色谱图中拖尾峰峰宽及分离度的新计算方法及其应用

陈　志[1]，李倩倩[1]，孙加燕[1]，曹　富[1]，李传响[2]
（1. 安庆医药高等专科学校，安徽安庆 246052；2.安庆市食品药品检验中心，安徽安庆 246003）

摘要：现行的各国药典主要采用半高峰宽法或峰宽法计算色谱峰的分离度（R_s）。半高峰宽法基于理想的、对称的高斯曲线推导而出，如用于拖尾峰 R_s 的计算，会产生误差。当使用上述 2 种方法计算得到的同一色谱峰 R_s 的结果有争议时，以峰宽法结果为准，但峰宽值的获取需要对峰曲线作切线处理或采用间接计算而得，不够便捷。该研究通过对色谱曲线进行指数修正高斯（EMG）模型的研究，得出峰宽值与不对称因子等参数之间的关系，提出可用于 R_s 快速计算的、新的峰宽计算公式，并通过真实色谱图进行验证，结果显示计算结果可靠。此外，还提出了计算 2 个拖尾峰之间完全分离所需最小距离的方法，供系统适用性试验中拟定最小 R_s 值参考。

关键词：拖尾峰；分离度；峰宽；拖尾因子；指数修正高斯模型
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)09-1374-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.09.014

A New Calculation Method for Peak Width and Resolution of Trailing Peaks in Chromatograms and Its Application

CHEN Zhi[1], LI Qianqian[1], SUN Jiayan[1], CAO Fu[1], LI Chuanxiang[2]
(*1. Anqing Medical College, Anqing 246052; 2. Anqing Food and Drug Inspection Center, Anqing 246003*)

ABSTRACT: The current national pharmacopeias mainly use the half-width method or the peak width method (tangent method) to calculate chromatographic peak resolution (R_s). The half-width method is based on a symmetric Gaussian curve, which may produce errors for calculating R_s of trailing peaks. If there is a dispute about the results of calculating R_s value between these two methods, the peak width method will be used. However, obtaining the peak width value requires tangent processing of the peak curve or indirect calculation, which is inconvenient. In this study, the relationships between the peak width value and the asymmetry factor and other parameters were derived by studying the exponentially modified Gaussian (EMG) model of chromatographic curve. A new peak width formula for rapid calculation of R_s value was proposed, which was verified through calculating R_s values of real chromatogram with trailing peaks. Additionally, a calculation method for the minimum distance required for complete separation between two trailing peaks is proposed, which was useful for determining the minimum R_s value in system applicability experiments.

Key Words: peak tailing; resolution; peak width; tailing factor; EMG model

现行《中华人民共和国药典》（ChP）和《美国药典》（USP）收录的分离度（R_s）计算方法主要有 2 种，即半高峰宽法和峰宽法，都是基于对称的高斯方程推导而出的，但在计算同一拖尾峰的 R_s 值时会存在差异，这与拖尾因子大小有关。若 2 种方法计算结果有争议时，一般以峰宽法计算结果为准。在主流色谱工作站软件中，可直接测量出各峰的峰面积、峰高、半高峰宽和不对称因子等值，而峰宽值则需要用切线法间接获得，故用峰宽计算 R_s 时不够便捷。本研究基于指数修正高斯（EMG）方程，并经试验验证，在切线法的基础上考虑到拖尾因子

收稿日期：2023-06-15
基金项目：安徽省教育厅质量工程项目(2022jyxm931)、安徽省教育厅自然课题项目(KJ2016A440)
作者简介：陈　志(1975—)，男，副教授，从事药品质量与安全的研究。
E-mail：czhi@aqmc.edu.cn

等因素，建立了一种快速计算峰宽的新方法，并无需额外的参数。在药品质量控制领域，各国药典对系统适用性试验要求都很严格[1—2]，特别是大的不对称峰与相邻杂质或降解产物峰的 R_s 是关注的重点，通过此模型，研究得出了相邻 2 个拖尾峰“完全分离最小距离”的计算经验式，可用于拟定系统适用性试验中最小 R_s 值时参考。

1 表征色谱峰的参数

1.1 半高峰宽、峰宽与分离度

色谱曲线的半高峰宽（$W_{0.5h}$）是指峰高一半处的峰宽。对曲线两侧拐点处做切线，与基线相交后两点之间的距离即为峰宽（W）。相邻两峰保留时间（t_{R1}，t_{R2}）之间的距离、$W_{0.5h}$ 或 W 都对两峰间 R_s 有影响。半高峰宽法和峰宽法计算 R_s 的关系如式（1）和（2）所示。

$$R_s=\frac{1.18(t_{R2}-t_{R1})}{W_{(1),0.5\,h}+W_{(2),0.5\,h}} \quad (1)$$

$$R_s=\frac{2(t_{R2}-t_{R1})}{W_1+W_2} \quad (2)$$

除了以上两种计算方法外，还有 5σ 法（five sigma method）和统计法，如式（3）和（4）所示。在一些文献[3]和教科书中还可以见到式（5）系列。

$$R_s=\frac{2.5(t_{R2}-t_{R1})}{W_{(1)4.4\,\%h}+W_{(2)4.4\,\%h}} \quad (3)$$

$$R_s=\frac{M_{1(2)}-M_{1(1)}}{2(W_{s(2)}+W_{s(1)})} \quad (4)$$

$$R_s=\frac{\sqrt{N}}{4}\cdot\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\cdot\left(\frac{k_{avg}}{1+k_{avg}}\right) \quad (5)$$

