



Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition

Guía de referencia sobre los principios de funcionamiento

Avisos

Número de referencia del manual:

M8301-95029 Rev. C
Edición 04/2019

Impreso en Alemania

Copyright

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2019

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

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Esta guía es válida para la revisión C.01.10 del software Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition.

Garantía

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

Licencias sobre la tecnología

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

Avisos de seguridad

PRECAUCIÓN

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

ADVERTENCIA

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

En esta guía...

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

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

- Para conceptos de OpenLab CDS ChemStation Edition, nuevas funciones y flujos de trabajo: el manual *OpenLab CDS ChemStation Edition – Conceptos y flujos de trabajo*.
- Para información sobre tareas contextuales específicas (“cómo” hacer algo), tutoriales, referencias a la interfaz de usuario y ayuda para la resolución de problemas: el sistema de ayuda en línea de ChemStation.
- Para obtener más información sobre la instalación del sistema y la preparación de las instalaciones: la *guía de instalación de la estación de trabajo Agilent OpenLab CDS*.
- Para obtener más información sobre los principios y tareas de administración del sistema: la *Agilent OpenLab CDS Administration Guide (Guía para administradores de Agilent OpenLab CDS)*.

1 Adquisición de datos

En este capítulo se describen los conceptos de adquisición de datos, ficheros de datos y libro de registro, entre otros.

2 Integración

En este capítulo se describen los conceptos de integración de los algoritmos de integración de ChemStation. Describe el algoritmo de integración, la integración y la integración manual.

3 Identificación de picos

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

4 Calibración

Este capítulo describe los principios de calibración del software de la ChemStation.

5 Cuantificación

En este capítulo se describe cómo ChemStation lleva a cabo la cuantificación. Proporciona detalles sobre los cálculos de % de área y % de altura, el cálculo por estándar externo o ESTD (External Standard), el cálculo de % Norm, el cálculo por estándar interno o ISTD (Internal Standard) y la cuantificación de picos no identificados.

6 Evaluación de la idoneidad del sistema

En este capítulo se describe lo que puede hacer la ChemStation para evaluar el rendimiento tanto del instrumento analítico antes utilizado para el análisis de muestras como el método analítico antes de que se utilice por rutina y comprobar el rendimiento de los análisis antes y durante los análisis rutinarios.

7 Cálculos específicos de CE

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

8 Revisión de datos, reprocesamiento y revisión por lotes

Este apartado describe las opciones para revisar datos y cómo reprocesar datos de secuencia. Asimismo, se detallan los conceptos de Revisión por lotes, Configuración de lotes, funciones de revisión e informes de lotes.

9 Elaboración de informes

OpenLab CDS ChemStation Edition ofrece dos tipos de elaboración de informes: Puede elegir entre la elaboración de informes clásica (idéntica a la función de presentación de datos de ChemStation B), o la nueva función Informes inteligentes. Este tema explica y ofrece una referencia al esquema ACAML utilizado en la función de elaboración de informes inteligentes.

10 Verificación del sistema

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

Contenido

1 Adquisición de datos 8

Definición de la adquisición de datos 9

Información del estado 11

2 Integración 14

Definición de la integración 16

Algoritmos de integración de ChemStation 18

Principio de funcionamiento 23

Reconocimiento de picos 24

Asignación de la línea base 31

Medida del área de pico 46

Eventos de integración 49

Integración manual 58

3 Identificación de picos 61

Definición de la identificación de picos 62

Reglas de asignación de picos 63

Tipos de identificación de picos 64

Tiempo de retención o migración absoluto 65

Tiempos de retención/migración corregidos 67

Cualificadores de pico 69

El proceso de identificación 72

4 Calibración 74

Curva de calibración 75

Calibración de grupo 77

Opciones de recalibración 78

5	Cuantificación	79
	Definición de la cuantificación	80
	Cálculos de cuantificación	81
	Factores de corrección	82
	% de área y % de altura	83
	Procedimientos de cálculo calibrados	84
	Cálculo ESTD	85
	Cálculo de % Norm	87
	Cálculo ISTD	88
	Cuantificación de picos no calibrados	91
6	Evaluación de la idoneidad del sistema	93
	Evaluación de la idoneidad del sistema	95
	Determinación del ruido	98
	Cálculo de la asimetría y simetría de pico	106
	Fórmulas y cálculos de idoneidad del sistema	108
	Definiciones generales	109
	Definiciones del test de rendimiento	110
	Definiciones de reproducibilidad	120
	Acceso al número de doble precisión almacenado internamente	127
7	Cálculos específicos de CE	130
	Tablas de calibración	131
	Calibración con corrección de la movilidad	134
	Estilos de información especiales de electroforesis capilar	140
	Áreas de picos corregidas	141
	Idoneidad del sistema para electroforesis capilar	142
	CE-MSD	143
8	Revisión de datos, reprocesamiento y revisión por lotes	144
	Tabla de navegación de Análisis de datos	145
	Definición de la revisión por lotes	151
	Habilitación de la función de revisión por lotes cuando se utiliza ChemStation con ECM	152

Configuración de lotes 153
Funciones de revisión 155
Informes de lotes 156

9 Elaboración de informes 157

Definición de ACAML 158
Esquema ACAML 159
Presentación de factores de farmacopeas en ChemStation 160

10 Verificación del sistema 162

Ventanas de verificación y diagnóstico 163
Registro GLPsave 166
Función del test del DAD 168

1

Adquisición de datos

Definición de la adquisición de datos	9
Ficheros de datos	9
Monitores en línea	10
Libro de registro	10
Información del estado	11
Estado de ChemStation	11
Barra de estado	11
Diagrama del sistema	12

En este capítulo se describen los conceptos de adquisición de datos, ficheros de datos y libro de registro, entre otros.

Definición de la adquisición de datos

Durante la adquisición de datos, todas las señales adquiridas por el instrumento se convierten de señales analógicas a señales digitales en el detector. La señal digital se transmite a ChemStation electrónicamente y se guarda en el fichero de datos de la señal.

Ficheros de datos

Un fichero de datos comprende un grupo de ficheros guardados por defecto en el directorio DATA o en un subdirectorio de este directorio con un nombre de fichero de datos y una extensión .D. Se puede definir manualmente un nombre de fichero de datos con 42 caracteres, incluida la extensión. Cada fichero del directorio sigue una convención de nombres (véase *Convenciones de los nombres de ficheros* en la guía *Conceptos y flujos de trabajo*). Se pueden añadir directorios de datos adicionales con las opciones de **Preferences**.

Tabla 1 Ficheros de datos

Nombre	Description
*.CH	Ficheros de datos de señales cromatográficas o electroferográficas. El nombre del fichero está compuesto por el tipo de módulo o detector, el número de módulo y la identificación de la señal o del canal. Por ejemplo, ADC1A.CH, donde ADC es el tipo de módulo, 1 es el número de módulo, A es el identificador de la señal y .CH es la extensión cromatográfica.
*.UV	Ficheros de datos espectrales UV. El nombre del fichero está compuesto por el tipo de detector y el número de dispositivo (solo con detectores de diodo-array y de fluorescencia).
*.ms	Ficheros de datos espectrales LCMS
REPORT.TXT, REPORT.PDF	Ficheros de datos de informes para los ficheros de datos de señal equivalentes. Nota: el nombre de fichero de un PDF puede ser diferente en caso de utilizar la convención de denominación Unique PDF.
Acq.MACAML	Este fichero contiene información acerca del método empleado durante la adquisición de datos. La información se guarda en el formato ACAML. Este tipo de ficheros los usa Intelligent Reporting.

Adquisición de datos

Definición de la adquisición de datos

Tabla 1 **Ficheros de datos**

Nombre	Description
Sequence.ACAML_	Este fichero contiene los resultados de una inyección única. La información se guarda en el formato ACAML. Este tipo de ficheros los usa Intelligent Reporting.
SAMPLE.MAC o SAMPLE.XML	Este fichero se utiliza para guardar valores de la muestra.
SAMPLE.MAC.BAK o SAMPLE.XML.BAK	Copia de seguridad del sample.mac. original. El fichero .bac se crea durante el reprocesamiento, cuando se actualizan por primera vez los parámetros de la muestra (como multiplicadores). Guarda los valores originales de la muestra utilizados durante la adquisición.
RUN.LOG	Entradas del libro de registro generadas durante un análisis. El libro de registro guarda un registro de los análisis. Todos los mensajes de error y los cambios de estado importantes de ChemStation se introducen en el libro de registro.
LCDIAG.REG	Para LC solamente. Contiene las curvas de los instrumentos (gradientes, temperatura, presiones, etc.), el volumen de la inyección y la descripción de los disolventes.
ACQRES.REG	Contiene información sobre las columnas. En GC, también contiene el volumen de la inyección.
GLPSAVE.REG	Parte del fichero de datos cuando se especifica Guardar datos GLP.
M_INTEV.REG	Contiene eventos de integración manuales.

Monitores en línea

Existen dos tipos de monitores en línea: el monitor de señales en línea y el monitor de espectros en línea. Para obtener más detalles, consulte la guía ChemStation Concepts and Workflows (Conceptos y flujos de trabajo de ChemStation).

Libro de registro

El libro de registro muestra los mensajes generados por el sistema analítico. Pueden ser mensajes de error, mensajes del sistema, o mensajes de eventos procedentes de un módulo. El libro de registro recoge estos eventos independientemente de que se muestren en pantalla o no.

Información del estado

Estado de ChemStation

La ventana ChemStation Status muestra un resumen del estado del software ChemStation.

Cuando se ejecuta un solo análisis:

- la primera línea de la ventana ChemStation Status muestra el análisis en curso,
- la segunda línea de la ventana muestra el estado del método actual, y
- la tercera línea muestra el nombre del fichero de datos primarios además del tiempo de análisis en minutos (para los instrumentos GC, también se muestran los ficheros de los inyectores delantero y posterior).

La ventana Instrument Status ofrece información sobre el estado de los módulos instrumentales y detectores. Muestra el estado de cada componente y las condiciones actuales cuando corresponda, por ejemplo, presión, gradiente y flujo.

Barra de estado

La vista Método y Control de ejecución de la interfase gráfica de usuario del sistema ChemStation está compuesta por barras de herramientas y una barra de estado. La barra de estado contiene un campo de estado del sistema e información sobre el método y la secuencia actualmente cargados. Si se modificaron después de cargarlos, aparecen marcados con un asterisco o una rueda dentada amarillos, en función del instrumento. El símbolo EMF amarillo indica límites de utilización que exceden los valores programados establecidos para consumibles de LC (por ejemplo, la lámpara).

Diagrama del sistema

Si los instrumentos analíticos configurados lo admiten (por ejemplo, los módulos LC Agilent Serie 1200 Infinity o el sistema GC Intuvo 9000), puede mostrarse un diagrama gráfico del sistema ChemStation que le permitirá comprobar rápidamente el estado del sistema de un vistazo. Seleccione la opción **System Diagram** en el menú **View** de la vista **Method and Run Control** para activar el diagrama. Se trata de una representación gráfica del sistema ChemStation El estado del sistema se mostrará utilizando la codificación por colores descrita a continuación.

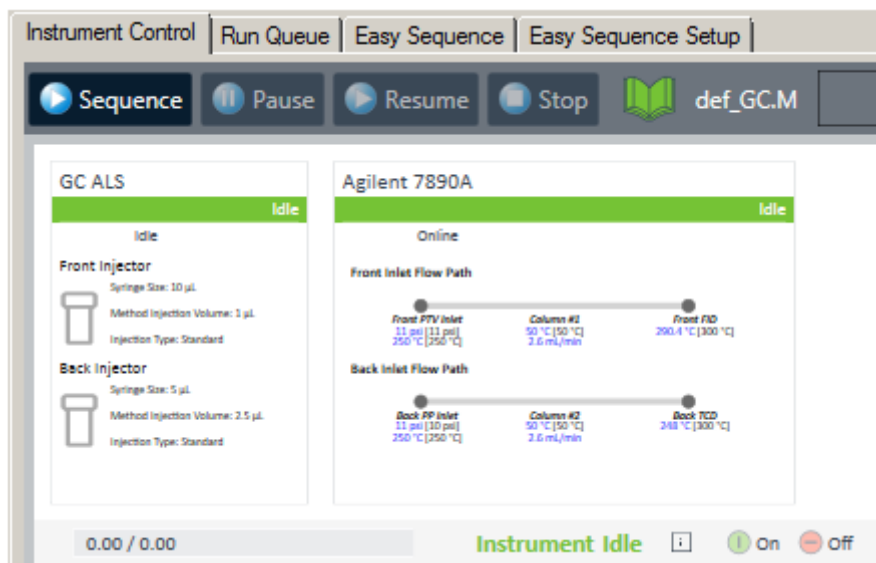


Figura 1 Diagrama del sistema, por ejemplo, para un sistema GC

Tabla 2 Colores empleados para indicar el estado del módulo o instrumento

Color	Status
Gris	Off-line (fuera de línea)
Verde	Inactivo
Naranja	No preparado
Rojo	Error
Cian	En espera (por ejemplo, con las lámparas apagadas)
Morado	Tiempo previo o posterior al análisis
Magenta	Inyección en curso
Azul	Análisis o tiempo posterior al análisis

Además, también podrá visualizar listas con los valores de los parámetros. Además de mostrar un resumen del estado, el diagrama permite tener acceso directo a los cuadros de diálogo para configurar los parámetros de cada componente del sistema.

Consulte la parte relativa a instrumentos del sistema de ayuda en línea para obtener más información acerca del diagrama del sistema.

2

Integración

Definición de la integración	16
Algoritmos de integración de ChemStation	18
Definición de términos	19
Definición de la línea base inicial	20
Seguimiento de la línea base	20
Asignación de la línea base	21
Identificación de los puntos cardinales de un pico	22
Principio de funcionamiento	23
Reconocimiento de picos	24
Anchura de pico	24
Filtros de reconocimiento de picos	25
Agrupamiento	26
Algoritmo de reconocimiento de picos	27
Picos solapados	29
Hombros	30
Asignación de la línea base	31
Construcción de la línea base por defecto	31
Inicio de la línea base	32
Final de la línea base	32
Penetración de la línea base	33
Relación pico/valle	34
Modos de división tangencial	36
Picos no asignados	43
Códigos de separación de picos	44
Medida del área de pico	46
Determinación del área	46
Unidades y factores de conversión	48
Eventos de integración	49
Eventos de integración para todas las señales	49
Eventos iniciales	49

Integración

Información del estado

Eventos programados	53
Integración automática	56
Integración manual	58
Almacenamiento de eventos de integración manual	59

En este capítulo se describen los conceptos de integración de los algoritmos de integración de ChemStation. Describe el algoritmo de integración, la integración y la integración manual.

Definición de la integración

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

La integración es un paso necesario para:

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

Función de la integración

Cuando se integra una señal, el software:

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

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

Capacidades del integrador

Los algoritmos del integrador incluyen las siguientes capacidades clave:

- posibilidad de integración automática para configurar los parámetros iniciales del integrador,
- la capacidad de definir tablas individuales de eventos de integración para cada señal cromatográfica o electroferográfica si se usan varias señales o más de un detector,

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

Algoritmos de integración de ChemStation

Para integrar un cromatograma o electroferograma, el integrador:

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

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

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

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

Para obtener más información, consulte “Eventos iniciales” en la página 49.

