# **ChemStation Agilent**



# Informazioni legali

© Agilent Technologies, Inc. 2004, 2005-2009

Nessuna parte di questo manuale può essere riprodotta in alcun formato o con alcun mezzo (inclusa l'archiviazione e la scansione elettroniche o la traduzione in una lingua straniera) senza previo consenso scritto di Agilent Technologies, Inc. secondo le disposizioni di legge sul diritto d'autore degli Stati Uniti, internazionali e locali applicabili.

### **Codice del manuale**

G2070-94126

#### **Edizione**

07/09

Stampato in Germania

Agilent Technologies Hewlett-Packard-Strasse 8 76337 Waldbronn

### **Revisione software**

Questo manuale è valido per le revisioni B.04.xx del software della ChemStation Agilent, dove xx identifica le revisioni secondarie del software che non influiscono sull'accuratezza tecnica di questo manuale.

### Garanzia

Le informazioni contenute in questo documento sono for-nite allo stato corrente e sono soggette a modifiche senza preavviso nelle edizioni future. Agilent non rilascia alcuna altra garanzia, esplicita o implicita, comprese le garanzie implicite di commerciabilità ed idoneità ad uno uso speci-fico, relativamente al presente manuale e alle informazioni in esso contenute. Salvo il caso di dolo o colpa grave, Agilent non sarà responsabile di errori o danni diretti o indi-retti relativi alla fornitura o all'uso di questo documento o delle informazioni in esso contenute. In caso di separato accordo scritto tra Agilent e l'utente con diverse condizioni di garanzia relativamente al contenuto di auesto documento in conflitto con le condizioni qui riportate prevarranno le condizioni dell'accordo separato.

### Licenze tecnologia

I componenti hardware e o software descritti in questo documento vengono forniti con licenza e possono essere utilizzati o copiati solo in conformità ai termini di tale licenza.

### Indicazioni di sicurezza

### AVVERTENZA

L'indicazione **AVVERTENZA** segnala un rischio. Richiama l'attenzione su una procedura operativa o analoga operazione che, se non eseguita correttamente o non rispettata, può provocare danni al prodotto o la perdita di dati importanti. Non eseguite mai alcuna operazione ignorando l'**AVVERTENZA**, fatelo solo dopo aver compreso e applicato completamente le indicazioni di Agilent.

### ATTENZIONE

L'indicazione ATTENZIONE segnala un rischio serio. Richiama l'attenzione su una procedura operativa o analoga operazione che, se non eseguita correttamente o non rispettata, può provocare lesioni personali o morte. Non eseguite mai alcuna operazione ignorando l'indicazione ATTENZIONE, fatelo solo dopo aver compreso e applicato completamente le indicazioni di Agilent.

Solo per ricerca.

## In questo manuale...

Questo manuale descrive vari concetti relativi alla ChemStation Agilent, allo scopo di permettere all'utente di acquisire una conoscenza più approfondita del funzionamento della ChemStation.

Per informazioni sull'uso della ChemStation, fare riferimento alla Guida in linea generale e all'esercitazione in linea.

#### 1 Caratteristiche della ChemStation Agilent

Questo capitolo descrive i componenti principali e le caratteristiche della ChemStation.

#### 2 Metodi

Questo capitolo descrive i concetti alla base dei metodi e spiega come utilizzarli.

#### 3 Acquisizione dei dati

Questo capitolo descrive i concetti di acquisizione dati, file di dati, registro elettronico e altro ancora.

#### 4 Integrazione

Questo capitolo spiega come effettuare le operazioni di integrazione e illustra gli algoritmi di integrazione della ChemStation. Vengono descritti l'algoritmo di integrazione, l'integrazione e l'integrazione manuale.

#### **5** Quantificazione

Questo capitolo descrive le modalità con cui la ChemStation effettua operazioni di quantificazione. In particolare, fornisce informazioni sui calcoli di area % e altezza %, standard esterno (ESTD), normalizzazione %, standard interno (ISTD) e sulla quantificazione di picchi non identificati.

#### 6 Identificazione dei picchi

Questo capitolo spiega come identificare i picchi.

### 7 Calibrazione

Questo capitolo spiega come calibrare la ChemStation.

#### 8 Automazione

Questo capitolo descrive i concetti legati all'automazione. In particolare, spiega come usare le sequenze con la ChemStation, cosa accade quando si esegue una sequenza e come personalizzare le sequenze.

#### 9 Revisione dei dati, rielaborazione e revisione dei lotti

Questo capitolo illustra le varie procedure disponibili per revisionare i dati e spiega come rielaborare i dati della sequenza. Inoltre, descrive i concetti di revisione e configurazione dei lotti, le funzioni di revisione e la stesura dei report sui lotti.

#### 10 Uso dei report della ChemStation

Questo capitolo descrive i report e contiene consigli utili su come redigere report sui risultati, i risultati quantitativi, gli stili di report, la destinazione del report e i report riassuntivi di sequenza.

#### 11 Valutazione della system suitability

Questo capitolo descrive ciò che può fare la ChemStation per valutare le prestazioni sia dello strumento analitico prima che venga utilizzato per l'analisi del campione e del metodo analitico prima che sia utilizzato normalmente e per controllare le prestazioni dei sistemi di analisi prima e durante le analisi di routine.

#### 12 Verifica del sistema

Questo capitolo descrive la funzione di verifica e le funzioni di verifica GLP della ChemStation.

# Sommario

### 1 Caratteristiche della ChemStation Agilent 9

Descrizione generale 11 Hardware della ChemStation 14 Software della ChemStation 15 Controllo dello strumento 32 Documentazione 33 Struttura delle directory della ChemStation 35 Riquadro di navigazione 39

### 2 Metodi 41

Che cos'è un metodo? 43 Le parti di un metodo 44 Stato dei metodi 47 Creazione di metodi 49 Modifica dei metodi 50 Struttura di una directory di metodo 52 Cosa accade quando si esegue un metodo? 53 Riepilogo del funzionamento di un metodo 59

### 3 Acquisizione dei dati 61

Cosa si intende per acquisizione di dati? 62 File di dati 63 Monitor in linea 65 Registro elettronico 66 Informazioni sullo stato 67

### 4 Integrazione 69

Che cos'è l'integrazione? 71 Che cosa fa l'integrazione? 72 Gli algoritmi di integrazione della ChemStation 73 Panoramica 75 Definizione dei termini 80 Principio di funzionamento82Riconoscimento dei picchi83Collocazione della linea di base92Misurazione dell'area del picco105Eventi di integrazione108Integrazione manuale114

### 5 Quantificazione 119

Che cos'è la quantificazione? 120 Calcoli di quantificazione 121 Fattori di correzione 122 Procedimenti di calcolo non calibrati 124 Procedimenti di calcolo calibrati 125 Calcolo dello standard esterno 126 Calcolo con il procedimento della normalizzazione % 128 Calcolo con il procedimento dello standard interno 129

### 6 Identificazione dei picchi 133

Che cos'è l'identificazione dei picchi? 134 Regole di corrispondenza dei picchi 135 Tipi di identificazione dei picchi 136 Tempo di ritenzione/migrazione assoluto 138 Tempi di ritenzione/migrazione corretti 140 Qualificatori dei picchi 142 Il procedimento di identificazione 145

#### 7 Calibrazione 147

Definizione dei termini 148 La tavola di calibrazione 149 Curva di calibrazione 150 Campioni incogniti 152 Tipi di calibrazione 153 Calibrazione di gruppo 160 Somma dei picchi 161 Ricalibrazione 162

### 8 Automazione 167

Che cos'è l'automazione? 169 Che cos'è una seguenza o un modello di seguenza? 170 Preferenze - Scheda Seguenza 171 Parametri di seguenza 173 Tavola di seguenza 174 Creazione di seguenze(seguenze e modelli di seguenza) 175 Utilizzo delle seguenze (seguenze e modelli di seguenza) 177 File di registrazione della seguenza 180 Cosa succede guando si esegue una seguenza? 181 Struttura del file di dati della seguenza (creazione di cartelle esclusive attiva) 183 Attribuzione del nome ai file di dati in una seguenza 184 Funzionamento post-seguenza 186 Ricalibrazione automatica 188 Come specificare le ricalibrazioni 189 Tipi di seguenze 192 Sequenze di calibrazione esplicite 193 Sequenze di calibrazione cicliche a livello singolo 194 Sequenze di calibrazione cicliche multilivello 195 Calibrazioni cicliche ed esplicite insieme 199 Sequenze di ricalibrazione ciclica con la tecnica del bracketing 201 Seguenze di ricalibrazione ciclica con più vial contenenti la stessa diluizione di uno standard 205

### 9 Revisione dei dati, rielaborazione e revisione dei lotti 209

Tavola di navigazione in Data Analysis (Analisi dei dati)210Che cos'è la revisione di un lotto?215Abilitazione della funzionalità di revisione dei lotti con l'opzione ChemStationOpenLAB installata216Configurazione del lotto217Funzioni di revisione220Rapporto relativo al lotto221

### 10 Uso dei report della ChemStation 223

Che cos'è un rapporto di stampa? 224 Rapporti sui risultati 225 Risultati quantitativi 227 Rapporto relativo ai valori dei campi personalizzati 229 Stili di report 230 Altri parametri per lo stile dei rapporti di stampa 233 Destinazione del rapporto di stampa 234 Report riassuntivi di sequenza 236

### 11 Valutazione della system suitability 241

Determinazione del rumore di fondo 245 Calcolo della simmetria del picco 250 Formule e calcoli di idoneità del sistema 252 Definizioni generali 253 Definizioni di test sulle prestazioni 254 Definizioni per la riproducibilità 260 Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente 265

### 12 Verifica del sistema 269

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi)270II registro GLPsave273Funzione DAD Test (verifica del rivelatore a serie di diodi)275



# Caratteristiche della ChemStation Agilent

Descrizione generale 11 Moduli dello strumento aggiuntivi 12 Moduli aggiuntivi di valutazione dei dati 12 Strumenti esclusivi per la valutazione dei dati 13 Hardware della ChemStation 14 Software della ChemStation 15 Sistema operativo 15 Metodi e sequenze 15 Configurazione del sistema 15 Modello di dati 16 Convenzioni per la denominazione dei file 16 Interfaccia software per l'utente 18 Acquisizione dei dati 19 Analisi dei dati — Visualizzazione 20 Analisi dei dati — Integrazione 21 Analisi dei dati — Quantificazione 22 Analisi dei dati — Revisione dei dati, Rielaborazione dei dati e Revisione dei lotti 22 Analisi dei dati — Stesura di rapporti di stampa standard 23 Analisi dei dati – Report specializzati 23 Utilità e compatibilità 26 Personalizzazione 27 Automazione 27 Buone pratiche di laboratorio 29 Controllo dello strumento 32 Rete 32 Documentazione 33



**1** Caratteristiche della ChemStation Agilent

In questo manuale...

Struttura delle directory della ChemStation35Riquadro di navigazione39Pulsanti di navigazione39ChemStation Explorer39

Questo capitolo descrive i componenti principali e le caratteristiche della ChemStation.

# **Descrizione generale**

Le ChemStation per gascromatografia, cromatografia liquida, LC/MSD, CE, CE/MSD e A/D sono sistemi di controllo dello strumento, acquisizione e valutazione dei dati per:

- Gascromatografi Agilent 7890A
- Gascromatografi Agilent 6890N, 6890Plus e 6890A
- Gascromatografi Agilent 6850
- Gascromatografi 5890 serie II
- Moduli e sistemi per LC Agilent serie 1100/1200
- LC/MSD Agilent serie 1100
   Single Quad LC/MSD Agilent serie 6100
- Sistemi per elettroforesi capillare (CE) Agilent 1600
- Sistemi per elettroforesi capillare (CE) Agilent 7100
- Sistemi Agilent per CE/MS
- Interfacce analogico-digitale a due canali Agilent 35900E

Il software è stato progettato per funzionare su personal computer IBM compatibili in ambiente operativo Microsoft<sup>®</sup> Windows XP Professional.

Il software è disponibile sotto forma di ChemStation di base a strumento singolo in cinque versioni. Tutte le versioni comprendono acquisizione dei dati, controllo dello strumento, analisi dei dati (integrazione, quantificazione e creazione di report), automazione e personalizzazione per uno strumento analitico. Uno strumento si definisce funzionante su base temporale singola anche se può raccogliere dati da diversi rivelatori contemporaneamente. Le cinque versioni sono:

- ChemStation per sistemi gascromatografici (GC) a strumento singolo, codice G2070BA
- ChemStation per sistemi di cromatografia liquida (LC) a strumento singolo, codice G2170BA
- ChemStation per elettroforesi capillare (CE) a strumento singolo, codice G1601BA

#### **1** Caratteristiche della ChemStation Agilent

**Descrizione** generale

- ChemStation per sistemi di cromatografia liquida/rivelatore a selezione di massa (LC/MSD) a strumento singolo, codice G2710BA
- ChemStation analogico/digitale (A/D) a strumento singolo per l'acquisizione di dati analogici con controllo degli eventi esterni, codice G2072BA.

La capacità di controllo dello strumento della ChemStation può essere aumentata acquistando moduli aggiuntivi di acquisizione dati e controllo dello strumento in modo da consentire l'installazione di più strumenti per l'uso di configurazioni a tecniche miste.

### Moduli dello strumento aggiuntivi

I moduli dello strumento aggiuntivi sono:

- Modulo aggiuntivo di controllo del sistema GC e di acquisizione dei dati, codice G2071BA
- Modulo aggiuntivo di controllo del sistema LC e di acquisizione dei dati, codice G2171BA
- Modulo aggiuntivo di controllo del sistema CE e di acquisizione dei dati, codice G2172BA
- Modulo di controllo dello strumento LC/MSD e modulo aggiuntivo di acquisizione e valutazione dei dati, codice G2712BA
- Modulo aggiuntivo di acquisizione dei dati analogici, codice G2073BA
- Modulo aggiuntivo MSD per l'aggiornamento di un sistema LC a LC7MSD, codice G2712BA.

### Moduli aggiuntivi di valutazione dei dati

La capacità di elaborazione dati delle ChemStation può essere aumentata acquistando moduli aggiuntivi adatti ad applicazioni specialistiche:

- Modulo aggiuntivo di valutazione spettri con rivelatore a serie di diodi (DAD), codice G2180BA
- Modulo aggiuntivo ChemStore per l'organizzazione dei campioni e la creazione di un database di risultati, codice G2181BA

- Modulo di valutazione dei dati di deconvoluzione e bioanalisi per LC/MSD, codice G2720BA, da usare esclusivamente con la ChemStation per LC/MSD.
- Opzione ChemStation OpenLAB, codice G2189BA, che fornisce un'interfaccia tra la ChemStation e *Agilent Enterprise Content Manager* (ECM).

Per ogni ChemStation possono essere configurati fino a quattro strumenti cromatografici. Se la configurazione include strumenti con rivelatori per spettroscopia (rivelatori a serie di diodi per cromatografia liquida o elettroforesi capillare) una ChemStation non supporta più di due rivelatori a serie di diodi e il numero di strumenti gestiti è ridotto a tre. Quando la ChemStation per LC/MS viene utilizzata per controllare un modulo Agilent serie 1100/1200 per LC/MS (oppure con un sistema LC Agilent serie 1100/1200 o 1090 serie II), non è possibile gestire altri strumenti dal PC.

### Strumenti esclusivi per la valutazione dei dati

Sono disponibili anche due prodotti creati esclusivamente per la valutazione dei dati, che non sono in grado di gestire strumenti. Tali strumenti sono stati appositamente creati per la valutazione dei dati e l'uso in ufficio.

- La ChemStation per la valutazione dei dati LC 3D, codice G2190BA, comprende le funzioni di analisi dei dati per le ChemStation GC, LC e CE la valutazione dei dati relativi a spettri ottenuti tramite strumenti a serie di diodi.
- La ChemStation per la valutazione dei dati LC/MSD, codice G2730BA, comprende le funzioni per la valutazione dei dati relativi a spettri ottenuti tramite rivelatori a serie di diodi, la valutazione dei dati relativi a spettri di massa, oltre alle capacità base della ChemStation per la valutazione dei dati.

1 Caratteristiche della ChemStation Agilent Hardware della ChemStation

# Hardware della ChemStation

Per ulteriori informazioni sull'hardware della ChemStation, consultare il manuale *Installazione della ChemStation*.

# Software della ChemStation

### Sistema operativo

La ChemStation è compatibile con i sistemi operativi Microsoft Windows XP Professional SP3 o Windows Vista Business SP1.

La funzione ChemStation Control Charts richiede la disponibilità di Microsoft Excel.

### Metodi e sequenze

Il metodo analitico spiega come eseguire una separazione specifica. Contiene tutti i parametri necessari per il controllo dello strumento, l'acquisizione e la valutazione dei dati, compresa l'integrazione, la quantificazione e la stesura di rapporti di stampa. Il sistema può essere programmato per acquisire dati provenienti dall'analisi di più campioni utilizzando metodi diversi. Il file di controllo per questo tipo di operazione si chiama sequenza e contiene tutte le informazioni sui singoli campioni, i riferimenti ai metodi adatti e le specifiche per la ricalibrazione automatica. Per ulteriori informazioni su metodi e sequenze, consultare la sezione "Automazione", pagina 27 e la Guida in linea.

### Configurazione del sistema

La configurazione viene effettuata con il programma Configuration Editor. Tale programma consente di definire gli strumenti, gli indirizzi GPIB o LAN, le directory di dati, le sequenze e i metodi, e l'impostazione dei colori usati nel software della ChemStation. Per ulteriori informazioni, consultare i manuali forniti con i moduli aggiuntivi della ChemStation.

# Modello di dati

Il software della ChemStation è stato progettato su un modello di dati basato su una struttura di memoria chiamata registro. Si tratta di strutture a scopo multiplo contenenti dati analitici ed informazioni bidimensionali (es. tempo/intensità) e tridimensionali (tempo/intensità/lunghezza d'onda).

La ChemStation fornisce comandi e funzioni per costruire, espandere, estrarre e, laddove non alteri dati primari, modificare registri. Per ulteriori informazioni, consultare la guida *Macro Programming Guide* disponibile anche nella Guida in linea.

### Convenzioni per la denominazione dei file

### Convenzioni di denominazione

Le regole seguenti consentono alla ChemStation di creare ed elaborare nomi validi per file e directory:

Non è possibile usare i seguenti caratteri per i nomi di file o directory: <> : " /  $\ @ \% * ? ' \&$  spazi, ecc

L'uso di questi caratteri nei nomi di file o directory può causare problemi durante il caricamento dei file nella ChemStation. Inoltre, se tali caratteri vengono utilizzati nella cartella di installazione, la copia di rielaborazione non si avvia e se nella cartella di installazione viene utilizzato il carattere %, alcune scelte rapide di "Agilent ChemStation " non funzioneranno correttamente.

Si applicano inoltre le seguenti regole:

Tabella 1 Caratteri non consentiti

Parametro della ChemStation	Character			
Nomi file di metodo:	% e . (punto) non sono consentiti			
Nomi file di dati (prefisso/caratteri a scalare):	gli spazi vuoti non sono consentiti			
Sottodirectory dei dati e delle sequenze:	[] + = ; , . (punto) e spazi non sono consentiti			

I seguenti nomi di dispositivi riservati non possono essere utilizzati come nomi di file:

- CON, PRN, AUX, NUL
- COMx (dove x è un numero compreso tra 1 e 9)
- LPT1x (dove x è un numero compreso tra 1 e 9)

Tali nomi non devono essere utilizzati neppure se seguiti da un'estensione (ad esempio Nul.txt).

NOTA

Per il test delle convenzioni di denominazione sono stati utilizzati sistemi operativi in lingua inglese, giapponese e cinese. Agilent non fornisce alcuna garanzia relativamente ai sistemi operativi in lingue diverse dall'inglese e ai corrispondenti caratteri speciali.

### Lunghezza massima dei nomi di file e di sottodirectory della ChemStation

Di seguito sono riportate le specifiche della ChemStation Agilent per i nomi di file e di sottodirectory:

File di dati/sottodirectory/percorso	Lunghezza massima	Aggiunta automatica	Esempio
Nome file di dati	38	.D	Demodad.d
Nomi file di dati con prefisso/carattere a scalare	15	.D	longname000001.d
Metodo Sequenza Ipersequenza Librerie Modelli di report personalizzati	40	. M . S . HYP . UVL . FRP	def_lc.m def_lc.s def_lc.hyp demodad.uvl areapct.frp
Sottodirectory del file di dati	40		demo (in Informazioni campione)
Sottodirectory della sequenza dati	40		demo (in Parametri di sequenza)

 Tabella 2
 Lunghezza massima dei nomi di file e di sottodirectory della ChemStation

#### **1** Caratteristiche della ChemStation Agilent

Software della ChemStation

File di dati/sottodirectory/percorso	Lunghezza massima	Aggiunta automatica	Esempio
Nome contenitore dati sequenza	40		test_date_time (creazione mediante le preferenze di sequenza)
Percorso dati Percorso metodo Percorso sequenza Percorso ipersequenza Percorso librerie Percorso modello di report personalizzato	100	100	c:\chem32\1\data c:\chem32\1\methods c:\chem32\1\sequence c:\chem32\1\hyper c:\chem32\speclib c:\chem32\repstyle

Tabella 2	Lunghezza	massima	dei no	omi di file e	e di sottod	irectory	della	ChemStat	ion

Tutti i messaggi del sistema di report dei registri elettronici della ChemStation in formato esteso e le stringhe informative vengono stampati su più righe. Alcuni report, come il report di sequenza, possono tagliare i nomi dei file per permettere l'inserimento di tutte le informazioni nel modello del report.

### Interfaccia software per l'utente

L'interfaccia per l'utente della ChemStation è suddivisa in finestre che raggruppano le funzionalità software in processi analitici tipo. Le seguenti tre finestre standard sono disponibili in tutte le configurazioni software:

- Controllo del metodo e delle analisi, per controllare ed acquisire dati dallo strumento;
- Analisi dei dati, per rivedere e rivalutare i dati acquisiti;
- Report Layout, per creare impaginazioni particolari per il rapporto di stampa.

Sono disponibili anche altre finestre con i moduli di valutazione dati o per configurazioni che supportano sistemi di diagnosi e procedure di verifica. Se si desidera che gli operatori analizzino campioni utilizzando una tavola facile da usare e preconfigurata, è disponibile una finestra ChemStation Companion. Il riquadro di navigazione contiene un pulsante di navigazione che consente di passare rapidamente dalle finestre della ChemStation a ChemStation Explorer strutturato ad albero. I contenuti di ChemStation Explorer dipendono dalle finestre e consentono l'accesso a diversi elementi della ChemStation.

Ciascuna finestra contiene elementi standard per l'utente come menu e barre degli strumenti. La barra degli strumenti standard consente di accedere rapidamente a informazioni specifiche del sistema, come metodi e sequenze. La finestra Controllo del metodo e delle analisi contiene anche una barra di stato relativa al sistema, un'area di informazioni sul campione che può essere configurata per analisi singole o automatizzate, e un diagramma schematico di interfaccia per le configurazioni GC, CE e LC. Il diagramma utilizza elementi grafici interattivi per consentire un accesso rapido ai parametri dello strumento e consente la visualizzazione grafica animata dello stato di ciascuna analisi durante il suo svolgimento. Il diagramma schematico dello strumento può essere disattivato, se inutilizzato, per ridurre l'utilizzo della memoria e delle altre risorse di Windows.

La finestra Analisi dei dati estende la barra di strumenti standard a modalità specifiche dell'analisi dei dati, comprese l'integrazione, la calibrazione, la stesura di rapporti di stampa, l'annotazione, la comparazione di segnali ed altre modalità aggiuntive specializzate, se i relativi moduli sono installati. Ciascuna di queste modalità di analisi dei dati è supportata da un set di strumenti specifico.

La finestra Progettazione rapporti consente all'utente di definire graficamente il layout di uno stile rapporto di stampa specifico secondo modalità grafiche precise. È anche possibile utilizzare un set di barre di strumenti specifiche.

### Acquisizione dei dati

Lo stato dello strumento viene tenuto costantemente sotto controllo e aggiornato sul display, insieme al tempo di svolgimento dell'analisi sia che il software venga visualizzato come finestra visibile, sia che venga visualizzato sotto forma di icona. Le variazioni che avvengono durante l'analisi, compresi gli eventuali errori e le condizioni dello strumento all'inizio e alla fine, vengono riportate nel registro elettronico del sistema e un riassunto di quest'ultimo viene archiviato con tutti i file di dati. Le condizioni dello strumento, come il flusso, la temperatura, la pressione e la composizione del solvente per i cromatografi liquidi possono essere registrate e memorizzate con ogni file di dati. Questi parametri possono essere visualizzati e riportati in forma grafica per provare la qualità di ogni analisi. L'esatta natura dei parametri registrati dipende sia dalla tecnica che dalle capacità dello strumento configurato.

Possono essere utilizzate due o più finestre per monitorare i dati in fase di acquisizione in tempo reale. I dati vengono visualizzati in unità di misura reali come mAU, Volt, gradi o bar. Ognuna delle finestre può mostrare segnali cromatografici/elettroferografici sovrapposti o parametri dello strumento, come la pressione. Le impostazioni predefinite della visualizzazione possono essere regolate e memorizzate dal sistema in modo che gli utenti possano impostare i parametri preferiti come valori predefiniti dello strumento. La finestra ha capacità di ingrandimento e il cursore può essere utilizzato per visualizzare la risposta di un segnale specifico in qualsiasi momento.

Durante un'analisi, è possibile sfruttare appieno la funzionalità della Chem-Station utilizzando la copia non in linea. Durante l'acquisizione, la parte di analisi dei dati della sessione in linea di uno strumento non è accessibile e la revisione dei dati deve essere eseguita nella copia non in linea.

È disponibile una funzione di "snapshot" per quegli utenti che desiderano avviare l'elaborazione dei dati prima della fine dell'analisi. Lo snapshot deve essere effettuato nella copia non in linea delle sessioni dello strumento ed è immediatamente presente per la revisione.

La disposizione delle finestre contenenti informazioni relative al segnale ed allo stato, compresi i componenti dell'interfaccia schematica dello strumento, vengono salvati automaticamente.

Per ulteriori informazioni sull'acquisizione dei dati, consultare la sezione "Acquisizione dei dati", pagina 61 e la Guida in linea.

### Analisi dei dati — Visualizzazione

La finestra Data Analysis (Analisi dei dati) estende la barra di strumenti standard a funzioni di analisi dei dati raggruppate per tipo di operazione da effettuare comprese l'integrazione, la calibrazione, la stesura di rapporti di stampa, l'annotazione e la comparazione dei segnali. Sono possibili le seguenti operazioni grafiche:

- visualizzazione di segnale singolo o multiplo selezionabile al momento di caricare il cromatogramma/elettroferogramma;
- sovrapposizione di cromatogrammi/elettroferogrammi di campioni diversi;
- sottrazione di un cromatogramma/elettroferogramma da un altro;
- allineamento grafico verticale e orizzontale dei segnali in modo da facilitare la comparazione visiva;
- inversione del segnale o visualizzazione a specchio per facilitare la comparazione visiva;
- zoom grafico e funzioni di scorrimento;
- regolazione degli attributi di visualizzazione, compresa la selezione di marcatori, linee di base, assi, tempi di ritenzione/migrazione e nomi dei composti (l'utente può anche scegliere il carattere per le etichette di tempi di ritenzione e composti, regolare le dimensioni e l'orientamento della visualizzazione, selezionare la visualizzazione come sovrapposta o separata e scegliere i fattori di scala);
- la visualizzazione del cromatogramma/elettroferogramma può comprendere sovrapposizioni grafiche di parametri dello strumento a seconda della capacità di quello configurato;
- possono essere aggiunte annotazioni definite dall'utente in modo interattivo, unitamente alla selezione del carattere, delle dimensioni, dell'orientamento del testo e del colore (una volta definite, le annotazioni possono essere spostate, modificate o eliminate);
- copiare la visualizzazione negli Appunti di Windows sia in formato metafile che in formato bitmap;
- una funzione di *pick mode* per visualizzare i valori dei punti di dati individuali nelle unità del rivelatore,
- esportazione di punti digitalizzati di tempo/intensità negli Appunti di Microsoft Windows.

### Analisi dei dati — Integrazione

L'algoritmo di integrazione della ChemStation è la seconda versione di una nuova generazione nata con lo scopo di aumentare la robustezza, l'affidabilità e la facilità d'uso.

# Analisi dei dati — Quantificazione

La modalità di calibrazione della ChemStation della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) consente la visualizzazione simultanea di:

- segnale o segnali in corso di calibrazione con un'indicazione della finestra dei tempi di ritenzione/migrazione del composto attuale;
- tavola di calibrazione la cui visualizzazione può essere configurata da un sistema di selezione dei parametri di calibrazione dettagliato
- curva di calibrazione del composto in corso di calibrazione.

Le finestre delle modalità di calibrazione sono collegate in modo che la modifica effettuata in una si rifletta automaticamente in tutte le altre. Questa modalità consente la selezione grafica e la modifica dei dati di calibrazione.

La quantificazione si basa su calcoli in percentuale, percentuale normalizzata, standard esterno, standard esterno percentuale, standard interno, standard interno percentuale, calcoli effettuabili sia sull'area del picco, sia sull'altezza. Le calibrazioni possono essere multilivello e possono comprendere diversi standard interni. Le variazioni nelle calibrazioni vengono salvate automaticamente e possono essere usate per variare il peso dei calcoli di ricalibrazione.

Per ulteriori informazioni sulla quantificazione e la calibrazione, consultare la sezione "Calibrazione", pagina 147.

## Analisi dei dati — Revisione dei dati, Rielaborazione dei dati e Revisione dei lotti

Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) sono disponibili le due funzioni seguenti:

- Navigation Table (Tavola di navigazione)
- Batch Review (Revisione dei lotti)

La tavola di navigazione consente molte operazioni grafiche importanti:

- funzioni di configurazione della tavola standard, quali ordinamento, opzioni di trascinamento, selezione di colonne, raggruppamento di voci per specificare la configurazione della tavola di navigazione preferita
- funzioni disponibili facendo clic con il pulsante destro del mouse per caricare o sovrapporre un segnale, esportare dati e stampare rapporti

- revisione dei dettagli del segnale tramite l'espansione di una riga della tavola di navigazione
- revisione dei segnali e creazione di rapporti della ChemStation sia utilizzando i metodi caricati che il metodo del file di dati singolo DA.M, ad esempio, per la revisione degli eventi di integrazione manuale
- rielaborazione dei dati di sequenza (dati di sequenza acquisiti dalla Chem-Station Rev. B.02.01 e successive)

La revisione dei lotti consente le seguenti operazioni grafiche importanti:

- definizione della revisione e rielaborazione automatica o manuale dei file di dati (calibrati)
- ricalibrazione della tavola di calibrazione
- revisione delle tavole dei composti dei metodi calibrati
- creazione di rapporti di lotti specifici

### Analisi dei dati — Stesura di rapporti di stampa standard

È possibile scegliere vari tipi di rapporto di stampa, definibili dall'utente, secondo le specifiche visualizzate nello schermo. Ogni rapporto standard contiene gruppi di informazioni standard ed una serie di informazioni opzionali.

Per ulteriori informazioni sullo stile dei rapporti di stampa, consultare la sezione "Uso dei report della ChemStation", pagina 223.

### Analisi dei dati – Report specializzati

La ChemStation comprende anche funzioni avanzate per la creazione di report per applicazioni che richiedono report specializzati. Questo tipo di report contiene statistiche sulla qualità della separazione, analisi delle tendenze in serie di campioni e layout stabiliti dall'utente.

### Report di idoneità del sistema

I report di idoneità del sistema consentono agli utenti di creare report sui parametri delle prestazioni del sistema per singole analisi. Esistono tre tipi di report: Software della ChemStation

Il modello standard del report **Performance** consente la stampa dei parametri relativi a metodi non calibrati che comprendono:

- Tempo di ritenzione/migrazione
- Fattore di capacità (k')
- Area dei picchi
- Altezza dei picchi
- Simmetria
- Ampiezza reale del picco a metà altezza
- Efficienza espressa in numero di piatti teorici
- Risoluzione
- Selettività.

Per i metodi calibrati il nome del composto e la quantità sostituiscono le colonne di area del picco, altezza e selettività.

L'intestazione del report contiene l'intestazione e il piè di pagina standard, le informazioni sul campione, i parametri della colonna analitica e, opzionalmente, la tracciatura del cromatogramma/elettroferogramma.

Lo stile **Performance and Noise** aggiunge una valutazione del rumore del segnale, in un massimo di sette intervalli di valutazione definiti dall'utente, ai dati dello stile **Performance**. I parametri del rumore sono riportati come rapporti segnale-rumore per ogni picco o composto calibrato e sotto forma di tavola del rumore per ogni segnale. Ciascuna tavola contiene il valore del rumore calcolato mediante sei volte la deviazione standard, picco a picco e ASTM oltre a migrazione e deriva.

Lo stile **Extended Performance** aggiunge rappresentazioni grafiche dei picchi singoli e mostra i tempi di inizio e di termine, l'ampiezza a metà altezza e la linea di base. Questo stile comprende i parametri che seguono oltre a quelli riportati nei report standard sulle prestazioni:

- Area, altezza e quantità
- Disallineamento
- Eccesso
- Fattore di scodamento USP
- Intervallo di tempo fra punti di dati e numero di punti di dati sul picco
- Momenti statistici (da M0 a M4)

- Ampiezza del picco a metà altezza calcolata con i metodi vero, sigma cinque, tangente e scodamento
- Piatti/colonna e piatti/metro calcolati con l'ampiezza del picco a metà altezza e i metodi sigma cinque, tangente e statistici.

Gli utenti possono definire le scale di valutazione del rumore di fondo e i limiti accettabili per questi criteri di prestazioni. I valori al di fuori dei limiti stabiliti sono segnalati nel report.

Per ulteriori informazioni sui calcoli di idoneità del sistema consultare "Valutazione della system suitability", pagina 241.

### Report di riepilogo della sequenza

I report di riepilogo della sequenza vengono prodotti alla fine di una serie di analisi automatiche. Il loro campo di applicazione va dal breve riepilogo dei campioni analizzati alla ripetibilità grafica dettagliata, all'analisi di tendenza di parametri scelti dall'utente relativi a serie di campioni diversi analizzati con lo stesso metodo.

Per ulteriori informazioni sui report di riepilogo della sequenza, consultare la Guida in linea e la sezione "Report riassuntivi di sequenza", pagina 236.

### **Report personalizzati**

La ChemStation fornisce una modalità di definizione personalizzata che consente agli utenti di definire il contenuto esatto dei propri report. L'utente definisce graficamente il layout del report, che può contenere informazioni generali su campione, segnale, integrazione e risultati dell'analisi quantitativa. Si possono definire elementi singoli, come il testo, le tavole ed i grafici ed organizzare sezioni di informazioni, definire graficamente la loro posizione, le dimensioni e l'orientamento di ogni elemento definito. Le singole sezioni possono essere aggiunte, eliminate, riordinate o inserite l'una nell'altra.

L'utente può decidere di visualizzare i titoli e le note a piè pagina su ogni foglio, unitamente all'ora ed alla numerazione della pagina nel formato **page x of y**. Le informazioni incluse nel report possono riferirsi a qualsiasi parametro definito dalla ChemStation o dall'utente.

Dopo la definizione, il report può essere associato a un metodo particolare in modo che venga impostato come formato di report predefinito per un determinato tipo di analisi. I report personalizzati possono essere visualizzati su schermo, inviati a una stampante o stampati su file. I report visualizzati su schermo contengono grafici.

Per ulteriori informazioni sul layout del report, consultare la Guida in linea.

### Report dei diagrammi di controllo

Il software della ChemStation fornisce una funzione **Control Chart**. Dopo la sua installazione e selezione, è possibile usare questa funzione per controllare un parametro scelto di un composto ogni volta che si esegue un metodo. Questi parametri comprendono: Quantità, Fattore di risposta, Tempo di ritenzione/migrazione e Area.

Per ulteriori informazioni sui report personalizzati e dei diagrammi di controllo, consultare la Guida in linea.

### Utilità e compatibilità

### Informazioni generali

La ChemStation è in grado di importare ed esportare file di dati in formato cromatografico andi (Analytical Data Interchange) creato dalla Analytical Instrument Association (AIA), revisione 1.0, copyright 1992. L'importazione dei dati è supportata al livello di conformità uno (informazioni sul campione e dati del segnale) e l'esportazione dei dati al livello di conformità due (informazioni sul campione, dati del segnale e risultati di integrazione).

La ChemStation comprende comandi e funzioni per supportare lo standard di scambio dinamico dei dati (Dynamic Data Exchange, DDE) della piattaforma Microsoft Windows come client o server DDE. I comandi consentono di stabilire e terminare collegamenti, trasferire informazioni in entrambe le direzioni ed eseguire funzioni di controllo a distanza.

### Personalizzazione

La ChemStation può essere personalizzata utilizzando diversi comandi disponibili. Questi comandi possono essere raggruppati per eseguire automaticamente una funzione specifica; tale gruppo è denominato macro. Gli utenti che scrivono macro possono definire variabili personalizzate, utilizzare costrutti condizionali o di ciclo, eseguire operazioni di I/O fisico (ad esempio la gestione dei file e l'interazione tra gli utenti), nidificare le macro nonché programmare e scambiare dati con altre applicazioni MS-DOS o Windows.

Per ulteriori informazioni sulla personalizzazione, consultare il manuale *Macro Programming Guide* (Guida alla programmazione di macro) contenuto nella Guida in linea.

### Automazione

La ChemStation può eseguire sequenze multimetodo.

L'insieme dei parametri di sequenza può essere definito per utilizzare file generati automaticamente o numerati in sequenza, con un prefisso di un massimo di quindici caratteri definito dall'utente. L'utente può scegliere se effettuare analisi complete o semplicemente rielaborare solo sequenze, oppure scegliere una serie di comandi di chiusura specifici per tecnica o una macro di chiusura definita dall'utente, che viene eseguita se una sequenza viene interrotta per errore o al completamento di tutte le analisi.

La tavola di sequenza, o la lista di analisi da effettuare, viene costruita in un'interfaccia per l'utente di formato simile a fogli elettronici che permette di definire il numero di vial e i nomi dei campioni, i metodi di analisi, i parametri di quantificazione del campione, compresa la quantità ed il fattore di moltiplicazione e di diluizione, la specifica di calibrazione, il parametro LIMSID di scambio dei dati ed il numero di iniezioni ripetute. A seconda degli strumenti e dei moduli configurati, sono accessibili ulteriori campi, ad esempio se un sistema LC Agilent 1100/1200 include un raccoglitore di frazioni, nella tavola di sequenza viene visualizzata la colonna "Fract. Start". L'aspetto della tavola di sequenza può essere configurato dall'utente. L'utente può passare da una cella all'altra della tabella e copiare, tagliare o incollare singole celle o righe intere o serie di righe per costruire sequenze in modo rapido ed efficiente. I campioni possono essere identificati nella tavola di sequenza come incogniti, calibrati o di controllo. Il tipo di campione determina qualsiasi tipo di trattamento speciale di valutazione dei dati del campione:

- i campioni incogniti vengono valutati e vengono stesi rapporti di stampa secondo quanto specificato nel metodo,
- i campioni di calibrazione vengono utilizzati per ricalibrare il componente di quantificazione del metodo come descritto di seguito,
- i campioni di controllo vengono valutati rapportandoli ai limiti di ogni componente definito nel metodo. Se i risultati sono al di fuori degli intervalli di parametri specificati, l'esecuzione della sequenza viene interrotta.

È possibile definire ricalibrazioni semplici, cicliche e con la tecnica del bracketing. Le ricalibrazioni semplici significano che avviene una ricalibrazione ogni volta che viene definito un campione di calibrazione nella sequenza. Le ricalibrazioni cicliche avvengono ad intervalli regolari, ogni volta che vengono analizzate serie di campioni incogniti. Per effettuare una calibrazione in bracketing di una serie di campioni incogniti, occorre analizzare due gruppi di calibrazione. I risultati quantitativi relativi ai campioni incogniti vengono quindi calcolati utilizzando una tavola di calibrazione di media tra i due gruppi.

La funzione di sequenza parziale permette di vedere l'ordine di esecuzione di una sequenza e di scegliere l'aggiunta di campioni singoli da rianalizzare o rielaborare. Se si sceglie di rivalutare dati già acquisiti si può specificare se si intende usare i dati originali di quantificazione del campione o dati nuovi, inseriti nella tavola della sequenza.

Le sequenze possono essere arrestate temporaneamente per iniettare campioni singoli prioritari utilizzando un altro metodo, quindi riavviate senza bloccare il processo automatico. Si possono anche aggiungere campioni ad una sequenza mentre viene eseguita.

Entrambe le tavole possono essere stampate.

Per ulteriori informazioni sulle sequenze, consultare la sezione "Automazione" , pagina 167 e la Guida in linea.

### Buone pratiche di laboratorio

La ChemStation è stata progettata nel rispetto di standard riconosciuti a livello internazionale con determinate funzioni che permettono all'utente di lavorare in un ambiente regolamentato. Queste funzioni si applicano alla completa costruzione dei metodi e alla verifica della loro conformità agli usi previsti, al controllo del funzionamento del sistema al fine di garantirne la rintracciabilità, all'originalità e alla qualità dei dati.

### Processo di sviluppo

Il Certificato di Validazione allegato a tutti i pacchetti software documenta il processo di sviluppo e le verifiche eseguite come parte del ciclo di sviluppo. Il processo di sviluppo è registrato secondo gli standard di qualità previsti da ISO 9001. Tale certificato è documentato unitamente ai protocolli di rivalidazione sul luogo di installazione nel *Validation Binder* della *ChemStation Agilent per LC*.

### Specifica dei metodi ed uso

- Metodi globali: le specifiche complete relative allo strumento e all'analisi dei dati sono archiviate in una singola directory. I metodi comprendono le specifiche dei limiti di concentrazione dei composti, che permettono di controllare che i risultati delle quantificazioni non vengano applicati al di fuori della serie calibrata.
- Il registro elettronico delle modifiche dello strumento offre agli utenti un metodo validato che registra automaticamente i dati relativi alla data e al tipo di modifiche. Gli utenti possono aggiungere un commento relativo al motivo della modifica. Il registro elettronico delle modifiche viene memorizzato automaticamente in formato binario insieme al metodo. Per impedire l'accesso non autorizzato alle registrazioni, queste vengono protette da uno schema di accesso, come descritto di seguito. Il registro delle modifiche può essere visualizzato e stampato.
- Possono essere assegnati limiti, a seconda dei composti di ciascun metodo, per un determinato numero di parametri cromatografici/elettroferografici e di prestazioni del sistema, come descritto nella sezione relativa all'analisi dei dati ed alla quantificazione. I risultati che superano gli intervalli di parametri previsti vengono utilizzati per controllare l'esecuzione delle sequenze automatizzate come descritto nell'apposita sezione. Tutti questi elementi sono riportati nel rapporto di stampa di analisi appropriato.

