



OpenLab ChemStation

Informations de référence pour le traitement des données

Avertissements

Infos sur le document

N° de document : D0013749fr Rév. A.1
Édition : 02/2025

Copyright

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2025

Conformément aux lois nationales relatives à la propriété intellectuelle, toute reproduction totale ou partielle de ce manuel sous quelque forme et par quelque moyen que ce soit (y compris le stockage et l'extraction électroniques ou la traduction en langue étrangère) est interdite sans le consentement écrit préalable de la société Agilent Technologies, Inc..

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

Version du logiciel

Ce guide est valable pour la version LTS 01.11 de Agilent OpenLab ChemStation.

Garantie

Les informations contenues dans ce document sont fournies « en l'état » et pourront faire l'objet de modifications sans préavis dans les éditions ultérieures. Dans les limites de la législation en vigueur, Agilent exclut en outre toute garantie, expresse ou implicite, quant à ce manuel et aux informations qu'il contient, notamment, sans limitation, toute garantie marchande et aptitude à un but particulier. En aucun cas, Agilent ne peut être tenu responsable des éventuelles erreurs contenues dans ce document, ni des dommages pouvant découler indirectement de la fourniture, de l'utilisation ou de la qualité de ce document ou des informations qu'il contient. Si Agilent et l'utilisateur ont souscrit un contrat écrit distinct dont les conditions de garantie relatives aux informations contenues dans le présent document entrent en conflit avec les présentes, les conditions de garantie du contrat distinct se substituent à celles du présent document.

Licences technologiques

Le matériel et le logiciel décrits dans ce document sont protégés par un accord de licence et leur utilisation ou reproduction sont soumises aux termes et conditions de ladite licence.

Limitation des droits

Droits restreints de l'administration des États-Unis. Les droits octroyés au gouvernement fédéral concernant les logiciels et les données techniques ne comprennent que les droits habituellement conférés aux clients finaux. Agilent fournit cette licence commerciale habituelle pour les logiciels et les données techniques conformément aux réglementations FAR 12.211 (données techniques) et 12.212 (logiciels)

et, pour le département de la Défense, DFARS 252.227-7015 (données techniques – articles commerciaux) et DFARS 227.7202-3 (droits concernant les logiciels commerciaux ou la documentation se rapportant aux logiciels).

Mentions de sécurité

ATTENTION

Une mention **ATTENTION** signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, le produit risque d'être endommagé ou les données d'être perdues. En présence d'une mention **ATTENTION**, vous ne devez continuer votre opération uniquement que si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

AVERTISSEMENT

Une mention **AVERTISSEMENT** signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, les personnes risquent de s'exposer à des lésions graves. En présence d'une mention **AVERTISSEMENT**, vous ne devez continuer votre opération uniquement que si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

Dans ce guide...

Ce guide s'adresse aux utilisateurs chevronnés, administrateurs système et personnes chargées de valider le logiciel Agilent OpenLab ChemStation. Il contient des informations de référence concernant les principes de fonctionnement, calculs et algorithmes de traitement de données utilisés dans la version LTS 01.11 de OpenLab ChemStation.

Les instructions de ce guide permettent de vérifier la fonctionnalité du système au regard des spécifications en matière de besoins de l'utilisateur. Elles vous seront également utiles pour définir et mener les tâches de validation de système prescrites par le plan de validation. Les ressources suivantes fournissent des informations complémentaires.

- Didacticiels d'introduction : Voir les modules d'apprentissages disponibles depuis la plate-forme d'apprentissage et de ressources utilisateur du logiciel OpenLab ChemStation.
- Pour des informations contextuelles sur les tâches, référence de l'interface utilisateur et aide à la résolution des problèmes : aide en ligne de ChemStation.
- Pour les concepts et procédures de travail de OpenLab ChemStation : le manuel sur les concepts et procédures de travail basiques de OpenLab ChemStation.
- Pour des informations détaillées sur l'installation du système et la préparation du site : le Guide d'installation de la station de travail OpenLab ChemStation ou le Guide d'installation du système distribué et des stations de travail en réseau OpenLab ChemStation, respectivement.
- Pour des informations détaillées sur les principes et les tâches d'administration du système : le Guide de l'administrateur de la station de travail OpenLab ChemStation.

Dans ce qui suit, le terme ChemStation désigne le logiciel Agilent OpenLab ChemStation.

1 Intégration

Ce chapitre décrit les concepts et les algorithmes d'intégration du ChemStation integrator.

2 Identification des pics

Ce chapitre décrit les principes de l'identification des pics.

3 Étalonnage

Ce chapitre présente les calculs détaillés utilisés dans le processus d'étalonnage.

4 Quantification

Ce chapitre décrit comment les composés sont quantifiés et explique les calculs utilisés dans la quantification.

5 Aptitude du système

Ce chapitre décrit ce que peut faire OpenLab CDS pour évaluer les performances de l'instrument analytique et de la méthode analytique.

6 Calculs propres à l'EC

Ce chapitre ne vous concerne que si vous utilisez le logiciel ChemStation pour contrôler des instruments EC.

7 Vérification du système

Ce chapitre décrit la fonction de vérification et les fonctionnalités GLP de la ChemStation.

Sommaire

1 Intégration 7

- Qu'est-ce que l'intégration ? 8
- Les algorithmes d'intégration de la ChemStation 10
- Principe de fonctionnement 15
- Identification d'un pic 16
- Mesure d'aire de pic 26
- Attribution de la ligne de base 29
- Événements d'intégration 41
- Intégration manuelle 63

2 Identification des pics 66

- En quoi consiste l'identification des pics ? 67
- Règles de correspondance des pics 68
- Types d'identification des pics 69
- Temps de rétention/migration absolu 70
- Temps de rétention/migration corrigés 72
- Qualificateurs de pic 74
- La procédure d'identification 76

3 Étalonnage 78

- Qu'est-ce que l'étalonnage ? 79
- Courbe d'étalonnage 80
- Calcul de la courbe d'étalonnage 81
- Étalonnage groupé 85
- Options de réétalonnage 86

4 Quantification 87

- Qu'est-ce que la quantification ? 88
- Facteurs de correction 89
- % aire et % hauteur 91

Quantification des composés étalonnés	92
Quantification des pics non étalonnés	97
Calcul du pourcentage normalisé	99

5 Aptitude du système 100

Évaluation de la performance optimale	101
Évaluation de la conformité du système	101
Définition du bruit	104
Calcul de l'asymétrie et de la symétrie de pic	115
Calculs et formules d'aptitude du système	117
Définitions générales	118
Définition des tests de performances	119
Définitions de reproductibilité	131
Accès au nombre en double précision stocké en interne	136

6 Calculs propres à l'EC 139

Tables d'étalonnage	140
Étalonnage à l'aide de la correction de mobilité	143
Styles de rapport spéciaux pour l'électrophorèse capillaire	149
Surfaces de pic corrigées	150
Aptitude du système pour l'électrophorèse capillaire	151
EC-DDM	152

7 Vérification du système 153

Vues Verification (Vérification) et Diagnosis (Diagnostic)	154
Registre GLPsave	157
Fonction de test DAD	159

1

Intégration

Qu'est-ce que l'intégration ?	8
Description de l'intégration	8
Fonctions de l'intégrateur	9
Les algorithmes d'intégration de la ChemStation	10
Présentation	10
Définition de la ligne de base initiale	11
Suivi de la ligne de base	12
Attribution de la ligne de base	13
Terminologie	14
Principe de fonctionnement	15
Identification d'un pic	16
Largeur de pic	16
Filtres de reconnaissance de pic	17
Regroupement de tranches d'intégration	18
Algorithme de reconnaissance de pic	19
Pics fusionnés	21
Épaulements	22
Construction de la ligne de base par défaut	23
Codes de séparation de pic	24
Mesure d'aire de pic	26
Détermination de l'aire	26
Unités et facteurs de conversion	28
Attribution de la ligne de base	29
Le début de la ligne de base	29
La fin de la ligne de base	29
Modes de correction de la ligne de base	30
Rapport pic/vallée	32
Approximation tangentielle	33
Événements d'intégration	41
Événements d'intégration pour tous les signaux	41
Événements initiaux	44
Événements programmés	49
Intégration automatique	61
Intégration manuelle	63
Enregistrement des événements d'intégration manuelle	64

Ce chapitre décrit les concepts et les algorithmes d'intégration du ChemStation integrator.

Qu'est-ce que l'intégration ?

L'intégration consiste à identifier les pics dans un signal et à calculer leur taille.

L'intégration est une étape indispensable pour :

- l'identification,
- la qualification,
- l'étalonnage,
- la quantification,
- les calculs de pureté des pics,
- la recherche dans la bibliothèque spectrale.

Description de l'intégration

Lors de l'intégration d'un signal, le logiciel :

- identifie l'instant de début et l'instant de fin de chaque pic,
- détecte le sommet de chaque pic, c'est-à-dire le temps de rétention/migration,
- construit une ligne de base,
- calcule l'aire, la hauteur et la largeur et la symétrie de chaque pic.

Ce processus est contrôlé par des paramètres appelés événements d'intégration.

Fonctions de l'intégrateur

Les algorithmes d'intégration proposent les grandes fonctions suivantes :

- fonction d'intégration automatique, utilisée pour établir les paramètres d'intégration initiaux,
- fonction de définition de tables d'événements d'intégration différentes pour chaque signal chromatographique/électrophorétique, si l'on utilise plusieurs signaux ou détecteurs,
- définition interactive des événements d'intégration permettant de sélectionner le moment des événements sur un graphique,
- intégration manuelle de chromatogrammes ou d'électrophorétogrammes nécessitant une interprétation humaine (il est également possible d'enregistrer ces événements dans la méthode et de les utiliser en fonctionnement automatique),
- annotation des résultats d'intégration,
- définition de paramètres d'intégration pour la prédéfinition ou l'ajustement des réglages de base de l'intégrateur concernant le rejet d'aire, le rejet de hauteur, la largeur de pic, la sensibilité de pente, la détection d'épaulement, la correction de la ligne de base et la détection d'approximation tangentielle sur front ou traînée,
- paramètres de contrôle de la ligne de base (par exemple, forcer la ligne de base, maintenir la ligne de base, ligne de base passant par tous les points vallées, ligne de base au niveau de la vallée suivante, insertion d'une ligne de base arrière à partir de la fin du pic en cours),
- contrôle de la sommation d'aires,
- reconnaissance de pic négatif,
- détection de définition de pic de solvant,
- commandes d'intégrateur définissant les plages de temps de rétention/migration pour le bon fonctionnement de l'intégrateur,
- attribution d'épaulement de pic grâce à des calculs de dérivée seconde,
- échantillonnage amélioré de points de données non équidistants pour de meilleures performances avec des fichiers de données CPL DAD reconstruits à partir de spectres DAD.

Les algorithmes d'intégration de la ChemStation

Présentation

Pour intégrer un chromatogramme/électrophorétogramme, l'intégrateur :

- 1 définit la ligne de base initiale,
- 2 surveille et actualise la ligne de base en continu,
- 3 identifie l'instant de début d'un pic,
- 4 détecte le sommet de chaque pic,
- 5 identifie l'instant de fin du pic,
- 6 construit une ligne de base,
- 7 calcule l'aire, la hauteur et la largeur de chaque pic.

Ce processus est contrôlé par des **integration events**. Les principaux événements d'intégration sont la sensibilité de pente initiale, la largeur de pic, la correction de la ligne de base, l'aire de rejet et la hauteur de rejet. Le logiciel permet de définir des valeurs initiales pour ces événements, entre autres. Les valeurs initiales prennent effet au début du chromatogramme. De plus, la fonction d'intégration automatique comporte un ensemble d'événements initiaux que vous pouvez optimiser plus avant.

Les événements initiaux donnent généralement de bons résultats d'intégration sur la totalité du chromatogramme, mais il est parfois souhaitable de mieux contrôler la progression d'une intégration.

Le logiciel permet de contrôler le mode d'intégration en programmant de nouveaux événements d'intégration à des instants appropriés dans le chromatogramme.

Pour plus d'informations, voir « Événements initiaux », page 44.

Définition de la ligne de base initiale

Points cardinaux

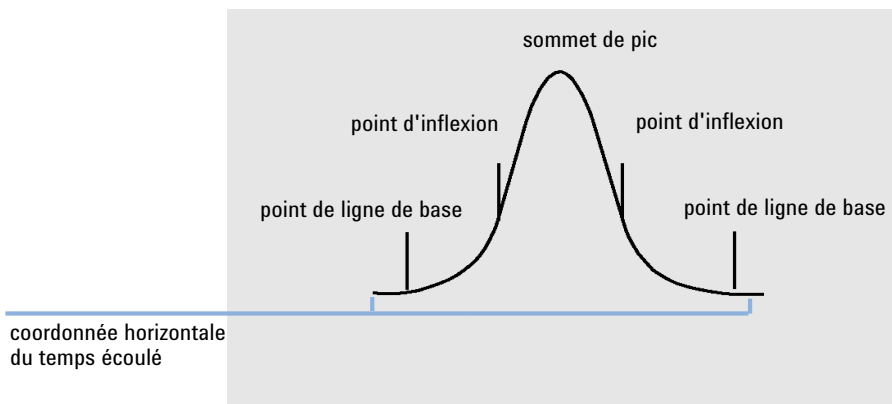


Figure 1 Points cardinaux

Définition de la ligne de base initiale

Étant donné que les conditions de ligne de base dépendent de l'application et du détecteur, l'intégrateur utilise des paramètres tirés des événements d'intégration et du fichier de données pour optimiser la ligne de base.

Pour pouvoir intégrer des pics, l'intégrateur doit d'abord définir un **baseline point**. Au début de l'analyse, l'intégrateur définit un niveau de ligne de base initial, en prenant le premier point de données comme point de ligne de base provisoire. Il essaie ensuite de redéfinir ce point de ligne de base initial en se fondant sur la moyenne du signal d'entrée. S'il n'obtient pas de point de ligne de base initial redéfini, il conserve le premier point de données comme point de ligne de base initial potentiel.

Identification des points cardinaux d'un pic

L'intégrateur détermine qu'un pic est peut-être en train de débuter lorsque les points de ligne de base potentielle se situent hors de l'enveloppe de la ligne de base et que la courbure de la ligne de base dépasse une certaine valeur, définie par le paramètre de sensibilité de pente de l'intégrateur. Si cette condition persiste, l'intégrateur reconnaît le front montant d'un pic. Le pic est alors traité.

Début

- 1 Pente et courbure dans la limite : l'intégrateur continue à suivre la ligne de base.
- 2 Pente et courbure au-dessus de la limite : un pic est possible.
- 3 La pente reste au-dessus de la limite : un pic est reconnu. Le point de début du pic est défini.
- 4 La courbure devient négative : le point d'inflexion avant est défini.

Sommet

- 1 La pente passe par zéro et devient négative : sommet du pic. Le sommet est défini.
- 2 La courbure devient positive : le point d'inflexion arrière est défini.

Fin

- 1 Pente et courbure dans la limite : la fin du pic est proche.
- 2 La pente et la courbure restent dans la limite : la fin du pic est définie.
- 3 L'intégrateur revient en mode de suivi de la ligne de base.

Suivi de la ligne de base

L'intégrateur échantillonne les données numériques à une fréquence déterminée par la largeur de pic initiale ou par la largeur de pic calculée, au fur et à mesure de l'analyse. Il considère chaque point de données comme un point de ligne de base potentiel.

L'intégrateur détermine une *enveloppe de ligne de base* à partir de sa pente. Dans l'algorithme de suivi, la pente est la dérivée première et la courbure la seconde dérivée. L'enveloppe de ligne de base peut être vue comme un cône, dont la pointe se situe au point de données en cours. Les niveaux d'acceptation supérieure et inférieure du cône sont :

- + pente montante + courbure + décalage de ligne de base doit être inférieur au niveau de seuil,
- - pente montante - courbure + décalage de ligne de base doit être plus positive (c'est-à-dire moins négative) que le niveau de seuil.

Au fur et à mesure de l'acceptation de nouveaux points de données, le cône avance jusqu'à l'apparition d'une rupture.

Pour être accepté comme point de ligne de base, un point de données doit répondre aux conditions suivantes :

- il doit se trouver à l'intérieur de l'enveloppe de ligne de base définie,
- la courbure de la ligne de base au point de donnée (déterminée par les filtres de dérivation), doit être inférieure à une valeur critique, déterminée par le réglage de sensibilité de pente en cours.

Le point de ligne de base initial, établi au début de l'analyse, est ensuite révisé continuellement à une fréquence déterminée par la largeur du pic, pour la moyenne mobile des points de données inclus dans l'enveloppe de la ligne de base sur une période déterminée par la largeur du pic. L'intégrateur suit et révisé périodiquement la ligne de base pour compenser sa dérive, jusqu'à la détection d'un front montant de pic.

Attribution de la ligne de base

Pendant l'analyse, l'intégrateur règle la ligne de base du chromatogramme/de l'électrophorétogramme sur une fréquence définie par la valeur de largeur de pic. Après avoir échantillonné un certain nombre de points de données, il amène la ligne de base du point de ligne de base initial au point de ligne de base actuel. L'intégrateur reprend le suivi de la ligne de base sur les points de données suivants et redéfinit à nouveau la ligne de base. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que l'intégrateur identifie le début d'un pic.

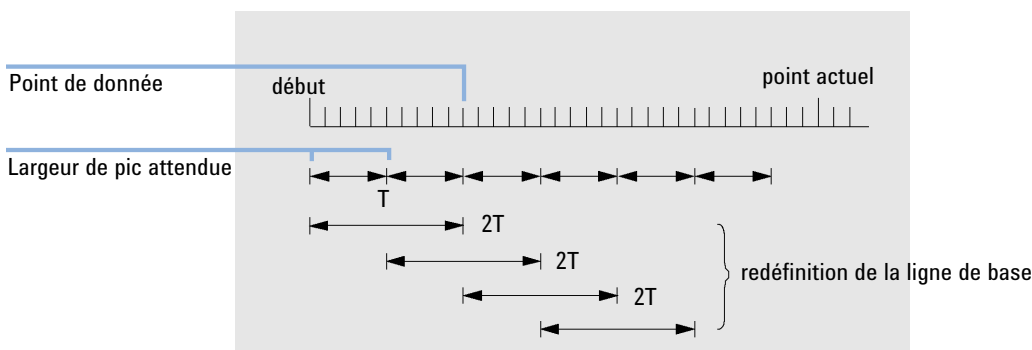


Figure 2 Ligne de base

Au début de l'analyse, l'intégrateur utilise le premier point de données. Ce point de ligne de base est redéfini périodiquement selon la formule suivante :

Les aires sont sommées sur un temps T (largeur de pic prévue). Ce temps ne peut jamais être plus court qu'un point de données. La procédure se poursuit tant

que la condition de ligne de base existe. La pente et la courbure sont également calculées. Si la pente et la courbure sont toutes deux inférieures au seuil, le système additionne deux aires sommées et les compare à la ligne de base précédente. Si la nouvelle valeur est inférieure à la ligne de base précédente, elle remplace immédiatement la précédente. Si la nouvelle valeur est supérieure à la précédente, elle est enregistrée en tant que nouvelle ligne de base provisoire, puis confirmée si une ou plusieurs valeurs sont conformes aux critères de pente et de linéarité de la courbure. Cette dernière limitation ne s'applique pas si les pics négatifs sont autorisés. Pendant le suivi de la ligne de base, un contrôle doit également être effectué pour détecter les solvants à montée rapide. Ceux-ci peuvent être trop rapides pour la détection de front montant (au moment où la pente montante est confirmée, le critère de solvant peut ne plus être valide). À la première occurrence, le premier point de données est sur la ligne de base. Il est remplacé par la moyenne sur $2 T$ si le signal est sur la ligne de base. La ligne de base est ensuite réinitialisée à chaque période T (voir [Figure 2](#), page 13).

Terminologie

Pic de solvant

Le pic de solvant est généralement très grand, mais ne joue aucun rôle sur le plan analytique et n'est pas intégré habituellement. Cependant, lorsque de petits pics, intéressants analytiquement parlant, sont élués tout près du pic de solvant, par exemple, pendant la traînée du pic de solvant, des conditions d'intégration particulière peuvent être définies pour calculer une aire qui tient compte de la traînée du pic de solvant.

Épaulements (avant, arrière)

Les épaulements apparaissent quand deux pics sont si proches qu'il n'existe plus de vallée entre eux, ils ne sont donc pas résolus. Les épaulements peuvent apparaître sur le front montant (avant) du pic ou sur le front descendant (traîne) du pic. Lors de la détection d'épaulement, il est possible de les intégrer par intégration tangentielle ou projection sur la ligne de base.

Pente

La pente d'un pic reflète le changement de la concentration du composé en fonction du temps, elle sert à déterminer le point de départ du pic, son sommet et sa fin.

Principe de fonctionnement

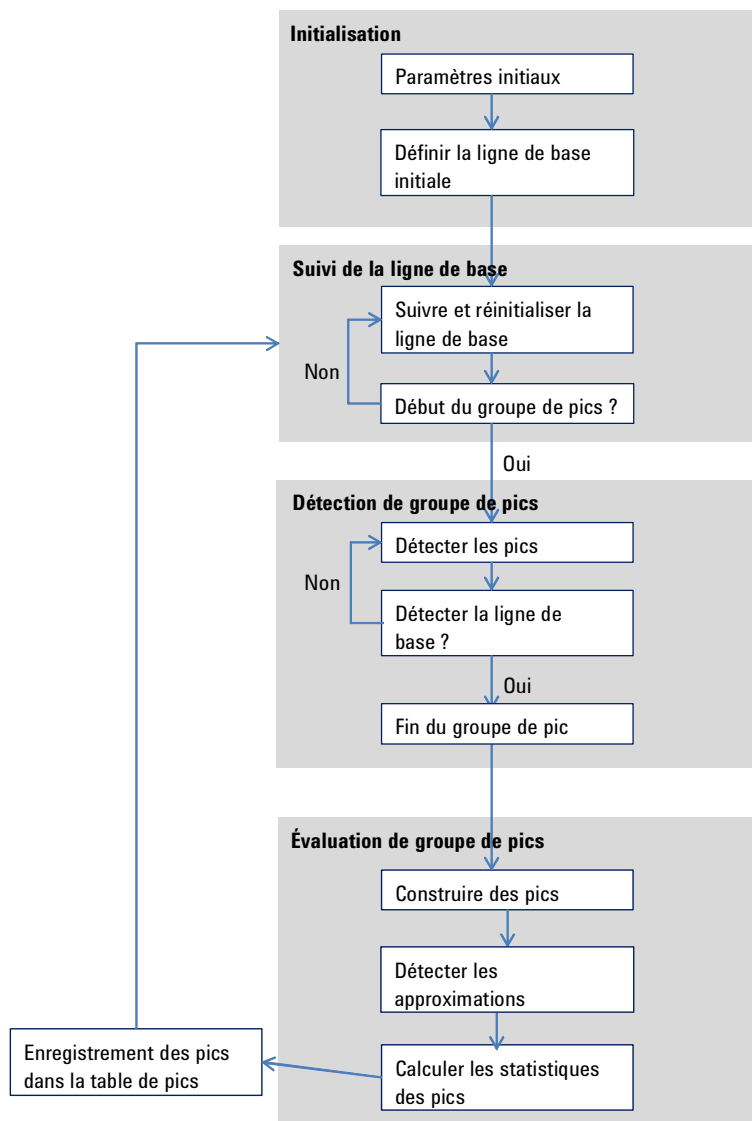


Figure 3 Organigramme de l'intégrateur

Identification d'un pic

L'intégrateur utilise différents outils pour reconnaître et caractériser un pic :

- largeur de pic,
- les filtres de reconnaissance du pic,
- le regroupement de tranches d'intégration (bunching),
- l'algorithme de reconnaissance du pic,
- l'algorithme de sommet du pic, et
- des calculs non gaussiens (par exemple de traînée, fusion de pics).

Largeur de pic

Pendant l'intégration, la largeur du pic est calculée à partir de l'aire et de la hauteur ajustées du pic :

$$\text{Largeur} = \text{aire ajustée} / \text{hauteur ajustée}$$

ou bien, si les points d'inflexion sont disponibles, à partir de la largeur entre les points d'inflexion.

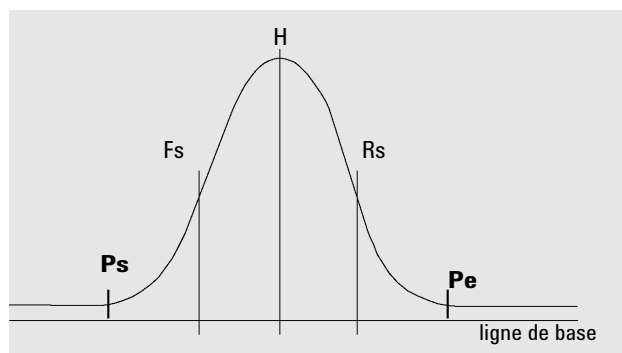


Figure 4 Calcul de largeur de pic

Dans la figure ci-dessus, l'aire totale (A) est la somme des aires comprises entre le début du pic (Ps) et la fin de ce dernier (Pe), compte tenu de la ligne de base. Fs est la pente frontale au point d'inflexion, Rs est la pente de traîne au point d'inflexion.

Le paramètre de largeur de pic contrôle la capacité de l'intégrateur à distinguer les pics du bruit de la ligne de base. Pour obtenir de bonnes performances, la largeur du pic définie doit être proche de la largeur des pics chromatographiques réels.

La largeur du pic peut être modifiée de trois façons :

- avant l'intégration, vous pouvez spécifier la largeur initiale du pic,
- pendant l'intégration, l'intégrateur met automatiquement à jour la largeur du pic de manière à maintenir une bonne correspondance avec les filtres de reconnaissance de pic,
- au cours de l'intégration, il est possible de redéfinir ou de modifier la largeur de pic par un événement programmé dans le temps.

Filtres de reconnaissance de pic

L'intégrateur comporte trois filtres de reconnaissance de pic, qui lui permettent de reconnaître les pics en détectant les variations de la pente et de la courbure dans un ensemble de points de données contigus. Ces filtres utilisent la dérivée première (pour mesurer la pente) et la dérivée seconde (pour mesurer la courbure) des points de données analysés par l'intégrateur. Les filtres de reconnaissance sont les suivants :

- Filter 1** Pente (courbure) de deux (trois) points de données contigus
- Filter 2** Pente de quatre points de données contigus et courbure de trois points de données non contigus
- Filter 3** Pente de huit points de données contigus et courbure de trois points de données non contigus

Le filtre effectivement utilisé dépend du paramètre de largeur de pic. Par exemple, au début d'une analyse, le filtre 1 peut être utilisé. Si la largeur de pic augmente au cours de l'analyse, l'intégrateur passe d'abord au filtre 2, puis au filtre 3. Pour que la reconnaissance donne de bons résultats, vous devez régler la largeur de pic sur une valeur proche de la largeur effective des pics de chromatogramme/d'électrophorogramme. Au cours de l'analyse, l'intégrateur actualise la largeur de pic pour optimiser l'intégration, si nécessaire.

L'intégrateur calcule la nouvelle largeur de pic de différentes façons, suivant la configuration d'instrument.

Intégration

Identification d'un pic

Pour les configurations CPL/EC, le calcul de largeur de pic par défaut est un calcul composite :

$$0,3 \times (\text{point d'inflexion droit} - \text{point d'inflexion gauche}) + 0,7 \times \text{aire/hauteur.}$$

Pour les configurations CPG, le calcul de largeur de pic par défaut utilise le rapport aire/hauteur. Ce calcul ne surestime pas la largeur lorsque des pics sont fusionnés au-dessus du point de mi-hauteur.

Dans certains types d'analyse, par exemple les analyses de CPG isotherme et de CPL isocratique, les pics peuvent s'élargir de manière significative au cours de l'analyse. Pour compenser cette dérive, l'intégrateur actualise automatiquement la largeur du pic au fur et à mesure que les pics s'élargissent durant l'analyse. La mise à jour est automatique, à moins que la fonction correspondante n'ait été désactivée avec l'événement programmé de largeur de pic fixe.

L'actualisation de la largeur de pic est pondérée comme suit :

$$0,75 \times (\text{largeur de pic existante}) + 0,25 \times (\text{largeur du pic actuel})$$

Regroupement de tranches d'intégration

Le regroupement est le moyen utilisé par l'intégrateur pour conserver les pics élargis dans la plage efficace des filtres de reconnaissance de pics et conserver une bonne sélectivité.

L'intégrateur ne peut continuer à augmenter indéfiniment la largeur des pics. En effet, au-delà d'une certaine largeur, les filtres de reconnaissance des pics ne pourraient plus voir les pics. Pour outrepasser cette limitation, l'intégrateur regroupe les points de données, ce qui revient à réduire la largeur du pic en conservant la même aire.

Lors du regroupement de données, les points sont regroupés par deux puissance facteur de regroupement, c'est-à-dire sans regroupement = 1x, regroupés une fois = 2x, regroupés deux fois = 4x, etc.

Le regroupement se base sur la fréquence d'acquisition des données et la largeur de pic. L'intégrateur utilise ces paramètres pour définir le facteur de regroupement et donner le nombre de points de données approprié (voir [Tableau 1](#), page 19).

Le regroupement s'effectue par puissance de deux en fonction de la largeur de pic attendue ou reconnue. L'algorithme de regroupement est résumé dans [Tableau 1](#), page 19.

Tableau 1 Critères de groupage

Largeur de pic attendue	Filtre(s) utilisé(s)	Groupage effectué
0 à 10 points de données	Premier	Aucun
8 à 16 points de données	Deuxième	Aucun
12 à 24 points de données	Troisième	Aucun
16 à 32 points de données	Deuxième	Une fois
24 à 48 points de données	Troisième	Une fois
32 à 96 points de données	Troisième, deuxième	Deux fois
64 à 192 points de données	Troisième, deuxième	Trois fois

Algorithme de reconnaissance de pic

L'intégrateur identifie le début du pic avec un point de ligne de base déterminé par l'algorithme de reconnaissance de pic. L'algorithme de reconnaissance de pic compare dans un premier temps les sorties des filtres de reconnaissance de pic à la valeur de sensibilité de pente initiale pour augmenter ou diminuer l'accumulateur de pente montante. L'intégrateur identifie le point auquel la valeur de l'accumulateur de pente montante a été multipliée par ≥ 15 par rapport à la valeur du point où le pic a commencé.

