Agilent

OpenLab ChemStation

データ解析リファレンス

注意

文書情報

文書番号 : D0013749ja Rev. A.1
エディション : 2025 年 2 月

著作権

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2025

本マニュアルの内容は米国著作権法および国際著作権法によって保護されており、Agilent Technologies, Inc. の書面による事前の許可なく、本書の一部または全部を複製することはいかなる形態や方法（電子媒体への保存やデータの抽出または他国語への翻訳など）によっても禁止されています。

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

ソフトウェアリビジョン

このガイドは、Agilent OpenLab ChemStation のリビジョン LTS 01.11 に対応しています。

保証

このマニュアルの内容は「現状有姿」提供されるものであり、将来の改訂版で予告なく変更されることがあります。Agilent は、法律上許容される最大限の範囲で、このマニュアルおよびこのマニュアルに含まれるいかなる情報に関しても、明示黙示を問わず、商品性の保証や特定目的適合性の保証を含むいかなる保証も行いません。Agilent は、このマニュアルまたはこのマニュアルに記載されている情報の提供、使用または実行に関連して生じた過誤、付随的損害あるいは間接的損害に対する責任を一切負いません。Agilent とお客様の間に書面による別の契約があり、このマニュアルの内容に対する保証条項がここに記載されている条件と矛盾する場合は、別に合意された契約の保証条項が適用されます。

技術ライセンス

本書で扱っているハードウェアおよびソフトウェアは、ライセンスに基づき提供されており、それらのライセンス条項に従う場合のみ使用または複製することができます。

権利の制限

米国政府の制限付き権利について：連邦政府に付与されるソフトウェアおよび技術データに係る権利は、エンドユーザーのお客様に通例提供されている権利に限定されています。Agilent は、ソフトウェアおよび技術データに係る通例の本商用ライセンスを、FAR 12.211（Technical Data）および 12.212（Computer Software）、並びに、国防総省に対しては、DFARS 252.227-7015（Technical Data -Commercial Items）および DFARS 227.7202-3（Rights in Commercial Computer Software or Computer Software Documentation）の規定に従い提供します。

安全にご使用いただくために

注意

注意は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行しなかったり、指示を遵守しないと、製品の破損や重要なデータの損失に至るおそれのある操作手順や行為に対する注意を促すマークです。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、**注意**を無視して先に進んではなりません。

警告

警告は、取り扱い上、危険があることを示します。正しく実行しなかったり、指示を遵守しないと、人身への傷害または死亡に至るおそれのある操作手順や行為に対する注意を促すマークです。指示された条件を十分に理解し、条件が満たされるまで、警告を無視して先に進んではなりません。

本書の内容

本書は、上級者のユーザー、システム管理者、および Agilent OpenLab ChemStation を検証する担当者向けに用意されています。OpenLab ChemStation のリビジョン LTS 01.11 で使用する、操作、計算およびデータ解析のアルゴリズムの原理に関する情報が記載されています。

本書を使用して、システムの機能性をユーザーが必要とする仕様で確認し、検証プランで定義されているシステム検証タスクを定義および実行してください。以下のリソースには追加情報が記載されています。

- 入門チュートリアル：OpenLab ChemStation User Resources & Learning からアクセス可能なラーニングモジュールを参照してください。
- コンテキストに応じたタスク情報（実際の手順）、ユーザーインターフェイスの参照場所、およびトラブルシューティングヘルプ: ChemStation オンラインヘルプシステム
- OpenLab ChemStation のコンセプトとワークフロー: マニュアル『OpenLab ChemStation コンセプトとワークフロー』
- システムのインストールおよびサイトプレパレーションの詳細: 『OpenLab ChemStation ワークステーションのインストールおよびアップグレード』、または OpenLab ChemStation ネットワークワークステーションと分散システムのインストールガイド（英語）
- システム管理の原則とタスクの詳細：『OpenLab ChemStation ワークステーション管理者ガイド』

以降、ChemStation は、Agilent OpenLab ChemStation のことを指します。

1 積分

本章では、ChemStation インテグレータのコンセプトと積分アルゴリズムについて説明します。

2 ピーク同定

本章では、ピーク同定のコンセプトについて説明します。

3 キャリブレーション

この章では、キャリブレーション処理に使用される計算について詳しく説明します。

4 定量

この章では、化合物を定量化する方法と、定量に使用される計算について説明します。

5 システムスータビリティ

この章では、分析機器と分析メソッドの両方のパフォーマンスを評価するために OpenLab CDS で実行可能な内容について説明します。

6 CE 固有の計算

この章は、ChemStation を使用して CE 機器をコントロールする場合にのみ関連する内容です。

7 システム ベリフィケーション

本章では、ベリフィケーション機能および ChemStation の GLP ベリフィケーションの特徴について説明します。

目次

1 積分 7

積分とは 8
ChemStation の積分アルゴリズム 10
操作の原理 15
ピーク認識 16
ピーク面積の測定 26
ベースラインアロケーション 29
積分イベント 41
マニュアル積分 62

2 ピーク同定 65

ピーク同定とは 66
ピークマッチングルール 67
ピーク同定のタイプ 68
絶対リテンション/マイグレーションタイム 70
補正済みリテンション/マイグレーションタイム 72
ピーククォリファイア 74
同定プロセス 76

3 キャリブレーション 78

キャリブレーションとは 79
検量線 80
検量線の計算 81
グループキャリブレーション 85
リキャリブレーションオプション 86

4 定量 87

定量とは 88
補正係数 89
面積%および高さ% 91

キャリブレーションされた化合物の定量　92
キャリブレーションされていないピークの定量　97
norm% 計算　99

5　システムスータビリティ　100

ピークパフォーマンス評価　101
システムスータビリティの評価　101
ノイズ測定　104
ピークのテーリングファクターと対称度の計算　115
システムスータビリティの式および計算　117
一般定義　118
パフォーマンステストの定義　119
再現性に関する定義　131
内部保持されている倍精度数へのアクセス　136

6　CE 固有の計算　139

キャリブレーションテーブル　140
移動度補正を使用したキャリブレーション　143
キャピラリー電気泳動用の特別なレポートスタイル　149
補正済みピーク面積　150
キャピラリー電気泳動用のシステムスータビリティ　151
CE-MSD　152

7　システム ベリフィケーション　153

ベリフィケーションおよび診断ビュー　154
GLPsave レジスタ　157
DAD テスト機能　159

1 積分

積分とは 8
積分について 8
積分の機能 9
ChemStation の積分アルゴリズム 10
概要 10
初期ベースラインの定義 11
ベースラインの追跡 12
ベースラインの割り当て 13
用語の定義 14
操作の原理 15
ピーク認識 16
ピーク幅 16
ピーク認識フィルタ 17
バンチング 18
ピーク認識アルゴリズム 19
マージピーク 21
ショルダー 22
デフォルトのベースラインの設定 23
ピーク分離コード 24
ピーク面積の測定 26
面積の決定 26
単位および変換係数 28
ベースラインアロケーション 29
ベースラインの開始 29
ベースラインの終了 29
ベースライン補正モード 30
ピークバレー比 32
タンジェントスキム 33
積分イベント 41
全てのシグナルの積分イベント 41
初期イベント 44
タイムイベント 49
自動積分 60
マニュアル積分 62
マニュアル積分イベントの保存 63

本章では、ChemStation インテグレータのコンセプトと積分アルゴリズムについて説明します。

積分とは

積分は、シグナルのピークを同定し、そのサイズを計算するための操作です。

積分は、以下のために必要なステップです。

- 同定
- 適格性評価
- キャリブレーション
- 定量
- ピーク純度計算
- スペクトルライブラリサーチ

積分について

シグナルを積分するとき、ソフトウェアは次のことを行います。

- 各ピークの開始時刻と終了時刻を識別する。
- 各ピークの頂点を見つける。これは、リテンション/マイグレーションタイムです。
- ベースラインを確定する。
- ピークごとの面積、高さ、ピーク幅、および対称度を計算する。

このプロセスは、積分イベントと呼ばれるパラメータでコントロールできます。

積分の機能

積分の機能には、以下のような主要な機能が含まれています。

- 初期積分パラメータを設定するための自動積分機能
- 複数のシグナルまたは複数の検出器を使用する場合に、クロマトグラム/エレクトロフェログラムシグナルごとに個別の積分イベントテーブルを定義する機能
- グラフィカルにイベント時間を選択できる積分イベントの対話的な定義
- 人間による解釈を必要とするクロマトグラムやエレクトロフェログラムのグラフィカルなマニュアル積分（これらのイベントをメソッドに記録して、自動操作の一部として使用することもできます）
- 積分結果の注釈
- 基本的なインテグレータ設定を設定または修正するためのインテグレータパラメータの定義。次の設定が含まれます。面積リジェクト、高さリジェクト、ピーク幅、スロープ感度、ショルダー検出、ベースライン補正、およびタンジェントスキム（フロント／テール）検出
- ベースラインの強制、ベースラインのホールド、すべての谷でのベースライン、次の谷でのベースライン、現在のピークの終わりから後方へベースラインをフィットなどの、ベースラインコントロールパラメータ
- 面積和のコントロール
- ネガティブピークの認識
- 溶媒ピーク定義検出
- インテグレータ操作に対してリテンション/マイグレーションタイムの範囲を定義するインテグレータコントロールコマンド
- 2 次導関数計算を用いたピークショルダー割り当て
- DAD スペクトルから再構成された DAD LC データファイルでより良い性能を得るための、不等間隔のデータポイントでのサンプリングの改善

ChemStation の積分アルゴリズム

概要

クロマトグラム/ エレクトロフェログラムを積分するには、次のことが行われます。

1 初期ベースラインを定義する
2 連続してベースラインの追跡と更新を行う
3 ピークの開始時間を識別する
4 各ピークの頂点を見つける
5 ピークの終了時間を識別する
6 ベースラインを確定する。
7 ピークごとの面積、高さ、ピーク幅を計算する。

このプロセスは、**積分イベント**でコントロールできます。最も重要なイベントは初期スロープ感度、ピーク幅、ベースライン補正、面積リジェクト、および高さリジェクトです。ソフトウェアでは、これらおよび他のイベントの初期値を設定することができます。初期値は、クロマトグラムの開始点で有効になります。さらに、自動積分機能には初期イベントのセットが含まれます。これらの初期イベントはユーザーが最適化することができます。

ほとんどの場合、クロマトグラム全体は初期イベントで良好に積分されますが、積分の経過をより詳細にコントロールしたい場合があります。

このソフトウェアでは、クロマトグラムの適切な時点で新しい積分イベントをプログラムすることにより、積分の実行方法をコントロールできます。

詳細情報は、「初期イベント」 44 ページを参照してください。

初期ベースラインの定義

主要なポイント

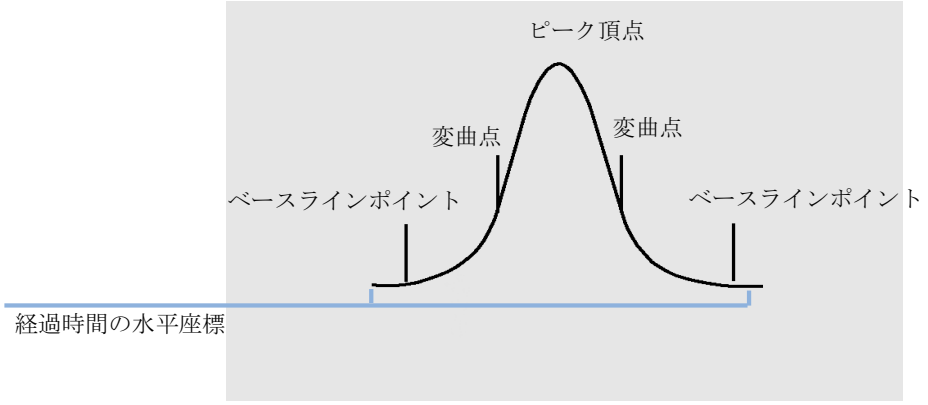


図 1　　主要なポイント

初期ベースラインの定義

ベースラインの条件はアプリケーションおよび検出器のハードウェアに応じて変わるため、インテグレータは、積分イベントとデータファイルの両方からのパラメータを使用してベースラインを最適化します。

インテグレータがピークを積分するには、まず**ベースラインポイント**を決定する必要があります。分析開始時に、最初のデータポイントを暫定的なベースラインポイントとして、初期ベースラインレベルを設定します。それから、入力シグナルの平均に基づいて、この初期ベースラインポイントの再定義を行います。再定義された初期ベースラインポイントを取得できない場合には、最初のデータポイントを初期ベースラインポイントの可能性のあるものとして保持します。

ピークの主要なポイントの認識

インテグレータは、ベースラインの可能性のあるポイントがベースラインスロープ外にあり、ベースラインの曲率がインテグレータのスロープ感度パラメータで決められた値を超えた場合には、ピークが開始されたと判断します。この条件が継続すれば、インテグレータはそれがピークのアップスロープであり、ピークが処理されていると認識します。

開始

1 スロープと曲率が制限範囲内の場合:ベースラインの追跡を継続します。
2 スロープと曲率が制限範囲を超えた場合:ピークの可能性があります。
3 スロープが制限範囲を超え続けている場合:ピークが認識され、ピーク開始ポイントが定義されます。
4 曲率が負になった場合:フロント側の変曲点が定義されます。

頂点

1 スロープが 0 を過ぎて負になった場合:ピーク頂点が定義されます。
2 曲率が正になった場合:リア側の変曲点が定義されます。

終了

1 スロープと曲率が制限範囲内の場合:ピークの終了が近づいています。
2 スロープと曲率が制限範囲内にとどまった場合:ピークの終了が定義されます。
3 インテグレータはベースライン追跡モードに戻ります。

ベースラインの追跡

インテグレータは、分析の進行とともに、初期ピーク幅または計算されたピーク幅で決定される取り込み速度でデジタルデータをサンプリングします。各データポイントは、ベースラインポイントの可能性があるものとみなされます。

インテグレータは、ベースラインのスロープをもとに、ベースライン追跡アルゴリズムでベースラインエンベロープを決定します。アルゴリズムは一次微分係数でスロープを、二次微分係数で曲率を決定します。ベースラインエンベロープは円錐状のものとして表現できます。円錐の頂点が現在のデータポイントになります。円錐の許容上限および下限レベルは、次のようになります。

- + アップスロープ + 曲率 + ベースラインバイアスは、スレッショルドレベルより小さい必要があります。
- - アップスロープ - 曲率 + ベースラインバイアスは、スレッショルドレベルより大きい (これらが負の場合には絶対値が小さい) 必要があります。

新しいデータポイントが受け入れられると、円錐は前方に移動し、これがブレークアウトまで続きます。

ベースラインポイントとして受け入れられるためには、データポイントは次の条件を満たす必要があります。

- 定義済みのベースラインエンベロープ内にあること。
- データポイントでのベースラインの曲率 (微分係数フィルタで決まる)が、現在のスロープ感度設定で決まる限界値より小さいこと。

こうして、分析の開始時に設定された初期ベースラインポイントは、ベースラインエンベロープ内に入ったデータポイントの移動平均値に連続的にリセットされます。このリセットは、ピーク幅で決定される期間にわたり、ピーク幅で決定される速度で行われます。インテグレータはベースラインを追跡し、ドリフトを補正するために定期的にリセットします。これは、ピークのアップスロープが見つかるまで続きます。

ベースラインの割り当て

インテグレータは、分析中にピーク幅の値で決められた頻度で、クロマトグラフ/エレクトロフェログラムを割り当てます。インテグレータは、特定の数のデータポイントをサンプリングすると、初期ベースラインポイントから現在のベースラインポイントにベースラインをリセットします。インテグレータは、次のデータポイントのセットの間、ベースラインの再追跡を行い、それからまたベースラインをリセットします。このプロセスは、インテグレータがピークの開始を認識するまで続きます。

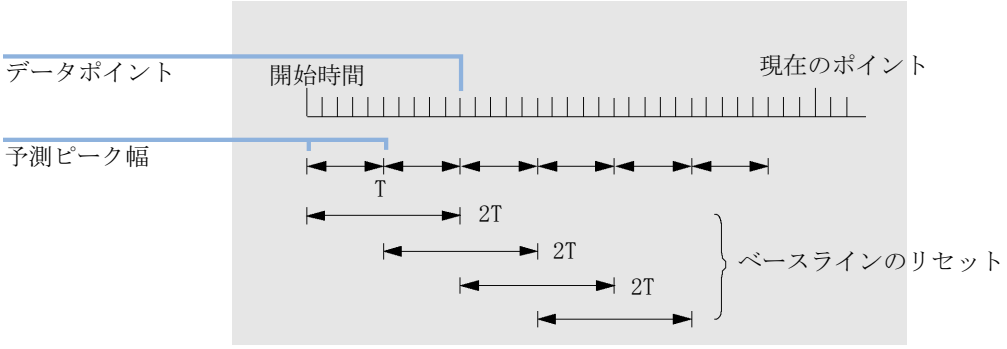


図 2　　ベースライン

分析の開始時に、最初のデータポイントが使用されます。ベースラインポイントは、次の式に従って定期的にリセットされます。

面積は、時間 T（ピーク幅の期待値）にわたって加算されます。この時間は、決して 1 データポイントより短くはなりません。これは、ベースライン条件が満たされるまで続きます。スロープと曲率も計算します。スロープと曲率の両方がスレッショルドよりも小さい場合には、加算した 2 つの面積の和を取り、それから前のベースラインと比較します。新しい値が前のベースラインよりも小さい場合には、直ちに古い値を新しい値に置き換えます。新しい値が前の値より大きい場合には、それは仮の新しいベースライン値として保存され、さらに 1 つの値がスロープと曲率の平坦さの基準を満たすことを確認します。後者の制限は、ネガティブピークが許されている場合には無効です。ベースライン中には、溶媒の速い上昇を調べるチェックも行う必要があります。これらは、アップスロープを検出するには速すぎる場合があります。（アップスロープが確認されると、溶媒の基準は有効ではなくなります。）最初の段階では、最初のデータポイントを通るのがベースラインです。これは、シグナルがベース上にある場合には、2 T の平均値で置き換えられます。その後、ベースラインは T ごとにリセットされます（13ページ 図2を参照してください）。

用語の定義

溶媒ピーク

溶媒ピークは一般的に分析にとって重要ではない非常に大きなピークで、通常積分されません。しかし、分析対象の溶出物のピークが非常に小さく、かつ溶媒ピークに近接している場合（たとえば溶媒ピークのテーリングにのっている場合）、対象溶出物の面積を計算するために特別な積分条件を設定することができます。

ショルダー (フロント、リア)

ショルダーは、2 つのピークが非常に近くに溶出するためにピーク間に谷間がなく、ピークが解決されない場合に発生します。ショルダーは、ピークのリーディングエッジ（前部）またはトレーリングエッジ（後部）に発生することがあります。ショルダーが検出されると、それらをタンジェントスキムまたはドロップラインのどちらかで積分できます。

スロープ

ピークスロープは、時間に対する成分の濃度の変化を意味し、ピークの開始点、ピーク頂点、およびピークの終了点の決定に使用されます。

操作の原理

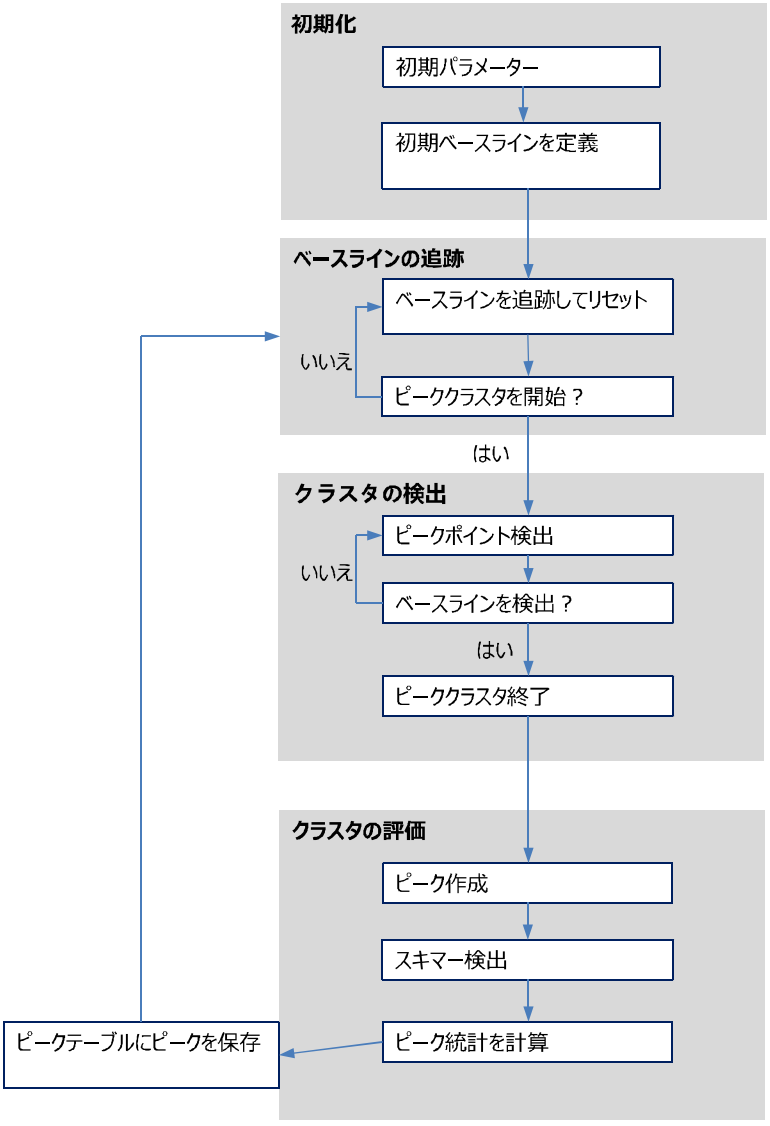


図 3　積分のフローチャート

ピーク認識

インテグレータは、ピークを認識し、特徴付けるために、次のものを使用します。

- ピーク幅
- ピーク認識フィルタ
- バンチング
- ピーク認識アルゴリズム
- ピーク頂点アルゴリズム
- 非ガウス型の計算（テーリング、重なったピークなど）

ピーク幅

積分中、ピーク幅は、次のように調整されたピーク面積と高さから計算されます。

幅 = 調整された面積 / 調整された高さ

または、変曲点が利用可能な場合には、変曲点間の幅になります。

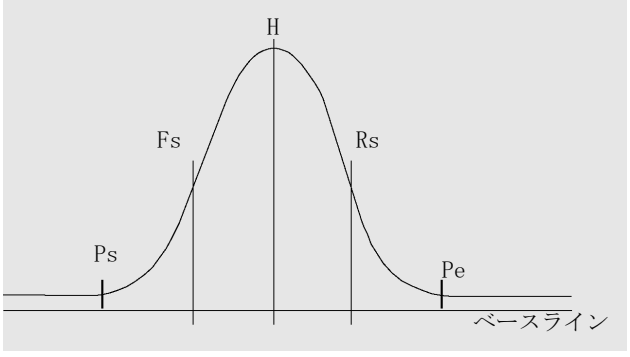


図 4　　ピーク幅の計算

上の図で、総面積 A は、ピーク開始（Ps）からピーク終了（Pe）までの面積の和であり、ベースラインで調整されたものです。Fs は変曲点でのフロントスロープで、Rs は変曲点でのリアスロープです。

ピーク幅の設定は、インテグレータがベースラインノイズからピークを識別する能力を決定します。良いパフォーマンスを得るには、ピーク幅は、実際のクロマトグラフのピークの幅に近い値に設定する必要があります。

ピーク幅は、３通りの方法で変更されます。

- 積分処理前に、初期ピーク幅を指定できます。
- 積分処理中に、インテグレータは、ピーク認識フィルターとの一致を良好に保つため、必要に応じて自動的にピーク幅を更新します。
- 積分処理中に、タイムプログラムイベントを使って、ピーク幅をリセットまたは変更することができます。

ピーク認識フィルタ

インテグレータは３つのピーク認識フィルタを持っており、連続するデータポイントのスロープと曲率の変化を検出してピークを認識するために使用します。このフィルタには、インテグレータが調べているデータポイントの一次微分係数（スロープを測定する）と二次微分係数（曲率を測定する）が含まれています。認識フィルタには次のものがあります。

フィルタ 1 連続する２つ（３つ）のデータポイントのスロープ（曲率）

フィルタ 2 連続する４つのデータポイントのスロープと、連続しない３つのデータポイントの曲率

フィルタ 3 連続する８つのデータポイントのスロープと、連続しない３つのデータポイントの曲率

実際に使用されるフィルタは、ピーク幅の設定で決まります。たとえば、分析の開始時にフィルタ１が使用されたとします。分析中にピーク幅が広がった場合には、フィルタはまずフィルタ２に、それからフィルタ３に変更されます。認識フィルタから良いパフォーマンスを得るために、ピーク幅は実際のクロマトグラフ/エレクトロフェログラムピークの幅に近い値に設定する必要があります。分析中、積分を最適化するために、インテグレータは必要に応じてピーク幅を更新します。

インテグレータは、更新されたピーク幅を機器の構成に応じて次の異なる方法で計算します。

LC/CE コンフィグレーションの場合、デフォルトのピーク幅の計算には次の複合計算方法を用います。

0.3 x (右側の変曲点 – 左側の変曲点) + 0.7 x 面積/高さ

GC コンフィグレーションの場合、デフォルトのピーク幅の計算には面積/高さの計算方法を用います。この計算は、半値幅を超えるところで重なっている場合には、幅を過大評価しません。

特定のタイプの分析、たとえば GC 等温分析や LC アイソクラティック分析では、ピークは分析が進むにつれて顕著に広くなります。これを補正するため、インテグレータは分析中にピークが広くなると、ピーク幅を自動的に更新します。これは、更新が固定ピーク幅タイムイベントで無効にされていない限り、自動的に行われます。

ピーク幅の更新は、次の方法で重み付けされます。

0.75 x (既存のピーク幅) + 0.25 x (現在のピーク幅)

バンチング

バンチングとは、良好な選択性を保つために、インテグレータがピーク認識フィルターの有効範囲内にピークの広がりを維持する手段です。

インテグレータは、ピークの広がりに合わせて無制限にピーク幅を大きくし続けることはできません。最終的には、ピークはピーク認識フィルターによって確認できなくなるほど広くなります。この制限を克服するため、インテグレータはデータポイントをまとめ、同じ面積を維持しながら効果的にピークを狭くします。

データがバンチングされる際に、データポイントは 2 のバンチング数累乗されてまとめられます。つまり、 未バンチ = 1x、1 回バンチ = 2x、2 回バンチ = 4x など。

バンチングは、取り込み速度とピーク幅に基づいています。インテグレータは、これらのパラメータを使用してバンチング係数を設定し、適切なデータポイント数を計算します（18ページ表1を参照してください）。

バンチングは、予測ピーク幅または過去のピーク幅に基づいた 2 の累乗で実行されます。バンチングアルゴリズムについては 18ページ表1に概説されています。

表 1　　バンチングの基準

予測ピーク幅	使用されるフィルタ	行われるバンチング
データポイント 0 ～ 10	フィルタ 1	なし
データポイント 8 ～ 16	フィルタ 2	なし

表 1 バンチングの基準

予測ピーク幅	使用されるフィルタ	行われるバンチング
データポイント 12 ～ 24	フィルタ 3	なし
データポイント 16 ～ 32	フィルタ 2	1 回
データポイント 24 ～ 48	フィルタ 3	1 回
データポイント 32 ～ 96	フィルタ 3、2	2 回
データポイント 64 ～ 192	フィルタ 3、2	3 回

ピーク認識アルゴリズム

インテグレータは、ピーク認識アルゴリズムによって決定されたベースラインポイントを、ピークの開始として識別します。ピーク認識アルゴリズムは、まずピーク認識フィルタの出力を初期スロープ感度と比較して、アップスロープ積算器の値を増加または減少させます。インテグレータは、アップスロープ積算器の値が ≥15 になった点を、ピーク開始点として宣言します。

