OpenLab CDS

# Guia de Referência de Data Analysis

# Avisos

## Informações do documento

Nº doc.: D0013815pt Rev. A
Edição: 04/2022

## Copyright

© Agilent Technologies, Inc. 2012-2022

Nenhuma parte deste material pode ser reproduzida de qualquer forma ou por qualquer meio (incluindo armazenamento e recuperação eletrônica ou a tradução para outro idioma) sem autorização prévia por escrito da Agilent Technologies, Inc. de acordo com as leis de direitos autorais americanas e internacionais.

Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95051,

EUA

## Revisão do Software

Este guia é válido para a revisão 2.7 do Agilent OpenLab CDS.

## Garantia

O material contido neste documento é fornecido "no estado em que se encontra" e está sujeito a alterações, sem aviso prévio em edições futuras. Além disso, com o máximo rigor permitido pelas leis aplicáveis, a Agilent isenta-se de responsabilidade em relação a garantias, expressas ou implícitas, em relação a este manual e a qualquer informação contida nele, incluindo mas não limitado as garantias implícitas de adequação comercial e adequação a um propósito específico. A Agilent não será responsável por erros ou por danos incidentais ou consequenciais relacionados ao fornecimento, ao uso ou ao desempenho deste documento ou de qualquer informação nele contida. Se a Agilent e o usuário possuírem um acordo por escrito em separado com os termos de garantia cobrindo o material neste documento que entrem em conflito com esses termos, os termos de garantia do documento em separado prevalecerão.

## Licenças de tecnologia

O hardware e/ou software descrito(s) neste documento é/são fornecido(s) sob licença, podendo ser usado(s) ou copiado(s) somente de acordo com os termos dessa licença.

## Legenda de direitos restritos

Direitos restritos ao governo dos EUA. Os direitos de software e dados técnicos concedidos ao governo federal incluem apenas os direitos normalmente concedidos aos clientes usuários finais. A Agilent fornece esta licença comercial habitual relatvBivamente a software e dados técnicos de acordo com a FAR 12.211 (Dados técnicos) e 12.212 (Software de computador) e, para o Departamento de Defesa, segundo a DFARS 252.227-7015 (Dados técnicos – Itens comerciais) e DFARS 227.7202-3 (Direitos relativos a software de computador comercial ou documentação de software de computador).

## Avisos de segurança

**CUIDADO**

Um aviso de **CUIDADO** representa um perigo. Ele chama a atenção para uma prática, um procedimento operacional ou similares que, se não forem seguidos corretamente poderão resultar em danos ao produto ou em perda de dados importantes. Não prossiga após uma indicação de **CUIDADO** até que as condições indicadas sejam completamente compreendidas e atendidas.

**AVISO**

**Um AVISO representa um perigo. Ele chama a atenção para uma prática, um procedimento operacional ou similares que, se não forem seguidos corretamente poderão resultar em lesões pessoais ou fatais. Não prossiga após uma indicação de AVISO até que as condições indicadas tenham sido totalmente compreendidas e atendidas.**

## Referência para o Data Analysis

# Neste Guia...

Este guia destina-se aos usuários avançados, administradores do sistema e às pessoas responsáveis por validar o Agilent OpenLab CDS. Contém informações de referência sobre os princípios de cálculo e algoritmos do Data Analysis.

Use este guia para verificar a funcionalidade do sistema em relação a suas especificações de requisitos de usuário e para definir e executar as tarefas de validação do sistema definidas em seu plano de validação. Os seguintes recursos contêm informações adicionais.

- Para informações de tarefas específicas do contexto ("Como Fazer"), referências à Interface do Usuário e ajuda para solução de problemas: OpenLab Help & Learning.
- Para detalhes sobre a instalação do sistema e preparação do local: *Guia de Requisitos do OpenLab CDS*, *Guia da Estação de Trabalho do OpenLab CDS* ou *Guia do Cliente e AIC do OpenLab CDS*.

## 1 Preparação do Sinal

Este capítulo descreve como o sinal pode ser preparado, por exemplo, através da subtração do branco, antes de ser integrado.

## 2 Integração com o Integrador ChemStation

Este capítulo descreve os conceitos e algoritmos de integrador do integrador ChemStation no OpenLab CDS.

## 3 Integração com o Integrador do EZChrom

Este capítulo contém a descrição de eventos de integração EZChrom.

## 4 Identificação do pico

Este capítulo descreve os conceitos de identificação do pico.

## 5 Calibração

Este capítulo contém detalhes sobre cálculos utilizados no processo de calibração.

## 6 Quantificação

Este capítulo descreve como os compostos são quantificados e explica os cálculos utilizados na quantificação.

## 7 Análise Espectral UV

Este capítulo descreve os conceitos de verificação de impureza e a confirmação da identidade do composto com base na análise espectral UV.

## 8 Espectrometria de Massas

Este capítulo descreve o cálculo de pureza da amostra com base em espectrometria de massas.

## 9 System Suitability

Este capítulo descreve o que o OpenLab CDS pode fazer para avaliar o desempenho do instrumento analítico e do método analítico.

# Conteúdo


**1 Preparação do Sinal 7**

Suavização de Sinal 8
Subtração do Branco 11

**2 Integração com o Integrador ChemStation 12**

O que é integração? 13
Os algoritmos do integrador 15
Princípio da operação 20
Reconhecimento do pico 21
Medição da área do pico 32
Alocação da linha de base 35
Eventos de Integração 46

**3 Integração com o Integrador do EZChrom 66**

Eventos de Integração 67
Descrições do Código da Linha de Base 83

**4 Identificação do pico 85**

O que é identificação do pico? 86
Resolução de conflito 88
Tempo de retenção relativos 89
Composto de referência de tempo 91
Atualizar método de processamento 93

**5 Calibração 98**

O que é calibração? 99
Curva de calibração 100
Cálculos da curva de calibração 113
Avaliação da curva de calibração 121

**6 Quantificação 128**

O que é quantificação? 129
Fatores de correção 130
% de massa e concentração 131
%Área e %Altura 132
Quantificação de compostos calibrados 133
Quantificação de compostos não calibrados 138
Quantificação de picos não identificados 141
Normalização 142
Quantificação de grupo 145

**7 Análise Espectral UV 153**

O que é análise espectral UV? 154
Verificação de impureza UV 156
Confirmação UV 167

**8 Espectrometria de Massas 168**

Pureza da amostra MS 169
Pureza de pico MS 171

**9 System Suitability 173**

Avaliar adequação do sistema 174
Determinação do Ruído 176
Cálculo de simetria e assimetria do pico 187
Fórmulas e cálculos de adequação do sistema 189
Definições do teste de desempenho 190

# 1 Preparação do Sinal

Suavização de Sinal 8
Abordagem geral 8
Detalhes do algoritmo 9
Subtração do Branco 11

Este capítulo descreve como o sinal pode ser preparado, por exemplo, através da subtração do branco, antes de ser integrado.

Este capítulo descreve como o sinal pode ser preparado antes de ser integrado.

**NOTA**

Quando as configurações de suavização e subtração do branco são usadas para processar dados, o sistema realizará a suavização primeiro e depois a subtração do branco com os sinais suavizados.

# Suavização de Sinal

## Abordagem geral

### Suposições

Todos os algoritmos de suavização consideram que os dados são dados equidistantes. Os dados não equidistantes são transformados em dados equidistantes, aplicando uma interpolação spline e através de reamostragem dos dados usando a menor diferença de tempo nos dados não equidistantes.

### Suavização - algoritmo de base

Todos os algoritmos de suavização aplicam uma janela de tamanho *2m+1* preenchida com coeficientes de suavização, usando a seguinte abordagem:

$$x'(i) = \sum_{j=-m}^{j=m} x(i+j) \cdot a(j)$$

onde

| | |
|---|---|
| a | Matriz de coeficientes de suavização |
| x' | Sinal suavizado |
| m | Número par especificando a metade da largura da janela de suavização |

Essa abordagem conduz a um número ímpar *2m+1* para o tamanho total da janela.

### Tratamento das bordas

Uma vez que é suposto os coeficientes de suavização estarem normalizados, as bordas precisam de uma consideração especial.

Para filtragem por **Média móvel** e **Gaussiana**, a janela é reduzida na borda direita ou esquerda e os coeficientes são recalculados para chegarem a uma soma total de 1 (normalização).

Para **Savitzy-Golay**, o tratamento é mais complicado. É preciso preservar as propriedades de filtragem Savitzy-Golay também perto das bordas do sinal. Consulte "Detalhes do algoritmo" na página 9.

## Detalhes do algoritmo

### Média móvel

A **Média móvel** é o algoritmo de suavização mais simples. Todos os coeficientes são calculados da seguinte forma:

$$a(i) = \frac{1}{2m+1}; i = [-m, m]$$

onde

| | |
|---|---|
| a | Matriz de coeficientes de suavização |
| m | Número par especificando a metade da largura da janela de suavização |

Isso indica que a função de suavização possui uma forma retangular. Esse tipo de suavização também é chamado de média boxcar.

## Gaussiana

A suavização **Gaussiana** usa coeficientes obtidos da distribuição normal Gauss. Dado o número *2m+1* como tamanho da janela, o desvio padrão σ da distribuição normal é calculado da seguinte forma:

$$\sigma = \frac{2m + 1}{6} - 1$$

Os coeficientes individuais são computados da seguinte forma:

$$a'(i) = e^{-\frac{1}{2}\left|\frac{i}{\sigma}\right|^2}; i = [-m, m]$$

Em uma segunda etapa, os coeficientes são normalizados de modo que a soma seja 1:

$$a(i) = \frac{a'(i)}{\sum_{i=-m}^{i=m} a'(i)}$$

## Savitzky-Golay

Os coeficientes para a suavização Savitzky-Golay são calculados a fim de garantir que a área sob a função permaneça inalterada. O cálculo dos coeficientes baseia-se no artigo *General Least-Squares Smoothing and Differentiation by the Convolution (Savitzky-Golay) Method* de Gorry (1990)[1].

Esse cálculo garante que as propriedades de preservação da área de suavização Savitzky-Golay também sejam válidas nos limites do sinal.

[1] Gorry, P.A., 1990. General Least-Squares Smoothing and Differentiation by the Convolution (Savitzky-Golay) Method. Analytical Chemistry 62, 570-573

# Subtração do Branco

Ao analisar uma amostra, o sinal obtido pode ser causado por analitos, bem como por solventes de diluição, fases móveis, aditivos, etc. Utilize a subtração do branco para receber um cromatograma limpo, apenas com contribuição dos analitos.

Os sinais em branco podem ter origem em:

- um branco de amostra em uma sequência
- um branco de amostra fora da sequência (por exemplo, uma corrida única)

O novo sinal é calculado através da subtração do sinal em branco:

Sinal novo = sinal da amostra - sinal em branco

Para cromatogramas extraídos usando um comprimento de onda específico:

Sinal novo = sinal da amostra no comprimento de onda - sinal em branco no comprimento de onda

Se um branco e uma amostra apresentarem taxas de dados diferentes, a taxa de dados do branco será ajustada. Os pontos de dados são removidos ou criados por interpolação spline.

Se o tempo de corrida da amostra for maior do que o tempo de corrida do branco, o novo sinal conterá pontos de dados corrigidos e não corrigidos.

# 2 Integração com o Integrador ChemStation


O que é integração? 13
O que a integração faz? 13
Capacidades do integrador 14
Os algoritmos do integrador 15
Visão geral 15
Definir a linha de base inicial 16
Rastrear a linha de base 17
Alocar a linha de base 18
Definição dos termos 19
Princípio da operação 20
Reconhecimento do pico 21
Largura do pico 22
Filtros de reconhecimento do pico 23
Agrupamento 24
O algoritmo de reconhecimento do pico 25
Picos unidos 26
Ombros 27
Construção da linha de base padrão 28
Códigos da linha de base 29
Medição da área do pico 32
Determinação da área 33
Unidades e fatores de conversão 34
Alocação da linha de base 35
Modos de correção da linha de base 35
Razão pico-vale 37
Tangente Skim 38
Modos tangente skim 42
Eventos de Integração 46
Eventos de integração padrão: Eventos iniciais 46
Eventos de integração padrão: Eventos de tempo 51
Eventos de integração avançados 63


Este capítulo descreve os conceitos e algoritmos de integrador do integrador ChemStation no OpenLab CDS.

# O que é integração?

A integração localiza os picos em um sinal e calcula o seus tamanhos.

A integração é um passo necessário para:

- identificação
- calibração
- quantificação

## O que a integração faz?

Quando um sinal é integrado, o software:

- identifica um tempo inicial e um tempo final para cada pico
- encontra o ápice de cada pico, que é, o tempo de retenção/migração,
- constrói uma linha de base e
- calcula a área, altura, largura do pico e simetria para cada pico.

Este processo é controlado pelos parâmetros chamados eventos de integração.

## Capacidades do integrador

Os algoritmos do integrador incluem as seguintes capacidades chave:

- a habilidade de definir tabelas de evento de integração individual para cada sinal cromatográfico se vários sinais ou mais de um detector for utilizado
- integração gráfica manual dos cromatogramas exigindo interpretação humana
- comentário dos resultados de integração
- definições do parâmetro do integrador para definir ou modificar as configurações básicas do integrador para a rejeição por área, largura do pico, slope sensitivity, detecção de ombro, correção de linha de base e detecção da tangente skim frontal/da cauda
- parâmetros de controle de linha de base, tais como forçar linha de base, linha de base e todos os vales, linha de base no próximo vale, ajustar retorno de linha de base a partir do final do pico atual, ponto de linha de base mais provável a partir de um intervalo de tempo
- controle da somatória de área
- reconhecimento de pico negativo
- detecção da definição do pico do solvente
- controle do integrador comanda os intervalos de tempo de retenção definidos para a operação do integrador
- alocação do ombro do pico através da utilização de cálculos derivativos secundários

# Os algoritmos do integrador

## Visão geral

Para integrar um cromatograma, o integrador...

1. define a linha de base inicial,
2. rastreia e atualiza a linha de base continuamente,
3. identifica o tempo inicial para um pico,
4. encontra o ápice de cada pico,
5. identifica o tempo final para um pico,
6. constrói uma linha de base e
7. calcula a área, altura, largura do pico e simetria para cada pico.

Este processo é controlado pelos **eventos de integração**. Os eventos mais importantes são o slope sensitivity inicial, largura do pico, modo de ombros, rejeição por área e rejeição por altura. O software lhe permite definir valores iniciais para estes e outros eventos. Os valores iniciais têm efeito no início do cromatograma.

Na maioria dos casos, os eventos iniciais darão bons resultados de integração para o cromatograma inteiro mas pode haver vezes em que você deseja mais controle sobre o progresso de uma integração.

O software lhe permite controlar como uma integração é realizada lhe habilitando a programar novos eventos de integração em momentos apropriados no cromatograma.

# Definir a linha de base inicial

## Pontos cardinais

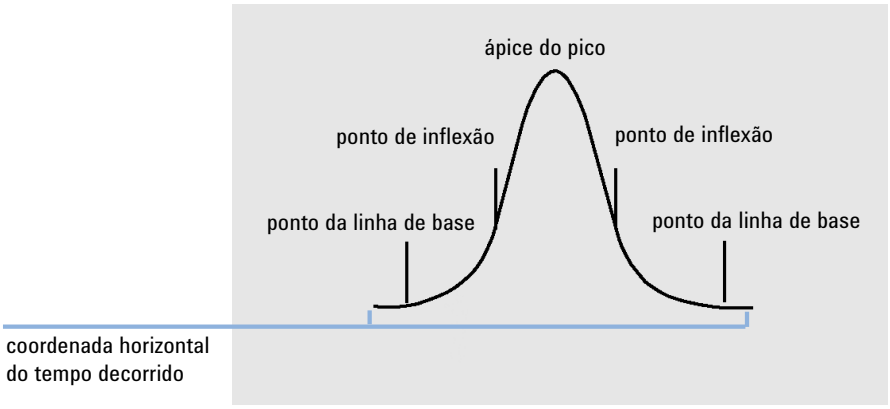



**Figura 1** **Pontos cardinais**

## Definir a linha de base inicial

Como as condições da linha de base variam de acordo com o aplicativo e com o hardware detector, o integrador utiliza os parâmetros dos eventos de integração e do arquivo de dados para otimizar a linha de base.

Antes de o integrador poder integrar os picos, ele deve estabelecer um **ponto da linha de base**. No início da análise, o integrador estabelece um nível da linha de base inicial tomando o primeiro ponto de dados como uma tentativa do ponto da linha de base. Ele então tenta redefinir este ponto da linha de base inicial na média do sinal de entrada. Se o integrador não obtiver um ponto da linha de base inicial redefinido, ele reterá o primeiro ponto de dados como um potencial ponto da linha de base inicial.

## Identificar os pontos cardinais de um pico

O integrador determina que um pico pode estar iniciando quando os potenciais pontos da linha de base ficam fora do envelope da linha de base e a curvatura da linha de base excede um certo valor como determinado pelo parâmetro do slope sensitivity do integrador. Se esta condição continuar, o integrador reconhece que ele está na subida de um pico e o pico é processado.

### Inicial

1. Slope e curvatura dentro do limite: continua rastreando a linha de base.
2. Slope e curvatura acima do limite: possibilidade de um pico.
3. Slope mantém-se acima do limite: pico reconhecido, ponto do início do pico definido.
4. Curvatura torna-se negativa: ponto de inflexão frontal definido.

### Ápice

1. O slope passa pelo zero e torna-se negativo: ápice do pico, ponto do ápice definido.
2. Curvatura torna-se positiva: ponto de inflexão traseiro definido.

### Final

1. Slope e curvatura dentro do limite: aproximando-se do final do pico.
2. Slope e curvatura mantêm-se dentro do limite: do final do pico definido.
3. O integrador retorna para o modo de rastreamento da linha de base.

## Rastrear a linha de base

O integrador experimenta os dados digitais em um determinado intervalo pela largura inicial ou pela largura calculada do pico, enquanto a execução progride. Ele considera cada ponto de dados como um potencial ponto da linha de base.

O integrador determina um *envelope da linha de base*do slope da linha de base, usando um algoritmo de rastreamento da linha de base no qual o slope é determinado pelo primeiro derivado e a curvatura pelo segundo derivado. O envelope da linha de base pode ser visualizado como um cone com a sua ponta no ponto de dados atual. Os níveis superior e inferior de aceitação do cone são:

- + ascendente + curvatura + tendência da linha de base devem ser mais baixas que o nível de threshold;
- - ascendente - curvatura - tendência da linha de base devem ser mais positivas (por exemplo, menos negativas) que o nível de threshold.

Como os pontos de dados são aceitos, o cone se move para frente até que ocorra uma erupção.

Para ser aceito como um ponto da linha de base, o ponto de dados deve satisfazer as seguintes condições:

- deve estar entre o envelope da linha de base definida;
- a curvatura da linha de base no ponto de dados (determinada pelos filtros derivados) deve estar abaixo de um valor crítico, como determinado pela configuração atual do slope sensitivity.

O ponto da linha de base inicial, estabelecido no início da análise é então continuamente redefinido, em um intervalo determinado pela largura do pico, para a média de movimento dos pontos de dados que estão entre o envelope da linha de base por um período determinado pela largura do pico. O integrador rastreia e redefine periodicamente a linha de base para compensar o desvio até que seja detectada uma subida do pico.

## Alocar a linha de base

O integrador aloca a linha de base cromatográfica durante a análise a uma frequência determinada pelo valor da largura do pico. Quando o integrador tiver experimentado um certo número de pontos de dados, ele redefine a linha de base a partir do ponto da linha de base inicial para o ponto da linha de base atual. O integrador continua a rastrear a linha de base pelo próximo conjunto de pontos de dados e redefine a linha de base novamente. Este processo continua até que o integrador identifique o início de um pico.

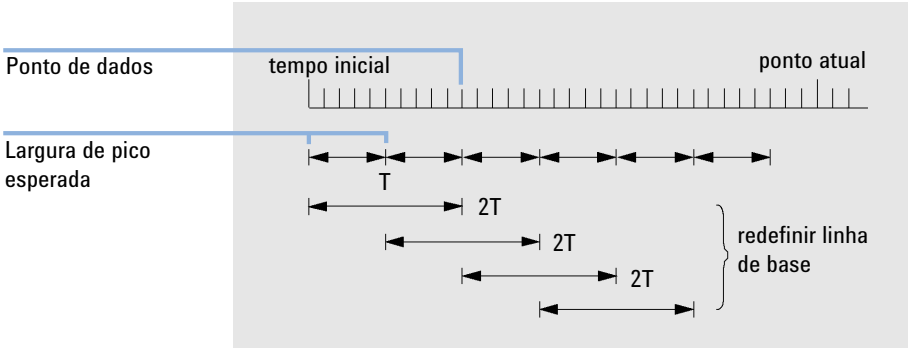



**Figura 2 Linha de base**

No início do processo de integração, o primeiro ponto de dados é utilizado. Esse ponto da linha de base é redefinido periodicamente conforme mostrado na figura (consulte Figura 2 na página 18).

As áreas são somadas por um tempo T (largura do pico esperada). Este tempo não pode nunca ser menos que um ponto de dados. Isto continua desde que exista condição da linha de base agora. O slope e a curvatura também são obtidos. Se o slope e a curvatura forem menores que o threshold, duas áreas somadas são unidas e comparadas com a linha de base anterior. Se o novo valor for menor que a linha de base anterior, o novo valor substitui imediatamente o antigo. Se o novo valor for maior que o valor anterior, ele é armazenado como uma tentativa de nova linha de base e é confirmado se mais um valor satisfizer o critério de nivelamento do slope e da curvatura. Esta última limitação não fica ativa se os picos negativos forem permitidos. Durante a linha de base, deve ser feita uma verificação para examinar solventes de ascensão rápida. Eles podem ser muito rápidos para a detecção do movimento ascendente. (No momento que o movimento ascendente é confirmado, o critério do solvente pode já não ser válido.) No primeiro tempo através do primeiro ponto de dados está a linha de base. É substituído pela média 2 T se o sinal estiver na base. A linha de base é então redefinida a cada T (consulte Figura 2 na página 18).

## Definição dos termos

### Pico do Solvente

O pico do solvente, que geralmente é um pico muito grande de nenhuma importância analítica, não está normalmente integrado. No entanto, quando picos pequenos de interesse analítico ficam próximos ao pico de solvente, por exemplo, na cauda do pico de solvente, condições de integração especiais podem ser definidas para calcular suas áreas corretas para a contribuição da cauda do pico de solvente.

### Ombro (frente, traseira)

Os ombros ocorrem quando dois picos ficam tão próximos que não existe nenhum vale entre ele e eles não são resolvidos. Os ombros podem ocorrer na extremidade dianteira (frontal) do pico ou na extremidade traseira(posterior) do pico. Quando os ombros são detectados, eles podem ser integrados pela tangente skim ou pelas quedas da linha de base.

### Inclinação

A inclinação de um pico, que denota a alteração de concentração do componente pelo tempo, é usada para determinar o início, o ápice e o fim de um pico.

# Princípio da operação

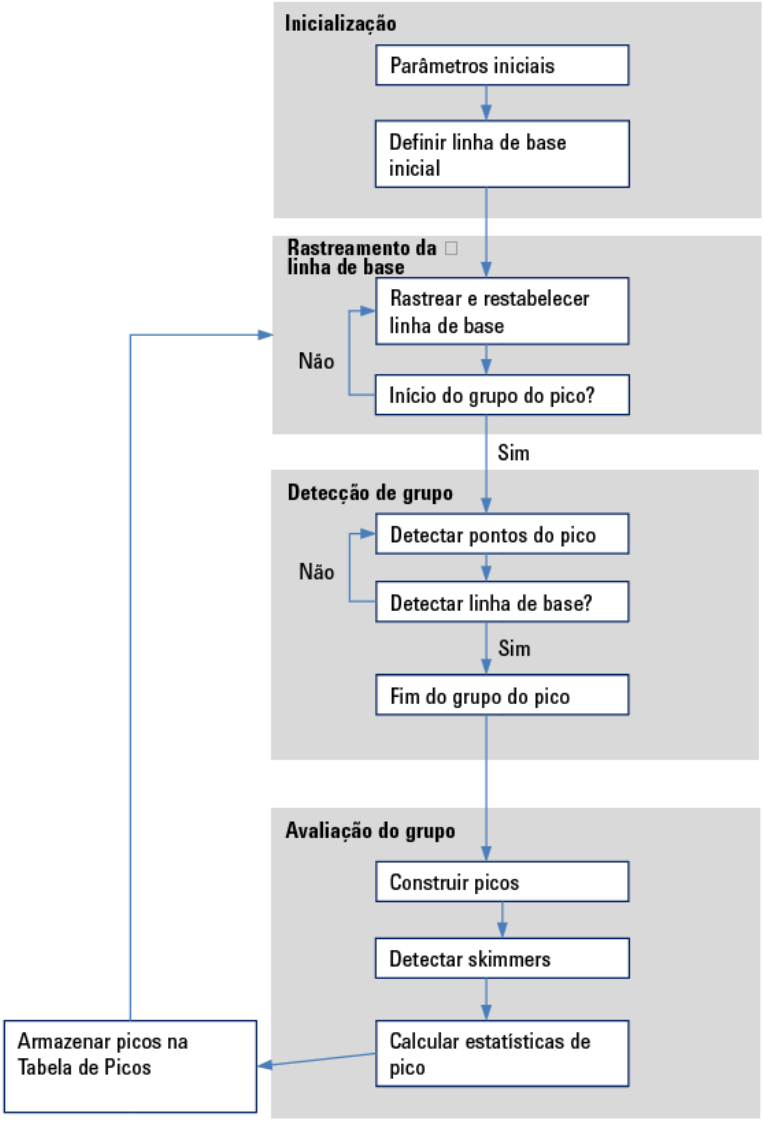



Figura 3 Diagrama do fluxo do integrador

# Reconhecimento do pico

O integrador utiliza várias ferramentas para reconhecer e caracterizar um pico:


- "Largura do pico" na página 22
- "Filtros de reconhecimento do pico" na página 23
- "Agrupamento" na página 24
- "O algoritmo de reconhecimento do pico" na página 25
- "Picos unidos" na página 26
- "Ombros" na página 27
- "Construção da linha de base padrão" na página 28
- "Códigos da linha de base" na página 29

# Largura do pico

Durante a integração, a largura do pico é calculada a partir da área e altura do pico ajustadas:

*Largura = área ajustada/altura ajustada*

ou se os pontos de inflexão estiverem disponíveis a partir da largura entre os pontos de inflexão.

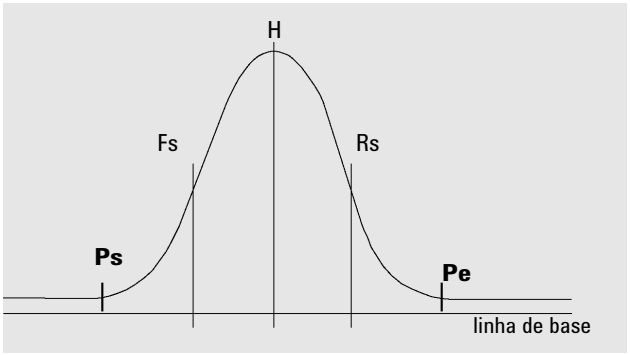



**Figura 4 Cálculo da largura do pico**

Na figura acima, a área total A, é a soma das áreas do início do pico (Ps) até o final do pico (Pe), ajustado para a linha de base. Fs é o slope frontal no ponto de inflexão, Rs é o slope traseiro no ponto de inflexão.

A largura do pico controla a habilidade do integrador para distinguir picos de ruídos da linha de base. Para obter um bom desempenho, a largura do pico deve ser definida próxima à largura do pico cromatográfico atual.

Existem três formas da largura do pico ser alterada:

- antes do processo de integração, é possível especificar a largura inicial do pico;
- durante o processo de integração, o integrador atualiza automaticamente a largura do pico como necessário para manter uma boa correspondência com os filtros de reconhecimento do pico;
- durante o processo de integração, é possível redefinir ou modificar a largura do pico utilizando um evento de tempo programado.

# Filtros de reconhecimento do pico

O integrador tem três filtros de reconhecimento do pico que utiliza para reconhecer os picos detectando alterações no slope e na curvatura dentro de um conjunto de pontos de dados contíguos. Estes filtros contêm o primeiro derivado (para medir o slope) e o segundo derivado (para medir a curvatura) dos pontos de dados a serem examinados pelo integrador.

**NOTA**

Para proporcionar resultados confiáveis, o pico deve conter, pelo menos, dez pontos de dados.

Os filtros de reconhecimento são:

**Filtro 1** Slope (curvatura) de dois (três) pontos de dados contíguos

**Filtro 2** Slope de quatro pontos de dados contíguos e curvatura de três pontos de dados não contíguos

**Filtro 3** Slope de oito pontos de dados contíguos e curvatura de três pontos de dados não contíguos

O filtro atual utilizado é determinado pela configuração da largura do pico. Por exemplo, no início de uma análise, o Filtro 1 pode ser utilizado. Se a largura do pico aumentar durante a análise, o filtro é alterado primeiro para o Filtro 2 e, em seguida, para o filtro 3. Para obter um bom desempenho nos filtros de reconhecimento, a largura do pico deve ser definida próxima à largura do pico cromatográfico atual. Durante a execução, o integrador atualiza a largura do pico como necessário para otimizar a integração.

O integrador calcula a largura atualizada do pico de formas diferentes, dependendo da técnica do instrumento.

Para dados LC, o cálculo padrão da largura do pico utiliza um cálculo composto:

0,3 * (Ponto de inflexão direito - Ponto de inflexão esquerdo) + 0,7 * Área/Altura

Para dados GC, o cálculo padrão da largura do pico utiliza área/altura. Este cálculo não superestima a largura quando estão unidos acima do ponto de altura média.

Em certos tipos de análises, por exemplo, análises isotérmicas GC e isocráticas LC, os picos tornam-se significativamente mais amplos durante o progresso da análise. Para compensar isso, o integrador atualiza automaticamente a largura do pico enquanto o pico é ampliado durante uma análise. Ele faz isso automaticamente a menos que a atualização tenha sido desativada com o evento de tempo da largura de pico fixa.

A atualização da largura do pico é medida da seguinte forma:

0,75 * (largura do pico existente) + 0,25 * (largura do pico atual)

## Agrupamento

O agrupamento é meio pelo qual o integrador mantém picos ampliados dentro do intervalo eficaz dos filtros de reconhecimento do pico de forma a manter uma boa seletividade.

O integrador não pode continuar a aumentar a largura do pico indefinidamente para picos ampliados. Eventualmente, os picos tornar-se-iam tão amplos que eles não poderiam ser vistos pelos filtros de reconhecimento do pico. Para superar esta limitação, o integrador agrupa os pontos de dados, estreitando o pico de forma eficaz enquanto mantém a mesma área.

Quando os dados são agrupados, os pontos de dados são agrupados em dois, elevados para o poder de agrupamento, por exemplo, não agrupado = 1x, agrupado uma vez = 2x, agrupado duas vezes = 4x etc.

O agrupamento é baseado no intervalo de dados e na largura do pico.
O integrador utiliza esses parâmetros para definir o fator de agrupamento para dar o número apropriado de pontos de dados (consulte Tabela 1 na página 24).

O agrupamento é efetuado de dois em dois baseado na largura do pico esperada ou experimentada. O algoritmo de agrupamento está resumido em Tabela 1 na página 24.

**Tabela 1 Critério de agrupamento**

| Largura de pico esperada | Filtro(s) utilizado(s) | Agrupamento realizado |
|---|---|---|
| 0 - 10 pontos de dados | Primeiro | Nenhum |
| 8 - 16 pontos de dados | Segundo | Nenhum |
| 12 - 24 pontos de dados | Terceiro | Nenhum |
| 16 - 32 pontos de dados | Segundo | Uma vez |
| 24 - 48 pontos de dados | Terceiro | Uma vez |
| 32 - 96 pontos de dados | Terceiro, segundo | Duas vezes |
| 64 - 192 pontos de dados | Terceiro, segundo | Três vezes |

# O algoritmo de reconhecimento do pico

O integrador identifica o início do pico com um ponto de linha de base determinado pelo algoritmo de reconhecimento do pico. O algoritmo de reconhecimento do pico primeiro compara as saídas do s filtros de reconhecimento do pico com o valor do slope sensitivity inicial, para aumentar ou diminuir o slope de subida. O integrador declara que o ponto no qual o valor do acumulador de slope de subida é ≥15 indica que um pico começou.

## Início do pico

Em Tabela 2 na página 25 a largura esperada do pico determina que valores da curvatura e slope do filtro são comparados com o Slope sensitivity. Por exemplo, quando a largura esperada do pico é pequena, os números do Filtro 1 são adicionados ao acumulador de slope de subida. Se a largura esperada do pico aumentar, então os números para o Filtro 2, e eventualmente para o Filtro 3, são utilizados.

Quando o valor do acumulador de slope de subida é ≥15, o algoritmo reconhece que um pico pode estar iniciando.

**Tabela 2 Valores adicionais para o acumulador de movimento ascendente**

| Filtro derivado 1 - 3 saídas contra o slope sensitivity | Filtro 1 | Filtro 2 | Filtro 3 |
|---|---|---|---|
| Slope > Slope sensitivity | +8 | +5 | +3 |
| Curvatura > Slope sensitivity | +0 | +2 | +1 |
| Slope < (-) Slope sensitivity | -8 | -5 | -3 |
| Slope < \|Slope Sensitivity\| | -4 | -2 | -1 |
| Curvatura < (-) Slope sensitivity | -0 | -2 | -1 |

## Final do pico

Em Tabela 3 na página 26 a largura esperada do pico determina que valores da curvatura e slope do filtro são comparados com o Slope sensitivity. Por exemplo, quando a largura do pico esperada é pequena, os números do Filtro 1 são adicionados ao acumulador de slope de descida. Se a largura esperada do pico aumentar, então os números para o Filtro 2, e eventualmente para o Filtro 3, são utilizados.

Quando o valor do acumulador de descida de slope é ≥15, o algoritmo reconhece que um pico pode estar terminando.

**Tabela 3 Valores adicionais para o acumulador de movimento de slope de descida**

| Filtro derivado 1 - 3 saídas contra o slope sensitivity | Filtro 1 | Filtro 2 | Filtro 3 |
|---|---|---|---|
| Slope < (-) Slope sensitivity | +8 | +5 | +3 |
| Curvatura < (-) Slope sensitivity | +0 | +2 | +1 |
| Slope > Slope sensitivity | -11 | -7 | -4 |
| Slope > \|Slope Sensitivity\| | -28 | -18 | -11 |
| Curvatura > Slope sensitivity | -0 | -2 | -1 |

### O algoritmo do ápice do pico

O ápice do pico é reconhecido pelo ponto mais alto no cromatograma construindo um ajuste parabólico que passa pelos pontos de dados mais altos.

## Picos unidos

Os picos unidos acontecem quando um novo pico começa antes do final do pico ser encontrado. A figura ilustra como o integrador lida com picos unidos.

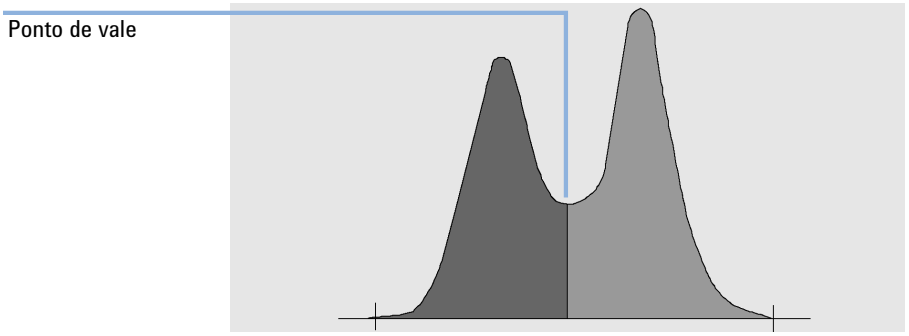



**Figura 5 Picos unidos**

O integrador processa os picos unidos da seguinte forma:

1. ele soma a área do primeiro pico até o ponto do vale.
2. no ponto do vale, a somatória do primeiro pico termina e a somatória para o segundo pico é iniciada.
3. quando o integrador localiza o final do segundo pico, a somatória da área para. Este processo pode ser visualizado ao separar os picos unidos traçando uma perpendicular a partir do ponto do vale entre os dois picos.

# Ombros

Os ombros são picos não resolvidos na extremidade frontal ou traseira de um pico maior. Quando um ombro está presente, não existe nenhum vale verdadeiro no sentido de slope negativo seguido de slope positivo. Um pico pode ter vários ombros frontais e/ou traseiros.

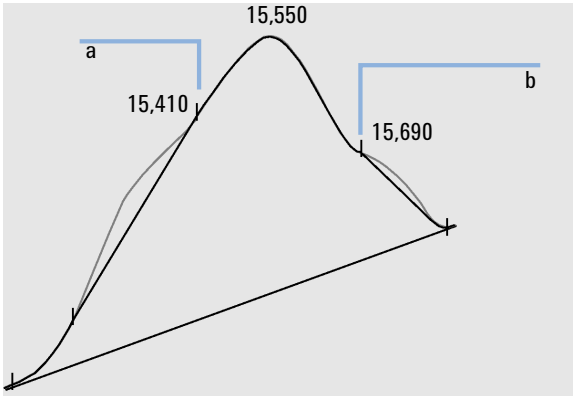



**Figura 6 Ombros do pico**

Os ombros são detectados a partir da curvatura do pico como dado pela segundo derivada. Quando a curvatura vai a zero, o integrador identifica um ponto de inflexão, tais como pontos a e b em Figura 6 na página 27.

- Um potencial ombro frontal existe quando um segundo ponto de inflexão é detectado antes do ápice do pico. Se um ombro for confirmado, o início do ponto do ombro é definido no ponto máximo de curvatura positiva da inflexão.
- Um potencial ombro traseiro existe quando um segundo ponto de inflexão é detectado antes do final do pico ou do vale. Se um ombro for confirmado, o início do ponto do ombro é definido no ponto mínimo de inclinação após o ápice do pico.

O tempo de retenção é determinado a partir do ponto do ombro de máxima curvatura. Com um evento de integração programado, o integrador pode também calcular as áreas do ombro como picos normais com linhas de queda nos pontos do pico do ombro de inflexão.

A área do ombro é subtraída do pico principal.

Os ombros do pico podem ser tratados como picos normais pela utilização de um evento de tempo do integrador.

## Construção da linha de base padrão

Após qualquer pico cluster estar completo e a linha de base ser encontrada, o integrador solicita o algoritmo de alocação da linha de base para alocar a linha de base utilizando a técnica "pegs-and-thread". Ela utiliza as correções da área trapezoidal e altura proporcional para normalizar e manter a linha de base o mais baixo possível. As entradas para o algoritmo de alocação da linha de base também incluem os parâmetros do método e dos arquivos de dados que identificam o detector e o aplicativo que o integrador utiliza para otimizar o seu cálculo.

No caso mais simples, o integrador constrói a linha de base como uma série de segmentos de linha reta entre:

- o início da linha de base,
- início do pico, vale, pontos finais,
- a linha de base do pico.

