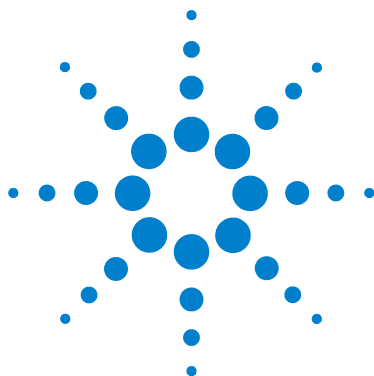




OpenLAB CDS ChemStation Edition

了解光谱模块



Agilent Technologies

声明

© Agilent Technologies, Inc. 1994-2016, 2017

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。

Microsoft® 是 Microsoft Corporation 在美国的注册商标。

手册部件号

M8301-97170 版本 B

版本

04/17

德国印刷

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

软件版本

本指南适用于 AgilentOpenLAB CDS ChemStation Edition 版本 C.01.xx 版，其中 xx 指软件的次版本，并不影响本手册的技术准确性。

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

如果在履行美国政府某项重要合同或转包合同时要使用此软件，将以以下方式提供并授权软件：DFAR 252.227-7014（1995 年 6 月）定义的“商业计算机软件”；FAR 2.101 (a) 定义的“商业项目”；FAR 52.227-19（1987 年 6 月）或任何同等机构规定或合同条款定义的“受限计算机软件”。软件的使用、复制或公开必须遵守安捷伦科技有限公司的标准商业许可条款的规定，美国政府的任何非 DOD 部门和机构所拥有的权利不得超出 FAR 52.227-19(c)(1-2)（1987 年 6 月）中定义的“受限权利”的范围。美国政府用户拥有的权利不得超出 FAR 52.227-14（1987 年 6 月）或 DFAR 252.227-7015 (b)(2)（1995 年 11 月）中定义的“受限权利”的范围（适用于所有技术数据）。

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 ...

本手册介绍 AgilentOpenLAB CDS ChemStation Edition C.01.xx 版本的光谱模块所涉及的概念。本手册通过特殊的光谱概念对《概念和 workflows》手册中的信息进行了补充，这些概念适用于 LC 3D 和 CE 系统的 Agilent ChemStation 版本和用于 MSD 的 Agilent ChemStation 版本的紫外 - 可见部分。

1 了解光谱分析

本章内容包括以下部分：

- 什么是光谱分析？
- 确定最佳检测波长。
- 光谱报告格式。

2 光谱库

传统的数据系统通过基于保留时间的相关性对检测的化合物进行定量。如果存在以下情况，这可能会导致错误的识别：

- 指定的保留时间窗口中出现了未校正的化合物，
- 指定的保留时间窗口中显示了多个峰，
- 由于溶剂流速更改或更常见的柱特性更改，化合物在柱上保留的时间长于指定的保留时间窗口。

避免此类错误的一种方法是使用特征峰（如 *OpenLAB CDS ChemStation Edition Reference* 手册中所述）。

由于紫外 - 可见光谱可用于识别峰，因此使用二极管阵列检测器可以避免此类错误。标准光谱是在明确定义的色谱条件下从参比样品中采集的，它存储在数据库（光谱库）中。您可以将未知样品的峰光谱与存储在一个或多个谱库中的峰光谱进行比较。可以将光谱重叠以进行视觉比较，并可以计算标准光谱和样品光谱的相似性。

OpenLAB CDS ChemStation Edition 版本可以为色谱图中的所有峰以及序列中的所有色谱图自动执行此过程。除了峰确认以外，本软件还可以使用“纯度首选项”对话框中的设置执行峰纯度检查。

这些定性结果可以和定量结果合并到一个报告中。此报告将包含某一运行中分析所需的每个峰的所有信息，例如：

- 化合物名称，
- 含量，

- 保留时间，
- 特征匹配因子，
- 纯度匹配因子。

本章介绍了光谱库检索的概念。有关如何执行谱库检索的信息，请参阅联机帮助系统和综合教程。

3 评价峰纯度

本章介绍了中的峰纯度评估。

目录

1	了解光谱分析	7
	什么是光谱分析?	8
	确定最佳检测波长	10
	光谱报告格式	12
2	光谱库	13
	检索模式	14
	报告说明	16
	纯度标记	16
	谱库匹配标记	16
	化合物名称标记	17
	含量标记	17
3	评价峰纯度	19
	检查峰纯度	20
	什么是峰纯度检查?	20
	匹配因子	21
	通过选择参比光谱进行背景校正	22
	峰纯度技术	23
	峰纯度显示	24
	“光谱”窗口	24
	光谱标准化	25
	“纯度”窗口	26
	光谱相似曲线	27
	阈值曲线	28

目录

使用特定目标光谱	30
纯度计算和显示	31
将峰分类为纯峰或不纯的峰	32
峰纯度信息	32
高级峰纯度选项	34
使用峰纯度分析	36
光谱采集	36
设置峰纯度选项	36
质谱峰纯度	38
质谱纯度计算	39
质谱纯度显示	39
索引	41



1

了解光谱分析

什么是光谱分析?	8
确定最佳检测波长	10
光谱报告格式	12



1 了解光谱分析

什么是光谱分析？

什么是光谱分析？

光谱分析使您可以处理从紫外 - 可见二极管阵列检测器或荧光检测器中采集的光谱数据。

当结合使用光谱数据分析与色谱数据时，光谱数据分析将向分析数据中添加第三维数据（请参阅图 1）。

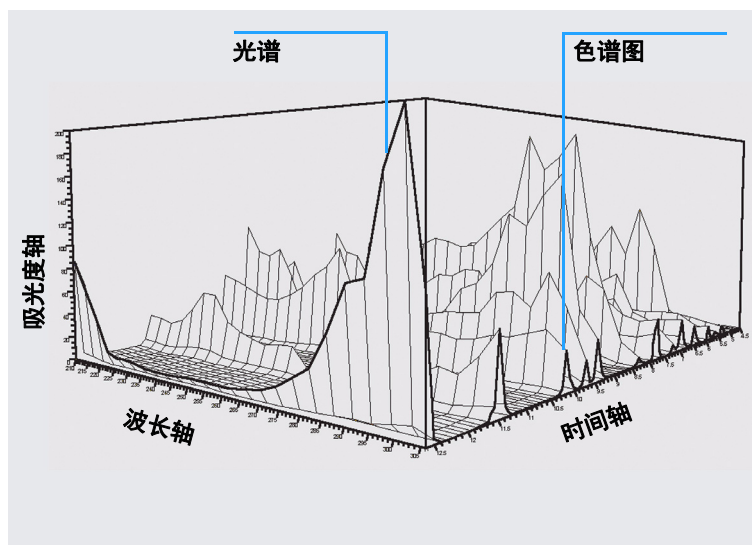


图 1 光谱信息

紫外 - 可见二极管阵列检测器

紫外 - 可见二极管阵列检测器使您可以连续采集光谱图的紫外 - 可见区域中的光谱；由于二极管阵列检测器可以同时采集所有波长，因此光谱采集过程中不会降低灵敏度。

荧光检测器

荧光检测器使您可以通过以下三种模式采集光谱数据：

- 可以设置固定的激发波长并采集发射光谱
- 可以设置固定的发射波长并采集激发光谱
- 可以进行荧光扫描，在扫描过程中激发波长和发射波长均会发生变化，从而获得样品的三维特性。

