

Agilent OpenLAB CDS ChemStation

エディション

操作原理



Agilent Technologies

注意

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2011

本マニュアル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式や方法（電子媒体による保存や読み出し、外国語への翻訳なども含む）においても、禁止されています。

マニュアル番号

M8301-96022

エディション

7/2011

Printed in Germany

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

本製品は、システムが適切な規制機関で登録を受け関連する規制に準拠している場合、ビトロ診断システムのコンポーネントとして使用できます。それ以外の場合は、一般的な実験用途でのみ使用できます。

ソフトウェアリビジョン

このガイドは、Agilent OpenLAB CDS ChemStation エディションのリビジョン C.01.03 に対して有効です。

Microsoft® は、Microsoft Corporation の米国の登録商標です。

保証

このマニュアルに含まれる内容は「現状のまま」提供されるもので、将来のエディションにおいて予告なく変更されることがあります。また、Agilent は、適用される法律によって最大限に許可される範囲において、このマニュアルおよびそれに含まれる情報に関して、商品性および特定の目的に対する適合性の暗黙の保証を含みそれに限定されないすべての保証を明示的か暗黙的かを問わず一切いたしません。Agilent は、このマニュアルまたはそれに含まれる情報の所有、使用、または実行に付随する過誤、または偶然的または間接的な損害に対する責任を一切負わないものとします。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の文書の条項と矛盾する場合は、別の契約の保証条項が適用されます。

技術ライセンス

このマニュアルで説明され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いて提供され、そのライセンスの条項に従って使用またはコピーできます。

安全に関する注意

注意

注意は、危険を表します。これは、正しく実行しなかったり、指示を順守しないと、製品の損害または重要なデータの損失にいたるおそれがある操作手順や行為に対する注意を喚起します。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、危険を表します。これは、正しく実行しなかったり、指示を順守しないと、人身への傷害または死亡にいたるおそれがある操作手順や行為に対する注意を喚起します。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。

このガイドの内容

このガイドは、上級者のユーザー、システム管理者、および Agilent OpenLAB CDS ChemStation エディションを検証する担当者向けに用意されています。Agilent OpenLAB CDS ChemStation エディションで使用される、操作方法、計算、およびデータ解析アルゴリズムについて参照情報について説明します。

このガイドを使用して、ユーザー要件仕様書でシステムの機能性を確認し、検証計画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的な情報が記載されています。

- OpenLAB CDS ChemStation エディションのコンセプト、新しい機能とワークフロー：マニュアル『OpenLAB CDS ChemStation エディション、基本概念とワークフロー』。
- コンテキスト固有のタスク情報（「方法」）、チュートリアル、ユーザーインターフェースへの参照事項、およびトラブルシューティングヘルプ：ChemStation オンラインヘルプシステム。
- システムのインストールおよび site preparation の詳細：『Agilent OpenLAB CDS Workstation インストールガイド』。
- システム管理の原則とタスクの詳細：『オンラインシステム管理ガイド』。

1 データ取り込み

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

2 積分

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

3 ピーク同定

本章では、ピーク同定のコンセプトについて説明します。

4 キャリブレーション

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

5 定量

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

6 システムスータビリティの評価

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

7 CE 固有の計算

この章は、ChemStation を使用して CE 機器をコントロールする場合にのみ関連する内容です。

8 データレビュー、再解析、バッチレビュー

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

9 レポート

このトピックでは、OpenLAB CDS ソフトウェアのインテリジェントレポート機能で使用する ACAML スキームについて説明します。

10 システムベリフィケーション

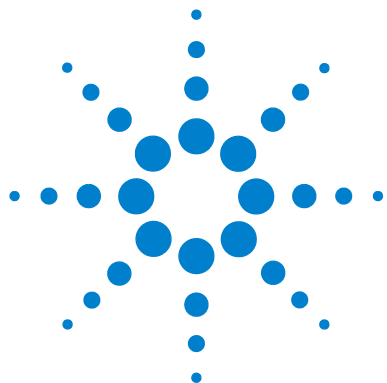
本章では、ベリフィケーション機能および ChemStation の GLP ベリフィケーションの特徴について説明します。

目次

1	データ取り込み	9
	データ取り込みとは	10
	ステータス情報	13
2	積分	15
	積分とは	17
	ChemStation のインテグレータアルゴリズム	19
	操作の原則	21
	ピーク認識	22
	ベースライン割り当て	29
	ピーク面積の測定	41
	積分イベント	44
	マニュアル積分	49
3	ピーク同定	53
	ピーク同定とは	54
	ピークマッチングルール	55
	ピーク同定のタイプ	56
	絶対リテンション / マイグレーションタイム	58
	補正済みリテンション / マイグレーションタイム	60
	ピーククォリファイア	62
	同定プロセス	65
4	キャリブレーション	67
	検量線	68
	グループキャリブレーション	70
	リキャリブレーションオプション	71
5	定量	73
	定量とは	74
	定量計算	75
	補正係数	76

キャリブレーションされていない計算の手順	78
キャリブレーションされた計算の手順	79
ESTD 計算	80
norm% 計算	82
ISTD 計算	83
6 システムスータビリティの評価	87
システムスータビリティの評価	89
ノイズ測定	92
ピーク対称性の計算	97
システムスータビリティの式および計算	99
一般定義	100
パフォーマンステストの定義	101
再現性に関する定義	107
内部保持されている倍精度数へのアクセス	112
7 CE 固有の計算	115
キャリブレーションテーブル	116
移動度補正を使用したキャリブレーション	119
キャピラリー電気泳動用の特別なレポートスタイル	125
補正済みピーク面積	126
キャピラリー電気泳動用のシステムスータビリティ	127
CE-MSD	128
8 データレビュー、再解析、バッチレビュー	129
データ解析におけるナビゲーションテーブル	130
バッチレビューとは	136
ECM を用いた OpenLAB CDS 使用時におけるバッチレビュー機能の有効化	137
バッチ設定	138
レビュー機能	141
バッチレポート	142
9 レポート	143
ACAML とは	144
ACAML スキーマ	145

10 システムベリフィケーション	147
ベリフィケーションおよび診断ビュー	148
GLP セーブレジスタ	151
DAD テスト機能	153



1 データ取り込み

データ取り込みとは	10
データファイル	10
オンラインモニタ	12
ログブック	12
ステータス情報	13
ChemStation ステータス	13
ステータスバー	13
システムダイアグラム	14

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



データ取り込みとは

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

データファイル

データファイル是一群のファイルからなっており、デフォルトではデータファイル名と拡張子 .D を持つサブディレクトリとして、データディレクトリまたはそのサブディレクトリに保存されます。データファイル名は、拡張子を含めて 40 文字までで、マニュアルで定義できます。ディレクトリの各ファイルは命名規則に従います（コンセプトとワークフロー ガイドのファイルの命名規則 を参照してください）。データディレクトリの追加は、[プレファレンス] 設定からできます。

表 1 データファイル

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

表 1 データファイル

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

オンラインモニタ

2 種類のオンラインモニタ、オンラインシグナルモニタとオンラインスペクトルモニタがあります。

オンラインシグナルモニタ

オンラインシグナルモニタを使えば、複数のシグナルを、そして関連機器がサポートしている場合には機器パフォーマンスプロットを、同じウィンドウでモニタできます。表示するシグナルを選択し、時間と吸光度軸を調整できます。この機能をサポートしている検出器の場合には、バランスボタンが使用できます。

ディスプレイ内で十字線のカーソルを移動すれば、メッセージ行に絶対シグナルレスポンスを表示できます。

オンラインスペクトルモニタ

オンラインスペクトルモニタは、スペクトル解析をサポートしている ChemStation でのみ使用できます。これは、吸光度を波長の関数として表示します。表示された波長範囲と吸光度のスケールは、両方とも調整できます。

ログブック

ログブックには、分析システムによって作成されたメッセージが表示されます。これらのメッセージは、モジュールからのエラーメッセージ、システムメッセージまたはイベントメッセージになります。ログブックは、これらのメッセージを、表示されるかどうかにはかわりなく記録します。ログブックのイベントに関する詳しい情報を入手するには、適切な行をダブルクリックして、説明となるヘルプテキストを表示します。

ステータス情報

ChemStation ステータス

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

シングル分析の実行中には、次のようになります。

- [ChemStation ステータス] ウィンドウの最初の行には、実行中の分析が表示されます。
- ステータスウィンドウの 2 行目には、現在のメソッドのステータスが表示されます。
- 生データファイル名は、分単位の実分析時間と一緒に 3 行目表示されます (GC 機器の場合、フロントおよびバックインジェクタのファイルも表示されます)。

[機器ステータス] ウィンドウには、機器モジュールと検出器についてのステータス情報が表示されます。これらは、個別のコンポーネントのステータスと、適切な場合には、圧力、グラジェント、流量データなど、現在の状態が表示されます。

ステータスバー

ChemStation のグラフィカルユーザーインターフェイスは、ChemStation の [メソッド&ランコントロール] ビューのツールバーとステータスバーから構成されています。ステータスバーは、システムステータスフィールドと、現在読み込まれているメソッドおよびシーケンスに関する情報からなっています。読み込み後に修正された場合は、黄色の歯車でマークされます。Agilent 1100/1200 シリーズ LC モジュールの場合は、黄色い EMF 記号によって、ユーザーは、消耗品 (ランプなど) に設定された使用期限が切れたことがわかります。

システムダイアグラム

設定された分析機器によってサポートされている場合 (Agilent 1200 Infinity シリーズ LC モジュールまたは Agilent 6890 シリーズ GC など)、ChemStation システムでグラフィカルなシステムダイアグラムを表示できます。これにより、システムのステータスを一目でチェックできます。ダイアグラムを有効にするには、[メソッド&ランコントロール] ビューの [表示] メニューから [システムダイアグラム] を選択します。これは、ChemStation システムをグラフィカルに表現したものです。各コンポーネントはアイコンによって表されます。以下に示すカラーコーディングによって、現在のステータスが表示されます。

表 2 モジュールまたは機器のステータスを示すために使用される色

色	ステータス
暗灰色	オフライン
薄灰色	スタンバイ (ランプ消灯など)
黄色	ノットレディ
緑色	レディ
紫色	プレラン、ポストラン
青色	分析
赤色	エラー

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

システムダイアグラムの詳細は、オンラインヘルプシステムの機器の部分を参照してください。



2 積分

積分とは	17
ChemStation のインテグレートアルゴリズム	19
用語の定義	20
操作の原則	21
ピーク認識	22
ピーク幅	22
ピーク認識フィルタ	23
バンチ化	24
ピーク認識アルゴリズム	25
マージピーク	27
ショルダー	27
ベースライン割り当て	29
デフォルトのベースラインの設定	29
ベースラインの開始	30
ベースラインの終了	30
ベースラインの落ち込み	30
ピーク / 谷比	32
タンジェントスキム	33
割り当てられないピーク	38
ピーク分離コード	39
ピーク面積の測定	41
面積の決定	41
単位と変換ファクタ	43
積分イベント	44
初期イベント	44
タイムイベント	47
自動積分	47
マニュアル積分	49



2 積分

ステータス情報

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

積分とは

積分は、シグナルのピークを同定し、そのサイズを計算するための操作です。

積分は、以下のために必要なステップです。

- 同定
- 適格性評価
- キャリブレーション
- 定量
- ピーク純度計算
- スペクトルライブラリサーチ

積分の内容

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。

インテグレータの機能

インテグレータアルゴリズムには、以下のような主要な機能が含まれています。

2 積分

積分とは

- 初期インテグレータパラメータの設定、自動積分機能
- 複数のシグナルまたは複数の検出器を使用する場合に、クロマトグラム / エレクトロフェログラムシグナルごとに個別の積分イベントテーブルを定義する機能
- グラフィカルにイベント時間を選択できる積分イベントの対話的な定義
- 人間による解釈を必要とするクロマトグラムやエレクトロフェログラムのグラフィカルなマニュアル積分（これらのイベントをメソッドに記録して、自動操作の一部として使用することもできます）
- 積分結果の注釈
- 基本的なインテグレータ設定を設定または修正するためのインテグレータパラメータの定義。次の設定が含まれます。面積リジェクト、高さリジェクト、ピーク幅、スロープ感度、ショルダー検出、ベースライン補正、およびフロント / テイルタンジェントスキム検出
- ベースラインの強制、ベースラインのホールド、すべての谷でのベースライン、次の谷でのベースライン、現在のピークの終わりから後方へベースラインをフィットなどの、ベースラインコントロールパラメータ
- 面積和のコントロール
- ネガティブピークの認識
- 溶媒ピーク定義検出
- インテグレータ操作に対してリテンション / マイグレーションタイムの範囲を定義するインテグレータコントロールコマンド
- 2 次導関数計算を用いたピークショルダー割り当て
- DAD スペクトルから再構成された DAD LC データファイルでより良い性能を得るための、不等間隔のデータポイントでのサンプリングの改善

ChemStation のインテグレートアルゴリズム

インテグレータでクロマトグラム / エレクトロフェログラムを積分するには、次のことを行います。

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

このプロセスは、**積分イベント**でコントロールできます。最も重要なイベントは初期スロープ感度、ピーク幅、ベースライン補正、面積リジェクト、および高さリジェクトです。ソフトウェアでは、これらおよび他のイベントの初期値を設定することができます。初期値は、クロマトグラムの開始点で有効になります。加えて、自動積分機能ではさらに最適化可能な初期イベントが提供されます。

ほとんどの場合、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しい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。

詳細情報は、『「初期イベント」 44 ページ 』を参照してください。

用語の定義

主要なポイント

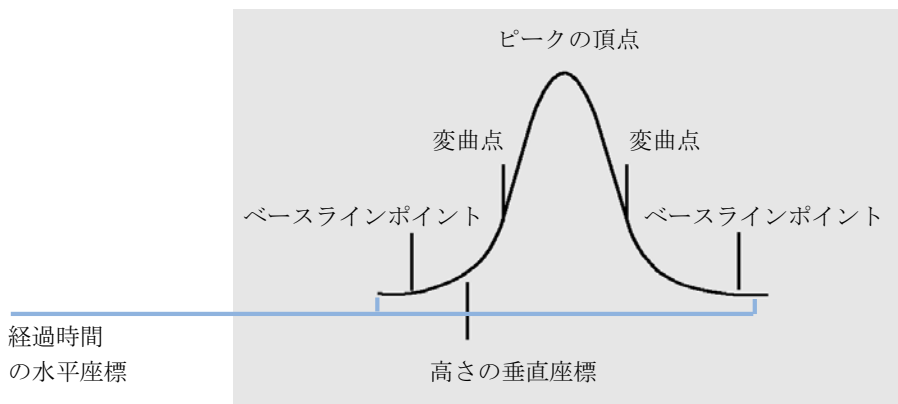


図 1 主要なポイント

溶媒ピーク

溶媒ピークは一般的に分析にとって重要ではない非常に大きなピークで、通常積分されません。しかし、分析対象溶出のピークが小さい場合、たとえば溶媒ピークに近接した、溶媒ピークテーリングにのっている場合、それらの面積を計算するために特別な積分条件を設定できます。

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（前面）またはトレーリングエッジ（背面）に発生することもあります。ショルダが検出されると、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。

操作の原則

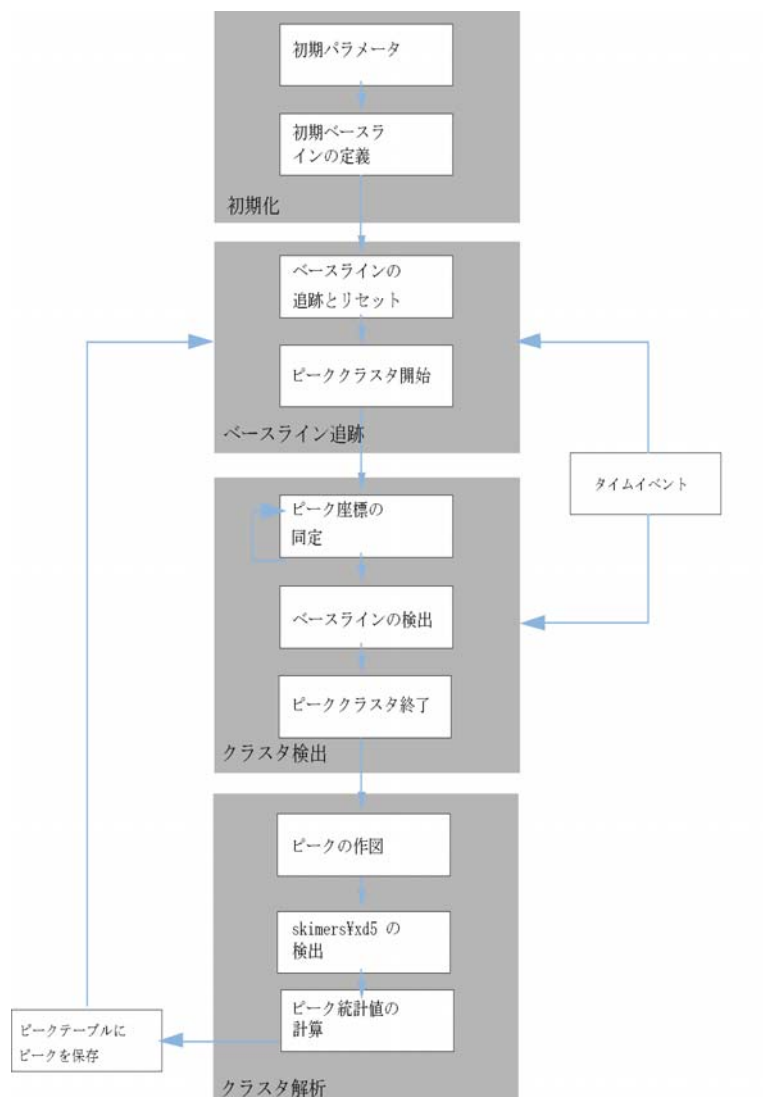


図 2 インテグレータ流量ダイアグラム

ピーク認識

インテグレータは、ピークを認識し、特徴付けるために、次のものを使用します。

- ピーク幅
- ピーク認識フィルタ、
- バンチ化、
- ピーク認識アルゴリズム、
- ピーク頂点アルゴリズム、および
- 非ガウス型の計算（テーリング、重なったピークなど）です。

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。

$$\text{幅} = \text{調整された面積} / \text{調整された高さ}$$

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。

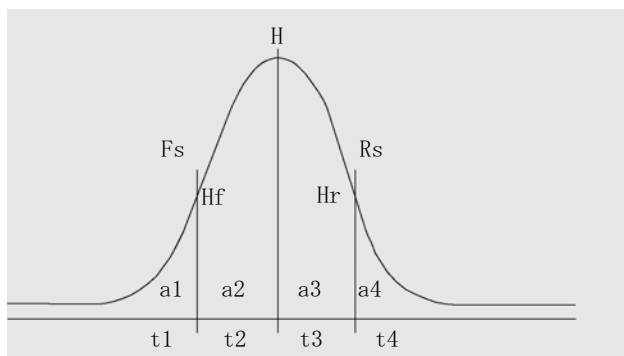


図 3 ピーク幅の計算

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

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

ピーク幅は、3 通りの方法で変更されます。

- ・ 分析前に、初期ピーク幅を指定できます。
- ・ 分析中に、インテグレータは、ピーク認識フィルタ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。
- ・ 分析中に、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。

