## 使用 Cobra 和 SmartPeaks 实现智能积分

## 介绍

色谱峰检测和积分是色谱分析法中的基本任务,通常是 通过色谱数据系统(CDS)完成的。让软件能够按要求(或 按照实验室规定)进行色谱峰检测与积分,既富有挑战 性且又费时。色谱峰检测中的常见挑战包括:

- 从噪音中识别出色谱峰
- 正确识别潜在基线
- 在一系列色谱图中保持正确的色谱峰和基线检测
- 正确处理驼峰以及其它未分离的色谱峰

理想状态下,使用处理方法中的检测参数可以应对这些 挑战,以便在多个色谱图间自动应用相同的处理方式, 从而将不同操作人员所带来的变化降至最低。但是,找 到能够生成所需结果的参数组合常常是一个枯燥的过程, 导致很多色谱分析人员不得不放弃,转而求助于易受人 为影响且耗时的手动积分。

#### 色谱峰积分

可靠的色谱定量分析取决于准确和可重现的色谱峰积 分。色谱峰积分决定色谱峰面积、峰高和峰的保留时间。 这些信息被用于所有的后继计算,例如校准或未知物的 分析。

简单地说,积分包括了从色谱峰起点到色谱峰终点的检 测器输出的总合。为了实现这个目标,积分由二个独立 的事件组成:积分开始和结束。色谱峰起点和终点定义 了积分的开始和结束,并可通过检测器输出的显著变化 或检测器输出的变化率来加以识别。然而,定义色谱峰 边界仍是非常复杂的。 在理想状态下,色谱峰(图1)应完全对称,具有明显的 检测器信号变化,可清楚地识别色谱峰起始点和终点。



Figure 1. Idyllic chromatographic peak

事实上,积分极其复杂多变。色谱数据系统必须识别众多 不同的变化以及变化导致的影响,例如:对称性不同的峰、 重叠峰、谷点、大小和大小比例不同的峰、低矮峰的起点 和落点、色谱峰前延或拖尾、峰顶点和未分离峰谷的漂移, 在倾斜的背景吸收和背景噪音情况下的基线等(图2)。



Figure 2. Typical chromatography



# 使用 Cobra 和 SmartPeaks 实现智能积分

目录	
1. 介绍	1
2. 色谱峰积分	
3.Cobra 色谱峰检测算法	
4.Cobra 向导	
5. 常见积分问题	
6.SmartPeaks 积分助手	
7.Cobra 检测参数	
8. 添加和编辑 Cobra 检测参数	
9. 总结	

## 3.Cobra 色谱峰检测算法

Thermo Scientific<sup>™</sup> Dionex<sup>™</sup> Chromeleon<sup>™</sup> 色谱数据系统版本 7 的 Cobra<sup>™</sup> 色谱峰检测算法为所有色谱分析人员简化了 积分过程,使完成色谱图处理所需要的工作量降至最低, 并在多个色谱图间提供了一致且可靠的峰检测。

Corba 算法使用先进的信号处理系统以从噪音中辨别出真 正的色谱峰,以复杂的曲线拟合技术准确定位色谱峰最 大值和拐点。仅使用几个简单的参数就能够对所有类型 色谱图进行积分。利用智能向导,可以快速轻松地设置 这些参数的数值,Cobra 算法随后可立即对样品序列中的 每个色谱图进行积分。

为了充分表征组分峰的色谱检测信号, Cobra 的基本要求 是每个峰都有一组 10 到 40 个数据点。有鉴于此,对从 Chromeleon6 中导入的、使用 "自动"的数据采集速率设 置而记录的数据,不建议使用 Cobra 对其进行重新积分。

Cobra 采用一系列算法来分析色谱图,确定真正的底层的 基线,并正确识别色谱峰的起始和终止。这些算法仅用 于色谱图的积分,不影响基本数据,描述见第7.1部分。

简而言之, Cobra 使用了自适应的 Savitzky-Golay 平滑功能, 随后转换成二阶导数,再根据信号特性依照自动阈值来 评估此二阶导数。

计算导数时,由于噪音会被放大,因此使用足够的平滑 来优化信噪比并确保正确识别色谱峰的起始点和终点是 非常重要的。Cobra 采用自适应 Savitzky-Golay 平滑函数来 消除噪音,同时不会丢失重要信息。

Cobra 之所以使用色谱信号的二阶导数,是因为这样可识 别组分色谱峰。此外,评估色谱峰的二阶导数能够减少 背景吸收的影响,当背景有比待测物色谱峰更低的曲率 时,可确保能准确、一致地识别拐点和色谱峰最大值。

例如,以下二张色谱图显示了同一待测物的色谱峰,但 其中一张色谱图有较大的倾斜背景吸收(图3)。中间的 是这二个信号的一阶导数(图4)。 可以看出, 纯待测物的色谱图(灰色)和有干扰色谱图(蓝 色)之间的差异已减小。该效果在二阶导数(图5)中会 大大加强。



