Agilent

OpenLab ChemStation

数据分析参考

声明

文档信息

文档编号：D0013749zh Rev. A.1
版本：02/2025

版权所有

© Agilent Technologies, Inc. 2010-2025

根据美国和国际版权法，未经 Agilent Technologies, Inc. 事先同意和书面许可，不得以任何形式、任何方式（包括存储为电子版、修改或翻译成外文）复制本手册的任何部分。

Agilent Technologies
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn, Germany

软件版本

本指南适用于 Agilent OpenLab ChemStation LTS 01.11 版本。

担保说明

本文档内容按 “原样” 提供，在将来的版本中如有更改，恕不另行通知。此外，在适用法律允许的最大范围内，Agilent 对本手册以及此处包含的任何信息不作任何明示或暗示担保，包括但不仅限于适销性和针对某一特殊用途的适用性的暗示担保。对于因提供、使用或执行本手册或此处包含的任何信息而产生的错误，或造成的偶然或必然的损失，Agilent 不承担任何责任。如果 Agilent 与用户签订了单独的书面协议，其中涉及本文档内容的担保条款与这些条款冲突，则以协议中的担保条款为准。

技术许可

本文档中所述的硬件和 / 或软件是根据许可提供的，只能根据此类许可的条款进行使用或复制。

权力限制说明

美国政府受限权利。授予联邦政府的软件和技术数据权利仅包括通常提供给最终用户的那些权利。Agilent 根据 FAR12.211（技术数据）和 12.212（计算机软件）和（对于国防部）DFARS252.227-7015（技术数据 — 商品）以及 DFARS 227.7202-3（商业计算机软件或计算机软件文档中的权利）来提供软件和技术数据方面的此常规商业许可。

安全声明

小心

小心提示表示危险。提醒您注意某个操作步骤、某项操作或类似问题，如果执行不当或未遵照提示操作，可能会损坏产品或丢失重要数据。不要忽视**小心**提示，直到完全理解和符合所指出的条件。

警告

“警告” 声明表示存在危险。提醒您注意某个操作步骤、某项操作或类似问题，如果执行不当或未遵照提示操作，可能会导致人身伤害或死亡。除非已完全理解并符合所指出的条件，否则请不要忽视 “警告” 声明而继续进行操作。

内容提要...

本指南面向高级用户、系统管理员以及负责验证 Agilent OpenLab ChemStation 的人员。它包含有关用于 LTS 01.11 版本的 OpenLab ChemStation 的操作原理、计算和数据分析算法的参考信息。

使用本指南可根据用户要求验证系统功能，并且可定义和执行在验证计划中定义的系统验证任务。以下资源中包含附加信息。

- 关于介绍性教程：参见“学习模块”，可从 OpenLab ChemStation 用户资源和学习平台上获取。
- 关于特定于上下文的任务（“操作方法”）信息、用户界面参考以及故障排除帮助：ChemStation 在线帮助系统。
- 关于 OpenLab ChemStation 的概念和工作流程：“OpenLab ChemStation 基本概念和工作流程”手册。
- 有关系统安装和现场准备的详细信息：分别为“OpenLab ChemStation 工作站安装指南”，或“OpenLab ChemStation 网络化工作站和分布式系统安装指南”
- 有关系统管理原理和任务的详细信息：OpenLab ChemStation 工作站管理员指南。

在下文中，“ChemStation”一词是指 Agilent OpenLab ChemStation。

1 积分

本章介绍 ChemStation 积分器的概念和积分器算法。

2 峰识别

本章介绍了峰识别的概念。

3 校正

本章详细介绍校正过程中使用的计算方法。

4 定量

本章介绍如何定量化合物，并介绍定量中使用的计算。

5 系统适用性

本章介绍 OpenLab CDS 如何评估分析仪器和分析方法的性能。

6 CE 特定计算

本章只与使用 ChemStation 控制 CE 仪器有关。

7 系统验证

本章介绍 ChemStation 的验证功能和 GLP 验证功能。

目录

1 积分 7

什么是积分? 8
ChemStation 积分器算法 10
操作原理 15
峰识别 16
峰面积测量 25
基线定位 28
积分事件 38
手动积分 56

2 峰识别 58

什么是峰识别? 59
峰的匹配原则 60
峰识别的类型 61
绝对保留/迁移时间 62
修正的保留/迁移时间 64
特征峰 65
识别过程 67

3 校正 69

什么是校正? 70
校正曲线 71
校正曲线计算 72
分组校正 76
重新校正选择 77

4 定量 78

什么是定量? 79
修正因子 80
面积百分比法和峰高百分比法 81

校正化合物的定量 82
未校正峰的定量 87
归一化法计算 89

5 系统适用性 90

峰性能评估 91
评估系统适用性 91
噪音测定 94
计算峰的不对称性和对称性 103
系统适用性公式和计算 105
常用定义 106
性能测试定义 107
重现性的定义 119
内部存储双精度数的存取 124

6 CE 特定计算 127

校正表 128
使用流动性修正进行校正 130
毛细管电泳的特殊报告格式 135
修正峰面积 136
毛细管电泳的系统适用性 137
CE-MSD 138

7 系统验证 139

验证和诊断视图 140
GLPsave 寄存器 143
DAD 测试功能 144

1 积分

什么是积分? 8
积分的功能是什么? 8
积分器功能 9
ChemStation 积分器算法 10
概述 10
定义初始基线 11
基线跟踪 12
定位基线 13
术语定义 14
操作原理 15
峰识别 16
峰宽 16
峰识别过滤器 17
集束 18
峰识别算法 18
合并峰 20
肩峰 21
默认基线的建立 22
峰分离代码 23
峰面积测量 25
峰面积的确定 25
单位和转换因子 27
基线定位 28
基线的起点 28
基线的结束 28
基线校正模式 29
峰谷比 31
切线撇去 32
积分事件 38
针对所有信号的积分事件 38
初始事件 41
定时事件 44
自动积分 55
手动积分 56
保存手动积分事件 57

本章介绍 ChemStation 积分器的概念和积分器算法。

什么是积分?

积分用于在信号中定位峰并计算其大小。

积分对以下操作来说是必不可少的步骤:

- 识别
- 认证
- 校正
- 定量计算
- 峰纯度计算
- 谱库检索

积分的功能是什么?

当对某个信号进行积分时，软件将:

- 识别每个峰的开始和结束时间，
- 找到每个峰的顶点；即保留时间/迁移时间，
- 建立基线，以及
- 计算每个峰的面积、峰高、峰宽和对称因子。

该过程由称为积分事件的参数控制。

积分器功能

积分器算法具有以下主要功能:

- 用于设置初始积分器参数的自动积分功能,
- 如果使用多个信号或多个检测器,能够定义每个色谱图/电泳图谱信号的各积分事件表,
- 交互式定义积分事件,这允许用户以图形化方式选择事件时间,
- 对需要人工解释的色谱图或电泳图谱进行图形化手动积分(这些事件也可以记录在方法中并用作自动操作的一部分),
- 标注积分结果,
- 定义积分器参数,以设置或修改针对最小峰面积、最小峰高、峰宽、斜率灵敏度、肩峰检测、基线校正以及前部/拖尾切线撇去检测的基本积分器设置。
- 基线控制参数,如强制划基线、维持基线、划基线至所有峰谷,划基线至下一峰谷,从当前峰尾部反向拟合基线,
- 峰面积加和控制,
- 负峰识别,
- 溶剂峰定义检测,
- 定义积分器操作的保留/迁移时间范围的积分器控制命令。
- 通过使用二阶导数计算定位肩峰,
- 改进了非等距离数据点取样,以在使用从 DAD 光谱重构的 DAD LC 数据文件时获得更佳性能。

ChemStation 积分器算法

概述

要对色谱图/电泳图谱进行积分，积分器应：

1 定义初始基线，

2 连续跟踪和更新基线，

3 确认峰的开始时间，

4 找到每个峰的顶点，

5 确认峰的结束时间，

6 建立基线，以及

7 计算每个峰的面积、峰高和峰宽。

该过程由**积分事件**控制。最重要的事件包括初始斜率灵敏度、峰宽、基线校正、最小峰面积和最小峰高。软件允许您设置这些事件以及其他事件的初始值。这些初始值将在色谱图的开始时生效。此外，自动积分功能为您提供了一组可以进一步优化的初始事件。

多数情况下，初始事件可以为整个色谱图提供良好的积分结果，但有时候您也许希望对积分的进度进行更多的控制。

软件允许您在合适的时间在色谱图中安排新的积分事件，以此来控制积分的执行过程。

有关详细信息，请参见第 41 页的 初始事件。

定义初始基线

特征点

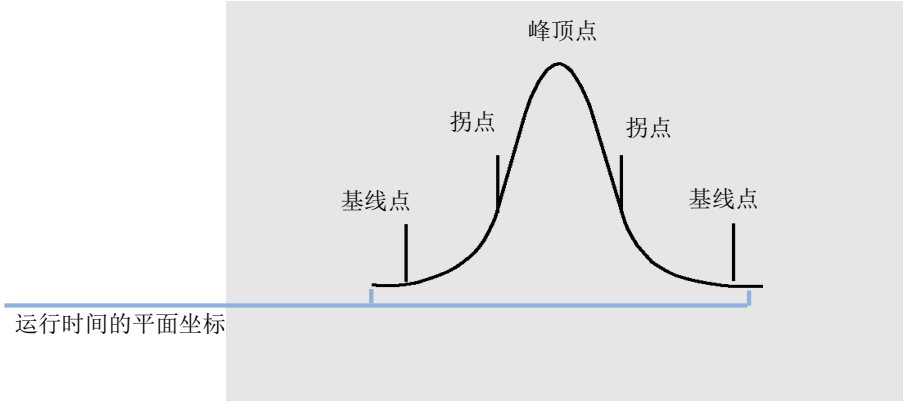


图 1　　特征点

定义初始基线

由于基线条件随应用程序和检测器硬件而变化，因此积分器使用来自积分事件和数据文件的参数来优化基线。

在积分器可以对峰进行积分之前，积分器必须先建立一个**基线点**。分析开始时，积分器将第一个数据点作为假设的基线点确立一个初始基线级别。然后，它根据输入信号的平均值尝试重新定义此初始基线点。如果积分器未获得重新定义的初始基线点，则将保留第一个数据点作为可能的初始基线点。

识别峰的特征点

当可能的基线点位于基线范围之外、并且基线曲率超出由积分器斜率灵敏度参数确定的某一特定值时，积分器将认为可能有一个峰将要开始。如果这种状况持续下去，积分器将识别出它位于峰的上升区，并对峰进行处理。

开始

1 斜率和曲率均在极限值内：继续跟踪基线。

2 斜率和曲率超出极限值：可能是峰。

3 斜率持续超出极限值： 识别到峰，已定义峰开始点。

4 曲率变为负值： 已定义前拐点。

顶点

1 斜率经过零并变为负值： 峰顶点，已定义顶点。

2 曲率变为正值： 已定义后拐点。

结束

1 斜率和曲率均在极限值内：峰将结束。

2 斜率和曲率均保持在限定值内： 已定义峰终点。

3 积分器返回到基线跟踪模式。

基线跟踪

在运行过程中，积分器将按照由初始峰宽或计算峰宽所确定的速率对数字数据进行取样。它将每个数据点都当作潜在的基线点。

积分器使用基线跟踪算法，根据基线的斜率确定一个**基线范围**，其中斜率由一阶导数确定，曲率由二阶导数确定。可以将基线范围显示为圆锥图，其顶点位于当前的数据点处。圆锥的上下验收水平分别为：

- + 上升区 + 曲率 + 基线偏移必须低于阈值级别，
- - 上升区 - 曲率 + 基线偏移的正极性必须高于（即负极性必须低于）阈值级别。

接受新数据点时，圆锥图将向前移动直至被打断。

成为基线点的数据点必须满足以下条件：

- 必须位于定义的基线范围内，
- 数据点处的基线曲率（由导数过滤器确定），必须低于由当前斜率灵敏度设置确定的临界值。

然后，分析开始时建立的初始基线点将按照峰宽确定的速率不断进行重置，重置为峰宽确定的一段时间内处于基线范围内的数据点的移动平均值。积分器将跟踪并定期重新设置基线以补偿漂移，直到检测到峰的上升区。

定位基线

在分析过程中，积分器将按照由峰宽值确定的频率来定位色谱/电泳图谱基线。当积分器对一定数目的数据点进样后，它将重置初始基线点到当前基线点的基线。积分器继续针对下一组数据点跟踪基线，并再次重置基线。该过程将一直进行，直到积分器确定峰的开始为止。

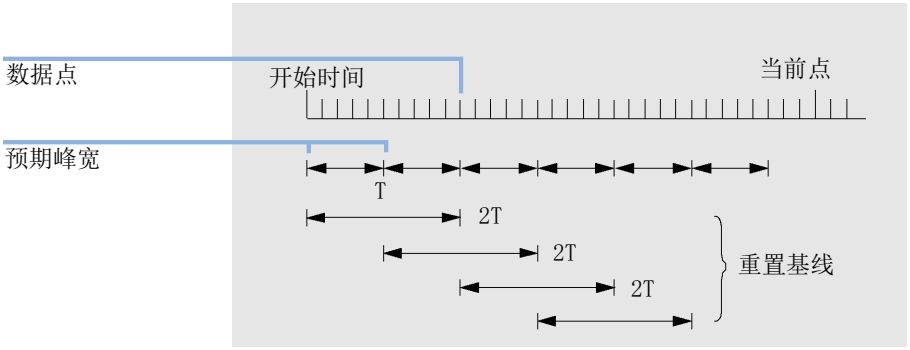


图 2　　基线

在运行开始时，使用第一个数据点。 然后系统将根据以下公式定期重置此基线点：

对时间 T（预期峰宽）上的峰面积进行加和。此时间永远大于一个数据点。只要基线条件存在，就会继续进行加和。系统还将计算斜率和曲率。如果斜率和曲率均小于阈值，则将两个加和面积相加，并与前一个基线进行比较。如果新值小于前一个基线，则新值将立即替换旧值。如果新值大于前一个基线，则将其作为假定的新基线值保存并在另一个值满足斜率和曲率平滑度标准时对其进行确认。如果允许负峰，则后一个限制条件无效。在基线过程中，还必须检查快速上升的溶剂。溶剂可能会上升得太快，以至于无法检测到上升区。（确认上升区后，溶剂标准将可能不再有效。）第一时间通过第一个数据点的就是基线。如果基线上有信号，则此基线将被 2 T 平均值替换。然后，将在每个 T 上重置基线（请参见第 13 页的图 2）。

术语定义

溶剂峰

溶剂峰通常是非常大的峰，没有必要对其进行分析，因此一般不对其进行积分。但是，当具有分析价值的小峰洗脱到接近溶剂峰时（例如，在溶剂峰的拖尾峰上），可以设置特殊的积分条件来计算这些小峰的面积，这些面积根据溶剂峰的拖尾峰进行修正。

肩峰（前峰、后峰）

当两个峰洗脱到非常接近以至于两峰之间没有峰谷时，将出现肩峰。肩峰是未分开的峰。肩峰可能出现在峰的上升沿（前伸峰），也可能出现在峰的下降沿（拖尾峰）。当检测到肩峰时，可以通过切线撇去或垂线对其进行积分。

斜率

峰的斜率，表示化合物的浓度随时间的变化情况，用于确定峰起点、峰顶点和峰止点。

操作原理

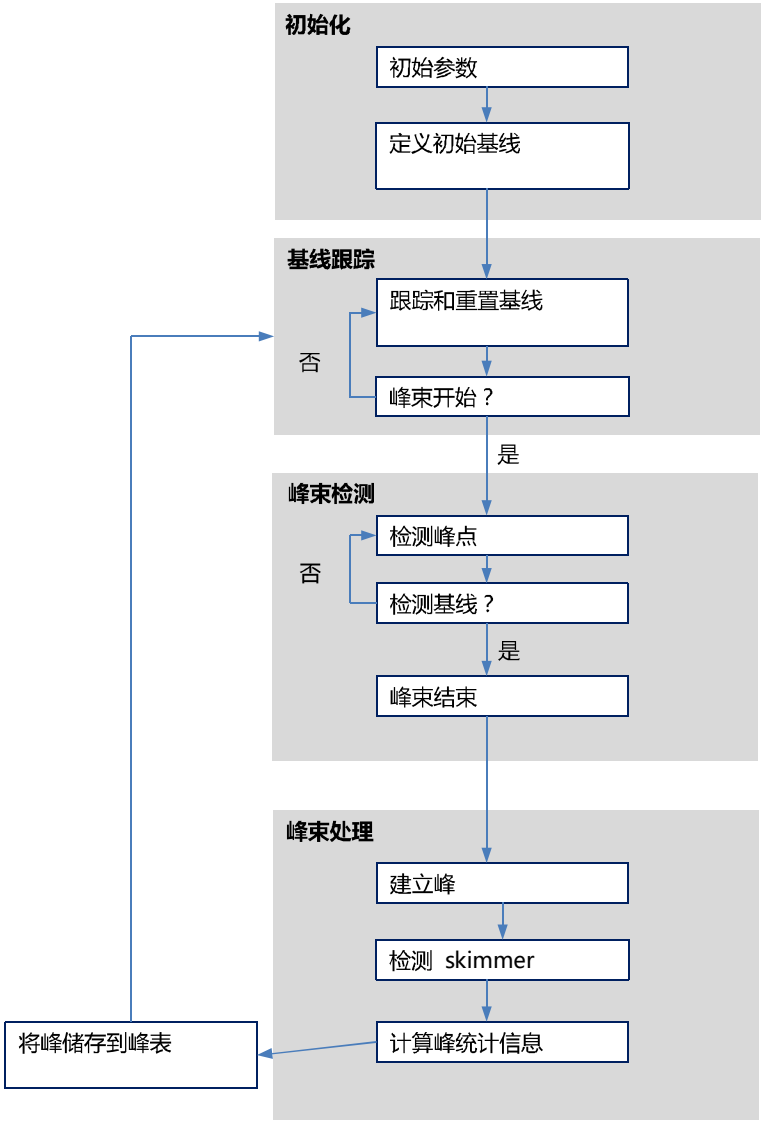


图 3　　积分仪流程图

峰识别

积分器使用多种工具来识别和描述峰：

- 峰宽，
- 峰识别过滤器，
- 集束，
- 峰识别算法，
- 峰顶点算法，以及
- 非高斯计算（例如拖尾峰、合并峰）。

峰宽

在积分过程中，将根据调整后的峰面积和峰高来计算峰宽：

峰宽 = 调整后的峰面积/调整后的峰高

或者，如果存在拐点，则根据拐点之间的宽度来计算峰宽。

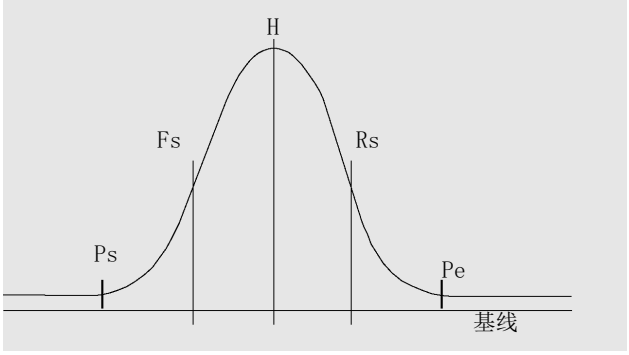


图 4　　峰宽计算

在上图中，总面积 A 是针对基线调整的从峰开始 (Ps) 到峰结束 (Pe) 的面积的总和。Fs 为拐点处的峰前斜率，Rs 为拐点处的峰尾斜率。

峰宽的设置控制了积分器区分峰和基线噪音的能力。要获得良好性能，必须将峰宽设置为与实际色谱峰的峰宽接近的值。

可以通过三种方式改变峰宽：

- 积分过程之前，您可以设定初始峰宽，
- 积分过程中，积分器将根据需要自动更新峰宽，以便与峰识别过滤器保持良好的一致性，
- 积分过程中，您可以使用时间安排事件来重置或修改峰宽。

峰识别过滤器

积分器具有三种峰识别过滤器，这些过滤器通过检测一组连续数据点内的斜率和曲率的变化来识别峰。这些过滤器包含积分器检测的数据点的一阶导数（用于测量斜率）和二阶导数（用于测量曲率）。这些识别过滤器分别为：

过滤器 1 两个（三个）连续数据点的斜率（曲率）

过滤器 2 四个连续数据点的斜率和三个非连续数据点的曲率

过滤器 3 八个连续数据点的斜率和三个非连续数据点的曲率

实际使用的过滤器由峰宽设置决定。例如，在分析开始时，可能使用过滤器 1。如果在分析过程中峰宽增加，过滤器将首先更改为过滤器 2，然后更改为过滤器 3。要获得识别过滤器的良好性能，必须将峰宽设置为与实际色谱/电泳图谱的峰宽接近的值。在运行过程中，积分器将根据需要更新峰宽以优化积分。

积分器将以不同的方式计算更新后的峰宽，具体取决于仪器配置：

对于 LC/CE 配置，默认峰宽计算使用合成计算法：

0.3 x（右侧拐点 - 左侧拐点）+ 0.7 x 峰面积/峰高

对于 GC 配置，默认峰宽计算使用峰面积/峰高。该计算方法可保证当峰在半高点以上合并时不会过高地估计峰宽。

在某些类型的分析中，例如恒温 GC 分析和等度 LC 分析，峰的宽度将随着分析的进行而显著增加。为补偿这一点，当分析过程中峰加宽时，积分器将自动更新峰宽。 除非已通过固定峰宽定时事件禁用更新，否则将自动执行此操作。

更新峰宽时按照以下方式进行加权计算：

0.75 x（现有峰宽）+ 0.25 x（当前峰的峰宽）

集束

集束是积分器在峰识别过滤器的有效范围内增大峰宽以保持良好选择性的方式。

积分器无法一直无限增加峰宽以加宽峰。最终峰将变得非常宽以致无法被峰识别过滤器发现。要克服这个限制，积分器将对所有数据点进行集束，在保持相同峰面积的同时有效地将峰变窄。

集束数据时，数据点将集束为集束权的两倍，即，未集束数据 = 1x，集束一次 = 2x，集束两次 = 4x 等。

集束是根据数据采集频率和峰宽进行的。积分器使用这些参数设置集束因子，以设置合适数量的数据点（请参见第 18 页的 表 1）。

集束是将预期或据经验得知的峰宽变为两倍。集束算法概述请见第 18 页的 表 1。

表 1　集束条件

预期峰宽	使用的过滤器	集束完成
0 - 10 个数据点	第一个	无
8 - 16 个数据点	第二个	无
12 - 24 个数据点	第三个	无
16 - 32 个数据点	第二个	一次
24 - 48 个数据点	第三个	一次
32 - 96 个数据点	第三个，第二个	两次
64 - 192 个数据点	第三个，第二个	三倍

峰识别算法

积分器使用峰识别算法所确定的基线点来识别峰的开始。峰识别算法首先将峰识别过滤器的输出值与初始斜率灵敏度的值进行比较，以增加或减少上升区累加器。积分器将声明上升区累加器的值 ≥15 的点，该点表示峰的开始。

峰开始

在第 19 页的 表 2 中，预期峰宽决定哪个过滤器的斜率与曲率值将和斜率灵敏度值作比较。例如，如果预期峰宽较小，则将过滤器 1 的数目添加到上升区累加器中。如果预期峰宽增加，则将使用过滤器 2 的数目，最后使用过滤器 3 的数目。

