



OpenLab CDS

Руководство пользователя программы анализа данных Data Analysis

Примечания

Сведения о документе

№ документа: D0013815ru Вер. А
Издание: 04/2022

Авторское право

© Agilent Technologies, Inc. 2012-2022

Согласно законам США и международным законам об авторском праве запрещается воспроизведение любой части данного руководства в любой форме и любым способом (включая сохранение на электронных носителях, извлечение или перевод на иностранный язык) без предварительного письменного разрешения компании Agilent Technologies, Inc.

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

Версия ПО

Данное руководство предназначено для версии 2.7 Agilent OpenLab CDS.

Гарантия

Материал представлен в документе «как есть» и может быть изменен в последующих изданиях без уведомления. Кроме того, в пределах, допустимых действующим законодательством, компания Agilent отказывается от всех явных или подразумеваемых гарантийных обязательств в отношении данного руководства и любой содержащейся в нем информации, в том числе от подразумеваемой гарантии товарной пригодности и гарантии пригодности для конкретной цели. Компания Agilent не несет ответственности за ошибки, случайные или косвенные убытки, связанные с поставкой и эффективным применением на практике данного документа и любой содержащейся в нем информации. Если между компанией Agilent и пользователем подписано отдельное соглашение, условия гарантии которого не соответствуют условиям гарантий, содержащимся в данном документе, то силу имеют условия отдельного соглашения.

Технологические лицензии

Аппаратура и (или) программное обеспечение, описанные в данном документе, поставляются по лицензии и могут использоваться или копироваться только в соответствии с условиями лицензии.

Ограничение прав

Ограничение прав Правительства США. Права на программное обеспечение и технические данные, предоставляемые федеральному правительству, включают только права, передаваемые в обычном порядке конечным пользователям.

Agilent предоставляет стандартную коммерческую лицензию на программное обеспечение и технические данные в соответствии с FAR 12.211 (технические данные) и 12.212 (компьютерное программное обеспечение), а для Министерства обороны США — согласно DFARS 252.227-7015 (технические данные — коммерческие элементы) и DFARS 227.7202-3 (права, касающиеся коммерческого программного обеспечения или документации по компьютерному программному обеспечению).

Предупреждающие сообщения

ОСТОРОЖНО

Сообщение **ОСТОРОЖНО** указывает на опасность. Данное сообщение предназначено для привлечения внимания к процедуре, методике и т. п., которые при неправильном выполнении или несоблюдении рекомендаций могут привести к повреждению продукта или потере важных данных. Если в документе встречается сообщение **ОСТОРОЖНО**, не следует продолжать выполнение действий до тех пор, пока указанные условия не будут полностью уяснены и выполнены.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Сообщение **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ** указывает на опасность. Данное сообщение предназначено для привлечения внимания к процедуре, методике и т. п., которые при неправильном выполнении или несоблюдении рекомендаций могут привести к травме или смерти. Если в документе встречается сообщение **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ**, не следует продолжать выполнение действий до тех пор, пока указанные условия не будут полностью уяснены и выполнены.

В данном руководстве...

Данное руководство предназначено для продвинутых пользователей, системных администраторов и лиц, ответственных за валидацию Agilent OpenLab CDS. В нем содержится справочная информация о принципах расчетов и алгоритмах анализа данных.

Используйте это руководство, чтобы проверить функциональность системы согласно техническим требованиям пользователя, а также для определения и выполнения задач валидации системы, определенных в плане валидации. Следующие материалы содержат дополнительную информацию.

- Контекстно-зависимую информацию (практические руководства), справочную информацию о пользовательском интерфейсе и помощь в поиске и устранении неисправностей можно найти в центре помощи и обучения OpenLab.
- Дополнительную информацию по установке системы и подготовке рабочего места можно найти в руководствах *Требования для установки OpenLab CDS*, *Руководство пользователя OpenLab CDS Workstation* и *Руководство клиентских и клиент-серверных систем OpenLab CDS*.

1 Подготовка сигнала

В этом разделе описан порядок предварительной обработки сигналов (например, вычитание холостого сигнала) до интегрирования.

2 Интегрирующий алгоритм ChemStation

Этот раздел посвящен понятиям и алгоритмам интегрирования ChemStation в OpenLab CDS.

3 Интегрирующий алгоритм EZChrom

Этот раздел описывает события интегрирования EZChrom.

4 Идентификация пиков

В этом разделе описываются понятия идентификации пика.

5 Калибровка

Этот раздел подробно описывает расчеты, применяемые в ходе калибровки.

6 Количественный анализ

В этом разделе описывается количественный анализ соединений и объясняются расчеты, которые при нем используются.

7 Анализ спектров УФ

В этом разделе описаны понятия проверки примесей и идентификации соединения на основе анализа спектров УФ.

8 Масс-спектрометрия

Эта глава описывает расчет чистоты пробы по данным масс-спектрометрии.

9 Пригодность системы

Эта глава описывает, каким образом OpenLab CDS может оценить рабочие характеристики аналитического прибора и аналитического метода.

Содержание

1	Подготовка сигнала	7
	Сглаживание сигнала	8
	Вычитание холостого сигнала	11
2	Интегрирующий алгоритм ChemStation	12
	Что представляет собой интегрирование?	13
	Алгоритмы интегрирования	15
	Принцип действия	21
	Распознавание пика	22
	Измерение площади пика	34
	Размещение базовой линии	37
	События интегрирования	48
3	Интегрирующий алгоритм EZChrom	70
	События интегрирования	71
	Описания кодов базовой линии	89
4	Идентификация пиков	91
	Что представляет собой идентификация пика?	92
	Устранение конфликтов	94
	Относительные времена удерживания	95
	Соединение — эталон по времени	97
	Обновление метода обработки	100
5	Калибровка	106
	Что такое калибровка?	107
	Калибровочная кривая	108
	Расчет калибровочной кривой	121
	Оценка калибровочной кривой	130

6 Количественный анализ 137

- Что такое количественный анализ? 138
- Поправочные коэффициенты 139
- Концентрация и массовая доля в % 141
- Процент площади и процент высоты 142
- Количественный анализ калибровочных соединений 143
- Количественный анализ некалиброванных соединений 149
- Количественный анализ неидентифицированных пиков 152
- Нормировка 154
- Количественный анализ групп 157

7 Анализ спектров УФ 165

- Что такое анализ спектров УФ? 166
- Проверка на примеси по спектру УФ 168
- Подтверждение идентификации по спектру УФ 180

8 Масс-спектрометрия 181

- Чистота пробы МС 182
- Чистота пика МС 184

9 Пригодность системы 186

- Оценка пригодности системы 187
- Определение шума 190
- Расчет асимметрии и симметрии пика 201
- Формулы и расчеты пригодности системы 203
- Определения проверки рабочих характеристик 204

Сглаживание сигнала	8
Общий подход	8
Подробности алгоритма	9
Вычитание холостого сигнала	11

В этом разделе описан порядок предварительной обработки сигналов (например, вычитание холостого сигнала) до интегрирования.

Этот раздел описывает порядок предварительной обработки сигналов до интегрирования.

ПРИМЕЧАНИЕ

Если при обработке данных используются и вычитание, и сглаживание холостого сигнала, система сначала выполнит сглаживание, а затем вычитет холостой сигнал из сглаженного сигнала.

Сглаживание сигнала

Общий подход

Исходные предположения

Все алгоритмы сглаживания предполагают, что точки на кривой сигнала разделены одинаковыми интервалами. Если на кривой имеются неравноотстоящие точки, они преобразуются в равноотстоящие путем полиномиальной интерполяции кривой и передискретизации с интервалом, равным минимальному расстоянию между неравноотстоящими точками.

Базовый алгоритм сглаживания

Все алгоритмы сглаживания работают на сегментах размером $2m+1$, в которых каждой точке присваивается коэффициент сглаживания по следующему уравнению:

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

где:

a	массив коэффициентов сглаживания
x'	сглаженный сигнал
m	четное число, задающее полуширину сегмента сглаживания

В этом алгоритме полная ширина сегмента сглаживания равна нечетному числу $2m+1$.

Краевые точки сегментов

Так как коэффициенты сглаживания должны быть нормированы, краевые точки нуждаются в специальном подходе.

Для алгоритмов фильтрации **Скользящее среднее** и **По Гауссу** сегмент обрезается в левой и правой краевых точках, после чего коэффициенты нормируются (пересчитываются таким образом, чтобы их сумма равнялась 1).

Алгоритм **Савицкого-Голея** обрабатывает краевые точки более сложным образом. Для этого алгоритма необходимо не допустить нарушения свойств фильтра Савицкого-Голея для краевых точек. См. раздел [«Подробности алгоритма»](#) на странице 9.

Подробности алгоритма

Скользящее среднее

Скользящее среднее — это самый простой из алгоритмов сглаживания. Все коэффициенты в этом алгоритме вычисляются по следующему уравнению:

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

где:

a	массив коэффициентов сглаживания
m	четное число, задающее полуширину сегмента сглаживания

Это значит, что сглаживающая функция имеет прямоугольную форму. Иногда этот алгоритм сглаживания называют также узкополосным сглаживанием.

По Гауссу

Для сглаживания по **Гауссу** применяются коэффициенты, выбранные из нормального Гауссовского распределения. Если принять ширину сегмента равной $2m+1$, стандартное отклонение σ нормального распределения рассчитывается по формуле:

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

Индивидуальные коэффициенты затем рассчитываются следующим образом:

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

На втором этапе коэффициенты нормируются таким образом, чтобы их сумма была равна 1:

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

Савицкого-Голея

Коэффициенты для сглаживания по алгоритму Савицкого-Голея рассчитываются таким образом, чтобы гарантировать неизменность площади под графиком функции. Эти коэффициенты рассчитываются в соответствии со статьей Горри от 1990 г. *General Least-Squares Smoothing and Differentiation by the Convolution (Savitzky-Golay) Method* (Универсальный (Савицкого-Голея) алгоритм сглаживания и дифференцирования по методу наименьших квадратов)¹

Этот алгоритм обеспечивает сохранение свойств сглаживания по Савицкому-Голею (неизменность площади под графиком функции) также для краевых точек сигнала.

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

Вычитание холостого сигнала

Полученный во время анализа пробы сигнал может быть вызван не только определяемыми соединениями, но и разбавителями, подвижной фазой, добавками и т. д. Вычитание холостого сигнала позволяет получить чистую хроматограмму, вклад в которую внесли только определяемые вещества.

Холостой сигнал может быть получен во время анализа

- холостой пробы в последовательности или
- холостой пробы отдельно от последовательности (например, при анализе единичной пробы).

Новый сигнал получается вычитанием холостого по формуле:

Новый сигнал = сигнал пробы – холостой сигнал

Для извлеченной хроматограммы на определенной длине волны:

Новый сигнал = сигнал пробы на заданной длине волны – холостой сигнал на заданной длине волны

Если скорость сбора данных для холостого сигнала и пробы отличаются, скорость для холостого сигнала меняется. Точки данных либо удаляются из него, либо добавляются путем полиномиальной интерполяции.

Если хроматограмма пробы длиннее холостой хроматограммы, в новой хроматограмме будут как исправленные, так и неисправленные точки.

Что представляет собой интегрирование?	13
Что происходит при интегрировании?	13
Возможности интегрирования	14
Алгоритмы интегрирования	15
Общие сведения	15
Выявление исходной базовой линии	16
Отслеживание базовой линии	18
Размещение базовой линии	19
Определение терминов	20
Принцип действия	21
Распознавание пика	22
Ширина пика	22
Фильтры распознавания пика	23
Группировка	25
Алгоритм распознавания пика	26
Слившиеся пики	28
Плечи	29
Построение базовой линии по умолчанию	30
Коды базовой линии	31
Измерение площади пика	34
Определение площади	35
Единицы измерения и коэффициенты пересчета	36
Размещение базовой линии	37
Режимы коррекции базовой линии	37
Отношение пика к седловине	39
Отделение по касательной	40
Режимы отделения по касательной	44
События интегрирования	48
События стандартного интегрирования: исходные события	48
События стандартного интегрирования: временные события	54
Дополнительные события интегрирования	67

Этот раздел посвящен понятиям и алгоритмам интегрирования ChemStation в OpenLab CDS.

Что представляет собой интегрирование?

В ходе интегрирования обнаруживаются пики сигнала и определяется их размер.

Интегрирование является необходимым шагом для:

- идентификации;
- калибровки;
- количественного анализа.

Что происходит при интегрировании?

При интегрировании сигнала программное обеспечение:

- выявляет время начала и окончания для каждого пика
- находит вершину для каждого пика; то есть время удерживания/миграции
- выстраивает базовую линию и
- рассчитывает площадь, высоту, ширину и симметрию для каждого пика.

Этот процесс контролируется параметрами, называемыми событиями интегрирования.

Возможности интегрирования

Алгоритмы интегратора поддерживают следующие основные возможности:

- возможность определять индивидуальные таблицы событий интегрирования для каждого сигнала хроматограммы при многоканальных сигналах или использовании нескольких детекторов;
- графическое интегрирование хроматограмм вручную, требующее интерпретации человеком;
- аннотация результатов интегрирования;
- определение параметров интегрирования для установки или изменения базовых настроек интегратора для отбраковки по площади и по высоте, ширины пика, чувствительности к фронту, обнаружения уступов, исправления базовой линии и определения касательных спереди и сзади;
- параметры управления базовой линией, такие как принудительное проведение базовой линии, удерживание базовой линии, базовая линия через точки минимума между пиками, базовая линия до следующей точки минимума, базовая линия назад из конечной точки текущего пика, наиболее вероятная точка базовой линии из временного интервала;
- управление суммированием площадей;
- распознавание отрицательных пиков;
- обнаружение пика растворителя;
- контрольные команды интегратора, определяющие интервалы времени удерживания для действий интегратора;
- выделение уступов на пике с помощью вычисления второй производной.

Алгоритмы интегрирования

Общие сведения

При интегрировании хроматограммы интегратор...

- 1 Определяет исходную базовую линию.
- 2 Непрерывно отслеживает и обновляет базовую линию.
- 3 Определяет время начала пика.
- 4 Находит вершину для каждого пика.
- 5 Определяет время конца пика.
- 6 Выстраивает базовую линию.
- 7 Рассчитывает площадь, высоту, ширину и симметрию для каждого пика.

Этот процесс контролируется **событиями интегрирования**. Самыми важными событиями являются начальные: чувствительность к фронту, ширина пика, режим уступов, отбраковка по площади и отбраковка по высоте. Программное обеспечение позволяет установить начальные значения для этих и других событий. Начальные значения начинают действовать с момента старта хроматограммы.

В большинстве случаев использование начальных событий дает хорошие результаты для всей хроматограммы, но иногда необходим более полный контроль над процессом интегрирования.

Программное обеспечение позволяет контролировать процесс интегрирования, позволяя программировать новые события интегрирования в заданное время на хроматограмме.

Выявление исходной базовой линии

Ключевые точки

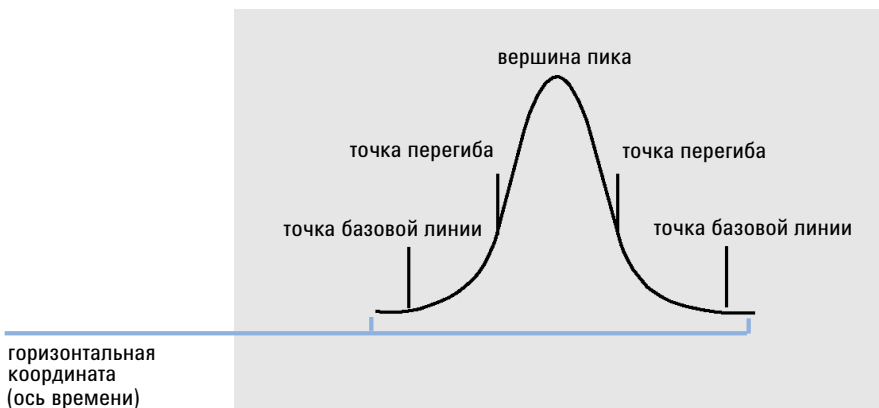


Рисунок 1 Ключевые точки

Выявление исходной базовой линии

Поскольку характеристики базовой линии меняются в зависимости от методики и типа детектора, интегрирующее устройство использует установленные значения как из событий интегрирования, так и из файла данных для оптимизации базовой линии.

Перед тем как интегрирующее устройство сможет интегрировать пики, должна быть установлена вкладка **Точка базовой линии**. Перед началом анализа интегрирующее устройство устанавливает исходный уровень базовой линии, используя первую точку данных как условную точку базовой линии. Затем происходит уточнение этой точки за счет усреднения входного сигнала. Если интегрирующее устройство не получает уточненную исходную точку базовой линии, то первая точка данных сохраняется в качестве потенциальной начальной точки, принадлежащей базовой линии.

Распознавание ключевых точек пика

Интегрирующее устройство определяет, что пик может начаться, когда потенциальные точки базовой линии лежат вне диапазона базовой линии и кривизна базовой линии превышает определенное значение, установленное интегрирующим устройством в качестве параметра чувствительности к наклону. Если такое состояние продолжается, то интегрирующее устройство признает, что базовая линия вышла на передний склон пика, и пик обрабатывается.

Начало

- 1 Наклон и кривизна находятся в пределах диапазона: отслеживание базовой линии продолжается.
- 2 Наклон и кривизна выходят за пределы диапазона: возможность появления пика.
- 3 Наклон продолжает выходить за пределы диапазона: пик признается, определяется начальная точка пика.
- 4 Кривизна становится отрицательной: передняя точка перегиба определена.

Вершина

- 1 Наклон проходит через нулевое значение и становится отрицательным: определены вершина и точка вершины пика.
- 2 Кривизна становится положительной: задняя точка перегиба определена.

Конец

- 1 Наклон и кривизна находятся в пределах диапазона: приближается конец пика.
- 2 Наклон и кривизна остаются в пределах диапазона: конец пика определен.
- 3 Интегрирующее устройство возвращается к режиму отслеживания базовой линии.

Отслеживание базовой линии

Цифровые данные образцов интегрирования обеспечиваются со скоростью, определяемой посредством начальной или вычисленной ширины пика во время анализа. При этом каждая точка данных принимается точкой потенциально принадлежащей базовой линии.

Интегрирующее устройство определяет *границу базовой линии* по наклону базовой линии, используя алгоритм отслеживания базовой линии. В этом алгоритме наклон вычисляется как первая производная функции в точке базовой линии, а кривизна — как вторая производная. Диапазон базовой линии может быть представлен в виде конуса, вершиной которого является текущая точка данных. Верхние и нижние допустимые уровни конуса определяются следующим образом:

- сумма верхнего наклона, кривизны вогнутости и смещения базовой линии должна быть ниже, чем пороговый уровень,
- сумма нижнего наклона, кривизны выпуклости и смещения базовой линии должна быть более положительной (т.е. менее отрицательной), чем пороговый уровень.

Как только новые данные точек принимаются (обработаны), конус продвигается вперед до тех пор, пока не завершится анализ.

Для того, чтобы точка данных была принята в качестве точки базовой линии, она должна удовлетворять следующим условиям:

- попадать в установленный диапазон базовой линии,
- кривизна базовой линии в этой точке данных (определяемая фильтрами производной) должна быть ниже критического значения, определенного текущим параметром чувствительности к наклону.

Исходная точка базовой линии, установленная в начале анализа, после этого постоянно обновляется со скоростью определяемой параметром ширины пика. Обновление происходит к смещающемуся среднему значению точек данных, лежащих в диапазоне базовой линии за период, определяемый параметром ширины пика. Интегрирующее устройство прослеживает и периодически обновляет базовую линию для компенсации дрейфа до тех пор, пока не будет определен восходящий участок пика.

Размещение базовой линии

Интегрирующий алгоритм размещает базовую линию хроматограммы в течение анализа с частотой, определяемой значением ширины пика. После того как интегрирующий алгоритм произведет выбор конкретного числа точек данных, происходит обновление исходной точки базовой линии на текущую. Интегрирующий алгоритм продолжает размещать базовую линию по следующему набору точек данных, и базовая линия обновляется вновь. Этот процесс продолжается до тех пор, пока интегрирующий алгоритм не обнаружит начало пика.

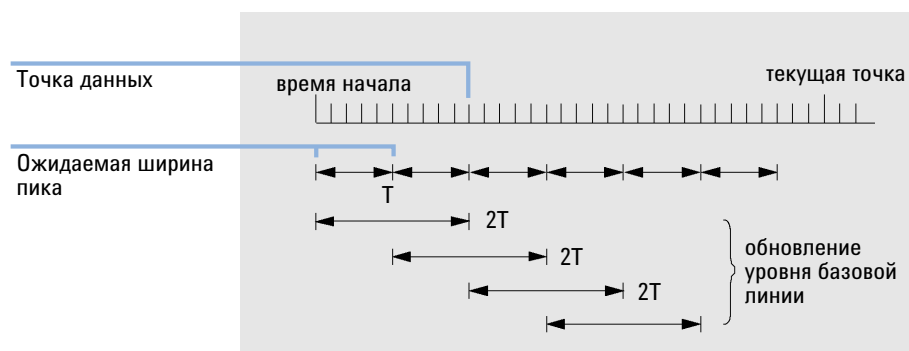


Рисунок 2 Базовая линия

Для начала процесса интегрирования используется первая точка данных. Точка базовой линии периодически обновляется, как показано на рисунке (см. Рис. 2 на странице 19).

Суммируются площади в пределах времени T (ожидаемая ширина пика). Это время никогда не может быть меньше, чем время для одной точки данных. Это продолжается до тех пор, пока выполняются условия базовой линии. Наклон и кривизна преобразуются так же. Если и наклон и кривизна меньше, чем установленный порог, то две суммированные площади складываются и сравниваются с предыдущей базовой линией. Если новое значение меньше, чем предыдущая базовая линия, то новое значение незамедлительно заменяет старое. Если новое значение оказывается больше предыдущего, оно регистрируется как условно новое значение базовой линии. В случае удовлетворения еще одного значения критерию линейности к наклону и кривизне это значение подтверждается. Последнее ограничение не действует, если допускаются отрицательные пики. Во время размещения базовой линии должна быть также выполнена проверка для анализа возможного вклада быстро возрастающего сигнала от используемых растворителей. Это может произойти слишком быстро для обнаружения переднего наклона пика (ко времени подтверждения

переднего склона пика критерий пика растворителя может оказаться уже недействительным). Сначала базовой линии присваивается первая точка данных. Она заменяется на среднее значение сигнала за интервал времени $2T$, если сигнал остается на базовой линии. После этого базовая линия обновляется каждый интервал времени T (см. Рис. 2 на странице 19).

Определение терминов

Пик растворителя

Пик растворителя, который обычно очень большой и не имеет аналитического значения, как правило, не интегрируется. Тем не менее, когда небольшие, представляющие интерес пики, выходят в непосредственной близости к пику растворителя (например находятся на заднем склоне пика растворителя), могут быть установлены специальные условия интегрирования для вычисления их площади, с поправкой на вклад заднего склона пика растворителя.

Уступ (передний, задний)

Уступы возникают, когда два пика выходят настолько близко, что впадины между ними не обнаруживается, и они являются неразрешенными. Уступ может появиться на переднем или на заднем склоне пика. При обнаружении уступов они могут быть проинтегрированы либо посредством отделяющей касательной, либо по линии проекции.

Наклон

Склон пика, который обозначает изменение концентрации компонента со временем, используется для определения начала, вершины и конца пика.

Принцип действия

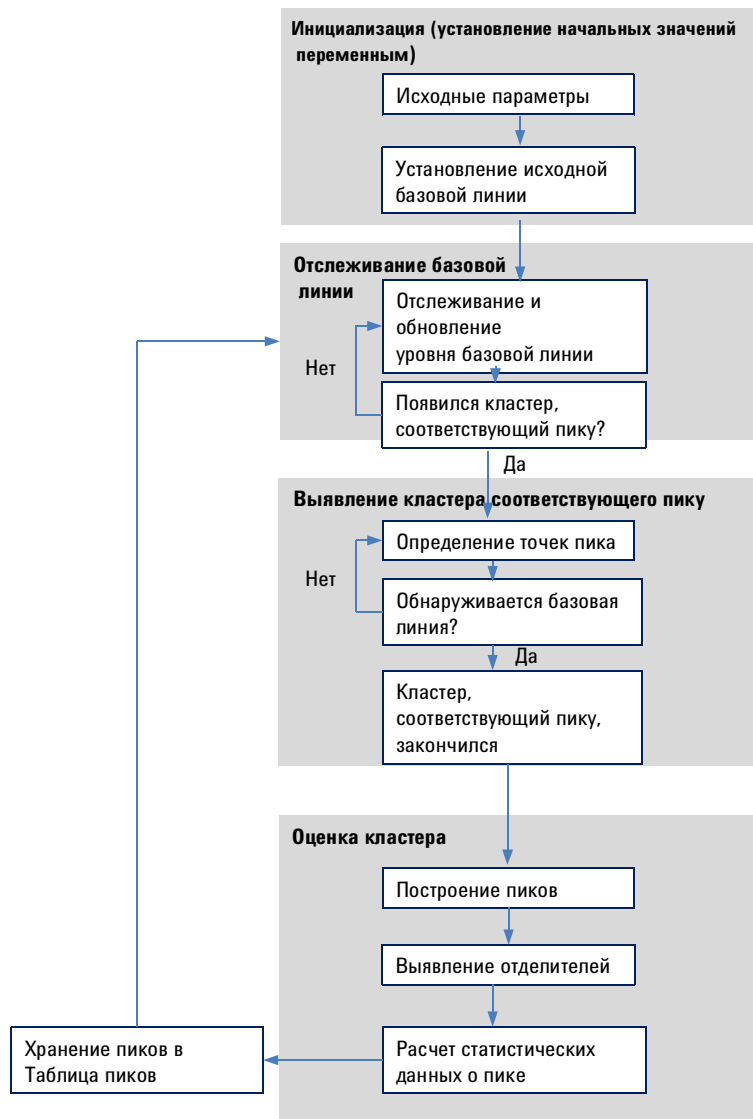


Рисунок 3 Блок-схема интегрирующего алгоритма

Распознавание пика

Интегратор использует несколько параметров, чтобы распознать и охарактеризовать пик.

- «Ширина пика» на странице 22
- «Фильтры распознавания пика» на странице 23
- «Группировка» на странице 25
- «Алгоритм распознавания пика» на странице 26
- «Слившиеся пики» на странице 28
- «Плечи» на странице 29
- «Построение базовой линии по умолчанию» на странице 30
- «Коды базовой линии» на странице 31

Ширина пика

Во время интегрирования ширина пика рассчитывается, исходя из скорректированной площади и высоты пика:

Ширина = скорректированная площадь / скорректированная высота

или, если есть точки перегиба, то исходя из расстояния между этими точками.

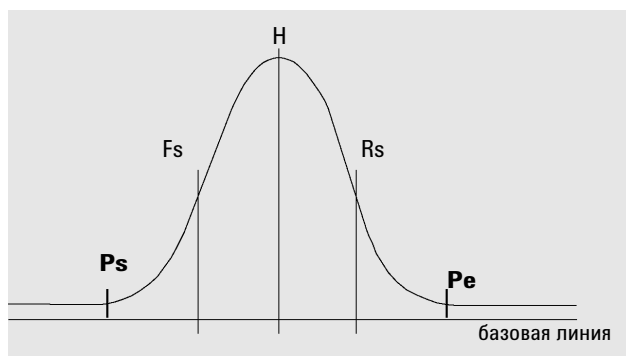


Рисунок 4 Расчет ширины пика

На рисунке, расположенном выше, общей площадью A является сумма площадей от начала (P_s) до конца (P_e) пика с корректировкой на базовую линию. Где F_s – это точка перегиба на переднем склоне пика, а R_s – это точка перегиба на заднем склоне пика.

Параметр ширина пика задает способность интегрирующего устройства отличать пики от шума базовой линии. Для получения хорошей производительности ширина пика должна быть установлена достаточно близко к фактической ширине пиков на хроматограмме.

Существует три способа изменения ширины пика:

- до начала процесса интегрирования можно указать исходную ширину пика,
- во время интегрирования интегрирующий алгоритм автоматически обновляет ширину пика по мере необходимости, для поддержания хорошего соответствия с фильтрами распознавания пика,
- во время интегрирования можно обновлять или изменять ширину пика с помощью временных событий.

Фильтры распознавания пика

Интегратор имеет три фильтра распознавания пика, которые можно использовать для распознавания пиков путем обнаружения изменений в наклоне и кривизне в пределах непрерывного набора точек данных. Эти фильтры содержат первую производную (для измерения наклона) и вторую производную (для измерения кривизны) точек данных, анализируемых интегратором.

ПРИМЕЧАНИЕ

Для того, чтобы полученные результаты можно было считать надежными, в пике должно быть не менее десяти точек данных.

Фильтрами распознавания пика являются:

- Фильтр 1** Наклон (кривизна) для двух (трех) смежных точек данных.
- Фильтр 2** Наклон для четырех смежных точек данных и кривизна для трех не смежных точек данных.
- Фильтр 3** Наклон для восьми смежных точек данных и кривизна для трех не смежных точек данных

Фактически используемый фильтр определяется установленным значением ширины пика. Например, в начале анализа может использоваться фильтр 1. По мере того, как в ходе анализа ширина пиков увеличивается, алгоритм меняет фильтр сначала на второй, потом на третий. Для получения хороших результатов от фильтров распознавания ширина пика должна быть установлена достаточно близко к фактической ширине пиков на хроматограмме. В ходе анализа интегратор обновляет значение ширины пика, по мере необходимости, для оптимизации интегрирования.

Интегратор вычисляет обновленное значение ширины пика различными способами, в зависимости от приборной методики.

В жидкостной хроматографии ширина пика по умолчанию рассчитывается используя сложную формулу:

$$0,3 \times (\text{правая точка перегиба} - \text{левая точка перегиба}) + 0,7 \times \text{площадь/высота}$$

Для данных газовой хроматографии расчет ширины пика по умолчанию использует отношение площади к высоте пика. Такой расчет не приводит к завышению ширины пика в случае пиков, слившихся выше точки половины высоты.

В определенных видах анализа, например для изотермической ГХ и изократической ВЭЖХ, пики с увеличением времени удерживания становятся значительно шире. Чтобы компенсировать это, интегратор автоматически обновляет значение ширины пика по мере уширения пиков в ходе анализа. Это делается автоматически до тех пор, пока обновление не будет отключено фиксированием временного параметра ширины пика.

Обновление значения ширины пика рассчитывается с учетом весовых коэффициентов следующим образом:

$$0,75 \times (\text{имеющаяся ширина пика}) + 0,25 \times (\text{ширина текущего пика})$$

Группировка

Группировка представляет собой средство, с помощью которого интегрирующее устройство сохраняет уширяющиеся пики в пределах эффективного диапазона фильтров распознавания пика для поддержания хорошей селективности.

Интегрирующий алгоритм не может бесконечно увеличивать значение ширины пика для уширяющихся пиков. В конечном счете, пики становятся настолько широкими, что не могут быть обнаружены с помощью фильтров распознавания пика. Чтобы преодолеть это ограничение, интегрирующий алгоритм группирует точки данных вместе, эффективно сужая пик при сохранении той же площади.

Когда данные сгруппированы, точки данных объединяются как удвоенные к степени объединения, т. е. группировка не производится = 1х; однократная группировка = 2х; двукратная группировка = 4х и т. д.

Параметры группировки основываются на скорости сбора данных и ширине пика. Интегрирующий алгоритм использует эти параметры, чтобы установить коэффициент группирования для получения соответствующего числа точек данных (см. Табл. 1 на странице 25).

Точки данных группируются по две, четыре, восемь и т. д. в зависимости от ожидаемой или экспериментально найденной ширины пика. Алгоритм группировки приводится в Табл. 1 на странице 25.

Таблица 1 Критерии группировки

Ожидаемая ширина пика	Используемые фильтры	Выполнение группировки
0 – 10 точек данных	Первый	Нет
8 – 16 точек данных	Второй	Нет
12 – 24 точек данных	Третий	Нет
16 – 32 точек данных	Второй	Один раз
24 – 48 точек данных	Третий	Один раз
32 – 96 точек данных	Третий, второй	Два раза
64 – 192 точек данных	Третий, второй	Три раза

Алгоритм распознавания пика

Интегрирующее устройство определяет начало пика с точки базовой линии посредством алгоритма распознавания пика. Алгоритм распознавания пика сначала сравнивает выходные данные фильтров распознавания пиков со значением исходной чувствительности к наклону, чтобы увеличить или уменьшить параметр угла наклона восходящего участка пика. Интегрирующее устройство объявляет точку, в которой значение параметра угла наклона восходящего участка становится ≥ 15 , точкой, обозначающей начало пика.

Начало пика

В Табл. 2 на странице 26 ожидаемая ширина пика определяет, какие значения фильтра наклона и кривизны сравниваются с чувствительностью к наклону. Например, когда ожидаемая ширина пика мала, числа фильтра 1 добавляются к значению параметра угла наклона восходящего участка. Если ширина ожидаемого пика увеличивается, то используются числа фильтра 2 и в конечном итоге фильтра 3.

Когда значение параметра угла наклона восходящего участка пика ≥ 15 , алгоритм признает, что пик может быть начат.

Таблица 2 Пошаговые значения для параметра переднего наклона

Выходные данные производных фильтров 1 – 3 по сравнению с чувствительностью к наклону	Фильтр 1	Фильтр 2	Фильтр 3
Наклон > чувствительность к наклону	+8	+5	+3
Кривизна > чувствительность к наклону	+0	+2	+1
Наклон < (-) чувствительность к наклону	-8	-5	-3
Наклон < чувствительность к наклону	-4	-2	-1
Кривизна < (-) чувствительность к наклону	-0	-2	-1

Конец пика

В Табл. 3 на странице 27 ожидаемая ширина пика определяет, какие значения фильтра наклона и кривизны сравниваются с чувствительностью к наклону. Например, когда ожидаемая ширина пика мала, числа фильтра 1 добавляются к накопителю нисходящего участка. Если ширина ожидаемого пика увеличивается, то используются числа фильтра 2 и в конечном итоге фильтра 3.

Когда значение параметра угла наклона нисходящего участка ≥ 15 , алгоритм признает, что пик может быть закончен.

Таблица 3 Пошаговые значения для параметра заднего наклона

Выходные данные производных фильтров 1 – 3 по сравнению с чувствительностью к наклону	Фильтр 1	Фильтр 2	Фильтр 3
Наклон < (-) чувствительность к наклону	+8	+5	+3
Кривизна < (-) чувствительность к наклону	+0	+2	+1
Наклон > чувствительность к наклону	-11	-7	-4
Наклон > чувствительность к наклону	-28	-18	-11
Кривизна > чувствительность к наклону	-0	-2	-1

Алгоритм распознавания вершины пика

Вершина пика распознается как самая высокая точка хроматограммы (пика) путем построения параболической аппроксимации, которая проходит через самые высокие значения точек данных.

Слившиеся пики

Слившиеся пики появляются, когда новый пик начинается до того, как был обнаружен конец предыдущего пика. Рисунок показывает, каким образом интегрирующее устройство обращается со слившимися пиками.

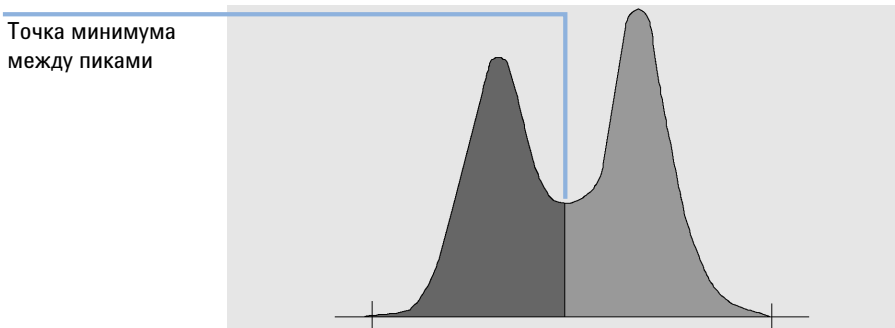


Рисунок 5 Слившиеся пики

Интегрирующая система обрабатывает слившиеся пики следующим образом:

- 1 подсчитывает площадь первого пика до точки минимума между пиками.
- 2 в точке минимума между пиками подсчет площади для первого пика прекращается и начинается подсчет для второго пика.
- 3 когда интегрирующее устройство обнаруживает конец второго пика, подсчет площади прекращается. Этот процесс может быть представлен как разделение слившихся пиков путем опускания перпендикуляра из точки минимума между пиками на базовую линию.

Плечи

Плечами являются неразделенные пики на переднем или заднем фронте большого пика. Плечо наблюдается, когда между пиками нет фактической впадины, то есть перехода отрицательного наклона в положительный. Пик может иметь любое количество плеч как на заднем, так и на переднем фронтах.

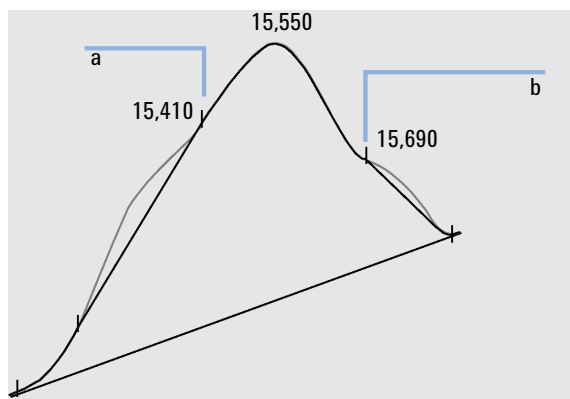


Рисунок 6 Уступы на пике

Изначально плечи определяются по кривизне пика посредством определения второй производной функции в точке. Когда кривизна достигает нуля, интегратор определяет точку перегиба, такие как точки а и b на Рис. 6 на странице 29

- Потенциальное плечо на переднем склоне определяется, если обнаруживается вторая точка перегиба перед вершиной пика. Если плечо подтверждается, то точкой начала плеча устанавливается точка с максимальной положительной кривизной перед точкой перегиба.
- Потенциальное плечо на заднем фронте определяется, если обнаруживается вторая точка перегиба перед концом пика или минимумом между пиками. Если плечо подтверждается, то точкой начала плеча устанавливается точка с минимальной первой производной после вершины пика.

