



OpenLab CDS

データ解析リファレンスガイド

注意

文書情報

文書番号 : D0028019ja Rev. A
エディション : 2024 年 1 月

著作権

© Agilent Technologies, Inc. 2012-2024

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

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

ソフトウェアリビジョン

このガイドは改訂版が発行されるまで、Agilent OpenLab CDS のリビジョン 2.8 に対応しています。

保証

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

技術ライセンス

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

権利の制限

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

安全にご使用いただくために

注意

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

警告

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

本書の内容

本書は、上級者のユーザー、システム管理者、および Agilent OpenLab CDS を検証する担当者向けに用意されています。本書には、計算とデータ解析のアルゴリズムの原理に関する情報が記載されています。

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

- コンテキスト固有のタスク情報（「方法」）、ユーザーインターフェイスへの参考事項、およびトラブルシューティングヘルプ: OpenLab Help and Learning。
- システムのインストールおよびサイトプレパレーションの詳細: 『OpenLab CDS 要件とサポートする機器 ワークステーション、クライアント、および機器コントローラ』、『OpenLab CDS Workstation インストールおよびコンフィグレーション』または『OpenLab CDS クライアント／機器コントローラ インストールおよびコンフィグレーション』。

1 シグナルの準備

この章では、積分される前のブランク減算などによるシグナルの準備方法について解説します。

2 ChemStation インテグレータを使用した積分

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

3 EZChrom インテグレータを使用した積分

本章では、EZChrom 積分イベントについて説明します。

4 ピーク同定

本章では、ピーク同定のコンセプトについて説明します。

5 キャリブレーション

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

6 定量

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

7 UV スペクトル分析

この章では、UV スペクトル分析に基づいた純度チェックと化合物同定の確認の概念について説明します。

8 質量分析

この章では、質量分析に基づいたサンプル純度計算について説明します。

9 システムスタビリティ

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

目次

1	シグナルの準備	7
	シグナルのスムージング	8
	ブランク減算	11
2	ChemStation インテグレータを使用した積分	12
	積分とは	13
	積分アルゴリズム	15
	操作の原理	20
	ピーク認識	21
	ピーク面積の測定	31
	ベースラインアロケーション	34
	積分イベント	48
3	EZChrom インテグレータを使用した積分	70
	積分イベント	71
	ベースラインコードの説明	87
4	ピーク同定	89
	ピーク同定とは	90
	競合の分解能	92
	相対リテンションタイム	93
	タイムリファレンス化合物	96
	解析メソッドの更新	98
5	キャリブレーション	104
	キャリブレーションとは	105
	検量線	106
	検量線の計算	119
	検量線の評価	127

6	定量	134
	定量とは	135
	補正ファクタ	136
	濃度とアマウント %	137
	面積% および高さ%	138
	キャリブレーションされた化合物の定量	139
	キャリブレーションされていない化合物の定量	144
	同定されていないピークの定量	147
	ノーマライズ	148
	グループの定量	151
7	UVスペクトル分析	159
	UVスペクトル分析とは	160
	UV純度チェック	162
	UV比較	174
8	質量分析	175
	MSサンプル純度	176
	MSピーク純度	178
9	システムスタビリティ	180
	システムスタビリティの評価	181
	ノイズ測定	183
	ピークの対称度 10% と対称度の計算	194
	システムスタビリティの式および計算	197
	パフォーマンステストの定義	198

1 シグナルの準備

シグナルのスムージング 8

一般的な方法 8

アルゴリズムの詳細 9

ブランク減算 11

この章では、積分される前のブランク減算などによるシグナルの準備方法について解説します。

この章では、積分を実行する前のシグナル処理について説明します。

注記

ブランク減算とスムージング両方の設定を使用してデータを解析すると、最初にスムージングが行われ、次にスムージングされたシグナルでブランク減算が行われます。

シグナルのスムージング

一般的な方法

前提

すべてのスムージングアルゴリズムでは、データが等距離データであると仮定しています。非等距離データは、補間を適用し、非等距離データの最小時間差を使用してデータを再サンプリングすることにより、等距離データに変換します。

MS 以外のデータは、スプライン補間を使用して変換されます。

MS データの場合、変換はスムージングアルゴリズムによって異なります。**Savitzky-Golay** では、スプライン補間が使用されます。**移動平均**または**ガウス**では、線形補間が使用されます。

スムージング - 基本のアルゴリズム

すべてのスムージングアルゴリズムは、以下のアプローチを使用し、スムージング係数から計算されたサイズ **2m+1** のウィンドウを適用します。

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

ここで、

a	スムージング係数の配列
x'	スムージングされたシグナル
m	スムージングウィンドウの半幅を指定する偶数

このアプローチにより、合計ウィンドウサイズに対する奇数 **2m+1** が得られます。

エッジの処理

スムージング係数はノーマライズされるため、エッジには特別な考慮が必要です。

移動平均およびガウスフィルターの場合、左または右のエッジでウィンドウが切り取られ、合計が1になるように係数が再計算されます（ノーマライズ）。

Savitzky-Golay の場合、処理はより複雑になります。シグナルのエッジ付近でも Savitzky-Golay フィルターの特性を保持する必要があるためです。「アルゴリズムの詳細」9 ページを参照してください。

アルゴリズムの詳細

移動平均

移動平均は、最も単純なスムージングアルゴリズムです。係数は以下のように計算されます。

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

ここで

2

スムージング係数の配列

m

スムージングウィンドウの半値幅を指定する偶数

したがって、スムージング関数は矩形を有しています。この種類のスムージングは Boxcar averaging とも呼ばれます。

ガウス

ガウススムージングは、ガウス正規分布からサンプリングされた係数を使用します。数値 **2m+1** をウィンドウサイズとすると、正規分布の標準偏差 σ が以下のように計算されます。

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

次に、個々の係数が以下のように計算されます。

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

2番目のステップで、係数は合計が1になるようにノーマライズされます。

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

Savitzky-Golay

Savitzky-Golay スムージングの係数は、関数の下の面積が変わらないように計算されます。係数の計算は、Gorryによる論文『General Least-Squares Smoothing and Differentiation by the Convolution (Savitzky-Golay) Method』(1990)¹に基づいています。

この計算により、Savitzky-Golay スムージングで面積が維持される特性がシグナルの境界でも有効になります。

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

ブランク減算

サンプルの分析時には、分析対象物のほかに希釈溶媒、移動相、添加剤などによるシグナルが生じる場合があります。ブランク減算を使用すると、分析対象物のみのクロマトグラムが得られます。

ブランク減算では、以下を使用することができます。

- ・ シーケンス内のブランクサンプル
- ・ シーケンスにないブランクサンプル（たとえば、シングルランなど）

新しいシグナルからは、ブランクシグナルが減算されます。

新しいシグナル = サンプルシグナル – ブランクシグナル

特定の波長を使用した抽出クロマトグラムの場合：

新しいシグナル = 特定波長のサンプルシグナル – 特定波長のブランクシグナル

特定の m/z を使用した抽出クロマトグラムの場合：

新しいシグナル = 特定 m/z のサンプルシグナル – 特定 m/z のブランクシグナル

ブランクとサンプルの取込速度が異なる場合、ブランクの取込速度が調整されます。補間によってデータポイントが削除または作成されます（MS データの場合は線形補間、MS 以外のデータの場合はスプライン補間）。

サンプルの分析時間がブランクの分析時間よりも長い場合、新しいシグナルには減算されたデータポイント、および減算されていないデータポイントが含まれてしまいます。

積分とは	13
積分について	13
積分の機能	14
積分アルゴリズム	15
概要	15
初期ベースラインの定義	16
ベースラインの追跡	17
ベースラインの割り当て	18
用語の定義	19
操作の原理	20
ピーク認識	21
ピーク幅	21
ピーク認識フィルター	22
バンチング	23
ピーク認識アルゴリズム	24
マージピーク	26
ショルダー	27
デフォルトのベースラインの設定	28
ベースラインコード	28
ピーク面積の測定	31
面積の決定	31
単位と変換ファクタ	33
ベースラインアロケーション	34
ベースライン補正モード	34
ピークバレー比	36
タンジェントスキム	38
タンジェントスキムモード	40
ショルダーモード	45
タンジェントスキムモードとショルダーモードの組み合わせ	47
積分イベント	48
標準積分イベント: 初期イベント	48
標準積分イベント: タイムイベント	53
詳細積分イベント	66

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

積分とは

積分は、シグナルのピークを同定し、そのサイズを計算するための操作です。

積分は、以下のために必要なステップです。

- 同定
- キャリブレーション
- 定量

積分について

シグナルを積分するとき、ソフトウェアは次のことを行います。

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

このプロセスは、積分イベントと呼ばれるパラメータでコントロールできます。

積分の機能

積分アルゴリズムには、以下のような主要な機能が含まれています。

- 複数のシグナルまたは複数の検出器を使用する場合に、クロマトグラフシグナルごとに個別の積分イベントテーブルを定義する機能
- 人による解釈を必要とするクロマトグラムのグラフィカルなマニュアル積分
- 積分結果の注釈
- 基本的な積分設定を設定または修正するための積分パラメータの定義。設定には、面積リジェクト、高さリジェクト、ピーク幅、スロープ感度、ショルダー検出、ベースライン補正、およびフロント/テールタンジエントスキム検出が含まれます。
- ベースラインの強制、ベースラインのホールド、すべての谷でのベースライン、次の谷でのベースライン、現在のピークの終わりから後方へベースラインをフィット、時間範囲内にある最も可能性の高いベースラインポイントなどの、ベースラインコントロールパラメータ
- 面積和のコントロール
- ネガティブピークの認識
- 溶媒ピーク定義検出
- 積分操作に対してリテンションタイムレンジを定義する積分コントロールコマンド
- 2次微分次数計算を用いたピークショルダー割り当て

積分アルゴリズム

概要

クロマトグラムを積分するには、次のことが行われます。

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

このプロセスは、**積分イベント**でコントロールできます。最も重要なイベントは初期スロープ感度、ピーク幅、ショルダーモード、面積リジェクト、および高さリジェクトです。ソフトウェアでは、これらおよび他のイベントの初期値を設定することができます。初期値は、クロマトグラムの開始点で有効になります。

初期イベントはクロマトグラム全体に対して良好な積分結果をもたらしますが、積分の進行とともににより詳細なコントロールを行う必要がある場合もあります。

ソフトウェアでは、クロマトグラムの適切な時点での新規積分イベントをプログラムできるようにすることによって、積分の実行方法をコントロールできるようになっています。

初期ベースラインの定義

主要なポイント

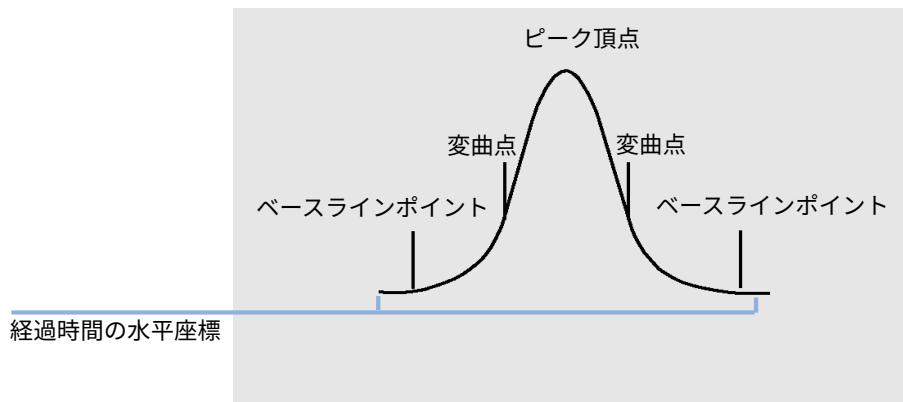


図 1 主要なポイント

初期ベースラインの定義

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

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

ピークの主要なポイントの認識

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

開始

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

頂点

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

終了

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

ベースラインの追跡

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

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

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

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

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

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

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

ベースラインの割り当て

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

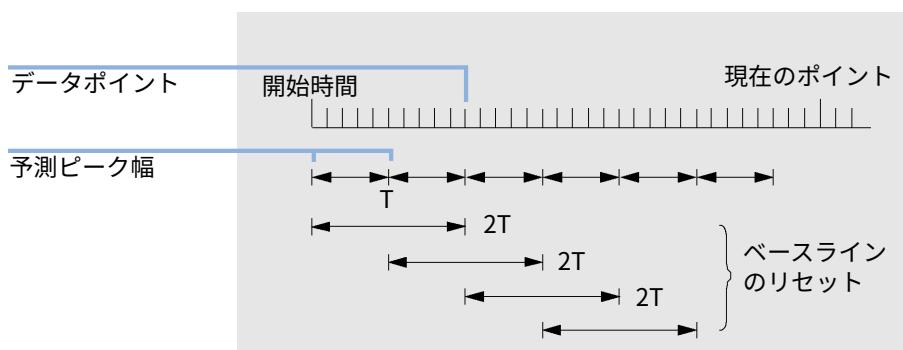


図2 ベースライン

積分処理の開始時に、最初のデータポイントが使用されます。ベースラインポイントは、式に示すように定期的にリセットされます (18ページ 図2を参照)。

面積は、時間 T (ピーク幅の期待値) にわたって加算されます。この時間は、決して 1 データポイントより短くはなりません。これは、ベースライン条件が満たされるまで続きます。スロープと曲率も計算します。スロープと曲率の両方がスレッショルドよりも小さい場合には、加算した 2 つの面積の和を取り、それから前のベースラインと比較します。新しい値が前のベースラインよりも小さい場合には、直ちに古い値を新しい値に置き換えます。新しい値が前の値より大きい場合には、それは仮の新規ベースライン値として保存され、さらに 1 つの値がスロープと曲率の平坦さの基準を満たすことを確認します。後者の制限は、ネガティブピークが許されている場合には無効です。ベースライン中には、溶媒の速い上昇を調べるチェックも行う必要があります。これらは、アップスロープを検出するには速すぎる場合があります。（アップスロープが確認されると、溶媒の基準は有効ではなくなります。）最初の段階では、最初のデータポイントを通るのがベースラインです。これは、シグナルがベース上にある場合には、 $2T$ の平均値で置き換えられます。その後、ベースラインは T ごとにリセットされます（18 ページ 図2 を参照してください）。

用語の定義

溶媒ピーク

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

ショルダー (フロント、リア)

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

スロープ

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

操作の原理

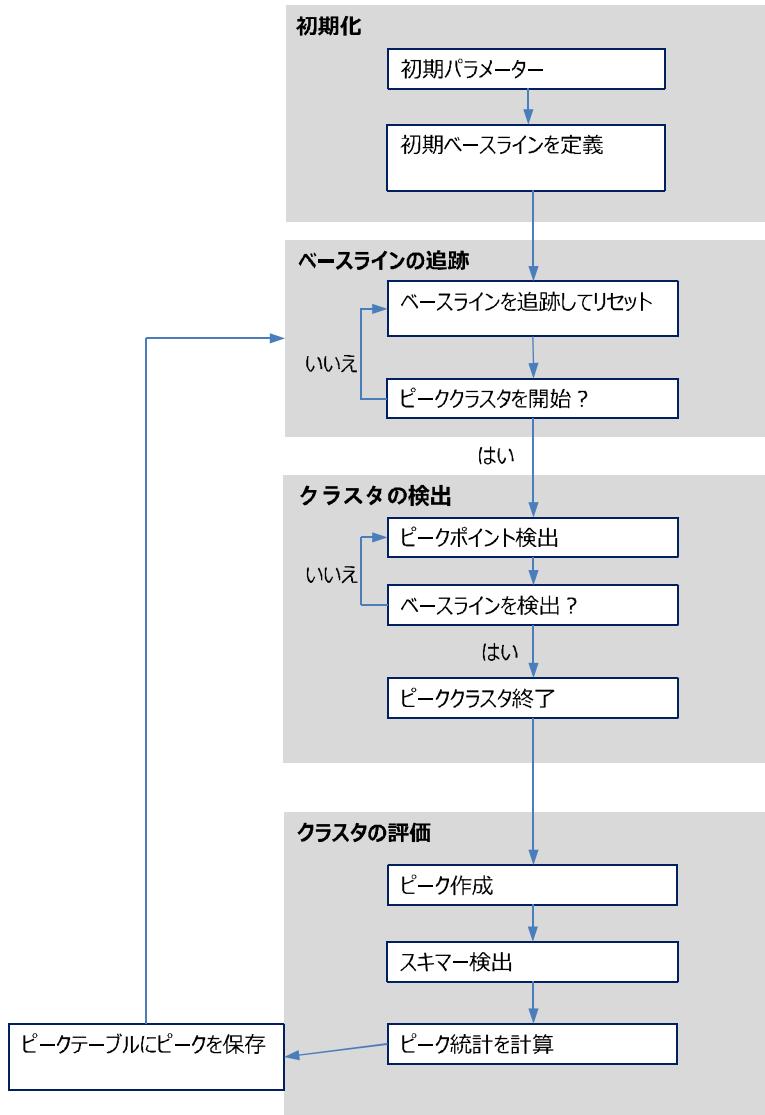


図 3 積分のフローチャート

ピーク認識

インテグレータは、ピークを認識し、特徴付けるために、次のものを使用します。

- ・「ピーク幅」 21 ページ
- ・「ピーク認識フィルター」 22 ページ
- ・「バンチング」 23 ページ
- ・「ピーク認識アルゴリズム」 24 ページ
- ・「マージピーク」 26 ページ
- ・「ショルダー」 27 ページ
- ・「デフォルトのベースラインの設定」 28 ページ
- ・「ベースラインコード」 28 ページ

ピーク幅

積分中、ピーク幅は、次のように調整されたピーク面積と高さから計算されます。

幅 = 調整された面積 / 調整された高さ

または、変曲点が利用可能な場合には、変曲点間の幅になります。

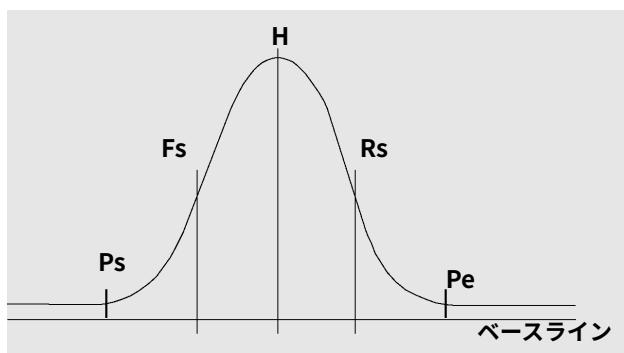


図 4 ピーク幅の計算

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

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

ピーク幅は、3通りの方法で変更されます。

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

ピーク認識フィルター

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

注記

信頼性の高い結果を得るためにには、ピークに少なくとも 10 のデータポイントが含まれている必要があります。

認識フィルターには次のものがあります。

フィルタ 1 連続する 2 つ（3 つ）のデータポイントのスロープ（曲率）

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

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

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

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

LC データの場合、デフォルトのピーク幅の計算には次の複合計算方法を用います。

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

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

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

ピーク幅の更新は、次の方法で重み付けされます。

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

バンチング

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

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

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

バンチングは、取り込み速度とピーク幅に基づいています。インテグレータは、これらのパラメータを使用してバンチング係数を設定し、適切なデータポイント数を計算します (24 ページ [表1](#) を参照してください)。

バンチングは、予測ピーク幅または過去のピーク幅に基づいた 2 の累乗で実行されます。バンチングアルゴリズムについては 24 ページ [表1](#) に概説されています。

表1 バンチングの基準

予測ピーク幅	使用されるフィルタ	行われるバンチング
データポイント 0 ~ 10	フィルタ 1	なし
データポイント 8 ~ 16	フィルタ 2	なし
データポイント 12 ~ 24	フィルタ 3	なし
データポイント 16 ~ 32	フィルタ 2	1回
データポイント 24 ~ 48	フィルタ 3	1回
データポイント 32 ~ 96	フィルタ 3、2	2回
データポイント 64 ~ 192	フィルタ 3、2	3回

ピーク認識アルゴリズム

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

ピーク開始

25ページ表2を使用し、予測ピーク幅によってスロープ感度と比較されるフィルタのスロープと曲率の値が決定されます。たとえば、予測ピーク幅が小さい場合には、フィルタ1の値がアップスロープ積算器に加算されます。予測ピーク幅が大きくなると、フィルタ2の値が、それからフィルタ3の値が使用されます。

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

表2 アップスロープ積算器への増分値

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

ピーク終了

25ページ表3を使用し、予測ピーク幅によってスロープ感度と比較されるフィルタのスロープと曲率の値が決定されます。たとえば、予測ピーク幅が小さい場合には、フィルタ1の値がダウンスロープ積算器に加算されます。予測ピーク幅が大きくなると、フィルタ2の値が、それからフィルタ3の値が使用されます。

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

表3 ダウンスロープ積算器への増分値

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

ピーク頂点アルゴリズム

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

マージピーク

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

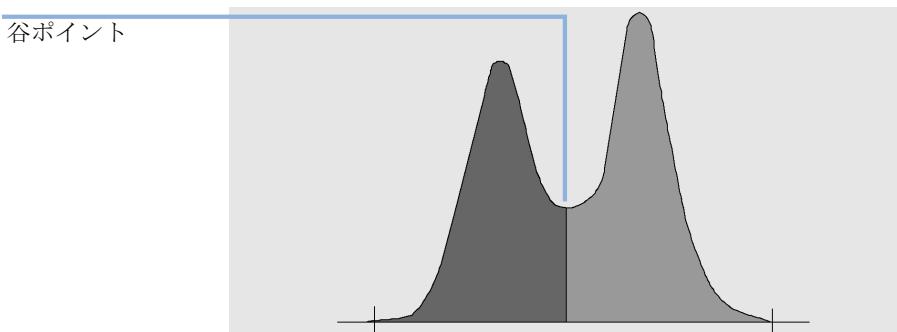


図 5 マージピーク

インテグレータは、マージピークを次の方法で処理します。

- 1 最初のピークの面積を谷ポイントまで加算します。
- 2 谷ポイントで、最初のピークの面積の加算が終わり、2番目のピークの加算が始まります。
- 3 インテグレータが2番目のピークの終わりを検出すると、面積の加算は終了します。このプロセスは、マージピークを、2つのピークの間の谷ポイントで垂直に分割するとして説明できます。

ショルダー

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

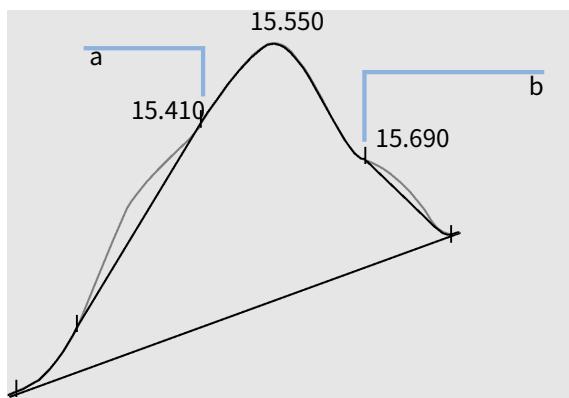


図 6 ピークショルダー

ショルダーは、二次微分係数から与えられる、ピークの曲率で検出されます。曲率がゼロになる場合、インテグレータにより、27ページ 図6のポイント a および b などの変曲点が認識されます。

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

リテンションタイムは、ショルダーの負の最大曲率の点から決定されます。プログラムされた積分イベントでは、インテグレータはショルダーの面積もショルダーのピークの変曲点から引いた直線で分割することにより、通常のピークの場合のように計算します。

ショルダーの面積は、メインピークから減算されます。

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

デフォルトのベースラインの設定

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

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

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

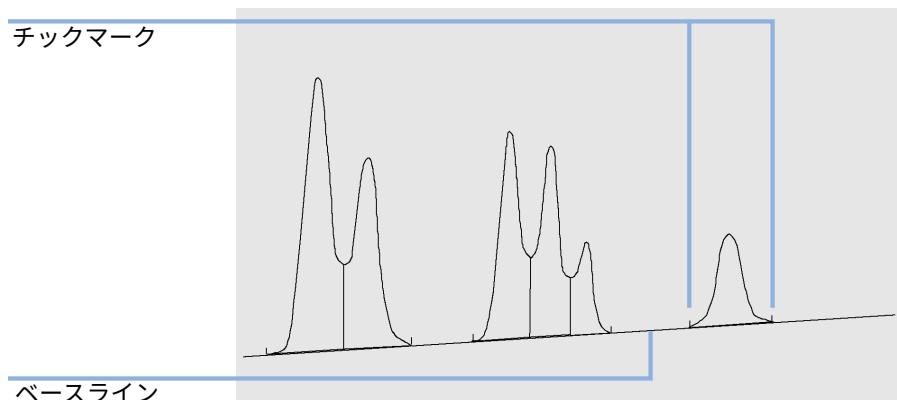


図7 デフォルトのベースラインの設定

ベースラインコード

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

表4 4文字のコード

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

ベースラインコードは、【注入結果】テーブルおよびすべてのデフォルトレポートテンプレートに含まれます。

注入結果							
ピーク		サマリー					
#	名前	BL コード	RT (min)	面積	面積 %	高さ	高さ % アマウント
1		BV	0.593	8.232	0.908	3.048	0.99
2		VV	0.593	5.966	2.803	2.229	3.08
3		BV	0.594	15.496	1.264	5.700	1.38
4		VV	0.825	9.097	1.003	2.132	0.69
			0.593	15.496	1.264	5.700	1.38

図 8 注入結果

シグナル: DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0

RT [min]	タイプ	ピーク幅 [min]	面積	高さ	面積%
0.893	VB	0.29	146.23	55.98	33.11
1.326	BB	0.19	30.15	11.07	6.83
1.785	BB	0.22	11.25	3.88	2.55
2.268	BB	0.19	8.33	2.76	1.89

図 9 例: Short_Areaレポートからのテーブル

文字 1 と 2

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

- B ピークはベースライン上で開始または終了しました。
- P ピークはベースラインが落ち込んでいるところで開始または終了しました。
- V ピークは谷のドロップラインで開始または終了しました。
- H ピークは強制的に水平化されたベースライン上で開始または終了しました。
- F ピークは強制されたポイント上で開始または終了しました。
- M ピークはマニュアルで積分されました。
- U ピークは割り当てられませんでした。

付加的なフラグが追加されることもあります(優先順位に従います)。

3 文字目

3番目の文字は、エラーまたはピークフラグを示します。

- A** 積分は中断されました。積分イベント ON/OFF や、シグナル分析時間終了などが原因です。
- D** ピークが歪んでいました（ピーク形状不良）。
- 空白** ピークはノーマルピークです。

4 文字目

4番目の文字は、ピークタイプを示します。強制積分イベントの場合や、マニュアル積分が実行された場合のみ表示されます。たとえば、積分イベントを使用して溶媒ピークを定義したり、マニュアル積分を使用してベースラインを補正またはピークを削除した場合です。

- S** ピークは溶媒ピークです。
- N** ピークはネガティブピークです。
- +** ピークは面積ピーク和です。
- T** タンジェントスキムピークです（標準のスキム、直線）。
- X** タンジェントスキムピークです（古いモードの指數曲線スキム）。
- E** タンジェントスキムピークです（新しいモードの指數曲線スキム）。
- G** タンジェントスキムピークまたはショルダーです（ガウス）。
- m** マニュアルベースラインによって定義されたピークです。
- n** マニュアルベースラインによって定義されたネガティブピークです。
- t** マニュアルベースラインによって定義された、タンジェントスキムピークです。
- x** マニュアルベースラインによって定義された、タンジェントスキムピーク（指數曲線スキム）です。
- R** ピークは再計算したピークです。
- f** フロントショルダータンジェントによって定義されたピークです。
- b** リアショルダータンジェントによって定義されたピークです。
- F** フロントショルダードロップラインによって定義されたピークです。
- B** リアショルダードロップラインによって定義されたピークです。
- U** ピークは割り当てられていません。

ピーク面積の測定

ピーク積分の最後のステップは、最終的なピーク面積を決定することです。

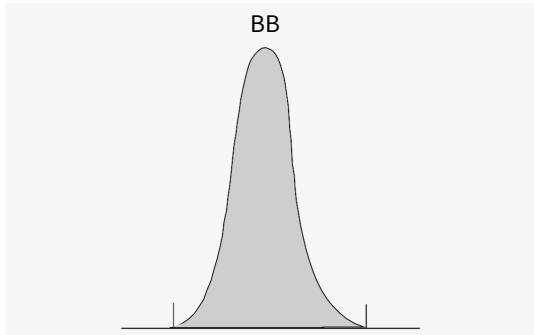


図 10 ベースライン間のピークの面積測定

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

面積の決定

積分中にインテグレータが計算する面積は、次のように決定されます。

- ベースライン間 (BB) ピークの場合には、31ページ 図10のように、ピーク開始と終了の間の、ベースラインより上の面積になります。
- 谷 - 谷 (W) ピークの場合には、32ページ 図11のように、谷ポイントからの垂線で区切られた、ベースラインより上の面積になります。

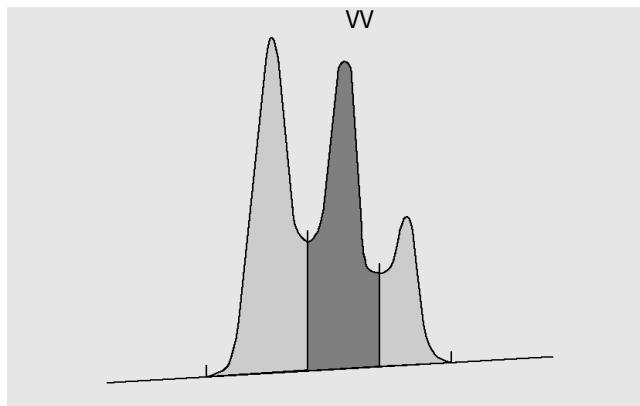


図 11 谷 - 谷ピークの面積測定

- タンジェント (T) ピークの場合、リセットベースラインより上の面積です。
- 溶媒 (S) ピークの場合、最後に見つかったベースラインポイントからの水平延長線の上、タンジェント (T) ピークに与えられたリセットベースラインの下の面積になります。溶媒ピークの上昇が遅すぎて認識されない場合があります。また分析中に、溶媒ピークに子ピークのグループが乗っていると思われる場合があります。これは通常、第一ピークが他のものより非常に大きい、マージピークのグループによって生じます。後者のピークは第一ピークのテールに乗っているため、単純な垂線で処理すると後者のピークを誇張することになります。第一のピークを強制的に溶媒として認識させることにより、グループの残りはテールからスキムすることができます。
- ベースラインの下に生じたネガティブピークは、32ページ 図12に示されたような正の面積になります。

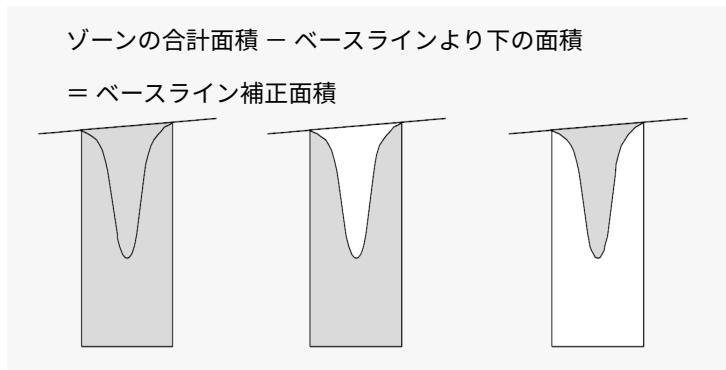


図 12 ネガティブピークの面積測定

単位と変換ファクタ

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

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

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

ベースラインアロケーション

ベースライン補正モード

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

ベースライン補正モード：クラシカル

落ち込みは、構築されたベースラインの下までシグナルが降下すると生じます (34ページ 図13のポイント a)。

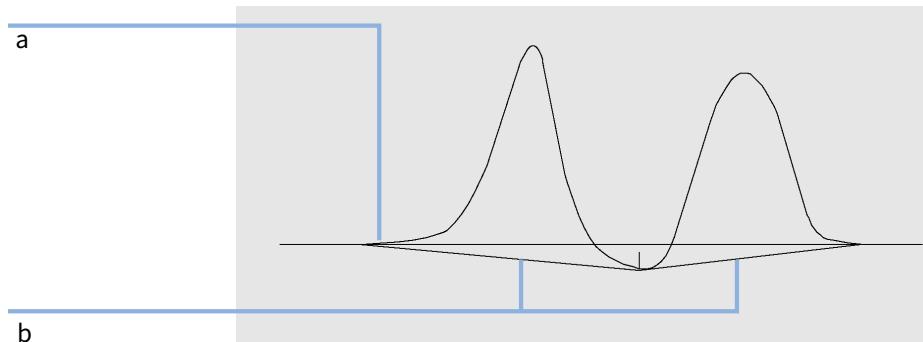


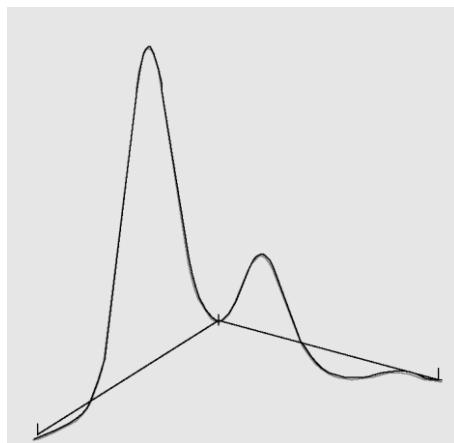
図 13 ベースラインの落ち込み

ベースライン落ち込みが生じると、その部分のベースラインは34ページ 図13のポイント b のように再構築されます。すべてのベースライン落ち込みを除去するために、次の補正モードを使用できます。

