

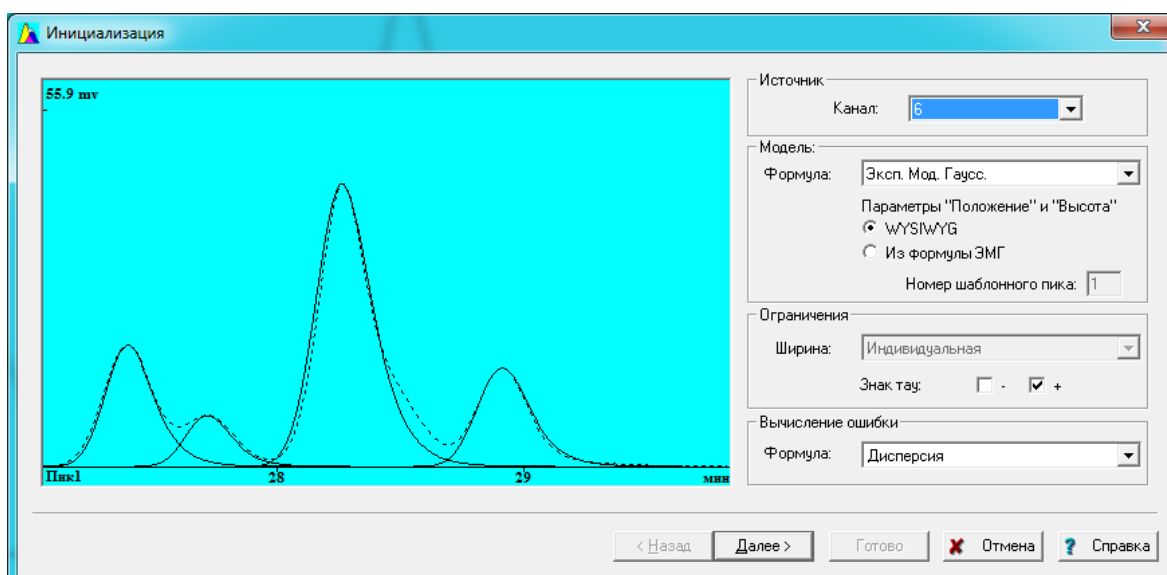
Разделение смежных хроматографических пиков

Для разделения группы смежных пиков предусмотрена процедура, позволяющая разложить группу на отдельные пики, аппроксимировав их функцией Гаусса, экспоненциально-модифицированной функцией Гаусса или произвольной функцией, задаваемой формой выбранного эталонного пика. Для краткости эта процедура именуется *разложением пиков по форме*.

Для выполнения гаусс-разложения выполните следующее.

- Откройте хроматограмму и выделите с помощью мыши группу смежных пиков, которые требуется разделить. В результате в окне будет представлена только выбранная область. Участок хроматограммы следует выделять таким образом, чтобы на нем полностью помещались выбранные пики, но не попадали вершины других пиков.
- Выберите команду **Обработка/Дополнительно/Разложение пиков по форме**.
 - ♦ Если группа пиков полностью помещается в окне, сразу откроется окно **Инициализация**.
 - ♦ Если начальная и/или конечная точки выбранной группы пиков выходят за пределы окна, появится сообщение: «Пик №... выходит за пределы окна. Увеличить окно? Да/Нет». Нажмите кнопку **Да** – в противном случае пик, не поместившийся в окне, будет исключен из анализа. После этого откроется окно **Инициализация**.

Инициализация



- Если обрабатывается многоканальная хроматограмма, выберите канал, для которого будет проводиться аппроксимация, в списочном поле **Источник/Канал**.
- В списочном поле **Модель/Формула** выберите модель, по которой будет производиться аппроксимация: *Гауссиана*, *Эксп.Мод.Гаусс*, *По образцу* и задайте соответствующие выбранной модели параметры процедуры (см. далее).