Время удерживания определяется из точки плеча с максимальной отрицательной кривизной. С помощью программируемого события интегрирования интегрирующий алгоритм может также подсчитать площади плеч как обычных пиков, используя линии проекции на точки перегиба плеча пика.

Площадь плеча вычитается из площади основного пика.

Плечи на пике могут быть обработаны как обычные пики с помощью временных событий интегрирующего алгоритма.

Построение базовой линии по умолчанию

После завершения любого кластера пиков и обнаружения базовой линии интегратор запрашивает в алгоритме размещения базовой линии способ построения ломаной. Чтобы нормировать базовую линию и удерживать ее максимально низко, используются трапецевидные зоны и пропорциональные поправки высоты. Исходные данные алгоритма размещения базовой линии также содержат параметры из метода и файлов данных, определяющих детектор и методику, которую интегратор использует для оптимизации своих расчетов.

В самом простом случае интегратор строит базовую линию как последовательность отрезков прямой между:

- началом базовой линии;
- точками начала, вершины и конца пика;
- базовой линией пика.

Штриховые метки

Базовая линия

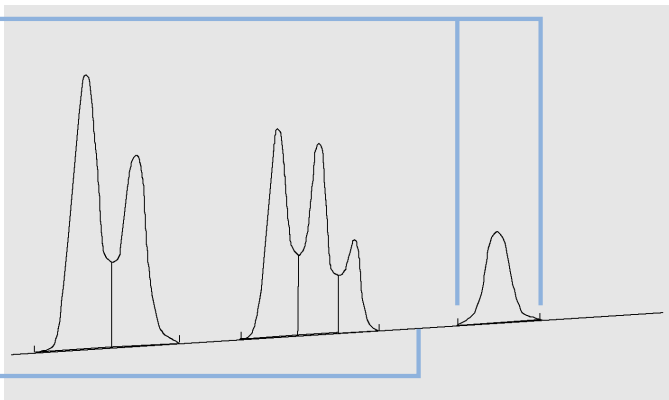


Рисунок 7 Построение базовой линии по умолчанию

Коды базовой линии

В результатах интегрирования в отчете каждому пику присваивается двух-, трех- или четырехзначный код, который описывает, как был проведен сигнал базовой линии.

Таблица 4 Четырехсимвольный код

Первый символ	Второй символ	Третий символ	Четвертый символ
Базовая линия в начале	Базовая линия в конце	Ошибка/метка пика	Тип пика

Коды базовой линии включаются также в таблицу **результатов ввода пробы** и во все шаблоны отчетов по умолчанию.

Результаты ввода пробы									
Пики		Сводка							
№	Название	Код БЛ	Описание сигнала	ВУ (мин)	Площадь (mAU)	Площадь%	Высота (mAU)	Высота%	
1	Nifedipin	BV	DAD1 A, Sig=235,10 Ref=5...	4,190	478,076	14,477	118,390	15,82	
2		BV	DAD1 B, Sig=254,10 Ref=5...	4,190	217,551	14,131	53,743	15,41	
3		VV	DAD1 C, Sig=350,20 Ref=5...	4,190	120,796	14,140	29,883	15,45	
4		BV	DAD1 B, Sig=254,10 Ref=5...	4,891	8,382	0,544	1,940	0,56	
5		VV	DAD1 A, Sig=235,10 Ref=5...	4,892	17,530	0,531	4,070	0,54	

Рисунок 8 Результаты ввода пробы

Сигнал: DAD1 A, Sig=235,10 Ref=550,60

ВУ [мин]	Тип	Ширина [мин]	Площадь	Высота	Площадь%
4,190	BV	0,06	478,08	118,39	14,48
4,892	VV	0,06	17,53	4,07	0,53
5,684	VV	0,07	2376,75	533,52	71,97
6,701	VB	0,07	429,95	92,23	13,02
Сумма			3302,31		

Рисунок 9 Пример. Таблица из краткого отчета о площадях пиков.

Первый и второй знаки

Первый знак описывает базовую линию в начале пика, а второй знак описывает базовую линию в конце пика.

- B** Пик начался или закончился на базовой линии.
- P** Пик начался или закончился, когда базовая линия находилась в провале.
- V** Пик начался или закончился на линии проекции с точки впадины.
- H** Пик начался или закончился на принудительно установленной горизонтальной базовой линии.
- F** Пик начался или закончился на принудительной точке.
- M** Пик был проинтегрирован вручную.
- U** Пик не был выявлен.

Дополнительные метки могут также быть добавлены (в порядке приоритета).

Символ 3

Третий символ описывает ошибки или метку пика:

- A** Интегрирование было прервано. Например, событием интегрирования Вкл./Выкл. или из-за окончания времени записи сигнала.
- D** Искривленный пик (плохая форма пика).

Пробел Обычный пик.

Символ 4

Четвертый символ описывает тип пика. Он выводится только для принудительных событий интегрирования и при интегрировании вручную. Например, если вы воспользовались событием интегрирования для выделения пика растворителя или с помощью интегрирования вручную исправили базовую линию или удалили пик.

- S** Пик растворителя.
- N** Отрицательный пик.
- +** Пик является результатом суммирования площадей.
- T** Базовая линия пика проведена по касательной (стандартная касательная).
- X** Базовая линия пика проведена по касательной (старая модель экспоненциальной касательной).
- E** Базовая линия пика проведена по касательной (новая модель экспоненциальной касательной).
- m** Базовая линия пика задана вручную.
- n** Отрицательный пик с базовой линией, заданной вручную.
- t** Базовая линия пика проведена по заданной вручную касательной.
- x** Базовая линия пика проведена по заданной вручную касательной (экспоненциальная касательная).
- R** Пересчитанный пик.
- f** Базовая линия пика проведена по касательной к переднему фронту.
- b** Базовая линия пика проведена по касательной к заднему фронту.
- F** Пик отделяется перпендикуляром к переднему фронту.
- B** Пик отделяется перпендикуляром к заднему фронту.
- U** Пик не связан с соединением.

Измерение площади пика

Заключительным шагом в интегрировании пика является определение его окончательной площади.

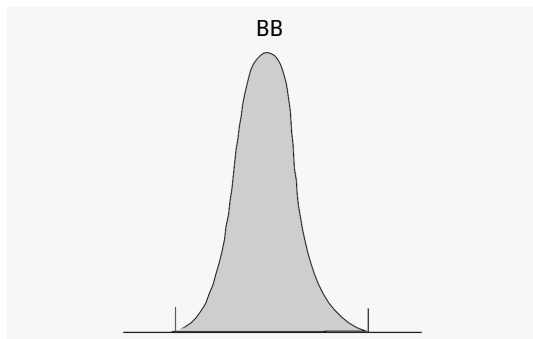


Рисунок 10 Измерение площади для пиков, начинающихся и заканчивающихся на базовой линии.

В случае простого изолированного пика площадь пика определяется суммарной площадью над базовой линией между началом и концом пика.

Определение площади

Площадь, которую интегрирующее устройство рассчитывает в процессе интегрирования, определяется следующими способами:

- для пиков, начинающихся и заканчивающихся на базовой линии (BB), как площадь над базовой линией между началом и концом пика, как на Рис. 10 на странице 34,
- для пиков, начинающихся и заканчивающихся на впадине (VV), как площадь над базовой линией, выделенная вертикальными линиями проекции из точек минимума между пиками, как на Рис. 11 на странице 35,

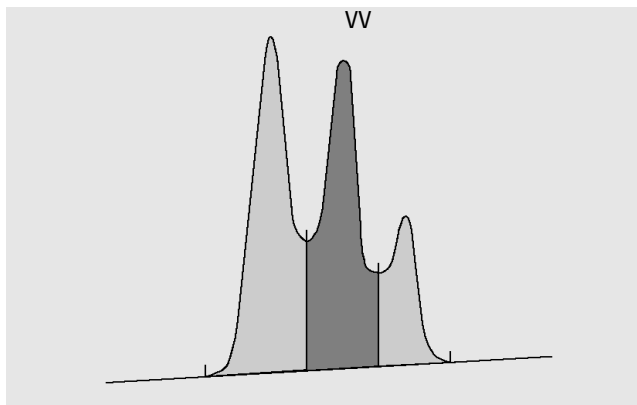


Рисунок 11 Измерение площади для пиков, начинающихся и заканчивающихся на точках минимумов между пиками.

- для пиков, выявленных по касательной (T), как площадь над обновленной базовой линией,
- для пиков растворителя (S), как площадь над горизонтальным продлением из последней обнаруженной точки базовой линии и под обновленной базовой линией, полученной для пиков, выявленных по касательной (T). Пик растворителя может увеличиваться слишком медленно, чтобы быть распознанным, или же в ходе анализа возможно появление группы пиков, которую следует обрабатывать как пик растворителя с множеством наездников. Обычно такой пик включает группу слившихся пиков, где один гораздо больше, чем остальные. Простая разметка линией проекции будет завышать результаты обработки последующих пиков, так как они, на самом деле, находятся на заднем склоне первого пика. При принудительном распознавании первого пика как пик растворителя остальная часть группы отделяется от заднего склона,

- отрицательные пики, которые встречаются ниже базовой линии, имеют положительную площадь, как показано на Рис. 12 на странице 36.

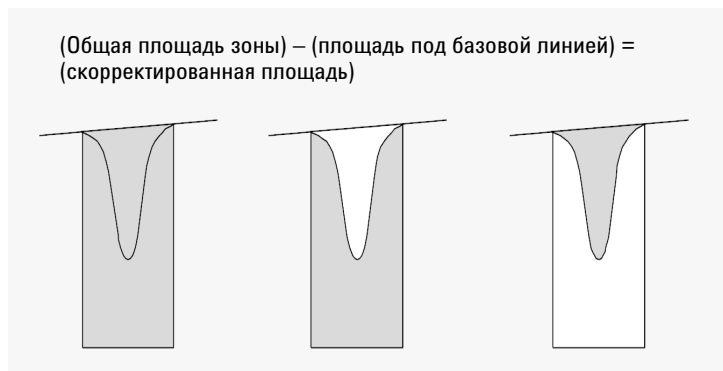


Рисунок 12 Измерение площади отрицательных пиков

Единицы измерения и коэффициенты пересчета

Хроматограмма представляет собой набор точек, которые могут быть либо исходными данными, либо данными интегрирования. В случае данных интегрирования каждая точка данных соответствует площади, которая выражается как *Высота* × *Время*. В случае исходных данных каждая точка соответствует высоте.

Таким образом, в случае данных интегрирования, высота — это расчетная величина, полученная делением площади на время, прошедшее с предшествующей точки данных. В случае исходных данных, площадь рассчитывается путем умножения высоты точки на время, прошедшее с предшествующей точки данных.

Расчеты интегрирования используют оба понятия. Интегратор использует следующие единицы измерения: *отклик детектора* × *секунды* для площади и *отклик детектора* для высоты. Это сделано, чтобы обеспечить общую базу для округления (когда это необходимо). Результаты измерений времени, площади и высоты выдаются в отчете в реальных физических единицах независимо от того, как они измеряются, рассчитываются и хранятся в программе.

Размещение базовой линии

Режимы коррекции базовой линии

В OpenLab CDS доступно несколько режимов исправления базовой линии. Они описываются в следующих разделах.

Режим коррекции базовой линии: классический

Пересечение происходит при снижении сигнала ниже уровня построенной базовой линии (точка а в разделе [Рис. 13](#) на странице 37).

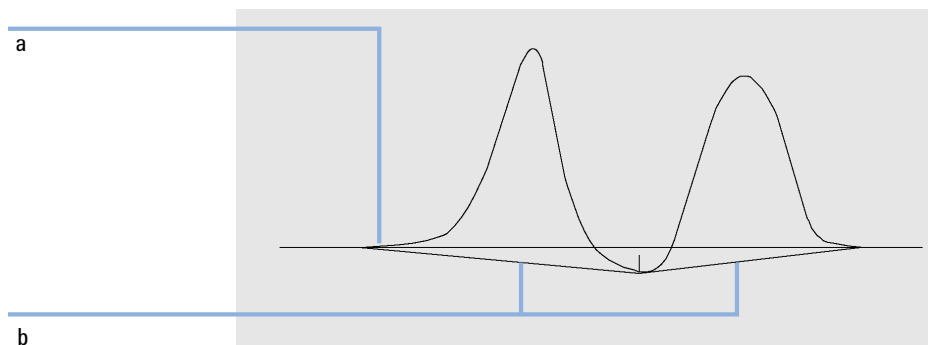


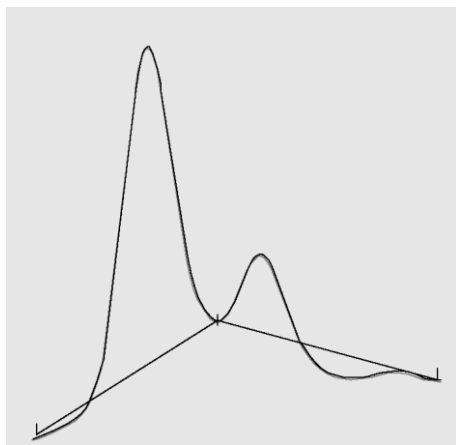
Рисунок 13 Провал базовой линии

Если происходит провал базовой линии, то обычно можно перестроить ее часть, как показано точками b в разделе [Рис. 13](#) на странице 37. Можно использовать следующие режимы исправления базовой линии для удаления всех провалов:

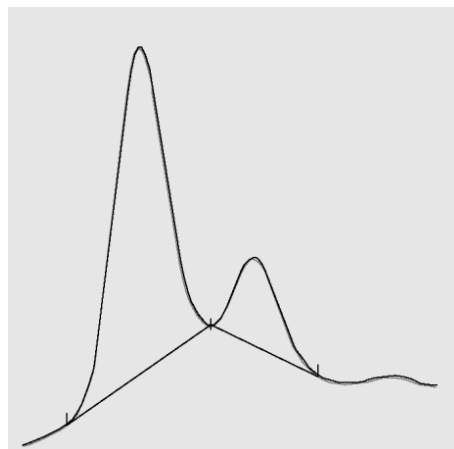
- **Без пересечений**
- **Расширенный**

Режим коррекции базовой линии: без пересечений

Когда выбран этот параметр, каждый кластер пиков исследуется на наличие провалов базовой линии. Если провалы обнаружены, то начальная или конечная (либо обе) точки пика смещаются до тех пор, пока не исчезнут все провалы.



Режим коррекции базовой линии
Классический



Режим коррекции базовой линии **Без пересечений**

ПРИМЕЧАНИЕ

Режим исправления базовой линии **Без пересечений** не доступен для пиков растворителя, а также для их пиков-наездников и уступов.

Режим коррекции базовой линии: дополнительно

В режиме расширенного исправления базовой линии интегратор пытается оптимизировать положение начала и конца пиков, заново проводит базовую линию для кластера пиков и удаляет провалы базовой линии (см. раздел «[Режим коррекции базовой линии: без пересечений](#)» на странице 38). Во многих случаях расширенное исправление базовой линии дает более стабильную базовую линию, которая менее зависима от чувствительности к наклону.

Отношение пика к седловине

Отношение высоты пика к высоте точки минимума между пиками (для краткости называемое отношением пика к седловине) является количественным параметром, оценивающим, как хорошо пик отделяется от пиков других соединений. Этот устанавливаемый пользователем параметр является частью режима улучшенного отслеживания базовой линии. Он используется для определения того, должны ли два пика, не разделенные до базовой линии, быть разделены перпендикуляром или базовой линией, проведенной через седловину. Интегратор рассчитывает это отношение из высот меньшего пика и седловины между пиками после коррекции на базовую линию. Когда отношение пика к седловине меньше значения, установленного пользователем, используется перпендикуляр. В противном случае базовая линия проводится из находящейся на базовой линии начальной точки первого пика до седловины и из седловины до находящейся на базовой линии конечной точки второго пика (сравните «Режим коррекции базовой линии: без пересечений» на странице 38 с Рис. 14 на странице 39).

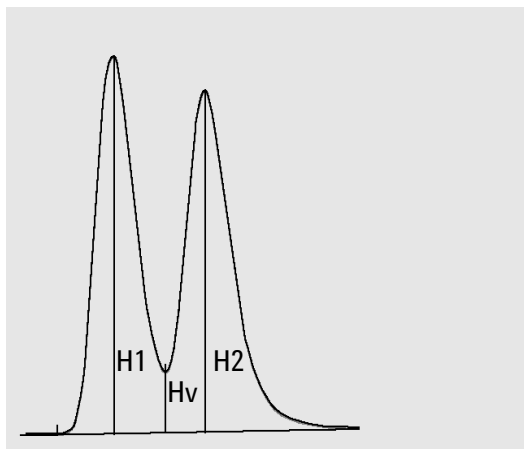


Рисунок 14 Отношение пика к седловине

Отношение пика к седловине рассчитывается по следующим уравнениям:

$$H1 \geq H2, \text{ отношение пика к седловине} = H2/Hv$$

и

$$H1 < H2, \text{ отношение пика к седловине} = H1/Hv$$

Рис. 15 на странице 40 показывает, как установленное пользователем значение отношения пика к седловине влияет на базовую линию.



Рисунок 15 Влияние отношения высот пика и точки минимума на базовую линию

Отделение по касательной

Отделяющая касательная является видом базовой линии, построенной для пиков на переднем или заднем склоне основного пика. Для этого метода требуется, чтобы два пика не разделялись базовой линией.

Следующие рисунки иллюстрируют метод отделения по касательной:

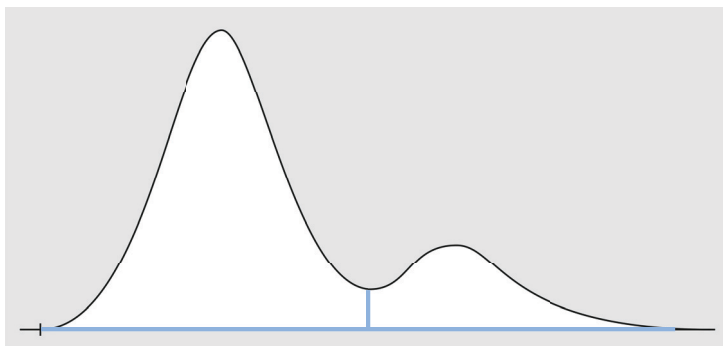


Рисунок 16 Пики без касательной, разделенные перпендикуляром

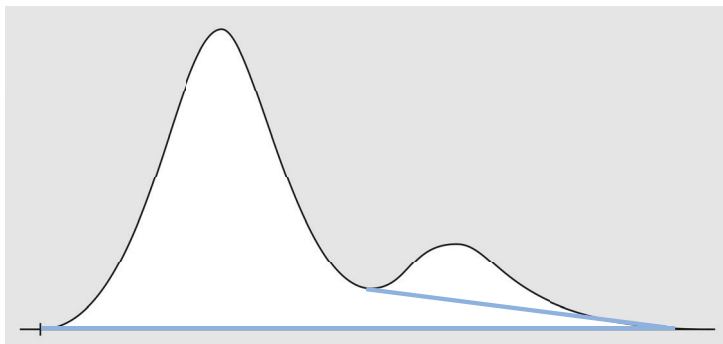


Рисунок 17 Отделение по касательной сзади

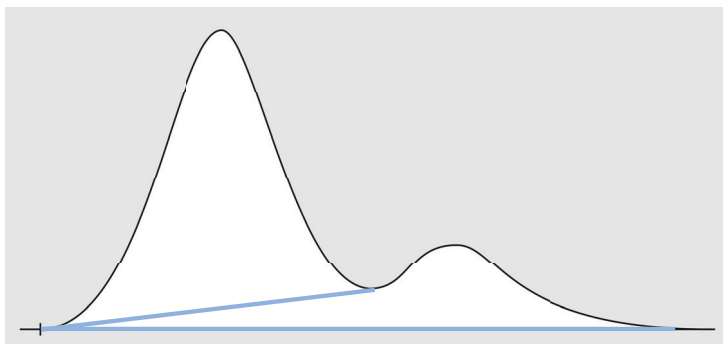


Рисунок 18 Отделение по касательной спереди

Критерии отделения

Следующие критерии определяют, какая базовая линия используется для расчета площади пика-наездника, выходящего на переднем или заднем фронте основного пика.

- Отношение высоты для касательной (**Отношение высоты для касательной на переднем фронте** или **Отношение высоты для касательной на заднем фронте**)
- **Отношение седловины для касательной**

Отношением высоты для касательной является отношение исправленной на высоту базовой линии высоты основного пика (H_p на рисунке ниже) к исправленной на высоту базовой линии высоте пика-наездника (H_c). Чтобы базовая линия пика-наездника была проведена по касательной к основному пику, заданное значение должно быть ниже этой величины. Чтобы для всего анализа отключить выделение пиков-наездников с помощью экспоненциальной касательной к основному пику, задайте этому параметру очень большое значение или сделайте его равным нулю.

Отношением седловины для касательной является отношение высоты пика-наездника над базовой линией (H_c на рисунке ниже) к седловине между пиками над базовой линией (H_v). Чтобы базовая линия пика-наездника была проведена по касательной к основному пику, заданное значение должно быть выше этой величины.

ПРИМЕЧАНИЕ

Если для серии пиков-наездников на хвосте основного пика хотя бы один из этих критериев не соответствует действительности, все пики-наездники после последнего из них, для которого оба этих критерия соответствуют действительности, будут выделены с помощью перпендикуляра к базовой линии, а не с помощью касательной к основному пику.

ПРИМЕЧАНИЕ

Эти критерии не используются, если активно временное событие для выделения с помощью касательной к основному пику или если основной пик сам является пиком-наездником. Базовая линия между основным пиком и пиком-наездником должна иметь тип **Седловина** (см. «Коды базовой линии» на странице 31).

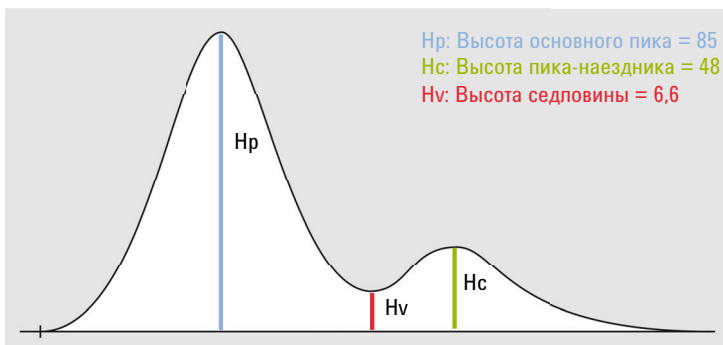


Рисунок 19 Пример расчета значений для критериев отделения

Отношение высоты для касательной = H_p / H_c

Отношение седловины для касательной = H_c / H_v

где:

H_p Исправленная на высоту базовой линии высота основного пика.

H_v Высота седловины над базовой линией.

H_c Исправленная на высоту базовой линии высота пика-наездника.

Отделение по касательной сзади

Чтобы выделить с помощью касательной пик-наездник на заднем фронте основного пика, задайте следующие параметры.

- Отношение высоты для касательной на заднем фронте = $85 / 48 = 1,77$
Введите для событий интегрирования значение ниже 1,77.
- Отношение седловины для касательной = $48 / 6,6 = 7,3$
Введите для событий интегрирования значение выше 7,3.

Отделение по касательной спереди

В этом случае пиком-наездником является первый из пиков, а основным — второй. Поэтому чтобы выделить с помощью касательной пик-наездник на переднем фронте основного пика, задайте следующие параметры.

- Отношение высоты для касательной на переднем фронте = $48 / 85 = 0,56$
Введите для событий интегрирования значение ниже 0,56.
- Отношение седловины для касательной = $85 / 6,6 = 12,9$
Введите для событий интегрирования значение выше 12,9.

Режимы отделения по касательной

Четыре модели доступны для расчета площадей соответствующих пиков, когда возможна отделяющая касательная:

- Экспоненциальная кривая
- Новое экспоненциальное отделение
- Прямолинейное отделение
- Сочетание расчетов экспоненциального и прямолинейного отделений для лучшей аппроксимации (стандартные отделения)

Экспоненциальная кривая

Эта модель отделения, используя экспоненциальное уравнение, проводит кривую через начало и конец пика-наездника. Кривая проходит под каждым пиком-наездником, которые сопровождают основной пик. Площадь под отделяющей кривой отнимается от пиков-наездников и добавляется к площади основного пика.

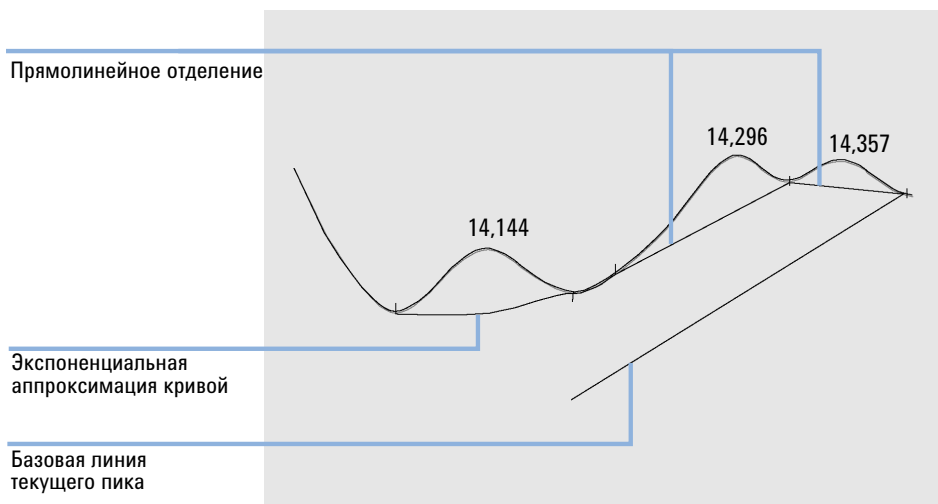


Рисунок 20 Экспоненциальная касательная

Новая экспоненциальная кривая

Эта модель отделения проводит кривую, используя экспоненциальное уравнение, приблизительно описывающее передний или задний склон большого пика. Кривая проходит под одним или более пиками, которые сопровождают основной пик (пики-наездники). Площадь под отделяющей кривой отнимается от пиков-наездников и прибавляется к основному пику. При использовании такой экспоненциальной модели можно отделить больше одного пика-наездника. Все пики пика-наездника после первого разделяются линиями проекции, начиная с конца первого пика-наездника и спроецированными только на отделяющую кривую.

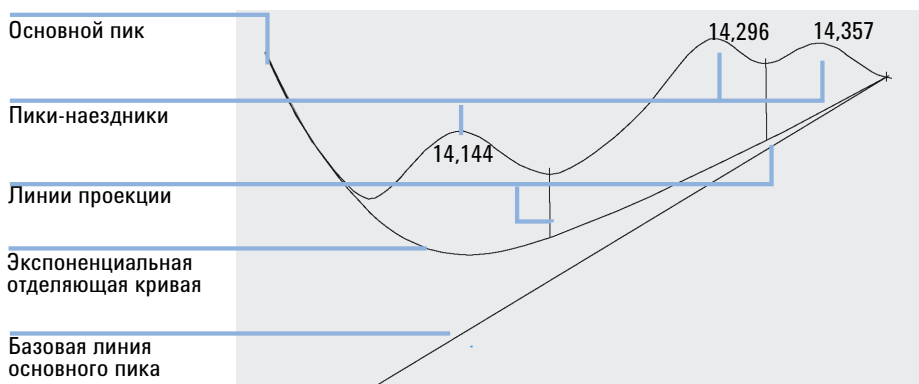


Рисунок 21 Новое экспоненциальное отделение

Прямолинейное отделение

Эта модель отделения проводит прямую линию через начало и конец пика-наездника. Высота начала пика-наездника корректируется с учетом наклона основного пика. Площадь под прямой линией отнимается от пиков-наездников и прибавляется к основному пику.

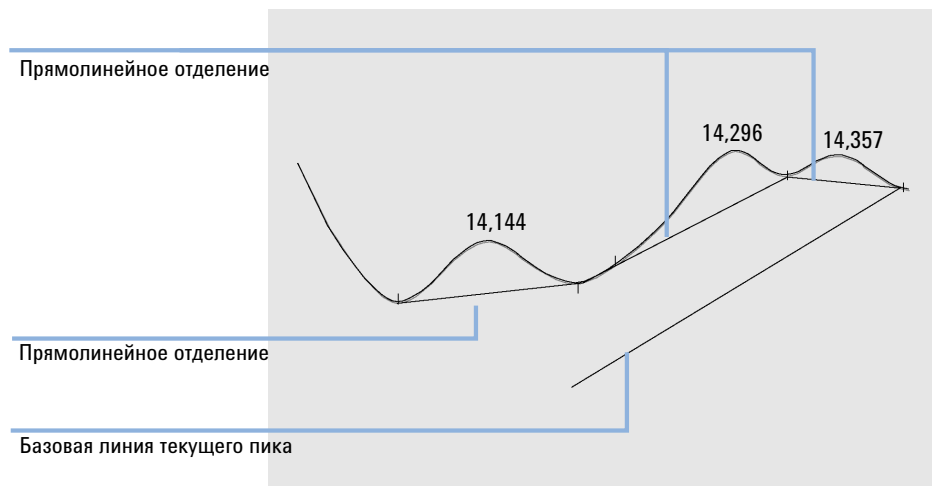


Рисунок 22 Прямолинейное отделение

Стандартное

Этот метод по умолчанию, где для лучшей аппроксимации применяется сочетание экспоненциальной и прямой касательной.

Переход от экспоненциальной касательной к прямой выполняется так, чтобы исключить резкие перепады высот или площадей.

- Когда сигнал значительно выше базовой линии, для аппроксимации заднего склона применяется экспонента.
- Когда сигнал находится в пределах конуса базовой линии, для аппроксимации заднего склона применяется прямая.

В сочетании методов применяется отделение по экспоненциальной или прямой касательной.

Расчет экспоненциальной кривой для отделений

Следующее уравнение используется для расчета экспоненциальной касательной для отделения пиков-наездников:

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

где:

H_b	Высота экспоненциальной касательной для отделения пика-наездника в момент времени t_R
H_0	Высота (над базовой линией) начала экспоненциальной касательной для отделения пика-наездника
B	Коэффициент ослабления экспоненциальной функции
t_0	Время, соответствующее началу экспоненциальной касательной для отделения пика-наездника
t_R	Время удерживания
A	Наклон базовой линии основного пика
C	Смещение базовой линии основного пика

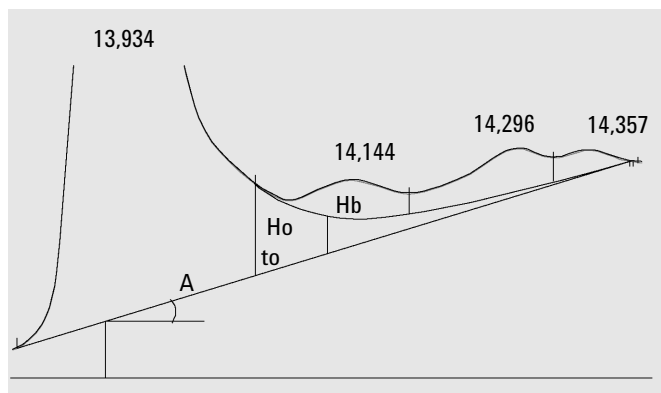


Рисунок 23 Значения, используемые для подсчета экспоненциального отделения

События интегрирования

Доступные события интегрирования разделены на следующие группы.

- Исходные события интегрирования применяются с начала интегрирования. Их можно найти как значения по умолчанию в подразделе **Стандартные** раздела **События интегрирования** метода обработки. Эти события нельзя удалить, можно только изменить их значения.
- Временные события начинаются после начала интегрирования. Временные события могут изменять значения исходных событий, а также включать и выключать дополнительные параметры интегрирования. Их можно добавить в подраздел **Стандартные** раздела **События интегрирования** метода обработки.
- События интегрирования, которые всегда применяются ко всем сигналам, можно задать в подразделе **Дополнительно** раздела **События интегрирования**.

События стандартного интегрирования: исходные события

Чувствительность к фронту

Задаёт значение наклона сигнала, используемое для идентификации точек начала и конца пика во время интегрирования.

Значение можно задать либо для отдельного сигнала, либо для всех сигналов совместно.

Когда наклон сигнала превышает значение **Чувствительность к фронту**, устанавливается начальная точка пика, а когда наклон сигнала становится меньше значения **Чувствительность к фронту**, устанавливается конечная точка пика.

Ширина пика

Регулирует селективность интегратора при выделении пиков из шума базовой линии. Этот параметр должен быть равен ширине на половине высоты первого ожидаемого пика (за исключением пика растворителя).

Интегратор обновляет значение ширины пика по мере необходимости для оптимизации интегрирования.

Если выбранная начальная ширина пика оказывается слишком маленькой, то шум может быть принят за пики. Если одновременно присутствуют и широкие, и узкие пики, то можно использовать события, программируемые во время выполнения, чтобы настроить ширину для определенных пиков. Иногда пики становятся значительно шире в ходе анализа, например в режимах изотермической ГХ и изократической ВЭЖХ. Чтобы это компенсировать, интегратор автоматически обновляет значение ширины пика, когда пики расширяются в ходе анализа, если не отключить обновление временным событием.

Обновление значения ширины пика рассчитывается с учетом весовых коэффициентов следующим образом:

$$0,75 \times (\text{текущее значение ширины пика}) + 0,25 \times (\text{ширина текущего пика})$$

Отбраковка по площади

Задаёт минимальную площадь пика, представляющего интерес.

Все пики с площадью меньше минимальной не обрабатываются. Интегратор исключает все пики, которые после исправления базовой линии имеют значение меньше, чем установленное в параметре

Отбраковка по площади. Значение параметра **Отбраковка по площади** должно быть больше или равно нулю.

ПРИМЕЧАНИЕ

Параметр **Отбраковка по площади** игнорируется при ручном интегрировании.

Отбраковка по площади%

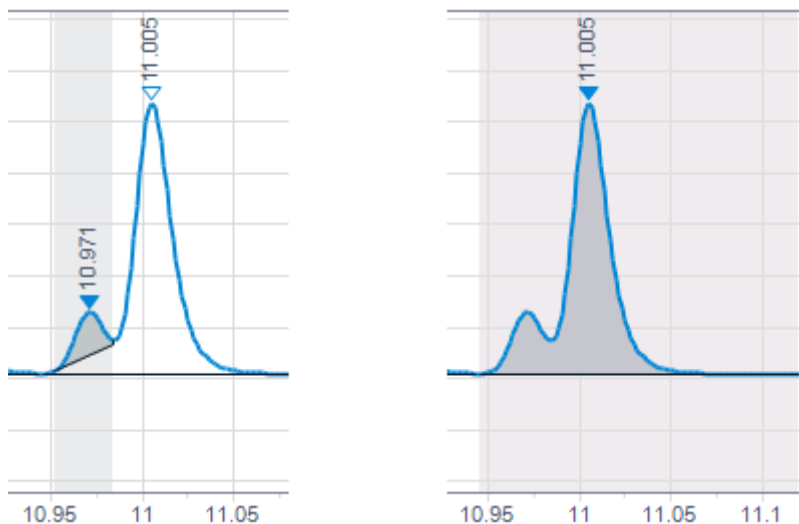
Задаёт минимальное отношение площади пика, представляющего интерес, к сумме площадей всех пиков хроматограммы.

Пики, для которых отношение площади пика к сумме площадей всех пиков хроматограммы меньше минимальной, не включаются в отчет.

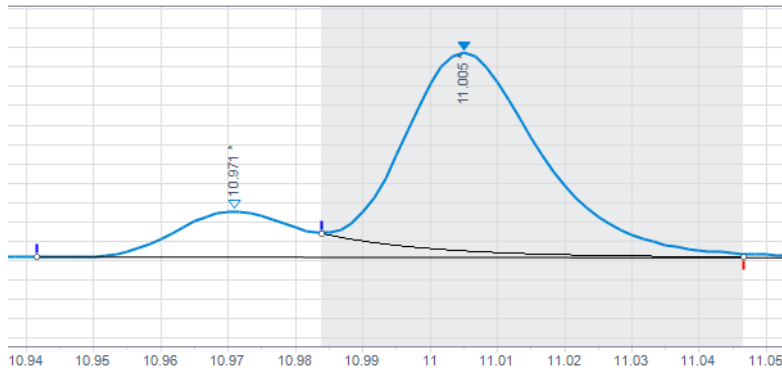
Интегратор отбрасывает все пики, для которых после коррекции на базовую линию отношение площади пика к сумме площадей всех пиков хроматограммы меньше минимальной.

Введите ожидаемую относительную площадь наименьшего пика. Эту информацию можно получить, проинтегрировав файл данных со значениями отбраковки, по высоте и площади равными 0. Выберите подходящее минимальное значение из столбца **Относительная площадь** в результатах интегрирования.

Если пик, игнорируемый из-за малой относительной площади, является наездником, его площадь будет включена в площадь основного пика.



Если для основного пика относительная площадь ниже предельного значения, а для наездника — выше, основной пик не будет отброшен, так как от него зависит расчет пика-наездника и построение базовой линии.



Отбраковка по высоте

Задаёт минимальную высоту пика, представляющего интерес.

Все пики с высотой меньше минимальной не обрабатываются. Интегратор исключает все пики, которые после исправления базовой линии имеют меньшее значение, чем установленное в параметре **Отбраковка по высоте**.

ПРИМЕЧАНИЕ

Параметр **Отбраковка по высоте** игнорируется при ручном интегрировании.

Режим плечевых пиков

Задаёт исходный метод поиска плеча на пике.

Можно выбрать одно из следующих значений.

Выкл.	Уступы не определяются.
Опустить базовую линию	Уступы интегрируются с использованием перпендикуляра.
Касательная базовая линия	Уступы интегрируются с использованием касательной базовой линии.

Этот параметр определяет, как приложение обрабатывает пики, не разделённые базовой линией. Дополнительные сведения о касательных см. в разделе «Отделение по касательной» на странице 40. Когда используется касательная базовая линия, можно выбирать разные режимы (см. раздел «Режимы отделения по касательной» на странице 44).

