

Peak-ABC

層析積分處理及數據擷取系統

中文使用手冊

宏濬儀器有限公司

GREAT TIDE INSTRUMENT CO., LTD.

地址:台北市民權西路 20 號 10 樓之 12

電話:(02)25372120

傳真:(02)25371870

E-mail:hplc@hplc.com.tw

Website:www.hplc.com.tw

目錄索引

一、基本設定-----	Page 2
二、啟動數據擷取-----	Page 5
三、積分處理-----	Page 8
四、報表列印-----	Page 11
五、圖譜比對-----	Page 12
六、結果比對-----	Page 14
七、標準品校正曲線做法-----	Page 16
八、凝膠滲透層析(GPC)處理程序-----	Page 18
九、附錄(Peak-ABC 計算公式)-----	Page 21

Peak-ABC 層析積分處理及數據擷取系統中文使用方法

一、基本設定：

1. 開機程序:打開電腦電源，待畫面進入 windows 系統後，再開啟訊號截取介面盒電源。此時介面盒上之紅燈會閃爍，待紅燈穩定不再閃爍後即可開啟軟體。

2. 按桌面之  圖示進入系統，即可看到以下畫面(圖 1)

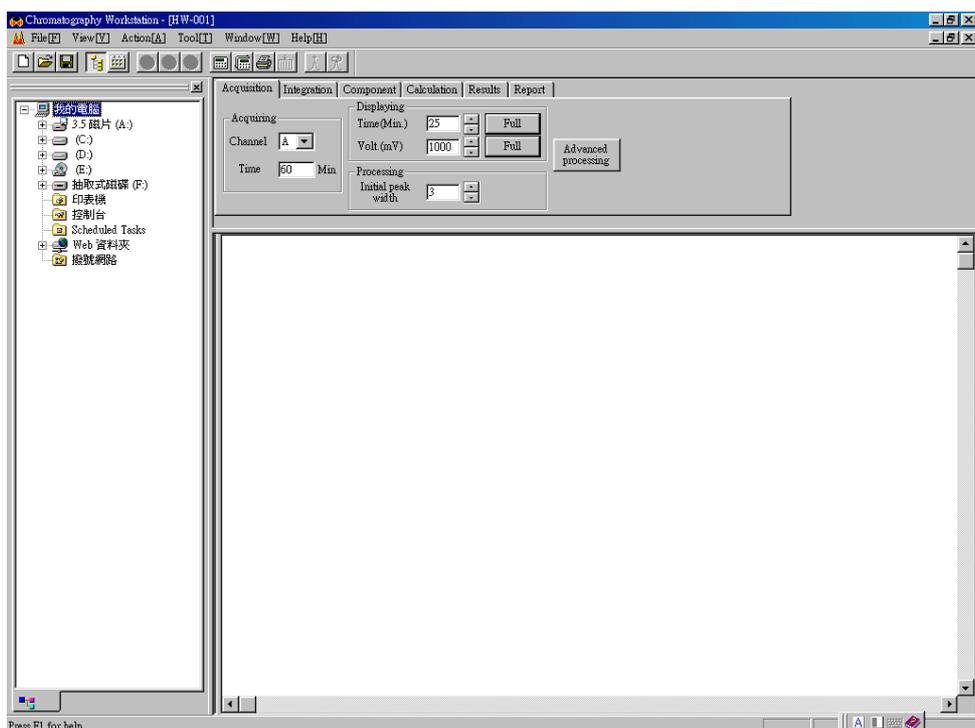


圖 1

3. 按工具列之 View 會彈出選項，並選擇 Option，即可看到以下畫面(圖 2)

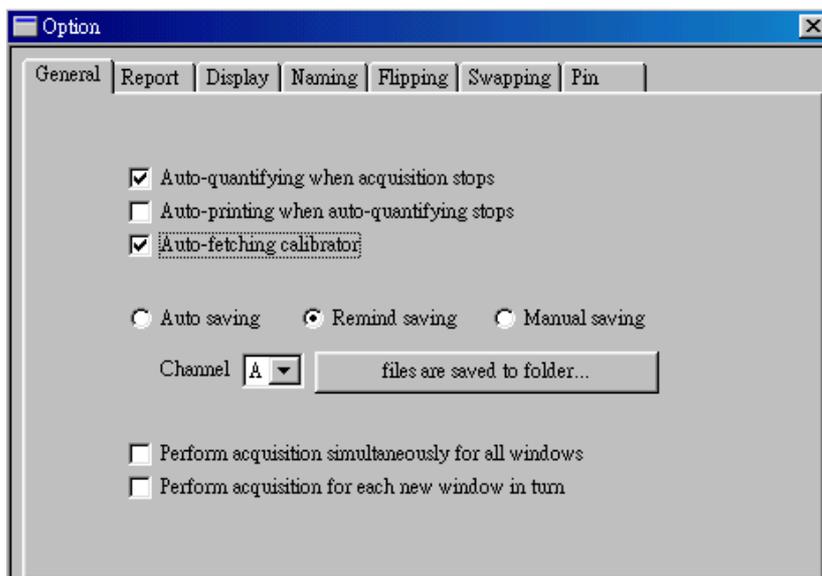


圖 2

4. 依序設定系統各狀態

(1) General-----Auto-quantifying when acquisition stops(數據擷取結束後, 自動積分計算)

-----Auto-printing when auto-quantifying stops(自動積分計算後, 自動跳至列印功能)

-----Auto-fetching calibrator(自動取得校正因子)

-----Auto saving(自動存檔)

-----Remind saving(提醒存檔, 會跳出存檔路徑之畫面)

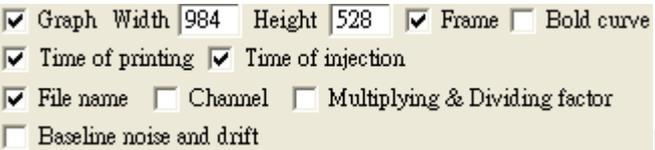
-----Manual saving(手動存檔, 數據擷取結束後不會存檔, 必須於目前顯示畫面自行手動存檔, 否則此層析圖將會因下次執行數據擷取時而消失)

-----  (選擇 A 及 B 通道於數據擷取結束後所要存檔之路徑)

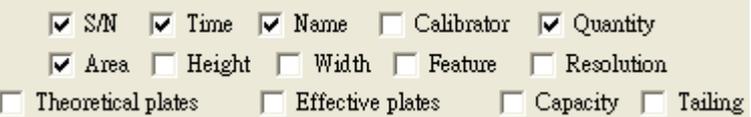
-----Perform acquisition simultaneously for all windows(如開啟兩個畫面並分別設定 A 及 B 通道, 選取此功能則執行數據擷取時, 所有畫面將全部同時被啟動)

-----Perform acquisition for each new window in turn(如一次開啟多個畫面, 選取此功能則執行第一個畫面數據擷取後, 再啟動數據擷取將自動跳至下一個畫面)

(2) Report-----  (可輸入字串於列印報表時加入起始標題)

