



Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition

Référence des principes de fonctionnement

Avertissements

Référence du manuel

M8301-93029 Rev. C
Edition 04/2019

Imprimé en Allemagne

Copyright

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2019

Conformément aux lois nationales et internationales relatives à la propriété intellectuelle, toute reproduction totale ou partielle de ce manuel sous quelque forme que ce soit, par quelque moyen que ce soit, voie électronique ou traduction, est interdite sans le consentement écrit préalable de la société Agilent Technologies, Inc.

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Ce guide concerne la version C.01.10
du logiciel Agilent OpenLab CDS
ChemStation Edition.

Garantie

Les informations contenues dans ce document sont fournies "en l'état" et pourront faire l'objet de modifications sans préavis dans les éditions ultérieures. Dans les limites de la législation en vigueur, Agilent exclut en outre toute garantie, expresse ou implicite, quant à ce manuel et aux informations contenues dans ce dernier, notamment, mais sans s'y restreindre, toute garantie marchande et aptitude à un but particulier. En aucun cas, Agilent ne peut être tenu responsable des éventuelles erreurs contenues dans ce document, ni des dommages directs ou indirects pouvant découler des informations contenues dans ce document, de la fourniture, de l'usage ou de la qualité de ce document. Si Agilent et l'utilisateur ont souscrit un contrat écrit distinct dont les conditions de garantie relatives au produit couvert par ce document entrent en conflit avec les présentes conditions, les conditions de garantie du contrat distinct se substituent aux conditions stipulées dans le présent document.

Licences technologiques

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

Mentions de sécurité

ATTENTION

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

AVERTISSEMENT

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

Dans ce guide...

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

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

- Principes d'OpenLab CDS ChemStation Edition, nouvelles fonctionnalités et procédures : le manuel *OpenLab CDS ChemStation Edition – Concepts et procédures de base*.
- Informations contextuelles sur les tâches, didacticiel, référence de l'interface utilisateur et aide à la résolution des problèmes : aide en ligne de ChemStation.
- Informations détaillées sur l'installation du système et la préparation du site : le guide *Agilent OpenLab CDS Workstation Installation*.
- Détails sur les principes d'administration du système et les tâches : le guide *Administration d'Agilent OpenLab CDS*.

1 Acquisition de données

Ce chapitre décrit entre autres l'acquisition de données, les fichiers de données et le journal.

2 Intégration

Ce chapitre décrit les principes de l'intégration des algorithmes d'intégration de la ChemStation. Il décrit l'algorithme d'intégration, l'intégration et l'intégration manuelle.

3 Identification des pics

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

4 Étalonnage

Ce chapitre décrit les principes d'étalonnage du logiciel ChemStation.

5 Quantification

Ce chapitre décrit la procédure de quantification de ChemStation. Il détaille les calculs de surface (%) et de hauteur (%), les calculs des étalons externes (ESTD), des étalons internes (ISTD) et des pourcentages normalisés, ainsi que la quantification des pics non identifiés.

6 Evaluation de la conformité du système

Ce chapitre décrit les fonctions proposées par le logiciel ChemStation pour évaluer les performances de l'instrument d'analyse avant son utilisation à des fins d'analyse d'échantillons et les performances de la méthode d'analyse avant son utilisation en conditions standard. Il indique également comment vérifier les performances des systèmes d'analyse avant et pendant les analyses de routine.

7 Calculs propres à l'EC

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

8 Révision, retraitement des données et révision par lot

Ce chapitre décrit les possibilités de révision des données et les procédures de retraitement de données de séquence. Il présente également les principes de révision par lot, de configuration par lot, les fonctions de révision et la génération de rapports.

9 Reporting

OpenLab CDS ChemStation Edition permet deux types de Reporting : vous pouvez choisir entre le Classic ChemStation Reporting (inchangée par rapport à la création de rapports de ChemStation B) ou la nouvelle reporting création intelligente de rapports. Cette rubrique décrit et fournit une référence pour le schéma ACAML utilisé dans la fonctionnalité d'Intelligent Reporting.

10 Vérification du système

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

Sommaire

1 Acquisition de données 8

Qu'est-ce que l'acquisition de données ? 9

Informations sur l'état 12

2 Intégration 15

Qu'est-ce que l'intégration ? 17

Les algorithmes d'intégration de la ChemStation 19

Principe de fonctionnement 24

Reconnaissance de pic 25

Attribution de la ligne de base 32

Mesure d'aire de pic 47

Événements d'intégration 50

Intégration manuelle 58

3 Identification des pics 61

En quoi consiste l'identification des pics ? 62

Règles de correspondance des pics 63

Types d'identification des pics 64

Temps de rétention/migration absolu 65

Temps de rétention/migration corrigés 67

Qualificateurs de pic 69

La procédure d'identification 72

4 Étalonnage 74

Courbe d'étalonnage 75

Étalonnage groupé 77

Options de réétalonnage 78

5	Quantification	79
	Définition	80
	Calculs de la quantification	81
	Facteurs de correction	82
	% aire et % hauteur	83
	Procédures de calcul étalonnées	84
	Calcul ESTD	85
	Calcul du pourcentage normalisé	87
	Calcul ISTD	88
	Quantification des pics non étalonnés	91
6	Evaluation de la conformité du système	93
	Evaluation de la conformité du système	95
	Définition du bruit	98
	Calcul de l'asymétrie et de la symétrie de pic	107
	Calculs et formules de conformité du système	109
	Définitions générales	110
	Définition des tests de performance	111
	Définitions de la reproductibilité	121
	Accès au nombre en double précision stocké en interne	128
7	Calculs propres à l'EC	131
	Tables d'étalonnage	132
	Étalonnage à l'aide de la correction de mobilité	135
	Styles de rapport spéciaux pour l'électrophorèse capillaire	141
	Surfaces de pic corrigées	142
	Aptitude du système pour l'électrophorèse capillaire	143
	EC-DDM	144
8	Révision, retraitement des données et révision par lot	145
	Table de navigation de la vue Data Analysis (Analyse de données)	146
	Définition de la révision par lot	152
	Activation de la fonctionnalité de vérification par lot à l'aide de ChemStation avec ECM	153

Configuration de lot 154
Fonctions de révision 156
Génération de rapports par lot 158

9 Reporting 159

En quoi consiste ACAML ? 160
Le schéma ACAML 161
Facteurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation 162

10 Vérification du système 164

Vues Verification (Vérification) et Diagnosis (Diagnostic) 165
Registre GLPsave 168
Fonction de test DAD 170

1

Acquisition de données

Qu'est-ce que l'acquisition de données ? 9

Fichiers de données 9

Moniteurs en temps réel 11

Journal 11

Informations sur l'état 12

Etat de la ChemStation 12

Barre d'état 12

Schéma du système 13

Ce chapitre décrit entre autres l'acquisition de données, les fichiers de données et le journal.

Qu'est-ce que l'acquisition de données ?

Lors de l'acquisition de données, tous les signaux analogiques acquis par l'instrument d'analyse sont convertis en signaux numériques dans le détecteur. Le signal numérique est ensuite transmis électroniquement au logiciel ChemStation, puis est stocké dans le fichier de données de signaux.

Fichiers de données

Un fichier de données est constitué d'un groupe de FICHIERS stockés par défaut ou dans un sous-répertoire de ce répertoire en tant que sous-répertoire avec un nom de fichier de données et une extension .D. Un nom du fichier de données peut être défini manuellement en utilisant jusqu'à 42 caractères (y compris l'extension). Chaque fichier présent dans le répertoire respecte une convention de noms (reportez-vous à *Conventions de noms de fichiers* dans le guide *Concepts et procédures de base*). Des répertoires de données additionnels peuvent être ajoutés à l'aide des paramètres **Préférences**.

Tableau 1 Fichiers de données

Nom	Description
*.CH	Fichiers de données de signaux chromatographiques/électrophorétiques. Le nom du fichier comporte le type de module ou de détecteur, le numéro du module et l'identification du signal ou du canal. Par exemple, pour ADC1A.CH, ADC correspond au type de module, 1 au numéro du module et A est l'identificateur du signal. ".CH" désigne l'extension chromatographique.
*.UV	Fichiers de données spectrales UV. Le nom du fichier se compose du type de détecteur et du numéro de l'appareil (uniquement pour les détecteurs à barrette de diodes et à fluorescence).
*.ms	Fichiers de données spectrales LCMS.
REPORT.TXT, REPORT.PDF	Fichiers de données de rapport pour les fichiers de données de signaux équivalents. Remarque : le nom de fichier PDF peut être différent si vous utilisez le système de nom de fichier PDF unique.

Acquisition de données

Qu'est-ce que l'acquisition de données ?

Tableau 1 Fichiers de données

Nom	Description
Acq.MACAML	Le fichier contient des informations concernant la méthode utilisée pendant l'acquisition de données. Les informations sont enregistrées au format ACAML. Les fichiers ACAML sont utilisés par la création intelligente de rapports.
Sequence.ACAM_	Le fichier contient les résultats d'une seule injection. Les informations sont enregistrées au format ACAML. Les fichiers ACAML sont utilisés par la création intelligente de rapports.
SAMPLE.MAC ou SAMPLE.XML	Ce fichier permet de stocker les valeurs d'échantillon.
SAMPLE.MAC.BAK ou SAMPLE.XML.BAK	Sauvegarde du fichier sample.mac d'origine. Le fichier .bac est créé lors du retraitement, lorsque les paramètres d'échantillonnage (comme les multiplicateurs) sont mis à jour pour la première fois. Il contient les valeurs d'échantillon d'origine utilisées lors de l'acquisition.
RUN.LOG	Entrées du journal générées au cours d'une analyse. Le journal conserve un enregistrement de l'analyse. Tous les messages d'erreur et les changements d'état importants du logiciel ChemStation sont consignés dans le journal.
LCDIAG.REG	Pour les systèmes CPL uniquement. Contient les courbes d'instrument (gradients, température, pression, etc.), le volume d'injection et la description du solvant.
ACQRES.REG	Contient des informations de colonne. Pour les systèmes CPG, il contient également le volume d'injection.
GLPSAVE.REG	Partie du fichier de données intégrée lorsque l'option Enregistrer les données BPL est activée.
M_INTEV.REG	Contient les événements d'intégration manuelle.

Moniteurs en temps réel

Il existe deux types de moniteurs en temps réel : le moniteur de signaux et le moniteur de spectres. Pour plus de détails, reportez-vous au guide Concepts et procédures de travail de la ChemStation.

Journal

Le journal affiche les messages générés par le système analytique. Il peut s'agir de messages d'erreur, de messages système ou de messages d'événement provenant d'un module. Le journal enregistre ces événements, qu'ils soient affichés ou non.

Informations sur l'état

Etat de la ChemStation

La fenêtre d'état de la ChemStation affiche un récapitulatif de l'état du logiciel ChemStation.

Lorsqu'une analyse individuelle est en cours :

- la première ligne de la fenêtre d'état de la ChemStation affiche l'évolution de l'analyse en cours,
- la deuxième ligne de la fenêtre d'état affiche l'état de la méthode en cours et
- le nom du fichier de données brutes apparaît sur la troisième ligne, avec le temps d'analyse réel exprimé en minutes (pour un instrument CPG, les fichiers correspondant aux injecteurs avant et arrière apparaissent également).

Les fenêtres d'état d'instrument fournissent des informations sur l'état des détecteurs et des modules d'instrument. Elles affichent l'état des différents composés et, le cas échéant, les conditions en cours, par exemple, les données relatives à la pression, au gradient et au débit.

Barre d'état

L'interface utilisateur graphique du système ChemStation se compose de barres d'outils et d'une barre d'état dans la vue Contrôle de méthode et d'analyse. La barre d'état comprend un champ d'état du système et des informations sur la séquence et la méthode chargées. En cas de modification après leur chargement, elles sont identifiées par un astérisque ou une roue dentée jaune selon l'instrument. Un symbole EMF jaune indique que les limites d'utilisation fixées pour les consommables (tels que la lampe) de LC ont été dépassées.

Schéma du système

Si cette option est prise en charge par les instruments d'analyse configurés (par exemple, les modules LC Agilent série 1200 Infinity ou le système de GC Intuvo 9000), vous pouvez afficher un schéma graphique de votre système ChemStation. Un simple coup d'œil suffit alors à vérifier l'état du système. Sélectionnez l'option **System Diagram** dans le menu **View** dans l'affichage **Method and Run Control** pour activer le schéma. Il s'agit d'une représentation graphique de votre système ChemStation. L'état du système est indiqué par un code couleur décrit ci-après.

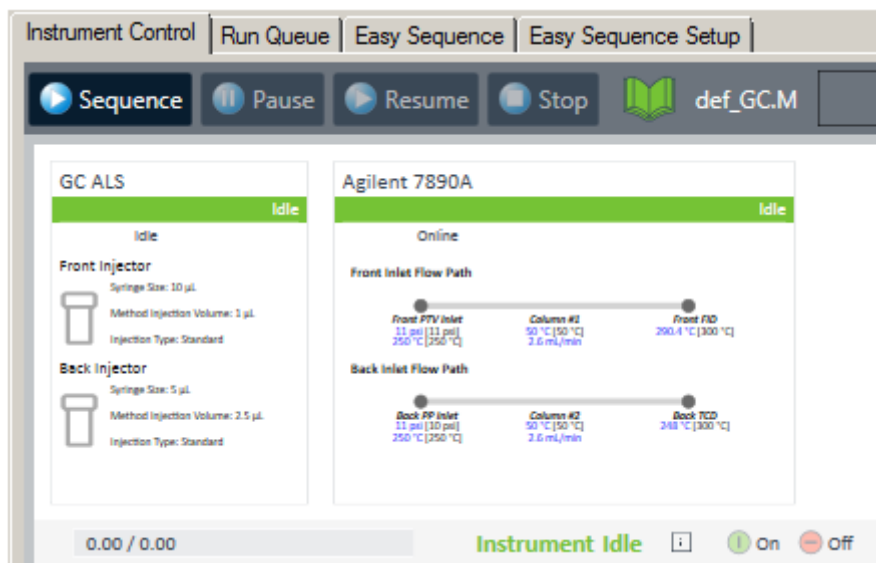


Figure 1 Diagramme du système, par exemple pour un système de GC

Tableau 2 Couleurs utilisées pour indiquer l'état du module ou de l'instrument

Couleur	Status
gris	hors ligne
vert	inactif
orange	non prêt
rouge	erreur
cyan	mode veille (par exemple, lampes éteintes)
violet	pré-analyse, post-analyse
magenta	en cours d'injection
bleu	en cours d'analyse ou post-analyse

Il est également possible d'afficher des listes des paramètres en cours d'utilisation. En plus d'un aperçu de l'état général du système, ce schéma offre un accès rapide aux boîtes de dialogue permettant de configurer les paramètres de chaque composant du système.

Pour plus d'informations sur le schéma du système, reportez-vous à la section de l'aide en ligne consacrée aux instruments.

2

Intégration

Qu'est-ce que l'intégration ?	17
Les algorithmes d'intégration de la ChemStation	19
Terminologie	20
Définition de la ligne de base initiale	21
Suivi de la ligne de base	21
Attribution de la ligne de base	22
Identification des points cardinaux d'un pic	23
Principe de fonctionnement	24
Reconnaissance de pic	25
Largeur de pic	25
Filtres de reconnaissance de pic	26
Regroupement de tranches d'intégration	27
Algorithme de reconnaissance de pic	28
Pics fusionnés	30
Épaulements	31
Attribution de la ligne de base	32
Construction de la ligne de base par défaut	32
Le début de la ligne de base	33
La fin de la ligne de base	33
Pénétration de la ligne de base	34
Rapport pic / vallée	35
Modes d'intégration tangentielle	37
Pics non attribués	44
Codes de séparation de pic	45
Mesure d'aire de pic	47
Détermination de l'aire	47
Unités et facteurs de conversion	49
Événements d'intégration	50
Événements d'Intégration pour Tous les Signaux	50
Événements initiaux	50

Intégration

Informations sur l'état

Événements programmés	54
Intégration automatique	56
Intégration manuelle	58
Enregistrement des événements d'intégration manuelle	59

Ce chapitre décrit les principes de l'intégration des algorithmes d'intégration de la ChemStation. Il décrit l'algorithme d'intégration, l'intégration et l'intégration manuelle.

Qu'est-ce que l'intégration ?

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

L'intégration est une étape indispensable pour :

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

Description de l'intégration

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

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

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

Fonctions de l'intégrateur

Les algorithmes d'intégration proposent les grandes fonctions suivantes :

- fonction d'intégration automatique, utilisée pour établir les paramètres d'intégration initiaux,
- fonction de définition de tables d'événements d'intégration différentes pour chaque signal chromatographique/électrophorétique, si l'on utilise plusieurs signaux ou détecteurs,
- définition interactive des événements d'intégration permettant de sélectionner le moment des événements sur un graphique,

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

Les algorithmes d'intégration de la ChemStation

Pour intégrer un chromatogramme/électrophorétogramme, l'intégrateur :

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

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

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

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

Pour plus d'informations, voir « Événements initiaux », page 50.

