



Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition

操作原理

注意

マニュアル番号

M8301-96029 リビジョン C
エディション 04/2019

Printed in Germany

著作権

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2019

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

このガイドは、Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition のリビジョン C.01.10 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 CDS ChemStation Edition を検証する担当者向けに用意されています。Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition 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。

- OpenLab CDS ChemStation Edition のコンセプト、新しい機能、およびワークフロー:
『OpenLab CDS ChemStation Edition コンセプトとワークフロー』
- コンテキスト固有のタスク情報 (「方法」)、チュートリアル、ユーザーインターフェイスへの参考事項および
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
- 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:
『Agilent OpenLab CDS ワークステーションインストールガイド』
- システム管理の原則とタスクの詳細:
『Agilent OpenLab CDS 管理ガイド』

1 データ取り込み

本章では、データ取り込み、データファイル、ログブックなどのコンセプトについて説明します。

2 積分

本章では、ChemStation インテグレートアルゴリズムの積分コンセプトについて説明します。積分アルゴリズム、積分、およびマニュアル積分について説明します。

3 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。

4 キャリブレーション

この章では、ChemStation ソフトウェアのキャリブレーションの原則について説明します。

5 定量

この章では、ChemStation で定量を行う方法について説明します。面積% および高さ% の計算、ESTD 計算、norm% 計算、ISTD 計算、および同定されていないピークの定量に関する詳細を説明します。

6 システムスータビリティの評価

この章では、サンプル分析に使用する前の分析機器および定期的に使用する前の分析メソッド両方のパフォーマンスを評価するため、および分析システムが定期的な分析に使用される前および分析の実行中にパフォーマンスをチェックするために、ChemStation で実行可能な内容について説明します。

7 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。

8 データレビュー、再解析、バッチレビュー

本章では、データレビューおよびシーケンスデータの再解析方法について説明します。さらに、バッチレビュー、バッチコンフィグレーション、レビュー機能、バッチレポートのコンセプトを説明します。

9 レポート

OpenLab CDS ChemStation Edition には、2つのレポートタイプがあります。クラシック ChemStation レポート（ChemStation B バージョンと同様）か新しいインテリジェントレポートを選択できます。このトピックでは、インテリジェントレポート機能で使用する ACAML スキームについて説明します。

10 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 データ取り込み 8
 - データ取り込みとは 9
 - ステータス情報 12
- 2 積分 15
 - 積分とは 16
 - ChemStation の積分アルゴリズム 18
 - 動作原理 24
 - ピーク認識 25
 - ベースライン割り当て 32
 - ピーク面積の測定 48
 - 積分イベント 51
 - マニュアル積分 59
- 3 ピーク同定 62
 - ピーク同定とは 63
 - ピークマッチングルール 64
 - ピーク同定のタイプ 65
 - 絶対リテンション/マイグレーションタイム 67
 - 補正済みリテンション/マイグレーションタイム 69
 - ピーククオリファイア 71
 - 同定プロセス 74
- 4 キャリブレーション 76
 - 検量線 77
 - グループキャリブレーション 79
 - リキャリブレーションオプション 80

5	定量	81
	定量とは	82
	定量計算	83
	補正係数	84
	面積%および高さ%	86
	キャリブレーションされた計算の手順	87
	ESTD 計算	88
	norm% 計算	90
	ISTD 計算	91
	キャリブレーションされていないピークの定量	94
6	システムスーナビリティの評価	96
	システムスーナビリティの評価	98
	ノイズ測定	101
	ピークのテーリングファクターと対称度の計算	110
	システムスーナビリティの式および計算	112
	一般定義	113
	パフォーマンステストの定義	114
	再現性に関する定義	125
	内部保持されている倍精度数へのアクセス	133
7	CE 固有の計算	136
	キャリブレーションテーブル	137
	移動度補正を使用したキャリブレーション	140
	キャピラリー電気泳動用の特別なレポートスタイル	146
	補正済みピーク面積	147
	キャピラリー電気泳動用のシステムスーナビリティ	148
	CE-MSD	149
8	データレビュー、再解析、バッチレビュー	150
	データ解析におけるナビゲーションテーブル	151
	バッチレビューとは	157
	ECM を用いた ChemStation 使用時における バッチレビュー機能の有効化	158

	バッチ設定	159
	レビュー機能	162
	バッチレポート	164
9	レポート	165
	ACAML とは	166
	ACAML スキーマ	167
	ChemStation で薬局方に関連するファクタをレポート	168
10	システムベリフィケーション	171
	ベリフィケーションおよび診断ビュー	172
	GLP セーブレジスタ	175
	DAD テスト機能	177

1

データ取り込み

データ取り込みとは 9

データファイル 9

オンラインモニタ 11

ログブック 11

ステータス情報 12

ChemStation ステータス 12

ステータスバー 12

システムダイアグラム 13

本章では、データ取り込み、データファイル、ログブックなどのコンセプトについて説明します。

データ取り込みとは

データ取り込み中、分析機器によって取り込まれたすべてのシグナルは、検出器内でアナログシグナルからデジタルシグナルに変換されます。デジタルシグナルは ChemStation に電子的に転送され、シグナルデータファイルに保存されます。

データファイル

データファイル是一群のファイルからなっており、デフォルトではデータファイル名と拡張子 .D を持つサブディレクトリとして、データディレクトリまたはそのサブディレクトリに保存されます。データファイル名は、拡張子を含めて最大 42 文字までで、マニュアルで定義できます。ディレクトリの各ファイルは命名規則に従います（コンセプトとワークフローガイドのファイルの命名規則を参照してください）。データディレクトリの追加は、**【プレファレンス】** 設定からできます。

表 1 データファイル

名前	説明
*.CH	クロマトグラフ/電気泳動シグナルデータファイルです。ファイル名は、モジュールまたは検出器のタイプ、モジュール番号およびシグナルまたはチャンネルの識別子から構成されます。たとえば、ADC1A.CH の場合、ADC はモジュールタイプ、1 はモジュール番号、A はシグナル識別子、.CH はクロマトグラフを表す拡張子です。
*.UV	UV スペクトルデータファイルです。ファイル名は、検出器タイプとデバイス番号から構成されます（ダイオードアレイおよび蛍光検出器の場合のみ）。
*.ms	LCMS スペクトルデータファイルです。
REPORT.TXT, REPORT.PDF	シグナルデータファイルと同等のレポートデータファイルです。 注：PDF で一意のファイル名を使用する場合、PDF ファイル名は異なる可能性があります。

表 1 データファイル

名前	説明
Acq.MACAML	このファイルには、データ取り込み中に使用したメソッドの情報が含まれます。情報は ACAML フォーマットで保存されます。ACAML ファイルは、インテリジェントレポートで使用されます。
Sequence.ACAML_	このファイルには、シングル注入結果が含まれます。情報は ACAML フォーマットで保存されます。ACAML ファイルは、インテリジェントレポートで使用されます。
SAMPLE.MAC または SAMPLE.XML	サンプル値が保存されるファイルです。
SAMPLE.MAC.BAK または SAMPLE.XML.BAK	オリジナルの sample.mac のバックアップです。サンプルパラメータ（倍率など）が最初に更新された際、再解析中に .bak ファイルが作成されます。このファイルには、取り込みに使用されたオリジナルのサンプル値が保存されています。
RUN.LOG	分析中に作成されたログブックエントリです。ログブックは、分析の記録を保持します。すべてのエラーメッセージと、ChemStation の重要なステータス変更は、ログブックに記録されます。
LCDIAG.REG	LC の場合のみです。機器カーブ（グラジエント、温度、圧力など）、注入量および溶媒の説明が含まれます。
ACQRES.REG	カラム情報が含まれます。GC の場合には、注入量も保存されます。
GLPSAVE.REG	〔GLP データの保存〕を指定した場合のデータファイルの一部です。
M_INTEV.REG	マニュアル積分イベントが含まれます。

オンラインモニタ

2種類のオンラインモニタ、オンラインシグナルモニタとオンラインスペクトルモニタがあります。詳細は、『OpenLab CDS ChemStation Edition コンセプトとワークフロー』ガイドを参照してください。

ログブック

ログブックには、分析システムによって作成されたメッセージが表示されます。これらのメッセージは、モジュールからのエラーメッセージ、システムメッセージまたはイベントメッセージです。メッセージが表示されたかどうかに関わらず、これらのイベントはログブックに記録されます。

ステータス情報

ChemStation ステータス

[ChemStation ステータス] ウィンドウには、ChemStation ソフトウェアの全体的なステータスが表示されます。

シングル分析の実行中には、次のようになります。

- [ChemStationステータス] ウィンドウの最初の行には、実行中の分析が表示されます。
- ステータスウィンドウの2行目には、現在のメソッドのステータスが表示されます。
- 3行目には、分析時間（分単位）と生データのファイル名が表示されます (GC 機器の場合、フロントおよびバックインジェクタのファイルも表示されます)。

[機器ステータス] ウィンドウには、機器モジュールと検出器についてのステータス情報が表示されます。このウィンドウには、各コンポーネントのステータスと、必要に応じて圧力、グラジエント、流量データなどの現在の状態が表示されます。

ステータスバー

ChemStation のグラフィカルユーザーインターフェイスは、ChemStation の [メソッド&ランコントロール] ビューのツールバーとステータスバーから構成されています。ステータスバーは、システムステータスフィールドと、現在読み込まれているメソッドおよびシーケンスに関する情報からなっています。メソッドやシーケンスを読み込んだ後で修正すると、機器に応じて、黄色のアスタリスクまたは歯車のマークが付きます。黄色の EMF 記号は、LC 消耗品（ランプなど）の使用期限が設定値を超えたことを示しています。

システムダイアグラム

設定した分析機器でサポートされている場合（Agilent 1200 Infinity LC シリーズモジュール、またはIntuvo 9000 GC システムなど）、ChemStation システムでグラフィカルなシステムダイアグラムを表示できます。これにより、システムのステータスを一目でチェックできます。ダイアグラムを有効にするには、**【メソッド & ランコントロール】** ビューの **【表示】** メニューから **【システムダイアグラム】** を選択します。これは、ChemStation システムをグラフィカルに表現したものです。以下に示すカラーコードによって、現在のステータスが表示されます。



図 1 システムダイアグラム、GC の例

表2 モジュールまたは機器のステータスを示す色

色	ステータス
灰色	オフライン
緑色	待機
オレンジ	ノットレディ
赤色	エラー
シアン	スタンバイ（ランプ消灯など）
紫色	プレラン、ポストラン
マゼンダ	注入中
青色	分析中またはポストラン

また、実際のパラメータ設定のリストを表示することもできます。ステータスの概要のほかに、ダイアグラムからシステムコンポーネントごとのパラメータ設定のダイアログボックスに素早くアクセスできます。

システムダイアグラムの詳細は、オンラインヘルプの機器パートを参照してください。

積分とは	16
ChemStation の積分アルゴリズム	18
用語の定義	19
初期ベースラインの定義	20
ベースラインの追跡	20
ベースラインの割り当て	21
ピークの主要なポイントの認識	22
動作原理	24
ピーク認識	25
ピーク幅	25
ピーク認識フィルタ	26
バンチング	27
ピーク認識アルゴリズム	28
マージピーク	30
ショルダー	31
ベースライン割り当て	32
デフォルトのベースラインの設定	32
ベースラインの開始	33
ベースラインの終了	33
ベースラインの落ち込み	33
ピーク/谷比	35
タンジェントスキムモード	38
割り当てられないピーク	45
ピーク分離コード	46
ピーク面積の測定	48
面積の決定	49
単位と変換ファクタ	50
積分イベント	51
全てのシグナルの積分イベント	51
初期イベント	51
タイムイベント	55
自動積分	57
マニュアル積分	59
マニュアル積分イベントの保存	60

本章では、ChemStation インテグレータアルゴリズムの積分コンセプトについて説明します。積分アルゴリズム、積分、およびマニュアル積分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

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**」 51 ページを参照してください。

用語の定義

主要なポイント

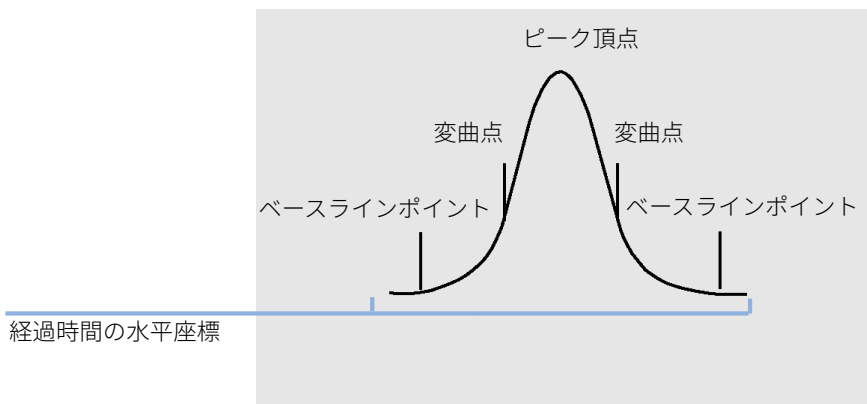


図2 主要なポイント

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。

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。

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の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。