システムスータビリティの計算に使用されるピーク幅の定義については、『「システムスータビリティの評価」 87 ページ 図』を参照してください。

ピーク認識フィルタ

インテグレータは 3 つのピーク認識フィルタを持っており、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。このフィルタには、インテグレータが調べているデータポイントの一次微分係数（スロープを測定する）と二次微分係数（曲率を測定する）が含まれています。認識フィルタ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 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、フィルタはまずフィルタ 2 に、それからフィルタ 3 に変更されます。認識フィルタから良いパフォーマンスを得るために、ピー

2 積分 ピーク認識

ク幅は実際のクロマトグラフ / エレクトロフェログラムピークの幅に近い値に設定する必要があります。分析中、積分を最適化するために、インテグレータは必要に応じてピーク幅を更新します。

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

LC/CE コンフィグレーションの場合、デフォルトのピーク幅の計算には次の複合計算方法を用います。

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

GC コンフィグレーションの場合、デフォルトのピーク幅の計算には面積 / 高さの計算方法を用います。この計算は、半値幅を超えると重なっている場合には、幅を過大評価しません。

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

ピーク幅の更新は、次の方法で重み付けされます。

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

バンチ化

バンチ化は、インテグレータが、選択性を良好に保てるよう、広がるピークをピーク認識フィルタの有効範囲内に収めるために使用する方法です。

インテグレータは、ピークが広がるときでも、ピーク幅を無限に大きくすることはできません。そのため、ピークが広がりすぎて、ピーク認識フィルタが認識できなくなる可能性があります。この制限に対処するため、インテグレータは複数のデータポイントをまとめて（バンチ化）、面積を同じに保ちながら、ピークを実質的に狭くします。

データをバンチ化すると、データポイントは 2 のバンチ回数のべき乗の単位でまとめられます。つまり、バンチ化しない場合 = 1x、1 回バンチ化 = 2x、2 回バンチ化 = 4x などとなります。

バンチ化は、取込速度とピーク幅に基づいて行われます。インテグレータは、これらのパラメータを使用して、データポイントが適切な数になるように、バンチ化係数を設定します（『25 ページ 図 表 3』を参照）。

バンチ化は、予想される、または実際のピーク幅に基づき、2 のべき乗の単位で行われます。バンチ化アルゴリズムは、『25 ページ 図 表 3』に要約されています。

表 3 バンチ化の基準

予想されるピーク幅	使用されるフィルタ	行われるバンチ化
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
32 - 96 data points	フィルタ 3、2	2 回
64 - 192 data points	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します。インテグレータは、アップスロープ積算器の値が ≥ 15 になったら、ピークが始まったポイントとします。

ピークの開始

『26 ページ 図 表 4』には、予想されるピーク幅により、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、予想される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。予想される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。

2 積分 ピーク認識

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

表 4 アップスロープ積算器への増分値

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

ピークの終了

『26 ページ 図 表 5』には、予想されるピーク幅により、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、予想される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。予想されるピーク幅が大きくなると、フィルタ 2 の値が、それからフィルタ 3 の値が使用されます。

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

表 5 ダウンスロープ積算器への増分値

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

ピーク頂点アルゴリズム

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

マージピーク

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

谷ポイント

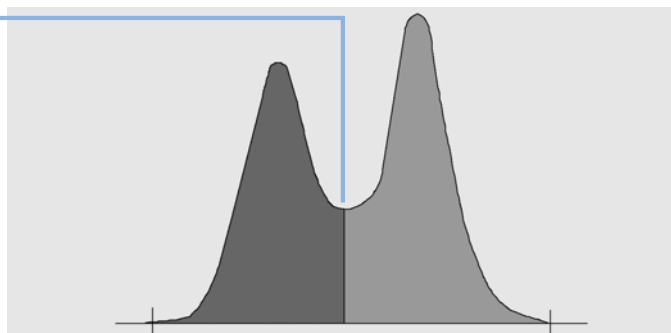


図 4 重なったピーク

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、最初のピークのアリの加算が終わり、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

2 積分 ピーク認識

は、負のスロープに正のスロープが続くという意味で、真の谷は存在しません。ピークには、フロントまたはリアのショルダーはいくつでもあり得ます。

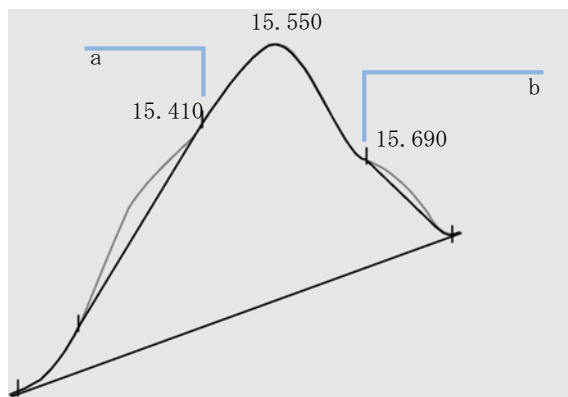


図 5 ピークショルダー

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、『28 ページ 図 5』のポイント a および b などの変曲点が認識されます。

- ピークの頂点の前に、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。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、変曲点の前の正の曲率最大の点に設定されます。
- ピークの終わりまたは谷の前に、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。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、開始ポイントからカーブまでのターゲットポイントに設定されます。

リテンション / マイグレーションタイムは、ショルダーの負の最大の曲率の点から決定されます。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、メインのピークから減算されます。

ピークのショルダーは、インテグレータのタイムイベントを使うことにより、通常のピークのように扱うことができます。

ベースライン割り当て

ピーククラスタが完了し、ベースラインが見つかり、インテグレータはベースライン割り当てアルゴリズムに対して、『釘と糸』のテクニックでベースラインを割り当てるようにリクエストします。これは、台形の領域と、比例による高さ補正を使用して、ベースラインを正規化し、可能な限り下方に来るようにするものです。ベースライン割り当てアルゴリズムへの入力には、検出器とアプリケーションを識別するメソッドおよびデータファイルからのパラメータも含まれており、インテグレータはこれらを利用して、計算を最適化します。

デフォルトのベースラインの設定

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

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

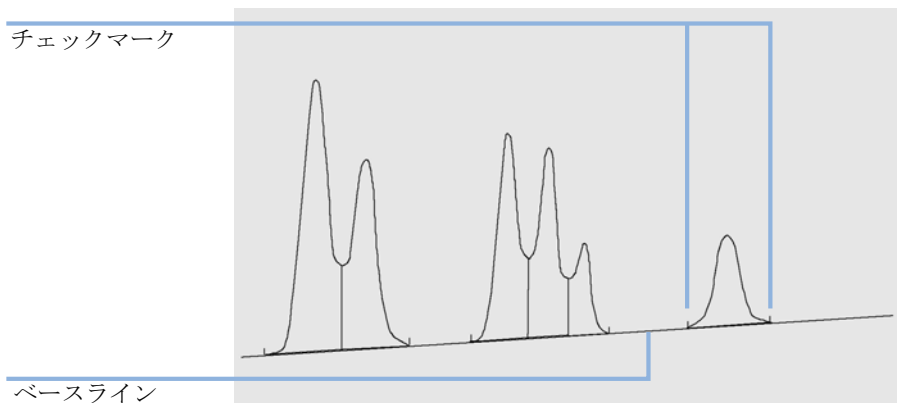


図 6 デフォルトのベースラインの設定

ベースラインの開始

分析の開始時にベースラインが見つからなかった場合には、ベースラインの開始は、次のいずれかの方法で決められます。

- 分析開始のポイントが最初のベースラインポイントより下だった場合には、分析の開始から最初のベースラインポイントまで、
- 分析開始のポイントが最初の谷より下だった場合には、分析の開始から最初の谷ポイントまで、
- 最初の谷が、分析の開始から最初のベースラインポイントまで引いた直線の延長よりも下に出ている場合には、分析の開始から最初の谷ポイントまで、
- 分析の開始から最初のベースラインポイントまで、水平のベースラインを伸ばす。

ベースラインの終了

最後の有効なベースラインポイントは、ベースラインの終了を示すものとして用いられます。分析がベースライン上で終わらなかった場合には、ベースラインの終了は、最後の有効なベースラインポイントから、確定されたベースラインドリフトまでとして計算されます。

ピークが谷で終わっているのに、続くピークが設定した面積リジェクト値よりも低かった場合には、ベースラインは、ピークの始まりから、次の真のベースラインポイントまで引いた直線を延長したものになります。ピークが同様の仕方で始まっている場合には、同じ規則が適用されます。

ベースラインの落ち込み

落ち込みは、構成されたベースラインよりもシグナルが下に来た場合に生じます（『31 ページ 図 7』のポイント a）。ベースラインの落ち込みが生じた場合には、ベースラインのその部分は通常、『31 ページ 図 7』のポイント b のように、再構成されます。

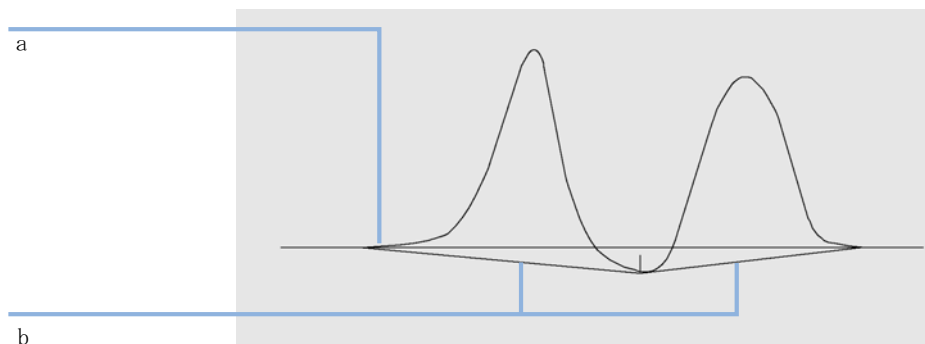


図 7 ベースラインの落ち込み

ベースラインの落ち込みをすべて除去するには、次の追跡オプションを使用できます。

クラシカルベースライン追跡（負ピークなし）

このオプションを選択すると、ピーククラスごとに、ベースライン落ち込みを検索します。落ち込みが見つかったら、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（『31 ページ 図 7』と『31 ページ 図 8』のベースラインを比較してください）。

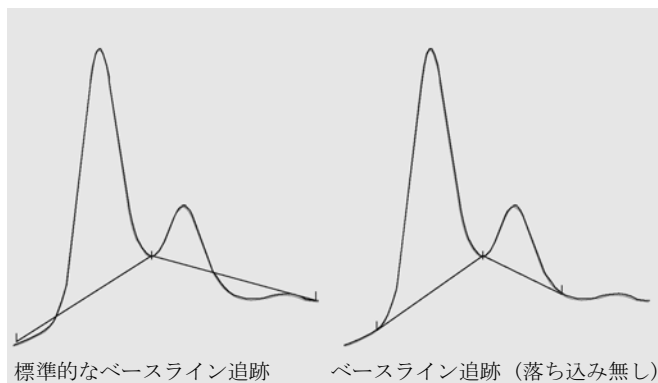


図 8 標準的なベースライン追跡と、ベースライン追跡（落ち込みなし）

注記

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

2 積分

ベースライン割り当て

拡張ベースライン追跡

拡張ベースライン追跡モードでは、インテグレータがピークの開始点および終了点を最適化し、ピーククラスタのベースラインを再構築し、ベースラインの落ち込みをなくします（『31 ページ 図 7』を参照）。多くの場合、拡張ベースライン追跡モードを使えば、スロープ感度に影響されにくい、より安定したベースラインを得ることができます。

ピーク / 谷比

このユーザー指定のパラメータは、拡張ベースライン追跡モードの要素の 1 つです。これは、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されます。インテグレータは、ベースライン補正された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を計算します。ピーク / 谷比がユーザー指定値より低い場合は、ドロップラインが使用されます。それ以外の場合は、最初のピークの開始点から谷へ、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（『31 ページ 図 8』と『32 ページ 図 9』を比較してください）。

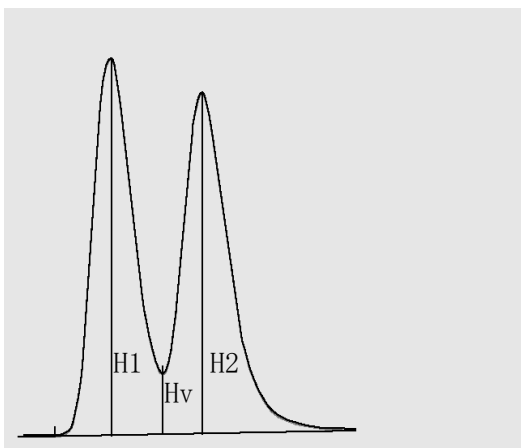


図 9 ピーク / 谷比

ピーク / 谷比は、次の式を使用して計算されます。

$$H1 \geq H2, \text{ ピーク / 谷比} = H2/Hv$$

および

$H1 < H2$, ピーク / 谷比 = $H1/Hv$

『33 ページ 図 10』は、ピーク / 谷比のユーザー指定値がベースライン及ぼす影響を示しています。

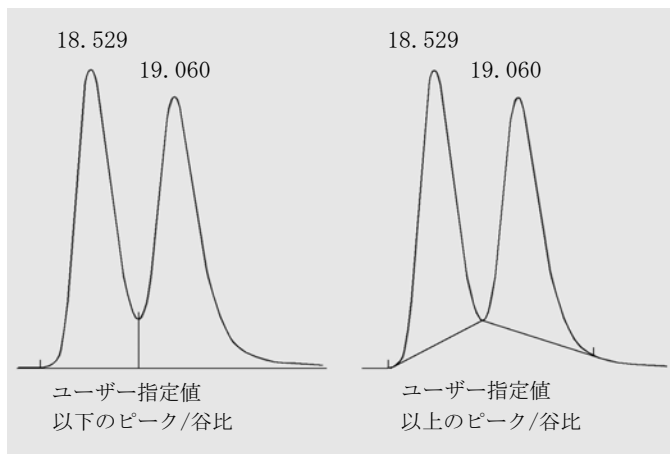


図 10 ベースラインに対するピーク / 谷比の影響

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。タンジェントスキムを有効にすると、適切なピーク面積を計算するために、次の 4 つのモデルが利用できます。

- 指数曲線近似
- 新規指数スキム
- 直線スキム
- 最適なフィットを算出する指数と直線の組み合わせ（標準スキム）

指数曲線近似

このスキムモデルでは、子ピークの開始から終了まで指数関数を使って曲線が描かれます。この曲線は、親ピークに続く、各子ピークの下を通りま

2 積分

ベースライン割り当て

す。スキム曲線の下面積は、子ピークから減算され、親ピークに加算されます。

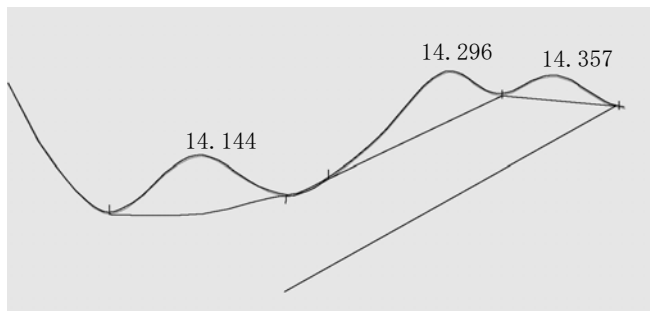


図 11 指数スキム

新モードの指数曲線近似

このスキムモデルでは、親ピークのリーディング / トレーリングエッジを近似する指数関数を使って曲線が描かれます。曲線は、親ピークに続く 1 つ以上のピーク（子ピーク）の下を通過します。スキム曲線より下の面積は子ピークから差し引かれ、メインピークに追加されます。複数の子ピークを同じ指数モデルでスキムできます。最初の子ピーク後のすべてのピークは、最初の子ピークの終了から始まり、ドロップラインによって区切られ、スキム曲線までのみ降下します。

直線スキム

このスキムモデルでは、子ピークの開始から終了まで直線を描きます。子ピークの開始の高さは、親ピークのスロープに合わせて補正されます。直線の下面積は、子ピークから減算され、親ピークに加算されます。

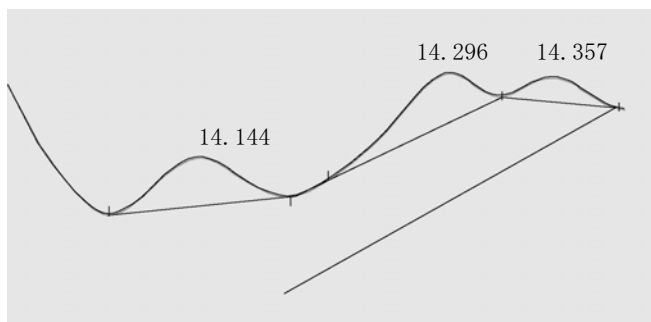


図 12 直線スキム

標準スキム

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

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

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

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

スキム基準

親ピークのトレーリングエッジ上に出ている子ピークの面積を計算するのに、スキム直線を使用するかどうかは、次の 2 つの基準によって決められます。

- テールスキム高さ比
- 谷高さ比

これらの基準は、指数方式のタイムイベントが有効な場合、または親ピークそのもの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分離コードは、タイプ である必要があります。

2 積分

ベースライン割り当て

〔テールスキム高さ比〕は、ベースライン補正された子ピークの高さ（Hc）に対するベースライン補正された親ピークの高さ（『36 ページ 図 13』の Hp）の比率です。この比は、スキムされる子ピークに対して指定された値より大きい必要があります。

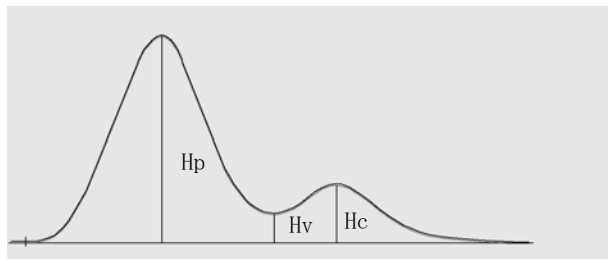


図 13 スキム基準

テールスキム高さ比の値を高さの値、または 0 に設定すれば、分析中の指数スキムを無効にすることができます。

〔谷高さ比〕は、ベースライン上の谷の高さ（『36 ページ 図 13』の Hv）に対するベースライン上の子ピークの高さ（同じ図の Hc）の比率です。この比は、スキムされる子ピークに対して指定された値より小さい必要があります。