当上升区累加器的值≥15 时，算法将认为某个峰可能要开始。

表 2 上升区累加器的增量值

导数过滤器 1 到 3 的输出值与斜率灵敏度的比较	过滤器 1	过滤器 2	过滤器 3
斜率 > 斜率灵敏度	+8	+5	+3
曲率 > 斜率灵敏度	+0	+2	+1
斜率 < (-) 斜率灵敏度	-8	-5	-3
斜率 < |斜率灵敏度|	-4	-2	-1
曲率 < (-) 斜率灵敏度	-0	-2	-1

峰结束

在第 19 页的 表 3 中，预期峰宽决定哪个过滤器的斜率与曲率值将和斜率灵敏度值作比较。例如，如果预期峰宽较小，则将过滤器 1 的数目添加到下降区累加器中。如果预期峰宽增加，则将使用过滤器 2 的数目，最后使用过滤器 3 的数目。

当下降区累加器的值≥15 时，算法将认为某个峰可能要结束。

表 3 下降斜累加器的增量值

导数过滤器 1 到 3 的输出值与斜率灵敏度的比较	过滤器 1	过滤器 2	过滤器 3
斜率 < (-) 斜率灵敏度	+8	+5	+3
曲率 < (-) 斜率灵敏度	+0	+2	+1
斜率 > 斜率灵敏度	-11	-7	-4
斜率 > |斜率灵敏度|	-28	-18	-11
曲率 > 斜率灵敏度	-0	-2	-1

峰顶点算法

峰顶点被认为是色谱图中的最高点，由通过最高数据点的抛物线拟合而产生。

合并峰

如果在发现峰结束之前发现新峰开始，则会出现合并峰。下图说明了积分器如何处理合并峰。

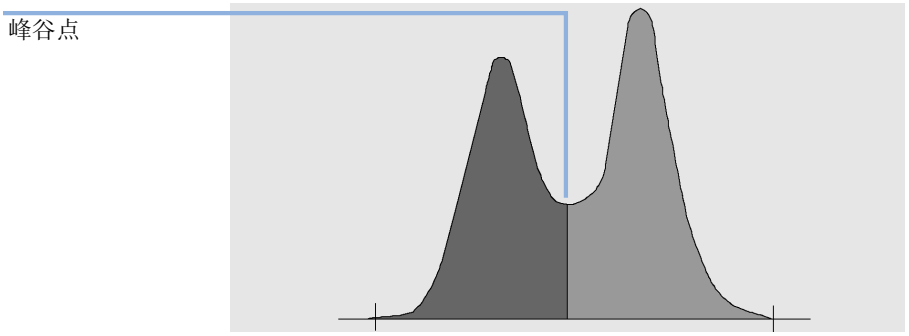


图 5　　合并峰

积分器使用以下方式处理合并峰：

1. 积分器加和峰谷点之前的第一个峰的面积。
2. 在峰谷点，第一个峰的面积加和结束，第二个峰的面积加和开始。
3. 当积分器找到第二个峰的结束点时，面积加和将停止。此过程用图形表示就是通过在两峰之间的峰谷点画一条垂直线来分离合并峰。

肩峰

肩峰是一个大峰的上升沿或下降沿上的未成形峰。当存在肩峰时，负斜率后跟着正斜率的情况下，并没有真正的峰谷。一个峰可能有任意数目的前肩峰和/或后肩峰。

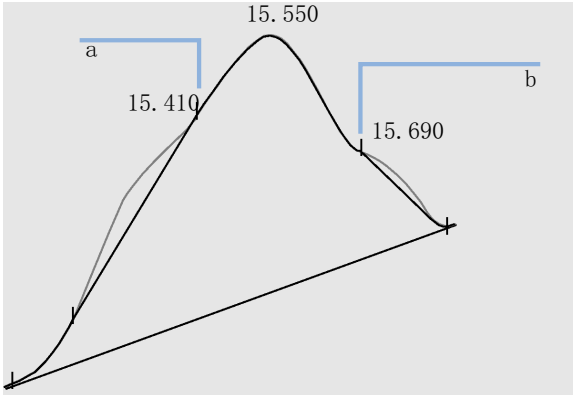


图 6　　肩峰

肩峰是通过二阶导数给出的峰的曲率来检测的。曲率趋于零时，积分器将识别出拐点，例如第 21 页的图 6中的点 a 和 b。

- 如果在峰顶点之前检测到第二个拐点，则有可能存在一个前肩峰。如果确实存在肩峰，则肩峰的开始点设定在拐点之前的最大正曲率点。
- 如果在峰的结束点或峰谷之前检测到第二个拐点，则有可能存在一个后肩峰。如果确实存在肩峰，则肩峰的开始点设定在峰顶点之后第一个最小斜率的点。

保留/迁移时间通过最大负曲率的肩峰点确定。使用编程积分事件，积分器也可以像计算常规峰的面积那样通过在肩峰拐点处画垂线来计算肩峰的面积。

肩峰面积会从主峰面积中扣除。

肩峰可通过积分器定时事件，像常规峰一样进行处理。

默认基线的建立

完成任何峰束后，且找到基线时，积分器请求基线定位算法使用柱－纹技术。它使用梯形区域和比例高度校正归一化和维持尽量低的基线。基线定位算法的输入也包括方法中的参数和识别检测器和应用程序的数据文件，积分器将用其优化计算。

在最简单的情况下，积分器用以下元素之间的连线来建立基线：

- 基线起始点，
- 峰开始、峰谷、终点
- 峰基线

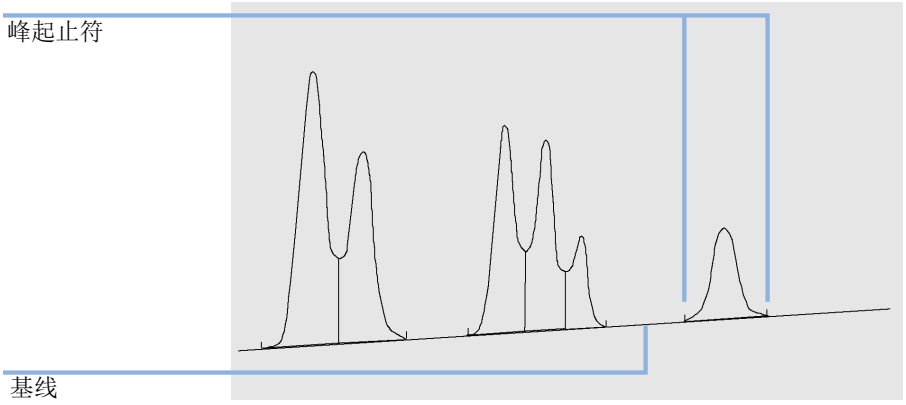


图 7　　默认基线的建立

峰分离代码

在报告的积分结果中，每个峰都分配有两个、三个或四个字符的代码，描述信号基线的绘制方法。

表 4 四字符代码

第一个字符	第二个字符	第三个字符	第四个字符
起始基线	结束基线	错误/峰标记	峰类型

字符 1 和 2

第一个字符表示峰起点的基线，第二个字符表示峰终点的基线。

B 峰在基线上开始或停止。

P 峰在基线被穿透时开始或停止。

V 峰在开始或停止时有峰谷垂线。

H 峰在强制水平基线上开始或停止。

F 峰在强制点上开始或停止。

M 峰是手动积分的。

U 未指定峰。

也可再添加其他标记（按优先级的顺序）。

字符 3

第三个字符描述错误或峰标记：

A 积分已中断。例如，因为积分事件开/关，或因为信号运行时间结束。

D 峰被扭曲（峰形状差）。

空格 峰为常规峰。

字符 4

第四个字符表示峰类型。

S	峰为溶剂峰。
N	峰为负峰。
+	峰为面积加和峰。
T	切线撇去峰（标准撇去）。
X	切线撇去峰（旧的指数撇去模式）。
E	切线撇去峰（新的指数撇去模式）。
m	由手动基线定义的峰。
n	由手动基线定义的负峰。
t	由手动基线定义的切线撇去峰。
x	由手动基线定义的切线撇去峰（成份撇去）。
R	该峰是重新计算的峰（例如主峰，请参见第 35 页的 切线撇去模式）。
f	由前肩峰切线定义的峰。
b	由尾肩峰切线定义的峰。
F	由前肩峰垂线定义的峰。
B	由尾肩峰垂线定义的峰。
U	未指定峰。

峰面积测量

峰积分的最后一步是确定峰的最终面积。

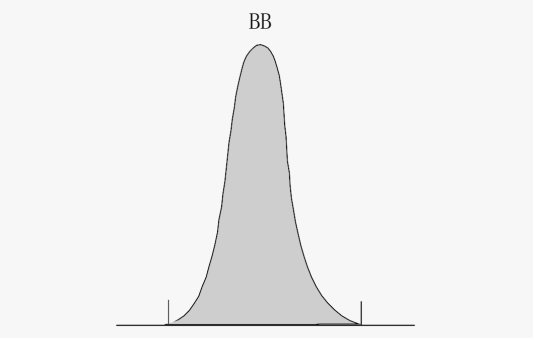


图 8　　基线到基线峰的面积测量

对于简单的孤立峰，峰面积由峰的开始点与结束点之间的基线以上的累加峰面积确定。

峰面积的确定

在积分过程中，积分器计算面积的方法如下：

- 对于基线到基线 (BB) 峰，面积为峰开始点与结束点之间的基线以上的面积，如第 25 页的图 8 中所示。
- 对于峰谷到峰谷 (VV) 峰，面积为从峰谷点处用垂线分成片段的基线以上面积，如第 26 页的图 9 中所示。

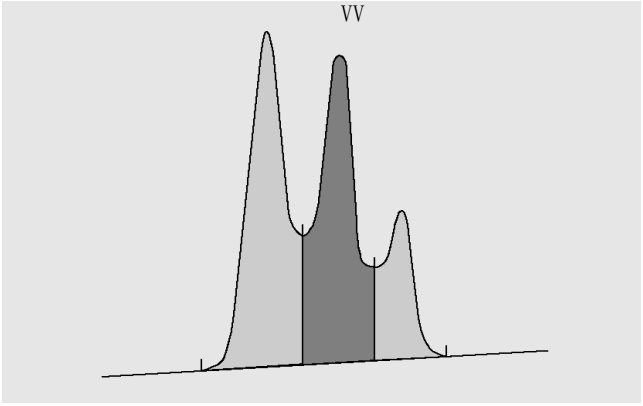


图 9　　峰谷到峰谷峰的面积测量

- 对于切线 (T) 峰，其面积为重置的基线以上的面积，
- 对于溶剂 (S) 峰，其面积为最后确立的基线点处的水平延伸线以上的面积，及切线 (T) 峰的重置的基线以下部分的面积。溶剂峰可能上升得太慢而难以确认，或者在运行中有一组较好的峰，您认为应该作为带骑峰的溶剂峰来处理。这通常包括一组合并峰，其中的第一个峰要比其他峰大得多。因为其他峰通常位于第一个峰的尾部，所以简单的垂线处理可能会夸大这些峰。通过强制将第一个峰识别为溶剂峰，该组中其他的峰将从尾部被撇去。
- 基线以下的负峰具有正面积，如 第 26 页的图 10 中所示。

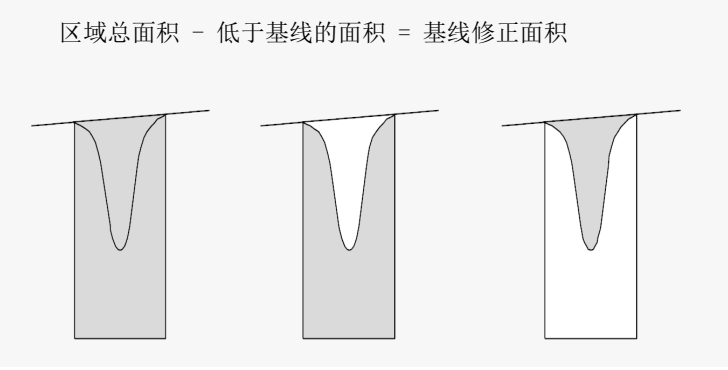


图 10　　负峰的面积测量

单位和转换因子

表面上看，数据包含一组数据点；它们可以是取样数据，也可以是积分数据。如果是积分数据，则每个数据点对应一个面积，表示为**峰高 × 时间**。如果为取样数据，则每个数据点对应一个峰高。

因而，如果为积分数据，峰高为已计算出的实体（用面积除以开始处理数据点后经历的时间）。如果为取样数据，则通过用开始处理数据点后经历的时间乘以数据来计算面积。

积分计算使用这两种实体。积分器内部的携带单位为：面积的**检测器响应 × 秒**，并且**检测器响应**作为高度。必要时，这样做可以为整数截尾提供公共基数。无论在软件中如何检测、计算和保存时间、面积和峰高的检测值，在报告中均以实际物理单位表示。

基线定位

基线的起点

如果在运行开始时未找到基线，将用以下方式之一来建立基线的开始：

- 如果运行的开始点低于第一个基线点，则从运行开始点到第一个基线点来建立。
- 如果运行开始点低于第一个峰谷点，则从运行开始点到第一个峰谷点来建立。
- 如果第一个峰谷点穿透了从运行开始点到第一个基线点之间的假想线，则从运行开始点到第一个峰谷点来建立。
- 从运行的开始点到延伸至第一个基线点的水平基线来建立。

基线的结束

最后一个有效基线点被用来指示基线的结束。对于不在基线上结束的运行情况，基线结束是通过最后一个有效基线点到建立的基线漂移来计算。

如果一个峰在明显的峰谷处结束，但下一个峰低于所设置的最小峰面积，则基线从该峰的开始处延伸到下一个真实基线点。如果一个峰以相似的方式开始，则同样如此。

基线校正模式

OpenLab ChemStation 中有多个可用的基线校正模式。这些将在下面的章节中介绍。

基线校正模式：经典

信号低于绘制的基线时即发生穿透（第 29 页的图 11 中点 a）。

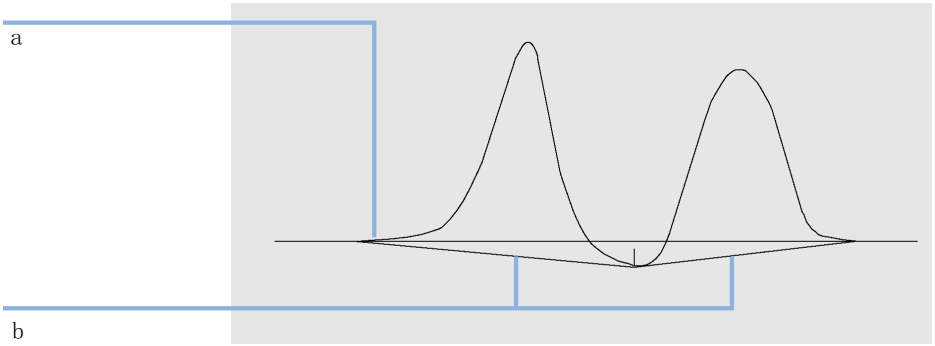


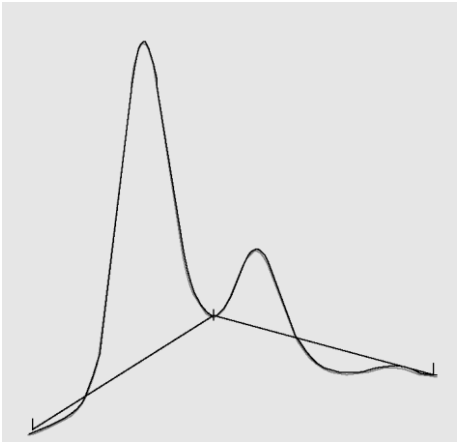
图 11　基线穿透

如果发生基线穿透，则该部分基线可能会被重建，如 第 29 页的图 11 中点 b。您可使用以下校正模式删除所有基线穿透：

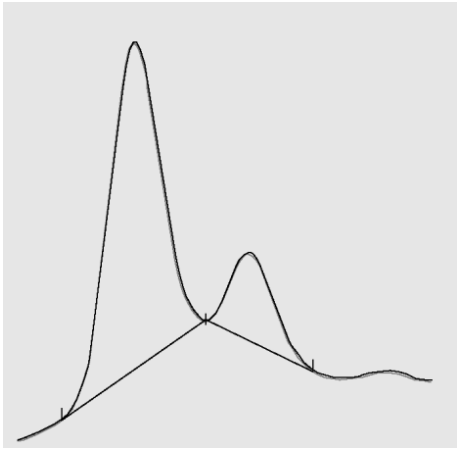
- **无穿透**
- **高级**

基线校正模式： 无渗透

选择此选项后，将在每个峰束中搜索基线穿透。如果发现穿透，峰的起点和/或终点将会被更改直到不存在穿透。



基线校正模式 **经典**



基线校正模式 **无穿透**

注意 具有子峰和肩峰的溶剂峰不能使用基线校正模式**无穿透**。

基线校正模式：高级

在高级基线校正模式下，积分器尝试最优化峰的起始和结束位置，为一簇峰重建基线并且移去基线穿透（见第 30 页的 基线校正模式： 无渗透）。在许多情况下，高级基线校正可提供更稳定的基线，对斜率灵敏度依赖程度较低。

峰谷比

峰谷比是一种质量测定手段，表明峰与其他物质对应的峰的分离程度。此用户指定的参数为高级基线跟踪模式的要素。它将被用于决定是否使用画垂线或峰谷基线分离两个未显示基线分离的峰。积分器计算较小峰的基线修正高度与峰谷的基线修正高度之间的比率。如果峰谷比小于用户指定的值，则使用画下拉线方式；否则，将从第一个峰的开始处的基线到峰谷并从峰谷到第二个峰的结束处的基线画一条基线（第 30 页的 基线校正模式： 无渗透与第 31 页的图 12相比）。

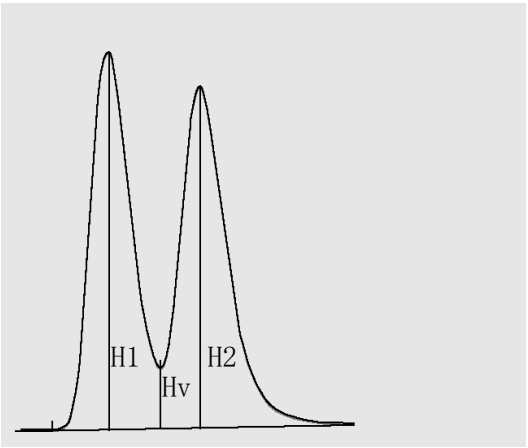


图 12　　峰谷比

使用以下公式计算峰谷比：

H1≥H2，峰谷比 = H2/Hv

和

H1 < H2，峰谷比 = H1/Hv

第 32 页的图 13 显示用户定义的峰谷比的值对基线的影响。

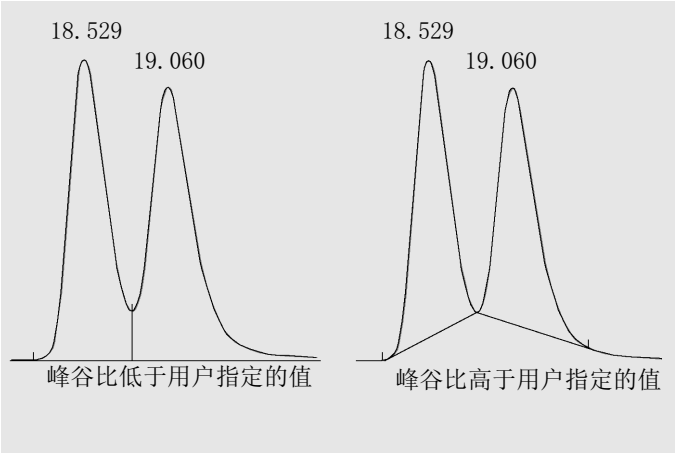


图 13　基线上的峰谷比的影响

切线撇去

切线撇去是针对峰的上升斜率或下降斜率上的峰的一种基线建立形式。前提是这两个峰没有被基线分隔。

下图显示了切线撇去的原理：

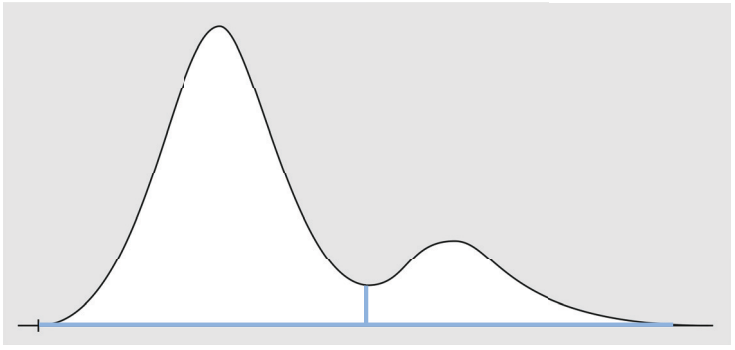


图 14　无撇去的峰，由下拉线分隔

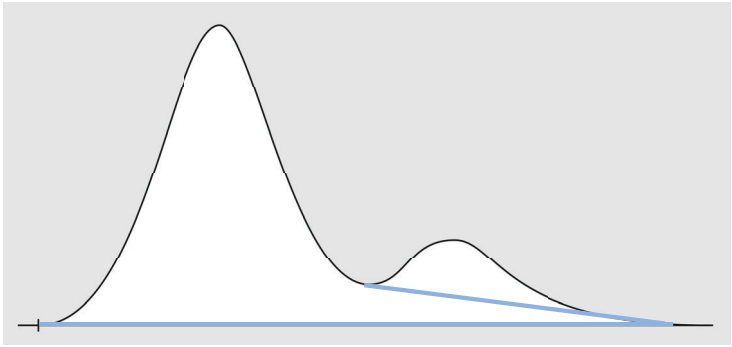


图 15　拖尾撇去

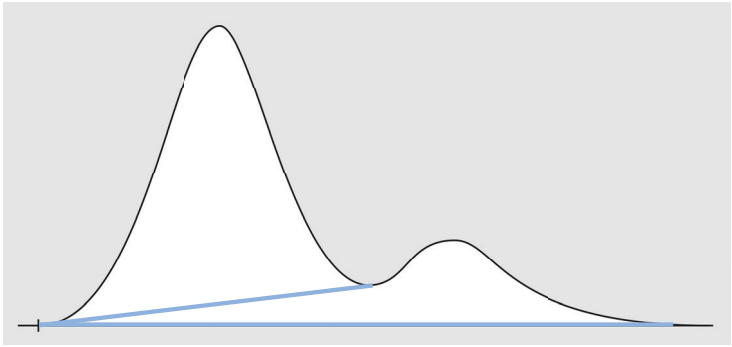


图 16　前伸撇去

撇去标准

以下标准可用于确定是否使用撇去线计算母峰上升或拖尾沿上的子峰洗脱面积：

- 撇去高度比（**前伸撇去高度比**或**拖尾撇去高度比**）
- **撇去峰/谷比**

撇去高度比是基线修正母峰高度（下图中的 Hp）与基线修正子峰高度 (Hc) 之间的比率。要撇去子峰，请使用低于此比率的值。要禁用整个运行中的指数撇去，您可将该参数设置为较高的值或零。