Terminologie

Points cardinaux

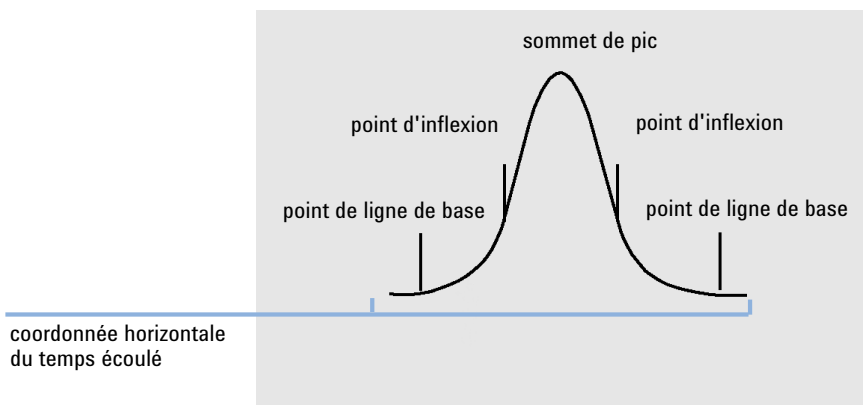


Figure 2 Points cardinaux

Pic de solvant

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

Épaulements (avant, arrière)

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

Pente

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

Définition de la ligne de base initiale

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

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

Suivi de la ligne de base

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

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

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

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

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

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

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

Attribution de la ligne de base

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

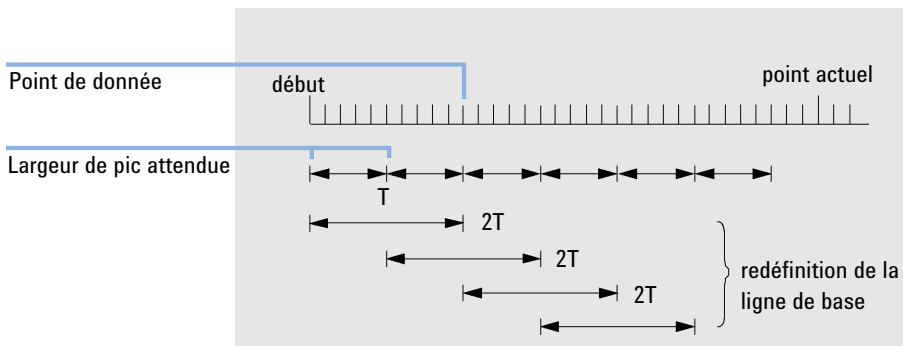


Figure 3 Ligne de base

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

Les aires sont sommées sur un temps T (largeur de pic prévue). Ce temps ne peut jamais être plus court qu'un point de données. La procédure se poursuit tant que la condition de ligne de base existe. La pente et la courbure sont également calculées. Si la pente et la courbure sont toutes deux inférieures au seuil, le système additionne deux aires sommées et les compare à la ligne de base précédente. Si la nouvelle valeur est inférieure à la ligne de base précédente, elle remplace immédiatement la précédente. Si la nouvelle valeur est supérieure à la précédente, elle est enregistrée en tant que nouvelle ligne de base provisoire, puis confirmée si une ou plusieurs valeurs sont conformes aux critères de pente et de

linéarité de la courbure. Cette dernière limitation ne s'applique pas si les pics négatifs sont autorisés. Pendant le suivi de la ligne de base, un contrôle doit également être effectué pour détecter les solvants à montée rapide. Ceux-ci peuvent être trop rapides pour la détection de front montant (au moment où la pente montante est confirmée, le critère de solvant peut ne plus être valide). À la première occurrence, le premier point de données est sur la ligne de base. Il est remplacé par la moyenne sur $2 T$ si le signal est sur la ligne de base. La ligne de base est ensuite réinitialisée à chaque période T (voir [Figure 3](#), page 22).

Identification des points cardinaux d'un pic

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

Début

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

Sommet

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

Fin

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

Principe de fonctionnement

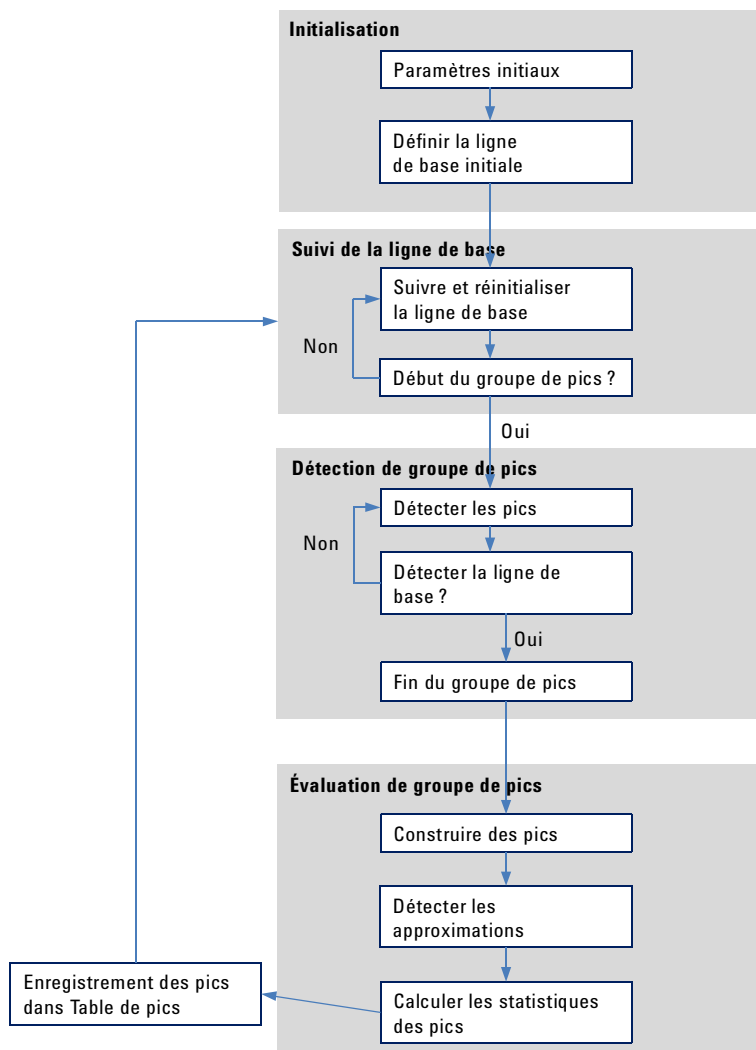


Figure 4 Organigramme de l'intégrateur

Reconnaissance de pic

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

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

Largeur de pic

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

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

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

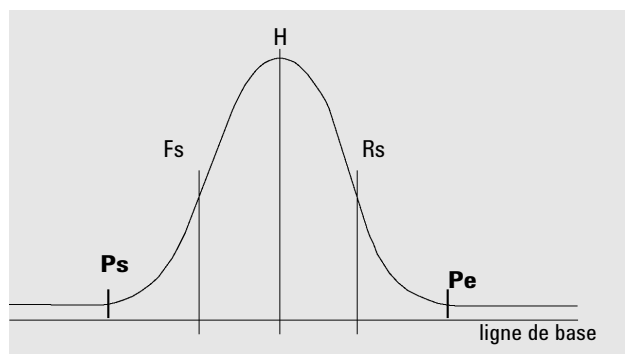


Figure 5 Calcul de largeur de pic

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

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

La largeur du pic peut être modifiée de trois façons :

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

Pour connaître les définitions de largeur de pic utilisées par les calculs de conformité du système, voir la section « [Evaluation de la conformité du système](#) », page 93.

Filtres de reconnaissance de pic

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

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

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

Intégration

Reconnaissance de pic

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

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

0,3 x (point d'inflexion droit - point d'inflexion gauche) + 0,7 x aire/hauteur.

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

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

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

0,75 x (largeur de pic existante) + 0,25 x (largeur du pic actuel)

Regroupement de tranches d'intégration

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

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

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

Le regroupement se base sur la fréquence d'acquisition des données et la largeur de pic. L'intégrateur utilise ces paramètres pour définir le facteur de regroupement et donner le nombre de points de données approprié (voir [Tableau 3](#), page 28).

Le regroupement s'effectue par puissance de deux en fonction de la largeur de pic attendue ou reconnue. L'algorithme de regroupement est résumé dans [Tableau 3](#), page 28.

Tableau 3 Critères de groupage

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

Algorithme de reconnaissance de pic

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

Début de pic

Dans [Tableau 4](#), page 29, la largeur de pic attendue détermine les valeurs de pente et de courbure de filtre à comparer à la sensibilité de pente. Par exemple, lorsque la largeur de pic attendue est faible, les valeurs du filtre 1 sont ajoutées à l'accumulateur de pente montante. Si la largeur de pic attendue augmente, les valeurs du filtre 2 et finalement celles du filtre 3 sont utilisées.

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

Tableau 4 Valeurs incrémentales de l'accumulateur de pente montante

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

Fin du pic

Dans [Tableau 5](#), page 29, la largeur de pic attendue détermine les valeurs de pente et de courbure de filtre à comparer à la sensibilité de pente. Par exemple, si la largeur de pic attendue est faible, les valeurs du filtre 1 sont ajoutées à l'accumulateur de pente descendante. Si la largeur de pic attendue augmente, les valeurs du filtre 2 et finalement celles du filtre 3 sont utilisées.

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

Tableau 5 Valeurs incrémentales pour l'accumulateur de pente descendante

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

Algorithme de sommet de pic

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

Pics fusionnés

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

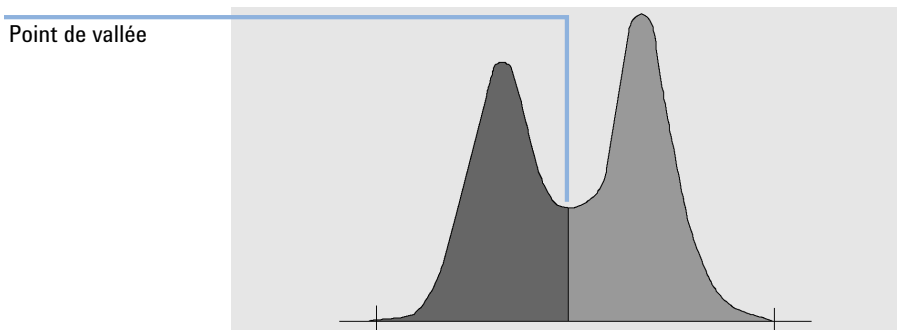


Figure 6 Pics fusionnés

L'intégrateur gère les pics fusionnés comme suit :

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

Épaulements

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

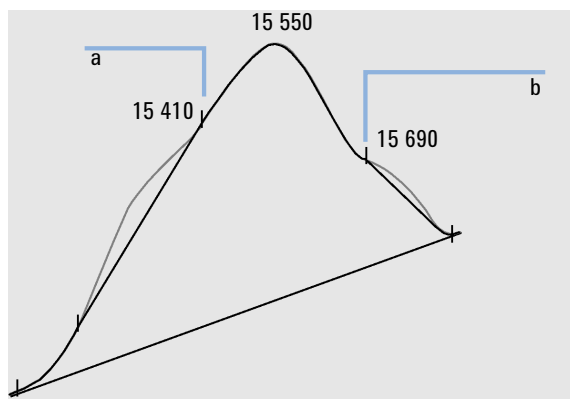


Figure 7 Épaulements de pic

Les épaulements sont détectés à partir de la courbure du pic, mesurée par la dérivée seconde. Lorsque la courbure tend vers zéro, l'intégrateur identifie un point d'inflexion, tel que les points a et b de [Figure 7](#), page 31.

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

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

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

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

Attribution de la ligne de base

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

Construction de la ligne de base par défaut

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

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

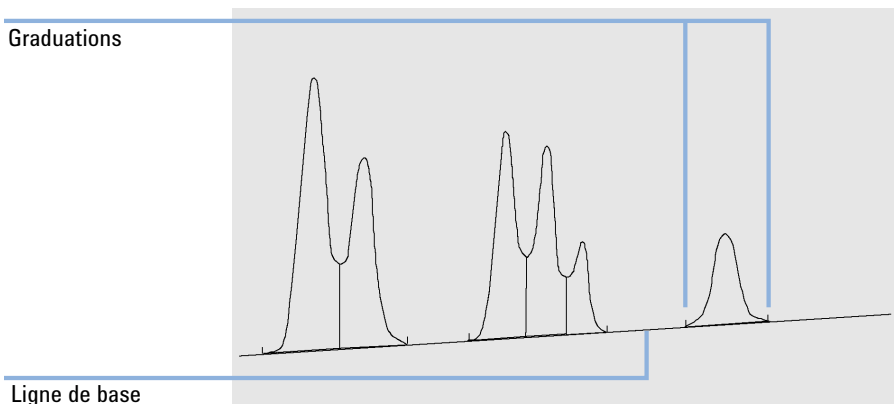


Figure 8 Construction de la ligne de base par défaut

Le début de la ligne de base

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

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

La fin de la ligne de base

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

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

Pénétration de la ligne de base

Une pénétration est définie par une descente du signal en dessous de la ligne de base construite (point a sur [Figure 9](#), page 34).

En cas de pénétration de la ligne de base, cette partie de ligne de base peut être reconstruite comme pour le point b sur [Figure 9](#), page 34.

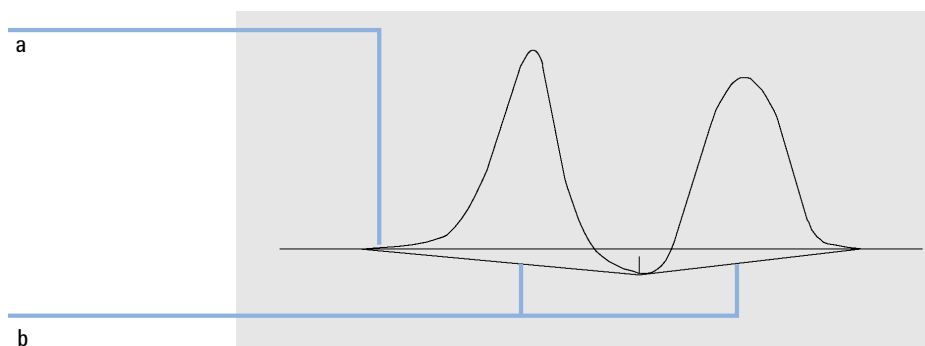


Figure 9 Pénétration de la ligne de base

Les options de suivi de la ligne de base suivantes permettent de supprimer les pénétrations de la ligne de base :

Classical Baseline Tracking (no penetrations)

Lorsque cette option est sélectionnée, l'intégrateur recherche des pénétrations de la ligne de base dans chaque groupe de pics. Si des pénétrations sont détectées, les points de début et/ou de fin du pic sont décalés jusqu'à ce que toutes les pénétrations aient été éliminées (comparez les lignes de base de [Figure 9](#), page 34 et de [Figure 10](#), page 35).

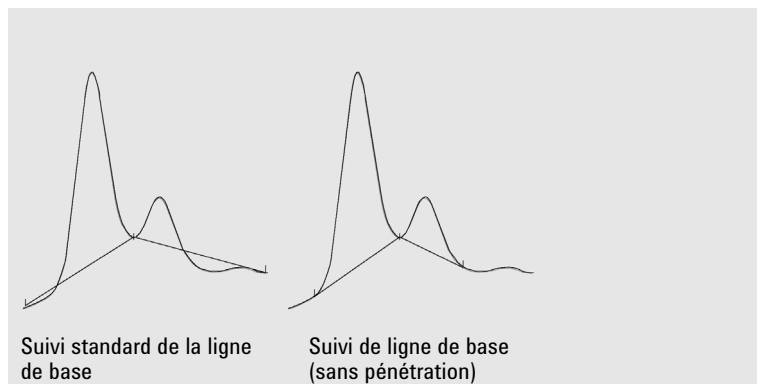


Figure 10 Suivi standard de ligne de base et suivi de ligne de base (sans pénétration)

REMARQUE

Le **Baseline tracking (no penetration)** est indisponible pour les pics de solvant, leurs pics-fils et leurs épaulements.

Suivi de ligne de base avancé

Dans le mode de suivi avancé de la ligne de base, l'intégrateur tente d'optimiser les emplacements de début et de fin de pics, il redéfinit la ligne de base pour un groupe de pics et supprime les pénétrations des lignes de base (voir Figure 10, page 35). Dans beaucoup de cas, le mode de suivi avancé de la ligne de base donne une ligne de base plus stable, moins dépendante de la sensibilité de pente.

Rapport pic / vallée

Le rapport pic/vallée est une mesure de qualité, qui indique le niveau de séparation du pic par rapport aux pics d'autres substances. Ce paramètre défini par l'utilisateur est employé dans le mode de suivi avancé de ligne de base. Il permet de décider si deux pics qui ne présentent pas de séparation à la ligne de base sont séparés par une projection verticale ou une ligne de base de vallée. L'intégrateur calcule le rapport entre la hauteur corrigée par la ligne de base du pic le plus petit et la hauteur corrigée par la ligne de base de la vallée. Si le rapport pic/vallée est inférieur à la valeur définie par l'utilisateur, une projection verticale est utilisée ; sinon, une ligne de base est tracée de la ligne de base au début du premier pic jusqu'à la vallée, puis de la vallée à la ligne de base à la fin du deuxième pic (comparer la Figure 10, page 35 à la Figure 11, page 36).