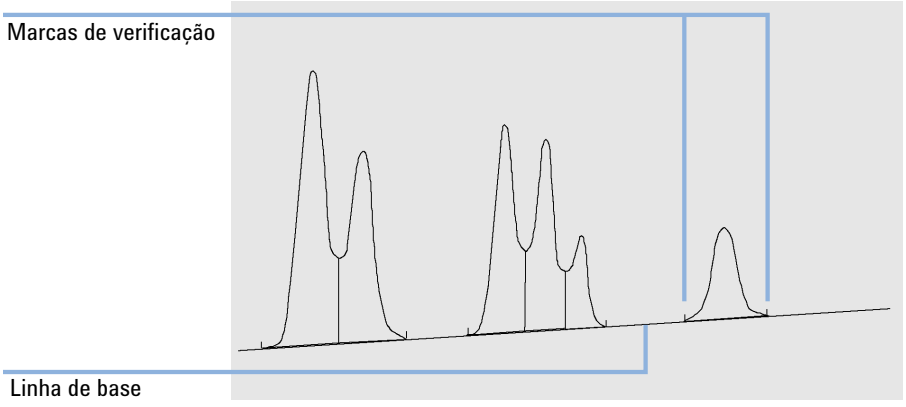



**Figura 7 Construção da linha de base padrão**

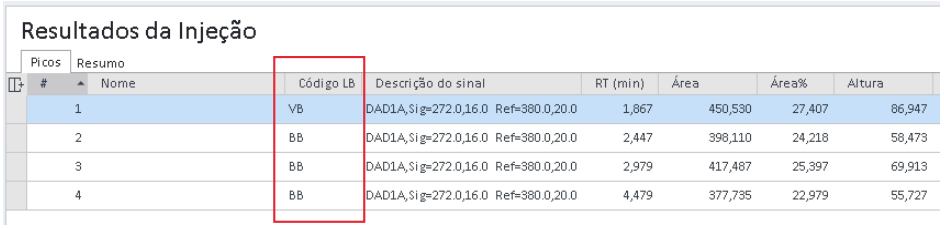
# Códigos da linha de base

Nos resultados de integração de um relatório, a cada pico é atribuído um código de dois, três ou quatro caracteres que descreve como a linha de base do sinal foi desenhada.

**Tabela 4 Código de quatro caracteres**

| Primeiro caractere | Segundo caractere | Terceiro caractere | Quarto caractere |
|---|---|---|---|
| Linha de base no início | Linha de base no fim | Indicador de erro/pico | Tipo de pico |

Os códigos da linha de base estão incluídos na tabela **Resultados de Injeção** e em todos os modelos de relatório padrão.



Resultados da Injeção

Picos | Resumo

| # | Nome | Código LB | Descrição do sinal | RT (min) | Área | Área% | Altura |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | VB | DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0 | 1,867 | 450,530 | 27,407 | 86,947 |
| 2 | | BB | DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0 | 2,447 | 398,110 | 24,218 | 58,473 |
| 3 | | BB | DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0 | 2,979 | 417,487 | 25,397 | 69,913 |
| 4 | | BB | DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0 | 4,479 | 377,735 | 22,979 | 55,727 |

**Figura 8 Resultados da injeção**

**Sinal:** DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0

| RT [min] | Tipo | Largura [min] | Área | Altura | Área% |
|---|---|---|---|---|---|
| 1,867 | VB | 0,56 | 450,53 | 86,95 | 27,41 |
| 2,447 | BB | 0,50 | 398,11 | 58,47 | 24,22 |
| 2,979 | BB | 0,68 | 417,49 | 69,91 | 25,40 |
| 4,479 | BB | 0,47 | 377,73 | 55,73 | 22,98 |
| | | Soma | 1643,86 | | |

**Figura 9 Exemplo: Tabela do relatório resumido de área**

### Caracteres 1 e 2

O primeiro caractere descreve a linha de base no início do pico e o segundo caractere descreve a linha de base no fim do pico.

**B** O pico começou ou parou na linha de base.

**P** O pico começou ou parou enquanto a linha de base estava penetrada.

**V** O pico começou ou parou com uma queda de linha de base no vale.

**H** O pico começou ou parou em uma linha de base horizontal forçada.

**F** O pico começou ou parou em um ponto forçado.

**M** O pico foi integrado manualmente.

**U** A atribuição do pico foi desfeita.

Sinais adicionais podem também ser anexados (em ordem de precedência).

### Caractere 3

O terceiro caractere descreve um indicador de erro ou pico:

**A** A integração foi interrompida. Por exemplo, devido aos eventos de integração LIGAR/DESLIGAR ou devido ao fim do tempo de corrida do sinal.

**D** O pico estava distorcido (forma do pico incorreta).

**Espaço em branco** O pico é um pico normal.

### Caractere 4

O quarto caractere descreve o tipo de pico. É mostrado apenas em associação a eventos de integração forçados ou se a integração manual tiver sido acionada. Por exemplo, você usa um evento de integração para definir um pico do solvente ou usa a integração manual para corrigir a linha de base ou excluir um pico.

| | |
|---|---|
| **S** | O pico é um pico do solvente. |
| **N** | O pico é um pico negativo. |
| **+** | O pico é um pico de somatória de área. |
| **T** | Pico tangente skim (skim padrão). |
| **X** | Pico tangente skim (modo skim exponencial antigo). |
| **E** | Pico tangente skim (modo skim exponencial novo). |
| **m** | Pico definido pela linha de base manual. |
| **n** | Pico negativo definido pela linha de base manual. |
| **t** | Pico tangente skim definido pela linha de base manual. |
| **x** | Pico tangente skim (skim exponencial) definido pela linha de base manual. |
| **R** | O pico é um pico recalculado. |
| **f** | Pico definido por uma tangente de ombro frontal. |
| **b** | Pico definido por uma tangente de ombro traseiro. |
| **F** | Pico definido por uma queda de linha de ombro frontal. |
| **B** | Pico definido por uma queda de linha de ombro traseiro. |
| **U** | O pico não foi atribuído. |

# Medição da área do pico

A etapa final da integração do pico determina a área final do pico.

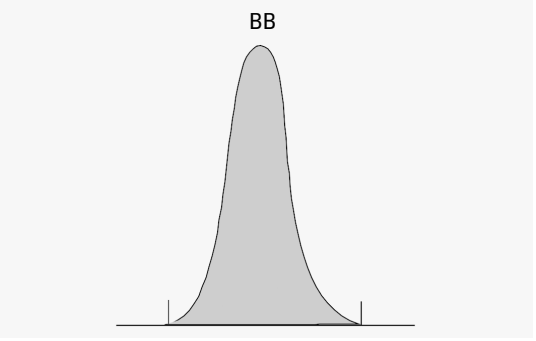



**Figura 10 A medição da área para picos de linha de base para linha de base**

No caso de um pico simples e isolado, a área do pico é determinada pela área acumulada acima da linha de base entre o começo e o fim do pico.

## Determinação da área

A área que o integrador calcula durante a integração é determinada como se segue:

- para os picos de linha de base para linha de base (BB), a área acima da linha de base entre o início e o fim do pico e, como na Figura 10 na página 32;
- para picos vale para vale (VV), a área acima da linha de base, segmentada com linhas de queda verticais a partir dos pontos do vale, como em Figura 11 na página 33;

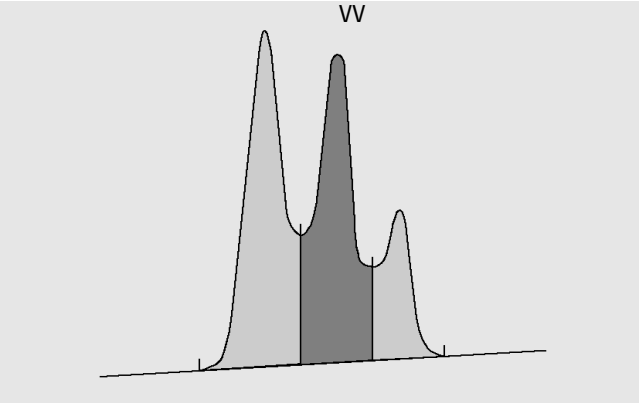



**Figura 11 Medição da área para picos de vale para vale**

- para picos tangentes (T), a área acima da linha de base redefinida;
- para picos do solvente (S), a área acima da extensão horizontal a partir do ponto da linha de base encontrada por último e abaixo da linha de base de redefinição dada aos picos tangentes (T). Um pico do solvente pode aumentar muito devagar para ser reconhecido ou pode haver um grupo de picos na execução que você acha que deve ser tratado como um solvente com um conjunto de riders. Isto geralmente envolve um grupo de picos unido onde o primeiro é muito maior que os outros. O tratamento simples de queda de linha de base iria exagerar os picos posteriores porque eles estão na verdade na cauda do primeiro. Ao forçar o primeiro pico a ser reconhecido como um solvente, o resto do grupo é retirado da cauda;

- picos negativos que ocorrem abaixo da linha de base têm uma área positiva, como mostrado em Figura 12 na página 34.

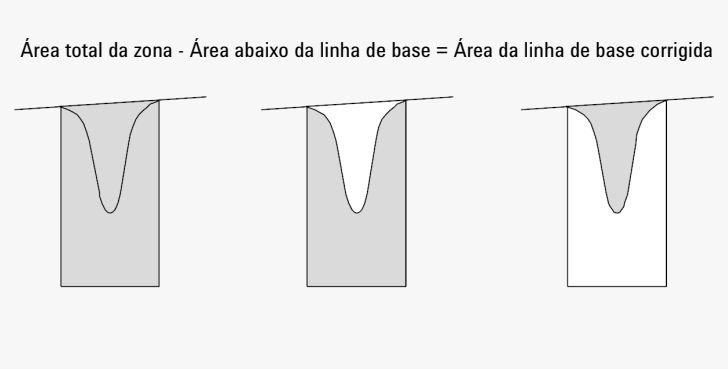



**Figura 12 Medição da área para picos negativos**

## Unidades e fatores de conversão

Externamente, os dados contêm um conjunto de pontos de dados, eles podem ser dados amostrados ou integrados. No caso de dados integrados, casa ponto de dados corresponde a uma área que é expressa por *Altura × Tempo*. No caso de dados amostrados, cada ponto de dados corresponde a uma altura.

Portanto, no caso de dados integrados, a altura é uma grandeza calculada, obtida dividindo a área pelo tempo decorrido desde o ponto de dados anterior. No caso de dados amostrados, a área é calculada multiplicando os dados pelo tempo decorrido desde o ponto de dados anterior.

O cálculo de integração faz uso de ambas as grandezas. As unidades tratadas internamente no integrador são: *resposta do detector × segundos* para a área e **resposta do detector** como altura. Isto é feito para fornecer uma base comum para o truncamento inteiro quando necessário. As medições de tempo, área e altura são relatadas em unidades físicas reais, independentemente de como elas são medidas, calculadas e armazenadas no software.

# Alocação da linha de base

## Modos de correção da linha de base

Vários modos de correção da linha de base estão disponíveis em OpenLab CDS. Eles são descritos nas seções a seguir.

### Modo de correção da linha de base: Clássico

Uma penetração ocorre quando o sinal cai abaixo da linha de base construída (ponto a em Figura 13 na página 35).

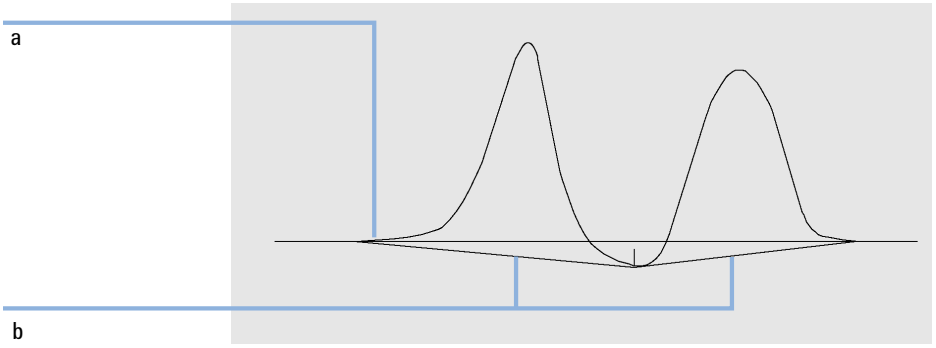


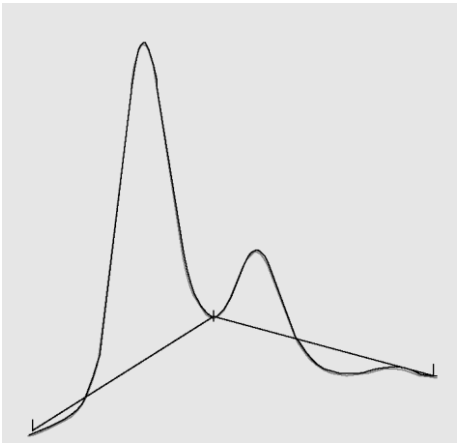

**Figura 13 Penetração da linha de base**

Se ocorrer uma penetração de linha de base, aquela parte da linha de base pode ser reconstruída, como mostrada pelos pontos b em Figura 13 na página 35. É possível utilizar os seguintes modos de correção para remover todas as penetrações da linha de base:

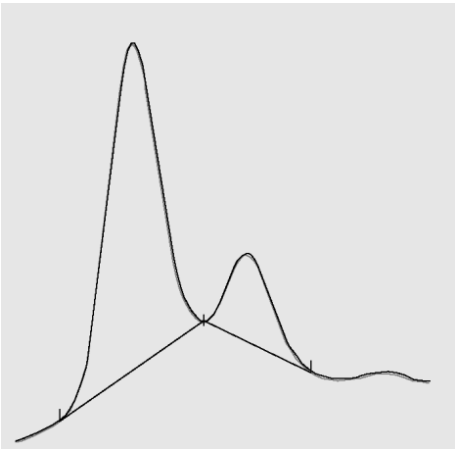
- **Sem penetração**
- **Avançado**

### Modo de correção da linha de base: Sem penetração

Quando esta opção é selecionada, cada grupo do pico é procurado para as penetrações da linha de base. Se as penetrações forem encontradas, os pontos inicial e/ou final do pico são alterados até que não exista nenhuma penetração.



Modo de correção da linha de base **Clássico**



Modo de correção da linha de base **Sem penetração**

NOTA

O modo de correção da linha de base **Sem penetração** não está disponível para picos de solventes, com seus picos menores e ombros.

### Modo de correção da linha de base: Avançado

No modo de correção da linha de base, o integrador tenta aperfeiçoar o início e o final de um pico, restabelecendo a linha de base para um grupo de picos e remove a penetração de linha de base (consulte "Modo de correção da linha de base: Sem penetração" na página 36). Em vários casos, a correção de linha de base avançada oferece uma linha de base mais estável, que é menos dependente do slope sensitivity.

## Razão pico-vale

A razão pico-vale é uma medida de qualidade, indicando quão bem o pico está separado de outros picos de substância. Este parâmetro especificado pelo usuário é um componente do modo avançado de rastreamento da linha de base. É usado para decidir se dois picos que não apresentam separação da linha de base são separados usando uma queda de linha ou uma linha de base no vale. O integrador calcula a razão entre a altura corrigida pela linha de base do pico secundário e a altura corrigida pela linha de base do vale. Quando a razão pico vale é menor que o valor especificado, uma linha de queda é usada, caso contrário, uma linha de base é desenhada a partir da linha de base do início do primeiro pico até o vale e a partir do vale até a linha de base no final do segundo pico (compare "Modo de correção da linha de base: Sem penetração" na página 36 com Figura 14 na página 37).

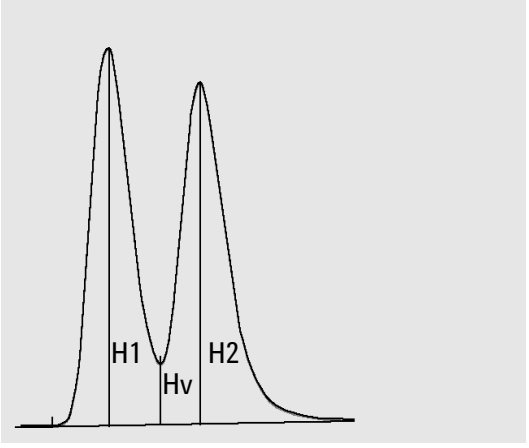



**Figura 14 Razão pico vale**

A razão pico-vale é calculada usando as seguintes equações;

*H1≥H2, Razão pico vale = H2/Hv*

e

*H1 < H2, Razão pico vale= H1/Hv*

Figura 15 na página 38 exibe como o valor especificado pelo usuário da razão pico vale afeta as linhas de base.

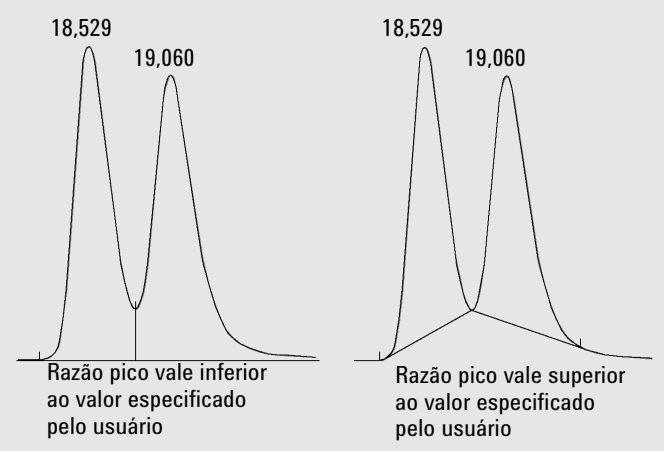



**Figura 15 Efeito da razão pico vale nas linhas de base**

## Tangente Skim

A tangente skim é uma forma de linha de base construída para picos encontrados na zona ascendente ou descendente de um pico. O pré-requisito é que os dois picos não estejam separados pela linha de base.

As figuras a seguir ilustram o princípio do tangente skim:

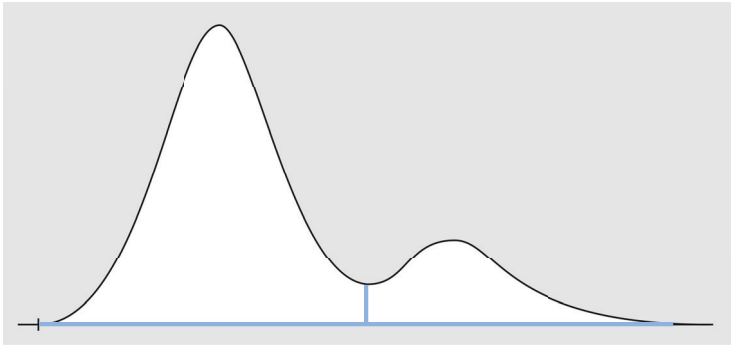


**Figura 16 Picos sem skim, separados por uma queda de linha**

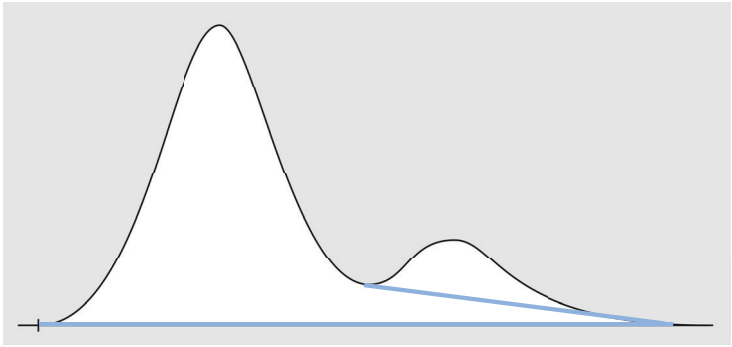


**Figura 17 Skimming de cauda**

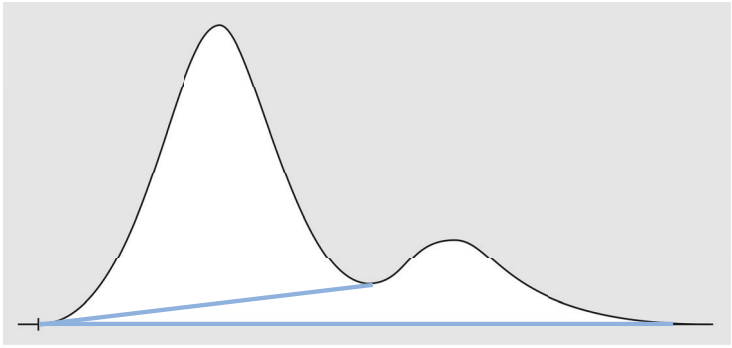


**Figura 18 Skimming frontal**

## Critério de skim

O seguinte critério determina se uma linha skim é utilizada para calcular a área de um pico secundário eluindo na extremidade frontal ou traseira de um pico principal:

- Razão altura skim (**Razão skim altura frente** ou **Razão skim altura cauda**)
- **Razão skim/vale**

A *razão skim altura* é a razão da altura corrigida pela linha de base de um pico principal (Hp na figura abaixo) para a altura corrigida pela linha de base de um pico secundário (Hc). Para fazer o skim do pico secundário, utilize um valor mais baixo que esta razão. Para desabilitar o skim exponencial ao longo da execução, é possível definir este parâmetro para um valor alto ou para zero.

A *razão skim/vale* é a razão da altura do pico secundário acima da linha de base (Hc na figura abaixo) à altura do vale acima da linha de base (Hv). Para fazer o skim do pico secundário, utilize um valor maior que esta razão.

**NOTA**

Se um desses critérios não for cumprido para um conjunto de picos secundários na cauda do pico principal, todos os picos secundários após o último pico secundário que cumpriu ambos os critérios não recebem mais skim, mas utilizam uma queda de linha de base

**NOTA**

Este critério não é utilizado se um evento de tempo para um exponencial estiver ativo ou se um pico principal for um pico secundário. O código da linha de base entre o pico principal e o pico secundário deve ser de tipo **Vale** (consulte"Códigos da linha de base" na página 29).

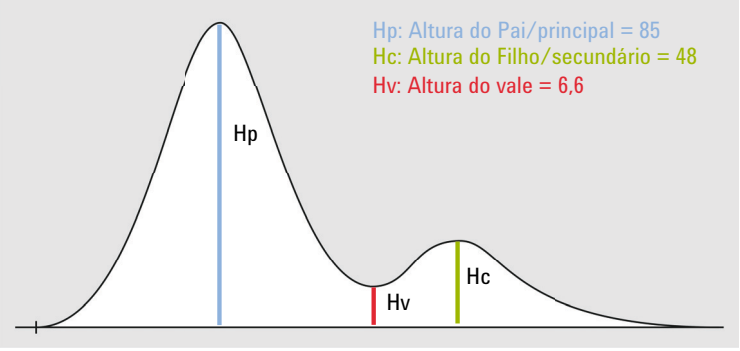



**Figura 19 Exemplo para calcular os valores de critério do skim**

Razão skim/altura = Hp/Hc

Razão skim/vale = Hc/Hv

onde

| | |
|---|---|
| Hp | Altura corrigida pela linha de base do pico principal |
| Hv | Altura do vale acima da linha de base |
| Hc | Altura corrigida pela linha de base do pico secundário |

**Skimming de cauda**

Para utilizar o skimming de cauda, você deve definir os parâmetros da seguinte forma:

- Razão skim altura na cauda = 85 / 48 = 1,77

  Nos eventos de integração, utilize um valor < 1,77.
- Razão skim/vale = 48 / 6,6 = 7,3

  Nos eventos de integração, utilize um valor > 7,3.

**Skimming frontal**

Com o skimming frontal, o primeiro pico é o pico secundário e o segundo é o pico principal. Dessa forma, para utilizar o skimming frontal, você deve definir os parâmetros da seguinte forma:

- Razão de altura skim cauda = 48 / 85 = 0,56

  Nos eventos de integração, utilize um valor < 0,56.
- Razão skim/vale = 85 / 6,6 = 12,9

  Nos eventos de integração, utilize um valor > 12,9.

# Modos tangente skim

Quando o tangente skim é habilitado, estão disponíveis quatro modelos para calcular áreas do pico adequadas:

- Curva exponencial
- Novo skim exponencial
- Skim de linha reta
- Cálculos combinados de linha exponencial e reta para melhor se adequar (skims padrão)

## Curva exponencial

O modelo skim desenha uma curva utilizando um exponencial através do início e final de um pico secundário. A curva passa embaixo de cada pico secundário que siga o pico principal; a área embaixo da curva skim é subtraída do pico secundário e adicionada ao pico principal.

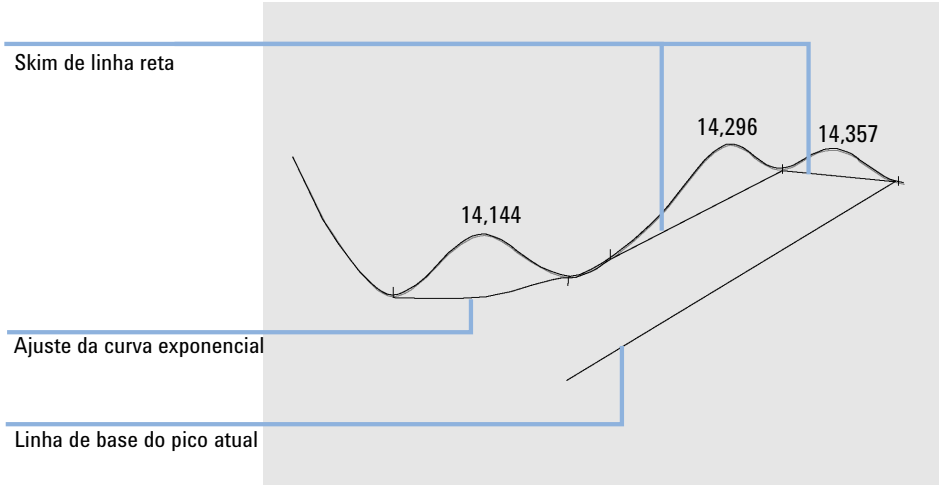



**Figura 20 Skim exponencial**

## Nova curva exponencial

O modelo skim desenha uma curva utilizando uma equação exponencial para aproximar a extremidade frontal ou traseira do pico principal. A curva passa embaixo de um ou mais picos que sigam o pico principal (picos menores). A área embaixo da curva skim é subtraída dos picos menores e adicionada ao pico principal. É possível fazer skim em mais de um pico secundário utilizando o mesmo modelo exponencial; todos os picos após o primeiro pico secundário são separados pelas quedas de linhas de base, começando no final do primeiro pico secundário, e são deixados apenas na curva de skim.

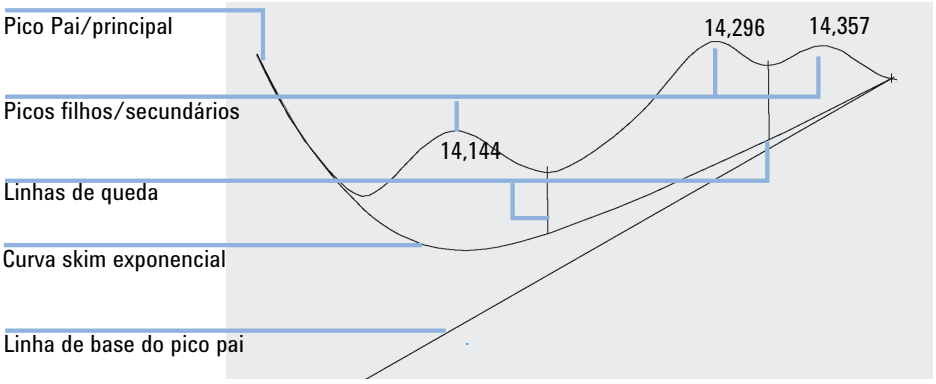



**Figura 21 Novo skim exponencial**

### Skim de linha reta

O modelo skim desenha uma linha reta pelo início e final de um pico secundário. A altura do início do pico secundário é corrigida para o slope do pico principal. A área embaixo da linha reta é subtraída dos picos menores e adicionada ao pico principal.

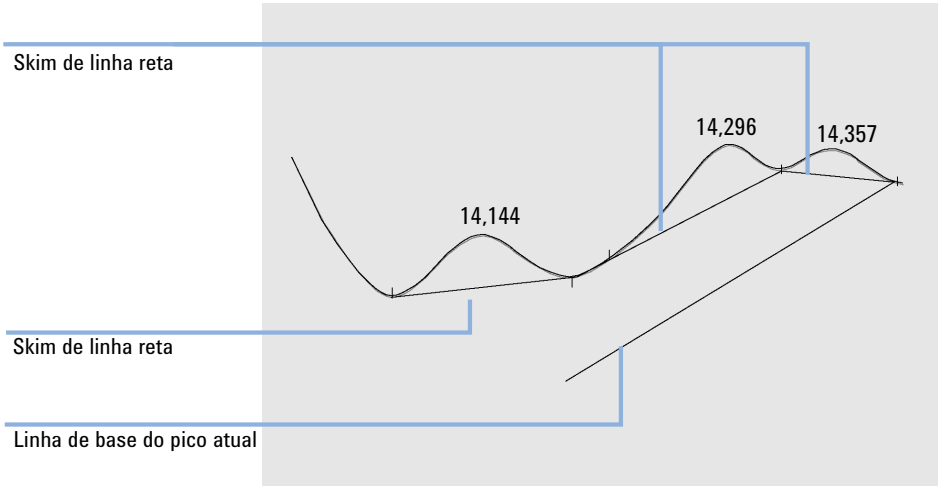



**Figura 22 Skim de linha reta**

### Skims padrão

O método padrão é uma combinação dos cálculos da linha exponencial e reta para melhor se adequar.

A troca de um cálculo exponencial para um cálculo linear é executado de forma a eliminar descontinuidades bruscas de alturas ou áreas.

- Quando o sinal estiver bem acima da linha de base, o cálculo de ajuste da cauda é exponencial.
- Quando o sinal estiver dentro do envelope de linha de base, o cálculo de ajuste e cauda é uma linha reta.

Os cálculos de combinação são relatados como tangente skim exponencial ou reto.

## Cálculo da curva exponencial para skims

A seguinte equação é utilizada para calcular um skim exponencial:

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

onde

| | |
|---|---|
| Hb | Altura do skim exponencial no tempo $t_R$ |
| $H_0$ | Altura (acima da linha de base) do início de um skim exponencial |
| B | Fator de decaimento da função exponencial |
| $t_0$ | Tempo correspondente ao início de um skim exponencial |
| $t_R$ | Tempo de retenção |
| A | Inclinação da linha de base de um pico pai |
| C | Offset da linha de base de um pico pai |

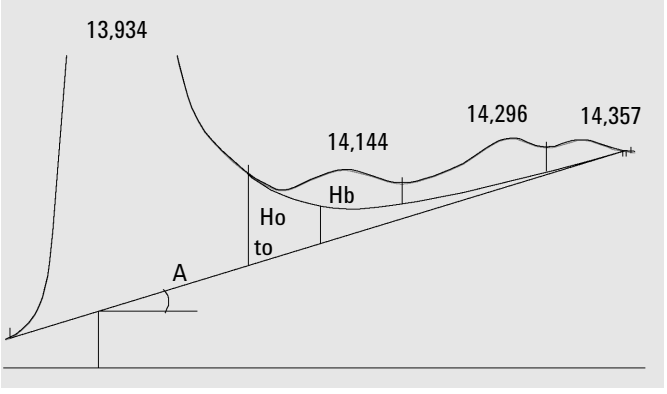



**Figura 23 Valores utilizados para calcular um skim exponencial**

# Eventos de Integração

Os eventos de integração disponíveis são divididos nos grupos a seguir:

- Os eventos de integração iniciais são aqueles que se aplicam no início da integração. É possível encontrá-los como valores padrão no nó **Padrão** da seção **Eventos de Integração** no método de processamento. Estes eventos não podem ser excluídos, mas você pode alterar os valores.
- Os eventos de tempo acontecem após o início da integração. Os eventos de tempo podem alterar o valor de um evento inicial ou podem ativar ou desativar parâmetros de integração adicionais. Eles podem ser adicionados no nó **Padrão** da seção **Eventos de Integração** no método de processamento.
- Os eventos de integração que sempre se aplicam a todos os sinais podem ser configurados no nó **Avançado** da seção **Eventos de integração**.

## Eventos de integração padrão: Eventos iniciais

**Slope sensitivity**

Define o valor da inclinação do sinal que é usado para identificar os pontos inicial e final de um pico durante a integração.

Você pode definir os valores especificamente para um determinado sinal ou globalmente para todos os sinais.

Quando a inclinação do sinal excede o valor de **Slope Sensitivity**, um ponto inicial do pico é estabelecido; quando a inclinação do sinal diminui abaixo do valor de **Slope Sensitivity**, um ponto final do pico é estabelecido.

**Largura do pico**

Controla a seletividade do integrador para distinguir picos de ruídos da linha de base. Você especifica a largura do pico em unidades de tempo que correspondem à largura do pico a meia altura do primeiro pico esperado (excluindo o pico de solvente).

O integrador atualiza a largura do pico quando necessário durante a execução para otimizar a integração:

Os ruídos podem ser interpretados como picos se a largura inicial do pico for muito baixa. Se picos amplos e estreitos estiverem misturados, você pode decidir utilizar eventos de tempo de execução programados para ajustar a largura do pico de determinados picos. Por vezes os picos tornam-se significativamente mais amplos durante o progresso da análise, por exemplo, em análises isotérmicas GC e isocráticas LC. Para compensar isso, o integrador atualiza automaticamente a largura do pico enquanto o pico é ampliado durante uma análise, a menos que seja desabilitado com um evento de tempo.

A atualização da largura do pico é medida da seguinte forma:

*0,75 × (largura do pico existente) + 0,25 × (largura do pico atual)*

**Rejeição por área**

Define a área do menor pico de interesse.

Quaisquer picos que tiverem áreas menores que a área mínima não são relatados: O integrador rejeita quaisquer picos que sejam menores que o valor da **Rejeição por área** depois da correção de linha de base. O valor da **Rejeição por área** deve ser maior ou igual a zero.

NOTA

A **Rejeição por área** é ignorada durante a integração manual.

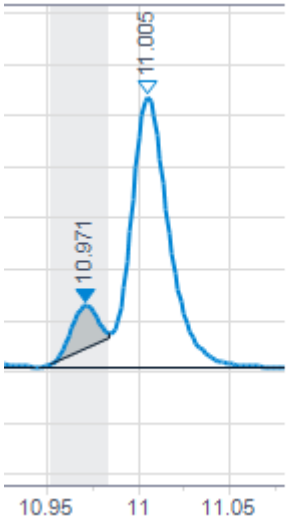
**Rejeição de área%**

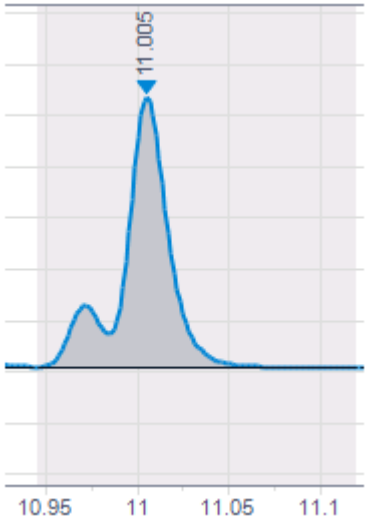
Define a área% do menor pico de interesse.

Quaisquer picos que tiverem áreas% menores que a área% mínima não são relatados. O integrador rejeita quaisquer picos com uma área% menor do que o valor informado após a correção de linha de base.

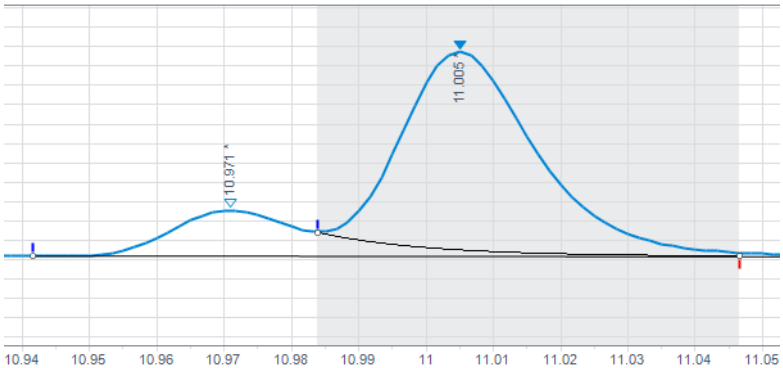
Insira a área% do menor pico esperado. Você pode obter essas informações ao integrar primeiramente o arquivo de dados com a área e a rejeição por altura definida para 0 (zero). Use a coluna **Área%** nos resultados de integração para selecionar um valor mínimo adequado.

Se um pico que não estiver integrado devido a uma baixa de área% for um pico tangente, ele será unido ao pico principal.



Se o pico principal for inferior ao threshold de área%, mas o pico tangente estiver acima do threshold, o pico principal é mantido, uma vez que o cálculo do pico tangente e a construção de linha de base seriam baseados em um pico excluído.




**Rejeição por altura**

Define a altura do menor pico de interesse.

Quaisquer picos que tenham alturas menores que a altura mínima não serão relatados: O integrador rejeita quaisquer picos que sejam menores que o valor de **Rejeição por altura** após a correção de linha de base.

NOTA

A **Rejeição por altura** é ignorada durante a integração manual.

**Modo de ombros**

Define o método inicial de detectar ombros nos picos.

Você pode optar por:

| | |
|---|---|
| **Desligado** | Os ombros não são detectados. |
| **Linha de base de queda** | Os ombros são integrados com uma queda de linha. |
| **Linha de base tangente** | Os ombros são integrados com uma linha de base tangente. |

Esta configuração define como a aplicação lida com os picos que não são separados pela linha de base. Para obter mais informações sobre "tangente skim", consulte "Tangente Skim" na página 38. Se utilizar uma linha de base tangente, é possível escolher entre modos diferentes (consulte "Modos tangente skim" na página 42).

### Escolher a largura do pico

Escolha a configuração que forneça filtragem suficiente para prevenir que ruídos sejam confundidos com picos sem distorcer as informações no sinal.

- Para escolher uma largura inicial do pico apropriada para um pico único de interesse, utilize a largura do tempo do pico como a base como referência.
- Para escolher uma largura inicial do pico adequada quando existem vários picos de interesse, defina a largura inicial do pico para um valor igual ou menor que a largura do pico mais estreito para obter uma seletividade ideal do pico.

### Rejeição por altura e largura do pico

A **largura do pico** e a **rejeição por altura** são muito importantes no processo de integração. Você pode alcançar diferentes resultados alterando esses valores.

- Aumente a rejeição por altura e a largura do pico onde componentes relativamente dominantes devem ser detectados e quantificados em um ambiente de alto ruído. Uma largura do pico aumentada melhora a filtragem de ruído e uma rejeição por altura aumentada garante que ruídos aleatórios sejam ignorados.
- Diminua a rejeição por altura e a largura do pico para detectar e quantificar componentes de rastreamento, aqueles cujas alturas se aproximam do ruído em si. A diminuição da largura do pico diminui a filtragem do sinal enquanto a diminuição da rejeição por altura garante que os picos pequenos não sejam rejeitados por não terem altura suficiente.
- Quando uma análise contém picos com várias larguras, ajuste a largura do pico para os picos mais estreitos e reduza a rejeição por altura para garantir que os picos mais amplos não sejam ignorados pela sua altura reduzida.

### Ajustar a integração

Geralmente é útil alterar os valores de slope sensitivity, largura do pico, rejeição por altura e rejeição por área para personalizar a integração. A figura abaixo mostra como estes parâmetros afetam a integração de cinco picos em um sinal.

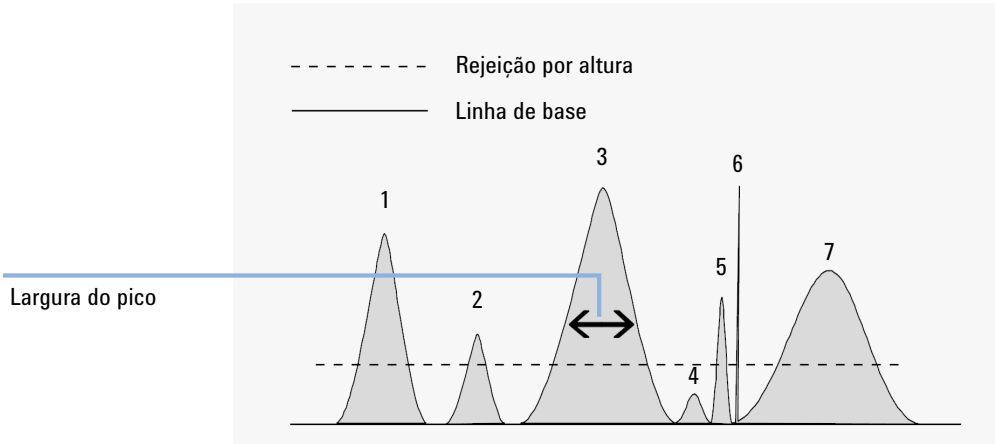



**Figura 24 Utilizando eventos iniciais**

Um pico é integrado apenas quando os quatro parâmetros de integração forem cumpridos. Ao utilizar a largura do pico para o pico 3, a rejeição por área e slope sensitivity mostradas, apenas os picos 1, 3 e 7 são integrados.

