



OpenLab ChemStation

## Manuale di riferimento per l'analisi dei dati

# Informazioni legali

## Documento informativo

Doc. N.: D0013749it Rev. A.1  
Edizione: 02/2025

## Copyright

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2025

Nessuna parte di questo manuale può essere riprodotta in alcun formato o con alcun mezzo (inclusa l'archiviazione e la scansione elettronica o la traduzione in una lingua straniera) senza previo consenso scritto di Agilent Technologies, Inc. secondo le disposizioni di legge sul diritto d'autore degli Stati Uniti, internazionali e locali applicabili.

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

## Versione software

Questo manuale è valido per la versione LTS 01.11 di Agilent OpenLab ChemStation.

## Garanzia

Le informazioni contenute in questo documento sono fornite allo stato corrente e sono soggette a modifiche senza preavviso nelle edizioni future. Agilent non rilascia alcuna altra garanzia, esplicita o implicita, comprese le garanzie implicite di commerciabilità ed idoneità ad uno uso specifico, relativamente al presente manuale e alle informazioni in esso contenute. Salvo il caso di dolo o colpa grave, Agilent non sarà responsabile di errori o danni diretti o indiretti relativi alla fornitura o all'uso di questo documento o delle informazioni in esso contenute. In caso di separato accordo scritto tra Agilent e l'utente con diverse condizioni di garanzia relativamente al contenuto di questo documento in conflitto con le condizioni qui riportate prevarranno le condizioni dell'accordo separato.

## Licenze tecnologiche

I componenti hardware e o software descritti in questo documento vengono forniti con licenza e possono essere utilizzati o copiati solo in conformità ai termini di tale licenza.

## Legenda della limitazione dei diritti

Limitazione dei diritti del governo USA. I diritti relativi a software e dati tecnici concessi al governo federale includono esclusivamente i diritti comunemente forniti ai clienti finali. Agilent fornisce questa consueta licenza commerciale su software e dati tecnici ai sensi di FAR 12.211 (Dati tecnici) e 12.212 (Software per computer) e, per il Dipartimento della Difesa, DFARS 252.227-7015 (Dati tecnici - articoli commerciali) e DFARS 227.7202-3 (Diritti su software per computer commerciali o documentazione per software per computer).

## Indicazioni di sicurezza

### AVVERTENZA

L'indicazione **ATTENZIONE** segnala un rischio serio. Richiama l'attenzione su una procedura operativa o analoga operazione che, se non eseguita correttamente o non rispettata, può provocare lesioni personali o morte. Non eseguite mai alcuna operazione ignorando l'indicazione **ATTENZIONE**, fatelo solo dopo aver compreso e adottato completamente le indicazioni di Agilent.

### ATTENZIONE

L'indicazione **AVVERTENZA** segnala un rischio. Richiama l'attenzione su una procedura operativa o analoga operazione che, se non eseguita correttamente o non rispettata, può provocare danni al prodotto o la perdita di dati importanti. Non eseguite mai alcuna operazione ignorando l'**AVVERTENZA**, fatelo solo dopo aver compreso e adottato completamente le indicazioni di Agilent.

## In questo manuale...

Questo manuale è destinato a utenti avanzati, amministratori di sistema e responsabili della validazione di Agilent OpenLab ChemStation. Contiene informazioni di riferimento sui principi di funzionamento, sui calcoli e sugli algoritmi di analisi dei dati utilizzati nella versione LTS 01.11 di OpenLab ChemStation.

Utilizzare questo manuale per verificare la funzionalità del sistema rispetto agli specifici requisiti dell'utente e per definire ed eseguire le attività di validazione del sistema definite nel proprio piano di validazione. Le seguenti risorse contengono ulteriori informazioni.

- Per i tutorial introduttivi: vedere i moduli di apprendimento accessibili tramite la piattaforma formativa e di risorse per gli utenti di OpenLab ChemStation.
- Per informazioni pratiche su come eseguire attività specifiche per contesto, riferimenti all'interfaccia utente e guida alla risoluzione dei problemi: la guida in linea di ChemStation.
- Per i concetti e flussi di lavoro di OpenLab ChemStation: il manuale OpenLab ChemStation Concetti e flussi di lavoro.
- Per dettagli sull'installazione del sistema e sulla preparazione del sito: rispettivamente OpenLab ChemStation Workstation Installation Guide o OpenLab ChemStation Networked Workstations and Distributed System Installation Guide.
- Per dettagli sui principi e sulle attività di amministrazione del sistema: OpenLab ChemStation Workstation Administrator's Guide.

Nel seguito il termine ChemStation si riferisce ad Agilent OpenLab ChemStation Edition.

### 1 Integrazione

Questo capitolo descrive i concetti e gli algoritmi dell'integratore della ChemStation.

### 2 Identificazione dei picchi

Questo capitolo descrive i concetti relativi all'identificazione dei picchi.

### **3 Calibrazione**

Questo capitolo contiene informazioni dettagliate sui calcoli utilizzati nella procedura di calibrazione.

### **4 Quantificazione**

Questo capitolo descrive la quantificazione dei composti e spiega i calcoli utilizzati nella quantificazione.

### **5 Idoneità del sistema**

Questo capitolo descrive le operazioni che OpenLab CDS può eseguire per valutare le prestazioni sia dello strumento analitico che del metodo analitico.

### **6 Calcoli specifici per CE**

Questo capitolo è pertinente solo se si utilizza ChemStation per controllare gli strumenti CE.

### **7 Verifica del sistema**

Questo capitolo descrive la funzione di verifica e le funzioni di verifica GLP della ChemStation.

# Sommario

## 1 Integrazione 7

- Che cos'è l'integrazione? 8
- Gli algoritmi dell'integratore della ChemStation 10
- Principio di funzionamento 15
- Riconoscimento dei picchi 16
- Misurazione dell'area del picco 26
- Collocazione della linea di base 29
- Eventi di integrazione 41
- Integrazione manuale 62

## 2 Identificazione dei picchi 65

- Che cos'è l'identificazione dei picchi? 66
- Regole di corrispondenza dei picchi 67
- Tipi di identificazione dei picchi 68
- Tempo di ritenzione/migrazione assoluto 69
- Tempi di ritenzione/migrazione corretti 71
- Qualificatori dei picchi 73
- Il procedimento di identificazione 75

## 3 Calibrazione 77

- Che cos'è la calibrazione? 78
- Curva di calibrazione 79
- Calcolo della curva di calibrazione 80
- Calibrazione di gruppo 84
- Opzioni di ricalibrazione 85

## 4 Quantificazione 86

- Che cos'è la quantificazione? 87
- Fattori di correzione 88
- Area % e altezza % 90

Quantificazione di composti calibrati	91
Quantificazione di picchi non calibrati	97
Calcolo con il procedimento della normalizzazione %	99

## **5 Idoneità del sistema 100**

Valutazione delle prestazioni dei picchi	101
Valutazione della system suitability	101
Determinazione del rumore di fondo	104
Calcolo dell'asimmetria e della simmetria dei picchi	115
Formule e calcoli di idoneità del sistema	117
Definizioni generali	118
Definizioni di test sulle prestazioni	119
Definizioni per la riproducibilità	131
Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente	136

## **6 Calcoli specifici per CE 139**

Tavole di calibrazione	140
Calibrazione mediante correzione della mobilità	143
Stili di rapporto speciali per elettroforesi capillare	149
Aree del picco corrette	150
Applicabilità del sistema per elettroforesi capillare	151
CE-MSD	152

## **7 Verifica del sistema 153**

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi)	154
Il registro GLPsave	157
Funzione test DAD	159

# 1

## Integrazione

Che cos'è l'integrazione?	8
Che cosa fa l'integrazione?	8
Capacità dell'integratore	9
Gli algoritmi dell'integratore della ChemStation	10
Panoramica	10
Definizione della linea di base iniziale	11
Monitoraggio della linea di base	12
Collocazione della linea di base	13
Definizione dei termini	14
Principio di funzionamento	15
Riconoscimento dei picchi	16
Larghezza del picco	16
Filtri di riconoscimento dei picchi	17
Raggruppamento	18
Algoritmo di riconoscimento del picco	19
Picchi fusi	21
Spalle	22
Costruzione della linea di base predefinita	23
Codici di separazione tra i picchi	24
Misurazione dell'area del picco	26
Determinazione dell'area	26
Unità e fattori di conversione	28
Collocazione della linea di base	29
Inizio della linea di base	29
Fine della linea di base	29
Modalità di correzione della linea di base	30
Rapporto picco-valle	32
Tangente di interpolazione	33
Eventi di integrazione	41
Eventi di integrazione per tutti i segnali	41
Eventi iniziali	44
Eventi programmati	49
Autointegrazione	60
Integrazione manuale	62
Salvataggio degli eventi di integrazione manuale	63

Questo capitolo descrive i concetti e gli algoritmi dell'integratore della ChemStation.

## Che cos'è l'integrazione?

L'integrazione localizza i picchi in un segnale e calcola le loro dimensioni.

L'integrazione è necessaria per:

- identificazione
- qualificazione
- calibrazione
- quantificazione
- calcolo della purezza dei picchi
- ricerca nella libreria di spettri.

## Che cosa fa l'integrazione?

Quando un segnale viene integrato, il software:

- identifica un inizio e una fine di ogni picco
- trova l'apice di ogni picco, ossia il tempo di ritenzione/migrazione
- costruisce una linea di base
- calcola l'area, l'altezza, l'ampiezza del picco e la simmetria di ciascun picco

Questo processo è controllato da parametri chiamati eventi di integrazione.

## Capacità dell'integratore

Gli algoritmi di integrazione includono le seguenti capacità:

- autointegrazione, per impostare i parametri di integrazione iniziali
- capacità di definire tavole personali degli eventi per ogni segnale cromatografico/elettroferografico, in presenza di segnali multipli o di più rivelatori
- definizione interattiva degli eventi di integrazione che consenta agli utilizzatori di selezionare graficamente i tempi
- integrazione grafica manuale di cromatogrammi o elettroferogrammi che richiedono l'interpretazione umana (gli eventi possono anche essere registrati nel metodo ed utilizzati come parte delle operazioni automatizzate)
- annotazione dei risultati dell'integrazione
- definizione dei parametri dell'integratore per impostare o modificare le impostazioni di base per scarto di area o altezza, ampiezza dei picchi, sensibilità del flesso, rilevazione della spalla, correzione della linea di base e rilevazione della tangente di interpolazione anteriore/posteriore
- parametri di controllo della linea di base, come hold baseline, force baseline, baseline at all valleys, baseline at next valley ecc.
- controllo della sommatoria delle aree
- riconoscimento di picchi negativi
- rilevazione e definizione del picco del solvente
- comandi di controllo dell'integratore che definiscano gli intervalli dei tempi di ritenzione/migrazione per il funzionamento dell'integratore
- collocazione delle spalle dei picchi utilizzando la derivata seconda
- miglioramento del campionamento di punti di dati non equidistanti per ottenere migliori prestazioni con file di dati DAD LC ricostruiti da spettri DAD

## Gli algoritmi dell'integratore della ChemStation

### Panoramica

Per integrare un cromatogramma/elettroferogramma l'integratore:

- 1 definisce la linea di base iniziale
- 2 controlla continuamente ed aggiorna la linea di base
- 3 identifica il tempo di inizio di un picco
- 4 trova l'apice di ogni picco
- 5 identifica il tempo di fine del picco
- 6 costruisce una linea di base
- 7 calcola l'area, l'altezza e l'ampiezza di ciascun picco.

Questo processo è controllato da **integration events**. Gli eventi più importanti sono la sensibilità iniziale della pendenza, l'ampiezza del picco, la correzione della linea di base, lo scarto di area e lo scarto dell'altezza. Il software consente di impostare valori iniziali per questi ed altri eventi. I valori iniziali hanno effetto all'inizio del cromatogramma. Inoltre, la funzione di integrazione automatica fornisce un set di eventi iniziali che possono essere ottimizzati in una fase successiva.

Benché nella maggior parte dei casi, gli eventi iniziali forniscano buoni risultati di integrazione per l'intero cromatogramma, è talvolta necessario un maggiore controllo sul processo di integrazione.

Il software consente di controllare come viene eseguita l'integrazione e di programmare nuovi eventi di integrazione in momenti appropriati del cromatogramma.

Per ulteriori informazioni, consultare la sezione "Eventi iniziali", pagina 44

## Definizione della linea di base iniziale

### Punti cardinali

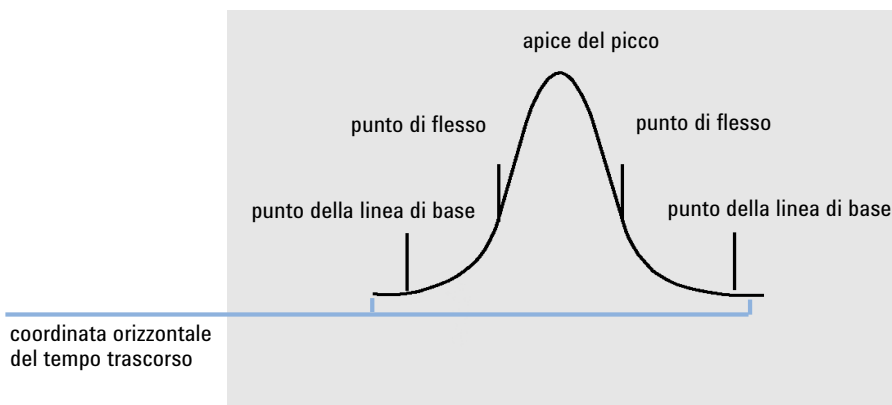


Figura 1 Punti cardinali

### Definizione della linea di base iniziale

Poiché le condizioni della linea di base variano in funzione dell'applicazione e dell'hardware del rivelatore, l'integratore utilizza parametri provenienti sia dagli eventi di integrazione che dal file di dati per ottimizzare la linea di base.

Prima che l'integratore possa integrare i picchi, deve stabilire un **baseline point**. Quando inizia l'analisi, l'integratore stabilisce un livello iniziale della linea di base considerando il primo punto di dati come un punto della linea di base potenziale. Quindi, tenta di ridefinire il punto iniziale basandosi sulla media del segnale di input. Se l'integratore non ottiene un punto iniziale della linea di base ridefinito, mantiene il primo punto di dati come punto potenziale di inizio della linea di base.

### Identificazione dei punti cardinali di un picco

L'integratore stabilisce che un picco potrebbe iniziare quando potenziali punti della linea di base si trovano al di fuori della stessa e la curvatura della linea di base supera un determinato valore, come stabilito dal parametro di sensibilità della pendenza dell'integratore. Se queste condizioni persistono, l'integratore decide che il punto si trova sulla curva ascendente e quindi il picco viene elaborato.

Inizio

- 1 Pendenza e curvatura nei limiti: continuare il controllo della linea di base.
- 2 Pendenza e curvatura al di sopra dei limiti: possibilità di un picco.
- 3 La pendenza rimane al di sopra dei limiti: picco riconosciuto, punto di inizio del picco definito.
- 4 La curvatura diventa negativa: punto di flesso anteriore definito.

Apice

- 1 La pendenza passa dallo zero e diventa negativa: apice del picco, apice del picco definito.
- 2 La curvatura diventa positiva: punto di flesso posteriore definito.

Fine

- 1 Pendenza e curvatura nei limiti: ci si trova in prossimità della fine del picco.
- 2 La pendenza e la curvatura rimangono nei limiti: fine del picco definita.
- 3 L'integratore ritorna alla modalità di monitoraggio della linea di base.

## Monitoraggio della linea di base

L'integratore campiona i dati digitali, nel corso dell'analisi, ad una percentuale determinata dal valore iniziale di ampiezza del picco o da quello calcolato. Ogni punto di dati viene considerato come potenziale punto della linea di base.

L'integratore determina un *inviluppo della linea di base* dalla pendenza della linea di base utilizzando un algoritmo di monitoraggio dove la pendenza è determinata con la derivata prima e la curvatura con la derivata seconda. L'inviluppo della linea di base può essere visualizzato come cono, con il suo vertice sul punto di dati corrente. I livelli di accettazione superiore e inferiore del cono sono:

- + ascendente + curvatura + linea di base la cui inclinazione deve essere inferiore al livello di soglia,
- - discendente - curvatura + linea di base la cui inclinazione deve essere più positiva (ovvero, meno negativa) del livello di soglia.

Non appena i nuovi punti di dati vengono accettati, il cono si muove in avanti fino a che non si verifica un'interruzione.

Per essere accettato come punto della linea di base, un punto di dati deve soddisfare le seguenti condizioni:

- deve trovarsi all'interno dell'involuppo della linea di base definito;
- la curvatura della linea di base al punto di dati (determinata da filtri in derivata) deve trovarsi al di sotto di un valore critico, determinato dall'impostazione corrente della sensibilità della pendenza.

Il punto della linea di base, stabilito all'inizio dell'analisi, viene continuamente reimpostato con una frequenza determinata dall'ampiezza del picco, come media variabile dei punti di dati che rientrano nell'involuppo della linea di base per un periodo determinato dall'ampiezza del picco. L'integratore rintraccia e reimposta periodicamente la linea di base per compensare la deriva, fino a che non viene rivelato un picco in pendenza ascendente.

## Collocazione della linea di base

L'integratore colloca la linea di base cromatografica/elettroferografica durante l'analisi, a una frequenza determinata dal valore dell'ampiezza del picco. Quando l'integratore ha campionato un certo numero di punti di dati, reimposta la linea di base dal punto iniziale a quello corrente. L'integratore riprende a controllare la linea di base sul set successivo di punti di dati e reimposta la linea di base. Il processo continua fino a che l'integratore non identifica l'inizio di un picco.

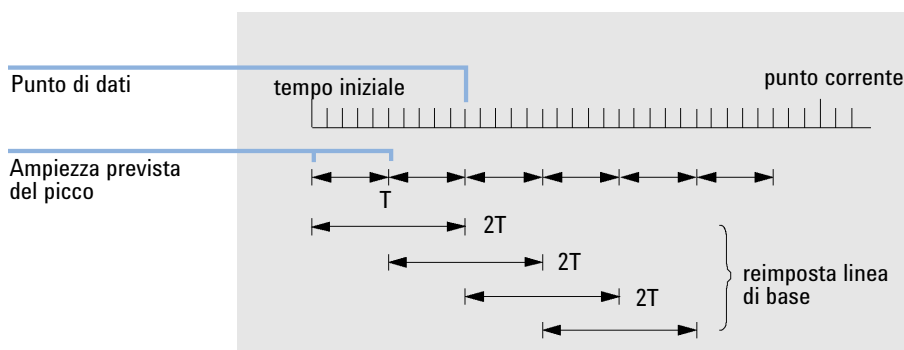


Figura 2 Linea di base

All'avvio dell'esecuzione viene usato il primo punto di dati. Questo punto della linea di base viene periodicamente reimpostato in base alla formula seguente:

Le aree vengono sommate per il tempo  $T$  (ampiezza picco prevista). Questo tempo non può mai essere inferiore a un punto di dati. L'operazione continua finché esistono le condizioni della linea di base. Vengono prese in considerazione

sia la pendenza che la curvatura. Se entrambe sono inferiori alla soglia, vengono sommate due aree e confrontate con la linea di base precedente. Se il nuovo valore è inferiore alla linea di base precedente, tale valore sostituisce immediatamente quello esistente. Se il nuovo valore è maggiore del precedente, tale valore viene archiviato come possibile nuovo valore per la linea di base e viene confermato se un ulteriore valore soddisfa i criteri di piattezza di pendenza e curvatura. Se sono consentiti picchi negativi, questa ultima limitazione non viene applicata. Durante il calcolo della linea di base, deve essere eseguito un controllo per l'esame di solventi a incremento veloce. L'incremento potrebbe essere troppo veloce per il rilevamento della pendenza ascendente. Al momento della conferma della pendenza ascendente, il criterio del solvente potrebbe non essere più valido. La linea di base passa per il primo punto di dati al tempo 1. Se il segnale è sulla base, viene sostituito dalla media 2 T. La linea di base viene quindi reimpostata ogni T (vedere la [Figura 2](#), pagina 13).

## Definizione dei termini

### **Picco di solvente**

Il picco di solvente, che è generalmente un picco molto grande di nessuna importanza analitica, normalmente non viene integrato. Tuttavia, quando picchi di piccole dimensioni ma di interesse per l'analisi eluiscono vicino al picco di solvente, ad esempio sulla coda, possono essere impostate condizioni di integrazione speciali per calcolare le aree corrette del contributo della coda del picco di solvente.

### **Spalla (anteriore, posteriore)**

Le spalle si verificano quando due picchi eluiscono in tempi talmente ravvicinati che non esiste avvallamento fra loro e rimangono non risolti. Le spalle possono prodursi sul bordo anteriore del picco o su quello posteriore. Quando si rilevano spalle, esse possono essere integrate utilizzando tangenti di interpolazione o perpendicolari.

### **Pendenza**

La pendenza di un picco, che denota la modifica della concentrazione di un composto rispetto al tempo, viene utilizzata per determinare la comparsa di un picco, il suo apice e la sua fine.

## Principio di funzionamento

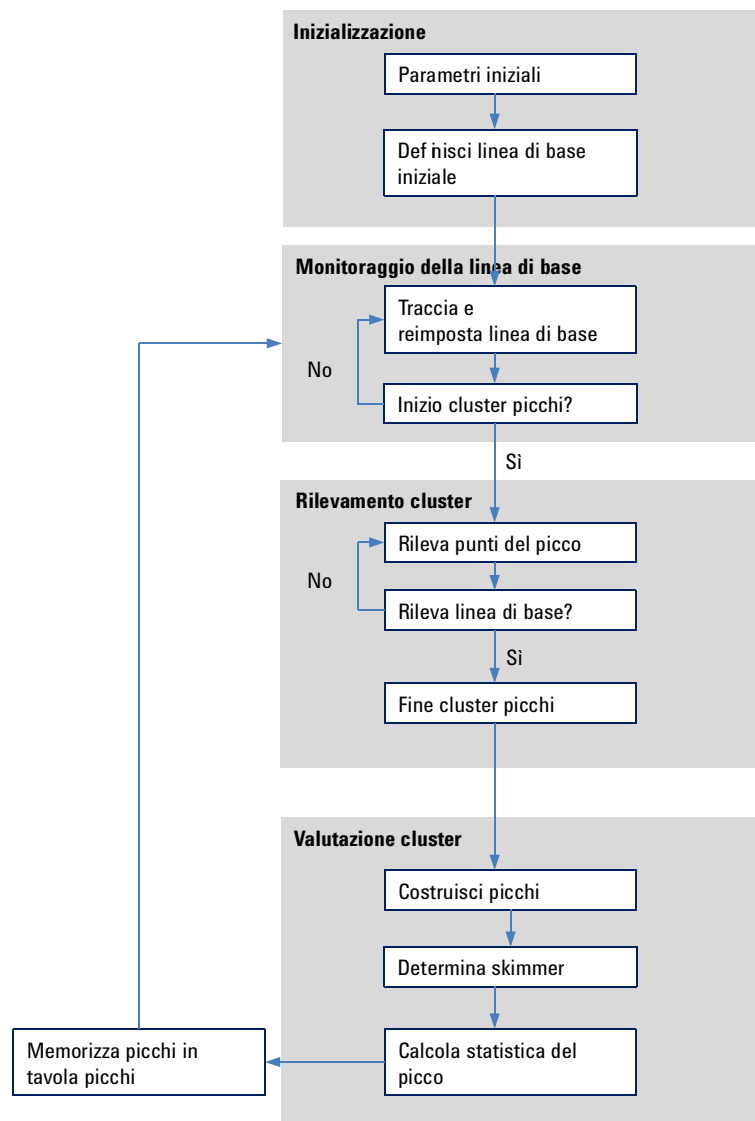


Figura 3 Diagramma di flusso dell'integratore

## Riconoscimento dei picchi

L'integratore utilizza diversi strumenti per riconoscere e caratterizzare un picco:

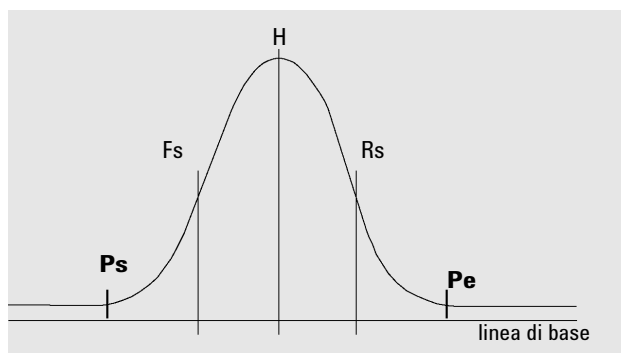
- larghezza dei picchi,
- filtri di riconoscimento dei picchi,
- raggruppamento,
- algoritmo del software per il riconoscimento dei picchi,
- algoritmo del software per l'apice del picco e
- calcoli non gaussiani (per esempio scodamento, fusione dei picchi).

### Larghezza del picco

Durante l'integrazione la larghezza del picco viene calcolata dall'area e dall'altezza regolata del picco:

$$\text{Larghezza} = \text{area regolata} / \text{altezza regolata}$$

oppure, se sono disponibili i punti di flesso, viene calcolata dalla larghezza fra i punti di flesso.



**Figura 4** Calcolo dell'ampiezza del picco

Nella figura precedente, l'area totale  $A$  è la somma delle aree dall'inizio del picco ( $Ps$ ) alla fine del picco ( $Pe$ ), regolata per la linea di base.  $Fs$  è la pendenza anteriore al punto di flesso;  $Rs$  è la pendenza posteriore al punto di flesso.

L'impostazione della larghezza del picco controlla la capacità dell'integratore di distinguere i picchi dal rumore di fondo. Per ottenere buone prestazioni, la larghezza del picco deve essere impostata su un valore prossimo alla larghezza degli effettivi picchi cromatografici.

La larghezza del picco può essere modificata in tre modi:

- prima del processo di integrazione è possibile specificare la larghezza iniziale del picco,
- durante il processo di integrazione l'integratore aggiorna automaticamente la larghezza del picco come necessario per mantenere una buona corrispondenza con i filtri di riconoscimento dei picchi,
- durante il processo di integrazione è possibile reimpostare o modificare la larghezza del picco tramite un evento programmato in base al tempo.

## Filtri di riconoscimento dei picchi

L'integratore dispone di filtri di riconoscimento dei picchi che possono essere utilizzati per il riconoscimento dei picchi mediante la rilevazione delle modifiche di curvatura e pendenza all'interno di un gruppo di punti di dati contigui. Questi filtri contengono la derivata prima (per misurare la pendenza) e la derivata seconda (per misurare la curvatura) dei punti esaminati dall'integratore. I filtri di riconoscimento sono:

**Filter 1** Pendenza (curvatura) di due (tre) punti di dati contigui

**Filter 2** Pendenza di quattro punti di dati contigui e curvatura di tre punti di dati non contigui

**Filter 3** Pendenza di otto punti di dati contigui e curvatura di tre punti di dati non contigui

Il filtro reale utilizzato è determinato dall'impostazione dell'ampiezza del picco. Ad esempio, all'inizio dell'analisi, è possibile utilizzare Filtro 1. Se durante l'analisi l'ampiezza del picco aumenta, il filtro viene impostato prima su Filtro 2, quindi su Filtro 3. Per ottenere buone prestazioni dai filtri di riconoscimento, l'ampiezza del picco deve essere impostata su un valore prossimo all'ampiezza dei picchi reali cromatografici/elettroferografici. Durante l'analisi, l'integratore aggiornerà l'ampiezza del picco secondo necessità per ottimizzare l'integrazione.

L'integratore calcola l'ampiezza del picco aggiornata in vari modi, in base alla configurazione dello strumento:

## Integrazione

### Riconoscimento dei picchi

Per le configurazioni LC/CE, il calcolo predefinito dell'ampiezza del picco utilizza un calcolo composito:

$$0.3 \times (\text{Right Inflection Point} - \text{Left Inflection point}) + 0.7 \times \text{Area/Height}$$

Per le configurazioni GC, il calcolo predefinito dell'ampiezza del picco utilizza l'area/altezza. Questo calcolo non sopravvaluta l'ampiezza del picco quando i picchi sono fusi sopra la metà dell'altezza.

In alcuni tipi di analisi, ad esempio GC isothermico e LC isocratico, i picchi diventano significativamente più ampi con il progredire dell'analisi. Per compensare questa situazione, l'integratore aggiorna l'ampiezza automaticamente mentre i picchi diventano più ampi durante l'analisi. Lo strumento effettua questa operazione automaticamente, a meno che l'aggiornamento non sia stato disabilitato con un evento di ampiezza fissa del picco programmato a tempo.

L'aggiornamento dell'ampiezza del picco viene calcolato come segue:

$$0,75 \times (\text{ampiezza del picco esistente}) + 0,25 \times (\text{ampiezza del picco attuale})$$

## Raggruppamento

Il raggruppamento è il mezzo tramite il quale l'integratore aumenta la larghezza dei picchi all'interno del raggio di azione dei filtri di riconoscimento dei picchi per mantenere una buona selettività.

L'integratore non può aumentare illimitatamente la larghezza del picco per allargare i picchi. Alla fine, i picchi diventano così larghi che i filtri di riconoscimento dei picchi potrebbero non essere più in grado di vederli. Per superare questa limitazione, l'integratore raggruppa i punti dati restringendo i picchi e mantenendo al contempo la stessa area.

Quando i dati vengono raggruppati, i punti dati vengono raggruppati in gruppi di due elevato alla potenza di raggruppamento, ovvero: non raggruppati = 1x, raggruppati una volta = 2x, raggruppati due volte = 4x e così via.

Il raggruppamento è basato sulla velocità di campionamento e sulla larghezza del picco. L'integratore utilizza questi parametri per impostare il fattore di raggruppamento per fornire il numero appropriato di punti dati (vedere [Tabella 1](#), pagina 19).

Il raggruppamento si effettua secondo le potenze di due in base alla larghezza del picco attesa o verificata. L'algoritmo di raggruppamento è riassunto in [Tabella 1](#), pagina 19.

**Tabella 1** Criteri di raggruppamento

Ampiezza picco attesa	Filtro(i) utilizzato(i)	Raggruppamento
0 - 10 punti dati	Primo	Nessuno
8 - 16 punti dati	Secondo	Nessuno
12 - 24 punti dati	Terzo	Nessuno
16 - 32 punti dati	Secondo	1 volta
24 - 48 punti dati	Terzo	1 volta
32 - 96 punti dati	Terzo, secondo	2 volte
64 - 192 punti dati	Terzo, secondo	Tre volte

## Algoritmo di riconoscimento del picco

L'integratore identifica l'inizio del picco con un punto sulla linea di base determinato dall'algoritmo di riconoscimento del picco. L'algoritmo di riconoscimento del picco confronta dapprima gli output dei filtri di riconoscimento dei picchi con il valore della sensibilità iniziale della pendenza in modo da aumentare o diminuire l'accumulatore della curva ascendente. L'integratore dichiara il punto in cui il valore dell'accumulatore di pendenza ascendente è  $\geq 15$  come punto che indica che un picco è iniziato.

