

不同生产厂家注射用头孢哌酮钠含量测定的 近红外定量模型的建立

逢焕欢^{1,2}, 冯艳春^{1,4}, 胡昌勤^{1*}, 相秉仁³

1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050
2. 吉林省药品检验所, 吉林 长春 130062
3. 中国药科大学, 江苏 南京 210009
4. 中国医学科学院中国协和医科大学医药生物技术研究所以, 北京 100050

摘要 采用近红外漫反射光谱法和偏最小二乘回归算法建立了2种测样方式对不同厂家注射用头孢哌酮钠中头孢哌酮的含量进行快速测定的定量分析模型。对9个厂家的19批注射用头孢哌酮钠样品及其降解物中头孢哌酮的含量进行了预测, 积分球模型的交叉验证均方根误差(RMSECV)和预测均方根误差(RMSEP)分别为0.636和2.01, 光纤模型的交叉验证均方根误差(RMSECV)和预测均方根误差(RMSEP)分别为0.857和3.71。根据ICH指导原则, 从专属性、线性、重现性、稳定性、准确性等几个方面对两模型的方法进行了验证, 进而说明光纤测样方式建立的模型专属性和适用性均良好, 完全可以对不同生产厂家的同一品种的药品进行快速的初步定量分析, 适用于药品检验车的快速无损检测。

主题词 近红外漫反射光谱; 定量分析; 方法验证; 快速检测; 头孢哌酮

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)12-2214-05

引言

近红外漫反射光谱技术由于具有快速、简便、无损伤等独特的优点已越来越受到人们的重视, 伴随着傅里叶变换近红外光谱仪器生产技术的日趋成熟, 现该技术已广泛应用于多个领域^[1]。在药物分析领域, 已成功地用于对药物多种剂型如液体制剂^[2]、片剂和胶囊剂^[3,4]等的含量进行测定。近年来亦用于对假药的快速识别^[5,6]。

假药(Counterfeit drug)是目前世界各国特别是发展中国家共同面临的问题之一。根据近红外光谱分析的特点, 在国家食品药品监督管理局的支持下, 从2002年起, 我们开始着手建立近红外药品识别系统, 该系统包括定性分析和定量分析两部分^[7], 装配在药品检测车上, 可以大大地提高对假药识别的速度和识别能力, 满足基层现场监督的需要。车载近红外光谱仪采用光纤探头采集数据, 其应用的关键为是否能在不同的“药品快速检测专用车”上实现近红外模型的共享。本文以注射用头孢哌酮钠为研究对象, 探讨药品检测车中利用光纤探头无损采集安瓿瓶中的样品信息, 测定注射用粉针剂含量; 及模型不经任何处理直接在同品牌不同型号近红

外光谱仪中相互传递的可行性。

1 仪器与试剂

EQUINOX55, 2台MATRIX-F(编号: 7903, 1104)和2台MPA(编号: 2104, 3202)型傅里叶变换近红外光谱仪(德国Bruker公司), EQUINOX55和MPA配有硫化铅(PbS)和铟镓砷(InGaAs)检测器、外接积分球和1.5 m固体光纤探头, MATRIX-F为便携式车载型近红外仪, 仅配有铟镓砷(InGaAs)检测器, 外接1.5 m固体光纤探头, OPUS化学工作站, Quant2定量分析软件; Agilent1100高效液相色谱仪。乙腈为色谱纯, 去离子蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 样品及其含量

头孢哌酮钠的生产可分为溶媒结晶工艺和冷冻干燥工艺, 对应的形成结晶型粉末和无定型粉末。从15个药品生产企业收集的31批注射用头孢哌酮钠中, 结晶型样品为23批, 无定型样品为8批。按中国药典2000年版方法^[8], 采用

收稿日期: 2005-10-17, 修订日期: 2006-01-16

基金项目: 国家财政部重点项目资助

作者简介: 逢焕欢, 女, 1977年生, 中国药科大学在职硕士研究生

*通讯联系人

HPLC 测定注射用头孢哌酮钠中头孢哌酮的含量 ($\% \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

2.2 训练集样本

选取 14 个企业的 14 批结晶型样品和 7 个企业的 7 批无定型样品; 其中 3 个企业的结晶型粉末 (编号: CPZ-2, CPZ-70, CPZ-71) 和 4 个企业的无定型粉末 (编号: CPZ-3, CPZ-16, CPZ-69, CPZ-72) 各一批, 置 60%、相对湿度 40% 的恒温恒湿箱中敞口放置, 分别于 0, 24, 36, 48 h 取样; 共计 22 个样品 (其中 6 个为加速实验样品) 作为训练集样本。含量范围从 70.8%~89.6%。