在色谱分析过程中可以采集激发光谱和发射光谱，但由于荧光检测器是扫描型检测器，因此采集的波长越多（扫描范围越宽），分析的灵敏度就越低。三维荧光扫描必须在停止流量模式下进行，或在离线状态下进行，因为它要求整个分析过程中池中的样品浓度恒定。

光谱处理

可以通过多种方式处理光谱数据。例如，您可以：

- 从光谱数据中提取色谱信号，以确定每个峰的最佳检测波长，
- 执行光谱库检索以获得定性识别，
- 计算色谱信号比率以确定峰纯度，并
- 执行峰纯度检查以查找（隐藏的）不纯物。

确定最佳检测波长

确定了峰分离的合适条件之后，方法开发中的下一步是确定每个峰的最佳检测波长。

一种技术是以等高图（称为等吸收图）的形式呈现峰强度（吸收值或荧光值）、波长和时间。此技术将光谱信息绘制为一系列位于波长和时间平面上的等吸收浓度线。这样可以同时显示和观察所有的光谱信息。请参阅图 2 中的中央显示区。

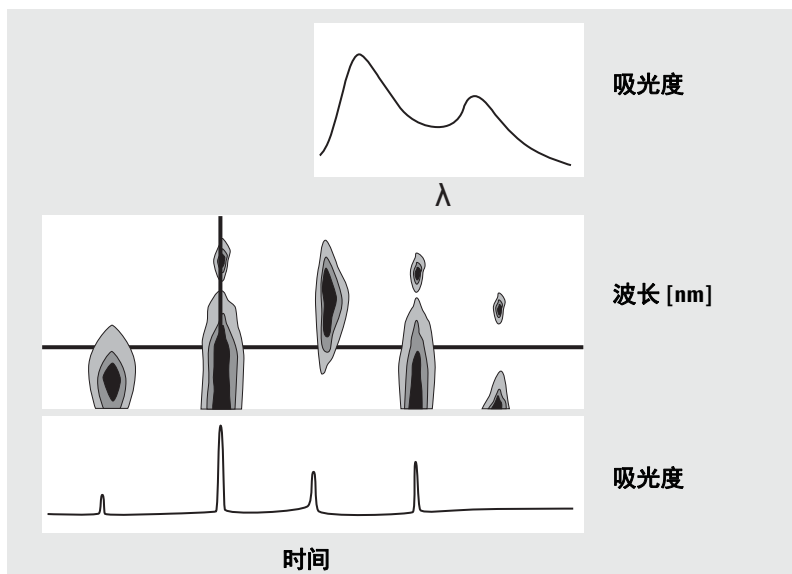


图 2 等高线图

在方法开发中，此技术对于确定每个分离峰的最佳检测波长非常有用。波长与等高线图的水平游标位置相对应。沿波长轴移动游标时，将在下面的窗口中重新生成色谱图，请参阅图 2。

要确定峰的最佳检测波长，需要执行以下操作：

- 从光标字段中选择“**快速视图**”并移动中央显示区中的水平游标，直到目标峰的吸光度达到最高，并且下面显示区中的色谱分离良好。
- 从光标字段中选择“**信号**”并优化谱带宽度以增大信噪比，从而获得最佳检测波长。通过单击“复制”按钮，可以将选定的信号和谱带宽度传输到数据分析视图中的信号窗口。这样，信号和谱带宽度就可以用于测试积分、识别和定量过程。

荧光检测器的波长优化通常需要以下两个条件：

- 设置一个低紫外范围（230 到 250 nm）内的激发波长并采集发射光谱。对于色谱图中的每个峰，均使用等高线图来确定最佳发射波长。
- 准备一个时间表以设置每个峰洗脱时的最佳发射波长，并采集激发光谱。

荧光光谱

三维等高线图仅用于显示从荧光扫描中获得的光谱。在这种情况下，光谱信息将被绘制在激发波长 / 发射波长平面上。由于荧光扫描是在停止流量模式下或离线状态下进行的，因此没有时间轴。您可以从等高线图中提取任意波长的激发或发射光谱；激发光谱显示在等高线图上方（垂直游标），发射光谱显示在等高线图下方（水平游标）。

光谱报告格式

在光谱模块中可以使用以下报告格式：

- 谱库检索

生成一个包括谱库检索结果的校正报告。根据在“自动谱库检索”对话框中指定的参数打印峰编号、保留时间、谱库检索匹配因子、含量及化合物名称。有关详细信息，请参阅第 16 页的“[报告说明](#)”。

- 简短 + 光谱

包含仪器状况、色谱图、定量结果和峰纯度信息。

- 细节 + 光谱

包含表头、仪器状况、色谱图、定量结果、校正曲线和峰纯度信息。表头存储在方法目录中名为 **RPTHEAD.TXT** 的文件中。您可以使用文本编辑器更改表头以包含特定于方法的文本。

- 性能 + 谱库检索

结合了性能和谱库检索类型。

峰纯度信息

峰纯度信息指每种化合物纯度图中的峰之间的光谱评估。这些图包含重叠和归一化光谱，以及单个和重叠信号。纯度图还可以包含阈值和相似性曲线，这取决于方法的“纯度首选项”设置。

数字计算包含纯度因子（光谱形状中的相似性的量度标准）。有关峰纯度的详细信息，请参阅第 3 章，“[评价峰纯度](#)”。



2 光谱库

检索模式	14
报告说明	16
纯度标记	16
谱库匹配标记	16
化合物名称标记	17
含量标记	17



检索模式

在光谱库检索过程中，可以使用三种检索模式中的一种。光谱库和校正表对于所有三种模式都是不可缺少的。您可以将峰纯度检查作为一个选项进行添加。

- “按光谱识别”谱库检索。

此模式是最常用的检索模式。ChemStation 版本使用色谱图作为谱库检索的基础。它将**积分器找到的所有峰**的峰光谱与最多四个指定谱库中的光谱进行比较。为了加快进程或提高可靠性，您可以使用谱库检索模板来缩小谱库检索范围，只检索位于特定保留时间窗口内的光谱（请参阅图 3）。

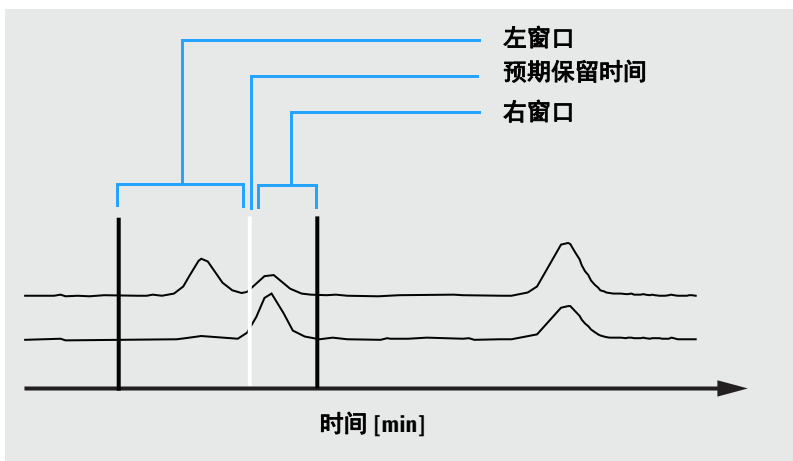


图 3 保留时间窗口

将把最佳匹配的化合物的名称指定给峰。您可以通过自己的阈值来指定此匹配所需的精确程度。如果找到了优于阈值的匹配因子，则将该峰报告为**已识别**。然后，ChemStation 版本将查询校正表，从中查找具有相同名称的条目。如果找到这样的条目，数据将用于计算和报告含量。