Figure 3. Overlaid of chromatograms



Figure 4. First derivative



Figure 5. Second derivative

这种情况下, 纯待测物的色谱图与有干扰的色谱图几乎 相同。

在色谱图的二阶导数中,噪音阈值是自动确定的(见图 6和图7中的红色虚线)。阈值下限之下的区间最小值就 是色谱峰顶点。拐点或阈值上限之上的区间最大值是色 谱峰的起点和终点(图6)。基线是那些横跨超过噪音阈 值限度的曲率的点的插值。(图7)。





Figure 6. Local minimum and maximum

Figure 7. Baseline interpolation

#### 4.Cobra 向导

Cobra 向导通过将用户输入操作最少化,智能地改善了分析人员的体验。该向导用于指导操作人员正确指定初始 色谱峰检测参数,以在必要时帮助优化积分。积分更具 结构性和直观性,可以放心操作,因此排除了边试边改 的办法和手动积分操作。关于 Chromeleon CDS 如何确定设 置这些参数所用值的详情,见第7.1部分。

Cobra 向导可协助分析人员定义 Cobra 所要求的 4 个关键 参数:

#### 积分范围

除非分析人员另有规定,默认情况下整个色谱图都会被 积分。仅需点击拖拽鼠标,划过色谱图,应被积分的区 域将会被高亮标记(见图8)。同时,三个检测设置参数 也会被创建: Inhibit On(开启禁止积分), Inhibit Off(关 闭禁止积分), second Inhibit On(再次开启禁止积分)。



Figure 8. Defining integration range

对于离子色谱,在所谓的"水负峰"或"死体积峰"的 情况下,还存在其它的色谱测定问题。该负峰(与水相关) 在需要检测的色谱峰之前出峰,并且需要特别处理以避 免影响到其它色谱峰的积分。使用者可以通过复选框定 义是否要考虑死体积峰。

## 基线噪音范围

Cobra 将自动尝试从色谱图中选择一个平坦的"无峰"区 域来测量基线噪音(详述见第7.1部分)。但分析人员可 通过简单地点击并拖曳鼠标选中应使用的区域以特别指 定一个不同的范围。大多数情况下,默认选择是可接受 的(见图9)。二个检测参数被创建:BLNoiseStart(基线 噪音起点)和BLNoiseEnd(基线噪音终点)。



Figure 9. Defining baseline noise range

#### Cobra 平滑宽度

Cobra 会自动确定色谱图中最窄峰的峰宽,并用该值设置 Cobra 的平滑宽度(详见第7.1部分)。不过,使用者可 以简单地通过选择色谱图中的另一个色谱峰(见图10) 来指定一个不同的值,或点击并拖拽鼠标来高亮显示应 使用的峰宽。大多数情况下,默认选择是可接受的。一 个检测参数被创建: Smoothing(平滑)。



Figure 10. Defining Cobra Smoothing Width

## 最小峰面积

Cobra 会自动确定所积出的最小峰的面积,并相应设置最 小峰面积数值(详见第7.1部分)。不过,操作人员可以 通过简单选择色谱图中应求积分的最小峰来轻松指定一 个不同的值(详见图11)。大多数情况下,自动确定的 值都可以接受。检测表中会添加一个参数: Minimum Area (最小峰面积)。检测设置支持在不同保留时间段内设 置多个最小峰面积参数,但通过向导只支持设置第一个 最小峰面积参数。



Figure 11. Defining Minimum Area

最终,用户可决定将这些 Cobra 检测参数用于所有或仅指 定的通道或进样类型(图 12)。这样可以轻松快速地将 不同的检测参数用于不同的检测器或进样类型。



Figure 12. Defining Channel and Injection Type

使用这些简单的步骤,任何分析人员均可快速、轻松而 自信地指定初始色谱峰检测参数,确保积分一致性、准 确性,而无需费力地从失败的尝试中找到解决办法,从 而消除了对手动积分的依赖。

## 5. 常见积分问题

当基线不稳定或色谱峰分离不彻底的时候,会出现一些常见积分问题。例如,图 13A 中,数据系统选择从第一个色 谱峰之前的负峰最低处到该色谱峰后的区域绘制基线。问题无疑就是在特征峰之前的负峰被误判为真正基线。使用 Cobra 算法中的"考虑死体积峰"选项可以轻松予以纠正(图 13B)。



Figure 13. A) Incorrect baselinedue to negative dip, B) Correct integration with Cobra

图 14A 显示了另一个常见积分错误。在该图中,色谱峰终点被误判,导致色谱峰基线绘制错误。这个问题通常发生在 色谱峰拖尾严重,峰比较小,而基线发生漂移的时候。存在这种情况时,不仅色谱峰会被错误积分,而且色谱峰终点 在下一阵运行中会显著变化。Cobra 算法通过基于色谱峰基线的斜率自动计算阈值,实现了具备一致性的适当的积分, 见图 14B。



Figure 14. A) Incorrect baseline due to negative dipon tailing peak, B) Correct integration with Cobra

积分难题的另一个来源是未分离的色谱峰组的色谱峰基线位置的多种选择。绘制二个色谱峰之间基线的最常见选项为 垂直分割、谷到谷,切线切削、指数切削和高斯切削(图 15)。每种选择都各有利弊。

## 垂直切割

垂直切割法(图 15A)需要从色谱峰之间的峰谷和水平基 线之间绘制一条。如色谱峰大小几乎相同,而且没有拖 尾或前伸现象,这样计算而得的色谱峰面积应该是相当 准确的。