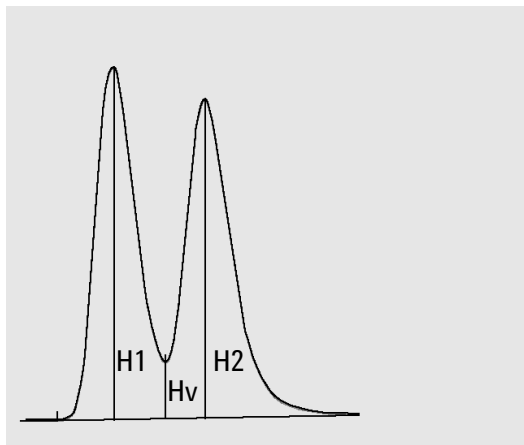


Figure 11 Rapport pic / vallée

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

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

et

$H1 < H2$, Rapport pic/vallée = $H1/Hv$

La [Figure 12](#), page 36 illustre l'incidence de la valeur de rapport pic/vallée définie par l'utilisateur sur les lignes de base.

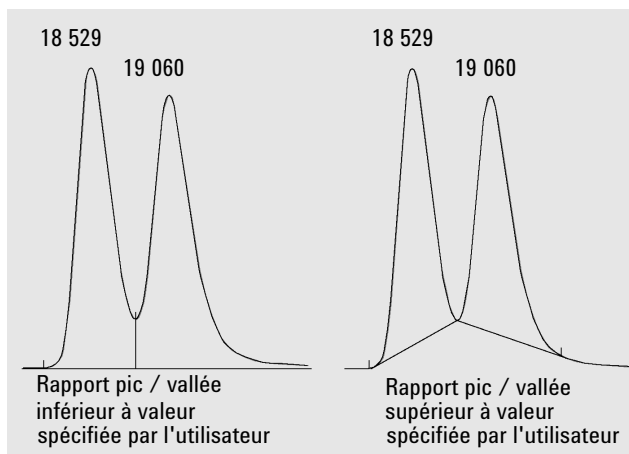


Figure 12 Incidence du rapport pic/vallée sur les lignes de base

Modes d'intégration tangentielle

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

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

Courbe exponentielle

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

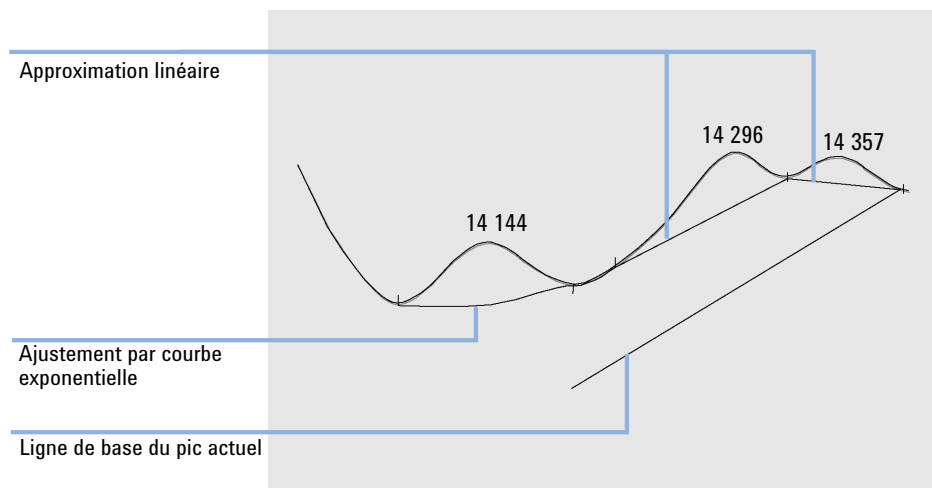


Figure 13 Approximation exponentielle

Nouvelle courbe exponentielle

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

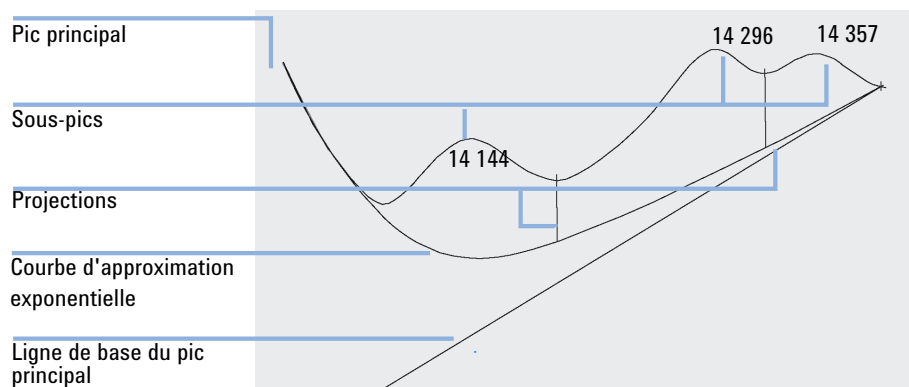


Figure 14 Nouvelle approximation exponentielle

Approximation linéaire

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

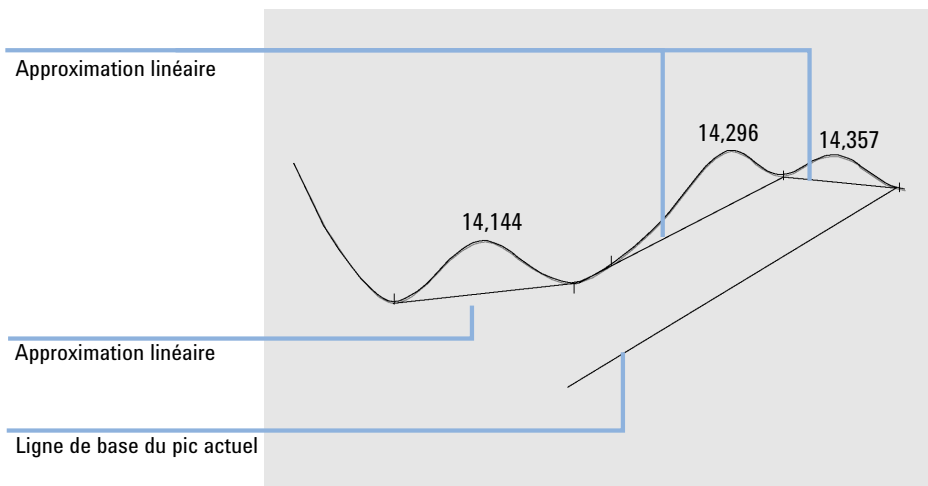


Figure 15 Approximation linéaire

Approximations standard

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

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

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

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

Critères d'approximation

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

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

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

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

REMARQUE

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

REMARQUE

Ces critères ne sont pas utilisés si un événement programmé est actif pour une exponentielle, ou si le pic parent est lui-même un pic fils. Le code de ligne de base entre le pic parent et le pic fils doit être du type **Valley** (voir « Codes de séparation de pic », page 45).

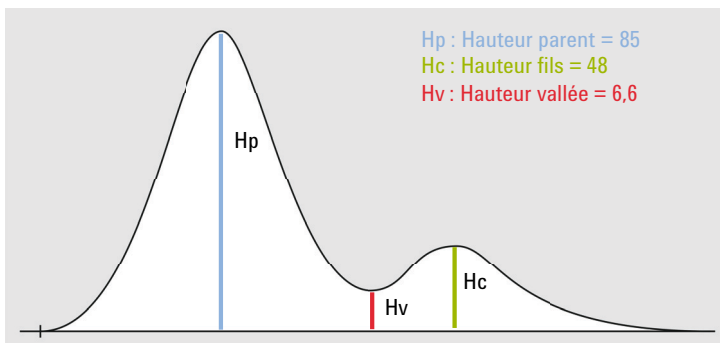


Figure 16 Exemple de calcul de la valeur des critères d'approximation

Rapport de hauteur d'approximation = H_p / H_c

Rapport hauteur/vallée pour approximation = H_c / H_v

où :

H_p Hauteur corrigée de la ligne de base du pic parent

H_v Hauteur de la vallée au-dessus de la ligne de base

H_c Hauteur corrigée de la ligne de base du pic fils

Approximation de la traîne

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

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

Approximation de front

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

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

Calcul d'ajustement de la courbe exponentielle pour l'écrêtage

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

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

où :

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

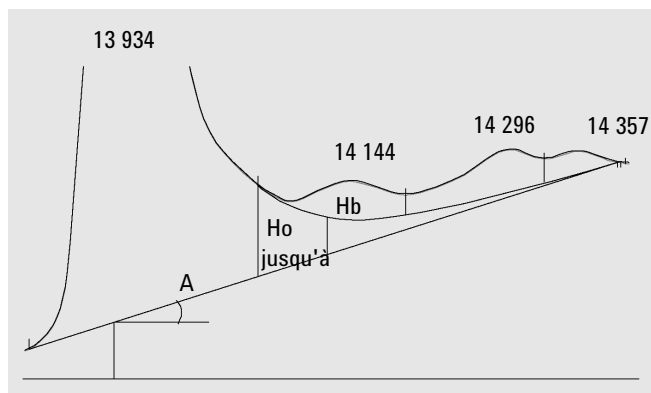


Figure 17 Valeurs utilisées pour calculer une approximation exponentielle

Approximation de front de pic

Quant aux pics d'un enfant à l'arrière d'un pic du parent, une intégration spéciale est requise pour quelques pics sur le front/l'inclinaison supérieure d'un pic, référez-vous à [Figure 18](#), page 43.

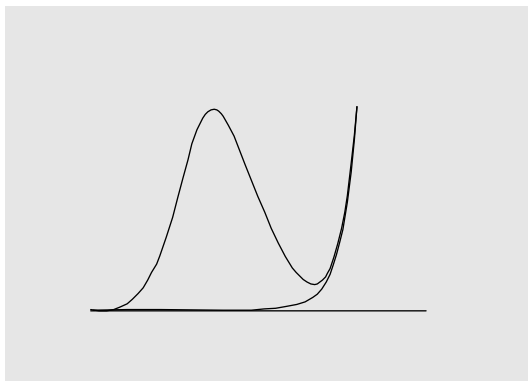


Figure 18 Approximation de front de pic

L'approximation de front de pic est traitée dans la même manière que l'approximation de pic d'arrière, en utilisant les mêmes modèles d'approximation.

Les critères d'approximation sont :

- rapport hauteur / front d'approximation
- rapport hauteur / vallée

Le rapport hauteur vallée a la même valeur pour l'approximation de front de pic que pour l'approximation de traîne (voir « Rapport hauteur / vallée »). Le rapport hauteur / front est calculé comme le rapport hauteur / traîne (voir « Rapport hauteur / traîne »), mais peut avoir une valeur différente.

Pics non attribués

Pour certaines constructions de ligne de base, des petites aires peuvent être au-dessus de la ligne de base et au-dessous du signal, mais ne font pas partie des pics identifiés. Ces aires ne sont normalement ni mesurées, ni présentées dans les rapports. Si l'option unassigned peaks (Pics non attribués) est activée, ces aires sont mesurées et mentionnées dans le rapport comme étant des pics non attribués. Le temps de rétention/migration pour ces aires est le point central entre le début et la fin de l'aire, comme indiqué sur la [Figure 19](#), page 44.

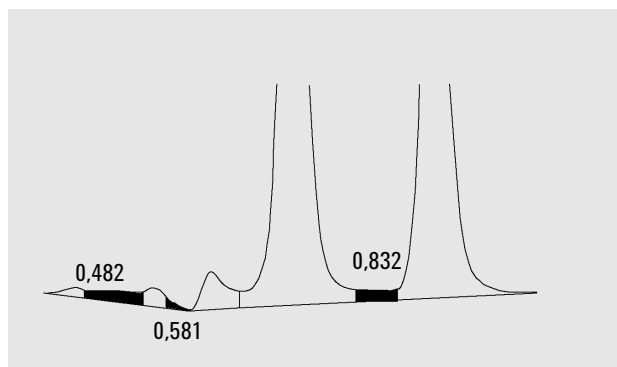


Figure 19 Pics non attribués

Codes de séparation de pic

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

Tableau 6 Code à quatre caractères

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

Caractères 1 et 2

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

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

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

Caractère 3

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

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

Espace blanc Le pic est un pic normal.

Caractère 4

Le quatrième caractère décrit le type de pic.

- S** Le pic est un pic de solvant.
- N** Le pic est un pic négatif.
- +** Le pic est un pic obtenu par sommation d'aires.
- T** Le pic est calculé par intégration tangentielle (approximation standard).
- X** Le pic est calculé par approximation tangentielle (ancien mode d'approximation exponentielle).
- E** Le pic est calculé par approximation tangentielle (nouveau mode d'approximation exponentielle).
- m** Le pic est défini par une ligne de base manuelle.
- n** Le pic négatif est défini par une ligne de base manuelle.
- t** Le pic est calculé par approximation tangentielle avec une ligne de base manuelle.
- x** Le pic est calculé par approximation tangentielle (approximation exponentielle) avec une ligne de base manuelle.
- R** Le pic est un pic recalculé (par exemple un pic parent ; voir « Modes d'intégration tangentielle », page 37).
- f** Le pic est défini par une tangente d'épaulement avant.
- b** Le pic est défini par une tangente d'épaulement arrière.
- F** Le pic est défini par une projection verticale d'épaulement avant.
- B** Le pic est défini par une projection verticale d'épaulement arrière.
- U** Le pic n'est pas attribué.

Mesure d'aire de pic

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

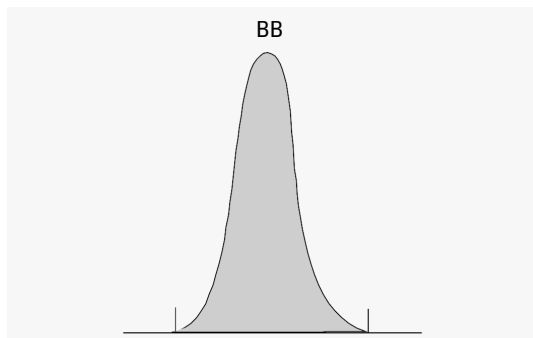


Figure 20 Mesure d'aire pour des pics de ligne de base à ligne de base

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

Détermination de l'aire

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

- pour les pics de ligne de base à ligne de base (BB), il s'agit de l'aire au-dessus de la ligne de base entre le début et la fin du pic, comme sur la [Figure 20](#), page 47,
- pour les pics de vallée à vallée (VV), il s'agit de l'aire au-dessus de la ligne de base, segmentée par des projections verticales partant des points de vallée, comme sur la [Figure 21](#), page 48,

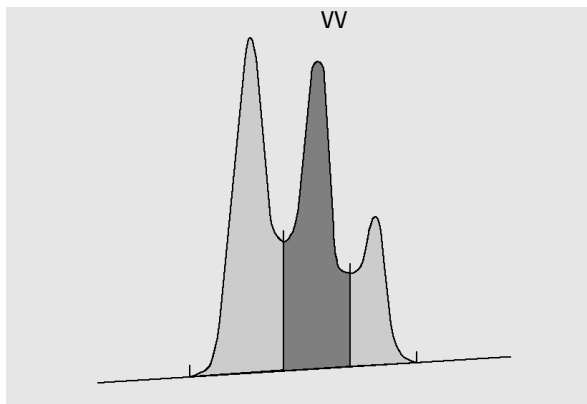


Figure 21 Mesure d'aire pour des pics de vallée à vallée

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

- les pics négatifs (au-dessous de la ligne de base) ont une aire positive, comme le montre la [Figure 22](#), page 49.

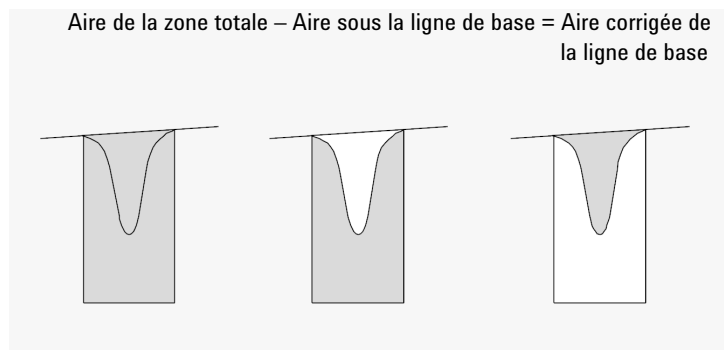


Figure 22 Mesure d'aire pour des pics négatifs

Unités et facteurs de conversion

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

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

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

Événements d'intégration

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

Événements d'Intégration pour Tous les Signaux

Les événements suivants sont fournis pour tous les signaux:

- Mode d'Approximation Tangente
- Rapport Hauteur Pic d'Approximation
- Rapport Front Hauteur Pic d'Approximation
- Rapport Vallée d'Approximation
- Correction de la ligne de base
- Rapport pic/vallée

Événements initiaux

**Initial Peak
Width**

La fonction de largeur initiale de pic définit la largeur interne de pic de l'intégrateur au début de l'analyse. La largeur initiale de pic est utilisée pour mettre à l'échelle l'accumulateur qui détecte la pente montante, la pente descendante et la traîne. Si nécessaire, l'intégrateur actualise la largeur de pic en cours d'analyse pour optimiser l'intégration. Vous pouvez définir la largeur de pic en unités de temps : il s'agit alors de la largeur à mi-hauteur du premier pic attendu (pic de solvant exclu).