如果在校正表中找不到匹配的名称，依然可以识别峰，但由于没有为此化合物校正方法，因此将不计算含量。

建议在分析中检索未知化合物时使用此模式。如果色谱图中的化合物数目比谱库中的条目数少，此模式最有效。

- 使用校正表的靶标化合物分析。

本检索模式仅适用于方法已经校正的化合物。**OpenLAB CDS ChemStation Edition** 仅会将已校正化合物的峰光谱与最多四个指定谱库的光谱进行比较。只有已通过光谱比较确认的峰，才被报告为已识别。校正表中定义的化合物名称必须与谱库中定义的化合物名称相同。

可以将保留时间的目标窗口指定为检索方法的一部分。在识别过程中，只能使用保留时间适合目标窗口的峰。仅当匹配超过已设置的阈值时，才将最佳匹配报告为已识别。

建议使用此模式检索色谱图中已校正的特定化合物。如果色谱图中包含多种化合物，但只有少数几种目标化合物已校正，则此模式比第一种检索模式更可取。

- 使用谱库的靶标化合物分析。

此检索模式适用于所有谱库条目（不仅适用于那些包含在校正表中的谱库条目）。**ChemStation** 版本使用光谱库作为基础。它将**所有谱库光谱**与色谱图中的峰光谱进行比较，并尝试识别由积分器找到的位于保留时间窗口（在谱库检索模板中为谱库条目指定）内的所有峰。在识别过程中，只能使用保留时间适合目标窗口的峰。找到超过已设置的阈值的匹配时，就会将峰报告为已识别。定量过程将根据校正表中化合物的名称来进行。如果化合物在谱库和校正表中都存在，则将化合物报告为已校正且已识别。如果化合物不包含在校正表中，则将其报告为未校正。

建议在已设置包含特定化合物组的谱库时使用此模式。例如，您可以有一个包含水溶性维生素的谱库和一个包含脂溶性维生素的谱库。然后，您可以检索色谱图以查找这些特定化合物。如果色谱图包含多种化合物而谱库中仅包含少数几种化合物，则此模式比第一种检索模式更可取。

- 峰纯度检查

峰纯度检查是可选的。建议在进行谱库检索之前使用峰纯度检查，因为匹配的可靠性只取决于分离的质量。**ChemStation** 版本会比较每个峰的不同部分中光谱的一致性。它将计算和报告纯度因子。可以通过阈值来定义纯度，如果低于此阈值，将在报告中使用 x 标记有问题的结果。有关峰纯度的详细信息，请参阅第 3 章，“评价峰纯度”。

报告说明

通过光谱库检索生成的典型报告包括：

- 标注有保留 / 迁移时间的色谱图 / 电泳图谱，
- 包含有关文件名和检索参数信息的表头，
- 检测器信号说明及两个分析表，
- 分析中找到的峰的保留时间，
- 谱库匹配候选的保留时间，
- 校正表中记录的保留时间，
- 化合物含量及其纯度因子（如果已选择），以及：
 - 谱库条目编号，
 - 谱库匹配因子，
 - 化合物名称。

在谱库检索报告的不同列中，使用特定标记来表示化合物纯度、化合物匹配和化合物命名。

这些标记的含义如下面的步骤所述。

纯度标记

对于不纯的化合物，处于峰上升区和下降区的光谱通常是不同的，因此这两个区域的光谱均被用于谱库检索。

- u:** 化合物不纯，并使用处于上升区的光谱进行识别。
- d:** 化合物不纯，并使用处于下降区的光谱进行识别。

谱库匹配标记

- x:** 匹配因子低于给定的匹配阈值。

化合物名称标记

- ?:** 使用低于给定匹配阈值的匹配因子来识别的化合物。
- ?:** 使用已分配给另一更佳匹配的化合物名称来识别的化合物。对于此特定化合物，无法找到一个具有唯一名称的更佳匹配。

含量标记

- +:** 个体含量高 - 高于在“化合物详细信息”中设置的含量限制。
- :** 个体含量低 - 低于在“化合物详细信息”中设置的含量限制。

将与校正表中的任何条目均不匹配的峰列在标为“未校正化合物”的单独的表中。



3 评价峰纯度

检查峰纯度	20
什么是峰纯度检查?	20
匹配因子	21
通过选择参比光谱进行背景校正	22
峰纯度技术	23
峰纯度显示	24
“光谱”窗口	24
光谱标准化	25
“纯度”窗口	26
光谱相似曲线	27
阈值曲线	28
使用特定目标光谱	30
纯度计算和显示	31
将峰分类为纯峰或不纯的峰	32
峰纯度信息	32
高级峰纯度选项	34
使用峰纯度分析	36
光谱采集	36
设置峰纯度选项	36
质谱峰纯度	38
质谱纯度计算	39
质谱纯度显示	39

本节介绍了可以用于评价峰纯度的各种方法。



检查峰纯度

在所有色谱分析中，一个非常重要的问题就是峰是由一个组分还是多个组分构成的。在质量控制中，隐藏在目标峰之后的不纯物会导致错误的结果。在研究分析中，隐藏的且未被检测到的组分可能会导致丢失有价值的重要信息，从而影响研究工作。

什么是峰纯度检查？

峰纯度检查用于评价峰是纯的，还是包含不纯物。此评价基于洗脱峰过程中记录的光谱比较。使用每个峰中的五个光谱来评价纯度：每个上升区和下降区上的两个光谱以及一个位于最高点的光谱（最高点或顶点光谱）。对这五个光谱进行平均，并将其与峰中记录的所有光谱进行比较。

如果峰光谱与平均光谱不一致，则理论上该峰包含光谱不纯物。光谱不纯可能是由一个或多个组分、未基线分离的峰或背景吸收所导致。

注意

如果光谱是一致的，峰仍可能包含不纯物。如果光谱吸收相对于主化合物很小，或不纯物和主化合物具有相同或几乎相同的光谱以及相近的洗脱时间，则可能出现上述情况。

“光谱”窗口包含峰光谱，此光谱由在标准化和重叠模式下绘制的比较（平均）光谱构成。“纯度”窗口包含加了纯度信息的信号。纯度因子是对光谱图形状相似性的量度。

即使在系统中存在背景吸收仍然可以检测到峰的不纯物，主要是靠校正。通常，背景吸收不会干扰峰的定量，因为它也会影响峰起点和终点的高度，而这种影响可以通过基线校正来消除。在一次分析中，可以通过使用不同的溶剂或溶剂组成来改变背景吸收。

匹配因子

通过视觉上的光谱比较进行峰不纯物检测比较耗费时间，且不适于自动化操作。有几种统计技术可用于光谱的自动比较。一种技术是对两个光谱进行数学比较。此技术计算出一个匹配因子来表示光谱间的相似程度。

比较两个光谱，得到如下定义的匹配因子：

$$\text{匹配因子} = \frac{10^3 \times \left\{ \sum x \times y - \left(\frac{\sum x \times \sum y}{n} \right) \right\}^2}{\left\{ \sum x^2 - \left(\frac{\sum x \times \sum x}{n} \right) \right\} \times \left\{ \sum y^2 - \left(\frac{\sum y \times \sum y}{n} \right) \right\}}$$