式中：$W_{(x)4.4\%\,h}$ 为峰高 4.4%处的峰宽，$M_{1(x)}$、$M_{2(x)}$ 分别为曲线第一中心矩和第二中心矩（方差），x 为色谱峰编号，$W_{s(x)}$ 为峰的方差衍生出的峰宽 $(M_2)^{1/2}$，N 为理论塔板数，α 为两峰容量因子 k_2 与 k_1 之比，$k_{avg}=(k_1+k_2)/2$。

理想的对称峰可以用高斯方程（6）来描述，其中 c 为 t 时刻色谱曲线的浓度，A 为峰面积，σ 为标准偏差，控制着峰形，t_R 为保留时间，决定了峰位。

$$c=\frac{A}{\sigma\sqrt{2\pi}}e^{-\frac{(t-t_R)^2}{2\sigma^2}} \quad (6)$$

如图 1 所示，峰 1、峰 2 为相邻的 2 个对称峰，它们的峰宽分别为 $4\sigma_1$ 和 $4\sigma_2$，当 t_R 之差为分别为 $\sigma_1+\sigma_2$、$1.5\sigma_1+1.5\sigma_2$、$2\sigma_1+2\sigma_2$ 和 $3\sigma_1+3\sigma_2$ 时，代入式（2），可得到 R_s=0.5、0.75、1.0 和 1.5，两峰交叉重叠面积则为 15.9%、6.7%、2.3%和 0.15%。当 R_s=1.5 时，可以认为完全分离，如图 1D 所示。

1.2 对称因子（symmetry factor）和拖尾因子（tailing factor，T）

多项研究[4—6]表明，实际的色谱峰是不对称的，这主要是由柱内因素和柱外因素综合造成的，以拖尾峰较为常见。各国药典引入对称因子或拖尾因子来衡量峰的对称性，二者定义的内涵相同，如式（7）所示。

$$T=\frac{W_{0.05\,h}}{2d} \quad (7)$$

式中：$W_{0.05h}$ 为 5%峰高处的峰宽；d 为峰顶在 5%峰高处横坐标平行线的投影点至峰前沿与此平行线交点的距离，如图 2 所示。表征峰形还引入了不对称因子（A_s）的概念，即 10%处峰高点水平到峰拖尾距离 b 与到峰前沿水平距离 a 的比值，即 $A_s=b/a$。

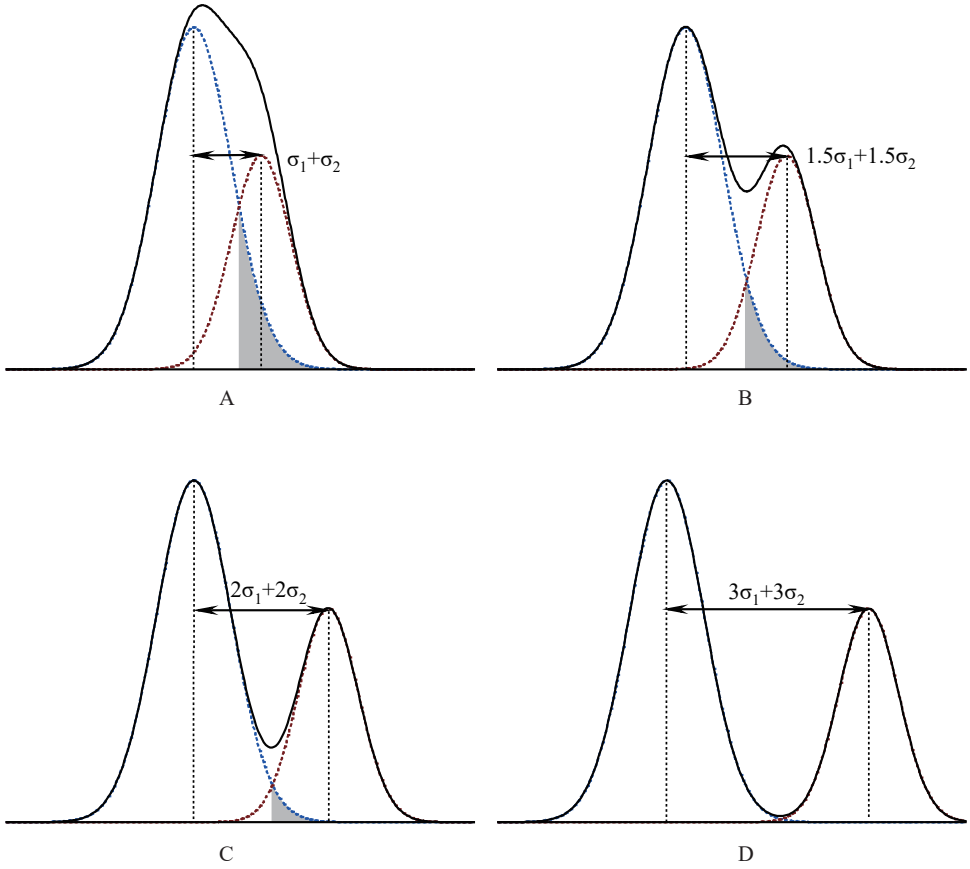
A_s 和 T 的关系式可表述为 $A_s\approx1+1.5(T-1)$[7]。图 3 列举了两者之间的换算值及对应的峰形关系。

