &= z2 \\
 b' &= z1 - (U23 * c') \\
 a' &= z0 - (U12 * b') - (U13 * c')
 \end{aligned}$$

Por último, se debe revertir la normalización:

$$\begin{aligned}
 a &= a' \\
 b &= \frac{b'}{\text{Norm}} \\
 c &= \frac{c'}{\text{Norm}^2}
 \end{aligned}$$

Valores residuales relativos

Para cada nivel de calibración se muestra el valor *residual relativo*. Ese valor se calcula utilizando la fórmula siguiente:

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

donde:

relRES = valor residual relativo en porcentaje

La respuesta calculada representa el punto sobre la curva de calibración.

La *desviación estándar residual*, que se imprime en algunos informes y cuando se selecciona la impresión de la tabla y las curvas de calibración, se calcula utilizando la fórmula siguiente:

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

donde:

ResSTD = desviación estándar residual

Resp_{calibratedi} = respuesta calibrada para el punto i

Resp_{calculatedi} = respuesta calculada para el punto i

n = número de puntos de calibración

Calibración de grupo

La calibración de grupo puede aplicarse a compuestos en los que no se conocen las concentraciones de forma individual, sino que se conoce la suma de concentraciones del grupo de compuestos. Un ejemplo son los isómeros para los que se calibran los grupos completos de compuestos. Para ello, se utilizan las siguientes fórmulas:

Calibración

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

donde:

$Conc_{AB}$ es la concentración del grupo de compuestos formada por un compuesto A y uno B

$Respuesta_A$ es el área o altura de un compuesto A

RF_A es el factor de respuesta

Para compuestos pertenecientes a un grupo de compuestos se asumen factores de respuesta iguales:

$$RF_A = RF_B$$

Por tanto, la concentración de un compuesto perteneciente a un grupo se calcula del siguiente modo:

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

Opciones de recalibración

Existen diferentes formas de actualizar las respuestas en la tabla de calibración con los nuevos datos de calibración.

Average

El promedio de los análisis de calibración se calcula con la siguiente fórmula:

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

Floating Average

Se calcula la media ponderada de los análisis de calibración. El peso actualizado se fija en el cuadro de diálogo **Recalibration Settings**.

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

Replace

Los nuevos valores de respuesta reemplazan a los anteriores.

4

Cuantificación

Definición de la cuantificación	88
Cálculos de cuantificación	89
Factores de corrección	89
Factor de respuesta absoluta	89
Multiplicador	90
Factor de dilución	90
Cantidad de muestra	90
% de área y % de altura	91
Cuantificación de compuestos calibrados	92
Cálculo para ESTD	92
Cálculo para ISTD	94
Cuantificación de picos no calibrados	97
Cuantificación indirecta usando un compuesto calibrado	97
Cuantificación mediante un factor manual	98
Cálculo de % Norm	99

En este capítulo se describe cómo se cuantifican los compuestos y se explican los cálculos utilizados para la cuantificación.

Definición de la cuantificación

Una vez integrados e identificados los picos, el paso siguiente del análisis es la cuantificación. La cuantificación utiliza el área o la altura de pico para determinar la concentración de un compuesto en una muestra.

Un análisis cuantitativo incluye varios pasos que se resumen a continuación:

- Conocimiento del compuesto que se analiza.
- Establecimiento de un método para analizar muestras que contengan este compuesto.
- Análisis de una o varias muestras que contengan una o varias concentraciones conocidas del compuesto para obtener la respuesta debida a dicha concentración.

Alternativamente, se puede analizar una serie de estas muestras con distintas concentraciones de los compuestos de interés si el detector genera una respuesta no lineal. Este proceso se conoce como *calibración multinivel*.

- Análisis de la muestra que contiene una concentración desconocida del compuesto para obtener la respuesta debida a la concentración desconocida.
- Comparación de la respuesta de la concentración desconocida con la respuesta de la concentración conocida para determinar la cantidad del compuesto que está presente.

Para obtener una comparación válida para la respuesta de muestra desconocida a la de la muestra conocida, se deben adquirir y procesar los datos en condiciones idénticas.

Cálculos de cuantificación

ChemStation ofrece los procedimientos de cálculo siguientes para determinar la concentración de cada componente presente en una mezcla:

- Porcentaje
- Normalización
- Estándar externo o ESTD (External Standard)
- % de ESTD
- Estándar interno o ISTD (Internal Standard)
- % de ISTD

Los cálculos utilizados para determinar la concentración de un compuesto en una muestra desconocida dependen del tipo de cuantificación. Cada procedimiento de cálculo utiliza el área o la altura de pico para el cálculo y genera un tipo de informe distinto.

Factores de corrección

Los cálculos de cuantificación utilizan cuatro factores de corrección: el *factor de respuesta absoluta*, el *multiplicador*, el *factor de dilución* y la *cantidad de muestra*. Estos factores se utilizan en los procedimientos de calibración para compensar las variaciones de la respuesta del detector a distintos componentes de muestra, concentraciones, diluciones de muestra, cantidades de muestra y para convertir unidades.

Factor de respuesta absoluta

El factor de respuesta absoluto de un componente de muestra representa la cantidad del componente dividida por el área o la altura medida del pico del componente en el análisis de una mezcla de calibración. El factor de respuesta absoluto, que se utiliza en cada procedimiento de cálculo calibrado, corrige la respuesta del detector para los componentes individuales de las muestras.

Multiplicador

El multiplicador se utiliza en cada fórmula de cálculo para multiplicar el resultado de cada componente. El multiplicador se puede utilizar para convertir unidades en cantidades expresadas.

Factor de dilución

El factor de dilución es un número por el que se multiplican todos los resultados calculados antes de imprimir el informe. Se puede utilizar para cambiar la escala de los resultados o corregir los cambios de una composición de muestra durante el trabajo previo al análisis. También se puede utilizar el factor de dilución para cualquier otra finalidad que requiera la utilización de un factor constante.

Cantidad de muestra

Si se seleccionan los cálculos % de ESTD o % de ISTD, los informes de ESTD e ISTD ofrecen valores relativos en lugar de absolutos, es decir, la cantidad de cada componente se expresa como un porcentaje de la cantidad de muestra. La cantidad de muestra se utiliza en los informes de % de ESTD y % de ISTD para convertir la cantidad absoluta de los componentes analizados en valores relativos dividiendo por el valor especificado.

% de área y % de altura

El procedimiento de cálculo de **Area%** proporciona el área de cada pico del análisis como un porcentaje del área total de todos los picos del análisis. El **Area%** no requiere una calibración previa y no depende de la cantidad de muestra inyectada dentro de los límites del detector. No se utiliza ningún factor de respuesta. Si todos los componentes responden del mismo modo al detector y son eluidos, el **Area%** ofrecerá una aproximación adecuada de las cantidades relativas de los componentes.

El **Area%** se utiliza por rutina cuando los resultados cualitativos son de interés, y para obtener información a fin de crear la tabla de calibración necesaria para otros procedimientos de calibración.

El procedimiento de cálculo de **Height%** proporciona la altura de cada pico del análisis como un porcentaje de la altura total de todos los picos del análisis.

El multiplicador y el factor de dilución del cuadro de diálogo **Calibration Settings** o **Sample Information**, o bien de **Sequence Table** no se aplican en el cálculo del % de área o de altura.

Cuantificación de compuestos calibrados

Los procedimientos de cálculo para patrones externos (ESTD), de normalización e internos (ISTD) requieren factores de respuesta y, por lo tanto, una tabla de calibración. En la tabla de calibración se especifica la conversión de respuestas en las unidades seleccionadas mediante el procedimiento seleccionado.

Cálculo para ESTD

El procedimiento ESTD es el procedimiento de cuantificación básico en el que se analizan tanto las muestras de calibración como las desconocidas en las mismas condiciones. A continuación, se comparan los resultados de la muestra desconocida con los de la muestra de calibración para calcular la cantidad en la desconocida.

En el procedimiento ESTD, a diferencia del procedimiento ISTD, se utilizan factores de respuesta absolutos. Los factores de respuesta se obtienen a partir de una calibración y luego se almacenan. En los análisis de muestras siguientes, se calculan las cantidades de los componentes aplicando estos factores de respuesta a las cantidades de muestra medidas. Asegúrese de que el tamaño de la inyección de muestra se puede reproducir entre análisis, puesto que no hay ningún estándar en la muestra para corregir las variaciones del tamaño de la inyección o la preparación de la muestra.

Al preparar un informe ESTD, el cálculo de la cantidad de un compuesto determinado de una muestra desconocida se realiza en dos pasos:

- 1 Se calcula una ecuación para la curva que pasa por los puntos de calibración de este compuesto utilizando el tipo de ajuste especificado en el cuadro de diálogo Configuración de calibración o Curva de calibración.
- 2 La cantidad del compuesto en la muestra desconocida se calcula mediante la ecuación que se describe más abajo. Puede que esta cantidad aparezca en el informe o que se utilice en otros cálculos requeridos por los valores Multiplicador, Factor de dilución o Cantidad de muestra antes de que se informe sobre ellos.

Si se selecciona el ESTD, la ecuación utilizada para calcular la cantidad absoluta del componente x es la siguiente:

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

donde:

Respuesta_x es la respuesta del pico x;

RF_x es el factor de respuesta del componente x, que se calcula del modo siguiente:

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

M es el multiplicador.

D es el factor de dilución.

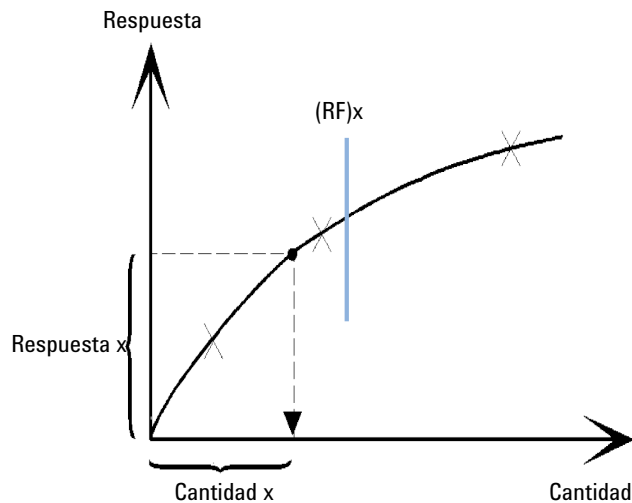


Figura 41 Factor de respuesta

El multiplicador y el factor de dilución se obtienen del cuadro de diálogo **Calibration Settings** o **Sample Information**.

Si se selecciona el informe % de ESTD y la cantidad de muestra es distinta de cero, la cantidad relativa (%) de un componente x se calculará del modo siguiente:

Cuantificación

Cuantificación de compuestos calibrados

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

donde:

La *cantidad absoluta de x* se calcula tal como se muestra más arriba en el cálculo de ESTD.

La *cantidad de muestra* se obtiene del cuadro de diálogo Información de muestra o Ajustes de cuantificación para análisis individuales. Si la cantidad de la muestra es cero, se calculará el ESTD.

Cálculo para ISTD

El procedimiento ISTD elimina los inconvenientes del método ESTD añadiendo una cantidad conocida de un componente, que sirve como factor de normalización. Este componente, el *estándar interno*, se añade tanto a las muestras de calibración como a las desconocidas.

El software recupera los factores de respuesta apropiados obtenidos de una calibración anterior almacenada en el método. El software calcula las concentraciones de componentes mediante la concentración y las áreas de pico o alturas del estándar interno del análisis.

El compuesto utilizado como estándar interno debe ser similar al compuesto calibrado, tanto químicamente como en su tiempo de retención/migración, pero debe ser cromatográficamente distinguible.

Tabla 8 Procedimiento ISTD

Ventajas	Inconvenientes
La variación del tamaño de la muestra no es crítica.	Se debe añadir el estándar interno a todas las muestras.
La deriva del instrumento se compensa con el estándar interno.	
Los efectos de las preparaciones de muestra se minimizan si el comportamiento químico del ISTD y la muestra desconocida son similares.	

Si se utiliza el procedimiento ISTD para calibraciones con una característica no lineal, se debe tener cuidado para que los errores resultantes del principio de cál-

culo no provoquen errores sistemáticos. En las calibraciones multinivel, la cantidad del compuesto ISTD debe mantenerse constante, es decir, la misma para todos los niveles si la curva de calibración del compuesto es no lineal.