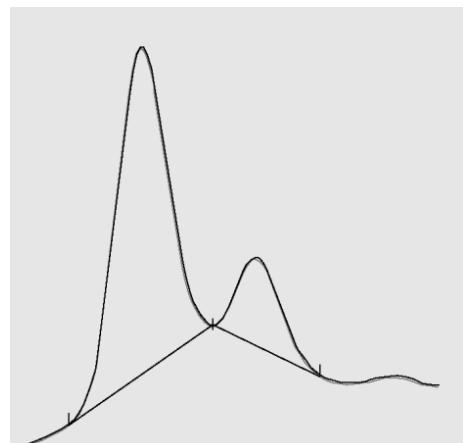
- ・ 負ピークなし
- ・ アドバンスド (最適化されたベースライン)
- ・ アドバンスド+ (最適化されたベースライン)

ベースライン補正モード：負ピークなし

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



ベースライン補正モードクラシカル



ベースライン補正モード負ピークなし

注記

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

ベースライン補正モード：アドバンスド

アドバンスドベースライン補正モードでは、インテグレータはピークの開始と終了場所を最適化し、ピークのクラスタ用ベースラインを再確立し、ベースライン落ち込みを除去します。（「ベースライン補正モード：負ピークなし」35ページ参照）クラシカル補正モードと比較して、アドバンスドベースライン補正によりスロープ感度への依存性の少ない安定性に優れたベースラインが得られます。

アドバンスド+

アドバンスド+ベースライン補正モードでは、インテグレータは、ショルダー検出を最適化します。これによりショルダーピーク処理が向上し、さらに重要なショルダーの同定が向上します。アドバンスド補正モードと比較して、アドバンスド+ベースライン補正ではより安定したショルダーの結果が得られます。

アドバンスド+ベースライン補正モードでは、内部で**ピーク高さの更新**イベントを使用します。したがって、ピーク高さは補間された高さではなく、常に絶対高さになります。

ピークバレー比

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

（「ベースライン補正モード：負ピークなし」35ページと36ページ図14を比較してください）。

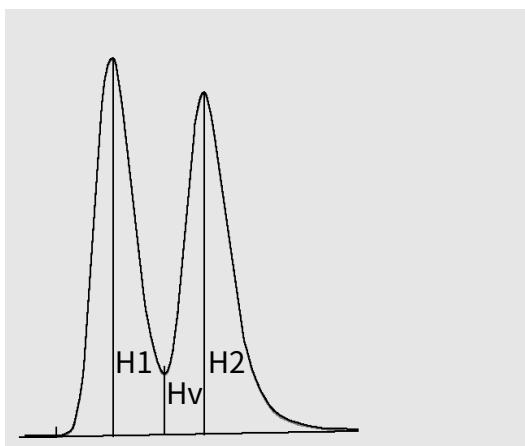


図 14 ピークバレー比

ピークバレー比は、次の式を使用して計算されます。

$$H1 \geq H2, \text{ ピークバレー比} = H2/Hv$$

および

$$H1 < H2, \text{ ピークバレー比} = H1/Hv$$

37ページ 図15は、ピークバレー比の設定がどのようにベースラインに影響を与えるかを示しています。

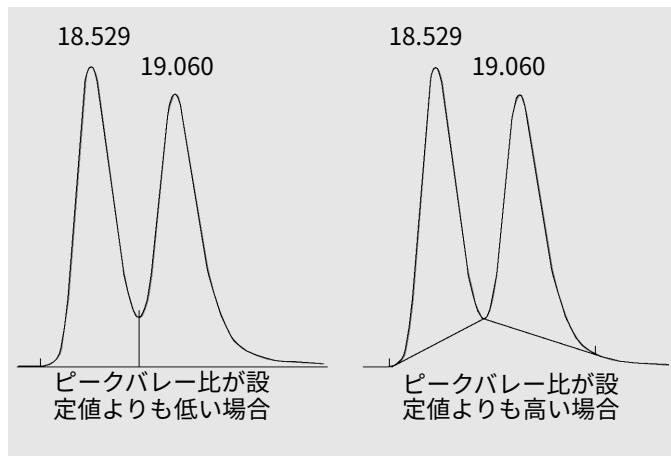


図 15 ピークバレー比のベースラインへの効果

タンジェントスキム

タンジェントスキムは、あるピークのアップスロープまたはダウンスロープで見つかったピークのためにベースラインを設定する方法の1つです。2つのピークがベースラインで分離されていないことと、ピーク間に谷があることが前提条件です。タンジェントスキムによって検出されるピークは**ライダーピーク**と呼ばれます。谷がない場合、ピークは**ショルダー**と呼ばれます。

次の図で、タンジェントスキムの原理を説明します。

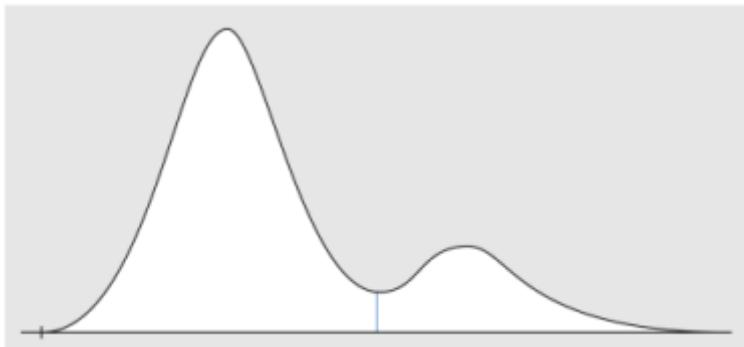


図 16 谷とドロップラインで区切られている、スキムのないピーク

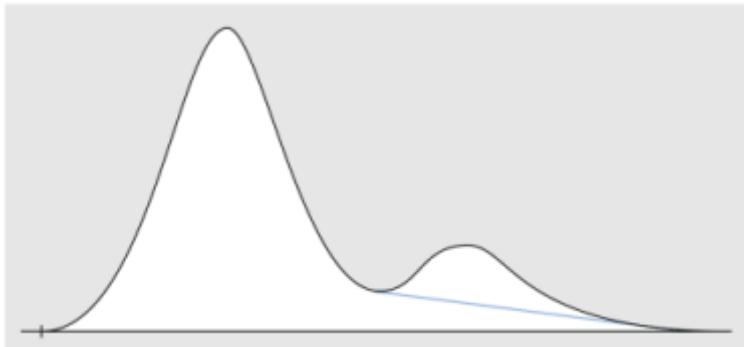


図 17 テールスキム

スキム基準

以下の基準により、親ピークのリーディングエッジとトレーリングエッジのどちらにスキムラインをひき、子ピークとするかが決まります。

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

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

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

注記

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

注記

これらの基準は、指數のタイムイベントが有効な場合、または親ピーク自身が子ピークの場合には使用されません。親ピークと子ピークの間のベースラインコードは、【谷】のタイプでなければなりません（「ベースラインコード」28ページを参照）。

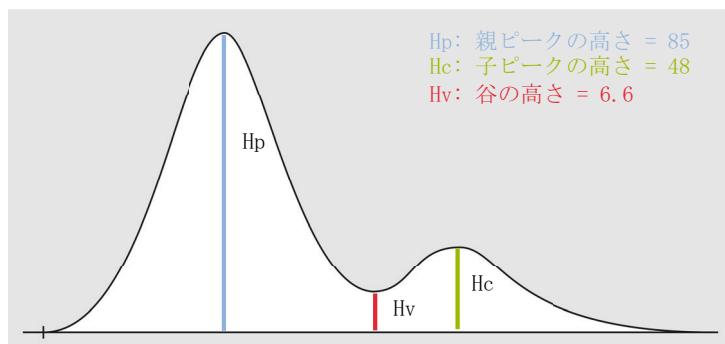


図 18 スキム基準値の計算例

$$\text{スキム高さ比} = H_p / H_c$$

$$\text{スキム谷比} = H_c / H_v$$

ここで、

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

テールスキム テールスキムを使用するには、次のようにパラメータを設定します。

- テールスキム高さ比 = $85 / 48 = 1.77$
積分イベントでは、1.77 未満の値を使用します。
- スキム谷比 = $48 / 6.6 = 7.3$
積分イベントでは、7.3 より大きい値を使用します。

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

- フロントスキム高さ比 = $48 / 85 = 0.56$
積分イベントでは、0.56 未満の値を使用します。
- スキム谷比 = $85 / 6.6 = 12.9$
積分イベントでは、12.9 より大きい値を使用します。

タンジェントスキムモード

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

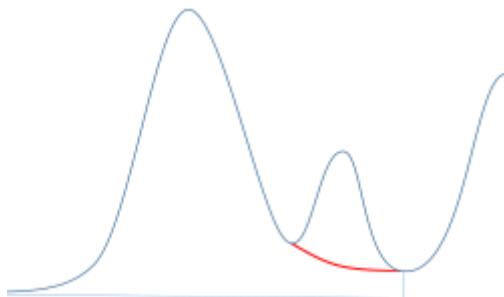
- 指数曲線
- 新しい指数曲線
- 標準（最適になるように指数または直線の計算が自動的に選択されます）
- 直線
- ガウス

注記

スキムピークまたはショルダーピークを含むシグナルを定量する必要がある場合、ピーク面積ではなくピーク高さを評価することを検討してください。

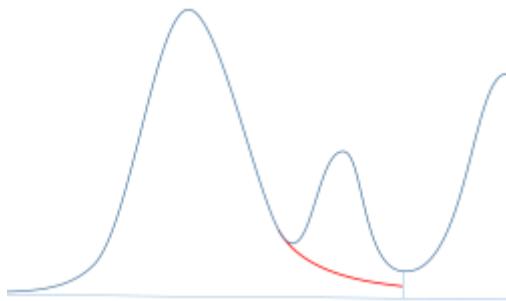
指数曲線スキム

このスキムモデルでは、子ピークの開始から終了まで指数関数を使って曲線が描かれます。曲線は、親ピークに続くそれぞれの子ピークの下を個別に通過します。



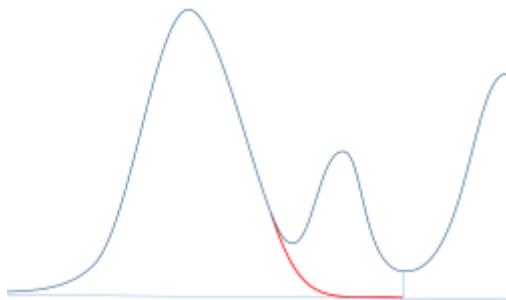
新しい指数曲線スキム

このスキムモデルでは、指数関数を使って曲線が描かれます。親ピークシグナルのリーディング/トレーリングエッジを近似します。曲線は1つ以上の子ピークの下を通過します。複数の子ピークを同じ指数モデルでスキムできます。最初の子ピーク後のすべてのピークは、最初の子ピークの終了から始まり、ドロップラインによって区切られ、スキム曲線までののみ降下します。



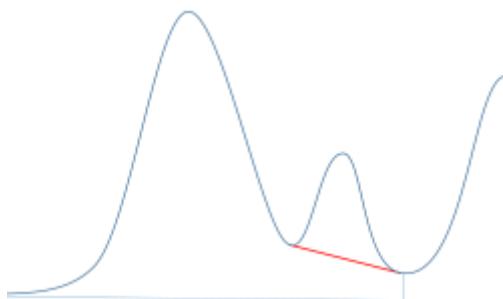
ガウススキム

このスキムモデルでは、新しい指数曲線スキムと同じ関数を使いますが、最適なフィットを見つけるために親ピークのより高いところで検索し、親ピークベースラインのリーディング/トレーリングエッジを近似します。このため、一般的にガウススキムでは、新しい指数曲線スキムよりも大きい面積を計算します。



直線スキム

このスキムモデルでは、子ピークの開始から終了まで直線を描きます。テールライダーピークの開始（またはフロントライダーピークの終了）の高さが、親ピーカスロープに対して補正される場合があります。



標準スキム

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

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

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

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

指数曲線スキムの計算

以下の式を使用して、指数曲線、新しい指数曲線、またはガウススキムを計算します。

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

ここで、

H_b	時間 t_R での指数曲線スキムの高さ
H_0	スキム開始の高さ（ベースライン上）（指数曲線とガウススキムでは推定が異なります）
B	減衰率（指数曲線とガウススキムでは推定が異なります）
t_0	スキム開始の時間（指数曲線とガウススキムでは推定が異なります）
t_R	リテンションタイム
A	親ピークのベースラインのスロープ
C	親ピークのベースラインのオフセット（指数曲線とガウススキムでは推定が異なります）

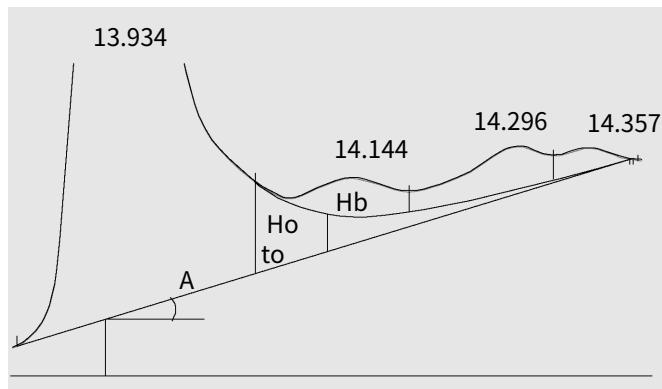


図 19 指数曲線スキムの計算に使用される値

ショルダーモード

ショルダー検出を有効にすると、適切なピーク面積を計算するために、次のモデルが利用できます。

- ドロップベースライン
- タンジェントベースライン
- 新しい指数曲線
- ガウス

ドロップベースライン

変曲点からのドロップラインによって、メインピークからショルダーピークが分離されます。

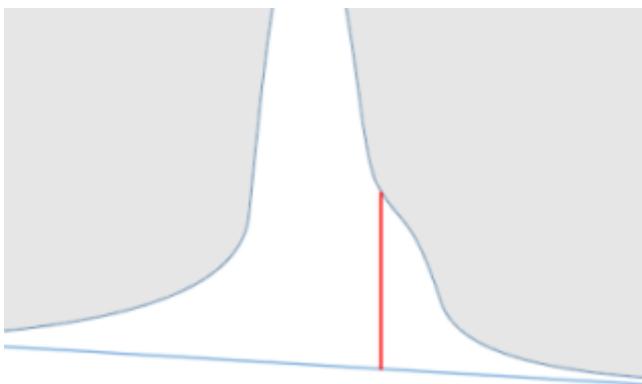


図 20 ドロップラインのあるショルダー

タンジェントベースライン

変曲点を通る直線によって、ショルダーピークが定義されます。

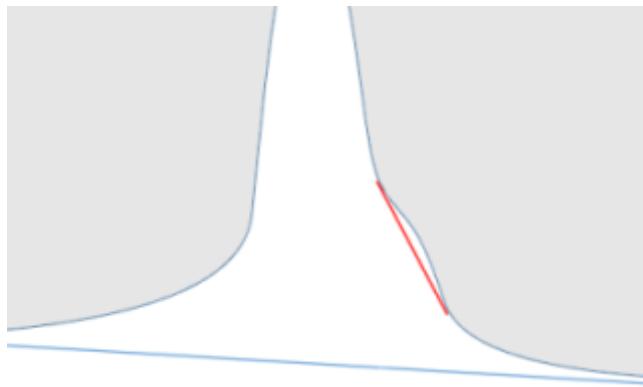


図 21 タンジェントベースラインのあるショルダー

新しい指数曲線

このショルダーモードでは、指数関数を使って曲線が描かれます。ショルダーピークのリーディング/トレーリングエッジを近似します。

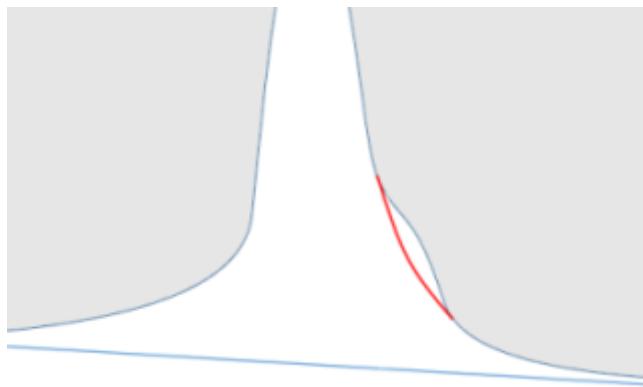


図 22 新しい指数曲線ベースラインのあるショルダー

ガウス

このショルダーモードモデルでは、新しい指数曲線モードと同じ関数を使いますが、最適なフィットを見つけるために親ピークのより高いところで検索します。一般的にガウススキムでは、新しい指数曲線スキムよりも大きい面積を計算します。

副生物がないことを保証する必要がある場合などは、ガウスマードを使用します。

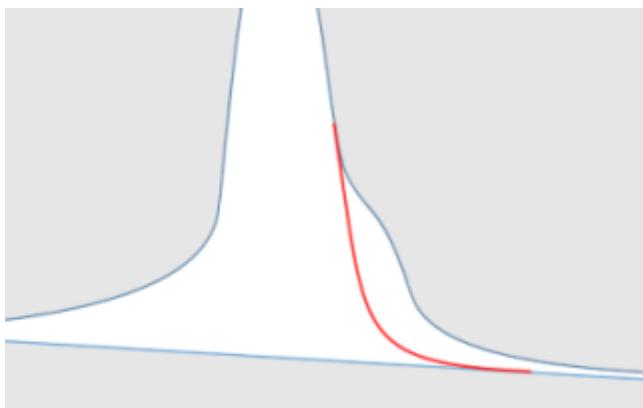


図 23 ガウスベースラインのあるショルダー

タンジェントスキムモードとショルダーモードの組み合わせ

OpenLab CDS では、タンジェントスキムモードとショルダーモードを個々に設定できます。ただし、すべての組み合わせで有益な結果が得られるとは限りません。

表5 ショルダーモードとタンジェントスキムモードの推奨される組み合わせ

ショルダーモード	タンジェントスキムモード
ドロップ ¹	スキム高さ比を 0.0 に設定してドロップラインで区切れます。
ガウス	ガウス
新しい指数曲線	新しい指数曲線
タンジェント	直線

¹ または任意のショルダーモード

積分イベント

使用可能な積分イベントは次のグループに分けられます。

- 初期積分イベントは、積分の開始から適用されるイベントです。解析メソッドの [積分イベント] セクションの [標準] ノードで初期値を確認できます。これらのイベントは削除できませんが、値を変更することはできます。
- タイムイベントは積分の開始後に起こります。タイムイベントは、初期イベントの値を変更する、または追加積分パラメータのオン/オフを切り替える場合があります。解析メソッドの [積分イベント] セクションの [標準] ノードで追加できます。
- すべてのシグナルに常に適用される積分イベントは、 [積分イベント] セクションの [詳細] ノードで設定できます。

標準積分イベント: 初期イベント

スロープ感度

積分でピークの開始ポイントと終了ポイントの識別に使用されるシグナルスロープの値を設定します。

特定のシグナルに指定値を設定することも、すべてのシグナルに一般値を設定することもできます。

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

ピーク幅

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

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

選択した初期ピーク幅が狭すぎる場合には、ノイズがピークとして解釈されることがあります。広いピークと狭いピークが混ざっている場合には、ランタイムプログラムイベントを使用して、特定のピークに合わせてピーク幅を調整することができます。時には、たとえば GC 等温分析や LC アイソクラティック分析では、ピークは分析が進むにつれて顕著に広くなります。これを補正するため、インテグレータは分析中にピークが広くなると、ピーク幅を自動的に更新します。これは、タイムイベントで無効になっていない限り行われます。

ピーク幅の更新は、次の方法で重み付けされます。

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

面積リジェクト

関連する最小のピーク面積を設定します。

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

ショルダーが検出された場合：ショルダーのリジェクトについては、事前の概算に基づきます。この概算では、ショルダーの開始からショルダーの終了まで、タンジェントを対角線として使用して、ショルダーの面積が四角形として計算されます。

注記

マニュアル積分の間、面積リジェクトは無視されます。

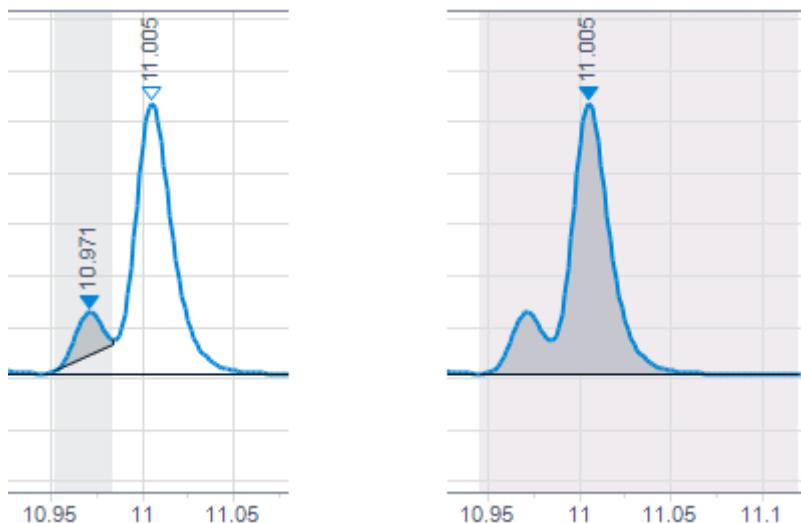
面積% リジェクト

関連する最小のピーク面積%を設定します。

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

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

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



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

高さリジェクト

関連する最小のピーク高さを設定します。

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

ショルダーが検出された場合：ショルダーのリジェクトについては、事前の概算に基づきます。この概算では、ショルダーの開始からショルダーの終了まで、タンジェントを対角線として使用して、ショルダーの高さが四角形の高さとして計算されます。

注記

マニュアル積分の間、高さリジェクトは無視されます。

ショルダー モード

ピークでショルダを検出する初期のメソッドを設定します。

この設定では、ベースラインで分離されていないピークをアプリケーションがどのようにして取り扱うのかを定義します。次から選択できます。

オフ	ショルダーは積分されません。
ドロップ	ショルダーはドロップラインで積分されます。
タンジェント	ショルダーはタンジェントベースラインで積分されます。
新しい指数曲線	ショルダーは指数曲線ベースラインで積分されます。
ガウス	ショルダーはガウスベースラインで積分されます。

タンジェントスキムの詳細については、「タンジェントスキム」38ページおよび「タンジェントスキムモード」40ページを参照してください。

ピーク幅の選択

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

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

高さリジェクトとピーク幅

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

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

積分のチューニング

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

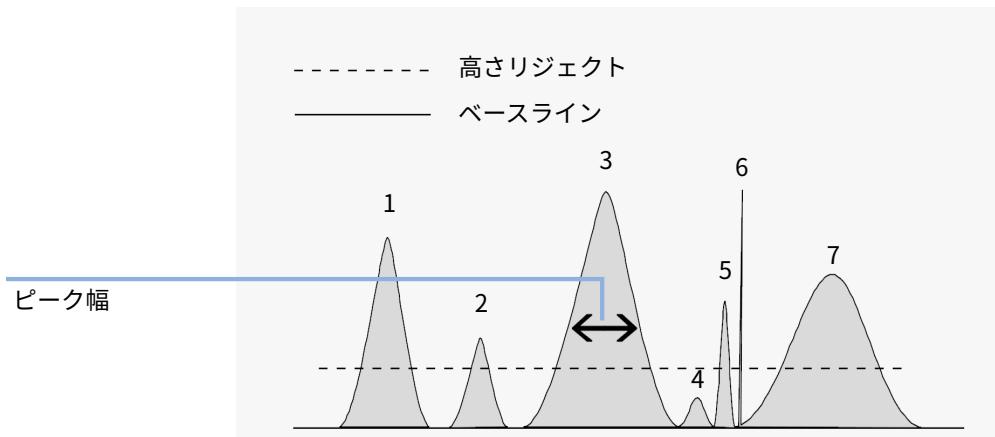


図 24 初期イベントの使用

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

- ピーク 1 は、4 つの積分パラメータすべてが満たされているので積分されます。
- ピーク 2 は、面積が設定された面積リジェクト値より小さいのでリジェクトされます。
- ピーク 3 は、4 つの積分パラメータすべてが満たされているので積分されます。
- ピーク 4 は、ピーク高さが高さリジェクトの値より小さいので積分されません。
- ピーク 5 は、面積が設定された面積リジェクト値より小さいのでリジェクトされます。
- ピーク 6 は積分されません。フィルタリングとバンチ化により、ピークは見えなくなっています。
- ピーク 7 は積分されます。

表6 高さおよび面積リジェクト値

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

標準積分イベント: タイムイベント

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

特定のシグナルに指定値を設定することも、すべてのシグナルに一般値を設定することもできます。

面積リジェクト 初期イベントを参照してください。（「標準積分イベント: 初期イベント」 48 ページ）

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

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

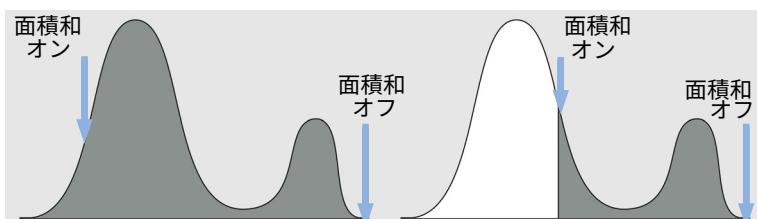


図 25 ピーク頂点後でピーク終了前の【面積和オン】イベント

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

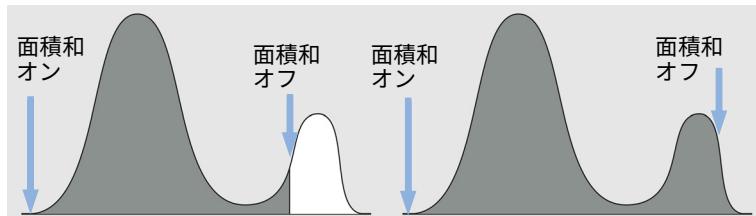


図 26 ピーク開始後でピーク頂点前の【面積和オフ】イベント

面積和スライス

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

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

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

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

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

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

【開始】 イベントから次の**【終了】** イベントまでの間では、ベースラインが常に一直線に引かれ、その範囲内では方向が変更されません。終了点の後（少なくとも 0.001 min 後）でなければ、**【範囲からベースラインを設定】**、**【範囲**

から下のベースラインを設定]、または [範囲からベースラインを使用] のイベントを使用することによって長期間のベースラインの変更を再度適用するこ
とはできません。

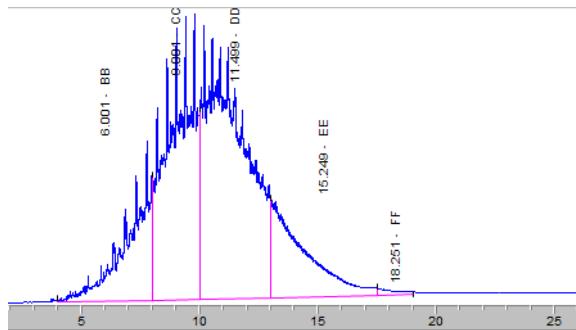


図 27 例：面積和スライス

上の図に、以下のタイムイベントの例を示します。

表 7 ベースラインの設定

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

表 8 面積和スライス

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

自動ピーク幅

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

**ベースライン
(谷から谷)**

ピーク間のすべての谷でベースラインをリセットするポイント（オン/オフ）を設定します。

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

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

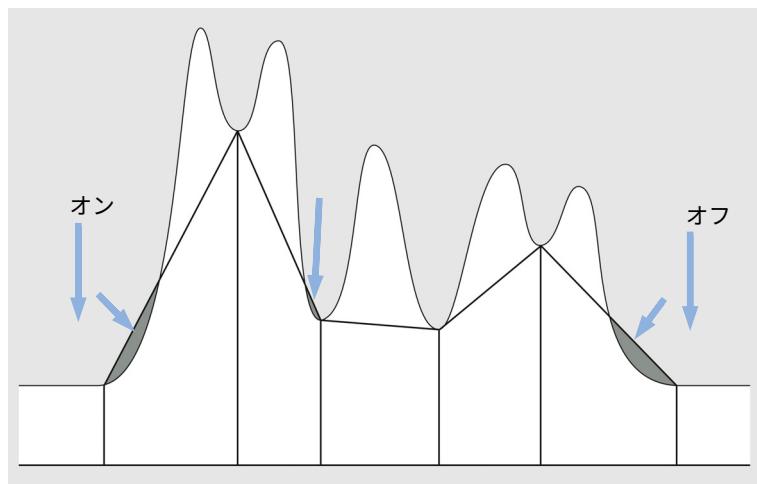


図 28 [ベースライン（谷から谷）] イベント

ベースライン
(後方へ)

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

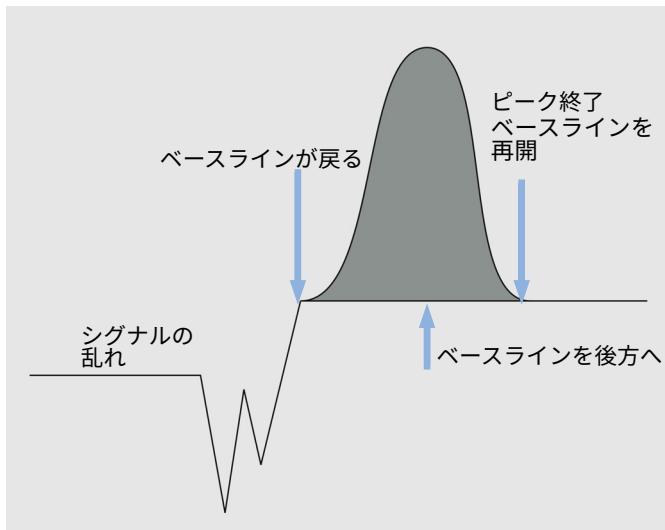


図 29 [ベースライン (後方へ)] イベント

ベースライン
ホールド

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

ベースライン
(次の谷へ)

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

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

ベースライン
(今すぐ)

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

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

ショルダー検
出

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

ショルダーは、指定されている [ショルダーモード] に従って検出されます。
「標準積分イベント: 初期イベント」 48 ページを参照してください。

- 固定ピーク幅** ピーク幅を設定して、次のピークのピーク幅の自動更新を無効にします。良いパフォーマンスを得るには、ピーク幅を実際のピークの半値幅に近い値に設定してください。
- 高さリジェクト** 初期イベントを参照してください。（「標準積分イベント: 初期イベント」 48 ページ）
- 積分** 積分の停止と開始を行う間のポイント（**オン/オフ**）を設定します。積分のオンとオフの間のピークは無視されます。

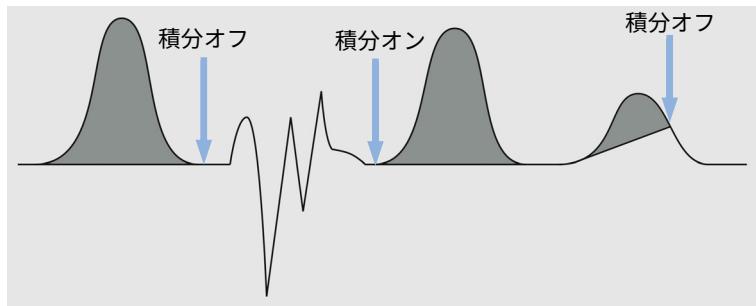


図 30 [インテグレーション] イベント

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

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

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

- 最大面積** 目的ピークの最大の面積を設定します。

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

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

最大高さ 目的ピークの最大の高さを設定します。

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

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

**ネガティブ
ピーク**

ネガティブピークを認識する間のポイント（**オン/オフ**）を設定します。

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

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

注記

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

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

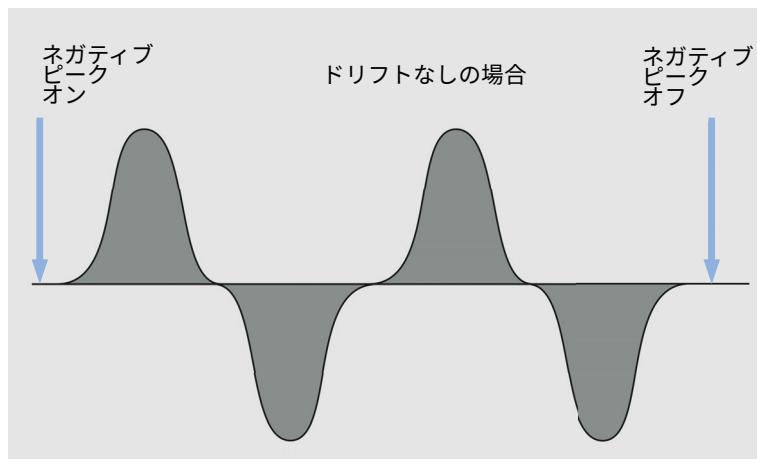


図 31 [ネガティブピーク] イベント

ピーククラスター

ピーククラスターの開始イベントと終了イベント内ですべてのピークに共通のベースラインを作成します。

開始時間や終了時間がネストピーク（ショルダーまたはライダー）と交差する場合、親ピークがピーククラスターの開始時間と終了時間を定義します。2つのピーククラスターの範囲が互いに交差する場合、2つ目のピーククラスター範囲を定義するイベントが無視されます。