### Inizio picco

Nella [Tabella 2](#), pagina 20 l'ampiezza dei picchi prevista determina quali valori di pendenza del filtro e di curvatura devono essere confrontati con il valore di sensibilità della pendenza. Ad esempio, i numeri della colonna Filtro 1 vengono aggiunti all'accumulatore di pendenza ascendente quando l'ampiezza del picco prevista è ridotta. Se l'ampiezza del picco prevista aumenta, vengono utilizzati prima i numeri della colonna Filtro 2, quindi quelli della colonna Filtro 3.

Quando il valore dell'accumulatore di pendenza ascendente è  $\geq 15$ , l'algoritmo assume che stia per iniziare un picco.

**Tabella 2 Valori di incremento dell'accumulatore in pendenza ascendente**

Derivata Filtro 1 - 3 Output a fronte della sensibilità di pendenza	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3
Pendenza > Sensibilità pendenza	+8	+5	+3
Curvatura > Sensibilità pendenza	+0	+2	+1
Pendenza < (-) Sensibilità pendenza	-8	-5	-3
Pendenza <  Sensibilità pendenza	-4	-2	-1
Curvatura < (-) Sensibilità pendenza	-0	-2	-1

#### Fine picco

Nella **Tabella 3**, pagina 20 l'ampiezza dei picchi prevista determina quali valori di pendenza del filtro e di curvatura devono essere confrontati con il valore di sensibilità della pendenza. Ad esempio, i numeri della colonna Filtro 1 vengono aggiunti all'accumulatore di pendenza discendente quando l'ampiezza del picco prevista è ridotta. Se l'ampiezza del picco prevista aumenta, vengono utilizzati prima i numeri della colonna Filtro 2, quindi quelli della colonna Filtro 3.

Quando il valore dell'accumulatore di pendenza discendente è  $\geq 15$ , l'algoritmo assume che stia per terminare un picco.

**Tabella 3 Valori di incremento dell'accumulatore di pendenza discendente**

Derivata Filtro 1 - 3 Output a fronte della sensibilità di pendenza	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3
Pendenza < (-) Sensibilità pendenza	+8	+5	+3
Curvatura < (-) Sensibilità pendenza	+0	+2	+1
Pendenza > Sensibilità pendenza	-11	-7	-4
Pendenza >  Sensibilità pendenza	-28	-18	-11
Curvatura > Sensibilità pendenza	-0	-2	-1

Algoritmo dell'apice del picco

L'apice del picco viene riconosciuto come punto più alto del cromatogramma costruendo un'interpolazione parabolica che passa attraverso i punti di dati più elevati.

## Picchi fusi

La fusione dei picchi si verifica quando un picco inizia prima che sia stata trovata la fine di un altro picco. La figura illustra come l'integratore gestisce i picchi fusi.

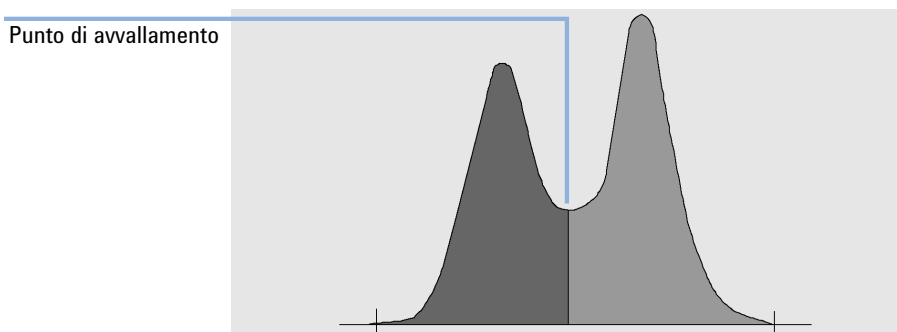


Figura 5 Picchi fusi

L'integratore elabora i picchi fusi come segue:

- 1 Effettua la sommatoria dell'area del primo picco fino al punto di avvallamento.
- 2 Al punto di avvallamento la sommatoria del primo picco termina ed inizia la sommatoria del secondo picco.
- 3 Quando l'integratore individua la fine del secondo picco la sommatoria delle aree termina. Questo processo può essere visualizzato separando i picchi fusi e tracciando una perpendicolare dal punto di avvallamento fra i due picchi.

## Spalle

Si tratta di picchi non risolti del bordo anteriore o posteriore di un picco più grande. Quando è presente una spalla, non si tratta di una valle vera e propria, cioè di una pendenza negativa seguita da una positiva. Un picco può avere un numero qualsiasi di spalle anteriori e/o posteriori.

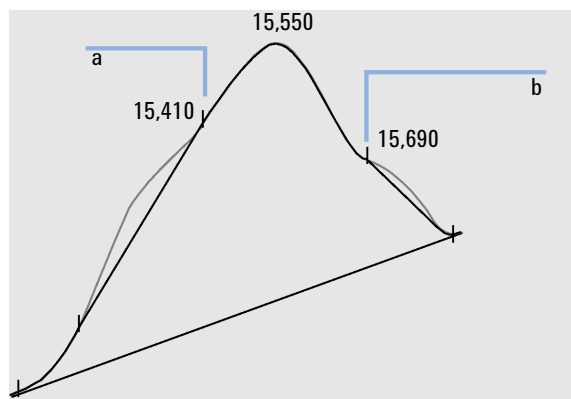


Figura 6 Spalle del picco

Le spalle vengono individuate dalla curvatura del picco data dalla derivata seconda. Quando la curvatura tende a zero, l'integratore identifica un punto di flesso, come i punti a e b in Figura 6, pagina 22.

- Una potenziale spalla anteriore esiste quando viene individuato un secondo punto di flesso prima dell'apice del picco. Se la spalla è confermata, l'inizio del punto di spalla viene stabilito al punto massimo di curvatura positiva prima del punto di flesso.
- Una potenziale spalla posteriore esiste quando viene individuato un secondo punto di flesso prima della fine del picco o della valle. Se la spalla è confermata, l'inizio del punto di spalla viene stabilito in corrispondenza del punto del primo minimo della pendenza dopo l'apice del picco.

Il tempo di ritenzione/migrazione è determinato dal punto di massima curvatura negativa della spalla. Con un evento di integrazione programmato, l'integratore è in grado di calcolare anche le aree delle spalle come se si trattasse di picchi normali con perpendicolari ai punti di flesso del picco di spalla.

L'area della spalla è sottratta da quella del picco principale.

Le spalle dei picchi possono essere gestite come picchi normali utilizzando gli eventi programmati previsti dall'integratore.

## Costruzione della linea di base predefinita

Una volta terminati i cluster di picchi e trovata la linea di base, l'integratore chiede all' algoritmo di collocazione della linea di base di collocare la linea di base utilizzando una tecnica pegs-and-thread. Quest'ultima utilizza correzioni trapezoidali dell'area e proporzionali dell'altezza per normalizzare e mantenere la linea di base più bassa possibile. Gli input all'algoritmo di collocazione della linea di base comprendono anche parametri dal metodo e dai file di dati che identificano il rivelatore e l'applicazione e che l'integratore utilizza per ottimizzare i propri calcoli.

Nel caso più semplice, l'integratore costruisce la linea di base come una serie di segmenti di linea retta fra:

- l'inizio della linea di base,
- inizio del picco, valle, punti di fine,
- linea di base del picco

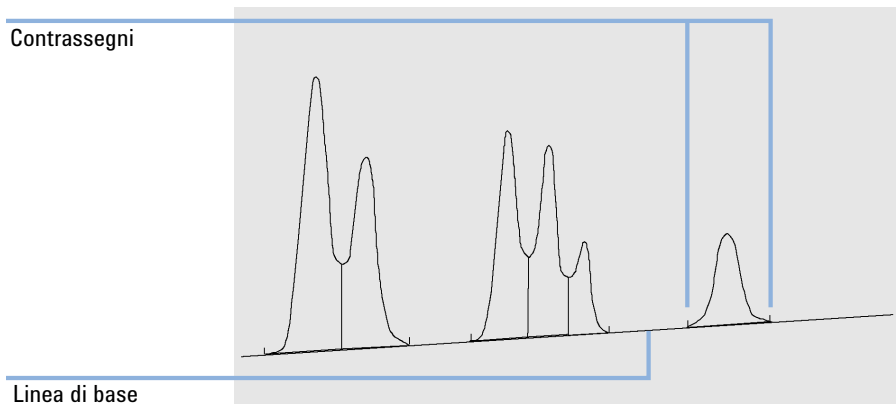


Figura 7 Costruzione della linea di base predefinita

## Codici di separazione tra i picchi

Nei risultati di integrazione di un report, ad ogni picco viene assegnato un codice a due, tre o quattro caratteri che descrive come è stata tracciata la linea di base del segnale.

**Tabella 4** Codice di quattro caratteri

Primo carattere	Secondo carattere	Terzo carattere	Quarto carattere
Linea di base all'inizio	Linea di base alla fine	Contrassegno di errore/picco	Tipo di picco

### Caratteri 1 e 2

Il primo carattere descrive la linea di base all'inizio del picco e il secondo carattere descrive la linea di base alla fine del picco.

- B** Il picco iniziava o si fermava sulla linea di base.
- P** Il picco iniziava o si fermava mentre la linea di base veniva attraversata.
- V** Il picco iniziava o si fermava con una perpendicolare a valle.
- H** Il picco iniziava o si fermava su una linea di base orizzontale forzata.
- F** Il picco iniziava o si fermava su un punto forzato.
- M** Il picco era stato integrato manualmente.
- U** Il picco non era stato assegnato.

Possono essere acclusi anche altri contrassegni (in ordine di precedenza).

### Carattere 3

Il terzo carattere descrive un contrassegno di errore o di picco.

- A** L'integrazione è stata abbandonata. Ciò, per esempio, può essere dovuto all'ATTIVAZIONE/DISATTIVAZIONE degli eventi di integrazione oppure alla fine del tempo di analisi del segnale.
- D** Il picco è distorto (forma dei picchi irregolare).

**Spazio vuoto** Si tratta di un picco normale.

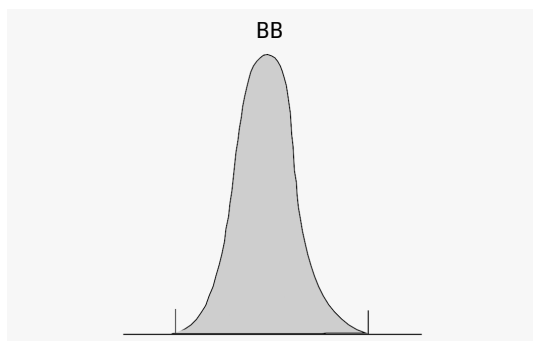
**Carattere 4**

Il quarto carattere descrive il tipo di picco.

- S** Si tratta di un picco di solvente.
- N** Si tratta di un picco negativo.
- +** Si tratta di un picco ottenuto da sommatoria di aree.
- T** Picco skim tangente (skim standard).
- X** Picco skim tangente (skim esponenziale, modalità precedente).
- E** Picco skim tangente (skim esponenziale, modalità nuova).
- m** Picco definito da linea di base manuale.
- n** Picco negativo definito da linea di base manuale.
- t** Picco skim tangente definito da linea di base manuale.
- x** Picco skim tangente (skim esponenziale) definito da linea di base manuale.
- R** Il picco è un picco ricalcolato (ad esempio un picco parent, vedere [“Modalità tangente di interpolazione”](#), pagina 36).
- f** Picco definito da una tangente alla spalla anteriore.
- b** Picco definito da una tangente alla spalla posteriore.
- F** Picco definito da una perpendicolare sulla spalla anteriore.
- B** Picco definito da una perpendicolare sulla spalla posteriore.
- U** Il picco non è assegnato.

## Misurazione dell'area del picco

L'ultima fase dell'integrazione del picco è la determinazione dell'area finale del picco.



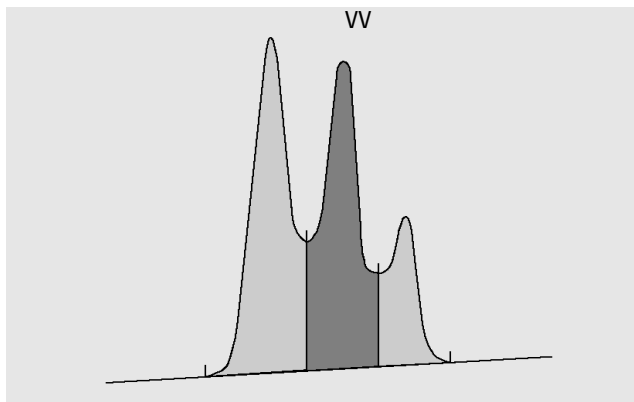
**Figura 8** Misurazione dell'area di picchi da linea di base a linea di base

Nel caso di un semplice picco isolato, l'area viene determinata come quella al di sopra della linea di base, fra l'inizio e la fine del picco.

## Determinazione dell'area

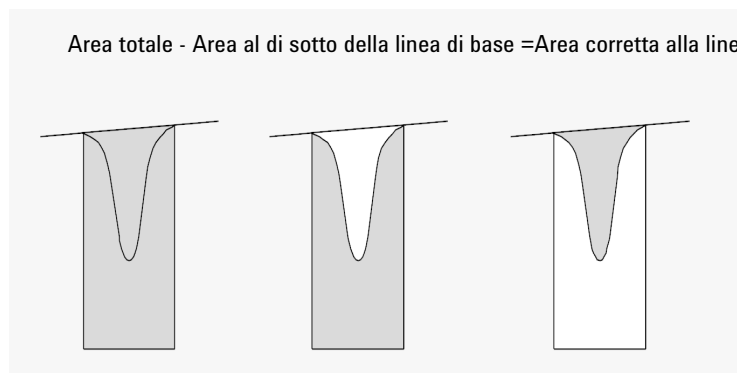
L'area calcolata dall'integratore durante l'integrazione viene determinata nei seguenti modi:

- per i picchi da linea di base a linea di base (BB), l'area sopra la linea di base fra l'inizio e la fine del picco, come nella [Figura 8](#), pagina 26,
- per i picchi da valle a valle (VV), l'area sopra la linea di base, segmentata con linee perpendicolari dai punti di avvallamento, come nella [Figura 9](#), pagina 27,



**Figura 9** Misurazione dell'area dei picchi da valle a valle

- per i picchi tangenti (T), l'area al di sopra della linea di base reimpostata,
- per i picchi di solvente (S), l'area al di sopra dell'estensione orizzontale dall'ultimo punto trovato sulla linea di base ed al di sotto della linea di base reimpostata per i picchi tangenti (T). Un picco di solvente può venire visualizzato troppo lentamente per essere riconosciuto, o può esistere un gruppo di picchi che fanno parte dell'analisi ma che si pensa debbano essere trattati come solvente con un gruppo di picchi successivi. Ciò di solito coinvolge un gruppo di picchi fusi dove il primo è maggiore dei successivi. Il semplice fatto di tracciare la perpendicolare metterebbe in evidenza gli ultimi picchi, dato che si trovano effettivamente sulla coda del primo. Se si desidera riconoscere il primo picco come solvente, si eliminano tutti gli altri dalla coda,
- i picchi negativi che si trovano sotto la linea di base hanno comunque un'area positiva, come mostrato in [Figura 10](#), pagina 27.



**Figura 10** Misurazione dell'area per i picchi negativi

## Unità e fattori di conversione

Esternamente, i dati contengono un set di punti di dati e possono essere campionati o integrati. Nel caso dei dati integrati, ciascun punto di dati corrisponde a un'area espressa come prodotto *altezza × tempo*. Nel caso dei dati campionati, ciascun punto di dati corrisponde a un'altezza.

Pertanto, nel caso dei dati integrati, l'altezza è un'entità calcolata ottenuta dividendo l'area per il tempo trascorso dal punto di dati precedente. Nel caso dei dati campionati, l'area viene calcolata moltiplicando i dati per il tempo trascorso dal punto di dati precedente.

Il calcolo di integrazione utilizza entrambe le entità. Le unità utilizzate all'interno dell'integratore sono: *risposta del rivelatore × secondi* per l'area e **detector response** come altezza. Questa soluzione garantisce una base comune per il troncamento degli interi, qualora fosse necessario. Le misure di tempo, area e altezza sono riportate in unità fisiche reali, indipendentemente dal modo in cui sono misurate, calcolate e archiviate nel software.

## Collocazione della linea di base

### Inizio della linea di base

Se all'inizio dell'analisi non si trova nessuna linea di base, l'inizio verrà stabilito in uno dei modi che seguono:

- Dall'inizio dell'analisi al primo punto della linea di base, se il punto di inizio dell'analisi è inferiore al primo punto della linea di base.
- Dall'inizio dell'analisi al primo punto di avvallamento se il punto di inizio dell'analisi è inferiore alla prima valle.
- Dall'inizio dell'analisi al primo punto di avvallamento, se la prima valle penetra in una linea immaginaria disegnata dall'inizio dell'analisi alla prima linea di base.
- Dall'inizio dell'analisi ad una linea di base orizzontale estesa al primo punto della linea di base.

### Fine della linea di base

L'ultimo punto valido della linea di base viene utilizzato per designare la fine della linea di base. Nel caso in cui l'analisi non finisca con la linea di base, la fine della linea di base viene calcolata dall'ultimo punto valido alla deriva stabilita per la linea di base.

Se un picco finisce in una valle evidente, ma il picco seguente si trova al di sotto del valore di scarto dell'area, così com'è stato impostato, la linea di base viene proiettata dall'inizio del picco al punto reale successivo della linea di base. Se un picco inizia allo stesso modo, viene applicata una regola simile.

## Modalità di correzione della linea di base

In OpenLab ChemStation sono disponibili diverse modalità di correzione della linea di base. Tali modalità sono descritte nelle sezioni che seguono.

### Modalità di correzione della linea di base: Classical (Classica)

La penetrazione avviene quando il segnale cade al di sotto della linea di base costruita (punto a in [Figura 11](#), pagina 30).

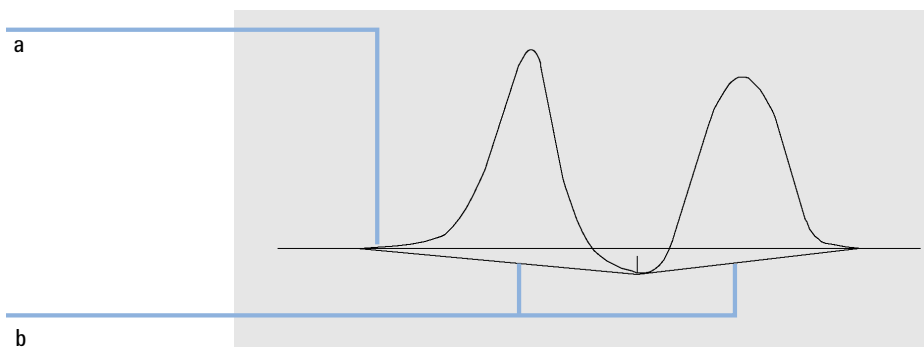


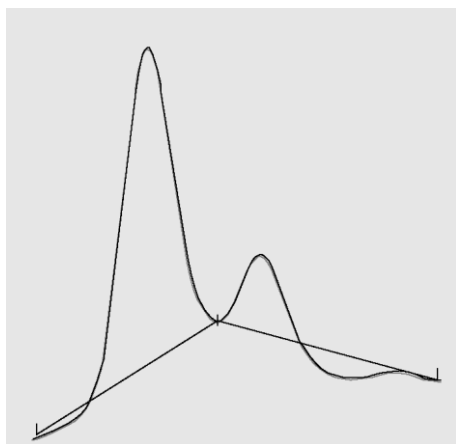
Figura 11 Penetrazione della linea di base

Se si verifica una penetrazione della linea di base, quella parte di linea di base può essere ridisegnata come mostrato dai punti b in [Figura 11](#), pagina 30. È possibile utilizzare le seguenti modalità di correzione per rimuovere tutte le penetrazioni della linea di base:

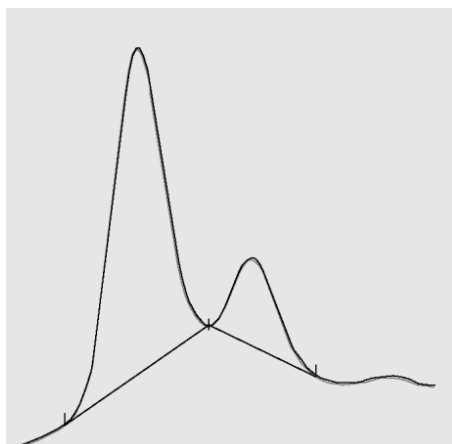
- **No penetration**
- **Advanced**

### Modalità di correzione della linea di base: No Penetration (Nessuna penetrazione)

Quando questa opzione è selezionata, vengono ricercate tutte le penetrazioni in tutti i cluster di picchi. Se vengono individuate delle penetrazioni, i punti di inizio e/o di fine del picco vengono spostati fino a che non vi sono più penetrazioni.



Modalità di correzione della linea di base **Classical**



Modalità di correzione della linea di base **No penetration**

#### NOTA

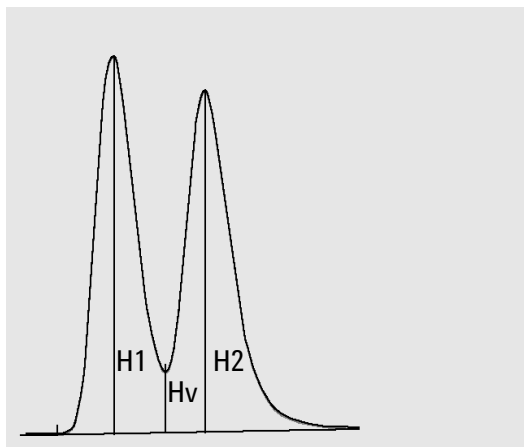
La modalità di correzione della linea di base **No penetration** non è disponibile per i picchi di solvente, con i rispettivi picchi child e spalle.

### Modalità di correzione della linea di base: Advanced (Avanzata)

Nella modalità di correzione avanzata della linea di base, l'integratore cerca di ottimizzare le posizioni iniziale e finale dei picchi, ristabilisce la linea di base per un cluster di picchi ed elimina le penetrazioni della linea di base (vedere "[Modalità di correzione della linea di base: No Penetration \(Nessuna penetrazione\)](#)", pagina 31). In molti casi, la correzione avanzata della linea di base fornisce una linea di base più stabile, meno dipendente dalla sensibilità della pendenza.

## Rapporto picco-valle

Il rapporto picco-valle è una misura della qualità che indica quanto il picco è separato dai picchi di altre sostanze. Questo parametro specificato dall'utente costituisce parte della modalità di monitoraggio avanzato della linea di base. Viene utilizzato per decidere se due picchi che non hanno la stessa separazione della linea di base sono separati da una perpendicolare o da una linea di base di avvallamento. L'integratore calcola il rapporto fra l'altezza (corretta alla linea di base) del picco più piccolo e l'altezza della valle corretta alla linea di base. Quando il rapporto picco-valle è minore del valore specificato, viene utilizzata una linea perpendicolare; altrimenti viene tracciata una linea di base dalla linea di base all'inizio del primo picco alla valle e dalla valle alla linea di base alla fine del secondo picco (confrontare la "Modalità di correzione della linea di base: No Penetration (Nessuna penetrazione)", pagina 31 con la Figura 12, pagina 32).



**Figura 12** Rapporto picco-valle

Il rapporto picco-valle viene calcolato tramite le seguenti equazioni:

$$H1 \geq H2, \text{ rapporto picco-valle} = H2/Hv$$

e

$$H1 < H2, \text{ rapporto picco-valle} = H1/Hv$$

La Figura 13, pagina 33 mostra come il valore del rapporto picco-valle specificato dall'utente influenza le linee di base.

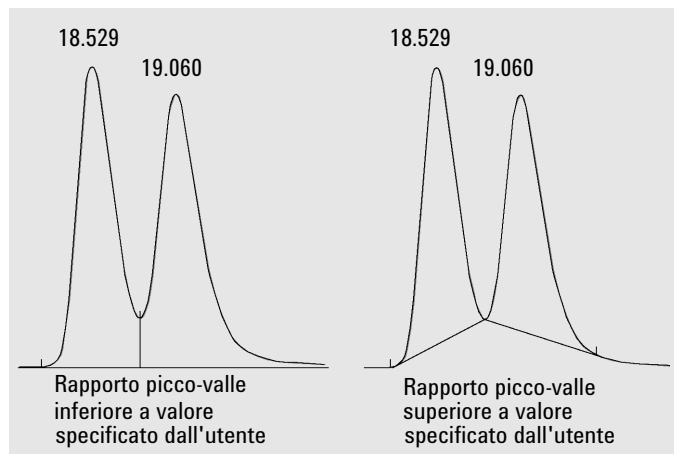


Figura 13 Effetto del rapporto picco-valle sulla linea di base

## Tangente di interpolazione

La tangente di interpolazione è una forma di costruzione della linea di base effettuata per i picchi che si trovano sulla pendenza ascendente o discendente di un picco. Il prerequisito è che i due picchi non siano separati sulla linea di base.

Le figure che seguono illustrano il principio della tangente di interpolazione:

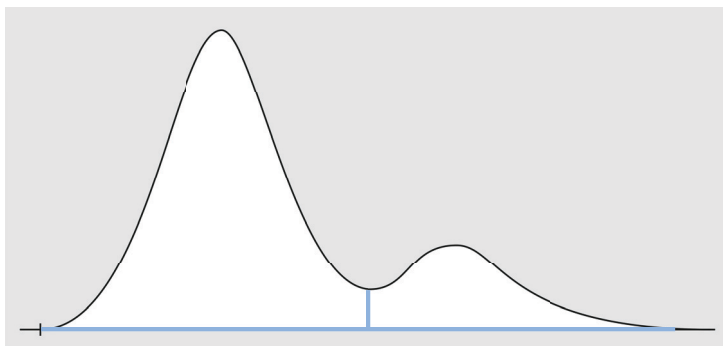


Figura 14 Picchi senza skim, separati da una linea perpendicolare

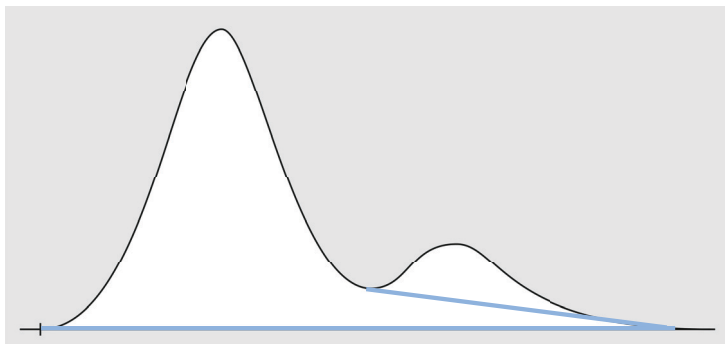


Figura 15 Skim di coda

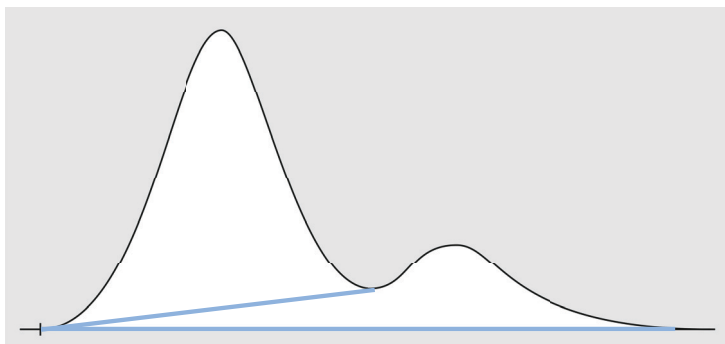


Figura 16 Skim anteriore

### Criteri di skim

I seguenti criteri determinano se viene utilizzata una linea di skim per calcolare l'area di un picco child che eluisce sul bordo anteriore o posteriore di un picco parent:

- Rapporto di altezza di skim (**Front skim height ratio** o **Tail skim height ratio**)
- **Skim valley ratio**

Il *rapporto altezza-skim* è il rapporto fra l'altezza corretta alla linea di base del picco parent ( $H_p$  nella seguente figura) e l'altezza corretta alla linea di base del picco child ( $H_c$ ). Per ottenere lo skim del picco child, utilizzare un valore inferiore a tale rapporto. Per disabilitare lo skim esponenziale per tutto il ciclo, è possibile impostare tale parametro a un valore elevato o a zero.

Il *rapporto valle-skim* è il rapporto fra l'altezza del picco child sopra la linea di base ( $H_c$  nella seguente figura) e l'altezza della valle sopra la linea di base ( $H_v$ ). Per ottenere lo skim del picco child, utilizzare un valore superiore a tale rapporto.

#### NOTA

Se uno di questi criteri non è rispettato per un insieme di picchi child sulla coda di un picco parent, tutti i picchi child successivi all'ultimo picco child che soddisfa entrambi i criteri non sono più sottoposti a skim ma utilizzano una perpendicolare.

#### NOTA

Questi criteri non sono utilizzati se è attivo un evento programmato per un'esponenziale, o se il picco parent è esso stesso un picco child. Il codice della linea di base fra il picco parent e il picco child deve essere di tipo **Valley** (vedere "Codici di separazione tra i picchi", pagina 24).

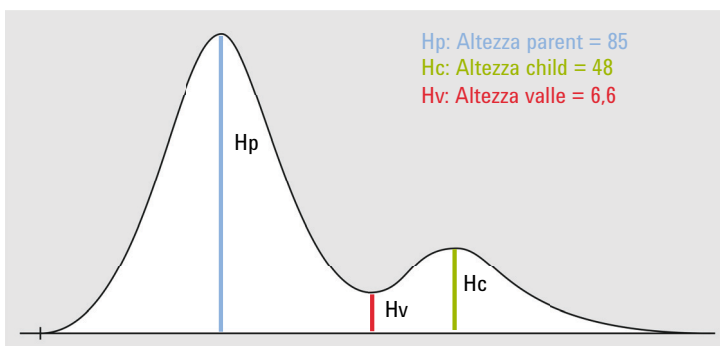


Figura 17 Esempio di calcolo dei valori dei criteri di skim

$$\text{Rapporto altezza-skim} = H_p / H_c$$

$$\text{Rapporto valle-skim} = H_c / H_v$$

## Integrazione

### Collocazione della linea di base

in cui

Hp	Altezza corretta alla linea di base del picco parent
Hv	Altezza della valle sopra la linea di base
Hc	Altezza corretta alla linea di base del picco child

**Tail Skimming** Per utilizzare lo skim di coda, si impostano i parametri come segue:

- Rapporto altezza-skim coda =  $85 / 48 = 1,77$   
Negli eventi di integrazione, utilizzare un valore  $< 1,77$ .
- Rapporto valle-skim =  $48 / 6,6 = 7,3$   
Negli eventi di integrazione, utilizzare un valore  $> 7,3$ .

### Front Skimming

Con lo skim anteriore, il primo picco è il picco child, mentre il secondo picco è il picco parent. Per utilizzare lo skim anteriore, si impostano i parametri come segue:

- Rapporto altezza-skim anteriore =  $48 / 85 = 0,56$   
Negli eventi di integrazione, utilizzare un valore  $< 0,56$ .
- Rapporto valle-skim =  $85 / 6,6 = 12,9$   
Negli eventi di integrazione, utilizzare un valore  $> 12,9$ .