Definición de términos

Puntos cardinales

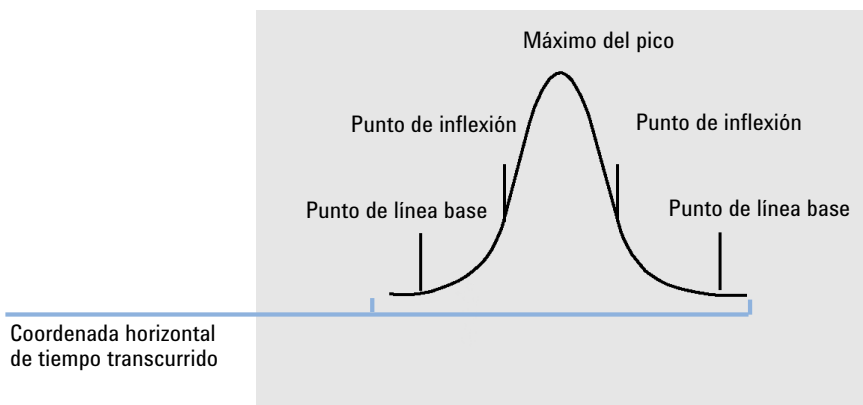


Figura 2 Puntos cardinales

Pico de disolvente

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

Hombro (frontal, trasero)

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

Pendiente

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

Definición de la línea base inicial

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

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

Seguimiento de la línea base

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

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

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

A medida que se van aceptando nuevos puntos de datos, el cono se desplaza hacia adelante hasta que dejen de cumplirse las condiciones.

Para ser aceptado como punto de línea base, un punto de datos debe cumplir las condiciones siguientes:

- debe encontrarse dentro de la zona definida como de línea base,
- la curvatura de la línea base en el punto de datos (determinada por los filtros basados en derivadas) debe estar por debajo de un valor crítico determinado por el valor actual del parámetro de sensibilidad de la pendiente.

El punto de línea base inicial establecido al comienzo del análisis se restablece así de forma continua, a una velocidad determinada por la anchura de pico, como el promedio móvil de los puntos de datos que se encuentran dentro de la zona de línea base durante un período de tiempo determinado por la anchura de pico. El integrador realiza un seguimiento continuo de la línea base y la restablece periódicamente para compensar la deriva hasta que detecta la pendiente ascendente de un pico.

Asignación de la línea base

El integrador asigna durante el análisis la línea base cromatográfica o electroferográfica con una frecuencia determinada por el valor de anchura de pico. Cuando ha muestreado un número determinado de puntos de datos, restablece la línea base desde el punto de línea base inicial al punto de línea base actual. El integrador reanuda entonces el seguimiento de la línea base en el siguiente conjunto de puntos de datos para restablecer nuevamente la línea base. El proceso continúa hasta que el integrador identifica el inicio de un pico.

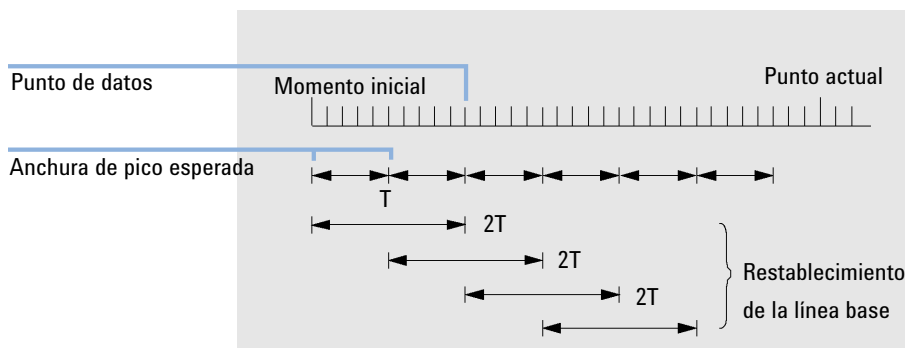


Figura 3 Línea base

Al inicio del proceso, se utiliza el primer punto de datos. El punto de línea base se restablece periódicamente de acuerdo con la siguiente fórmula:

Se suman las áreas durante un tiempo T (anchura de pico esperada). Ese tiempo no puede ser inferior a un punto de datos. El proceso continúa mientras exista una condición de línea base. Se adquieren asimismo medidas de pendiente y curvatura. Si tanto la pendiente como la curvatura son inferiores al umbral, se combinan entre sí dos sumas de áreas y se comparan con la línea base previa. Si el nuevo valor es inferior a la línea base previa, pasa a reemplazar inmediatamente al valor antiguo. Si es superior al valor previo, se graba como nuevo valor provisional de la línea base y se confirmará si un valor más cumple los criterios de planaridad de la pendiente y la curvatura. Esta última limitación

no tiene efecto cuando se permiten picos negativos. Durante la fase de línea base, es preciso realizar asimismo comprobaciones para examinar disolventes con rápida elevación de la señal; la elevación puede ser demasiado rápida para permitir la detección de una pendiente ascendente (para cuando se confirma la pendiente ascendente, el criterio de disolvente puede no ser ya válido). En el momento inicial, el primer punto de datos constituye la línea base. Ese valor se reemplaza por el promedio calculado sobre $2T$ si la señal está en base. La línea base se restablece entonces a cada intervalo T (consulte [Figura 3](#) en la página 21).

Identificación de los puntos cardinales de un pico

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

Iniciar

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

Máximo

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

Final

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

Principio de funcionamiento

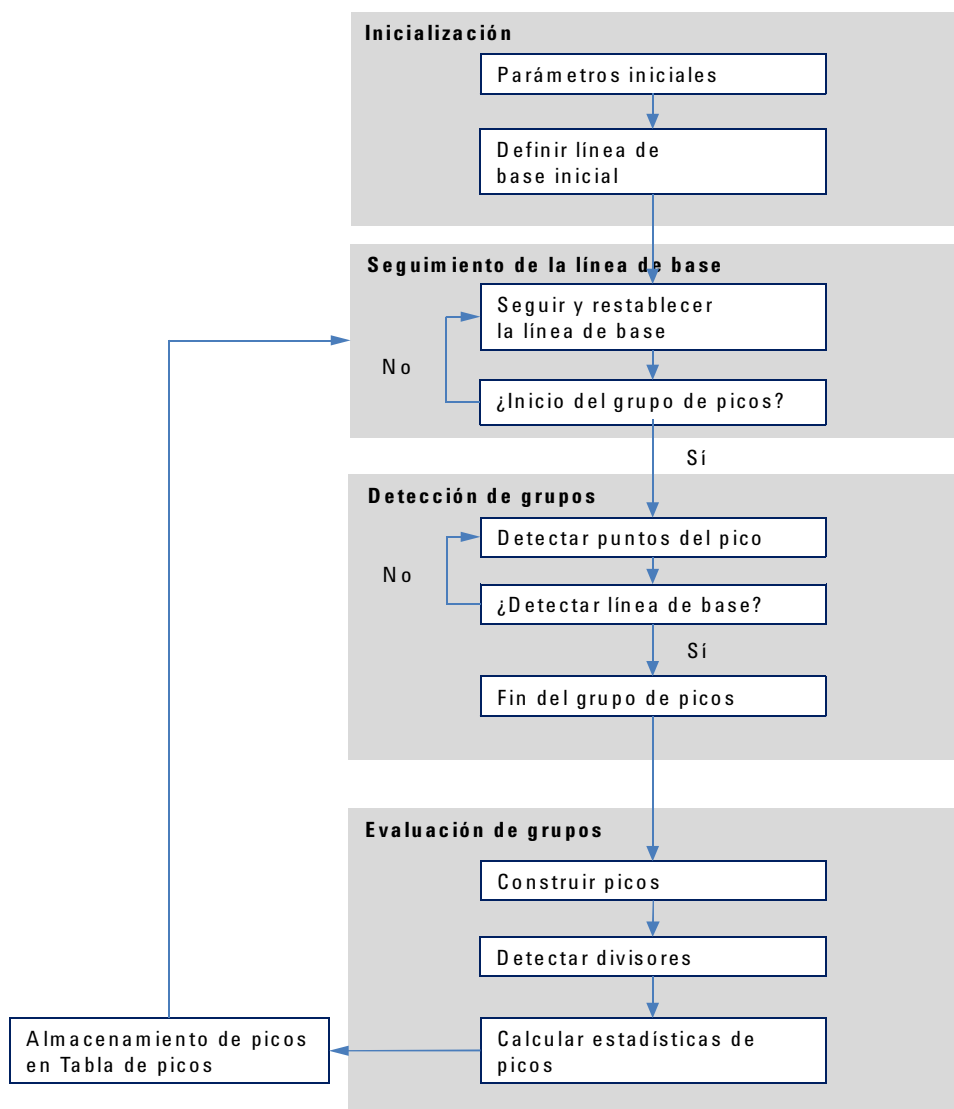


Figura 4 Diagrama de flujo del integrador

Reconocimiento de picos

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

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

Anchura de pico

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

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

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

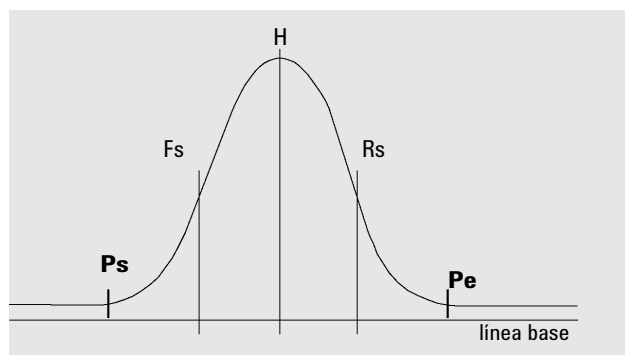


Figura 5 Cálculo de la anchura de pico

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

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

Hay tres modos de cambiar la anchura de pico:

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

Para obtener información acerca de las definiciones de anchura de pico utilizadas en los cálculos de idoneidad del sistema, consulte la sección “Evaluación de la idoneidad del sistema” en la página 93

Filtros de reconocimiento de picos

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

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

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

Integración

Reconocimiento de picos

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

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

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

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

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

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

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

Agrupamiento

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

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

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

El agrupamiento se realiza basándose en la velocidad de datos y la anchura de pico. El integrador utiliza esos parámetros para fijar el factor de agrupamiento de modo que se obtenga el número de puntos de datos apropiado (consulte [Tabla 3](#) en la página 27).

El agrupamiento se realiza en potencias de dos en función de la anchura de pico esperada u obtenida. El algoritmo de agrupamiento se resume en [Tabla 3](#) en la página 27.

Tabla 3 Criterios de agrupamiento

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

Algoritmo de reconocimiento de picos

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

Inicio del pico

En la [Tabla 4](#) en la página 28, la anchura de pico esperada determina el filtro cuyos valores de pendiente y curvatura se comparan con la sensibilidad de pendiente. Por ejemplo, cuando la anchura de pico esperada es pequeña, los valores del filtro 1 se añaden al acumulador de pendiente ascendente. Si la anchura de pico esperada aumenta, se utilizan entonces los valores correspondientes al filtro 2 y, en última instancia, al filtro 3.

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

Tabla 4 Valores de incremento del acumulador de pendiente ascendente

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

Fin del pico

En la [Tabla 5](#) en la página 28, la anchura de pico esperada determina el filtro cuyos valores de pendiente y curvatura se comparan con la sensibilidad de pendiente. Por ejemplo, cuando la anchura de pico esperada es pequeña, los valores del filtro 1 se añaden al acumulador de pendiente descendente. Si la anchura de pico esperada aumenta, se utilizan entonces los valores correspondientes al filtro 2 y, en última instancia, al filtro 3.

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

Tabla 5 Valores de incremento del acumulador de pendiente descendente

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

Algoritmo de determinación del máximo de pico

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

Picos solapados

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

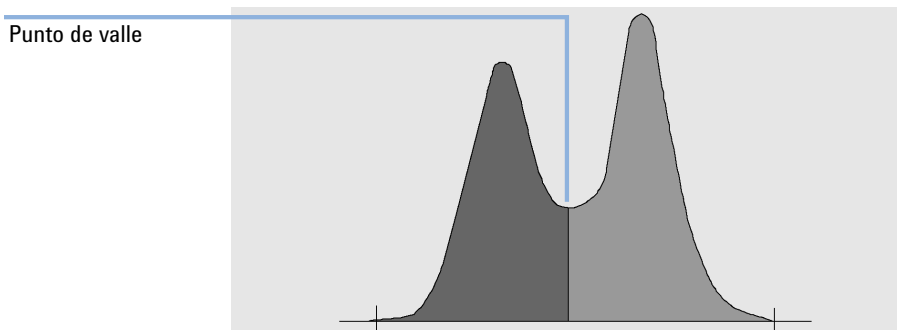


Figura 6 Picos solapados

El integrador procesa los picos solapados como sigue:

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

Hombros

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

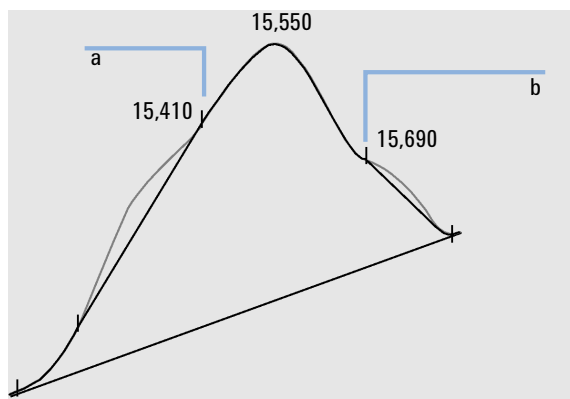


Figura 7 Hombros de pico

Los hombros se detectan a partir de la curvatura del pico, que viene dada por la segunda derivada. Cuando la curvatura cae a cero, el integrador identifica un punto de inflexión, como los puntos a y b en [Figura 7](#) en la página 30.

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

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

El área del hombro se resta del pico principal.

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

Asignación de la línea base

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

Construcción de la línea base por defecto

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

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

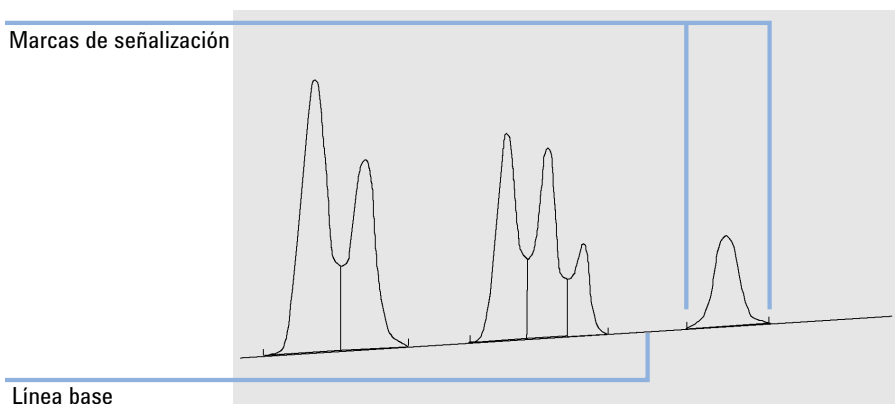


Figura 8 Construcción de la línea base por defecto

Inicio de la línea base

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

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

Final de la línea base

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

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

Penetración de la línea base

Se produce una penetración cuando la señal cae por debajo de la línea base construida (punto a en [Figura 9](#) en la página 33).

En caso de penetración, por lo general se reconstruye esa parte de la línea base, tal como muestran los puntos b en [Figura 9](#) en la página 33.