ピーク開始

19ページ表2 を使用し、予測ピーク幅によってスロープ感度と比較されるフィルタのスロープと曲率の値が決定されます。たとえば、予測ピーク幅が小さい場合には、フィルタ 1 の値がアップスロープ積算器に加算されます。予測ピーク幅が大きくなると、フィルタ 2 の値が、それからフィルタ 3 の値が使用されます。

アップスロープ積算器の値が ≥15 の場合、ピークが開始していることをアルゴリズムが認識します。

表 2 アップスロープ積算器への増分値

微分係数フィルタ 1 ～ 3 の出力とスロープ感度	フィルタ 1	フィルタ 2	フィルタ 3
スロープ > スロープ感度	+8	+5	+3
曲率 > スロープ感度	+0	+2	+1
スロープ < (-) スロープ感度	-8	-5	-3

表 2 アップスロープ積算器への増分値

微分係数フィルタ 1 ～ 3 の出力とスロープ感度	フィルタ 1	フィルタ 2	フィルタ 3
スロープ < |スロープ感度|	-4	-2	-1
曲率 < (-) スロープ感度	-0	-2	-1

ピーク終了

20ページ表3 を使用し、予測ピーク幅によってスロープ感度と比較されるフィルタのスロープと曲率の値が決定されます。たとえば、予測ピーク幅が小さい場合には、フィルタ 1 の値がダウンスロープ積算器に加算されます。予測ピーク幅が大きくなると、フィルタ 2 の値が、それからフィルタ 3 の値が使用されます。

ダウンスロープ積算器の値が ≥15の場合、ピークが終了していることをアルゴリズムが認識します。

表 3 ダウンスロープ積算器への増分値

微分係数フィルタ 1 ～ 3 の出力とスロープ感度	フィルタ 1	フィルタ 2	フィルタ 3
スロープ < (-) スロープ感度	+8	+5	+3
曲率 < (-) スロープ感度	+0	+2	+1
スロープ > スロープ感度	-11	-7	-4
スロープ > |スロープ感度|	-28	-18	-11
曲率 > スロープ感度	-0	-2	-1

ピーク頂点アルゴリズム

ピークの頂点は、最も高いデータポイントを通る放物線を描いたときの、クロマトグラムの最も高いポイントとして認識されます。

マージピーク

マージピークは、ピークの終わりが見つかる前に新しいピークが始まると起こります。図は、マージピークをインテグレータがどのように扱うかを示しています。

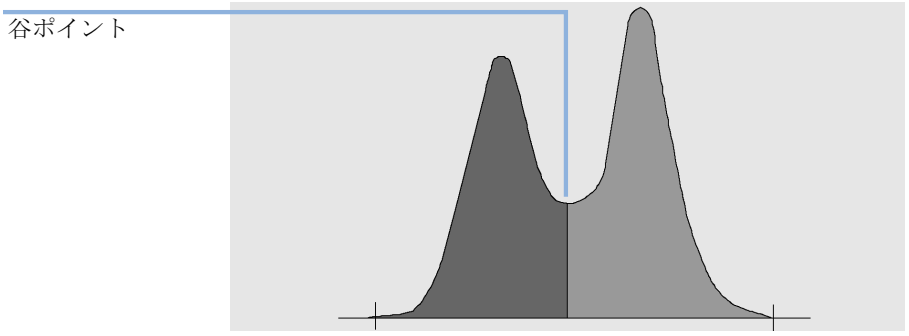


図 5　マージピーク

インテグレータは、マージピークを次の方法で処理します。

1 最初のピークの面積を谷ポイントまで加算します。

2 谷ポイントで、最初のピークの面積の加算が終わり、2 番目のピークの加算が始まります。

3 インテグレータが 2 番目のピークの終わりを検出すると、面積の加算は終了します。このプロセスは、マージピークを、2 つのピークの間の谷ポイントで垂直に分割するとして説明できます。

ショルダー

ショルダーは、大きなピークのリーディングまたはトレーリングエッジにある、分離されていないピークのことです。ショルダーが存在するときには、ネガティブスロープに正のスロープが続くと言う意味で、真の谷は存在しません。ピークには、フロントまたはリアのショルダーはいくつでもあり得ます。

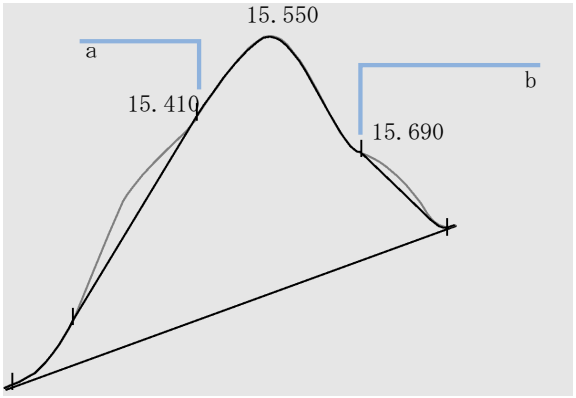


図 6　　ピークショルダー

ショルダーは、二次微分係数から与えられる、ピークの曲率で検出されます。曲率がゼロになる場合、インテグレータにより、22ページ 図6のポイント a および b などの変曲点が認識されます。

- ピーク頂点の前に、2 番目の変曲点が見つかった場合には、フロント側のショルダーの可能性があります。ショルダーであることが確認された場合には、ショルダーの開始ポイントは、変曲点の前の、正の最大曲率の点に設定されます。
- ピーク終了または谷の前に、2 番目の変曲点が見つかった場合には、リア側のショルダーの可能性があります。ショルダーであることが確認された場合には、ショルダーの開始ポイントは、ピーク頂点の後の、スロープの最初の最小値の点に設定されます。

リテンション/マイグレーションタイムは、ショルダーの負の最大の曲率の点から決定されます。積分イベントをプログラムすると、通常のピークと同様、ショルダーピークの変曲点から引いた直線で分割したショルダー面積を計算することもできます。

ショルダーの面積は、メインピークから減算されます。

ピークのショルダーは、積分タイムイベントを使うことにより、通常のピークのように扱うことができます。

デフォルトのベースラインの設定

ピーククラスタが完了しベースラインが見つかったら、インテグレータはベースライン割り当てアルゴリズムを要求し、ペグとスレッドの技術を用いてベースラインを割り当てます。台形面積と比例的な高さの補正を用いて、可能な最も低いベースラインをノーマライズして維持します。ベースライン割り当てアルゴリズムには、計算を最適化するためにインテグレータにより使用される、検出器とアプリケーションを同定するメソッドとデータファイルからのパラメータも含まれています。

最も単純な場合、インテグレータは、ベースラインを次のものを結ぶ線分として設定します。

- ベースラインの開始
- ピークの開始、谷、終了ポイント
- ピークベースライン

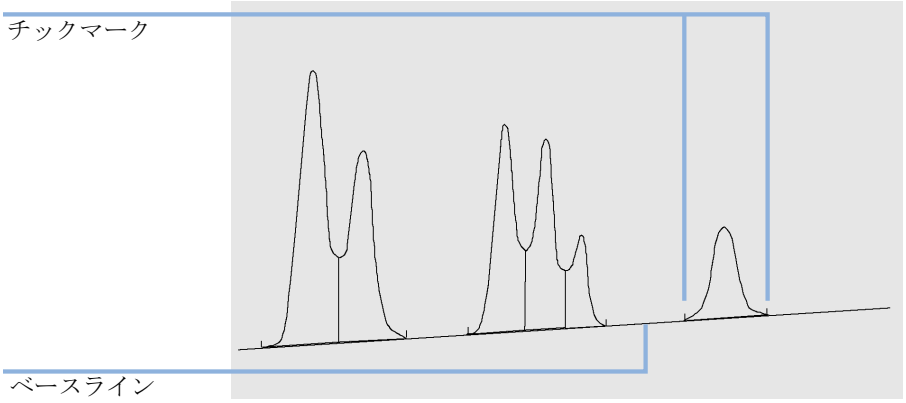


図 7　デフォルトのベースラインの設定

ピーク分離コード

レポートの積分結果の各ピークには、シグナルベースラインの引き方を説明する 2、3、または 4 文字のコードが割り当てらています。

表 4　　4 文字のコード

最初の文字	２番目の文字	３番目の文字	４番目の文字
開始時のベースライン	終了時のベースライン	エラー/ピークフラグ	ピーク タイプ

文字１と２

最初の文字はピークの開始時のベースラインを説明し、２番目の文字はピークの終了時のベースラインを説明します。

B ピークはベースライン上で開始または終了しました。

P ピークはベースラインが落ち込んでいるところで開始または終了しました。

V ピークは谷のドロップラインで開始または終了しました。

H ピークは強制的に水平化されたベースライン上で開始または終了しました。

F ピークは強制されたポイント上で開始または終了しました。

M ピークはマニュアルで積分されました。

U ピークは割り当てられませんでした。

付加的なフラグが追加されることもあります (優先順位に従います)。

３文字目

３番目の文字は、エラーまたはピークフラグを示します。

A 積分は中断されました。積分イベント ON/OFF や、シグナル分析時間終了などが原因です。

D ピークが歪んでいました（ピーク形状不良）。

空白 ピークはノーマルピークです。

４文字目

４番目の文字は、ピークタイプを示します。

S ピークは溶媒ピークです。

N ピークはネガティブピークです。

+ ピークは面積ピーク和です。

T タンジェントスキムピークです（標準のスキム）。

X タンジェントスキムピークです（古いモードの指数曲線スキム）。

E タンジェントスキムピークです（新しいモードの指数曲線スキム）。

m マニュアルベースラインによって定義されたピークです。

n マニュアルベースラインによって定義されたネガティブピークです。

t マニュアルベースラインによって定義された、タンジェントスキムピークです。

x マニュアルベースラインによって定義された、タンジェントスキムピーク（指数曲線スキム）です。

R ピークは、再計算したピークです（たとえば、親ピーク。「タンジェントスキムモード」 36 ページ を参照）。

f フロントショルダータンジェントによって定義されたピークです。

b リアショルダータンジェントによって定義されたピークです。

F フロントショルダードロップラインによって定義されたピークです。

B リアショルダードロップラインによって定義されたピークです。

U ピークは割り当てられていません。

ピーク面積の測定

ピーク積分の最後のステップは、最終的なピーク面積を決定することです。

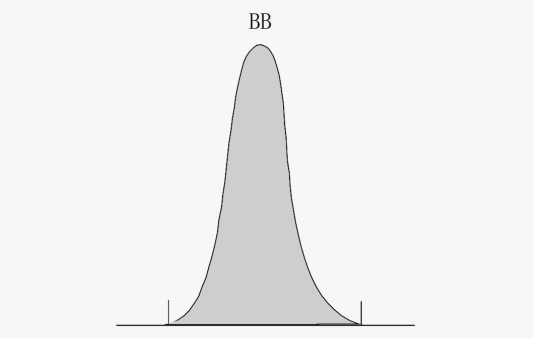


図 8　　ベースライン間のピークの面積測定

単純に分離したピークの場合、ピークの面積は、ピークの開始と終了の間の、ベースラインより上の面積を積算することによって決定できます。

面積の決定

積分中にインテグレータが計算する面積は、次のように決定されます。

- ベースライン間（BB）ピークの場合には、26ページ 図8のように、ピーク開始と終了の間の、ベースラインより上の面積になります。
- 谷 - 谷 (W) ピークの場合には、27ページ 図9のように、谷ポイントからの垂線で区切られた、ベースラインより上の面積になります。

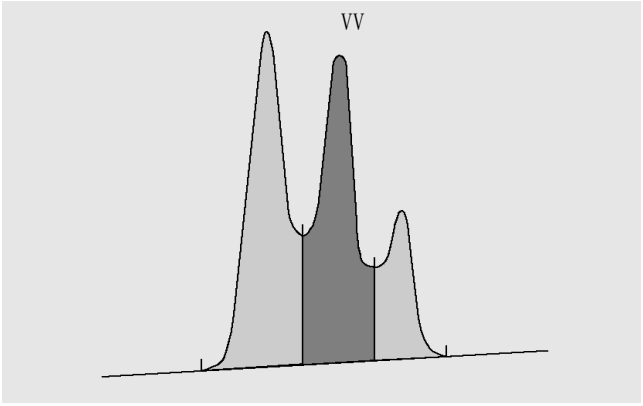


図 9　谷 - 谷ピークの面積測定

- タンジェント（T）ピークの場合、リセットベースラインより上の面積です。
- 溶媒（S）ピークの場合、最後に見つかったベースラインポイントからの水平延長線の上、タンジェント（T）ピークに与えられたリセットベースラインの下の面積になります。溶媒ピークの上昇が遅すぎて認識されない場合があります。また分析中に、溶媒ピークに子ピークのグループが乗っていると思われる場合があります。これは通常、第一ピークが他のものより非常に大きい、マージピークのグループによって生じます。後者のピークは第一ピークのテールに乗っているため、単純な垂線で処理すると後者のピークを誇張することになります。第一のピークを強制的に溶媒として認識させることにより、グループの残りはテールからスキムすることができます。
- ベースラインの下に生じたネガティブピークは、27ページ 図10に示されたような正の面積になります。

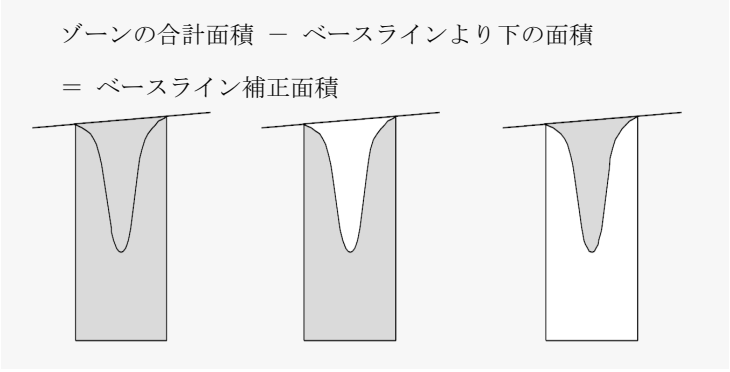


図 10　ネガティブピークの面積測定

単位および変換係数

外部的には、データはデータポイントのセットを含んでいます。これらはサンプリングされたデータか、または積分されたデータです。積分されたデータの場合、各データポイントは**高さ x 時間**と表される面積に対応します。サンプリングされたデータの場合、各データポイントは高さに対応します。

したがって積分されたデータの場合、高さは計算された実体であり、前のデータポイントから経過した時間で面積を割ることによって得られます。サンプリングされたデータの場合、直前のデータポイントから経過した時間をデータに掛けることで面積が計算されます。

積分の計算は、両方の実体を使用します。インテグレータの内部で使用される単位は、面積の場合は**［検出器レスポンス × 秒］**、高さは**［検出器レスポンス］**です。これは、必要に応じて整数に丸めるための、共通の基盤を用意するためです。時間、面積、高さの測定値は、ソフトウェア内でどのように測定、計算、保存されているかにはかかわりなく、実際の物理的な単位でレポートされます。

ベースラインアロケーション

ベースラインの開始

分析の開始時にベースラインが見つからなかった場合には、ベースラインの開始は、次のいずれかの方法で決められます。

- 分析開始のポイントが最初のベースラインポイントより下だった場合には、分析の開始から最初のベースラインポイントまで、
- 分析開始のポイントが最初の谷より下だった場合には、分析の開始から最初の谷ポイントまで、
- 最初の谷が、分析の開始から最初のベースラインポイントまで引いた直線の延長よりも下に出ている場合には、分析の開始から最初の谷ポイントまで、
- 分析の開始から最初のベースラインポイントまで、水平のベースラインを伸ばす。

ベースラインの終了

最後の有効なベースラインポイントは、ベースラインの終了を示すものとして用いられます。分析がベースライン上で終わらなかった場合には、ベースラインの終了は、最後の有効なベースラインポイントから、確定されたベースラインドリフトまでとして計算されます。

ピークが谷で終わっているのに、続くピークが設定した面積リジェクト値よりも低かった場合には、ベースラインは、ピークの始まりから、次の真のベースラインポイントまで引いた直線を延長したものになります。同じようにピークが始まっている場合には、同じ規則が適用されます。

ベースライン補正モード

OpenLab ChemStation では、いくつかのベースライン補正モードを使用できます。これらについて以下のセクションで説明します。

ベースライン補正モード：クラシカル

落ち込みは、構築されたベースラインの下までシグナルが降下すると生じます（30ページ 図11のポイント a）。

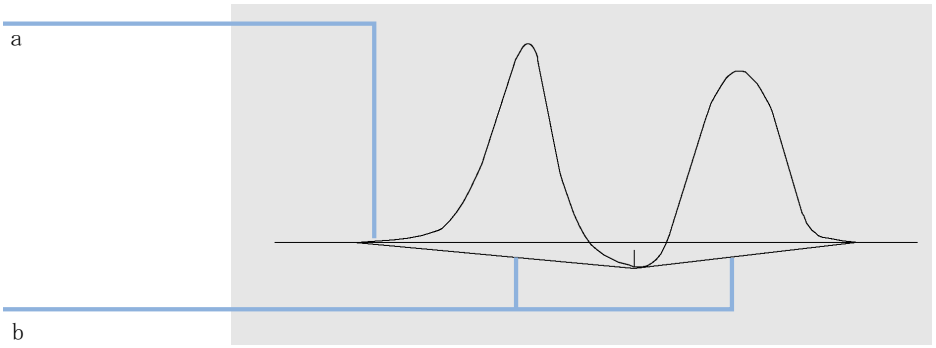


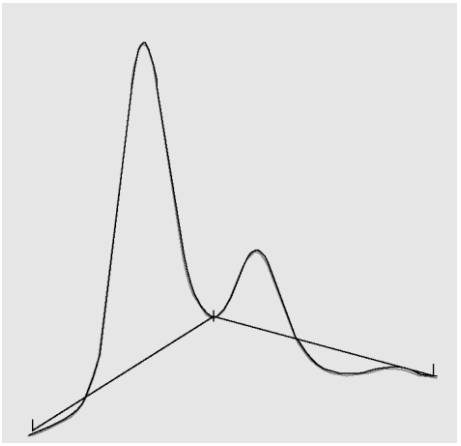
図 11　ベースラインの落ち込み

ベースライン落ち込みが生じると、その部分のベースラインは30ページ 図11のポイント b のように再構築されます。すべてのベースライン落ち込みを除去するために、次の補正モードを使用できます。

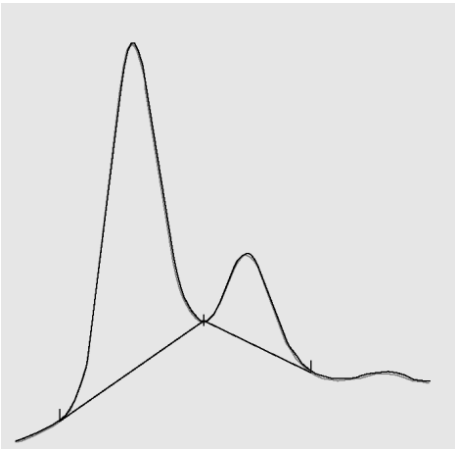
- **負ピークなし**
- **アドバンスド**

ベースライン補正モード： 負ピークなし

このオプションを選択すると、ピーククラスタごとに、ベースライン落ち込みを検索します。落ち込みが見つかると、ピークの開始または終了ポイントを落ち込みがなくなるまでシフトします。



ベースライン補正モード**クラシカル**



ベースライン補正モード**負ピークなし**

注記

［負ピークなし］ベースライン補正モードは、溶媒ピーク、その子ピークおよびショルダーでは利用できません。

ベースライン補正モード：アドバンスド

アドバンスドベースライン補正モードでは、インテグレータはピークの開始と終了場所を最適化し、ピークのクラスタ用ベースラインを再確立し、ベースライン落ち込みを除去しようとします。「ベースライン補正モード： 負ピークなし」 31 ページ多くの場合に、アドバンスドベースライン補正によりスロープ感度への依存性の少ない安定性に優れたベースラインが得られます。

ピークバレー比

ピークバレー比は、ピークが他の化合物ピークからどのくらい分離されているかを示す、分析の品質を測る尺度です。このユーザー指定のパラメータは、アドバンスドベースライン追跡モードの要素の 1 つです。これは、ベースラインで分離していない 2 つのピークを、ドロップラインまたは谷ベースラインのどちらを使用して分離するのかを決定するために使用されます。インテグレータは、ベースライン補正された低い方のピークの高さと、ベースライン補正された谷の高さの比率を計算します。ピークバレー比が設定値より低い場合は、ドロップラインが使用されます。それ以外の場合は、最初のピークの開始点から谷へ、次に谷から 2 番目のピークの終了点にベースラインが引かれます（「ベースライン補正モード： 負ピークなし」 31 ページ と 32ページ 図12 を比較してください）。

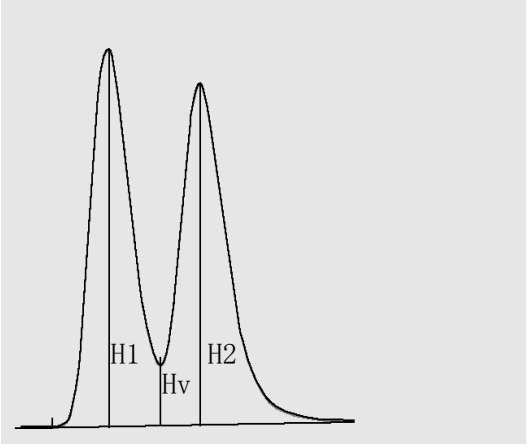


図 12　ピークバレー比

ピークバレー比は、次の式を使用して計算されます。

H1≥H2, ピークバレー比 = H2/Hv

および

H1 < H2, ピークバレー比 = H1/Hv

33ページ 図13は、ピークバレー比の設定がどのようにベースラインに影響を与えるかを示しています。

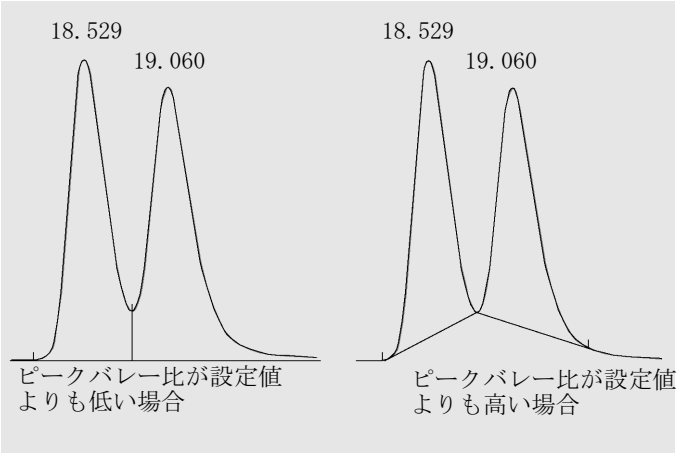


図 13　ピークバレー比のベースラインへの効果

タンジェントスキム

タンジェントスキムは、あるピークのアップスロープまたはダウンスロープで見つかったピークのためにベースラインを設定する方法の 1 つです。2 つのピークがベースラインで分離されていないことが前提条件です。

次の図で、タンジェントスキムの原理を説明します。

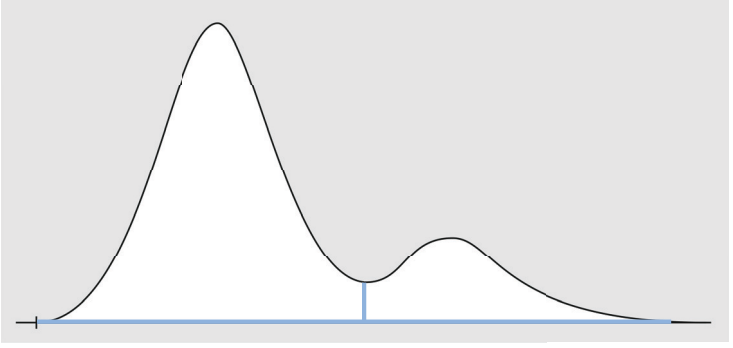


図 14　ドロップラインによって区切られている、スキムのないピーク

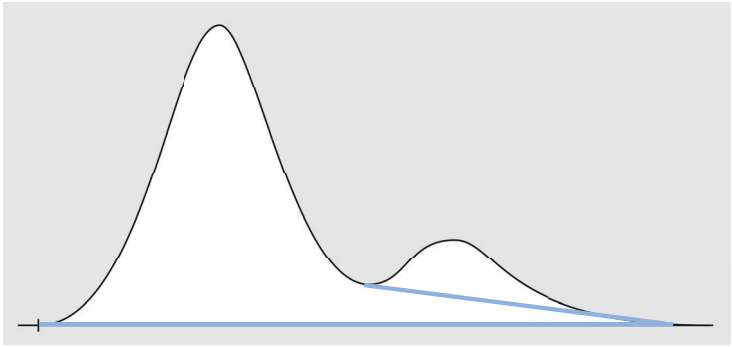


図 15　テールスキム

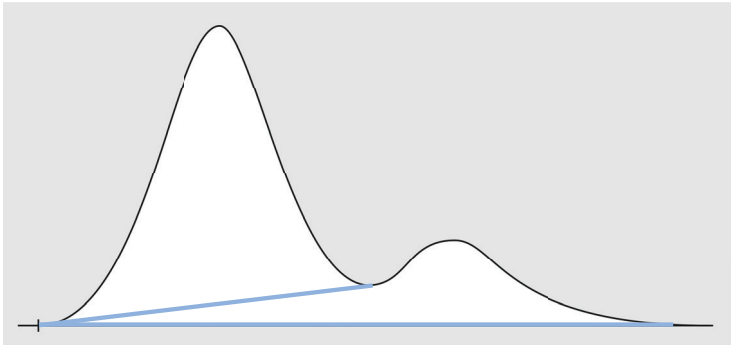


図 16　フロントスキム

スキム基準

親ピークのリーディングとトレーリングエッジのどちらにスキムラインをひき子ピークにするかが決まります。

- スキム高さ比（**[フロントスキム高さ比]** または **[テールスキム高さ比]**）
- **スキム谷比**

スキム高さ比は、ベースライン補正された親ピークの高さ（下図の Hp）と、ベースライン補正された子ピークの高さ（Hc）の比率です。子ピークをスキムさせるには、この比率よりも低い値を使用します。実行全体を通して指数曲線スキムを無効にするために、このパラメータを高い値またはゼロに設定できます。

スキム谷比は、ベースラインより上にある子ピークの高さ（下図の Hc）と、ベースラインより上にある谷の高さ（Hv）の比率です。子ピークをスキムさせるには、この比率よりも大きい値を使用します。

注記

親ピークのテールにある子ピークのセットがこれらの基準のいずれかに適合しない場合、両方の基準に適合する最後の子ピークの後のすべての子ピークはスキムされなくなり、ドロップラインが適用されます。

注記

これらの基準は、指数のタイムイベントが有効な場合、または親ピーク自身が子ピークの場合には使用されません。親ピークと子ピークの間のベースラインコードは、**［谷］**のタイプでなければなりません（「ピーク分離コード」24 ページを参照）。