En el análisis de estándar interno, la cantidad del componente de interés está relacionada con la cantidad del componente estándar interno por la relación de las respuestas de los dos picos.

En una calibración ISTD de dos análisis, el cálculo de la relación de cantidad corregida de un determinado compuesto de una muestra desconocida se realiza en las fases siguientes:

Análisis 1: Calibración

- 1 Los puntos de calibración se crean calculando una relación de cantidad y una relación de respuesta para cada nivel de un pico determinado de la tabla de calibración.

La relación de cantidad es la cantidad del compuesto dividida por la cantidad del estándar interno a este nivel.

La relación de respuesta es el área del compuesto dividida por el área o la altura del estándar interno a este nivel.

- 2 Una ecuación para la curva que pasa por los puntos de calibración se calcula utilizando el tipo de ajuste de curva especificado en el cuadro de diálogo Configuración de calibración o Curva de calibración.

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

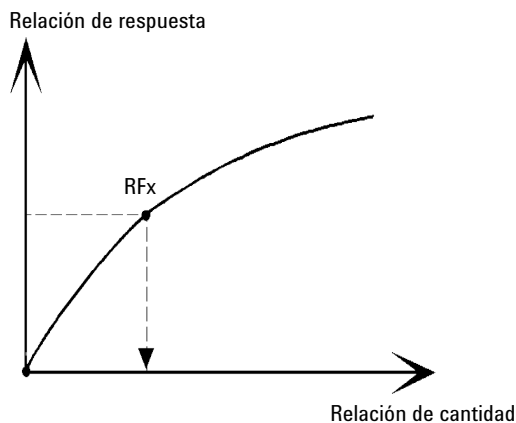


Figura 42 Relación de cantidad

Análisis 2: Muestra desconocida

- 1 Se divide la respuesta del compuesto de la muestra desconocida por la respuesta del estándar interno de la muestra desconocida a fin de proporcionar una relación de respuesta para la muestra desconocida.
- 2 Se calcula una relación de cantidad para la muestra desconocida utilizando la ecuación de ajuste de curva determinada en el paso 2 anterior y la cantidad real de ISTD de la muestra.

Cálculo de compuestos calibrados para ISTD

Las ecuaciones utilizadas para calcular la cantidad real de un compuesto calibrado (x) para una calibración de un único nivel son las siguientes:

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

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

donde:

RF_x es el factor de respuesta del compuesto x.

La *cantidad real* de ISTD es el valor indicado en el cuadro de diálogo Configuración de calibración o Información de muestra para el patrón interno añadido a la muestra desconocida.

M es el multiplicador.

D es el factor de dilución.

Si se selecciona el tipo de informe % de ISTD, se utilizará la ecuación siguiente para calcular la cantidad relativa (%) del componente x:

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

Cuantificación de picos no calibrados

Los picos no calibrados pueden cuantificarse bien con un factor de respuesta fijo o bien con los datos de calibración de uno de los compuestos calibrados. La cuantificación con un factor de respuesta fijo o los datos de compuestos calibrados es específica de la señal. En el último caso, si el compuesto calibrado es cuantificado mediante un método ISTD, el ISTD se usa para los picos no identificados del mismo modo que para el compuesto calibrado.

Cuantificación indirecta usando un compuesto calibrado

Si los datos de calibración de un compuesto calibrado van a usarse para cuantificar picos no calibrados, el compuesto calibrado se selecciona en la lista desplegable **Using Compound** del cuadro de diálogo **Calibration Settings**. Los cálculos son los mismos que para los compuestos calibrados. Si el compuesto calibrado se cuantifica mediante un método ISTD, el ISTD se usa para el compuesto no calibrado del mismo modo que para el compuesto de referencia.

La ausencia de un pico de referencia origina un valor cero del pico no calibrado.

Cuantificación mediante un factor manual

El software le permite cuantificar un compuesto identificado basado en un factor de respuesta fijo (**With Rsp Factor** del cuadro de diálogo **Calibration Settings**). En este caso, la cantidad de compuesto se calcula utilizando el factor de respuesta fijo:

$$\text{Cantidad} = \text{Respuesta} * \text{FactorResp} * M * D$$

donde:

Factor manual

Factor de respuesta fijo

Respuesta

La respuesta puede ser Área o Altura

Uso de un factor manual con un método ISTD

Si la cantidad del compuesto se cuantifica utilizando un factor de respuesta fijo y un ISTD, la fórmula se lee como sigue:

$$\text{Relación de áreas} = \text{Área} / \text{Área}_{\text{ISTD}}$$

o bien:

$$\text{Relación de alturas} = \text{Altura} / \text{Altura}_{\text{ISTD}}$$

La cantidad se calcula a continuación como sigue:

$$\text{Cantidad} = \text{Relación de áreas} * \text{Factor manual} * \text{Cantidad}_{\text{ISTD}}$$

o bien:

$$\text{Cantidad} = \text{Relación de alturas} * \text{Factor manual} * \text{Cantidad}_{\text{ISTD}}$$

Dependencia del factor manual y del factor de respuesta (RF)

Si se define RF como **Response per amount** (valor predeterminado):

$$\text{RF} = 1 / \text{Factor manual}$$

Si se define RF como **Amount per response**:

$$\text{RF} = \text{Factor manual}$$

Cálculo de % Norm

En el método de normalización, se aplican los factores de respuesta a las áreas de picos (o alturas) para compensar los cambios que se producen en la sensibilidad del detector para los distintos componentes de las muestras.

El informe % Norm se calcula del mismo modo que un informe ESTD, con la diferencia de que hay un paso adicional para calcular las cantidades relativas de los compuestos en lugar de las absolutas.

El informe % Norm tiene el mismo inconveniente que los informes % de área y % de altura. Cualquier cambio que afecte al área de pico total afectará al cálculo de concentración de cada pico individual. El informe de normalización sólo debe utilizarse si todos los componentes de interés son eluidos e integrados. Si se excluyen determinados picos de un informe de normalización, cambiarán los resultados del informe de la muestra.

La ecuación utilizada para calcular el **Norm%** de un componente x es la siguiente:

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

donde:

Respuesta_x	es el área (o la altura) del pico x,
RF_x	es el factor de respuesta,
$\sum (\text{Respuesta} \cdot RF)$	es el total de todos los productos ($\text{Respuesta} \cdot RF$) para todos los picos, incluido el pico x,
M	es el multiplicador,
D	es el factor de dilución.

El multiplicador y el factor de dilución se obtienen del cuadro de diálogo **Quantitation Settings** disponible en el cuadro de diálogo **Specify Report**, o de la tabla de secuencia.

5 Idoneidad del sistema

Evaluación de rendimiento de pico	101
Evaluación de la idoneidad del sistema	101
Determinación del ruido	104
Cálculo del ruido utilizando seis veces la desviación estándar	105
Cálculo del ruido con la fórmula pico a pico	106
Cálculo del ruido con el método ASTM	107
Cálculo de señal-ruido	110
Deriva y desviación	113
Cálculo de la asimetría y simetría de pico	115
Fórmulas y cálculos de idoneidad del sistema	117
Definiciones generales	118
Volumen de huecos	118
Tiempo de retención del compuesto no retenido, T_m [minutos]	118
Definiciones del test de rendimiento	119
Descripción general de los ensayos de rendimiento	119
Momentos estadísticos, sesgo y exceso	121
Anchura verdadera de pico W_x [min]	123
Factor de capacidad (USP)	123
Factor de cola (USP) t	124
Número de platos teóricos por Columna n	125
Número de platos teóricos por metro, N [1/m]	126
Retención relativa y selectividad	127
Resolución (USP, ASTM) R	128
Resolución (EP/JP) R_s	128
Resolución (definiciones clásicas de ChemStation)	128
Relación pico a valle (EP/JP)	129
Definiciones de la reproducibilidad	131
Media de la muestra, M	131
Desviación estándar de la muestra, S	132
Desviación estándar relativa, RSD [%] (USP)	132
Desviación estándar de la media, S	132
Desviación estándar, S	133
Intervalo de confianza, CI	133
Coefficiente de correlación	134
Acceso al número de doble precisión almacenado internamente	136

En este capítulo se describe qué puede hacer OpenLab CDS para evaluar el rendimiento del instrumento analítico y el método analítico.

Evaluación de rendimiento de pico

El Rendimiento de pico se puede calcular para cualquier pico integrado de los datos cargados y también para picos nuevos integrados manualmente. La *herramienta interactiva de rendimiento de pico* calcula las características del pico y las muestra en la UI. La herramienta de rendimiento de pico usa la anchura de pico verdadera en varias alturas y un tiempo de retención evaluado por un algoritmo de modelación de picos. Estos valores se muestran exclusivamente en la UI de la herramienta de rendimiento de pico. Pueden variar ligeramente según los valores del integrador que se muestran en los informes.

Evaluación de la idoneidad del sistema

La evaluación del rendimiento tanto del instrumento analítico antes de su uso en análisis de muestras como del método antes de su uso diario, es una buena práctica analítica. También es recomendable comprobar el rendimiento de los sistemas de análisis antes y durante los análisis rutinarios. El software ChemStation proporciona las herramientas para realizar los tres tipos de pruebas de forma automática. La comprobación del instrumento incluye la sensibilidad del detector, la precisión de los tiempos de retención y migración y la precisión de las áreas de picos. Una prueba de métodos incluye la precisión de los tiempos y cantidades de retención y migración, la selectividad y la robustez del método en las variaciones día a día mientras está en funcionamiento. La comprobación del sistema afecta a la precisión de la cantidad, la resolución entre dos picos específicos y las colas de picos.

Los laboratorios tienen que cumplir:

- La Normativa de prácticas adecuadas de laboratorio (GLP),
- La Normativa de prácticas adecuadas de fabricación (GMP) y la Normativa Actual de prácticas adecuadas de fabricación (cGMP) y
- La normativa de prácticas automatizadas de laboratorio adecuadas (GALP).

Se aconseja que los laboratorios realicen estas pruebas y documenten los resultados exhaustivamente. Los laboratorios que formen parte de un sistema de control de la calidad, por ejemplo para cumplir con la ISO9000, tendrán que demostrar el buen funcionamiento de sus instrumentos.

ChemStation coteja los resultados de diferentes análisis y los evalúa de forma estadística en el informe de resúmenes de secuencias.

Las pruebas se documentan en un formato aceptado generalmente por las autoridades apropiadas y por auditores independientes. Las estadísticas incluyen:

- Tiempo de retención/migración del pico
- Área de pico
- Cantidad
- Altura de pico
- Anchura de pico a media altura
- Simetría de pico
- Cola de pico
- Factor de capacidad (k')
- Números de platos
- Resolución entre picos
- Selectividad relativa al pico anterior
- Sesgo
- Exceso

Se calcula el valor medio, la desviación estándar, la desviación estándar relativa y el intervalo de confianza. Puede configurar los límites para la desviación estándar, la desviación estándar relativa o el intervalo de confianza de estos parámetros. Si los valores superan los límites, el informe le indica que les preste atención.

La calidad de los datos analíticos se sostiene manteniendo los registros de las condiciones reales en el momentos en el que las mediciones se realizaron. La información se almacena con los datos e incluye los datos de muestras. Las curvas de rendimiento del instrumento se registran durante el análisis entero como señales y se almacenan en el fichero de datos. Si el instrumento lo admite, estos registros, superpuestos en el cromatograma, pueden recuperarse cuando se desee, por ejemplo durante una auditoría.

El ruido y la deriva de la línea base se pueden medir de forma automática. Un nivel mínimo detectable puede calcularse con los datos de altura de pico para cada componente calibrado en el método.

Finalmente, puede incluirse la configuración del instrumento, los números de serie del instrumento, la identificación de columnas/capilares y sus propios comentarios en el informe impreso.

Los resultados de rendimiento ampliados se calculan sólo para los componentes calibrados en el método, asegurando la caracterización en las horas de retención/migración y los nombres de los componentes.