值 x 与 y 分别是第一和第二光谱中测量的吸光度（波长相同）； n 是数据点个数， Σ 是数据的加和。在极值处，匹配因子为 0 表示不匹配，为 1000 表示光谱一致。通常，大于 990 的值表示光谱相似。介于 900 和 990 之间的值表示有一定的相似性，但是必须慎重解释结果。所有低于 900 的值表示光谱是不同的。

匹配因子受许多参数的影响，这些参数由样品和分离方法确定。它们包括化合物特性、基质化合物的光谱吸收、光谱噪音级别以及由溶剂或不同仪器（不同的波长校正）导致的背景吸收和光谱漂移。

平滑光谱

当光谱噪音与光谱属于同一级时，峰纯度检查的可靠性会受到限制。以下是平滑光谱的工作方式。

- 1 如果定义了数据点个数（例如 5，也称为过滤器），则使用立方回归可以确定一个新数据点。
- 2 然后，过滤器去掉一个离得较远的点，采用其余 4 个已使用的数据点和一个附加的点重复上述过程。

通过使用平滑算法可以减小统计噪音，使得平滑后的光谱识别更为可靠。

注意

平滑算法还可以改变光谱的变化曲线，这取决于过滤器的长度，即同时在平滑算法中使用的数据点个数。建议在比较光谱之前使用相同的过滤器来平滑所有光谱。

锯齿化光谱

如果采集的光谱分辨率低，则您可以使用锯齿化使光谱更近似于曲线而不是多边形。方法是使用三角函数计算光谱的原始数据点之间的附加数据点。锯齿化光谱时，将保留原始数据点。

对数光谱

对数光谱可以压缩吸光度标尺。吸光度范围很大时，此方法可能有用。

导数光谱

在比较不同化合物时，导数光谱会提供比原始光谱更具体的详细信息。光谱中的微小差异在视觉上将更加明显且更易识别。但是，噪音也会增大，从而限制了导数光谱的使用。

通过选择参比光谱进行背景校正

可以采用多种类型的校正从数据文件中提取峰光谱以进行背景校正：

手动参比选择

选定某个参比光谱后，将从数据文件中提取指定时间的选定光谱，并从每个峰光谱中将其扣除。此校正不能用于背景吸收不断变化的情况。

选定两个基线光谱后，在两个光谱之间会进行线性内插。然后，将从每个峰光谱中扣除基于该线性内插重构的参比光谱。此校正可以用于背景吸收缓慢变化的情况。

自动参比选择

在自动参比选择中，选定的参比光谱取决于数据文件中光谱的存储模式。

所有光谱：选定峰的积分峰开始和结束光谱被用作参比光谱并被线性内插（如同对两个参比光谱进行手动参比选择时一样）。

峰控制光谱：最近的基线光谱被用作参比光谱并被扣除（如同对一个参比光谱进行手动参比选择时一样）。

峰纯度技术

峰纯度技术只能用于实现了基线分离的峰。如果峰未实现基线分离，则峰纯度较复杂，因为每个峰包含的相邻峰会成为它的不纯物。

对于某一数据文件中的所有峰，可能会基于每个峰交互地确定峰纯度，也可以在每个分析结束时自动确定峰纯度，并将此作为使用光谱报告类型（例如“细节 + 光谱”）时的方法的一部分。

您可以设置与以下内容相关的选项来优化峰纯度处理，从而获得更高的准确度和性能：

- 用于纯度确定的波长范围，
- 参比光谱，
- 纯度阈值，
- 光谱处理，包括对数、平滑和锯齿因子以及导数的阶，
- 计算和显示的纯度组分（包括光谱、光谱偏差、信号、相似性和阈值曲线）。

以下部分介绍了可以用于判断峰纯度的技术，包括：

- 光谱标准化

比较从峰的不同部分取得的标准化光谱，

- 相似曲线

将平均光谱或选定的光谱与峰洗脱时取得的所有其他光谱进行比较。

峰纯度显示

“光谱”窗口

“光谱”窗口显示了用于计算纯度计算中使用的平均光谱的五个光谱。您可以使用 Agilent ChemStation 版本的图形处理更详细地检查峰光谱。

光谱标准化

一种常用的峰纯度技术包括将从峰中获取的光谱进行标准化和比较。标准化补偿了峰洗脱时经过检测器池的组分浓度的变化。此功能是 Agilent ChemStation 版本光谱显示工具的一部分。

例如，光谱采集于峰的上升区、顶点和下降区。光谱会被标准化并重叠，以便进行图形显示。此技术对于交互式数据评估非常有用，并且还适用于自动化的常规分析。

此外，如果选择使用数字因子，则可以对上升区光谱和下降区光谱进行数学比较，并可以将每个峰的纯度因子和保留时间一起打印出来。

图 4 的示例中显示了光谱采集于峰上升区、峰顶点和峰下降区，以及对光谱进行标准化。视觉上的比较和软件计算出的纯度因子都清楚地显示了纯峰和不纯峰之间的差异。

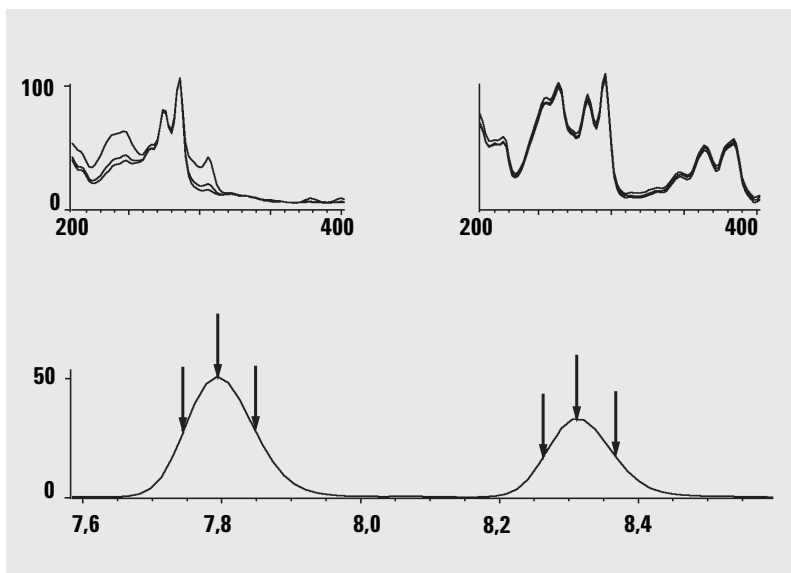


图 4 通过重叠光谱进行峰纯度检查

“纯度”窗口

“纯度”窗口的内容取决于选定的纯度参数。缺省的显示是**纯度比率**，它显示了带有叠加的相似性和阈值曲线的信号（请参阅图 5）。显示内容下面的绿色和红色带状区域显示用户定义的纯度阈值。为峰中的每个光谱计算出的纯度值显示为一个黑点；如果黑点位于绿色带状区域内，则光谱纯度处于可接受的纯度定义范围之内。