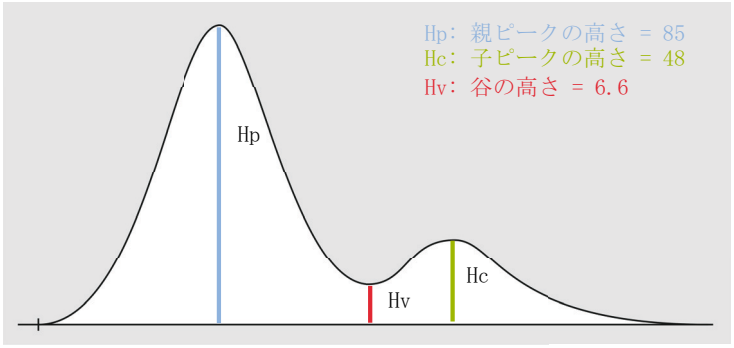


図 17　スキム基準値の計算例

スキム高さ比 = Hp / Hc

スキム谷比 = Hc / Hv

ここで、

Hp	ベースライン補正された親ピークの高さ
Hv	ベースラインより上にある谷の高さ
Hc	ベースライン補正された子ピークの高さ

テールスキム

テールスキムを使用するには、次のようにパラメータを設定します。

- テールスキム高さ比 = 85 / 48 = 1.77

  積分イベントでは、1.77 未満の値を使用します。
- スキム谷比 = 48 / 6.6 = 7.3

  積分イベントでは、7.3 より大きい値を使用します。

フロントスキム

フロントスキムを使用すると、最初のピークが子ピークで 2 番目のピークが親ピークになります。したがって、フロントスキムを使用するには、次のようにパラメータを設定します。

- フロントスキム高さ比 = 48 / 85 = 0.56

  積分イベントでは、0.56 未満の値を使用します。
- スキム谷比 = 85 / 6.6 = 12.9

  積分イベントでは、12.9 より大きい値を使用します。

タンジェントスキムモード

タンジェントスキムを有効にすると、適切なピーク面積を計算するために、次の 4 つのモデルが利用できます。

- 指数曲線
- 新しい指数曲線スキム
- 直線スキム
- 最適なフィットを算出する指数と直線の組み合わせ（スタンダードスキム）

指数曲線

このスキムモデルでは、子ピークの開始から終了まで指数関数を使って曲線が描かれます。この曲線は、親ピークに続く、各子ピークの下を通ります。スキム曲線の下の面積は、子ピークから減算され、親ピークに加算されます。

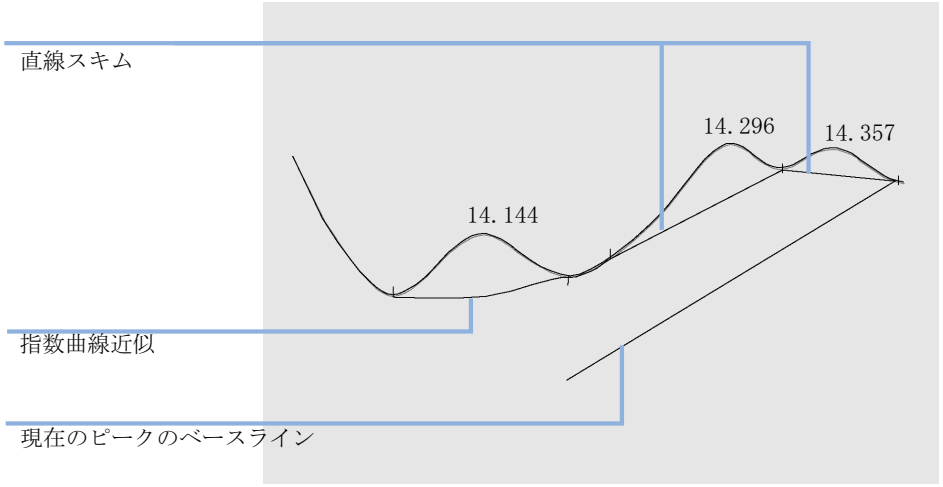


図 18　指数曲線スキム

新しい指数曲線

このスキムモデルでは、親ピークのリーディング/トレーリングエッジを近似する指数関数を使って曲線が描かれます。曲線は、親ピークに続く 1 つ以上のピーク（子ピーク）の下を通過します。スキム曲線より下の面積は子ピークから差し引かれ、メインピークに追加されます。複数の子ピークを同じ指数モデルでスキムできます。最初の子ピーク後のすべてのピークは、最初の子ピークの終了から始まり、ドロップラインによって区切られ、スキム曲線までのみ降下します。

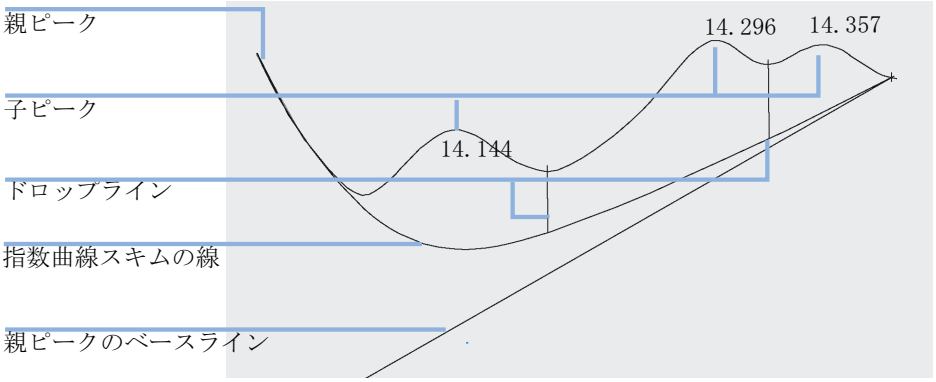


図 19　新しい指数曲線スキム

直線スキム

このスキムモデルでは、子ピークの開始から終了まで直線を描きます。子ピークの開始の高さは、親ピークのスロープに合わせて補正されます。直線の下の面積は、子ピークから減算され、親ピークに加算されます。

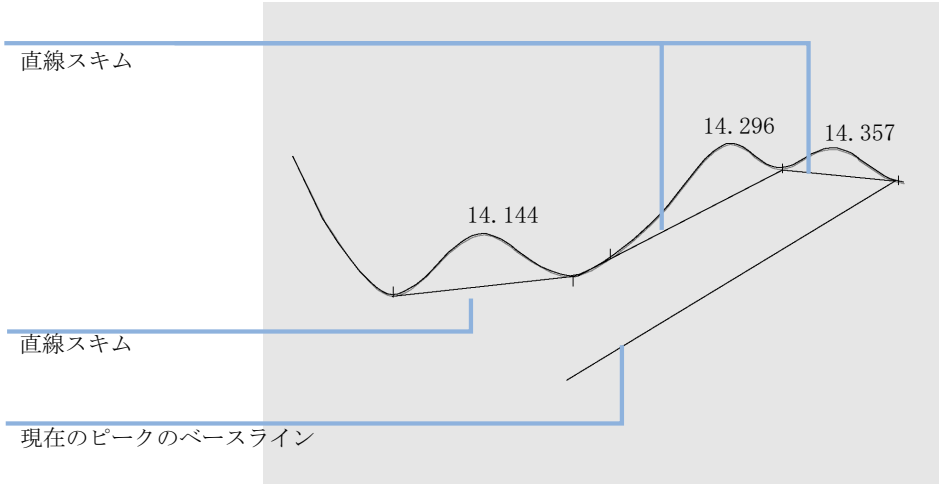


図 20　直線スキム

標準スキム

このデフォルトメソッドは、指数と直線の計算方法を最もよくフィットするように組み合わせたものです。

指数と直線の計算の切替は、高さや面積が不連続になることがないように行われます。

- シグナルがベースラインよりも高いところでは、テールフィッティング計算は指数方式です。
- シグナルがベースラインエンベロープ内に入るところでは、テールフィッティング計算は直線方式です。

組み合わせた計算方式は、指数または直線のタンジェントスキムとしてレポートされます。

スキムの指数曲線の計算

以下の式を使用して指数曲線スキムを計算します。

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

ここで、

Hb	時間 t_R での指数曲線スキムの高さ
H_0	指数曲線スキムの開始の高さ（ベースラインの上）
B	指数関数の減衰率
t_0	指数曲線スキムの開始する時間
t_R	リテンションタイム
A	親ピークのベースラインのスロープ
C	親ピークのベースラインのオフセット

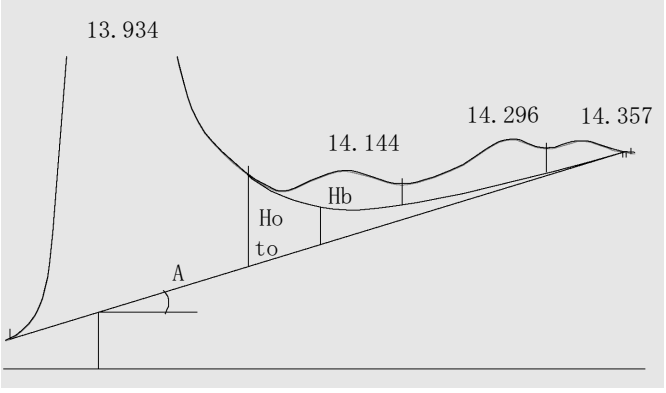


図 21　指数曲線スキムの計算に使用される値

積分イベント

インテグレータには、多数の初期およびタイムインテグレータイベントが用意されています。多くのイベントは、オン/オフまたは開始/停止のペアになっています。

全てのシグナルの積分イベント

タンジェントスキムモード あるピークのアップスロープまたはダウンスロープで見つかったピークのベースライン設定のタイプを定義します。「タンジェントスキムモード」36ページを参照してください。

指数	各子ピークの高さ補正された開始点と終了点を通る指数曲線を描きます。
新しい指数	親ピークのトレーリング エッジを近似する指数曲線を描きます。
標準	最適なフィットが得られるように指数と直線の計算を組み合わせます。
直線	各子ピークの高さ補正された開始点と終了点を通る直線を引きます。

テールピークスキム高さ比 **［スキム谷比］**と併せて、溶媒またはその他の大きなピークのテールで小さいピークをスキムするタンジェントの条件を設定します。「スキム基準」34ページを参照してください。

ベースライン補正された親ピークの高さ（Hp）と、ベースライン補正された子ピークの高さ（Hc）の比率です。比率が指定されている値を超えると、スキムが有効になります。

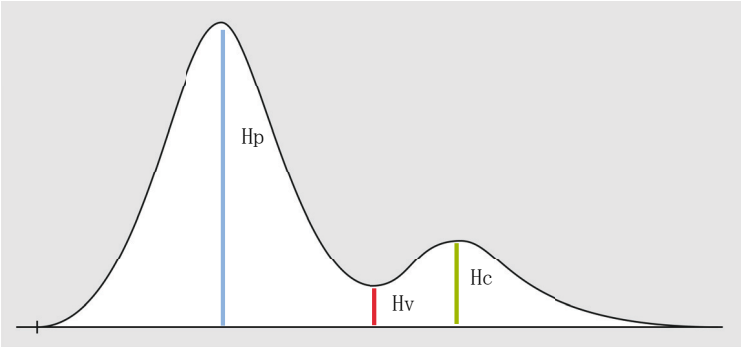


図 22　例：テールスキムを使用したピーク

フロントピークスキム高さ比

［スキム谷比］と併せて、溶媒またはその他の大きなピークのフロントで小さいピークをスキムするタンジェントの条件を設定します。「スキム基準」34 ページを参照してください。

ベースライン補正された親ピークの高さ（Hp）と、ベースライン補正された子ピークの高さ（Hc）の比率です。比率が指定されている値を超えると、スキムが有効になります。

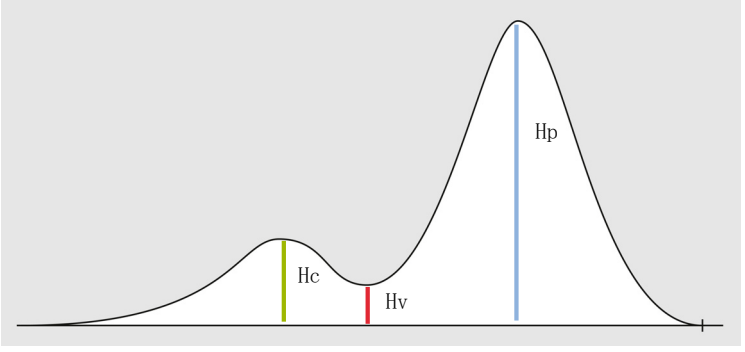


図 23　例：フロントスキムを使用したピーク

スキム谷比

［テールスキム高さ比］または［フロントスキム高さ比］と併せて、溶媒またはその他の大きなピークのテールまたはフロントの小さいピークをスキムするタンジェントの条件を設定します。「スキム基準」34ページを参照してください。

ベースライン補正された子ピークの高さ（Hc）と、ベースライン補正された谷の高さ（Hv）の比率です。比率が指定されている値を下回ると、スキムが有効になります。

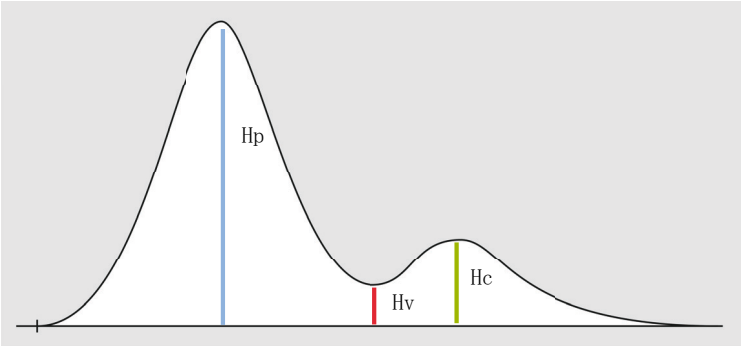


図 24　例：テールスキムを使用したピーク

ベースライン補正

ベースライン補正のタイプを設定します。「ベースライン補正モード」30ページを参照してください。

以下のパラメータの中から選択できます。

クラシカル	ベースライン落ち込みを受け入れます。
負ピークなし	ベースラインを再構築して、ベースライン落ち込みを削除します。
アドバンスド	インテグレータは、ピークの開始と終了場所を最適化し、ピークのクラスタ用ベースラインを再確立し、ベースライン落ち込みを除去しようとします。

ピーク谷比 ドロップラインまたは谷ベースラインを使用して、ベースライン分離を示さない２つのピークを分離するかどうかを決定するために使用します。これは、ベースライン補正されたより小さなピークの高さと、ベースライン補正された谷の高さの比率です。「ピークバレー比」 32 ページを参照してください。

ピークバレー比が指定値より低い場合は、ドロップラインが使用されます（A）。それ以外の場合は、最初のピークの開始点から谷へ、および谷から2番目のピークの終了点にベースラインが引かれます（B）。

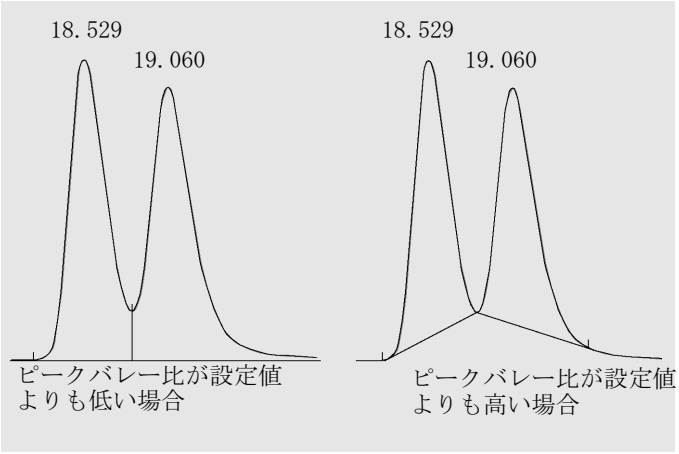


図 25　ピークバレー比のベースラインへの効果

初期イベント

スロープ感度 スロープ感度は、ピーク感度の設定です。シグナルスロープの上昇が **［スロープ感度］** の値を上回る場合には、ピークの開始ポイントが設定されます。シグナルスロープの下降が **［スロープ感度］** の値を下回る場合には、ピークの終了ポイントが設定されます。

ピーク幅 インテグレータがベースラインノイズからピークを識別する選択性を決定します。最初の期待されるピーク（溶媒ピークを除く）の半値幅に対応する時間の単位でピーク幅を設定します。

インテグレータは、積分を最適化するために、分析中の必要な時にピーク幅を更新します。

選択した初期ピーク幅が狭すぎる場合には、ノイズがピークとして解釈されることがあります。広いピークと狭いピークが混ざっている場合には、ランタイムプログラムイベントを使用して、特定のピークに合わせてピーク幅を調整することができます。時には、たとえば GC 等温分析や LC アイソクラティック

分析では、ピークは分析が進むにつれて顕著に広くなります。これを補正するため、インテグレータは分析中にピークが広くなると、ピーク幅を自動的に更新します。これは、タイムイベントで無効になっていない限り行われます。

ピーク幅の更新は、次の方法で重み付けされます。

0.75 × (既存のピーク幅) + 0.25 × (現在のピーク幅)

面積リジェクト

最小の目的ピーク面積を設定します。

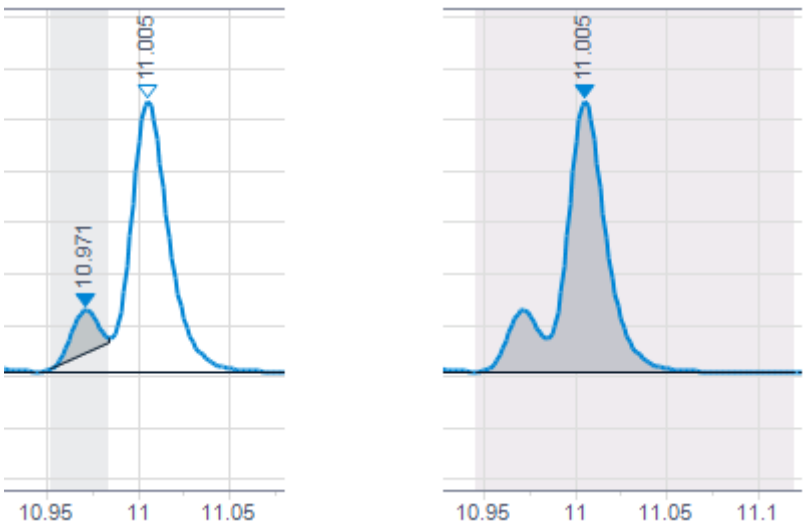
面積が最小面積値より小さいピークは、レポートされません。ベースラインの修正後、［**面積リジェクト**］の値より小さいピークはインテグレータによりリジェクトされます。［**面積リジェクト**］の値は、ゼロ以上でなければなりません。

面積パーセントリジェクト

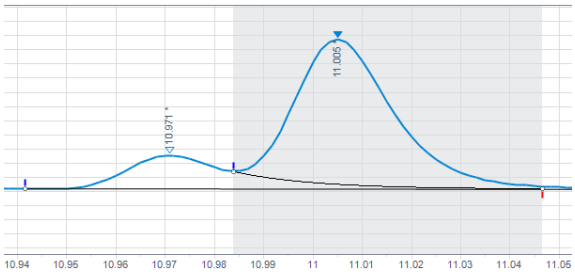
最小の目的ピーク面積% を設定します。

面積% が最小面積% 値より小さいピークは、レポートされません。ベースラインの補正後、面積% が所定の値より小さいピークはインテグレータにより除外されます。

面積% が低いために積分されていないピークがライダーピークの場合、親ピークとマージされます。



親ピークが面積% スレッショルドを下回っていて、ライダーピークがスレッショルドを上回っている場合、ライダーピークの計算およびベースライン設定は除外されることから、親ピークは維持されます。



高さリジェクト

最小の目的ピーク高さを設定します。

高さがこの最小高さより小さいピークは、レポートされません。ベースラインの修正後、［**高さリジェクト**］値より小さいピークはインテグレータによりリジェクトされます。

ショルダー

ピークでショルダを検出する初期のメソッドを設定します。

ショルダー検出がオンの場合、インテグレータは、二次微分係数で与えられるピークの曲率を使用してショルダーを検出します。曲率がゼロになると、インテグレータはこの変曲点をショルダーの可能性があると認識します。インテグレータがピークの頂点前に別の変曲点を認識すると、ショルダーが検出されたことになります。

次から選択できます。

- オフ

  ショルダーは検出されません。
- ドロップベースライン

  ショルダーはドロップラインと統合されます。
- タンジェントベースライン

  ショルダーはタンジェントベースラインと統合されます。タンジェントスキムの詳細については、「タンジェントスキム」 33 ページを参照してください。タンジェントベースラインを使用する場合、さまざまなモードを選択できます（「タンジェントスキムモード」 36 ページを参照）。

ピーク幅の選択

ノイズがピークとして認識されるのを防ぎ、一方で、シグナルの情報を歪めないような、適切な設定を選択してください。

- 目的ピークに適した初期ピーク幅を選択するには、ベースのピークの時間幅を基準としてください。
- 対象とするピークが複数ある場合に、適切な初期ピーク幅を選択するには、最適なピーク選択性が得られるように、初期ピーク幅は最も狭いピーク幅以下の値に設定してください。

高さリジェクトとピーク幅

ピーク幅と**高さリジェクト**は両方とも、積分プロセスで非常に重要です。これらの値を変更すると、異なった結果になることがあります。

- ノイズの多い環境で、多量の成分を検出する必要がある場合には、高さリジェクトとピーク幅の両方を大きくします。ピーク幅を大きくするとノイズの除去効果が改善され、高さリジェクトを大きくするとランダムノイズが無視されやすくなります。
- 高さがノイズそのものに近い、微量成分を検出して定量するには、高さリジェクトとピーク幅を小さくします。ピーク幅を小さくするとシグナルのフィルターリング効果が小さくなり、高さリジェクトを小さくすると高さが足りないために小さなピークが拒否されることがなくなります。
- 分析対象にさまざまなピーク幅のピークが含まれている場合には、ピーク幅を最も狭いピークに合わせるとともに、高さリジェクトを小さくして、高さが減ったために広いピークが無視されることがないようにしてください。

積分のチューニング

積分をカスタマイズするには、スロープ感度、ピーク幅、高さリジェクト、面積リジェクトの値を変更することが、多くの場合に有効です。以下の図は、これらのパラメータがシグナル内の 5 つのピークの積分にどのように影響するかを示しています。

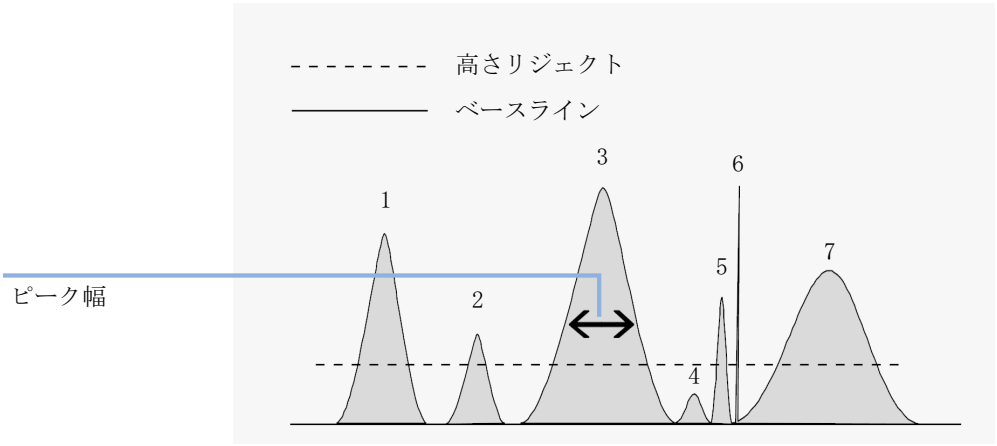


図 26　初期イベントの使用

ピークは、4 つの積分パラメータのすべてが満たされたときにのみ、積分されます。示されている面積リジェクトとスロープ感度の、ピーク 3 のピーク幅を使用すると、ピーク 1、3、および 7 だけが積分されます。

ピーク 1　は、4 つの積分パラメータすべてが満たされているので積分されます。

ピーク 2　は、面積が設定された面積リジェクト値より小さいのでリジェクトされます。

ピーク 3　は、4 つの積分パラメータすべてが満たされているので積分されます。

ピーク 4　は、ピーク高さが高さリジェクトの値より小さいので積分されません。

ピーク 5　は、面積が設定された面積リジェクト値より小さいのでリジェクトされます。

ピーク 6　は積分されません。フィルターリングとバンチ化により、ピークは見えなくなります。

ピーク 7　は積分されます。

表 5　高さおよび面積リジェクト値

積分パラメータ	ピーク 1	ピーク 2	ピーク 3	ピーク 4	ピーク 5	ピーク 7
高さリジェクト	超える	超える	超える	超えない	超える	超える
面積リジェクト	超える	超えない	超える	超えない	超えない	超える
ピーク積分	はい	いいえ	はい	いいえ	いいえ	はい

タイムイベント

ChemStation では、タイムイベントのセットを提供し、内部アルゴリズムベースライン定義とユーザー定義の積分モードを選択できます。デフォルトの構成が適切でない場合には、タイムイベントを使用して、シグナルベースラインをカスタマイズすることができます。たとえば、ユーザーはデフォルトの面積和の結果に影響しない、新しい面積和イベントを作成することができます。これらのイベントは、最終的なピーク面積を加算する場合、そして短期間および長期間のベースラインの逸脱を補正する場合に、役立ちます。

面積リジェクト

「初期イベント」 44 ページを参照してください。

面積和

インテグレータが面積を合計する範囲のポイント（［オン］/［オフ］）を設定します。

面積和によって作成されるピークのリテンション/マイグレーションタイムは、開始時間と終了時間の平均です。**［面積和オン］**イベントがピークの開始後かつ頂点の前で生じた場合は、ピーク全体が和に含まれます。ピーク頂点の後かつピークの終了前に生じた場合は、ピークは断ち切られてすぐに面積和が始まります。

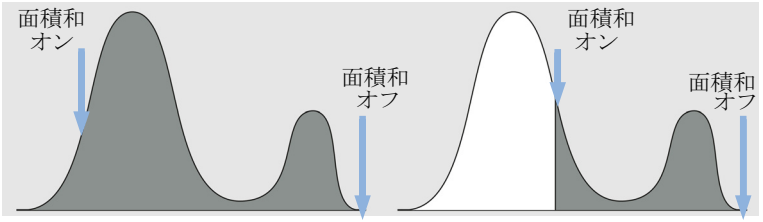


図 27　ピーク頂点後でピーク終了前の［面積和オン］イベント

［面積和オフ］イベントがピークの開始後かつ頂点の前で生じた場合は、面積和がすぐに終わります。これが生じたシグナルのポイントが谷ポイントになります。**［面積和オフ］**イベントが頂点の後で生じた場合、イベントはピークの終了まで延長されます。

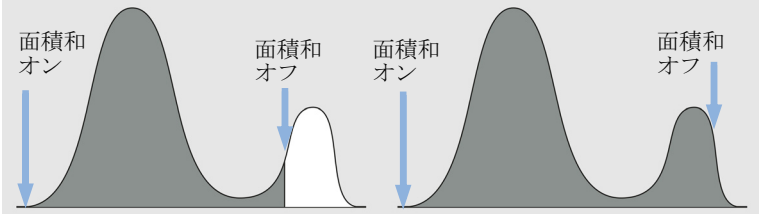


図 28　ピーク開始後でピーク頂点前の［面積和オフ］イベント

面積和スライス

このイベントを使用すると、面積や時間間隔のロスのない連続した面積和の間隔を定義できます。

このイベントは、**［面積和］**に類似しています。ただし、このイベントを使用すると、時間間隔と積分ピーク面積のロスのない隣接した面積和の間隔を定義することができますピークはこのイベントを設定したポイントで分割され、面積和は **［面積和スライス］** 間隔が指定されている位置で正確に開始および終了となります。

面積和スライスピークのリテンションタイムは、スライス時間間隔の中間です。リテンションタイムは、同定やリキャリブレーションによって変更されません。インテグレータはデータポイントの取得を面積和スライス開始イベントとともに開始し、面積和スライス終了イベントととも終了するため、リテンションタイムは少ししかシフトしません。そのため、リテンションタイムの変化は最大でも 2 つのデータポイント間の時間までです。