Un informe típico de comprobación del rendimiento del sistema contiene los siguientes resultados de rendimiento:

- Información del instrumento
- Detalles de la columna/capilar
- Método analítico
- Información de muestras
- Información de adquisición
- Descripción de la señal y determinación del ruido de la línea base
- Señal etiquetada con tiempos de retención/migración o nombres de compuestos

Además, se genera la siguiente información para cada compuesto calibrado en el cromatograma:

- Tiempo de retención/migración
- k'
- Simetría
- Anchura de pico
- Número de platos
- Resolución
- Relación señal-ruido
- Nombre del compuesto

Determinación del ruido

El ruido puede determinarse a partir de los valores de los puntos de datos de un rango de tiempo seleccionado de una señal. El ruido se trata de tres formas diferentes:

- como seis veces la desviación estándar (sd) de la regresión lineal de la deriva,
- como pico a pico (deriva corregida) y
- como determina el método ASTM (ASTM E 685-93).

El ruido puede calcularse para un máximo de siete rangos de la señal; los rangos se especifican como parte de la configuración de idoneidad del sistema en los parámetros de información.

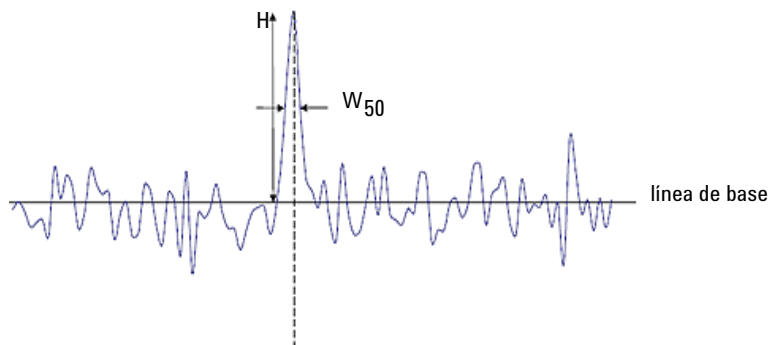
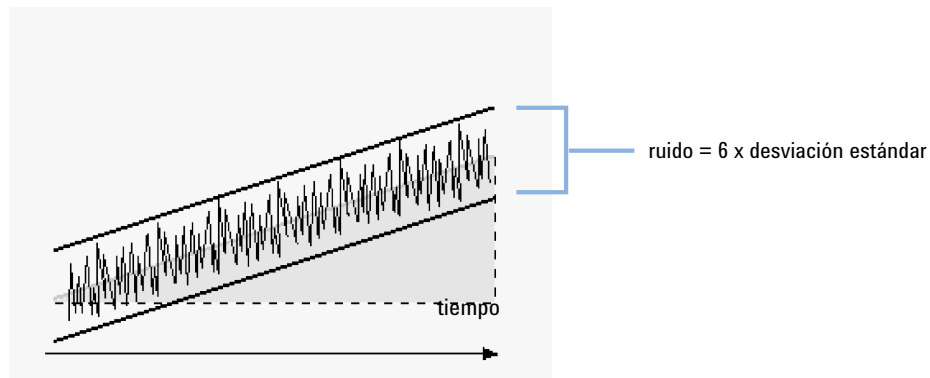


Figura 43 Cromatograma con señal de pico y ruido

H	Altura de pico desde la línea base (línea recta de mejor ajuste a través del ruido)
W_{50}	Anchura de pico a media altura

Cálculo del ruido utilizando seis veces la desviación estándar



Se calcula la regresión lineal con todos los puntos de datos en el rango de tiempo de la señal seleccionada. El ruido se calcula con la fórmula:

$$N = 6 \times Std$$

donde:

N	Ruido según el método de seis veces la desviación estándar.
Est.	Desviación estándar de la regresión lineal de todos los puntos de datos en el rango de tiempo seleccionado.

Cálculo del ruido con la fórmula pico a pico

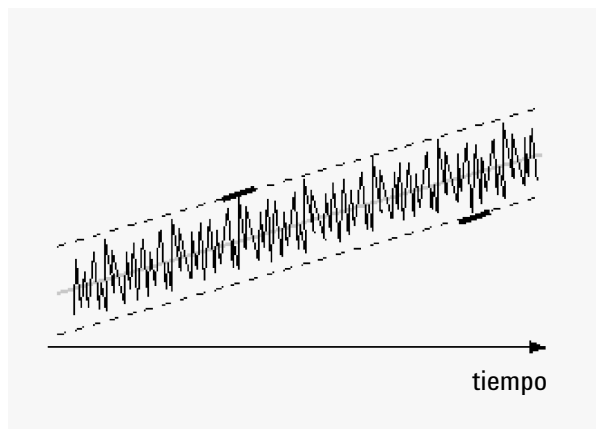


Figura 44 Ilustración del ruido pico a pico con deriva

Se calcula la deriva en primer lugar determinando la regresión lineal con todos los puntos de datos en el rango de tiempo de un pico. Esa línea de regresión lineal se resta de todos los puntos de datos englobados en el intervalo de tiempo, obteniéndose así la señal corregida por la deriva.

Entonces se calcula el ruido pico a pico con la fórmula:

$$N = I_{\max} - I_{\min}$$

donde:

N	Ruido pico a pico
I_{\max}	Valor más alto (máximo) de I_x en el rango de tiempo
I_{\min}	Valor más bajo (mínimo) de I_x en el rango de tiempo
I_x	Intensidad de la señal, corregida según la deriva (la deriva se calcula mediante la fórmula LSQ)

Para cálculos de la Farmacopea Europea, el ruido pico a pico se calcula usando una señal blanco de referencia en un rango de -10 y $+10$ veces W_{50} flanqueando cada pico. Esta región puede ser simétrica a la señal de interés o asimétrica si es necesario debido a las señales de la matriz.

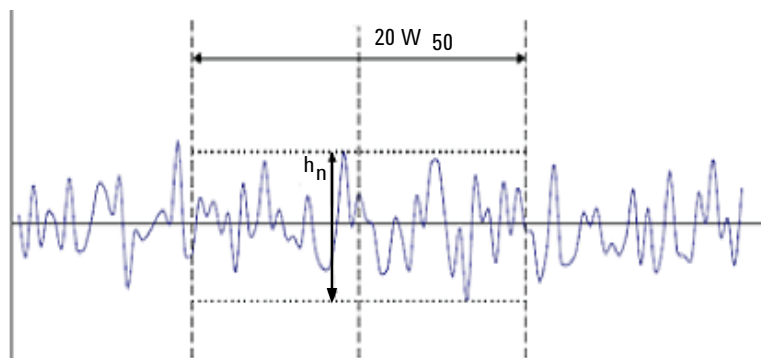


Figura 45 Determinación del ruido a partir del cromatograma de una muestra del blanco.

donde

$20 W_{50}$ es la región correspondiente al pliegue 20 de W_{50} .

h_n es la amplitud máxima del ruido de la línea base en el pliegue 20 de la región W_{50} .

Cálculo del ruido con el método ASTM

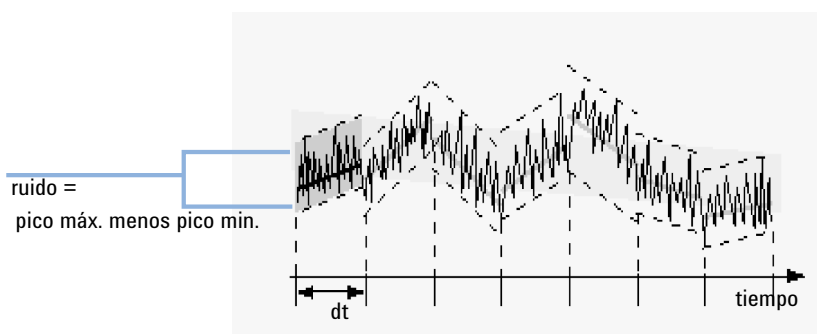


Figura 46 Determinación del ruido con el método ASTM

El cálculo del ruido ASTM (ASTM E 685-93) se basa en una práctica estándar para comprobar los detectores fotométricos de la longitud de onda variable que

se utilizan en cromatografía de líquidos, según define la Sociedad Americana para Ensayos y Materiales (American Society for Testing and Materials). Se pueden distinguir tres tipos diferentes de ruido en función del tamaño del rango de tiempo. La determinación del ruido se basa en las mediciones pico a pico en los rangos de tiempo definidos.

- *Tiempo de ciclo, t*

Ruido a largo plazo, la amplitud máxima correspondiente a todas las variaciones aleatorias de la señal del detector con frecuencias de entre 6 y 60 ciclos por hora. El ruido a largo plazo se determina cuando el intervalo de tiempo seleccionado es superior a una hora. El intervalo de tiempo correspondiente a cada ciclo (dt) se fija en 10 minutos, lo que da como mínimo seis ciclos dentro del intervalo de tiempo seleccionado.

Ruido a corto plazo, la amplitud máxima correspondiente a todas las variaciones aleatorias de la señal del detector con una frecuencia superior a un ciclo por minuto. El ruido a corto plazo se determina para un intervalo de tiempo seleccionado de entre 10 y 60 minutos. El intervalo de tiempo correspondiente a cada ciclo (dt) se fija en un minuto, lo que da como mínimo 10 ciclos dentro del intervalo de tiempo seleccionado.

Ruido a muy corto plazo (no incluido en ASTM E 685-93); este término se introduce para describir la amplitud máxima correspondiente a todas las variaciones aleatorias de la señal del detector con una frecuencia superior a un ciclo por cada 0,1 minutos.

El ruido a muy corto plazo se determina para un intervalo de tiempo seleccionado de entre 1 y 10 minutos. El intervalo de tiempo correspondiente a cada ciclo (dt) se fija en 0,1 minutos, lo que da como mínimo 10 ciclos dentro del intervalo de tiempo seleccionado.

- *Número de ciclos, n*

El número de ciclos se calcula de la forma siguiente:

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

donde t es el tiempo de ciclo y t_{tot} es el tiempo total a lo largo del cual se calcula el ruido.

- *Cálculo del ruido pico a pico en cada ciclo*

Se calcula la deriva en primer lugar determinando la regresión lineal con todos los puntos de datos en el rango de tiempo. Esa línea de regresión lineal se resta de todos los puntos de datos englobados en el intervalo de tiempo, obteniéndose así la señal corregida por la deriva. Entonces se calcula el ruido pico a pico con la fórmula:

$$N = I_{\max} - I_{\min}$$

donde N es el ruido pico a pico, I_{\max} es el pico de intensidad más alta (máxima) y I_{\min} es el pico de intensidad más baja (mínima) de los englobados en el intervalo de tiempo.

- *Ruido ASTM*

El ruido ASTM se calcula de la siguiente manera:

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

donde N_{ASTM} es el ruido basado en el método ASTM.

No se realiza determinación ASTM del ruido si el intervalo de tiempo seleccionado es inferior a un minuto. Dependiendo del intervalo, si el intervalo de tiempo seleccionado es superior o igual a un minuto, se determina el ruido utilizando uno de los métodos ASTM anteriormente descritos. En el cálculo se utilizan al menos siete puntos de datos por ciclo. Los ciclos de la determinación automatizada del ruido tienen un solapamiento del 10 %.

Cálculo de señal-ruido

ChemStation tiene las siguientes opciones para calcular la relación señal-ruido:

- *6 Sigma*: El ruido se calcula usando seis veces la desviación estándar de la regresión lineal (6 sigma). Los datos para el cálculo del ruido se toman de un intervalo de tiempo específico en la señal actual. Si define múltiples intervalos de tiempo, se utilizará el intervalo más cercano al pico.
- *USP* (de acuerdo con la definición de la Farmacopea de Estados Unidos): El ruido se calcula con la fórmula pico a pico. Los datos para el cálculo del ruido se toman de un intervalo de tiempo específico en la señal actual. Si define múltiples intervalos de tiempo, se utilizará el intervalo más cercano al pico.
- *EP* (de acuerdo con la definición de la Farmacopea Europea): El ruido se calcula con la fórmula pico a pico. Los datos para el cálculo del ruido se toman de una señal en blanco. El intervalo de tiempo para el cálculo del ruido es un intervalo de tiempo de 20 veces la anchura del pico, centrada alrededor del tiempo de retención del pico.

Cálculo de la relación señal-ruido sin señal de referencia (6 sigma, USP)

El rango más cercano al pico se selecciona de los rangos que se especifican en la configuración de idoneidad del sistema.