-----  [可選取報表列印之內容, 包含

Graph(報表加入層析圖), Width(層析圖寬度), Height(層析圖高度), Frame(層析圖加外框), Bold curve(層析圖畫面使用粗線條), Time of printing(報表加入列印時間), Time of injection(報表加入注射時間), File name(報表加入檔案名稱), Channel(報表加入通道名稱), Multiplying & Dividing factor(報表加入乘積因子及除積因子), Baseline noise and drift(報表加入雜訊及漂移程度之數值)]

-----  [可選取結果報表列印

之內容, 包含 S/N(波峰序號), Time(滯留時間), Name(波峰名稱), Calibrator(校正因子), Quantity(含量), Area(面積), Height(高度), Width(半波峰寬度), Feature(波峰積分之標記形態), Resolution(解析度), Theoretical plates(理論板數), Effective plates(效能板數), Capacity(容量因子), Tailing(拖尾因子)]

-----Insert page break between reports during batch printing(使用整批報表列印功能時, 自動分頁每張層析圖)

----- Printing through Word Printing through WordPad (可選擇報表列印由 Word 或 WordPad 來編輯)

(3) Display----- Black White (可選擇層析圖畫面之背景顏色為黑或白色)

----- None All Only those selected in component table [可選擇於波峰上端顯示滯留時間, None(不顯示), All(所有有積分之波峰皆顯示), Only those selected in component table(只顯示於成分表中有編輯之波峰)]

----- None All Only those selected in component table [可選擇於波峰上端顯示波峰序號, None(不顯示), All(所有有積分之波峰皆顯示), Only those selected in component table(只顯示於成分表中有編輯之波峰)]

-----Displaying baseline and splitting line(層析圖積分後, 顯示基線及波峰分離線於層析圖上)

-----Displaying name and RetTime of components as per component table(層析圖積分後, 顯示成分表中有編輯之波峰名稱於層析圖上)

-----Displaying method of integration as per integration table(層析圖積分後, 顯示積分表中之積分方法於層析圖上)

-----Displaying axes(層析圖顯示時間 min 及訊號值 mV 軸線)

-----Displaying the curve in another channel during acquisition(訊號擷取時, 顯示另外一個通道之擷取狀態於同一畫面上)

----- For ch voltage, and convert to unit by 1mV = (訊號擷取時, 可按 set to zero 將 A 或 B 通道之基線歸零, 及轉換 Y 軸單位數值)

----- Decimal place for component quantity (可輸入成分濃度欲顯示之小數點以下位數)

----- Peak resolution: horizontal vertical(可選擇波峰解析度運算基礎依據水平或垂直方式)

(4) Naming----- Prefix (可輸入層析圖欲儲存之檔案名稱字首)

----- Insert window creating date (在檔案名稱中, 插入視窗開啟時間)

----- Insert window creating time (在檔案名稱中, 插入視窗開啟時間)

----- Insert S/N starting from (檔案名稱之設定, 可插入批號並可指定從哪個

批號開始編排)

----- Suffix (可輸入層析圖欲儲存之檔案名稱字尾)

----- Insert S/N of file generated from the same window (層析圖有相同檔名時, 可自動編排序號)

----- file saving date (檔案名稱之設定, 可插入儲存日期)

----- file saving time (檔案名稱之設定, 可插入儲存時間)

完成本頁設定後, 需再開啟新的檔案後才會套用新的檔名

(5) Flipping-----訊號擷取前, 可於 A 及 B 通道中設定時間區間。在區間內, 如擷取之數據為負波峰則軟體會將其強迫轉為正波峰, 或如為正波峰則強迫轉為負波峰

(6) Swapping-----訊號截取前, 可於各組時間區間, 設定 A 及 B 通道之數據擷取相互交換
----- Join at rear without covering original (軟體不覆蓋原通道之數據, 而是直接將在設定之時間區間內另一通道所擷取之數據加在層析圖最後面。)

(7) Pin-----設定軟體管理階層之密碼

5. 以上設定完成, 按圖 2 之  跳出

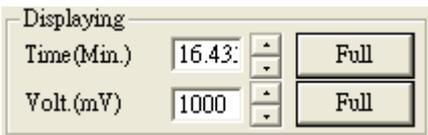
本處設定完成後, 除非另有更動否則於下次開啟軟體不需要再設定。

二、啟動數據擷取：

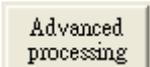
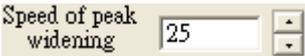
1. 如圖 1 畫面, 於 Acquisition 之頁面中設定各項參數

(1) Channel (選擇此畫面欲接收 A 或 B 通道之訊號)

(2) Time Min (設定分析停止時間, 訊號擷取過程中可任意延長時間)

(3)  (設定顯示之時間及訊號範圍, 可輸入數值或按 Full 鍵來顯示全幅)

(4)  (設定半波峰最小寬度, 半波峰寬度必須大於設定之數值才會積分)

- (5)  (可按此鍵來設定進階功能)
- (6)  (設定波峰之最小面積, 波峰面積必須大於設定之數值才會積分)
- (7)  (除非需要對較小之波峰做積分, 不建議在處理層析圖時使用此功能, 否則會造成層析圖積分混亂)
- (8)  (此功能不建議在處理層析圖使用, 否則會造成層析圖積分混亂)

2. 如圖 1 畫面之 Integration 頁面, 暫不理會, 將於後面之積分處理單元再介紹
3. 如圖 1 畫面之 Component 頁面, 暫不理會, 將於後面之定量程序單元再介紹
4. 如圖 1 畫面之 Calculation 頁面, 將第一欄位選在 Normalization 處, 其餘暫不理會, 將於後面之定量程序單元再介紹
5. 如圖 1 畫面之 Results 頁面, 暫不理會, 將於後面之積分處理單元再介紹
6. 如圖 1 畫面之 Report 頁面中之 Front section 及 Rear section 輸入文字, 可於報表列印時一併印出, 一般可輸入分析條件或註解等
7. 以上設定完成, 按工具列之 File 會彈出選項, 並選擇 Save template 將以上六項頁面儲存為一個樣版檔案, 往後欲使用相同條件只需按 Load template 取出樣版檔案即可
8. 完成以上準備, 按簡圖列之  鍵或由儀器來啟動訊號接收, 此時會看到簡圖列出現  鍵, 如要中途強迫停止訊號接收, 只要按此  鍵即可
9. 如要開啟 B 通道之數據擷取, 只要按簡圖列之  開啟新檔, 並按照以上步驟操作即可
10. 如同時開啟 A 及 B 通道兩個畫面或更多畫面, 可利用工具列之 Window 彈出選項, 並選擇 Cascade, Tile horizontally, 或 Tile vertically 來觀看畫面(圖 3, 圖 4, 圖 5)