**Slope
Sensitivity**

La sensibilité de pente est un réglage de sensibilité de détection de pic. Il est modifiable sur une échelle linéaire.

Height reject

La hauteur de rejet permet de rejeter des pics en fonction de leur hauteur finale. Les pics de hauteur inférieure à la hauteur minimale sont ignorés.

Area reject

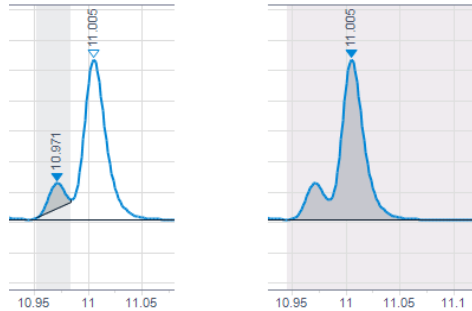
L'aire de rejet permet de rejeter des pics en fonction de leur aire finale. Tous les pics dont l'aire est inférieure à l'aire minimale sont ignorés.

Area% reject Le % d'aire de rejet définit le % d'aire du plus petit pic d'intérêt.

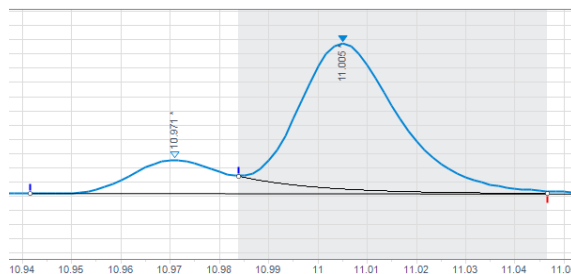
Tous les pics avec un % d'aire inférieur au % d'aire minimum sont ignorés. L'intégrateur rejette les pics ayant un % d'aire inférieur à la valeur fournie après correction de la ligne de base.

Saisir le % d'aire du plus petit pic attendu. Vous pouvez obtenir cette information en intégrant tout d'abord le fichier de données avec la valeur zéro (0) attribuée à l'aire et à la hauteur de rejet. Utilisez la colonne **Area%** dans les résultats d'intégration afin de choisir une valeur minimale appropriée.

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



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



Shoulder detection

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

Peak Width

Le paramètre de largeur de pic détermine la capacité de l'intégrateur à distinguer les pics du bruit de la ligne de base. Pour de bons résultats, la largeur de pic doit être réglée sur une valeur proche de la largeur à mi-hauteur des véritables pics. Si nécessaire, l'intégrateur actualise la largeur de pic en cours d'analyse pour optimiser l'intégration.

Choix de la largeur de pic

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

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

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

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

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

Height Reject et Peak Width

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

- Augmentez la hauteur de rejet et la largeur de pic pour détecter et quantifier des composants relativement dominants dans un environnement à bruit important. Une largeur de pic plus élevée améliore le filtrage du bruit et une hauteur de rejet plus élevée permet d'ignorer le bruit aléatoire.
- Diminuez la hauteur de rejet et la largeur de pic pour détecter et quantifier des composants traces, dont les hauteurs sont proches de celles du bruit lui-même. En diminuant la largeur de pic, vous diminuez le filtrage des

signaux, tandis qu'en diminuant la hauteur de rejet, vous vous assurez que les petits pics ne seront pas rejetés en raison de leur hauteur insuffisante.

- Si une analyse contient des pics de différentes largeurs, définissez la largeur de pic en fonction des pics les plus étroits et diminuez la hauteur de rejet afin d'éviter que les pics les plus larges soient ignorés en raison de leur hauteur réduite.

Optimisation de l'intégration

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

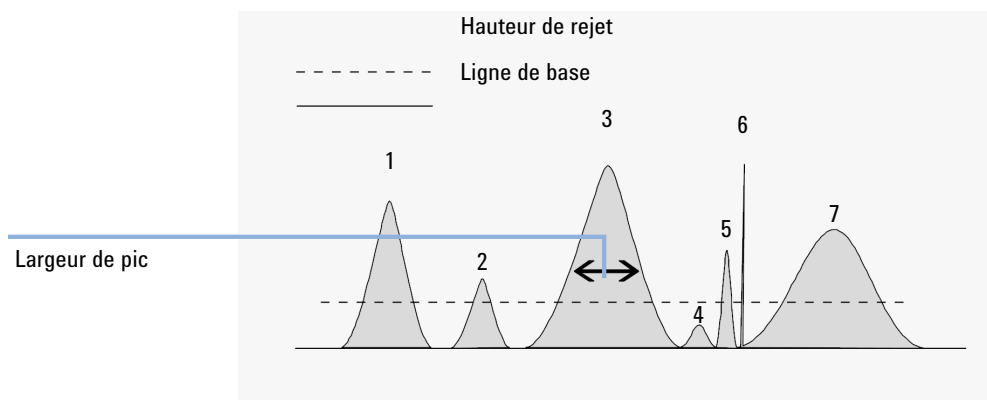


Figure 23 Utilisation d'événements initiaux

Un pic n'est intégré que s'il remplit les critères des quatre paramètres d'intégration. Avec une largeur de pic égale à celle du pic 3, le rejet d'aire et la sensibilité de pente illustrés, seuls les pics 1, 3, 5 et 7 sont intégrés.

- Pic 1** Est intégré, car il remplit les quatre critères d'intégration.
- Pic 2** Est rejeté, car son aire est inférieure à l'aire de rejet définie.
- Pic 3** Est intégré, car il remplit les quatre critères d'intégration.
- Pic 4** N'est pas intégré, car sa hauteur est inférieure à la hauteur de rejet.
- Pic 5** Est rejeté, car son aire est inférieure à l'aire de rejet définie.

Pic 6 N'est pas intégré, car le filtrage et le groupage rendent ce pic invisible.

Pic 7 Est intégré.

Tableau 7 Valeurs de hauteur et d'aire de rejet

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

Événements programmés

OpenLab CDS ChemStation Edition offre des événements programmés, qui permettent un choix entre les modes d'intégrateur de la définition de base de l'algorithme interne et la définition de l'utilisateur. Ces événements programmés peuvent être utilisés pour personnaliser la construction de base du signal lorsque la construction par défaut n'est pas appropriée. Par exemple, l'utilisateur peut créer un type d'événement pour une somme nouvelle de zone, qui n'altère pas les résultats d'AreaSum par défaut. Ces événements peuvent être utiles pour l'addition des surfaces de pics et pour corriger des aberrations de la ligne de base à court et à long terme. Pour plus d'informations sur les événements d'intégration, référez-vous aussi à « [Événements initiaux](#) », page 50

Sommation d'aires

Sommation d'aires Définit les points entre lesquels l'intégrateur fait la somme des aires entre la sommation d'aires dans le temps et la sommation d'aires hors temps.

Section de sommation d'aires Cet événement est semblable à **Area Sum**. Il permet d'intégrer des sections de temps contiguës du chromatogramme sans perte d'intervalles de temps.

La fonction de sommation d'aires vous permet de suivre une ligne de base définie par l'utilisateur à long terme, permettant l'intégration sur un groupe de pics en définissant un intervalle. La sommation d'aires fait la somme des aires sous les pics pour cet intervalle. Le système définit le temps de rétention de la sommation d'aires comme le point central de l'intervalle de temps sur lequel l'aire est sommée. La précision du point central défini varie entre 0,001 min pour une fréquence d'acquisition élevée et 0,1 min pour une faible fréquence d'acquisition.

Si une section contient un pic dont l'aire ou la hauteur est inférieure à un seuil donné (aire ou hauteur de rejet), elle sera néanmoins répertoriée afin d'éviter les sections manquantes.

Événements de fond

Fond Maintenant	Configure un point (temps) auquel l'intégrateur redémarre le fond à la taille actuelle du point des données, si le signal est un pic.
Fond aux Vallées	Configure des points (Départ/Arrêt) entre lesquels l'intégrateur règle le fond à chaque vallée entre les pics.
Prise de Fond	Un fond horizontal est dessiné à l'hauteur de chaque fond établi d'où l'événement de prise de fond est activé jusqu'à où l'événements de prise de fond est fermé.
Fond Vallée Suivante	Il fixe un point auquel l'intégrateur règle le fond à la vallée suivante entre les pics, et ensuite révoque cette fonction automatiquement.

Les événements suivants peuvent être utilisés pour la somme de la zone avec **Area Sum Slice** dans des chromatogrammes complexes. Ils aident à trouver automatiquement la meilleure définition de base, en faisant inutile l'interaction manuelle. Cela est utile surtout lors de l'analyse des résultats GC. Le fond est calculé selon un interval de temps en utilisant des estimations statistiques.

Configurer Fond de la Gamme	Définit la gamme du chromatogramme utilisé pour estimer un fond nouveau. La gamme des points de données est utilisée pour calculer un point de fond important du point de vue statistique au milieu d'une série de temps. Cet algorithme ignore de manière intelligente les troubles de pics ou les pics inattendus qui arrivent dans cet interval par une caractéristique d'élimination statistique de deux étapes. Cela assure des résultats plus fiables pour l'estimation de fond.
------------------------------------	--

Deux événements **Set Baseline from Range** sont connectés par une ligne étroite entre les points centraux. [Figure 24](#), page 56 montre la configuration de l'intervalle de gamme de fond qui est montrée comme une zone grise ombrée.

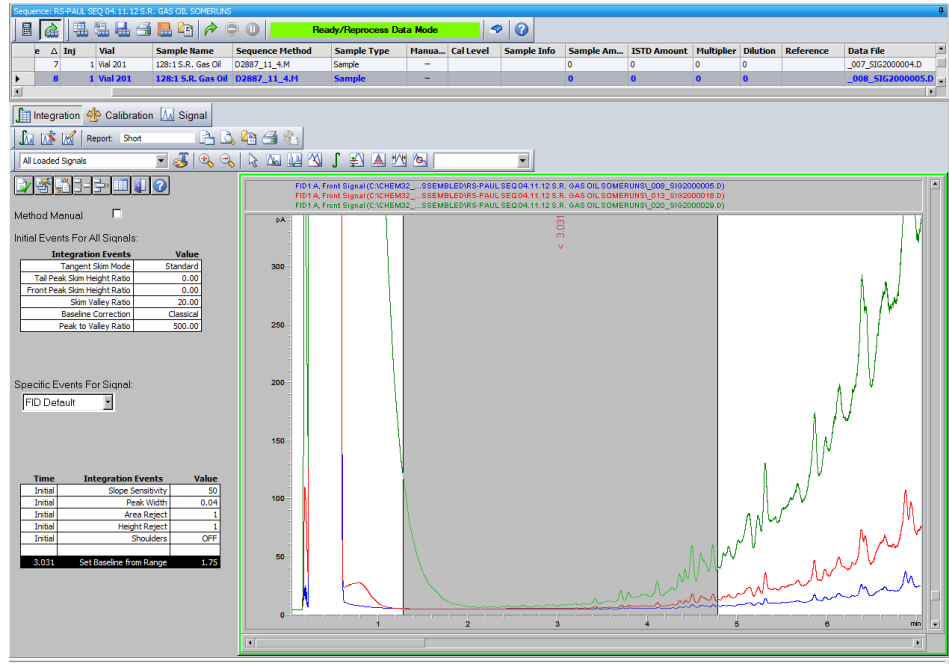


Figure 24 « Définir la ligne de base à partir de la plage » : L'intervalle de la plage de la ligne de base est illustré par un ombrage gris

Configurer Fond Bas de la Gamme

Similaire à **Set Baseline from Range**, mais il réduit sa valeur pour réduire la pénétration de fond. **Set Low Baseline from Range** est calculée par une soustraction de deux sigmas (Déviation standard du bruit) de la valeur y de la **Set Baseline from Range**.

Utiliser le Fond de la Gamme

Permet le projet d'une valeur de fond à un temps plus tard ou plus tôt. Egalement, il permet de construire les courbes de fond qui changent la pente dessous un ensemble de pics.

Intégration automatique

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

Principes de fonctionnement

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

L'algorithme examine 1 % au début et à la fin du chromatogramme pour déterminer le bruit et la pente de cette partie. Le bruit est calculé comme étant 3 fois l'écart type de la régression linéaire divisé par la racine carré du nombre en pourcentage de points utilisés dans la régression. Ces valeurs sont utilisées pour définir des valeurs appropriées de hauteur de rejet et de sensibilité de pente pour l'intégration. L'algorithme attribue ensuite une valeur temporaire à la largeur de pic, en fonction de la durée du chromatogramme, le plus souvent 0,5 % en LC et 0,3 % à 0,2 % en GC. La valeur initiale d'aire de rejet est définie à zéro et un essai d'intégration est effectuée. L'essai est répété plusieurs fois si nécessaire, en modifiant les paramètres à chaque fois jusqu'à ce qu'au moins 5 pics soient détectés ou qu'une intégration soit effectuée avec une hauteur de rejet initiale de 0. L'essai d'intégration se termine si les conditions ci-dessous ne sont pas atteintes après 10 essais.

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

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

Paramètres d'intégration automatique

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

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

Intégration manuelle

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

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

L'intégration manuelle comporte les fonctions suivantes :

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

Codes de séparation de pic pour les pics intégrés manuellement

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

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

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

Enregistrement des événements d'intégration manuelle

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

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

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

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

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

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

Dans les versions de la ChemStation antérieures à la version B.04.01, les événements d'intégration manuelle étaient enregistrés dans la méthode et non dans le fichier de données individuel. Cette procédure peut toujours être utilisée.

Le menu **Integration** de la vue **Data Analysis** fournit les points suivants qui permettent de gérer les événements d'intégration manuelle avec la méthode :

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

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

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

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

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

3 Identification des pics

En quoi consiste l'identification des pics ?	62
Règles de correspondance des pics	63
Types d'identification des pics	64
Temps de rétention/migration absolu	64
Temps Relatif de Rétention	64
Temps de rétention/migration corrigé	64
Qualificateurs de pics	64
Limites quantitatives	64
Temps de rétention/migration absolu	65
Temps de rétention/migration corrigés	67
Pics de référence simples	67
Pics de référence multiples	67
Qualificateurs de pic	69
Corrélation de signal	70
Vérification de qualificateur	70
Calcul de rapport de qualificateur	70
La procédure d'identification	72
Recherche des pics de référence	72
Recherche des pics ISTD	72
Recherche des pics étalonnés restants	73
Classification des pics non identifiés	73

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

En quoi consiste l'identification des pics ?

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

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

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

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

Cette procédure est contrôlée par :

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

Règles de correspondance des pics

Les règles suivantes concernent la procédure de correspondance des pics :

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

Types d'identification des pics

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

Temps de rétention/migration absolu

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

Temps Relatif de Rétention

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

Temps de rétention/migration corrigé

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

Qualificateurs de pics

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

Limites quantitatives

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

Temps de rétention/migration absolu

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

La Figure 25, page 65 illustre une fenêtre de temps de rétention/migration pour le pic 2 située entre 1,809 et 2,631 minutes, alors que le temps de rétention/migration prévu est de 2,22 minutes. Il existe deux possibilités pour le pic 2. L'une est à 1,85 minutes et l'autre à 2,33 minutes. Si le pic attendu n'est pas un pic de référence, le pic le plus proche du temps de rétention/migration attendu de 2,22 minutes est sélectionné.

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

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

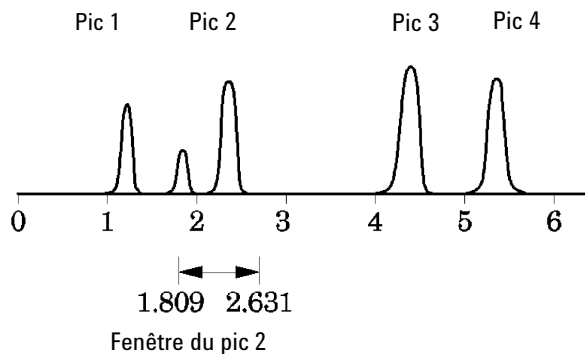


Figure 25 Fenêtres de temps de rétention/migration

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

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

Identification des pics

Temps de rétention/migration absolu

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

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

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

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

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

Temps de rétention/migration corrigés

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

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

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

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

Pics de référence simples

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

Pics de référence multiples

La correction des temps de rétention/migration avec un pic de référence simple est basée sur le postulat que l'écart du temps de rétention/migration réel par rapport aux temps de rétention/migration prévus change de manière uniforme et

linéaire pendant le déroulement de l'analyse. Or, pendant une longue analyse, il est fréquent que les temps de rétention/migration changent de manière non uniforme. Dans ces conditions, l'utilisation de plusieurs pics de référence répartis tout au long de l'analyse offre de meilleurs résultats. Le signal est alors divisé en plusieurs zones. La variation de l'écart entre les temps de rétention/migration est supposée linéaire à l'intérieur de chaque zone, mais la valeur de cette variation est déterminée séparément pour chacune d'elle.

REMARQUE

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

Qualificateurs de pic

Un composant peut être détecté à l'aide de plusieurs signaux. Si elle s'applique à toutes les formes de chromatographie qui utilisent plusieurs détecteurs ou des détecteurs permettant de générer plusieurs signaux, la détection multisignal est généralement utilisée en chromatographie liquide avec des détecteurs à longueurs d'onde multiples ou à barrette de diodes. Ces détecteurs sont normalement réglés de sorte que la longueur d'onde la plus proche de la valeur d'absorbance (aire) la plus élevée soit utilisée pour définir le pic principal de la table d'étalonnage. Sur [Figure 26](#), page 69 il s'agit de λ_1 .