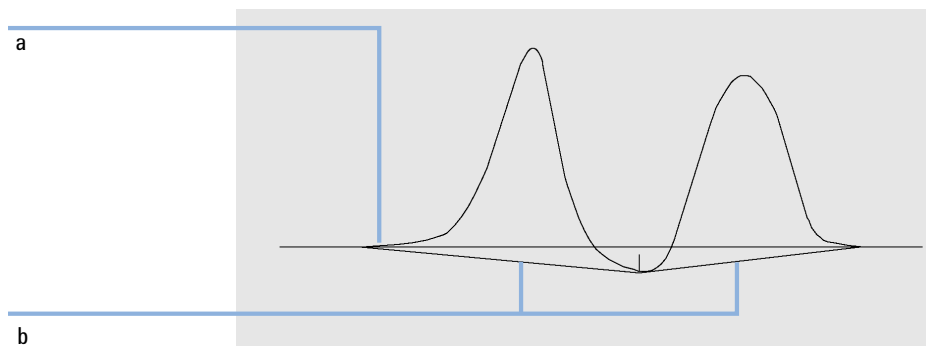


Figura 9 Penetración de la línea base

El usuario puede utilizar las siguientes opciones de seguimiento para eliminar todas las penetraciones de la línea base:

Classical Baseline Tracking (no penetrations)

Cuando se selecciona esta opción, cada grupo de picos se examina en busca de posibles penetraciones de la línea base. Si se encuentran penetraciones, se desplazan los puntos de inicio y/o final del pico hasta eliminarlas por completo (compárense las líneas base de [Figura 9](#) en la página 33 y [Figura 10](#) en la página 34).

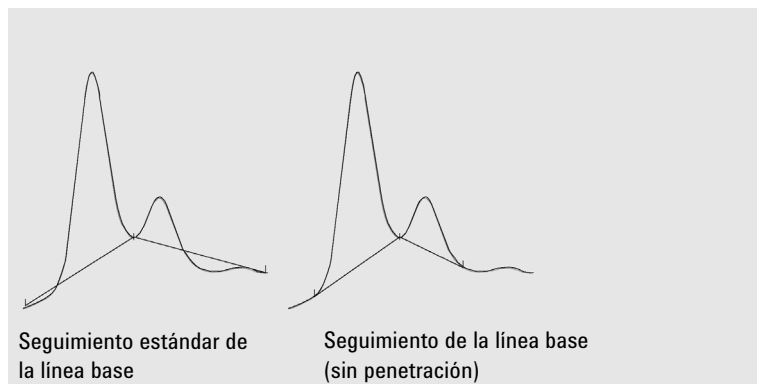


Figura 10 Seguimiento estándar de la línea base y seguimiento de la línea base (sin penetraciones)

NOTA

El **Baseline tracking (no penetration)** no está disponible para los picos del disolvente, con sus hombros y picos secundarios.

Seguimiento avanzado de la línea base

En el modo de seguimiento avanzado de la línea base, el integrador trata de optimizar la ubicación del inicio y el final de los picos, restablece la línea base para un grupo de picos y elimina las penetraciones de la línea base (consulte [Figura 10](#) en la página 34). En muchos casos, con el modo de seguimiento avanzado se consigue una línea base más estable, menos dependiente de la sensibilidad de la pendiente.

Relación pico/valle

La relación pico/valle es una medida de la calidad, que indica cómo de bien se separa el pico de otros picos de sustancias. Este parámetro especificado por el usuario forma parte del modo de seguimiento avanzado de la línea base. Se utiliza para decidir si dos picos que no muestran separación a nivel de la línea base deben separarse utilizando una línea de caída vertical o una línea base de valle. El integrador calcula la relación entre la altura corregida por la línea base del menor de los picos y la altura corregida por la línea base del valle. Cuando la relación pico/valle es inferior al valor especificado por el usuario, se utiliza una línea de caída vertical; de lo contrario, se traza una línea base desde la línea base del inicio del primer pico al valle y desde el valle a la línea base del final del segundo pico (vea la comparativa [Figura 10](#) en la página 34 con [Figura 11](#) en la página 35).

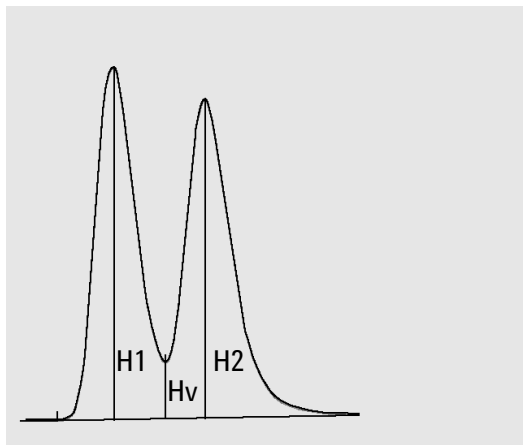


Figura 11 Relación pico/valle

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

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

y

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

Figura 12 en la página 35 muestra cómo el valor especificado por el usuario de la relación pico/valle influye en las líneas base.

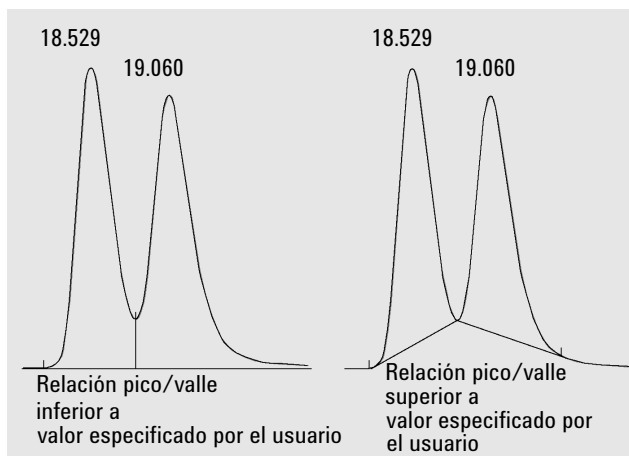


Figura 12 Efecto de la relación pico/valle sobre las líneas base

Modos de división tangencial

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

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

Ajuste a una curva exponencial

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

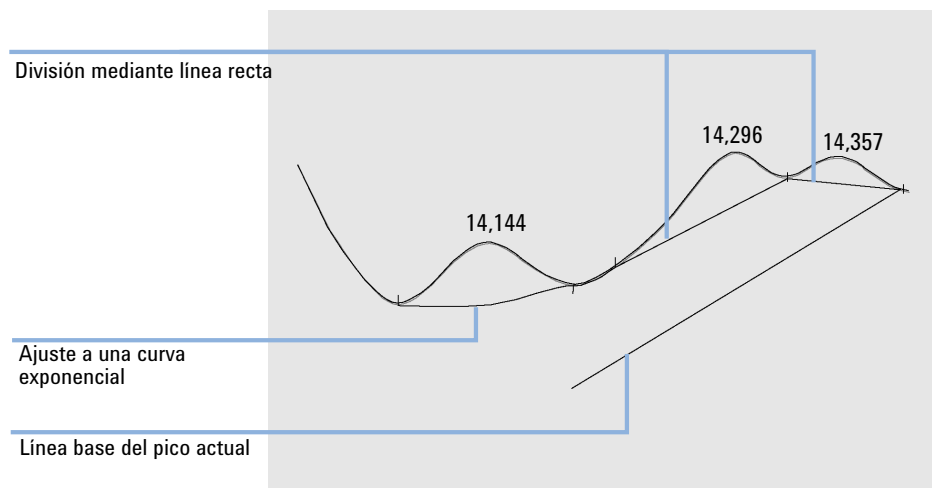


Figura 13 División exponencial

Nueva curva exponencial

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

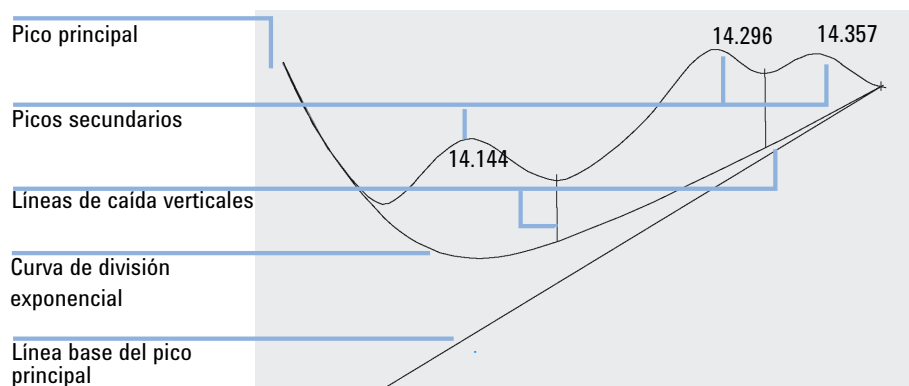


Figura 14 Nueva división exponencial

División mediante línea recta

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

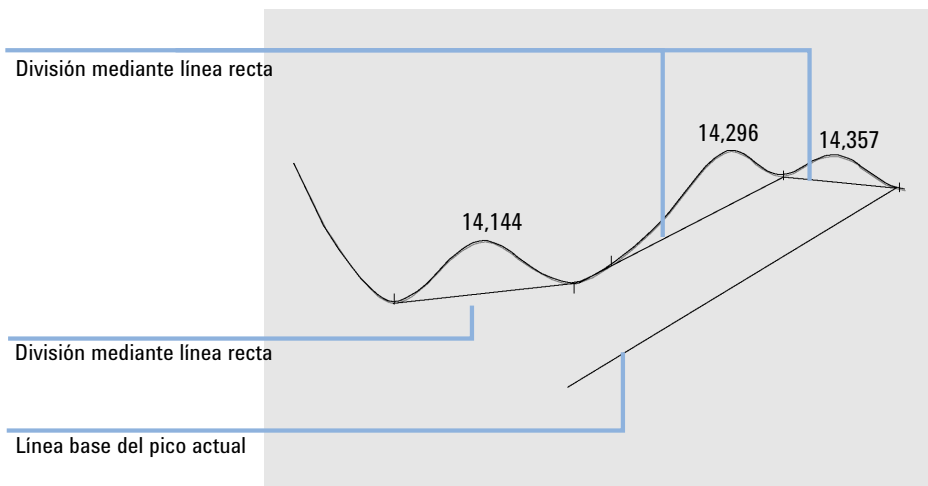


Figura 15 División mediante línea recta

Divisiones estándar

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

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

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

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

Criterios de división

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

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

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

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

NOTA

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

NOTA

Estos criterios no se utilizan si se está aplicando un evento programado para un cálculo exponencial o si el pico principal es en sí mismo un pico secundario de otro. El código de separación entre el pico principal y el secundario debe ser de tipo **Valley** (consulte "Códigos de separación de picos" en la página 44).

Integración

Asignación de la línea base

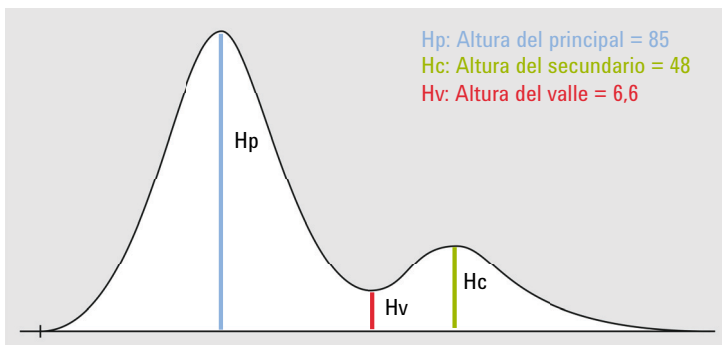


Figura 16 Ejemplo para calcular los valores de los criterios de división

Relación de alturas para división = H_p / H_c

Relación de división de valle = H_c / H_v

donde:

H_p	Altura del pico principal corregida por la línea base
H_v	Altura del valle por encima de la línea base
H_c	Altura del pico secundario corregida por la línea base

División de cola

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

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

División frontal

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

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

Cálculo de ajuste a curva exponencial empleado en las divisiones

Para calcular una división exponencial se utiliza la ecuación siguiente:

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

donde:

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

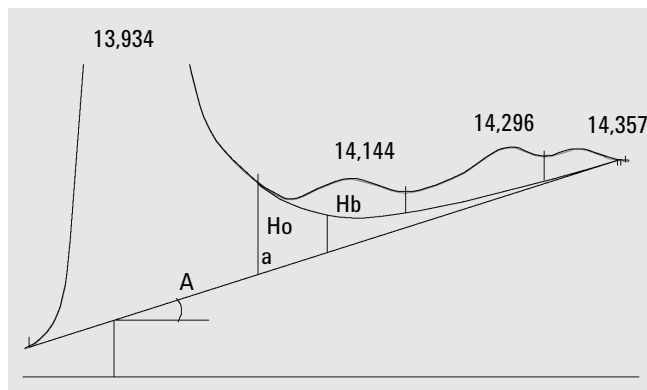


Figura 17 Valores utilizados para calcular una división exponencial

División de pico frontal

Al igual que para los picos secundarios ubicados en la cola de otro principal, la presencia de picos en el frente/la pendiente ascendente de otro pico requiere una integración especial, véase [Figura 18](#) en la página 42.

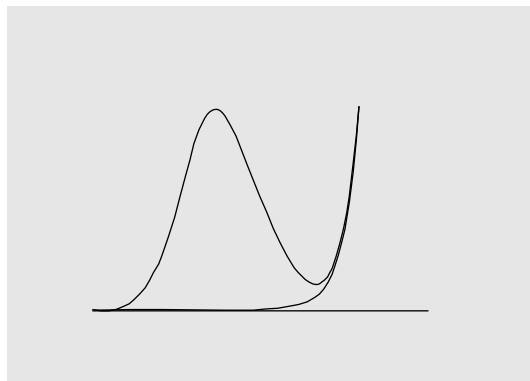


Figura 18 División de pico frontal

La división de picos frontales se trata del mismo modo que la de picos de cola, utilizando los mismos modelos de división.

Los filtros de división son los siguientes:

- relación de alturas para división frontal
- relación de altura con respecto al valle

La relación de altura con respecto al valle tiene el mismo valor para divisiones tanto de picos frontales como de picos de cola (véase la sección Relación de altura con respecto al valle); la relación de alturas para división frontal se calcula del mismo modo que la relación de alturas para división de cola (véase la sección Relación de alturas para división de cola) pero puede tener un valor diferente.

Picos no asignados

Con algunas construcciones de línea base, hay pequeñas áreas que quedan por encima de la línea base y por debajo de la señal y que no forman parte de ningún pico reconocido. Por lo general, estas áreas ni se miden ni se muestran. Si se habilita la función de picos no asignados, dichas áreas se miden y se muestran como picos no asignados. El tiempo de retención o migración correspondiente a tales áreas es el punto medio entre el inicio y el final del área, tal como se muestra en [Figura 19](#) en la página 43.

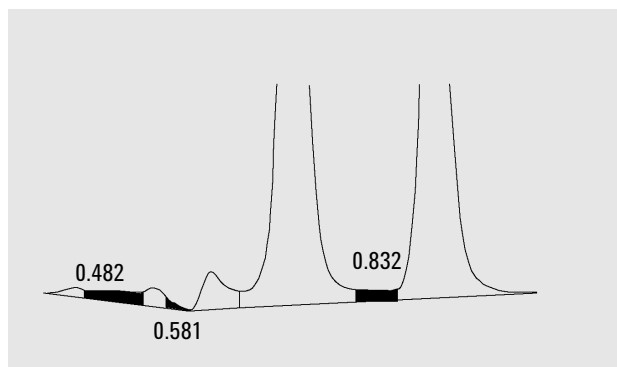


Figura 19 Picos no asignados

Códigos de separación de picos

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

Tabla 6 Código de cuatro caracteres

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

Caracteres 1 y 2

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

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

También se pueden añadir marcas adicionales (por orden de precedencia)

Carácter 3

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

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

Espacio en blanco

El pico es un pico normal.

Carácter 4

El cuarto carácter describe el tipo de pico.