**Pico 1** é integrado assim que os quatro parâmetros de integração sejam cumpridos.

**Pico 2** é rejeitado porque a área está abaixo do valor definido da rejeição por área.

**Pico 3** é integrado assim que os quatro parâmetros de integração sejam cumpridos.

**Pico 4** não é integrado porque a altura do pico está abaixo da rejeição por altura.

**Pico 5** é rejeitado porque a área está abaixo do valor definido da rejeição por área.

**Pico 6** não é integrado; a filtragem e o agrupamento tornam o pico invisível.

**Pico 7** é integrado.

**Tabela 5 Valores de rejeição por altura e área**

| Parâmetro de integração | Pico 1 | Pico 2 | Pico 3 | Pico 4 | Pico 5 | Pico 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rejeição por altura | Acima | Acima | Acima | Abaixo | Acima | Acima |
| Rejeição por área | Acima | Abaixo | Acima | Abaixo | Abaixo | Acima |
| Pico integrado | Sim | Não | Sim | Não | Não | Sim |

# Eventos de integração padrão: Eventos de tempo

OpenLab CDS oferece um conjunto de eventos de tempo que permitem uma escolha entre os modos do integrador da definição da linha de base do algoritmo interno e a definição do usuário. Estes eventos de tempo podem ser usados para personalizar a construção da linha de base do sinal quando a construção padrão não é apropriada. Por exemplo: o usuário pode criar um novo tipo de evento de somatória de área (consulte **Fatia da somatória de área**) que não altera os resultados da SomatóriaÁrea padrão. Estes eventos podem ser úteis para áreas do pico da somatória final e para corrigir aberrações da linha de base de curto e longo prazo.

Você pode definir os valores especificamente para um determinado sinal ou globalmente para todos os sinais.

**Rejeição por área**

Consulte Eventos iniciais ("Eventos de integração padrão: Eventos iniciais" na página 46).

**Somatória de área**

Define pontos (**Ligado**/**Desligado**) entre os quais o integrador soma as áreas.

O tempo de retenção/migração de um pico criado com somatória de área é uma média dos tempos inicial e final. Se a **Somatória de área ligada** de um evento ocorrer após o início de um pico, mas antes do ápice, o pico inteiro é incluído na somatória. Se ocorrer após o ápice do pico, mas antes do final do pico, o pico é truncado e a somatória de área começa imediatamente.

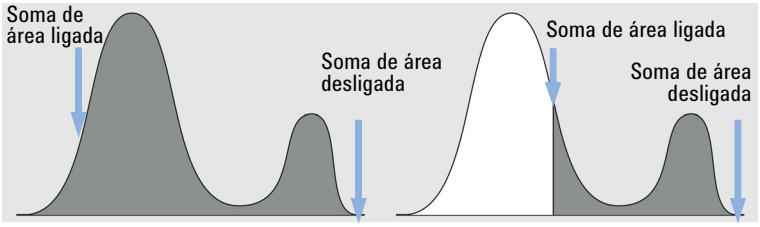



**Figura 25 Evento Somatória de área ligada após o ápice do pico, mas antes do final do pico**

Se a **Somatória de área desligada** de um evento ocorrer após o início de um pico, mas antes do ápice, a somatória de área é terminada imediatamente. O ponto no sinal onde isto ocorre se torna um ponto de vale. Se um evento **Somatória de área desligada** ocorrer depois do ápice, o evento é adiado até o final do pico.

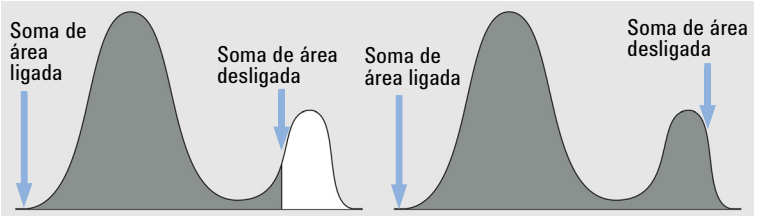



**Figura 26** **Evento Somatória de área desligada após o início do pico, mas antes do ápice**

**Fatia da somatória de área**

O evento permite definir intervalos consecutivos para somatória de área sem nenhuma perda em área ou intervalos de tempo.

Este evento é similar ao evento **Somatória de área**. No entanto, com este evento é possível definir intervalos de somatória de área contíguos sem nenhuma perda nos intervalos de tempo e nas áreas integradas do pico. Um pico é dividido no ponto onde você define este evento; a somatória de área começa e termina exatamente onde os intervalos **Fatia da somatória de área** são especificados.

O tempo de retenção do pico da fatia da somatória de área é o meio do intervalo de tempo da fatia. O tempo de retenção não é alterado com identificação ou recalibração. Ele pode somente ser alterado ligeiramente, uma vez que o integrador começa apenas a tomar os pontos de dados com o evento inicial da fatia da somatória de área e termina com o evento final da fatia da somatória de área. Dessa forma, o tempo de retenção pode variar pelo tempo entre dois pontos de dados.

Utilize o parâmetro **Iniciar** para definir os tempos iniciais para cada fatia da somatória de área. O próximo tempo inicial é utilizado como o tempo final para a fatia de tempo anterior, para que você possa utilizar vários eventos iniciais uns a seguir aos outros.

O parâmetro **Iniciar-ÁreaNeg** define o início da integração de uma fatia de tempo onde qualquer área negativa (abaixo da linha de base definida) é subtraída da área da fatia de tempo.

O parâmetro **Final** define o final da última fatia de tempo. A área da fatia de tempo é calculada ignorando qualquer área abaixo da linha de base definida. Se nenhum outro evento de fatia da somatória de área se seguir, o integrador retoma a sua detecção de pico normal novamente.

Entre o intervalo de um evento **Inicial** e o próximo evento **Final**, a linha de base é sempre uma linha reta sem alterações de direção entre eles. As alterações da linha de base a longo prazo podem ser aplicadas novamente usando os eventos **Definir linha de base a partir de um intervalo**, **Definir linha de base inferior a partir de um intervalo** ou **Utilizar linha de base a partir do intervalo**, somente após o ponto final (pelo menos 0,001 min depois).

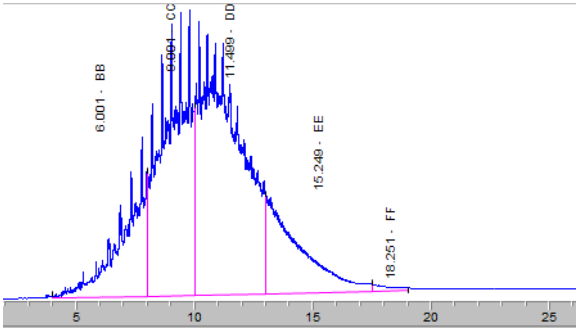



**Figura 27 Exemplo: Fatia da somatória de área**

A figura acima exibe um exemplo com os seguintes eventos de tempo:

**Tabela 6 Construção da linha de base**

| Tempo | Evento | Parâmetro |
|---|---|---|
| 4 min | Definir linha de base a partir de um intervalo | +-2 min |
| 22 min | Definir linha de base a partir de um intervalo | +-4 min |

**Tabela 7 Fatias da somatória de área**

| Tempo | Evento | Parâmetro |
|---|---|---|
| 4 min | Fatia da somatória de área | Inicial |
| 8 min | Fatia da somatória de área | Inicial |
| 10 min | Fatia da somatória de área | Inicial |
| 13 min | Fatia da somatória de área | Inicial |
| 17,5 min | Fatia da somatória de área | Inicial |
| 19 min | Fatia da somatória de área | Final |

**Largura de pico automática**

Liga a atualização automática da largura do pico para os próximos picos. Continuará com qualquer largura do pico naquele momento e continuará a monitorar a largura do pico com base nas larguras de pico encontradas anteriormente.

**Linha de base nos vales**

Define pontos (**Ligado**/**Desligado**) entre os quais o integrador redefine a linha de base nos vales entre os picos.

A redefinição repetida da linha de base pode cortar os cantos dos picos. Tais cantos tornam-se áreas negativas, reduzindo a área total dos picos.

Esta função é útil quando picos estão sobrepostos a outros picos amplos e menores e você deseja que a linha de base seja redefinida para todos os pontos no vale.

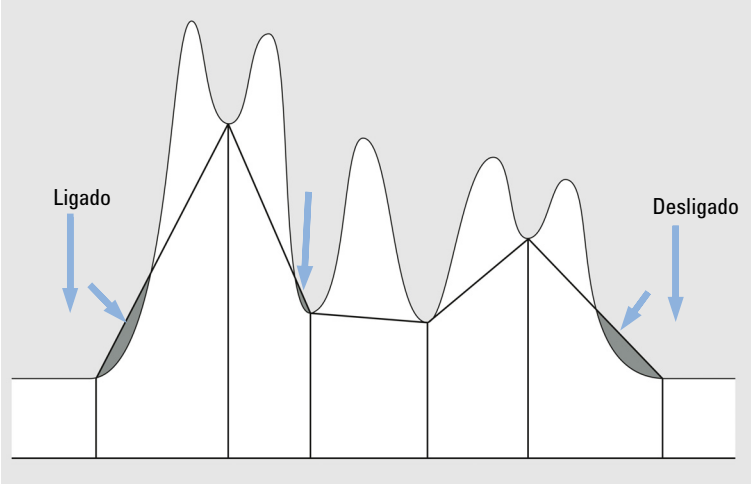



**Figura 28 Evento Linha de base nos vales**

**Retorno de linha de base** Determina um ponto no qual o integrador padrão estende a linha de base horizontalmente para trás a partir do ponto de linha de base declarado para este ponto.

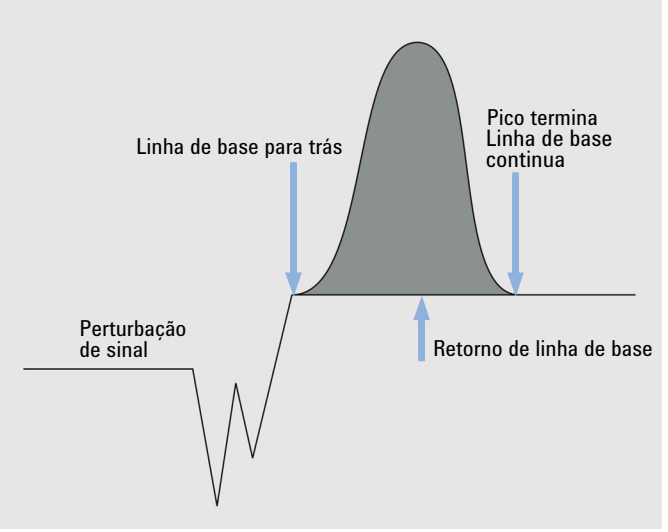



**Figura 29 Evento Retorno de linha de base**

**Manter linha de base** Uma linha de base horizontal é desenhada na altura da linha de base definida a partir do ponto em que o evento Manter linha de base é ligado até o ponto em que o evento Manter linha de base é desligado.

**Linha de base no próximo vale** Define um ponto no qual o integrador redefine a linha de base no próximo vale entre os picos e, em seguida, cancela a função automaticamente.

Esta função é útil em grupos de picos unidos que você supõe que estejam sobrepostos a outros picos ou em clusters separados próximos. A função é ignorada durante a somatória de área.

**Linha de base Agora** Define um ponto (tempo) no qual o integrador restabelece a linha de base para a altura atual do ponto de dados, se o sinal estiver em um pico.

Se o sinal estiver na linha de base, a função é ignorada e a linha de base detectada é usada.

**Detectar Ombros** Define os pontos (**Ligado**/**Desligado**) entre os quais o integrador inicia e para de detectar ombros.

Os ombros são detectados de acordo com o **Modo de ombros** especificado. Consulte "Eventos de integração padrão: Eventos iniciais" na página 46.

**Largura de pico fixa** Define a largura do pico e desabilita a atualização automática da largura do pico para os próximos picos. Para obter um bom desempenho, defina a largura do pico próxima à largura a meia altura dos picos atuais.

**Rejeição por altura** Consulte Eventos iniciais ("Eventos de integração padrão: Eventos iniciais" na página 46).

**Integração** Define os pontos (**Ligado**/**Desligado**) entre os quais o integrador para e inicia a integração.

Os picos entre os tempos em que o integrador é ligado e desligado são ignorados.

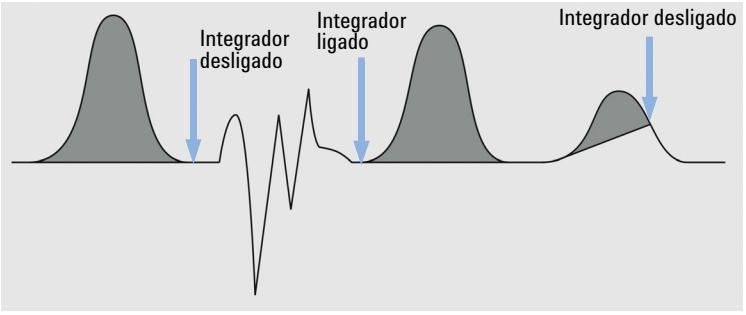



**Figura 30 Evento de integração**

A linha de base é desenhada a partir do último ponto declarado, incluindo quaisquer redefinições para a penetração. Todas as outras funções do integrador juntamente com as alterações de definição da largura do pico, threshold a rejeição por área são ignoradas quando o integrador é desligado. Nos pontos **Ligado** e **Desligado** o ponto da linha de base é restabelecido.

Quando o integrador é configurado para reiniciar, um novo ponto de linha de base é redefinido no nível do sinal atual.

Esta função é útil para ignorar partes do cromatograma/eletroferograma ou para eliminar perturbações na linha de base.

**Área máxima** Define a área do maior pico de interesse.

Quaisquer picos que tenham áreas maiores que a área máxima não são reportados: O integrador rejeita quaisquer picos que sejam maiores que o valor da área máxima após a correção de linha de base.

É possível utilizar este evento, por exemplo, para excluir o pico do solvente de um cromatograma GC a partir dos resultados de integração, mas incluir picos rider.

**Altura máxima** Define a altura do maior pico de interesse.

Quaisquer picos que tenham alturas maiores que a altura máxima não são reportados: O integrador rejeita quaisquer picos que sejam mais altos que o valor da altura máxima após a correção de linha de base.

É possível utilizar este evento, por exemplo, para excluir o pico do solvente de um cromatograma GC a partir dos resultados de integração, mas incluir picos rider.

**Pico negativo** Define os pontos (**Ligado**/**Desligado**) entre os quais o integrador reconhece os picos negativos.

Quando picos negativos são reconhecidos, o integrador não redefine mais a linha de base automaticamente após a penetração. De agora em diante qualquer penetração da linha de base será integrada utilizando a linha de base estabelecida como zero. As áreas são construídas relativas a essa linha de base e recebem um valor absoluto.

A função de pico negativo pode somente ser utilizada com confiança quando o desvio da linha de base é menor se comparado ao tamanho do pico, uma vez que a linha de base é construída a partir de um ponto de linha de base declarado no início do grupo do pico até a linha de base estabelecida no final do pico.

**NOTA**

A somatória da área é desativada automaticamente se o evento **Picos negativos ligados** for ativado.

O "tangente skim" também é desativado durante a detecção do pico negativo; tais picos são separados pela queda de linha.

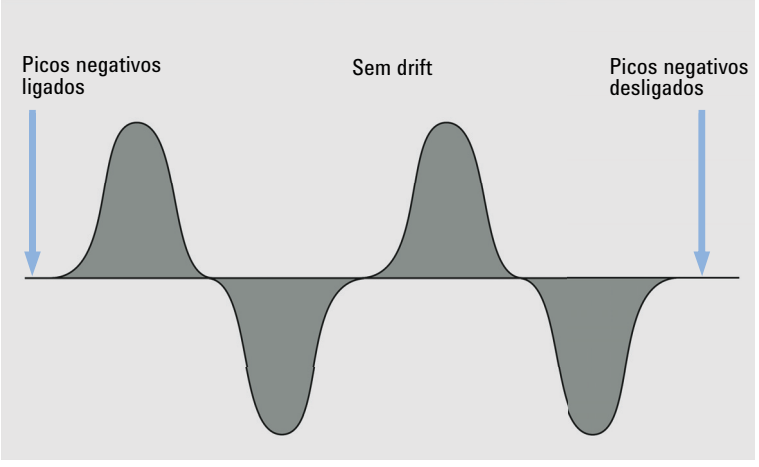



**Figura 31 Evento Pico negativo**

**Definir linha de base a partir do intervalo**

Utiliza um intervalo de pontos de dados para calcular um ponto de linha de base estaticamente significativo no ponto médio de um intervalo de tempo.

O valor que você fornece é o intervalo de tempo em volta de um ponto específico no tempo. Isso define o intervalo a ser utilizado para determinar o ponto da linha de base. Consulte "Modos de correção da linha de base" na página 35 para detalhes de cálculos estatísticos da linha de base.

Se definir o valor = 0, o ponto de dados do cromatograma mais próximo é utilizado como um ponto de linha de base; nenhuma estatística é realizada. Se definir um valor negativo, a configuração faz o mesmo que **Utilizar linha de base a partir do intervalo**=**Limpar**: Isso interrompe a utilização do algoritmo estatístico da linha de base.

É possível especificar qualquer área no cromatograma do cálculo da linha de base. Idealmente, deve ser uma área que está livre de antecedentes químicos e contenha apenas ruídos.

Se você especificar dois pontos **Definir linha de base a partir do intervalo** (por exemplo, no início e no fim de um cromatograma), a linha de base entre eles é conectada com uma linha reta.

**Definir linha de base inferior a partir de um intervalo**

Similar a **Definir linha de base a partir do intervalo**, mas utiliza o ponto da linha de base mais baixo que permite que mais 30 % pontos de dados de ruído estejam acima dele. Com isso, a penetração da linha de base é minimizada.

Utilize **Definir linha de base inferior a partir de um intervalo** em vez de **Definir linha de base a partir do intervalo** quando a área do cromatograma utilizado para o cálculo contiver ruídos químicos excessivos ou spikes de ruídos eletrônicos.

**Definir linha de base inferior a partir de um intervalo** é calculado por uma subtração de um sigma (desvio padrão de ruído) a partir do valor y de **Definir linha de base a partir do intervalo**.

**Modo de ombros**

Consulte Eventos iniciais ("Eventos de integração padrão: Eventos iniciais" na página 46).

**Slope sensitivity**

Consulte Eventos iniciais ("Eventos de integração padrão: Eventos iniciais" na página 46).

**Pico do Solvente**

Os picos acima de um slope específico em unidades de mV/s são detectados como picos do solvente que se encontram fora do intervalo da conversão analógica/digital.

Os últimos picos recebem "tangente skim" automaticamente; não é preciso ligar o evento tangente skim.

Se a detecção de pico do solvente estiver desligada, as quedas da linha de base são desenhadas a partir do último pico em vez das tangentes.

**Dividir pico** Especifica um ponto no qual dividir um pico com uma queda de linha de base.

NOTA

Não é possível utilizar **Dividir pico** enquanto a **Somatória de área** estiver ligada. Para dividir um pico enquanto a **Somatória de área** está ligada, utilize o evento integração manual correspondente.

Não é possível dividir os picos "skimmed" utilizando o evento **Dividir pico**.

**Tangente skim da cauda** Especifica onde o "tangente skim" começa e termina.

**Ligado**

Define um ponto no qual o integrador define uma tangente skim na última borda do próximo pico. Todos os picos acima da tangente são integrados na linha de base restabelecida. A tangente é desenhada a partir do vale antes do pico pequeno até o ponto após o mesmo, onde o gradiente do sinal do detector é igual ao gradiente da tangente. O tempo de evento da tangente skim pode ser inserido a qualquer momento durante o pico. Designa o pico também como um pico do solvente.

**Desligado**

Termina o "tangente skim" após o pico atual ser completado ou se, no intervalo designado, nenhum pico for encontrado (e um solvente não for inadvertidamente designado no próximo grupo).

**Modo tangente skim** Os seguintes modelos estão disponíveis para calcular as áreas adequadas do pico:

- Exponencial(Figura 20 na página 42)
- Nova exponencial(Figura 21 na página 43)
- Padrão(Figura na página 44)
- Reto(Figura 22 na página 44)

**Picos não atribuídos**

Com algumas construções da linha de base, existem pequenas áreas acima da linha de base e abaixo do sinal, mas não são parte de nenhum pico reconhecido. Normalmente, tais áreas não são medidas nem reportadas. Se picos não atribuídos estiverem ligados, essas áreas são medidas e reportadas como picos não atribuídos. O tempo de retenção/migração para tal área é o ponto médio entre o início e o final da área.

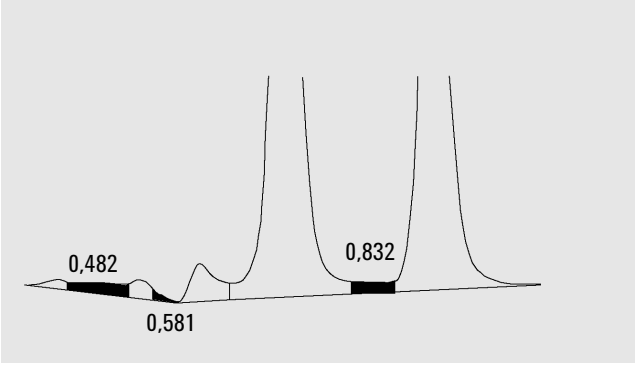



**Figura 32 Picos não atribuídos**

**Atualizar altura de pico**

O evento força o integrador a usar a altura absoluta do ponto de dados mais alto como altura do pico. Sem este evento, o máximo de uma curva interpolada é usado. O evento **Atualizar altura de pico** é útil especialmente em sinais com picos extremamente acentuados e angulares ou picos precedidos por um declive. Picos assim são típicos para sinais MSD.

O tempo inicial de **Atualizar altura de pico** não é avaliado. O evento sempre afeta o cromatograma inteiro.

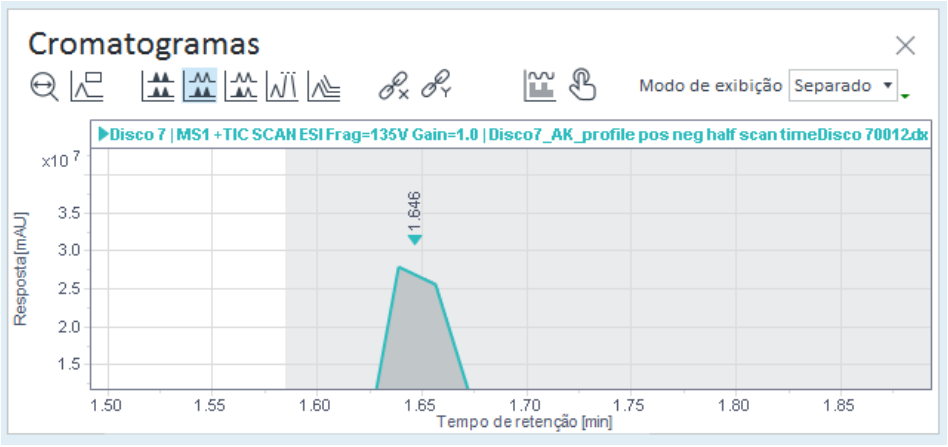



**Figura 33 Integração padrão**

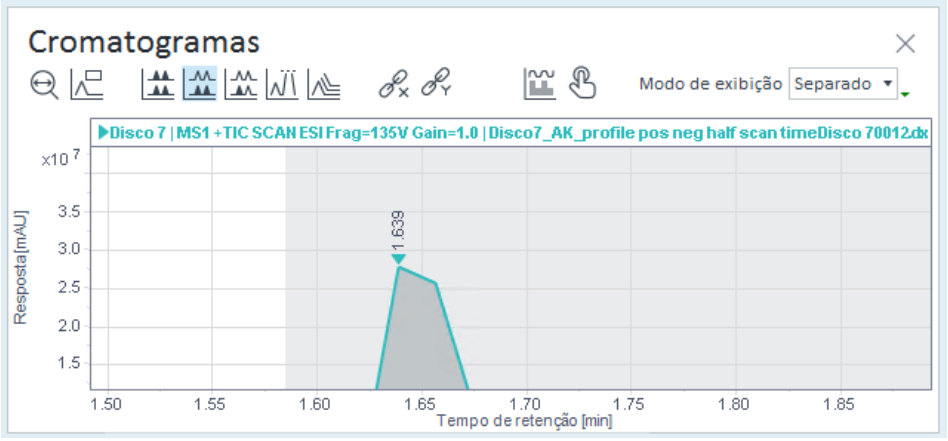



**Figura 34 Integração com o evento Atualizar altura de pico**

**Utilizar linha de base a partir do intervalo**

Permite projetar um valor de linha de base para um tempo anterior ou posterior para minimizar as penetrações da linha de base.

Se o valor de **Definir linha de base a partir de um intervalo** ou de **Definir linha de base inferior a partir de um intervalo** for calculado em uma área sem picos cromatográficos, pode ser vantajoso projetar a linha de base calculada para o tempo imediatamente antes de o primeiro pico de interesse eluir (ou para o tempo imediatamente após o último pico de interesse ter eluído). **Utilizar linha de base a partir do intervalo** permite fazer até três dessas projeções em cada direção.

Pode ser vantajoso utilizar este evento quando você tiver construído uma linha de base ascendente ou descendente, uma vez que, de outra forma, a linha de base reta poderia cortar através da curva cromatografica involuntariamente. O parâmetro informa o integrador a partir de quais os intervalos da linha de base se deve selecionar o ponto de linha de base e projeta a linha de base para o ponto de linha de base no intervalo de tempo específico.

É possível utilizar os seguintes parâmetros:

- **Limpar**: Limpa o comportamento da nova linha de base e retorna ao algoritmo tradicional a partir deste ponto.
- **Esquerda**: Utiliza o valor de linha de base a partir do limite mais próximo à esquerda deste ponto no tempo.
- **Direita**: Utiliza o valor de linha de base a partir do limite mais próximo à direita deste ponto no tempo.
- **Range 1**—**Range 9**: Utiliza o valor da linha de base a partir de um determinado intervalo da linha de base. Os intervalos da linha de base são contados a partir do início do cromatograma.

Consulte também o exemplo abaixo de **Fatia da somatória de área** (Figura 27 na página 53).

# Eventos de integração avançados

Os eventos de integração avançados são fornecidos para todos os sinais.

**Modo tangente skim**

Define o tipo de construção de linha de base para os picos encontrados no lado ascendente ou descendente de um pico. Consulte "Modos tangente skim" na página 42.

| | |
|---|---|
| **Exponencial** | Desenha uma curva exponencial pela altura corrigida de início e final de cada pico secundário. |
| **Nova exponencial** | Desenha uma curva exponencial para aproximar a borda do pico principal. |
| **Padrão** | Combina cálculos de linha exponencial e reta para melhor se adequar. |
| **Reto** | Desenha uma linha reta pela altura corrigida de início e final de cada pico secundário. |

**Razão de altura skim na cauda**

Define, juntamente com a **Razão skim/vale**, as condições para aplicar "tangente skim" em um pico pequeno na cauda de um solvente ou outro pico maior. Consulte "Critério de skim" na página 39.

É a razão entre a altura do pico principal corrigido por linha de base (Hp) e a altura do pico secundário corrigido por linha de base (Hc). Razões maiores que o valor especificado habilitarão o skim.

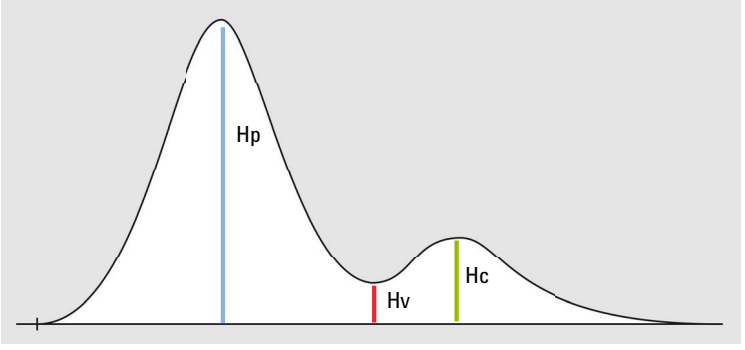



**Figura 35 Exemplo: Pico com skim na cauda**

**Razão de altura skim frontal**

Define, juntamente com a **Razão skim/vale**, as condições para aplicar "tangente skim" em um pico pequeno na parte frontal de um solvente ou outro pico maior. Consulte "Critério de skim" na página 39.

É a razão entre a altura do pico principal corrigido por linha de base (Hp) e a altura do pico secundário corrigido por linha de base (Hc). Razões maiores que o valor especificado habilitarão o skim.

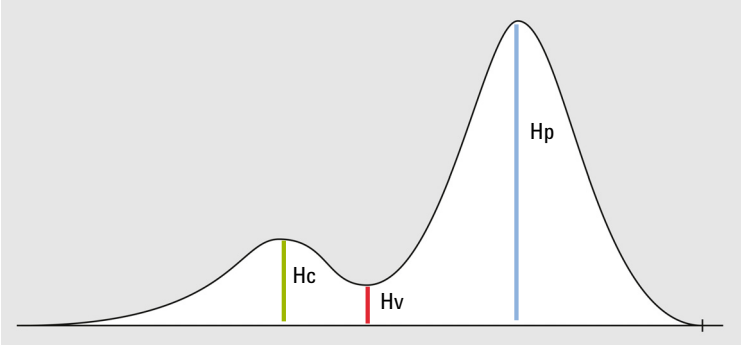



**Figura 36 Exemplo: Pico com skim frontal**

**Razão skim/vale**

Define, juntamente com a **Razão de altura skim na cauda** ou **Razão de altura skim frontal**, as condições para aplicar "tangente skim" em um pico pequeno na cauda ou na parte frontal de um solvente ou outro pico maior. Consulte "Critério de skim" na página 39.

É a razão entre a altura do pico secundário corrigido por linha da base (Hc) e a altura do vale corrigido por linha de base (Hv). Razões mais baixas que o valor especificado habilitarão o skim.

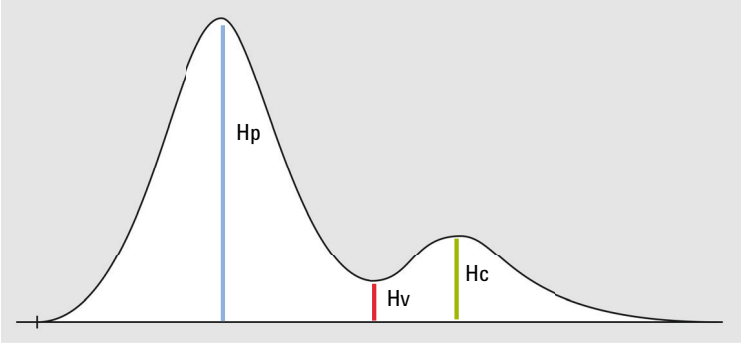



**Figura 37 Exemplo: Pico com skim na cauda**

**Modo de correção da linha de base**

Define o tipo de correção de linha de base. Consulte "Modos de correção da linha de base" na página 35.

Você pode escolher entre os seguintes parâmetros:

| | |
|---|---|
| **Clássico** | Aceitar penetrações de linha de base. |
| **Sem penetrações** | Remove as penetrações da linha de base, reconstruindo a linha de base. |
| **Avançado** | O integrador tenta aperfeiçoar o início e o final de um pico, restabelecendo a linha de base para um grupo de picos e remove a penetração de linha de base. |

**Razão pico-vale**

Utilizado para decidir se dois picos que não mostram separação de linha de base serão separados utilizando uma queda de linha de base ou um vale na linha de base, esta é a razão entre a altura corrigida da linha de base do menor pico pela altura corrigida da linha de base no vale. Consulte "Razão pico-vale" na página 37.

Quando a razão pico-vale é menor que o valor especificado, uma queda de linha é usada (A); caso contrário, uma linha de base é desenhada a partir da linha de base do início do primeiro pico até o vale e a partir do vale até a linha de base no fim do segundo pico (B).

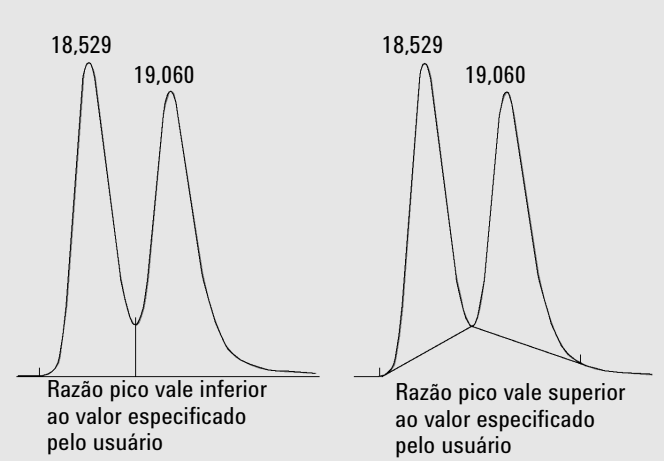



**Figura 38 Efeito da razão pico vale nas linhas de base**

# 3 Integração com o Integrador do EZChrom

Eventos de Integração 67
Descrições do Código da Linha de Base 83

Este capítulo contém a descrição de eventos de integração EZChrom.

# Eventos de Integração

Você pode definir os valores especificamente para um determinado sinal ou globalmente para todos os sinais. Para adicionar um evento de tempo, clique com o botão direito na tabela de parâmetros.

Existem diferentes tipos de eventos de integração: Para alguns deles, você pode definir um intervalo de tempo com hora de início e fim durante o qual um parâmetro está ativo. Para outros, você pode definir um valor específico a ser usado a partir de um tempo inicial ou durante um intervalo de tempo. As colunas **Parada de tempo [min.]** e **Valor** estão habilitadas ou inativas dependendo do tipo de evento.

NOTA

Diferentemente do OpenLab EZChrom, o tempo de parada fica inativa para os seguintes eventos de integração no OpenLab CDS:

- Largura
- Threshold
- Sensibilidade para ombros
- Área mínima
- Reiniciar linha de base
- Reiniciar linha de base no vale

**Largura**

Usada para diferenciar picos reais de ruído. O sistema usa o valor padrão de largura = 0,2 min.

O evento **Largura** é usado para calcular um valor para aglomerar ou suavizar os pontos de dados antes de o algoritmo de integração ser aplicado. A integração funciona melhor quando há 20 pontos atravessando um pico. Se um pico for amostrado em excesso (i.e. a frequência de amostragem for alta demais), o parâmetro **Largura** será usado para aferir a média dos dados de tal maneira que o algoritmo de integração enxergue apenas 20 pontos atravessando o pico.

Um evento **Largura** será aplicado a um determinado pico contanto que ocorra antes de ou no ápice pico.

O parâmetro **Largura** só é usado para corrigir superamostragem. Não pode corrigir dados com amostragem insuficiente (i.e. frequência de amostragem baixa demais ocasionando menos de 20 pontos adquiridos no pico mais estreito).

Os diagramas abaixo mostram exemplos de como valores incorretos podem afetar a linha de base do pico.

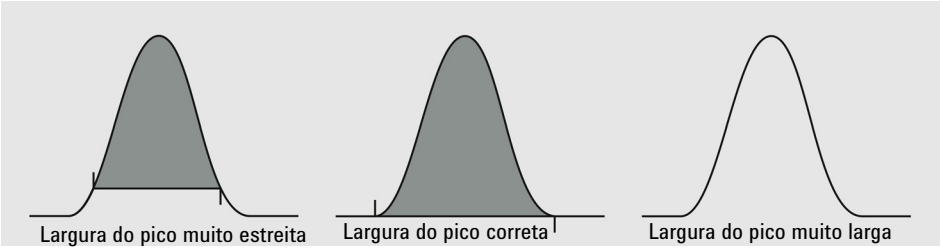



**Figura 39 Largura**

**NOTA**

Na maioria das circunstâncias, um valor de Largura inicial baseado no pico mais estreito do cromatograma será adequado para a devida integração de todos os picos. No entanto, um novo evento temporizado de Largura deve ser informado toda vez que a largura de um pico dobrar.

**NOTA**

Valores extremos de Largura e Threshold (muito grandes ou muito pequenos) podem resultar na não detecção dos picos.

**Threshold**

Este parâmetro é o primeiro derivado, usado para permitir que o algoritmo de integração faça a distinção entre início e fim dos picos e ruído e desvio da linha de base. O valor do **Limiar** é baseado no primeiro maior valor derivado determinado em uma seção do cromatograma.

Os diagramas abaixo mostram exemplos de como valores incorretos podem afetar a linha de base do pico.

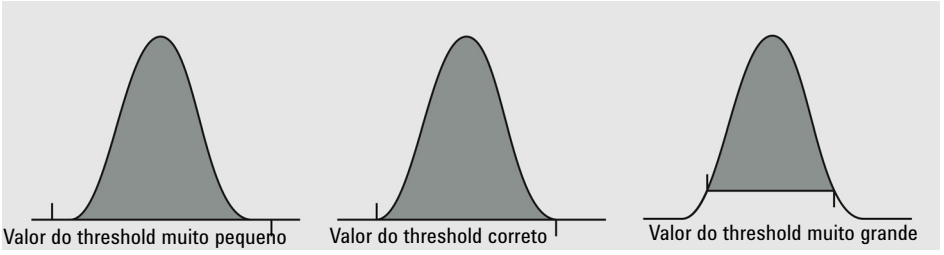



**Figura 40 Threshold**

**NOTA**

Valores extremos de Largura e Threshold (muito grandes ou muito pequenos) podem resultar na não detecção dos picos.

**Sensibilidade para ombros**

Este parâmetro é usado para permitir a detecção de ombros em picos maiores. Um valor maior irá diminuir a sensibilidade dos ombros enquanto valores menores aumentam a sensibilidade em picos dos ombros. O valor de **Sensibilidade para Ombros** é baseado no segundo maior valor derivado determinado em uma seção do cromatograma.

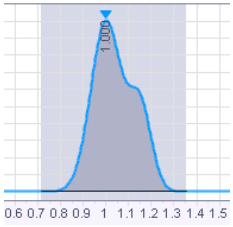



**Figura 41 Conjunto de valores da sensibilidade do ombro alto demais**

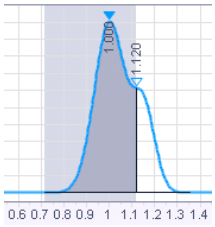



**Figura 42 Conjunto de valores da sensibilidade do ombro correto**

**Integração desligada**

Este evento desliga a integração do seu cromatograma durante o intervalo especificado. Este evento é útil se você não estiver interessado em determinadas áreas do seu cromatograma e não quiser que picos sejam reportados para essa seção.

Ao usar **Integração Desligada** para desabilitar picos, essas regiões serão incluídas no cálculo de ruído. Deixe todos os picos integrados para obter os valores corretos de ruído.

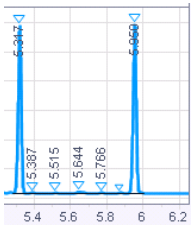



**Figura 43 Integração padrão**

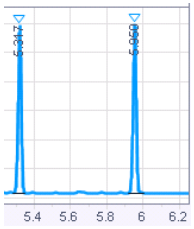



**Figura 44 Integração desligada de 5,35 to 5,85 min**

**Vale a vale** Este evento faz com que as linhas de base de picos que não estão totalmente resolvidos (i.e. não retornam à linha de base) sejam levadas ao ponto mínimo entre os picos.

Se esse evento não for usado, uma linha de base é projetada no próximo ponto no qual o cromatograma retorna à linha de base e uma perpendicular é projetada para picos que não alcançam a linha de base.