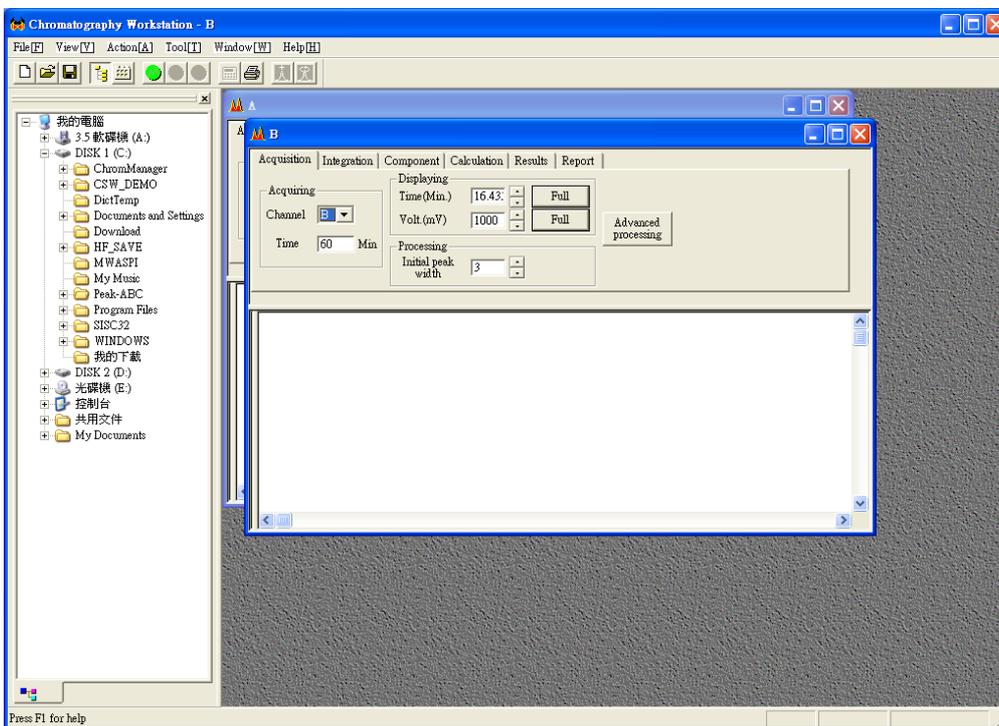


圖 3

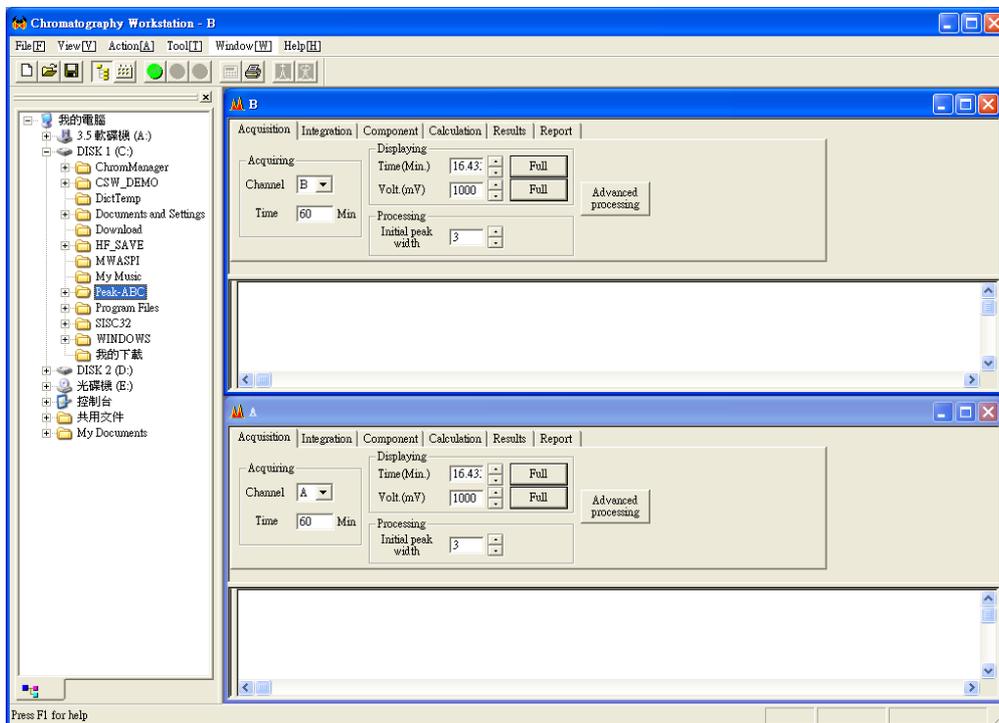


圖 4

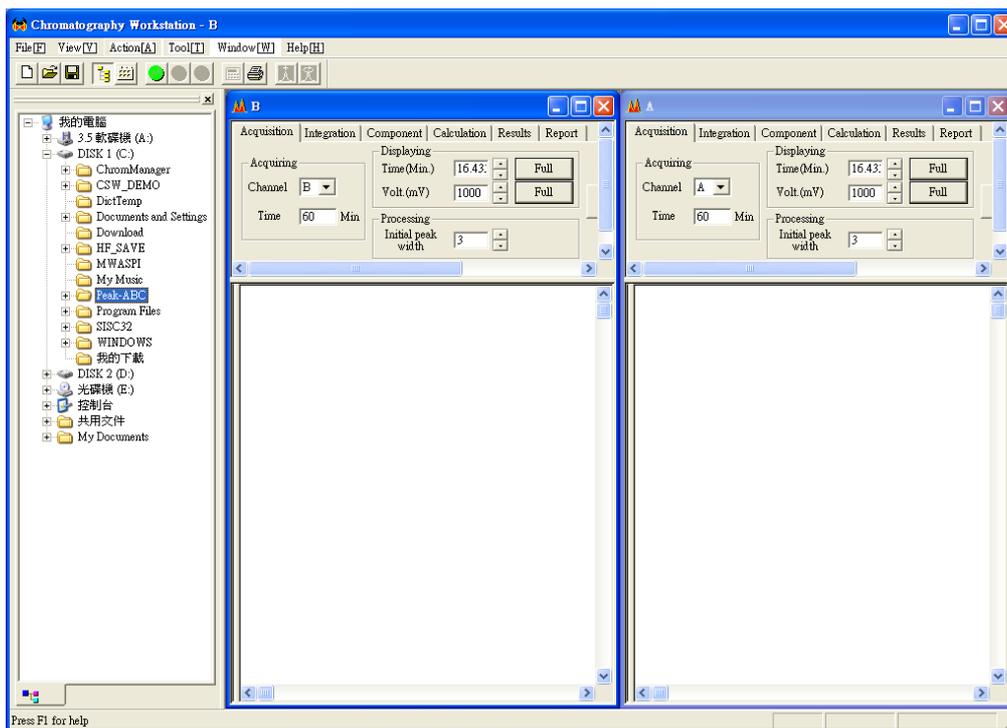


圖 5

三、積分處理：

1. 待數據擷取結束後，可直接處理目前畫面上之層析圖，或點選圖 6 左邊檔案總管內之檔案來開啟層析圖做積分處理

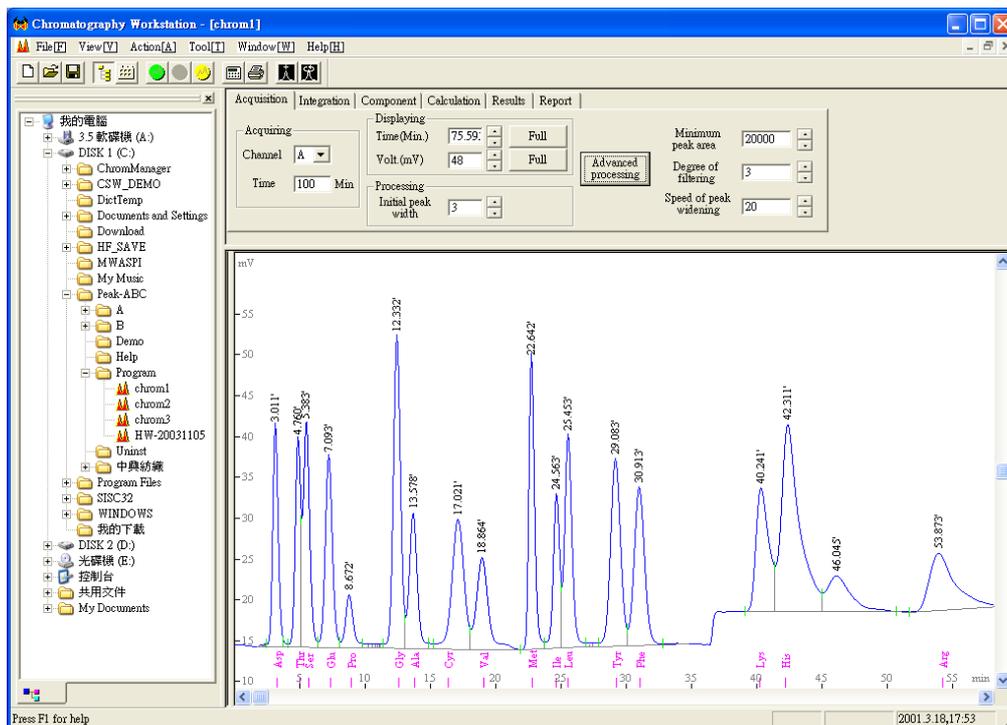


圖 6

- 如於 Acquisition 之頁面中修改各項參數(Initial peak width 和 Minimum peak area), 需再按一次  鍵, 重新套用新的積分條件, 注意如做一般之積分處理而非定量程序處理, 必須於 Calculation 頁面中, 將第一欄位選在 Nomalization 處, 且於 Component 頁面中應為空白
- 再積分處理結束後並不會立即更新結果報表, 必須按簡圖列之  鍵來套入結果報表(圖 7)

Acquisition Integration Component Calculation Results Report								
	RetTime	Name	Calib	Quantity	Area	Height	Width	Feature
1	3.011			4.2403	818434	27755	27.692	L
2	4.760			3.9612	764550	25862	27.763	V
3	5.383			4.7092	908926	27882	30.614	V
4	7.093			4.5416	876590	23444	35.114	V
5	8.672			1.1675	225349	6117	34.597	RV
6	12.333			7.4103	1430265	38012	35.336	V
7	13.578			3.3647	649424	16151	37.761	RV

To archive
Clear arch.
Averaging
Merge

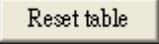
圖 7

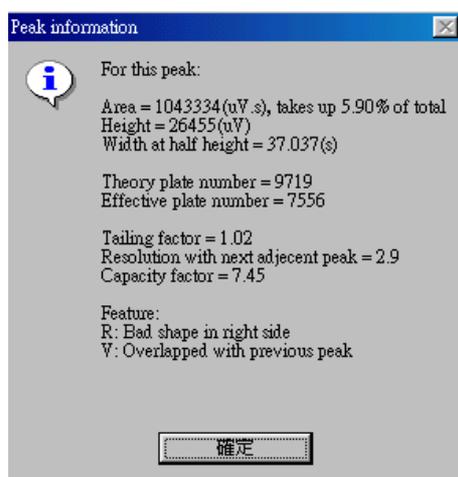
- 如欲使用手動積分方式, 可利用簡圖列之  鍵(增加一波峰, 可以滑鼠之左鍵直接拉積分線), 或  鍵(消除一波峰, 可以滑鼠之左鍵於已積分之波峰上直接點掉), 另用滑鼠左鍵以拖曳方式可放大層析圖, 此時可明顯看到每支波峰都有起始及結束點, 可以滑鼠左鍵於點上直接選定位置, 原則為使積分起始及結束點接近基線位置, 於層析圖上再點兩下滑鼠左鍵, 可回到原始層析圖大小
- 使用手動積分後, 必須再按簡圖列之  鍵來更新結果報表
- 如欲使用功能積分方式, 可於層析圖之某時間點上按滑鼠之右鍵彈出功能, 並選擇 Input integration table 內之 Start to ignore peaks(開始消除波峰), Start to merge peaks(開始合併波峰), Start to treat peaks split(開始分裂波峰), Start to treat peaks overlap(開始重疊波峰), Reset to default integrating(重回系統內設初始積分條件), 或 Treat this as tailing peak(將此波峰當作前波峰拖尾上之波峰)功能處理, 此時於 Integration 頁面中, 可看到所使用功能積分的時間和方法(圖 8)