Début de pic

Dans [Tableau 2](#), page 20, la largeur de pic attendue détermine les valeurs de pente et de courbure de filtre à comparer à la sensibilité de pente. Par exemple, lorsque la largeur de pic attendue est faible, les valeurs du filtre 1 sont ajoutées à l'accumulateur de pente montante. Si la largeur de pic attendue augmente, les valeurs du filtre 2 et finalement celles du filtre 3 sont utilisées.

Lorsque la valeur de l'accumulateur de pente montante est ≥ 15 , l'algorithme reconnaît un début de pic potentiel.

Tableau 2 Valeurs incrémentales de l'accumulateur de pente montante

Sorties des filtres de dérivée 1 à 3 en fonction de la sensibilité de pente	Filtre 1	Filtre 2	Filtre 3
Pente > Sensibilité de pente	+8	+5	+3
Courbure > Sensibilité de pente	+0	+2	+1
Pente < (-) Sensibilité de pente	-8	-5	-3
Pente < Sensibilité de pente	-4	-2	-1
Courbure < (-) Sensibilité de pente	-0	-2	-1

Fin du pic

Dans [Tableau 3](#), page 20, la largeur de pic attendue détermine les valeurs de pente et de courbure de filtre à comparer à la sensibilité de pente. Par exemple, si la largeur de pic attendue est faible, les valeurs du filtre 1 sont ajoutées à l'accumulateur de pente descendante. Si la largeur de pic attendue augmente, les valeurs du filtre 2 et finalement celles du filtre 3 sont utilisées.

Lorsque la valeur de l'accumulateur de pente descendante est ≥ 15 , l'algorithme reconnaît une fin de pic potentielle.

Tableau 3 Valeurs incrémentales pour l'accumulateur de pente descendante

Sorties des filtres de dérivée 1 à 3 en fonction de la sensibilité de pente	Filtre 1	Filtre 2	Filtre 3
Pente < (-) Sensibilité de pente	+8	+5	+3
Courbure < (-) Sensibilité de pente	+0	+2	+1
Pente > Sensibilité de pente	-11	-7	-4
Pente > Sensibilité de pente	-28	-18	-11
Courbure > Sensibilité de pente	-0	-2	-1

Algorithme de sommet de pic

Le sommet de pic est détecté comme étant le point le plus haut du chromatogramme, par construction d'un ajustement parabolique passant par les points de données les plus hauts.

Pics fusionnés

On parle de pics fusionnés lorsqu'un nouveau pic commence avant la détection de la fin du pic précédent. La figure illustre la manière dont l'intégrateur traite les pics fusionnés.

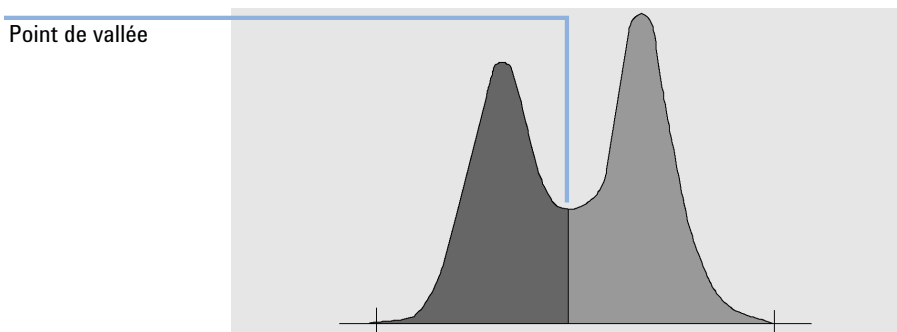


Figure 5 Pics fusionnés

L'intégrateur gère les pics fusionnés comme suit :

- 1 Il cumule l'aire du premier pic jusqu'au point de vallée.
- 2 Au point de vallée, la sommation d'aire pour le premier pic prend fin et la sommation pour le deuxième pic commence.
- 3 Lorsque l'intégrateur localise la fin du deuxième pic, la sommation d'aire s'arrête. Ce processus revient à séparer les pics fusionnés en abaissant une perpendiculaire à partir du point de vallée entre les deux pics.

Épaulements

Les épaulements sont des pics non résolus sur le front ou la traîne d'un pic de plus grande taille. En présence d'un épaulement, il n'y a pas de vraie vallée, c'est-à-dire de pente négative suivie par une pente positive. Un pic peut avoir un nombre quelconque d'épaulements avant et/ou arrière.

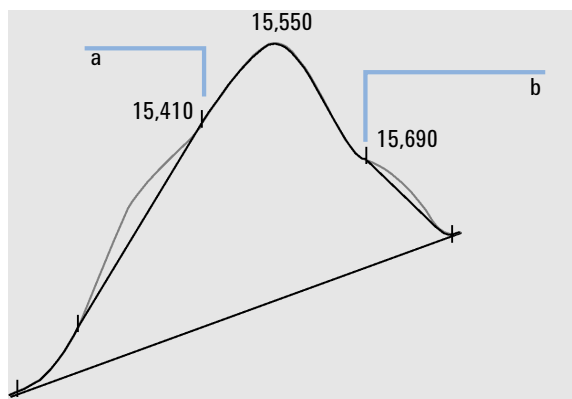


Figure 6 Épaulements de pic

Les épaulements sont détectés à partir de la courbure du pic, mesurée par la dérivée seconde. Lorsque la courbure tend vers zéro, l'intégrateur identifie un point d'inflexion, tel que les points a et b de Figure 6, page 22.

- Un épaulement avant potentiel est signalé si un deuxième point d'inflexion est détecté avant le sommet du pic. Si l'épaulement est confirmé, son début est placé au point de courbure positive maximale avant le point d'inflexion.
- La détection d'un deuxième point d'inflexion avant la fin du pic ou la vallée indique la possibilité d'un épaulement arrière. Si l'épaulement est confirmé, son début est placé au point du premier minimum de la pente après le sommet du pic.

Le temps de rétention/migration est déterminé à partir du point de courbure négative maximale de l'épaulement. Avec un événement d'intégration programmé, l'intégrateur peut également calculer les aires d'épaulement comme des pics normaux délimités par des projections verticales aux points d'inflexion de l'épaulement.

L'aire de l'épaulement est soustraite du pic principal.

Un événement programmé de l'intégrateur permet de traiter les épaulements de pic comme des pics normaux.

Construction de la ligne de base par défaut

Une fois qu'un groupe de pics est terminé et que la ligne de base est détectée, l'intégrateur demande à l'algorithme d'attribution d'attribuer la ligne de base par une technique d'essais et d'erreurs. Il utilise des corrections d'aire trapézoïdale et de hauteur proportionnelle afin de normaliser et maintenir la ligne de base la plus basse possible. Les entrées dans l'algorithme d'attribution de la ligne de base comprennent également des paramètres issus des fichiers de méthodes et de données identifiant le détecteur et l'application utilisés par l'intégrateur pour optimiser ses calculs.

Dans les cas les plus simples, l'intégrateur construit la ligne de base comme une suite de segments de droite entre :

- le début de la ligne de base,
- les points de début de pic, de vallée, de fin de pic,
- la ligne de base du pic.

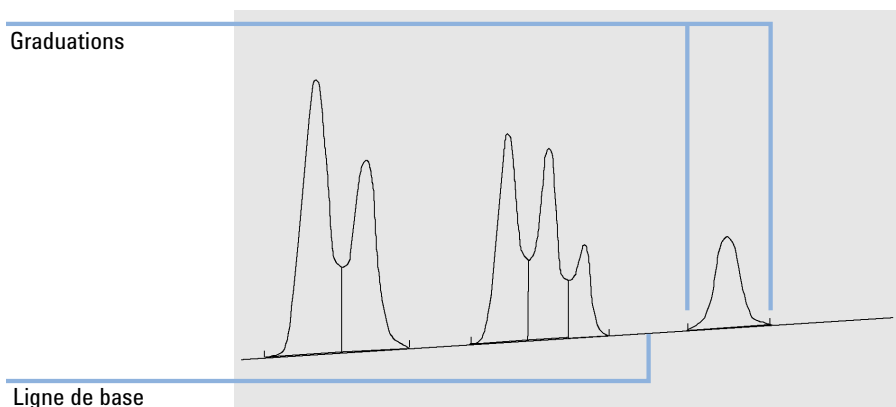


Figure 7 Construction de la ligne de base par défaut

Codes de séparation de pic

Dans les résultats d'intégration d'un rapport, un code à deux, trois ou quatre caractères est attribué à chaque pic, décrivant comment la ligne de base du signal a été dessinée.

Tableau 4 Code à quatre caractères

Premier caractère	Second caractère	Troisième caractère	Quatrième caractère
Ligne de base au début	Ligne de base à la fin	Erreur/indicateur de pic	Type de pic

Caractères 1 et 2

Le premier caractère décrit la ligne de base au début du pic et le deuxième caractère décrit la ligne de base à la fin du pic.

- B** Le pic a commencé ou s'est arrêté sur la ligne de base.
- P** Le pic a commencé ou s'est arrêté pendant la pénétration de la ligne de base.
- V** Le pic a commencé ou s'est arrêté avec une ligne verticale de vallée.
- H** Le pic a commencé ou s'est arrêté sur une ligne de base horizontale forcée.
- F** Le pic a commencé ou s'est arrêté sur un point forcé.
- M** Le pic a été intégré manuellement.
- U** Le pic n'a pas été attribué.

Des indicateurs supplémentaires peuvent aussi être ajoutés (par ordre de priorité) :

Caractère 3

Le troisième caractère décrit une erreur ou un indicateur de pic :

- A** L'intégration a été abandonnée. Par exemple à cause des événements d'intégration ON/OFF, ou de la fin du temps d'analyse d'un signal.
- D** Le pic était déformé (mauvaise forme de pic).

Espace blanc Le pic est un pic normal.

Caractère 4

Le quatrième caractère décrit le type de pic.

- S** Le pic est un pic de solvant.
- N** Le pic est un pic négatif.
- +** Le pic est un pic obtenu par sommation d'aires.
- T** Le pic est calculé par intégration tangentielle (approximation standard).
- X** Le pic est calculé par approximation tangentielle (ancien mode d'approximation exponentielle).
- E** Le pic est calculé par approximation tangentielle (nouveau mode d'approximation exponentielle).
- m** Le pic est défini par une ligne de base manuelle.
- n** Le pic négatif est défini par une ligne de base manuelle.
- t** Le pic est calculé par approximation tangentielle avec une ligne de base manuelle.
- x** Le pic est calculé par approximation tangentielle (approximation exponentielle) avec une ligne de base manuelle.
- R** Le pic est un pic recalculé (par exemple un pic parent ; voir « Modes d'approximation tangentielle », page 36).
- f** Le pic est défini par une tangente d'épaulement avant.
- b** Le pic est défini par une tangente d'épaulement arrière.
- F** Le pic est défini par une projection verticale d'épaulement avant.
- B** Le pic est défini par une projection verticale d'épaulement arrière.
- U** Le pic n'est pas attribué.

Mesure d'aire de pic

La dernière étape de l'intégration d'un pic consiste à déterminer son aire finale.

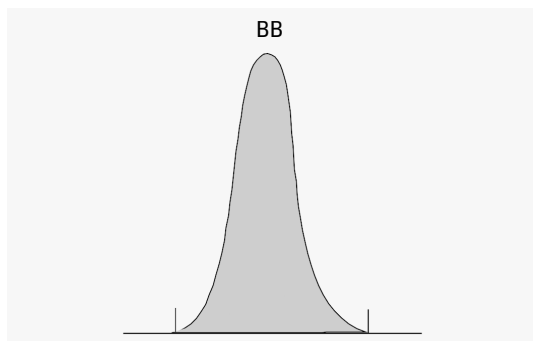


Figure 8 Mesure d'aire pour des pics de ligne de base à ligne de base

Dans le cas d'un pic simple isolé, l'aire de pic est calculée comme l'aire cumulée au-dessus de la ligne de base entre le début et la fin du pic.

Détermination de l'aire

L'aire que l'intégrateur calcule pendant l'intégration est déterminée comme suit :

- pour les pics de ligne de base à ligne de base (BB), il s'agit de l'aire au-dessus de la ligne de base entre le début et la fin du pic, comme sur la [Figure 8](#), page 26,
- pour les pics de vallée à vallée (VV), il s'agit de l'aire au-dessus de la ligne de base, segmentée par des projections verticales partant des points de vallée, comme sur la [Figure 9](#), page 27,

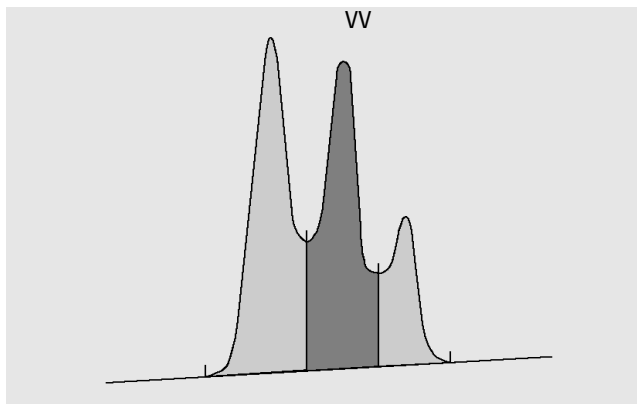


Figure 9 Mesure d'aire pour des pics de vallée à vallée

- pour les pics tangentiels (T), il s'agit de l'aire au-dessus de la ligne de base redéfinie,
- pour les pics de solvant (S), il s'agit de l'aire située au-dessus du prolongement horizontal du dernier point de ligne de base détecté et au-dessous de la ligne de base redéfinie attribuée aux pics tangentiels (T). Il arrive qu'un pic de solvant s'élève trop lentement pour être reconnu, ou que l'on rencontre en cours d'analyse un groupe de pics qui semble devoir être traité comme un pic de solvant avec un ensemble de pics portés. Il s'agit généralement d'un groupe de pics fusionnés dont le premier est bien plus grand que les autres. Le simple traitement par projection verticale amplifierait ces derniers pics, parce qu'ils se trouvent en réalité sur la traîne du premier. Si l'on force l'inté-

grateur à reconnaître le premier pic comme un pic de solvant, le reste du groupe est éliminé de la traîne,

- les pics négatifs (au-dessous de la ligne de base) ont une aire positive, comme le montre la [Figure 10](#), page 28.

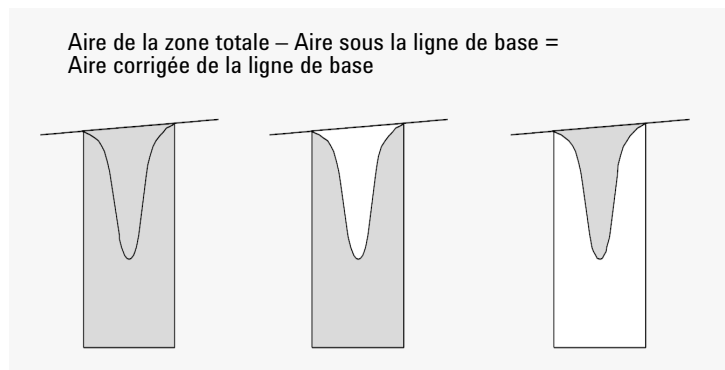


Figure 10 Mesure d'aire pour des pics négatifs

Unités et facteurs de conversion

En externe, les données contiennent un ensemble de points de données ; il peut s'agir soit de données échantillonnées, soit de données intégrées. Dans le cas des données intégrées, chaque point de données correspond à une surface, exprimée sous la forme *Hauteur x Temps*. Pour les données échantillonnées, chaque point de données correspond à une hauteur.

Par conséquent, pour les données intégrées, la hauteur est une entité calculée, obtenue par division de la surface par le temps écoulé depuis le point de données précédent. Pour les données échantillonnées, l'aire s'obtient par multiplication des données par le temps écoulé depuis le point de données précédent.

Le calcul d'intégration utilise les deux types d'entités. Les unités utilisées par l'intégrateur sont : *réponse du détecteur x secondes* pour la surface, et **detector response** en hauteur. Ceci permet d'assurer une base commune pour les troncatures d'entiers éventuellement nécessaires. Les mesures de temps, de surface et de hauteur sont présentées en unités physiques réelles, quelles que soient leurs méthodes de mesure, de calcul et d'enregistrement dans le logiciel.

Attribution de la ligne de base

Le début de la ligne de base

Si aucune ligne de base n'est détectée au début de l'analyse, le début de la ligne de base est défini d'une des manières suivantes :

- du début de l'analyse au premier point de ligne de base, si le point de début de l'analyse est plus bas que le premier point de la ligne de base,
- du début de l'analyse au premier point de vallée, si le point de début de l'analyse est plus bas que la première vallée,
- du début de l'analyse au premier point de vallée, si la première vallée pénètre une ligne imaginaire tracée du début de l'analyse à la première ligne de base,
- du début de l'analyse à une ligne de base horizontale prolongée depuis le premier point de la ligne de base.

La fin de la ligne de base

Le dernier point validé de la ligne de base sert à désigner la fin de la ligne de base. Quand l'analyse ne se termine pas sur la ligne de base, la fin de la ligne de base est calculée à partir du dernier point de ligne de base valable jusqu'à la dérive connue de la ligne de base.

Si un pic se termine sur une vallée apparente mais que le pic suivant se trouve en dessous de la valeur de rejet d'aire définie, la ligne de base est projetée à partir du début du pic jusqu'au vrai point de ligne de base suivant. Si un pic débute de manière similaire, la même règle s'applique.

Modes de correction de la ligne de base

Dans OpenLab ChemStation, plusieurs modes de correction de la ligne de base sont disponibles. Ils sont décrits dans les sections suivantes.

Mode de correction de la ligne de base : Classique

Une pénétration est définie par une descente du signal en dessous de la ligne de base construite (point a sur [Figure 11](#), page 30).

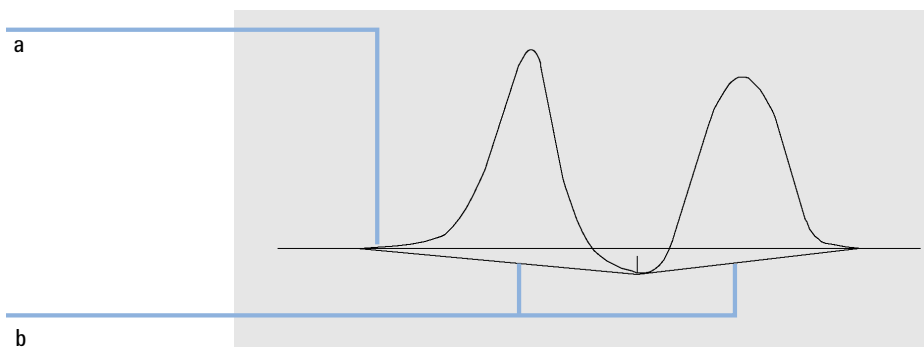


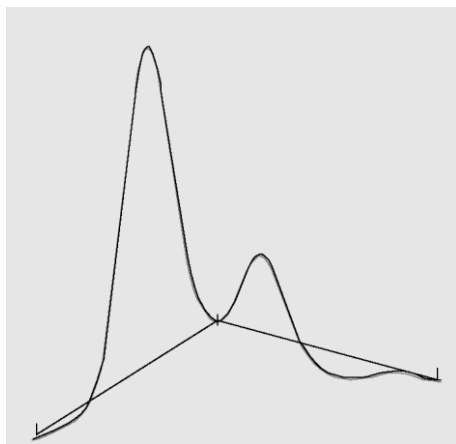
Figure 11 Pénétration de la ligne de base

En cas de pénétration de la ligne de base, cette partie de ligne de base peut être reconstruite comme pour le point b sur [Figure 11](#), page 30. Les modes de correction suivants permettent de supprimer toutes les pénétrations de la ligne de base :

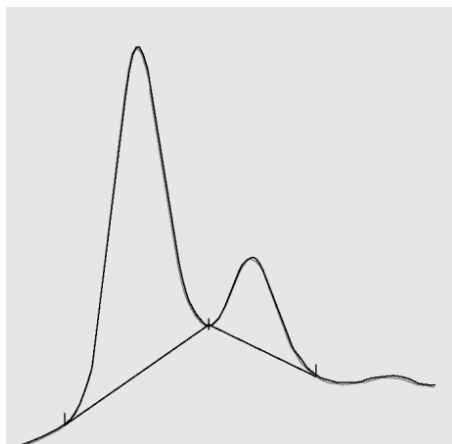
- **No penetration**
- **Advanced**

Mode de correction de la ligne de base : Sans pénétration

Lorsque cette option est sélectionnée, l'intégrateur recherche des pénétrations de la ligne de base dans chaque groupe de pics. Si des pénétrations sont détectées, les points de début et/ou de fin du pic sont décalés jusqu'à ce que toutes les pénétrations aient été éliminées.



Mode de correction de la ligne de base **Classical**



Mode de correction de la ligne de base **No penetration**

REMARQUE

Le mode de correction de la ligne de base **No penetration** est indisponible pour les pics de solvant, leurs pics-fils et leurs épaulements.

Mode de correction de la ligne de base : Avancé

Dans le mode de correction avancé de la ligne de base, l'intégrateur tente d'optimiser les emplacements de début et de fin de pics, il redéfinit la ligne de base pour un groupe de pics et supprime les pénétrations de ligne de base (voir « [Mode de correction de la ligne de base : Sans pénétration](#) », page 31). Dans beaucoup de cas, le mode de correction avancé de la ligne de base donne une ligne de base plus stable, moins dépendante de la sensibilité de pente.

Rapport pic/vallée

Le rapport pic/vallée est une mesure de qualité, qui indique le niveau de séparation du pic par rapport aux pics d'autres substances. Ce paramètre personnalisé est utilisé dans le mode de suivi de ligne de base avancé. Il permet de décider si deux pics qui ne présentent pas de séparation de ligne de base sont séparés par une ligne verticale ou un point de vallée. L'intégrateur calcule le rapport entre la hauteur corrigée par la ligne de base du pic le plus petit et la hauteur corrigée par la ligne de base de la vallée. Si le rapport pic/vallée est inférieur à la valeur définie par l'utilisateur, une projection verticale est utilisée ; sinon, une ligne de base est tracée de la ligne de base au début du premier pic jusqu'à la vallée, puis de la vallée à la ligne de base à la fin du deuxième pic (comparer la « [Mode de correction de la ligne de base : Sans pénétration](#) », page 31 à la [Figure 12](#), page 32).

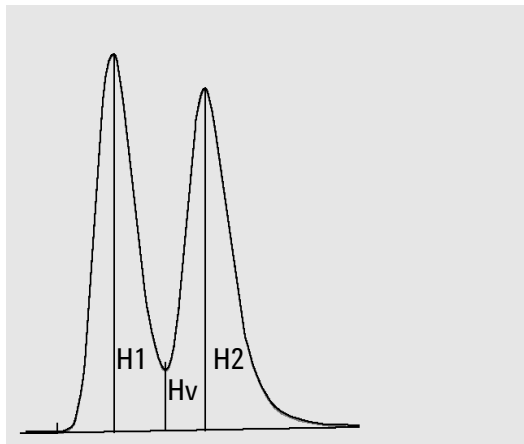


Figure 12 Rapport pic / vallée

Le rapport pic/vallée se calcule à l'aide des équations suivantes :

$$H1 \geq H2, \text{ Rapport pic/vallée} = H2/Hv$$

et

$$H1 < H2, \text{ Rapport pic/vallée} = H1/Hv$$

La [Figure 13](#), page 33 illustre l'incidence de la valeur de rapport pic/vallée définie par l'utilisateur sur les lignes de base.

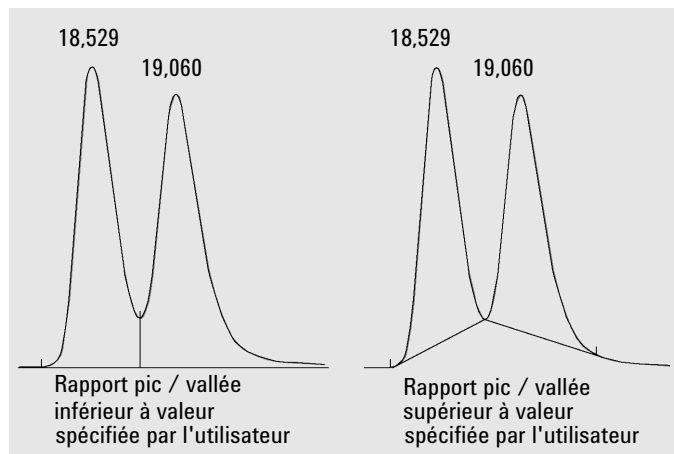


Figure 13 Incidence du rapport pic/vallée sur les lignes de base

Approximation tangentielle

L'approximation tangentielle est une forme de ligne de base construite pour les pics détectés sur le front ou la traîne d'un autre pic. Condition préalable : les deux pics ne sont pas séparés par la ligne de base.

Les figures suivantes illustrent le principe d'approximation tangentielle :

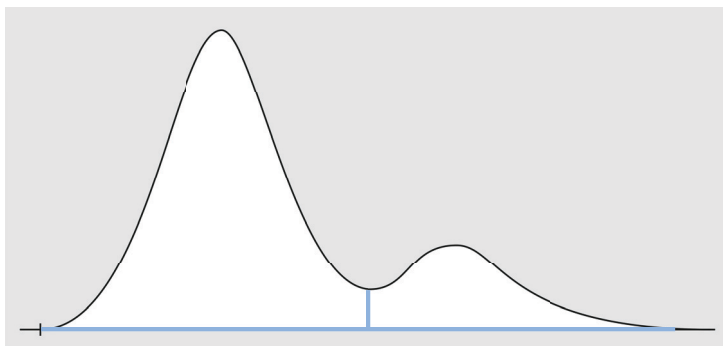


Figure 14 Pics sans approximation, séparés par une projection verticale

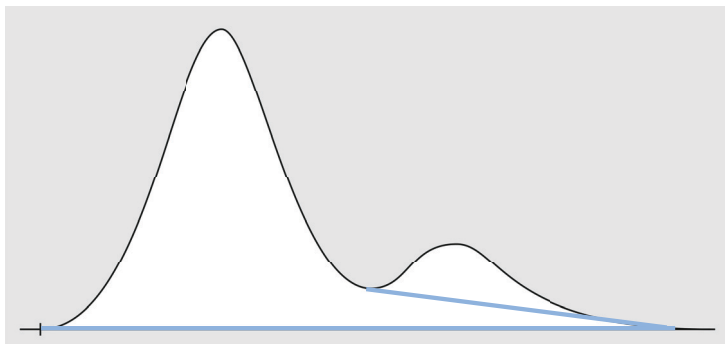


Figure 15 Approximation de la traîne

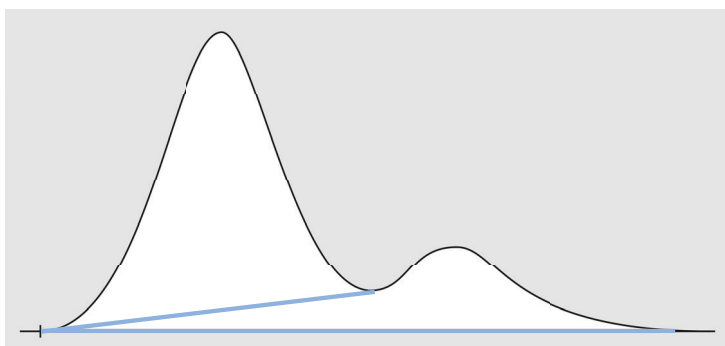


Figure 16 Approximation de front

Critères d'approximation

Les critères suivants déterminent l'utilisation d'une ligne d'approximation pour calculer l'aire d'un pic fils éluant à l'avant ou à la traîne d'un pic parent :

- Rapport de hauteur d'approximation (**Front skim height ratio** ou **Tail skim height ratio**)
- **Skim valley ratio**

Le *rapport de hauteur d'approximation* est le rapport de la hauteur corrigée de la ligne de base du pic parent (H_p sur la figure ci-dessous) sur la hauteur corrigée de la ligne de base du pic fils (H_c). Pour faire l'approximation du pic fils, utilisez une valeur inférieure à ce rapport. Pour désactiver l'approximation exponentielle durant une analyse, vous pouvez paramétrer la valeur de manière à ce qu'elle soit élevée ou égale à zéro.

Le *Rapport hauteur/vallée pour approximation* est le rapport de la hauteur du pic fils au-dessus de la ligne de base (H_c de la figure ci-dessous) sur la hauteur de la vallée au-dessus de la ligne de base (H_v). Pour faire l'approximation du pic fils, utilisez une valeur supérieure à ce rapport.

REMARQUE

Si l'un de ces critères n'est pas rempli pour un ensemble de pics fils à la traîne du pic parent, tous les pics fils après le dernier pic fils qui a rempli les deux critères ne suivent plus la ligne d'approximation mais une ligne verticale.

REMARQUE

Ces critères ne sont pas utilisés si un événement programmé est actif pour une exponentielle, ou si le pic parent est lui-même un pic fils. Le code de ligne de base entre le pic parent et le pic fils doit être du type **Valley** (voir « Codes de séparation de pic », page 24).

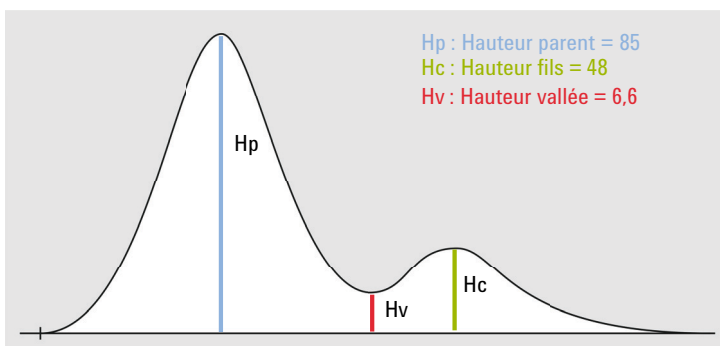


Figure 17 Exemple de calcul de la valeur des critères d'approximation

$$\text{Rapport de hauteur d'approximation} = H_p / H_c$$

$$\text{Rapport hauteur/vallée pour approximation} = H_c / H_v$$

où :

Hp	Hauteur corrigée de la ligne de base du pic parent
Hv	Hauteur de la vallée au-dessus de la ligne de base
Hc	Hauteur corrigée de la ligne de base du pic fils

Tail Skimming Pour une approximation de la traîne, les paramètres doivent être définis comme suit :

- Rapport approximation de la traîne/hauteur = $85 / 48 = 1,77$
Pour les événements d'intégration, utilisez une valeur $< 1,77$.
- Rapport hauteur/vallée pour approximation = $48 / 6,6 = 7,3$
Pour les événements d'intégration, utilisez une valeur $> 7,3$.