Выбор ширины пика

Выберите значение, которое обеспечивает достаточную фильтрацию для предотвращения шума, принимаемого за пик, без искажения информации в сигнале.

- Чтобы выбрать подходящую исходную ширину для интересующего одиночного пика, воспользуйтесь в качестве базового значения шириной пика у основания.
- Чтобы выбрать подходящую исходную ширину для нескольких интересующих пиков, выберите исходную ширину пика не больше ширины самого узкого из пиков. Это позволит обеспечить оптимальную селективность для этих пиков.

Отбраковка по высоте и ширина пика

Ширина пика и исключаемая высота (задаётся параметром **отбраковка по высоте**) очень важны в процессе интегрирования. Изменяя эти значения, можно достигнуть разных результатов.

- Если нужно определить относительно преобладающие компоненты на фоне высокого шума и провести их количественный анализ, увеличьте отбраковку по высоте и ширину пика. Увеличение ширины пика улучшает фильтрацию шумов, а повышение отбраковки по высоте обеспечивает игнорирование случайных шумов.

- Если нужно определить следовые количества компонентов, высота которых приближается к уровню шума (и провести количественный анализ), уменьшите отбраковку по высоте и ширину пика. Уменьшение ширины пика ослабляет фильтрацию сигнала, а понижение отбраковки по высоте гарантирует, что небольшие пики не будут исключены из-за недостаточной высоты.
- Когда в анализе имеются пики с различной шириной, установите ширину пика в соответствии с самыми узкими пиками и уменьшите отбраковку по высоте, чтобы гарантировать, что широкие пики не будут исключены из-за сниженной высоты.

Настройка интегрирования

Часто бывает полезно изменить значения для параметров чувствительности к фронту, ширины пика, исключаемой высоты (отбраковки по высоте) и отбраковки по площади (отбраковки по площади), чтобы настроить интегрирование. Рисунок ниже показывает, как эти параметры влияют на интегрирование пяти пиков на сигнале.

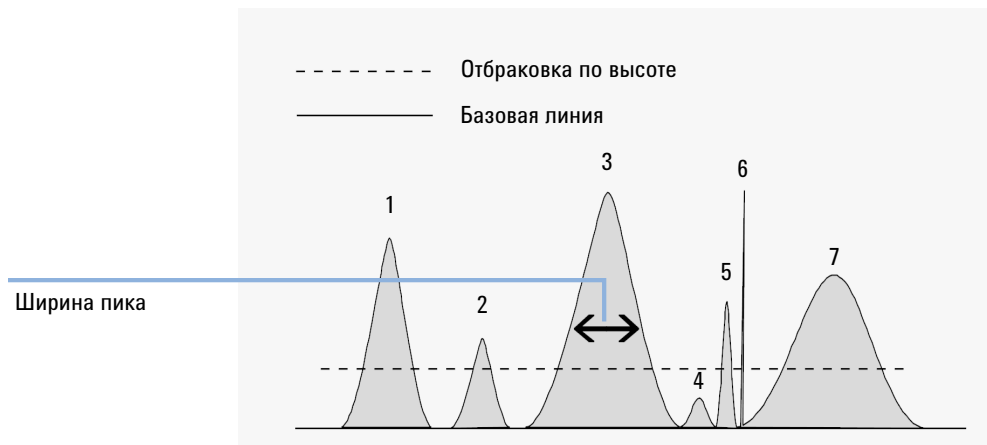


Рисунок 24 Использование исходных параметров

Пик интегрируется, только если выполняются условия всех четырех параметров интегрирования. Если используется ширина пика, соответствующая пику 3 и показанные значения отбраковки по площади и чувствительности к фронту, то интегрируются только пики 1, 3 и 7.

Пик 1 интегрируется, так как выполняются условия всех четырех параметров интегрирования.

- Пик 2** исключается, поскольку его площадь ниже установленного значения отбраковки по площади.
- Пик 3** интегрируется, так как выполняются условия всех четырех параметров интегрирования.
- Пик 4** не интегрируется, поскольку его высота ниже отбраковки по высоте.
- Пик 5** исключается, поскольку его площадь ниже установленного значения отбраковки по площади.
- Пик 6** не интегрируется, поскольку становится невидимым в результате фильтрации и группировки.
- Пик 7** интегрируется.

Таблица 5 Значения исключаемой высоты и площади

Параметр интегрирования	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5	Пик 7
Отбраковка по высоте	Выше	Выше	Выше	Ниже	Выше	Выше
Отбраковка по площади	Выше	Ниже	Выше	Ниже	Ниже	Выше
Пик интегрируется	Да	Нет	Да	Нет	Нет	Да

События стандартного интегрирования: временные события

OpenLab CDS предлагает набор временных событий, которые позволяют выбрать режимы интегратора для определения базовой линии по внутреннему алгоритму или согласно определению пользователя. Эти временные события могут использоваться для настройки построения базовой линии, если стандартный алгоритм построения не подходит. Например, пользователь может создать новый тип события суммирования площади (см. **Суммирование площади отрезками**), который не изменяет результаты стандартного события «СумПлощ». Такие события могут быть полезны для суммирования конечных площадей пика и для коррекции кратковременных и продолжительных отклонений базовой линии.

Значение можно задать либо для отдельного сигнала, либо для всех сигналов совместно.

Отбраковка по площади

См. раздел Начальные события («События стандартного интегрирования: исходные события» на странице 48).

Суммирование площади

Определяет точки (**Вкл./Выкл.**), между которыми интегратор суммирует площади.

Время удерживания/миграции пика, полученного суммированием площади, является средним арифметическим его времени начала и окончания. Если событие **Суммирование площади вкл.** происходит после начала пика, но до его вершины, то в сумму включается весь пик. Если оно происходит после вершины пика, но до его окончания, то пик усекается, и суммирование площади начинается немедленно.



Рисунок 25 Событие Суммирование площади вкл. после вершины, но до конца пика

Если событие **Суммирование площади выкл.** происходит после начала пика, но до его вершины, то суммирование площади прекращается немедленно. Точка на сигнале, где это произошло, становится точкой минимума. Если событие **Суммирование площади выкл.** происходит после вершины пика, то оно откладывается до конца пика.



Рисунок 26 Событие Суммирование площади выкл. после начала, но до вершины пика

Суммирование площади отрезками

Это событие позволяет задать последовательные интервалы суммирования площади без потери площади или временных интервалов.

Это событие подобно событию **Суммирование площади**, но позволяет определять смежные интервалы суммирования площади без потери временных интервалов и площади интегрируемых пиков. Пик разделяется в точке, где задается это событие. Суммирование площади начинается и заканчивается точно в соответствии с заданными интервалами

Суммирование площади отрезками.

Время удерживания пика при суммировании площади отрезками равно среднему значению временного интервала. Время удерживания не меняется в ходе идентификации или повторной калибровки. Оно может лишь слегка смещаться, поскольку интегратор обрабатывает точки данных только между событиями начала и конца суммирования площади. Таким образом, время удерживания может меняться не более чем на время между двумя точками данных.

Используйте параметр **Начало**, чтобы определить время начала для каждого отрезка суммирования площади. Следующее время начала используется как время конца для предыдущего временного отрезка, и поэтому можно использовать несколько событий начала одно за другим.

Параметр **Старт-отрПЛ.** определяет начало интегрирования временного отрезка, на котором любая отрицательная площадь (ниже установленной базовой линии) вычитается из площади отрезка.

Параметр **Конец** определяет конец последнего временного отрезка. При расчете площади временного отрезка не учитываются площади ниже установленной базовой линии. Если далее не идут другие события суммирования площади отрезками, то интегратор возобновляет обычное обнаружение пиков.

В пределах диапазона между событиями **Начало** и **Конец** базовая линия всегда представляет собой прямую без изменения направления. Только после конечной точки (по крайней мере на 0,001 min позже) можно снова вносить в базовую линию долгосрочные изменения с помощью событий **Установить базовую линию из интервала**, **Установить низ базовой линии из диапазона** и **Использовать базовую линию из интервала**.

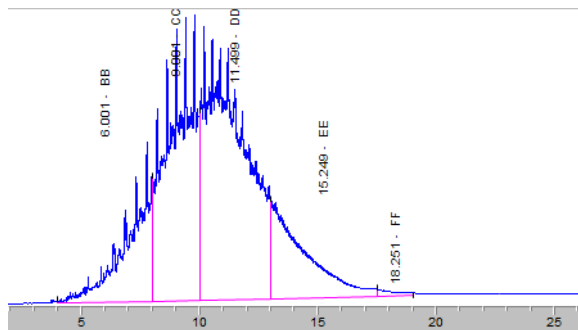


Рисунок 27 Пример. Суммирование площади отрезками

На рисунке выше показан пример с использованием следующих временных событий.

Таблица 6 Построение базовой линии

Время	Событие	Параметр
4 min	Установить базовую линию из интервала	+2 min
22 min	Установить базовую линию из интервала	+4 min

Таблица 7 Суммирование площади отрезками

Время	Событие	Параметр
4 min	Суммирование площади отрезками	Начало
8 min	Суммирование площади отрезками	Начало
10 min	Суммирование площади отрезками	Начало
13 min	Суммирование площади отрезками	Начало
17,5 min	Суммирование площади отрезками	Начало
19 min	Суммирование площади отрезками	Конец

Ширина пика автоматиче- ски

Включает автоматическое обновление ширины для следующих пиков. Восстанавливается предыдущая ширина пика и возобновляется отслеживание ширины по ранее обнаруженным пикам.

**Базовая
линия через
седловины**

Устанавливает точки (**Вкл./Выкл.**), между которыми интегратор обновляет базовую линию в каждой точке минимума между пиками.

В результате повторяющегося сброса базовой линии могут обрезаться углы пиков. Такие углы включаются в отрицательную площадь и уменьшают общую измеренную площадь пиков.

Данная функция полезна, когда необходимо обновлять базовую линию в каждой из точек минимума между пиками-наездниками широкого пика малой высоты.

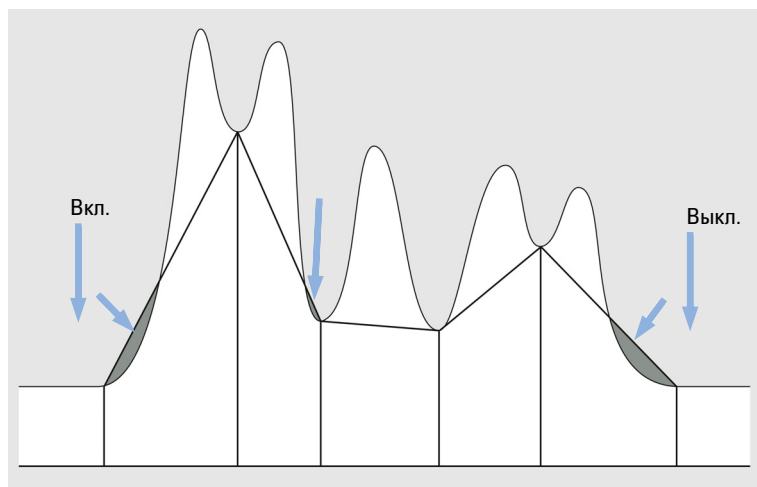


Рисунок 28 Событие Базовая линия через седловины

Базовая линия назад

Задаёт точку, в которой стандартный интегратор продлевает базовую линию по горизонтали назад из рассчитанной точки базовой линии.

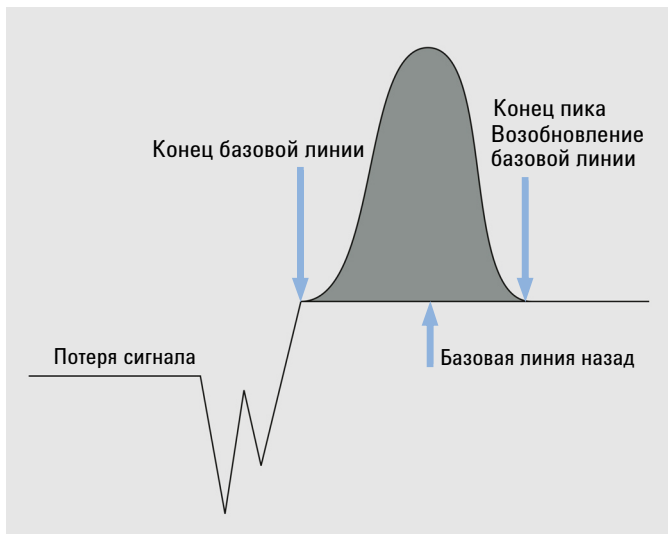


Рисунок 29 Событие Базовая линия назад

Удерживание базовой линии

Горизонтальная базовая линия проводится на высоте установленной базовой линии от того момента, где включено событие удерживания базовой линии, до момента, где это событие выключено.

Базовая линия через следующую седловину

Устанавливает точку, в которой интегратор обновляет базовую линию на следующем минимуме между пиками и затем автоматически отменяет эту функцию.

Эта функция полезна для групп объединенных пиков, которые предположительно являются пиками-наездниками или расположены в отдельных кластерах близко друг к другу. Эта функция игнорируется при суммировании площади.

Базовая линия здесь

Устанавливает точку (времени), в которой интегратор задает базовую линию по текущей высоте точки данных, если сигнал находится на пике.

Если сигнал находится на базовой линии, то данная функция игнорируется и используется обнаруженная базовая линия.

Обнаружение уступов

Определяет точки (**Вкл./Выкл.**) между которыми интегратор начинает и заканчивает обнаружение уступов.

Уступы обнаруживаются в соответствии с заданным значением параметра **Режим уступов**. См. раздел «События стандартного интегрирования: исходные события» на странице 48.

Фиксированная ширина пика

Устанавливает ширину пика и отключает ее автоматическое обновление для следующих пиков. Для достижения хорошей производительности задавайте значение, близкое к фактической ширине пиков на половине высоты.

Отбраковка по высоте

См. раздел Начальные события («События стандартного интегрирования: исходные события» на странице 48).

Интегрирование

Определяет точки (**Вкл./Выкл.**) между которыми интегратор начинает и останавливает интегрирование.

Пики, появляющиеся во время между выключением и включением интегратора, игнорируются.



Рисунок 30 Событие Интегрирование

Базовая линия проводится из последней рассчитанной точки, включая все сбросы в результате провала. Все другие функции интегратора наряду с заданными изменениями ширины пика, порогом и отбраковки по площади игнорируются после выключения интегратора. В точках **Вкл.** и **Выкл.** точка базовой линии устанавливается заново.

В заданный момент перезапуска интегратора устанавливается новая точка базовой линии на уровне текущего сигнала.

Данная функция оказывается полезной, если нужно пропустить некоторые части хроматограммы/электрофореграммы или исключить искажения базовой линии.

Максимальная площадь

Определяет площадь наибольшего анализируемого пика.

Все пики с площадью больше максимальной не обрабатываются. Интегратор исключает все пики, которые после исправления базовой линии имеют большее значение, чем установленное в параметре «Максимальная площадь».

Например, можно использовать это событие, чтобы исключить из результатов интегрирования пик растворителя в хроматограмме ГХ, но включить его пики-наездники.

Максимальная высота

Определяет высоту наибольшего анализируемого пика.

Все пики с высотой больше максимальной не обрабатываются. Интегратор исключает все пики, которые после исправления базовой линии имеют большее значение, чем установленное в параметре «Максимальная высота».

Например, можно использовать это событие, чтобы исключить из результатов интегрирования пик растворителя в хроматограмме ГХ, но включить его пики-наездники.

Отрицательный пик

Определяет точки (**Вкл./Выкл.**) между которыми интегратор распознает отрицательные пики.

При распознавании отрицательных пиков интегратор перестает автоматически сбрасывать базовую линию после провала. С этого момента любой провал базовой линии будет интегрироваться, считая установленную базовую линию за ноль. Площади строятся относительно этой базовой линии и даются с абсолютными значениями.

Функция отрицательного пика может использоваться, только если достоверно известно, что дрейф базовой линии мал по сравнению с размером пика, поскольку базовая линия строится от рассчитанной точки базовой линии в начале кластера пиков до установленной базовой линии в конце пика.

ПРИМЕЧАНИЕ

Суммирование площади автоматически выключается, когда активируется событие **Отрицательный пик вкл.**

Во время обнаружения отрицательных пиков также выключается отделение по касательной. Такие пики разделяются линией проекции.

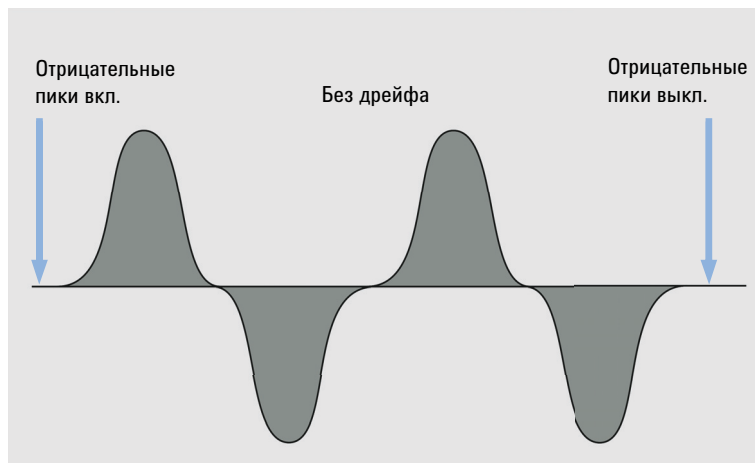


Рисунок 31 Событие Отрицательный пик

Установить базовую линию из интервала

Использует диапазон точек данных для расчета статистически значимых точек базовой линии в середине временного интервала.

Указанное значение представляет собой временной интервал, в который входит заданный момент времени. Оно задает диапазон, используемый для определения точки базовой линии. Сведения о статистических расчетах базовой линии см. в разделе «Режимы коррекции базовой линии» на странице 37.

Если задано значение 0, то точкой базовой линии станет ближайшая точка данных хроматограммы без проведения статистических расчетов.

Отрицательное значение параметра эквивалентно значению

Использовать базовую линию из интервала = статистический алгоритм расчета базовой линии не применяется.

Пользователь может указать область на хроматограмме для расчета базовой линии. В идеале эта область должна быть свободна от химического фона и может содержать только шум.

Если с помощью параметра **Установить базовую линию из интервала** определены две точки (например, в начале и конце хроматограммы), то базовая линия проводится между ними по прямой.

Установить низ базовой линии из интервала

Этот параметр аналогичен параметру **Установить базовую линию из интервала**, но в нем используется наименее вероятная точка базовой линии, выше которой могут размещаться на 30 % больше точек данных. Таким образом предельно сокращается провал базовой линии.

Если область хроматограммы для расчетов содержит избыточный химический шум или всплески электронного шума, используйте параметр **Установить низ базовой линии из интервала** вместо **Установить базовую линию из интервала**.

Значение параметра **Установить низ базовой линии из интервала** рассчитывается путем вычитания одной сигмы (стандартное отклонение шума) из значения μ для параметра **Установить базовую линию из интервала**.

Режим плечевых пиков

См. раздел Начальные события («События стандартного интегрирования: исходные события» на странице 48).

Чувствительность к фронту

См. раздел Начальные события («События стандартного интегрирования: исходные события» на странице 48).

Пик растворителя

Пики выше заданного наклона в единицах мВ/с определяются как пики растворителя, находящиеся вне диапазона аналого-цифрового преобразования.

К пикам с размытым задним фронтом автоматически применяется отделение по касательной; не требуется переключение на событие «Прямая касательная».

Если отключено обнаружение пика растворителя, то вместо касательной для таких пиков используются линии проекции.

Разделить пик

Определяет точку, где происходит разделение пика по линии проекции.

ПРИМЕЧАНИЕ

Событие **Разделить пики** нельзя использовать, пока включено событие **Подсчет площади**. Чтобы разделить пики, пока включено событие **Подсчет площади**, воспользуйтесь соответствующим событием ручного интегрирования.

Событие **Разделить пики** не умеет отделять дочерние пики.

**Касательная
сзади**

Определяет начало или конец отделения по касательной.

Вкл.

Определяет точку, в которой интегратор устанавливает отделение по касательной для заднего фронта следующего пика. Все пики над касательной интегрируются по вновь проведенной базовой линии. Касательная проводится из точки минимума перед небольшим пиком в точку после него, где градиент сигнала детектора равен градиенту касательной. Для события «Прямая касательная» можно задать любое время в пределах пика. Кроме того, пик обозначается как пик растворителя.

Выкл.

Останавливает отделение по касательной после завершения текущего пика или если в заданном интервале пики не обнаружены (тогда в следующем кластере не будет случайно обозначен пик растворителя).

**Режим
касательной**

Для оптимального расчета площади пиков доступны следующие модели.

- Экспонента (Рис. 20 на странице 44)
- Новая экспонента (Рис. 21 на странице 45)
- Стандартное (Рис. на странице 46)
- Прямая (Рис. 22 на странице 46)

Неопределенные пики

В некоторых случаях при построении базовой линии небольшие области остаются выше базовой линии и ниже сигнала, но не входят ни в один из распознанных пиков. Как правило, такие области не измеряются и не включаются в отчет. Если включен параметр «Неопределенные пики», то эти области измеряются и включаются в отчет как неопределенные пики. Временем удерживания/миграции для такой области будет средняя точка между ее началом и концом.

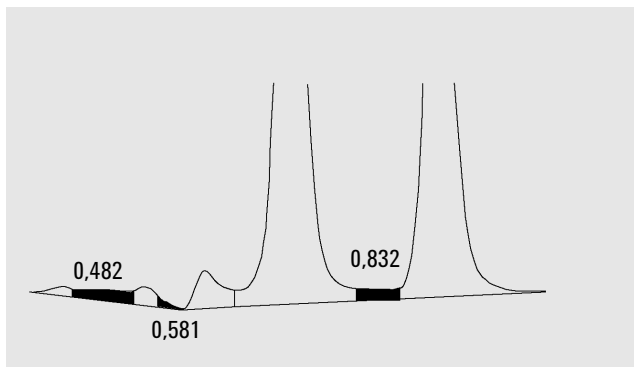


Рисунок 32 Неопределенные пики

Обновить высоту пика

Это событие заставляет интегратор использовать в качестве высоты пика абсолютную высоту самой высокой точки данных. Без этого события используется максимум интерполированной кривой. Событие **Обновить высоту пика** особенно полезно для обработки сигналов с очень резкими и острыми пиками, а также с пиками, предваряемыми провалом хроматограммы. Такие пики часто встречаются в сигналах МСД.

Время начала события **Обновить высоту пика** не учитывается. Это событие всегда действует на всю хроматограмму.

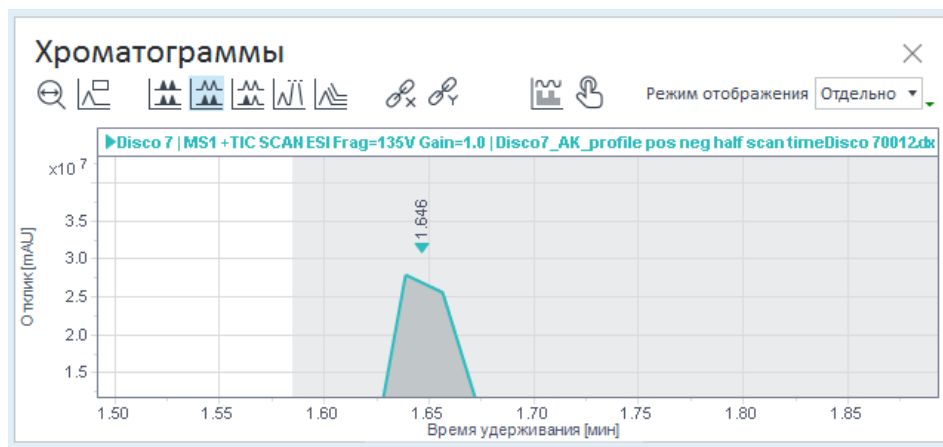


Рисунок 33 Интегрирование по умолчанию

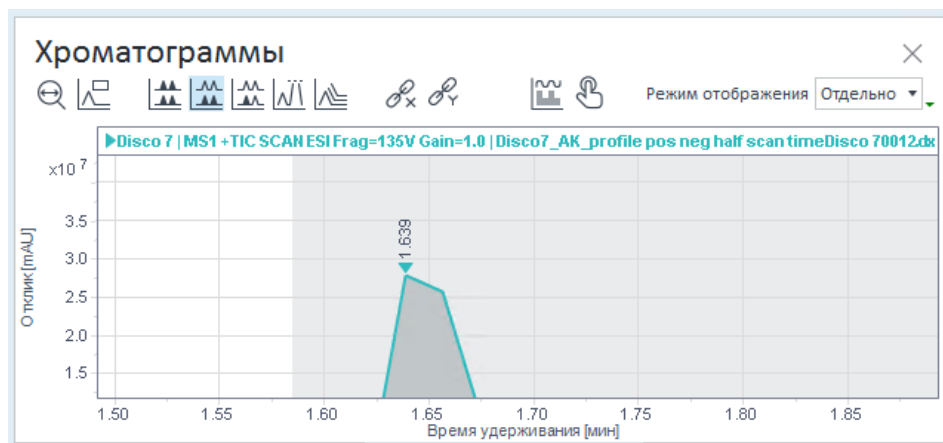


Рисунок 34 Интегрирование с событием «Обновить высоту пика»

Использовать базовую линию из интервала

Позволяет проецировать значение базовой линии на более позднее или раннее время для сокращения провалов базовой линии.

Если значение параметра **Установить базовую линию из интервала** или **Установить низ базовой линии из диапазона** рассчитывается в области, где отсутствуют хроматографические пики, целесообразно спроецировать базовую линию непосредственно на время перед выходом первого анализируемого пика (или непосредственно после выхода последнего анализируемого пика). Параметр **Использовать базовую линию из интервала** позволяет выполнить до трех таких проекций в каждом направлении.

Данное событие полезно при построении базовой линии для переднего или заднего склона, поскольку прямая базовая линия может случайно обрезать кривую хроматограммы. По этому параметру интегратор определяет диапазон базовой линии для выбора точки начала интегрирования и проецирования базовой линии в эту точку в заданном временном интервале.

Доступны следующие значения.

- **Очистить.** Очистка нового режима базовой линии и возврат к обычному алгоритму, начиная с данной точки.
- **Слева.** Выбор значения базовой линии из ближайшего диапазона слева от данной точки.
- **Справа.** Выбор значения базовой линии из ближайшего диапазона справа от данной точки.
- **Интервал 1 — Интервал 9.** Выбор значения базовой линии из заданного диапазона базовой линии. Интервалы базовой линии нумеруются от начала хроматограммы.

См. также пример в разделе **Суммирование площади отрезками** (Рис. 27 на странице 56).

Дополнительные события интегрирования

Дополнительные события предусмотрены для всех сигналов.

Режим касательной

Определяет тип построения базовой линии для пиков, обнаруженных на переднем или заднем склоне основного пика. См. раздел «Режимы отделения по касательной» на странице 44.

Экспонента	Проведение экспоненциальной кривой через начало и конец каждого дочернего пика (с поправкой на высоту).
Новая экспонента	Проведение экспоненциальной кривой для аппроксимации заднего фронта основного пика.
Стандартное	Сочетание расчетов экспоненциальной и прямой линии для лучшей аппроксимации.
Прямая	Проведение прямой линии через начало и конец каждого дочернего пика (с поправкой на высоту).

Отношение высот для касательной сзади

Наряду с параметром **Отношение седловины для касательной** определяет условия для отделения по касательной небольшого пика на заднем фронте растворителя или другого большого пика. См. раздел «Критерии отделения» на странице 41.

Это отношение высот основного пика (H_p) и пика-наездника (H_c) с поправкой на базовую линию. Для отношений выше заданного значения будет включаться отделение по касательной.

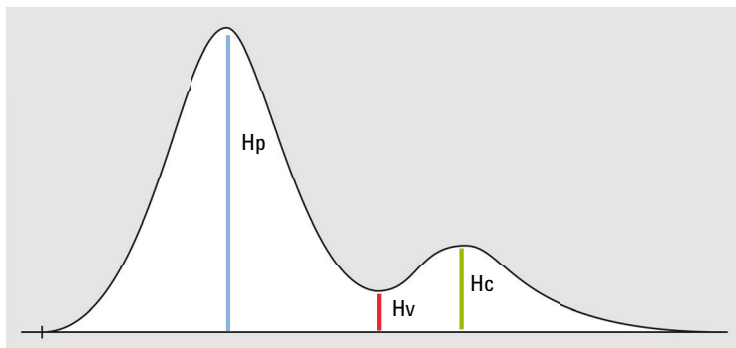


Рисунок 35 Пример. Пик с отделением по заднему фронту

**Отношение
высот для
касательной
спереди**

Наряду с параметром **Отношение седловины для касательной** определяет условия для отделения по касательной небольшого пика на переднем фронте растворителя или другого большого пика. См. раздел «Критерии отделения» на странице 41.

Это отношение высот основного пика (H_p) и пика-наездника (H_c) с поправкой на базовую линию. Для отношений выше заданного значения будет включаться отделение по касательной.

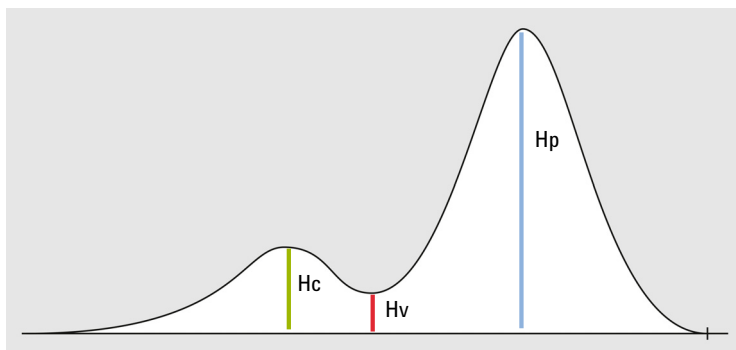


Рисунок 36 Пример. Пик с отделением по переднему фронту

**Отношение
седловины
для
касательной**

Наряду с параметрами **Отношение высот для касательной сзади** и **Отношение высот для касательной спереди** определяет условия для отделения по касательной небольшого пика на заднем или переднем фронте растворителя или другого большого пика. См. раздел «Критерии отделения» на странице 41.

Это отношение высот пика-наездника (H_c) и минимума между пиками (H_v) с поправкой на базовую линию. Для отношений ниже заданного значения будет включаться отделение по касательной.

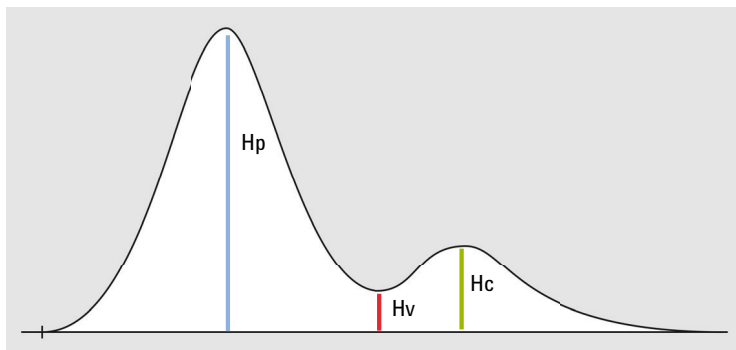


Рисунок 37 Пример. Пик с отделением по заднему фронту

Режим исправления базовой линии

Определяет тип исправления базовой линии. См. раздел «[Режимы коррекции базовой линии](#)» на странице 37.

Доступные значения.

Классический	Допускаются пересечения базовой линии.
Без пересечений	Удаление пересечений базовой линии путем ее перестраивания.
Расширенный	Интегратор пытается оптимизировать положение начала и конца пиков, исправляет базовую линию для кластера пиков и ликвидирует пересечения базовой линии.

Отношение пика к седловине

Параметр определяет, будут ли два пика, не разрешенных до базовой линии, отделены с помощью перпендикуляра или путем проведения базовой линии через точку минимума между ними. Это отношение высот меньшего пика и точки минимума между пиками с поправкой на базовую линию. См. раздел «[Отношение пика к седловине](#)» на странице 39.

Если отношение пика к седловине меньше заданного значения, используется перпендикуляр (A). В противном случае базовая линия проводится от начала первого пика до точки минимума между пиками и из точки минимума между пиками до конца второго пика (B).



Рисунок 38 Влияние отношения высот пика и точки минимума на базовую линию



3

Интегрирующий алгоритм EZChrom

События интегрирования 71

Описания кодов базовой линии 89

Этот раздел описывает события интегрирования EZChrom.

События интегрирования

Значение можно задать либо для отдельного сигнала, либо для всех сигналов совместно. Чтобы добавить временное событие, щелкните правой кнопкой мыши по таблице параметров.

События интегрирования бывают разных видов. Для некоторых из них можно задать интервал времени, определяемый временем начала и конца события, в течение которого параметр будет активен. Другие задают определенное значение, которое будет использоваться с момента начала события или в течение определенного интервала времени. В зависимости от типа события столбцы **Время окончания [мин]** и **Значение** будут либо доступны, либо недоступны.

ПРИМЕЧАНИЕ

В OpenLab CDS, за исключением OpenLab EZChrom, время конца события выделяется серым для следующих событий интегрирования:

- Ширина
- Порог
- Чувствительность к плечу
- Минимальная площадь
- Отменить базовую линию
- Отменить базовую линию в седловине

Ширина

Используется, чтобы отличить истинные пики от шума. Система использует значение ширины пика по умолчанию = 0,2 min.

Событие **Ширина** используется для расчета значения для группировки (сглаживания) точек данных до применения алгоритма интегрирования. Интегрирование лучше всего работает с 20 точками на пик. Если количество проб для пика превышает это значение (то есть частота отбора проб слишком велика), то для усреднения данных будет использоваться параметр **Ширина**, а алгоритм интегрирования будет обрабатывать только 20 точек для пика.

Событие **Ширина** будет применяться к заданному пику, если оно происходит до его вершины или в вершине.

Параметр **Ширина** используется только для корректировки избыточного числа проб. Он не может исправить данные с недостаточным числом проб (то есть когда вследствие слишком низкой частоты отбора было получено менее 20 точек данных для пика минимальной ширины).

На приведенных ниже диаграммах показаны примеры того, как неправильные значения могут повлиять на базовую линию пика.



Рисунок 39 Ширина

ПРИМЕЧАНИЕ

В большинстве случаев исходное значение параметра «Ширина», взятое по самому узкому пику на хроматограмме, будет достаточным для правильного интегрирования всех пиков. Однако каждый раз, когда ширина пика удваивается, необходимо вводить новое временное событие «Ширина».

ПРИМЕЧАНИЕ

Крайние (слишком большие или слишком малые) значения параметров «Ширина» и «Порог» могут препятствовать обнаружению пиков.

Порог

Этот параметр задает пороговое значение первой производной, которое позволяет алгоритму интегрирования отличать точки начала и конца пика от шума и дрейфа базовой линии. Значение **порога** равно наивысшему значению первой производной, найденной для сегмента хроматограммы.

На приведенных ниже диаграммах показаны примеры того, как неправильные значения могут повлиять на базовую линию пика.



Рисунок 40 Порог

ПРИМЕЧАНИЕ

Крайние (слишком большие или слишком малые) значения параметров «Ширина» и «Порог» могут препятствовать обнаружению пиков.

Чувствительность к плечу

Параметр позволяет определять плечи на больших пиках. Большее значение снижает чувствительность при поиске плеча, и наоборот. Значение **чувствительности к плечу** равно наивысшему значению второй производной, найденной для сегмента хроматограммы.

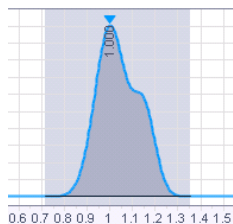


Рисунок 41 Задано слишком большое значение чувствительности к уступу

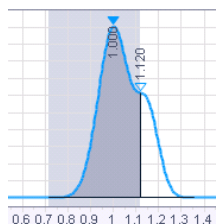


Рисунок 42 Задано правильное значение чувствительности к уступу

Интегрирование выкл.

Это событие отключает интегрирование хроматограммы в заданном диапазоне. Это может быть полезным, если вас не интересуют некоторые области хроматограммы и вы не хотите включать в отчет пики из этих областей.

Области, в которых поиск пиков отключен с помощью события **Интегрирование выкл.**, тем не менее включаются в расчет шума. Чтобы получить правильное значение шума, рекомендуется проинтегрировать все пики.

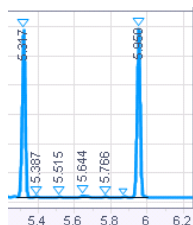


Рисунок 43 Интегрирование по умолчанию

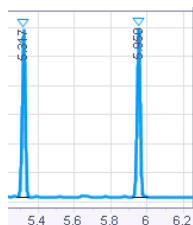


Рисунок 44 Интегрирование выкл. с 5,35 до 5,85 min

**От
седловины
до
седловины**

При активации этого события базовые линии частично слившихся (т. е. разделенных не до базовой линии) пиков будут проводиться через точку седловины между пиками.

Если это событие неактивно, базовая линия будет проведена до следующей точки, в которой хроматограмма пересекает базовую линию, а от точки седловины между пиками к ней будет проведен перпендикуляр.

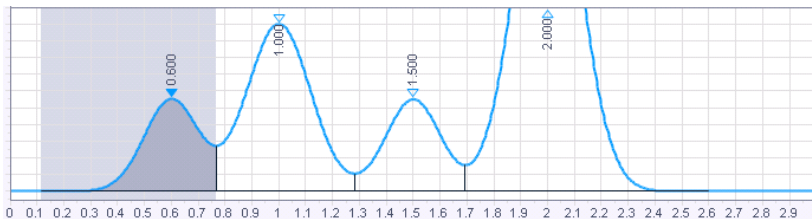


Рисунок 45 Интегрирование по умолчанию

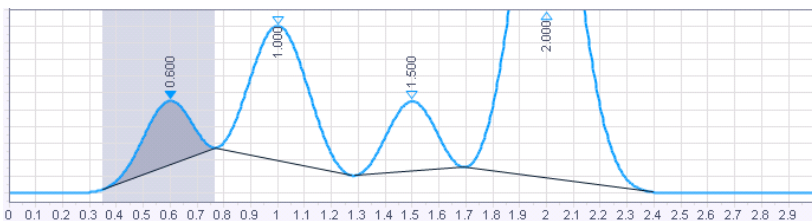


Рисунок 46 Интегрирование с событием От седловины до седловины

Горизонтальная базовая линия

Это событие проецирует базовую линию горизонтально вперед для пиков в заданном временном интервале. Базовая линия начинается в точке начала первого из пиков в этом интервале. Заканчивается базовая линия в точке пересечения с линией сигнала или в точке окончания последнего из пиков.