Software della ChemStation

• I rapporti di stampa relativi alla prestazione del sistema o di system suitability (vedere la sezione precedente relativa ai rapporti di stampa) forniscono analisi dettagliate sulla qualità della separazione.

La ChemStation può essere configurata in modo da limitare l'accesso a due livelli utente: operatore e manager. Il livello manager può essere protetto da password e consente l'accesso a tutte le funzioni della ChemStation. Il livello operatore consente solo di usare le funzioni di base e di eseguire i metodi analitici definiti. Il livello operatore è destinato all'uso di routine nei laboratori ed impedisce specificamente agli utenti di modificare metodi e crearne di nuovi.

### Robustezza del metodo

I rapporti riassuntivi della sequenza (vedere la sezione "Report riassuntivi di sequenza", pagina 236) consentono di verificare la robustezza di un metodo. I rapporti di stampa in formato esteso per criteri scelti dall'utente vengono riportati sotto forma di diagrammi di tendenza e possono essere usati per determinare i limiti reali di funzionamento. Tali limiti possono quindi essere incorporati nel metodo per verificare, mediante l'analisi di campioni di controllo, che funzioni secondo le specifiche.

### Funzionamento del sistema

Il kit di verifica della ChemStation, che fa parte del software standard, controlla automaticamente che l'installazione ed il funzionamento delle parti di elaborazione dei dati siano corretti, confrontando i risultati generati dall'esecuzione del test con valori conosciuti preregistrati. Il kit di verifica permette agli utenti di definire i propri file di dati e metodi come base per il test.

### Rintracciabilità, qualità e originalità dei dati

Un registro elettronico riferito al periodo di analisi tiene traccia delle transazioni dell'intero sistema. Inoltre, registra eventi non ricorrenti (come errori o modifiche di parametri effettuati durante l'analisi) così come le condizioni dello strumento prima e dopo ciascuna analisi. Insieme a ciascun file di dati viene salvata una copia del relativo estratto del registro elettronico.

Le condizioni reali dello strumento, come la pressione, il flusso e la temperatura durante l'analisi vengono registrate se lo strumento configurato supporta questa funzionalità. Questi dati possono in seguito essere visualizzati in forma grafica con il cromatogramma/elettroferogramma per mostrare le condizioni reali dello strumento durante una particolare analisi o essere inclusi nel rapporto di stampa.

I metodi salvati con il file di dati registrano il metodo reale al momento dell'analisi e consentono la ricostruzione completa dei dati registrati anche in una data successiva. Il metodo viene salvato dopo il completamento di tutte le fasi dell'analisi.

Tutti i rapporti riportano il tempo ed hanno pagine numerate (nel formato  $pagina \ x \ di \ y$ ). L'utente può selezionare il livello di dettaglio desiderato, dal semplice rapporto di stampa in forma di riassunto a descrizioni più dettagliate di tutto il sistema (vedere la sezione sui rapporti di stampa).

I file creati con Registro salvataggio GLP, specificati come parte della configurazione del metodo, vengono usati per salvare tutti i dati originali, comprese le informazioni relative ai campioni, il metodo di analisi dei dati, i segnali cromatografici/elettroferografici, le condizioni dello strumento, i risultati dell'integrazione e della quantificazione, i dati dei rapporti di stampa ed il registro elettronico dell'analisi, in un file binario protetto da somma di controllo (checksum). Si tratta di un formato binario non modificabile che assicura l'originalità dei risultati. Il file contiene uno schema di revisione che indica se i dati sono stati rielaborati.

I tipi di campione di controllo possono essere definiti nella tavola di sequenza ed utilizzati per confrontare automaticamente le prestazioni dello strumento con i risultati relativi al controllo della qualità del campione, quando lo strumento viene usato in modalità automatica. Eventuali risultati non compresi nell'intervallo specificato dall'utente determinano l'interruzione del funzionamento automatico. 1 Caratteristiche della ChemStation Agilent Controllo dello strumento

# **Controllo dello strumento**

La capacità di controllo dello strumento della ChemStation può essere aumentata acquistando altri moduli strumentali che consentano configurazioni a più strumenti e tecniche miste. Per ulteriori informazioni, consultare il manuale fornito con i moduli aggiuntivi.

### Rete

La ChemStation è stata collaudata ed è supportata dal software Agilent Lan-Manager e da prodotti Microsoft Windows XP Professional e Microsoft Windows Vista Business basati sulla specifica IEEE 802.3 CSMA/CD. Quindi, è generalmente compatibile con qualsiasi software di rete a sua volta compatibile con gli standard di programmazione di Microsoft Windows.

Questi prodotti permettono alla ChemStation di condividere fisicamente dispositivi come plotter e stampanti con altri computer di laboratorio nonché di condividere informazioni come file di dati e metodi.

### **Client/Server**

Il software della ChemStation deve essere installato su un server di rete adatto e scaricato sugli eventuali PC client. Ogni configurazione specifica del client assicura un ambiente adatto per tecniche ed utenti diversi, mentre l'installazione centralizzata del software consente di gestire le varie copie della stessa ChemStation in un solo ambiente di lavoro.

### Controllo dello strumento basato su LAN

Il software della ChemStation è dotato di un sistema di controllo dello strumento ed acquisizione di dati basato su LAN per i sistemi GC Agilent 7890 e GC Agilent 6890, il modulo di controllo Agilent 35900E A/D e il cromatografo liquido Agilent Serie 1100/1200. È possibile controllare agevolmente gli strumenti collegandoli alla LAN sulla quale risiede il PC della ChemStation. Questa disposizione consente al PC della ChemStation di essere installato lontano dallo strumento che controlla.

# Documentazione

La documentazione contiene sezioni specifiche sui seguenti argomenti.

- Installazione e apprendimento del software della ChemStation.
- Uso del software della ChemStation.
- Conoscenza dei principi di funzionamento del software.
- Personalizzazione della ChemStation.

### Installazione e apprendimento

Ogni prodotto software della ChemStation è dotato di un manuale di installazione contenente informazioni dettagliate sulle funzioni chiave dell'hardware e del software del PC, sull'installazione delle interfacce oltre all'installazione e ad alla qualificazione della ChemStation. Il manuale è specifico per la configurazione acquistata e può comprendere sezioni sulla risoluzione di problemi, registri di sistema e consigli per la manutenzione.

### Uso del software

Esistono inoltre due ulteriori categorie di informazioni in linea per l'utente.

La ChemStation comprende una Guida in linea (help) in formato Windows, sensibile al contesto e dotata di indici. Questo sistema fornisce informazioni dettagliate su ogni schermo e spiegazioni sul significato dei parametri. Le spiegazioni sono supportate da rappresentazioni grafiche quando necessarie e possono essere copiate negli Appunti di Windows per essere aggiunte alla documentazione personale dell'utente o per la stampa.

Un manuale di addestramento in linea incluso nella Guida in linea fornisce un valido ausilio all'apprendimento del software, lavorando al contempo sui propri metodi e dati. Fornisce una panoramica delle fasi iniziali di acquisizione e analisi dei dati.

La parte Come... della Guida in linea comprende liste di controllo e funzioni relative a tecniche più complesse o ad operazioni cromatografiche più comuni per aiutare coloro che utilizzano il sistema meno frequentemente ad impostare correttamente gli strumenti. Le liste di controllo sono collegate direttamente ad informazioni fornite dalla Guida in linea.

### Comprensione dei principi

Il manuale *Conoscere la ChemStation* descrive i principi di funzionamento del software e degli algoritmi utilizzati per il trattamento dei dati.

### Personalizzazione

Gli utenti più esperti che desiderano personalizzare il funzionamento della ChemStation o che desiderano aggiungere ulteriori funzioni possono scrivere macro.

Il manuale di riferimento primario, ossia la guida *Macro Programming Guide* disponibile anche nella Guida in linea, contiene una serie completa di esempi funzionali corredati da una descrizione esauriente sui tipi di dati interni e sulle relative strutture.

I comandi della Guida in linea, accessibili dal menu Help (Guida) della Chem-Station o dalla finestra di dialogo Show Command (Mostra comando), costituiscono la funzione di riferimento del programmatore. Essi comprendono la sintassi e la spiegazione dei parametri con macro di esempio per illustrare l'uso di molte macro. Gli utenti possono copiare esempi e sintassi di comandi direttamente nei file sorgente delle loro macro.

# Struttura delle directory della ChemStation

L'esempio che segue illustra la struttura della directory della ChemStation. Tale struttura comprende directory generiche che possono essere condivise da tutti gli strumenti configurati e directory specifiche dello strumento. Il programma di installazione del software crea una sottodirectory della directory predefinita della ChemStation (per impostazione predefinita CHEM32) per ciascun strumento configurato denominandola con il numero dello strumento. Per impostazione predefinita i dati, i metodi e le sequenze dello strumento vengono archiviati all'interno di questa sottodirectory. Tramite Preferenze è possibile aggiungere ulteriori sottodirectory per i dati, i metodi e le sequenze. Tramite ChemStation Explorer è possibile spostarsi tra i nuovi percorsi aggiunti per caricare dati, metodi e sequenze. I nuovi percorsi sono inoltre disponibili in qualsiasi casella di selezione all'interno delle voci di menu della ChemStation (ad esempio per l'impostazione dei percorsi nei parametri di sequenza).

Le sottodirectory della ChemStation sono le seguenti:

### **1** Caratteristiche della ChemStation Agilent

Struttura delle directory della ChemStation




Directory	Contents	
Chem32	Contiene i programmi necessari per configurare e avviare il software ChemStation. Deve essere parte della variabile PATH. Questa directory viene aggiunta automaticamente dal programma di installazione, se non si imposta un'altra directory.	
STILERAP	Utilizzata per modelli rapporto di stampa definiti tramite Report Template Editor.	
CORE	Utilizzata per i componenti centrali del software e condivisa da tutti gli strumenti cromatografici/elettroferografici configurati. È la directory di lavoro della ChemStation.	
IMMAGINI	Contiene la grafica utilizzata dalla ChemStation.	
Lingua	Utilizzata per i codici specifici della lingua di questa parte del software.	
1024, 800, ToolbarSupport Files	Contiene file di inizializzazione per l'interfaccia grafica. Non modificare questa directory.	
helpenu	Usata per la versione inglese americano dei file della Guida del nucleo software appropriato.	
ВАСКИР	Usata per ottenere copie di file precedenti durante l'installazione.	
DRIVER	Contiene i driver per gli strumenti configurati.	
1	Usata per lo strumento configurato (da 1 a 4). Questa sottodirectory comprende cinque ulteriori sottodirectory: DATI, METODI, SEQUENZA, VERIFICA e TEMP.	
DATI	Contiene tutte le directory dei risultati delle analisi. Può anche contenere ulteriori sottodirectory se il disco viene strutturato in modo tale da definirle usando le finestre di dialogo Informazioni sul campione o Parametri sequenza. Le directory dei risultati sono identificate da un nome con un'estensione .D. Per ulteriori informazioni sulla struttura dei file di dati, consultare la sezione "Acquisizione dei dati", pagina 61. Ulteriori percorsi di dati possono essere aggiunti tramite l'opzione Preferenze.	
METODI	Contiene tutte le directory di metodo che hanno un'estensione .M. Per ulteriori informazioni sui contenuti, consultare la sezione "Struttura di una directory di metodo", pagina 52. Ulteriori percorsi per i metodi possono essere aggiunti tramite l'opzione Preferenze.	

 Tabella 3
 Sottodirectory ChemStation

### **1** Caratteristiche della ChemStation Agilent

Struttura delle directory della ChemStation

Directory	Contents	
SEQUENZA	Contiene il percorso predefinito per le tavole di sequenza. I file di sequenza in questa directory hanno un'estensione .S. Ulteriori percorsi per le sequenze possono essere aggiunti utilizzando l'opzione Preferenze; vedere "Preferenze - Scheda Sequenza", pagina 171 e "Parametri di sequenza", pagina 173.	
VERIFICA	Contiene i file di dati, metodi ed i risultati di processo dei dati archiviati in file di registrazione (.REG). I file eseguono la procedura di verifica della ChemStation come descritto nella Guida in linea. Per ogni verifica viene usato un gruppo di dati, metodo e file di registrazione.	
TEMP	La sottodirectory TEMP contiene file temporanei e file di registro elettronico. Ad esempio per lo strumento 1 il registro elettronico in linea è chiamato INSTR1.LOG, mentre quello non in linea è denominato INSTR1-2.LOG.	
LC, GC, CE, MS	Codice specifico per driver di strumento come i file INI.	
ΙΩΤ	Contiene i file necessari per la creazione del rapporto IQT.	
speclibs	Contiene le librerie degli spettri.	

### Tabella 3 Sottodirectory ChemStation

### Riquadro di navigazione

Il riquadro di navigazione, disponibile nella parte sinistra di tutte le finestre della ChemStation, è progettato per consentire un rapido accesso a molti elementi chiave della ChemStation e per passare rapidamente ad altre finestre. Contiene ChemStation Explorer con struttura ad albero e un'area di pulsanti configurabili. Include anche la funzione di scomparsa automatica, in modo da non sottrarre spazio di lavoro alla ChemStation. Offre inoltre funzioni standard quali il ridimensionamento, la ridisposizione e l'area dei pulsanti di navigazione.

### Pulsanti di navigazione

I pulsanti di navigazione consentono di passare da una finestra all'altra della ChemStation facendo clic sullo specifico pulsante di navigazione. La sezione Navigation Button (Pulsante di navigazione) può essere ridotta a icona, ingrandita o ridisposta.

### **ChemStation Explorer**

Il contenuto del riquadro di navigazione varia a seconda della finestra. Per Method and Run Control (Controllo del metodo e delle analisi), Data Analysis (Analisi dei dati) e Report Layout (Disposizione rapporto) ChemStation Explorer consente di navigare in vari elementi della ChemStation. Per impostazione predefinita, questi elementi per dati, metodi e sequenze sono basati sulle impostazioni di Configuration Editor. Le posizioni di questi elementi possono essere espanse ed è possibile specificare nuovi nodi per i metodi, le sequenze e la posizione dei dati, utilizzando l'opzione "Preferences" (Preferenze) del menu View (Visualizza).

### 1 Caratteristiche della ChemStation Agilent

Riquadro di navigazione

Pulsanti di navigazione	Elementi di ChemStation Explorer
Method and Run Control (Controllo del metodo e delle analisi)	Modelli di sequenza / Metodi master
Data Analysis (Analisi dei dati)	Dati / Metodi master
Report Layout (Disposizione rapporto)	Metodi master
Verification (Verifica) (LC e LC/MS)	Scelte rapide di verifica specifiche per finestra
Diagnosis (Diagnosi) (LC e LC/MS)	Scelte rapide di diagnosi specifiche per finestra
Tune (Regolazione) (LC/MS)	Scelte rapide di regolazione specifiche per finestra

### Tabella 4 Elementi del riquadro di navigazione



**Descrizione della ChemStation Agilent** 

## Metodi

2

Che cos'è un metodo? 43 Le parti di un metodo 44 Informazioni sui metodi 44 Controllo dello strumento 44 Analisi dei dati 45 Lista di controllo del periodo di funzionamento 46 Stato dei metodi 47 Metodi memorizzati 47 Metodo corrente 48 Creazione di metodi 49 Modifica dei metodi 50 Parti di metodo da modificare 50 Struttura di una directory di metodo 52 Cosa accade quando si esegue un metodo? 53 Funzionamento del metodo 53 Comando o macro in pre-analisi (Lista di controllo del periodo di funzionamento) 54 Acquisizione dei dati(Lista di controllo del periodo di funzionamento) 54 Data Analysis (Analisi dei dati)(Lista di controllo del periodo di funzionamento) 55 Analisi dei dati personalizzata(Lista di controllo del periodo di funzionamento) 56 Salvataggio dei dati secondo la Buona Prassi di Laboratorio (GLP)(Lista di controllo del periodo di funzionamento) 56 Comando o macro post-analisi(Lista di controllo del periodo di funzionamento) 57 Salvataggio di una copia del metodo con dati(Lista di controllo del periodo di funzionamento) 57



### 2 Metodi

Riquadro di navigazione

Salvataggio di una copia del metodo con dati come metodo DA.M (predefinito di ChemStation) 58

Riepilogo del funzionamento di un metodo 59

Questo capitolo descrive i concetti alla base dei metodi e spiega come utilizzarli.

## Che cos'è un metodo?

Un metodo comprende tutti i parametri per l'acquisizione e l'analisi di dati, insieme a eventuali funzioni pre e post analisi, per un determinato campione.

I file dei metodi disponibili (\*.m) sono visualizzati in ChemStation Explorer. Per una navigazione rapida e semplice, è possibile aggiungere altri percorsi di metodi alla struttura di selezione di ChemStation Explorer utilizzando la scheda **Paths** della finestra di dialogo **Preferences**.

#### 2 Metodi

Le parti di un metodo

## Le parti di un metodo

Un metodo è identificato da un nome composto da un massimo di 40 caratteri alfanumerici. Il nome file ha sempre un'estensione .M per identificarlo come metodo. I metodi vengono memorizzati come directory che contengono singoli file relativi ai componenti del metodo.

Ogni metodo include quattro componenti:

- informazioni sul metodo,
- controllo dello strumento,
- analisi dei dati,
- lista di controllo del periodo di funzionamento.

### Informazioni sui metodi

Questa sezione viene usata per definire informazioni di tipo descrittivo sul metodo.

### **Controllo dello strumento**

Definisce i parametri di controllo di uno strumento o i suoi componenti. In uno strumento per cromatografia liquida, i parametri, come la composizione della fase mobile, il flusso, il volume di iniezione, la lunghezza d'onda del rivelatore e così via, controllano la pompa, l'iniettore ed il rivelatore. In uno strumento per gascromatografia, i parametri, come la temperatura e la pressione di iniezione, il flusso in una colonna impaccata e così via, controllano lo strumento.

### Analisi dei dati

Definisce i parametri di controllo dell'elaborazione dei dati.

### Dettagli del segnale

Definisce i segnali e le relative proprietà usate per la valutazione dei dati.

### Eventi di integrazione

Definisce gli eventi programmati a tempo che si verificano a specifici tempi di ritenzione/migrazione su un cromatogramma/elettroferogramma. Questi eventi programmati possono essere utilizzati per modificare le modalità di integrazione del segnale.

### Identificazione dei picchi

Definisce i parametri di elaborazione dei dati associati all'identificazione di picchi nel cromatogramma/elettroferogramma.

### Quantificazione dei picchi

Definisce i parametri di elaborazione dei dati con effetti sui calcoli quantitativi che determinano la quantità o la concentrazione del componente del campione che corrisponde ad ogni picco.

### Calibrazione e ricalibrazione

Definisce i parametri di elaborazione dati che riguardano la calibrazione e la frequenza con la quale viene effettuata.

### Campi personalizzati

Definisce le proprietà dei campi personalizzati relativi al campione o composto disponibili per il metodo. I campi personalizzati consentono di aggiungere informazioni relative a un composto presente in un campione.

### Report

Definisce il formato del report stampato dopo un'analisi.

## Lista di controllo del periodo di funzionamento

Definisce quali parti del metodo vengono eseguite durante il funzionamento.

La lista di controllo può essere usata per effettuare le seguenti operazioni:

- Acquisire, memorizzare ed elaborare i dati per produrre un report
- Eseguire solo una parte del metodo
- Acquisire e memorizzare i dati senza analizzarli
- Rianalizzare i file di dati esistenti
- Usare macro personalizzate per l'analisi dei dati e le elaborazioni pre e post-analisi
- Salvare i risultati in un registro secondo la Buona Prassi di Laboratorio.

## Stato dei metodi

Un metodo può essere in due condizioni: metodo memorizzato o metodo corrente.

### Metodi memorizzati

Si tratta di metodi memorizzati sul disco del computer. I metodi archiviati hanno un nome costituito da un massimo di 40 caratteri alfanumerici seguito dall'estensione .M. I metodi vengono memorizzati nella ChemStation in un massimo di tre percorsi:

- Il metodo master viene memorizzato in una sottodirectory di metodi, disponibile nel nodo Metodi di ChemStation Explorer, e non viene direttamente associato con alcun contenitore di dati.
- Quando si esegue una sequenza (con l'opzione **Unique Folder Creation ON**, vedere "Preferenze Scheda Sequenza", pagina 171), le copie di tutti i metodi master usati vengono memorizzate nel contenitore dati della sequenza insieme ai file di dati. Questi metodi vengono direttamente collegati alla sequenza e utilizzati anche durante la rielaborazione della sequenza. Le modifiche apportate a questi metodi non vengono propagate ai metodi master. Le modifiche vengono propagate al metodo nel contenitore della sequenza e ai singoli metodi (DA.M) durante la rielaborazione della sequenza. Se per l'acquisizione dei dati si intende utilizzare il metodo aggiornato presente nel contenitore della sequenza, è necessario
  - Copiare tale metodo dal contenitore dei dati della sequenza in uno dei percorsi dei metodi definiti, oppure
  - Utilizzare l'opzione **save as** per salvare il metodo aggiornato come metodo master.

Il metodo nuovo/aggiornato diventa quindi disponibile in ChemStation Explorer, nella finestra dei metodi, come metodo master.

• Inoltre, due copie del metodo, utilizzate per analizzare un campione, vengono archiviate con i file dei dati ACQ.M e DA.M. ACQ.M è il metodo di acquisizione, DA.M è il metodo di analisi dei dati. DA.M è il metodo che viene caricato insieme al file dei dati se si seleziona la casella di controllo **Load DA method from data file** nella scheda **Signal Options** della finestra di dialogo **Preferences**. Le modifiche apportate a questo metodo (ad esempio gli eventi d'integrazione programmati) sono specifiche per il file di dati associato e non vengono propagate al metodo di sequenza o al metodo master.

La tavola di navigazione consente di aggiornare i metodi singoli e di sequenza in base alla sequenza o al metodo master corrispondente facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla relativa riga. Se si seleziona l'opzione **Update Master Method/Update Sequence Method**, i parametri di analisi dei dati del metodo scelto vengono ricopiati sul metodo master/sequenza corrispondente. La cronologia del metodo target rifletterà questo aggiornamento automatico.

 Tabella 5
 Disponibilità della funzionalità Update .... Method nella tavola di navigazione

Metodo caricato	Opzione di aggiornamento disponibile
Metodo di analisi singola dei dati (DA.M)	Update Master Method Update Sequence Method
Metodo di sequenza	Update Master Method
Metodo master	

### **Metodo corrente**

Quando un metodo memorizzato viene richiamato dal disco diventa corrente. Esiste sempre un metodo corrente in uso nella memoria. Quando la ChemStation viene avviata per la prima volta, il metodo predefinito fornito da Agilent Technologies viene caricato come parte della procedura di avviamento. Può presentarsi come i seguenti:

- DEF\_LC.M per uno strumento per cromatografia liquida,
- DEF\_GC.M per un gascromatografo,
- DEF\_CE.M per uno strumento per elettroforesi capillare.

Una copia del metodo predefinito viene conservata in memoria e sarà considerata come il metodo corrente. A questo punto è possibile caricare un metodo diverso che diventerà il metodo corrente.

## Creazione di metodi

La creazione di un nuovo metodo consiste sempre nel modificare il metodo corrente e nel salvare le modifiche con un nome nuovo. Tenere presente che quando si modifica il metodo corrente, la versione su disco rimane invariata fino a quando le modifiche non vengono salvate.

Si può scegliere la modalità di creazione di un metodo. È possibile crearne uno che esegua una sola o tutte le parti dell'analisi. Ad esempio si può creare un metodo che acquisisca solo dati. Quando arriva il momento di analizzare i dati e produrre un rapporto di ricerca in biblioteca, il metodo può essere modificato ancora per queste attività di elaborazione dei dati.

#### NOTA Quando si carica un metodo per analizzare un campione, deve essere sempre caricato un metodo master da un nodo del metodo in ChemStation Explorer. È bene evitare l'uso di metodi di sequenza (provenienti da un contenitore di dati di sequenza) o specifici metodi associati ai file di dati (ACQ.M o DA.M).

### NOTA

Non eliminare il metodo predefinito (DEF\_LC.M, DEF\_CE.M o DEF\_GC.M). Questi file vengono usati come modelli per creare metodi nuovi.

2 Metodi Modifica dei metodi

## Modifica dei metodi

I metodi esistenti si possono modificare con la funzione Modifica intero metodo nel menu Metodo. L'utente viene guidato attraverso tutte le finestre di dialogo e alla fine può salvare il metodo. Il processo viene illustrato di seguito:



### Parti di metodo da modificare

Ogni metodo ha quattro componenti che possono essere modificati separatamente.

Alcune delle voci che seguono si riferiscono a finestre di dialogo specifiche, mentre altre sono solo descrittive.

• Informazioni sul metodo comprende:

- una descrizione del metodo in forma di testo.
- *Controllo dello strumento* dipende dalla configurazione e può comprendere:
  - parametri del forno;
  - parametri dell'iniettore;
  - parametri del rivelatore;
- Analisi dei dati comprende:
  - dettagli del segnale;
  - parametri di integrazione;
  - parametri di quantificazione;
  - parametri di calibrazione,
  - parametri d'impostazione del campo personalizzato e
  - parametri per la stesura di rapporti di stampa.
- Lista di controllo del periodo di funzionamento comprende:
  - le parti di metodo da eseguire.

NOTA

Occorre tenere presente che i metodi possono essere memorizzati in tre posizioni della ChemStation. Accertarsi di apportare le modifiche al metodo corretto.

#### 2 Metodi

Struttura di una directory di metodo

## Struttura di una directory di metodo

Il metodo comprende un gruppo di file memorizzati nella directory di metodo.

La sottodirectory dei metodi comprende tutte quelle con estensione .M. È possibile aggiungere ulteriori sottodirectory di metodi utilizzando le impostazioni delle preferenze.

I file di metodo che hanno un'estensione .MTH contengono i parametri impostati in formato UNICODE. Il file INFO.MTH comprende i parametri di controllo del metodo.

I file di metodo che contengono i parametri dello strumento hanno il nome del modulo analitico collegato. Ad esempio:

HPCE1.MTH	Contiene il metodo di acquisizione per l'elettroforesi capillare.
ADC1.MTH	Contiene il metodo di acquisizione per Agilent 35900. Se vengono configurati due strumenti identici, i file di metodo saranno chiamati ADC1.MTH, ADC2.MTH.
DAMETHOD.REG	Per la valutazione di dati.
LALS1.REG	Comprende i parametri per l'autocampionatore Agilent serie 1100/1200 quando è configurato un sistema LC modulare classico. I file di metodo per gli altri moduli Agilent serie 1100/1200 seguono la stessa convenzione Lxxx1.reg dove xxx è l'acronimo del modulo.
AgilentSamplerDriver 1.RapidControl.xxx.x ml	Comprende i parametri per l'autocampionatore Agilent serie 1100/1200 quando è configurato un sistema LC modulare. Sono presenti diversi file .xml per le varie parti dei parametri (indicate dalle parte xxx del nome file). File .xml simili sono disponibili per gli altri moduli.

 Tabella 6
 Esempi di file di metodo

2

## Cosa accade quando si esegue un metodo?

La finestra di dialogo Lista di controllo del periodo di funzionamento specifica le parti di metodo da eseguire quando viene avviata l'analisi.

La finestra di dialogo è costituita da otto parti:

- macro o comando pre-analisi;
- acquisizione dei dati;
- analisi dei dati standard;
- metodo di analisi per il secondo segnale (solo GC);
- analisi dei dati personalizzata;
- salvataggio dei dati GLP;
- comando o macro post-analisi;
- salvataggio di una copia del metodo con i relativi dati (RUN.M).

Quando si esegue un metodo, vengono eseguite le parti specificate nella finestra di dialogo Lista di controllo del periodo di funzionamento.

### Funzionamento del metodo

La figura fornisce una panoramica generale dello stato della ChemStation durante il funzionamento del metodo, dove *tutte* le parti di Lista di controllo del periodo di funzionamento sono state selezionate.

NOTA

Tenere presente che se la funzione di creazione di cartelle esclusive è disattivata, i metodi ACQ.M e DA.M non vengono generati. Per informazioni dettagliate, consultare "Preferenze - Scheda Sequenza", pagina 171..

### 2 Metodi

Cosa accade quando si esegue un metodo?



Figura 3 Funzionamento del metodo

# Comando o macro in pre-analisi (Lista di controllo del periodo di funzionamento)

Se si specifica un comando o una macro di pre-analisi, viene eseguito prima dell'inizio dell'analisi. Questa parte viene di solito usata per personalizzare il sistema unitamente ad altri pacchetti software.

# Acquisizione dei dati(Lista di controllo del periodo di funzionamento)

- Tutti i parametri sono impostati sulle condizioni iniziali specificate nel metodo corrente.
- Il programma di iniezione viene eseguito se richiesto e l'iniezione viene effettuata da un vial definito come corrente.

2

- Il monitor mostra l'andamento dell'analisi comprese informazioni sul cromatogramma/elettroferogramma oltre ai dati spettrali, se disponibili.
- I dati vengono acquisiti ed archiviati in un file di dati.
- Quando termina l'acquisizione dei dati, una copia del metodo attualmente eseguito viene memorizzato automaticamente nel file di dati ACQ.M.

# Data Analysis (Analisi dei dati)(Lista di controllo del periodo di funzionamento)

Dopo l'arresto, l'analisi viene terminata e tutti i dati grezzi vengono archiviati sul disco rigido del computer. La parte di software relativa all'analisi dei dati viene avviata quando tutti i dati grezzi sono stati archiviati.

### Integrazione

- Gli oggetti di cromatogrammi/elettroferogrammi contenuti nel segnale sono integrati come specificato nella finestra di dialogo Integration Events (Eventi di integrazione).
- Vengono determinati l'inizio e la fine del picco oltre all'apice ed al tempo di ritenzione/migrazione.
- Le linee di base di ogni picco vengono definite per determinare l'area e l'altezza finale del picco.
- I risultati dell'integrazione vengono visualizzati in una lista in Integration Results (Risultati integrazione).

### Identificazione e quantificazione dei picchi

- Utilizzando tempi di ritenzione/migrazione e qualificatori del picco opzionali, il software identifica i picchi facendo riferimenti incrociati fra questi e composti conosciuti definiti nella tavola di calibrazione.
- Utilizzando le altezze o le aree dei picchi, il software calcola la quantità di ogni componente usando i parametri di calibrazione della tavola.

#### 2 Metodi

Cosa accade quando si esegue un metodo?

## Ricerca in biblioteca di spettri (ChemStation solo per sistemi LC 3D, CE, CE/MS e LC/MS)

Per tutti i picchi con spettri UV-visibile a disposizione, può essere effettuata una ricerca automatica nella biblioteca di spettri per identificare i componenti del campione sulla base UV-vis. Per informazioni più dettagliate, consultare la sezione *Conoscere il modulo di valutazione spettri*.

## Controllo della purezza dei picchi (ChemStation solo per sistemi LC 3D, CE, CE/MS e LC/MS)

Per un picco che ha a disposizione spettri UV-vis si può calcolare un fattore di purezza e riportarlo in un registro. La purezza può essere determinata automaticamente alla fine di ogni analisi, come parte del metodo, selezionando la casella Check Purity (Controllo purezza) al momento della specifica di una ricerca automatica in biblioteca o quando si sceglie uno stile di rapporto. Per informazioni più dettagliate, consultare la sezione *Conoscere il modulo di* valutazione spettri.

#### Rapporto di stampa

Si tratta di un bollettino con le identità e le quantità dei componenti identificati nell'analisi.

## Analisi dei dati personalizzata(Lista di controllo del periodo di funzionamento)

Permette di utilizzare macro personalizzate per valutare dati analitici.

# Salvataggio dei dati secondo la Buona Prassi di Laboratorio (GLP)(Lista di controllo del periodo di funzionamento)

Salva il registro binario GLPSave.Reg insieme al metodo di analisi dei dati nella subdirectory dei file di dati predefinita. Questa funzione ha lo scopo di aiutare a provare l'originalità dei dati e la qualità delle singole analisi.

Cosa accade quando si esegue un metodo?

Il file binario GLPSave.Reg contiene le informazioni seguenti in un registro non modificabile e protetto da checksum:

- punti di impostazione chiave dello strumento (possono essere revisionati graficamente);
- segnali cromatografici o elettroferografici;
- risultati dell'integrazione;
- risultati della quantificazione;
- metodo di analisi dei dati;
- registro elettronico.

Questi dati vengono salvati solo quando la funzione Save GLP Data (Salva dati GLP) viene attivata selezionando l'apposita casella della lista di controllo del periodo di funzionamento. È possibile esaminare i dati GLP, ma non modificarli, dal menu di analisi dei dati della ChemStation.

## Comando o macro post-analisi(Lista di controllo del periodo di funzionamento)

Se viene specificato un comando o una macro post-analisi, sarà eseguito dopo la valutazione dei dati. Ad esempio la copia dei dati su disco per un backup.

# Salvataggio di una copia del metodo con dati(Lista di controllo del periodo di funzionamento)

Viene effettuato dopo l'acquisizione dei dati e solo se Data Acquisition (Acquisizione dei dati) è attiva nella lista di controllo del periodo di funzionamento. Questa operazione consente di copiare il metodo *corrente* nella directory di dati in un file denominato RUN.M. Cosa accade quando si esegue un metodo?

# Salvataggio di una copia del metodo con dati come metodo DA.M (predefinito di ChemStation)

A seconda delle voci contrassegnate nella **Run Time Checklist**, una copia del metodo eseguito *corrente* viene salvata come metodo DA.M insieme al file di dati. Questa operazione viene eseguita dopo l'esecuzione dell'ultima voce contrassegnata nella **Run Time Checklist**, solitamente dopo la parte **Standard Data Analysis**.

2

## Riepilogo del funzionamento di un metodo

La lista che segue mostra il flusso di funzionamento di un metodo quando sono state selezionate tutte le parti della Lista di controllo del periodo di funzionamento.

1 Macro o comando pre-analisi

Effettua un'operazione prima dell'inizio dell'analisi.

**2** Acquisizione dei dati

Programma l'iniettore.

Inietta il campione.

Acquisisce i dati grezzi.

Archivia i dati.

- **3** *Salva una copia del metodo con dati* (RUN.M)- opzionale in base alla Lista di controllo del periodo di funzionamento.
- **4** Salva una copia del metodo con dati (ACQ.M) impostazione predefinita della ChemStation
- 5 Analisi dei dati (Dati di processo)

Carica il file di dati.

Integra il file di dati.

Identifica e quantifica il picco.

Ricerca nella biblioteca di spettri, se disponibile.

Controlla la purezza del picco, se disponibile.

Stampa il rapporto.

- 6 Analisi dei dati personalizzata Esegue le macro definite.
- 7 Salvataggio dei dati secondo la Buona Prassi di Laboratorio (GLP) Salva il registro binario GLPSave.Reg
- 8 Macro o comando post-analisi

Esegue un'operazione dopo il completamento dell'analisi. Ad esempio produce un rapporto di stampa personalizzato.

**9** Salva una copia del metodo con dati (DA.M) - impostazione predefinita della ChemStation

### 2 Metodi

Riepilogo del funzionamento di un metodo



**Descrizione della ChemStation Agilent** 

## Acquisizione dei dati

3

Cosa si intende per acquisizione di dati? 62 File di dati 63 Monitor in linea 65 Monitor in linea per i segnali 65 Monitor in linea per spettri 65 Registro elettronico 66 Informazioni sullo stato 67 Stato della ChemStation 67 Barra di stato 67 Diagramma di sistema 68

Questo capitolo descrive i concetti di acquisizione dati, file di dati, registro elettronico e altro ancora.



#### **3** Acquisizione dei dati

Cosa si intende per acquisizione di dati?

## Cosa si intende per acquisizione di dati?

Durante la fase di acquisizione dei dati, tutti i segnali acquisiti dallo strumento analitico vengono convertiti da segnali analogici a segnali digitali all'interno del rivelatore. Il segnale digitale viene trasmesso alla ChemStation in formato elettronico e salvato nel file dati del segnale.

I file di dati disponibili (\*.d) sono visualizzati in ChemStation Explorer. Per una navigazione rapida e semplice, è possibile aggiungere altri percorsi di file alla struttura di selezione di ChemStation Explorer utilizzando la scheda Percorsi della finestra di dialogo Preferenze.

## File di dati

Un file di dati contiene un gruppo di file archiviati, per impostazione predefinita, nella directory DATA come sottodirectory, con il nome del file di dati e l'estensione .D. Il nome del file di dati può essere definito manualmente, utilizzando fino a 40 caratteri inclusa l'estensione. Ciascun file contenuto nella directory ha un nome convenzionale. È possibile aggiungere ulteriori directory di dati utilizzando le impostazioni per le preferenze.

 Tabella 7
 File di dati

Nome	Description
*.CH	File di dati relativi a segnali cromatografici/elettroferografici. Il nome del file comprende il tipo di modulo o di rivelatore oltre all'identificazione del segnale o del canale. Ad esempio in ADC1A.CH, ADC sta per il tipo di modulo, 1 per il numero di modulo e A per l'identificatore di segnale; .CH è l'estensione cromatografica.
*.UV	File di dati relativi a spettri UV. Contiene il tipo di rivelatore ed il numero di dispositivi (solo con rivelatore a serie di diodi e rivelatore a fluorescenza).
REPORT.TXT, REPORT.PDF	File di dati di rapporto per i file equivalenti contenenti dati relativi al segnale.
SAMPLE.MAC	Macro di informazioni sul campione.
SAMPLE.MAC.BAC	Copia della macro originale relativa alle informazioni del campione. Il file viene creato quando i parametri del campione originale (come i moltiplicatori) vengono aggiornati durante la rielaborazione.
RUN.LOG	Voci del registro elettronico generate durante un'analisi. Il registro elettronico tiene traccia dell'analisi. Tutti i messaggi di errore e le modifiche di stato significative della ChemStation vengono salvati nel registro elettronico
LCDIAG.REG	Solo per cromatografia liquida. Contiene curve relative allo strumento (gradiente, temperatura, pressione, ecc.), volume di iniezione e descrizioni del solvente.
ACQRES.REG	Contiene informazioni sulla colonna. Per i gascromatografi contiene anche il volume di iniezione.

	Tabel	la 7	File	di	dati
--	-------	------	------	----	------

Nome	Description
GLPSAVE.REG	Parte del file di dati in cui viene specificato il salvataggio dei dati GLP.
M_INTEV.REG	Contiene gli eventi d'integrazione manuale.

Il metodo può essere archiviato con i file relativi ai risultati (run.m). In questi casi, la directory del metodo può essere archiviata come sottodirectory nella directory del file di dati utilizzando l'opzione Salva il metodo con i dati nella lista di controllo della fase di esecuzione.

Per i dati acquisiti con la ChemStation B.02.01 o versioni successive, ciascuna cartella di dati (\*.D) contiene le due cartelle di metodi seguenti:

- Metodo di acquisizione (ACQ.M) per ogni singolo file di dati
- Metodo di analisi dei dati (DA.M) per ogni singolo file di dati

Il metodo di acquisizione specifico ACQ.M serve per conservare i parametri di acquisizione. Quindi, è consigliabile non modificarlo durante le successive attività di revisione dei dati. DA.M è un metodo di analisi dei dati specifico per uno specifico file di dati. Ad esempio, nel caso di aggiornamenti della tavola di calibrazione, i metodi DA.M sono diversi per ogni analisi. Nella ChemStation B.03.01 o versioni successive, questo comportamento può essere disattivato disabilitando la funzione Creazione cartelle esclusive.

## **Monitor in linea**

Esistono due tipi di monitor in linea, uno relativo ai segnali e uno relativo agli spettri.

### Monitor in linea per i segnali

Questo tipo di monitor consente di controllare parecchi segnali e, se supportato da uno strumento, diagrammi relativi alle prestazioni dello stesso, nella stessa finestra. È possibile scegliere i segnali che si desidera visualizzare e programmare il tempo e l'asse di assorbanza. Per i rivelatori che supportano questa funzione è disponibile un tasto di equilibrazione.

Si può visualizzare la risposta di segnale assoluto tenendo premuto il tasto sinistro del mouse nella finestra del monitor.

### Monitor in linea per spettri

Il monitor in linea per spettri è disponibile solo per la ChemStation che supporta un modulo di valutazione spettri. Illustra l'assorbanza come funzione della lunghezza d'onda. È possibile regolare sia l'intervallo di lunghezze d'onda visualizzato che la scala di assorbanza. 3 Acquisizione dei dati Registro elettronico

## **Registro elettronico**

Visualizza messaggi creati dal sistema analitico. Possono essere messaggi di errore, di sistema o di segnalazione di eventi in un modulo. Il registro elettronico riporta questi eventi indipendentemente dal fatto che possano essere o meno visualizzati. Per ottenere ulteriori informazioni su un evento presente nel registro elettronico, fare doppio clic sulla riga desiderata per visualizzare un testo descrittivo.

## Informazioni sullo stato

### **Stato della ChemStation**

La finestra Status (Stato) illustra un riepilogo delle condizioni del software della ChemStation.

Quando viene eseguita una sola analisi:

- sulla prima riga della finestra Status (Stato) della ChemStation viene visualizzato Run in Progress (Analisi in corso);
- sulla seconda riga viene visualizzato lo stato del metodo corrente;
- sulla terza riga viene visualizzato il nome del file di dati grezzi insieme al tempo effettivo dell'analisi in minuti. Per uno strumento GC vengono visualizzati anche i file relativi agli iniettori anteriore e posteriore.

Le finestre Instrument Status (Stato strumento) forniscono informazioni sui moduli ed i rivelatori dello strumento. Mostrano anche le condizioni dei singoli componenti e dove necessario anche dati su pressione, gradiente e flusso.

### Barra di stato

L'interfaccia grafica per l'utente della ChemStation comprende barre di strumenti ed una barra di stato nella finestra Method and Run Control (Controllo del metodo e delle analisi). La barra di stato comprende un campo che visualizza lo stato del sistema ed informazioni sul metodo attualmente caricato e sulla sequenza. Se questi ultimi sono stati modificati dopo il caricamento, sono contrassegnati da un ingranaggio giallo. Per un modulo Agilent Serie 1100/1200, il simbolo EMF giallo indica che i limiti di utilizzo per le parti di consumo (ad esempio la lampada), sono stati superati.

### Diagramma di sistema

Se supportato dagli strumenti analitici configurati (ad esempio i moduli Agilent Serie 1100/1200 per LC o il gascromatografo Agilent Serie 6890) è possibile visualizzare un diagramma del sistema gestito dalla ChemStation. Ciò consente di controllare rapidamente lo stato del sistema. Scegliere System Diagram (Diagramma del sistema) dal menu View (Visualizza) della finestra Method o Run Control (Controllo del metodo e delle analisi) per attivare il diagramma. Si tratta di una rappresentazione grafica dell'intero sistema della ChemStation. Ogni componente è rappresentato da un'icona. Lo stato viene visualizzato utilizzando il seguente codice di colori:

Colore	Status
grigio	inattivo o spento
giallo	non pronto
verde	pronto
blu	in funzione
rosso	errore

Tabella 8 Codice di colore per il diagramma di sistema

Inoltre, è possibile visualizzare una lista delle impostazioni dei parametri in uso. Oltre a fornire una visione generale del sistema, il diagramma consente di accedere velocemente alle finestre di dialogo per impostare i parametri di ogni componente del sistema.