Front Skimming Avec l'approximation de front, le premier pic est le pic fils et le deuxième pic le pic parent. Ainsi, pour une approximation de front, les paramètres doivent être définis comme suit :

- Rapport approximation du front/hauteur = $48 / 85 = 0,56$
Pour les événements d'intégration, utilisez une valeur $< 0,56$.
- Rapport hauteur/vallée pour approximation = $85 / 6,6 = 12,9$
Pour les événements d'intégration, utilisez une valeur $> 12,9$.

Modes d'approximation tangentielle

Lorsque l'approximation tangentielle est activée, quatre modèles permettent de calculer les aires des pics correspondants :

- Courbe exponentielle
- Nouvelle approximation exponentielle
- Approximation linéaire
- Combinaison de calculs linéaire et exponentiel (approximations standard)

Courbe exponentielle

Ce modèle d'approximation utilise une courbe correspondant à une équation exponentielle et passant par le point de début et le point de fin du sous-pic. La courbe passe sous chaque sous-pic suivant le pic principal. L'aire sous la courbe d'approximation est soustraite des sous-pics et ajoutée au pic principal.

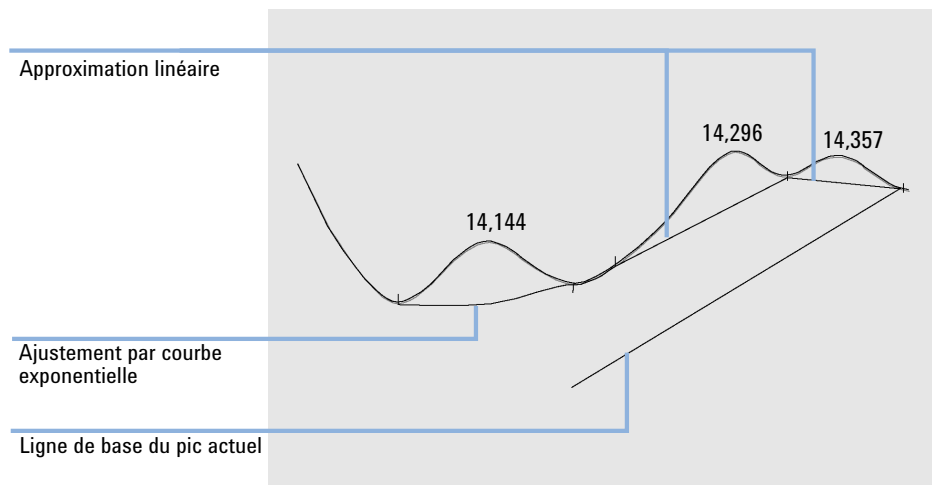


Figure 18 Approximation exponentielle

Nouvelle courbe exponentielle

Ce modèle d'approximation utilise une courbe correspondant à une équation exponentielle pour obtenir une approximation du front ou de la traînée du pic principal (sous-pics). La courbe passe sous un ou plusieurs des pics qui suivent le pic principal (sous-pics). L'aire sous la courbe d'approximation est soustraite des sous-pics et ajoutée au pic principal. Il est ainsi possible d'écrêter plusieurs sous-pics à l'aide du même modèle exponentiel ; tous les pics suivant le premier sous-pic sont séparés par des projections verticales, à partir de la fin du premier sous-pic, et sont abaissés à la courbe d'approximation.

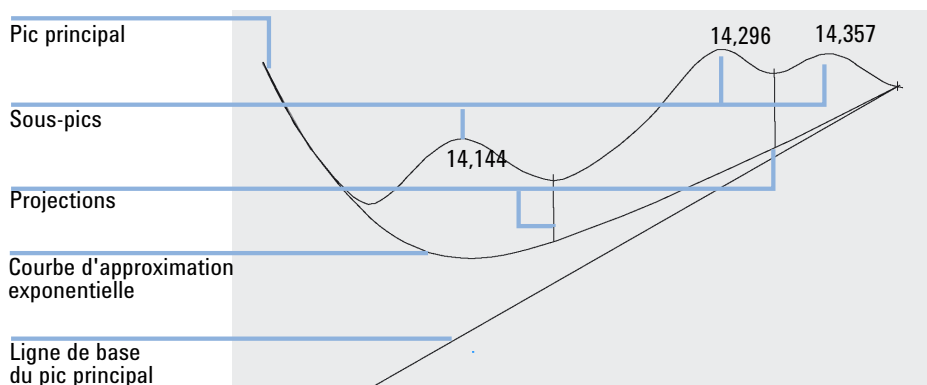


Figure 19 Nouvelle approximation exponentielle

Approximation linéaire

Ce modèle d'approximation trace un segment de droite du début à la fin d'un sous-pic. La hauteur du début du sous-pic est corrigée en fonction de la pente du pic principal. L'aire sous le segment de droite est soustraite du sous-pic et ajoutée au pic principal.

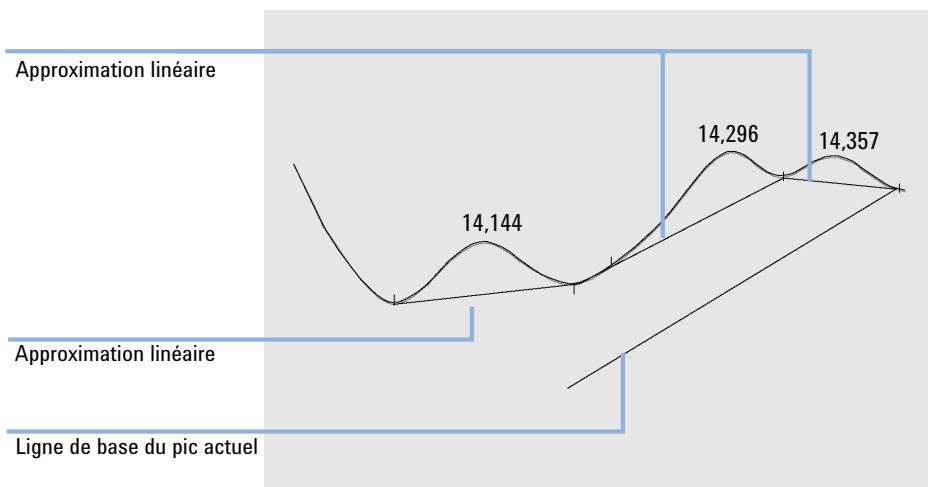


Figure 20 Approximation linéaire

Approximations standard

Cette méthode par défaut associe approximations exponentielles et approximations linéaires pour donner un résultat optimal.

Le passage du calcul exponentiel au calcul linéaire est effectué de manière à éliminer des discontinuités importantes de hauteur ou d'aire.

- Lorsque le signal est nettement au-dessus de la ligne de base, le calcul d'ajustement de traîne est exponentiel.
- Si le signal se situe dans l'enveloppe de la ligne de base, le calcul d'ajustement de traîne est de type linéaire.

Les calculs combinés sont décrits comme approximation exponentielle ou linéaire tangentielle.

Intégration

Attribution de la ligne de base

Calcul de la courbe exponentielle pour les approximations

L'équation suivante est utilisée pour calculer une approximation exponentielle :

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

où :

H_b	Hauteur de l'approximation exponentielle au temps t_R
H_0	Hauteur (au-dessus de la ligne de base) du début de l'approximation exponentielle
B	Facteur de décroissance de la fonction exponentielle
t_0	Temps correspondant au début de l'approximation exponentielle
t_R	Temps de rétention
A	Pente de la ligne de base du pic parent
C	Décalage de la ligne de base du pic parent

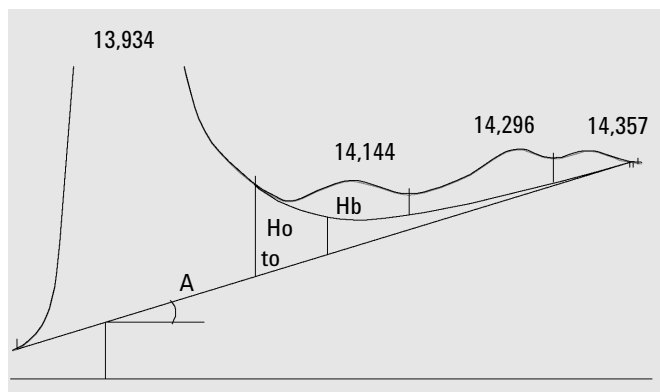


Figure 21 Valeurs utilisées pour calculer une approximation exponentielle

Événements d'intégration

L'intégrateur propose un certain nombre d'événements initiaux et programmés. De nombreux événements sont des paires actif/inactif ou début/fin.

Événements d'intégration pour tous les signaux

Mode d'approximation tangentielle

Définit le type de ligne de base construite pour les pics détectés sur le front ou la traîne d'un autre pic. Voir « [Modes d'approximation tangentielle](#) », page 36.

Exponential	Trace une courbe exponentielle entre le début et la fin – corrigés par rapport à la hauteur – de chaque pic fils.
New Exponential	Trace une courbe exponentielle pour obtenir une approximation de la traînée du pic principal.
Standard	Combine les calculs linéaires et exponentiels pour un ajustement optimal.
Straight	Trace un segment de droite entre le début et la fin – corrigés par rapport à la hauteur – de chaque pic fils.

Rapport de hauteur d'approximation de la traîne

Avec le **Skim valley ratio**, définit les conditions d'approximation tangentielle d'un petit pic présent sur la traîne d'un pic de solvant ou d'un autre grand pic. Voir « [Critères d'approximation](#) », page 35.

C'est le rapport de la hauteur du pic principal corrigé par rapport à la ligne de base (H_p) sur la hauteur du pic fils corrigé par rapport à la ligne de base (H_c). Les rapports supérieurs à la valeur spécifiée permettront de lancer une approximation.

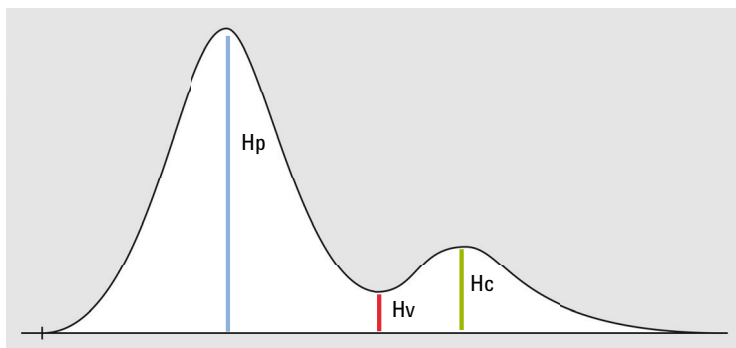


Figure 22 Exemple : Pic avec approximation de la traîne

Rapport de hauteur d'approximation de front

Avec le **Skim Valley Ratio**, définit les conditions d'approximation tangentielle d'un petit pic présent sur le front d'un pic de solvant ou d'un autre grand pic. Voir « Critères d'approximation », page 35.

C'est le rapport de la hauteur du pic principal corrigé par rapport à la ligne de base (H_p) sur la hauteur du pic fils corrigé par rapport à la ligne de base (H_c). Les rapports supérieurs à la valeur spécifiée permettront de lancer une approximation.

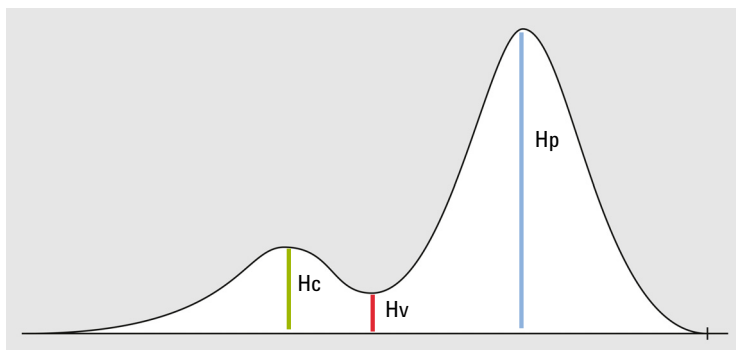


Figure 23 Exemple : Pic avec approximation de front

Rapport Pic/Vallée pour approximation

Avec le **Tail Skim Height Ratio** ou le **Front Skim Height Ratio**, définit les conditions d'approximation tangentielle d'un petit pic présent sur la traîne ou sur le front d'un pic de solvant ou d'un autre grand pic. Voir « Critères d'approximation », page 35.

C'est le rapport de la hauteur du pic fils corrigé par rapport à la ligne de base (H_c) sur la hauteur de la vallée corrigée par rapport à la ligne de base (H_v). Les rapports inférieurs à la valeur spécifiée permettront de lancer une approximation.

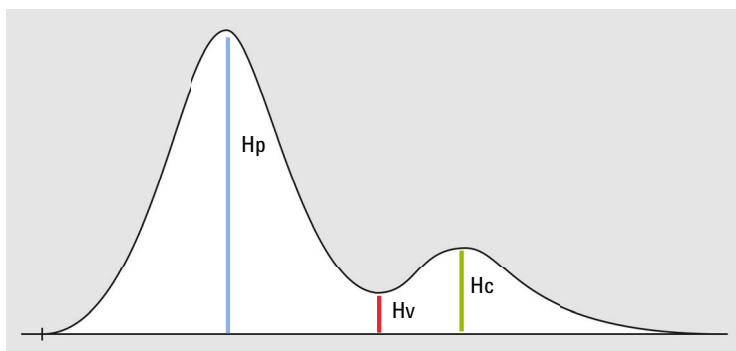


Figure 24 Exemple : Pic avec approximation de la traîne

Correction de la ligne de base

Définit le type de correction de la ligne de base Voir « Modes de correction de la ligne de base », page 30.

Vous pouvez choisir entre les paramètres suivants :

Classical	Accepte les pénétrations de la ligne de base.
No penetrations	Supprime les pénétrations de la ligne de base en redessinant la ligne de base.
Advanced	L'intégrateur tente d'optimiser les emplacements de début et de fin de pics, il redéfinit la ligne de base pour un groupe de pics et supprime les pénétrations des lignes de base (voir).

Rapport pic/vallée

Permet de décider si deux pics qui ne sont pas séparés par la ligne de base sont séparés par une projection verticale ou une ligne de base de vallée. C'est le rapport de la hauteur corrigée par rapport à la ligne de base du plus petit pic sur la hauteur corrigée par rapport à la ligne de base de la vallée. Voir « Rapport pic/vallée », page 32.

Si le rapport pic/vallée est inférieur à la valeur définie par l'utilisateur, une projection verticale est utilisée (A) ; sinon, une ligne de base est tracée de la ligne de base au début du premier pic jusqu'à la vallée, puis de la vallée à la ligne de base à la fin du deuxième pic (B).

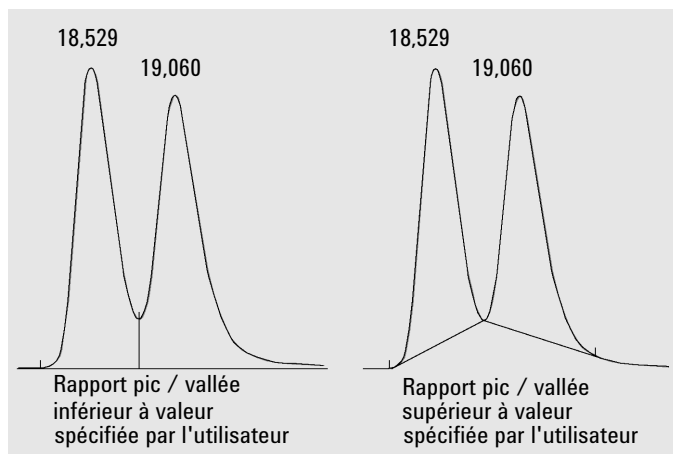


Figure 25 Incidence du rapport pic/vallée sur les lignes de base

Événements initiaux

Slope Sensitivity

La sensibilité de pente est un réglage de sensibilité de détection de pic. Lorsque la pente du signal dépasse la valeur de **Slope Sensitivity**, un point de départ de pic est créé ; lorsque la pente du signal devient inférieure à la valeur de **Slope Sensitivity**, un point de fin de pic est créé.

Peak Width

Contrôle la sélectivité de l'intégrateur pour distinguer les pics du bruit de la ligne de base. Vous pouvez définir la largeur de pic en unités de temps : il s'agit alors de la largeur à mi-hauteur du premier pic attendu (pic de solvant exclu).

Si nécessaire, l'intégrateur actualise la largeur de pic en cours d'analyse pour optimiser l'intégration.

Si la largeur initiale de pic sélectionnée est trop petite, le bruit risque d'être interprété comme des pics. Si le signal comprend à la fois des pics larges et des pics étroits, vous pouvez utiliser des événements programmés afin d'ajuster la largeur de pic pour certains pics. Il arrive que les pics s'élargissent nettement en cours d'analyse (par exemple, lors d'analyses de CPG isotherme ou de CPL isocratique). Pour compenser cette dérive, l'intégrateur actualise automatiquement la largeur du pic au fur et à mesure que les pics s'élargissent durant l'analyse, sauf si la fonction correspondante est désactivée par le biais d'un événement programmé.

L'actualisation de la largeur de pic est pondérée comme suit :

$$0,75 \times (\text{largeur de pic existante}) + 0,25 \times (\text{largeur du pic actuel})$$

Area reject

Définit l'aire du plus petit pic d'intérêt.

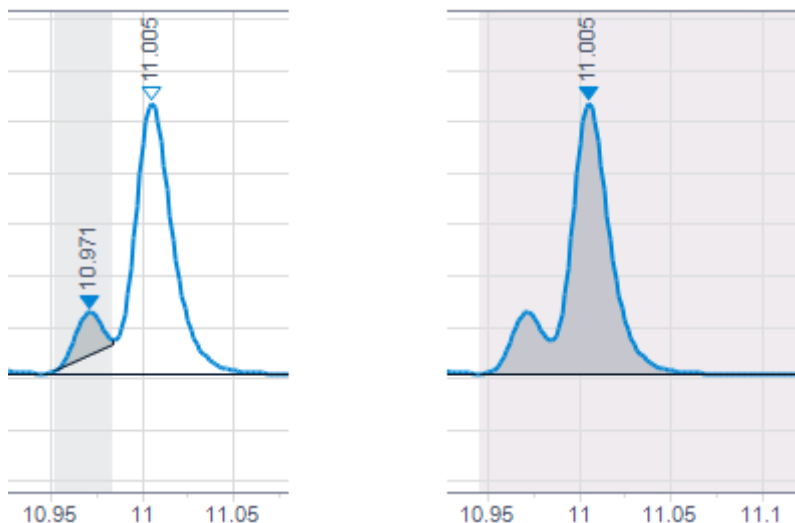
Tous les pics dont l'aire est inférieure à l'aire minimale sont ignorés. L'intégrateur rejette les pics ayant une aire inférieure à la valeur de l'**Area Reject** après correction de la ligne de base. La valeur de l'**Area Reject** doit être supérieure ou égale à zéro.

Area Percent reject

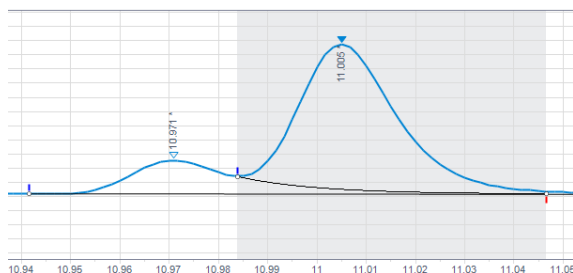
Définit l'aire, en %, du plus petit pic d'intérêt.

Tous les pics avec un % d'aire inférieur au % d'aire minimum sont ignorés. L'intégrateur rejette les pics ayant un % d'aire inférieur à la valeur fournie après correction de la ligne de base.

Si un pic qui n'est pas intégré en raison de son faible % d'aire est un pic porté, il sera fusionné au pic parent.



Si le pic parent est en dessous du seuil du % d'aire mais que le pic porté est au-dessus du seuil, le pic parent est conservé car sinon, le calcul ainsi que la ligne de base du pic porté seraient basés sur un pic exclu.



Height reject

Définit la hauteur du plus petit pic d'intérêt.

Les pics de hauteur inférieure à la hauteur minimale sont ignorés. L'intégrateur rejette les pics ayant une hauteur inférieure à la valeur de **Height Reject** après correction de la ligne de base.

Shoulders Définit la méthode initiale de détection des épaulements sur les pics.

Lorsque la détection d'épaulement est activée, l'intégrateur détecte les épaulements en utilisant la courbure du pic donnée par la dérivée seconde. Si la courbure atteint zéro, l'intégrateur identifie ce point d'inflexion comme étant un épaulement possible. Si l'intégrateur identifie un autre point d'inflexion avant le sommet du pic, un épaulement a été détecté.

Vous pouvez choisir entre :

- Inactif
Les épaulements ne sont pas détectés.
- Ligne de base verticale
Les épaulements sont intégrés avec une projection verticale.
- Ligne de base tangentielle
Les épaulements sont intégrés avec une ligne de base tangentielle. Pour plus d'informations sur l'approximation tangentielle, reportez-vous à « [Approximation tangentielle](#) », page 33. Si vous utilisez une ligne de base tangentielle, plusieurs modes sont disponibles (voir « [Modes d'approximation tangentielle](#) », page 36).

Choix de la largeur de pic

La valeur sélectionnée doit assurer un filtrage tout juste suffisant pour éviter que le bruit soit interprété comme des pics, sans déformer les informations du signal.

- Pour choisir une largeur initiale de pic adaptée à un pic recherché, prenez la largeur (durée) de ce pic comme référence.
- Pour bien choisir la largeur initiale de pic lorsque plusieurs pics vous intéressent, réglez la largeur initiale de pic sur une valeur égale ou inférieure à la largeur du pic le plus étroit : cela optimise la sélectivité de pic.

Hauteur de rejet et Largeur de pic

La **peak width** et la **height reject** sont deux aspects cruciaux du processus d'intégration. La modification de ces valeurs influe sur les résultats.

- Augmentez la hauteur de rejet et la largeur de pic pour détecter et quantifier des composants relativement dominants dans un environnement à bruit important. Une largeur de pic plus élevée améliore le filtrage du bruit et une hauteur de rejet plus élevée permet d'ignorer le bruit aléatoire.
- Diminuez la hauteur de rejet et la largeur de pic pour détecter et quantifier des composants traces, dont les hauteurs sont proches de celles du bruit lui-même. En diminuant la largeur de pic, vous diminuez le filtrage des signaux, tandis qu'en diminuant la hauteur de rejet, vous vous assurez que les petits pics ne seront pas rejetés en raison de leur hauteur insuffisante.
- Si une analyse contient des pics de différentes largeurs, définissez la largeur de pic en fonction des pics les plus étroits et diminuez la hauteur de rejet afin d'éviter que les pics les plus larges soient ignorés en raison de leur hauteur réduite.

Optimisation de l'intégration

Il est souvent utile de modifier les valeurs de sensibilité de pente, de largeur de pic, de hauteur de rejet et d'aire de rejet pour personnaliser l'intégration. La figure ci-dessous illustre l'influence de ces paramètres sur l'intégration de cinq pics dans un signal.

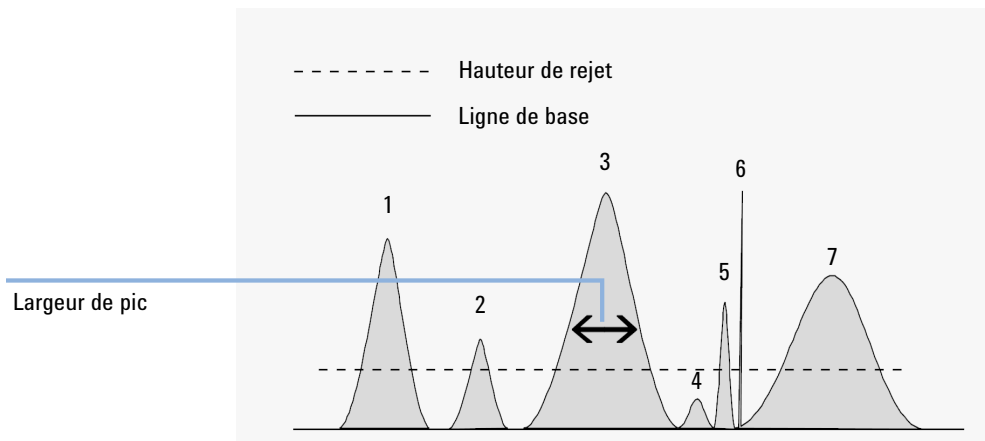


Figure 26 Utilisation d'événements initiaux

Un pic n'est intégré que s'il remplit les critères des quatre paramètres d'intégration. Avec une largeur de pic égale à celle du pic 3, le rejet d'aire et la sensibilité de pente illustrés, seuls les pics 1, 3 et 7 sont intégrés.

- Pic 1** Est intégré, car il remplit les quatre critères d'intégration.
- Pic 2** Est rejeté, car son aire est inférieure à l'aire de rejet définie.
- Pic 3** Est intégré, car il remplit les quatre critères d'intégration.
- Pic 4** N'est pas intégré, car sa hauteur est inférieure à la hauteur de rejet.
- Pic 5** Est rejeté, car son aire est inférieure à l'aire de rejet définie.
- Pic 6** N'est pas intégré, car le filtrage et le groupage rendent ce pic invisible.
- Pic 7** Est intégré.

Tableau 5 Valeurs de hauteur et d'aire de rejet

Paramètre d'intégration	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4	Pic 5	Pic 7
Hauteur de rejet	Au-dessus	Au-dessus	Au-dessus	Au-dessous	Au-dessus	Au-dessus
Aire de rejet	Au-dessus	Au-dessous	Au-dessus	Au-dessous	Au-dessous	Au-dessus
Pic intégré	Oui	Non	Oui	Non	Non	Oui

Événements programmés

ChemStation offre des événements programmés qui permettent de choisir entre les modes d'intégrateur de la définition de la ligne de base de l'algorithme interne et la définition de l'utilisateur. Ces événements programmés peuvent être utilisés pour personnaliser la construction de la ligne de base du signal lorsque la construction par défaut n'est pas appropriée. Par exemple, l'utilisateur peut créer un type d'événement pour une nouvelle sommation de zone qui n'altère pas les résultats d'AreaSum par défaut. Ces événements peuvent être utiles pour l'addition des surfaces de pics et pour corriger des aberrations de la ligne de base à court et à long terme.

Aire de rejet Voir « Événements initiaux », page 44.

Sommation d'aires

Définit des points (Actif/Inactif) entre lesquels l'intégrateur additionne les aires.

Le temps de rétention/migration d'un pic créé avec la sommation d'aire est la moyenne des temps de début et de fin. Si un événement **Area sum on** se produit après le début d'un pic, mais avant son sommet, le pic entier est inclus dans la somme. S'il se produit après le sommet de pic, mais avant la fin du pic, le pic est tronqué et la sommation d'aires commence immédiatement.

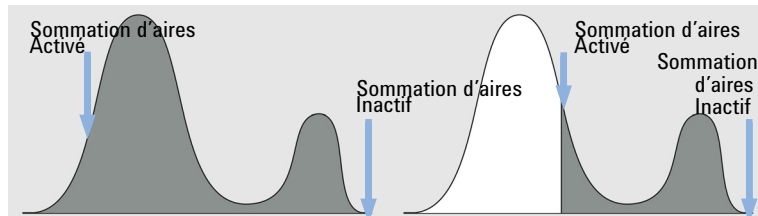


Figure 27 Événement Area sum on après le sommet de pic, mais avant la fin de pic

Si un événement **Area sum off** se produit après le début d'un pic, mais avant son sommet, la sommation d'aires se termine immédiatement. Le point du signal où cela se produit devient un point de vallée. Si l'événement **Area sum off** se produit après le sommet, l'événement est différé jusqu'à la fin du pic.

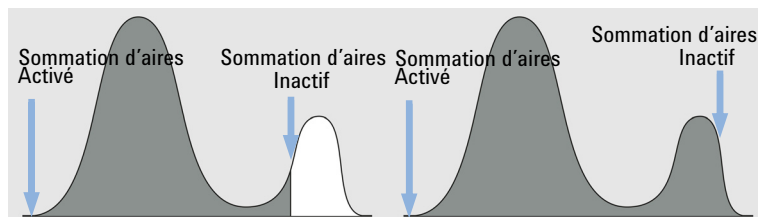


Figure 28 Événement Area sum off après le début de pic, mais avant le sommet

Section de sommation d'aires

Cet événement permet de définir des intervalles consécutifs de sommation d'aires sans perte d'aires ou d'intervalles de temps.

Cet événement est semblable à l'événement **Area Sum**. Cependant, avec cet événement, vous pouvez définir des intervalles contigus de sommation d'aires sans perte d'intervalles de temps ni d'aires de pic intégrées. Un pic est dédoublé au point de définition de cet événement ; la sommation d'aires commence et s'achève exactement là où les intervalles **Area Sum Slice** sont spécifiés.

Le temps de rétention du pic de section de sommation d'aires est le milieu de l'intervalle de temps de la section. Le temps de rétention ne change ni avec l'identification ni avec le réétalonnage. Il peut seulement être décalé légèrement, car l'intégrateur ne commence à recueillir les points de donnée qu'au début de l'événement Section de sommation d'aires - Démarrage puis se termine avec l'événement Section de sommation d'aires - Fin. Donc, le temps de rétention ne peut varier tout au plus que par le temps entre deux points de donnée.

Utilisez le paramètre **Start** pour définir les heures de démarrage pour chaque section de sommation d'aires. La prochaine heure de démarrage sert d'heure de fin pour la section de temps précédente. Vous pouvez donc utiliser plusieurs événements de départ les uns après les autres.

Le paramètre **Start-negA** définit le démarrage de l'intégration d'une section de temps où l'aire négative (sous la ligne de base définie) est soustraite de l'aire de la section de temps.

Le paramètre **End** définit la fin de la dernière section de temps. L'aire de la section de temps est calculée en ignorant l'aire sous la ligne de base définie. Si aucun autre événement Section de sommation d'aires ne suit, l'intégrateur reprend la détection régulière de pics.

Dans la plage allant d'un événement de **Start** au prochain événement de **End**, la ligne de base est toujours une ligne droite sans changements de direction. C'est seulement après le point de fin (au moins 0,001 min plus tard) qu'il est possible d'appliquer de nouveau des changements à long terme de la ligne de base en utilisant les événements **Set Baseline from Range**, **Set Low Baseline from Range** ou **Use Baseline from Range**.