各面積和スライスの開始時間を定義するには、**［開始］** パラメータを使用します。次の開始時間は、先行するタイムスライスの終了時間として使用されます。そのため、複数の開始イベントを次々と使用できます。

［負の面積で開始］パラメータは、負の（設定されたベースラインより下の）面積がタイムスライスの面積から差し引かれるタイムスライスの積分の開始点を規定します。

［終了］パラメータは、最後のタイムスライスの終了点を規定します。タイムスライスの面積は、ベースラインより下の面積を無視して計算されます。他の面積和スライスイベントが続かなくなると、インテグレータは通常のピーク検出を再開します。

［開始］イベントから次の**［終了］**イベントまでの間では、ベースラインが常に一直線に引かれ、その範囲内では方向が変更されません。終了点の後（少なくとも0.001 min後）でなければ、**［範囲からベースラインを設定］**、**［範囲から下のベースラインを設定］**、または**［範囲からベースラインを使用］**のイベントを使用することによって長期間のベースラインの変更を再度適用することはできません。

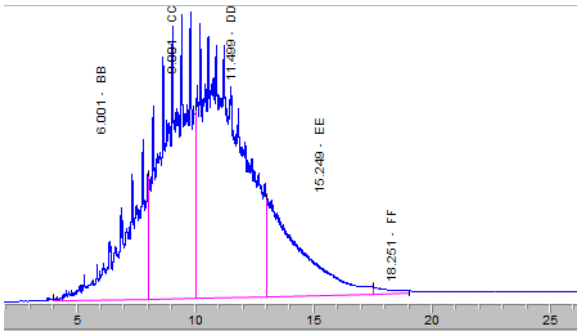


図 29　例：面積和スライス

上の図に、以下のタイムイベントの例を示します。

表 6　ベースラインの設定

時間	イベント	パラメータ
4 min	範囲からベースラインを設定	+-2 min
22 min	範囲からベースラインを設定	+-4 min

表 7　面積和スライス

時間	イベント	パラメータ
4 min	面積和スライス	開始点
8 min	面積和スライス	開始点
10 min	面積和スライス	開始点
13 min	面積和スライス	開始点
17.5 min	面積和スライス	開始点
19 min	面積和スライス	終了点

自動ピーク幅　次のピークのピーク幅の自動更新をオンにします。この更新は、その時のピーク幅がどのような値でも再開し、以前検出されたピーク幅に基づいてピーク幅の追跡を再開します。

ベースライン（谷から谷）

ここで設定したポイント（オン/オフ）間で、インテグレータがピーク間のすべての谷でベースラインをリセットします。

ベースラインを繰り返しリセットすると、ピークの隅を削除できます。削除された隅は負の面積になるため、ピークの測定面積の合計は減少します。

この機能は、広くて低いピークの背に複数のピークが乗っている場合に、ベースラインをすべての谷のポイントにリセットしたいときに役立ちます。

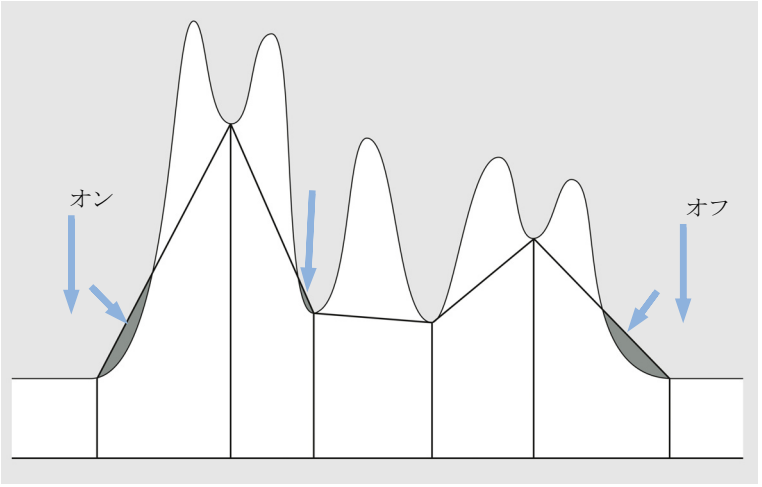


図 30　［ベースライン（谷から谷）］イベント

ベースライン（後方へ）

標準インテグレータが、明らかにしたベースラインポイントからこのポイントまで水平に後方へ、ベースラインを拡張するポイントを１つ設定します。

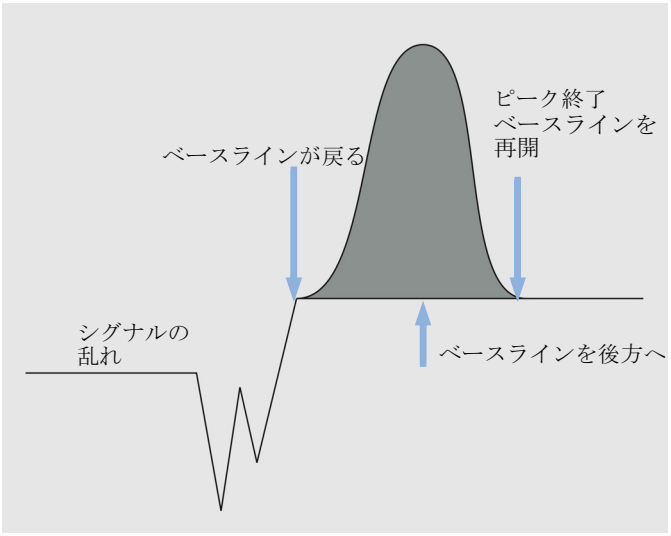


図 31　［ベースライン（後方へ）］イベント

ベースライン ホールド　ベースラインホールドイベントがオンになった時点からオフになった時点まで、確定済みのベースラインの高さで水平ベースラインを引きます。

ベースライン（次の谷へ）　インテグレータがピーク間の次の谷でベースラインをリセットした後、この機能を自動的にキャンセルするポイントを設定します。

この機能は、背に乗っているか、または互いに近い位置で分離したクラスタになっていると見なされる、マージピークのグループに役立ちます。面積和の実行中、この機能は無視されます。

ベースライン（今すぐ）　シグナルがピーク状態である場合に、インテグレータがベースラインを現在のデータポイントの高さにリセットするポイント（時間）を設定します。

ショルダ検出　ショルダー検出の開始と停止を行うポイント（［オン］/［オフ］）を設定します。

信号がベースライン上にある場合は、この機能は無視され、検出されるベースラインが使用されます。

ショルダーは、指定されている［ショルダーモード］に従って検出されます。「初期イベント」 44 ページを参照してください。

固定ピーク幅　ピーク幅を設定して、次のピークのピーク幅の自動更新を無効にします。良いパフォーマンスを得るには、ピーク幅を実際のピークの半値幅に近い値に設定してください。

高さリジェクト 「初期イベント」 44 ページを参照してください。

積分 積分の停止と開始を行う間のポイント（［オン］/［オフ］）を設定します。

積分のオンとオフの間のピークは無視されます。

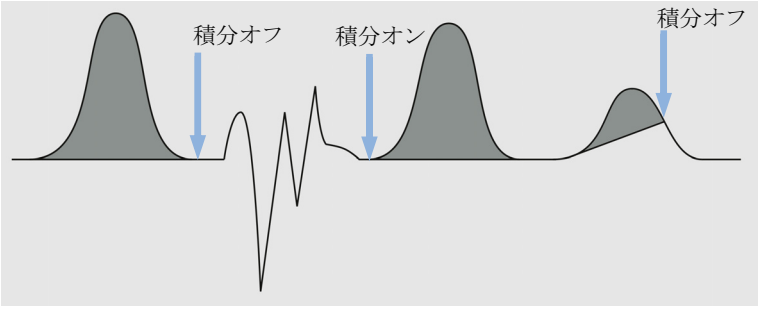


図 32　［インテグレーション］イベント

ベースラインは、最後に明らかにしたポイントから描かれ、落ち込みのためのすべてのリセットを含みます。その他のすべての積分機能と、ピーク幅、スレッショルド、および面積リジェクトの設定変更は、積分機能がオフになると無視されます。ベースラインポイントは、**［オン］**および**［オフ］**ポイントで再度確立されます。

インテグレータが設定されて再起動すると、現在のシグナルレベルで新規ベースラインポイントがリセットされます。

この機能は、クロマトグラム/エレクトロフェログラムの一部を無視する、またはベースライン変動を解消するのに便利です。

最大面積 最大の目的ピーク面積を設定します。

面積が最大面積値より大きいピークは、レポートされません。ベースラインの修正後、最大面積値より大きいピークはインテグレータにより除外されます。

例えば、このイベントを使用して、GC クロマトグラムの溶媒ピークを積分結果から除外することができますが、そのライダーピークを含めることはできません。

最大高さ 最大の目的ピーク高さを設定します。

高さが最大値より大きいピークは、レポートされません。ベースラインの修正後、最大値より高いピークはインテグレータにより除外されます。

例えば、このイベントを使用して、GC クロマトグラムの溶媒ピークを積分結果から除外することができますが、そのライダーピークを含めることはできません。

ネガティブピーク

ネガティブピークを認識する間のポイント（［オン］/［オフ］）を設定します。

ネガティブピークが認識されると、インテグレータは落ち込み後にベースラインを自動リセットしなくなります。その後のすべてのベースラインの落ち込みは、ゼロとして確立されたベースラインを使用して積分されます。このベースラインとの比較によって面積が形成されて、絶対値が求められます。

ベースラインは、ピーククラスタの開始点で明らかにしたベースラインポイントからピークの終了点で確立されたベースラインまで構築されるため、ネガティブピーク機能は、ベースラインドリフトがピークサイズに比べて小さい場合のみ信頼して使用できます。

注記

［ネガティブピークオン］イベントが有効になると、面積和は自動的に無効になります。

ネガティブピークの検出中はタンジェントスキムも無効になり、このようなピークはドロップラインによって分離されます。

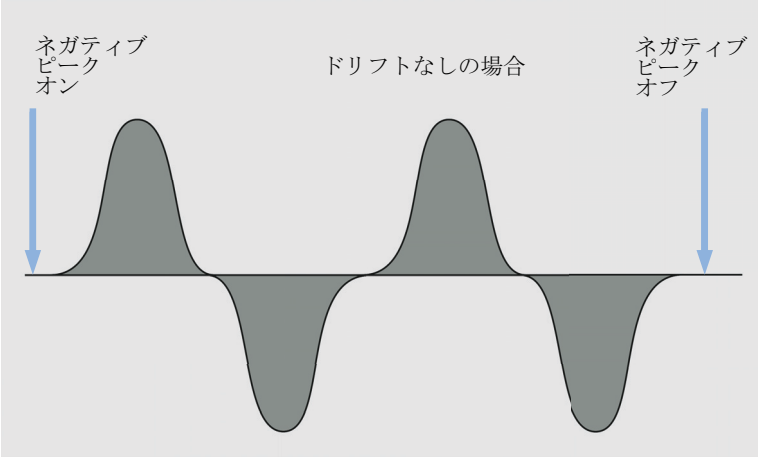


図 33　［ネガティブピーク］イベント

ベースライン範囲設定

データポイントの範囲を使用して、時間範囲の中間で統計的に有効なベースラインポイントを計算します。

提供する値は、指定された時間点の周囲の時間間隔です。これにより、ベースラインポイントを決定するために使用される範囲が定義されます。ベースラインの統計的計算について詳しくは、「ベースライン補正モード」30ページを参照してください。

値 = 0 を設定すると、最も近いクロマトグラムデータポイントがベースラインポイントとして使用され、統計処理は一切行なわれません。マイナス値を設定すると、**［ベースライン範囲の選択］**=**［クリア］**と同じ動作になります。つまり、統計的なベースラインアルゴリズムの使用を停止します。

ベースラインテスト用に、クロマトグラム内で面積を指定することができます。化学的バックグランドがなくノイズのみを含む面積とするのが理想的です。56ページ 図34では、灰色表示でベースライン範囲の設定を表示しています。

2 つの**［範囲からベースラインを設定］**点を指定する場合（たとえばクロマトグラムの開始および終了点）、その間のベースラインが直線でつながれます。

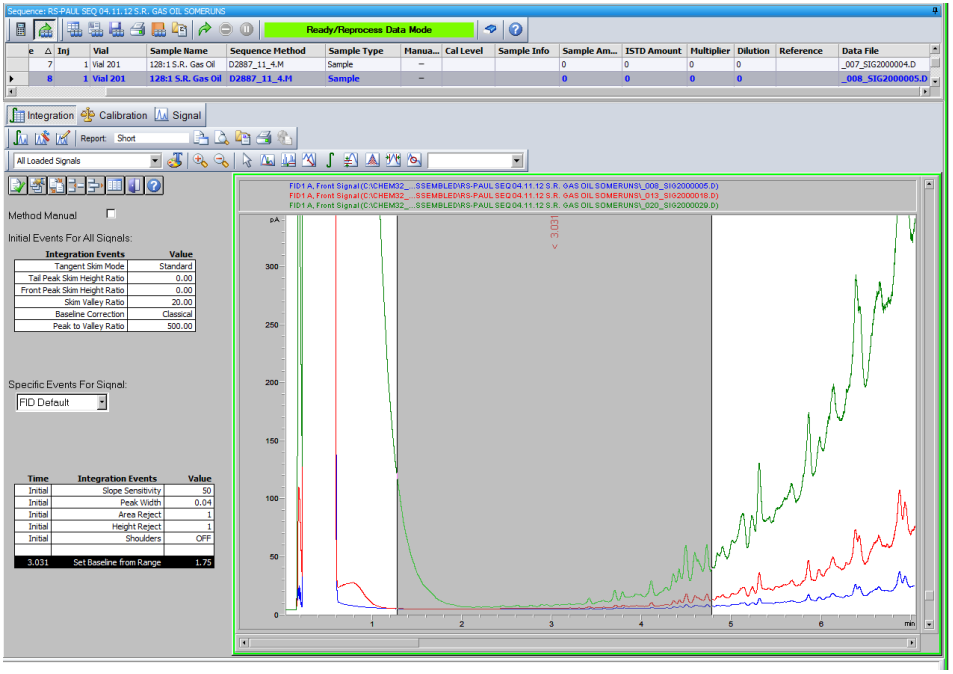


図 34　「ベースライン範囲設定」ベースライン範囲の間隔は、灰色で表示されています。

ベースライン範囲を指定（最低）

［ベースライン範囲を指定］に似ていますが、ノイズデータポイントを 30 % 多く上乗せできる、最も低いと考えられるベースラインポイントを使用します。そのため、ベースラインの落ち込みが最小化されます。

値は、指定されたイベント時間の前後の時間間隔です。これにより、ベースラインポイントを決定するために使用される範囲が定義されます。ベースラインの統計的計算について詳しくは、「ベースライン補正モード」30ページを参照してください。

値 = 0 を設定すると、最も近いクロマトグラムデータポイントがベースラインポイントとして使用され、統計処理は一切行なわれません。マイナス値を設定すると、**［範囲からベースラインを使用］**=**［消去］**と同じ動作になります。つまり、統計的なベースラインアルゴリズムの使用を停止します。

ベースライン計算に、クロマトグラムの時間と間隔を指定することができます。化学的バックグランドがなくノイズのみを含むのが理想的です。

2 つの**［範囲からベースラインを設定］**点を指定する場合（たとえばクロマトグラムの開始および終了点）、その間のベースラインが直線でつながれます。

計算に使用するクロマトグラムの面積に過剰な化学的ノイズまたは電子ノイズのスパイクがある場合には、**［ベースライン範囲設定］**の代わりに**［ベースライン範囲設定（最低）］**を使用してください。

ショルダー

「初期イベント」 44 ページを参照してください。

スロープ感度

「初期イベント」 44 ページを参照してください。

溶媒ピーク

mV/s の単位で特定のスロープを超えるピークは、A/D 変換の範囲外にある、溶媒ピークとして検出されます。

トレーリングピークは、自動的にタンジェントスキムされるため、タンジェントスキムイベントをオンにする必要はありません。

溶媒ピーク検出がオフの場合、ドロップラインはタンジェントの代わりにトレーリングピークから描かれます。

ピーク分割

ピークをドロップラインで分割するポイントを指定します。

注記

［面積和］がオンになっている間は**［ピーク分割］**を使用できません。**［面積和］**がオンになっている間にピークを分割するには、対応するマニュアル積分イベントを使用します。

スキムしたピークは**［ピーク分割］**イベントを使用して分割できません。

タンジェントスキム（テール）

タンジェントスキムを開始または終了する位置を指定します。

［オン］

インテグレータが次のピークのトレーリングエッジ上にタンジェントスキムを設定するポイントを設定します。接線を超えるピークは、すべてリセットベースラインに積分されます。接線が引かれるのは、小さいピーク前の谷から検出器シグナル勾配がタンジェント勾配と等しくなるポイントまでです。タンジェントスキムイベント時間には、ピーク中の任意の時間を入力できます。またピークを溶媒ピークとして指定します。

［オフ］

現在のピークの終了後、または指定した間隔にわたってピークが検出されない場合に、タンジェントスキムを終了します (溶媒が次のクラスタに不用意に指定されなくなります)。

タンジェントスキムモード

適切なピーク面積を計算するために、以下のモデルが利用できます。

- 指数（37ページ 図18 を参照）
- 新しい指数（38ページ 図19 を参照）
- 直線（39ページ 図20 を参照）
- スタンダード（「標準スキム」 39 ページ を参照）

割り当てられないピーク

一部のベースライン設定では、認識されたいずれのピークにも含まれない狭い面積が、ベースラインより上かつシグナルより下の部分に存在します。このような面積は通常、測定もレポートも行なわれません。割り当てられていないピークをオンにすると、これらの面積は割り当てられていないピークとして測定およびレポートされます。このような領域のリテンション/マイグレーションタイムは、領域の開始点と終了点の中間です。

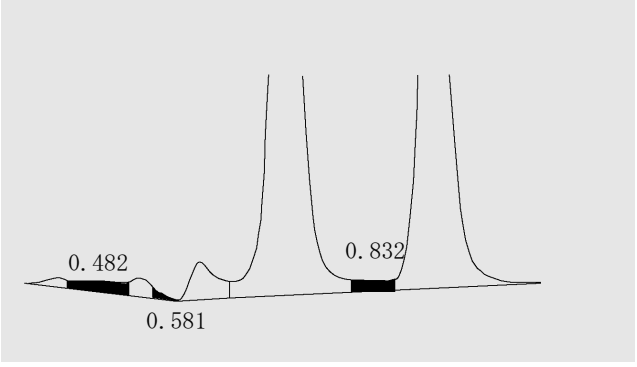


図 35　割り当てられないピーク

ピーク高さの更新

このイベントは、インテグレータが最も高いデータポイントの絶対高さをピーク高さとして使用するよう強制します。このイベントを使用しないと、補間された検量線の最大が使用されます。**ピーク高さの更新**イベントは、急勾配のあるピークや、前に急降下しているピークのあるシグナルで特に役立ちます。このようなピークは MSD シグナルでは一般的です。

ピーク高さの更新イベントの開始時間は評価されません。イベントは常にクロマトグラム全体に影響します。

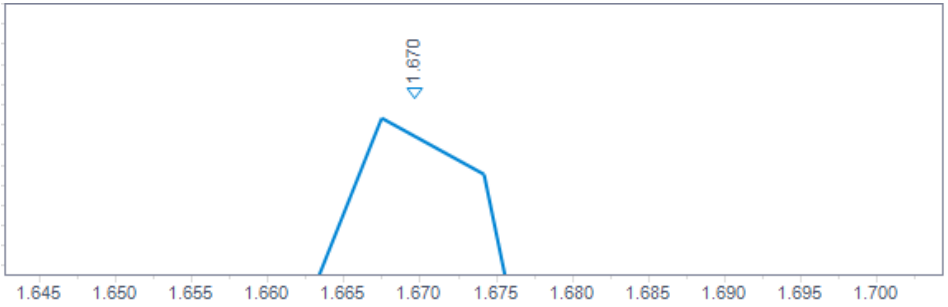


図 36　デフォルトの積分

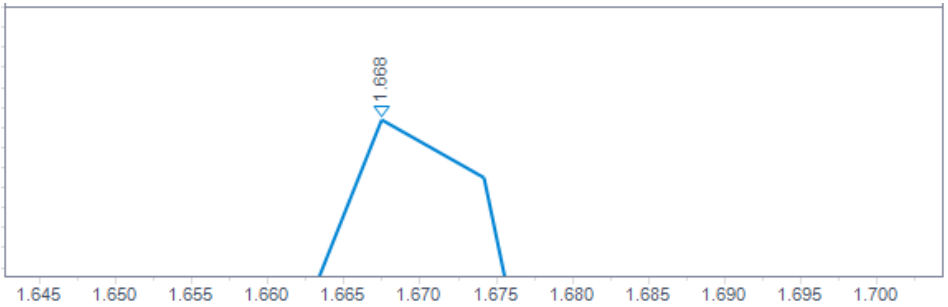


図 37　ピーク高さを更新イベントの積分

ベースライン範囲を使用

ベースライン落ち込みを最小化するために、それ以前または以降の時間にベースライン値を見積もることができます。

［範囲からベースラインを設定］または**［範囲から下のベースラインを設定］**の値をクロマトピークのない面積で計算する場合、対象の第 1 ピークが溶出する直前（または対象の最後のピークが溶出した直後）に、計算されたベースラインを想定すると有意な場合があります。**［範囲からベースラインを使用］**では、どの方向でもこのような投影を 3 つまで作成できます。

このイベントは、直線のベースラインが意図せずにクロマトグラム曲線を通過する可能性があり、これを避けるためにアップスロープまたはダウンスロープのベースラインを作成した場合に使用すると有意な場合があります。パラメー

タはインテグレータに対して、どのベースライン範囲からベースラインポイントを取得して、ベースラインを指定の時間間隔のベースラインポイントまで引くかを指定します。

以下のパラメータを使用できます。

- **［クリア］**：新規ベースラインの動作を消去して、このポイントから従来のアルゴリズムに戻します。
- **［左］**：このポイントの左側から時間的に最も近いベースライン範囲にあるベースライン値を使用します。
- **［右］**：このポイントの右側から時間的に最も近いベースライン範囲にあるベースライン値を使用します。
- **［範囲 1］**～**［範囲 9］**：指定されたベースライン範囲にあるベースライン値を使用します。ベースライン範囲は、クロマトグラムの開始点からカウントされます。

［面積和スライス］（51ページ 図29）に基づく例も参照してください。

自動積分

自動積分機能は、初期イベントを設定するための開始点を提供します。これは、新しいメソッドを実装する場合に、特に役立ちます。タイムイベントを含んでいない、デフォルトの積分イベントテーブルから始めます。それから、一般的な使用目的のために自動積分機能によって提案されたパラメータを最適化することができます。

操作の原理

自動積分機能は、クロマトグラムデータを読み込んで、クロマトグラムオブジェクト内の各シグナルに対する初期積分パラメータの最適値を計算します。

アルゴリズムは、クロマトグラムの開始と終了の 1% の部分を調べて、その部分のノイズとスロープを決定します。ノイズは、線形回帰の標準偏差の 3 倍を、回帰で使用されたポイントのパーセント数の平方根で割った値として、決定されます。これらの値は、積分の高さリジェクトおよびスロープ感度に適切な値を割り当てるために使用されます。そのあとピーク幅の暫定値としてLC の場合は 0.5%、GC の場合はクロマトグラムの長さに応じて 0.3% ないし 0.2% が割り当てられます。初期面積リジェクトはゼロに設定して、積分を試行します。この試行は、少なくとも 5 つのピークが検出されるまで、毎回パラメータを調整し、または初期高さリジェクトを 0 に設定して、必要に応じて数回繰り返されます。積分の試行は、10 回行っても上記の条件が満たされなかった場合には、終了します。

それから、積分の結果が調べられ、検出されたピークの幅に基づいてピーク幅が調整され、初期ピークに向かって計算のバイアスが設定されます。検出されたピークのピーク対称性を使用し、ピーク幅計算に 0.8 ～ 1.3 の対称性を持つピークだけを含みます。十分に対称なピークが検出されないと、この制限は緩和され、**下限値は 1.5 分の 1** に、**上限値は 1.5 倍**にされます。それから、ピーク間のベースラインを調べて、以前の高さリジェクトおよびスロープ感度の値を調整します。面積リジェクトは、積分の試行の間に検出された最も対称度の高いピークの最小面積の 90% に設定されます。

クロマトグラムは、これらの積分パラメータの最終的な値を使用して再度積分され、その積分の結果が保存されます。

自動積分のパラメータ

次のパラメータが、自動積分機能によって設定されます。

- 初期スロープ感度
- 初期高さ
- 初期ピーク幅
- 初期面積リジェクト

マニュアル積分

このタイプの積分では、選択したピークまたはピークのグループを積分できます。初期面積リジェクト値を除き、ソフトウェアのイベント積分は、マニュアル積分の指定範囲内では無視されます。マニュアル積分の結果得られた 1 つまたは複数のピークが、面積リジェクトのスレッショルドよりも低い場合には切り捨てられます。マニュアル積分イベントは、絶対時間値を用います。シグナルドリフトは調整されません。

マニュアル積分では、自分でピークの開始および終了ポイントを定義して、再計算した面積を定量しポートに含めることができます。これらの各ポイントは、レポート内ではピーク分離コード M によってラベルされます。

マニュアル積分には、次の機能があります。

ベースラインを引く ピークまたは複数のピークのためのベースラインポイントを指定します。メニュー項目の［**積分**］>［**全ての谷**］では、範囲内のピークをすべての谷ポイントで自動的に分離するかを指定できます。

ネガティブピーク ネガティブピークとしてベースラインより下の面積すべてを処理する時間を指定します。範囲内のピークをすべての谷のポイントで自動的に分離するかを指定できます。

タンジェントスキム メインピークから離れてタンジェントスキムされたピークの面積を計算します。タンジェントスキムされたピークの面積は、メインピークの面積から減算されます。

ピークの分割 ピークをドロップラインで分割するポイントを指定します。

ピーク削除 積分結果から 1 つ以上のピークを削除します。

マニュアル積分ピークのピーク分離コード

マニュアル積分によるピークは、積分レポート内ではピークコード**MM**によってラベルされます。

マニュアル積分ピークの前にピークがあり、マニュアル積分によってこのピークの終了が変化した場合、これにはコード**F**（強制）が与えられます。谷ポイントは、検出されると、コード**V**に設定されます。

タンジェントスキムなど、マニュアル積分によって影響を受けたメインピークの溶媒は、**R**（再計算溶媒）でラベルされます。

マニュアル積分イベントの保存

マニュアルでベースラインを引くなどのマニュアル積分イベントは、タイムイベントよりもさらに多くのデータファイルやシグナルに特化しています。複雑なクロマトグラムの場合、これらのイベントを再解析に使用できることが非常に望まれます。そのため、メソッドを使用するのではなく、シグナルのマニュアル積分イベントをデータファイルに直接保存できます。

データファイルをレビューまたは再解析する時はいつでも、データファイル中のこれらのマニュアル積分イベントが自動的に適用されます。マニュアル積分イベントを含む分析は、**ナビゲーションテーブル**の対応する列に印が付きます。

手動によるベースライン描画やピーク削除のツールに加えて、以下の操作を行う 3 つの追加ツールがユーザーインターフェイスに用意されています。

- 現在表示されているクロマトグラムのマニュアルイベントをデータファイルに保存
- 現在表示されているクロマトグラムからすべてのイベントを削除
- 最後のマニュアル積分イベントを元に戻す (イベントが保存されるまで使用可能)

ナビゲーションテーブルでのレビュー中に次のデータファイルに対して操作を続行する場合、ChemStation は未保存のマニュアル積分イベントがないか確認し、イベントを保存するかどうかをユーザーに尋ねます。