### Modalità tangente di interpolazione

Quando la definizione della tangente di interpolazione è abilitata, sono disponibili quattro modelli per calcolare aree di picchi appropriate:

- Curva esponenziale
- Nuovo skim esponenziale
- Skim a linea retta
- Combinazione dei calcoli a linea retta e a curva esponenziale per l'interpolazione migliore (skim standard)

Curva esponenziale

Questo modello di skim traccia una curva utilizzando un'equazione esponenziale fra l'inizio e la fine del picco child. La curva passa sotto ogni picco child che segue il picco parent; l'area sotto la curva di skim viene sottratta dai picchi child e aggiunta al picco parent.

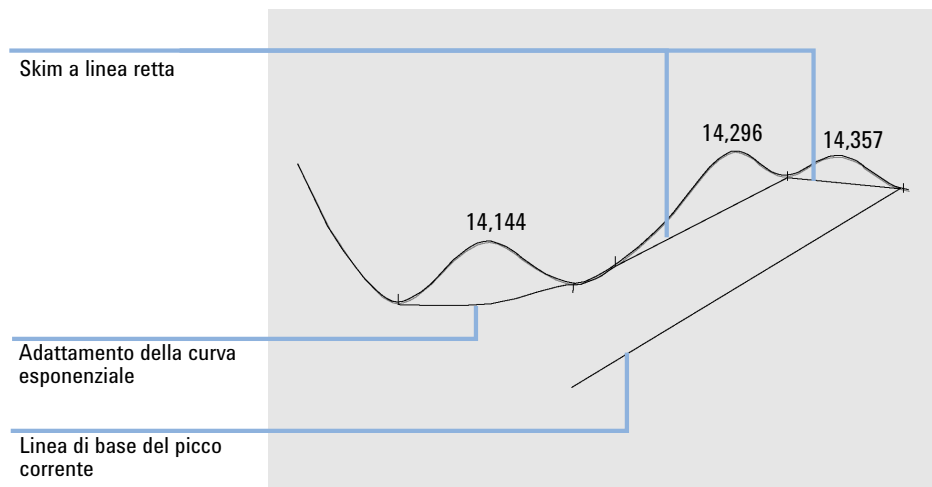


Figura 18 Skim esponenziale

## Integrazione

### Collocazione della linea di base

Nuova curva esponenziale

Questo modello di skim traccia una curva utilizzando un'equazione esponenziale per approssimare il bordo anteriore o posteriore del picco parent. La curva passa sotto uno o più picchi, detti picchi child, che seguono il picco parent. L'area sotto la curva di skim viene sottratta dai picchi child e aggiunta al picco principale. Più picchi child possono essere integrati utilizzando lo stesso modello esponenziale; tutti i picchi successivi al primo picco child sono separati perpendicolarmente, iniziando alla fine del primo picco child, e tracciando la perpendicolare solo fino alla curva di skim.

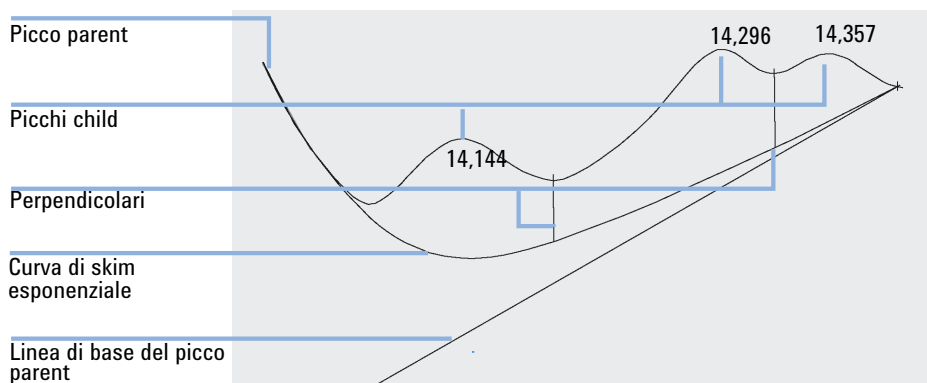


Figura 19 Nuovo skim esponenziale

## Skim a linea retta

Questo modello di skim traccia una linea retta fra l'inizio e la fine di un picco child. L'altezza dell'inizio del picco child viene corretta in base alla pendenza della linea di base parent. L'area sotto la linea retta viene sottratta dal picco child e aggiunta al picco parent.

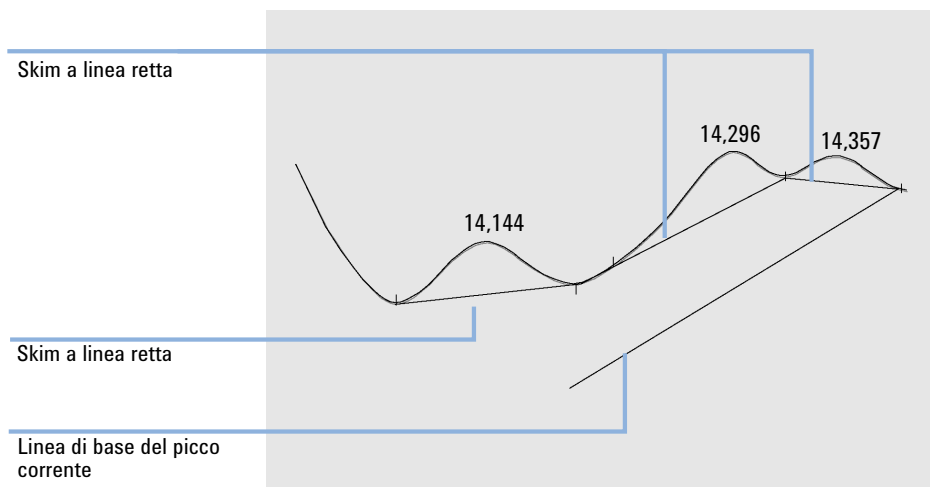


Figura 20 Skim a linea retta

## Skim standard

Questo metodo predefinito è una combinazione di calcoli in linea retta ed esponenziali per una migliore corrispondenza.

Il passaggio da un calcolo esponenziale a uno lineare viene effettuato in modo da eliminare discontinuità improvvise delle altezze o delle aree.

- Quando il segnale si trova ben al di sopra della linea di base, il calcolo di adattamento dello scodamento è esponenziale.
- Quando il segnale si trova entro l'area della linea di base, il calcolo di adattamento dello scodamento è a linea retta.

I calcoli in combinazione vengono riportati come skim esponenziale o a linea retta tangente.

## Integrazione

### Collocazione della linea di base

Calcolo della curva esponenziale per gli skim

La seguente equazione viene utilizzata per calcolare uno skim esponenziale:

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

in cui

$H_b$	Altezza dello skim esponenziale al tempo $t_R$
$H_0$	Altezza (sopra la linea di base) dell'inizio dello skim esponenziale
$B$	Fattore di decadimento della funzione esponenziale
$t_0$	Tempo corrispondente all'inizio dello skim esponenziale
$t_R$	Tempo di ritenzione
$A$	Pendenza della linea di base del picco parent
$C$	Offset della linea di base del picco parent

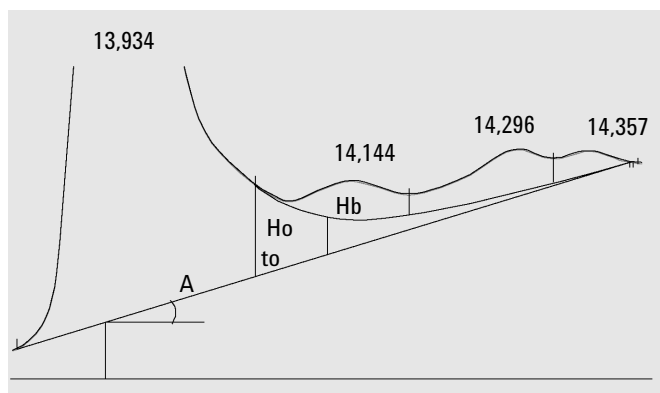


Figura 21 Valori utilizzati per calcolare uno skim esponenziale

## Eventi di integrazione

L'integratore fornisce all'utente vari eventi di integrazione iniziali e programmati. Molti eventi sono di tipo on/off, start/stop.

### Eventi di integrazione per tutti i segnali

#### **Modalità tangente di interpolazione**

Definire il tipo di costruzione della linea di base per i picchi che si trovano sulla pendenza ascendente o discendente di un picco. Vedere ["Modalità tangente di interpolazione"](#), pagina 36.

<b>Exponential</b>	Traccia una curva esponenziale attraverso l'inizio e la fine corretti per l'altezza di ciascun picco child.
<b>New Exponential</b>	Traccia una curva esponenziale per approssimare il fronte discendente del picco parent.
<b>Standard</b>	Combina i calcoli a linea retta ed esponenziale per la migliore interpolazione.
<b>Straight</b>	Traccia una linea retta attraverso l'inizio e la fine corretti per l'altezza di ciascun picco child.

#### **Rapporto altezza-skim coda del picco**

Insieme a **Skim valley ratio**, imposta le condizioni per la tangente di interpolazione di un picco di dimensioni ridotte sulla coda di un solvente o di un altro picco di grandi dimensioni. Vedere ["Criteri di skim"](#), pagina 35.

È il rapporto tra l'altezza del picco parent corretta alla linea di base ( $H_p$ ) e l'altezza del picco child corretta alla linea di base ( $H_c$ ). Rapporti superiori al valore specificato abilitano lo skim.

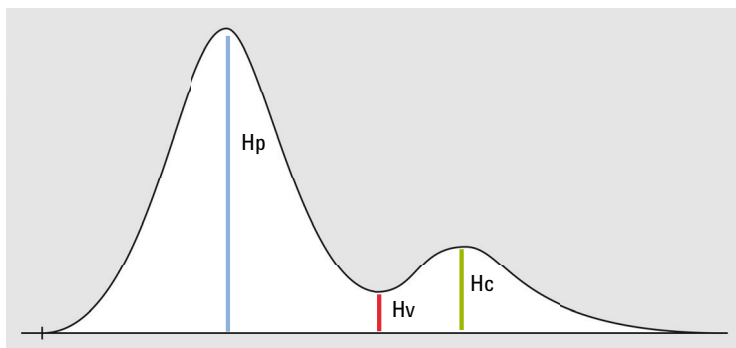


Figura 22 Esempio: picco con skim di coda

**Rapporto  
altezza-skim  
del picco  
anteriore**

Insieme a **Skim Valley Ratio**, imposta le condizioni per la tangente di interpolazione di un picco di dimensioni ridotte sul lato anteriore di un solvente o di un altro picco di grandi dimensioni. Vedere "Criteri di skim", pagina 35.

È il rapporto tra l'altezza del picco parent corretta alla linea di base ( $H_p$ ) e l'altezza del picco child corretta alla linea di base ( $H_c$ ). Rapporti superiori al valore specificato abilitano lo skim.

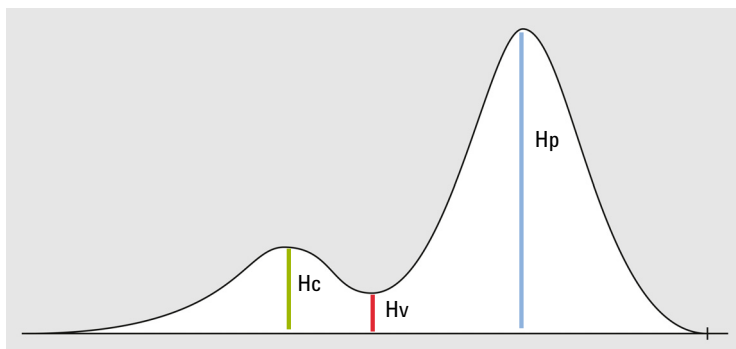


Figura 23 Esempio: picco con skim anteriore

**Rapporto  
valle-skim**

Insieme a **Tail Skim Height Ratio** o **Front Skim Height Ratio**, imposta le condizioni per la tangente di interpolazione di un picco di dimensioni ridotte sulla coda o sul lato anteriore di un solvente o di un altro picco di grandi dimensioni. Vedere "Criteri di skim", pagina 35.

È il rapporto tra l'altezza del picco child corretta alla linea di base ( $H_c$ ) e l'altezza della valle corretta alla linea di base ( $H_v$ ). Rapporti inferiori al valore specificato abilitano lo skim.

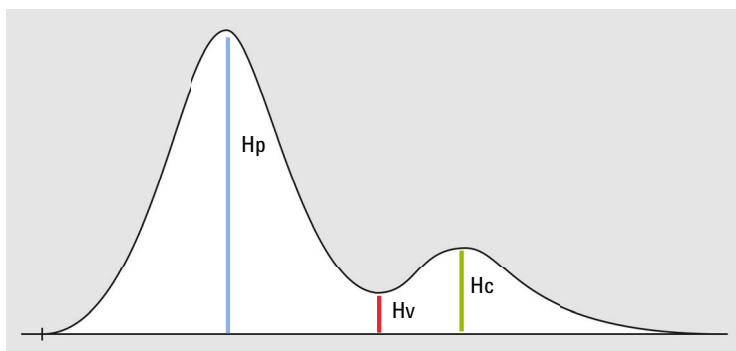


Figura 24 Esempio: picco con skim di coda

#### Correzione della linea di base

Imposta il tipo di correzione della linea di base. Vedere “[Modalità di correzione della linea di base](#)”, pagina 30.

È possibile scegliere tra i seguenti parametri:

<b>Classical</b>	Accetta le penetrazioni della linea di base.
<b>No penetrations</b>	Rimuove le penetrazioni della linea di base ricostruendo la linea di base.
<b>Advanced</b>	L'integratore cerca di ottimizzare le posizioni iniziale e finale dei picchi, ristabilisce la linea di base per un cluster di picchi ed elimina le penetrazioni della linea di base.

#### Rapporto picco-valle

Viene utilizzato per decidere se due picchi non separati sulla linea di base devono essere separati tramite una perpendicolare o una linea di base della valle; è il rapporto tra l'altezza corretta alla linea di base del picco più piccolo e l'altezza corretta alla linea di base della valle. Vedere “[Rapporto picco-valle](#)”, pagina 32.

Quando il rapporto picco-valle è minore del valore specificato, viene utilizzata una linea perpendicolare (A); altrimenti viene tracciata una linea di base dalla linea di base all'inizio del primo picco alla valle e dalla valle alla linea di base alla fine del secondo picco (B).

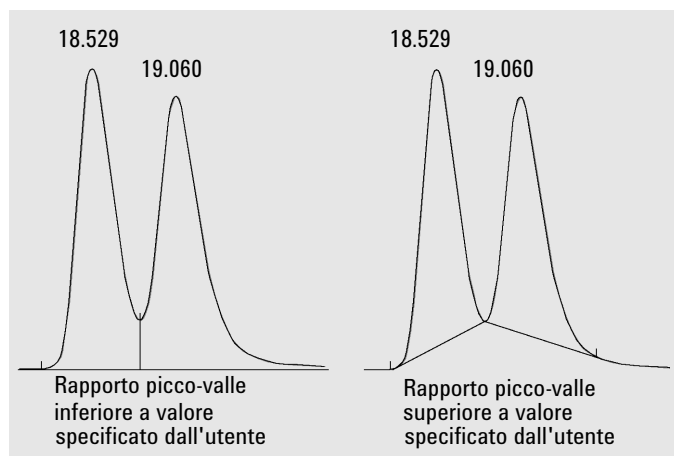


Figura 25 Effetto del rapporto picco-valle sulla linea di base

## Eventi iniziali

**Slope Sensitivity**

La sensibilità della pendenza è l'impostazione della sensibilità del picco. Quando la pendenza del segnale supera il valore **Slope Sensitivity** viene stabilito un punto di inizio del picco; quando la pendenza del segnale scende al di sotto del valore **Slope Sensitivity** viene stabilito un punto di fine del picco.

**Peak Width**

Controlla la selettività dell'integratore in modo che possa distinguere i picchi dal rumore di fondo. La larghezza del picco viene specificata in unità di tempo che corrispondono alla larghezza del picco a metà altezza del primo picco previsto (escluso il picco del solvente).

Se necessario, l'integratore aggiorna la larghezza del picco durante l'analisi per ottimizzare l'integrazione:

Se la larghezza del picco iniziale scelta è troppo bassa, il rumore può essere interpretato come picchi. Se sono presenti sia picchi ampi che picchi stretti, si può decidere di utilizzare eventi programmati del tempo di analisi per regolare la larghezza del picco per alcuni picchi. Talvolta la larghezza dei picchi aumenta in misura significativa al procedere dell'analisi, per esempio nel caso delle analisi GC isotermitiche ed LC isocratiche. Per compensare questo fenomeno, l'integratore aggiorna automaticamente la larghezza del picco man mano che i picchi si allargano durante l'analisi, a meno che tale funzione non sia stata disabilitata tramite un evento programmato.

L'aggiornamento della larghezza del picco viene ponderato come segue:

$$0,75 \times (\text{larghezza del picco esistente}) + 0,25 \times (\text{larghezza del picco corrente})$$

**Area reject**

Imposta l'area del picco di interesse più piccolo.

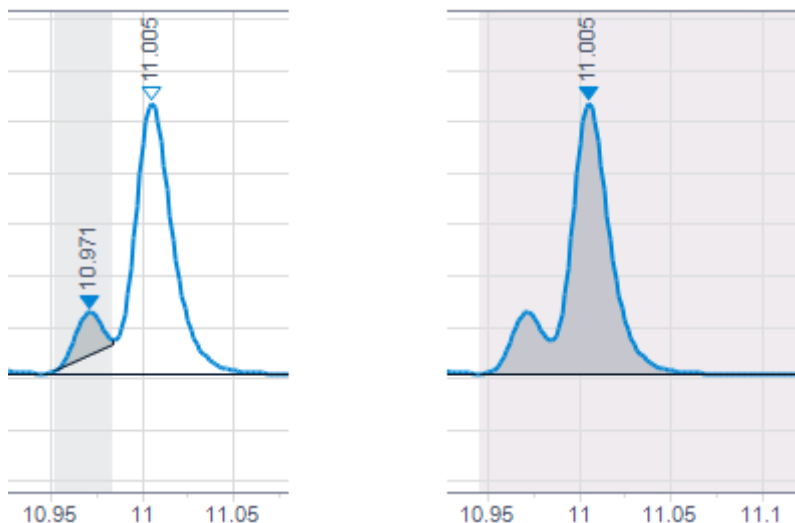
Non viene riportato alcun picco la cui area sia inferiore all'area minima: l'integratore rifiuta qualunque picco di dimensioni inferiori al valore **Area Reject** dopo la correzione della linea di base. Il valore **Area Reject** deve essere maggiore o uguale a zero.

#### Area Percent reject

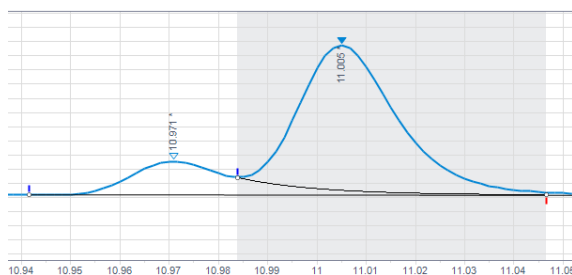
Imposta l'area percentuale del picco di interesse più piccolo.

Non viene riportato alcun picco la cui area percentuale sia inferiore all'area percentuale minima. L'integratore rifiuta qualunque picco con un'area percentuale inferiore al valore dato dopo la correzione della linea di base.

Se un picco che non è stato integrato a causa dell'area percentuale bassa è un picco secondario, verrà unito al picco parent.



Se il picco parent è al di sotto della soglia dell'area percentuale ma il picco secondario è al di sopra di tale soglia, il picco parent viene mantenuto poiché altrimenti il calcolo del picco secondario e la costruzione della linea di base si baserebbero su un picco escluso.



#### Height reject

Imposta l'altezza del picco di interesse più piccolo.

Non viene riportato alcun picco la cui altezza sia inferiore a tale altezza minima: l'integratore rifiuta qualunque picco di dimensioni inferiori al valore **Height Reject** dopo la correzione della linea di base.

**Shoulders** Imposta il metodo iniziale di rilevazione delle spalle sui picchi.

Quando la rilevazione delle spalle è attiva, l'integratore individua le spalle utilizzando la curvatura del picco data dalla derivata seconda. Se la curvatura assume valore zero, l'integratore identifica il punto di flesso come possibile spalla. Se l'integratore identifica un altro punto di flesso prima dell'apice del picco, si tratta di una spalla.

È possibile scegliere tra:

- Off (Disattivata)  
Le spalle non vengono rilevate.
- Drop Baseline (Linea di base con perpendicolare)  
Le spalle vengono integrate con una linea perpendicolare.
- Tangent Baseline (Linea di base tangente)

Le spalle vengono integrate con una linea di base tangente. Per ulteriori informazioni sulla tangente di interpolazione vedere ["Tangente di interpolazione"](#), pagina 33. Se si usa una linea di base tangente, è possibile scegliere tra diverse modalità (vedere ["Modalità tangente di interpolazione"](#), pagina 36).

### Scelta della larghezza del picco

Scegliere l'impostazione che fornisce un filtro sufficiente per distinguere il rumore di fondo dai picchi senza distorcere le informazioni fornite dal segnale.

- Per scegliere una larghezza iniziale del picco adeguata per un solo picco di interesse, utilizzare come riferimento la larghezza temporale del picco alla base.
- Per scegliere una larghezza iniziale del picco adeguata in presenza di più picchi di interesse, impostare la larghezza iniziale del picco su un valore minore o uguale alla larghezza del picco più stretto per ottenere una selettività ottimale.

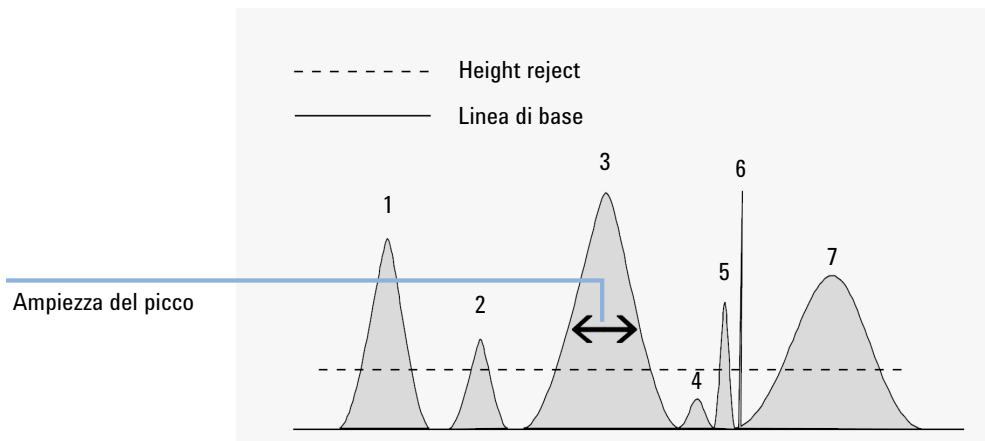
### Scarto in base all'altezza e larghezza del picco

Sia **peak width** sia **height reject** sono parametri molto importanti per il processo di integrazione. Modificando questi valori, si possono ottenere risultati molto diversi.

- Aumentare entrambi i valori quando devono essere identificati componenti relativamente dominanti e quantificati in un ambiente con rumore di fondo elevato. L'aumento dell'ampiezza migliora il filtro del rumore, mentre un aumento dello scarto dell'altezza assicura che il rumore di fondo venga ignorato.
- Ridurre i valori per rivelare e quantificare componenti a livello traccia e in particolare di quelli che hanno un'altezza prossima al livello di rumore di fondo. La riduzione dell'ampiezza riduce anche la capacità di filtrare il segnale, mentre la riduzione dello scarto dell'altezza assicura che i picchi più piccoli non vengano esclusi a causa della loro altezza insufficiente.
- Quando un'analisi contiene picchi di larghezze variabili, impostare la larghezza del picco per i picchi più stretti e ridurre lo scarto in base all'altezza per assicurare che i picchi ampi non vengano ignorati a causa della loro altezza ridotta.

### Affinamento dell'integrazione

Risulta spesso utile modificare i valori di sensibilità della pendenza, larghezza del picco, scarto in base all'altezza e scarto in base all'area per personalizzare l'integrazione. La figura che segue illustra come questi parametri influenzino l'integrazione di cinque picchi in un segnale.



**Figura 26** Uso degli eventi iniziali

Un picco viene integrato solo quando tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti. Utilizzando la larghezza del picco del picco 3, lo scarto in base all'area e la sensibilità della pendenza in figura, vengono integrati solo i picchi 1, 3 e 7.

- Picco 1** Viene integrato perché tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti.
- Picco 2** Viene escluso perché l'area è inferiore al valore impostato per lo scarto in base all'area.
- Picco 3** Viene integrato perché tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti.
- Picco 4** Non viene integrato perché l'altezza del picco è inferiore al valore di scarto in base all'altezza.
- Picco 5** Viene escluso perché l'area è inferiore al valore impostato per lo scarto in base all'area.
- Picco 6** Non viene integrato; il filtro e il raggruppamento rendono il picco invisibile.
- Picco 7** Viene integrato.

**Tabella 5** Valori Scarto dell'altezza e Scarto dell'area

Parametro di integrazione	Picco 1	Picco 2	Picco 3	Picco 4	Picco 5	Picco 7
Scarto dell'altezza	Superiore	Superiore	Superiore	Inferiore	Superiore	Superiore
Scarto dell'area	Superiore	Inferiore	Superiore	Inferiore	Inferiore	Superiore
Picco integrato	Sì	No	Sì	No	No	Sì

## Eventi programmati

ChemStation offre un insieme di eventi programmati che consentono di scegliere tra le modalità dell'integratore per la definizione della linea di base con l'algoritmo interno e la definizione dell'utente. Questi eventi programmati possono essere utilizzati per personalizzare la costruzione della linea di base del segnale quando la costruzione predefinita non è adatta. Ad esempio, l'utente può creare un nuovo tipo di evento di somma delle aree che non altera i risultati di AreaSum predefinita. Questi eventi possono essere utili nella somma finale delle aree dei picchi e nella correzione di alterazioni della linea di base a breve e a lungo termine.

### Scarto in base all'area

Vedere "Eventi iniziali", pagina 44.

### Somma delle aree

Imposta i punti (On/Off) tra i quali l'integratore somma le aree.

Il tempo di ritenzione/migrazione di un picco creato con la somma delle aree è la media tra il tempo iniziale e quello finale. Se un evento **Area sum on** si verifica dopo l'inizio di un picco ma prima dell'apice, l'intero picco viene incluso nella somma. Se si verifica dopo l'apice del picco, ma prima della fine del picco, il picco viene troncato e la somma delle aree inizia immediatamente.

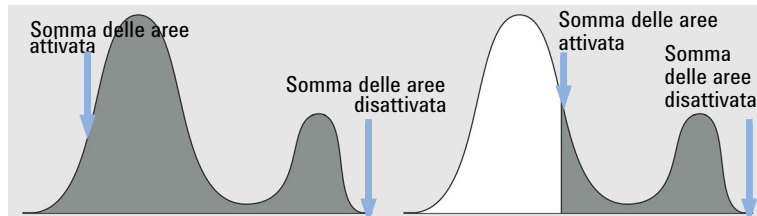


Figura 27 Evento Area sum on dopo l'apice del picco, ma prima della fine del picco

Se un evento **Area sum off** si verifica dopo l'inizio di un picco ma prima dell'apice, la somma delle aree termina immediatamente. Il punto sul segnale in corrispondenza di tale evento diventa un punto di avvallamento. Se l'evento **Area sum off** si verifica dopo l'apice, l'evento viene postposto fino alla fine del picco.

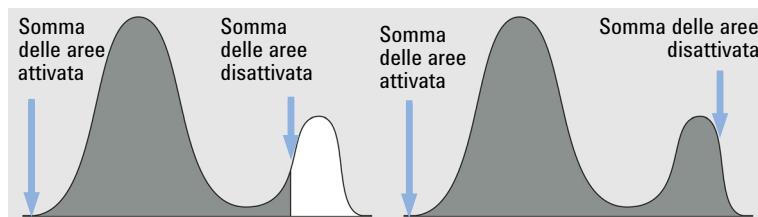


Figura 28 Evento Area sum off dopo l'inizio del picco, ma prima dell'apice

#### Porzione di somma delle aree

Questo evento consente di definire intervalli consecutivi di somma delle aree senza alcuna perdita di area o intervalli temporali.

Questo evento è simile all'evento **Area Sum**. Con questo evento, tuttavia, è possibile definire intervalli contigui di somma delle aree senza alcuna perdita di intervalli temporali o aree dei picchi integrate. Un picco viene suddiviso in corrispondenza del punto in cui si imposta l'evento; la somma delle aree inizia e finisce esattamente dove sono specificati gli intervalli **Area Sum Slice**.

Il tempo di ritenzione del picco nella porzione di somma delle aree è il centro dell'intervallo temporale della porzione. Il tempo di ritenzione non cambia con l'identificazione o la ricalibrazione. Può soltanto spostarsi leggermente, in quanto l'integratore inizia a raccogliere i punti di dati solo con l'evento di inizio della porzione di somma delle aree e termina con l'evento di fine della porzione di somma delle aree. Pertanto, il tempo di ritenzione può variare al massimo in misura pari al tempo tra due punti di dati.

Utilizzare il parametro **Start** per definire i tempi iniziali di ciascuna porzione di somma delle aree. Il tempo iniziale successivo è utilizzato come tempo finale della porzione temporale precedente, cosicché è possibile impiegare una serie di eventi iniziali uno dopo l'altro.

Il parametro **Start-negA** definisce l'inizio dell'integrazione di una porzione temporale in cui l'eventuale area negativa (al di sotto della linea di base impostata) viene sottratta dall'area della porzione temporale.

Il parametro **End** definisce la fine dell'ultima porzione temporale. L'area della porzione temporale viene calcolata ignorando l'eventuale area al di sotto della linea di base impostata. Se non segue alcun altro evento porzione di somma delle aree, l'integratore riprende nuovamente la normale rilevazione dei picchi.

Nell'intervallo che va da un evento **Start** al successivo evento **End** la linea di base è sempre una retta senza cambio di direzione. Solo dopo il punto di fine (almeno 0,001 min più tardi) è possibile applicare nuovamente modifiche a lungo termine alla linea di base tramite gli eventi **Set Baseline from Range**, **Set Low Baseline from Range** o **Use Baseline from Range**.