Подбор параметров аппроксимирующих функций производится путем минимизации величины ошибки. Способ вычисления ошибки выбирается в списочном поле **Вычисление ошибки/Формула**: *Дисперсия* или *Высота*Дисперсия*. В первом случае программа будет минимизировать величину

$$\sqrt{\sum (y_i - y_{ai})^2}$$

где y_i и y_{ai} – y -координаты точки хроматографического пика и аппроксимирующей кривой соответственно. Во втором – величину

$$\sqrt{\sum y_i (y_i - y_{ai})^2}$$

то есть, во втором случае каждая точка берется с весом, пропорциональным ее y -координате.

Аппроксимация функцией Гаусса

Этот вариант используется для аппроксимации симметричных пиков функцией Гаусса:

$$G(t) = h \cdot e^{-\frac{(T-t)^2}{2\sigma^2}}$$

где h – высота пика, T – позиция (положение максимума), σ – половина ширины по уровню 0.607.

Единственным выбираемым параметром является способ варьирования ширины пиков: она может подбираться индивидуально для каждого пика, иметь одно и то же оптимизированное значение для всех пиков или же оптимизироваться при условии одинаковой эффективности для всех пиков.

- ♦ В списочном поле **Ограничения/Ширина** выберите значение *Индивидуальная*, *Одинаковая* или *По эффективности*.

Аппроксимация экспоненциально-модифицированной функцией Гаусса

Этот вариант используется для аппроксимации асимметричных пиков экспоненциально-модифицированной функцией Гаусса (ЭМГ). В ПО *МультиХром* используются 2 варианта формулы для ЭМГ (см. **Аппроксимация асимметричных пиков: экспоненциально-модифицированная функция Гаусса**

):

$$F(t) = \frac{h \cdot \sigma}{\tau} \sqrt{\frac{\pi}{2}} \cdot e^{\left(\frac{\sigma^2}{2\tau^2} \frac{t-\mu}{\tau}\right)} \cdot \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{\mu-t}{\sigma} + \frac{\sigma}{\tau}\right)\right)\right) \quad \text{«классическая» формула}$$

или в виде произведения «гауссовой» и «экспоненциальной» функций $F(t) = G(t) \cdot E(t)$

где $G(t)$ – функция Гаусса, $E(t)$ – функция, осуществляющая экспоненциальную модификацию:

$$E(t) = \frac{\sigma}{\tau} \sqrt{\frac{\pi}{2}} \cdot \operatorname{erfcx}\left(\frac{1}{\sqrt{2}} \left(\frac{T-t}{\sigma} + \frac{\sigma}{\tau}\right)\right)$$

τ – параметр, характеризующий степень асимметрии пика. Остальные параметры те же, что и для функции Гаусса, но не имеют того же наглядного смысла.


В отчете для пиков могут быть представлены параметры h и T , соответствующие высоте и положению пика на графике, либо формальные параметры из формулы ЭМГ. Выбор производится переключателями **Параметры «Положение»** и **«Высота»: WYSIWYG** или **Из формулы ЭМГ**.

В области **Ограничения** для параметра **Ширина** зафиксировано значение *Индивидуальная*, соответственно ширина каждого пика подбирается только индивидуально

Возможность выбора параметра **Знак тау** позволяет ограничиться только положительными (по умолчанию) или только отрицательными значениями, а также разрешить использовать оба знака. В последнем случае число вариантов, которые программа анализирует при выборе оптимума, резко возрастает, поэтому его рекомендуется использовать только тогда, когда известно, что отдельные пики могут иметь явно выраженную асимметрию другого знака