El ruido se calcula bien usando seis veces la desviación estándar de la regresión lineal o el uso de la fórmula pico a pico (USP).

El cálculo señal-ruido se realiza para cada pico de la señal. Si no se puede encontrar un valor de ruido, la señal-ruido se notifica como "-".

El cálculo señal-ruido se realiza con la fórmula:

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

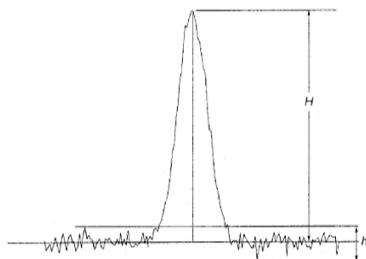


Figura 47 Relación señal-ruido

Cálculo de la relación señal-ruido según la definición de la EP

La relación señal-ruido (S/N) se puede calcular según la definición de la Farmacopea Europea. La relación S/N se calcula con la ecuación:

$$S/N = 2H/h$$

donde:

H es la altura del pico correspondiente al componente de interés en el cromatograma obtenido con la solución de referencia indicada,

h es el valor absoluto de la fluctuación más grande del ruido desde la línea de base en un cromatograma obtenido después de inyectar un blanco y observar una distancia igual a veinte veces la anchura a mitad de altura del pico en el cromatograma obtenido con la solución de referencia indicada y ubicada del mismo modo alrededor del lugar donde se encontraría el pico.

El valor de ruido usado se calcula con el método "Pico a pico" (véase "Cálculo del ruido con la fórmula pico a pico" en la página 106).

S/N se informa para todos los picos presentes en la señal del cromatograma, siempre que exista una señal de referencia correspondiente. Para una señal del cromatograma en particular, la señal de referencia se asigna automáticamente si se especifica el fichero de datos de referencia. Si no puede asignarse una señal de referencia a una señal del cromatograma, la relación señal-ruido no será calculada para los picos en esa señal en particular.

Determinación del rango de ruido

El rango de ruido en la señal de referencia se determina de acuerdo con uno de los algoritmos siguientes

- Si la señal de referencia no es lo suficientemente larga: $HoraDelInicio - TiempoFinal < 20 * W_{50}$
 - $HoraDelInicio = \text{hora de inicio (de la señal de referencia)}$ y
 - $TiempoFinal = \text{tiempo final (de la señal de referencia)}$
- Si la señal de referencia es lo suficientemente larga, pero el pico está ubicado tal que $(RT - 10 * W_{50})$ es menor que el punto de inicio de la señal de referencia.
 - $HoraDelInicio = \text{hora de inicio (de la señal de referencia)}$ y
 - $TiempoFinal = HoraDelInicio + 20 * W_{50}$
- Si la señal de referencia es lo suficientemente larga, pero el pico está ubicado tal que RT o $RT + 10 * W_{50}$ es mayor que el punto final de la señal de referencia
 - $TiempoFinal = \text{tiempo final (de la señal de referencia)}$ y
 - $HoraDelInicio = TiempoFinal - 20 * W_{50}$
- Si el pico está ubicado tal que RT o $RT + 10 * W_{50}$ es mayor que el punto final de la señal de referencia
 - $HoraDelInicio = RT - 10 * W_{50}$ y
 - $TiempoFinal = RT + 10 * W_{50}$

donde:

RT es el Tiempo de retención y

W_{50} es la anchura de pico a media altura.

Deriva y desviación

La deriva y la desviación se calculan si se selecciona **Signal to noise** en el método de procesamiento. Se calculan independientemente del tipo de cálculo de ruido que se seleccione.

Deriva La deriva está dada como la pendiente de la regresión lineal. Se calcula la deriva en primer lugar determinando la regresión lineal con todos los puntos de datos en el rango de tiempo. Esa línea de regresión lineal se resta de todos los puntos de datos englobados en el intervalo de tiempo, obteniéndose así la señal corregida por la deriva.

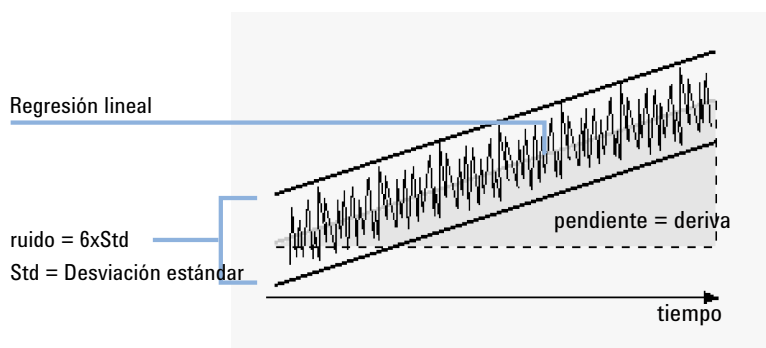


Figura 48 Deriva para ruido como seis veces la desviación estándar

Fórmula de la curva:

$$y(x) = a + bX$$

donde:

N	Número de observaciones discretas
X_i	Variable independiente, i-ésima observación
Y_i	Variable dependiente, i-ésima observación

Coefficientes:

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

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

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

Desviación La desviación se determina como el ruido pico a pico de los valores de los datos medios en los ciclos de ruido ASTM; consulte “Cálculo del ruido utilizando seis veces la desviación estándar” en la página 105.

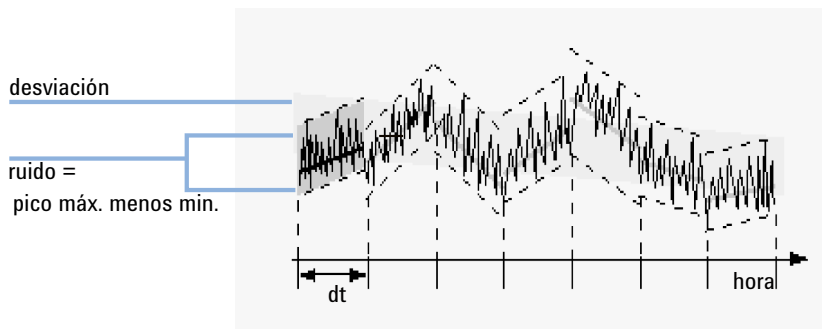


Figura 49 Desviación del ruido determinada por el método ASTM

Cálculo de la asimetría y simetría de pico

Asimetría La ChemStation determina la relación de asimetría de un pico comparando la anchura media - altura pico medio al 5 % (véase "Factor de cola (USP) t" en la página 124) o 10 % (véase la ecuación siguiente) de la altura de pico.

$$A_s = \frac{W_{10}}{2W_{f,10}}$$

donde:

A_s	Asimetría 10 %
W_{10}	Anchura de pico al 10 % de la altura de pico
$W_{f,10}$	Anchura de la mitad frontal de la anchura de pico al 10 % de la altura de pico.

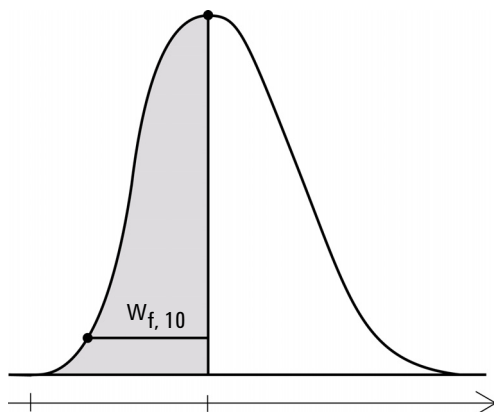


Figura 50 Cálculo de la asimetría de pico

Simetría La simetría de pico la calcula el integrador como un pseudomomento usando las siguientes ecuaciones de momento:

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

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

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

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

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

Si no se encuentran puntos de inflexión, o solo se recoge un punto de inflexión, la simetría de pico se calcula de la siguiente forma:

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

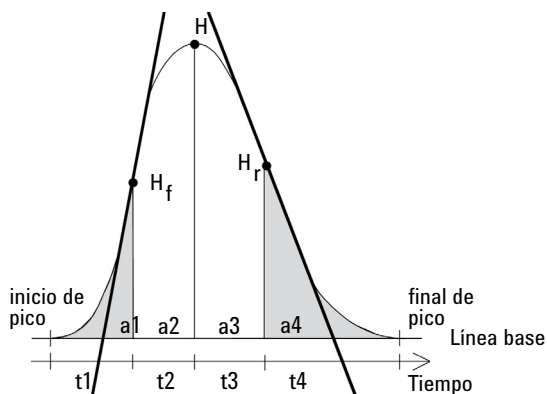


Figura 51 Cálculo del factor de simetría del pico

donde

a_i = área del corte

t_i = tiempo del corte

H_f = altura del primer punto de inflexión

H_r = altura del último punto de inflexión

H = altura en el vértice

Fórmulas y cálculos de idoneidad del sistema

La ChemStation utiliza las fórmulas siguientes para obtener los resultados de varios tests de idoneidad del sistema. Se informa de los resultados con los estilos de informes **Performance**, **Performance+Noise** y **Performance+LibSearch** y **Extended Performance**.

Cuando se especifica ASTM o USP para una definición dada, la definición conforma las dadas en la referencia correspondiente. Sin embargo, los símbolos que aquí se utilizan pueden no ser los mismos que los utilizados en la referencia.

Las referencias que se utilizan en este contexto son:

- *ASTM:Sección E 685 – 93 (2021)*
- *USP:Farmacopea de Estados Unidos, Primer suplemento de la USP 37-NF32*
- *EP:Ph. Eur., 11.ª edición*
- *JP:Farmacopea japonesa, 15.ª edición*

NOTA

A partir de la USP 2022, se armonizaron con la Ph. Eur. y la JP los cálculos de diversos parámetros asociados a los picos. Consulte la ayuda en línea de ChemStation para obtener detalles sobre qué fórmula de la EP/JP se debe usar para cumplir los requisitos de la USP 2022.

Definiciones generales

Volumen de huecos

$$V = d^2 \pi l \left(\frac{f}{4} \right)$$

donde:

d	diámetro de la columna [cm]
π	constante, relación entre la circunferencia y el diámetro de un círculo
l	longitud de la columna [cm]
f	fracción del volumen de la columna que no está ocupado por la fase estacionaria pero que está disponible para la fase móvil; valor predeterminado para f = 0,68 (para Hypersil)

Tiempo de retención del compuesto no retenido, T_m [minutos]

(También denominado tiempo muerto o tiempo nulo)

$$T_m = \frac{V}{F}$$

donde:

F	Velocidad de flujo de LC [ml/min]
---	-----------------------------------

Definiciones del test de rendimiento

Descripción general de los ensayos de rendimiento

Los factores de las tablas de pico, como se definen en la USP, la EP y la JO, están disponibles para usarse en los informes de ChemStation. La tabla que aparece a continuación proporciona una descripción general de los factores disponibles, sus definiciones y los nombres de los valores. Para obtener más detalles sobre los cálculos, consulte las secciones correspondientes en esta guía.