USP-NF 2023 版第 621 章色谱法中关于系统适用性要求已更新，默认的对称因子范围已从 0.8 ～ 1.5 扩展到 0.8 ～ 1.8；在专题（Monograph）中甚至出现了对某些化合物拖尾因子要求不大于 2.0 的规定。《欧洲药典》(EP) 第 11 版、《英国药典》(BP) 2024 版及《日本药典》（JP）第 18 版中的对称因子规定范围为 0.8 ～ 1.8。ChP 也在修订默认的对称因子范围（从 0.8 ～ 1.5 扩展到 0.8 ～ 1.8），目前处于在征求意见阶段。此外，各国药典往往会在药品正文项下对 T 做出具体规定。

2 峰模型背景理论

2.1 EMG 拖尾峰模型的建立与峰宽测算

实际色谱峰多为不对称峰。用来描述不对称峰的函数非常多[8—10]，其中 EMG 方程［式（8）］应用较广泛[11]。FOLEY 等[4]在 1983 年基于此方程推导出的理论塔板数 N_{SYS} 计算公式已被主流色谱工作站软件采用。此方程是由高斯函数和时间指数衰减函数经过卷积而得[11—13]，可以很好地描述各类不对称峰的峰形。



A—R_s=0.5；B—R_s=0.75；C—R_s=1.0；D—R_s=1.5。

图 1　t_R 之差典型值与 R_s、重叠面积大小的关系

Fig.1　Typical Value of t_R Difference versus R_s, Size of Overlap Area

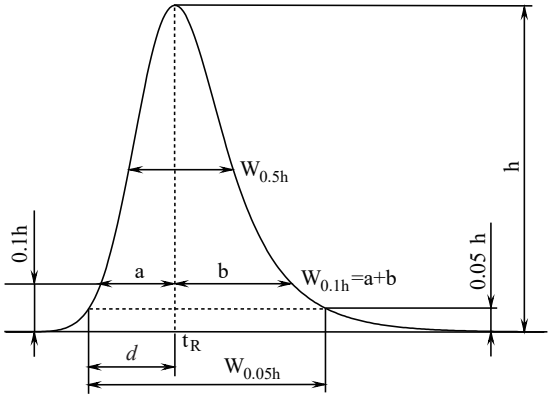


图 2　拖尾峰的表征

Fig.2　Characterization of Tailing Peak

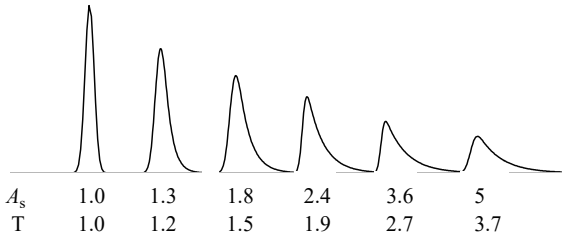


图 3　A_s 和 T 的换算及对应的峰形关系

Fig.3 The Conversion of A_s and T and the Corresponding Peak-shape Relationship

$$f(t)=\frac{A}{\tau\sigma_G\sqrt{2\pi}}\int_0^{\infty}\exp\left[-\left(\frac{t-t_G-t'}{\sqrt{2}\sigma_G}\right)-\frac{t'}{\tau}\right]dt' \qquad (8)$$

式中：$f(t)$ 为 t 时刻样品量，A 为峰面积，t_G 是未修正的高斯函数中心位置，σ_G 是高斯函数的标准偏差，τ 是指数衰减函数的时间常数。式 (8) 可写成式 (9) 的形式[14—16]。

$$f(t)=\frac{A}{2\tau}e^{\frac{1}{2}\left(\frac{\sigma_G}{\tau}\right)^2-\frac{t-t_G}{\tau}}\int_{-\infty}^{Z\sqrt{2}}\frac{\exp\left(-\frac{y^2}{2}\right)dy}{\sqrt{2\pi}} \qquad (9)$$

式中：$Z=\left(\frac{t-t_G}{\sigma_G}-\frac{\sigma_G}{\tau}\right)/\sqrt{2}$，将式 (9) 的定积分部

分变换成误差函数，可写成式（10）的形式。

$$f(t)=\frac{A}{2\tau}e^{\frac{1}{2}(\frac{\sigma_G}{\tau})^2-\frac{t-t_G}{\tau}}(1+\mathrm{erf}(\frac{1}{\sqrt{2}}(\frac{t-t_G}{\sigma_G}-\frac{\sigma_G}{\tau}))) \quad (10)$$

本研究使用工具软件 GeoGebra™（GGB）6.0 建立色谱峰模型，在软件中输入式（10），然后对此色谱曲线求导数 $f'(t)$，得式（11）。

$$f'(t)=-\frac{t-t_G}{\sigma_G^2}f(t) \quad (11)$$

将式（11）输入 GGB 6.0 软件，或直接对式（10）使用求导命令，生成 EMG 函数的导数函数曲线，再用顶点工具取得此导函数的 2 个顶点 O 和 P 的值，将其坐标 x 值赋于式（10），得 2 个拐点 U 点和 V，然后经过此两点对曲线作切线，两条切线与 x 轴相交得 2 个点 L 和 R，这两点连线的距离即为峰宽 W，如图 4 所示。此外，在模型曲线上设置了半高峰宽 $W_{0.5h}$。