Per ulteriori informazioni sul diagramma del sistema, consultare la parte relativa agli strumenti della Guida in linea.



## Integrazione

4

Che cos'è l'integrazione? 71 Che cosa fa l'integrazione? 72 Gli algoritmi di integrazione della ChemStation 73 Capacità dell'integratore 73 Panoramica 75 Definizione della linea di base iniziale 75 Monitoraggio della linea di base 76 Collocazione della linea di base 77 Identificazione dei punti cardinali di un picco 78 Definizione dei termini 80 Punti cardinali 80 Picco di solvente 80 Spalla (anteriore, posteriore) 81 Pendenza 81 Principio di funzionamento 82 Riconoscimento dei picchi 83 Ampiezza del picco 83 Filtri di riconoscimento dei picchi 84 Raggruppamento 85 Algoritmo di riconoscimento del picco 86 Calcoli non gaussiani 90 Collocazione della linea di base 92 Costruzione della linea di base predefinita 92 Inizio della linea di base 93 Contrassegni 93 Fine della linea di base 93 Penetrazione della linea di base 94



#### 4 Integrazione

Informazioni sullo stato

Rapporto picco-valle 95 Funzione di definizione della tangente di interpolazione 97 Picchi non assegnati 102 Codici di separazione del picco 103 Misurazione dell'area del picco 105 Determinazione dell'area 105 Unità e fattori di conversione 107 Eventi di integrazione 108 Eventi iniziali 108 Eventi programmati 111 Autointegrazione 112 Integrazione manuale 114

Questo capitolo spiega come effettuare le operazioni di integrazione e illustra gli algoritmi di integrazione della ChemStation. Vengono descritti l'algoritmo di integrazione, l'integrazione e l'integrazione manuale.

## Che cos'è l'integrazione?

L'integrazione localizza i picchi in un segnale e calcola le loro dimensioni.

L'integrazione è necessaria per:

- quantificazione;
- calcoli della purezza dei picchi (ChemStation solo per sistemi LC 3D, CE, CE/MS e LC/MS);
- ricerche in librerie di spettri (ChemStation solo per sistemi LC 3D, CE, CE/MS e LC/MS).

## Che cosa fa l'integrazione?

Quando un segnale viene integrato, il software:

- identifica un'ora di inizio e di fine per ciascun picco ed evidenzia questi punti con segni orizzontali;
- trova l'apice di ogni picco, ossia il tempo di ritenzione/migrazione;
- costruisce una linea di base;
- calcola l'area, l'altezza e l'ampiezza del picco.

Questo processo è controllato da parametri chiamati eventi di integrazione.
4

# Gli algoritmi di integrazione della ChemStation

L'algoritmo di integrazione della ChemStation è la seconda versione di una nuova generazione nata con lo scopo di aumentare la robustezza, l'affidabilità e la facilità d'uso.

## Capacità dell'integratore

Gli algoritmi di integrazione includono le seguenti capacità:

- autointegrazione, per impostare i parametri di integrazione iniziali;
- capacità di definire tavole personali degli eventi per ogni segnale cromatografico/elettroferografico, in presenza di segnali multipli o di più rivelatori;
- definizione interattiva degli eventi di integrazione che consenta agli utilizzatori di selezionare graficamente i tempi;
- integrazione grafica manuale o "ad elastico" di cromatogrammi/elettroferogrammi che richiedono l'interpretazione umana (gli eventi possono anche essere registrati nel metodo e utilizzati come parte delle operazioni automatizzate);
- visualizzazione e stampa dei risultati di integrazione;
- integrazione di almeno 1000 picchi per cromatogramma/elettroferogramma.
- definizione dei parametri dell'integratore per impostare o modificare le impostazioni di base per scarto di area o altezza, ampiezza dei picchi e sensibilità del flesso;
- parametri di controllo della linea di base, come forza linea di base, trattieni linea di base, linea di base su tutti gli avvallamenti, linea di base su successivo avvallamento, adatta linea di base all'indietro a partire dalla fine del picco corrente;
- controllo della sommatoria delle aree;
- riconoscimento di picchi negativi;
- processo di definizione della tangente di interpolazione con comandi di definizione dei picchi di solvente;

Gli algoritmi di integrazione della ChemStation

- la capacità di definire tavole individuali di eventi di calcolo della tangente di interpolazione anteriore/posteriore per tutti i segnali cromatografici/elettroferografici;
- la capacità di definire parametri di correzione della linea di base (non correlati al segnale);
- comandi di controllo dell'integratore che definiscano gli intervalli dei tempi di ritenzione/migrazione per il funzionamento dell'integratore;
- collocazione delle spalle dei picchi utilizzando la derivata seconda o calcoli sul grado di curvatura;
- miglioramento del campionamento di punti di dati non equidistanti per ottenere migliori prestazioni con file di dati DAD LC ricostruiti da spettri DAD.

# Panoramica

Per integrare un cromatogramma/elettroferogramma l'integratore:

- 1 definisce la linea di base iniziale;
- 2 controlla continuamente ed aggiorna la linea di base;
- **3** identifica un tempo di inizio del picco ed evidenzia questo punto con un contrassegno verticale;
- 4 identifica l'apice del picco e stampa il tempo di ritenzione/migrazione;
- **5** identifica un tempo di fine del picco ed evidenzia questo punto con un contrassegno verticale;
- 6 costruisce una linea di base;
- 7 calcola l'area, l'altezza e l'ampiezza di ciascun picco.

Questo processo è controllato da *eventi di integrazione*. Gli eventi più importanti sono la *sensibilità iniziale della pendenza, l'ampiezza del picco, lo scarto di area* e *lo scarto dell'altezza*. Il software consente di impostare valori iniziali per questi ed altri eventi. I valori iniziali hanno effetto all'inizio del cromatogramma. Inoltre, la funzione di integrazione automatica fornisce un set di eventi iniziali che possono essere ottimizzati in una fase successiva.

Benché nella maggior parte dei casi, gli eventi iniziali forniscano buoni risultati di integrazione per l'intero cromatogramma, è talvolta necessario un maggiore controllo sul processo di integrazione.

Il software consente di controllare come viene eseguita l'integrazione e di programmare nuovi eventi di integrazione in momenti appropriati del cromatogramma.

Per ulteriori informazioni, consultare la sezione "Eventi iniziali", pagina 108.

### Definizione della linea di base iniziale

Poiché le condizioni della linea di base variano in funzione dell'applicazione e dell'hardware del rivelatore, l'integratore utilizza parametri provenienti sia dal metodo che dal file di dati per ottimizzare la linea di base. Prima che l'integratore possa integrare i picchi, deve stabilire un *punto della linea di base*. Quando inizia l'analisi, l'integratore stabilisce un livello iniziale della linea di base considerando il primo punto di dati come un punto della linea di base potenziale. Quindi, tenta di ridefinire il punto iniziale basandosi sulla media del segnale di input. Se l'integratore non ottiene un punto iniziale della linea di base ridefinito, mantiene il primo punto di dati come punto potenziale di inizio della linea di base.

## Monitoraggio della linea di base

L'integratore campiona i dati digitali, nel corso dell'analisi, ad una percentuale determinata dal valore iniziale di ampiezza del picco o da quello calcolato. Ogni punto di dati viene considerato come potenziale punto della linea di base.

L'integratore determina un *inviluppo della linea di base* dalla pendenza della linea di base utilizzando un algoritmo di monitoraggio dove la pendenza è determinata con la derivata prima e la curvatura con la derivata seconda. L'inviluppo della linea di base può essere visualizzato come cono, con il suo vertice sul punto di dati corrente. I livelli di accettazione superiore e inferiore del cono sono:

- + ascendente + curvatura + linea di base la cui inclinazione deve essere inferiore al livello di soglia,
- - discendente curvatura + linea di base la cui inclinazione deve essere più positiva (ovvero, meno negativa) del livello di soglia.

Non appena i nuovi punti di dati vengono accettati, il cono si muove in avanti fino a che non si verifica un'interruzione.

Per essere accettato come punto della linea di base, un punto di dati deve soddisfare le seguenti condizioni:

- deve trovarsi all'interno dell'inviluppo della linea di base definito;
- la curvatura della linea di base al punto di dati (determinata da filtri in derivata) deve trovarsi al di sotto di un valore critico, determinato dall'impostazione corrente della sensibilità della pendenza.

Il punto della linea di base, stabilito all'inizio dell'analisi, viene continuamente reimpostato con una frequenza determinata dall'ampiezza del picco, come media variabile dei punti di dati che rientrano nell'inviluppo della linea di base per un periodo determinato dall'ampiezza del picco. L'integratore rintraccia e reimposta periodicamente la linea di base per compensare la deriva, fino a che non viene rivelato un picco in pendenza ascendente.

### Collocazione della linea di base

L'integratore colloca la linea di base cromatografica/elettroferografica durante l'analisi, a una frequenza determinata dal valore dell'ampiezza del picco. Quando l'integratore ha campionato un certo numero di punti di dati, reimposta la linea di base dal punto iniziale a quello corrente. L'integratore riprende a controllare la linea di base sul set successivo di punti di dati e reimposta la linea di base. Il processo continua fino a che l'integratore non identifica l'inizio di un picco.



Figura 4 Linea di base

All'inizio dell'analisi, questa impostazione della linea di base viene utilizzata come linea di base iniziale. Se non viene impostata, viene utilizzato il primo punto di dati. Questo punto della linea di base viene quindi periodicamente reimpostato in base alla formula seguente:

Le aree vengono sommate per il tempo T (ampiezza picco prevista). Questo tempo non può mai essere inferiore a un punto di dati. L'operazione continua finché esistono le condizioni della linea di base. Vengono prese in considerazione sia la pendenza che la curvatura. Se entrambe sono inferiori alla soglia, vengono sommate due aree e confrontate con la linea di base precedente. Se il nuovo valore è inferiore alla linea di base precedente, tale valore sostituisce immediatamente quello esistente. Se il nuovo valore è maggiore del precedente, tale valore viene archiviato come possibile nuovo valore per la linea di base e viene confermato se un ulteriore valore soddisfa i criteri di piattezza di pendenza e curvatura. Se sono consentiti picchi negativi, questa ultima limitazione non viene applicata. Durante il calcolo della linea di base, deve essere eseguito un controllo per l'esame di solventi a incremento veloce. L'incremento potrebbe essere troppo veloce per il rilevamento della pendenza ascendente. Al momento della conferma della pendenza ascendente, il criterio del solvente potrebbe non essere più valido. La linea di base passa per il primo punto di dati al tempo 1. Se il segnale è sulla base, viene sostituito dalla media 2 T. La linea di base viene quindi reimpostata ogni T (vedere la Figure 4, pagina 77).

## Identificazione dei punti cardinali di un picco

L'integratore stabilisce che un picco potrebbe iniziare quando potenziali punti della linea di base si trovano al di fuori della stessa e la curvatura della linea di base supera un determinato valore, come stabilito dal parametro di sensibilità della pendenza dell'integratore. Se queste condizioni persistono, l'integratore decide che il punto si trova sulla curva ascendente e quindi il picco viene elaborato.

#### Inizio

- 1 Pendenza e curvatura nei limiti: continuare il monitoraggio della linea di base.
- 2 Pendenza e curvatura al di sopra dei limiti: possibilità di un picco.
- **3** La pendenza rimane al di sopra dei limiti: picco riconosciuto, punti cardinali definiti.
- 4 La curvatura diventa negativa: punto di flesso anteriore.

#### Apice

- 1 La pendenza passa dallo zero e diventa negativa: apice del picco, punti cardinali definiti.
- 2 La curvatura diventa positiva: punto di flesso posteriore.

#### Fine

1 Pendenza e curvatura nei limiti: ci si trova in prossimità della fine del picco.

- **2** La pendenza e la curvatura rimangono nei limiti: fine del picco, punti cardinali definiti.
- 3 L'integratore ritorna alla modalità di monitoraggio della linea di base.

# Definizione dei termini

# Punti cardinali





I punti cardinali sono punti scelti dall'integratore per definire e quantificare un picco. I punti della linea di base, delle valli, dell'apice ed i punti di flesso vengono designati come punti cardinali e salvati. Ogni punto cardinale ha una coordinata orizzontale del tempo trascorso, una coordinata verticale dell'altezza misurata dalla linea di base e altri parametri, quali i tipi di picchi, i codici di separazione, i valori di inizio/fine di picchi potenziali e l'altezza corrispondente, le letture di area e di pendenza, utilizzati dall'integratore per calcolare l'area dei picchi.

# Picco di solvente

Il picco di solvente, che è generalmente un picco molto grande di nessuna importanza analitica, normalmente non viene integrato. Tuttavia, quando picchi di piccole dimensioni ma di interesse per l'analisi eluiscono vicino al picco di solvente, ad esempio sulla coda, possono essere impostate condizioni di integrazione speciali per calcolare le aree corrette del contributo della coda del picco di solvente.

# Spalla (anteriore, posteriore)

Le spalle si verificano quando due picchi eluiscono in tempi talmente ravvicinati che non esiste avvallamento fra loro e rimangono non risolti. Le spalle possono prodursi sul bordo anteriore del picco o su quello posteriore. Quando si rilevano spalle, esse possono essere integrate utilizzando tangenti di interpolazione o perpendicolari.

### Pendenza

La pendenza di un picco, che denota la modifica della concentrazione di un composto rispetto al tempo, viene utilizzata per determinare la comparsa di un picco, il suo apice e la sua fine.

Principio di funzionamento

# Principio di funzionamento



Figura 6 Diagramma di flusso dell'integratore

# Riconoscimento dei picchi

L'integratore utilizza diversi strumenti per riconoscere e caratterizzare un picco:

- ampiezza del picco;
- filtri di riconoscimento dei picchi;
- raggruppamento;
- algoritmo di riconoscimento del picco;
- algoritmo dell'apice del picco;
- calcoli non gaussiani (ad esempio scodamento, fusione dei picchi).

## Ampiezza del picco

Durante l'integrazione, l'ampiezza del picco viene calcolata utilizzando l'area e l'altezza del picco stesso:

#### Larghezza = Area/Altezza

Oppure, se sono disponibili i punti di flesso, viene calcolata utilizzando l'ampiezza fra i punti di flesso.



Figura 7 Calcolo dell'ampiezza del picco

Riconoscimento dei picchi

Nella Figura Calcolo dell'ampiezza del picco, l'area totale A è la somma delle aree a1, a2, a3 e a4. Fs è la pendenza anteriore sul punto di flesso; Rs è la pendenza posteriore sul punto di flesso. Se nessuno dei due punti di flesso viene trovato, l'ampiezza del picco viene determinata come segue:

#### Larghezza = Area regolata / Altezza regolata

L'impostazione dell'ampiezza del picco controlla la capacità dell'integratore di distinguere i picchi dal rumore della linea di base. Per ottenere buone prestazioni, l'ampiezza deve essere impostata vicino a quella dei picchi cromatogra-fici/elettroferografici reali.

L'ampiezza dei picchi può essere modificata in tre modi:

- Prima dell'esecuzione, è possibile specificare l'ampiezza iniziale del picco
- Durante l'esecuzione, l'integratore aggiorna automaticamente l'ampiezza del picco come necessario per mantenere una buona corrispondenza con i filtri di riconoscimento dei picchi
- Durante l'esecuzione, è possibile reimpostare o modificare l'ampiezza del picco utilizzando un evento programmato sul tempo.

Per la definizione di ampiezza del picco utilizzata dai calcoli di idoneità del sistema, consultare la sezione "Ampiezza del picco", pagina 83.

### Filtri di riconoscimento dei picchi

L'integratore dispone di filtri di riconoscimento dei picchi che possono essere utilizzati per il riconoscimento dei picchi mediante la rilevazione delle modifiche di curvatura e pendenza all'interno di un gruppo di punti di dati contigui. Questi filtri contengono la derivata prima (per misurare la pendenza) e la derivata seconda (per misurare la curvatura) dei punti esaminati dall'integratore. I filtri di riconoscimento sono:

- Filtro 1 Pendenza (curvatura) di due (tre) punti di dati contigui
- Filtro 2 Pendenza di quattro punti di dati contigui e curvatura di tre punti di dati non contigui
- Filtro 3 Pendenza di otto punti di dati contigui e curvatura di tre punti di dati non contigui

Il filtro reale utilizzato è determinato dall'impostazione dell'ampiezza del picco. Ad esempio, all'inizio dell'analisi, è possibile utilizzare Filtro 1. Se durante l'analisi l'ampiezza del picco aumenta, il filtro viene impostato prima su Filtro 2, quindi su Filtro 3. Per ottenere buone prestazioni dai filtri di rico-noscimento, l'ampiezza del picco deve essere impostata su un valore prossimo all'ampiezza dei picchi reali cromatografici/elettroferografici. Durante l'analisi, l'integratore aggiornerà l'ampiezza del picco secondo necessità per otti-mizzare l'integrazione.

L'integratore calcola l'ampiezza del picco aggiornata in vari modi, in base alla configurazione dello strumento:

Per le configurazioni LC/CE, il calcolo predefinito dell'ampiezza del picco utilizza un calcolo composito:

#### 0.3 x (Right Inflection Point - Left Inflection point) + 0.7 x Area/Height

Per le configurazioni GC, il calcolo predefinito dell'ampiezza del picco utilizza l'area/altezza. Questo calcolo non sopravvaluta l'ampiezza del picco quando i picchi sono fusi sopra la metà dell'altezza.

In alcuni tipi di analisi, ad esempio GC isotermico e LC isocratico, i picchi diventano significativamente più ampi con il progredire dell'analisi. Per compensare questa situazione, l'integratore aggiorna l'ampiezza automaticamente mentre i picchi diventano più ampi durante l'analisi. Lo strumento effettua questa operazione automaticamente, a meno che l'aggiornamento non sia stato disabilitato o l'ampiezza del picco non sia stata impostata su un valore specifico con un evento programmato a tempo.

L'aggiornamento dell'ampiezza del picco viene calcolato come segue:

0.75 x (existing peak width) + 0.25 x (width of current peak)

Se un evento di integrazione programmato a tempo disabilita o imposta l'ampiezza del picco su un valore specifico, l'adattamento automatico dell'ampiezza viene disabilitato.

### Raggruppamento

Il raggruppamento è il mezzo tramite il quale l'integratore aumenta l'ampiezza all'interno del raggio di azione dei filtri di riconoscimento dei picchi per mantenere una buona selettività. Riconoscimento dei picchi

L'integratore non può aumentare senza limiti l'ampiezza del picco per allargare i picchi all'infinito. Alla fine, i picchi diventano così ampi che i filtri di riconoscimento potrebbero non essere più in grado di vederli. Per superare questa limitazione, l'integratore raggruppa i punti di dati restringendo i picchi e mantenendo al contempo la stessa area.

Quando i dati vengono raggruppati, i punti di dati vengono raggruppati come due elevato alla potenza di raggruppamento, ovvero non raggruppati = 1x, raggruppati una volta = 2x, raggruppati due volte = 4x e così via.

Il raggruppamento tiene conto della velocità di campionamento e dell'ampiezza del picco. L'integratore utilizza questi parametri per impostare il fattore di raggruppamento e fornire il numero appropriato di punti dati Table 9, pagina 86.

Il raggruppamento si effettua alla seconda potenza in base all'ampiezza attesa o verificata. L'algoritmo di raggruppamento è riassunto in Table 9, pagina 86.

Ampiezza picco attesa	Filtro(i) utilizzato(i)	Raggruppamento
0 - 10 punti dati	Primo	Nessuno
8 - 16 punti dati	Secondo	Nessuno
12 - 24 punti dati	Terzo	Nessuno
16 - 32 punti dati	Secondo	1 volta
24 - 48 punti dati	Terzo	1 volta
32 - 96 punti dati	Terzo, secondo	2 volte
64 - 192 punti dati	Terzo, secondo	Tre volte

 Tabella 9
 Criteri di raggruppamento

# Algoritmo di riconoscimento del picco

L'integratore identifica l'inizio del picco con un punto sulla linea di base determinato dall'algoritmo di riconoscimento del picco. L'algoritmo di riconoscimento del picco confronta dapprima gli output dei filtri di riconoscimento dei picchi con il valore della sensibilità iniziale della pendenza in modo da aumentare o diminuire l'accumulatore della curva ascendente. L'integratore dichiara il punto in cui il valore dell'accumulatore di pendenza ascendente è ≥15 come punto che indica che un picco è iniziato.

L'algoritmo di riconoscimento del picco è mostrato in Figure 8, pagina 87.



Figura 8 Riconoscimento del picco

### I criteri sono i seguenti:

- t1 Il contatore della curva ascendente è maggiore o uguale a 1
- t2 Il contatore delle curva ascendente è uguale a zero
- t3 Il contatore della curva ascendente è maggiore o uguale a 2
- Apice del picco trovato e ampiezza intermedia del picco trovata o

Riconoscimento dei picchi

- Apice del picco trovato e contatore della curva discendente maggiore o uguale a 2
- t5 Terminazione del picco o
  - Reimpostazione della linea di base
- **t6** Valle del picco trovata e contatore della curva ascendente maggiore o uguale a 2, o
  - Sigma della curva discendente maggiore del doppio del sigma della fine del picco, o
  - Reimpostazione della linea di base o
  - Reimpostazione della linea di base alla successiva valle e rilevamento della valle del picco
- t7 Il criterio della curva discendente non viene più soddisfatto
- t8 Il criterio della curva discendente viene di nuovo soddisfatto
- **t9** Valle del picco trovata e contatore della curva ascendente maggiore o uguale a 2, o
  - Il contatore della curva discendente è uguale a zero, o
  - Sigma della curva discendente maggiore del sigma della fine del picco, o
  - Reimpostazione della linea di base o
  - Reimpostazione della linea di base alla valle successiva
- t10 Il contatore della curva ascendente è maggiore o uguale a 2
- t11 Il contatore della curva ascendente è inferiore o uguale a 1

#### Inizio picco

Nella Table 10, pagina 89 l'ampiezza dei picchi prevista determina quali valori di pendenza del filtro e di curvatura devono essere confrontati con il valore di sensibilità della pendenza. Ad esempio, i numeri della colonna Filtro 1 vengono aggiunti all'accumulatore di pendenza ascendente quando l'ampiezza del picco prevista è ridotta. Se l'ampiezza del picco prevista aumenta, vengono utilizzati prima i numeri della colonna Filtro 2, quindi quelli della colonna Filtro 3.

Quando il valore dell'accumulatore di pendenza ascendente è  $\geq$ 15, l'algoritmo presuppone che il picco stia per iniziare.

Derivata Filtro 1 - 3 Output a fronte della sensibilità di pendenza	Filter 1	Filter 2	Filter 3
Pendenza > Sensibilità pendenza	+8	+5	+3
Curvatura > Sensibilità pendenza	+0	+2	+1
Pendenza < (-) Sensibilità pendenza	-8	-5	-3
Pendenza >  Sensibilità pendenza	-4	-2	-1
Curvatura < (-) Sensibilità pendenza	-0	-2	-1

Tabella 10 Valori di incremento dell'accumulatore in pendenza ascendente

### **Fine picco**

Nella Table 11, pagina 89 l'ampiezza dei picchi prevista determina quali valori di pendenza del filtro e di curvatura devono essere confrontati con il valore di sensibilità della pendenza. Ad esempio, i numeri della colonna Filtro 1 vengono aggiunti all'accumulatore di pendenza discendente quando l'ampiezza del picco prevista è ridotta. Se l'ampiezza del picco prevista aumenta, vengono utilizzati prima i numeri della colonna Filtro 2, quindi quelli della colonna Filtro 3.

Quando il valore dell'accumulatore di pendenza discendente è ≥15, l'algoritmo presuppone che il picco stia per terminare.

Derivata Filtro 1 - 3 Output a fronte della sensibilità di pendenza	Filter 1	Filter 2	Filter 3	
Pendenza > Sensibilità pendenza	+8	+5	+3	
Curvatura > Sensibilità pendenza	+0	+2	+1	
Pendenza < (-) Sensibilità pendenza	-11	-7	-4	
Pendenza >  Sensibilità pendenza	-28	-18	-11	
Curvatura < (-) Sensibilità pendenza	-0	-2	-1	

 Tabella 11
 Valori di incremento dell'accumulatore di pendenza discendente

Riconoscimento dei picchi

### Algoritmo dell'apice del picco

L'apice del picco viene riconosciuto nei punti più elevati del cromatogramma costruendo una parabola che passa attraverso i punti di dati più elevati.

## Calcoli non gaussiani

### Picchi fusi

La fusione dei picchi si verifica quando un picco inizia prima che sia stata trovata la fine di un altro picco. La figura illustra come l'integratore gestisce i picchi fusi.



L'integratore elabora i picchi fusi come segue:

- 1 Effettua la sommatoria dell'area del primo picco fino al punto di avvallamento.
- **2** Al punto di avvallamento la sommatoria del primo picco termina ed inizia la sommatoria del secondo picco.
- **3** Quando l'integratore individua la fine del secondo picco la sommatoria delle aree termina. Questo processo può essere visualizzato separando i picchi fusi e tracciando una perpendicolare dal punto di avvallamento fra i due picchi.

### Spalle

Si tratta di picchi non risolti del bordo anteriore o posteriore di un picco più grande. Quando è presente una spalla, non si tratta di una valle vera e propria, cioè di una pendenza negativa seguita da una positiva. Un picco può avere un numero qualsiasi di spalle anteriori e/o posteriori.



Figura 10 Spalle del picco

Le spalle vengono individuate dalla curvatura del picco alla derivata seconda. Quando la curvatura è ridotta a zero, l'integratore identifica un punto di flesso simile ai punti "a" e "b" nella Figure 10, pagina 91.

- Una potenziale spalla anteriore esiste quando viene individuato un secondo punto di flesso prima dell'apice del picco. Se la spalla è confermata, l'inizio del punto di spalla viene stabilito al punto massimo di curvatura positiva prima del punto di flesso.
- Una potenziale spalla posteriore esiste quando viene individuato un secondo punto di flesso prima della fine del picco o della valle. Se confermata, l'inizio del punto di spalla viene stabilito e impostato sul punto corrispondente dal punto di inizio alla curva.

Il tempo di ritenzione/migrazione è determinato dal punto di massima curvatura negativa della spalla. Con un evento di integrazione programmato, l'integratore è in grado di calcolare anche le aree delle spalle come se si trattasse di picchi normali con perpendicolari ai punti di flesso del picco di spalla.

L'area della spalla è sottratta da quella del picco principale.

Le spalle dei picchi possono essere gestite come picchi normali utilizzando gli eventi programmati previsti dall'integratore.

# Collocazione della linea di base

Dopo aver completato tutti i cluster di picchi ed aver determinato la linea di base, l'integratore chiede all'algoritmo di collocazione della linea di base di collocare la linea di base utilizzando una tecnica pegs-and-thread. Quest'ultima utilizza correzioni trapezoidali dell'area e proporzionali dell'altezza per normalizzare e mantenere la linea di base più bassa possibile. Gli input all'algoritmo di collocazione della linea di base comprendono anche parametri acquisiti da file di dati e di metodi che identificano il rivelatore e le applicazioni che l'integratore utilizza per ottimizzare i suoi calcoli.

# Costruzione della linea di base predefinita

Nel caso più semplice, l'integratore costruisce la linea di base come una serie di segmenti di linea retta fra:

- L'inizio della linea di base
- I contrassegni
- La fine del picco



Figura 11 Costruzione della linea di base predefinita

### Inizio della linea di base

Se all'inizio dell'analisi non si trova nessuna linea di base, l'inizio verrà stabilito in uno dei modi che seguono:

- Dall'inizio dell'analisi al primo punto della linea di base, se il punto di inizio dell'analisi è inferiore al primo punto della linea di base.
- Dall'inizio dell'analisi al primo punto di avvallamento se il punto di inizio dell'analisi è inferiore alla prima valle.
- Dall'inizio dell'analisi al primo punto di avvallamento, se la prima valle penetra in una linea immaginaria disegnata dall'inizio dell'analisi alla prima linea di base.
- Dall'inizio dell'analisi ad una linea di base orizzontale estesa al primo punto della linea di base.

# Contrassegni

I contrassegni identificano l'inizio e la fine di un picco. La loro posizione è determinata dai tempi di inizio e fine del picco salvati nella tavola del picco.

### Fine della linea di base

L'ultimo punto valido della linea di base viene utilizzato per designare la fine della linea di base. Nel caso in cui l'analisi non finisca con la linea di base, la fine della linea di base viene calcolata dall'ultimo punto valido alla deriva stabilita per la linea di base.

Se un picco finisce in una valle evidente, ma il picco seguente si trova al di sotto del valore di scarto dell'area, così com'è stato impostato, la linea di base viene proiettata dall'inizio del picco al punto reale successivo della linea di base. Se un picco inizia allo stesso modo, viene applicata una regola simile. Collocazione della linea di base

# Penetrazione della linea di base

La penetrazione avviene quando il segnale scende al di sotto della linea di base costruita (punto a nella Figure 12, pagina 94. Se si verifica una penetrazione, quella parte di linea di base in genere viene ridisegnata come mostrano i punti "b" nella Figure 12, pagina 94.





È possibile utilizzare le seguenti opzioni di monitoraggio per rimuovere tutte le penetrazioni della linea di base:

### Monitoraggio della linea di base classico (nessuna penetrazione)

Quando questa opzione è selezionata, vengono ricercate tutte le penetrazioni in tutti i cluster di picchi. Se vengono trovate penetrazioni, i punti di inizio e/o di fine del picco vengono spostati fino a che non vi sono più penetrazioni (confrontare la linea di base nella Figure 12, pagina 94 e nella Figure 13, pagina 95).

b



Monitoraggio standard linea di base Monitoraggio linea di base (senza penetrazione)

Figura 13 Monitoraggio standard della linea di base e monitoraggio della linea di base (nessuna penetrazione)

La funzione Monitoraggio della linea di base (nessuna penetrazione) non è disponibile per i picchi di solvente, con i rispettivi picchi child e spalle.

#### Monitoraggio avanzato della linea di base

Nella modalità di monitoraggio avanzato della linea di base, l'integratore cerca di ottimizzare le posizioni iniziale e finale dei picchi, ristabilisce la linea di base per un cluster di picchi ed elimina le penetrazioni della linea di base (consultare la sezione Figure 12, pagina 94). In molti casi, questa modalità fornisce una linea di base più stabile, meno dipendente dalla sensibilità della pendenza.

## **Rapporto picco-valle**

NOTA

Questo parametro specificato dall'utente costituisce parte della modalità di monitoraggio avanzato della linea di base. Viene utilizzato per decidere se due picchi che non hanno la stessa separazione della linea di base sono separati da una perpendicolare o da una linea di base di avvallamento. L'integratore calcola il rapporto fra l'altezza (corretta alla linea di base) del picco più piccolo e l'altezza della valle corretta alla linea di base. Quando il rapporto picco-valle è minore del valore specificato, viene utilizzata una linea perpendicolare; altriCollocazione della linea di base

menti viene tracciata una linea di base dalla linea di base all'inizio del primo picco alla valle e dalla valle alla linea di base alla fine del secondo picco (confrontare la Figure 13, pagina 95 con la Figure 14, pagina 96).



Figura 14 Rapporto picco-valle

Il rapporto picco-valle viene calcolato utilizzando le seguenti equazioni:

 $H1 \ge H2$ , Rapporto picco-valle = H2/Hv

e

H1 < H2, Rapporto picco-valle = H1/Hv

Figure 15, pagina 97 mostra come il valore del rapporto picco-valle specificato dall'utente influenzi la linea di base.



Figura 15 Effetto del rapporto picco-valle sulle linee di base

# Funzione di definizione della tangente di interpolazione

È una forma di costruzione della linea di base effettuata per picchi che si trovano sulla pendenza ascendente o discendente di un picco. Quando la definizione della tangente di interpolazione è abilitata, sono disponibili quattro modelli per calcolare aree di picchi appropriate:

- · adattamento della curva esponenziale;
- nuovo skim esponenziale;
- skim a linea retta;
- combinazione dei calcoli per la linea retta e quella esponenziale per un migliore adattamento (skim standard).

#### Adattamento della curva esponenziale

Questo modello di skim traccia una curva utilizzando un'equazione esponenziale attraverso l'inizio e la fine del picco child (l'altezza dell'inizio del picco child viene corretta per la pendenza del picco parent). La curva passa sotto ogni picco child che segue il picco parent; l'area sotto la curva di skim viene sottratta dal picco child e aggiunta al picco parent (vedere la Figure 17, pagina 98).

Collocazione della linea di base



Figura 16 Skim esponenziale

#### Nuovo modo di adattamento della curva esponenziale

Questo modello di skim traccia una curva utilizzando un'equazione esponenziale per approssimare il bordo anteriore o posteriore del picco parent. La curva passa sotto uno o più picchi che seguono il picco parent (detti picchi child). L'area sotto la curva di skim viene sottratta dai picchi child e aggiunta al picco principale. Più di un picco può essere eliminato usando lo stesso modello esponenziale; tutti i picchi successivi al primo picco child sono separati perpendicolarmente, iniziando alla fine del primo picco child, e sono separati solo fino allo skim (vedere Figure 17, pagina 98).



Δ

#### Skim a linea retta

Questo modello di skim traccia una linea retta fra l'inizio e la fine del picco child. L'altezza dell'inizio del picco child viene corretta per la pendenza del picco parent. L'area sotto la linea retta viene sottratta dal picco child e aggiunta al picco parent (vedere la Figure 18, pagina 99).



Figura 18 Skim a linea retta

### **Skim standard**

Il calcolo appropriato viene scelto in funzione della specifica applicazione. Per impostazione predefinita il metodo scelto è una combinazione di calcoli di linea retta ed esponenziale per ottenere l'adattamento migliore.

Il passaggio da un calcolo esponenziale ad uno lineare viene effettuato in modo da eliminare discontinuità improvvise delle altezze o delle aree.

- Quando il segnale si trova molto al di sotto della linea di base, il calcolo di adattamento dello scodamento è esponenziale.
- Quando il segnale si trova entro la linea di base, il calcolo di adattamento dello scodamento è quello della linea retta.

I calcoli in combinazione vengono riportati come esponenziali o tangent skim.

#### Criteri di skim

Due criteri determinano se una linea di skim viene utilizzata per calcolare l'area di un picco child che eluisce sul bordo di coda di un picco parent:

- Rapporto altezza-skim coda
- Rapporto altezza-valle

Collocazione della linea di base

Questi criteri non sono utilizzati se è attivo un evento programmato a tempo per un esponenziale, o se il picco parent è un picco child in sé. Il codice di separazione fra i picchi parent e child deve essere di tipo **Valley**.

**Tail Skim Height Ratio** è il rapporto fra l'altezza corretta alla linea di base del picco parent (Hp nella Figure 19, pagina 100) e l'altezza corretta alla linea di base del picco child (Hc). Questo rapporto deve essere maggiore del valore specificato per il picco child da sottoporre a skim.



Figura 19 Criteri di skim

È possibile disattivare lo skim esponenziale in tutta l'analisi impostando il valore del rapporto altezza-skim coda su un valore alto o su zero.

**Valley Height Ratio** è il rapporto dell'altezza del picco child sopra la linea di base (Hc nella Figure 19, pagina 100) e l'altezza della valle sopra la linea di base (Hv nella stessa figura). Questo rapporto deve essere minore del valore specificato per il picco child da sottoporre a skim.

#### Calcolo dell'adattamento della curva esponenziale per gli skim

La seguente equazione viene utilizzata per calcolare uno skim esponenziale (vedere la Figure 22, pagina 102):

$$Hb = Ho \times exp(-B \times (Tr - To)) + A \times Tr + C$$

Dove:

Hb = Altezza dello skim esponenziale sul tempo Tr

Ho = Altezza (sopra la linea di base) dell'inizio dello skim esponenziale

B = Fattore di decadimento della funzione esponenziale

To = Tempo corrispondente all'inizio dello skim esponenziale

A = Pendenza della linea di base del picco parent



#### C = Offset della linea di base del picco parent



Il modello esponenziale viene adattato attraverso la parte della coda del picco parent, immediatamente prima del primo picco child. Figure 21, pagina 101 mostra la curva corretta di un picco child dopo l'applicazione della funzione di definizione della tangente d'interpolazione.



Figura 21 Picco child corretto alla coda

#### Skim del picco anteriore

Come per i picchi child sulla coda del picco parent, per alcuni picchi sulla parte anteriore/ascendente di un picco, è richiesta un'integrazione speciale. Vedere la Figure 22, pagina 102.

Collocazione della linea di base



Figura 22 Skim del picco anteriore

Lo skim del picco anteriore viene gestito come lo skim del picco di coda, utilizzando gli stessi modelli di skim.

I criteri di skim sono:

- Rapporto altezza-skim anteriore
- Rapporto altezza-valle

Il rapporto altezza-valle utilizza lo stesso valore sia per lo skim del picco anteriore che per quello del picco di coda (vedere "Rapporto altezza-valle"); il rapporto altezza-skim anteriore viene calcolato con la stessa procedura usata per il rapporto altezza-skim coda (vedere "Rapporto altezza-skim coda"), ma può avere valore diverso.

### Picchi non assegnati

Con alcune costruzioni di linea di base si determinano piccole aree al di sopra della linea di base ed al di sotto del segnale, ma che non fanno parte di nessun picco riconosciuto. Di solito queste aree non vengono misurate né riportate. Se la funzione viene attivata queste aree vengono misurate e riportate come picchi non assegnati. Il tempo di ritenzione/migrazione di tali aree è il punto intermedio fra l'inizio e la fine dell'area, come illustrato dalla Figure 23, pagina 103.



Figura 23 Picchi non assegnati

# Codici di separazione del picco

Nei rapporti si assegna ad ogni picco un codice di due, tre o quattro caratteri che descrive come è stato disegnato il segnale della linea di base.

### Caratteri 1 e 2

Il primo carattere descrive la linea di base all'inizio del picco e il secondo carattere descrive la linea di base alla fine del picco.

- **B** Il picco inizia o termina sulla linea di base.
- **V** Il picco è iniziato o terminato con una perpendicolare al punto di avvallamento.
- **P** Il picco inizia o termina mentre si verifica una penetrazione della linea di base.
- H Il picco è iniziato o terminato su una linea di base orizzontale forzata.
- F Il picco è iniziato o terminato su un punto forzato.
- M Il picco è stato integrato manualmente.
- **U** Il picco non è stato assegnato.

È possibile aggiungere ulteriori contrassegni (in ordine di precedenza):

Collocazione della linea di base

#### **Carattere 3**

- **D** Il picco è stato distorto.
- **A** L'integrazione è stata interrotta.
- **U** Si è verificata una condizione al di sotto dell'intervallo.
- **0** Si è verificata una condizione al di sopra dell'intervallo.

#### **Carattere 4**

Il quarto carattere descrive il tipo di picco:

- **S** Si tratta di un picco di solvente.
- **N** Si tratta di un picco negativo.
- + Si tratta di un picco ottenuto da sommatoria di aree.
- **T** Picco tangent-skim (skim standard).
- X Picco tangent-skim (skim esponenziale vecchia modalità).
- E Picco tangent-skim (skim esponenziale nuova modalità).
- **m** Picco definito da linea di base manuale.
- **n** Picco negativo definito da linea di base manuale.
- t Picco tangent-skim definito da linea di base manuale.
- **R** Si tratta di un picco di solvente ricalcolato.
- f Picco definito da una tangente alla spalla anteriore.
- **b** Picco definito da una tangente alla spalla posteriore.
- F Picco definito da una perpendicolare sulla spalla anteriore.
- **B** Picco definito da una perpendicolare sulla spalla posteriore.
- **U** Il picco non è assegnato.

4

# Misurazione dell'area del picco

L'ultima fase dell'integrazione del picco è la determinazione dell'area finale del picco.

Le aree dei picchi vengono calcolate in base al contenuto dei file di punti cardinali. I punti cardinali sono punti scelti dall'integratore per definire e quantificare un picco (vedere "Identificazione dei punti cardinali di un picco", pagina 78). I punti comprendono punti della linea di base, punti di avvallamento, apici del picco e punti del picco presi a metà altezza. I punti cardinali hanno una coordinata orizzontale del tempo trascorso, una verticale di altezza a partire dalla linea di base, l'area ed altri parametri utilizzati dall'integratore per calcolare le aree del picco.



Figura 24 Misurazione dell'area di picchi da linea di base a linea di base

Nel caso di un semplice picco isolato, l'area viene determinata come quella al di sopra della linea di base, fra l'inizio e la fine del picco (identificate da appositi segni).

# **Determinazione dell'area**

L'area calcolata dall'integratore durante l'integrazione viene determinata nei seguenti modi:

• per i picchi da linea di base a linea di base (BB), l'area sopra la linea di base fra i contrassegni, come nella Figure 24, pagina 105,

Misurazione dell'area del picco

• per i picchi da valle a valle (VV), l'area sopra la linea di base, segmentata con perpendicolari dai contrassegni, come nella Figure 25, pagina 106,



Figura 25 Misurazione dell'area dei picchi da valle a valle

- per i picchi tangenti (T), l'area al di sopra della linea di base reimpostata,
- per i picchi di solvente (S), l'area al di sopra dell'estensione orizzontale dall'ultimo punto trovato sulla linea di base ed al di sotto della linea di base reimpostata per i picchi tangenti (T). Un picco di solvente può venire visualizzato troppo lentamente per essere riconosciuto, o può esistere un gruppo di picchi che fanno parte dell'analisi ma che si pensa debbano essere trattati come solvente con un gruppo di picchi successivi. Ciò di solito coinvolge un gruppo di picchi fusi dove il primo è maggiore dei successivi. Il semplice fatto di tracciare la perpendicolare metterebbe in evidenza gli ultimi picchi, dato che si trovano effettivamente sulla coda del primo. Se si desidera riconoscere il primo picco come solvente, si eliminano tutti gli altri dalla coda,
- i picchi negativi che si trovano sotto la linea di base hanno comunque un'area positiva, come mostrato in Figure 26, pagina 107.

Δ



Figura 26 Misurazione dell'area per i picchi negativi

# Unità e fattori di conversione

Esternamente, i dati contengono una serie di punti di dati. Possono essere dati campionati o integrati. Nel caso di dati integrati, ciascun punto di dati corrisponde a un'area, che viene espressa come *Altezza* × *Tempo*. Nel caso di dati campionati, ciascun punto di dati corrisponde a un'altezza.