Аппроксимация функцией, подобной образцовому пику

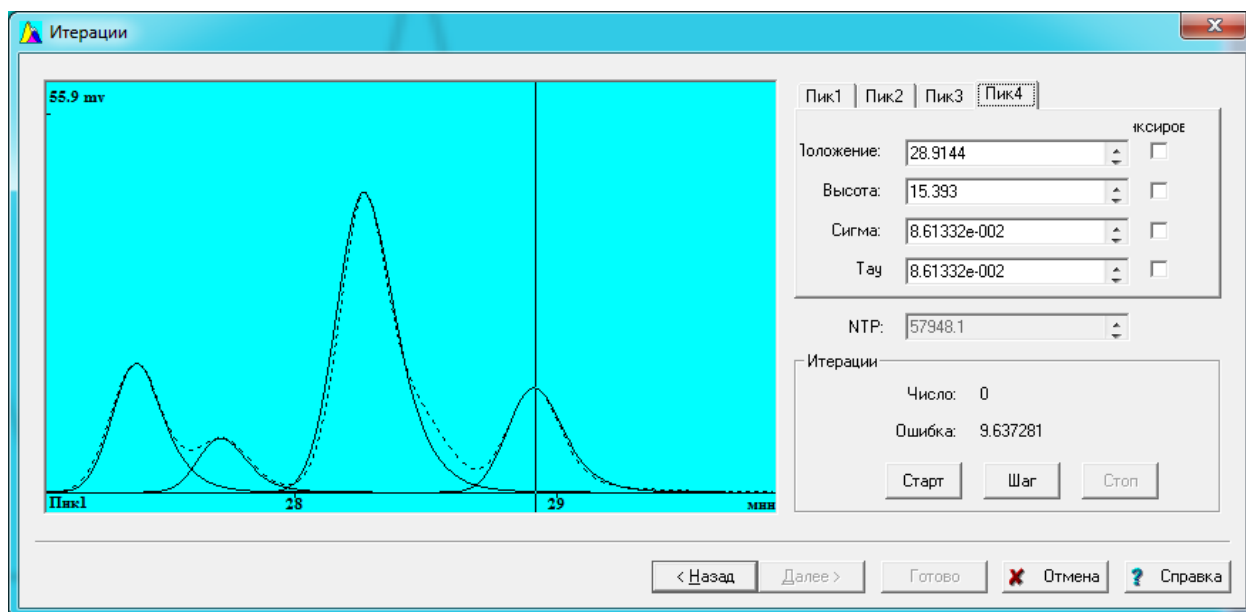
Этот вариант используется в тех случаях, когда различные пики имеют похожую форму, но недостаточно хорошо аппроксимируются функцией Гаусса или ЭМГ.

 В качестве образца следует выбирать отдельно стоящий пик с низким уровнем шума (большим отношением сигнал/шум). Как правило, такие пики не попадают в окно вместе с разделяемыми пиками, поэтому пик-образец следует выбрать заранее и зафиксировать его номер.

- ♦ Введите в поле **Модель/Номер пика-образца** номер выбранного пика, под которым он представлен на хроматограмме.
- ♦ В списочном поле **Ограничения/Ширина** выберите значение *Индивидуальная*, *Одинаковая* или *По эффективности*.

- После выбора модели и соответствующих ей параметров перейдите к следующему шагу, нажав кнопку **Далее** (**Next**), при этом произойдет переход в окно **Итерации**.

Итерации



- Для запуска автоматического процесса подбора аппроксимирующей функции методом последовательных итераций нажмите кнопку **Итерации/Старт**.

После выполнения очередной итерации значение в поле **Итерации/Число** увеличивается на единицу, а в поле **Итерации/Ошибка** выводится достигнутое на этом шаге значение ошибки (в %), вычисляемое по формуле, выбранной в окне **Инициализация**. Одновременно на листах **Пик1**, **Пик2** и т. д. обновляются значения *параметров* (см. раздел **Параметры, изменяемые при итерациях**) для соответствующих пиков. Процедура останавливается, когда при очередном шаге величина ошибки остается неизменной.

Пользователю также предоставляется возможность управления процедурой аппроксимации вручную:

- остановка процедуры (кнопка **Итерации/Стоп**);
- пошаговое управление процедурой (кнопка **Итерации/Шаг**);
- блокировка изменения отдельных параметров в ходе процедуры (установка флажка **Блок**)¹;
- ручная установка для любого параметра для оценки его влияния на величину ошибки (вводом с клавиатуры или прокруткой).

Параметры, изменяемые при итерациях

Набор параметров, варьируемых программой при итерациях, так и доступных для изменения пользователем вручную, зависит от выбранной модели и заданных ограничений.