- ・ $+ \text{アップスロープ} + \text{曲率} + \text{ベースラインバイアス}$ は、スレッショルドレベルより小さい必要があります。
- ・ $- \text{アップスロープ} - \text{曲率} + \text{ベースラインバイアス}$ 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、これがブレイ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のリセットします。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。

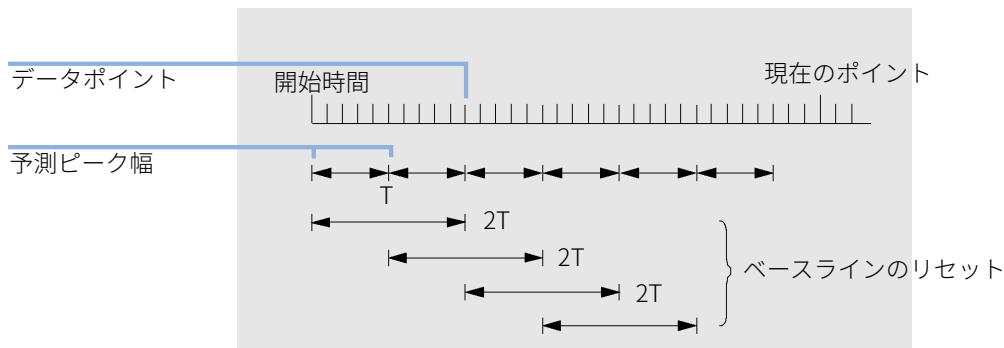


図3 ベースライン

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のリセットされます。

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ュホー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、 $2T$ 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（21 ページ 図3を参照してください）。

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。

動作原理

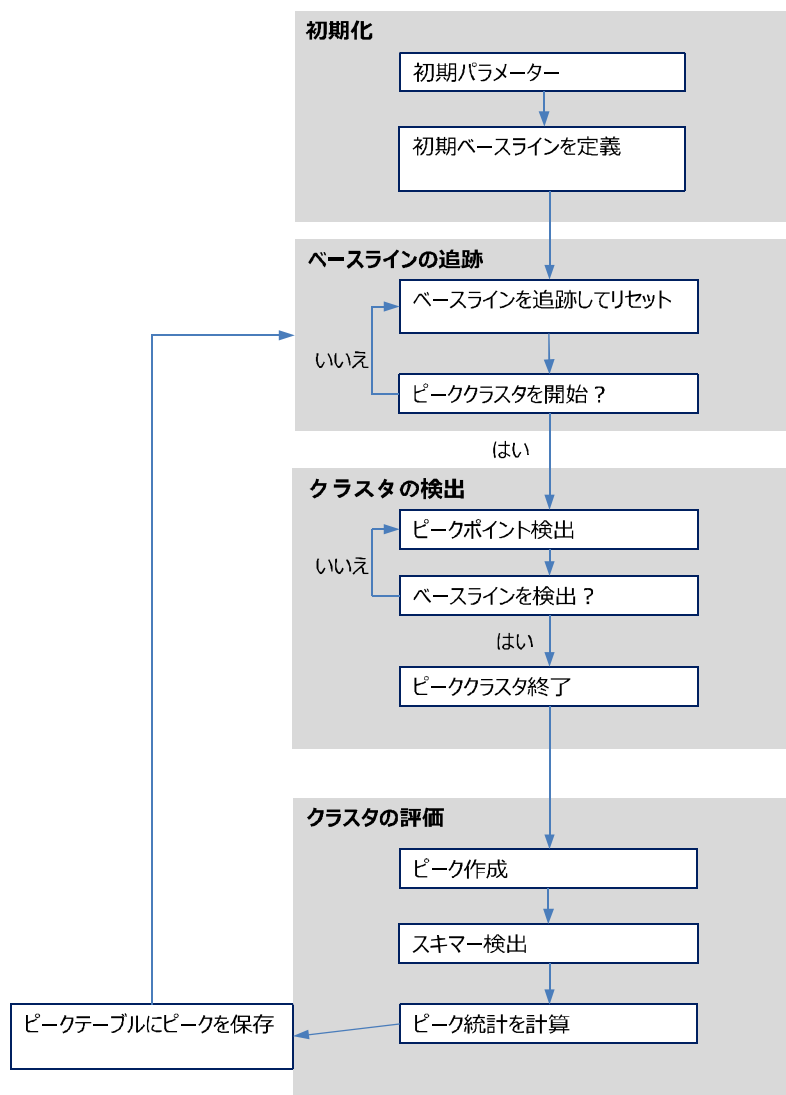


図 4 積分のフローチャート

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。

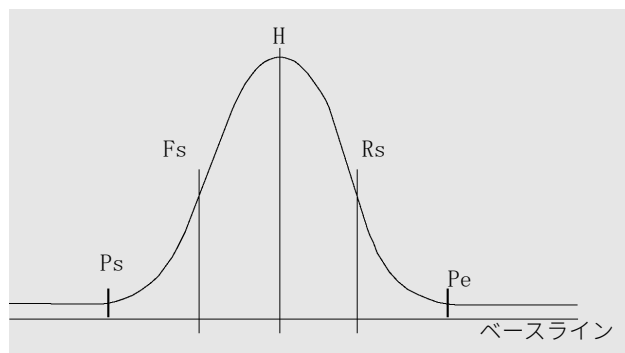


図5 ピーク幅の計算

上記の図で、総面積 A は、ピーク開始 (P_s) からピーク終了 (P_e) 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/電気泳動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。

- 分析前に初期ピーク幅を指定する。
- 分析中にピーク認識フィルターとの一致を良好に保つため、インテグレータが必要に応じてピーク幅を自動的に更新する。
- タイムイベントをプログラムして、分析中にピーク幅をリセットまたは変更する。

システムスータビリティの計算に使用されるピーク幅の定義については、「システムスータビリティの評価」 96 ページを参照してください。

ピーク認識フィルター

インテグレータは3つのピーク認識フィルターを持っており、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。このフィルターには、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。認識フィルターには次のものがあります。

フィルター 1 連続する 2 つ（3 つ）のデータポイントのスロープ（曲率）

フィルター 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

フィルター 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ーは、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ー 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、フィルターはまずフィルター 2 に、それからフィルター 3 に変更されます。認識フィルター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。

$0.3 \times (\text{右側の変曲点} - \text{左側の変曲点}) + 0.7 \times \text{面積} / \text{高さ}$

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がります。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がると、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。

$0.75 \times (\text{既存のピーク幅}) + 0.25 \times (\text{現在のピーク幅})$

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がります。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（28ページ表3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28ページ表3に概説されています。

表 3 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
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

29ページ表4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 4 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
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

29ページ表5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 5 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。

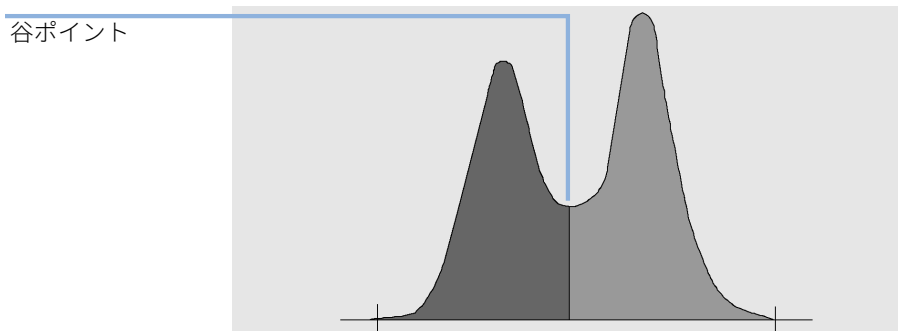


図6 マージピーク

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いう意味で、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。

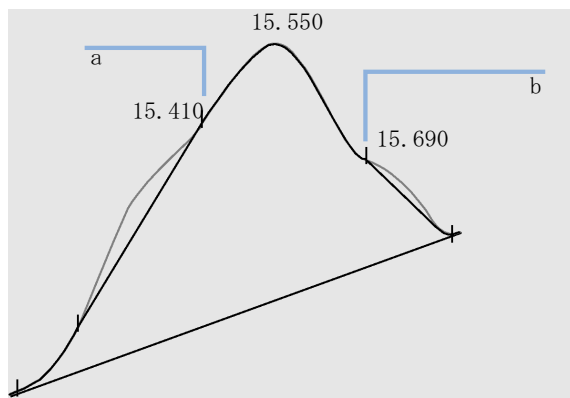


図7 ピークショルダー

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、31ページ 図7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得ます。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得ます。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。

ベースライン割り当て

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に対して、『釘と糸』のテクニックでベースラインを割り当てるようにリクエストします。これは、台形の領域と比例による高さ補正を使用してベースラインを正規化し、できるだけ低いベースラインを維持するようにします。ベースライン割り当てアルゴリズムへの入力には、検出器とアプリケーションを識別するメソッドおよびデータファイルからのパラメータも含まれており、インテグレータはこれらを利用して、計算を最適化します。

デフォルトのベースラインの設定

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

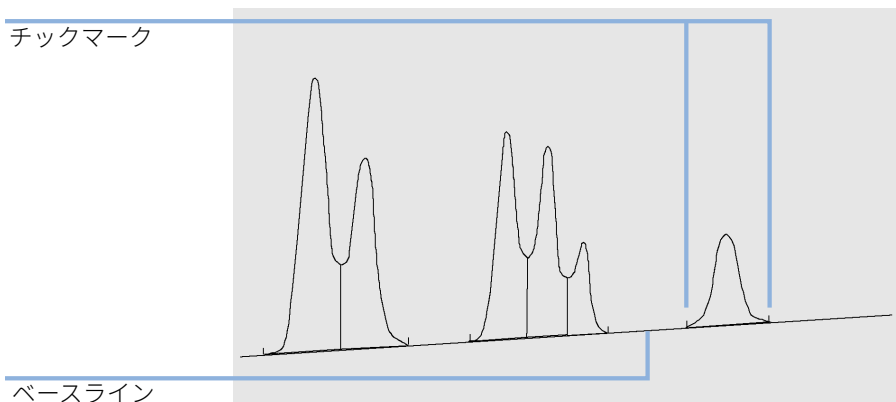


図8 デフォルトのベースラインの設定

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。

ベースラインの落ち込み

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 (34ページ 図9のポイント a)。

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34ページ 図9のポイント b のように再構築されます。

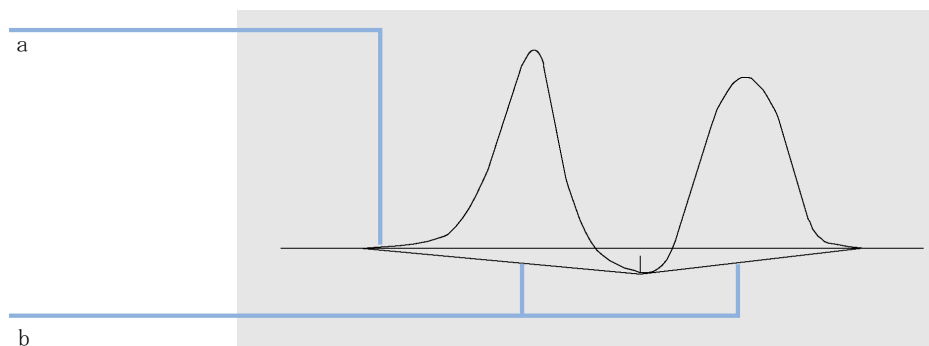


図9 ベースラインの落ち込み

ベースラインの落ち込みを除去するために、次の追跡オプションを使用できます。

クラシカルベースライン追跡（負ピークなし）

このオプションを選択すると、ピーククラスごとに、ベースライン落ち込みを検索します。落ち込みがある場合、ピークの開始または終了を負ピークとならないポイントまでシフトします。（34ページ 図9と35ページ 図10のベースラインを比較してください）。