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

Medida del área de pico

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

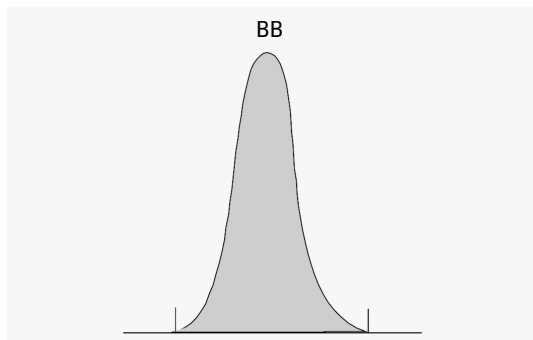


Figura 20 Medida del área de pico de línea base a línea base

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

Determinación del área

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

- para picos de línea base a línea base (BB), el área por encima de la línea base entre el inicio de pico y el fin de pico, como se muestra en [Figura 20](#) en la página 46,
- para picos de valle a valle (VV), el área por encima de la línea base segmentada con líneas de caída verticales trazadas a partir de los puntos valle, como se muestra en [Figura 21](#) en la página 47,

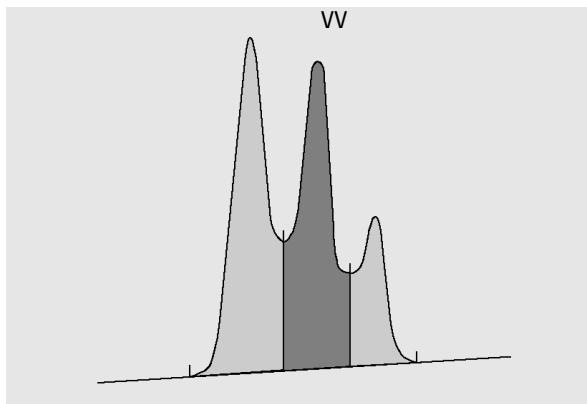


Figura 21 Medida del área para picos de valle a valle

- para picos tangenciales (T), el área por encima de la línea base restablecida,
- para picos de disolvente (S), el área por encima de la extrapolación horizontal desde el último punto de línea base encontrado y por debajo de la línea base restablecida asignada a picos tangenciales (T). Es posible que un pico de disolvente produzca una elevación de la señal demasiado lenta para el reconocimiento del pico o que en medio del análisis aparezca un grupo de picos que el usuario considere que deben ser tratados como un disolvente con una serie de picos montados. Ése suele ser el caso de un grupo de picos solapados en el que el primer pico es mucho mayor que el resto. El tratamiento más simple, el de la línea de caída vertical, exageraría los picos posteriores al estar éstos en realidad sobre la cola del primero. Forzando el reconocimiento del primer pico como pico de disolvente, es posible dividir de la cola el resto del grupo,
- los picos negativos que se dan bajo la línea base tienen un área positiva, como se muestra en [Figura 22](#) en la página 47.

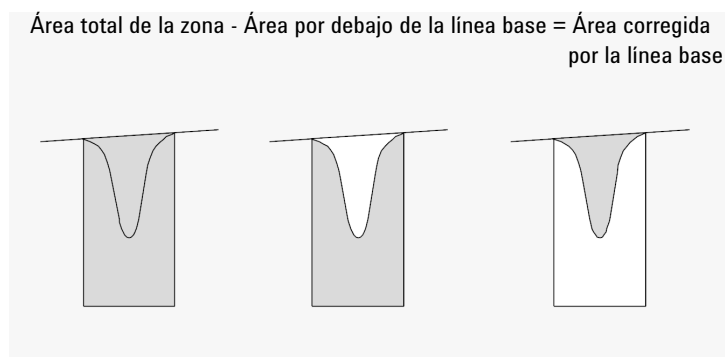


Figura 22 Medida del área para picos negativos

Unidades y factores de conversión

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

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

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

Eventos de integración

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

Eventos de integración para todas las señales

Los siguientes eventos se proporcionan para todas las señales:

- Modo de división tangencial
- Relación de alturas para división de pico de cola
- Relación de alturas para división de pico frontal
- Relación de división de valle
- Corrección de línea base
- Relación pico a valle

Eventos iniciales

Anchura de pico inicial

La anchura de pico inicial establece el valor de anchura de pico que el integrador utiliza internamente al comienzo del análisis. Esta anchura de pico inicial se utiliza para escalar el acumulador que detecta pendientes ascendentes, pendientes descendentes y colas. El integrador actualiza la anchura de pico como sea necesario durante el análisis para optimizar la integración. El usuario especifica la anchura de pico en unidades de tiempo correspondientes a la anchura a media altura del primer pico esperado (excluido el pico del disolvente).

Sensibilidad de pendiente

La sensibilidad de pendiente establece el nivel de sensibilidad para la detección de picos. Es un parámetro que cambia en una escala lineal.

Rechazo por altura

El rechazo por altura establece el umbral de rechazo del pico por la altura final. Los picos con altura inferior al valor fijado como mínimo aceptable no se muestran.

Rechazo por área

El rechazo por área establece el umbral de rechazo del pico por el área final. Los picos con área inferior al valor fijado como mínimo aceptable no se muestran.

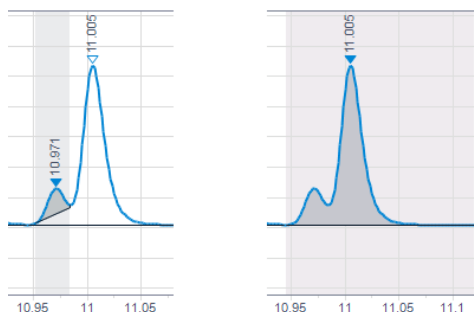
Rechazo por % área

Rechazo por % área establece el % área mínima del pico de interés.

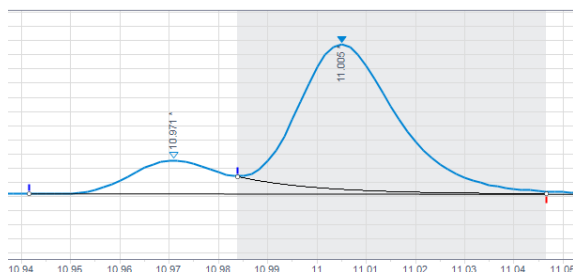
Los picos con % área inferior al valor fijado como mínimo aceptable no se muestran. El integrador rechaza los picos que estén por debajo del valor de rechazo por % área después de la corrección de la línea de base.

Introduzca el % área del menor pico esperado. Puede obtener esta información integrando primero el fichero de datos con rechazo por área y altura ajustados en cero (0). Utilice la columna **Area %** de los resultados de integración para elegir un valor mínimo adecuado.

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



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



Shoulder detection

Cuando la detección de hombros está habilitada, el integrador detecta los posibles hombros utilizando la curvatura de pico dada por la segunda derivada. Cuando la curvatura se hace cero, el integrador identifica ese punto de inflexión

como un posible hombro. Si el integrador identifica otro punto de inflexión antes del máximo del pico, se ha detectado un hombro.

Peak Width

El parámetro anchura de pico controla la selectividad del integrador para distinguir los picos del ruido de la línea de base. Para obtener buenos resultados, debe fijarse un valor cercano a la anchura a media altura de los picos reales. El integrador actualiza la anchura de pico como sea necesario durante el análisis para optimizar la integración.

Selección de la anchura de pico

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

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

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

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

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

Height Reject y Peak Width

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

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

Ajuste de la integración

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

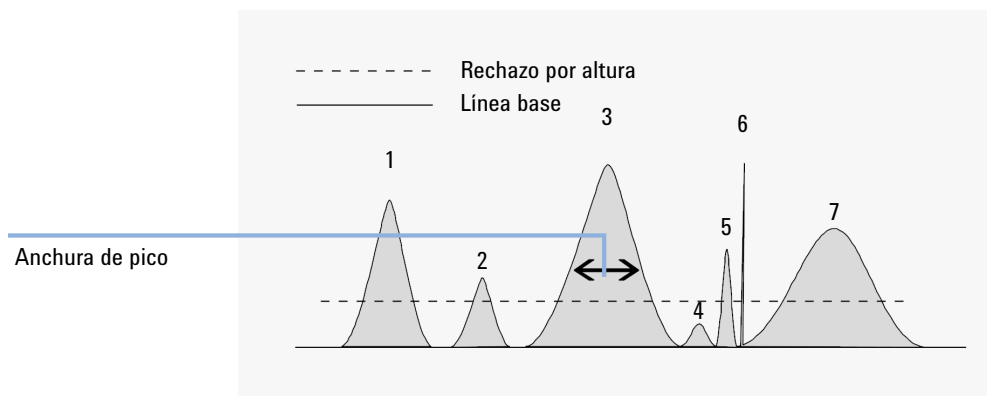


Figura 23 Uso de eventos iniciales

Un pico se integra únicamente si se satisfacen los requisitos de los cuatro parámetros de integración. Utilizando la anchura de pico correspondiente al pico

3, el rechazo por área y la sensibilidad de pendiente que se muestran, sólo los picos 1, 3, 5 y 7 resultan integrados.

- Pico 1** se integra puesto que se satisfacen los requisitos de los cuatro parámetros de integración.
- Pico 2** se rechaza por estar el área por debajo del valor fijado para el rechazo por área.
- Pico 3** se integra puesto que se satisfacen los requisitos de los cuatro parámetros de integración.
- Pico 4** no se integra al estar la altura de pico por debajo del valor fijado para el rechazo por altura.
- Pico 5** se rechaza por estar el área por debajo del valor fijado para el rechazo por área.
- Pico 6** no se integra; el filtrado y el agrupamiento hacen el pico indetectable.
- Pico 7** se integra.

Tabla 7 Valores de rechazo por altura y área

Parámetro de integración	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 7
Rechazo por altura	Por encima	Por encima	Por encima	Por debajo	Por encima	Por encima
Rechazo por área	Por encima	Por debajo	Por encima	Por debajo	Por debajo	Por encima
Pico integrado	Sí	No	Sí	No	No	Sí

Eventos programados

OpenLab CDS ChemStation Edition ofrece un conjunto de eventos programados, que permite elegir entre los modos del integrador de la definición de la línea base del algoritmo interno y la definición del usuario. Estos eventos programados pueden usarse para personalizar la construcción de la línea de base de la señal cuando la construcción predeterminada no es adecuada. Por ejemplo, el usuario puede crear un tipo nuevo de evento de suma de área, que no altera los resultados de la Suma de Área predeterminada. Dichos eventos pueden resultar útiles para sumar áreas de pico finales y para corregir aberraciones a corto y largo plazo de la línea base. Para obtener información adicional acerca de los eventos de integración, consulte la sección “[Eventos iniciales](#)” en la página 49.

Suma de áreas

Suma de áreas Define los puntos entre los cuales el integrador suma las áreas entre el tiempo de suma de áreas y el tiempo de resta del área.

Corte de suma de áreas Esto es similar a la **Area Sum**. Permite integrar cortes de tiempo contiguos del cromatograma sin perder intervalos de tiempo.

La función de suma de áreas le permite seguir la línea de base definida de un usuario a largo plazo para integrarla en un grupo de picos mediante la definición de un intervalo. La suma del área suma las áreas que se encuentran por debajo de los picos de este intervalo. El sistema define el tiempo de retención de la suma de áreas como el punto central del intervalo de tiempo en el que se suma el área. La precisión del punto central definido varía entre 0,001 min a una velocidad de adquisición de datos alta y 0,1 min a una velocidad de adquisición de datos baja.

Si un corte incluye un pico con un área o altura inferior a un nivel umbral dado (rechazo del área o de la altura) se incluirá en la lista, sin embargo, para evitar que haya cortes omitidos.

Eventos de la línea base

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

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

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

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

Los siguientes eventos se pueden usar para la suma de área con **Area Sum Slice** en cromatogramas complejos. Estos ayudan a encontrar automáticamente la mejor definición de línea base, lo que hace que las interacciones manuales sean innecesarias. Esto es especialmente útil al analizar resultados de GC. La línea de base se calcula con base en un intervalo de tiempo usando estimadores estadísticos.

Fijar línea base a partir de rango

Define el rango del cromatograma usado para estimar la nueva línea base. El rango de puntos de datos se usa para calcular un punto de la línea base significativo estadísticamente en el punto medio del rango de tiempo. Este algoritmo ignora en forma inteligente las alteraciones de marcado o picos inesperados que ocurren en este intervalo a través de una función de eliminación estadística de dos etapas. Esto garantiza resultados más confiables para estimar la línea base.

Dos eventos **Set Baseline from Range** se conectan con una línea recta entre sus puntos centrales. [Figura 24](#) en la página 55 ilustra la configuración del intervalo del rango de la línea base, que se muestra como un área sombreada en color gris.

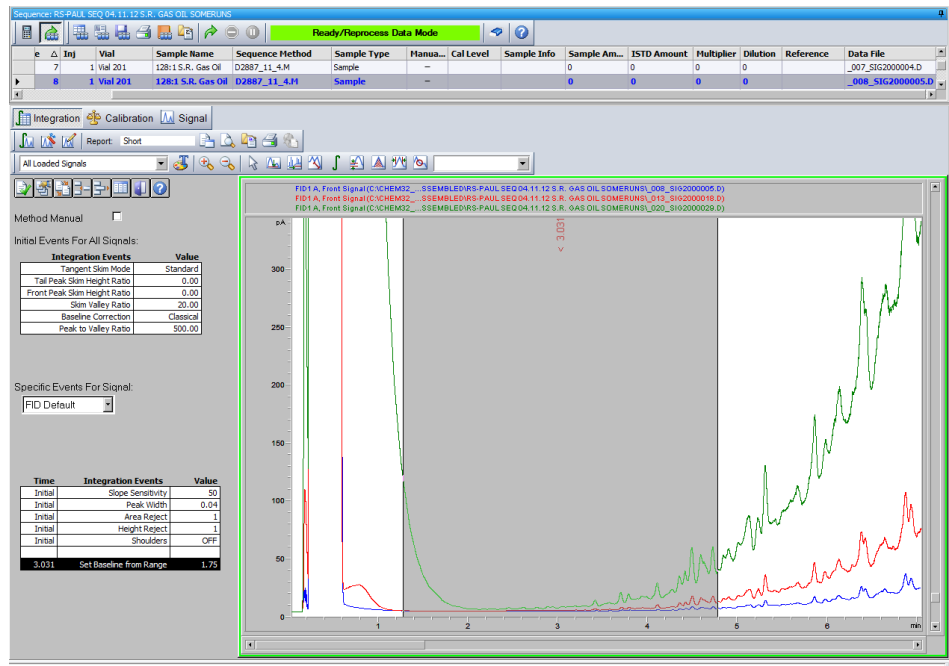


Figura 24 "Fijar línea base a partir de rango": el intervalo del rango de la línea base se indica con un sombreado gris.

Fijar línea base baja a partir de rango

Similar a **Set Baseline from Range**, pero reduce su valor para minimizar la penetración de la línea base. **Set Low Baseline from Range** se calcula al restar dos sigma (desviación estándar del ruido) del valor y de **Set Baseline from Range**.

Usar línea base a partir de rango

Permite proyectar un valor de la línea base a un momento posterior o anterior. También permite construir curvas de la línea base que cambian de pendiente debajo de un grupo de pico.