スキムの指数曲線近似の計算

以下の式を使用して指数スキムを計算します。

$$H_b = H_o \times \exp(-B \times (T_r - T_o)) + A \times T_r + C$$

変数の意味は次のとおりです。

Hb = 時間 Tr での指数スキムの高さ

Ho = 指数スキムの開始の高さ（ベースラインの上）

B = 指数関数の減衰率

To = 指数スキムの開始に対応する時間

A = 親ピークのベースラインのスロープ

C = 親ピークのベースラインのオフセット

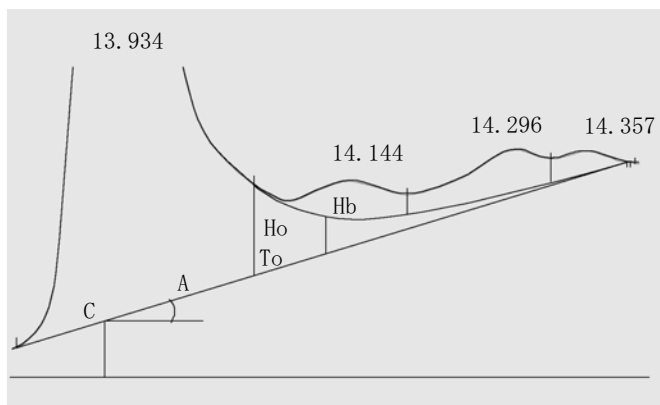


図 14 指数スキムを計算するために使用される値

指数モデルは、最初の子ピークの直前にある親ピークのテールの一部の近似を示します。『37 ページ 図 15』は、タンジェントスキム後の子ピークの補正カーブを表します。

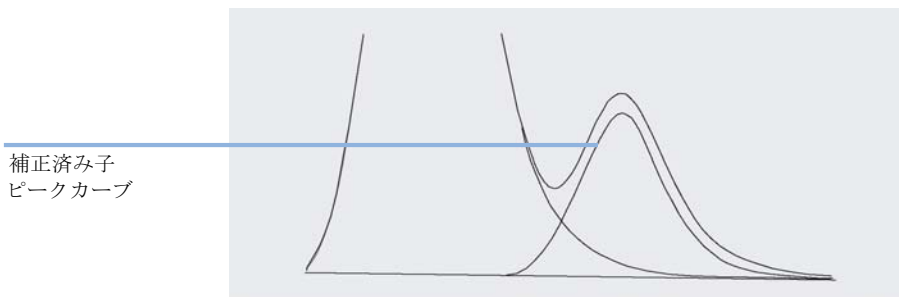


図 15 テール補正された子ピーク

フロントピークスキム

親ピークのテール上の子ピークの場合、ピークのフロント側 / アップスロープ上の特定のピークについては、特別な積分が必要となります（『38 ページ 図 16』を参照）。

2 積分

ベースライン割り当て

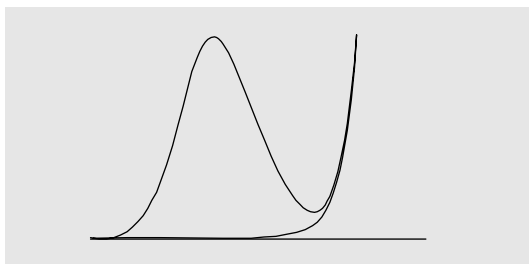


図 16 フロントピークスキム

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

スキム基準は次の通りです。

- フロントスキム高さ比
- 谷高さ比

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

割り当てられないピーク

ベースライン設定によっては、ベースラインとシグナルの間にあるものの、認識されたどのピークにも属さない小さな領域が存在することがあります。通常、そのような領域は測定されることもレポートされることもありません。[割り当てられないピーク] をオンにすると、これらの領域も測定され、割り当てられないピークとしてレポートされます。そのような領域のリテンション / マイグレーションタイムは、『39 ページ 図 17』のように領域の開始と終了の midpoint になります。

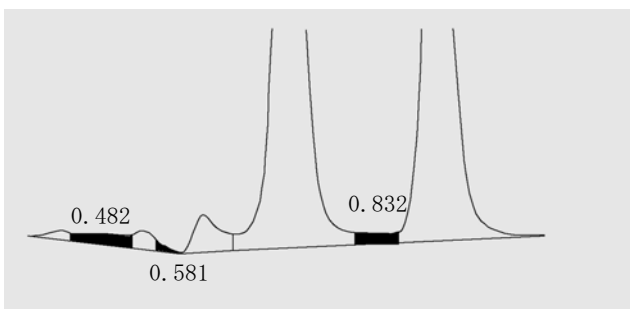


図 17 割り当てられないピーク

ピーク分離コード

レポートでは、各ピークに、シグナルベースラインの引かれ方を説明する 2、3、または 4 文字のコードが割り当てられます。

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。
- 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。
- 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。
- H** ピークは強制された水平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）。

文字 3

- D** ピークは歪んでいました。
- A** 積分は中断されました。

2 積分

ベースライン割り当て

U 範囲より下の条件が発生しました。

O 範囲より上の条件が発生しました。

4 文字目

4 番目の文字は、ピークタイプを示します。

S ピークは溶媒ピークです。

N ピークはネガティブピークです。

+ ピークは面積ピーク和です。

T タンジェントスキムピークです (標準のスキム)。

X タンジェントスキムピークです (古いモードの指数スキム)。

E タンジェントスキムピークです (新しいモードの指数スキム)。

m マニュアルベースラインによって定義されたピークです。

n マニュアルベースラインによって定義されたネガティブピークです。

t マニュアルベースラインによって定義された、タンジェントスキムピークです。

R ピークはメインピークで再計算された溶媒ピークです。

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、ピークの最終的な面積を決定することです。

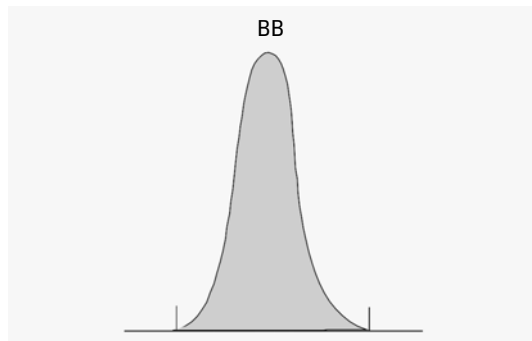


図 18 ベースライン間の面積測定

単純に分離したピークの場合、ピークの間積は、(チックマークにより認識される) ピークの開始と終了の間の、ベースラインより上の面積を積算することによって決定できます。

面積の決定

積分中にインテグレータが計算する面積は、次のように決められます。

- ベースライン間 (BB) ピークの場合には、『41 ページ 図 18』のように、ピーク開始からピーク終了間のベースライン上の面積になります。
- 谷 - 谷 (VV) ピークの場合には、『42 ページ 図 19』のように、谷ポイントからの垂直のドロップラインで区切られた、ベースライン上の面積になります。

2 積分

ピーク面積の測定

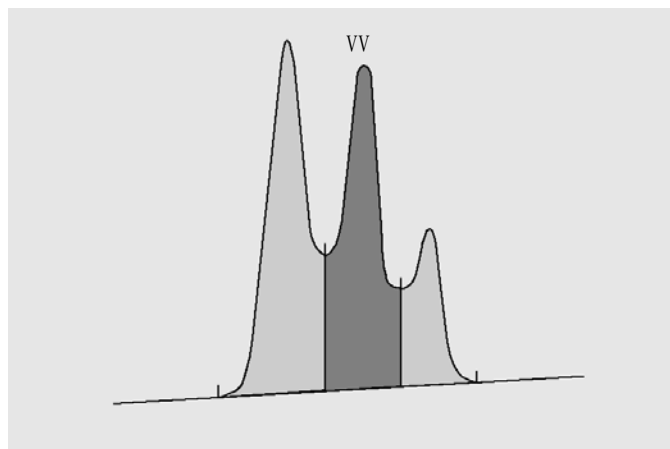


図 19 谷 - 谷ピークの面積測定

- 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面積になります。溶媒ピークは遅すぎて認識されないことがあります。または、ライダーのセットにより、溶媒として扱うべきと思われるピークのグループが分析に現れることがあります。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。単純なドロップラインによる扱いは、後者のピークを誇張する結果になります。実際には、それらは第一ピークのテールに乗っているからです。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、『43 ページ 図 20』に示されたような正の面積になります。

トータルゾーン面積 - ベースラインより下の面積 = ベースライン補正面積

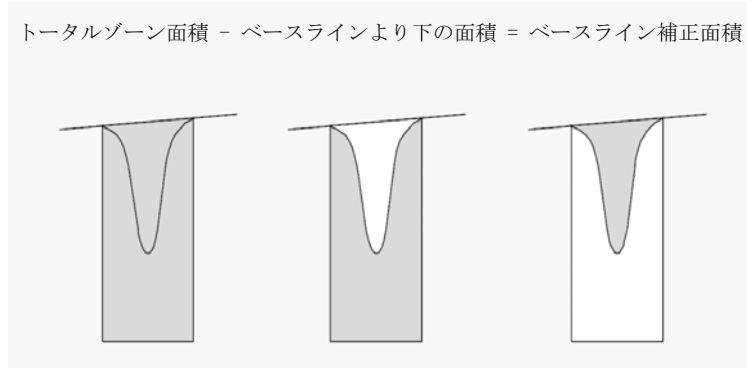


図 20 ネガティブピークの面積測定

単位と変換ファクタ

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

そのため、積分されたデータの場合には、高さは計算される実体で、面積を、直前のデータポイントから経過した時間で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には、面積は、データに、直前のデータポイントから経過した時間を掛けることによって計算されます。

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

積分イベント

インテグレータには、多数の初期およびタイムインテグレートイベントが用意されています。多くのイベントは、オン / オフまたは開始 / 停止のペアになっています。

初期イベント

- | | |
|---------|--|
| 初期ピーク幅 | 初期ピーク幅は、インテグレータの内部ピーク幅を分析の開始時にこの値に設定します。この初期ピーク幅は、ピークのアップスロープ、ダウンスロープ、およびテーリングを検出する積算器の縮尺調整をするために使用されます。インテグレータは、積分を最適化するために、分析中の必要な時にピーク幅を更新します。最初の期待されるピーク（溶媒ピークを除く）の半値幅に対応する時間の単位でピーク幅を設定します。 |
| スロープ感度 | スロープ感度は、ピーク感度の設定です。これは、ライナースケールで変化する設定です。 |
| 高さリジェクト | 高さリジェクトは、最終的な高さによるピーク排除を設定します。高さが最小高さより小さいピークは、レポートされません。 |
| 面積リジェクト | 面積リジェクトは、最終的な面積によるピーク排除を設定します。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。 |
| ショルダー検出 | ショルダー検出がオンの場合、インテグレータは二次微分係数で与えられるピークの曲率を使用して、ショルダーを検出します。曲率がゼロになると、インテグレータはこの変曲点をショルダーの可能性があると認識します。インテグレータがピークの頂点前に別の変曲点を認識すると、ショルダーが検出されたことになります。 |

ピーク幅

ピーク幅の設定は、インテグレータがベースラインノイズからピークを識別する選択性を決定します。良いパフォーマンスを得るには、ピーク幅は実際のクロマトグラフ / エレクトロフェログラムの半値幅に近い値に設定する必要があります。インテグレータは、積分を最適化するために、分析中の必要な時にピーク幅を更新します。

ピーク幅の選択

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

- 対象とする単一のピークに適した初期ピーク幅を選択するには、ピークの時間幅を基準にしてください。
- 対象とするピークが複数ある場合に、適切な初期ピーク幅を選択するには、最適なピーク選択性が得られるように、初期ピーク幅は最も狭いピーク幅以下の値に設定してください。

選択したピーク幅が狭すぎる場合には、ノイズがピークとして解釈されることがあります。広いピークと狭いピークが混ざっている場合には、ランタイムプログラムイベントを使用して、特定のピークに合わせてピーク幅を調整することができます。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がります。これを補正するため、インテグレータは分析中にピークが広がると、ピーク幅を自動的に更新します。これは、タイムイベントで無効になっていない限り行われます。

ピーク幅の更新は、次の方法で重み付けされます。

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

高さリジェクトとピーク幅

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

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

2 積分

積分イベント

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。

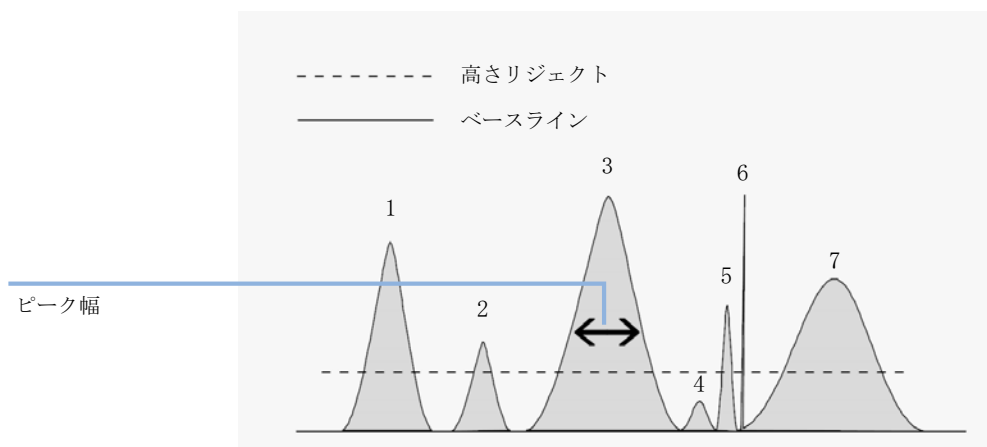


図 21 初期イベントの使用

ピークは、4 つの積分パラメータのすべてが満たされたときにのみ、積分されます。示されている面積リジェクトとスロープ感度の、ピーク 3 のピーク幅を使用すると、ピーク 1、3、5、7 だけが積分されます。

- ピーク 1** は、4 つの積分パラメータすべてが満たされているので積分されます。
- ピーク 2** は、面積が設定された面積リジェクト値より小さいのでリジェクトされます。
- ピーク 3** は、4 つの積分パラメータすべてが満たされているので積分されます。
- ピーク 4** は、ピーク高さが高さリジェクトの値より小さいので積分されません。
- ピーク 5** は、面積が設定された面積リジェクト値より小さいのでリジェクトされます。
- 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ります。

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

タイムイベント

シグナルベースラインの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。これらのイベントは、最終的なピーク面積を加算する場合、そして短期間および長期間のベースラインの逸脱を補正する場合に、役立ちます。積分イベントについての詳細は、『「初期イベント」 [44 ページ](#) 』を参照してください。

自動積分

自動積分機能は、初期イベントを設定するための開始点を提供します。これは、新しいメソッドを実装する場合に、特に役立ちます。タイムイベントを含んでいない、デフォルトの積分イベントテーブルから始めます。それから、一般的な使用目的のために自動積分機能によって提案されたパラメータを最適化することができます。

操作の原則

自動積分機能は、クロマトグラムデータを読み込んで、クロマトグラムオブジェクト内の各シグナルに対する初期積分パラメータの最適値を計算します。

アルゴリズムは、クロマトグラムの開始と終了の 1% の部分を調べて、その部分のノイズとスロープを決定します。ノイズは、線形回帰の標準偏差

2 積分 積分イベント

の 3 倍を、回帰で使用されたポイントのパーセント数の平方根で割った値として、決定されます。これらの値は、積分の高さリジェクトおよびスロープ感度に適切な値を割り当てるために使用されます。それからアルゴリズムは、クロマトグラムの長さに応じ、LC の場合は 0.5%、GC の場合は 0.3% ないし 0.2 % として、ピーク幅の一時的な値を割り当てます。初期面積リジェクトはゼロに設定して、積分を試行します。この試行は、少なくとも 5 つのピークが検出されるまで、毎回パラメータを調整し、または初期高さリジェクトを 0 に設定して、必要に応じて数回繰り返されます。積分の試行は、10 回行っても上記の条件が満たされなかった場合には、終了します。

それから、積分の結果が調べられ、検出されたピークの幅に基づいてピーク幅が調整され、初期ピークに向かって計算のバイアスが設定されます。検出されたピークのピーク対称性を使用し、ピーク幅計算に 0.8 ~ 1.3 の対称性を持つピークだけを含みます。十分に対称なピークが検出されないと、この制限は緩和され、**下限値は 1.5 分の 1 に、上限値は 1.5 倍に**されます。それから、ピーク間のベースラインを調べて、以前の高さリジェクトおよびスロープ感度の値を調整します。面積リジェクトは、積分の試行の間に検出された最も対称度の高いピークの最小面積の 90% に設定されます。

クロマトグラムは、これらの積分パラメータの最終的な値を使用して再度積分され、その積分の結果が保存されます。

自動積分のパラメータ

次のパラメータが、自動積分機能によって設定されます。

- 初期スロープ感度
- 初期高さ
- 初期ピーク幅
- 初期面積リジェクト

マニュアル積分

マニュアル積分

このタイプの積分を行えば、選択したピーク、またはピークのグループを積分できます。初期面積リジェクト値を除き、ソフトウェアのイベント積分は、マニュアル積分の指定範囲内では無視されます。マニュアル積分の結果得られた 1 つまたは複数のピークが、面積リジェクトのスレッシュホルドよりも低い場合には、廃棄されます。マニュアル積分イベントは、絶対時間値を用います。シグナルドリフトは調整しません。

マニュアル積分では、自分でピークの開始および終了ポイントを定義して、定量とレポートのために再計算する面積を含めることができます。マニュアル積分によるピークは、レポート内ではピーク分離コード M によってラベルされます。

マニュアル積分では、次の機能が提供されます。

- | | |
|------------------|---|
| ベースラインを引く | ピークまたは複数のピークのためのベースラインが引かれる場所を指定します。メニュー項目の [積分] > [全ての谷] では、範囲内のピークをすべての谷のポイントで自動的に分離するかを指定できます。 |
| ネガティブピーク | ネガティブピークとしてベースラインより下の面積すべてを処理する時間を指定します。範囲内のピークをすべての谷のポイントで自動的に分離するかを指定できます。 |
| タンジェントスキム | メインピークから離れてタンジェントスキムされたピークの面積を計算します。タンジェントスキムされたピークの面積は、メインピークの面積から減算されます。 |
| ピーク分割 | ピークをドロップラインで分割するポイントを指定します。 |
| ピーク削除 | 積分結果から 1 つ以上のピークを削除します。 |

マニュアル積分ピークのピーク分離コード

マニュアル積分によるピークは、積分レポート内ではピークコード MM によってラベルされます。

2 積分

マニュアル積分

マニュアル積分ピークの前にピークがあり、マニュアル積分によってこのピークの終了が変化した場合、これにはコード F（強制）が与えられます。谷ポイントは、検出されると、コード V に設定されます。

タンジェントスキムなど、マニュアル積分によって影響を受けたメインピークの溶媒は、R（再計算溶媒）でラベルされます。

マニュアル積分イベントの保存

ベースラインの手動描画などのマニュアル積分イベントは、タイム積分イベントよりデータファイルおよびシグナルの詳細になります。複雑なクロマトグラムの場合、これらのイベントを再解析に使用できることが非常に望まれます。そのため、メソッドを使用するのではなく、シグナルのマニュアル積分イベントをデータファイルに直接保存できます。