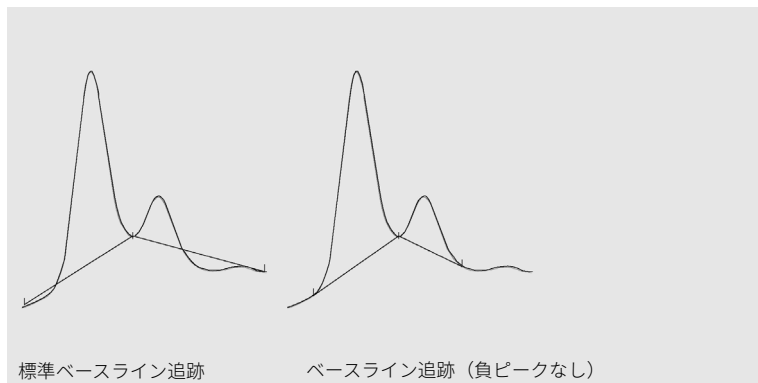


図 10 標準的なベースライン追跡およびベースライン追跡（負ピークなし）

注記

ベースライン追跡（負ピークなし） は、溶媒ピーク、その子ピークおよびシヨルダーでは利用できません。

アドバンスドベースライン追跡

アドバンスドベースライン追跡モードでは、インテグレータはピークの開始と終了場所を最適化し、ピークのクラスター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（35ページ 図10を参照）。多くの場合に、アドバンスドベースライン追跡モードにより、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/谷比

ピーク谷比は、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。ピーク谷比がユーザー指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（35ページ 図10と36ページ 図11を比較してください）。

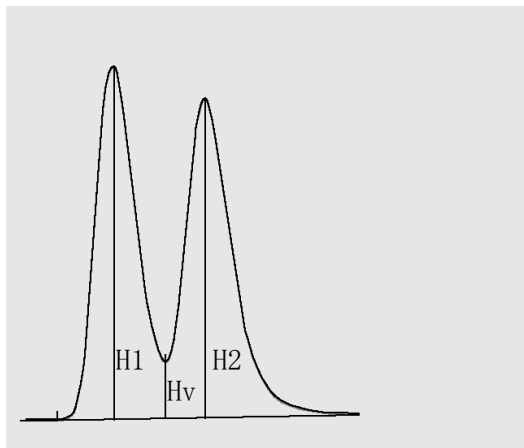


図 11 ピークバレー比

ピーク谷比は、次の式を使用して計算されます。

$H1 \geq H2$, ピーク谷比 = $H2/Hv$

および

$H1 < H2$, ピーク谷比 = $H1/Hv$

37ページ 図12 は、ピーク谷比のユーザー指定値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。

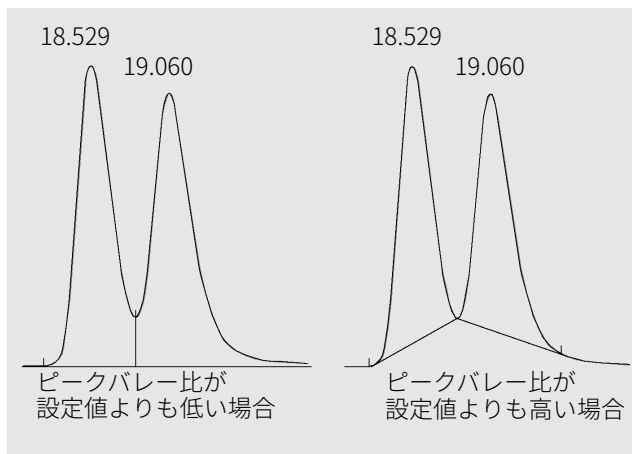


図 12 ピークバレー比のベースラインへの効果

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。

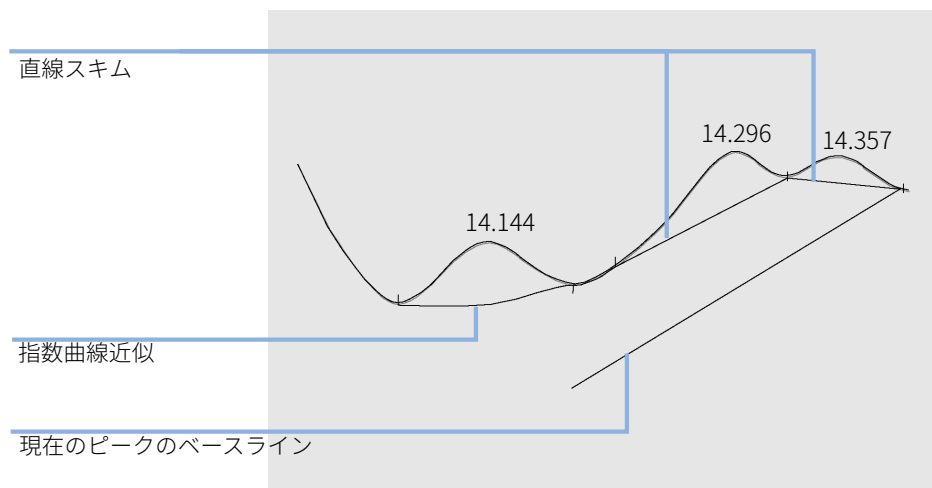


図 13 指数曲線スキム

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。

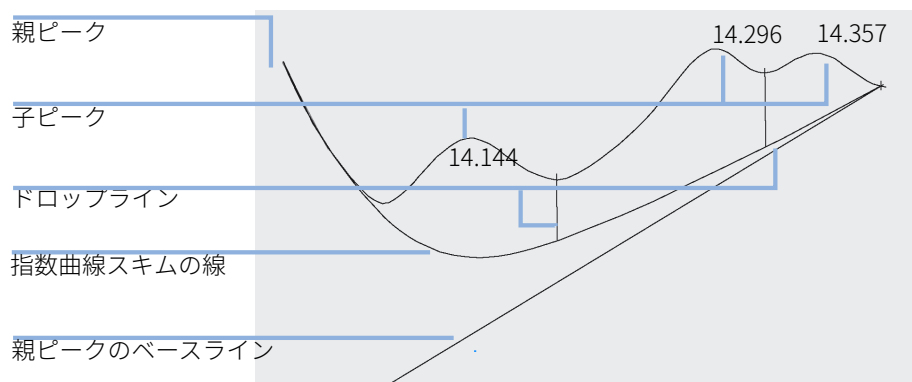


図 14 新しい指数曲線スキム

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。

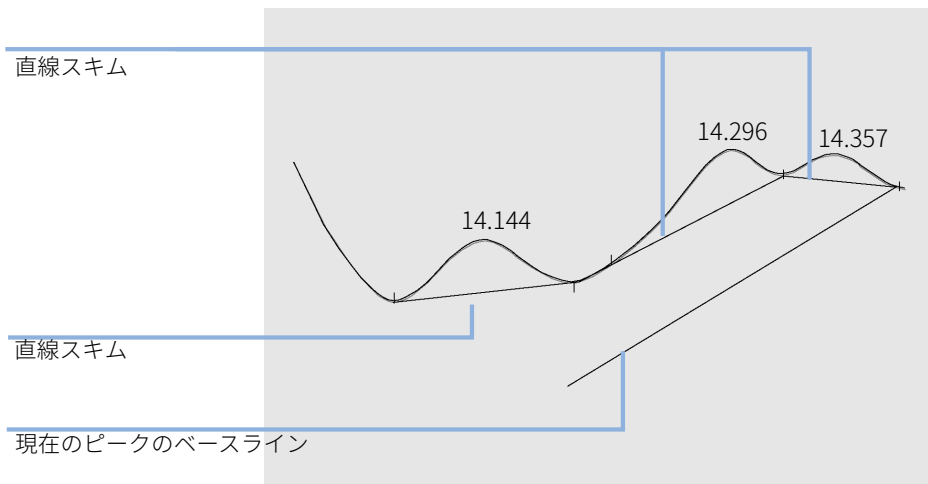


図 15 直線スキム

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 H_p ）と、ベースライン補正された子ピークの高さ（ H_c ）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 H_c ）と、ベースラインより上にある谷の高さ（ H_v ）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、ドロップラインを使用します。

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](#)」46 ページを参照）。

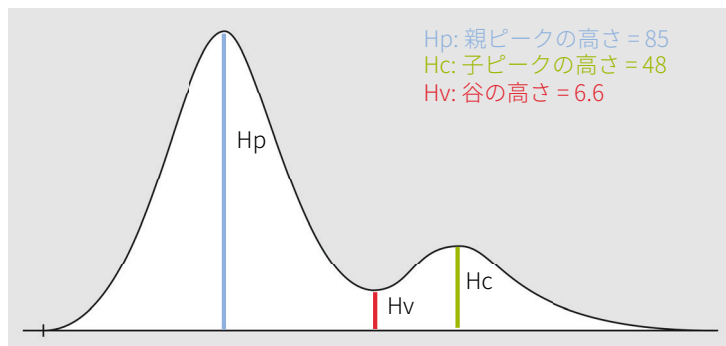


図 16 スキム基準値の計算例

$$\text{スキム高さ比} = H_p / H_c$$

$$\text{スキム谷比} = H_c / H_v$$

ここで、

H_p	ベースライン補正された親ピークの高さ
H_v	ベースラインより上にある谷の高さ
H_c	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。

スキムの指数曲線近似の計算

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、

H_b	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

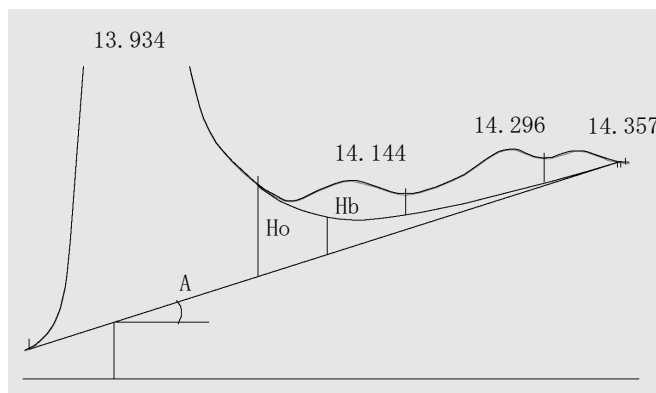


図 17 指数曲線スキムの計算に使用される値

フロントピークスキム

親ピークのテール上の子ピークの場合、ピークのフロント/アップスロープ上の特定のピークについては、特別な積分が必要となります (44ページ 図18 を参照)。

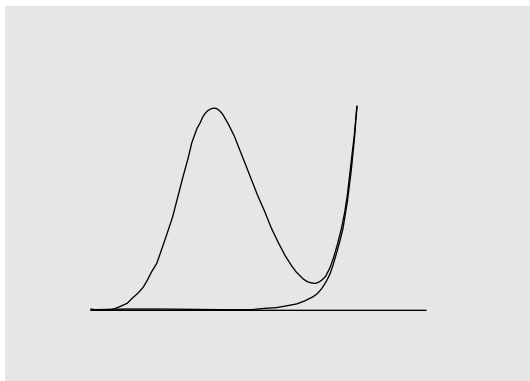


図 18 フロントピークスキム

フロントピークスキムは、テールピークスキムと同じスキムモデルを使い、同じ方法で扱われます。

スキム基準は次の通りです。

- フロントスキム高さ比
- 谷高さ比

谷高さ比は、フロントピークスキムとテールピークスキムで、同じ値を取ります(「谷高さ比」を参照してください)。フロントスキム高さ比は、テールスキム高さ比と同じ方法で計算されますが(「テールスキム高さ比」を参照してください)、異なる値になることがあります。

割り当てられないピーク

ベースライン設定によっては、ベースラインとシグナルの間にあるものの、認識されたどのピークにも属さない小さな領域が存在することがあります。通常、そのような領域は測定されることもレポートされることもありません。[割り当てられないピーク] をオンにすると、これらの領域も測定され、割り当てられないピークとしてレポートされます。そ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、45ページ 図19 のように領域の開始と終了の midpoint になります。

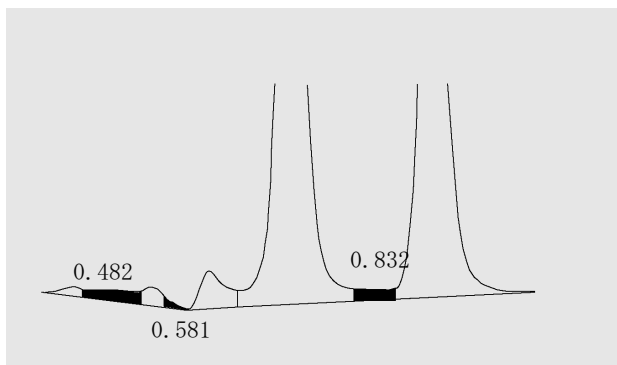


図 19 割り当てられないピーク

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れています。

表 6 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](#)」 38 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、ピークの最終的な面積を決定することです。