通过改变不同的 τ（范围 1.0 ～ 4.3）和 σ_G（范围 1 ～ 4），得到不同峰形下的 a、b、h 和 W 等值，如表 1 所示。

将表 1 中的 b/a 值定成自变量 X，$A\cdot(h\cdot W)^{-1}$ 值设成因变量 Y，绘制关系图，结果可见二者之间呈线性关系，即 Y=0.057X+0.57，且线性关系良好（相关系数 R^2=0.999 6）。经变换得式（12）。

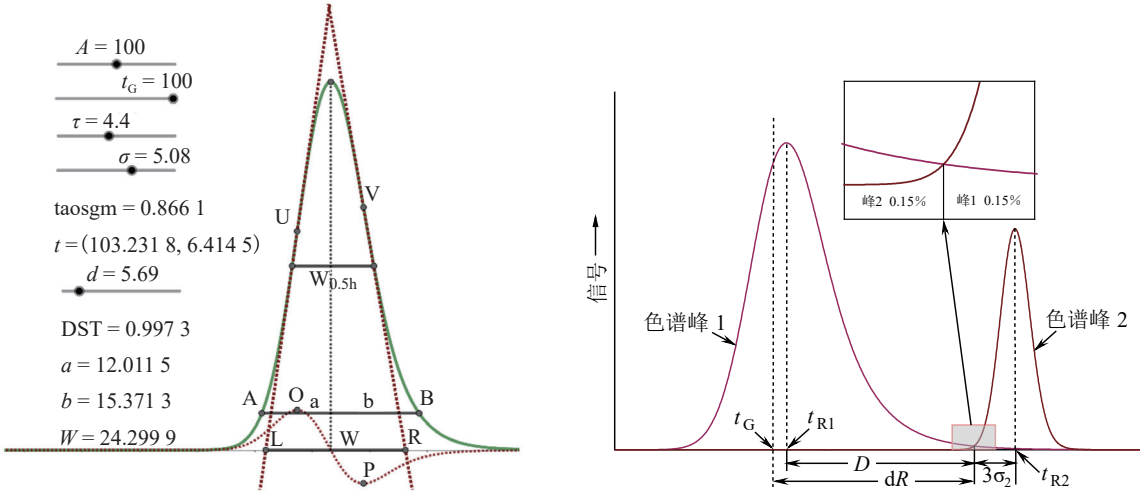
$$W=\frac{A/h}{0.057\frac{b}{a}+0.57} \quad (12)$$

A、h 和 b/a 这 3 个参数都可以在色谱工作站软件中直接获取，所以利用式（12）能快速计算出峰宽 W，再代入式（2）即可得 R_s。式（12）中变量 X 的范围为 1.00 ～ 2.16，换算成 T，范围为 1.0 ～ 1.8，满足 USP、EP、BP、JP 的要求［拖尾因子范围 1.0 ～ 1.8（拖尾峰）］，也符合 ChP 要求。残差分析结果显示，式（12）的拟合残差很小。

将扩大 b/a 的范围至 1.00 ～ 3.67，再进行分析，可见 X 值与 Y 值之间呈非线性的指数关系，拟合方程为 Y=0.936 − 0.38$e^{(-0.203X)}$，整理后得式（13）。

$$W=\frac{A/h}{0.936-0.38\exp(-0.203\frac{b}{a})} \quad (13)$$

同上，将变量 X 换算成 T，所得范围为 1.0 ～ 2.8，说明式（13）能涵盖 USP、EP、BP、JP 以及 ChP 拖尾因子范围 1.0 ～ 1.8（拖尾峰）要求，也就是说该式适用于峰形拖尾程度较严重的情况，用其



注：d 为 σ_G 倍率；t 为峰顶点；t_G 为峰位，本模型设定峰面积 A=100、峰位 t_G=100；taosgm 为 τ/σ_G；b/a 为不对称因子（A_s）；DST 为模型峰（实线所示）拖尾一侧与相邻峰重叠的峰面积百分比，通过不断改变 d，以确保 DST=99.7%；dR 为 t_G 到峰面积为 99.7%交叉点处（峰的拖尾一侧）的距离，D 为 t_{R1} 到此交叉点的距离。

图 4 利用 EMG 模型计算峰宽（A）和 2 个拖尾峰完全分离（99.7%）的最小距离（B）

Fig.4 Calculation of Peak Width (A) and Minimum Distance (B) for Complete Resolution (99.7%) of Two Trailing Peaks by EMG Model

表 1　不对称因子与峰宽、半高峰宽等参数之间的关系

Tab.1　Relationship between the Asymmetry Factor *b*/*a* of Different Peaks and Parameters such as Peak Width and Half-width