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

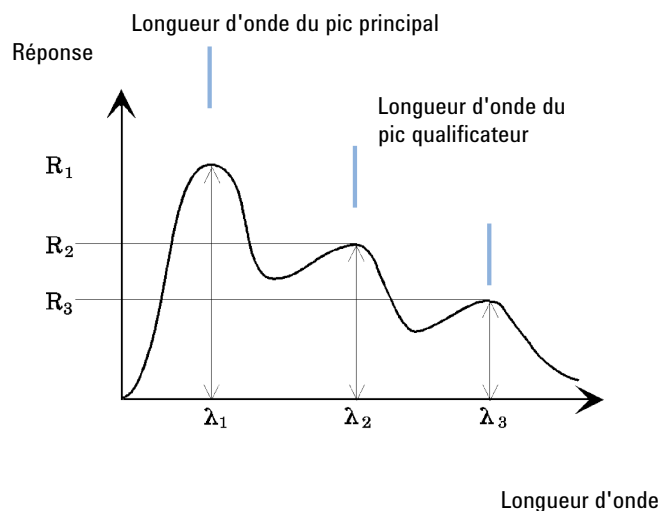


Figure 26 Qualificateurs de pic

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

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

Corrélation de signal

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

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

Vérification de qualificateur

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

Calcul de rapport de qualificateur

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

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

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

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

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

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

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

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

La procédure d'identification

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

Recherche des pics de référence

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

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

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

Recherche des pics ISTD

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

Recherche des pics étalonnés restants

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

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

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

Classification des pics non identifiés

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

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



4 Étalonnage

Courbe d'étalonnage 75

Étalonnage groupé 77

Options de réétalonnage 78

Ce chapitre décrit les principes d'étalonnage du logiciel ChemStation.

Courbe d'étalonnage

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

Généralement, une aliquote de l'échantillon étalon est injectée, un signal est obtenu et la réponse est déterminée en calculant l'aire ou la hauteur du pic, comme décrit sur [Figure 27](#), page 75.

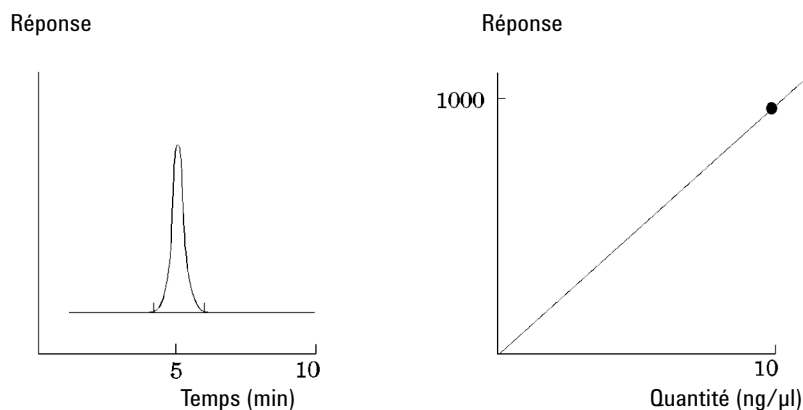


Figure 27 Signal de l'étalon (10 ng/μl) et courbe d'étalonnage

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

0,00000 à 1,00000

où :

0,00000 = pas d'ajustement

1,00000 = ajustement parfait

REMARQUE

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

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

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

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

où :

relRES = résidu relatif en pourcentage

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

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

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

où :

ResSTD = écart type du résidu

Resp_{calibratedi} = réponse étalonnée pour le point i

Resp_{calculatedi} = réponse calculée pour le point i

n = nombre de points d'étalonnage

Étalonnage groupé

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

Étalonnage

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

où :

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

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

RF_A désigne le facteur de réponse.

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

$$RF_A = RF_B$$

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

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

Options de réétalonnage

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

Average

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

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

Floating Average

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

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

Replace

Les nouvelles valeurs des réponses remplacent les anciennes valeurs.

5

Quantification

Définition	80
Calculs de la quantification	81
Facteurs de correction	82
Facteur de réponse absolu	82
Multiplicateur	82
Facteur de dilution	82
Quantité d'échantillon	82
% aire et % hauteur	83
Procédures de calcul étalonnées	84
Calcul ESTD	85
Calcul du pourcentage normalisé	87
Calcul ISTD	88
Analyse 1 : Étalonage	89
Analyse 2 : Echantillon inconnu	90
Calcul ISTD des pics étalonnés	90
Quantification des pics non étalonnés	91
Quantification indirecte à l'aide d'un composé étalonné	91
Quantification à l'aide d'un facteur manuel	91

Ce chapitre décrit la procédure de quantification de ChemStation. Il détaille les calculs de surface (%) et de hauteur (%), les calculs des étalons externes (ESTD), des étalons internes (ISTD) et des pourcentages normalisés, ainsi que la quantification des pics non identifiés.

Définition

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

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

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

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

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

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

Calculs de la quantification

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

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

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

Facteurs de correction

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

Facteur de réponse absolu

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

Multiplicateur

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

Facteur de dilution

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

Quantité d'échantillon

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

% aire et % hauteur

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

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

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

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

Procédures de calcul étalonnées

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

Calcul ESTD

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

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

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

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

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

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

où :

Response_x représente la réponse du pic x ;

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

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

M représente le multiplicateur ;

D représente le facteur de dilution.

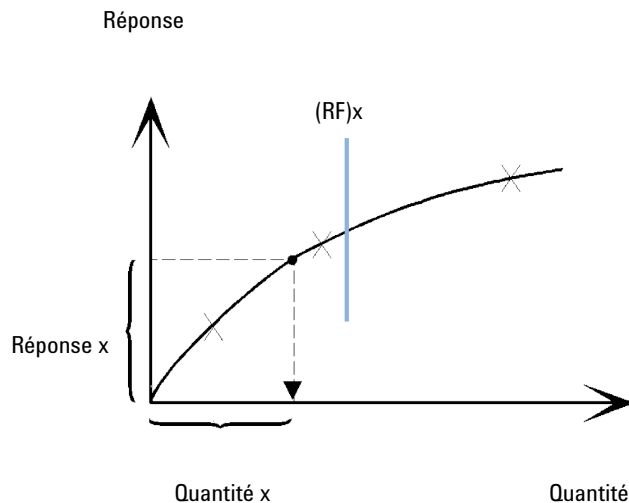


Figure 28 Facteur de réponse

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

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

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

où :

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

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

Calcul du pourcentage normalisé

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

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

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

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

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

où :

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

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

Calcul ISTD

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

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

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

Tableau 8 Procédure ISTD

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

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

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

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

Analyse 1 : Étalonnage

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

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

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

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

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

Rapport de réponse

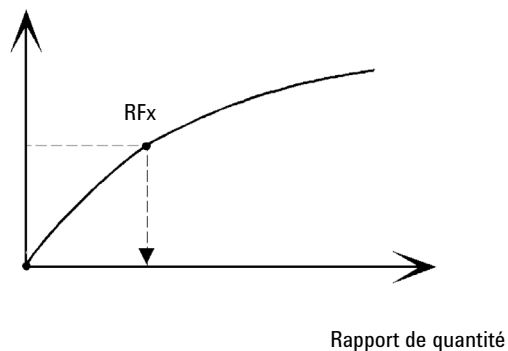


Figure 29 Rapport de quantité

Analyse 2 : Echantillon inconnu

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

Calcul ISTD des pics étalonnés

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

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

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

où :

RF_x représente le facteur de réponse pour le composé x ;

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

M représente le multiplicateur.

D représente le facteur de dilution.

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

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

Quantification des pics non étalonnés

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

Quantification indirecte à l'aide d'un composé étalonné

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

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

Quantification à l'aide d'un facteur manuel

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

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

où :

Facteur manuel

Facteur de réponse fixe

Réponse

La réponse peut être la surface ou la hauteur

Quantification

Quantification des pics non étalonnés

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

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

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

ou :

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

La quantité est alors calculée comme suit :

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

ou :

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

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

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

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

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

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

6 Evaluation de la conformité du système

Evaluation de la conformité du système	95
Définition du bruit	98
Calcul du bruit selon le principe 6 x écart type	99
Calcul du bruit à l'aide de la formule crête à crête	99
Calcul du bruit par la méthode ASTM	101
Calcul du rapport signal sur bruit	102
Dérive et déviation	106
Calcul de l'asymétrie et de la symétrie de pic	107
Calculs et formules de conformité du système	109
Définitions générales	110
Volume mort	110
Temps de rétention de composé non retenu t (m) [min]	110
Définition des tests de performance	111
Moments statistiques	111
Moments statistiques, obliquité et excès	112
Largeur de pic réelle W_x [min.]	113
Facteur de capacité (USP), rapport de capacité (ASTM) k'	113
Facteur de Poursuite (USP) t	114
Nombre de plateaux théoriques par colonne n	115
Nombre de plateaux théoriques par mètre N [1/m]	116
Définition des tests de performance	111
Résolution (USP, ASTM) R	117
Résolution (EP/JP) R_s	118
Résolution (définitions classiques de ChemStation)	118
Rapport pic/vallée (EP/JP)	119
Définitions de la reproductibilité	121
Moyenne d'échantillon M	121
Écart-type d'échantillon S	121
Écart-type relatif ETR [%] (USP)	122
Écart-type de la moyenne SM	122
Intervalle de confiance IC	122

Définitions de la reproductibilité	121
Coefficient de corrélation	126
Déviatiion standard (S)	127
Accès au nombre en double précision stocké en interne	128

Ce chapitre décrit les fonctions proposées par le logiciel ChemStation pour évaluer les performances de l'instrument d'analyse avant son utilisation à des fins d'analyse d'échantillons et les performances de la méthode d'analyse avant son utilisation en conditions standard. Il indique également comment vérifier les performances des systèmes d'analyse avant et pendant les analyses de routine.

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

Evaluation de la conformité du système

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

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

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

d'effectuer ces tests et de documenter les résultats de manière détaillée. Les laboratoires participant à un système de contrôle de la qualité (par exemple, dans le cadre de la norme ISO 9000) doivent apporter la preuve des bonnes performances de leurs instruments.

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

Les essais sont documentés dans un format qui est généralement accepté par les autorités réglementaires et par les vérificateurs indépendants.

Ces statistiques portent sur les données suivantes :

- temps de rétention/migration de pic,
- aire de pic,
- quantité,
- hauteur de pic,
- largeur de pic à mi-hauteur,
- symétrie de pic,

- traînée de pic,
- facteur de capacité (k'),
- nombre de plateaux,
- résolution entre pics,
- sélectivité par rapport au pic précédent,
- asymétrie,
- excès.

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

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

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

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

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

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

- informations relatives à l'instrument,
- détails sur la colonne/le capillaire,
- méthode analytique,
- informations sur l'échantillon,
- informations sur l'acquisition,

- description du signal et détermination du bruit de la ligne de base,
- signal avec valeurs de temps de rétention/migration ou noms de composés.

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

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

Définition du bruit

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

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

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

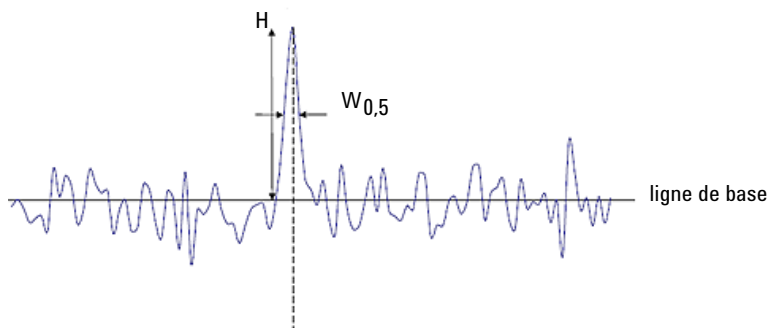


Figure 30 Chromatogramme avec signal de pic et bruit

H	Hauteur de pics du haut vers la ligne de base (meilleure linéaire à travers le bruit)
$W_{0,5}$	Largeur de pic à mi-hauteur

Calcul du bruit selon le principe 6 x écart type

La régression linéaire est calculée en utilisant tous les points des données dans la plage de temps définie (voir « [Ajustement linéaire](#) », page 123). Le bruit est défini par la formule suivante :

$$N = 6 \times ET$$

où

N est le bruit basé sur la méthode 6 x écart type, et

ET est l'écart-type de la régression linéaire de tous les points de données dans la plage de temps définie.

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

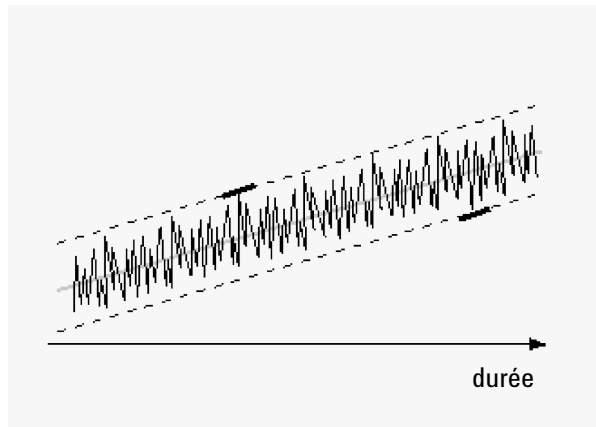


Figure 31 Illustration du bruit crête à crête avec la dérive

Pour calculer la dérive, il convient d'abord de déterminer la régression linéaire à partir de tous les points de données dans la plage de temps (voir la section « [Ajustement linéaire](#) », page 123). La droite de régression linéaire est soustraite de tous les points de données de l'intervalle de temps afin d'obtenir un signal corrigé en fonction de la dérive.

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

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

où

N est le bruit crête à crête,

I_x représente les points de données calculés à l'aide de la formule LSQ, où

I_{\max} est le pic d'intensité maximale et

I_{\min} le pic d'intensité minimale dans la plage de temps.

Pour les calculs de la pharmacopée européenne, le bruit crête à crête est calculé à l'aide d'un signal de référence à vide sur une plage de -10 et $+10$ multipliée par $W_{0,5}$ encadrant chaque pic. Cette région peut être symétrique au signal d'intérêt ou asymétrique si nécessaire en raison de signaux matriciels.

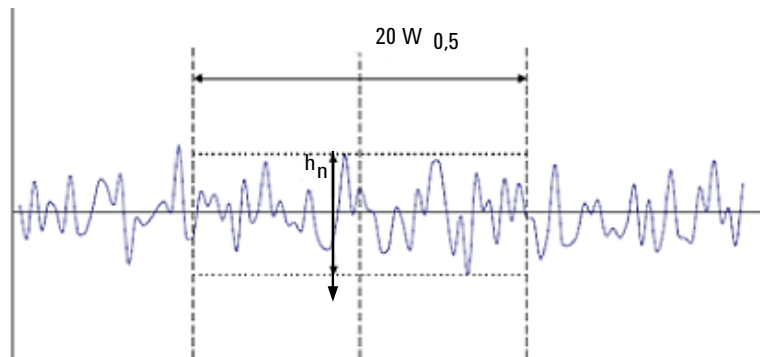


Figure 32 La détermination du bruit du chromatogramme d'un échantillon vide

Où

$20 W_{0,5}$ est la région correspondant à 20 fois $W_{0,5}$.

h_n est l'amplitude maximale du bruit de ligne de base dans la région correspondant à 20 fois $W_{0,5}$.

Calcul du bruit par la méthode ASTM

La méthode de calcul du bruit ASTM (ASTM E 685-93) repose sur la pratique standard de test de détecteurs photométriques à longueur d'onde variable utilisés en chromatographie liquide, conformément aux directives de l'American Society for Testing and Materials (ASTM). En fonction de la taille de l'intervalle de temps, on distingue trois types de bruit. La détermination du bruit repose sur la mesure crête à crête dans des plages de temps définies.

Durée de cycle, t

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

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

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

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

Détermination du nombre de cycles, n

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

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

Calcul du bruit crête à crête dans chaque cycle

Pour calculer la dérive, il convient d'abord de déterminer la régression linéaire à partir de tous les points de données dans la plage de temps (voir la section « Ajustement linéaire », page 123). La droite de régression linéaire est soustraite de tous les points de données de l'intervalle de temps afin d'obtenir un signal corrigé en fonction de la dérive. Le bruit crête à crête est ensuite calculé grâce à cette formule :

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

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

Calcul du bruit ASTM

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

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

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

Calcul du rapport signal sur bruit

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

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

- *EP* (selon la définition de la pharmacopée européenne) : Le bruit est calculé à l'aide de la formule crête-à-crête. Les données relatives au calcul du bruit sont tirées d'un signal blanc. La plage de temps pour le calcul du bruit est un intervalle de la plage de temps de 20 fois la largeur de pic, centré autour du temps de rétention du pic.

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

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

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

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

Le rapport signal/bruit est calculé selon cette formule :

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

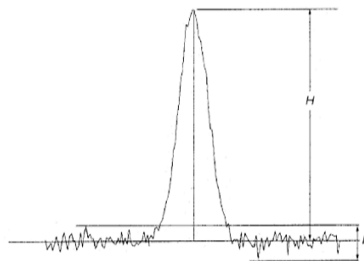


Figure 33 Rapport signal/bruit

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

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

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

Où :

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

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

La valeur du bruit est calculée à l'aide de la méthode « crête à crête » (voir « Calcul du bruit à l'aide de la formule crête à crête », page 99).