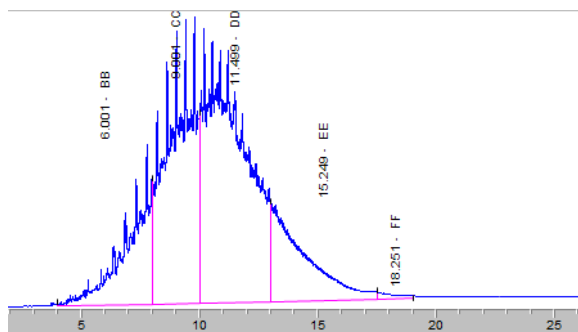


Figure 29 Exemple : Section de sommation d'aires

La figure ci-dessus montre un exemple avec les événements programmés suivants :

Tableau 6 Construction de la ligne de base

Durée	Événement	Paramètre
4 min	Définir LB à partir de la plage	+2 min
22 min	Définir LB à partir de la plage	+4 min

Tableau 7 Sections de sommation d'aires

Durée	Événement	Paramètre
4 min	Section de sommation d'aires	Démarrage
8 min	Section de sommation d'aires	Démarrage
10 min	Section de sommation d'aires	Démarrage
13 min	Section de sommation d'aires	Démarrage
17,5 min	Section de sommation d'aires	Démarrage
19 min	Section de sommation d'aires	Fin

Largeur de pic auto

Active la mise à jour automatique de la largeur de pic pour les prochains pics. Il permet de reprendre avec la largeur de pic du moment et de reprendre le suivi de la largeur de pic en fonction des largeurs de pics précédentes.

Ligne de base de vallées

Définit des points (Actif/Inactif) entre lesquels l'intégrateur règle la ligne de base à chaque vallée entre les pics.

La redéfinition répétée de la ligne de base peut rogner les coins de pics. De tels coins deviennent des aires négatives qui réduisent l'aire mesurée totale des pics.

Cette fonction est utile lorsque des pics sont portés sur le dos d'un pic bas et large et que vous souhaitez redéfinir la ligne de base de tous les points de vallée.

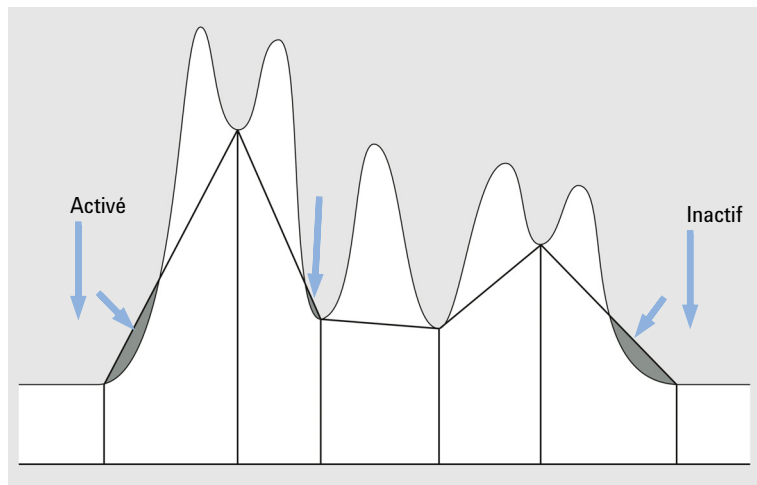


Figure 30 Événement Baseline at valleys

Ligne de base arrière

Définit un point qui permet à l'intégrateur standard de prolonger la ligne de base, horizontalement et en arrière, depuis le point de ligne de base identifié jusqu'à ce point.

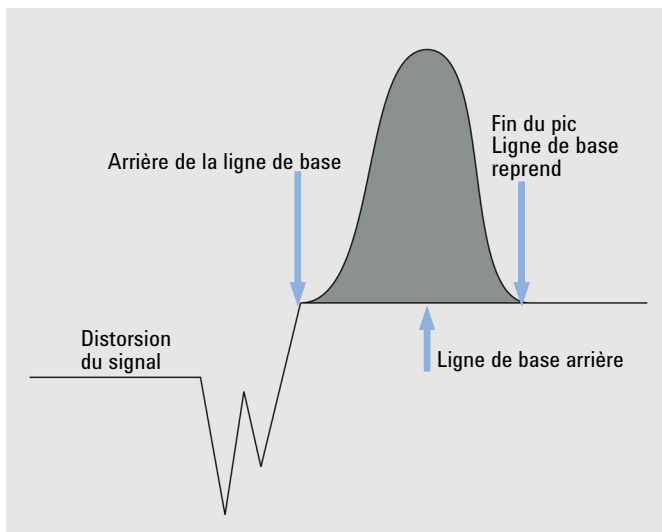


Figure 31 Événement Baseline backwards

Maintien de la ligne de base

Une ligne de base horizontale est tracée, à la hauteur de la ligne de base établie, depuis le départ de l'événement de maintien de la ligne de base jusqu'à l'arrêt de cet événement.

Ligne de base de la vallée suivante

Il fixe un point auquel l'intégrateur réajuste la ligne de base à la vallée suivante entre les pics, et ensuite révoque cette fonction automatiquement.

Cette fonction est utile avec des groupes de pics fusionnés, qui semblent être portés sur le dos d'un pic ou être en groupes séparés proches les uns des autres. La fonction est ignorée au cours de la sommation d'aires.

Ligne de base maintenant

Définit un point (temps) auquel l'intégrateur réajuste la ligne de base sur la hauteur en cours du point de donnée, si le signal est sur un pic.

Détection d'épaulements

Définit des points (Actif/Inactif) entre lesquels l'intégrateur commence et cesse la détection d'épaulements.

Si le signal se trouve sur la ligne de base, la fonction est ignorée et la ligne de base détectée est utilisée.

Les épaulements sont détectés selon le mode d'épaulement spécifié. Voir « Événements initiaux », page 44.

Largeur fixe de pic Définit la largeur de pic et désactive la mise à jour automatique de la largeur de pic pour les prochains pics. Pour de bons résultats, la largeur de pic doit être réglée sur une valeur proche de la largeur à mi-hauteur des véritables pics.

Hauteur de rejet Voir « Événements initiaux », page 44.

Intégration Définit des points (Actif/Inactif) entre lesquels l'intégrateur cesse et commence l'intégration.

Les pics situés entre les moments où l'intégrateur est activé puis désactivé sont ignorés.

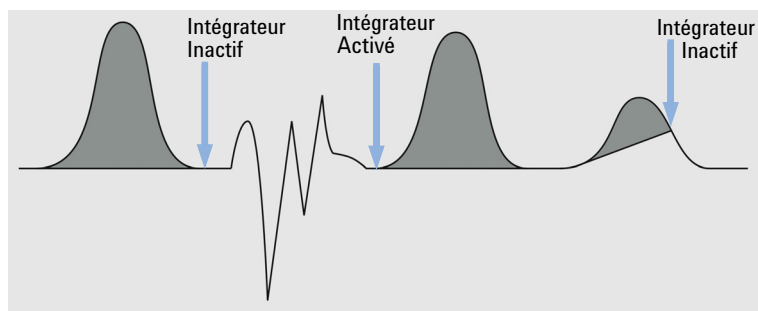


Figure 32 Événements d'Intégration

La ligne de base est tracée à partir du dernier point identifié y compris les réajustements pour pénétration. Toutes les autres fonctions de l'intégrateur, avec les changements définis de largeur de pic, de seuil et d'aire de rejet, sont ignorés lorsque l'intégrateur est activé. Aux points **On** et **Off**, le point de la ligne de base est ré-établi.

Lorsque l'intégrateur est programmé pour redémarrer, un nouveau point de ligne de base est redéfini au niveau du signal en cours.

Cette fonction est utile pour ignorer des parties de l'électrophérogramme/chromatogramme ou pour éliminer les perturbations de la ligne de base.

Zone maximale Définit l'aire du plus grand pic d'intérêt.

Tous les pics dont l'aire est supérieure à l'aire maximale sont ignorés. L'intégrateur rejette les pics ayant une aire supérieure à la valeur de l'aire maximale après correction de la ligne de base.

Vous pouvez utiliser cet événement, par exemple, pour exclure le pic de solvant d'un chromatogramme GC des résultats d'intégration, mais y inclure ses pics portés.

Hauteur maximale

Définit la hauteur du plus grand pic d'intérêt.

Les pics dont la hauteur est supérieure à la hauteur maximale sont ignorés. L'intégrateur rejette les pics ayant une hauteur supérieure à la valeur maximale après correction de la ligne de base.

Vous pouvez utiliser cet événement, par exemple, pour exclure le pic de solvant d'un chromatogramme GC des résultats d'intégration, mais y inclure ses pics portés.

Pic négatif

Définit des points (Actif/Inactif) entre lesquels l'intégrateur reconnaît les pics négatifs.

Lorsque l'intégrateur reconnaît des pics négatifs, il ne réajuste plus automatiquement la ligne de base après pénétration. À partir de là, chaque pénétration de la ligne de base sera intégrée en utilisant la ligne de base établie comme zéro. Les aires sont construites par rapport à cette ligne de base et reçoivent une valeur absolue.

La fonction de pic négatif ne peut être utilisée de manière fiable que lorsque la dérive de la ligne de base est faible par rapport à la taille du pic. En effet, la ligne de base est construite à partir du point de ligne de base identifié au début du groupe de pics jusqu'à la ligne de base établie à la fin du pic.

REMARQUE

La sommation d'aires est automatiquement désactivée si l'événement **Negative Peaks On** est activé.

L'approximation tangentielle est également désactivée durant la détection de pic négatif ; de tels pics sont séparés par des projections verticales.

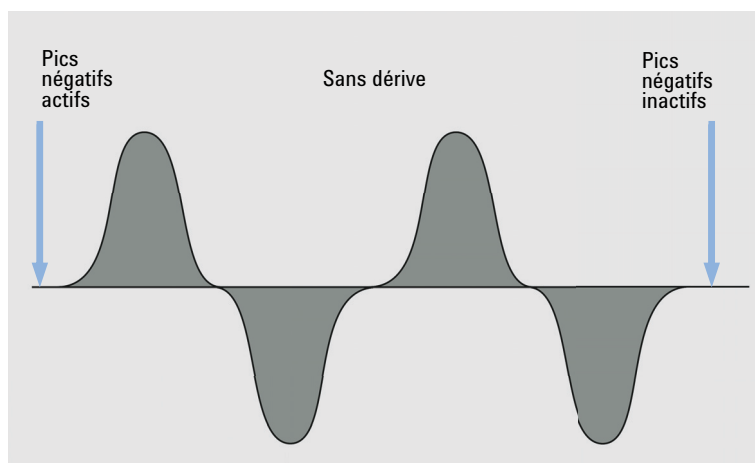


Figure 33 Événement Negative peak

Définir la ligne de base à partir de la plage

Utilise une plage de points de données pour calculer un point de ligne de base important du point de vue statistique au niveau du point médian d'une plage temporelle.

La valeur à fournir est l'intervalle de temps autour d'un point spécifié dans le temps. Elle définit la plage à utiliser pour déterminer le point de ligne de base. Voir « [Modes de correction de la ligne de base](#) », page 30 pour en savoir plus sur les calculs statistiques de la ligne de base.

Si vous réglez la valeur sur 0, le point de données de chromatogramme le plus proche est utilisé comme point de ligne de base ; aucun calcul statistique n'est réalisé. Si vous définissez une valeur négative, le résultat de la configuration est le même que **Use baseline from range=Clear**: Il interrompt l'usage de l'algorithme statistique de la ligne de base.

Vous pouvez spécifier une aire quelconque du chromatogramme pour le calcul de la ligne de base. Idéalement, cette aire ne doit contenir que du bruit de fond et être exempte de signaux chimiques. [Figure 34](#), page 57 montre la configuration de l'intervalle de la plage de ligne de base représenté sous forme d'une zone grise ombrée.

Si vous spécifiez deux points **Set Baseline from Range** (par exemple au début et à la fin d'un chromatogramme), la ligne de base entre eux est connectée par une ligne droite.

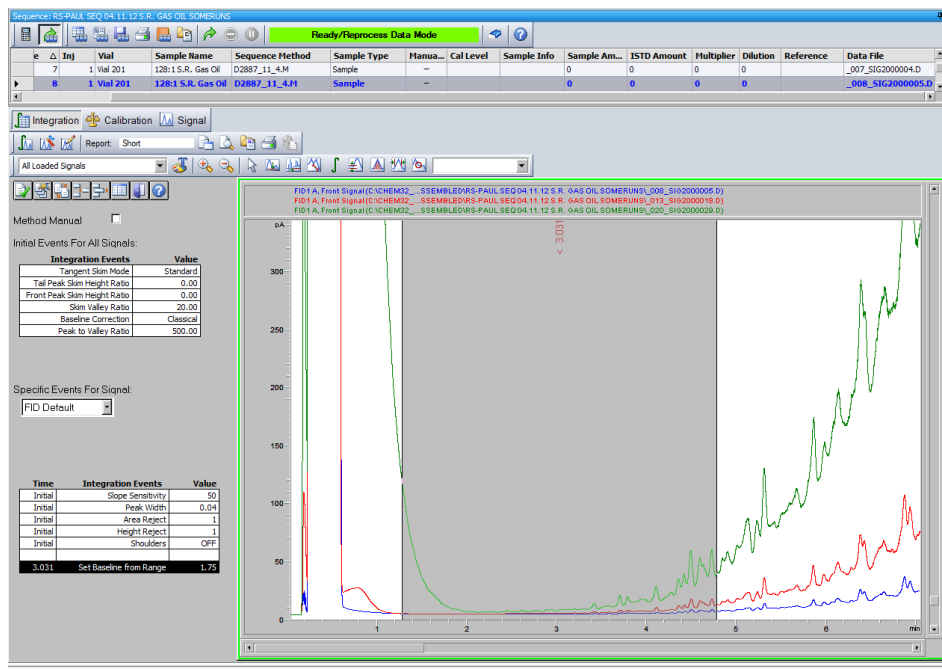


Figure 34 « Définir la ligne de base à partir de la plage » : L'intervalle de la plage de la ligne de base est illustré par un ombrage gris

Définir une ligne de base basse à partir de la plage

Similaire à **Set Baseline from Range** mais utilise le point de ligne de base le plus bas possible au dessus duquel sont situés 30 % de points de données de bruit supplémentaires. Ainsi, la pénétration de la ligne de base est minimisée.

La valeur à fournir est l'intervalle de temps autour de l'heure spécifiée de l'événement. Elle définit la plage à utiliser pour déterminer le point de ligne de base. Voir « [Modes de correction de la ligne de base](#) », page 30 pour en savoir plus sur les calculs statistiques de la ligne de base.

Si vous réglez la valeur sur 0, le point de données de chromatogramme le plus proche est utilisé comme point de ligne de base ; aucun calcul statistique n'est réalisé. Si vous définissez une valeur négative, le résultat de la configuration est le même que **Use baseline from range=Clear**. Il interrompt l'usage de l'algorithme statistique de la ligne de base.

Vous pouvez spécifier des heures et intervalles quelconques dans le chromatogramme pour le calcul de la ligne de base. Idéalement, ils ne doivent contenir que du bruit de fond et être exempts de signaux chimiques.

Si vous spécifiez deux points **Set Baseline from Range** (par exemple au début et à la fin d'un chromatogramme), la ligne de base entre eux est connectée par une ligne droite.

Utilisez **Set Low Baseline from Range** au lieu de **Set Baseline from Range** lorsque l'aire du chromatogramme utilisé pour le calcul contient trop de bruit chimique ou de pointes de bruit électronique.

Épaulements Voir « Événements initiaux », page 44.

Sensibilité de pente Voir « Événements initiaux », page 44.

Pic de solvant Les pics dont la pente est supérieure à une valeur spécifique en mV/s sont identifiés comme des pics de solvant situés en dehors de la gamme de conversion analogique-numérique.

Les pics de traîne sont automatiquement soumis à l'approximation tangentielle ; il n'est pas nécessaire d'activer l'événement Approximation tangentielle.

Si la détection de pic de solvant est désactivée, les projections verticales sont tracées depuis le pic de traîne au lieu des tangentes.

Pic dédoublé Définit un point où un pic doit être divisé par une projection verticale.

REMARQUE

Vous ne pouvez pas utiliser **Split Peak** lorsque **Area Sum** est activé. Pour diviser un pic lorsque **Area Sum** est activé, utilisez l'événement d'intégration manuelle correspondant.

Vous ne pouvez pas diviser des pics qui ont été soumis à l'approximation tangentielle à l'aide de l'événement **Split Peak**.

Approximation tangentielle de traîne

Spécifie où commencer ou finir l'approximation tangentielle.

On

Définit un point auquel l'intégrateur applique une approximation tangentielle sur la traîne du prochain pic. Tous les pics au-dessus de la tangente sont intégrés à la ligne de base redéfinie. La tangente est tracée de la vallée précédent le petit pic au point suivant où le gradient de signal du détecteur est égal au gradient de la tangente. Le temps de l'événement Approximation tangentielle peut être saisi à tout moment durant le pic. Désigne également le pic comme un pic de solvant.

Off

Met fin à l'approximation tangentielle une fois le pic en cours achevé ou si, dans l'intervalle désigné, aucun pic n'a été détecté (et aucun solvant ne sera involontairement désigné dans le prochain groupe).

Mode d'approximation tangentielle

Les modèles suivants sont disponibles pour calculer des aires de pic appropriées :

- Exponentielle (voir [Figure 18](#), page 37)
- Nouvelle exponentielle (voir [Figure 19](#), page 38)
- Linéaire (voir [Figure 20](#), page 39)
- Standard (voir « [Approximations standard](#) », page 39)

Pics non attribués

Pour certaines constructions de ligne de base, des petites aires peuvent être au-dessus de la ligne de base et au-dessous du signal, mais ne font pas partie des pics identifiés. Ces aires ne sont normalement ni mesurées, ni présentées dans les rapports. Si l'option Unassigned peaks (Pics non attribués) est activée, ces aires sont mesurées et mentionnées dans le rapport comme étant des pics non attribués. Le temps de rétention/migration pour ces aires est le point médian entre le début et la fin de l'aire.

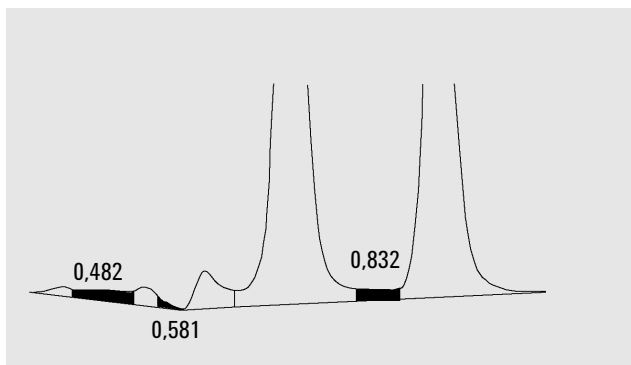


Figure 35 Pics non attribués

Mis à jour de hauteur de pic

Cet événement oblige l'intégrateur à utiliser la hauteur absolue du point de donnée le plus élevé comme valeur de hauteur de pic. Sans cet événement, le maximum d'une courbe interpolée est utilisé. L'événement **Update peak height** est particulièrement utile avec des pics dont la pente est extrêmement forte ou des pics précédés par un creux. De tels pics sont typiques des signaux MSD.

L'heure de début de l'événement **Update peak height** n'est pas évaluée. L'événement affecte toujours l'ensemble du chromatogramme.

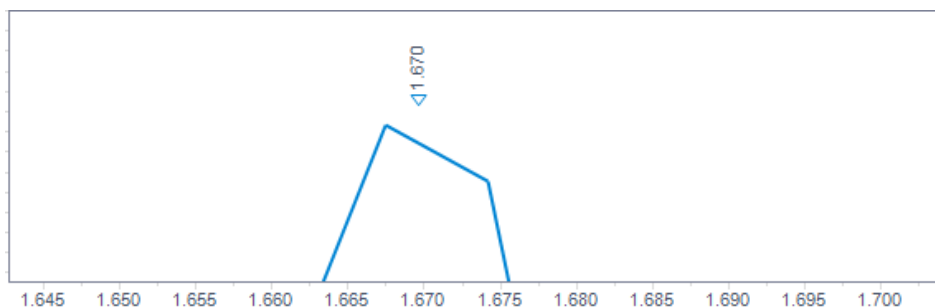


Figure 36 Intégration par défaut

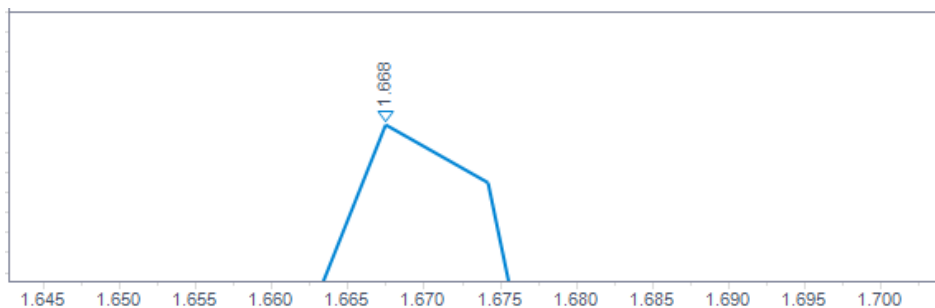


Figure 37 Intégration avec événement Mis à jour de hauteur de pic

Utiliser la ligne de base de la plage

Permet de projeter une valeur de ligne de base à un moment ultérieur ou antérieur pour minimiser les pénétrations de la ligne de base.

Si la valeur **Set Low Baseline from Range** ou **Set Baseline from Range** est calculée sur une aire sans pic chromatographique, il peut être avantageux de projeter la ligne de base calculée sur le temps immédiatement avant l'éluion du premier pic d'intérêt (ou sur le temps immédiatement après l'éluion du dernier pic d'intérêt).

Use Baseline from Range permet de réaliser jusqu'à trois projections de la sorte dans les deux sens.

Il peut être avantageux d'utiliser cet événement lorsque vous avez construit une ligne de base montante ou descendante, car, sinon, la ligne de base droite risque

de couper la courbe du chromatogramme involontairement. Le paramètre indique à l'intégrateur dans quelle plage de ligne de base prélever le point de ligne de base et projeter la ligne de base sur le point de ligne de base dans l'intervalle de temps donné.

Vous pouvez utiliser les paramètres suivants :

- **Clear** : Efface le nouveau comportement de la ligne de base et revient à l'algorithme traditionnel à partir de ce point.
- **Left** : Utilise la valeur de ligne de base provenant de la plage de ligne de base la plus proche de la gauche de ce point dans le temps.
- **Right** : Utilise la valeur de ligne de base provenant de la plage de ligne de base la plus proche de la droite de ce point dans le temps.
- **Range 1—Range 9**: Utilise la valeur de ligne de base provenant de la plage de ligne de base donnée. Les plages de ligne de base sont numérotées à partir du début du chromatogramme.

Voir également l'exemple dans **Area Sum Slice** (Figure 29, page 51).

Intégration automatique

La fonction **Autointegrate** est un point de départ pour la définition d'événements initiaux. Elle est particulièrement utile lors de la mise en oeuvre d'une méthode nouvelle. Il est possible de commencer avec une table d'événements d'intégration par défaut ne contenant aucun événement programmé, puis d'optimiser les paramètres proposés par la fonction d'intégration automatique pour utilisation générale.

Principes de fonctionnement

La fonction **Autointegrate** lit les données du chromatogramme et calcule les valeurs optimales des paramètres d'intégration initiaux pour chaque signal du chromatogramme.

L'algorithme examine 1 % au début et à la fin du chromatogramme pour déterminer le bruit et la pente de cette partie. Le bruit est calculé comme étant 3 fois l'écart type de la régression linéaire divisé par la racine carré du nombre en pourcentage de points utilisés dans la régression. Ces valeurs sont utilisées pour définir des valeurs appropriées de hauteur de rejet et de sensibilité de pente pour l'intégration. L'algorithme attribue ensuite une valeur temporaire à la largeur de pic, en fonction de la durée du chromatogramme, le plus souvent 0,5 % en LC et 0,3 % à 0,2 % en GC. La valeur initiale d'aire de rejet est définie à zéro et un essai

Intégration

Événements d'intégration

d'intégration est effectuée. L'essai est répété plusieurs fois si nécessaire, en modifiant les paramètres à chaque fois jusqu'à ce qu'au moins 5 pics soient détectés ou qu'une intégration soit effectuée avec une hauteur de rejet initiale de 0. L'essai d'intégration se termine si les conditions ci-dessous ne sont pas atteintes après 10 essais.

Les résultats de l'intégration sont examinés et la largeur de pic ajustée en fonction des largeurs des pics détectés, ce qui oriente le calcul vers les pics initiaux. La symétrie des pics détectés est utilisée pour n'inclure que les pics dont la symétrie est comprise entre 0,8 et 1,3 pour le calcul de largeur de pic. S'il n'est pas possible de détecter suffisamment de pics symétriques, cette limite est étendue à $minSymmetry/1,5$ et $maxSymmetry*1,5$. La ligne de base entre les pics est ensuite examinée pour optimiser les valeurs précédentes de hauteur de rejet et de sensibilité de pente. L'aire de rejet est définie à 90% de l'aire minimale du pic le plus symétrique détecté pendant l'essai d'intégration.

Le chromatogramme est à nouveau intégré avec ces valeurs finales des paramètres d'intégration et les résultats de l'intégration sont enregistrés.

Paramètres d'intégration automatique

Les paramètres ci-dessous sont définis par la fonction d'intégration automatique :

- Sensibilité de pente initiale
- Hauteur initiale
- Largeur de pic initiale
- Aire de rejet initiale

Intégration manuelle

Ce type d'intégration permet d'intégrer des pics ou groupes de pics sélectionnés. Hormis pour la valeur initiale de rejet de surface, l'intégration des événements du logiciel est ignorée dans la plage indiquée d'intégration manuelle. Si un ou plusieurs des pics résultant de l'intégration manuelle se trouvent sous le seuil de rejet de surface, ceux-ci sont ignorés. Les événements d'intégration manuelle utilisent des valeurs de temps absolues. Ils ne sont pas ajustés pour tenir compte de la dérive du signal.

L'**Manual Integration** permet de définir les points de début et de fin du pic, puis d'inclure les surfaces recalculées dans les modules de quantification et de génération de rapports. Chacun de ces points est signalé dans les rapports par le code de séparation de pics M.

L'intégration manuelle comporte les fonctions suivantes :

- Draw Baseline** indique à quel endroit les lignes de base doivent être tracées pour un pic ou un ensemble de pics. L'option de menu **Integration >all valleys** permet aussi d'indiquer si les pics de la plage donnée doivent être séparés automatiquement à tous les points de vallée.
- Negative Peaks** indique s'il faut traiter les aires situées au-dessous de la ligne de base comme des pics négatifs. Il est également possible de spécifier si les pics dans la plage donnée doivent être séparés automatiquement à tous les points de vallée.
- Tangent Skim** calcule l'aire des pics soustraits d'un pic principal par approximation tangentielle. La surface du pic soumis à l'approximation tangentielle est soustraite de la surface du pic principal.
- Split Peak** définit un point où un pic doit être divisé par une ligne verticale.
- Delete Peak(s)** supprime un ou plusieurs pics des résultats d'intégration.

Codes de séparation de pic pour les pics intégrés manuellement

Dans les rapports d'intégration, les pics intégrés manuellement sont désignés par le code de pic *MM*.

S'il existe un pic avant le pic intégré manuellement et que la fin de ce pic est modifiée par l'intégration manuelle, la fin du pic reçoit le code *F* (forcée). Les points de vallée détectés sont marqués par le code *V*.

Un pic de solvant affecté par une intégration manuelle, par exemple une approximation tangentielle, est accompagné du code *R* (pic de solvant recalculé).

Enregistrement des événements d'intégration manuelle

Les événements d'intégration manuelle (ligne de base dessinée manuellement, par exemple) sont encore plus spécifiques du fichier de données et du signal que les événements d'intégration programmés. Dans le cas de chromatogrammes complexes, il est particulièrement souhaitable de pouvoir utiliser ces événements pour le retraitement. Il est donc possible de stocker les événements d'intégration manuelle directement dans le fichier de données du signal, plutôt qu'avec la méthode.

Chaque fois que le fichier de données est examiné ou retraité, les événements manuels dans le fichier de données sont automatiquement appliqués. Une analyse contenant des événements d'intégration manuelle est marquée dans la **Navigation Table** dans la colonne correspondante.

Outre les outils utilisés pour dessiner une ligne de base et effacer un pic manuellement, trois outils supplémentaires sont disponibles dans l'interface utilisateur afin de :

- sauvegarder les événements manuels des chromatogrammes actuellement affichés dans le fichier de données,
- effacer tous les événements des chromatogrammes actuellement affichés,
- annuler les derniers événements d'intégration manuelle (fonction disponible jusqu'à ce que l'événement soit sauvegardé).

Lorsque vous passez au fichier de données suivant pendant la révision dans la **Navigation Table**, la ChemStation vérifie les événements d'intégration manuelle non sauvegardés et demande à l'utilisateur s'il souhaite sauvegarder ces événements.

Les événements manuels enregistrés dans le fichier de données pendant la révision dans la **Navigation Table** n'interfèrent pas avec les événements d'intégration manuelle enregistrés pendant la révision dans le mode **Batch**. Ces deux modes de révision sont totalement séparés des événements manuels d'un fichier de données.

Dans les versions de la ChemStation antérieures à la version B.04.01, les événements d'intégration manuelle étaient enregistrés dans la méthode et non dans le fichier de données individuel. Cette procédure peut toujours être utilisée. Le menu **Integration** de la vue **Data Analysis** fournit les points suivants qui permettent de gérer les événements d'intégration manuelle avec la méthode :

- **Update Manual Events of Method** : sauvegarde les nouveaux événements manuels extraits dans la méthode.

Intégration

Intégration manuelle

- **Apply Manual Events from Method** : applique les événements manuels actuellement sauvegardés dans la méthode au fichier de données actuellement chargé.
- **Remove Manual Events from Method** : efface les événements manuels de la méthode.

Afin de convertir les événements manuels enregistrés dans une méthode pour les stocker dans le fichier de données, il convient d'appliquer les événements de la méthode et d'enregistrer les résultats dans le fichier de données. Si vous le souhaitez, vous pouvez éliminer les événements de la méthode.

Si la case **Manual Events** de la **Integration Events Table** d'une méthode est cochée, les événements manuels de la méthode sont toujours appliqués lors du chargement d'un fichier de données utilisant cette méthode. Si le fichier de données contient des événements manuels supplémentaires, ils sont appliqués après les événements de la méthode. Quand la case **Manual Events** est cochée, l'utilisateur n'est jamais invité à sauvegarder les événements dans le fichier de données.