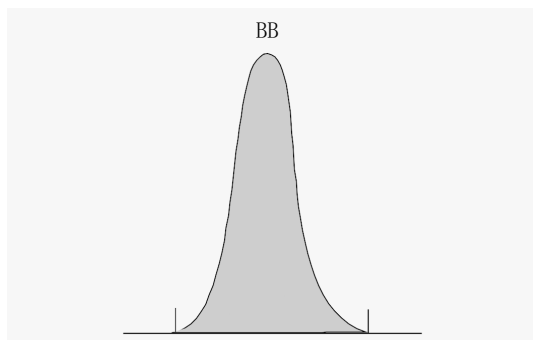


図 20 ベースライン間のピークの面積測定

単純に分離したピークの場合、ピーク的面積は、（チックマークにより認識される）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、48ページ 図20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 (VV) ピークの場合には、49ページ 図21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。

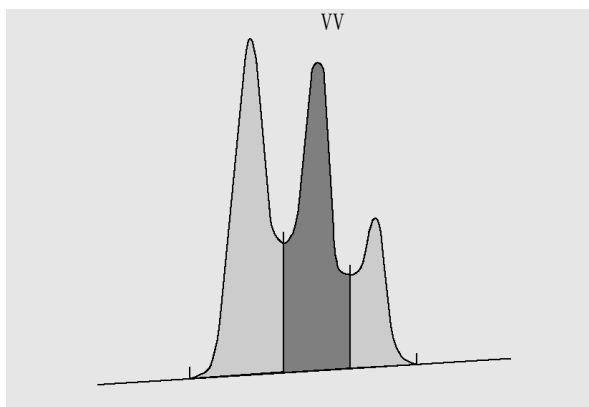


図 21 谷 - 谷ピークの面積測定

- 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、50ページ 図22に示されたような正の面積になります。

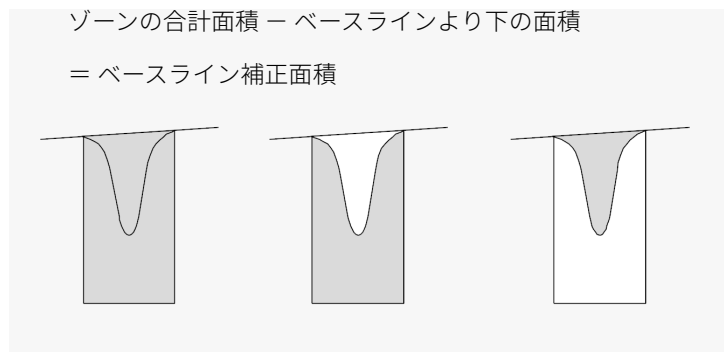


図 22 ネガティブピークの面積測定

単位と変換ファクタ

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 사용되는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わりなく、実際の物理的な単位でレポートされます。

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ト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

すべてのシグナルには以下のイベントがあります。

- タンジェントスキムモード
- テールピークスキム高さ比
- フロントピークスキム高さ比
- スキム谷比
- ベースライン補正
- ピーク谷比

初期イベント

初期ピーク幅 分析の開始時に、インテグレータの内部ピーク幅がこの値に設定されます。この初期ピーク幅は、ピークのアップスロープ、ダウンスロープ、およびテーリングを検出する積算器の縮尺調整をするために使用されます。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。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。

スロープ感度 スロープ感度は、ピーク感度の設定です。この設定はリニアスケールで変化します。

高さリジェクト 高さリジェクトは、最終的な高さによるピーク除外を設定します。高さが最小高さより小さいピークは、レポートされません。

**面積
リジェクト**

面積リジェクトは、最終的な面積によるピーク除外を設定します。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。

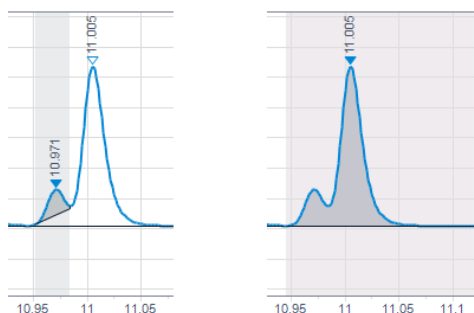
**面積%
リジェクト**

面積% リジェクトは、対象ピークの最小面積% を設定します。

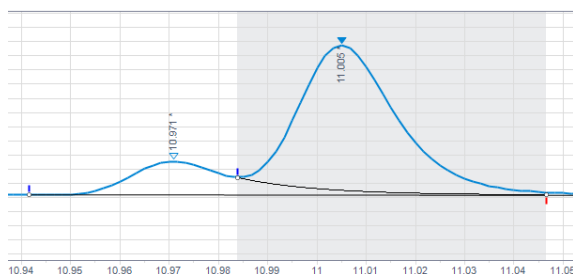
面積% が最小面積% 値より小さいピークは、レポートされません。ベースラインの補正後、面積% が所定の値より小さいピークはインテグレータにより除外されます。

予測される最小のピーク面積% を入力します。この情報は、最初に面積および高さリジェクトをゼロ (0) に設定してデータファイルを積分することで取得できます。積分結果の **【面積%】** 列の値を使用して、適切な最小値を設定します。

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% スレッシュホールドを下回っていて、ライダーピークがスレッシュホー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。

**ショルダー
検出**

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。

ピーク幅

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選択性を決定します。良いパフォーマンスを得るには、ピーク幅は実際のピークの半値幅に近い値に設定する必要があります。インテグレータは、積分を最適化するために、分析中に必要に応じてピーク幅を更新します。

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。

- 対象とする単一のピークに適した初期ピーク幅を選択するには、ピークの時間幅を基準にしてください。
- 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。

選択した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。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幅が広がります。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がると、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。

$$0,75 \times (\text{既存のピーク幅}) + 0,25 \times (\text{現在のピーク幅})$$

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。

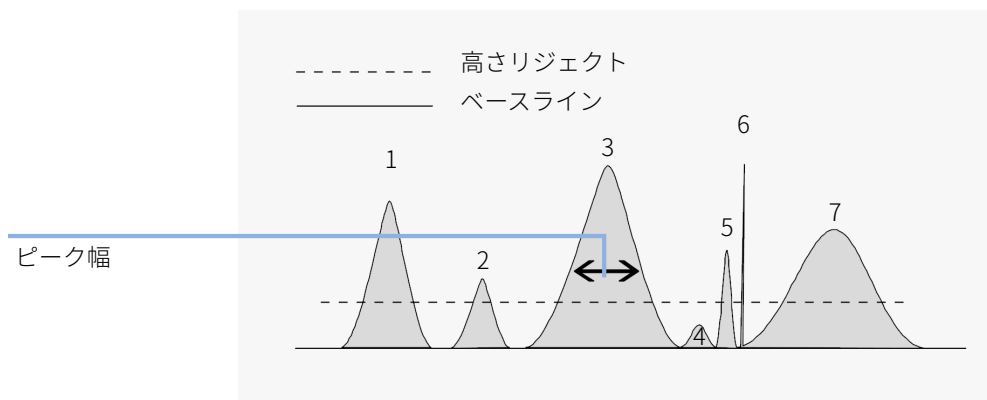


図 23 初期イベントの使用

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、5、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せん。
- ピーク 6** は積分されません。フィルタ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 7 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

OpenLab CDS ChemStation Edition には、タイムイベントのセットがあります。タイムイベントでは内部アルゴリズムのベースライン定義とユーザー定義の間で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。積分イベントについての詳細は、以下も参照してください。「[初期イベント](#)」 51 ページ

面積和

面積和 インテグレータが面積を合計する範囲（面積和オンから面積和オフまでの時間）をポイントで設定します。

面積和スライス このイベントは、**【面積和】** に類似しています。時間間隔の損失なく、クロマトグラムの連続したタイムスライス積分を行うことができます。

面積和の機能でベースラインを定義し、インターバルを設定することによりピークのクラスターで積分できます。面積和は、このインターバルのピーク面積を合計します。面積和のリテンションタイムは面積を合計するインターバルの中心点として定義されます。定義される中心点の真度は、0.001 min（取り込み速度が速い場合）から 0.1 min（取り込み速度が遅い場合）の間で変化します。

所定のスレッシュホールドを下回る面積または高さのピークがスライスに含まれる場合（面積または高さリジェクト）、スライスが失われることを避けるためにこれらも一覧表示されます。

ベースラインイベント

- | | |
|--------------------------|---|
| 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。 |
| 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
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。 |

次のイベントは、複雑なクロマトグラムで**【面積和スライス】**を用いた面積和に使用できます。これらは、自動的に最適なベースライン定義を見つけるために役立ち、手動での操作が不要になります。これは、GC 結果の解析に特に便利です。ベースラインは、統計推定を使用して時間間隔に基づいて計算されます。

- | | |
|-------------------------|---|
| ベースライン
範囲を指定 | 新しいベースラインの推定に使用されるクロマトグラムの範囲を定義します。時間範囲の中間点で統計的に有効なベースラインポイントを計算するために、データポイントの範囲を使用します。このアルゴリズムは、2段階の統計的除去機能を使用して、この間隔で生じるスパイク障害や予想外のピークを無視します。このことにより、ベースライン推定のさらに信頼性の高い結果を確保できます。 |
|-------------------------|---|

2つのイベントの**【ベースライン範囲設定】**は、その中心点が直線で結ばれます。57ページ 図24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。

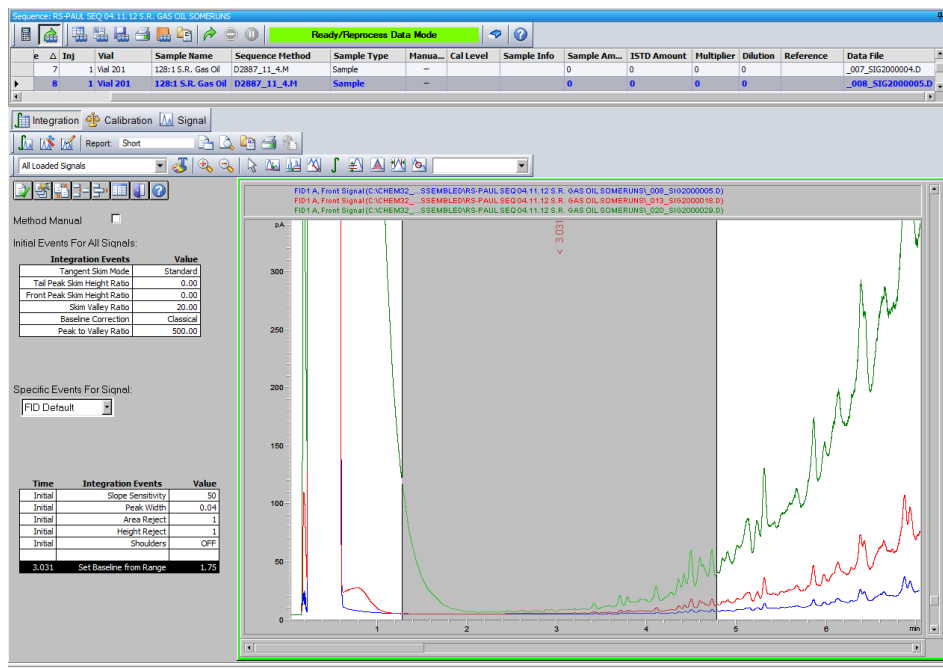


図 24 「ベースライン範囲設定」ベースライン範囲の間隔は、灰色で表示されています。

ベースライン 範囲を指定 (最低)

【ベースライン範囲設定】に類似していますが、ベースラインの落ち込みを最小限にとどめるために、その値を削減します。【ベースライン範囲設定(最低)】は、【ベースライン範囲設定】のy値から2つのシグマを減算(ノイズ標準偏差)することにより計算されます。

ベースライン 範囲の選択

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。また、ピーククラスタの下にあるスロープを変更するベースライン曲線を作成できます。

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ュホー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的面積を計算します。タンジェントスキムされたピーク的面積は、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す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。