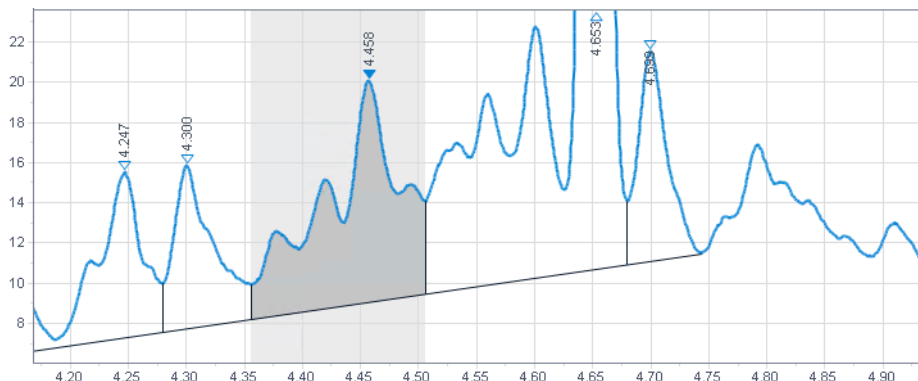


Рисунок 47 Интегрирование по умолчанию

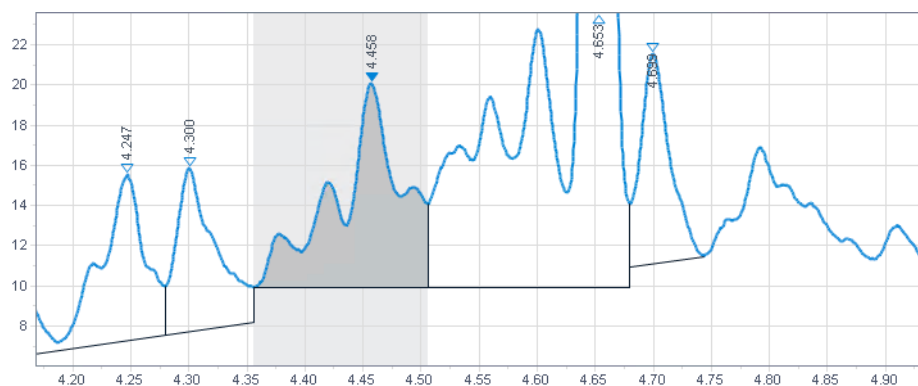


Рисунок 48 Интегрирование с горизонтальной базовой линией между точками 4,4 и 4,69 min

Горизонтальная базовая линия назад

Это событие принудительно проводит горизонтальную базовую линию в направлении начала хроматограммы. Для всех пиков в заданном временном интервале базовая линия будет проведена в обратном направлении. Эта базовая линия определяется точкой конца последнего из пиков в заданном интервале. Она проецируется в обратном направлении до точки пересечения с линией сигнала или до точки начала первого из пиков.

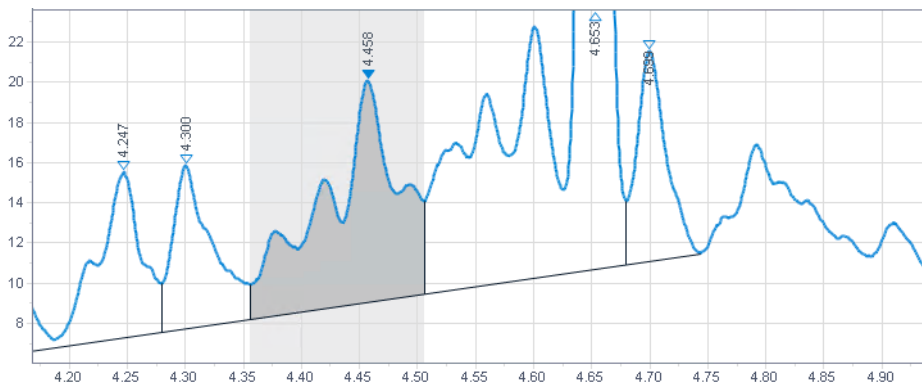


Рисунок 49 Интегрирование по умолчанию

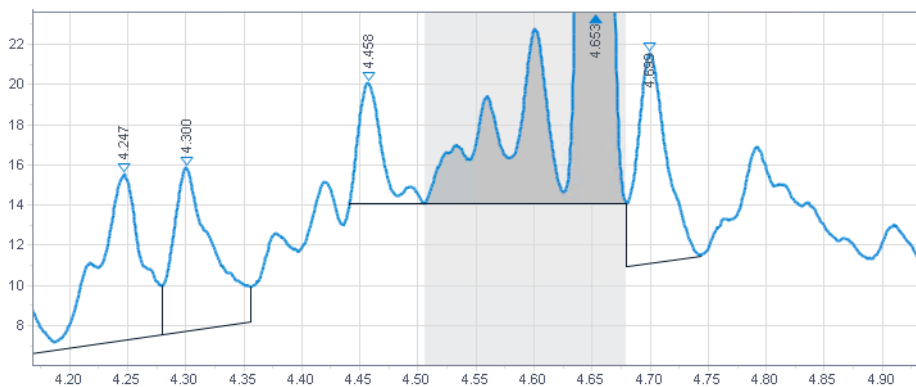


Рисунок 50 Интегрирование с обратной горизонтальной базовой линией между точками 4,4 и 4,69 min

Горизонтальная базовая линия в низшей точке

Это событие применяется для всех пиков, для которых время удерживания попадает в интервал, заданный параметрами **Время (мин)** и **Время окончания (мин)**.

Значение задает момент, когда интегратор начинает искать самую низкую точку базовой линии.

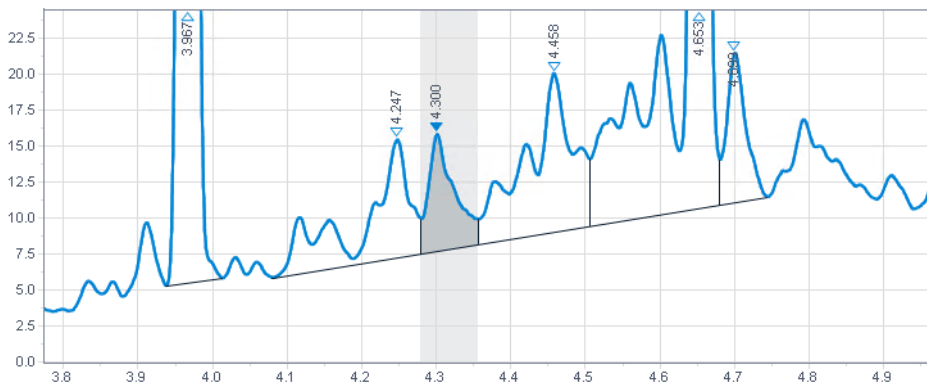


Рисунок 51 Интегрирование по умолчанию

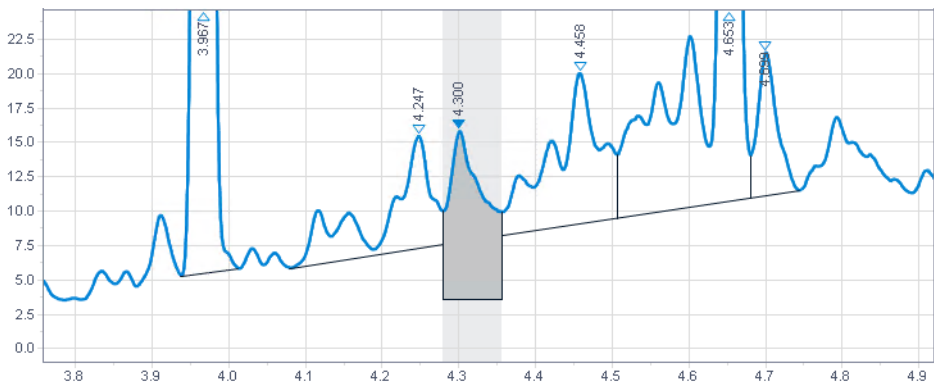


Рисунок 52 Интегрирование с горизонтальной базовой линией, проведенной через низшую точку между точками 4,25 и 4,35 min, со значением, равным 3,8 min

Прямая касательная

Это событие применяется для интегрирования малого пика, расположенного на заднем склоне большого пика. Базовая линия малого пика образуется касательной, проведенной от седловины большого пика к точке касания на хроматограмме.

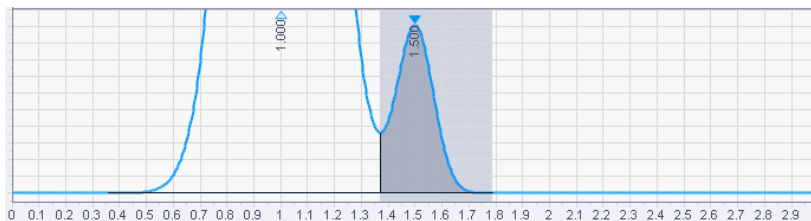


Рисунок 53 Интегрирование по умолчанию

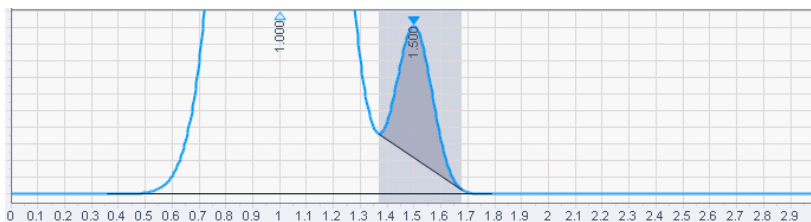


Рисунок 54 Интегрирование с событием Прямая касательная

Прямая касательная спереди

Принудительно проводит базовую линию дочернего пика на переднем склоне материнского пика по касательной.

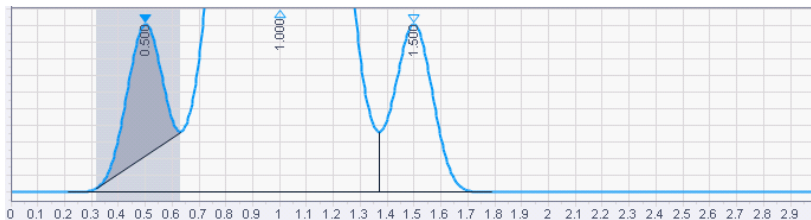
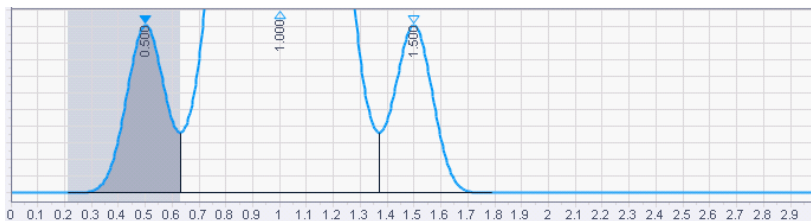


Рисунок 55 Интегрирование с событием Прямая касательная спереди

Экспоненциальная касательная

Это событие применяется для интегрирования малых пиков, расположенных на заднем склоне большого пика. Базовая линия малых пиков образуется экспонентой, проведенной от седловины большого пика к точке касания на хроматограмме.

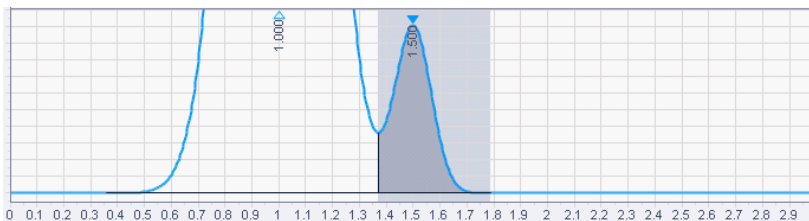


Рисунок 56 Интегрирование по умолчанию

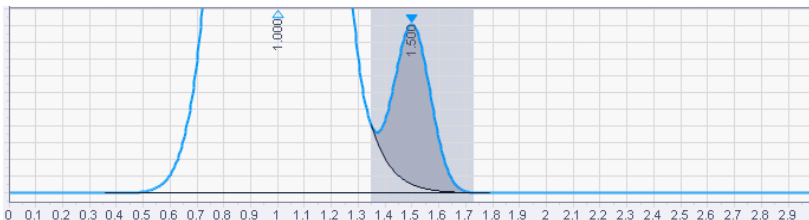


Рисунок 57 Интегрирование с событием Экспоненциальная касательная

Экспоненциальная касательная спереди

Принудительно проводит базовую линию дочернего пика на переднем склоне материнского пика по экспоненте.

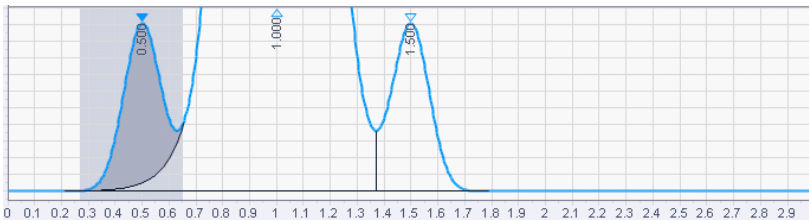
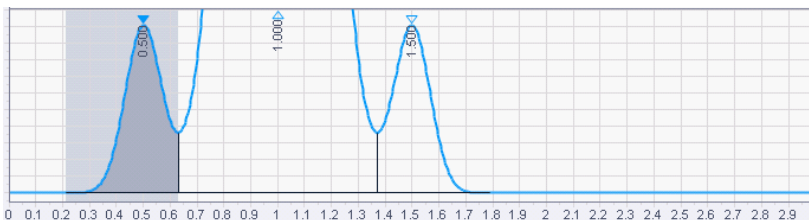


Рисунок 58 Интегрирование с событием Экспоненциальная касательная спереди

**Минимальная
площадь**

Это событие позволяет задать минимальную площадь определяемых пиков. Пики с площадью меньше данного минимума не будут проинтегрированы и не будут считаться пиками. Это событие позволяет исключить из отчета пики шумов и примесей.

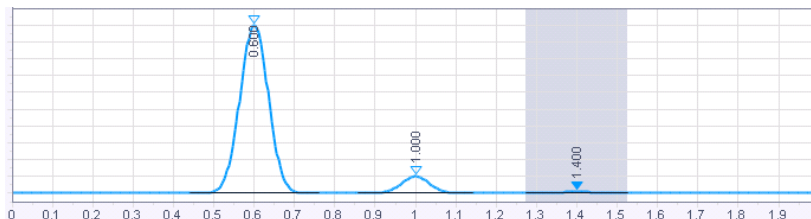


Рисунок 59 Интегрирование по умолчанию

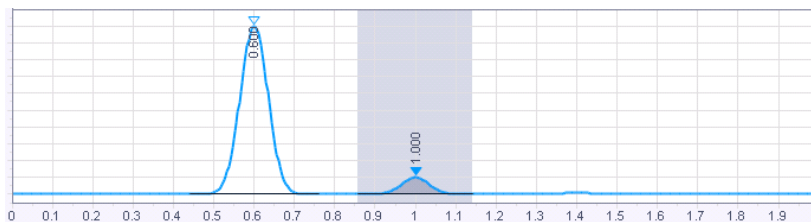
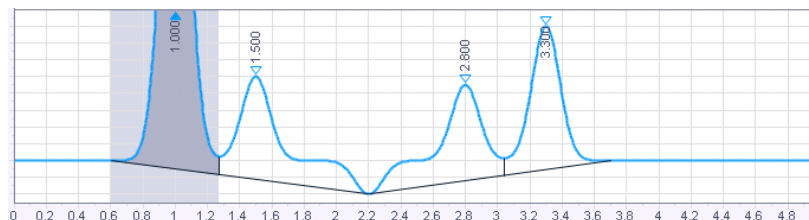
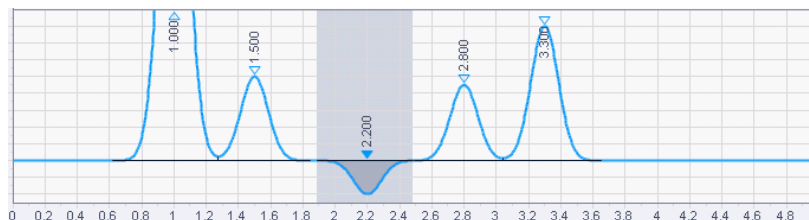


Рисунок 60 Интегрирование с событием Минимальная площадь

**Отрицатель-
ный пик**

Это событие позволяет проинтегрировать сегменты хроматограммы, которые опускаются ниже базовой линии, с помощью обычного алгоритма интегрирования пиков и представить их в качестве истинных пиков. Это событие полезно при использовании некоторых типов детекторов, таких как рефрактометрический, которые для некоторых соединений могут давать отрицательный отклик.

**Рисунок 61** Интегрирование по умолчанию**Рисунок 62** Интегрирование с событием Отрицательный пик

Отключить детектирование конца пика

Это событие отключает поиск конечной точки пика в указанном временном интервале. Это заставляет ПО считать все пики, попадающие в этот интервал, одним пиком. Это событие позволяет просуммировать площади серии последовательных пиков. Так как все пики в этом случае считаются частью одного и того же пика, его временем удерживания считается время удерживания первой же вершины, встреченной интегратором после активации события **Отключить детектирование конца пика**.

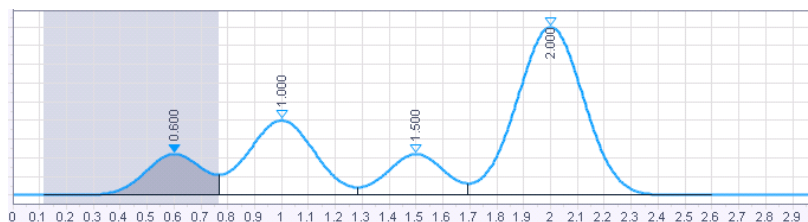


Рисунок 63 Интегрирование по умолчанию

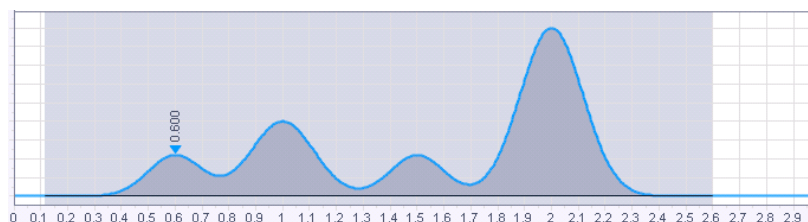


Рисунок 64 Отключить детектирование конца пика между 0,4 и 2,3 min

**Базовая
линия
вручную**

Это событие позволяет изменить базовую линию пика, не изменяя параметры интегрирования. Базовая линия будет проведена от точки сигнала в начале события к точке сигнала в конце события.

Это может быть удобным, чтобы изменить базовую линию пика, не затрагивая базовые линии остальных пиков хроматограммы.

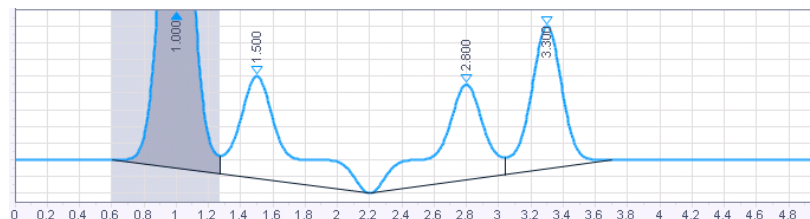


Рисунок 65 Интегрирование по умолчанию



Рисунок 66 Интегрирование с построением базовой линии вручную между 2,3 и 3,6 min

Пик вручную Это команда позволяет задать моменты начала и конца не найденного программой пика. Это может быть удобным, чтобы принудительно проинтегрировать пик, не затрагивая общие параметры интегрирования.

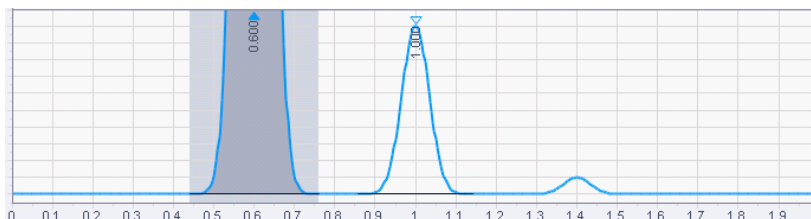


Рисунок 67 Интегрирование по умолчанию

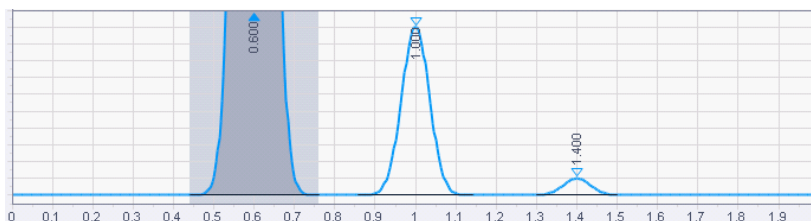


Рисунок 68 Принудительное интегрирование небольшого пика с событием «Пик вручную» между 1,3 и 1,5 min

Разделить пик

Это событие принудительно выполняет разделение пика перпендикуляром, опущенным к базовой линии. Перпендикуляр опускается из точки на хроматограмме в момент, заданный временем события.

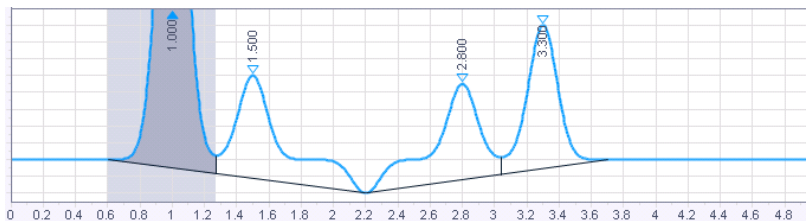


Рисунок 69 Интегрирование по умолчанию

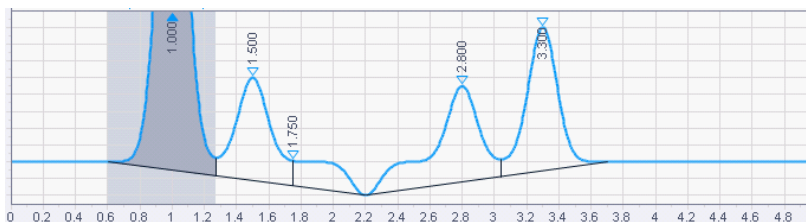


Рисунок 70 Интегрирование с событием Разделить пик 1,75 min

**Начало пика
здесь / Конец
пика здесь**

Это событие принудительно начинает или завершает интегрирование пика в указанной точке.

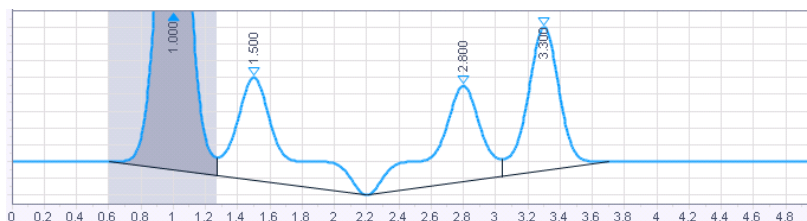


Рисунок 71 Интегрирование по умолчанию

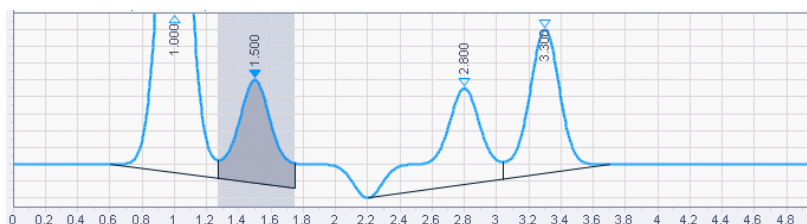


Рисунок 72 Интегрирование с событием Конец пика здесь 1,75 min

**Сброс
базовой
линии**

Это событие позволяет сбросить базовую линию в заданной точке хроматограммы.

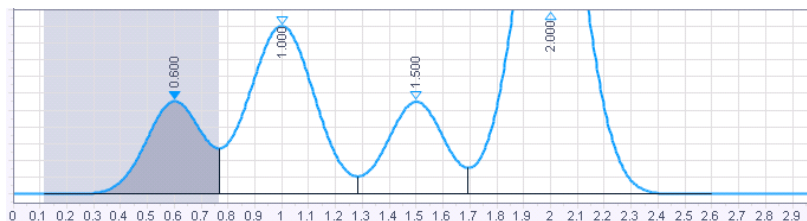


Рисунок 73 Интегрирование по умолчанию

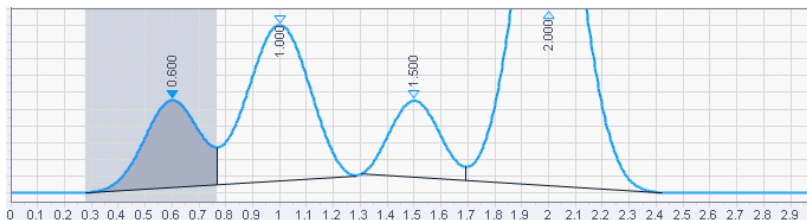


Рисунок 74 Интегрирование с событием Отменить базовую линию 1,3 min

Отменить базовую линию в седловине

ПРИМЕЧАНИЕ

Это событие сбросит базовую линию в точку следующей седловины, обнаруженной после момента этого события.

Это событие должно вставляться после начала первого пика в кластере, иначе начало пика будет идентифицировано как минимум между пиками.

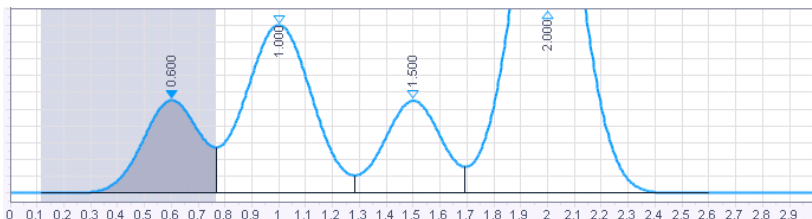


Рисунок 75 Интегрирование по умолчанию

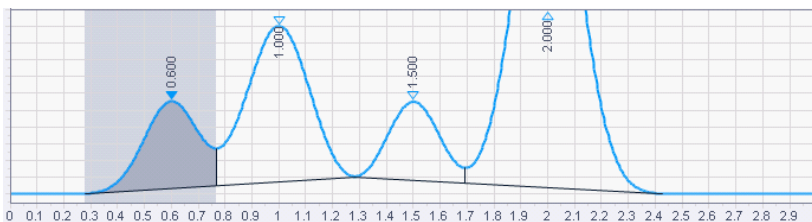


Рисунок 76 Интегрирование с событием Отменить базовую линию в седловине 1,2 min

Максимальная площадь

Определяет площадь наибольшего анализируемого пика.

Все пики с площадью больше максимальной не обрабатываются. Интегратор исключает все пики, которые после исправления базовой линии имеют большее значение, чем установленное в параметре «Максимальная площадь».

Например, можно использовать это событие, чтобы исключить из результатов интегрирования пик растворителя в хроматограмме ГХ, но включить его пики-наездники.

Максимальная высота

Определяет высоту наибольшего анализируемого пика.

Все пики с высотой больше максимальной не обрабатываются. Интегратор исключает все пики, которые после исправления базовой линии имеют большее значение, чем установленное в параметре «Максимальная высота».

Например, можно использовать это событие, чтобы исключить из результатов интегрирования пик растворителя в хроматограмме ГХ, но включить его пики-наездники.

Описания кодов базовой линии

Описания кодов базовой линии

Код базовой линии состоит из двух букв. Первая указывает на тип базовой линии в начале пика, вторая — в конце. Коды базовой линии включаются также в таблицу **результатов ввода пробы** и во все шаблоны отчетов по умолчанию.

Результаты ввода пробы									
Пики		Сводка							
№	Название	Код БЛ	Описание сигнала	ВУ (мин)	Площадь (mAU)	Площадь%	Высота (mAU)	Высота%	
1	Nifedipin	BV	DAD1 A, Sig=235,10 Ref=5...	4,190	478,076	14,477	118,390	15,82	
2		BV	DAD1 B, Sig=254,10 Ref=5...	4,190	217,551	14,131	53,743	15,41	
3		VV	DAD1 C, Sig=350,20 Ref=5...	4,190	120,796	14,140	29,883	15,45	
4		BV	DAD1 B, Sig=254,10 Ref=5...	4,891	8,382	0,544	1,940	0,56	
5		VV	DAD1 A, Sig=235,10 Ref=5...	4,892	17,530	0,531	4,070	0,54	

Рисунок 77Результаты ввода пробы

Сигнал:		DAD1 A, Sig=235,10 Ref=550,60				
ВУ [мин]	Тип	Ширина [мин]	Площадь	Высота	Площадь%	
4,190	BV	0,06	478,08	118,39	14,48	
4,892	VV	0,06	17,53	4,07	0,53	
5,684	VV	0,07	2376,75	533,52	71,97	
6,701	VB	0,07	429,95	92,23	13,02	
		Сумма	3302,31			

Рисунок 78Пример. Таблица из краткого отчета о площадях пиков.

- B** Базовая линия
- C** Экспонента
- f** Принудительные начало и конец пика (задаются пользователем)
- I** Пик оборван по событию Интегрирование выкл.
- N** Начало отрицательного пика
- P** Конец отрицательного пика
- H** Горизонтальная базовая линия вперед
- h** Горизонтальная базовая линия назад
- M** Базовая линия или пик заданы вручную
- m** Начало или конец базовой линии сдвинуты
- S** Плечо
- T** Прямая касательная
- V** Седловина
- v** Принудительно заданная седловина
- x** Разделить пик
- E** Хроматограмма закончилась раньше, чем был найден конец пика.
В качестве конца пика используется последняя точка хроматограммы.
- R** Сброс базовой линии
- L** Горизонтальная базовая линия через низшую точку

Что представляет собой идентификация пика?	92
Оценка окна времени удерживания	93
Устранение конфликтов	94
Относительные времена удерживания	95
Расчеты для относительного времени удерживания (ОВУ)	96
Соединение — эталон по времени	97
Использование соединений — эталонов по времени	97
Расчеты для эталонных соединений по времени	98
Обновление метода обработки	100
Обновления времени удерживания	100
Расчет обновленных времен удерживания	101
Пример. Время удерживания обновляется при использовании относительного времени удерживания	103
Расчет глобального сдвига времен удерживания	105

В этом разделе описываются понятия идентификации пика.

Что представляет собой идентификация пика?

Идентификация пика определяет соединения в неизвестной пробе на основе их хроматографических характеристик.

Распознавание этих соединений является необходимым шагом количественного определения, если оно выполняется в аналитическом методе. Метод обработки может включать в себя этап идентификации, даже если количественное определение в нем не выполняется. Характеристики сигнала каждого определяемого компонента записываются в таблицу соединений метода.

Процесс распознавания пика заключается в сравнении каждого пика в сигнале с пиками, записанными в таблицу соединений.

Основа идентификации — ожидаемое время удерживания и окна абсолютного и относительного (в процентах) времен удерживания. Окончательное окно времени удерживания рассчитывается как сумма окон относительного и абсолютного времен удерживания. Окно размещается на хроматограмме так, чтобы ожидаемое время удерживания находилось в его середине.

Ожидаемое время удерживания либо указываются в методе в виде абсолютного значения времени, либо рассчитывается из относительного времени удерживания. Соединения-эталонные времена позволяют корректировать ожидаемые времена удерживания исходя из возможных сдвигов, наблюдаемых для определенных эталонных соединений.

$$W_{nd} W_{dth} = A_{bs} R T W_{nd} + \frac{Exp R T * Rel R T W_{nd}}{100}$$

где:

Окно абс. ВУ

Окно абсолютного времени удерживания

Ожид. ВУ

Ожидаемое время удерживания.

Окно отн. ВУ

Окно относительного времени удерживания

Шир. окна

Полуширина интервала времени удерживания

Что представляет собой идентификация пика?

$$\text{Окно ВУ} = [\text{Ожид. ВУ} - \text{Шир. окна}; \text{Ожид. ВУ} + \text{Шир. окна}]$$

где:

Ожид. ВУ	Ожидаемое время удерживания
Окно ВУ	Окно времени удерживания
Шир. окна	Полуширина интервала времени удерживания

Оценка окна времени удерживания

Окно идентификации — это сумма относительного и абсолютного окон, симметрично наложенных на ожидаемое время удерживания. Например:

Ожидаемое время удерживания = 1 min

Абсолютное окно времени удерживания = 0,2 min

Относительное окно времени удерживания = 10 % = 1 min * 10/100 = 0,1 min

Окно идентификации = $[1 - 0,2 - 0,1; 1 + 0,2 + 0,1] = [0,7; 1,3]$

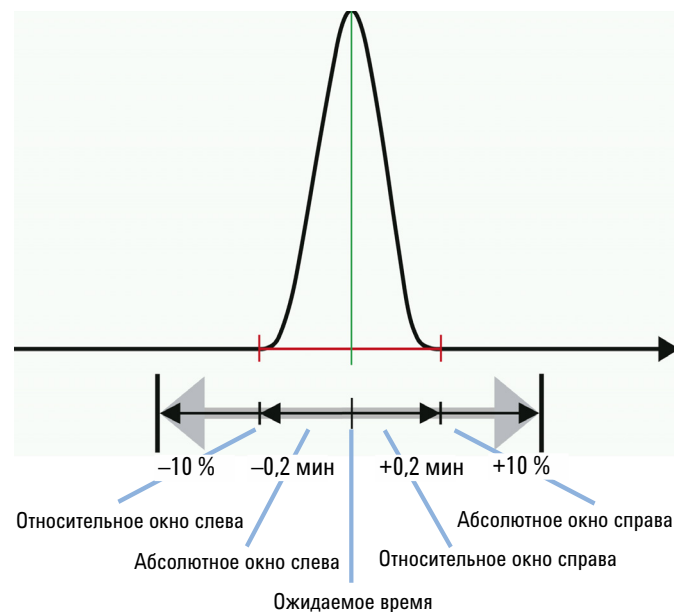


Рисунок 79 Окно идентификации

Устранение конфликтов

Если несколько пиков находятся в пределах окна времени удерживания, существует несколько способов идентифицировать конкретный пик. Можно выбрать одно из следующих значений параметра **Совпадение пика** в параметрах идентификации соединения:

- **Первый**: используется первый пик в окне времени удерживания.
- **Последний**: используется последний пик в окне времени удерживания.
- **Ближайший** (значение по умолчанию): используется ближайший к ожидаемому времени удерживания пик.
- **Наибольшая площадь**: используется пик с наибольшей площадью в окне времени удерживания.
- **Наибольшая высота**: используется пик с наибольшей высотой в окне времени удерживания.

Если не удастся разрешить конфликт, то пики не будут идентифицироваться, а в журнал обработки будет записано предупреждение.

Относительные времена удерживания

Относительные времена удерживания можно использовать для проверки правильности идентификации соединений. Для расчета относительного времени удерживания время удерживания соединения сравнивается с временем удерживания другого определенного соединения (называемого эталоном ОВУ). Отношение этих двух времен удерживания, т. е. относительное время удерживания или ОВУ, как правило, является известной величиной, которую можно ввести в программу.

Сами по себе значения относительных времен удерживания не влияют на процесс идентификации соединений. Для этого используются только абсолютные времена удерживания. Они либо указываются в методе обработки данных в виде абсолютных значений времени, либо рассчитываются из относительных времен удерживания. Для исправления потенциальных сдвигов окон времен удерживания могут применяться либо эталонные соединения, либо обновления метода.

Следующий пример демонстрирует параметры идентификации для эталона ОВУ и связанных с ним соединений.

Таблица соединений			Параметры квалификатора		Общее		
№	Тип	Название	Сигнал	Этал. ОВУ	Соответствующий эталон ОВУ	Ожид. ВУ (мин)	ОВУ
1		Ref #1	DAD1A	☒		2,000	1,000
2		Соединение №1	DAD1A	☐	Ref #1 (DAD1A)	3,000	1,500

Связанное соединение

Соединение-эталон ОВУ

Если изменить ожидаемое ВУ связанного с эталоном соединения, система автоматически пересчитает его относительное ВУ. И наоборот, если изменить значение относительного ВУ, система пересчитает ожидаемое ВУ.

Если изменить ожидаемое ВУ эталона ОВУ, система пересчитает ожидаемые ВУ для всех связанных с ним соединений.

Если вы пользуетесь и эталонными по времени соединениями, и эталонами ОВУ одновременно, сдвиг времени удерживания рассчитывается для эталона ОВУ (см. «Расчеты для эталонных соединений по времени» на странице 98). Затем система пересчитает ожидаемые ВУ для связанных соединений так, чтобы относительные ВУ не изменились.

Таблица соединений		Параметры квалификатора			Общее			
№	Тип	Название	Сигнал	Эталон по в	Соотв. врем. эталон	Ожид. ВУ (мин)	ОВУ	Этал. ОВУ.
1		Ref #1	DAD1A	☐		2,000	1,000	☒
2		Соединение №1	DAD1A	☐	Time Ref (DAD1A)	3,000	1,500	☐
3		Time Ref	DAD1A	☒		3,500		☐

ВУ: исправленное, при необходимости

ОВУ: не изменяется

Также для этого можно воспользоваться функцией **обновления ВУ** для эталона ОВУ. Параметры обновления можно задать только для эталона ОВУ. Связанным с ним соединениям будут принудительно присвоены такие же значения для того, чтобы значения относительных времен удерживания не изменялись.