ベースラインは、最初のピーク開始時間で開始され、最後のピーク終了時間で終了します。ピーククラスターの領域全体が考慮されます。ピークとして検出されていないピーククラスター内の領域は、割り当てられないピークとしてレポートされます（ベースラインコード U）。ピーククラスター内にはネガティブピークはありません。したがって、面積リジェクトまたは高さリジェクトによって、あるいはピーククラスターベースラインの落ち込みがあるシグナルによってのみギャップは発生します。

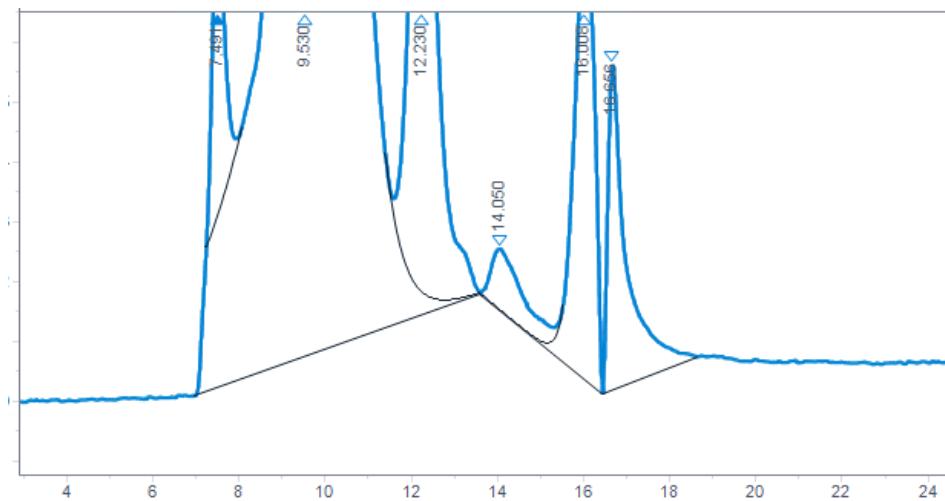


図 32 ピーククラスターイベントがない積分

ChemStation インテグレータを使用した積分 積分イベント

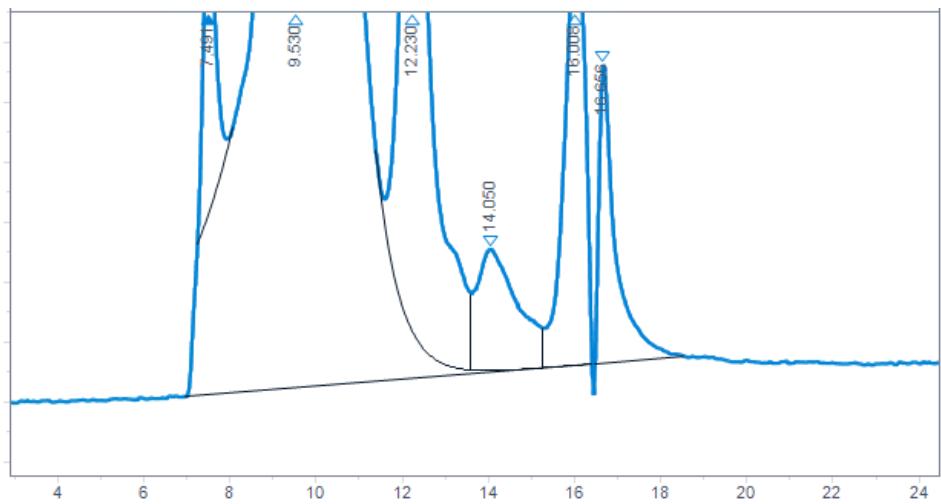


図 33 ピーククラスターの [開始] イベントが 6 min で [終了] イベントが 20 min の積分

ピーククラスター オプション [負ピークなし開始] を使用すると、シグナルの落ち込みがないベースラインが作成されます。

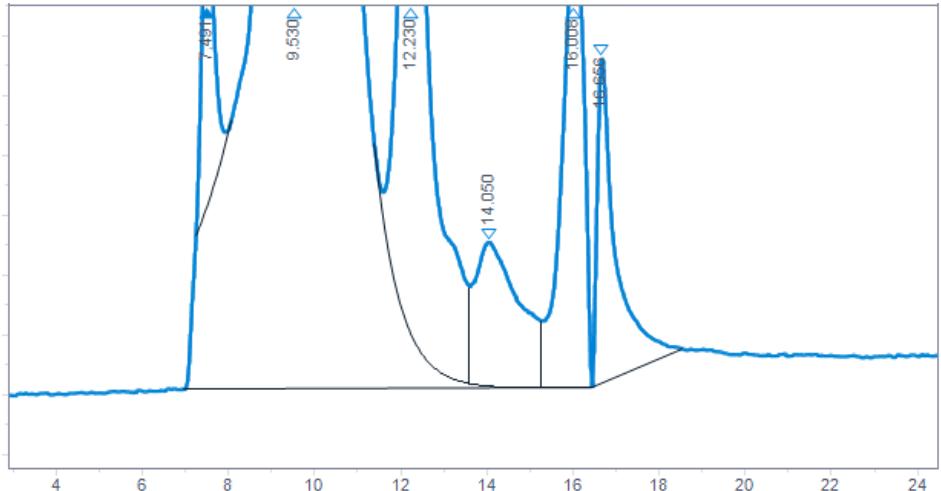


図 34 ピーククラスターの [負ピークなし開始] イベントが 6 min で [終了] イベントが 20 min の積分

範囲からベー
スラインを設
定

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

値は、指定されたイベント時間の前後の時間間隔です。これにより、ベースラインポイントを決定するために使用される範囲が定義されます。ベースラインの統計的計算について詳しくは、「ベースライン補正モード」34ページを参照してください。

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

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

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

範囲から下の
ベースライン
を設定

データポイントの範囲を使用して、時間範囲の中間で統計的に有効なベースラインポイントを計算します。範囲からベースラインを設定以外に、このイベントではノイズデータポイントを30%多く上乗せできる、最も低いと考えられるベースラインポイントを使用します。そのため、ベースラインの落ち込みが最小化されます。範囲から最も低いベースラインを設定は、範囲からベースラインを設定のY-値から1シグマ（ノイズ標準偏差）を減算することにより計算されます。

値は、指定されたイベント時間の前後の時間間隔です。これにより、ベースラインポイントを決定するために使用される範囲が定義されます。ベースラインの統計的計算について詳しくは、「ベースライン補正モード」34ページを参照してください。

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

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

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

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

**ショルダー
モード** 初期イベントを参照してください。（「標準積分イベント: 初期イベント」48ページ）

スロープ感度 初期イベントを参照してください。（「標準積分イベント: 初期イベント」48ページ）

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

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

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

ピークの分割 ピークをドロップラインで分割するポイントを指定します。

注記

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

スキムしたピークは **【ピーク分割】** イベントを使用して分割できません。

**タンジェント
スキム
(テール)** タンジェントスキムを開始または終了する位置を指定します。

[オン]

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

[オフ]

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

タンジェントスキムモード

適切なピーク面積を計算するために、以下のタンジェントスキムモードが利用できます。

- ・ 指数曲線
- ・ 新しい指数曲線
- ・ 標準
- ・ 直線
- ・ ガウス

詳細については、「タンジェントスキムモード」40ページを参照してください。

割り当てられないピーク

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

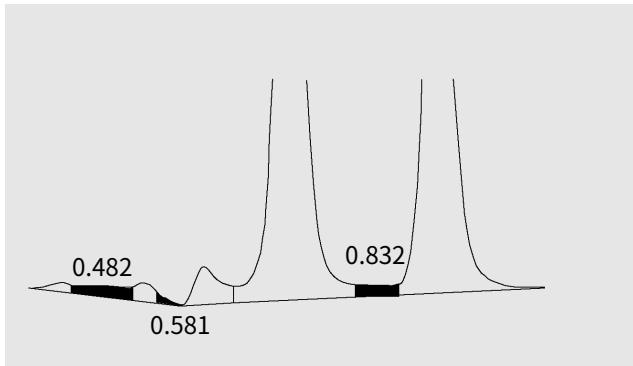


図 35 割り当てられないピーク

ピーク高さの 更新

このイベントは、インテグレータが最も高いデータポイントをピーク頂点として使用し、これによりピーク高さとピークリテンションタイムの両方が定義されます。このイベントを使用しないと、補間された検量線の最大が使用されます。ピーク高さの更新イベントは、急勾配のあるピークや、ピークの前に急な落ち込みのあるシグナルで特に役立ちます。このようなピークは MSD シグナルでは一般的です。

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

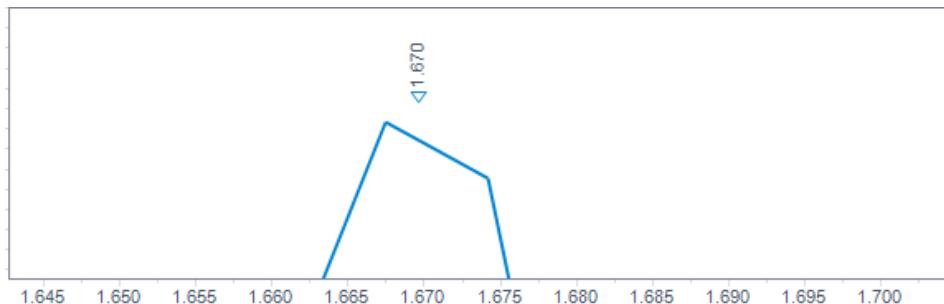


図 36 デフォルトの積分

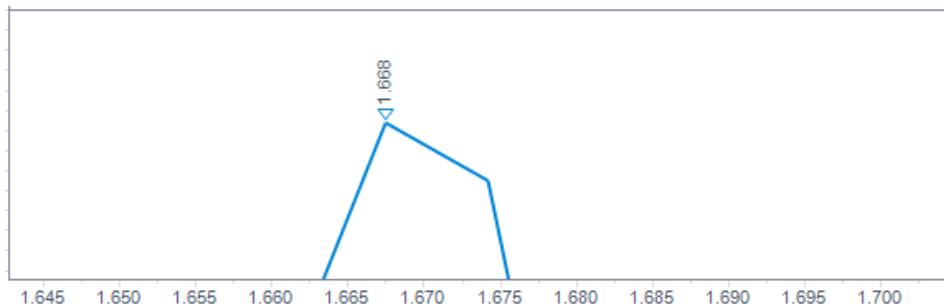


図 37 ピーク高さを更新イベントの積分

範囲からベ ースラインを使 用

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

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

このイベントは、直線のベースラインが意図せずにクロマトグラム曲線を通過する可能性があり、これを避けるためにアップスロープまたはダウンスロープのベースラインを作成した場合に使用すると有意な場合があります。パラメータはインテグレータに対して、どのベースライン範囲からベースラインポイントを取得して、ベースラインを指定の時間間隔のベースラインポイントまで引くかを指定します。

以下のパラメータを使用できます。

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

[面積和スライス] (55ページ 図27) に基づく例も参照してください。

詳細積分イベント

詳細積分イベントは、すべてのシグナルに備わっています。

タンジェントスキムモード あるピークのアップスロープまたはダウンスロープで見つかったピークのベースライン設定のタイプを定義します。「**タンジェントスキムモード**」40ページを参照してください。

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

テールスキム
高さ比

【スキム谷比】と併せて、溶媒またはその他の大きなピークのテールで小さいピークをスキムするタンジェントの条件を設定します。「スキム基準」39ページを参照してください。

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

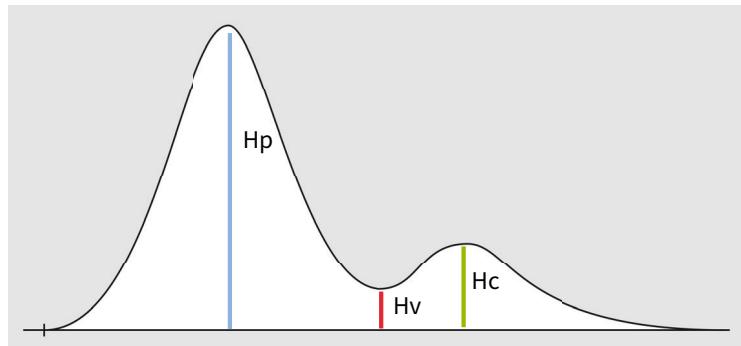


図 38 例：テールスキムを使用したピーク

フロントスキム高さ比

【スキム谷比】と併せて、溶媒またはその他の大きなピークの前面の小さいピークをスキムするタンジェントの条件を設定します。「スキム基準」39ページを参照してください。

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

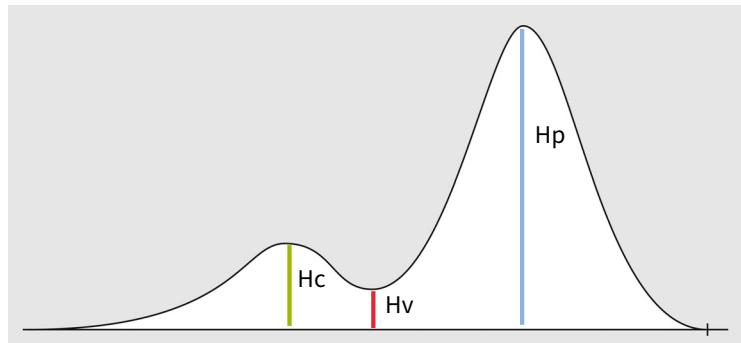


図 39 例：フロントスキムを使用したピーク

スキム谷比 [テールスキム高さ比] または [フロントスキム高さ比] と併せて、溶媒またはその他の大きなピークのテールまたは前面の小さいピークをスキムするタンジェントの条件を設定します。「スキム基準」39ページを参照してください。

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

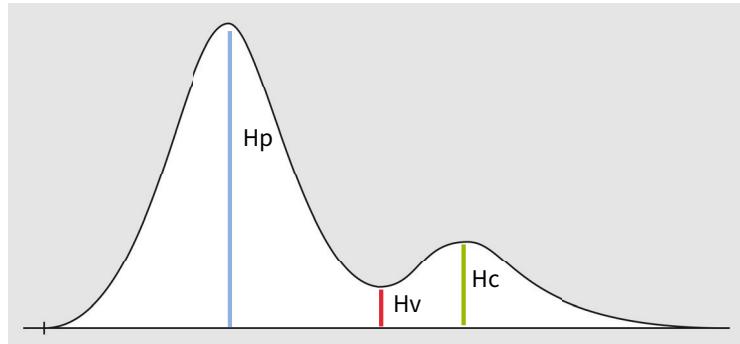


図 40 例：テールスキムを使用したピーク

ベースライン補正モード ベースライン補正のタイプを設定します。「ベースライン補正モード」34ページを参照してください。

以下のパラメータの中から選択できます。

クラシカル

ベースライン落ち込みを受け入れます。

負ピークなし

ベースラインを再構築して、ベースライン落ち込みを削除します。

アドバンスド

インテグレータは、ピークの開始と終了場所を最適化し、ピークのクラスタ用ベースラインを再確立し、ベースライン落ち込みを除去しようとします。

アドバンスド+

インテグレータは、ショルダー検出を最適化しようとします。これによりショルダーピーク処理が向上し、同時にショルダーコンポーネント数が減少します。

ピークバレー
比

ドロップラインまたは谷ベースラインを使用して、ベースライン分離を示さない2つのピークを分離するかどうかを決定するために使用します。これは、ベースライン補正されたより小さなピークの高さと、ベースライン補正された谷の高さの比率です。「ピークバレー比」36ページを参照してください。

ピークバレー比が指定値より低い場合は、ドロップラインが使用されます

(A)。それ以外の場合は、最初のピークの開始点から谷へ、および谷から2番目のピークの終了点にベースラインが引かれます (B)。

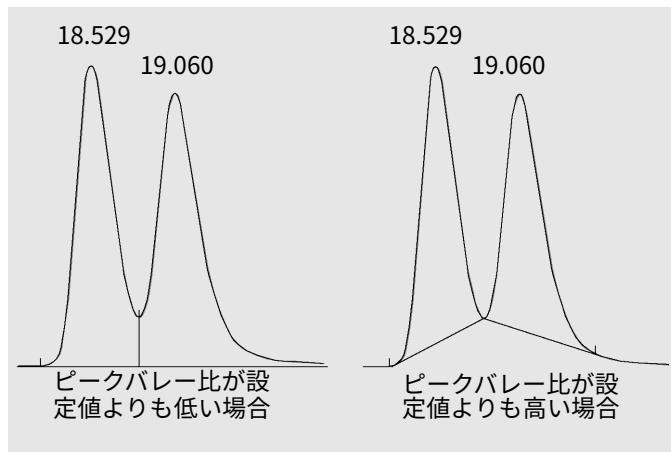


図 41 ピークバレー比のベースラインへの効果

積分イベント 71

ベースラインコードの説明 87

本章では、EZChrom 積分イベントについて説明します。

積分イベント

特定のシグナルに指定値を設定することも、すべてのシグナルに一般値を設定することもできます。タイムイベントを追加する場合は、テーブル内を右クリックします。

積分イベントには次のような異なるタイプがあります。一部のタイプでは、パラメータを有効にする開始時間と終了時間で時間範囲を定義することができます。その他のタイプでは、開始時間から、または時間範囲内に使用される特定の値を定義できます。 [終了時間 [min]] および [値] 列は、イベントのタイプに応じて有効 / 無効に切り替わります。

注記

OpenLab CDS では以下の積分イベントの終了時間は無効になっています (OpenLab EZChrom を除く)。

- ・ 幅
- ・ スレッショルド
- ・ 肩ピーク処理
- ・ 最小面積
- ・ リセットベースライン
- ・ 谷渡り処理ベースラインリセット

幅

ノイズと真のピークを区別するために使用されます。システムのデフォルト値は、ピーク幅 = 0.2 min です。

[幅] イベントは、積分アルゴリズムが適用される前のデータポイントのバンチングやスムージングの値を計算するために使用されます。ピーク全域のポイント数が 20 ポイントの場合に、積分は最適に機能します。ピークがオーバーサンプルされた場合 (つまり、サンプリング周波数が高過ぎた場合) は、積分アルゴリズムがピーク全域で 20 ポイントのみを処理するようにデータを平均化するために、**[幅]** パラメータが使用されます。

[幅] イベントは、ピークの頂点の前または頂点の上で生じた場合に限り、指定されたピークに適用されます。

[幅] パラメータは、オーバーサンプリングを補正するためだけに使用されます。アンダーサンプルのデータ (つまり、サンプリング周波数が低すぎて、最も狭いピークの全域のポイント数が 20 ポイントに満たない場合) は補正できません。

下図に、誤った値がピークベースラインに与える可能性のある影響の例を示します。

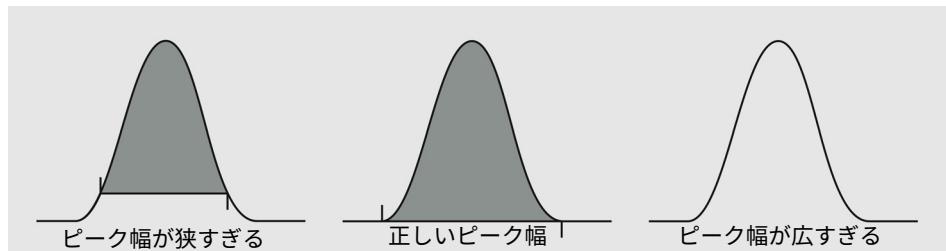


図 42 ピーク幅

注記

ほとんどの場合、クロマトグラム内の最も狭いピークに基づく初期の幅の値は、すべてのピークを正しく積分するために適切です。しかし、ピーク幅が2倍になった場合には、その都度新しい幅タイムイベントに入る必要があります。

注記

幅とスレッショルドの両方の値が極端な（大きすぎるまたは小さすぎる）場合は、ピークが検出されなくなる場合があります。

スレッショルド

このパラメータは一次微分値であり、積分アルゴリズムがベースラインノイズとドリフトからピークの開始点と終了点を識別できるようにするために使用されます。【スレッショルド】値は、クロマトグラムのセクションで決定される最も高い一次微分値に基づいています。

下図に、誤った値がピークベースラインに与える可能性のある影響の例を示します。

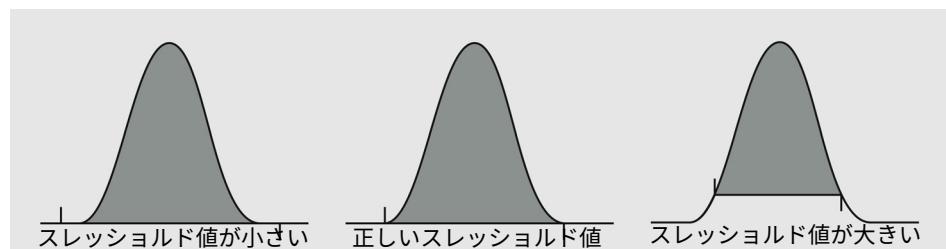


図 43 スレッショルド

注記

幅とスレッショルドの両方の値が極端な（大きすぎるまたは小さすぎる）場合は、ピークが検出されなくなる場合があります。

肩ピーク処理

このパラメータは、大きいピーク上でショルダーを検出できるようにするために使用されます。値を大きくするとショルダーピークに対する感度が下がり、小さくすると上がります。【肩ピーク処理】値は、クロマトグラムのセクションで決定される最も高い二次微分値に基づいています。

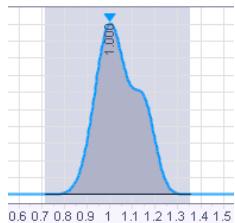


図 44 肩ピーク処理値の設定が高すぎる

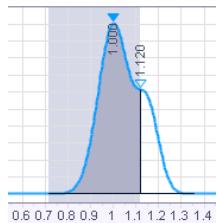


図 45 肩ピーク処理値が正しく設定されている

積分オフ このイベントは、指定した範囲のクロマトグラムの積分をオフにします。このイベントは、不要なクロマトグラム領域を指定し、そのセクションのピークをレポートしたくない場合に役立ちます。

【積分オフ】を使用してピークを無効にすると、これらの領域はノイズ計算に含まれるようになります。すべてのピークを積分させて、正しいノイズ値が得られるようにしてください。

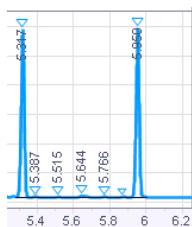


図 46 デフォルトの積分

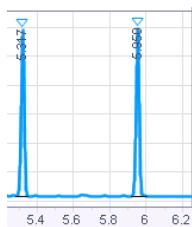


図 47 5.35 から 5.85 min まで積分オフ

谷渡り処理

このイベントを使用すると、完全に解決されていない（つまり、ベースラインまで戻らない）ピークのベースラインが、ピーク間の最小ポイントに引かれます。

このイベントを使用しないと、ベースラインはクロマトグラムがベースラインに戻る次のポイントまで引かれ、ベースラインに達しないピークについては垂線が引かれます。

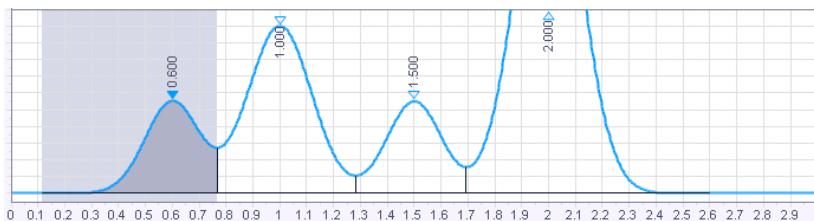


図 48 デフォルトの積分

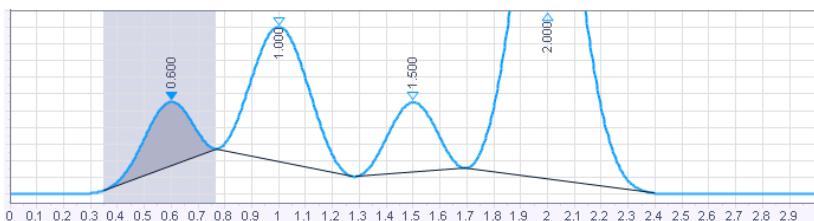


図 49 谷から谷イベントによる積分

水平ベースラ
イン

このイベントは、指定された時間範囲内にあるピークのベースラインを水平に引くことができます。ベースラインは、定義された時間範囲内の最初のピークが始まる位置から開始されます。ベースラインの終点は、シグナルと交差する位置か、最後のピークが終了する位置です。

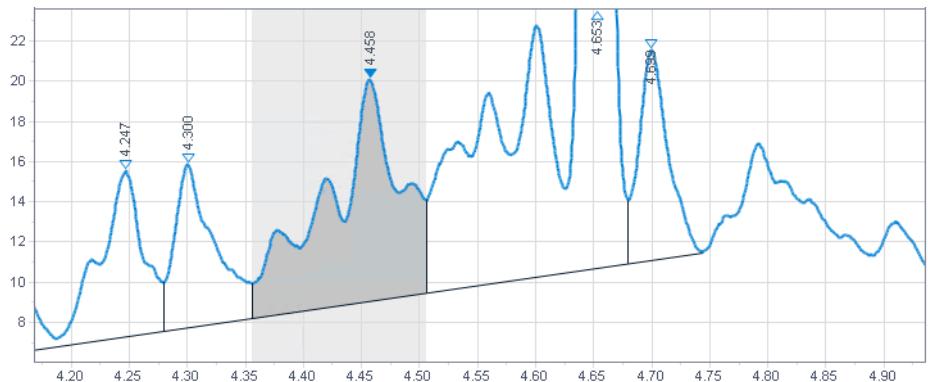
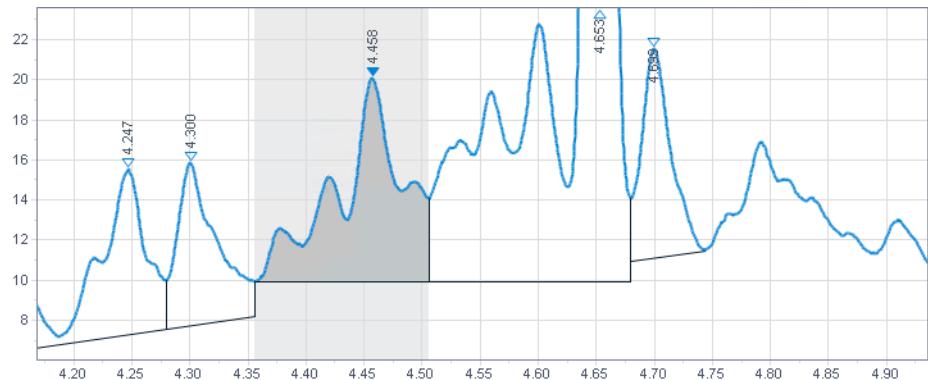


図 50 デフォルトの積分

図 51 4.4 から 4.69 min までの間のベースライン水平処理イベントによる
積分

後方水平ベー
スライン

このイベントを使用すると、クロマトグラムの開始点に向けて水平なベースラインが強制的に引かれます。指定された時間範囲内にあるピークに対して後方水平ベースラインが作成されます。ベースラインは、定義された時間範囲内の最後のピークの終点によって定義されます。シグナルと交差する位置か、最初のピークが始まる位置まで引かれます。

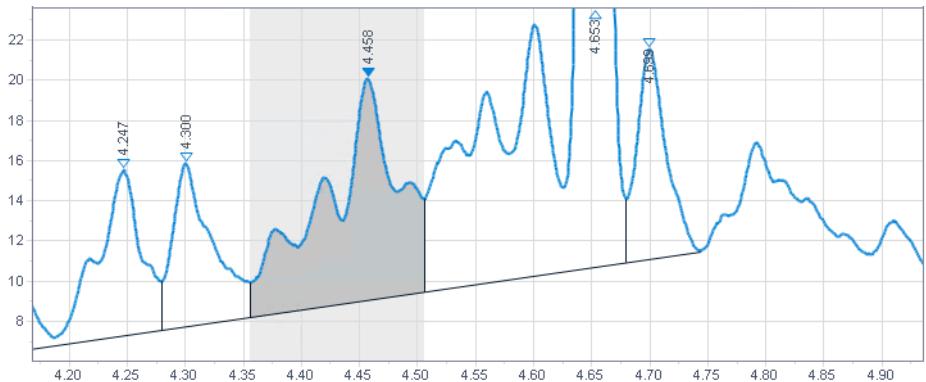
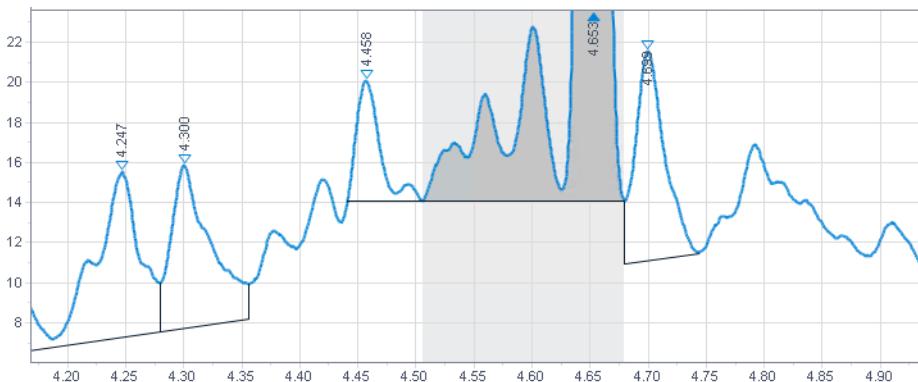


図 52 デフォルトの積分

図 53 4.4 から 4.69 min までの間の後方ベースライン水平処理イベントに
よる積分

最下点水平
ベースライン

このイベントは、リテンションタイムが [時間 (min)] および [終了時間 (min)] によって定義される時間範囲内にあるすべてのピークに適用されます。

[値] は、インテグレータが最も低いベースラインポイントの検索を開始する時間を定義します。

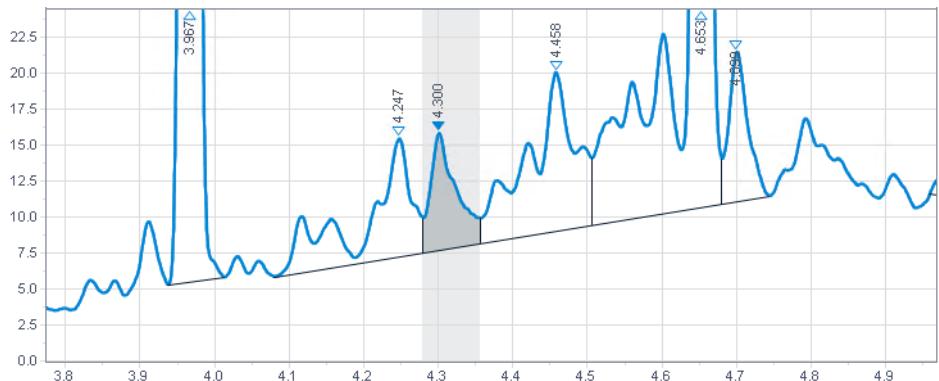


図 54 デフォルトの積分

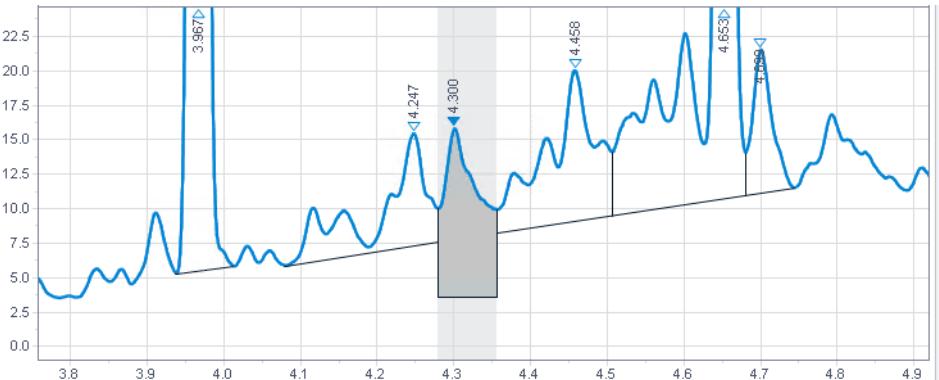


図 55 [値] が 3.8 min に設定され、4.25 から 4.35 min までの間の最下点水平ベースラインイベントによる積分

タンジェント
スキム

このイベントを使用すると、大きいピークのテーリングエッジに位置する小さいピークが積分されます。小さいピークのベースラインは、大きいピークの谷からクロマトグラム上の接点まで引かれる接線になります。