Integración automática

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

Principios de funcionamiento

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

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

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

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

Integración

Eventos de integración

Parámetros de la integración automática

La función Integración automática establece valores para los siguientes parámetros:

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

Integración manual

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

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

La integración manual ofrece las siguientes funciones:

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

Códigos de separación de picos para picos integrados manualmente

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

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

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

Almacenamiento de eventos de integración manual

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3 Identificación de picos

Definición de la identificación de picos	62
Reglas de asignación de picos	63
Tipos de identificación de picos	64
Tiempo de retención o migración absoluto	64
Tiempo de retención relativo	64
Tiempo de retención o migración corregido	64
Cualificadores de pico	64
Límites de cantidad	64
Tiempo de retención o migración absoluto	65
Tiempos de retención/migración corregidos	67
Picos de referencia sencillos	67
Picos de referencia múltiples	68
Cualificadores de pico	69
Correlación de la señal	70
Verificación del cualificador	70
Cálculo de la relación de cualificadores	70
El proceso de identificación	72
Búsqueda de los picos de referencia	72
Búsqueda de los picos ISTD	72
Búsqueda de los picos calibrados restantes	73
Clasificación de picos no identificados	73

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

Definición de la identificación de picos

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

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

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

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

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

Reglas de asignación de picos

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

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

Tipos de identificación de picos

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

Tiempo de retención o migración absoluto

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

Tiempo de retención relativo

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

Tiempo de retención o migración corregido

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

Cualificadores de pico

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

Límites de cantidad

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

Tiempo de retención o migración absoluto

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

Figura 25 en la página 65 muestra una ventana de tiempo de retención o migración para el pico 2 que está entre 1,809 y 2,631 minutos, cuando el tiempo de retención o migración esperado es de 2,22 minutos. Hay dos posibilidades para el pico 2. Uno es en 1,85 minutos y otro en 2,33 minutos. Si el pico esperado no es de referencia, se selecciona el pico más cercano al tiempo de retención o migración esperado de 2,22 minutos.

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

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

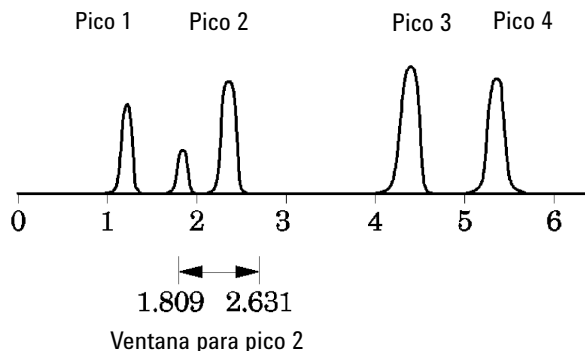


Figura 25 Ventanas de tiempo de retención o migración

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

- ventanas de picos de referencia, que se aplican sólo a los picos de referencia,

Identificación de picos

Tiempo de retención o migración absoluto

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

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

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

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

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

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

Tiempos de retención/migración corregidos

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

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

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

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

Picos de referencia sencillos

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

Picos de referencia múltiples

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

NOTA

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

Cualificadores de pico

Puede detectarse un componente con más de una señal. Aunque sea aplicable a todos los formularios de cromatografía con detectores múltiples o detectores capaces de producir señales múltiples, la detección multiseñal se utiliza principalmente en cromatografía de líquidos con varios detectores de longitud de onda y diodo-array. Estos detectores se configuran normalmente de forma que la longitud de onda más próxima al área de absorción mayor se utiliza para definir el pico principal en la tabla de calibración. En [Figura 26](#) en la página 69 es λ_1 .

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

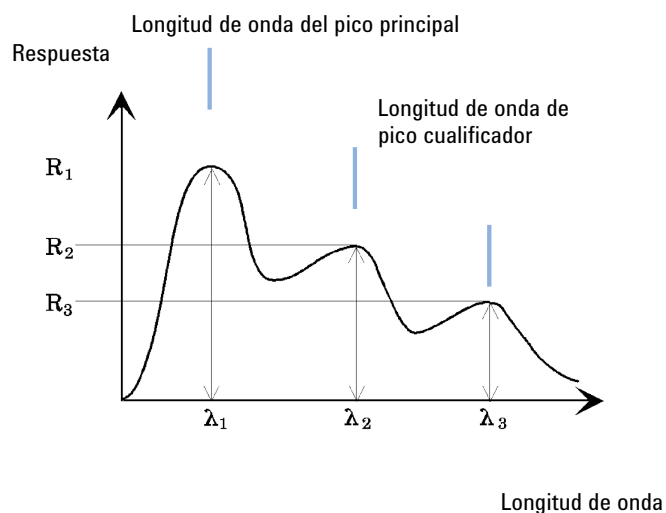


Figura 26 Cualificadores de pico

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

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

Correlación de la señal

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

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

Verificación del cualificador

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

Cálculo de la relación de cualificadores

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

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

ambos se miden en el tiempo de retención del compuesto.

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

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

Identificación de picos

Cualificadores de pico

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

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

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

El proceso de identificación

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

Búsqueda de los picos de referencia

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

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

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

Búsqueda de los picos ISTD

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

Búsqueda de los picos calibrados restantes

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

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

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

Clasificación de picos no identificados

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

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



4

Calibración

Curva de calibración	75
Calibración de grupo	77
Opciones de recalibración	78

Este capítulo describe los principios de calibración del software de la ChemStation.

Curva de calibración

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

Normalmente se inyecta una alícuota de la muestra de calibración, se obtiene una señal y se determina la respuesta calculando el área o la altura del pico, de forma similar a lo que se ilustra en la [Figura 27](#) en la página 75.

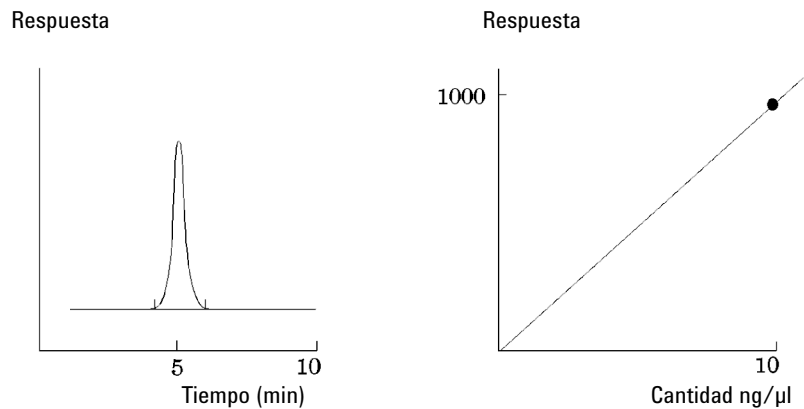


Figura 27 Señal de la muestra de calibración (10 ng/μl) y curva de calibración

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

De 0,00000 a 1,00000

Donde:

0,00000 = ausencia de ajuste

1,00000 = ajuste perfecto

NOTA

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

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

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

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

Donde:

relRES = valor residual relativo en porcentaje

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

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

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

Donde:

ResSTD = desviación estándar residual

Resp_{calibratedi} = respuesta calibrada para el punto i

Resp_{calculatedi} = respuesta calculada para el punto i

n = número de puntos de calibración

Calibración de grupo

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

Calibración

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

donde:

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

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

RF_A es el factor de respuesta

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

$$RF_A = RF_B$$

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

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

Opciones de recalibración

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

Average

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

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

Floating Average

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

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

Replace

Los nuevos valores de respuesta reemplazan a los anteriores.

5

Cuantificación

Definición de la cuantificación	80
Cálculos de cuantificación	81
Factores de corrección	82
Factor de respuesta absoluta	82
Multiplicador	82
Factor de dilución	82
Cantidad de muestra	82
% de área y % de altura	83
Procedimientos de cálculo calibrados	84
Cálculo ESTD	85
Cálculo de % Norm	87
Cálculo ISTD	88
Análisis 1: Calibración	89
Análisis 2: Muestra desconocida	89
Cálculo ISTD de picos calibrados	90
Cuantificación de picos no calibrados	91
Cuantificación indirecta usando un compuesto calibrado	91
Cuantificación mediante un factor manual	91

En este capítulo se describe cómo ChemStation lleva a cabo la cuantificación. Proporciona detalles sobre los cálculos de % de área y % de altura, el cálculo por estándar externo o ESTD (External Standard), el cálculo de % Norm, el cálculo por estándar interno o ISTD (Internal Standard) y la cuantificación de picos no identificados.

Definición de la cuantificación

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

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

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

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

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

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

Cálculos de cuantificación

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

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

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

Factores de corrección

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

Factor de respuesta absoluta

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

Multiplicador

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

Factor de dilución

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

Cantidad de muestra

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

% de área y % de altura

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

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

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

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

Procedimientos de cálculo calibrados

Los procedimientos de cálculo de estándar externo o ESTD (External Standard), de normalización y el cálculo de estándar interno o ISTD (Internal Standard) requieren factores de respuesta y, por lo tanto, una tabla de calibración. En la tabla de calibración se especifica la conversión de respuestas en las unidades seleccionadas mediante el procedimiento seleccionado.

Cálculo ESTD

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

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

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

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

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

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

donde:

Respuesta_x es la respuesta del pico x;

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

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

M es el multiplicador.

D es el factor de dilución.

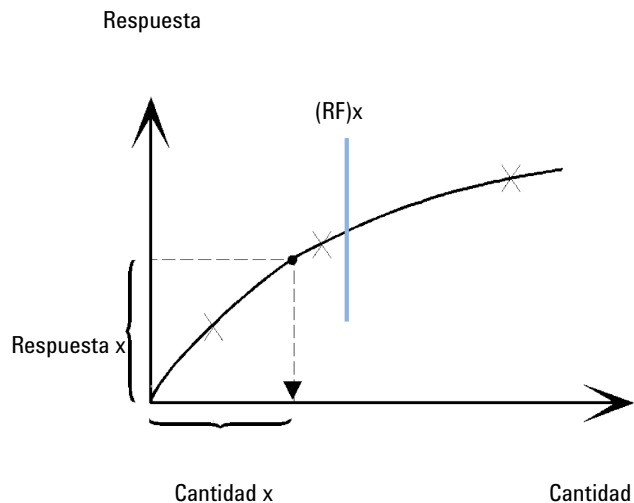


Figura 28 Factor de respuesta

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

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

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

donde:

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

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

Cálculo de % Norm

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

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

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

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

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

donde:

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

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

Cálculo ISTD

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

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

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

Tabla 8 Procedimiento ISTD

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

Si se utiliza el procedimiento ISTD para calibraciones con una característica no lineal, se debe tener cuidado para que los errores resultantes del principio de cálculo no provoquen errores sistemáticos. En las calibraciones multinivel, la cantidad del compuesto ISTD debe mantenerse constante, es decir, la misma para todos los niveles si la curva de calibración del compuesto es no lineal.

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

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

Análisis 1: Calibración

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

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

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

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

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

Relación de respuesta

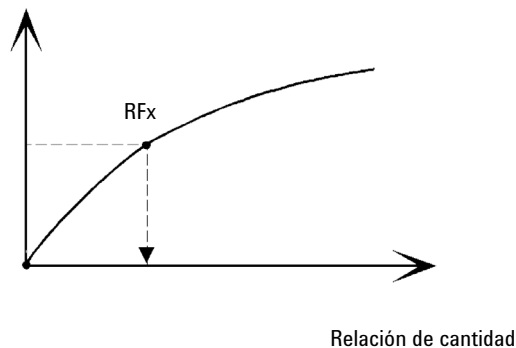


Figura 29 Relación de cantidad

Análisis 2: Muestra desconocida

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

Cálculo ISTD de picos calibrados

Las ecuaciones utilizadas para calcular la cantidad real de un componente calibrado para una calibración de un único nivel son las siguientes:

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

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

donde:

RF_x es el factor de respuesta para el compuesto x .

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

M es el multiplicador.

D es el factor de dilución.

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

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

Cuantificación de picos no calibrados

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

Cuantificación indirecta usando un compuesto calibrado

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

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

Cuantificación mediante un factor manual

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

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

donde:

Factor manual

Factor de respuesta fijo

Respuesta

La respuesta puede ser Área o Altura

Cuantificación

Cuantificación de picos no calibrados

Uso de un factor manual con un método ISTD

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

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

o bien:

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

La cantidad se calcula a continuación como sigue:

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

o bien:

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

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

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

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

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

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

6 Evaluación de la idoneidad del sistema

Evaluación de la idoneidad del sistema	95
Determinación del ruido	98
Cálculo del ruido utilizando seis veces la desviación estándar	99
Cálculo del ruido con la fórmula pico a pico	99
Cálculo del ruido con el método ASTM	101
Cálculo de señal-ruido	102
Deriva y desviación	105
Cálculo de la asimetría y simetría de pico	106
Fórmulas y cálculos de idoneidad del sistema	108
Definiciones generales	109
Volumen de hueco	109
Tiempo de retención del compuesto no retenido t_r (m) [minutos]	109
Definiciones del test de rendimiento	110
Momentos estadísticos	110
Momentos estadísticos, sesgo y exceso	111
Anchura verdadera de pico W_x [min]	112
Factor de capacidad (USP), índice de capacidad (ASTM) k'	112
Factor de cola (USP) t	113
Número de platos teóricos por Columna n	114
Número de platos teóricos por metro N [1/m]	115
Definiciones del test de rendimiento	110
Resolución (USP, ASTM) R	116
Resolución (EP/JP) R_s	117
Resolución (definiciones clásicas de ChemStation)	117
Relación pico a valle (EP/JP)	118
Definiciones de reproducibilidad	120
Media de muestra M	120
Desviación estándar de la muestra S	120
Desviación estándar relativa RSD[%] (USP)	121
Desviación estándar de la media SM	121
Intervalo de confianza CI	121

Definiciones de reproducibilidad 120

Coefficiente de correlación 125

Desviación estándar (S) 126

Acceso al número de doble precisión almacenado internamente 127

En este capítulo se describe lo que puede hacer la ChemStation para evaluar el rendimiento tanto del instrumento analítico antes utilizado para el análisis de muestras como el método analítico antes de que se utilice por rutina y comprobar el rendimiento de los análisis antes y durante los análisis rutinarios.

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

Evaluación de la idoneidad del sistema

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

Los laboratorios tienen que cumplir:

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

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

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

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

- Tiempo de retención/migración del pico
- Área de pico
- Cantidad
- Altura de pico
- Anchura de pico a media altura
- Simetría de pico
- Cola de pico

- Factor de capacidad (k')
- Números de platos
- Resolución entre picos
- Selectividad relativa al pico anterior
- Sesgo
- Exceso

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

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

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

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

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

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

- Información del instrumento
- Detalles de la columna/capilar
- Método analítico
- Información de muestras
- Información de adquisición

- Descripción de la señal y determinación del ruido de la línea base
- Señal etiquetada con tiempos de retención/migración o nombres de compuestos

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

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

Determinación del ruido

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

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

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

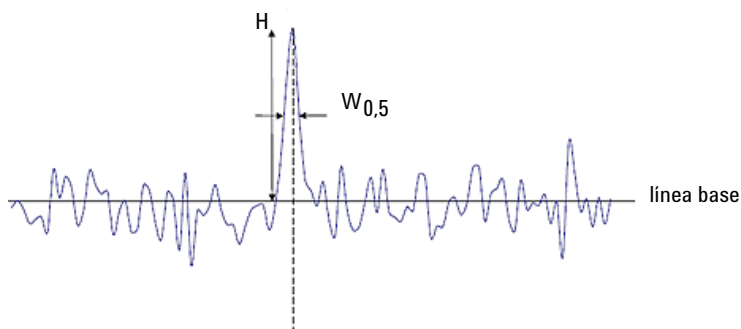


Figura 30 Cromatograma con señal de pico y ruido

H	Altura de pico desde la línea base (línea recta de mejor ajuste a través del ruido)
$W_{0,5}$	Anchura de pico a media altura

Cálculo del ruido utilizando seis veces la desviación estándar

Se calcula la regresión lineal con todos los puntos de datos en el rango de tiempo indicado (véase “Ajuste lineal” en la página 122). El ruido se calcula con la fórmula:

$$N = 6 \times Std$$

donde

N es el ruido según el método de desviación estándar por seis y

Std es la desviación estándar de la regresión lineal de todos los puntos de datos en el rango de tiempo seleccionado.