Tabla 9 Valores de las farmacopeas en los informes de ChemStation

USP	EP	JP	Definición	Informes clásicos (RLE)	Informes inteligentes (RTE)
Factor de simetría o factor de cola	Factor de simetría	Factor de simetría	$S = W_5/2f$	Cola USP	Factorde_Colade_Pico
-	-	-	$S = W_{10}/2f$	Asimetría USP al 10 % de la altura	Peak_Asymmetry_10Perc
Factor de separación	-	Factor de separación	$\alpha = k'_{(a)}/k'_{(b)}$ T_R del pico a < T_R del pico b	Selectividad	Selectividadde_Pico
Retención relativa	Retención relativa	-	Con compuestos con RRT: $r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$	-	Peak_RelativeRetTime_EP
Tiempo de retención relativa (RRT)	Retención relativa sin ajustar	Retención relativa sin ajustar	$Rr = t_2/t_1$	-	Tiempo_de_retención_relat_Pico
-	Resolución	Resolución	$R_s = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$	Resolución (EP) Resolución (JP)	Resoluciónde_Pico_EP Resoluciónde_Pico_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right) (T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Resolución	Resoluciónde_Pico_Clásica
Resolución	-	-	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_t(2) + W_t(1)}$	-	Resoluciónde_Pico_USP

Tabla 9 Valores de las farmacopeas en los informes de ChemStation

USP	EP	JP	Definición	Informes clásicos (RLE)	Informes inteligentes (RTE)
Número de platos teóricos (eficiencia)			$n = 16 \left(\frac{t_R}{W_t} \right)^2$	Método de tangente de plato	Peak_TheoreticalPlates_USP
-	Número de platos (eficiencia)	Número de platos (eficiencia)	$N = 5,54 \times t_R^2 / W_{50}^2$	Método de altura media de plato	Peak_TheoreticalPlates_EP Peak_TheoreticalPlates_JP
	Relación S/N	Relación S/N	S/N = 2H/h Ruido: Cálculo pico a pico; señal de referencia en blanco; intervalo de tiempo 20 veces la anchura del pico.	-	Señal_Ruido_Pico_EP
Relación S/N			S/N = 2H/h Ruido: Cálculo pico a pico; intervalo de tiempo en la señal actual.		Peak_SignalToNoise_USP
			S/N = 2H/h Ruido: Cálculo 6 sigma; intervalo de tiempo en la señal actual.		Peak_SignalToNoise_6Sigma
Relación pico a valle	Relación pico a valle	Relación pico a valle	$p/v = H_p/H_v$	Relación pico/valle (Frente y cola)	Relación_Valle_Pico_a_Pico
-	-	-	S=B/A	Asimetría Foley-Dorsey al 10 % de altura	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7 (T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A,B) / \min(A,B))}$	Platos Foley-Dorsey	-

Momentos estadísticos, sesgo y exceso

Los momentos estadísticos se calculan como una alternativa para describir figuras de picos asimétricas. Hay un número de momentos de picos infinito, pero sólo se utilizan los cinco primeros en conexión con los picos cromatográficos. A éstos se les denomina momento 0, momento 1... momento 4.

El momento 0 representa el área de pico.

El momento 1 es el tiempo medio de retención o el tiempo de retención medido en el centro de gravedad del pico. Es diferente del tiempo de retención cromatográfico medido en el máximo del pico, a menos que el pico sea simétrico.

El momento 2 es la varianza del pico, una medida de la dispersión lateral. Es la suma de la varianza contribuida por partes diferentes del sistema de instrumentos.

El momento 3 describe la simetría vertical o sesgo. Es la medida del inicio del pico a partir del estándar gaussiano. El sesgo que se produce de forma adicional en el informe Rendimiento y ampliado no tiene dimensiones. Un pico simétrico tiene un sesgo cero. Los picos con cola tienen sesgo positivo y el momento 1 es mayor que el tiempo de retención. Los picos con frente tienen sesgo negativo y el momento 1 es menor que el tiempo de retención.

El momento 4 o exceso es la medición de la compresión o estrechamiento del pico en el eje vertical y cómo se compara a un estándar gaussiano para el que el momento 4 es cero. Se puede visualizar moviendo o apartando los lados del pico gaussiano en un área constante. Si se comprime o aplasta el pico en la comparación, el exceso es negativo. Si es más alto, el exceso es positivo. Además el exceso se indica en el informe Rendimiento y ampliado en su forma sin dimensiones.

Cálculo de los momentos estadísticos

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

donde:

N = Número de cortes de área

A_i = Valor (Respuesta) del corte del área indexado por i

d_t = Intervalo de tiempo entre los cortes de área adyacentes

t_0 = Tiempo del primer corte de área

$\sum_{i=1}^N$ = Suma del índice de inicio 1 al índice final N para observaciones discretas

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

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

Anchura verdadera de pico W_x [min]

W_x = anchura de pico al x % de altura del total

donde:

W_t	Anchura de pico tangente, 4 sigma, obtenida insertando tangentes en los puntos de inflexión con la línea base
$W_{4,4}$	Anchura al 4,4 % de altura (anchura 5 sigma)
W_5	Anchura al 5 % de altura (anchura de pico con cola), para el factor de cola USP
W_{10}	Anchura al 10 % de altura
W_{50}	Anchura al 50 % de altura (anchura de pico a media altura verdadera o sigma 2,35).

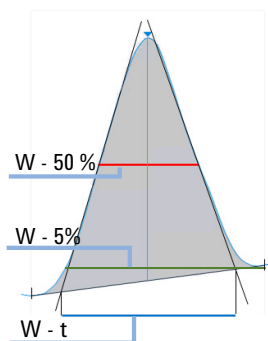


Figura 52 Anchura de pico al x % de la altura

Factor de capacidad (USP)

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

donde:

t_R = tiempo de retención del pico [min]

t_0 = tiempo nulo [min]

Factor de cola (USP) t

NOTA

El factor de simetría (USP, EP y JP) es idéntico al factor de cola (USP). Todos están disponibles como "Peak_TailFactor" en Intelligent Reporting. Consulte también "Descripción general de los ensayos de rendimiento" en la página 119.

$$S = \frac{W_5}{2f}$$

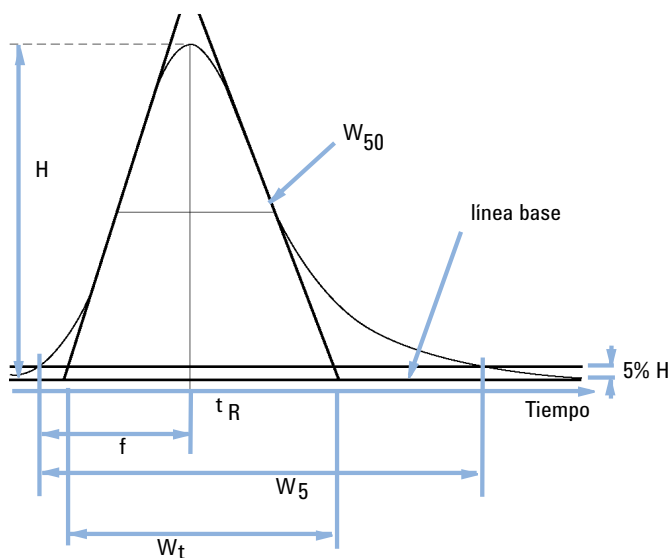


Figura 53 Parámetros de rendimiento

S	Factor de simetría o factor de cola (USP)
H	Altura de pico
t _R	Tiempo de retención
f	Distancia en minutos entre el frente del pico y t _R , medida al 5% de la altura de pico
W ₅₀	Anchura de pico al 50% de la altura [min]
W ₅	Anchura de pico al 5% de la altura de pico [min]
W _t	Anchura de pico según las tangentes

Número de platos teóricos por Columna n

Método tangente (USP, ASTM):

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{W_t} \right)^2$$

donde:

T_R	Tiempo de retención
W_t	Anchura de pico según las tangentes [min]

Método de media anchura (ASTM, EP, JP):

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

donde:

T_R	Tiempo de retención
W_{50}	Anchura de pico a media altura [min]

Método 5 sigma:

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

donde:

T_R	Tiempo de retención
$W_{4.4}$	Anchura de pico al 4,4 % de la altura de pico [min]

Método estadístico:

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

donde:

Mx = momento estadístico x^0

Método Foley Dorsey

La ecuación Foley-Dorsey se utiliza para los picos asimétricos. Corrige el recuento de platos de la cola y la ampliación de picos.

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

Donde

- W_{10} = anchura de pico al 10 % de la altura de picos
- A: frontal y B: cola, siendo $A+B = W_{10}$

Número de platos teóricos por metro, N [1/m]

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

donde:

- | | |
|---|--|
| n | Número de platos teóricos |
| l | Longitud de la columna [cm] (según se proporciona en el método de procesamiento) |

Retención relativa y selectividad

Selectividad La selectividad calcula el valor alfa para todos los picos de la señal, excepto para el primero. Para cada par de picos adyacentes (picos 1 y 2, t_R del pico 1 < t_R del pico 2), se calculará la selectividad de la forma siguiente:

$$\alpha = \frac{k'_{2'}}{k'_{1'}} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}, \alpha > 1$$

donde:

$$k'_{(x)} \quad \text{Factor de capacidad del pico } x: (t_{Rx} - t_0)/t_0$$

Retención relativa (EP) La retención relativa (ajustada) conforme a la EP únicamente se puede calcular si se ha definido e identificado el pico de referencia de la relación de RT. Los valores *alfa* son <1 si el pico está a la izquierda de la referencia, y >1 si el pico está a la derecha de la referencia.

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

donde

t_{Ri} = tiempo de retención del pico de interés

t_{Rst} = tiempo de retención del pico de referencia

t_M = tiempo de retención

La Retención relativa (no ajustada), según la EP, se calcula como

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

Resolución (USP, ASTM) R

Método de la tangente (perteneciente a los picos 1 y 2, t_R del pico 1 < t_R del pico 2; t_R en minutos)

$$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t(2)} + W_{t(1)}}$$

donde:

t_R	Tiempo de retención
W_t	Anchura de la tangente [min]

Resolución (EP/JP) Rs

La resolución (JP) y la resolución (EP) se calculan con la siguiente definición:

$$R_s = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$$

NOTA

Además, la resolución clásica $(2.35/2)^*$... está disponible en Intelligent Reporting como `Peak_Resolution_Classic`. En ["Descripción general de los ensayos de rendimiento"](#) en la página 119 puede consultar una lista completa de los valores.

Resolución (definiciones clásicas de ChemStation)

Método de anchura media:

$$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$$

Método 5 sigma:

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

Método estadístico:

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

donde:

$M1_{(x)}$ = tiempo de retención medio del pico x (primer momento estadístico) [min]

$W_{B(x)}$ = ancho de base del pico x [min]

$W_{4,4(x)}$ = anchura al 4,4 % de altura del pico x [min]

$W_{50(x)}$ = anchura al 50 % de altura del pico x [min]

$W_S(x)$ = anchura derivada de los momentos estadísticos = $\sqrt{(M2)}$ del pico x [min]
(véase también "Cálculo de los momentos estadísticos" en la página 122)

Relación pico a valle (EP/JP)

La relación pico a valle (**p/v ratio** en los resultados de la inyección) se calcula para indicar la calidad de la separación de los picos. Se calcula con la farmacopea europea y la farmacopea japonesa (EP, JP).

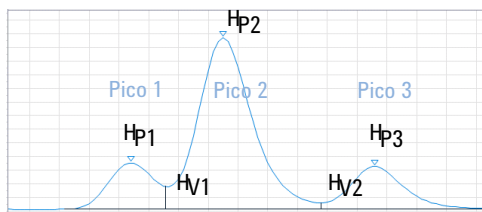
NOTA

Este valor se calcula de manera diferente en comparación con el umbral usado para la operación de división de pico de línea base avanzada del integrador.

La relación pico a valle se calcula para picos separados por un valle:

$$PV = \text{altura de pico} / \text{altura de valle}$$

Si hay valles tanto a la izquierda como a la derecha de un pico, la relación pico a valle se calcula para el frente y para la cola. Con Informes inteligentes, se mostrará el p/v mínimo. Con Informes clásicos, el informe *Rendimiento ampliado clásico* mostrará ambos valores.



Para el pico 1:

$$PV = \frac{H_{P1}}{H_{V1}}$$

Para el pico 2:

$$PV_F = \frac{H_{P2}}{H_{V1}}$$

$$PV_T = \frac{H_{P2}}{H_{V2}}$$

Para el pico 3:

$$PV = \frac{H_{P3}}{H_{V2}}$$

donde:

PV	Relación pico a valle
PV _F	Relación pico a valle, frente
PV _T	Relación pico a valle, cola
H _{Px}	Altura del pico x
H _{Vx}	Altura del valle x

Si el pico muestra diversos hombros separados por un valle, la relación pico a valle se calcula para cada hombro.

Definición de un valle:

- Su altura y tiempo se comparten entre dos picos consecutivos
- Su línea base se comparte entre dos picos consecutivos
- La altura absoluta de la línea base es superior a 10^{-5} .

Definiciones de la reproducibilidad

Para la revisión estadística de los datos analíticos en cuando a la reproducibilidad, se considera una secuencia como una muestra aleatoria pequeña extraída de un número infinito de resultados experimentales posibles. Para lograr un conjunto de resultados completos, se requiere una cantidad sin límite de material de muestras así como tiempo. Estrictamente los datos estadísticos no sólo se aplican a un conjunto completo autocontenido o población de datos. Por consiguiente constituye un requisito previo para este tratamiento que la muestra seleccionada sea representativa de todos los datos.