但如有显著的第一个峰拖尾,或第二个峰前伸,则面积 将失真,而积分得到的面积也会产生相应错误。此外, 如果色谱峰比例悬殊,例如20:1时,则较小的峰将受主 峰影响得到明显的过多的峰面积。这种情况下,较大的 峰的准确性将远好于较小的峰。最后,当色谱峰之间的 分离度太小,以致没有明显峰谷时,垂直切割将导致较 小的"肩峰"的积分面积过大。这种情况下,可能更适 合选择其它方法。

## 谷到谷

谷到谷法(图 15B)将起点和终点设置于色谱峰之间的峰 谷点,以此方式对每个色谱峰单独积分。该方法通常不 是最佳方式,因为其通常会低估真实色谱峰面积,然而, 如果一组流出峰下出现了一个已知基线干扰,或者在某 些梯度洗脱的情况下,基线有较小持续宽幅上扬时,可 以使用这种方法。

#### 切线或指数切削

图 15(C和D)中的两种切削方式使用独立基线把第一个 峰和第二个峰分开。第一个峰的积分从其起点开始到峰 组的明显终点为止。第二个峰基线从色谱峰之间的峰谷 开始,在信号靠近基线时结束。切削色谱峰"下方"的 面积被加到首峰上,而非切削色谱峰上。该方法也被称 为切线积分法,而小峰则被标记为切削峰、肩峰或驼峰。 切削过程可能有若干变化:

- 切线切削法;从峰谷到色谱峰终点(或色谱峰起始点) 画一条直线(图 15C)。通常有两种选择:在较低色谱 峰终点上的切线或同时二个色谱峰终点上的切线。
  - 在较低色谱峰终点的切线意味着该直线是在上升驼
    峰起始点,或在下降驼峰终点,即色谱峰信号最低
    的部分,在色谱图上正切划线。
  - 在二个色谱峰的终点处的切线意味着色谱峰起点和
    终点均是按直线与色谱图正切的方式确定的。
- 指数切削法;使用一个指数函数来创建弯曲的切削线, 以尝试得出近似的第一个峰潜在基线(图 15D)。

无论使用哪种切削,得到的始终是一个峰面积估计值, 通常,积分法的一致性比切线切削还是指数切削都重要。 作为第一守则,如较小的峰小于主峰高度的10%,则切削 色谱峰就是合适的积分方式。如较小的峰大于主峰高度 的10%,则最好采用垂线法。

即便是经验最丰富的色谱分析人员,理解所有这些不同 的方法和技巧,并能够指定正确的检测参数来实现理想 的积分也是非常艰巨的任务。Chromeleon CDS 通过为色谱 分析人员提供 SmartPeaks<sup>™</sup> 积分助手解决了这些问题。



Figure 15. Defining Channel and Injection Type.Baseline Profiles. A) Drop Perpendicular, B) Valley to Valley, C) Tangential Skim, D) Exponential Skim

## 6.SmartPeaks 积分助手

SmartPeaks 积分助手为分析人员提供了最简单的界面,快速直观地对未分离峰组进行积分。用户只需激活 SmartPeaks 工具并选择一个色谱图区域。SmartPeaks 随后会以图形的方式显示可用的积分选项,如谷到谷基线或 指数切削(图 16)。



Figure 16. SmartPeaks Integration Assistant – displays integration options

使用者随后选择想要的选项, SmartPeaks 将相应的参数和值添加到处理方法中, 以便对序列中的所有色谱图自动应用 所要求的积分形式(图17)。更多选项(通过高级侧边栏,图16)允许使用者定义将这些参数应用到色谱图的哪一部分、 哪些检测通道和/或进样类型。



Figure 17. SmartPeaks Integration Assistant – displays integration options

该过程只需几秒,消除了调整积分中的边试边改过程,使任何使用者都能设置合适的参数,以确保未分离色谱峰的正 确积分。

## 7.Cobra 检测参数

积分是相当复杂且具有挑战性的,但对于准确的定量分 析至关重要。Cobra 检测算法、Cobra 向导和 SmartPeaks 积分助手简化了色谱法检测和积分过程。但对于某些复 杂色谱图而言,仍有必要提供更多的积分参数,从而实 现正确积分。Chromeleon CDS 版本 7 全面提供了一整套 可适用的、灵活的参数,以协助色谱分析人员实现其积 分目标。

这些参数可分为4类:

- 禁止对不需要的色谱峰积分的参数
- 影响基线的参数
- 帮助界定色谱峰起始点和终点的参数
- 影响驼峰和肩峰检测的参数

检测参数会影响其所应用到的所有色谱图的积分。每个 检测参数均被赋予了一个默认值,即使是在处理方法中 未明确规定的检测参数,也始终用此默认值应用到色谱 图上。

任何时候,每个参数均可采用新值,但只有最后指定的 值才有效,而且仅针对所指定的色谱时间段。随后这些 参数会重新设定为默认值。

理解这些参数的目的和应用对任何色谱分析人员而言 都是非常重要的,唯有如此,才能将这些参数成功应用 于处理方法,以实现最佳结果。

## 7.1 使用 Cobra 参数的"自动"设置功能

#### Cobra 平滑宽度

如果用户启用"自动"选项,则会为整个色谱图动态 设置平滑宽度,因此每个数据描点均会使用独立宽度。 执行以下算法以自动计算初始滤波器宽度,随后将其用 于进一步计算。