Afin de convertir les événements manuels enregistrés dans une méthode pour les stocker dans le fichier de données, il convient d'appliquer les événements de la méthode et d'enregistrer les résultats dans le fichier de données. Vous pouvez éliminer immédiatement les événements de la méthode.

Si la case **Manual Events** de la **Integration Events Table** d'une méthode est cochée, les événements manuels de la méthode sont toujours appliqués lors du chargement d'un fichier de données utilisant cette méthode. Si le fichier de données contient des événements manuels supplémentaires, ils sont appliqués après les événements de la méthode. Quand la case **Manual Events** est cochée, l'utilisateur n'est jamais invité à sauvegarder les événements dans le fichier de données.

2

Identification des pics

En quoi consiste l'identification des pics ?	67
Règles de correspondance des pics	68
Types d'identification des pics	69
Temps de rétention/migration absolu	69
Temps Relatif de Rétention	69
Temps de rétention/migration corrigé	69
Qualificateurs de pics	69
Limites quantitatives	69
Temps de rétention/migration absolu	70
Temps de rétention/migration corrigés	72
Pics de référence simples	72
Pics de référence multiples	73
Qualificateurs de pic	74
Corrélation de signal	75
Vérification de qualificateur	75
Calcul de rapport de qualificateur	75
La procédure d'identification	76
Recherche des pics de référence	76
Recherche des pics ISTD	77
Recherche des pics étalonnés restants	77
Classification des pics non identifiés	77

Ce chapitre décrit les principes de l'identification des pics.

En quoi consiste l'identification des pics ?

L'identification des pics consiste à identifier les composants d'un échantillon inconnu en se basant sur leurs caractéristiques chromatographiques/d'électrophérogramme, déterminées par l'analyse d'un étalon bien défini.

L'identification de ces composants est une étape nécessaire dans la quantification si la méthode d'analyse a recours à la quantification. Les caractéristiques du signal de chaque composant concerné sont stockées dans la table d'étalonnage de la méthode.

L'objectif de la procédure d'identification des pics vise à comparer chaque pic du signal aux pics stockés dans la table d'étalonnage.

La table d'étalonnage contient les temps de rétention/migration prévus pour les composants concernés. Un pic correspondant au temps de rétention/migration d'un pic dans la table d'étalonnage reçoit les attributs de ce composant, par exemple nom et facteur de réponse. Les pics qui ne correspondent pas à ceux de la table d'étalonnage sont classés dans la catégorie des pics inconnus. Cette procédure est contrôlée par :

- le temps de rétention/migration de la table d'étalonnage pour les pics désignés comme pics de référence,
- les fenêtres de temps de rétention/migration spécifiées pour les pics de référence,
- les temps de rétention/migration dans la table d'étalonnage pour les pics étalonnés qui ne sont pas des pics de référence,
- la fenêtre de temps de rétention/migration spécifiée pour ces pics normaux (pas de référence), et
- la présence de tout pic de qualification supplémentaire dans les rapports corrects.

Règles de correspondance des pics

Les règles suivantes concernent la procédure de correspondance des pics :

- si un pic d'échantillon se situe dans la fenêtre de correspondance d'un pic de composant provenant de la table d'étalonnage, il adopte les attributs de ce composant,
- si plusieurs pics d'échantillon se situent dans la fenêtre de correspondance, le pic le plus proche du temps de rétention/migration prévu est identifié comme ce composant,
- si un pic correspond à une référence ou à un étalon interne, le plus grand pic de la fenêtre est identifié comme ce composant,
- si des qualificateurs de pic sont également utilisés, le rapport de pic doit être associé à la fenêtre de correspondance des pics pour identifier le pic de composant,
- si le pic correspond à un pic de qualification, le pic dont les mesures sont les plus proches du pic principal du composé est identifié, et
- si un pic d'échantillon ne se situe pas dans une fenêtre de correspondance, il est répertorié dans les composants inconnus.

Types d'identification des pics

Vous pouvez utiliser différentes techniques pour établir la correspondance entre les pics d'échantillon et ceux de la table d'étalonnage du logiciel ChemStation.

Temps de rétention/migration absolu

Le temps de rétention/migration du pic d'échantillon est comparé au temps de rétention/migration attendu spécifié pour chaque composant de la table d'étalonnage.

Temps Relatif de Rétention

Le système calcule le temps relatif de rétention (EP) et le temps de rétention Relatif (USP) comme $(R_r = t_2/t_1)$ les deux pour des pics calibrés et pour les pics non calibrés.

Temps de rétention/migration corrigé

Les temps de rétention/migration attendus des pics de composant sont corrigés à partir des temps de rétention/migration réels d'un ou plusieurs pics de référence et la correspondance est faite avec ces temps de rétention/migration corrigés (relatifs). Le ou les pics de référence doivent être spécifiés dans la table d'étalonnage.

Qualificateurs de pics

Outre l'identification des pics par le temps de rétention/migration, vous pouvez utiliser des qualificateurs de pics pour obtenir un résultat plus précis. Si plusieurs pics surviennent dans une fenêtre de temps de rétention/migration, les qualificateurs devront être utilisés pour identifier le composant corrigé.

Limites quantitatives

Les limites quantitatives définies dans la boîte de dialogue Caractéristiques de composé sont utilisées pour qualifier l'identification des pics. Si la quantité du composé identifié respecte les limites quantitatives, l'identification des pics est indiquée dans le rapport (dans la création classique de rapports uniquement, pas dans la création intelligente de rapports).

Temps de rétention/migration absolu

Une fenêtre de temps de rétention/migration est utilisée dans le processus d'identification des pics. Cette fenêtre est centrée sur le temps de rétention/migration d'un pic prévu. Tout pic d'échantillon qui se situe dans cette fenêtre est susceptible d'être exploité à des fins d'identification des composants.

La [Figure 38](#), page 70 illustre une fenêtre de temps de rétention/migration pour le pic 2 située entre 1,809 et 2,631 minutes, alors que le temps de rétention/migration prévu est de 2,22 minutes. Il existe deux possibilités pour le pic 2. L'une est à 1,85 minutes et l'autre à 2,33 minutes. Si le pic attendu n'est pas un pic de référence, le pic le plus proche du temps de rétention/migration attendu de 2,22 minutes est sélectionné.

Si le pic attendu correspond à une référence ou à un étalon interne, le plus grand pic de la fenêtre est sélectionné.

Dans les deux cas, le logiciel ChemStation sélectionne le pic situé à 2,33 minutes. Si les deux pics étaient de taille identique, le pic le plus proche du centre de la fenêtre serait sélectionné.

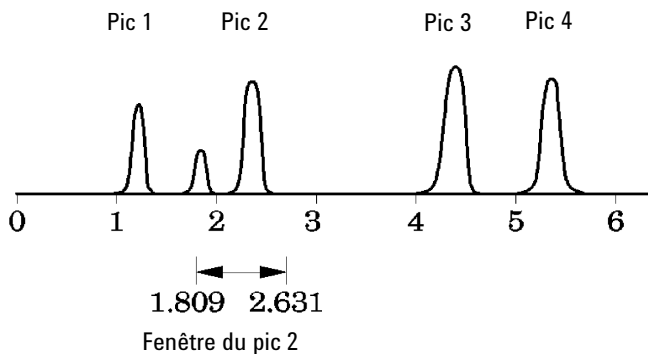


Figure 38 Fenêtres de temps de rétention/migration

La localisation des pics est effectuée à l'aide de trois types de fenêtres :

- les fenêtres de pic de référence, qui concernent uniquement les pics de référence,
- les fenêtres de pic autre que de référence, qui s'appliquent à tous les autres pics étalonnés, et
- les fenêtres propres à des composants particuliers, définies dans la boîte de dialogue **Compound Details**.

Les valeurs par défaut de ces fenêtres sont saisies dans la boîte de dialogue Paramètres d'étalonnage. La largeur de chaque côté du temps de rétention/migration qui définit la fenêtre d'identification de pic est la somme des fenêtres absolue et en pourcentage.

Une fenêtre de 5 % signifie que le pic doit avoir un temps de rétention/migration de $\pm 2,5$ % par rapport au temps de rétention/migration étalonné pour ce pic. Par exemple, un pic avec un temps de rétention/migration de 2,00 lors de d'étalonnage doit apparaître entre 1,95 et 2,05 minutes dans les analyses suivantes.

Par exemple, une fenêtre absolue de 0,20 minute et une fenêtre relative de 10 % donnent une fenêtre de temps de rétention/migration située entre 1,80 et 2,20 minutes.

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

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

Temps de rétention/migration corrigés

Etablir la correspondance entre des pics par les temps de rétention/migration absolus est peut-être simple mais pas toujours fiable. En effet, les temps de rétention/migration individuels peuvent varier légèrement en raison d'un petit changement de conditions ou de technique. De ce fait, certains pics peuvent sortir des fenêtres de correspondance et ne seront donc pas identifiés.

Pour prendre en compte les inévitables fluctuations intervenant dans les temps de rétention/migration absolus, l'une des techniques consiste à exprimer les temps de rétention/migration des composants par rapport à un ou plusieurs pics de référence.

Chaque pic de référence est identifié dans la table d'étalonnage, sous la forme d'une entrée dans la colonne de référence. La technique de correspondance relative utilise le ou les pics de référence pour modifier l'emplacement des fenêtres de correspondance, afin de compenser les glissements dans les temps de rétention/migration des pics d'échantillon.

Si aucun pic de référence n'est défini dans la méthode ou si la ChemStation ne peut identifier au moins un pic de référence pendant l'analyse, le logiciel utilise les temps de rétention/migration absolus pour l'identification.

Pics de référence simples

Une fenêtre de temps de rétention/migration pour le pic de référence est créée aux alentours de son temps de rétention/migration. Le plus grand pic situé dans cette fenêtre est considéré comme le pic de référence. Les temps de rétention/migration attendus pour tous les autres pics de la table d'étalonnage sont corrigés en fonction du rapport du temps de rétention/migration attendu au temps de rétention/migration réel du pic de référence.

Pics de référence multiples

La correction des temps de rétention/migration avec un pic de référence simple est basée sur le postulat que l'écart du temps de rétention/migration réel par rapport aux temps de rétention/migration prévus change de manière uniforme et linéaire pendant le déroulement de l'analyse. Or, pendant une longue analyse, il est fréquent que les temps de rétention/migration changent de manière non uniforme. Dans ces conditions, l'utilisation de plusieurs pics de référence répartis tout au long de l'analyse offre de meilleurs résultats. Le signal est alors divisé en plusieurs zones. La variation de l'écart entre les temps de rétention/migration est supposée linéaire à l'intérieur de chaque zone, mais la valeur de cette variation est déterminée séparément pour chacune d'elle.

REMARQUE

L'algorithme de correction du temps peut échouer si les temps de rétention de plusieurs pics de référence sont trop proches les uns des autres et s'ils ne sont pas répartis sur toute la durée de l'analyse.

Qualificateurs de pic

Un composant peut être détecté à l'aide de plusieurs signaux. Si elle s'applique à toutes les formes de chromatographie qui utilisent plusieurs détecteurs ou des détecteurs permettant de générer plusieurs signaux, la détection multisignal est généralement utilisée en chromatographie liquide avec des détecteurs à longueurs d'onde multiples ou à barrette de diodes. Ces détecteurs sont normalement réglés de sorte que la longueur d'onde la plus proche de la valeur d'absorbance (aire) la plus élevée soit utilisée pour définir le pic principal de la table d'étalonnage. Sur [Figure 39](#), page 74 il s'agit de λ_1 .

Les deux autres longueurs d'onde de détection peuvent être utilisées en tant que qualificateurs de pic. Sur cette figure, il s'agit de λ_2 et de λ_3 .

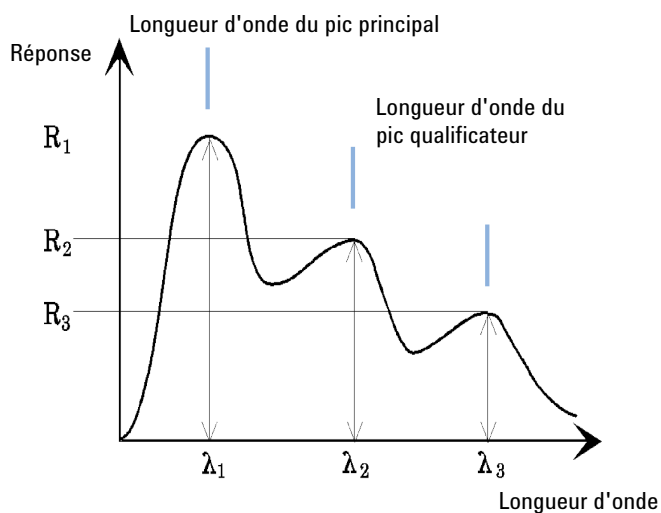


Figure 39 Qualificateurs de pic

Les pics d'un composé ont un rapport de réponse constant à différentes longueurs d'onde.

La réponse de pic qualificateur représente un certain pourcentage de la réponse du pic principal. Les limites qui déterminent la plage acceptable de la réponse attendue sont définies dans la table d'étalonnage lorsque l'option Identification Details (Détails d'identification) est sélectionnée. Si le rapport entre le qualificateur de pic principal λ_1 et le qualificateur de pic, par exemple, λ_3 , est dans les limites tolérées, l'identité du composé peut être confirmée.

Corrélation de signal

La corrélation de signal signifie que deux pics mesurés dans des signaux de détecteur différents au sein d'une même fenêtre temporelle sont attribués au même composé. La fenêtre de corrélation de signal est contrôlée via le paramètre **SignalCorrWin**, dans la table **QuantParm** du registre **_DaMethod**. La fonctionnalité de corrélation de signal est désactivée lorsque la fenêtre de corrélation de signal est définie sur 0,0 minute (pour plus d'informations, consultez l'aide en ligne). Lorsque la corrélation de signal est désactivée, les pics éluant au même temps de rétention/migration dans des signaux de détecteur différents sont traités comme des composés différents.

La fenêtre de corrélation de signal par défaut est de 0,03 minute pour les données de LC, électrophorèse capillaire, électrophorèse capillaire/spectrométrie de masse, et LC/MS, et de 0,0 minute pour les données de GC.

Vérification de qualificateur

Si la corrélation de signal est désactivée, la vérification de qualificateur est activée par défaut pour tous les types de fichier de données. Il peut être désactivé en configurant le drapeau **UseQualifiers** dans le tableau **Quantification Parameters** de la méthode. La vérification du qualificateur est également désactivée lorsque la corrélation de signal est désactivée.

Calcul de rapport de qualificateur

Lorsque la vérification des qualificateurs est désactivée pour un composé, le rapport de la taille du qualificateur et de la taille du pic principal est comparé aux limites étalonnées. La taille désigne la hauteur ou l'aire, selon le paramètre de calcul défini dans Specify Report (Spécification de rapport).

Les pics qualificateurs peuvent être étalonnés de la même manière que les composés cibles. L'utilisateur ne doit pas spécifier le rapport de qualificateur prévu. Le rapport de qualificateur attendu est calculé automatiquement :

Les deux mesures sont effectuées au temps de rétention du composé.

Le paramètre QualTolerance définit la plage acceptable du rapport de qualificateur, par exemple, $\pm 20\%$.

La tolérance peut être définie dans la table d'étalonnage de l'interface utilisateur (Identification Details - Détails d'identification) et est exprimée en pourcentage absolu.

Pour un étalonnage multiniveau, ChemStation calcule une tolérance de qualificateur minimale sur la base des rapports de qualificateur mesurés à chaque niveau d'étalonnage. La tolérance de qualificateur minimale est calculée à l'aide de l'équation suivante :

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

où q_i est le rapport de qualificateur mesuré au niveau i .

La procédure d'identification

Lorsqu'il tente d'identifier les pics, le logiciel réalise trois passes au niveau des données d'intégration.

Recherche des pics de référence

La première passe vise à identifier les pics de référence. Le logiciel examine les temps de rétention/migration des pics provenant d'une analyse, pour trouver des correspondances dans les fenêtres de rétention/migration des pics de référence dans la table d'étalonnage. Un pic de l'analyse est identifié comme pic de référence dans la table d'étalonnage si son temps de rétention/migration se situe dans la fenêtre construite pour le pic de la table d'étalonnage.

Si une fenêtre contient plusieurs pics, le pic avec l'aire la plus grande ou la hauteur la plus élevée, suivie par une correspondance positive du qualificateur de signal, si cette option est définie, est alors désigné comme pic de référence.

Une fois chaque pic de référence trouvé, la différence entre son temps de rétention/migration et celle qui figure dans la table d'étalonnage, est utilisée pour ajuster les temps de rétention/migration prévus de tous les autres pics dans la table d'étalonnage.

Recherche des pics ISTD

La seconde passe vise à identifier les pics d'étalon interne définis. S'ils n'ont pas déjà été identifiés en tant que ISTD, ils peuvent l'être en tant que pics de référence. Les pics ISTD sont identifiés par les fenêtres de temps de rétention/migration des pics et par les qualificatifs de pics. Si la fenêtre ISTD contient plusieurs pics, le plus grand pic est retenu.

Recherche des pics étalonnés restants

La troisième passe vise à identifier tous les pics restants répertoriés dans la table d'étalonnage. Les pics autres que ceux de référence dans la table d'étalonnage sont comparés aux pics d'analyse restants à l'aide de la fenêtre du temps de rétention RT.

A chaque pic étalonné correspond un temps de rétention/migration propre dans la table d'étalonnage. Il est ajusté à l'analyse en cours sur la base de l'identification préalable des pics de référence. La fenêtre de temps de rétention/migration du pic étalonné est ajustée d'après le temps de rétention/migration corrigé du pic étalonné.

Si plusieurs pics sont trouvés dans la même fenêtre, le pic avec un temps de rétention/migration le plus proche du temps de rétention/migration prévu et qui répond aussi aux spécifications de qualificatif facultatives est choisi.

Classification des pics non identifiés

S'il reste des pics non identifiés, ils sont répertoriés dans la catégorie des pics inconnus. La ChemStation essaie de regrouper les pics inconnus appartenant au même composé. Si un pic a été détecté dans plusieurs signaux, les pics avec le même temps de rétention/migration dans chaque signal sont groupés en un seul composé.

Les pics inconnus sont intégrés dans les rapports classiques si l'option correspondante a été sélectionnée dans la boîte de dialogue **Specify Report**.

3

Étalonnage

Qu'est-ce que l'étalonnage ?	79
Courbe d'étalonnage	80
Calcul de la courbe d'étalonnage	81
Ajustement linéaire	81
Ajustement quadratique	81
Résidus relatifs	84
Étalonnage groupé	85
Options de réétalonnage	86

Ce chapitre présente les calculs détaillés utilisés dans le processus d'étalonnage.

Qu'est-ce que l'étalonnage ?

Une fois que les pics ont été intégrés et identifiés, l'étape suivante de l'analyse quantitative est l'étalonnage. Les quantités et réponses sont rarement directement proportionnelles à la masse réelle de l'échantillon à analyser. Ce qui rend nécessaire l'étalonnage avec matériaux de référence. La quantification utilise l'aire ou la hauteur de pic pour déterminer la quantité d'un composé dans un échantillon.

L'analyse quantitative comporte de nombreuses étapes, brièvement résumées ci-après :

- Connaître le composé analysé.
- Établir une méthode d'analyse d'échantillons contenant une quantité connue de ce composé, appelée l'échantillon d'étalonnage ou étalon.
- Analyser l'échantillon d'étalonnage pour obtenir la réponse correspondant à cette quantité.

Il est également possible d'analyser un certain nombre de ces étalons avec différentes quantités du composé en question si la réponse de votre détecteur est non linéaire. Ce processus est appelé *étalonnage multiniveau*.

Avec les méthodes d'étalonnage suivantes, vous pouvez effectuer une quantification :

- Étalonnage spécifique au composé (ESTD, ISTD)
- Quantification indirecte à l'aide d'étalonnage ou de facteur de réponse provenant d'un autre composé ou groupe
- Facteur de réponse fixe (**Manual Factor**)

Les courbes d'étalonnages et les calculs ESTD sont basés sur des réponses (aire ou hauteur) mesurées de quantités données. Les courbes d'étalonnages et les calculs ISTD sont basés sur des réponses relatives et des quantités relatives.

Courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage est la représentation graphique des données de quantité et de réponse pour un composé, obtenues à partir d'un ou plusieurs échantillons étalons.

Généralement, une aliquote de l'échantillon étalon est injectée, un signal est obtenu et la réponse est déterminée en calculant l'aire ou la hauteur du pic, comme décrit sur [Figure 40](#), page 80.

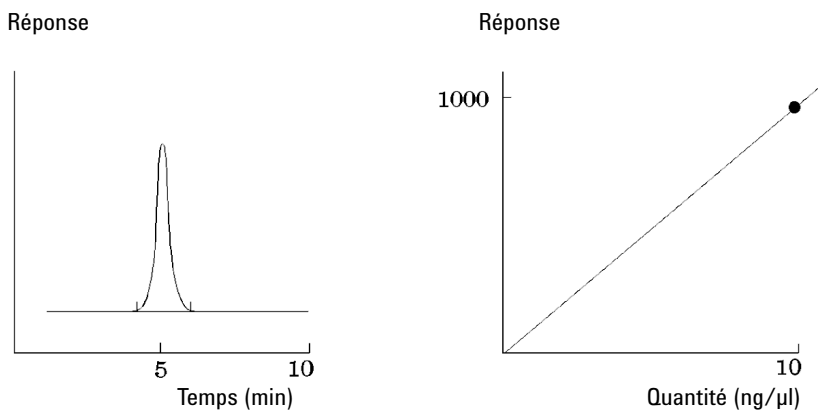


Figure 40 Signal de l'étalon (10 ng/μl) et courbe d'étalonnage

Calcul de la courbe d'étalonnage

Ajustement linéaire

N = nombre d'observations discrètes

X_i = variable indépendante, i^{e} observation

Y_i = variable dépendante, i^{e} observation

Formule de la courbe :

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

Coefficients :

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

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

où :

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

Ajustement quadratique

Formule de la courbe quadratique :

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

Au moins trois points d'étalonnage sont nécessaires pour l'ajustement quadratique. Deux points sont nécessaires si l'origine est incluse ou forcée.

Calcul des coefficients pour l'ajustement quadratique

Les coefficients résultent des équations linéaires simultanées présentées ci-dessous. L'algorithme de Crout est utilisé pour résoudre l'équation matricielle normale correspondante ($A^T A x = A^T y$). Dans la formule donnée, les sommes sont abrégées comme suit :

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

Pour éviter tout débordement, les valeurs x sont normalisées avant la saisie du calcul :

$$\text{Norm} = \sum(x)$$

$$x = x / \text{Norm}$$

Équations normales de la courbe quadratique :

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

Ou sous la forme d'une équation matricielle :

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

Décomposition de Crout :

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

Avec les abréviations de valeur suivantes :

$$L11 = W$$

$$U12 = \frac{XW}{L11}$$

$$L21 = XW$$

$$U13 = \frac{X2W}{L11}$$

$$L31 = X2W$$

$$L22 = X2W - L21 * U12$$

$$U23 = \frac{X3W - L21 * U13}{L22}$$

$$L32 = X3W - L31 * U12$$

$$L33 = X4W - (L31 * U13) - (L32 * U23)$$

$$z0 = \frac{YW}{L11}$$

$$z1 = \frac{XYW - (L21 * z0)}{L22}$$

$$z2 = \frac{X2YW - (L31 * z0) - (L32 * z1)}{L33}$$

$$c' = z2$$

$$b' = z1 - (U23 * c')$$

$$a' = z0 - (U12 * b') - (U13 * c')$$

Enfin, la normalisation doit être inversée :

$$a = a'$$

$$b = \frac{b'}{\text{Norm}}$$

$$c = \frac{c'}{\text{Norm}^2}$$

Résidus relatifs

Le *résidu relatif* est affiché pour chaque niveau d'étalonnage. Il est calculé à l'aide de la formule suivante :

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

où :

relRES = résidu relatif en pourcentage

La réponse calculée représente le point sur la courbe d'étalonnage.

L'*écart type des résidus*, qui apparaît dans certains rapports et lorsque les courbes et la table d'étalonnage sont imprimées, est calculé à l'aide de la formule suivante :

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

où :

ResSTD = écart type du résidu

Resp_{calibrated_i} = réponse étalonnée pour le point i

Resp_{calculated_i} = réponse calculée pour le point i

n = nombre de points d'étalonnage

Étalonnage groupé

L'étalonnage groupé est applicable aux composés lorsque les concentrations individuelles ne sont pas connues, alors que la somme des concentrations d'un groupe de composés est connue. C'est par exemple le cas des isomères. Les groupes de composés entiers sont étalonnés. Les formules utilisées sont les suivantes :

Étalonnage

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

où :

$Conc_{AB}$ désigne la concentration du groupe de composés comportant le composé A et le composé B.

$Response_A$ désigne l'aire (ou la hauteur) du composé A.

RF_A désigne le facteur de réponse.

Pour les composés qui appartiennent à un groupe de composés, nous partons du principe que les facteurs de réponse sont égaux :

$$RF_A = RF_B$$

La concentration d'un composé faisant partie d'un groupe se calcule par conséquent de la façon suivante :

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

Options de réétalonnage

Il existe plusieurs méthodes d'actualisation des réponses qui figurent dans la table d'étalonnage en fonction des nouvelles données d'étalonnage.

Average

La moyenne de toutes les analyses d'étalonnage est calculée par la formule suivante :

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

Floating Average

Une moyenne pondérée de toutes les analyses d'étalonnage est calculée. La pondération actualisée est définie dans la boîte de dialogue **Recalibration Settings**.

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

Replace

Les nouvelles valeurs des réponses remplacent les anciennes valeurs.

4

Quantification

Qu'est-ce que la quantification ?	88
Calculs de la quantification	89
Facteurs de correction	89
Facteur de réponse absolue	89
Multiplicateur	90
Facteur de dilution	90
Quantité d'échantillon	90
% aire et % hauteur	91
Quantification des composés étalonnés	92
Calcul ESTD	92
Calcul ISTD	94
Quantification des pics non étalonnés	97
Quantification indirecte à l'aide d'un composé étalonné	97
Quantification à l'aide d'un facteur manuel	98
Calcul du pourcentage normalisé	99

Ce chapitre décrit comment les composés sont quantifiés et explique les calculs utilisés dans la quantification.

Qu'est-ce que la quantification ?

Une fois que les pics ont été intégrés et identifiés, l'étape suivante de l'analyse est la quantification. La quantification utilise l'aire ou la hauteur de pic pour déterminer la concentration d'un composé dans un échantillon.

L'analyse quantitative comporte de nombreuses étapes, brièvement résumées ci-après :

- Connaître le composé analysé.
- Établir une méthode pour analyser les échantillons contenant ce composé.
- Analyser un ou plusieurs échantillons contenant une ou plusieurs concentrations connues du composé, pour déterminer la réponse correspondant à chaque concentration.

Il est également possible d'analyser un certain nombre de ces échantillons avec différentes concentrations des composés en question si la réponse de votre détecteur est non linéaire. Ce processus est appelé *étalonnage multi-niveau*.

- Analyser l'échantillon contenant une concentration inconnue du composé pour déterminer la réponse correspondant à cette concentration.
- Déterminer la concentration du composé recherché par comparaison de sa réponse à celle de la concentration connue.

Pour obtenir une comparaison valide de la réponse de l'échantillon inconnu à celle de l'échantillon connu, les données doivent être obtenues et traitées dans des conditions identiques.

Calculs de la quantification

ChemStation met à votre disposition les procédures de calcul suivantes pour déterminer la concentration de chaque composant présent dans un mélange :

- Pourcentage
- Normalisation
- Etalon externe (ESTD)
- %ESTD
- Etalon interne (ISTD)
- %ISTD

Les calculs utilisés pour déterminer la concentration d'un composé dans un échantillon inconnu dépendent du type de quantification. Chaque procédure de calcul utilise l'aire du pic ou sa hauteur pour le calcul et génère un type de rapport différent.

Facteurs de correction

Les calculs de quantification utilisent quatre facteurs de correction : le *facteur de réponse absolue*, le *multiplicateur*, le *facteur de dilution* et la *quantité d'échantillon*. Ces facteurs sont utilisés dans les procédures d'étalonnage pour compenser les variations de réponse du détecteur aux différents composants des échantillons, concentrations, dilutions d'échantillons, quantités d'échantillons et pour la conversion d'unités.

Facteur de réponse absolue

Le facteur de réponse absolue d'un composant d'échantillon représente la quantité du composant divisée par l'aire ou la hauteur mesurée du pic du composant dans l'analyse d'un mélange étalon. Le facteur de réponse absolue, qui est utilisé par chaque procédure de calcul étalonnée, corrige les différences de réponse que le détecteur présente vis-à-vis des différents composants d'échantillon.

Multiplicateur

Le multiplicateur est utilisé dans chaque formule de calcul pour multiplier le résultat de chaque composant. Le multiplicateur peut être utilisé pour convertir les unités exprimant les quantités.

Facteur de dilution

Le facteur de dilution est le nombre par lequel tous les résultats calculés sont multipliés avant l'impression du rapport. Le facteur de dilution permet de modifier l'échelle des résultats ou de corriger les modifications apportées à la composition de l'échantillon pendant l'analyse préalable. Vous pouvez également recourir au facteur de dilution à n'importe quelle autre fin nécessitant l'utilisation d'un facteur constant.

Quantité d'échantillon

Si les calculs de %ESTD ou %ISTD sont sélectionnés, les rapports ESTD et ISTD donnent des valeurs relatives, et non absolues : la quantité de chaque composant est exprimée en pourcentage de la quantité de l'échantillon. La quantité d'échantillon est utilisée dans les rapports %ESTD et %ISTD pour convertir la quantité absolue de chaque composant analysé en une quantité relative, en la divisant par la valeur spécifiée.

% aire et % hauteur

La procédure de calcul **Area%** détermine l'aire de chaque pic de l'analyse en pourcentage de l'aire cumulée de tous les pics de l'analyse. La fonction **Area%** ne nécessite pas d'étalonnage préalable et ne dépend pas de la quantité d'échantillon injecté, dans les limites du détecteur. Aucun facteur de réponse n'est utilisé. Si tous les composants réagissent de manière identique dans le détecteur, **Area%** donne une approximation acceptable des quantités relatives des composants.

La fonction **Area%** est couramment employée pour rechercher des résultats qualitatifs. Elle sert également à produire des informations permettant de créer la table d'étalonnage requise par d'autres procédures d'étalonnage.

La procédure **Height%** détermine la hauteur de chaque pic de l'analyse en pourcentage de la hauteur cumulée de tous les pics de l'analyse.