τ	σ_G	*b*	*a*	*h*	*W*	*d*	$dR^{1)}$	t_R	$D^{2)}$	*b*/*a*	$A\cdot(h\cdot W)^{-1}$	$A\cdot(h\cdot D)^{-1}$	$W_{0.5h}$
1.0	1.0	3.265 8	2.397 5	31.282 8	4.944 9	6.30	6.30	100.697 4	5.602 6	1.362 2	0.646 5	0.570 6	2.890 9
1.7		4.679 7	2.540 7	25.646 3	5.786 4	10.19	10.19	100.940 0	9.250 0	1.841 9	0.673 9	0.421 5	3.375 7
2.4		6.201 3	2.649 1	21.633 2	6.607 1	14.13	14.13	101.106 3	13.023 7	2.340 9	0.699 6	0.354 9	3.870 1
3.1		7.759 7	2.735 8	18.690 5	7.408 2	18.20	18.20	101.231 4	16.968 6	2.836 4	0.722 2	0.315 3	4.372 3
3.8		9.335 3	2.807 7	16.452 1	8.194 2	22.20	22.20	101.331 0	20.869 0	3.324 9	0.741 8	0.291 3	4.879 3
4.3		10.466 9	2.852 4	15.157 1	8.748 3	25.02	25.02	101.392 0	23.628 0	3.669 5	0.754 2	0.279 2	5.242 5
1.0	2.0	4.947 2	4.526 8	18.200 2	8.712 1	3.89	7.78	100.856 3	6.923 7	1.092 9	0.630 7	0.793 6	5.117 7
1.7		5.996 1	4.720 7	16.373 7	9.528 1	5.49	10.98	101.256 7	9.723 3	1.270 2	0.641 0	0.628 1	5.577 5
2.4		7.297 3	4.886 1	14.736 3	10.373 4	7.38	14.76	101.556 3	13.203 7	1.493 5	0.654 2	0.513 9	6.056 7
3.1		8.725 9	5.027 0	13.348 1	11.215 1	9.31	18.62	101.792 7	16.827 3	1.735 8	0.668 0	0.445 2	6.542 0
3.8		10.216 9	5.149 0	12.180 6	12.046 2	11.27	22.54	101.986 4	20.553 6	1.984 2	0.681 5	0.399 4	7.032 1
4.3		11.303 8	5.226 8	11.459 3	12.633 0	12.75	25.50	102.105 8	23.394 2	2.162 7	0.690 8	0.373 0	7.385 0
1.0	2.5	5.898 2	5.584 1	14.969 8	10.624 0	3.53	8.82	100.893 8	7.931 2	1.056 2	0.628 8	0.842 3	6.246 4
1.7		6.806 4	5.787 5	13.799 8	11.404 5	4.69	11.72	101.347 6	10.377 4	1.176 1	0.635 4	0.698 3	6.687 2
2.4		7.981 2	5.969 6	12.665 9	12.241 4	6.10	15.25	101.699 4	13.550 6	1.337 0	0.645 0	0.582 6	7.158 9
3.1		9.319 8	6.129 1	11.652 2	13.087 6	7.60	19.00	101.982 6	17.017 4	1.520 6	0.655 7	0.504 3	7.639 9
3.8		10.750 5	6.269 7	10.766 3	13.929 2	9.18	22.95	102.217 9	20.732 1	1.714 7	0.666 8	0.448 0	8.125 3
4.3		11.805 7	6.360 4	10.204 8	14.525 3	10.27	25.68	102.364 0	23.311 0	1.856 1	0.674 6	0.420 4	8.474 3
1.0	3.0	6.883 6	6.641 6	12.688 7	12.552 1	3.34	10.02	100.918 8	9.101 2	1.036 4	0.627 9	0.865 9	7.383 7
1.7		7.679 7	6.848 6	11.899 3	13.292 0	4.18	12.54	101.414 4	11.125 6	1.121 4	0.632 2	0.755 4	7.803 0
2.4		8.740 7	7.042 1	11.084 7	14.112 4	5.28	15.84	101.810 3	14.029 7	1.241 2	0.639 3	0.643 0	8.265 0
3.1		9.983 4	7.216 1	10.323 2	14.955 6	6.48	19.44	102.135 0	17.305 0	1.383 5	0.647 7	0.559 8	8.741 1
3.8		11.344 0	7.372 0	9.635 4	15.801 6	7.74	23.22	102.408 1	20.811 9	1.538 7	0.656 8	0.498 7	9.223 1
4.3		12.360 9	7.473 6	9.189 6	16.404 3	8.68	26.04	102.579 1	23.460 9	1.653 9	0.663 4	0.463 8	9.569 6
1.0	3.5	7.891 4	7.700 1	10.997 7	14.493 2	3.21	11.24	100.936 3	10.298 7	1.024 8	0.627 4	0.882 9	8.434 3
1.7		8.596 4	7.907 0	10.442 7	15.191 3	3.84	13.44	101.464 7	11.975 3	1.087 2	0.630 4	0.799 7	8.925 0
2.4		9.559 0	8.108 0	9.839 9	15.989 8	4.72	16.52	101.897 9	14.622 1	1.179 0	0.635 6	0.695 0	9.375 2
3.1		10.709 8	8.293 0	9.254 5	16.824 5	5.72	20.02	102.259 4	17.760 6	1.291 4	0.642 3	0.608 4	9.845 4
3.8		11.804 1	8.438 3	8.785 3	17.549 0	6.60	23.10	102.566 9	20.533 1	1.398 9	0.648 6	0.554 4	10.323 8
4.3		12.968 2	8.572 2	8.350 7	18.274 3	7.55	26.42	102.790 9	23.634 1	1.512 8	0.655 3	0.506 7	10.668 2
1.0	4.0	8.914 4	8.760 0	9.696 9	16.444 4	3.13	12.52	100.948 8	11.571 2	1.017 6	0.627 1	0.891 2	9.677 6
1.7		9.544 1	8.964 4	9.293 4	17.101 7	3.62	14.48	101.503 4	12.976 6	1.064 7	0.629 2	0.829 2	10.024 8
2.4		10.423 0	9.169 9	8.836 2	17.875 1	4.31	17.24	101.968 4	15.271 6	1.136 7	0.633 1	0.741 1	10.489 9
3.1		11.489 3	9.363 1	8.377 6	18.697 1	5.14	20.56	102.362 2	18.197 8	1.227 1	0.638 4	0.655 9	10.952 7
3.8		12.697 5	9.541 6	7.940 3	19.538 0	6.03	24.12	102.701 0	21.419 0	1.330 8	0.644 6	0.588 0	11.426 9
4.3		13.625 7	9.660 3	7.646 1	20.142 4	6.70	26.80	102.916 1	23.883 9	1.410 5	0.649 3	0.547 6	11.769 2