撇去峰谷比是基线上方子峰高度（下图中的 Hc）与基线上方峰谷高度 (Hv) 之比。要撇去子峰，请使用高于此比率的值。

注意

如果母峰拖尾处的一系列子峰未满足这些条件中的一个，则最后一个满足所有条件的子峰后的所有子峰均不再撇去，仅使用下拉线。

注意

如果有作用中的指数定时事件，或母峰本身就是一个子峰，则不使用这些条件。母峰和子峰之间的基线代码必须为类型**峰谷**（见 第 23 页的 峰分离代码）。

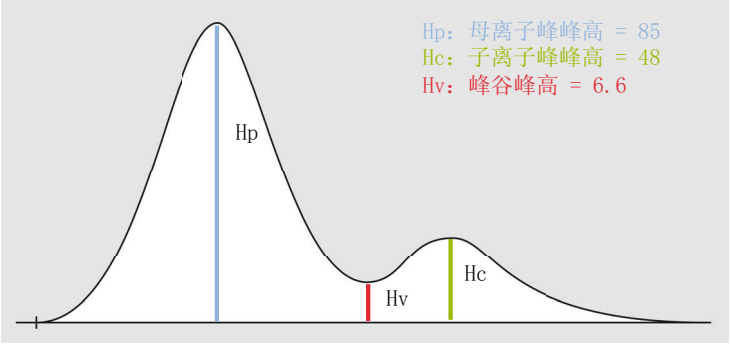


图 17　撇去条件值计算示例

撇去高度比 = Hp / Hc

撇去峰谷比 = Hc / Hv

其中：

Hp	母峰的基线修正高
Hv	峰谷高度在基线之上
Hc	子峰的基线修正高度

拖尾撇去　要使用拖尾撇去，您必须如下设置参数：

- 尾部撇去高度比 = 85 / 48 = 1.77

  在积分事件中，使用 < 1.77 的值。
- 撇去峰谷比 = 48 / 6.6 = 7.3

  在积分事件中，使用 > 7.3 的值。

前伸撇去　使用前伸撇去时，第一个峰是子峰，第二个峰是母峰。因此，要使用前伸撇去，您应如下设置参数：

- 前伸撇去高度比 = 48 / 85 = 0.56

  在积分事件中，使用 < 0.56 的值。
- 撇去峰谷比 = 85 / 6.6 = 12.9

  在积分事件中，使用 > 12.9 的值。

切线撇去模式

启用切线撇去之后，可使用四种模型计算适当的峰面积：

- 指数曲线
- 新指数撇去
- 直线撇去
- 结合指数计算和直线计算以获得最佳拟合（标准撇去）

指数曲线

此撇去模型使用指数公式通过子峰的开始点和结束点绘制曲线。此曲线从每个跟随父峰的子峰下面穿过；撇去曲线以下的面积将从子峰中减去并添加到父峰。

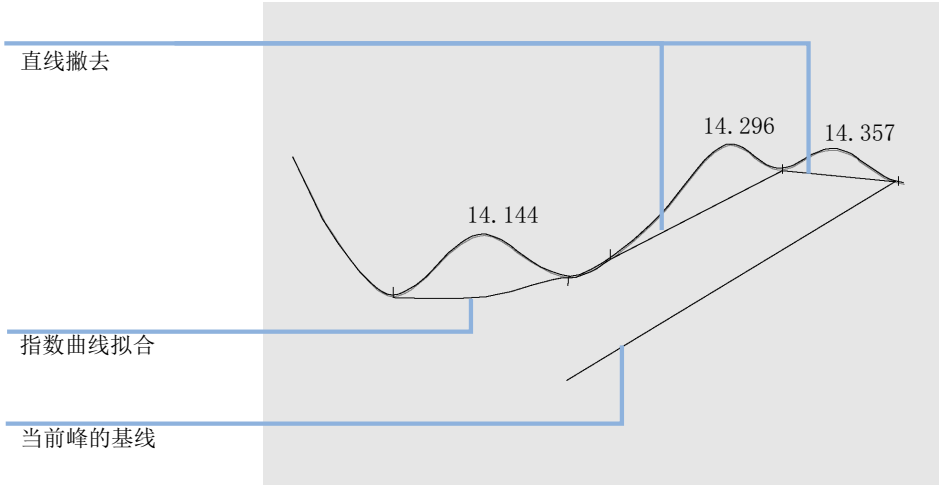


图 18　指数撇去

新指数曲线

使用指数公式绘制的撇去模型曲线，以估计父峰的上升沿或下降沿。此曲线从一个或多个父峰后面的峰（子峰）下穿过。撇去曲线以下的面积将从子峰中减去并添加到主峰。使用同一指数模型可以撇去多个子峰；通过画垂线从第一子峰的结束点开始分离第一个子峰以后的所有峰，垂线只画至撇去曲线处。

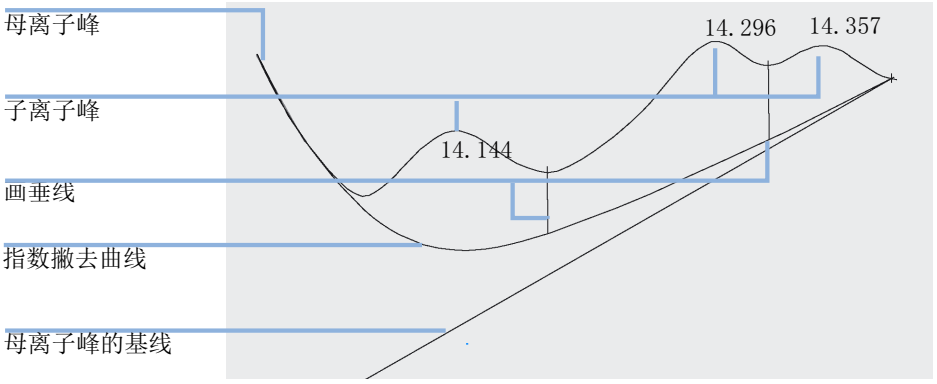


图 19　新指数撇去

直线撇去

撇去模型通过子峰的开始和结束点画直线。用父峰斜率修正子峰开始点的峰高。直线以下的面积将从子峰中减去并添加到父峰。

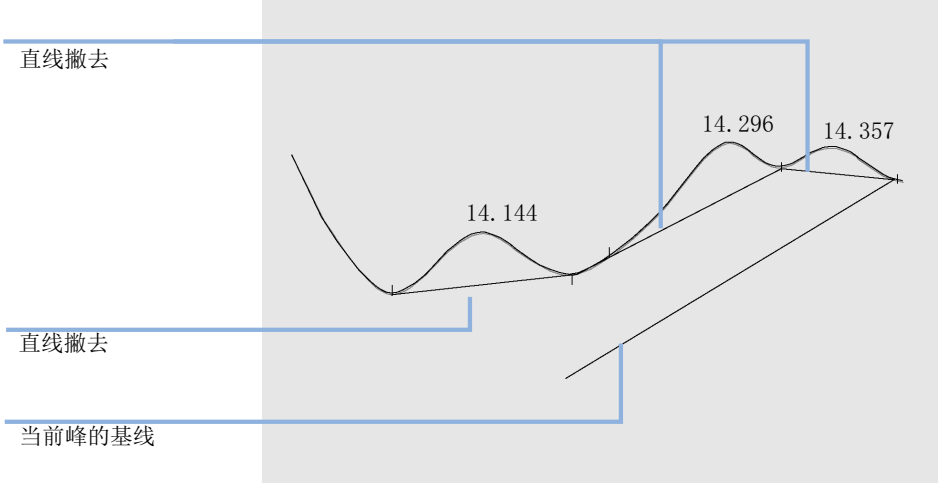


图 20　直线撇去

标准撇去

缺省方法是将指数计算和直线计算进行组合以达到最佳拟和。

通过消除峰高或面积的突然的不连续，从指数计算切换到线性计算。

- 当信号高出基线很多时，尾部拟合计算为指数计算。
- 当信号在基线范围内时，尾部拟合计算为直线计算。

两种计算的结合称为指数撇去或切线撇去。

计算用于撇去的指数曲线

使用以下公式计算指数撇去：

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

其中：

Hb	t_R 时的指数撇去的峰高
H_0	指数撇去开始点的峰高（基线以上）
B	指数函数的衰变因子
t_0	对应于指数撇去开始点的时间
t_R	保留时间
A	父峰的基线的斜率
C	父峰的基线的偏移

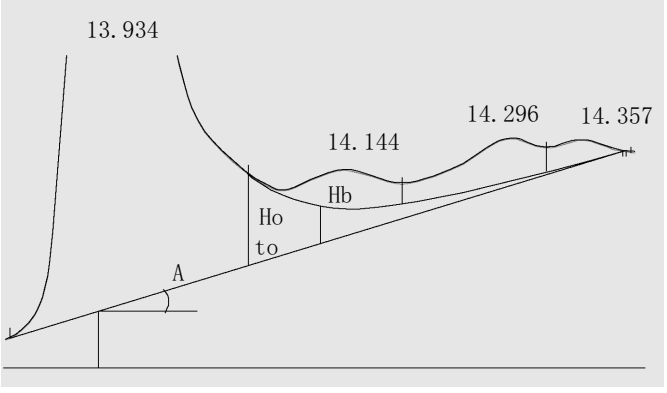


图 21　用于计算指数撇去的值

积分事件

积分器提供了许多初始和定时积分事件。许多事件均为开/关或开始/停止对。

针对所有信号的积分事件

切线撇去模式 定义针对峰的上升斜率或下降斜率上的峰的基线建立形式。请参见第 35 页的 切线撇去模式。

指数	通过子峰的高度校正开始和结束点画指数曲线。
新建指数	绘制一条指数曲线以估计父峰下降沿。
标准	结合指数计算和直线计算以获得最佳拟合。
直线	通过子峰的高度校正开始和结束点画直线。

拖尾峰撇去高度比 此选项与**撇去峰谷比**一起用于设置在溶剂或其他大型峰的拖尾处切线撇去小峰的条件。请参见第 33 页的 撇去标准。

它是基线修正父峰高度 (Hp) 与基线修正子峰高度 (Hc) 之间的比率。高于指定值的比率将启动撇去。

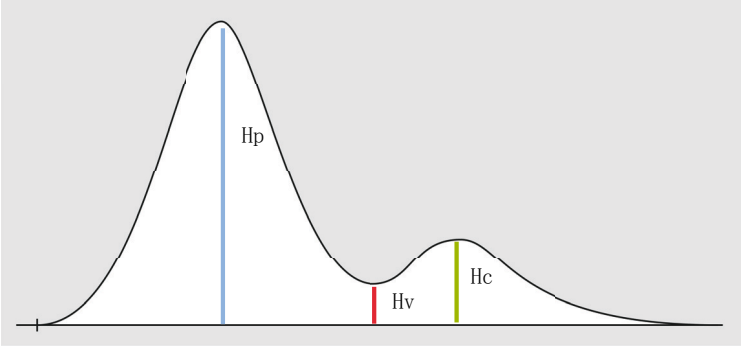


图 22 例如：带拖尾撇去的峰

前伸峰撇去高度比

此选项与**撇去峰谷比**一起用于设置在溶剂或其他大型峰的前伸峰处切线撇去小峰的条件。请参见第 33 页的 撇去标准。

它是基线修正父峰高度 (Hp) 与基线修正子峰高度 (Hc) 之间的比率。高于指定值的比率将启动撇去。

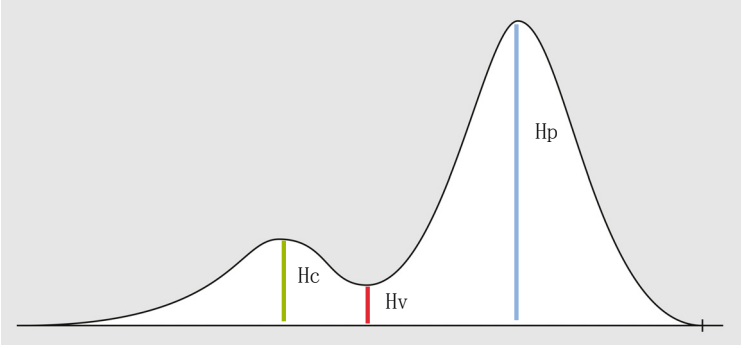


图 23　例如：带前伸撇去的峰

撇去峰谷比

此选项与**拖尾峰撇去峰高比**或**前伸峰撇去峰高比**一起用于设置在溶剂或其他大型峰的拖尾或前伸峰处切线撇去小峰的条件。请参见第 33 页的 撇去标准。

它是基线修正子峰高度 (Hc) 与基线修正峰谷高度 (Hv) 之间的比率。低于指定值的比率将启动撇去。

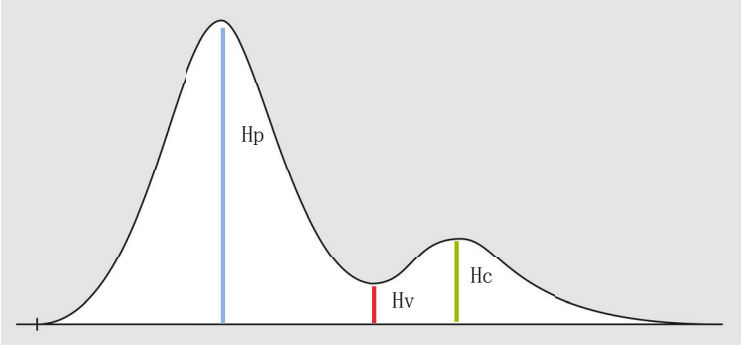


图 24　例如：带拖尾撇去的峰

基线校正 设置基线校正的类型。请参见第 29 页的 基线校正模式。

可以选用以下参数：

经典	接受基线穿透。
无穿透	通过重建基线移除基线穿透。
高级	积分器尝试最优化峰的起始和结束位置，为一簇峰重建基线并且移去基线穿透。

峰谷比 用于确定不显示基线分离的两个峰是否使用下拉线或峰谷基线进行分离，这是小峰的基线修正高度与峰谷的基线修正高度的比率。请参见第 31 页的 峰谷比。

如果峰谷比小于指定的值，则使用画下拉线方式 (A)；否则，将从第一个峰的开始处的基线到峰谷并从峰谷到第二个峰的结束处的基线画一条基线 (B)。

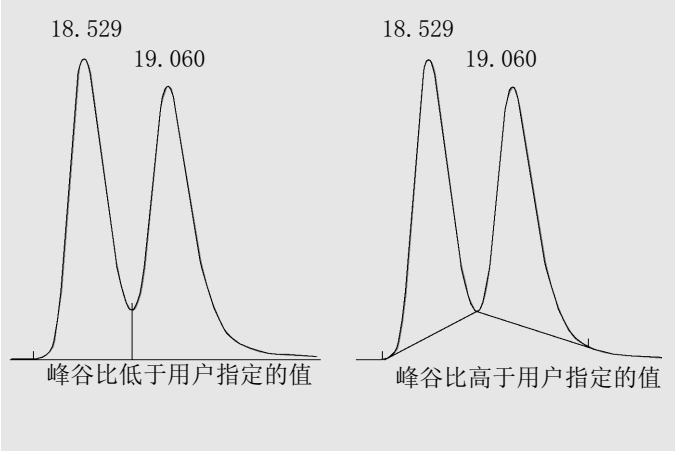


图 25 基线上的峰谷比的影响

初始事件

斜率灵敏度 斜率灵敏度为峰灵敏度的设置。如果信号斜率大于**斜率灵敏度**值，将建立峰起点；如果信号斜率降到**斜率灵敏度**值以下，将建立峰止点。

峰宽 控制积分器的选择性以区分峰与基线噪声。根据第一个预期峰（溶剂峰除外）的半高处的峰宽来指定以时间为单位的峰宽。

在运行过程中，积分器将在必要时更新峰宽以优化积分：

如果选择的初始峰宽太小，则可能会将噪声当作峰。如果宽峰和窄峰混在一起，则可以选用运行时间编程事件为特定的峰调整峰宽。有时候，峰将随着分析的进行而明显变宽，例如在恒温 GC 分析和等度 LC 分析中。为补偿这一点，积分器将在分析过程中峰变宽时自动更新峰宽，除非使用定时事件进行禁用。

更新峰宽时按照以下方式进行加权计算：

0.75 ×（现有峰宽）+0.25 ×（当前峰的峰宽）

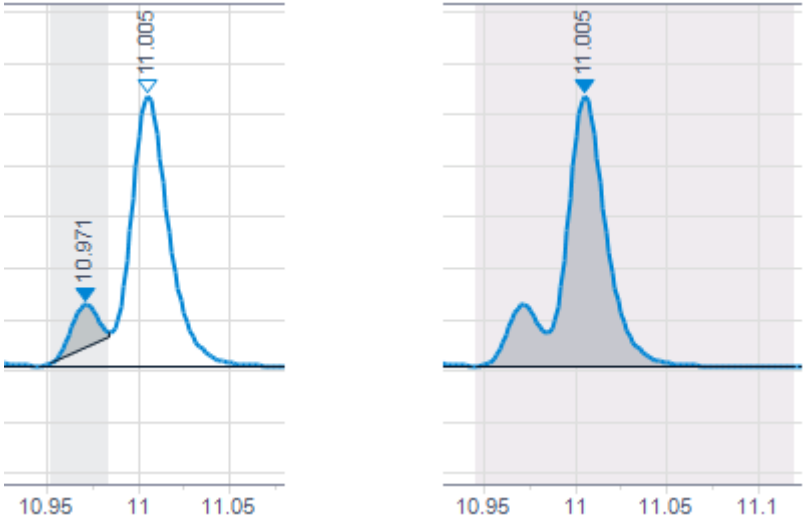
最小峰面积 设置最小目标峰的面积。

任何面积小于最小面积的峰都不会进行报告：基线校正后，积分器会排除任何面积小于**最小峰面积**值的峰。**最小峰面积**值必须大于或等于零。

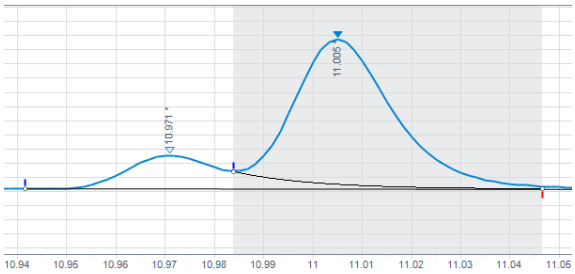
最小峰面积百分比 设置最小目标峰的面积百分比。

不会报告任何面积小于最小面积百分比的峰。基线校正后，积分器会排除任何面积百分比小于给定值的峰。

如果驼峰由于低峰面积百分比而导致峰未积分，将合并为主峰。



如果主峰低于峰面积百分比阈值，但是驼峰高于该阈值，则保留主峰，否则由于驼峰的计算，基线的建立将基于排除的峰。



最小峰高 设置最小目标峰的高度。

任何小于最小峰高的峰都不会进行报告。基线校正后，积分器会排除任何高度小于**最小峰高**值的峰。

肩峰 设置在峰上检测肩峰的初始方法。

当肩峰检测处于打开状态时，积分器将使用二阶导数给出的峰的曲率来检测肩峰。曲率变为零时，积分器将此拐点识别为可能的肩峰。如果积分器在峰顶点出现之前识别到另一个拐点，则表示已经检测到一个肩峰。

您可以从以下选项中进行选择：

- 关闭

  不检测肩峰。
- 下拉基线

  肩峰是使用下拉线积分的。
- 切线基线

  肩峰是使用切线基线积分的。有关切线撇去的更多详细信息，请参见第 32 页的 切线撇去。如果您使用切线基线，您可选择多种模式（见第 35 页的 切线撇去模式）。

选择峰宽

选择刚好能将噪音过滤掉（以避免将噪音解释为峰），而又不会破坏信号中的信息的设置。

- 要为单个目标峰选择合适的初始峰宽，请使用峰的时间宽作为峰的基本参数。
- 为了选择用于多个目的峰的合适初始峰宽，设定初始峰宽等于或小于最窄峰宽，以选择最佳峰。

最小峰高和最小峰宽

峰宽和**最小峰高**在积分过程中都是很重要的。可以通过更改这些值来获得不同的结果。

- 在高噪声环境下，需要对相对占多数的组分进行检测和定量时，可增加最小峰高和峰宽。增加峰宽可提高噪声过滤，增加最小峰高可保证忽略随机噪声。
- 在检测和定量高度接近噪声的痕量组分时，要降低最小峰高和峰宽。减少峰宽将降低信号的过滤，而降低最小峰高可保证高度不够的小峰不会被排除。
- 当分析中含有各种峰宽的峰时，应将峰宽设置为较窄峰的峰宽并降低最小峰高，以确保宽峰不会因为高度降低而被忽略。

调谐积分

通常，更改斜率灵敏度值，峰宽，最小峰高和最小峰面积来自定义积分是很有用的。下图显示了这些参数对一个信号中的五个峰的积分的影响。

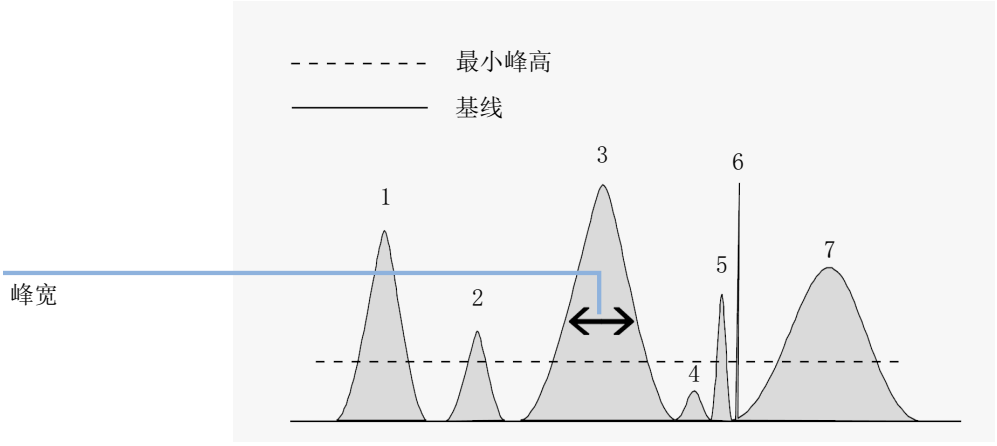


图 26　使用初始事件

只有当满足所有四个积分参数时，才会对峰进行积分。如果使用峰 3 的峰宽以及所示的最小峰面积和斜率灵敏度，则仅对峰 1、峰 3 和峰 7 进行积分。

峰 1　由于满足所有四个积分参数，因此将对其进行积分。

峰 2　由于其面积小于设置的最小峰面积，因此被排除。

峰 3　由于满足所有四个积分参数，因此将对其进行积分。

峰 4　由于峰高低于最小峰高，因此不对其进行积分。

峰 5 由于其面积小于设置的最小峰面积，因此被排除。

峰 6 不对其进行积分；过滤和集束使此峰不可见。

峰 7 对其积分。

表 5 最小峰高值和最小峰面积值

积分参数	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 7
最小峰高	高于	高于	高于	低于	高于	高于
最小峰面积	高于	低于	高于	低于	低于	高于
积分峰	是	否	是	否	否	是