Le multiplicateur et le facteur de dilution extraits des **Calibration Settings** dans la boîte de dialogue **Sample Information** ou **Sequence Table** ne sont pas utilisés dans le calcul des % aire ou % hauteur.

Quantification des composés étalonnés

Les procédures de calcul d'étalon externe (ESTD), de normalisation et d'étalon interne (ISTD) requièrent des facteurs de réponse et utilisent pour cela une table d'étalonnage. La table d'étalonnage propose la conversion des réponses dans les unités choisies en fonction de la procédure sélectionnée.

Calcul ESTD

La procédure ESTD est la procédure de quantification de base dans laquelle l'échantillon étalon et l'échantillon inconnu sont analysés dans les mêmes conditions. On compare alors les résultats de l'échantillon inconnu à ceux de l'étalon pour calculer les quantités dans l'échantillon inconnu.

Contrairement à la procédure ISTD, la procédure ESTD utilise des facteurs de réponse absolus. Les facteurs de réponse sont obtenus à partir d'un étalonnage, puis enregistrés. Lors des analyses d'échantillons suivantes, le calcul quantitatif applique ces facteurs de réponse aux quantités d'échantillons mesurées. Pour ce type de calcul, il est essentiel que le volume d'échantillon injecté soit reproductible d'une analyse à l'autre, car il n'y a pas d'étalon dans l'échantillon pour corriger les variations de volume injecté ou de préparation d'échantillon.

Lors de la génération d'un rapport ESTD, le calcul de la quantité d'un composé spécifique dans un échantillon inconnu est effectué en deux étapes :

- 1 L'équation de la courbe passant par les points d'étalonnage du composé est calculée, à l'aide du type de régression défini dans la boîte de dialogue Paramètres d'étalonnage ou Courbe d'étalonnage.
- 2 La quantité du composé dans l'échantillon inconnu est calculée à l'aide de l'équation décrite ci-après. Cette quantité peut être intégrée au rapport ou réutilisée dans les autres calculs requis par les valeurs Multiplicateur, Facteur de dilution ou Quantité d'échantillon.

Quantification

Quantification des composés étalonnés

Avec un rapport ESTD, l'équation permettant de calculer la quantité absolue d'un composant x est la suivante :

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

où :

Réponse_x représente la réponse du pic x ;

RF_x représente le facteur de réponse du composant x, calculé comme suit :

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

M représente le multiplicateur ;

D représente le facteur de dilution.

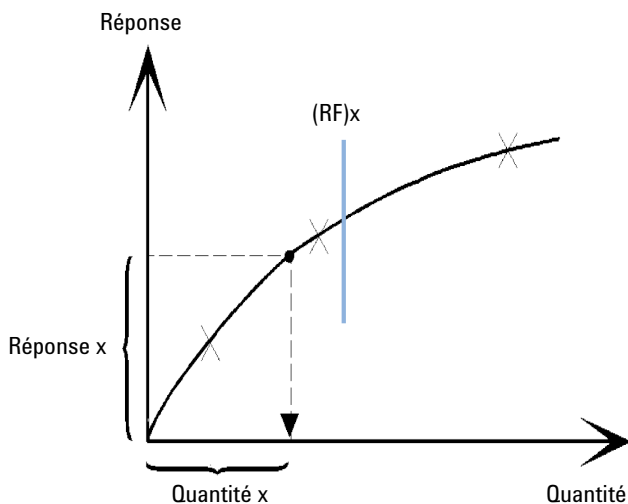


Figure 41 Facteur de réponse

Le multiplicateur et le facteur de dilution sont lus soit dans la boîte de dialogue **Calibration Settings**, soit dans la boîte de dialogue **Sample Information**.

Quantification

Quantification des composés étalonnés

Si le rapport % ESTD est sélectionné et que la quantité d'échantillon est différente de zéro, la quantité relative (%) d'un composant x est calculée comme suit :

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

où :

La *quantité absolue de x* est calculée comme indiqué ci-dessus dans le calcul ESTD,

La *quantité d'échantillon* est tirée de la zone Informations d'échantillon, ou de la boîte de dialogue Paramètres de quantification pour les analyses simples. Si la quantité d'échantillon est égale à zéro, l'ESTD est calculé.

Calcul ISTD

La procédure ISTD élimine les inconvénients de la méthode ESTD en ajoutant une quantité connue d'un composant servant de facteur de normalisation. Ce composant, l'*étalon interne*, est ajouté à la fois aux étalons et aux échantillons inconnus.

Le logiciel se sert des facteurs de réponse appropriés obtenus d'un étalonnage précédent enregistré dans la méthode. A l'aide de la concentration de l'étalon interne et des aires ou hauteurs des pics de l'analyse, le logiciel calcule la concentration des composants.

Le composé utilisé comme étalon interne doit être similaire tant du point de vue chimique qu'au niveau du temps de rétention/migration au composé étalonné, mais doit s'en distinguer chromatographiquement.

Tableau 8 Procédure ISTD

Avantages	Inconvénients
La variation de quantité injectée n'est pas primordiale.	L'étalon interne doit être ajouté à chaque échantillon.
La dérive d'instrument est compensée par l'étalon interne.	
Les effets dus à la préparation de l'échantillon sont réduits si le comportement chimique de l'ISTD et celui de l'inconnu sont similaires.	

Si vous utilisez la procédure ISTD pour des étalonnages avec une caractéristique non linéaire, veillez à ce que les éventuelles erreurs issues du principe de calcul n'entraînent pas d'erreur systématique. Dans les étalonnages multiniveaux, la quantité du composé ISTD doit être constante, c'est-à-dire identique pour chaque niveau si la courbe d'étalonnage du composé n'est pas linéaire.

Dans l'analyse de l'étalon interne, la quantité du composant étudié est liée à la quantité de l'étalon interne par le rapport des réponses des deux pics.

Lors d'un étalonnage ISTD à deux analyses, le calcul du rapport de quantité corrigé d'un composé donné dans un échantillon inconnu se déroule comme suit :

Analyse 1 : Étalonnage

- 1 Les points d'étalonnage sont calculés à partir d'un rapport de quantité et d'un rapport de réponse pour chaque niveau d'un pic particulier dans la table d'étalonnage.

Le rapport de quantité est la quantité du composé divisée par la quantité de l'étalon interne à ce niveau.

Le rapport de réponse est l'aire du composé divisée par l'aire ou la hauteur de l'étalon interne à ce niveau.

- 2 Une équation de la courbe passant par les points d'étalonnage est calculée à l'aide du type de régression défini dans la boîte de dialogue Calibration Settings (Paramètres d'étalonnage) ou Calibration Curve (Courbe d'étalonnage).

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

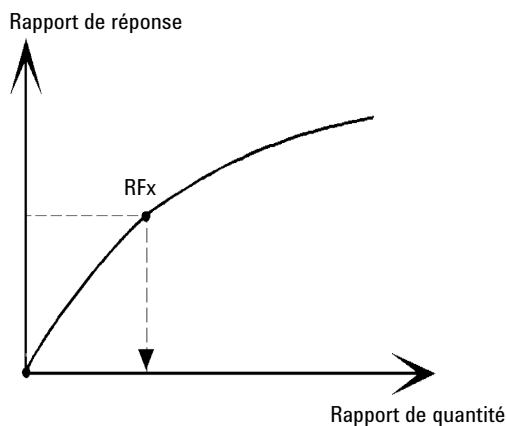


Figure 42 Rapport de quantité

Analyse 2 : Échantillon inconnu

- 1 La réponse du composé dans l'échantillon inconnu est divisée par la réponse de l'étalon interne dans l'échantillon inconnu pour donner un rapport de réponse pour ce dernier.
- 2 Un rapport de quantité pour l'échantillon inconnu est calculé à l'aide de l'équation de la courbe de régression déterminée à l'étape 2 ci-dessus et de la quantité réelle d'ISTD dans l'échantillon.

Calcul ISTD des composés étalonnés

Les équations permettant de calculer la quantité réelle d'un composé étalonné x pour un étalonnage à un seul niveau sont :

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

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

où :

RF_x représente le facteur de réponse pour le composé x ;

La quantité réelle (*Actual Amt*) d'ISTD représente la valeur entrée dans la boîte de dialogue Calibration Settings (Paramètres d'étalonnage) ou Sample Info (Informations d'échantillon) pour l'étalon interne ajouté à l'échantillon inconnu ;

M représente le multiplicateur.

D représente le facteur de dilution.

Lorsque le type de rapport ISTD% est sélectionné, l'équation suivante permet de calculer la quantité relative (%) d'un composant x :

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

Quantification des pics non étalonnés

Les pics non étalonnés peuvent être quantifiés en utilisant un facteur de réponse fixe ou à partir des données d'étalonnage de l'un des composés étalonnés. La quantification avec un facteur de réponse fixe ou à partir des données d'un composé étalonné est signal spécifique. Dans le second cas, si le composé étalonné est quantifié par une méthode à étalon interne, l'étalon interne est utilisé pour les pics non identifiés de la même manière que pour le composé étalonné.

Quantification indirecte à l'aide d'un composé étalonné

Si les données d'étalonnage d'un composé étalonné ne sont pas utilisées pour quantifier des pics non étalonnés, le composé étalonné est sélectionné dans la liste déroulante **Using Compound** dans la boîte de dialogue **Calibration Settings**. Les calculs sont les mêmes que pour les composés étalonnés. Si le composé de référence est quantifié par une méthode à étalon interne, l'étalon interne est utilisé pour le composé non étalonné de la même manière que pour le composé de référence.

L'absence du pic de référence aboutit à une quantité égale à zéro pour le pic non étalonné.

Quantification à l'aide d'un facteur manuel

Le logiciel vous permet de quantifier un composé identifié sur la base d'un facteur de réponse fixe (**With Rsp Factor** dans la boîte de dialogue **Calibration Settings**). Dans ce cas, la quantité du composé est calculée à l'aide du facteur de réponse fixe :

$$\text{Quantité} = \text{Réponse} * \text{Facteur de réponse} * M * D$$

où :

Facteur manuel

Facteur de réponse fixe

Réponse

La réponse peut être la surface ou la hauteur

Utilisation d'un facteur manuel avec une méthode à étalon interne

Si la quantité de composé est calculée avec le facteur de réponse fixe et un étalon interne, la formule se lit comme suit :

$$\text{Rapport des surfaces} = \text{Surface} / \text{Surface}_{\text{Étalon interne}}$$

ou :

$$\text{Rapport des hauteurs} = \text{Hauteur} / \text{Hauteur}_{\text{Étalon interne}}$$

La quantité est alors calculée comme suit :

$$\text{Quantité} = \text{Rapport des surfaces} * \text{Facteur manuel} * \text{Quantité}_{\text{Étalon interne}}$$

ou :

$$\text{Quantité} = \text{Rapport des hauteurs} * \text{Facteur manuel} * \text{Quantité}_{\text{Étalon interne}}$$

Dépendance du facteur manuel et du facteur de réponse (FR)

Si le FR est défini comme étant la **Response per amount** (paramètre par défaut) :

$$\text{FR} = 1 / \text{Facteur manuel}$$

Si le FR est défini comme étant la **Amount per response** :

$$\text{FR} = \text{Facteur manuel}$$

Calcul du pourcentage normalisé

Dans la méthode de normalisation, les facteurs de réponse sont appliqués aux surfaces (ou hauteurs) des pics de manière à compenser les différences de sensibilité du détecteur pour les différents composants de l'échantillon.

Le calcul du rapport Norm% est identique au rapport ESTD, à la différence près que le calcul des quantités relatives de composé comprend une étape supplémentaire pour calculer des quantités relatives et non absolues.

Le rapport Norm% présente les mêmes inconvénients que les rapports % aire et % hauteur. Toute modification affectant la surface de pic totale a une incidence sur le calcul de la concentration de chaque pic. Le rapport de normalisation ne doit donc être utilisé que si tous les éléments recherchés sont élués et intégrés. L'exclusion de pics sélectionnés d'un rapport de normalisation modifie les résultats finaux pour l'échantillon.

L'équation utilisée pour calculer le **Norm%** d'un composant x est la suivante :

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

où :

Response_x	représente l'aire (ou la hauteur) du pic x ;
RF_x	représente le facteur de réponse ;
$\sum(\text{Response} \cdot \text{RF})$	représente le total de tous les produits $\text{Response} \cdot \text{RF}$ pour tous les pics (y compris le pic x) ;
M	représente le multiplicateur ;
D	représente le facteur de dilution.

Le multiplicateur et le facteur de dilution sont tirés soit des **Quantitation Settings** de la boîte de dialogue **Specify Report**, soit de la table de séquence.

5 Aptitude du système

Évaluation de la performance optimale	101
Évaluation de la conformité du système	101
Définition du bruit	104
Calcul du bruit selon le principe 6 x écart type	105
Calcul du bruit à l'aide de la formule crête à crête	106
Calcul du bruit par la méthode ASTM	107
Calcul du rapport signal sur bruit	110
Dérive et déviation	113
Calcul de l'asymétrie et de la symétrie de pic	115
Calculs et formules d'aptitude du système	117
Définitions générales	118
Volume mort volume mort	118
Temps de rétention de composé non retenu t (m) [min]	118
Définition des tests de performances	119
Présentation des tests de performance	119
Moments statistiques, asymétrie et excès	121
Largeur de pic réelle W _x [min]	123
Facteur de capacité (USP)	123
Facteur de traînée USP (USP) t	124
Nombre de plateaux théoriques par colonne n	125
Nombre de plateaux théoriques par mètre N [1-m]	126
Rétention relative, sélectivité	127
Résolution (USP, ASTM) R	128
Résolution (EP/JP) R _s	128
Résolution (définitions classiques de ChemStation)	128
Rapport pic/vallée (EP/JP)	129
Définitions de reproductibilité	131
Moyenne de l'échantillon (M)	131
Écart type de l'échantillon (S)	132
Écart type relatif RSD (RSD[%]) (USP)	132
Écart type de la moyenne (S)	132
Écart type (S)	133
Intervalle de confiance IC	133
Coefficient de corrélation	134
Accès au nombre en double précision stocké en interne	136

Ce chapitre décrit ce que peut faire OpenLab CDS pour évaluer les performances de l'instrument analytique et de la méthode analytique.

Évaluation de la performance optimale

La performance optimale peut être calculée pour tout pic intégré des données chargées, ainsi que pour de nouveaux pics intégrés manuellement. La fonction interactive *Outil de performance optimale* calcule les caractéristiques de pic et les affiche sur l'IU. L'outil de performance optimale utilise la largeur de pic réelle à des hauteurs différentes et un temps de rétention évalué par un algorithme de modélisation des pics. Ces valeurs sont affichées exclusivement sur l'IU de l'outil de performance optimale. Elles peuvent varier légèrement par rapport aux valeurs de l'intégrateur affichées dans les rapports.

Évaluation de la conformité du système

L'évaluation des performances de l'instrument d'analyse avant son utilisation dans le cadre de l'analyse d'échantillons, ainsi que l'évaluation des performances de la méthode d'analyse avant qu'elle ne soit appliquée de manière routinière, font partie des bonnes pratiques à adopter. Il est également souhaitable de vérifier les performances du système d'analyse avant et pendant les analyses de routine. Le logiciel ChemStation comporte des fonctionnalités permettant de réaliser automatiquement ces trois types de test. Un test d'instrument peut porter sur la sensibilité du détecteur, ainsi que sur la précision des temps de rétention/migration de pic ou des aires de pic. Un test de méthode peut vérifier la précision des quantités et des temps de rétention/migration, ainsi que la sélectivité et la robustesse de la méthode en termes de variance quotidienne. Un test du système peut porter sur la précision des quantités, la résolution entre deux pics spécifiques et la traînée de pic.

Il est recommandé aux laboratoires qui doivent se conformer aux réglementations suivantes :

- bonnes pratiques de laboratoire (BPL),
- bonnes pratiques de fabrication (BPF) et bonnes pratiques de fabrication appliquées aux États-Unis (BPFa),
- bonnes pratiques d'automatisation de laboratoire (GALP),

d'effectuer ces tests et de documenter les résultats de manière détaillée. Les laboratoires participant à un système de contrôle de la qualité (par exemple, dans

le cadre de la norme ISO 9000) doivent apporter la preuve des bonnes performances de leurs instruments.

La ChemStation rassemble des résultats générés par différentes analyses qui sont ensuite statistiquement évalués dans le rapport récapitulatif de séquence.

Les essais sont documentés dans un format qui est généralement accepté par les autorités réglementaires et par les vérificateurs indépendants. Ces statistiques portent sur les données suivantes :

- temps de rétention/migration de pic,
- aire de pic,
- quantité,
- hauteur de pic,
- largeur de pic à mi-hauteur,
- symétrie de pic,
- traînée de pic,
- facteur de capacité (k'),
- nombre de plateaux,
- résolution entre pics,
- sélectivité par rapport au pic précédent,
- asymétrie,
- excès.

La valeur moyenne, l'écart type, l'écart type relatif et l'intervalle de confiance sont des valeurs calculées. Vous pouvez définir des limites d'écart type, d'écart type relatif ou d'intervalle de confiance pour chaque paramètre. Si les valeurs dépassent les limites définies, elles sont marquées dans le rapport afin d'attirer votre attention.

Il est possible de prouver la qualité des données analytiques en conservant des enregistrements des conditions réelles au moment des mesures. Ces informations sont stockées avec les données et présentées dans un rapport avec les données d'échantillon. Les courbes de performance de l'instrument sont enregistrées pendant toute l'analyse sous forme de signaux. Elles sont ensuite stockées dans le fichier de données. Si l'instrument le permet, ces enregistrements, superposés sur le chromatogramme, peuvent être rappelés à la demande, par exemple lors d'un audit.

La dérive et le bruit de la ligne de base peuvent être mesurés automatiquement. Un niveau de détection minimum peut être calculé à partir des données de hauteur de pic pour chaque composé étalonné dans la méthode.

Enfin, vous pouvez ajouter la configuration de l'instrument, le numéro de série des instruments, l'identification de colonne/capillaire et vos commentaires dans chaque rapport imprimé.

Des résultats de performances complets sont calculés uniquement pour les composés étalonnés dans la méthode, afin d'assurer la caractérisation par le temps de rétention/migration et les noms de composé.

Un rapport type de test des performances du système comprend les résultats suivants :

- informations relatives à l'instrument,
- détails sur la colonne/le capillaire,
- méthode analytique,
- informations sur l'échantillon,
- informations sur l'acquisition,
- description du signal et détermination du bruit de la ligne de base,
- signal avec valeurs de temps de rétention/migration ou noms de composés.

En outre, les informations suivantes sont générées pour chaque composé étalonné dans le chromatogramme :

- temps de rétention/migration,
- k' ,
- symétrie,
- largeur de pic,
- nombre de plateaux,
- résolution,
- rapport signal/bruit,
- nom du composé.

Définition du bruit

Le bruit peut être défini à partir des valeurs de points de données sur une plage de temps sélectionnée d'un signal. Il existe trois modes de traitement du bruit :

- selon le principe de l'écart type (sd) x 6 de la régression linéaire de la dérive,
- selon le principe de crête à crête (correction de la dérive) et
- selon la méthode ASTM (ASTM E 685-93).

Il est possible de calculer le bruit pour sept plages du signal au maximum. Les plages sont définies via les paramètres d'aptitude système des options de rapport.

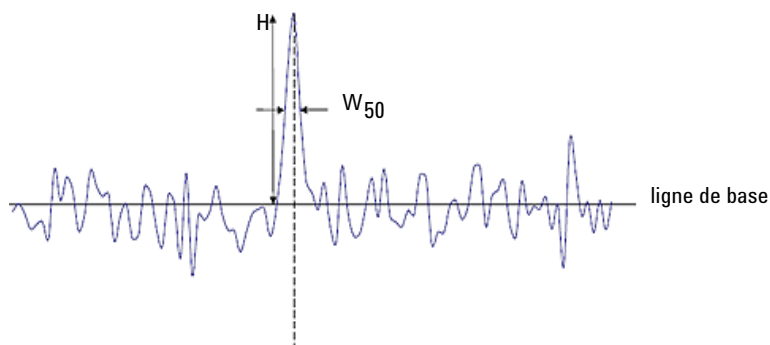
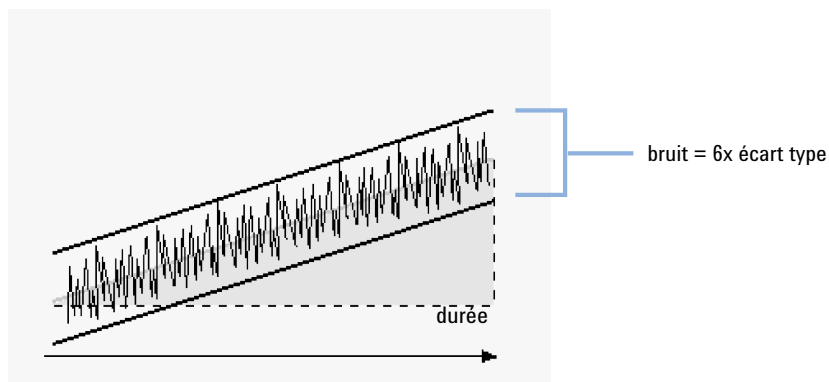


Figure 43 Chromatogramme avec signal de pic et bruit

H	Hauteur de pics du haut vers la ligne de base (meilleure linéaire à travers le bruit).
W ₅₀	Largeur de pic à mi-hauteur.

Calcul du bruit selon le principe 6 x écart type



La régression linéaire est calculée en utilisant tous les points de données dans la plage du signal en cours. Le bruit est défini par la formule suivante :

$$N = 6 \times ET$$

où :

N

Bruit basé sur la méthode six fois l'écart type.

Étalon

Écart-type de la régression linéaire de tous les points de données dans la plage de temps définie.

Calcul du bruit à l'aide de la formule crête à crête

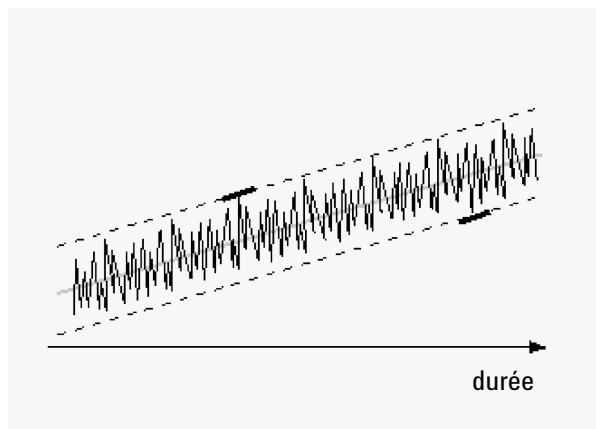


Figure 44 Illustration du bruit crête à crête avec la dérive

Pour calculer la dérive, il convient d'abord de déterminer la régression linéaire à partir de tous les points de données dans la plage de temps d'un pic. La droite de régression linéaire est soustraite de tous les points de données de l'intervalle de temps afin d'obtenir un signal corrigé en fonction de la dérive.

Le bruit crête à crête est ensuite calculé grâce à cette formule :

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

où :

N	Bruit (crête à crête).
I_{\max}	Valeur I_x la plus élevée (maximale) de la plage de temps.
I_{\min}	Valeur I_x la plus basse (minimale) dans la plage de temps.
I_x	Intensité du signal, corrigée par la dérive (la dérive est calculée avec la formule LSQ).

Pour les calculs de la pharmacopée européenne, le bruit crête à crête est calculé à l'aide d'un signal de référence à vide sur une plage de -10 et +10 multipliée par W_{50} encadrant chaque pic. Cette région peut être symétrique au signal d'intérêt ou asymétrique si nécessaire en raison de signaux matriciels.

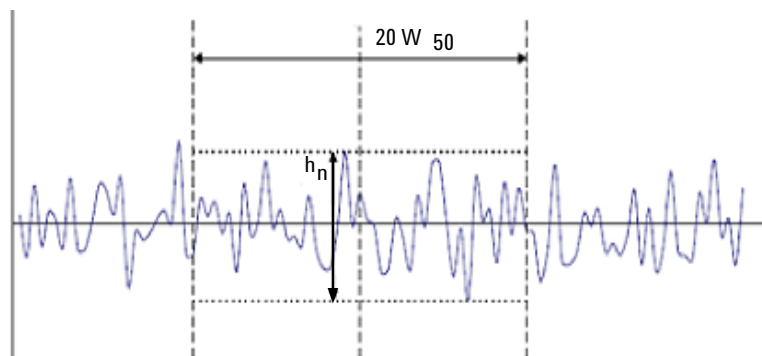


Figure 45 La détermination du bruit du chromatogramme d'un échantillon vide

Où

$20 W_{50}$ est la région correspondant à 20 fois W_{50} .

H_{n_n} est l'amplitude maximale du bruit de ligne de base dans la région correspondant à 20 fois W_{50} .

Calcul du bruit par la méthode ASTM

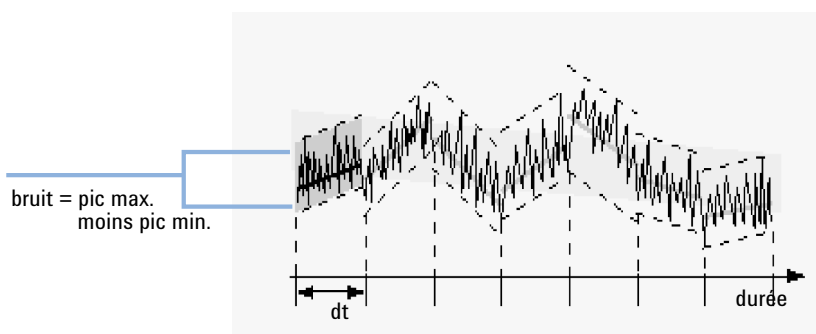


Figure 46 Détermination du bruit par la méthode ASTM

La méthode de calcul du bruit ASTM (ASTM E 685-93) repose sur la pratique standard de test de détecteurs photométriques à longueur d'onde variable utili-

sés en chromatographie liquide, conformément aux directives de l'American Society for Testing and Materials (ASTM). En fonction de la taille de l'intervalle de temps, on distingue trois types de bruit. La détermination du bruit repose sur la mesure crête à crête dans des plages de temps définies.

- *Durée de cycle, t*

Bruit à long terme : amplitude maximale de toutes les variations aléatoires de signal du détecteur, aux fréquences comprises entre 6 et 60 cycles par heure. Le bruit est défini comme étant à long terme lorsque la plage de temps sélectionnée dépasse une heure. La plage de temps de chaque cycle (dt) est de 10 minutes, ce qui correspond à six cycles au moins dans la plage de temps sélectionnée.

Bruit à court terme : amplitude maximale de toutes les variations aléatoires de signal du détecteur d'une fréquence supérieure à un cycle par minute. Le bruit est défini comme étant à court terme lorsque la plage de temps sélectionnée est comprise entre 10 et 60 minutes. La plage de temps de chaque cycle (dt) est d'une minute, ce qui correspond à 10 cycles au moins dans la plage de temps sélectionnée.

Bruit à très court terme (ne fait pas partie de la norme ASTM E 685-93) : cette notion est introduite afin de décrire l'amplitude maximale de toutes les variations aléatoires de signal du détecteur d'une fréquence supérieure à un cycle par 0,1 minute.

Le bruit est défini comme étant à très court terme lorsque la plage de temps sélectionnée est comprise entre 1 et 10 minutes. La plage de temps de chaque cycle (dt) est de 0,1 minute, ce qui correspond à 10 cycles au moins dans la plage de temps sélectionnée.

- *Nombre de cycles, n*

Le nombre de cycles est calculé ainsi :

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

où t est le temps de cycle et t_{tot} la durée totale pendant laquelle le bruit est calculé.

- *Bruit crête à crête dans chaque cycle*

Pour calculer la dérive, il convient d'abord de déterminer la régression linéaire à partir de tous les points de données dans la plage de temps. La droite de régression linéaire est soustraite de tous les points de données de l'intervalle de temps afin d'obtenir un signal corrigé en fonction de la dérive. Le bruit crête à crête est ensuite calculé grâce à cette formule :

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

où N est le bruit crête à crête, I_{\max} le pic d'intensité maximale et I_{\min} , le pic d'intensité minimale dans la plage de temps.

- *Bruit ASTM*

Le bruit ASTM est calculé comme suit :

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

où N_{ASTM} est le bruit calculé selon la méthode ASTM.

La détermination ASTM du bruit n'est pas effectuée si la plage de temps sélectionnée est inférieure à une minute. En fonction de la plage, si la plage de temps sélectionnée est supérieure ou égale à une minute, le bruit est défini selon l'une des méthodes ASTM décrites précédemment. Le calcul prend en compte au moins sept points de données par cycle. Dans la détermination automatisée du bruit les cycles se chevauchent de 10 %.

Calcul du rapport signal sur bruit

Le logiciel de station de travail analytique Agilent ChemStation dispose des options suivantes pour calculer le bruit pour le rapport signal sur bruit :

- *6 sigma* : le bruit est calculé en utilisant six fois l'écart type (SD) de la régression linéaire (6 sigma). Les données relatives au calcul du bruit sont tirées d'un intervalle de temps spécifique dans le signal actuel. Si vous avez défini plusieurs intervalles de temps, l'intervalle le plus proche du pic sera utilisé.
- *USP* (selon la définition de l'United States Pharmacopoeia) : le bruit est calculé à l'aide de la formule crête-à-crête. Les données relatives au calcul du bruit sont tirées d'un intervalle de temps spécifique dans le signal actuel. Si vous avez défini plusieurs intervalles de temps, l'intervalle le plus proche du pic sera utilisé.
- *EP* (selon la définition de la pharmacopée européenne) : le bruit est calculé à l'aide de la formule crête-à-crête. Les données relatives au calcul du bruit sont tirées d'un signal blanc. La plage de temps pour le calcul du bruit est un intervalle de la plage de temps de 20 fois la largeur de pic, centré autour du temps de rétention du pic.

Calcul du signal sur bruit sans signal de référence (6 sigma, USP)

La plage la plus proche du pic est sélectionnée à partir des plages spécifiées dans les paramètres d'aptitude système.

Le bruit est calculé en utilisant six fois l'écart type (SD) de la régression linéaire ou en utilisant la formule crête-à-crête (USP).

Le rapport signal/bruit est calculé pour chaque pic du signal. Si aucune valeur ne peut être obtenue, le rapport signal sur bruit est indiqué sous la forme « - ».