データファイルをレビューまたは再解析する時はいつでも、データファイル中のこれらのマニュアル積分イベントが自動的に適用されます。マニュアル積分イベントを含む分析は、**ナビゲーションテーブル**の対応する列に印が付きます。

手動によるベースライン描画やピーク削除のツールに加えて、以下の操作を行う 3 つの追加ツールがユーザーインターフェースに用意されています。

- データファイルに現在表示されているクロマトグラムのマニュアルイベントを保存
- 現在表示されているクロマトグラムからすべてのイベントを削除
- 最後のマニュアル積分イベントを元に戻す（イベントが保存されるまで使用可能）

ナビゲーションテーブルでのレビュー中に次のデータファイルに対して操作を続行する場合、ChemStation は未保存のマニュアル積分イベントがないか確認し、イベントを保存するかどうかをユーザーに尋ねます。

ナビゲーションテーブルでのレビュー中にデータファイルに保存されたマニュアルイベントが、[**パッチ**] モードでのレビュー中に保存されたマニュアル積分イベントに干渉することはありません。これら 2 つのレビュー方法は、データファイルのマニュアルイベントに関して完全に分離されています。

ChemStation リビジョン B.04.01 以前の場合、個々のデータファイルの代わりに、メソッドにマニュアル積分イベントを保存しました。B.04.01 でもこのワークフローを使用することができます。メソッドでマニュアル積分イベントを処理するために、[データ解析] ビューの [積分] メニューには以下の項目が示されます。

- **メソッドのマニュアルイベントの更新**：メソッドに新しく記載されたマニュアルイベントを保存します。
- **メソッドからマニュアルイベントを適用**：現在メソッドに保存されているマニュアルイベントを現在読み込まれているデータファイルに適用します。
- **メソッドからマニュアルイベントの削除**：メソッドからマニュアルイベントを削除します。

メソッドに保存されたマニュアルイベントをデータファイル内のストレージに変換するには、メソッドからイベントを使用し、データファイルに結果を保存します。希望する場合は、メソッドからイベントを削除します。

メソッドの [積分イベントテーブル] の [マニュアルイベント] チェックボックスがオンの場合、このメソッドを用いるデータファイルを読み込む際に、メソッドのマニュアルイベントが常に適用されます。データファイルに追加マニュアルイベントを含む場合、メソッドのイベントの後に適用されます。[マニュアルイベント] チェックボックスがオンの場合、データファイルにイベントを保存するかどうかユーザーが尋ねられることはありません。

メソッドに保存されたマニュアルイベントをデータファイル内のストレージに変換するには、メソッドからイベントを使用し、データファイルに結果を保存します。希望する場合は、メソッドからイベントを削除します。

メソッドの [積分イベントテーブル] の [マニュアルイベント] チェックボックスがオンの場合、このメソッドを用いるデータファイルを読み込む際に、メソッドのマニュアルイベントが常に適用されます。データファイルに追加マニュアルイベントを含む場合、メソッドのイベントの後に適用されます。[マニュアルイベント] チェックボックスがオンの場合、データファイルにイベントを保存するかどうかユーザーが尋ねられることはありません。

2 積分

マニュアル積分



3 ピーク同定

ピーク同定とは	54
ピークマッチングルール	55
ピーク同定のタイプ	56
絶対リテンション / マイグレーションタイム	56
補正リテンション / マイグレーションタイム	56
ピーククオリファイア	56
アマウントリミット	57
絶対リテンション / マイグレーションタイム	58
補正済みリテンション / マイグレーションタイム	60
単一のリファレンスピーク	60
複数のリファレンスピーク	61
ピーククオリファイア	62
シグナル相関	63
クオリファイアバリフィケーション	63
クオリファイア比の計算	63
同定プロセス	65
リファレンスピークの検出	65
ISTD ピークの検出	65
残りのキャリブレーションピークの検出	66
未確認のピークの分類	66

本章では、ピーク同定のコンセプトについて説明します。



ピーク同定とは

ピーク同定は、未知のサンプルの中の成分を、そのクロマトグラフ / 電気泳動特性に基づき、よく知られたキャリブレーションサンプルの分析と比較することによって、識別することです。

分析メソッドで定量が要求されている場合には、これらの成分の同定は、定量のための必要なステップとなります。対象とする各成分のシグナル特性は、メソッドのキャリブレーションテーブルに保存されます。

ピーク同定プロセスの機能は、シグナルの各ピークを、キャリブレーションテーブルに保存されたピークと比較することです。

キャリブレーションテーブルには、対象とする成分の、予想されるリテンション / マイグレーションタイムが含まれています。キャリブレーションテーブルのピークのリテンション / マイグレーションタイムと一致したピークには、その成分の属性、たとえば名前やレスポンスファクタが与えられます。キャリブレーションテーブルのどのピークとも一致しなかったピークは、不明として分類されます。このプロセスは、次のものによってコントロールされます。

- タイムリファレンスピークとして指定されたピークの、キャリブレーションテーブルでのリテンション / マイグレーションタイム、
- リファレンスピークに指定されたリテンション / マイグレーションタイムウィンドウ、
- タイムリファレンスピークではないキャリブレーションピークの、キャリブレーションテーブルでのリテンション / マイグレーションタイム、
- リファレンス以外のピークに指定されたリテンション / マイグレーションタイムウィンドウ、および
- 正しい比を持つ、付加的な所定のピークの存在。

ピークマッチングルール

ピークマッチングプロセスには、次の規則が適用されます。

- サンプルのピークが、キャリブレーションテーブルの成分ピークのピークマッチングウィンドウ内に入った場合には、ピークにはその成分の属性が与えられます。
- 複数のサンプルのピークがピークマッチングウィンドウ内に入った場合には、予想されるリテンション / マイグレーションタイムに最も近いピークが、その成分として同定されます。
- ピークがタイムリファレンスまたは内部標準の場合には、ウィンドウ内の最大のピークがその成分として同定されます。
- ピーククオリファイアも使用されている場合には、成分のピークを同定するために、ピーク比がピークマッチングウィンドウと組み合わせられます。
- ピークがクオリファイアピークの場合には、化合物のメインのピークに最も近い測定ピークが同定されます。そして
- サンプルピークがどのピークマッチングウィンドウにも入らなかった場合には、不明な成分として一覧表示されます。

ピーク同定のタイプ

サンプルのピークを ChemStation ソフトウェアのキャリブレーションテーブル内のピークとマッチさせるためには、いくつかの技法があります。

絶対リテンション / マイグレーションタイム

サンプルピークのリテンション / マイグレーションタイムは、キャリブレーション テーブル内の各成分に指定された、予想リテンション / マイグレーションタイムと比較されます。

補正リテンション / マイグレーションタイム

成分ピークの予想リテンション / マイグレーションタイムは、1 つまたは複数のピークの実際のリテンション / マイグレーションタイムを使用して補正され、マッチングプロセスはこの補正された（相対）リテンション / マイグレーションタイムを使用して行われます。リファレンスピークは、キャリブレーションテーブル内で指定されている必要があります。

ピーククォリファイア

リテンション / マイグレーションタイムでピークを同定することに加えて、ピーククォリファイアを使用すれば、より正確な結果を得ることができます。リテンション / マイグレーションタイムウィンドウ内に複数のピークが存在する場合には、正しい化合物を同定するために、クォリファイアを使用する必要があります。

アマウントリミット

〔化合物詳細〕 ダイアログボックスで定義されたアマウントリミットは、ピーク同定をクオリファイするために使用されます。同定された化合物のアマウントがアマウントリミット内であれば、ピークの同定がレポートに記述されます。

3 ピーク同定

絶対リテンション / マイグレーションタイム

絶対リテンション / マイグレーションタイム

リテンション / マイグレーションタイムウィンドウは、ピークマッチングプロセスで使用されます。リテンション / マイグレーションタイムウィンドウは、予想されるピークのリテンション / マイグレーションタイムの中心となるウィンドウです。このウィンドウ内に入ったサンプルは、成分同定の候補と見なされます。

『58 ページ 図 22』は、1.809 ～ 2.631 分のピーク 2 のリテンション / マイグレーションタイムウィンドウを示しています。ここでは、予想リテンション / マイグレーションタイムは 2.22 分です。ピーク 2 には 2 つの可能性があり、一方は 1.85 分で、もう一方は 2.33 分です。予想ピークがリファレンスピークなしの場合には、予想リテンション / マイグレーションタイムの 2.22 分に近い方のピークが選択されます。

予想ピークがタイムリファレンスまたは内部標準の場合には、ウィンドウ内の最大ピークが選択されます。

どちらの場合にも、ChemStation は 2.33 分のピークを選択します。2 つのピークが同じサイズの場合には、ウィンドウの中心に近いほうのピークが選択されます。

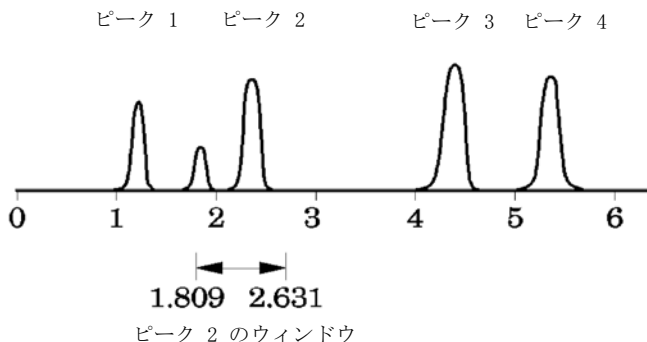


図 22 リテンション / マイグレーションタイムウィンドウ

ピークの同定には、3 種類のウィンドウが使用されます。

- リファレンスピークウィンドウは、リファレンスピークにのみ適用されます。

- リファレンスピークなしのウィンドウは、キャリブレーションされた他のすべてのピークに適用されます。
- [化合物詳細] ダイアログボックスでは、個々の成分の固有のウィンドウ値を設定します。

これらのウィンドウのデフォルト値は、[キャリブレーション設定] ダイアログボックスで入力します。ピークマッチングウィンドウを定義するリテンション / マイグレーションタイムの両サイドは、絶対ウィンドウとパーセンテージウィンドウの和です。

5% のウィンドウは、ピークのリテンション / マイグレーションタイムが、そのピークのキャリブレーションされたリテンション / マイグレーションタイムの下 2.5 % から上 2.5% までの間に入っていないなければならないことを意味しています。たとえば、キャリブレーション分析でリテンション / マイグレーションタイムが 2.00 分のピークは、その後の分析では 1.95 ~ 2.05 分に現れる必要があります。

たとえば、絶対ウィンドウが 0.20 分で、相対ウィンドウが 10% の場合には、リテンション / マイグレーションタイムウィンドウは 1.80 ~ 2.20 分になります。

$$1.80 \text{ 分} = 200 \text{ 分} - 0.10 \text{ 分} (0.20 \text{ 分} / 2) - 0.10 \text{ 分} (2.00 \text{ 分の } 10 \%)$$

$$2.20 \text{ 分} = 200 \text{ 分} + 0.10 \text{ 分} (0.20 \text{ 分} / 2) + 0.10 \text{ 分} (2.00 \text{ 分の } 10 \%)$$

3 ピーク同定

補正済みリテンション / マイグレーションタイム

補正済みリテンション / マイグレーションタイム

絶対リテンション / マイグレーションタイムを使ってピークをマッチするのは、簡潔な方法ですが常に信頼できるとは言えません。個々のリテンション / マイグレーションタイムは、条件やテクニックにおける小さな変更によって変化します。その結果、ピークマッチングウィンドウ外にピークが発生し、認識されません。

絶対リテンション / マイグレーションタイムで発生する避けられないばらつきに対処するテクニックは、1 つ以上のリファレンスピークに対する成分のリテンション / マイグレーションタイムを表すことです。

リファレンスピークは、キャリブレーションテーブル内でそのピークの参照列内のエントリとして認識されます。相対ピークマッチングテクニックは、サンプルピークのリテンション / マイグレーションタイム内のシフトを相殺する目的でピークマッチングウィンドウの位置を変更するために、リファレンスピークまたはピークを使用します。

メソッド内に定義されたリファレンスピークがない、あるいは ChemStation が実行中に少なくとも 1 つも識別できない場合、ソフトウェアは識別のために絶対リテンション / マイグレーションタイムを使用します。

単一のリファレンスピーク

リファレンスピークのリテンション / マイグレーションタイムウィンドウは、そのリテンション / マイグレーションタイムの周囲に作成されます。このウィンドウ内の最大のピークが、リファレンスピークとして同定されます。キャリブレーションテーブル内のその他のピークの予想リテンション / マイグレーションタイムは、リファレンスピークの予想リテンション / マイグレーションタイムと実際のリテンション / マイグレーションタイムとの比に基づいて補正されます。

複数のリファレンスピーク

単一のリファレンスピークによるリテンション / マイグレーションタイムの補正は、予想リテンション / マイグレーションタイムと実際のリテンション / マイグレーションタイムとのずれが、分析が進むとともに、均一そして線形に変化するという仮定に基づいています。長い分析ではしばしば、リテンション / マイグレーションタイムの変化は不均一です。そのような場合には、分析中に間隔を置いて、複数のリファレンスピークを使用すれば、より良い結果が得られます。この場合、シグナルは別個のゾーンに分けられます。それぞれのゾーン内では、リテンション / マイグレーションタイムのずれは均一であるものの、変化率はゾーンごとに異なると仮定します。

注記

複数のリファレンスピークのリテンションタイムが近すぎ、分析全体に分散していない場合には、時間補正アルゴリズムはうまく働かないことがあります。

ピーククオリファイア

1 つ以上のシグナルで成分を検出できます。複数の検出器または複数のシグナルを生成できる検出器を使用するすべての形態のクロマトグラフィに当てはまることですが、多波長またはダイオードアレイ検出器を使用する液体クロマトグラフィでは、マルチシグナルの検出が最も一般的に使用されています。通常は、メインピークがキャリブレーションテーブル内で定義される際に最大吸光度に近い波長が使用されるように、それらの検出器は設定されています。『62 ページ 図 23』では、 λ_1 です。

シグナルとして取り込んだ他の 2 つの波長は、ピーククオリファイアとして使用できます。図では、これらは λ_2 および λ_3 です。

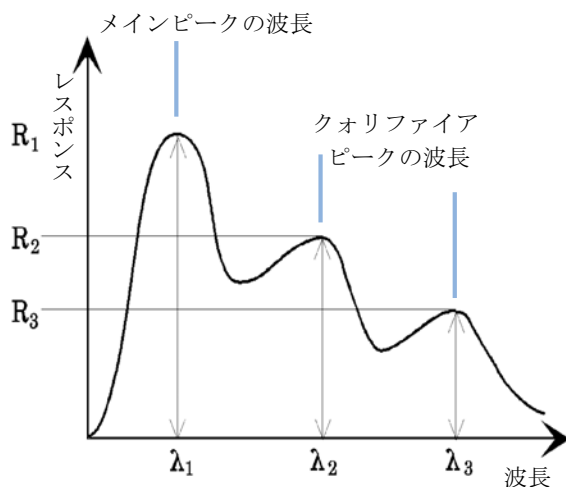


図 23 ピーククオリファイア

化合物のピークは、複数の波長に一定のレスポンス比を持ちます。

クオリファイアピークレスポンスは、メインピークレスポンスの割合の一部です。同定詳細オプションが選択されていると、予測レスポンスの許容範囲を決定するリミットをキャリブレーションテーブルで設定できます。メインピーククオリファイア λ_1 と、たとえば λ_3 などのクオリファイア

ピーク間の比率が許容リミットの範囲内であれば、化合物同一性が確認可能です。

シグナル相関

シグナル相関とは、定義されたタイムウィンドウの異なる検出器シグナルで測定された 2 つのピークを同じ化合物に割り当てることです。シグナル相関ウィンドウは、_DaMethod レジスタの QuantParm テーブル内にある SignalCorrWin パラメータによってコントロールされます。シグナル相関は、シグナル相関ウィンドウを 0.0 分に設定すると無効になります（詳細については、『マクロプログラミングガイド』を参照してください）。シグナル相関がオフの場合、異なる検出器シグナルで同じリテンション / マイグレーションタイムで溶出しているピークは異なる化合物として扱われます。

LC、CE、CE/MS、および LC/MS データ用のデフォルトシグナル相関ウィンドウは 0.03 分で、GC データ用は 0.0 分です。

クオリファイアベリフィケーション

シグナル相関が有効化された場合、すべてのデータファイルタイプに対して、デフォルトでクオリファイアベリフィケーションが有効になります。メソッドの**定量パラメータ**テーブル内にある UseQualifiers フラグを設定すると、これを無効にできます（詳細については、『マクロプログラミングガイド』を参照してください）。シグナル相関がオフになると、クオリファイアベリフィケーションも無効になります。

クオリファイア比の計算

クオリファイアベリフィケーションが化合物に対して有効化されると、クオリファイアのサイズとメインピークのサイズの比が、キャリブレーションリミットに対して検証されます。サイズは、レポート条件の中の計算ベースの設定に従って、高さまたは面積を表します。

3 ピーク同定

ピーククオリファイア

クオリファイアピークは、目標化合物と同じ方法でキャリブレーションで
きます。ユーザーが予想クオリファイア比を指定する必要はありません。
予想クオリファイア比は自動的に計算されます。

両者とも化合物のリテンションタイムで測定されます。

QualTolerance パラメータは、クオリファイア比の許容範囲値を定義しま
す。たとえば、± 20% などです。

キャリブレーションテーブルユーザーインターフェース（同定詳細）内で許
容値を設定でき、それは絶対比率で表します。

マルチレベルのキャリブレーションの場合、ChemStation は各キャリブ
レーションレベルの測定クオリファイア比に基づいて最小クオリファイア
許容値を計算します。以下の式を使用して、最小クオリファイア許容値が
計算されます。

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

この式で q_i は、レベル i での測定クオリファイア比を表します。

同定プロセス

ソフトウェアは、ピークを同定しようとする際、積分データを 3 回検査します。

リファレンスピークの検出

最初の検査は、タイムリファレンスピークを同定します。ソフトウェアは、キャリブレーションテーブルの中でリファレンスピークのリテンション / マイグレーションウィンドウの範囲内にあるものを探す分析の中から、ピークリテンション / マイグレーションタイムを検出します。分析ピークのリテンション / マイグレーションタイムが、キャリブレーションテーブルピーク用に構築されたウィンドウの範囲内にある場合、その分析のピークがキャリブレーションテーブル内のリファレンスピークであると同定されます。

ウィンドウ内で複数のピークが検出された場合は、正のシグナルクオリファイアの一致（設定されている場合）が後に続き、最大面積または高さを持つピークが、リファレンスピークとして選択されます。

各タイムリファレンスピークが検出されると、検出されたリテンション / マイグレーションタイムとキャリブレーションテーブル内に格納されている値との違いを使用して、キャリブレーションテーブル内の他のすべてのピークの予想リテンション / マイグレーションタイムが調整されます。