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

Détermination de la plage de bruits

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

- Si le signal de référence n'est pas assez long : $HeureDébut - HeureFin < 20 * W_{0,5}$
 - $HeureDébut =$ heure de début du signal de référence et
 - $HeureFin =$ heure de fin du signal de référence
- Si le signal de référence est assez long, mais que le pic est situé de sorte que $(TR - 10 * W_{0,5})$ est inférieur au point de départ du signal de référence
 - $HeureDébut =$ heure de début du signal de référence et
 - $HeureFin = HeureDébut + 20 * W_{0,5}$
- Si le signal de référence est assez long, mais que le pic est situé de sorte que TR ou $TR + 10 * W_{0,5}$ est supérieur au point de fin du signal de référence
 - $HeureFin =$ heure de fin du signal de référence et
 - $HeureDébut = - HeureFin - 20 * W_{0,5}$
- Si le pic est situé de sorte que TR ou $TR + 10 * W_{0,5}$ est supérieur au point de fin du signal de référence
 - $HeureDébut = TR - 10 * W_{0,5}$ et
 - $HeureFin = TR + 10 * W_{0,5}$

Où :

TR est le temps de rétention, et

$W_{0,5}$ la largeur de pic à mi-hauteur.

Dérive et déviation

La dérive est donnée comme la pente de regression linéaire. Le cours est premièrement calculé en déterminant la regression linéaire en utilisant tous les points de données dans la gamme de temps (reférez à « [Ajustement linéaire](#) », page 123). La droite de regression linéaire est soustraite de tous les points de données de l'intervalle de temps afin d'obtenir un signal corrigé en fonction de la dérive.

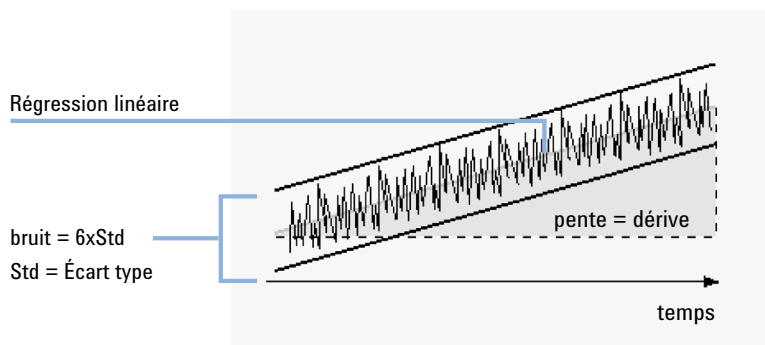


Figure 34 Sens pour bruit écart la Déviation Standard

La promenade est déterminée comme le bruit pic à pic des valeurs des données moyennes dans les cycles de bruit ASTM, voir « [Calcul du bruit par la méthode ASTM](#) », page 101.

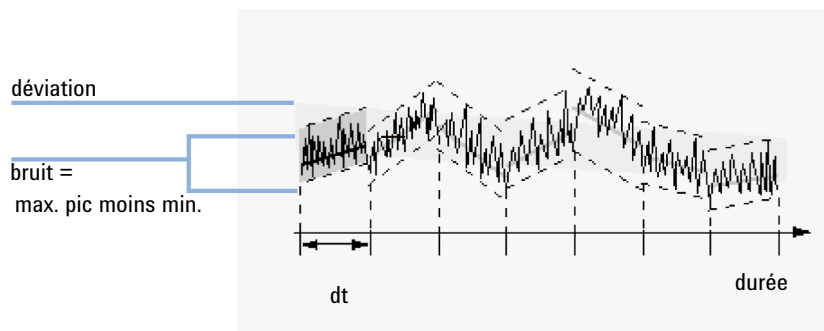


Figure 35 Déviation de bruit comme décidée par la Méthode ASTM

Calcul de l'asymétrie et de la symétrie de pic

Asymétrie

Le logiciel de station de travail analytique Agilent ChemStation détermine le rapport d'asymétrie d'un pic en comparant les demi-largeurs du pic à 5 % (voir « Facteur de Poursuite (USP) t », page 114) ou 10 % (voir l'équation ci-dessous) de sa hauteur.

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

où :

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

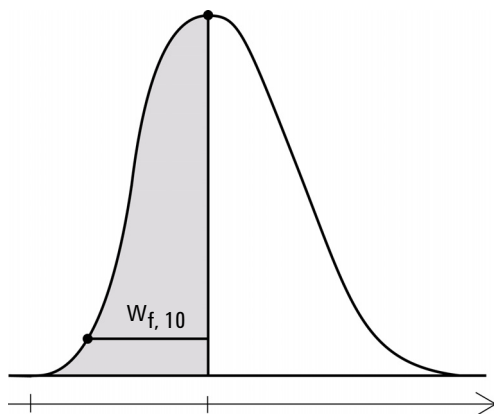


Figure 36 Calcul de l'asymétrie de pic

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

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

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

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

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

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

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

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

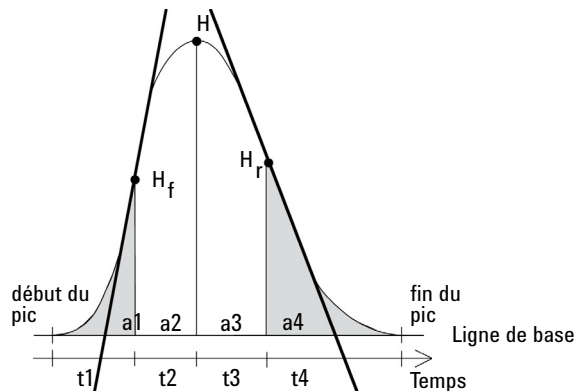


Figure 37 Calcul du facteur de symétrie de pic

où :

a_i = aire de la section

t_i = instant de la section

H_f = hauteur du point d'inflexion avant

H_r = hauteur du point d'inflexion arrière

H = hauteur au sommet

Calculs et formules de conformité du système

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

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

Les références utilisées dans ce contexte sont les suivantes :

- *ASTM :Section E 682 - 93, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 14.01*
- *USP :The United States Pharmacopeia, XX. Révision, pp. 943 - 946*
- *EP : Pharmacopée européenne, 7ème édition*
- *JP : Pharmacopée japonaise, 15ème édition*

Définitions générales

Volume mort

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

où :

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

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

(Également appelé temps mort ou temps de volume mort)

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

où :

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

Définition des tests de performance

Moments statistiques

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

où :

N = nombre de sections d'aire

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

d_t = intervalle entre les sections d'aire adjacentes

t_0 = instant de la première section d'aire

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

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

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

Moments statistiques, obliquité et excès

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

Le moment 0 représente l'aire du pic.

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

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

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

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

Largeur de pic réelle W_x [min.]

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

où :

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

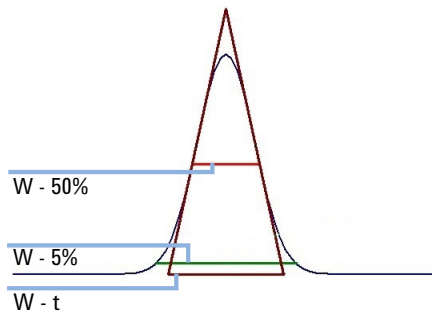


Figure 38 Largeur de pic à x % de la hauteur

Facteur de capacité (USP), rapport de capacité (ASTM) k'

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

où :

t_R = temps de rétention du pic [min]

t_0 = temps de volume mort [min]

Facteur de Poursuite (USP) t

REMARQUE

Le Facteur Symétrie (JP) et le facteur Symétrie (EP) S sont identiques avec le Facteur de Poursuite (USP). Tout cela est disponible comme "Pic_FacteurPoursuite" dans le Rapport Intelligent. Voir aussi « Facteurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation », page 162.

$$t = \frac{W_{5,0}}{t_w \cdot 2}$$

où :

t_w = distance (en min.) entre le front de pic et T_R , mesurée à 5 % de la hauteur du pic

$W_{5,0}$ = largeur de pic à 5% de la hauteur de pic [min.]

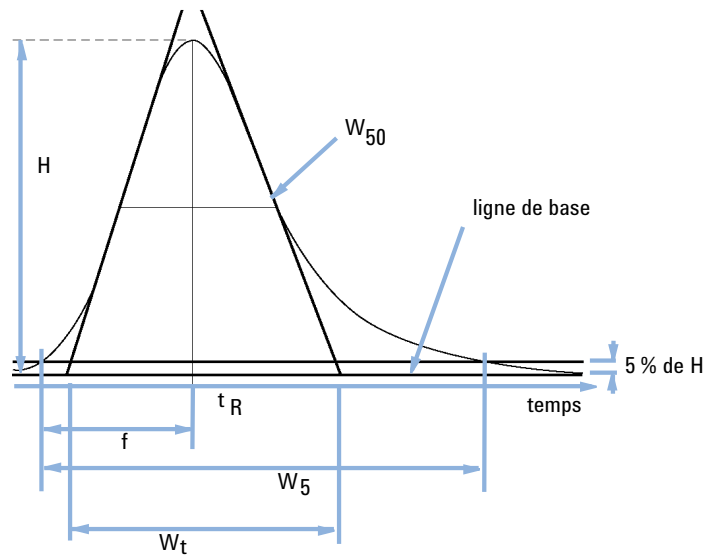


Figure 39 Paramètres de performance

Nombre de plateaux théoriques par colonne n

Méthode tangentielle (USP, ASTM) :

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

où :

T_R	Temps de rétention
W_B	Largeur de base [min.]

Méthode à mi-largeur (ASTM, EP, JP) :

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

où :

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

Méthode 5 x écart-type :

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

où :

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

Méthode statistique :

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

où :

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

Méthode de Foley-Dorsey

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

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

Où

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

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

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

où :

n	Nombre de plateaux théoriques
l	Longueur de la colonne [cm] (telle que définie dans la méthode de traitement)

Rétention relative (USP, ASTM), sélectivité alpha

REMARQUE

La rétention relative (USP) est disponible sous la forme « Sélectivité » ou « Pic_Sélectivité » dans la création de rapports.

(Concernant les pics a et b, T_R du pic a < T_R du pic b)

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

où :

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

Rétention relative (PE, JP)

La rétention relative (ajustée) selon la PE et le facteur de séparation selon la JP sont calculés à l'aide de la même formule :

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

Où

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

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

t_M = temps mort

La rétention relative (ajustée, PE) et le facteur de séparation (JP) sont disponibles sous la forme « TempsRétRelative_PE » dans la création intelligente de rapports et « Sélectivité » dans la création classique de rapports.

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

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

Résolution (USP, ASTM) R

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

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

où :

t_R Temps de rétention

W_t Largeur tangente [min]

Résolution (EP/JP) Rs

Méthode à mi-largeur (Résolution adoptée dans le rapport de performances) :

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

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

REMARQUE

La définition en Résolution en USP diffère de la définition dans European (EP) et Japanese (JP) Pharmacopoeias. Les calculs EP et JP sont disponibles dans l'Edition ChemStation C.01.04.

En plus, la Résolution Classique (2.35/2)*... est disponible pour un Rapport Intelligent comme Pic_Résolution_Classique. Pour une liste complète des valeurs, voir « Facteurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation », page 162.

Résolution (définitions classiques de ChemStation)

Méthode mi-largeur:

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

Méthode 5 x écart-type :

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

Méthode statistique :

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

où :

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

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

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

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

$W_S(x)$ = largeur dérivée des moments statistiques = $\sqrt{(M2)}$ pour pic x [min.]
(à voir aussi « Moments statistiques », page 111)

Rapport pic/vallée (EP/JP)

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

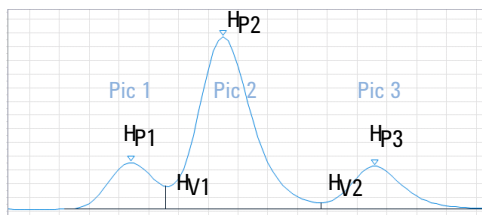
REMARQUE

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

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

PV = hauteur de pic / hauteur de vallée

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



Pour le pic 1 :

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

Pour le pic 2 :

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

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

Pour le pic 3 :

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

où :

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

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

Définition d'une vallée :

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

Définitions de la reproductibilité

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

Moyenne d'échantillon M

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

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

où :

N = nombre d'observations discrètes

X_i = valeur des observations discrètes indexées par i

Écart-type d'échantillon S

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

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

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

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

Écart-type relatif ETR [%] (USP)

L'écart-type relatif se définit ainsi :

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

Écart-type de la moyenne S_M

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

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

Prenons un exemple afin d'illustrer notre propos :

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

Intervalle de confiance IC

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

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

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

où :

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

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

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

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

Intervalle de confiance 95 % pour 6 échantillons :

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

$$N = 6$$

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

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

Ajustement linéaire

N = nombre d'observations discrètes

X_i = variable indépendante, i^e observation

Y_i = variable dépendante, i^e observation

Formule de la courbe :

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

Coefficients :

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

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

où :

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

Ajustement quadratique

Formule de la courbe quadratique :

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

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

Calcul des coefficients pour l'ajustement quadratique

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

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

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

$$\begin{aligned} \text{Norm} &= \sum(x) \\ x &= x / \text{Norm} \end{aligned}$$

Équations normales de la courbe quadratique :

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

Ou sous la forme d'une équation matricielle :

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

Décomposition de Crout :

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

Avec les abréviations de valeur suivantes :

$$L11 = W$$

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

$$L21 = XW$$

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

$$L31 = X2W$$

$$L22 = X2W - L21 * U12$$

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

$$L32 = X3W - L31 * U12$$

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

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

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

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

$$c' = z2$$

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

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

Enfin, la normalisation doit être inversée :

$$a = a'$$

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

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

Coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation (r) est une mesure de l'ajustement de la courbe d'étalonnage entre les points de données. Il est calculé à l'aide de l'équation suivante :

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

où

r	Coefficient de corrélation
wt_i	Pondération du point de données
\bar{y}	Valeurs moyennes des réponses ou quantités mesurées
y_i	Réponse mesurée (Aire, RapportAire [méthode de l'étalon interne], Hauteur ou RapportHauteur [méthode de l'étalon interne]) ou quantité (Quantité, RapportQuantité [méthode de l'étalon interne]), en fonction du mode d'étalonnage
\bar{Y}	Valeurs moyennes des réponses ou quantités prévues
Y_i	Réponse ou quantité prévue (à l'aide de la courbe d'étalonnage)

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

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

où

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

et

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

où

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

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

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

Déviatiion standard (S)

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

Accès au nombre en double précision stocké en interne

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

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

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

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

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

Les exemples suivants génèrent un fichier .TXT dans le dossier d'instruments publics (par exemple C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1). Pour connaître le chemin d'accès réel, utilisez l'entrée de ligne de commande `print _instpath$`. Utilisez d'autres noms de fichiers et de dossiers selon les besoins. Affichez les informations contenues dans ce fichier en utilisant NOTEPAD ou un éditeur de texte approprié.

Données brutes de pic :

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

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

Données de pic traitées :

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

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

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

Informations traitées relatives au composé :

- Quantité calculée

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

Informations relatives à la table d'étalonnage :

- Nombre de niveaux
- Quantité
- Aire
- Hauteur

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

Informations sur la régression linéaire :

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

Utilisez l'entrée de ligne de commande suivante :

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

7

Calculs propres à l'EC

Tables d'étalonnage	132
Étalonnage standard	132
Étalonnage du poids moléculaire des protéines	133
Étalonnage de la paire de bases d'ADN	133
Focalisation isoélectrique capillaire	134
Étalonnage à l'aide de la correction de mobilité	135
Introduction	135
Calculs de mobilité effective	136
Calculs de mobilité relative	139
Styles de rapport spéciaux pour l'électrophorèse capillaire	141
Surfaces de pic corrigées	142
Aptitude du système pour l'électrophorèse capillaire	143
Facteur de capacité k'	143
EC-DDM	144
Soustraction du bruit de fond	144

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

Tables d'étalonnage

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

Étalonnage standard

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

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

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

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

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

Étalonnage du poids moléculaire des protéines

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

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

où :

MW est le poids moléculaire

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

t est le temps de migration

k_0 et k_1 sont les coefficients de l'équation linéaire

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

Étalonnage de la paire de bases d'ADN

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

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

où :

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

t est le temps de migration

k_0 et k_1 sont les coefficients de l'équation linéaire

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

Focalisation isoélectrique capillaire

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

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

où :

pI est le point isoélectrique

t est le temps de migration

k_0 et k_1 sont les coefficients de l'équation linéaire

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

Étalonnage à l'aide de la correction de mobilité

Introduction

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

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

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

Il existe deux types de correction de mobilité :

Correction de mobilité effective

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

Correction de mobilité relative

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

Calculs de mobilité effective

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

Tableau 9 Marqueurs EOF fréquemment utilisés

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

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

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

Généralités

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

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

où

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

L est la longueur totale du capillaire

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

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

Si $t < t_R$, alors

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

Si $t > t_R$, alors

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

où

t est le temps de migration du pic

t_R est le temps de montée

V est la tension finale

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

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

La mobilité apparente ou relative est alors

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

La mobilité réelle ou effective est

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

où

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

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

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

Étalonnage

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

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

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

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

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

Calcul de la mobilité

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

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

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

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

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

Réétalonnage

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

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

Le temps de migration attendu pour chaque pic est ajusté :

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

et les mobilités sont mises à jour :

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

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

Calculs de mobilité relative

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

Généralités

Comme pour les calculs de mobilité effective, le coefficient

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

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

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

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

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

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

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

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

Étalonnage

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

Calcul de mobilité

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

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

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

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

Styles de rapport spéciaux pour l'électrophorèse capillaire

REMARQUE

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

Le style de rapport suivant est spécifique au système d'EC OpenLab CDS ChemStation Edition :

Mobilité d'EC

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

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

Où

l est la longueur effective du capillaire (cm)

L est la longueur totale du capillaire (cm)

t est le temps de migration (min)

V est la tension (kV)

Si la correction de la mobilité effective (voir « [Calculs de mobilité effective](#) », page 136) est activée, la colonne indiquant le type de pic dans les rapports simples (par exemple les rapports standard externes) est remplacée par une colonne de mobilité. Le rapport de mobilité d'EC imprime les mobilités effectives et non apparentes.