定时事件

ChemStation 提供了一组定时事件，这些事件允许您选择内部算法基线定义或用户定义的积分器模式。在默认基线建立不合适时，这些定时事件可用于自定义信号基线的建立。例如，用户可以创建新的峰面积加和事件类型，这不会改变默认峰面积加和的结果。在计算最终峰面积的总和以及修正短期和长期的基线偏差时，这些事件可能会有用。

最小峰面积 请参见第 41 页的 初始事件。

峰面积加和 设置积分器加和面积的端点（开/关）。

使用面积加各创建的峰的保留/迁移时间是开始和结束时间的平均。如果在一个峰开始后但顶点前发生**面积加和打开**事件，则整个峰均计入加和。如果发生在峰顶点之后，但在峰结束之前，则峰被截断并立即开始面积加和。

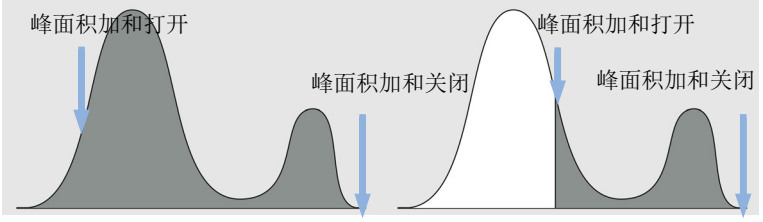


图 27 峰顶点之后峰结束之前的峰面积加和打开事件

如果在一个峰开始后但顶点前发生**面积加和关闭**事件，则加和立即结束。信号上发生此事件的点成为“峰谷点”。如果**面积加和关闭**事件发生在顶点之后，则事件被延迟到峰结束之后。

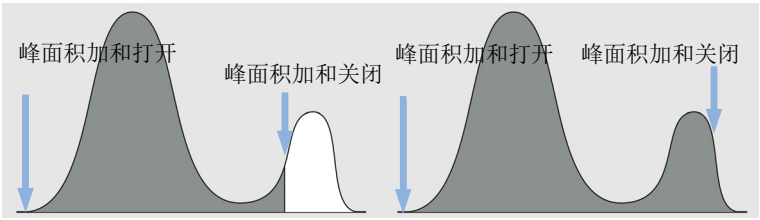


图 28　峰开始之后峰顶点之前的峰面积加和关闭事件

峰面积加和片段

此事件可无面积或时间间隔损失地定义连续峰面积加和间隔。

该事件与**峰面积加和**事件类似。但您可用此事件定义连续面积加和间隔且不会有时间间隔和积分峰面积损失。峰在您设置事件的点拆分，面积加和严格在设置的**峰面积加和片断**间隔上开始和结束。

面积加和片段峰的保留时间在片断时间间隔的中间。保留时间不随识别或重新校正而变化。可能只做轻微更改，这是因为积分器可能会在面积加和片断开始事件开始采集数据点，并在面积加和片断结束事件时结束。因此，保留时间的变化最多就是两个数据点之间的时间。

使用**开始**参数设置各个峰加和片断的开始时间。下一开始时间用作之前的时间片断的结束时间，因此您可在相互之间使用多个开始事件。

开始负峰面积参数定义了从时间片断面积中扣除任何负面积（在设定基线以下）时的积分起始点。

结束参数定义最后一个时间片断的终点。计算时间片断的面积时忽略任何在设定基线以下的面积。如果后面没有其他面积加和片断，则积分器恢复正常的峰检测模式。

在从**开始**事件到下一**结束**事件的范围内，基线总是一条直线，在方向上没有任何变化。仅在结束点之后（至少 0.001 min 后），可再次使用事件**根据范围设置基线**、**根据范围设置低基线**或**根据范围使用基线**设置长期基线变化。

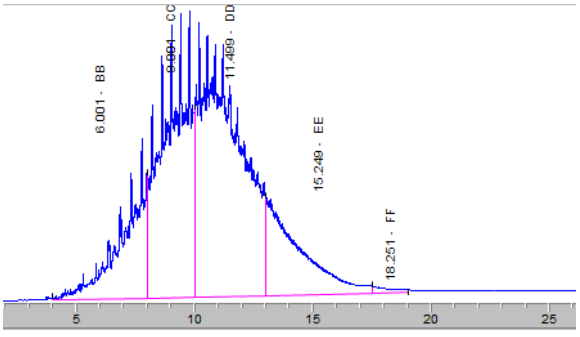


图 29　例如：峰面积加和片段

上图显示了包含以下定时事件的示例：

表 6 基线构造

时间	事件	参数
4 min	根据范围设置基线	+-2 min
22 min	根据范围设置基线	+-4 min

表 7 峰面积加和片断

时间	事件	参数
4 min	峰面积加和片段	开始
8 min	峰面积加和片段	开始
10 min	峰面积加和片段	开始
13 min	峰面积加和片段	开始
17.5 min	峰面积加和片段	开始
19 min	峰面积加和片段	结束

自动峰宽 启用自动更新下一个峰的峰宽。这会恢复该时间点的任何峰宽，同时根据之前找到的峰宽恢复峰宽跟踪。

谷底基线 设置若干点（打开/关闭）；处于这些点之间时，积分器将重置各个峰的峰谷之间的基线。

重复重新设置基线会切掉峰角。这种角成为负面积，会减少测量的峰的总面积。

当峰的背景为一个很宽的低峰，且您希望将基线重置到所有峰谷点时，可使用该功能。

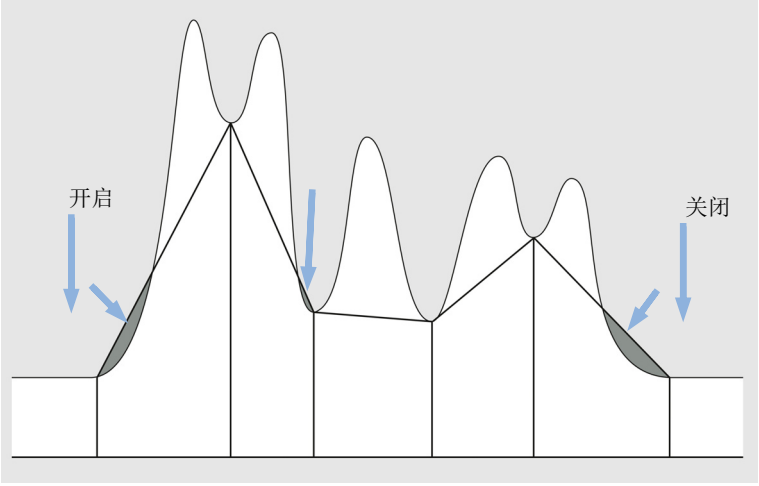


图 30 峰谷处的基线事件

基线反向 设置标准积分器扩展基线的点，在水平方向上，从已声明的基线点反向延伸至此点。

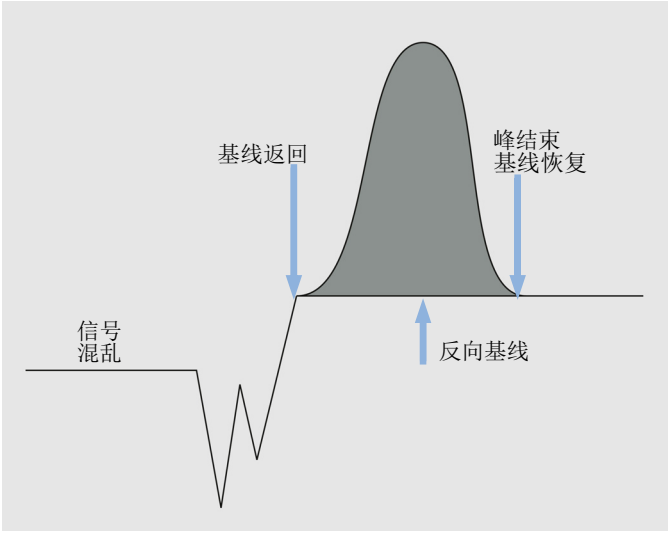


图 31 基线返回事件

基线维持 在已建立基线的高度，从基线维持事件的打开处至基线维持事件的关闭处绘制一条水平基线。

基线连到下一峰谷 设置一个点，在该点积分器将在峰之间的下一个峰谷处重新设置基线，然后自动取消该功能。

该功能用于一组合并的峰，即您认为有重叠或多个簇峰紧密连的时候。面积加和期间会忽略该功能。

开始基线 在数据点的当前位置设置一个点（时间），积分器将基线重新设置到该点（如果信号在峰上）。

检测肩峰 设置积分器开始和停止检测肩峰的端点（开/关）。

如果信号位于基线上，则会忽略此功能，并使用检测到的基线。

肩峰是根据设置的肩峰模式进行检测的。请参见第 41 页的 初始事件。

固定峰宽 设置峰宽并禁用下一峰的峰宽的自动更新。要获得良好性能，请将峰宽设置为与实际半峰高处的峰宽接近的值。

最小峰高 请参见第 41 页的 初始事件。

积分 设置积分器停止和开始积分的端点（开/关）。

积分器关闭与打开时的时间之间的峰将被忽略。

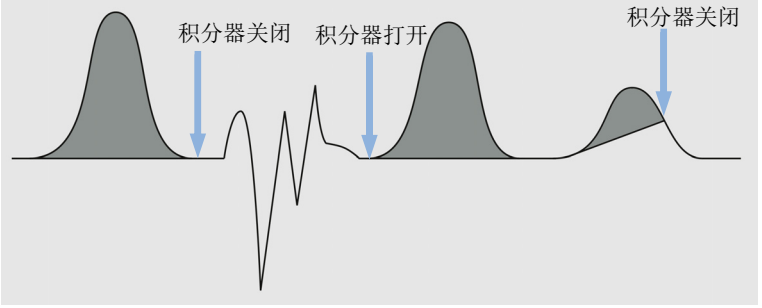


图 32 积分事件

基线是从最后一个声明的点开始绘制的，包括所有穿透重置。积分器关闭时会忽略所有其他积分器功能和设置的峰宽、阈值和最小面积更改。在**开**和**关**点，基线点重建。

积分器设置为重新开始时，新基线点会在当前信号水平上重置。

此功能适用于忽略色谱图/电泳图谱中的部分或消除基线干扰。

最大峰面积 设置最大目标峰的面积。

任何面积大于最大面积的峰都不会进行报告。基线校正后，积分器会排除任何面积大于最大峰面积值的峰。

您可对此事件进行调整，如从积分结果中排除 GC 色谱图的溶剂峰，但包含驼峰。

最大峰高 设置最大目标峰的高度。

任何高度大于最大高度的峰都不会进行报告。基线校正后，积分器会排除任何高度大于最大峰高度值的峰。

您可对此事件进行调整，如从积分结果中排除 GC 色谱图的溶剂峰，但包含驼峰。

负峰 设置积分器识别负峰的端点（开/关）。

识别到负峰时，积分器不会在穿透后自动重置基线。自此之后所有基线穿透均将使用绘制的零基线积分。面积是相当对该基线计算的绝对值。

负峰功能只能在基线偏移与峰大小相比很小时使用，因为基线是从峰簇开始处声明的基线点绘制到峰结束处已建立的基线。

注意

激活**负峰打开**事件后，“峰面积加和”将自动取消。

负峰检测时将自动取消切线撇去；此类峰由下拉线分隔。

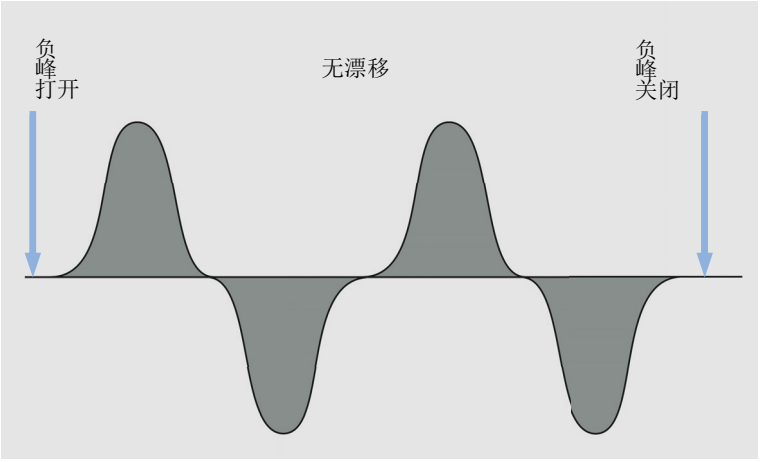


图 33　负峰事件

根据范围设置基线

使用一系列点在时间范围的中点计算统计数据上有意义的基线点。

您提供的值是指定时间点附近的时间间隔。它用来定义用于确定基线点的范围。有关基线的统计计算详情，请参见第 29 页的 基线校正模式。

如果设置值 =0，使用最近的色谱图数据点作为基线点；不作任何统计。如果设置负值，设置与**根据范围使用基线**=**清除**相同：它会停止使用统计基线算法。

您可在色谱图中指定任何用于基线计算的面积。在理想情况下，该面积应没有化学背景，仅包含噪声。第 51 页的图 34 说明了基线范围间隔的设置，以灰色阴影区域表示。

如果您指定了两个**根据范围设置基线**点（例如色谱图的起点和终点），那么两点间的基线将以一条直线连接。

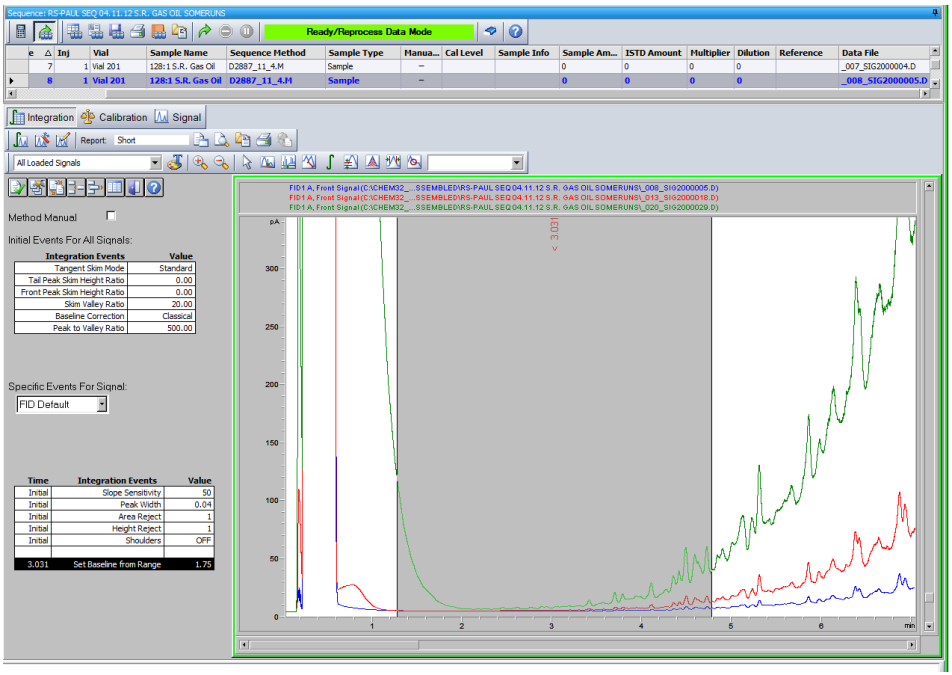


图 34　“根据范围设置基线”： 基线范围间隔以灰色阴影表示

根据范围设置低基线

与**根据范围设置基线**类似，但使用最低可能的基线点，允许上方有超过 30% 的噪声数据点。这样，基线渗透会被最小化。

您提供的值是事件的指定时间附近的时间间隔。它用来定义用于确定基线点的范围。有关基线的统计计算详情，请参见第 29 页的 基线校正模式。

如果设置值 =0，使用最近的色谱图数据作为基线点；不作任何统计。如果设置负值，设置与**根据范围使用基线**=**清除**相同：它会停止使用统计基线算法。

您可在色谱图中指定任何用于基线计算的时间和间隔。在理想情况下，它应该没有化学背景，仅包含噪声。

如果您指定了两个**从范围设置基线**点（例如色谱图的起点和终点），那么两点间的基线将以一条直线连接。

当色谱图面积用于包含大量化学噪声或电子噪声尖峰时，使用**从范围设置低基线**代替**从范围设置基线**。

肩峰　请参见第 41 页的 初始事件。

斜率灵敏度　请参见第 41 页的 初始事件。

溶剂峰 超出特定斜率（以 mV/s 为单位）的峰会被当作溶剂峰检测，溶剂峰在模数转换的范围之外。

将自动对拖尾峰进行切线撇去，不必打开切线撇去事件。

如果溶剂峰检测已关闭，那么将从拖尾峰开始划垂线，而非切线。

分裂峰 指定利用支线来划分峰的点。

注意

当启用**峰面积加和**时，您无法使用**分裂峰**。如要在**峰面积加和**启用时分裂峰，请使用相应的手动积分事件。

您无法使用**分裂峰**事件分裂撇去的峰。

拖尾峰切线撇去 设置从哪里开始或结束切线撇去。

开启

设置一个点，积分器在该点设置下一个峰的峰后缘的切线撇去。高于切线的所有峰被积分以重新设置基线。从小峰前的峰谷到小峰后的点之间划一条切线，在此处，检测器信号梯度与切线梯度相等。在峰期间，任何时候都可以输入切线撇去事件时间。将峰也指定为溶剂峰。

关闭

在当前峰结束之后，或者如果在指定的间隔未找到峰（且在下一个峰束中未指定溶剂峰），将结束切线撇去。

切线撇去模式 下列模型可用于计算合适的峰面积：

- 指数（请参见第 35 页的图 18）
- 新指数（请参见第 36 页的图 19）
- 直线（请参见第 36 页的图 20）
- 标准（请参见第 37 页的 标准撇去）

未指定峰 对于部分基线建立，有些小区域在基线之上和信号之下，但不属于任何已识别的峰。通常这些区域既不测定也不报告。如果开启未指定峰，则这些区域会被测定并报告为未指定峰。此类区域的保留时间/迁移时间为该区域的开始和结束的中点。

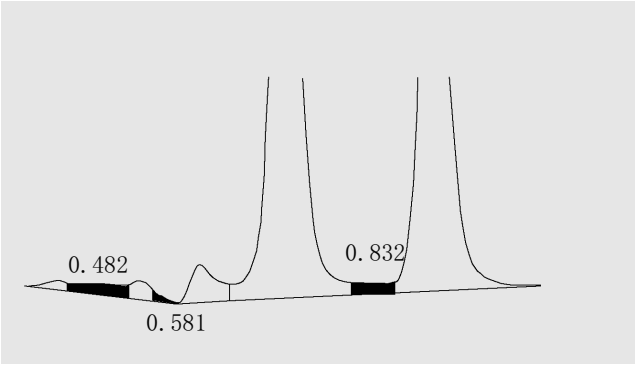


图 35 未指定峰

更新峰高 此事件强制积分器使用最高数据点的绝对峰高作为峰高。如果没有此事件，就会使用插值曲线的最大值。**更新峰高**事件尤其适用于具有极其陡峭和带角度的峰的信号，或者峰值之前有一个向下的倾斜。像这样的峰是 MSD 信号的典型。

不评估**更新峰高**事件的开始时间。此事件总是影响到整个色谱图。

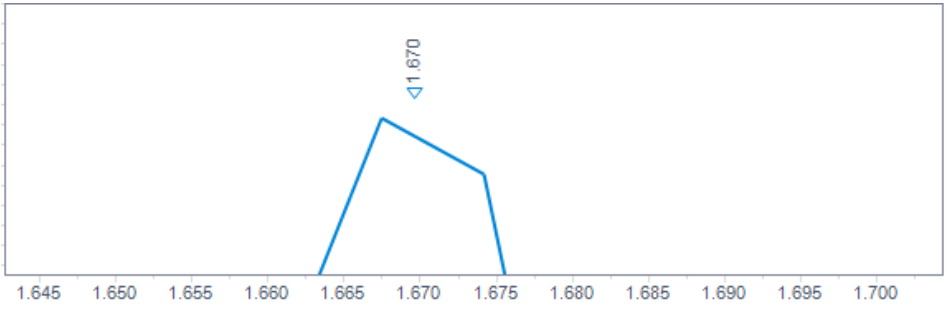


图 36 缺省积分

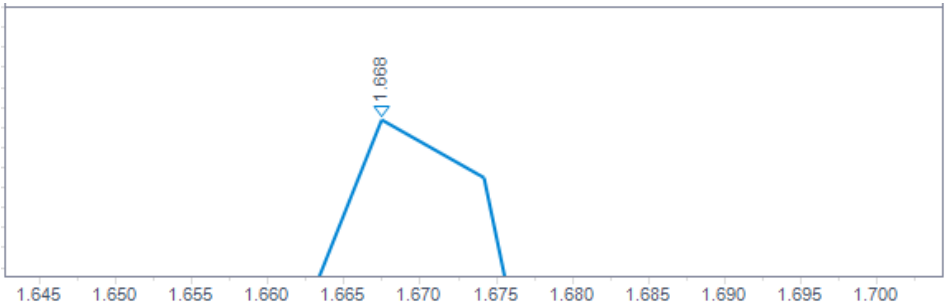


图 37　使用更新峰高事件积分

根据范围使用基线

可以将基线值延伸至之前或之后的时间以最小化基线渗透。

如果在没有色谱峰的区域计算**从范围设置基线**或**从范围设置低基线**值，那么将计算所得的基线投影到第一个目标洗脱物的峰即将出现（或是最后目标峰被洗脱之后）的时间将非常有利。**从范围使用基线**使您可以向任意方向进行最多三个此类投影。

建立上升或下降基线时，该事件会很有效，因为直基线可能会意外穿过色谱图曲线。该参数告诉积分器从哪个基线范围拾取基线点并将基线投影到给定时间范围的基线点。

可以使用以下参数：

- **清除**：清除新建基线行为并从此点返回传统算法。
- **左**：使用离该时间点左侧最近的基线范围中的基线值。
- **右**：使用离该时间点右侧最近的基线范围中的基线值。
- **范围 1**—**范围 9**：使用给定的基线范围内的基线值。基线范围是从色谱图开始计数的。

另请见**面积加和片断** (第 45 页的图 29) 中的示例。

自动积分

自动积分功能为设置初始事件提供了开始点。这在实现新方法时尤其有用。以不包含定时事件的缺省积分事件表开始；然后可以优化自动积分功能所提供的常规参数。

操作原理

自动积分功能将读取色谱图数据，并计算出色谱图对象中每个信号的初始积分参数的最优值。

此算法将在色谱图的开始和结束部分检查 1%，并确定该部分的噪声和斜率。噪声是通过以下方法来确定的：线性衰退的标准偏差除以衰退中使用的点的百分数的平方根，然后再乘以 3。这些值用于为积分的最小峰高和斜率灵敏度指定适当的值。然后，此算法根据色谱图的长度指定临时峰宽值（LC 为 0.5%，GC 为 0.3% 到 0.2%）。将初始最小峰面积设置为零，并进行一次尝试性积分。如有必要，可多次重复此尝试，每次尝试后均调整参数，直到至少检测到 5 个峰或以 0 为初始最小峰高进行积分。如果尝试 10 次后仍未满足上述条件，则尝试积分将被终止。

系统将检查积分结果，并根据检测到的峰的峰宽调整峰宽，以使计算偏向初始峰。已检测到的峰的峰对称因子用于仅将那些对称因子在 0.8 和 1.3 之间的峰，进行峰宽计算。如果未找到足够的对称峰，则可以将此限制条件放宽到以下范围：**最小对称因子的 /1.5** 到**最大对称因子的 1.5 倍**之间。然后，系统将检查峰间的基线，以更新最小峰高和斜率灵敏度的初期值。将最小峰面积设置为在尝试积分过程中检测到的最对称的峰的最小面积的 90%。