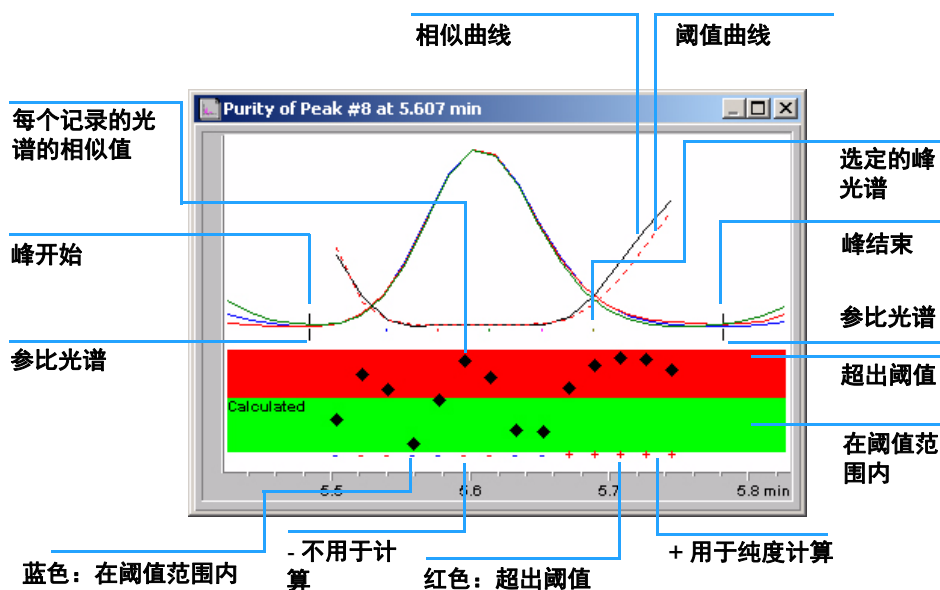


图 5 “纯度”窗口

光谱相似曲线

光谱相似曲线显示在光谱显示的“纯度”窗口内（请参阅第 39 页的图）。

如果详细信息显示得不清楚，您可以通过按住鼠标左键并移动鼠标来放大这些信息。移动鼠标时在屏幕上划出的区域将成为放大区。要恢复原始显示，请双击鼠标左键。

光谱相似曲线提供了最详细的峰纯度信息。峰的所有光谱都会与一个或多个光谱（缺省情况下为平均光谱）进行比较。匹配程度或**光谱相似性**将在洗脱的过程中绘制出来。理想的纯峰变化曲线是一条值为 1000 的水平直线，如图 6 (a) 所示。

在每个峰的起点和终点，信噪比下降，光谱背景噪音对峰光谱的影响变得明显。图 6 (b) 中显示了噪音对相似曲线的影响。

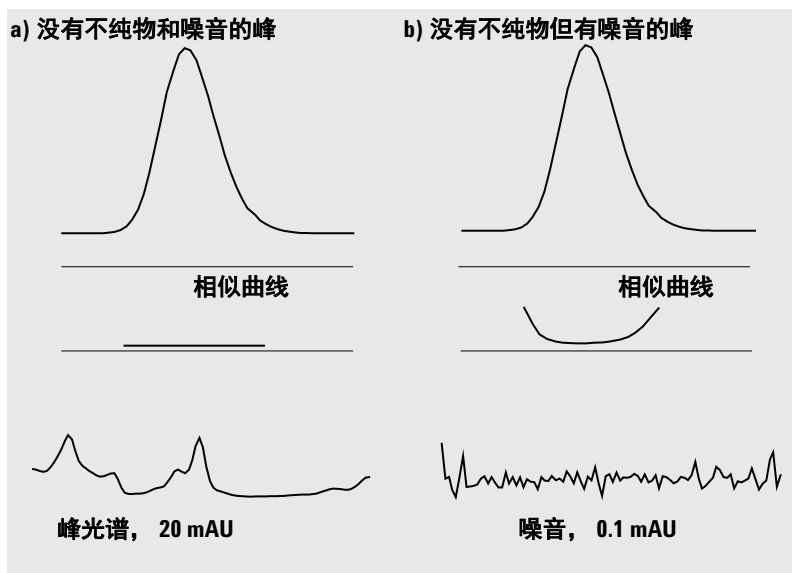


图 6 在有噪音和无噪音的条件下绘制的涉及理想相似因子 (1000) 和用户定义的阈值 (980) 的纯峰的相似曲线。

阈值曲线

阈值曲线显示了噪音对给定相似曲线的影响。这种影响朝着峰的起点和终点方向迅速增大。阈值曲线本质上是带有背景噪音组分的纯峰的相似曲线。

在图 7 中可以看到噪音的影响。相似因子会随信噪比的降低而减小，或者在噪声级别恒定的情况下，会随吸光度范围的减小而减小。

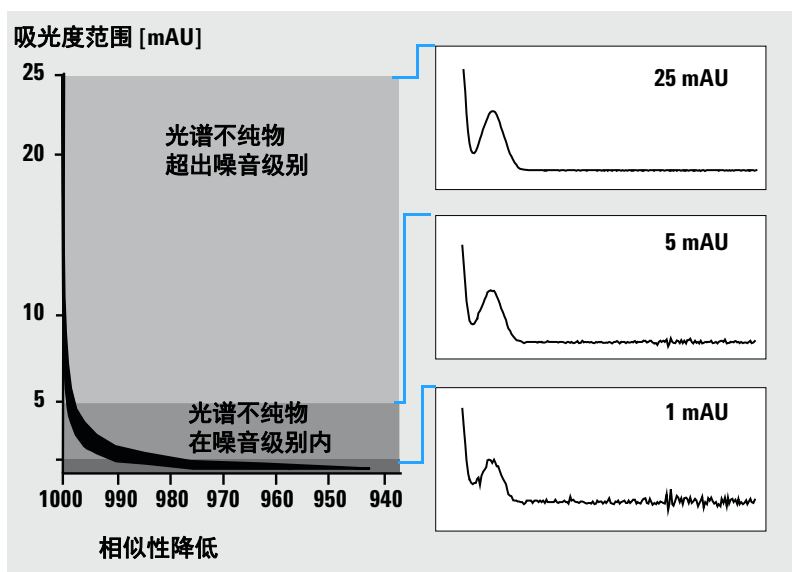


图 7 噪音级别对相似因子的作用

图 8 (a) 显示了有噪音的纯峰的相似曲线和阈值曲线，而图 8 (b) 显示了一个不纯峰的相似曲线和阈值曲线。

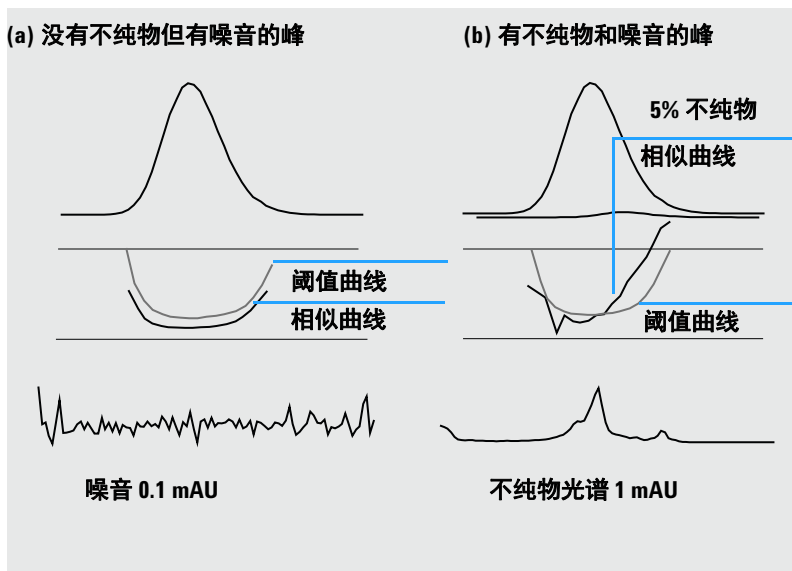


图 8 不纯物和噪音对相似性和阈值曲线的影响

噪音阈值是根据指定时间的纯噪音光谱的标准偏差自动确定的，缺省情况下是运行开始时（即 0 分钟）的 14 个光谱。

用折线表示的阈值曲线给出了在噪音限值内光谱不纯物的范围。高于此阈值，光谱不纯物将超出光谱背景噪音，并且相似曲线与阈值曲线相交，这表明存在不纯物（假定已合理选择参比和噪音参数）。