Surfaces de pic corrigées

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

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

La surface corrigée est calculée selon la formule suivante :

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

Où

A_c est la surface de pic corrigée (mUA)

A est la surface du pic (mUA·s)

t est le temps de migration (min)

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

Aptitude du système pour l'électrophorèse capillaire

Facteur de capacité k'

En électrophorèse capillaire, la valeur k' du facteur de capacité ne peut pas être calculée automatiquement pour tous les modes de fonctionnement. Reportez-vous au manuel *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer* (Introduction à l'électrophorèse capillaire haute performance) pour consulter les formules respectives. Les valeurs répertoriées dans les rapports sont valides uniquement pour la ChemStation Agilent pour systèmes CPL 3D, car la ChemStation Agilent pour systèmes EC utilise les mêmes algorithmes.

EC-DDM

Soustraction du bruit de fond

Quand vous sélectionnez l'élément de menu **Subtract Background** (BSB), le dernier spectre de masse sélectionné est soustrait de chaque point de l'électrophorétogramme actuel. Les données résultantes sont enregistrées dans le même répertoire et avec le même nom que le fichier de données d'origine ; cependant, l'extension du fichier devient .BSB.

Le nouveau fichier de données devient le fichier de données actuel et l'électrophorétogramme avec soustraction de bruit de fond s'affiche. Un enregistrement du nombre de soustractions du bruit de fond effectuées est conservé dans l'élément Opérateur de l'en-tête du fichier de données.

Si vous visualisez une liste des données BSB sous forme de tableau, vous pouvez observer des différences dues à la précision de la représentation des données.

REMARQUE

Les fichiers texte AIDE dans le LC/MS concernent uniquement les paramètres LC et non EC. Certaines fonctions disponibles dans le logiciel LC/MS ne sont pas disponibles ou applicables aux applications CE/MS mais sont utilisées dans le LC. La fonction **peak matching** ne s'applique pas aux CE-MS et est donc inactive. Dans CE-MS, UV et MS, la détection a lieu à différentes longueurs effectives du capillaire de séparation. L'identification des pics est impossible en raison de la résolution différente à différentes longueurs effectives.

8

Révision, retraitement des données et révision par lot

Table de navigation de la vue Data Analysis (Analyse de données)	146
Configuration de la table de navigation	146
Barre d'outils de la table de navigation	148
Révision des données à l'aide de la table de navigation	149
Retraitement d'une séquence à l'aide de la table de navigation	150
Définition de la révision par lot	152
Activation de la fonctionnalité de vérification par lot à l'aide de ChemStation avec ECM	153
Configuration de lot	154
Table de lots	154
Table de composés	155
Rapport de lot	155
Interface utilisateur	155
Fonctions de révision	156
Étalonnage dans le cadre de la révision par lot	156
Génération de rapports par lot	158
Historique de lot	158

Ce chapitre décrit les possibilités de révision des données et les procédures de retraitement de données de séquence. Il présente également les principes de révision par lot, de configuration par lot, les fonctions de révision et la génération de rapports.

Table de navigation de la vue Data Analysis (Analyse de données)

La vue **Data Analysis** inclut une table de navigation conçue pour faciliter les déplacements parmi les fichiers de données. Cette table affiche les analyses contenues dans le sous-répertoire de données ou de données de séquence sélectionné. Utilisez-la **Navigation Table** pour charger les différentes analyses ou pour faire défiler automatiquement les acquisitions chargées. Pour plus de détails, veuillez voir le manuel *OpenLab CDS ChemStation Edition, Basis Concepts and Workflows*.

Configuration de la table de navigation

La table de navigation affiche les informations relatives aux fichiers de données, en fonction des ensembles de données disponibles. La table de navigation est en lecture seule et ne peut pas être modifiée.

Tableau 10 Colonnes de la table de navigation

Colonnes des analyses simples	Colonnes des analyses de séquence
Superp.	Superp.
ECM	ECM
TYPE	TYPE
Date/heure	Ligne
Opérateur	Inj (Injection)
Flacon	Flacon
Fichier de données	Nom d'échantillon
Nom d'échantillon	Nom de méthode
Nom de méthode	Type d'échantillon
Événements manuels	Événements manuels
Informations sur l'échantillon	Niveau d'étalonnage
Quantité d'échantillon	Informations sur l'échantillon

Tableau 10 Colonnes de la table de navigation

Colonnes des analyses simples	Colonnes des analyses de séquence
Quantité ISTD	Quantité d'échantillon
Multiplicateur	Quantité ISTD
Dilution	Multiplicateur
---	Dilution
---	Fichier de données

La table de navigation comporte des fonctions de configuration de table standard, telles que le tri et le glisser-déplacer pour déplacer des colonnes. Il est également possible de sélectionner les colonnes qui apparaissent dans la table de navigation.

En outre, vous pouvez regrouper les données en fonction d'une colonne : par exemple, il est possible de regrouper les fichiers chargés sur la base de la colonne operator (opérateur) pour afficher les analyses simples effectuées par un **operator** précis.

Plusieurs fonctions de la table de navigation sont accessibles via le bouton droit de la souris : chargement ou superposition d'un signal, exportation de données, impression de rapports, affichage des paramètres de la méthode d'acquisition, etc. Vous pouvez développer chaque ligne de cette table en cliquant sur le signe + (plus) à gauche de la ligne pour configurer les options d'acquisition :

- **Signal** : liste les acquisitions et permet d'indiquer celles qui doivent être chargées. La sélection de l'affichage des acquisitions s'applique à chaque analyse.
- **General Info** : liste les détails d'en-tête concernant l'analyse.
- **Instrument curves** : permet de sélectionner les courbes de données d'instrument à afficher avec le chromatogramme et/ou l'électrophérogramme sur l'écran et sur l'impression.

Barre d'outils de la table de navigation

La **Navigation Table** comporte deux barres d'outils permettant de réviser des données d'analyse simple et/ou de séquence, ou de retraiter des données de séquence.

Outils de révision des données


La fonction de révision de la table de navigation permet de naviguer automatiquement ou manuellement dans les acquisitions chargées. En fonction de l'option sélectionnée dans **Preferences / Signal/Review**, le système peut intégrer automatiquement l'acquisition et imprimer un rapport pour chaque fichier lorsqu'il est chargé. La méthode appliquée au fichier de données est indiquée dans le menu supérieur.

Outils de retraitement des séquences

La barre d'outils de retraitement des séquences n'est disponible que lorsqu'une séquence acquise à l'aide de la ChemStation version B.02.01 ou supérieure est chargée avec le **Unique Folder Creation**. Il est possible de lancer, d'arrêter ou d'interrompre le retraitement de la séquence. En outre, la barre d'outils permet d'accéder aux boîtes de dialogue suivantes pour modifier les paramètres de retraitement des séquences et d'impression :

- **Sequence Table** (copie du modèle *.s d'origine, située dans le conteneur de données de séquence)
- Boîte de dialogue **Sequence Parameters**
- Boîte de dialogue **Sequence Output**
- Boîte de dialogue **Sequence Summary Parameters**
- Boîte de dialogue **Extended Statistic Parameters**
- **Save Current Sequence**
- **Print Current Sequence**

Révision des données à l'aide de la table de navigation

Le contrôle des données s'effectue en mode Recalcul. Pour passer dans ce mode, cliquez sur  dans la barre d'outils de la table de navigation. Cette opération ouvre la barre d'outils du mode Recalcul. Selon le flot de traitement requis, vous pouvez vérifier vos données selon l'une des méthodes suivantes :

- 1 À l'aide de la méthode d'analyse enregistrée avec chaque fichier de données (données de séquence B.02.01 ou ultérieures). Sélectionnez **Start Autostepping** dans le menu **Recalculate** en mode **Data Analysis** pour que le système charge la méthode de traitement de données stockée avec chaque fichier de données avant de charger le fichier lui-même. Au fur et à mesure de l'appel des lignes de la table de navigation lors de la révision des données, la méthode associée au fichier de données sélectionné est chargée, puis utilisée pour la revue et la création du rapport.
- 2 À l'aide d'une autre méthode. Si vous souhaitez passer les données en revue par une autre méthode que celle qui a été enregistrée avec le fichier de données, sélectionnez **With method** dans le menu **Recalculate** en mode **Data Analysis**. Vous devez alors sélectionner une méthode et un modèle de rapport dans la boîte de dialogue **Recalculate with Method**. Vous pouvez également définir l'**Autostep interval** et la **Destination** du rapport. Les réglages sélectionnés dans cette boîte de dialogue remplacent provisoirement les valeurs figurant dans l'onglet **Signal/Review Options** de la boîte de dialogue **Preferences**. Les paramètres sont réinitialisés à la fermeture de la session ChemStation. L'intégrateur charge la méthode sélectionnée, puis s'en sert pour calculer les résultats de tous les fichiers de données compris dans l'ensemble de résultats.
- 3 À l'aide de la dernière méthode utilisée pour calculer les résultats. Sélectionnez **Last Result Mode** dans le menu **Recalculate** en mode **Data Analysis**. Ce mode charge la dernière méthode utilisée pour calculer les résultats associés au fichier de données. Remarque : si aucune méthode de traitement de données n'est associée au fichier de données, le système passe directement au fichier suivant. Ce mode influe à la fois sur le passage automatique aux fichiers suivants et sur le chargement manuel de fichiers de données.

Retraitement d'une séquence à l'aide de la table de navigation

REMARQUE

Les données de séquence acquises à l'aide de la ChemStation version B.01.03 (ou une version antérieure) doivent être retraitées via l'option **reprocess** de la vue **Method and Run Control**. Cette règle s'applique également aux données acquises dans la version B.03.01 ou une version ultérieure, si le mode **Unique Folder Creation** est désactivé.

Les données de séquence acquises avec la version B.02.01 ou une version ultérieure du logiciel ChemStation doivent être retraitées à l'aide des outils de retraitement figurant dans la table de navigation **Data Analysis**.

Pour retraiter les données de séquence via la table de navigation de la vue **Data Analysis**, tous les fichiers nécessaires doivent être présents dans le conteneur de données de séquence :

- les fichiers de données de séquence (*.d)
- tous les fichiers de méthodes (*.m) utilisés durant la séquence
- une copie du modèle de séquence d'origine (*.s)
- le fichier de lot de la séquence (*.b)
- le fichier journal de la séquence (*.log)

Au cours du retraitement, les différentes méthodes DA.M des fichiers de données sont mises à jour, ainsi que le fichier de commande (*.b).

Grâce aux fonctions de retraitement **Data Analysis**, il est possible de modifier le modèle de séquence (*.s) dans le conteneur de données afin de modifier le multiplicateur, la dilution, etc., ou d'utiliser une autre méthode pour le retraitement. Par défaut, le paramètre de retraitement de séquence **parts of method to run** pour l'analyse de données est défini sur **Reprocessing only**, et l'option **Use Sequence Table Information** est sélectionnée. Ces valeurs par défaut permettent de modifier les paramètres du modèle de séquence et de procéder à un retraitement sans modifier à nouveau les paramètres de séquence dans **Data Analysis**.

Si vous n'avez pas modifié explicitement la méthode dans le modèle de séquence, le système utilise les méthodes de séquence stockées dans le conteneur de données pour retraiter la séquence. Il s'agit des méthodes initialement utilisées lors de l'acquisition des données. Si vous devez modifier certains paramètres de méthode (par exemple, spécifier une impression vers un fichier *.xls), vous devez modifier et enregistrer les méthodes du conteneur de

séquence. Ces modifications générales sont ensuite appliquées à tous les fichiers de données pendant le retraitement.

Si vous souhaitez utiliser la méthode du conteneur de séquence mise à jour pour les acquisitions de données ultérieures, vous devez la copier depuis le conteneur de données de séquence vers l'un des chemins de méthode définis. La méthode nouvelle/mise à jour est alors disponible en tant que méthode de référence dans la vue des méthodes de l'Explorateur ChemStation.

Définition de la révision par lot

La révision par lot est une fonction d'analyse de données permettant à l'analyste de « faire un premier passage » sur les résultats d'une séquence ou d'une sélection d'analyses en les vérifiant rapidement et facilement. Il gagne ainsi du temps notamment lorsqu'il traite de grandes quantités d'échantillons. Lorsqu'une séquence est analysée, un fichier de commande (.b) est automatiquement généré et placé dans le répertoire de données avec les fichiers de données. Ce fichier de commande contient des pointeurs vers les fichiers de données de la révision par lot proprement dite. Durant le chargement d'un lot, l'analyste doit uniquement sélectionner la méthode à utiliser pour ce lot, puis choisir les différents fichiers de données à analyser. Il peut vérifier l'exactitude de l'étalonnage, les performances de l'instrument et les intégrations effectuées avant d'approuver les résultats. Les paramètres d'intégration de chromatogramme modifiés peuvent être enregistrés avec le fichier de données afin de garantir la traçabilité des données. Cet environnement interactif donne également accès à toutes les autres fonctions d'analyse de données, telles que la pureté des pics, la recherche en bibliothèque, etc.

La révision par lot utilise les mêmes registres d'analyse de données (ChromReg et ChromRes) que l'analyse de données standard. Par conséquent, cette fonction ne doit pas être utilisée dans une session en ligne en cours d'analyse.

Activation de la fonctionnalité de vérification par lot à l'aide de ChemStation avec ECM

Lorsqu'OpenLab CDS ChemStation Edition avec ECM est utilisé, la fonction de révision par lot n'est pas disponible par défaut. Afin de pouvoir utiliser la révision par lot, cette fonctionnalité doit être activée par une entrée dans la section [PCS] du fichier ChemStation.ini. Ce fichier se trouve dans le répertoire C:\WINDOWS.

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

L'entrée par défaut, _BatchReview=0, désactive la fonctionnalité.

Configuration de lot

Un lot est un ensemble de fichiers de données sélectionné par l'utilisateur, traité selon une méthode définie par celui-ci. Tous les fichiers de données du lot sont traités via la même méthode. Les étapes de traitement exécutées lorsqu'un nouvel échantillon est chargé pour révision sont sélectionnables (intégration, identification/quantification, création de rapports).

Toutes les analyses d'étalonnage du lot permettent de créer une table d'étalonnage simple à l'aide des moyennes des facteurs de réponse, utilisée ultérieurement en vue de la quantification.

Table de lots

Les analyses sont affichées dans une table de lots que l'utilisateur peut configurer :

- le nombre et le contenu des colonnes de la table peuvent être spécifiés ;
- les analyses peuvent être triées par
 - index d'analyse (ordre dans lequel elles ont été acquises), quels que soient les autres critères,
 - type d'échantillon (échantillons de contrôle, puis étalons et échantillons normaux), puis par index d'analyse dans chaque type d'échantillon,
 - méthode (si plusieurs méthodes ont servi à acquérir les analyses), puis par index d'analyse dans chaque méthode ;
- Les échantillons, les échantillons étalons et les échantillons témoins peuvent être affichés dans la table ou masqués.

Chaque analyse sélectionnée occupe une ligne de la table de lots. Vous pouvez exclure une analyse de la table de lots (par exemple de l'étalonnage) en sélectionnant le type d'échantillon Removed (Supprimé).

Table de composés

Les résultats des composés apparaissent dans une table de composés que l'utilisateur peut configurer, mais le contenu de cette table dépend du type d'échantillon de la table de lots :

- La liste des composés inclut tous les composés trouvés dans la méthode qui a été chargée pour la révision par lot.
- Si la table de lots n'affiche que des étalons (les échantillons et les échantillons de contrôle sont masqués), la table de composés comporte d'autres colonnes d'informations d'étalonnage (quantité attendue, erreur relative et erreur absolue).
- Si la table de lots n'affiche que des analyses de contrôle (les échantillons et les étalons sont masqués), la table de composés comporte d'autres colonnes pour toutes les limites de contrôle définies.

Pour les colonnes contenant des informations de composé, vous pouvez inclure le nom du composé dans le titre de la table en ajoutant %s à la spécification de colonne.

Rapport de lot

Le rapport de lot inclut deux tables généralement semblables aux tables de lots et de composés, que l'utilisateur peut configurer.