ピーク同定とは	63
ピークマッチングルール	64
ピーク同定のタイプ	65
絶対リテンション/マイグレーションタイム	65
相対リテンションタイム	65
補正リテンション/マイグレーションタイム	65
ピーククオリファイア	66
アマウントの上限/下限	66
絶対リテンション/マイグレーションタイム	67
補正済みリテンション/マイグレーションタイム	69
単一のリファレンスピーク	69
複数のリファレンスピーク	70
ピーククオリファイア	71
シグナル相関	72
クオリファイアベリフィケーション	72
クオリファイア比の計算	72
同定プロセス	74
リファレンスピークの検出	74
ISTD ピークの検出	74
残りのキャリブレーションピークの検出	75
同定されていないピークの分類	75

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。
- ピーククオ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せられます。
- ピークがクオ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（ $R_r = t_2/t_1$ ）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。

ピーククオリファイア

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、ピーククオ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、クオ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。

67ページ 図25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。

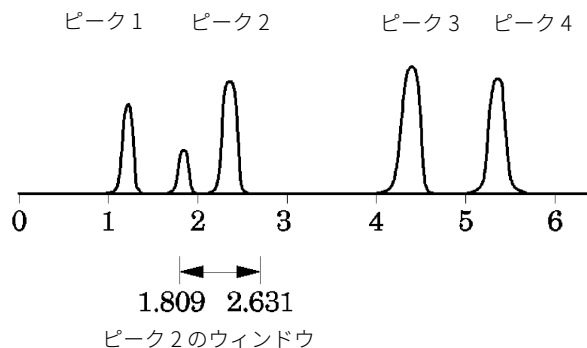


図 25 リテンション/マイグレーションタイムウィンドウ

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。

$$1.80 \text{ 分} = 2.00 \text{ 分} - 0.10 \text{ 分} (0.20 \text{ 分}/2) - 0.10 \text{ 分} (2.00 \text{ 分の } 5\%)$$

$$2.20 \text{ 分} = 2.00 \text{ 分} + 0.10 \text{ 分} (0.20 \text{ 分}/2) + 0.10 \text{ 分} (2.00 \text{ 分の } 5\%)$$

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。

ピーククオリファイア

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。71ページ 図26 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、ピーククオ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。

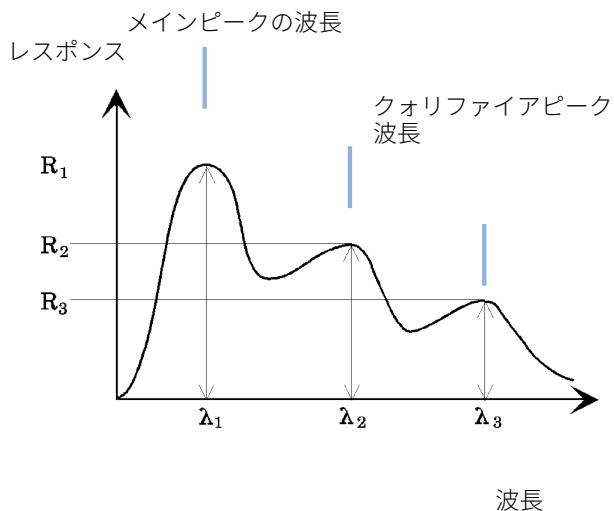


図 26 ピーククオリファイア

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。メインピーククオリファイア λ_1 と、たとえば λ_3 などのクオ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。

クオ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、デフォルトでクオ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 **[クオリファイア使用]** 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、クオリファイアベリフィケーションも無効になります。

クオリファイア比の計算

クオ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、クオ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。

クオ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。ユーザーが予想クオリファイア比を指定する必要はありません。予想クオ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、クオ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ーフェース (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オリファイア比に基づいて最小クオリファイア許容値を計算します。以下の式を使用して、最小クオリファイア許容値が計算されます。

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

この式で q_i は、レベル i での測定クオ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、正のシグナルクオリファイアの一致 (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オ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オ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。

4

キャリブレーション

検量線 77

グループキャリブレーション 79

リキャリブレーションオプション 80

この章では、ChemStation ソフトウェアのキャリブレーションの原理則について説明します。

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、77ページ 図27のようになります。

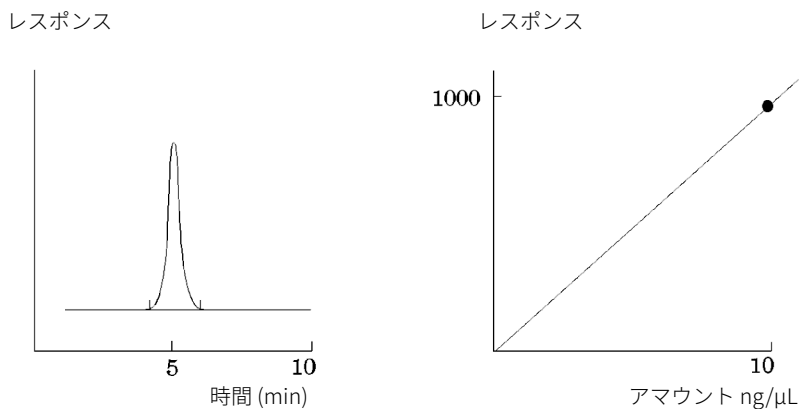


図 27 キャリブレーションサンプル (10 ng/μL) シグナルおよび検量線

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。傾きが正の検量線の場合、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 = 完全なフィット

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。

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。

定量とは	82
定量計算	83
補正係数	84
絶対レスポンスファクタ	84
倍率	84
希釈率	84
サンプルアmount	85
面積%および高さ%	86
キャリブレーションされた計算の手順	87
ESTD 計算	88
norm% 計算	90
ISTD 計算	91
分析 1:キャリブレーション	92
分析 2:未知サンプル	93
キャリブレーションピークのISTD計算	93
キャリブレーションされていないピークの定量	94
キャリブレーション化合物を使用した間接定量	94
マニュアル RFを使用した定量	95

この章では、ChemStation で定量を行う方法について説明します。面積% および高さ% の計算、ESTD 計算、norm% 計算、ISTD 計算、および同定されていないピークの定量に関する詳細を説明します。

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、各成分の結果に乘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乘じられる係数です。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計算の手順

外部標準 (ESTD)、標準化、および内部標準 (ISTD) の計算では、レスポンスファクタが必要で、その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は、選択した手順によって、選択した単位へのレスポンスの変換を指定します。

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。

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

変数の意味は次のとおりです。

Response_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。

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

M は、倍率です。

D は、希釈率です。

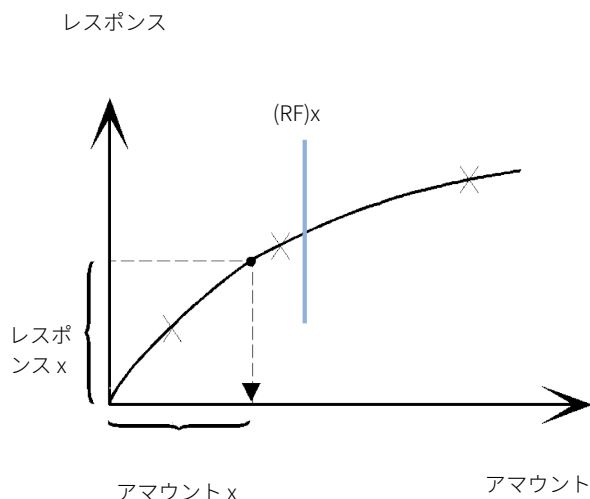


図 28 レスポンスファクタ

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mountがゼロでない場合は、成分 x の相対アmount (%) 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mount) 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mount**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mountがゼロの場合は、ESTD が計算されます。

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が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。

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

変数の意味は次のとおりです。

レスポンス_x	ピーク x の面積 (または高さ)
RF_x	レスポンスファクタ
$\sum(\text{Response} \cdot \text{RF})$	ピーク x を含むすべてのピークに対する $(\text{Response} \cdot \text{RF})$ 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。

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、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。	内部標準をすべてのサンプルに添加する必要がある。
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。	

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。

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

レスポンス比

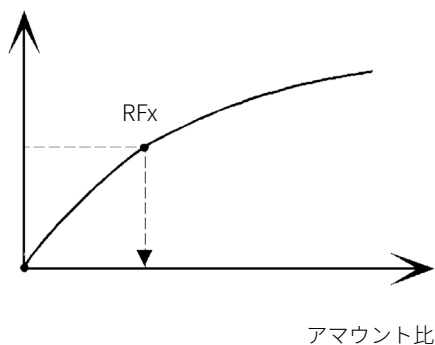


図 29 アマウント比

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ピークの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成分 x の実アマウントを計算するのに使用される式は、次のようなものです。

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

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

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 (**実アマウント**) は、[キャリブレーション設定] または 未知のサンプルに追加された内部標準向けの [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% レポートタイプが選択された場合、成分 x の相対 (%) アマウントの計算には次の式が使用されます。

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

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。

$$\text{アマウント} = \text{レスポンス} * \text{レスポンスファクタ} * M * D$$

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。

$$\text{面積比} = \text{面積} / \text{面積}_{\text{ISTD}}$$

または

$$\text{高さ比} = \text{高さ} / \text{高さ}_{\text{ISTD}}$$

そして、アマウントは以下のように計算されます。

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

または

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

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：

$$\text{RF} = 1 / \text{マニュアル RF}$$

RF を **アマウント/レスポンス**として定義した場合：

$$\text{RF} = \text{マニュアル RF}$$

6

システムスータビリティの評価

システムスータビリティの評価	98
ノイズ測定	101
標準偏差の6倍を使用したノイズ計算	102
最大振幅（ピーク to ピーク）の式を使用したノイズ計算	102
ASTM メソッドによるノイズ計算	104
S/N の計算	105
ドリフトとうねり	108
ピークのテーリングファクターと対称度の計算	110
システムスータビリティの式および計算	112
一般定義	113
空隙量	113
保持されない成分のリテンションタイム t_r (min) [分]	113
パフォーマンステストの定義	114
統計モーメント	114
統計モーメント、スキュー、およびエクセス	115
真のピーク幅 W_x [min]	115
キャパシティファクタ (USP)、キャパシティ比 (ASTM) k'	117
テーリングファクタ (USP) t	117
カラムごとの理論段数 n	119
1メートル当たりの理論段数 N [1/m]	120
パフォーマンステストの定義	114
分離度 (USP, ASTM) R	121
分離度 (EP/JP) R_s	122
分離度 (ChemStation クラシック定義)	122
ピーク谷比 (EP/JP)	123
再現性に関する定義	125
サンプル平均 M	125
サンプル標準偏差 S	126
相対標準偏差 RSD[%] (USP)	126
平均値の標準偏差 SM	126
信頼区間 CI	127
再現性に関する定義	125
相関係数	131
標準偏差	132
内部保持されている倍精度数へのアクセス	133

この章では、サンプル分析に使用する前に分析機器の性能を評価するため、また分析メソッドをルーチン的に使用する前にそのメソッドの性能を評価するために ChemStation で行うことができる内容を説明します。

また、分析システムの性能をルーチン分析前あるいは分析中にチェックするために ChemStation で実施可能な内容についても説明します。

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
- キャパシティブアクタ (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で、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/キャピラリー識別番号、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/キャピラリーの詳細
- 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。

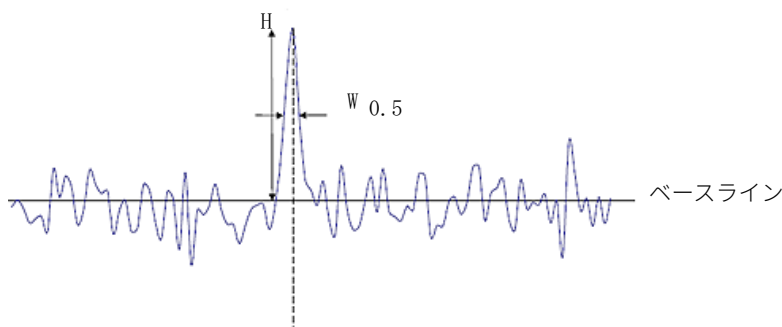


図 30 ピークシグナルおよびノイズのクロマトグラム

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)