Di conseguenza, nel caso di dati integrati, l'altezza è un'entità calcolata, ottenuta dividendo l'area per il tempo trascorso dal precedente punto di dati. Nel caso di dati campionati, l'area viene calcolata moltiplicando i dati per il tempo trascorso dal precedente punto di dati.

Il calcolo di integrazione utilizza entrambe le entità. Le unità utilizzate all'interno dell'integratore sono: *conteggi × millisecondi* per l'area e *conteggi* per l'altezza. Questa soluzione garantisce una base comune per le troncature degli interi, se richiesto. Le misurazioni del tempo, dell'area e dell'altezza sono riportate in unità fisiche reali, indipendentemente dal modo in cui sono misurate, calcolate e archiviate nel software.

# Eventi di integrazione

L'integratore fornisce all'utente un certo numero di eventi di integrazione iniziali e programmati a tempo. Molti eventi sono di tipo on/off, start/stop.

## Eventi iniziali

**Initial peak width** imposta l'ampiezza interna del picco su questo valore per l'inizio dell'analisi. Questo valore iniziale viene usato per scalare l'accumulatore che rivela la curva ascendente, la curva discendente e la coda del picco. Se necessario, l'integratore aggiorna l'ampiezza del picco durante l'analisi per ottimizzare l'integrazione. L'ampiezza del picco viene specificata in unità di tempo che corrispondono all'ampiezza del picco a metà altezza del primo picco previsto (escluso il picco del solvente).

**Slope sensitivity** è l'impostazione della sensibilità del picco. Questa impostazione cambia su scala lineare.

**Height reject** imposta il rifiuto del picco in base all'altezza finale. Nessun picco con un'altezza inferiore all'altezza minima impostata verrà inserito nel rapporto.

**Area reject** imposta il rifiuto del picco in base all'area finale. Nessun picco con un'area inferiore all'area minima impostata verrà inserito nel rapporto.

Quando la funzione **shoulder detection** è attiva, l'integratore individua le spalle utilizzando la curvatura del picco acquisita dalla derivata seconda. Se la curvatura assume un valore zero, l'integratore identifica il punto di flesso come possibile spalla. Se l'integratore identifica un altro punto di flesso prima dell'apice del picco, si tratta di una spalla.

#### Ampiezza del picco

Controlla la selettività dell'integratore in modo che possa distinguere i picchi dal rumore della linea di base. Per ottenere buoni risultati, l'ampiezza del picco deve essere impostata su un valore prossimo all'ampiezza a metà altezza dei picchi cromatografici/elettroferografici reali. Se necessario, l'integratore aggiorna l'ampiezza del picco durante l'analisi per ottimizzare l'integrazione.
#### Come scegliere il valore dell'ampiezza del picco

Scegliere l'impostazione che fornisce un filtro sufficiente per distinguere il rumore di fondo dai picchi senza distorcere le informazioni fornite dal segnale.

- Per scegliere un'ampiezza iniziale adatta a un solo picco di interesse, utilizzare l'ampiezza nel tempo del picco come base di riferimento.
- Per scegliere un'ampiezza iniziale adatta per più picchi di interesse, impostare l'ampiezza iniziale su un valore uguale od inferiore al picco più piccolo per ottenere una selettività ottimale.

Se l'ampiezza iniziale scelta è troppo bassa, il rumore può essere interpretato come picco. Se sono presenti sia picchi ampi che picchi ristretti, si possono utilizzare eventi programmati di analisi per adattare l'ampiezza di alcuni dei picchi. Talvolta i picchi diventano significativamente più ampi mentre l'analisi progredisce. Ciò accade ad esempio nelle analisi GC isotermiche e LC isocratiche. Per compensare questa situazione, l'integratore aggiorna automaticamente l'ampiezza del picco man mano che i picchi aumentano l'ampiezza durante l'analisi, se non è stata disabilitata la funzione o se non è stato impostato un evento programmato.

L'aggiornamento di Ampiezza del picco viene calcolato come segue:

0.75 x (existing peak width) + 0.25 x (width of current peak)

Se un evento di integrazione programmato a tempo disabilita o imposta l'ampiezza del picco su un valore specifico, l'adattamento automatico dell'ampiezza viene disabilitato.

#### Scarto dell'altezza e ampiezza del picco

Si tratta di valori molto importanti per il processo di integrazione. Modificando questi valori, si possono ottenere risultati molto diversi.

• Aumentare entrambi i valori quando devono essere identificati componenti relativamente dominanti e quantificati in un ambiente con rumore di fondo elevato. L'aumento dell'ampiezza migliora il filtro del rumore, mentre un aumento dello scarto dell'altezza assicura che il rumore di fondo venga ignorato.

Eventi di integrazione

- Ridurre i valori per rivelare e quantificare componenti a livello traccia e in particolare di quelli che hanno un'altezza prossima al livello di rumore di fondo. La riduzione dell'ampiezza riduce anche la capacità di filtrare il segnale, mentre la riduzione dello scarto dell'altezza assicura che i picchi più piccoli non vengano esclusi a causa della loro altezza insufficiente.
- Quando un'analisi contiene picchi con ampiezze diverse, l'ampiezza deve essere impostata per i picchi più ristretti e lo scarto dell'altezza ridotto per assicurare che i picchi più ampi non vengano ignorati a causa della loro altezza ridotta.

#### **Calibrazione dell'integrazione**

Risulta spesso utile modificare i valori di sensibilità della pendenza, ampiezza del picco, scarto dell'altezza e scarto di area per personalizzare l'integrazione.

La Figure 27, pagina 110 illustra come questi parametri influenzino l'integrazione di cinque picchi in un segnale.



Figura 27 Uso degli eventi iniziali

Un picco viene integrato solo quando tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti. Utilizzando l'ampiezza del picco numero 3, i valori di scarto dell'area e di sensibilità della pendenza illustrati dalla Figure 27, pagina 110, solo i picchi 1, 3, 5 e 7 saranno integrati.

**Picco 1** Viene integrato perché tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti.

- **Picco 2** Viene escluso perché l'area si trova al di sotto del valore di scarto dell'area impostato.
- **Picco 3** Viene integrato perché tutti e quattro i parametri di integrazione sono soddisfatti.
- **Picco 4** Non viene integrato perché l'altezza del picco è al di sotto del valore di scarto dell'altezza.
- **Picco 5** Viene escluso perché l'area si trova al di sotto del valore di scarto dell'area impostato.
- **Picco 6** Non viene integrato; il filtro e il raggruppamento rendono il picco invisibile.
- **Picco 7** Viene integrato.

Tabella 12 Valori Scarto dell'altezza e Scarto dell'area

Parametro di integrazione	Picco 1	Picco 2	Picco 3	Picco 4	Picco 5	Picco 7
Scarto dell'altezza	Maggiore	Superiore	Superiore	Inferiore	Superiore	Superiore
scarto dell'area	Superiore	Inferiore	Superiore	Inferiore	Inferiore	Superiore
Picco integrato	Sì	No	Sì	No	No	Sì

### Eventi programmati

Si possono programmare eventi di integrazione per personalizzare la costruzione della linea di base del segnale quando quella predefinita non è adatta. Questi eventi possono essere utili nella somma finale delle aree dei picchi e nella correzione di alterazioni della linea di base a breve e a lungo termine. Per ulteriori informazioni sugli eventi di integrazione, consultare la sezione "Eventi iniziali", pagina 108.

### Autointegrazione

La funzione **Autointegrate** fornisce un punto di partenza per l'impostazione degli eventi iniziali. Si rivela particolarmente utile quando si implementa un nuovo metodo. Si inizia con la tavola degli eventi di integrazione predefiniti che non contiene eventi programmati a tempo. È possibile ottimizzare i parametri proposti dalla funzione Autointegrazione per uso generale.

#### Principi di funzionamento

La funzione**Autointegrate** legge i dati del cromatogramma e calcola i valori ottimali per i parametri di integrazione iniziale per ogni segnale del cromatogramma.

L'algoritmo esamina l'1% all'inizio e alla fine del cromatogramma e determina il rumore e la pendenza per questa parte. Il rumore viene determinato come 3 volte la deviazione standard della regressione lineare, diviso per il quadrato del numero percentuale di punti usati nella regressione. Questi valori vengono usati per assegnare valori appropriati allo scarto dell'altezza e alla sensibilità della pendenza per l'integrazione. L'algoritmo assegna quindi un valore temporaneo all'ampiezza del picco, in base alla lunghezza del cromatogramma, usando 0,5% per LC e da 0,3% a 0,2% per GC. Viene effettuata un'integrazione di prova con il valore iniziale di Scarto dell'area impostato su zero. Se necessario, la prova viene ripetuta più volte, regolando i parametri ogni volta, fino a che non vengono rilevati almeno 5 picchi o finché non viene eseguita l'integrazione con uno scarto dell'altezza iniziale di 0. L'integrazione di prova termina se queste condizioni non vengono soddisfatte entro 10 prove.

I risultati dell'integrazione vengono esaminati e l'ampiezza del picco viene regolata sulla base delle ampiezze di picco dei picchi rilevati, tendendo il calcolo verso i picchi iniziali. La simmetria di picco dei picchi rilevati viene utilizzata per includere solo i picchi con simmetria fra 0,8 e 1,3 per il calcolo dell'ampiezza del picco. Se non vengono trovati sufficienti picchi simmetrici, questo limite viene allargato a *minSymmetry/1.5* e *maxSymmetry×1.5*. La linea di base fra i picchi viene quindi esaminata per rifinire i valori precedenti di scarto dell'altezza e di sensibilità della pendenza. Lo scarto di area viene impostato su 90% dell'area minima del picco più simmetrico rilevato durante l'integrazione di prova.

Il cromatogramma viene integrato di nuovo usando questi valori finali per i parametri di integrazione e i risultati dell'integrazione vengono archiviati.

#### Parametri dell'autointegrazione

Per la funzione di autointegrazione, vengono impostati i seguenti parametri:

- Sensibilità della pendenza iniziale
- Altezza iniziale
- Ampiezza del picco iniziale
- Scarto di area iniziale

## Integrazione manuale

### Integrazione manuale

Questo tipo di integrazione consente di integrare picchi selezionati o gruppi di picchi. Eccettuato il valore iniziale di scarto dell'area, gli eventi di integrazione impostati vengono ignorati dal software entro l'ambito di integrazione manuale specificato. Tutti i picchi risultanti dall'integrazione manuale al di sotto del limite del parametro di scarto dell'area vengono scartati. Gli eventi di integrazione manuali usano valori di tempo assoluti. Non tengono conto delle deviazioni di segnale.

L'**Manual Integration** permette di definire l'inizio e la fine del picco e di includere quindi le aree ricalcolate nella quantificazione e nella stesura di report. I picchi integrati manualmente sono evidenziati nei report con il codice di separazione del picco M.

L'Manual Integration offre le seguenti funzioni:

**Draw Baseline** specifica dove devono essere disegnate le linee di base per un picco o un gruppo di picchi. È inoltre possibile specificare se i picchi della scala indicata devono essere separati automaticamente in corrispondenza dei punti di avvallamento.

**Negative Peaks** specifica quando considerare come picchi negativi le aree al di sotto della linea di base. È inoltre possibile specificare se i picchi della scala indicata devono essere separati automaticamente in corrispondenza dei punti di avvallamento.

**Tangent Skim** calcola le aree dei picchi eliminati tangenzialmente dal picco principale. L'area del picco eliminato viene sottratta dall'area del picco principale.

Split Peak specifica un punto dove dividere un picco con una perpendicolare.

Delete Peak(s) elimina uno o più picchi dai risultati di integrazione.

#### Codici di separazione del picco per i picchi integrati manualmente

I picchi integrati manualmente sono evidenziati nei report di integrazione con il codice *MM*.

Se c'è un picco prima di quello integrato manualmente e la sua fine cambia a causa dell'integrazione manuale, il codice corrispondente sarà F (forzato).

Un picco di solvente influenzato dall'integrazione manuale, ad esempio un tangent skim, viene contrassegnato con R (solvente ricalcolato).

### Salvataggio degli eventi di integrazione manuale

Gli eventi manuali di integrazione, come una linea di base disegnata a mano, sono file di dati ancora più specifici rispetto agli eventi di integrazione tempificati. In caso di cromatogrammi complessi, è preferibile utilizzare questo tipo di eventi per la rielaborazione. Pertanto a partire dalla ChemStation B.04.01 gli eventi manuali di integrazione possono essere memorizzati direttamente nel file dei dati anziché con il metodo.

Ogni volta che il file dei dati viene esaminato o rielaborato, gli eventi manuali di integrazione nel file dei dati vengono applicati automaticamente. Un'analisi contenente eventi manuali di integrazione viene segnalata nella relativa colonna della **Navigation Table**.

Oltre agli strumenti per tracciare una linea di base ed eliminare manualmente un picco, l'interfaccia utente fornisce anche strumenti che consentono di:

- Salvare gli eventi manuali dei cromatogrammi attualmente visualizzati nel file di dati
- Rimuovere tutti gli eventi dai cromatogrammi attualmente visualizzati
- Annullare gli ultimi eventi manuali di integrazione (disponibili fino al salvataggio dell'evento).

Quando si passa al file di dati successivo durante la revisione nella **Navigation Table**, la ChemStation controlla se ci sono eventi manuali di integrazione non salvati e chiede all'utente se desidera salvarli.

Gli eventi manuali memorizzati nel file dei dati durante la revisione nella **Navigation Table** non interferiscono con gli eventi manuali di integrazione memorizzati durante la revisione in modalità **Batch**. Queste due modalità di revisione sono completamente diverse rispetto agli eventi manuali di un file dei dati. Nelle revisioni di ChemStation precedenti alla B.04.01, gli eventi d'integrazione manuale venivano memorizzati con il metodo anziché nei singoli file di dati. Nella versione B.04.01, è ancora possibile utilizzare questo flusso di lavoro. Il menu **Integration** nella finestra **Data Analysis** fornisce le seguenti opzioni per la gestione degli eventi manuali di integrazione con il metodo:

- Update Manual Events of Method: salva i nuovi eventi manuali tracciati nel metodo.
- Apply Manual Events from Method: applica gli eventi manuali correntemente salvati nel metodo al file dei dati attualmente caricato.
- Remove Manual Events from Method: elimina gli eventi manuali dal metodo.

Per convertire gli eventi manuali memorizzati in un metodo e memorizzarli nel file dei dati, applicare gli eventi dal metodo e memorizzare i risultati nel file dei dati. Se necessario, rimuovere gli eventi dal metodo.

Se la casella di controllo **Manual Events** della **Integration Events Table** è selezionata, gli eventi manuali del metodo vengono sempre applicati quando si carica un file dei dati con questo metodo. Se il file dei dati contiene eventi manuali aggiuntivi, questi vengono applicati dopo gli eventi del metodo. Se la casella di controllo **Manual Events** è selezionata, all'utente non viene mai richiesto di salvare gli eventi nel file dei dati.

Per convertire gli eventi manuali memorizzati in un metodo e memorizzarli nel file dei dati, applicare gli eventi dal metodo e memorizzare i risultati nel file dei dati. Ora è possibile rimuovere gli eventi dal metodo.

Se la casella di controllo **Manual Events** della **Integration Events Table** è selezionata, gli eventi manuali del metodo vengono sempre applicati quando si carica un file dei dati con questo metodo. Se il file dei dati contiene eventi manuali aggiuntivi, questi vengono applicati dopo gli eventi del metodo. Se la casella di controllo **Manual Events** è selezionata, all'utente non viene mai richiesto di salvare gli eventi nel file dei dati.

#### Conversione di eventi d'integrazione manuale salvati in un metodo

Nelle revisioni di ChemStation precedenti alla B.04.01, gli eventi d'integrazione manuale venivano memorizzati con il metodo anziché nei singoli file di dati. Per memorizzare gli eventi manuali in modo specifico per il file di dati, risultava più conveniente utilizzare il singolo metodo DA.M di ogni specifico file di dati. Il menu **Integrazione** della finestra **Data Analysis** fornisce numerose opzioni che consentono di convertire gli eventi d'integrazione manuale del metodo in eventi memorizzati nel file di dati o di continuare a lavorare con gli eventi manuali memorizzati nel metodo:

- Update Manual Events of Method: salva i nuovi eventi manuali tracciati nel metodo.
- Apply Manual Events from Method: applica gli eventi manuali correntemente salvati nel metodo al file dei dati attualmente caricato.
- Remove Manual Events from Method: elimina gli eventi manuali dal metodo.

#### 4 Integrazione

Integrazione manuale



# Quantificazione

5

Che cos'è la quantificazione? 120 Calcoli di quantificazione 121 Fattori di correzione 122 Fattore di risposta assoluto 122 Moltiplicatore 122 Fattore di diluizione 122 Quantità di campione 123 Procedimenti di calcolo non calibrati 124 Area % e altezza % 124 Procedimenti di calcolo calibrati 125 Calcolo dello standard esterno 126 Calcolo con il procedimento della normalizzazione % 128 Calcolo con il procedimento dello standard interno 129 Fase 1: Calibrazione 130 Fase 2: Campione incognito 131 Calcolo ISTD di picchi calibrati 131 Calcolo ISTD di picchi non calibrati 132

Questo capitolo descrive le modalità con cui la ChemStation effettua operazioni di quantificazione. In particolare, fornisce informazioni sui calcoli di area % e altezza %, standard esterno (ESTD), normalizzazione %, standard interno (ISTD) e sulla quantificazione di picchi non identificati.



#### 5 Quantificazione

Che cos'è la quantificazione?

## Che cos'è la quantificazione?

Dopo che i picchi sono stati integrati e identificati, il passo successivo dell'analisi è la quantificazione. La quantificazione utilizza l'area o l'altezza del picco per determinare la concentrazione di un composto in un campione.

Un'analisi quantitativa comporta effettuare varie operazioni che sono brevemente descritte di seguito:

- Identificare il composto che si sta analizzando.
- Definire un metodo per analizzare campioni che contengono il composto.
- Analizzare uno o più campioni che contengono concentrazioni note del composto, per ottenere la risposta dovuta a tali concentrazioni.

In alternativa, è possibile analizzare un certo numero di questi campioni con concentrazioni diverse del composto di interesse, se il rivelatore a disposizione ha un tipo di risposta non lineare. Questo procedimento è chiamato *calibrazione multilivello*.

- Analizzare il campione contenente una concentrazione nota del composto, per ottenere la risposta dovuta a tale concentrazione.
- Confrontare la risposta dovuta alla concentrazione incognita con quella dovuta alla concentrazione nota, per determinare in quale quantità è presente il composto.

Per poter confrontare validamente la risposta del campione incognito con quella del campione noto, i dati devono essere acquisiti ed elaborati in condizioni identiche.

## Calcoli di quantificazione

Per determinare la concentrazione di ogni componente presente nella miscela, la ChemStation offre i seguenti procedimenti di calcolo

- Percentuale
- Normalizzazione
- Standard esterno (ESTD)
- ESTD%
- Standard interno (ISTD)
- ISTD%

I calcoli utilizzati per determinare la concentrazione di un composto in un campione incognito dipendono dal tipo di quantificazione. Ogni procedimento di calcolo utilizza l'area o l'altezza del picco e produce un tipo diverso di rapporto.

### Fattori di correzione

I calcoli di quantificazione utilizzano quattro fattori di correzione, *fattore di risposta assoluto, moltiplicatore, fattore di diluizione e quantità di campione.* Questi fattori vengono usati nelle procedure di calibrazione per compensare le variazioni di risposta del rivelatore ai diversi componenti del campione e per differenti concentrazioni, diluizioni e quantità del campione, unità di conversione.

### Fattore di risposta assoluto

Il fattore di risposta assoluto per un componente in un campione corrisponde alla quantità del componente divisa per l'area o l'altezza misurate del picco di tale componente nell'analisi di una miscela di calibrazione. Il fattore di risposta assoluto, usato per ogni procedura di calcolo calibrata, corregge la risposta del rivelatore ai componenti individuali del campione.

### Moltiplicatore

Il moltiplicatore viene usato in ogni formula di calcolo per moltiplicare il risultato per ogni componente. Il moltiplicatore può essere usato per convertire le unità utilizzate per esprimere le quantità.

### Fattore di diluizione

Il fattore di diluizione è un numero per il quale vengono moltiplicati tutti i risultati calcolati prima della stampa del rapporto. Si può usare il fattore di diluizione per modificare la scala dei risultati o correggere in caso di modifiche nella composizione del campione durante la preparazione che precede l'analisi. Il fattore di diluizione può anche essere usato per altri scopi che richiedano l'uso di un fattore costante.

### Quantità di campione

Se si scelgono i calcoli ESTD% o ISTD%, i rapporti ESTD e ISTD danno valori relativi invece che assoluti: la quantità di ogni composto viene espressa come percentuale della quantità di campione. La quantità di campione viene usata nei rapporti ESTD% e ISTD% per convertire la quantità assoluta dei componenti analizzati in valori relativi, dividendo per il valore specificato.

## Procedimenti di calcolo non calibrati

I procedimenti di calcolo non calibrati non richiedono tavola di calibrazione.

### Area % e altezza %

Il procedimento di calcolo dell'area % riporta l'area di ogni picco dell'analisi come percentuale dell'area totale di tutti i picchi dell'analisi. Esso non richiede calibrazione preventiva e non dipende dalla quantità di campione iniettata entro i limiti del rivelatore. Non vengono usati fattori di risposta. Se tutti i componenti rispondono allo stesso modo nel rivelatore e sono eluiti, l'area % costituisce una buona approssimazione delle quantità relative di componenti.

L'area % è usata normalmente dove i risultati qualitativi sono motivo di interesse e per produrre informazioni per creare la tavola di calibrazione richiesta per altri procedimenti di calibrazione.

La procedura di calcolo dell'altezza % riporta l'altezza di ogni picco dell'analisi come percentuale dell'altezza totale di tutti i picchi dell'analisi.

Il moltiplicatore e il fattore di diluizione di **Calibration Settings**, della finestra di dialogo **Sample Information** o di **Sequence Table** non sono applicati nel calcolo di Area% o Altezza%.

## Procedimenti di calcolo calibrati

I procedimenti di calcolo dello standard esterno (ESTD), della normalizzazione e dello standard interno (ISTD) richiedono fattori di risposta e quindi prevedono l'utilizzo di una tavola di calibrazione. La tavola di calibrazione specifica la conversione delle risposte in unità scelte dall'utente unitamente alla procedura. Calcolo dello standard esterno

### Calcolo dello standard esterno

Lo standard esterno (ESTD) è un procedimento di quantificazione di base nel quale i campioni di calibrazione e incogniti vengono analizzati nelle stesse condizioni. I risultati ottenuti con un campione incognito vengono successivamente confrontati con quelli del campione di calibrazione, per calcolare la quantità nel campione incognito.

Il procedimento ESTD, a differenza del procedimento ISTD, usa fattori di risposta assoluti. I fattori di risposta sono ottenuti da una calibrazione e quindi archiviati. Nelle analisi che seguono, le quantità dei componenti vengono calcolate applicando tali fattori di risposta alle quantità di campione misurate. Tuttavia, è importante verificare che la quantità di campione iniettata sia riproducibile in tutte le analisi, poiché nel campione non è presente uno standard per la correzione delle variazioni dovute alla quantità di campione iniettato o alla preparazione del campione.

Quando si prepara un rapporto ESTD, il calcolo della quantità di un particolare composto in un campione incognito avviene in due fasi:

- 1 Si calcola un'equazione per la curva attraverso i punti di calibrazione per il composto, utilizzando il tipo di adattamento della curva specificato nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione o Curva di calibrazione.
- **2** La quantità di composto nel campione incognito viene calcolata usando l'equazione descritta in seguito. La quantità può essere riportata nel rapporto o può essere usata per ulteriori calcoli richiesti per stabilire il moltiplicatore, il fattore di diluizione o la quantità di campione, prima di essere resi in forma di rapporto.

Se si sceglie il rapporto ESTD, l'equazione da usare per calcolare la quantità assoluta del componente x, è la seguente:

Absolute Amt of x =  $Response_x \cdot RF_x \cdot M \cdot D$ 

Dove:

Responsex è la risposta del picco x;

*RFx* è il fattore di risposta per il componente x, calcolato come:

 $RF_x = \frac{Amount_x}{M}$ Response, *M* è il moltiplicatore.

D è il fattore di diluizione.





Il moltiplicatore e il fattore di diluizione possono essere visualizzati sia nella finestra di dialogo Calibration Settings che Sample Information.

Se viene scelto il rapporto ESTD% e la quantità del campione non è zero, la quantità relativa (%) di un composto x viene calcolata come segue:

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

Dove:

La quantità assoluta di x (absolute Amt) viene calcolata come sopra;

La quantità di campione si ottiene dalla finestra di dialogo Informazioni sul campione o Impostazioni di calibrazione per analisi singole. Se la quantità di campione è zero, si calcola l'ESTD.

Calcolo con il procedimento della normalizzazione %

### Calcolo con il procedimento della normalizzazione %

Nel metodo della normalizzazione percentuale (Norm%), alle aree o alle altezze dei picchi vengono applicati i fattori di risposta, per compensare eventuali variazioni della sensibilità del rivelatore nei confronti dei diversi componenti del campione.

Il report Norm% viene calcolato allo stesso modo di un report ESTD, a eccezione del fatto che è necessario un ulteriore passaggio per calcolare le quantità di composto relative invece che assolute.

Il report di normalizzazione percentuale (Norm%) ha lo stesso svantaggio di quelli di area e altezza percentuale. Qualsiasi modifica che interessi l'area totale del picco interesserà anche il calcolo della concentrazione di ogni singolo picco. Il report di normalizzazione può essere usato solo se tutti i componenti eluiscono e possono essere integrati. L'esclusione di alcuni picchi da un report di normalizzazione comporta la necessità di modificare i risultati relativi al campione.

L'equazione utilizzata per calcolare la Norm% di un componente x è:

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

Dove:

Risposta <sub>x</sub>	è l'area o l'altezza del picco x	
RF <sub>x</sub>	è il fattore di risposta	
$\Sigma$ (Risposta $\cdot$ RF)	è il totale di tutti i prodotti <i>(Risposta · RF)</i> per tutti i picchi compreso il picco x	
Μ	è il moltiplicatore	
D	è il fattore di diluizione	

Il moltiplicatore e il fattore di diluizione possono essere visualizzati nelle finestre di dialogo **Calibration Settings** e **Sample Information**.

5

### Calcolo con il procedimento dello standard interno

Il procedimento ISTD elimina gli svantaggi del metodo ESTD grazie all'aggiunta di un componente in quantità nota, che serve da fattore di normalizzazione. Questo componente, detto *standard interno*, viene aggiunto sia ai campioni di calibrazione sia a quelli incogniti.

Il software prende i fattori di risposta adeguati ottenuti da una calibrazione precedentemente archiviata in un metodo. Usando la concentrazione dello standard interno e le aree o le altezze dei picchi prese dall'analisi, il software calcola le concentrazioni dei componenti.

Il composto usato come standard interno dovrebbe essere simile al composto calibrato, sia chimicamente, sia per quanto riguarda il tempo di ritenzione/migrazione, ma deve essere distinguibile cromatograficamente.

Vantaggi	Svantaggi
La variazione delle del volume iniettato non è significativa.	È necessario aggiungere lo standard interno a ogni campione.
La deviazione dello strumento è compensata dallo standard interno.	
Gli effetti della preparazione del campione sono ridotti al minimo se il comportamento chimico dell'ISTD e quello del campione incognito sono simili.	

Tabella 13 Procedura ISTD

Se la procedura ISTD viene usata per calibrazioni con caratteristiche non lineari, occorre prestare attenzione affinché errori del principio di calcolo non provochino errori sistematici. Nelle calibrazioni multilivello, la quantità di composto usato come ISTD deve essere tenuta costante, cioè la stessa per tutti i livelli se la curva di calibrazione del composto non è lineare.

Nell'analisi con lo standard interno, la quantità del componente che interessa è correlata alla quantità di componente standard interno dal rapporto delle risposte dei due picchi. Calcolo con il procedimento dello standard interno

In una calibrazione ISTD in due fasi, il calcolo del rapporto di quantità corretto di un composto particolare in un campione sconosciuto avviene nelle fasi che seguono.

### **Fase 1: Calibrazione**

1 I punti di calibrazione vengono costruiti calcolando il rapporto di quantità e quello di risposta per ciascun livello di un particolare picco della tavola di calibrazione.

Il rapporto di quantità è uguale all'area del composto divisa per l'area o l'altezza dello standard interno a questo livello.

Il rapporto di risposta è uguale all'area del composto divisa per l'area o l'altezza dello standard interno a questo livello.

**2** Si calcola un'equazione per la curva passante per i punti di calibrazione utilizzando il tipo di curva stabilito nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione o Curva di calibrazione.

$$RF_{x} = \frac{Amount Ratio}{Response Ratio}$$
Rapporto di risposta
$$RF_{x}$$
RFx
RFx
Response Ratio

Figura 29 Rapporto di quantità

### Fase 2: Campione incognito

- 1 La risposta del composto nel campione incognito viene divisa per la risposta dello standard interno nel campione incognito per trovare un rapporto di risposta per il campione stesso.
- **2** Il rapporto di quantità viene calcolato usando l'equazione della curva determinata al punto due della fase precedente e la quantità reale di ISTD nel campione.

### Calcolo ISTD di picchi calibrati

Le equazioni usate per calcolare la quantità effettiva di un componente calibrato x per una calibrazione a livello singolo sono:

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

Actual Amount of x =  $RF_x$  (Response Ratio)<sub>x</sub> · Actual Amount of ISTD · M · D

Dove:

 $RF_{\rm x}$  è il fattore di risposta del composto x

La *quantità effettiva* di ISTD è il valore inserito nella finestra di dialogo Impostazioni calibrazione o Informazioni campione per lo standard interno aggiunto al campione incognito

M è il moltiplicatore

D è il fattore di diluizione

Se si sceglie il tipo di report ISTD%, si usa l'equazione seguente per calcolare la quantità relativa (%) del componente x:

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

Calcolo con il procedimento dello standard interno

### Calcolo ISTD di picchi non calibrati

Esistono due modi per definire il fattore di risposta usato per calcolare la quantità dei picchi non identificati.

1 Usare il fattore di risposta fisso impostato nella casella Con fattore di risposta della finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione. È possibile scegliere di correggere il fattore di risposta fisso precisando una correzione dell'ISTD.

Actual Amount of x =  $RF_x$  (Response Ratio)<sub>x</sub> · Actual Amount of ISTD ·  $M \cdot D$ 

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

 $\mathrm{RF}_{\mathbf{x}}$  è il fattore di risposta stabilito nella finestra di dialogo Calibration Settings.

Da queste formule si può notare che le variazioni di risposta dell'ISTD vengono usate per correggere la quantificazione del componente incognito.

2 Utilizzare un picco calibrato. Ciò assicura che lo stesso fattore di risposta venga usato per la quantificazione di tutti i picchi. Il fattore di risposta del composto scelto e dei picchi non calibrati viene corretto durante tutte le ricalibrazioni. Se il fattore di risposta del picco calibrato cambia, il fattore di risposta dei picchi non identificati cambia della stessa quantità. Se la tavola di calibrazione è già impostata, si può scegliere un composto dalla casella Uso del composto della finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione.

Le equazioni usate per calcolare la quantità effettiva di un picco non calibrato x sono illustrate in precedenza.



6

# Identificazione dei picchi

Che cos'è l'identificazione dei picchi? 134 Regole di corrispondenza dei picchi 135 Tipi di identificazione dei picchi 136 Tempo di ritenzione/migrazione assoluto 136 Tempo di ritenzione/migrazione corretto 136 Qualificatori 136 Limiti di quantità 137 Tempo di ritenzione/migrazione assoluto 138 Tempi di ritenzione/migrazione corretti 140 Picchi di riferimento singoli 140 Picchi di riferimento multipli 140 Qualificatori dei picchi 142 Correlazione del segnale 143 Verifica del qualificatore 143 Calcolo del rapporto del qualificatore 143 Il procedimento di identificazione 145 Identificazione dei picchi di riferimento 145 Identificazione dei picchi ISTD 145 Come trovare i rimanenti picchi calibrati 146 Classificazione di picchi non identificati 146

Questo capitolo spiega come identificare i picchi.



## Che cos'è l'identificazione dei picchi?

L'identificazione dei picchi stabilisce i componenti di un campione incognito basandosi sulle sue caratteristiche cromatografiche/elettroferografiche determinate dall'analisi di un campione di calibrazione ben definito.

L'identificazione di questi componenti è un passo necessario per la quantificazione se il metodo analitico la richiede. Le caratteristiche del segnale di ogni componente di interesse sono contenute nella tavola di calibrazione del metodo.

La funzione del processo di identificazione del picco è quella di paragonare ogni picco del segnale ai componenti della tavola di calibrazione.

La tavola di calibrazione contiene i tempi di ritenzione/migrazione desiderati per i componenti di interesse. Ad ogni picco con un tempo di ritenzione/migrazione corrispondente ad uno contenuto nella tavola di calibrazione, vengono attribuite le caratteristiche di quel composto: ad esempio il nome ed il fattore di risposta. I picchi i cui tempi non corrispondono a quelli contenuti nella tavola di calibrazione sono classificati come sconosciuti. Questo processo è controllato da alcuni fattori:

- il tempo di ritenzione/migrazione nella tavola di calibrazione per i picchi qualificati come picchi di riferimento temporale;
- Le finestre sui tempi di ritenzione/migrazione specificate per i picchi di riferimento.
- I tempi di ritenzione/migrazione nella tavola di calibrazione per i picchi calibrati che non sono di riferimento temporale.
- Le finestre sui tempi di ritenzione/migrazione specificate per questi picchi che non costituiscono riferimento.
- La presenza di altri picchi qualificatori in rapporti corretti.

## Regole di corrispondenza dei picchi

Le regole che seguono sono da applicare nel procedimento di corrispondenza dei picchi.

- Se il picco di un campione ha un tempo di ritenzione che rientra nei limiti della finestra di corrispondenza per un componente contenuto nella tavola di calibrazione, gli vengono attribuite le caratteristiche di quest'ultimo.
- Se più di un picco di campione rientra nei limiti della finestra di corrispondenza di un componente, allora il picco più vicino al tempo di ritenzione/migrazione atteso viene identificato come quel componente.
- Se un picco è un riferimento temporale o uno standard interno, allora il picco più grande della finestra viene identificato come quel componente.
- Se si usano qualificatori, allora i loro rapporti sono usati insieme alla finestra di corrispondenza per identificare il componente.
- Se un picco è un qualificatore, il picco misurato che più si avvicina al picco principale del composto viene identificato.
- Se un picco presente nel campione non rientra in nessuna finestra di corrispondenza, viene elencato come componente incognito.

## Tipi di identificazione dei picchi

Esistono molte tecniche da utilizzare per la determinazione di corrispondenze fra campioni e picchi contenuti nella tavola di calibrazione del software della ChemStation.

#### Tempo di ritenzione/migrazione assoluto

Il tempo di ritenzione migrazione del picco di campione viene paragonato al tempo di ritenzione/migrazione atteso, specificato per ogni componente nella tavola di calibrazione.

#### Tempo di ritenzione/migrazione corretto

I tempi di ritenzione/migrazione attesi per i picchi di componenti, vengono corretti usando i tempi di ritenzione/migrazione reali di uno o più picchi di riferimento ed il processo di corrispondenza viene effettuato usando questi tempi corretti (relativi) di ritenzione/migrazione. Il picco o i picchi di riferimento devono essere specificati nella tavola di calibrazione.

### Qualificatori

Oltre all'identificazione dei picchi tramite tempo di ritenzione/migrazione, si possono usare i qualificatori per ottenere un risultato più preciso. Se nella finestra del tempo di ritenzione/migrazione si trovano più picchi allora i qualificatori devono essere usati per identificare il composto corretto.

## Limiti di quantità

Le quantità definite nella finestra di dialogo Compound Details (Dettagli composto) vengono usati per qualificare l'identificazione dei picchi. Se la quantità di composto identificato rientra nei limiti, il rapporto conterrà l'identificazione del picco. Tempo di ritenzione/migrazione assoluto

### Tempo di ritenzione/migrazione assoluto

Nel processo di corrispondenza dei picchi viene usata una finestra per i tempi di ritenzione/migrazione. Questa finestra è centrata sul tempo di ritenzione/migrazione per ciascun picco atteso. Ciascun picco di campione che rientra nella finestra può essere potenzialmente usato per identificare il componente.

La Figure 30, pagina 138 mostra una finestra dei tempi di ritenzione/migrazione per il picco 2 che si trova fra 1,809 e 2,631 minuti, dove il tempo di ritenzione/migrazione atteso è di 2,22 minuti. Per il picco 2 esistono due possibilità: a 1,85 minuti e a 2,33 minuti. Se il picco atteso non è un picco di riferimento, viene scelto il picco più prossimo al tempo di ritenzione/migrazione atteso di 2,22 minuti.

Se il picco atteso è un riferimento temporale o uno standard interno, viene scelto il picco più grande della finestra.

In entrambi i casi la ChemStation sceglie il picco a 2,33 minuti. Se i due picchi sono delle stesse dimensioni, viene scelto il picco più prossimo al centro della finestra.





I picchi possono essere identificati tramite tre tipi di finestre:

• La finestra dei picchi di riferimento che si applica solo ai picchi di riferimento.

- La finestra dei picchi che non costituiscono riferimento, che si applica a tutti gli altri picchi calibrati.
- Valori specifici per componenti singoli stabiliti nella finestra di dialogo **Compound Details**.

I valori predefiniti per queste finestre vengono impostati nella finestra di dialogo Impostazioni di calibrazione. L'ampiezza ad entrambi i lati del tempo di ritenzione/migrazione, che definisce la finestra di corrispondenza del picco, è la somma della finestra assoluta e di quella percentuale.

Una finestra del 5% significa che il picco deve avere un tempo di ritenzione/migrazione compreso tra meno del 2,5% e più del 2,5% rispetto al tempo di ritenzione/migrazione calibrato per il picco. Ad esempio un picco con un tempo di ritenzione/migrazione di 2,00 durante la calibrazione, dovrà essere visualizzato da 1,95 a 2,05 minuti nelle analisi successive.

Ad esempio una finestra assoluta di 0,20 minuti ed una relativa del 10% dà una finestra per il tempo di ritenzione/migrazione compresa fra 1,80 e 2,20 minuti.

1,80 min = 2,00 min - 0,10 min (0,20 min / 2) - 0,10 min (10 % di 2,00 min).

2,20 min = 200 min + 0,10 min (0,20 min / 2) + 0,10 min (10% di 2,00 min).

Tempi di ritenzione/migrazione corretti

### Tempi di ritenzione/migrazione corretti

La corrispondenza dei picchi con tempi di ritenzione/migrazione assoluti può essere semplice ma non sempre affidabile. I tempi possono variare a causa di piccoli cambiamenti di condizioni o di tecnica. Si possono ottenere picchi fuori dalla finestra di corrispondenza, quindi non identificati.

Una tecnica per controllare le inevitabili fluttuazioni che avvengono nei tempi di ritenzione/migrazione assoluti, consiste nell'esprimere i tempi di ritenzione/migrazione di uno o più picchi di riferimento.

I picchi di riferimento vengono identificati nella tavola di calibrazione come elemento della colonna di riferimento per quel picco. La tecnica di corrispondenza del picco relativo usa il picco o i picchi di riferimento per modificare la collocazione delle finestre di corrispondenza per compensare gli spostamenti dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi campione.

Se nessun picco di riferimento è stato definito nel metodo o la ChemStation non è in grado di identificare almeno un picco di riferimento durante l'analisi il software userà tempi di ritenzione/migrazione assoluti per l'identificazione.

#### Picchi di riferimento singoli

Si crea una finestra del tempo di ritenzione/migrazione del picco di riferimento intorno al suo tempo di ritenzione/migrazione. Il picco maggiore che rientra in essa è il picco di riferimento. I tempi di ritenzione/migrazione attesi di tutti i picchi della tavola vengono corretti secondo il tempo di ritenzione/migrazione atteso e il tempo reale del picco di riferimento.

#### Picchi di riferimento multipli

La correzione di tempi di ritenzione/migrazione con un solo picco di riferimento si basa sul presupposto che la deviazione dei tempi di ritenzione/migrazione reali da quelli attesi, cambi in modo uniforme e lineare con il progredire dell'analisi. Spesso durante un'analisi molto lunga i tempi di ritenzione/migrazione cambiano in modo non uniforme. In questi casi si ottengono risultati migliori usando picchi di riferimento multipli distanziati ad intervalli lungo l'analisi. Ciò suddivide il segnale in zone separate. All'interno di ognuna si suppone che la deviazione fra il tempo di ritenzione/migrazione cambi in modo lineare, ma la percentuale di variazione viene determinata in modo separato per ogni zona.

#### NOTA

L'algoritmo di correzione del tempo può non funzionare se i tempi di ritenzione dei picchi di riferimento multipli sono troppo vicini l'uno all'altro e non sono distribuiti per tutto il tempo di analisi.

## Qualificatori dei picchi

Un componente può essere identificato tramite più segnali. Sebbene sia applicabile a tutte le forme di cromatografia che usano molti rivelatori o rivelatori capaci di produrre segnali multipli, la rivelazione multisegnale viene usata più comunemente in cromatografia liquida con l'uso di rivelatori a lunghezza d'onda multipla o a serie di diodi. Questi rivelatori sono normalmente impostati in modo che la lunghezza d'onda più prossima all'area di assorbanza maggiore venga usata per definire il picco principale sulla tavola di calibrazione. Nella Figure 31, pagina 142 è Lambda<sub>1</sub>.

Le altre due lunghezze d'onda acquisite come segnali possono essere usate come qualificatori dei picchi. Nella figura sono Lambda $_2$  e Lambda $_3$ .



Figura 31 Qualificatori dei picchi

I picchi di un composto hanno un rapporto di risposta costante per le diverse lunghezze d'onda.

La risposta del picco qualificatore è una percentuale della risposta del picco principale. I limiti che determinano l'intervallo accettabile per la risposta attesa possono essere impostati nella tavola di calibrazione quando si seleziona l'opzione Dettagli identificazione. Se il rapporto fra il picco qualificatore principale Lambda<sub>1</sub> ed il picco qualificatore, ad esempio Lambda<sub>3</sub>, si trova fra i limiti consentiti allora l'identità del composto può essere confermata.

#### Correlazione del segnale

Correlare il segnale significa assegnare due picchi misurati in diversi segnali del rivelatore entro una finestra di tempo definita allo stesso composto. La finestra di correlazione del segnale può essere controllata tramite il parametro **SignalCorrWin** nella tavola **QuantParm** del registro **\_DaMethod**. La correlazione del segnale viene disattivata impostando la relativa finestra a 0,0 minuti (per ulteriori informazioni, consultare il manuale *Macro Programming Guide*). Quando la funzione di correlazione del segnale è disabilitata, i picchi che eluiscono con lo stesso tempo di ritenzione/migrazione su segnali diversi del rivelatore, vengono considerati come composti diversi.