Положение	Положение максимума пика на графике (или параметр T в формулах $G(t)$ и $E(t)$ при установке Из формулы ЭМГ).	Изменяется для всех пиков независимо
Высота	Высота пика на графике (или параметр h в формулах $G(t)$ и $E(t)$ при установке Из формулы ЭМГ).	Изменяется для всех пиков независимо
Сигма	Параметр σ в формулах $G(t)$ и $E(t)$, равный для	Зависит от установки параметра Ограничения/Ширина :

¹ Блокировка параметров производится отдельно для каждого пика. Кроме того, при выборе режима варьирования ширины пика *По эффективности* возможна блокировка числа теоретических тарелок (**NTP**).

модели *Гауссиана* половине ширины пика по уровню 0.607

Для модели *По образцу* – расчетная величина, характеризующая ширину пика (для пиков Гауссовой формы совпадает с σ).

Tau Параметр τ в формуле $E(t)$, используемый только для модели *Эксп. Мод.Гаусс*

NTP Число теоретических тарелок

Одинаковая – изменяется для всех пиков одинаково.

Индивидуальная – изменяется для всех пиков независимо.

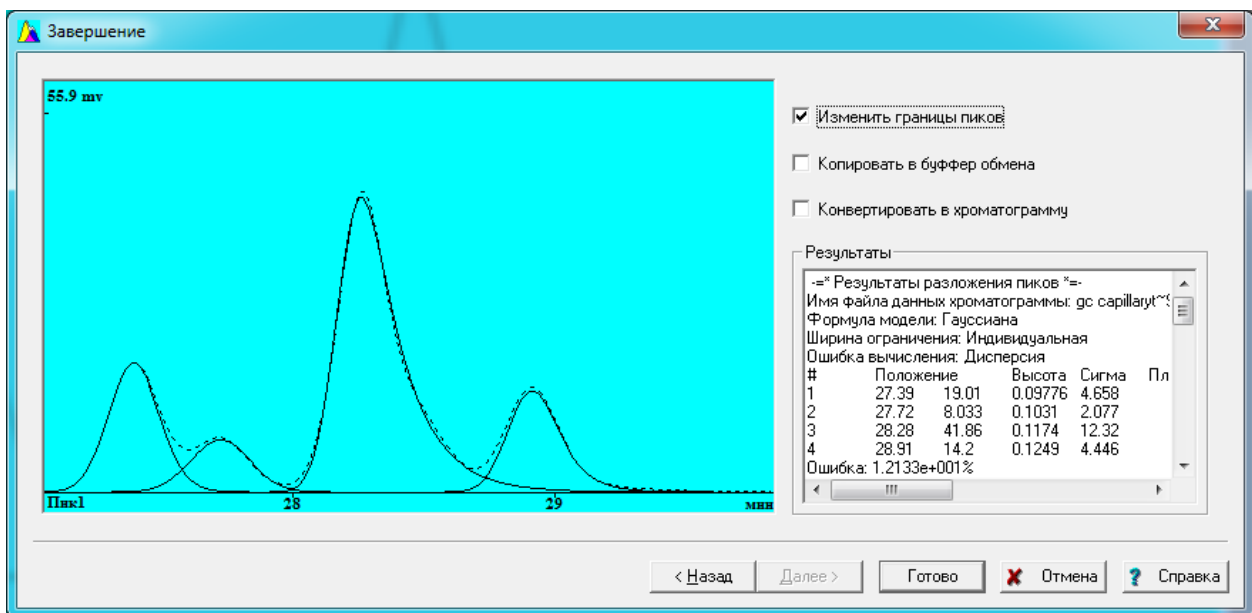
По эффективности – является вычисляемым параметром.

Изменяется для всех пиков независимо

Является вычисляемым параметром. При установке параметра **Ограничения/Ширина: По эффективности** изменение этой величины может быть заблокировано.

- По завершении процедуры аппроксимации перейдите к следующему шагу, нажав кнопку **Далее (Next)**, при этом произойдет переход в окно **Завершение**.