$W_{0.5}$ 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、任意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（「[直線近似](#)」 127 ページを参照してください）。ノイズは、次の式によって計算されます。

$$N = 6 \times \text{Std}$$

変数の意味は次のとおりです。

N は、6 倍標準偏差法に基づくノイズです。

Std は、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 to ピーク）の式を使用したノイズ計算

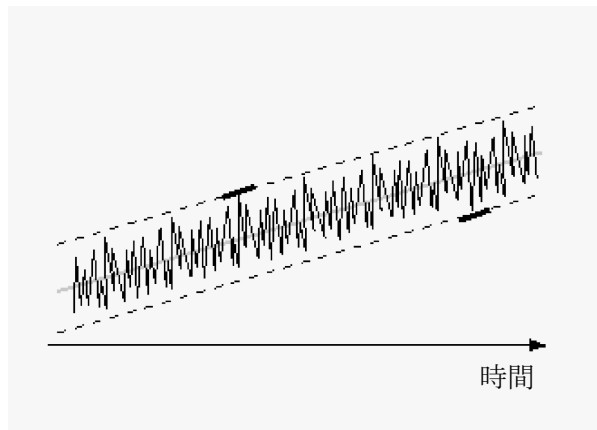


図 31 ピーク・トゥ・ピークノイズとドリフトの図

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直線回帰を決定することで、最初に計算されます（「[直線近似](#)」 127 ページを参照）。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 to ピークノイズは、次の式を使用して計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

N はピーク to ピークノイズです。

I_x は、LSQ 計算式を使って計算されたデータポイントで、次のようになります。

$I_{\max}$ は最高（最大）強度のピークです。

$I_{\min}$ はこの時間範囲内の最低（最小）強度のピークです。

ヨーロッパ薬局方の計算では、ピーク to ピークノイズは、ブランクのリファレンスシグナルを、各ピークの $W_{0.5}$ 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。

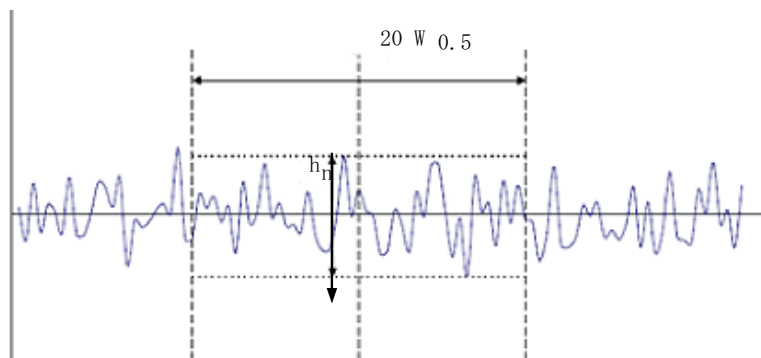


図 32 ブランクサンプルのクロマトグラムからノイズ判断

変数の意味は次のとおりです。

$20 W_{0.5}$ は、 $W_{0.5}$ の 20 倍に相当する領域です。

h_n は、20 倍の $W_{0.5}$ 領域におけるベースラインノイズの最大振幅です。

ASTM メソッドによるノイズ計算

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よって異なる 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。

周期の数 n の決定

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

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間ノイズの計算

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直線回帰を決定することで、最初に計算されます（「直線近似」 127 ページを参照してください）。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。ピーク間ノイズは、次の式を使用して計算されます。

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

ここでは、N がピーク間ノイズ、 $I_{\max}$ 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 ノイズの計算

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

ここでは、 N_{ASTM} は、ASTM メソッド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。

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

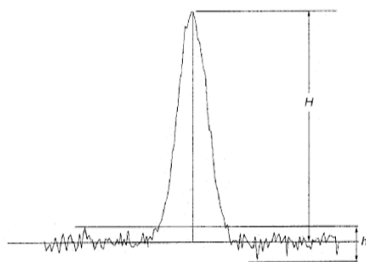


図 33 シグナル/ノイズ (SN 比)

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 to ピーク）の式を使用したノイズ計算」 102 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： $\text{StartTime} - \text{EndTime} < 20 * W_{0.5}$
 - $\text{StartTime} =$ （リファレンスシグナルの）開始時間
 - $\text{EndTime} =$ （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、 $(\text{RT} - 10 * W_{0.5})$ 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
 - $\text{StartTime} =$ （リファレンスシグナルの）開始時間
 - $\text{EndTime} = \text{StartTime} + 20 * W_{0.5}$
- リファレンスシグナルの長さが十分であるが、 RT または $\text{RT} + 10 * W_{0.5}$ 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
 - $\text{EndTime} =$ （リファレンスシグナルの）終了時間
 - $\text{StartTime} = \text{EndTime} - 20 * W_{0.5}$

- RTまたは $RT + 10 \cdot W_{0.5}$ 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
 - $StartTime = RT - 10 \cdot W_{0.5}$
 - $EndTime = RT + 10 \cdot W_{0.5}$

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。

$W_{0.5}$ は半値幅です。

ドリフトとうねり

ドリフトは線形回帰のスロープ（傾き）として与えられます。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（「直線近似」 127 ページを参照してください）。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。

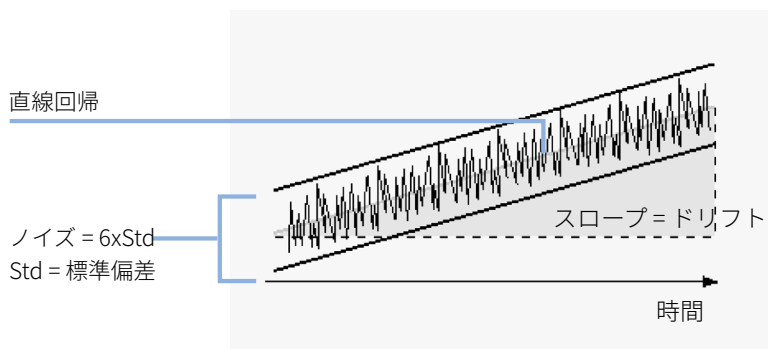


図 34 標準偏差の 6 倍を使用したノイズのドリフト

うねりは、ASTM ノイズサイクル内の中間データ値のピーク to ピークノイズとして測定されます。『「ASTM メソッドによるノイズ計算」 104 ページ』を参照してください。

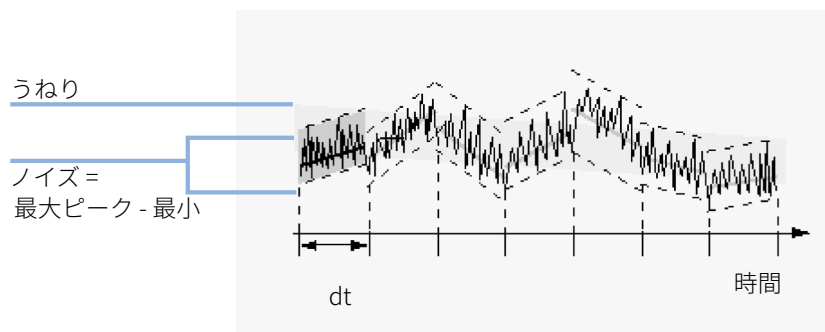


図 35 ASTM メソッドで測定されたノイズのうねり

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_j 」117 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。

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

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

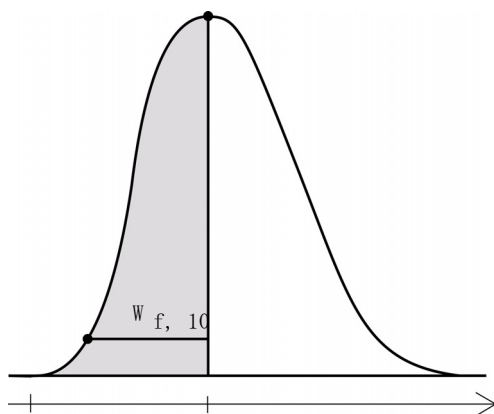


図 36 ピーク対称度の計算

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。

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

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

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

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

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

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。

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

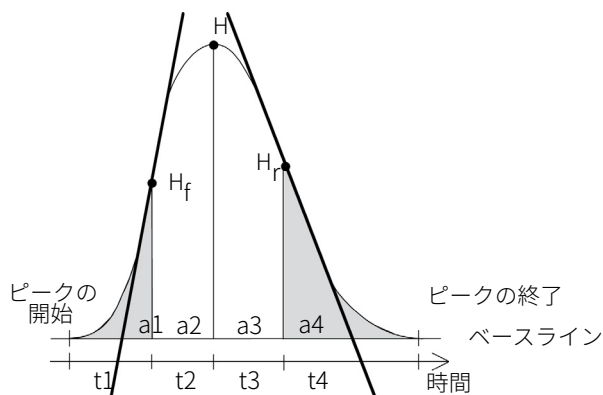


図 37 Cピーク対称度ファクタの計算

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:セクション E 682 – 93、Annual Book of ASTM Standards、Vol.14.01
- USP:The United States Pharmacopeia, XX. Revision, pp. 943 - 946
- EP: European Pharmacopoeia, 7th Edition
- JP:日本薬局方、第 15 版

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 (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

統計モーメント

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

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

t₀ = 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

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

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

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、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]レポート与えられます。

真のピーク幅 W_x [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し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)

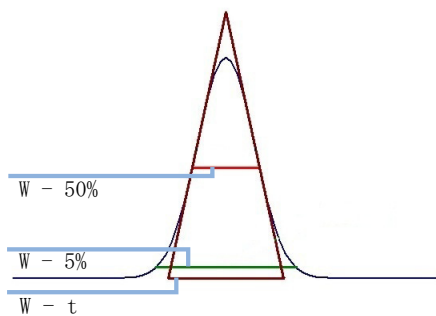


図 38 高さ x % でのピーク幅

キャパシティファクタ (USP)、キャパシティ比 (ASTM) k'

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

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 (JP) およびシンメトリー係数 (EP) S 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。「[ChemStation で薬局方に関連するファクタをレポート](#)」 168 ページ も参照してください。

$$t = \frac{W_{5.0}}{t_w \cdot 2}$$

変数の意味は次のとおりです。

t_w = ピークフロントと T_R 間の距離 (時間)。ピーク高さの 5 % で測定されます。

$W_{5.0}$ = ピーク高さの 5 % のピーク幅 [min]

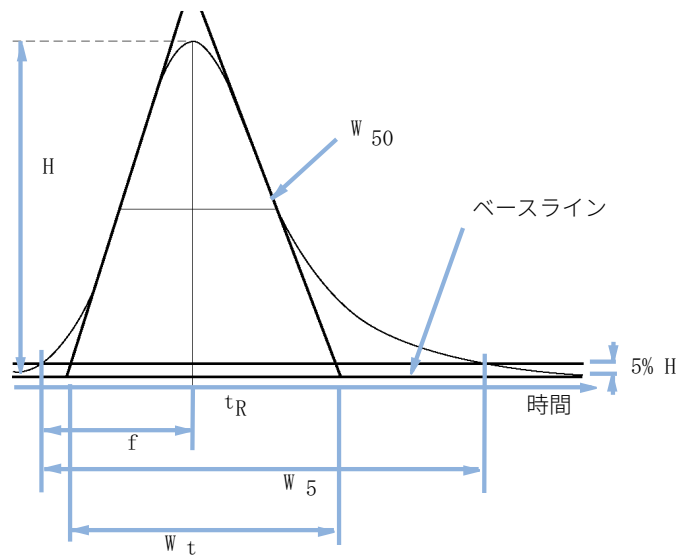


図 39 パフォーマンスパラメータ

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_B ベース幅 [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。

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

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 (USP, ASTM) 、選択性アルファ

注記

相対リテンション (USP) は、レポートで「選択性」または「ピーク_選択性」として使用できます。

(ピーク a および b に関連、ピーク a の T_R < ピーク b の T_R)

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

変数の意味は次のとおりです。

$k'_{(x)}$ = 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、JP）

EP に準じた相対リテンション（調整）および JP に準じた分離係数は、次の計算式を使って計算されます。

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

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

相対リテンション（調整、EP）および分離係数（JP）は、インテリジェントレポートでは「相対リテンション時間_EP」、およびクラシックレポートでは「選択性」として使用できます。

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

半値幅法（パフォーマンス レポートで使用される分離度）：

分離度 (JP) および分離度 (EP) は次の定義で計算されます。

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

注記

USP における分離度の定義は、欧州薬局方（EP）と日本薬局方（JP）の定義では異なっています。EP および JP の計算は、ChemStation エディション C.01.04 から使用できるようになりました。

さらに、クラシック分離度 $(2.35/2) \cdot \dots$ 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、以下を参照してください。「[ChemStation で薬局方に関連するファクタをレポート](#)」 168 ページ

分離度 (ChemStation クラシック定義)

半値幅法:

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

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」 114 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。

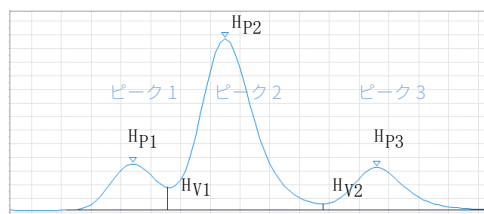
注記

この値は、インテグレータの拡張ベースラインピーク分割操作のスレッシュホー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。