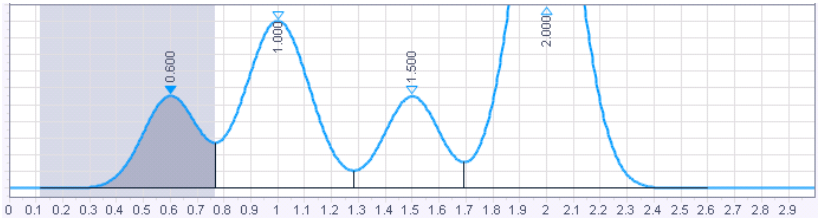



**Figura 45 Integração padrão**

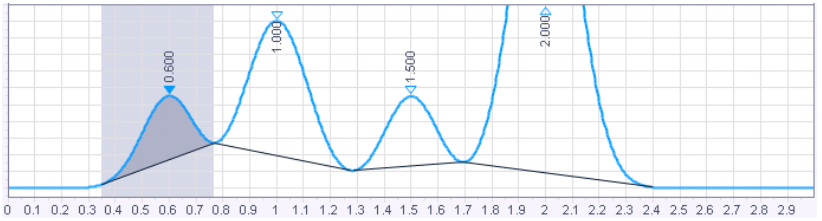



**Figura 46 Integração com evento Vale a vale**

**Linha de base Horizontal**

Este evento permite que você projete a linha de base para frente na horizontal para os picos dentro do intervalo de tempo especificado. A linha de base começa onde o primeiro pico dentro do intervalo de tempo definido começa. O final da linha de base é onde ela cruza o sinal ou onde termina o último pico.

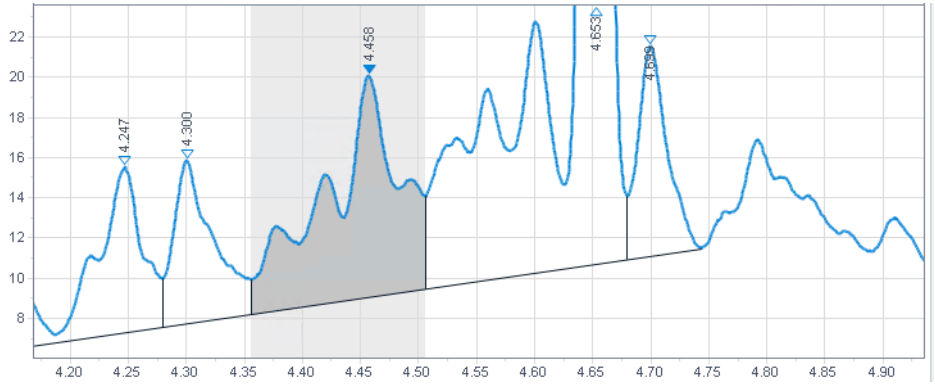



**Figura 47 Integração padrão**

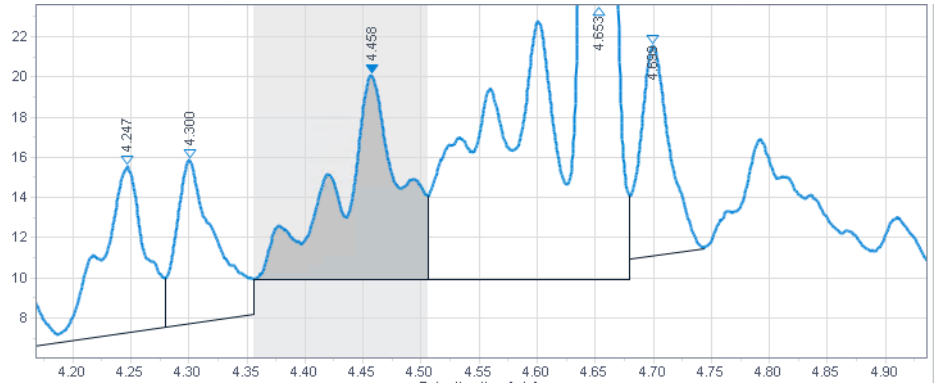



**Figura 48 Integração com evento Linha de base horizontal entre 4,4 e 4,69 min**

**Linha de base horizontal de retorno**

Este evento é usado para forçar uma linha de base horizontal na direção do início do cromatograma. Uma linha de base horizontal de retorno será criada para os picos dentro do intervalo de tempo especificado. A linha de base é definida pelo final do último pico dentro do término do intervalo de tempo definido. Ela é projetada de volta para onde ela cruza o sinal ou onde o primeiro pico começa.

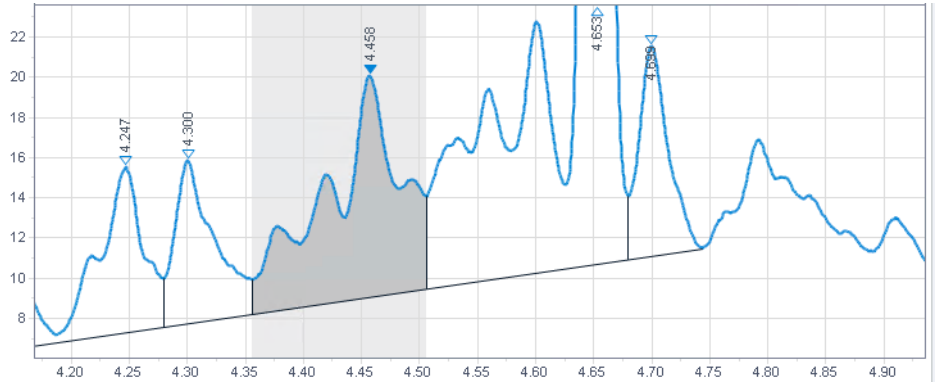



**Figura 49 Integração padrão**

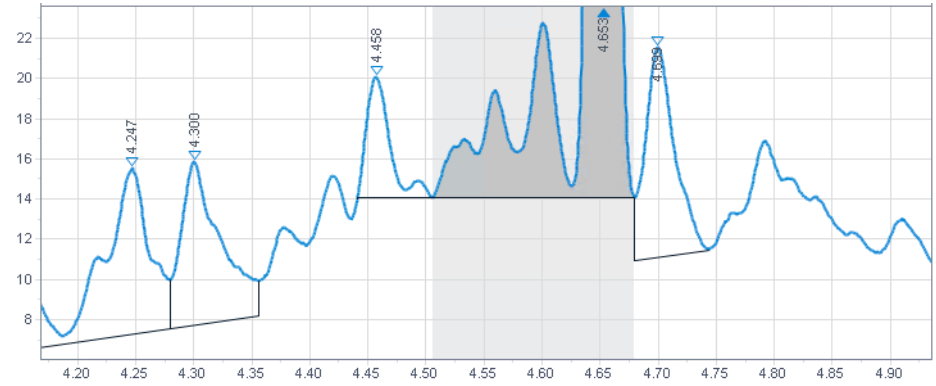



**Figura 50 Integração com evento Linha de base horizontal inverso entre 4,4 e 4,69 min**

**Ponto mais baixo da linha de base horizontal**

Este evento é aplicado a todos os picos cujos tempos de retenção estão dentro do intervalo de tempo definido por **Tempo (min)** e **Tempo de Parada (min)**.

O **Valor** define o tempo em que o integrador começa a pesquisar o ponto de linha de base mais baixo.

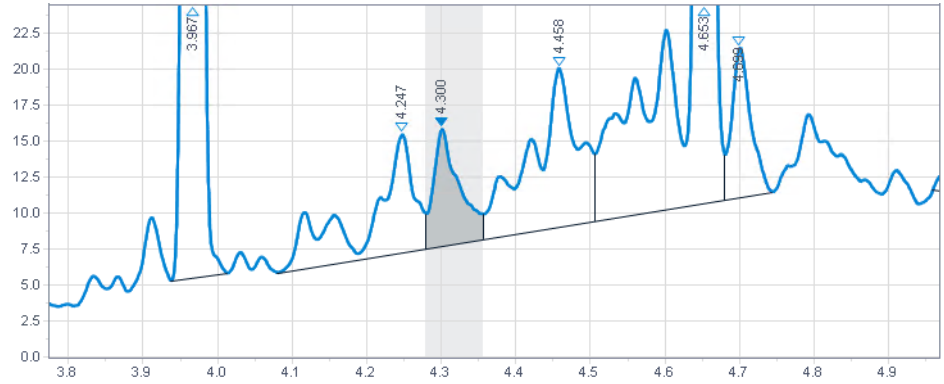



**Figura 51 Integração padrão**

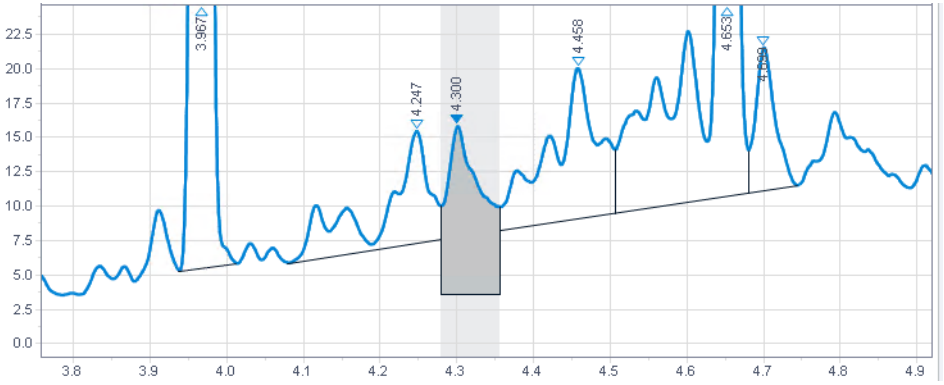



**Figura 52 Integração com evento de ponto mais baixo da linha de base horizontal entre 4,25 e 4,35 min, com Valor definido como 3,8 min**

**Tangente skim** Este evento é usado para integrar um pequeno pico localizado na extremidade de um pico maior. A linha de base do pico pequeno se torna uma tangente levada do vale do pico maior até o ponto da tangente no cromatograma.

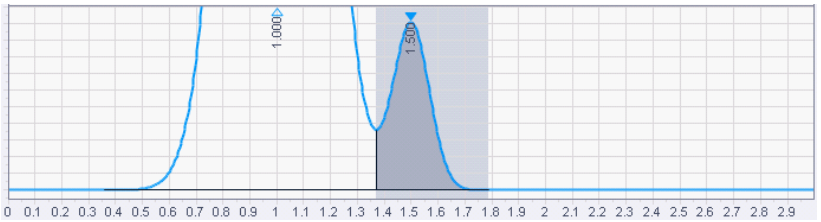



**Figura 53 Integração padrão**

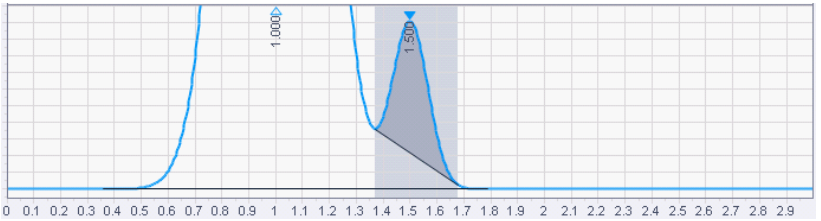



**Figura 54 Integração com evento Skim tangente**

**Tangente skim frontal** Este evento é usado para forçar uma linha de base tangencial para um pico filho na extremidade de um pico mãe.

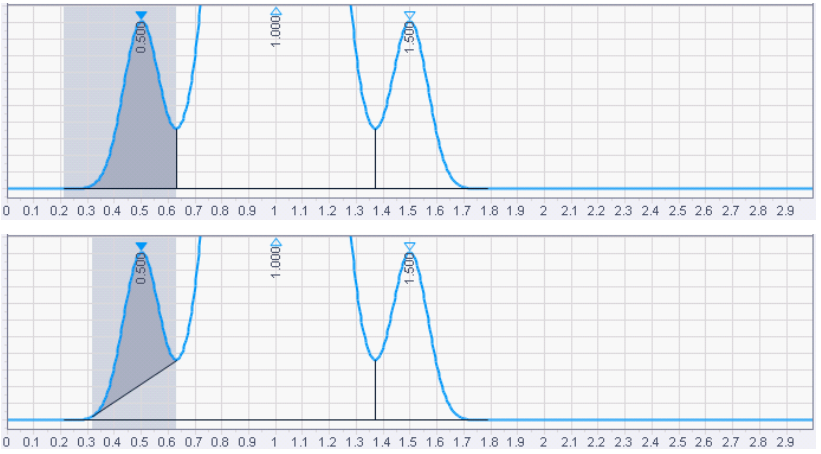



**Figura 55 Integração com evento Skim tangente frontal**

**Skim exponencial**

Este evento é usado para integrar pequenos picos localizados na extremidade de um pico maior. A linha de base do pico pequeno se torna uma tangente exponencial levada do vale do pico maior até o ponto da tangente no cromatograma.

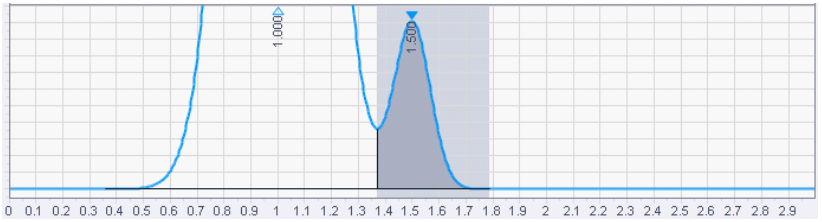



**Figura 56 Integração padrão**

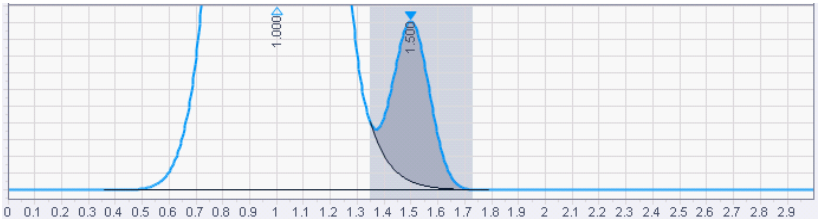



**Figura 57 Integração com evento Skim exponencial**

**Skim exponencial frontal**

Este evento é usado para forçar uma linha de base exponencial para um pico filho na extremidade de um pico mãe.

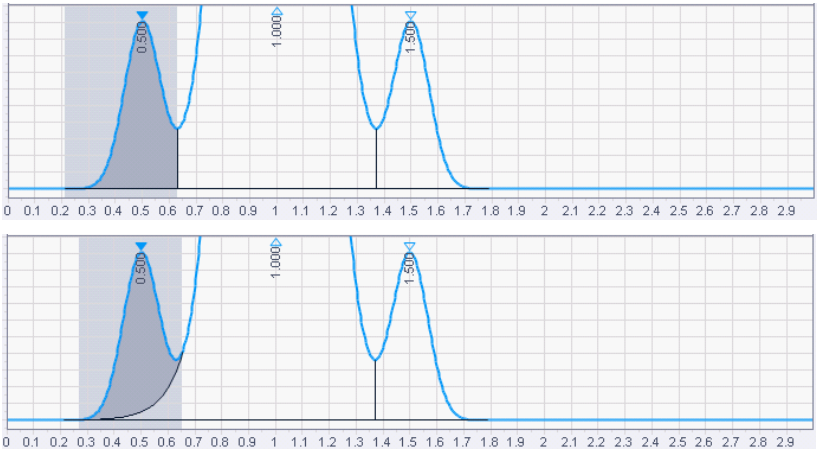



**Figura 58 Integração com evento Skim exponencial frontal**

**Área mínima** Este evento permite a você informar um limite de área para detecção de picos. Picos cujas áreas se enquadram nessa área mínima não serão integrados e reportados como picos. Este evento é útil para eliminar ruído ou picos contaminadores do seu relatório.

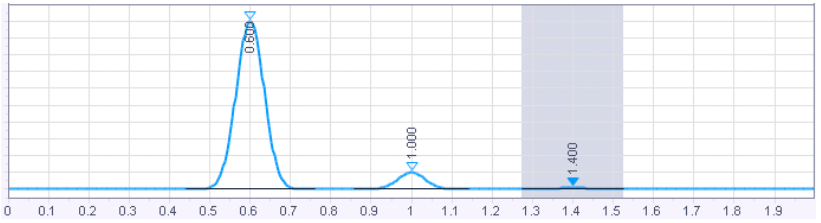



**Figura 59 Integração padrão**

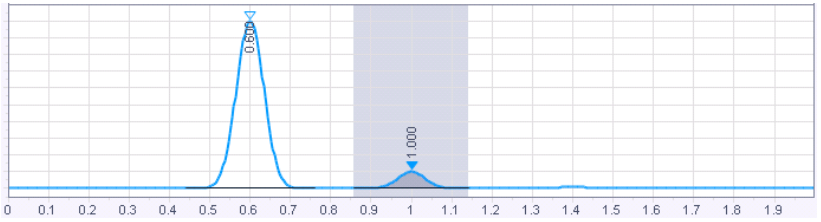



**Figura 60 Integração com evento Área mínima**

**Pico negativo** Este evento faz com que porções do cromatograma que estejam abaixo da linha de base sejam integradas usando a lógica normal dos picos e reportadas como picos reais. Este evento é útil ao usar detectores como tipos de Índice Refrativo que dão uma resposta negativa a determinados compostos.

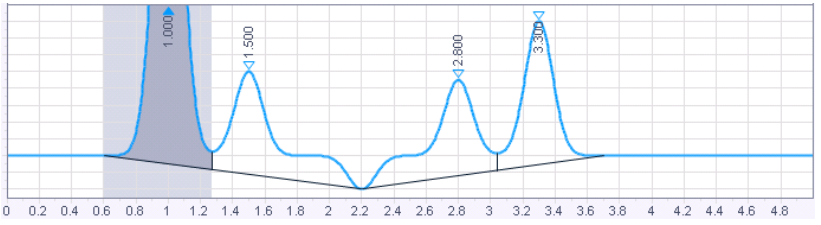



**Figura 61 Integração padrão**

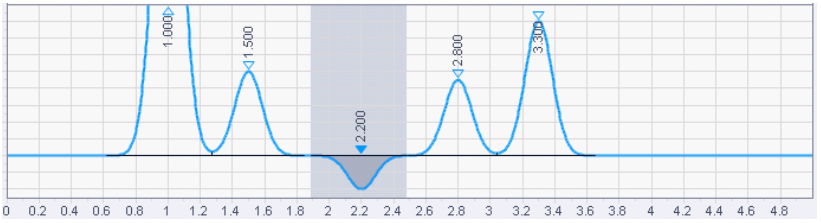



**Figura 62 Integração com evento Pico negativo**

**Desligar detecção de final do pico**

Este evento é usado para desligar a detecção de final do pico entre horários especificados, forçando o software a tratar picos que se enquadrem na janela do evento como um único pico. Este evento é uma forma útil de combinar as áreas de uma série de picos contíguos em uma área. Como os picos são considerados parte de um único pico, o tempo de retenção é atribuído à hora do primeiro ápice após o evento **Desligar Detecção de Final do Pico**.

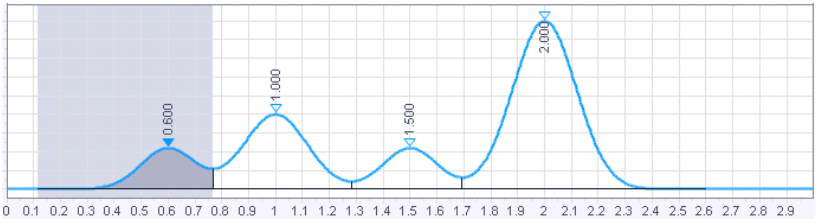



**Figura 63 Integração padrão**

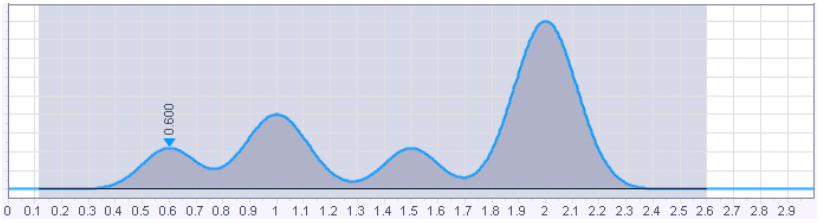



**Figura 64 Desligar detecção de final do pico entre 0,4 e 2,3 min**

**Linha de base manual**

Este evento permite que você mude a forma de traçar a linha de base para um pico sem alterar os parâmetros de integração. A linha de base será traçada do sinal na hora de início até o sinal na hora de parada.

Isso é conveniente quando você quiser mudar onde uma linha de base é traçada para um pico sem alterar como a linha de base é traçada para outros picos no cromatograma.

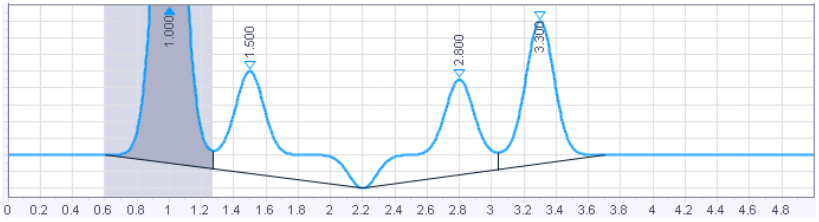



**Figura 65 Integração padrão**

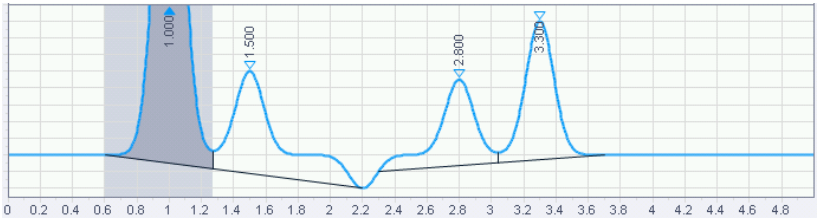



**Figura 66 Integração com linha de base manual entre 2,3 e 3,6 min**

**Pico manual** Esse comando permite que você defina as horas de início e fim de um pico que não foi detectado anteriormente. Isso é conveniente quando você quiser forçar a integração de um pico, mas não quiser alterar seus parâmetros gerais de integração.

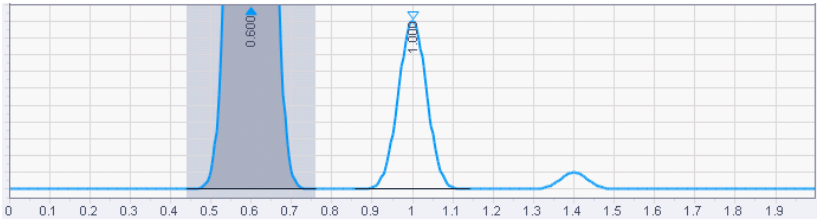



**Figura 67 Integração padrão**

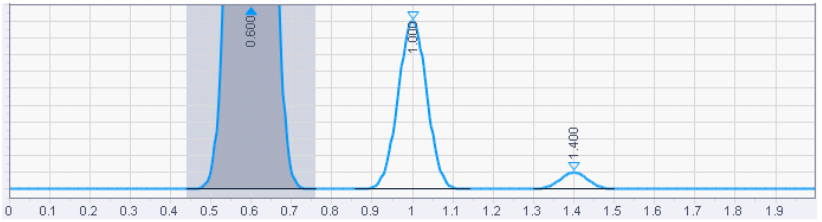



**Figura 68 Integração de pico pequeno forçada usando evento de pico manual entre 1,3 e 1,5 min**

**Dividir pico** Este evento é usado para forçar uma integração com projeção de linha perpendicular em um pico. A perpendicular será projetada no momento em que o evento for inserido.

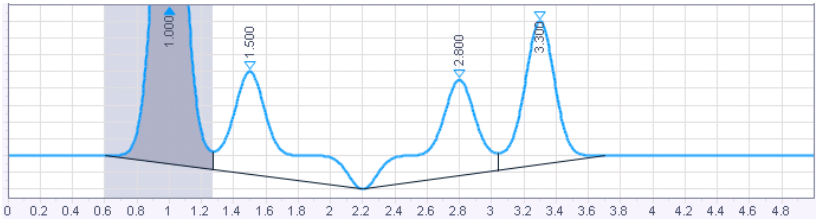



**Figura 69 Integração padrão**

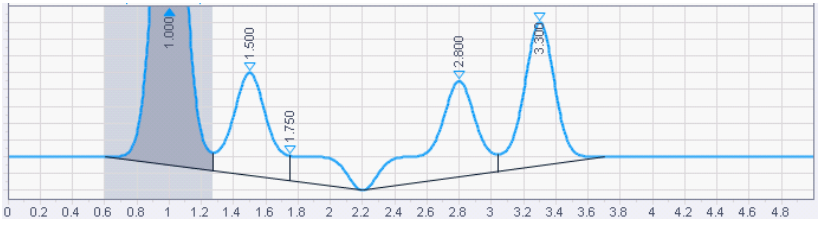



**Figura 70 Integração com um evento Dividir pico em 1,75 min**

**Forçar início do pico / Forçar final do pico**

Esses eventos são usados para forçar o início ou fim da integração do pico a um ponto específico.

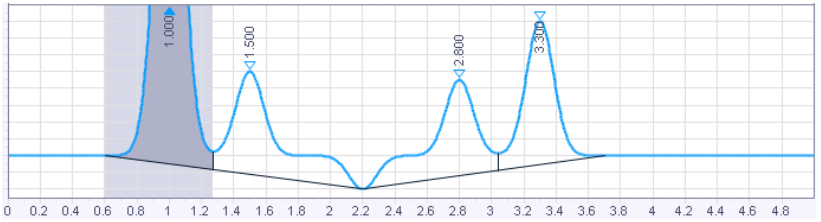



**Figura 71 Integração padrão**

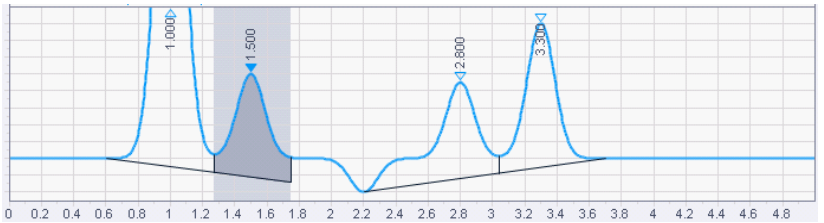



**Figura 72 Integração com um evento Forçar fim do pico em 1,75 min**

**Reiniciar linha de base**

Este evento permite que você defina a linha de base em um ponto designado no cromatograma.

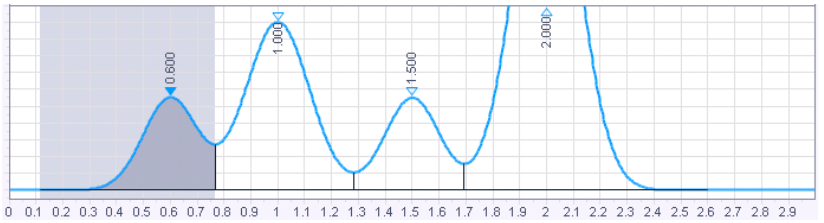



**Figura 73 Integração padrão**

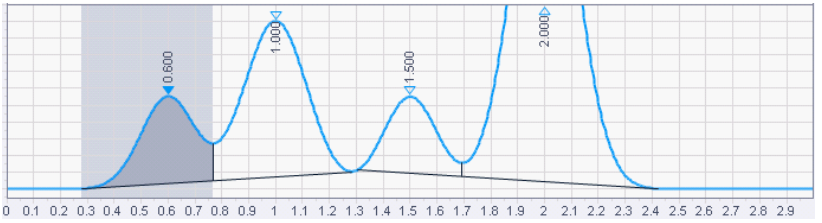



**Figura 74 Integração com um evento Restabelecer linha de base em 1,3 min**

**Reiniciar linha de base no vale**

Este evento fará com que a linha de base seja reiniciada no próximo vale detectado após o evento.

NOTA

O evento deve ser colocado após o início do primeiro pico no cluster; caso contrário, o início do pico será identificado como o vale.

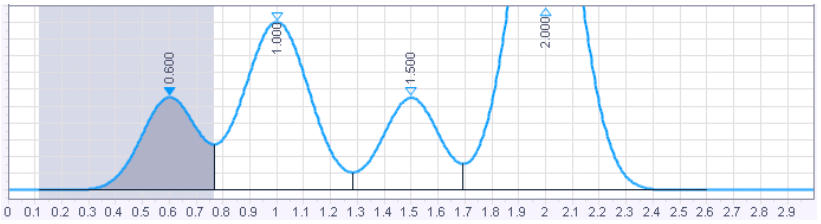



**Figura 75 Integração padrão**

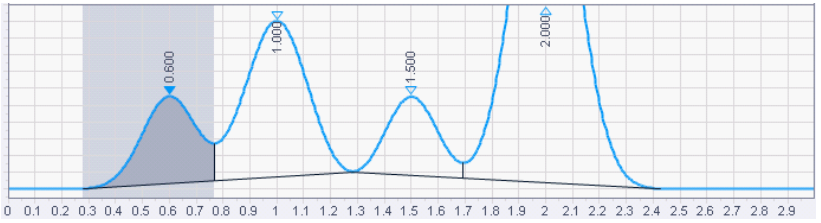



**Figura 76 Integração com um evento Restabelecer linha de base no vale em 1,2 min**

**Área máxima**

Define a área do maior pico de interesse.

Quaisquer picos que tenham áreas maiores que a área máxima não são reportados: O integrador rejeita quaisquer picos que sejam maiores que o valor da área máxima após a correção de linha de base.

É possível utilizar este evento, por exemplo, para excluir o pico do solvente de um cromatograma GC a partir dos resultados de integração, mas incluir picos rider.

**Altura máxima**

Define a altura do maior pico de interesse.

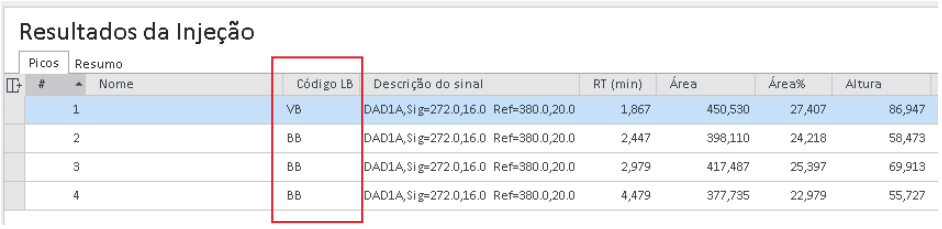
Quaisquer picos que tenham alturas maiores que a altura máxima não são reportados: O integrador rejeita quaisquer picos que sejam mais altos que o valor da altura máxima após a correção de linha de base.

É possível utilizar este evento, por exemplo, para excluir o pico do solvente de um cromatograma GC a partir dos resultados de integração, mas incluir picos rider.

# Descrições do Código da Linha de Base

## Descrições do Código da Linha de Base

Um código de linha de base consiste em duas letras. A primeira letra indica o tipo de linha de base do início do pico e a segunda letra indica o tipo de linha de base do final do pico. Os códigos da linha de base estão incluídos na tabela **Resultados de Injeção** e em todos os modelos de relatório padrão.




| # | Nome | Código LB | Descrição do sinal | RT (min) | Área | Área% | Altura |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | VB | DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0 | 1,867 | 450,530 | 27,407 | 86,947 |
| 2 | | BB | DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0 | 2,447 | 398,110 | 24,218 | 58,473 |
| 3 | | BB | DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0 | 2,979 | 417,487 | 25,397 | 69,913 |
| 4 | | BB | DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0 | 4,479 | 377,735 | 22,979 | 55,727 |

**Figura 77** **Resultados da injeção**

**Sinal:** DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0

| RT [min] | Tipo | Largura [min] | Área | Altura | Área% |
|---|---|---|---|---|---|
| 1,867 | VB | 0,56 | 450,53 | 86,95 | 27,41 |
| 2,447 | BB | 0,50 | 398,11 | 58,47 | 24,22 |
| 2,979 | BB | 0,68 | 417,49 | 69,91 | 25,40 |
| 4,479 | BB | 0,47 | 377,73 | 55,73 | 22,98 |
| | | Soma | 1643,86 | | |

**Figura 78** **Exemplo: Tabela do relatório resumido de área**

**B** Linha de base

**C** Exponencial

**f** Forçar início ou fim do pico (definido pelo usuário)

**I** Pico terminado pelo evento de Integração Desligada

**N** Iniciar pico negativo

**P** Terminar pico negativo

**H** Projetar para a frente na horizontal

**h** Retorno na horizontal

**M** Linha de base manual ou pico manual

**m** Mover início/fim da linha de base

**S** Ombro

**T** Tangente skim

**V** Vale

**v** Ponto de vale forçado

**x** Dividir pico

**E** Fim do cromatograma encontrado antes do final do pico.

Fim do cromatograma utilizado como fim do pico.

**R** Restabelecer linha de base

**L** Ponto mais baixo horizontal

# 4 Identificação do pico

O que é identificação do pico? 86
Avaliação da janela do tempo de retenção 87
Resolução de conflito 88
Tempo de retenção relativos 89
Cálculos para tempos de retenção relativos (RRT) 90
Composto de referência de tempo 91
Sobre os compostos de referência de tempo 91
Cálculos para compostos de referência de tempo 92
Atualizar método de processamento 93
Atualizações do tempo de retenção 93
Cálculos para tempos de retenção atualizados 94
Exemplo: Atualizações do tempo de retenção com RRT 95
Cálculo para alteração do tempo de retenção global 97

Este capítulo descreve os conceitos de identificação do pico.

# O que é identificação do pico?

A identificação do pico identifica os compostos em uma amostra desconhecida baseada nas suas características cromatográficas.

A identificação destes compostos é uma etapa necessária na quantificação se o método analítico necessitar de quantificação. É possível criar um método de processamento válido com identificação, mesmo sem quantificação. As características de cada componente de interesse são armazenadas na tabela de composto do método.

A função do processo de identificação do pico é comparar cada pico no sinal com os picos armazenados na tabela de composto.

A identificação é baseada no tempo de retenção esperado, janela do tempo de retenção absoluto e janela do tempo de retenção relativo em %. A janela do tempo de retenção final é a soma das janelas relativa e absoluta, aplicada simetricamente ao tempo de retenção esperado.

O tempo de retenção esperado é especificado no método como valor do tempo absoluto ou calculado a partir de um tempo de retenção relativo. Os compostos de referência de tempo podem ser utilizados para corrigir os tempos de retenção esperados com base em possíveis mudanças observadas pelos compostos de referência específicos.

$$\text{Wnd Wdth} = \text{Abs R T Wnd} + \frac{\text{RT Esper.} * \text{Rel R T Wnd}}{100}$$

onde

| | |
|---|---|
| Abs R T Wnd | Janela do tempo de retenção absoluto |
| Exp R T | Tempo de retenção esperado |
| Rel R T Wnd | Janela do tempo de retenção relativo |
| Wnd Wdth | Largura da janela |

R T Wnd = [Exp R T - Wnd Wdth; Exp R T + Wnd Wdth]

onde

| | |
|---|---|
| Exp R T | Tempo de retenção esperado |
| R T Wnd | Janela do tempo de retenção |
| Wnd Wdth | Largura da janela |

## Avaliação da janela do tempo de retenção

A janela de identificação é a soma da janela relativa e absoluta, aplicada simetricamente ao tempo de retenção esperado. Por exemplo:

Tempo de retenção esperado = 1 min

Janela do tempo de retenção absoluto = 0,2 min

Janela do tempo de retenção relativo = 10 % = 1 min * 10/100 = 0,1 min

Janela de identificação = [1 - 0,2 - 0,1 ; 1 + 0,2 + 0,1] = [0,7 ; 1,3]

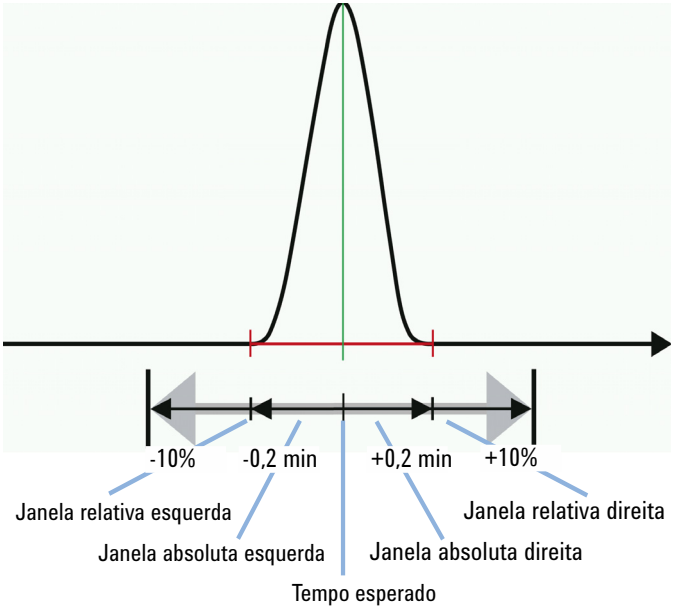



**Figura 79 Janela de identificação**

# Resolução de conflito

Se vários picos estão entre a janela do tempo de retenção, existem diferentes formas de como identificar um pico específico. É possível escolher entre os seguintes valores para **Coincidir pico** nos parâmetros de identificação do composto:

- **Primeiro**: Utiliza o primeiro pico na janela do tempo de retenção.
- **Último**: Utiliza o último pico na janela do tempo de retenção.
- **Mais próximo** (configuração padrão): Utiliza o pico mais próximo ao tempo de retenção esperado.
- **Maior área**: Utiliza o pico com a maior área na janela do tempo de retenção.
- **Maior altura**: Utiliza o pico com a maior altura na janela do tempo de retenção.

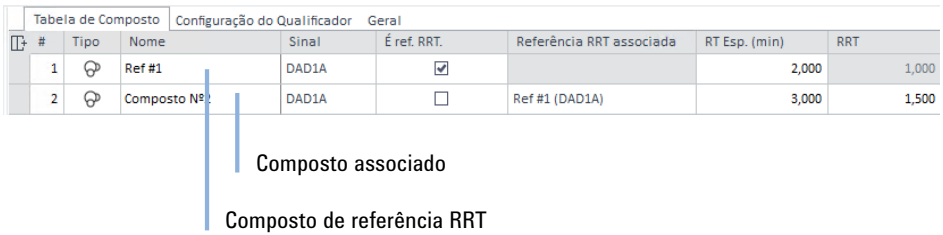
Se o conflito não for resolvido, nenhum dos picos será identificado e um aviso será escrito no log de processamento.

# Tempo de retenção relativos

É possível utilizar os tempos de retenção relativos para verificar se a identificação dos seus compostos está correta. O tempo de retenção de um composto é comparado ao tempo de retenção de outro composto específico (também denominado como Referência RRT). A razão dos dois tempos de retenção, isto é, o tempo de retenção relativo RRT é normalmente um número conhecido que você pode oferecer no aplicativo.

Os valores RRT não têm nenhum impacto na identificação do composto. Apenas os tempos de retenção esperados absolutos são utilizados para este propósito. Eles são especificados no método de processamento como valores do tempo absoluto ou calculados a partir de um tempo de retenção relativo. Os compostos de referência de tempo ou atualizações do método podem ser usados para corrigir estas janelas dos tempos de retenção absoluto baseados em possíveis alterações.