## Integrazione

### Eventi di integrazione

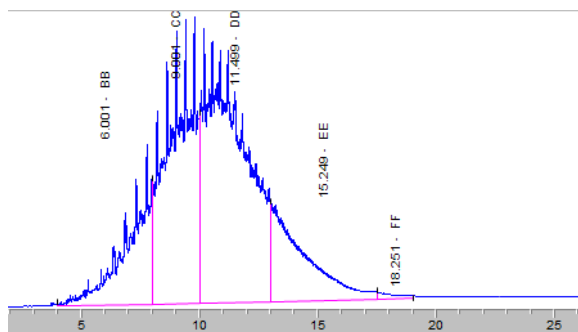


Figura 29 Esempio: Porzione di somma delle aree

La figura precedente mostra un esempio con i seguenti eventi programmati:

Tabella 6 Costruzione della linea di base

Tempo	Evento	Parametro
4 min	Imposta LB dall'intervallo	+2 min
22 min	Imposta LB dall'intervallo	+4 min

Tabella 7 Porzioni di somma delle aree

Tempo	Evento	Parametro
4 min	Porzione di somma delle aree	Inizio
8 min	Porzione di somma delle aree	Inizio
10 min	Porzione di somma delle aree	Inizio
13 min	Porzione di somma delle aree	Inizio
17,5 min	Porzione di somma delle aree	Inizio
19 min	Porzione di somma delle aree	Fine

#### Larghezza del picco automatica

Attiva l'aggiornamento automatico della larghezza del picco per i picchi successivi. Riprende con il valore della larghezza del picco definito nello specifico istante e ricomincia il monitoraggio della larghezza dei picchi in base alle larghezze trovate in precedenza.

#### Linea di base ai punti di avvallamento

Imposta i punti (On/Off) tra cui l'integratore reimposta la linea di base a ogni valle tra i picchi.

La reimpostazione ripetuta della linea di base può tagliare gli angoli dei picchi. Tali angoli diventano area negativa e riducono l'area totale misurata dei picchi.

Questa funzione è utile quando sono presenti picchi secondari in coda a un picco largo e basso e si desidera reimpostare la linea di base su tutti i punti di avvallamento.

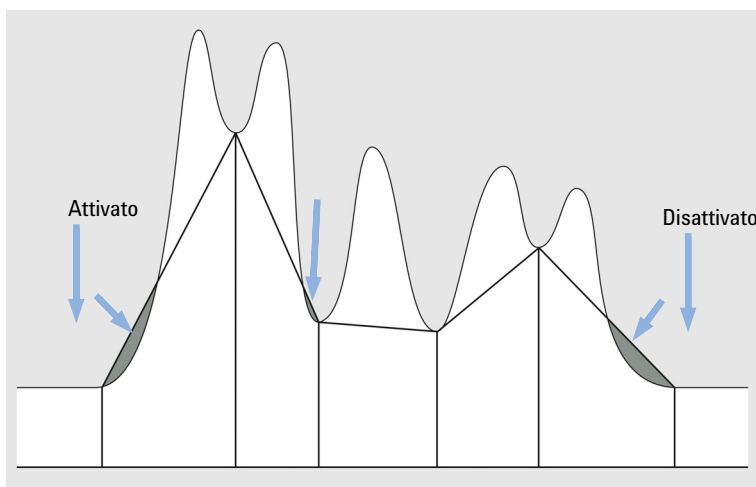


Figura 30 Evento Baseline at valleys

#### Linea di base all'indietro

Imposta un punto in corrispondenza del quale l'integratore standard estende la linea di base, orizzontalmente all'indietro, dal punto dichiarato della linea di base a questo punto.

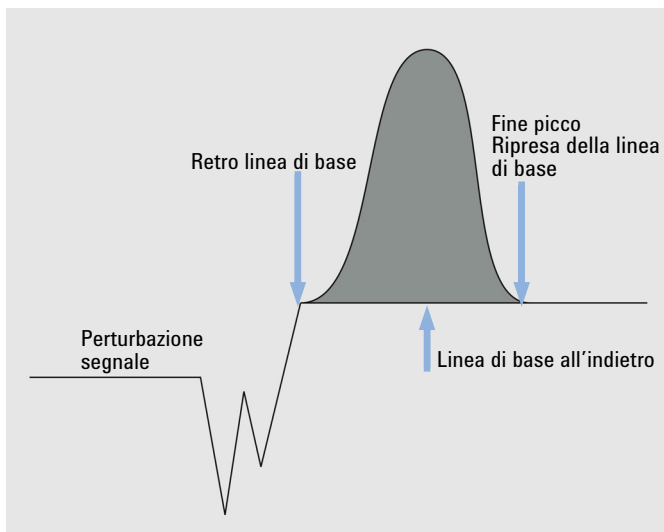


Figura 31 Evento Baseline backwards

#### Blocca linea di base

Viene tracciata una linea di base orizzontale all'altezza stabilita per la linea di base, a partire dalla quale viene attivato l'evento di blocco della linea di base. L'attivazione permane fino a dove tale evento viene disattivato.

#### Linea di base a valle successiva

Imposta un punto al quale l'integratore reimposta la linea di base alla valle successiva tra i picchi, per poi annullare questa funzione automaticamente.

Questa funzione è utile nei gruppi di picchi fusi, che si assume siano secondari in coda o in cluster separati prossimi tra loro. La funzione viene ignorata durante la somma delle aree.

#### Linea di base corrente

Imposta un punto (tempo) nel quale l'integratore reimposta la linea di base sull'altezza corrente del punto di dati, se il segnale è su un picco.

#### Rileva spalle

Imposta i punti (On/Off) tra i quali l'integratore avvia e interrompe la rilevazione delle spalle.

Se il segnale si trova sulla linea di base, la funzione viene ignorata e viene utilizzata la linea di base rilevata.

Le spalle vengono rilevate in base alla modalità spalle specificata. Vedere "Eventi iniziali", pagina 44.

- Larghezza del picco fissa** Imposta la larghezza del picco e disattiva l'aggiornamento automatico della larghezza del picco per i picchi successivi. Per ottenere buoni risultati, impostare la larghezza del picco su un valore prossimo alla larghezza a metà altezza dei picchi effettivi.
- Scarto in base all'altezza** Vedere "Eventi iniziali", pagina 44.
- Integrazione** Imposta i punti (On/Off) tra i quali l'integratore avvia e arresta l'integrazione. I picchi tra i tempi in cui l'integratore viene disattivato e attivato sono ignorati.

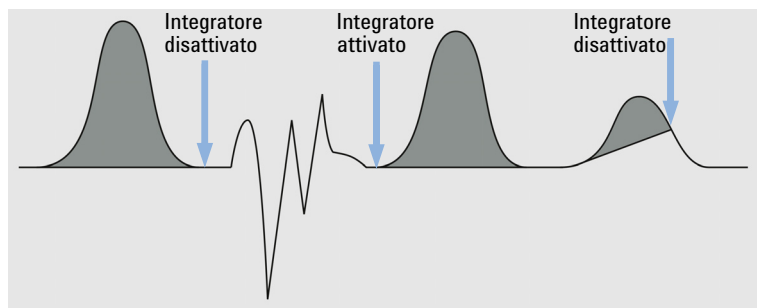


Figura 32 Evento Integration

La linea di base viene tracciata dall'ultimo punto dichiarato include le eventuali reimpostazioni per la penetrazione. Tutte le altre funzioni dell'integratore unitamente alle modifiche impostate di larghezza del picco, soglia e scarto in base all'area sono ignorate quando l'integratore è disattivato. In corrispondenza dei punti **On** e **Off** il punto della linea di base viene ristabilito.

Quando è impostato il riavvio dell'integratore, un nuovo punto della linea di base viene reimpostato al livello di segnale corrente.

Questa funzione è utile per ignorare parti del cromatogramma/elettroferogramma o per eliminare i disturbi della linea di base.

**Area massima** Imposta l'area del picco di interesse più grande.

Non viene riportato alcun picco la cui area sia superiore all'area massima: l'integratore rifiuta qualunque picco di dimensioni superiori al valore dell'area massima dopo la correzione della linea di base.

È possibile utilizzare questo evento, per esempio, per escludere il picco di solvente di un cromatogramma GC dai risultati dell'integrazione, ma includerne i picchi secondari.

#### Altezza massima

Imposta l'altezza del picco di interesse più grande.

Non viene riportato alcun picco la cui altezza sia superiore all'altezza massima: l'integratore rifiuta qualunque picco di dimensioni superiori al valore dell'altezza massima dopo la correzione della linea di base.

È possibile utilizzare questo evento, per esempio, per escludere il picco di solvente di un cromatogramma GC dai risultati dell'integrazione, ma includerne i picchi secondari.

#### Picco negativo

Imposta i punti (On/Off) tra i quali l'integratore riconosce i picchi negativi.

Quando i picchi negativi sono riconosciuti, l'integratore non reimposta più automaticamente la linea di base dopo la penetrazione. Da questo punto in poi, qualsiasi penetrazione della linea di base sarà integrata utilizzando come zero la linea di base stabilita. Le aree vengono costruite rispetto a questa linea di base e viene loro assegnato un valore assoluto.

È possibile utilizzare in sicurezza la funzione picchi negativi solo quando la deriva della linea di base è contenuta rispetto alle dimensioni dei picchi, in quanto la linea di base viene costruita dal punto dichiarato della linea di base all'inizio del cluster di picchi fino alla linea di base stabilita alla fine del picco.

#### NOTA

La sommatoria delle aree è disattivata automaticamente se è attivato l'evento **Negative Peaks On**.

Anche la tangente di interpolazione è disattivata durante la rivelazione dei picchi negativi; tali picchi sono separati da una linea perpendicolare.

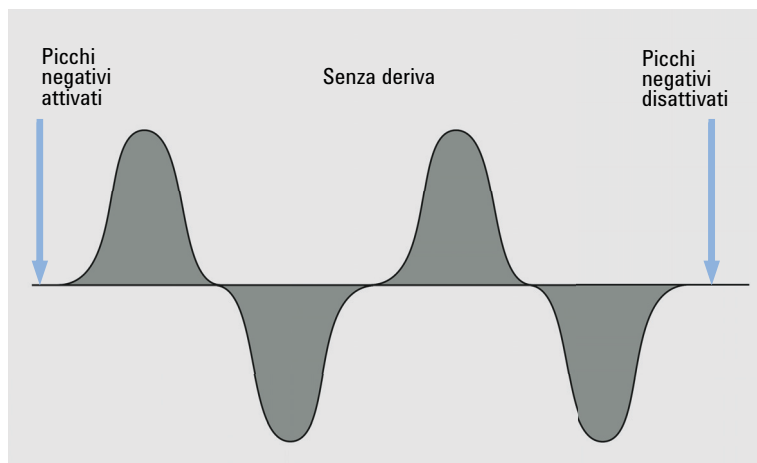


Figura 33 Evento Negative peak

#### Imposta linea di base dall'intervallo

Utilizza un intervallo di punti di dati per calcolare un punto statisticamente significativo della linea di base a metà di un intervallo di tempo.

Il valore fornito dall'utente è l'intervallo di tempo intorno a un punto temporale specificato. Definisce l'intervallo da utilizzare per determinare il punto della linea di base. Vedere "Modalità di correzione della linea di base", pagina 30 per informazioni dettagliate sui calcoli statistici della linea di base.

Se si imposta il valore =0, come punto della linea di base viene utilizzato il punto di dati più vicino nel cromatogramma; non viene effettuato alcun calcolo statistico. Se si imposta un valore negativo, il risultato dell'impostazione è lo stesso di **Use baseline from range=Clear**: impedisce l'uso dell'algoritmo statistico della linea di base.

È possibile specificare qualsiasi area nel cromatogramma per il calcolo della linea di base. In uno scenario ideale, dovrebbe essere un'area priva di rumore chimico di fondo e contenere esclusivamente rumore. La Figura 34, pagina 56 illustra l'impostazione dell'intervallo della linea di base, mostrato come area ombreggiata grigia.

Se si specificano due punti **Set Baseline from Range** (per esempio all'inizio e alla fine di un cromatogramma), la linea di base che unisce tali punti è una linea retta.

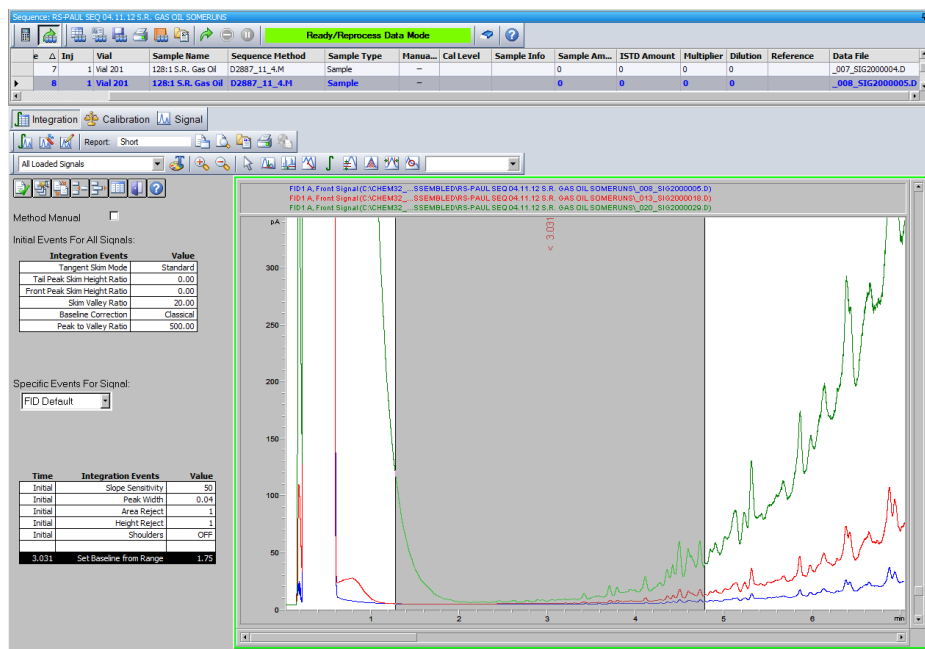


Figura 34 "Imposta linea di base dall'intervallo": l'intervallo della linea di base è indicato da un'ombreggiatura grigia

#### Imposta linea di base inferiore dall'intervallo

Analogo a **Set Baseline from Range**, ma utilizza il punto della linea di base probabile più basso, cosa che consente il 30% in più di punti di dati del rumore al di sopra dello stesso. La penetrazione della linea di base viene pertanto ridotta al minimo.

Il valore fornito dall'utente è l'intervallo temporale intorno al tempo specificato dell'evento. Definisce l'intervallo da utilizzare per determinare il punto della linea di base. Vedere "[Modalità di correzione della linea di base](#)", pagina 30 per informazioni dettagliate sui calcoli statistici della linea di base.

Se si imposta il valore =0, come punto della linea di base viene utilizzato il punto di dati più vicino nel cromatogramma; non viene effettuato alcun calcolo statistico. Se si imposta un valore negativo, il risultato dell'impostazione è lo stesso di **Use baseline from range=Clear**: impedisce l'uso dell'algoritmo statistico della linea di base.

È possibile specificare qualsiasi tempo e intervallo nel cromatogramma per il calcolo della linea di base. In uno scenario ideale, dovrebbe essere priva di rumore chimico di fondo e contenere esclusivamente rumore.

Se si specificano due punti **Set Baseline from Range** (per esempio all'inizio e alla fine di un cromatogramma), la linea di base che unisce tali punti è una linea retta.

Utilizzare **Set Low Baseline from Range** anziché **Set Baseline from Range** quando l'area del cromatogramma utilizzata per il calcolo contiene rumore chimico eccessivo o picchi di rumore elettronico.

**Spalle** Vedere "[Eventi iniziali](#)", pagina 44.

**Sensibilità  
della pendenza** Vedere "[Eventi iniziali](#)", pagina 44.

**Picco  
di solvente** I picchi al di sopra di una pendenza specifica in unità mV/s sono rilevati come picchi di solvente che giacciono all'esterno dell'intervallo della conversione analogico-digitale.

Ai picchi in coda viene applicato automaticamente lo skim tangente; non è necessario attivare il relativo evento.

Se la rivelazione del picco di solvente è disattivata, dal picco in coda vengono tracciate linee perpendicolari anziché tangenti.

**Picco  
suddiviso** Specifica un punto in cui suddividere un picco con una linea perpendicolare.

#### NOTA

Non è possibile utilizzare **Split Peak** mentre **Area Sum** è attiva. Per suddividere un picco mentre **Area Sum** è attiva, utilizzare l'evento di integrazione manuale corrispondente.

Non è possibile suddividere i picchi skim utilizzando l'evento **Split Peak**.

#### Tangente di interpolazione posteriore

Specifica il punto iniziale o finale della tangente di interpolazione.

#### On

Imposta un punto in cui l'integratore imposta una tangente di interpolazione sul fronte discendente del picco successivo. Tutti i picchi al di sopra della tangente vengono integrati sulla linea di base reimpostata. La tangente viene tracciata dalla valle prima del picco di dimensioni ridotte al punto dopo lo stesso in cui il gradiente del segnale del rivelatore è uguale al gradiente della tangente. Il tempo dell'evento tangente di interpolazione può essere immesso in corrispondenza di qualsiasi istante durante il picco. Stabilisce il picco anche come un picco di solvente.

#### Off

Termina la tangente di interpolazione una volta completato il picco corrente o se nell'intervallo designato non viene individuato alcun picco (e un solvente non verrà designato inavvertitamente nel cluster successivo).

#### Modalità tangente di interpolazione

Sono disponibili i seguenti modelli per calcolare aree dei picchi adeguate:

- Exponential (Esponenziale); vedere [Figura 18](#), pagina 37
- New Exponential (Nuovo esponenziale); vedere [Figura 19](#), pagina 38
- Straight (Diritto); vedere [Figura 20](#), pagina 39
- Standard; vedere "Skim standard", pagina 39

#### Picchi non assegnati

Alcune costruzioni della linea di base generano piccole aree al di sopra della linea di base e al di sotto del segnale che non fanno parte di alcun picco riconosciuto. In genere queste aree non vengono né misurate né riportate. Se la funzione relativa ai picchi non assegnati è attiva, queste aree vengono misurate e riportate come picchi non assegnati. Il tempo di ritenzione/migrazione di tali aree è il punto intermedio fra l'inizio e la fine dell'area.

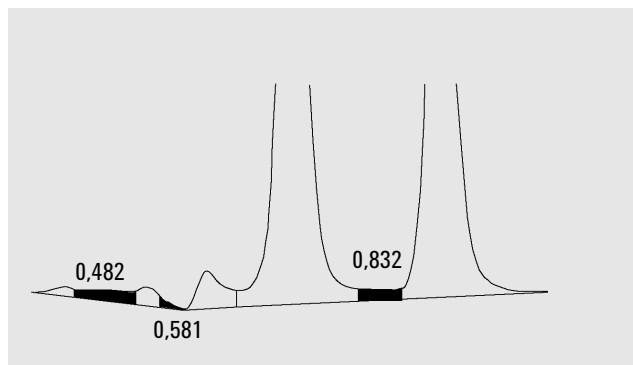


Figura 35 Picchi non assegnati

#### Aggiorna altezza del picco

Questo evento forza l'integratore a utilizzare come altezza del picco l'altezza assoluta del punto di dati più alto. Senza questo evento viene utilizzato il massimo di una curva interpolata. L'evento **Update peak height** è utile in particolare per i segnali caratterizzati da picchi estremamente ripidi e ad angolo o per i picchi preceduti da una flessione. Picchi di questo genere sono caratteristici per i segnali dei rivelatori a selezione di massa.

Il tempo iniziale dell'evento **Update peak height** non viene valutato. L'evento interessa sempre l'intero cromatogramma.

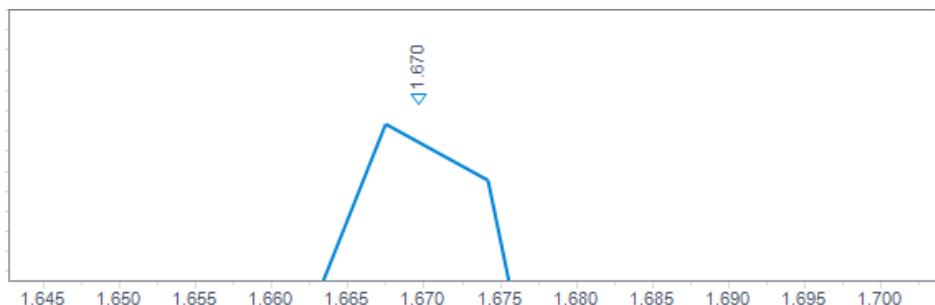


Figura 36 Integrazione predefinita

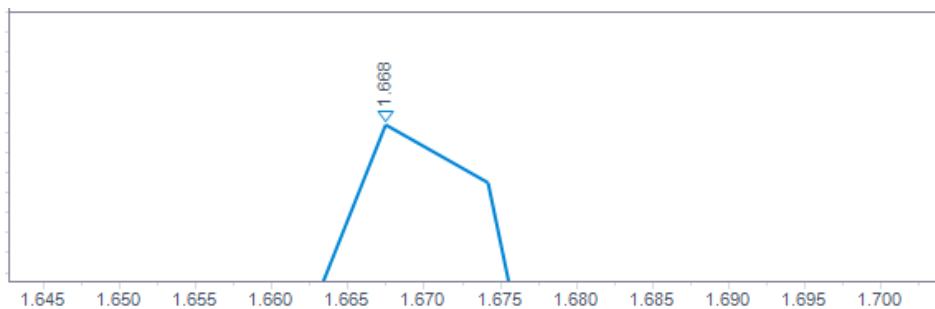


Figura 37 Integrazione con evento di aggiornamento dell'altezza del picco

#### Utilizza linea di base dall'intervallo

Consente di proiettare un valore della linea di base a un momento successivo o precedente per ridurre al minimo le penetrazioni della linea di base.

Se il valore **Set Baseline from Range** o il valore **Set Low Baseline from Range** viene calcolato in un'area senza picchi cromatografici, può essere vantaggioso proiettare la linea di base calcolata fino al tempo immediatamente precedente l'eluzione del primo picco di interesse (o fino al tempo immediatamente successivo all'avvenuta eluzione dell'ultimo picco di interesse). **Use Baseline from Range** consente di creare fino a tre proiezioni di questo tipo in ambe le direzioni.

L'uso di questo evento può risultare vantaggioso se è stata costruita una linea di base con pendenza crescente o decrescente, poiché altrimenti la linea di base diritta potrebbe tagliare accidentalmente la curva del cromatogramma. Il parametro indica all'integratore da quale degli intervalli della linea di base scegliere il punto della linea di base e proiettare la linea di base fino al punto della linea di base all'intervallo temporale indicato.

È possibile utilizzare i seguenti parametri:

- **Clear:** annulla il comportamento della nuova linea di base e torna all'algoritmo tradizionale a partire da questo punto.
- **Left:** utilizza il valore della linea di base dall'intervallo della linea di base più vicino alla sinistra di questo punto temporale.
- **Right:** utilizza il valore della linea di base dall'intervallo della linea di base più vicino alla destra di questo punto temporale.
- **Range 1-Range 9:** usa il valore della linea di base dall'intervallo della linea di base indicato. Gli intervalli della linea di base sono contati dall'inizio del cromatogramma.

Vedere anche l'esempio in **Area Sum Slice** (Figura 29, pagina 51).

## Autointegrazione

La funzione **Autointegrate** fornisce un punto di partenza per l'impostazione degli eventi iniziali. Si rivela particolarmente utile quando si implementa un nuovo metodo. Si inizia con la tavola degli eventi di integrazione predefiniti che non contiene eventi programmati a tempo. È possibile ottimizzare i parametri proposti dalla funzione Autointegrazione per uso generale.

### Principi di funzionamento

La funzione **Autointegrate** legge i dati del cromatogramma e calcola i valori ottimali per i parametri di integrazione iniziale per ogni segnale del cromatogramma.

L'algoritmo esamina l'1% all'inizio e alla fine del cromatogramma e determina il rumore e la pendenza per questa parte. Il rumore viene determinato come 3 volte la deviazione standard della regressione lineare, diviso per il quadrato del numero percentuale di punti usati nella regressione. Questi valori vengono usati per assegnare valori appropriati allo scarto dell'altezza e alla sensibilità della pendenza per l'integrazione. L'algoritmo assegna quindi un valore temporaneo all'ampiezza del picco, in base alla lunghezza del cromatogramma, usando 0,5% per LC e da 0,3% a 0,2% per GC. Viene effettuata un'integrazione di prova con il valore iniziale

di Scarto dell'area impostato su zero. Se necessario, la prova viene ripetuta più volte, regolando i parametri ogni volta, fino a che non vengono rilevati almeno 5 picchi o finché non viene eseguita l'integrazione con uno scarto dell'altezza iniziale di 0. L'integrazione di prova termina se queste condizioni non vengono soddisfatte entro 10 prove.

I risultati dell'integrazione vengono esaminati e l'ampiezza del picco viene regolata sulla base delle ampiezze di picco dei picchi rilevati, tendendo il calcolo verso i picchi iniziali. La simmetria di picco dei picchi rilevati viene utilizzata per includere solo i picchi con simmetria fra 0,8 e 1,3 per il calcolo dell'ampiezza del picco. Se non vengono trovati sufficienti picchi simmetrici, questo limite viene allargato a  $minSymmetry/1.5$  e  $maxSymmetry \times 1.5$ . La linea di base fra i picchi viene quindi esaminata per rifinire i valori precedenti di scarto dell'altezza e di sensibilità della pendenza. Lo scarto di area viene impostato su 90% dell'area minima del picco più simmetrico rilevato durante l'integrazione di prova.

Il cromatogramma viene integrato di nuovo usando questi valori finali per i parametri di integrazione e i risultati dell'integrazione vengono archiviati.

#### Parametri dell'autointegrazione

Per la funzione di autointegrazione, vengono impostati i seguenti parametri:

- Sensibilità della pendenza iniziale
- Altezza iniziale
- Ampiezza del picco iniziale
- Scarto di area iniziale

## Integrazione manuale

Questo tipo di integrazione consente di integrare picchi selezionati o gruppi di picchi. Eccettuato il valore iniziale di scarto dell'area, gli eventi di integrazione del software vengono ignorati entro l'ambito di integrazione manuale specificato. Tutti i picchi risultanti dall'integrazione manuale al di sotto della soglia di scarto dell'area vengono scartati. Gli eventi di integrazione manuali usano valori di tempo assoluti. Non tengono conto della deriva del segnale.

Il **Manual Integration** permette di definire l'inizio e la fine del picco e di includere quindi le aree ricalcolate nella quantificazione e nella stesura di report. Ognuno di questi punti è evidenziato nei report con il codice di separazione del picco M.

L'integrazione manuale offre le seguenti funzionalità:

- Draw Baseline** specifica dove devono essere disegnate le linee di base per un picco o un gruppo di picchi. Con la voce di menu **Integration >all valleys** è inoltre possibile specificare se i picchi della scala indicata devono essere separati automaticamente in corrispondenza di tutti i punti di valle.
- Negative Peaks** specifica quando considerare le aree al di sotto della linea di base come picchi negativi. È inoltre possibile specificare se i picchi della scala indicata devono essere separati automaticamente in corrispondenza dei punti di valle.
- Tangent Skim** calcola le aree dei picchi eliminati mediante skim tangente dal picco principale. L'area del picco eliminato mediante skim tangente viene sottratta dall'area del picco principale.
- Split Peak** specifica un punto dove dividere un picco con una perpendicolare.
- Delete Peak(s)** elimina uno o più picchi dai risultati di integrazione.

Codici di separazione del picco per i picchi integrati manualmente

I picchi integrati manualmente sono evidenziati nei rapporti di integrazione con il codice *MM*.

Se c'è un picco prima di quello integrato manualmente e la sua fine cambia a causa dell'integrazione manuale, il codice corrispondente sarà *F* (forzato). Quando vengono rilevati punti di avvallamento, sono impostati con il codice *V*.

Un picco di solvente nel picco principale influenzato dall'integrazione manuale, ad esempio un tangent skim, viene contrassegnato con *R* (solvente ricalcolato).

## Salvataggio degli eventi di integrazione manuale

Gli eventi manuali di integrazione, come una linea di base disegnata a mano, sono ancora più specifici dei file di dati e dei segnali rispetto agli eventi di integrazione temporizzati. In caso di cromatogrammi complessi, è preferibile utilizzare questo tipo di eventi per la rielaborazione. Pertanto, gli eventi manuali di integrazione possono essere memorizzati direttamente nel file dei dati anziché con il metodo.

Ogni volta che il file dei dati viene esaminato o rielaborato, gli eventi manuali di integrazione nel file dei dati vengono applicati automaticamente. Un'analisi contenente eventi manuali di integrazione viene segnalata nella relativa colonna della **Navigation Table**.

Oltre agli strumenti per tracciare una linea di base ed eliminare manualmente un picco, l'interfaccia utente fornisce anche strumenti che consentono di:

- Salvare gli eventi manuali dei cromatogrammi attualmente visualizzati nel file di dati.
- Rimuovere tutti gli eventi dai cromatogrammi attualmente visualizzati.
- Annullare gli ultimi eventi manuali di integrazione (disponibili fino al salvataggio dell'evento).

Quando si passa al file di dati successivo durante la revisione nella **Navigation Table**, la ChemStation controlla se ci sono eventi manuali di integrazione non salvati e chiede all'utente se desidera salvarli.

Gli eventi manuali memorizzati nel file dei dati durante la revisione nella **Navigation Table** non interferiscono con gli eventi manuali di integrazione memorizzati durante la revisione in modalità **Batch**. Queste due modalità di revisione sono completamente diverse rispetto agli eventi manuali di un file dei dati.

Nelle revisioni di ChemStation precedenti alla B.04.01, gli eventi d'integrazione manuale venivano memorizzati con il metodo anziché nei singoli file di dati. È ancora possibile utilizzare questo flusso di lavoro. Il menu **Integration** nella finestra **Data Analysis** fornisce le seguenti opzioni per la gestione degli eventi manuali di integrazione con il metodo:

- **Update Manual Events of Method**: salva i nuovi eventi manuali tracciati nel metodo.
- **Apply Manual Events from Method**: applica gli eventi manuali correntemente salvati nel metodo al file dei dati attualmente caricato.
- **Remove Manual Events from Method**: elimina gli eventi manuali dal metodo.

Per convertire gli eventi manuali memorizzati in un metodo e memorizzarli nel file dei dati, applicare gli eventi dal metodo e memorizzare i risultati nel file dei dati. Se necessario, rimuovere gli eventi dal metodo.

Se la casella di controllo **Manual Events** della **Integration Events Table** è selezionata, gli eventi manuali del metodo vengono sempre applicati quando si carica un file dei dati con questo metodo. Se il file dei dati contiene eventi manuali aggiuntivi, questi vengono applicati dopo gli eventi del metodo. Se la casella di controllo **Manual Events** è selezionata, all'utente non viene mai richiesto di salvare gli eventi nel file dei dati.

Per convertire gli eventi manuali memorizzati in un metodo e memorizzarli nel file dei dati, applicare gli eventi dal metodo e memorizzare i risultati nel file dei dati. Ora è possibile rimuovere gli eventi dal metodo.

Se la casella di controllo **Manual Events** della **Integration Events Table** è selezionata, gli eventi manuali del metodo vengono sempre applicati quando si carica un file dei dati con questo metodo. Se il file dei dati contiene eventi manuali aggiuntivi, questi vengono applicati dopo gli eventi del metodo. Se la casella di controllo **Manual Events** è selezionata, all'utente non viene mai richiesto di salvare gli eventi nel file dei dati.