- 首先, Cobra 通过使用当前信号值和之前信号值的差减,例如数据点4的信号值-数据点1的信号值等, 评估每个点的斜率。
- 其次,Cobra分析该斜率的集合,寻找紧跟最小值之后的最大值。如果两者之间过零点(即最大值在0以上,最小值在0以下),则计算出与峰顶点相应的点。该点会给出色谱峰两个拐点之间的宽度(w)和峰高(h)的估算值。

- 这些点将根据宽度(w)进行分类,构建一条将具有最小宽度的点连接至具有最大宽度的点的直线(见图 18)。标出该条线下方具有最大偏差的点(j),而所有相对较小的点则被忽略,因为这些点可能与信号噪音相关。对其余点则计算用峰高(h)加权的平均峰宽(图 18 中的阴影区域)。
- 最后,用此平均宽度乘以一个因子(默认值为1.5), 计算得出滤波宽度。

然后,将此滤波宽度进一步用于以下两个步骤: 重采样和平滑。



Figure 18. Selection of filter width from peak estimates

#### 重采样

重采样有几个目的:

- 消除或抑制噪音
- 减少数据量,加快更多处理的速度
- 确保获得随后的算法中需要的等距数据点

Cobra 在现有数据点之间取一个最小时间间隙(步长), 并计算一个新步长。重采样因子用于限制所要考虑的数 据点(默认值为 50):

## 新步长 = 初始步长 ÷ 重采样因子 × 滤波宽度的 最大值 / 初始步长或 3

如原始数据为非等距,或计算得出的新步长大于初始步 长,则色谱图随后会使用三次插值重新取样,以按新步 长计算新信号值。

## 平滑

基线和色谱峰检测基于(重采样而得的)色谱图的曲率, 但色谱图可能包含大量噪音,因此需要采取额外的处理 步骤来平滑数据,实现信号和噪音的区分。

Cobra 使用 Savitzky-Golay 算法平滑数据。该算法把一个 二次多项式用于接近目前数据描点的数据描点集合(按 上一步计算的滤波宽度和(可能是新的)步长来进行定 义)。但使用固定滤波宽度会导致某些色谱峰被过度平 滑,或经过平滑后的信号可能过冲,见图 19。这在色 谱峰切削时明显是有问题的,因为这些处理集中地使用 斜率和平滑后的信号。可以看到,经过切削的基线(红 色)过早停止,因为切线在最小的平滑信号处与基线是 平行的。



Figure 19. Selection of filter width from peak estimatesThe original signal (black) is not reproduced by the smoothed one (gray)

通过减少滤波宽度来避免此问题会导致在色谱峰检测 过程中忽略小峰,因为较小的滤波宽度导致了较高的噪 音,从而掩盖真峰曲率。因此,解决方案是要检测过 高的信号,并相应调整对色谱图中每个数据点的滤波 宽度。因此在整个色谱图上,要动态设置滤波器宽度, 以便在评估每个数据描点(斜率和曲率)时使用独立的 宽度。 在图 20 中,蓝色曲线显示了若干具有固定滤波宽度的 经平滑后信号与组合一起的色谱图(黑色)自调节平 滑后的信号(红色)。对组合图中各个信号的加权会 及时显示在色谱图上三个不同点的小方框中,加权后 的平均滤波宽度标为垂直蓝线。



Figure 20. Overview of the adaptive smoothing process

图 21 显示了滤波(或平滑)宽度如何自动进行调整以 适应于平滑色谱图。这也适用于一阶导数和二阶导数。



Figure 21. Variation of the mean smoothing width (blue) across a chromatogram (black, almost hidden by the red curve of the smoothed signal). The bounds of the noise level are shown in orange

总之,如果用户启用了"自动"选项,就会对整个色 谱图动态设置平滑宽度。重要的是要注意色谱图的平 滑和求导仅在色谱峰检测和积分期间内部使用。所有 其它积分结果,例如峰高或面积,始终依照原始信号 进行计算。

#### 基线噪音范围

如用户选择了"自动"选项,会自动使用一种算法来计 算合适的时间范围。使用美国材料与试验协会(ASTM) 方法 E685-93 时,色谱的噪音信号时会使用一个为 Cobra 平滑宽度倍数的宽度,在窗口中多次计算色谱图信号噪 音(图 22 中的 dt),从而得出一系列信号噪音水平的 估计值,当一个窗口叠加在一个真峰上时,这些值已被 异常值污染。



Figure 22. ASTM E 685-93 for signal to noise calculation

从统计学上看,这些估值的相当一部分属于基线,因此 可使用具有可配置百分比或"数字排位"的值(如中位 为50%)作为信号噪音水平的有效估计。该排名要求给 定百分比的色谱图未被色谱峰覆盖。但该百分比会随色 谱图长度而改变,如短色谱图的无峰时间百分比较小。 为对此予以补偿,使用了以下方程式来计算排名。