Таблица соединений		Параметры квалификатора			Общее		
№	Тип	Название	Сигнал	Этал. ОВУ.	Соответствующий эталон ОВУ	Поправка ВУ	Козф-т поправки ВУ (%)
1		RRT Ref	DAD1A	☒		После каждого выполнения	50,000
2		Соединение №1	DAD1A	☐	RRT Ref (DAD1A)	После каждого выполнения	

Связанные соединения используют те же значения обновления ВУ, что и соответствующий эталон ОВУ

ОВУ соединения эталона использует функцию обновления ВУ

У **неидентифицированных пиков** связанных с ними соединений нет. В таком случае для расчета значений ОВУ будет использован первый эталон ОВУ.

Расчеты для относительного времени удерживания (ОВУ)

Расчет относительного времени удерживания (ОВУ) из ожидаемого времени удерживания:

$$ОВУ = \text{ожидаемое } ВУ_{\text{соединение}} / \text{ожидаемое } ВУ_{\text{эталон}}$$

При изменении значения ОВУ соответствующего соединения его ожидаемое ОВУ пересчитывается следующим образом:

$$\text{Ожидаемое } ВУ_{\text{соединения}} = ОВУ * \text{Ожидаемое } ВУ_{\text{эталона}}$$

Соединение — эталон по времени

Использование соединений — эталонов по времени

Соединения-эталоны времени позволяют приложению корректировать окна абсолютного времени удерживания исходя из возможных сдвигов, наблюдаемых для выбранных соединений-эталонов времени.

В качестве эталонов могут быть помечены один или несколько соединений из метода обработки. Для каждого соединения или группы по времени можно задать соединение-эталон времени для коррекции ожидаемого времени удерживания. Величина поправки может регулироваться с помощью индивидуального поправочного коэффициента, который можно задать для каждого соединения для коррекции ожидаемого времени удерживания в столбце **Коэффициент** (значение по умолчанию = 1).

Если соединению назначено соединение-эталон времени, его время удерживания будет исправлено в соответствии с величиной сдвига времени удерживания этого эталона. Для идентификации пика на хроматограмме алгоритм идентификации соединений будет использовать это исправленное ожидаемое время удерживания. Для групп по времени этот сдвиг применяется к моментам начала и конца группы. Сам сдвиг, кроме того, исправляется на заданный поправочный коэффициент. Если на хроматограмме не будет найдено одно из эталонных соединений, связанные с ним пики и группы по времени не будут идентифицированы.

Если в методе используются *внутренние стандарты* и включен параметр **Использовать эталонные соединения по времени**, внутренние стандарты по умолчанию используются в качестве таких эталонов.

Если вы используете одновременно *соединения-эталоны времени* и эталоны относительного времени удерживания, поправка вносится и в ожидаемое $V_{U_{\text{эталона}}}$, и в ожидаемое $V_{U_{\text{соединения}}}$, поэтому относительное время удерживания остается постоянным.

ПРИМЕЧАНИЕ

При использовании соединений-эталонов времени они должны быть назначены *каждому* соединению и группе по времени. В противном случае метод будет непоследовательным и не сможет быть использован для обработки данных.

Расчеты для эталонных соединений по времени

Если используются эталонные соединения по времени, приложение корректирует окна абсолютного времени удерживания на основании возможных сдвигов, наблюдаемых для выбранных эталонных соединений по времени.

Сдвиг эталонного соединения по времени

$\text{Сдвиг}_{\text{эталон}} = \text{Фактическое ВУ}_{\text{эталон}} - \text{Ожидаемое ВУ}_{\text{эталон}}$	
где:	
$\text{Сдвиг}_{\text{эталон}}$	Сдвиг по времени для эталонного соединения
Фактическое ВУ _{эталон}	Фактическое время удерживания эталонного соединения
Ожидаемое ВУ _{эталон}	Ожидаемое время удерживания эталонного соединения

ВУ соответствующего соединения

Для соединений, используемых как эталоны по времени, ожидаемое время удерживания рассчитывается при помощи дополнительного коэффициента.

$\text{Исправленное ожидаемое ВУ} = \text{Ожидаемое ВУ} + (\text{Сдвиг}_{\text{эталон}} * \text{Коэффициент})$	
где:	
Исправленное ожидаемое ВУ	Исправленное ожидаемое время удерживания
Ожидаемое ВУ	Ожидаемое время удерживания
$\text{Сдвиг}_{\text{эталон}}$	Сдвиг по времени эталонного соединения
Коэффициент	Коэффициент для соединений с соответствующим эталонным соединением по времени (Коэффициент)

Время начала
и конца соот-
ветствующей
группы по
времени

Для групп по времени ожидаемое время начала и конца рассчитывается так:

Исправленное начало интервала = Начало интервала + (Сдвиг_{эталон} * Коэффициент)

Исправленный конец интервала = Конец интервала + (Сдвиг_{эталон} * Коэффициент)

где:

Исправленное начало интервала	Исправленное время начала группы по времени
Начало интервала	Время начала группы по времени
Исправленный конец интервала	Исправленное время конца группы по времени
Конец интервала	Время конца группы по времени
Сдвиг _{эталон}	Сдвиг по времени эталонного соединения
Коэффициент	Коэффициент для групп по времени с соответствующим эталонным соединением по времени (Коэффициент)

Обновление метода обработки

Обновления времени удерживания

В зависимости от типа обновления времен удерживания (**Никогда**, **После каждого выполнения** или **После калибровочных стандартов**), задаваемого для всех идентифицированных соединений и групп по времени, ожидаемое время удерживания метода обработки автоматически обновляется после вычисления исправленного ожидаемого времени удерживания. Если по исправленному значению удалось найти соединение, то такое исправленное значение делается новым ожидаемым значением метода.

Обновление времени удерживания может выполняться независимо от эталонов времени.

ПРИМЕЧАНИЕ

Если тип обновления времени удерживания — **После каждого выполнения** или **После калибровочных стандартов**, то все вводы проб обрабатываются последовательно. Изменения, внесенные в метод, будут применены к следующему вводу пробы. Это не позволит выполнять параллельную обработку некалиброванных вводов проб.

Кроме обновления времен удерживания в ходе каждого анализа их можно вручную сдвинуть на заданную величину.

Расчет обновленных времен удерживания

Для внесения поправки в ожидаемое время удерживания приложение считает текущее время удерживания и рассчитывает сдвиг относительно ожидаемого времени удерживания. Этот сдвиг, помноженный на весовой коэффициент для данного соединения, прибавляется к ожидаемому времени удерживания.

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

где:

Shift	Сдвиг времени удерживания соединения
ActualRT	Текущее время удерживания соединения
ExpRT	Ожидаемое время удерживания соединения

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

где:

NewExpRT	Исправленное ожидаемое время удерживания соединения
ExpRT	Ожидаемое время удерживания соединения
Shift	Сдвиг времени удерживания соединения
RTUpdate	Весовой коэффициент (Коэф-т поправки ВУ (%)) соединения

Обновленное время удерживаний соединений-эталонов времени

Обновление времен удерживания может использоваться независимо от наличия *эталонов времени*. Сдвиги и исправленные времена удерживания для соединений-эталонов времени рассчитываются так же, как и для остальных соединений, с помощью функции *Обновление ВУ*:

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

где:

$\text{NewExpRT}_{\text{Ref}}$	Исправленное ожидаемое время удерживания эталонного соединения
$\text{ExpRT}_{\text{Ref}}$	Ожидаемое время удерживания эталонного соединения
$\text{Shift}_{\text{Ref}}$	Сдвиг по времени для эталонного соединения
$\text{RTUpdate}_{\text{Ref}}$	Весовой коэффициент (Коэф-т поправки ВУ (%)) эталонного соединения

Исправленное время удерживания соединения, связанного с эталоном времени удерживания, рассчитывается с использованием дополнительного коэффициента:

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

где:

NewExpRT	Исправленное ожидаемое время удерживания соединения
ExpRT	Ожидаемое время удерживания соединения
$\text{Shift}_{\text{Ref}}$	Сдвиг по времени для эталонного соединения
RTUpdate	Весовой коэффициент (Коэф-т поправки ВУ (%)) соединения
Коэффициент	Коэффициент для соединений с соответствующим эталонным соединением по времени (Коэффициент)

Для *групп по времени* ожидаемое время удерживания и времена начала и конца временного интервала обновляются только при использовании эталонов времени или относительного времени удерживания.

Пример. Время удерживания обновляется при использовании относительного времени удерживания

Автоматическое обновление времен удерживания в методах, использующих относительные времена удерживания, осуществляется следующим образом.

- Рассчитываются ожидаемые ВУ соединений-эталонов ОБУ по уравнению для нового ожидаемого времени удерживания (см. «Расчет обновленных времен удерживания» на странице 101).
- Ожидаемые ВУ связанных соединений изменяется так, чтобы значения ОБУ не изменились, как видно из уравнения для ожидаемого времени удерживания соединения (см. «Расчеты для относительного времени удерживания (ОБУ)» на странице 96).
- Времена удерживания начала и конца группы по времени изменяются таким образом, чтобы значения ОБУ не изменились, по тому же уравнению, что применяется для расчета ожидаемого ВУ соединения.

Например, рассмотрим метод обработки с тремя соединениями и одной группой по времени, использующий одновременно обновление времен удерживания и относительные времена удерживания.

Таблица соединений			Параметры квалификатора		Общее				
№	Тип	Название	Сигнал	Этал. ОБУ	Соответствующий эталон О	Поправка ВУ	Коеф-т поправки ВУ (%)	Ожид. ВУ (мин)	ОБУ
2		Группа №1	DAD1A	☐	RRT Ref (DAD1A)	После каждого выпол		0,000	
4		RRT Ref	DAD1A	☒		После каждого выпол	50,000	3,000	1,000
5		C2	DAD1A	☐	RRT Ref (DAD1A)	После каждого выпол		6,000	2,000
3		C3	DAD1A	☐	RRT Ref (DAD1A)	После каждого выпол		1,500	0,500

Рисунок 80 Параметры соединения

Параметры группы по времени

☐ Включить идентифицированные пики

☐ Определить количество для каждого пика индивидуально

начало ВУ	начало ОБУ	конец ВУ	конец ОБУ
3,000	1,00	6,000	2,00

Рисунок 81 Параметры группы по времени

После обработки данных ввода пробы для трех соединений были найдены следующие времена удерживания:

- Эталон ОВУ: 4,000 min
- C2: 8,000 min
- C3: 2,000 min

По этим данным ожидаемое ВУ соединения-эталона ОВУ исправляется следующим образом:

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

$$\text{NewExpRT} = 3.000 \text{ min} + \left((4.000 \text{ min} - 3.000 \text{ min}) * \frac{50}{100} \right)$$

$$= 3.500 \text{ min}$$

Ожидаемые времена удерживания остальных соединений, а также моменты начала и конца группы по времени исправляются таким образом, чтобы относительные времена удерживания не изменились.

$$\text{Ожидаемое ВУ}_{\text{соединения}} = \text{ОВУ} * \text{Ожидаемое ВУ}_{\text{эталона}}$$

$$\text{Ожидаемое ВУ}_{\text{C2}} = 2,000 * 3,500 \text{ min} = 7,000 \text{ min}$$

$$\text{Ожидаемое ВУ}_{\text{C3}} = 0,500 * 3,500 \text{ min} = 1,750 \text{ min}$$

$$\text{ВУ}_{\text{НачалаВремГруп}} = 1,000 * 3,500 \text{ min} = 3,500 \text{ min}$$

$$\text{ВУ}_{\text{КонцаВремГруп}} = 2,000 * 3,500 \text{ min} = 7,000 \text{ min}$$

Расчет глобального сдвига времен удерживания

В рамках редактирования метода можно сдвинуть все ожидаемые времена удерживания и интервалы времени групп по времени одновременно. Новые времена удерживания рассчитываются следующим образом.

Абсолютный сдвиг:

$$\text{NewExpRT} = \text{ExpRT} + \text{Shift}$$

где:

NewExpRT	Исправленное ожидаемое время удерживания соединения
ExpRT	Ожидаемое время удерживания соединения
Shift	Абсолютное значение, введенное пользователем

Относительный сдвиг:

$$\text{NewExpRT} = \text{ExpRT} + \left(\text{ExpRT} * \frac{\text{Shift}}{100} \right)$$

где:

NewExpRT	Исправленное ожидаемое время удерживания соединения
ExpRT	Ожидаемое время удерживания соединения
Shift	Относительно значение, введенное пользователем

Что такое калибровка?	107
Калибровочная кривая	108
Что такое калибровочная кривая?	108
Тип и коэффициент отклика	109
Уровень калибровки	114
Присвоение веса точкам калибровки	116
Модели калибровочных кривых	119
Расчет калибровочной кривой	121
Параметры для расчета кривой	122
Линейная аппроксимация	123
Квадратичная аппроксимация	124
Логарифмическая и экспоненциальная аппроксимация	128
Аппроксимация по среднему КО	129
Оценка калибровочной кривой	130
Проверка калибровочной кривой	130
Относительная погрешность	130
Статистика калибровочной кривой	132

Этот раздел подробно описывает расчеты, применяемые в ходе калибровки.

Что такое калибровка?

После того как пики были проинтегрированы и идентифицированы, следующим шагом в количественном анализе является калибровка. Количество соединения и его отклик редко бывают прямо пропорциональны массе анализируемой пробы. Это делает калибровку по эталонным стандартам необходимой. В количественном анализе для определения количества соединения в пробе используется площадь пика или его высота.

Количественный анализ включает много этапов, которые могут быть кратко сформулированы следующим образом:

- Узнать, какое соединение определяется.
- Выбрать метод анализа проб, содержащих известное количество этого соединения, называемых калибровочными пробами или калибровочными стандартами.
- Проанализировать калибровочный стандарт и узнать отклик для этого количества соединения.

Если отклик детектора нелинейный, можно проанализировать ряд стандартов с разным количеством определяемого соединения. Этот процесс называется *многоуровневой калибровкой*.

Для количественного определения можно использовать следующие методы калибровки:

- Калибровка по определяемому соединению (внешний или внутренний стандарт).
- Косвенное количественное определение по калибровочной кривой или коэффициенту отклика другого соединения или группы соединений.
- Постоянный коэффициент отклика (параметр **Коэффициент вручную**).

Калибровочные кривые и расчеты метода внешнего стандарта основаны на измерении отклика (площади или высоты пика) для определенного количества соединения. Калибровочные кривые и расчеты метода внутреннего стандарта основаны на относительных откликах и относительных количествах соединений (см. раздел «Относительные отклики с ISTD» на странице 111).

Калибровочная кривая

Что такое калибровочная кривая?

Калибровочная кривая является графическим представлением данных о количестве и отклике для одного соединения, полученных от одного или нескольких калибровочных образцов.

Обычно вводится аликвота калибровочного образца, поступает сигнал, и отклик определяется расчетом площади или высоты пика, как показано на следующем рисунке.

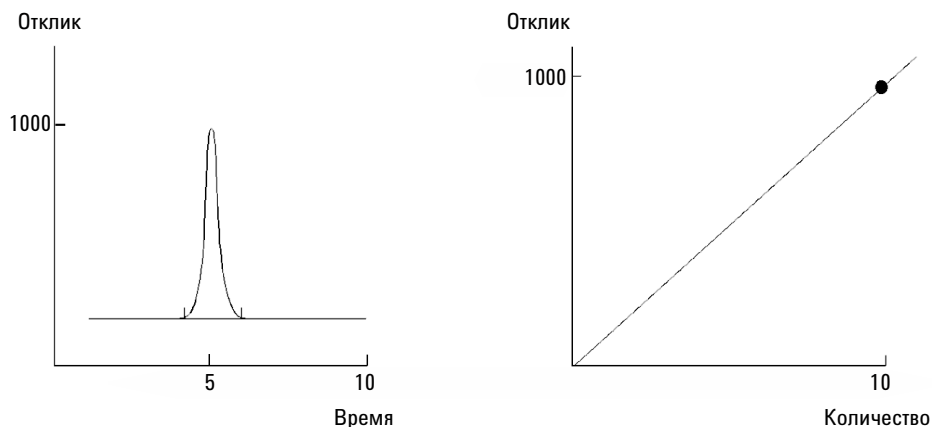


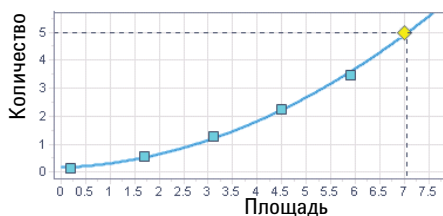
Рисунок 82 Калибровочный образец, сигнал и калибровочная кривая

Тип и коэффициент отклика

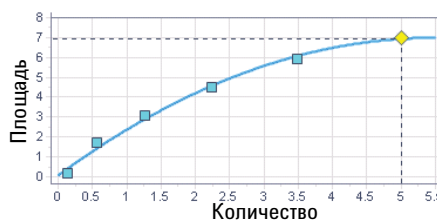
Существуют различные настройки, позволяющие выбрать, какое из значений наносить на оси x и y калибровочной кривой:

Способ задания КО

Коэффициент отклика (КО) — это мера увеличения сигнала при обнаружении соединения. Он определяется как отношение отклика к количеству соединения или наоборот. В общих настройках метода в разделе **Способ задания КО** можно переключаться между типами **Отклик от количества** (по умолчанию) или **Количество от отклика**. Изменение этого параметра равносильно перестановке осей x и y калибровочной кривой.



Количество от отклика



Отклик от количества (по умолчанию)

Рисунок 83 При другом способе задания КО «Отклик» имеет значение Площадь

Расчет КО:

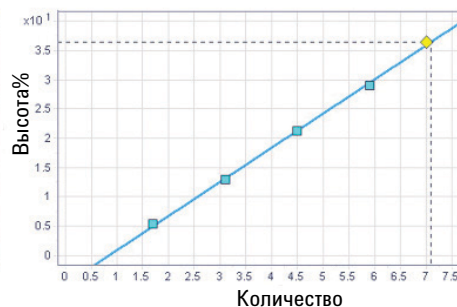
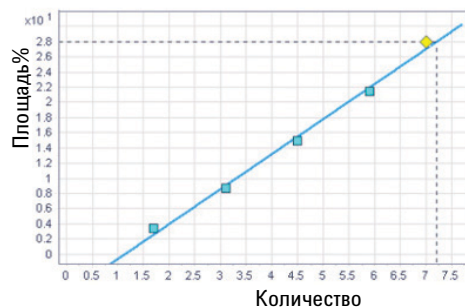
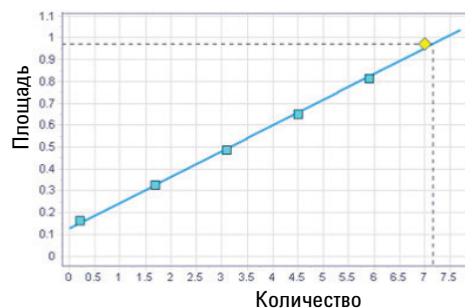
$$КО = \text{Отклик} / \text{Количество}$$

или

$$КО = \text{Количество} / \text{Отклик}$$

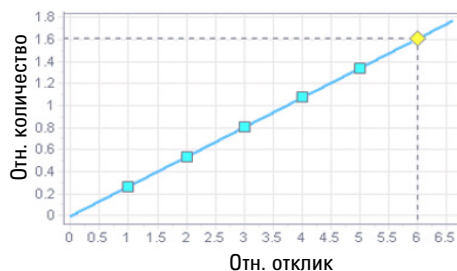
Тип отклика

Для отклика можно определить тип **Площадь**, **Площадь%**, **Высота** или **Высота%**. Можно выбирать тип отклика индивидуально для каждого соединения.

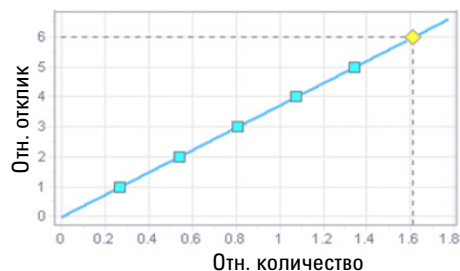


Относительные отклики с ISTD

Если в пробе используются внутренние стандарты (ISTD), то на калибровочной кривой отображаются относительные количества и относительные отклики. Расчет зависит от способа задания КО.



Отклик от количества (по умолчанию)



Количество от отклика

Расчет КО:

$$КО = (\text{Отклик} / \text{Отклик ISTD}) / (\text{Количество} / \text{Количество ISTD})$$

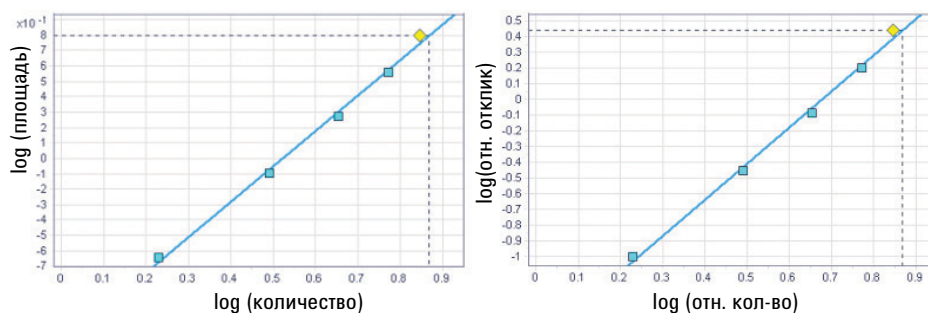
или

$$КО = (\text{Количество} / \text{Количество ISTD}) / (\text{Отклик} / \text{Отклик ISTD})$$

Модель кривой Log/log

Если для соединения выбрана модель кривой **log/log**, то и количество, и отклик наносятся на кривую в логарифмических значениях.

Можно использовать модель **log/log** в комбинации с обоими способами задания КО, со всеми типами отклика и с внутренними и внешними стандартами.



Отклик от количества (по умолчанию)

Количество от отклика

Рисунок 84 Пример для модели log/log с внешними или внутренними стандартами

Расчет КО для показанных выше примеров:

$$КО = \log(\text{Отклик}) / \log(\text{Количество})$$

$$КО = \log(\text{Отклик}/\text{Отклик ISTD}) / \log(\text{Количество}/\text{Количество ISTD})$$

Преобразованный отклик

При выборе преобразованного отклика в качестве отклика на графике откладывается рассчитанное значение, а в качестве количества — исходное.

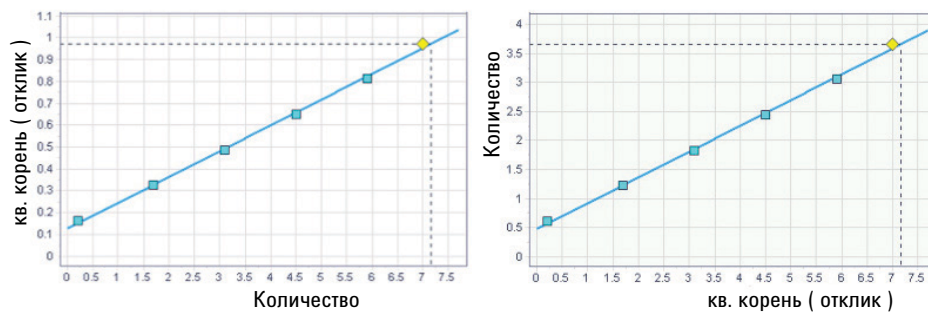


Рисунок 85 Примеры преобразования отклика с использованием квадратного корня

Расчет КО для показанного выше примера:

$$КО = \text{кв. корень}(\text{отклик}) / \text{количество}$$

или

$$КО = \text{количество} / \text{кв. корень}(\text{отклик})$$

Уровень калибровки

Для всех соединений в методе обработки число уровней калибровки одинаковое. Это число задает число точек, связывающих количество соединения и отклик, по которым строится калибровочная кривая. Точка для каждого уровня определяется путем анализа соответствующего калибровочного стандарта. Для каждого соединения на калибровочной кривой показаны точки калибровки, из которых были вычислены эти средние точки.

Обновить точку калибровки для определенного уровня можно, повторив анализ калибровочного стандарта или проанализировав больше калибровочных стандартов для этого уровня. Если для параметра **Расчет кривой** выбрать использование средних значений, точка калибровки будет обновлена средним значением новой измеренной точки и всеми уже имеющимися значениями (см. «[Режимы использования отдельных точек калибровки](#)» на странице 114).

Порядок сбора точек калибровки контролируется параметром **Тип анализа** следующим образом.

- Ничего не выбрано. К калибровочной кривой будет добавлена новая точка.
- **Очистить всю калибровку.** Перед сохранением новых точек калибровки удаляются все точки калибровки на всех уровнях.
- **Очистить калибровку для уровня.** Перед сохранением новых точек калибровки удаляются все точки калибровки на данном уровне.

Повторная обработка тех же самых калибровочных стандартов будет обновлять одну и ту же точку калибровки, а не добавлять на кривую новые точки.

Режимы использования отдельных точек калибровки

В методе обработки можно выбрать, как именно используются новые точки калибровки в построении калибровочной кривой. Поддерживаются следующие режимы.

- **Из среднего по уровню.** Количества соединений и отклики всех точек калибровки для одного уровня усредняются и используются в алгоритме для построения оптимальной калибровочной кривой.
- **Из индивидуальных калибровочных точек.** Все количества соединений и отклики для всех отдельных точек калибровки используются для построения калибровочной кривой непосредственно.

Среднее значение

Среднее значение для всех калибровочных анализов рассчитывается по следующей формуле:

$$\text{Response} = \frac{((n - 1) * \text{Response}) + \text{MeasResponse}}{n}$$

где:

n	Число калибровочных точек
ИзмОтклик	Измеренный отклик

Калибровка в режиме скобок

Для этого типа калибровки калибровочные стандарты анализируются до и после анализа проб. В ходе обработки данных первыми обрабатываются калибровочные стандарты между открытием и закрытием скобок. По ним строится калибровочная кривая, с помощью которой обсчитываются пробы в этой скобке.

Во всех режимах скобок, кроме **Индивидуальный**, операция **Очистить всю калибровку** выполняется автоматически для всех открытых скобок. В режиме скобок **Индивидуальный** при необходимости можно задать тип обработки **Очистить всю калибровку**.

Скобки задаются в окне **списка вводов проб**. В программе доступны несколько режимов скобок:

- **Полностью**

Калибровочная кривая рассчитывается по всем калибровочным стандартам в последовательности, начиная с первого и заканчивая последним. Все пробы обрабатываются только *после* построения калибровочной кривой.

- **Без перекрытия**

Для этого режима в последовательности должны быть как минимум три серии стандартов, а в середине должны быть как минимум два стандарта. Каждый из стандартов в середине последовательности используется только в одной скобке.

Если в середине больше двух стандартов, они будут поделены между предыдущей и последующей скобками. Если в середине нечетное количество стандартов, лишний будет помещен в предыдущую скобку.

- **С перекрытием**

В последовательности должны быть как минимум три набора стандартов. Стандарты в середине последовательности используются в двух скобках (предыдущая и последующая скобка).

- **Индивидуальный**

Пробы можно группировать как угодно. В столбце **Тип анализа** можно отдельно для каждого калибровочного стандарта указать, какой из уровней калибровки должен быть очищен. Если не задать тип анализа, для этого стандарта будет рассчитано среднее с соответствующим стандартом из предыдущего блока.

Присвоение веса точкам калибровки

Для компенсации погрешности отклика на разных уровнях калибровки можно присвоить точкам калибровки, по которым строится калибровочная кривая, весовые коэффициенты, которые отражают относительную важность этой точки.

Присвоение весов точкам калибровки контролируется параметром **Метод весовых коэффициентов**. По умолчанию точкам на всех уровнях присваивается одинаковый весовой коэффициент, а весовой коэффициент для кривой в целом нормируется к 1.

Доступны следующие весовые коэффициенты:

Нет

Все точки калибровки имеют одинаковый вес.

вес. коэфф. = 1

где:

вес. коэфф.

Весовой коэффициент уровня калибровки

1/Кол-во

Точке калибровки присваивается весовой коэффициент $1/\text{количество соединения}$, нормированный по точке с минимальным количеством соединения таким образом, чтобы максимальный весовой коэффициент был равен 1. Если начало координат включено в кривую, ему присваивается среднее значение весов остальных точек калибровки.

$$wt = \frac{\text{Minimum(Amounts)}}{\text{CurrentAmount}}$$

где:

Текущее количество	Количество для уровня
Минимум (Количества)	Минимальное количество соединения среди всех точек (уровней) калибровочной кривой
вес. коэфф.	Весовой коэффициент уровня калибровки

1/Кол-во²

Точке калибровки присваивается весовой коэффициент $1/(\text{количество соединения})^2$, нормированный по точке с минимальным количеством соединения таким образом, чтобы максимальный весовой коэффициент был равен 1. Квадратичные весовые коэффициенты точек калибровки, например, можно использовать для корректировки разброса. Они гарантируют, что вес точек калибровки, расположенных ближе к началу координат (обычно для них измерения выполняются точнее), будет выше, чем у точек калибровки, удаленных от начала координат (для них возможен разброс).

$$wt = \frac{\text{Minimum(Amounts)}^2}{\text{CurrentAmount}^2}$$

где:

Текущее количество	Количество для уровня
Минимум (Количества)	Минимальное количество соединения среди всех точек (уровней) калибровочной кривой
вес. коэфф.	Весовой коэффициент уровня калибровки

1/Отклик

Точке калибровки присваивается весовой коэффициент 1/отклик, нормированный по точке с минимальным откликом таким образом, чтобы максимальный весовой коэффициент был равен 1. Если начало координат включено в кривую, ему присваивается среднее значение весов остальных точек калибровки.

$$wt = \frac{\text{Minimum(Responses)}}{\text{CurrentResponse}}$$

где:

Текущий отклик	Отклик для уровня
Минимум (Отклики)	Минимальный отклик среди всех точек (уровней) калибровочной кривой
вес. коэфф.	Весовой коэффициент уровня калибровки

1/Отклик²

Точке калибровки присваивается весовой коэффициент 1/отклик², нормированный по точке с минимальным откликом таким образом, чтобы максимальный весовой коэффициент был равен 1. Квадратичные весовые коэффициенты точек калибровки, например, можно использовать для корректировки разброса. Они гарантируют, что вес точек калибровки, расположенных ближе к началу координат (обычно для них измерения выполняются точнее), будет выше, чем у точек калибровки, удаленных от начала координат (для них возможен разброс).

$$wt = \frac{\text{Minimum(Responses)}^2}{\text{CurrentResponse}^2}$$

где:

Текущий отклик	Отклик для уровня
Минимум (Количества)	Минимальный отклик среди всех точек (уровней) калибровочной кривой
вес. коэфф.	Весовой коэффициент уровня калибровки

Модели калибровочных кривых

OpenLab CDS может рассчитать кривую калибровки в соответствии с различными моделями. Поддерживаются следующие модели (см. «Расчет калибровочной кривой» на странице 121):

- Линейная аппроксимация (см. «Линейная аппроксимация» на странице 123)
- Квадратичная аппроксимация (см. «Квадратичная аппроксимация» на странице 124)
- Логарифмическая и квадратичная аппроксимация (см. «Логарифмическая и экспоненциальная аппроксимация» на странице 128)
- Аппроксимация по среднему КО (см. «Аппроксимация по среднему КО» на странице 129)

Вы можете установить модель кривой калибровки отдельно для каждого калибруемого соединения.

Обработка нулевой точки

При расчете калибровочной кривой приложение может по-разному учитывать нулевую точку графика. Можно установить этот параметр независимо для каждого соединения. Для каждого типа кривой доступен определенный набор параметров для обработки нулевой точки (например, логарифмическую калибровочную кривую нельзя принудительно провести через нулевую точку).

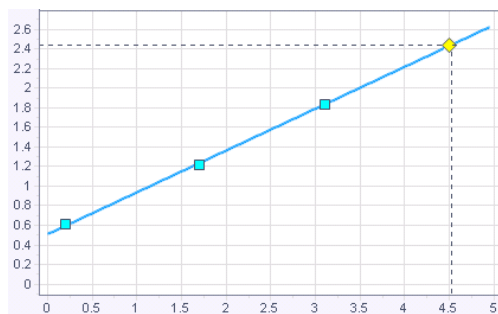


Рисунок 86 Не учитывать нулевую точку

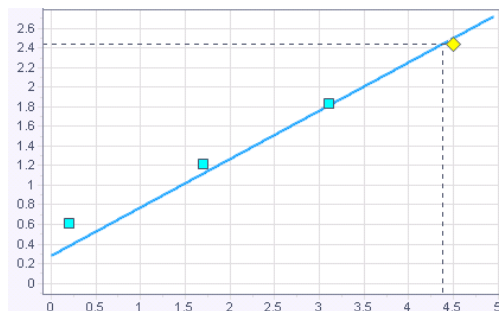


Рисунок 87 Включить нулевую точку в расчеты

Параметр **Включить** добавляет к уровням калибровки точку с количеством = 0 и откликом = 0.

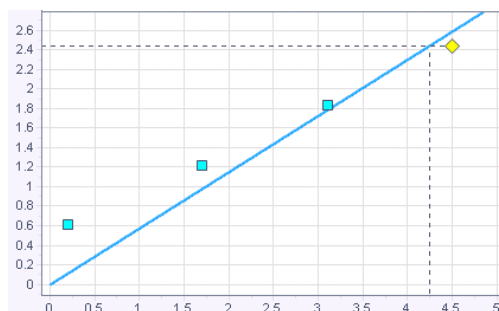


Рисунок 88 Принудительно провести калибровочную кривую через нулевую точку

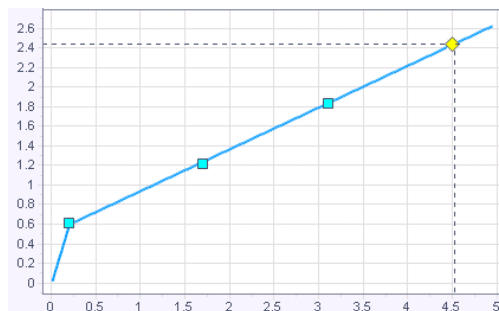


Рисунок 89 Подключить нулевую точку (не включается в расчеты)

Расчет калибровочной кривой

Оптимальная калибровочная кривая рассчитывается путем аппроксимации точек калибровки. Эта аппроксимация основана на методе наименьших квадратов, который минимизирует сумму квадратов отклонений точек от кривой. Тип кривой применяется к взвешенным точкам калибровки. Расчет зависит от способа задания коэффициента отклика (см. раздел «Тип и коэффициент отклика» на странице 109).

Если КО определен, как **Отклик от количества**:

$$\Sigma(\text{вес. коэфф.} * (\text{ПлощадьТКал} - \text{РассчитПлощадь})^2) = \text{минимум}$$

где:

Σ	Сумма по всем точкам (уровням) калибровки
РассчитПлощадь	Площадь, полученная для количества соединения на данном уровне калибровки из калибровочной кривой
ПлощадьТКал	Площадь точки калибровки на данном уровне калибровки
вес. коэфф.	Весовой коэффициент точки калибровки

$$\Sigma(\text{вес. коэфф.} * (\text{ВысотаТКал} - \text{РассчитВысота})^2) = \text{минимум}$$

где:

Σ	Сумма по всем точкам (уровням) калибровки
РассчитВысота	Высота, полученная для количества соединения на данном уровне калибровки из калибровочной кривой
ВысотаТКал	Высота точки калибровки на данном уровне калибровки
вес. коэфф.	Весовой коэффициент точки калибровки

Если КО определен, как **Количество от отклика**:

$$\Sigma(\text{вес. коэф.} * (\text{Кол-воТКал} - \text{РассчитКол-во})^2) = \text{минимум}$$

где:

Σ	Сумма по всем точкам (уровням) калибровки
РассчитКол-во	Количество, полученное для высоты или площади пика на данном уровне калибровки из калибровочной кривой
Кол-воТКал	Количество для точки калибровки на данном уровне калибровки
вес. коэфф.	Весовой коэффициент точки калибровки

Параметры для расчета кривой

При всех расчетах кривой используются следующие параметры:

a, b, c	Коэффициенты кривой
x	В режиме Отклик от количества : Количество (ESTD) или отношение количества (ISTD) В режиме Количество от отклика : Площадь, процент площади, высота или процент высоты (ESTD) Отношение площади или высоты (ISTD)
y	В режиме Отклик от количества : Площадь, процент площади, высота или процент высоты (ESTD) Отношение площади или высоты (ISTD) В режиме Количество от отклика : Количество (ESTD) или отношение количества (ISTD)
вес. коэфф.	Весовой коэффициент уровня калибровки

Линейная аппроксимация

Для аппроксимации кривой используется метод наименьших квадратов (см. «Расчет калибровочной кривой» на странице 121).

Уравнение кривой:

$$y = a * x + b$$

где:

a наклон

b точка пересечения с осью Y

Расчет коэффициентов кривой:

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

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

для линейной аппроксимации требуется как минимум две точки калибровки.

Включить нулевую точку

Если нулевая точка включена, точка (0,0) добавляется к другим точкам и ей присваивается среднее значение весовых коэффициентов других точек, то есть значение $\Sigma(\text{ВКТК})$ увеличивается на среднее значение весовых коэффициентов других точек.

Принудительно через нулевую точку

При включении параметра «Принудительно через нулевую точку» уравнение кривой будет следующим:

$$y = a * x$$

где:

a

наклон

Расчет коэффициента кривой:

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

Если кривая принудительно проводится через нулевую точку или нулевая точка включается в расчет, то для аппроксимации достаточно одного уровня калибровки.

Квадратичная аппроксимация

Формула квадратичной кривой:

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

Для квадратичной аппроксимации требуется как минимум три точки калибровки. Если начало координат включено или принудительно установлено, необходимы две точки.