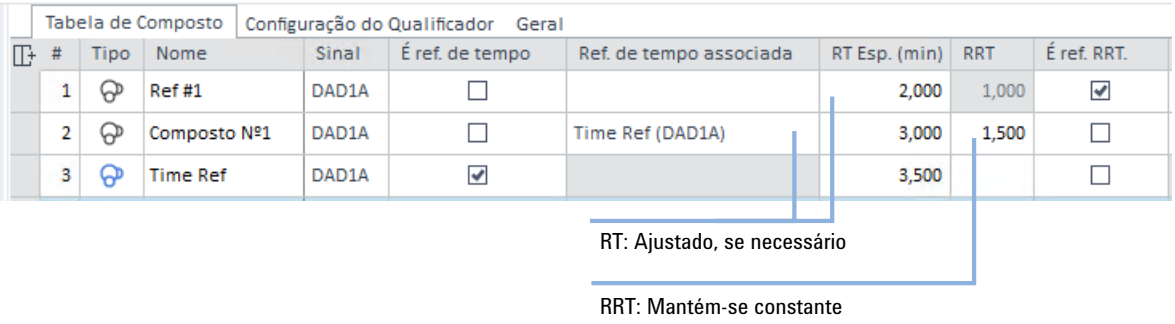
O seguinte exemplo mostra os parâmetros de identificação para um composto de referência RRT com um composto associado.



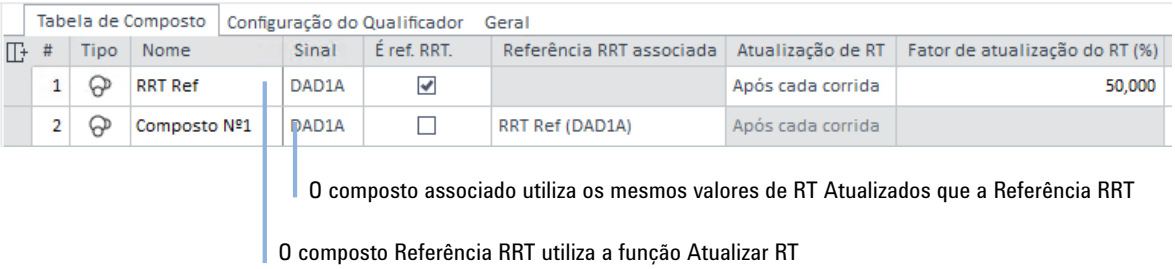

Se você alterar o RT esperado do composto associado, o valor do TRR do mesmo será recalculado automaticamente. E vice versa, se você alterar o valor RRT, o RT esperado será recalculado.

Se alterar o RT esperado do composto de referência RRT, o sistema recalcula o RT esperado dos compostos associados.

Se utilizar os *compostos de referência de tempo* com compostos de referência RRT, a alteração do tempo de retenção é aplicada ao composto de referência RRT (consulte "Cálculos para compostos de referência de tempo" na página 92). O sistema recalcula o RT esperado do composto associado para que os valores RRT não sejam alterados.




É possível também utilizar a função **Atualizar RT** com compostos de referência RRT. No entanto, só é possível configurar os parâmetros de atualização para os compostos de referência RRT. Os compostos associados são forçados a utilizar os mesmos valores como referências, para que os valores RRT não sejam alterados.




Para *picos não identificados*, não há compostos associados. Nesse caso, o primeiro composto de referência RRT é usado para calcular o valor de RRT.

## Cálculos para tempos de retenção relativos (RRT)

Cálculo do tempo de retenção relativo (RRT) a partir dos tempos de retenção esperados:

$$RRT = RT_{composto}\ esperado / RT_{referência}\ esperado$$

Se alterar o valor RRT do composto associado, o RT esperado é recalculado da seguinte forma:

$$RT\ Esperado_{composto} = RRT * RT\ esperado_{referência}$$

# Composto de referência de tempo

## Sobre os compostos de referência de tempo

Se utilizar os compostos de referência de tempo, o aplicativo corrige as janelas do tempo de retenção absoluto baseado em possíveis alterações observadas pelos compostos de referência específicos.

É possível marcar um ou mais compostos no método de processamento como compostos de referência de tempo. Para cada composto ou grupo de tempo, um composto de referência de tempo pode ser selecionado para corrigir o tempo de retenção esperado. A extensão da correção pode ser ajustada por um fator de correção individual que pode ser selecionado para cada composto para corrigir o tempo de retenção esperado (coluna **Fator**, padrão = 1).

Se um composto tiver um composto de referência de tempo atribuído a ele, o tempo de retenção esperado será corrigido pela alteração do composto de referência de tempo atribuído. O algoritmo de identificação do composto utilizará o tempo de retenção esperado corrigido para identificar o pico no cromatograma. No caso de grupos com tempo, os intervalos de tempo são corrigidos pela alteração. Geralmente a alteração é corrigida pelo fator de correção inserido. Se um composto de referência associado não for encontrado no cromatograma, os picos e grupos de tempo vinculados não são identificados.

Se *padrões internos* forem utilizados e **Utilizar compostos referência de tempo** for selecionado, os padrões internos são, por padrão, definidos como compostos de referência de tempo.

Se utilizar *compostos de referência de tempo* e compostos de referência RRT, o $RT_{referência}$ esperado e $RT_{composto}$ esperado são ajustados para que o RRT permaneça constante.

**NOTA**

Ao utilizar compostos de referência de tempo, *todos* os compostos e grupos com tempo devem ter um composto de referência de tempo atribuído a eles. Caso contrário, o método estará inconsistente e não poderá ser utilizado para reprocessamento.

# Cálculos para compostos de referência de tempo

Se utilizar os compostos de referência de tempo, o aplicativo corrige as janelas do tempo de retenção absoluto baseado em possíveis alterações observadas pelos compostos de referência de tempo selecionados.

**Alteração do composto de referência de tempo**

$$Alteração_{Ref} = RTReal_{Ref} - RTEsp_{Ref}$$

onde

| | |
|---|---|
| $Alteração_{Ref}$ | Alteração de tempo do composto de referência |
| $RTReal_{Ref}$ | Tempo de retenção real do composto de referência |
| $RTEsp_{Ref}$ | Tempo de retenção esperado do composto de referência |

**RT de composto associado**

Para compostos que utilizam uma referência de tempo, o tempo de retenção esperado é calculado utilizando um fator adicional.

$$RTEsperadoCorrig = RTEsperado + (Alteração_{Ref} * Fator)$$

onde

| | |
|---|---|
| RTEsperadoCorrig | Retenção esperada corrigida |
| RTEsperado | Tempo de retenção esperado |
| $Alteração_{Ref}$ | Alteração de tempo do composto de referência de tempo |
| Fator | Fator para compostos com composto de referência de tempo associado (**Fator**) |

**Tempo inicial e hora de parada do grupo com tempo associado**

Para grupos com tempo, os tempos inicial e final são calculados de acordo com:

$$Início\ do\ intervalo\ corrigido = Início\ do\ intervalo + (Alteração_{Ref} * Fator)$$

$$Fim\ do\ intervalo\ corrigido = Fim\ do\ intervalo + (Alteração_{Ref} * Fator)$$

onde

| | |
|---|---|
| Início do intervalo corrigido | Tempo de início do grupo temporizado corrigido |
| Início do intervalo | Tempo de início do grupo temporizado |
| Final do intervalo corrigido | Hora de parada do grupo temporizado corrigido |
| Final do Intervalo | Hora de parada do grupo temporizado |
| $Alteração_{Ref}$ | Alteração de tempo do composto de referência de tempo |
| Fator | Fator para grupos com tempo com um composto de referência de tempo associado (**Fator**) |

# Atualizar método de processamento

## Atualizações do tempo de retenção

Baseado no tipo de atualização do tempo de retenção (**Nunca**, **Após cada corrida** ou **Após padrões de calibração**) de todos os compostos ou grupos temporizados, o tempo de retenção esperado no método de processamento é atualizado automaticamente após o tempo de retenção esperado corrigido ter sido calculado. Se o composto puder ser encontrado no valor corrigido, o valor corrigido torna-se o novo valor esperado no método.

As atualizações do tempo de retenção podem ser aplicadas com ou sem referências de tempo.

NOTA

Se a atualização do tempo de retenção estiver definida para **Após cada corrida** ou **Após padrões de calibração**, todas as injeções são processadas em ordem sequencial. A alteração no método será aplicada com a próxima injeção e nenhum processamento paralelo de injeções que não forem de calibração poderá ser realizado.

Além de atualizar os tempos de retenção durante a execução, é possível também alterar manualmente todos os tempos de retenção por um dado valor.

# Cálculos para tempos de retenção atualizados

Para corrigir os tempos de retenção esperados, o aplicativo lê o tempo de retenção atual e calcula a alteração para o tempo de retenção esperado. Esta alteração, multiplicada por um fator de ponderação de composto específico, é adicionada ao tempo de retenção esperado.

Alteração = RTReal - RTEsp

onde

| | |
|---|---|
| Alteração | Alteração de tempo do composto |
| RTReal | Tempo de retenção real do composto |
| RTEsperado | Tempo de retenção esperado do composto |

$$\text{NovoRTEsp} = \text{RTEsperado} + \left(\text{Alteração} * \frac{\text{AtualizarRT}}{100}\right)$$

onde

| | |
|---|---|
| NovoRTEsp | Tempo de retenção esperado corrigido do composto |
| RTEsperado | Tempo de retenção esperado do composto |
| Alteração | Alteração de tempo do composto |
| AtualizarRT | Fator de ponderação (**Fator de atualização do RT [%]**) do composto |

## Tempos de retenção atualizados com compostos de referência de tempo

É possível utilizar atualizações RT com ou sem *referências de tempo.* A alteração e os tempos de retenção corrigidos dos compostos de referência de tempo são calculados da mesma forma que qualquer composto, utilizando a função *Atualizar RT:*

$$\text{NovoRTEsp Ref} = \text{RTEsp}_{Ref} + \left(\text{Alteração}_{Ref} * \frac{\text{AtualizarRT}_{Ref}}{100}\right)$$

onde

| | |
|---|---|
| $\text{NovoRTEsp}_{\text{Ref}}$ | Tempo de retenção esperado corrigido do composto de referência |
| $\text{ExpR T}_{\text{Ref}}$ | Tempo de retenção esperado do composto de referência |
| $\text{Alteração}_{\text{Ref}}$ | Alteração de tempo do composto de referência |
| $\text{AtualizarRT}_{\text{Ref}}$ | Fator de ponderação (**Fator de atualização do RT [%]**) do composto de referência |

O tempo de retenção corrigido de um composto associado a uma referência de tempo é calculado usando um fator adicional:

$$\mathrm{NewExpRT} = \mathrm{ExpRT} + \left( \mathrm{Shift}_{\mathrm{Ref}} * \frac{\mathrm{RTUpdate}}{100} * \mathrm{Factor} \right)$$

onde

| | |
|---|---|
| NovoRTEsp | Tempo de retenção esperado corrigido do composto |
| RTEsp | Tempo de retenção esperado do composto |
| $\mathrm{Alteração}_{\mathrm{Ref}}$ | Alteração de tempo do composto de referência |
| AtualizarRT | Fator de ponderação (**Fator de atualização do RT [%]**) do composto |
| Fator | Fator para compostos com composto de referência de tempo associado (**Fator**) |

No caso dos *grupos temporizados*, o tempo de retenção esperado, o tempo inicial do intervalo ou o tempo final do intervalo são atualizados apenas se utilizar referências de tempo ou tempos de retenção relativos.

## Exemplo: Atualizações do tempo de retenção com RRT

Se você atualizar automaticamente os tempos de retenção e também utilizar os tempos de retenção relativos, os valores são atualizados da seguinte forma:

- O RT esperado do composto de referência RRT é calculado conforme mostrado na equação para NewExpRT (consulte "Cálculos para tempos de retenção atualizados" na página 94)
- O RT esperado do composto associado é ajustado para manter os valores de RRT constantes, conforme mostrado na equação para o $\mathrm{RT\ Esperado}_{\mathrm{composto}}$ (consulte "Cálculos para tempos de retenção relativos (RRT)" na página 90)
- Os tempos Iniciar RT e Parar RT de um grupo temporizado são ajustados para manter os valores de RRT constantes, utilizando a mesma equação como para o $\mathrm{RT\ Esperado}_{\mathrm{composto}}$.

Por exemplo, considere um método de processamento com 3 compostos e um Grupo Temporizado, onde Atualizar RT e RRT são utilizados:

Tabela de Composto | Configuração do Qualificador | Geral

| # | Tipo | Nome | Sinal | É ref. RRT. | Referência RRT associada | Atualização de RT | Fator de atualização do RT (%) | RT Esp. (min) | RRT |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | Grupo Nº1 | DAD1A | ☐ | RRT Ref (DAD1A) | Após cada corrida | | 0,000 | |
| 3 | | RRT Ref | DAD1A | ☑ | | Após cada corrida | 50,000 | 3,000 | 1,000 |
| 4 | | C2 | DAD1A | ☐ | RRT Ref (DAD1A) | Após cada corrida | | 6,000 | 2,000 |
| 2 | | C3 | DAD1A | ☐ | RRT Ref (DAD1A) | Após cada corrida | | 1,500 | 0,500 |

**Figura 80 Parâmetros do composto**

Parâmetros de Eventos de Tempo

☐ Incluir picos identificados

☐ Quantificar cada pico individualmente

| Iniciar RT | Iníco RRT | Parar RT | Parar RRT |
|---|---|---|---|
| 3,000 | 1,00 | 6,000 | 2,00 |

**Figura 81 Parâmetros de grupo temporizado**

Após processar uma injeção, os 3 compostos foram encontrados nos seguintes tempos de retenção:

- RRT ref.: 4,000 min
- C2: 8,000 min
- C3: 2,000 min

Como resultado, o RT esperado do composto de referência RRT é corrigido da seguinte forma:

$$\text{NovoRTEsp} = \text{RTEsperado} + \left(\text{Alteração} * \frac{\text{AtualizarRT}}{100}\right)$$

$$\text{NovoRTEsp} = 3{,}000\ \textit{mín.} + \left((4{,}000\ \textit{mín.} - 3{,}000\ \textit{mín.}) * \frac{50}{100}\right) = 3{,}500\ \textit{mín.}$$

Os tempos de retenção esperados dos outros compostos, bem como dos tempos de início e fim do grupo temporizado são ajustados, para que o RRT seja constante.

$RT\ Esperado_{composto} = RRT * RT\ esperado_{referência}$

$RT_{C2}$ esperado = 2,000 * 3,500 min = 7,000 min

$RT_{C3}$ esperado = 0,500 * 3,500 min = 1,750 min

$InícioRT_{GrupoTemp}$ = 1,000 * 3,500 min = 3,500 min

$FimRT_{GrupoTemp}$ = 2,000 * 3,500 min = 7,000 min

# Cálculo para alteração do tempo de retenção global

Como parte da edição do método, você pode alterar todos os tempos de retenção esperados e intervalos de tempo para grupos temporizados de uma só vez. Os novos tempos de retenção são calculados da seguinte forma.

Alteração absoluta:

NovoRTEsp = RTEsperado + Alteração

onde

| | |
|---|---|
| NovoRTEsp | Tempo de retenção esperado corrigido do composto |
| RTEsperado | Tempo de retenção esperado do composto |
| Alteração | Valor absoluto inserido pelo usuário |

Alteração relativa:

$$\text{NovoRTEsp} = \text{RTEsperado} + \left(\text{RTEsperado} * \frac{\text{Alteração}}{100}\right)$$

onde

| | |
|---|---|
| NovoRTEsp | Tempo de retenção esperado corrigido do composto |
| RTEsperado | Tempo de retenção esperado do composto |
| Alteração | Valor relativo inserido pelo usuário |

# 5 Calibração

O que é calibração? 99
Curva de calibração 100
O que é uma curva de calibração 100
Tipo de resposta e fator de resposta 101
Nível de calibração 106
Ponderação de pontos de calibração 108
Modelos de curvas de calibração 111
Cálculos da curva de calibração 113
Parâmetros para o cálculo da curva 114
Ajuste linear 115
Ajuste quadrático 116
Ajustes logarítmicos e exponenciais 119
Ajuste de RF médio 120
Avaliação da curva de calibração 121
Verificação da curva de calibração 121
Valores residuais relativos 121
Estatísticas da Curva de Calibração 123

Este capítulo contém detalhes sobre cálculos utilizados no processo de calibração.

# O que é calibração?

Depois que os picos tiverem sido integrados e identificados, a próxima etapa na análise quantitativa é a calibração. A quantidade e a resposta raramente têm proporção direta com a massa real da amostra a ser analisada. Isso torna necessária a calibração com materiais de referência. A quantificação utiliza a área ou altura do pico para determinar a quantidade de um composto em uma amostra.

Uma análise quantitativa envolve muitas etapas que estão brevemente resumidas a seguir:

- Conheça o composto que você está analisando.
- Estabeleça um método para analisar amostras contendo uma quantidade conhecida desse composto, que é chamada amostra ou padrão de calibração.
- Analise a amostra de calibração para obter a resposta devida para aquela quantidade.

  Como alternativa, você pode analisar uma série desses padrões com diferentes quantidades dos compostos de interesse se o seu detector tiver uma resposta não linear. Esse processo é denominado *calibração multinível*.

Você pode realizar a quantificação com os seguintes métodos de calibração:

- Calibração específica de um composto (ESTD, ISTD)
- Quantificação indireta usando fator de resposta ou calibração de outro composto ou grupo
- Fator de resposta fixo (**Fator manual**)

Os cálculos e as curvas de calibração ESTD são baseados em respostas medidas (área ou altura) de determinadas quantidades. Os cálculos e as curvas de calibração ISTD são baseados em respostas relativas e quantidades relativas (consulte "Respostas relativas com ISTD" na página 103).

# Curva de calibração

## O que é uma curva de calibração

Uma curva de calibração é uma representação gráfica dos dados de resposta e quantidade para um composto obtido a partir de uma ou mais amostras de calibração.

Normalmente, é injetada uma alíquota da amostra de calibração, é obtido um sinal e a resposta é determinada calculando a área ou altura do pico, similar à figura a seguir.

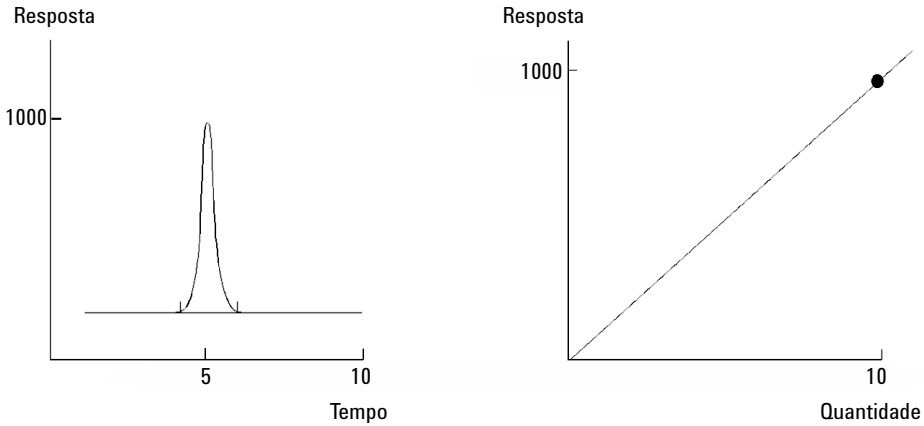


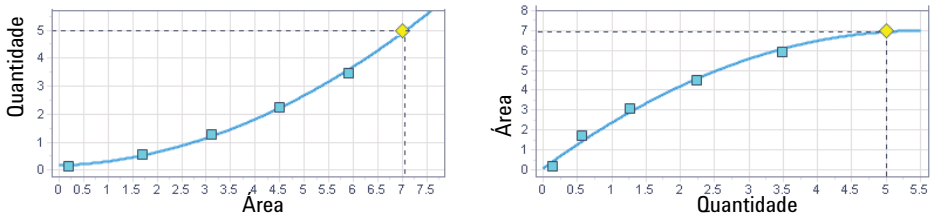

**Figura 82 Amostra de calibração, sinal, e curva de calibração**

# Tipo de resposta e fator de resposta

Há diferentes configurações que permitem a você escolher quais valores são representados nos eixos x e y da curva de calibração:

## Definição do FR

O fator de resposta (FR) é uma medida da extensão de alteração do sinal caso um composto seja detectado. É definido como a proporção da resposta em relação à quantidade do composto ou vice-versa. Nas configurações gerais de métodos em **Definição do FR**, você pode alternar entre **Resposta por quantidade** (padrão) ou **Quantidade por resposta**. Ao alterar essa configuração, você troca de posição os eixos x e y da curva de calibração.




Quantidade por resposta

Resposta por quantidade (padrão)

**Figura 83 Definições diferentes do FR, Resposta definida como Área**

Cálculo do FR:

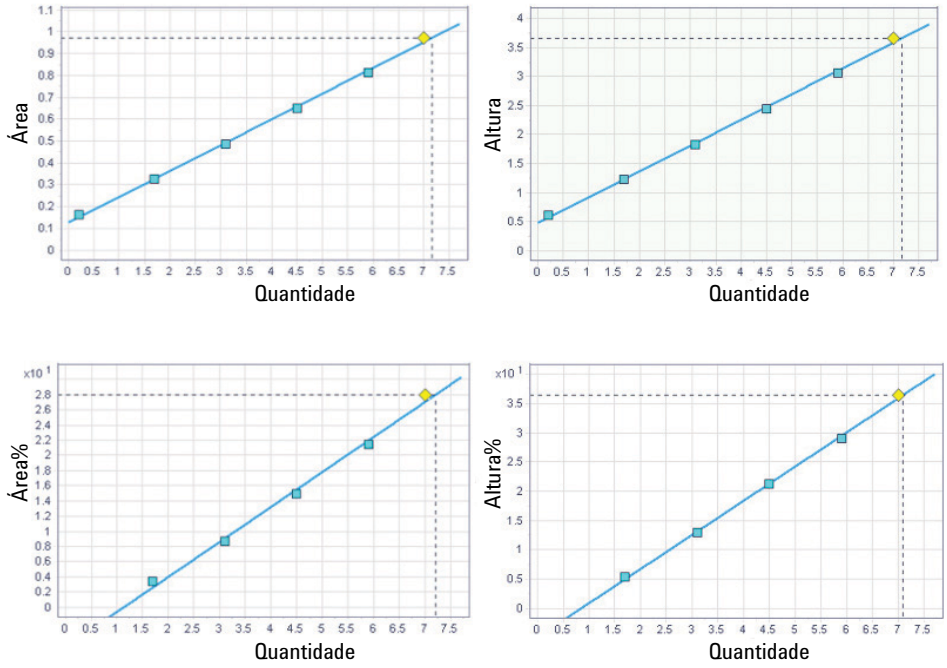
FR = Resposta/Quantidade

ou

FR = Quantidade/Resposta

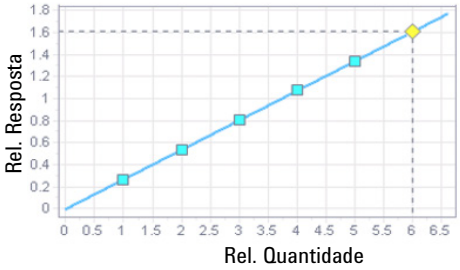
## Tipo de resposta

A resposta em si pode ser definida como **Área**, **Área%**, **Altura** ou **Altura%**. Você pode escolher o tipo de resposta individualmente para cada composto.

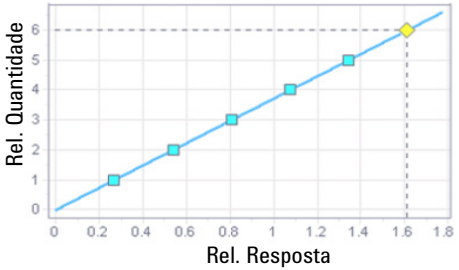


## Respostas relativas com ISTD

Se você utilizar os padrões internos (ISTDs) na sua amostra, respostas relativas e quantidades relativas serão exibidas na curva de calibração. O cálculo depende da definição do FR.




Resposta por quantidade (padrão)




Quantidade por resposta

Cálculo do FR:

FR = (Resposta/Resposta ISTD) / (Quantidade/Quantidade ISTD)

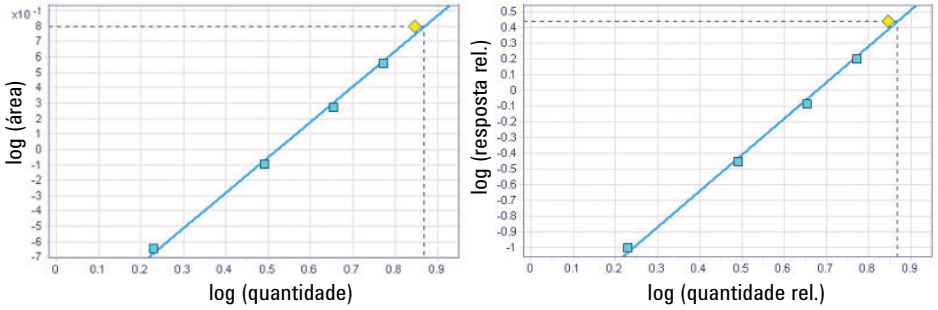
ou

FR = Quantidade/Quantidade ISTD) / (Resposta/Resposta ISTD)

## Modelo de curva log/log

Se você selecionar o modelo de curva **log/log** para um composto, a quantidade e a resposta serão representadas como valores logarítmicos.

Você pode usar o modelo **log/log** em conjunto com ambas as definições de FR, com todos os tipos de resposta e com padrões internos ou externos.




Resposta por quantidade (padrão) Quantidade por resposta

**Figura 84 Exemplo para modelo log/log com padrões externos ou internos**

Cálculo do FR para os exemplos mostrados acima:

FR = log (Resposta) / log (Quantidade)

FR = log (Resposta/Resposta ISTD) / log(Quantidade/Quantidade ISTD)

## Resposta em escala

Caso selecione uma resposta em escala, a resposta será representada como um valor calculado enquanto a quantidade será representada sem modificações.

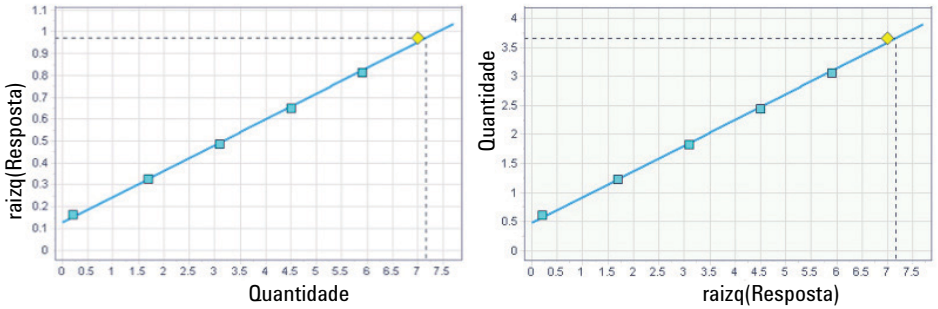



**Figura 85 Exemplos para uma resposta em escala usando a função raizq**

Cálculo do FR para os exemplos mostrados acima:

FR = raizq(Resposta)/Quantidade

ou

FR = Quantidade/raizq(Resposta)

# Nível de calibração

Existe um número global de níveis de calibração por método de processamento para todos os compostos. O número de níveis de calibração define quantos pontos (quantidade, resposta) são usados para calcular a curva de calibração. Você define cada nível processando o padrão de calibração correspondente. Para cada composto, a curva de calibração mostra os pontos de calibração que foram usados para calcular as médias.

Ao executar novamente um padrão de calibração ou ao processar padrões de calibração adicionais de um determinado nível de calibração, o ponto de calibração desse nível é atualizado. Se optar por usar valores médios nas configurações de **Cálculo da curva**, o ponto de calibração será atualizado pelo valor médio do novo ponto medido e todos os valores já existentes (consulte "Modos de usar pontos individuais" na página 106).

A coleta de pontos de calibração pode ser controlada pelo **Tipo de corrida** conforme segue:

- Nenhuma seleção: Um novo ponto será adicionado à curva de calibração.
- **Limpar toda a calibração**: Todos os pontos de calibração para todos os níveis de calibração são excluídos antes de os novos pontos de calibração serem salvos.
- **Apagar nível de calibração**: Todos os pontos de calibração para o nível de calibração fornecido são excluídos antes de os novos pontos de calibração serem salvos.

Reprocessar a mesma injeção do padrão de calibração várias vezes atualizará o mesmo ponto de calibração na curva e não irá adicionar novos pontos.

## Modos de usar pontos individuais

É possível escolher por método de processamento como os pontos de calibração são usados para calcular a curva de calibração. Estão disponíveis os seguintes modos:

- **A partir da média por nível**: Quantidades e respostas de todos os pontos de calibração que contribuem para um nível terão sua média aferida e serão usadas para calcular a melhor curva de calibração.
- **A partir de pontos de calibração individuais**: Todas as quantidades e respostas dos pontos de calibração individuais serão usadas diretamente para determinar a curva de calibração.

### Média

A média de todas as corridas de calibração é calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Resposta} = \frac{((n-1) * \text{Resposta}) + \text{Resposta da medição}}{n}$$

onde

| | |
|---|---|
| n | Número de pontos de calibração |
| Resposta "Meas" | Resposta da medição |

## Calibração com bracket

Em calibrações com bracket, as amostras são agrupadas por calibrações pré-amostra e pós-amostra. Os padrões de calibração entre brackets de abertura e fechamento são processados primeiro e uma curva de calibração é calculada. Essa curva é então usada para calcular as amostras neste bracket.

Para todos os modos de bracketing, exceto **Personalizado**, uma operação de **Limpar toda a calibração** é executada automaticamente para todos os brackets de abertura. Para o modo de bracketing **Personalizado**, você pode definir o Tipo de corrida para **Limpar toda a calibração**, conforme necessário.

O bracketing é configurado na janela **Lista de Injeção**. Existem diferentes modos de bracketing:

- **Global**

  A curva de calibração é calculada com todos os padrões de calibração na sequência, começando com o primeiro e terminando com o último. Todas as amostras são reprocessadas *após* a curva de calibração ter sido calculada.

- **Sem overlap**

  Você deve ter pelo menos três conjuntos de padrões em sua sequência e pelo menos dois padrões no meio. Os padrões no meio da sequência são usados em apenas um único bracket.

  Se existirem mais de dois padrões no meio, estes serão divididos e alocados aos brackets anteriores e seguintes. Em caso de números de padrões ímpares no meio, o padrão extra será alocado ao bracket anterior.

- **Overlap**

  Você deve ter pelo menos três conjuntos de padrões em sua sequência. Os padrões no meio da sequência são usados em dois brackets (o bracket anterior e posterior).

- **Personalizado**

  Crie os brackets como necessário. Na coluna **Tipo de corrida**, é possível escolher, individualmente para cada padrão de calibração, quais níveis de calibração devem ser limpos. Se não escolher nenhum tipo de corrida, um bracket terá sua média feita pelo seu antecessor.

## Ponderação de pontos de calibração

Para compensar a variação da resposta em diferentes quantidades de calibração, você pode especificar a ponderação (ou importância) relativa dos vários pontos de calibração usados para gerar a curva.

O parâmetro que controla a ponderação é o **Método de Ponderação**. O peso padrão é igual para todos os níveis e o peso máximo para cada curva está normalizado em 1.

Estão disponíveis os seguintes fatores de ponderação:

### Nenhum

Todos os pontos de calibração têm pesos iguais.

$$p = 1$$

onde

| | |
|---|---|
| p | Fator de ponderação do nível de calibração |

### 1/Quantidade

Um ponto de calibração é ponderado pelo fator 1/Quantidade, normalizado com a menor quantidade de modo que o maior fator de ponderação seja 1. Se a origem estiver incluída, será atribuída a média das ponderações de outros pontos de calibração.

$$p = \frac{\text{Mínimo (Quantidades)}}{\text{Quantidades Atuais}}$$

onde

| | |
|---|---|
| Quantidade atual | Quantidade do nível |
| Mínimo (Quantidades) | A menor quantidade em todos os pontos (níveis) usados para a curva de calibração |
| p | Fator de ponderação do nível de calibração |

### 1/Quantidade ao quadrado

Um ponto de calibração é ponderado pelo fator 1/Quantidade$^2$, normalizado com a menor quantidade de modo que o maior fator de ponderação seja 1. Podem ser usadas ponderações quadráticas de pontos de calibragem, por exemplo, para ajustar uma diferença nos pontos de calibração. Isso garante que pontos de calibração mais próximos à origem, que normalmente podem ser medidos com mais precisão, obtenham um peso maior que pontos de calibração mais afastados da origem, que podem estar espalhados.

$$p = \frac{\text{Mínimo(Quantidades)}^2}{\text{Quantidades Atuais}^2}$$

onde

| | |
|---|---|
| Quantidade atual | Quantidade do nível |
| Mínimo (Quantidades) | A menor quantidade em todos os pontos (níveis) usados para a curva de calibração |
| p | Fator de ponderação do nível de calibração |

### 1/Resposta

Um ponto de calibração é ponderado pelo fator 1/Resposta, normalizado com a menor resposta de modo que o maior fator de ponderação seja 1. Se a origem estiver incluída, será atribuída a média das ponderações de outros pontos de calibração.

$$p = \frac{\text{Mínimo (Respostas)}}{\text{Resposta Atual}}$$

onde

| | |
|---|---|
| Resposta atual | Resposta de nível |
| Mínimo (Respostas) | Menor resposta em todos os pontos (níveis) usados para a curva de calibração |
| p | Fator de ponderação do nível de calibração |

### 1/Resposta ao quadrado

Um ponto de calibração é ponderado pelo fator 1/Resposta$^2$, normalizado com a menor resposta de modo que o maior fator de ponderação seja 1. Podem ser usadas ponderações quadráticas de pontos de calibragem, por exemplo, para ajustar uma diferença nos pontos de calibração. Isso garante que pontos de calibração mais próximos à origem, que normalmente podem ser medidos com mais precisão, obtenham um peso maior que pontos de calibração mais afastados da origem, que podem estar espalhados.

$$p = \frac{\text{Mínimo(Respostas)}^2}{\text{Resposta Atual}^2}$$

onde

| | |
|---|---|
| Resposta atual | Resposta de nível |
| Mínimo (Quantidades) | Menor resposta em todos os pontos (níveis) usados para a curva de calibração |
| p | Fator de ponderação do nível de calibração |

# Modelos de curvas de calibração

OpenLab CDS pode calcular a calibração de acordo com diferentes modelos. São suportados os seguintes modelos (consulte "Cálculos da curva de calibração" na página 113):

- Ajuste linear (consulte "Ajuste linear" na página 115)
- Ajuste quadrático (consulte "Ajuste quadrático" na página 116)
- Ajuste logarítmico e exponencial (consulte "Ajustes logarítmicos e exponenciais" na página 119)
- Ajuste de RF médio (consulte "Ajuste de RF médio" na página 120)

Você pode configurar o modelo da curva de calibração individualmente para cada composto calibrado.

## Tratamento da origem

A Aplicação pode considerar a origem do gráfico de diferentes formas ao calcular a curva de calibração. Você pode definir este parâmetro de maneira independente para cada composto. Dependendo do tipo de curva, só estão disponíveis opções de tratamento de origem específicas (por exemplo, você não pode forçar a curva através da origem com uma curva de calibração logarítmica).

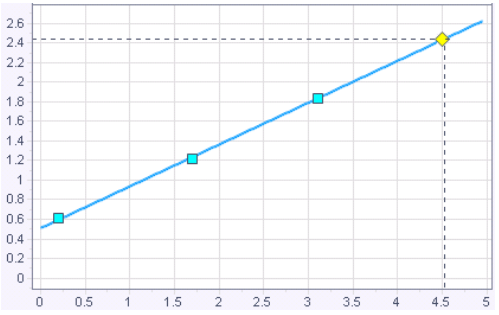



**Figura 86 Ignorar origem**

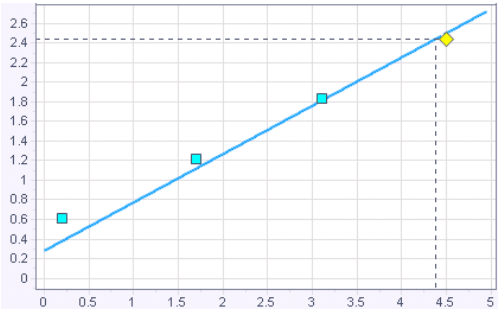



**Figura 87 Incluir a origem no cálculo**

Com a opção **Incluir**, um ponto com quantidade=0 e resposta=0 é adicionado aos níveis de calibração.

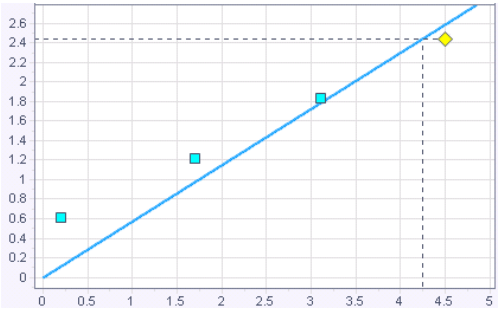



**Figura 88 Forçar a curva de calibração através da origem**

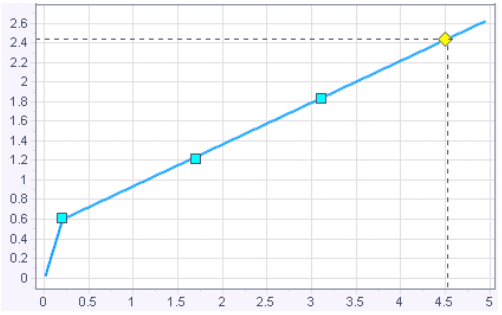



**Figura 89 Conectar a origem (não incluída no cálculo)**

# Cálculos da curva de calibração

A curva de calibração ideal é calculada fazendo a correspondência da curva com os pontos de calibração. O cálculo da curva é baseado em ajuste pelo método dos mínimos quadrados (LSQ), que minimiza a soma dos quadrados residuais. O tipo de curva é aplicado a pontos de calibração ponderados. O cálculo depende da definição do fator de resposta (Definição do FR, consulte "Tipo de resposta e fator de resposta" na página 101).

Com o FR definido como **Resposta por quantidade**:

$$\Sigma(p * (CalÁreaPonto - ÁreaCalculada)^2) = mín.$$

onde

| | |
|---|---|
| Σ | Soma dos pontos de calibração (níveis) |
| ÁreaCalculada | A área lida a partir da curva em uma quantidade do nível de calibração |
| CalÁreaPonto | Área do nível de calibração |
| p | Fator de ponderação do ponto de calibração |

$$\Sigma(p * (CalAlturaPonto - AlturaCalculada)^2) = mín.$$

onde

| | |
|---|---|
| Σ | Soma dos pontos de calibração (níveis) |
| AlturaCalculada | A altura lida a partir da curva na quantidade do nível de calibração |
| CalAlturaPonto | Altura do nível de calibração |
| p | Fator de ponderação do ponto de calibração |

Com o FR definido como **Quantidade por resposta**:

$$\Sigma(p * (CalQuantidadePonto - QuantidadeCalculada)^2) = mín.$$

onde

| | |
|---|---|
| Σ | Soma dos pontos de calibração (níveis) |
| QuantidadeCalculada | A quantidade lida a partir da curva na área ou altura do nível de calibração |
| CalQuantidadePonto | Quantidade do nível de calibração |
| p | Fator de ponderação do ponto de calibração |

# Parâmetros para o cálculo da curva

Todos os cálculos da curva utilizam os seguintes parâmetros:

| | |
|---|---|
| a, b, c | Coeficientes da curva |
| x | Com **Resposta por quantidade**:<br>Quantidade (ESTD) ou proporção de quantidade (ISTD)<br>Com **Quantidade por resposta**:<br>Área, Área%, Altura ou Altura% (ESTD)<br>Proporção de área ou proporção de altura (ISTD) |
| y | Com **Resposta por quantidade**:<br>Área, Área%, Altura ou Altura% (ESTD)<br>Proporção de área ou proporção de altura (ISTD)<br>Com **Quantidade por resposta**:<br>Quantidade (ESTD) ou proporção de quantidade (ISTD) |
| p | Fator de ponderação do nível de calibração |

# Ajuste linear

O cálculo da curva é baseado no ajuste com o método dos mínimos quadrados (consulte "Cálculos da curva de calibração" na página 113).