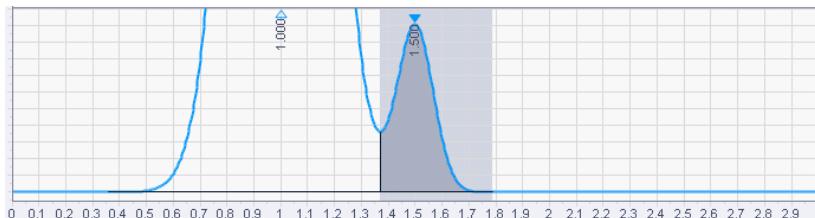


図 56 デフォルトの積分

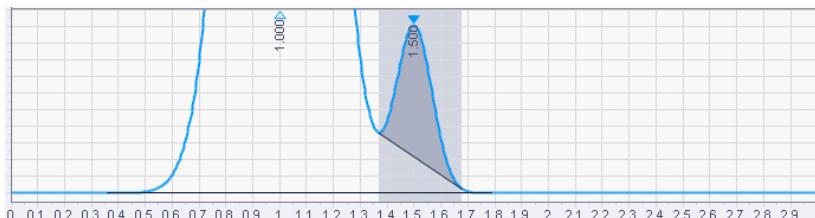


図 57 [タンジェントスキム] イベントによる積分

フロントタン
ジェントスキ
ム

このイベントを使用すると、親ピークのリーディングエッジにある子ピークに、タンジェントベースラインが強制的に使用されます。

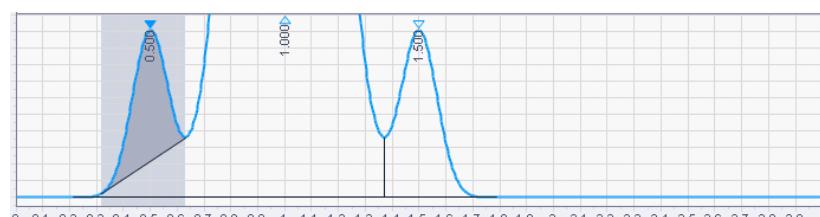
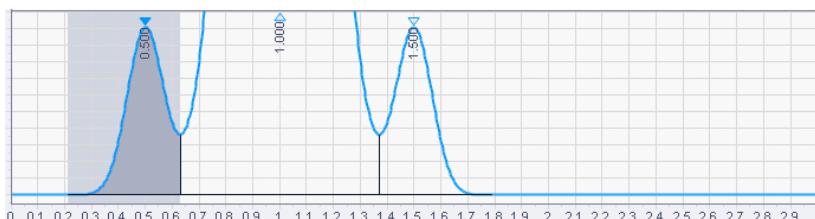


図 58 [フロントタンジェントスキム] イベントによる積分

指数曲線スキム

このイベントを使用すると、大きいピークのテーリングエッジに位置する小さいピークが積分されます。小さいピークのベースラインは、大きいピークの谷からクロマトグラム上の接点まで引かれる指数曲線になります。

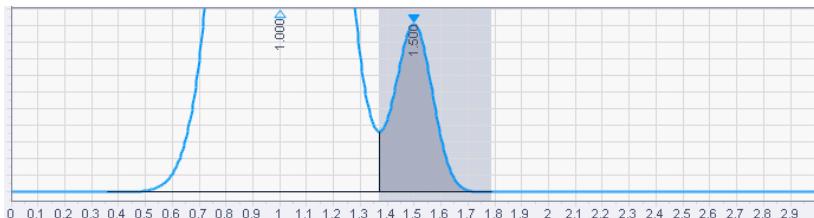


図 59 デフォルトの積分

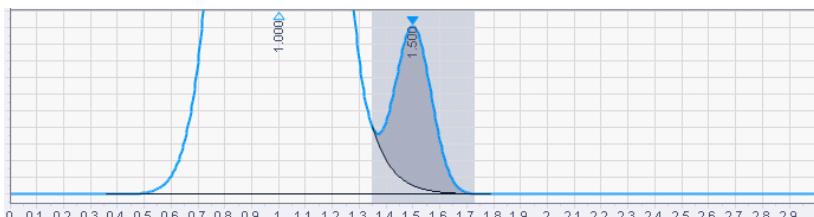


図 60 [指数曲線スキム] イベントによる積分

フロント指数曲線スキム

このイベントを使用すると、親ピークのリーディングエッジにある子ピークのために、指数曲線ベースラインが強制的に使用されます。

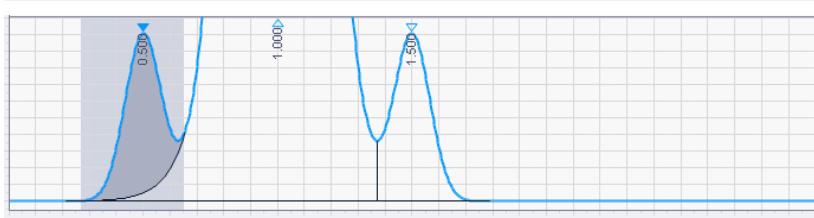
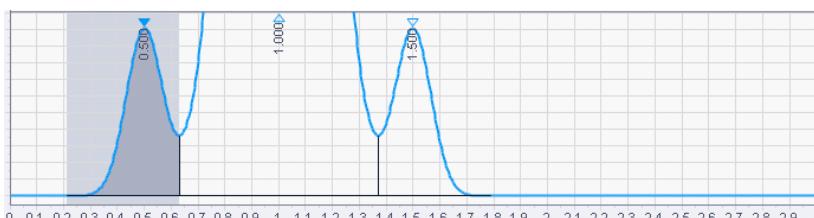


図 61 [フロント指数曲線スキム] イベントによる積分

最小面積

このイベントを使用すると、ピーク検出の面積制限を入力できます。この最小ピーク面積に満たない面積のピークは積分されず、ピークとしてレポートされません。このイベントは、ノイズや汚染物質のピークをレポートから除去するために役立ちます。

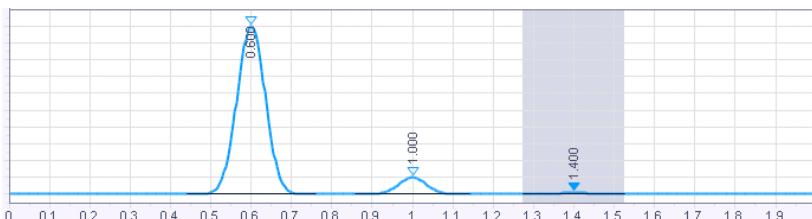


図 62 デフォルトの積分

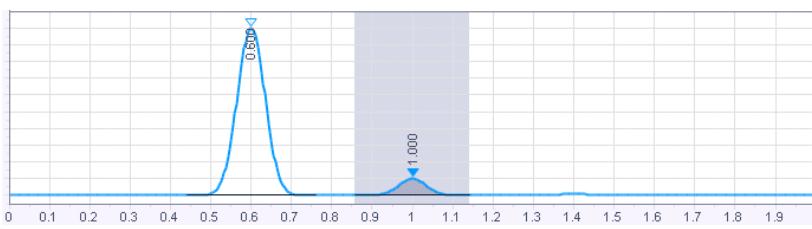


図 63 [最小ピーク面積] イベントによる積分

**ネガティブ
ピーク**

このイベントを使用すると、ベースラインより下に下降するクロマトグラムの部分が通常のピーク処理方法を使用して積分されて、真のピークとしてレポートされます。このイベントは、特定の化合物に対して負の反応を示す屈折率などの検出器タイプを使用する場合に役立ちます。

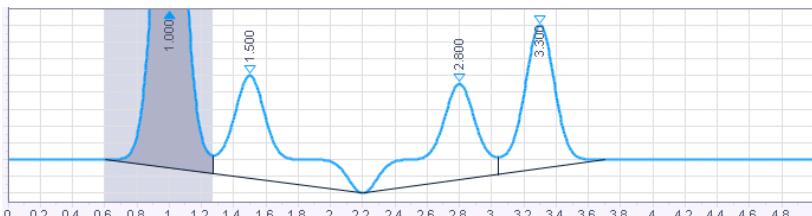


図 64 デフォルトの積分

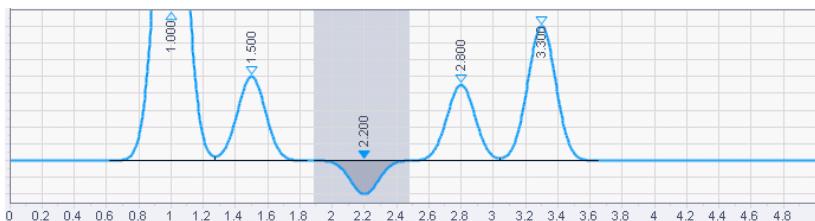


図 65 [ネガティブピーク] イベントによる積分

ピーク終了の
検出を無効

このイベントを使用すると、指定した時間のピーク終了の検出をオフにして、イベントのウィンドウ内のピークを単独のピークとして強制的に処理します。このイベントは、連続した切れ目のない複数のピークの領域を1つの領域に結合するために便利な手段です。各ピークは単独のピークの一部と見なされるため、リテンションタイムは [ピーク終了の検出を無効] イベントの後、最初の頂点の時間に対して割り当てられます。

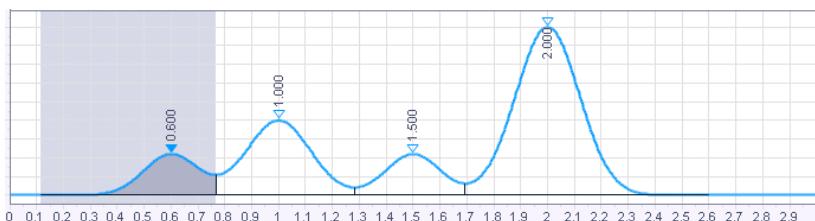


図 66 デフォルトの積分

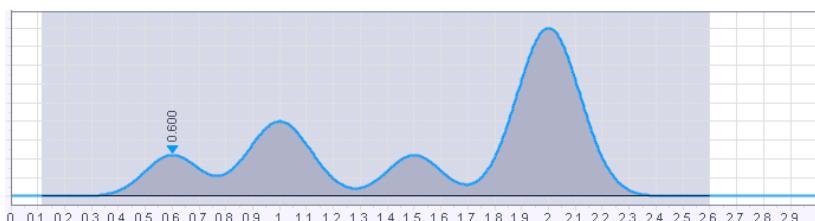


図 67 0.4から 2.3 min までの [ピーク終了検出が無効]

マニュアル
ベースライン

このイベントを使用すると、積分パラメータを変更せずにピークのベースラインの引き方を変更することができます。ベースラインは、開始時間のシグナルから終了時間のシグナルまで引かれます。

あるピークについてはベースラインを引く位置を変更し、クロマトグラム内の別のピークについてはベースラインの引き方を変更したくない場合に便利です。

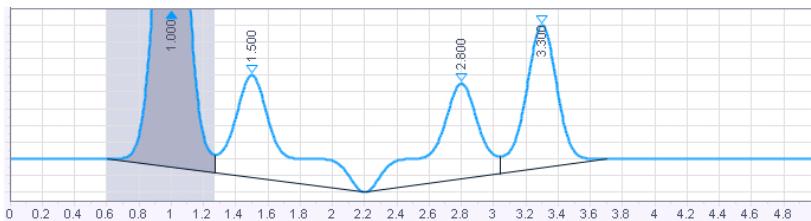


図 68 デフォルトの積分



図 69 2.3 から 3.6 min までのマニュアルベースラインによる積分

マニュアル
ピーク

このコマンドを使用すると、以前に検出されなかったピークの開始時間と終了時間を定義できます。積分パラメータ全体を変更せずに、ピークを強制的に積分する場合に便利です。

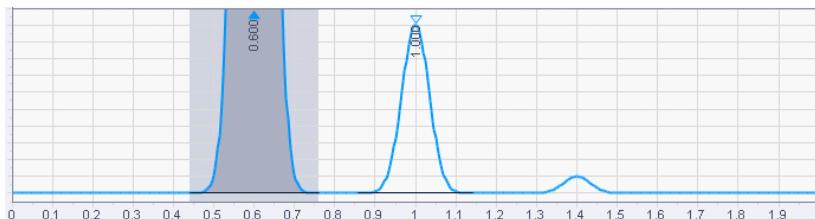


図 70 デフォルトの積分

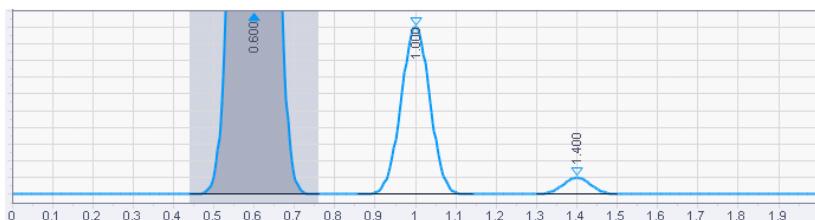


図 71 1.3 から 1.5 min までのマニュアルピークイベントを使用した小さい
ピークの強制積分

ピークの分割

このイベントを使用すると、垂直なドロップラインの積分がピーク内で強制的に行なわれます。垂直なドロップラインは、イベントが挿入された時点で引かれます。

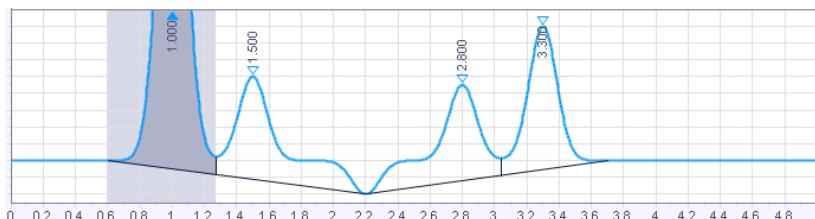


図 72 デフォルトの積分



図 73 1.75 min での [ピーク分割] イベントによる積分

ピーク開始に
強制/ピーク
終了に強制

これらのイベントを使用すると、ピーク積分の開始点と終了点が特定のポイントに強制的に変更されます。

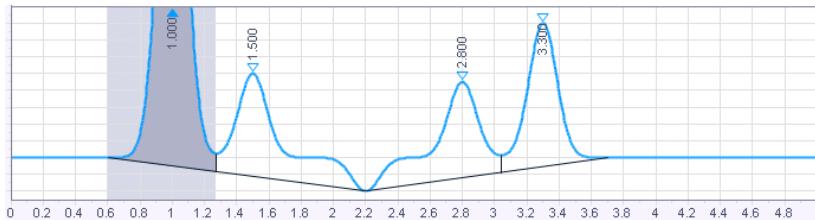


図 74 デフォルトの積分



図 75 1.75 min での [ピーク終了点変更] イベントによる積分

リセットベー
スライン

このイベントは、クロマトグラム上の指定ポイントにベースラインをセットさせます。

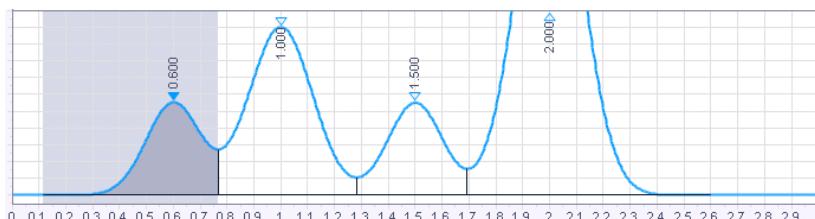


図 76 デフォルトの積分

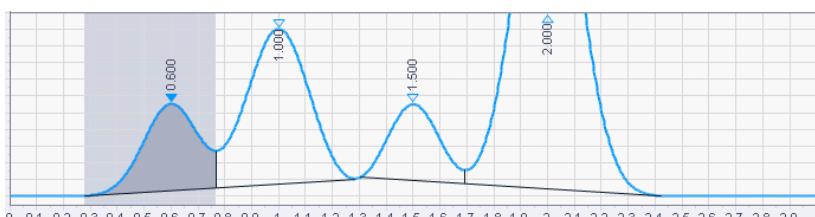


図 77 1.3 min の [リセットベースライン] イベントによる積分

谷渡り処理
ベースライン
リセット

注記

このイベントを使用すると、イベント後に検出された次の谷でベースラインがリセットされます。

このイベントは、クラスタ内の最初のピークの開始点の後に配置する必要があります。そうしないと、ピークの開始点が谷として識別されます。

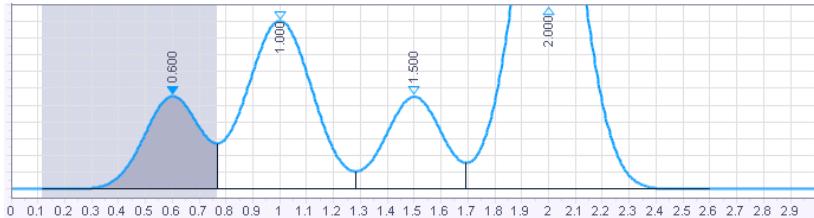


図 78 デフォルトの積分

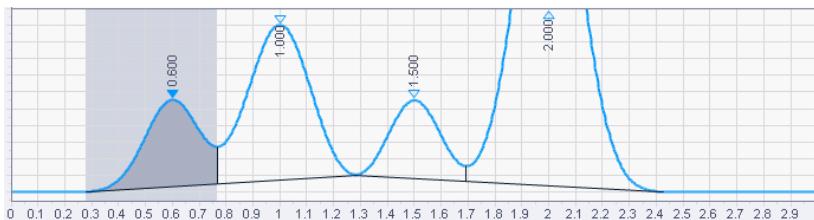


図 79 1.2 min での [谷から谷ベースラインリセット] イベントによる積分

最大面積

目的ピークの最大の面積を設定します。

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

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

最大高さ

目的ピークの最大の高さを設定します。

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

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

ベースラインコードの説明

ベースラインコードの説明

ベースラインコードは2文字で構成されます。1番目の文字はピーク開始のベースラインタイプを示し、2番目の文字はピーク終了のベースラインタイプを示します。ベースラインコードは、【注入結果】テーブルおよびすべてのデフォルトレポートテンプレートに含まれます。

注入結果							
ピーク		サマリー	BL コード	RT (min)	面積	面積 %	高さ
#	名前						
1			BV	0.593	8.232	0.908	3.048
2			VV	0.593	5.966	2.803	2.229
3			BV	0.594	15.496	1.264	5.700
4			VV	0.825	9.097	1.003	2.132
合計				0.876	46.022	1.784	2.176
平均				0.593	11.505	0.904	2.176

図 80 注入結果

シグナル: DAD1A,Sig=272.0,16.0 Ref=380.0,20.0

RT [min]	タイプ	ピーク幅 [min]	面積	高さ	面積%
0.893	VB	0.29	146.23	55.98	33.11
1.326	BB	0.19	30.15	11.07	6.83
1.785	BB	0.22	11.25	3.88	2.55
2.268	BB	0.19	8.33	2.76	1.89

図 81 例: Short_Areaレポートからのテーブル

- B ベースライン
- C 指数
- f 強制ピーク開始または終了 (ユーザー定義)
- I 積分オフィベントによりピーク終了
- N ネガティブピーク開始
- P ネガティブピーク終了
- H 前方水平
- h 後方水平

- M** マニュアルベースラインまたはマニュアルピーク
- m** ベースライン開始/終了の移動
- S** ショルダー
- T** タンジェントスキム
- V** 谷渡り処理
- v** 強制谷ポイント
- x** ピークの分割
- E** ピークが検出される前にクロマトグラムが終了
クロマトグラムの終了をピーク終了として使用
- R** リセットベースライン
- L** 最下点水平

4 ピーク同定

ピーク同定とは	90
リテンションタイムウィンドウの評価	91
競合の分解能	92
相対リテンションタイム	93
相対リテンションタイム（RRT）の計算	95
タイムリファレンス化合物	96
タイムリファレンス化合物について	96
タイムリファレンス化合物の計算	96
解析メソッドの更新	98
リテンションタイムの更新	98
更新済みリテンションタイムの計算	99
例：RRT によるリテンションタイム更新	101
グローバルリテンションタイムシフトの計算	103

本章では、ピーク同定のコンセプトについて説明します。

ピーク同定とは

未知サンプル内の化合物が、クロマトグラフの特性に基づいて同定されます。

化合物の同定は、必要な分析メソッドで定量を行なう際に必要となるステップです。定量を行なわない場合でも、同定を行なう解析メソッドを作成することができます。対象となる各成分のシグナル特性は、メソッドの化合物テーブルに保存できます。

ピーク同定プロセスの機能では、シグナル内の各ピークと、化合物テーブルに保存されているピークとの比較が行なわれます。

同定は、予測リテンションタイム、絶対リテンションタイムウインドウ、および相対リテンションタイムウインドウに基づいて行なわれます。タイムウインドウの単位は%です。最終的なリテンションタイムウインドウは、相対ウインドウと絶対ウインドウの和で、予測リテンションタイムに対して対称的に適用されます。

予測リテンションタイムは、メソッド内で絶対時間値として指定されるか、または相対リテンションタイムから計算されます。タイムリファレンス化合物を使用すると、特定のリファレンス化合物によって測定される適用可能なシフトに基づいて、予測リテンションタイムを補正することができます。

$$W_{\text{nd}} \text{ Wdth} = \text{絶対 RT ウインドウ} + \frac{\text{予測 RT} * \text{相対 RT ウインドウ}}{100}$$

ここで、

絶対 RT ウインドウ 絶対リテンションタイムウインドウ

予測 RT 予測リテンションタイム

相対 RT ウインドウ 相対リテンションタイムウインドウ

W_{nd} Wdth ウインドウ幅

$$RT \text{ Wnd} = [\text{予測 RT} - W_{\text{nd}} \text{ Wdth}, \text{予測 RT} + W_{\text{nd}} \text{ Wdth}]$$

ここで、

予測 RT 予測リテンションタイム

RT Wnd リテンションタイムウインドウ

W_{nd} Wdth ウインドウ幅

リテンションタイムウィンドウの評価

同定ウィンドウは相対ウィンドウと絶対ウィンドウの和で、予測リテンションタイムに対称的に適用されます。たとえば、

予測リテンションタイム = 1 min

絶対リテンションタイムウィンドウ = 0.2 min

相対リテンションタイムウィンドウ = 10 % = 1 min * 10/100 = 0.1 min

同定ウィンドウ = $[1 - 0.2 - 0.1; 1 + 0.2 + 0.1] = [0.7; 1.3]$

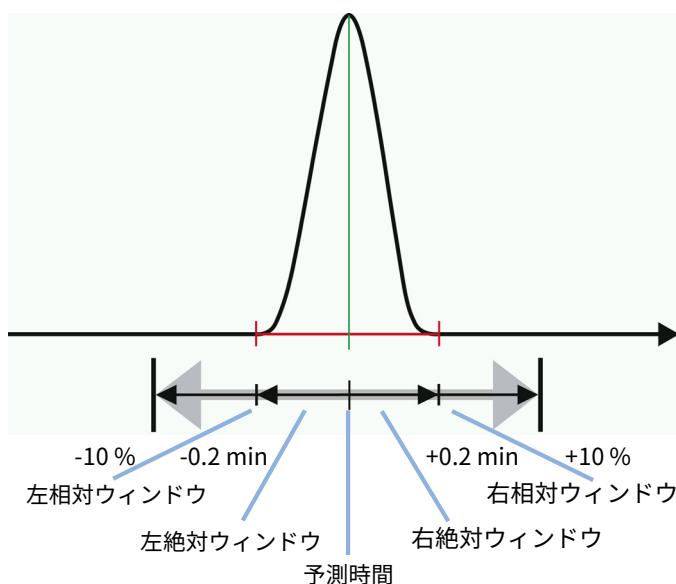


図 82 同定ウィンドウ

競合の分解能

リテンションタイムウィンドウ内に複数のピークがある場合は、さまざまな方法で特定のピークを認識できます。次の中から、化合物同定パラメータの [ピーク一致] の値を選択できます。

- **[最初]** : リテンションタイムウィンドウの最初のピークを使用します。
- **[最後]** : リテンションタイムウィンドウの最後のピークを使用します。
- **[最も近い]** (デフォルト設定) : 予測リテンションタイムに最も近いピークを使用します。
- **[最も近いネスト]** : ベースピークとネストピークがあり、両方のリテンションタイムが同じである場合、ネストピークを使用します。
- **[最大面積]** : リテンションタイムウィンドウの最大面積のピークを使用します。
- **[最大高さ]** : リテンションタイムウィンドウの最大高さのピークを使用します。

競合を解決できない場合は、どのピークも認識されず、解析ログに警告が書き込まれます。

相対リテンションタイム

化合物の同定が正しいかどうかをチェックするために、相対リテンションタイムを使用することができます。化合物のリテンションタイムと、別の特定の化合物（RRT リファレンスとも呼ばれます）のリテンションタイムとの比較が行なわれます。2つのリテンションタイムの比率である相対リテンションタイム (RRT) は通常、既知の値で、アプリケーションに入力することができます。

RRT 値そのものは、化合物同定に影響を及ぼしません。影響を与えるには、絶対予測リテンションタイムを使用するしかありません。これらは、解析メソッド内で絶対時間値として指定されるか、または相対リテンションタイムから計算されます。タイムリファレンス化合物またはメソッド更新を使用すると、適用可能なシフトに基づいて、これらの絶対リテンションタイムウィンドウを補正することができます。

以下の例は、RRT リファレンス化合物と関連付けられた化合物の同定パラメータを示しています。

化合物テーブル		ケオリファイア設定		全般				
□	#	タイプ	名前	シグナル	RRT リファレンス	RRT リファレンス化合物	予測 RT (min)	RRT
	3	⌚	Ref #1	DAD1A	<input checked="" type="checkbox"/>		2.000	1.000
	4	⌚	化合物 #1	DAD1A	<input type="checkbox"/>	Ref #1 (DAD1A)	3.000	1.500

関連付けられた化合物

RRT リファレンス化合物

関連付けられた化合物の予測 RT を変更すると、その RRT 値が自動的に再計算されます。その反対に、RRT 値を変更すると、予測 RT が再計算されます。

RRT リファレンス化合物の予測 RT を変更すると、システムは関連付けられた化合物の予測 RT を再計算します。

タイムリファレンス化合物を RRT リファレンス化合物とともに使用すると、リテンションタイムシフトが RRT リファレンス化合物に適用されます（「[タイムリファレンス化合物の計算](#)」96 ページを参照）。システムは、RRT 値が変更されないように、関連付けられた化合物の予測 RT を再計算します。

ピーク同定

相対リテンションタイム

化合物テーブル		クロマトグラフ設定 全般						
#	タイプ	名前	シグナル	タイムリファレンス	タイムリファレンス化合物	予測 RT (min)	RRT	RRT リファレンス
2	⌚	Ref #1	DAD1A	<input type="checkbox"/>		2.000	1.000	<input checked="" type="checkbox"/>
3	⌚	化合物 #1	DAD1A	<input type="checkbox"/>	Time Ref (DAD1A)	3.000	1.500	<input type="checkbox"/>
4	⌚	Time Ref	DAD1A	<input checked="" type="checkbox"/>		3.500		<input type="checkbox"/>

RT: 必要に応じて調整

RRT: 一定の値を維持

RRT リファレンス化合物とともに **[RT 更新]** 機能を使用することもできます。ただし、設定できるのは RRT リファレンス化合物の更新パラメータのみです。関連付けられた化合物は、RRT 値が変更されないように、それぞれのリファレンスとして同じ値を使用するよう強制されます。

化合物テーブル		クロマトグラフ設定 全般						
#	タイプ	名前	シグナル	RRT リファレンス	RRT リファレンス化合物	RT 更新	RT 更新係数 (%)	
2	⌚	RRT Ref	DAD1A	<input checked="" type="checkbox"/>		各実行後	50.000	
3	⌚	化合物 #1	DAD1A	<input type="checkbox"/>	RRT Ref (DAD1A)	各実行後		

関連付けられた化合物は、RRT リファレンスと同じ RT 更新の値を使用

RRT リファレンス化合物は RT 更新の設定を使用

同定されていないピークの場合、関連付けられた化合物はありません。この場合、最初の RRT リファレンス化合物から RRT 値が計算されます。

相対リテンションタイム (RRT) の計算

解析メソッド
に表示される
値

$$RRT = \text{予測 RT}_{\text{化合物}} / \text{予測 RT}_{\text{リファレンス}}$$

関連付けられた化合物の RRT 値を変更すると、その予測 RT は次のように再計算されます。

$$\text{予測 RT}_{\text{化合物}} = RRT * \text{予測 RT}_{\text{リファレンス}}$$

注入結果に表
示される値

同定されたピークの場合：

$$RRT = \text{実際の RT}_{\text{化合物}} / \text{実際の RT}_{\text{リファレンス}}$$

同定されていないピークの場合：

$$RRT = \text{実際の RT}_{\text{ピーク}} / \text{実際の RT}_{\text{最初のリファレンス}}$$

タイムリファレンス化合物

タイムリファレンス化合物について

タイムリファレンス化合物を使用するとアプリケーションは、特定のリファレンス化合物によって観察される適用可能なシフトに基づいて、絶対リテンションタイムウィンドウを補正します。

解析メソッド内のひとつまたは複数の化合物を、タイムリファレンス化合物としてマークすることができます。また、各化合物またはタイムグループについてタイムリファレンス化合物を選択して、予測リテンションタイムを補正することができます。補正の範囲は、予測リテンションタイム（列係数、デフォルト = 1）を補正するために各化合物で選択する個々の補正係数で調整することができます。

化合物にタイムリファレンス化合物が割り当てられている場合、予測リテンションタイムは割り当てられているタイムリファレンス化合物のシフトによって補正されます。化合物同定アルゴリズムは、この補正済みの予測リテンションタイムを使用してクロマトグラムのピークを同定します。タイムグループの場合には、シフトによって時間範囲が補正されます。一般に、シフトは入力した補正ファクタによって補正されます。関連付けられたリファレンス化合物がクロマトグラムで見つからない場合、関連のあるピークとタイムグループは同定されません。

タイムリファレンス化合物と RRT リファレンス化合物を使用している場合は、RRT が一定に保たれるように、予測 RT_{リファレンス} と予測 RT_{化合物} の両方が調整されます。

注記

タイムリファレンス化合物を使用している場合、**すべての化合物**とタイムグループはそれぞれに関連付けられたタイムリファレンス化合物を有している必要があります。そうでないとメソッドが矛盾して、メソッドを再解析に使用することができません。

タイムリファレンス化合物の計算

タイムリファレンス化合物を使用するとアプリケーションは、選択したタイムリファレンス化合物によって測定される適用可能なシフトに基づいて、絶対リテンションタイムウィンドウを補正します。アプリケーションは、最初に予測リテンションタイムに基づいた範囲内でリファレンスピークを特定します。予測リテンションタイムはメソッドで定義します。以降の計算は、このタイムリファレンスを使用する化合物に対して実行されます。

タイムリファレンス化合物のシフト

$$\text{Shift}_{\text{Ref}} = \text{ActualRT}_{\text{Ref}} - \text{ExpRT}_{\text{Ref}}$$

ここで、

$\text{Shift}_{\text{Ref}}$ リファレンス化合物のタイムシフト

$\text{ActualRT}_{\text{Ref}}$ リファレンス化合物の実際のリテンションタイム

$\text{ExpRT}_{\text{Ref}}$ リファレンス化合物の予測リテンションタイム

関連付けられた化合物の RT

タイムリファレンスを使用する化合物の予測リテンションタイムは、追加ファクタを使用して計算されます。

$$\text{CorrectedExpRT} = \text{ExpRT} + (\text{Shift}_{\text{Ref}} * \text{Factor})$$

ここで、

CorrectedExpRT 補正済みの予測リテンションタイム

ExpRT 予測リテンションタイム

$\text{Shift}_{\text{Ref}}$ タイムリファレンス化合物のタイムシフト

Factor 関連付けられたタイムリファレンス化合物のある化合物に使用するファクタ（[係数]）

関連付けられたタイムグループの開始時間と終了時間

タイムグループの場合は、予測開始時間と予測終了時間がそれぞれ次のように計算されます。

$$\text{Corrected Range Start} = \text{Range Start} + (\text{Shift}_{\text{Ref}} * \text{Factor})$$

$$\text{Corrected Range End} = \text{Range End} + (\text{Shift}_{\text{Ref}} * \text{Factor})$$