Cálculo del ruido con la fórmula pico a pico

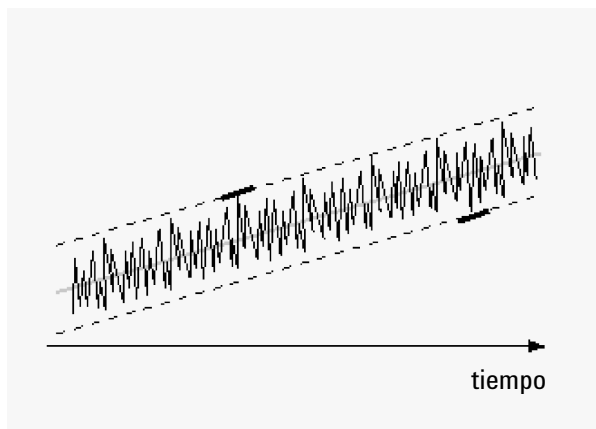


Figura 31 Ilustración del ruido pico a pico con deriva

Se calcula la deriva en primer lugar determinando la regresión lineal con todos los puntos de datos en el rango de tiempo (véase “Ajuste lineal” en la página 122). Esa línea de regresión lineal se resta de todos los puntos de datos englobados en el intervalo de tiempo, obteniéndose así la señal corregida por la deriva.

Cálculo del ruido con el método ASTM

El cálculo del ruido ASTM (ASTM E 685-93) se basa en una práctica estándar para comprobar los detectores fotométricos de la longitud de onda variable que se utilizan en cromatografía de líquidos, según define la Sociedad Americana para Ensayos y Materiales (American Society for Testing and Materials). Se pueden distinguir tres tipos diferentes de ruido en función del tamaño del rango de tiempo. La determinación del ruido se basa en las mediciones pico a pico en los rangos de tiempo definidos.

Tiempo de ciclo, t

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

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

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

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

Determinación del número de ciclos, n

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

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

Cálculo del ruido pico a pico en cada ciclo

En primer lugar se calcula la deriva utilizando todos los puntos de datos englobados en el intervalo de tiempo para determinar la regresión lineal (véase “Ajuste lineal” en la página 122). Esa línea de regresión lineal se resta de todos los puntos de datos englobados en el intervalo de tiempo, obteniéndose así la señal corregida por la deriva. Se calcula entonces el ruido pico a pico utilizando la fórmula siguiente:

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

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

Cálculo del ruido ASTM

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

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

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

Cálculo de señal-ruido

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

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

toman de una señal en blanco. El intervalo de tiempo para el cálculo del ruido es un intervalo de tiempo de 20 veces la anchura del pico, centrada alrededor del tiempo de retención del pico.

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

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

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

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

El cálculo señal-ruido se realiza con la fórmula:

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

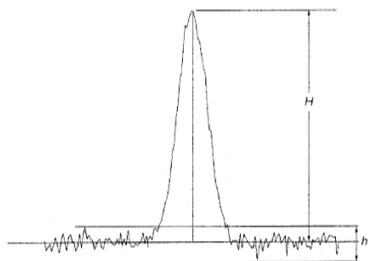


Figura 33 Relación señal-ruido

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

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

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

donde

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

h es el valor absoluto de la fluctuación más grande del ruido desde la línea de base en un cromatograma obtenido después de inyectar un blanco y observar una distancia igual a veinte veces la anchura a mitad de altura del pico en el

cromatograma obtenido con la solución de referencia indicada y ubicada del mismo modo alrededor del lugar donde se encontraría el pico.

El valor de ruido usado se calcula con el método "Pico a pico" (véase "Cálculo del ruido con la fórmula pico a pico" en la página 99).

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

Determinación del rango de ruido

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

- Si la señal de referencia no es lo suficientemente larga: $\text{HoraDelInicio} - \text{TiempoFinal} < 20 * W_{0,5}$
 - $\text{HoraDelInicio} = \text{hora de inicio (de la señal de referencia)}$ y
 - $\text{TiempoFinal} = \text{tiempo final (de la señal de referencia)}$
- Si la señal de referencia es lo suficientemente larga, pero el pico está ubicado tal que $(RT - 10 * W_{0,5})$ es menor que el punto de inicio de la señal de referencia.
 - $\text{HoraDelInicio} = \text{hora de inicio (de la señal de referencia)}$ y
 - $\text{TiempoFinal} = \text{hora de inicio} + 20 * W_{0,5}$
- Si la señal de referencia es lo suficientemente larga, pero el pico está ubicado tal que RT o $RT + 10 * W_{0,5}$ es mayor que el punto final de la señal de referencia
 - $\text{TiempoFinal} = \text{tiempo final (de la señal de referencia)}$ y
 - $\text{HoraDelInicio} = \text{tiempo final} - 20 * W_{0,5}$
- Si el pico está ubicado tal que RT o $RT + 10 * W_{0,5}$ es mayor que el punto final de la señal de referencia
 - $\text{HoraDelInicio} = RT - 10 * W_{0,5}$ y
 - $\text{TiempoFinal} = RT + 10 * W_{0,5}$

donde

RT es el tiempo de retención y

$W_{0,5}$ es la anchura de pico a media altura.

Deriva y desviación

La deriva está dada como la pendiente de la regresión lineal. Se calcula la deriva en primer lugar determinando la regresión lineal con todos los puntos de datos en el rango de tiempo (véase “Ajuste lineal” en la página 122). Esa línea de regresión lineal se resta de todos los puntos de datos englobados en el intervalo de tiempo, obteniéndose así la señal corregida por la deriva.

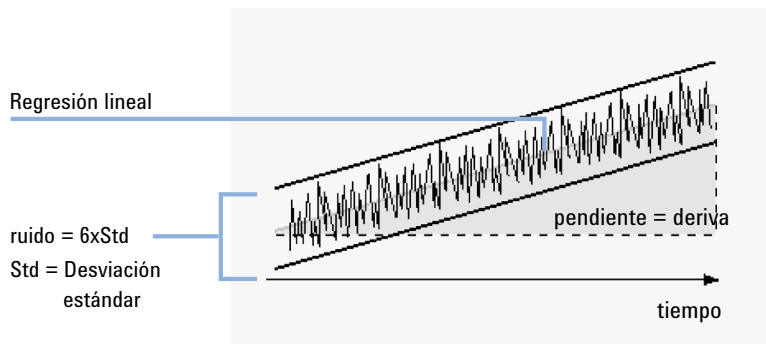


Figura 34 Deriva para ruido como seis veces la desviación estándar

La desviación se determina como el ruido pico a pico de los valores de los datos medios en los ciclos de ruido ASTM, véase “Cálculo del ruido con el método ASTM” en la página 101.

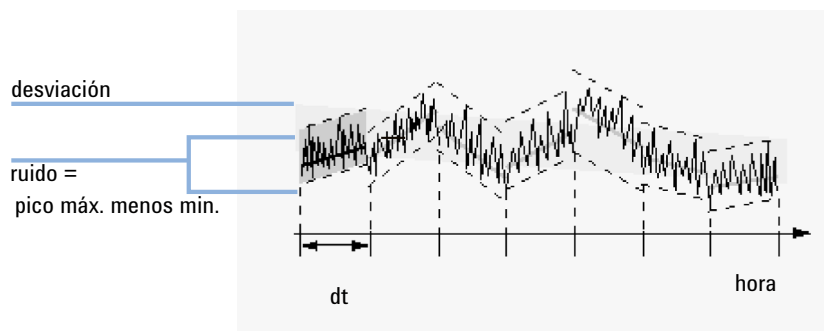


Figura 35 Desviación del ruido determinada por el método ASTM

Cálculo de la asimetría y simetría de pico

Asimetría La ChemStation determina la relación de asimetría de un pico comparando la anchura media - altura pico medio al 5 % (véase “Factor de cola (USP) t” en la página 113) o 10 % (véase la ecuación siguiente) de la altura de pico.

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

donde:

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

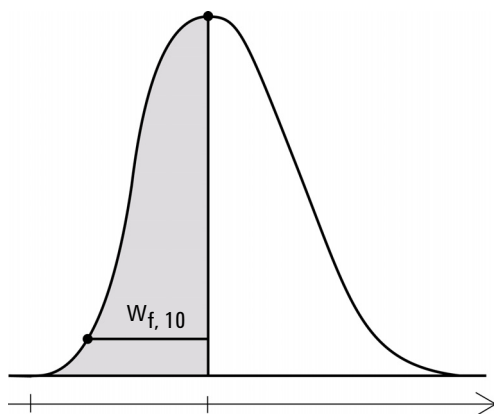


Figura 36 Cálculo de la asimetría de pico

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

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

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

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

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

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

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

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

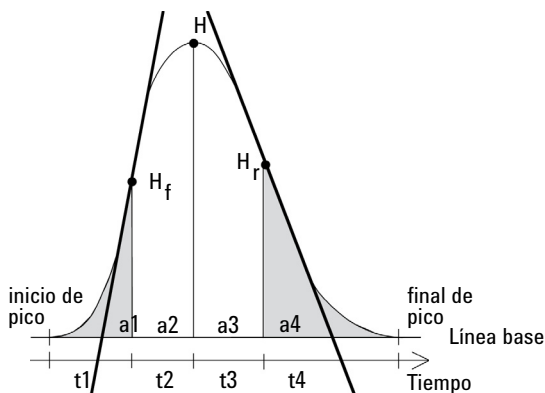


Figura 37 Cálculo del factor de simetría del pico

donde

a_i = área del corte

t_i = tiempo del corte

H_f = altura del primer punto de inflexión

H_r = altura del último punto de inflexión

H = altura en el vértice

Fórmulas y cálculos de idoneidad del sistema

El software ChemStation utiliza las fórmulas siguientes para obtener los resultados de varias pruebas de idoneidad del sistema. Se informa de los resultados con los estilos de informes **Performance**, **Performance+Noise** y **Performance+LibSearch** y **Extended Performance**.

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

Las referencias que se utilizan en este contexto son:

- *ASTM: Sección E 682 - 93, Annual Book of ASTM Standards, vol. 14.01*
- *USP: Farmacopea de Estados Unidos, XX. Revisión, pág. 943 - 946*
- *EP: Farmacopea Europea, 7ª Edición*
- *JP: Farmacopea Japonesa, 15ª Edición*

Definiciones generales

Volumen de hueco

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

donde:

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

Tiempo de retención del compuesto no retenido t (m) [minutos]

(También denominado tiempo muerto o tiempo nulo)

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

donde:

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

Definiciones del test de rendimiento

Momentos estadísticos

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

donde:

N = Número de cortes de área

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

d_t = Intervalo de tiempo entre los cortes de área adyacentes

t₀ = Tiempo del primer corte de área

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

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

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

Momentos estadísticos, sesgo y exceso

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

El momento 0 representa el área de pico.

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

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

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

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

Anchura verdadera de pico W_x [min]

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

donde:

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

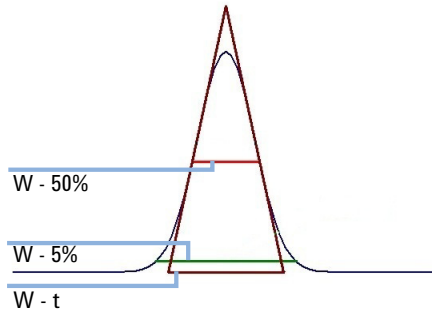


Figura 38 Anchura de pico al x % de la altura

Factor de capacidad (USP), índice de capacidad (ASTM) k'

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

donde:

t_R = tiempo de retención del pico [min]

t_0 = tiempo nulo [min]

Factor de cola (USP) t

NOTA

El Factor de simetría (JP) y Factor de simetría (EP) S son idénticos al Factor de cola (USP). Todos están disponibles como "Factor Pico_de cola" en Informes inteligentes. Consulte también "Presentación de factores de farmacopeas en ChemStation" en la página 160.

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

donde:

t_w = distancia en minutos entre el frente del pico y T_R , medida al 5 % de la altura de pico

$W_{5.0}$ = anchura de pico al 5 % de la altura de pico [min]

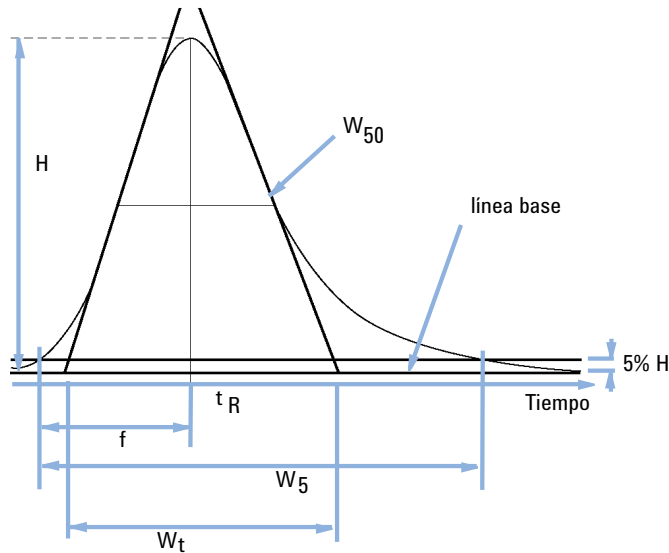


Figura 39 Parámetros de rendimiento

Número de platos teóricos por Columna n

Método tangente (USP, ASTM):

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

donde:

T_R	Tiempo de retención
W_B	Anchura de base [min]

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

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

donde:

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

Método 5 sigma:

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

donde:

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

Método estadístico:

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

donde:

Mx = momento estadístico x^0

Método Foley Dorsey

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

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

Donde

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

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

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

donde:

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

Retención relativa (USP, ASTM), selectividad alpha

NOTA

La Retención relativa (USP) está disponible como "Selectividad" o "Selectividadde_Pico" en los informes.

(Pertenece a los picos a y b, T_R del pico a < T_R del pico b)

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

donde

$k'_{(x)}$ = factor de capacidad del pico x: $(t_{Rx} - t_0) / t_0$

Resolución (EP/JP) R_s

Método de anchura media (Resolución utilizada en el Informe de rendimiento):

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

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

NOTA

La definición de Resolución en USP difiere de la definición de las farmacopeas europea (EP) y japonesa (JP). Los cálculos de EP y JP están disponibles desde la Edición C.01.04. de ChemStation.