Acquisition Integration Component Calculation Results Report		
	Time to start	Method of integration
1	9.631	Ignore peaks
2	15.470	Default integrating
3	20.627	Treat peaks split
4	42.770	Treat as tailing peak
5		
6		
7		

Reset table

圖 8

7. 使用功能積分後，必須再按簡圖列之  鍵來更新結果報表
8. 如欲重新利用自動積分或手動積分方式，可按 Integration 頁面中之  鍵來刪除處理記錄
9. 以上介紹之自動積分，手動積分及功能積分皆可同時交叉使用
10. 欲翻轉波峰使其於某段時間內之波峰如為負波峰強迫轉變為正波峰，或如為正波峰強迫轉變為負波峰，可於層析圖中欲翻轉之起始時間點上按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Start point to flip 及欲結束翻轉之時間點上選擇 End point to flip 功能即可
11. 欲使樣品層析圖扣除空白層析圖，可先取出一空白層析圖，並於層析圖上按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Set as chromatogram of blank sample，再取出樣品層析圖，並於層析圖上按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Subtract as chromatogram of blank sample 即可得到另一已扣除空白之新的層析圖
12. 欲觀看單一波峰之各項資料，可於波峰上按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Magnitude of baseline drift & Noise(基線漂移及雜訊程度)，或 Peak information(波峰資訊) (圖 9)



(圖 9)

13. 欲將層析圖之數據擷取點轉入，可按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Get raw chromatogram data from file 功能
14. 欲將層析圖之數據擷取點轉出，可按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Export raw chromatogram data to file 功能
15. 欲將層析圖貼到其他應用程式，可按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Copy chromatogram to clipboard，再開啟其他應用程式並選擇貼上