2.3 验证集样本

剩余的 9 个企业 19 批样品 (其中 6 个为加速实验样品) 作为验证集样本, 1 个企业的样品未包括在训练集中; 结晶型样品 15 批, 无定型样品 4 批; 含量范围从 70.0%~89.7%。

2.4 NIR 光谱采集

积分球采样方式 (EQUINOX55, MPA2104, MPA3202): 扫描范围: $4\,000 \sim 12\,000 \text{ cm}^{-1}$; 分辨率: 8 cm^{-1} ; 扫描次数: 64 次, 将样品置标准瓶中, 积分球漫反射测定, 每份样品测定 3 次。光纤采样方式 (EQUINOX55, MATRIX-F7903, MATRIX-F1104): 扫描范围: $4\,000 \sim 12\,000 \text{ cm}^{-1}$; 分辨率: 8 cm^{-1} ; 扫描次数: 64 次, 不破坏样品包装, 将固体光纤探头抵住安瓿瓶底, 每份样品测定 5 次。

3 结果与讨论

3.1 训练集样本的选择

头孢哌酮钠包括结晶型和无定型 2 种粉末, 二者在贮存过程中不断分解, 并表现出不同的稳定性^[9]。不同晶型的头孢哌酮钠 NIR 图谱略有差异 (图 1), 为使模型对头孢哌酮钠晶型的影响降至最低, 将 41 个样品 (包括加速降解样品) 首先进行聚类分析 (预处理方法: 一阶导数-矢量归一; 谱段: $4\,243 \sim 4\,424$ 和 $5\,443 \sim 6\,253 \text{ cm}^{-1}$) (图 2), 在 0.25 处可将全部样品分为 7 大类, 结晶型样品主要分为 5 类, 无定型样

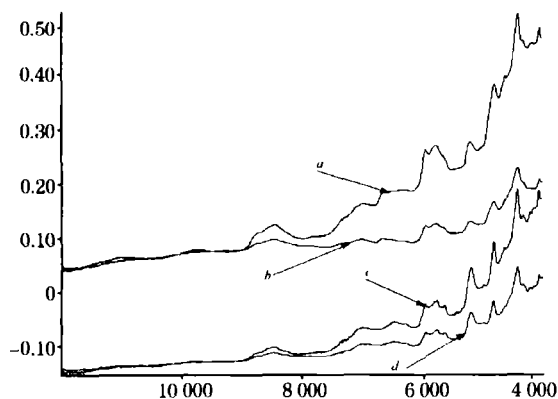


Fig 1 The spectrum of different crystal form recorded by different sampling mode for cefoperazone

a: Spectra of amorphism recorded by integrating sphere sampling mode; b: Spectra of amorphism recorded by fibre sampling mode; c: Spectra of crystal form recorded by integrating sphere sampling mode; d: Spectra of crystal form recorded by fibre sampling mode

品集中为 2 类; 从每大类中分别取出 3~4 个样品共计 22 个样品作为训练集样本; 训练集样本中加入部分加速降解样品, 降低了不同晶型样品的不同降解过程对模型的影响, 使得所建模型的预测能力和粗放性更强。