Расчет коэффициентов квадратичной подгонки

Коэффициенты будут решением следующей системы линейных уравнений. Для решения соответствующего нормального матричного уравнения ($A^T A x = A^T y$) используется алгоритм Краута. В приведенной формуле суммы сокращаются следующим образом:

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

Чтобы избежать переполнения, перед началом расчета значения x нормируются:

$$\text{Норм} = \sum(x)$$

$$x = x / \text{Норм}$$

Нормальные уравнения для квадратичной кривой:

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

В виде матричного уравнения:

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

Разложение Краута:

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

Со следующими сокращениями:

$$L_{11} = W$$

$$U_{12} = \frac{XW}{L_{11}}$$

$$L_{21} = XW$$

$$U_{13} = \frac{X^2W}{L_{11}}$$

$$L_{31} = X^2W$$

$$L_{22} = X^2W - L_{21} * U_{12}$$

$$U_{23} = \frac{X^3W - L_{21} * U_{13}}{L_{22}}$$

$$L_{32} = X^3W - L_{31} * U_{12}$$

$$L_{33} = X^4W - (L_{31} * U_{13}) - (L_{32} * U_{23})$$

$$z_0 = \frac{YW}{L_{11}}$$

$$z_1 = \frac{XYW - (L_{21} * z_0)}{L_{22}}$$

$$z_2 = \frac{X^2YW - (L_{31} * z_0) - (L_{32} * z_1)}{L_{33}}$$

$$a' = z_2$$

$$b' = z_1 - (U_{23} * a')$$

$$c' = z_0 - (U_{12} * b') - (U_{13} * a')$$

Затем следует обратить нормирование:

$$c = c'$$

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

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

Принудительно через нулевую точку

Если выбрано принудительное проведение кривой через нулевую точку, то при создании нормальных уравнений поправочный коэффициент a обнуляется.

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

$$L11 = X2W$$

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

$$L21 = X3W$$

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

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

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

$$a' = z1$$

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

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

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

Включить нулевую точку

Если нулевая точка включена, точка (0,0) добавляется к другим точкам и ей присваивается среднее значение весовых коэффициентов других точек, то есть значение $\Sigma(BKTK)$ увеличивается на среднее значение весовых коэффициентов других точек.

Логарифмическая и экспоненциальная аппроксимация

Логарифмическая и экспоненциальная аппроксимация

Для экспоненциальной и логарифмической аппроксимации шкалы по оси количеств или интенсивности сигнала преобразуются с помощью функции натурального логарифма $\ln$. После этого к преобразованным данным применяется линейная аппроксимация с учетом весовых коэффициентов.

Параметры **Включить нулевую точку** и **Принудительно через нулевую точку** для этих типов аппроксимации неактивны, так как функция $\ln$ в точке начала координат уходит в бесконечность.

Логарифмический

Уравнение кривой:

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

Преобразования: Преобразуется шкала по оси x .

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

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

Экспонента

Уравнение кривой:

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

Преобразования: Преобразуется шкала по оси y .

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

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

Дважды логарифмическая аппроксимация

Для дважды логарифмической аппроксимации обе шкалы, и по оси количеств, и по оси интенсивности сигнала, преобразуются с помощью функции десятичного логарифма $\log$. После этого к преобразованным данным применяется линейная аппроксимация с учетом весовых коэффициентов.

Параметры **Включить нулевую точку** и **Принудительно через нулевую точку** для этого типа аппроксимации неактивны, так как функция $\log$ в точке начала координат уходит в бесконечность.

Уравнение кривой:

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

Преобразования: Преобразуются шкалы по осям x и y .

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

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

Аппроксимация по среднему КО

Формула для среднего коэффициента отклика:

$$y = a * x$$

где:

a

наклон

Программа сначала вычисляет коэффициент отклика (КО) для каждого калибровочного стандарта. Затем из этих коэффициентов рассчитывается среднее. Средний КО приводится в легенде калибровочной кривой и соответствует наклону кривой («Тип и коэффициент отклика» на странице 109).

Кривая всегда проходит через начало координат, этот параметр включается автоматически. Автоматически включается метод весовых коэффициентов **Отсутствует**.

При аппроксимации по среднему КО величины r и R^2 не имеют смысла и не рассчитываются.

Оценка калибровочной кривой

Качество подгонки калибровочной кривой к уровням калибровки и наличие выбросов (результатов измерений, лежащих далеко от кривой) можно оценить с помощью статистических расчетов. При расчете калибровочной кривой становятся известными коэффициент корреляции и относительное стандартное отклонение для каждой кривой, а также относительное остаточное значение для каждого калибровочного уровня.

Проверка калибровочной кривой

После расчета калибровочные кривые проверяются. В описанных далее случаях появляются предупреждения:

- недостаточно точек калибровки для расчета кривой;
- кривая имеет нулевой или отрицательный наклон;
- наклон имеет бесконечное значение;
- не удастся рассчитать калибровочную кривую (например, произошло числовое переполнение).

Относительная погрешность

Погрешность — это расстояние от точки калибровки до вычисленной калибровочной кривой:

$$\text{Погрешность} = y_i - Y_i$$

где:

y_i	Измеренный отклик (площадь или высота) или количество (в зависимости от режима калибровки)
Y_i	Расчетный отклик или количество для уровня i (найденный по калибровочной кривой)

Относительная погрешность рассчитывается для каждого уровня калибровки по следующей формуле:

$$\text{Rel Residual} = \frac{\text{Residual}}{Y_i} = \frac{(y_i - Y_i)}{Y_i}$$

где:

y_i Измеренный отклик (площадь или высота) или количество

Y_i Расчетный отклик или количество для уровня i (найденный по калибровочной кривой)

Относительная погрешность часто измеряется в процентах (поле **ОтнОстаток%**). Для этого значение относительной погрешности из поля **ОтнО. погрешн.** умножается на 100.

Статистика калибровочной кривой

При расчете калибровочной кривой для каждой кривой становятся известны коэффициент корреляции, коэффициент детерминации и остаточное стандартное отклонение.

Коэффициент корреляции

Коэффициент корреляции (r) дает степень подгонки калибровочной кривой между точками данных. Он рассчитывается по следующей формуле:

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

где

r	Коэффициент корреляции
wt_i	Вес точки данных
$\bar{y}$	Средние значения измеренного отклика или количества Если калибровочная кривая принудительно проведена через точку начала координат (Начало координат = Принудительно в методе обработки данных), OpenLab CDS рассчитывает нецентрированный коэффициент детерминации. В таком случае значение $\bar{y}$ из расчетов отбрасывается.
y_i	Измеренный отклик (площадь, отношение площадей (метод внутреннего стандарта), высота или отношение высот (метод внутреннего стандарта)) или количества (количество или отношение значений количества (метод внутреннего стандарта)) в зависимости от режима калибровки
$\bar{Y}$	Средние значения предполагаемого отклика или количества
Y_i	Предполагаемое значение отклика или количества (при использовании калибровочной кривой)

$\bar{y}$ и $\bar{Y}$ являются средними значениями измеренного и ожидаемого отклика или количества, вычисленными по следующей формуле:

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

где

wt_i	Вес точки данных
$\bar{y}$	Средние значения измеренного отклика или количества
y_i	Измеренный отклик (площадь, отношение площадей (метод внутреннего стандарта), высота или отношение высот (метод внутреннего стандарта)) или количества (количество или отношение значений количества (метод внутреннего стандарта)) в зависимости от режима калибровки

и

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

где

wt_i	Вес точки данных
$\bar{Y}$	Средние значения предполагаемого отклика или количества
Y_i	Предполагаемое значение отклика или количества (при использовании калибровочной кривой)

При использовании **принудительного начала координат** считается, что центр точек находится на нулевой отметке, а средние значения заменяются нулевыми. Программы для расчетов других производителей могут использовать другие подходы, и полученные с их помощью результаты могут немного отличаться.

Коэффициент корреляции равен 1 для идеальной аппроксимации. Он уменьшается по мере того, как отдельные или усредненные точки калибровки отклоняются от кривой регрессии. Обычно значение составляет от 0,99 до 1. Коэффициент корреляции не является прямым показателем точности аналитического метода, при этом низкие значения указывают на низкую точность.

Коэффициент детерминации

Коэффициент детерминации R^2 рассчитывается по следующей формуле:

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

где

R^2	Коэффициент детерминации
$\bar{y}$	Средние значения измеренного отклика или количества Если калибровочная кривая принудительно проведена через точку начала координат (Начало координат = Принудительно в методе обработки данных), OpenLab CDS рассчитывает нецентрированный коэффициент детерминации. В таком случае значение $\bar{y}$ из расчетов отбрасывается.
y_i	Измеренный отклик или количество. Отклик может быть площадью (площадь, относительная площадь и отношение площадей (для методов с внутренним стандартом)) или высотой (высота, относительная высота или отношение высот (для методов с внутренним стандартом)). Количество может быть либо абсолютным, либо отношением количеств (для методов с внутренним стандартом). Тип значения зависит от режима калибровки.
Y_i	Предполагаемое значение отклика или количества (при использовании калибровочной кривой)

Остаточное стандартное отклонение

Остаточное стандартное отклонение (иногда называемое среднеквадратичной погрешностью) рассчитывается по следующему уравнению:

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

где:

d = 3	Количество степеней свободы квадратичной кривой, не проходящей через точку начала координат.
d = 2	Количество степеней свободы квадратичной кривой, принудительно проведенной через точку начала координат, или количество степеней свободы линейной кривой, не проходящей через точку начала координат.
d = 1	Количество степеней свободы линейной кривой, принудительно проведенной через точку начала координат.
Остаточное ст. отклонение	Остаточное стандартное отклонение
y _i	Измеренный отклик (площадь, отношение площадей (метод внутреннего стандарта), высота или отношение высот (метод внутреннего стандарта)) или количества (количество или отношение значений количества (метод внутреннего стандарта)) в зависимости от режима калибровки
Y _i	Предполагаемое значение отклика или количества (при использовании калибровочной кривой)
n	число калибровочных точек

Для калибровочных кривых, **проводимых через точку начала координат**, эта точка включается в расчеты наравне с остальными и учитывается в значении n.

К значениям у весовые коэффициенты не применяются.

Остаточное стандартное отклонение — это более чувствительный способ оценить качество калибровочной кривой по сравнению с коэффициентом корреляции. В идеальном случае остаточное стандартное отклонение равно 0. Чем больше значение остаточного стандартного отклонения — тем дальше от кривой лежат точки калибровки.

Стандартное отклонение

Стандартное отклонение рассчитывается по формуле для *среднеквадратичного отклонения*:

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

где:

σ	Стандартное отклонение
N	Число проб
x_i	Измеренный отклик или количество. Для кривой типа <i>Средний КО</i> это коэффициент отклика соединения для одной пробы.
μ	Среднее значение. Для кривой типа <i>Средний КО</i> это средний коэффициент отклика соединения для всех проб.

ПРИМЕЧАНИЕ

Для кривой типа **Средний КО**. Эта формула применяется вместо формулы для выборочного среднеквадратичного отклонения ($N-1$ в делителе) из-за как правило небольшой выборки (малого числа точек калибровки).

Относительное стандартное отклонение

Относительное стандартное отклонение рассчитывается по формуле:

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

где:

OCO	Относительное стандартное отклонение
σ	Стандартное отклонение
μ	Среднее значение

Что такое количественный анализ?	138
Расчеты при количественном анализе	138
Поправочные коэффициенты	139
Множители	139
Коэффициент разбавления	140
Концентрация и массовая доля в %	141
Процент площади и процент высоты	142
Количественный анализ калибровочных соединений	143
Расчет по методу внешнего стандарта	143
Расчет по методу внутреннего стандарта	145
Количественный анализ некалиброванных соединений	149
Косвенный количественный анализ с использованием калибровочных соединений	149
Количественный анализ с параметром «Коэффициент вручную»	150
Количественный анализ неидентифицированных пиков	152
Количественный анализ неидентифицированных пиков с заданным коэффициентом отклика	152
Количественный анализ неидентифицированных пиков с использованием калиброванного соединения	153
Нормировка	154
Расчет нормированных концентраций	155
Расчет нормированных количеств	156
Количественный анализ групп	157
Определение группы по времени	157
Количественный анализ группы по времени	159
Определение группы по названию	163
Количественный анализ группы по названию	164

В этом разделе описывается количественный анализ соединений и объясняются расчеты, которые при нем используются.

Что такое количественный анализ?

После того, как пики были проинтегрированы и идентифицированы, следующим шагом является количественный анализ. В количественном анализе для определения количества соединения в пробе используется площадь пика или его высота.

Количественный анализ включает много этапов, которые могут быть кратко сформулированы следующим образом:

- Анализ пробы с неизвестным количеством соединения для получения отклика, соответствующего этому количеству.
- Сравнение отклика неизвестного количества с откликом известного количества для определения фактического количества соединения.

Для корректного сравнения отклика неизвестной пробы с откликом известной пробы сопоставляемые данные должны быть получены и обработаны в одинаковых условиях.

Расчеты при количественном анализе

OpenLab CDS предлагает следующие процедуры расчета для определения количества каждого компонента, присутствующего в смеси:

- процент площади или высоты (Площадь% или Высота%);
- Количественный анализ с параметром «Коэффициент вручную»
- внешний стандарт (ESTD);
- внутренний стандарт (ISTD);
- Косвенный количественный анализ с использованием калибровочных соединений

Расчеты, используемые для определения концентрации соединения в неизвестной пробе, зависят от типа количественного анализа. В каждой методике расчета используется площадь или высота пика, но проводится анализ разного типа.

Поправочные коэффициенты

В количественном анализе используются различные поправочные коэффициенты, *множитель* (для соединения или ввода пробы) и *коэффициент разбавления*. Эти коэффициенты используются в процедурах калибровки для компенсации изменений в отклике детектора на различные компоненты пробы, значения концентрации, степени разбавления пробы, количества пробы и чистоты соединений, а также для преобразования единиц.

Множители

Множители используются в каждой расчетной формуле для умножения результата для каждого соединения. Множители позволяют преобразовывать единицы измерения для пересчета количества в концентрацию или вносить поправки для учета различной чистоты стандартов.

Множители задаются на уровне отдельных проб (список вводов проб или таблица последовательности) и на уровне соединений (таблица соединений в методе обработки). В OpenLab CDS можно ввести до пяти множителей на уровне пробы и один множитель соединения.

Множитель для идентифицированного соединения рассчитывается по формуле:

$$\text{Множитель} = \text{МножительСоединения} * \text{МножительПробы1} * \text{МножительПробы 2} * \dots$$

Коэффициент разбавления

Коэффициент разбавления — это число, на которое умножается или делится количество при расчете концентрации (см. «концентрация»). Коэффициенты разбавления устанавливаются на уровне вводов проб (столбцы **Коэф. разбавл.** в списке вводов проб). Можно использовать коэффициент разбавления для изменения шкалы представления результатов или для учета изменений в составе пробы в ходе предварительного анализа. Можно также использовать коэффициент разбавления для любых других целей, требующих использования постоянного коэффициента.

Разбавление пробы является сочетанием нескольких (до 5) коэффициентов разбавления:

Разбавление пробы = Коэффициент разбавления 1 * Коэффициент разбавления 2 *...

Концентрация и массовая доля в %

Концентрация отображается в столбце **Концентрация** таблицы результатов ввода пробы.

Расчет зависит от следующих параметров (все параметры доступны на вкладке **Общее** раздела **Соединения > Калибровка**):

- **Расчет концентрации:** этот параметр позволяет использовать коэффициенты разбавления в качестве делителей или дополнительных множителей.
- **Расчет массовой доли в %:** концентрация рассчитывается, как массовая доля в процентах (отношение массы вещества к массе пробы).

Если флажок **Расчет массовой доли в %** снят (по умолчанию):

Концентрация = Количество * Множители * Коэффициенты разбавления

или

$$\text{Concentration} = \text{Amount} * \frac{\text{Multipliers}}{\text{Dilution Factors}}$$

Если флажок **Расчет массовой доли в %** установлен:

Концентрация рассчитывается как массовая доля в процентах (отношение массы вещества к массе пробы).

$$\text{Concentration} = \left(\frac{\text{Amount}}{\text{Sample Amount}} * 100 \right) * \text{Multipliers} * \text{Dilution Factors}$$

или

$$\text{Concentration} = \left(\frac{\text{Amount}}{\text{Sample Amount}} * 100 \right) * \frac{\text{Multipliers}}{\text{Dilution Factors}}$$

Больше информации о вычислении множителей и коэффициентов разбавления можно найти в разделе «[Поправочные коэффициенты](#)» на странице 139.

Процент площади и процент высоты

Способ расчета **Площадь%** сообщает площадь каждого пика в сигнале как процент от общей площади всех пиков сигнала. Способ **Площадь%** не требует предварительной калибровки и не зависит от введенного количества пробы в диапазоне детектора. При этом не используются коэффициенты отклика. Если все компоненты дают одинаковый отклик в детекторе, то подсчет **Площадь%** обеспечивает пригодную оценку относительных количеств компонентов.

Подсчет **Площадь%** регулярно используется там, где интерес представляют качественные результаты, чтобы получить информацию для создания таблицы соединений, которая требуется для других калибровочных процедур.

Способ расчета **Высота%** сообщает высоту каждого пика в сигнале как процент от общей высоты всех пиков сигнала.

В расчете по проценту площади или проценту высоты не применяются поправочные коэффициенты.

Количественный анализ калибровочных соединений

Для способов расчета по методу внешнего стандарта (ESTD), с нормированием и по методу внутреннего стандарта (ISTD) требуется калибровка и поэтому используется таблица соединений. Таблица соединений устанавливает способ преобразования откликов в выбранные единицы в соответствии с намеченной процедурой.

Расчет по методу внешнего стандарта

Метод внешнего стандарта ESTD является основным методом количественного анализа, при котором как калибровочные, так и исследуемые образцы анализируются при одинаковых условиях. Для подсчета количества в неизвестной пробе сравниваются результаты, полученные для исследуемого и калибровочного образцов.

В отличие от метода внутреннего стандарта, метод внешнего стандарта использует абсолютные коэффициенты отклика. Коэффициенты отклика определяются из калибровки и затем записываются. В последующих анализах количества веществ определяются уже путем применения этих коэффициентов отклика к откликам проанализированных образцов. Убедитесь, что размер вводимой пробы воспроизводится от одного ввода пробы к другому, так как в образце нет стандарта, с помощью которого можно было скорректировать изменения введенного объема пробы или изменения на этапе пробоподготовки.

При обработке данных анализа с использованием внешнего стандарта расчет количества отдельного соединения в неизвестной пробе происходит в два этапа:

- 1 По калибровочным точкам данного соединения рассчитывается уравнение калибровочной кривой, при этом используются параметры аппроксимации, указанные в параметрах **Режим** и **Нулевая точка** таблицы соединений.
- 2 Количество вещества в неизвестной пробе рассчитывается по уравнению, описанному выше. Это количество может быть выведено в отчет непосредственно или после дополнительных вычислений с использованием множителей пробы, соединения и коэффициентов разбавления.

Одноуровневая калибровка

Для одноуровневой калибровки коэффициент отклика — это просто отношение отклика и количества для точки калибровки. Если флажки **Включить нулевую точку** и **Принудительно через нулевую точку** сняты, программа выдаст предупреждение.

Коэффициент отклика (КО) определяется как отношение отклика к количеству соединения или наоборот (см. раздел «Способ задания КО» на странице 109). Для расчета КО приложение использует количество соединения в калибровочном стандарте и соответствующий этому соединению отклик, полученный при анализе этого стандарта.

Формула одноуровневой калибровки по внешнему стандарту зависит от типа отклика, заданного в методе обработки:

$$\text{Количество} = \text{Площадь пика} / \text{КО}$$

или:

$$\text{Количество} = \text{Высота пика} / \text{КО}$$

где:

Количество

Количество соединения

КО

Коэффициент отклика

Подробнее о расчете концентрации см. «Концентрация и массовая доля в %» на странице 141.

Многоуровневая калибровка

При многоуровневой калибровке коэффициент отклика определяют по калибровочной кривой.

Расчет по методу внутреннего стандарта

Метод внутреннего стандарта устраняет недостатки метода внешнего стандарта путем добавления известного количества вещества, которое служит в качестве нормализующего фактора. Это вещество, *внутренний стандарт*, добавляется как в калибровочные, так и в исследуемые образцы.

Соединение, используемое в качестве внутреннего стандарта, должно быть похоже на калибруемое соединение как химически, так и по времени удерживания/миграции, но должно быть хроматографически различимо.

Таблица 8 Метод внутреннего стандарта

Достоинства	Недостатки
Изменение объема пробы не критично.	Внутренний стандарт должен добавляться к каждому образцу.
Дрейф показаний прибора компенсируется внутренним стандартом.	
Влияние способов подготовки образца сведено к минимуму, если химические свойства внутреннего стандарта и исследуемого вещества схожи.	

Если метод внутреннего стандарта используется для калибровок с нелинейными характеристиками, следует остерегаться того, чтобы ошибки, которые вытекают из метода подсчета, не привели к систематическим ошибкам. Для многоуровневой калибровки количество вещества внутреннего стандарта должно оставаться постоянным, т. е. тем же самым для всех уровней.

При анализах с использованием внутреннего стандарта количество интересующего вещества связано с количеством вещества внутреннего стандартного компонента отношением откликов двух пиков.

OpenLab CDS поддерживает до пяти внутренних стандартов.

Для расчетов с использованием внутреннего стандарта вместо исходных абсолютных значений откликов и количеств используются относительные. Они рассчитываются делением отклика и количества соединения измеряемого пика на отклик и количество соединения для пика соответствующего внутреннего стандарта.

$$\text{Относительный отклик} = \text{Отклик} / \text{Отклик}_{\text{внутр.ст.}}$$

$$\text{Относительное количество} = \text{Количество} / \text{Количество}_{\text{внутр.ст.}}$$

Отклик может быть площадью, относительной площадью, высотой или относительной высотой (см. раздел «Тип и коэффициент отклика» на странице 109).

При выполнении расчетов с использованием внутреннего стандарта расчет исправленного количества определенного соединения в неизвестной пробе выполняется в несколько этапов. Эти этапы описаны в следующих разделах.

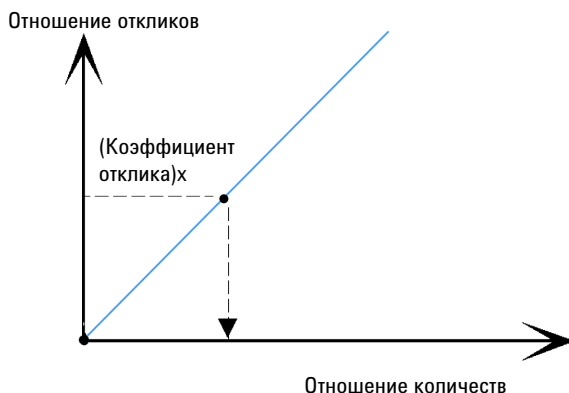
Калибровочные пробы

- 1 Калибровочные точки строятся путем расчета отношения количеств и отношения откликов для каждого уровня отдельного соединения в таблице соединений.

Отношение количеств — это количество соединения, деленное на количество внутреннего стандарта для этого уровня.

Отношение откликов — это отклик соединения (площадь или высота пика), деленное на отклик пика внутреннего стандарта для этого уровня.

- 2 Уравнение кривой, проходящей через калибровочные точки, рассчитывается с использованием модели кривой, указанной в таблице соединений метода обработки



Неизвестная проба

- 1 Для получения отношения откликов для неизвестной пробы, отклик соединения делится на отклик внутреннего стандарта, полученные для исследуемого образца.
- 2 Отношение количеств для определяемого соединения подсчитывается, используя уравнение для калибровочного графика, определенное в «Калибровочные пробы» на странице 146, и фактическое количество внутреннего стандарта в пробе.

Одноуровневая калибровка по внутреннему стандарту

Для одноуровневой калибровки относительный коэффициент отклика (ОКО) оценивается из отклика и концентрации калибровочных стандартов. В зависимости от определения коэффициента отклика в глобальных параметрах калибровки применяется одна из следующих формул:

Если КО определен, как **Отклик от количества**:

$$RRF = \frac{\text{Rel Response}}{\text{Rel Amount}}$$

Если КО определен, как **Количество от отклика**:

$$RRF = \frac{\text{Rel Amount}}{\text{Rel Response}}$$

где:

ОКО	Относительный коэффициент отклика
Отн. отклик	Относительный отклик
Отн. кол-во	Относительное количество

Количество и концентрация рассчитываются из значений отклика, полученных по результатам анализа, по следующим уравнениям:

Если КО определен, как **Отклик от количества**:

$$\text{Amount} = \left(\frac{\text{Rel Response}}{\text{RRF}} \right) * \text{Amount}_{\text{STD}}$$

Если КО определен, как **Количество от отклика**:

$$\text{Количество} = \text{ОКО} * \text{Отн. отклик} * \text{Кол-во}_{\text{ВН.СТ.}}$$

где:

Количество	Количество соединения
Отн. отклик	Относительный отклик
ОКО	Относительный коэффициент отклика
Кол-во _{ВН.СТ.}	Количество внутреннего стандарта

Для многоуровневой калибровки относительный коэффициент отклика оценивается из калибровочной кривой.

Подробнее о расчете концентрации см. «Концентрация и массовая доля в %» на странице 141.

Количественный анализ некалиброванных соединений

Количественный анализ некалиброванных соединений может проводить с заданным коэффициентом отклика или с помощью данных калибровки для одного из калиброванных соединений. Количественный анализ с заданным коэффициентом отклика или данными калиброванного соединения зависит от сигнала. В последнем случае, если количественный анализ калиброванного соединения проведен методом ISTD, то для неидентифицированных пиков используется ISTD таким же образом, как и для калиброванного соединения.

Косвенный количественный анализ с использованием калибровочных соединений

Если данные калибровки одного из калиброванных соединений предполагается использовать для количественного определения некалиброванных соединений, такое калиброванное соединение следует особым образом пометить в методе обработки. Для этого перейдите на вкладку **Таблица соединений** раздела **Калибровка** и в столбце **Режим** выберите **Эталон**. Все расчеты для некалиброванных соединений выполняются так же, как и для калиброванных. Если для количественного определения эталонного соединения применяется внутренний стандарт, этот внутренний стандарт будет использоваться и для определения некалиброванных соединений.

Отсутствие пика эталонного соединения приведет к тому, что количество некалиброванного соединения будет равно нулю.

Дополнительно в столбце **Испр. эталона** можно ввести поправочный коэффициент, на который будет умножен отклик пика, перед тем как рассчитывать количество некалиброванного соединения из коэффициента отклика калиброванного соединения.

Количественный анализ с параметром «Коэффициент вручную»

Программное обеспечение позволяет проводить количественный анализ идентифицированного соединения, основанный на заданном коэффициенте отклика (столбец **Коэффициент вручную**). В этом случае количество соединения рассчитывается по коэффициенту отклика:

$$\text{Количество} = \text{Отклик} * \text{Коэффициент вручную}$$

где:

Коэффициент вручную

Заданный коэффициент отклика

Отклик

Отклик может измеряться как площадь, процент площади, высота, процент высоты, относительная площадь или относительное количество (см. раздел «Тип и коэффициент отклика» на странице 109)

Подробнее о расчете концентрации см. «Концентрация и массовая доля в %» на странице 141.

Использование коэффициента вручную с методом ISTD

Если количественный анализ для соединения проводится с заданным коэффициентом отклика и ISTD, формула выглядит следующим образом:

$$\text{Относительная площадь} = \text{Площадь} / \text{Площадь}_{\text{ISTD}}$$

или:

$$\text{Относительная высота} = \text{Высота} / \text{Высота}_{\text{ISTD}}$$

В этом случае количество рассчитывается следующим образом:

$$\text{Количество} = \text{Относительная площадь} * \text{Коэффициент вручную} * \text{Количество}_{\text{ISTD}}$$

или:

$$\text{Количество} = \text{Относительная высота} * \text{Коэффициент вручную} * \text{Количество}_{\text{ISTD}}$$

Подробнее о расчете концентрации см. «Концентрация и массовая доля в %» на странице 141.

Зависимость коэффициента вручную и коэффициента отклика (КО)

Если КО определен, как **Отклик от количества**: (по умолчанию):

$$КО = 1 / \text{Коэффициент вручную}$$

Если КО определен, как **Количество от отклика**:

$$КО = \text{Коэффициент вручную}$$

Дополнительные сведения о коэффициенте отклика см. в разделе «[Тип и коэффициент отклика](#)» на странице 109.

Количественный анализ неидентифицированных пиков

Количественный анализ неидентифицированных пиков может быть проведен с использованием групп по времени с заданным коэффициентом отклика или с данными калибровки для одного из калиброванных соединений. Количественный анализ с заданным коэффициентом отклика или данными калиброванного соединения зависит от сигнала. В последнем случае, если количественный анализ калиброванного соединения проведен методом ISTD, то для неидентифицированных пиков используется ISTD таким же образом, как и для калиброванного соединения.

Дополнительные сведения о группах по времени см. в разделе [«Определение группы по времени»](#) на странице 157.

Количественный анализ неидентифицированных пиков с заданным коэффициентом отклика

В данном случае создается группа по времени в режиме количественного анализа **Коэффициент вручную**. Определенные временные интервалы группы по времени включают соответствующие неидентифицированные пики.

Кроме того, должны быть исключены пики, для которых проведен количественный анализ. Если выбран параметр **Определить количество для каждого пика индивидуально**, то количество и концентрация всех неидентифицированных пиков рассчитываются с использованием заданного коэффициента отклика.

Дополнительные сведения о расчете см. в разделе [«Количественный анализ групп по времени по коэффициенту вручную»](#) на странице 159.

Количественный анализ неидентифицированных пиков с использованием калиброванного соединения

В данном случае создается группа по времени в режиме количественного анализа **Эталон**. Определенные временные интервалы группы по времени включают соответствующие неидентифицированные пики.

Дополнительно в столбце **Испр. эталона** можно ввести поправочный коэффициент, на который будет умножен отклик пика, перед тем как рассчитывать количество некалиброванного соединения из коэффициента отклика калиброванного соединения.

Кроме того, должны быть исключены пики, для которых проведен количественный анализ. Если выбран параметр **Определить количество для каждого пика индивидуально**, то количество и концентрация всех неидентифицированных пиков рассчитываются с использованием эталонной кривой.

Нормировка

Общие параметры калибровки метода обработки данных позволяют выполнить нормировку количеств.

Анализ с нормировкой имеет те же недостатки, что и расчеты по относительной площади или высоте. Любые изменения, влияющие на общую площадь пиков, будут также влиять и на подсчет концентрации каждого пика. Нормировку рекомендуется применять только если все определяемые компоненты элюируются и интегрируются. Исключение отдельных пиков из обработки при использовании нормировки приведет к изменению расчетной концентрации пробы.

Подробную информацию о группах по времени можно найти в разделе [«Определение группы по времени»](#) на странице 157.

Если отдельные пики учитываются в составе группы по времени, они не включаются второй раз в полное количество; они уже были включены в количество группы по времени.

По умолчанию коэффициент нормировки равен 100,00 и результат анализа имеет размерность процентов (Норм%). Однако в методе можно задать и другое число и единицу измерения. Полное количество — это сумма количеств всех обсчитываемых соединений и групп по времени, не зависящая от основного пика соединения.

Система позволяет указывать, нужно ли включать в расчет внутренние стандарты. Если они не включаются (по умолчанию), то количества внутренних стандартов не прибавляются к полному количеству, а нормированное количество для них не рассчитывается.

Для *именованных групп* количество группы не включается в полное количество. Однако если в именованную группу был явно добавлен внутренний стандарт, он учитывается в количестве этой группы, даже если не будет учитываться при нормировке. Это может привести к тому, что нормированное количество для именованной группы будет больше 100 %.

Расчет нормированных концентраций

Нормированная концентрация соединения — это концентрация соединения относительно суммы концентрации всех обнаруженных в пробе соединений.

Расчет этой концентрации зависит от состояния флажка **Применить коэффициенты коррективы для нормализованных концентраций**. Этот флажок можно найти в параметрах калибровки метода обработки.

Если в расчете используются поправочные коэффициенты, то в зависимости от метода расчета концентрации **нормированная концентрация** может рассчитываться по одной из следующих формул:

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

Или

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

Без поправочных коэффициентов нормированная концентрация рассчитывается по формуле:

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

где:

$C_{норм}$	Нормированная концентрация
$M_{соед}$	Множитель, заданный для соединения в методе обработки
A	Количество
$M_{пробы}$	Множители, заданные для пробы в таблице последовательности
$D_{пробы}$	Коэффициенты разбавления, заданные для пробы в списке вводов проб или в таблице последовательности
f	Коэффициент нормировки, заданный в методе обработки данных

Расчет нормированных количеств

Нормированное количество соединения рассчитывается по уравнению:

$$\text{Compound Norm Amount} = \text{Compound Amount} * \frac{\text{Normalization}}{\text{Total Amount}}$$

где:

Количество соединения	Количество соединения
Нормированное количество соединения	Количество соединения после нормировки
Нормировка	Коэффициент нормировки, заданный в методе обработки данных
Суммарное количество соединений	Сумма количеств всех соединений и групп по времени. Количества для именованных групп не включаются в полное количество. Если для групп по времени активировать параметр Включить идентифицированные пики , то количества идентифицированных соединений, входящих в такие группы, будет учитываться в расчетах дважды.

$$\text{Group Norm Amount} = \text{Group Amount} * \frac{\text{Normalization}}{\text{Total Amount}}$$

где:

Количество группы	Количество группы
Норм. количество группы	Количество для группы после нормировки
Нормировка	Коэффициент нормировки, заданный в методе обработки данных

$$\text{Peak Norm Amount} = \text{Peak Amount} * \frac{\text{Normalization}}{\text{Total Amount}}$$

где:

Нормировка	Коэффициент нормировки, заданный в методе обработки данных
Количество пика	Количество для пика
Норм. количество пика	Количество для пика после нормировки

Количественный анализ групп

Определение группы по времени

Группа по времени включает в себя один или нескольких временных интервалов и задается на определенном сигнале. Ожидаемое время удерживания группы по времени используется только для сортировки, и его можно ввести вручную.

Группы по времени соответствуют *некалиброванным* и *калиброванным* диапазонам OpenLab EZChrom.

Следующий пример демонстрирует три группы по времени, причем группы 2 и 3 перекрываются. C1 и C2 — это идентифицированные соединения. Неидентифицированный пик с ВУ 5,689 min учитывается в обеих группах. Идентифицированные пики учитываются, только если это задано в параметрах группы.

Группы	Временные интервалы	Включить идентифицированные пики?
Группа 1	0,8 min - 1,4 min 2,8 min - 3,4 min	Нет
Группа 2	3,8 min - 5,9 min	Да
Группа 3	5,4 min - 7,2 min	Нет

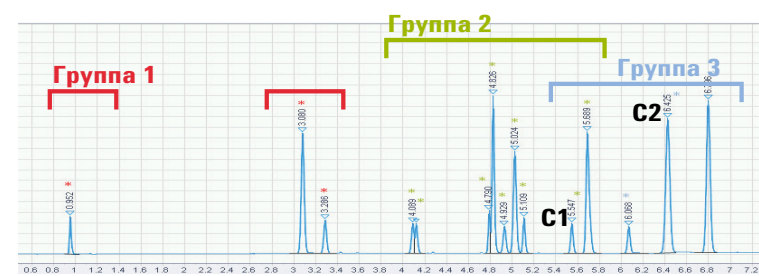


Рисунок 90 Пример. Группы по времени

ПРИМЕЧАНИЕ

Если для группы по времени не указан временной интервал, ее высота, площадь и количество соединения не рассчитываются. Если для группы по времени указаны один или нескольких временных интервалов, но в них не найдено ни одного пика, высота и площадь такой группы будут равны 0.

Если времена удерживания исправляются по эталону времени удерживания, то времена начала и окончания группы по времени исправляются на величину соответствующего сдвига (см. «[Расчеты для эталонных соединений по времени](#)» на странице 98).

Для количественного анализа рассчитываются площадь, высота или преобразованный отклик группы путем суммирования соответствующих значений отдельных пиков, содержащихся во временных интервалах (включая или исключая идентифицированные пики, в зависимости от параметров группы).

Группа по времени калибруется и количественные расчеты для нее выполняются с использованием параметров калибровки группы. Группы по времени поддерживают все режимы калибровки и количественных расчетов, доступные для обычных соединений (**Кривая**, **Коэффициент в ручную** и **Эталон**). В параметрах группы можно выбрать, чтобы количественные расчеты для каждого пика выполнялись отдельно. В таком случае для каждого пика группы количественный расчет выполняется отдельно, с использованием коэффициента отклика группы.

Внимание! Так как параметры калибровки группы по времени рассчитываются для группы в целом, использовать нелинейные калибровочные кривые и кривые с большим сдвигом следует с осторожностью.

Применять нелинейные калибровочные кривые для групп по времени не рекомендуется, так как это может негативно повлиять на точность результатов из-за некоммутативности расчетов.

Если калибровочная кривая группы сильно смещена (т. е. у нее высокое значение b точки пересечения с осью ординат), это смещение равномерно распределяется по всем пикам в пределах этой группы. Такое распределение может неправильно отражать вклад каждого из соединений в калибровочную кривую.

Если пик входит в несколько групп или в составе группы обсчитываются идентифицированные пики, такая ситуация может приводить к конфликтам. Подробнее о разрешении конфликтов можно узнать в разделе «[Оценка параметров группы по времени](#)» на странице 161.

Количественный анализ группы по времени

Количественный анализ групп по времени по коэффициенту вручную

В таком случае количество для группы рассчитывается с использованием фиксированного коэффициента отклика, заданного вручную.

Для внешнего стандарта:

Количество группы = Отклик группы * Коэффициент вручную

где:

Коэффициент вручную	Заданный коэффициент отклика
Отклик группы	Сумма всех (преобразованных) откликов

Или для внутреннего стандарта:

$$\text{Group Amount} = \frac{\text{Group Response}}{\text{Response}_{\text{STD}}} * \text{Manual Factor} * \text{Amount}_{\text{STD}}$$

где:

Кол-во _{вн.ст.}	Количество внутреннего стандарта
Коэффициент вручную	Заданный коэффициент отклика
Отклик _{вн.ст.}	(Преобразованный) отклик внутреннего стандарта

Концентрация группы = Количество группы * Множители * Коэффициенты разбавления

или

Концентрация группы = Количество группы * Множители / Коэффициенты разбавления

Больше информации о том, как вычислить множители и коэффициенты разбавления, можно найти в разделе «[Поправочные коэффициенты](#)» на странице 139. Больше информации о том, как вычислить концентрацию, можно найти в разделе «[Концентрация и массовая доля в %](#)» на странице 141.