Le rapport signal/bruit est calculé selon cette formule :

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

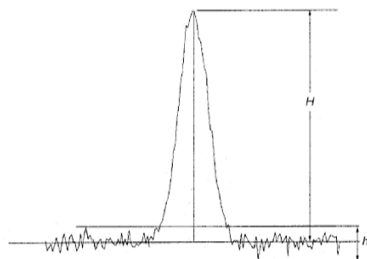


Figure 47 Rapport signal/bruit

Calcul du rapport signal sur bruit selon la définition de la EP

Le rapport signal sur bruit (S/B) peut être calculé selon la définition de la pharmacopée européenne. Le S/B est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$S/B = 2 H/h$$

Où :

H est la hauteur du pic correspondant au composant concerné du chromatogramme obtenu avec la solution de référence prescrite,

h est la valeur absolue de la fluctuation la plus importante du bruit par rapport à la ligne de base d'un chromatogramme obtenue après injection d'une solution à blanc et observée sur une distance égale à vingt fois la largeur à mi-hauteur du pic du chromatogramme obtenue avec la solution de référence prescrite, et répartie de manière égale autour de l'endroit où ce pic se trouverait.

La valeur du bruit est calculée à l'aide de la méthode « crête à crête » (voir « Calcul du bruit à l'aide de la formule crête à crête », page 106).

Le S/B est indiqué pour tous les pics présents dans le signal du chromatogramme, à condition qu'il existe un signal de référence correspondant. Pour un signal particulier du chromatogramme particulier, le signal de référence est automatiquement attribué si vous indiquez le fichier de données de référence. Si aucun signal de référence ne peut être attribué à un signal du chromatogramme, le rapport signal sur bruit ne sera pas calculé pour les pics de ce signal particulier.

Détermination de la plage de bruits

La plage de bruits du signal de référence est déterminée en fonction des algorithmes suivants.

- Si le signal de référence n'est pas assez long : $HeureDébut - HeureFin < 20 * W_{50}$
 - $HeureDébut =$ heure de début du signal de référence et
 - $HeureFin =$ heure de fin du signal de référence
- Si le signal de référence est assez long, mais que le pic est situé de sorte que $(TR - 10 * W_{50})$ est inférieur au point de départ du signal de référence
 - $HeureDébut =$ heure de début du signal de référence et
 - $HeureFin = HeureDébut + 20 * W_{50}$
- Si le signal de référence est assez long, mais que le pic est situé de sorte que TR ou $TR + 10 * W_{50}$ est supérieur au point de fin du signal de référence
 - $HeureFin =$ heure de fin (du signal de référence), et
 - $HeureDébut = - HeureFin - 20 * W_{50}$
- Si le pic est situé de sorte que TR ou $TR + 10 * W_{50}$ est supérieur au point de fin du signal de référence
 - $HeureDébut = TR - 10 * W_{50}$ et
 - $HeureFin = TR + 10 * W_{50}$

Où :

TR est le temps de rétention, et

W_{50} la largeur de pic à mi-hauteur.

Dérive et déviation

Les dérives et déviations sont calculées si le rapport **Signal to noise** est sélectionné dans la méthode de traitement. Elles sont calculées quel que soit le type de calcul du bruit sélectionné.

Dérive La dérive est définie comme la pente de régression linéaire. Pour calculer la dérive, il convient d'abord de déterminer la régression linéaire à partir de tous les points de données dans la plage de temps. La droite de régression linéaire est soustraite de tous les points de données de l'intervalle de temps afin d'obtenir un signal corrigé en fonction de la dérive.

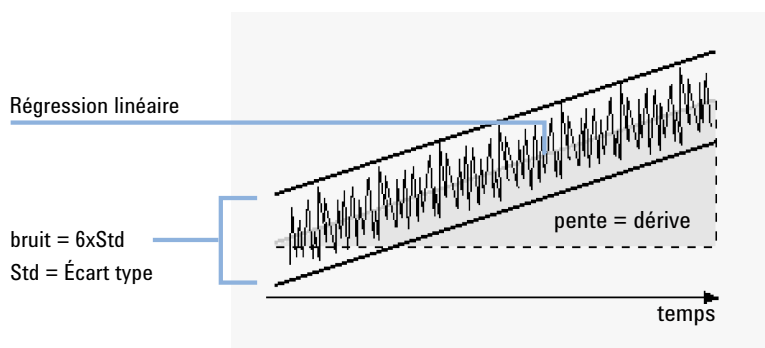


Figure 48 Sens pour bruit écart la Déviation Standard

Formule de la courbe :

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

où :

N	Nombre d'observations discrètes
X_i	Variable indépendante, i^{e} observation
Y_i	Variable dépendante, i^{e} observation

Coefficients :

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

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

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

Déviatiion La déviation est définie comme le bruit pic à pic des valeurs de données moyennes dans les cycles de bruit ASTM, voir « Calcul du bruit selon le principe 6 x écart type », page 105.

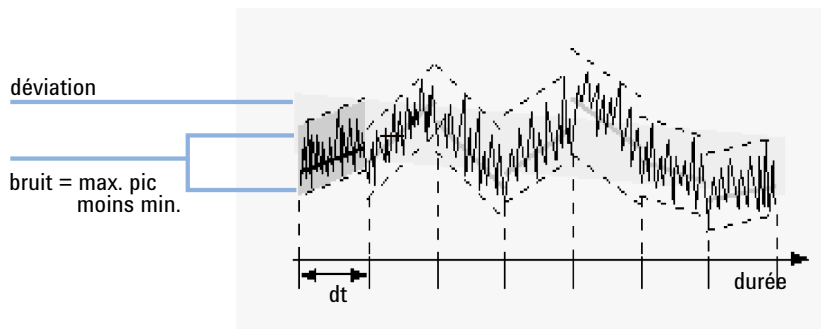


Figure 49 Déviation de bruit comme décidée par la Méthode ASTM

Calcul de l'asymétrie et de la symétrie de pic

Asymétrie

Le logiciel de station de travail analytique Agilent ChemStation détermine le rapport d'asymétrie d'un pic en comparant les demi-largeurs du pic à 5 % (voir « Facteur de traînée USP (USP) t », page 124) ou 10 % (voir l'équation ci-dessous) de sa hauteur.

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

où :

A_s Asymétrie à 10 %.

W_{10} Largeur du pic à 10 % de sa hauteur.

$W_{f,10}$ Moitié avant de la largeur du pic à 10 % de sa hauteur.

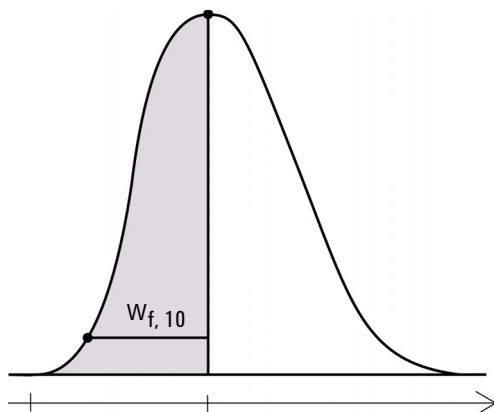


Figure 50 Calcul de l'asymétrie de pic

Symétrie La symétrie de pic est calculée en tant que pseudo-moment par l'intégrateur à l'aide des équations de moment suivantes :

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

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

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

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

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

Si aucun point d'inflexion n'est détecté ou si un seul point d'inflexion est rapporté, la symétrie de pic est calculée comme suit :

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

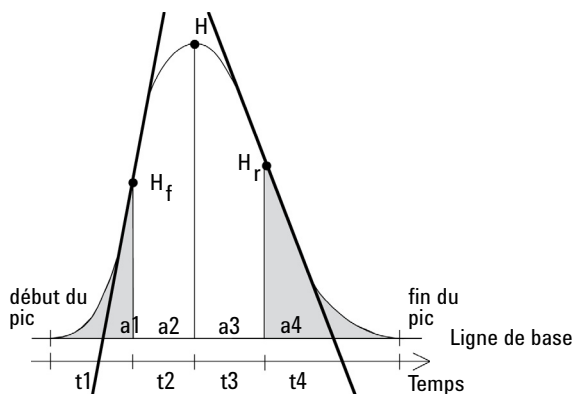


Figure 51 Calcul du facteur de symétrie de pic

où :

a_i = aire de la section

t_i = instant de la section

H_f = hauteur du point d'inflexion avant

H_r = hauteur du point d'inflexion arrière

H = hauteur au sommet

Calculs et formules d'aptitude du système

Le logiciel ChemStation utilise les formules suivantes pour calculer les résultats des différents tests de conformité du système. Les résultats sont ensuite intégrés dans un rapport qui utilise les styles **Performance**, **Performance+Noise**, **Performance+LibSearch** et **Extended Performance**.

Si une norme ASTM ou USP est spécifiée pour une définition donnée, celle-ci doit se conformer à la référence correspondante. Toutefois, les symboles utilisés ici ne sont pas nécessairement identiques à ceux adoptés dans la référence.

Les références utilisées dans ce contexte sont les suivantes :

- *ASTM : Section E 685 – 93 (2021)*
- *USP : Pharmacopée des États-Unis, premier supplément à l'USP 37-NF32*
- *EP : Pharmacopée européenne, 11e édition*
- *JP : Pharmacopée japonaise, 18e édition*

REMARQUE

Depuis l'USP 2022, plusieurs calculs de paramètres de performances relatives aux pics ont été alignés sur l'EP et la JP. Reportez-vous à l'aide en ligne de ChemStation pour plus de détails sur la formule EP/JP que vous devez utiliser pour garantir la conformité avec l'USP 2022.

Définitions générales

Volume mort volume mort

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

où :

d	diamètre de la colonne [cm]
π	constante, rapport de la circonférence d'un cercle à son diamètre
l	longueur de la colonne [cm]
f	fraction du volume de la colonne qui n'est pas utilisée par la phase stationnaire, mais disponible pour la phase mobile ; valeur par défaut de f = 0,68 (pour Hypersil)

Temps de rétention de composé non retenu t (m)
[min]

(Également appelé temps mort ou temps de volume mort)

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

où :

F	Débit de LC [ml/min]
---	----------------------

Définition des tests de performances

Présentation des tests de performance

Les facteurs de la table des pics peuvent être inclus dans les rapports ChemStation selon leur définition dans l'USP, la EP et la JP. La table ci-dessous présente une vue d'ensemble des facteurs disponibles, avec leur description et les noms des valeurs. Pour plus d'informations concernant les calculs, reportez-vous aux sections correspondantes de ce guide.

Tableau 9 Valeurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation

USP	EP	JP	Définition	Création classique de rapports (RLE)	Création intelligente de rapports (RTE)
Facteur de symétrie ou facteur de traînée	Facteur de symétrie	Facteur de symétrie	$S = W_5/2f$	Traînée USP	Pic_FacteurDeTraînée
-	-	-	$S=W_{10}/2f$	Asymétrie USP à 10 % de hauteur	Peak_Asymmetry_10Perc
Facteur de séparation	-	Facteur de séparation	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ T_R du pic a < T_R du pic b	Sélectivité	Pic_Sélectivité
Rétention relative	Rétention relative	-	Avec composés RRT : $r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$	-	Pic_TempsRétRelative_EP
Temps de rétention relative (RRT)	Rétention relative non ajustée	Rétention relative non ajustée	$Rr = t_2/t_1$	-	Pic_TempsRétRelatif
-	Résolution	Résolution	$R_s = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$	Résolution (EP) Résolution (JP)	Pic_Résolution_EP Pic_Résolution_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right) (T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Résolution	Pic_Résolution_Classique
Résolution	-	-	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_t(2) + W_t(1)}$	-	Pic_Résolution_USP

Tableau 9 Valeurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation

USP	EP	JP	Définition	Création classique de rapports (RLE)	Création intelligente de rapports (RTE)
Nombre de plateaux théoriques (Efficacité)			$n = 16 \left(\frac{t_R}{W_t} \right)^2$	Méthode tangentielle de plateaux	Pic_PlateauxThéoriques_USP
-	Nombre de plateaux (Efficacité)	Nombre de plateaux (Efficacité)	$N = 5,54 \times t_R^2 / W_{50}^2$	Méthode à mi-hauteur de plateaux	Pic_PlateauxThéoriques_EP Pic_PlateauxThéoriques_JP
	Rapport S/B	Rapport S/B	S/B = 2 H/h Bruit : Calcul crête-à-crête ; signal de référence blanc ; intervalle de temps 20x largeur de pic.	-	Pic_SignalBruit_EP
Rapport S/B			S/B = 2 H/h Bruit : Calcul crête-à-crête ; intervalle de temps dans le signal actuel.		Peak_SignalToNoise_USP
			S/B = 2 H/h Bruit : Calcul 6 sigma ; intervalle de temps dans le signal actuel.		Peak_SignalToNoise_6Sigma
Rapport pic/vallée	Rapport pic/vallée	Rapport pic/vallée	$p/v = H_p/H_v$	Rapport pic/vallée (front et traîne)	Pic_RapportPicVallée
-	-	-	$S = B/A$	Asymétrie Foley-Dorsey à 10 % de hauteur	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7 (T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A,B) / \min(A,B))}$	Plateaux de Foley-Dorsey	-

Moments statistiques, asymétrie et excès

Le calcul des moments statistiques est une solution de remplacement pour décrire les formes de pic asymétriques. Il existe un nombre infini de moments de pic, mais seuls les cinq premiers sont utilisés dans le cadre des calculs de pics chromatographiques. Ils portent les noms suivants : Moment 0, Moment 1, ... Moment 4.

Le moment 0 représente l'aire du pic.

Le moment 1 est le temps de rétention moyen, ou le temps de rétention mesuré au niveau du centre de gravité du pic. Il diffère du temps de rétention chromatographique mesuré au niveau maximal du pic, sauf si le pic est symétrique.

Le moment 2 est la variance de pic, soit une mesure de la dispersion latérale. Il s'agit de la somme de la variance générée par différents éléments du système d'instrument.

Le moment 3 décrit la symétrie verticale ou obliquité. Il s'agit de la mesure de l'écart de la forme de pic par rapport au modèle gaussien. L'obliquité définie dans le rapport Performances + Étendu constitue sa forme adimensionnelle. Un pic symétrique présente une valeur d'obliquité égale à zéro. Les pics de traînée présentent une obliquité positive et leur moment 1 est supérieur au temps de rétention. Les pics de front diffus présentent une obliquité négative et leur moment 1 est inférieur au temps de rétention.

Le moment 4 (également appelé "excès") mesure la compression ou l'étirement du pic le long d'un axe vertical, par rapport à un modèle gaussien dont le moment 4 est égal à zéro. Il est possible de le visualiser en déplaçant ou en séparant les côtés du pic gaussien, tout en maintenant une aire constante. Si le pic apparaît comprimé ou écrasé, son excès est négatif. Dans le cas contraire, son excès est positif. En outre, l'excès est défini dans le rapport Performances + Étendu, sous sa forme adimensionnelle.

Calcul des moments statistiques

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

où :

N = nombre de sections d'aire

A_i = valeur (réponse) de la section d'aire indexée par i

d_t = intervalle entre les sections d'aire adjacentes

t_0 = instant de la première section d'aire

$\sum_{i=1}^N$ = somme, de l'indice de début 1 à l'indice de fin N, pour les observations discrètes

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

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

Largeur de pic réelle W_x [min]

W_x = largeur de pic à une hauteur de x% du total

où :

W_t	Largeur du pic tangent, 4 x écart-type, obtenu à l'intersection des tangentes passant par les points d'inflexion avec la ligne de base
$W_{4,4}$	Largeur à 4,4 % de hauteur (largeur de 5 x écart-type)
W_5	Largeur à 5 % de hauteur (largeur de pic de traînée), utilisée dans le cadre du facteur de traînée USP
W_{10}	Largeur à 10 % de la hauteur
W_{50}	Largeur à 50 % de hauteur (largeur de pic réelle à mi-hauteur ou 2,35 x écart-type)

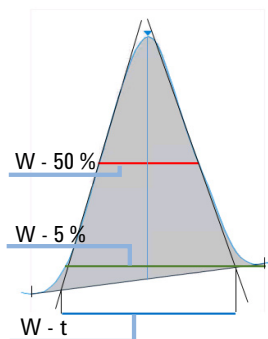


Figure 52 Largeur de pic à x % de la hauteur

Facteur de capacité (USP)

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

où :

t_R = temps de rétention du pic [min]

t_0 = temps de volume mort [min]

Facteur de traînée USP (USP) t

REMARQUE

Le facteur de symétrie (USP, EP, JP) est identique au facteur de traînée (USP). Les deux sont disponibles comme « Pic_FacteurDeTraînée » dans le Rapport Intelligent. Voir également « Présentation des tests de performance », page 119.

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

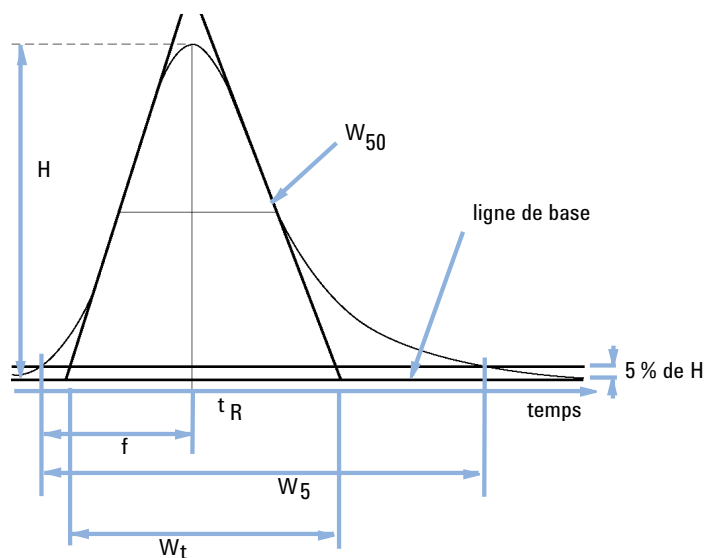


Figure 53 Paramètres de performance

S	Facteur de symétrie, facteur de traînée (USP)
H	Hauteur de pic
t _R	Temps de rétention
f	Distance (en min) entre le front de pic et t _R , mesurée à 5 % de la hauteur du pic
W ₅₀	Largeur de pic à 50 % de la hauteur de pic [min]
W ₅	Largeur de pic à 5% de la hauteur de pic [min.]
W _t	Largeur de pic tangentielle

Nombre de plateaux théoriques par colonne n

Méthode tangentielle (USP, ASTM) :

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

où :

T_R	Temps de rétention
W_t	Largeur de pic tangentielle [min.]

Méthode à mi-largeur (ASTM, EP, JP) :

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

où :

T_R	Temps de rétention
W_{50}	Largeur de pic à mi-hauteur [min.]

Méthode 5 x écart-type :

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

où :

T_R	Temps de rétention
$W_{4,4}$	Largeur de pic à 4,4 % de la hauteur de pic [min.]

Méthode statistique :

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

où :

$M_x = x^{\text{th}}$ moment statistique

Aptitude du système

Définition des tests de performances

Méthode de Foley-Dorsey

L'équation de Foley-Dorsey est utilisée pour les pics asymétriques. Elle corrige le compte de plateaux pour la traînée de pic et l'élargissement.

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

Où

- W_{10} = largeur de pic à 10 % de hauteur du pic
- A : front et B : traînée de pic, avec $A+B = W_{10}$

Nombre de plateaux théoriques par mètre N [1-m]

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

où :

n

Nombre de plateaux théoriques

l

Longueur de la colonne [cm] (telle que définie dans la méthode de traitement)

Rétention relative, sélectivité

Sélectivité Sélectivité calcule la valeur alpha de tous les pics de signaux sauf le premier. Pour chaque paire de pics adjacents (pics 1 et 2, t_R du pic 1 < t_R du pic 2), la sélectivité est calculée comme suit :

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

où :

$k'_{(x)}$ facteur de capacité du pic x : $(t_{Rx} - t_0)/t_0$

Rétention relative (EP) La rétention relative (ajustée), selon la EP, ne peut être calculée que si un pic de référence du rapport RT (Temps de rétention) a été défini et identifié. Les valeurs *alpha* sont < 1 si le pic est situé à gauche de la référence, et > 1 si le pic est à droite de la référence.

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

Où

t_{Ri} = temps de rétention du pic d'intérêt

t_{Rst} = temps de rétention du pic de référence

t_M = temps mort

La rétention relative (non ajustée) selon la EP est calculée comme suit

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

Résolution (USP, ASTM) R

Méthode des tangentes (concernant les pics 1 et 2, t_R du pic 1 < t_R du pic 2; t_R en min)

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

où :

t_R Temps de rétention

W_t Largeur tangente [min]

Résolution (EP/JP) Rs

La Résolution (JP) et la Résolution (EP) sont calculées avec les définitions suivantes :

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

REMARQUE

En plus, la Résolution Classique $(2.35/2)^*$... est disponible pour un Rapport Intelligent en tant que Pic_Résolution_Classique. Pour une liste complète des valeurs, voir « [Présentation des tests de performance](#) », page 119

Résolution (définitions classiques de ChemStation)

Méthode mi-largeur:

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

Méthode 5 x écart-type :

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

Méthode statistique :

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

où :

$M1_{(x)}$ = temps de rétention moyen pour le pic x (1er moment statistique) [min.]

$W_{B(x)}$ = largeur de base du pic x [min.]

$W_{4,4(x)}$ = largeur à 4,4% de la hauteur du pic x [min.]

$W_{50(x)}$ = largeur à 50 % de la hauteur du pic x [min.]

$W_S(x)$ = largeur dérivée des moments statistiques = $\sqrt{(M2)}$ pour pic x [min] (à voir aussi « Calcul des moments statistiques », page 122)

Rapport pic/vallée (EP/JP)

Le rapport pic/vallée (**p/v ratio** dans les résultats d'injection) est calculé pour indiquer la qualité de la séparation de pics. Il est calculé d'après les pharmacopées européenne et japonaise (EP, JP).

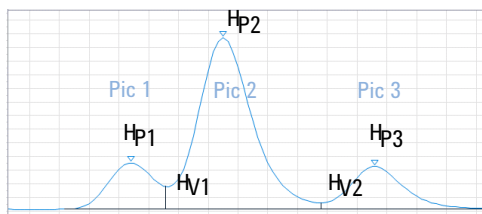
REMARQUE

Cette valeur est calculée différemment comparée au seuil utilisé pour l'opération avancée de séparation pic/ligne de base de l'intégrateur.

Le rapport pic/vallée est calculé pour les pics séparés par une vallée :

$$PV = \text{hauteur de pic} / \text{hauteur de vallée}$$

S'il y a une vallée à droite et à gauche d'un pic, le rapport pic/vallée est calculé pour le front et la traîne. Avec Intelligent Reporting, le rapport p/v minimum est affiché. Avec Classic Reporting, le rapport *Classic extended performance (Performance classique étendue)* affiche les deux valeurs.



Aptitude du système

Définition des tests de performances

Pour le pic 1 :

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

Pour le pic 2 :

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

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

Pour le pic 3 :

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

où :

PV	Rapport pic/vallée
PV _F	Rapport pic/vallée, front
PV _T	Rapport pic/vallée, traîne
H _{Px}	Hauteur du pic x
H _{Vx}	Hauteur de la vallée x

Si un pic présente plusieurs épaulements séparés par des vallées, le rapport pic/vallée est calculé pour chaque épaulement.

Définition d'une vallée :

- Sa hauteur et son temps sont partagés par deux pics consécutifs.
- Sa ligne de base est partagée par deux pics consécutifs.
- La hauteur absolue de la ligne de base est supérieure à 10⁻⁵.

Définitions de reproductibilité

Dans le cadre de la révision statistique des données analytiques en matière de reproductibilité, la séquence s'apparente à un petit échantillon aléatoire prélevé dans un nombre infini de résultats expérimentaux. Le traitement d'un ensemble complet de résultats requiert une quantité de matériel d'échantillon illimitée, ainsi que du temps. Les données strictement statistiques ne s'appliquent qu'à un jeu ou à une population de données complet et autonome. Dès lors, un tel traitement doit reposer sur le postulat que l'échantillon sélectionné est bien représentatif de toutes les données.

Moyenne de l'échantillon (M)

La valeur moyenne M d'un échantillon aléatoire constitué de N mesures est calculée à partir de cet ensemble limité de N valeurs uniques X_i observées, indexé à l'aide d'un compteur consécutif i sur la base de la formule suivante :

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

où :

N = nombre d'observations discrètes

X_i = valeur des observations discrètes indexées par i

Écart type de l'échantillon (S)

Prenons un échantillon aléatoire de taille N. L'écart-type S de l'échantillon de taille finie sélectionné et extrait de la population globale de données est déterminé par :

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

Deux points différencient l'écart-type d'échantillon S de l'écart-type pour la totalité de la population s :

- à la place de la valeur moyenne réelle, seule la valeur moyenne d'échantillon M est utilisée, et
- la division s'effectue par N-1, au lieu de N.

Écart type relatif RSD (RSD[%]) (USP)

L'écart-type relatif se définit ainsi :

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

Écart type de la moyenne (S)

Prenons M en tant que moyenne d'échantillon et S en tant qu'écart-type de l'échantillon [ou (N-1)]. L'écart-type S_M de la moyenne d'échantillon M est défini par :

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

Prenons un exemple afin d'illustrer notre propos :

Bien que le temps de rétention d'un composé donné puisse parfois s'écarter légèrement de la valeur moyenne calculée au cours d'une séquence, les données émanant d'une autre séquence présentent des écarts bien plus notables, notamment en raison des modifications de la température ambiante ou de la dégradation du matériel de la colonne au cours du temps. Pour déterminer cet écart, l'écart-type de la moyenne d'échantillon S_M est calculé selon la formule ci-dessus.

Écart type (S)

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

Intervalle de confiance IC

L'intervalle de confiance donne des informations à propos du niveau de pertinence de l'estimation d'une valeur moyenne lorsqu'elle est appliquée à l'ensemble de la population et non plus à un échantillon uniquement.

L'intervalle de confiance $100 \times (1 - \alpha) \%$ de la moyenne générale est donné par la formule :

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

où :

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

est le point de pourcentage de la table de distribution t à une probabilité de risque de α .

Pour les statistiques développées dans le cadre du rapport récapitulatif de séquence, il convient d'utiliser un intervalle de confiance de 95 % ($\alpha = 0,05$).

La distribution t (ou "distribution de Student") doit être adoptée pour les petits volumes d'échantillon. Pour les volumes d'échantillon importants, les résultats de la distribution t ou de la distribution normale (gaussienne) ne présentent plus aucune différence. Par conséquent, pour 30 échantillons ou plus, vous pouvez opter pour la distribution normale (il est particulièrement difficile de calculer la distribution t lorsque le nombre d'échantillons est élevé, la distribution normale donne donc la meilleure approximation).

Intervalle de confiance 95 % pour 6 échantillons :

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

$$N = 6$$

La valeur correcte de t doit être dérivée de la table de distribution t pour 5 (N-1) degrés de liberté et pour la valeur $\alpha/2$, soit 0,025. On obtient alors la formule de calcul suivante pour l'IC :

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

Coefficient de corrélation

Un *coefficient de corrélation* est affiché avec le graphique de la courbe d'étalonnage. Le coefficient de corrélation (r) est une mesure de l'ajustement de la courbe d'étalonnage entre les points de données. Pour les courbes d'étalonnage avec une pente positive, la valeur du coefficient est donnée à cinq décimales, dans la plage :

0,00000 à 1,00000

où :

0,00000 = pas d'ajustement

1,00000 = ajustement parfait

REMARQUE

Le coefficient de corrélation n'est pas directement corrélé avec une bonne précision et une bonne exactitude de la méthode analytique. Il doit être principalement utilisé pour établir le meilleur type de courbe.

Pour évaluer un type de courbe, vous devez avoir assez de niveaux d'étalonnage pour obtenir une pertinence statistique suffisante.

Le coefficient de corrélation (r) est calculé à l'aide de l'équation suivante :

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

où

r	Coefficient de corrélation.
wt_i	Pondération du point de données.
\bar{y}	Valeurs moyennes des réponses ou quantités mesurées Si la courbe d'étalonnage est contrainte à passer par l'origine (Origin=Force dans la méthode de traitement), OpenLab ChemStation calcule le coefficient de détermination non centré. Dans ce cas, \bar{y} est omis.
y_i	Réponse mesurée (aire, RapportAire [méthode de l'étalon interne], Hauteur ou RapportHauteur [méthode de l'étalon interne]) ou quantité (Quantité, RapportQuantité [méthode de l'étalon interne]), en fonction du mode d'étalonnage.
\bar{Y}	Valeurs moyennes des réponses ou quantités prévues.
Y_i	Réponse ou quantité prévue (à l'aide de la courbe d'étalonnage).

\bar{y} et \bar{Y} sont les valeurs moyennes des réponses ou quantités mesurées et prévues, calculées comme suit :

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

où

wt_i	Pondération du point de données
\bar{y}	Valeurs moyennes des réponses ou quantités mesurées
y_i	Réponse mesurée (aire, RapportAire [méthode de l'étalon interne], Hauteur ou RapportHauteur [méthode de l'étalon interne]) ou quantité (Quantité, RapportQuantité [méthode de l'étalon interne]), en fonction du mode d'étalonnage

et

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

où

wt_i	Pondération du point de données
\bar{Y}	Valeurs moyennes des réponses ou quantités prévues
Y_i	Réponse ou quantité prévue (à l'aide de la courbe d'étalonnage)

Pour la **Forced Origin**, on suppose que les points sont centrés sur zéro (en miroir par rapport au troisième quadrant) et que les valeurs moyennes sont remplacées par zéro.

Le coefficient de corrélation est de 1 en cas d'ajustement parfait ou lorsque les points sont répartis de manière symétrique autour de la courbe. Il diminue à mesure que la répartition des points d'étalonnage devient asymétrique. Les valeurs types sont comprises entre 0,99 et 1. Le coefficient de corrélation n'est pas une mesure très sensible de la qualité de la courbe.

Accès au nombre en double précision stocké en interne

À des fins de validation, il est parfois nécessaire de recalculer manuellement les résultats de la ChemStation, notamment les courbes d'étalonnage, les coefficients de corrélation et les plateaux théoriques. Lors d'une telle opération, le format de nombre utilisé par la ChemStation doit être respecté.

Pour tous les nombres stockés en interne au sein de la ChemStation, on utilise comme type de données du langage "C" le type DOUBLE. Cela signifie que 14 chiffres significatifs sont enregistrés pour chaque nombre. La mise en œuvre de ce type de données est conforme à la manière dont Microsoft implémente la norme IEEE relative aux types de données du langage "C", ainsi qu'aux règles connexes en matière d'arrondis (pour plus d'informations, reportez-vous aux documents Microsoft Q42980, Q145889 et Q125056).