ナビゲーションテーブルでのレビュー中にデータファイルに保存されたマニュアルイベントが、［**バッチ**］モードでのレビュー中に保存されたマニュアル積分イベントに干渉することはありません。これら 2 つのレビュー方法は、データファイルのマニュアルイベントに関して完全に分離されています。

ChemStation リビジョン B.04.01 以前の場合、マニュアル積分イベントは、個々のデータファイルではなくメソッドに保存されました。このワークフローを使用することもできます。メソッドでマニュアル積分イベントを処理するために、［**データ解析**］ビューの［**積分**］メニューには以下の項目が示されます。

- **メソッドのマニュアルイベント アップデート**: メソッドに新しく記載されたマニュアルイベントを保存します。
- **メソッドからマニュアルイベント適用**: 現在メソッドに保存されているマニュアルイベントを現在読み込まれているデータファイルに適用します。
- **メソッドからマニュアルイベント削除**: メソッドからマニュアルイベントを削除します。

メソッドに保存されたマニュアルイベントをデータファイル内のストレージに変換するには、メソッドからイベントを使用し、データファイルに結果を保存します。不要な場合は、メソッドからイベントを削除します。

メソッドの［**積分イベントテーブル**］の［**マニュアルイベント**］チェックボックスがオンの場合、このメソッドを用いるデータファイルを読み込む際に、メソッドのマニュアルイベントが常に適用されます。データファイルにマニュアルイベントの追加がある場合、メソッドのイベントの後に適用されます。［**マニュアルイベント**］チェックボックスがオンの場合、データファイルにイベントを保存するかどうかユーザーが尋ねられることはありません。

メソッドに保存されたマニュアルイベントをデータファイル内のストレージに変換するには、メソッドからイベントを使用し、データファイルに結果を保存します。不要な場合は、ここでメソッドからイベントを削除します。

メソッドの［**積分イベントテーブル**］の［**マニュアルイベント**］チェックボックスがオンの場合、このメソッドを用いるデータファイルを読み込む際に、メソッドのマニュアルイベントが常に適用されます。データファイルにマニュアルイベントの追加がある場合、メソッドのイベントの後に適用されます。［**マニュアルイベント**］チェックボックスがオンの場合、データファイルにイベントを保存するかどうかユーザーが尋ねられることはありません。

2 ピーク同定

ピーク同定とは 66
ピークマッチングルール 67
ピーク同定のタイプ 68
絶対リテンション/マイグレーションタイム 68
相対リテンションタイム 68
補正リテンション/マイグレーションタイム 68
ピーククォリファイア 68
アマウントの上限/下限 69
絶対リテンション/マイグレーションタイム 70
補正済みリテンション/マイグレーションタイム 72
単一のリファレンスピーク 72
複数のリファレンスピーク 73
ピーククォリファイア 74
シグナル相関 75
クォリファイアベリフィケーション 75
クォリファイア比の計算 75
同定プロセス 76
リファレンスピークの検出 76
ISTD ピークの検出 77
残りのキャリブレーションピークの検出 77
同定されていないピークの分類 77

本章では、ピーク同定のコンセプトについて説明します。

ピーク同定とは

ピーク同定は、未知のサンプルの中の成分を、そのクロマトグラフ/電気泳動特性に基づき、よく知られたキャリブレーションサンプルの分析と比較することによって、同定されます。

分析メソッドで定量が要求されている場合には、これらの成分の同定は、定量のための必要なステップとなります。対象とする各成分のシグナル特性は、メソッドのキャリブレーションテーブルに保存されます。

ピーク同定プロセスの機能は、シグナルの各ピークを、キャリブレーションテーブルに保存されたピークと比較することです。

キャリブレーションテーブルには、対象とする成分の予想リテンション/マイグレーションタイムが含まれています。キャリブレーションテーブルのピークのリテンション/マイグレーションタイムと一致したピークには、その成分の属性、たとえば名前やレスポンスファクタが与えられます。キャリブレーションテーブルのどのピークとも一致しなかったピークは、不明として分類されます。このプロセスは、次のものによってコントロールされます。

- タイムリファレンスピークとして指定されたピークのキャリブレーションテーブルでのリテンション/マイグレーションタイム
- リファレンスピークに指定されたリテンション/マイグレーションタイムウィンドウ
- タイムリファレンスピークではないキャリブレーションピークのキャリブレーションテーブルでのリテンション/マイグレーションタイム
- リファレンス以外のピークに指定されたリテンション/マイグレーションタイムウィンドウ
- 正しい比を持つクオリファイアピークの存在。

ピークマッチングルール

ピークマッチングプロセスには、次の規則が適用されます。

- サンプルのピークが、キャリブレーションテーブルの成分ピークのピークマッチングウィンドウ内に入った場合には、ピークにはその成分の属性が与えられます。
- 複数のサンプルのピークがピークマッチングウィンドウ内に入った場合には、予想されるリテンション/マイグレーションタイムに最も近いピークが、その成分として同定されます。
- ピークがタイムリファレンスまたは内部標準の場合には、ウィンドウ内の最大のピークがその成分として同定されます。
- ピーククォリファイアも使用されている場合には、成分のピークを同定するために、ピーク比がピークマッチングウィンドウと組み合わされます。
- ピークがクォリファイアピークの場合には、化合物のメインのピークに最も近い測定ピークが同定されます。
- サンプルピークがどのピークマッチングウィンドウにも入らなかった場合には、不明な成分として表示されます。

ピーク同定のタイプ

サンプルのピークをChemStationソフトウェアのキャリブレーションテーブル内のピークとマッチさせるためには、いくつかの技法があります。

絶対リテンション/マイグレーションタイム

サンプルピークのリテンション/マイグレーションタイムは、キャリブレーション テーブル内の各成分に指定された、予想リテンション/マイグレーションタイムと比較されます。

相対リテンションタイム

システムは、相対リテンションタイム（EP）および相対リテンションタイム（USP）を、キャリブレーションピークおよびアンキャリブレーションピークの両方で（Rr = t2/t1）として計算します。

補正リテンション/マイグレーションタイム

成分ピークの予想リテンション/マイグレーションタイムは、1 つまたは複数のピークの実際のリテンション/マイグレーションタイムを使用して補正されます。マッチングプロセスはこの補正された (相対) リテンション/マイグレーションタイムを使用して行われます。リファレンスピークは、キャリブレーションテーブル内で指定されている必要があります。

ピーククォリファイア

リテンション/マイグレーションタイムでピークを同定することに加えて、ピーククォリファイアを使用すれば、より正確な結果を得ることができます。リテンション/マイグレーションタイムウィンドウ内に複数のピークが存在する場合には、正しい化合物を同定するために、クォリファイアを使用する必要があります。

アマウントの上限/下限

［化合物詳細］ダイアログボックスで定義されるアマウントの範囲は、ピーク認識を検証するために使用されます。同定された各化合物のアマウントがアマウントの範囲内にある場合、ピーク同定がレポートに示されます（クラシックレポートのみ、インテリジェントレポートでは不可）。

絶対リテンション/マイグレーションタイム

リテンション/マイグレーションタイムウィンドウは、ピークマッチングプロセスで使用されます。リテンション/マイグレーションタイムウィンドウは、予想されるピークのリテンション/マイグレーションタイムの中心となるウィンドウです。このウィンドウ内に入ったサンプルは、成分同定の候補と見なされます。

70ページ 図38は、1.809 ～ 2.631 分のピーク 2 のリテンション/マイグレーションタイムウィンドウを示しています。ここでは、予想リテンション/マイグレーションタイムは 2.22 分です。ピーク 2 には 2 つの可能性があります。一方は 1.85 分で、もう一方は 2.33 分です。予想ピークがリファレンスピークなしの場合には、予想リテンション/マイグレーションタイムの 2.22 分に近い方のピークが選択されます。

予想ピークがタイムリファレンスまたは内部標準の場合には、ウィンドウ内の最大ピークが選択されます。

どちらの場合にも、ChemStation は 2.33 分のピークを選択します。2 つのピークが同じサイズの場合には、ウィンドウの中心に近い方のピークが選択されます。

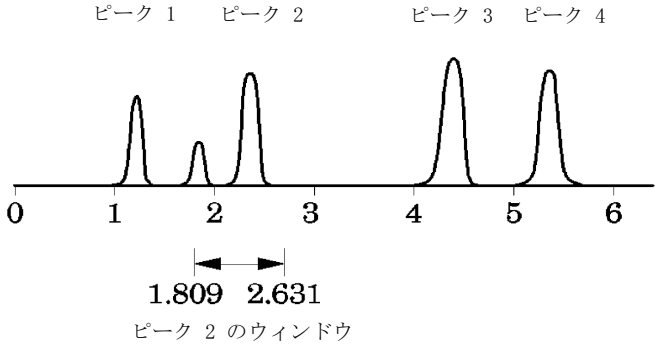


図 38　リテンション/マイグレーションタイムウィンドウ

ピークの同定には、3 種類のウィンドウが使用されます。

- リファレンスピークウィンドウは、リファレンスピークにのみ適用されます。
- リファレンスピークなしのウィンドウは、キャリブレーションされた他のすべてのピークに適用されます。
- **［化合物詳細］**ダイアログボックスで、個々の成分の固有のウィンドウ値を設定します。

これらのウィンドウのデフォルト値は、［キャリブレーション設定］ダイアログボックスで入力します。ピークマッチングウィンドウを定義するリテンション/マイグレーションタイムの両サイドは、絶対ウィンドウとパーセンテージウィンドウの和です。

5% のウィンドウは、ピークのリテンション/マイグレーションタイムが、そのピークのキャリブレーションされたリテンション/マイグレーションタイムの下 2.5 % から上 2.5% までの間に入っていなければならないことを意味します。たとえば、キャリブレーション分析でリテンション/マイグレーションタイムが 2.00 分のピークは、その後の分析では 1.95 ～ 2.05 分に現れる必要があります。

たとえば、絶対ウィンドウが 0.20 分で、相対ウィンドウが 10% の場合には、リテンション/マイグレーションタイムウィンドウは 1.80 ～ 2.20 分になります。

1.80 分 = 2.00 分 - 0.10 分 (0.20 分/2) - 0.10 分 (2.00 分の 5%)

2.20 分 = 200 分 + 0.10 分 (0.20 分/2) + 0.10 分 (2.00 分の 5%)

補正済みリテンション/マイグレーションタイム

絶対リテンション/マイグレーションタイムを使ってピークをマッチするのは、簡潔な方法ですが常に信頼できるとは言えません。個々のリテンション/マイグレーションタイムは、条件やテクニックにおける小さな変更によって変化します。その結果、ピークマッチングウィンドウ外にピークが発生し、同定されません。

絶対リテンション/ マイグレーションタイムでは避けられないばらつきに対処するテクニックは、成分のリテンション/ マイグレーションタイムを、1 つ以上のリファレンスピークに対する相対時間として表すことです。

リファレンスピークは、キャリブレーションテーブル内でそのピークの参照列内のエントリとして認識されます。相対ピークマッチングでは、リファレンスピークを使用してピークマッチングウィンドウの位置を変更し、サンプルピークのリテンション/ マイグレーションタイムのシフトを相殺します。

メソッド内に定義されたリファレンスピークがない、あるいは 分析中にリファレンスピークを 1 つも同定できない場合、同定には絶対リテンション/ マイグレーションタイムが使用されます。

単一のリファレンスピーク

リファレンスピークのリテンション/マイグレーションタイムウィンドウは、そのリテンション/マイグレーションタイムの周囲に作成されます。このウィンドウ内の最大のピークが、リファレンスピークとして同定されます。キャリブレーションテーブル内のその他のピークの予想リテンション/マイグレーションタイムは、リファレンスピークの予想リテンション/マイグレーションタイムと実際のリテンション/マイグレーションタイムとの比に基づいて補正されます。

複数のリファレンスピーク

単一のリファレンスピークによるリテンション/マイグレーションタイムの補正は、予想リテンション/マイグレーションタイムと実際のリテンション/マイグレーションタイムとのずれが、分析が進むとともに、均一そして線形に変化するという仮定に基づいています。長い分析ではしばしば、リテンション/マイグレーションタイムの変化は不均一です。そのような場合には、分析中に間隔を置いて、複数のリファレンスピークを使用すれば、より良い結果が得られます。この場合、シグナルは別個のゾーンに分けられます。それぞれのゾーン内では、リテンション/マイグレーションタイムのずれは均一であるものの、変化率はゾーンごとに異なると仮定します。

注記

複数のリファレンスピークのリテンションタイムが近すぎ、分析全体に分散していない場合には、時間補正アルゴリズムはうまく働かないことがあります。

ピーククォリファイア

成分を、1 つ以上のシグナルで検出することができます。複数の検出器または複数のシグナルを生成できる検出器を使用するすべての形態のクロマトグラフィに当てはまることですが、マルチシグナルでの検出は、マルチ波長またはダイオードアレイ検出器を用いた液体クロマトグラフィで最も一般的に使用されています。通常は、メインピークがキャリブレーションテーブル内で定義される際に最大吸光度に近い波長が使用されるように、それらの検出器は設定されています。74ページ 図39 では、λ_1 です。

シグナルとして取り込んだ他の 2 つの波長は、ピーククォリファイアとして使用できます。図では、これらは λ_2 および λ_3 です。

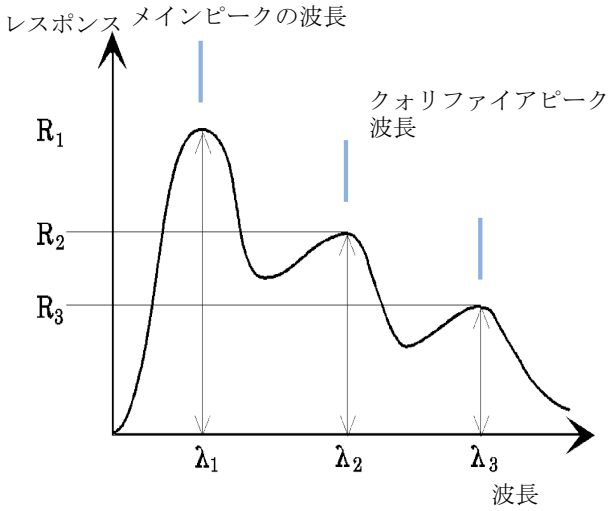


図 39　ピーククォリファイア

化合物のピークは、異なる波長で一定のレスポンス比を持ちます。

クオリファイアピークレスポンスは、メインピークのレスポンスに対して一定の比率を示します。同定詳細オプションが選択されていると、予測レスポンスの許容範囲をキャリブレーションテーブルで設定できます。メインピーククォリファイア λ_1 と、たとえば λ_3 などのクォリファイアピーク間の比率が許容リミットの範囲内であれば、化合物同一性が確認可能です。

シグナル相関

シグナル相関とは、定義されたタイムウィンドウの異なる検出器シグナルで測定された 2 つのピークを同じ化合物に割り当てることです。シグナル相関ウィンドウは、**_DaMethod** レジスタの **QuantParm** テーブル内にある **SignalCorrWin** パラメータによってコントロールされます。シグナル相関は、シグナル相関ウィンドウを 0.0 分に設定すると無効になります (詳細については、オンラインヘルプを参照してください)。シグナル相関がオフの場合、異なる検出器シグナルで同じリテンション/マイグレーションタイムで溶出しているピークは異なる化合物として扱われます。

LC、CE、CE/MS、および LC/MS データ用のデフォルトシグナル相関ウィンドウは 0.03 分で、GC データ用は 0.0 分です。

クォリファイアベリフィケーション

シグナル相関が有効である場合、すべてのデータファイルタイプに対して、デフォルトでクォリファイアベリフィケーションが有効になります。 これは、メソッドの［**定量パラメータ**］テーブルの［**クォリファイア使用**］フラグを設定することにより無効にできます。シグナル相関がオフになると、クォリファイアベリフィケーションも無効になります。

クォリファイア比の計算

クォリファイアベリフィケーションが化合物に対して有効化されると、クォリファイアのサイズとメインピークのサイズの比が、キャリブレーションリミットに対して検証されます。サイズは、レポート条件の中の計算ベースの設定に従って、高さまたは面積を表します。

クォリファイアピークは、目標化合物と同じ方法でキャリブレーションできます。ユーザーが予想クォリファイア比を指定する必要はありません。予想クォリファイア比は自動的に計算されます。

両者とも化合物のリテンションタイムで測定されます。

QualTolerance パラメータは、 クォリファイア比の許容範囲値を定義します。たとえば、± 20% などです。

キャリブレーションテーブルユーザーインタフェース (同定詳細) 内で許容値を設定でき、それは絶対比率で表します。

マルチレベルのキャリブレーションの場合、ChemStation は各キャリブレーションレベルの測定クォリファイア比に基づいて最小クォリファイア許容値を計算します。以下の式を使用して、最小クォリファイア許容値が計算されます。

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

この式で q_i は、レベル i での測定クォリファイア比を表します。

同定プロセス

ソフトウェアは、ピークを同定しようとする際、積分データを 3 回検査します。

リファレンスピークの検出

最初は、タイムリファレンスピークを同定します。キャリブレーションテーブルで指定したリテンションタイム/マイグレーションタイムを参照し、一致するピークのリテンションタイム/マイグレーションタイムを分析結果から検索します。分析ピークのリテンション/マイグレーションタイムが、キャリブレーションテーブルピーク用に構築されたウィンドウの範囲内にある場合、その分析のピークがキャリブレーションテーブル内のリファレンスピークであると同定されます。

ウィンドウ内で複数のピークが検出された場合は、正のシグナルクォリファイアの一致 (設定されている場合) が後に続き、最大面積または高さを持つピークが、リファレンスピークとして選択されます。

各タイムリファレンスピークが検出されると、検出されたリテンション/マイグレーションタイムとキャリブレーションテーブル内に格納されている値との違いを使用して、キャリブレーションテーブル内の他のすべてのピークの予想リテンション/マイグレーションタイムが調整されます。

ISTD ピークの検出

2 回目の検査は、定義済み内部標準ピークを同定します。それらのピークが ISTD として同定されていない場合は、タイムリファレンスピークとして同定されます。ISTD ピークは、ピークリテンション/マイグレーションタイムウィンドウとピーククォリファイアにより同定されます。複数のピークが同じ ISTD ウィンドウ内で検出された場合は、最大のピークが選択されます。

残りのキャリブレーションピークの検出

3 回目の検査は、キャリブレーションテーブルに一覧表示されている残りすべてのピークを同定します。キャリブレーションテーブル内の非リファレンスピークは、RT ウィンドウを使用して残りの分析ピークとマッチされます。

非リファレンスキャリブレーションピークは、それぞれキャリブレーションテーブル内に固有のリテンション/マイグレーションタイムを保持しています。これは、あらかじめ同定したタイムリファレンスピークに基づいた特定の分析のために調整されます。キャリブレーションピークのリテンション/マイグレーションタイムウィンドウは、キャリブレーションピークの補正済みリテンション/マイグレーションタイムに基づいて調整されます。

同じウィンドウ内に複数のピークが検出された場合は、予想リテンションタイム/マイグレーションタイムに最も近く、かつオプションのクォリファイア仕様に適合するリテンション/マイグレーションタイムを持つピークが選択されます。

同定されていないピークの分類

同定されていないピークが残っている場合、不明なピークに分類されます。ChemStation は、同じ化合物に属する不明なピークのグループ化を試みます。複数のシグナルでピークが検出された場合は、各シグナル内で同じリテンション/マイグレーションタイムを持つピークが 1 つの化合物にグループ化されます。

［**レポート条件**］ダイアログボックスで適切に選択すると、不明ピークはクラシックレポートで報告されます。

3 キャリブレーション

キャリブレーションとは 79
検量線 80
検量線の計算 81
直線近似 81
二次曲線 81
相対残差 84
グループキャリブレーション 85
リキャリブレーションオプション 86

この章では、キャリブレーション処理に使用される計算について詳しく説明します。

キャリブレーションとは

ピークの積分と同定が終わった後の、次の定量分析のステップは、キャリブレーションです。アマウントとレスポンスが、分析対象のサンプルの実際の質量に正比例することはほとんどありません。そのため、参照材料によるキャリブレーションが必要になります。定量では、ピークの面積または高さを使用してサンプル内の化合物のアマウントが決定されます。

定量分析には多くのステップが含まれています。その概要を以下に示します。

- 分析する化合物を認識する。
- その化合物の既知のアマウントを含んでいるサンプル（キャリブレーションサンプルまたは標準と呼ばれる）を分析するためのメソッドを確立する。
- キャリブレーションサンプルを分析して、そのアマウントによるレスポンスを求める。

  あるいは、ご使用の検出器のレスポンスが非線形の場合には、さまざまなアマウントの対象化合物の標準を数多く使用して分析することもできます。この処理を**マルチレベルキャリブレーション**と呼びます。

定量を実施するには、以下のキャリブレーションメソッドを使用できます。

- 化合物に固有のキャリブレーション（ESTD、ISTD）
- 他の化合物またはグループのキャリブレーションまたはレスポンスファクタを使用した間接定量
- 固定レスポンスファクタ（**マニュアル RF**）

ESTD の検量線と計算は、測定されたアマウントのレスポンス（面積または高さ）に基づいています。ISTD の検量線と計算は、相対レスポンスと相対アマウントに基づいています。

検量線

検量線は、ひとつまたは複数のキャリブレーションサンプルから得られる、ある化合物のアマウントおよびレスポンスデータのグラフィック表示です。

一般に、一定量のキャリブレーションサンプルを注入してシグナルを取得し、ピークの面積または高さを計算することでレスポンスが決定され、80ページ図40のようになります。

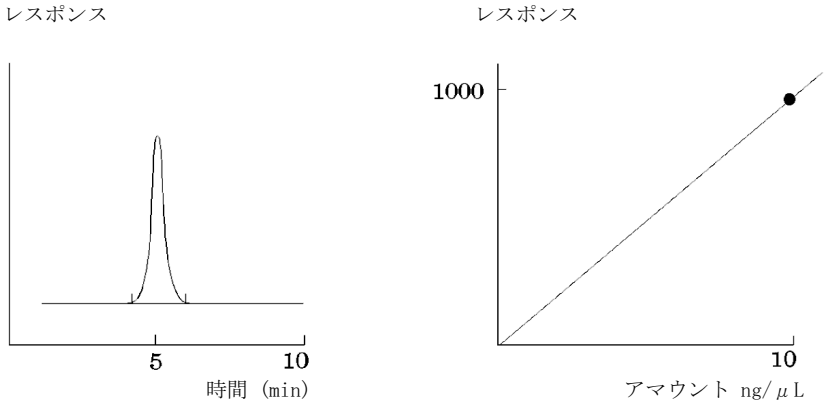


図 40　キャリブレーションサンプル (10 ng/µL) シグナルおよび検量線

検量線の計算

直線近似

n = 部分測定の数

X_i = 独立変数、i 番目の測定

Y_i = 従属変数、i 番目の測定

検量線の式：

$$\mathbf{y}(\mathrm{X}) = \mathbf{a} + \mathbf{bX}$$

係数:

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

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

変数の意味は次のとおりです。

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

二次曲線

二次曲線の式：

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

二次曲線にはキャリブレーションポイントが 3 つ以上必要です。原点を含む、あるいは原点を強制通過する場合は、2 つのポイントが必要です。

二次曲線近似に使用する係数の計算

係数は、以下の連立一次方程式から得られます。対応する標準マトリックス方程式（$A^TAx = A^Ty$）を解くためには、Crout のアルゴリズムが使用されます。指定された計算式の中では、合計が次のように簡略化されます：

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

オーバーフローを回避するため、計算を始める前に X-値がノーマライズされます：

$$Norm = \Sigma(x)$$

$$x = x / Norm$$

二次曲線の正規方程式：

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

マトリックス方程式で記述した場合：

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

Crout の分解：

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

値の省略形：

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

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

最後に、逆ノーマライズする必要があります：

$$a = a'$$
$$b = \frac{b'}{Norm}$$
$$c = \frac{c'}{Norm^2}$$

相対残差

各キャリブレーションレベルには**相対残差**が表示されます。この値は次の式を使用して計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

relRES = 相対残差（%）

計算されたレスポンスは、検量線のポイントを表します。

［キャリブレーションテーブルと検量線の印刷］を選択するときに、一部のレポートに印刷される**残差標準偏差**は、次の式を使用して計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

ResSTD = 残差標準偏差

$Resp_{calibratedi}$ = ポイント i に対するキャリブレーション済みレスポンス

$Resp_{calculatedi}$ = ポイント i に対する計算されたレスポンス

n = キャリブレーションポイントの数

グループキャリブレーション

グループキャリブレーションは、個々の濃度は不明だが、化合物グループの濃度の合計が分かっている場合の化合物に適用できます。それはたとえば、異性体などです。全体の化合物グループがキャリブレーションされます。次の式が使用されます。

キャリブレーション

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

変数の意味は次のとおりです。

Conc$_{AB}$ は、化合物 A および B から構成される化合物グループの濃度

Response$_A$は、化合物 A の面積 (または高さ)

RF$_A$ は、レスポンスファクタ

化合物グループ内の化合物には、同等のレスポンスファクタを仮定します。

$$RF_A = RF_B$$

そのため、化合物グループ内の化合物の濃度は、次の式で計算されます。

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

リキャリブレーションオプション

キャリブレーションテーブルのレスポンスを新しいキャリブレーションデータで更新するには、いくつかの方法があります。

平均

すべてのキャリブレーション分析の平均が次の式を用いて計算されます。

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

重み付け移動平均

すべてのキャリブレーション分析に対する重み付け平均が計算されます。更新済みの重み付けは、**［リキャリブレーション設定］**ダイアログボックスで設定されます。

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

置換

新しいレスポンス値が古い値に置き換わります。

4 定量

定量とは 88
定量の計算 89
補正係数 89
絶対レスポンスファクタ 89
倍率 90
希釈率 90
サンプルアマウント 90
面積%および高さ% 91
キャリブレーションされた化合物の定量 92
ESTD 計算 92
ISTD 計算 94
キャリブレーションされていないピークの定量 97
キャリブレーション化合物を使用した間接定量 97
マニュアル RFを使用した定量 97
norm% 計算 99

この章では、化合物を定量化する方法と、定量に使用される計算について説明します。

定量とは

ピークが積分され同定された後の分析における次の段階は、定量になります。定量では、ピーク面積または高さを使用し、サンプル内の化合物の濃度を測定します。

定量分析には多くの手順が含まれますが、要約すると次のようになります。

- 分析している化合物を把握する。
- この化合物を含んでいるサンプルの分析方法を確立する。
- 既知の濃度または化合物の濃度を含む 1 つまたは複数のサンプルを分析して、その濃度に起因するレスポンスを取得する。

  検出器に非直線形のレスポンスが返ってくる場合は、化合物の異なる濃度を使用して、たくさんのサンプルを分析することもできます。このプロセスは、**マルチレベルキャリブレーション**と呼ばれます。
- 化合物の未知の濃度を含むサンプルを分析して、その未知の濃度に起因するレスポンスを取得します。
- 未知の濃度のレスポンスを既知の濃度の反応と比較し、存在する化合物の量を測定します。

未知のサンプルの反応と既知のサンプルのレスポンスとを有効に比較するには、同一の条件のもとでデータを取得し処理する必要があります。

定量の計算

ChemStationでは、混合物内に存在する成分ごとの濃度を測定する次のような計算手順が提供されます。

- パーセント
- 標準化
- 外部標準 (ESTD)
- ESTD%
- 内部標準 (ISTD)
- ISTD%

未知のサンプル内の化合物の濃度を測定するのに使用される計算方法は、定量の種類によって異なります。各計算手順では、計算にピーク領域または高さが使用され、異なる種類のレポートが生成されます。

補正係数

定量計算では、**絶対レスポンスファクタ**、**倍率**、**希釈率**、および**サンプルアマウント**の4つの補正係数が使用されます。これらの係数は、キャリブレーションの手順の中で使用され、検出器のレスポンスにおける変動を、異なるサンプル成分、濃度、サンプル希釈、サンプルアマウント、および変換単位に補正します。