Media de la muestra, M

El valor medio M de una muestra aleatoria consistente en N medidas, se calcula a partir de un número limitado de valores X_i únicos observados de N indexados con un contador consecutivo y según la fórmula:

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

donde:

N = número de observaciones discretas

X_i = valor de observaciones discretas indexadas por i

Desviación estándar de la muestra, S

Considere una muestra aleatoria de tamaño N. La desviación estándar S de la muestra para la muestra finita seleccionada de una gran cantidad de datos se determina por

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

La desviación estándar S de la muestra difiere en dos puntos de la desviación estándar s del resto de datos:

- En vez del valor medio real sólo el valor medio de la muestra M se utiliza
- división por N-1 en vez de N.

Desviación estándar relativa, RSD [%] (USP)

La desviación estándar relativa se define como

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

Desviación estándar de la media, S_M

M es la media de la muestra y S la desviación estándar [o (N-1)] de la muestra. La desviación estándar S_M de la media de la muestra M se determina por

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

Se puede ilustrar además con un ejemplo:

Mientras que el tiempo de retención de un componente dado puede desviarse ligeramente del valor medio calculado en una secuencia, los datos de otra secuencia pueden diferir mucho más por, como ejemplo, cambios de temperatura ambiental, degradación del material de la columna con el tiempo, etc. Para determinar esta desviación, la desviación estándar de la media de la muestra S_M se calcula con la fórmula anterior.

Desviación estándar, S

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

Intervalo de confianza, CI

El intervalo de confianza se calcula para proporcionar información sobre si es bueno el valor medio de cálculo, cuando se aplica a todos los datos y no sólo a la muestra.

El intervalo de confianza en $100 \times (1 - \alpha) \%$ para la media global se calcula con

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

donde:

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

el punto de porcentaje de la tabla de distribución t con una probabilidad de riesgo de α

Para las estadísticas extendidas en el informe de resúmenes de secuencias puede utilizarse el 95 % del intervalo de confianza ($\alpha = 0,05$).

Conviene utilizar la distribución t (o "distribución del estudiante") para volúmenes de muestras pequeños. En caso de grandes volúmenes de muestras, los resultados de la distribución t y la distribución normal (gaussiana) no difieren en nada. Por tanto, para 30 o más muestras, puede utilizarse la distribución normal (sería muy difícil calcular la distribución t para grandes números; la distribución normal es la mejor forma de aproximación).

Intervalo de confianza del 95 % para 6 muestras:

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

$$N = 6$$

El valor correcto de t se extrae de la tabla de distribución t con 5 (N-1) grados de libertad y con el valor $\alpha/2$, siendo 0,025. Se da la siguiente fórmula de cálculo de CI:

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

Coeficiente de correlación

Junto con el gráfico de la curva de calibración se muestra un *coeficiente de correlación*. El coeficiente de correlación (r) da una medida del ajuste de la curva de calibración a los puntos de datos. Para las curvas de calibración con pendiente positiva, el valor del coeficiente incluye cinco decimales y está dentro del siguiente rango:

De 0,00000 a 1,00000

donde:

0,00000 = ausencia de ajuste

1,00000 = ajuste perfecto

NOTA

El coeficiente de correlación no está relacionado directamente con la bondad de la precisión y la exactitud del método analítico. Debe utilizarse esencialmente para determinar el mejor tipo de curva.

A la hora de evaluar un tipo de curva, debe trabajar con un número suficiente de niveles de calibración para conseguir una significancia estadística adecuada.

El coeficiente de correlación (r) se calcula con la ecuación siguiente:

$$r = \frac{\sum (y_i - \bar{y}) * (Y_i - \bar{Y}) * wt_i}{(\sum (y_i - \bar{y})^2 * wt_i) * \sum (Y_i - \bar{Y})^2 * wt_i)^{\frac{1}{2}}}$$

donde

r	Coeficiente de correlación
wt_i	Peso del punto de datos
\bar{y}	Valores medios de las respuestas o cantidades medidas Si se hace pasar la curva de calibración por el origen (Origin=Force en el método de procesamiento), OpenLab ChemStation se calculará el coeficiente de calibración sin centrar. En ese caso, se omitirá \bar{y} .
y_i	Respuesta medida (Área, AreaRatio (método ISTD), altura o HeightRatio (método ISTD)) o cantidad (Cantidad, AmountRatio (método ISTD)), dependiendo del modo de calibración
\bar{Y}	Valores medios de las respuestas o cantidades previstas
Y_i	Respuesta o cantidad prevista (mediante la curva de calibración)

Idoneidad del sistema

Definiciones de la reproducibilidad

\bar{y} y \bar{Y} son valores medios de las respuestas o cantidades medidas o previstas, calculados de la siguiente forma:

$$\bar{y} = \frac{\sum(y_i * wt_i)}{\sum(wt_i)}$$

donde

wt_i	Peso del punto de datos
\bar{y}	Valores medios de las respuestas o cantidades medidas
y_i	Respuesta medida (Área, AreaRatio (método ISTD), altura o HeightRatio (método ISTD)) o cantidad (Cantidad, AmountRatio (método ISTD)), dependiendo del modo de calibración

y

$$\bar{Y} = \frac{\sum(Y_i * wt_i)}{\sum(wt_i)}$$

donde

wt_i	Peso del punto de datos
\bar{Y}	Valores medios de las respuestas o cantidades previstas
Y_i	Respuesta o cantidad prevista (mediante la curva de calibración)

En el caso de **Forced Origin** (Origen forzado) se supone que los puntos quedan centrados en el cero (simétricos con el tercer cuadrante) y los valores medios se sustituyen por cero.

El coeficiente de correlación es 1 para un ajuste perfecto, o cuando los puntos se distribuyen simétricamente alrededor de la curva. Se reduce si los puntos de calibración están distribuidos menos simétricamente. Los valores típicos están comprendidos entre 0,99 y 1. El coeficiente de correlación no es una medida muy sensible de la calidad de la curva.

Acceso al número de doble precisión almacenado internamente

Para propósitos de validación, sería necesario calcular manualmente los resultados de ChemStation como curvas de calibración, coeficientes de correlación, platos teóricos, etc. Al realizar esta operación, hay que tener en cuenta el formato de números que utiliza ChemStation.

Para todos los números que ChemStation almacene internamente se utiliza el tipo de datos "C" DOBLE. Esto quiere decir que se almacenan 14 dígitos para cada número. La puesta en práctica de este tipo de datos se adhiere a la de Microsoft de la normativa IEEE para datos de tipo C y las reglas que implican (consulte los documentos de Microsoft Q42980, Q145889 y Q125056).

Debido al número ilimitado de parámetros que se utilizan en el cálculo de la tabla de calibración, no es posible calcular el error exacto que posiblemente se introduzca por la propagación y acumulación de errores relacionados. Las pruebas exhaustivas con las distintas construcciones de las curvas de calibración muestran, en cambio, que se puede garantizar la exactitud hasta 10 dígitos. Mientras que en la reproducibilidad del área, de la altura y del tiempo de retención de análisis cromatográficos tiene normalmente tres dígitos, son suficientes 10 dígitos importantes de los cálculos. Por esta razón, la calibración, y otras tablas, muestran un máximo de 10 dígitos importantes.

Si se requiere un cálculo externo (manual) para validación, se recomienda que se utilicen todos los dígitos para los cálculos internos. Con los datos mostrados o relacionados de los cálculos externos puede obtenerse resultados que difieran de ChemStation por errores de redondeo.

En los párrafos siguientes se describe cómo acceder a los dígitos almacenados internos para números que normalmente se requieren para cálculos manuales. En todos los casos, es preciso cargar e informar sobre el fichero de datos con el estilo de informe apropiado antes de ejecutar el comando de la lista. Todos los comandos se introducen en la línea de comandos de ChemStation, disponible en el menú de visualización.

Los siguientes ejemplos generan un fichero .TXT en la carpeta pública de instrumentos (por ejemplo, C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1). Para conocer la ruta real, utilice la entrada `print _instpath$` de la línea de comandos. Utilice otros nombres de archivo y carpeta como corresponda. La información de este archivo puede visualizarse en el Bloc de notas o en un editor de texto apropiado.

Información del pico sin procesar:

- Tiempo de retención
- Área
- Altura
- Anchura (integrador)
- Simetría
- Tiempo de inicio del pico
- Tiempo de fin del pico

Utilice la entrada de la línea de comandos:

```
DUMPTABLE CHROMREG, INTRESULTS, _instpath$ + "INTRES.TXT"
```

Información del pico procesada:

- Tiempo de retención calculado
- Tiempo de retención esperado
- Área
- Altura
- Anchura (integrador)
- Simetría
- Anchura media - Altura pico media (Rendimiento y Rendimiento ampliado)
- Factor de cola (Rendimiento y Rendimiento ampliado)
- Selectividad (Rendimiento y Rendimiento ampliado)
- K' (Rendimiento ampliado)
- Anchura de pico tangente (Rendimiento ampliado)
- Sesgo (Rendimiento ampliado)
- Platos teóricos - Anchura media (Rendimiento y Rendimiento ampliado)
- Platos teóricos - Tangente (Rendimiento ampliado)
- Platos teóricos - Sigma 5 (Rendimiento ampliado)
- Platos teóricos - Estadística (Rendimiento ampliado)
- Resolución - Anchura media (Rendimiento y Rendimiento ampliado)
- Resolución - Tangente (Rendimiento ampliado)
- Resolución - Sigma 5 (Rendimiento ampliado)
- Resolución - Estadística (Rendimiento ampliado)

Utilice la entrada de la línea de comandos:

```
DUMPTABLE CHROMRES, PEAK, _instpath$ + "PEAK.TXT"
```

Información del componente procesado:

- Cantidad calculada

Utilice la entrada de la línea de comandos:

```
DUMPTABLE CHROMRES, COMPOUND, _instpath$ + "COMPOUND.TXT"
```

Información de la tabla de calibración:

- Número del nivel
- Cantidad
- Área
- Altura

Utilice la entrada de la línea de comandos:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, CALPOINT, _instpath$ + "CALIB.TXT"
```

Información de regresión lineal:

- Interceptación Y (CurveParm1)
- Pendiente (CurveParm2)
- Coeficiente de correlación

Utilice la entrada de la línea de comandos:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, PEAK, _instpath$ + "REGRESS.TXT"
```

6

Cálculos específicos de CE

Tablas de calibración	140
Calibración estándar	140
Calibración del peso molecular de la proteína	141
Calibración de pares de bases de ADN	141
Calibración del enfoque isoelectrico	142
Calibración con corrección de la movilidad	143
Introducción	143
Cálculos de la movilidad efectiva	144
Cálculos de la movilidad relativa	147
Estilos de información especiales de electroforesis capilar	149
Áreas de picos corregidas	150
Idoneidad del sistema para electroforesis capilar	151
Factor de capacidad, k'	151
CE-MSD	152
Sustracción de fondo	152

Este capítulo es importante únicamente si se utiliza ChemStation para controlar instrumentos de CE.

Tablas de calibración

Cuatro tipos de calibración diferentes están disponibles en la lista desplegable de la tabla de calibraciones.

Calibración estándar

La calibración estándar se basa en el área de pico o en la altura de pico. Cuando selecciona **Standard Calibration** puede seleccionar **Calculate Signals Separately** o bien **Calculate with Corrected Areas**.

La opción Calcular señales por separado se selecciona cuando se quiere asegurar que, en el cálculo de informes Norm%, el porcentaje de las señales informadas por separado suma el 100 % para cada señal. Cuando se deselecciona **Calculate signals separately**, es el porcentaje de todas las señales el que suma el 100 %. Para clasificar por señal en la tabla de calibración es necesario seleccionar antes **Calculate signals separately**.

Seleccione **Calculate with Corrected Areas** para corregir el área de pico en base al tiempo de migración. En este modo, el área se divide por el tiempo de migración, lo que mejora la reproducibilidad de los análisis cuantitativos cuando los tiempos de migración no son estables.