使用积分参数的这些最终值重新积分色谱图，并保存积分结果。

自动积分参数

自动积分功能设置以下参数：

- 初始斜率灵敏度
- 初始峰高
- 初始峰宽
- 初始最小峰面积

手动积分

此类型的积分允许对选定的峰或峰组进行积分。在指定的手动积分范围内，将忽略此软件的事件积分（初始最小峰面积除外）。如果手动积分出来的一个或多个峰低于最小峰面积阈值，则此积分将被废弃。手动积分事件使用绝对时间值。它们不会为信号漂移作调整。

手动积分允许您定义峰的开始点和结束点，并在定量和报告中包括重新计算的面积。所有这些点都将在报告中使用峰分离代码 M 标示。

手动积分提供以下功能：

划基线 指定要为一个峰或一组峰绘制基线的位置。使用菜单项**积分** > **所有峰谷**，您也可以指定是否在所有的峰谷点处都应自动分离给定范围内的峰。

负峰 指定何时将基线以下的任何面积视为负峰。您也可以指定是否在所有的峰谷点处都自动分离给定范围内的峰。

切线撇去 计算从主峰由切线斜滑掉的峰面积。切线撇去的峰面积将从主峰的峰面积中扣除。

分裂峰 指定用垂线分裂峰的点。

删除峰 根据积分结果删除一个或多个峰。

用于手动积分峰的峰分离代码

在积分报告中，手动积分峰以峰代码 **MM** 标记。

如果在手动积分峰之前存在一个峰，并且该峰的结束部分由于手动积分而有所改变，则将用代码 **F**（强制）标记该峰。 检测到峰谷点后，它们会设置为代码 **V**。

受手动积分影响（例如切线撇去）的主峰上的溶剂峰将用 **R**（重新计算的溶剂峰）标记。

保存手动积分事件

手动积分事件（例如手动绘制的基线）比定时积分事件更依赖数据文件和信号。如果色谱图很复杂，最好能用这些事件进行重新处理。因此可将手动积分事件直接存储在每个信号的数据文件中，而不是方法中。

每次浏览或重新处理数据文件，都会自动应用数据文件中的这些手动事件。将会在**导航表**的相应列中标记包含手动积分事件的运行。

除了用于绘制基线和用于手动删除峰的工具外，用户界面上还有另外三个工具可供使用，以便

- 将当前显示的色谱图的手动事件保存到数据文件中，
- 删除当前显示的色谱图中的所有事件，
- 撤消上一个手动积分事件（在事件未保存的情况下，此功能才可用）。

如果用户在**导航表**中浏览数据期间继续查看下一个数据文件，则 ChemStation 会检查所有未保存的手动积分事件并询问用户是否希望保存这些事件。

在**导航表**中查看数据期间，存储在数据文件中的手动积分事件不会影响以**批处理**模式进行查看期间存储的手动积分事件。对于数据文件中的手动积分事件，上述两种查看方法完全不同。

在 ChemStation B.04.01 之前的版本中，手动积分事件存储在方法中，而不是单独的数据文件中。此工作流程仍可使用。**数据分析**视图中的**积分**菜单提供了以下项，以便处理存储在方法中的手动积分事件：

- **更新方法中的手动积分事件**：将新抽取的手动积分事件保存到方法中。
- **应用方法中的手动积分事件**：将当前保存在方法中的手动积分事件应用到当前调用的数据文件。
- **删除方法中的手动积分事件**：从方法中删除手动积分事件。

要将保存在方法中的手动积分事件存储到数据文件中，需应用方法中的相应事件，然后将结果存储到数据文件中。如有需要，请删除方法中的事件。

如果启用了方法的**积分事件表**的**手动积分事件**复选框，则调用使用了此方法的数据文件时将始终应用这一方法的手动积分事件。如果该数据文件包含其他手动积分事件，则将在上述方法的事件之后应用其他手动积分事件。启用**手动积分事件**复选框时，永远不会要求用户将事件保存到数据文件中。

要将保存在方法中的手动积分事件存储到数据文件中，需应用方法中的相应事件，然后将结果存储到数据文件中。现在，可以删除方法中的事件。

如果启用了方法的**积分事件表**的**手动积分事件**复选框，则调用使用了此方法的数据文件时将始终应用这一方法的手动积分事件。如果该数据文件包含其他手动积分事件，则将在上述方法的事件之后应用其他手动积分事件。启用**手动积分事件**复选框时，永远不会要求用户将事件保存到数据文件中。

2 峰识别

什么是峰识别? 59
峰的匹配原则 60
峰识别的类型 61
绝对保留/迁移时间 61
相对保留时间 61
修正的保留/迁移时间 61
特征峰 61
含量极限值 61
绝对保留/迁移时间 62
修正的保留/迁移时间 64
单个参考峰 64
多个参考峰 64
特征峰 65
信号关联 66
特征峰验证 66
特征峰比率计算 66
识别过程 67
找出参考峰 67
找出内标峰 67
找出其它校正峰 67
未识别峰的分类 68

本章介绍了峰识别的概念。

什么是峰识别?

峰识别是根据对已知标准样品分析所确定的色谱/电泳特征，来识别未知样品中的组分。

如果分析方法要求定量，则这些组分的识别将是定量过程中的必要步骤。每个目标组分的信号特征都保存在方法的校正表中。

峰识别过程的作用是将信号中的每个峰与保存在校正表中的峰作比较。

校正表中包含目的组分的预计保留/迁移时间。与校正表中的峰的保留/迁移时间相匹配的峰将被赋予该组分的特性，如名字和响应因子。与校正表中的任何峰都不匹配的峰被归为未知峰。该过程由以下因素控制：

- 校正表中用于时间参考峰的保留/迁移时间，
- 为参考峰指定的保留/迁移时间窗口，
- 校正表中用于非时间参考峰的校正峰的保留/迁移时间，
- 为非参考峰指定的保留/迁移时间窗口，
- 在修正比率中出现的任何其他特征峰。

峰的匹配原则

峰匹配过程的原则如下：

- 如果一个样品峰落在校正表中一个组分峰的峰匹配窗口内，则该峰将被赋予该组分的属性，
- 如果一个以上样品峰落在峰的匹配窗口以内，则将最接近预期的保留/迁移时间的那个峰确定为那个组分。
- 如果是一个时间参考峰或内标峰，则将窗口中最大的峰识别为该组分，
- 如果还使用了特征峰，则将结合使用峰的比率与峰匹配窗口来识别组分峰，
- 如果该峰是一个特征峰，则将识别距该化合物主峰最近的实测峰，
- 如果一个样品峰未落在任何峰的匹配窗口内，则将该峰列为未知组分。

峰识别的类型

可使用多种技术匹配样品峰和 ChemStation 软件的校正表中的峰。

绝对保留/迁移时间

样品峰的保留/迁移时间与校正表内为每一组分指定的预计保留/迁移时间相比较。

相对保留时间

系统为校正峰和未校正峰计算相对保留时间（EP 或 USP）的方法都是 Rr = t2/t1。

修正的保留/迁移时间

组分峰的预计保留/迁移时间用一个或多个参考峰的实际保留/迁移时间来修正，并且用这些已修正的（相对）保留/迁移时间来进行匹配过程。参考峰必须在校正表中指定。

特征峰

除了用保留/迁移时间来识别峰以外，还可以使用特征峰来得到更精确的结果。如果在保留/迁移时间窗口内出现多个峰，那么，在识别正确的化合物时应该使用特征峰。

含量极限值

“化合物详细信息”对话框中定义的含量极限值用于对峰识别进行定性。如果已识别化合物的含量未超出含量极限值，峰识别将在报告中被指出（仅适用于经典报告，不适用于智能报告）。

绝对保留/迁移时间

保留/迁移时间窗口用于峰的匹配过程。保留/迁移时间窗口是以预计峰的保留/迁移时间为中心的窗口。落在这个窗口中的任何样品峰均可以被认为是候选的组分识别。

第 62 页的图 38 所示为一个保留/迁移时间窗口，峰 2 的窗口在 1.809 和 2.631 分钟之间，其预计的保留/迁移时间为 2.22 分钟。峰 2 有两种可能性。一个在 1.85 分钟，另一个在 2.33 分钟。如果预计的峰是一个非参考峰，就选最接近预计保留/迁移时间为 2.22 分钟的峰。

如果预期的峰是一个时间参考峰或内标峰，则选择该窗口中最大的峰。

在这两种情况下，ChemStation 均选择在 2.33 分钟处的峰。如果两个峰大小一样，则选择最接近该窗口中心的峰。

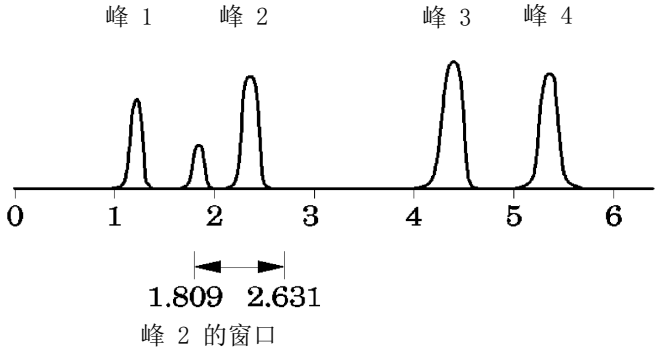


图 38　保留/迁移时间窗口

在尝试定位峰时，将使用三种类型的窗口。

- 仅适用于参考峰的参考峰窗口，
- 适用于所有其他校正峰的非参考峰窗口，以及
- 用于在**化合物详细信息**对话框中设置的各个成分的特定窗口值。

在“校正设置”对话框中输入这些窗口的缺省值。定义峰匹配窗口的保留/迁移时间两边的宽度，是绝对和百分比窗口之和。

一个 5 % 的窗口表示该峰的保留/迁移时间必须介于小于该峰的校正保留/迁移时间的 2.5 % 和大于该峰的校正保留/迁移时间的 2.5 % 之间。例如，校正运行中保留/迁移时间为 2.00 分钟的峰，样品运行中必须落在 1.95 和 2.05 分钟之间。

例如，一个 0.20 分钟的绝对窗口和一个 10 % 的相对窗口将提供一个介于 1.80 和 2.20 分钟之间的保留/迁移时间窗口。

1.80 min = 2.00 min - 0.10 min (0.20 min / 2) - 0.10 min (5% * 2.00 min)。

2.20 min = 200 min + 0.10 min (0.20 min / 2) + 0.10 min (5% * 2.00 min)。

修正的保留/迁移时间

用绝对保留/迁移时间来匹配峰可能比较简单，但并不总是可靠。由于条件或技术中微小的差异，各个保留/迁移时间可能略有变化，结果可能导致峰出现在峰匹配窗口之外，因而无法识别这些峰。

对于这种绝对保留/迁移时间不可避免的波动的问题，我们可以这样解决，用与一个或多个参考峰比较来表示组分的保留/迁移时间。

参考峰是在校正表中使用该峰的参考列中的条目来识别的。相关的峰匹配技术使用一个（或多个）参考峰来修正峰匹配窗口的定位，以补偿样品峰的保留/迁移时间的漂移。

如果方法中没有定义参考峰或在运行中化学工作站无法识别任何参考峰，软件将使用绝对保留/迁移时间来识别。

单个参考峰

参考峰的保留/迁移时间窗口以它的保留/迁移时间为中心创建，落在该窗口中的最大峰被识别为参考峰。以此参考峰预计的保留/迁移时间对实际保留/迁移时间的比率来修正校正表中的所有其它峰的预计保留/迁移时间。

多个参考峰

使用单个参考峰来修正保留/迁移时间是基于以下假定：运行过程中，实际保留/迁移时间偏离预计保留/迁移时间的偏差均匀且线性地变化。在长时间的运行中，保留/迁移时间常常不一致地变化。在这种情况下，使用运行中相间隔的多个参考峰，可以得到更好的结果。这一方法将信号分裂到独立的区域中。在每个区域中，保留/迁移时间的偏差假定为线性变化，而每个区域的变化速率是分别确定的。

注意

如果多个参考峰保留时间彼此离得太近，并且在整个运行期间无法区分开，则时间修正算法可能会失败。

特征峰

一个组分可被检测到具有多个信号。尽管多信号检测可用于各种使用多个检测器的色谱或各种使用可产生多个信号的检测器的色谱，但是多信号检测通常主要用于使用多波长检测器或二级管阵列检测器的液相色谱中。通常会对此类检测器进行设置，以使用最接近最大吸收（或面积）的波长来定义校正表中的主峰。在第 65 页的图 39中，这是 $Lambda_1$。

所得另两个信号的波长可用作特征峰。在图中，这些是 $Lambda_2$ 和 $Lambda_3$。

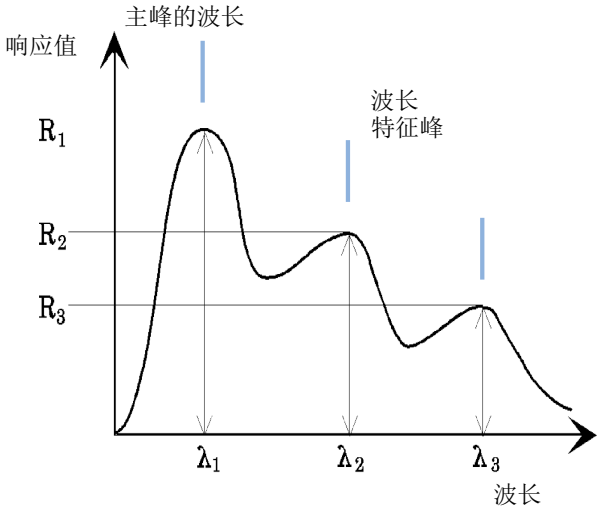


图 39　特征峰

一个化合物的峰在不同的波长上有固定的响应比率。

特征峰的响应值就是主峰响应值的一个百分比值。当选定了“定性细节表”选项后，即可在校正表中设置预期响应值的允许范围限制。如果主特征峰 $Lambda_1$ 与特征峰的比率（例如，$Lambda_3$）在允许的限值内，则可以确定该化合物的特征。

信号关联

信号关联就是将某一定义时间窗内从不同检测器信号检测到的两个峰指定给同一化合物。信号关联窗口可以由**_DaMethod**寄存器的**QuantParm**表中的**SignalCorrWin**参数来控制。如果将信号关联窗口设置为 0.0 分钟，将禁用信号关联（有关详细信息，请参见在线帮助）。当信号关联关闭时，在同一保留/迁移时间以不同检测器信号洗脱的峰将被视为不同的化合物。

LC、CE、CE/MS 和 LC/MS 数据的缺省信号关联窗口是 0.03 分钟，GC 数据的缺省信号关联窗口是 0.0 分钟。

特征峰验证

如果启用了信号关联，则缺省情况下，对所有数据文件类型而言，特征峰验证都处于活动状态。可以通过设置方法的**定量参数**表中的**使用特征峰**标志来对其进行禁用。当信号关联关闭时，特征峰验证也将被禁用。

特征峰比率计算

当为某化合物启用特征峰验证时，特征峰大小与主峰大小的比率会对照校正限制进行验证。根据“设定报告”中计算基础设置，该大小可以是峰高也可以是峰面积。

可以使用与目标化合物相同的方式对特征峰进行校正。用户无需指定预期特征峰比率。系统将自动计算预期特征峰比率：

均在化合物保留时间上检测。

QualTolerance 参数定义了特征峰比率的允许范围，例如，± 20%。

这个允许范围可以在校正表用户界面（“定性细节表”）中设置，它是一个绝对百分数。

对于多级校正，化学工作站根据每个校正级别的实测实测特征峰比来计算特征峰的最低容差条件。使用以下公式计算特征峰的最小允许范围：

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

其中，q_i 是在第 i 级测得的特征峰比率。

识别过程

尝试识别峰时，软件在积分数据中进行三次积分。

找出参考峰

第一次积分识别时间参考峰。软件寻找运行峰的保留/迁移时间，以与校正表中参考峰的保留/迁移窗口相匹配。如果该运行峰的保留/迁移时间在为校正表峰建立的窗口之内，则将该运行峰确定为校正表中的参考峰。

如果在窗口内找到多个峰，其中面积或高度值最大的峰（其后带有一个正极信号特征峰匹配 [如果设置]）将被选作参考峰。

找到参考峰后，根据参考峰的保留/迁移时间与校正表中给出的保留/迁移时间之间的差异，来调整校正表中其它峰的预计保留/迁移时间。

找出内标峰

第二次积分是识别所有已定义的内标峰。如果峰尚未被识别为内标峰，则可能被识别为时间参考峰。ISTD 峰是通过峰的保留/迁移时间和特征峰来识别的。如果在同一个内标窗口内找到多个峰，将选择最大的峰。

找出其它校正峰

第三次积分识别列在校正表中的其他所有峰。校正表中的非参考峰通过其保留时间窗口与其余运行峰相匹配。

校正表中每个非参考校正峰都有它自己的保留/迁移时间。在特定运行中将根据时间参考峰的预识别来加以调整。校正峰的保留/迁移时间窗口是根据校正峰的已修正保留/迁移时间来调整的。

如果在同一窗口内发现一个以上的峰，则选择保留/迁移时间与预计保留/迁移时间最接近，且满足可选特征峰指标的峰。

未识别峰的分类

如果还有尚未分类的峰，则它们将被归类为未知。ChemStation 会尝试将属于同一化合物的未知峰分组。如果在多个信号中检测到同一个峰，那么信号中保留/迁移时间相同的峰将被分为一个化合物。

如果在**指定报告**对话框中选择了相应选项，就会在经典报告中报告未知峰。

3 校正

什么是校正? 70
校正曲线 71
校正曲线计算 72
线性拟合 72
平方拟合 72
相对残差 75
分组校正 76
重新校正选择 77

本章详细介绍校正过程中使用的计算方法。

什么是校正?

积分和识别峰后，定量分析的下一步即校正。含量与响应很少直接与所分析的样品的实际质量成比例。这就需要通过所需参考材料进行校正。定量通过峰面积或峰高来计算样品中化合物的含量。

定量分析包含许多步骤，主要如下：

- 知道您分析的是哪种化合物。
- 确定分析包含此已知含量化合物的样品（即校正样品或标样）的方法。
- 分析校正样品得到与该含量相应的响应。

  如果您的检测器有非线性响应，您还可对多个不同化合物含量的标样进行分析。此过程称为**多级校正**。

通过以下校正方法您可执行定量：

- 化合物特定校正 (ESTD, ISTD)
- 使用其他化合物或组的校正或响应因子间接定量
- 固定的响应因子（**手动因子**）

ESTD 校正曲线和计算是根据测量的给定含量的响应（峰面积或峰高）得到的。ISTD 校正曲线和计算是根据相对响应和相对含量得出的。

校正曲线

校正曲线是从一个或多个校正样品中获取的一种化合物的含量和响应数据的图形表示法。

通常，通过进一针标样、获取相应信号，通过计算峰面积或峰高来确定响应，与第 71 页的图 40类似。

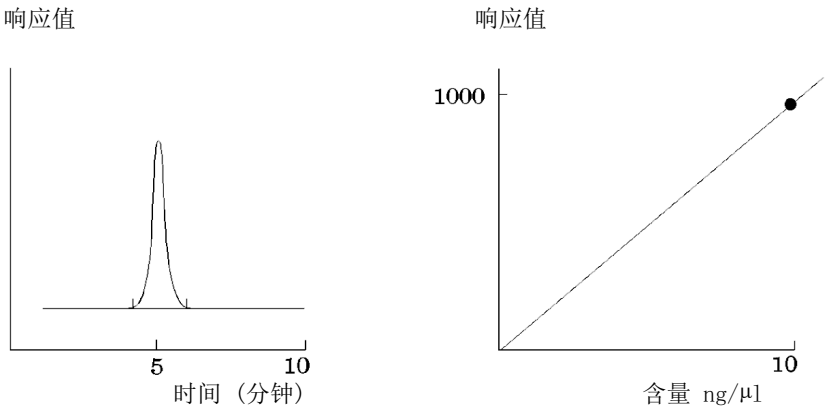


图 40　校正样品 (10 ng/µl) 信号和校正曲线

校正曲线计算

线性拟合

N = 不连续观察的数量

X_i = 自变量，i^{th} 观察

Y_i = 因变量，i^{th} 观察

曲线公式：

$$\mathbf{y}(\mathrm{X}) = \mathbf{a} + \mathbf{bX}$$

系数：

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

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

其中：

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

平方拟合

二次曲线公式：

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

平方拟合至少需要三个校正点。如果包含原点或强制使用原点，则需要两个点。

计算二次拟合的系数

系统是从下面的模拟线性方程得到的。使用克劳特算法计算相应的标准方程 ($A^TAx = A^Ty$)。在给定的公式中，和简化为：

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

为避免溢出，x 值在开始计算前先归一化：

$$Norm = \Sigma(x)$$

$$x = x / Norm$$

二次曲线的标准方程：

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

或写作矩阵方程：

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

克劳特分解：

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

使用值简化：

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

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

最后必须反向归一化：

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

相对残差

对于每种校正级别，均会显示**相对残留**。其计算公式如下：

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

其中：

relRES = 相对残留百分比

计算的响应表示校正曲线上的点。

残留标准偏差（该数据打印在某些报告中，且是在选择打印校正表和曲线时）的计算公式如下：

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

其中：

ResSTD = 残留标准偏差

$Resp_{calibratedi}$ = 点 i 的校正响应

$Resp_{calculatedi}$ = 点 i 的计算响应

n = 校正点数量

分组校正

化合物中单个浓度未知，但化合物组的整个浓度已知，这种情况下可以使用分组校正。 用异构体举例。 整个化合物组已经校正。 如下的公式会被用到：

校正

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

其中：

Conc$_{AB}$ 为构成化合物 A 和 B 的化合物组的浓度

Response$_A$为化合物 A 的峰面积（或峰高）

RF$_A$ 为响应因子

如果化合物属于同一化合物组，我们假定响应因子相等：

$$RF_A = RF_B$$

因此，化合物组中一种化合物的浓度的计算方式如下：

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

重新校正选择

可以通过多种方式用新的校正数据来更新校正表中的响应值。

平均

使用以下公式计算所有校正运行的平均值

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

浮点平均

计算所有校正运行的加权平均值。 在**重新校正设置**对话框中设置更新的加权值。

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

替换

用新的响应值替换旧值。

4 定量

什么是定量? 79
定量计算 79
修正因子 80
绝对响应因子 80
乘积因子 80
稀释因子 80
样品量 80
面积百分比法和峰高百分比法 81
校正化合物的定量 82
ESTD 计算 82
ISTD 计算 84
未校正峰的定量 87
使用校正的化合物进行间接定量 87
使用手动因子定量 87
归一化法计算 89

本章介绍如何定量化合物，并介绍定量中使用的计算。

什么是定量?