La finestra di correlazione del segnale predefinita per dati LC, CE, CE/MS e LC/MS è di 0,03 minuti e 0,0 minuti per dati GC.

### Verifica del qualificatore

Se la funzione di correlazione del segnale è abilitata, per impostazione predefinita la verifica del qualificatore è attiva per tutti i tipi di file di dati. Può essere comunque disabilitata impostando il segno **UseQualifiers** nella tavola **Quantification Parameters** relativa al metodo (per ulteriori informazioni, consultare la guida Macro Programming Guide). La verifica del qualificatore viene disabilitata quando la correlazione del segnale viene disattivata.

### Calcolo del rapporto del qualificatore

Quando si abilita la verifica dei qualificatori per un composto, il rapporto fra le dimensioni del qualificatore e quelle del picco principale viene verificato rispetto ai limiti calibrati. La dimensione può essere l'altezza o l'area a seconda dell'impostazione della base di calcolo specificata in Specifica rapporto. I picchi qualificatori possono essere calibrati nello stesso modo dei composti target. In altre parole, non è necessario specificare il rapporto qualificatore atteso. Il rapporto del qualificatore atteso viene calcolato automaticamente:

entrambi misurati al tempo di ritenzione del composto.

Il parametro QualTolerance definisce l'intervallo accettabile per il rapporto del qualificatore, ad esempio ±20%.

La tolleranza può essere impostata nell'interfaccia utente della tavola di calibrazione tramite l'opzione Dettagli identificazione ed è una percentuale assoluta.

Per le calibrazioni multilivello la ChemStation calcola una tolleranza minima per il qualificatore basandosi su rapporti del qualificatore misurati per ciascun livello di calibrazione. La tolleranza minima per il qualificatore viene calcolata utilizzando la seguente equazione:

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

Dove  $q_i$  è il rapporto del qualificatore misurato al livello i.
# Il procedimento di identificazione

Nel tentativo di identificare i picchi, il software effettua tre passaggi attraverso i dati di integrazione.

### Identificazione dei picchi di riferimento

Il primo passaggio identifica i picchi di riferimento temporale. Il software ricerca i tempi di ritenzione/migrazione da un'analisi per effettuare corrispondenze all'interno delle finestre di ritenzione/migrazione dei picchi di riferimento della tavola di calibrazione. Un picco dell'analisi viene identificato come picco di riferimento nella tavola di calibrazione se il tempo di ritenzione/migrazione del picco dell'analisi rientra nei limiti della finestra costruita per il picco della tavola di calibrazione.

Se in una finestra si è trovato più di un picco, quello con l'area o l'altezza maggiore seguita dalla corrispondenza di un qualificatore di segnale positivo, se impostato, viene scelto come picco di riferimento.

Dopo ogni volta che si è trovato il picco di riferimento, la differenza fra il suo tempo di ritenzione/migrazione e quello dato dalla tavola di calibrazione viene usato per sistemare i tempi di migrazione/ritenzione attesi per tutti i picchi della tavola .

### Identificazione dei picchi ISTD

Il secondo passaggio identifica qualsiasi picco definito come standard interno. Se non sono ancora stati identificati come picchi ISTD, possono essere identificati come picchi di riferimento temporale. I picchi ISTD sono identificati da finestre del tempo di ritenzione/migrazione e picchi qualificatori. Se è stato trovato più di un picco nella stessa finestra ISTD, si sceglie quello maggiore.

# Come trovare i rimanenti picchi calibrati

Il terzo passaggio identifica tutti i picchi che rimangono elencati sulla tavola di calibrazione. Per i picchi che non sono riferimenti contenuti nella tavola di calibrazione vengono trovate corrispondenze con i rimanenti picchi dell'analisi usando le proprie finestre RT.

Ogni picco di questo tipo calibrato ha il proprio tempo di ritenzione/migrazione all'interno della tavola. Quest'ultimo viene sistemato durante una particolare analisi basandosi su una preidentificazione dei picchi di riferimento temporale. La finestra del tempo di ritenzione/migrazione del picco calibrato viene regolata basandosi sul tempo di ritenzione/migrazione corretto del picco calibrato.

Se si trova più di un picco nella stessa finestra, viene scelto il picco con il tempo di ritenzione/migrazione più vicino a quello atteso e rispondente alle specifiche del qualificatore opzionale.

## Classificazione di picchi non identificati

Se rimangono picchi non identificati, sono classificati come sconosciuti. La ChemStation cerca di raggruppare i picchi sconosciuti che appartengono allo stesso composto. Se un picco è stato rivelato in più segnali, i picchi con lo stesso tempo di ritenzione/migrazione di ogni segnale sono raggruppati sotto lo stesso composto.

I picchi incogniti vengono segnalati solo se è stata effettuata l'apposita selezione nella finestra di dialogo Calibration Settings (Impostazioni di calibrazione).



# Calibrazione

7

Definizione dei termini 148 La tavola di calibrazione 149 Curva di calibrazione 150 Campioni incogniti 152 Tipi di calibrazione 153 Calibrazione a livello singolo 153 Calibrazione multilivello 154 Intervalli di calibrazione 156 Corrispondenze delle curve di calibrazione 156 Trattamento dell'origine 156 Calibrazione di gruppo 160 Somma dei picchi 161 Ricalibrazione 162 Che cos'è la ricalibrazione? 162 Perché ricalibrare? 162 Ricalibrazione manuale 162 Ricalibrazioni con somma dei picchi 163 Opzioni di ricalibrazione 163 Modalità di ricalibrazione 164 Ricalibrazione di picchi non identificati 164

Questo capitolo spiega come calibrare la ChemStation.



7 Calibrazione Definizione dei termini

# Definizione dei termini

Calibrazione	La calibrazione è il procedimento di determinazione di fattori di risposta uti- lizzati per calcolare le concentrazioni assolute di componente iniettando cam- pioni di calibrazione appositamente preparati. La tavola di calibrazione viene anche utilizzata per l'identificazione. Vedere "Identificazione dei picchi", pagina 133.
Composto	Un composto chimico può comprendere diversi picchi, in un una calibrazione multisegnale, di solito uno per segnale. In una calibrazione ad un solo segnale il composto si riferisce ad un picco.
Livello di calibra- zione	Un livello di calibrazione comprende i punti di calibrazione per una concentra- zione di campione di calibrazione. In una calibrazione multisegnale, i punti di calibrazione possono essere distribuiti su diversi segnali.
Punto di calibra- zione	Un punto di calibrazione si riferisce ad un rapporto quantità/risposta per un picco sulla curva di calibrazione.
Campione di cali- brazione	Un campione di calibrazione, chiamato anche standard di calibrazione o miscela standard, è un campione contenente una quantità nota del composto da quantificare. Nel software il campione viene chiamato anche iniezione dal vial relativo al campione di calibrazione.
	I campioni di calibrazione possono essere acquistati da fornitori di prodotti chimici o preparati direttamente utilizzando una quantità accuratamente misurata di composto puro. La quantità di composto nel campione di calibra- zione viene espressa in genere come concentrazione, di solito in unità ng/µl.

# La tavola di calibrazione

La tavola di calibrazione specifica la conversione in unità scelte di aree o altezze di picchi secondo il procedimento di calcolo selezionato. La tavola di calibrazione contiene una lista di tempi di ritenzione/migrazione ottenuta da un'analisi di calibrazione. I tempi di ritenzione/migrazione vengono paragonati ai tempi di ritenzione/migrazione di picchi relativi all'analisi di un campione. Dove si verifica una corrispondenza si suppone che il picco del campione rappresenti lo stesso composto presente nella tavola di calibrazione, consultare il "Identificazione dei picchi", pagina 133. Durante un'analisi o mentre viene prodotto un report di stampa, le quantità inserite per ogni picco vengono usate per calcolare le quantità per il procedimento di calcolo selezionato per il report. Il tipo e la quantità di informazioni richieste per creare una tavola di calibrazione variano con il tipo di procedimento di calcolo desiderato.

Per creare una tavola di calibrazione sono necessarie le informazioni seguenti.

- Il tempo di ritenzione/migrazione per ogni picco componente la miscela di calibrazione.
- La quantità di ogni composto usato nel preparare la miscela di calibrazione espressa in unità significative.

7 Calibrazione Curva di calibrazione

# Curva di calibrazione

Una curva di calibrazione è la rappresentazione grafica dei dati relativi alla quantità ed alla risposta per un composto ottenuto per uno o più campioni di calibrazione.

Di solito viene iniettata un'aliquota del campione di calibrazione, si ottiene un segnale e viene determinata la risposta calcolando l'area o l'altezza del picco, come illustrato dalla Figure 32, pagina 150.





Il *coefficiente di correlazione* viene visualizzato insieme al grafico della curva di calibrazione, che corrisponde alla radice quadrata del coefficiente di regressione e fornisce la misura della correlazione della curva di calibrazione ed i dati misurati. Il valore del coefficiente è espresso con tre cifre decimali, nella scala:

da 0,000 a 1,000

Dove:

0,000 = Nessuna correlazione

1,000 = Correlazione perfetta

Per ciascun livello di calibrazione viene visualizzato il *residuo relativo*. Si calcola usando la formula che segue:

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

Dove:

relRES= Residuo relativo in percentuale

La risposta calcolata rappresenta il punto sulla curva di calibrazione.

La *deviazione standard del residuo*, che viene stampata su alcuni rapporti e viene calcolata utilizzando la formula che segue quando si seleziona Stampa tavola calibrazione e curve:

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

Dove:

ResSTD = Deviazione standard del residuo

Respcalibratedi = Risposta calibrata per punto i

Respcalibratedi = Risposta calcolata per punto i

N= Numero di punti di calibrazione

# Campioni incogniti

È un campione che contiene una quantità sconosciuta di composto da quantificare.

Per stabilire quanto di quel composto è contenuto nel campione incognito è necessario:

- Creare una curva di calibrazione per il composto
- Iniettare un'aliquota di campione incognito ed effettuare l'analisi esattamente allo stesso modo usato per il campione di calibrazione
- Determinare, a partire dal segnale, la risposta, e quale sia l'area o l'altezza del picco dovuta alla quantità sconosciuta di composto
- Usare la curva di calibrazione per calcolare la quantità di composto nel campione incognito

Ad esempio se l'area del picco nel campione incognito è 500, è possibile determinare che la quantità nell'incognito è di 5 ng/ $\mu$ l, utilizzando la curva di calibrazione illustrata nella Figure 33, pagina 152.



Figura 33 Segnale di un campione incognito e curva di calibrazione

# Tipi di calibrazione

La ChemStation offre due tipi di calibrazione, a livello singolo e multiplo.

## Calibrazione a livello singolo

La curva di calibrazione illustrata nella Figure 34, pagina 153 contiene un punto, che corrisponde a un livello. Per la curva di calibrazione a livello singolo, la risposta del rivelatore si suppone lineare, nell'intervallo di lavoro delle concentrazioni per il campione di interesse. Il fattore di risposta per il picco di un determinato componente è dato dall'inverso dell'inclinazione della curva di calibrazione passante attraverso il punto e per l'origine. Uno svantaggio della calibrazione a livello singolo è dato dal fatto che la risposta del rivelatore alla concentrazione del campione si suppone lineare e passa per l'origine in un diagramma di concentrazione contro risposta. Ciò non è sempre vero e può portare a risultati non accurati.



Figura 34 Curva di calibrazione a livello singolo

Per ottenere risultati quantitativi accurati, la curva di calibrazione deve avere almeno due livelli. Questi livelli devono comprendere le quantità che ci si aspetta di trovare nei campioni incogniti.

#### 7 Calibrazione

Tipi di calibrazione



Figura 35 Curva di calibrazione a due livelli

Ad esempio se si desidera quantificare un composto e si suppone che i campioni incogniti possano contenere da 1 a 10 ng/ $\mu$ l, allora la curva di calibrazione deve comprendere almeno due livelli, come mostra la Figure 35, pagina 154.

### Limiti di quantità

La ChemStation permette di definire scale quantitative valide per le quantità assolute di ciascun componente.

## **Calibrazione multilivello**

La calibrazione multilivello si usa quando non è abbastanza accurato supporre che un componente mostri una risposta lineare o confermare la linearità della scala di calibrazione. Ciascun livello di calibrazione corrisponde ad un campione con una particolare concentrazione di componenti. I campioni devono essere preparati in modo che la concentrazione di ciascun componente vari lungo la scala di concentrazioni attese nei campioni sconosciuti. In questo modo si permette una modifica della risposta del rivelatore in funzione della concentrazione e si calcolano i nuovi fattori di risposta. Questa curva di calibrazione ha tre livelli e mostra una corrispondenza lineare passante per l'origine. Questo metodo di corrispondenza è simile alla calibrazione a punto singolo. La risposta del rivelatore alla concentrazione si suppone lineare. La differenza fra i due tipi di calibrazione è tale che con corrispondenza lineare, l'inclinazione della retta della risposta del rivelatore può essere determinata con la migliore corrispondenza passante per un certo numero di punti, uno per ciascun livello.



Figura 36 Curva di calibrazione multilivello con tre livelli

La tavola di calibrazione corrispondente, cioè la tabulazione delle informazioni utilizzate per produrre la curva, può risultare simile a quella riportata nella Table 14, pagina 155.

Livello	Quantità (ng∕µl)	Risposta (conteggi area)
1	1	100
2	5	500
3	10	1000

 Tabella 14
 Tavola di calibrazione

In questo esempio i campioni di calibrazione usati per produrre i tre livelli sono stati identificati come 1, 2 e 3.

## Intervalli di calibrazione

Ogni calibrazione multilivello è valida per l'intervallo di concentrazioni usate per i campioni di calibrazione. L'estrapolazione di una curva di calibrazione, specialmente se non lineare, è nel migliore dei casi solo un'approssimazione. La scala di calibrazione valida per ogni composto può essere definita nella finestra di dialogo Compound Details (Dettagli composto). Ogni valore inserito per quel composto può essere espresso come limite superiore o inferiore. Se questi limiti vengono superati il rapporto di stampa viene annotato.

## Corrispondenze delle curve di calibrazione

Sono disponibili vari tipi di calcolo corrispondenti alle curve che possono essere usate per calibrazioni multilivello.

- Spezzata
- Lineare
- Logaritmica
- Potenza
- Esponenziale
- Quadratico
- Cubico
- Di media (Risposta/Quantità)

### **Corrispondenza non lineare**

In alcuni casi, la risposta del rivelatore ai cambiamenti di concentrazione del campione non è lineare. Per questi tipi di analisi un metodo di calibrazione a regressione lineare non è adatto e si devono usare calcoli di calibrazione a livello multiplo.

# Trattamento dell'origine

Esistono quattro modi di trattare l'origine tracciando una curva di risposta:

• Ignorarla

- Comprenderla
- Forzarne l'inserimento
- Collegarla

Per forzare l'origine in modo che venga inserita nella curva di calibrazione, è necesario riprodurre i punti di calibrazione ottenuti intorno all'origine, facendoli passare dal primo al terzo quadrante. L'uso di tali i punti per il calcolo della regressione assicura che la curva di calibrazione che ne risulta passi attraverso l'origine. Ciò è illustrato anche nella Figure 37, pagina 157.



Figura 37 Forzatura dell'origine perché venga inclusa

Per ulteriori informazioni sulle corrispondenze delle curve di calibrazione e sul trattamento dell'origine, consultare la *Guida in linea*.

#### Peso dei punti di calibrazione

Quando si imposta la curva di calibrazione predefinita, è possibile specificare il peso relativo (o importanza) dei vari punti di calibrazione usati per generare la curva.

### 7 Calibrazione

Tipi di calibrazione

#### Possono essere scelte le seguenti opzioni:

Peso	Descrizione
Uguale	Tutti i punti di calibrazione hanno peso uguale nella curva.
Lineare (Amnt)	Un punto di calibrazione con quantità x ha il peso 1/x normalizzato alla quantità inferiore in modo che il fattore di peso più elevato sia 1. La normalizzazione viene effettuata moltiplicando il peso per la quantità inferiore. Ad esempio il peso di un punto di calibrazione con quantità x è (1/x) × a dove a è la quantità minore del composto calibrato, preparata negli standard di calibrazione. Se l'origine viene compresa, le viene assegnata la media dei pesi degli altri punti di calibrazione.
Lineare (Resp)	Per un punto di calibrazione con risposta y si normalizza il peso 1/y alla risposta inferiore in modo che il fattore di peso maggiore sia 1. La normalizzazione si effettua moltiplicando il peso per la risposta inferiore. Ad esempio il peso di un punto di calibrazione con quantità y è (1/y) × b dove b è la risposta corrispondente alla quantità inferiore del composto calibrato preparato negli standard di calibrazione. Se l'origine viene compresa, le viene assegnata la media dei pesi degli altri punti di calibrazione.
Quadratico (Amnt)	Un punto di calibrazione con quantità x ha il peso 1/x <sup>2</sup> normalizzato alla quantità inferiore in modo che il fattore di peso più elevato sia 1. La normalizzazione viene effettuata moltiplicando il peso per la quantità inferiore. Ad esempio il peso di un punto di calibrazione con quantità x è (1/x <sup>2</sup> ) × a <sup>2</sup> dove a è la quantità minore del composto calibrato, preparata negli standard di calibrazione.
Quadratico (Resp)	Per un punto di calibrazione con risposta y si normalizza il peso 1/y <sup>2</sup> alla risposta inferiore in modo che il fattore di peso maggiore sia 1. La normalizzazione si effettua moltiplicando il peso per la risposta inferiore. Ad esempio il peso di un punto di calibrazione con quantità y è (1/y <sup>2</sup> ) × b <sup>2</sup> dove b è la risposta corrispondente alla quantità inferiore del composto calibrato preparato negli standard di calibrazione.
Numero di calibrazioni	Un punto di calibrazione viene pesato secondo il numero di ricalibrazioni del punto. Non viene effettuato alcun tipo di normalizzazione.

Pesi di punti di calibrazione quadratici, ad esempio, possono essere utilizzati per regolare punti di calibrazione sparsi. Ciò assicura che i punti di calibrazione più vicini all'origine, che possono essere misurati in maniera più accurata, ottengano un peso maggiore dei punti di calibrazione più lontani dall'origine, che possono essere sparsi.

La decisione di quale tipo di peso utilizzare per i punti di calibrazione dovrebbe essere basata sulle esigenze del metodo.

# Calibrazione di gruppo

La calibrazione di gruppo può essere applicata a composti le cui concentrazioni individuali non sono note mentre la somma delle concentrazioni del gruppo è nota. Un esempio 1 costituito dagli isomeri. Vengono calibrati composti completi. Si usano le formule che seguono:

Calibrazione

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

Dove:

 $\mathit{ConcAB}$  è la concentrazione del gruppo di composti comprendente il composto A e B

 $Response_A$  è l'area (o l'altezza) del composto A

 $R\!F_{\rm A}$  è il fattore di risposta

Per i composti all'interno di un gruppo supponiamo fattori di risposta uguali:

 $RF_A = RF_B$ 

Quindi la concentrazione di un composto entro un gruppo viene calcolata come segue:

$$Conc_{A} = \frac{Conc_{AB} \cdot Resp_{A}}{Resp_{A} + Resp_{B}}$$

# Somma dei picchi

Per alcune applicazioni nelle industrie farmaceutiche e petrolchimiche viene fornita una tavola di somma dei picchi, la somma può così essere effettuata in maniera più efficiente eseguendo le seguenti operazioni.

- Somma dell'area di picchi che rientrano entro un intervallo specificato dall'utente.
- Somma delle aree di un intervallo di picchi e calcoli effettuati con singolo moltiplicatore.
- Somma delle aree di tutti i picchi con lo stesso nome.

La tavola di somma dei picchi è simile ma distinta dalla tavola di calibrazione standard. Come la tavola di calibrazione è associata al metodo corrente.

NOTA

È necessario creare una tavola di calibrazione per un'analisi prima di poter creare una tavola di somma dei picchi.

# **Ricalibrazione**

## Che cos'è la ricalibrazione?

La ricalibrazione è il processo utilizzato quando si desidera aggiornare un livello sulla curva di calibrazione. Quando si ricalibra, si analizza un altro campione che contiene gli stessi composti di calibrazione dell'originale e, ciò che è più importante, nella stessa quantità. Quando si analizza un campione di calibrazione si ottengono fattori di risposta aggiornati e tempi di ritenzione/migrazione. È anche possibile scegliere i fattori di risposta medi su di un certo numero di calibrazioni, in modo che i fattori di risposta possano essere valutati uniformemente.

## Perché ricalibrare?

La maggior parte delle calibrazioni hanno vita breve a causa delle continue modifiche in cromatografia. La ricalibrazione è necessaria per mantenere l'accuratezza dell'analisi. Supponiamo di aver creato una tavola di calibrazione per il composto caffeina, che sarà usata ogni volta che viene richiesta una quantificazione relativa ad un campione contenente caffeina. Ad un certo punto bisognerà sostituire la colonna/il capillare. Sebbene questi siano sostituiti con altri esattamente dello stesso tipo, non si comporteranno esattamente allo stesso modo dei precedenti usati al momento della creazione della tavola di calibrazione per la caffeina. Quindi, per assicurare che le analisi siano significative, bisogna ricalibrare i livelli della tavola di calibrazione con la nuova colonna o capillare, per analizzare poi i campioni che contengono quantità sconosciute di caffeina. Così facendo si è certi di quantificare campioni analizzati nelle stesse condizioni.

## **Ricalibrazione manuale**

È possibile inserire informazioni sulla calibrazione dei picchi manualmente e normalizzare la tavola di calibrazione utilizzando il tasto di opzione Manual Setup (Impostazione manuale) nella finestra di dialogo New Calibration Table (Nuova tavola di calibrazione). Di solito viene prodotto un nuovo metodo di calibrazione analizzando una miscela standard di calibrazione, creando una tavola di calibrazione ed inserendo le quantità di tutti i picchi calibrati per ottenere fattori di risposta. Per alcune applicazioni questo tipo di approccio non è indicato, ad esempio, per l'industria petrolchimica dove si analizzano per anni gli stessi composti ed i fattori di risposta di ciascuno di essi e dei vari rivelatori sono disponibili con facilità.

La tavola di calibrazione viene creata manualmente inserendo i picchi ed i fattori di risposta nella tavola di calibrazione, ricalibrando il metodo utilizzando uno standard che contenga almeno un picco di risposta di riferimento e selezionando un aggiornamento Delta%.

### Ricalibrazioni con somma dei picchi

Quando si effettua una ricalibrazione, gli intervalli dei tempi di ritenzione/migrazione nella tavola Peaksum relativa al metodo verranno aggiornati prima di effettuare la ricalibrazione vera e propria. Le ricalibrazioni con somma dei picchi vengono effettuate in questo modo per assicurare che il delta venga incorporato ai calcoli di tempo.

## Opzioni di ricalibrazione

Esistono diversi modi di aggiornare le risposte nella tavola di calibrazione con i nuovi dati a disposizione.

### Media

La media di tutte le calibrazioni viene calcolata utilizzando la seguente formula

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

### Media variabile

Viene calcolata una media pesata di tutte le calibrazioni. Il peso aggiornato viene impostato nella finestra di dialogo Recalibration Settings (Impostazioni di ricalibrazione).

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

#### Sostituzione

I nuovi valori di risposta sostituiscono i vecchi.

## Modalità di ricalibrazione

Dal software della ChemStation la ricalibrazione può essere effettuata in due modi. È possibile effettuare la calibrazione in modo interattivo oppure automatico durante una sequenza di analisi automatizzata. La ricalibrazione interattiva avviene quando l'utente interviene direttamente nel processo con l'aiuto del software dopo aver iniettato uno o più campioni di calibrazione. La ricalibrazione con utilizzo di una sequenza avviene al momento specificato, ma l'operazione viene effettuata direttamente dal software. Per ulteriori informazioni, consultare la sezione "Ricalibrazione automatica", pagina 188.

Per informazioni sulle modalità di ricalibrazione da software, consultare la parte Come... della Guida in linea.

### Ricalibrazione di picchi non identificati

Esistono tre modi di ricalibrare i picchi non identificati.

#### Nessuna ricalibrazione

Se un picco della tavola di calibrazione non può essere identificato nei risultati di integrazione, la calibrazione non è considerata valida. Se questo avviene in una sequenza, anche la sequenza viene interrotta.

### **Ricalibrazione parziale**

Questa funzione permette la ricalibrazione dei soli picchi identificati. Se alcuni picchi non si trovano, la calibrazione non viene interrotta ma il rapporto di stampa riporta la mancanza dei picchi.

### Ricalibrazione di tutti i tempi di ritenzione/migrazione

Questa funzione permette la ricalibrazione di tutti i tempi di ritenzione/migrazione di tutti i picchi identificati e non. Questa operazione viene effettuata utilizzando i tempi di ritenzione/migrazione dei picchi identificati. Non vi è aggiornamento di fattori di risposta per i picchi non identificati.



### **Descrizione della ChemStation Agilent**



**Descrizione della ChemStation Agilent** 

# Automazione

8

Che cos'è l'automazione? 169 Che cos'è una seguenza o un modello di seguenza? 170 Preferenze - Scheda Sequenza 171 Parametri di sequenza 173 Tavola di seguenza 174 Creazione di sequenze(sequenze e modelli di sequenza) 175 Utilizzo di Sequence Table Editor 175 Come usare il tasto Insert Vial Range (Inserisci serie di vial)... 175 Come usare il tasto Append Line (Aggiungi linea) 175 Utilizzo dei pulsanti dei campi personalizzati 176 Utilizzo delle seguenze (seguenze e modelli di seguenza) 177 Campioni prioritari 177 Sequenze con campioni di controllo 177 Come bloccare una seguenza 177 178 Come interrompere una seguenza Come arrestare temporaneamente una seguenza 178 Esecuzione di una sequenza parziale 178 File di registrazione della sequenza 180 Cosa succede guando si esegue una seguenza? 181 Struttura del file di dati della sequenza (creazione di cartelle esclusive attiva) 183 Attribuzione del nome ai file di dati in una seguenza 184 Attribuzione automatica del nome ai file durante una seguenza 184 Come inserire nomi di file manualmente 185 Funzionamento post-sequenza 186 Not Ready Timeout (Timeout non pronto) (solo cromatografia liquida ed elettroforesi capillare) 186



### 8 Automazione

**Ricalibrazione** 

Wait Time (Tempo di attesa) (solo cromatografia liquida ed elettroforesi capillare) 187 Ricalibrazione automatica 188 Come specificare le ricalibrazioni 189 Parametri di ricalibrazione nella tavola di sequenza 189 Tipi di seguenze 192 Sequenze di calibrazione esplicite 193 Sequenze di calibrazione cicliche a livello singolo 194 Sequenze di calibrazione cicliche multilivello 195 Ordine di analisi - Metodo A 196 Ordine di analisi - Metodo B 197 Calibrazioni cicliche ed esplicite insieme 199 Esempio 199 Ordine di analisi del metodo SimpReg 200 Sequenze di ricalibrazione ciclica con la tecnica del bracketing 201 Esempio 201 Funzionamento della seguenza con bracketing 202 Esempio 203 Sequenze di ricalibrazione ciclica con più vial contenenti la stessa diluizione di uno standard 205 Sequenza di ricalibrazione ciclica con vial di calibrazione usati "in successione" 205 Ricalibrazioni cicliche con uso di un vial diverso per ogni calibrazione 207 Sequenza in bracketing che utilizza vial diversi per l'apertura e la chiusura dei bracket 207

Questo capitolo descrive i concetti legati all'automazione. In particolare, spiega come usare le sequenze con la ChemStation, cosa accade quando si esegue una sequenza e come personalizzare le sequenze.

# Che cos'è l'automazione?

L'automazione è l'analisi non sorvegliata di più iniezioni.

La parte di software della ChemStation che riguarda le sequenza permette di automatizzare l'acquisizione e la valutazione dei dati oltre che la stesura di rapporti di stampa.

#### 8 Automazione

Che cos'è una sequenza o un modello di sequenza?

# Che cos'è una sequenza o un modello di sequenza?

Una sequenza è una serie di istruzioni che rende automatica l'analisi di campioni.

Una sequenza può essere utilizzata per iniettare automaticamente i campioni, per acquisire e analizzare dati secondo il metodo definito per il campione specificato. Ciascun vial di campione in una sequenza può essere analizzato con un diverso metodo analitico che utilizza diverse impostazioni cromatografiche o elettroferografiche e diversi parametri di valutazione.

ChemStation introduce due modalità di archiviazione dei dati per consentire la scelta del modello di archiviazione corrispondente al proprio flusso di lavoro. Tali modalità influiscono sull'uso della sequenza:

- Unique Folder Creation ON (Creazione cartelle esclusive attivata)
- Unique Folder Creation OFF (Creazione cartelle esclusive disattivata)

La funzione di creazione di cartelle esclusive per la congruenza dei dati campione utilizza le sequenze come "modelli di sequenza" da utilizzare per eseguire più volte l'acquisizione; tuttavia, tali modelli non vengono utilizzati per la rielaborazione nel controllo del metodo e delle analisi. Quando viene eseguito il modello di sequenza, viene creato un contenitore di dati della sequenza che contiene tutti i file relativi. Se il modello di sequenza viene riutilizzato, viene creato ogni volta un nuovo contenitore dati della sequenza

La disattivazione della funzione di creazione di cartelle esclusive comporta l'archiviazione di tutti i dati in una directory. I file \*.s di sequenza non vengono utilizzati come modelli di sequenza, pertanto la riesecuzione di una sequenza potrebbe provocare la sovrascrittura dei dati presenti, se l'utente non cambia directory di archiviazione.

Le sequenze e i modelli di sequenza disponibili (\*.s) sono visualizzabili in ChemStation Explorer. Per una navigazione rapida e semplice, è possibile aggiungere alla struttura di selezione di ChemStation Explorer altri percorsi per le sequenze e i modelli di sequenza, utilizzando la scheda Percorsi della finestra di dialogo Preferenze.

# Preferenze - Scheda Sequenza

La scheda Sequenza permette all'utente di scegliere due diversi modelli per la memorizzazione dei dati. Tali modelli definiscono la modalità di archiviazione dei dati della sequenza nella ChemStation.

#### **Creazione cartelle esclusive attiva**

Con questa modalità di archiviazione dei dati, si crea un collegamento solido e permanente tra i dati grezzi e il metodo. Ciascun file di dati, sia che venga acquisito all'interno di una sequenza o come singola analisi, contiene collegamenti ad almeno due metodi: il metodo utilizzato per acquisire i dati e quello utilizzato per l'analisi dei dati.

I dati della sequenza sono archiviati in un contenitore dati della sequenza utilizzando un nome di contenitore della sequenza definito. È possibile specificare le convenzioni di denominazione (Modello del nome) per questi contenitori di sequenza nella scheda Sequenza della finestra di dialogo Preferenze. Se non viene specificato un modello di nome, viene utilizzato un modello di nome di sequenza predefinito. La scheda Sequenza è utilizzata solo per l'acquisizione dei dati ed è pertanto presente solo per i sistemi in linea.

Il modello di nome della sequenza può contenere varie sezioni. Il nome creato dal sistema per il contenitore dati della sequenza dipende dalle sezioni selezionate del modello di nome della sequenza. Tutti i file di dati, i metodi, il registro elettronico delle sequenze, il file sequence\_name.s e il file sequence\_name.b che appartengono a questa particolare sequenza, vengono archiviati nel contenitore dati della sequenza. Il contenitore dati della sequenza viene creato all'avvio della sequenza.

I file della sequenza (.s) sono utilizzati come modelli di sequenza e questo concetto consente di eseguire più volte qualsiasi file sequences.s senza sovrascrivere i dati esistenti e senza modificare i parametri della sequenza. Se nel modello di nome della sequenza non sono utilizzati né caratteri a scalare né l'ora, il sistema introduce automaticamente caratteri a scalare per evitare di sovrascrivere i dati. Per la seconda, la terza e tutte le sequenze successive che utilizzano lo stesso modello di sequenza, al nome del contenitore della sequenza vengono aggiunti caratteri a scalare.

### 8 Automazione

Preferenze - Scheda Sequenza

#### Creazione cartelle esclusive inattiva

In questa modalità di archiviazione dei dati, il nome del metodo è l'unico collegamento esistente tra il file di dati e il metodo utilizzato per l'acquisizione e l'elaborazione. Nessuna copia del metodo viene salvata con la sequenza o il file di dati; se il metodo viene modificato o viene creato un nuovo metodo con tale nome, la sequenza non può essere riprodotta esattamente. I file di dati della sequenza vengono memorizzati in base ai parametri specificati nel gruppo File di dati della finestra di dialogo Parametri sequenza; in questa modalità la funzione di denominazione della sequenza nella scheda Sequenza della finestra di dialogo Preferenze è disattivata. Tale modalità di archiviazione dei dati è identica alle versioni della ChemStation precedenti alla B.02.01 e pertanto non può sfruttare completamente le ultime funzionalità di revisione/rielaborazione dei dati della finestra Analisi dei dati della ChemStation.

#### NOTA

I dati della sequenza acquisiti mediante l'opzione "Creazione cartelle esclusive inattiva devono essere rielaborati utilizzando l'opzione di rielaborazione nella finestra Controllo del metodo e delle analisi.

#### NOTA

Le soluzioni Add-On G2189BA ChemStation OpenLAB e G2181BA ChemStore richiedono la modalità "Creazione cartelle esclusive attiva". Non appena l'Add-On viene installato sulla ChemStation, l'opzione "Creazione cartelle esclusive inattiva" viene disattivata.

# Parametri di sequenza

La finestra di dialogo **Sequence Parameters** contiene informazioni comuni a tutti i vial di campioni di una sequenza. Utilizzare questa finestra di dialogo per effettuare le seguenti operazioni.

- Selezionare la directory dei dati utilizzando la casella combinata **Path** e immettere le informazioni sul nome dell'operatore (viene visualizzato il nome dell'operatore immesso nella finestra di dialogo **access level**) e
- Specificare come deve essere elaborata la sequenza scegliendo una parte specifica dei parametri Metodi ed Esecuzione.

Ad esempio si può scegliere di:

- Eseguire la lista di controllo del periodo di funzionamento.
- Eseguire solo l'acquisizione.
- Eseguire solo la rielaborazione per i dati acquisiti fino alla ChemStation Rev. B.01.03. per i dati acquisiti con l'opzione **Unique Folder Creation OFF**.

#### I dati della sequenza acquisiti con le versioni ChemStation fino a B.01.03 o acquisiti con l'opzione **Unique folder Creation OFF** devono essere rielaborati tramite l'opzione **reprocess** nella finestra **Method and Run Control**.

I dati della sequenza acquisiti con le versioni ChemStation B.02.01 e superiori devono essere rielaborati tramite l'opzione **reprocess** nella tavola **Data Analysis Navigation table**.

Se si sceglie l'opzione **reprocess** si può stabilire se usare i dati relativi al campione definiti al momento della sua analisi originaria oppure attivare la casella di controllo **Use Sequence Table information** per utilizzare dati aggiornati inserendo i dati nuovi nella tabella delle sequenze:

- Specificare cosa accade quando finisce la sequenza utilizzando i parametri di **shutdown**.
- Specificare se deve essere usato il codice a barre nella sequenza e come devono essere trattate le mancate corrispondenze se sul sistema è installato un lettore di codici a barre.

NOTA

8 Automazione Tavola di sequenza

# Tavola di sequenza

La tavola di sequenza determina quali metodi vengono usati per analizzare i vial di campione e l'ordine secondo il quale vengono analizzati. Questa tavola contiene anche informazioni sul campione compreso il nome e i parametri quantitativi.

Per strumenti che supportano campionature doppie (GC) viene visualizzato il gruppo di iniezione. Scegliendo Front o Back si visualizzano le linee della tavola di sequenza e la condizione dell'iniettore in quel momento.

Per una descrizione delle colonne contenute in questa tavola e delle loro modalità di interazione con le informazioni archiviate con il metodo, vedere i riferimenti nella Guida in linea.

# Creazione di sequenze(sequenze e modelli di sequenza)

Usare la tavola di sequenza per precisare i campioni, i metodi ed i vial da analizzare nella sequenza. La tavola elenca ogni campione nell'ordine in cui verrà analizzato e contiene le informazioni necessarie su vial, metodo e calibrazione per ciascun campione.

### Utilizzo di Sequence Table Editor

Se si desidera cambiare la visualizzazione e il contenuto della tavola di sequenza, è possibile aprire Sequence Table Editor facendo clic sul simbolo di elenco nell'angolo in basso a destra di Sequence Table (Tavola di sequenza). Sequence Table Editor si apre e consente di specificare se in Sequence table (Tavola di sequenza) è visualizzata una determinata colonna. Inoltre è possibile definire la larghezza di ogni colonna della tavola di sequenza. In base ai pacchetti software installati, verranno aggiunti altri campi colonna, ad esempio il campo "Target Mass" (Massa target) se è installato un LC/MS o il campo "Study" (Studio) per l'installazione Add-On di ChemStore.

## Come usare il tasto Insert Vial Range (Inserisci serie di vial)...

Se si hanno molti campioni che si servono dello stesso metodo, è possibile inserire i campioni nella Sequence Table (Tavola di sequenza) utilizzando la funzione Insert Vial Range (Inserisci serie di vial). Questa funzione copia il nome del metodo, la serie di vial, il numero di iniezioni per vial e, se richiesto, la quantità di campione, la quantità di standard interno, il moltiplicatore e la diluizione. Il sistema inserisce l'informazione per ogni vial della serie.

### Come usare il tasto Append Line (Aggiungi linea)

Per aggiungere una nuova linea alla fine della tavola di sequenza scegliere il tasto Append Line (Aggiungi linea).

8

### 8 Automazione

Creazione di sequenze(sequenze e modelli di sequenza)

# Utilizzo dei pulsanti dei campi personalizzati

Se nel metodo usato nella tabella di sequenza sono stati impostati campi personalizzati, selezionare il pulsante Campi personalizzati per potere modificare i valori dei campi personalizzati per ciascun campione (campi personalizzati relativi al campione) o per ciascun composto presente nel metodo di un campione (campi personalizzati relativi al composto).

# Utilizzo delle sequenze (sequenze e modelli di sequenza)

È possibile creare ed accedere alle sequenze e ai modelli di sequenza dal menu Sequenza. Le sequenze possono essere create e salvate come i metodi. Quando si salva una sequenza, viene creato un file con estensione .S. Se si desidera modificare la sequenza o usarla ancora, si può accedere alla sequenza usando ad esempio l'opzione Carica sequenza dal menu Sequenza.

### Campioni prioritari

Una sequenza in esecuzione può essere temporaneamente arrestata dopo il completamento del metodo corrente. La sequenza può essere arrestata per consentire l'analisi di un campione prioritario dello stesso metodo o di un altro. La sequenza può quindi essere ripresa e continua con il campione in corso di analisi al momento dell'interruzione.

### Sequenze con campioni di controllo

Nel campo Sample Type (Tipo di campione) della tavola di sequenza è possibile specificare campioni di controllo. Il metodo utilizzato per analizzare il campione di controllo deve contenere una tavola di calibrazione con i limiti per uno dei composti. Se i limiti vengono superati, la sequenza viene arrestata e riportato un messaggio sul registro elettronico. Se si sta utilizzando uno dei rapporti di stampa della ChemStation, anche i limiti del campione di controllo vengono stampati sui rapporti delle analisi. Per informazioni su come definire una sequenza con campioni di controllo, consultare la Guida in linea.

### Come bloccare una sequenza

L'analisi in corso sarà completata prima della fine della sequenza. Una sequenza bloccata non può in nessun caso essere ripresa.

8

Utilizzo delle sequenze (sequenze e modelli di sequenza)

### Come interrompere una sequenza

Questa funzione termina immediatamente una sequenza attiva.

### Come arrestare temporaneamente una sequenza

Durante la pausa di arresto il nome del file della tavola di sequenza e il nome del file di dati non possono essere modificati. Nella tavola si possono modificare le linee di sequenza che non sono ancora state eseguite o cambiare il numero dei vial nella linea in corso di analisi. Si possono aggiungere, togliere e modificare le linee di sequenza per analisi future.

Può essere necessario modificare una sequenza attiva per aggiungere un nuovo gruppo di campioni. Si può modificare la sequenza in modo che i vial siano i prossimi ad essere elaborati, dopo i campioni della linea in analisi.

## Esecuzione di una sequenza parziale

Una tavola di sequenza già impostata può essere eseguita parzialmente scegliendo **Partial Sequence** dal menu **Sequence**. Il sistema visualizza la finestra di dialogo **Partial Sequence** e permette di selezionare dalla tavola campioni singoli e di analizzarli.

Su ogni riga della finestra di dialogo **Partial Sequence** viene riportata una sola analisi. Per ogni analisi vengono riportati il vial, il metodo, il file di dati ed il nome del campione. Inoltre nelle colonne "Seq Tbl" e "Calib:RF:RT" compaiono informazioni codificate sulla tavola di sequenza e sui campioni di calibrazione. Per informazioni sui codici, consultare la Guida in linea.

Tramite il tasto **Print** è possibile ottenere una copia cartacea della sequenza parziale.

La seguente finestra di dialogo **Partial Sequence** compare quando sono in uso il metodo SimpReg e la tabella delle sequenze, mostrati più avanti nella Table 20, pagina 199 e nella Table 21, pagina 200. I campioni 1, 2, 4, 5 e 8 vengono evidenziati per poi essere elaborati.

#### Automazione 8

Utilizzo delle sequenze (sequenze e modelli di sequenza)

5ele	ct the	parts	of the sequence	e to run. (Spac	ebar togg:	les selection)		
Sel	Run	Vial	Method	Data File	Seq Tb	Calib:RF:RT	Sample Name	
	1	1	SIMPREG	C1F03001	F:03:01	1:01:AV:AV	Calibration A	
	2	1	SIMPREG	C1F03002	F:03:02	1:01:AV:AV	Calibration A	
	3	1	SIMPREG	C2F03001	F:03:01	2:02:AV:AV	Calibration A	
	4	2	SIMPREG	002F0301	F:03:01		Sample1	
	5	1	SIMPREG	C1F04001	F:04:01	1:01:AV:AV	Calibration A	
	6	1	SIMPREG	C1F04002	F:04:02	1:01:AV:AV	Calibration A	
	7	1	SIMPREG	C2F04001	F:04:01	2:02:AV:AV	Calibration A	
	8	3	SIMPREG	003F0401	F:04:01		Sample 2	
	9	1	SIMPREG	C1F05001	F:05:01	1:01:AV:AV	Calibration A	
	10	1	SIMPREG	C1F05002	F:05:02	1:01:AV:AV	Calibration A	
	11	1	SIMPREG	C2F05001	F:05:01	2:02:AV:AV	Calibration A	
	12	4	SIMPREG	004F0501	F:05:01		Sample3	
	13	1	SIMPREG	C1F06001	F:06:01	1:01:AV:AV	Calibration A	
	14	1	SIMPREG	C1F06002	F:06:02	1:01:AV:AV	Calibration A	
	15	1	SIMPREG	C2F06001	F:06:01	2:02:AV:AV	Calibration A	
	16	1	SIMPREG	C2F06001	F:06:01		Control	
	17	1	SIMPREG	C1F07001	F:07:01	1:01:AV:AV	Calibration A	

**Figura 38** Finestra di dialogo Partial sequence (Sequenza parziale)

#### Sequenza parziale nella modalità Creazione cartelle esclusive attiva

I dati della sequenza sono archiviati in un contenitore dati della sequenza utilizzando un nome di contenitore della sequenza definito. Se si esegue una sequenza parziale, il sistema crea un nuovo contenitore per i dati della sequenza in base alle impostazioni di **Preference** ogni volta che viene eseguita una parte di tale sequenza. Pertanto è possibile creare, ad esempio, tre contenitori dei dati della sequenza eseguendo tre volte una sequenza parziale in base a una sola sequenza.