Además de la calibración estándar, hay tres calibraciones específicas de electroforesis capilar que son monoseñal en base al tiempo de migración. La señal está definida por la descripción de la señal en el método de calibración. Si el fichero de datos contiene señales múltiples, entonces solo se puede seleccionar una señal y se extrae del fichero de datos. El formato de la tabla de calibración depende del tipo de calibración seleccionada.

Las tareas de cuantificación pueden realizarse a partir de la calibración del tamaño del biopolímero (gráfico Ferguson) para la proteína SDS.

Calibración del peso molecular de la proteína

La **Protein molecular weight calibration** requiere un estándar de calibración con componentes de pesos moleculares conocidos o un pico de referencia. La ecuación de calibración es:

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

donde:

MW es el peso molecular

t_{ref} es el tiempo de migración del pico de referencia

t es el tiempo de migración

k_0 y k_1 son los coeficientes de la ecuación lineal

La tabla de calibración contiene el nombre, el tiempo de migración, t_{ref}/t (tiempo de migración relativo), peso molecular y $\log(MW)$ de cada componente.

Calibración de pares de bases de ADN

La **DNA base-pair calibration** es similar a la **protein molecular weight calibration**, aunque funciona con un pico de referencia y requiere un estándar de calibración con un número de pares de bases determinado. La ecuación de calibración es:

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

donde:

$n^\circ BP$ es el número de los pares de bases

t es el tiempo de migración

k_0 y k_1 son los coeficientes de la ecuación lineal

La tabla de calibración contiene el nombre, el tiempo de migración, $1/t$, pares de bases y $\log(\text{pares de bases})$ de cada componente.

Calibración del enfoque isoeléctrico

La **capillary isoelectric focusing calibration** (cIEF) requiere un estándar de calibración con proteínas estándar de puntos isoeléctricos conocidos (pI). La ecuación de calibración es:

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

donde:

pI es el punto isoeléctrico

t es el tiempo de migración

k_0 y k_1 son los coeficientes de la ecuación lineal

La tabla de calibración contiene el nombre, el tiempo de migración y pI (punto isoeléctrico) de cada componente.

Calibración con corrección de la movilidad

Introducción

Cambios ligeros en la composición del tampón, la temperatura de análisis o la viscosidad, así como la absorción en la pared del capilar, pueden influir en el flujo electro-osmótico (EOF) y hacerlo inestable. El cambio resultante en EOF puede crear una desviación estándar alta de los tiempos de migración. Las correcciones por movilidad pueden reducir de manera significativa el efecto de las variaciones de tiempo de migración entre análisis, monitorizando el tiempo de migración de un pico de referencia de la movilidad y aumentando a su vez en gran medida la reproducibilidad del tiempo de migración.

El pico de referencia de la movilidad debería elegirse con las siguientes prioridades:

- Seleccione el pico con la señal más alta.
- Seleccione el pico más aislado.
- El marcador EOF o el estándar interno pueden utilizarse también como pico de referencia de la movilidad.
- Agrande la ventana de búsqueda para encontrar siempre el pico de referencia de la movilidad.
- Si aparecen varios picos en la ventana de búsqueda, el pico con más señal se escoge de forma automática como pico de referencia de la movilidad.

Hay dos tipos de corrección de la movilidad disponibles:

Effective Mobility Correction

La **Effective Mobility Correction** utiliza las movilidades efectivas de todos los picos y requiere la disponibilidad de los datos de la curva de voltaje con el electroferograma. Además, cuando se trabaja con la corrección de la movilidad efectiva, se pueden determinar las movilidades efectivas verdaderas de todos los componentes de la muestra.

Relative Mobility Correction

La **Relative Mobility Correction** funciona aun sin disponer de datos de voltaje y asume en este caso un voltaje constante en todas las mediciones.

Cálculos de la movilidad efectiva

Además del pico de referencia, es necesario, para corregir la movilidad efectiva, incluir un marcador neutro que corresponda a la velocidad de EOF. Algunos marcadores usados generalmente y sus longitudes de onda asociadas son:

Tabla 10 Marcadores EOF usados normalmente

Componente	Longitud de onda
Propanol 1	210 nm
Acetona	330 nm
Acetonitrilo	190 nm
Benceno	280 nm
Guanosina	252 nm
Óxido de mesitilo	253 nm
Metanol	205 nm
Fenol	218 nm
Piridina	315 nm
Tetrahidrofurano	212 nm
Uracilo	259 nm

Los datos de voltaje sobre el tiempo y las dimensiones capilares se salvan en un archivo de datos o se pueden introducir de forma manual durante la configuración de la tabla de calibración. Si almacena los datos del voltaje durante la ejecución serán más precisos. Asegúrese de almacenar también las dimensiones capilares con el método. Para volver a procesar las señales adquiridas sin datos de voltaje o dimensiones capilares, introduzca el voltaje y el tiempo de rampa en el grupo "Voltaje y dimensiones capilares" del cuadro de diálogo.

A raíz de los datos se determina la movilidad efectiva de cada componente.

General

La movilidad aparente de un pico de la muestra se define por la ecuación:

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

donde

l es la longitud efectiva del capilar (la longitud del punto de inyección al punto de detección)

L es la longitud capilar total

$V(t)$ es el voltaje medio de la hora 0 a la hora de migración t del pico

El voltaje medio se calcula a partir del voltaje medido o de la rampa de voltaje que se especifica en el método con las siguientes ecuaciones:

Si $t < t_R$ entonces

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

Si $t > t_R$ entonces

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

donde

t es el tiempo de migración del pico

t_R es el tiempo de la rampa

V es el voltaje final

La ecuación de movilidad puede simplificarse introduciendo un coeficiente:

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

La movilidad relativa o aparente es entonces

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

La movilidad efectiva o real es

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

donde

μ_{app} es la movilidad aparente de cualquier pico

μ_{EOF} es la movilidad aparente de un marcador neutro

Los componentes con velocidad inferior que EOF (normalmente aniones) serán negativos en la movilidad efectiva.

Calibración

La movilidad real de un pico de la muestra que se utilizará como pico de referencia de movilidad en mediciones posteriores se calcula utilizando el tiempo de migración del marcador neutro (μ_{EOF}):

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

Las movilidades efectivas de todos los picos se calculan entonces y se almacenan como movilidades esperadas:

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

La tabla de calibración contiene por tanto el tiempo de migración registrado y la movilidad real calculada de cada componente en las columnas de tiempo de migración esperado y movilidad esperada.

Cálculos de movilidad

El valor real de μ_{EOF} se calcula con el pico de referencia de la movilidad:

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

El tiempo de migración esperado de cada pico se ajusta entonces:

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

Los valores calculados se utilizan en la identificación de picos y se rempazan los valores de la tabla de calibración.

Recalibración

El tiempo de migración del pico de referencia de la movilidad se utiliza para calcular el valor real de μ_{EOF} :

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

El tiempo de migración esperado de cada pico se ajusta:

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

y se actualizan las movilidades:

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

Durante la ejecución de la calibración los valores esperados del tiempo de migración, así como los valores de movilidad reales se actualizan en la tabla de calibración.

Cálculos de la movilidad relativa

Se puede efectuar también una corrección del tiempo de migración basado en las movilidades relativas. En este caso no se necesita un marcador EOF, voltaje, no dimensiones capilares. El software aún corrige los cambios del tiempo de migración aunque no muestre los valores de movilidad.

General

Como en cálculos de movilidad efectiva, el coeficiente

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

se usa en los cálculos de movilidad relativa para describir la relación entre la movilidad y el tiempo de migración:

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

La diferencia es que en ecuaciones de movilidad relativa, k aparece tanto en el numerador como en el denominador de una fracción, por lo que la dimensión capilar puede eliminarse. El factor k se calcula como

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

donde $V(t)$ es el voltaje medio de la hora 0 a la hora de migración t del pico.

Cuando el parámetro del voltaje está en **Ignore**, k es una constante que puede eliminarse de ecuaciones para el tiempo de migración esperado (véase más abajo).

Las ecuaciones siguientes describen el caso general de $k = k(t)$, aunque el software considera todos los casos cuando calcula k .

Calibración

El pico de referencia de movilidad se identifica y se almacena el tiempo de migración (t_{refcal}). Los tiempos de migración esperados ($t_{expcalN}$) de todos los picos se guardan.

Cálculo de la movilidad

Cuando se ha detectado un pico de referencia, el tiempo de migración esperado de cada pico se ajusta de acuerdo con el tiempo de migración real del pico de referencia de la movilidad:

$$t_{new\ exp\ N} = \frac{k(t_{old\ exp\ N})}{(k(t_{exp\ cal\ N})/t_{exp\ cal\ N} - k(t_{ref\ cal})/t_{ref\ cal} + k(t_{ref\ act})/t_{ref\ act})}$$

Entonces, se actualiza el tiempo de migración del pico de referencia desde el último análisis de calibración:

$$t_{ref\ cal} = t_{ref\ act}$$

Estilos de información especiales de electroforesis capilar

NOTA

Los cálculos específicos de CE se pueden presentar con el *Classic ChemStation Reporting* (Informe clásico de ChemStation).

El siguiente estilo de informe es específico para ChemStation para sistemas de electroforesis capilar (CE):

Movilidad de CE **CE Mobility** comprende resultados de texto cuantitativos, especialmente la movilidad aparente. Para usar este estilo de informe, es necesario suministrar la información sobre el capilar usado antes de la adquisición, y se almacena la señal de voltaje. La movilidad aparente se calcula según la siguiente fórmula.

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

donde

l es la longitud efectiva del capilar (cm)

L es la longitud total del capilar (cm)

t es el tiempo de migración (min)

V es el voltaje (kV)

Si se activa la corrección de movilidad efectiva (consulte “Cálculos de la movilidad efectiva” en la página 144), la columna de tipo de pico en los informes sencillos (los informes de patrón externo, por ejemplo) es sustituida por una columna de movilidad. El informe Movilidad CE imprime las movilidades efectivas, en vez de las aparentes.

Áreas de picos corregidas

La Agilent ChemStation para sistemas CE le permite utilizar áreas de picos corregidas de los cálculos de área normales. Estas áreas se utilizan en calibración e informes estándar.

Para activar esta opción, seleccione **Calculate with Corrected Areas** para corregir el área del pico del tiempo de migración. En este modo, el área se divide por el tiempo de la migración que mejora la reproducibilidad de los análisis cuantitativos cuando los tiempos de migración no son estables.

El área corregida se calcula con la siguiente fórmula.

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

Donde

A_c es el área del pico corregida (mAU)

A es el área del pico (mAU sec)

t es el tiempo de migración (minutos)

Al área corregida nos referimos a veces como área normalizada.

Idoneidad del sistema para electroforesis capilar

Factor de capacidad, k'

En electroforesis capilar no se puede calcular el valor del factor de capacidad k' de forma automática en todos los modos operativos. Consulte el manual *Electroforesis capilar de altas prestaciones*: un iniciador de las fórmulas respectivas. Los valores que se recogen en los informes sólo son válidos para los sistemas LC 3D de la Agilent ChemStation puesto que los sistemas CE utilizan los mismos algoritmos que la Agilent ChemStation para sistemas LC 3D.

CE-MSD

Sustracción de fondo

Al seleccionar el elemento de menú **Subtract Background** (BSB), el último espectro de masas que se haya seleccionado se sustraerá de cada punto del electroferograma actual. Los datos resultantes se guardarán en el mismo directorio y con el mismo nombre que el archivo de datos original; sin embargo, la extensión del archivo se cambiará a .BSB.

El nuevo archivo de datos pasará a ser el archivo de datos actual y se mostrará el electroferograma con sustracción de fondo. En la parte del operador del encabezado del archivo de datos se registrará el número de sustracciones de fondo que se hayan realizado.

Si visualiza los datos BSB en forma de listado tabular, puede observar diferencias debido a la precisión de la representación de datos.

NOTA

Los archivos de texto de ayuda (HELP) del sistema LC/MS hacen referencia exclusivamente a los parámetros de LC, no a los de CE. Algunas funciones disponibles en el software LC/MS tampoco estarán disponibles o no podrán utilizarse para aplicaciones CE/MS, pero sí para aplicaciones LC. La función de **peak matching** no puede utilizarse para aplicaciones CE-MS; por tanto, no estará activa. En las aplicaciones CE-MS, la detección UV y MS se produce a diferentes longitudes efectivas del capilar de separación. Debido a las diferencias de resolución a distintas longitudes efectivas, la asignación de picos no resulta posible.