絶対レスポンスファクタ

あるサンプル成分の絶対レスポンスファクタは、成分の量をキャリブレーション混合物の分析における成分のピークの測定面積または高さで割ったものを表します。キャリブレーションされた各計算手順で使用される絶対レスポンスファクタは、検出器のレスポンスをサンプルの個々の成分に補正します。

倍率

倍率は、各成分の結果に乗じるために各計算式で使用されます。倍率は、単位を変換して量を表すために使用できます。

希釈率

希釈率は、レポートが印刷される前に、すべての計算された結果に乗じられる係数です。結果のスケールを変更するために、または分析前にサンプル組成の変更を補正するために希釈率を使用できます。コンスタントファクターの使用を必要とする以外の目的にも希釈率を使用できます。

サンプルアマウント

ESTD% または ISTD% の計算が選択された場合、ESTD および ISTD レポートには、絶対値ではなく相対値が表示されます。つまり、各成分のアマウントは、サンプルアマウントの割合として表示されます。サンプルアマウントは、ESTD% および ISTD% レポート内で使用され、指定された値で割ることにより、分析された成分の絶対アマウントを相対値に変換します。

面積%および高さ%

［**面積%**］の計算方法では、分析における各ピークの面積は、すべてのピークの面積の合計に対するパーセンテージとしてレポートされます。［**面積%**］は、前もってキャリブレーションする必要がなく、検出器に注入されたサンプルの量に依存しません。レスポンスファクタは使用しません。すべての成分が検出器の中で均等に反応する場合、［**面積%**］は成分の相対アマウントに相応する近似値になります。

［**面積%**］は、定性的な結果が重要な場合、および他のキャリブレーション手順に必要なキャリブレーションテーブルを作成するための情報を生成するのに使用されます。

［**高さ%**］の計算方法では、分析における各ピークの高さは、すべてのピークの高さの合計に対するパーセンテージとしてレポートされます。

キャリブレーション設定、**サンプル情報** ダイアログボックス、または**シーケンステーブル**からの倍率および希釈率は、面積% または高さ% 計算に適用されません。

キャリブレーションされた化合物の定量

絶対検量線法（ESTD）、ノーマライズ、および内部標準法（ISTD）の計算方法にはレスポンスファクタが必要なため、キャリブレーションテーブルが使用されます。キャリブレーションテーブルにより、選択した単位へのレスポンスの変換が、選択した手順ごとに指定されます。

ESTD 計算

ESTD は基本的な定量の手順で、キャリブレーションサンプルと未知サンプルの両方を同じ条件のもとで分析します。未知サンプルの結果は、後にキャリブレーションサンプルの結果と比較されて、未知サンプルのアマウントが計算されます。

ESTD 手順は、ISTD 手順とは異なり、絶対レスポンスファクタが使用されます。レスポンスファクタはキャリブレーションから取得され、その後保存されます。引き続きサンプルを分析すると、このレスポンスファクタを測定したサンプルアマウントに適用し、成分のアマウントを計算します。注入量やサンプル前処理の変動を補正するための標準試料がサンプル中にないため、分析間でサンプルの注入量に再現性があるかを確認します。

ESTD レポートを準備する際、未知サンプルの中の特定の化合物のアマウントの計算が、次の 2 つのステップで行われます。

1 この化合物のキャリブレーションポイントを通る曲線の式は、［キャリブレーション設定］または［検量線］ダイアログボックスで指定されたフィットの種類を使用して計算されます。

2 未知サンプル内の化合物のアマウントは、次に説明する式を使用して計算します。このアマウントはレポートで表示されるか、レポートされる前に、倍率、希釈率、またはサンプルアマウントの値による追加の計算で使用される可能性があります。

ESTD レポートを選択した場合、化合物 x の絶対アマウントの計算に使用する式は次のとおりです。

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

変数の意味は次のとおりです。

Responsex_x は、ピーク x のレスポンスです。

RF_x は、コンポーネント x のレスポンスファクタで、次のように計算されます。

$$\mathrm{RF}_x = \frac{\mathrm{Amount}_x}{\mathrm{Response}_x}$$

Mは、倍率です。

D は、希釈率です。

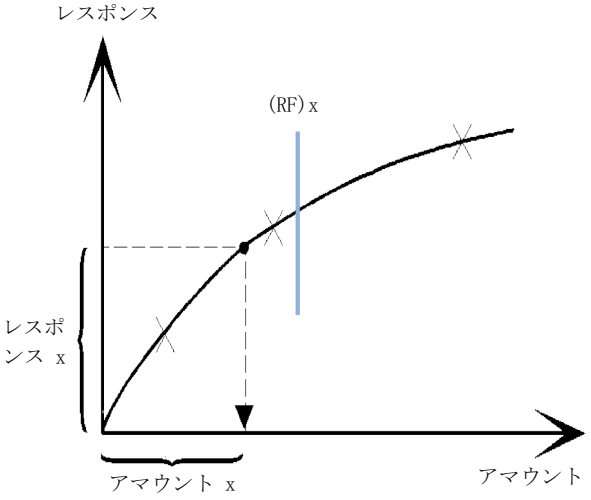


図 41　レスポンスファクタ

倍率および希釈率は、**［キャリブレーション設定］**または**［サンプル情報］**ダイアログボックスのいずれかから読み込みます。

ESTD% レポートが選択され、サンプルアマウントがゼロでない場合は、成分 x の相対アマウント (%) は次のように計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

x の Absolute Amt （絶対アマウント）は、ESTD 計算セクションで示したとおり計算されます。

シングルランでは、**サンプルアマウント**を、［サンプル情報］ボックスまたは［定量設定］ダイアログボックスから取得します。サンプルアマウントがゼロの場合は、ESTD が計算されます。

ISTD 計算

ISTD 手順では、ノーマライジングファクタとして働く成分の既知のアマウントを追加することにより、ESTD 方式の欠点が排除されます。この**内部標準**の成分は、キャリブレーションおよび未知のサンプルの両方に添加されます。

ソフトウェアは、メソッドの中に保存されている以前のキャリブレーションから取得した適切なレスポンスファクタを取り込みます。分析による内部標準の濃度およびピーク面積または高さを使用して、ソフトウェアは成分の濃度を計算します。

内部標準として使用される化合物は、化学的にもリテンション/マイグレーションタイムにおいてもキャリブレーション化合物に類似していなければなりませんが、クロマトグラフ的には識別できなければなりません。

表 8　　ISTD手順

利点	欠点
サンプルサイズバリエーションは重要ではない。 機器のドリフトは、内部標準で補正できる。 ISTDと未知のサンプルの化学的挙動が類似している場合、サンプルの準備の影響が最小限に抑えられる。	内部標準をすべてのサンプルに添加する必要がある

ISTD手順が非直線形の特徴をもったキャリブレーションに使用される場合、計算方式の結果発生するエラーが組織的なエラーを引き起こさないように注意する必要があります。マルチレベルキャリブレーションでは、ISTD化合物のアマウントを一定、つまり、化合物のキャリブレーションカーブが非直線形の場合、すべてのレベルで同じにする必要があります。

内部標準分析では、対象となる成分のアマウントは、2 つのピークの比率によって内部標準成分のアマウントと関係しています。

2 回分析のISTDキャリブレーションでは、未知のサンプルでの特定の化合物の補正されたアマウント比の計算は、次のような段階により実行されます。

分析 1：キャリブレーション

1 キャリブレーションポイントは、キャリブレーション テーブルの特定のピークの、レベルごとのアマウント比とレスポンス比の計算によって作成します。

アマウント比は、任意のレベルについての内部標準のアマウントによって分割される化合物のアマウントです。

レスポンス比は、任意のレベルについての内部標準の面積または高さによって分割される化合物の面積です。

2 キャリブレーションポイントを通る曲線についての式は、[キャリブレーション設定] または [検量線] ダイアログ ボックスで指定されたカーブフィットの種類を使用して計算されます。

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

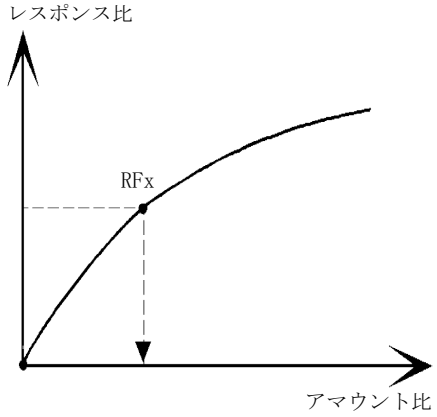


図 42　アマウント比

分析 2：未知サンプル

1 未知のサンプルでの化合物のレスポンスは、未知のサンプルでの内部標準のレスポンスで分割され、未知のレスポンス比を提供します。

2 未知のサンプルのアマウント比は、上記のステップ2の検量線の式およびサンプル内の ISTD の実アマウントを使用して計算されます。

キャリブレーションされた化合物の ISTD 計算

シングルレベルキャリブレーション用に、キャリブレーションされた化合物 X の実アマウントを計算するのに使用される式は次のとおりです。

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

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

変数の意味は次のとおりです。

RF$_X$ は、化合物 x のレスポンスファクタです。

ISTD の実アマウント **(Actual Amt)** は、［キャリブレーション設定］ダイアログボックスまたは未知のサンプルに追加された内部標準用の［サンプル情報］ダイアログボックスに入力された値です。

Mは、倍率です。

D は、希釈率です。

ISTD% レポートタイプを選択した場合、次の式を使用して化合物 x の相対（%）アマウントを計算します。

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

キャリブレーションされていないピークの定量

キャリブレーションされていないピークは、固定レスポンスファクタを使用するか、またはいずれかのキャリブレーション化合物のキャリブレーションデータを使用して定量できます。定量に固定レスポンスファクタを使用するかキャリブレーション化合物データを使用するかは、シグナルによって決まります。後者の場合、キャリブレーション化合物を ISTD メソッドで定量化すると、キャリブレーション化合物の場合と同じ方法で、同定されていないピークに ISTD が使用されます。

キャリブレーション化合物を使用した間接定量

キャリブレーション化合物のキャリブレーションデータをキャリブレーションされていないピークの定量化に使用すると、**［キャリブレーション設定］**ダイアログボックスの**［既存化合物使用］**ドロップダウンリストからキャリブレーション化合物が選択されます。計算は、キャリブレーション化合物の場合と同じです。リファレンス化合物を ISTD メソッドで定量すると、リファレンス化合物の場合と同じ方法で、キャリブレーションされていない化合物に ISTD が使用されます。

リファレンスピークがないと、キャリブレーションされていないピークのアマウントはゼロになります。

マニュアル RFを使用した定量

本ソフトウェアを使用すると、ユーザーは固定レスポンスファクタ（**［キャリブレーション設定］**ダイアログボックスの**［レスポンス ファクタ固定］**）に基づいて同定されている化合物を定量することができます。この場合、化合物のアマウントは固定レスポンスファクタを使用して計算されます。

アマウント = レスポンス * レスポンスファクタ * M * D

ここで、

マニュアル RF	固定レスポンスファクタ
レスポンス	レスポンスは面積または高さです。

ISTD メソッドを使用したマニュアル RFの利用

化合物のアマウントが固定レスポンスファクタと ISTD を使用して定量される場合、公式は以下の通りになります。

面積比 = 面積/面積$_{ISTD}$

または

高さ比 = 高さ/高さ$_{ISTD}$

そして、アマウントは以下のように計算されます。

アマウント = 面積比 * マニュアル RF * アマウント$_{ISTD}$

または

アマウント = 高さ比 * マニュアル RF * アマウント$_{ISTD}$

マニュアル RFとレスポンスファクタ（RF）の依存性

RF を［**レスポンス/アマウント**］（デフォルト設定）として定義した場合:

RF = 1 / マニュアル RF

RF を **アマウント/レスポンス**として定義した場合：

RF = マニュアル RF

norm% 計算

ノーマライゼーション方式では、異なるサンプル成分に対して検出器の感度に発生する変化を補正するために、ピーク面積 (または高さ) にレスポンスファクタを適用します。

Norm% レポートは ESTD レポートと同じ方法で計算されますが、化合物の絶対量ではなく相対量を計算する追加の手順があります。

norm% レポートには、面積% および高さ% レポートと同様の欠点があります。全体のピーク面積に影響を与える変更は、各個別ピークの濃度計算にも影響を与えます。ノーマライゼーションレポートは、重要なすべての成分が溶出され統合された場合にのみ使用する必要があります。選択されたピークをノーマライゼーションレポートから除外すると、サンプル内のレポート結果が変更されます。

成分 x の **Norm%** を計算するのに使用されるのは次の式です。

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

変数の意味は次のとおりです。

Response$_X$	ピーク x の面積（または高さ）
RF$_X$	レスポンスファクタ
Σ(Response・RF)	ピーク x を含むすべてのピークに対する **(Response・RF)** の積のすべての合計
M	乗数
D	希釈率

倍率および希釈率は、**［レポート条件］**ダイアログボックスの **［定量設定］**または［シーケンステーブル］からのいずれかより読み込みます。

5 システムスータビリティ

ピークパフォーマンス評価　101
システムスータビリティの評価　101
ノイズ測定　104
標準偏差の 6 倍を使用したノイズ計算　105
最大振幅（ピーク・トゥ・ピーク）の式を使用したノイズ計算　106
ASTM 法によるノイズ計算　107
S/N の計算　110
ドリフトおよびうねり　113
ピークのテーリングファクターと対称度の計算　115
システムスータビリティの式および計算　117
一般定義　118
空隙量　118
保持されない成分のリテンションタイム t (m) [分]　118
パフォーマンステストの定義　119
パフォーマンステストの概要　119
統計モーメント、スキューおよびエクセス　121
真のピーク幅 Wx [min]　123
キャパシティファクタ（USP）　123
テーリングファクタ（USP）t　124
カラムごとの理論段数 n　125
1 メートル当たりの理論段数 N [1-m]　126
相対リテンション、選択性　126
分離度（USP, ASTM）R　127
分離度 (EP/JP) Rs　128
分離度 (ChemStation クラシック定義)　128
ピーク谷比 (EP/JP)　129
再現性に関する定義　131
サンプル平均 M　131
サンプル標準偏差 S　132
相対標準偏差 RSD[%]（USP）　132
平均値の標準偏差 S　132
標準偏差　133
信頼区間 CI　133
相関係数　134
内部保持されている倍精度数へのアクセス　136

この章では、分析機器と分析メソッドの両方のパフォーマンスを評価するために OpenLab CDS で実行可能な内容について説明します。

ピークパフォーマンス評価

ピークパフォーマンスは、読み込まれたデータの積分ピークでも、新しくマニュアル積分されたピークでも計算できます。対話型**ピークパフォーマンスツール**は、ピークの特徴を計算し、UI に表示します。ピークパフォーマンスツールでは、さまざまな高さの真のピーク幅と、ピークモデリングアルゴリズムが評価したリテンションタイムを使用します。これらの値はピークパフォーマンスツール UI にのみ表示されます。レポートに表示されるインテグレータの値とわずかに異なる場合があります。

システムスータビリティの評価

分析機能の性能、および分析メソッドのパフォーマンスを、サンプル分析前にルーチンとして評価することは、優れた分析の実践法です。また、ルーチン分析前や実行中に、分析システムのパフォーマンスをチェックするのも良い考えです。ChemStation ソフトウェアには、これらの 3 つの種類のテストを自動的に行うためのツールがあります。機器テストには、検出器の感度、ピークリテンション/マイグレーションタイムの精度、およびピーク面積精度のテストを含めることができます。メソッドテストには、リテンション/マイグレーションタイムとアマウントの精度、選択性、および操作における日々の変化に対するメソッドの堅牢性に関するテストを含めることができます。システムテストには、アマウントの精度、2 つの特定のピーク間の分離度、およびピークテーリングのテストを含めることができます。

ラボでは、次の要件を満たす必要があります。

- GLP 規制
- GMP 規制および cGMP 規制
- GALP 規制

ラボでは、これらのテストの実施、およびその結果の完全な文書化が推奨されます。たとえば、ISO9000 認定に応じた品質管理システムの一部になっているラボでは、機器のパフォーマンスが適切であることを証明する必要があります。

ChemStation では、複数の分析結果を照合し、シーケンスサマリレポートの中で統計的に解析します。

テストは、規制当局および独立監査によって一般的に認められているフォーマットで文書化されます。統計には次のものが含まれます。

- ピークリテンション/マイグレーションタイム
- ピーク面積
- アマウント
- ピーク高さ
- ピーク半値幅
- ピーク対称度
- ピークテーリング
- キャパシティファクタ (k')
- 理論段数
- ピーク間の分離度
- 先行するピークに関連した選択性
- 歪み
- 超過

平均値、標準偏差、相対標準偏差、および信頼区間が計算されます。標準偏差、相対標準偏差、または信頼区間のパラメータにリミットを設定できます。値がリミットを超える場合は、そのことに注意を促すようにレポートにフラグが付きます。

測定が行われた時の実際の状態の記録を取ることにより、分析データの質をサポートすることができます。この情報はデータとともに保存され、サンプルデータとともにレポートされます。分析全体の機器パフォーマンスカーブをシグナルとして記録し、データファイルに保存します。機器がサポートしている場合、この記録は、クロマトグラムに重ね描きされ、たとえば監査の時など、必要に応じて呼び出すことができます。

ベースラインノイズおよびドリフトは、自動計測が可能です。検出可能な最小レベルが、メソッド内でキャリブレーションされた化合物ごとにピーク高さのデータから計算されます。

最後に、機器コンフィグレーション、機器のシリアル番号、カラム/キャピラリ識別番号、および自分のコメントを印刷する各レポートに入れることができます。

拡張パフォーマンス結果は、リテンション/マイグレーションタイムと化合物名でピークを識別するため、メソッドでキャリブレーションされた化合物に対してのみ計算されます。

典型的なシステムパフォーマンステストのレポートには、次のパフォーマンス結果が含まれます。

- 機器の詳細
- カラム/キャピラリの詳細
- 分析メソッド
- サンプル情報
- 測定情報
- シグナル情報およびベースラインノイズ測定
- リテンション/マイグレーションタイムまたは化合物名でラベル付けされたシグナル

さらに、次に挙げる情報がクロマトグラム内のキャリブレーションされた化合物ごとに作成されます。

- リテンション/マイグレーションタイム
- k´
- 対称度
- ピーク幅
- 理論段数
- 分離度
- SN 比
- 化合物名

ノイズ測定

ノイズは、シグナルの選択された時間範囲で取得されたデータポイント値から測定されます。ノイズは、次の異なる 3 種類の方法で扱われます。

- ドリフトの直線回帰の標準偏差（sd）の 6 倍
- ピーク to ピーク（修正されたドリフト）
- ASTM メソッド（ASTM E 685-93）による測定

ノイズは、シグナルの最高 7 つの範囲に対して計算できます。範囲は、レポートパラメータ中の、システムスータビリティの設定の一部として指定されます。

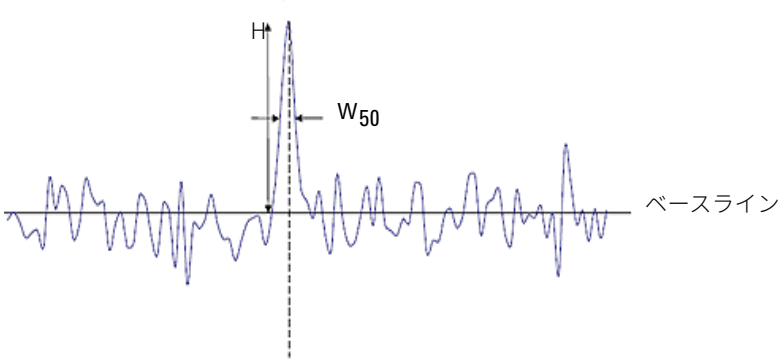
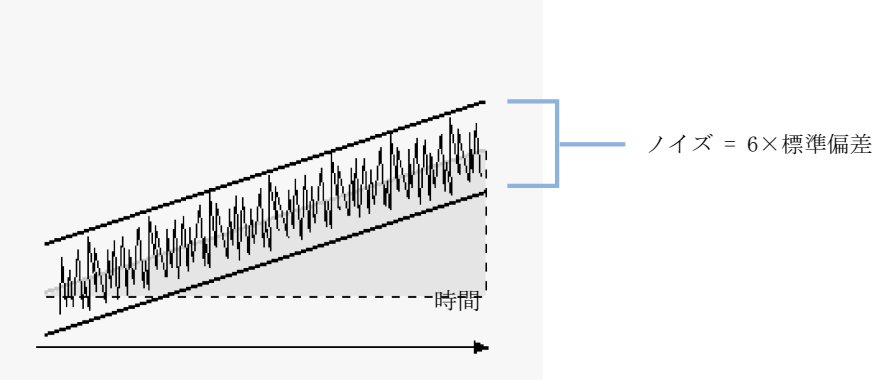


図 43　ピークシグナルおよびノイズのクロマトグラム

H　一番上からベースラインまでのピークの高さ（ノイズを通過する最適な直線）

W_{50}　ピーク半値幅

標準偏差の 6 倍を使用したノイズ計算



直線回帰は、現在のシグナルの時間範囲内のすべてのデータポイントを使用して計算されます。ノイズは、次の式によって計算されます。

$$N = 6 \times Std$$

ここで、

N	6 倍標準偏差法に基づくノイズです。
Std	選択した時間範囲内のすべてのデータポイントの直線回帰の標準偏差です。

最大振幅（ピーク・トゥ・ピーク）の式を使用したノイズ計算

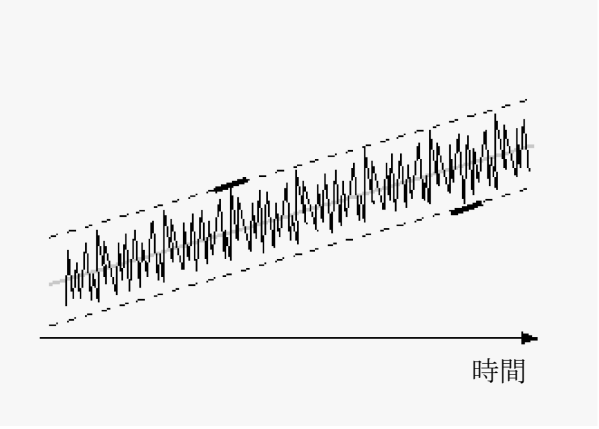


図 44　ピーク・トゥ・ピークノイズとドリフトの図

ドリフトは、ピークの時間範囲のすべてのデータポイントを使用して線形回帰を決定することで、最初に計算されます。直線回帰ラインは、時間範囲内のすべてのデータポイントから減算されることによって、ドリフト補正されたシグナルを与えます。

ピーク・トゥ・ピークノイズは、次の式を使用して計算されます。

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

ここで、

N	ピーク・トゥ・ピークノイズ
I_{max}	時間範囲内の最高（最大）I_x 値
I_{min}	時間範囲内の最低（最小）I_x 値
I_x	ドリフトによって補正されたシグナルの強度 （ドリフトはLSQの式を使用して計算されます）

ヨーロッパ薬局方の計算では、ピーク・トゥ・ピークノイズは、ブランクのリファレンスシグナルを、各ピークを囲む W_{50} の -10 から +10 倍の範囲で使用して計算されます。この領域はシグナルに対して対称、またはマトリックスシグナルの場合は非対称にもできます。

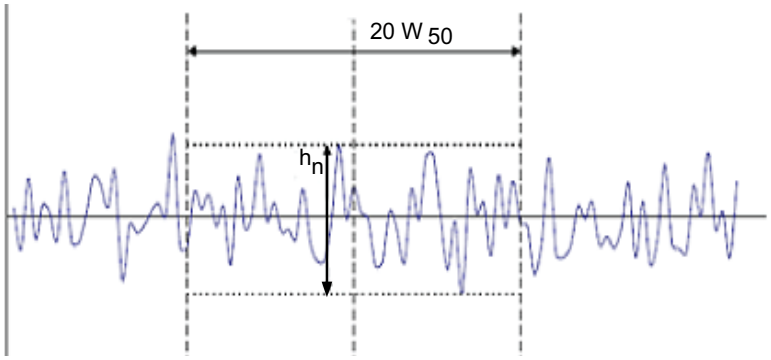


図 45　ブランクサンプルのクロマトグラムからノイズ判断

変数の意味は次のとおりです。

20 W_{50} は、W_{50} の 20 倍に相当する領域です。

h_n は、20 倍の W_{50} 領域におけるベースラインノイズの最大振幅です。

ASTM 法によるノイズ計算

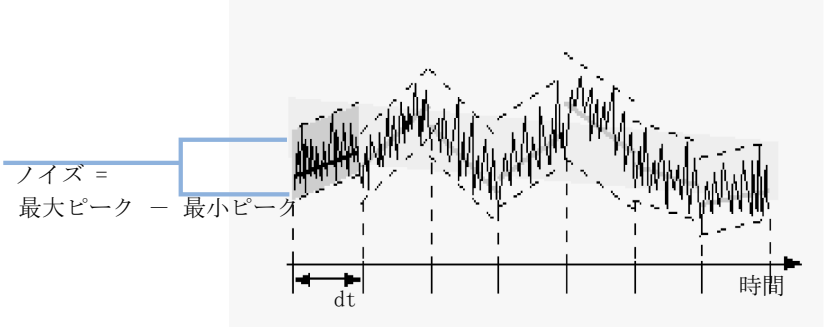


図 46　ASTM 法によるノイズ測定

ASTM ノイズ測定（ASTM E 685-93）は、American Society for Testing and Materials（ASTM、米国材料試験協会）による定義に従って、液体クロマトグラフィに使用される可変波長光度検出器をテスト用の規格に基づいています。

時間範囲の大きさに従って異なる 3 種類のノイズに区別できます。ノイズ決定は、定義された時間範囲内のピーク間の測定に基づきます。

- **サイクル タイム、t**

  長周期ノイズ：1 時間当たりのサイクルが 6 ～ 60 ある周波数検出器シグナルのあらゆるランダム変動に対する最大振幅。長周期ノイズは、選択した時間の範囲が 1 時間を超えるときに決まります。各サイクル（dt）の時間範囲は 10 分に設定されます。この 10 分間で、選択した時間範囲内に最少で 6 サイクル得られます。

  短周期ノイズ：1 分間当たりのサイクルが 1 を上回る周波数検出器シグナルのあらゆるランダム変動に対する最大振幅。短周期ノイズは、選択した時間範囲が 10 ～ 60 分間の選択した時間範囲に対して決まります。各サイクル（dt）の時間範囲は 1 分に設定されます。この 1 分間で、選択した時間範囲内に最少で 10 サイクル得られます。

  超短周期ノイズ（ASTM E 685-93 の対象外）：この用語は、0.1 分間当たりのサイクルが 1 を上回る周波数検出器シグナルのあらゆるランダム変動に対する最大振幅を説明するために使用されます。

  超短周期ノイズは、選択した時間範囲が 1 ～ 10 分間の選択した時間範囲に対して決まります。各サイクル（dt）の時間範囲は 0.1 分に設定されます。この 0.1 分間で、選択した時間範囲内に最少で 10 サイクル得られます。

- **サイクル数、n**

  サイクル数は以下のように計算されます。

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

  ここでは、t がサイクルタイム、t_{tot} はノイズが計算される対象の合計時間です。

- **各サイクルのピーク・トゥ・ピークノイズの計算**

  ドリフトは、時間範囲のすべてのデータポイントを使用して線形回帰を決定することで、最初に計算されます。直線回帰ラインは、時間範囲内のすべてのデータポイントから減算されることによって、ドリフト補正されたシグナルを与えます。ピーク・トゥ・ピークノイズは、次の式を使用して計算されます。