ISTD ピークの検出

2 回目の検査は、定義済み内部標準ピークを同定します。それらのピークが ISTD として同定されていない場合は、タイムリファレンスピークとして同定されます。ISTD ピークは、ピークリテンション / マイグレーションタイムウィンドウとピーククオリファイアにより同定されます。複数のピークが同じ ISTD ウィンドウ内で検出された場合は、最大のピークが選択されます。

残りのキャリブレーションピークの検出

3 回目の検査は、キャリブレーションテーブルに一覧表示されている残りすべてのピークを同定します。キャリブレーションテーブル内の非リファレンスピークは、RT ウィンドウを使用して残りの分析ピークとマッチされます。

非リファレンスキャリブレーションピークは、それぞれキャリブレーションテーブル内に固有のリテンション / マイグレーションタイムを保持しています。これは、あらかじめ同定したタイムリファレンスピークに基づいた特定の分析のために調整されます。キャリブレーションピークのリテンション / マイグレーションタイムウィンドウは、キャリブレーションピークの補正済みリテンション / マイグレーションタイムに基づいて調整されます。

同じウィンドウ内に複数のピークが検出された場合は、予想リテンションタイム / マイグレーションタイムに最も近く、かつオプションのクオリファイア仕様に適合するリテンション / マイグレーションタイムを持つピークが選択されます。

未確認のピークの分類

同定されていないピークが残っている場合、それらは不明なピークに分類されます。ChemStation は、同じ化合物に属する不明なピークをグループ化しようと試みます。複数のシグナルでピークが検出された場合は、各シグナル内で同じリテンション / マイグレーションタイムを持つピークが 1 つの化合物にグループ化されます。

[キャリブレーション設定] ダイアログボックス内で対応する選択がなされた場合、不明のピークは報告されます。



4 キャリブレーション

検量線	68
グループキャリブレーション	70
リキャリブレーションオプション	71

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



検量線

検量線は、ひとつまたは複数のキャリブレーションサンプルから得られる、ある化合物の量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、『68 ページ 図 24』のようになります。

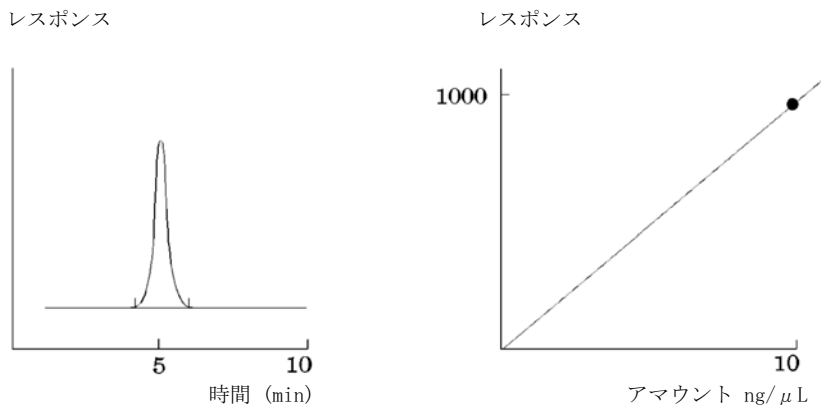


図 24 キャリブレーションサンプル (10 ng/μL) シグナルおよび検量線

相関係数は、検量線の図で表示されます。相関係数は回帰係数の平方根であり、相関係数によって、データポイント間の検量線のフィットが測定できます。係数の値は、以下の範囲内の 3 桁で表されます。

0.000 ~ 1.000

変数の意味は次のとおりです。

0.000 = フィットなし

1.000 = 完全なフィット

各キャリブレーションレベルには**相対残差**が表示されます。この値は次の式を使用して計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

relRES = 相対残差 (%)

計算されたレスポンスは、検量線のポイントを表します。

[キャリブレーションテーブルと検量線の印刷] を選択するときに、一部のレポートに印刷される**残差標準偏差**は、次の式を使用して計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

ResSTD = 残差標準偏差

Resp_{calibratedi} = ポイント i に対するキャリブレーション済みレスポンス

Resp_{calculatedi} = ポイント i に対する計算されたレスポンス

n = キャリブレーションポイントの数

グループキャリブレーション

グループキャリブレーションは、個々の濃度は不明だが、化合物グループの濃度の合計が分かっている場合の化合物に適用できます。それはたとえば、異性体などです。全体の化合物グループがキャリブレーションされます。次の式が使用されます。

キャリブレーション

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

変数の意味は次のとおりです。

Conc_{AB} は、化合物 A および B から構成される化合物グループの濃度

Response_A は、化合物 A の面積（または高さ）

RF_A は、レスポンスファクタ

化合物グループ内の化合物には、同等のレスポンスファクタを仮定します。

$$RF_A = RF_B$$

そのため、化合物グループ内の化合物の濃度は、次の式で計算されます。

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

リキャリブレーションオプション

キャリブレーションテーブルのレスポンスを新しいキャリブレーションデータで更新するには、いくつかの方法があります。

平均

すべてのキャリブレーション分析の平均が次の式を用いて計算されます。

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

重み付け移動平均

すべてのキャリブレーション分析に対する重み付け平均が計算されます。更新済みの重み付けは、[リキャリブレーション設定] ダイアログボックスで設定されます。

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

置換

新しいレスポンス値が古い値に置き換わります。

4 キャリブレーション

リキャリブレーションオプション



5 定量

定量とは	74
定量計算	75
補正係数	76
絶対レスポンスファクタ	76
倍率	76
希釈率	76
サンプルアマウント	77
キャリブレーションされていない計算の手順	78
面積 % および高さ %	78
キャリブレーションされた計算の手順	79
ESTD 計算	80
norm% 計算	82
ISTD 計算	83
分析 1: キャリブレーション	84
分析 2: 未知サンプル	85
キャリブレーションピークの ISTD 計算	85
キャリブレーションされていないピークの ISTD 計算	86

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



定量とは

ピークが積分され同定された後の分析における次の段階は、定量になります。定量では、ピーク面積または高さを使用し、サンプル内の化合物の濃度を測定します。

定量分析には多くの手順が含まれますが、要約すると次のようになります。

- 分析している化合物を把握する。
- この化合物を含んでいるサンプルの分析方法を確立する。
- 既知の濃度または化合物の濃度を含む 1 つまたは複数のサンプルを分析して、その濃度に起因するレスポンスを取得する。

検出器に非直線形のレスポンスが返ってくる場合は、化合物の異なる濃度を使用して、たくさんのサンプルを分析することもできます。このプロセスは、**マルチレベルキャリブレーション**と呼ばれます。

- 化合物の未知の濃度を含むサンプルを分析して、その未知の濃度に起因するレスポンスを取得します。
- 未知の濃度のレスポンスを既知の濃度の反応と比較し、存在する化合物の量を測定します。

未知のサンプルの反応と既知のサンプルのレスポンスとを有効に比較するには、同一の条件のもとでデータを取得し処理する必要があります。

定量計算

ChemStation では、混合物内に存在する成分ごとの濃度を測定する次のような計算手順が提供されます。

- パーセント
- 標準化
- 外部標準 (ESTD)
- ESTD%
- 内部標準 (ISTD)
- ISTD%

未知のサンプル内の化合物の濃度を測定するのに使用される計算方法は、定量の種類によって異なります。各計算手順では、計算にピーク領域または高さが使用され、異なる種類のレポートが生成されます。

補正係数

定量計算では、絶対レスポンスファクタ、倍率、希釈率、およびサンプルアマウントの4つの補正係数が使用されます。これらの係数は、キャリブレーションの手順の中で使用され、検出器のレスポンスにおける変動を、異なるサンプル成分、濃度、サンプル希釈、サンプルアマウント、および変換単位に補正します。

絶対レスポンスファクタ

あるサンプル成分の絶対レスポンスファクタは、成分の量をキャリブレーション混合物の分析における成分のピークの測定面積または高さで割ったものを表します。キャリブレーションされた各計算手順で使用される絶対レスポンスファクタは、検出器のレスポンスをサンプルの個々の成分に補正します。

倍率

倍率は、各成分の結果に乘じるために各計算式で使用されます。倍率は、単位を変換して量を表すために使用できます。

希釈率

希釈率ファクタは、レポートが印刷される前に、すべての計算された結果が乘じられる係数です。結果のスケールを変更するために、または分析前にサンプル組成の変更を補正するために希釈率を使用できます。コンスタントファクターの使用を必要とする以外の目的にも希釈率を使用できます。

サンプルアmount

ESTD% または ISTD% の計算が選択された場合、ESTD および ISTD レポートには、絶対値ではなく相対値が表示されます。つまり、各成分のアmountは、サンプルアmountの割合として表示されます。サンプルアmountは、ESTD% および ISTD% レポート内で使用され、指定された値で割ることにより、分析された成分の絶対アmountを相対値に変換します。

キャリブレーションされていない計算の手順

キャリブレーションされていない計算の手順では、キャリブレーションテーブルは必要ありません。

面積 % および高さ %

[面積 %] の計算方法では、分析における各ピーク的面積は、すべてのピーク的面積の合計に対するパーセンテージとしてレポートされます。[面積 %] は、前もってキャリブレーションする必要がなく、検出器に注入されたサンプルの量に依存しません。レスポンスファクタは使用しません。すべての成分が検出器の中で均等に反応する場合、[面積 %] は成分の相対アマウントに相応する近似値になります。

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

[高さ %] の計算方法では、分析における各ピークの高さは、すべてのピークの高さの合計に対するパーセンテージとしてレポートされます。

キャリブレーション設定、サンプル情報 ダイアログボックス、またはシーケンステーブルからの倍率および希釈率は、面積 % または高さ % 計算に適用されません。

キャリブレーションされた計算の手順

外部標準 (ESTD)、標準化、および内部標準 (ISTD) の計算では、レスポンスファクタが必要で、そのためキャリブレーションテーブルが使用されます。キャリブレーションテーブルは、選択した手順によって、選択した単位へのレスポンスの変換を指定します。

ESTD 計算

ESTD は基本的な定量の手順で、キャリブレーションおよび未知サンプルの両方を同じ条件のもと分析します。未知サンプルの結果は、その後キャリブレーションサンプルの結果と比較し、未知サンプルのアマウントを計算します。

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。キャリブレーションからレスポンスファクタを取得し、その後保存します。引き続きサンプルを分析する中で、このレスポンスファクタを測定したサンプルアマウントに適用することにより、成分のアマウントを計算します。注入サイズ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、分析間でサンプル注入サイズに再現性があるかを確認します。

ESTD レポートを準備する際、未知サンプルの中の特定の化合物のアマウントの計算が、次の 2 つのステップで行われます。

- 1 この化合物のキャリブレーションポイントを通る曲線の式は、[キャリブレーション設定] または [検量線] ダイアログボックスで指定されたフィットの種類を使用して計算されます。
- 2 未知サンプル内の化合物のアマウントは、次に説明する式を使用して計算されます。このアマウントはレポートで表示されるか、レポートされる前に、倍率、希釈率、またはサンプルアマウントの値により呼び出された追加の計算で使用される可能性があります。

ESTD レポートを選択した場合、化合物 x の絶対アマウントを計算するのに使用する式は次のとおりです。

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

変数の意味は次のとおりです。

Response_x は、ピーク x のレスポンスです。

RF_x は、コンポーネント x のレスポンスファクタで、次のように計算されます。

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

M は倍率です。

D は、希釈率です。

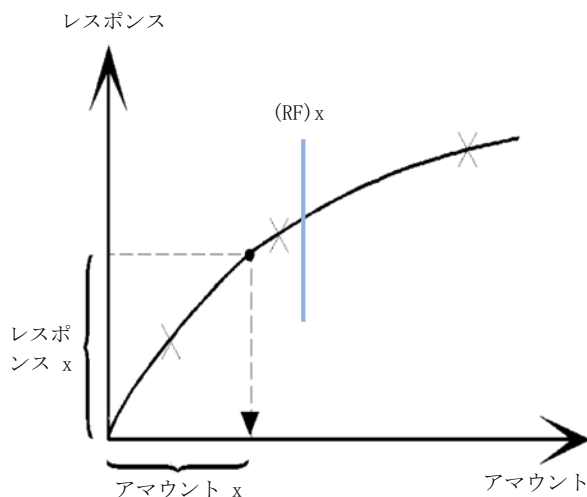


図 25 レスポンスファクタ

倍率および希釈率は、[キャリブレーション設定] または [サンプル情報] ダイアログボックスのいずれかから読み込みます。

ESTD% レポートが選択され、サンプルアmountがゼロでない場合は、成分 x の相対アmount (%) は次のように計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

x の絶対アmountは、上記の ESTD 計算で示してあります。

シングルランではサンプルアmountを、[サンプル情報] ボックスまたは [キャリブレーション設定] ダイアログボックスから取得します。サンプルアmountがゼロの場合は、ESTD が計算されます。

norm% 計算

ノーマライゼーション方式では、異なるサンプル成分に対して検出器の感度に発生する変化を補正するために、ピーク面積（または高さ）にレスポンスファクタを適用します。

Norm% レポートは、化合物の絶対アmountよりも相対アmountを計算する追加ステップがある点を除いて、ESTD レポートと同じように計算されます。

norm% レポートには、面積% および高さ% レポートと同様の欠点があります。全体のピーク面積に影響を与える変更は、各個別ピークの濃度計算にも影響を与えます。ノーマライゼーションレポートは、重要なすべての成分が溶出され統合された場合にのみ使用する必要があります。選択されたピークをノーマライゼーションレポートから除外すると、サンプル内のレポート結果が変更されます。

成分 x の Norm% を計算するのに使用されるのは次の式です。

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

変数の意味は次のとおりです。

レスポンス _x	ピーク x の面積（または高さ）
RF _x	レスポンスファクタ
S (Response · RF)	ピーク x を含むすべてのピークに対する (Response · RF) の積のすべての合計
M	乗数
D	希釈率

倍率および希釈率は、[レポート条件] ダイアログボックスの [定量設定] または [シーケンステーブル] からのいずれかより読み込みます。

ISTD 計算

ISTD 手順では、ノーマライジングファクタとして働く成分の既知のアマウントを追加することにより、ESTD 方式の欠点が排除されます。この**内部標準**の成分は、キャリブレーションおよび未知のサンプルの両方に追加されます。

ソフトウェアは、メソッドの中に保存されている以前のキャリブレーションから取得した適切なレスポンスファクタを取り込みます。分析による内部標準の濃度およびピーク面積または高さを使用して、ソフトウェアは成分の濃度を計算します。

内部標準として使用される化合物は、化学的にもリテンション / マイグレーションタイムにおいてもキャリブレーション化合物に類似していなければなりません、クロマトグラフ的には識別できなければなりません。

表 7 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追加する必要がある
機器のドリフトは、内部標準で補正できる。	
ISTD と未知のサンプルの化学的挙動が類似している場合、サンプルの準備の影響が最小限に抑えられる。	

ISTD 手順が非直線形の特徴をもったキャリブレーションに使用される場合、計算方式の結果発生するエラーが組織的なエラーを引き起こさないように注意する必要があります。マルチレベルキャリブレーションでは、ISTD 化合物のアマウントを一定、つまり、化合物のキャリブレーションカーブが非直線形の場合、すべてのレベルで同じにする必要があります。

内部標準分析では、対象となる成分のアマウントは、2 つのピークの比率によって内部標準成分のアマウントと関係しています。

ツーランの ISTD キャリブレーションでは、未知のサンプルでの特定の化合物の補正されたアマウント比の計算は、次のような段階により実行されます。

分析 1: キャリブレーション

- 1 キャリブレーションポイントは、キャリブレーション テーブルの特定のピークの、レベルごとのアマウント比とレスポンス比の計算によって作成します。
アマウント比は、任意のレベルについての内部標準のアマウントによって分割される化合物のアマウントです。
レスポンス比は、任意のレベルについての内部標準の面積または高さによって分割される化合物の面積です。
- 2 キャリブレーションポイントを通る曲線についての式は、[キャリブレーション設定] または [検量線] ダイアログ ボックスで指定されたカーブフィットの種類を使用して計算されます。

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

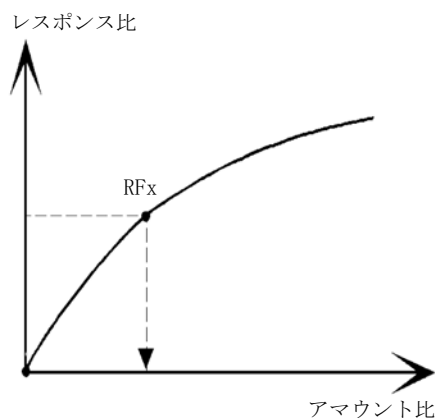


図 26 アマウント比

分析 2: 未知サンプル

- 1 未知のサンプルでの化合物のレスポンスは、未知のサンプルでの内部標準のレスポンスで分割され、未知のレスポンス比を提供します。
- 2 未知のサンプルのアマウント比は、上記のステップ 2 の検量線の式およびサンプル内の ISTD の実アマウントを使用して計算されます。

キャリブレーションピークの ISTD 計算

シングルレベルキャリブレーション用に、キャリブレーションされた成分 x の実アマウントを計算するのに使用される式は、次のようなものです。

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

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

変数の意味は次のとおりです。

RF_x は化合物 x のレスポンスファクタです。

ISTD の実アマウント（**実アマウント**）は、[キャリブレーション設定] または 未知のサンプルに追加された内部標準向けの [サンプル情報] ダイアログボックスに入力された値です。

M は倍率です。

D は、希釈率です。

ISTD% レポートタイプが選択された場合、成分 x の相対 (%) アマウントの計算には次の式が使用されます。

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

キャリブレーションされていないピークの ISTD 計算

同定されていないピークのアマウントを計算するのに使用されるレスポンスファクタを定義するには、2通りの方法があります。

- 1 [キャリブレーション設定] ダイアログボックスの [レスポンスファクタ 固定] ボックスで設定される固定レスポンスファクタを使用します。ISTD 補正を指定することで、固定レスポンスファクタの補正を選択できます。

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

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

RF_x は、[キャリブレーション設定] ダイアログボックスで設定されるレスポンスファクタです。

これらの式からは、ISTD レスポンス内にある変動が未知の成分の定量を補正するのに使用されることがわかるはずです。

- 2 キャリブレーションピークを使用します。これにより、すべてのピークの定量に確実に同じレスポンスファクタが使用されるようになります。選択された化合物およびキャリブレーションされていないピークのレスポンスファクタは、すべてのリキャリブレーションの際に補正されます。キャリブレーションされたピークのレスポンスファクタが変化した場合、キャリブレーションされていないピークのレスポンスファクタもまた、同様のアマウントだけ変化します。キャリブレーションテーブルがすでに設定されている場合、[キャリブレーション設定] ダイアログボックスにある [既存化合物使用] コンボボックスから化合物を選択できます。