使用特定目标光谱

Agilent ChemStation 版本可以计算与不同目标光谱相关的纯度因子和相似曲线，如图 9 所示。通常，与平均光谱的缺省比较可以提供大多数未知不纯物的最有价值的信息。能够选择特定目标光谱，这种灵活性在分析者必须假定不纯物的位置或需要提高纯度评估的灵敏度时很有价值。以下示例可能有助于说明如何应用此原理：如果假定不纯物位于峰尾，则选择拖尾光谱或顶点光谱来与所有其他光谱进行比较，将可以提供此情况下的最重要信息。

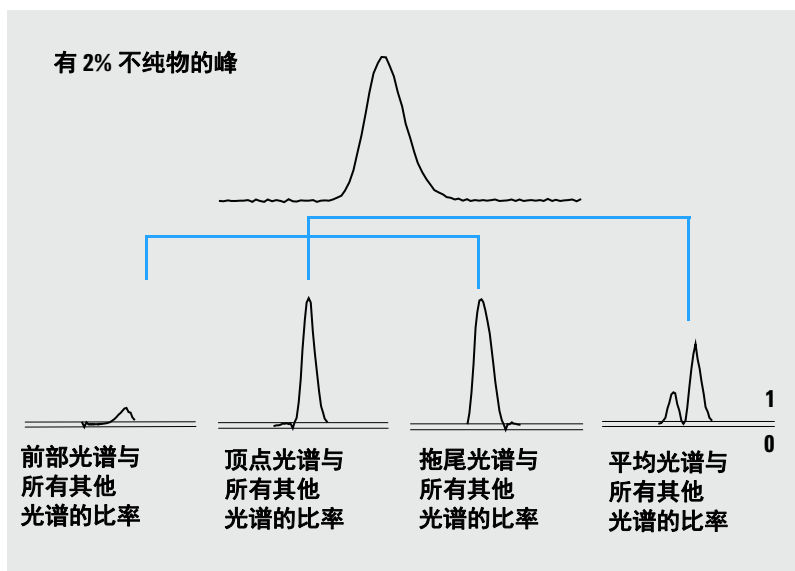


图 9 对相同峰选择不同目标光谱时得到的比率曲线

图 9 显示了在响应最大（顶点）之后包含一个不纯物的峰的前部光谱、顶点光谱、拖尾光谱和平均光谱的比率曲线。

前部光谱显示峰结束处有一个小的光谱不纯物。由于前部光谱吸收值小（给出了一个相对较高的阈值曲线），因此第一个比率曲线中的偏差也较小。

顶点光谱显示在峰前部有一个小的不纯物（顶点光谱只包含一个含量非常低的不纯物）并且在峰尾处有一个大的不纯物。

拖尾光谱（包含一个高含量不纯物）显示峰前部有一个光谱不纯物。

平均光谱（五个选定峰光谱的平均值）表明在整个峰中有光谱不纯物。此平均光谱包含了不纯物对光谱的影响。在这种情况下，不纯物对平均光谱的影响比对顶点光谱的影响更大，表明与顶点光谱的比率曲线相比，在洗脱或迁移开始时有一个含量较高的光谱不纯物，而在峰尾处有一个含量较低的不纯物。

相似、阈值和比率曲线的轮廓图取决于不纯物的位置、级别和光谱差异。因此，对于其形状没有任何通用声明。情况不同，轮廓图也不尽相同。

纯度计算和显示

纯度因子并非峰纯度的绝对量度标准。它只是在计算中所使用的参数（特别是纯度阈值）的函数。因此，需要将其结果与阈值集一起解释。对于纯峰，不同的参数设置会产生相似的结果。对不纯的峰，则会产生最差的实例分析。计算中只考虑表示不纯物的数据点（例如低于阈值的光谱），因此阈值的变化可能会极大地影响不纯峰的纯度因子。有关这些计算的详细信息，请参阅下面的内容。有关 Agilent ChemStation 版本相似曲线的详细描述，请参阅第 27 页的“[光谱相似曲线](#)”。

所有光谱

- 1 为峰记录的高于用户定义的阈值的所有已校正的参比光谱都会被用于计算纯度和阈值曲线；“光谱”窗口中将显示这些光谱中的五个光谱。
- 2 通过在显示在“光谱”窗口中的每个光谱和这五个光谱的平均值之间的计算得到匹配因子；在**纯度**显示中将这匹配因子绘制为单个点。
对于用户定义的阈值，在纯度图上将叠加相似曲线。

对于计算得到的阈值，阈值是针对每个光谱计算的；光谱的纯度值被定义为阈值与相似值之间的比率，结果为一条直线。这可以更好地表示纯与不纯的数据点。在纯度图上将叠加相似性和阈值曲线。

峰控制光谱

- 1 为峰记录的高于用户定义的阈值的所有已校正的参比峰光谱都会被用于计算并显示在“光谱”窗口中。
- 2 通过在显示在“光谱”窗口中的每个光谱和这些光谱的平均值之间计算得到匹配因子；在纯度显示中将这匹配因子绘制为单个点。
- 3 纯度值是计算出的所有匹配因子的平均值。

将峰分类为纯峰或不纯的峰

计算得到的纯度级别用于产生显示在屏幕上的纯度声明。

- 如果纯度因子低于阈值（手动设置，或根据阈值曲线计算 - 请参见 第 29 页的图 8），则会将峰归类为“纯”。
- 如果纯度因子不在阈值范围内，则会将峰归类为“不纯”。

注意

检测到的不纯物是光谱不纯物，但并不意味着它一定是化合物不纯物。光谱不纯物可能是由溶剂组成发生变化（梯度）导致的，也可能在未实现基线分离的峰中出现。

峰纯度信息

纯度因子

纯度因子给出了峰纯度的数字值。

- 如果峰被分类为纯峰，则纯度因子为阈值内所有光谱的平均值。
- 如果峰被分类为不纯的峰，则纯度因子为超出阈值的所有光谱的平均值。

不论哪种情况，都应指定用于计算纯度因子的光谱数目和计算依据。

阈值

对于计算得到的阈值，这是用于计算纯度因子的所有这些光谱的平均值。对于用户定义的阈值，这是在纯度选项中设置的值。

峰光谱

峰光谱显示了用于纯度计算的五个光谱的详细信息。还可以显示

- 差异光谱
通过计算平均光谱和每个选定的光谱之间差异得到的光谱。纯峰的差异光谱仅显示噪音。
- 比较光谱
用于纯度计算的平均光谱。
- 所有记录的光谱
从峰中记录的所有光谱。