在分析过程中，峰被积分和识别之后，下一步就是定量。定量使用峰面积或峰高来确定样品中化合物的浓度。

定量分析包括许多步骤，简单归纳如下：

- 了解您所分析的化合物。
- 建立分析含有这种化合物的样品的方法。
- 分析含有已知浓度的化合物的样品，以获得该浓度下的对应值。

  如果您的检测器具有非线性响应，您还可以选择对多个含有不同浓度的目标化合物的样品进行分析。这一过程被称作**多级校正**。
- 分析含有未知浓度的化合物的样品，以获得未知浓度情况下的响应。
- 将未知浓度的响应与已知浓度的响应相比较，以确定化合物的含量。

要获得未知样品响应与已知样品响应之间的有效比较，必须在相同的条件下采集和处理数据。

定量计算

ChemStation 提供了以下用于计算混合物中各组分浓度的计算流程：

- 百分比法
- 归一化
- 外标 (ESTD)
- ESTD%
- 内标 (ISTD)
- ISTD%

用于确定未知样品中化合物浓度的计算方法取决于定量类型。 每种计算过程都使用峰面积或峰高进行计算并生成不同的报告类型。

修正因子

定量计算使用四个修正因子：**绝对响应因子**、**乘积因子**、**稀释因子**和**样品量**。在校正过程中，这些因子用来补偿检测器对不同样品组分、浓度、样品稀释、样品量响应的变化，还补偿单位转换。

绝对响应因子

在一个校正混合物分析中，样品组分的绝对响应因子由该组分含量除以该组分的峰的测定面积或峰高来表示。绝对响应因子用于在每次校正计算过程中修正各样品组分的检测器响应。

乘积因子

在每个计算公式中，乘积因子用来乘以每一组分的结果。也可将乘积因子用来转换单位以表示含量。

稀释因子

稀释因子是在报告打印之前，所有的计算结果都将乘以的一个数字。在预分析工作中，您可以使用稀释因子来改变结果范围或修正样品组分的变化。您也可以将稀释因子用于需要使用常量因子的任何其他用途。

样品量

如果选择了外标百分比法或内标百分比法计算，则外标和内标报告给出的都是相对值而不是绝对值，也就是说，每一组分的含量用样品量的百分比来表示。在外标百分比和内标百分比报告中使用样品量，将分析组分的绝对含量除以指定值来将其转换为相对值。

面积百分比法和峰高百分比法

峰面积百分比计算过程将运行中每个峰的面积报告为占运行中所有峰的总面积的百分比。**峰面积百分比**不需要预校正，也不依赖于检测器限制内的样品进样量。不使用任何响应因子。如果检测器中所有组分的响应相等，则**峰面积百分比**将得出各组分相对含量的近似值。

峰面积百分比通常用于目标定性结果中，并且生成信息以创建其他校正过程所需的校正表。

峰高百分比计算过程将运行中每个峰的高度报告为占运行中所有峰的总高度的百分比。

在面积百分比法或峰高百分比法计算中，不应用**校正设置**、**样品信息**对话框或**序列表**中的乘积因子和稀释因子。

校正化合物的定量

外标 (ESTD)、归一化和内标 (ISTD) 计算程序需要响应因子，因此要使用校正表。依据您所选择的程序，校正表指定将响应转换为您所选择的单位。

ESTD 计算

ESTD 过程是基本的定量过程，在该过程中，校正样品和未知样品均在相同的条件下进行分析。然后，将未知样品的结果与校正样品的结果相比较，来计算出未知样品的含量。

ESTD 过程使用绝对响应因子，这一点与 ISTD 过程不同。通过校正获得响应因子，然后将其保存。在接下来的样品运行中，通过将这些响应因子应用到实测样品量中来计算组分含量。请确保几次运行的样品进样量可以重复，因为在样品中没有用来修正进样量或样品制备差异的标准。

在准备 ESTD 报告时，未知样品中特定化合物的含量的计算分为两个步骤：

1 使用“校正设置”或“校正曲线”对话框中指定的拟合类型来计算通过这种化合物校正点的曲线公式。

2 未知样品中化合物的含量通过下述公式来计算。这个含量可能会出现在报告中，或在报告之前，用于由乘积因子、稀释因子或样品量值所调用的其他计算。

如果选择了 ESTD 报告，用于计算组分 X 的绝对含量的公式为：

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

其中：

$Response_x$ 是峰 x 的响应值；

RF_x 是组分 x 的响应因子，计算公式为：

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

M 是乘积因子。

D 是稀释因子。

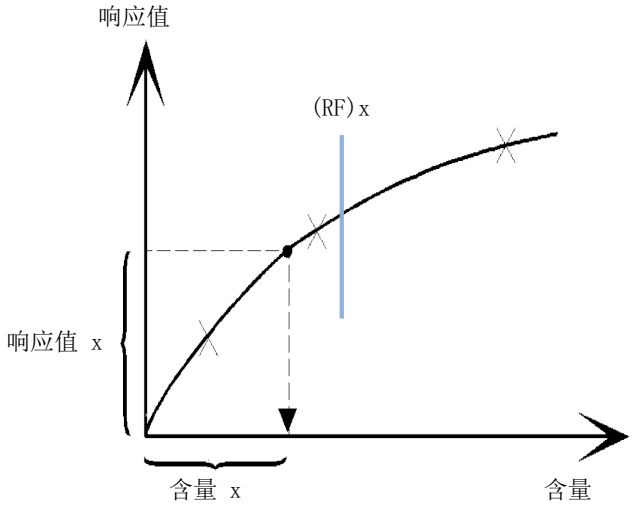


图 41　响应因子

乘积因子和稀释因子可以从**校正设置**或**样品信息**对话框中读取。

如果选择外标百分比报告，并且样品量不为零，则组分 x 的相对含量百分比按以下公式进行计算：

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

其中：

x 的绝对含量按上述外标计算中所示的方法进行计算；

样品量可以从“样品信息”框中获得，或者对于单次运行，可以从“定量设置”对话框中获得。如果样品量为零，则计算 ESTD。

ISTD 计算

内标过程通过加入某个组分的已知含量并将其用作归一化因子，从而消除了外标方法的缺点。将该组分（**内标**）添加到校正样品和未知样品中。

软件通过贮存在方法中的由先前校正获得的响应因子，并使用运行中的内标物浓度和峰面积或高度，来计算组分的浓度。

用作内标的化合物应与被校正化合物在化学性质上相似，保留/迁移时间相近，但必须可以通过色谱图区分。

表 8　ISTD 过程

优点	缺点
样品大小的偏差并不严重。	内标必须添加到每个样品。
仪器漂移会由内标进行补偿。	
如果 ISTD 的化学行为和未知状态相似，则样品制备的影响会降到最低。	

将内标过程用于非线性特性时必须小心，不要由于计算原理错误而导致系统性错误。在多级校正中，ISTD 化合物的含量必须为常数，即，如果化合物的校正曲线为非线性曲线，那么内标含量在各级标样中都应相同。

在内标分析中，目标组分的含量与内标组分的含量有关，这种关系由这两个峰的响应值之比决定。

在双运行内标校正中，未知样品中特定化合物的修正含量比的计算分为以下两个阶段：

运行 1：校正

1 校正点是通过计算校正表中每个级别的特定峰的含量比和响应比形成的。

含量比是指该级别化合物的含量除以该级别内标的含量。

响应比是指该级别化合物的面积除以该级别内标的面积或高度。

2 使用“校正设置”对话框或“校正曲线”对话框中所指定的曲线拟合类型，来计算通过校正点的曲线的公式。

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

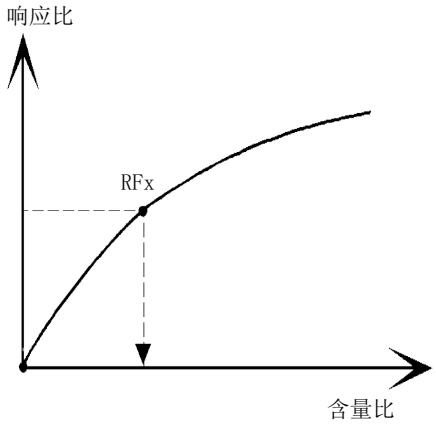


图 42　含量比

运行 2：未知样品

1 未知样品中的化合物响应值除以内标的相应值可以得出未知样品的响应比。

2 未知样品的含量比是通过上面步骤 2 中得出的曲线拟合方程和样品中 ISTD 的实际含量计算出来的。

校正化合物的 ISTD 计算

用于计算校正化合物 x 的实际含量的单级校正公式：

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

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

其中：

RF$_X$ 是化合物 x 的响应因子。

ISTD 的实际含量 **(Actual Amt)** 是在“校正设置”对话框或“样品信息”对话框中输入的要添加到未知样品中的内标的值；

M 是乘积因子。

D 是稀释因子。

如果选择了 ISTD% 报告类型，可使用以下公式计算组分 X 的相对含量 (%)：

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

未校正峰的定量

未校正峰可通过固定响应因子或使用一种已校正化合物的校正数据进行定量。使用固定响应因子或校正的化合物数据进行的定量是信号特定的。对于后者，若校正的化合物是通过内标方法定量的，则未标识峰使用内标的方式和校正化合物的使用方式相同。

使用校正的化合物进行间接定量

若使用一种已校正的化合物的校正数据定量未校正峰，可从**校正设置**对话框的**使用化合物**下拉列表中选择已校正的化合物。计算方法和校正化合物相同。若参比化合物是通过内标方法定量的，则未校正化合物使用内标的方式和参比化合物的使用方式相同。

参比峰缺失会使未校正峰的含量结果为零。

使用手动因子定量

软件允许用户选择使用固定响应因子（**校正设置**对话框中的**响应因子**）对已识别的化合物进行定量。在这种情况下化合物含量是使用固定响应因子计算的：

含量 = 响应 * 响应因子 * M * D

其中：

手动因子	固定响应因子
响应值	响应可以是峰面积或高度

在 ISTD 方法中使用手动因子

如果化合物含量是使用固定响应因子和内标进行定量的，公式如下：

峰面积比 = 峰面积 / 峰面积$_{ISTD}$

或：

高度比 = 高度 / 高度$_{ISTD}$

然后如下计算含量：

含量 = 峰面积比 * 手动因子 * 含量$_{ISTD}$

或：

含量 = 高度比 * 手动因子 * 含量$_{ISTD}$

手动因子和响应因子 (RF) 的依赖性

RF 定义为**响应值/含量**（默认设置）：

RF = 1 / 手动因子

RF 定义为**含量/响应值**：

RF = 手动因子

归一化法计算

在归一化法中，将响应因子应用到峰面积或峰高，以补偿检测器灵敏度针对不同样品组分所发生的变化。

归一化法报告的计算方法与外标报告相似，只是它采用另外一个步骤来计算化合物的相对含量而不是绝对含量。

归一化法报告与面积百分比报告和峰高百分比报告具有相同的缺点。任何影响总的峰面积的变化都将影响每个单峰的浓度计算。只有当所有目标组分都被洗脱和积分时才应使用归一化报告。从归一化报告中去掉选定的峰将改变样品报告结果。

用于计算组分 x 的**归一化法**的公式为：

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

其中：

Response$_x$	是峰 x 的峰面积（或峰高），
RF$_x$	是响应因子，
Σ（Response · RF)	是包括峰 x 在内的所有峰的所有**（响应值 · RF）**乘积的总和，
M	是乘积因子，
D	是稀释因子。

乘积因子和稀释因子可以从**指定报告**对话框中的**定量设置**或从“序列表”中读取。

5 系统适用性

峰性能评估 91
评估系统适用性 91
噪音测定 94
用 6 倍标准偏差计算噪音 95
用峰-峰公式计算噪音 95
采用 ASTM 方法进行噪音计算 97
信噪比的计算 98
漂移和偏移 101
计算峰的不对称性和对称性 103
系统适用性公式和计算 105
常用定义 106
死体积死体积 106
不保留化合物的保留时间 t (m) [min] 106
性能测试定义 107
性能测试概述 107
统计动差，斜峰和剩余峰 109
真实峰宽 Wx [min] 111
容量因子 (USP) 111
拖尾因子 (USP) t 112
每个色谱柱的理论塔板数 n 113
每米的理论塔板数 N [1-m] 114
相对保留，选择性 115
分离度（USP、ASTM）R 115
分离度 (EP/JP) Rs 116
分离度（ChemStation 经典定义） 116
峰谷比 (EP/JP) 117
重现性的定义 119
样品平均值 M 119
样品标准偏差 S 119
相对标准偏差 RSD[%] (USP) 120
平均值的标准偏差 S 120
标准偏差 (S) 120
置信区间 CI 120
相关系数 121
内部存储双精度数的存取 124

本章介绍 OpenLab CDS 如何评估分析仪器和分析方法的性能。

峰性能评估

可以为调用数据中任意已积分的峰或新增的手动积分峰计算其峰性能。交互式**峰性能工具**计算峰特征并将其显示在用户界面上。“峰性能”工具使用各个高度的真实峰宽，以及峰建模算法得出的保留时间。这些值只显示在“峰性能”工具 UI 中。这些值可能会与报告中显示的积分器值略有不同。

评估系统适用性

在分析仪器及分析方法使用前对其性能进行评估，是一种很好的分析做法。在常规分析前及分析过程中，也最好检查分析系统的性能。ChemStation 软件提供了自动执行这三种测试的工具。仪器测试可包括检测器灵敏度、峰保留/迁移时间的精度和峰面积的精度。方法测试可包括保留/迁移时间及含量的精度、选择性以及方法对操作中的日常变化的耐用性。**系统测试**可包括含量精度、两个特定峰之间的分离度和峰拖尾情况。

实验室必须符合：

- 优良实验室规范条例 (GLP)，
- 优良生产规范条例 (GMP) 和现行优良生产规范条例 (cGMP)，及
- 优良自动化实验室规范 (GALP)。

实验室应执行这些测试并完整记录结果。作为质量控制体系的一部分的实验室（例如遵守 ISO 9000 认证条例），必须验证其仪器性能良好。

ChemStation 比较数次运行的结果，并在序列总结报告中进行统计评估。

测试结果以监管机构和独立审核员通常认可的格式记录。统计包括：

- 峰保留/迁移时间，
- 峰面积，
- 含量；
- 峰高，
- 半峰高峰宽，
- 峰对称性，
- 峰拖尾，

- 容量因子 (k´)，
- 塔板数，
- 峰之间的分离度，
- 与前一峰的相对选择性，
- 斜峰，以及
- 剩余峰。

将计算平均值、标准偏差、相对标准偏差及置信区间。您可以针对每个参数设置标准偏差、相对标准偏差或置信区间的极限值。如果数值超过极限值，报告将进行标记以引起用户注意。

记录测量时的实际条件可支持分析数据的质量。这些信息与数据一起保存并与样品数据一起进行报告。整个分析过程中的仪器性能曲线作为信号进行记录，并保存在数据文件中。如果仪器支持，可以在需要时重新调用这些叠加在色谱图上的记录，例如在审核过程中。

基线噪音和漂移可自动测得。用这种方法，通过每个校正过的化合物的峰高数据可计算最小可检测水平。

最后，打印的每个报告可包括仪器配置、仪器序列号、色谱柱/毛细管柱识别及用户自己的注释。

扩展性能结果的计算只适用于以此方法校正的化合物，以保证保留/迁移时间和化合物名称的特性。

标准的系统性能测试报告包括下列性能结果：

- 仪器的详细信息，
- 色谱柱/毛细管柱详细情况，
- 分析方法，
- 样品信息，
- 采集信息，
- 信号描述及基线噪音测定，以及
- 标有保留/迁移时间或化合物名称的信号。

此外，针对色谱图中的每个校正过的化合物，还将生成以下信息：

- 保留/迁移时间，
- k´，
- 对称性，
- 峰宽，

- 塔板数，
- 分离度，
- 信噪比，以及
- 化合物名称。

噪音测定

噪音可通过信号的选定时间范围内的数据点值来测定。噪音有三种不同的处理方式：

- 作为漂移的线性回归标准偏差 (sd) 的六倍，
- 作为峰到峰（已修正漂移）噪音，以及
- 用 ASTM (ASTM E 685-93) 方法测定的噪音。

可以为最多七种范围的信号计算噪音；在报告参数中范围被指定为系统适用性设置的一部分。

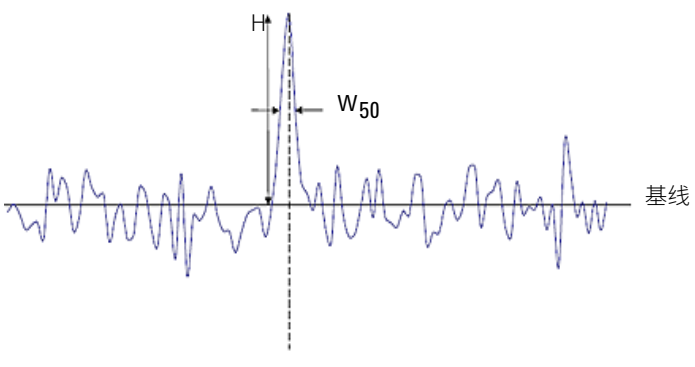
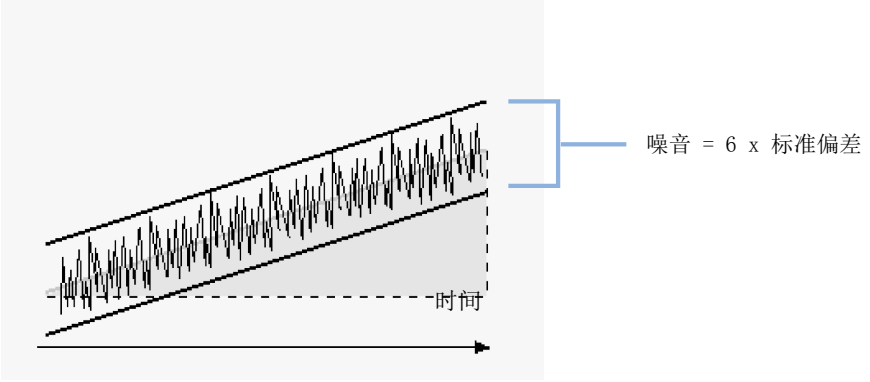


图 43　带峰信号和噪音的色谱图

H	从峰顶至基线（可穿越噪音的最佳直线）的峰高
W_{50}	半峰高处的峰宽

用 6 倍标准偏差计算噪音



使用当前信号时间范围内的所有数据点来计算线性回归。按以下公式计算噪音：

$$N = 6 \times Std$$

其中：

N	基于六倍标准偏差方法的噪音
Std	选定的时间范围内所有数据点的线性回归的标准偏差

用峰-峰公式计算噪音

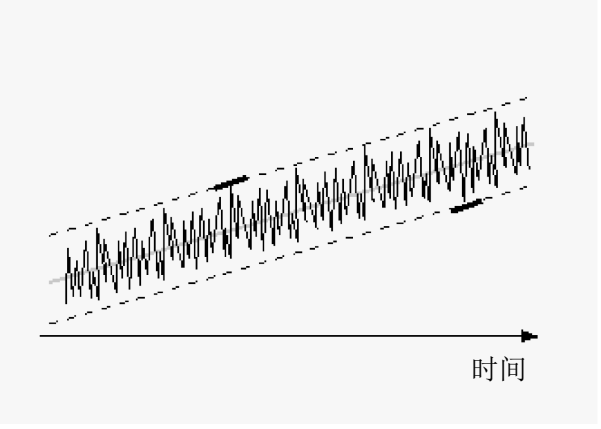


图 44　带漂移的峰-峰噪声的图解

首先通过使用峰的时间范围内的所有数据点确定线性回归来计算漂移。从该时间范围内的所有数据点减去线性回归线，以提供已修正漂移的信号。

然后使用以下公式计算峰-峰噪音：

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

其中：

N	峰-峰噪音
I_{max}	该时间范围内的最高（最大） I_x 值
I_{min}	该时间范围内的最低（最小） I_x 值
I_x	通过漂移纠正信号强度（使用 LSQ 公式计算漂移）

欧洲药典中，峰-峰噪音使用一个以峰为中心，+/- 10 倍 W_{50} 范围的空白参比信号进行计算。该区域可与目标信号相对称，若存在基质信号时，也可以不对称。

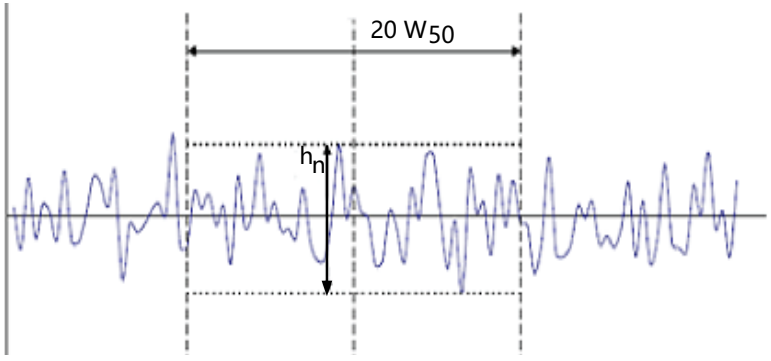


图 45　根据空白样品的色谱图进行噪声测定

其中

20 W_{50} 指的是对应 20 倍 W_{50} 的区域。

h_n 指的是在 20 倍 W_{50} 区域内，基线噪音的最大高度。

采用 ASTM 方法进行噪音计算

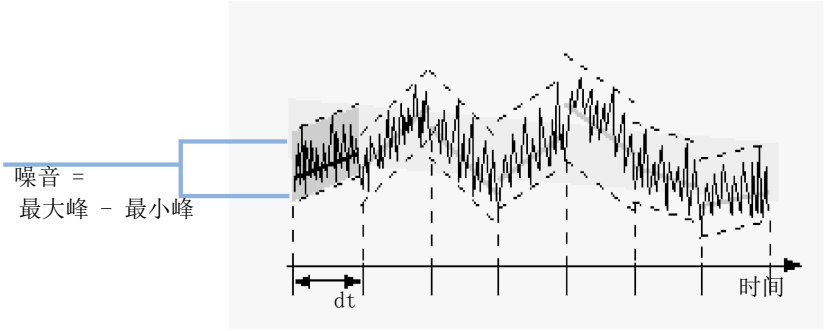


图 46　采用 ASTM 方法进行音测定

ASTM 噪音测定 (ASTM E 685-93) 依据的是用于对液相色谱中所用的可变波长光度检测器进行测试的标准做法，该标准做法由美国材料试验协会 (American Society for Testing and Materials, ASTM) 制定。根据时间范围的大小，可区分三种不同类型的噪音。噪音测定依据的是在定义的时间范围内的峰-峰测量。

- **循环时间，t**

  长期噪音，即每小时频率介于 6 到 60 次循环的检测器信号所有随机偏差的最大振幅。长期噪音可在选定的时间范围超过一小时的情况下加以确定。每次循环 (dt) 的时间范围设置为 10 分钟，这样会在选定的时间范围内至少实现六次循环。

  短期噪音，即每分钟频率大于一次循环的检测器信号所有随机偏差的最大振幅。可确定介于 10 到 60 分钟的选定时间范围内的短期噪音。每次循环 (dt) 的时间范围设置为一分钟，这样会在选定的时间范围内至少实现 10 次循环。