ここで、

$\text{Corrected Range Start}$ タイムグループの補正済み開始時間

Range Start タイムグループの開始時間

$\text{Corrected Range End}$ タイムグループの補正済み終了時間

RangeEnd タイムグループの終了時間

$\text{Shift}_{\text{Ref}}$ タイムリファレンス化合物のタイムシフト

Factor 関連付けられたタイムリファレンス化合物のあるタイムグループに使用するファクタ（[係数]）

解析メソッドの更新

リテンションタイムの更新

解析メソッド内の予測リテンションタイムは、補正済みの予測リテンションタイムが計算されたあとで、同定されたすべての化合物またはタイムグループのリテンションタイム更新のタイプ（【なし】、【各実行後】、または【キャリブレーション後】）に基づいて自動更新されます。補正済みの値に基づいて化合物を検出できた場合は、その補正済みの値がメソッド内の新しい予測値になります。

リテンションタイムの更新は、タイムリファレンスを使用するしないに関わらず適用できます。

注記

リテンションタイムの更新が【各実行後】または【キャリブレーション後】に設定されている場合は、すべての注入が順番通りに処理されます。メソッドの変更はその次の注入から適用され、キャリブレーション以外の注入の並行処理は実施できなくなります。

分析中のリテンションタイムの更新に加えて、すべてのリテンションタイムを指定した値だけ手動でシフトすることもできます。

更新済みリテンションタイムの計算

予測リテンションタイムを補正するために、アプリケーションは現在のリテンションタイムを読み込んで、予測リテンションタイムへのシフトを計算します。このシフトは、化合物に固有の重み付けファクタが乗算されてから、予測リテンションタイムに加算されます。

$$\text{Shift} = \text{ActualRT} - \text{ExpRT}$$

ここで、

Shift	化合物のタイムシフト
ActualRT	化合物の実際のリテンションタイム
ExpRT	化合物の予測リテンションタイム

$$\text{新しい予測 RT} = \text{予測 RT} + \left(\text{シフト} * \frac{\text{RT 更新係数}}{100} \right)$$

ここで、

新しい予測 RT	化合物の補正済みの予測リテンションタイム
予測 RT	化合物の予測リテンションタイム
シフト	化合物のタイムシフト
RT 更新係数	化合物の重み付け係数（[RT更新係数（%）]）

タイムリファレンス化合物で更新されたリテンションタイム

RT 更新は、**タイムリファレンス**を使用するしないに関わらず使用できます。タイムリファレンス化合物自体のシフトと補正済みリテンションタイムは、**RT 更新**機能を使用して化合物の場合と同じように計算されます。

$$\text{新しい予測 } RT_{\text{Ref}} = \text{予測 } RT_{\text{Ref}} + \left(Shift_{\text{Ref}} * \frac{RT \text{ 更新係数}_{\text{Ref}}}{100} \right)$$

ここで、

新しい予測 RT_{Ref}	リファレンス化合物の補正済みの予測リテンションタイム
予測 RT_{Ref}	リファレンス化合物の予測リテンションタイム
$Shift_{\text{Ref}}$	リファレンス化合物のタイムシフト
$RT \text{ 更新係数}_{\text{Ref}}$	リファレンス化合物の重み付け係数（[RT 更新係数 (%)]）

タイムリファレンスに関連付けられた化合物の補正済みのリテンションタイムが、追加の係数を使用して計算されます。

$$\text{NewExpRT} = \text{ExpRT} + \left(Shift_{\text{Ref}} * \frac{RTUpdate}{100} * \text{Factor} \right)$$

ここで、

新しい予測 RT	化合物の補正済みの予測リテンションタイム
ExpRT	化合物の予測リテンションタイム
$Shift_{\text{Ref}}$	リファレンス化合物のタイムシフト
$RTUpdate$	化合物の重み付け係数（[RT 更新係数 (%)]）
Factor	関連付けられたタイムリファレンス化合物のある化合物に使用するファクタ（[係数]）

タイムグループの場合は、タイムリファレンスまたは相対リテンションタイムを使用する場合のみ、予測リテンションタイム、範囲開始時間、または範囲終了時間が更新されます。

例：RRTによるリテンションタイム更新

リテンションタイムを自動更新して、さらに相対リテンションタイムを使用する場合は、次のように値が更新されます。

- RRT リファレンス化合物の予測 RT は、NewExpRT の式に示されるように計算されます（「更新済みリテンションタイムの計算」99 ページを参照）。
- 関連付けられた化合物の予測 RT は、予測 $RT_{\text{化合物}}$ の式に示されるように調整されて、RRT 値が一定に保たれます（「相対リテンションタイム (RRT) の計算」95 ページを参照）。
- タイムグループの RT 開始時間と RT 終了時間は、予測 $RT_{\text{化合物}}$ と同じ式を使用して調整され、RRT 値が一定に保たれます。

例として、RT 更新と RRT を使用した、3 つの化合物と 1 つのタイムグループの解析メソッドを考えてみます。

化合物テーブル		ケオリファイア設定		全般					
#	タイプ	名前	シグナル	RRT リファレンス	RRT リファレンス化合物	RT 更新	RT 更新係数 (%)	予測 RT (min)	RRT
2	□	グループ #1	DAD1A	<input type="checkbox"/>	RRT Ref (DAD1A)	各実行後		0.000	
4	⌚	RRT Ref	DAD1A	<input checked="" type="checkbox"/>		各実行後	50.000	3.000	1.000
5	⌚	化合物 #2	DAD1A	<input type="checkbox"/>	RRT Ref (DAD1A)	各実行後		6.000	2.000
3	⌚	化合物 #3	DAD1A	<input type="checkbox"/>	RRT Ref (DAD1A)	各実行後		1.500	0.500

図 83 化合物パラメータ

タイムグループパラメータ			
<input type="checkbox"/> 同定ピークを含む			
<input type="checkbox"/> 各ピークを個々に定量			
RT 開始	RTT 開始	RT 終了	RTT 終了
3.000	1.00	6.000	2.00

図 84 タイムグループパラメータ

注入データの解析後に、3 つの化合物が次のリテンションタイムで見つかった場合:

- RRT ref : 4.000 min
- C2 : 8.000 min
- C3 : 2.000 min

その結果、RRT リファレンス化合物の予測 RT は以下のように補正されます。

$$\text{新しい予測 RT} = \text{予測 RT} + \left(\text{シフト} * \frac{\text{RT 更新係数}}{100} \right)$$

$$\text{新しい予測 RT} = 3.000 \text{ min} + \left((4.000 \text{ min} - 3.000 \text{ min}) * \frac{50}{100} \right) = 3.500 \text{ min}$$

その他の化合物の予測リテンションタイムおよびタイムグループの開始時間と終了時間は、RRT 値が一定に保たれるように調整されます。

$$\text{予測 RT}_{\text{化合物}} = \text{RRT} * \text{予測 RT}_{\text{リファレンス}}$$

$$\text{予測 RT}_{C2} = 2.000 * 3.500 \text{ min} = 7.000 \text{ min}$$

$$\text{予測 RT}_{C3} = 0.500 * 3.500 \text{ min} = 1.750 \text{ min}$$

$$\text{RT開始}_{\text{TimedG}} = 1.000 * 3.500 \text{ min} = 3.500 \text{ min}$$

$$\text{RT終了}_{\text{TimedG}} = 2.000 * 3.500 \text{ min} = 7.000 \text{ min}$$

グローバルリテンションタイムシフトの計算

メソッドの編集の一環として、タイムグループのすべての予測リテンションタイムと時間範囲を一度にシフトすることができます。新しいリテンションタイムは以下のように計算されます。

絶対シフト：

$$\text{新しい予測 RT} = \text{予測 RT} + \text{シフト}$$

ここで、

新しい予測 RT 化合物の補正済みの予測リテンションタイム

予測 RT 化合物の予測リテンションタイム

シフト ユーザーが入力した絶対値

相対シフト：

$$\text{新しい予測 RT} = \text{予測 RT} + \left(\text{予測 RT} * \frac{\text{シフト}}{100} \right)$$

ここで、

新しい予測 RT 化合物の補正済みの予測リテンションタイム

予測 RT 化合物の予測リテンションタイム

シフト ユーザーが入力した相対値

5 キャリブレーション

キャリブレーションとは	105
検量線	106
検量線とは	106
レスポンスタイプとレスponsファクタ	107
キャリブレーションレベル	112
キャリブレーションポイントの重み付け	114
検量線モデル	117
検量線の計算	119
検量線を計算するためのパラメータ	120
直線検量線	121
二次曲線近似	122
対数近似と指数近似	125
RF 平均近似	126
検量線の評価	127
検量線のベリフィケーション	127
相対残差	127
検量線の統計値	129

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

キャリブレーションとは

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

定量分析には多くのステップが含まれています。その概要を以下に示します。

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

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

定量を実施するには、以下のキャリブレーションメソッドを使用できます。

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

ESTD の検量線と計算は、測定されたアマウントのレスポンス（面積または高さ）に基づいています。ISTD の検量線と計算は、相対レスポンスと相対アマウントに基づいています（「[ISTD での相対レスポンス](#)」 109 ページを参照）。

検量線

検量線とは

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

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

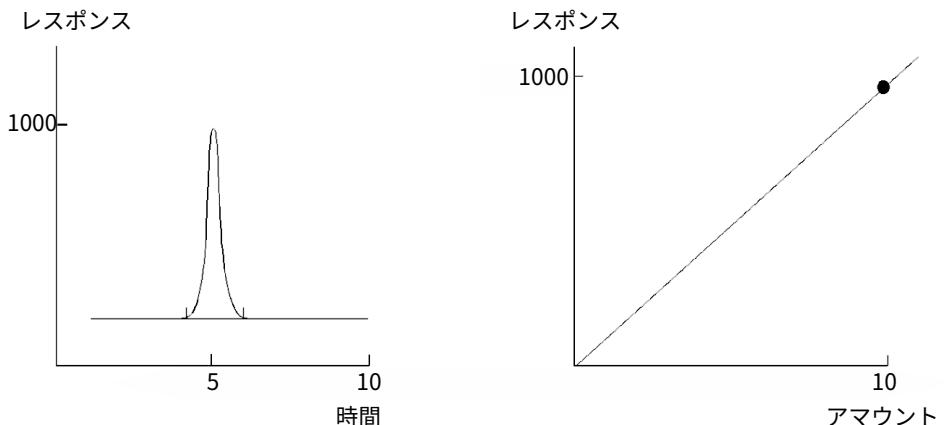


図 85 キャリブレーションサンプル、シグナル、および検量線

レスポンスタイプとレスポンスファクタ

検量線の x 軸と y 軸にプロットされた値を選択するには、さまざまな設定があります。

RF 定義

レスポンスファクタ (RF) は、化合物が検出されたときにシグナルの量を測るための単位です。これは、化合物のアマウントに対するレスポンスの割合、またはこの逆として定義されます。RF 定義に基づく一般的な方法の設定の中で、[レスポンス/アマウント]（デフォルト）と [アマウント/レスポンス] を切り替えることができます。この設定を変更するとき、検量線の x 軸と y 軸が交換されます。

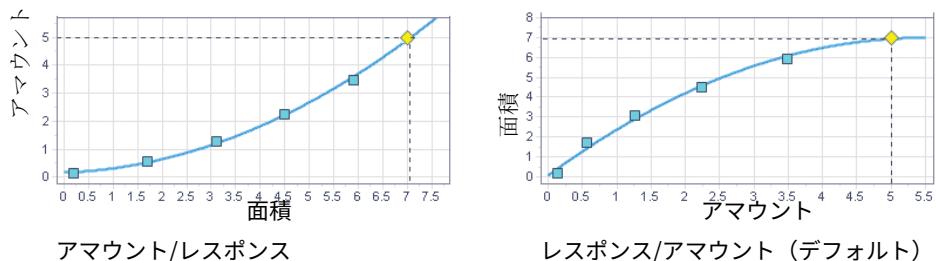


図 86 さまざまな RF の定義、[面積] として設定されるレスポンス

RF 計算：

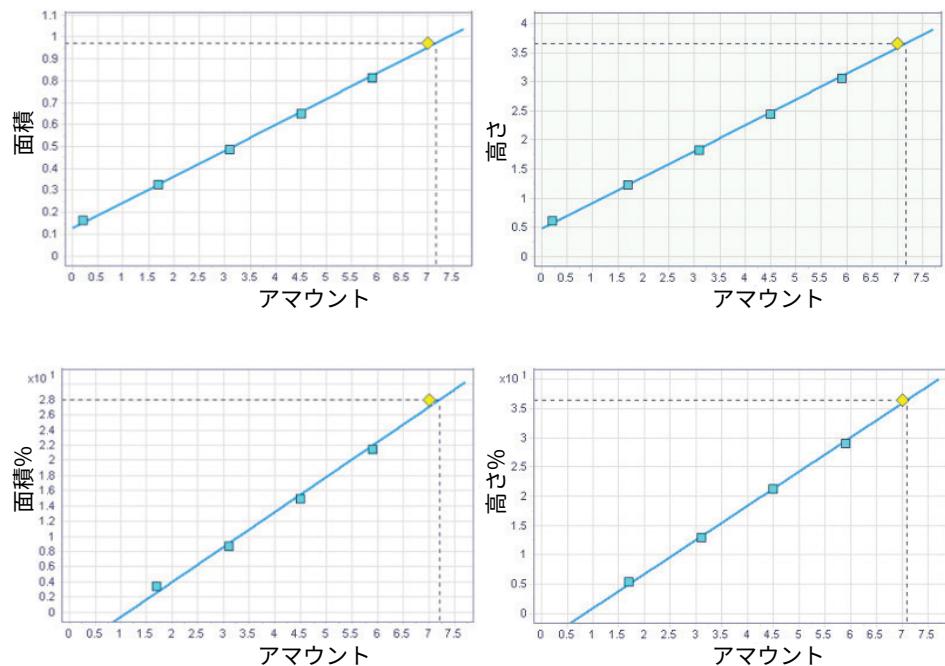
$$RF = \text{レスポンス}/\text{アマウント}$$

または

$$RF = \text{アマウント}/\text{レスポンス}$$

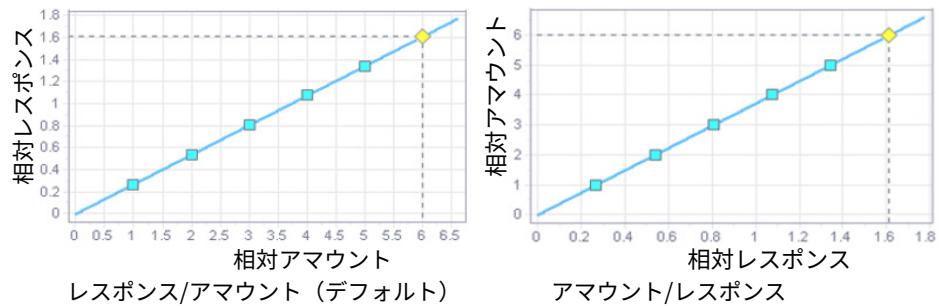
レスポンスのタイプ

レスポンスは、【面積】、【面積%】、【高さ】、または【高さ%】として定義されます。それぞれの化合物について、個別にレスポンスタイプを選択することができます。



ISTD での相対レスポンス

使用するサンプルで内部標準 (ISTD) を使用する場合、相対アマウントと相対レスポンスが検量線に表示されます。計算は、RF の定義によって異なります。



RF 計算：

$$RF = (\text{レスポンス} / \text{ISTD レスポンス}) / (\text{アマウント} / \text{ISTD アマウント})$$

または

$$RF = (\text{アマウント}/\text{ISTD アマウント}) / (\text{レスポンス}/\text{ISTD レスポンス})$$

Log/Log 検量線モデル

ある化合物に [Log/log] の検量線モデルを選択すると、アマウントとレスポンスの両方が対数値としてプロットされます。

[log/log] モデルは、両方の RF 定義、すべてのレスポンスタイプ、および内部標準法や絶対検量線法と組み合わせて使用できます。

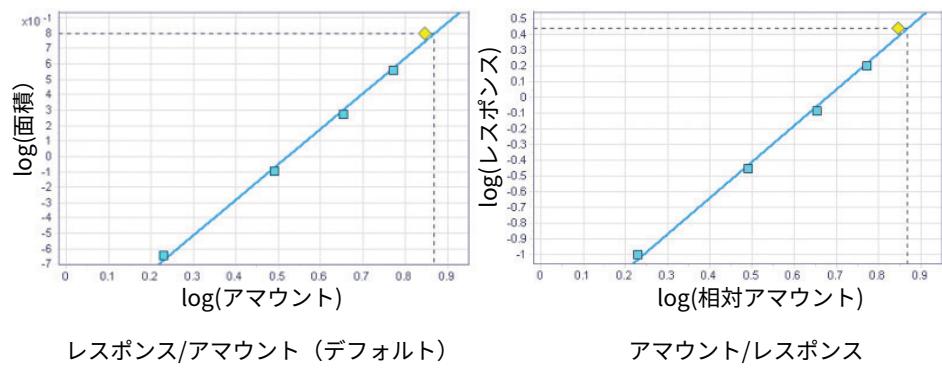


図 87 絶対検量線法または内部標準法を使用した log/log モデルの例

上記の例の RF 計算：

$$RF = \log(\text{レスポンス}) / \log(\text{アマウント})$$

$$RF = \log(\text{レスポンス} / \text{ISTD レスポンス}) / \log(\text{アマウント} / \text{ISTD アマウント})$$

スケールレスポンス

スケールレスポンスを選択した場合、アマウントは変更なしでプロットされますが、レスポンスは計算値としてプロットされます。

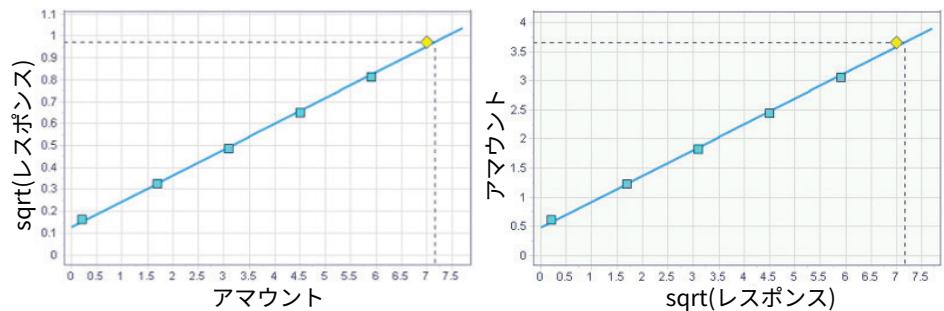


図 88 sqrt 関数を使用したスケールレスポンスの例

上記の例の RF 計算：

$$RF = \sqrt{\text{レスポンス}} / \text{アマウント}$$

または

$$RF = \text{アマウント} / \sqrt{\text{レスポンス}}$$

キャリブレーションレベル

すべての化合物に対するグローバルなキャリブレーションレベル数が、解析メソッドごとに1つあります。複数のキャリブレーションレベルによって、検量線の計算にいくつのポイント（アマウント、レスポンス）が使用されるかが定義されます。対応するキャリブレーションサンプルを解析することによって各レベルを定義してください。各化合物の検量線には、平均の計算に使用したキャリブレーションポイントが表示されます。

キャリブレーションサンプルを再分析する場合や、特定のキャリブレーションレベルにキャリブレーション標準を追加して解析する場合、そのレベルのキャリブレーションポイントが更新されます。【検量線計算】設定で平均値を使用することを選択した場合、キャリブレーションポイントは新たに測定されたポイントとすべての既存の値の平均値によって更新されます（「個々のポイントを使用するモード」112ページを参照）。

キャリブレーションポイントの収集は、以下のように【タイプ】でコントロールすることができます。

- 未選択: 検量線に新しいポイントが追加されます。
- 検量線をすべて消去**: 新しいキャリブレーションポイントが保存される前に、すべてのキャリブレーションレベルのすべてのキャリブレーションポイントが削除されます。
- このレベルの検量線を消去**: 新しいキャリブレーションポイントが保存される前に、特定のキャリブレーションレベルのすべてのキャリブレーションポイントが削除されます。

同じキャリブレーション標準の注入を複数回再解析すると、検量線の同じキャリブレーションポイントが更新されるだけで、新しいポイントは追加されません。

個々のポイントを使用するモード

検量線を計算するためにキャリブレーションポイントを使用する方法を、解析メソッドごとに選択することができます。以下のモードが使用できます。

- レベルごとの平均から**: あるレベルに寄与するすべてのキャリブレーションポイントのアマウントとレスポンスが平均化されて、最適な検量線を計算するためのアルゴリズムに使用されます。
- 個々のキャリブレーションポイントから**: 個々のキャリブレーションポイントのすべてのアマウントとレスポンスが、検量線を決めるために直接使用されます。

平均

すべてのキャリブレーション分析の平均が次の式を用いて計算されます。

$$\text{レスポンス} = \frac{(n - 1) * \text{レスポンス} + \text{レスポンス値}}{n}$$

ここで、

n	キャリブレーションポイントの数
レスポンス値	測定レスポンス

ブラケットキャリブレーション

ブラケットキャリブレーションでは、サンプルがプレサンプルキャリブレーションとポストサンプルキャリブレーションでブラケットされます。開始ブラケットと終了ブラケットの間のキャリブレーション標準がまず解析され、それから検量線が計算されます。その後、この検量線を使用して、このブラケットのサンプルが計算されます。

[カスタム] を除くすべてのブラケットモードでは、すべての開始ブラケットに対して、**[検量線をすべて消去]** 操作が自動的に実行されます。**[カスタム]** ブラケットモードでは、必要に応じて **[タイプ]** を **[検量線をすべて消去]** に設定できます。

ブラケットは、**[注入リスト]** ウィンドウで設定されています。さまざまなブラケットモードが存在します。

- **すべて**

検量線は、シーケンス中の最初から最後のすべてのキャリブレーションサンプルで計算されます。検量線の計算後、すべてのサンプルが再解析されます。

- **オーバラップなし**

シーケンス内に少なくとも 3 つの標準セットがあり、中間のセットには少なくとも 2 つの標準が必要です。シーケンスの中間にある標準セットは、それぞれ 1 つのブラケットにのみ使用されます。

中間の標準セットが 2 つより多い場合は分割され、先行するブラケットと後ろに続くブラケットに割り当てられます。中間の標準の数が奇数の場合、先行するブラケットに 1 つ多い標準が割り当てられます。

・ オーバラップ

シーケンス内に少なくとも3つの標準セットが必要です。シーケンスの中間にある標準は、2つのセットのブラケットに使用されます（先行するセットと、後ろに続くセット）。

・ カスタム

必要に応じてブラケットを作成します。[タイプ] では、どのキャリブレーションレベルを消去するかを、各キャリブレーションサンプルごとに選択できます。タイプを選択しなかった場合は、ブラケットはその先行分とで平均されます。

キャリブレーションポイントの重み付け

異なるキャリブレーションアマウントでのレスポンスの変動を補正するため
に、検量線の作成に使用するさまざまなキャリブレーションポイントの相対的
な重み付け（または重要度）を指定することができます。

重み付けをコントロールするパラメータは **【重み付け方法】** です。デフォルトでは、すべてのレベルの重み付けが同じになり、各検量線の最大の重み付けが1にノーマライズされます。

以下の重み付けファクタが利用できます。

なし

すべてのキャリブレーションポイントの重み付けが同じになります。

wt = 1

ここで、

wt

キャリブレーションレベルの重み付けファクタ

1/アマウント

キャリブレーションポイントは1/アマウントのファクタで重み付けされ、最大の重み付けファクタが1となるように最小アマウントに対してノーマライズされます。原点が含まれる場合は、その他の各キャリブレーションポイントの重み付けの平均値が原点に割り当てられます。

$$wt = \frac{\text{最小 (アマウント)}}{\text{現在のアマウント}}$$

ここで、

現在のアマウント	レベルアマウント
最小 (アマウント)	検量線に使用したすべてのポイント (レベル) のなかで最も低いアマウント
wt	キャリブレーションレベルの重み付けファクタ

1/アマウントスクウェア

キャリブレーションポイントは1/アマウント²のファクタで重み付けされ、最大の重み付けファクタが1となるように最小アマウントに対してノーマライズされます。二次のキャリブレーションポイントの重み付けは、たとえばキャリブレーションポイントの広がりを調整するために使用することができます。これにより、一般的に正確に測定できる原点に近いキャリブレーションポイントに対して、広がりを持つ可能性のある原点から遠いキャリブレーションポイントよりも高い重み付けを与えることができるようになります。

$$wt = \frac{\text{最小 (アマウント)}^2}{\text{現在のアマウント}^2}$$

ここで、

現在のアマウント	レベルアマウント
最小 (アマウント)	検量線に使用したすべてのポイント (レベル) のなかで最も低いアマウント
wt	キャリブレーションレベルの重み付けファクタ

1/レスポンス

キャリブレーションポイントは1/レスポンスのファクタで重み付けされ、最大の重み付けファクタが1となるように最小レスポンスに対してノーマライズされます。原点が含まれる場合は、その他の各キャリブレーションポイントの重み付けの平均値が原点に割り当てられます。

$$wt = \frac{\text{最小 (レスポンス)}}{\text{現在のレスポンス}}$$

ここで、

現在のレスポンス	レベルレスポンス
最小 (レスポンス)	検量線に使用したすべてのポイント (レベル) のなかで最も低いレスポンス
wt	キャリブレーションレベルの重み付けファクタ

1/レスポンススクウェア

キャリブレーションポイントは1/レスポンス²のファクタで重み付けされ、最大の重み付けファクタが1となるように最小レスポンスに対してノーマライズされます。二次のキャリブレーションポイントの重み付けは、たとえばキャリブレーションポイントの広がりを調整するために使用することができます。これにより、一般的に正確に測定できる原点に近いキャリブレーションポイントに対して、広がりを持つ可能性のある原点から遠いキャリブレーションポイントよりも高い重み付けを与えることができるようになります。

$$wt = \frac{\text{最小 (アマウント)}^2}{\text{現在のアマウント}^2}$$

ここで、

現在のレスポンス	レベルレスポンス
最小 (アマウント)	検量線に使用したすべてのポイント (レベル) のなかで最も低いレスポンス
wt	キャリブレーションレベルの重み付けファクタ

検量線モデル

OpenLab CDSは、さまざまなモデルの検量線を計算することができます。以下のモデルがサポートされています（「検量線の計算」119ページを参照）。

- ・ 直線検量線（「直線検量線」121ページを参照）
- ・ 二次曲線近似（「二次曲線近似」122ページを参照）
- ・ 対数近似と指数近似（「対数近似と指数近似」125ページを参照）
- ・ RF 平均近似（「RF 平均近似」126ページを参照）

キャリブレーション済みのそれぞれの化合物に検量線モデルを個別に設定することができます。

原点の取り扱い

検量線を計算するときに、アプリケーションはグラフの原点をさまざまな方法で検討することができます。それぞれの化合物について、このパラメータを単独で設定することができます。検量線のタイプに応じて、固有の原点の取り扱いに関するオプションのみを使用することができます（たとえば、対数の検量線の原点に曲線を強制的に通過させることはできません）。



図 89 原点を無視する



図 90 原点をキャリブレーションに含める

[含む] オプションでは、アマウントが 0 でレスポンスが 0 のポイントがキャリブレーションレベルに追加されます。



図 91 原点に検量線を強制的に通過させる

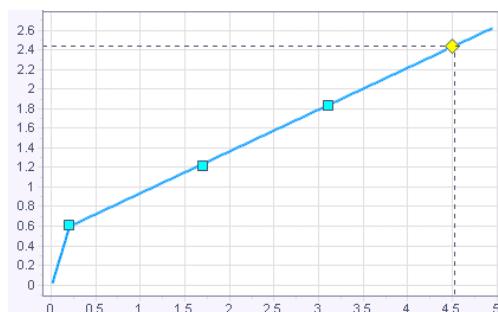


図 92 (計算に含まれない) 原点をつなげる

検量線の計算

各キャリブレーションポイントに検量線をマッチングさせることにより、最適な検量線が計算されます。検量線の計算は、残差二乗和を最小化させる最小二乗法（LSQ）に基づいて行なわれます。検量線タイプは、重み付けされたキャリブレーションポイントに適用されます。計算は、レスポンスファクタの定義によって異なります（RFの定義については、「レスポンスタイプとレスポンスファクタ」107ページを参照すること）。

RFをレスポンス/アマウントとして定義した場合：

$$\Sigma(wt * (CalPointArea - CalculatedArea)^2) = \min$$

ここで、

Σ	すべてのキャリブレーションポイント（レベル）の和
CalculatedArea	検量線から読み取られる、キャリブレーションレベルのアマウントにおける面積
CalPointArea	キャリブレーションレベルの面積
wt	キャリブレーションポイントの重み付けファクタ

$$\Sigma(wt * (CalPointHeight - CalculatedHeight)^2) = \min$$

ここで、

Σ	すべてのキャリブレーションポイント（レベル）の和
CalculatedHeight	検量線から読み取られる、キャリブレーションレベルのアマウントにおける高さ
CalPointHeight	キャリブレーションレベルの高さ
wt	キャリブレーションポイントの重み付けファクタ

RF を アマウント/レスポンスとして定義した場合：

$$\Sigma(wt * (CalPointAmount - CalculatedAmount)^2) = \min$$

ここで、

Σ	すべてのキャリブレーションポイント (レベル) の和
CalculatedAmount	検量線から読み取られる、キャリブレーションレベルの面積または高さにおけるアマウント
CalPointAmount	キャリブレーションレベルのアマウント
wt	キャリブレーションポイントの重み付けファクタ

検量線を計算するためのパラメータ

すべての検量線では、以下のパラメータを使用できます。

a、b、c 検量線の係数

x	レスポンス/アマウントの場合： アマウント (ESTD) 、またはアマウント比 (ISTD) アマウント/レスポンスの場合： 面積、面積%、高さ、または高さ% (ESTD) 面積比または高さ比 (ISTD)
---	---

y	レスポンス/アマウントの場合： 面積、面積%、高さ、または高さ% (ESTD) 面積比または高さ比 (ISTD) アマウント/レスポンスの場合： アマウント (ESTD) 、またはアマウント比 (ISTD)
---	---

wt	キャリブレーションレベルの重み付けファクタ
----	-----------------------

直線検量線

検量線の計算は、最小二乗法に基づきます（「検量線の計算」 119 ページを参照）。

検量線の式：

$$y = a * x + b$$

ここで、

a スロープ

b γ 切片

検量線の係数の計算：

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

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

直線検量線にはキャリブレーションポイントが2つ以上必要です。

原点を含む

原点が含まれる場合は、 $(0,0)$ のポイントがその他のポイントに追加されて、その他のポイントの重み付けの平均値によって重み付けされます。つまり、 $\Sigma(wt)$ の項がその他のポイントの重み付けの平均値によって増加されます。

原点強制通過

原点強制通過のオプションを選択すると、検量線の式は以下のようになります。

$$y = a^* x$$

として、

アスローブ

検量線の係数の計算:

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

原点を含む、あるいは原点を強制通過する場合、必要なキャリブレーションレベルは1つだけです。

二次曲線近似

二次曲線の式：

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

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

二次曲線近似に使用する係数の計算

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

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

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

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

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

二次曲線の正規方程式：

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

マトリックス方程式で記述した場合：

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

Crout の分解：

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

値の省略形：

$$L11 = W$$

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

$$L21 = XW$$

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

$$L31 = X2W$$

$$L22 = X2W - L21 * U12$$

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

$$L32 = X3W - L31 * U12$$

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

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

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

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

$$a' = z2$$

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

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

最後に、逆ノーマライズする必要があります：

$$c = c'$$

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

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

原点強制通過

原点強制通過オプションを選択すると、正規方程式を作成するときにオフセットの項 **a** がゼロに設定されます。

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

$$L11 = X2W$$

$$U12 = \frac{X3W}{L11}$$

$$L21 = X3W$$

$$L22 = X4W - (L21 * U12)$$

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

$$z1 = \frac{X2YW - (L21 * z0)}{L22}$$

$$a' = z1$$

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

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

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

原点を含む

原点が含まれる場合は、(0,0) のポイントがその他のポイントに追加されて、その他のポイントの重み付けの平均値によって重み付けされます。つまり、 $\Sigma(wt)$ の項がその他のポイントの重み付けの平均値によって増加されます。

対数近似と指数近似

対数近似と指数近似

対数近似と指数近似を計算するために、アマウントまたはレスポンスのスケールは \ln 関数を使用して変換されます。直線カーブフィットと重み付けファクタは変換後のデータに適用され、検量線は変換後のデータで計算されます。

【原点を含む】および【原点強制通過】オプションは、原点における \ln 関数の特異性により無効になります。

対数

検量線の式：

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

変換： x のスケールが変換されます。

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

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

指数

検量線の式：

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

変換： y のスケールが変換されます。

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

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

Log/Log 近似

log/log近似を計算するために、アマウントまたはレスポンスのスケールはlog関数を使用して変換されます。直線カーブフィットと重み付けファクタは変換後のデータに適用され、検量線は変換後のデータで計算されます。