## 2

# Identificazione dei picchi

Che cos'è l'identificazione dei picchi?	66
Regole di corrispondenza dei picchi	67
Tipi di identificazione dei picchi	68
Tempo di ritenzione/migrazione assoluto	68
Tempo di ritenzione relativa	68
Tempo di ritenzione/migrazione corretto	68
Qualificatori	68
Limiti di quantità	68
Tempo di ritenzione/migrazione assoluto	69
Tempi di ritenzione/migrazione corretti	71
Picchi di riferimento singoli	71
Picchi di riferimento multipli	72
Qualificatori dei picchi	73
Correlazione del segnale	74
Verifica del qualificatore	74
Calcolo del rapporto del qualificatore	74
Il procedimento di identificazione	75
Identificazione dei picchi di riferimento	75
Identificazione dei picchi ISTD	76
Come trovare i rimanenti picchi calibrati	76
Classificazione di picchi non identificati	76

Questo capitolo descrive i concetti relativi all'identificazione dei picchi.

## Che cos'è l'identificazione dei picchi?

L'identificazione dei picchi stabilisce i componenti di un campione incognito basandosi sulle sue caratteristiche cromatografiche/elettroferografiche determinate dall'analisi di un campione di calibrazione ben definito.

L'identificazione di questi componenti è un passo necessario per la quantificazione se il metodo analitico la richiede. Le caratteristiche del segnale di ogni componente di interesse sono contenute nella tavola di calibrazione del metodo.

La funzione del processo di identificazione del picco è quella di paragonare ogni picco del segnale ai componenti della tavola di calibrazione.

La tavola di calibrazione contiene i tempi di ritenzione/migrazione desiderati per i componenti di interesse. Ad ogni picco con un tempo di ritenzione/migrazione corrispondente ad uno contenuto nella tavola di calibrazione, vengono attribuite le caratteristiche di quel composto: ad esempio il nome ed il fattore di risposta. I picchi i cui tempi non corrispondono a quelli contenuti nella tavola di calibrazione sono classificati come sconosciuti. Questo processo è controllato da alcuni fattori:

- il tempo di ritenzione/migrazione nella tavola di calibrazione per i picchi qualificati come picchi di riferimento temporale;
- Le finestre sui tempi di ritenzione/migrazione specificate per i picchi di riferimento.
- I tempi di ritenzione/migrazione nella tavola di calibrazione per i picchi calibrati che non sono di riferimento temporale.
- Le finestre sui tempi di ritenzione/migrazione specificate per questi picchi che non costituiscono riferimento.
- La presenza di altri picchi qualificatori in rapporti corretti.

## Regole di corrispondenza dei picchi

Le regole che seguono sono da applicare nel procedimento di corrispondenza dei picchi.

- Se il picco di un campione ha un tempo di ritenzione che rientra nei limiti della finestra di corrispondenza per un componente contenuto nella tavola di calibrazione, gli vengono attribuite le caratteristiche di quest'ultimo.
- Se più di un picco di campione rientra nei limiti della finestra di corrispondenza di un componente, allora il picco più vicino al tempo di ritenzione/migrazione atteso viene identificato come quel componente.
- Se un picco è un riferimento temporale o uno standard interno, allora il picco più grande della finestra viene identificato come quel componente.
- Se si usano qualificatori, allora i loro rapporti sono usati insieme alla finestra di corrispondenza per identificare il componente.
- Se un picco è un qualificatore, il picco misurato che più si avvicina al picco principale del composto viene identificato.
- Se un picco presente nel campione non rientra in nessuna finestra di corrispondenza, viene elencato come componente incognito.

## Tipi di identificazione dei picchi

Esistono molte tecniche da utilizzare per la determinazione di corrispondenze fra campioni e picchi contenuti nella tavola di calibrazione del software della ChemStation.

### **Tempo di ritenzione/migrazione assoluto**

Il tempo di ritenzione migrazione del picco di campione viene paragonato al tempo di ritenzione/migrazione atteso, specificato per ogni componente nella tavola di calibrazione.

### **Tempo di ritenzione relativa**

Il sistema calcola il tempo di ritenzione relativa EP e il tempo di ritenzione relativa USP come ( $R_r = t_2/t_1$ ) per picchi calibrati e non calibrati.

### **Tempo di ritenzione/migrazione corretto**

I tempi di ritenzione/migrazione attesi per i picchi di componenti, vengono corretti usando i tempi di ritenzione/migrazione reali di uno o più picchi di riferimento ed il processo di corrispondenza viene effettuato usando questi tempi corretti (relativi) di ritenzione/migrazione. Il picco o i picchi di riferimento devono essere specificati nella tavola di calibrazione.

### **Qualificatori**

Oltre all'identificazione dei picchi tramite tempo di ritenzione/migrazione, si possono usare i qualificatori per ottenere un risultato più preciso. Se nella finestra del tempo di ritenzione/migrazione si trovano più picchi allora i qualificatori devono essere usati per identificare il composto corretto.

### **Limiti di quantità**

I limiti di quantità definiti nella finestra di dialogo Dettagli composto sono usati per qualificare l'identificazione del picco. Se la quantità del composto identificato è entro i limiti di quantità, l'identificazione del picco viene indicata nel report (solo in Classic Reporting, non in Intelligent Reporting).

## Tempo di ritenzione/migrazione assoluto

Nel processo di corrispondenza dei picchi viene usata una finestra per i tempi di ritenzione/migrazione. Questa finestra è centrata sul tempo di ritenzione/migrazione per ciascun picco atteso. Ciascun picco di campione che rientra nella finestra può essere potenzialmente usato per identificare il componente.

Figura 38, pagina 69 mostra una finestra dei tempi di ritenzione/migrazione per il picco 2 che si trova fra 1,809 e 2,631 minuti, dove il tempo di ritenzione/migrazione atteso è di 2,22 minuti. Ci sono due possibilità per il picco 2. Una è a 1,85 minuti e l'altra a 2,33 minuti. Se il picco atteso non è un picco di riferimento, viene scelto il picco più prossimo al tempo di ritenzione/migrazione atteso di 2,22 minuti.

Se il picco atteso è un riferimento temporale o uno standard interno, viene scelto il picco più grande della finestra.

In entrambi i casi la ChemStation sceglie il picco a 2,33 minuti. Se i due picchi sono delle stesse dimensioni, viene scelto il picco più prossimo al centro della finestra.

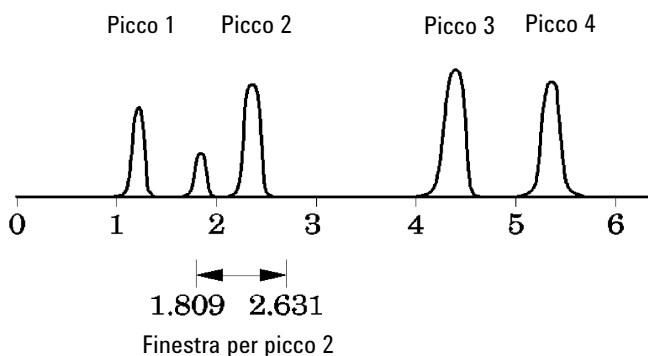


Figura 38 Finestre del tempo di ritenzione/migrazione

## Identificazione dei picchi

### Tempo di ritenzione/migrazione assoluto

I picchi possono essere identificati tramite tre tipi di finestre:

- La finestra dei picchi di riferimento che si applica solo ai picchi di riferimento.
- La finestra dei picchi che non costituiscono riferimento, che si applica a tutti gli altri picchi calibrati.
- Valori specifici per componenti singoli stabiliti nella finestra di dialogo **Compound Details**.

I valori predefiniti per queste finestre vengono impostati nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione. L'ampiezza ad entrambi i lati del tempo di ritenzione/migrazione, che definisce la finestra di corrispondenza del picco, è la somma della finestra assoluta e di quella percentuale.

Una finestra del 5% significa che il picco deve avere un tempo di ritenzione/migrazione compreso tra meno del 2,5% e più del 2,5% rispetto al tempo di ritenzione/migrazione calibrato per il picco. Ad esempio, un picco con un tempo di ritenzione/migrazione di 2,00 durante la calibrazione, dovrà essere visualizzato fra 1,95 a 2,05 minuti nelle analisi successive.

Ad esempio una finestra assoluta di 0,20 minuti ed una relativa del 10% dà una finestra per il tempo di ritenzione/migrazione compresa fra 1,80 e 2,20 minuti.

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

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

## Tempi di ritenzione/migrazione corretti

La corrispondenza dei picchi con tempi di ritenzione/migrazione assoluti può essere semplice ma non sempre affidabile. I tempi possono variare a causa di piccoli cambiamenti di condizioni o di tecnica. Si possono ottenere picchi fuori dalla finestra di corrispondenza, quindi non identificati.

Una tecnica per controllare le inevitabili fluttuazioni che avvengono nei tempi di ritenzione/migrazione assoluti, consiste nell'esprimere i tempi di ritenzione/migrazione di uno o più picchi di riferimento.

I picchi di riferimento vengono identificati nella tavola di calibrazione come elemento della colonna di riferimento per quel picco. La tecnica di corrispondenza del picco relativo usa il picco o i picchi di riferimento per modificare la collocazione delle finestre di corrispondenza per compensare gli spostamenti dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi campione.

Se nessun picco di riferimento è stato definito nel metodo o la ChemStation non è in grado di identificare almeno un picco di riferimento durante l'analisi il software userà tempi di ritenzione/migrazione assoluti per l'identificazione.

### **Picchi di riferimento singoli**

Si crea una finestra del tempo di ritenzione/migrazione del picco di riferimento intorno al suo tempo di ritenzione/migrazione. Il picco maggiore che rientra in essa è il picco di riferimento. I tempi di ritenzione/migrazione attesi di tutti i picchi della tavola vengono corretti secondo il tempo di ritenzione/migrazione atteso e il tempo reale del picco di riferimento.

## Picchi di riferimento multipli

La correzione di tempi di ritenzione/migrazione con un solo picco di riferimento si basa sul presupposto che la deviazione dei tempi di ritenzione/migrazione reali da quelli attesi, cambi in modo uniforme e lineare con il progredire dell'analisi. Spesso durante un'analisi molto lunga i tempi di ritenzione/migrazione cambiano in modo non uniforme. In questi casi si ottengono risultati migliori usando picchi di riferimento multipli distanziati ad intervalli lungo l'analisi. Ciò suddivide il segnale in zone separate. All'interno di ognuna si suppone che la deviazione fra il tempo di ritenzione/migrazione cambi in modo lineare, ma la percentuale di variazione viene determinata in modo separato per ogni zona.

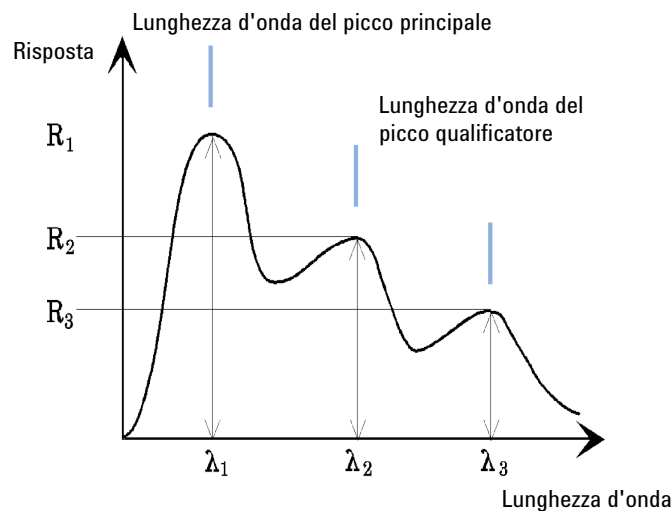
### NOTA

L'algoritmo di correzione del tempo può non funzionare se i tempi di ritenzione dei picchi di riferimento multipli sono troppo vicini l'uno all'altro e non sono distribuiti per tutto il tempo di analisi.

## Qualificatori dei picchi

Un componente può essere identificato tramite più segnali. Sebbene sia applicabile a tutte le forme di cromatografia che usano molti rivelatori o rivelatori capaci di produrre segnali multipli, la rivelazione multisegnale viene usata più comunemente in cromatografia liquida con l'uso di rivelatori a lunghezza d'onda multipla o a serie di diodi. Questi rivelatori sono normalmente impostati in modo che la lunghezza d'onda più prossima all'area di assorbanza maggiore venga usata per definire il picco principale sulla tavola di calibrazione. Nella [Figura 39](#), pagina 73 è  $\lambda_1$ .

Le altre due lunghezze d'onda acquisite come segnali possono essere usate come qualificatori dei picchi. Nella figura sono  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ .



**Figura 39** Qualificatori dei picchi

I picchi di un composto hanno un rapporto di risposta costante per le diverse lunghezze d'onda.

La risposta del picco qualificatore è una percentuale della risposta del picco principale. I limiti che determinano l'intervallo accettabile per la risposta attesa possono essere impostati nella tavola di calibrazione quando si seleziona l'opzione Dettagli identificazione. Se il rapporto fra il picco qualificatore principale  $\lambda_1$  ed il picco qualificatore, ad esempio  $\lambda_3$ , si trova fra i limiti consentiti allora l'identità del composto può essere confermata.

## Correlazione del segnale

Correlazione del segnale significa che due picchi misurati in diversi segnali del rivelatore entro una finestra di tempo definita vengono assegnati allo stesso composto. La finestra di correlazione del segnale può essere controllata dal parametro **SignalCorrWin** nella tabella **QuantParm** del registro **\_DaMethod**. La correlazione del segnale viene disattivata impostando la relativa finestra a 0,0 minuti (per ulteriori informazioni, consultare la guida in linea). Quando la funzione di correlazione del segnale è disabilitata, i picchi che eluiscono con lo stesso tempo di ritenzione/migrazione su segnali diversi del rivelatore vengono trattati come composti diversi.

La finestra di correlazione del segnale predefinita è di 0,03 minuti per dati LC, CE, CE/MS e LC/MS e di 0,0 minuti per dati GC.

## Verifica del qualificatore

Se la funzione di correlazione del segnale è abilitata, per impostazione predefinita la verifica del qualificatore è attiva per tutti i tipi di file di dati. Può essere disattivata impostando il segno **UseQualifiers** nella tavola **Quantification Parameters** relativa al metodo. La verifica del qualificatore viene disabilitata quando la correlazione del segnale viene disattivata.

## Calcolo del rapporto del qualificatore

Quando si abilita la verifica dei qualificatori per un composto, il rapporto fra le dimensioni del qualificatore e quelle del picco principale viene verificato rispetto ai limiti calibrati. La dimensione può essere l'altezza o l'area a seconda dell'impostazione della base di calcolo specificata in Specifica rapporto.

I picchi qualificatori possono essere calibrati nello stesso modo dei composti target. In altre parole, non è necessario specificare il rapporto qualificatore atteso. Il rapporto del qualificatore atteso viene calcolato automaticamente:

entrambi misurati al tempo di ritenzione del composto.

Il parametro **QualTolerance** definisce l'intervallo accettabile per il rapporto del qualificatore, ad esempio  $\pm 20\%$ .

La tolleranza può essere impostata nell'interfaccia utente della tavola di calibrazione tramite l'opzione **Dettagli identificazione** ed è una percentuale assoluta.

## Identificazione dei picchi

### Il procedimento di identificazione

Per le calibrazioni multilivello la ChemStation calcola una tolleranza minima per il qualificatore basandosi su rapporti del qualificatore misurati per ciascun livello di calibrazione. La tolleranza minima per il qualificatore viene calcolata utilizzando la seguente equazione:

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

Dove  $q_i$  è il rapporto del qualificatore misurato al livello  $i$ .

## Il procedimento di identificazione

Nel tentativo di identificare i picchi, il software effettua tre passaggi attraverso i dati di integrazione.

### Identificazione dei picchi di riferimento

Il primo passaggio identifica i picchi di riferimento temporale. Il software ricerca i tempi di ritenzione/migrazione da un'analisi per effettuare corrispondenze all'interno delle finestre di ritenzione/migrazione dei picchi di riferimento della tavola di calibrazione. Un picco dell'analisi viene identificato come picco di riferimento nella tavola di calibrazione se il tempo di ritenzione/migrazione del picco dell'analisi rientra nei limiti della finestra costruita per il picco della tavola di calibrazione.

Se in una finestra si è trovato più di un picco, quello con l'area o l'altezza maggiore seguita dalla corrispondenza di un qualificatore di segnale positivo, se impostato, viene scelto come picco di riferimento.

Dopo ogni volta che si è trovato il picco di riferimento, la differenza fra il suo tempo di ritenzione/migrazione e quello dato dalla tavola di calibrazione viene usato per sistemare i tempi di migrazione/ritenzione attesi per tutti i picchi della tavola.

## Identificazione dei picchi ISTD

Il secondo passaggio identifica qualsiasi picco definito come standard interno. Se non sono ancora stati identificati come picchi ISTD, possono essere identificati come picchi di riferimento temporale. I picchi ISTD sono identificati da finestre del tempo di ritenzione/migrazione e picchi qualificatori. Se è stato trovato più di un picco nella stessa finestra ISTD, si sceglie quello maggiore.

## Come trovare i rimanenti picchi calibrati

Il terzo passaggio identifica tutti i picchi che rimangono elencati sulla tavola di calibrazione. Per i picchi che non sono riferimenti contenuti nella tavola di calibrazione vengono trovate corrispondenze con i rimanenti picchi dell'analisi usando le proprie finestre RT.

Ogni picco di questo tipo calibrato ha il proprio tempo di ritenzione/migrazione all'interno della tavola. Quest'ultimo viene sistemato durante una particolare analisi basandosi su una preidentificazione dei picchi di riferimento temporale. La finestra del tempo di ritenzione/migrazione del picco calibrato viene regolata basandosi sul tempo di ritenzione/migrazione corretto del picco calibrato.

Se si trova più di un picco nella stessa finestra, viene scelto il picco con il tempo di ritenzione/migrazione più vicino a quello atteso e rispondente alle specifiche del qualificatore opzionale.

## Classificazione di picchi non identificati

Se rimangono picchi non identificati, sono classificati come sconosciuti. ChemStation cerca di raggruppare i picchi sconosciuti che appartengono allo stesso composto. Se un picco è stato rivelato in più segnali, i picchi con lo stesso tempo di ritenzione/migrazione di ogni segnale sono raggruppati sotto lo stesso composto.

I picchi sconosciuti vengono segnalati nei report classici se è stata effettuata l'apposita selezione nella finestra di dialogo **Specify Report**.

# 3

## Calibrazione

Che cos'è la calibrazione?	78
Curva di calibrazione	79
Calcolo della curva di calibrazione	80
Interpolazione lineare	80
Interpolazione quadratica	80
Residui relativi	83
Calibrazione di gruppo	84
Opzioni di ricalibrazione	85

Questo capitolo contiene informazioni dettagliate sui calcoli utilizzati nella procedura di calibrazione.

## Che cos'è la calibrazione?

Dopo che i picchi sono stati integrati e identificati, il passo successivo dell'analisi quantitativa è la calibrazione. Raramente sussiste una relazione di proporzionalità diretta tra quantità e risposta e la massa effettiva del campione da analizzare. Per questa ragione è necessario eseguire la calibrazione con materiali di riferimento. La quantificazione utilizza l'area o l'altezza del picco per determinare la quantità di un composto in un campione.

Un'analisi quantitativa è articolata in vari passaggi che sono brevemente descritti di seguito:

- Identificare il composto che si sta analizzando.
- Stabilire un metodo per l'analisi di campioni contenenti una quantità nota di tale composto, noto come campione per la calibrazione o standard.
- Analizzare il campione per la calibrazione per ottenere la risposta dovuta a tale specifica quantità.

In alternativa, se la risposta del rivelatore in uso è non lineare è possibile analizzare un certo numero di tali standard con quantità differenti del composto di interesse. Questo procedimento è noto come *calibrazione multilivello*.

I seguenti metodi di calibrazione consentono di eseguire la quantificazione:

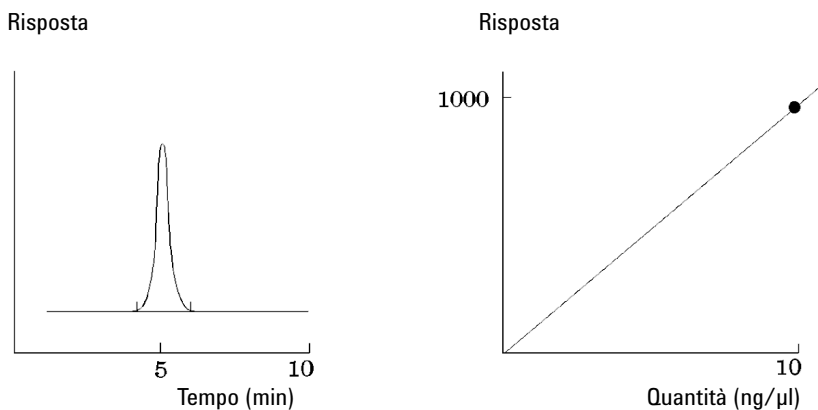
- Calibrazione specifica per composto (standard esterno o ESTD, standard interno o ISTD)
- Quantificazione indiretta utilizzando la calibrazione o il fattore di risposta di un altro composto o gruppo
- Fattore di risposta fisso (**Manual Factor**)

Le curve di calibrazione e i calcoli ESTD si basano su risposte misurate (area o altezza) di quantità definite. Le curve di calibrazione e i calcoli ISTD si basano su risposte relative e quantità relative.

## Curva di calibrazione

Una curva di calibrazione è la rappresentazione grafica dei dati relativi alla quantità ed alla risposta per un composto ottenuto per uno o più campioni di calibrazione.

In genere viene iniettata un'aliquota del campione di calibrazione, si ottiene un segnale e si determina la risposta calcolando l'area o l'altezza del picco come illustrato in [Figura 40](#), pagina 79.



**Figura 40** Campione di calibrazione (10ng/μl): segnale e curva di calibrazione

## Calcolo della curva di calibrazione

### Interpolazione lineare

N= numero di osservazioni discrete

$X_i$  = variabile indipendente,  $i^{\text{esima}}$  osservazione

$Y_i$  = variabile dipendente,  $i^{\text{esima}}$  osservazione

Formula della curva:

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

Coefficienti:

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

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

dove:

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

### Interpolazione quadratica

Formula della curva quadratica:

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

Sono necessari almeno tre punti di calibrazione per l'interpolazione quadratica.  
Sono necessari due punti se si include o forza l'origine.

Calcolo dei coefficienti per l'interpolazione quadratica

I coefficienti derivano dalle seguenti equazioni lineari simultanee. Per risolvere la corrispondente equazione normale della matrice ( $A^T A x = A^T y$ ) si usa l'algoritmo di Crout. Nella formula riportata, le somme sono abbreviate come segue:

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

Per evitare l'overflow, i valori x vengono normalizzati prima di essere inseriti nel calcolo:

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

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

Equazioni normali per la curva quadratica:

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

Oppure scritte sotto forma di equazione di matrice:

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

Decomposizione di Crout:

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

Con le seguenti abbreviazioni dei valori:

$$L11 = W$$

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

$$L21 = XW$$

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

$$L31 = X2W$$

$$L22 = X2W - L21 * U12$$

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

$$L32 = X3W - L31 * U12$$

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

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

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

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

$$c' = z2$$

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

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

Infine, la normalizzazione deve essere invertita:

$$a = a'$$

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

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

## Residui relativi

Per ciascun livello di calibrazione viene visualizzato il *residuo relativo*. Si calcola usando la formula che segue:

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

in cui:

relRES= Residuo relativo in percentuale

La risposta calcolata rappresenta il punto sulla curva di calibrazione.

La *deviazione standard del residuo*, che viene stampata su alcuni rapporti e viene calcolata utilizzando la formula che segue quando si seleziona Stampa tavola calibrazione e curve:

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

in cui:

ResSTD = Deviazione standard del residuo

Resp<sub>calibratedi</sub> = Risposta calibrata per punto i

Resp<sub>calculatedi</sub> = Risposta calcolata per punto i

N= Numero di punti di calibrazione

## Calibrazione di gruppo

La calibrazione di gruppo può essere applicata a composti le cui concentrazioni individuali non sono note mentre la somma delle concentrazioni del gruppo è nota. Un esempio 1 costituito dagli isomeri. Vengono calibrati composti completi. Si usano le formule che seguono:

Calibrazione

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

Dove:

$Conc_{AB}$  è la concentrazione del gruppo di composti comprendente il composto A e B

$Response_A$  è l'area (o l'altezza) del composto A

$RF_A$  è il fattore di risposta

Per i composti all'interno di un gruppo supponiamo fattori di risposta uguali:

$$RF_A = RF_B$$

Quindi la concentrazione di un composto entro un gruppo viene calcolata come segue:

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

## Opzioni di ricalibrazione

Esistono diversi modi di aggiornare le risposte nella tavola di calibrazione con i nuovi dati a disposizione.

### **Average**

La media di tutte le calibrazioni viene calcolata utilizzando la seguente formula

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

### **Floating Average**

Viene calcolata una media pesata di tutte le calibrazioni. Il peso aggiornato viene impostato nella finestra di dialogo **Recalibration Settings**.

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

### **Replace**

I nuovi valori di risposta sostituiscono i vecchi.

# 4

## Quantificazione

Che cos'è la quantificazione?	87
Calcoli di quantificazione	88
Fattori di correzione	88
Fattore di risposta assoluto	88
Moltiplicatore	89
Fattore di diluizione	89
Quantità di campione	89
Area % e altezza %	90
Quantificazione di composti calibrati	91
Calcolo ESTD	91
Calcolo ISTD	93
Quantificazione di picchi non calibrati	97
Quantificazione indiretta mediante un composto calibrato	97
Quantificazione mediante un fattore manuale	98
Calcolo con il procedimento della normalizzazione %	99

Questo capitolo descrive la quantificazione dei composti e spiega i calcoli utilizzati nella quantificazione.

## Che cos'è la quantificazione?

Dopo che i picchi sono stati integrati e identificati, il passo successivo dell'analisi è la quantificazione. La quantificazione utilizza l'area o l'altezza del picco per determinare la concentrazione di un composto in un campione.

Un'analisi quantitativa comporta effettuare varie operazioni che sono brevemente descritte di seguito:

- Identificare il composto che si sta analizzando.
- Definire un metodo per analizzare campioni che contengono il composto.
- Analizzare uno o più campioni che contengono concentrazioni note del composto, per ottenere la risposta dovuta a tali concentrazioni.

In alternativa, è possibile analizzare un certo numero di questi campioni con concentrazioni diverse del composto di interesse, se il rivelatore a disposizione ha un tipo di risposta non lineare. Questo procedimento è chiamato *calibrazione multilivello*.

- Analizzare il campione contenente una concentrazione nota del composto, per ottenere la risposta dovuta a tale concentrazione.
- Confrontare la risposta dovuta alla concentrazione incognita con quella dovuta alla concentrazione nota, per determinare in quale quantità è presente il composto.

Per poter confrontare validamente la risposta del campione incognito con quella del campione noto, i dati devono essere acquisiti ed elaborati in condizioni identiche.

## Calcoli di quantificazione

Per determinare la concentrazione di ogni componente presente nella miscela, la ChemStation offre i seguenti procedimenti di calcolo

- Percentuale
- Normalizzazione
- Standard esterno (ESTD)
- ESTD%
- Standard interno (ISTD)
- ISTD%

I calcoli utilizzati per determinare la concentrazione di un composto in un campione incognito dipendono dal tipo di quantificazione. Ogni procedimento di calcolo utilizza l'area o l'altezza del picco e produce un tipo diverso di rapporto.

## Fattori di correzione

I calcoli di quantificazione utilizzano quattro fattori di correzione, *fattore di risposta assoluto*, *moltiplicatore*, *fattore di diluizione* e *quantità di campione*. Questi fattori vengono usati nelle procedure di calibrazione per compensare le variazioni di risposta del rivelatore ai diversi componenti del campione e per differenti concentrazioni, diluizioni e quantità del campione, unità di conversione.

## Fattore di risposta assoluto

Il fattore di risposta assoluto per un componente in un campione corrisponde alla quantità del componente divisa per l'area o l'altezza misurate del picco di tale componente nell'analisi di una miscela di calibrazione. Il fattore di risposta assoluto, usato per ogni procedura di calcolo calibrata, corregge la risposta del rivelatore ai componenti individuali del campione.

## Moltiplicatore

Il moltiplicatore viene usato in ogni formula di calcolo per moltiplicare il risultato per ogni componente. Il moltiplicatore può essere usato per convertire le unità utilizzate per esprimere le quantità.

## Fattore di diluizione

Il fattore di diluizione è un numero per il quale vengono moltiplicati tutti i risultati calcolati prima della stampa del rapporto. Si può usare il fattore di diluizione per modificare la scala dei risultati o correggere in caso di modifiche nella composizione del campione durante la preparazione che precede l'analisi. Il fattore di diluizione può anche essere usato per altri scopi che richiedano l'uso di un fattore costante.

## Quantità di campione

Se si scelgono i calcoli ESTD% o ISTD%, i rapporti ESTD e ISTD danno valori relativi invece che assoluti: la quantità di ogni composto viene espressa come percentuale della quantità di campione. La quantità di campione viene usata nei rapporti ESTD% e ISTD% per convertire la quantità assoluta dei componenti analizzati in valori relativi, dividendo per il valore specificato.

## Area % e altezza %

Il procedimento di calcolo dell'**Area%** riporta l'area di ogni picco dell'analisi come percentuale dell'area totale di tutti i picchi dell'analisi. **Area%** non richiede calibrazione preventiva e non dipende dalla quantità di campione iniettata entro i limiti del rivelatore. Non vengono usati fattori di risposta. Se tutti i componenti rispondono allo stesso modo nel rivelatore e sono eluiti, **Area%** costituisce una buona approssimazione delle quantità relative di componenti.

**Area%** è usata normalmente dove i risultati qualitativi sono motivo di interesse e per produrre informazioni per creare la tavola di calibrazione richiesta per altri procedimenti di calibrazione.

La procedura di calcolo dell'**Height%** riporta l'altezza di ogni picco dell'analisi come percentuale dell'altezza totale di tutti i picchi dell'analisi.

Il moltiplicatore e il fattore di diluizione di **Calibration Settings**, della finestra di dialogo **Sample Information** o di **Sequence Table** non sono applicati nel calcolo di Area% o Altezza%.

## Quantificazione di composti calibrati

Le procedure di calcolo con standard esterno (ESTD), normalizzazione e standard interno (ISTD) richiedono fattori di risposta e quindi prevedono l'utilizzo di una tavola di calibrazione. La tavola di calibrazione specifica la conversione delle risposte nelle unità scelte dall'utente in base alla procedura selezionata.

### Calcolo ESTD

La procedura ESTD è un procedimento di quantificazione di base nel quale i campioni di calibrazione e incogniti vengono analizzati nelle stesse condizioni. I risultati ottenuti con un campione incognito vengono successivamente confrontati con quelli del campione di calibrazione, per calcolare la quantità nel campione incognito.