Además de la Resolución clásica (2.35/2)*...está disponible en Intelligent Reporting como Resoluciónde_Pico_Clásica. En "[Presentación de factores de farmacopeas en ChemStation](#)" en la página 160 se puede consultar una lista completa de los valores

Resolución (definiciones clásicas de ChemStation)

Método de anchura media:

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

Método 5 sigma:

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

Método estadístico:

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

donde:

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

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

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

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

$W_S(x)$ = anchura derivada de los momentos estadísticos = $\sqrt{(M2)}$ del pico x [min]
(véase también "Momentos estadísticos" en la página 110)

Relación pico a valle (EP/JP)

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

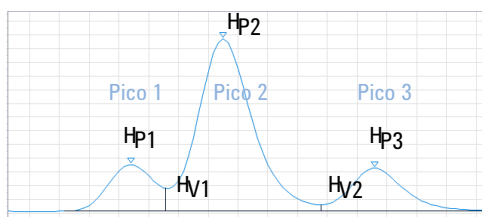
NOTA

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

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

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

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



Para el pico 1:

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

Para el pico 2:

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

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

Para el pico 3:

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

donde:

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

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

Definición de un valle:

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

Definiciones de reproducibilidad

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

Media de muestra M

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

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

donde:

N = número de observaciones discretas

X_i = valor de observaciones discretas indexadas por i

Desviación estándar de la muestra S

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

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

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

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

Desviación estándar relativa RSD[%] (USP)

La desviación estándar relativa se define como

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

Desviación estándar de la media S_M

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

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

Se puede ilustrar además con un ejemplo:

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

Intervalo de confianza CI

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

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

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

donde:

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

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

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

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

Intervalo de confianza del 95 % para 6 muestras:

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

$$N = 6$$

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

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

Ajuste lineal

N = número de observaciones discretas

X_i = variable independiente, i-ésima observación

Y_i = variable dependiente, i-ésima observación

Fórmula de la curva:

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

Coefficientes:

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

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

donde

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

Ajuste cuadrático

Fórmula de la curva cuadrática:

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

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

Cálculo de los coeficientes de ajuste cuadrático

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

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

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

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

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

Ecuaciones normales de la curva cuadrática:

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

O se escriben como ecuación matricial:

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

Descomposición de Crout:

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

Con abreviaturas de valores:

$$L11 = W$$

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

$$L21 = XW$$

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

$$L31 = X2W$$

$$L22 = X2W - L21 * U12$$

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

$$L32 = X3W - L31 * U12$$

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

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

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

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

$$c' = z2$$

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

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

Finalmente, se puede revertir la normalización:

$$a = a'$$

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

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

Coeficiente de correlación

El coeficiente de correlación (r) da una medida del ajuste de la curva de calibración a los puntos de datos. Se calcula utilizando la ecuación siguiente:

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

donde

r	Coeficiente de correlación
wt_i	Peso del punto de datos
\bar{y}	Valores medios de las respuestas o cantidades medidas
y_i	Respuesta medida (Área, AreaRatio (método ISTD), altura o HeightRatio (método ISTD)) o cantidad (Cantidad, AmountRatio (método ISTD)), dependiendo del modo de calibración
\bar{Y}	Valores medios de las respuestas o cantidades previstas
Y_i	Respuesta o cantidad prevista (mediante la curva de calibración)

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

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

donde

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

y

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

donde

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

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

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

Desviación estándar (S)

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

Acceso al número de doble precisión almacenado internamente

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

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

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

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

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

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

Información del pico sin procesar:

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

Utilice la entrada de la línea de comandos:

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

Información del pico procesada:

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

Utilice la entrada de la línea de comandos:

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

Información del componente procesado:

- Cantidad calculada

Utilice la entrada de la línea de comandos:

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

Información de la tabla de calibración:

- Número del nivel
- Cantidad
- Área
- Altura

Utilice la entrada de la línea de comandos:

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

Información de regresión lineal:

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

Utilice la entrada de la línea de comandos:

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

7

Cálculos específicos de CE

Tablas de calibración	131
Calibración estándar	131
Calibración del peso molecular de la proteína	132
Calibración de pares de bases de ADN	132
Calibración del enfoque isoelectrico	133
Calibración con corrección de la movilidad	134
Introducción	134
Cálculos de la movilidad efectiva	135
Cálculo de movilidad relativa	138
Estilos de información especiales de electroforesis capilar	140
Áreas de picos corregidas	141
Idoneidad del sistema para electroforesis capilar	142
Factor de capacidad k'	142
CE-MSD	143
Sustracción de fondo	143

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

Tablas de calibración

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

Calibración estándar

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

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

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

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

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

Calibración del peso molecular de la proteína

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

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

donde:

MW es el peso molecular

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

t es el tiempo de migración

k_0 y k_1 son los coeficientes de la ecuación lineal

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

Calibración de pares de bases de ADN

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

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

donde:

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

t es el tiempo de migración

k_0 y k_1 son los coeficientes de la ecuación lineal

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

Calibración del enfoque isoeléctrico

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

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

donde:

pI es el punto isoeléctrico

t es el tiempo de migración

k_0 y k_1 son los coeficientes de la ecuación lineal

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

Calibración con corrección de la movilidad

Introducción

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

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

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

Hay dos tipos de corrección de la movilidad disponibles:

Corrección de la movilidad efectiva

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

Corrección de la movilidad relativa

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

Cálculos de la movilidad efectiva

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

Tabla 9 Marcadores EOF usados normalmente

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

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

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

General

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

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

donde

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

L es la longitud capilar total

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

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

Si $t < t_R$ entonces

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

Si $t > t_R$ entonces

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

donde

t es el tiempo de migración del pico

t_R es el tiempo de la rampa

V es el voltaje final

La ecuación de movilidad puede simplificarse introduciendo un coeficiente:

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

La movilidad relativa o aparente es entonces

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

La movilidad efectiva o real es

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

donde

α_{app} es la movilidad aparente de cualquier pico

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

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

Calibración

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

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

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

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

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

Cálculos de movilidad

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

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

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

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

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

Recalibración

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

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

El tiempo de migración esperado de cada pico se ajusta:

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

y se actualizan las movilidades:

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

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

Cálculo de movilidad relativa

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

General

Como en cálculos de movilidad efectiva, el coeficiente

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

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

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

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

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

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

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

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

Calibración

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

Cálculo de la movilidad

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

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

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

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

Estilos de información especiales de electroforesis capilar

NOTA

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

El siguiente estilo de informe es específico para OpenLab CDS ChemStation Edition para sistemas CE:

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

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

Donde:

l es la longitud efectiva del capilar (cm)

L es la longitud total del capilar (cm)

t es el tiempo de migración (min)

V es el voltaje (kV)

Si se activa la corrección de movilidad efectiva (consulte ["Cálculos de la movilidad efectiva"](#) en la página 135), la columna de tipo de pico en los informes sencillos (los informes de patrón externo, por ejemplo) es sustituida por una columna de movilidad. El informe Movilidad CE imprime las movilidades efectivas, en vez de las aparentes.

Áreas de picos corregidas

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

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

El área corregida se calcula con la siguiente fórmula.

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

Donde

A_c es el área del pico corregida (mAU)

A es el área del pico (mAU sec)

t es el tiempo de migración (minutos)

Al área corregida nos referimos a veces como área normalizada.

Idoneidad del sistema para electroforesis capilar

Factor de capacidad k'

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

CE-MSD

Sustracción de fondo

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

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

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

NOTA

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

8

Revisión de datos, reprocesamiento y revisión por lotes

Tabla de navegación de Análisis de datos	145
Configuración de la tabla de navegación	145
Barra de herramientas de la tabla de navegación	147
Revisión de datos con la tabla de navegación	148
Reprocesamiento de secuencias con la tabla de navegación	149
Definición de la revisión por lotes	151
Habilitación de la función de revisión por lotes cuando se utiliza ChemStation con ECM	152
Configuración de lotes	153
Tabla de lotes	153
Tabla de compuestos	154
Informe de lotes	154
Interfase de usuario	154
Funciones de revisión	155
Calibración en la revisión por lotes	155
Informes de lotes	156
Historial de lotes	156

Este apartado describe las opciones para revisar datos y cómo reprocesar datos de secuencia. Asimismo, se detallan los conceptos de Revisión por lotes, Configuración de lotes, funciones de revisión e informes de lotes.

Tabla de navegación de Análisis de datos

La vista **Data Analysis** incluye una tabla de navegación diseñada para facilitar la navegación entre los ficheros de datos. La tabla de navegación muestra los análisis de un subdirectorio de datos seleccionados o de datos de secuencia. Es posible utilizar la **Navigation Table** para cargar análisis individuales o para desplazarse automáticamente por las señales cargadas. Para obtener más detalles, consulte el *Manual de edición, conceptos fundamentales y flujos de trabajo de OpenLab CDS ChemStation Edition*.

Configuración de la tabla de navegación

La tabla de navegación muestra información de los ficheros de datos en función de los conjuntos de datos disponibles. La tabla es de sólo lectura y no se pueden sobrescribir sus valores.

Tabla 10 Columnas de la tabla de navegación

Columnas de análisis individuales	Columnas de análisis de secuencias
Superposición	Superposición
ECM	ECM
TIPO	TIPO
Fecha/hora	Línea
Operador	Iny. (inyección)
Vial	Vial
Fichero de datos	Nombre de la muestra
Nombre de la muestra	Nombre del método
Nombre del método	Tipo de muestra
Eventos manuales	Eventos manuales
Información de muestra	Nivel Calib. (nivel de calibración)
Cantidad de muestra	Información de muestra
Cantidad ISTD	Cantidad de muestra
Multiplicador	Cantidad ISTD

Tabla 10 Columnas de la tabla de navegación

Columnas de análisis individuales	Columnas de análisis de secuencias
Dilución	Multiplicador
---	Dilución
---	Fichero de datos

La tabla de navegación incluye funciones habituales de configuración de tablas, tales como opciones de ordenamiento y "arrastrar y soltar" para trasladar columnas a distintos sitios. También es posible seleccionar las columnas que se muestran en la tabla de navegación.

De manera adicional, es posible realizar agrupamientos específicos de columnas; así, por ejemplo, se pueden mostrar los análisis individuales de un determinado operador agrupando los ficheros cargados por la columna **operator**.

La tabla de navegación ofrece funciones de botón derecho del ratón para cargar una señal, superponer una señal, exportar datos, imprimir informes, ver los parámetros del método de adquisición, etc. Cada línea de la tabla de navegación se puede ampliar pulsando sobre el signo + (más) situado a la izquierda de la línea para configurar opciones específicas de la señal:

- **Signal:** Enumera las señales adquiridas y permite especificar las señales que se van a cargar. La selección de visualización de señales se aplica de manera individual a cada análisis.
- **General Info:** Enumera los detalles de cabecera correspondientes al análisis.
- **Instrument curves:** Permite seleccionar las curvas de datos del instrumento que se van a mostrar junto con el cromatograma/electroferograma en pantalla y en la impresión.

Barra de herramientas de la tabla de navegación

La **Navigation Table** incluye dos conjuntos de herramientas que le permiten revisar un solo análisis, los datos de una secuencia o reprocesar estos datos.

Conjunto de herramientas de revisión de datos


La función de revisión de la tabla de navegación le permite revisar de forma automática o manual las señales cargadas. En función de la selección especificada en Opciones de **Preferences / Signal/Review**, el sistema puede integrar de forma automática la señal e imprimir un informe de cada fichero conforme se carga. El método que se aplica al fichero de datos se muestra en el menú superior.

Conjunto de herramientas de reprocesamiento de secuencias

El conjunto de herramientas de reprocesamiento de secuencias sólo está disponible cuando se carga una secuencia adquirida con ChemStation B.02.01 o con una versión posterior adquirida con la opción **Unique Folder Creation** habilitada. Es posible iniciar, detener y poner en pausa el reprocesamiento de la secuencia. Además, con la barra de herramientas puede acceder a los cuadros de diálogo para cambiar el parámetro de reprocesamiento de secuencias e impresión:

- **Sequence Table** (copia de la plantilla original *.s ubicada en el contenedor de datos de secuencia)
- Cuadro de diálogo **Sequence Parameters**
- Cuadro de diálogo **Sequence Output**
- Cuadro de diálogo **Sequence Summary Parameters**
- Cuadro de diálogo **Extended Statistic Parameters**
- **Save Current Sequence**
- **Print Current Sequence**

Revisión de datos con la tabla de navegación

Consulte sus datos en el Modo recalcular, al que se accede haciendo clic en  en la barra de herramientas de la tabla de navegación. Se abrirá el conjunto de herramientas del Modo recalcular. En función del volumen de trabajo que tenga, puede revisar los datos de tres formas:

- 1 Revise los datos utilizando el método de análisis de datos almacenado con cada fichero de datos (datos de secuencia B.02.01 o posterior). Seleccione **Start Autostepping** del menú **Recalculate** en modo **Data Analysis** para que el sistema cargue el método individual de análisis de datos almacenado con el fichero de datos antes de cargar el fichero de datos. Como se accede a cada línea de la tabla de navegación durante el proceso de revisión de datos, el método vinculado al fichero de datos seleccionado se carga y se utiliza para revisar y generar el informe.
- 2 Revisar los datos utilizando un método diferente: Si desea utilizar un método diferente del método almacenado en el fichero de datos para revisar los datos, seleccione **With method** del menú **Recalculate** en modo **Data Analysis**. En este caso, seleccione un método y una plantilla de informe del cuadro de diálogo **Recalculate with Method**. También puede especificar un **Autostep interval** y un **Destination** del informe; los valores que seleccione en este cuadro de diálogo anularán temporalmente los valores de la pestaña **Signal/Review Options** del cuadro de diálogo **Preferences**, y se resetearán cuando termine la sesión de ChemStation. El método seleccionado se carga y se utiliza para calcular resultados a partir de todos los ficheros de datos en el conjunto de resultados.
- 3 Consulte sus datos utilizando el método que se usó por última vez para calcular los resultados. Seleccione **Last Result Mode** del menú **Recalculate** en modo **Data Analysis**. Este modo carga el método que se usó por última vez para calcular los resultados para los ficheros de datos. Tenga en cuenta que si el fichero de datos no tiene el método de análisis de datos correspondiente, se omitirá durante la evolución automática. Este modo afecta tanto a la evolución automática como a la carga manual de los ficheros de datos.

Reprocesamiento de secuencias con la tabla de navegación

NOTA

Los datos de secuencia adquiridos en las revisiones hasta la B.01.03 deben volver a procesarse con la opción de **reprocess** de la ventana **Method and Run Control**. Lo mismo sucede con los datos adquiridos en B.03.01 o posterior cuando la **Unique Folder Creation** está desactivada.

Los datos de secuencia adquiridos con las revisiones de ChemStation B.02.01 o posteriores deben ser reprocesados con el conjunto de herramientas de reprocesamiento de la tabla Navegación de **Data Analysis**.

Para reprocesar con la tabla de navegación de **Data Analysis**, todos los ficheros necesarios están en el contenedor de datos de la secuencia:

- ficheros de datos de secuencia (*.d)
- todos los ficheros de métodos (*.m) que se utilizan en la secuencia
- copia de la plantilla de secuencias original (*.s)
- fichero de lotes relacionados con la secuencia (*.b)
- fichero de libro de registro relacionado con la secuencia (*.log)

Durante el reprocesamiento, se actualizan los métodos individuales DA.M de los ficheros de datos, así como el fichero de lotes (*.b).

Con las funciones de reprocesamiento de **Data Analysis** es posible modificar la plantilla de secuencias (*.s) del contenedor de datos para cambiar el multiplicador, la dilución, etc. o utilizar un método de reprocesamiento diferente. Por defecto, el parámetro de secuencia de reprocesamiento de análisis de datos **parts of method to run** está fijado en **Reprocessing only** y la opción **Use Sequence Table Information** está activada. Los valores predefinidos por defecto le permiten cambiar los parámetros de la plantilla de secuencia y ejecutar un reproceso sin necesidad de volver a editar los parámetros de la secuencia de **Data Analysis**.

Si no ha cambiado explícitamente el método en la plantilla de secuencias, el sistema utiliza los métodos de secuencias almacenados en el contenedor de datos de secuencias para reprocesar la secuencia. Estos métodos son los originales utilizados durante la adquisición de datos. Si es necesario cambiar los parámetros de un método concreto (por ejemplo, especificar la impresión en un fichero *.xls), hay que modificar y guardar los métodos del contenedor de secuencias. Este cambio general se aplica a todos los ficheros de datos durante el reprocesamiento.

Si desea utilizar el método del contenedor de secuencias actualizado para la adquisición de más datos, es necesario copiar este método del contenedor de datos de secuencias a una de las rutas de métodos definidas. El método nuevo o actualizado estará disponible en ChemStation Explorer, en la ventana de métodos, como método maestro.