获得的计算结果是可控的。同样，式 (13) 的拟合残差很小。

2.2　EMG 拖尾峰模型的峰形与 *W* 和 $W_{0.5h}$ 的关系

ANDERSON 等 [17] 报道用 τ/σ 比值来描述峰形，随着 τ/σ 比值的增加，峰形将变得更加倾斜，反之峰形接近高斯对称形状，如图 5 所示。

采用工具软件 Origin 对表 1 中的相关数据进行多元线性回归分析，结果显示 τ/σ 为 0.25 ～ 4.30 时，$W_{0.5h}$ 或 *W* 与 τ、σ 的关系式如式 (14) 和 (15) 所示，相关系数 R^2 分别为 0.999 8 和 0.999 9；式 (14) 修正了文献 [18] 中该公式的常数项，可用于预测药物多组分的色谱参数、优化试验方案和色谱条件等。

$$W_{0.5h}=2.20\sigma+0.68\tau+0.046 \quad (14)$$

$$W=3.78\sigma+1.16\tau+0.02 \quad (15)$$

2.3　拖尾峰“完全分离最小距离”模型建立

在工具软件 GGB 中输入式 (10)，建立 2 个拖尾峰 1 和峰 2，如所图 4B 所示。

对于峰 1，*D* 为保留时间 t_{R1} 到两峰完全分离 (99.7 %) 交叉点处的距离。由表 1 所示，*b*/*a* 值与 $A\cdot(h\cdot D)^{-1}$ 值 (分别设定为自变量 *X* 和因变量 *Y*) 之间呈非线性的指数关系，拟合方程为 $Y=0.311+5.2e^{(-2.1X)}$，$R^2=0.994\ 2$，整理后得式 (16)。

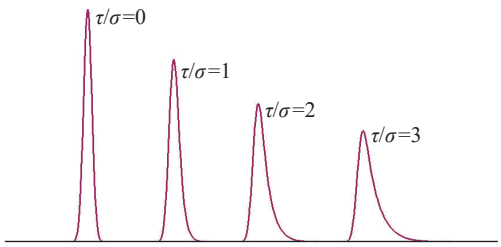


图 5 τ/σ 值与峰拖尾程度关系的示意图

Fig.5 Schematic Diagram of the Relationship of τ/σ Value between Degree of Peak Trailing

$$D=\frac{A/h}{h(0.311+5.2\exp(-\frac{2.18b}{a}))} \quad (16)$$

如要实现两峰完全分离，为简化计算，可将两峰交叉点与 t_{R2} 距离近似看成 $3\sigma_2$，如图 4B 所示，因半高峰宽 $W_{0.5h}=2.354\sigma_2$，故 $3\sigma_2=1.274W_{0.5h}$，此时峰 1 与峰 2 保留时间之差即为“完全分离最小距离”，如式 (17) 所示。

$$t_{R2}-t_{R1}=D+3\sigma_2=\frac{A/h}{h(0.311+5.2\exp(-\frac{2.18b}{a}))}+3\sigma_2 \quad (17)$$

式 (17) 中 A、h、b/a 和 $W_{0.5h}$ 这 4 个参数皆可从色谱工作站积分结果中得到，而非间接计算，结合峰宽方程［式 (12) 和 (13)］，代入式 (1) 或 (2)，就可计算 R_s，供拟定系统适用性试验拖尾峰的最小 R_s 时参考。

3 验证试验

3.1 试验方法

选择一张真实色谱图来验证本研究所得新公式 (12)、(13)、(16)、(17) 计算的可靠性。实验仪器为 1100 型高效液相色谱仪（安捷伦公司），色谱软件工作站为 DataApex 公司的 Clarity，检测某稠环化合物混合样品，色谱图如图 6 所示，色谱峰的积分结果如表 2 所示。