$PV = \text{ピーク高さ} / \text{谷高さ}$

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

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。

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 $100 \times (1 - \alpha) \%$ 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せん ($\alpha = 0.05$)。

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:

$$1 - \alpha = 0.95$$

$$N = 6$$

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、 $\alpha/2$ 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。

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

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：

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

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 ($A^T A x = A^T y$) 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：

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

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：

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

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

二次曲線の正規方程式：

$$\Sigma(\text{wt}) * a + \Sigma(x * \text{wt}) * b + \Sigma(x^2 * \text{wt}) * c = \Sigma(y * \text{wt})$$

$$\Sigma(x * \text{wt}) * a + \Sigma(x^2 * \text{wt}) * b + \Sigma(x^3 * \text{wt}) * c = \Sigma(x * y * \text{wt})$$

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

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：

$$L11 = W$$

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

$$L21 = XW$$

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

$$L31 = X2W$$

$$L22 = X2W - L21 * U12$$

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

$$L32 = X3W - L31 * U12$$

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

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

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

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

$$c' = z2$$

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

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

最後に、逆ノーマライズする必要があります：

$$a = a'$$

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

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

相関係数

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。この値は次の式を使用して計算されます。

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

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
y_i	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
Y_i	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
y_i	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
Y_i	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。

標準偏差

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

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"
```

キャリブレーションテーブル	137
標準キャリブレーション	137
タンパク質分子量キャリブレーション	138
DNA 塩基対キャリブレーション	138
キャピラリー等電点電気泳動	139
移動度補正を使用したキャリブレーション	140
はじめに	140
実効移動度計算	141
相対移動度計算	144
キャピラリー電気泳動用の特別なレポートスタイル	146
補正済みピーク面積	147
キャピラリー電気泳動用のシステムスータビリティ	148
容量ファクタ k'	148
CE-MSD	149
バックグラウンド減算	149

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**【補正された面積和】**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

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

k₀ と **k₁** 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、**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:

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

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

k₀ および **k₁** 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 9 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。

α_{app} は、すべてのピークの見掛け移動度です。

α_{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効移動度は、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})。

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

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。

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

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

μ_{EOF} 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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

さらに、移動度が更新されます。

$$\mu_{\text{real}N} = \mu_{\text{app}N} - \mu_{\text{EOFact}}$$

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

$$k(t) = (I \cdot L) / I'(t)$$

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。

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

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。

$$k(t) = 1 / I'(t)$$

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 (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 ($t_{\text{expcal}N}$) 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。

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

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 OpenLab CDS ChemStation Edition 固有のものであります。

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ー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ー (cm)

Lは全キャピラリー長 (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**」 141 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。

A_c 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作成されますが、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、バックグラウ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ウ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中には、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 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。

データ解析におけるナビゲーションテーブル 151

ナビゲーションテーブルのコンフィグレーション 151

ナビゲーションテーブルツールバー 153

ナビゲーションテーブルを用いたデータレビュー 154

ナビゲーションテーブルを用いたシーケンス再解析 155

バッチレビューとは 157

ECM を用いた ChemStation 使用時における
バッチレビュー機能の有効化 158

バッチ設定 159

バッチテーブル 159

化合物テーブル 160

バッチレポート 160

ユーザーインターフェイス 161

レビュー機能 162

バッチレビュー内のキャリブレーション 162

バッチレポート 164

バッチ履歴 164

本章では、データレビューおよびシーケンスデータの再解析方法について説明します。さらに、バッチレビュー、バッチコンフィグレーション、レビュー機能、バッチレポートのコンセプトを説明します。

データ解析におけるナビゲーションテーブル

【データ解析】ビューには、データファイル間のナビゲーション促進のためのナビゲーションテーブルが用意されています。ナビゲーションテーブルには、選択したデータまたはシーケンスデータサブディレクトリの分析データが表示されます。【ナビゲーションテーブル】を使用して、個々の実行を読み込むか、読み込んだシグナルを自動的にスクロールすることが可能です。詳細は、『OpenLab CDS ChemStation Edition コンセプトとワークフロー』マニュアルを参照してください。

ナビゲーションテーブルのコンフィグレーション

ナビゲーションテーブルには、使用可能なデータセットに応じてデータファイル情報が表示されます。ナビゲーションテーブルは読み取りのみであり、値の上書きはできません。

表 10 ナビゲーションテーブルの列項目

シングルランの列項目	シーケンスランの列項目
重ね書き	重ね書き
ECM	ECM
タイプ	タイプ
日時	ライン
オペレーター	注入
バイアル	バイアル
データファイル	サンプル名
サンプル名	メソッド名
メソッド名	サンプルタイプ
マニュアルイベント	マニュアルイベント
サンプル情報	Cal レベル (キャリブレーションレベル)
サンプルアマウント	サンプル情報

表 10 ナビゲーションテーブルの列項目

シングルランの列項目	シーケンスランの列項目
ISTD アマウント	サンプルアマウント
倍率	ISTD アマウント
希釈率	倍率
---	希釈率
---	データファイル

ナビゲーションテーブルには、ソートおよびカラムを別な場所に移動するためのドラッグアンドドロップオプションなど、標準のテーブルコンフィグレーション機能が含まれています。また、ナビゲーションテーブルに表示するカラムを選択することもできます。

さらに、カラム固有のグループ化が可能です。たとえば、**【オペレータ】**カラムで読み込まれたファイルをグループ化することで、特定のオペレータのシングルランを表示することができます。

ナビゲーションテーブルでは、マウスを右クリックする機能によって、シグナルの読み込み、シグナルの重ね書き、データのエクスポート、レポートの印刷、メソッドの取込パラメータの表示などが可能です。ナビゲーションテーブルの各ラインは、ラインの左側の+（プラス）記号をクリックして展開して、シグナル指定オプションを設定できます。

- **シグナル:** 取り込んだシグナルを一覧表示し、読み込むシグナルを指定することができます。シグナル表示の選択は、実行するたびに個別に適用されます。
- **一般情報:** 分析に関するヘッダーの詳細を一覧表示します。
- **機器カーブ:** クロマトグラム/エレクトロフェログラムと併せて、画面と出力に表示する機器データカーブを選択することができます。

ナビゲーションテーブルツールバー

ナビゲーションテーブルには、シングルラン/シーケンスデータのレビュー、またはシーケンスデータの再解析のどちらかが可能な2つのツールセットが含まれています。

データレビューツールセット

ナビゲーションテーブルのレビュー機能により、読み込まれたシグナルを自動的にまたはマニュアルで処理することができます。**[プレファレンス]**、**[シグナル/レビューオプション]**で指定された選択に応じて、システムは自動的にシグナルを積分し、ファイルが読み込まれる時に各ファイルのレポートを印刷できます。データファイルに適用されるメソッドは、トップメニュー内に表示されます。

シーケンス再解析ツールセット

シーケンス再解析ツールセットは、ChemStation B.02.01以降で取り込まれたシーケンスが読み込まれ、「**ユニークなフォルダ作成**」がオンの状態で取り込また場合にのみ利用可能です。シーケンスの再解析の開始、停止、一時停止が可能です。さらにツールバーからは、シーケンスの再解析および印刷用のパラメータを変更するために、次に挙げるダイアログボックスにアクセスできます。

- **シーケンステーブル**(シーケンスデータコンテナ内にある、元の *.s テンプレートのコピー)
- **[シーケンスパラメータ]**ダイアログボックス
- **[シーケンス出力]**ダイアログボックス
- **[シーケンスサマリパラメータ]**ダイアログボックス
- **[拡張統計パラメータ]**ダイアログボックス
- **現在のシーケンスの保存**
- **現在のシーケンスの印刷**

ナビゲーションテーブルを用いたデータレビュー

【再計算モード】でデータをレビューするには、【ナビゲーションテーブル】ツールバーでをクリックします。この操作で、【再計算モード】ツールセットが開きます。必要なワークフローに応じて、次に挙げる3つの方法のうちの1つを使用してデータをレビューできます。

- 1 各データファイルと一緒に保存されているデータ解析メソッドを使用してデータをレビューする（シーケンスデータ B.02.01 以降）。【データ解析】モードで、【再計算】メニューから【オートステップ開始】を選択し、データと一緒に保存されている個々のデータ解析メソッドをシステムに読み込ませ、その後データファイルを読み込みます。データレビュー処理時にナビゲーションテーブルの各行にアクセスする際、選択したデータファイルにリンクされたメソッドを読み込み、レポートのレビューおよび作成に使用します。
- 2 異なるメソッドを使用してデータをレビューする。データのレビューに、データファイルと一緒に保存されたメソッドとは異なるメソッドを使用する場合は、【データ解析】モードの【再計算】メニューから【メソッド】を選択します。この場合、【メソッドで再計算】ダイアログボックスでメソッドとレポートテンプレートを選択します。【オートステップ間隔】およびレポートの【出力先】を指定することもできます。このダイアログボックスで一時的に選択する値によって【プレファレンス】ダイアログボックスの【シグナル/レビューオプション】タブの値が無効になります。この値は ChemStation セッションを終了するときにリセットされます。選択したメソッドを読み込み、結果セットのすべてのデータファイルの結果を計算するために使用します。
- 3 前回使用したメソッドを使用して、データをレビューする。【データ解析】モードの【再計算】メニューから、【前回の結果モード】を選択します。このモードでは、そのデータファイルの結果を計算するために前回使用されたメソッドを読み込みます。データ解析メソッドが存在しないデータファイルは、オートステップでスキップされるので注意してください。このモードは、オートステップおよびデータファイルのマニュアル読み込みの両方に影響します。