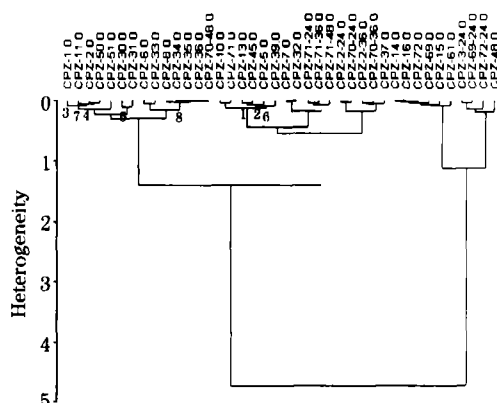


Fig 2 The hierarchical cluster analysis result for cefoperazone

3.2 光谱范围及预处理方法的选择

粉剂中通常不含各种辅料, 近红外光谱主要体现了其活性成分的结构信息。将配制的无定型与结晶型头孢哌酮钠样品光谱经一阶导数-矢量归一化处理后, 发现二者光谱有较明显的差异; 头孢哌酮钠的结晶型产品和无定型产品的水份含量不同, 前者可高达 5%, 后者一般低于 2%^[8]。水分子中的 $-\text{OH}$ 在 NIR 光谱区的 $7\,000 \text{ cm}^{-1}$ ($1\,430 \text{ nm}$) 和 $5\,128 \text{ cm}^{-1}$ ($1\,950 \text{ nm}$) 附近分别有一个很强的倍频和合频吸收带; 为去除水峰的干扰, 建模谱段扣除了水分子的 2 个强吸收谱段 ($4\,243 \sim 4\,424 \text{ cm}^{-1}$; $5\,443 \sim 6\,253 \text{ cm}^{-1}$)。

对样本集光谱进行预处理可以降低光谱的系统误差, 进而消除不同仪器型号间的系统误差满足模型传递的需要。用导数的方法对谱图进行预处理, 可以有效消除基线偏移的影响, 并提高谱图的分辨率, 从而降低或消除某些系统误差; 用矢量归一化对谱图进行预处理, 通常可以大大减小与重复性相关的光谱变化, 如同一物质由于光纤采样位置不同及来自于不同生产厂家而产生的一些细微的光谱差异。同等测量条件下比较, 光纤探头测样方式获得的光谱吸收峰较强而采用积分球则较弱 (见图 2), 即硫化铅 (PbS) 检测器光谱信号的响应要强于铟镓砷 (InGaAs) 检测器; 积分球采样时通过积分球的不断旋转对样品的漫反射光进行全面的收集, 因此由积分球测得的样品光谱信噪比高、重复性好, 另外由于安瓿瓶底的厚薄不均导致光纤较积分球测样方式获得的光谱重现性差, 光谱基线有较大的偏移, 因此积分球模型的预处理方法为矢量归一而光纤模型的预处理方法为一阶导数-矢量归一。

3.3 建立模型

为评价利用光纤采集样本信息所建立的 NIR 模型的有效性, 对相同样本, 分别建立积分球模型和光纤模型, 并比较二者的差异。

两模型预处理方法、建模谱段、相关系数 (r)、因子数 (Rank)、交叉验证均方根误差 (RMSECV) 见表 1。图 3 和

图 4 分别为 2 种测样方式所建模型的交叉验证测定的头孢哌酮训练集样品的 NIR 结果与参考 HPLC 方法结果的相关性曲线。由表 1, 在整个研究的浓度范围内, 两模型 NIR 结果与 HPLC 结果的相关性良好; 积分球模型的交叉验证均方根

误差(RMSECV)和相关系数(r)均大于光纤模型, 说明测样方式对模型有一定的影响, 但这种测量方式所产生的误差不会影响光纤模型对药品进行初筛的能力。

Table 1 Characteristics of the final calibration models

	Integrating sphere model	Fibre model
Wavelength range/ cm^{-1}	4 243 ~ 4 424, 5 443 ~ 6 253	4 243 ~ 4 424, 5 443 ~ 6 253
Spectra pretreatment	Vector normalization	1st derivative, vector Normalization
r^2	0.991 6	0.984 7
Rank	10	8
RMSECV/ ($\% \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)	0.636	0.857

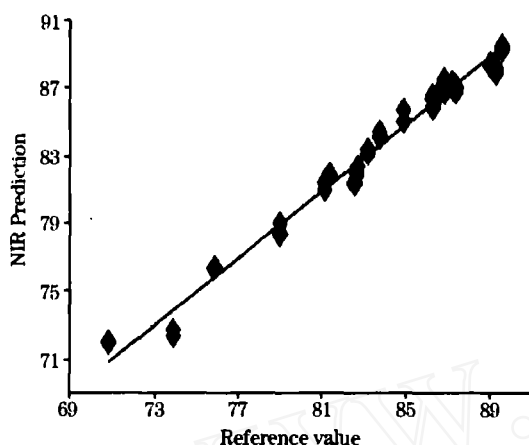


Fig. 3 The cross validation results for cefoperazone in integrating sphere sampling mode

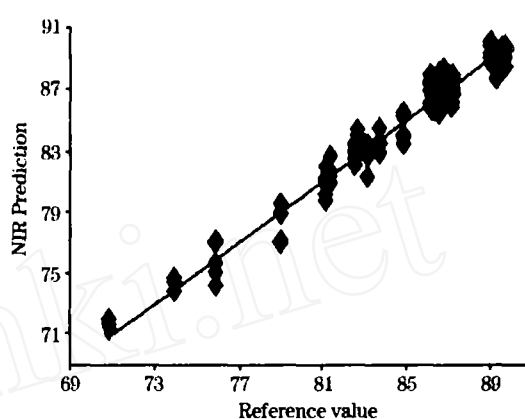


Fig. 4 The cross validation results for cefoperazone in fibre sampling mode

Table 2 Validation of the calibration models for the determination of cefoperazone content