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

  ここでは、N がピーク・トゥ・ピークノイズ、I_{max} が時間範囲における最も強い（最大の）ランプ強度のピークであり、I_{min} は、最も低い（最少の）ランプ強度のピークです。

- **ASTM ノイズ**

  ASTM ノイズは以下のように計算されます。

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

  ここでは、N_{ASTM} は、ASTM 法に基づくノイズです。

  選択した時間範囲が 1 分より短い場合、ASTM ノイズ測定は実行されません。選択した時間範囲が 1 分以上の場合は、その範囲に基づいて、前述の ASTM法を使ってノイズが測定されます。1サイクル当たり少なくとも 7 つのデータポイントが計算に使用されます。自動ノイズ決定のサイクルは、10 % 重複します。

S/N の計算

ChemStation には、S/N 比に対してノイズを計算する以下のオプションがあります。

- **6 シグマ**：ノイズは直線回帰の標準偏差の 6 倍（6 シグマ）を使用して計算されます。ノイズ計算用のデータは、現在のシグナル内の特定の時間間隔から取得されます。複数の時間間隔を定義した場合は、ピークに最も近い間隔が使用されます。
- **USP**（米国薬局方の定義による）:ノイズは最大振幅（ピーク to ピーク）の式を使用して計算されます。ノイズ計算用のデータは、現在のシグナル内の特定の時間間隔から取得されます。複数の時間間隔を定義した場合は、ピークに最も近い間隔が使用されます。
- **EP**（ヨーロッパ薬局方の定義による）:ノイズは最大振幅（ピーク to ピーク）の式を使用して計算されます。ノイズ計算用のデータは、ブランクシグナルから取得されます。ノイズ計算の時間範囲は、ピークのリテンションタイムを中心とした、ピーク幅の 20 倍の時間範囲間隔です。

リファレンスシグナルなしでの S/N の計算（6 シグマ、USP）

システムスータビリティ設定で指定されている範囲からピークに最も近い範囲が選択されます。

ノイズは直線回帰の標準偏差の 6 倍を使用するか、最大振幅（ピーク to ピーク）の式を使用して (USP) 計算されます。

S/N は、各シグナルのピークごとに計算されますノイズ値が見つからない場合、S/N は “-” として報告されます。

S/N は、次の式で計算されます。

$$\text{SN 比} = \frac{\text{ピーク高さ}}{\text{最も近い範囲のノイズ}}$$

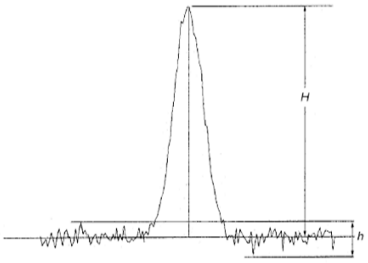


図 47　シグナル/ノイズ（SN 比）

EP 定義による S/N 比計算

シグナル/ノイズ（S/N）比は、欧州薬局方の定義に従って計算できます。S/N は、次の式によって計算されます。

S/N = 2H/h

変数の意味は次のとおりです。

H は、指定された標準液で得られたクロマトグラムのコンポーネントに相当するピークの高さです。

h は、クロマトグラムのベースラインからの最大ノイズ変動の絶対値です。このクロマトグラムは、ブランク注入の後、指定された標準液で得られたクロマトグラムのピークの周りを、ピークの半値幅の 20 倍に等しい距離で観察して得られます。

使用するノイズ値は、ピークto ピークメソッドを使用して計算されます（「最大振幅（ピーク・トゥ・ピーク）の式を使用したノイズ計算」 106 ページを参照）。

S/N は、対応するリファレンスシグナルが存在する場合、クロマトグラムシグナルにあるすべてのピークに対してレポートされます。特定のクロマトグラムシグナルについて、リファレンスデータファイルを指定している場合、リファレンスシグナルが自動的に割り当てられます。クロマトグラムのシグナルにリファレンスシグナルを割り当てられない場合は、その特定のシグナルのピークに対しては、S/N 比が計算されません。

ノイズ範囲の決定

リファレンスシグナルのノイズ範囲は、以下のいずれかのアルゴリズムに従って決定されます。

- リファレンスシグナルの長さが十分でない場合：**StartTime - EndTime < 20*W_{50}**
  - **StartTime = （リファレンスシグナルの）開始時間**
  - **EndTime = （リファレンスシグナルの）終了時間**
- リファレンスシグナルの長さが十分であるが、**(RT-10*W_{50})** がリファレンスシグナルの開始点未満の場所にある場合
  - **StartTime = （リファレンスシグナルの）開始時間**
  - **EndTime = StartTime + 20*W_{50}**
- リファレンスシグナルの長さが十分であるが、**RT** または **RT+10*W_{50}** がリファレンスシグナルの終点を超える場所にある場合
  - **EndTime = （リファレンスシグナルの）終了時間**
  - **StartTime = EndTime - 20*W_{50}**
- **RT**または**RT+10*W_{50}** がリファレンスシグナルの終点を超える場所にある場合
  - **StartTime = RT - 10*W_{50}**
  - **EndTime = RT + 10*W_{50}**

変数の意味は次のとおりです。

RT はリテンションタイムです。

W_{50} は半値幅です。

ドリフトおよびうねり

ドリフトおよびうねりは、解析メソッドで［SN 比］が選択されている場合に計算されます。選択したノイズ計算タイプにかかわらずに計算されます。

ドリフト

ドリフトは、直線回帰の傾きとして計算されます。ドリフトは、時間範囲のすべてのデータポイントを使用して線形回帰を決定することで、最初に計算されます。直線回帰ラインは、時間範囲内のすべてのデータポイントから減算されることによって、ドリフト補正されたシグナルを与えます。

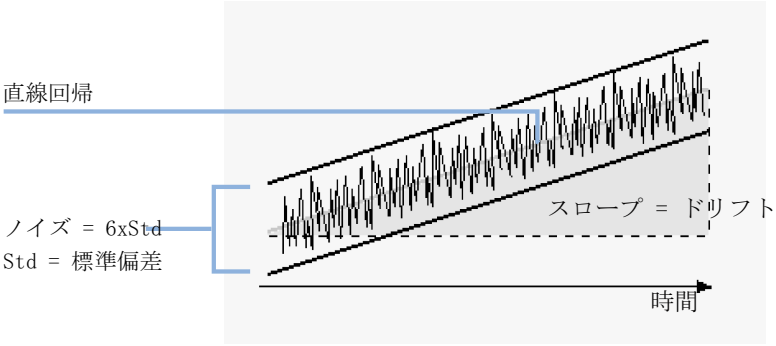


図 48　標準偏差の 6 倍を使用したノイズのドリフト

検量線の式：

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

ここで、

N	測定の数
X_i	独立変数、i 番目の測定
Y_i	従属変数、i 番目の測定

係数：

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

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

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

うねり うねりは、ASTM ノイズサイクルにおける中間データ値のピーク to ピークノイズとなります。「標準偏差の 6 倍を使用したノイズ計算」 105 ページを参照してください。

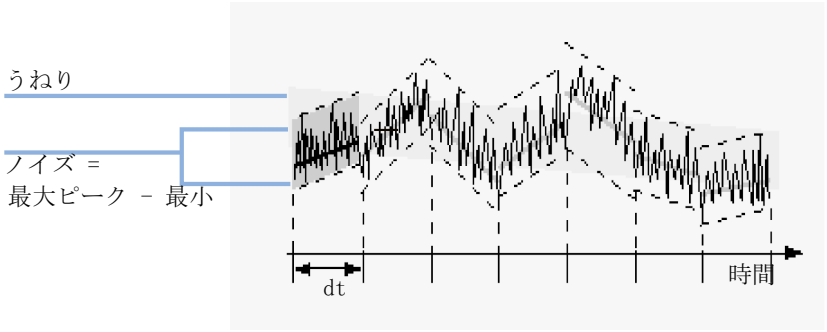


図 49 ASTM メソッドで測定されたノイズのうねり

ピークのテーリングファクターと対称度の計算

テーリングファクター

ChemStation では、ピーク高さの 5%（「テーリングファクタ（USP）t」 124 ページを参照）または 10%（以下の式を参照） でのピーク半値幅を比較することでピークの対称度 10% を決定します。

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

ここで、

A_S	テーリングファクター 10%
W_{10}	ピーク高さ 10% でのピーク幅
$W_{f,\,10}$	ピーク高さ 10% でのピーク幅の前半分

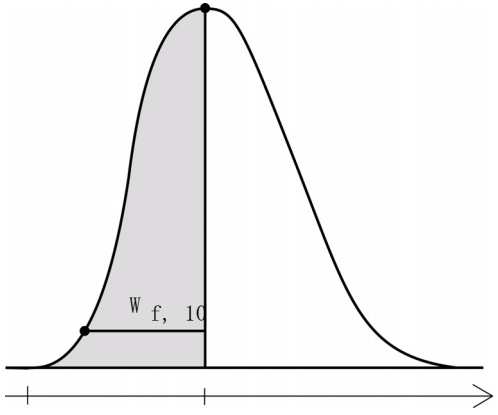


図 50　ピーク対称度の計算

対称度

ピーク対称度は以下のモーメント式を使用して整数によって疑似モーメントとして計算されます。

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

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

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

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

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

変曲点が見つからない場合や、変曲点が 1 つしか報告されない場合、ピーク対称度は以下のように計算されます。

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

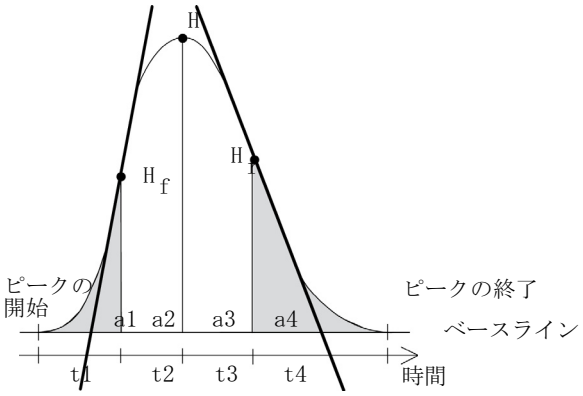


図 51　Cピーク対称度ファクタの計算

変数の意味は次のとおりです。

a_i = スライス面積

t_i = スライス時間

H_f = フロント変曲点の高さ

H_r = バック変曲点の高さ

H = 頂点の高さ

システムスータビリティの式および計算

ChemStation では、さまざまなシステムスータビリティのテストから結果を取得するのに、次の式が使用されます。結果は、**［パフォーマンス］**、**［パフォーマンス+ノイズ］**、**［パフォーマンス+ライブラリサーチ］**、および**［拡張パフォーマンス］**レポートスタイルを使用してレポートされます。

ASTM または USP が指定されている場合、その定義は対応する参考文献に従います。ただし、ここで使用されている記号は、参考文献で使用されているものと異なる可能性があります。

ここで使用される参考文献は以下のとおりです。

- **ASTM: Section E 685 – 93 (2021)**
- **USP: The United States Pharmacopeia, First Supplement to USP 37-NF32**
- **EP: European Pharmacopoeia, 11th Edition**
- **JP:日本薬局方、第 18 版**

注記

USP 2022 以降、いくつかのピークパフォーマンスパラメータ計算が EP および JP と一致されています。USP 2022 に準拠するために使用すべき EP/JP の式の詳細については、ChemStation オンラインヘルプを参照してください。

一般定義

空隙量

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

ここで、

d	カラム内径 [cm]
π	定数。円の外周と内径の比率
l	カラム長さ [cm]
f	固定相によって取り込まれず移動相に使用可能なカラムボリュームのフラクション。f のデフォルト値 = 0.68（Hypersilの場合）

保持されない成分のリテンションタイム t (m) [分]

(デッドタイムまたは空隙時間とも呼ばれる)

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

ここで、

F	LC の流量 [mL/min]

パフォーマンステストの定義

パフォーマンステストの概要

USP、EP および JP で定義されたピークテーブルのファクタが、ChemStation レポートで使用できます。以下のテーブルには、使用可能なファクタ、その定義および値の名称の概要を提示しています。計算の詳細については、このガイドの各セクションを参照してください。

表 9　ChemStation レポートでの薬局方の値

USP	EP	JP	定義	クラシックレポート（RLE）	インテリジェントレポート（RTE）
シンメトリー係数またはテーリングファクタ	対称度係数	対称度係数	$S = W_5/2f$	USP テーリング	ピーク_テーリングファクタ
-	-	-	$S=W_{10}/2f$	USP ピーク対称度（10% 高さ）	ピーク_テーリングファクタ（10パーセント）
分離係数	-	分離係数	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ ピーク a の T_R < ピーク b の T_R	選択性	ピーク_選択性
相対リテンション	相対リテンション	-	RRT 化合物：$r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$		ピーク_相対リテンションタイム_EP
相対リテンションタイム（RRT）	未調整相対リテンション	未調整相対リテンション	$Rr = t_2/t_1$	-	ピーク_相対リテンションタイム

表 9 ChemStation レポートでの薬局方の値

USP	EP	JP	定義	クラシック レポート（RLE）	インテリジェント レポート（RTE）
-	分離度	分離度	$Rs = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50\,(1)} + W_{50\,(2)}}$	分離度(EP) 分離度(JP)	ピーク_分離度_EP ピーク_分離度_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right)\left(T_{R\,(b)} - T_{R\,(a)}\right)}{W_{50\,(b)} + W_{50\,(a)}}$	分離度	ピーク_分離度_クラシック
分離度	-	-	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t\,(2)} + W_{t\,(1)}}$	-	ピーク_分離度_USP
理論段数（効率）			$n = 16\left(\frac{t_R}{W_t}\right)^2$	理論段数タンジェント法	ピーク_理論段数_USP
-	理論段数（効率）	理論段数（効率）	$N = 5.54 \times t_R^2 / W_{50}^2$	* 理論段数（半値幅法）：	ピーク_理論段数_EP ピーク_理論段数_JP
	S/N 比	S/N 比	S/N = 2H/h ノイズ：ピーク to ピーク計算、ブランクリファレンスシグナル、時間間隔 20x ピーク幅。	-	ピーク_S/N比_EP
S/N 比			S/N = 2H/h ノイズ：ピーク to ピーク計算、現在のシグナル内の時間間隔。		ピーク_S/N_USP
			S/N = 2H/h ノイズ：6 シグマ計算、現在のシグナル内の時間間隔。		Peak_SignalToNoise_6Sigma
ピーク谷比	ピーク谷比	ピーク谷比	$p/v = H_p/H_v$	ピーク谷比（フロントおよびテール）	ピーク_ピーク谷比

表 9 ChemStation レポートでの薬局方の値

USP	EP	JP	定義	クラシック レポート（RLE）	インテリジェント レポート（RTE）
-	-	-	S=B/A	Foley-Dorsey 式 ピーク対称度 （10% 高さ）	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7(T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A,B)/\min(A,B))}$	Foley-Dorsey 式 理論段数	-

統計モーメント、スキューおよびエクセス

統計モーメントは、非対称ピーク形状を説明する代わりの方法として計算されます。 ピークモーメントの数は無限にありますが、最初の 5 つを使用してクロマトグラフピークに接続します。 これらは、[0番目のモーメント]、[1番目のモーメント]、... [4番目のモーメント] と呼ばれます。

0 番目のモーメントはピーク面積を表します。

1番目のモーメントは、平均リテンションタイムまたはピークの重力の中心で測定されたリテンションタイムです。 ピークが対象でない限りは、これはピークの最大値で測定されたクロマトグラフのリテンションタイムとは異なります。

2番目のモーメントは、側面波及の測定であるピークの分散です。 これは、機器システムの別の部分からの分散の合計です。

3番目のモーメントは、縦の対称度または歪みを説明します。 これは、ガウス標準からのピーク形状の逸脱を測定します。 [パフォーマンス + 拡張] レポートで追加された歪みは、無次元の形態です。 対称ピークには 0 の歪みがあります。 テーリングピークには正の歪みがあり、1 番目のモーメントはリテンションタイムより大きくなります。 フロントピークには負の歪みがあり、1 番目のモーメントはリテンションタイムより小さくなります。

4番目のモーメントまたはエクセスは、縦軸に沿ったピークの圧縮または伸縮の大きさで、4 番目のモーメントが 0 であるようなガウス標準とこれとの比較方法です。 これは、コンスタント面積を維持しながらガウスピークの側を移動または分離させることで視覚化できます。 比較においてピークを圧縮または小さくする場合は、エクセスは負になります。 高い場合は、エクセスは正になります。 また、エクセスは [パフォーマンス + 拡張]レポートで与えられます。

統計モーメントの計算

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

変数の意味は次のとおりです。

N = スライス面積の数

A_i = インデックス i のスライス面積値（レスポンス）

d_t = 隣接するスライス面積間の時間間隔

t_0 = 最初のスライス面積の時間

$\sum_{i=1}^{N}$ = 部分測定の開始インデックス 1 から終了インデックス N の合計

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

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

真のピーク幅 Wx [min]

W_x = 全体の x % 高さでのピーク幅

ここで、

W_t	タンジェントが変曲点を通ってベースラインと交差することによって得られるタンジェントピーク幅、4 シグマ
$W_{4.4}$	高さ 4.4% での幅 (5 シグマ幅)
W_5	高さ 5% での幅 (テーリングピーク幅)、USP テーリングファクタ用
W_{10}	高さ 10% での幅
W_{50}	高さ 50% での幅 (真の半値ピーク幅または 2.35 シグマ)

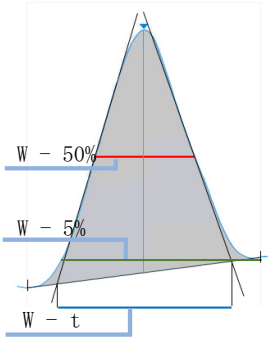


図 52　高さ x % でのピーク幅

キャパシティファクタ（USP）

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

変数の意味は次のとおりです。

T_R = ピークのリテンションタイム [min]

T_0= 空隙時間 [min]

テーリングファクタ（USP）t

注記

シンメトリー係数（USP、EP、JP）は、テーリングファクタ（USP）と同一です。インテリジェントレポートで "ピーク_テーリングファクタ" として使用できます。「パフォーマンステストの概要」 119 ページも参照してください。

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

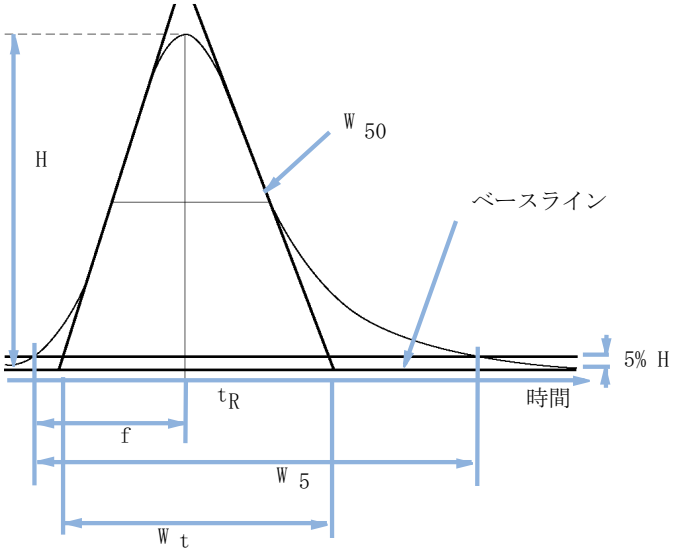


図 53　パフォーマンスパラメータ

S	シンメトリー係数、テーリングファクタ（USP）
H	ピーク高さ
t_R	リテンションタイム
f	ピークフロントと t_R 間の距離（単位：分）。ピーク高さの 5 % で測定されます。
W_{50}	高さ 50% のピーク幅 [min]
W_5	ピーク高さ 5% のピーク幅 [min]
W_t	タンジェントピーク幅

カラムごとの理論段数 n

タンジェント法（USP, ASTM）：

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

ここで、

T_R	リテンションタイム
W_t	タンジェントピーク幅 [min]

半値幅法（ASTM, EP, JP）：

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

ここで、

T_R	リテンションタイム
W_{50}	ピーク半値幅 [min]

5 シグマ法:

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

ここで、

T_R	リテンションタイム
$W_{4.4}$	ピーク高さ 4.4% でのピーク幅 [min]

統計法:

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

変数の意味は次のとおりです。

Mx = x 番目 統計モーメント

Foley Dorsey メソッド

Foley-Dorsey 式は、テーリングファクターピークで使用されます。これは、ピークテーリングおよび広がりに対して段数を修正します。

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

変数の意味は次のとおりです。

- W_{10} = ピーク高さの 10% でのピーク幅
- A：リーディング、B：テーリング、A+B = W_{10}

1 メートル当たりの理論段数 N [1-m]

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

ここで、

n	理論段数
l	カラム長さ [cm]（解析メソッドで指定）

相対リテンション、選択性

選択性 選択性では、最初のピークを除くすべてのシグナルピークに対してアルファ値を計算します。隣接するピークのすべてのペアに対して（ピーク 1 および 2、ピーク 1 の t_R < ピーク2 の t_R）、選択性は以下のように計算されます。

$$\text{alpha} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}, \text{alpha} > 1$$

ここで、

$k'_{(x)}$	ピーク x のキャパシティファクタ：$(t_{Rx}-t_0)/t_0$

相対リテンション（EP）

EP に準じた相対リテンション（調整）は、RT 比リファレンスピークが定義され識別されている場合のみ計算できます。**アルファ**値は、ピークがリファレンスの左にある場合は < 1 になり、ピークがリファレンスの右にある場合は > 1 になります。

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

変数の意味は次のとおりです。

t_{Ri} = 対象ピークのリテンションタイム

t_{Rst} = リファレンスピークのリテンションタイム

t_M = ホールドアップ時間

EP に準じた相対リテンション（調整なし）は、次のように計算されます。

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

分離度（USP, ASTM）R

タンジェント法 (ピーク 1 および 2 に関連、ピーク 1 の t_R < ピーク 2 の t_R、t_R [min])

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

ここで、

t_R	リテンションタイム
W_t	タンジェント幅 [min]

分離度 (EP/JP) Rs

分離度 (JP) および分離度 (EP) は次の定義で計算されます。

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

注記

さらに、クラシック分離度 (2.35/2)*... は、インテリジェントレポートで ピーク_分離度_クラシック として使用できます。値のリストは、「パフォーマンステストの概要」 119 ページを参照してください。

分離度 (ChemStation クラシック定義)

半値幅法:

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

5 シグマ法:

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

統計法:

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

変数の意味は次のとおりです。

$M1_{(x)}$ = ピーク x［min］の平均リテンションタイム (1 番目の統計モーメント)

$W_{B(x)}$ = ピーク x［min］のベース幅

$W_{4.4(x)}$ = ピーク x［min］の 4.4% 高さでの幅

$W_{50(x)}$ = ピーク x［min］の 50% 高さでの幅

$W_S(x)$ = 統計モーメントから抽出した幅 = ピーク x［min］$\sqrt{(M2)}$ （「統計モーメントの計算」 122 ページ も参照してください）

ピーク谷比 (EP/JP)

ピーク谷比（注入結果の **p/v 比**）は、ピーク分離のクオリティを示すために計算されます。欧州薬局方および日本薬局方（EP、JP）で 計算されます。

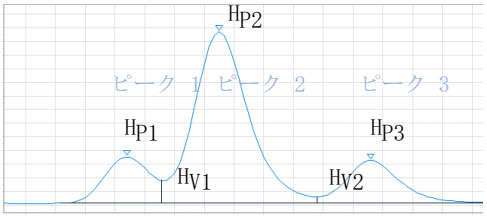
注記

この値は、インテグレータのアドバンスドベースラインピーク分割操作用のスレッショルドとは異なる方法で計算されます。

ピーク谷比は、 谷によって分離されたピークに対して計算されます。

PV = ピーク高さ / 谷高さ

ピークの左右両側に谷がある場合、ピーク谷比はフロントおよびテールに対して計算されます。インテリジェントレポートでは、最小 p/v が表示されます。クラシックレポートでは、クラシック拡張パフォーマンスレポートに両方の値が表示されます。



ピーク 1：

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

ピーク 2：

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

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

ピーク 3：

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

ここで、

PV	ピーク谷比
PV_F	ピーク谷比、フロント
PV_T	ピーク谷比、テール

H_{Px}	ピーク x の高さ
H_{Vx}	谷 x の高さ

ピークに谷によって分離された複数のショルダーがある場合、ショルダーごとにピーク谷比が計算されます。

谷の定義：

- その高さおよび時間が 2 つの連続したピークの間で共有されている。
- そのベースラインが 2 つの連続したピークの間で共有されている。
- ベースラインの絶対高さが 10^{-5}より大きい。

再現性に関する定義

再現性の点から見た分析データの統計的レビューでは、シーケンスは、無数の起こり得る実験結果から取得した小さなランダムサンプルと見なされます。結果全体を吟味するには、無限のサンプル材料と時間が必要になります。厳密に統計的なデータは、完全な自己完結型のデータセットや母集団にのみ当てはまります。そのため、選択されたサンプルが全データを代表していると仮定できることが、そのような処理に対する前提条件になります。

サンプル平均 M

N 回の測定から構成されるランダムサンプルの平均値 M は、次に挙げる式に基づいて、連続カウンタ i をインデックスに持つ、このN のシングル測定値 X_i の限定されたセットから計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

N = 部分測定の回数

X_i = i 個目の部分測定の値

サンプル標準偏差 S

サイズが N であるランダムサンプルがあるとします。大きなデータ母集団から選択された有限のサンプルに対するサンプル標準偏差 S は、次のように決定されます。

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

サンプル標準偏差 S は、全体の母集団に対する標準偏差 s とは次の 2 点で異なります。

- 実際の平均値の代わりに、サンプル平均値 M が使用される
- N の代わりに N-1で 割る

相対標準偏差 RSD[%]（USP）

相対標準偏差は、次のように定義されます。

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

平均値の標準偏差 S

M をサンプル平均値、S をサンプル [または (N-1)] 標準偏差とします。 サンプル平均値 M の標準偏差 S_M は、次のように決定されます。

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

これをさらに例を使って説明すると、次のようになります。

ある化合物のリテンションタイムは、1 つのシーケンスの中で計算された平均値からわずかに外れている可能性があるのに対し、他のシーケンスからのデータは、たとえば周囲の温度が変化したり、時間が経つにつれてカラムの充填剤が劣化したりすることが原因で、さらに大きく異なる可能性があります。この偏差を測定するために、サンプル平均値の標準偏差 S_M を、上記の式に基づいて計算できます。

標準偏差

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

信頼区間 CI

信頼区間は、ある標本についてのみではなく、母集団全体に適用した場合の平均値の推定がどれほど正確であるかを得るために計算されます。

全体平均の 100 x (1 -α) % 信頼区間は、次の式から得られます。

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

変数の意味は次のとおりです。

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

α のリスク確率での t 分布のパーセントα

シーケンスサマリレポートの拡張統計には、95% の信頼区間が使用できます (α = 0.05).