【原点を含む】および【原点強制通過】オプションは、原点におけるlog関数の特異性により無効になります。

検量線の式：

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

変換： x と y のスケールは変換されます。

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

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

RF 平均近似

RF 平均の式：

$$y = a * x$$

ここで、

$$a \quad \text{スロープ}$$

アプリケーションは最初にキャリブレーションサンプルごとにレスポンスファクタ (RF) を計算します。次に、すべてのレスポンスファクタが平均されます。RF 平均は検量線の凡例で示され、線のスロープに対応しています。（「レスポンスタイプとレスポンスファクタ」107 ページ）

原点強制通過オプションが自動的に使用されることから、Y切片は常にゼロになります。重み付け方法は自動的に【なし】に設定されます。

RF 平均近似では、 r と R^2 が関連しておらず、計算されていません。

検量線の評価

統計的な計算を用いて、検量線のキャリブレーションレベルに適切か、異常値（検量線から遠く離れている測定値）の存在を評価することができます。検量線の計算を行なうと、各検量線の相関係数と相対標準偏差が得られるとともに、各キャリブレーションレベルの相対残差値が得られます。

検量線のベリフィケーション

計算が終了すると検量線のベリフィケーションが行なわれ、以下の場合には警告がセットされます。

- ・ 検量線の計算に必要な十分なキャリブレーションポイントがない
- ・ カーブスロープがゼロまたは負である
- ・ スロープが無限の値になる
- ・ 検量線を計算できない（たとえば、数値のオーバーフローが生じている）

相対残差

残差は、計算された検量線からキャリブレーションポイントまでの距離の指標です。

$$\text{残差} = y_i - Y_i$$

ここで、

y_i キャリブレーションモードに応じて測定されたレスポンス
(面積または高さ) またはアマウント

Y_i レベル i に対して予測されるレスポンスまたはアマウント
(検量線を使用して計算される)

相対残差は、以下の式を使用して各キャリブレーションレベルについて計算されます。

$$\text{相対残差} = \frac{\text{残差}}{Y_i} = \frac{(y_i - Y_i)}{Y_i}$$

ここで、

y_i 測定されたレスポンス（面積または高さ）またはアマウント

Y_i レベル i に対して予測されるレスポンスまたはアマウント
(検量線を使用して計算される)

相対残差は、% 単位で報告されることがよくあります（[相対残差 %]）。その場合は、[相対残差] に 100 を掛ける必要があります。

検量線の統計値

検量線の計算を行なうと、各検量線の相関係数、決定係数、および残差標準偏差が得られます。

相関係数

相関係数 (r) によって、データポイント間の検量線のフィットが測定できます。この値は次の式を使用して計算されます。

$$r = \frac{\sum (y_i - \bar{y}) * (Y_i - \bar{Y}) * w_{t_i}}{(\sum (y_i - \bar{y})^2 * w_{t_i}) * \sum (Y_i - \bar{Y})^2 * w_{t_i})^{1/2}}$$

変数の意味は次のとおりです。

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

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

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

変数の意味は次のとおりです。

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

および

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

変数の意味は次のとおりです。

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

【原点強制通過】 では、ポイントはゼロを中心に分布している（第三象限に反転している）と見なされ、平均値はゼロで置き換えられます。サードパーティの計算プログラムでは異なるアプローチを使用する場合があり、この場合は結果がわずかに異なります。

相関係数は、完全に一致している場合は 1 になります。個々のキャリブレーションポイントまたは平均キャリブレーションポイントが回帰曲線から逸脱すると、相関係数は小さくなります。通常は 0.99 から 1 までの値をとります。相関係数は分析メソッドの精度の直接的な評価基準ではありませんが、小さい値は精度が低いことを示します。

決定係数

決定係数 (R^2) は、以下のように計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

R^2	決定係数
\bar{y}	測定されたレスポンスまたはアマウントの平均値 検量線が原点を強制的に通過する場合（解析メソッドの 【原点】 = 【強制通過】）、OpenLabCDSは中心に位置しない決定係数を計算します。この場合、 \bar{y} は省略されます。
y_i	測定されたレスポンスまたはアマウント。レスポンスは、面積（面積、面積%、または面積比（ISTD メソッド））または高さ（高さ、高さ%、または高さ比（ISTD メソッド））の場合があります。アマウントは、絶対アマウントまたはアマウント比（ISTD メソッド）の場合があります。値のタイプはキャリブレーションモードによって変わります。
Y_i	予測されるレスポンスまたはアマウント（検量線を使用）

残差標準偏差

残差標準偏差（二乗平均平方根誤差と呼ばれることもあります）は、以下の式を用いて計算されます。

$$\text{残差 SD} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - Y_i)^2}{(n - d)}}$$

ここで、

$d = 3$	二次曲線の自由度、原点の強制通過なし
$d = 2$	原点の強制通過を伴う二次曲線の自由度、または線形曲線の自由度、原点の強制通過なし
$d = 1$	原点の強制通過を伴う線形曲線の自由度
残差 SD	残差標準偏差
y_i	測定されたレスポンス（面積、面積比（ISTD メソッド）、高さまたは高さ比（ISTD メソッド））、またはアマウント（アマウント、アマウント比（ISTD メソッド））で、キャリブレーションモードによる

Y _i	予測されるレスポンスまたはアマウント（検量線を使用）
n	キャリブレーションポイントの数

[原点を含む] 検量線タイプの場合は、計算の中で正則点として原点(0,0)が含まれ、n によってカウントされます。

Y-値は重み付けされません。

残差標準偏差は、相関係数よりも感度の高い検量線品質の指標です。完全にフィットしている場合、残差標準偏差はゼロになります。残差標準偏差値が大きくなるにつれて、キャリブレーションポイントは検量線から離れていきます。

標準偏差

標準偏差は、**母集団の標準偏差**の式で計算されます。

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

ここで、

σ	標準偏差
N	サンプルの数
x_i	測定されたレスポンスまたはアマウント値。検量線モデル RF 平均 の場合、シングルサンプルの化合物のレスポンスファクタ RF です。
μ	平均値。検量線モデル RF 平均 の場合、すべてのサンプルの化合物の平均レスポンスファクタです。

注記

検量線モデル **RF 平均**の場合：通常、母集団（キャリブレーションポイント数）が少ないため、サンプル母集団の標準偏差の代わりにこの式が使用されます（分母として N-1）。

相対標準偏差

相対標準偏差は、以下のように計算されます。

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

ここで、

RSD 相対標準偏差

σ 標準偏差

μ 平均値

6 定量

定量とは	135
定量の計算	135
補正ファクタ	136
倍率	136
希釈率	136
濃度とアマウント %	137
面積% および高さ%	138
キャリブレーションされた化合物の定量	139
ESTD 計算	139
ISTD 計算	140
キャリブレーションされていない化合物の定量	144
キャリブレーション化合物を使用した間接定量	144
マニュアル RF を使用した定量	145
同定されていないピークの定量	147
固定レスポンスファクタを使用した同定されていないピークの定量	147
キャリブレーション化合物を使用した同定されていないピークの定量	147
ノーマライズ	148
Norm 濃度の計算	149
Norm アマウントの計算	150
グループの定量	151
タイムグループの定義	151
タイムグループの定量	153
グループの定義	157
グループの定量化	158

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

定量とは

ピークの積分と同定が終わった後の、次の分析のステップは、定量です。定量では、ピークの面積または高さを使用してサンプル内の化合物のアマウントが決定されます。

定量分析には多くのステップが含まれています。その概要を以下に示します。

- アマウントが分かっていない化合物を含むサンプルを分析して、未知のアマウントによるレスポンスを求める。
- 未知のアマウントのレスポンスと既知のアマウントのレスポンスを比較して、含まれている化合物の量を決定する。

未知サンプルのレスポンスと既知サンプルのレスポンスを正しく比較するためには、同じ条件でデータを取得および処理する必要があります。

定量の計算

OpenLab CDS は、混合物中に含まれる各成分のアマウントを求めるために、以下の計算方法を提供しています。

- 面積% または高さ% (Area% または Height%)
- マニュアル RF を使用した定量
- 絶対検量線法 (ESTD)
- 内部標準法 (ISTD)
- キャリブレーション化合物を使用した間接定量

未知サンプルに含まれる化合物の濃度を求めるために使用される計算は、定量のタイプによって異なります。各計算方法では、ピークの面積または高さを計算に使用してさまざまなタイプの分析を処理しています。

補正ファクタ

定量の計算には、**倍率**（化合物または注入の倍率）と**希釈率**などの補正ファクタが適用されます。これらのファクタは、さまざまなサンプル成分、濃度、サンプル希釈率、サンプルアマウント、化合物純度に対する検出器レスポンスの変動を補正するため、および単位変換のために、キャリブレーション手順で使用されます。

倍率

倍率は、各化合物の結果を乗算するための各計算式に使用されます。倍率を使用して、単位を変換して濃度を示したり、あるいは濃度を補正して、標準化合物のさまざまな純度を補正したりすることができます。

倍率は、注入データ（注入リストまたはシーケンステーブル）および化合物（キャリブレーションテーブル、解析メソッドの一部）に対して設定されます。OpenLab CDSの中で、最大で5つの注入データ倍率と化合物倍率を1つ設定することができます。

既知の化合物の倍率を以下に示します。

$$\text{倍率} = \text{化合物倍率} * \text{注入データ倍率 1} * \text{注入データ倍率 2} * \dots$$

希釈率

希釈率とは、濃度を計算するためにアマウントを乗算または除算する際に使用する数です（濃度を参照）。希釈率は、注入データに対して設定されます（注入リストの【**希釈率**】列）。結果のスケールの変更または分析前にサンプル組成の変更を補正するために希釈率を使用します。定数係数の使用を必要とする以外の目的にも希釈率を使用できます。

サンプル希釈率は、最大で5つの希釈率を組み合わせたものです。

$$\text{サンプル希釈率} = \text{希釈率 1} * \text{希釈率 2} * \dots$$

濃度とアマウント %

濃度は、注入結果の **【濃度】** 列に表示されます。

以下の設定に応じて計算結果は異なります（すべての設定は **【化合物】** > **【キャリブレーション】** ノードの **【全般】** タブで設定できます）。

- **濃度と補正アマウント計算**：この設定では、希釈率を除数またはもう一つの乗数として使用します。
- **アマウント % の計算**：濃度をアマウントのパーセンテージ（サンプルアマウントに対する化合物アマウント）として計算します。

【アマウント % の計算】 をオフ（デフォルトの設定）：

$$\text{濃度} = \text{アマウント} * \text{倍率} * \text{希釈率}$$

または

$$\text{濃度} = \text{アマウント} * \frac{\text{倍率}}{\text{希釈率}}$$

【アマウント % の計算】 をオン：

濃度をアマウントのパーセンテージ（サンプルアマウントに対する化合物アマウント）として計算します。

$$\text{濃度} = \left(\frac{\text{アマウント}}{\text{サンプルアマウント}} * 100 \right) * \text{倍率} * \text{希釈率}$$

または

$$\text{濃度} = \left(\frac{\text{アマウント}}{\text{サンプルアマウント}} * 100 \right) * \frac{\text{倍率}}{\text{希釈率}}$$

倍率と希釈率の計算の詳細については、「**補正ファクタ**」136 ページを参照してください。

面積% および高さ%

【面積%】の計算では、シグナルのすべてのピークの合計面積に対する各ピークの面積がパーセンテージとしてレポートされます。【面積%】は、事前にキャリブレーションする必要がなく、検出器に注入されたサンプルのアマウントに依存しません。レスポンスファクタは使用されません。すべての成分が検出器の中で均等に反応する場合、【面積%】は成分の相対アマウントに相応する近似値になります。

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

【高さ%】の計算では、シグナルのすべてのピークの高さの合計に対する各ピークの高さがパーセンテージとしてレポートされます。

【面積%】および【高さ%】の計算には、補正係数は適用されません。

キャリブレーションされた化合物の定量

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

ESTD 計算

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

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

ESTD による分析を準備する際、未知サンプル中の特定の化合物のアマウントの計算が、次の 2 つのステップで行われます。

- 1 この化合物のキャリブレーションポイントを通る検量線の式を、化合物テーブルの **【モード】** および **【原点】** の設定で指定したタイプに適合させて計算します。
- 2 未知サンプル内の化合物のアマウントを、上記の式を使用して計算します。このアマウントはレポートに表示されるか、レポートされる前に、倍率や希釈率を考慮してから使用されます。

シングルレベルキャリブレーション

シングルレベルキャリブレーションの場合のレスポンスファクタは、キャリブレーションポイントのレスポンスとアマウントの単純な比です。 **【原点を含む】** および **【原点強制通過】** をオフにすると、警告が発生します。

レスポンスファクタ RF は、レスポンスとアマウントの比、またはその逆として定義されます（「[RF 定義](#)」 107 ページを参照）。RF を計算するために、アプリケーションはキャリブレーションサンプルの化合物アマウント、およびキャリブレーションサンプルの対応するレスポンスを使用します。

ESTD 結果のシングルレベルキャリブレーションを計算するための公式は、解析メソッドに設定したレスポンスのタイプにより異なります。

アマウント = ピーク面積 / RF

または

アマウント = ピーク高さ / RF

ここで、

アマウント

化合物のアマウント

RF

レスポンスファクタ

濃度の計算の詳細については、「濃度とアマウント %」137 ページを参照してください。

マルチレベルキャリブレーション

マルチレベルキャリブレーションの場合のレスポンスファクタは、検量線によって評価されます。

ISTD 計算

ISTD の手順では、ノーマライズファクタとして機能する既知のアマウントの化合物を追加することにより、ESTD 法の欠点を解消しています。この化合物が**内部標準**であり、キャリブレーションサンプルと未知サンプルの両方に追加されます。

内部標準として使用される化合物は、化学的にもリテンション/マイグレーションタイムもキャリブレーションされた化合物と同等である必要がありますが、クロマトグラフによる識別が可能でなければなりません。

定量

キャリブレーションされた化合物の定量

表9 ISTD手順

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

ISTD の手順を非線形特性を持つキャリブレーションに使用する場合は、計算原理に起因する誤差が系統誤差を引き起こしていないことに注意する必要があります。マルチレベルキャリブレーションでは、ISTD 化合物のアマウントを一定に保つ必要があります。つまり、すべてのレベルについて同一とします。

内部標準法の分析では、対象化合物のアマウントと内部標準物質のアマウントの関係は、2つのピークのレスポンスの比で示されます。

OpenLab CDS は最大 5 つの ISTD 化合物を許容します。

ISTD 計算では、「生」のレスポンスとアマウントの代わりに、相対レスポンスと相対アマウントが使用されます。これらは、目的ピークのレスポンスとアマウントを、対応する ISTD 化合物のレスポンスとアマウントで割ることによって計算されます。

$$\text{相対レスポンス} = \text{レスポンス}/\text{レスポンス}_{\text{ISTD}}$$

$$\text{相対アマウント} = \text{アマウント}/\text{アマウント}_{\text{ISTD}}$$

レスポンスは、面積、面積 %、高さ、高さ % となります（「レスポンスタイルとレスポンスファクタ」 107 ページを参照）。

ISTD キャリブレーションでは、未知サンプル中の特定の化合物の補正されたアマウント比が、複数のステップで計算されます。これらのステージについては、以下のセクションで説明します。

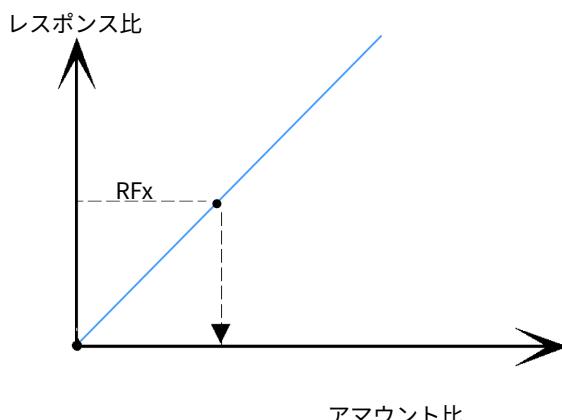
キャリブレーションサンプル

- キャリブレーションポイントは、化合物テーブル内の特定の化合物の、各レベルのアマウント比とレスポンス比を計算することによって設定されます。

アマウント比は、化合物のアマウントをそのレベルの内部標準のアマウントで割ったものです。

レスポンス比は、このレベルの内部標準のレスポンスで割った化合物のレスポンス（面積または高さ）です。

- キャリブレーションポイントを通る検量線の式は、解析メソッドの化合物テーブルで指定されている検量線モデルの種類を使用して計算されます。



未知サンプル

- 未知サンプルの化合物のレスポンスが未知サンプルの内部標準のレスポンスで除算されることで、未知サンプルのレスポンス比が示されます。
- 未知サンプルのアマウント比は、「キャリブレーションサンプル」 142 ページで決定される検量線モデル式、およびサンプル中の ISTD の実際のアマウントを使用して計算されます。

定量

キャリブレーションされた化合物の定量

シングルレベル ISTD キャリブレーション

シングルレベルキャリブレーションの場合、相対レスポンスファクタ (RRF) は、キャリブレーションサンプルのレスポンスとアマウントの値を使用して評価されます。グローバルキャリブレーション設定における RF 定義に応じて、以下の公式のうちのいずれかが適用されます。

RF を レスポンス/アマウントとして定義した場合：

$$RRF = \frac{\text{相対レスポンス}}{\text{相対アマウント}}$$

RF を アマウント/レスポンスとして定義した場合：

$$RRF = \frac{\text{相対アマウント}}{\text{相対レスポンス}}$$

ここで、

RRF	相対レスポンスファクタ
相対レスポンス	相対レスポンス
相対アマウント	相対アマウント

アマウントと濃度は、以下の式に従って、サンプル測定のレスポンス値を使用して計算されます。

RF を レスポンス/アマウントとして定義した場合：

$$\text{アマウント} = \left(\frac{\text{相対レスポンス}}{RRF} \right) * \text{アマウント}_{ISTD}$$

RF を アマウント/レスポンスとして定義した場合：

$$\text{アマウント} = RRF * \text{相対レスポンス} * \text{アマウント}_{ISTD}$$

ここで、

アマウント	化合物アマウント
相対レスポンス	相対レスポンス
RRF	相対レスポンスファクタ
アマウント _{ISTD}	内部標準のアマウント

マルチレベルキャリブレーションの場合の相対レスポンスファクタは、検量線によって評価されます。

濃度の計算の詳細については、「濃度とアマウント %」 137 ページを参照してください。

キャリブレーションされていない化合物の定量

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

キャリブレーション化合物を使用した間接定量

キャリブレーション化合物のキャリブレーションデータをキャリブレーションされていない化合物の定量化に使用すると、キャリブレーション化合物は解析メソッド内で同定されます（【キャリブレーション】ノード、【化合物テーブル】タブ：【モード】で【リファレンス】を選択します）。計算は、キャリブレーション化合物の場合と同じです。リファレンス化合物を ISTD メソッドで定量すると、リファレンス化合物の場合と同じ方法で、キャリブレーションされていない化合物に ISTD が使用されます。

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

オプションとして、リファレンス化合物のレスポンスファクタからアマウントを計算する前にピークのレスポンスに乗算するための補正ファクタ（【リファレンス補正】）を入力することができます。

定量

キャリブレーションされていない化合物の定量

マニュアル RF を使用した定量

本ソフトウェアを使用すると、ユーザーは固定レスポンスファクタ（マニュアル RF 列）に基づいて同定されている化合物を定量することができます。この場合、化合物のアマウントは固定レスポンスファクタを使用して計算されます。

$$\text{アマウント} = \text{レスポンス} * \text{マニュアル RF}$$

ここで、

マニュアル RF	固定レスポンスファクタ
レスポンス	レスポンスは、面積、面積 %、高さ、高さ %、 相対 レスポンス アマウント（「レスポンスタイル」と「レスポンスファクタ」 107 ページを参照）

濃度の計算の詳細については、「濃度とアマウント %」 137 ページを参照してください。

ISTD メソッドを使用したマニュアル RF の利用

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

$$\text{相対エリア} = \text{エリア}/\text{エリア}_{\text{ISTD}}$$

または

$$\text{相対高さ} = \text{高さ}/\text{高さ}_{\text{ISTD}}$$

そして、アマウントは以下のように計算されます。

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

または

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

濃度の計算の詳細については、「濃度とアマウント %」 137 ページを参照してください。

定量

キャリブレーションされていない化合物の定量

マニュアル RFとレスポンスファクタ (RF) の依存性

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

$$RF = 1 / \text{マニュアル RF}$$

RFを **アマウント/レスポンス** として定義した場合:

$$RF = \text{マニュアル RF}$$

レスポンスファクタの詳細については、「レスポンスタイプとレスポンスファクタ」 107 ページを参照してください。

同定されていないピークの定量

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

タイムグループの詳細については、「[タイムグループの定義](#)」 151 ページを参照してください。

固定レスポンスファクタを使用した同定されていないピークの定量

この場合、定量モード [\[マニュアル RF\]](#) にてタイムグループを生成します。タイムグループの指定時間範囲には、該当する同定されていないピークが含まれています。

また、定量を完了したピークは除外する必要があります。 [\[各ピークを個々に定量\]](#) オプションを設定すると、同定されていないすべてのピークのアマウントと濃度が固定レスポンスファクタを使用して計算されます。

計算の詳細については、「[マニュアル RF によるタイムグループの定量](#)」 153 ページを参照してください。

キャリブレーション化合物を使用した同定されていないピークの定量

この場合、定量モード [\[リファレンス\]](#) にてタイムグループを生成します。タイムグループの指定時間範囲には、該当する同定されていないピークが含まれています。オプションとして、リファレンス化合物のレスポンスファクタからアマウントを計算する前にピークのレスポンスに乗算するための補正ファクタ（ [\[リファレンス補正\]](#) ）を入力することができます。

また、定量を完了したピークは除外する必要があります。 [\[各ピークを個々に定量\]](#) オプションを指定すると、同定されていないすべてのピークのアマウントと濃度が検量線リファレンスを使用して計算されます。

ノーマライズ

解析メソッドのキャリブレーション全般設定で、ノーマライズしたアマウントを計算させることができます。

ノーマライズ計算には、面積% および高さ% の計算と同様の欠点があります。全体のピーク面積に影響を及ぼすような変更を加えると、個々のピークの濃度計算にも影響します。ノーマライズ計算は、重要な成分がすべて溶出し、積分された場合にのみ使用できます。選択されたピークをノーマライズ計算から除外すると、サンプル内のレポート結果が変更されます。

タイムグループについて詳しくは、「[タイムグループの定義](#)」 151 ページを参照してください。

タイムグループ内で個々のピークを計算する場合、各ピークはアマウント合計に二度含まれることはありません。タイムグループアマウントに含まれます。

Norm% 結果のデフォルトファクターは 100.00 です。ただし、メソッドに異なった数値と単位を設定できます。アマウント合計は、計算済みのすべての化合物アマウントとタイムグループアマウントの合計で、化合物のメインピークのシグナルには依存しません。

ISTD 化合物を計算に含めるか否かを選択できます。除外すると（デフォルト設定）、ISTD アマウントはトータルアマウントに追加されず、ISTD の化合物ノーマライズアマウントは計算されません。

グループの場合、グループアマウントはアマウント合計に含まれません。ただし、ISTD がこのグループに明示的に追加されている場合、ISTD がノーマライズから除外されている場合でも、グループアマウントに追加されます。これによりグループのノーマライズアマウントが 100% より大きくなる場合があります。

Norm 濃度の計算

化合物の Norm 濃度とは、検出されたすべての化合物の濃度の合計に対する対象化合物の濃度を指します。

[ノーマライズされた濃度に補正係数を適用] のチェックボックスの設定により計算は異なります。このチェックボックスは、解析メソッドのキャリブレーション設定に含まれます。

補正係数が適用される場合、化合物の**Norm 濃度**は、濃度計算に応じて以下のように計算されます。

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

または

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

補正係数が適用されない場合、Norm 濃度は以下のように計算されます。

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

ここで、

C_N	Norm 濃度
M_{comp}	解析メソッドで設定された、化合物固有の倍率
A	アマウント
M_{sample}	注入リストまたはシーケンステーブルで設定された、サンプル固有の倍率
D_{sample}	注入リストまたはシーケンステーブルで設定された、サンプル固有の希釈率
f	解析メソッドで定義されたノーマライズファクター

Norm アマウントの計算

化合物の [Norm アマウント] の計算式は以下の通りです。

$$\text{化合物の Norm アマウント} = \frac{\text{ノーマライズ}}{\text{アマウント合計}}$$

ここで、

化合物アマウント	化合物のアマウント
化合物の Norm アマウント	ノーマライズ化合物のアマウント
ノーマライズ	解析メソッドで定義されたノーマライズファクター
アマウント合計	すべての化合物のアマウントとタイムグループのアマウントの和 グループの場合、グループアマウントはアマウント合計に含まれません。タイムグループの場合、[同定ピークを含む] を有効にすると、タイムグループ内の同定された化合物のアマウントは2回カウントされます。

$$\text{グループの Norm アマウント} = \frac{\text{ノーマライズ}}{\text{アマウント合計}}$$

ここで、

グループアマウント	グループのアマウント
グループの Norm アマウント	ノーマライズグループのアマウント
ノーマライズ	解析メソッドで定義されたノーマライズファクター

$$\text{ピーク Norm アマウント} = \frac{\text{ノーマライズ}}{\text{アマウント合計}}$$

ここで、

ノーマライズ	解析メソッドで定義されたノーマライズファクター
ピークアマウント	ピークのアマウント
ピーク Norm アマウント	ノーマライズピークのアマウント

グループの定量

タイムグループの定義

タイムグループは特定のシグナル上で定義され、1つ以上の時間範囲を含みます。グループの予測リテンションタイムは、並べ替えのためにのみ使用され、手入力することができます。

タイムグループは、OpenLab EZChrom のキャリブレーションされていない範囲またはキャリブレーションされた範囲に対応します。

以下にグループ2とグループ3がオーバーラップする3つのタイムグループの例を示します。C1とC2は同定された化合物です。5.689 minで同定されていないピークが両方のグループで評価されます。同定されたピークは、評価するようにグループパラメータが設定されている場合のみ評価されます。

グループ	時間範囲	同定されたピークを含む
グループ1	0.8 min ~ 1.4 min 2.8 min ~ 3.4 min	いいえ
グループ2	3.8 min ~ 5.9 min	はい
グループ3	5.4 min ~ 7.2 min	いいえ

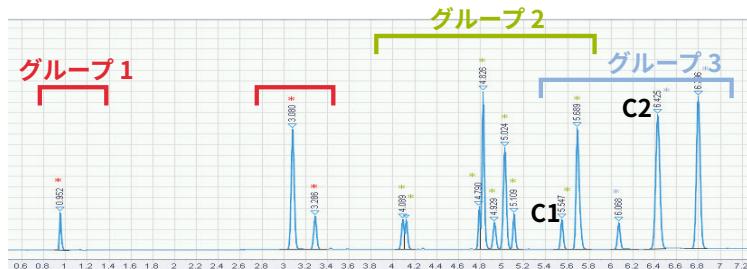


図 93 例：タイムグループ

注記

タイムグループに時間範囲が定義されていない場合、面積、高さ、アマウントは計算されません。タイムグループに時間範囲が定義されているものの（複数可）、範囲内にピークが見つからない場合、面積と高さは0になります。

タイムリファレンス化合物を使用してリテンションタイムを修正すると、タイムグループの開始時間と終了時間も相当量のシフトによって修正されます（「タイムリファレンス化合物の計算」 96 ページを参照）。

定量の場合、時間範囲に含まれる個々のピークの値を合計してグループの面積、高さ、またはスケールレスポンスが計算されます（同定されたピークが含まれるか除外されるかはグループパラメータの設定によって決まります）。

グループのキャリブレーションパラメータを使用してタイムグループがキャリブレーションおよび定量されます。タイムグループは通常の化合物のすべてのキャリブレーションモードおよび定量化モードをサポートします（**検量線、マニュアル RF、リファレンス**）。グループパラメータでは、すべてのピークの個別定量を選択できます。この場合、グループの各ピークはグループのレスポンスファクタ（RF）によって個別に定量されます。

注意：タイムグループはグループ全体のキャリブレーションパラメータを使用します。非線形の検量線やオフセットが大きい検量線と一緒に使用する場合は注意してください。

非線形検量線のタイムグループの使用はお勧めしません。計算の非可換性によって計算結果が不正確になる可能性があります。

グループの検量線のオフセットが大きい場合（切片 (b) 値が大きい場合）、タイムグループウィンドウ内で見つかったすべてのピークにオフセットが均等に分散されます。均等に分散されることによって各化合物が適切に表現されない場合があります。

ピークが複数のグループに属している、または同定されたピークがグループの一部として定量されていると矛盾が生じます。競合の解決の詳細については、「**タイムグループパラメータの評価**」 155 ページを参照してください。

タイムグループの定量

マニュアル RF によるタイムグループの定量

この場合、グループのアマウントは手入力した固定レスポンスファクタに基づいて計算されます。

ESTD:

$$\text{グループアマウント} = \text{グループレスポンス} * \text{マニュアル RF}$$

ここで、

マニュアル RF 固定レスポンスファクタ

グループレスポンス (スケール) レスponsの和

または ISTD:

$$\text{グループアマウント} = \frac{\text{グループレスポンス}}{\text{レスポンス}_{ISTD}} * \text{マニュアル RF} * \text{アマウント}_{ISTD}$$

ここで、

アマウント_{ISTD} 内部標準のアマウント

マニュアル RF 固定レスポンスファクタ

レスポンス_{ISTD} 内部標準の (スケール) レスponsの和

$$\text{グループ濃度} = \text{グループアマウント} * \text{倍率} * \text{希釈率}$$

または

$$\text{グループ濃度} = \text{グループアマウント} * \text{倍率} / \text{希釈率}$$

倍率と希釈率の計算方法の詳細については、「補正ファクタ」136 ページを参照してください。濃度の計算方法の詳細については、「濃度とアマウント %」137 ページを参照してください。

独自の検量線によるタイムグループの定量

独自の検量線に基づいてタイムグループを定量することができます。レスポンススケール [レスポンス/RT] を除き、すべてのキャリブレーションオプションまたはキャリブレーションレベルがサポートされています。ISTD モードでは、ISTD の使用を選択する必要があります。

スケールレスポンス値を選択した場合、スケールレスポンスは個々のスケールレスポンスの合計になります。

リファレンス化合物の検量線によるタイムグループの定量

別の化合物またはタイムグループの検量線を使用してタイムグループを定量することができます。ソフトウェアによって、リファレンス検量線のレスポンスファクタの使用が可能になります。この場合、リファレンス化合物またはグループのレスポンスファクタからアマウントを計算する前にレスポンスに乗算するための補正ファクタ（[リファレンス補正]）を入力することができます。

タイムグループの検量線は、検量線モデルが [直線] で原点を強制通過している場合のみ、リファレンスとして利用できます。ISTD の場合は、リファレンス化合物と同じ ISTD が使用されます。

タイムグループのピークを個々に定量

すべてのピークを個別に定量するように選択した場合は、各ピークアマウントは次のように計算されます。

$$\text{ピークアマウント} = \text{グループアマウント} * \frac{\text{ピークレスポンス}}{\text{グループレスポンス}}$$

$$\text{ピーク濃度} = \text{ピークアマウント} * \text{倍率} * \text{希釈率}$$

または

$$\text{ピーク濃度} = \text{ピークアマウント} * \text{倍率} / \text{希釈率}$$

倍率と希釈率の計算方法の詳細については、「補正ファクタ」136 ページを参照してください。濃度の計算方法の詳細については、「濃度とアマウント %」137 ページを参照してください。

タイムグループパラメータの評価



タイムグループの定義で **【同定ピーカーを含む】** チェックボックスを選択していない場合、グループの結果には1つ以上の時間範囲内で検出された未知ピークの結果のみ含まれます。選択した場合、同定されたピークの結果も考慮されます。

タイムグループの定義で **【各ピーカーを個々に定量】** チェックボックスを選択していない場合、グループにある個々のピークは定量されません。面積、高さ、スケールレスポンスのみ個々のピーク結果として利用できますが、アマウントや濃度は利用できません。選択した場合、指定した時間範囲の各ピークがグループのキャリブレーションパラメータを使って定量されます。この選択の有無で、グループの結果に変更はありません。

競合の解決

ピークが複数のグループに属している、または同定されたピークがグループの一部として定量されていると矛盾が生じます。この場合は次のルールが適用されます。

- 未知のピークが複数のグループに属しており、キャリブレーションレベルを含むキャリブレーションパラメータが両方のグループで定義されている場合：ピークは複数回レポートされますが、常に同じアマウントでレポートされます。ピークは一度しか定量されません。