- 参比光谱
用于背景校正的光谱。

纯度和噪音计算

有关纯度计算的信息显示了记录的光谱数和已被用于计算纯度因子的阈值内或超出阈值的光谱数。

有关噪音计算的信息显示了已被用于计算噪音阈值的光谱及计算结果。可以显示噪音光谱以及噪音统计图。还可以更改用于噪音计算的参数。

注意

更改用于背景噪音计算的参数可能会对纯度计算的结果产生较大影响。在进行任何更改之前，请确保您已了解第 34 页的“[高级峰纯度选项](#)”中给出的信息。

纯度曲线

“**纯度曲线**”信息显示了峰中的每个光谱与平均光谱比较的结果。“差异”列中的值表示“纯度”列与“阈值”列中值之间的算术差异。差异值用于确定哪些光谱用于计算峰的纯度因子和阈值。

更多纯度曲线

“**更多纯度曲线**”的信息显示了除使用平均光谱外，使用前部、顶点和拖尾光谱计算的纯度结果（请参阅第 30 页的“[使用特定目标光谱](#)”）。您可以选择显示其中任何计算或所有计算的相似曲线。还可以更改纯度计算的参数以及显示结果的方式。

注意

更改纯度计算的参数可能会对纯度结果产生较大影响。在进行任何更改之前，请确保您已了解第 34 页的“[高级峰纯度选项](#)”中给出的信息。

高级峰纯度选项

在“高级峰纯度选项”中所做的更改可能会对纯度结果产生较大影响。建议您首先了解所做的更改将会对结果产生的影响，然后再进行更改。

纯度计算

缺省情况下，纯度计算使用峰中的五个光谱的平均值（请参阅第 20 页的“[什么是峰纯度检查？](#)”），但也可以使用其他光谱作为计算的依据：

“**所有峰光谱**”使用所有五个选定的光谱来产生五组结果，这些结果显示在同一窗口中。

“**顶点光谱**”、“**前部光谱**”和“**拖尾光谱**”使用特定的光谱，使您可以提高纯度分析的灵敏度（请参阅第 30 页的“[使用特定目标光谱](#)”）。

“**前部和拖尾光谱**”显示了使用前部和拖尾光谱作为纯度计算的依据所产生的两组结果。

缺省的峰纯度显示是纯度比率（如第 26 页的图 5 所示），但也可以将纯度结果显示为相似性和阈值曲线。

Agilent ChemStation 版本提供了三种模式来显示相似性和阈值曲线：

- 1 不进行任何转换（请参阅第 35 页的图 10 [a]）；
- 2 使用自然对数 $\ln$ （请参阅第 35 页的图 10 [b]），其优点是可以显示图形较低部分中峰顶点的更详细的信息；
- 3 使用比率：比率 = $\frac{1000 - \text{相似性}}{1000 - \text{阈值}}$ ，（请参阅第 35 页的图 10 [c]）。

对于光谱纯峰，比值小于 1；对于光谱不纯的峰，比值大于 1。比率模式的优点是只显示一条线，解释起来较为容易。

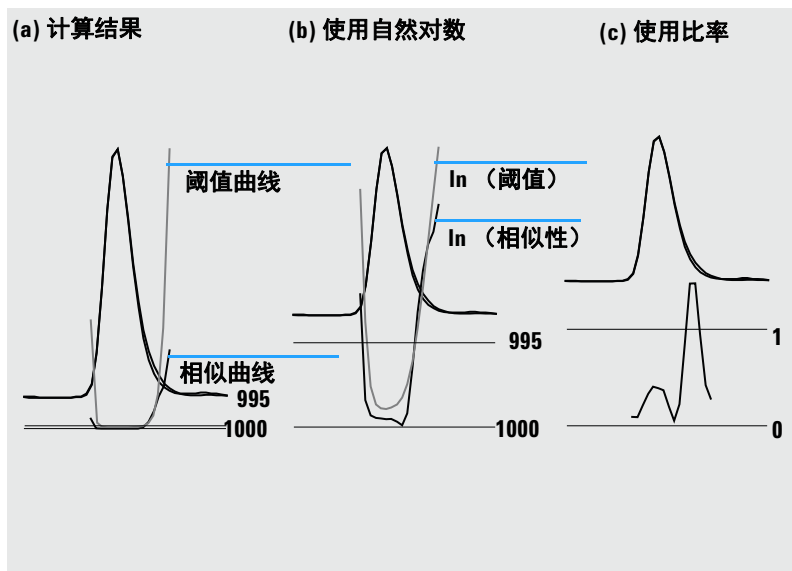


图 10 阈值曲线和相似曲线
(a) 计算结果
(b) I_n (阈值) 和 I_n (相似性)，以及
(c) 使用比率

噪音阈值

缺省情况下，将使用运行开始时（0 分钟）的 14 个纯噪音光谱的标准偏差自动确定噪音阈值。您可以更改用于计算噪音标准偏差的光谱的时间和数目，也可以输入一个固定的标准偏差值（缺省值为 0.1）。通过指定数目的扫描计算得到的标准偏差最为准确。

使用峰纯度分析

本部分包括有关采集适于峰纯度分析的数据和设置峰纯度选项的实用提示。

光谱采集

峰纯度测试基于对峰中的光谱的比较。请确保有足够数目的光谱可用于比较，并且光谱的质量较高。确保检测器被维护得很好，灯的亮度足够，并选择了适当的流通池和狭缝。通常，应优化灵敏度而非分辨率，因为即使很小的光谱改变都会在较宽的波长范围上反映出来，而分辨率通常没有这么重要。

使用“存储所有光谱”功能来连续地收集光谱。多个检测器支持全部在峰中模式，该模式会在检测到峰且在运行开始时存储约 20 个峰，用来确定纯度分析的基线时，不断收集光谱。

将仪器方法的二极管阵列检测器部分的峰宽设置为运行中最窄的目标峰的峰宽。

请保样品浓度适合检测器的线性运行范围。如果组分浓度过高，检测器的运行范围将超出吸收度最高的波长的线性范围，但在其他波长仍保持在线性范围内。这会导致光谱的形状随着浓度而变化，并将组分报告为“可能不纯”。如果组分浓度过低，则光谱的信噪比不佳，纯度分析的灵敏度也会下降。准确性、灵敏度最高的纯度分析通常针对的是高度约 250 至 800 mAU 的光谱范围。

使用缺省设置来检查峰纯度。如果检测到可能存在不纯物，则可以对结果进行进一步地分析，以确认不纯物并深入了解其特性。

设置峰纯度选项

在“光谱选项”对话框的相应选项卡中选择以下设置。

波长范围

使用此设置可以控制用于纯度分析的波长范围的部分。例如，您可以设置一个下限，用于排除流动相吸光度导致噪音过大的波长。还可以设置一个上限，用于排除目标化合物不吸收的较大波长。

光谱处理

使用光谱处理可以执行数学计算以转换、平滑或锯齿化光谱。实际上，能够扩大光谱中的微小差异的任何处理（求导数）也会增大噪音，而能够减小噪音的任何处理（平滑）也会降低微小光谱变化的灵敏度。

吸收阈值

吸收阈值用于设置分析中可以包含的最低光谱强度。通常，阈值被设置为 1-2 mAU，以确保将峰边缘处的光谱包括在纯度检查中。

参比光谱

参比光谱是用于校正背景吸光度的基线光谱。建议您始终使用一个参比光谱。建议的设置为“自动”。使用此模式时，将从靠近积分开始和结束的基线提取光谱。这两个光谱的线性外插用于校正峰中的每个光谱。由于这是两点参比，它可以使用梯度补偿检测器漂移和流动相组成中的变化。其他参比模式用于与先前的软件进行向后兼容，从而即使只收集少数光谱，也可以获得某些纯度信息。