#### Sequenza parziale nella modalità Creazione cartelle esclusive non attiva

I file di dati della sequenza vengono archiviati in base ai parametri specificati nel gruppo **Data File** della finestra di dialogo **Sequence Parameters**. Anche se la sequenza viene eseguita parzialmente, tutti i file di dati vengono archiviati nella stessa sottodirectory.

#### 8 Automazione

File di registrazione della sequenza

# File di registrazione della sequenza

Viene creato un registro della sequenza che indica cosa è accaduto durante l'esecuzione della stessa. Esso è utile per stabilire quando si è verificato un errore, in caso la sequenza sia stata eseguita senza sorveglianza o durante la notte. Il nome del file contenente il registro elettronico ha sempre l'estensione .log. Il file del registro elettronico si trova nella directory nella quale sono stati archiviati i dati della sequenza.
8

## Cosa succede quando si esegue una sequenza?

#### Avvio di una sequenza utilizzando "Creazione cartelle esclusive attiva"

Il sistema crea un contenitore dati della sequenza sulla base della definizione del percorso nei parametri di sequenza e delle impostazioni delle preferenze per la sequenza. Il modello della sequenza \*.s; tutti i metodi definiti nella tavola di sequenza appartenenti a questa particolare sequenza vengono copiati nel contenitore dati della sequenza. Il sistema continua a lavorare con tali file durante l'acquisizione. Avvio della sequenza; il metodo della linea della sequenza corrispondente viene caricato all'interno della ChemStation da questi contenitori di dati.

#### Avvio di una sequenza utilizzando "Creazione cartelle esclusive inattiva"

Avvio di una sequenza; il sistema carica il file \*.s della sequenza e in base alla voce nella tavola di sequenza, il metodo corrispondente della linea della sequenza viene caricato nella ChemStation. Contrariamente a quanto avviene con l'altra modalità di archiviazione dei dati (Creazione di cartelle esclusive attiva), non viene creato alcun contenitore di dati della sequenza. La sequenza e i metodi rimangono nella directory master corrispondente.

#### Altre operazioni eseguite durante l'esecuzione della sequenza:

Le seguenti operazioni vengono ripetute per ciascuna linea della sequenza eseguita:

- Se dotato di campionatore automatico, il software dapprima trova il campione nel campionatore automatico secondo il numero inserito nella colonna Vial.
- Sullo strumento vengono impostati i parametri del metodo.
- Si esegue la macro pre-analisi.
- Il campione viene quindi iniettato nello strumento (manualmente o automaticamente).

Cosa succede quando si esegue una sequenza?

- Viene effettuata la valutazione dei dati del metodo: Integrazione, quantificazione e stesura di un rapporto, comprese eventuali macro specificate dall'utente. Qualora venga utilizzata la modalità "Creazione cartelle esclusive attiva", il sistema archivia due ulteriori metodi, ACQ.M e DA.M, durante l'analisi.
- Si esegue la macro post-analisi.
- Durante l'intero processo la ChemStation segue l'andamento della sequenza in tempo reale e produce un file di registrazione della sequenza.

#### Stato della ChemStation



Figura 39 Stato della sequenza

## Struttura del file di dati della sequenza (creazione di cartelle esclusive attiva)

Nella versione della ChemStation B.02.01 e successive, il collegamento tra i dati non elaborati e il metodo è stato rafforzato, come mostra la figura Struttura del file di dati della sequenza (creazione di cartelle esclusiva attiva).

D:\TREE1\DATA\TEST1\DEMOBATCH 12	-01-2006 13-05-01	
<u>Eile E</u> dit ⊻iew F <u>a</u> vorites <u>I</u> ools <u>H</u> elp		
🖕 Back 🔹 🔿 👻 🔂 🖓 Search 🛛 🎦 Fold	ers 🧭 🚰 🖳 🗙 🗠	2   EE
Address 🗀 D:\TREE1\DATA\TEST1\DEMOBATCH	12-01-2006 13-05-01	
Folders	× Name A	Metodi usati
一 中心 TBFF1	2006011201.	nella sequenza
	DEMOBATCH	I.M
DEMO	SIG1000001.0	2
TEST SEQ 1	SIG100002.0	2
E-C TEST1	SIG1000003.0	5
E- DEMOBATCH 12-01-2006	13.05.01 📃 🗋 SIG1000004.0	5
- Ci 2006011201.M	SIG100005.0	)
- DEMOBATCH.M	SIG100006.0	2
🖻 🦳 SIG1000001.D	SIG1000007.0	)
🖻 🦳 SIG100002.D	SIG100008.0	) Matada di sanuisiziana
ACO.M	SIG100009.0	) Ivietodo di acquisizione
DA.M	SIG100010 I	)
🗄 🛄 SIG100003.D	SIG1000011.0	Metodo di analisi dei dati
🕀 🗀 SIG1000004.D	SIG1000012.0	)
🖽 🛅 SIG1000005.D	SIG1000013.I	)
🖶 🗀 SIG100006.D	🔚 🛄 SIG1000014.0	)
🗎 📄 💼 🗀 SIG1000007.D	SIG1000015.0	)
🗄 🔂 SIG1000008.D	C SIG1000016.0	)
🗄 📄 🗄 💼 SIG1000009.D	SIG1000017.0	)
🗄 📋 📋 SIG1000010.D	SIG1000018.0	Contenitore dei deti delle seguenza
🕀 🧰 🛄 SIG1000011.D	SIG1000019.0	
🕀 🧰 🧰 SIG1000012.D	SIG100020.0	)
🖶 🛄 SIG1000013.D	TEST.M	File hatch
🕀 🧰 🧰 SIG1000014.D	DEMOBATCH	I.B Pagietre delle acquenze
😟 🗀 SIG1000015.D	DEMOBATCH	ILLOG REGISTRO DELLA SEQUENZA
😟 🧰 🧰 SIG1000016.D	DEMOBATCH	I.S
😟 🛄 SIG1000017.D	METHODS.R	EG IVIOdello di sequenza
🖻 🗀 SIG1000018.D		
🗎 🗎 🕀 🛄 SIG1000019.D		
🕀 🛄 SIG1000020.D		
TEST.M		



8

Attribuzione del nome ai file di dati in una sequenza

## Attribuzione del nome ai file di dati in una sequenza

L'attribuzione del nome ai file di una sequenza viene effettuata:

- in modo automatico;
- manualmente;
- con il sistema di prefisso/caratteri a scalare.

### Attribuzione automatica del nome ai file durante una sequenza

#### Vial di campioni

Ad esempio 017-0103.D

Dove:

- le prime tre cifre si riferiscono al numero di vial 017;
- il quarto carattere è una lineetta di separazione in cromatografia liquida ed elettroforesi capillare (-); in gascromatografia sarà (F) per front o (B) per back;
- il quinto ed il sesto carattere indicano la linea di sequenza che definisce il metodo usato, ad esempio 01 sta per la prima linea di sequenza;
- il settimo ed ottavo carattere indicano il numero di iniezione per un determinato vial del metodo: ad esempio 03 sta per la terza iniezione.

#### Analisi in bianco

Ad esempio NV--0499.D

Dove:

- NV significa nessun vial.
- - è una lineetta di separazione.
- 0499 è la 99<sup>esima</sup> analisi del bianco della linea di sequenza numero 4.

Attribuzione del nome ai file di dati in una sequenza

### Come inserire nomi di file manualmente

Una delle colonne della tavola di sequenza si chiama Datafile. Quando non contiene dati, viene utilizzato lo schema specificato per attribuire un nome ai file di dati. Se viene inserito testo in questa colonna, la ChemStation lo utilizza per attribuire il nome al file di dati per l'analisi.

Se viene specificata più di una iniezione per vial su di una linea con un file di dati il cui nome sia stato inserito manualmente, la ChemStation tronca automaticamente caratteri dalla fine del nome inserito dall'utente ed aggiunge il numero di iniezione. Ciò impedisce che lo stesso nome venga usato per più iniezioni.

#### Uso del sistema di prefisso/caratteri a scalare

Utilizzando questo sistema la ChemStation crea un nome per ogni analisi. Per uno strumento che supporta analisi a due segnali come il gascromatografo, la ChemStation creerà un nome per ogni segnale.

L'impostazione della sequenza consente l'uso di nomi di file lunghi per il prefisso/caratteri a scalare. Il nome del file di dati definito da un prefisso/caratteri a scalare può essere lungo fino a quindici caratteri più l'estensione .d, per un totale di diciassette caratteri.

Al campo del prefisso/caratteri a scalare si applicano le seguenti regole:

- i caratteri a scalare possono essere al massimo 6
- se un prefisso utilizza meno di nove caratteri, i caratteri a scalare vengono automaticamente estesi a 6 cifre
- il numero utilizzato nei caratteri a scalare è il numero iniziale che viene incrementato

#### Tabella 15

Prefisso	Caratteri a scalare	risulta nel nome file
long	000001	long000001
longname	000001	longname000001
testwithalongna	1	testwithalongna1

Funzionamento post-sequenza

## Funzionamento post-sequenza

È possibile specificare cosa accade dopo che una sequenza ha terminato la sua normale esecuzione o quando la ChemStation incontra un errore durante il funzionamento della sequenza stessa. Per quanto riguarda la cromatografia liquida attivando la funzione Post-Sequence Cmd/Macro (Comando/macro post-sequenza) di Sequence Parameters (Parametri sequenza) si può scegliere di:

- impostare il sistema in STANDBY con la pompa e la lampada spente,
- impostare il sistema in LAMPOFF con tutte le lampade spente (solo cromatografia liquida ed elettroforesi capillare),
- impostare il sistema in PUMPOFF con tutte le pompe spente (solo CL e EC),
- usare la macro predefinita SHUTDOWN o modificare SHUTDOWN.MAC per determinare funzioni specifiche.

Ad esempio se si desidera spegnere il sistema dopo che la sequenza è stata completata. Si può usare questa macro anche per impostare il flusso a zero e ridurlo gradualmente.

Nella finestra Sequence Parameters (Parametri sequenza), è possibile specificare le macro personali da usare inserendo il loro nome nel campo Post-Sequence Cmd/Macro (Comando/macro post-sequenza) e barrando l'apposita casella.

## Not Ready Timeout (Timeout non pronto) (solo cromatografia liquida ed elettroforesi capillare)

La funzione Not Ready Timeout (Timeout non pronto) in Sequence Parameters (Parametri sequenza) indica l'intervallo di tempo per il quale il sistema attende che lo strumento sia pronto: trascorso questo tempo il sistema si arresta.

## Wait Time (Tempo di attesa) (solo cromatografia liquida ed elettroforesi capillare)

Sequence Parameters (Parametri sequenza) permette di specificare il tempo di attesa dopo che un metodo è stato caricato e prima della prima iniezione di quel metodo. Ciò può essere utile per permettere il riequilibrio della colonna/del capillare quando si usano condizioni di analisi nuove.

## **Ricalibrazione automatica**

La calibrazione viene spesso effettuata dopo una modifica delle condizioni operative, ad esempio dopo la sostituzione di una colonna o di un capillare. La ricalibrazione automatica viene effettuata di solito all'inizio di una sequenza di analisi o ad intervalli regolari durante una sequenza come parte di un programma per compensare fattori che interessano la prestazione analitica.

Esistono due modi per specificare la ricalibrazione automatica della sequenza.

- Sequenze di calibrazione esplicite.
- Sequenze di calibrazione cicliche.

## Ricalibrazione nella modalità "Unique Folder Creation ON" (Creazione cartelle esclusive attiva)

Quando si esegue una ricalibrazione, la tavola di calibrazione del metodo usato viene aggiornata in base alle impostazioni del metodo definite. Se viene utilizzata la modalità di archiviazione dei dati "Unique Folder Creation ON" (Creazione di cartelle esclusive attiva), i metodi ricalibrati saranno disponibili nel contenitore di dati della sequenza. La tavola di calibrazione del metodo della sequenza viene aggiornato durante tale processo. Oltre al metodo DA.M dei singoli file di dati, contiene la calibrazione aggiornata utilizzata per la creazione dei risultati.

## Ricalibrazione nella modalità "Unique Folder Creation OFF" (Creazione cartelle esclusive inattiva)

Quando si esegue una ricalibrazione, la tavola di calibrazione del metodo usato viene aggiornata in base alle impostazioni del metodo definite. Se viene utilizzata la modalità di archiviazione dei dati "Unique Folder Creation OFF" (Creazione di cartelle esclusive inattiva), la tavola di calibrazione del metodo master viene aggiornata durante la ricalibrazione.

8

## Come specificare le ricalibrazioni

I parametri di ricalibrazione per la sequenza vengono inseriti direttamente nella tavola apposita. I parametri definiscono come si ricalibra il metodo durante una sequenza.

#### Parametri di ricalibrazione nella tavola di sequenza

Il fattore di risposta ed i tempi di ritenzione/migrazione possono essere aggiornati in diversi modi. Il livello di calibrazione, l'aggiornamento del fattore di risposta e dei tempi di ritenzione/migrazione vengono utilizzati per le elaborazione dei dati quando si ricalibra la tavola.

Se si inserisce Calibration nella colonna SampleType della tavola di campioni, le seguenti colonne diventano attive e possono essere modificate.

- Cal Level
- Update RT
- Update RF
- Interval

I valori possono essere inseriti in ciascuna di queste colonne come illustrato nella tavola.

CAL Level	Update RT	Update RF	Interval
Numero livello nella tavola di calibrazione # (1-999)	No update	No update	Numero intervallo di ricalibrazione ciclico # (1-999)
	Average	Average	Bianco
	Replace	Replace	
		Bracket	
		Delta%	

**Tabella 16** Parametri di ricalibrazione della tavola di sequenza

Come specificare le ricalibrazioni

La tavola mostra le colonne della tavola di sequenza che contengono i parametri di ricalibrazione e i valori che possono essere inseriti.

#### **No Update**

Il fattore di risposta o il tempo di ritenzione/migrazione non cambia.

#### **Replace**

Sostituisce la risposta precedente (altezze o aree) con quella dell'analisi in corso. La risposta non viene cambiata per i picchi che non si trovano in questa operazione di ricalibrazione.

#### Average

Calcola una media delle risposte (aree o altezze) per ogni picco, basata sull'operazione di calibrazione originaria e su tutte le ricalibrazioni calcolate in media fino a quel momento. Se manca un picco in una delle ricalibrazioni, la risposta media del picco non ne risentirà.

#### Bracket

I campioni sono raggruppati in calibrazioni pre e post campione. La valutazione viene effettuata quando l'ultimo campione di calibrazione dell'ultimo gruppo è stato analizzato. I dati di calibrazione esistenti vengono sostituiti dai dati che risultano dalla calibrazione del gruppo di apertura. Le calibrazioni del gruppo di chiusura vengono mediate con quelle di questa tavola di calibrazione.

#### Interval

L'intervallo di ricalibrazione determina quanto spesso si effettui una calibrazione durante una sequenza. La frequenza di calibrazione corrisponde al numero di iniezioni di campione effettuate prima del successivo gruppo di iniezioni di calibrazione. All'inizio dell'analisi ha luogo una calibrazione ed i risultati (fattori di risposta) vengono inseriti nella tavola di calibrazione. Questi risultati vengono usati per i successivi calcoli quantitativi. Dopo che è stato effettuato il numero di iniezioni specificato, si effettua un'altra calibrazione ed i risultati vengono inseriti nella tavola di calibrazione e sovrascritti ai risultati dei calcoli precedenti.

#### Delta%

Il calcolo del delta% consente di paragonare i fattori di risposta di un'analisi con i fattori di risposta inseriti manualmente in una tavola di calibrazione. Il delta% è quindi applicato a tutti i picchi calibrati contenuti nella tavola. Si possono identificare diversi standard interni ed i loro fattori di risposta misurati vengono usati per calcolare nuovi fattori di risposta per altri picchi. L'operatore identifica quale standard interno deve essere usato per il calcolo del delta% per ogni picco elencato nella tavola di calibrazione.

## Tipi di sequenze

Le sequenze possono essere dei seguenti tipi:

- sequenze di calibrazione esplicita;
- sequenze di calibrazione esplicita a livello singolo;
- sequenze di calibrazione ciclica multilivello;
- calibrazioni cicliche ed esplicite contenute nella stessa sequenza;
- sequenze di calibrazione cicliche con calibrazioni in bracketing.

8

## Sequenze di calibrazione esplicite

Questo tipo di sequenza ricalibra ad intervalli definiti scelti dall'utente nella tavola di sequenza.

Per sequenze di calibrazione esplicite, i campioni di calibrazione sono inseriti nella sequenza senza un intervallo di calibrazione nella tavola di ricalibrazione della sequenza del metodo. La ricalibrazione si effettua una volta per ogni campione di calibrazione inserito nella tavola di sequenza.

Sequenze di calibrazione cicliche a livello singolo

## Sequenze di calibrazione cicliche a livello singolo

Questo tipo di sequenza utilizza lo stesso vial, cioè il campione di calibrazione, ad intervalli regolari nella sequenza.

Recalibration Interval (Intervallo di ricalibrazione) nella tavola di ricalibrazione della sequenza determina le modalità di effettuazione della ricalibrazione. Ad esempio, un valore di intervallo di ricalibrazione uguale a due, ricalibrerà ogni due vial di campione nella sequenza.

8

## Sequenze di calibrazione cicliche multilivello

Questo tipo di sequenza usa campioni di calibrazione diversi per ricalibrare un metodo calibrato multilivello.

L'esempio che segue descrive una sequenza a due metodi comprendente un Metodo A e un Metodo B per analizzare due gruppi di campioni. Entrambi i metodi sono metodi di calibrazione multilivello che si ricalibreranno automaticamente ad intervalli definiti.

Per ogni metodo la tavola di sequenza ha tre componenti:

- Due livelli di calibrazione:
  - righe della sequenza 1 e 2 nel metodo A;
  - righe della sequenza 8 e 9 nel metodo B.
- Cinque voci per i campioni:
  - righe della sequenza da 3 a 7 nel metodo A;
  - righe della sequenza da 10 a 14 nel metodo B.

Le calibrazioni sono specificate ad intervalli regolari inserendo l'intervallo di ricalibrazione nella tavola di ricalibrazione della sequenza.

- Il metodo A ricalibrerà ogni due campioni.
- Il metodo B ricalibrerà ogni tre campioni.

La tavola di sequenza riportata di seguito è incompleta per semplificare l'esempio.

Riga	Vial	Nome del metodo	ln./Vial	Tipo di campione	Livello calib.	Aggior na RF	Aggiorna RT	lnter vallo
1	1	Metodo A	1	Calibrazione	1	Media	Nessun agg.	2
2	2	Metodo A	1	Calibrazione	2	Media	Nessun agg.	2
3	10	Metodo A	1					

Tabella 17 Tavola di sequenza per i metodi A e B

Sequenze di calibrazione cicliche multilivello

Riga	Vial	Nome del metodo	ln./Vial	Tipo di campione	Livello calib.	Aggior na RF	Aggiorna RT	Inter vallo
4	11	Metodo A	1					
5	12	Metodo A	1					
6	13	Metodo A	1					
7	14	Metodo A	1					
8	3	Metodo B	1	Calibrazione	1	Media	Nessun agg.	3
9	5	Metodo B	2	Calibrazione	2	Media	Nessun agg.	3
10	20	Metodo B	1					
11	21	Metodo B	1					
12	22	Metodo B	1					
13	23	Metodo B	1					
14	24	Metodo B	1					

Tabella 17 Tavola di sequenza per i metodi A e B

## Ordine di analisi - Metodo A

Questa sezione descrive l'ordine di analisi del metodo A che costituisce la prima parte della sequenza a due metodi.

Tahella	18	Ordine	di analisi	- Metodo A
lancila	10	orume	ui anansi	- MELOUU A

N.Iniez.	Metodo	Vial	Operazione
1	Metodo A	1	Livello di calibrazione 1 e rapporto di stampa
2	Metodo A	2	Livello di calibrazione 2 e rapporto di stampa
3	Metodo A	10	Analisi del campione e rapporto di stampa
4	Metodo A	11	Analisi del campione e rapporto di stampa
5	Metodo A	1	Livello di calibrazione 1 e rapporto di stampa

8

6	Metodo A	2	Livello di calibrazione 2 e rapporto di stampa
7	Metodo A	12	Analisi del campione e rapporto di stampa
8	Metodo A	13	Analisi del campione e rapporto di stampa
9	Metodo A	1	Livello di calibrazione 1 e rapporto di stampa
10	Metodo A	2	Livello di calibrazione 2 e rapporto di stampa
11	Metodo A	14	Analisi del campione e rapporto di stampa
-			

Tabella 18 Ordine di analisi - Metodo A

## Ordine di analisi - Metodo B

Questa sezione descrive l'ordine di analisi del Metodo B che costituisce la seconda parte della sequenza a due metodi.

Il metodo B presenta, rispetto al metodo A, le seguenti differenze:

• Vi sono due iniezioni per vial per il livello di calibrazione 2. L'intervallo di calibrazione è stabilito a 3.

N.Iniez.	Metodo	Vial	Operazione
12	Metodo B	3	Livello di calibrazione 1 e rapporto di stampa
13	Metodo B	5	Livello di calibrazione 2 e rapporto di stampa
14	Metodo B	5	Livello di calibrazione 2 e rapporto di stampa
15	Metodo B	20	Analisi del campione e rapporto di stampa
16	Metodo B	21	Analisi del campione e rapporto di stampa
17	Metodo B	22	Analisi del campione e rapporto di stampa
18	Metodo B	3	Livello di calibrazione 1 e rapporto di stampa
19	Metodo B	5	Livello di calibrazione 2 e rapporto di stampa
20	Metodo B	5	Livello di calibrazione 2 e rapporto di stampa

Tabella 19 Ordine di analisi - Metodo B

Sequenze di calibrazione cicliche multilivello

#### Tabella 19 Ordine di analisi - Metodo B

21	Metodo B	23	Analisi del campione e rapporto di stampa
22	Metodo B	24	Analisi del campione e rapporto di stampa

Notare che i risultati illustrati nella Table 18, pagina 196 e Table 19, pagina 197 possono essere ottenuti utilizzando Partial Sequence (Sequenza parziale) per aver una visione in anteprima, dopo aver impostato la tavola di sequenza.

8

## Calibrazioni cicliche ed esplicite insieme

Questo tipo di sequenza consente di eseguire calibrazioni esplicite e cicliche nella stessa sequenza.

Questa funzione permette di ricalibrare completamente il metodo all'inizio della sequenza (*ricalibrazione esplicita*) e quindi di aggiornare la calibrazione (*ricalibrazione ciclica*) durante la sequenza.

- Devono essere specificate due righe di calibrazione per ciascun livello della tavola Sequenza. Una riga di calibrazione è riservata all'inserimento della ricalibrazione esplicita e l'altra alla ricalibrazione ciclica.
- La tavola di sequenza *deve* contenere inserimenti per ogni riga di calibrazione e tutti i vial della ricalibrazione ciclica *devono* comparire prima sia della ricalibrazione esplicita sia dei campioni.

### Esempio

La seguente tavola di sequenza illustra un metodo calibrato a livello singolo chiamato SimpReg. Per semplificare l'esempio, è stata troncata.

1	1	SimpReg	1	Calibrazione	1	Media	Media	3
2	1	SimpReg	1	Calibrazione	1	Sostitu- zione	Sostitu- zione	
3	2	SimpReg	1					
4	3	SimpReg	1					
5	4	SimpReg	1					
6	5	SimpReg	1					
7	6	SimpReg	1					

Tabella 20 Tavola di sequenza per SIMPREG

La tavola presenta due inserimenti per il livello di calibrazione singolo.

Calibrazioni cicliche ed esplicite insieme

- La prima riga di calibrazione è per lo stesso livello, ma calcola una media dei parametri di calibrazione. L'intervallo di ricalibrazione specifica che la ricalibrazione viene effettuata ogni tre campioni.
- Il secondo inserimento sostituisce tutti i parametri di ricalibrazione, ciò significa che viene effettuata una ricalibrazione completa. Non ha *nessun* intervallo di ricalibrazione.

#### Tavola di sequenza

Comprende sette righe. La prima riga specifica il campione di ricalibrazione ciclica. La seconda descrive la ricalibrazione esplicita effettuata una sola volta all'inizio della sequenza. Dalla terza alla settima riga sono elencati i campioni da analizzare.

L'ordine degli inserimenti nella tavola di calibrazione è molto importante. Tutti i vial relativi alla ricalibrazione ciclica *devono* essere visualizzati *prima* dei campioni o di ogni inserimento di ricalibrazione esplicita per quel metodo.

### Ordine di analisi del metodo SimpReg

Questa sezione descrive l'ordine di analisi per il metodo SimpReg.

Riga seq.	N. iniez.	Metodo	Vial	Operazione
2	1	SimpReg	1	Calibrazione semplice
1	2	SimpReg	1	Calibrazione regolare
3	3	SimpReg	2	Analisi del campione
3	4	SimpReg	3	Analisi del campione
4	5	SimpReg	4	Analisi del campione
5	6	SimpReg	1	Calibrazione regolare
6	7	SimpReg	5	Analisi del campione
7	8	SimpReg	6	Analisi del campione

 Tabella 21
 Ordine di analisi del metodo SimpReg

## Sequenze di ricalibrazione ciclica con la tecnica del bracketing

In una sequenza ciclica calibrata con bracketing, la tavola di calibrazione usata per calcolare i risultati quantitativi relativi ai campioni incogniti viene creata calcolando la media dei risultati della calibrazione attuale e di quelli della calibrazione precedente. Questa nuova tavola offre una rappresentazione più accurata della risposta dello strumento al momento dell'analisi del campione.

## **Esempio**

Consideriamo la situazione seguente.

- Deviazione della risposta dello strumento.
- Sono state specificate tre iniezioni della stessa miscela a due componenti.
- Due iniezioni sono descritte come campioni di calibrazione ed uno come campione.
- Il primo ed il terzo sono campioni di calibrazione.
- La seconda iniezione è un campione.

Per ottenere un risultato quantitativo preciso per l'iniezione numero due (il campione), deve essere effettuata un'interpolazione fra due campioni di calibrazione, come mostra la figura. Questa procedura è nota come bracketing.

8

Sequenze di ricalibrazione ciclica con la tecnica del bracketing



Figura 41 Tecnica del bracketing

### Funzionamento della sequenza con bracketing

- I primi vial di calibrazione vengono analizzati.
- I vial di campioni vengono analizzati.
- I vial di calibrazione successivi vengono analizzati.
- Viene prodotta la tavola di calibrazione sostituendo i fattori di risposta pre-esistenti con fattori nuovi e calcolando la media delle calibrazioni successive per creare una nuova tavola.
- Vengono valutati i file di dati relativi ai campioni e creati i rapporti di stampa.
- La sequenza ritorna alla fase due se ci sono ancora vial di campioni da analizzare.

### **Esempio**

Questa sezione riporta un esempio di sequenza in bracketing comprendente un metodo chiamato Brack.M. Questo metodo è uno standard interno a due livelli che utilizza la calibrazione ciclica.

#### Tavola di sequenza

La tavola di sequenza di Brack.M (illustrata nella pagina seguente) è incompleta per semplificare l'esempio. È composta da sette righe. Le prime due definiscono le condizioni di ricalibrazione per ogni livello. Le rimanenti definiscono i campioni da analizzare.

La tavola di ricalibrazione della sequenza del metodo Brack.M ha:

- l'inserimento di Bracket nella colonna Update Response Factor (Aggiorna fattore di risposta) che specifica il bracketing dei campioni con campioni di calibrazione;
- l'inserimento di Replace in Update Retention/Migration Times (Aggiorna tempi di ritenzione/migrazione) che specifica la sostituzione dei tempi di ritenzione/migrazione;
- l'inserimento di 3 in Recalib Interval (Intervallo di ricalibrazione) che precisa la ricalibrazione ogni tre campioni.

1	1	BRACK-M	2	Calibrazione	1	Bracket	Replace	3
2	2	BRACK-M	2	Calibrazione	2	Bracket	Replace	3
3	10	BRACK-M	1					
4	11	BRACK-M	1					
5	12	BRACK-M	1					
6	13	BRACK-M	1					
7	14	BRACK-M	1					

Tabella 22 Tavola di sequenza per BRACK-M

8

Sequenze di ricalibrazione ciclica con la tecnica del bracketing

#### Ordine di analisi per una sequenza di ricalibrazione in bracketing

Run	Method Name	Vial No.	Inj No	DataFile Name	Lvl No.	Upd RF	Upd Ret	Operation
1	Brack.M	1	1	c1-03001.d	1	R	R	Report for Calibration Run No.1
2	Brack.M	1	2	c1-03002.d	1	A	R	Report for Calibration Run No.2
3	Brack.M	2	1	c2-03001.d	2	R	R	Report for Calibration Run No.3
4	Brack.M	2	2	c2-03002.d	2	A	R	Report for Calibration Run No.4
								Print Calibration Table
5	Brack.M	10	1	010-0301.d				Sample Analysis, no report
6	Brack.M	11	1	011-0301.d				Sample Analysis, no report
7	Brack.M	12	1	012-0301.d				Sample Analysis, no report
8	Brack.M	1	1	c1-03003.d	1	A	R	Calibration Analysis, no report
9	Brack.M	1	2	c1-03004.d	1	A	R	Calibration Analysis, no report
10	Brack.M	2	1	c2-03003.d	2	A	R	Calibration Analysis, no report
11	Brack.M	2	2	c2-03004.d	2	A	R	Calibration Analysis, no report
								Print Calibration Table
				010-0301.d				Report for Sample Run No.5
				011-0301.d				Report for Sample Run No.6
				012-0301.d				Report for Sample Run No.7
				c1-03003.d	1	R		Report for Calibration Run No.8
				c1-03004.d	1	A		Report for Calibration Run No.9
				c2-03003.d	2	R		Report for Calibration Run No.10
				c2-03004.d	2	A		Report for Calibration Run No.11
12	Brack.M	13	1	013-0301.d				Sample Analysis, no report
13	Brack.M	14	1	014-0301.d				Sample Analysis, no report
14	Brack.M	1	1	c1-03005.d	1	A	R	Calibration Analysis, no report
15	Brack.M	1	2	c1-03006.d	1	A	R	Calibration Analysis, no report
16	Brack.M	2	1	c2-03005.d	2	A	R	Calibration Analysis, no report
17	Brack.M	2	2	c2-03006.d	2	A	R	Calibration Analysis, no report
								Print Calibration Table
				013-0301.d				Report for Sample Run No.12
				014-0301.d				Report for Sample Run No.13
				c1-03005.d	1	R		Report for Calibration Run No.14
				c1-03006.d	1	A		Report for Calibration Run No.15
				c2-03005.d	2	R		Report for Calibration Run No.16
				c2-03006.d	2	A		Report for Calibration Run No.17

Where A = average

R = replace

## Sequenze di ricalibrazione ciclica con più vial contenenti la stessa diluizione di uno standard

## Sequenza di ricalibrazione ciclica con vial di calibrazione usati "in successione"

Quando si esegue una sequenza molto lunga che effettua ricalibrazioni cicliche, cioè che ricalibra automaticamente dopo un numero prefissato di iniezioni di campione, esiste in potenza il rischio di esaurire il volume di campione contenuto nel vial di calibrazione nel corso della sequenza. La tavola di sequenza della ChemStation consente di usare una serie di vial contenenti la stessa diluizione di uno standard da utilizzare *in successione*.

In questo modo sequenze anche molto lunghe possono essere programmate con ricalibrazioni automatiche ad intervalli prefissati, utilizzando diversi vial di calibrazione per ogni livello, dato che il contenuto di ogni vial può essere consumato nelle stesse proporzioni.

Definendo un numero adatto di vial di calibrazione è anche possibile garantire che ogni vial di calibrazione venga utilizzato una sola volta. Si tratta di un requisito importante nei casi in cui si richieda un nuovo vial di ricalibrazione per ogni calibrazione, ad esempio se un analita evapora una volta che il setto viene punto o inizia a degradarsi entrando in contatto con l'acciaio dell'ago. La sezione che segue descrive come deve essere impostata la tavola di sequenza della ChemStation per far fronte a questo tipo di esigenza.

Determinare il numero totale di vial di calibrazione per ogni livello basandosi sull'uso previsto del calibrante per la durata della sequenza.

Impostare una linea di ricalibrazione ciclica per ogni vial di calibrazione. Le linee definite per lo stesso livello di calibrazione devono essere su linee di sequenza adiacenti e le posizioni di vial definite devono essere anch'esse adiacenti. Scegliere un intervallo di ricalibrazione identico per tutte le linee di calibrazione. Ad esempio se la sequenza deve ricalibrarsi ogni 6 iniezioni di campione, impostare l'intervallo di ricalibrazione a 6.

8

Sequenze di ricalibrazione ciclica con più vial contenenti la stessa diluizione di uno standard

N. vial	Nome del campione	Tipo di campione	Nome del metodo	N.iniez.	Lvi	Upd RT	Upd RF	Interval
1	Cal1a	Calib	Metodo A	1	1	Avg	Avg	6
2	Cal1b	Calib	Metodo A	1	1	Avg	Avg	6
3	Cal1c	Calib	Metodo A	1	1	Avg	Avg	6
5	Cal2a	Calib	Metodo A	1	2	Avg	Avg	6
6	Cal2b	Calib	Metodo A	1	2	Avg	Avg	6
7	Cal2c	Calib	Metodo A	1	2	Avg	Avg	6
10	Campione 10	Campione	Metodo A	6				
11	Campione 11	Campione	Metodo A	6				
12	Campione 12	Campione	Metodo A	6				
13	Campione 13	Campione	Metodo A	6				
14	Campione 14	Campione	Metodo A	6				

Tabella 23 Sequenza di ricalibrazione ciclica con 3 vial definiti per ogni livello

L'ordine di esecuzione è:

- Vial 1 (Cal1a)
- Vial 5 (Cal2a)
- 6 dal vial 10 (Campione 10)
- Vial 2 (Cal1b)
- Via 6 (Cal2b)
- 6 dal vial 11 (Campione 11)
- Vial 3 (Cal1c)
- Vial 7 (Cal2c)
- 6 dal vial 12 (Campione 12)
- Vial 1 (Cal1a)
- Vial 5 (Cal2a)
- 6 iniezioni dal vial13 (Campione 13)
- Vial 2 (Cal1b)
- Vial 6 (Cal2b)
- ecc.

Sequenze di ricalibrazione ciclica con più vial contenenti la stessa diluizione di uno standard

## Ricalibrazioni cicliche con uso di un vial diverso per ogni calibrazione

Per assicurare che ogni vial di calibrazione venga iniettato una sola volta, la sequenza deve definire un numero sufficiente di vial di calibrazione diversi, in modo che *l'ordine in successione* descritto nell'esempio precedente non venga applicato. Ad esempio, se la sequenza processa 80 vial di campioni con ricalibrazioni richieste ogni 10 campioni, la tavola di sequenza deve contenere 80/10+1=9 linee di calibrazione per ogni livello.

Come nell'esempio precedente, le linee di calibrazione devono essere adiacenti e riferirsi a posizioni di vial adiacenti.

## Sequenza in bracketing che utilizza vial diversi per l'apertura e la chiusura dei bracket

La stessa funzione è disponibile per le sequenze in bracketing. Definendo la serie di vial di calibrazione adatti può essere definita una sequenza in bracketing in modo che vial di calibrazione diversi vengano usati per l'apertura e la chiusura dei bracket. Anche in questo caso le linee di calibrazione della sequenza devono essere adiacenti così come le posizioni dei vial di calibrazione.

Che i vial di calibrazione in bracketing vengano usati nella modalità "in successione" oppure per una sola iniezione dipende unicamente e semplicemente dal numero totale di vial di calibrazione per ogni livello e dal numero di ricalibrazioni richieste dalla sequenza.

L'esempio che segue definisce 3 iniezioni di campione in bracketing, fra diverse calibrazioni. Il bracket di apertura utilizza un vial di calibrazione diverso da quello di chiusura. Le ricalibrazioni sono richieste dopo ogni iniezione di campione, quindi l'intervallo di ricalibrazione deve essere 1. Il numero di linee di ricalibrazione per livello è uguale al numero di campioni più uno.

Sequenze di ricalibrazione ciclica con più vial contenenti la stessa diluizione di uno standard

N. vial	Nome del campione	Tipo di campione	Nome del metodo	N.iniez.	Lvi	Upd RT	Upd RF	Interval
1	Cal1a	Calib	Metodo A	1	1	Brkt	Brkt	1
2	Cal1b	Calib	Metodo A	1	1	Brkt	Brkt	1
3	Cal1c	Calib	Metodo A	1	1	Brkt	Brkt	1
4	Cal1d	Calib	Metodo A	1	1	Brkt	Brkt	1
10	Campione 10	Campione	Metodo A	1				
11	Campione 11	Campione	Metodo A	1				
12	Campione 12	Campione	Metodo A	1				

Tabella 24 Vial diversi utilizzati per l'apertura e la chiusura dei bracket

L'ordine di esecuzione di questa sequenza è:

- Vial 1 (Cal1a), Apertura Bracket 1
- Vial 10 (Campione 10)
- Vial 2 (Cal1b), Chiusura Bracket 1 ed apertura Bracket 2
- Vial 11 (Campione 11)
- Vial 3 (Cal1c), Chiusura Bracket 2 ed apertura Bracket 3
- Vial 12 (Campione 12)
- Vial 4 (Cal1d), Chiusura Bracket 3



9

**Descrizione della ChemStation Agilent** 

# Revisione dei dati, rielaborazione e revisione dei lotti

Tavola di navigazione in Data Analysis (Analisi dei dati) 210 Configurazione della tavola di navigazione 210 Barra degli strumenti della tavola di navigazione 211 Revisione dei dati tramite la tavola di navigazione 212 Rielaborazione della sequenza tramite la tavola di navigazione 213 Che cos'è la revisione di un lotto? 215 Abilitazione della funzionalità di revisione dei lotti con l'opzione ChemStation OpenLAB installata 216 Configurazione del lotto 217 Tavola di raggruppamento 217 Tavola dei composti 218 Rapporto relativo al lotto 218 Interfaccia utente 218 Funzioni di revisione 220 La calibrazione nella revisione di gruppi 220 Rapporto relativo al lotto 221

Storico lotto 221

Questo capitolo illustra le varie procedure disponibili per revisionare i dati e spiega come rielaborare i dati della sequenza. Inoltre, descrive i concetti di revisione e configurazione dei lotti, le funzioni di revisione e la stesura dei report sui lotti.



## Tavola di navigazione in Data Analysis (Analisi dei dati)

La finestra Data Analysis (Analisi dei dati) include una tavola di navigazione progettata per facilitare la navigazione nei file di dati. La tavola di navigazione mostra le analisi contenute in una subdirectory selezionata di dati o dati della sequenza. È possibile utilizzare la tavola di navigazione per accedere alle singole analisi o per scorrere automaticamente i segnali caricati. Per ulteriori informazioni, vedere il manuale "Getting Started With New ChemStation Workflow".

### Configurazione della tavola di navigazione

La tavola di navigazione mostra le informazioni sui file di dati in base alle serie di dati disponibili. È di sola lettura e i suoi valori non possono essere sovrascritti.

Colonne analisi singole	Colonne analisi in sequenza
Sovrapposizione	Sovrapposizione
Data / Ora	Riga
Operatore	Iniezione
Vial	Vial
File di dati	Nome del campione
Nome del campione	Nome del metodo
Nome del metodo	Tipo di campione
Eventi manuali	Eventi manuali
Informazioni campione	Livello di calibrazione
Quantità di campione	Informazioni campione
Quantità ISTD	Quantità di campione

Tabella 25 Colonne della tavola di navigazione

Colonne analisi singole	Colonne analisi in sequenza
Moltiplicatore	Quantità ISTD
Diluizione	Moltiplicatore
	Diluizione
	File di dati

Tabella 25 Colonne della tavola di navigazione

Include caratteristiche di configurazione standard, come opzioni di ordinamento e trascinamento per spostare le colonne in altre posizioni. Inoltre, è possibile selezionare le colonne in essa visualizzate.

È anche possibile eseguire raggruppamenti specifici per colonna; ad esempio è possibile visualizzare analisi singole di un particolare operatore raggruppando i file caricati in base alla colonna "operatore".

Nella tavola di navigazione è possibile usare il pulsante destro del mouse per caricare un segnale, sovrapporre un segnale, esportare dati, stampare rapporti, visualizzare i parametri del metodo di acquisizione e così via. Ciascuna riga della tavola di navigazione può essere espansa facendo clic sul segno + (più) visualizzato a sinistra per configurare opzioni specifiche per segnale:

- *Segnale:* elenca i segnali acquisiti e consente di specificare quelli da caricare. La selezione di visualizzazione del segnale viene applicata singolarmente a ciascuna analisi.
- Informazioni generali: elenca i dettagli di intestazione dell'analisi.
- *Curve strumento:* consente di selezionare le curve dei dati dello strumento da visualizzare insieme al cromatogramma/elettroferogramma e nella stampa.

## Barra degli strumenti della tavola di navigazione

La **Navigation Table** include due gruppi di strumenti che consentono di esaminare i dati di analisi singola/sequenza o di rielaborare i dati della sequenza.

#### Gruppo di strumenti per la revisione di dati

La funzione di revisione della tavola di navigazione consente di esaminare automaticamente o manualmente i segnali caricati. In base alla selezione specificata in **Preferences / Signal/Review**, il sistema può integrare automaticamente il segnale e stampare un report per ciascun file caricato. Il metodo applicato al file di dati è visualizzato nel menu superiore.