  极短期噪音（并非 ASTM E 685-93 的一部分），引入此术语之目的在于描述大于每 0.1 分钟一次循环的检测器信号所有随机偏差的最大振幅。

  可确定介于 1 到 10 分钟的选定时间范围内的极短期噪音。每次循环 (dt) 的时间范围设置为 0.1 分钟，这样会在选定的时间范围内至少实现 10 次循环。

- **循环次数，n**

  循环次数计算方法：

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

  其中，t 为循环时间，而 t_{tot} 为总时间，在该总时间内计算噪音。

- **每次循环的峰-峰噪音**

  首先通过使用时间范围内的所有数据点确定线性回归来计算漂移。从该时间范围内的所有数据点减去线性回归线，以提供已修正漂移的信号。然后使用以下公式计算峰-峰噪音：

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

  其中，N 为峰-峰噪音，I_{max} 为相应时间范围内最高（最大）强度的峰，而 I_{min} 为相应时间范围内最低（最小）强度的峰。

- **ASTM 噪音**

  ASTM 噪音计算方法：

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

  其中，N_{ASTM} 为基于 ASTM 方法的噪音。

  如果选定的时间范围低于一分钟，则 ASTM 噪声测定未完成。根据相应范围的不同，如果选定的时间范围大于或等于一分钟，则使用上述 ASTM 方法之一来测定噪声。在计算过程中，至少使用每次循环的七个数据点。自动噪音测定中的循环重叠 10 %。

信噪比的计算

ChemStation 有以下几种计算信噪比噪音的选项：

- **6 δ**：使用线性回归标准偏差的六倍 (6 δ) 来计算噪音。由当前信号中的特定时间间隔来计算得出噪音数据。如果您定义了多个时间间隔，将使用最接近峰的间隔。
- **USP**（根据美国药典的定义）：用峰-峰公式计算噪音。由当前信号中的特定时间间隔来计算得出噪音数据。如果您定义了多个时间间隔，将使用最接近峰的间隔。
- **EP**（根据欧洲药典的定义）：用峰-峰公式计算噪音。由空白信号中的特定时间间隔来计算得出噪音数据。噪音计算的时间范围是峰宽的 20 倍的时间范围间隔，以峰的保留时间为中心。

信噪比的计算不适用参比信号（6 δ、USP）

在系统适应性设置指定的范围中，选择最接近峰的范围。

使用线性回归标准偏差的六倍或峰-峰公式 (USP) 计算噪音。

系统将为信号中的每个峰计算信噪比。如果找不到噪音值，会将信噪比报告为"-"。

使用以下公式计算信噪比：

$$\text{信噪比} = \frac{\text{峰高}}{\text{指定范围的噪音}}$$

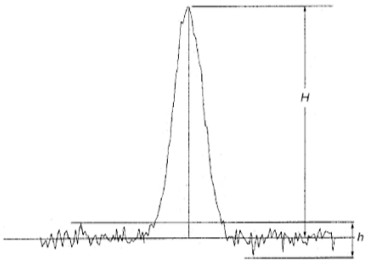


图 47　信噪比

根据欧洲药典定义进行信噪比计算

信噪比 (S/N) 可根据欧洲药典定义进行计算。使用如下公式计算 S/N：

S/N = 2H/h

其中：

H 是使用规定的参比溶液得到的色谱图中对应组分的峰高，

h 是在进样空白的色谱图中，观察等同于 20 倍的半峰高（使用规定的参比溶液得到的色谱图）距离的时间内相对于基线的最大噪声波动绝对值。

使用的噪声值以“峰-峰”方法（请参见第 95 页的 用峰-峰公式计算噪音）进行计算。

软件对色谱图信号中所有的峰的 **S/N** 进行了报告，只要存在对应的参比信号。对于某个特定的色谱图信号，如果指定了参比数据文件，参比信号将自动分配。如果无法为色谱图信号指定一个参比信号，那么将不会为该信号中的峰进行信噪比的计算。

噪声范围测定

参比信号中的噪声范围根据下列一种算法进行测定

- 如果参比信号不够长： **StartTime - EndTime < 20*W_{50}**
  - **StartTime = 开始时间（参比信号）**，而
  - **EndTime = 结束时间（参比信号）**
- 如果参比信号足够长，但是已出现峰，**(RT-10*W_{50})** 小于参比信号的开始点
  - **StartTime = 开始时间（参比信号）**，而
  - **EndTime = StartTime + 20*W_{50}**
- 如果参比信号足够长，但是已出现峰，**RT** 或 **RT+10*W_{50}** 大于参比信号的结束点
  - **EndTime = 结束时间（参比信号）**，而
  - **StartTime = EndTime - 20*W_{50}**
- 如果已出现峰，**RT** 或 **RT+10*W_{50}** 大于参比信号的结束点
  - **StartTime = RT - 10*W_{50}**，而
  - **EndTime = RT + 10*W_{50}**

其中：

RT 为保留时间，而

W_{50} 为半峰宽。

漂移和偏移

如果在处理方法中选择了**信噪比**，则计算漂移和偏移。无论选择何种噪音计算类型都要计算。

漂移 根据线性回归的斜率给定的漂移。首先通过使用时间范围内的所有数据点确定线性回归来计算漂移。从该时间范围内的所有数据点减去线性回归线，以提供已修正漂移的信号。

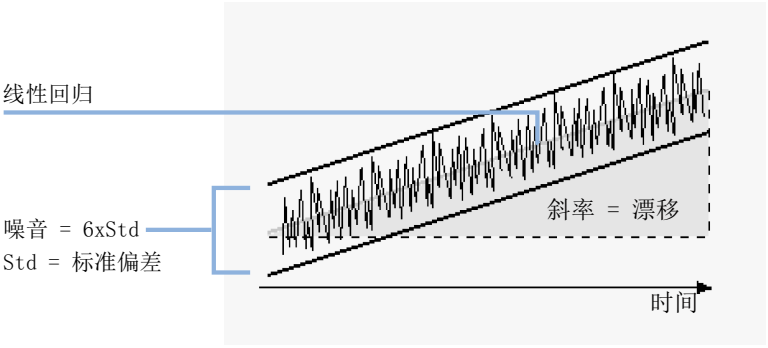


图 48 六倍标准偏差的噪声漂移

曲线公式：

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

其中：

N	不连续观察的数量
X_i	自变量，第 i 个观察
Y_i	因变量，第 i 个观察

系数：

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

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

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

偏移 偏移根据 ASTM 噪音循环中的中间数据值的峰-峰噪声来确定，请参见第 95 页的 用 6 倍标准偏差计算噪音。

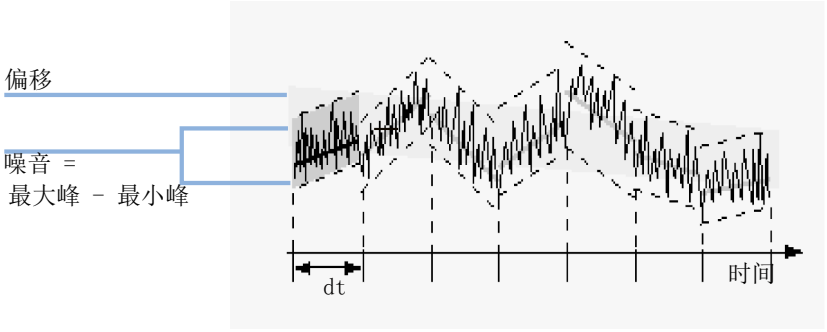


图 49 通过 ASTM 测得的噪声波动

计算峰的不对称性和对称性

不对称性 ChemStation 通过比较 5% （请参见第 112 页的 拖尾因子 (USP) t）或 10%（请参见下面的等式）峰高的半峰宽确定峰的不对称比率。

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

其中：

A_S	不对称性 10%
W_{10}	10% 峰高处的峰宽
$W_{f,\,10}$	10% 峰高处的前半峰宽

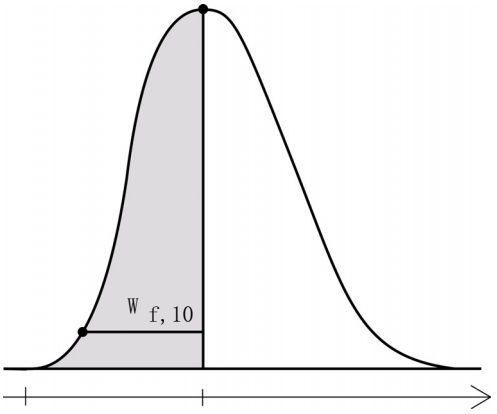


图 50 计算峰不对称性

对称性 峰对称性是作为伪距，由积分器使用下列距式计算的：

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

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

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

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

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

如果未发现拐点，或只有一个拐点，则会以以下方式计算峰对称性：

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

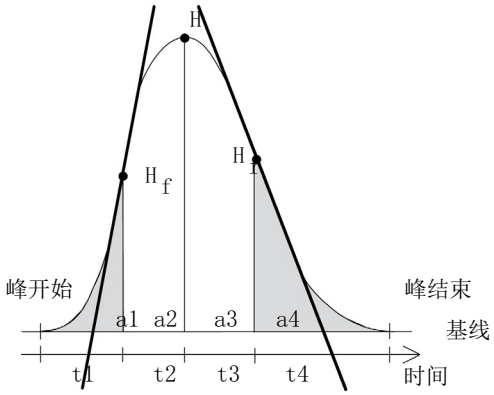


图 51　峰对称因子计算

其中：

a_i = 片段的面积

t_i = 片段的时间

H_f = 前拐点的高度

H_r = 后拐点的高度

H = 顶点处的峰高

系统适用性公式和计算

化学工作站使用以下公式来获取各种系统适应性测试的结果。使用**性能**、**性能 + 噪声**、**性能 + 谱图检索**和**扩展性能**报告类型报告结果。

如果为某一给定的定义指定了 ASTM 或 USP，则该定义与相应的参比中给定的定义相符。但是，此处所用的符号可能不同于参比中所用的符号。

本文中所用的参考资料为：

- **ASTM：E 685 – 93 (2021) 部分**
- **USP：美国药典，USP 37-NF32 第一补编**
- **EP：欧洲药典，第 11 版**
- **JP：日本药典，第 18 版**

注意

从 USP 2022 开始，若干峰性能参数计算已与 EP 和 JP 协调一致。请参阅 ChemStation 在线帮助，了解为符合 USP 2022 标准而需要使用的 EP/JP 公式的详细信息。

常用定义

死体积死体积

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

其中：

d	色谱柱直径 [cm]
π	常量，圆周与圆环直径的比值
l	色谱柱长度 [cm]
f	色谱柱体积的滞留组分不是根据固定相计算的，而是流动相，默认值：f = 0.68（适用于 Hypersil）

不保留化合物的保留时间 t (m) [min]

（也称为死时间或死时间）

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

其中：

F	液相色谱的流速 [ml/min]

性能测试定义

性能测试概述

在峰表中，USP、EP 和 JP 定义的因子可用于 ChemStation 报告。下表提供了可用因子的概述、定义和值名称。有关计算的更多细节，请参阅本指南中的相应部分。

表 9 ChemStation 报告中的药典值

USP	EP	JP	定义	经典报告 (RLE)	智能报告 (RTE)
对称因子或拖尾因子	对称因子	对称因子	$S = W_5/2f$	USP 拖尾	峰拖尾因子
-	-	-	$S = W_{10}/2f$	在 10% 峰高的 USP 不对称性	峰_不对称性_10%
分离因子	-	分离因子	$\alpha = k'_{(a)} / k'_{(b)}$ a 峰的 T_R < b 峰的 T_R	选择性	峰_选择性
相对保留	相对保留	-	使用 RRT 化合物： $r = (t_{R2}-t_0)/(t_{R1}-t_0)$		峰_相对保留时间_EP
相对保留时间 (RRT)	未调整的相对保留时间	未调整的相对保留时间	$Rr = t_2/t_1$	-	峰_相对保留时间
-	分离度	分离度	$Rs = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50\,(1)} + W_{50\,(2)}}$	分离度(EP) 分离度(JP)	峰_分离度_EP 峰_分离度_JP
-	-	-	$R = \frac{\left(\frac{2.35}{2}\right)\left(T_{R(b)} - T_{R(a)}\right)}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$	分离度	峰_分离度_经典
分离度	-	-	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t\,(2)} + W_{t\,(1)}}$	-	峰_分离度_USP
理论塔板数（柱效）			$n = 16\left(\frac{t_R}{W_t}\right)^2$	理论塔板数（切线法）	峰_理论塔板数_USP

表 9 ChemStation 报告中的药典值

USP	EP	JP	定义	经典报告 (RLE)	智能报告 (RTE)
-	塔板数（柱效）	塔板数（柱效）	$N = 5.54 \times t_R^2/W_{50}^2$	理论塔板数（半峰高法）	峰_理论塔板数_EP 峰_理论塔板数_JP
	信噪比	信噪比	S/N = 2H/h 噪声：峰-峰计算；空白参比信号；峰宽的 20 倍的时间间隔。	-	峰_信噪比_EP
信噪比			S/N = 2H/h 噪声：峰-峰计算；当前信号的时间间隔。		峰_信噪比_USP
			S/N = 2H/h 噪声：6 δ 计算；当前信号的时间间隔。		Peak_SignalToNoise_6Sigma
峰谷比	峰谷比	峰谷比	$p/v = H_p/H_v$	峰谷比（前伸和拖尾）	峰_峰谷比
-	-	-	S=B/A	在 10% 峰高的 Foley-Dorsey 不对称性	-
-	-	-	$N_{sys} = \frac{41.7(T_R/W_{10})^2}{1.25 + (\max(A,B)/\min(A,B))}$	Foley-Dorsey 塔板数	-

统计动差，斜峰和剩余峰

统计要素可以作为说明不对称峰形的另一种方法来计算。有无数个峰要素，但只有前五个与色谱峰一起使用。 它们被称为第 0 要素、第 1 要素、... 第 4 要素。

第 0 要素表示峰面积。

第 1 要素为平均保留时间，或在峰重心处测得的保留时间。它不同于在峰最大值处检测的色谱保留时间（对称峰除外）。

第 2 要素表示峰的变化，即宽展的大小。它是仪器系统各部分的差异之和。

第 3 要素说明垂直对称性或斜度。它是根据高斯标准测得的峰形偏差。在性能和扩展报告中额外给出的斜度没有单位。对称峰的斜度为零。拖尾峰的斜度为正值，其第一要素大于保留时间。前峰的斜度为负值，其第一要素小于保留时间。

第 4 要素或余值用来测量在峰纵向轴上的压缩或拉伸，以及与第 4 要素为零的高斯标准相比的情况。可以在面积保持不变的情况下，通过压缩或拉伸高斯峰的边缘对其进行观察。如果在比较中峰被压缩或挤压变形，则其余值为负值。如果峰变得更高，则其余值为正值。同样，在性能和扩展报告中，过剩性也没有单位。

统计动差计算

$$M0 = d_t \cdot X$$

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

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

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

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

其中：

N = 峰面积片段数

A_i = 按 i 进行索引的峰面积片段的值（响应）

d_t = 相邻峰面积片段之间的时间间隔

t_0 = 第一个峰面积片段的时间

$\sum_{i=1}^{N}$ = 从索引 1 到最后索引 N 进行不连续观察的总和

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

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

真实峰宽 Wx [min]

W_x = 总 x % 峰高处的峰宽

其中：

W_t	切线峰宽，4 δ，通过切线与基线的拐点相交而得出
$W_{4.4}$	4.4% 峰高处的峰宽（5 δ 峰宽）
W_5	5% 峰高处的峰宽（拖尾峰宽），用于 USP 拖尾因子
W_{10}	10% 峰高处的峰宽
W_{50}	50% 峰高处的峰宽（真实半峰高峰宽或 2.35 δ）

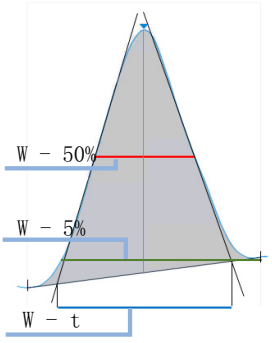


图 52　x % 峰高处的峰宽

容量因子 (USP)

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

其中：

t_R = 峰保留时间 [min]

t_0= 死时间 [min]

拖尾因子 (USP) t

注意

对称因子 (USP, EP, JP) 与拖尾因子 (USP) 相同。在智能报告中都可用，表示为“峰_拖尾因子”。另请参见第 107 页的 性能测试概述。

$$S = \frac{W_5}{2f}$$

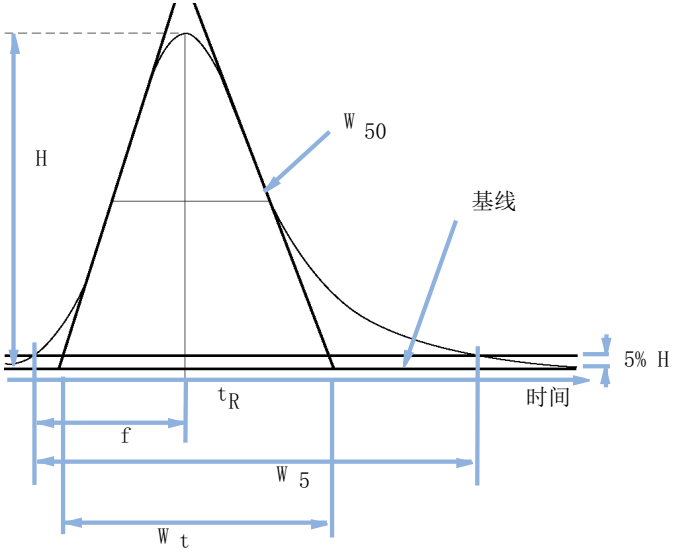


图 53　性能参数

S	对称因子、拖尾因子 (USP)
H	峰高
t_R	保留时间
f	前伸峰和 t_R 之间的最短距离（测量值为峰高的 5%）
W_{50}	50% 峰高处的峰宽 [min]
W_5	5% 峰高处的峰宽 [min]
W_t	切线峰宽

每个色谱柱的理论塔板数 n

切线法（USP、ASTM）：

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

其中：

T_R	保留时间
W_t	切线峰宽 [min]

半峰宽法 (ASTM、EP、JP)：

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

其中：

T_R	保留时间
W_{50}	半峰高处的峰宽 [min]

5 σ 法：

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

其中：

T_R	保留时间
$W_{4.4}$	4.4% 峰高处的峰宽 [min]

统计方法:

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

其中：

Mx = 第 x 个统计要素

Foley Dorsey 法

Foley-Dorsey 公式用于非对称峰的计算。它可以为峰拖尾和展宽校正塔板计数。

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

其中

- W_{10} = 10% 峰高处的峰宽
- A：前伸峰，B：拖尾峰，A+B = W_{10}

每米的理论塔板数 N [1-m]

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

其中：

n	理论塔板数
l	色谱柱长度 [cm]（与在处理方法中提供的一样）

相对保留，选择性

选择性 选择性计算除第一个信号峰外的所有信号峰的 alpha 值。对于每对相邻的峰（峰 1 和 2，峰 1 的 t_R <峰 2 的 t_R，选择性的计算如下：

$$\text{alpha} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}, \text{ alpha} > 1$$

其中：

$k'_{(x)}$	峰 x 的容量因子：$(t_{Rx}-t_0)/t_0$

相对保留 (EP) 只有在定义和确定了 RT 比参比峰的情况下，才能根据 EP 计算相对保留（调整后）。如果峰值位于参比的左侧，则 **alpha** 值小于 1；如果峰值位于参比的右侧，则 alpha 值大于 1。

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

其中

t_{Ri} = 目标峰的保留时间

t_{Rst} = 参比峰的保留时间

t_M = 维持时间

EP 中的相对保留（未调整）的计算公式如下

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

分离度（USP、ASTM）R

切线方法（与峰 1 和 峰 2 有关，峰 1 的 t_R < 峰 2 的 t_R；t_R 以 min 为单位）

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

其中：

t_R	保留时间
W_t	切线宽度 (min)

分离度 (EP/JP) Rs

使用如下定义计算 JP 和 EP 中定义的分离度：

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

注意

此外，经典分离度 (2.35/2)*… 以 Peak_Resolution_Classic 的形式出现在智能报告中。有关值的完整列表，请参见第 107 页的 性能测试概述

分离度（ChemStation 经典定义）

半峰宽法：

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

5 σ 法：

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

统计方法:

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

其中：

$M1_{(x)}$ = x 峰的平均保留时间（第一统计要素） [min]

$W_{B(x)}$ = x 峰的基准峰宽 [min]

$W_{4.4(x)}$= x 峰在 4.4% 峰高处的峰宽 [min]

$W_{50(x)}$= x 峰在 50% 峰高处的峰宽 [min]

$W_S(x)$ = 通过统计要素所得的峰宽 = x 峰的 $\sqrt{(M2)}$ [min]（另请参见第 109 页的 统计动差计算）

峰谷比 (EP/JP)

峰谷比（进样结果中的 **p/v 比**）计算结果表示的是峰分离的质量。该值将根据欧洲药典和日本药典 (EP, JP) 进行计算。

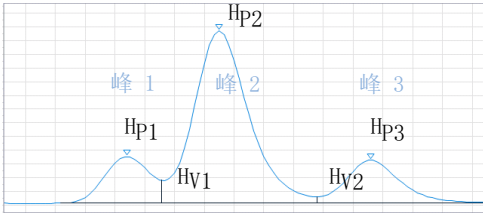
注意

与用于积分器的高级基线峰分裂操作的阈值相比，该值的计算方式有所不同。

峰谷比计算的是峰与谷之比：

PV = 峰高 / 谷高

如果峰的左右两侧均有谷，则计算前伸和拖尾峰谷比。智能报告功能将显示最小 p/v。对于经典报告，“经典扩展性能”报告中将同时显示两个值。



对于峰 1：

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

对于峰 2：

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

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

对于峰 3：

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

其中：

PV	峰谷比
PV_F	峰谷比，前伸
PV_T	峰谷比，拖尾
H_{Px}	峰 x 的高度
H_{Vx}	谷 x 的高度

如果峰有多个由谷分离的肩峰，则计算的是每个肩峰的峰谷比。

谷的定义：

- 其高度和时间在两个连续的峰之间共享
- 其基线在两个连续的峰之间共享
- 绝对基线高度大于 10^{-5}。

重现性的定义

要从重复性角度对分析数据进行统计检查，序列将被看作是从无限个可能的实验结果中随机抽取的小样品。要得到一组完整的结果，需要无限量的样品材料以及时间。严格的统计数据仅适用于完整的自包含集或数据分布。因此，该处理的一个先决条件是所选择的样品能够代表所有数据。

样品平均值 M

包含 N 个检测值的随机样品平均值 M，是对以连续计数器 i 索引的 N 个单观察值的有限集合 X_i 根据下述公式计算得出的：

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

其中：

N = 非连续观察次数

X_i= 按 i 索引的非连续观察值

样品标准偏差 S

假设随机样品大小为 N。从大量数据分布中抽取的有限样品的样品标准偏差 S 由下列公式确定

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

样品标准偏差 S 与所有数据的标准偏差 s 有两点不同：

- 仅使用样品平均值 M 而不使用实际平均值；
- 用 N-1 作分母，而不是 N。

相对标准偏差 RSD[%] (USP)

相对标准偏差定义为

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

平均值的标准偏差 S

M 为样品平均值，S 为样品 [或 (N-1)] 标准偏差。 样品平均值 M 的标准偏差 S_M 由以下公式计算

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

进一步举例说明：

在一个序列中，某化合物的保留时间与计算的平均值可能稍有偏差，而另一序列的数据由于环境温度变化、色谱柱材料随时间老化等因素可能产生更大的差异。要确定这种偏差，可以使用上述公式计算样品平均值的标准偏差 S_M。