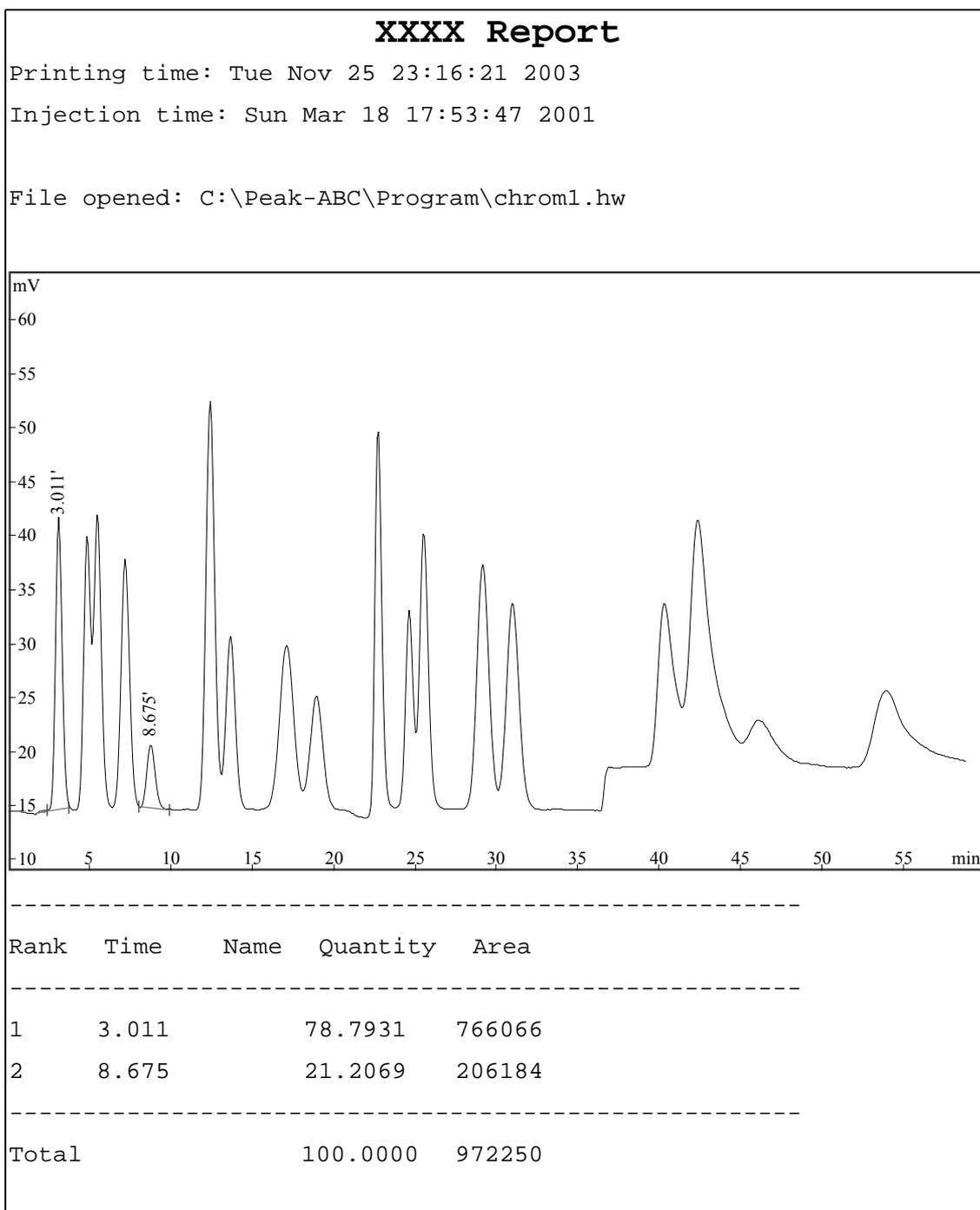
16. 欲將 Results 中之資料貼到其他應用程式, 可使之反白再按滑鼠之右鍵彈出功能, 並選擇 Copy, 再開啟其他應用程式並選擇貼上

17. 積分處理完成, 可按簡圖列之  鍵來儲存檔案

四、報表列印：

1. 開啟一張層析圖, 並按簡圖列之  鍵, 可跳至 Word 或 WordPad 程式, 並自動加入報表, 可自行於報表中修改或編輯(表 1)

表 1



2. 可一次開啟多張層析圖，按工具列之 Action 會彈出選項，並選擇 Batch printing 來執行整批報表列印

五、圖譜比對：

1. 按工具列之 Tool 會彈出選項，並選擇 Chromatograms compiler, 即可看到以下畫面(圖 10)

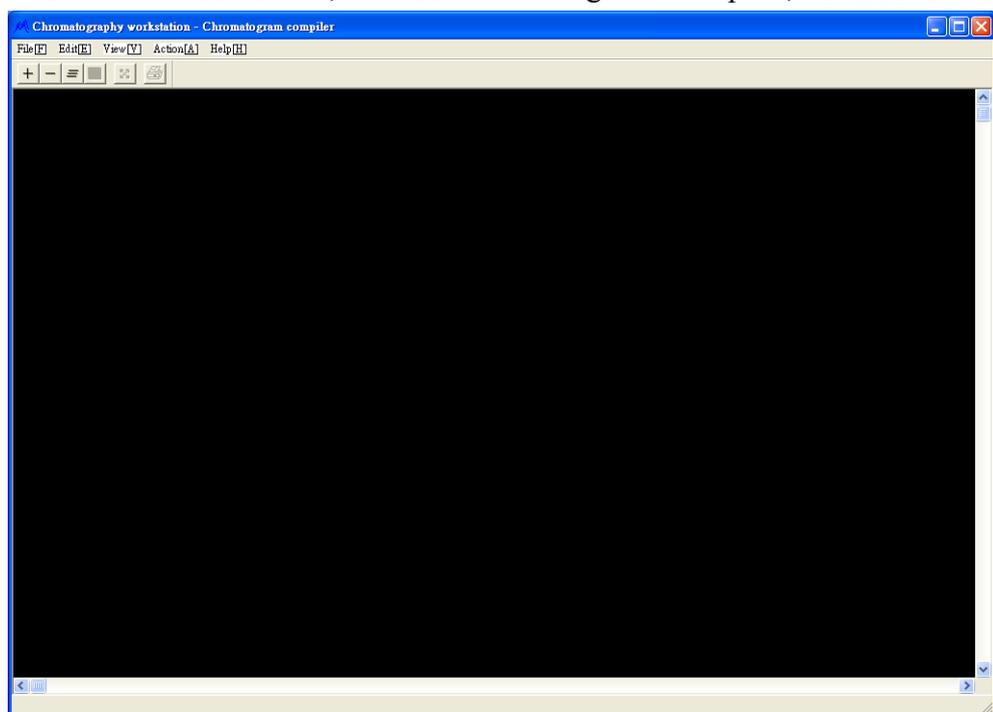


圖 10

2. 按簡圖列之  鍵，會彈出檔案取得畫面，選取一檔案或以鍵盤之 Ctrl 搭配滑鼠左鍵來一次選取多個檔案，選取後即可看到下頁畫面(圖 11)
3. 可按簡圖列之  鍵，來彈出設定觀看選項(圖 12)，並設定 Width(觀看之總寬度), Height(觀看之總高度), Sideway(層析圖側移), 及 Upway(層析圖上移), Display time at peak top(顯示時間於波峰上端), Display name at peak top(顯示名稱於波峰上端)
4. 可按簡圖列之  鍵，來清除畫面
5. 可按簡圖列之  鍵，來列印此畫面