Fórmula da curva:

$$y = a * x + b$$

onde

| | |
|---|---|
| a | Inclinação |
| b | Intercepção em Y |

Cálculo de coeficientes da curva:

$$b = \frac{\sum(x^2 * wt) * \sum(y * wt) - \sum(x * y * wt) * \sum(x * wt)}{\sum(wt) * \sum(x^2 * wt) - \sum(x * wt)^2}$$

$$a = \frac{\sum(wt) * \sum(x * y * wt) - \sum(x * wt) * \sum(y * wt)}{\sum(wt) * \sum(x^2 * wt) - \sum(x * wt)^2}$$

São necessários pelo menos dois pontos de calibração para um ajuste linear.

## Incluir origem

Se a origem for incluída, o ponto (0,0) é adicionado aos outros pontos e ponderado pelo valor médio dos pesos dos outros pontos, isto é, o termo **Σ**(p) é aumentado com o valor médio dos pesos dos outros pontos.

## Forçar origem

Se a opção forçar origem for selecionada, a fórmula da curva será a seguinte:

$$y = a * x$$

onde

| | |
|---|---|
| a | Inclinação |

Cálculo do coeficiente da curva:

$$a = \frac{\sum(x * y * wt)}{\sum(x^2 * wt)}$$

Só é necessário um nível de calibração quando a origem for incluída ou forçada.

# Ajuste quadrático

Fórmula da curva quadrática:

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

São necessários pelo menos três pontos de calibração para o ajuste quadrático. São necessários dois pontos se a origem for incluída ou forçada.

## Cálculo de coeficientes para ajuste quadrático

Os coeficientes resultam das equações lineares simultâneas abaixo. O algoritmo de Crout é usado para resolver a equação da matriz normal correspondente ($A^TAx = A^Ty$). Na fórmula dada, as somas são abreviadas como:

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

A fim de evitar extravasamentos, os valores de x são normalizados antes de entrarem no cálculo:

Norma = $\Sigma(x)$

x = x / Norma

Equações normais para curva quadrática:

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

Ou escritas como equação da matriz:

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

Decomposição de Crout:

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

Com abreviações de valores:

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

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

Por fim, a normalização deve ser invertida:

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

### Forçar origem

Se a opção forçar origem for selecionada, o termo de offset *a* é colocado em zero ao criar as equações normais.

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

$$L11 = X2W$$
$$U12 = \frac{X3W}{L11}$$
$$L21 = X3W$$
$$L22 = X4W - (L21 * U12)$$

$$z0 = \frac{XYW}{L11}$$
$$z1 = \frac{X2YW - (L21 * z0)}{L22}$$
$$a' = z1$$
$$b' = z0 - (U12 * a')$$
$$b = \frac{b'}{Norm}$$
$$a = \frac{a'}{Norm^2}$$

### Incluir origem

Se a origem for incluída, o ponto (0,0) é adicionado aos outros pontos e ponderado pelo valor médio dos pesos dos outros pontos, isto é, o termo **Σ**(p) é aumentado com o valor médio dos pesos dos outros pontos.

# Ajustes logarítmicos e exponenciais

## Ajustes logarítmicos e exponenciais

Para calcular o ajuste exponencial e logarítmico, as escalas de quantidade ou resposta são transformadas usando a função ln. O ajuste da curva linear e os fatores de ponderação são aplicados aos dados transformados e a curva é calculada sobre os dados transformados.

As opções **Incluir origem** e **Forçar origem** não são válidas devido à singularidade da função ln na origem.

### Logarítmica

Fórmula da curva:

$y = a * \ln(x) + b$

Transformações: A escala *x* é transformada.

$x' = \ln(x); y' = y$

$y' = a * x' + b$

### Exponencial

Fórmula da curva:

$y = b * e^{a * x}$

Transformações: A escala *y* é transformada.

$x' = x; y' = \ln(y)$

$y' = \ln(b) + a*x'$

### Ajuste log/log

Para calcular o ajuste log/log, ambas as escalas de quantidade e resposta são transformadas usando a função. O ajuste da curva linear e os fatores de ponderação são aplicados aos dados transformados e a curva é calculada sobre os dados transformados.

As opções **Incluir origem** e **Forçar origem** não são válidas devido à singularidade da função log na origem.

Fórmula da curva:

$$\log(y) = a * \log(x) + b$$

Transformações: As escalas *x* e *y* são transformadas.

$$x' = \log(x); y' = \log(y)$$

$$y' = a * x' + b$$

## Ajuste de RF médio

Fórmula de RF médio:

$$y = a * x$$

onde

| | |
|---|---|
| a | Inclinação |

O aplicativo primeiro calcula o fator de resposta (RF) de cada amostra de calibração. Em seguida, é calculada a média de todos os fatores de resposta. O RF médio é indicado na legenda de curva de calibração e corresponde à inclinação da linha ("Tipo de resposta e fator de resposta" na página 101).

A interseção y é sempre zero, uma vez que a opção de forçar origem é usada automaticamente. O método de ponderação é definido automaticamente para **Nenhum**.

Com o ajuste de RF médio, r e $R^2$ não são relevantes nem calculados.

# Avaliação da curva de calibração

A qualidade do ajuste da curva de calibração com os níveis de calibração e a presença de valores discrepantes (medidas que estão longe da curva) podem ser avaliadas usando cálculos estatísticos. O cálculo da curva de calibração fornece um coeficiente de correlação e um desvio padrão relativo para cada curva, assim como um valor residual relativo para cada nível de calibração.

## Verificação da curva de calibração

Após os cálculos, as curvas de calibração são verificadas e são colocados avisos se:

- não houver pontos de calibração suficientes para o cálculo da curva
- a inclinação da curva for zero ou negativa
- a inclinação for infinita
- a curva de calibração não pode ser calculada (por exemplo, ao ultrapassar os limites numéricos)

## Valores residuais relativos

O valor residual é uma medida da distância do ponto de calibração da curva calculada:

$$\text{Residual} = y_i - Y_i$$

onde

| | |
|---|---|
| $y_i$ | Resposta medida (área ou altura) ou quantidade, dependendo do modo de calibração. |
| $Y_i$ | Resposta ou quantidade prevista para o nível i (calculada usando a curva). |

O valor residual relativo é calculado para cada nível de calibração utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{ValorResRelativo} = \frac{\text{Residual}}{Y_i} = \frac{(y_i - Y_i)}{Y_i}$$

onde

| | |
|---|---|
| $y_i$ | Resposta ou quantidade medida (área ou altura). |
| $Y_i$ | Resposta ou quantidade prevista para o nível i (calculada usando a curva). |

O valor residual relativo é frequentemente reportado em unidades de % (**% do ValorResRelativo**). Nesse caso, o **ValorResRelativo** deve ser multiplicado por 100.

# Estatísticas da Curva de Calibração

## Estatísticas da curva de calibração

O cálculo da curva de calibração fornece para cada curva os números do coeficiente de correlação, coeficiente de determinação e desvio padrão residual.

## Coeficiente de correlação

O coeficiente de correlação (r) dá uma medida do ajuste da curva de calibração entre os pontos de dados. É calculado utilizando a seguinte equação:

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

onde

| | |
|---|---|
| r | Coeficiente de correlação |
| $p_i$ | Peso do ponto de dados |
| $\bar{y}$ | Valores médios das respostas ou quantidades medidas<br>Se a curva de calibração for forçada através da origem (**Origem**=**Força** no método de processamento), o OpenLab CDS calcula o coeficiente de determinação não centrado. Neste caso, $\bar{y}$ é omitido. |
| yi | Resposta medida (Área, ProporçãoÁrea (método ISTD), Altura ou ProporçãoAltura (método ISTD)) ou quantidade (Quantidade, ProporçãoQuantidade (método ISTD)), dependendo do modo de calibração |
| $\bar{Y}$ | Valores médios das respostas ou quantidades previstas |
| Yi | Resposta ou quantidade prevista (usando a curva de calibração) |

$\bar{y}$ e $\bar{Y}$ são valores médios das respostas ou quantidades medidas e previstas, calculados da seguinte forma:

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

onde

| | |
|---|---|
| $p_i$ | Peso do ponto de dados |
| $\bar{y}$ | Valores médios das respostas ou quantidades medidas |
| yi | Resposta medida (Área, ProporçãoÁrea (método ISTD), Altura ou ProporçãoAltura (método ISTD)) ou quantidade (Quantidade, ProporçãoQuantidade (método ISTD)), dependendo do modo de calibração |

e

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

onde

| | |
|---|---|
| $p_i$ | Peso do ponto de dados |
| $\bar{Y}$ | Valores médios das respostas ou quantidades previstas |
| Yi | Resposta ou quantidade prevista (usando a curva de calibração) |

Para **Origem Forçada** presume-se que os pontos estejam centralizados em zero (refletidos no terceiro quadrante) e que os valores médios sejam substituídos por zero. Os programas de cálculos de terceiros podem usar uma abordagem diferente, o que gerará resultados ligeiramente diferentes.

O coeficiente de correlação é 1 para um ajuste perfeito. Reduz-se à medida que os pontos individuais ou médios de calibração se desviam da curva de regressão. Os valores típicos estão entre 0,99 e 1. O coeficiente de correlação não é uma medida direta de precisão do método analítico, mas valores baixos indicam baixa precisão.

## Coeficiente de determinação

O coeficiente de determinação ($R^2$) é calculado conforme segue:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - Y_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

onde

| | |
|---|---|
| $R^2$ | Coeficiente de determinação |
| $\bar{y}$ | Valores médios das respostas ou quantidades medidas<br>Se a curva de calibração for forçada através da origem (**Origem**=**Força** no método de processamento), o OpenLab CDS calcula o coeficiente de determinação não centrado. Neste caso, $\bar{y}$ é omitido. |
| yi | Resposta ou quantidade medida. A resposta pode ser área (Área, Área% ou ProporçãoÁrea [método ISTD]) ou altura (Altura, Altura% ou ProporçãoAltura [método ISTD]). A quantidade pode ser quantidade absoluta ou ProporçãoQuantidade (método ISTD). O tipo do valor depende do modo de calibração. |
| Yi | Resposta ou quantidade prevista (usando a curva de calibração) |

## Desvio padrão residual

O desvio padrão residual (às vezes denominado erro quadrado médio) é calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{DesPadrãoResidual} = \sqrt{\frac{\Sigma(y_i - Y_i)^2}{(n-d)}}$$

onde

| | |
|---|---|
| d = 3 | Grau de liberdade para uma curva quadrática, sem origem forçada |
| d = 2 | Grau de liberdade para uma curva quadrática com origem forçada, ou<br>Grau de liberdade para uma curva linear, sem origem forçada |
| d = 1 | Grau de liberdade para uma curva linear com origem forçada |
| DesPadrãoResidual | Desvio padrão residual |
| yi | Resposta medida (Área, ProporçãoÁrea (método ISTD), Altura ou ProporçãoAltura (método ISTD)) ou quantidade (Quantidade, ProporçãoQuantidade (método ISTD)), dependendo do modo de calibração |
| Yi | Resposta ou quantidade prevista (usando a curva de calibração) |
| n | número de pontos de calibração |

Para curvas de calibração com opção de **Incluir origem**, a origem (0,0) é incluída como um ponto regular no cálculo e contada por n.

Os valores de y não são ponderados.

O desvio padrão residual proporciona uma medida mais sensível da qualidade da curva que o coeficiente de correlação. Para um ajuste perfeito, o desvio padrão residual é zero. Com o aumento dos valores do desvio padrão residual, os pontos de calibração ficam mais longe da curva.

## Desvio padrão

O desvio padrão é calculado com a fórmula para *desvio padrão de população*:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(x_i - \mu)^2}$$

onde

| | |
|---|---|
| $\sigma$ | Desvio padrão |
| N | Número de amostras |
| $x_i$ | Resposta ou quantidade de valor medida. Para o *RF médio* de modelo de curva, esse é o fator de resposta de um composto em uma amostra única. |
| $\mu$ | Valor médio. Para o *RF médio* de modelo de curva, esse é o fator de resposta médio de um composto em todas as amostras. |

NOTA

Para o modelo de curva **RF médio**: Devido à população normalmente pequena relativamente (número de pontos de calibração), esta fórmula é usada em vez do desvio padrão de população da amostra (com N-1 como denominador).

## Desvio padrão relativo

O desvio padrão relativo é calculado da seguinte forma:

$$RSD = 100 \cdot \frac{\sigma}{\mu}$$

onde

| | |
|---|---|
| RSD | Desvio padrão relativo |
| $\sigma$ | Desvio padrão |
| $\mu$ | Valor médio |

# 6 Quantificação

O que é quantificação? 129
Cálculos de quantificação 129
Fatores de correção 130
Multiplicadores 130
Fator de diluição 130
% de massa e concentração 131
%Área e %Altura 132
Quantificação de compostos calibrados 133
Cálculo de ESTD 133
Cálculo do ISTD 135
Quantificação de compostos não calibrados 138
Quantificação indireta usando um composto calibrado 138
Quantificação usando um fator manual 139
Quantificação de picos não identificados 141
Quantificar picos não identificados usando um fator de resposta fixo 141
Quantificar picos não identificados usando um composto calibrado 141
Normalização 142
Calcular concentrações normalizadas 143
Calcular quantidades normalizadas 144
Quantificação de grupo 145
Definição de um grupo com tempo 145
Quantificar um grupo com tempo 147
Definição de um grupo nomeado 151
Quantificar um grupo nomeado 152

Este capítulo descreve como os compostos são quantificados e explica os cálculos utilizados na quantificação.

# O que é quantificação?

Após os picos terem sido integrados e identificados, a próxima etapa na análise é a quantificação. A quantificação utiliza a área ou altura do pico para determinar a quantidade de um composto em uma amostra.

Uma análise quantitativa envolve muitas etapas que estão brevemente resumidas a seguir:

- Analise a amostra que contém uma quantidade desconhecida do composto para obter a resposta devida para a quantidade desconhecida.
- Compare a resposta da quantidade desconhecida com a resposta da quantidade conhecida para determinar quanto do composto está presente.

Para obter uma comparação válida entre a resposta da amostra desconhecida e a amostra conhecida, os dados devem ser obtidos e processados em condições idênticas.

## Cálculos de quantificação

OpenLab CDS oferecem os seguintes procedimentos de cálculo para determinar a quantidade de cada componente presente em uma mistura:

- Porcentagem da Área ou Altura (Área% ou Altura%)
- Quantificação usando um Fator manual
- Padrão externo (ESTD)
- Padrão interno (ISTD)
- Quantificação indireta usando um composto calibrado

Os cálculos usados para determinar a concentração de um composto em uma amostra desconhecida dependem do tipo da quantificação. Cada procedimento de cálculo usa a área ou altura do pico para o cálculo e produz um tipo diferente de análise.

# Fatores de correção

Os cálculos de quantificação usam diferentes fatores de correção, o *multiplicador* (composto ou multiplicador de injeção) e o *fator de diluição*. Esses fatores são usados nos procedimentos de calibração para compensar variações na resposta do detector a diferentes componentes da amostra, concentrações, diluições de amostra, quantidades de amostra, purezas de compostos e para converter unidades.

## Multiplicadores

Os multiplicadores são usados em cada fórmula de cálculo para multiplicar o resultado para cada composto. Um multiplicador pode ser usado para converter unidades para expressar concentrações ou para corrigir a concentração e assim compensar diferentes purezas dos compostos padrão.

Os multiplicadores são definidos no nível da injeção (lista de injeções ou tabela de sequência) e no nível do composto (tabela de calibração, parte do método de processamento). Em OpenLab CDS, você pode configurar até 5 multiplicadores de injeção e 1 multiplicador de compostos.

O multiplicador para um composto conhecido é:

Multiplicador = Multiplicador do composto * Multiplicador de injeção 1 * Multiplicador de injeção 2 *...

## Fator de diluição

O fator de diluição é um número pelo qual a quantidade é multiplicada ou dividida para calcular a concentração (ver concentração). Os fatores de diluição são definidos no nível da injeção (coluna **Fator de diluição** na lista de injeções). Você pode usar o fator de diluição para alterar a escala dos resultados ou corrigir alterações na composição da amostra durante o trabalho de pré-análise. Você também pode usar o fator de diluição para qualquer outra finalidade que requeira o uso de um fator constante.

A diluição da amostra é uma combinação de até 5 fatores de diluição:

Diluição da amostra = Fator de diluição 1 * Fator de diluição 2 *...

# % de massa e concentração

A concentração é exibida na coluna **Concentração** nos resultados da injeção.

O cálculo depende das seguintes configurações (todas as configurações estão disponíveis na guia **Geral** do nó **Compostos >Calibração**):

- **Cálculo de concentração**: com esta configuração, é possível escolher entre usar fatores de diluição como um divisor ou como outro multiplicador.
- **Calcular % de massa**: calcular a concentração como porcentagem de massa (quantidade do composto em relação à quantidade de amostra).

Com **Calcular % de massa** desmarcada (esta é a configuração padrão):

Concentração = Quantidade * Multiplicadores * Fatores de diluição

ou

$$\text{Concentração} = \text{Quantidade} * \frac{\text{Multiplicadores}}{\text{Fatores de Diluição}}$$

Com **Calcular % de massa** selecionada:

A concentração é calculada como porcentagem de massa (quantidade do composto em relação à quantidade de amostra).

$$\text{Concentração} = \left(\frac{\text{Quantidade}}{\text{Quantidade de Amostra}} * 100\right) * \text{Multiplicadores} * \text{Fatores de Diluição}$$

ou

$$\text{Concentração} = \left(\frac{\text{Quantidade}}{\text{Quantidade de Amostra}} * 100\right) * \frac{\text{Multiplicadores}}{\text{Fatores de Diluição}}$$

Para mais informações sobre o cálculo de multiplicadores e fatores de diluição, consulte "Fatores de correção" na página 130.

# %Área e %Altura

O procedimento de cálculo **Área%** reporta a área de cada pico no sinal como uma porcentagem da área total de todos os picos no sinal. **Área%** não requer calibração prévia e não depende da quantidade de amostra injetada dentro dos limites do detector. Não são usados fatores de resposta. Se todos os componentes responderem igualmente no detector, a **Área%** fornecerá uma aproximação adequada das quantidades relativas de componentes.

A **Área%** é usada rotineiramente quando resultados qualitativos forem de interesse e para produzir informações a fim de criar a tabela de compostos necessária para outros procedimentos de calibração.

O procedimento de cálculo **Altura%** reporta a altura de cada pico no sinal como uma porcentagem da altura total de todos os picos no sinal.

Fatores de correção não são aplicados no cálculo de Área% ou Altura%.

# Quantificação de compostos calibrados

Os procedimentos de cálculo de padrão externo (ESTD), normalização e padrão interno (ISTD) requerem calibração e, portanto, utilizam uma tabela de compostos. A tabela de compostos especifica a conversão de respostas nas unidades que você escolher por meio do procedimento selecionado.

## Cálculo de ESTD

O procedimento de ESTD é o procedimento básico de quantificação no qual tanto a calibração como amostras desconhecidas são analisadas nas mesmas condições. Os resultados da amostra desconhecida são então comparados com aqueles da amostra de calibração para calcular a quantidade na amostra desconhecida.

O procedimento de ESTD utiliza fatores de resposta absolutos, diferentemente do procedimento de ISTD. Os fatores de resposta são obtidos a partir de uma calibração e depois armazenados. Nas corridas de amostras seguintes, as quantidades do composto são calculadas aplicando esses fatores de resposta às respostas de amostras medidas. Certifique-se de que o tamanho da injeção da amostra possa ser reproduzido de corrida em corrida, uma vez que não há nenhum padrão na amostra para corrigir variações no tamanho da injeção ou na preparação da amostra.

Ao preparar uma análise de ESTD, o cálculo da quantidade de um composto em particular em uma amostra desconhecida ocorre em duas etapas:

1. Uma equação para a curva através dos pontos de calibração para esse composto é calculada usando o tipo de ajuste especificado nas configurações **Modo** e **Origem** na tabela de compostos.
2. A quantidade do composto na amostra desconhecida é calculada usando a equação descrita acima. Essa quantidade pode aparecer no relatório ou pode ser usada em cálculos adicionais exigidos por valores de multiplicador de amostras, multiplicador de compostos ou fator de diluição sendo reportados.

### Calibração de nível único

No caso da calibração de nível único, o fator de resposta é simplesmente a razão entre resposta e quantidade do ponto de calibração. Se as opções **Incluir origem** e **Forçar origem** forem desativadas, será emitido um alerta.

O fator de resposta FR é definido como uma razão de resposta e quantidade ou vice-versa (consulte "Definição do FR" na página 101). Para calcular o FR, o aplicativo utiliza a quantidade do composto da amostra de calibração e a resposta correspondente da amostra de calibração.

A fórmula para o cálculo da calibração de nível único dos resultados de ESTD depende do tipo de resposta que você definiu no método de processamento:

Quantidade = Área do pico / FR

ou:

Quantidade = Altura do pico / FR

onde

| | |
|---|---|
| Quantidade | Quantidade do composto |
| FR | Fator de resposta |

Para detalhes sobre o cálculo de concentrações, consulte "% de massa e concentração" na página 131.

### Calibração multinível

Para a calibração multinível, o fator de resposta é avaliado a partir da curva de calibração.

# Cálculo do ISTD

O procedimento de ISTD elimina as desvantagens do método ESTD adicionando uma quantidade conhecida de um composto que serve de fator normalizador. Esse composto, o *padrão interno*, é adicionado tanto às amostras desconhecidas como às amostras de calibração.

O composto utilizado como padrão interno deve ser similar ao composto calibrado, tanto quimicamente como em tempo de retenção/migração, mas deve ser diferenciável cromatograficamente.

**Tabela 8 Procedimento de ISTD**

| Vantagens | Desvantagens |
|---|---|
| A variação no tamanho da amostra não é fundamental.<br><br>A oscilação do instrumento é compensada pelo padrão interno.<br><br>Os efeitos de preparações de amostras são minimizados se o comportamento químico do ISTD e da amostra desconhecida forem similares. | O padrão interno deve ser adicionado a todas as amostras. |

Se o procedimento de ISTD for utilizado para calibrações com uma característica não linear, deve-se tomar cuidado para que erros resultantes do princípio de cálculo não causem erros sistemáticos. Em calibrações multinível, a quantidade do composto de ISTD deve ser mantida constante, ou seja, a mesma para todos os níveis.

Na análise do padrão interno, a quantidade do composto de interesse está relacionada à quantidade do componente do padrão interno pela razão das respostas dos dois picos.

O OpenLab CDS permite até 5 compostos de ISTD.

Para o cálculo do ISTD, são utilizadas respostas relativas e quantidades relativas em vez das respostas e quantidades "brutas". Elas são calculadas dividindo a resposta e a quantidade do pico de interesse pela resposta e quantidade do composto de ISTD correspondente:

$$\text{Resposta relativa} = \text{Resposta} / \text{Resposta}_{\text{ISTD}}$$

$$\text{Quantidade relativa} = \text{Quantidade} / \text{Quantidade}_{\text{ISTD}}$$

A resposta pode ser Área, % Área, Altura ou % Altura (consulte "Tipo de resposta e fator de resposta" na página 101).

Em uma calibração ISTD, o cálculo da razão de quantidade corrigida de um composto em particular em uma amostra desconhecida ocorre em vários estágios. Esses estágios são descritos nas seções a seguir.

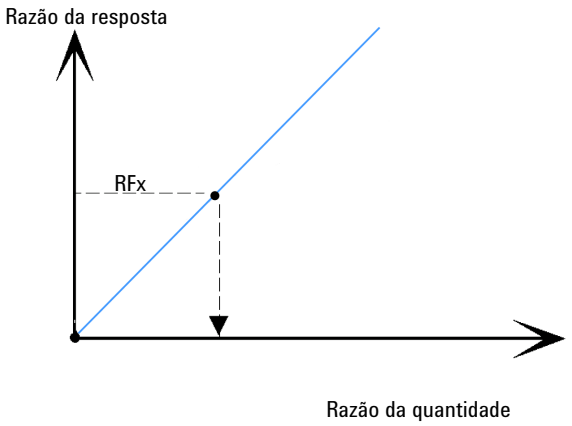
## Amostras de calibração

1 Os pontos de calibração são construídos calculando uma razão de quantidade e uma razão de resposta para cada nível de um composto em particular na tabela de compostos.

   A razão da quantidade é a quantidade do composto dividida pela quantidade do padrão interno nesse nível.

   A razão da resposta é a resposta (área ou altura) do composto dividida pela resposta do padrão interno nesse nível.

2 Uma equação para a curva através dos pontos de calibração é calculada usando o tipo de modelo de curva especificado na tabela de compostos do método de processamento.




## Amostra desconhecida

1 A resposta do composto na amostra desconhecida é dividida pela resposta do padrão interno na amostra desconhecida para dar uma razão de resposta para a amostra desconhecida.

2 Uma razão de quantidade para a amostra desconhecida é calculada usando a equação do modelo de curva determinada na "Amostras de calibração" na página 136 e a quantidade real de ISTD na amostra.

### Calibração ISTD de nível único

No caso da calibração de nível único, o fator de resposta relativa (FRR) é avaliado usando valores de resposta e quantidade de amostras de calibração. Dependendo da definição do FR nas configurações gerais de calibração, se aplica uma das seguintes fórmulas:

Com o FR definido como **Resposta por quantidade**:

$$\mathrm{FRR} = \frac{\mathrm{ResRelativa}}{\mathrm{QuanRelativa}}$$

Com o FR definido como **Quantidade por resposta**:

$$\mathrm{FRR} = \frac{\mathrm{QuanRelativa}}{\mathrm{ResRelativa}}$$

onde

| | |
|---|---|
| FRR | Fator de resposta relativa |
| ResRelativa | Resposta relativa |
| QuanRelativa | Quantidade relativa |

A quantidade e a concentração são calculadas de acordo com as fórmulas a seguir, usando o valor de resposta da medição da amostra:

Com o FR definido como **Resposta por quantidade**:

$$\mathrm{Quantidade} = \left(\frac{\mathrm{ResRelativa}}{\mathrm{FRR}}\right) * \mathrm{Quantidade}_{ISTD}$$

Com o FR definido como **Quantidade por resposta**:

$$\mathrm{Quantidade} = \mathrm{FRR} * \mathrm{ResRelativa} * \mathrm{Quantidade}_{\mathrm{ISTD}}$$

onde

| | |
|---|---|
| Quantidade | Quantidade do composto |
| ResRelativa | Resposta relativa |
| FRR | Fator de resposta relativa |
| $\mathrm{Quantidade}_{\mathrm{ISTD}}$ | Quantidade de padrão interno |

Para calibração multinível, o fator de resposta relativa é avaliado a partir da curva de calibração.

Para detalhes sobre o cálculo de concentrações, consulte "% de massa e concentração" na página 131.

# Quantificação de compostos não calibrados

Compostos não calibrados podem ser quantificados com um fator de resposta fixo ou usando os dados de calibração de um dos compostos calibrados. A quantificação utilizando um fator de resposta fixo ou dados de compostos calibrados é específica para um sinal. Em último caso, se o composto calibrado for quantificado por um método ISTD, o ISTD será usado para os picos não identificados da mesma forma que para o composto calibrado.

## Quantificação indireta usando um composto calibrado

Se os dados de calibração de um composto calibrado tiverem de ser usados para quantificar compostos não calibrados, o composto calibrado será identificado no método de processamento (nó **Calibração**, guia **Tabela de compostos**: em **Modo**, selecione **Referência**). Os cálculos são os mesmos usados para compostos calibrados. Se o composto de referência for quantificado por um método ISTD, o ISTD será usado para o composto não calibrado da mesma forma que para o composto de referência.

Um pico de referência faltante resulta em uma quantidade zero do composto não calibrado.

Como opção, um fator de correção (**Correção de ref.**) pode ser inserido para multiplicar a resposta do pico antes de a quantidade ser calculada a partir do fator de resposta do composto de referência.

# Quantificação usando um fator manual

O software permite a você quantificar um composto identificado que seja baseado em um fator de resposta fixa (coluna **Fator manual**). Nesse caso, a quantidade do composto é calculada usando o fator de resposta fixa:

Quantidade = Resposta * Fator manual

onde

| | |
|---|---|
| Fator manual | Fator de resposta fixa |
| Resposta | A resposta pode ser Área, Área%, Altura, Altura%, Rel. Área ou Rel. Quantidade (consulte "Tipo de resposta e fator de resposta" na página 101) |

Para detalhes sobre o cálculo de concentrações, consulte "% de massa e concentração" na página 131.

## Utilizar um fator manual com um método ISTD

Se a quantidade do composto for quantificada usando o fator de resposta fixa e o ISTD, a fórmula será lida conforme segue:

$$\text{Área relativa} = \text{Área} / \text{Área}_{\text{ISTD}}$$

ou:

$$\text{Altura relativa} = \text{Altura} / \text{Altura}_{\text{ISTD}}$$

A quantidade é então calculada conforme segue:

$$\text{Quantidade} = \text{Área relativa} * \text{Fator manual} * \text{Quantidade}_{\text{ISTD}}$$

ou:

$$\text{Quantidade} = \text{Altura relativa} * \text{Fator manual} * \text{Quantidade}_{\text{ISTD}}$$

Para detalhes sobre o cálculo de concentrações, consulte "% de massa e concentração" na página 131.

### Dependência do fator manual e do fator de resposta (FR)

Com o FR definido como **Resposta por quantidade** (configuração padrão):

FR = 1 / Fator manual

Com o FR definido como **Quantidade por resposta**:

FR = Fator manual

Para obter mais informações sobre o fator de resposta, consulte "Tipo de resposta e fator de resposta" na página 101.

# Quantificação de picos não identificados

Picos não identificados podem ser quantificados usando grupos temporizados, com um fator de resposta fixo ou com os dados de calibração de um dos compostos calibrados. A quantificação utilizando um fator de resposta fixo ou dados de compostos calibrados é específica para um sinal. Em último caso, se o composto calibrado for quantificado por um método ISTD, o ISTD será usado para os picos não identificados da mesma forma que para o composto calibrado.

Para obter mais informações sobre grupos temporizado, consulte "Definição de um grupo com tempo" na página 145.

## Quantificar picos não identificados usando um fator de resposta fixo

Nesse caso, você cria um grupo temporizado com o modo de quantificação **Fator manual**. Os intervalos de tempo especificados do grupo temporizado incluem os picos relevantes não identificados.

Além disso, picos quantificados devem ser excluídos. Definindo a opção **Quantificar cada pico individualmente**, a quantidade e a concentração de todos os picos não identificados são calculadas usando o fator de resposta fixa.

Para detalhes sobre o cálculo, consulte "Quantificar um grupo com tempo com um fator manual" na página 147.

## Quantificar picos não identificados usando um composto calibrado

Nesse caso, você cria um grupo temporizado com o modo de quantificação **Referência**. Os intervalos de tempo especificados do grupo temporizado incluem os picos relevantes não identificados. Como opção, um fator de correção (**Correção de ref.**) pode ser inserido para multiplicar a resposta do pico antes de a quantidade ser calculada a partir do fator de resposta do composto de referência.

Além disso, picos quantificados devem ser excluídos. Especificando a opção **Quantificar cada pico individualmente**, a quantidade e a concentração de todos os picos não identificados são calculadas usando a referência da curva.

# Normalização

Você pode optar por normalizar quantidades nas configurações gerais de calibração de um método de processamento.

A análise de normalização possui a mesma desvantagem que os cálculos de Área% e Altura%. Qualquer alteração que afete a área total do pico afetará o cálculo de concentração de cada pico individual. A análise de normalização só deve ser utilizada se todos os componentes forem eluídos e integrados.
A exclusão de picos selecionados de uma análise de normalização irá modificar os resultados reportados na amostra.

Para informações detalhadas sobre grupos temporizados, consulte "Definição de um grupo com tempo" na página 145.

Se picos individuais forem calculados em grupos temporizados, esses picos individuais não serão incluídos uma segunda vez na quantidade total; eles já estão incluídos na quantidade do grupo temporizada.

O fator de normalização padrão é 100,00 para criar resultados de %Norm.
No entanto, é possível definir um número e unidade diferentes no método.
A quantidade total é a soma de todas as quantidades calculadas de compostos e grupos temporizados, independente do sinal do pico principal do composto.

Você pode escolher se compostos de ISTD são incluídos ou não no cálculo. Se for excluída (configuração padrão), a quantidade de ISTD não será adicionada à quantidade total e nenhuma quantidade de normalização de compostos será calculada para os ISTDs.

Para *grupos nomeados*, a quantidade do grupo não está incluída na quantidade total. Contudo, se um ISTD for explicitamente adicionado a este grupo nomeado, ele será adicionado à quantidade do grupo, mesmo que o ISTD esteja excluído da normalização. Isto pode resultar em quantidades de normalização maiores do que 100% para o grupo nomeado.

# Calcular concentrações normalizadas

A concentração normalizada de um composto se refere à concentração do composto em relação à soma das concentrações de todos os compostos detectados.

O cálculo depende do status da caixa de seleção **Aplicar fatores de correção a concentrações normalizadas**. Esta caixa de seleção faz parte das configurações de calibração no método de processamento.

Se os fatores de correção forem aplicados, a **Concentração normalizada** de um composto será calculada da seguinte forma, dependendo do cálculo de concentração:

$$C_N = \frac{M_{comp} \cdot A}{\sum(M_{comp} \cdot A)} \cdot M_{sample} \cdot D_{sample} \cdot f$$

Ou

$$C_N = \frac{M_{comp} \cdot A}{\sum(M_{comp} \cdot A)} \cdot \frac{M_{sample}}{D_{sample}} \cdot f$$

Se os fatores de correção não forem aplicados, a concentração normalizada será calculada como:

$$C_N = \frac{M_{comp} \cdot A}{\sum(M_{comp} \cdot A)} \cdot f$$

onde

| | |
|---|---|
| $C_N$ | Concentração normalizada |
| $M_{comp}$ | Multiplicador específico de composto, definido no método de processamento |
| A | Quantidade |
| $M_{amostra}$ | Multiplicadores específicos de composto, definidos na lista de injeção ou na tabela de sequência |
| $D_{amostra}$ | Fatores de diluição específicos da amostra, definidos na lista de injeção ou na tabela de sequência |
| f | Fator de normalização, definido no método de processamento |

# Calcular quantidades normalizadas

A equação utilizada para calcular a **Quant normalizada** de um composto é:

$$\text{Quantidade Normalizada do Composto} = \text{Quantidade do Composto} * \frac{\text{Normalização}}{\text{Quantidade Total}}$$

onde

| | |
|---|---|
| Quantidade do Composto | Quantidade do composto |
| Quantidade Normalizada do Composto | Quantidade do composto de normalização |
| Normalização | Fator de normalização, definido no método de processamento |
| Quantidade Total | Soma de todas as quantidades do composto e quantidades do grupo temporizado<br>As quantidades de grupos nomeados não são incluídas na quantidade total. Quantidades de compostos identificados em grupos temporizados são contadas duas vezes se você tiver habilitado **Incluir picos identificados** para o grupo temporizado. |

$$\text{Quantidade Normalizada do Grupo} = \text{Quantidade do Grupo} * \frac{\text{Normalização}}{\text{Quantidade Total}}$$

onde

| | |
|---|---|
| Quantidade do Grupo | Quantidade do grupo |
| Quantidade Normalizada do Grupo | Quantidade do grupo de normalização |
| Normalização | Fator de normalização, definido no método de processamento |

$$\text{Quantidade Normalizada do Pico} = \text{Quantidade do Pico} * \frac{\text{Normalização}}{\text{Quantidade Total}}$$

onde

| | |
|---|---|
| Normalização | Fator de normalização, definido no método de processamento |
| Quantidade do Pico | Quantidade do pico |
| Quantidade Normalizada do Pico | Quantidade do pico de normalização |

# Quantificação de grupo

## Definição de um grupo com tempo

Um grupo temporizado contém uma ou mais regiões temporais e é definido em um sinal específico. O tempo de retenção esperado do grupo serve apenas para fins de classificação e pode ser inserido manualmente.

O grupo temporizado corresponde ao *intervalo descalibrado* ou ao *intervalo calibrado* no OpenLab EZChrom.

O exemplo a seguir mostra três grupos temporizados, onde o Grupo 2 e o Grupo 3 se sobrepõem. C1 e C2 são compostos identificados. O pico não identificado em 5,689 min é avaliado em ambos os grupos. Picos identificados só são avaliados se os parâmetros do grupo estiverem devidamente definidos.

| Grupos | Intervalos de tempo | Incluir picos identificados? |
|---|---|---|
| Grupo 1 | 0,8 min - 1,4 min<br>2,8 min - 3,4 min | Não |
| Grupo 2 | 3,8 min - 5,9 min | Sim |
| Grupo 3 | 5,4 min - 7,2 min | Não |

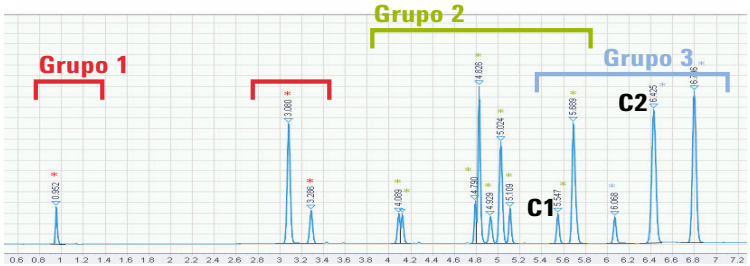



**Figura 90 Exemplo: Grupos temporizados**

NOTA

Se um grupo temporizado não tiver uma região de tempo definida, sua área, altura e quantidade não serão calculadas. Se um grupo temporizado tiver uma região ou regiões definidas, mas nenhum pico for encontrado nessa região ou nessas regiões, sua área e altura serão iguais a zero.

Se você corrigir os tempos de retenção usando compostos de referência de tempo, as horas de início e de parada do grupo temporizado também serão corrigidas pelas mudanças correspondentes (consulte "Cálculos para compostos de referência de tempo" na página 92).

Para a quantificação, a área, a altura ou a resposta em escala do grupo é calculada pela soma dos valores correspondentes dos picos individuais contidos nos intervalos de tempo (incluindo ou excluindo picos identificados, dependendo dos parâmetros do grupo).

Um grupo temporizado é calibrado e quantificado usando os parâmetros de calibração do grupo. Grupos temporizados suportam todos os modos de calibração e quantificação de compostos regulares (**Curva**, **Fator manual**, **Referência**). Nos parâmetros do grupo, você pode optar por quantificar todos os picos individualmente. Nesse caso, cada pico do grupo é quantificado individualmente com o fator de resposta (FR) do grupo.

Cuidado: Uma vez que os Grupos temporizados usam os parâmetros de calibração do grupo inteiro, é necessário ter cuidado ao usar com curvas não lineares e/ou de calibração com um grande offset.

Não é recomendado usar um Grupo temporizado com curvas de calibração não lineares, pois possivelmente o cálculo gerará resultados imprecisos devido à natureza não comutativa dos cálculos.

Se uma curva de calibração do grupo tiver um offset significante (ou seja, um valor [b] com grande interseção), o offset será distribuído igualmente em todos os picos encontrados dentro das janelas do grupo temporizado. É possível que a distribuição igualitária não descreva todos os componentes adequadamente.

Podem ocorrer conflitos se um pico pertencer a vários grupos ou se picos identificados forem quantificados como parte do grupo. Para mais detalhes sobre a resolução de conflito, consulte "Avaliação dos parâmetros de grupo temporizado" na página 149.

# Quantificar um grupo com tempo

## Quantificar um grupo com tempo com um fator manual

Nesse caso, a quantidade do grupo é calculada de acordo com um fator de resposta fixa inserido manualmente.