如果两个峰没有完全实现基线分离，使用自动参比选择来自动选择参比光谱可能会导致从两峰间的峰谷选择参比光谱。未分离的峰不可能是纯峰。在这种情况下，纯度测试可以用于查找其他隐藏的组分。使用手动参比选择可以从峰组之前和之后选择参比光谱。

纯度阈值

如果通过采集峰控制光谱来收集数据，则需要输入纯度阈值的值。通常，使用缺省值 990 会得到可以接受的结果。

如果通过采集所有光谱或峰中的全部光谱来收集数据，则通过允许 Agilent ChemStation 版本根据每个光谱各自的信噪比计算其阈值将会得到最佳结果。此外，也可以为峰中的所有扫描设置一个固定的阈值（不建议使用此方法）。如果要使用固定阈值，请使用高于峰控制光谱值的值（例如介于 995 和 998 之间的值）。

质谱峰纯度

在 LC/MS 中，化合物的特征离子丰度在某个特定保留时间最大，此时 MSD 中组分的浓度为最大。根据色谱条件和扫描周期时间，相近洗脱的峰的保留时间可能会非常接近，并且在总离子色谱图 (TIC) 中多个组分可能会显示为单峰或失真的峰（如肩峰）。通过检查各个离子最大化时的保留时间，就有可能将在相同保留时间最大化的离子簇分组；然后可以假定这些离子全部属于相同组分。如果有多个离子簇，在相同色谱图峰包络线下它们最大化的保留时间不同，则可以认为峰不纯，并可以确定各个离子簇。

在此分析中，做了以下几个假设：

- 多组分混合物的组分可以通过其质谱或保留时间来分离。混合物的每个组分都具有独特的质谱和唯一的 m/z 值，或者组分可以充分地被分离，从而可以确定多个最大值。
- 信噪比足够高，从而可以清楚地确定实际最大值。
- 用作计算组分保留时间依据的离子保留时间是精确而有代表性的。

除了极少数例外，电喷雾电离 (ESI) 只产生分子离子，除非离子源的碰撞诱导解离 (CID) 用于产生碎片。这意味着如果在一系列光谱中找到两种不同的单电荷离子（即使它们一起洗脱），就有可能对这些离子进行识别和定量。执行此操作时应小心，因为阳离子和阴离子加合物可以产生预期的 $[M+H]^+$ 或 $[M-H]^-$ 以外的离子。大气压化学电离 (APCI) 也产生分子离子，但与电喷雾相比，其中的热碎片更常见。

另外，质谱包含可用于帮助识别和纯度评估的同位素信息。

只有存在光谱和时间差异时才能通过峰纯度算法识别不纯的峰。手动处理则可以不受此限制。与紫外数据不同，只要“化合物”包含不同离子，就可以使用 MS 数据对不纯的峰进行定量。通常，峰纯度需要使用扫描数据而不是 SIM 数据。

质谱纯度计算

使用选定的一组 m/z 值检索覆盖峰积分区域的 TIC 范围，并确定每个 m/z 值的最大丰度值。对于找到的每个最大值，都将使用抛物线拟合来计算内插保留时间（扫描数）。最大值的保留时间将被分成簇，然后使用此区域内存在的组分进行识别。有关簇中有多少组分、每个组分的保留时间（扫描数）以及最大的 m/z 值的信息将会被报告。

使用丰度值大于扫描中的最大丰度值（基峰）的 1% 的所有 m/z 值，通过检查在积分峰时间范围的 25%、50% 和 75% 时的扫描来获得选定的一组 m/z 值。对于每个选定的 m/z 值，在确定簇之前，时间范围内第一次扫描和最后一次扫描的平均丰度将被用于背景校正。

组中的每个 m/z 值是在时间范围内的每次扫描中检查的，最大丰度值及其两端的丰度值将被存储在一起。对于每个 m/z 值，只存储一个最大值。存储的每个最大值都会被验证，方法是检查此最大值既没有出现在第一次扫描中也没有出现在最后一次扫描中，并且两端的丰度值均不为零。

计算了 m/z 值的内插扫描数并且进行了背景校正之后，将产生一个包含 m/z 值、丰度和内插扫描数的表（按内插扫描数排序）。

通过检查列表中按扫描数升序排列的最大丰度值来确定簇。一旦注册了簇，将计算出簇中的 m/z 值的平均内插扫描数；如果所考虑的下一个点比此平均值多出一半扫描数，则开始一个新的簇。

找到的簇数被报告为组分数；平均内插扫描数为报告的扫描数；簇中具有两个最大丰度的 m/z 值被报告为离子。

含有多个簇的积分峰将被报告为不纯。

质谱纯度显示

“峰离子”窗口

“峰离子”窗口显示了每个簇中具有最大丰度的两个 m/z 值。单组分峰显示在同一保留时间最大化的两个离子；多组分峰显示在同一保留时间最大化的成对离子。每对离子表示不纯峰中的一个组分。您可以使用 ChemStation 版本的图形处理更详细地检查离子。

3 评价峰纯度 质谱峰纯度

“MS 峰纯度结果 ” 窗口

“MS 峰纯度结果 ” 窗口包含峰纯度分析的表格式结果。表中的每行包含一个组分的信息：平均内插扫描数和两个丰度最大的离子。

索引

B

报告

- 峰纯度, 12
- 光谱, 12
- 谱库检索, 12

背景

- 吸收, 20

背景校正, 22

比较

- 光谱, 25

标准化

- 光谱, 25

波长

- 最佳, 10

不纯物, 20

C

COMPARE 命令, 21

参比光谱, 36

- 背景校正, 22

纯度

- 峰, 20

纯度计算

- 阈值曲线, 28, 31
- 质谱, 39

纯度显示

- 质谱, 39

D

导数光谱, 22

等高

- 图, 10
- 线, 10

等高线图, 10

第三维, 8

顶点光谱, 30

对数光谱, 22

F

峰

- 不纯物, 20

- 纯度, 20

峰纯度

- 光谱相似曲线, 27
- 是什么?, 20
- 使用特定目标光谱, 30
- 阈值曲线, 28, 34
- 质谱, 38

峰信号窗口, 27

G

光谱

- 标准化, 25
- 参比, 36
- 导数, 22
- 对数, 22
- 平滑, 21
- 校正, 22

光谱, 荧光, 11

光谱采集, 36

光谱处理

- 比较, 25
- 标准化, 25

光谱分析

- 是什么?, 8

光谱相似曲线, 27

H

化合物名称标记, 17

J

基线

- 校正, 22

M

目标光谱, 30

P

匹配因子, 21

平滑光谱, 21

平均光谱, 31

谱库匹配标记, 16

Q

前部光谱, 30

确定

- 最佳波长, 10

T

提示, 36

拖尾光谱, 30

X

线性范围, 36

Y

荧光光谱, 11

索引

阈值曲线, 28, 31, 34
显示模式, 29

Z

质谱峰纯度, 38
自动光谱库检索
 靶标化合物分析, 15
 标准检索, 14
 峰纯度, 15
 概要, 3
 检索模式, 14
最佳波长, 10

内容提要

本指南介绍 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition 中光谱模块的相关概念。这些概念适用于 LC 3D 和 CE 系统以及 Agilent ChemStation LC-MSD 的紫外 - 可见部分。

© Agilent Technologies 1994-2016, 2017

德国印刷
04/17



M8301-97170 版本 B



Agilent Technologies