最初の予測リテンションタイムのグループパラメータを使って定量されます。両方のグループが同じ予測リテンションタイムの場合、最後に作成されたグループが使用されます。

- 同定されたピークがグループの一部として定量されているものの、個別のキャリブレーションパラメータが定義されている場合は、グループのパラメータではなく個別のパラメータで定量されます。
- 同定されたピークがグループの一部として定量され、特定のキャリブレーションパラメータが定義されていない場合、化合物はグループのパラメータで定量されます。グループのレスポンスのタイプ（面積または高さ）が使用されます。
- 同定されたピークがこのグループの**内部標準 (ISTD)** で、グループパラメータ **【同定ピーカーを含む】** が設定されている場合、このピークのレスポンスがタイムグループのレスポンスから減算されます。

スケールレス ポンスによる 定量

[注入結果] ウィンドウの **【スケールレスポンス】** 列に、定量された各ピークのレスポンスが表示されます。グループの検量線がスケールされていない場合、スケールレスポンスはピーク面積または高さと等しくなります。

グループのスケールレスポンスは、タイムグループに含まれる個々のピークのスケールレスポンスの和として計算されます。グループのキャリブレーションと定量は、このスケールレスポンスの和に基づいています。

タイムグループの面積および高さも合計値ですが、これらはレスポンス値にスケールが適用されていない場合のみ計算されます。

グループの定義

グループは、ユーザが選択した化合物とタイムグループで構成されます。各化合物またはタイムグループが個別に同定され、定量されます。ESTD および ISTD の計算は、個々の化合物のキャリブレーションデータに基づいて行なわれます。グループの面積、高さ、アマウント、および濃度は、個々の面積、高さ、アマウント、および濃度を合計することによって計算されます。グループそのものはキャリブレーションされません。1つの化合物が複数のグループで共有される場合もあります。

グループの予測リテンションタイムは、並べ替えのためにのみ使用され、手入力することができます。

グループは、OpenLab EZChrom の [同定ピークグループ] に対応します。

以下に1つの化合物を共有する2つのグループの例を示します。

グループ	グループ 1	グループ 2
含まれる化合物	C1	
	C2	
		C3
	C4	C4
		C5
		C6

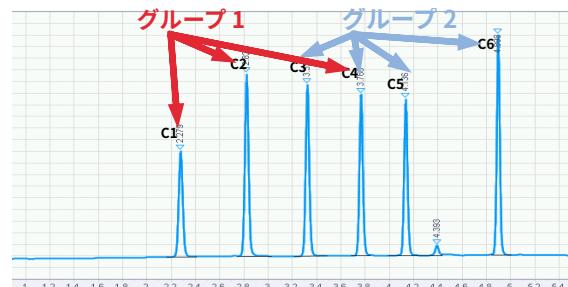


図 94 例：グループ

グループの定量化

グループテーブル内の結果を以下に示します。

グループ面積 = Σ 化合物ピーク面積 + Σ タイムグループ面積

グループ高さ = Σ 化合物ピーク高さ + Σ タイムグループ高さ

グループアマウント = Σ 化合物アマウント + Σ タイムグループアマウント

グループ濃度 = Σ 化合物濃度 + Σ タイムグループ濃度

名前付きグループ内で化合物やタイムグループがまったく同定されなかった場合、名前付きグループは「同定なし」の分析として表示されます。

7 UV スペクトル分析

UV スペクトル分析とは	160
UV 純度チェック	162
ノイズ計算	163
有効スペクトルの決定	164
バックグラウンド補正	164
類似性計算	165
スレッショルド計算	166
純度評価	167
スレッショルド、シミラリティカーブ、および感度について	168
従来の純度プロットとの比較	170
UV 比較	174

この章では、UV スペクトル分析に基づいた純度チェックと化合物同定の確認の概念について説明します。

UVスペクトル分析とは

UVスペクトル解析に固有のさまざまなウィンドウおよび機能があります。これらのウィンドウを表示して機能にアクセスするには、選択した注入データにスペクトルデータが含まれている必要があります (3D UVシステムで測定したデータなど)。

UVスペクトル解析は、日常的に行う分析に追加の品質基準を提供します。

- **化合物同定の確認**

アプリケーションは、UVスペクトルを特定のUVリファレンススペクトルと比較します。高い一致ファクタは、化合物がおそらく同一であるということを示します。

計算の詳細については、UV比較を参照してください。(「UV比較」 174 ページ)

- **UV純度のチェック**

アプリケーションは、すべてのピークのUVスペクトルをピーク頂点スペクトルと比較します。そして、全体の一致ファクタであるUV純度を計算します。UV純度の値が低い場合は、有意に異なるUVスペクトルを持つ共溶出ピークがあることを示します。

計算の詳細については、UV純度チェックを参照してください。(「UV純度チェック」 162 ページ)

UVスペクトル解析は、UV-Vis ダイオードアレイ検出器または蛍光検出器から取り込んだスペクトルデータを処理します。分析データをクロマトグラフデータと一緒に使用する場合に、それに3つ目の次元を追加します (161ページ図95を参照)。

UVスペクトル分析

UVスペクトル分析とは

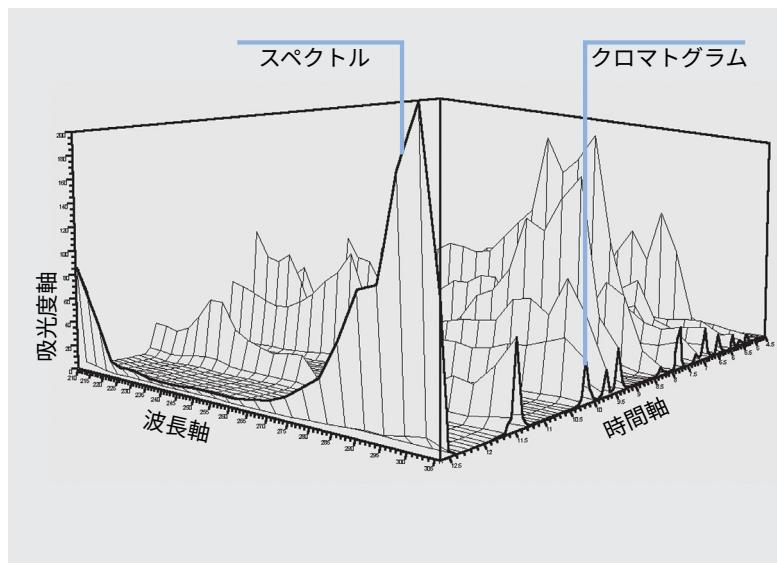


図 95 スペクトル情報

UV 純度チェック

純度チェックでは、ピークが純粋かあるいは不純物を含んでいるかが評価されます。この評価は、ピークの溶出中に記録されたスペクトルの比較に基づいて行われます。ベースライン補正が適用された後、ピークトップでのスペクトルがピーク内の記録されたすべての有効スペクトルと比較されます。その後、スペクトルの類似性の度合いを性格付ける一致ファクタが計算されます。

UV 純度の評価は、アプリケーションによって次の手順で実行されます。

1 ピークあたり

- a** 「ノイズ計算」 163 ページ
- b** 有効スペクトルの決定(「有効スペクトルの決定」 164 ページ)

2 スペクトルあたり：

- a** 「バックグラウンド補正」 164 ページ
- b** 「類似性計算」 165 ページ
- c** 「スレッシュホールド計算」 166 ページ

3 「純度評価」 167 ページ

ノイズ計算

今後の評価の準備として、ベースライン始点とベースライン終点にて、スペクトルの各ピークの次の数値がアプリケーションにより計算されます。

- ・ノイズ変数
- ・ノイズ標準偏差 σ

ベースラインの開始と終了のタイミングは、積分により決まります。複数のピークがドロップラインによってのみ分離されている場合は、すべてのピークについて、ノイズ計算に対して同じスペクトルが使用されます。

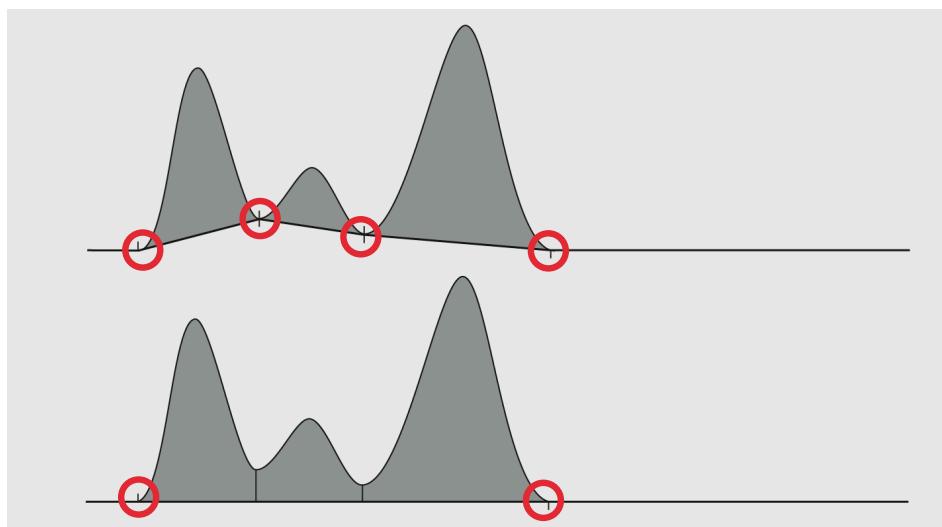


図 96 積分によって決まるベースラインの開始と終了

有効スペクトルの決定

有効なシグナルを持つスペクトルだけを確実に評価するために、レスポンス範囲が小さすぎるスペクトルはフィルタリングにより除外されます。以下が該当する場合のみ、スペクトルが以降の計算に使用されます。

- レスポンス範囲が 3σ より大きい。
- レスponsス範囲がピーク頂点スペクトルのレスポンス範囲の 10 % より大きいか等しい。各スペクトルのレスポンス範囲は、最大 - 最小レスポンスとして計算されます。

バックグラウンド補正

ベースライン補正については、以下のスペクトルが評価されます。

- ピークのベースライン始点でのスペクトル
- ピークのベースライン終点でのスペクトル

ベースラインの開始と終了のタイミングは、積分により決まります。複数のピークがドロップラインによってのみ分離されている場合は、すべてのピークについて、バックグラウンド補正に対して同じスペクトルが使用されます（[163ページ 図96](#)を参照）。

2つのベースラインスペクトルの線形補間が計算されます。個々のピークスペクトルそれぞれを補正するために、対応するリテンションタイムで補間スペクトルが減算されます。

類似性計算

バックグラウンドが補正されて残っているピークスペクトルが、バックグラウンドの補正されたピーク頂点スペクトルと比較されます。一致ファクタは、0 (類似性なし) ~ 1000 (同一直線) の範囲内の値です。

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - x_{av}) \cdot (y_i - y_{av})]}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - x_{av})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - y_{av})^2 \right]}}$$

ここで、

r 相関係数

x_i, y_i 検討対象のデータポイントにおける各波長での吸光度、ピーク頂点における各波長での吸光度

n それぞれの時間のデータポイントで取り込まれたスペクトルのデータポイント数（波長データの数。解析メソッドで対象とするスペクトル範囲および測定時のスペクトル取り込みステップにより異なる）

x_{av}, y_{av} 検討対象のデータポイントにおける各波長での吸光度の平均値、ピーク頂点における各波長での吸光度の平均値

$$\text{一致ファクタ (データポイントごと)} = r^2 * 1000$$

スレッショルド計算

感度 50% でのリファレンススレッショルドは、次の式を用いて計算されます。

$$T = 1000 * \left(1 - 0,5 * \left(\frac{VAR_{noise}}{VAR_{peak}} + \frac{VAR_{noise}}{VAR_{target}} \right) \right)$$

ここで、

VAR _{noise}	ノイズスペクトルの計算された分散スレッショルド
VAR _{peak}	ピークスペクトルの分散
VAR _{target}	比較に使用されるスペクトルの分散（ピーク開始からの頂点までのデータポイント純度計算、頂点からピーク終了までのデータポイント純度計算）

ソフトウェアで使用されるスレッショルド (T_s) は感度値によって異なります。スレッショルドは以下の式を用いて計算されます。

感度が 50% より大きい場合：

$$T_s = T + \frac{(1000 - T) \cdot (S - 50)}{50}$$

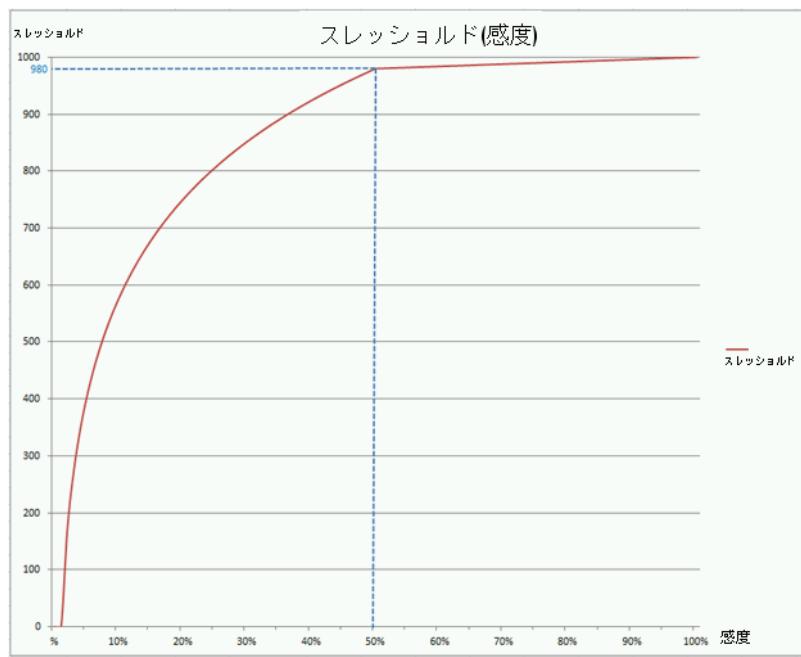
感度が 50% 以下の場合：

$$T_s = T \cdot \frac{\log(S)}{\log(50)}$$

ここで、

T_s	選択した感度 S に対するスレッショルド [0 – 1000]
T	感度 50% でのリファレンススレッショルド
S	感度 [0 - 100] %

個々のスレッショルド値に対して、生データポイントごとに、これらの数式のいずれかが適用されます。



赤色のカーブは、自動的に計算されたスレッショルドカーブです。このカーブに対して自動的に計算されたスレッショルド値は 980 です（感度値 50%）。

純度評価

シミラリティカーブの値は、感度補正されたスレッショルド値および一致ファクタから計算されます。（「スレッショルド計算」 166 ページ, 「類似性計算」 165 ページ）

$$\text{比} = \log((1000 - \text{スレッショルド}) / (1000 - \text{一致ファクタ}))$$

ピークのすべての値がシミラリティカーブに表示されます。シミラリティカーブは [【ピーク詳細】](#) ウィンドウに表示できます。スレッショルドの限界を 0 としたとき、ピークのシミラリティカーブは、純度良好とみなされる正の値と純度が悪いと認められる負の値の領域に分散されるような形で表示されます。

スレッショルド、シミラリティカーブ、および感度について

OpenLab CDS V2.x では、すべてのデータポイントに対してスレッショルドが自動的に計算されます。純度判定の基準は、ピークの感度パーセントの値で調整します。

このため、感度は固定スレッショルド値ではありません。純度チェック感度の値の調整ではスレッショルドが変更されますが、反映の度合いは直線的ではありません。これはそれぞれの生データポイントでのスレッショルドが同一ではありませんからです。例として、2.950 min でのスレッショルド値が998の場合、2.960 min でスレッショルドは必ずしも同じ値にはなりません。すべてのデータポイントでそれぞれスレッショルドが計算されることにより、ピーク全体のスレッショルドカーブが得られます。

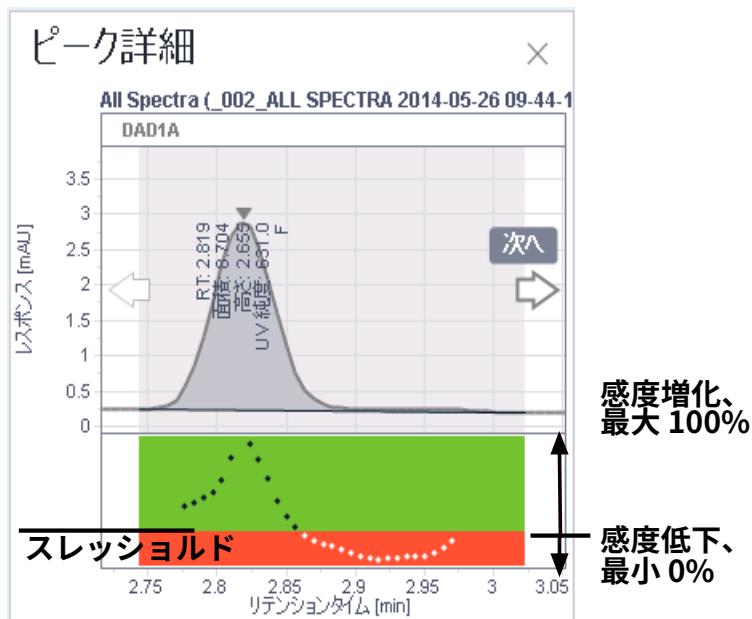


図 97 シミラリティカーブ

次にスレッショルドカーブに純度チェックの感度が適用されます。データ解析では、ピークの表示の下に対数をとったスレッショルドカーブとシミラリティカーブが描かれます。スレッショルドカーブは、表示上では平坦に描かれ、純度良好と純度が悪いと認められる領域の境界となります。シミラリティカーブ（[ピーク詳細] に表示）は、「純度評価」167ページで説明する式を使用して描かれます。スレッショルドの限界を0としたとき、ピーク全体にわたってのシミラリティカーブは、純度良好とみなされる正の値と純度が悪いと認められる負の値の領域に分散されるような形で表示されます。

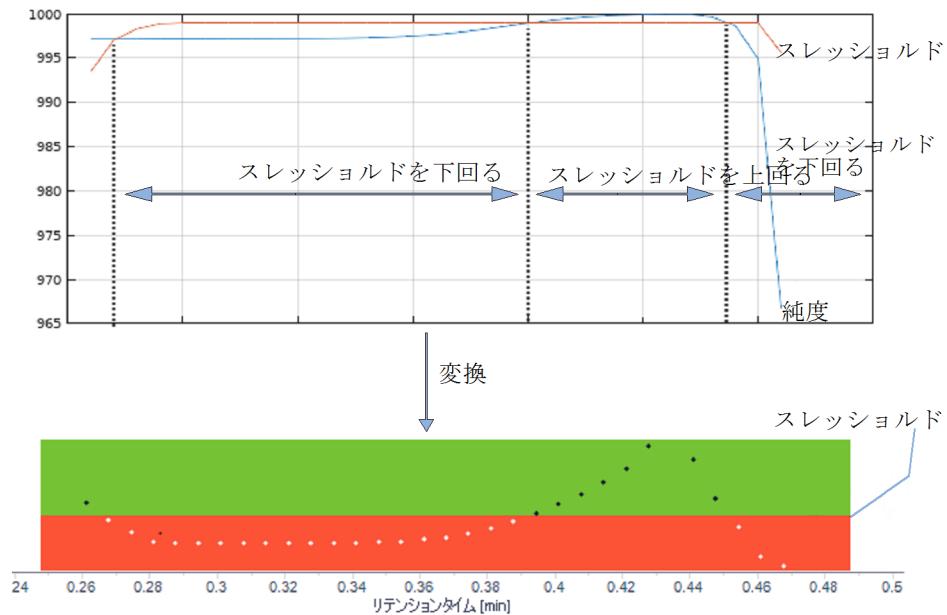


図 98 変換の前後

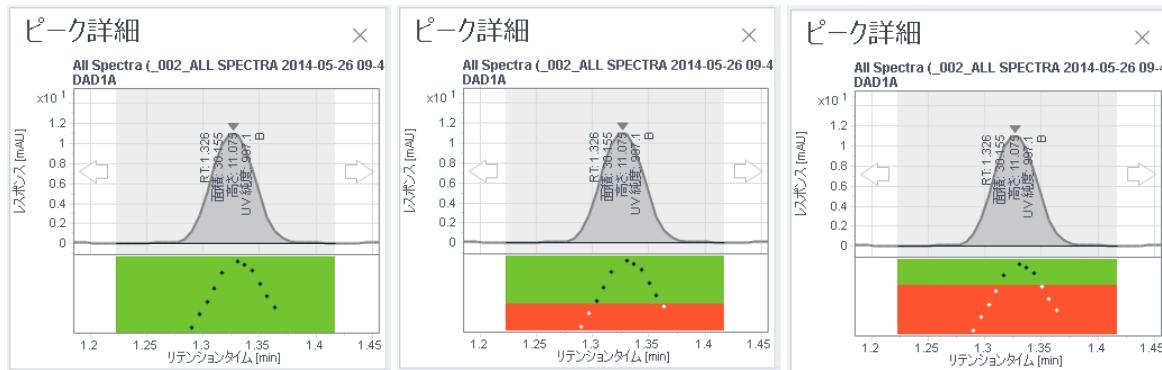
たとえば、

- 一致ファクタ 990、スレッショルド 980 のデータポイント：
 $\text{比} = \log((1000 - 980) / (1000 - 990)) = \log(2) = +0.3$
 この生データポイントは純度基準を満たしています。
- 一致ファクタ 970、スレッショルド 990 のデータポイント：
 $\text{比} = \log((1000 - 990) / (1000 - 970)) = \log(0.33) = -0.48$
 この生データポイントは純度基準を満たしていません。

感度を増減させると、計算されたスレッショルドカーブのプロファイルが変化します。感度の範囲は 0 から 100 % で、デフォルトのスレッショルドは 50 % となります。

シミラリティカーブは非線形（対数）で表示されるため、スレッショルドはデータポイント間で一対一の関係にマッピングされません。感度が 20 % 増減された場合、スレッショルドカーブは上または下に移動し、その振幅も変化します。生データポイントのスレッショルドは +/- 20 % の分だけが変更されるわけではありません。

感度	スレッショルド
0 %	最小値 = 0
0 <= s <= 100	計算されたスレッショルドカーブ (リファレンスカーブ : 50%)
100 %	最大値 = 1000



低感度 - このピークは純粋であると見なされます。

デフォルト感度 - このピークは純粋でないと見なされます。

高感度 - このピークは純粋でないと見なされます。

1つでもデータポイントがスレッショルドを下回る場合、全体的なUVピーク純度ファクターが1000に近い場合でも、ピークは純粋でないとフラグ付けされます。

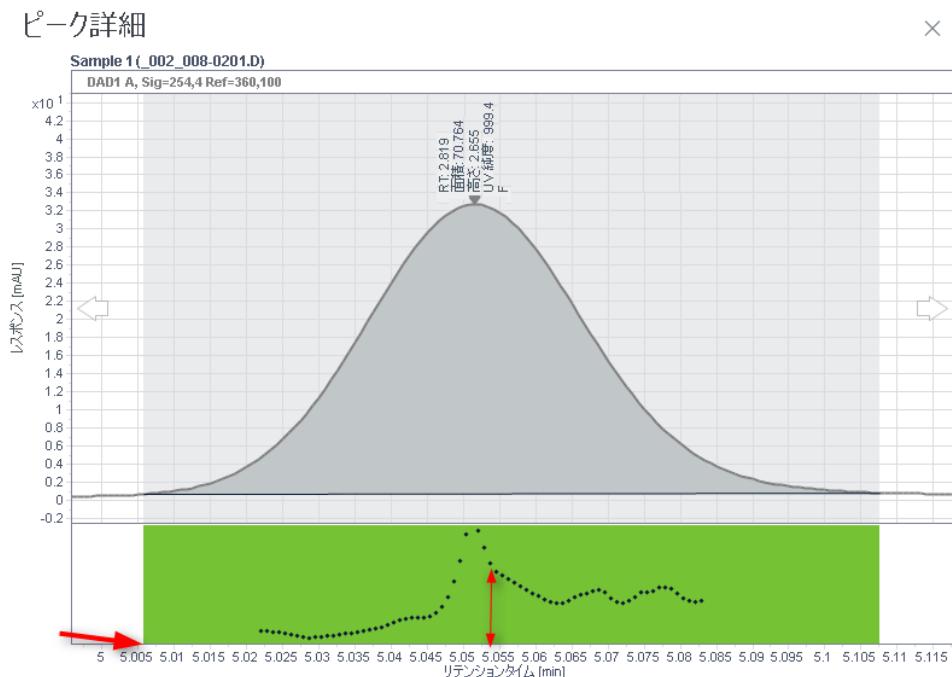
従来の純度プロットとの比較

OpenLab ChemStationには、スレッショルドを固定値にしたり、スレッショルドカーブタイプにするなど、さまざまな計算タイプがあります。固定スレッショルド値では、ピーク全体でのノイズの影響の変動を考慮しません。OpenLab CDS v2.xでは、データポイントごとにこのスレッショルドが自動的に計算され、スレッショルドカーブが作成されます。この場合、感度パーセントを使用して分析の精度が調整されます。

新しいプロットには、ChemStationと同じ情報がより便利な方法で表示されます。クラシカルなスレッショルドカーブの代わりに、クラシカルなスレッショルドカーブに対するスレッショルドの差（デルタ）の対数値が表示されます。これによりフラットなラインが作成され、これがプロットの赤色と緑色の部分の境界線になります。スレッショルドを上回るすべてのポイントは緑色のエリアにあり（黒い点）、スレッショルドを下回るすべてのポイントは赤色のエリアにあります（白い点）。

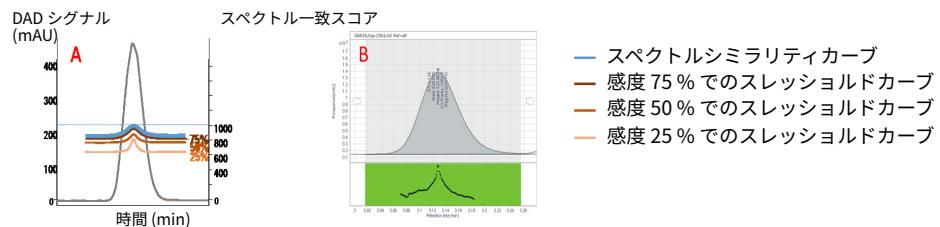
ChemStationと比較して、緑色のエリアと赤色のエリアが反転しています。スレッショルドよりも上が緑で、スレッショルドよりも下が赤になっています。緑色のエリアでは、スレッショルドラインから離れるほど、値が良くなっています。カーブの下の赤色のエリアでは、離れるほど悪くなっています。

すべてがスレッショルドを上回っている場合は、スレッショルドラインはプロットの底部にあります。



以下の例は、OpenLab CDS ChemStation Edition のシミラリティカーブ（逆シミラリティカーブを表示）に類似した従来の純度プロットと、OpenLab CDS v2.x シミラリティカーブとの違いを示しています。

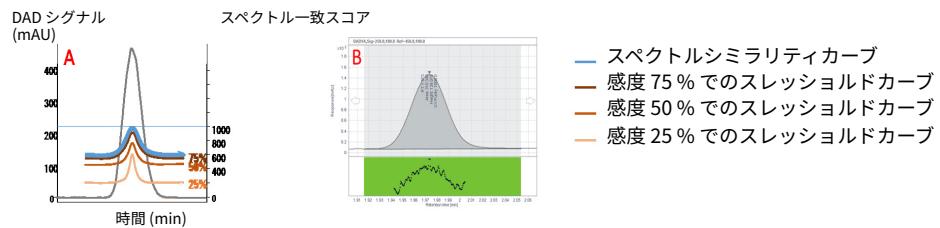
純粹ピーク



1A シミラリティカーブとさまざまな感度で計算されたスレッシュルドカーブの概略ビュー

2B シミラリティカーブのデータ解析ビュー

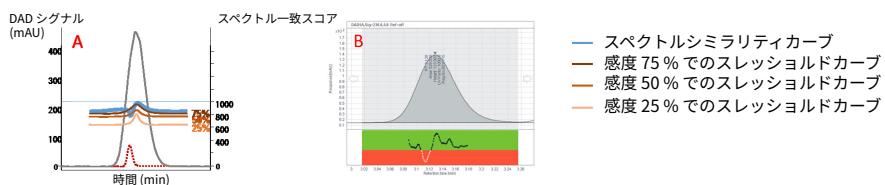
高いノイズ値の純粹ピーク



1A シミラリティカーブとさまざまな感度で計算されたスレッシュルドカーブの概略ビュー

2B シミラリティカーブのデータ解析ビュー

不純ピーク



-
- 1A シミラリティカーブとさまざまな感度で計算されたスレッショルドカーブの概略ビュー
- 2B シミラリティカーブと感度 50% の対数曲線スレッショルドのデータ解析ビュー
-

サマリー

OpenLab CDS v2.x と OpenLab CDS ChemStation Edition とではスレッショルドカーブタイプをメソッドで比較でき、OpenLab CDS v2.x ではリファレンスバックグラウンドノイズがピーク開始時とピーク終了時に自動的に選択され、感度は追加要素であり、OpenLab CDS ChemStation Edition では使用できません。

50 % のデフォルト感度を使用した場合、どちらのクロマトデータシステムでもアルゴリズムは同じですが、ノイズリファレンスが異なるために結果が異なります。感度が増減すると、スレッショルドカーブのプロファイルは OpenLab CDS ChemStation Edition のスレッショルドカーブと比較すると異なります。

UV 比較

UV リファレンススペクトルは、きちんと定義されたクロマトグラフ条件でのリファレンスサンプルから取り出されます。ピーク頂点での現在のスペクトルを UV リファレンススペクトルと比較することによって、化合物の同定を確認できます。2 つのスペクトルの一致ファクタがアプリケーションにより計算されます。

比較のアルゴリズムは、UV 純度チェックに使用されるものと同一です（「類似性計算」165 ページを参照）。バックグラウンド補正は任意で、解析メソッド内で選択できます。

UV 比較で、注入結果の表示が緑色になるには、一致ファクタが指定のリミット値よりも大きくなければなりません。一致ファクタのリミットは解析メソッドで設定します。UV 比較一致ファクタの結果が注入結果に表示されます。

注入結果					
ピーク	サマリー	名前	シグナル情報	RT (min)	UV 比較の一致ファクタ
		4 A	DAD1A	0.895	1000
		15 B	DAD1A	1.330	1000
		18 C	DAD1A	1.789	1000
		23 D	DAD1A	2.272	693
		30 E	DAD1A	2.441	1000
		35 F	DAD1A	2.823	999

図 99　注入結果の UV 比較一致ファクタ

MS サンプル純度 176

MS ピーク純度 178

この章では、質量分析に基づいたサンプル純度計算について説明します。

MS サンプル純度

MS サンプル純度計算では、サンプルが純粋かあるいは不純物を含んでいるかが評価されます。この評価はレスポンスの比較に基づいています。一方には、サンプル内のすべての化合物およびフラグメントのレスポンスがあります。もう一方には、特定のターゲットイオンによって生じたレスポンスがあります。サンプル純度は両方のレスポンスの比率として計算されます。

アプリケーションは選択されたベースシグナルおよび計算に基づいてさまざまな手順を実行し、MS サンプル純度を計算します。

対象ターゲット

- 1 [注入リスト] の [ターゲット] 列で指定されたターゲット質量を取得します (270など)。式が入力されている場合、式から分子量を計算します。
- 2 解析メソッドで指定された付加化合物を適用します (たとえば、+H および+Na、ターゲット質量 270 の場合、ターゲットは 271 および 293 となります)。
- 3 すべてのターゲットの EIC を抽出し、これらの EIC を単一の EIC に合計します。
- 4 その合計された EIC 内のピークのリテンションタイムを決定します。
- 5 ベースシグナルのクロマトグラムで一致するピークを特定します。

一致するピークが特定されると、ターゲットは [検出] としてマークされます。

ベースシグナルを MS 検出器から取得

TIC %の計算を使用

$$\text{MS サンプル純度} = \frac{\text{一致ピーク(TIC)の面積}}{\text{すべての積分ピーク(TIC)の面積}} \times 100$$

EIC/TIC %の計算を使用

$$\text{MS サンプル純度} = \frac{\text{シングルピーク(EIC 合計)の面積}}{\text{すべての積分ピーク(TIC)の面積}} \times 100$$

注記

MS をベースシグナルとして選択し (解析メソッドの [MS サンプル純度] > [プロパティ])、複数の TIC シグナルがある場合、各 TIC シグナルは [サンプル純度結果] ウィンドウの左側のテーブルにベースシグナルとして表示されます。

ベースシグナルを他の検出器 (MS 以外) から取得

$$\text{MS サンプル純度} = \frac{\text{一致ピーク(ベースシグナル)の面積}}{\text{すべての積分ピーク(ベースシグナル)の面積}} \times 100$$

前提

MS サンプル純度は以下の前提で計算されます。

- MS サンプル純度計算は概算であり厳密なものではありません。
- EIC/TIC % 計算の場合：MS データは、ほとんどのイオンアバンダンスが分子イオンクラスターにあるように取り込まれます。ソース内の解離はごくわずかになります。
- MS 以外の検出器からのベースシグナルの場合：その他の検出器は MS 検出器よりもレスポンスが均一かつ一般的です。
- サンプル内のすべての化合物のレスポンスファクタは均一となります。