Количественный анализ группы по времени по собственной калибровочной кривой

Количественный анализ группы по времени можно провести по ее собственной калибровочной кривой. Поддерживаются все варианты и уровни калибровки, за исключением преобразования **Отклик/ВУ**. В режиме ISTD необходимо выбрать внутренний стандарт для использования.

При выборе значения преобразованного отклика преобразованный отклик представляет собой сумму отдельно преобразованных откликов.

Количественный анализ группы по времени по кривой эталонного соединения

Количественный анализ группы по времени можно провести по калибровочной кривой другого отдельного соединения. Программное обеспечение позволяет использовать коэффициент отклика эталонного соединения (калибровочную кривую). В этом случае перед расчетом количества по коэффициенту отклика эталонного соединения можно ввести поправочный коэффициент (**Испр. эталона**), на который умножается отклик. В случае внутреннего стандарта берется тот же ISTD, что и для эталонного соединения.

Индивидуальный количественный анализ пиков в группе по времени

Если вы выберете выполнять количественные расчеты для каждого пика в группах по времени по отдельности, то количество соединения для пика будет рассчитываться по формуле:

$$\text{Peak Amount} = \text{Group Amount} * \frac{\text{Peak Response}}{\text{Group Response}}$$

Концентрация пика = Количество пика * Множители * Коэффициенты разбавления

или

Концентрация пика = Количество пика * Множители / Коэффициенты разбавления

Больше информации о том, как вычислить множители и коэффициенты разбавления, можно найти в разделе «Поправочные коэффициенты» на странице 139. Больше информации о том, как вычислить концентрацию, можно найти в разделе «Концентрация и массовая доля в %» на странице 141.

Оценка параметров группы по времени

Метод обработки

Таблица соединений			Параметры калификатора	Общее	
№	Тип	Название		Ожид. ВУ (мин)	Абсолют
2	⊕	Соединение №1		3,000	
3	⊕	Соединение №2		3,500	
1	⊕	Группа №1		0,000	

Параметры группы по времени

☐ Включить идентифицированные пики

☐ Определить количество для каждого пика индивид

начало ВУ: 0,000 конец ВУ: 0,000

Если для **Включить идентифицированные пики** флажок не установлен, результаты в группе включают в себя только результаты для пиков неизвестных соединений, попавших в один или несколько временных интервалов. Если флажок установлен, в подсчет будут включены также результаты для идентифицированных пиков.

Если в параметрах группы по времени флажок **Определить количество для каждого пика индивидуально** не установлен, количественные оценки для входящих в группу индивидуальных пиков не проводятся. В таком случае для индивидуальных пиков доступны только площадь, высота и преобразованный отклик, но не количество или концентрация. Если флажок установлен, количество соединения определяется отдельно для каждого пика в заданном временном интервале по параметрам калибровки группы. Установка или снятие этого флажка не влияет на результаты для группы.

Решение конфликтов

Если пик входит в несколько групп или в составе группы обсчитываются идентифицированные пики, такая ситуация может приводить к конфликтам. В таких случаях применяются следующие правила.

- Если пик неизвестного соединения входит в несколько групп, и для обеих этих групп определены параметры калибровки, включающие в себя уровни калибровки: Пик включается в отчет несколько раз, но количество каждый раз указывается одинаковое. Количественный расчет для него выполняется только один раз.

Для количественного расчета пика используются параметры группы с наименьшим ожидаемым временем удерживания. Если ожидаемое время удерживания для обеих групп одинаковое, используется группа, созданная последней.

- Если идентифицированный пик включается в количественный расчет для группы, но для него заданы его собственные параметры калибровки, то количество для этого пика рассчитывается с использованием его собственных параметров, а не параметров группы.

- Если идентифицированный пик включается в количественный расчет для группы и для него не заданы его собственные параметры калибровки, то количество для этого пика рассчитывается с использованием параметров группы. Для расчетов применяется тип отклика (площадь или высота), заданный для группы.
- Если идентифицированный пик является *внутренним стандартом* данной группы и для этой группы активирован параметр **Включить идентифицированные пики**, отклик этого пика будет вычтен из отклика группы по времени.

**Количествен-
ный анализ
для преобра-
зованных
откликов**

В окне **Результаты ввода проб** столбец **Преобразованный отклик** показывает отклик для каждого количественно оцениваемого пика. Если калибровочная кривая группы не масштабируется, преобразованный отклик соответствует площади или высоте пика.

Преобразованный отклик группы рассчитывается как *сумма* преобразованных откликов отдельных пиков, включенных в группу по времени. Калибровка и количественный анализ группы выполняются на основании суммы преобразованных откликов.

Площадь и высота в группе по времени также являются суммарными значениями, но рассчитываются, только если значения отклика не подвергались преобразованию.

Определение группы по названию

В именованную группу входят выбранные пользователем соединения и группы по времени. Количества для всех веществ и групп по времени, входящих в именованную группу, рассчитываются отдельно. Расчеты по внешним и внутренним стандартам выполняются с использованием данных калибровки индивидуальных соединений. Площадь, высота, количество и концентрация именованной группы рассчитываются сложением индивидуальных значений площадей, высот, количеств и концентраций. Калибровка для именованной группы в целом не выполняется. Одно соединение может входить в несколько именованных групп.

Ожидаемое время удерживания группы используется только для сортировки и его можно ввести вручную.

Именованная группа соответствует *группе именованных пиков* OpenLab EZChrom.

Следующий пример демонстрирует две именованные группы, с одним соединением, входящим в обе из них.

Группы	Группа 1	Группа 2
Включенные соединения	C1	
	C2	
		C3
	C4	C4
		C5
		C6

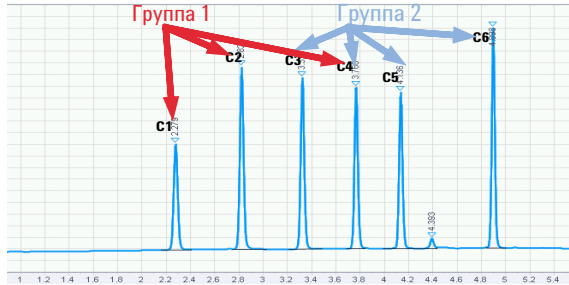


Рисунок 91 Пример. Группы по названию

Количественный анализ группы по названию

Результаты представлены в таблице группы по названию:

Площадь группы = Σ площадей пиков соединений + Σ площадей групп по времени

Высота группы = Σ высот пиков соединений + Σ высот групп по времени

Количество группы = Σ количеств соединений + Σ количеств групп по времени

Концентрация группы = Σ концентраций соединений + Σ концентраций групп по времени

Если ни одно из соединений или групп по времени в группе по названию не было идентифицировано, то группа по названию отображается в анализе как неидентифицированная.

Что такое анализ спектров УФ?	166
Проверка на примеси по спектру УФ	168
Расчет шума	168
Определяет значимые спектры	169
Коррекция фона	170
Расчет подобия	170
Расчет порогового значения	171
Оценка чистоты	172
О пороговых значениях, кривых подобия и чувствительности	173
Сравнение с традиционными графиками чистоты	176
Подтверждение идентификации по спектру УФ	180

В этом разделе описаны понятия проверки примесей и идентификации соединения на основе анализа спектров УФ.

Что такое анализ спектров УФ?

В программе анализа данных доступны несколько окон и функций, относящихся к анализу спектров УФ. Для просмотра этих окон и доступа к этим функциям выбранный ввод пробы должен включать в себя данные спектров УФ, например полученные на трехмерной УФ-системе.

Анализ спектров УФ позволяет добавить несколько дополнительных качественных критериев в рутинный анализ:

- *Подтверждение идентификации соединения*

Приложение сравнивает спектр УФ с соответствующим эталонным спектром. Высокий коэффициент совпадения указывает на то, что соединения, скорее всего, идентичны.

Подробнее об этих расчетах можно узнать в разделе

Подтверждение УФ ([«Подтверждение идентификации по спектру УФ»](#) на странице 180).

- *Проверка на примеси по спектру УФ*

Приложение сравнивает все спектры УФ пика со спектром вершины пика. Затем оно рассчитывает общий коэффициент совпадения, называемый чистотой по спектру УФ. Низкое значение чистоты по спектру УФ указывает на то, что пик представляет собой слившиеся пики соединений с сильно различающимися спектрами УФ.

Подробнее об этих расчетах можно узнать в разделе Проверка на примеси УФ ([«Проверка на примеси по спектру УФ»](#) на странице 168).

Функции анализа спектра УФ работают со спектральными данными, полученными от диодно-матричного детектора видимого и УФ-диапазона, и от детектора флуоресценции. Совместно с хроматографическими данными они добавляют в аналитическую информацию третье измерение (см. раздел [Рис. 92](#) на странице 167).

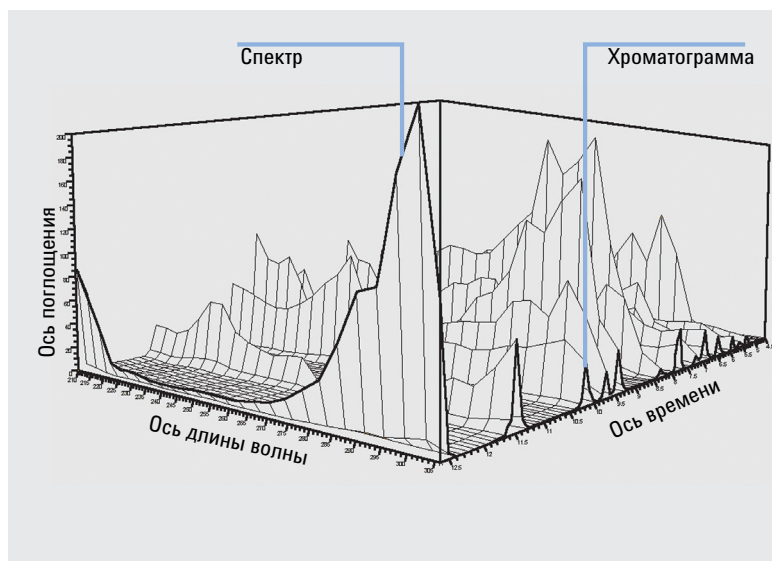


Рисунок 92 Спектральная информация

Проверка на примеси по спектру УФ

Проверка чистоты позволяет оценить, не содержит ли пик примесей. Для этого система сравнивает спектры, записанные в ходе элюирования пика. После коррекции базовой линии спектр вершины пика сравнивается со всеми значимыми спектрами, записанными вдоль пика. Программа рассчитывает коэффициент совпадения, характеризующий сходство спектров.

Для проверки чистоты по УФ-спектру программа выполняет следующие шаги.

- 1 Для пика
 - a «Расчет шума» на странице 168
 - b Определяет значимые спектры («Определяет значимые спектры» на странице 169)
- 2 Для спектра
 - a «Коррекция фона» на странице 170
 - b «Расчет подобия» на странице 170
 - c «Расчет порогового значения» на странице 171
- 3 «Оценка чистоты» на странице 172

Расчет шума

В рамках подготовки к дальнейшему анализу приложение рассчитывает следующие значения для каждого пика по спектрам в начале и конце базовой линии:

- Дисперсия шума
- Стандартное отклонение шума σ

Время начала и конца базовой линии зависит от интегрирования. Если несколько пиков разделены только перпендикуляром, то для расчета шума во всех пиках используются одни и те же спектры.

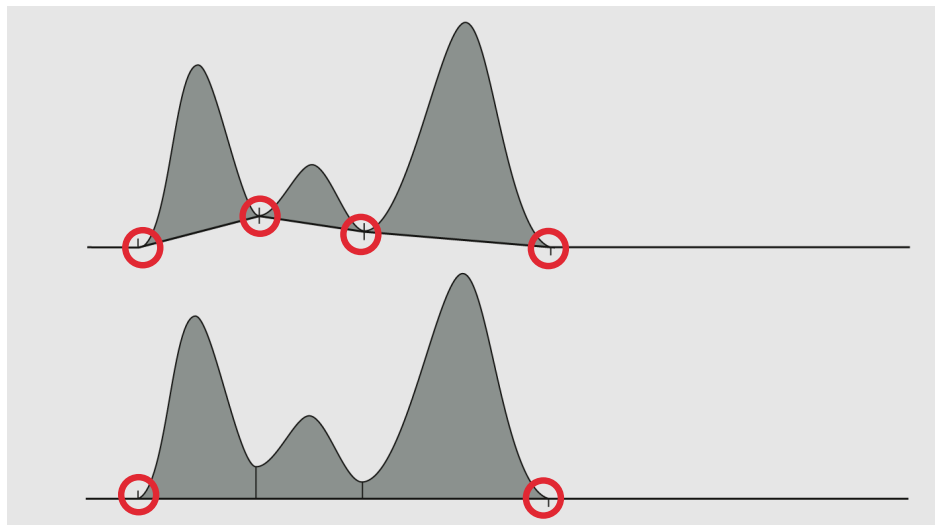


Рисунок 93 Начало и конец базовой линии зависят от интегрирования

Определяет значимые спектры

Чтобы не обсчитывать спектры со слишком слабым сигналом, приложение отбрасывает спектры со слишком маленьким диапазоном откликов. Спектры используются для дальнейших расчетов, только если они соответствуют одному из перечисленных условий.

- Диапазон откликов больше 3σ
- Диапазон откликов не меньше 10 % диапазона откликов спектра вершины пика. Диапазон откликов для каждого спектра рассчитывается как разница максимального и минимального откликов.

Коррекция фона

Для исправления базовой линии приложение оценивает следующие спектры:

- Спектр в начале базовой линии пика
- Спектр в конце базовой линии пика

Время начала и конца базовой линии зависит от интегрирования. Если несколько пиков разделены только перпендикуляром, то для вычитания фона во всех пиках используются одни и те же спектры (см. раздел [Рис. 93](#) на странице 169).

Рассчитывается линейная интерполяция двух спектров базовой линии. Для коррекции спектра каждого пика приложение вычитает из спектра интерполяции соответствующее время удерживания.

Расчет подобия

Программа сравнивает спектр вершины пика после коррекции базовой линии со спектрами всех остальных точек пика после коррекции базовой линии. Коэффициент совпадения — это число от 0 (сходство отсутствует) до 1000 (полное совпадение).

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

где:

r	Корреляция
x_i, y_i	Измеренные на одной длине волны оптические плотности для рассматриваемой точки данных и для вершины пика, соответственно.
n	Число длин волн, записываемых для точки данных (зависит от ширины спектральной полосы метода обработки данных и числа шагов записи спектра).
x_{av}, y_{av}	Средняя оптическая плотность рассматриваемой точки данных и вершины пика, соответственно.

Коэффициент совпадения (для каждой точки данных) = $r^2 \cdot 1000$

Расчет порогового значения

Эталонное пороговое значение при чувствительности 50% рассчитывается по следующему уравнению:

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

где:

$VAR_{шум}$	Расчетный порог дисперсии спектра шума
$VAR_{пик}$	Дисперсия спектра пика
$VAR_{цель}$	Дисперсия спектра, который используется для сравнения (в начале пика для расчета чистоты точек данных до вершины пика, в конце пика для расчета чистоты точек данных после вершины пика)

Пороговое значение (T_s), используемое программой, зависит от заданной чувствительности. Оно рассчитывается по следующим формулам:

Если чувствительность выше 50%:

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

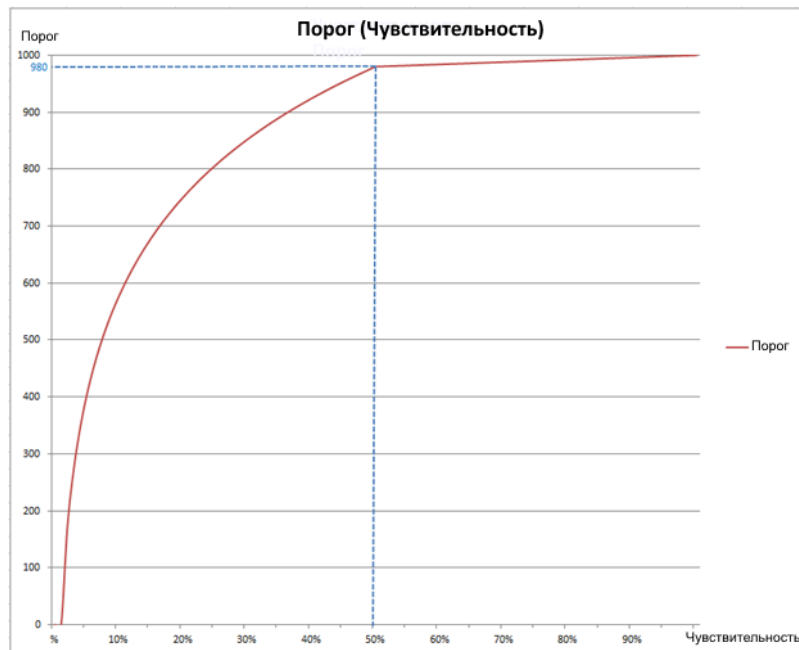
Если чувствительность ниже или равна 50%:

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

где:

T_s	пороговое значение [0 – 1000] для заданной чувствительности S
T	Эталонное пороговое значение для чувствительности 50%
S	Чувствительность [0 - 100] %

Для каждого индивидуального порогового значения в каждой точке исходных данных применяется одна из этих формул.



Красная линия — это автоматически рассчитанная пороговая кривая. Автоматически рассчитанное пороговое значение для кривой из этого примера — 980 (соответствует значению чувствительности 50%).

Оценка чистоты

Единичные значения для кривой подобия рассчитываются из исправленного на чувствительность порогового значения и коэффициента совпадения («Расчет порогового значения» на странице 171, «Расчет подобия» на странице 170).

$$\text{Коэффициент} = \log((1000 - \text{Порог}) / (1000 - \text{Коэффициент совпадения}))$$

Все значения для пика выводятся на *кривой подобия*. Ее можно найти в окне **подробностей пика**. Эта кривая подобия показывает распределение положительных (точки данных, отвечающие чистому веществу) и отрицательных (точки данных, отвечающие веществу с примесями) значений вдоль пика. 0 представляет собой пороговое значение.

О пороговых значениях, кривых подобиия и чувствительности

В OpenLab CDS v2.x пороговое значения рассчитывается автоматически для каждой точки данных. Точность анализа регулируется значением чувствительности в процентах.

Таким образом чувствительность — это не фиксированное пороговое значение. Изменение чувствительности не приводит к линейному изменению порогового значения, так как эти значения отличаются для каждой точки исходных данных. Как пример, на рисунке ниже показано, что если для точки 1,950 min пороговое значение равно 998, это не значит, что для точки 1,960 min значение будет таким же. Для каждой точки данных пороговое значение рассчитывается отдельно, это позволяет построить вдоль пика кривую пороговых значений.

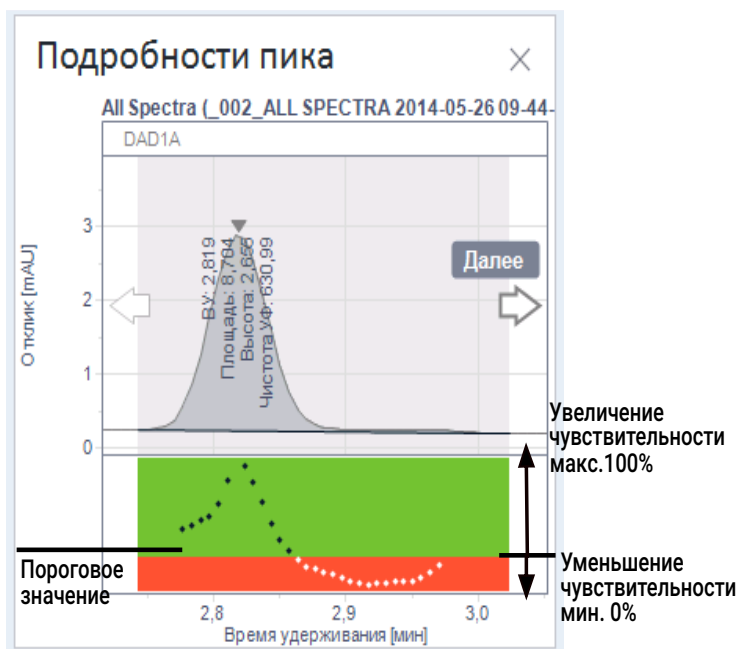


Рисунок 94 Кривая подобиия

Значение чувствительности чистоты пика затем применяется ко всей кривой пороговых значений. В программе анализа данных под пиками строится кривая логарифмического преобразования кривых пороговых значений и подобиия. В случае кривой пороговых значений она при этом преобразуется в ровную линию между участками без примесей и с приме-

сями. Кривая подобиия (которая показывается в окне подробностей пика) строится по уравнению, приведенному в разделе «Оценка чистоты» на странице 172. Эта кривая подобиия показывает распределение положительных (точки данных, отвечающие чистому веществу) и отрицательных (точки данных, отвечающие веществу с примесями) значений вдоль пика. 0 представляет собой пороговое значение.

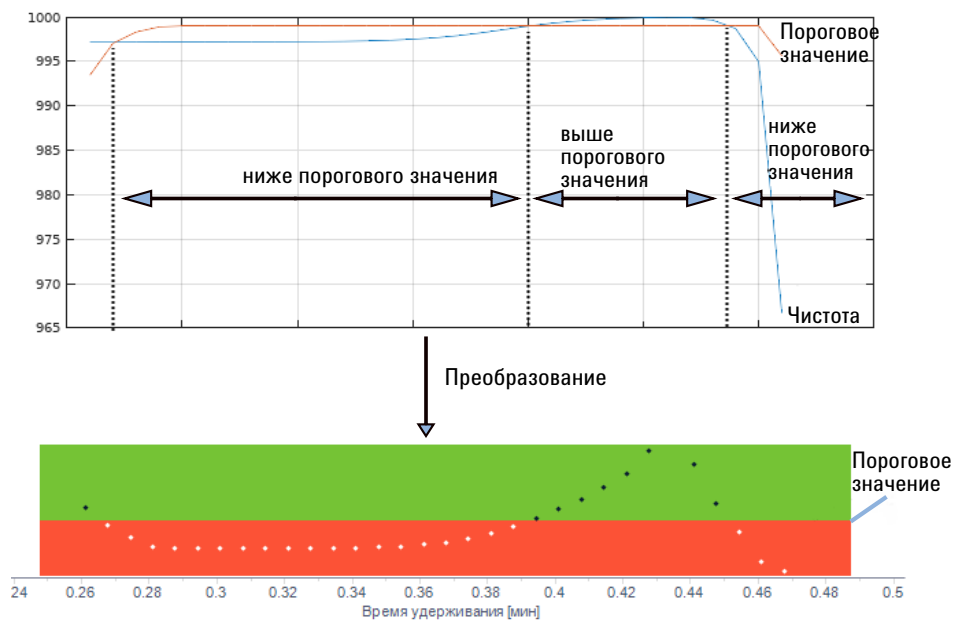


Рисунок 95 До и после преобразования

Например:

- Точка данных с коэффициентом совпадения 990 и пороговым значением 980:

$$\text{Коэффициент} = \log((1000 - 980) / (1000 - 990)) = \log(2) = +0,3$$

Эта точка исходных данных отвечает критерию чистоты.

- Точка данных с коэффициентом совпадения 970 и пороговым значением 990:

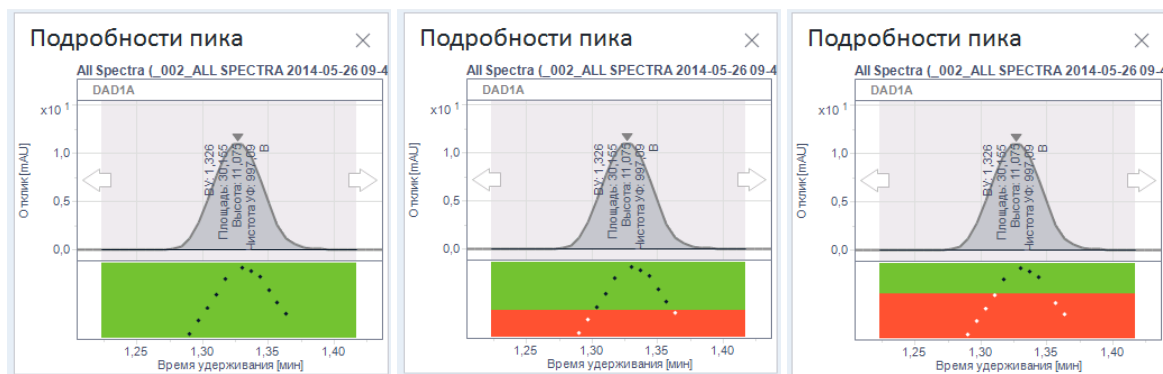
$$\text{Коэффициент} = \log((1000 - 990) / (1000 - 970)) = \log(0,33) = -0,48$$

Эта точка исходных данных не отвечает критерию чистоты.

Повышение или понижение чувствительности значит, что профиль построенной кривой пороговых значений изменяется. Чувствительность может иметь значения от 0 до 100 %. Расчетное пороговое значение по умолчанию — 50 %.

Так как кривая подобию строится в логарифмической шкале, пороговые значения точек не отражают взаимно однозначное соответствие между ними. При увеличении или уменьшении чувствительности на 20 % кривая пороговых значений не только перемещается вверх или вниз, но и изменяет свою амплитуду. Пороговые значения для точек исходных данных не изменяются при изменении чувствительности на +/- 20 %.

Чувствительность	Порог
0 %	Минимальное допустимое значение = 0
$0 \leq s \leq 100$	Рассчитанные кривые пороговых значений (эталонная кривая при значении 50%)
100 %	Максимальное допустимое значение = 1000



Низкая чувствительность — пик считается чистым

Чувствительность по умолчанию — пик считается пиком с примесями

Высокая чувствительность — пик считается пиком с примесями

Пик помечается как пик с примесями, если хотя бы одна из его точек лежит ниже порогового значения, даже если в целом коэффициент чистоты УФ-спектра пика близок к 1000.

Сравнение с традиционными графиками чистоты

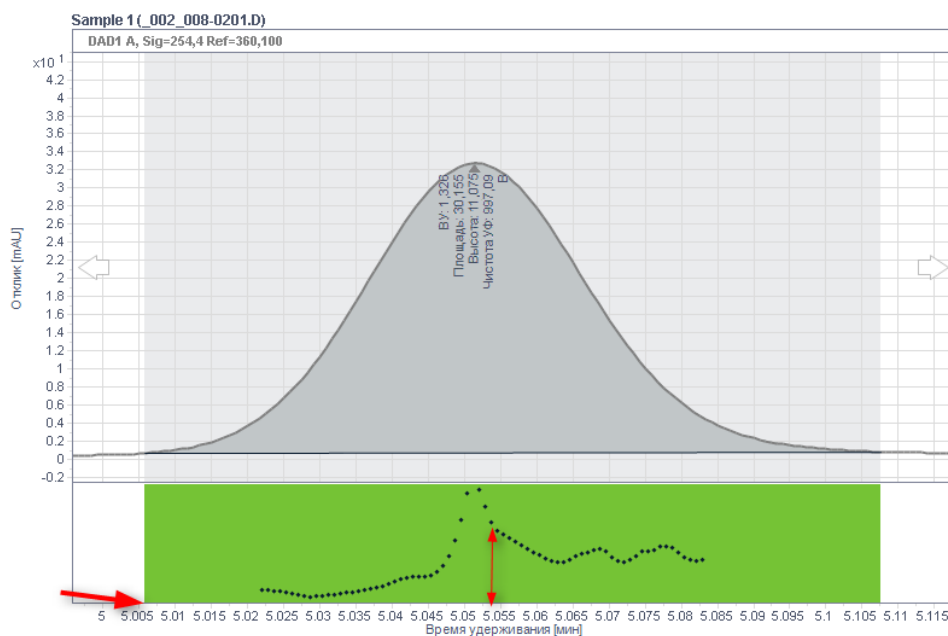
OpenLab CDS ChemStation Edition поддерживает несколько типов расчета предельных значений, поэтому пороговые значения могут быть как фиксированными значениями, так и кривыми. Фиксированные пороговые значения не учитывают влияние дисперсии шумов вдоль пика. Поэтому в OpenLab CDS v2.x, пороговое значения рассчитывается автоматически для каждой точки данных, что дает в результате кривую пороговых значений. Точность анализа затем регулируется значением чувствительности в процентах.

На новом графике отображается та же информация, что и в ChemStation, но его легче читать. Вместо классической кривой пороговых значений он показывает кривую логарифма разницы между пороговыми значениями и классической кривой пороговых значений. Это дает ровную линию, разделяющую красную и зеленую часть графика. Все точки выше порогового значения лежат в зеленой области (черные точки), а все точки ниже порогового значения — в красной (белые точки).

По сравнению с ChemStation график получается перевернутым: соответствующие критерию чистоты точки (зеленая область) лежат выше не соответствующих (красная область). Чем дальше точка в зеленой области отстоит от линии пороговых значений — тем лучше ее значение. Чем дальше точка в красной области отстоит от линии пороговых значений — тем хуже.

Если все точки лежат выше пороговых значений, линия пороговых значений находится в нижней части графика:

Подробности пика

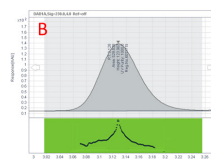
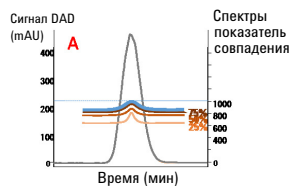


Следующий пример демонстрирует различия между традиционным графиком чистоты, похожим на кривую подобию в OpenLab CDS ChemStation (в котором кривые подобию перевернуты), и кривой подобию OpenLab CDS v2.x:

Анализ спектров УФ

Проверка на примеси по спектру УФ

Чистый пик

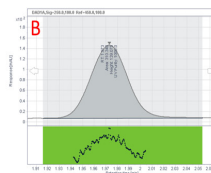
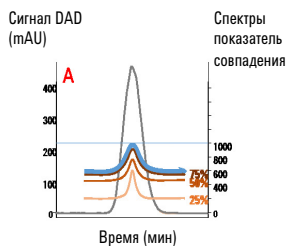


- Кривая подобию спектров
- Кривая пороговых значений при чувствительности 75%
- Кривая пороговых значений при чувствительности 50%
- Кривая пороговых значений при чувствительности 25%

1A Схематическое изображение кривой подобию и соответствующих *расчетных кривых пороговых значений* при различных чувствительностях

2B Кривая подобию в программе анализа данных

Чистый, но шумный пик

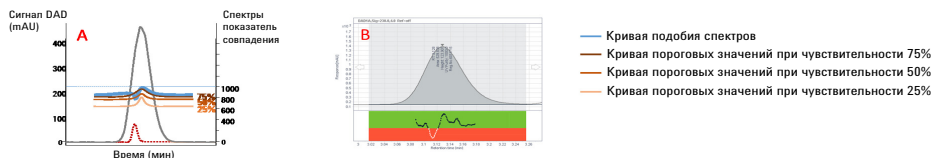


- Кривая подобию спектров
- Кривая пороговых значений при чувствительности 75%
- Кривая пороговых значений при чувствительности 50%
- Кривая пороговых значений при чувствительности 25%

1A Схематическое изображение кривой подобию и соответствующих *расчетных кривых пороговых значений* при различных чувствительностях

2B Кривая подобию в программе анализа данных

Пик с примесями



-
- 2A Схематическое изображение кривой подбора и соответствующих *расчетных кривых пороговых значений* при различных чувствительностях
-
- 2B Изображение кривой подбора и соответствующих *расчетных кривых пороговых значений* при чувствительности 50% в программе анализа данных
-

Заключение

Методы оценки чистоты пика по кривой пороговых значений можно сравнивать только между OpenLab CDS v2.x и OpenLab CDS ChemStation Edition. Разница между ними в том, что в OpenLab CDS v2.x эталонный фоновый шум автоматически замеряется в начале и в конце пика, и присутствует дополнительный фактор — чувствительность, которого нет в OpenLab CDS ChemStation Edition.

При значении чувствительности по умолчанию, равном 50%, алгоритмы обеих систем хроматографических данных одинаковы, однако результаты их работы получаются разные из-за разного выбора эталонных образцов шума. При увеличении или уменьшении чувствительности профиль кривой пороговых значений будет изменяться по сравнению с кривой пороговых значений OpenLab CDS ChemStation Edition.

Подтверждение идентификации по спектру УФ

Эталонный спектр УФ снимается с эталонной пробы в установившихся условиях хроматографирования. Сравнение текущего спектра вершины пика с эталонным спектром УФ позволяет подтвердить идентификацию соединения. Приложение рассчитывает коэффициент совпадения этих двух спектров.

Алгоритм сравнения идентичен алгоритму, который используется для проверки на примеси по спектру УФ (см. раздел «Расчет подобия» на странице 170). Вычитание фонового спектра для этого не является обязательным и задается в методе обработки.

Для подтверждения идентификации по спектру УФ коэффициент совпадения должен быть выше заданного предела. В таком случае в результатах ввода пробы этот коэффициент будет выделен зеленым. Предел коэффициента совпадения задается в методе обработки. Рассчитанный коэффициент совпадения спектров УФ выводится в таблицу результатов ввода пробы.

Результаты ввода пробы						
Пики		Сводка				
№	Название	Описание сигнала	ВУ (мин)	Чистота УФ	Площадь	
1	A	DAD1A	0,893	999,97		
2	B	DAD1A	1,326	997,09		
3	C	DAD1A	1,785	998,27		
4	D	DAD1A	2,268	997,89		
5	E	DAD1A	2,437	999,99		
6	F	DAD1A	2,819	630,99		

Рисунок 96 Коэффициент совпадения спектров УФ в таблице результатов ввода пробы.

8

Масс-спектрометрия

Чистота пробы МС 182

Чистота пика МС 184

Эта глава описывает расчет чистоты пробы по данным масс-спектрометрии.

Чистота пробы МС

Расчет чистоты пробы по данным МС позволяет оценить, не содержит ли проба примесей. Эта оценка выполняется путем сравнения откликов. С одной стороны имеются данные по отклику всех соединений и фрагментов в пробе. С другой стороны имеются данные по отклику определенных целевых ионов. Чистота пробы рассчитывается, как отношение этих двух откликов.

В зависимости от выбранных базового сигнала и метода расчетов программа считает чистоту пробы по данным МС по разным алгоритмам.

Целевое соединение найдено?

- 1 Взять молекулярные массы целевых соединений из столбцов **Цель** таблицы **Список вводов проб** (например 270). Если введена формула, рассчитать молекулярную массу из формулы.
- 2 Добавить аддукты, заданные в методе обработки, например водород (+H) и натрий (+Na), чтобы получить из массы целевого соединения 270 массы целевых ионов 271 и 293.
- 3 Извлечь хроматограммы EIC для всех целевых ионов и сложить в одну.
- 4 Определить время удерживания пика на этой единой суммарной хроматограмме EIC.
- 5 Найти совпадающий пик на хроматограмме исходного сигнала.

Если удалось найти совпадающий пик, целевое соединение считается **найденным**.

Исходный сигнал МС-детектора

С расчетом **TIC %**

$$\text{Чистота пробы МС} = \frac{\text{площадь соответствующего пика (полная ионная хроматограмма)}}{\text{площадь всех интегрированных пиков (полная ионная хроматограмма)}} \times 100$$

С расчетом **EIC/TIC %**

$$\text{Чистота пробы МС} = \frac{\text{площадь единичного пика (сумма хроматограмм выделенных ионов)}}{\text{площадь всех интегрированных пиков (полная ионная хроматограмма)}} \times 100$$

ПРИМЕЧАНИЕ

Если в качестве базового сигнала выбран сигнал **МС** (в методе обработки данных в меню **Чистота пробы МС > Свойства**) и в результатах доступны несколько сигналов ТИС, каждый из них будет показан в качестве базового сигнала в таблице слева в окне **Результаты чистоты пробы**.

Исходный сигнал другого детектора (не МС)

$$\text{Чистота пробы МС} = \frac{\text{площадь соответствующего пика (основной сигнал)}}{\text{площадь всех интегрированных пиков (основной сигнал)}} \times 100$$

Исходные предположения

Чистота пробы по спектру МС рассчитывается исходя из следующих предположений.

- Результаты расчетов чистоты пробы по спектру МС — это только грубая оценка.
- Для расчетов по соотношению **EIC/TIC %**: Данные МС собираются таким образом, чтобы кластер молекулярного иона был самым интенсивным пиком в спектре. Молекулярный ион практически не диссоциирует во время ионизации.
- Для исходных сигналов детекторов кроме МС: Другие детекторы дают более однородный и универсальный отклик по сравнению с МС-детектором.
- Для всех соединений пробы коэффициент отклика не изменяется по всей длине хроматограммы.

Чистота пика МС

Чистота пика по данным МС рассчитывается из доли ионов компонента из спектров, сгруппированных вместе и составляющих целевое вещество, по отношению к другим присутствующим компонентам.

Для расчета чистоты пика по данным МС программа выполняет следующие шаги.

- 1 Выполняет деконволюцию по всей длине хроматограммы.
 - a Строит хроматограммы по выделенным ионам для (n) наиболее интенсивных значений m/z . Число (n) можно указать в методе обработки данных в меню **Соединения > Спектры** вкладки **Чистота пика МС**.
 - b Ищет время удерживания пика для каждой хроматограммы выделенного иона.
 - c На основе пиков хроматограмм по выделенным ионам определяет компоненты, которые имеют одинаковые времена удерживания.
- 2 Находит целевой компонент, соответствующих искомому соединению.
 - a Находит базовые параметры для дальнейших расчетов:
 - интервал погрешности m/z из внутренних параметров по умолчанию (m/z от -0,3 до +0,7).
 - m/z иона для количественного определения искомого соединения, равный m/z самого интенсивного пика на масс-спектре в вершине пика на общей ионной хроматограмме.
 - Диапазон времен удерживания для искомого соединения (текущего соединения), заданный в методе обработки данных в меню **Соединения > Идентификация**.
 - b Для каждого компонента, обнаруженного в результате деконволюции, система находит все значения m/z , попадающие в интервал погрешности m/z иона для количественного определения искомого соединения.
 - c Для каждого такого значения m/z система проверяет наличие на хроматограмме выделенного иона пика в интервале времен удерживания искомого соединения.
 - d Компонент с наибольшим пиком этого типа идентифицируется, как искомое соединение.