Definición de la revisión por lotes

La revisión por lotes es una funcionalidad del análisis de datos diseñada para ayudar a un analista a realizar rápida y fácilmente la primera revisión de los resultados de una secuencia o una selección de análisis. Esta funcionalidad le permitirá ahorrar tiempo, especialmente con el reprocesamiento de grandes cantidades de muestras. Cuando se analiza una secuencia, se genera de forma automática un archivo de lotes (con extensión.b) y se coloca en el directorio de datos junto con los ficheros de datos. Este fichero de datos contiene indicadores de los ficheros de datos de la revisión del lote. Cuando se carga un lote, el analista sólo tiene que seleccionar el método que vaya a utilizar con el lote y después seleccionar uno por uno los ficheros de datos que quiere analizar en el lote. Antes de aprobar los resultados, es posible comprobar la exactitud de la calibración, el rendimiento del instrumento y las diferentes integraciones. Cualquier parámetro de integración específico del cromatograma que se modifique, puede almacenarse con el fichero de datos para la trazabilidad de datos. Este entorno interactivo permite también acceder a todas las funciones de análisis de datos como pureza del pico, búsqueda de librerías, etc.

La revisión por lotes utiliza los mismos registros de análisis de datos (ChromReg y ChromRes) que los análisis de datos estándares y no debería utilizarse en sesiones en línea que estén analizando en ese momento.

Habilitación de la función de revisión por lotes cuando se utiliza ChemStation con ECM

Cuando se utiliza OpenLab CDS ChemStation Edition con ECM, la función Revisión por lotes no estará disponible por defecto. Para poder utilizar la revisión por lotes, se deberá habilitar dicha función mediante una entrada en la sección [PCS] del fichero ChemStation.ini. El fichero se ubica en el directorio de Windows c:\WINDOWS.

```
[PCS] _BatchReview=1
```

La entrada por defecto, _BatchReview=0, desactiva la función.

Configuración de lotes

Un lote es una serie de ficheros de datos que ha seleccionado el usuario y que se procesa según el método definido también por el usuario. Todos los ficheros de datos del lote se procesan con el mismo método. Los pasos de proceso que se realizan cada vez que se carga una nueva muestra para revisar se pueden seleccionar (integración, identificación/cuantificación e informe).

Todos los análisis de calibración del lote se utilizan para generar una sola tabla de calibración con factores de respuesta promediados que se utiliza después para la cuantificación.

Tabla de lotes

Los análisis se muestran en una tabla de lotes que el usuario puede configurar:

- puede especificarse el número y el contenido de las columnas de la tabla;
- los análisis pueden clasificarse por
 - índice de análisis (el orden en el que se adquieren los análisis) independientemente de otros criterios,
 - tipo de muestra (muestras de control primero, luego muestras de calibración, después muestras normales) y por índice de análisis dentro de cada tipo,
 - método (si se utilizó más de un método para adquirir los análisis) y por índice de análisis dentro de cada método,
- muestras, muestras de calibración y muestras de control que se visualizan en la tabla o están ocultas.

Cada análisis seleccionado ocupa una línea en la tabla de lotes. Puede excluir un análisis en la tabla de lotes (por ejemplo, desde la calibración) cambiando el tipo de muestra a Retirada.

Tabla de compuestos

Los resultados de compuestos se muestran en la tabla de compuestos, que el usuario puede configurar, aunque su contenido depende del tipo de muestras de la tabla de lotes:

- La lista de compuestos contiene todos los compuestos del método cargado para la revisión por lotes.
- Si en la tabla de lotes sólo se visualizan las muestras de calibración (se ocultan las muestras y las muestras de control), la tabla de compuestos muestra columnas adicionales con información relacionada con la calibración (cantidad esperada, error relativo y error absoluto).
- Si en la tabla de lotes sólo se muestran los análisis de control (se ocultan las muestras y las muestras de calibración), la tabla de compuestos muestra columnas adicionales de los límites de control definidos).

Para las columnas que contengan información específica del compuesto, es posible incluir el nombre del compuesto en el título de la tabla añadiendo %s a las especificaciones de la columna.

Informe de lotes

El informe de lotes contiene dos tablas generalmente análogas a la tabla de lotes y a la de compuestos; el usuario puede configurar estas tablas.

Para las columnas que contengan información específica del compuesto, es posible incluir el nombre del compuesto en el título de la tabla añadiendo %s a las especificaciones de la columna. Se permiten títulos multilínea; inserte el carácter '\n' para introducir un salto de línea.

Interfase de usuario

La revisión por lotes le permite elegir entre dos interfaces de usuario:

- la interfase estándar incluye una barra con los botones que representan la mayoría de las opciones del menú Lote, junto con las tablas de lotes y compuestos.
- una interfase mínima con una barra de botones similar a la interfase estándar, que reemplaza la tabla de lotes y compuestos con un cuadro combinado que contiene sólo la información especificada en la tabla de lotes. La barra de botones de esta interfase mínima no contiene los botones relacionados con la tabla de lotes ni con la tabla de compuestos.

Funciones de revisión

Los archivos de datos se pueden mostrar de dos formas:

- manualmente, seleccionando un análisis de la tabla para mostrar,
- automáticamente, con un intervalo predefinido entre cada archivo de datos. Durante la visualización automática, sólo aparecen los tipos de muestras visualizados en la tabla; los análisis se muestran en el orden en el que aparecen en la tabla. La revisión automática puede pausarse y reanudarse después, o detenerse.

Las funciones estándar de ChemStation están disponibles con la revisión por lotes. Esto incluye la calibración, la manipulación manual de cromatogramas, por ejemplo con el suavizado o la integración manual. Los cambios realizados en un archivo de datos se pueden marcar y guardar con el fichero de lotes. Los cromatogramas que se han revisado se marcan con un asterisco en la tabla de lotes. También es posible descartar los cambios que se han realizado solo al cromatograma actual o todos los cambios realizados a todos los cromatogramas del lote.

NOTA

Revisión por lotes le permite guardar los eventos de integración manual por análisis. También se pueden guardar los eventos manuales con el archivo de datos fuera de Revisión por lotes. Para evitar que haya conflictos entre dos grupos de integraciones manuales, los eventos manuales que se hayan almacenado en el archivo de datos no se aplicarán en Revisión por lotes.

Cuando se carga un análisis, las opciones de proceso seleccionadas se ejecutan; si ya se ha procesado el análisis y se han guardado los cambios, se carga el análisis procesado. Este proceso es más rápido que cargar un análisis sin procesar, porque no hay que procesar nada.

Calibración en la revisión por lotes

La calibración en las revisiones por lotes funciona de forma independiente de la configuración de recalibración de la tabla de secuencia. El primer paso en la calibración de lotes siempre sustituye las entradas de los tiempos de respuesta y retención de la tabla de calibración. En los siguientes patrones de calibración, se promedian los valores de respuesta y los de retención.

Al hacer clic en la barra de herramientas de revisión por lotes, el sistema se recalibra gracias a todos los análisis de calibración del lote y crea una tabla de calibración recalibrada. Al hacer clic en la barra de herramientas de revisión por lotes, se recalculan las cantidades de cada compuesto calibrado. Las cantidades de todas las muestras se calculan a partir de la tabla de calibración recalibrada.

Informes de lotes

La “Tabla de lotes” en la página 153, que puede configurar el usuario, puede imprimirse directamente por impresora, mostrarse en pantalla o imprimirse en un fichero con el prefijo que el usuario especifique en uno de los siguientes formatos:

- Archivo de texto UNICODE con extensión .TXT.
- Formato de intercambio de datos con extensión .DIF.
- Valores separados por comas con extensión .CSV.
- Formato de Microsoft Excel con extensión .XLS.

Las opciones de generación de informes también ofrecen la posibilidad de ordenar las muestras (por índice de análisis, tipo de muestra o método) independientemente del método de clasificación de la tabla de lotes. Las prioridades de clasificación son las mismas que las de “Tabla de lotes” en la página 153.

Historial de lotes

La revisión por lotes mantiene un registro de todas las acciones relacionadas con el lote actual. Cualquier acción que cambie el lote (como por ejemplo, cambiar el cromatograma de la pantalla, el tipo de muestra o cargar y guardar el lote) añade una línea al historial de lotes con el nombre y la fecha, el nombre del operador y una descripción de la acción.

También puede añadir sus propios comentarios al historial de lotes. No se pueden editar las entradas del historial de lotes existentes y no se puede acceder a la lista del historial excepto a través de la opción de menú Historial de lotes.

9

Elaboración de informes

Definición de ACAML 158

Esquema ACAML 159

Presentación de factores de farmacopeas en ChemStation 160

OpenLab CDS ChemStation Edition ofrece dos tipos de elaboración de informes: Puede elegir entre la elaboración de informes clásica (idéntica a la función de presentación de datos de ChemStation B), o la nueva función Informes inteligentes. Este tema explica y ofrece una referencia al esquema ACAML utilizado en la función de elaboración de informes inteligentes.

Definición de ACAML

ACAML *Agilent Common Analytical Markup Language*, es un lenguaje de marcación que se utiliza para capturar y describir datos analíticos en el dominio de la cromatografía y la espectrometría. ACAML ha sido diseñado para describir todos los tipos de datos en entornos analíticos. Se centra en proporcionar un estándar común de Agilent que permita el intercambio transparente de información entre distintas plataformas y aplicaciones.

La aproximación utilizada consiste en definir un lenguaje de esquema unificado con independencia de la técnica y la aplicación. ACAML se puede utilizar para describir datos analíticos de manera genérica, sin ningún aspecto especial (p. ej., punto de vista centrado en resultados): desde un único instrumento o método hasta escenarios más complejos con múltiples instrumentos, métodos, usuarios y cientos o miles de muestras.

Para manejar y validar documentos de instancias ACAML no se requiere ninguna aplicación adicional (como un validador ACAML especial). En su revisión inicial, ACAML soporta únicamente datos cromatográficos (LC, GC).

Esquema ACAML

La base del esquema ACAML es el lenguaje XML industrial.

El esquema ACAML es de tipado fuerte:

- para respaldar la idea de intercambio de datos estandarizado y
- para evitar el crecimiento sin control de tipos autodefinidos.

La definición del esquema asegura que cada documento de instancias esté bien definido y que la integridad referencial entre todos los objetos esté garantizada.

Para manejar y validar documentos de instancias ACAML no se requiere ninguna aplicación adicional (como un validador ACAML especial).

Presentación de factores de farmacopeas en ChemStation

Los factores de las tablas de picos, tal como se definen en las farmacopeas estadounidense (USP), europea (EP) y japonesa (JP), están disponibles para usarse en los informes de ChemStation. En la tabla siguiente se proporciona una descripción general de los factores disponibles, sus definiciones y los nombres de los valores. Para obtener más información sobre los cálculos, consulte las secciones correspondientes de esta guía.

Tabla 11 Valores de farmacopea en los informes de ChemStation

USP	EP	JP	Definición	Informes clásicos (RLE)	Informes inteligentes (RTE)
Factor de cola de pico	Factor de simetría	Factor de simetría	$S = W_{0,05h}/2f$	Colas de pico USP	Pico_FactorDeCola
-	-	-	$S=W_{0,10h}/2f$	Asimetría USP al 10 % de la altura	Peak_Asymmetry_10Perc
-	Retención relativa (ajustada)	Factor de separación	$r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$		TiempoRetenciónRelativo_EP
Retención relativa	-	-	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ T_R del pico a < T_R del pico b	Selectividad	Selectividad_del_pico
-	Resolución	Resolución	$R_s = 1,18 \times (t_{R2}-t_{R1}) / (W_{0,5h1} + W_{0,5h2})$	Resolución (EP) Resolución (JP)	Resolución_de_pico_EP Resolución_de_pico_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2,35}{2}\right) (T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Resolución	Resolución_de_pico_clásica
Resolución	-	-	$R_s = 2,0 \times (t_{R2}-t_{R1}) / (W_1 - W_2)$	-	Resolución_de_pico_USP
Eficiencia			$N = 16 \times (t/W)^2$	Método de la tangente de platos	Peak_TheoreticalPlates_USP
-	Eficiencia	Eficiencia	$N = 5,54 \times t_R^2 / W_{0,5h}^2$	Método a media altura de platos	Peak_TheoreticalPlates_EP

Tabla 11 Valores de farmacopea en los informes de ChemStation

USP	EP	JP	Definición	Informes clásicos (RLE)	Informes inteligentes (RTE)
Tiempo de retención relativa	Tiempo de retención relativa		$R_r = t_2/t_1$	-	Pico_TiempoRetenciónRelativa
	relación S/N	relación S/N	S/N = 2H/h Ruido: Cálculo pico a pico; señal de referencia en blanco; intervalo de tiempo 20x anchura del pico.	-	Pico_Señal-Ruido_EP
	relación S/N		S/N = 2H/h Ruido: Cálculo pico a pico; intervalo de tiempo en la señal actual.		Peak_SignalToNoise_USP
			S/N = 2H/h Ruido: Cálculo 6 sigma; intervalo de tiempo en la señal actual.		Peak_SignalToNoise_6Sigma
Relación pico/valle	Relación pico/valle		$p/v = H_p/H_v$	Relación pico/valle (Frente y cola)	Pico_RelaciónPicoValle
-	-	-	S=B/A	Asimetría Foley-Dorsey al 10 % de altura	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7 (T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A, B) / \min(A, B))}$	Platos Foley-Dorsey	-

10

Verificación del sistema

Ventanas de verificación y diagnóstico	163
Verificación del sistema	163
Registro GLPsave	166
Función del test del DAD	168
Función de revisión del test del DAD	168

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

Ventanas de verificación y diagnóstico

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

Verificación del sistema

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

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

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

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

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

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

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

Están disponibles los siguientes componentes de la prueba de verificación :

Electrónica digital (solo DAD Agilent Serie 1100/1200)

Un cromatograma de prueba se almacena en el detector de diodo array. Este cromatograma se envía a ChemStation después de que haya superado los mismos pasos de preprocesamiento como datos primarios normales de los fotodiodos. Los datos resultantes se comparan con los datos del resultado original almacenados en ChemStation para el cromatograma de esta prueba. Si no coinciden, no se supera la prueba. Esta prueba asegura que la electrónica del DAD, que se encarga del preprocesamiento de los datos, funciona todavía correctamente. Como se utiliza un cromatograma de la prueba almacenado; la lámpara o el diodo array no forman parte de esta prueba. Se pueden comprobar con la ["Función del test del DAD"](#) en la página 168.

Integración de picos

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

Cuantificación de compuestos

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

Impresión de informes

Se imprime de nuevo el informe original.

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

```
=====
ChemStation Verification Test Report
=====
```

Tested Configuration:

Component	Revision
ChemStation for LC 3D ChemStation	B.01.01
Microsoft Windows	Microsoft Windows XP
Processor	Processor_Architecture_Intel
CoProcessor	yes

ChemStation Verification Test Details:

```
Test Name : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL
Data File : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL\VERIFY.D
Method    : C:\CHEM32\1\VERIFY\DEFAULT.VAL\VERIFY.M
Original Datafile      : VERIFY.D
Original Acquisition Method : VERIFY.M
Original Operator      : Hewlett-Packard
Original Injection Date : 4/16/93 11:56:07 AM
Original Sample Name   : Isocratic Std.
```

Signals Tested:

```
Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=450,80 of VERIFY.D
```

ChemStation Verification Test Results:

Test Module	Selected	For Test	Test Result
Digital electronics test	No		N/A
Integration test	yes		Pass
Quantification test	yes		Pass
Print Analytical Report	No		N/A

ChemStation Verification Test Overall Results: Pass

Registro GLPsave

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

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

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

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

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

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

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

Por ejemplo puede:

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

Función del test del DAD

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

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

Función de revisión del test del DAD

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

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

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

En este manual

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

La información aquí contenida pueden utilizarla los profesionales responsables de la validación para la planificación y ejecución de tareas de validación del sistema.

www.agilent.com

© Agilent Technologies 2010-2019

Impreso en Alemania
04/2019



M8301-95029 Rev. C