Il procedimento ESTD, a differenza del procedimento ISTD, usa fattori di risposta assoluti. I fattori di risposta sono ottenuti da una calibrazione e quindi archiviati. Nelle analisi che seguono, le quantità dei componenti vengono calcolate applicando tali fattori di risposta alle quantità di campione misurate. Tuttavia, è importante verificare che la quantità di campione iniettata sia riproducibile in tutte le analisi, poiché nel campione non è presente uno standard per la correzione delle variazioni dovute alla quantità di campione iniettato o alla preparazione del campione.

Quando si prepara un rapporto ESTD, il calcolo della quantità di un particolare composto in un campione incognito avviene in due fasi:

- 1 Si calcola un'equazione per la curva attraverso i punti di calibrazione per il composto, utilizzando il tipo di adattamento della curva specificato nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione o Curva di calibrazione.
- 2 La quantità di composto nel campione incognito viene calcolata usando l'equazione descritta di seguito. La quantità può essere riportata nel report o può essere usata per ulteriori calcoli richiesti per stabilire il moltiplicatore, il fattore di diluizione o la quantità di campione, prima di essere inclusi nel report.

## Quantificazione

### Quantificazione di composti calibrati

Se si sceglie il rapporto ESTD, l'equazione da usare per calcolare la quantità assoluta del componente x, è la seguente:

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

in cui:

$\text{Response}_x$  è la risposta del picco x;

$RF_x$  è il fattore di risposta per il componente x, calcolato:

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

$M$  è il moltiplicatore.

$D$  è il fattore di diluizione.

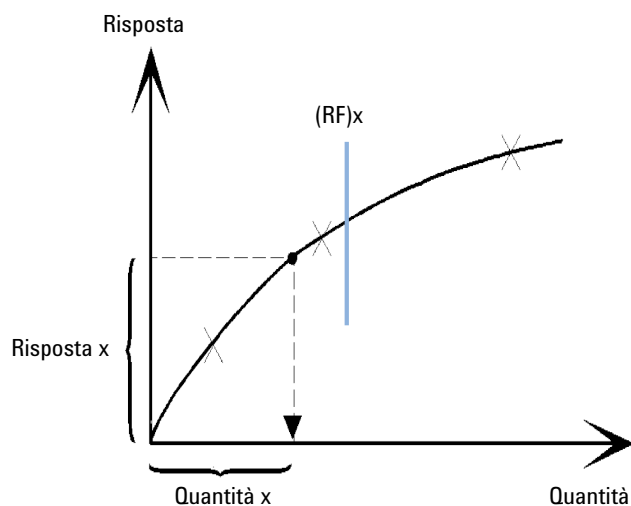


Figura 41 Fattore di risposta

Il moltiplicatore e il fattore di diluizione sono leggibili sia dalla finestra di dialogo **Calibration Settings** sia dalla finestra di dialogo **Sample Information**.

## Quantificazione

### Quantificazione di composti calibrati

Se viene scelto il rapporto ESTD% e la quantità del campione non è zero, la quantità relativa (%) di un composto x viene calcolata come segue:

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

in cui:

La *quantità assoluta di x* viene calcolata come mostrato sopra nel calcolo di ESTD;

La *quantità di campione* si ottiene dalla finestra di dialogo Informazioni sul campione o dalla finestra di dialogo Impostazioni di quantificazione per analisi singole. Se la quantità di campione è zero, si calcola l'ESTD.

## Calcolo ISTD

Il procedimento ISTD elimina gli svantaggi del metodo ESTD grazie all'aggiunta di un componente in quantità nota, che serve da fattore di normalizzazione. Questo componente, detto *standard interno*, viene aggiunto sia ai campioni di calibrazione sia a quelli incogniti.

Il software prende i fattori di risposta adeguati ottenuti da una calibrazione precedentemente archiviata in un metodo. Usando la concentrazione dello standard interno e le aree o le altezze dei picchi prese dall'analisi, il software calcola le concentrazioni dei componenti.

Il composto usato come standard interno dovrebbe essere simile al composto calibrato, sia chimicamente, sia per quanto riguarda il tempo di ritenzione/migrazione, ma deve essere distinguibile cromatograficamente.

**Tabella 8** Procedura ISTD

Vantaggi	Svantaggi
La variazione delle del volume iniettato non è significativa.	È necessario aggiungere lo standard interno a ogni campione.
La deviazione dello strumento è compensata dallo standard interno.	
Gli effetti della preparazione del campione sono ridotti al minimo se il comportamento chimico dell'ISTD e quello del campione incognito sono simili.	

## Quantificazione

### Quantificazione di composti calibrati

Se la procedura ISTD viene usata per calibrazioni con caratteristiche non lineari, occorre prestare attenzione affinché errori del principio di calcolo non provochino errori sistematici. Nelle calibrazioni multilivello, la quantità di composto usato come ISTD deve essere tenuta costante, cioè la stessa per tutti i livelli se la curva di calibrazione del composto non è lineare.

Nell'analisi con lo standard interno, la quantità del componente che interessa è correlata alla quantità di componente standard interno dal rapporto delle risposte dei due picchi.

In una calibrazione ISTD in due fasi, il calcolo del rapporto di quantità corretto di un composto particolare in un campione sconosciuto avviene nelle fasi che seguono.

#### Fase 1: calibrazione

- 1 I punti di calibrazione vengono costruiti calcolando il rapporto di quantità e quello di risposta per ciascun livello di un particolare picco della tavola di calibrazione.

Il rapporto di quantità è uguale all'area del composto divisa per l'area o l'altezza dello standard interno a questo livello.

Il rapporto di risposta è uguale all'area del composto divisa per l'area o l'altezza dello standard interno a questo livello.

- 2 Si calcola un'equazione per la curva passante per i punti di calibrazione utilizzando il tipo di curva stabilito nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione o Curva di calibrazione.

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

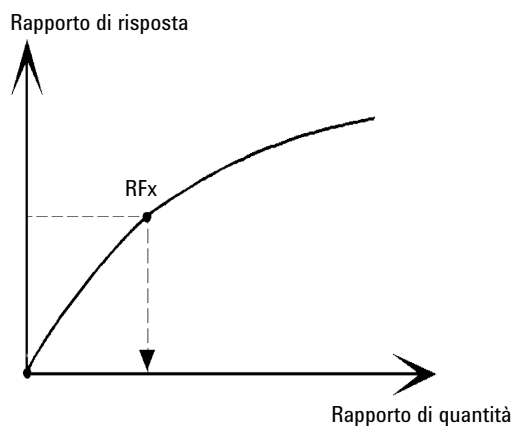


Figura 42 Rapporto di quantità

**Fase 2: campione incognito**

- 1 La risposta del composto nel campione incognito viene divisa per la risposta dello standard interno nel campione incognito per trovare un rapporto di risposta per il campione stesso.
- 2 Il rapporto di quantità viene calcolato usando l'equazione della curva determinata al punto due della fase precedente e la quantità reale di ISTD nel campione.

**Calcolo ISTD di composti calibrati**

Le equazioni usate per calcolare la quantità effettiva di un composto calibrato  $x$  per una calibrazione a livello singolo sono:

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

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

in cui:

$RF_x$  è il fattore di risposta per il composto  $x$ ;

La *quantità effettiva* di ISTD è il valore inserito nella finestra di dialogo delle impostazioni di calibrazione o delle informazioni sul campione per lo standard interno aggiunto al campione incognito;

$M$  è il moltiplicatore.

$D$  è il fattore di diluizione.

Se si sceglie il tipo di report ISTD%, l'equazione seguente è utilizzata per calcolare la quantità relativa (%) del componente  $x$ :

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

## Quantificazione di picchi non calibrati

I picchi non calibrati possono essere quantificati mediante un fattore di risposta fisso oppure utilizzando i dati di calibrazione di uno dei composti calibrati. La quantificazione mediante un fattore di risposta fisso o mediante i dati di un composto calibrato è specifica per segnale. Nel secondo caso, se il composto calibrato è stato quantificato mediante un metodo ISTD, tale metodo ISTD è utilizzato per i picchi non identificati nello stesso modo in cui è stato utilizzato per il composto calibrato.

### Quantificazione indiretta mediante un composto calibrato

Se i dati di calibrazione di un composto calibrato devono essere utilizzati per quantificare picchi non calibrati, il composto calibrato viene scelto dall'elenco a discesa **Using Compound** della finestra di dialogo **Calibration Settings**. I calcoli sono gli stessi utilizzati per i composti calibrati. Se il composto di riferimento è quantificato mediante un metodo ISTD, il metodo ISTD viene utilizzato per il composto non calibrato nello stesso modo in cui è stato utilizzato per il composto di riferimento.

Un picco di riferimento mancante dà come risultato una quantità nulla per il picco non calibrato.

## Quantificazione mediante un fattore manuale

Il software consente di quantificare un composto identificato che è basato su un fattore di risposta fisso (**With Rsp Factor** nella finestra di dialogo **Calibration Settings**). In questo caso, la quantità del composto è calcolata mediante il fattore di risposta fisso:

$$\text{Quantità} = \text{Risposta} * \text{Fattore di risposta} * M * D$$

in cui

Fattore manuale

Fattore di risposta fisso

Risposta

La risposta può essere Area o Altezza

Utilizzo di un fattore manuale con un metodo ISTD

Se la quantità di composto è quantificata mediante il fattore di risposta fisso e il metodo ISTD, la formula si legge come segue:

$$\text{Rapporto aree} = \text{Area} / \text{Area}_{\text{ISTD}}$$

oppure:

$$\text{Rapporto altezze} = \text{Altezza} / \text{Altezza}_{\text{ISTD}}$$

La quantità è quindi calcolata come segue:

$$\text{Quantità} = \text{Rapporto aree} * \text{Fattore manuale} * \text{Quantità}_{\text{ISTD}}$$

oppure:

$$\text{Quantità} = \text{Rapporto altezze} * \text{Fattore manuale} * \text{Quantità}_{\text{ISTD}}$$

Dipendenza del fattore manuale e del fattore di risposta (RF)

Con RF definito come **Response per amount** (impostazione predefinita):

$$\text{RF} = 1 / \text{Fattore manuale}$$

Con RF definito come **Amount per response**:

$$\text{RF} = \text{Fattore manuale}$$

## Calcolo con il procedimento della normalizzazione %

Nel metodo della normalizzazione percentuale (Norm%), alle aree o alle altezze dei picchi vengono applicati i fattori di risposta, per compensare eventuali variazioni della sensibilità del rivelatore nei confronti dei diversi componenti del campione.

Il report Norm% viene calcolato allo stesso modo di un report ESTD, a eccezione del fatto che è necessario un ulteriore passaggio per calcolare le quantità di composto relative invece che assolute.

Il report di normalizzazione percentuale (Norm%) ha lo stesso svantaggio di quelli di area e altezza percentuale. Qualsiasi modifica che interessi l'area totale del picco interesserà anche il calcolo della concentrazione di ogni singolo picco. Il report di normalizzazione può essere usato solo se tutti i componenti eluiscono e possono essere integrati. L'esclusione di alcuni picchi da un report di normalizzazione comporta la necessità di modificare i risultati relativi al campione.

L'equazione utilizzata per calcolare la **Norm%** di un componente x è:

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

dove:

$Risposta_x$	è l'area o l'altezza del picco x
$RF_x$	è il fattore di risposta
$\sum(Risposta \cdot RF)$	è il totale di tutti i prodotti ( $Risposta \cdot RF$ ) per tutti i picchi compreso il picco x
$M$	è il moltiplicatore
$D$	è il fattore di diluizione

Il moltiplicatore e il fattore di diluizione possono essere visualizzati nelle finestre di dialogo **Quantitation Settings** e **Specify Report** o nella tabella di sequenza.

## 5 Idoneità del sistema

Valutazione delle prestazioni dei picchi	101
Valutazione della system suitability	101
Determinazione del rumore di fondo	104
Calcolo di un rumore pari a sei volte la deviazione standard	105
Calcolo del rumore tramite la formula da picco a picco	106
Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM	107
Calcolo del rapporto segnale-rumore	110
Deriva e oscillazione	113
Calcolo dell'asimmetria e della simmetria dei picchi	115
Formule e calcoli di idoneità del sistema	117
Definizioni generali	118
Volume vuoto	118
Tempo di ritenzione di un composto non trattenuto t (m) [min]	118
Definizioni di test sulle prestazioni	119
Panoramica dei test delle prestazioni	119
Momenti statistici, disallineamento ed eccesso	121
Larghezza reale del picco W <sub>x</sub> [min]	123
Fattore di capacità (USP)	123
Fattore di scodamento t (USP)	124
Numero di piatti teorici n per colonna	125
Numero di piatti teorici al metro N [1-m]	126
Ritenzione relativa, selettività	127
Risoluzione R (USP, ASTM)	128
Risoluzione R <sub>s</sub> (EP/JP)	128
Risoluzione (definizioni classiche della ChemStation)	128
Rapporto picco-valle (EP/JP)	129
Definizioni per la riproducibilità	131
Media M del campione	131
Deviazione standard S del campione	132
Deviazione standard relativa RSD[%] (USP)	132
Deviazione standard della media S	132
Deviazione standard (S)	133
Intervallo di confidenza CI	133
Coefficiente di correlazione	134
Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente	136

Questo capitolo descrive le operazioni che OpenLab CDS può eseguire per valutare le prestazioni sia dello strumento analitico che del metodo analitico.

## Valutazione delle prestazioni dei picchi

Le prestazioni dei picchi possono essere calcolate sia per ogni picco integrato dai dati caricati sia per picchi nuovi integrati manualmente. Lo *Strumento per le prestazioni dei picchi* interattivo calcola le caratteristiche dei picchi e le visualizza nell'interfaccia utente. Lo Strumento per le prestazioni dei picchi utilizza la reale larghezza dei picchi a varie altezze e un tempo di ritenzione valutato mediante un algoritmo di modellazione dei picchi. Tali valori sono visualizzati esclusivamente nell'interfaccia utente dello Strumento per le prestazioni dei picchi. È possibile che essi varino leggermente rispetto ai valori dell'integratore che vengono visualizzati nei report.

## Valutazione della system suitability

Secondo le buone prassi di laboratorio, è opportuno sia valutare le prestazioni di uno strumento analitico prima che venga utilizzato per l'analisi dei campioni sia il metodo analitico prima che venga usato per le analisi di routine. Inoltre, è opportuno anche controllare le prestazioni dei sistemi di analisi prima, durante e dopo le analisi di routine. Il software ChemStation fornisce strumenti idonei per effettuare questi tre tipi di test automaticamente. I test sulla strumentazione possono includere la misurazione della sensibilità dello strumento, della precisione dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi e della precisione delle aree dei picchi. Un metodo di prova può includere la misurazione dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi e delle relative quantità, della selettività e della robustezza del metodo rispetto alle variazioni che si verificano giornalmente durante l'uso. I test sui sistemi possono comprendere la misurazione della precisione delle quantità, della risoluzione tra due picchi specifici e lo scodamento dei picchi.

I laboratori che hanno l'obbligo di conformarsi con:

- Buona Prassi di Laboratorio (Good Laboratory Practice - GLP);
- Buona Prassi di Produzione (Good Manufacturing Practice regulations - GMP e Current Good Manufacturing Practice regulations - cGMP);
- Buona Prassi di Laboratorio automatizzata (Good Automated Laboratory Practice - GALP);

sono tenuti a eseguire questi test e a documentare dettagliatamente i risultati. Il laboratorio che hanno aderito a sistemi di controllo della qualità, come la certificazione ISO9000, devono poter certificare le prestazioni di tutti gli strumenti utilizzati.

ChemStation consente di raggruppare i risultati di varie analisi e di creare un report di riepilogo che contenga una valutazione statistica di tali risultati.

I test vengono generalmente documentati in un formato approvato dagli enti normativi e dalle società di certificazione esterne. Le statistiche includono informazioni su:

- tempo di ritenzione/migrazione dei picchi,
- area dei picchi,
- quantità,
- altezza dei picchi,
- larghezza dei picchi a metà altezza,
- simmetria dei picchi,
- scodamento dei picchi,
- fattore di capacità ( $k'$ ),
- numero di piatti,
- risoluzione tra i picchi,
- selettività rispetto al picco precedente,
- scostamento,
- eccesso.

Vengono calcolati anche il valore medio, la deviazione standard, la deviazione standard relativa e l'intervallo di confidenza. Gli utenti possono impostare limiti per la deviazione standard, la deviazione standard relativa o l'intervallo di confidenza per ciascuno dei parametri. Se i valori superano i limiti, i valori anomali vengono evidenziati nel report per richiamare l'attenzione dell'operatore.

La qualità dei dati analitici è ulteriormente supportata dalla possibilità di registrare le condizioni effettive presenti al momento delle misurazioni. Queste informazioni vengono salvate con i dati e incluse nei report insieme ai dati dei campioni. Le curve di prestazione degli strumenti vengono registrate durante tutta l'analisi sotto forma di segnali e salvate nel file dati. Se lo strumento lo consente, è possibile richiamare queste registrazioni su richiesta, per esempio durante gli audit, e sovrapporle ai cromatogrammi.

Il programma consente anche di misurare automaticamente il rumore della linea di base e la deriva. Utilizzando i dati dell'altezza dei picchi per ciascun composto calibrato presente nel metodo, è possibile anche calcolare un livello minimo rilevabile.

Infine, è possibile anche includere in ciascun report stampato informazioni sulla configurazione degli strumenti, i numeri di serie degli strumenti, i dati identificativi su colonne/capillari e commenti personali.

I risultati sulle prestazioni estese vengono calcolati solo per i composti calibrati nel metodo e caratterizzati utilizzando i tempi di ritenzione/migrazione e i nomi dei composti.

Un rapporto di test tipico sulle prestazioni di un sistema contiene generalmente i seguenti risultati sulle prestazioni:

- dettagli sullo strumento
- dettagli su colonne/capillari
- metodo analitico
- informazioni sul campione
- informazioni sull'acquisizione
- descrizione del segnale e determinazione del rumore della linea di base
- segnale etichettato con i tempi di ritenzione/migrazione o i nomi dei composti.

Inoltre, per ciascun composto calibrato contenuto nel cromatogramma vengono generate le seguenti informazioni:

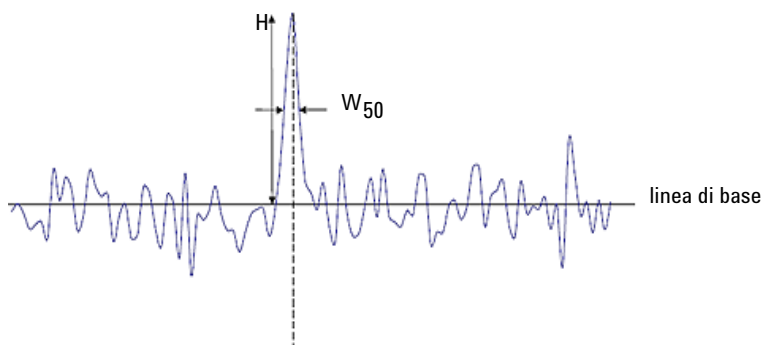
- tempo di ritenzione/migrazione,
- $k'$ ,
- simmetria,
- larghezza dei picchi
- numero del piatto
- risoluzione,
- rapporto segnale-rumore,
- nome del composto.

## Determinazione del rumore di fondo

Il rumore può essere determinato a partire dal valore dei punti di dati di una scala temporale di segnale scelta. Il rumore di fondo può essere trattato in tre modi:

- Come sei volte la deviazione standard (sd) della regressione lineare di deriva.
- Come da picco a picco (corretto per la deriva) e
- Come stabilito dal metodo ASTM (ASTM E685-93).

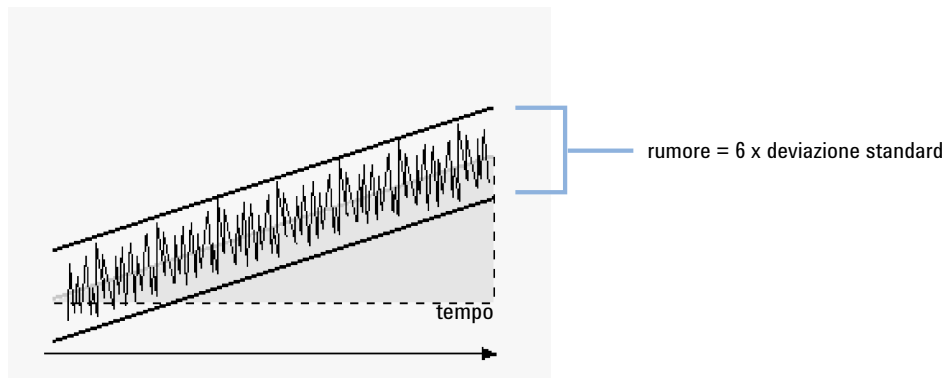
Il rumore può essere calcolato per un massimo di sette intervalli del segnale; gli intervalli devono essere specificati come parte delle impostazioni di idoneità del sistema nei parametri per la stesura dei rapporti.



**Figura 43** Cromatogramma con segnale di picco e rumore

H	Altezza del picco dal valore massimo alla linea di base (migliore linea retta attraverso il rumore)
$W_{50}$	Larghezza dei picchi a metà altezza

## Calcolo di un rumore pari a sei volte la deviazione standard



La regressione lineare viene calcolata utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo del segnale corrente. Il rumore è dato dalla seguente formula:

$$N = 6 \times Std$$

in cui

N	Rumore basato sul metodo con sei volte la deviazione standard
Std	Deviazione standard della regressione lineare di tutti i punti di dati nell'intervallo di tempo selezionato

## Calcolo del rumore tramite la formula da picco a picco

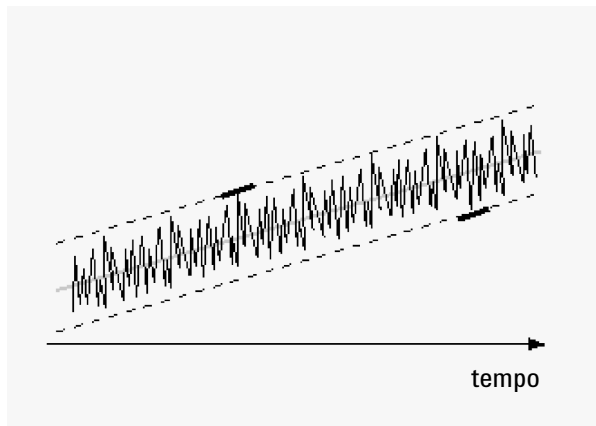


Figura 44 Illustrazione del rumore da picco a picco con deriva

La deriva viene innanzitutto calcolata determinando la regressione lineare utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo di un picco. La retta di regressione lineare viene sottratta da tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo per fornire un segnale corretto per la deriva.

Il rumore da picco a picco viene quindi calcolato utilizzando la formula:

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

in cui

N	Rumore da picco a picco
$I_{\max}$	Valore $I_x$ più elevato (massimo) nell'intervallo di tempo
$I_{\min}$	Valore $I_x$ più basso (minimo) nell'intervallo di tempo
$I_x$	Intensità del segnale, corretta per la deriva (la deriva è calcolata con la formula LSQ)

Secondo i calcoli della Farmacopea Europea il rumore da picco a picco viene calcolato utilizzando un segnale di riferimento del bianco nell'intervallo di  $-10/+10$  volte  $W_{50}$  che accompagna ciascun picco. Questa regione può essere simmetrica al segnale di interesse oppure, se necessario a causa di segnali di matrice, asimmetrica.

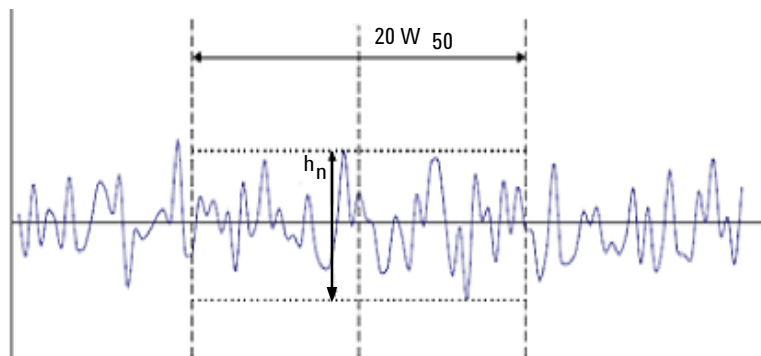


Figura 45 Determinazione del rumore dal cromatogramma di un bianco

In cui

La regione  $20 W_{50}$  corrisponde a 20 volte  $W_{50}$ .

$h_n$  è l'ampiezza massima del rumore di fondo nella regione 20 volte  $W_{50}$ .

## Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM

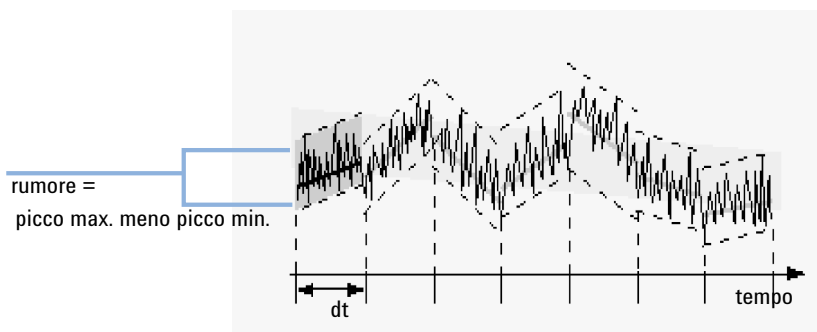


Figura 46 Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM

La determinazione del rumore ASTM (ASTM E 685-93) si basa sulle pratiche standard per la verifica di rivelatori fotometrici a lunghezza d'onda variabile utiliz-

zati in cromatografia liquida, come definito dalla Società Americana per la verifica ed i materiali (American Society for Testing and Materials). Basandosi sulle dimensioni dell'intervallo di tempo si possono distinguere tre diversi tipi di rumore. La determinazione del rumore si basa su una misurazione da picco a picco entro un intervallo di tempo definito.

- *Durata del ciclo, t*

*Rumore a lungo termine*, l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale di frequenza del rivelatore va da 6 a 60 cicli all'ora. Il rumore a lungo termine si determina quando la scala scelta supera l'ora. La scala temporale per ogni ciclo (dt) è impostata su 10 minuti in modo da ottenere almeno sei cicli nell'intervallo di tempo scelto.

*Rumore a breve termine*, l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale del rivelatore di una frequenza superiore ad un ciclo al minuto. Il rumore a breve termine si determina per una scala temporale scelta fra i 10 ed i 60 minuti. La scala temporale per ogni ciclo (dt) è impostata su un minuto in modo da ottenere almeno 10 cicli nell'intervallo di tempo scelto.

*Rumore a brevissimo termine (non facente parte di ASTM E 685-93)*, questo termine è stato introdotto per descrivere l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale del rivelatore di una frequenza superiore ad un ciclo ogni 0,1 minuti.

Il rumore a brevissimo termine si determina per un intervallo di tempo selezionato da 1 a 10 minuti. La scala temporale per ogni ciclo (dt) è impostata su 0,1 minuti in modo da ottenere almeno 10 cicli nell'intervallo di tempo scelto.

- *Numero di cicli, n*

Il numero di cicli è calcolato come segue:

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

in cui t è la durata del ciclo e  $t_{tot}$  è il tempo totale per il quale il rumore viene calcolato.

- *Rumore da picco a picco in ciascun ciclo*

La deriva viene innanzitutto calcolata determinando la regressione lineare utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo. La retta di regressione lineare viene sottratta da tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo per fornire un segnale corretto per la deriva. Il rumore da picco a picco viene quindi calcolato utilizzando la formula:

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

in cui  $N$  è il rumore da picco a picco,  $I_{\max}$  è il picco con l'intensità più alta (massima) e  $I_{\min}$  è il picco con l'intensità più bassa (minima) per l'intervallo di tempo specificato.

- *Rumore ASTM*

Il rumore ASTM è calcolato come segue:

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

in cui  $N_{ASTM}$  è il rumore secondo il metodo ASTM.

La determinazione del rumore secondo ASTM non viene effettuata se l'intervallo di tempo scelto è inferiore a un minuto. Se la scala temporale scelta è maggiore od uguale a un minuto, il rumore può essere determinato secondo i metodi ASTM precedentemente descritti, a seconda della scala. Per il calcolo vengono usati almeno sette punti di dati per ciclo. Nella determinazione del rumore automatizzata i cicli sono sovrapposti per il 10 %.

## Calcolo del rapporto segnale-rumore

ChemStation ha le seguenti opzioni per calcolare il rumore per il rapporto segnale-rumore:

- *Sigma 6*: Il rumore è calcolato utilizzando sei volte la variazione standard della regressione lineare (sigma 6). I dati per il calcolo del rumore sono presi da uno specifico intervallo di tempo nel segnale corrente. Se si definiscono molteplici intervalli di tempo, sarà utilizzato l'intervallo più vicino al picco.
- *USP* (secondo la definizione della Farmacopea Europea): Il rumore è calcolato tramite la formula da picco a picco. I dati per il calcolo del rumore sono presi da uno specifico intervallo di tempo nel segnale corrente. Se si definiscono molteplici intervalli di tempo, sarà utilizzato l'intervallo più vicino al picco.
- *EP* (secondo la definizione della Farmacopea Europea): Il rumore è calcolato tramite la formula da picco a picco. I dati per il calcolo del rumore sono presi da uno segnale del bianco. L'intervallo di tempo per il calcolo del rumore è un intervallo di tempo 20 volte la larghezza del picco, centrato sul tempo di ritenzione del picco.

Calcolo del rapporto segnale-rumore senza segnale di riferimento (sigma 6, USP)

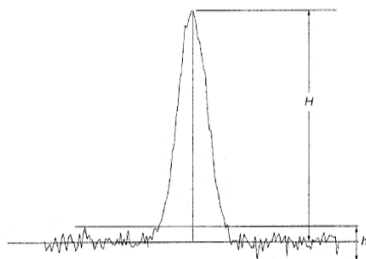
L'intervallo più vicino al picco viene selezionato come specificato nelle impostazioni di idoneità del sistema.

Il rumore è calcolato usando sei volte la variazione standard della regressione lineare o usando la formula da picco a picco (USP).

Il rapporto segnale-rumore viene calcolato per tutti i picchi del segnale. Se non è possibile trovare un valore di rumore, il rapporto segnale-rumore viene contrassegnato con "-".

Il rapporto segnale-rumore viene quindi calcolato utilizzando la formula:

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



**Figura 47** Rapporto segnale-rumore

Calcolo del rapporto segnale-rumore secondo la definizione della Farmacopea Europea (EF)

Il rapporto segnale-rumore (S/N) può essere calcolato attraverso la definizione della Farmacopea Europea. S/N viene calcolato utilizzando l'equazione:

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

In cui:

*H* è l'altezza del picco corrispondente al componente in questione nel cromatogramma ottenuto con la soluzione di riferimento stabilita,

*h* è il valore assoluto della fluttuazione più ampia del rumore rispetto alla linea di base in un cromatogramma ottenuto dopo l'iniezione di un bianco e osservato a una distanza pari a venti volte la larghezza a metà altezza del picco ottenuto nel cromatogramma eseguito con la soluzione di riferimento stabilita e situato in modo uniforme attorno alla posizione in cui dovrebbe trovarsi il picco.