- 3 Если системе не удастся найти искомое соединение, она пытается повторить деконволюцию для всей пробы в режиме *высокого разрешения*, уменьшив коэффициент размера окна ВУ в два раза. Результаты высокого разрешения кэшируются, и в них выполняется поиск всех искомых соединений, которые не удалось обнаружить в списке компонентов при обычном разрешении. Автоматическое создание результатов с высоким разрешением позволяет идентифицировать множество искомых соединений, которые ранее были пропущены.
- 4 Система пытается обнаружить *раздвоенные пики* с одинаковыми ВУ и m/z основного пика. Наличие таких раздвоенных пиков может существенно систематически снижать оценку чистоты. Раздвоенные пики могут появляться, если коэффициент размера окна ВУ слишком мал. Поэтому система пытается автоматически исправить ошибку путем повторного выполнения деконволюции всей пробы в режиме *низкого разрешения*, увеличив коэффициент размера окна ВУ в два раза. Результаты низкого разрешения кэшируются, и в них выполняется поиск всех искомых соединений, пики которых похожи на раздвоенные.
- 5 Система ищет все компоненты, вносящие свой вклад в пик искомого соединения, т. е. такие, которые имеют спектральные пики в пределах интервала погрешности m/z иона для количественного определения искомого соединения и для которых время удерживания совпадает с временем удерживания искомого соединения.
- 6 Затем система рассчитывает чистоту по следующей формуле:

$$Purity(Target\ compound) = \frac{Area(Target\ component\ shape)}{\sum (Area(Contributing\ component\ shape))}$$

Оценка пригодности системы	187
Определение шума	190
Подсчет шума с использованием шестикратного стандартного отклонения	191
Подсчет шума с использованием формулы полного размаха шума	192
Подсчет шума по методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM)	194
Расчет шума с помощью среднеквадратичного отклонения (СКО)	196
Расчет отношения сигнала к шуму	197
Дрейф и блуждание базовой линии	199
Расчет асимметрии и симметрии пика	201
Формулы и расчеты пригодности системы	203
Определения проверки рабочих характеристик	204
ПРИМЕЧАНИЕ. Время удерживания, которое используется для проверки рабочих характеристик.	204
Общая информация о проверках рабочих характеристик	206
Фактическая ширина пика W_x [мин]	208
Коэффициент емкости, коэффициент удерживания (имеет разные терминологические обозначения согласно требованиям Фармакопеи США и ASTM) k'	209
Коэффициент симметрии, Коэффициент размытия (согласно требованиям фармакопеи США) t	210
Число теоретических тарелок на колонку (USP)	211
Число теоретических тарелок на метр N [1/м]	211
Относительное удерживание, селективность	212
Разрешающая способность (согласно требованиям фармакопеи США и ASTM) R	212
Разрешающая способность (согласно требованиям Европейской и Японской фармакопей) R_s	213
Отношение пика к седловине (EP/JP)	213

Эта глава описывает, каким образом OpenLab CDS может оценить рабочие характеристики аналитического прибора и аналитического метода.

Оценка пригодности системы

Оценка пригодности как аналитического прибора (до того, как он будет использован для анализа образца), так и аналитического метода (до того, как он будет использоваться регулярно) является хорошей аналитической практикой. Также полезно проводить проверку пригодности аналитических систем до и в течение рутинных анализов. OpenLab предоставляет набор инструментов, которые позволяют выполнить эти три вида проверок автоматически. *Проверка прибора* может включать в себя проверку чувствительности детектора, воспроизводимости времен удерживания и площадей пиков. *Проверка метода* может включать в себя оценку точности воспроизводимости времен удерживания, определения количеств, селективности и эксплуатационной надежности метода при нормальных изменениях условий эксплуатации. *Проверка системы* может включать в себя проверку воспроизводимости количеств, разрешения между двумя конкретными пиками и размытия пиков.

Некоторые лаборатории в вопросах пригодности системы должны отвечать требованиям некоторых из перечисленных документов.

- Правилам организации работ в лаборатории (GLP),
- Правилам организации работ на производстве (GMP) и действующим Правилам работы на производстве (cGMP), и
- Требованиям к автоматизации работ в лаборатории (GALP).

Таким лабораториям рекомендуется выполнять эти проверки и подробно документировать результаты. Лаборатории, которые являются частью системы контроля и обеспечения качества, например, в соответствии с сертификатом ISO9000, обязаны продемонстрировать надлежащие эксплуатационные характеристики своих приборов.

Чтобы объединить и статистически обработать результаты нескольких анализов OpenLab CDS включает в себя функцию для создания сводного отчета о серии результатов. Для этих сводных отчетов доступен ряд шаблонов (например, SequenceSummary_Extended.rdl). При необходимости эти шаблоны можно изменять.

Результаты проверок документируются в формате, который, как правило, принимается контролирующими органами и независимыми аудиторами. Статистические данные включают:

- время удерживания пика,
- площадь пика,
- количество,
- высоту пика
- ширину пика на заданной высоте,
- симметричность пика,
- размывание тыла пика,
- коэффициент емкости (k'),
- числа теоретических тарелок,
- степень разделения между пиками и
- селективность относительно предыдущего пика.

Расширенные результаты измерения рабочих характеристик рассчитываются только для калиброванных соединений, для которых можно указать времена удерживания и названия соединений.

Типичный отчет о проверке рабочих характеристик системы содержит следующую информацию и результаты измерения следующих показателей:

- сведения о колонке,
- метод обработки данных,
- информацию о пробе,
- информацию о методе сбора данных,
- описание сигнала и определение шума базовой линии и
- аналитический сигнал с обозначениями либо времен удерживания либо названий соединений.

Кроме того, для каждого калиброванного соединения на хроматограмме приводится следующая информация:

- время удерживания/миграции,
- k' ,
- симметричность,
- ширина пика,
- число теоретических тарелок,
- разрешение,
- соотношение сигнал-шум и
- название соединения.

Определение шума

Шум может быть определен по значениям точек данных из выбранного временного диапазона сигнала. Шум может рассчитываться одним из следующих способов.

- Как шестикратное стандартное отклонение (sd) линейной регрессии дрейфа базовой линии.
- Способом полного размаха шума (с поправкой на дрейф).
- Согласно методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM E 685-93).
- Как среднеквадратичное отклонение (СКО) линейной регрессии дрейфа базовой линии.

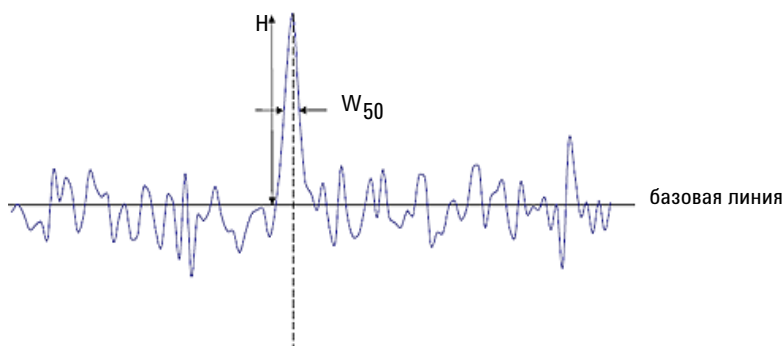


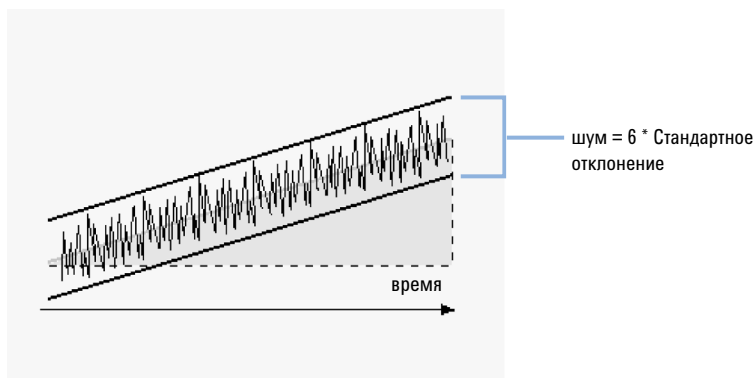
Рисунок 97 Хроматограмма с сигналом пика и шумом базовой линии.

H	Высота пика от вершины до базовой линии (аппроксимирующая прямая по точкам шума)
W ₅₀	Ширина пика на половине высоты

ПРИМЕЧАНИЕ

Для очень маленьких пиков программа может найти время удерживания, соответствующее моменту после окончания пика. Это может привести к отрицательной ширине пика. В такой тупиковой ситуации величина шума не рассчитывается.

Подсчет шума с использованием шестикратного стандартного отклонения



Линейная регрессия рассчитывается с использованием всех точек данных в пределах интервала времени текущего сигнала. Шум определяется по формуле:

$$N = 6 \times Std$$

где:

N	Уровень шума, рассчитанный по методу шестикратного стандартного отклонения
Std	Стандартное отклонение линейной регрессии всех точек данных в выбранном интервале времени.

Подсчет шума с использованием формулы полного размаха шума

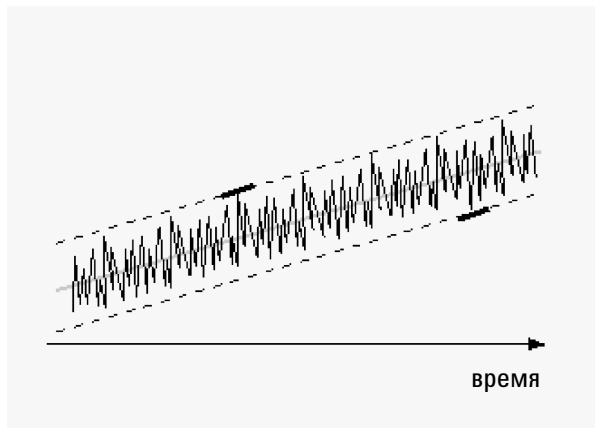


Рисунок 98 Изображение шума полного размаха с дрейфом

Сначала рассчитывается дрейф путем определения линейной регрессии с использованием всех точек данных по всей ширине пика. Прямая линейной регрессии вычитается из всех точек данных внутри интервала времени для получения сигнала с поправкой на дрейф базовой линии.

Затем шум полного размаха рассчитывается по формуле:

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

где:

N	Шум полного размаха
$I_{\max}$	Максимальное из значений I_x по всей ширине пика
$I_{\min}$	Минимальное из значений I_x по всей ширине пика
I_x	Интенсивность сигнала с поправкой на дрейф базовой линии (дрейф рассчитывается по методу наименьших квадратов)

Согласно требованиям Европейской фармакопеи, шум полного размаха рассчитывается с использованием пустого сигнала фонового шума в диапазоне до ± 10 значений ширины пика на половине высоты (W_{50}) по обе стороны от каждого пика. Эта область может быть симметричной относительно представляющего интерес сигнала или асимметричной, если требуется из-за сигналов матрицы.

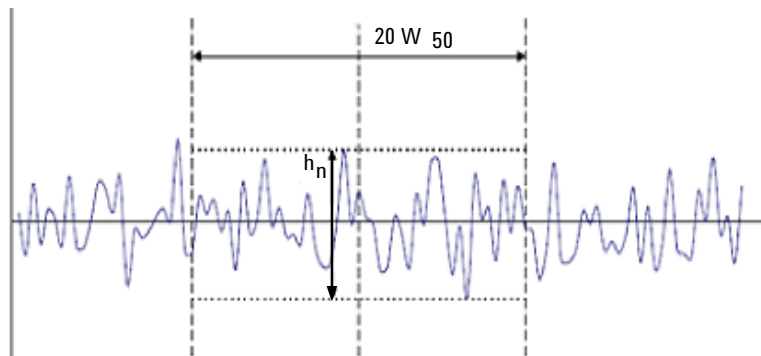


Рисунок 99 Определение шума по хроматограмме холостой пробы

Где

$20 W_{50}$ является областью, соответствующей 20 значениям ширины пика на половине высоты (W_{50});

h_n является максимальной амплитудой шума базовой линии в области 20 значений ширины пика на половине высоты (W_{50}).

Подсчет шума по методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM)

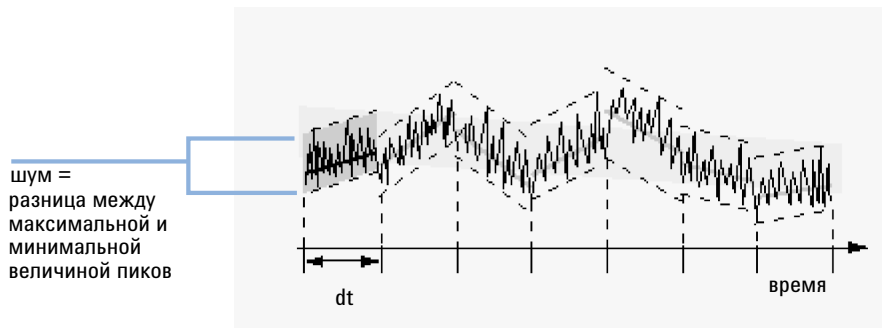


Рисунок 100 Определение шума по методу ASTM.

Определение шума по методу ASTM E 685-93 основано на положениях стандарта Американского общества по испытаниям и материалам, для проверки переменной длины волны фотометрических детекторов, используемых в жидкостной хроматографии. В зависимости от размера интервала времени можно выделить три различных типа шума. Определение шума основывается на измерении шума полного размаха в пределах определенных интервалов времени.

- *Продолжительность цикла, t*

Долговременный шум — это максимальная амплитуда для всех случайных изменений сигнала детектора с частотой от 6 до 60 циклов в час. Долговременный шум определяется, когда выбранный интервал времени превышает один час. Интервал времени для каждого цикла (dt) устанавливается на 10 мин, что дает по крайней мере шесть циклов в пределах выбранного интервала времени.

Кратковременный шум — это максимальная амплитуда для всех случайных изменений сигнала детектора частотой выше одного цикла в минуту. Кратковременный шум определяется при выбранном интервале времени от 10 до 60 мин. Интервал времени для каждого цикла (dt) устанавливается равным 1 мин, что дает не менее 10 циклов в пределах выбранного интервала.

Мгновенный шум (не является частью метода ASTM E 685-93) — этот термин введен для описания максимальной амплитуды для всех случайных изменений сигнала детектора с частотой выше одного периода за 0,1 мин.

Мгновенный шум определяется при выбранном интервале времени от 1 до 10 мин. Интервал времени для каждого цикла (dt) устанавливается равным 0,1 мин, что дает не менее 10 циклов в пределах выбранного интервала времени.

- *Число циклов, n*

Число циклов рассчитывается по формуле:

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

где t — это продолжительность цикла, а t_{tot} — это общее время, в течение которого рассчитывается шум.

- *Полный размах шума для каждого цикла*

Сначала рассчитывается дрейф путем определения линейной регрессии с использованием всех точек данных в диапазоне времени. Прямая линейной регрессии вычитается из всех точек данных внутри интервала времени для получения сигнала с поправкой на дрейф базовой линии. Затем шум полного размаха рассчитывается по формуле:

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

где Шум — это шум полного размаха, Интенсивность_{max} — это самая высокая (максимальная) интенсивность пика, а Интенсивность_{min} — это самая низкая (минимальная) интенсивность пика в интервале времени.

- *Шум по методу ASTM*

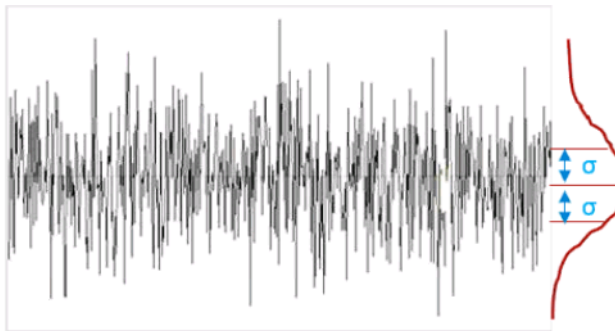
Шум по методу ASTM рассчитывается по следующей формуле:

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

где N_{ASTM} — уровень шума по методу ASTM.

Определение шума по методу ASTM не производится, если выбранный интервал времени менее 1 мин. В зависимости от диапазона, если выбранный интервал времени ≥ 1 мин, шум определяется с помощью одного из методов ASTM, описанных ранее. То есть в расчетах используется по меньшей мере семь точек данных за цикл. При автоматизированном определении шума циклы перекрываются на 10 %.

Расчет шума с помощью среднеквадратичного отклонения (СКО)



Линейная регрессия рассчитывается с использованием всех точек данных в пределах интервала времени текущего сигнала.

Шум определяется по формуле:

$$\text{СКО} = S$$

где:

СКО

Шум, рассчитанный по методу среднеквадратичного отклонения

S

Стандартное отклонение

Стандартное отклонение линейной регрессии с уравнением $y(X) = a + bX$ для всех точек данных в заданном временном интервале:

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

где:

a

пересечение с осью Y

b

наклон

N

число отдельных результатов измерения

X_i

независимая переменная $i^{\text{го}}$ измерения

Расчет отношения сигнала к шуму

OpenLab CDS предусматривает несколько функций для расчета отношения сигнала к шуму. Для расчета шума можно выбрать как алгоритм, так и интервал, в котором определяется шум.

Методы 6 сигма и СКО

Отношение сигнала к шуму рассчитывается по формуле:

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

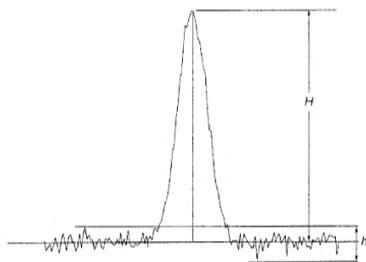


Рисунок 101 Соотношение сигнал-шум

Методы полного размаха и ASTM

Отношение сигнала к шуму рассчитывается по формуле:

$$\text{Сиг/Шум} = 2H/h$$

где:

H

Высота пика определяемого компонента на хроматограмме заданного стандартного раствора.

h

Абсолютное значение самого большого отклонения шума от базовой линии на хроматограмме холостой пробы в интервале, равном 20 значениям ширины пика определяемого компонента на половине высоты и расположенном таким образом, чтобы время удерживания пика определяемого компонента находилось в центре этого интервала. Время удерживания и ширина пика определяемого компонента находятся по хроматограмме заданного стандартного раствора. Согласно определению Европейской фармакопеи, отношение сигнала к шуму рассчитывается по отношению к шуму сигнала холостой пробы, рассчитанному для интервала времени, содержащего пик, для которого и вычисляется отношение сигнала к шуму.

Диапазон шума

Шум может рассчитываться в следующих временных интервалах и для следующих сигналов.

- Фиксированный временной интервал на том же сигнале или на сигнале холостой пробы.
- Временной интервал относительно начала или конца пика на том же сигнале или на сигнале холостой пробы.
- Автоматически определенный временной интервал на сигнале холостой пробы.

Автоматически определенный временной интервал рассчитывается по одному из следующих алгоритмов.

- Если сигнал холостой пробы недостаточно продолжительный:
($\text{Время окончания интервала} - \text{Время начала интервала} < 20 \cdot W_{50}$)
 - $\text{Время начала интервала} = \text{Время начала сигнала холостой пробы}, \text{ а}$
 - $\text{Время окончания интервала} = \text{Время окончания сигнала холостой пробы}$
- Если сигнал холостой пробы достаточно продолжительный, но пик расположен слишком близко к началу сигнала:
($t_R - 10 \cdot W_{50} < \text{Время начала сигнала холостой пробы}$)
 - $\text{Время начала интервала} = \text{Время начала сигнала холостой пробы}, \text{ а}$
 - $\text{Время окончания интервала} = \text{Время начала интервала} + 20 \cdot W_{50}$
- Если сигнал холостой пробы достаточно продолжительный, но пик расположен слишком близко к окончанию сигнала:
($t_R + 10 \cdot W_{50} < \text{Время окончания сигнала холостой пробы}$)
 - $\text{Время окончания интервала} = \text{Время окончания сигнала холостой пробы}, \text{ и}$
 - $\text{Время начала интервала} = \text{Время окончания интервала} - 20 \cdot W_{50}$
- Если сигнал холостой пробы достаточно продолжительный и пик расположен достаточно далеко от его начала и конца:
($t_R - 10 \cdot W_{50} > \text{Время начала сигнала холостой пробы}, t_R + 10 \cdot W_{50} < \text{Время окончания сигнала холостой пробы}$)
 - $\text{Время начала интервала} = t_R - 10 \cdot W_{50}, \text{ а}$
 - $\text{Время окончания интервала} = t_R + 10 \cdot W_{50}$

где

t_R — время удерживания, а

W_{50} — ширина пика на половине высоты.

Дрейф и блуждание базовой линии

Дрейф и блуждание базовой линии рассчитываются в случае, если в методе обработки данных выбран параметр **Отношение сигнал-шум**. Они рассчитываются независимо от выбранного метода расчета шума.

Дрейф базовой линии

Дрейф базовой линии определяется по наклону линейной регрессии. Сначала рассчитывается дрейф путем определения линейной регрессии с использованием всех точек данных в диапазоне времени. Прямая линейной регрессии вычитается из всех точек данных внутри интервала времени для получения сигнала с поправкой на дрейф базовой линии.

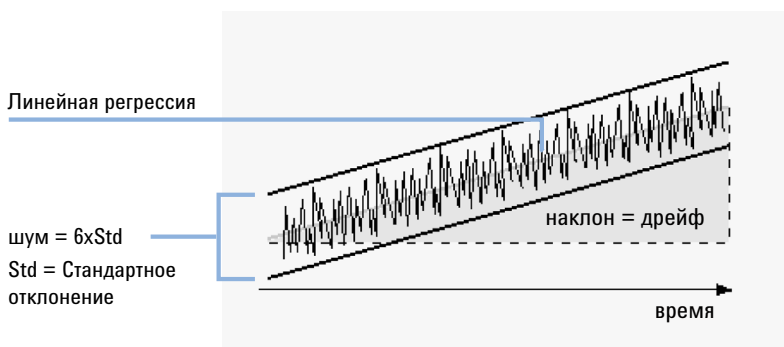


Рисунок 102 Определение дрейфа для шума, используя шестикратное стандартное отклонение

Уравнение кривой:

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

где:

N — число отдельных результатов измерения

X_i — независимая переменная $i^{\text{го}}$ измерения

Y_i — зависимая переменная $i^{\text{го}}$ измерения

Коэффициенты:

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

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

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

**Блуждание
базовой
линии**

Блуждание базовой линии определяется как шум полного размаха по средним значениям данных в циклах шума по методу ASTM, см. «Подсчет шума с использованием шестикратного стандартного отклонения» на странице 191.

блуждание

шум =
разница между
максимальной и
минимальной
величиной пиков

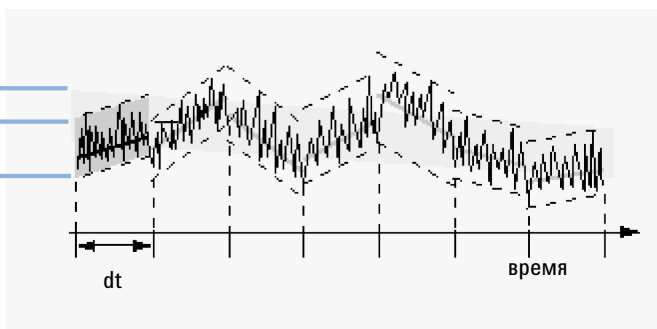


Рисунок 103 Определение отклонения шума по методу Американского общества по испытанию материалов (ASTM)

Расчет асимметрии и симметрии пика

Асимметрия Для расчета асимметрии пика сравниваются его полуширины на 10% его высоты:

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

где:

A_s Асимметрия пика на 10% высоты

W_{10} Ширина пика на 10% высоты

$W_{f, 10}$ Полуширина передней половины пика на 10% высоты

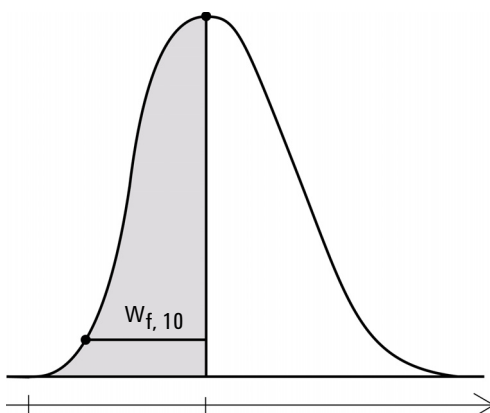


Рисунок 104 Расчет асимметрии пика

Симметрия В большинстве фармакопей коэффициент симметричности пика рассчитывается сравнением полуширин пика на 5% его высоты. В OpenLab этот коэффициент называется коэффициентом размытия (см. «Коэффициент симметрии, Коэффициент размытия (согласно требованиям фармакопеи США) t » на странице 210). Симметрия пика в OpenLab рассчитывается интегрирующим алгоритмом как псевдомомент с использованием следующих уравнений для определения момента:

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

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

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

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

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

Если алгоритм не найдет ни одной точки перегиба или найдет только одну, то симметрия пика рассчитывается следующим образом:

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

где:

a_i	Площадь сегмента
t_i	Время сегмента
H_f	Высота передней точки перегиба
H_r	Высота задней точки перегиба
H	Высота вершины

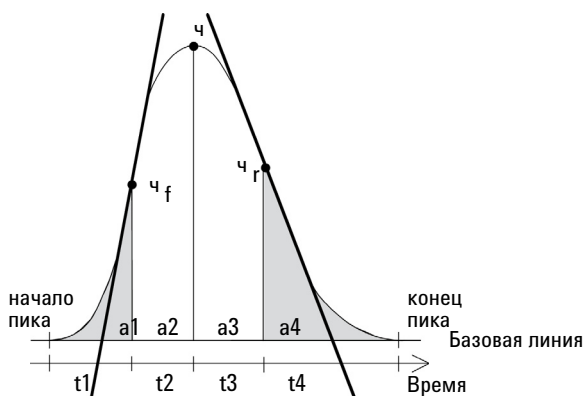


Рисунок 105 Расчет коэффициента симметричности пика

Формулы и расчеты пригодности системы

Для различных проверок пригодности системы результаты рассчитываются по следующим формулам. Результаты расчетов пригодности системы отражаются в отчетах **Эксплуатационные параметры + Уровень шума** и **Расширенные эксплуатационные параметры**.

Если для данного определения имеется руководство ASTM или фармакопеи США (USP), то это определение согласуется с соответствующими контрольными документами, изданными этими организациями. Однако обозначения, используемые здесь, могут не совпадать с теми, которые используются в контрольных документах.

Список контрольных документов:

- ASTM: Раздел E 685 – 93, Ежегодная книга стандартов ASTM, том. 14.01
- USP: Фармакопея Соединенных Штатов Америки, XX издание, стр. 943–946
- EP: Европейская фармакопея, седьмое издание
- JP: Японская фармакопея, шестнадцатое издание

Определения проверки рабочих характеристик

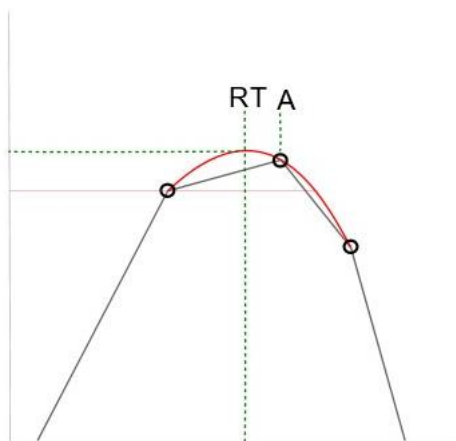
ПРИМЕЧАНИЕ. Время удерживания, которое используется для проверки рабочих характеристик.

Характеристики пика могут быть рассчитаны для любого проинтегрированного пика из загруженных данных, а также для новых проинтегрированных вручную пиков. Программа рассчитывает параметры пиков и характеристики колонки с помощью модельного времени удерживания пика, которое рассчитывается самой программой. Это время может немного отличаться от времени удерживания, из результатов анализа, хроматограммы или отчета. Модельное время удерживания пика можно включить в отчет (см. Поля данных, применяемые в отчетах о пригодности системы в справке по отчетам или ищите по ключевому слову *PeakModelRT*).

ПРИМЕЧАНИЕ

Обратите внимание на то, что время удерживания (ВУ), приведенное на рисунке ниже и определенное во время интегрирования пика, не обязательно связано с наивысшей точкой данных. Время удерживания, как правило, рассчитывается с помощью модели параболической интерполяции. Это значит, что не только время удерживания ВУ потенциально может быть больше или меньше, чем время удерживания наивысшей точки данных, но и высота пика также может быть выше или ниже наивысшей точки данных.

Модельное время удерживания пика рассчитывается путем сглаживания сигнала, чтобы избежать влияния шума. После этого определяется наивысшая точка данных в окрестностях ВУ пика. ВУ этой точки считается модельным временем удерживания пика.



где:

ВУ

Время удерживания, приводимое в результатах ввода пробы

A

Модельное время удерживания пика, используемое для расчетов рабочих характеристик

Общая информация о проверках рабочих характеристик

Таблица 9 Фармакопейные значения в OpenLab CDS

Фармакопея США	Европейская фармакопея	Японская фармакопея	Определение	Название столбца в таблице результатов ввода	Поле, используемое в шаблоне отчета
Коэффициент симметрии или коэффициент размытия	Коэффициент симметрии	Коэффициент симметрии	$S = \frac{W_5}{2f}$	Размытие	Peak_TailFactor
Коэффициент разделения	–	Коэффициент разделения	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$	Селективность	Peak_Selectivity
Относительное удерживание	Относительное удерживание	–	С эталонами ОБУ: $\frac{RT_{\text{peak}} - t_0}{RT_{\text{ref}} - t_0}$	ОБУ ЕФ	Peak_RelativeRetTime_EP
Относительное время удерживания (ОБУ)	Неисправленное относительное время удерживания	Неисправленное относительное время удерживания	С эталонами ОБУ $\frac{RT_{\text{peak}}}{RT_{\text{ref}}}$	ОБУ	Peak_RelativeRetTime
–	Разрешение	Разрешение	$R_s = 1.18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{50(1)} + W_{50(2)}}$	Разреш. ЕФ Разреш. ЯпФ	Peak_Resolution_EP Peak_Resolution_JP
Разрешение	–	–	$R = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{t(2)} + W_{t(1)}}$	Разреш. Фарм.США	Peak_Resolution_USP
Число теоретических тарелок (эффективность)	–	–	$n = 16 \left(\frac{t_R}{W_t} \right)^2$	Тарелок Фарм. США	Peak_TheoreticalPlates_USP

Таблица 9 Фармакопейные значения в OpenLab CDS

Фармакопея США	Европейская фармакопея	Японская фармакопея	Определение	Название столбца в таблице результатов ввода	Поле, используемое в шаблоне отчета
–	Число теоретических тарелок (эффективность)	Число теоретических тарелок (эффективность)	$n = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{50}} \right)^2$	Тарелок ЕФ Тарелок ЯпФ	Peak_TheoreticalPlates_EP Peak_TheoreticalPlates_JP
Отношение Сиг./Шум	Отношение Сиг./Шум	Отношение Сиг./Шум	При расчете шума по моделям Абс. или ASTM: $\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$ При расчете шума по моделям 6С0 или СКО: $\frac{S}{N} = \frac{H}{h}$	Сиг./Шум	Peak_SignalToNoise
Отношение пика к седловине	Отношение пика к седловине	Отношение пика к седловине	$\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}$	Отношение п/с	Peak_PeakValleyRatio

Фактическая ширина пика W_x [мин]

W_x = ширина пика на высоте $x\%$ от полной его высоты

где:

W_t

Ширина пика по касательным, 4 сигма, полученная при пересечении касательных, проведенных через точки перегиба, с базовой линией

$W_{4.4}$

Ширина пика на уровне 4,4% высоты (ширина 5 сигма)

W_5

Ширина пика на уровне 5% высоты (ширина пика с размытым тылом), используемая для коэффициента размытия, по требованиям Фармакопеи США

W_{10}

Ширина пика на уровне 10% высоты

W_{50}

Ширина пика на уровне 50% высоты (истинная ширина пика на половине высоты или 2,35 сигма).

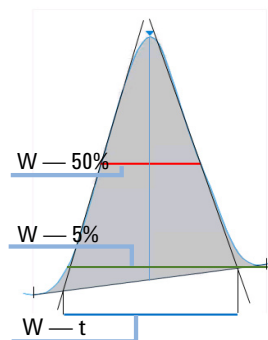


Рисунок 106 Ширина пика на $x\%$ его высоты.

Коэффициент емкости, коэффициент удерживания (имеет разные терминологические обозначения согласно требованиям Фармакопеи США и ASTM) k'

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

где:

t_R

Время удерживания пика [мин]

t_0

Время выхода пика неудерживаемых компонентов в минутах (заданное в методе обработки)

Коэффициент симметрии, Коэффициент размытия (согласно требованиям фармакопеи США) t

ПРИМЕЧАНИЕ

Коэффициент симметрии (согласно требованиям Фармакопеи США, ЕФ, ЯпФ) идентичен коэффициенту размытия (согласно требованиям Фармакопеи США) В программе интеллектуальных отчетов Intelligent Reporting они оба доступны в виде поля Peak_TailFactor. См. также Табл. 9 на странице 206.

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

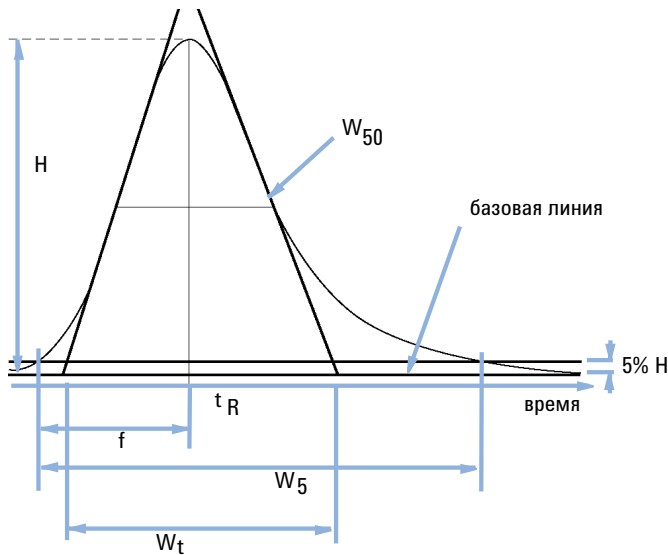


Рисунок 107 Параметры эффективности

S	Коэффициент симметрии, коэффициент размытия (согласно требованиям Фармакопеи США)
H	Высота пика
t _R	Время удерживания
f	Расстояние между началом пика и t _R , измеренное на уровне 5% высоты пика
W ₅₀	Ширина пика на 50% высоты [мин]
W ₅	Ширина пика на 5% высоты [мин]
W _t	Ширина пика по касательным

Число теоретических тарелок на колонку (USP)

Метод расчета с помощью касательных (согласно требованиям Фармакопеи США и ASTM):

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

где:

t_R Время удерживания

W_t Ширина пика по касательным [мин]

Метод расчета на уровне половины высоты (согласно требованиям ASTM, Европейской и Японской фармакопей):

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

где:

t_R Время удерживания

W_{50} Ширина пика на половине высоты [мин]

Число теоретических тарелок на метр N [1/м]

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

где:

n Число теоретических тарелок

l Длина колонки [см] (заданная в методе обработки)

Относительное удерживание, селективность

Селективность

Расчет селективности рассчитывает значение альфа для всех пиков на графике сигнала, кроме первого. Для каждой пары соседних пиков (пики 1 и 2, t_R пика 1 < t_R пика 2) селективность рассчитывается по следующему уравнению:

$$\alpha = \frac{k'_{\text{2}}}{k'_{\text{1}}} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}, \alpha > 1$$

где:

$k'_{(x)}$ коэффициент емкости для пика x: $(t_{Rx} - t_0)/t_0$

Относительное удерживание (по Европейской фармакопее)

Относительное время удерживания по Европейской фармакопее (ОВУ ЕФ) может быть рассчитано только в методике задан эталон ОВУ, и его пик был найден на хроматограмме. Значение *альфа* меньше 1 для пиков слева от пика эталона ОВУ и больше 1 для пиков справа от пика эталона ОВУ.

$$\frac{RT_{\text{peak}} - t_0}{RT_{\text{ref}} - t_0}$$

Разрешающая способность (согласно требованиям фармакопеи США и ASTM) R

Метод касательных (относится к пикам 1 и 2, t_R пика 1 < T_R пика 2; t_R измеряется в минутах)

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

где:

t_R Время удерживания

W_t Ширина пика по касательным [мин]

Для пика 1:

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

Для пика 2:

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

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

$$PV = \min(PV_F, PV_T)$$

Для пика 3:

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

где:

PC	Отношение пика к седловине
PC _Н	Отношение пика к седловине для начала пика
PC _К	Отношение пика к седловине для конца пика
H _{Px}	Высота пика x
H _{Vx}	Высота седловины x

Если на пике несколько плечей, разделенных седловинами, для каждого из этих плечей рассчитывается свое отношение пика к седловине.

Определение седловины:

- Ее высота и время относятся к обоим последовательным пикам.
- Ее базовая линия относится к обоим последовательным пикам.
- Абсолютная высота базовой линии больше 10^{-5} .

Расчеты отношения пика к седловине всегда проводятся с абсолютными значениями. Поэтому даже если один или несколько пиков будут отрицательными, отношение пика к седловине всегда будет положительными.

ПРИМЕЧАНИЕ

Отношение пика к седловине не рассчитывается для сигналов с недостаточным числом точек данных.

В этой книге

Данное руководство содержит справочную информацию о принципах работы, расчетах и алгоритмах анализа данных, используемых в Agilent OpenLab CDS. Информация, содержащаяся в данном документе, может быть использована специалистами по валидации для планирования и выполнения задач поверки системы.

- Интегрирование алгоритмом ChemStation
- Интегрирование алгоритмом EZChrom
- Идентификация пиков
- Калибровка
- Количественный анализ
- Анализ спектров УФ
- Масс-спектрометрия
- Пригодность системы

www.agilent.com

© Agilent Technologies Inc. 2012-2022
Издание: 04/2022

№ документа: D0013815ru Вер. А