ESTD:

Quantidade do grupo = Resposta do grupo * Fator manual

onde

| | |
|---|---|
| Fator manual | Fator de resposta fixa |
| Resposta do grupo | Soma de todas as respostas (em escala) |

ou ISTD:

$$\text{Quantidade do Grupo} = \frac{\text{Resposta do grupo}}{\text{Resposta}_{ISTD}} * \text{Fator manual} * \text{Quantidade}_{ISTD}$$

onde

| | |
|---|---|
| $\text{Quantidade}_{ISTD}$ | Quantidade do padrão interno |
| Fator manual | Fator de resposta fixa |
| $\text{Resposta}_{ISTD}$ | Resposta (em escala) do padrão interno |

Concentração do grupo = Quantidade do grupo * Multiplicadores * Fatores de diluição

ou

Concentração do grupo = Quantidade do grupo * Multiplicadores / Fatores de diluição

Para mais informações sobre como calcular multiplicadores e fatores de diluição, consulte "Fatores de correção" na página 130. Para mais informações sobre como calcular a concentração, consulte "% de massa e concentração" na página 131.

### Quantificar um grupo com tempo com sua própria curva de calibração

Um grupo temporizado pode ser quantificado de acordo com sua própria curva de calibração. Todos os níveis ou opções de calibração são suportados, com exceção da escala de resposta **Resposta/RT**. No modo ISTD, você deve selecionar um ISTD a ser usado.

Caso escolha um valor de resposta em escala, a resposta em escala será a soma das respostas em escala individuais.

### Quantificar um grupo com tempo com a curva de um composto de referência

O grupo temporizado pode ser quantificado de acordo com a curva de calibração de outro composto simples. O software permite a você usar o fator de resposta de um composto de referência (curva de calibração). Nesse caso, um fator de correção (**Correção de ref.**) pode ser inserido para multiplicar a resposta antes de a quantidade ser calculada a partir do fator de resposta do composto de referência. No caso do ISTD, o mesmo ISTD é usado como composto de referência.

### Quantificar picos individualmente em um grupo com tempo

Se você escolher quantificar todos os picos individualmente, a quantidade de picos individual é calculada como:

$$\text{Quantidade do Pico} = \text{Quantidade do Grupo} * \frac{\text{Resposta do pico}}{\text{Resposta do grupo}}$$

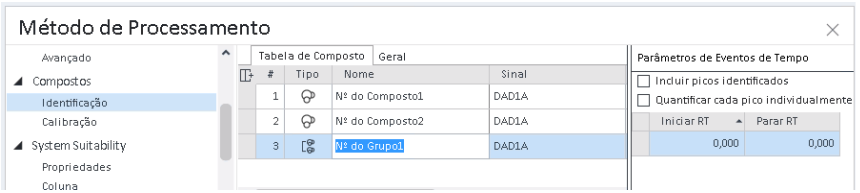
Concentração do pico = Quantidade do pico * Multiplicadores * Fatores de diluição

ou

Concentração do pico = Quantidade do pico * Multiplicadores / Fatores de diluição

Para mais informações sobre como calcular multiplicadores e fatores de diluição, consulte "Fatores de correção" na página 130. Para mais informações sobre como calcular a concentração, consulte "% de massa e concentração" na página 131.

## Avaliação dos parâmetros de grupo temporizado




Se a caixa de seleção **Incluir picos identificados** não estiver selecionada na definição do grupo temporizado, os resultados do grupo incluirão apenas os resultados dos picos desconhecidos encontrados em uma ou mais regiões de tempo. Se estiver selecionada, os resultados dos picos identificados também são levados em conta.

Se a caixa de seleção **Quantificar cada pico individualmente** não estiver selecionada na definição do grupo temporizado, os picos individuais que pertencem ao grupo não serão quantificados. Apenas a área, a altura e a resposta em escala estão disponíveis como resultados de picos individuais, mas não a quantidade ou concentração. Se estiver selecionada, cada pico na região de tempo determinada é quantificado com os parâmetros de calibração do grupo. Selecionar ou desmarcar esta caixa de seleção não altera os resultados do grupo.

**Resolução de conflito**

Podem ocorrer conflitos se um pico pertencer a vários grupos ou se picos identificados forem quantificados como parte do grupo. Nesses casos, aplicam-se as seguintes regras:

- Se um pico desconhecido pertencer a vários grupos, e os parâmetros de calibração, incluindo os níveis de calibração, forem definidos para ambos os grupos: O pico é relatado várias vezes, mas sempre com a mesma quantidade. É quantificado apenas uma vez.

  O pico é quantificado com os parâmetros do grupo com o menor tempo de retenção esperado. Se ambos os grupos tiverem o mesmo tempo de retenção esperado, o último grupo criado será usado.
- Se um pico identificado for quantificado como parte do grupo, mas tiver seus próprios parâmetros de calibração definidos, será quantificado com seus próprios parâmetros e não com os parâmetros do grupo.
- Se um pico identificado for quantificado como parte do grupo e não tiver parâmetros de calibração específicos definidos, o composto será quantificado com os parâmetros do grupo. É usado o tipo de resposta (área ou altura) do grupo.
- Se um pico identificado for o *padrão interno (ISTD)* deste grupo e o parâmetro de grupo **Incluir picos identificados** estiver configurado, a resposta deste pico será subtraída da resposta do grupo temporizado.

### Quantificação com respostas em escala

Na janela **Resultados da injeção**, a coluna **Resposta em escala** exibe a resposta de cada pico quantificado. Se a curva de calibração do grupo não for dimensionada, a resposta em escala é igual à altura ou área do pico.

A resposta em escala é calculada como a *soma* das respostas em escala dos picos individuais incluídos no grupo temporizado. A calibração e quantificação do grupo baseiam-se nesta soma de respostas em escala

A área e a altura do grupo temporizado também são valores somados, mas serão calculados apenas se nenhuma escala for aplicada aos valores de resposta.

# Definição de um grupo nomeado

O grupo nomeado consiste em grupos temporizados e compostos selecionados pelo usuário. Cada composto ou grupo temporizado é identificado e quantificado sozinho. Cálculos de ESTD e ISTD são baseados nos dados de calibração dos compostos individuais. A área, altura, quantidade e concentração calculada do grupo são a soma das áreas, alturas, quantidades e concentrações individuais. O grupo nomeado em si não é calibrado. Um composto pode estar em vários grupos nomeados.

O tempo de retenção esperado do grupo serve apenas para fins de classificação e pode ser inserido manualmente.

O grupo nomeado corresponde ao *grupo de Picos Nomeados* no OpenLab EZChrom.

O exemplo a seguir mostra dois grupos nomeados onde um composto está contido em ambos os grupos:

| Grupos | Grupo 1 | Grupo 2 |
|---|---|---|
| Compostos incluídos | C1 | |
| | C2 | |
| | | C3 |
| | C4 | C4 |
| | | C5 |
| | | C6 |

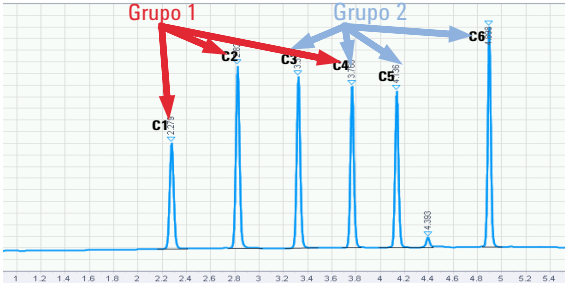



**Figura 91 Exemplo: Grupos nomeados**

## Quantificar um grupo nomeado

Os resultados na tabela do grupo nomeado são:

Área do grupo = Σ Áreas do pico do composto + Σ Áreas do grupo com tempo

Altura do grupo = Σ Alturas dos picos do composto + Σ Alturas do grupo com tempo

Quantidade do grupo = Σ Quantidades do composto + Σ Quantidades do grupo com tempo

Concentração do grupo = Σ Concentrações do composto + Σ Concentrações do grupo com tempo

Se nenhum dos compostos ou grupos com tempo no grupo nomeado tiverem sido identificados, o grupo nomeado aparecerá como "não identificado" na análise.

# 7 Análise Espectral UV

O que é análise espectral UV? 154
Verificação de impureza UV 156
Cálculo do ruído 156
Determinar espectros significativos 157
Correção do background 157
Cálculo de semelhança 158
Cálculo do threshold 159
Avaliação de impureza 160
Sobre o threshold, curvas de similaridade e sensibilidade 161
Comparação com gráficos de pureza tradicionais 164
Confirmação UV 167

Este capítulo descreve os conceitos de verificação de impureza e a confirmação da identidade do composto com base na análise espectral UV.

# O que é análise espectral UV?

Há diferentes janelas e funções específicas da análise espectral UV. Para visualizar essas janelas e acessar as funções, a injeção focada deve conter dados espectrais (por exemplo, adquiridos com um sistema UV 3D).

A análise espectral UV oferece critérios de qualidade adicionais para análises de rotina:

- *Confirmar a identidade do composto*

  A aplicação compara um espectro UV com um espectro UV de referência específico. Um valor alto de correspondência indica que os compostos são provavelmente idênticos.

  Para detalhes sobre o cálculo, consulte Confirmação UV ("Confirmação UV" na página 167).

- *Verificar impurezas UV*

  A aplicação compara todos os espectros UV de um pico com o espectro do ápice. Ele calcula um fator geral de correspondência, o valor de Pureza UV. Um valor de Pureza UV baixo indica que há picos coeluídos com um espectro UV significativamente diferente.

  Para detalhes sobre o cálculo, consulte Verificação de Impureza UV ("Verificação de impureza UV" na página 156).

A análise espectral UV processa dados espectrais obtidos de um detector de fotodiodos visível sob UV ou um detector de fluorescência. Ela adiciona uma terceira dimensão aos dados analíticos ao utilizá-la com os dados cromatográficos (consulte Figura 92 na página 155).

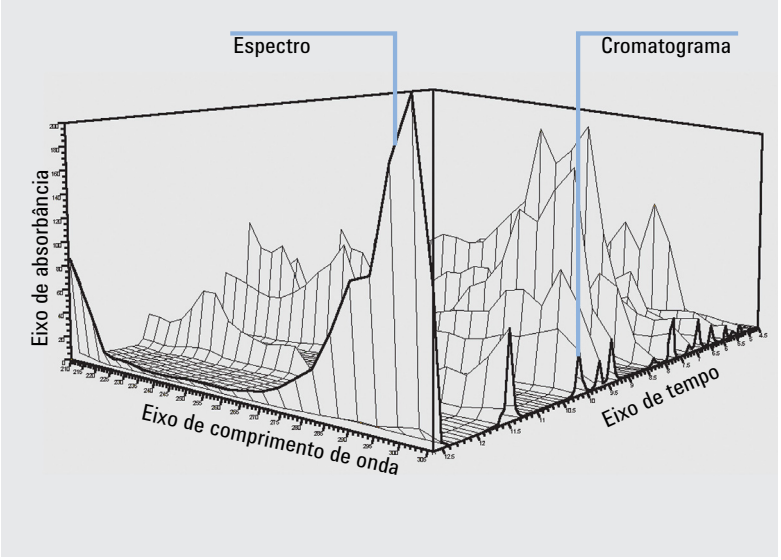



**Figura 92 Informações espectrais**

# Verificação de impureza UV

Uma verificação de impureza avalia se um pico é puro ou se contém impurezas. Essa avaliação é baseada na comparação de espectros registrados durante a eluição do pico. Após aplicar uma correção de linha de base, o espectro no ápice do pico é comparado com todos os espectros significativos registrados no pico. O aplicativo calcula um fator de correspondência que caracteriza o grau de similaridade dos espectros.

O aplicativo executa as seguintes etapas para avaliar impurezas UV:

1 Por pico
   a "Cálculo do ruído" na página 156
   b Determinar espectros significativos("Determinar espectros significativos" na página 157)
2 Por espectro:
   a "Correção do background" na página 157
   b "Cálculo de semelhança" na página 158
   c "Cálculo do threshold" na página 159
3 "Avaliação de impureza" na página 160

## Cálculo do ruído

Como preparação para avaliações posteriores, o aplicativo calcula os seguintes números para cada pico a partir dos espectros no início e no final da linha de base:

- Variação de ruído
- Desvio padrão de ruído $\sigma$

As horas de início e fim da linha de base dependem da integração. Se múltiplos picos forem separados apenas por uma queda da linha de base, todos os picos usam os mesmos espectros para o cálculo de ruído.

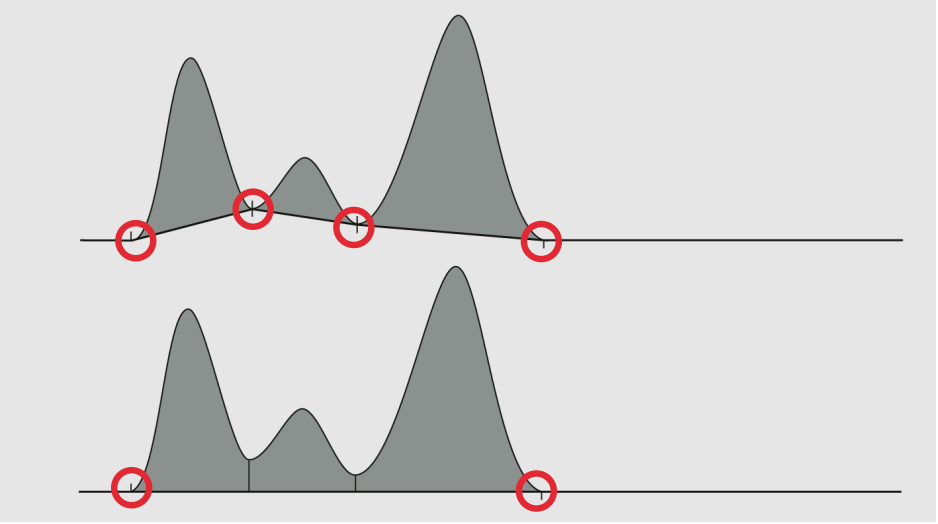


**Figura 93 Início e fim da linha de base dependendo da integração**

## Determinar espectros significativos

Para garantir que somente espectros com um sinal significativo sejam avaliados, o aplicativo filtra espectros onde a faixa de resposta é pequena demais. Os espectros são usados para cálculos adicionais somente se o seguinte se aplicar:

- A faixa de resposta é superior a 3σ
- A faixa de resposta é superior ou igual a 10 % da faixa de resposta do espectro do ápice. A faixa de resposta para cada espectro é calculada como resposta máx.–mín.

## Correção do background

Para a correção de linha de base, o aplicativo avalia os seguintes espectros:

- Espectros no início da linha de base do pico
- Espectros no fim da linha de base do pico

As horas de início e fim da linha de base dependem da integração. Se vários picos estiverem separados apenas por uma queda da linha de base, todos os picos usam os mesmos espectros para correção de fundo (consulte Figura 93 na página 157).

Uma interpolação linear dos dois espectros de linha de base é calculada. Para corrigir cada espectro de pico individual, o aplicativo subtrai o espectro de interpolação no tempo de retenção correspondente.

## Cálculo de semelhança

O aplicativo compara cada um dos espectros de pico restantes com background corrigido com o espectro do ápice com background corrigido. O fator de correspondência é um valor de entre 0 (nenhuma similaridade) e 1000 (espectros idênticos).

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n} [(x_i - x_{av}) \cdot (y_i - y_{av})]}{\sqrt{\left[ \sum_{i=1}^{n} (x_i - x_{av})^2 \cdot \sum_{i=1}^{n} (y_i - y_{av})^2 \right]}}$$

onde

| | |
|---|---|
| r | Correlação |
| $x_i$, $y_i$ | Absorbâncias medidas no mesmo comprimento de onda do ponto de dados e do ápice do pico considerados, respectivamente |
| n | Número de comprimentos de onda adquiridos por ponto de dados dentro do tempo (dependendo da largura de banda do comprimento de onda do método de processamento e das etapas de coleta de espectros de aquisição) |
| $x_{av}$, $y_{av}$ | Absorbâncias médias do ponto de dados e dos espectros no ápice do pico considerados, respectivamente |

Fator de correspondência (em cada ponto de dados) = $r^2 * 1000$

## Cálculo do threshold

O threshold de referência a uma sensibilidade de 50% é calculado usando a seguinte fórmula:

$$T = 1000 * \left(1 - 0,5 * \left(\frac{VAR_{noise}}{VAR_{peak}} + \frac{VAR_{noise}}{VAR_{target}}\right)\right)$$

onde

| | |
|---|---|
| $VAR_{ruído}$ | Threshold de variação calculado dos espectros de ruído |
| $VAR_{pico}$ | Variação dos espectros do pico |
| $VAR_{alvo}$ | Variação do espectro utilizado para a comparação (início de pico para o cálculo de pureza dos pontos de dados antes do ápice e no final do pico para o cálculo de pureza dos pontos de dados após o ápice) |

O threshold (Ts) usado no software depende do valor de sensibilidade. É feito o cálculo com as seguintes fórmulas:

Se a sensibilidade for superior a 50%:

$$T_S = T + \frac{(1000 - T) \cdot (S - 50)}{50}$$

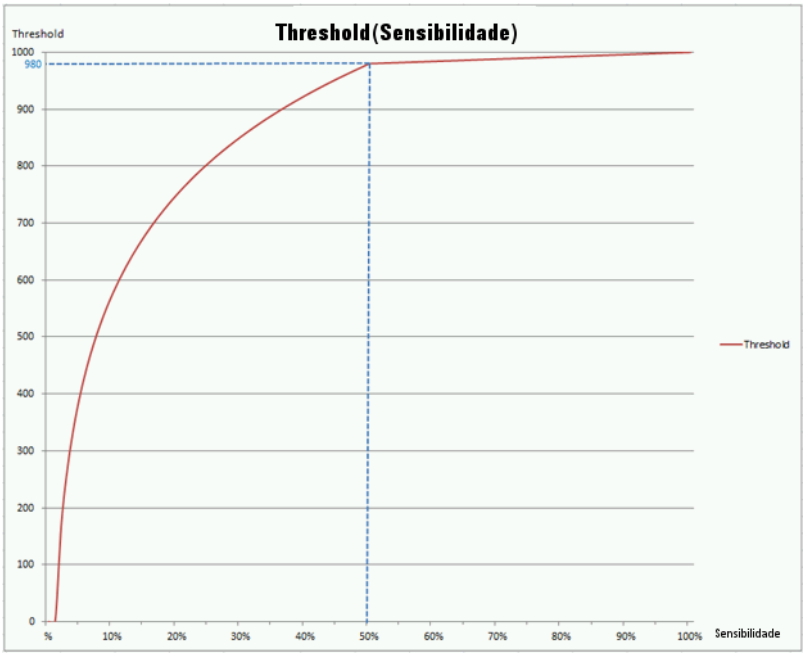
Se a sensibilidade for inferior ou igual a 50%:

$$T_S = T \cdot \frac{\log(S)}{\log(50)}$$

onde

| | |
|---|---|
| $T_S$ | threshold [0 – 1000] para a sensibilidade S selecionada |
| T | Threshold de referência a uma sensibilidade de 50% |
| S | Sensibilidade [0 - 100]% |

A cada valor de threshold individual, em cada ponto de dados brutos, é aplicada uma dessas fórmulas.




A curva vermelha é a curva do threshold calculada automaticamente. O valor de threshold calculado automaticamente neste exemplo de curva é 980 (que é o valor de sensibilidade de 50%).

## Avaliação de impureza

Os valores únicos da curva de similaridade são calculados a partir do valor do threshold com sensibilidade corrigida e do fator de correspondência ("Cálculo do threshold" na página 159, "Cálculo de semelhança" na página 158).

Razão = log( (1000 - Threshold) / (1000 - Fator de Correspondência) )

Todos os valores de um pico são mostrados na *curva de similaridade*. Pode visualizá-la na janela **Detalhes do pico**. Esta curva de similaridade mostra uma distribuição de valores positivos (pontos de dados puros) e negativos (pontos de dados impuros) ao longo do pico, onde 0 representa o limite de threshold.

## Sobre o threshold, curvas de similaridade e sensibilidade

No OpenLab CDS v2.x, o threshold é calculado automaticamente para cada ponto de dados. A precisão da análise é ajustada usando a porcentagem de sensibilidade.

A sensibilidade não é, portanto, um valor de threshold fixo. Modificar a sensibilidade não muda o valor de threshold com uma relação linear, uma vez que os valores de threshold não são idênticos em todos pontos de dados raw. Como exemplo, na figura abaixo, se o valor de threshold em 1,950 min for 998, isso não significa que o threshold seria necessariamente o mesmo em 1,960 min. Todo o ponto de dados tem o seu próprio threshold calculado, levando a uma curva de threshold ao longo do pico.

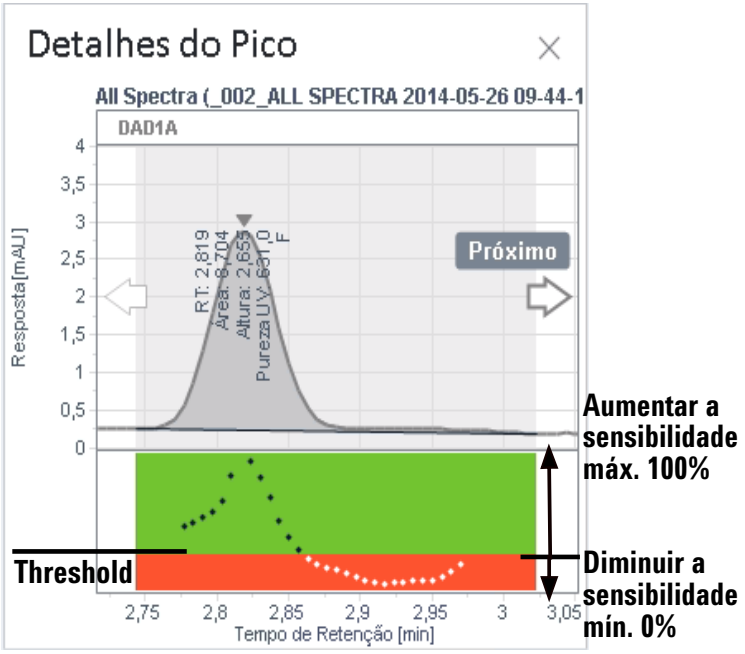



**Figura 94** Curva de similaridade

A sensibilidade de pureza de pico é então aplicada à curva de threshold. No Data Analysis, uma transformação logarítmica das curvas de threshold e de similaridade desenha-se abaixo dos picos. A curva de threshold é então uma linha plana entre as regiões pura e impura. A curva de similaridade (mostrada em Detalhes do pico) é desenhada usando a fórmula, conforme descrito em "Avaliação de impureza" na página 160. Esta curva de similaridade mostra então uma distribuição de valores positivos (pontos de dados puros) e negativos (pontos de dados impuros) ao longo do pico, onde 0 representa o limite de threshold.

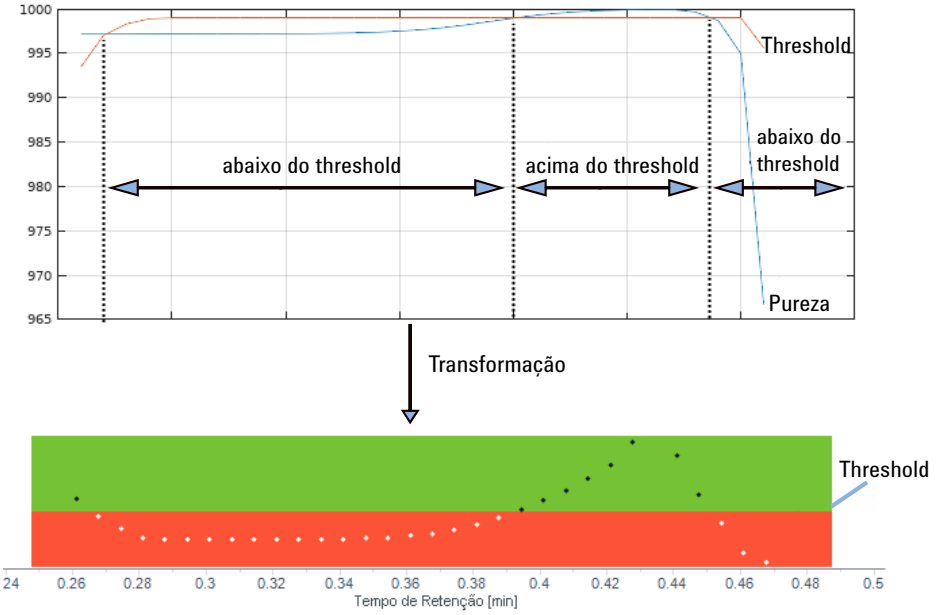



**Figura 95 Antes e depois da transformação**

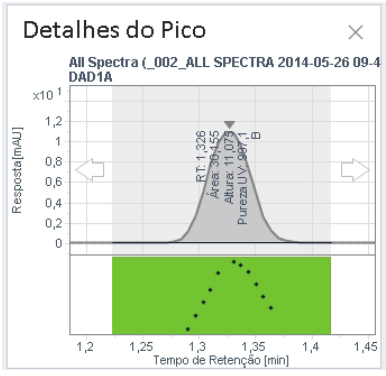
Por exemplo:

- Ponto de dados com um fator de correspondência de 990 e threshold de 980:
  Razão = log( (1000 - 980) / (1000 - 990) ) = log(2) = *+0,3*
  Este ponto de dados raw cumpre o critério de pureza.
- Ponto de dados com um fator de correspondência de 970 e threshold de 990:
  Razão = log( (1000 - 990) / (1000 - 970) ) = log(0,33) = *-0,48*
  Este ponto de dados brutos não cumpre o critério de pureza.

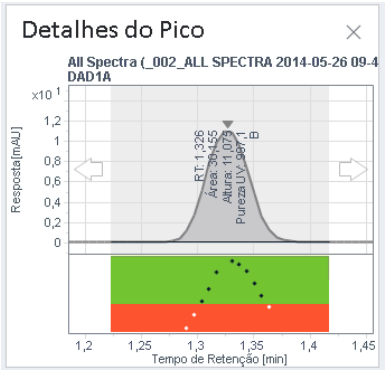
Diminuir ou aumentar a sensibilidade significa que o perfil da curva de threshold calculado está mudando. O intervalo completo de sensibilidade é de 0 a 100 %, onde o threshold calculado padrão encontra-se a 50 %.

Como a exibição da curva de similaridade é não linear (mas sim logarítmica), o threshold não irá mapear segundo uma relação de um para um, de um ponto de dados para outro. Se a sensibilidade for aumentada/diminuída por 20 %, a curva de threshold move-se para cima ou para baixo e suas amplitudes também sofrem alterações. Os thresholds de ponto de dados brutos não são alterados por +/- 20 %.

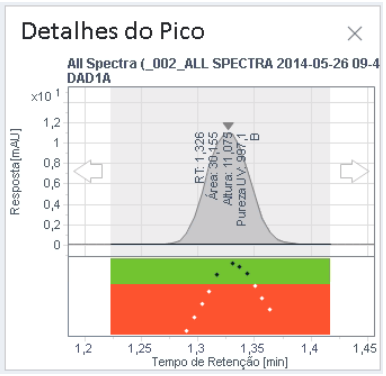
| Sensibilidade | Threshold |
|---|---|
| 0 % | Valor mais baixo possível = 0 |
| 0 <= s <= 100 | Curvas de threshold calculadas (com uma curva de referência de 50%) |
| 100 % | Valor mais alto possível = 1000 |




Sensibilidade baixa – este pico é considerado puro




Sensibilidade padrão – este pico é considerado impuro




Alta sensibilidade – este pico é considerado impuro

Um pico é marcado como impuro quando um ponto de dados estiver abaixo de seu threshold, mesmo se o fator de pureza de pico UV global esteja próximo a 1000.

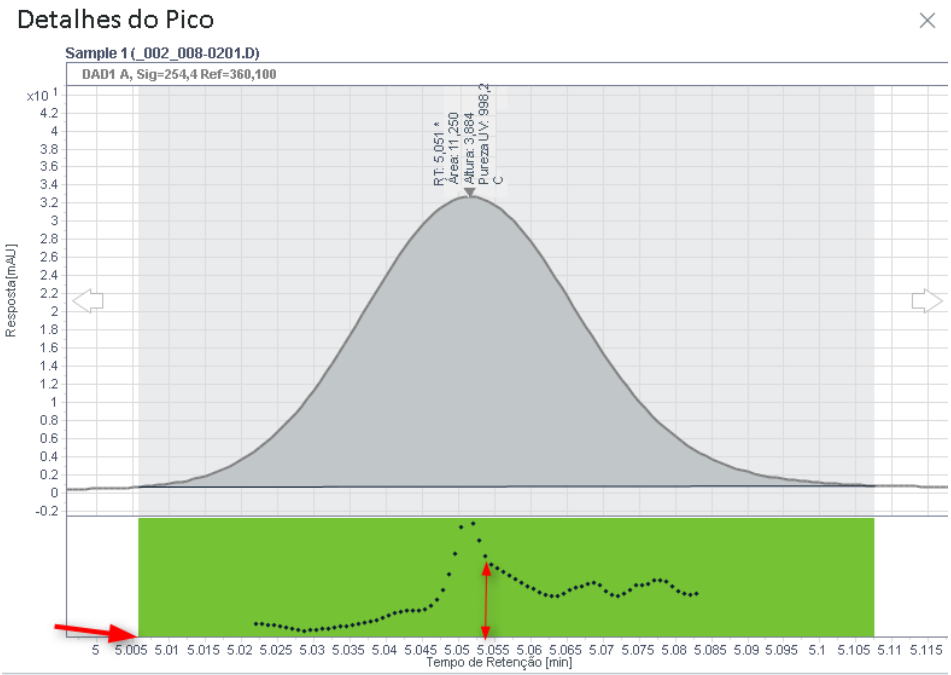
## Comparação com gráficos de pureza tradicionais

Na Edição ChemStation do OpenLab CDS, existem tipos de cálculos de thresholds diferentes, de modo que os thresholds podem ser de valores fixos ou de tipos de curva de threshold. Os valores de threshold fixos não consideram a variação de contribuição de ruído ao longo do pico. Portanto, no OpenLab CDS v2.x, este threshold é calculado automaticamente para cada ponto de dados, levando a uma curva de threshold. A precisão da análise é então ajustada usando a porcentagem de sensibilidade.

O novo gráfico mostra as mesmas informações como no ChemStation, porém de forma mais conveniente. Em vez da curva de threshold clássica, ele mostra o valor logarítmico da diferença (delta) do threshold em relação à curva de threshold clássica. Isto cria uma linha plana, que é a borda entre a parte vermelha e a parte verde do gráfico. Todos os pontos acima do threshold estão na área verde (pontos pretos) e todos os pontos abaixo do threshold estão na área de leitura (pontos brancos).

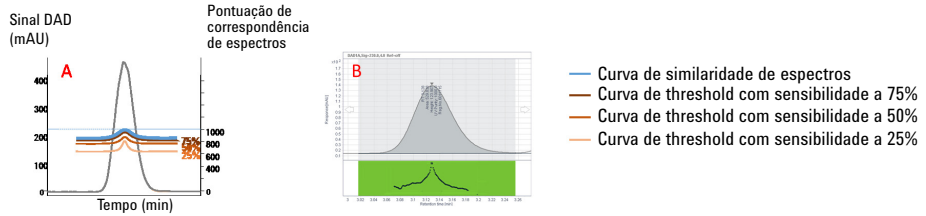
Em comparação ao ChemStation, as partes corretas e incorretas são invertidas: As partes corretas (verdes) estão na parte superior e as incorretas (vermelhas) estão na parte inferior. Quanto maior a distância desde a linha do threshold na área verde, melhor será o valor. Quanto maior a distância na área vermelha abaixo da curva, pior será o valor.

Nos casos em que tudo está acima do threshold, a linha do threshold está na parte inferior do gráfico:



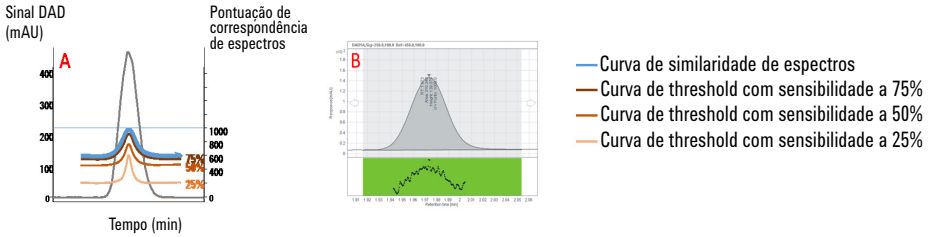

Os exemplos a seguir mostram as diferenças entre um gráfico de pureza tradicional, similar à curva de similaridade da edição ChemStation do OpenLab CDS (que mostra curvas de similaridade invertidas) e a curva de similaridade do OpenLab CDS v2.x:

## Pico puro



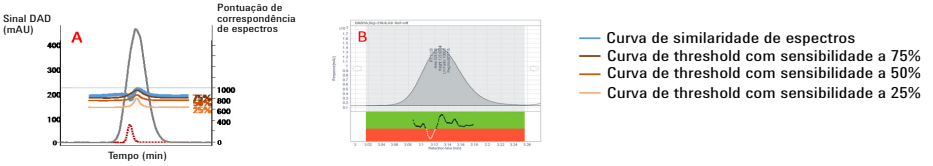

| | |
|---|---|
| 1A | Visualização esquemática da curva de similaridade e suas *curvas de threshold calculadas* com sensibilidades diferentes |
| 2B | Visualização em Data Analysis da curva de similaridade |

## Pico puro com valor de ruído alto




| | |
|---|---|
| 1A | Visualização esquemática da curva de similaridade e suas *curvas de threshold calculadas* com sensibilidades diferentes |
| 2B | Visualização em Data Analysis da curva de similaridade |

## Pico impuro




| | |
|---|---|
| 1A | Visualização esquemática da curva de similaridade e suas *curvas de threshold calculadas* com sensibilidades diferentes |
| 2B | Visualização em Data Analysis da curva de similaridade e sua *linha de threshold logarítmica com sensibilidade de 50%* |

## Resumo

Somente os métodos de tipo de curva de threshold podem ser comparados entre o OpenLab CDS v2.x e a Edição ChemStation do OpenLab CDS com a particularidade de que, no OpenLab CDS v2.x, o ruído de fundo de referência é selecionado automaticamente no início e no final do pico, e de que a sensibilidade é um fator adicional que não está disponível na Edição ChemStation do OpenLab CDS.

Ao usar uma sensibilidade padrão de 50%, o algoritmo em ambos os sistemas de dados cromatográficos é o mesmo, mas os resultados serão diferentes devido a referências de ruído diferentes. Se a sensibilidade for aumentada ou diminuída, os perfis de curva de threshold sofrerão alterações em comparação com as curvas de threshold da Edição ChemStation do OpenLab CDS.

# Confirmação UV

Espectros de referência UV são adquiridos a partir de uma amostra de referência em condições cromatográficas bem definidas. É possível confirmar a identidade de um composto comparando o espectro atual no ápice do pico com o espectro de referência UV. A aplicação calcula um fator de correspondência para os dois espectros.

O algoritmo para a comparação é idêntico àquele usado para a verificação de impureza UV (consulte "Cálculo de semelhança" na página 158). A correção de fundo é opcional, podendo ser selecionada no método de processamento.

Para a confirmação UV, o fator de correspondência deve ser maior que um determinado limite a ser colorido em verde nos resultados da injeção. Você estabelece o limite do fator de correspondência no método de processamento. O fator de correspondência para confirmação UV resultante é mostrado nos resultados da injeção.

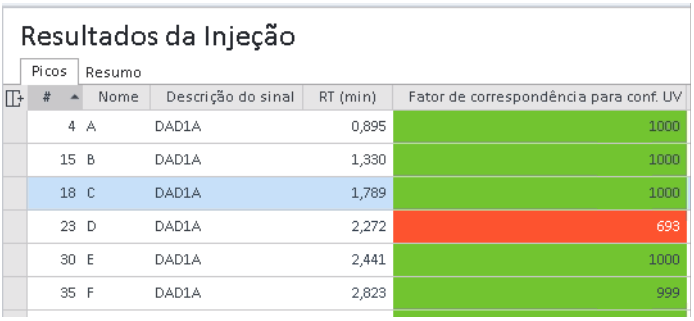



**Figura 96 Fator de correspondência para confirmação UV nos resultados da injeção**

# 8 Espectrometria de Massas

Pureza da amostra MS 169
Pureza de pico MS 171

Este capítulo descreve o cálculo de pureza da amostra com base em espectrometria de massas.

# Pureza da amostra MS

O cálculo de pureza da amostra MS avalia se uma amostra é pura ou se contém impurezas. Essa avaliação é baseada na comparação de respostas. Por um lado, existe a resposta de todos os compostos e fragmentos em uma amostra. Por outro lado, existe a resposta causada por íons alvo específicos. A pureza da amostra é calculada como a razão de ambas as respostas.

A aplicação realiza diferentes etapas para calcular a pureza da amostra MS, dependendo do sinal de base selecionado e do cálculo:

## Alvo encontrado?

1. Obtenha as massas alvo dadas na coluna **Alvo** da **Lista de injeção** (por exemplo, 270). Se uma fórmula for introduzida, calcule o peso molecular a partir da fórmula.
2. Aplique os adutos especificados no método de processamento (por exemplo, +H e +Na e uma massa alvo de 270 resultariam nos alvos 271 e 293).
3. Extraia EICs para todos os alvos e some esses EICs em um único EIC.
4. Determine o tempo de retenção do pico nesse único EIC somado.
5. Localize o pico correspondente no cromatograma do sinal de base.

Se um pico correspondente puder ser encontrado, o alvo é marcado como **encontrado**.

## O sinal de base é de um detector seletivo de massas

Com cálculo de **% de TIC**

$$\text{Pureza da amostra MS} = \frac{\text{área do pico correspondente (TIC)}}{\text{a área de todos os picos integrados (TIC)}} \times 100$$

Com cálculo de **% de EIC/TIC**:

$$\text{Pureza da amostra MS} = \frac{\text{área do pico único (EIC somado)}}{\text{área de todos os picos integrados (TIC)}} \times 100$$

NOTA

Se **MS** for escolhido como o sinal de base (no método de processamento em **Pureza da Amostra de MS >Propriedades**), e houver vários sinais de TIC, cada sinal de TIC será mostrado como um sinal de base na tabela do lado esquerdo na janela **Resultados de Pureza da Amostra**.

### O sinal de base é de outro detector (não MS)

$$\text{Pureza da amostra MS} = \frac{\text{área do pico correspondente (sinal de base)}}{\text{a área de todos os picos integrados (sinal de base)}} \times 100$$

### Suposições

A pureza da amostra MS é calculada com base nas seguintes suposições:

- O cálculo de pureza da amostra MS pretende obter apenas uma aproximação.
- Para cálculos **EIC/TIC %**: Os dados de MS são adquiridos de tal forma que a maior abundância de íons está no cluster de íons moleculares. Há somente um pequeno grau de dissociação na fonte.
- Para sinais base de detectores não MS: A resposta do outro detector é mais uniforme e universal em relação ao detector MS.
- Todos os compostos na amostra têm fatores de resposta uniformes.

# Pureza de pico MS

O cálculo de pureza de pico MS se baseia na porcentagem de íons componentes dos espectros que se agrupam e constituem o alvo em relação a outros componentes presentes.

O aplicativo executa as seguintes etapas para calcular a pureza de pico MS:

1 Execute uma deconvolução em todo o intervalo cromatográfico.

   **a** Para os valores m/z detectados (n) mais abundantes, crie um Cromatograma de Íons Extraídos (EIC). Você pode definir o número no método de processamento em **Compostos > Espectros**, na guia **Pureza de Pico MS**.

   **b** Em cada EIC, encontre o tempo de retenção do pico.

   **c** Defina os componentes baseados nos picos EIC que eluem no mesmo tempo de retenção.

2 Determine o componente-alvo que corresponde ao composto-alvo.

   **a** Obtenha parâmetros básicos para mais cálculos:

   - Intervalo delta m/z, das configurações padrão internas (m/z -0,3 a +0,7)
   - Quantificador-alvo m/z, ao extrair o espectro MS no ápice do pico TIC e encontrar o m/z de maior abundância
   - Janela do tempo de retenção para o composto-alvo (composto atual), a partir do método de processamento em **Compostos > Identificação**

   **b** Para cada componente encontrado por deconvolução, encontre todos os valores de m/z que caem dentro do intervalo delta m/z do quantificador-alvo m/z.