キャリブレーションされていないピーク x の実アマウントを計算するのに使用される式を上を示しています。



6

システムスータビリティの評価

システムスータビリティの評価	89
ノイズ測定	92
標準偏差の 6 倍を使用したノイズ計算	92
ピーク to ピーク の式を使用したノイズ計算	93
ASTM メソッドによるノイズ計算	94
S/N 計算	96
ドリフトおよびうねり	96
ピーク対称性の計算	97
システムスータビリティの式および計算	99
一般定義	100
空隙量	100
リテンションされない化合物のリテンションタイム t (m) [分]	100
パフォーマンステストの定義	101
統計モーメント	101
統計モーメント、歪み、および超過	102
真のピーク幅 W_x [分]	103
容量ファクタ (USP)、容量比率 (ASTM) k'	103
USP テーリングファクタ (USP) t	103
カラムごとの理論段数 (USP, ASTM) n	104
メートルごとの理論段数 N [1/m]	105
相対リテンション (USP, ASTM)、選択性 α	105
分離度 (USP, ASTM) R	106
再現性に関する定義	107
サンプル平均 M	107
サンプル標準偏差 S	107
相対標準偏差 $RSD[\%]$ (USP)	108
平均値の標準偏差 SM	108



6 システムスタビリティの評価

ISTD 計算

信頼区間 CI	109
回帰分析	110
回帰係数	110
標準偏差 (S)	111
内部保持されている倍精度数へのアクセス	112

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

システムスータビリティの評価

サンプル分析に使用する前の分析機器と、定期的に使用する前の分析メソッドの両方のパフォーマンスを評価することは、良い分析の習慣です。定期的な分析の前および実行中に、分析システムのパフォーマンスをチェックするのも良い考えです。ChemStation ソフトウェアでは、これらの 3 つの種類のテストを自動的に行うためのツールが提供されています。機器テストでは、検出器の感度、ピークリテンション / マイグレーションタイムの精度、およびピーク面積精度のテストが含まれます。メソッドテストでは、リテンション / マイグレーションタイムとアマウントの精度、選択性、および操作における日々の変化に対するメソッドの堅牢性の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 つの特定のピーク間の分離度、およびピークテーリングのテストが含まれます。

ラボでは、次の要件を満たす必要があります。

- GLP 規制
- GMP 規制および cGMP 規制
- GALP 規制

ラボでは、これらのテストの実施、およびその結果の完全な文書化が推奨されます。たとえば、ISO9000 認定に応じた品質管理システムの一部になっているラボでは、機器のパフォーマンスが適切であることを証明する必要があります。

ChemStation では、複数の分析結果を照合し、シーケンスサマリレポートの中でそれらの結果を統計的に解析します。

テストは、規制当局および独立監査によって一般的に認められているフォーマットで文書化されます。統計には次のものが含まれます。

- ピークリテンション / マイグレーションタイム
- ピーク面積
- アマウント
- ピーク高さ
- ピーク半値幅
- ピーク対称度

6 システムスタビリティの評価

システムスタビリティの評価

- ピークテーリング
- 容量ファクタ (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
- 歪み
- 超過

平均値、標準偏差、相対標準偏差、および信頼区間が計算されます。標準偏差、相対標準偏差、または信頼区間のパラメータにリミットを設定できます。値がリミットを超える場合は、そのことに注意を促すようにレポートにフラグが付きます。

測定が行われた時の実際の状態の記録を取ることで、分析データの質がサポートされます。ChemStation のログブックは分析前後に機器条件を記録します。この情報はデータとともに保存され、サンプルデータとともにレポートされます。分析全体の機器パフォーマンスカーブをシグナルとして記録し、データファイルに保存します。機器が記録することをサポートしている場合には、クロマトグラムに重ね書きし、たとえば監査の時など、必要に応じて呼び出すことができます。

ベースラインノイズおよびドリフトは、自動的に計測されます。検出可能な最小レベルが、メソッド内でキャリブレーションされた化合物ごとにピーク高さのデータから計算されます。

最後に、機器コンフィグレーション、機器のシリアル番号、カラム / キャピラリー識別番号、および自分のコメントを印刷される各レポートに入れることができます。

拡張パフォーマンス結果は、リテンション / マイグレーションタイムと化合物名によって特徴付けることで、メソッドでキャリブレーションされた化合物に対してのみ計算されます。

典型的なシステムパフォーマンステストのレポートには、次のパフォーマンス結果が含まれます。

- 機器の詳細
- カラム / キャピラリーの詳細
- 分析メソッド

- サンプル情報
- 取り込み情報
- シグナル説明およびベースラインノイズ測定
- リテンション / マイグレーションタイムまたは化合物名でラベル付けされたシグナル

さらに、次に挙げる情報がクロマトグラム内のキャリブレーションされた化合物ごとに生成されます。

- リテンション / マイグレーションタイム
- k'
- 対称度
- ピーク幅
- 理論段数
- 分離度
- シグナル / ノイズ (S/N 比)
- 化合物名

ノイズ測定

ノイズは、シグナルの選択された時間範囲で取得されたデータポイント値から測定されます。ノイズは、次の異なる 3 種類の方法で扱われます。

- ドリフトの直線回帰の標準偏差の 6 倍 (sd)
- ピーク to ピーク (修正されたドリフト)
- ASTM メソッド (ASTM E 685-93) による測定

ノイズは、シグナルの最高 7 つの範囲に対して計算できます。範囲は、レポートパラメータの中で、システムスータビリティの設定の一部として指定されます。

標準偏差の 6 倍を使用したノイズ計算

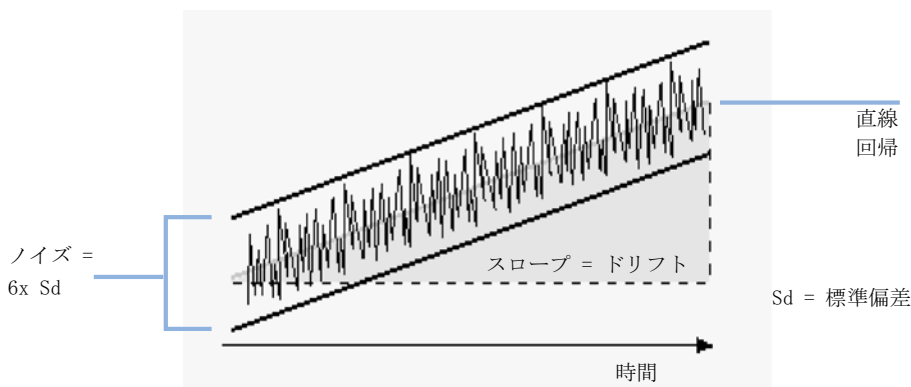


図 27 標準偏差の 6 倍を使用したノイズ

直線回帰は、任意の時間範囲内のすべてのデータポイントを使用して計算されます（『「回帰分析」110 ページ 図』を参照してください）。ノイズは、次の式によって取得されます。

$$N = 6 \times Std$$

変数の意味は次のとおりです。

N は、6 倍標準偏差法に基づくノイズです。

Std は、この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。

ピーク to ピーク の式を使用したノイズ計算

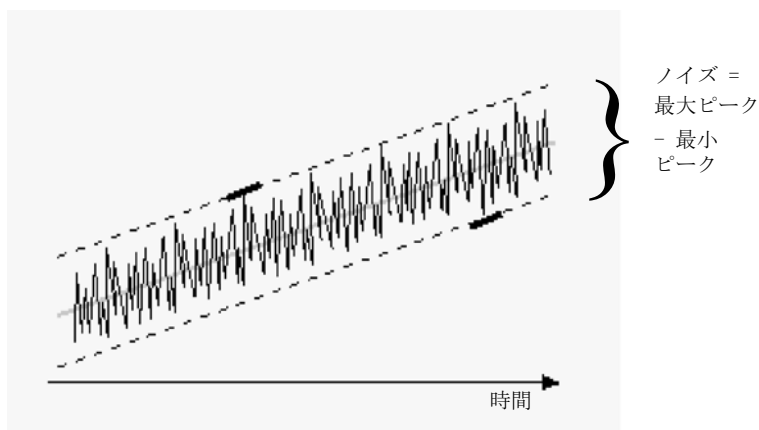


図 28 最大ピークから最小ピーク（距離）としてのノイズ

ドリフトは、時間範囲内のすべてのデータポイントを使用して直線回帰を測定することでまず計算されます（『「回帰分析」110 ページ 図』を参照）。直線回帰のラインは、ドリフト修正済みシグナルを得るために時間範囲内のすべてのデータポイントから差し引かれます。ピーク to ピークによるノイズは、次の式によって取得されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

N はピーク to ピークノイズです

$I_{\max}$ は最高（最大）強度のピークです

$I_{\min}$ はこの時間範囲内の最低（最小）強度のピークです。

ASTM メソッドによるノイズ計算

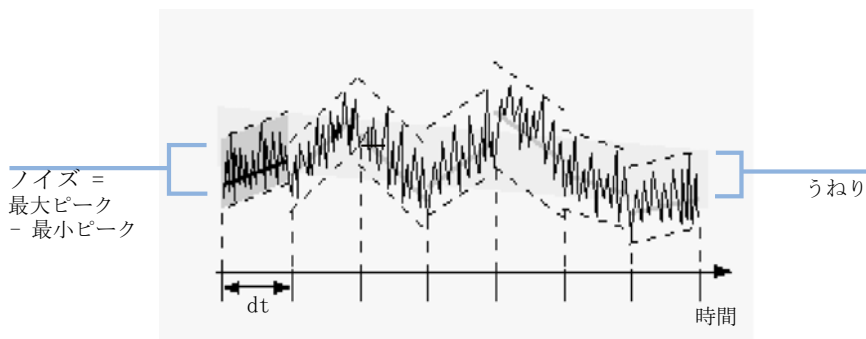


図 29 ASTM メソッドで測定されたノイズ

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 時間を超えると決まります。各サイクル (dt) の時間範囲は 10 分に設定されます。この 10 分間で、選択した時間範囲内に最少で 6 サイクル得られます。

短周期ノイズ。1 分間当たりのサイクルが 1 を上回る周波数検出器シグナルのあらゆるランダム変動に対する最大振幅。短周期ノイズは、選択した時間範囲が 10 ～ 60 分間の選択した時間範囲に対して決まります。各サイクル (dt) の時間範囲は 1 分に設定されます。この 1 分間で、選択した時間範囲内に最少で 10 サイクル得られます。

超短周期ノイズ (ASTM E 685-93 の対象外)。この用語は、0.1 分間当たりのサイクルが 1 を上回る周波数検出器シグナルのあらゆるランダム変動に対する最大振幅を説明するために使用されます。

超短周期ノイズは、選択した時間範囲が 1 ～ 10 分間の選択した時間範囲に対して決まります。各サイクル (dt) の時間範囲は 0.1 分に設定されま

す。この 0.1 分間で、選択した時間範囲内に最少で 10 サイクル得られます。

周期の数 n の決定

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

ここでは、t がサイクルタイム、t_{tot} はノイズが計算される対象の合計時間です。

各サイクルのピーク間ノイズの計算

ドリフトは、時間範囲のすべてのデータポイントを使用して直線回帰を決定することで、最初に計算されます（『「回帰分析」 110 ページ 図』を参照してください）。直線回帰ラインは、時間範囲内のすべてのデータポイントから減算されることによって、ドリフト補正されたシグナルを与えます。ピーク間ノイズは、次の式を使用して計算されます。

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

ここでは、N がピーク間ノイズ、I_{max} が時間範囲における最も強い（最大の）ランプ強度のピークであり、I_{min} は、最も低い（最少の）ランプ強度のピークです。

ASTM ノイズの計算

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

ここでは、N_{ASTM} は、ASTM メソッドに基づくノイズです。

選択した時間範囲が 1 分より短い場合、ASTM ノイズ測定は実行されません。選択した時間範囲が 1 分以上の場合は、その範囲に基づいて、前述の ASTM 法を使ってノイズが測定されます。1 サイクル当たり少なくとも 7 つのデータポイントが計算に使用されます。自動ノイズ決定のサイクルは、10 % 重複します。

S/N 計算

S/N 計算のためにノイズを計算するには、ドリフトの直線回帰の標準偏差の 6 倍 (sd) が ChemStation では使用されます。システムスーパビリティ設定内で指定されている範囲からピークに最も近い範囲が選択されます。S/N は、次の式によって取得されます。

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

S/N は、各シグナル内のピークごとに計算されます ChemStation でノイズ値が見つからない場合は、S/N は「-」と記録されます。

ドリフトおよびうねり

ドリフトは、直線回帰のスロープとして表されます。標準偏差の 6 倍を使用したノイズの図を参照してください。うねりは、ASTM ノイズサイクル内の中間データ値のピーク to ピークノイズとして測定されます。「ASTM メソッドで測定されたノイズ」を参照してください。

ピーク対称性の計算

ChemStation では、ピーク対称度の比率は測定されません。これは通常、ピーク高さのピーク半値幅を 10 %、または FDA が推奨する 5% で比較して測定されます。

ピーク対称度は、インテグレータによって次に挙げるモーメント方程式で擬似モーメントとして計算されます。

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

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

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

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

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

変曲点が発見されない場合、または変曲点が 1 個だけ記録された場合は、ピーク対称度は次のように計算されます。

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

6 システムスタビリティの評価

ピーク対称性の計算

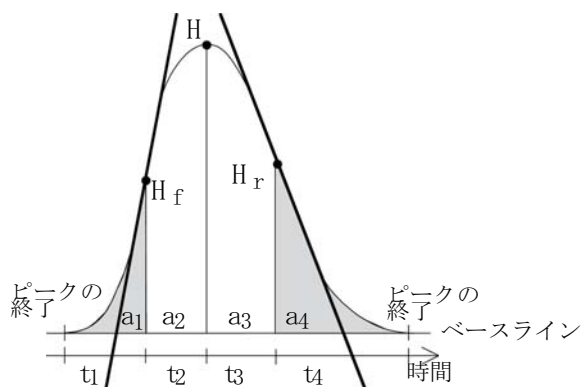


図 30 ピーク対称度ファクタの計算

変数の意味は次のとおりです。

a_i = 区分の面積

a_i = 区分の時間

H_f = 表の変曲点の高さ

H_r = 裏の変曲点の高さ

H = 頂点の高さ

システムスータビリティの式および計算

ChemStation では、さまざまなシステムスータビリティのテストから結果を取得するのに、次の式が使用されます。結果は、パフォーマンス、パフォーマンス + ノイズ、パフォーマンス + スペクトル、および拡張パフォーマンスレポートスタイルを使用してレポートされます。

所定の定義に ASTM または USP が指定されている場合、定義は対応する出典に従います。ただし、ここで使用されている記号は、出典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 2 つの出典は以下のとおりです。

- ASTM (米国材料試験協会) : セクション E 682 - 93, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 14.01
- USP (米国薬局方) : The United States Pharmacopeia, XX. Revision, pp. 943 - 946

一般定義

空隙量

$$V = d^2 \pi l \{f/4\}$$

変数の意味は次のとおりです。

d = カラムの直径 [cm]

p = 定数、円の円周対直径の比率

l = カラムの長さ [cm]

f = 固定相では利用されないが、移動相で利用可能なカラム量の割合。f
のデフォルト値 = 0.68 (Hypersil 用)

リテンションされない化合物のリテンションタイム t (m) [分]

(デッドタイムまたは空隙時間とも呼ばれる)

$$T_m = V/F$$

変数の意味は次のとおりです。

F = 流量 of LC [ml/分]

パフォーマンステストの定義

統計モーメント

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

変数の意味は次のとおりです。

N = スライス面積の数

A_i = インデックス i のスライス面積値 (レスポンス)

d_t = 隣接するスライス面積間の時間間隔

t₀ = 最初のスライス面積の時間

$\sum_{i=1}^N$ = 部分測定を開始インデックス 1 から終了インデックス N の合計

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

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

統計モーメント、歪み、および超過

統計モーメントは、非対称ピーク形状を説明する代替りの方法として計算されます。ピークモーメントの数は無限にあります。最初の 5 つを使用してクロマトグラフピークに接続します。これらは、[0 番目のモーメント]、[1 番目のモーメント]、… [4 番目のモーメント] と呼ばれます。

0 番目のモーメントはピーク面積を表します。

1 番目のモーメントは、平均リテンションタイムまたはピークの重力の中心で測定されたリテンションタイムです。ピークが対象でない限りは、これはピークの最大値で測定されたクロマトグラフのリテンションタイムとは異なります。

2 番目のモーメントは、側面波及の測定であるピークの分散です。これは、機器システムの別の部分からの分散の合計です。

3 番目のモーメントは、縦の対称度または歪みを説明します。これは、ガウス標準からのピーク形状の逸脱を測定します。[パフォーマンス + 拡張] レポートで追加された歪みは、無次元の形態です。対称ピークには 0 の歪みがあります。テーリングピークには正の歪みがあり、1 番目のモーメントはリテンションタイムより大きくなります。フロントピークには負の歪みがあり、1 番目のモーメントはリテンションタイムより小さくなります。

4 番目のモーメントまたは超過は、縦軸に沿ったピークの圧縮または伸縮の大きさで、4 番目のモーメントが 0 であるようなガウス標準とこれとの比較方法です。これは、コンスタント面積を維持しながらガウスピークの側を移動または分離させることで視覚化できます。比較においてピークを圧縮または小さくする場合は、超過は負になります。高い場合は、超過は正になります。また、超過は無次元の形式にある [パフォーマンス + 拡張] レポートで与えられます。

真のピーク幅 W_x [分]

W_x = width of peak at height x % of total height

W_B ベース幅、4 シグマ、変曲点を通るタンジェントをベースラインを交差させることで取得（タンジェント法のピーク幅）。

$W_{4.4}$ 高さの 4.4% 幅（5 シグマ幅）

$W_{5.0}$ 高さの 5% 幅（テーリングピーク幅）、USP テーリングファクタに使用

$W_{50.0}$ 高さの 50% 幅（真の半値幅または 2.35 シグマ）

容量ファクタ（USP）、容量比率（ASTM） k'

$$k' = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

変数の意味は次のとおりです。

T_R = ピークのリテンションタイム [分]

T_0 = 空隙時間 [分]

USP テーリングファクタ（USP） t

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

変数の意味は次のとおりです。

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

$W_{5.0}$ = ピーク高さの 5 % のピーク幅 [min]