排名 =30× 色谱图长度(分钟)/10.0 (至少 30,最多 100)

通过将此排名应用于信号噪音估计值集,Cobra 能够计 算信号噪音的可靠数据。

接下来,Cobra 会使用 RDP 算法以得出近似的色谱图(图 23)。该算法以递归方式划分色谱图"线"。

起初,其包括了第一点和最后一点间的所有数据 描点(图 23A)。其会自动将第一点和最后一点 标记为要保留的点。随后,其会查找离以第一点 和最后一点为端点的线段最远的点(标记为绿 色)。如比起之前计算的信号噪音(蓝色区域), 该点离上述线段更远,则必须保留该点。

随后,用第一点和最差点重新执行该算法(图 23B)。如果偏离最远的点现在比之前计算的信

号噪音更靠近上述线段,在近似线不比信号噪音更差的 情况下,这些点之间目前未标记为"保留"的任何点均 可剔除(标记为红色)。

继续用最差点和最后一点执行该算法(图 23C),并以 递归方式运行,直至处理完整个色谱图(图 23D 到 G)。 当递归完成后,可生成一张新的色谱图,其中仅包含已 标记为保留的点(蓝线 图 23G)。

最后,取用该算法计算出的最长片段的时间范围(开始 和结束时间)作为"Cobra 基线噪音范围"的范围。



Figure 23. Ramer - Douglas - Peucker algorithm

#### 最小峰面积

如在 Cobra 向导中选择了"使用自动最小峰面积"选项,则用"最小信噪比"参数来确定检测限。这种情况下, Chromeleon CDS 会使用以下方程式来计算最小峰面积 的阈值:

### 最小信噪比 × 基线信号噪音 × 最小峰宽

基线信号噪音值源自于 Cobra 基线噪音范围规定的色谱 图部分。如未规定最小峰宽,则使用 Cobra 平滑宽度参 数进行替代。

#### 最小高度

如该参数设置为"自动",则用"最小信噪比"参数确 定检测限。这种情况下,Chromeleon CDS会使用以下 方程式来计算最小高度的阈值:

最小信噪比 × 基线信号噪音

基线信号噪音值源自于 Cobra 基线噪音范围规定的色谱 图部分。

#### 7.2 禁止不需要的色谱峰积分的参数

#### 检测负峰

"检测负峰"参数能够启用或禁止负峰的检测。当参数 启用时,会检测负峰和正峰(图24)。该参数有3个选项:

- •关闭:不检测负峰(默认)。
- 开启:检测负峰,自动开启"锁定基线"参数。在结果列表中,负峰面积会显示为正值。
- 开启但不标记:检测负峰,但不标记,或不在结果 之中。



Figure 24. Detect negative peaks. A) Off, B) On, C) On Don't Label

#### 检测肩峰

该参数可以用来启动 / 禁止肩峰检测。鉴于没有严格的数 字表示方法来描述肩峰,大部分色谱分析人员都公认肩 峰是主峰和较小峰之间没有峰谷的一种驼峰(例如较小 峰顶点低于其起始点,图25)。该参数只有两个选项可用:

- 开启:把肩峰当作正常峰(默认)。
- 关闭:不识别肩峰。关闭肩峰检测不会禁用所有驼峰 检测。

如检测到肩峰,则如何进行积分(或不积分)将由各种 驼峰和最小参数的设置决定。有关驼峰参数的更多信息, 请参见第7.5部分。



Figure 25. Detect Shoulder Peaks. A) On, B) Off

#### 禁止积分

"禁止积分"参数可用以从积分中排除特定色谱图面积。 在忽略不感兴趣或含有不需要分析的色谱峰的色谱图面 积时,例如,色谱图开始时的大溶剂峰,或进样结束时 的梯度洗脱导致的峰时,禁止积分非常有用。该参数有 两个选项可用:

- 开启: 禁用色谱峰检测。
- •关闭:启用色谱峰检测(默认)。

设置为"开启"时,唯有参数被重新设置为"关闭"后, 才会重新激活色谱峰检测。在禁用积分=开启和禁用积 分=关闭之间的区域内,色谱峰检测被禁用,即在该区 域内不对色谱峰进行识别。屏幕上会显示色谱图,但不 进行积分(图 26)。



Figure 26. Inhibit Integration

#### 最小峰面积

该检测参数用来确定最小面积阈值,面积低于此值的色 谱峰均会被忽略,这是从已积分色谱图中忽略小峰的最 常用参数。它是 Cobra 算法使用的参数之一,可用设置有:

- 自动:如选择自动(默认),Chromeleon 会自动计算 检测限,如第7.1部分中所述。
- 0-1E+15: 以 < 信号单位 > x 分钟(如 mAU\*min)的 形式设置一个绝对阈值



Figure 27. Minimum Area

#### 最小峰高

"最小峰高"检测参数被用来确定最小高度阈值,峰高低于此值的色谱峰均则会被忽略。每个色谱峰的峰高是相对于其各自的基线进行测量的。对于驼峰而言,这意味着峰高测定是相对于切削基线进行的,因此未分离色谱峰的基线类型会强烈影响到峰高。可用设置有:

- 自动:如选择自动(默认),则会计算检测限,如第7.1
  部分中所述。
- 0 1E+12: 以 < 信号单位 > (如 mAU)的形式设置一 个绝对阈值



Figure 28. Minimum Height

#### 最小相对面积

如色谱峰面积低于特定阈值会被拒绝。在一次通过基础 上测量色谱峰,与色谱图内所有色谱峰的总值(总面积) 相对。在待测物浓度可发生变化,且主要待测物色谱峰 面积会降至绝对最小面积阈值(用于拒绝较小、不想要 的色谱峰)之下的序列中,该参数很有用。

使用"最小相对面积"参数后,降至指定最小面积值之下的相关峰仍将进行检测和求积分,因为它们比当前色 谱图总面积的最小相对面积阈值大。可用设置有:

- •关闭:检测所有色谱峰(默认)。
- 0-100: 以百分比为单位(%)



Figure 29. Minimum Relative Area

#### 最小相对高度

如色谱峰的最小相对高度低于特定的阈值会被拒绝积 分。最小高度是相对于色谱图中最高峰进行测定的,而 高度是依照最小峰高进行测定的。该参数可按与最小相 对面积相似的方式使用。可用设置有:

- •关闭:检测所有色谱峰(默认)。
- 0-100百分比(%)



Figure 30. Minimum Relative Height

## 最小信噪比

该参数可设置计算检测限所需的信噪比,因此可在"最 小面积"和"最小峰高"参数中使用。检测限是最小信 号高度,也就是刚能够与零点区分的信号高度。信噪比 越低,则检测限越低,从而识别的色谱峰就越多。如"最 小峰面积"或"最小峰高"=自动,该参数会自动生效。 可用设置有:

1-100: (默认值=2)



Figure 31. Minimum Signal to Noise Ratio

#### 最大峰宽

"最大峰宽"检测参数定义若干分钟内的最大峰宽, 任何峰宽大于该参数的色谱峰将在峰检测期间被忽略。 峰宽是按基线测量的。对于未达到基线的色谱峰,峰宽 是推算值。可用设置有:

- •关闭:考虑所有色谱峰(默认)。
- •0-1000: 若干分钟内的最大峰宽值。



Figure 32. Maximum Width

## 最小峰宽

"最小峰宽"检测参数定义了最小峰宽,在峰检测期间, 任何峰宽低于此值的色谱峰都会被忽略。峰宽是按基 线测量的。对于未达到基线的色谱峰,峰宽是推算值。 可用设置有:

- •关闭:所有峰宽 >0 分钟的色谱峰均被检测(默认)。
- •0-1000分钟。



Figure 33. Minimum Relative Width

## 7.3 影响基线的参数

#### 基线点

"基线点"检测参数被用来设置特定时间的基线点。如 积分开始过早或色谱峰结束延迟,可能需要修改基线。 这种情况下,可以通过插入一个合适的基线点来强制 色谱峰起点推迟,或终点提前。可用设置有:

 固定:在所选定的保留时间添加一个固定的基线点 (默认)。



Figure 34. Baseline Point

#### 基线类型

"基线类型"参数由"谷到谷"和"锁定基线"参数组成。 可用设置有:

- 谷到谷: 启用谷 谷的基线处理,即从一系列未分离 峰的最低点到最低点,
- 垂直切割:(默认)对于未分离峰而言,基线是从峰 组起始点画到终点,且未提升至相对最小值(谷点)。
   基线将第一个未分离峰的起始点连接至最后一个未分 离峰的终点。如其中有一个峰谷位于基线以下,则把
   基线连接至最小值,以避免峰的底部被切割。
- 以当前水平锁定:把基线固定在当前信号水平,且向 右水平外推(图 35A)。
- > 以整体最小值锁定: Chromeleon 向右搜索色谱图中的 最小绝对信号值。该搜索既可向色谱图尾部也可向下 一个基线点推进(见前述参数),基线水平锁定在已 发现的最低水平上(图 35B)。



Figure 35. Baseline Type. A) Lock at current level, B) Lock at global minimum

#### 最小基线框宽度

整个色谱峰检测过程中的一个关键部分就是确定色谱 图的哪些部分为基线(例如色谱峰外侧)。为了达成这 一目的,采用了一独立于主要色谱峰检测算法的附加算 法来识别色谱图的哪些部分为基线。该附加算法计算 色谱图的二阶导数上的阈值,以选择绝对弧度较小的 区域。为避免误测,只有宽度大于"最小基线框宽度" 参数所设阈值的区域才会被使用。将参数设为关闭,会 关闭基线线段的独立于色谱峰的检测。如图 36 所示, 以这种方式检测的基线起止点和终点被用来构建每个 色谱峰下的基线线段。可用设置有:

- •关闭(默认)。
- •0-1000分钟。



Figure 36. Detection of baseline segments (blue regions  $-2^{nd}$  derivative) and filling the gaps between by linear segments (red, solid lines – chromatogram)

#### 基线对齐

设置为开启状态时,当临近的色谱峰不积分,自动"拉 升"基线,以连接所选色谱峰的起始点和终点。从图 37A上可以看出,第一个峰未积分,第二个峰的基线 被连接(或对齐)至峰起始点。参数设为关闭时(图 37B),原始基线得到保持。可用设置有:

- •开启:基线对齐至峰起始点(默认)。
- •关闭:基线维持在原始水平。



Figure 37. Snap baseline. A) On. B) Off

#### 7.4 定义峰起始点和峰终点的参数

#### 组峰起始点/组峰终点

"组峰起始点和组峰终点"检测参数用于把若干连续色 谱峰识别为一个组峰。随后把该组峰当做一个色谱峰 来处理。在组峰中,任何其他检测参数均不适用,比如 用于检测驼峰的参数。最大色谱峰的最大峰值成为整个 组峰的最大峰值。Chromeleon CDS 在色谱图和成分表中 仅显示一个名称和数量。检测结果,如面积值和峰高, 均是为整个组峰计算。"组峰启动"参数标记了一个 组峰的开始,"组峰结束"参数标记了该组峰的结束。 可用设置有:

- 自动:组峰基线从首峰的峰起始点画至尾峰的峰结束 点(图 38A)。色谱峰定界符和基线水平由色谱峰检 测算法确定。
- 固定:基线从组峰起始点的保留时间信号值画至组峰 终点的保留时间信号值(图 38B)。



Figure 38 . Peak Group Start/End. A) Auto. B) Fixed

## 前伸 / 拖尾敏感度因子

前伸敏感度因子和拖尾敏感度因子分别是为峰起始点 和峰终点设置的信任阈值。如色谱峰起始点设置过早或 峰终点设置过晚(通常可在色谱峰有显著前伸或拖尾时 看到),设置这些参数可以修改检测峰起始点及/或峰 终点的敏感度。前伸/拖尾敏感度因子的值越大,峰起 始点/峰终点离色谱峰最大值也就越近。可用设置有:

- •关闭:自动检测峰起始点和峰终点(默认)。
- 1-100:寻找最佳前伸 / 拖尾敏感度因子时,通常把相应起始点设为 1.



Figure 39. A) Fronting Sensitivity Factor. B) Tailing Sensitivity Factor

#### 7.5 影响驼峰和肩峰检测的参数

#### 最大驼峰比率

如在一系列未分离峰中,有一个或多个色谱峰(h1 到 h4,图40)高于"最小驼峰比率"(见下文),则使用"最 大驼峰比率"检测参数来确定一个色谱峰应划分为主峰 还是驼峰。待划分色谱峰高度(如h2)将与该系列中 最高色谱峰的高度(即图40中的b)进行对比。如该 比率产生的值比最大肩峰比大,则该色谱峰为主峰。如 该比率产生的值比最大肩峰比小,则该色谱峰为驼峰。 从系列中最大的色谱峰开始,所有临近色谱峰都可以进 行分类。可用设置有:

•百分之0-100(%)(默认值=20)



Figure 40 . Maximum Rider Ratio

#### 最小驼峰比率

单个色谱峰高度(图41中h1到h5)与最大色谱峰高度(图 41中的b)之间的比率决定了一个色谱峰应划分为驼峰 还是主峰。如高度比的结果低于定义的"最小驼峰比 率",则把该色谱峰定义为主峰。图41中,只有h5色 谱峰为这种情况。如果高度比的结果比定义的最小比 大,则计算"最大驼峰比率"参数,由此产生的值可 用来将其余色谱峰分类为驼峰或主峰。

可用设置有:

•百分之0-100(%)。(默认值=10)



Figure 41 . Minimum Rider Ratio

#### 驼峰检测

该参数仅用于启用或禁用驼峰检测。可用设置有;

- 开启:与"最小/最大驼峰比率"参数匹配的所有驼峰均予以检测(默认)。
- •关闭:禁用驼峰检测,识别所有色谱峰为主峰。
- 仅前伸:只有色谱峰前伸边缘的驼峰被识别。
- 仅拖尾: 只有色谱峰拖尾边缘的驼峰被识别。

#### 驼峰切削

- "驼峰切削"参数可确定如何切削驼峰。可用设置有:
- 在色谱峰低端正切:取决于色谱峰是上升还是下降, 色谱峰起始点或终点的定义是否能使驼峰切削与色谱 图正切。
- 在色谱峰的两端正切:确定色谱峰起始点和终点以让 驼峰切削与色谱图两端正切。
- 指数:通过一个指数函数得出近似色谱图。大多数情况下,指数可非常精确地描绘出曲线的实际轨迹,而 驼峰通常会获得一个更为真实的面积。



Figure 42. A) Tangential at lower peak end, B) Tangential at both peak ends, C) Exponential

## 8. 添加和编辑 Cobra 检测参数

Cobra 检测参数用来确定色谱图如何进行积分,例如, 在哪些区域色谱峰要被禁止积分,或如何检测色谱峰起 始点和终点。因此,可以根据分析人员要求来调整积分, 从而在实际上消除对单个色谱图进行手动积分的需要。

Chromeleon CDS 会根据处理方法中规定的 Cobra 检测参数自动确定色谱峰面积并求其积分。但在处理方法中添加或编辑参数会给色谱分析人员带来一些挑战:

- 如何确保参数是在正确的保留时间时添加(如两个色 谱峰之间)?
- 如何查看添加或改变参数对色谱图的影响?
- 如何快速轻松地确定参数的敏感值?