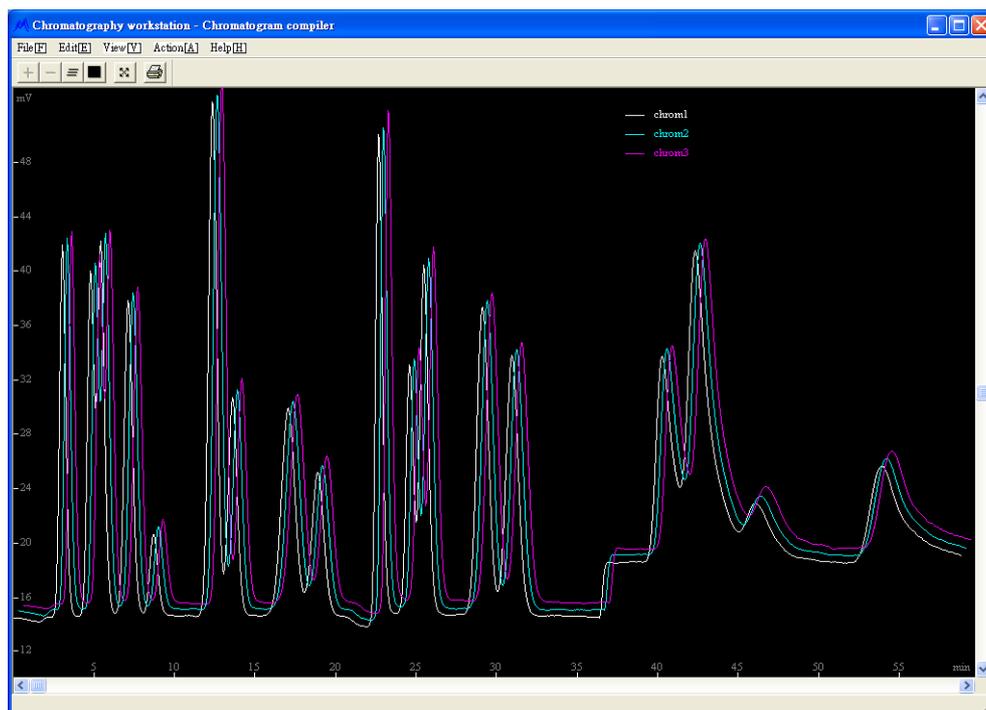


圖 11

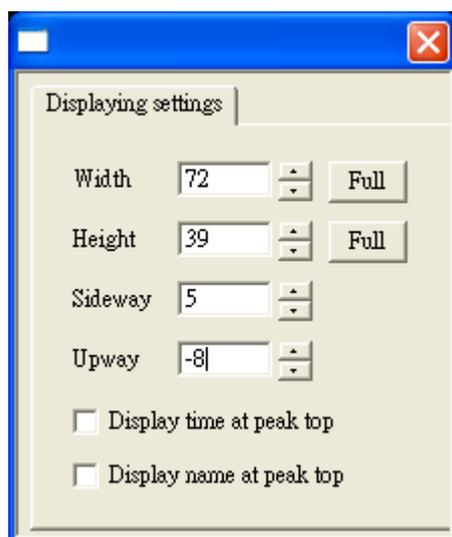


圖 12

6. 可按簡圖列之 **+** 鍵，來進行所選擇之圖譜前後相加

7. 可按簡圖列之 **-** 鍵，來進行所選擇之圖譜前後相減

8. 以上處理完成，按 **✖** 跳出

* 本疊圖功能之檔案無法儲存，但可以按 Edit 中之 Copy 將畫面貼到 word 中。在 word 中，

於圖上按滑鼠右鍵，選擇編輯圖片，則可以使用繪圖功能對線條顏色粗細等加以修飾。

六、結果比對：

1. 按工具列之 Tool 會彈出選項，並選擇 Results tables compiler, 即可看到以下畫面(圖 13)

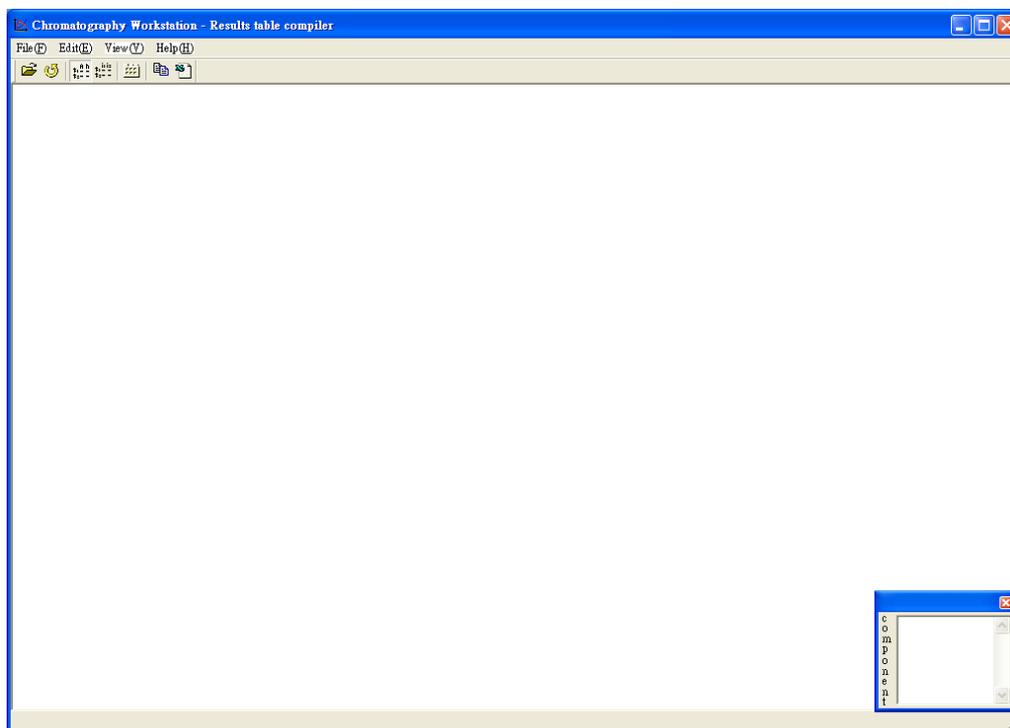


圖 13

2. 按圖 13 工具列之 View 會彈出選項，並選擇 Options, 即可看到以下畫面(圖 14), 並選取欲比對之內容, Rank(序號), File name(檔案名稱), Sample name(樣品名稱), Injection time(注射時間), Dilution factor(稀釋因子), Sample weight(樣品重), Average(平均數), Standard deviation(標準偏差), Relative standard deviation(相對標準偏差), Max(最大值), Min(最小值), Max-Min(最大減掉最小值差), Retention time(滯留時間), Quantity(含量), Calibrator(校正因子), Peak area(波峰面積), Peak height(波峰高度), Peak width(波峰寬度)等, 結束選擇後, 按