Aspects		Integrating sphere model	Fibre model
Linearity	Formula	$y = 0.9745x + 2.1109$	$y = 0.9701x + 2.5186$
	a	2.1109 ± 3.5309	2.5186 ± 2.9626
	b	0.9745 ± 0.0422	0.9701 ± 0.0352
	r^2	0.9832	0.9696
	RMSECV/ $\% \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$	0.636	0.857
	Concentration range	70.8% ~ 89.6%	70.8% ~ 89.6%
Repeatability	$n = 5$	0.3%	1.2%
Stability	$n = 5$	0.3%	1.2%
Accuracy	Mean accuracy	1.8%	2.9%
	RMSEP/ $\% \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$	1.84	3.66

3.4 模型的验证

根据 ICH 指导原则^[10], 从专属性、线性、重现性、稳定性、准确性等几个方面对模型进行了验证。预测 22 种 50 批头孢类粉针剂抗生素, 结果马氏距离均大于限定值, 被认定为异常, 说明该模型对头孢哌酮钠的分析是有专属性的; 线性、重现性、稳定性和准确性结果列于表 2, 表明建立的近红外定量方法和参考方法之间没有系统误差, 在整个研究的浓度范围内 NIR 结果与参考方法结果呈线性; 方法的重现性和稳定性良好配对, t 检验表明, 在 95% 可信区间两模型中

头孢哌酮的测量值和理论值均无显著性差异。

3.5 模型传递

一个好的模型应该能在不同的仪器上应用, 模型传递的成功与否直接影响着方法的推广应用。本实验用一台仪器测量的数据建立模型, 考察该模型在其他两台同类型但不同型号的仪器之间的传递能力。

分别在 4 台仪器上扫描验证集中 9 个厂家的 19 批注射用头孢哌酮钠样品, 用所建立的模型预测结果, 经方差分析, 积分球模型和光纤模型中, 未用于建模的仪器与建模仪

器所测结果及理论值之间无显著性差异。

3.6 两种测样方式的模型比较

由方法学的验证结果可见,积分球测样方式的准确性、精密度、重现性要优于光纤测样方式,这是由其测样方式的不同特点所决定的:积分球测样方式测样器件固定,试验时采用的积分球旋转测样方式减少了样品不均匀性给分析带来的影响,因此由积分球测得的样品光谱信噪比高、重复性好;光纤测样方式不破坏样品外包装,采样时光纤探头直接抵住安瓿瓶底进行测量,而由于样品来源不一致导致不同生产厂家外包装的安瓿瓶底多为厚薄不匀的,因此在瓶底不同的位置采样时通过样品的光程是不一致的,这种光程的不一致就导致了采集的 NIRS 有较大的基线漂移,光纤测得的样品光谱重复性较差,从而光纤模型与积分球模型相比其方法学考察结果稍差;从二者的测量误差看,积分球与光纤模型对未用于建模的 10 个厂家的 19 批样品的预测均方根误差(RMSEP)分别为 0.98 和 2.17($\% \text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$),预测结果与真实值平均相对误差分别为 0.8%和 1.9%,由以上分析可

以断定,安瓿瓶底对光纤模型的建立及其结果预测是有一定的影响的。

虽然光纤模型的测量误差较大,但光纤采样方式具有简便化、对样品外包装无损等特点也是积分球采样方式无法比拟的优点,而且光纤模型的测量误差($3.71 \% \text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)已能满足药品检测车中对药品进行初筛的要求,因此光纤测样方式关于安瓿瓶底的影响可以忽略。

4 结 论

本实验结果表明,采用偏最小二乘回归算法建立的积分球和光纤 2 种测样方式的定量分析模型,其方法结果准确可靠,重现性、稳定性均良好,可以对不同厂家头孢哌酮含量进行快速测定并可以直接在不同型号的仪器间进行模型传递。光纤测样方式模型更有实用性和普遍意义,可以作为药品检测车中的快速检测方法使用,满足实用化的要求。