Chromeleon 提供了一个简单、直观的界面,以协助分析 人员直接在色谱图上添加和编辑检测参数。这确保能以 最小工作量和延迟来实现参数的添加、定位和编辑。

#### 8.1 添加检测参数

检测参数可以通过与色谱图的直接图形交互来添加。这 显著促进了定义检测参数的流程。

为了直接在色谱图上添加检测参数,分析人员只需要选择"处理"工具栏中的"检测参数"组中的"插入"选项(图 43A)。然后就可在下拉菜单中直接找到最常用的参数(图 43B)。分析人员选择要插入的参数后,鼠标指针会变为如下外观:

分析人员随后将鼠标指针准确移动到需要使用该参数 的位置,点击色谱图(图43C)。定义的参数直接加入 到处理方法中,同时在色谱图上的所选保留时间处显示 一个旗标。动态数据链接可确保将该新参数会依次迅速 应用到所有色谱图中。



Figure 43. A) Insert option on the Processing ribbon, B) List of parameters, C) Click to insert

作为在色谱图中直接添加检测参数的备选方法,分析人员可仅将鼠标指针移到要插入参数的位置,然后点击鼠标 右键。

随后出现一个弹出菜单,该菜单提供了插入检测参数的选项(图 44A)。选择该选项后,分析人员可立即访问所 有可用检测参数,并能规定要求的设置(图 44B)。定义的参数再次直接加入处理方法,同时在色谱图上的所选 保留时间处显示一个旗标(图 44C)。



Figure 44. A) Right click to insert a detection parameter, B) Define parameter, C) Parameter applied

使用鼠标右键,拖出一个方框覆盖色谱图上的某个区域,就可以添加其他检测参数。例如,设置基线噪音范围时, 拖出一个方框覆盖某个基线区域(图 45 A),并选择相关参数(图 45B)以便添加参数(图 45 C),就是这么简单。



Figure 45. A) Select region, B) Select parameter, C) Parameters are inserted

如果添加参数后发现结果不理想,可以使用快速访问工具条上的取消按钮轻松移除设置。 2000 2000 这允许操作人员按顺序逐项取消所做的全部改变。

#### 8.2. 编辑检测参数

现有检测参数的编辑可以直接在色谱图上完成,换而言 之,可以在色谱图上修改参数值或把一个参数移到不同 位置。

#### 编辑参数值

分析人员只需双击所需检测参数上的标记(图 46A 和 B)即可编辑现有参数。当标记中的参数值改变后, Chromeleon CDS 会立即更新色谱图视图,以显现更改值 可能导致的影响(图 46C),而无需使用者发出改变命令, 这使分析人员能快速找到正确的值,以实现要求的积 分,同时避免增加不必要的处理方法版本。点击"Esc(退 出)"键,将放弃任何更改,同时,分析人员只需点击 "Enter(输入)"或点击标记以外的地方就可赋予新值(图 46D)。



Figure 46. A) Detection parameter flag, B) Double-click to edit, C) Instant update before commit, D) New value committed

对于某些参数,可以通过点击标记的箭头查看其固 定选项(见图 46B),并从下拉列表中选择一个参数 值(图 47)。



Figure 47. Dropdown list in flag

#### 编辑参数位置

要改变特定参数的对应的保留时间,只需把鼠标移动到 标记的虚线上,鼠标指针会变为如下外观:

然后只需点击并拖拽参数到新的保留时间处(图 48)。Chromeleon 会在处理方法中更新保留时间,并立 即显示改变后的色谱图。



Figure 48. Moving a single parameter

如在同一保留时间处有多个参数,可以移动全部或是单 个参数。需同时移动全部参数时,可使用上述步骤选择 虚线,然后拖拽至所需要的保留时间处(图 49)。



Figure 49. Moving a group of parameters

若只需从该组中移动一个标记,把鼠标移到所需标记 上,直至其变色,然后只需点击并拖拽,即可重新定位 该参数(图 50)。



Figure 50. Moving one parameter from a group

## 9 总结

Chromeleon CDS 强大旦智能化的色谱峰检测与积分功能可以应对色谱峰检测过程中的常见困难:

- Cobra 算法能成功从噪音中区分出色谱峰,并正确识 别基线。
- Cobra 向导可引导操作人员正确指定初始色谱峰检测 参数。
- SmartPeaks 积分助手可协助并引导色谱分析人员正确 处理驼峰和其它未分离峰。
- 使用简单的色谱图内嵌式编辑工具,任何色谱分析人员都可以轻松、直观、迅速插入新参数,并修改现有参数。

所有这些积分任务均可在无需色谱分析人员打开处理 方法(尽管参数已加入处理方法)的情况下完成,从 而可在一序列色谱图中保持正确的色谱峰和基线检测, 将不同操作者和手动积分操作带来的差异降至最低。

使用 Chromeleon CDS,实验室能够显著提高整体效率和 生产力。



赛默飞世尔科技(中国)有限公司

免费服务热线: 800 810 5118 400 650 5118 (支持手机用户)