En raison du nombre illimité de paramètres susceptibles d'être utilisés pour le calcul de la table d'étalonnage, il est impossible de déterminer l'erreur exacte éventuellement introduite par la propagation et l'accumulation des erreurs d'arrondi. Toutefois, des tests poussés à l'aide de différentes constructions de courbes d'étalonnage ont démontré que l'exactitude était garantie jusqu'à 10 chiffres. Alors que la reproductibilité de l'aire, de la hauteur et du temps de rétention d'une analyse chromatographique présentait en général 3 chiffres significatifs, l'application de 10 chiffres significatifs dans le cadre des calculs apparaît tout à fait suffisante. Par conséquent, la table d'étalonnage et les autres tables présentent 10 chiffres significatifs au maximum.

Si des calculs externes (manuels) sont requis au titre de la validation, il est recommandé d'utiliser tous les chiffres exploités dans le cadre des calculs en interne. Le fait d'utiliser des données arrondies et/ou affichées dans le cadre des calculs en externe peut fournir des résultats différents de ceux générés par la ChemStation, en raison des erreurs d'arrondi.

Les paragraphes suivants décrivent la manière d'accéder aux chiffres stockés en interne, qui composent les nombres généralement requis dans les calculs manuels. Dans tous les cas, un fichier de données doit être chargé et faire l'objet d'un rapport adéquat avant toute exécution d'une commande. Toutes les commandes sont saisies au niveau de la ligne de commande de la ChemStation, que vous pouvez activer via le menu Affichage.

Les exemples suivants génèrent un fichier .TXT dans le dossier d'instruments publics (par exemple C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1). Pour

connaître le chemin d'accès réel, utilisez l'entrée de ligne de commande `print _instpath$`. Utilisez d'autres noms de fichiers et de dossiers selon les besoins. Affichez les informations contenues dans ce fichier en utilisant NOTEPAD ou un éditeur de texte approprié.

Données brutes de pic :

- Temps de rétention
- Aire
- Hauteur
- Largeur (intégrateur)
- Symétrie
- Heure de début du pic
- Heure de fin du pic

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

Données de pic traitées :

- Temps de rétention mesuré
- Temps de rétention attendu
- Aire
- Hauteur
- Largeur (intégrateur)
- Symétrie
- Hauteur à mi-hauteur – mi-largeur (Performances et performances étendues)
- Facteur de traîne (Performances et performances étendues)
- Sélectivité (Performances et performances étendues)
- K' (Performances étendues)
- Largeur de pic tangentielle (Performances étendues)
- Obliquité (Performances étendues)
- Plateaux théoriques – Mi-largeur (Performances et performances étendues)
- Plateaux théoriques – Intégration tangentielle (Performances étendues)
- Plateaux théoriques – 5-Sigma (Performances étendues)
- Plateaux théoriques - Statistiques (Performances étendues)

Aptitude du système

Accès au nombre en double précision stocké en interne

- Résolution – Mi-largeur (Performances et performances étendues)
- Résolution – Intégration tangentielle (Performances étendues)
- Résolution – 5-Sigma (Performances étendues)
- Résolution - Statistiques (Performances étendues)

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

Informations traitées relatives au composé :

- Quantité calculée

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

Informations relatives à la table d'étalonnage :

- Nombre de niveaux
- Quantité
- Aire
- Hauteur

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

Informations sur la régression linéaire :

- Intersection Y (ParmCourbe1)
- Pente (ParmCourbe2)
- Coefficient de corrélation

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

6

Calculs propres à l'EC

Tables d'étalonnage	140
Étalonnage standard	140
Étalonnage du poids moléculaire des protéines	141
Étalonnage de la paire de bases d'ADN	141
Focalisation isoélectrique capillaire	142
Étalonnage à l'aide de la correction de mobilité	143
Introduction	143
Calculs de mobilité effective	144
Calculs de mobilité relative	147
Styles de rapport spéciaux pour l'électrophorèse capillaire	149
Surfaces de pic corrigées	150
Aptitude du système pour l'électrophorèse capillaire	151
Facteur de capacité k'	151
EC-DDM	152
Retrait du bruit de fond	152

Ce chapitre ne vous concerne que si vous utilisez le logiciel ChemStation pour contrôler des instruments EC.

Tables d'étalonnage

Quatre types d'étalonnage sont disponibles dans la liste déroulante de votre table d'étalonnage.

Étalonnage standard

L'étalonnage par étalon est basé sur la surface ou la hauteur du pic. Lorsque vous sélectionnez **Standard Calibration**, vous pouvez **Calculate Signals Separately** ou **Calculate with Corrected Areas**.

L'option Calculate Signals Separately (Calculer des signaux séparément) est sélectionnée lorsque vous souhaitez vous assurer que, dans le calcul des rapports %Norm, le pourcentage des signaux rapportés séparément atteint 100 % pour chaque signal. Lorsque l'option **Calculate signals separately** est désélectionnée, le pourcentage de tous les signaux cumulés s'élève à 100 %. La sélection **Calculate signals separately** est un préalable pour trier par signal dans le tableau de calibration.

Sélectionnez **Calculate with Corrected Areas** pour corriger la surface du pic en fonction du temps de migration. Dans ce mode, la surface est divisée par le temps de migration, ce qui peut améliorer la reproductibilité dans l'analyse quantitative lorsque les temps de migration sont instables.

En plus de l'Étalonnage Standard, il y a 3 étalonnages spécifiques des électrophorèses capillaires dont le signal se base sur le temps de migration. Le signal est défini par la description du signal dans la méthode d'étalonnage. Si le fichier des données contient plusieurs signaux, seulement un signal peut être choisi et est extrait du fichier de données. Le format de la table d'étalonnage dépend du type d'étalonnage sélectionné.

Les tâches de quantification peuvent être faites selon un étalonnage d'un biopolymère (Plan Ferguson) pour la Protéine-SDS.

Étalonnage du poids moléculaire des protéines

Protein molecular weight calibration requiert un étalonnage avec des composants de poids moléculaire connu et un pic de référence. L'équation d'étalonnage est la suivante :

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

où :

MW est le poids moléculaire

t_{ref} est le temps de migration du pic de référence

t est le temps de migration

k_0 et k_1 sont les coefficients de l'équation linéaire

La table d'étalonnage contient le nom, le temps de migration, t_{ref}/t (temps de migration relatif), le poids moléculaire et $\log(MW)$ pour chaque composant.

Étalonnage de la paire de bases d'ADN

DNA base-pair calibration est similaire à l'**protein molecular weight calibration**, mais n'utilise pas de pic de référence. Il requiert un étalon avec un nombre connu de paires de bases. L'équation d'étalonnage est la suivante :

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

où :

$\#BP$ est le nombre de paires de bases

t est le temps de migration

k_0 et k_1 sont les coefficients de l'équation linéaire

La table d'étalonnage contient le nom, le temps de migration, $1/t$, le nombre de paires de bases (Base Pairs) et $\log(Base Pairs)$ pour chaque composant.

Focalisation isoélectrique capillaire

Capillary isoelectric focusing calibration (cIEF) requiert un étalon avec des protéines standard de points isoélectriques (pI) connus. L'équation d'étalonnage est la suivante :

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

où :

pI est le point isoélectrique

t est le temps de migration

k_0 et k_1 sont les coefficients de l'équation linéaire

La table d'étalonnage contient le nom, le temps de migration et le point isoélectrique, pI, de chaque composant.

Étalonnage à l'aide de la correction de mobilité

Introduction

De légères modifications de composition du tampon, de viscosité ou de température d'analyse et d'adsorption au niveau de la paroi capillaire peuvent influencer le flux électro-osmotique (EOF) et le rendre instable. Les changements du flux électro-osmotique peuvent créer un écart type assez élevé des temps de migration. Les corrections de mobilité peuvent réduire considérablement l'effet des décalages de temps de migration d'une analyse à l'autre, en surveillant le temps de migration du pic de référence de mobilité, et augmenter ainsi considérablement la reproductibilité du temps de migration.

Le pic de référence de mobilité doit être choisi avec les priorités suivantes :

- Sélectionner le pic avec le signal le plus élevé.
- Sélectionner le pic le plus isolé.
- Le marqueur EOF ou étalon interne peut également faire office de pic de référence de mobilité.
- Agrandir la fenêtre de recherche pour être certain de trouver le pic de référence de mobilité.
- Si plusieurs pics se retrouvent dans la fenêtre de recherche, le pic avec le signal le plus élevé est automatiquement choisi comme pic de référence de mobilité.

Il existe deux types de correction de mobilité :

Effective Mobility Correction

La **Effective Mobility Correction** utilise les mobilités effectives de tous les pics. Les données de rampe de tension et de l'électrophorégramme doivent être disponibles. En outre, travailler avec une correction de mobilité effective permet de déterminer les mobilités effectives réelles de tous les composants d'échantillon.

Relative Mobility Correction

La **Relative Mobility Correction** peut s'effectuer en l'absence de données de tension, ce qui suppose une tension constante pour toutes les mesures.

Calculs de mobilité effective

Outre le pic de référence, les conditions requises pour la correction de la mobilité effective incluent un marqueur neutre qui correspond à la vitesse du flux électro-osmotique (EOF). Voici certains des marqueurs fréquemment utilisés (et leurs longueurs d'onde) :

Tableau 10 Marqueurs EOF fréquemment utilisés

Composé	Longueur d'onde
1-Propanol	210 nm
Acétone	330 nm
Acétonitrile	190 nm
Benzène	280 nm
Guanosine	252 nm
Oxyde de mésityle	253 nm
Méthanol	205 nm
Phénol	218 nm
Pyridine	315 nm
Tétrahydrofurane	212 nm
Uracile	259 nm

Les données de tension en fonction du temps et les dimensions capillaires sont enregistrées avec le fichier de données ou saisies manuellement lors de la configuration de la table d'étalonnage. Le stockage des données de tension pendant l'analyse offre des résultats plus précis. Veillez à stocker également les dimensions capillaires avec la méthode. Pour retraiter les signaux qui ont été acquis sans dimensions de tension des données/capillaires, introduisez le temps de tension et de rampe manuellement dans le groupe "Dimensions Tension et Capillaires" de la boîte de dialogue.

La mobilité effective de chaque composant est déterminée à partir de ces données.

Généralités

La mobilité apparente d'un pic d'échantillon est définie par l'équation suivante :

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

où

l est la longueur effective du capillaire (la distance du point d'injection au point de détection)

L est la longueur totale du capillaire

$V(t)$ est la tension moyenne du temps 0 au temps de migration t du pic

La tension moyenne est calculée à partir de la tension mesurée ou de la rampe de tension spécifiée dans la méthode à l'aide des équations suivantes :

Si $t < t_R$, alors

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

Si $t > t_R$, alors

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

où

t est le temps de migration du pic

t_R est le temps de montée

V est la tension finale

L'équation de mobilité peut être simplifiée à l'aide d'un coefficient :

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

La mobilité apparente ou relative est alors

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

La mobilité réelle ou effective est

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

où

μ_{app} est la mobilité apparente d'un pic

μ_{EOF} est la mobilité apparente d'un marqueur neutre

Les composants d'une vitesse inférieure à celle du flux électro-osmotique (EOF) (généralement des anions) entraînent des valeurs négatives de mobilité effective.

Étalonnage

La mobilité réelle d'un pic échantillon qui est utilisé comme un pic de référence de mobilité dans les mesures ultérieures est calculée en utilisant un temps de migration d'un repère neutre (μ_{EOF}):

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

Les mobilités effectives de tous les pics sont alors calculées et stockées comme mobilités attendues :

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

La table d'étalonnage contient alors le temps de migration mesuré et la mobilité réelle calculée pour chaque composant dans les colonnes correspondant au temps de migration et à la mobilité attendus.

Calcul de la mobilité

La valeur actuelle de μ_{EOF} est calculée en utilisant le Pic de Référence de Mobilité:

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

Le temps de migration attendu pour chaque pic est alors ajusté :

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

Les valeurs calculées sont utilisées pour l'identification des pics et remplacent les valeurs dans la table d'étalonnage.

Réétalonnage

Le temps de migration du pic de référence de mobilité est utilisé pour calculer la valeur actuelle de μ_{EOF} :

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

Le temps de migration attendu pour chaque pic est ajusté :

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

et les mobilités sont mises à jour :

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

Au cours d'une analyse d'étalonnage, les valeurs attendues de temps de migration et les valeurs de mobilité réelle sont mises à jour dans la table d'étalonnage.

Calculs de mobilité relative

La correction du temps de migration basée sur les mobilités relatives peut également être effectuée. Dans ce cas, ni le marqueur EOF, ni la tension, ni les dimensions du capillaire ne sont nécessaires. Le logiciel corrige toujours les décalages de temps de migration, mais n'affiche pas les valeurs de mobilité.

Généralités

Comme pour les calculs de mobilité effective, le coefficient

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

est utilisé dans les calculs de mobilité relative pour décrire les relations entre la mobilité et le temps de migration :

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

La différence réside dans le fait que dans les équations de mobilité relative, k apparaît à la fois en tant que numérateur et dénominateur de la fraction; ce qui signifie que la dimension capillaire peut être supprimée. Le facteur k est calculé comme suit

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

où $V(t)$ est la tension moyenne du temps 0 au temps de migration du pic

Lorsque le paramètre de tension est défini sur **Ignore**, k est une constante et peut être supprimé des équations du temps de migration attendu (voir ci-dessous).

Les équations suivantes décrivent le cas général pour $k = k(t)$, même si le logiciel tient compte de tous les cas lorsqu'il calcule k .

Étalonnage

Un pic de référence de mobilité est identifié et son temps de migration (t_{refcal}) est stocké. Les temps de migration attendus ($t_{expcalN}$) de tous les autres pics sont enregistrés.

Calcul de mobilité

Après détection du pic de référence, le temps de migration attendu de chaque pic est ajusté en fonction du temps de migration réel du pic de référence de mobilité :

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

Le temps de migration du pic de référence de la dernière analyse d'étalonnage est ensuite mis à jour :

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

Styles de rapport spéciaux pour l'électrophorèse capillaire

REMARQUE

Pour les calculs propres à la CE, seule la *Classic ChemStation Reporting* peut être utilisée.

Le style de rapport suivant est spécifique au système de CE ChemStation :

Mobilité CE La **CE Mobility** comprend des résultats quantitatifs sous forme de texte, notamment la mobilité apparente. Pour utiliser ce style de rapport, vous devez fournir les informations concernant le capillaire utilisé avant l'acquisition et la sauvegarde du signal de tension. La mobilité apparente est calculée selon la formule :

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

Où

l est la longueur effective du capillaire (cm)

L est la longueur totale du capillaire (cm)

t est le temps de migration (min)

V est la tension (kV)

Si la correction de la mobilité effective (voir « [Calculs de mobilité effective](#) », page 144) est activée, la colonne indiquant le type de pic dans les rapports simples (par exemple les rapports standard externes) est remplacée par une colonne de mobilité. Le rapport de mobilité de CE imprime les mobilités effectives et non apparentes.

Surfaces de pic corrigées

ChemStation Agilent pour systèmes EC permet d'utiliser des surfaces de pic corrigées à la place des calculs de surface standard. Ces surfaces sont utilisées dans l'étalonnage par étalon et les rapports.

Pour activer cette fonction, sélectionnez **Calculate with Corrected Areas** pour corriger la surface du pic en fonction du temps de migration. Dans ce mode, la surface est divisée par le temps de migration, ce qui peut améliorer la reproductibilité dans l'analyse quantitative lorsque les temps de migration sont instables.

La surface corrigée est calculée selon la formule suivante :

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

Où

A_c est la surface de pic corrigée (mUA)

A est la surface du pic (mUA·s)

t est le temps de migration (min)

Cette surface corrigée est parfois également appelée « surface normalisée ».

Aptitude du système pour l'électrophorèse capillaire

Facteur de capacité k'

En électrophorèse capillaire, la valeur k' du facteur de capacité ne peut pas être calculée automatiquement pour tous les modes de fonctionnement. Reportez-vous au manuel *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer* (Introduction à l'électrophorèse capillaire haute performance) pour consulter les formules respectives. Les valeurs répertoriées dans les rapports sont valides uniquement pour la ChemStation Agilent pour systèmes CPL 3D, car la ChemStation Agilent pour systèmes EC utilise les mêmes algorithmes.

EC-DDM

Retrait du bruit de fond

Quand vous sélectionnez l'élément de menu **Subtract Background** (BSB), le dernier spectre de masse sélectionné est soustrait de chaque point de l'électrophorétogramme actuel. Les données résultantes sont enregistrées dans le même répertoire et avec le même nom que le fichier de données d'origine ; cependant, l'extension du fichier devient .BSB.

Le nouveau fichier de données devient le fichier de données actuel et l'électrophorétogramme avec soustraction de bruit de fond s'affiche. Un enregistrement du nombre de soustractions du bruit de fond effectuées est conservé dans l'élément Opérateur de l'en-tête du fichier de données.

Si vous visualisez une liste des données BSB sous forme de tableau, vous pouvez observer des différences dues à la précision de la représentation des données.

REMARQUE

Les fichiers texte AIDE dans le LC/MS concernent uniquement les paramètres LC et non EC. Certaines fonctions disponibles dans le logiciel LC/MS ne sont pas disponibles ou applicables aux applications CE/MS mais sont utilisées dans le LC. La fonction **peak matching** ne s'applique pas aux CE-MS et est donc inactive. Dans CE-MS, UV et MS, la détection a lieu à différentes longueurs effectives du capillaire de séparation. L'identification des pics est impossible en raison de la résolution différente à différentes longueurs effectives.

7

Vérification du système

Vues Verification (Vérification) et Diagnosis (Diagnostic) 154

Vérification du système 154

Registre GLPsave 157

Fonction de test DAD 159

Fonction Examen du test DAD 159

Ce chapitre décrit la fonction de vérification et les fonctionnalités GLP de la ChemStation.

Vues Verification (Vérification) et Diagnosis (Diagnostic)

Si l'instrument configuré est compatible, ChemStation propose deux vues supplémentaires afin de réaliser des opérations de vérification et de diagnostic des instruments. Pour plus d'informations, reportez-vous à l'aide en ligne.

Vérification du système

La vérification du système est essentielle dans le cadre de l'utilisation de routine d'un instrument analytique au sein d'un laboratoire réglementé. Les fonctionnalités de vérification des BPL de ChemStation sont conçues pour vous aider à démontrer que le logiciel, ou un composant particulier du logiciel, fonctionne correctement, ou du moins qu'il fonctionnait correctement au moment d'une analyse donnée.

La fonction de vérification de ChemStation vous permet de vérifier le fonctionnement correct du logiciel ChemStation. Pour ce faire, vous pouvez retraiter les fichiers de données selon des méthodes spécifiques avant de comparer les résultats avec une norme prédéfinie. La fonction de vérification revêt un intérêt tout particulier lorsqu'il s'agit de faire la preuve de l'intégrité des résultats d'intégration et de quantification.

Le test de vérification standard est à votre disposition mais vous êtes libre de créer vos propres tests à partir de vos méthodes et fichiers de données, afin de vérifier les combinaisons logicielles algorithmiques utilisées par vos méthodes d'analyse. Le test de vérification est un fichier protégé. Il est donc impossible de le modifier ou de le supprimer.

L'élément Verification (Vérification) de la vue Data Analysis (Analyse de données) permet de sélectionner les options suivantes :

- Lancer un test de vérification dans la base de données.
- Définir un nouveau test de vérification et l'ajouter à la base de données.
- Supprimer un test de vérification de la base de données.

La section des procédures du système d'aide en ligne décrit la procédure à suivre pour réaliser ces tâches. Dans le cadre d'un test de vérification de ChemStation, vous pouvez exécuter le test dans son intégralité ou sélectionner certaines opérations uniquement.

Vérification du système

Vues Verification (Vérification) et Diagnosis (Diagnostic)

Les résultats du test de vérification sont enregistrés au format binaire dans le sous-répertoire par défaut : C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Verify, avec la méthode et les fichiers de données. Le sous-répertoire Verify se trouve au même niveau que les sous-répertoires de la séquence, des méthodes et des données. Vous pouvez envoyer les résultats à une imprimante ou dans un fichier. Le test, qui inclut les résultats de plusieurs tests de vérification combinés, est rapporté comme « réussi » ou « échec ».

Les composants de test de vérification suivants sont disponibles :

Électronique numérique (détecteur à barrette de diodes Agilent série 1100/1200 seulement)

Un chromatogramme de test est stocké dans le détecteur à barrette de diodes. Ce chromatogramme est envoyé à ChemStation une fois que les étapes de prétraitement préalables normales pour les données brutes provenant des photodiodes lui ont été appliquées. Les données résultantes sont ensuite comparées aux résultats d'origine stockés dans ChemStation pour ce chromatogramme de test. Le test échoue si des différences sont détectées. Ce test permet de garantir que les composants électroniques du détecteur à barrette de diodes qui assurent le prétraitement des données fonctionnent toujours parfaitement. Étant donné qu'un chromatogramme de test enregistré est utilisé, la lampe ou la barrette de diodes n'est pas concernée par ce test. Pour les vérifier, utilisez la « [Fonction de test DAD](#) », page 159.

Intégration des pics

Le fichier de données est intégré de nouveau conformément à la méthode d'origine. Les résultats sont comparés aux résultats d'intégration d'origine stockés dans le registre de vérification. Le test échoue si des différences sont détectées.

Quantification de composés

Les composés indiqués dans le fichier de données sont de nouveau quantifiés. Les résultats sont comparés aux résultats de quantification d'origine stockés dans le registre de vérification. Le test échoue si des différences sont détectées.

Impression du rapport

Le rapport d'origine est de nouveau imprimé.

La page suivante présente un exemple de test de vérification réussi.

```
=====
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
```

Registre GLPsave

Le registre GLPsave est enregistré au terme de chaque analyse lorsque cette option est sélectionnée sur la liste de vérification de l'exécution. Il contient les informations suivantes :

- les signaux,
- le journal,
- la table des résultats d'intégration,
- la table des résultats de quantification,
- les données de performance de l'instrument,
- la méthode d'analyse des données.

Ce registre est protégé dans son intégralité et généré lors de l'analyse. Vous pouvez le récupérer à tout moment pour servir de preuve quant aux méthodes analytiques utilisées.

L'option de registre GLPsave de la vue Data Analysis (Analyse de données) vous permet de consulter à tout moment le fichier de registre GLPsave. Ce fichier est protégé par un total de contrôle et il est crypté en code binaire afin d'empêcher toute modification.

Dans la boîte de dialogue utilisée pour sélectionner le registre GLPsave à consulter, vous pouvez sélectionner les options de révision suivantes :

- charger la méthode d'origine,
- charger les signaux d'origine,
- charger les données de performance d'instrument,
- imprimer la méthode d'origine,
- imprimer les résultats d'intégration d'origine,
- imprimer les résultats de quantification d'origine,
- générer un rapport initial à partir des signaux et de la méthode d'origine.

Vous pouvez utiliser la fonctionnalité de révision des BPL pour prouver que les données chromatographiques sont les données d'origine, pour démontrer la qualité de l'analyse à partir des données de performance de l'instrument et pour attester de l'authenticité de l'interprétation des données.

Par exemple, vous pouvez :

- recharger et réimprimer l'analyse des données utilisée dans la méthode au moment de l'analyse d'échantillon afin de prouver que l'évaluation des données présentées dans les résultats de l'analyse n'a pas été modifiée,
- passer en revue, sans les recalculer, les résultats d'intégration et de quantification afin d'attester de l'authenticité du rapport.

Fonction de test DAD

Les tests de détecteur peuvent s'inscrire dans le cadre de la validation de système de routine d'un instrument analytique dans un laboratoire réglementé.

Le test DAD vérifie les performances du détecteur à barrette de diodes. Ce test, disponible dans le menu Instrument (uniquement pour les unités CPL 3D et EC), vérifie l'étalonnage de longueur d'onde et d'intensité de l'instrument. Lorsque vous cliquez sur Save (Enregistrer), les résultats du test sont automatiquement enregistrés dans la base de données DADTest et un fichier de registre appelé DADTest.Reg est stocké dans le répertoire d'instrument par défaut.

Fonction Examen du test DAD

L'option **Review DAD Test** figurant dans le menu Vue de l'analyse de données permet de consulter à tout moment le fichier DADTest.Reg. Ce fichier est protégé par une somme de contrôle et est crypté en code binaire afin d'empêcher toute modification.

Vous pouvez examiner les parties suivantes du test DAD :

- | | |
|-------------------------------|---|
| Show Holmium Spectra | Trace tous les spectres d'holmium répertoriés dans la table d'examen du test DAD. Le spectre actif est désigné par une balise. |
| Show Intensity Spectra | Trace tous les spectres d'intensité répertoriés dans la table d'examen du test DAD. Le spectre actif est désigné par une balise. |
| Save as New Database | Si vous changez la lampe du DAD, vous pouvez réinitialiser la base de données DADTest en supprimant les résultats de test indésirables de la table avant d'utiliser cette fonction. |
| Show Selected Spectra | Affiche uniquement les spectres sélectionnés dans la table. |
| Show Intensity Graph | Vous pouvez tracer un graphique d'intensité afin d'obtenir une indication de la durée de vie de la lampe du détecteur à barrette de diodes. Ce graphique trace l'intensité maximale de la lampe en fonction du temps. |

Glossaire d'IU

A

Advanced

Avancé

all valleys

toutes les vallées

Amount per response

Quantité par réponse

Apply Manual Events from Method

Appliquer les événements manuels de la méthode

Area Percent reject

Aire de rejet (%)

Area reject

Aire de rejet

Area Reject

Aire de rejet

Area Sum

Sommation d'aires

Area sum off

Somme des aires - Inactif

Area sum on

Somme des aires - Actif

Area Sum Slice

Section de sommation d'aires

Area%

% aire

Autointegrate

Intégration automatique

Average

Moyenne

B

Baseline at valleys

Ligne de base de vallées

Baseline backwards

Ligne de base arrière

baseline point

point de ligne de base

Batch

Lot

C

Calculate signals separately

Calculer des signaux séparément

Calculate Signals Separately

calculer des signaux séparément

Calculate with Corrected Areas

les calculer avec des surfaces corrigées

Calibration Settings

Paramètres d'étalonnage

Capillary isoelectric focusing calibration

étalonnage de la focalisation isoélectrique capillaire

CE Mobility

Mobilité de CE

Classical

Classique

Clear

Effacer

Compound Details

Caractéristiques de composé

D

Data Analysis

Analyse des données

Delete Peak(s)

Supprimer le(s) pic(s)

detector response

réponse du détecteur

DNA base-pair calibration

étalonnage de paire de bases d'ADN

Draw Baseline

Tracer la ligne de base

E

Effective Mobility Correction

Correction de mobilité effective

End

Fin

Exponential

Exponentielle

Extended Performance

Performances étendues

F

Floating Average

Moyenne flottante

Force

Forcer

Forced Origin

origine forcée

Front skim height ratio

Rapport de hauteur d'approximation de front

Front Skim Height Ratio

rapport de hauteur d'approximation de front

H

height reject

hauteur de rejet

Height reject

Hauteur de rejet

Height Reject

Hauteur de rejet

Height%

% hauteur

Glossaire d'IU

I

Ignore

Ignorer

Integration

intégration

integration events

événements d'intégration

Integration Events Table

Table des événements d'intégration

L

Left

Gauche

M

Manual Events

Événements manuels

Manual Factor

Facteur manuel

Manual Integration

intégration manuelle

N

Navigation Table

Table de navigation

Negative peak

Pic négatif

Negative Peaks

Pics négatifs

Negative Peaks On

Pics négatifs - Actif

New Exponential

Nouvelle exponentielle

No penetration

Sans pénétration

No penetrations

Sans pénétrations

Norm%

% normalisé

O

Off

Inactif

On

Actif

Origin

Origine

P

p/v ratio

rapport p/v

peak matching

identification des pics

peak width

largeur de pic

Peak Width

Largeur de pic

Performance

Performances

Performance+LibSearch

Performances + LibSearch

Performance+Noise

Performances + Bruit

protein molecular weight calibration

étalonnage du poids moléculaire des protéines

Protein molecular weight calibration

étalonnage du poids moléculaire des protéines

Q

Quantification Parameters

Paramètres Quantification

Quantitation Settings

Paramètres de quantification

R

Range 1

Plage 1

Range 9

Plage 9

Recalibration Settings

Paramètres de réétalonnage

Relative Mobility Correction

Correction de mobilité relative

Remove Manual Events from Method

Supprimer les événements manuels de la méthode

Replace

Remplacement

Response per amount

Réponse par quantité

Review DAD Test

Examen du test DAD

Right

Droite

S

Sample Information

Informations d'échantillon

Save as New Database

Enregistrer en tant que nouvelle base de données

Sequence Table

Table de séquence

Set Baseline from Range

Définir la ligne de base à partir de la plage

Set Low Baseline from Range

Définir la ligne de base basse à partir de la plage

Glossaire d'IU

Shoulders

Épaulements

Show Holmium Spectra

Afficher les spectres d'holmium

Show Intensity Graph

Afficher le graphique d'intensité

Show Intensity Spectra

Afficher les spectres d'intensité

Show Selected Spectra

Afficher les spectres sélectionnés

Signal to noise

Signal sur bruit

Skim valley ratio

Rapport hauteur/vallée pour approximation

Skim Valley Ratio

rapport pic/vallée d'approximation

Slope Sensitivity

Sensibilité de pente

Specify Report

Spécifier le rapport

Split Peak

Division des pics

Standard Calibration

Étalonnage par étalon

Start

Démarrer

Start-negA.

Démarrer-négA.

Straight

Linéaire

Subtract Background

Soustraire le bruit de fond

T

Tail skim height ratio

Rapport de hauteur d'approximation de la traîne

Tail Skim Height Ratio

rapport de hauteur d'approximation de la traîne

Tangent Skim

Approximation tangentielle

U

Update Manual Events of Method

Mettre à jour les événements manuels de la méthode

Update peak height

Mis à jour de hauteur de pic

Use baseline from range

Utiliser la ligne de base de la plage

Use Baseline from Range

Utiliser la ligne de base de la plage

UseQualifiers

UtiliserQualificatifs

Using Compound

Composé utilisé

V

Valley

Vallée

W

With Rsp Factor

Avec facteur de réponse

Contenu de ce manuel

Ce guide contient des informations de référence concernant les principes de fonctionnement, les calculs et algorithmes de traitement de données utilisés dans OpenLab ChemStation Agilent.

Les professionnels de la validation pourront s'appuyer sur les informations fournies pour planifier et réaliser les tâches de validation du système.

www.agilent.com

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

N° de document : D0013749fr Rév. A.1