#### Gruppo di strumenti per la rielaborazione della sequenza

Il gruppo di strumenti di rielaborazione della sequenza è disponibile solo quando viene caricata una sequenza acquisita con ChemStation B.02.01 o versioni successive, che sia stata acquisita con la funzione **Unique Folder Creation**. È possibile avviare, interrompere e sospendere la rielaborazione della sequenza. Inoltre, la barra degli strumenti consente di accedere alle seguenti finestre di dialogo per modificare il parametro per la rielaborazione di sequenze e stampa:

- **Sequence Table** (copia del modello \*.s originale, presente nel contenitore dei dati della sequenza)
- Finestra di dialogo Sequence Parameters
- Finestra di dialogo Sequence Output
- Finestra di dialogo Sequence Summary Parameters
- Finestra di dialogo Extended Statistic Parameters
- Save Current Sequence
- Print Current Sequence

## Revisione dei dati tramite la tavola di navigazione

In base al flusso di lavoro richiesto, è possibile esaminare i dati in tre modi diversi:

1 Esaminare i dati della sequenza utilizzando il singolo metodo di ciascun file di dati (dati della sequenza versione B.02.01 o versioni successive): Utilizzare l'opzione Individual Method from Data File (DA.M) in Preferences / Signal/Review Options per fare in modo che il sistema carichi il singolo metodo di analisi dei dati (Da.M) archiviato con il file di dati prima del caricamento dei dati della sequenza. Quando si accede a ciascuna riga nella tavola di navigazione durante il processo di revisione dei dati, il DA.M collegato per il file di dati selezionato viene caricato e utilizzato per la revisione e per la generazione del report. Il nome del metodo viene visualizzato nella barra di stato; il sistema aggiunge 'from data file' tra parentesi (from data file) per indicare che il metodo caricato è il metodo singolo per il file di dati.

- 2 Revisione dei dati mediante un metodo della sequenza: Utilizzare l'opzione Sequence Method in Preferences / Signal/Review Options per fare il modo che il sistema carichi il metodo della sequenza corrispondente alla riga corrente della tavola di navigazione. Questo metodo viene caricato ogni volta che un file di dati viene caricato e utilizzato per la revisione e la generazione del report. Il nome del metodo viene visualizzato nella barra di stato; il sistema aggiunge la sequenza tra parentesi (sequence) per indicare che il metodo caricato è il metodo corrisponde alla riga corrente della tavola di navigazione.
- 3 Revisione dei dati mediante un metodo diverso: se per la revisione dei dati si desidera utilizzare un metodo diverso da quello singolo di analisi dei dati (DA.M) archiviato con il file di dati o dal metodo della sequenza, è necessario selezionare l'opzione current method in Preferences / Signal/Review Option. In questo caso, il sistema utilizza il metodo attualmente caricato per la revisione e per la generazione del report. Il nome del metodo viene visualizzato nella barra di stato.

Per i sistemi LC, CE, LC/MS e CE/MS, per impostazione predefinita è selezionata l'opzione **Individual Method from Data File (DA.M)**.

Per i sistemi GC, per impostazione predefinita è selezionata l'opzione Current Method.

## Rielaborazione della sequenza tramite la tavola di navigazione

NOTA

NOTA

I dati della sequenza acquisiti con le versioni ChemStation fino alla B.01.03 devono essere rielaborati tramite l'opzione **reprocess** disponibile in **Method and Run Control**. Ciò si applica ai dati acquisiti nella versione B.03.01 con l'opzione di creazione di cartelle esclusive disattivata.

I dati della sequenza acquisiti con le versioni ChemStation B.02.01 e versioni successive devono essere rielaborati tramite il gruppo di strumenti di rielaborazione disponibile nella tavola di navigazione **Data Analysis**.

Per la rielaborazione tramite la tavola di navigazione disponibile in **Data Analysis**, nel contenitore dei dati della sequenza sono presenti tutti i file necessari:

- File di dati della sequenza (\*.d)
- Tutti i file dei metodi (\*.m) utilizzati durante la sequenza
- Copia del modello della sequenza originale (\*.s)
- File del lotto relativo alla sequenza (\*.b)
- Registro elettronico relativo alla sequenza (\*.b)

Durante la rielaborazione, vengono aggiornati i singoli metodi DA.M per i file di dati e il file del lotto (\*.b).

Le funzioni di rielaborazione disponibili in **Data Analysis** consentono di modificare il modello di sequenza (\*.s) nel contenitore dei dati in modo da poter modificare il moltiplicatore, la diluizione, ecc. o utilizzare un metodo diverso per la rielaborazione. Per impostazione predefinita, il parametro della sequenza di rielaborazione disponibile in Analisi dei dati **parts of method to run** è impostata su **Reprocessing only** e l'opzione **Use Sequence Table Information** è selezionata. Questi valori predefiniti consentono di cambiare i parametri nel modello di sequenza e di eseguire una rielaborazione senza modificare di nuovo i parametri della sequenza **Data Analysis**.

Se il metodo nel modello di sequenza non è stato modificato esplicitamente, il sistema utilizza i metodi di sequenza archiviati nel contenitore dei dati della sequenza per rielaborare la sequenza. Questi sono i metodi originali utilizzati durante l'acquisizione dei dati. Anche se l'opzione **load DA method from data file** in **Preferences / Signal/Review Options** è selezionata, il sistema utilizza il metodo del contenitore della sequenza per la rielaborazione, non il DA.M dei file di dati singoli.

Se è necessario modificare particolari parametri del metodo (ad esempio specificare la stampa di un file \*.xls), occorre modificare e salvare i metodi nel contenitore della sequenza. Questa modifica generale viene quindi applicata a tutti i file di dati durante la rielaborazione.

Se a questo punto si desidera utilizzare il metodo nel contenitore della sequenza aggiornato per l'ulteriore acquisizione dei dati, è necessario copiare questo metodo dal contenitore dei dati della sequenza in uno dei percorsi del metodo definiti. Il metodo nuovo/aggiornato diventa quindi disponibile in ChemStation Explorer, nella finestra dei metodi, come metodo master.

## Che cos'è la revisione di un lotto?

La funzione è stata creata per aiutare l'analista ad effettuare una revisione "di massima" dei risultati di una sequenza o di un gruppo di analisi in maniera veloce ed agevole. Ciò consente di risparmiare tempo specialmente quando si deve rielaborare un numero elevato di campioni. Ogni volta che viene eseguita una sequenza, viene creato automaticamente un file di raggruppamento (con estensione a .b) che viene copiato nella directory dei dati insieme a questi ultimi. Il file di raggruppamento contiene puntatori diretti ai file di dati all'interno della funzione di revisione del lotto. Al momento di caricare un gruppo di dati, l'analista deve solo scegliere il metodo da usare e quindi selezionare singolarmente i file di dati desiderati da analizzare. È possibile controllare l'accuratezza della calibrazione, le prestazioni dello strumento e le singole integrazioni prima di approvare i risultati. Qualsiasi parametro di integrazione specifico per un cromatogramma modificato può essere archiviato insieme al file di dati per una maggiore rintracciabilità. Questo tipo di ambiente interattivo consente di accedere a tutte le altre funzioni di elaborazione dei dati, come la purezza dei picchi, la ricerca nella libreria, ecc.

Revisione lotto utilizza gli stessi registri delle funzioni di elaborazione dei dati (ChromReg e ChromRes), quindi non deve essere usata per le sessioni di analisi in corso.

## Abilitazione della funzionalità di revisione dei lotti con l'opzione ChemStation OpenLAB installata

Per impostazione predefinita la funzionalità di revisione dei lotti non è disponibile quando si installa ChemStation OpenLAB. Per utilizzare la revisione dei lotti, è necessario abilitare questa funzione mediante l'inserimento di un valore nella sezione [PCS] del file ChemStation.ini. Il file si trova nella directory c:\WINDOWS.

#### [PCS] \_BatchReview=1

Il valore predefinito, \_BatchReview=0, disattiva la funzione.
# **Configurazione del lotto**

Si definisce lotto una serie di file di dati scelti dall'utente ed elaborati utilizzando un metodo definito dall'utente. Tutti i file di dati del gruppo vengono processati utilizzando lo stesso metodo. Le fasi del processo effettuate ogni volta che un nuovo campione viene caricato per essere rivisto possono essere preventivamente selezionate (integrazione identificazione/quantificazione, stesura di rapporti).

Tutte le sequenze di calibrazione del gruppo vengono utilizzate per produrre una sola tavola di calibrazione, utilizzando fattori di risposta medi, da usare poi per la quantificazione.

## Tavola di raggruppamento

Le analisi eseguite vengono visualizzate in una tavola di raggruppamento configurata dall'utente:

- Può essere specificato il numero ed il contenuto delle colonne della tavola
- Le analisi possono essere suddivise per:
  - Ordine di analisi (l'ordine nel quale sono stati acquisiti i dati) indipendente da altri criteri
  - Tipo di campione (prima i campioni di controllo, poi campioni di calibrazione, quindi i campioni normali) o poi per ordine di analisi per ogni tipo di campione
  - Metodo (se nel corso delle analisi è stato utilizzato più di un metodo) e poi per ordine di analisi relativo a ciascun metodo
- Campioni, campioni di calibrazione e campioni di controllo che possono essere visualizzati all'interno della tavola oppure nascosti.

Ciascuna analisi selezionata occupa una riga della tavola. È possibile escludere un'analisi nella tavola di raggruppamento (ad esempio dalla calibrazione) modificando il tipo di campione in Rimosso.

# Tavola dei composti

I risultati relativi ai composti vengono visualizzati sotto forma di tavola configurabile dall'utente ma il contenuto di quest'ultima dipende dal tipo di campioni presenti nella tavola di raggruppamento.

- La lista comprende tutti i composti che si trovano nel metodo caricato per la revisione del gruppo di file.
- Se nella tavola vengono visualizzati solo campioni di calibrazione (i campioni ed i campioni di controllo rimangono nascosti), la tavola dei composti riporterà altre colonne per le informazioni relative alla calibrazione (quantità prevista, errore relativo e assoluto).
- Se nella tavola vengono visualizzate solo analisi di controllo (i campioni ed i campioni di calibrazione rimangono nascosti), la tavola dei composti comprende colonne aggiuntive per qualsiasi limite di controllo definito.

Per le colonne contenenti informazioni specifiche per un singolo composto, è possibile inserire il nome del composto nel titolo della tavola aggiungendo % alla specifica della colonna.

## **Rapporto relativo al lotto**

Il rapporto contiene due tavole generalmente analoghe alla tavola di raggruppamento ed alla tavola di composti; anche queste tavole possono essere configurate dall'utilizzatore.

Per le colonne contenenti informazioni specifiche per un singolo composto, è possibile inserire il nome del composto nel titolo della tavola aggiungendo % alla specifica della colonna. Sono consentiti titoli che occupano più di una riga; si deve inserire il carattere '|' nel punto in cui si desidera andare a capo.

# Interfaccia utente

La funzione di revisione consente di scegliere fra due interfacce utente:

• l'interfaccia standard comprende una barra di tasti, che riportano la maggior parte delle voci del menu Batch unitamente alla tavola di raggruppamento ed alla tavola dei composti; • un'interfaccia ridotta al minimo comprendente una barra di tasti simile a quella dell'interfaccia standard, ma nella quale la tavola di raggruppamento e la tavola dei composti sono sostituite da una casella combinata contenente unicamente le informazioni specificate per la tavola di raggruppamento. La barra di tasti dell'interfaccia minima non contiene pulsanti relativi alla tavola di raggruppamento né alla tavola dei composti.

#### 9 Revisione dei dati, rielaborazione e revisione dei lotti Funzioni di revisione

# Funzioni di revisione

I file di dati possono essere visualizzati in due modi:

- Manualmente, selezionando un'analisi da visualizzare dalla tavola.
- Automaticamente con un intervallo predefinito fra ogni file di dati. Durante la visualizzazione automatica, vengono visualizzati solo i campioni riportati nella tavola; le analisi vengono visualizzate nell'ordine in cui vengono visualizzate nella tavola. La revisione automatica può essere interrotta, ripresa o terminata.

Le funzioni standard della ChemStation sono disponibili anche per la revisione di gruppi di file. Esse comprendono la calibrazione e la manipolazione manuale di cromatogrammi, ad esempio la regolarizzazione o l'integrazione manuale. Qualsiasi modifica apportata ad un singolo file di dati può essere contrassegnata e salvata con il file di raggruppamento. I cromatogrammi revisionati sono contrassegnati da un asterisco nella tavola di raggruppamento. Si possono anche eliminare modifiche apportate al cromatogramma corrente oppure a tutti i cromatogrammi del gruppo.

Quando viene caricata un'analisi, le opzioni di elaborazione selezionate verranno eseguite; se un'analisi è stata elaborata e le modifiche salvate, viene caricata immediatamente. Si tratta di un processo molto più veloce rispetto a quello che prevede il caricamento di un'analisi non ancora elaborata perché quest'ultima fase può essere saltata.

## La calibrazione nella revisione di gruppi

La calibrazione in questo caso funziona indipendentemente dalle impostazioni di ricalibrazione nella tavola di sequenza. Il primo punto della calibrazione di gruppi sostituisce sempre gli inserimenti relativi a risposta e tempo di ritenzione nella tavola di calibrazione. Per i seguenti standard di calibrazione, viene calcolata una media dei valori di risposta e tempo di ritenzione.

# Rapporto relativo al lotto

La "Tavola di raggruppamento", pagina 217 può essere stampata direttamente su una stampante locale o visualizzata su schermo oppure stampata su file con un prefisso determinato dall'utente in uno dei seguenti formati:

- File di testo UNICODE con estensione .TXT
- File in formato Data Interchange Format con estensione .DIF
- File in formato Comma-Separated Values con estensione .CSV
- File Microsoft Excel con estensione .XLS

Le opzioni di stesura rapporti consentono anche di suddividere i campioni (per indice di analisi, tipo di campione o metodo) indipendentemente dal metodo di suddivisione scelto per la tavola di raggruppamento. Le priorità sono identiche a quelle della "Tavola di raggruppamento", pagina 217.

## **Storico lotto**

La funzione Batch review (Revisione lotto) tiene traccia di tutte le azioni che si riferiscono al gruppo corrente. Qualsiasi azione di modifica del gruppo di file (ad esempio il cambio di cromatogramma da visualizzare, del tipo di campione, oppure nel caricamento e salvataggio del gruppo) aggiunge una linea allo storico che riporta la data, l'ora ed il nome dell'operatore oltre ad una descrizione dell'evento.

Si possono anche aggiungere commenti individuali. Gli inserimenti già effettuati non possono essere modificati e la lista può essere consultata solo a partire dalla voce Batch History (Storico lotto) contenuta nell'apposito menu.

#### 9 Revisione dei dati, rielaborazione e revisione dei lotti Rapporto relativo al lotto



# 10 Uso dei report della ChemStation

Che cos'è un rapporto di stampa? 224 Rapporti sui risultati 225 Report non calibrati 225 Rapporti di stampa calibrati 225 Rapporto di stampa di standard esterno 225 Rapporto di stampa di standard interno 226 Report dei diagrammi di controllo 226 Risultati quantitativi 227 Rapporto relativo ai valori dei campi personalizzati 229 Stili di report 230 Come aggiungere uno stile di rapporto personalizzato alla lista degli stili esistenti 232 Altri parametri per lo stile dei rapporti di stampa 233 Tavola di somma dei picchi 233 Disposizione del rapporto di stampa per picchi non calibrati 233 Destinazione del rapporto di stampa 234 Formati dei file dei report 234 Report riassuntivi di seguenza 236 Sguardo d'insieme 236 Impostazione di un report riassuntivo di sequenza 236

Questo capitolo descrive i report e contiene consigli utili su come redigere report sui risultati, i risultati quantitativi, gli stili di report, la destinazione del report e i report riassuntivi di sequenza.



**10** Uso dei report della ChemStation

Che cos'è un rapporto di stampa?

# Che cos'è un rapporto di stampa?

Un rapporto di stampa può comprendere informazioni quantitative e qualitative sul campione in corso di analisi. Può essere in forma di stampa o visualizzato su schermo o file elettronico. Il rapporto di stampa può comprendere particolari relativi ai picchi rivelati durante l'analisi e la rappresentazione grafica dei segnali acquisiti.

# Rapporti sui risultati

Sono disponibili due tipi di rapporto di stampa.

- Il rapporto di stampa non calibrato, che non corregge la risposta del rivelatore.
- Il rapporto di stampa calibrato, che mostra risultati corretti in modo da compensare le differenze di risposta del rivelatore ai vari componenti del campione.

## **Report non calibrati**

I report non calibrati comprendono **Area%** e **Height%**. Si usano soprattutto per la preparazione di report calibrati. Possono essere validi come report finale se le quantità di composto richieste per produrre una risposta unitaria di area o altezza per i composti di interesse sono simili.

# Rapporti di stampa calibrati

I rapporti di stampa calibrati correggono la differenza di risposta del rivelatore ai composti riportati. Uno o più campioni di calibrazione contenenti quantità note di composti devono essere analizzati nelle stesse condizioni usate per il campione incognito. I dati di integrazione di questi campioni di calibrazione si usano per preparare la tavola di calibrazione. È una lista di tempi di ritenzione/migrazione, quantità e risposte, usata per i rapporti di stampa. I rapporti di stampa calibrati si basano su due procedimenti di calibrazione chiamati standard interno ed esterno.

# Rapporto di stampa di standard esterno

Il rapporto di stampa ESTD elenca i risultati con le unità o i composti scelti come percentuale di tutti i presenti. La procedura di standard esterno richiede che il volume relativo iniettato di entrambi i campioni, quello di calibrazione ed il campione incognito, debbano essere conosciuti in dettaglio. L'affidabilità del rapporto di stampa di standard esterno è limitata dalla riproducibilità dell'iniezione e da tutti i fattori che cambiano da campione a campione.

## Rapporto di stampa di standard interno

I limiti della procedura di standard esterno possono essere compensati usando la procedura di standard interno. Si aggiunge una quantità perfettamente conosciuta di standard interno (non necessariamente la stessa) sia al campione di calibrazione sia al campione incognito. La risposta di ogni composto che interessa viene divisa per la risposta dello standard interno per ottenere un rapporto di risposta. Le curve di calibrazione sono una rappresentazione di questo rapporto di risposta contro il rapporto di quantità; questa informazione viene usata per calcolare i risultati del rapporto di stampa. In questo modo si eliminano errori di volume di iniezione o piccole modifiche del sistema cromatografico/elettroferografico che possono interessare tutti i composti. Il rapporto di stampa ISTD elenca i risultati con le unità scelte.

# Report dei diagrammi di controllo

La funzione Report dei diagrammi di controllo tiene sotto controllo un singolo risultato durante più analisi di un composto specifico calibrato. La funzionalità **Control Chart** viene installata dopo che la ChemStation è già operativa. I metodi che utilizzano questa funzione passano i risultati ottenuti al foglio elettronico di Microsoft Excel dopo ogni analisi. Excel viene quindi usato per stampare il report.

# Risultati quantitativi

Il tipo di rapporto di stampa si identifica dal nome del metodo di calcolo usato per prepararlo, ad esempio rapporto ISTD. I tipi sono brevemente descritti di seguito. I calcoli relativi ad ogni rapporto vengono visualizzati in "Risultati quantitativi", pagina 227.

**Area%** è il tipo di rapporto di stampa più semplice e non richiede dati di calibrazione poiché non viene effettuata alcuna correzione della differenza di risposta del rivelatore per i componenti del campione. Questo tipo di rapporto è particolarmente utile per lo sviluppo di tavole di calibrazione da usare con gli altri tipi di rapporto di stampa. È anche adatto alle analisi nelle quali la differenza della risposta del rivelatore non è significativa.

**Height%** è un tipo di rapporto di stampa simile al precedente. Per i calcoli viene usata come base l'altezza invece dell'area.

**Norm%** produce un rapporto nel quale ogni componente viene riportato come percentuale di tutti i componenti presenti. I picchi vengono corretti in base alla risposta del rivelatore prima di calcolare la percentuale di ognuno.

**ESTD** fornisce la quantità reale di ogni sostanza in qualsiasi unità scelta. Le quantità vengono calcolate utilizzando una tavola di calibrazione precedentemente stabilita. L'uso di standard esterni richiede che il volume della miscela di calibrazione usata sia conosciuto.

**ESTD%** indica la quantità relativa di ogni sostanza come percentuale di campione iniettato. Le quantità vengono calcolate utilizzando una tavola di calibrazione precedentemente stabilita. L'uso di standard esterni richiede che il volume della miscela di calibrazione usata sia conosciuto.

**ISTD** indica la quantità reale di ogni sostanza. Le quantità vengono calcolate utilizzando una curva di calibrazione stabilita in precedenza. L'uso di uno standard interno sia nel campione, sia nella miscela di calibrazione elimina la necessità di conoscere e controllare il volume del campione iniettato. Corregge anche qualsiasi variazione delle prestazioni dello strumento da analisi ad analisi.

#### 10 Uso dei report della ChemStation Risultati quantitativi

**ISTD%** indica la quantità relativa di ogni sostanza come percentuale del campione iniettato. L'uso di standard interni sia nel campione sia nella miscela di calibrazione, elimina la necessità di conoscere e controllare il volume di campione iniettato. Corregge anche qualsiasi variazione delle prestazioni dello strumento da analisi ad analisi.

#### Uso dei report della ChemStation 10 Rapporto relativo ai valori dei campi personalizzati

# Rapporto relativo ai valori dei campi personalizzati

I valori dei campi personalizzati collegati ad un dato campione in base al suo metodo di acquisizione possono essere aggiunti al rapporto. I campi personalizzati del campione sono elencati al termine dell'intestazione del campione che contiene le informazioni generali sul campione. I campi personalizzati relativi ai composti vengono visualizzati alla fine del rapporto.

#### 10 Uso dei report della ChemStation Stili di report

# Stili di report

Sono disponibili i seguenti stili:

Si può scegliere di aggiungere un segnale a ciascuno dei tipi di report barrando l'apposita casella nella finestra di dialogo Specifica report.

- **None**: non viene incluso alcun tipo di testo. Il cromatogramma verrà riportato solo se è stata scelta l'opzione Aggiungi output cromatogramma.
- **Short**: contiene i risultati quantitativi di tutti i segnali integrati impostati nella finestra di dialogo Dettagli segnale (solo LC) o nella finestra di dialogo Segnale (solo GC). L'ampiezza del picco nel report breve viene calcolata con la formula più complessa utilizzata dall'integratore: PW = 0,3(IPRight -IPLeft) + 0,7(Area/Altezza) dove IPRight e IPLeft sono i punti di flesso.
- **Detail**: contiene i risultati del segnale e i risultati quantitativi oltre alle curve di calibrazione. L'intestazione viene archiviata in un file chiamato RPTHEAD.TXT nella directory del metodo. È possibile modificarla usando un elaboratore di testi ed inserire testo specifico per un metodo.
- **Header** + **Short**: contiene un'intestazione del file e i risultati quantitativi. L'intestazione viene archiviata in un file chiamato RPTHEAD.TXT nella directory del metodo. È possibile modificarla usando un elaboratore di testi ed inserire testo specifico per un metodo.
- **GLP** + **Short**: contiene l'intestazione, le informazioni sul campione, le condizioni dello strumento, il registro elettronico, il segnale e i risultati quantitativi. L'intestazione viene archiviata in un file chiamato RPTHEAD.TXT nella directory del metodo. È possibile modificarla usando un elaboratore di testi ed inserire testo specifico per un metodo.
- **GLP** + **Detail**: contiene l'intestazione, le informazioni sul campione, le condizioni dello strumento, il registro elettronico, il segnale, i risultati quantitativi e le curve di calibrazione. L'intestazione viene archiviata in un file chiamato RPTHEAD.TXT nella directory del metodo. È possibile modificarla usando un elaboratore di testi ed inserire testo specifico per un metodo.

- **Full**: contiene le intestazioni, le informazioni sul campione, le condizioni dello strumento, il registro elettronico, i segnali e i risultati quantitativi. L'intestazione viene archiviata in un file chiamato RPTHEAD.TXT nella directory del metodo. È possibile modificarla usando un elaboratore di testi ed inserire testo specifico per un metodo.
- **Performance**: genera un report secondo i limiti precisati nella finestra di dialogo Modifica limiti prestazioni del menu Idoneità del sistema.

Per metodi non calibrati, i parametri del report comprendono, per ciascun picco, il numero di picchi, il tempo di ritenzione/migrazione, l'area e l'altezza del picco, la descrizione del segnale, l'ampiezza reale del picco a metà altezza (consultare anche la sezione "Ampiezza reale del picco Wx [min]", pagina 256), la simmetria, il fattore k', l'efficienza (piatti) e la risoluzione.

Per i metodi calibrati i parametri del report comprendono il numero di picchi, il tempo di ritenzione/migrazione, il nome del composto, la quantità, la descrizione del segnale, l'ampiezza reale del picco a metà altezza, la simmetria, il fattore k', l'efficienza (piatti) e la risoluzione.

Il calcolo del picco a metà altezza non è uguale alla formula più complessa dell'ampiezza del picco utilizzata dall'integratore. I valori di efficienza e risoluzione si basano sull'ampiezza del picco calcolata. L'intestazione del report contiene tutte le informazioni importanti per il metodo, compreso lo strumento, la colonna/capillare, il campione ed i parametri di acquisizione. Anche il segnale viene rappresentato graficamente.

- **Performance** + **Noise**: combina lo stile del report Prestazioni con i calcoli del rumore di fondo per la scala definita nella finestra di dialogo Modifica intervallo rumore nel menu Idoneità del sistema. Inoltre il rumore viene dato come sei volte la deviazione standard, come picco a picco e come rumore di fondo ASTM; sono determinati anche deriva e variazione casuale.
- **Performance + Extended**: genera un report esteso con tutti i parametri, dai calcoli sulla prestazione dei picchi ai singoli diagrammi per ciascun picco. I diagrammi comprendono la linea di base, le tangenti e le ampiezze dei picchi ad altezze determinate. Questo tipo di report include solo i picchi calibrati.

Oltre ai parametri stampati per lo stile Prestazioni, vengono determinati e stampati altri parametri: l'inizio e la fine del picco i tempi, il disallineamento, l'eccesso, l'ampiezza del picco, il fattore di scodamento USP, l'intervallo di tempo fra punti di dati, il numero di punti di dati, i momenti statistici, i piatti teorici, i piatti al metro, la selettività e la risoluzione per ogni picco. L'ampiezza del picco, i piatti, i piatti per metro, la selettività e la risoluzione vengono calcolati attraverso i metodi: metà altezza reale, sigma 5, tangente e scodamento (per informazioni più dettagliate, consultare la sezione "Definizioni di test sulle prestazioni", pagina 254).

L'intestazione del report contiene informazioni relative al metodo, come lo strumento, la colonna/capillare, il campione ed i parametri di acquisizione ed una rappresentazione grafica del segnale. Per una lista completa degli algoritmi contenenti i parametri di prestazione dei picchi, consultare "Definizioni di test sulle prestazioni", pagina 254.

Gli stili di report spettrali (Short + Spectrum, Detail + Spectrum, Performance + Library Search) sono descritti nel volume *Conoscere il modulo di valutazione* spettri.

# Come aggiungere uno stile di rapporto personalizzato alla lista degli stili esistenti

È possibile aggiungere un modello di rapporto personale creato nella finestra Disposizione rapporto della ChemStation alla lista degli stili disponibili.

NOTA

Tutti i rapporti, eccetto quelli sulle prestazioni, elencano le ampiezze di picchi calcolate con una formula più complessa dall'integratore (per una descrizione dettagliata del calcolo dell'ampiezza del picco, consultare "Ampiezza del picco", pagina 83).

# Altri parametri per lo stile dei rapporti di stampa

# Tavola di somma dei picchi

Per alcune applicazioni nelle industrie farmaceutiche e petrolchimiche viene fornita una tavola di somma dei picchi, la somma può così essere effettuata in maniera più efficiente eseguendo le seguenti operazioni.

- Somma dell'area di picchi che rientrano entro un intervallo specificato dall'utente.
- Somma delle aree di un intervallo di picchi e calcoli effettuati con singolo moltiplicatore.
- Somma delle aree di tutti i picchi con lo stesso nome.

Una volta creato il rapporto di stampa la ChemStation utilizza la tavola di somma dei picchi per produrre un rapporto di somma da stampare dopo i calcoli del rapporto standard ad eccezione del valore di Norm% sostituito dal rapporto di somma dei picchi.

# Disposizione del rapporto di stampa per picchi non calibrati

Per modificare la disposizione del rapporto di stampa relativo a picchi non calibrati, selezionare una delle seguenti funzioni dalla finestra di dialogo Specify Report (Specifica rapporto).

- Separately (Separatamente) per inserire i picchi non calibrati in una tavola separata se si sceglie la suddivisione per tempi di ritenzione/migrazione o in tavole separate se si sceglie la suddivisione per segnali.
- With Calibrated Peaks (Con picchi calibrati) per inserire i picchi non calibrati insieme ai picchi calibrati.
- Do Not Report (Nessun rapporto) per evitare l'inserimento di picchi non calibrati.

Destinazione del rapporto di stampa

# Destinazione del rapporto di stampa

Il rapporto di stampa può essere inviato a diverse unità.

• Schermo

Il rapporto di stampa (comprendente testo e grafica) viene visualizzato sullo schermo nella finestra Report Preview (Anteprima rapporto), dalla quale può essere stampato.

• Stampante

Il rapporto di stampa contenente testo e grafici viene stampato sulla stampante attualmente selezionata.

• File

Il rapporto di stampa viene salvato in un file. Se i dati vengono salvati in un file è possibile rielaborare i dati con un altro programma, come Microsoft Windows EXCEL.

# Formati dei file dei report

Il report può essere salvato in formati diversi. Ciascun formato ha un'estensione specifica. È possibile selezionare più formati per un report.

- .TXT Il testo viene stampato come file di solo testo UNICODE.
- .EMF La parte grafica (segnale o curva di calibrazione) viene salvata come metafile Windows (WMF). Ciascun report può contenere più file .WMF. Il formato di file prodotto è conforme agli standard Microsoft come definito nella documentazione dello sviluppo del software di Windows. Questi file sono compatibili con il formato Aldus Placeable Metafile (APM) usato da numerosi pacchetti software brevettati.
- .DIF I dati contenuti nel report in forma tabulare vengono salvati in formato DIF (Data Interchange Format). Questo formato è supportato da programmi con fogli elettronici come Microsoft Windows EXCEL. Indipendentemente dallo stile scelto, vengono salvate solo le informazioni contenute nel tipo "Breve".

**.CSV** Il report è in formato CSV (Comma Separated Values). Si tratta di un formato molto semplice per i dati in forma tabulare, supportato da molti programmi con fogli elettronici e database. Indipendentemente dallo stile scelto, vengono salvate solo le informazioni contenute nel tipo "Breve".

Un report può contenere più file .DIF e .CSV. Il primo file di ciascun blocco, ad esempio REPORT00.CSV, contiene l'intestazione. I file che seguono contengono i dati dei tabulati.

Se i risultati sono ordinati in base al tempo di ritenzione/migrazione, è necessario un solo file per avere la tavola completa, ad esempio REPORT01.CSV.

Se i risultati sono ordinati in base al segnale, sarà necessario usare una tavola diversa per ciascun segnale. In questo caso i file sono denominati da Report01.CSV a ReportNN.CSV, dove NN è il numero del segnale.

- **.XLS** Il report viene esportato in Microsoft Excel in formato (XLS). I dati devono essere generalmente rielaborati.
- .PDF II report viene stampato in un file .pdf. La configurazione della ChemStation consente di installare una stampante PDF chiamata "PDF-XChange 4.0". Questa stampante sarà visibile nel menu Start/Impostazioni/Stampanti e fax solo dopo il riavvio del computer. All'avvio della ChemStation, viene creata un'altra stampante temporanea chiamata "ChemStation PDF" basata sulla stampante PDF-XChange. Durante l'esecuzione di qualsiasi sessione della ChemStation, ChemStation PDF sarà visibile nel menu Start/Impostazioni/Stampanti e fax. L'opzione Unique pdf file name consente di memorizzare i report .pdf in modo indipendente dai report stessi, con i nomi file <nome\_contenitore\_sequenza>\_<nome\_file\_dati>.pdf

# Report riassuntivi di sequenza

# Sguardo d'insieme

La ChemStation è in grado di produrre una serie di rapporti di stampa standard per ogni singola analisi. Il rapporto di stampa di riassunto della sequenza è un ulteriore tipo di rapporto di stampa che permette di calcolare e riportare parametri in analisi diverse. È molto utile, ad esempio, per verificare la stabilità di uno strumento o la robustezza di un metodo nuovo.

Questo tipo di rapporto di stampa comprende vari elementi.

- Una pagina di intestazione.
- La configurazione dello strumento, compresi i numeri di revisione ed i particolari della colonna/del capillare in uso.
- La tavola di sequenza che elenca che cosa avrebbe dovuto fare la sequenza automatica.
- Un registro elettronico che descrive cosa è stato effettivamente realizzato e qualsiasi evento inaspettato che si verifica durante la sequenza.
- Liste di metodi.
- Rapporti di stampa singoli per ogni campione.
- Statistiche sulle analisi basate sui criteri selezionati. Le *statistiche vengono* calcolate solo per i composti calibrati.
- Un indice con il numero di pagina ed i riferimenti a sezioni particolari del rapporto di stampa.

## Impostazione di un report riassuntivo di sequenza

Quando si imposta un report riassuntivo di sequenza, si può scegliere qualsiasi combinazione delle seguenti nove categorie attivando le apposite caselle e, dove necessario, scegliere uno stile di report dalla selezione Modello. Ogni modello specifica i contenuti ed il layout di quella particolare selezione di report riassuntivo della sequenza.

Si possono scegliere gli stili che seguono.

#### **One Page Header**

Il modello GLP stampa la parola GLP a lettere grandi come pagina titolo per il report che segue. Comprende la data e lo spazio per la firma.

#### Configuration

Scegliere **Configuration** se si desidera inserire la configurazione dello strumento e le specifiche della colonna analitica/capillare.

#### **Sequence Table**

Scegliere **Sequence Table** per inserire nel report una lista di campioni, parametri di quantificazione e nomi di metodi. Questa lista dovrebbe corrispondere a quanto il sistema ha analizzato.

#### Logbook

Scegliere **Logbook** per avere un elenco delle analisi effettuate dal sistema, comprese le condizioni dello strumento e qualsiasi evento inatteso verificatosi durante l'analisi dei campioni.

#### Methods

Scegliere **Methods** per elencare tutti i metodi analitici usati in una serie di analisi automatizzata.

#### **Analysis Reports**

Scegliere **Analysis Reports** per ottenere report singoli secondo lo stile impostato per il metodo.

I singoli report di analisi possono essere stampati dopo ogni analisi a seconda dello stile di report specificato per il metodo in questione, oltre alle sezioni specificate in **Sequence Summary Reporting**. Consultare la sezione "Output di sequenza".

#### SUILabel Type = Application > Statistics for Calibrated and Sample Runs

Scegliendo Calcolo statistico esecuzioni si possono ottenere analisi statistiche di tendenza per campioni di calibrazione. Scegliendo invece **Statistics** si possono ottenere analisi statistiche di tendenza per analisi di campioni (scono-

sciuti). Per entrambi le selezioni si possono avere i modelli Statistiche standard e Statistiche estese. **Extended Statistics** stampa le analisi in forma di grafico mentre **Standard Statistics** stampa unicamente il testo. La selezione effettuata nella finestra di dialogo **Items and Limits for Extended Statistics** viene usata solo se si sceglie l'opzione **Extended Statistic** nella finestra di dialogo **Sequence Summary Parameters**.

Se si sceglie l'opzione **Standard Statistic** nella finestra di dialogo **Sequence Summary Parameters**, le statistiche riportate saranno:

- Tempo di ritenzione/migrazione
- Area
- Altezza
- Quantità
- Ampiezza del picco (basata sullo stile del report, consultare la sezione "Stili di report", pagina 230)
- Simmetria.

Il calcolo statistico non distingue fra i diversi livelli di calibrazione in una sequenza che utilizza metodi di calibrazione multilivello. Ciò significa che i valori che dipendono dalla concentrazione, ad esempio Area, Altezza, Quantità (vedere la finestra di dialogo Voci e limiti per statistiche estese) sono presi tutti insieme, indipendentemente dal livello di calibrazione. I valori di **Statistics for Calibration Runs** non sono quindi utili per metodi di calibrazione multilivello nelle sequenze.

#### Riassunto

La selezione di **Summary** stampa una visione d'insieme delle serie di campioni analizzate e dei metodi usati. Se si seleziona Riassunto unitamente ad altre voci di Riassunto sequenza vengono inseriti i numeri di pagina che si riferiscono ad altre parti del report riassuntivo di sequenza. Sono disponibili due stili.

**Sample Summary** mette in forma di tabulato i particolari delle analisi dei campioni della sequenza con qualche informazione relativa ai campioni come nome, nome del file di dati, metodo e numero di vial.

**Compound Summary** crea un tabulato delle analisi del campione con risultati quantitativi di base per ogni composto calibrato o ogni picco, a seconda del metodo.

#### Output di sequenza

Nella finestra di dialogo **Sequence Output** è possibile definire dove stampare il report riassuntivo della sequenza.

Scegliendo **Report to file** ed inserendo un nome di file viene inviato il report nel file specificato. L'impostazione predefinita prevede che i dati vengano salvati in GLPrprt.txt. Nei sistemi gascromatografici a doppia iniezione i dati vengono salvati in GLPrptF.txt e GLPrptB.txt rispettivamente per l'iniettore anteriore e quello posteriore.

Selezionare **Report to PDF** per salvare il report come documento PDF. Il report viene salvato nella cartella della sequenza con il nome CLPrprt.PDF

Selezionare **Report to HTM** per stampare il report in formato HTML. Il report viene salvato in una directory HTM nella directory dei dati specificata in **Sequence Parameters**. Il report HTML è costituito da un file indice (index.htm) e da almeno altri due file, un file di contenuto (contents.htm) e un file GIF (Graphics Interchange Format) per ogni pagina del report (ad esempio page1.gif). Per visualizzare il report HTML, aprire il file indice nel browser.

Scegliendo **Report to printer** il report viene stampato sulla stampante di sistema. Stampa report singolo per ogni analisi attiva la stampa di report singoli per campione, secondo il metodo analitico, dopo ogni analisi. Questi report saranno aggiunti a quelli specificati in Report riassuntivo sequenza e prodotti alla fine dell'intera sequenza. È possibile specificare una nuova destinazione per questi report nella finestra di dialogo **Sequence Output** o utilizzare la destinazione specificata per ogni metodo.

#### 10 Uso dei report della ChemStation

Report riassuntivi di sequenza



11

# Valutazione della system suitability

Determinazione del rumore di fondo 245 Calcolo di un rumore pari a sei volte la deviazione standard 245 Calcolo del rumore tramite la formula da picco a picco 246 Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM 247 Calcolo del rapporto segnale-rumore 249 Deriva ed oscillazione 249 Calcolo della simmetria del picco 250 Formule e calcoli di idoneità del sistema 252 Definizioni generali 253 Volume vuoto 253 Tempo di ritenzione di un composto non ritenuto t (m) [min] 253 Definizioni di test sulle prestazioni 254 Momenti statistici 254 Momenti statistici, disallineamento ed eccesso 255 Ampiezza reale del picco Wx [min] 256 Fattore di capacità (USP), Rapporto di capacità (ASTM) k' 256 Fattore di scodamento USP t 256 Numero di piatti teorici per colonna (USP, ASTM) n 257 Numero di piatti teorici al metro N [1/m] 258 Ritenzione relativa (USP, ASTM), alfa di selettività 258 Risoluzione (USP, ASTM) R 259 Definizioni per la riproducibilità 260 Media campione M 260 Deviazione standard S del campione 260 Deviazione standard relativa RSD[%] (USP) 261 Deviazione standard della media SM 261 Intervallo di confidenza CI 262 Analisi della regressione 263



#### **11** Valutazione della system suitability

Report riassuntivi di sequenza

Coefficiente di regressione 263 Deviazione standard (S) 264 Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente 265

Questo capitolo descrive ciò che può fare la ChemStation per valutare le prestazioni sia dello strumento analitico prima che venga utilizzato per l'analisi del campione e del metodo analitico prima che sia utilizzato normalmente e per controllare le prestazioni dei sistemi di analisi prima e durante le analisi di routine.

Secondo le buone prassi di laboratorio, è opportuno sia valutare le prestazioni di uno strumento analitico prima che venga utilizzato per l'analisi dei campioni sia il metodo analitico prima che venga usato per le analisi di routine. Inoltre, è opportuno anche controllare le prestazioni dei sistemi di analisi prima, durante e dopo le analisi di routine. Il software ChemStation fornisce strumenti idonei per effettuare questi tre tipi di test automaticamente. I test sulla strumentazione possono includere la misurazione della sensibilità dello strumento, della precisione dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi e della precisione delle aree dei picchi. Un metodo di prova può includere la misurazione dei tempi di ritenzione/migrazione dei picchi e delle relative quantità, della selettività e della robustezza del metodo rispetto alle variazioni che si verificano giornalmente durante l'uso. I test sui sistemi possono comprendere la misurazione della precisione della precisione tra due picchi specifici e lo scodamento dei picchi.

I laboratori che hanno l'obbligo di conformarsi con:

- Le buone pratiche di laboratorio (GLP),
- Le buone pratiche di fabbricazione (GMP) e le buone pratiche di fabbricazione correnti (cGMP)
- Le buone pratiche di laboratori per i processi automatizzati (GALP)

sono tenuti a eseguire questi test e a documentare dettagliatamente i risultati. Il laboratori che hanno aderito a sistemi di controllo della qualità, come la certificazione ISO9000, devono poter certificare le prestazioni di tutti gli strumenti utilizzati.

ChemStation consente di raggruppare i risultati di varie analisi e di creare un report di riepilogo che contenga una valutazione statistica di tali risultati. I test vengono generalmente documentati in un formato approvato dagli enti normativi e dalle società di certificazione esterne. Le statistiche includono informazioni su:

- Tempo di ritenzione/migrazione dei picchi
- Area dei picchi
- Quantità
- Altezza dei picchi
- Larghezza dei picchi a metà altezza
- Simmetria dei picchi
- Scodamento dei picchi
- Fattore di capacità (k´)
- Numero di piastre
- Risoluzione tra i picchi
- Selettività rispetto al picco precedente
- Scostamento
- Eccessi

Vengono calcolati anche il valore medio, la deviazione standard, la deviazione standard relativa e l'intervallo di confidenza. Gli utenti possono impostare limiti per la deviazione standard, la deviazione standard relativa o l'intervallo di confidenza per ciascuno dei parametri. Se i valori superano i limiti, i valori anomali vengono evidenziati nel report per richiamare l'attenzione dell'operatore.

La qualità dei dati analitici è ulteriormente supportata dalla possibilità di registrare le condizioni effettive presenti al momento delle misurazioni. Il registro della ChemStation contiene informazioni sulle condizioni pre- e post- analisi di ciascun strumento Queste informazioni vengono salvate insieme ai dati e inclusi nei report insieme ai dati dei campioni. Le curve delle prestazioni degli strumenti vengono registrate, durante tutta l'analisi, come segnali e salvati nel file dati. Se lo strumento lo consente, è possibile richiamare queste registrazioni durante gli audit e sovrapporli sui cromatogrammi.