Pour les colonnes contenant des informations de composé, vous pouvez inclure le nom du composé dans le titre de la table en ajoutant %s à la spécification de colonne. Les en-têtes multilignes sont autorisés. Vous ajoutez le caractère « | » à l'endroit où vous souhaitez insérer un saut de ligne.

Interface utilisateur

La révision par lot offre deux interfaces utilisateur :

- l'interface standard, qui inclut une barre de boutons proposant la plupart des options du menu Batch (Lot), la table de lots et la table de composés,
- une interface minimale, qui inclut une barre de boutons semblable à l'interface standard, mais où les tables de lots et de composés sont remplacées par une boîte combinée contenant uniquement les informations spécifiées pour la table de lots. La barre de boutons de l'interface minimale ne comporte aucun bouton lié à la table de lots ou à la table de composés.

Fonctions de révision

Il existe deux modes d'affichage des fichiers de données :

- manuellement, en sélectionnant l'analyse à afficher dans la table,
- automatiquement, avec un intervalle prédéfini entre chaque fichier de données. Lors de l'affichage automatique, seuls les types d'échantillon affichés dans la table apparaissent. Les analyses sont affichées dans leur ordre d'apparition dans la table. La révision automatique peut être interrompue et reprise ultérieurement, ou arrêtée.

Les fonctions standard de ChemStation sont disponibles avec la révision par lot. Elles incluent l'étalonnage, le traitement manuel de chromatogrammes, par exemple par lissage ou intégration manuelle. Les modifications apportées à un fichier de données peuvent être marquées et enregistrées avec le fichier de lot. Les chromatogrammes révisés sont marqués d'un astérisque dans la table de lots. Vous pouvez également annuler les modifications du chromatogramme en cours uniquement ou toutes celles des chromatogrammes du lot.

REMARQUE

La révision par lot vous permet de sauvegarder les événements d'intégration manuels pour chaque analyse. Il est également possible de sauvegarder les événements manuels avec le fichier de données en dehors de la révision par lot. Afin d'éviter les conflits entre deux ensembles d'intégration manuelle, les événements manuels sauvegardés avec le fichier de données ne seront pas appliqués dans la révision par lot

Lorsqu'une analyse est chargée, les options de traitement sélectionnées sont exécutées. Si l'analyse a déjà été traitée et les modifications enregistrées, l'analyse traitée est chargée. Ce processus est plus rapide que le chargement de l'analyse non traitée, car aucun traitement n'est nécessaire.

Étalonnage dans le cadre de la révision par lot

L'étalonnage dans le cadre de la révision par lot ne dépend pas des paramètres de ré-étalonnage de la table de séquence. La première étape de l'étalonnage par lot remplace systématiquement les entrées de temps de réponse et de rétention de la table d'étalonnage. Pour les mélanges étalons suivants, la moyenne des valeurs de temps de réponse et de rétention est calculée.

En cliquant sur la barre d'outils de révision par lot, le système effectue un ré-étalonnage à partir de toutes les analyses d'étalonnage du lot afin de créer une table d'étalonnage ré-étalonnée. En cliquant sur la barre d'outils de révision par lot, les quantités de chaque composé étalonné seront recalculées. Les quantités de tous les échantillons sont calculées à partir de la table d'étalonnage ré-étalonnée.

Génération de rapports par lot

La « [Table de lots](#) », page 154 que l'utilisateur peut configurer peut être imprimée directement, affichée à l'écran ou imprimée dans un fichier avec un préfixe spécifié par l'utilisateur dans l'un des formats suivants :

- Fichier texte UNICODE (.TXT)
- Data Interchange Format (.DIF)
- Valeurs séparées par une virgule (.CSV)
- Microsoft Excel (.XLS)

Les options de création de rapports permettent également de trier les échantillons (par index d'analyse, type d'échantillon ou méthode), quelle que soit la méthode de tri de la table de lots. Les priorités de tri sont celles décrites pour la « [Table de lots](#) », page 154.

Historique de lot

La révision par lot met à jour un journal de toutes les opérations liées au lot en cours. Toute opération modifiant le lot (par exemple, modifier le chromatogramme affiché ou le type d'échantillon, charger et enregistrer le lot) ajoute une ligne à l'historique du lot. Cette ligne inclut la date et l'heure, le nom de l'opérateur en cours, ainsi que la description de l'événement.

En outre, vous pouvez ajouter vos propres commentaires à l'historique du lot. Les entrées existantes de l'historique du lot ne peuvent pas être modifiées. La liste des historiques est accessible via l'option de menu Batch History (Historique de lot) uniquement.

9

Reporting

En quoi consiste ACAML ? 160

Le schéma ACAML 161

Facteurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation 162

OpenLab CDS ChemStation Edition permet deux types de Reporting : vous pouvez choisir entre le Classic ChemStation Reporting (inchangée par rapport à la création de rapports de ChemStation B) ou la nouvelle reporting création intelligente de rapports. Cette rubrique décrit et fournit une référence pour le schéma ACAML utilisé dans la fonctionnalité d'Intelligent Reporting

En quoi consiste ACAML ?

ACAML Agilent Common Analytical Markup Language ; langage de marquage qui permet de capturer et de décrire les données analytiques dans les domaines de la chromatographie et de la spectrométrie. ACAML est conçu pour décrire tous les types de données dans les environnements analytiques. ACAML fournit à Agilent un standard commun qui permet d'échanger en toute transparence des informations entre différentes plateformes et applications.

L'approche consiste à définir un langage de schéma unifié indépendant des techniques et des applications. ACAML peut être utilisé pour décrire des données analytiques de manière générique, sans caractéristiques particulières (par ex. point de vue orienté résultats) : à partir d'un seul instrument ou d'une seule méthode jusqu'à un scénario complexe avec plusieurs instruments, méthodes, utilisateurs et des centaines, voire de milliers d'échantillons.

Aucune application supplémentaire (comme un validateur ACAML spécial) n'est requise pour prendre en charge et pour valider les documents d'instances ACAML. Dans sa version initiale, ACAML ne prend en charge que les données de chromatographie (LC, GC).

Le schéma ACAML

La base du schéma ACAML est le format XML industriel.

Le schéma ACAML est de type fort :

- pour prendre en charge l'idée d'un échange standardisé des données,
- pour éviter le développement non contrôlé de types auto-définis.

La définition de schéma vérifie que chaque instance-document est bien défini et que l'intégrité du référentiel entre tous les objets est garantie. Aucune application supplémentaire (comme un validateur ACAML spécial) n'est requise pour prendre en charge et pour valider les documents d'instances ACAML.

Facteurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation

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

Tableau 11 Valeurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation

USP	PE	JP	Définition	Création classique de rapports (RLE)	Création intelligente de rapports (RTE)
Facteur de traînée de pic	Facteur de symétrie	Facteur de symétrie	$S = W_{0,05h}/2f$	Traînée USP	Pic_FacteurDeTraîne
-	-	-	$S = W_{0,10h}/2f$	Asymétrie USP à 10 % de hauteur	Pic_Asymétrie_10Pour
-	Rétention relative (ajustée)	Facteur de séparation	$r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$		TempsRétRelative_PE
Rétention relative	-	-	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ T_R du pic a < T_R du pic b	Sélectivité	Pic_Sélectivité
-	Résolution	Résolution	$R_s = 1,18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{0,5h1} + W_{0,5h2})$	Résolution (PE) Résolution (JP)	Pic_Résolution_PE Pic_Résolution_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2,35}{2}\right) (T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	Résolution	Pic_Résolution_Classique
Résolution	-	-	$R_s = 2,0 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 - W_2)$	-	Pic_Résolution_USP
Efficacité			$N = 16 \times (t/W)^2$	Méthode tangentielle de plateaux	Pic_PlateauxThéoriques_USP
-	Efficacité	Efficacité	$N = 5,54 \times t_R^2 / W_{0,5h}^2$	Méthode à mi-hauteur de plateaux	Pic_PlateauxThéoriques_PE

Tableau 11 Valeurs de pharmacopée dans les rapports ChemStation

USP	PE	JP	Définition	Création classique de rapports (RLE)	Création intelligente de rapports (RTE)
Temps de rétention relatif	Temps de rétention relatif		$R_r = t_2/t_1$	-	Pic_TempsRétRelatif
	Rapport S/B	Rapport S/B	S/B = 2 H/h Bruit : Calcul crête-à-crête ; signal de référence blanc ; intervalle de temps 20x largeur de pic.	-	Pic_SignalBruit_PE
Rapport S/B			S/B = 2 H/h Bruit : Calcul crête-à-crête ; intervalle de temps dans le signal actuel.		Peak_SignalToNoise_USP
			S/B = 2 H/h Bruit : Calcul 6 sigma ; intervalle de temps dans le signal actuel.		Peak_SignalToNoise_6Sigma
Rapport pic/vallée	Rapport pic/vallée		$p/v = H_p/H_v$	Rapport pic/vallée (front et traîne)	Pic_RapportPicVallée
-	-	-	$S = B/A$	Asymétrie Foley-Dorsey à 10 % de hauteur	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7 (T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A,B) / \min(A,B))}$	Plateaux de Foley-Dorsey	-

10

Vérification du système

Vues Verification (Vérification) et Diagnosis (Diagnostic) 165

Vérification du système 165

Registre GLPsave 168

Fonction de test DAD 170

Fonction Examen du test DAD 170

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

Vues Verification (Vérification) et Diagnosis (Diagnostic)

Si l'instrument configuré est compatible, ChemStation propose deux vues supplémentaires afin de réaliser des opérations de vérification et de diagnostic des instruments. Pour plus d'informations, reportez-vous à l'aide en ligne.

Vérification du système

La vérification du système est essentielle dans le cadre de l'utilisation de routine d'un instrument analytique au sein d'un laboratoire réglementé. Les fonctionnalités de vérification des BPL de ChemStation sont conçues pour vous aider à démontrer que le logiciel, ou un composant particulier du logiciel, fonctionne correctement, ou du moins qu'il fonctionnait correctement au moment d'une analyse donnée.

La fonction de vérification de ChemStation vous permet de vérifier le fonctionnement correct du logiciel ChemStation. Pour ce faire, vous pouvez retraiter les fichiers de données selon des méthodes spécifiques avant de comparer les résultats avec une norme prédéfinie. La fonction de vérification revêt un intérêt tout particulier lorsqu'il s'agit de faire la preuve de l'intégrité des résultats d'intégration et de quantification.

Le test de vérification standard est à votre disposition mais vous êtes libre de créer vos propres tests à partir de vos méthodes et fichiers de données, afin de vérifier les combinaisons logicielles algorithmiques utilisées par vos méthodes d'analyse. Le test de vérification est un fichier protégé. Il est donc impossible de le modifier ou de le supprimer.

L'élément Verification (Vérification) de la vue Data Analysis (Analyse de données) permet de sélectionner les options suivantes :

- Lancer un test de vérification dans la base de données.
- Définir un nouveau test de vérification et l'ajouter à la base de données.
- Supprimer un test de vérification de la base de données.

La section des procédures du système d'aide en ligne décrit la procédure à suivre pour réaliser ces tâches. Dans le cadre d'un test de vérification de ChemStation,

vous pouvez exécuter le test dans son intégralité ou sélectionner certaines opérations uniquement.

Les résultats du test de vérification sont enregistrés au format binaire dans le sous-répertoire par défaut : C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Verify, avec la méthode et les fichiers de données. Le sous-répertoire Verify se trouve au même niveau que les sous-répertoires de la séquence, des méthodes et des données. Vous pouvez envoyer les résultats à une imprimante ou dans un fichier. Le test, qui inclut les résultats de plusieurs tests de vérification combinés, est rapporté comme « réussi » ou « échec ».

Les composants de test de vérification suivants sont disponibles :

Électronique numérique (détecteur à barrette de diodes Agilent série 1100/1200 seulement)

Un chromatogramme de test est stocké dans le détecteur à barrette de diodes. Ce chromatogramme est envoyé à ChemStation une fois que les étapes de prétraitement préalables normales pour les données brutes provenant des photodiodes lui ont été appliquées. Les données résultantes sont ensuite comparées aux résultats d'origine stockés dans ChemStation pour ce chromatogramme de test. Le test échoue si des différences sont détectées. Ce test permet de garantir que les composants électroniques du détecteur à barrette de diodes qui assurent le prétraitement des données fonctionnent toujours parfaitement. Étant donné qu'un chromatogramme de test enregistré est utilisé, la lampe ou la barrette de diodes n'est pas concernée par ce test. Pour les vérifier, utilisez la « [Fonction de test DAD](#) », page 170.

Intégration des pics

Le fichier de données est intégré de nouveau conformément à la méthode d'origine. Les résultats sont comparés aux résultats d'intégration d'origine stockés dans le registre de vérification. Le test échoue si des différences sont détectées.

Quantification de composés

Les composés indiqués dans le fichier de données sont de nouveau quantifiés. Les résultats sont comparés aux résultats de quantification d'origine stockés dans le registre de vérification. Le test échoue si des différences sont détectées.

Impression du rapport

Le rapport d'origine est de nouveau imprimé.

La page suivante présente un exemple de test de vérification réussi.

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

Tested Configuration:

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

ChemStation Verification Test Details:

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

Signals Tested:

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

ChemStation Verification Test Results:

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

```
ChemStation Verification Test Overall Results:    Pass
```

Registre GLPsave

Le registre GLPsave est enregistré au terme de chaque analyse lorsque cette option est sélectionnée sur la liste de vérification de l'exécution. Il contient les informations suivantes :

- les signaux,
- le journal,
- la table des résultats d'intégration,
- la table des résultats de quantification,
- les données de performance de l'instrument,
- la méthode d'analyse des données.

Ce registre est protégé dans son intégralité et généré lors de l'analyse. Vous pouvez le récupérer à tout moment pour servir de preuve quant aux méthodes analytiques utilisées.

L'option de registre GLPsave de la vue Data Analysis (Analyse de données) vous permet de consulter à tout moment le fichier de registre GLPsave. Ce fichier est protégé par un total de contrôle et il est crypté en code binaire afin d'empêcher toute modification.

Dans la boîte de dialogue utilisée pour sélectionner le registre GLPsave à consulter, vous pouvez sélectionner les options de révision suivantes :

- charger la méthode d'origine,
- charger les signaux d'origine,
- charger les données de performance d'instrument,
- imprimer la méthode d'origine,
- imprimer les résultats d'intégration d'origine,
- imprimer les résultats de quantification d'origine,
- générer un rapport initial à partir des signaux et de la méthode d'origine.

Vous pouvez utiliser la fonctionnalité de révision des BPL pour prouver que les données chromatographiques sont les données d'origine, pour démontrer la qualité de l'analyse à partir des données de performance de l'instrument et pour attester de l'authenticité de l'interprétation des données.

Par exemple, vous pouvez :

- recharger et réimprimer l'analyse des données utilisée dans la méthode au moment de l'analyse d'échantillon afin de prouver que l'évaluation des données présentées dans les résultats de l'analyse n'a pas été modifiée,
- passer en revue, sans les recalculer, les résultats d'intégration et de quantification afin d'attester de l'authenticité du rapport.

Fonction de test DAD

Les tests de détecteur peuvent s'inscrire dans le cadre de la validation de système de routine d'un instrument analytique dans un laboratoire réglementé.

Le test DAD vérifie les performances du détecteur à barrette de diodes. Ce test, disponible dans le menu Instrument (uniquement pour les unités CPL 3D et EC), vérifie l'étalonnage de longueur d'onde et d'intensité de l'instrument. Lorsque vous cliquez sur Save (Enregistrer), les résultats du test sont automatiquement enregistrés dans la base de données DADTest et un fichier de registre appelé DADTest.Reg est stocké dans le répertoire d'instrument par défaut.

Fonction Examen du test DAD

L'option **Review DAD Test** figurant dans le menu Vue de l'analyse de données permet de consulter à tout moment le fichier DADTest.Reg. Ce fichier est protégé par une somme de contrôle et est crypté en code binaire afin d'empêcher toute modification.

Vous pouvez examiner les parties suivantes du test DAD :

- Afficher les spectres d'holmium** Trace tous les spectres d'holmium répertoriés dans la table d'examen du test DAD. Le spectre actif est désigné par une balise.
- Afficher les spectres d'intensité** Trace tous les spectres d'intensité répertoriés dans la table d'examen du test DAD. Le spectre actif est désigné par une balise.
- Enregistrer en tant que nouvelle base de données** Si vous changez la lampe du DAD, vous pouvez réinitialiser la base de données DADTest en supprimant les résultats de test indésirables de la table avant d'utiliser cette fonction.
- Afficher les spectres sélectionnés** Affiche uniquement les spectres sélectionnés dans la table.
- Afficher le graphique d'intensité** Vous pouvez tracer un graphique d'intensité afin d'obtenir une indication de la durée de vie de la lampe du détecteur à barrette de diodes. Ce graphique trace l'intensité maximale de la lampe en fonction du temps.

Contenu de ce manuel

Ce guide contient des informations de référence concernant les principes de fonctionnement, calculs et algorithmes de traitement de données utilisés dans Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition.

Les professionnels de la validation pourront s'appuyer sur les informations fournies pour planifier et réaliser les tâches de validation du système.

www.agilent.com

© Agilent Technologies 2010-2019

Imprimé en Allemagne
04/2019



M8301-93029 Rev. C