MS ピーク純度

MS ピーク純度計算は、グループとしてターゲットを構成するスペクトルからのコンポーネントイオンが、他に存在するコンポーネントと比較して何パーセントあるかの推定値です。

アプリケーションは以下のステップで MS ピーク純度を計算します。

- 1 クロマトグラムの全範囲でデコンボリューションを実行します。
 - a 検出された m/z に対して、抽出イオンクロマトグラム (EIC) を作成します。作成する EIC の数 (抽出するイオンの数) は、解析メソッドの **[化合物] > [スペクトル] 、 [MS ピーク純度]** タブで設定できます。
 - b EIC ごとに、ピークのリテンションタイムを検索します。
 - c 同じリテンションタイムで溶出する EIC ピークに基づいてコンポーネントを定義します。
- 2 ターゲット化合物と一致するターゲットコンポーネントを決定します。
 - a アプリケーションが計算に使用する基本パラメータは以下の通りです。
 - m/z デルタ範囲；デフォルト設定 (m/z -0.3 ~ +0.7) 。
 - ターゲット定量対象化合物 m/z ; TIC ピーク頂点で MS スペクトルを抽出し、最高アバンダンスの m/z を検索して取得した値。
 - ターゲット化合物 (現在の化合物) のリテンションタイムウィンドウ；解析メソッドの **[化合物] > [同定]** の値。
 - b デコンボリューションで検出されたコンポーネントごとに、ターゲット定量対象化合物 m/z の m/z デルタ範囲内にあるすべての m/z 値を検索します。
 - c 検索された m/z 値ごとに、ターゲット定量対象化合物 EIC ピークのリテンションタイムウィンドウ内に EIC の頂点があるかどうかを確認します。
 - d こうして最大の該当ピークのあるコンポーネントを探し、それをターゲットコンポーネントとして使用します。
- 3 システムはターゲットコンポーネントを検出できなかった場合、今度は 1/2 のウィンドウサイズ係数を使って、**高分解能モード**でフルサンプル デコンボリューションを実行します。高分解能結果はキャッシュに格納され、標準分解能のコンポーネントリストでは検出できなかったターゲットコンポーネントがないか検索されます。高分解能結果の自動作成により、見逃されていた多数のターゲットコンポーネントを同定することができます。

- 4 システムは、同じ RT と基準ピーク m/z を共有するダブルコンポーネントを検出しようとします。こうしたダブルコンポーネントが存在すると、純度の推定値が大幅に低くなる可能性があります。ダブルコンポーネントは、RT ウィンドウサイズ係数が小さすぎる場合に発生します。システムはこれを正常な状態に戻すため、2倍のウィンドウサイズ係数を使って、低分解能モードでフルサンプル デコンボリューションを再度実行します。低分解能結果はキャッシュに格納され、ダブルコンポーネントに一致するターゲットが検索されます。
- 5 検出されたすべてのコンポーネントは、ターゲット定量対象化合物 m/z の m/z デルタ範囲内にスペクトルピークを持ち、リテンションタイムがターゲットピークと重なる任意のコンポーネントです。
- 6 純度の計算式は以下になります。

$$\text{純度(ターゲット化合物)} = \frac{\text{面積(ターゲット化合物形状)}}{\sum(\text{面積(コンポーネント形状)})}$$

システムスタビリティの評価	181
ノイズ測定	183
標準偏差の 6 倍を使用したノイズ計算	184
最大振幅 (ピーク・トゥ・ピーク) の式を使用したノイズ計算	185
ASTM 法によるノイズ計算	187
二乗平均平方根 (RMS) を使用したノイズ計算	189
SN の計算	190
ドリフトおよびうねり	192
ピークの対称度 10% と対称度の計算	194
システムスタビリティの式および計算	197
パフォーマンステストの定義	198
注記：パフォーマンステストに使用されるリテンションタイム	198
パフォーマンステストの概要	199
真のピーク幅 W_x [min]	201
キャパシティファクタ (USP)、キャパシティ比 (ASTM) k'	202
シンメトリー係数、テーリングファクタ (USP) t	203
カラムごとの理論段数 (USP)	204
1 メートル当たりの理論段数 N [1-m]	204
相対リテンション、選択性	205
分離度 (USP, ASTM) R	205
分離度 (EP/JP) Rs	206
ピークバレー比 (EP/JP)	207

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

システムスタビリティの評価

分析機器の性能、および分析メソッドのパフォーマンスを、サンプル分析前にルーチンとして評価することは、優れた分析の実践法です。また、ルーチン分析の前や、実行中に、分析システムのパフォーマンスをチェックするのも良い考えです。OpenLab には、上記のような 3 つのタイプのテストを自動的に行うためのツールがあります。**機器テスト**には、検出器の感度、ピークリテンションタイムの精度、およびピーク面積精度のテストが含まれます。**メソッドテスト**には、リテンションタイムとアマウントの精度、選択性、および操作における日々の変化に対するメソッドの堅牢性に関するテストが含まれます。**システムテスト**では、アマウントの精度、2 本のピーク間の分離度、およびピークテーリングのテストが含まれます。

ラボによっては、以下の規制に準拠しなければならない場合があります。

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

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

複数の分析結果を照合し、それらの結果を統計的に解析するために、OpenLab CDS では結果セットサマリーレポートの作成機能を提供しています。これらのサマリー用にさまざまなレポートテンプレートが利用できます (SequenceSummary_Extended.rdl など)。テンプレートは必要に応じて編集することができます。

検査は、規制当局や、独立監査法人によって一般的に受け入れられているフォーマットで文書化されます。統計には次のものが含まれます。

- ピークリテンションタイム
- ピーク面積
- アマウント
- ピーク高さ
- 特定の高さでのピーク幅
- ピーク対称度
- ピークテーリング
- キャパシティファクタ (k')

- 理論段数
- ピーク間の分離度
- 先行するピークに関連した選択性

拡張パフォーマンス結果は、リテンションタイムと化合物名でピークを識別するため、キャリブレーションされている化合物に対してのみ計算されます。

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

- カラムの詳細
- 解析メソッド
- サンプル情報
- 測定情報
- シグナル情報およびベースラインノイズ測定
- リテンションタイムまたは化合物名でラベル付けされたシグナル

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

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

ノイズ測定

ノイズは、現在のシグナルの時間範囲のデータポイント値から計算されます。
ノイズは、次の方法で計算されます。

- ドリフトの直線回帰の標準偏差 (sd) の 6 倍
- ピーク・トゥ・ピーク (ドリフト補正済み)
- ASTM 法 (ASTM E 685-93)
- ドリフトの線形回帰の二乗平均平方根 (RMS)

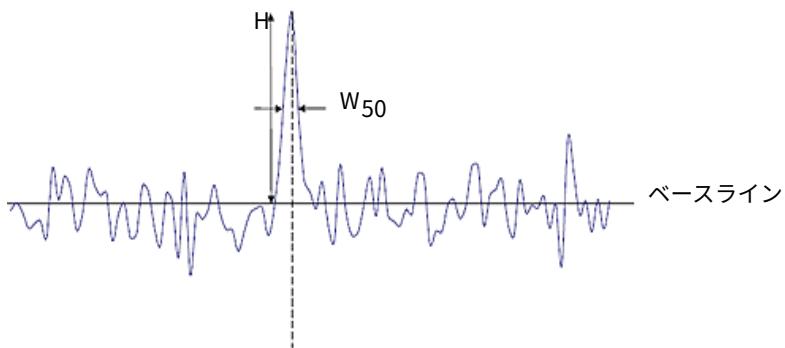


図 100 ピークシグナルおよびノイズのクロマトグラム

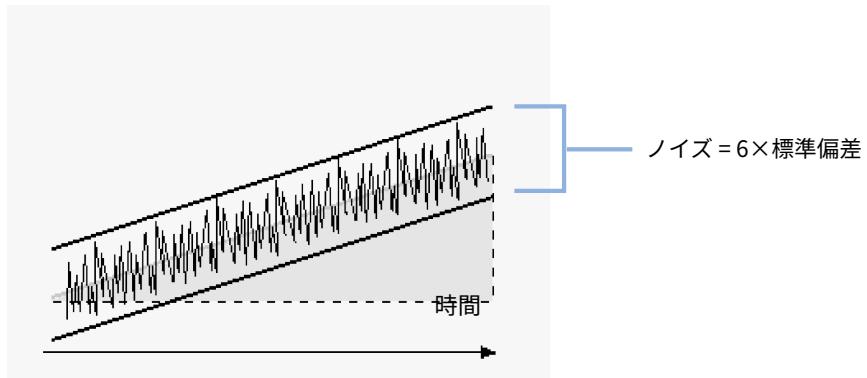
H 一番上からベースラインまでのピークの高さ (ノイズを通過する最適な直線)

W₅₀ ピーク半値幅

注記

非常に小さいピークの場合、アプリケーションがピーク終了後でリテンションタイムを検出し、ネガティブピーク幅になってしまふことがあります。この場合、ノイズ値は計算されません。

標準偏差の6倍を使用したノイズ計算



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

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

ここで、

N 6倍標準偏差法に基づくノイズです。

Std 選択した時間範囲内のすべてのデータポイントの直線回帰の標準偏差です。

最大振幅（ピーク・トゥ・ピーク）の式を使用した ノイズ計算

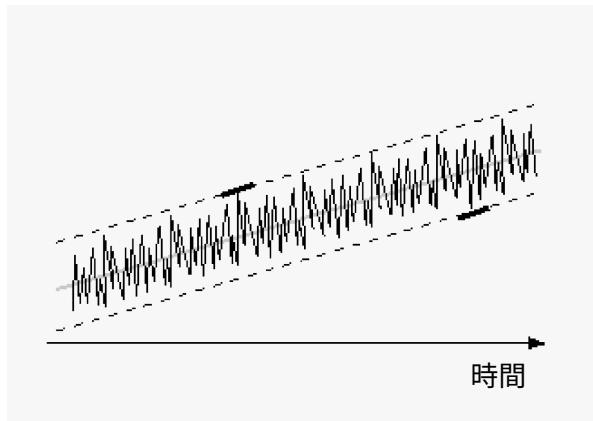


図 101 ピーク・トゥ・ピークノイズとドリフトの図

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

ピーク・トゥ・ピークノイズは、次の式を使用して計算されます。

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

ここで、

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

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

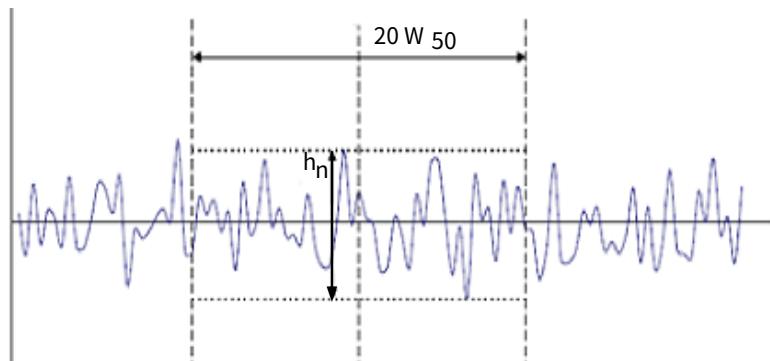


図 102 ブランクサンプルのクロマトグラムからノイズ判断

変数の意味は次のとおりです。

$20 W_{50}$ は、 W_{50} の 20 倍に相当する領域です。

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

ASTM 法によるノイズ計算

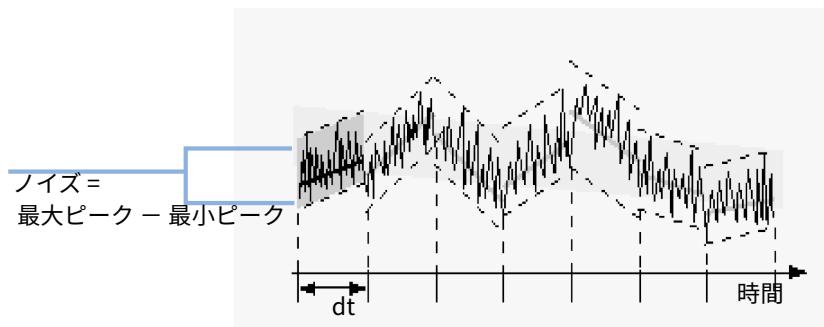


図 103 ASTM 法によるノイズ測定

ASTM ノイズ測定 (ASTM E 685-93) は、American Society for Testing and Materials (ASTM、米国材料試験協会) による定義に従って、液体クロマトグラフィに使用される可変波長光度検出器をテスト用の規格に基づいています。時間範囲の大きさに従って異なる 3 種類のノイズに区別できます。ノイズ決定は、定義された時間範囲内のピーク間の測定に基づきます。

- サイクル タイム、 t

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

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

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

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

- サイクル数、n

サイクル数は以下のように計算されます。

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

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

- 各サイクルのピーク・トゥ・ピークノイズの計算

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

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

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

- ASTM ノイズ

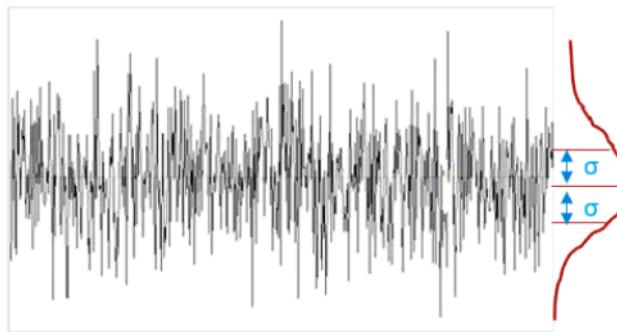
ASTM ノイズは以下のように計算されます。

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

ここでは、 N_{ASTM} は、ASTM 法に基づくノイズです。

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

二乗平均平方根 (RMS) を使用したノイズ計算



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

ノイズは、次の式によって計算されます。

$$RMS = S$$

ここで、

RMS 標準偏差法に基づくノイズ

S 標準偏差

関数 $y(X) = a + bX$ での、選択した時間範囲内のすべてのデータポイントの線形回帰の標準偏差です。

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

ここで、

a Y 切片

b スロープ

N 測定の数

X_i 独立変数、 i 番目の測定

SN の計算

OpenLab CDS には、シグナルノイズの計算に使用するさまざまなオプションがあります。アルゴリズムとノイズ範囲の両方を選択できます。

6 シグマまたは RMS 法

シグナルノイズは、次の式で計算されます。

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

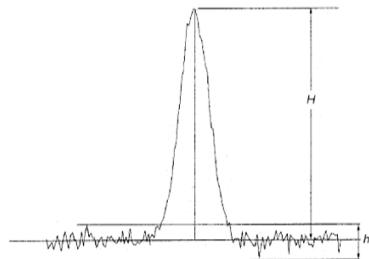


図 104 シグナル/ノイズ (SN 比)

ピーク・トゥ ・ピークまたは は ASTM 法

シグナルノイズは、次の式で計算されます。

$$\text{SN 比} = 2H/h$$

ここで、

H

規定のリファレンス溶液で取り込まれたクロマトグラムの対象コンポーネントに対応するピークの高さ。

h

クロマトグラムのベースラインからの最大ノイズ変動の絶対値です。このクロマトグラムは、注入後またはブランク注入で、指定された標準液で得られたクロマトグラムのピークの周りを、ピークの半値幅の 20 倍の時間を観察して得られます。

ヨーロッパ薬局方の定義により、SN は、ブランクのリファレンスシグナルおよび SN 比率が計算されているピークを含む時間範囲にわたって計算されたノイズに対して計算されます。

ノイズ範囲

ノイズは以下の時間範囲およびシグナルに対して計算できます。

- ・ ブランクリファレンスシグナルでの自動的に決定された時間範囲。ピーク半値幅の 20 倍に等しいノイズ範囲。
- ・ 同じシグナルまたはブランクリファレンスシグナルでの自動的に決定された時間範囲。ピーク半値幅の n 倍に等しいノイズ範囲。
- ・ 同じシグナルまたはブランクリファレンスシグナルでの固定時間範囲
- ・ 同じシグナルまたはブランクリファレンスシグナルでのピーク開始または終了に関連した時間範囲

自動的に決定された時間範囲は、以下のいずれかのアルゴリズムに従って計算されます。

- ・ リファレンスシグナルの長さが十分でない場合
(終了時間 - 開始時間 < $N \cdot W_{50}$)
 - ・ 開始時間 = シグナルの開始時間
 - ・ 終了時間 = シグナルの終了時間
$$N = \text{ピーク半値幅の倍数 (薬局方に応じて 5 ~ 20)}$$
- ・ リファレンスシグナルの長さが十分で、ピークが開始時間に近すぎる場合
($t_R - (N/2) \cdot W_{50} < \text{リファレンスシグナルの開始時間}$)
 - ・ 開始時間 = リファレンスシグナルの開始時間
 - ・ 終了時間 = 開始時間 + $20 \cdot W_{50}$
- ・ リファレンスシグナルの長さが十分で、ピークが終了時間に近すぎる場合
($t_R + (N/2) \cdot W_{50} > \text{リファレンスシグナルの終了時間}$)
 - ・ 終了時間 = リファレンスシグナルの終了時間
 - ・ 開始時間 = 終了時間 - $N \cdot W_{50}$
- ・ リファレンスシグナルの長さが十分で、ピークがリファレンスシグナルの開始時間および終了時間から十分に遠い場合
($t_R - (N/2) \cdot W_{50} > \text{開始時間}, t_R + (N/2) \cdot W_{50} < \text{終了時間}$)
 - ・ 開始時間 = $t_R - (N/2) \cdot W_{50}$
 - ・ 終了時間 = $t_R + (N/2) \cdot W_{50}$

変数の意味は次のとおりです。

t_R はリテンションタイムです。

W_{50} は半値幅です、

N はピーク半値幅の倍数です (薬局方に応じて 5 ~ 20)。

ドリフトおよびうねり

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

ドリフト

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

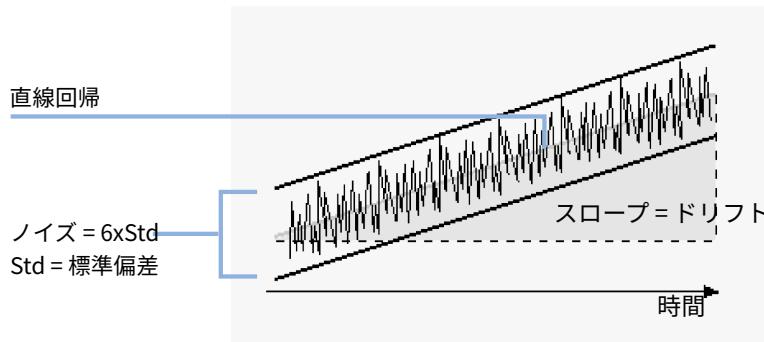


図 105 標準偏差の 6 倍を使用したノイズのドリフト

検量線の式：

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

ここで、

N 測定の数

X_i 独立変数、 i 番目の測定

Y_i 従属変数、 i 番目の測定

係数：

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

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

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

うねり うねりは、ASTM ノイズサイクルにおける中間データ値のピーク to ピークノイズとなります。『標準偏差の 6 倍を使用したノイズ計算』 184 ページを参照してください。

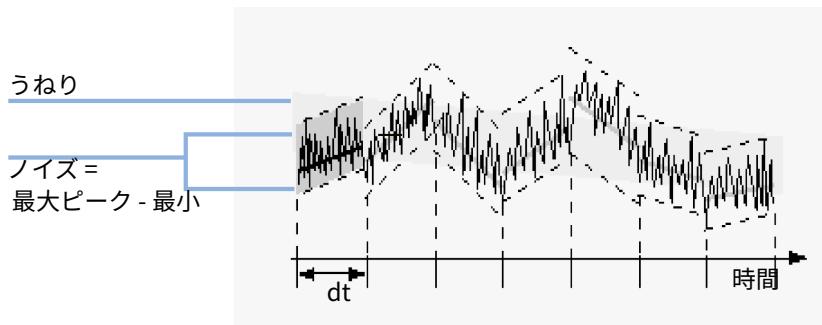


図 106 ASTM メソッドで測定されたノイズのうねり

ピークの対称度 10% と対称度の計算

対称度 10% ピーク対称度 10% は、ピーク高さの 10% での半値幅を比較することで計算されます。

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

ここで、

A_s 対称度 10%

W_{10} ピーク高さ 10% でのピーク幅

$W_{f,10}$ ピーク高さ 10% でのピーク幅のフロント半分

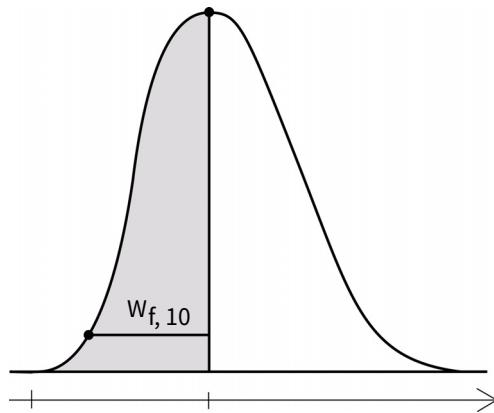


図 107 ピーク対称度の計算

対称度 ほとんどの薬局方では、ピークのシンメトリー係数は 5% での半値幅を比較することで計算されます。OpenLab では、この係数はテーリングファクタとして計算され保存されます（「シンメトリー係数、テーリングファクタ (USP) t」203 ページを参照）。OpenLab では、対称度は以下のモーメント式を使用して整数によって疑似モーメントとして計算されます。

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

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

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

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

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

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

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

ここで、

a_i	スライス面積
t_i	スライス時間
H_f	フロント変曲点の高さ
H_r	バック変曲点の高さ
H	頂点の高さ

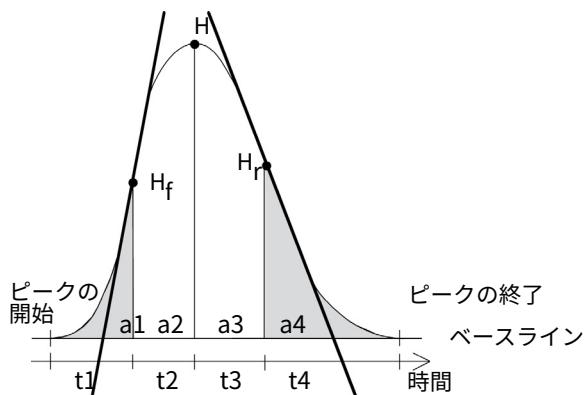


図 108 Cピーク対称度ファクタの計算

システムスタビリティの式および計算

さまざまなシステムスタビリティのテストから結果を取得するのに、次の式が使用されます。結果は、【パフォーマンス＆ノイズ】、【拡張パフォーマンス】レポートを使用してレポートされます。

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

ここで使用される参考文献は以下のとおりです。

- ASTM: セクション E 685 - 93、Annual Book of ASTM Standards、Vol.14.01
- USP: The United States Pharmacopeia, XX. Revision, pp. 943 - 946
USP 2022: US Pharmacopoeia, USP-NF 2022 Issue 3
- EP: European Pharmacopoeia, 11th Edition
- JP: 日本薬局方、第 16 版

パフォーマンステストの定義

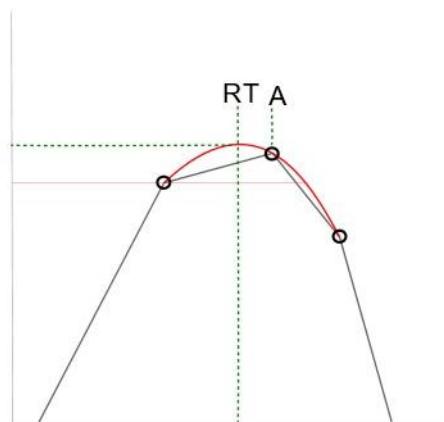
注記：パフォーマンステストに使用されるリテンションタイム

ピークパフォーマンスは、読み込まれたデータの積分ピークで計算でき、新しくマニュアル積分されたピークでも計算されます。アプリケーションは内部で計算されるピークモデルリテンションタイムを使用して、ピーク特性およびカラムパフォーマンスの値を計算します。そのため、注入結果、クロマトグラム、またはレポートに表示されるリテンションタイムとはわずかに異なる場合があります。ピークモデルリテンションタイムはレポートできます（レポートのヘルプのシステムスタビリティ用のデータフィールドを参照、または PeakModelRT を検索）。

注記

以下の図で示され、ピークインテグレータによって決定されたリテンションタイム (RT) は、必ずしも最も高いデータポイントに関連付けられているわけではありません。リテンションタイムは通常、放物線補間モデルを用いて計算されています。つまり、リテンションタイム (RT) は最も高いデータポイントのリテンションタイムより小さいか大きい可能性があり、その高さも最も高いデータポイントより高いか低い可能性があります。

ピークモデルリテンションタイムは、ノイズの干渉を避けるため、シグナルをスムージングすることで計算されます。この後、ピークの RT に最も近い、最も高いデータポイントが決定されます。このデータポイントの RT がピークモデルリテンションタイムとして使用されます。



ここで、

RT 注入結果に表示されたリテンションタイム
A パフォーマンスの計算に使用されるピークモデルリテンションタイム

パフォーマンステストの概要

表 10 OpenLab CDS の薬局方の値

USP	EP	JP	定義	注入結果の列名	レポートで使用するフィールド
シンメトリー係数 またはテーリング ファクタ	シンメトリー係数	シンメトリー係数	$S = \frac{W_5}{2f}$	テーリング	ピーク_テーリングファクタ
分離係数	-	分離係数	$\text{alpha} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$	選択性	ピーク_選択性
相対リテンション	相対リテンション	-	RRT 化合物： $\frac{RT_{peak} - t_0}{RT_{ref} - t_0}$	RRT EP	ピーク_相対リテンションタイム_EP
相対リテンションタイム (RRT)	未調整相対リテンション	未調整相対リテンション	RRT 化合物 $\frac{RT_{peak}}{RT_{ref}}$	RRT	ピーク_相対リテンションタイム
USP 2022: 分離度 分離度	分離度	-	$Rs = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$	分離度 USP 2022 分離度 EP 分離度 JP	ピーク_分離度_EP ピーク_分離度_JP
USP: 分離度	-	-	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t(2)} + W_{t(1)}}$	分離度 USP	ピーク_分離度_USP
理論段数 (効率)	-	-	$n = 16 \left(\frac{t_R}{W_t} \right)^2$	理論段数 USP	ピーク_理論段数_USP

表 10 OpenLab CDS の薬局方の値

USP	EP	JP	定義	注入結果の 列名	レポートで使用するフ ィールド
USP 2022: 理論段数 理論段数 (効率) (効率) ”	理論段数 (効率) ”	理論段数 (効率)	$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{50}} \right)^2$	理論段数 EP 理論段数 JP 理論段数 USP 2022	ピーク_理論段数_EP ピーク_理論段数_JP ピーク_理論段数 USP 2022
SN 比	SN 比	SN 比	P2P または ASTM ノイズ計算： $\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$ 6SD または RMS ノイズ 計算： $\frac{S}{N} = \frac{H}{h}$	SN	ピーク_SN比
ピークバ レー比	ピークバ レー比	ピークバ レー比	$\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}$	ピークバ レー比	ピーク_ピークバ レー 比

真のピーク幅 W_x [min]

W_x = 全体の $x\%$ 高さでのピーク幅

ここで、

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

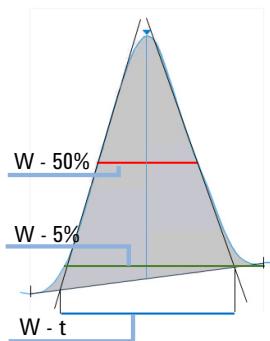


図 109 高さ $x\%$ でのピーク幅

キャパシティファクタ (USP)、キャパシティ比 (ASTM) k'

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

ここで、

t_R ピークのリテンションタイム [min]

t_0 空隙時間 [min] (解析メソッドで指定)

シンメトリー係数、テーリングファクタ (USP) t

注記

シンメトリー係数 (USP、EP、JP) は、テーリングファクタ (USP) と同一です。インテリジェントレポートで "ピーク_テーリングファクタ" として使用できます。199ページ表10も参照してください。

$$S = \frac{W_{50}}{2f}$$

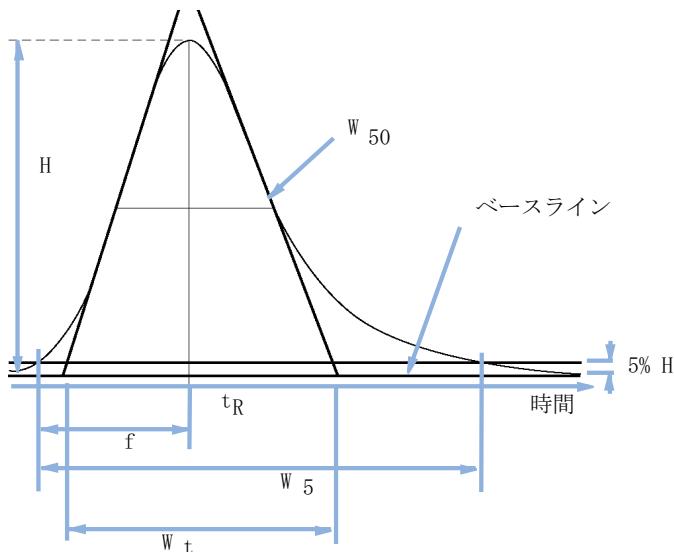


図 110 パフォーマンスパラメータ

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

カラムごとの理論段数 (USP)

タンジェント法 (USP, ASTM) :

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

ここで、

t_R リテンションタイム

W_t タンジェント幅 [min]

半値幅法 (ASTM, EP, JP; USP 2022) :

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

ここで、

t_R リテンションタイム

W_{50} ピーク半値幅 [min]

1 メートル当たりの理論段数 N [1-m]

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

ここで、

n 理論段数

l カラム長さ [cm] (解析メソッドで指定)

相対リテンション、選択性

選択性

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

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

ここで、

$$k'_{(x)}$$

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

相対リテンション (EP)

RRT (EP) は、RRT リファレンスピークが定義され識別されている場合のみ計算できます。アルファ値は、ピークが RRT リファレンスの左にある場合は < 1 になり、ピークが RRT リファレンスの右にある場合は > 1 になります。

$$\frac{RT_{peak} - t_0}{RT_{ref} - t_0}$$

分離度 (USP, ASTM) R

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

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

ここで、

$$t_R$$

リテンションタイム

$$W_t$$

タンジェント幅 [min]

分離度 (EP/JP) Rs

分離度 (USP 2022)、分離度 (JP) および分離度 (EP) は半値幅法で計算されます (パフォーマンスレポートで使用される分離度)。

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

ここで、

t_R リテンションタイム

W_{50} ピーク半値幅 [min]

ピークバレー比 (EP/JP)

ピークバレー比（注入結果のピークバレー比、p/v）は、ピークの分離の度合いを示すために計算されます。ヨーロッパ薬局方および日本薬局方（EP、JP）で計算されます。

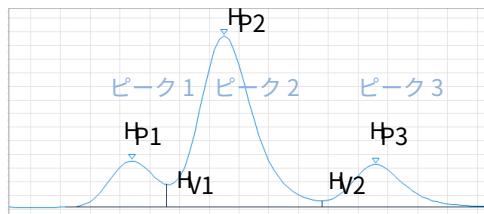
注記

この値は、積分イベントの詳細パラメータで設定したピークバレー比とは異なります。

ピークバレー比は、谷で分離されたピークに対して計算されます。

$$PV = \text{ピーク高さ} / \text{谷の高さ}$$

ピークの左右両側に谷がある場合、ピークバレー比はフロントおよびテールに対して計算されます。最小限のピークバレー比が表示されます。



ピーク 1 :

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

ピーク 2 :

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

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

$$PV = \text{Min}(PV_F, PV_T)$$

ピーク3：

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

ここで、

PV	ピークバレー比
PV _F	ピークバレー比、フロント
PV _T	ピークバレー比、テール
H _{PX}	ピーク x の高さ
H _{VX}	谷 x の高さ

ピークに谷で分離された複数のショルダーがある場合、ピークバレー比はショルダーごとに計算されます。

谷の定義：

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

ピークバレー比の計算では常に絶対値を使用します。このため、1つ以上のピークがネガティブの場合でも、ピークバレー比は常に正の値で表示されます。

注記

ピークバレー比は、シグナルを構成するデータポイントが少なすぎる場合は計算されません。

本書の内容

本書は、Agilent OpenLab CDS で使用している、操作、計算、およびデータ解析のアルゴリズムの原理に関する情報について説明します。本書に記載されている情報を使用して、バリデーション担当者はシステムのバリデーションタスクを計画および実行することができます。

- ChemStation アルゴリズムを使用した積分
- EZChrom アルゴリズムを使用した積分
- ピーク同定
- キャリブレーション
- 定量
- UV スペクトル解析
- 質量分析
- システムスタビリティ

www.agilent.com

© Agilent Technologies Inc. 2012-2024

エディション: 2024 年 1 月

文書番号: D0028019ja Rev. A