   **c** Para cada valor de m/z, verifique se o EIC possui um ápice dentro da janela do tempo de retenção do pico EIC do quantificador-alvo.

   **d** Obtenha o componente com o maior pico e use-o como componente-alvo.

3 Se o sistema não conseguir localizar um componente-alvo, ele tentará novamente executando a deconvolução de amostra completa em modo de *alta resolução*, usando um fator de tamanho de janela RT que é reduzido por um fator de 2. Os resultados de alta resolução são armazenados em cache e são pesquisados quanto a qualquer componente-alvo que não possa ser encontrado na lista de componentes de resolução normal. A geração automática dos resultados de alta resolução permite que muitos componentes-alvo, que antes haviam se perdido, sejam identificados.

4 O sistema tenta detectar *componentes duplos* que compartilham o mesmo RT e o pico base m/z. A presença de tais componentes duplicados pode influenciar fortemente a estimativa de pureza pela negativa. Componentes duplicados poderão ocorrer se o fator de tamanho de janela RT for muito pequeno. Portanto, o sistema tenta recuperar automaticamente executando novamente a deconvolução de amostra completa no modo de baixa resolução, usando um fator de tamanho de janela que é aumentado por um fator de 2. Os resultados de baixa resolução são armazenados em cache e são pesquisados quanto a qualquer alvo que corresponda a um componente duplicado.

5 Obtenha todos os componentes contribuintes, ou seja, qualquer componente que tenha picos espectrais dentro do intervalo de delta m/z do quantificador-alvo m/z e que sobreponha o pico-alvo no tempo de retenção.

6 Calcule a pureza usando a seguinte fórmula:

$$\mathbf{Pureza(Composto-alvo)} = \frac{\mathbf{Área(Formato\ do\ componente-alvo)}}{\sum \mathbf{(Área(Formato\ do\ componente\ contribuinte))}}$$

# 9 System Suitability

Avaliar adequação do sistema 174
Determinação do Ruído 176
Cálculo do Ruído Utilizando Seis Vezes o Desvio Padrão 177
Cálculo do Ruído Utilizando a Fórmula de Pico a Pico 178
Cálculo do Ruído pelo Método ASTM 179
Cálculo de ruído usando a Raiz Quadrada Média (RMS) 182
Cálculo de sinal/ruído 183
Drift e Wander 185
Cálculo de simetria e assimetria do pico 187
Fórmulas e cálculos de adequação do sistema 189
Definições do teste de desempenho 190
NOTA: Tempo de retenção usado nos testes de desempenho 190
Visão geral dos testes de desempenho 191
Largura real do pico Wx [mín.] 193
Fator de Capacidade (USP), Razão de Capacidade (ASTM) k' 194
Fator de Simetria, Fator de Cauda (USP) t 195
Número de Pratos Teóricos por Coluna (USP) 196
Número de Pratos Teóricos por Metro N [1-m] 196
Retenção Relativa, Seletividade 197
Resolução (USP, ASTM) R 197
Resolução (EP/JP) Rs 198
Razão Pico-Vale (EP/JP) 198

Este capítulo descreve o que o OpenLab CDS pode fazer para avaliar o desempenho do instrumento analítico e do método analítico.

# Avaliar adequação do sistema

Avaliar o desempenho do instrumento analítico antes de ser utilizado para análise da amostra e o método analítico antes de ser utilizado rotineiramente é uma boa prática de análise. Também é uma boa ideia verificar o desempenho dos sistemas de análise antes de e durante a análise de rotina. O OpenLab fornece as ferramentas para fazer esses três tipos de testes automaticamente. Um *teste do instrumento* pode incluir a sensibilidade do detector, a precisão dos tempos de retenção do pico e a precisão de áreas do pico. Um *teste do método* pode incluir a precisão de quantidades e tempos de retenção, a seletividade e a robustez do método levando em consideração uma variação diária na operação. Um *teste do sistema* pode incluir a precisão de quantidades, a resolução entre dois picos específicos e a cauda do pico.

Os laboratórios podem ter de atender a:

- Regulamentos de Boas Práticas de Laboratório (GLP),
- Regulamentos de Boas Práticas de Fabricação (GMP) e regulamentos atuais de Boas Práticas de Fabricação (cGMP) e
- Boas Práticas de Laboratório Automatizadas (GALP).

Os laboratórios são aconselhados a realizar esses testes e documentar detalhadamente os resultados. Laboratórios que façam parte de um sistema de controle de qualidade, por exemplo, para atender a certificação ISO 9000, terão de demonstrar o desempenho apropriado de seus instrumentos.

Para coletar resultados de várias corridas e avaliá-los estaticamente, o OpenLab CDS oferece uma função para criar relatórios resumidos do conjunto de resultados. Diferentes modelos de relatório estão disponíveis para esses resumos (por exemplo, SequenceSummary_Extended.rdl). É possível ajustá-los conforme necessário.

Os testes são documentados em um formato que é geralmente aceito por autoridades regulatórias e auditores independentes. Estatísticas incluem:

- tempo de retenção do pico,
- área do pico,
- quantidade,
- altura do pico,
- largura do pico em uma altura específica,
- simetria do pico,
- cauda do pico,

- fator de capacidade (k'),
- números de pratos,
- resolução entre picos e
- seletividade relativa ao pico anterior.

Os resultados de desempenho estendido são calculados apenas para compostos calibrados, assegurando a caracterização por tempos de retenção e nomes de compostos.

Um relatório típico de teste de desempenho do sistema contém os seguintes resultados de desempenho:

- detalhes da coluna,
- método de processamento,
- informações da amostra,
- informações de aquisição,
- descrição do sinal e determinação do ruído na linha de base e
- sinal identificado com tempos de retenção ou nomes de compostos.

Além disso, as informações a seguir são geradas para cada composto calibrado no cromatograma:

- tempo de retenção/migração,
- k´,
- simetria,
- largura do pico,
- número de pratos,
- resolução,
- relação sinal/ruído e
- nome do composto.

# Determinação do Ruído

O ruído pode ser determinado a partir dos valores de pontos de dados do intervalo de tempo do sinal atual. O ruído é tratado das seguintes formas:

- como seis vezes o desvio padrão (sd) da regressão linear do desvio,
- como pico a pico (com correção de desvio)
- conforme determinado pelo método ASTM (ASTM E 685-93).
- como a Raiz Quadrada Média (RMS) da regressão linear do desvio

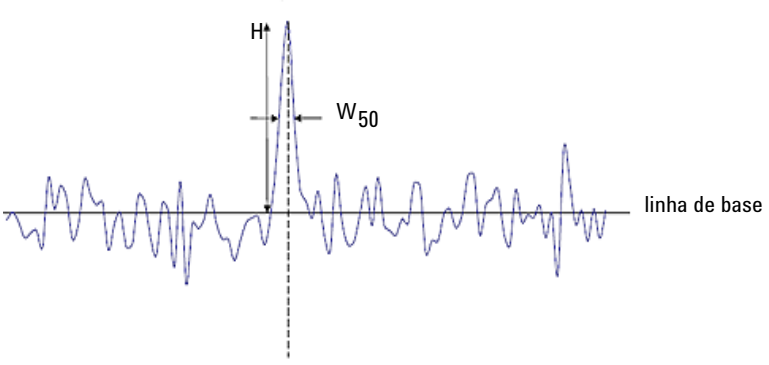


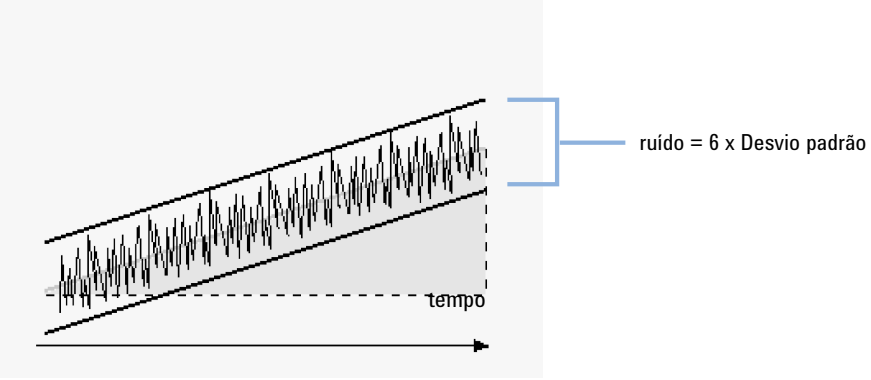

**Figura 97 Cromatograma com ruído e sinal do pico**

| | |
|---|---|
| H | Altura do pico do topo à linha de base (a melhor linha reta através do ruído) |
| $W_{50}$ | Largura do pico a meia altura |

**NOTA**

Em picos muito pequenos, o aplicativo pode encontrar um tempo de retenção após o término do pico, o que resulta em uma largura de pico negativa. No caso deste canto, nenhum valor de ruído será calculado.

# Cálculo do Ruído Utilizando Seis Vezes o Desvio Padrão




A regressão linear é calculada utilizando todos os pontos de dados dentro do intervalo de tempo do sinal atual. O ruído é dado pela fórmula:

$$N = 6 \times Pad$$

onde

| | |
|---|---|
| N | Ruído baseado no método seis vezes o desvio padrão |
| Pad. | Desvio padrão da regressão linear de todos os pontos de dados no intervalo de tempo selecionado |

# Cálculo do Ruído Utilizando a Fórmula de Pico a Pico

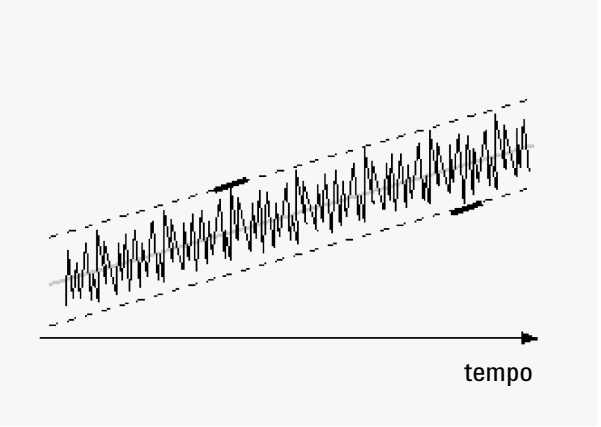



**Figura 98 Ilustração de ruído pico a pico com desvio**

O desvio é primeiro calculado determinando a regressão linear utilizando todos os pontos de dados no intervalo de tempo de um pico. A linha de regressão linear é subtraída de todos os pontos de dados dentro do intervalo de tempo para fornecer o sinal com o desvio corrigido.

O ruído pico a pico é então recalculado utilizando a fórmula:

$$N = I_{máx.} - I_{mín.}$$

onde

| | |
|---|---|
| N | Ruído pico a pico |
| $I_{máx.}$ | Valor mais alto (máximo) $I_x$ no intervalo de tempo |
| $I_{mín.}$ | Valor mais baixo (mínimo) $I_x$ no intervalo de tempo |
| $I_x$ | Intensidade do sinal, corrigida pelo desvio (o desvio é calculado usando a fórmula LSQ) |

Para cálculos da Farmacopeia Europeia, o ruído Pico a Pico é calculado utilizando um sinal de referência branco em uma faixa de -10 e +10 vezes $W_{50}$ dividindo cada pico. A região pode ser simétrica ao sinal de interesse ou assimétrica se necessário devido a sinais da matriz.

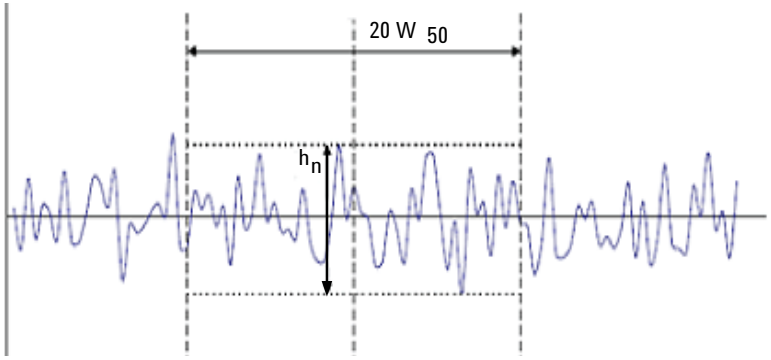



**Figura 99 Determinação do ruído do cromatograma de um branco de amostra**

Onde

20 $W_{50}$ é a região correspondente às 20 vezes do $W_{50}$.

$h_n$ é a amplitude máxima do ruído na linha de base da região 20 vezes $W_{50}$.

## Cálculo do Ruído pelo Método ASTM

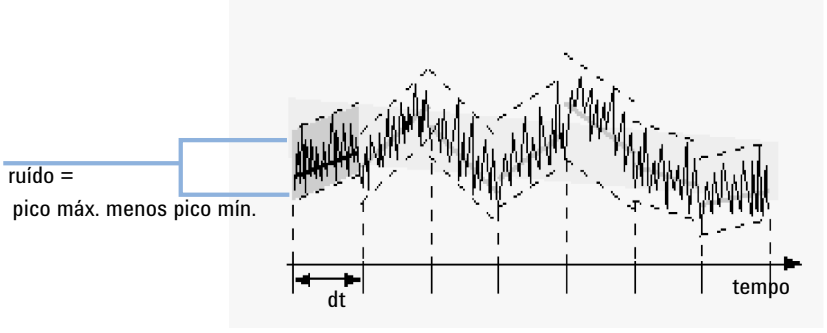



**Figura 100 Determinação do ruído pelo método ASTM**

A determinação do ruído ASTM (ASTM E 685-93) é baseada na prática padrão para testar detectores fotométricos de comprimento de onda variável utilizados em cromatografia líquida, conforme definido pela Sociedade Americana de Testes e Materiais. Com base no tamanho do intervalo de tempo, podem ser distinguidos três tipos diferentes de ruído. A determinação do ruído é baseada na medição pico a pico dentro de intervalos de tempo definidos.

- *Tempo do Ciclo, t*

  *Ruído a longo prazo*, a amplitude máxima para todas as variações aleatórias do sinal detector de frequências entre 6 e 60 ciclos por hora. O ruído a longo prazo é determinado quando o intervalo de tempo selecionado exceder uma hora. O intervalo de tempo para cada ciclo (dt) está definido como 10 minutos, o que proporcionará pelo menos seis ciclos dentro do intervalo de tempo selecionado.

  *Ruído a curto prazo*, a amplitude máxima para todas as variações aleatórias do sinal detector de uma frequência superior a um ciclo por minuto. O ruído a curto prazo é determinado para um intervalo de tempo selecionado entre 10 e 60 minutos. O intervalo de tempo para cada ciclo (dt) está definido como um minuto, o que proporcionará pelo menos 10 ciclos dentro do intervalo de tempo selecionado.

  *Ruído a prazo muito curto (não é parte da ASTM E 685-93),* esse termo é introduzido para descrever a amplitude máxima para todas as variações aleatórias do sinal detector de uma frequência superior a um ciclo por 0,1 minuto.

  O ruído a prazo muito curto é determinado para um intervalo de tempo selecionado entre 1 e 10 minutos. O intervalo de tempo para cada ciclo (dt) está definido como 0,1 minuto, o que proporcionará pelo menos 10 ciclos dentro do intervalo de tempo selecionado.

- *Número de Ciclos, n*

  O número de ciclos é calculado como:

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

  onde t é o tempo do ciclo e $t_{tot}$ é o tempo total durante o qual o ruído é calculado.

- *Ruído Pico a Pico em Cada Ciclo*

  O desvio é primeiro calculado determinando a regressão linear utilizando todos os pontos de dados no intervalo de tempo. A linha de regressão linear é subtraída de todos os pontos de dados dentro do intervalo de tempo para fornecer o sinal com o desvio corrigido. O ruído pico a pico é então recalculado utilizando a fórmula:

  $N = I_{máx.} - I_{mín.}$

  onde N é o ruído pico a pico, $I_{máx.}$ é o pico de maior intensidade (máxima) e $I_{mín.}$ é o pico de menor intensidade (mínima) no intervalo de tempo.

- *Ruído ASTM*

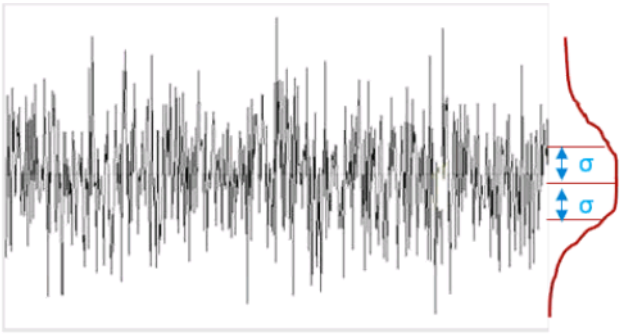
  O ruído ASTM é calculado como:

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

  onde $N_{ASTM}$ é o ruído baseado no método ASTM.

  Uma determinação do ruído ASTM não é feita se o intervalo de tempo selecionado estiver abaixo de um minuto. Dependendo do intervalo, se o intervalo de tempo selecionado for superior ou igual a um minuto, o ruído é determinado utilizando um dos métodos ASTM descritos anteriormente. São utilizados pelo menos sete pontos de dados por ciclo no cálculo. Os ciclos na determinação automatizada de ruído são sobrepostos em 10 %.

# Cálculo de ruído usando a Raiz Quadrada Média (RMS)




A regressão linear é calculada utilizando todos os pontos de dados dentro do intervalo de tempo do sinal atual.

O ruído é dado pela fórmula:

RMS = S

onde

| | |
|---|---|
| RMS | Ruído baseado no método de desvio padrão |
| S | Desvio Padrão |

Desvio padrão da regressão linear de todos os pontos de dados no intervalo de tempo selecionado, com a função linear y(X)= a + bX:

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

onde

| | |
|---|---|
| a | Intercepção em Y |
| b | inclinação |
| N | Número de observações discretas |
| $X_i$ | Variável independente, observação número i |

# Cálculo de sinal/ruído

O OpenLab CDS possui diferentes opções para o cálculo de sinal/ruído. Você pode escolher tanto o algoritmo quanto a faixa do ruído.

**Método 6 sigma ou RMS**

O sinal/ruído é calculado utilizando a fórmula:

$$\text{Sinal/ruído} = \frac{\text{Altura do pico}}{\text{Ruído do intervalo fechado}}$$

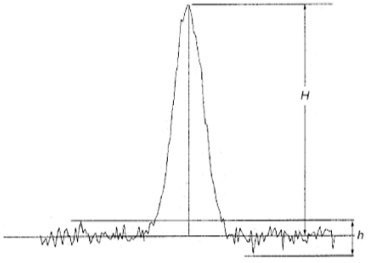



**Figura 101 Relação sinal/ruído**

**Pico a pico ou método ASTM**

O sinal/ruído é calculado utilizando a fórmula:

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

onde

| | |
|---|---|
| H | Altura do pico correspondente ao componente em questão no cromatograma obtido com a solução de referência prescrita. |
| h | Valor absoluto da maior flutuação do ruído de uma linha de base em um cromatograma obtido após a injeção ou aplicação de um branco e observado ao longo de uma distância igual a vinte vezes a largura a meia altura do pico no cromatograma obtido com a solução de referência prescrita e situado igualmente em torno do local onde esse pico seria encontrado.<br>De acordo com a definição da Farmacopeia Europeia, o sinal/ruído é calculado em relação a um sinal de referência branco e um ruído calculado no decorrer do intervalo de tempo que contém o pico para o qual a relação sinal/ruído está sendo calculada. |

**Intervalo de ruído**

O ruído pode ser calculado em relação às seguintes regiões de tempo e sinais:

- Região de tempo fixa, no mesmo sinal ou em um sinal de referência branco
- Região de tempo relativa ao início ou fim do pico, no mesmo sinal ou em um sinal de referência branco
- Região de tempo determinada automaticamente, em um sinal de referência branco.

Uma região de tempo determinada automaticamente é calculada de acordo com um dos seguintes algoritmos:

- Se o sinal de referência não for suficientemente longo

  *(TempoFinal – TempoInicial < 20*$W_{50}$)*

  - *TempoInicial = tempoinicial (do sinal de referência)* e
  - *TempoFinal = tempofinal (do sinal de referência)*
- Se o sinal de referência for longo o suficiente, mas o pico estiver muito próximo do tempoinicial

  *($t_R$-10*$W_{50}$ < tempoinicial do sinal de referência)*

  - *TempoInicial = tempoinicial (do sinal de referência)* e
  - *TempoFinal = TempoInicial + 20*$W_{50}$*
- Se o sinal de referência for longo o suficiente, mas o pico estiver muito próximo do tempofinal

  *($t_R$+10*$W_{50}$ > tempofinal do sinal de referência)*

  - *TempoFinal = tempofinal (do sinal de referência)* e
  - *TempoInicial = TempoFinal - 20*$W_{50}$*
- Se o sinal de referência for longo o suficiente e o pico estiver afastado o suficiente do tempoinicial e do tempofinal do sinal de referência

  *($t_R$-10*$W_{50}$ > tempoinicial, $t_R$+10*$W_{50}$ < tempofinal)*

  - *TempoInicial = $t_R$ - 10*$W_{50}$*, e
  - *TempoFinal = $t_R$ + 10*$W_{50}$*

onde

$t_R$ é o tempo de retenção e

$W_{50}$ é a largura do pico a meia altura.

# Drift e Wander

Drift e wander são calculados se a opção **Sinal/ruído** for selecionada no método de processamento. Eles são calculados independentemente do tipo de cálculo de ruído selecionado.

**Drift** Drift é informado como a inclinação da regressão linear. O desvio é primeiro calculado determinando a regressão linear utilizando todos os pontos de dados no intervalo de tempo. A linha de regressão linear é subtraída de todos os pontos de dados dentro do intervalo de tempo para fornecer o sinal com o desvio corrigido.

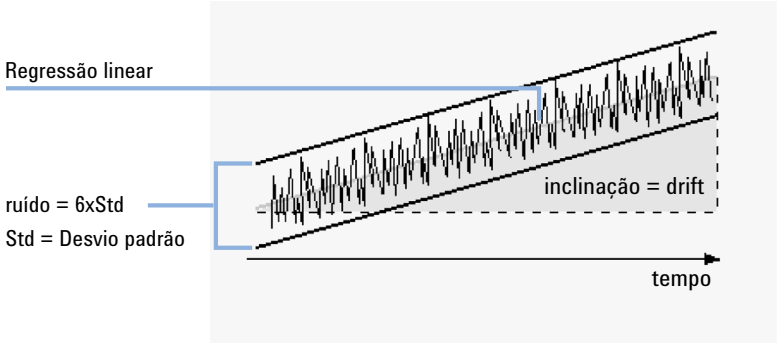



**Figura 102 Drift para ruído como Seis vezes o desvio padrão**

Fórmula da curva:

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

onde

| | |
|---|---|
| N | Número de observações discretas |
| $X_i$ | Variável independente, observação número i |
| $Y_i$ | Variável dependente, observação número i |

Coeficientes:

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

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

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

**Wander** Wander é determinado como o ruído de pico a pico dos valores de dados intermediários nos ciclos de ruídos ASTM; consulte "Cálculo do Ruído Utilizando Seis Vezes o Desvio Padrão" na página 177.

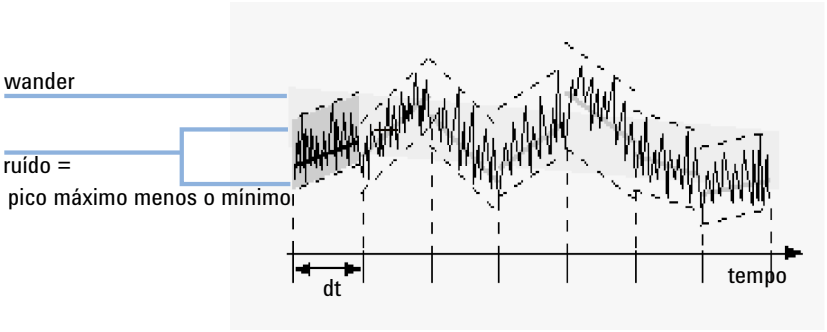



**Figura 103 Wander do ruído como determinado pelo método ASTM**

# Cálculo de simetria e assimetria do pico

**Assimetria** A assimetria do pico é calculada comparando as meias larguras do pico em 10% da altura do pico:

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

onde

| | |
|---|---|
| $A_S$ | Assimetria 10% |
| $W_{10}$ | Largura do pico em 10% da altura do pico |
| $W_{f,\,10}$ | Metade frontal da largura do pico em 10% da altura do pico. |

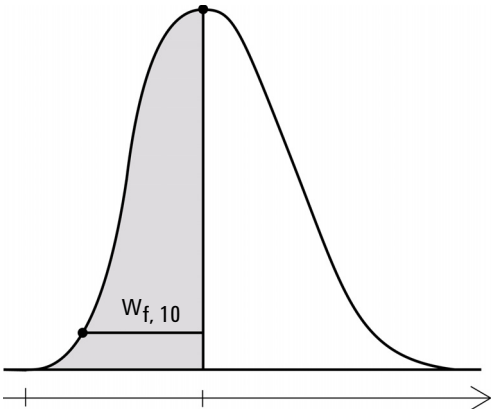



**Figura 104 Cálculo de assimetria do pico**

**Simetria** De acordo com a maioria das farmacopeias, o fator de simetria de um pico é calculado comparando as meias larguras do pico em 5%. No OpenLab, esse fator é calculado e armazenado como o Fator de cauda (consulte "Fator de Simetria, Fator de Cauda (USP) t" na página 195). No OpenLab, a simetria é calculada como um pseudomomento pelo integrador utilizando as seguintes equações de momento:

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

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

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

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

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

Se não forem encontrados pontos de inflexão ou somente um ponto de inflexão for reportado, a simetria do pico é calculada da seguinte maneira:

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

onde

| | |
|---|---|
| $a_i$ | Área da fatia |
| $t_i$ | Tempo da fatia |
| $H_f$ | Altura do ponto de inflexão frontal |
| $H_r$ | Altura do ponto de inflexão traseiro |
| H | Altura no ápice |

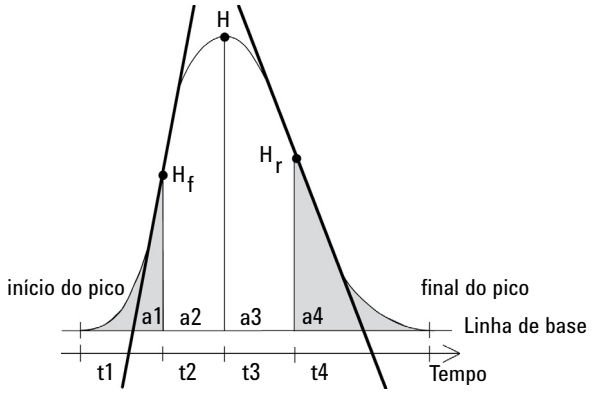



**Figura 105 Cálculo do Fator de Simetria do Pico**

# Fórmulas e cálculos de adequação do sistema

As fórmulas a seguir são usadas para obter os resultados para os vários testes de Adequação do sistema. Os resultados são reportados usando os relatórios **Desempenho+Ruído** e **Desempenho Estendido**.

Quando ASTM ou USP forem especificados para uma determinada definição, a definição estará em conformidade com aquelas fornecidas na referência correspondente. No entanto, os símbolos usados aqui podem não ser os mesmos daqueles usados na referência.

As referências usadas nesse contexto são:

- *ASTM: Seção E 685 – 93, Livro Anual de Normas ASTM, Vol.14.01*
- *USP: Farmacopeia Americana, XX. Revisão, pp. 943 – 946*
- *EP: Farmacopeia Europeia, 7ª Edição*
- *JP: Farmacopeia Japonesa, 16ª Edição*

# Definições do teste de desempenho

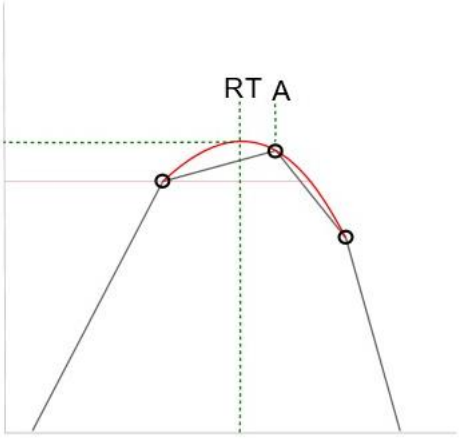
## NOTA: Tempo de retenção usado nos testes de desempenho

O Desempenho do Pico pode ser calculado para qualquer pico integrado dos dados carregados e também para novos picos integrados manualmente. O aplicativo calcula as características de pico e os valores de desempenho da coluna usando um tempo de retenção de modelo de pico que é calculado internamente. Pode diferir ligeiramente do tempo de retenção apresentado nos resultados de injeção, cromatogramas ou relatórios. O tempo de retenção de modelo de pico pode ser indicado (ver os campos de dados usados para fins de adequação do sistema na ajuda de Geração de Relatório, ou pesquise por *PeakModelRT*).

NOTA

Observe que o tempo de retenção (RT) indicado na figura abaixo e determinado pelo integrador de pico não está necessariamente associado ao ponto de dados mais alto. O tempo de retenção é geralmente calculado usando um modelo de interpolação parabólica. Isso significa que o tempo de retenção RT pode ser potencialmente menor ou maior que o tempo de retenção do ponto de dados mais alto, sendo que a altura também pode ser maior ou menor que o ponto de dados mais alto.

O tempo de retenção do modelo de pico é calculado suavizando o sinal para evitar a interferência de ruídos. Em seguida, o maior ponto de dados mais próximo do RT do pico é determinado. O RT deste ponto de dados é usado como o tempo de retenção do modelo de pico.




onde

| | |
|---|---|
| RT | O tempo de retenção mostrado nos resultados da injeção |
| A | O tempo de retenção do modelo de pico usado para cálculos de desempenho |

# Visão geral dos testes de desempenho

**Tabela 9 Valores da farmacopeia no OpenLab CDS**

| USP | EP | JP | Definição | Nome da coluna nos resultados da injeção | Campo usado na geração de relatório |
|---|---|---|---|---|---|
| Fator de simetria ou fator de cauda | Fator de simetria | Fator de simetria | $S = \frac{W_5}{2f}$ | Cauda | Pico_FatorDeCauda |
| Fator de Separação | - | Fator de Separação | $\text{alpha} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$ | Seletividade | Pico_Seletividade |
| Retenção relativa | Retenção relativa | - | Com os compostos RRT: $\frac{RT_{peak} - t_0}{RT_{ref} - t_0}$ | RRT EP | Pico_TempoDeRetençãoRelativo_EP |

**Tabela 9 Valores da farmacopeia no OpenLab CDS**

| USP | EP | JP | Definição | Nome da coluna nos resultados da injeção | Campo usado na geração de relatório |
|---|---|---|---|---|---|
| Tempo de retenção relativo (RRT) | Retenção relativa não ajustada | Retenção relativa não ajustada | Com os compostos RRT $\frac{RT_{peak}}{RT_{ref}}$ | RRT | Tempo_Retenção_Relativo_Pico |
| - | Resolução | Resolução | $Rs = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50\,(1)} + W_{50\,(2)}}$ | Resol. EP<br>Resol. JP | Pico_Resolução_EP<br>Pico_Resolução_JP |
| Resolução | - | - | $R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t\,(2)} + W_{t\,(1)}}$ | Resol. USP | Pico_Resolução_USP |
| Número de pratos teóricos (Eficiência) | - | - | $n = 16\left(\frac{t_R}{W_t}\right)^2$ | Pratos USP | Pico_PratosTeóricos_USP |
| - | Número de pratos (Eficiência) | Número de pratos (Eficiência) | $n = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{50}}\right)^2$ | Pratos EP<br>Pratos JP | Pico_PratosTeóricos_EP<br>Pico_PratosTeóricos_JP |
| razão S/R | razão S/R | razão S/R | Com cálculo de ruído ASTM ou P2P: $\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$ Com cálculo de ruído RMS ou 6SD: $\frac{S}{N} = \frac{H}{h}$ | S/N | Pico_SinalRuído |
| Razão pico-vale | Razão pico-vale | Razão pico-vale | $\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}$ | razão p/v | Pico_RazãoPicoVale |

# Largura real do pico Wx [mín.]

$W_x$ = largura do pico em x% de altura do total

onde

| | |
|---|---|
| $W_t$ | Largura do pico da tangente, 4 sigma, obtida pela intersecção das tangentes através dos pontos de inflexão com a linha de base |
| $W_{4,4}$ | Largura em 4,4% da altura (largura 5 sigma) |
| $W_5$ | Largura em 5% da altura (largura da cauda do pico), usada para o fator de cauda USP |
| $W_{10}$ | Largura em 10% da altura |
| $W_{50}$ | Largura em 50% da altura (largura do pico a meia altura real ou 2,35 sigma). |

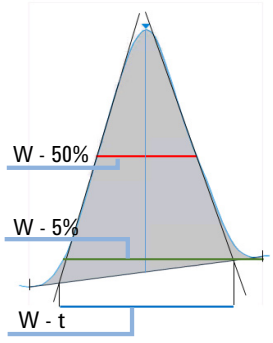



**Figura 106 Largura do pico a x% da altura**

# Fator de Capacidade (USP), Razão de Capacidade (ASTM) k'

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

onde

| | |
|---|---|
| $t_R$ | Tempo de retenção do pico [min] |
| $t_0$ | Tempo morto [min] (conforme fornecido no método de processamento) |

# Fator de Simetria, Fator de Cauda (USP) t

NOTA

O Fator de Simetria (USP, EP, JP) é idêntico com o Fator de Cauda (USP). Ambos estão disponíveis como "Peak_TailFactor" na Geração de Relatório Inteligente. Consulte também Tabela 9 na página 191.

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

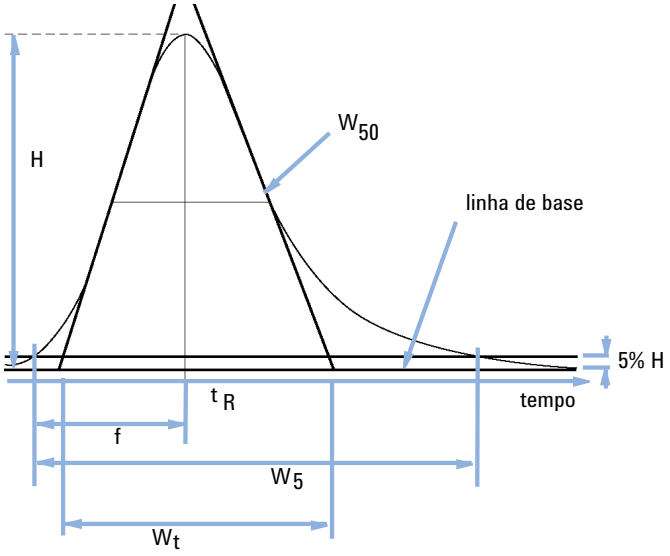



**Figura 107 Parâmetros de Desempenho**

| | |
|---|---|
| S | Fator de simetria, fator de cauda (USP) |
| H | Altura do pico |
| $t_R$ | Tempo de retenção |
| f | Distância em min. entre a frente do pico e $t_R$, com medição em 5% da altura do pico |
| $W_{50}$ | Largura do pico em 50% da altura [min] |
| $W_5$ | Largura de pico em 5% da altura do pico [min] |
| $W_t$ | Largura de pico da tangente |

# Número de Pratos Teóricos por Coluna (USP)

Método de tangente (USP, ASTM):

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

onde

| | |
|---|---|
| $t_R$ | Tempo de retenção |
| $W_t$ | Largura da tangente [min] |

Método de meia largura (ASTM, EP, JP):

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

onde

| | |
|---|---|
| $t_R$ | Tempo de retenção |
| $W_{50}$ | Largura de pico a meia altura [min] |

# Número de Pratos Teóricos por Metro N [1-m]

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

onde

| | |
|---|---|
| n | Número de prato teóricos |
| l | Comprimento da coluna [cm] (conforme fornecido no método de processamento) |

# Retenção Relativa, Seletividade

**Seletividade**

A seletividade calcula o valor alfa para todos os picos de sinal, exceto o primeiro. Para cada par de picos adjacentes (picos 1 e 2, $t_R$ do pico 1 < $t_R$ do pico 2), a seletividade é calculada da seguinte forma:

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

onde

| | |
|---|---|
| $k'_{(x)}$ | fator de capacidade para o pico x: $(t_{Rx}-t_0)/t_0$ |

**Retenção relativa, seletividade**

O RRT (EP) só pode ser calculado se tiver sido definido e identificado um pico de referência RRT. Os valores *alfa* são < 1, se o pico estiver à esquerda da referência RRT, e > 1 se o pico estiver à direita da referência RRT.

$$\frac{RT_{peak} - t_0}{RT_{ref} - t_0}$$

# Resolução (USP, ASTM) R

Método de tangente (em relação aos picos 1 e 2, $t_R$ do pico 1 < $t_R$ do pico 2; $t_R$ em min)

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

onde

| | |
|---|---|
| $t_R$ | Tempo de retenção |
| $W_t$ | Largura da tangente [min] |

## Resolução (EP/JP) Rs

A Resolução (JP) e a Resolução (EP) são calculadas com o método de meia largura (Resolução usada no Relatório de Desempenho):

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

onde

| | |
|---|---|
| $t_R$ | Tempo de retenção |
| $W_{50}$ | Largura de pico a meia altura [min] |

## Razão Pico-Vale (EP/JP)

A razão pico-vale (**razão p/v** nos resultados de injeção) é calculada para indicar a qualidade da separação dos picos. Esta é calculada com a Farmacopeia Europeia e Japonesa (EP, JP).

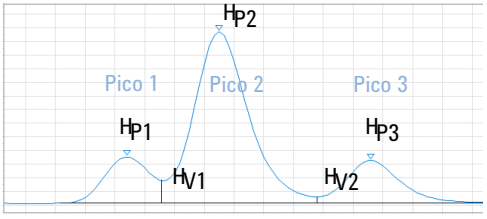
NOTA

Este valor é diferente da razão pico-vale que você configura nos parâmetros de integração avançados!

A razão pico-vale é calculada para picos separados por um vale:

PV = altura do pico/altura do vale

Se houver vales à esquerda e à direita de um pico, a razão pico-vale é calculada na parte inicial e final. A razão p/v mínima será apresentada.



Para o pico 1:

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

Para o pico 2:

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

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

$$PV = \mathrm{Min}(PV_F, PV_T)$$

Para o pico 3:

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

onde

| | |
|---|---|
| PV | Razão pico-vale |
| $PV_F$ | Razão pico-vale, parte inicial |
| $PV_T$ | Razão pico-vale, parte final |
| $H_{Px}$ | Altura do pico x |
| $H_{Vx}$ | Altura do vale x |

Se um pico tiver vários ombros separados por um vale, a razão pico-vale é calculada para cada ombro.

Definição de um vale:

- Sua altura e tempo são compartilhados entre dois picos consecutivos
- Sua linha de base é compartilhada entre dois picos consecutivos
- A altura absoluta da linha de base é superior a $10^{-5}$.

O cálculo da razão pico-vale usa sempre valores absolutos. Portanto, mesmo que um ou mais picos sejam negativos, a razão pico-vale será sempre apresentada como um número positivo.

**NOTA**

A razão pico-vale não é calculada no caso de sinais que consistem em poucos pontos de dados.

## Neste livro

Este guia contém informações de referência sobre os princípios de operação, cálculos e algoritmos de análise de dados utilizados no Agilent OpenLab CDS. As informações aqui contidas podem ser usadas por profissionais de validação para planejarem e executarem as tarefas de validação do sistema.

- Integração com o algoritmo ChemStation
- Integração com o algoritmo EZChrom
- Identificação do pico
- Calibração
- Quantificação
- Análise Espectral UV
- Espectrometria de Massas
- System Suitability

www.agilent.com

© Agilent Technologies Inc. 2012-2022
Edição: 04/2022

Nº doc.: D0013815pt Rev. A

Agilent