 跳出

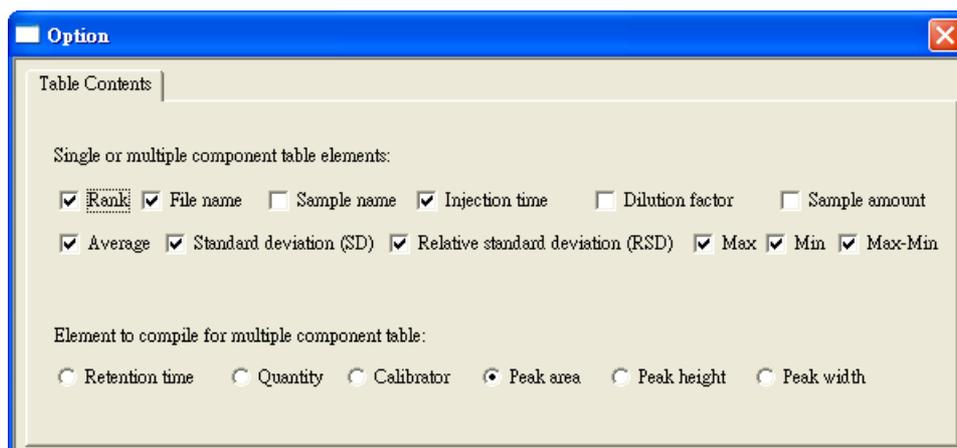


圖 14

- 按圖 13 簡圖列之  鍵，會彈出檔案取得畫面，選取一檔案或以鍵盤之 Ctrl 搭配滑鼠左鍵來一次選取多個檔案，選取後即可看到以下畫面(圖 15)

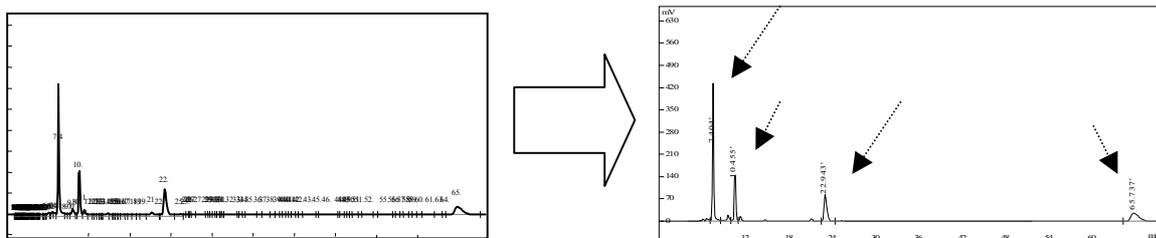
Rank	File	Inj Time	RetTime	Qty	Calib	Area	Height	Width
1	chrom1	2001.03.18,17:53:47	3.011	33.28	4.14406e-005	803077	27816	27.113
2	chrom2	2001.03.18,17:53:47	3.011	33.28	4.1631e-005	799404	27772	27.032
3	chrom3	2001.03.18,18:54:46	2.986	33.28	4.09273e-005	813149	27837	27.432
Average			3.002	33.28	4.1333e-005	805210	27808	
SD			0.014	0	3.64e-007	7116	33	
RSD%			0.48	0.00	0.88	0.88	0.12	
Max			3.011	33.28	4.1631e-005	813149	27837	
Min			2.986	33.28	4.09273e-005	799404	27772	
Max-Min			0.025	0	7.03691e-007	13745	65	

圖 15

- 可按簡圖列之  切換鍵，來切換單一成分或多成分列表比對
- 按簡圖列之  鍵，可將比對資料轉出至 Excel
- 以上處理完成，按  跳出

七.標準品校正曲線作法:

1. 進入軟體後關掉所有視窗，然後一次開啟欲作為標準品的檔案。
2. 任取一張圖，經由使用 Initial peak width & Minimum peak area，對層析圖做積分處理，並手動積分刪去標準品以外的 Peak，只留下標準品的 Peak。如下圖所示: 並以此圖作為一個 Template。



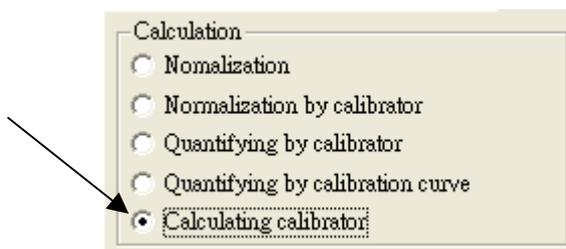
3. 如下圖，按 重新計算結果表(Results table)後，結果表中只剩下四個標準品的數據。

Acquisition	Integration	Component	Calculation	Results	Report			
	RetTime	Name	Calib	Quantity	Area	Height	Width	Feature
1	7.404			41.72	5152473	542865	8.913	V
2	10.455			21.34	2636083	214138	11.561	V
3	22.943			19.62	2423307	88719	25.651	V
4	65.737			17.32	2138766	25971	77.338	RMV
5								
6								
7								

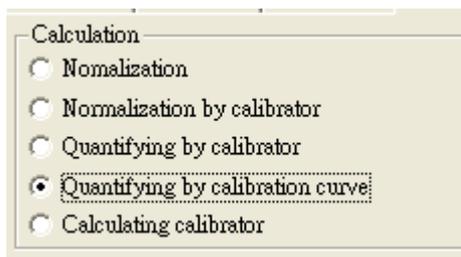
4. 在 Component table 中按下 。Results table 中的四個標準品滯留時間直接被抓取過來。接下來在 Name 欄中輸入標準品名稱。

Acquisition	Integration	Component	Calculation	Results	Report			
	RetTime	Name	Calib	Quantity	It'l std	Band beq	Band end	Grp Sum
1	7.404	aa						
2	10.455	bb						
3	22.943	cc						
4	65.737	dd						
5								
6								
7								

5. 跳到 Calculation table 中，點選到 Calculating calibrator。(意為將此圖選擇為製作校正曲線中的一個點)



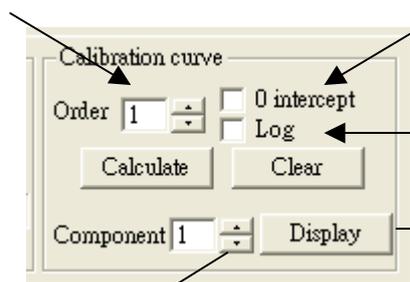
- 接著按 File 中的 Save Template 將本圖中的所有參數存成一個積分方法。
- 再按 File 中的 Load Template all 將剛剛儲存的 Template 套用至其他標準品檔案上。此時，所有開啟的標準品檔案自動套用剛剛儲存的積分方法，使用者不需要再對其他張圖做積分處理。
- 接下來在所有標準品檔案中的 Component table 裡，一一輸入標準品濃度。
- 輸入完成後，再開啟一新檔案。將 Calculation table 中的欄位點到 Quantifying by calibration curve。(意為套用剛剛製作完成的校正曲線)



- 按下多重計算機 。此時，軟體已經將標準曲線計算在此新檔案中。如下圖說明。

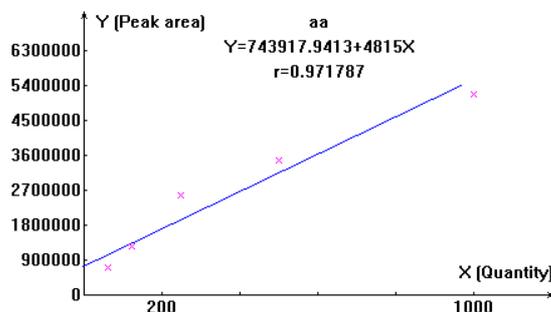
標準曲線方程式次方數

標準曲線方程式是否經過原點



對數形式之標準曲線

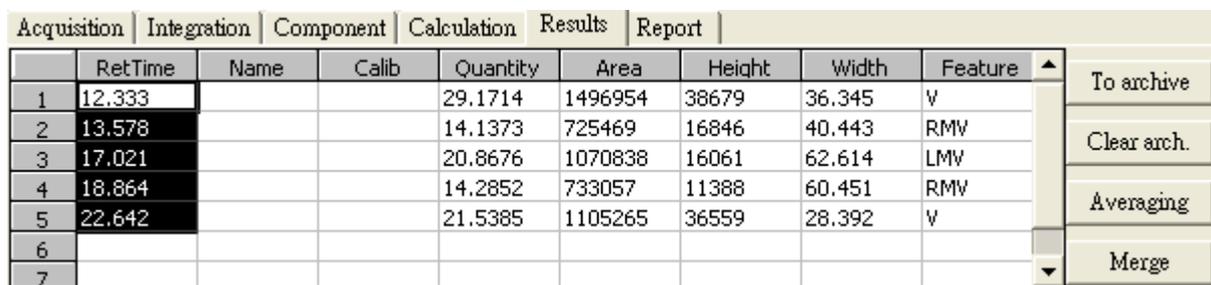
按上下選取其他標準品後，再按旁邊之 Display 即可看到標準品曲線圖。在圖上按右鍵可將此圖複製到 Word 中。