Il valore del rumore utilizzato viene calcolato utilizzando il metodo "da picco a picco" (vedere la sezione "Calcolo del rumore tramite la formula da picco a picco", pagina 106).

Il rapporto S/N viene riportato per tutti i picchi presenti nel segnale cromatografico, purché esista un corrispondente segnale di riferimento. Specificando il file di dati di riferimento per un determinato segnale cromatografico, il segnale di riferimento viene assegnato automaticamente. Se a un segnale cromatografico non può essere assegnato alcun segnale di riferimento, per i picchi in quel determinato segnale il rapporto segnale-rumore non verrà calcolato.

Determinazione dell'Intervallo del rumore

L'intervallo del rumore nel segnale di riferimento viene determinato secondo uno dei seguenti algoritmi

- Se il segnale di riferimento non è abbastanza lungo:  $StartTime - EndTime < 20 * W_{50}$ 
  - $StartTime = starttime$  (del segnale di riferimento) e
  - $EndTime = endtime$  (del segnale di riferimento)
- Se il segnale di riferimento è abbastanza lungo, ma il picco è situato in maniera tale che  $(RT - 10 * W_{50})$  è inferiore al punto di inizio del segnale di riferimento
  - $StartTime = starttime$  (del segnale di riferimento) e
  - $EndTime = StartTime + 20 * W_{50}$
- Se il segnale di riferimento è abbastanza lungo, ma il picco è situato in maniera tale che  $RT$  o  $RT + 10 * W_{50}$  è superiore al punto di fine del segnale di riferimento
  - $EndTime = endtime$  (del segnale di riferimento) e
  - $StartTime = EndTime - 20 * W_{50}$
- Se il picco è situato in maniera tale che  $RT$  o  $RT + 10 * W_{50}$  è superiore al punto di fine del segnale di riferimento
  - $StartTime = RT - 10 * W_{50}$  e
  - $EndTime = RT + 10 * W_{50}$

In cui:

$RT$  è il tempo di ritenzione e

$W_{50}$  è l'ampiezza del picco a metà altezza.

## Deriva e oscillazione

Deriva e oscillazione sono calcolati se nel metodo di elaborazione è selezionato **Signal to noise**. Vengono calcolati indipendentemente dal tipo di calcolo del rumore selezionato.

**Deriva** La deriva viene definita come la pendenza della regressione lineare. La deriva viene innanzitutto calcolata determinando la regressione lineare utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo. La retta di regressione lineare viene sottratta da tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo per fornire un segnale corretto per la deriva.

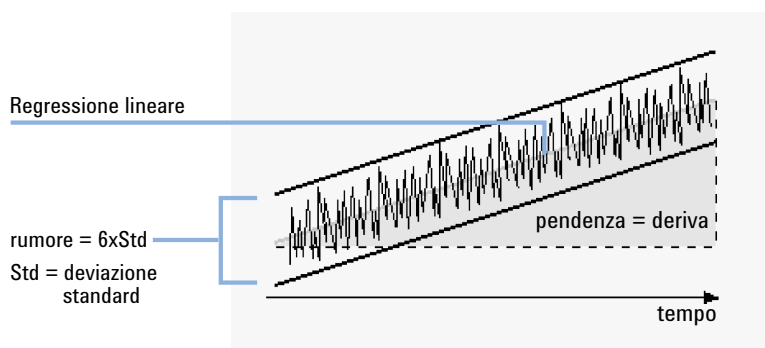


Figura 48 Deriva del rumore come sei volte la deviazione standard

Formula della curva:

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

in cui

N	Numero di osservazioni discrete
$X_i$	Variabile indipendente, $i^{\text{esima}}$ osservazione
$Y_i$	Variabile dipendente, $i^{\text{esima}}$ osservazione

Coefficienti:

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

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

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

**Oscillazione** L'oscillazione viene determinata come il rumore da picco a picco dei valori dei dati intermedi nei cicli di rumore; vedere "Calcolo di un rumore pari a sei volte la deviazione standard" , pagina 105.

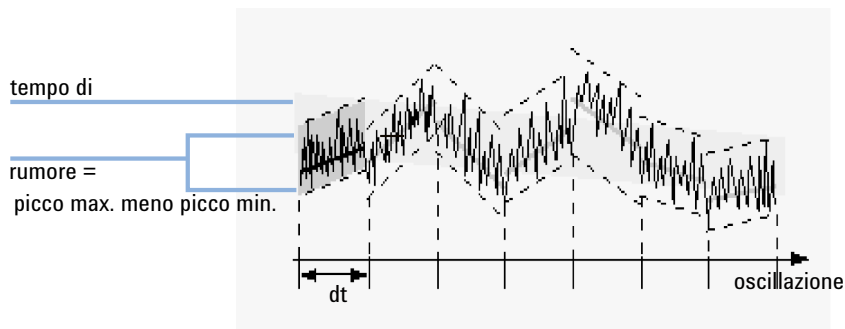


Figura 49 Oscillazione del rumore determinata secondo il metodo ASTM

## Calcolo dell'asimmetria e della simmetria dei picchi

**Asimmetria** La ChemStation determina il rapporto di asimmetria di un picco confrontando le metà altezze del picco al 5% (vedere "Fattore di scodamento t (USP)", pagina 124) o al 10% (vedere equazione seguente) dell'altezza del picco.

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

in cui

$A_s$	Asimmetria 10%
$W_{10}$	Larghezza del picco al 10% dell'altezza del picco
$W_{f, 10}$	Metà anteriore della larghezza del picco al 10% dell'altezza del picco.

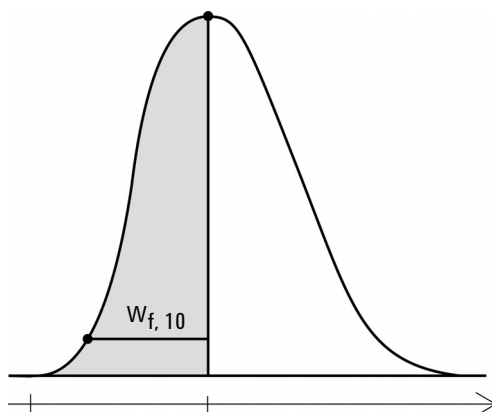


Figura 50 Calcolo dell'asimmetria del picco

**Simmetria**

La simmetria del picco viene calcolata come uno pseudomomento dall'integratore usando le seguenti equazioni di momento:

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

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

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

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

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

Se non si trova nessun punto di flesso, o se è riportato solo un punto di flesso, la simmetria del picco si calcola come segue:

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

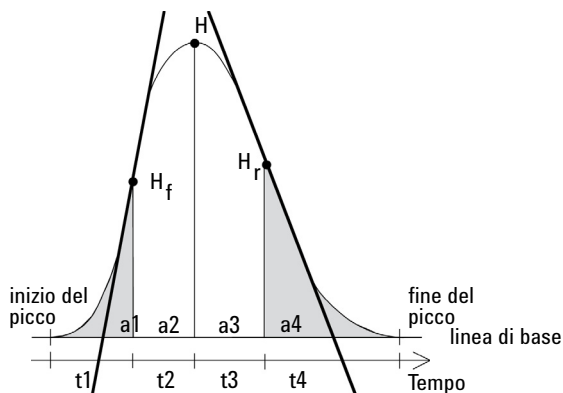


Figura 51 Calcolo del fattore di simmetria del picco

dove:

$a_i$  = area della porzione

$t_i$  = tempo della porzione

$H_f$  = altezza del punto di flesso anteriore

$H_f$  = altezza del punto di flesso posteriore

$H$  = altezza all'apice

## Formule e calcoli di idoneità del sistema

La ChemStation utilizza le formule seguenti per ottenere i risultati dei vari test di idoneità del sistema. I risultati vengono illustrati utilizzando gli stili di report **Performance**, **Performance+Noise**, **Performance+LibSearch** e **Extended Performance**.

Quando per una definizione si specifica ASTM o USP, allora la definizione sarà conforme a quelle date nei testi di riferimento corrispondenti. Tuttavia i simboli usati in questo manuale possono non essere gli stessi dei testi di riferimento.

I riferimenti usati in questo contesto sono:

- *ASTM: Sezione E 685 – 93 (2021)*
- *USP: The United States Pharmacopeia, First Supplement to USP 37-NF32*
- *EP: Farmacopea Europea, 11a edizione*
- *JP: Farmacopea Giapponese, 18a edizione*

### NOTA

A partire dalla farmacopea USP 2022, vari calcoli dei parametri delle massime prestazioni sono stati armonizzati con le farmacopee EP e JP. Fare riferimento alla guida in linea della ChemStation per informazioni dettagliate su quale formula EP/JP è necessario utilizzare ai fini della conformità alla farmacopea USP 2022.

## Definizioni generali

**Volume vuoto**

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

in cui

d	diámetro della colonna [cm]
$\pi$	costante, rapporto tra la circonferenza e il diametro di un cerchio
l	lunghezza della colonna [cm]
f	frazione del volume della colonna che non è occupata dalla fase stazionaria ma è disponibile per la fase mobile; valore predefinito di $f = 0,68$ (per le colonne Hypersil)

**Tempo di ritenzione di un composto non trattenuto  $t(m)$  [min]**

(Chiamato anche tempo morto o tempo vuoto)

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

in cui

F	Flusso di LC [ml/min]
---	-----------------------

## Definizioni di test sulle prestazioni

### Panoramica dei test delle prestazioni

I fattori della tavola dei picchi così come definiti nelle farmacopee USP, EP e JP sono disponibili per l'uso nei report ChemStation. La tabella seguente fornisce una panoramica dei fattori disponibili, delle relative definizioni e dei nomi dei valori. Per ulteriori dettagli sui calcoli, vedere le rispettive sezioni di questo manuale.

**Tabella 9** Valori di Farmacopea nei reporting della ChemStation

USP	EP	JP	Definizione	Classic reporting (RLE)	Intelligent reporting (RTE)
Fattore di simmetria o fattore di scodamento	Fattore di simmetria	Fattore di simmetria	$S = W_5/2f$	Scodamento USP	Peak_TailFactor
-	-	-	$S=W_{10}/2f$	Asimmetria USP al 10% dell'altezza	Peak_Asymmetry_10Perc
Fattore di separazione	-	Fattore di separazione	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ $T_R$ del picco a < $T_R$ del picco b	Selettività	Peak_Selectivity
Ritenzione relativa	Ritenzione relativa	-	Con composti RRT: $r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$	-	Peak_RelativeRetTime_EP
Tempo di ritenzione relativo (RRT)	Ritenzione relativa non corretta	Ritenzione relativa non corretta	$Rr = t_2/t_1$	-	Peak_RelativeRetTime
-	Risoluzione	Risoluzione	$R_s = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$	Risoluzione (EP) Risoluzione (JP)	Peak_Resolution_EP Peak_Resolution_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Risoluzione	Peak_Resolution_Classic
Risoluzione	-	-	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t(2)} + W_{t(1)}}$	-	Peak_Resolution_USP

**Tabella 9** Valori di Farmacopea nei reporting della ChemStation

USP	EP	JP	Definizione	Classic reporting (RLE)	Intelligent reporting (RTE)
Numero di piatti teorici (efficienza)			$n = 16 \left( \frac{t_R}{W_t} \right)^2$	Metodo Piatti - Tangente	Peak_TheoreticalPlates_USP
-	Numero di piatti (efficienza)	Numero di piatti (efficienza)	$N = 5,54 \times t_R^2 / W_{50}^2$	Metodo Piatti - Metà altezza	Peak_TheoreticalPlates_EP Peak_TheoreticalPlates_JP
	Rapporto S/N	Rapporto S/N	S/N = 2H/h Rumore: Calcolo da picco a picco; segnale di riferimento del bianco; intervallo di tempo 20x larghezza del picco.	-	Peak_SignalToNoise_EP
Rapporto S/N			S/N = 2H/h Rumore: Calcolo da picco a picco; intervallo di tempo nel segnale corrente.		Peak_SignalToNoise_USP
			S/N = 2H/h Rumore: Calcolo Sigma 6; intervallo di tempo nel segnale corrente.		Peak_SignalToNoise_6Sigma
Rapporto picco-valle	Rapporto picco-valle	Rapporto picco-valle	$p/v = H_p/H_v$	Rapporto picco-valle (anteriore e posteriore)	Peak_PeakValleyRatio
-	-	-	S=B/A	Asimmetria Foley-Dorsey al 10% dell'altezza	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7 (T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A,B) / \min(A,B))}$	Piatti Foley-Dorsey	-

## Momenti statistici, disallineamento ed eccesso

I momenti statistici sono utilizzati come alternativa per descrivere forme di picchi asimmetriche. Esiste un numero infinito di momenti del picco, ma solo i primi cinque sono utilizzati in relazione ai picchi cromatografici. Sono chiamati Momento 0°, Momento 1°, ... Momento 4°.

Il Momento 0° rappresenta l'area del picco.

Il Momento 1° è il tempo di ritenzione medio, o il tempo di ritenzione misurato al centro di gravità del picco. Questo valore è diverso dal tempo di ritenzione cromatografica misurato al massimo del picco se il picco non è simmetrico.

Il Momento 2° è la varianza del picco, cioè una misura della diffusione laterale. È la somma della varianza con il contributo di diverse parti del sistema.

Il Momento 3° descrive la simmetria verticale o il disallineamento. È la misura del distacco della forma del picco dallo standard gaussiano. Il disallineamento dato nel report Prestazioni + Esteso è la sua forma senza dimensioni. Un picco simmetrico ha un disallineamento uguale a zero. I picchi scodati hanno un disallineamento positivo e il Momento 1 è maggiore del tempo di ritenzione. I picchi con fronte anteriore hanno un disallineamento negativo ed il loro Momento 1 è minore del tempo di ritenzione.

Il Momento 4° o eccesso è una misura della compressione o dell'allungamento del picco lungo un asse verticale e di come può essere comparato ad uno standard gaussiano per il quale il Momento 4 equivale a zero. Può essere visualizzato muovendo o tirando lateralmente un picco gaussiano mantenendo l'area costante. Se il picco viene compresso o schiacciato per una comparazione, il suo eccesso sarà negativo. Se è più alto il suo eccesso sarà positivo. Anche l'eccesso viene incluso nel report Prestazioni + Esteso nella sua forma senza dimensioni.

### Calcolo dei momenti statistici

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

dove:

N = Numero di porzioni di area

A<sub>i</sub> = Valore (risposta) della porzione di area indicato da i

d<sub>t</sub> = Intervallo di tempo tra porzioni di area adiacenti

t<sub>0</sub> = Tempo della prima porzione di area

$\sum_{i=1}^N$  = Sommatoria dall'indice iniziale 1 all'indice finale N per le osservazioni discrete

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

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

## Larghezza reale del picco $W_x$ [min]

$W_x$  = larghezza del picco all' $x$  % dell'altezza totale

in cui

$W_t$	Larghezza del picco tangente, 4 sigma, ottenuta intersecando tangenti passanti per i punti di flesso con la linea di base
$W_{4,4}$	Ampiezza al 4,4% dell'altezza (ampiezza 5 sigma)
$W_5$	Ampiezza al 5% dell'altezza (larghezza del picco che scoda), utilizzata per il fattore di scodamento USP
$W_{10}$	Ampiezza al 10% dell'altezza
$W_{50}$	Ampiezza al 50% dell'altezza (larghezza a metà altezza effettiva del picco o 2,35 sigma).

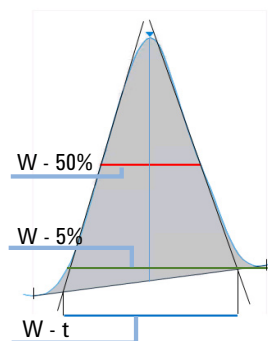


Figura 52 Larghezza del picco all' $x$ % dell'altezza

## Fattore di capacità (USP)

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

in cui:

$t_R$  = tempo di ritenzione del picco [min]

$t_0$  = tempo vuoto [min]

## Fattore di scodamento t (USP)

### NOTA

Il fattore di simmetria (USP, EP, JP) è identico al fattore di scodamento (USP). Entrambi sono disponibili come "Peak\_TailFactor" in Intelligent Reporting. Vedere anche la sezione "Panoramica dei test delle prestazioni", pagina 119.

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

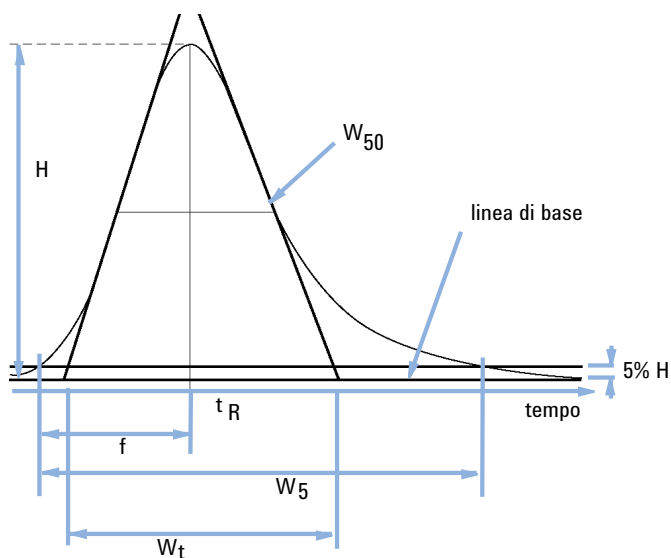


Figura 53 Parametri delle prestazioni

S	Fattore di simmetria, fattore di scodamento (USP)
H	Altezza del picco
$t_R$	Tempo di ritenzione
f	Distanza in min dalla parte anteriore del picco e $t_R$ , misurata al 5% dell'altezza del picco
$W_{50}$	Larghezza del picco al 50% dell'altezza [min]
$W_5$	larghezza del picco al 5% dell'altezza [min]
$W_t$	Larghezza del picco alle tangenti

## Numero di piatti teorici n per colonna

Metodo della tangente (USP, ASTM):

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

in cui

$T_R$	Tempo di ritenzione
$W_t$	Larghezza del picco alle tangenti [min]

Metodo della semiampiezza (ASTM, EP, JP):

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

in cui

$T_R$	Tempo di ritenzione
$W_{50}$	Larghezza del picco a metà altezza [min]

Metodo 5 sigma:

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

in cui

$T_R$	Tempo di ritenzione
$W_{4,4}$	larghezza del picco al 4,4% dell'altezza [min]

Metodo statistico:

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

dove:

$M_x = x^{\text{esimi}}$  del momento statistico

Metodo di Foley e Dorsey

L'equazione di Foley e Dorsey viene utilizzata per picchi asimmetrici. Corregge il calcolo dei piatti in caso di picchi scodati e slargati.

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

Dove:

- $W_{10}$  = larghezza del picco al 10% dell'altezza del picco
- A: fronting e B: scodamento, con  $A+B = W_{10}$

## Numero di piatti teorici al metro N [1-m]

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

in cui

n

Numero di piatti teorici

l

Lunghezza della colonna [cm] (come fornita nel metodo di elaborazione)

## Ritenzione relativa, selettività

**Selettività** La selettività calcola il valore alfa per tutti i picchi del segnale eccetto il primo. Per ogni coppia di picchi adiacenti (picchi 1 e 2,  $t_R$  del picco 1 <  $t_R$  del picco 2), la selettività viene calcolata come segue:

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

in cui

$k'_{(x)}$  fattore di capacità per il picco x:  $(t_{Rx} - t_0)/t_0$

**Ritenzione relativa (EP)** La ritenzione relativa (corretta) secondo EP può essere calcolata solo se è stato definito e identificato un picco di riferimento per il rapporto RT. I valori *alfa* sono < 1 se il picco si trova a sinistra del riferimento e > 1 se il picco si trova a destra del riferimento.

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

In cui

$t_{Ri}$  = tempo di ritenzione del picco di interesse

$t_{Rst}$  = tempo di ritenzione del picco di riferimento

$t_M$  = tempo morto

La ritenzione relativa (non corretta) secondo EP viene calcolata come

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

## Risoluzione R (USP, ASTM)

Metodo della tangente (con riferimento ai picchi 1 e 2,  $t_{R1}$  del picco 1 <  $t_{R2}$  del picco 2;  $t_R$  in min)

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

in cui

$t_R$  Tempo di ritenzione

$W_t$  Larghezza tangente [min]

## Risoluzione Rs (EP/JP)

La risoluzione (JP) e la risoluzione (EP) sono calcolate in base alla definizione seguente:

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

### NOTA

Inoltre, Classic Resolution  $(2,35/2)^*$ ... è disponibile per Intelligent Reporting come Peak\_Resolution\_Classic. Per un elenco completo dei valori vedere "Panoramica dei test delle prestazioni", pagina 119

## Risoluzione (definizioni classiche della ChemStation)

Metodo di metà altezza:

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

Metodo del Sigma 5:

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

Metodo statistico:

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

dove:

$M1_{(x)}$  = tempo di ritenzione medio per il picco x (Momento statistico 1) [min]

$W_{B(x)}$  = ampiezza di base per il picco x [min]

$W_{4,4(x)}$  = ampiezza al 4,4% dell'altezza per il picco x [min]

$W_{50(x)}$  = ampiezza al 50% dell'altezza per il picco x [min]

$W_S(x)$  = ampiezza derivata da momenti statistici =  $\sqrt{(M2)}$  per picco x [min]  
(vedere anche la sezione "Calcolo dei momenti statistici", pagina 122)

## Rapporto picco-valle (EP/JP)

Viene calcolato il rapporto picco-valle (**p/v ratio** nei risultati delle iniezioni) per indicare la qualità della separazione tra i picchi. Il calcolo viene effettuato utilizzando la farmacopea europea e la farmacopea giapponese (EP, JP).

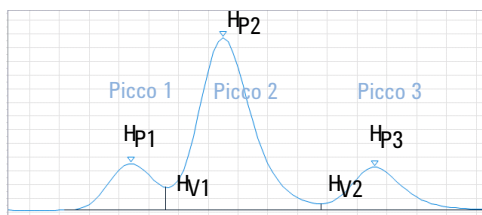
### NOTA

Questo valore viene calcolato in modo differente rispetto alla soglia utilizzata per l'operazione avanzata di divisione dei picchi della linea di base dell'integratore.

Il rapporto picco-valle viene calcolato per picchi separati da una valle come segue:

$$PV = \text{altezza del picco} / \text{altezza della valle}$$

Se è presente una valle sia a sinistra che a destra del picco, il rapporto picco-valle viene calcolato sia per il fronte che per la coda. Con la funzionalità Intelligent Reporting, viene visualizzato il rapporto p/v minimo. Con la funzionalità Classic Reporting, il report *Classico, prestazioni estese* visualizza entrambi i valori.



Per il picco 1:

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

Per il picco 2:

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

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

Per il picco 3:

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

in cui

PV	Rapporto picco-valle
PV <sub>F</sub>	Rapporto picco-valle, fronte
PV <sub>T</sub>	Rapporto picco-valle, coda
H <sub>Px</sub>	Altezza del picco x
H <sub>Vx</sub>	Altezza della valle x

Se un picco ha più spalle separate da una valle, il rapporto picco-valle viene calcolato per ogni spalla.

Definizione di valle:

- altezza e tempo sono condivise tra due picchi consecutivi;
- la linea di base è condivisa tra due picchi consecutivi;
- l'altezza assoluta della linea di base è maggiore di 10<sup>-5</sup>.

## Definizioni per la riproducibilità

Per la revisione statistica dei dati analitici in termini di riproducibilità, la sequenza è considerata un campione casuale di piccole dimensioni preso da un numero infinito di possibili risultati sperimentali. Per ottenere un gruppo completo di risultati sarebbe necessario disporre di una quantità illimitata di materiale campione e di tempo. Dati rigorosamente statistici si applicano unicamente ad un gruppo o ad una popolazione di dati completi e auto-contenuti. Quindi un requisito essenziale di tale trattamento è che il campione selezionato venga considerato rappresentativo di tutti i dati.

### Media M del campione

Il valore di media M di un campione casuale consistente di N misurazioni viene calcolato da questo gruppo limitato di N valori singoli osservati  $X_i$  indicizzati con un indicatore consecutivo i secondo la seguente formula:

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

Dove:

N = numero di osservazioni discrete

$X_i$  = Valore di osservazioni discrete indicate da i

## Deviazione standard S del campione

Consideriamo un campione casuale di dimensioni N. La deviazione standard S del campione per il campione finito scelto, preso da una popolazione di dati di grandi dimensioni, è determinato da

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

La deviazione standard S del campione differisce in due punti dalla deviazione standard s dell'intera popolazione:

- invece del valore reale di media viene utilizzato solo il valore di media M del campione e
- divisione per N-1 invece di N.

## Deviazione standard relativa RSD[%] (USP)

La deviazione relativa standard è definita come

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

## Deviazione standard della media S

Detta M la media del campione e S la deviazione standard dello stesso [o (N-1)]. La deviazione standard  $S_M$  della media del campione M è determinata da

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

Ciò può essere meglio illustrato da un esempio.

Mentre il tempo di ritenzione di un determinato composto può deviare leggermente dal valore di media calcolato durante una sequenza, i dati di un'altra sequenza possono differire in maniera più significativa a causa, ad esempio, delle modifiche della temperatura dell'ambiente, del degrado del materiale con il quale è stata fabbricata la colonna, ecc. Per determinare questa deviazione, la deviazione standard della media del campione  $S_M$  può essere calcolata in base alla seguente formula.

## Deviazione standard (S)

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

## Intervallo di confidenza CI

L'intervallo di confidenza viene calcolato per fornire informazioni sulla precisione della stima di un valore di media, quando lo si applica all'intera popolazione e non solo ad un campione.

L'intervallo di confidenza  $100 \times (1 - \alpha) \%$  per la media globale è dato da

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

dove:

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

Punto percentuale della tavola di distribuzione t ad una probabilità di rischio pari a  $\alpha$

Per la statistica estesa riportata nel report riassuntivo di sequenza, deve essere usato l'intervallo di confidenza del 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

La distribuzione t (o 'distribuzione di Student') deve essere utilizzata per volumi di campione ridotti. In caso di volumi di campioni elevati, i risultati della distribuzione t e la normale distribuzione (gaussiana) non risultano più diversi. Quindi, in caso di 30 o più campioni, può essere usata, in sostituzione, la normale distribuzione. Poiché sarebbe estremamente laborioso calcolare la distribuzione t per numeri elevati, la distribuzione normale costituisce la migliore approssimazione.

Intervallo di confidenza del 95% per 6 campioni:

$$1 - \alpha = 0.95$$

$$N = 6$$

Il valore corretto di t è stato preso dalla tavola di distribuzione t per 5 (N-1) gradi di libertà e per il valore  $\alpha/2$ , pari a 0,025. Ciò darà la seguente formula di calcolo per il CI:

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

## Coefficiente di correlazione

Insieme al grafico della curva di calibrazione viene visualizzato un *coefficiente di correlazione*. Il coefficiente di correlazione ( $r$ ) fornisce una misura della bontà dell'interpolazione tra la curva di calibrazione e i punti di dati. Nel caso delle curve di calibrazione a pendenza positiva, il valore del coefficiente è fornito fino a cinque cifre decimali nell'intervallo:

0,00000 - 1,00000

in cui:

0,00000 = Nessuna correlazione

1,00000 = Correlazione perfetta

### NOTA

Il coefficiente di correlazione non è direttamente correlato alla buona precisione e alla buona accuratezza del metodo analitico. Deve essere utilizzato principalmente per individuare il miglior tipo di curva.

Quando si valuta un tipo di curva, è necessario operare con un numero di livelli di calibrazione sufficienti a ottenere una rilevanza statistica sufficiente.

Il coefficiente di correlazione ( $r$ ) viene calcolato utilizzando la seguente equazione:

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

in cui

$r$	Coefficiente di correlazione
$wt_i$	Peso del punto di dati
$\bar{y}$	Valori medi delle risposte o delle quantità misurate Se la curva di calibrazione è forzata attraverso l'origine ( <b>Origin=Force</b> nel metodo di elaborazione), OpenLab ChemStation calcola il coefficiente di determinazione non centrato. In questo caso, $\bar{y}$ è omissis.
$y_i$	Risposta misurata (Area, AreaRatio (metodo degli standard interni), Height o HeightRatio (metodo degli standard interni)) o quantità misurata (Amount, AmountRatio (metodo degli standard interni)), a seconda della modalità di calibrazione
$\bar{Y}$	Valori medi delle risposte o delle quantità previste
$Y_i$	Risposta o quantità prevista (usando la curva di calibrazione)

$\bar{y}$  e  $\bar{Y}$  sono i valori medi delle risposte o quantità misurate e previste, calcolati come segue:

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

in cui

$wt_i$	Peso del punto di dati
$\bar{y}$	Valori medi delle risposte o delle quantità misurate
$y_i$	Risposta misurata (Area, AreaRatio (metodo degli standard interni), Height o HeightRatio (metodo degli standard interni)) o quantità misurata (Amount, AmountRatio (metodo degli standard interni)), a seconda della modalità di calibrazione

e

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

in cui

$wt_i$	Peso del punto di dati
$\bar{Y}$	Valori medi delle risposte o delle quantità previste
$Y_i$	Risposta o quantità prevista (usando la curva di calibrazione)

Per la **Forced Origin** si suppone che i punti siano centrati sullo zero (riflessi nel terzo settore), e i valori medi vengono sostituiti con zero.

Il coefficiente di correlazione è 1 per una correlazione perfetta o quando i punti sono distribuiti simmetricamente intorno alla curva. Si riduce quando i punti di calibrazione sono distribuiti in maniera meno simmetrica. I valori tipici sono tra 0,99 e 1. Il coefficiente di correlazione non è una misura molto sensibile della qualità della curva.

## Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente

Se, per scopi di validazione, fosse necessario ricalcolare manualmente i risultati ottenuti dalla ChemStation, come le curve di calibrazione, i coefficienti di correlazione, i piatti teorici, ecc., è necessario tenere conto del formato numerico utilizzato dalla ChemStation.

Per tutti i numeri salvati all'interno della ChemStation viene utilizzato il tipo di dati "C" DOPPIO. Ciò significa che vengono memorizzate 14 cifre significative per ogni numero. L'implementazione di questo tipo di dati segue l'adozione da parte di Microsoft dello standard IEEE per il tipo di dati "C" e delle regole di arrotondamento ad esso associate (consultare i documenti Microsoft Q42980, Q145889 e Q125056).

Dato che può essere utilizzato un numero illimitato di parametri per il calcolo della tavola di calibrazione, non è possibile calcolare l'esatta entità dell'errore probabilmente introdotto dalla propagazione e dall'accumulo di errori di arrotondamento. Tuttavia una verifica intensiva tramite diverse curve di calibrazione ha dimostrato che può essere garantita un'accuratezza di un massimo di 10 cifre. Dal momento che la ripetibilità dell'area, dell'altezza e del tempo di ritenzione di un'analisi cromatografica ha di solito 3 cifre significative, 10 cifre significative all'interno del calcolo sono in genere sufficienti. Per questa ragione la tavola di calibrazione e le altre tavole visualizzano un massimo di 10 cifre significative.