7

Verificación del sistema

Ventanas de verificación y diagnóstico 154

Verificación del sistema 154

Registro GLPsave 157

Función del test del DAD 158

Función de revisión del test del DAD 158

En este capítulo se describen la función de verificación y las funciones de verificación GLP de ChemStation.

Ventanas de verificación y diagnóstico

Si el instrumento configurado las admite, ChemStation contiene dos ventanas adicionales para la verificación de los instrumentos y las tareas de diagnóstico. Para obtener más información, consulte el sistema de ayuda en línea.

Verificación del sistema

La verificación del sistema es un componente clave en la utilización diaria de instrumento analítico en un laboratorio regulado. Las opciones de verificación de GLP están diseñadas para ayudarle a probar que el software o componentes importantes de este funcionan correctamente o funcionaban correctamente cuando se realizó un análisis concreto.

La función de verificación de ChemStation le permite verificar el funcionamiento correcto del software ChemStation. Puede hacerlo reprocesando archivos de datos según los métodos específicos y comparando los resultados con un estándar predefinido. La función de verificación es particularmente importante para probar la integridad de los resultados de integración y cuantificación.

Puede utilizar la prueba de verificación estándar o definir sus propias pruebas con su propio método y archivo de datos para comprobar las combinaciones de software algorítmicas utilizadas en los métodos de análisis. La prueba de verificación es un archivo protegido que no se puede cambiar ni borrar.

La opción Verificación en la ventana Análisis de datos le permite escoger cualquiera de las siguientes opciones:

- realizar una prueba de verificación en la base de datos,
- definir una nueva prueba de verificación y añadirla a la base de datos y
- borrar una prueba de verificación de la base de datos.

La sección Cómo... del sistema de ayuda en línea describe cómo realizar estas tareas. Cuando ejecuta una prueba de verificación de ChemStation, puede elegir entre realizar toda la prueba o seleccionar una combinación de piezas.

Los resultados de la prueba de verificación se guardan en formato binario en el subdirectorío predeterminado: C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Verify, junto con los archivos del método y de datos. El subdirectorío Verify está al mismo nivel que los subdirectoríos de secuencia, métodos y datos. Puede enviar los resultados a una impresora o a un archivo. Los resultados de la

Verificación del sistema

Ventanas de verificación y diagnóstico

prueba, incluido el resultado de una prueba de verificación combinada, se consideran como aprobado o suspenso.

Están disponibles los siguientes componentes de la prueba de verificación :

Electrónica digital (solo DAD Agilent Serie 1100/1200)

Un cromatograma de prueba se almacena en el detector de diodo array. Este cromatograma se envía a ChemStation después de que haya superado los mismos pasos de preprocesamiento como datos primarios normales de los fotodiodos. Los datos resultantes se comparan con los datos del resultado original almacenados en ChemStation para el cromatograma de esta prueba. Si no coinciden, no se supera la prueba. Esta prueba asegura que la electrónica del DAD, que se encarga del preprocesamiento de los datos, funciona todavía correctamente. Como se utiliza un cromatograma de la prueba almacenado; la lámpara o el diodo array no forman parte de esta prueba. Se pueden comprobar con la ["Función del test del DAD"](#) en la página 158.

Integración de picos

El archivo de datos se vuelve a integrar con el método original. Se comparan los resultados con los resultados de integración originales almacenados en el registro de verificación. Si no coinciden, no se supera la prueba.

Cuantificación de compuestos

Los compuestos del archivo de datos se vuelven a cuantificar. Se comparan los resultados con los resultados de cuantificación originales almacenados en el registro de verificación. Si no coinciden, no se supera la prueba.

Impresión de informes

Se imprime de nuevo el informe original.

En la página siguiente se muestra un ejemplo de una prueba de verificación completada con éxito.

```
=====
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

Registro GLPsave

El registro GLPsave se guarda al final de cada análisis cuando se selecciona la lista de control del análisis. Contiene la siguiente información:

- señales,
- libro de registro,
- tabla de resultados de integración,
- tabla de resultados de cuantificación,
- datos de rendimiento del instrumento y
- método de análisis de datos.

Es un registro protegido completo, generado en el momento del análisis. Puede consultarlo en cualquier momento del futuro como prueba de los métodos analíticos.

La opción Registro GLPsave en la ventana Análisis de datos le permite revisar el fichero de registro GLPsave en cualquier momento. El fichero está protegido por una clave y se codifica en binario para asegurar que no se cambia.

En el cuadro de diálogo que utilizó para seleccionar el registro GLPsave para revisión, puede seleccionar una de las opciones de revisión de las siguientes:

- cargar el método original,
- cargar las señales originales,
- cargar los datos de rendimiento del instrumento,
- imprimir el método original,
- imprimir los resultados de integración originales,
- imprimir los resultados de cuantificación originales y
- generar un informe original del método y las señales originales.

Puede utilizar la función de revisión GLP para mostrar que los datos cromatográficos son originales, probar la calidad del análisis de los datos de rendimiento del instrumento y demostrar la autenticidad de la interpretación de los datos.

Por ejemplo puede:

- volver a cargar e imprimir el análisis de datos con parte del método utilizado en el momento de análisis de la muestra para probar que la evaluación de datos, presentada como resultados de los análisis, no se ha modificado de ninguna forma y
- revisar sin volver a calcular los resultados de integración y cuantificación para probar la autenticidad del informe.

Función del test del DAD

Se pueden utilizar los test del detector como un paso en la validación del sistema rutinario de un instrumento analítico en un laboratorio regulado.

El test del DAD evalúa el rendimiento del detector de diodo-array. Cuando selecciona el test del DAD del menú Instrument (sólo para LC3D y CE) se comprueba la intensidad y calibración de la longitud de onda del instrumento. Si presiona Save, los resultados del test se guardan de forma automática en la base de datos DADTest, en un fichero de registro llamado DADTest.Reg en el directorio de instrumentos predeterminados.

Función de revisión del test del DAD

La función **Review DAD Test** del menú View de análisis de datos le permite revisar el fichero DADTest.Reg en cualquier momento. El fichero está protegido por una clave y se codifica en binario para asegurar que no se cambia.

Puede seleccionar cualquiera de las siguientes partes del test del DAD para revisar:

- | | |
|-------------------------------|---|
| Show Holmium Spectra | Se expresan en gráficos los espectros del holmio que se enumeran en la tabla de revisión del test del DAD. Se etiqueta el espectro activo. |
| Show Intensity Spectra | Se expresan en gráficos los espectros de intensidad que se enumeran en la tabla de revisión del test del DAD. Se etiqueta el espectro activo. |
| Save as New Database | Si cambia la lámpara del DAD puede reiniciar el DADTest borrando los resultados del test no deseados de la tabla y utilizando esta función para guardar como nueva base de datos. |
| Show Selected Spectra | Muestra los espectros seleccionados en la tabla. |
| Show Intensity Graph | Puede representar un gráfico de intensidad para dar indicaciones de la vida de la lámpara en el detector de diodo-array. El gráfico proporciona la función de intensidad máxima de la lámpara frente al tiempo. |

Glosario UI

A

Advanced

Avanzado

all valleys

todos los valles

Amount per response

Cantidad por respuesta

Apply Manual Events from Method

Aplicar eventos manuales del método

Area Percent reject

Rechazo por % área

Area reject

Rechazo por área

Area Reject

Rechazo por área

Area Sum

Suma de área

Area sum off

Suma de área desactivada

Area sum on

Suma de área desactivada

Area Sum Slice

Segmento de suma de área

Area%

% de área

Autointegrate

Integración automática

Average

Promedio

B

Baseline at valleys

Línea de base en valles

Baseline backwards

Línea de base hacia atrás

baseline point

punto de línea base

Batch

Lote

C

Calculate signals separately

Calcular señales por separado

Calculate Signals Separately

Calcular señales por separado

Calculate with Corrected Areas

Calcular con áreas corregidas

Calibration Settings

Configuración de calibración

capillary isoelectric focusing calibration

calibración del enfoque isoelectrico capilar

CE Mobility

Movilidad de CE

Classical

Clásico

Clear

Borrar

Compound Details

Detalles de compuesto

D

Data Analysis

Análisis de datos

Delete Peak(s)

Eliminar pico(s)

detector response

respuesta en el detector

DNA base-pair calibration

calibración de pares de bases de ADN

Draw Baseline

Dibujar línea base

E

Effective Mobility Correction

Corrección de la movilidad efectiva

End

Fin

Exponential

Exponencial

Extended Performance

Rendimiento ampliado

F

Floating Average

Promedio flotante

Force

Forzar

Front skim height ratio

Relación de alturas para división frontal

Front Skim Height Ratio

Relación de alturas para división frontal

H

height reject

Rechazo por altura

Height reject

Rechazo por altura

Height Reject

Rechazo por altura

Height%

% de altura

I

Ignore

Ignorar

Integration

Integración

integration events

eventos de integración

Integration Events Table

tabla Eventos de integración

L

Left

Izquierda

M

Manual Events

Eventos manuales

Manual Factor

Factor manual

Manual Integration

integración manual

N

Navigation Table

tabla de navegación

Negative peak

Pico negativo

Negative Peaks

Picos negativos

Negative Peaks On

Pico negativo activado

New Exponential

Exponencial nueva

No penetration

Sin penetración

No penetrations

Sin penetración

Norm%

% Norm

O

Off

Desactivada

On

Activada

Origin

Origen

P

p/v ratio

relación p/v

peak matching

asignación de picos

peak width

Anchura de pico

Peak Width

Anchura de pico

Performance

Rendimiento

Performance+LibSearch

Rendimiento + LibSearch

Performance+Noise

Rendimiento + Ruido

protein molecular weight calibration

calibración del peso molecular de la proteína

Protein molecular weight calibration

Calibración del peso molecular de la proteína

Q

Quantification Parameters

Parámetros de cualificación

Quantitation Settings

Ajustes de cuantificación

R

Range 1

Rango 1

Range 9

Rango 9

Recalibration Settings

Ajustes de recalibración

Relative Mobility Correction

Corrección de la movilidad relativa

Remove Manual Events from Method

Quitar eventos manuales del método

Replace

Sustituir

Response per amount

Respuesta por cantidad

Right

Derecha

S

Sample Information

Información de muestra

Save as New Database

Guardar como nueva base de datos

Sequence Table

Tabla de secuencia

Set Baseline from Range

Fijar línea de base a partir de rango

Set Low Baseline from Range

Fijar línea de base baja a partir de rango

Shoulders

Hombros

Show Holmium Spectra

Mostrar espectros de holmio

Glosario UI

Show Intensity Graph

Mostrar el gráfico de intensidad

Show Intensity Spectra

Mostrar espectros de intensidad

Show Selected Spectra

Mostrar espectros seleccionados

Signal to noise

Señal a ruido

Skim valley ratio

Relación de división de valle

Skim Valley Ratio

Relación de división de valle

Slope Sensitivity

Sensibilidad de pendiente

Specify Report

Especificar informe

Split Peak

Pico dividido

Standard

Estándar

Standard Calibration

Calibración estándar

Start

Inicio

Start-negA.

Inicio-A neg.

Straight

Recta

Subtract Background

Sustracción de fondo

T

Tail skim height ratio

Relación de alturas para división de cola

Tail Skim Height Ratio

Relación de alturas para división de cola

Tangent Skim

División tangencial

U

Update Manual Events of Method

Actualizar eventos manuales del método

Update peak height

Actualizar altura de pico

Use baseline from range

Usar línea de base a partir de rango

Use Baseline from Range

Usar línea de base a partir de rango

Using Compound

Uso de compuesto

V

Valley

Valle

W

With Rsp Factor

Con factor de respuesta

En este manual

En esta guía se incluye la información de referencia sobre los principios de funcionamiento, cálculos y algoritmos de análisis de datos utilizados en el software Agilent OpenLab ChemStation.

La información contenida en el mismo puede utilizarse por profesionales de validación para el planteamiento y la ejecución de tareas de validación del sistema.

www.agilent.com

© Agilent Technologies Inc. 2010-2025
Edición: 02/2025

N.º doc.: D0013749es Rev. A.1