ナビゲーションテーブルを用いたシーケンス再解析

注記

リビジョン B.01.03 までの ChemStation で取り込んだシーケンスデータは、**[メソッド & ランコントロール]**ビュー内の**再解析**オプションを用いて、再解析する必要があります。**[ユニークなフォルダ作成]** をオフに切り換えると、B.03.01 以降で取り込まれたデータに対しても同じことが適用されます。

ChemStation リビジョン B.02.01 以降で取り込まれたシーケンスデータは、**[データ解析]**ナビゲーションテーブルの再解析ツールセットを使用して再解析する必要があります。

データ解析のナビゲーションテーブルを使用して再解析を行うには、次に挙げるすべてのファイルがシーケンスデータコンテナ内に入っている必要があります。

- ・ シーケンスデータファイル (*.d)
- ・ シーケンスに使用されたすべてのメソッドファイル (*.m)
- ・ オリジナルシーケンステンプレートのコピー (*.s)
- ・ シーケンス関連バッチファイル (*.b)
- ・ シーケンス関連ログブックファイル (*.log)

解析中に、データファイル用の個々のメソッドである DA.M とバッチファイル (*.b) が更新されます。

データ解析の再解析機能を使用すると、データコンテナのシーケンステンプレート (*.s) を変更して、倍率、希釈率などを変更したり、再解析に他のメソッドを使用したりできます。デフォルトでは、データ解析の再解析シーケンスパラメータ「**メソッド実行部分**」は「**再解析のみ**」に設定され、「**シーケンステーブル情報を使用**」オプションにチェックマークが付きます。事前に定義された初期値によって、シーケンステンプレートのパラメータが変更でき、**[データ解析]** シーケンスパラメータを再度編集することなく再解析を実行できます。

シーケンステンプレートのメソッドを変更してないことがはっきりしている場合は、シーケンスコンテナに格納されているシーケンスメソッドを使用して、システムはシーケンスを再解析します。このメソッドは、データ取得中に使用された元のメソッドです。特定のメソッドパラメータを変更する必要がある場合には（たとえば、*.xls ファイルへの出力指定など）シーケンスコンテナのメソッドを変更し保存する必要があります。この一般的な変更は、再解析中にすべてのデータファイルに適用されます。

さらにデータを取り込むために更新済みのシーケンスコンテナメソッドを使用したい場合は、シーケンスデータコンテナから定義したメソッドパスにこのメソッドをコピーする必要があります。新しいメソッドまたは更新されたメソッドは、ChemStation エクスプローラのメソッドビューでマスターメソッドとして利用可能になります。

バッチレビューとは

バッチレビューとは、データ解析に含まれる機能で、分析者がシーケンスの結果の「最初の」レビューを行ったり、分析の選択を迅速、容易にするのに役立つように設計されています。このバッチレビューは、たくさんのサンプルを再解析する場合に特に時間を節約できます。シーケンスが分析されると、必ずバッチファイル (拡張子 .b を持つ) が自動的に生成され、データファイルとともにデータディレクトリ内に配置されます。このバッチファイルには、バッチレビューそれ自体の中にあるデータファイルへのポインタを含んでいます。バッチを読み込む際、分析者はバッチに使用するメソッドを選択し、バッチ内で分析する任意のデータファイルを個別に選択するだけです。キャリブレーションの正確さ、機器のパフォーマンス、および個別の積分を結果を承認する前にチェックすることができます。変更されたクロマトグラム特有のパラメータは、データの追跡を可能にするために、データファイルといっしょに保存できます。この対話式的环境では、ピーク純度、ライブラリ検索など、その他すべてのデータ解析機能の全体にアクセスできます。

バッチレビューでは、標準データ解析と同じデータ解析レジスタ (ChromReg および ChromRes) を使用するため、分析を実行中のオンラインセッションでは使用すべきではありません。

ECM を用いた ChemStation 使用時における バッチレビュー機能の有効化

ECM を用いて OpenLab CDS ChemStation Edition を使用する場合、デフォルトではバッチレビュー機能は使用できないようになっています。バッチレビューを使用するためには、ChemStation.ini ファイルの [PCS] セクションのエントリからこの機能を有効にする必要があります。このファイルは、Windows ディレクトリ (c:\WINDOWS) にあります。

[PCS] _BatchReview=1

デフォルトエントリの _BatchReview=0 でこの機能をオフにします。

バッチ設定

バッチとは、ユーザー定義のメソッドを使用して処理される、ユーザーが選択した一連のデータファイルのことです。バッチ内のすべてのデータファイルは、同じメソッドを使用して処理されます。レビューのために新しいサンプルが読み込まれるごとに実行される処理ステップを選択することができます (積分、同定/定量、レポート)。

バッチ内のすべてのキャリブレーションランが、平均化されたレスポンスファクタを使用して1つのシングルキャリブレーションテーブルを生成するために使用されます。このテーブルは、その後、定量するのに使用されます。

バッチテーブル

ユーザーが設定できるランがバッチテーブルに表示されます。

- テーブルの列の数と内容を指定できます。
- 分析は次に挙げる指標でソートできます。
 - 他のすべての条件から独立しているランインデックス (分析が取り込まれた順序)
 - サンプルタイプ (コントロールサンプル、キャリブレーションサンプル、ノーマルサンプルの順) と各サンプルタイプ内の分析インデックス
 - メソッドと (データ取り込みをするのに複数のメソッドが使用された場合は) 各メソッド内の分析インデックス
- サンプル、キャリブレーションサンプル、およびコントロールサンプルはテーブルに表示することも隠すこともできます。

選択された分析ごとに、バッチテーブルの1行を使用します。サンプルタイプを「削除」に変更することで、バッチテーブルの分析を除外できます (キャリブレーションからなど)。

化合物テーブル

化合物の結果がユーザー設定が可能な化合物テーブルに表示されますが、化合物テーブルの内容はバッチテーブル内のサンプルのタイプに依存します。

- 化合物リストは、バッチレビュー用に読み込まれたメソッド内で検出されたすべての化合物を含んでいます。
- キャリブレーションサンプルのみがバッチテーブルに表示される場合は (サンプルとコントロールサンプルは隠されている)、化合物テーブルにはキャリブレーション関連情報のための列が追加表示されます (予想アmount、相対エラー、および絶対エラー)。
- コントロールランのみがバッチテーブルに表示される場合は (サンプルとキャリブレーションサンプルは隠されている)、化合物テーブルには定義済みのコントロールリミット用の列が追加表示されます。

化合物特有の情報を含む列には、%s をカラムの仕様に追加することにより、化合物の名前をテーブルタイトルに含めることができます。

バッチレポート

バッチレポートには、通常、バッチテーブルと化合物テーブルに類似した2つのテーブルが含まれます。これらのテーブルも、ユーザー設定が可能です。

化合物特有の情報を含む列には、%s をカラムの仕様に追加することにより、化合物の名前をテーブルタイトルに含めることができます。複数行のヘッダーが使用できます。記号「|」を改行する位置に挿入します。

ユーザーインターフェイス

バッチレビューでは、次の2つのユーザーインターフェイスの中から選択できます。

- 標準インターフェイスには、バッチメニューのアイテムのほとんどに対応するボタンバー、バッチテーブル、化合物テーブルが含まれています。
- 最低限のインターフェイスには、標準インターフェイスと同様のボタンバーが含まれていますが、バッチテーブルと化合物テーブルがバッチテーブルに特化した情報のみを含むコンボボックスに置き換えられています。最低限のインターフェイスのボタンバーには、バッチテーブル関連または化合物テーブル関連のボタンが含まれていません。

レビュー機能

次の2つの方法でデータファイルを表示できます。

- テーブルから表示したい分析を選択する、マニュアルによる表示
- データファイルごとのインターバルを事前定義した、自動表示自動表示では、テーブルに表示されているサンプルタイプのみが表示されます。分析は、テーブル内の順序に従って表示されます。自動レビューは一時停止ができ、その後再開したり、停止したりできます。

バッチレビューでは、ChemStation が提供する標準機能が使用できます。これには、キャリブレーション、たとえばスムージングやマニュアル積分によるクロマトグラムのマニュアル操作が含まれます。データファイルに加えられたすべての変更は、マークされバッチファイルとともに保存されます。レビューされたクロマトグラムは、バッチテーブル内でアスタリスクでマークされます。現在のクロマトグラムのみに加えられた変更、またはバッチ内のすべてのクロマトグラムに加えられた変更を破棄することもできます。

注記

バッチレビューでは、分析ごとにマニュアル積分イベントを保存できます。バッチレビュー外部のデータファイルと一緒にマニュアルイベントを保存することも可能です。2つのマニュアル積分設定の矛盾を避けるため、データファイルと一緒に保存されたマニュアルイベントはバッチレビューでは適用されません。

レビューが開始されると、選択された処理オプションが実行されます。その処理がすでに実行され、変更が保存されていると、処理済の結果が読み込まれます。これは、未処理を読み込むよりも処理が必要ないので短時間で済みます。

バッチレビュー内のキャリブレーション

バッチレビュー内のキャリブレーションは、シーケンステーブルのリキャリブレーション設定とは独立して働きます。バッチキャリブレーションの最初のステップでは、必ずキャリブレーションテーブルのレスポンスおよびリテンションタイムのエントリ両方が置き換えられます。以降のキャリブレーション標準に対しては、レスポンスおよびリテンションタイムの値が平均化されます。

バッチレビューツールバーをクリックすると、バッチにあるすべてのキャリブレーションランでシステムがリキャリブレーションし、リキャリブレーションされたキャリブレーションテーブルが作成されます。次に、バッチレビューツールバーをクリックすると、キャリブレーションされた化合物ごとのアマウントが再計算されます。すべてのサンプルのアマウントが、リキャリブレーションされたキャリブレーションテーブルから計算されます。

バッチレポート

ユーザー設定が可能な「バッチテーブル」159 ページは、プリンタへ直接印刷したり、画面に表示したり、次に挙げるフォーマットのうちの1つを使用して、ユーザ指定のプレフィックスを付けてファイルに出力することもできます。

- 拡張子 .TXT を持つ UNICODE テキスト
- 拡張子 .DIF を持つデータ交換フォーマット
- 拡張子 .CSV を持つ CSV (値がコンマで区切られた) フォーマット
- 拡張子 .XLS を持つ Microsoft Excel フォーマット

レポートオプションは、バッチテーブル内のソートメソッドとは独立したサンプルソート (ランインデックス、サンプルタイプ、またはメソッドによる) も可能にします。ソートの優先順序は、「バッチテーブル」159 ページに従います。

バッチ履歴

バッチレビューでは、現在のバッチ処理に関連するすべてのアクションがログに記録されます。バッチを変更するすべてのアクション (たとえば、表示されたクロマトグラムの変更、サンプルタイプの変更、バッチの読み込みおよび保存など) に対しては、日付とタイムスタンプ、現在のオペレーター名、およびイベントの説明を記録する行がバッチ履歴に1行追加されます。

バッチ履歴には、自分のコメントを追加することもできます。既存のバッチ履歴のエントリは編集不可能で、履歴リストは、バッチ履歴のメニューアイテムからはできないとアクセスできません。

ACAML とは 166

ACAML スキーマ 167

ChemStation で薬局方に関連するファクタをレポート 168

OpenLab CDS ChemStation Edition には、2 つのレポートタイプがあります。クラシック ChemStation レポート（ChemStation B バージョンと同様）か新しいインテリジェントレポートを選択できます。このトピックでは、インテリジェントレポート機能で使用する ACAML スキームについて説明します。

ACAML とは

ACAML(Agilent Common Analytical Markup Language) は、クロマトグラフィおよび分光法ドメインで分析データを取り込み、記述するためのマークアップ言語です。ACAML は分析環境のすべてのデータタイプを記述できることを目的にしています。ACAML は、さまざまなプラットフォームやアプリケーション間の情報のシームレスな交換を可能にする、Agilent 共通の基準を提供することに重点を置いています。

その取り組みは、テクニックやアプリケーションに依存しない統一されたスキーマ言語を定義するものです。ACAML を使用すると、特別な捉え方（例：結果中心の視点）をすることなく包括的な方法で分析データを説明することができます。その範囲は、シングルの機器や複数の機器、メソッド、ユーザーおよび何百や何千ものサンプルを使用した複雑なシナリオまで様々です。

ACAML インスタンスドキュメントを処理して確認するための追加アプリケーション (特別な ACAML 検証ソフトなど) は必要ありません。初版では、ACAML はクロマトグラフィデータ (LC、GC) のみをサポートします。

ACAML スキーマ

ACAML スキーマは XML 標準規格をベースにしています。

ACAML スキーマは以下のように強く定型化されています。

- 標準化されたデータ交換の支援
- 自己定義型の無期限成長を回避

スキーマを定義することで、各インスタンスドキュメントが確実に定義され、すべてのオブジェクト間の参照の整合性が保証されます。ACAML インスタンスドキュメントを処理して確認するための追加アプリケーション (特別な ACAML 検証ソフトなど) は必要ありません。

ChemStation で薬局方に関連するファクタをレポート

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 11 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 (RLE)	インテリジェント レポート (RTE)
テーリング ファクタ	シンメトリ ー係数	シンメト リー係数	$S = W_{0.05h}/2f$	USP テーリング	ピーク_ テーリングファクタ
-	-	-	$S = W_{0.10h}/2f$	USP テーリング ファクター (10%高さ)	ピーク_ テーリングファクタ ー (10パーセント)
-	相対 リテンシ ョン (調整)	分離係数	$r = (t_{R2} - t_0)/(t_{R1} - t_0)$		相対リテンション時 間_EP
相対 リテンシ ョン	-	-	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ ピーク a の $T_R <$ ピーク b の T_R	選択性	ピーク_選択性
-	分離度	分離度	$R_s = 1.18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0.5h1} + W_{0.5h2})$	分離度(EP) 分離度(JP)	ピーク_分離度_EP ピーク_分離度_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right) (T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	分離度	ピーク_分離度_ クラシック
分離度	-	-	$R_s = 2.0 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 - W_2)$	-	ピーク_分離度 _USP

表 11 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 (RLE)	インテリジェント レポート (RTE)
効率			$N = 16 \times (t/W)^2$	理論段数 タンジェン ト法	ピーク_理論段数 _USP
-	効率	効率	$N = 5.54 \times t_R^2 / W_{0.5h}^2$	* 理論段数 (半値幅法) :	ピーク_理論段数 _EP
相対 リテンシヨ ンタイム	相対 リテンシヨ ンタイム		$Rr = t_2/t_1$	-	ピーク_ 相対リテンションタ イム
	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_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。		ピーク_S/N_6シグ マ
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 11 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 (RLE)	インテリジェント レポート (RTE)
-	-	-	$S=B/A$	Foley-Dorsey 式 テーリン グファクタ ー (10% 高 さ)	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7 (T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A,B)/\min(A,B))}$	Foley Dorsey 理論段数	-

ベリフィケーションおよび診断ビュー 172

システム ベリフィケーション 172

GLP セーブレジスタ 175

DAD テスト機能 177

DAD テストレビュー機能 177

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](#)」 177 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

GLP セーブレジスタ

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 CDS ChemStation Edition 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、検証担当者はシステムの検証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 2010-2019

Published in Germany
04/2019



M8301-96029 リビジョン C