Se per la validazione è richiesto un calcolo esterno (manuale), si consiglia di utilizzare tutte le cifre usate per il calcolo interno. L'uso dei dati visualizzati e/o arrotondati per i calcoli esterni può produrre risultati diversi da quelli prodotti dalla ChemStation, a causa degli errori di arrotondamento.

I paragrafi che seguono descrivono come accedere a tutte le cifre memorizzate internamente che di solito sono richieste per i calcoli manuali. In tutti i casi deve essere caricato un file di dati e deve essere prodotto un report con lo stile adatto prima dell'esecuzione del comando elencato. Tutti i comandi vengono inseriti sull'apposita riga di comando della ChemStation, che può essere abilitata dal menu Visualizza.

Gli esempi che seguono generano un file .TXT nella cartella degli strumenti pubblici (per esempio, C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1). Per ottenere il percorso effettivo, digitare la seguente espressione nella riga di comando:  
`print _instpath$`. Utilizzare nomi differenti per il file e la cartella secondo necessità. Le informazioni contenute nel file possono essere visualizzate utilizzando Blocco Note o un elaboratore di testi adatto.

Informazioni sui picchi non elaborati:

- Tempo di ritenzione
- Area
- Altezza
- Ampiezza (integratore)
- Simmetria
- Tempo di inizio del picco
- Tempo di fine del picco

Sulla riga di comando digitare:

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

Informazioni sul picco elaborato:

- Tempo di ritenzione misurato
- Tempo di ritenzione atteso
- Area
- Altezza
- Ampiezza (integratore)
- Simmetria
- Semiampiezza - semialtezza del picco (Prestazioni e Prestazioni estese)
- Fattore di scodamento (Prestazioni e Prestazioni estese)
- Selettività (Prestazioni e Prestazioni estese)
- $K'$  (Prestazioni estese)
- Larghezza del picco tangente (Prestazioni estese)
- Disallineamento (Prestazioni estese)
- Piatti teorici - Semiampiezza (Prestazioni e Prestazioni estese)
- Piatti teorici - Tangente (Prestazioni estese)
- Piatti teorici - 5 sigma (Prestazioni estese)
- Piatti teorici - Statistici (Prestazioni estese)
- Risoluzione - Semiampiezza (Prestazioni e Prestazioni estese)
- Risoluzione - Tangente (Prestazioni estese)
- Risoluzione - 5 sigma (Prestazioni estese)
- Risoluzione - Statistica (Prestazioni estese)

Sulla riga di comando digitare:

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

Informazioni sul composto elaborato:

- Quantità calcolata

Sulla riga di comando digitare:

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

Informazioni sulla tavola di calibrazione:

- Livello numerico
- Quantità
- Area
- Altezza

Sulla riga di comando digitare:

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

Informazioni sulla regressione lineare:

- Intercetta Y (CurveParm1)
- Pendenza (CurveParm2)
- Coefficiente di correlazione

Sulla riga di comando digitare:

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

## 6

# Calcoli specifici per CE

Tavole di calibrazione	140
Calibrazione standard	140
Calibrazione mediante peso molecolare delle proteine	141
Calibrazione mediante coppia di basi del DNA	141
Focalizzazione isoelettrica capillare	142
Calibrazione mediante correzione della mobilità	143
Introduzione	143
Calcoli di mobilità effettiva	144
Calcoli di mobilità relativa	147
Stili di rapporto speciali per elettroforesi capillare	149
Aree del picco corrette	150
Applicabilità del sistema per elettroforesi capillare	151
Fattore di capacità $k'$	151
CE-MSD	152
Sottrazione del fondo	152

Questo capitolo è pertinente solo se si utilizza ChemStation per controllare gli strumenti CE.

## Tavole di calibrazione

Nell'elenco a discesa relativo alla tavola di calibrazione sono disponibili quattro tipi diversi di calibrazione.

### Calibrazione standard

La calibrazione standard è basata sull'area del picco o sull'altezza del picco. Selezionando **Standard Calibration**, sono disponibili le opzioni **Calculate Signals Separately** e **Calculate with Corrected Areas**.

Selezionare l'opzione di calcolo con aree corrette per far sì che, nel calcolo dei rapporti di normalizzazione percentuale (Norm%), il valore percentuale dei segnali indicati separatamente corrisponda a 100% per ogni segnale. Se l'opzione **Calculate signals separately** è deselezionata, il valore percentuale di tutti i segnali corrisponde a 100%. È necessario selezionare **Calculate signals separately** per eseguire l'ordinamento in base al segnale nella tavola di calibrazione.

Selezionare **Calculate with Corrected Areas** per apportare una correzione all'area del picco in base al tempo di migrazione. In questa modalità, l'area viene divisa in base al tempo di migrazione per migliorare la riproducibilità nell'analisi quantitativa in caso di instabilità dei tempi di migrazione.

Oltre alla calibrazione standard, sono disponibili tre calibrazioni specifiche per l'elettroforesi capillare caratterizzate da un segnale basato sul tempo di migrazione. Il segnale viene definito dalla descrizione del segnale nel metodo di calibrazione. Se il file di dati contiene più segnali, può essere selezionato soltanto un segnale che viene estratto dal file di dati. Il formato della tavola di calibrazione dipende dal tipo di calibrazione selezionato.

Le operazioni di quantificazione possono essere eseguite basandosi sulla calibrazione in base alla taglia del biopolimero (diagramma di Ferguson) per proteina-SDS.

## Calibrazione mediante peso molecolare delle proteine

La **Protein molecular weight calibration** richiede uno standard di calibrazione con componenti di pesi molecolari noti e un picco di riferimento. L'equazione di calibrazione è la seguente:

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

Dove:

$MW$  è il peso molecolare.

$t_{ref}$  è il tempo di migrazione del picco di riferimento

$t$  è il tempo di migrazione.

$k_0$  e  $k_1$  sono i coefficienti dell'equazione lineare

La tavola di calibrazione contiene il nome, il tempo di migrazione,  $t_{ref}/t$  (tempo di migrazione relativo), il peso molecolare e  $\log(MW)$  per ogni componente.

## Calibrazione mediante coppia di basi del DNA

La **DNA base-pair calibration** è simile alla **protein molecular weight calibration**, ma non usa alcun picco di riferimento. Richiede uno standard di calibrazione con un numero noto di coppie di basi. L'equazione di calibrazione è la seguente:

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

Dove:

$\#BP$  è il numero di coppie di basi.

$t$  è il tempo di migrazione.

$k_0$  e  $k_1$  sono i coefficienti dell'equazione lineare.

La tavola di calibrazione contiene il nome, il tempo di migrazione,  $1/t$ , le coppie di basi e  $\log(\text{coppie di base})$  per ogni componente.

## Focalizzazione isoelettrica capillare

La **capillary isoelectric focusing calibration** (cIEF) richiede uno standard di calibrazione con proteine standard di punti isoelettrici (pI) noti. L'equazione di calibrazione è la seguente:

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

Dove:

pI è il punto isoelettrico.

t è il tempo di migrazione.

$k_0$  e  $k_1$  sono i coefficienti dell'equazione lineare.

La tavola di calibrazione contiene il nome, il tempo di migrazione e il punto isoelettrico pI per ogni componente.

## Calibrazione mediante correzione della mobilità

### Introduzione

Piccole modifiche nella composizione del tampone, nella temperatura o nella viscosità, nonché l'adsorbimento nella parete capillare, possono condizionare il flusso elettrosmotico (EOF) e renderlo instabile. La conseguente modifica dell'EOF può creare una considerevole deviazione standard dei tempi di migrazione. Le correzioni della mobilità consentono di ridurre notevolmente l'effetto dei cambiamenti del tempo di migrazione da un'analisi all'altra, mediante il monitoraggio del tempo di migrazione di un picco di riferimento della mobilità e l'aumento significativo della riproducibilità del tempo di migrazione.

È consigliabile scegliere il picco di riferimento della mobilità in base alle priorità seguenti:

- Selezionare il picco con il segnale più alto.
- Selezionare il picco più isolato.
- Il marker EOF o lo standard interno possono essere usati come picco di riferimento della mobilità.
- Ingrandire la finestra di ricerca in modo da individuare sempre il picco di riferimento della mobilità.
- Se diversi picchi sono indicati nella finestra di ricerca, il picco con il segnale più alto viene selezionato automaticamente come picco di riferimento della mobilità.

Sono disponibili due tipi di correzione della mobilità:

#### **Effective Mobility Correction**

Questo tipo di **Effective Mobility Correction** usa le mobilità effettive di tutti i picchi e richiede la disponibilità dei dati della rampa di tensione unitamente all'elettroferogramma. Inoltre, la correzione della mobilità effettiva consente di determinare le mobilità effettive vere di tutti i componenti del campione.

#### **Relative Mobility Correction**

Questo **Relative Mobility Correction** non richiede i dati di tensione e utilizza una tensione costante per tutte le misurazioni.

## Calcoli di mobilità effettiva

Oltre a un picco di riferimento, i requisiti per la correzione della mobilità effettiva includono un marker neutro che corrisponde alla velocità del flusso elettrosmotico (EOF). Di seguito sono riportati alcuni marker usati comunemente e le relative lunghezze d'onda.

**Tabella 10** Marker EOF comunemente usati

Composto	Lunghezza d'onda
1-Propanolo	210 nm
Acetone	330 nm
Acetonitrile	190 nm
Benzene	280 nm
Guanosina	252 nm
Ossido di mesitile	253 nm
Metanolo	205 nm
Fenolo	218 nm
Piridina	315 nm
Tetraidrofurano	212 nm
Uracile	259 nm

I dati relativi alla tensione e le dimensioni capillari possono essere salvati assieme al file di dati o essere immessi manualmente durante l'impostazione della tavola di calibrazione. La memorizzazione dei dati di tensione durante l'analisi comporta una maggiore accuratezza. Accertarsi di memorizzare anche le dimensioni capillari con il metodo. Per rielaborare i segnali acquisiti senza dati di tensione/dimensioni capillari, immettere manualmente la tensione e il tempo di passaggio nel campo Tensione e dimensioni capillari della finestra di dialogo.

In base ai dati, viene determinata la mobilità effettiva per ogni componente.

Informazioni generali

La mobilità apparente di un picco di campione è definita dall'equazione seguente:

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

dove

$l$  è la lunghezza effettiva del capillare (la lunghezza dal punto di iniezione al punto di rivelazione).

$L$  è la lunghezza totale del capillare.

$V(t)$  è la tensione media dal tempo 0 al tempo di migrazione  $t$  del picco.

La tensione media è calcolata a partire dalla tensione misurata o dalla rampa di tensione specificata nel metodo mediante le equazioni seguenti:

Se  $t < t_R$ ,

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

Se  $t > t_R$ ,

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

dove

$t$  è il tempo di migrazione del picco

$t_R$  è il tempo di passaggio

$V$  è la tensione finale

L'equazione della mobilità può essere semplificata mediante l'introduzione di un coefficiente:

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

La mobilità relativa o apparente diventa

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

La mobilità effettiva o reale diventa

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

dove

$\mu_{app}$  è la mobilità apparente di qualsiasi picco

$\mu_{EOF}$  è la mobilità apparente di un marker neutro

I componenti con velocità inferiore all'EOF (solitamente anioni) saranno caratterizzati da valori di mobilità effettiva negativi.

## Calibrazione

La mobilità reale di un picco di campione, da usare come picco di riferimento della mobilità nelle misurazioni successive, viene calcolata mediante il tempo di migrazione di un marker neutro ( $\mu_{EOF}$ ):

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

Le mobilità effettive di tutti i picchi vengono quindi calcolate e memorizzate come mobilità attese:

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

La tavola di calibrazione conterrà il tempo di migrazione misurato e la mobilità reale calcolata per ogni composto nelle colonne relative al tempo di migrazione atteso e alla mobilità attesa.

## Calcolo della mobilità

Il valore reale di  $\mu_{EOF}$  viene calcolato mediante il picco di riferimento della mobilità:

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

Quindi il tempo di migrazione atteso per ogni picco viene regolato:

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

I valori calcolati vengono usati per l'identificazione dei picchi e sostituiscono i valori presenti nella tavola di calibrazione.

## Ricalibrazione

Il tempo di migrazione del picco di riferimento della mobilità viene usato per calcolare il valore reale di  $\mu_{EOF}$ :

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

Il tempo di migrazione atteso per ogni picco viene regolato:

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

e le mobilità vengono aggiornate:

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

Durante la calibrazione, i valori attesi per il tempo di migrazione e i valori di mobilità reale vengono aggiornati nella tavola di calibrazione.

## Calcoli di mobilità relativa

È possibile eseguire anche la correzione del tempo di migrazione in base alle mobilità relative. In questo caso il marker EOF, la tensione e le dimensioni capillari non sono necessari. Il software esegue la correzione del tempo di migrazione ma non visualizza i valori di mobilità.

Informazioni generali

Come nei calcoli di mobilità effettiva, il coefficiente

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

viene usato nei calcoli di mobilità relativa per descrivere la relazione tra mobilità e tempo di migrazione:

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

La differenza è data dal fatto che, nelle equazioni della mobilità relativa, il fattore  $k$  appare sia nel numeratore sia nel denominatore di una frazione. Pertanto la dimensione capillare può essere eliminata. Il fattore  $k$  è calcolato nel modo seguente:

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

Dove  $V(t)$  è la tensione media dal tempo 0 al tempo di migrazione  $t$  del picco.

Quando il parametro della tensione è impostato su **Ignore**, il fattore  $k$  è una costante e può essere eliminato dalle equazioni relative al tempo di migrazione atteso (come illustrato di seguito).

Le equazioni seguenti descrivono il caso generale per  $k = k(t)$ , sebbene il software prenda in considerazione tutti i casi durante il calcolo del fattore  $k$ .

Calibrazione

Un picco di riferimento della mobilità viene identificato e il relativo tempo di migrazione ( $t_{refcal}$ ) viene memorizzato. I tempi di migrazione attesi ( $t_{expcalN}$ ) di tutti gli altri picchi vengono salvati.

Calcolo della mobilità

Dopo la rivelazione del picco di riferimento, il tempo di migrazione atteso per ogni picco viene regolato in base al tempo di migrazione reale del picco di riferimento della mobilità:

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

Quindi il tempo di migrazione del picco di riferimento dall'ultima calibrazione viene aggiornato:

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

## Stili di rapporto speciali per elettroforesi capillare

## NOTA

I calcoli specifici per CE possono essere riportati solo con il formato *Classic ChemStation Reporting*.

Il seguente stile di report è specifico per ChemStation per sistemi CE:

**Mobilità CE**

La **CE Mobility** include risultati quantitativi in forma testuale, in particolare la mobilità apparente. Per utilizzare questo stile di report è necessario fornire informazioni sul tipo di capillare utilizzato prima dell'acquisizione e memorizzare il segnale di tensione. La mobilità apparente è calcolata in base alla formula seguente.

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

In cui

$l$  è la lunghezza effettiva del capillare (cm)

$L$  è la lunghezza totale del capillare (cm)

$t$  è il tempo di migrazione (min)

$V$  è la tensione (kV)

Se è attivata la correzione della mobilità effettiva (vedere "[Calcoli di mobilità effettiva](#)", pagina 144), nei report semplici (report esterni standard, per esempio) la colonna del tipo di picco è sostituita dalla colonna della mobilità. Il report della mobilità di CE stampa le mobilità effettive anziché quelle apparenti.

## Aree del picco corrette

La ChemStation Agilent per sistemi CE consente di usare le aree del picco corrette invece dei calcoli di area normali. Tali aree vengono utilizzate per la calibrazione standard e i rapporti.

Per attivare questa funzione, selezionare **Calculate with Corrected Areas** per apportare una correzione all'area del picco in base al tempo di migrazione. In questa modalità, l'area viene divisa in base al tempo di migrazione per migliorare la riproducibilità nell'analisi quantitativa in caso di instabilità dei tempi di migrazione.

L'area corretta viene calcolata in base alla formula seguente:

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

Dove:

$A_c$  è l'area del picco corretta (mAU).

$A$  è l'area del picco (mAU·sec).

$t$  è il tempo di migrazione (min).

Talvolta l'area corretta viene denominata anche area normalizzata.

## Applicabilità del sistema per elettroforesi capillare

### Fattore di capacità $k'$

Nell'elettroforesi capillare, il valore del fattore di capacità  $k'$  non può essere calcolato automaticamente per tutte le modalità operative. Consultare il manuale *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer for the formulas respectively*. I valori indicati nei rapporti sono validi solo per la ChemStation Agilent per sistemi LC 3D, poiché la ChemStation Agilent per sistemi CE usa gli stessi algoritmi della ChemStation Agilent per sistemi LC 3D.

## CE-MSD

## Sottrazione del fondo

Quando si seleziona la voce di menu **Subtract Background** (BSB), lo spettro di massa selezionato più di recente viene sottratto da ciascun punto nell'elettroferogramma corrente. I dati risultanti vengono salvati nella stessa directory e con lo stesso nome del file di dati originale; l'estensione del file, tuttavia, viene modificata in .BSB.

Il nuovo file di dati diviene il file di dati corrente e viene visualizzato l'elettroferogramma con sottrazione del fondo. Nella voce Operator dell'intestazione del file di dati viene memorizzato un record del numero di sottrazioni del fondo eseguite.

Se si visualizza un elenco tabulare di dati BSB, si possono osservare differenze a causa della precisione della rappresentazione dei dati.

**NOTA**

I file di testo HELP in LC/MS fanno riferimento soltanto ai parametri LC e non ai parametri CE. Alcune funzioni che sono disponibili nel software LC/MS non sono disponibili o non sono pertinenti nel caso delle applicazioni CE/MS ma sono utilizzate in LC. La funzione **peak matching** non è applicabile alle analisi CE-MS e pertanto non è attiva. Nella tecnica CE-MS, la rivelazione UV e MS avviene a lunghezze effettive differenti del capillare di separazione. A causa della diversa risoluzione a lunghezze effettive diverse, la corrispondenza dei picchi non è possibile.

# 7

## Verifica del sistema

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi) 154

Verifica del sistema 154

Il registro GLPsave 157

Funzione test DAD 159

Funzione revisione test DAD 159

Questo capitolo descrive la funzione di verifica e le funzioni di verifica GLP della ChemStation.

## Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi)

Se ciò è supportato dallo strumento configurato, la ChemStation comprende due finestre aggiuntive per eseguire le funzioni di verifica e diagnosi. Per ulteriori informazioni, consultare la Guida in linea.

### Verifica del sistema

La verifica del sistema è un fattore chiave per l'utilizzo di uno strumento analitico in un laboratorio regolamentato. Le funzioni della ChemStation che permettono di effettuare verifiche secondo la buona prassi di laboratorio (GLP) sono state progettate per aiutare gli utenti a dimostrare che lo strumento, o un suo componente, funziona in modo ottimale o funzionava in modo ottimale al momento in cui è stata effettuata una particolare analisi.

Le funzioni di verifica della ChemStation consentono di controllare che il software funzioni correttamente. È possibile effettuare questa operazione rielaborando i file di dati secondo metodi specifici e paragonando i risultati ad uno standard predefinito. La funzione di verifica è particolarmente importante per dimostrare l'integrità dei risultati di integrazione e quantificazione.

È possibile usare il test di verifica standard o definire test personalizzati usando diversi metodi e file di dati per controllare le combinazioni algoritmiche del software utilizzate dai metodi di analisi. Il test di verifica è un file protetto e non può essere modificato o cancellato.

La funzione Verification (Verifica) della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) permette di scegliere fra le seguenti opzioni:

- effettuare un test di verifica del database;
- definire un nuovo test di verifica ed aggiungerlo al database;
- cancellare un test di verifica dal database.

La sezione How To (Come...) della Guida in linea descrive come eseguire queste operazioni. Quando si effettua un test di verifica sulla ChemStation, è possibile scegliere se effettuare il test per intero o selezionare una combinazione di parti.

I risultati del test di verifica vengono salvati in formato binario nella subdirectory predefinita: C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Verify, unitamente ai file di dati e di metodi. La subdirectory Verify è allo stesso livello delle subdirectory relative a sequenza, metodo e dati. È possibile inviare i risultati ad una stampante o ad un file. I risultati del test, compreso il risultato di un test di verifica combinato, sono positivi o negativi.

Sono disponibili i seguenti test:

#### Digital Electronics (solo DAD Agilent Serie 1100/1200)

Un cromatogramma di prova viene memorizzato nel rivelatore a serie di diodi. Il cromatogramma viene inviato alla ChemStation dopo essere passato attraverso le stesse fasi di preelaborazione dei dati grezzi comuni provenienti da fotodiodi. I dati che ne derivano vengono paragonati ai dati originali archiviati nella ChemStation per questo cromatogramma di prova. Se non c'è corrispondenza il test risulta negativo. Questo test assicura che il sistema elettronico del DAD, che effettua la preelaborazione dei dati, funzioni ancora correttamente. Dato che viene utilizzato un cromatogramma di prova memorizzato, la lampada ed il rivelatore a serie di diodi non prendono parte a questo test. Possono comunque essere controllati tramite la **"Funzione test DAD"**, pagina 159.

#### Integrazione dei picchi

Il file di dati viene di nuovo integrato utilizzando il metodo originale. I risultati vengono paragonati a quelli originali di integrazione archiviati nel registro di verifica. Se non sono corrispondenti il test risulta negativo.

#### Quantificazione del composto

I composti nei file di dati vengono di nuovo quantificati. I risultati vengono paragonati a quelli originali di quantificazione archiviati nel registro di verifica. Se non sono corrispondenti il test risulta negativo.

#### Stampa di report

Il rapporto originale viene stampato di nuovo.

La pagina che segue illustra un esempio di test di verifica completato con esito positivo.

```
=====
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
```

## Il registro GLPsave

Il registro GLPsave viene salvato alla fine di ogni analisi se viene scelto nella lista di controllo del periodo di funzionamento. Esso contiene le seguenti informazioni:

- segnali;
- registro elettronico;
- tavola dei risultati di integrazione;
- tavola dei risultati di quantificazione;
- dati sulle prestazioni dello strumento;
- metodo di analisi dei dati.

Si tratta di un registro completamente protetto, creato dal sistema al momento dell'analisi. È possibile richiamarlo in qualsiasi momento come prova dei metodi analitici.

L'opzione GLPsave Register nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) consente di rivedere il registro in qualunque momento. Il file è protetto da somma di controllo e da codice binario per assicurare che non possa essere modificato.

Se viene utilizzata la finestra di dialogo per scegliere il registro GLPsave, è possibile scegliere le opzioni di revisione dalle seguenti:

- load original method (carica metodo originale);
- load original signals (carica segnali originali);
- load instrument performance data (carica dati sulle prestazioni dello strumento);
- print original method (stampa metodo originale);
- print original integration results (stampa risultati di integrazione originali);
- print original quantification results (stampa risultati quantitativi originali);
- generate original report from the original method and signals (genera rapporto originale da metodo e segnali originali).

Si può usare la funzione di revisione GLP per dimostrare che i dati cromatografici sono originali, provare la qualità delle analisi dai dati sulle prestazioni dello strumento e dimostrare l'autenticità dell'interpretazione dei dati.

Ad esempio è possibile:

- ricaricare e ristampare la parte relativa all'elaborazione dei dati relativi al metodo utilizzato al momento dell'analisi del campione, al fine di provare che la valutazione dei dati, presentata come risultato dell'analisi, non sia stata modificata in alcun modo e
- rivedere i risultati di integrazione e quantificazione per provare l'autenticità del rapporto di stampa.

## Funzione test DAD

Il test del rivelatore può essere usato per la validazione di routine del sistema di uno strumento analitico in un laboratorio regolamentato.

Il test del DAD stabilisce quali sono le prestazioni del rivelatore a serie di diodi. Quando si sceglie DAD Test dal menu Strumento (solo per LC3D e CE) viene eseguito un controllo dello strumento per l'intensità e la calibrazione della lunghezza d'onda. Premendo Salva, i risultati del test vengono automaticamente salvati nel database DADTest, in un file chiamato DADTest.Reg che si trova nella directory predefinita dello strumento.

## Funzione revisione test DAD

La funzione **Review DAD Test** del menu Visualizza dell'analisi dei dati consente di rivedere il file DADTest.Reg in qualsiasi momento. Il file è protetto da somma di controllo e da codice binario per verificare che non possa essere modificato.

È possibile scegliere una qualsiasi delle seguenti parti del test:

- |                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Show Holmium Spectra</b>   | Visualizza tutti gli spettri di olmio elencati nella tavola Revisione test DAD. Lo spettro attivo viene segnalato.  |
| <b>Show Intensity Spectra</b> | Visualizza tutti gli spettri di intensità elencati nella tavola Revisione test DAD. Lo spettro attivo viene segnalato.  |
| <b>Save as New Database</b>   | Se viene sostituita la lampada del DAD è possibile reimpostare DADTest cancellando i risultati indesiderati dalla tavola, quindi utilizzando questa funzione per salvare come nuovo database.                   |
| <b>Show Selected Spectra</b>  | Visualizza solo gli spettri selezionati nella tavola.   |
| <b>Show Intensity Graph</b>   | È possibile tracciare un diagramma di intensità per fornire indicazioni sullo stato della lampada del rivelatore a serie di diodi. Il grafico fornisce una funzione dell'intensità massima rapportata al tempo. |

## Glossario-IU

### A

**Advanced**

Avanzata

**all valleys**

tutte le valli

**Amount per response**

Quantità per risposta

**Apply Manual Events from Method**

Applica eventi manuali dal metodo

**Area Percent reject**

Scarto in base all'area percentuale

**Area reject**

Scarto in base all'area

**Area Reject**

Scarto in base all'area

**Area Sum**

Somma delle aree

**Area sum off**

Somma delle aree disattivata

**Area sum on**

Somma delle aree attivata

**Area Sum Slice**

Porzione di somma delle aree

**Autointegrate**

Autointegrazione

**Average**

Media

### B

**Baseline at valleys**

Linea di base ai punti di avvallamento

**Baseline backwards**

Linea di base all'indietro

**baseline point**

punto della linea di base

### C

**Calculate signals separately**

Calcola segnali separatamente

**Calculate Signals Separately**

Calcola segnali separatamente

**Calculate with Corrected Areas**

Calcola con aree corrette

**Calibration Settings**

Impostazioni calibrazione

**capillary isoelectric focusing calibration**

calibrazione mediante focalizzazione isoelettrica capillare

**CE Mobility**

Mobilità CE

**Classical**

Classica

**Clear**

Annulla

**Compound Details**

Dettagli composto

### D

**Data Analysis**

Analisi dei dati

**Delete Peak(s)**

Elimina picchio/i

**detector response**

risposta del rivelatore

**DNA base-pair calibration**

calibrazione mediante coppia di basi del DNA

**Draw Baseline**

Traccia linea di base

### E

**Effective Mobility Correction**

correzione

**End**

Fine

**Exponential**

Esponenziale

**Extended Performance**

Prestazioni estese

### F

**Floating Average**

Media variabile

**Force**

Forza

**Forced Origin**

Origine forzata

**Front skim height ratio**

Rapporto altezza-skim anteriore

**Front Skim Height Ratio**

Rapporto altezza-skim anteriore

### H

**height reject**

scarto in base all'altezza

**Height reject**

Scarto in base all'altezza

**Height Reject**

Scarto in base all'altezza

**Height%**

Altezza%

### I

**Ignore**

Ignora

**Integration**

Integrazione

### **integration events**

eventi di integrazione

### **Integration Events Table**

Tavola degli eventi di integrazione

## L

### **Left**

Sinistra

## M

### **Manual Events**

Eventi manuali

### **Manual Factor**

Fattore manuale

### **Manual Integration**

integrazione manuale

## N

### **Navigation Table**

tavola di navigazione

### **Negative peak**

Picco negativo

### **Negative Peaks**

Picchi negativi

### **Negative Peaks On**

Picchi negativi attivati

### **New Exponential**

Nuovo esponenziale

### **No penetration**

Nessuna penetrazione

### **No penetrations**

Nessuna penetrazione

## O

### **Origin**

Origine

## P

### **p/v ratio**

rapporto p/v

### **peak matching**

corrispondenza dei picchi

### **peak width**

larghezza del picco

### **Peak Width**

Larghezza del picco

### **Performance**

Prestazioni

### **Performance+LibSearch**

Prestazioni+LibSearch

### **Performance+Noise**

Prestazioni+rumore

### **protein molecular weight calibration**

calibrazione mediante peso molecolare delle proteine

### **Protein molecular weight calibration**

calibrazione mediante peso molecolare delle proteine

## Q

### **Quantitation Settings**

Impostazioni di quantificazione

## R

### **Range 1**

Intervallo 1

### **Range 9**

Intervallo 9

### **Recalibration Settings**

Impostazioni di ricalibrazione

### **Relative Mobility Correction**

tipo di correzione

### **Remove Manual Events from Method**

Rimuovi eventi manuali dal metodo

### **Replace**

Sostituzione

### **Response per amount**

Risposta per quantità

### **Review DAD Test**

Revisione test DAD

### **Right**

Destra

## S

### **Sample Information**

Informazioni campione

### **Save as New Database**

Salva come nuovo database

### **Sequence Table**

Tavola sequenze

### **Set Baseline from Range**

Imposta linea di base dall'intervallo

### **Set Low Baseline from Range**

Imposta linea di base inferiore dall'intervallo

### **Shoulders**

Spalle

### **Show Holmium Spectra**

Mostra spettri di olmio

### **Show Intensity Graph**

Mostra grafico di intensità

### **Show Intensity Spectra**

Mostra spettri di intensità

### **Show Selected Spectra**

Mostra spettri selezionati

### **Signal to noise**

Segnale-rumore

### **Skim valley ratio**

Rapporto valle-skim

## Glossario-IU

### **Skim Valley Ratio**

Rapporto valle-skim

### **Slope Sensitivity**

Sensibilità della pendenza

### **Specify Report**

Specifica report

### **Split Peak**

Picco suddiviso

### **Standard Calibration**

Calibrazione standard

### **Start**

Inizio

### **Start-negA.**

Inizio-negA.

### **Straight**

Dritto

### **Subtract Background**

Sottrai il fondo

## T

### **Tail skim height ratio**

Rapporto altezza-skim coda

### **Tail Skim Height Ratio**

Rapporto altezza-skim coda

### **Tangent Skim**

Skim tangente

## U

### **Update Manual Events of Method**

Aggiorna eventi manuali del metodo

### **Update peak height**

Aggiorna altezza del picco

### **Use baseline from range**

Utilizza linea di base dall'intervallo

### **Use Baseline from Range**

Utilizza linea di base dall'intervallo

### **Using Compound**

Uso del composto

## V

### **Valley**

Valle

## W

### **With Rsp Factor**

Con fattore di risposta

## In questo manuale

Questo manuale contiene le informazioni di riferimento sui principi di funzionamento, sui calcoli e sugli algoritmi di analisi dei dati utilizzati in Agilent OpenLab ChemStation.

Le informazioni qui contenute possono essere utilizzate dai professionisti di validazione per pianificare ed eseguire le attività di validazione del sistema.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

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

Doc. N.: D0013749it Rev. A.1