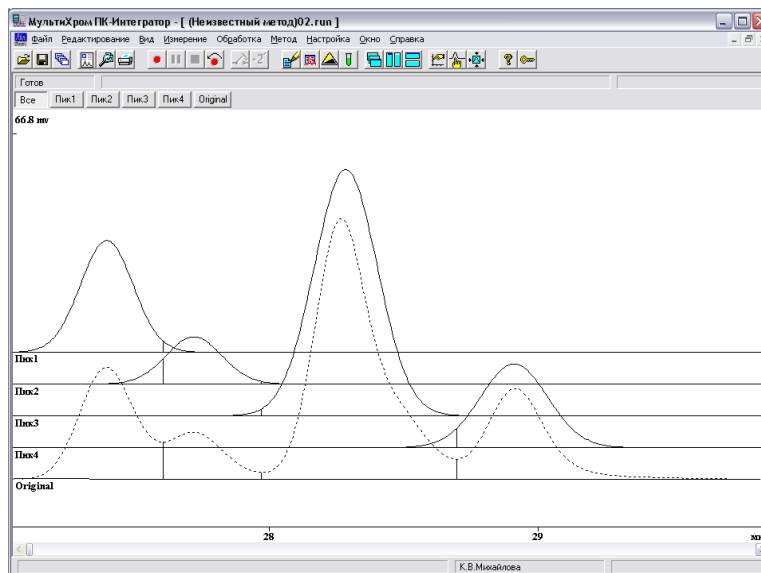
Завершение



На листе **Завершение** пользователю предоставляется возможность выбрать, каким образом использовать результаты гаусс-разложения. По умолчанию предлагается в исходной хроматограмме изменить границы пиков таким образом, чтобы отношение их площадей на хроматограмме с исправленными границами пиков было таким же, как отношение площадей аппроксимирующих пиков.


- Для того чтобы отказаться от внесения изменений в исходную хроматограмму, снимите флажок **Изменить границы пиков**.
- Для того чтобы скопировать график из окна **Окончание** в буфер, установите флажок **Копировать в буфер обмена**.
- Для того чтобы преобразовать полученный результат разложения участка хроматограммы на отдельные пики в многоканальную хроматограмму, установите флажок **Преобразовать в хроматограмму**. Полученная многоканальная хроматограмма гаусс-разложения откроется в новом окне².

² Предварительно многоканальную хроматограмму можно просмотреть в окне **Завершение**, дважды щелкнув мышью по графику.



- Завершите процедуру гаусс-разложения, нажав кнопку **Готово (Finish)**.

Результаты гаусс-разложения

 Результаты гаусс-разложения записываются в хроматограмме с преобразованными границами и/или в полученной многоканальной хроматограмме в окне **Настройки метода/Комментарий**. Эти данные могут быть включены в *простой отчет* к этим хроматограммам при выборе соответствующего раздела в окне **Опции отчета**.

Отчет представляется в виде таблицы пиков.

=* Результаты разложения пиков *=-

Имя файла данных хроматограммы: 1.rpl

Формула модели: Эксп. Мод. Гаусс.

Ширина ограничения: Индивидуальная

Знак тау: +

Ошибка вычисления: Дисперсия

#	ПоложениеG	ВысотаG	Сигма	Тау	Отн.Тау	Площадь	Удерживание	Высота	Высота/MaxУровень%
1	0.38	18.95	0.09486	0.009934	0.1047	4.506	0.3932	18.85	3.516
2	0.72	7.71	0.1165	0	0	2.25	0.7204	7.707	1.48
3	1.19	70.79	0.07409	0.1394	1.882	13.15	1.264	43.42	8.218
4	1.86	19.05	0.07923	0.08079	1.02	3.784	1.917	14.85	2.856

Ошибка: 2.8883e+000%

В первых 5 столбцах приведены параметры ЭМГ: T , h , σ , τ , а также отношение τ/σ . В следующих 3 столбцах представлены традиционные хроматографические параметры пика: *Площадь*, *Удерживание*, *Высота*. В последнем столбце приведено отношение высоты пика к верхней границе области линейности сигнала – эта величины превышает 100% в случае восстановления формы пика за пределами области линейности.

Читать теорию:

[Аппроксимация асимметричных пиков: экспоненциально-модифицированная функция Гаусса](#)