6 システムスタビリティの評価 パフォーマンステストの定義

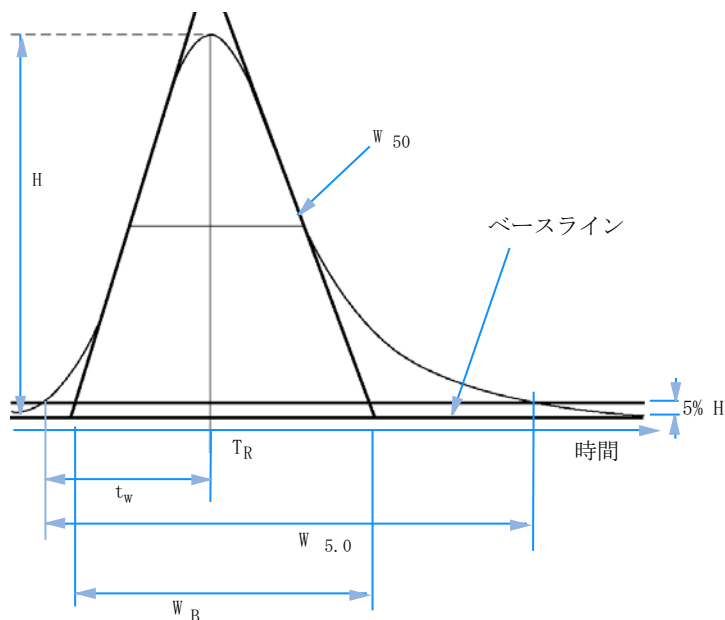


図 31 パフォーマンスパラメータ

カラムごとの理論段数 (USP, ASTM) n

タンジェント法 (USP, ASTM) :

$$n = 16 \left(\frac{T_R}{W_B} \right)^2$$

変数の意味は次のとおりです。

W_B = ベース幅 [分]

半値幅法 (USP, ASTM) :

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

変数の意味は次のとおりです。

W_{50} = ピーク高さの半分のピーク幅 [分]

5 シグマ法：

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

変数の意味は次のとおりです。

$W_{4.4}$ = ピーク高さの 4.4% のピーク幅 [分]

分散法：

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

変数の意味は次のとおりです。

$M_x = x$ 番目の統計モーメント（『統計モーメント』101 ページ [図](#)）も参照してください）

メートルごとの理論段数 N [1/m]

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

変数の意味は次のとおりです。

n = 理論段数

l = カラムの長さ [cm]

相対リテンション (USP, ASTM)、選択性 α

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

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

変数の意味は次のとおりです。

$k'_{(x)}$ = ピーク x の容量ファクタ

分離度 (USP, ASTM) R

(ピーク a および b に関連、ピーク a の T_R < ピーク b の T_R ; T_R の単位は分)

タンジェント法 (USP, ASTM):

$$R = \frac{2(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{B(b)} + W_{B(a)}}$$

5 シグマ法:

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

半値幅法 (パフォーマンス レポートで使用される分離度):

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

統計法

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

変数の意味は次のとおりです。

$M1_{(x)}$ = ピーク x の平均リテンションタイム (1 番目の統計モーメント)
[分]

$W_{B(x)}$ = ピーク x のベース幅 [幅]

$W_{4.4(x)}$ = ピーク x の 高さ 4.4% の幅 [分]

$W_{50(x)}$ = ピーク x の 高さ 50% の幅 [分]

$W_S(x)$ = 統計モーメントから抽出した幅 = ピーク x [分] の $\sqrt{M2}$
(『統計モーメント』 [101 ページ 図](#)) も参照してください)

再現性に関する定義

再現性の点から見た分析データの統計的レビューのためには、シーケンスは、無数の起こり得る実験結果から取得した小さなランダムサンプルと見なされます。結果全体を吟味するには、無限のサンプル材料と時間が必要になります。厳密に統計的なデータは、完全な自己完結型のデータセットや母集団にのみ当てはまります。そのため、選択されたサンプルが全データを表していると仮定できることが、そのような処理に対する前提条件になります。

サンプル平均 M

N 回の測定から構成されるランダムサンプルの平均値 M は、次に挙げる式に基づいて、連続カウンタ i をインデックスに持つ、この N のシングル観測値 X_i の限定されたセットから計算されます。

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

変数の意味は次のとおりです。

N = 部分測定の数

X_i = i 個目の部分測定値

サンプル標準偏差 S

サイズが N であるランダムサンプルがあるとします。大きなデータ母集団から選択された有限のサンプルに対するサンプル標準偏差 S は、次のように決定されます。

6 システムスーパビリティの評価

再現性に関する定義

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

サンプル標準偏差 S は、全体の母集団に対する標準偏差 s とは次の 2 点で異なります。

- 実際の平均値の代わりに、サンプル平均値 M が使用される
- N の代わりに $N-1$ で 割る

相対標準偏差 RSD[%] (USP)

相対標準偏差は、次のように定義されます。

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

平均値の標準偏差 S_M

M をサンプル平均値、 S をサンプル [または $(N-1)$] 標準偏差とします。サンプル平均値 M の標準偏差 S_M は、次のように決定されます。

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

これをさらに例を使って説明すると、次のようになります。

ある化合物のリテンションタイムは、1 つのシーケンスの中で計算された平均値からわずかに外れている可能性があるのに対し、他のシーケンスからのデータは、たとえば周囲の温度が変化したり、時間が経つにつれてカラムの材料が劣化したりすることが原因で、さらに大きく異なる可能性があります。この偏差を測定するために、サンプル平均値の標準偏差 S_M を、上記の式に基づいて計算できます。

信頼区間 CI

信頼区間を計算すると、平均値を 1 つのサンプルだけではなく、母集団全体に適用した場合に予想される、平均値の正確さに関する情報が得られます。

全体平均の $100 \times (1 - \alpha) \%$ 信頼区間は、次の式から得られます。

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

変数の意味は次のとおりです。

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

α のリスク確率での t 分布のパーセント a

シーケンスサマリレポートの拡張統計には、95% の信頼区間が使用できます ($\alpha = 0.05$)。

サンプル量が小さい場合は、 t 分布（または「研究者分布」）を使用する必要があります。サンプル量が大きい場合は、 t 分布および一般分布（ガウス分布）の結果には違いがありません。このため、サンプルが 30 以上の場合、一般分布が代わりに使用されます（数が大きい場合は t 分布の計算はとても困難になるので、近似値を求めるには一般分布が最適です）。

6 個のサンプルに対する 95% 信頼区間：

$$1 - \alpha = 0.95$$

$$N = 6$$

5 (N-1) 自由度に対して t 分布表から t の正しい値を取得する必要があります、 $\alpha/2$ の場合は 0.025 になります。これにより、次のような CI の計算式が成り立ちます。

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

回帰分析

次のように仮定します。

一次関数：

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

係数：

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

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

変数の意味は次のとおりです。

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

回帰係数

$$r = \frac{\left(N \cdot \sum_{i=1}^N X_i Y_i - \sum_{i=1}^N X_i \cdot \sum_{i=1}^N Y_i \right)}{\sqrt{\Delta_X \cdot \Delta_Y}}$$

変数の意味は次のとおりです。

$$\Delta_Y = N \cdot \sum_{i=1}^N Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^N Y_i \right)^2$$

標準偏差 (S)

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

内部保持されている倍精度数へのアクセス

バリデーションの目的で、検量線、相関係数、理論段数などの ChemStation から得られる結果をマニュアルで再計算する必要がある場合があります。これを行うには、ChemStation で使用される数の書式を考慮する必要があります。

ChemStation 内部に保存されているすべての数は、「C」のデータタイプである DOUBLE が使用されます。これは、扱う数ごとに、14 桁の有効数字が保存されている計算になります。このデータタイプの実装は、「C」のデータタイプおよび関連する端数計算ルールに関する IEEE 標準を Microsoft が実装したものに従っています (Microsoft の文書 Q42980、Q145889 および Q125056 を参照してください)。

キャリブレーションテーブルの計算に使用可能なパラメータの数に制限がないため、丸め誤差の増殖と蓄積により発生する恐れのあるエラーを正確に計算することは不可能です。一方、異なる検量線の構成で完全なテストを行うと、最高 10 桁の精度が保証されます。クロマトグラフ分析における面積、高さ、およびリテンションタイムの再現性は、通常 3 桁の有効数字で表されるので、計算においては、10 桁の有効数字があれば十分です。この理由から、キャリブレーションおよびその他のテーブルは、最高 10 桁の有効数字を表示します。

バリデーションのために外部（マニュアル）計算をする必要がある場合、内部計算に使用されるすべての桁を使用することをお勧めします。表示されたデータまたは端数を切り捨てたデータ（あるいはその両方）を外部計算に使用すると、丸め誤差のため、ChemStation が生成した結果とは異なる恐れがあります。

次の段落では、一般的にマニュアル計算で必要とされる、内部に保存されている数字のすべての桁にアクセスする方法を説明します。すべての場合において、一覧表示されたコマンドを実行する前に、適切なレポートスタイルを持つデータファイルを 1 つ読み込む必要があります。すべてのコマンドは、ChemStation のビューメニューからコマンドラインに入力できます。ファイル「C:\CHEM32\TEMP.TXT」の情報は、メモ帳または適切なテキストエディタを使用して表示できます。

生のピーク情報：

- リテンションタイム
- 面積
- 高さ
- 幅（インテグレータ）
- 対称度
- ピーク開始時間
- ピーク終了時間

コマンドラインに次のように入力します。

```
DUMPTABLE CHROMREG, INTRESULTS, " C:¥CHEM32¥1¥TEMP¥INTRES. TXT"
```

処理されたピーク情報：

- 測定されたリテンションタイム
- 予想リテンションタイム
- 面積
- 高さ
- 幅（インテグレータ）
- 対称度
- 半値幅 - ピーク高さの半分（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- テーリングファクタ（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- 選択性（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- K' （拡張パフォーマンス）
- タンジェント法のピーク幅（拡張パフォーマンス）
- 歪み（拡張パフォーマンス）
- 理論段数 - 半値幅（パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス）
- 理論段数 - タンジェント（拡張パフォーマンス）
- 理論段数 - 5- シグマ（拡張パフォーマンス）

6 システムスーパビリティの評価

内部保持されている倍精度数へのアクセス

- 理論段数 - 統計 (拡張パフォーマンス)
- 分離度 - 半値幅 (パフォーマンスおよび拡張パフォーマンス)
- 分離度 - タンジェント (拡張パフォーマンス)
- 分解能 - 5-シグマ (拡張パフォーマンス)
- 分離度 - 統計 (拡張パフォーマンス)

コマンドラインに次のように入力します。

```
DUMPTABLE CHROMRES, PEAK, " C:¥CHEM32¥1¥TEMP¥PEAK.TXT"
```

処理された化合物情報：

- 計算されたアマウント

コマンドラインに次のように入力します。

```
DUMPTABLE CHROMRES, COMPOUND, " C:¥CHEM32¥1¥TEMP¥COMPOUND.TXT"
```