11. 如果想改變校正曲線的參數，如是否經過原點或改變方程式次數，皆需要再按一次多重計算機，校正曲線才會重新計算。
12. 校正曲線完成後，有兩種方法可以利用此校正曲線。第一個方法是直接將此含有校正曲線之新檔案儲存，下次有未知濃度之樣品要利用此校正曲線來定量時，直接開啟此檔案，然後設定好通道和擷取數據時間後，開始擷取數據。擷取數據完成後，軟體會自動在 Result table 中算出待測物濃度出來。第二方法是按 File 中的 Save template，將所有的參數包括標準品校正曲線都存成一個方法。下次有其他張未知濃度之層析圖需要利用此校正曲線定量時，按 File 之 Load template 即可將校正曲線套用在該層析圖上。第二個方法的優點是隨時可以靈活運用此校正曲線圖。

八、凝膠滲透層析(GPC)處理程序

1. 開啟一已知分子量標準品層析圖，再依據單元三積分處理之程序完成一般積分處理
2. 於層析圖上按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Molecular weight distribution，可開啟 Excel 程式，於 Excel 畫面下方點選 Narrow Calibration 之頁面，再將 Excel 程式縮小並回到 Peak-ABC 系統
3. 於 Results 頁面中選取所有 RetTime，並按滑鼠之右鍵彈出功能，點選 Copy(圖 18)



	RetTime	Name	Calib	Quantity	Area	Height	Width	Feature
1	12.333			29.1714	1496954	38679	36.345	V
2	13.578			14.1373	725469	16846	40.443	RMV
3	17.021			20.8676	1070838	16061	62.614	LMV
4	18.864			14.2852	733057	11388	60.451	RMV
5	22.642			21.5385	1105265	36559	28.392	V
6								
7								

圖 18

4. 回到 Excel 程式，將之貼到 Retention Time 方格中，並輸入對應時間之已知分子量(圖 18)

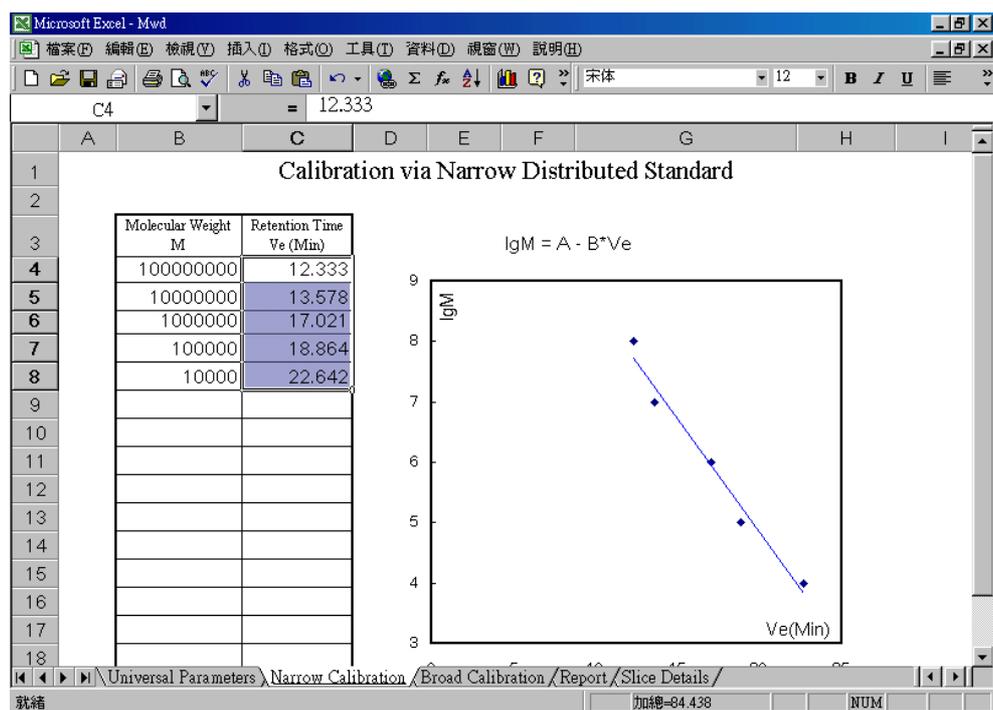


圖 19

5. 將圖 19 以檔案名稱 **MWD** 儲存後，關閉 Excel 程式
6. 回到 Peak-ABC 系統，並開啟一未知分子量之樣品層析圖，再依據單元三積分處理之程序完成一般積分處理
7. 於欲計算分子量之波峰上，按滑鼠之右鍵彈出功能，並選擇 Molecular weight distribution，可再開啟 Excel 程式，於 Excel 畫面下方點選 Report 之頁面，即可看到經套用校正曲線後之結果(表 2)

九、附錄：Peak-ABC 計算公式：

1. Theoretical plates = $5.54 \times (\text{Absolute peak top time} / \text{Width of peak at half height})^2$
2. Effective plates = $5.54 \times (\text{Relative peak top time}^* / \text{Width of peak at half height})^2$
* Relative peak top time is derived by subtracting the absolute peak top time of the very first peak from the absolute peak top time of the selected peak.
3. Tailing factor = the peak width measured at 5% of peak height / two times the width of left side of the peak
4. Capacity factor = $(\text{Absolute retention time of peak} / \text{Absolute retention time of the first peak}) - 1$
5. Horizontal resolution = $2 \times \text{peak top distant between two connecting peaks} / \text{the sum of base width of the two connecting peaks}$
6. Vertical resolution = $(1 - \text{the height of valley of the two connecting peaks} / \text{the average height of the two connecting peaks}) \times 100$
7. $SD = [\sum_{i=1 \sim n} (A_i - A_{avg.})^2 / (n-1)]^{1/2}$
* A = Area
8. $RSD\% = SD / A_{avg.} \times 100$

Feature : This column displays the feature of a peak corresponding to a component.

1. L : May consist of a hidden peak on the left.
2. R : May consist of a hidden peak on the right.
3. M : May be overlap by more than one hidden peaks.
4. N : Suspected to be a noise rather than a peak.
5. V : Overlap with another peak on the left.
6. T : Tangent split is applied to this peak.