3.2 计算结果

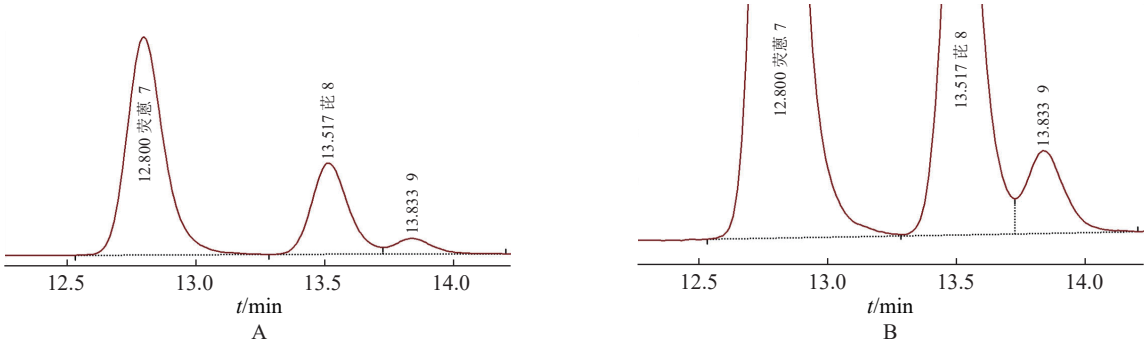
表 2 中峰 7、8、9 的不对称因子均在范围内 (1.0 ～ 1.8)，符合上述式 (12) (13) (16) (17) 使用的前提条件，对表 2 数据进行相应处理，结果如表 3 所示。

从表 3 可见，按式 (12) 和 (13) 计算，峰 7 和 8 间的 R_s 为 2.76，大于完全分离最小距离所需的 R_s(1.84)，也大于经典分离值 1.5。峰 8 和 9 间的 R_s 为 1.20，小于完全分离最小距离所需 R_s(1.85)，也小于经典分离值 1.5，故峰 8 和没有完全分离。与图 6 所示一致，与式 (4) 统计法的计算结果也较为接近。

在系统适用性试验方面，峰 7 和 8 完全分离测算距离为 0.479，实际为 0.717，超出完全分离距离；峰 8 和 9 完全分离测算距离为 0.486，实际为 0.316，显示未达到完全分离距离要求。故系统方案还要继续优化，以达到峰 8 和 9 间完全分离（R_s=1.85）的要求，可拟定成 2.0 或更高；为防试验成本上升和效率下降，不宜盲目提高此值。峰 7 和 8 的 R_s 至少为 1.84，拟定为 1.9 或 2.0 即可。

3.3 不同分离度计算方法的讨论

式 (2) 切线峰宽方法被药品监管机构采用，但



A—编号为 7、8、9 的 3 个峰的分离情况；B—靠近基线处的局部放大图。

图 6 真实色谱图示例

Fig.6 An Example of Real Chromatogram

表 2　某稠环化合物混合样品的色谱积分数据（部分）

Tab.2　Chromatographic Integration Data for a Mixed Sample of a Thick-ringed Compound (Partial)

峰编号	化合物名称	保留时间 /min	峰面积 /(mV·s)	峰高 /mV	$W_{0.5h}$ /min	偏斜度	超量	不对称因子	容量因子	柱效	$W_{0.5h}$分离度
7	荧蒽	12.800	117.613	11.652	0.16	0.923	2.294	1.309	26.83	36 206	—
8	芘	13.517	48.644	4.878	0.16	0.198	－0.071	1.300	28.38	40 374	2.67
9	其他	13.833	8.829	0.832	0.17	0.786	1.030	1.617	29.07	34 617	1.12

表 3　4 种方法计算 R_s 结果对比以及测算“完全分离最小距离”结果

Tab.3　Comparison of the R_s and the “Minimum Distance of Complete Separation” Measuring Results by Four Methods

峰编号	W	R_s				完全分离距离/min	
		半峰宽法[1)]	统计法[2)]	峰宽法[3)]	预测值[4)]	实际距离[5)]	最小距离[6)]
7	0.261	—	—	—	—	—	—
8	0.258	2.67	2.69	2.76	1.84	0.717	0.479
9	0.268	1.12	1.16	1.20	1.85	0.316	0.486

注：[1)] 实际色谱图上用 $W_{0.5h}$ 计算；[2)] 为按式 (4) 统计法计算；[3)] 用峰宽法按式 (12) 或 (13) 计算；[4)] 按式 (17) 测算得到的完全分离最小距离，结合峰宽值，预测获得的最小 R_s；[5)] 实际色谱图上两峰距离；[6)] 按式 (17) 测算得到的完全分离最小距离。

此法未涉及不对称峰的分离质量。半高峰宽法［式 (1)］、5σ 法［式 (3)］的原理基于对称峰形[19]，故在面对拖尾峰的计算时，它们都会造成一定的误差。而统计法［式 (4)］需要较多的参数，计算过程复杂。式 (5) 系列是基于式 (2) 的推导，中间过程做了一些近似处理，故一般只用于理论研究。

本研究中式 (12)、(13) 是基于切线法结合拖尾概念推导而得到的，在符合应用的前提条件下，计算更快、更准确。但本法对峰面积敏感，积分结果差异很大的相邻两峰面积需注意准确性。

3.4　“完全分离最小距离”的讨论

相邻峰峰高或峰宽相差百倍甚至更多时，造成 R_s 计算结果与实际的分离不符。而在方法开发过程中，对于重叠峰，可用式 (17) 以“完全分离最小距离”为原则，对色谱方法进行优化，以期获得最小完全分离距离。

3.5　EMG 方程模型局限性讨论

本研究基于 EMG 方程，但该方程本身有天然的局限性，过低或过高的不对称因子会使 EMG 不能较好地拟合真实色谱曲线。此外，本研究结论只涉及拖尾峰，不适用于前伸峰。