キャリブレーションテーブル情報：

- レベル番号
- アマウント
- 面積
- 高さ

コマンドラインに次のように入力します。

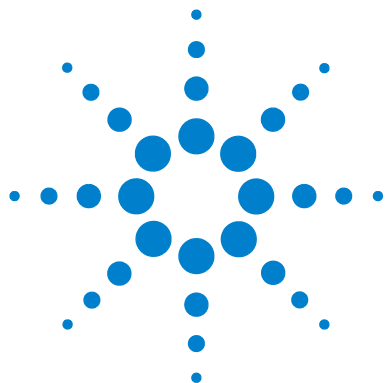
```
DUMPTABLE _DAMETHOD, CALPOINT, " C:¥CHEM32¥1¥TEMP¥CALIB.TXT"
```

直線回帰情報：

- Y-インターセプト (CurveParm1)
- スロープ (CurveParm2)
- 相関係数

コマンドラインに次のように入力します。

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, PEAK, " C:¥CHEM32¥1¥TEMP¥REGRESS.TXT"
```



7

CE 固有の計算

キャリブレーションテーブル	116
DNA 塩基対キャリブレーション	116
キャピラリー等電点電気泳動	116
DNA 塩基対キャリブレーション	116
キャピラリー等電点電気泳動	116
移動度補正を使用したキャリブレーション	119
はじめに	119
実効的移動度計算	120
相対移動度計算	123
キャピラリー電気泳動用の特別なレポートスタイル	125
補正済みピーク面積	126
キャピラリー電気泳動用のシステムスータビリティ	127
容量ファクタ k'	127
CE-MSD	128
バックグラウンド減算	128

この章は、ChemStation を使用して CE 機器をコントロールする場合にのみ関連する内容です。



キャリブレーションテーブル

キャリブレーションテーブルのドロップダウンリストには、4 つの異なるキャリブレーションタイプが用意されています。

DNA 塩基対キャリブレーション

[DNA 塩基対キャリブレーション] は、[タンパク質分子量キャリブレーション] に似ていますが、リファレンスピークなしで動作します。このキャリブレーションには、既知数の塩基対を含むキャリブレーション標準が必要です。キャリブレーションの式：

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

変数の意味は次のとおりです。

#BP は塩基の数

t はマイグレーションタイム

k_0 および k_1 は一次方程式の係数

キャリブレーションテーブルには、各成分の名前、マイグレーションタイム、 $1/t$ 、塩基対、および $\log(\text{塩基対})$ が含まれます。

キャピラリー等電点電気泳動

[キャピラリー等電収束キャリブレーション] (cIEF) には、既知等電点 (pI) の標準タンパク質を含むキャリブレーション標準が必要です。キャリブレーションの式：

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

変数の意味は次のとおりです。

pI は等電点

t はマイグレーションタイム

k_0 および k_1 は一次方程式の係数

キャリブレーションテーブルには、各成分の名前、マイグレーションタイム、 pI （等電点）が含まれます。

DNA 塩基対キャリブレーション

[DNA 塩基対キャリブレーション] は、[タンパク質分子量キャリブレーション] に似ていますが、リファレンスピークなしで動作します。このキャリブレーションには、既知数の塩基対を含むキャリブレーション標準が必要です。キャリブレーションの式：

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

変数の意味は次のとおりです。

#BP は塩基の数

t はマイグレーションタイム

k_0 および k_1 は一次方程式の係数

キャリブレーションテーブルには、各成分の名前、マイグレーションタイム、 $1/t$ 、塩基対、および $\log(\text{塩基対})$ が含まれます。

キャピラリー等電点電気泳動

[キャピラリー等電収束キャリブレーション] (cIEF) には、既知等電点 (pI) の標準タンパク質を含むキャリブレーション標準が必要です。キャリブレーションの式：

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

変数の意味は次のとおりです。

pI は等電点

t はマイグレーションタイム

k_0 および k_1 は一次方程式の係数

7 CE 固有の計算

キャリブレーションテーブル

キャリブレーションテーブルには、各成分の名前、マイグレーションタイム、pI（等電点）が含まれます。

移動度補正を使用したキャリブレーション

はじめに

バッファ組成のわずかな変動、分析温度や粘度の他、キャピラリ内壁への吸着も、電気浸透流（EOF）に影響を及ぼし、不安定にさせる原因となります。その結果としての EOF の変化により、かなり大きなマイグレーションタイムの標準偏差が生じます。移動度リファレンスピークのマイグレーションタイムをモニタリングすることで、移動度の補正をすることにより、分析毎でのマイグレーションタイムシフトを著しく提言させることができます。そしてマイグレーションタイム再現性を著しく向上させることができます。

以下の優先順位で、移動度リファレンスピークを選ばなければなりません。

- 一番高いシグナルでピークを選択します
- 最も分離されたピークを選択します
- 移動度リファレンスピークとして、EOF マーカーまたは内部標準も使用できます
- 検索ウィンドウを拡大して、移動度リファレンスピークを常に見つけます
- 検索ウィンドウでいくつかのピークが降下すると、最も高いシグナルを持つピークが、移動度リファレンスピークとして自動的に選ばれます。

2 つの移動度補正タイプが使用可能です。

実効的移動度補正

〔実効的移動度補正〕は、すべてのピークの実効的移動度を使用し、エレクトロフェログラムと一緒に電圧傾斜データを使用できるようにする必要があります。さらに、実効的移動度補正で作業すると、すべてのサンプル成分の実際の実効的移動度を測定できます。

相対移動度補正

〔相対移動度補正〕は、電圧データがない状態で操作でき、すべての測定に対して一定電圧であると仮定します。

実効的移動度計算

レファレンスピークに加えて、実効的移動度修正をするには EOF の速度に対応する中性（非イオン性）マーカが含まれる必要があります。一般的に使用されるマーカとその関連波長は次のとおりです。

表 8 一般的に使用される EOF マーカ

化合物	波長
1- プロパノール	210nm
アセトン	330nm
アセトニトリル	190nm
ベンゼン	280nm
グアノシン	252nm
メシチルオキシド	253nm
メタノール	205nm
フェノール	218nm
ピリジン	315nm
テトラヒドロフラン	212nm
ウラシル	259nm

時間経過ごとの電圧データおよびキャピラリサイズは、データファイルに保存されるか、手動でキャリブレーションテーブルセットアップ時に入力できます。動作時の電圧データを保存することがもっとも正確です。メソッドとともにキャピラリサイズも必ず保存するようにしてください。電圧データ / キャピラリサイズなしで取り込まれているシグナルを再解析するには、ダイアログボックスの [電圧およびキャピラリサイズ] グループに、電圧およびランピング時間を手動で入力します。

データから各化合物の実効的移動度が決定されます。

一般

サンプルピークの見掛け移動度を定義する式：

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

変数の意味は次のとおりです。

l はキャピラリの有効長（注入点から検出点までの長さ）

L は キャピラリの全長

$V(t)$ は 0 タイムからピークのマイグレーションタイムまでの平均電圧

平均電圧は、測定された電圧またはメソッド内で指定された電圧ランプから次の式を使用して計算されます。

$t < t_R$ の場合は

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

$t > t_R$ の場合は

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

変数の意味は次のとおりです。

t はピークのマイグレーションタイム

t_R はランプタイム

V は終了電圧

移動度の計算は、次の係数を導入することで簡素化できます。

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

相対または見掛け移動度は

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

実効的または実移動度は

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

変数の意味は次のとおりです。

μ_{app} は、すべてのピークの見掛け移動度です。

μ_{EOF} は、中性（非イオン性）マーカーの見掛け移動度です

7 CE 固有の計算

移動度補正を使用したキャリブレーション

EOF（通常、陰イオン）よりも低い速度のコンポーネントは、実効的移動度が負の値になります。

キャリブレーション

そして今後の測定において移動度リファレンスピークとして使用されるサンプルピークの実移動度は、中性マーカーのマイグレーションタイムを使用して計算されます（ μ_{EOF} ）。

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

すべてのピークの実効的移動度は、その後、予想移動度として計算され保存されます。

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

キャリブレーション テーブルは、予想マイグレーションタイムおよび予想移動度用のそれぞれの列に、各化合物の測定されたマイグレーションタイムおよび計算された実移動度を含んでいます。

移動度計算

μ_{EOF} の実測値は、移動度リファレンスピークを使用して計算されます。

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

各ピーク用の予想マイグレーションタイムは、その後調整されます。

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

計算値は、ピーク同定に使用され、キャリブレーションテーブル内の値に置き換わります。

リキャリブレーション

移動度リファレンスピークのマイグレーションタイムを使用して、 μ_{EOF} の実測値を計算します。

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

各ピーク用の予想マイグレーションタイムは、その後調整されます。

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

さらに、移動度が更新されます。

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

キャリブレーションランの間、マイグレーションタイムの予想値および実移動度値は、キャリブレーションテーブル内で更新されます。

相対移動度計算

相対移動度に基づくマイグレーションタイム補正も実行可能です。この場合、EOF マーカー、電圧、またはキャピラリサイズのいずれも必要ではありません。ソフトウェアは、マイグレーションタイムシフトを補正しますが移動度値は表示しません。

一般

実効的移動度の計算と同じ、係数

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

移動度とマイグレーションタイムの関係を説明するために相対移動度計算の中で使用されます。

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

違っている点は、相対移動度の計算式では、k が分数の分子および分母の両方に現れるという点です。このため、キャピラリサイズは必要なくなります。k ファクターは、次のように計算されます。

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

ここで、V(t) は 0 タイムからピークのマイグレーションタイムまでの平均電圧

電圧パラメータを [無視する] に設定すると、k は定数で予想マイグレーションタイムの計算式から除外できます（以下を参照）。

以下の計算式は、k = k(t) の一般的なケースを表しますが、ソフトウェアは k を計算する際はすべてのケースを考慮します。

7 CE 固有の計算

移動度補正を使用したキャリブレーション

キャリブレーション

移動度リファレンスピークが特定され、そのマイグレーションタイム (t_{refcal}) が保存されます。その他のピークのすべての予想マイグレーションタイム ($t_{expcalN}$) が保存されます。

移動度計算

リファレンスピークを検出すると、各ピークの予想マイグレーションタイムが、移動度リファレンスピークの実際のマイグレーションタイムに従って調整されます。

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

その後、前回のキャリブレーションランからのリファレンスピークのマイグレーションタイムが更新されます。

$$t_{refcal} = t_{refact}$$

キャピラリー電気泳動用の特別なレポートスタイル

CE システム用の Agilent ChemStation では、以下のレポートスタイルが追加されています。

CE の移動度 [CE の移動度] は、定量テキストの結果（特に、見かけの移動度）から構成されます。このレポートスタイルを使用するには、取込前に使用するキャピラリーに関する情報を入力し、電圧シグナルを保存する必要があります。見かけの移動度は、以下の式を使用して計算します。

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

変数の意味は次のとおりです。

l は有効長キャピラリー (cm)

L は全キャピラリー長 (cm)

t はマイグレーションタイム (min)

V は電圧 (kV)

実効的移動度補正（『「実効的移動度計算」[120 ページ 図](#)』を参照）が有効化されると、簡単なレポート（たとえば、標準レポート）の列でピークタイプの列は移動度の列に置き換わります。CE 移動度レポートには、見かけの移動度の代わりに実効的移動度がプリントされます。

補正済みピーク面積

CE システム用の Agilent ChemStation では、標準面積計算の代わりに補正済みピーク面積を使用できます。これらの面積は、標準キャリブレーションおよびレポートに用いられます。

この機能を有効にするには、[補正済み面積を用いた計算] を選択して、マイグレーションタイムに基づいたピーク面積の補正を行います。このモードでは、面積はマイグレーションタイムで分割されます。これにより、マイグレーションタイムが不安定な場合の定量分析での再現性を改善できます。

補正済み面積は、以下の式を使用して計算します。

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

変数の意味は次のとおりです。

A_c は補正済みピーク面積 (mAU)

A はピーク面積 (mAU·sec)

t はマイグレーションタイム (min)

この補正済み面積は、標準化済み面積とも呼ばれることがあります。

キャピラリー電気泳動用のシステムスタートビリティ

容量ファクタ k'

キャピラリー電気泳動では容量ファクタ k' の値は、すべての操作モードで自動計算できません。個々の式については、マニュアル『High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer』を参照してください。CE システム用 Agilent ChemStation は、LC 3D システム用 Agilent ChemStation と同じアルゴリズムを使用するので、レポートにリストされている値は、LC 3D システム用 Agilent ChemStation でのみ有効です。

CE-MSD

バックグラウンド減算

〔バックグラウンド減算 (BSB)〕メニュー項目を選択すると、直前に選択されたマススペクトルが、現在のエレクトロフェログラムの各ポイントから減算されます。結果のデータは、オリジナルのデータファイルと同じ名前で、同じディレクトリに保存されます。ただし、ファイル拡張子は .BSB に変更されます。

この新しいデータファイルが現在のデータファイルとなり、バックグラウンドが減算されたエレクトロフェログラムが表示されます。実行されたバックグラウンド減算の回数の記録は、データファイルヘッダの〔オペレータ〕項目に保持されます。

BSB データのテーブル形式のリストを表示する場合は、データ表示の精度による違いを観察できます。

注記

LC/MSD 内にある HELP テキストファイルは、LC パラメータのみ参照し、CE は参照しません。いくつかの LC/MSD ソフトウェアで利用可能な機能は、CE/MSD アプリケーションでは利用不可能または適用外ですが、LC アプリケーションでは使用が可能です。〔ピークマッチング〕機能は CE-MS には適用外なので、有効ではありません。CE-MS では、ひとつの分離キャピラリで UV および MS 検出が行われる有効長が異なります。有効長が違うため分離度が異なるので、ピークマッチングは行えません。



8

データレビュー、再解析、バッチレビュー

データ解析におけるナビゲーションテーブル	130
ナビゲーションテーブルのコンフィグレーション	130
ナビゲーションテーブルツールバー	132
ナビゲーションテーブルを用いたデータレビュー	133
ナビゲーションテーブルを用いたシーケンス再解析	134
バッチレビューとは	136
ECM を用いた OpenLAB CDS 使用時におけるバッチレビュー機能の有効化	137
バッチ設定	138
バッチテーブル	138
化合物テーブル	139
バッチレポート	139
ユーザーインターフェイス	139
レビュー機能	141
バッチレビュー内のキャリブレーション	141
バッチレポート	142
バッチ履歴	142

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



データ解析におけるナビゲーションテーブル

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

ナビゲーションテーブルのコンフィグレーション

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

表 9 ナビゲーションテーブルの列項目

シングランの列項目	シーケンスランの列項目
重ね書き	重ね書き
ECM	ECM
タイプ	タイプ
日時	ライン
オペレーター	注入
バイアル	バイアル
データファイル	サンプル名
サンプル名	メソッド名
メソッド名	サンプルタイプ
マニュアルイベント	マニュアルイベント

表 9 ナビゲーションテーブルの列項目

シングルランの列項目	シーケンスランの列項目
サンプル情報	Cal レベル（キャリブレーションレベル）
サンプルアマウント	サンプル情報
ISTD アマウント	サンプルアマウント
倍率	ISTD アマウント
希釈率	倍率
---	希釈率
---	データファイル

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

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

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

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

ナビゲーションテーブルツールバー

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

データレビューツールセット

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

シーケンス再解析ツールセット

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

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

ナビゲーションテーブルを用いたデータレビュー

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

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

ナビゲーションテーブルを用いたシーケンス再解析

注記

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

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

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

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

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

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

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

シーケンスコンテナのメソッドを変更し保存する必要があります。この一般的な変更は、再解析中にすべてのデータファイルに適用されます。

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

バッチレビューとは

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

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

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

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

[PCS] _BatchReview=1

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

バッチ設定

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

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

バッチテーブル

分析対象がユーザー設定が可能なバッチテーブルの中に表示されます。

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

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

化合物テーブル

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

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

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

バッチレポート

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

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

ユーザーインターフェイス

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

- 標準インターフェイスには、バッチメニューのアイテムのほとんどに対応するボタンバー、バッチテーブル、化合物テーブルが含まれています。

8 データレビュー、再解析、バッチレビュー

バッチ設定

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

レビュー機能

次の 2 つの方法でデータファイルを表示できます。

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

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

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

バッチレビュー内のキャリブレーション

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

バッチレポート

ユーザー設定が可能な『「バッチテーブル」 138 ページ 』は、プリンタへ直接印刷したり、画面に表示したり、次に挙げるフォーマットのうちの 1 つを使用して、ユーザ指定のプレフィックスを付けてファイルに出力することもできます。

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

レポートオプションは、バッチテーブル内のソートメソッドとは独立したサンプルソート（ランインデックス、サンプルタイプ、またはメソッドによる）も可能にします。ソートの優先順序は、『「バッチテーブル」 138 ページ 』に従います。

バッチ履歴

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

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



9 レポート

ACAML とは 144

ACAML スキーマ 145

このトピックでは、OpenLAB CDS ソフトウェアのインテリジェント
レポート機能で使用する ACAML スキームについて説明します。



ACAML とは

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

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

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

ACAML の詳細については、OLIR デザイナーマニュアル OpenLAB CDS サポート DVD（ディスク No. 6）を参照してください。

ACAML スキーマ

ACAML スキーマは産業 XML 規格を基準にしています。

ACAML スキーマは以下のように強く定型化されています。

- 標準化されたデータ交換の支援
- 自動化された詳細な処理が極めて複雑または不可能な自己定義型が無制限に成長することの回避

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

最新のリビジョン ACAML. 13. xsd のスキーマ定義については、OpenLAB CDS サポート DVD（ディスク No. 6）を参照してください。

9 レポート

ACAML スキーマ



10 システムベリフィケーション

ベリフィケーションおよび診断ビュー 148

システムベリフィケーション 148

GLP セーブレジスタ 151

DAD テスト機能 153

DAD テストレビュー機能 153

本章では、ベリフィケーション機能および ChemStation の GLP ベリフィケーションの特徴について説明します。



ベリフィケーションおよび診断ビュー

たとえば、LC 用 Agilent 1100/1200 シリーズモジュールなどの設定した機器でサポートされている場合は、ChemStation は機器のベリフィケーションおよび診断タスクを実行するビューを、追加で 2 つ用意しています。詳細については、オンラインヘルプシステムを参照してください。

システムベリフィケーション

システムベリフィケーションは、規制されたラボにおいて分析装置を定期的に使用する場合に、重要な要素となります。ChemStation の GLP ベリフィケーション機能は、ソフトウェアまたはソフトウェアの関連コンポーネントが正しく機能しているか、または特定の分析時に正しく機能していたかを容易に証明できるように設計されています。

ChemStation のベリフィケーション機能によって、ChemStation ソフトウェアが正しく動作しているかが検証ができます。これは、特定のメソッドに従ってデータファイルを再解析して、その結果と定義済の基準との比較を実行します。ベリフィケーション機能は、積分と定量の結果の完全性を保証するのに、特に重要です。

分析メソッドが使用するアルゴリズムソフトウェアの組み合わせをチェックするのに、標準ベリフィケーションテストを使用するか、別のメソッドとデータファイルを使用して独自のテストを定義できます。ベリフィケーションテストは保護されたファイルなので、変更や削除はできません。

[データ解析] ビュー内のベリフィケーションアイテムでは、次に挙げるオプションから任意のものを選択できます。

- データベース内でベリフィケーションテストを実行
- 新しいベリフィケーションテストを定義し、データベースに追加
- データベースからベリフィケーションテストを削除

オンラインヘルプシステムの「方法」の部分に、以上のタスクを実行する方法が説明してあります。ChemStation ベリフィケーションテストを実行するには、テスト全体の実行か部分を組み合わせて実行するかを選べます。

ベリフィケーションテストの結果はバイナリフォーマットで、デフォルトのサブディレクトリ c:\¥CHEM32¥1¥Verify にメソッドおよびデータファイルと一緒に保存されます。ベリフィケーション用のサブディレクトリは、シーケンス、メソッド、およびデータのサブディレクトリと同じレベルにあります。結果は、プリンタまたはファイルに出力することができます。組み合わせられたベリフィケーションテストを含むテスト結果は、合格または不合格の判定が行われます。

次に挙げるベリフィケーションテストコンポーネントが使用できます。

デジタルエレクトロニクス (Agilent 1100/1200 シリーズ DAD のみ)

テストクロマトグラムがダイオードアレイ検出器の中に保存されます。このクロマトグラムは、フォトダイオードアレイからの一般生データと同じ事前解析ステップを経た後、ChemStation に送られます。結果データは、このテストクロマトグラムのために ChemStation 内部に保存された元の結果データと比較されます。一致しない箇所があると、テストが失敗します。このテストにより、データ処理を行う DAD エレクトロニクスも正しく機能していることが保証されます。保存されたテストクロマトグラムが使用されるので、ランプまたはダイオードアレイは、このテストに含まれません。それらは、『「DAD テスト機能」 153 ページ 』を使用してチェックできます。

ピーク積分

データファイルは、オリジナルメソッドを使用して再度積分されます。その結果は、ベリフィケーションレジスタに保存されている元の積分結果と比較されます。一致しないと、テストが失敗します。

化合物定量

データファイル内の化合物は再度定量されます。その結果は、ベリフィケーションレジスタに保存されている元の定量結果と比較されます。一致しないと、テストが失敗します。

レポート印刷

元のレポートが再度印刷されます。

次のページは、正常に完了したベリフィケーションテストの例です。

10 システムベリフィケーション

ベリフィケーションおよび診断ビュー

ChemStation Verification Test Report

Tested Configuration:

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

ChemStation Verification Test Details:

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

Signals Tested:

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

ChemStation Verification Test Results:

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

ChemStation Verification Test Overall Results: Pass

GLP セーブレジスタ

GLP セーブレジスタは、ランタイムチェックリストの中で選択された場合、各分析の最後に保存されます。レジスタには、以下の情報が含まれています。

- シグナル
- ログブック
- 積分結果テーブル
- 定量結果テーブル
- 機器パフォーマンスデータ
- データ解析メソッド

このレジスタは、分析時に生成される、完全に保護されたレコードです。将来、好きな時に、分析メソッドの証拠として呼び出すことができます。

[データ解析] ビューの [GLP セーブレジスタ] オプションからは、いつでも GLP セーブレジスタファイルをレビューすることができます。ファイルはチェックサムで保護され、バイナリにエンコードされるので、確実に変更できないようになります。

GLP セーブレジスタをレビューに選択するのに使用するダイアログ ボックスで、レビューオプションを次のうちから選択できます。

- オリジナルメソッドの読み込み
- オリジナルシグナルの読み込み
- 機器パフォーマンスデータの読み込み
- オリジナルメソッドの印刷
- オリジナル積分結果の印刷
- オリジナル定量結果の印刷
- オリジナルのメソッドとシグナルから、オリジナルのレポートを生成

GLP レビューファンクションを使用して、オリジナルのクロマトグラフデータを表示でき、機器パフォーマンスデータからの解析の質を保証でき、データ解釈の信頼性を立証できます。

10 システムベリフィケーション

GLP セーブレジスタ

たとえば、次のことができます。

- サンプル解析時に使用するメソッドのデータ解析部分を再読み込みして再印刷し、解決の結果として表示されたデータ解析がいかなる方法でも変更されていないことを保証します。
- 再計算せずに、積分と定量の結果をレビューして、レポートの信頼性を保証します。

DAD テスト機能

検出器テストは、規制されたラボにおける分析装置の定期的なシステムバリデーションにおける一手順として使用できます。

DAD テストは、ご使用のダイオードアレイ検出器のパフォーマンスを評価します。[機器] メニューから DAD テストを選択すると (LC3D および CE のみ可能)、機器の強度および波長キャリブレーションがチェックされます。[保存] を押すと、デフォルトの機器ディレクトリにある **DADTest** データベース、つまり **DADTest.Reg** と呼ばれるレジスタファイルにテスト結果が自動的に保存されます。

DAD テストレビュー機能

[データ解析画面] メニューの [DAD テストレビュー] 機能により、いつでも **DADTest.Reg** ファイルをレビューすることができます。ファイルはチェックサムで保護され、バイナリにエンコードされるので、容易に変更できないようになります。

レビューには、次の DAD テストを選択できます。

- | | |
|----------------|---|
| ホルミウムスペクトルの表示 | DAD テストレビューテーブルに一覧表示されているすべてのホルミウムスペクトルをプロットします。アクティブなスペクトルにはタグが付けられます。 |
| 強度スペクトルの表示 | DAD テストレビューテーブルに一覧表示されているすべての強度スペクトルをプロットします。アクティブなスペクトルにはタグが付けられます。 |
| 新しいデータベースとして保存 | DAD のランプを交換する場合、テーブルから不必要なテスト結果を削除し、この機能を使用して新しいデータベースとして保存することにより、 DADTest をリセットできます。 |
| 選択されたスペクトルの表示 | テーブル内で選択したスペクトルのみ表示します。 |
| 強度グラフの表示 | 強度グラフをプロットし、ダイオードアレイ検出器内のランプの寿命を表示することができます。このグラフは、時間に対するランプの最大強度の示しています。 |

索引

A

ASTM ノイズ決定 94

C

CI 109

E

ESTD
計算 80
手順 80

G

GALP 89
GLP 89
GMP 89

N

norm%
計算 82
レポート 82

T

t 分布 109

U

USP テーリングファクタ 103

あ

アナログシグナル 10

い

イベント
積分 44

か

開始時間 19
外部標準 80
カラーコード 14

き

機器
ステータス 14
希釈率 81, 82

け

計算
ESTD 80
検量線
説明 68
とは? 68
検量
線 68

さ

残差
相対 68
標準偏差 69

し

式

パフォーマンステストの定義 101

シグナル 10

システムスタビリティ
式

USP テーリングファクタ 103

システムスタビリティ
含まれる統計 89
リミット 90

終了時間 19

初期ピーク幅 44

初期ベースライン 19

ショルダー検出 44

ショルダー 27

信頼区間 109

す

ステータス
機器 14
スロープ感度 44

せ

精度
数フォーマット 112
積分イベント 19, 44
積分のチューニング 46
積分 17
初期イベント 44
マニュアル 49
絶対

リテンションタイム 58

線

検量 68

た

タイムウィンドウ

リテンション / マイグレーション 58

高さ %

計算 78

高さリジェクト 44, 45

タンジェントスキム 33

ち

頂点 19

て

定量

ESTD 手順 80

データ取り込み 10

データファイル 10

テーリングファクタ
t 103

デジタルシグナル 10

の

ノイズ決定 94

は

パーセント計算 78

倍率 81, 82

パフォーマンス

テスト定義 101

ひ

ピーク / 谷比 32

ピーク終了 26

ピーク頂点 27

ピーク認識 25

フィルタ 23

ピークの開始 25

ピーク幅 44

ピーク

高さ 78

リテンションタイムウィンドウ 59

ピーク面積 41

微分係数 23

標準偏差

残差 69

標準

外部 80

ふ

フィルタ

ピーク認識 23

へ

ベースライン追跡 31

ベースラインの設定 29

ベースラインの落ち込み 30

ベースライン割り当て 29

ベースライン追跡 32

ま

マニュアル積分 49

め

メソッド

ステータス 14

面積 %

計算 78

面積リジェクト 44

も

モニタリング

機器ステータス 14

よ

溶媒ピーク 42

り

リテンションタイムウィンドウ 59

リテンションタイム

絶対 58

リファレンスウィンドウ 59

本書では

このガイドでは、Agilent OpenLAB CDS ChemStation エディションで使用する、操作方法、計算、およびデータ解析アルゴリズムについて参照情報について説明します。

本書に記載されている情報を使用して、検証担当者はシステムの検証タスクを計画および実行することができます。

© Agilent Technologies 2010-2011

Printed in Germany
7/2011



M8301-96022



Agilent Technologies