标准偏差 (S)

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

置信区间 CI

计算置信区间的目的是：当应用于全部数据分布而不仅是一个样品时，提供有关估算的平均值的效果的信息。

总平均值的置信区间 100 × (1 - α) % 按以下公式计算

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

其中：

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

为 t 分布表在风险概率为 α 时的百分比点 α

在序列总结报告的扩展统计分析中可能要使用 95% 的置信区间 (α = 0.05).

t 型分布（或“学生分布”）必须用于小样品量统计。 对于大样品量，t 分布与正态（高斯）分布的结果不再有区别。 因此，当样品数为 30 或更多时，可以使用正态分布（样品数量很大时，计算 t 分布很困难，正态分布是最好的近似替代方法）。

6 个样品 95% 的置信区间：

1 - α = 0.95

N = 6

必须从 t 分布表获得 t 的准确值，其自由度为 5 (N-1)，值 α/2，为 0.025。 它将给出如下的 CI 计算公式：

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

相关系数

相关系数显示在校正曲线的图形中。相关系数 (r) 是对不同数据点之间校正曲线的拟和实测。对于正斜率校正曲线，系数值保留五位小数，范围如下：

0.00000 到 1.00000

其中：

0.00000 = 无拟和

1.00000 = 完全拟合

注意

相关系数与分析方法的高精度和准确性没有直接关系。其主要用于确定最佳曲线类型。

评估曲线类型时，需要使用足够的校正级别来获得足够的统计关联。

相关系数 (r) 使用以下公式计算：

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

其中

r	相关系数
wt_i	数据点的加权
$\bar{y}$	测量的响应值或含量的平均值 如果校正曲线强制通过原点（处理方法中的**原点**=**强制**），则 OpenLab ChemStation 会计算未居中的确定系数。在这种情况下，将会忽略 $\bar{y}$。
yi	测量的响应值（峰面积、峰面积比率（内标方法）、峰高或峰高比率（内标方法））或含量，取决于校正模式
$\bar{Y}$	预测的响应值或含量的平均值
Yi	预测响应值或含量（使用校正曲线）

$\bar{y}$ 和 $\bar{Y}$ 是测量和预测的响应值或含量的平均值，计算方法如下：

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

其中

wt_i	数据点的加权
$\bar{y}$	测量的响应值或含量的平均值
yi	测量的响应值（峰面积、峰面积比率（内标方法）、峰高或峰高比率（内标方法））或含量，取决于校正模式

和

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

其中

wt_i	数据点的加权
$\bar{Y}$	预测的响应值或含量的平均值
Yi	预测响应值或含量（使用校正曲线）

强制原点是假设点以零为中心（相对第三象限对称）且平均值可替换为零。

完全拟合或数据对称分布于曲线周围时的相关系数为 1。它随校正点分布的不对称程度增加而减小。通常值在 0.99 和 1 之间。相关系数对曲线质量不是很敏感。

内部存储双精度数的存取

为了验证目的，可能必需要手动再计算 ChemStation 结果，例如校正曲线、相关系数、理论塔板数等。计算时，必须考虑 ChemStation 中的数字格式。

对于保存在 ChemStation 内的所有数据，使用“C”数据类型 DOUBLE。也就是说，为每个数值保存 14 个有效位。该数据类型的实现符合 Microsoft 在“C”数据类型方面的 IEEE 标准实现及相关的取整规定（请参见 Microsoft 文档 Q42980、Q145889 和 Q125056）。

由于可能用于计算校正表的参数数量没有限制，因此不可能计算可能由于传播和取整错误积累所带来的精确误差。然而通过对不同校正曲线建立的完整测试表明，可以保证高达 10 位数的准确性。在色谱分析中，峰面积、峰高和保留时间重复性通常具有 3 个有效位数，因此在计算中，10 个有效位数完全能满足需要。基于这个原因，校正表及其他表最多显示 10 个有效位数。

如果要求通过外部（手动）计算进行验证，建议使用用于内部计算的所有位数。使用用于外部计算的显示和/或取整数据可能由于取整误差导致结果不同于 ChemStation 结果。

下一段落介绍了如何存取通常用于手动计算的数值的所有内部存储的位数。在任何情况下，执行所列的命令之前，都必须先调用数据文件并以相应的报告类型进行报告。所有命令都从 Agilent ChemStation 命令行输入，可以从视图菜单启用命令行。

以下示例在公共仪器文件夹（例如 C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1）中生成了 .TXT 文件。如要获得实际路径，请使用命令行条目 print _instpath$。请酌情使用其他文件名和文件夹名称。使用记事本或适当的文本编辑器可以查看该文件中的信息。

原始峰信息：

- 保留时间
- 面积
- 峰高
- 宽度（积分器）
- 对称性
- 峰开始时间
- 峰结束时间

使用命令行输入：

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

已处理的峰信息：

- 测定的保留时间
- 预计保留时间
- 面积
- 峰高
- 宽度（积分器）
- 对称性
- 半峰宽 - 半峰高（性能和扩展性能）
- 拖尾因子（性能和扩展性能）
- 选择性（性能和扩展性能）
- K`（扩展性能）
- 切线峰宽（扩展性能）
- 斜度（扩展性能）
- 理论塔板数 - 半峰宽（性能和扩展性能）
- 理论塔板数 - 切线（扩展性能）
- 理论塔板数 - 5 σ（扩展性能）
- 理论塔板数 - 统计（扩展性能）
- 分离度 - 半峰宽（性能和扩展性能）
- 分离度 - 切线（扩展性能）
- 分离度 - 5 σ（扩展性能）
- 分离度 - 统计（扩展性能）

使用命令行输入：

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

已处理的化合物信息：

- 已计算的含量

使用命令行输入：

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

校正表信息：

- 级数
- 含量
- 面积
- 峰高

使用命令行输入：

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

线性回归信息：

- Y 截距 (CurveParm1)
- 斜率 (CurveParm2)
- 相关系数

使用命令行输入：

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

6 CE 特定计算

校正表 128
标准校正 128
蛋白质分子量校正 128
DNA 碱基对校正 129
毛细管等电聚集 129
使用流动性修正进行校正 130
简介 130
有效迁移率计算 131
相对迁移率计算 134
毛细管电泳的特殊报告格式 135
修正峰面积 136
毛细管电泳的系统适用性 137
容量因子 k' 137
CE-MSD 138
背景扣除 138

本章只与使用 ChemStation 控制 CE 仪器有关。

校正表

在您的校正表下拉列表中提供了四种不同的可用校正类型。

标准校正

标准校正以峰面积或峰高为基础。 选择**标准校正**时，您可以选择**每个信号单独计算**或**使用修正峰面积计算**。

如果要确保在“归一化法”报告的计算中，单独报告的每个信号的含量百分比合计达 100%，请选择“每个信号单独计算”。如果取消选择**每个信号单独计算**，则所有信号的含量百分比合计达 100%。选择**每个信号单独计算**是在校正表中按信号进行排序的先决条件。

选择**使用修正峰面积计算**以根据迁移时间对峰面积作出校正。在此模式下，峰面积将除以迁移时间，这样就可以在迁移时间不稳定时提高定量分析中的重现性。

除了标准校正以外，还有 3 种基于迁移时间的单信号毛细管电泳特定校正。 信号根据校正方法中的信号描述进行定义。 如果数据文件包含多个信号，可以仅选择一个信号，并将其从数据文件中扣除。校正表的格式取决于选定的校正类型。

可以根据生物聚合物大小校正（Ferguson 图）对 SDS 蛋白质执行定量任务。

蛋白质分子量校正

蛋白质分子量校正需要有一个已知分子量蛋白质和参比峰组成的校正标准。 校正方程式为：

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

其中：

MW为分子量

$\mathbf{t}_{ref}$ 为参比峰的迁移时间

t 为迁移时间

$\mathbf{k}_0$ 和 $\mathbf{k}_1$ 为线性方程式的系数

校正表包含每个组分的名称、迁移时间、$\mathbf{t}_{ref}$**/t**（相对迁移时间）、分子量和 **log（分子量）**。

DNA 碱基对校正

DNA 碱基对校正与**蛋白质分子量校正**类似，但是操作时不需要参比峰；它需要已知数量的碱基对组成的校正标准。 校正方程式为：

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

其中：

#BP 为碱基对的数量

t 为迁移时间

k_0 和 k_1 为线性方程式的系数

校正表包含每个组分的名称、迁移时间、**1/t**、碱基对和 **log（碱基对）** 。

毛细管等电聚集

毛细管等电聚焦校正 (cIEF) 需要已知等电点 (pI) 的标准蛋白质组成的校正标准。校正方程式为：

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

其中：

pI 为等电点

t 为迁移时间

k_0 和 k_1 为线性方程式的系数

校正表包含每个组分的名称、迁移时间和 **pI**（等电点）。

使用流动性修正进行校正

简介

缓冲液组成、运行温度或粘度以及毛细管壁吸附的轻微变化将影响电渗流 (EOF) 并使其不稳定。由此而导致的 EOF 变化可能会使迁移时间的标准偏差变得相当高。通过监测迁移率参考峰的迁移时间并依次显著增加迁移时间的重现性，迁移率校正可以显著降低因运行之间的迁移时间发生改变而产生的影响。

应按以下优先级选择迁移率参考峰：

- 选择具有最大信号的峰
- 选择最孤立的峰
- EOF 标记或内标也可以用作迁移率参考峰
- 放大检索窗口，以便随时查找迁移率参考峰
- 如果有多个峰落在检索窗口中，则自动选择具有最大信号的峰作为迁移率参考峰。

有两种迁移率修正类型：

有效迁移率修正 **有效迁移率修正**使用所有峰的有效迁移率，并要求电压阶升数据和电泳图谱均可使用。此外，使用有效迁移率修正还可以确定所有样品组分的实际有效迁移率。

相对迁移率修正 **相对迁移率修正**可以在缺少电压数据时为所有检测假定一个恒定电压。

有效迁移率计算

除了参比峰以外，有效淌度修正还要求包含一个与 EOF 速度相对应的中性标记。下面是一些常用的标记及其关联的波长：

表 10 常用 EOF 标记

化合物	波长
1 - 丙醇	210nm
丙酮	330nm
乙腈	190nm
苯	280nm
鸟苷	252nm
异亚丙基丙酮	253nm
甲醇	205nm
苯酚	218nm
吡啶	315nm
四氢呋喃	212nm
尿嘧啶	259nm

瞬时电压数据和毛细管规格可以与数据文件一起保存，或者也可以在校正表设置期间手动输入。在运行过程中存储电压数据可以最准确地执行此操作。确保也将毛细管规格与方法一起存储。要重新处理采集时未带电压数据/毛细管规格的信号，请在对话框的“电压和毛细管规格”组中手动输入电压值和阶升时间。

根据数据确定每个组分的有效淌度。

常规

通过以下方程式定义样品峰的表面迁移速率：

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

其中

l 为毛细管的有效长度（从进样点到检测点的长度）

L 为毛细管总长度

V(t) 为从起始时间 0 到峰的迁移时间 t 之间的平均电压

可以使用以下方程式，根据实测电压或在方法中指定的电压阶升来计算平均电压：

如果 $\mathbf{t < t_R}$，则

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

如果 $\mathbf{t > t_R}$，则

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

其中

t 为峰的迁移时间

$\mathbf{t_R}$ 为阶升时间

V 为结束电压

通过引入一个系数可以简化迁移速率的方程式：

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

相对迁移速率或表面迁移速率则变为

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

有效或实际迁移速率为

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

其中

$\propto_{app}$ 为任意峰的表面迁移速率

$\propto_{EOF}$ 为中性标记的表面迁移速率

速度小于 EOF（通常为阴离子）的组分得出的有效迁移速率将为负值。

校正

使用中性标记 (μ_{EOF}) 的迁移时间来计算样品峰（将在以后的检测中用作迁移率参比峰）的实际迁移率：

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

然后计算所有峰的有效迁移率，并将其存储为预期迁移率：

$$\mu_{\mathrm{real}N} = \mu_{appN} - \mu_{EOF} = k(t_N)/t_N - k(t_{EOF})/t_{EOF}$$

校正表中用于预期迁移时间和预期迁移率的列中将包含每种化合物的实测迁移时间和计算所得的实际迁移率。

迁移率计算

使用迁移率参比峰计算 μ_{EOF} 的实际值：

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

然后每个峰的预期迁移时间即调整为：

$$t_{new\,\mathrm{exp}N} = k(t_{old\,\mathrm{exp}N})/(\mu_{\mathrm{real}N} + \mu_{EOFact})$$

计算所得的值用于峰识别并替换校正表中的值。

重新校正

迁移率参比峰的迁移时间用于计算 μ_{EOF} 的实际值：

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

调整每个峰的预期迁移时间：

$$t_{new\,\mathrm{exp}N} = k(t_{old\,\mathrm{exp}N})/(\mu_{\mathrm{real}N} + \mu_{EOFact})$$

并更新迁移率：

$$\mu_{\mathrm{real}N} = \mu_{appN} - \mu_{EOFact}$$

校正运行期间，将在校正表中更新迁移时间的预期值和实际迁移率值。

相对迁移率计算

也可以执行基于相对淌度的迁移时间修正。 这种情况下，既不需要 EOF 标记、电压，也不需要毛细管规格。 软件仍将修正迁移时间变化，但不显示淌度值。

概述

与有效淌度计算相似，系数

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

用于计算相对淌度，以说明淌度和迁移时间之间的关系：

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

不同的是，在相对淌度的方程式中，k 同时出现在分数的分子和分母中；这意味着可以消去毛细管规格。 计算因子 k 的方程式如下：

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

其中 **V(t)** 为从时间 0 到峰的迁移时间之间的平均电压。

当电压参数设置为**忽略**时，**k** 为常数，因此可以在预期迁移时间的方程式中消去（参阅以下说明）。

尽管在计算 **k** 时软件会考虑所有情况，但以下方程式说明了 **k = k(t)** 的一般情况。

校正

识别淌度参比峰，并存储其迁移时间 ($\mathbf{t}_{refcal}$)。 保存所有其他峰的预期迁移时间 ($\mathbf{t}_{expcalN}$)。

淌度计算

检测参比峰之后，将根据淌度参比峰的实际迁移时间来调整每个峰的预期迁移时间：

$$t_{new\,\mathrm{exp}N} = \frac{k(t_{old\,\mathrm{exp}N})}{(k(t_{\mathrm{exp}calN})/t_{\mathrm{exp}calN} - k(t_{refcal})/t_{refcal} + k(t_{refact})/t_{refact})}$$

然后，将更新参比峰从上次运行校正开始的迁移时间：

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

毛细管电泳的特殊报告格式

注意

CE 特定计算只能使用**经典 ChemStation 报告**进行报告。

以下报告类型专门针对适用于 CE 系统的 ChemStation：

CE 迁移率

CE 迁移率由定量文本结果（特别是表观迁移率）构成。要使用此报告格式，您必须在采集数据前提供所用毛细管的相关信息并存储电压信号。表观迁移率计算公式如下。

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

其中

l 为有效毛细管长度 (cm)

L 为毛细管总长度 (cm)

t 为迁移时间 (min)

V 为电压 (kV)

如果已激活有效迁移率校正（请参见第 131 页的 有效迁移率计算），则简单报告（例如外标报告）中的峰类型列将替换为迁移率列。CE 迁移率报告将打印有效迁移率而不是表观迁移率。

修正峰面积

CE 系统的 Agilent 化学工作站允许您使用修正峰面积来代替常规面积计算。 将在标准校正和报告中使用这些面积。

要激活此功能，请选择**使用修正峰面积计算**以根据迁移时间对峰面积进行修正。在此模式下，峰面积将除以迁移时间，这样就可以在迁移时间不稳定时提高定量分析中的重现性。

根据以下公式计算修正峰面积：

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

其中

Ac为修正峰面积 (mAU)

A为峰面积 (mAU · sec)

t 为迁移时间 (min)

此修正峰面积有时也称为归一化峰面积。

毛细管电泳的系统适用性

容量因子 k'

在毛细管电泳中无法在所有操作模式下自动计算容量因子 k’ 值。 请参见手册**高性能毛细管电泳：**入门了解各自的公式。 报告中所列的值仅对 LC 3D 系统所用的 Agilent ChemStation 有效，这是因为 CE 系统所用 Agilent ChemStation 使用的算法与 LC 3D 系统所用 Agilent ChemStation 的算法相同。

CE-MSD

背景扣除

当您选择**背景扣除** (BSB) 菜单项时，会从当前电泳图谱中的每个点扣除最近选择的质谱。 生成的结果将保存至相同目录，名称也与原始数据文件相同；但文件扩展名将变为 .BSB。

新的数据文件将成为当前数据文件，还会显示扣除了背景的电泳图谱。 已执行的背景扣除次数的记录将保存在数据文件表头的“运算符”项中。

如果您正在查看 BSB 数据列表，可能会发现数据显示精度所带来的差异。

注意

LC/MS 中的“帮助”文本文件仅针对 LC 参数，而非 CE。 LC/MS 软件中的某些可用功能不存在于或不适用于 CE/MS 应用程序，但会在 LC 中使用。 **峰匹配**功能不适用于 CE-MS，因此并未激活。 在 CE-MS 中，如果分离毛细管的有效长度不同，则会进行 UV 和 MS 检测。 由于不同有效长度的分离度不同，所以无法进行峰匹配。

7 系统验证

验证和诊断视图 140
系统验证 140
GLPsave 寄存器 143
DAD 测试功能 144
审核 DAD 测试功能 144

本章介绍 ChemStation 的验证功能和 GLP 验证功能。

验证和诊断视图

如果已配置仪器支持，ChemStation 还包括用于执行仪器验证和诊断任务的另外两个视图。有关更多信息，请参见在线帮助系统。

系统验证

系统验证是法规规范实验室分析仪器日常使用中的主要部分。ChemStation 的优良实验室规范 (GLP) 验证功能旨在帮助您证实软件或软件相关组件正在正常运行，或在特定的分析时间，已经正常运行。

ChemStation 验证功能使您可以验证 ChemStation 软件是否运行正常。用户可根据特定方法重新处理数据文件，并将结果与预定义的标准相比较来执行此操作。验证功能对于证实积分及定量结果的完整性尤为重要。

您可以使用标准验证测试，也可以通过您自己的方法和数据文件定义您自己的测试，检查分析方法使用的算法软件组合。验证测试是一个受保护文件，不能更改或删除。

使用“数据分析”视图中的“验证”项可以选择以下任一选项：

- 在数据库中运行验证测试，
- 定义一个新的验证测试并将其添加到数据库，以及
- 从数据库中删除验证测试。

在线帮助系统中的“方法”部分介绍了如何执行这些任务。在运行 ChemStation 验证测试时，您可以选择是运行整个测试还是运行部分测试的组合。

验证测试结果与方法和数据文件一起以二进制格式保存到缺省子目录：C:\Users\Public\Documents\ChemStation\1\Verify，与方法和数据文件一起。验证子目录与序列、方法和数据子目录位于同一级别。您可以将结果发送到打印机或文件。测试结果（包括合并验证测试结果）将评级为通过或未通过。

可使用以下验证测试组件：

数字电子设备（仅适用于 Agilent 1100/1200 系列 DAD）

测试色谱图存储在二极管阵列检测器中。在该色谱图经过与来自光电二极管的正常原始数据相同的预处理步骤后，此色谱图将发送到 ChemStation。将此测试色谱图的结果数据与存储在 ChemStation 中的原始结果数据进行比较。如果存在不匹配，则表示测试未通过。该测试可确保进行数据预处理的 DAD 电子设备仍运行正常。由于使用已存储的测试色谱图，因此灯或二极管阵列不包括在此测试中。它们可通过第 144 页的 DAD 测试功能进行检查。

峰积分

使用原始方法对数据文件重新积分。将结果与存储在验证寄存器中的原始积分结果进行比较。如果存在不匹配，则表示测试未通过。

化合物定量

对数据文件中的化合物重新定量。将结果与存储在验证寄存器中的原始定量结果进行比较。如果存在不匹配，则表示测试未通过。

报告打印

重新打印原始报告。

下页显示了一个已成功地完成验证测试的示例。

```
================================================================
      ChemStation Verification Test Report
================================================================
```

Tested Configuration:

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

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

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

ChemStation Verification Test Results:

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

ChemStation Verification Test Overall Results:     Pass
```

GLPsave 寄存器

如果在运行时选项表中选择了 GLPsave 寄存器，则在每次分析结束时都会保存 GLPsave 寄存器。它包含下列信息：

- 信号，
- 工作日志，
- 积分结果表，
- 定量结果表，
- 仪器性能数据以及
- 数据分析方法。

该寄存器是在分析时生成的、完全受保护的记录。您可以在将来的任何时候重新调用该寄存器，以验证分析方法。

使用“数据分析”视图中的“GLPsave 寄存器”选项可以随时查看 GLPsave 寄存器文件。此文件受校验和保护，并用二进制进行编码以确保不会被更改。

在用于选择 GLPsave 寄存器以进行查看的对话框中，您可从下列各项中选择查看选项：

- 调用原始方法，
- 调用原始信号，
- 调用仪器性能数据，
- 打印原始方法，
- 打印原始积分结果，
- 打印原始定量结果以及
- 从原始方法和信号中生成原始报告。

您可以使用 GLP 查看功能来显示色谱数据是原始数据，通过仪器性能数据证实分析的质量，并证明数据解释的真实性。

例如，您可以：

- 重新调用和重新打印样品分析时所用方法的数据分析部分，以证实显示为分析结果的数据评估未通过任何方式进行修改，以及
- 无需重新计算便可查看积分和定量结果，从而证实报告的真实性。

DAD 测试功能

对于遵循法规规范的实验室,检测器测试是对分析仪器进行日常系统验证过程的一个步骤。

DAD 测试用于评估二极管阵列检测器的性能。如果您从“仪器”菜单中选择了 DAD 测试（仅适用于 LC3D 和 CE），则该测试将检查仪器的强度和波长校正。按“保存”后，测试结果将自动保存到 DADTest 数据库，它是一个位于缺省仪器目录中名为 DADTest.Reg 的寄存器文件。

审核 DAD 测试功能

使用数据分析“视图”菜单中的**查看 DAD 测试**功能可以随时查看 DADTest.Reg 文件。 该文件受校验和保护，并用二进制进行编码以确保不被更改。

您可以选择查看下列 DAD 测试的任何部分。

显示钬光谱 绘出 DAD 测试查看表中的所有钬光谱。 标记激活的光谱。

显示强度光谱图 绘出 DAD 测试查看表中列出的所有强度光谱图。 标记激活的光谱。

另存为新的数据库 如果在 DAD 中更换灯，则可以通过从表中删除所有不需要的测试结果，然后使用此功能另存为新的数据库来重置 DADTest。

显示选定光谱 仅显示在表中选定的光谱。

显示强度图 您可以绘制一个强度图来表示二极管阵列检测器中灯的使用寿命。 图中显示最大灯强度相对时间的函数。

内容提要

本指南包含 Agilent OpenLab ChemStation 中使用的操作原理、计算和数据分析算法相关参考信息。

此处包含的信息可供验证专业人员对系统验证任务进行计划和执行。

www.agilent.com

© Agilent Technologies Inc. 2010-2025

版本 : 02/2025

文档编号: D0013749zh Rev. A.1

Agilent