サンプル量が小さい場合は、t 分布 (または「スチューデント分布」) を使用する必要があります。サンプル量が大きい場合は、t 分布および一般分布（ガウス分布）の結果には違いがありません。このため、サンプルが 30 以上の場合、一般分布が代わりに使用されます (数が大きい場合は t 分布の計算はとても困難になるので、 近似値を求めるには一般分布が最適です)。

6 個のサンプルに対する 95% 信頼区間:

1 - α = 0.95

N = 6

5 (N-1) 自由度に対して t 分布表から t の正しい値を取得する必要があり、α/2 の場合は 0.025 になります。これにより、次のような CI の計算式が成り立ちます。

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

相関係数

相関係数は、検量線の図で表示されます。相関係数（r）によって、データポイント間の検量線のフィットが測定できます。ポジティブスロープのある検量線の場合、係数の値は以下の範囲内の小数点以下 5 桁で表されます。

0.00000 ～ 1.00000

変数の意味は次のとおりです。

0.00000 = フィットなし

1.00000 = 完全一致

注記

相関係数は、分析メソッドの良好な精度および真度に直接相関していません。主に最良の検量線タイプを決定するために使用してください。

検量線タイプを評価するときは、十分な統計的関連性を得るために適切なキャリブレーションレベルで作業する必要があります。

相関係数（r）は、次の式を使用して計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

r	相関係数
wt_i	データポイントの重み付け
$\bar{y}$	測定されたレスポンスまたはアマウントの平均値 検量線が原点を強制的に通過する場合（解析メソッドの**［原点］**=**［強制通過］**）、OpenLabChemStationは中心に位置しない決定係数を計算します。この場合、$\bar{y}$ は省略されます。
yi	測定されたレスポンス（面積、面積比（ISTD メソッド）、高さまたは高さ比（ISTD メソッド））、またはアマウント（アマウント、アマウント比（ISTD メソッド））で、キャリブレーションモードによる
$\bar{Y}$	予測されるレスポンスまたはアマウントの平均値
Yi	予測されるレスポンスまたはアマウント（検量線を使用）

$\bar{y}$ および $\bar{Y}$ は測定されたレスポンスまたはアマウントと予測されるレスポンスまたはアマウントの平均値で、以下のように計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

wt_i	データポイントの重み付け
$\bar{y}$	測定されたレスポンスまたはアマウントの平均値
yi	測定されたレスポンス（面積、面積比（ISTD メソッド）、高さまたは高さ比（ISTD メソッド））、またはアマウント（アマウント、アマウント比（ISTD メソッド））で、キャリブレーションモードによる

および

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

変数の意味は次のとおりです。

wt_i	データポイントの重み付け
$\bar{Y}$	予測されるレスポンスまたはアマウントの平均値
Yi	予測されるレスポンスまたはアマウント（検量線を使用）

［原点強制通過］ では、ポイントはゼロを中心に分布している（第三象限に反転している）と見なされ、平均値はゼロで置き換えられます。

相関係数は、完全にフィットしている場合、またはポイントが検量線に沿って対称的に分布している場合には 1 になります。キャリブレーションポイントの分布の対称性が低下すると、相関係数は小さくなります。通常は 0.99 から 1 までの値をとります。相関係数は、検量線品質の指標としてはあまり高感度ではありません。

内部保持されている倍精度数へのアクセス

バリデーションの目的で、検量線、相関係数、理論段数などの ChemStation から得られる結果をマニュアルで再計算する必要がある場合があります。これを行うには、ChemStation で使用される数の書式を考慮する必要があります。

ChemStation 内部に保存されているすべての数は、「C」のデータタイプである DOUBLE が使用されます。これは、扱う数ごとに、14 桁の有効数字が保存されている計算になります。このデータタイプの実装は、「C」のデータタイプおよび関連する端数計算ルールに関する IEEE 標準を Microsoft が実装したものに従っています (Microsoft の文書 Q42980、Q145889 および Q125056 を参照してください)。

キャリブレーションテーブルの計算に使用可能なパラメータの数に制限がないため、丸め誤差の増殖と蓄積により発生する恐れのあるエラーを正確に計算することは不可能です。一方、異なる検量線の構成で完全なテストを行うと、最高 10 桁の精度が保証されます。クロマトグラフ分析における面積、高さ、およびリテンションタイムの再現性は、通常 3 桁の有効数字で表されるので、計算においては、10 桁の有効数字があれば十分です。この理由から、キャリブレーションおよびその他のテーブルは、最高 10 桁の有効数字を表示します。

バリデーションのために外部 (マニュアル) 計算をする必要がある場合、内部計算に使用されるすべての桁を使用することをお勧めします。表示されたデータまたは端数を切り捨てたデータ (あるいはその両方) を外部計算に使用すると、丸め誤差のため、ChemStation が生成した結果とは異なる恐れがあります。

次の段落では、一般的にマニュアル計算で必要とされる、内部に保存されている数字のすべての桁にアクセスする方法を説明します。すべての場合において、一覧表示されたコマンドを実行する前に、適切なレポートスタイルを持つデータファイルを 1 つ読み込みレポートする必要があります。すべてのコマンドは、ChemStation のビューメニューからコマンドラインに入力できます。

以下の例では、パブリックの機器フォルダー（C:¥Users¥Public¥Documents¥ChemStation¥1 など）にファイル .TXT を作成しています。実際のパスを取得するには、コマンドラインエントリ print _instpath$ を使用してください。必要に応じて他のファイル名とフォルダー名を使用してください。このファイルの情報は、メモ帳または適切なテキストエディタを使用して表示できます。

生のピーク情報:

- リテンションタイム
- 面積
- 高さ
- 幅（インテグレータ）
- 対称度
- ピーク開始時間
- ピーク終了時間

コマンドラインに次のように入力します。

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

処理されたピーク情報:

- 測定されたリテンションタイム
- 予測リテンションタイム
- 面積
- 高さ
- 幅（インテグレータ）
- 対称度
- 半値幅 - ピーク高さの半分（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- テーリングファクタ（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- 選択性（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- K`（拡張パフォーマンス）
- タンジェント法のピーク幅（拡張パフォーマンス）
- 歪み（拡張パフォーマンス）
- 理論段数- 半値幅（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- 理論段数 - タンジェント（拡張パフォーマンス）
- 理論段数 - 5-シグマ（拡張パフォーマンス）
- 理論段数 - 統計（拡張パフォーマンス）
- 分離度- 半値幅（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- 分離度 - タンジェント（拡張パフォーマンス）

- 分解能 - 5-シグマ（拡張パフォーマンス）
- 分離度 - 統計（拡張パフォーマンス）

コマンドラインに次のように入力します。

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

処理された化合物情報:

- 計算されたアマウント

コマンドラインに次のように入力します。

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

キャリブレーションテーブル情報:

- レベル番号
- アマウント
- 面積
- 高さ

コマンドラインに次のように入力します。

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

直線回帰情報:

- Y-切片（CurveParm1）
- スロープ（CurveParm2）
- 相関係数

コマンドラインに次のように入力します。

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

6 CE 固有の計算

キャリブレーションテーブル 140
標準キャリブレーション 140
タンパク質分子量キャリブレーション 141
DNA 塩基対キャリブレーション 141
キャピラリ等電点電気泳動 142
移動度補正を使用したキャリブレーション 143
はじめに 143
実効移動度計算 144
相対移動度計算 147
キャピラリー電気泳動用の特別なレポートスタイル 149
補正済みピーク面積 150
キャピラリー電気泳動用のシステムスータビリティ 151
容量ファクタ k' 151
CE-MSD 152
バックグラウンド減算 152

この章は、ChemStation を使用して CE 機器をコントロールする場合にのみ関連する内容です。

キャリブレーションテーブル

キャリブレーションテーブルのドロップダウンリストには、4 つの異なるキャリブレーションタイプが用意されています。

標準キャリブレーション

標準キャリブレーションは、ピーク面積またはピーク高さに基づいています。**［標準キャリブレーション］**を選択すると、**［シグナルを別々に計算］**または**［補正さた面積和**のオプションが使用できます。

Norm% レポートの計算で、別々にレポートされたシグナルのアマウントパーセントが、各シグナルに対して合計 100% になるようにしたい場合は、［シグナルを別々に計算］を選択します。 **［シグナルを別々に計算］**が選択されていない場合、すべてのシグナルのアマウントパーセントの合計が 100% になります。 **［シグナルを別々に計算］**を選択することは、キャリブレーションテーブル内のシグナルでソートするための必須条件です。

［補正された面積で計算］を選択して、マイグレーションタイムに基づいたピーク面積の補正を行います。このモードでは、面積はマイグレーションタイムで分割されます。これにより、マイグレーションタイムが不安定な場合の定量分析での再現性を改善できます。

標準キャリブレーションに加え、シグナルのマイグレーションタイムをベースとしたキャピラリー電気泳動に特有のキャリブレーションが 3 つあります。 シグナルは、キャリブレーションメソッドのシグナル説明によって定義されます。 データファイルに複数のシグナルが含まれる場合、1 つのシグナルのみ選択され、データファイルから抽出されます。キャリブレーションテーブルの形式は選択されたキャリブレーションのタイプに依存します。

定量タスクは、SDS -タンパク質用バイオポリマーサイズキャリブレーション (ファーガソンプロット) に基づいて実行されます。

タンパク質分子量キャリブレーション

[タンパク質分子量キャリブレーション] は、分子量とリファレンスピークが既知の成分を含むキャリブレーション標準を必要とします。キャリブレーションの式:

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

変数の意味は次のとおりです。

MW は分子量

$\mathbf{t}_{ref}$ はリファレンスピークのマイグレーションタイム

t はマイグレーションタイム

$\mathbf{k}_0$ と $\mathbf{k}_1$ は、一次方程式の係数

キャリブレーションテーブルには、各成分の名前、マイグレーションタイム、$\mathbf{t}_{ref}$**/t** (相対マイグレーションタイム)、分子量、および**log(MW)** が含まれます。

DNA 塩基対キャリブレーション

[DNA 塩基対キャリブレーション] は、**[タンパク質分子量キャリブレーション]** に似ていますが、リファレンスピークなしで動作します。このキャリブレーションには、既知数の塩基対を含むキャリブレーション標準が必要です。キャリブレーションの式:

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

変数の意味は次のとおりです。

#BP は塩基の数

t はマイグレーションタイム

k_0 および k_1 は一次方程式の係数

キャリブレーションテーブルには、各成分の名前、マイグレーションタイム、**1/t**、塩基対、および **log(塩基対)** が含まれます。

キャピラリ等電点電気泳動

[キャピラリ等電収束キャリブレーション] (cIEF) には、既知等電点 (pI) の標準タンパク質を含むキャリブレーション標準が必要です。キャリブレーションの式:

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

変数の意味は次のとおりです。

pI は等電点

t はマイグレーションタイム

k_0 および k_1 は一次方程式の係数

キャリブレーションテーブルには、各成分の名前、マイグレーションタイム、**pI** (等電点) が含まれます。

移動度補正を使用したキャリブレーション

はじめに

バッファ組成、分析温度や粘度のほか、キャピラリー壁への吸着のわずかな変動も、電気浸透流（EOF）に影響を及ぼし、不安定にさせる原因となります。その結果、EOF が変化し、かなり大きなマイグレーションタイムの標準偏差が生じます。移動度リファレンスピークのマイグレーションタイムをモニタリングすることで、移動度の補正をすることにより、分析毎でのマイグレーションタイムシフトを著しく低減させることができます。そしてマイグレーションタイム再現性を著しく向上させることができます。

以下の優先順位で、移動度リファレンスピークを選ばなければなりません。

- 一番高いシグナルでピークを選択します
- 最も分離されたピークを選択します
- 移動度リファレンスピークとして、EOF マーカーまたは内部標準も使用できます
- 検索ウィンドウを拡大して、移動度リファレンスピークを常に探します
- 検索ウィンドウでいくつかのピークが降下すると、最も高いシグナルを持つピークが、移動度リファレンスピークとして自動的に選ばれます。

2 つの移動度補正タイプが使用可能です。

実効移動度補正

［実効移動度補正］は、すべてのピークの実効移動度を使用し、エレクトロフェログラムと一緒に電圧傾斜データを使用できるようにする必要があります。さらに、実効移動度補正で作業すると、すべてのサンプルコンポーネントの実際の実効的移動度を測定できます。

相対移動度補正

［相対移動度補正］は、電圧データがない状態で操作でき、すべての測定に対して一定電圧であると仮定します。

実効移動度計算

リファレンスピークに加えて、実効移動度を修正するには EOF の速度に対応する中性 (非イオン性) マーカーが含まれることが必要です。一般的に使用されるマーカーとその関連波長は次のとおりです。

表 10　一般的に使用される EOF マーカー

化合物	波長
1- プロパノール	210nm
アセトン	330nm
アセトニトリル	190nm
ベンゼン	280nm
グアノシン	252nm
メシチルオキシド	253nm
メタノール	205nm
フェノール	218nm
ピリジン	315nm
テトラヒドロフラン	212nm
ウラシル	259nm

時間経過ごとの電圧データおよびキャピラリサイズは、データファイルに保存される、または手動でキャリブレーションテーブルセットアップ時に入力できます。動作時の電圧データを保存することがもっとも正確です。メソッドとともにキャピラリサイズも必ず保存するようにしてください。電圧データ/キャピラリサイズなしで取り込まれているシグナルを再解析するには、ダイアログボックスの［電圧およびキャピラリサイズ］グループに、電圧およびランプ時間を手動で入力します。

データから各化合物の実効移動度が決定されます。

全般

サンプルピークの見掛け移動度を定義する式:

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

変数の意味は次のとおりです。

l はキャピラリーの有効長さ (注入位置から検出位置までの長さ)

L は キャピラリーの全長

V(t) は、時間 0 からピークのマイグレーションタイム t までの平均電圧

平均電圧は、測定された電圧またはメソッド内で指定された電圧ランプから次の式を使用して計算されます。

t < t_R の場合

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

t > t_R の場合

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

変数の意味は次のとおりです。

t はピークのマイグレーションタイム

t_R はランプ時間

V は終了電圧

移動度の計算は、次の係数を導入することで簡素化できます。

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

相対または見掛け移動度は

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

実効または実際の移動度は

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

変数の意味は次のとおりです。

$\propto_{app}$ は、すべてのピークの見掛け移動度です。

$\propto_{EOF}$ は、中性 (非イオン性) マーカーの見掛け移動度です

EOF (通常、陰イオン) よりも低い速度のコンポーネントは、実効移動度が負の値になります。

キャリブレーション

今後の測定において移動度リファレンスピークとして使用されるサンプルピークの実際の移動度は、中性マーカーのマイグレーションタイムを使用して計算されます (**μ**EOF)。

$$\mu_{\mathrm{real}ref} = \mu_{appref} - \mu_{EOF} = k(t_{ref})/t_{ref} - k(t_{EOF})/t_{EOF}$$

すべてのピークの実効移動度は、予期される移動度として計算され保存されます。

$$\mu_{\mathrm{real}N} = \mu_{appN} - \mu_{EOF} = k(t_N)/t_N - k(t_{EOF})/t_{EOF}$$

キャリブレーション テーブルは、予想マイグレーションタイムおよび予想移動度のそれぞれの列に、各化合物の測定したマイグレーションタイムおよび計算された実移動度を含んでいます。

移動度計算

μEOF の実測値は、移動度リファレンスピークを使用して計算されます。

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

各ピーク用の予想マイグレーションタイムは、その後調整されます。

$$t_{new\exp N} = k(t_{old\exp N})/(\mu_{\mathrm{real}N} + \mu_{EOFact})$$

計算値は、ピーク同定に使用され、キャリブレーションテーブル内の値に置き換わります。

リキャリブレーション

移動度リファレンスピークのマイグレーションタイムを使用して、**μ**EOF の実測値を計算します。

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

各ピークの予想マイグレーションタイムは、その後調整されます。

$$t_{new\exp N} = k(t_{old\exp N})/(\mu_{\mathrm{real}N} + \mu_{EOFact})$$

さらに、移動度が更新されます。

$$\mu_{\mathrm{real}N} = \mu_{appN} - \mu_{EOFact}$$

キャリブレーションランの間、マイグレーションタイムの予想値および実移動度値は、キャリブレーションテーブル内で更新されます。

相対移動度計算

相対移動度に基づくマイグレーションタイム補正も実行可能です。この場合、EOF マーカー、電圧、またはキャピラリサイズのいずれも必要ではありません。ソフトウェアは、マイグレーションタイムシフトを補正しますが移動度値は表示しません。

一般

実効的移動度の計算と同じ、係数

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

移動度とマイグレーションタイムの関係を説明するために相対移動度計算の中で使用されます。

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

違っている点は、相対移動度の計算式では、k が分数の分子および分母の両方に現れるという点です。このため、キャピラリサイズは必要なくなります。k ファクターは、次のように計算されます。

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

ここで、**V(t)** は 0 タイムからピークのマイグレーションタイムまでの平均電圧

電圧パラメータを **[無視する]** に設定すると、**k** は定数で予想マイグレーションタイムの計算式から除外できます (以下を参照)。

以下の計算式は、**k = k(t)** の一般的なケースを表しますが、ソフトウェアは **k** を計算する際はすべてのケースを考慮します。

キャリブレーション

移動度リファレンスピークが特定され、そのマイグレーションタイム ($\mathbf{t}_{refcal}$) が保存されます。 その他のピークのすべての予想マイグレーションタイム ($\mathbf{t}_{expcalN}$) が保存されます。

移動度計算

リファレンスピークを検出すると、各ピークの予想マイグレーションタイムが、移動度リファレンスピークの実際のマイグレーションタイムに従って調整されます。

$$t_{new\,\mathrm{exp}N} = \frac{k(t_{old\,\mathrm{exp}N})}{(k(t_{\mathrm{exp}calN})/t_{\mathrm{exp}calN} - k(t_{refcal})/t_{refcal} + k(t_{refact})/t_{refact})}$$

その後、前回のキャリブレーションランからのリファレンスピークのマイグレーションタイムが更新されます。

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

キャピラリー電気泳動用の特別なレポートスタイル

注記

CE 固有の計算は **クラシック ChemStation レポート** でのみレポートできます。

以下のレポートスタイルは、CE システム用の ChemStation 固有のものです。

CE の移動度

CE の移動度には、定量テキストの結果 (特に、見かけの移動度) が含まれます。このレポートスタイルを使用するには、取込前に使用するキャピラリに関する情報を入力し、電圧シグナルを保存する必要があります。見かけの移動度は、以下の式を使用して計算します。

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

変数の意味は次のとおりです。

lは有効長キャピラリ (cm)

L は全キャピラリ長 (cm)

tはマイグレーションタイム (min)

V は電圧 (kV)

実効的移動度補正 (「実効移動度計算」 144 ページを参照) が有効化されると、簡単なレポート (たとえば、外部標準レポート) の列でピークタイプの列は移動度の列に置き換わります。CE 移動度レポートには、見かけの移動度の代わりに実効的移動度がプリントされます。

補正済みピーク面積

CE システム用の Agilent ChemStation では、標準面積計算の代わりに補正済みピーク面積を使用できます。これらの面積は、標準キャリブレーションおよびレポートに用いられます。

この機能を有効にするには、**[補正済み面積を用いた計算]** を選択して、マイグレーションタイムに基づいたピーク面積の補正を行います。このモードでは、面積はマイグレーションタイムで分割されます。これにより、マイグレーションタイムが不安定な場合の定量分析での再現性を改善できます。

補正済み面積は、以下の式を使用して計算します。

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

変数の意味は次のとおりです。

Ac は補正済みピーク面積 (mAU)

A はピーク面積 (mAU·sec)

t はマイグレーションタイム (min)

この補正済み面積は、標準化済み面積とも呼ばれることがあります。

キャピラリー電気泳動用のシステムスータビリティ

容量ファクタ k'

キャピラリー電気泳動では容量ファクタ k' の値は、すべての操作モードで自動計算できません。 個々の式については、マニュアル『**High Performance Capillary Electrophoresis**: A Primer』を参照してください。CE システム用 Agilent ChemStation は、LC 3D システム用 Agilent ChemStation と同じアルゴリズムを使用するので、レポートにリストされている値は、LC 3D システム用 Agilent ChemStation でのみ有効です。

CE-MSD

バックグラウンド減算

［バックグラウンド減算］（BSB）メニュー項目を選択すると、最後に選択したマススペクトルが、現在のエレクトロフェログラム内の各ポイントから減算されます。結果データは、元のデータファイルと同じディレクトリ内に同じ名前で保存されますが、ファイル名拡張子だけ .BSB に変更されます。

新しいデータファイルが現在のデータファイルになり、バックグランド減算されたエレクトロフェログラムが表示されます。実行したバックグランド減算数の記録は、データファイルヘッダの Operator (演算子) 項目に保存されます。

BSB データを表形式で表示すると、データ表示の精度に起因する違いが表れることがあります。

注記

LC/MS のヘルプテキストファイルには、LC パラメータのみ記載されています。CE のパラメータはありません。LC/MS ソフトウェアで使える機能のなかには、CE/MS アプリケーションでは使用できないまたは適用できないが LC では使用されるものがあります。**ピークマッチング**の機能は、CE-MS では適用できないため、有効になっていません。CE-MS では、UV 検出と MS 検出は分離キャピラリの異なる有効長で発生します。有効長が異なると分離度も異なるため、ピークマッチングは行えません。

7 システム ベリフィケーション

ベリフィケーションおよび診断ビュー　154
システム ベリフィケーション　154
GLPsave レジスタ　157
DAD テスト機能　159
DAD テストレビュー機能　159

本章では、ベリフィケーション機能および ChemStation の GLP ベリフィケーションの特徴について説明します。

ベリフィケーションおよび診断ビュー

設定した機器でサポートされている場合は、ChemStation は機器のベリフィケーションおよび診断タスクを実行するビューを、追加で 2 つ用意しています。詳細については、オンラインヘルプシステムを参照してください。

システム ベリフィケーション

システムベリフィケーションは、規制されたラボにおいて分析装置を定期的に使用する場合に、重要な要素となります。ChemStation の GLP ベリフィケーション機能は、ソフトウェアまたはソフトウェアの関連コンポーネントが正しく機能しているか、または特定の分析時に正しく機能していたかを容易に証明できるように設計されています。

ChemStation のベリフィケーション機能によって、ChemStation ソフトウェアが正しく動作しているかが検証ができます。これは、特定のメソッドに従ってデータファイルを再解析して、その結果と定義済の基準との比較を実行します。ベリフィケーション機能は、積分と定量の結果の完全性を保証するのに、特に重要です。

分析メソッドが使用するアルゴリズムソフトウェアの組み合わせをチェックするのに、標準ベリフィケーションテストを使用するか、別のメソッドとデータファイルを使用して独自のテストを定義できます。ベリフィケーションテストは保護されたファイルなので、変更や削除はできません。

［データ解析］ビュー内のベリフィケーションアイテムでは、次に挙げるオプションから任意のものを選択できます。

- データベース内でベリフィケーションテストを実行
- 新しいベリフィケーションテストを定義し、データベースに追加
- データベースからベリフィケーションテストを削除

オンラインヘルプシステムに、以上のタスクを実行する方法が説明してあります。ChemStation ベリフィケーションテストを実行するには、テスト全体の実行か部分を組み合わせて実行するかを選べます。

ベリフィケーションテスト結果は、バイナリ形式でデフォルトサブディレクトリ：C:¥Users¥Public¥Documents¥ChemStation¥1¥Verify に、メソッドおよびデータファイルと一緒に保存されます。ベリフィケーション用のサブディレクトリは、シーケンス、メソッド、およびデータのサブディレクトリと同じレベルにあります。結果は、プリンタまたはファイルに出力することができます。

総合的なベリフィケーションテスト結果を含めたテスト結果は、合格または不合格と評価されます。

次に挙げるベリフィケーションテストコンポーネントが使用できます。

デジタルエレクトロニクス (Agilent 1100/1200 シリーズ DAD のみ)

テストクロマトグラムがダイオードアレイ検出器の中に保存されます。このクロマトグラムは、フォトダイオードアレイからの一般生データと同じ事前解析ステップを経た後、ChemStation に送られます。結果データは、このテストクロマトグラムのために ChemStation 内部に保存された元の結果データと比較されます。一致しない箇所があると、テストが失敗します。このテストにより、データ処理を行う DAD エレクトロニクスも正しく機能していることが保証されます。保存されたテストクロマトグラムが使用されるので、ランプまたはダイオードアレイは、このテストに含まれません。それらは、「DAD テスト機能」 159 ページを使用してチェックできます。

ピーク積分

データファイルは、オリジナルメソッドを使用して再度積分されます。その結果は、ベリフィケーションレジスタに保存されている元の積分結果と比較されます。一致しないと、テストが失敗します。

化合物定量

データファイル内の化合物は再度定量されます。その結果は、ベリフィケーションレジスタに保存されている元の定量結果と比較されます。一致しないと、テストが失敗します。

レポート印刷

元のレポートが再度印刷されます。

次のページは、正常に完了したベリフィケーションテストの例です。

```
================================================================
        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
```

GLPsave レジスタ

GLP セーブレジスタは、ランタイムチェックリストの中で選択された場合、各分析の最後に保存されます。レジスタには、以下の情報が含まれています。

- シグナル
- ログブック
- 積分結果テーブル
- 定量結果テーブル
- 機器パフォーマンスデータ
- データ解析メソッド

このレジスタは、分析時に生成される、完全に保護されたレコードです。将来、好きな時に、分析メソッドの証拠として呼び出すことができます。

[データ解析] ビューの [GLP セーブレジスタ] オプションからは、いつでも GLP セーブレジスタファイルをレビューすることができます。ファイルはチェックサムで保護され、バイナリにエンコードされるので、確実に変更できないようになります。

GLP セーブレジスタをレビューに選択するのに使用するダイアログ ボックスで、レビューオプションを次のうちから選択できます。

- オリジナルメソッドの読み込み
- オリジナルシグナルの読み込み
- 機器パフォーマンスデータの読み込み
- オリジナルメソッドの印刷
- オリジナル積分結果の印刷
- オリジナル定量結果の印刷
- オリジナルのメソッドとシグナルから、オリジナルのレポートを生成

GLP レビューファンクションを使用して、オリジナルのクロマトグラフデータを表示でき、機器パフォーマンスデータからの解析の質を保証でき、データ解釈の信頼性を立証できます。

たとえば、次のことができます。

- サンプル解析時に使用するメソッドのデータ解析部分を再読み込みして再印刷し、解決の結果として表示されたデータ解析がいかなる方法でも変更されていないことを保証します。
- 再計算せずに、積分と定量の結果をレビューして、レポートの信頼性を保証します。

DAD テスト機能

検出器テストは、規制されたラボにおける分析装置の定期的なシステムバリデーションにおける一手順として使用できます。

DAD テストは、ご使用のダイオードアレイ検出器のパフォーマンスを評価します。[機器] メニューから DAD テストを選択すると (LC3D および CE のみ可能)、機器の強度および波長キャリブレーションがチェックされます。[保存] を押すと、デフォルトの機器ディレクトリにある DADTest データベース、つまり DADTest.Reg と呼ばれるレジスタファイルにテスト結果が自動的に保存されます。

DAD テストレビュー機能

［データ解析画面］メニューの **［DAD テストレビュー］**機能により、いつでも DADTest.Reg ファイルをレビューすることができます。 ファイルはチェックサムで保護され、バイナリにエンコードされるので、容易に変更できないようになります。

レビューには、次の DAD テストを選択できます。

ホルミウムスペクトルの表示 DAD テストレビューテーブルに一覧表示されているすべてのホルミウムスペクトルをプロットします。 アクティブなスペクトルにはタグが付けられます。

強度スペクトルの表示 DAD テストレビューテーブルに一覧表示されているすべての強度スペクトルをプロットします。 アクティブなスペクトルにはタグが付けられます。

新しいデータベースとして保存 DAD のランプを交換する場合、テーブルから不必要なテスト結果を削除し、この機能を使用して新しいデータベースとして保存することにより、DADTest をリセットできます。

選択されたスペクトルの表示 テーブル内で選択したスペクトルのみ表示します。

強度グラフの表示 強度グラフをプロットし、ダイオードアレイ検出器内のランプの寿命を表示することができます。 このグラフは、時間に対するランプの最大強度の示しています。

本書の内容

本書は、Agilent OpenLab ChemStation で使用している、操作、計算、およびデータ解析のアルゴリズムの原理に関する情報について説明します。

本書に記載されている情報を使用して、バリデーション担当者はシステムのバリデーションタスクを計画および実行することができます。

www.agilent.com

© Agilent Technologies Inc. 2010-2025

エディション : 2025 年 2 月

文書番号: D0013749ja Rev. A.1

Agilent