Il programma consente anche di misurare automaticamente il rumore della linea di base e la deriva. Utilizzando i dati dell'altezza dei picchi per ciascun composto calibrato presente nel metodo, è possibile anche calcolare un livello minimo di rilevazione. Report riassuntivi di sequenza

Infine, è possibile anche includere in ciascun report stampato informazioni sulla configurazione degli strumenti, i numeri di serie degli strumenti, i dati identificativi sulle colonne/capillari e commenti personali.

I risultati estesi sulle prestazioni vengono calcolati solo per i composti calibrati nel metodo e caratterizzati utilizzando i tempi di ritenzione/migrazione e i nomi dei composti.

Un rapporto di test tipico sulle prestazioni di un sistema contiene generalmente i seguenti risultati sulle prestazioni:

- Dettagli sullo strumento
- Dettagli sulle colonne/i capillari
- Metodo analitico
- Informazioni sul campione
- Informazioni sull'acquisizione
- Descrizione del segnale e determinazione del rumore della linea di base
- Segnale etichettato con i tempi di ritenzione/migrazione o i nomi dei composti

Inoltre, per ciascun composto calibrato contenuto nel cromatogramma vengono generate le seguenti informazioni:

- Tempo di ritenzione/migrazione
- k´,
- Simmetria
- Ampiezza dei picchi
- Numero di piastre
- Risoluzione
- Rapporto segnale-rumore and
- Nome del composto

# Determinazione del rumore di fondo

Il rumore può essere determinato a partire dal valore dei punti di dati di una scala temporale di segnale scelta. Il rumore di fondo può essere trattato in tre modi:

- Come sei volte la deviazione standard (sd) della regressione lineare di deriva.
- Come picco-a-picco (deriva corretta).
- Come stabilito dal metodo ASTM (ASTM E685-93).

Il rumore può essere calcolato per un massimo di sette intervalli del segnale; gli intervalli devono essere specificati come parte delle impostazioni di System Suitability nei parametri per la stesura dei rapporti.

## Calcolo di un rumore pari a sei volte la deviazione standard



Figura 42 Rumore come sei volte la deviazione standard

La regressione lineare viene calcolata utilizzando tutti i punti di dati compresi in un intervallo di tempo dato (consultare la sezione "Analisi della regressione", pagina 263). Il rumore è dato dalla seguente formula:

 $N = 6 \times Std$ 

#### **11** Valutazione della system suitability

Determinazione del rumore di fondo

#### Dove

N è il rumore basato sul metodo di sei volte la deviazione standard

E Std è la deviazione standard della regressione lineare di tutti i punti di dati nell'intervallo di tempo

## Calcolo del rumore tramite la formula da picco a picco



Figura 43 Rumore dal picco massimo al picco minimo (Distanza)

La regressione lineare viene calcolata utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo (consultare la sezione "Analisi della regressione", pagina 263). La regressione lineare viene sottratta da tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo per fornire un segnale corretto della deriva. Il rumore da picco a picco viene quindi calcolato utilizzando la formula:

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

Dove

N è il rumore da picco a picco

I<sub>max</sub> è il picco con l'intensità più elevata (massimo)

 $I_{min} \dot{e}$ il picco di intensità inferiore (minimo) per l'intervallo di tempo specificato



### Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM

Figura 44Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM

La determinazione del rumore ASTM (ASTM E 685-93) si basa sulle pratiche standard per la verifica di rivelatori fotometrici a lunghezza d'onda variabile utilizzati in cromatografia liquida, come definito dalla Società Americana per la verifica ed i materiali (American Society for Testing and Materials). Basandosi sulle dimensioni dell'intervallo di tempo si possono distinguere tre diversi tipi di rumore. La determinazione del rumore si basa su una misurazione da picco a picco entro un intervallo di tempo definito.

#### Tempo del ciclo, t

*Rumore a lungo termine*, l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale di frequenza del rivelatore va da 6 a 60 cicli all'ora. Il rumore a lungo termine si determina quando la scala scelta supera l'ora. La scala temporale per ciascun ciclo (dt) viene impostata su dieci minuti e sarà pari a circa sei cicli all'interno della scala temporale scelta.

*Rumore a breve termine*, l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale del rivelatore di una frequenza superiore ad un ciclo al minuto. Il rumore a breve termine si determina per una scala temporale scelta fra i 10 ed i 60 minuti. La scala temporale per ogni ciclo (dt ) viene impostata su 1 minuto e sarà pari ad almeno 10 cicli nell'intervallo di tempo scelto.

*Rumore a brevissimo termine (non facente parte di ASTM E 685-93)*, questo termine è stato introdotto per descrivere l'ampiezza massima per tutte le variazioni casuali del segnale del rivelatore di una frequenza superiore ad un ciclo ogni 0,1 minuti.

Il rumore a brevissimo termine si determina per un intervallo di tempo selezionato da 1 a 10 minuti. La scala temporale per ogni ciclo (dt ) viene impostata su 0,1 minuti e sarà pari ad almeno 10 cicli nell'intervallo di tempo scelto.

#### Determinazione del numero dei cicli, n

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

Dove t è il tempo del ciclo e  $t_{\rm tot}$  è il tempo totale per il quale il rumore viene calcolato.

#### Calcolo del rumore da picco a picco per ciascun ciclo

La regressione lineare viene calcolata utilizzando tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo (consultare la sezione "Analisi della regressione", pagina 263). La regressione lineare viene sottratta da tutti i punti di dati compresi nell'intervallo di tempo per fornire un segnale corretto della deriva. Il rumore da picco a picco viene quindi calcolato utilizzando la formula:

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

Dove N è il rumore da picco a picco,  $I_{max}$  è il picco con l'intensità più elevata (massimo) e  $I_{min}$  è il picco di intensità inferiore (minimo) per l'intervallo di tempo specificato.

#### Calcolo del rumore secondo ASTM

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

Dove N<sub>ASTM</sub> è il rumore secondo il metodo ASTM.

La determinazione del rumore secondo ASTM non viene effettuata se l'intervallo di tempo scelto è inferiore a un minuto. Se la scala temporale scelta è maggiore od uguale a un minuto, il rumore può essere determinato secondo i metodi ASTM precedentemente descritti, a seconda della scala. Per il calcolo vengono usati almeno sette punti di dati per ciclo. Nella determinazione del rumore automatizzata i cicli sono sovrapposti per il 10%.

# Calcolo del rapporto segnale-rumore

Per il calcolo del rapporto segnale-rumore, la ChemStation utilizza il metodo di sei volte la deviazione standard (sd) della regressione lineare della deriva per il calcolo del rumore. L'intervallo più vicino al picco viene selezionato come specificato nelle impostazioni di System Suitability. Il rapporto segnale-rumore viene quindi calcolato utilizzando la formula:

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

Il rapporto segnale-rumore viene calcolato per tutti i picchi del segnale. Se la ChemStation non riesce a trovare un valore di rumore, il rapporto segnale-rumore viene contrassegnato con "-".

# Deriva ed oscillazione

La deriva viene data come pendenza della regressione lineare (vedere la Figura Rumore come sei volte la deviazione standard) e l'oscillazione viene determinata come rumore da picco a picco dei valori di metà dati nei cicli di rumore di fondo secondo ASTM (consultare la sezione Determinazione del rumore secondo il metodo ASTM).

# Calcolo della simmetria del picco

La ChemStation non determina il rapporto di asimmetria del picco, che viene normalmente determinato confrontando la metà delle ampiezze dei picchi al 10% dell'altezza o al 5%, come consigliato dall'FDA (Food and Drug Administration).

La simmetria del picco viene calcolata come pseudomomento dall'integratore utilizzando le seguenti equazioni di momento:

$$m_{1} = a_{1} \left( t_{2} + \frac{a_{1}}{1.5H_{f}} \right)$$

$$m_{2} = \frac{a_{2}^{2}}{0.5H_{f} + 1.5H}$$

$$m_{3} = \frac{a_{3}^{2}}{0.5H_{r} + 1.5H}$$

$$m_{4} = a_{4} \left( t_{3} + \frac{a_{4}}{1.5H_{r}} \right)$$
Peak symmetry =  $\sqrt{\frac{m_{1} + m_{2}}{m_{3} + m_{4}}}$ 

Se non si trova nessun punto di flesso o se ne trova solo uno, allora la simmetria del picco si calcola così:

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

#### 11 Valutazione della system suitability

Calcolo della simmetria del picco



Figura 45 Calcolo del fattore di simmetria del picco

Dove:

- a<sub>i</sub> = Area della porzione
- $t_i$  = Tempo della porzione
- $H_f$  = Altezza o punto di flesso anteriore
- ${\rm H_r}$  = Altezza o punto di flesso posteriore
- H = Altezza all'apice

Formule e calcoli di idoneità del sistema

# Formule e calcoli di idoneità del sistema

La ChemStation utilizza le formule seguenti per ottenere i risultati dei vari test di idoneità del sistema. I risultati vengono riportati con gli stili di report Prestazioni, Prestazioni + Rumore e Prestazioni + Esteso.

Quando per una definizione si specifica ASTM o USP, allora la definizione sarà conforme a quelle date nei testi di riferimento corrispondenti. Tuttavia i simboli usati in questo manuale possono non essere gli stessi dei testi di riferimento.

I due testi usati in questo contesto sono:

- ASTM: Section E 682 93, Annual Book of ASTM Standards, Vol.14.01
- USP: The United States Pharmacopeia, XX. Revision, pp. 943 946
# Definizioni generali

# Volume vuoto

 $V = d^2 \pi l(f/4)$ 

Dove:

d = Diametro della colonna [cm]

 $\pi$  = Costante, rapporto fra la circonferenza e il diametro di un cerchio.

l = Lunghezza della colonna [cm]

f = Frazione del volume della colonna non preso da una fase stazionaria ma disponibile come fase mobile; valore predefinito f = 0,68 (per la colonna modello Hypersil)

# Tempo di ritenzione di un composto non ritenuto t (m) [min]

(Chiamato anche tempo morto o vuoto)

 $T_m = V/F$ 

Dove:

F = Flusso in cromatografia liquida [ml/min]

# Definizioni di test sulle prestazioni

# Momenti statistici

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

Dove:

Ν	Numero di porzioni di area
A <sub>i</sub>	Valore della porzione di area indicato da i
d <sub>t</sub>	Intervallo di tempo tra porzioni di area adiacenti
t <sub>0</sub>	Tempo della prima porzione di area
$\sum_{i=1}^{N}$	Sommatoria dall'indice iniziale 1 all'indice finale N per le osservazioni discrete
$\mathbf{X} = \sum_{i=1}^{N} (A_i)$	

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

## Momenti statistici, disallineamento ed eccesso

I momenti statistici sono utilizzati come alternativa per descrivere forme di picchi asimmetriche. Esiste un numero infinito di momenti del picco, ma solo i primi cinque sono utilizzati in relazione ai picchi cromatografici. Sono chiamati Momento  $0^{\circ}$ , Momento  $1^{\circ}$ , ... Momento  $4^{\circ}$ .

Il Momento 0º rappresenta l'area del picco.

Il Momento 1<sup>o</sup> è il tempo di ritenzione medio, o il tempo di ritenzione misurato al centro di gravità del picco. Questo valore è diverso dal tempo di ritenzione cromatografica misurato al massimo del picco se il picco non è simmetrico.

Il Momento 2<sup>o</sup> è la varianza del picco, cioè una misura della diffusione laterale. È la somma della varianza con il contributo di diverse parti del sistema.

Il Momento 3º descrive la simmetria verticale o il disallineamento. È la misura del distacco della forma del picco dallo standard gaussiano. Il disallineamento dato nel report Prestazioni + Esteso è la sua forma senza dimensioni. Un picco simmetrico ha un disallineamento uguale a zero. I picchi scodati hanno un disallineamento positivo e il Momento 1 è maggiore del tempo di ritenzione. I picchi con fronte anteriore hanno un disallineamento negativo ed il loro Momento 1 è minore del tempo di ritenzione.

Il Momento 4<sup>o</sup> o eccesso è una misura della compressione o dell'allungamento del picco lungo un asse verticale e di come può essere comparato ad uno standard gaussiano per il quale il Momento 4 equivale a zero. Può essere visualizzato muovendo o tirando lateralmente un picco gaussiano mantenendo l'area costante. Se il picco viene compresso o schiacciato per una comparazione, il suo eccesso sarà negativo. Se è più alto il suo eccesso sarà positivo. Anche l'eccesso viene incluso nel report Prestazioni + Esteso nella sua forma senza dimensioni.

# Ampiezza reale del picco $W_x$ [min]

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

- W<sub>b</sub> Ampiezza base, sigma 4, ottenuta intersecando le tangenti attraverso i punti di flesso con la linea di base (ampiezza picco tangente)
- W<sub>4,4</sub> Ampiezza al 4,4% dell'altezza (ampiezza sigma 5)
- W<sub>5,0</sub> Ampiezza al 5% dell'altezza (ampiezza del picco che scoda), utilizzata per il fattore di scodamento USP
- W<sub>50.0</sub> Ampiezza al 50% dell'altezza (ampiezza effettiva del picco a metà altezza o 2.35 sigma).

# Fattore di capacità (USP), Rapporto di capacità (ASTM) k'

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

Dove:

T<sub>R</sub> = Tempo di ritenzione del picco [min]

T<sub>0</sub> = Tempo morto [min]

## Fattore di scodamento USP t

$$t = \frac{W_{5.0}}{t_{\rm w} \cdot 2}$$

Dove:

 $\rm t_w$  = Distanza in min dalla parte anteriore del picco a TR, misurato al 5% dell'altezza del picco

W<sub>5.0</sub> = Ampiezza del picco al 5% dell'altezza [min]

Definizioni di test sulle prestazioni



## Numero di piatti teorici per colonna (USP, ASTM) n

## Metodo della tangente (USP, ASTM):

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

Dove:

 $W_B$  = Ampiezza della base [min]

## Metodo di metà altezza (ASTM):

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

Dove:

 $W_{50}$  = Ampiezza del picco a metà dell'altezza [min]

Definizioni di test sulle prestazioni

#### Metodo del Sigma 5:

$$n = 25 \left(\frac{T_R}{W_{4,4}}\right)^2$$

Dove:

 $W_{4,4}$  = Ampiezza del picco al 4,4% dell'altezza [min]

#### Metodo della varianza:

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

Dove:

 $Mx = x^{0}$  del momento statistico (consultare anche la sezione "Momenti statistici" , pagina 254)

## Numero di piatti teorici al metro N [1/m]

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

Dove:

n = Numero di piatti teorici

l = Lunghezza della colonna [cm]

## Ritenzione relativa (USP, ASTM), alfa di selettività

Pertinente ai picchi a e b,  $T_R$  del picco a <  $T_R$  del picco b

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

Dove:

 $k'_{(x)}$  = fattore di capacità per il picco x

# **Risoluzione (USP, ASTM) R**

Relativa a picchi a e b,  $T_R$  del picco a <  $T_R$  del picco b;  $T_R$  in min

#### Metodo della tangente (USP, ASTM):

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

Metodo del Sigma 5:

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

Metodo dell'ampiezza a metà altezza (risoluzione utilizzata nel report sulle prestazioni):

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

#### Metodo statistico:

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

Dove:

 $M1_{(x)}$  = Tempo di ritenzione medio per il picco x (Momento statistico 1) [min]

 $W_{B(x)}$  = Ampiezza di base per il picco x [min]

 $W_{4.4(x)}$  = Ampiezza al 4,4% dell'altezza per il picco x [min]

W<sub>50(x)</sub> = Ampiezza al 50% dell'altezza per il picco x [min]

 $W_{S}(x) =$  Ampiezza derivata da momenti statistici =  $\sqrt{(M2)}$  per picco x [min] (consultare anche la sezione "Momenti statistici", pagina 254)

# Definizioni per la riproducibilità

Per la revisione statistica dei dati analitici in termini di riproducibilità, la sequenza è considerata un campione casuale di piccole dimensioni preso da un numero infinito di possibili risultati sperimentali. Per ottenere un gruppo completo di risultati sarebbe necessario disporre di una quantità illimitata di materiale campione e di tempo. Dati rigorosamente statistici si applicano unicamente ad un gruppo o ad una popolazione di dati completi e auto-contenuti. Quindi un requisito essenziale di tale trattamento è che il campione selezionato venga considerato rappresentativo di tutti i dati.

## Media campione M

Il valore di media M di un campione casuale consistente di N misurazioni viene calcolato da questo gruppo limitato di N valori singoli osservati X<sub>i</sub> indicizzati con un indicatore consecutivo i secondo la seguente formula:

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

Dove:

N = numero di osservazioni discrete

X<sub>i</sub> = Valore di osservazioni discrete indicate da i

## Deviazione standard S del campione

Consideriamo un campione casuale di dimensioni N. La deviazione standard S del campione per il campione finito scelto, preso da una popolazione di dati di grandi dimensioni, è determinato da

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

La deviazione standard S del campione differisce in due punti dalla deviazione standard s dell'intera popolazione:

- invece del valore reale di media viene utilizzato solo il valore di media M del campione e
- divisione per N-1 invece di N.

## Deviazione standard relativa RSD[%] (USP)

La deviazione relativa standard è definita come

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

## Deviazione standard della media $S_M$

Detta M la media del campione e S la deviazione standard dello stesso [o (N-1)]. La deviazione standard  $\rm S_M$  della media del campione M è determinata da

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

Ciò può essere meglio illustrato da un esempio.

Mentre il tempo di ritenzione di un determinato composto può deviare leggermente dal valore di media calcolato durante una sequenza, i dati di un'altra sequenza possono differire in maniera più significativa a causa, ad esempio, delle modifiche della temperatura dell'ambiente, del degrado del materiale con il quale è stata fabbricata la colonna, ecc. Per determinare questa deviazione, la deviazione standard della media del campione  $S_M$  può essere calcolata in base alla seguente formula.

## Intervallo di confidenza CI

L'intervallo di confidenza viene calcolato per fornire informazioni sulla precisione della stima di un valore di media, quando lo si applica all'intera popolazione e non solo ad un campione.

L'intervallo di confidenza 100 × (1 -  $\alpha$ ) % per la media globale è dato da

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

Dove:

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

Punto percentuale della tavola di distribuzione t ad una probabilità di rischio pari a  $\alpha$ )

Per la statistica estesa riportata nel report riassuntivo di sequenza, deve essere usato l'intervallo di confidenza del 95% ( $\alpha$  = 0.05).

La distribuzione t (o 'distribuzione di Student') deve essere utilizzata per volumi di campione ridotti. In caso di volumi di campioni elevati, i risultati della distribuzione t e la normale distribuzione (gaussiana) non risultano più diversi. Quindi, in caso di 30 o più campioni, può essere usata, in sostituzione, la normale distribuzione. Poiché sarebbe estremamente laborioso calcolare la distribuzione t per numeri elevati, la distribuzione normale costituisce la migliore approssimazione.

Intervallo di confidenza del 95% per 6 campioni:

1 -  $\alpha$  = 0.95

N = 6

Il valore corretto di t è stato preso dalla tavola di distribuzione t per 5 (N-1) gradi di libertà e per il valore  $\alpha/2$ , pari a 0,025. Ciò darà la seguente formula di calcolo per il CI:

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

# Analisi della regressione

Dato:

Funzione lineare:

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

Coefficienti:

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

Dove:

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

# Coefficiente di regressione

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

Dove:

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

11 Valutazione della system suitability Definizioni per la riproducibilità

**Deviazione standard (S)** 

\_

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

# Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente

Se, per scopi di validazione, fosse necessario ricalcolare manualmente i risultati ottenuti dalla ChemStation, come le curve di calibrazione, i coefficienti di correlazione, i piatti teorici, ecc. è necessario tenere conto del formato numerico utilizzato dalla ChemStation.

Per tutti i numeri salvati all'interno della ChemStation viene utilizzato il tipo di dati "C" DOUBLE. Ciò significa che vengono memorizzate 14 cifre significative per ogni numero. L'implementazione di questo tipo di dati segue l'adozione da parte di Microsoft dello standard IEEE per il tipo di dati "C" e delle regole di arrotondamento ad esso associate (consultare i documenti Microsoft Q42980, Q145889 e Q125056).

Dato che può essere utilizzato un numero illimitato di parametri per il calcolo della tavola di calibrazione, non è possibile calcolare l'esatta entità dell'errore probabilmente introdotto dalla propagazione e dall'accumulo di errori di arrotondamento. Tuttavia una verifica intensiva tramite diverse curve di calibrazione ha dimostrato che può essere garantita un'accuratezza di un massimo di 10 caratteri numerici. Dal momento che la ripetibilità dell'area, dell'altezza e del tempo di ritenzione di un'analisi cromatografica ha di solito 3 cifre significative, 10 cifre significative all'interno del calcolo sono in genere sufficienti. Per questa ragione la tavola di calibrazione e le altre tavole visualizzano un massimo di 10 cifre significative.

Se per la validazione è richiesto un calcolo esterno (manuale), si consiglia di utilizzare tutte le cifre usate per il calcolo interno. L'uso dei dati visualizzati e/o arrotondati per i calcoli esterni può produrre risultati diversi da quelli prodotti dalla ChemStation, a causa degli errori di arrotondamento.

Il paragrafo che segue descrive come accedere a tutte le cifre memorizzate internamente che di solito sono richieste per i calcoli manuali. In tutti i casi deve essere caricato un file di dati e deve essere prodotto un report con lo stile adatto prima dell'esecuzione del comando elencato. Tutti i comandi vengono inseriti sull'apposita riga di comando della ChemStation, che può essere abilitata dal menu Visualizza. Le informazioni contenute nel file "C:\CHEM32\ TEMP.TXT" possono essere visualizzate utilizzando Blocco Note o un elaboratore di testi adatto.

Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente

#### Informazioni sui picchi non elaborati:

- Tempo di ritenzione
- Area
- Altezza
- Ampiezza (integratore)
- Simmetria
- Tempo di inizio del picco
- Tempo di fine del picco

Sulla riga di comando digitare:

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

#### Informazioni sul picco elaborato:

- Tempo di ritenzione misurato
- Tempo di ritenzione atteso
- Area
- Altezza
- Ampiezza (integratore)
- Simmetria
- Metà ampiezza Metà altezza del picco (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- Fattore di scodamento (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- Selettività (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- K` (Prestazioni + Esteso)
- Ampiezza del picco tangente (Prestazioni + Esteso)
- Disallineamento (Prestazioni + Esteso)
- Piatti teorici Metà altezza (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- Piatti teorici Tangente (Prestazioni + Esteso)
- Piatti teorici Sigma 5 (Prestazioni + Esteso)
- Piatti teorici Statistico (Prestazioni + Esteso)
- Risoluzione Metà altezza (Prestazioni e Prestazioni + Esteso)
- Risoluzione Tangente (Prestazioni + Esteso)

Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente

- Risoluzione Sigma 5 (Prestazioni + Esteso)
- Risoluzione Statistico (Prestazioni + Esteso)

Sulla riga di comando digitare:

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

#### Informazioni sul composto elaborato:

• Quantità calcolata

Sulla riga di comando digitare:

DUMPTABLE CHROMRES, COMPOUND,"C:\CHEM32\1\TEMP\COM-POUND.TXT"

#### Informazioni sulla tavola di calibrazione:

- Livello numerico
- Quantità
- Area
- Altezza

Sulla riga di comando digitare:

DUMPTABLE DAMETHOD, CALPOINT,"C:\CHEM32\1\TEMP\CALIB.TXT"

#### Informazioni sulla regressione lineare:

- Intercetta Y (CurveParm1)
- Pendenza (CurveParm2)
- Coefficiente di correlazione

Sulla riga di comando digitare:

DUMPTABLE DAMETHOD, PEAK, "C:\CHEM32\1\TEMP\REGRESS.TXT"

Accesso ai numeri a doppia precisione memorizzati internamente



**Descrizione della ChemStation Agilent** 

# 12 Verifica del sistema

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi) 270
Verifica del sistema 270
Il registro GLPsave 273
Funzione DAD Test (verifica del rivelatore a serie di diodi) 275
Funzione Revisione test DAD 275

Questo capitolo descrive la funzione di verifica e le funzioni di verifica GLP della ChemStation.



#### 12 Verifica del sistema

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi)

# Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi)

Se supportato dagli strumenti configurati, come i moduli Agilent Serie 1100/1200 per LC, la ChemStation comprende due finestre aggiuntive per eseguire le funzioni di verifica e diagnosi. Per ulteriori informazioni, consultare la Guida in linea.

## Verifica del sistema

La verifica del sistema è un fattore chiave per l'utilizzo di uno strumento analitico in un laboratorio regolamentato. Le funzioni della ChemStation che permettono di effettuare verifiche secondo la buona prassi di laboratorio (GLP) sono state progettate per aiutare gli utenti a dimostrare che lo strumento, o un suo componente, funziona in modo ottimale o funzionava in modo ottimale al momento in cui è stata effettuata una particolare analisi.

Le funzioni di verifica della ChemStation consentono di controllare che il software funzioni correttamente. È possibile effettuare questa operazione rielaborando i file di dati secondo metodi specifici e paragonando i risultati ad uno standard predefinito. La funzione di verifica è particolarmente importante per provare l'integrità dei risultati di integrazione e quantificazione.

È possibile usare il test di verifica standard o definire test personalizzati usando diversi metodi e file di dati per controllare le combinazioni algoritmiche del software utilizzate dai metodi di analisi. Il test di verifica è un file protetto e non può essere modificato o cancellato.

La funzione Verification (Verifica) della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) permette di scegliere fra le seguenti opzioni:

- effettuare un test di verifica del database;
- definire un nuovo test di verifica ed aggiungerlo al database;
- cancellare un test di verifica dal database.

La sezione How To (Come...) della Guida in linea descrive come eseguire queste operazioni. Quando si effettua un test di verifica sulla ChemStation, è possibile scegliere se effettuare il test per intero o selezionare una combinazione di parti. I risultati del test di verifica vengono salvati nella subdirectory predefinita: c:\ CHEM32\1\Verify, unitamente ai file di dati e di metodi. La subdirectory Verify è allo stesso livello delle subdirectory relative a sequenza, metodo e dati. È possibile inviare i risultati ad una stampante o ad un file. I risultati del test, compreso il risultato di un test di verifica combinato, sono positivi o negativi.

Sono disponibili i seguenti test.

## Digital Electronics (solo DAD Agilent Serie 1100/1200)

Un cromatogramma di prova viene memorizzato nel rivelatore a serie di diodi. Il cromatogramma viene inviato alla ChemStation dopo essere passato attraverso le stesse fasi di processo dei dati grezzi comuni provenienti da fotodiodi. I dati che ne derivano vengono paragonati ai dati originali archiviati nella ChemStation per questo cromatogramma di prova. Se non c'è corrispondenza il test risulta negativo. Questo test assicura che il sistema elettronico del DAD, che effettua il processo dei dati, funzioni ancora correttamente. Dato che viene utilizzato un cromatogramma di prova memorizzato, la lampada ed il rivelatore a serie di diodi non prendono parte a questo test. Possono comunque essere controllati tramite la "Funzione DAD Test (verifica del rivelatore a serie di diodi)", pagina 275.

### Integrazione del picco

Il file di dati viene di nuovo integrato utilizzando il metodo originale. I risultati vengono paragonati a quelli originali di integrazione archiviati nel registro di verifica. Se non sono corrispondenti il test risulta negativo.

#### Quantificazione del composto

I composti nei file di dati vengono di nuovo quantificati. I risultati vengono paragonati a quelli originali di quantificazione archiviati nel registro di verifica. Se non sono corrispondenti il test risulta negativo.

#### Stampa del rapporto

Il rapporto originale viene stampato di nuovo.

La pagina che segue illustra un esempio di test di verifica completato con esito positivo.

## 12 Verifica del sistema

Finestre Verification (Verifica) e Diagnosis (Diagnosi)

======================================		
======================================		
Component	Revision	
ChemStation for LC 3D Cher Microsoft Windows Processor CoProcessor	nStation B.01.01 Microsoft W Processor_Archi	lindows XP tecture_Intel
ChemStation Verification Tes Test Name : C:\CHEM32\1\VI Data File : C:\CHEM32\1\VI Method : C:\CHEM32\1\VI Original Datafile Original Acquisition Metho Original Operator Original Injection Date Original Sample Name	st Details: SRIFY\DEFAULT.VAL SRIFY\DEFAULT.VAL\VERI : VERIFY.D od : VERIFY.M : Hewlett-Packard : 4/16/93 11:56:0 : Isocratic Std.	IFY.D IFY.M A D7 AM
Signals Tested: Signal 1: DAD1 A, Sig=254	4,4 Ref=450,80 of VERI	FY.D
ChemStation Verification Test Results:		
Test Module Se	lected For Test I	est Result.
Digital electronics test Integration test Quantification test Print Analytical Report	No yes yes No	N/A Pass Pass N/A
ChemStation Verification Tes	st Overall Results:	Pass

# **II registro GLPsave**

Il registro GLPsave viene salvato alla fine di ogni analisi se viene scelto nella lista di controllo del periodo di funzionamento. Esso contiene le seguenti informazioni:

- segnali;
- registro elettronico;
- tavola dei risultati di integrazione;
- tavola dei risultati di quantificazione;
- dati sulle prestazioni dello strumento;
- metodo di analisi dei dati.

Si tratta di un registro completamente protetto, creato dal sistema al momento dell'analisi. È possibile richiamarlo in qualsiasi momento come prova dei metodi analitici.

L'opzione GLPsave Register nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) consente di rivedere il registro in qualunque momento. Il file è protetto da somma di controllo e da codice binario per assicurare che non possa essere modificato.

Se viene utilizzata la finestra di dialogo per scegliere il registro GLPsave, è possibile scegliere le opzioni di revisione dalle seguenti:

- load original method (carica metodo originale);
- load original signals (carica segnali originali);
- load instrument performance data (carica dati sulle prestazioni dello strumento);
- print original method (stampa metodo originale);
- print original integration results (stampa risultati di integrazione originali);
- print original quantification results (stampa risultati quantitativi originali);
- generate original report from the original method and signals (genera rapporto originale da metodo e segnali originali).

Si può usare la funzione di revisione GLP per dimostrare che i dati cromatografici sono originali, provare la qualità delle analisi dai dati sulle prestazioni dello strumento e dimostrare l'autenticità dell'interpretazione dei dati.

Ad esempio è possibile:

- ricaricare e ristampare la parte relativa all'elaborazione dei dati relativi al metodo utilizzato al momento dell'analisi del campione, al fine di provare che la valutazione dei dati, presentata come risultato dell'analisi, non sia stata modificata in alcun modo e
- rivedere i risultati di integrazione e quantificazione per provare l'autenticità del rapporto di stampa.

# Funzione DAD Test (verifica del rivelatore a serie di diodi)

Il test del rivelatore può essere usato per la validazione di routine del sistema di uno strumento analitico in un laboratorio regolamentato.

Il test del DAD stabilisce quali sono le prestazioni del rivelatore a serie di diodi. Quando si sceglie DAD Test dal menu Strumento (solo per LC3D e CE) viene eseguito un controllo dello strumento per l'intensità e la calibrazione della lunghezza d'onda. Premendo Salva, i risultati del test vengono automaticamente salvati del database DADTest, in un file chiamato DADTest.Reg che si trova nella directory predefinita dello strumento.

## **Funzione Revisione test DAD**

	La funzione <b>Review DAD Test</b> del menu <b>View</b> di Analisi dei dati consente di rive- dere il file DADTest.Reg in qualsiasi momento. Il file è protetto da somma di controllo e da codice binario per verificare che non possa essere modificato.
	È possibile scegliere una qualsiasi delle seguenti parti del test:
Show Holmium Spectra	Visualizza tutti gli spettri di olmio elencati nella tavola Revisione test DAD. Lo spettro attivo viene segnalato.
Show Intensity Spectra	Visualizza tutti gli spettri di intensità elencati nella tavola Revisione test DAD. Lo spettro attivo viene segnalato.
Save as New Database	Se viene sostituita la lampada del DAD è possibile reimpostare DADTest cancel- lando i risultati indesiderati dalla tavola e utilizzando quindi la funzione <b>Save</b> <b>as New Database</b> .
Show Selected Spectra	Visualizza solo gli spettri selezionati nella tavola.
Show Intensity Graph	È possibile tracciare un diagramma di intensità per fornire indicazioni sullo stato della lampada del rivelatore a serie di diodi. Il grafico fornisce una fun- zione dell'intensità massima rapportata al tempo.

# **Glossario-IU**

## A

access level Livello di accesso Analysis Reports Report di analisi Apply Manual Events from Method Applica eventi manuali dal metodo Area reject Scarto dell'area Autointegrate Autointegrazione

### C

**Calibration Settings** Impostazioni calibrazione Character Carattere **Compound Details** Dettagli composto **Compound Summary** Riassunto composto Configuration Configurazione Contents Contenuto **Control Chart** Diagramma di controllo current method Metodo corrente Current Method Metodo corrente

#### D

Data Analysis Analisi dei dati Data Analysis Navigation table Navigazione analisi dei dati Data File File di dati Delete Peak(s) Elimina picchi Description Descrizione Detail Dettagli Draw Baseline Traccia linea di base

## E

Extended Esteso Extended Performance Prestazioni estese Extended Statistic Statistiche estese Extended Statistic Parameters Parametri statistiche estesi Extended Statistics Statistiche estese

## F

Full Completo

### Н

Header Intestazione Height reject Scarto dell'altezza Height% Altezza%

### 

Individual Method from Data File (DA.M) Singolo metodo da file di dati (Da.M) Initial peak width Ampiezza iniziale del picco Integration Integrazione Integration Events Table Tavola degli eventi di integrazione Items and Limits for Extended Statistics Voci e limiti per statistiche estese

## L

Library Search Ricerca libreria Ioad DA method from data file Carica metodo DA dal file di dati Load DA method from data file Carica il metodo DA dal file di dati Logbook Registro elettronico

#### Μ

Manual Events Eventi manuali

#### **Descrizione della ChemStation Agilent**

#### **Glossario-IU**

Manual Integration integrazione manuale Method and Run Control Controllo metodo ed esecuzione Methods Metodi

#### Ν

Navigation Table tavola di navigazione Negative Peaks Picchi negativi Noise Rumore None Nessuno

### 0

One Page Header Titolo su una pagina

### P

page x of y pagina x di y Partial Sequence Sequenza parziale parts of method to run Parte del metodo da eseguire Path Percorso Paths Percorsi Performance Prestazioni Performance and Noise Prestazioni e rumore Preference Preferenze

## Preferences Preferences Preferences / Signal/Review Preferences / Opzioni segnale/revisione Preferences / Signal/Review Option Preferences / Opzioni segnale/revisione Preferences / Opzioni segnale/revisione Print Stampa Print Current Sequence Stampa sequenza attuale

#### 0

Quantification Parameters Parametri di quantificazione

### R

**Remove Manual Events from Method** Rimuovi eventi manuali dal metodo Report to file Report su file Report to HTM Report su HTML Report to PDF Report su PDF Report to printer Report su stampante reprocess rielabora Reprocessing only Solo rielaborazione **Review DAD Test** Revisione test DAD **Bun Time Checklist** Lista di controllo della fase di esecuzione

### S

Sample Information Informazioni campione Sample Summary Riassunto campione save as Salva con nome Save as New Database Salva come nuovo database Save Current Sequence Salva sequenza attuale Sequence Sequenza Sequence Method Metodo della seguenza Sequence Output Output di sequenza Sequence Parameters Parametri di seguenza Sequence Summary Parameters Parametri riepilogo seguenza Sequence Summary Reporting Report riassuntivo sequenza Sequence Table Tavola sequenze Short Breve shoulder detection Rilevazione delle spalle shutdown arresto Signal Options Opzioni segnale Slope sensitivity Sensibilità della pendenza Spectrum Spettro Split Peak Divisione picco

#### **Glossario-IU**

Standard Data Analysis Analisi dei dati standard Standard Statistic Statistiche standard Standard Statistics Statistiche standard Statistics Statistiche esecuzione campioni Statistics for Calibration Runs Statistiche per esecuzione calibrazione Status Stato SUILabel Type = Application > Statistics for Calibrated and Sample Runs Tipo SUILabel = Applicazione > Statistiche per analisi calibrate e di campioni Summary

### т

Riassunto

Tail Skim Height Ratio Rapporto altezza-skim coda Tangent Skim Tangente di interpolazione

#### U

Unique Folder Creation Creazione cartelle esclusive attivata Unique folder Creation OFF Creazione cartelle esclusive attiva Unique Folder Creation OFF Creazione cartelle esclusive non attiva Unique Folder Creation ON Creazione di cartelle esclusive attivata Unique pdf file name Nome file PDF univoco Update .... Method Aggiorna... Metodo Update Manual Events of Method Aggiorna eventi manuali del metodo Update Master Method Aggiorna metodo master Update Sequence Method Aggiorna metodo di sequenza Use Sequence Table information Usa informazioni tabella sequenze Use Sequence Table Information Usa informazioni della tavola di sequenza

#### V

Valley Valle Valley Height Ratio Rapporto altezza-valle View Visualizza

# Indice

## A

accuratezza analisi 164 acquisizione dati cos'è? 62 altezza% calcolo 124 ampiezza del picco iniziale 108 ampiezza del picco 108 ampiezza picco all'altezza x% 256 tangente 256 analisi dei dati 45 report specializzati 23 analisi 164 accuratezza apice del picco 90 apice 75 area del picco 105 area% calcolo 124 assoluto tempo di ritenzione 138 automazione 167

#### B

bracketing calibrazione ciclica 201 buone pratiche di laboratorio 29

#### C

calcolo percentuale 124 calcolo ESTD 126

norm% 128 250 simmetria del picco calibrazione ciclica bracketing 201 calibrazione dell'integrazione 110 calibrazione multilivello 154 calibrazione campione 148 ciclica multilivello 195 composto 148 157 corrispondenze delle curve curva 150 132 impostazioni livello 148 multilivello 154 punto 148 campione incognito 152 campione calibrazione 148 incognito 152 ChemStation descrizione generale 11 personalizzazione 27 CI 262 collocazione linea di base 77, 92 composto 148 configurazione 15 contrassegni 72 controllo dello strumento 44 corrispondenze delle curve 157 curva costruzione della linea di base 92 curva calibrazione corrispondenze delle curve 157

cos'è? 150

descrizione 150 livello singolo 153 multilivello 154 curva di calibrazione forza attraverso lo zero (origine) 157 peso dei punti di calibrazione 157 curva calibrazione 150 corrispondenze delle curve 157

#### D

Da.M 58 derivata 84 descrizione generale del software configurazione del sistema 15 metodi e sequenze 15 sistema operativo 15 Determinazione rumore ASTM 247 determinazione rumore 247 deviazione standard campione 260 della media 261 261 relativa directory metodo 52 disallineamento 255 distribuzione t 262

### Ε

ESTD calcolo 126 procedura 126 eventi di integrazione 75, 108

#### Indice

### F

fattore di capacità 256 fattore di diluizione 127 fattore di scodamento USP 256 fattore di scodamento 256 file di metodo parametri dello strumento 52 file metodo 52 filtro riconoscimento picco 84 fine picco 89 finestra di riferimento 139 finestra di tempo ritenzione/migrazione 138 finestre del tempo di ritenzione 139 formati file rapporto raggruppamento 221 report dei risultati 234 formule di idoneità del sistema deviazione standard 260 fattore di capacità 256 fattore di scodamento USP 256 media 260 numero di piatti 257 risoluzione 259 ritenzione relativa 258 RSD 261 volume vuoto 253 formule di system suitability ampiezza picco 256 formule definizione test prestazioni 254 definizioni generali 253

#### 

informazioni sui metodi 44 inizio picco 88 integrazione manuale 114 integrazione contrassegni 72 intervallo di confidenza 262

### L

limiti di quantità 154 linea di base iniziale 75, 76 lista di controllo del periodo di funzionamento 46

#### Μ

metodi memorizzati 47 metodo directory 52 funzionamento 53 modifica 50 modello di sequenza 170 moduli dello strumento 12 moduli di valutazione dei dati 12 moltiplicatore 127 momenti statistici 255 multilivello calibrazione 154 sequenze cicliche 195 multipli picchi di riferimento 142

## Ν

norm% calcolo 128 report 128 numero di piatti 257

## 0

ora di inizio 75 origine collega 157 forza 157 ignora 157 includi 157 trattamento 157

## Ρ

penetrazione linea di base 94 personalizzazione report 25 peso lineare 157 punti di calibrazione 157 quadratico 157 uguale 157 picchi di riferimento multipli 142 picchi non assegnati 102 picco del solvente 106 picco negativo 77 picco altezza 124 finestra del tempo di ritenzione 139 qualificatori 142 quantificazione 120 risposta 142 simmetria 250 precisione formato del numero 265 Preferenze 35 prestazioni definizioni test 254

### 0

qualificatori 142 quantificazione cos'è? 120 procedura ESTD 126

#### Indice

### R

raggruppamento 85 rapporto di capacità 256 report dei diagrammi di controllo 26 report di idoneità del sistema 23 prestazioni estese 24 report delle prestazioni 24 stile prestazioni e rumore 24 report riassuntivo di sequenza 237 configurazione intestazione 237 metodi 237 pagina riassuntiva 238 registro elettronico 237 report di analisi 237 specifica di output 239 statistiche 237 tavola dei campioni 237 tavola di sequenza 237 report diagramma di controllo 26 formati file 234 idoneità del sistema 23 non calibrato 225 personalizzato 25 riepilogo della sequenza 25 stile 230 residuo deviazione standard 151 relativo 151 rete controllo strumento 32 ricalibrazione cos'è? 164 164 perchè riconoscimento del picco 86 riconoscimento picco filtro 84 rilevazione delle spalle 108 risoluzione 259

risposta rivelatore 153 risposta rapporto 142 rivelatore 153 ritenzione relativa 258

### S

salvare con dati copia del metodo 58 scarto dell'altezza 108, 109 scarto dell'area 108 segnale analogico 62 segnale digitale 62 segnale analogico 62 dettagli 45 62 digitale sensibilità della pendenza 108 sequenza calibrazione ciclica 195 177 crea modifica 177 salva 177 spalla 91 standard esterno 126 standard 126 esterno struttura directory 35 system suitability limiti 243 statistiche incluse 242

## T

tangente interpolazione 97 tavola di calibrazione che cos'è 149 tavola di raggruppamento configurazione 217 formati di output 221 stesura rapporto 221 tipo di campione rimosso 217 tempo di fine 75 tempo di ritenzione assoluto 138

### V

volume vuoto 253

www.agilent.com

# In questo volume

Questo manuale descrive vari concetti relativi alla ChemStation Agilent, allo scopo di permettere all'utente di acquisire una conoscenza più approfondita del funzionamento della Chem-Station.

Per informazioni sull'uso della ChemStation, fare riferimento alla Guida in linea generale e all'esercitazione in linea.

© Agilent Technologies 2004, 2005-2009

Printed in Germany 07/09



G2070-94126