4　总结

使用本研究推导的 2 个公式［式 (12) 和 (13)］，在其不对称因子范围内，可以快速和相对准确地计算出色谱峰的峰宽，继而计算出 R_s，后续试验验证了本法的有效性，精度不低于半高峰宽法结果。因此，本法可作为色谱工作站计算峰宽的替代方法。

对于未达到基线分离及 R_s 过小的某些峰，如不能使用式 (12) 和 (13)，可改用半高峰宽法，或用反卷积[20—21]等法解析。

在拟定药物系统适用性试验中的 R_s 时，如按常见的 R_s>1.5 来确定，有时会引起较大误差，按本研究报道的“完全分离最小距离”［式 (17)］，在保证两峰完全分离前提下，能快速预测出合适的 R_s，减少烦琐的优化过程，节约成本。

致谢：中国药科大学理学院骆雪芳副教授给予指导。

参考文献：

[1] 刘丽芳. 药品标准中 HPLC 法色谱条件的优化与系统适用性试验的重要性[J]. 中国药品标准, 2005, **6**(1): 3-6.

[2] 李　飞, 李　云, 许真玉. 色谱系统适用性试验在分析方法使用中的重要性[J]. 中国新药杂志, 2019, **28**(6): 666-669.

[3] FOLEY J P. Resolution equations for column chromatography [J]. *Analyst*, 1991, **116**(12): 1275-1279.

[4] FOLEY J P, DORSEY J G. Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks [J]. *Anal Chem*, 1983, **55**(4): 730-737.

[5] VANDERHEYDEN Y, VANDERLINDEN K, BROECKHOVEN K, *et al*. Problems involving the

determination of the column-only band broadening in columns producing narrow and tailed peaks [J]. *J Chromatogr A*, 2016, **1440**: 74-84.

[6] VANDERHEYDEN Y, BROECKHOVEN K, DESMET G. Peak deconvolution to correctly assess the band broadening of chromatographic columns [J]. *J Chromatogr A*, 2016, **1465**: 126-142.

[7] SNYDER L R, KIRKLAND J J, DOLAN J W. Introduction to modern liquid chromatography [M]. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010.

[8] DI MARCO V B, BOMBI G G. Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks [J]. *J Chromatogr A*, 2001, **931**(1/2): 1-30.

[9] PEREIRA F J, LÓPEZ R, RODRÍGUEZ-CORDERO A, *et al*. New models involving quantum chemical parameters for assessing the chromatographic retention process [J]. *Microchem J*, 2021, **170**(7): 106693.

[10] BAEZA-BAEZA J J, GARCÍA-ALVAREZ-COQUE M C. Characterization of chromatographic peaks using the linearly modified Gaussian model. Comparison with the bi-Gaussian and the Foley and Dorsey approaches [J]. *J Chromatogr A*, 2017, **1515**: 129-137.

[11] ALI S, ARA J, SHAH I. A comparison of different parameter estimation methods for exponentially modified Gaussian distribution [J]. *Afr Mat*, 2022, **33**: 58.

[12] GOLUBEV A. Exponentially modified peak functions in biomedical sciences and related disciplines [J]. *Comput Math Methods Med*, 2017, **2017**: 7925106.

[13] YAU W W. Characterizing skewed chromatographic band broadening [J]. *Anal Chem*, 1977, **49**(3): 395-398.

[14] TORRES-LAPASIÓ J R, BAEZA-BAEZA J J, GARCÍA-ALVAREZ-COQUE M C. A model for the description, simulation, and deconvolution of skewed chromatographic peaks [J]. *Anal Chem*, 1997, **69**(18): 3822-3831.

[15] KALAMBET Y, KOZMIN Y, MIKHAILOVA K, *et al*. Reconstruction of chromatographic peaks using the exponentially modified Gaussian function [J]. *J Chemometr*, 2011, **25**(7): 352-356.

[16] CAVANILLAS S, SERRANO N, DÍAZ-CRUZ J M, *et al*. Parametric signal fitting of highly asymmetric voltammograms by using the exponentially modified Gaussian (EMG) function [J]. *Chemometr Intell Lab Syst,* 2016, **152**: 80-87.

[17] ANDERSON A H, GIBB T C, LITTLEWOOD A B. Computer resolution of unresolved convoluted gas-chromatographic peaks [J]. *J Chromatogr Sci*, 1970, 8(11): 640-646.

[18] 李浩春, 林彬生, 罗春荣, 等. 气相色谱全流出曲线的曲线拟合法及其应用 [J]. 中国科学(B辑 化学 生物学 农学 医学 地学), 1986, (5): 449-461.

[19] SONG D, WANG J. Modified resolution factor for asymmetrical peaks in chromatographic separation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, **32**(6): 1105-1112.

[20] HANDLOVIC T T, WAHAB M F, ROY S, *et al*. Automated regularized deconvolution for eliminating extra-column effects in fast high-efficiency separations [J]. *Anal Chem*, 2023, **95**(29): 11028-11036.

[21] PÉREZ-BAEZA M, ESCUDER-GILABERT L, MEDINA-HERNÁNDEZ M J, *et al*. Modified Gaussian models applied to the description and deconvolution of peaks in chiral liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2020, **1625**: 461273.