参 考 文 献

- [1] LU Wan-zhen, et al(陆婉珍,等). Modern Near Infrared Spectroscopy Analysis Technology(现代近红外光谱分析技术). Beijing: Petrolic and Chemical Industry Press(北京:中国石化出版社), 2000. 1.
- [2] SUN Mei-ling, et al(孙美玲,等). Journal of China Pharmaceutical University(中国药科大学学报), 2003, 34(3): 240.
- [3] BAI Ying-kui, SHEN Xuan-guo, FENG YI, et al(白英奎,申铨国,冯毅,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(6): 898.
- [4] SUN Mei-ling, et al(孙美玲,等). Journal of China Pharmaceutical University(中国药科大学学报), 2003, 34(5): 473.
- [5] Scafi S H F, Pasquini C. Analyst, 2001, 126: 2218.
- [6] Olsen B A, Borer M W. Pharmaceutical Technology, 2002, 6: 62.
- [7] HU Chang-qin, et al(胡昌勤,等). Chinese Pharmaceutical(中国药事), 2004, 18(4): 250.
- [8] The Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China(国家药典委员会). Chinese Pharmaceutical(中国药典·二部). Beijing: Chemical Industry Press(北京:化学工业出版社), 2000. 938.
- [9] YANG Li-hong, et al(杨利红,等). Chinese Pharmaceutical(中国药事), 2001, 15, (4): 256.
- [10] Moffat Anthony C, Trafford Andrew D. Analyst, 2000, 125: 1341.

Construction of Universal Quantitative Models for Determination of Cefoperazone Sodium for Injection from Different Manufacturers Using Near Infrared Reflectance Spectroscopy

PANG Huan-huan^{1,2}, FENG Yan-chun^{1,4}, HU Chang-qin^{1*}, XIANG Bing-ren³

1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China

2. Jilin Institute of Drug Control, Changchun 130062, China

3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

4. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract Universal quantitative models using NIR reflectance spectroscopy in two different kinds of sampling mode were developed for the analysis of cefoperazone sodium for injection from different manufacturers in China. The quantitative models were established using partial least squares (PLS). Nineteen batches of cefoperazone sodium for injection samples from 9 different manufacturers were predicted by the quantitative models. The root mean square errors of cross validation (RMSECV) and the

root mean square errors of prediction (RMSEP) of the model in integrating sphere sampling mode were 0.99 and 0.98, respectively. The values of RMSECV and RMSEP of the model in fibre sampling mode were 1.12 and 1.17, respectively. Based on the ICH guidelines and characteristics of NIR spectra, the quantitative models were then evaluated in terms of specificity, linearity, accuracy, and precision. The authors' study has shown that it is feasible to build a universal quantitative model in fibre sampling mode for quick analysis of pharmaceutical products from different manufacturers. As a result of its good specificity and applicability, the model could be used for quick, non-destructive prescreening of counterfeit and substandard drugs in the mobile vehicle.

Keywords NIR reflectance spectroscopy; Quantitation; Validative analysis; Quick inspection; Cefoperazone

(Received Oct. 17, 2005; accepted Jan. 16, 2006)

* Corresponding author

第三届全国实验室管理科学研讨会征文通知 (第一轮)

由中国分析测试协会主办、《分析试验室》编辑部承办的“第三届全国实验室管理科学研讨会”定于 2007 年 7 月 10~14 日在青海省西宁市召开。

会议内容包括实验室管理科学、实验室认证认可、实验室比对、实验室信息管理系统(LIMS)、实验室仪器设备运行及考核、实验室技术人员培训等有关方面的学术研讨。会议将邀请有关专家做大会报告, 欢迎全国各行业的实验室管理人员及实验室科研工作人员参加会议。

会议征文请在 2007 年 5 月 31 日通过邮局邮寄、电子邮件发送到会议筹备组(三日内收到筹备组的回复邮件方为发送成功), 并注明联系人、详细通信地址、联系电话、传真号码及 e-mail 地址。征文经专家审稿后部分录用征文可在《分析试验室》期刊上正式发表。

欲参加会议的各界人士, 也请于 2007 年 5 月 31 日前与会议筹备组联系, 以便继续为您寄发下一轮通知。

筹备组地址: 100088 北京新外大街 2 号《分析试验室》编辑部实验室管理会议筹备组

电话: 010-82241919, 82013328; 传真: 010-82013328

e-mail: ana-info@263.net

联系人: 孙臣良 田春霞

中国分析测试协会
2006 年 9 月 30 日