

近红外光谱法同时快速测定五种抗结核药物的主成分含量

滕乐生, 王 迪, 宋 佳, 张益波, 郭伟良, 滕利荣*

吉林大学生命科学学院, 吉林 长春 130012

摘 要 20 世纪 80 年代以来, 全球的结核病形势急剧恶化, 利福平片、异烟肼片、吡嗪酰胺片、异福片和异福酰胺片是目前比较有效的抗结核药物。文章采用近红外光谱技术(NIRS)结合偏最小二乘法(PLS)建立了同时测定上述五种抗结核药物中的利福平(RMP)、异烟肼(INH)和吡嗪酰胺(PZA)含量的定量分析模型。实验结果表明, 采用原始光谱建立模型测定以上抗结核药物中各组份含量时, 测定 RMP 含量的最有效的波长范围为 1 981 ~ 2 195 nm, 测定 INH 含量的最有效波长范围分别是 1 540 ~ 1 717 nm 和 2 086 ~ 2 197 nm, 测定 PZA 含量的最有效波长范围分别是 1 460 ~ 1 537 nm, 1 956 ~ 2 022 nm 和 2 268 ~ 2 393 nm, 最优模型测定 RMP, INH 和 PZA 含量的交互验证均方根误差(RMSECV)分别为 0.049 4, 0.025 7 和 0.030 7, 模型对预测集样品中的 RMP, INH 和 PZA 含量预测, 预测均方根误差(RMSEP)分别为 0.034 9, 0.016 6 和 0.013 4, 预测相关系数(r_p)分别达到 0.986 4, 0.998 9 和 0.999 3, 表明模型预测准确可靠, 该研究对抗结核药物生产中质量检验和在线检测有重要的意义。

关键词 近红外光谱; 偏最小二乘法; 抗结核药物; 主成分含量

中图分类号: O657.3, R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-0593(2008)08-1814-05

引 言

无论是经济发达国家还是发展中国家, 结核病人都在不断的增加, 每年新发病 800 万 ~ 1 000 万, 每年因结核病死亡 200 万人 ~ 300 万人, 结核病对青少年造成的死亡比任何传染病都多^[1, 2]。我国是世界上结核病负担最重的 22 个国家之一。利福平(RMP)、异烟肼(INH)和吡嗪酰胺(PZA)是目前抗结核比较有效的药物。RMP 是利福霉素类半合成广谱杀菌剂, 对多种病原微生物均有抗菌活性。对革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌均有明显的抗菌作用; INH 可以抑制结核菌菌壁分枝菌酸成份的合成, 从而使结核杆菌丧失多种能力(耐酸染色, 增殖力, 疏水性)而死亡, 对代谢活力强的结核菌作用更强。吡嗪酰胺对人型结核杆菌有较好的抗菌作用, 在 pH(5 ~ 5.5)时, 杀菌作用最强, 尤其对处于酸性环境中缓慢生长的吞噬细胞内的结核菌是目前最佳杀菌药物之一。因单用耐药性产生较快, 异福片(RMP 和 INH 复方制剂)和异福酰胺(RMP, INH 和 PZA 复方制剂)可显著提高利福平和异烟肼的抗菌活性, 并且延缓耐药性的产生, 更有利于患者的用药依从性^[3, 4]。RMP, INH 和 PZA 的常规测定方法

主要有反相高效色谱法^[5]、二极管阵列光度法^[6]、薄层层析法^[7]和紫外分光光度计法^[8], 这些方法均需要对样品进行预处理, 有些方法还需对样品的成分进行分离测定, 操作繁琐费时, 并且需要大量的有机试剂, 容易造成污染。

近红外(near infrared, NIR)光谱技术是近年迅速发展起来的绿色分析技术, 其定量分析技术在建立可靠的校正模型的基础上, 可直接对样品进行无损检测, 具有分析速度快、效率高、成本低和多组分同时测定等优点, 非常适合工业现场在线检测^[9-12]。因 NIR 中有效信息率低, 对复杂样品进行近红外光谱分析需从复杂、重叠、变动的光谱中提取微弱信息, 非常困难^[13]。偏最小二乘法(partial least square, PLS)由于具有较强的提供信息的能力而成为化学计量学中最受推崇的多变量校正方法, 目前是最有效的分析方法之一, 它从自变量矩阵和应变量矩阵中提取偏最小二成分, 有效地降维, 并消除自变量间可能存在的复共线关系, 明显改善数据结果的可靠性和准确度^[14, 15]。本文应用近红外光谱法结合偏最小二乘法(NIR-PLS)建立测定利福平片、异烟肼片、吡嗪酰胺片、异福片和异福酰胺片中 RMP, INH 和 PZA 含量的定量分析模型, 并用所建模型对预测集样品进行预测, 得到较好的结果, 该方法有望成为药物分析的常规方法之一。

收稿日期: 2007-05-06, 修订日期: 2007-08-12

基金项目: 中国医学基金会新药发展基金项目(20061108)资助

作者简介: 滕乐生, 1983 年生, 吉林大学生命科学学院研究生

*通讯联系人 e-mail: tenglr@jlu.edu.cn

1 实 验

1.1 实验材料

利福平 (99.59%)、异烟肼 (99.87%) 和吡嗪酰胺 (99.66%) 对照品购于中国药品生物制品检定所; 辅料购买于成都市泰山薄膜包衣有限公司。

1.2 仪器和样品光谱的测定

UV-3150 型紫外-可见近红外分光光度计 (日本岛津公司), 附件 ISR-3100 积分球; 仪器参数为: 光谱范围 800 ~ 2 500 nm, 光谱通带宽度为 12 nm, 每个样品进行近红外扫描 3 次, 取平均值作为该样品的近红外光谱。Waters486 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), Nucleosil ODS (4.6 mm × 150 mm, 10 μm) 色谱柱 (大连江申分离科技公司)。利福平片, 异烟肼片、吡嗪酰胺片、异福片和异福酰胺片样品的光谱如图 1, 由图 1 可以看出五种抗结核药物样品的光谱比较复杂和吸收峰严重重叠, 简单线性关系无法解析。

1.3 样品的制备

分别按照利福平片、异烟肼片、吡嗪酰胺片、异福片和

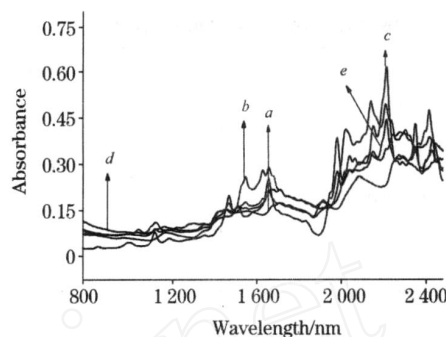


Fig 1 NIR spectra of samples

a: Rifampicin tablet; b: Isoniazide tablet; c: Pyrazinamide tablet; d: Rifampicin and isoniazide tablet; e: Rifampicin isoniazide and pyrazinamide tablets

异福酰胺片处方量, 精密称取各主药适量, 按处方比例加入辅料, 混合均匀, 制成片剂样品, 样品的 RMP, INH 和 PZA 含量采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定^[5], 样品的各组分 HPLC 测定含量统计结果如表 1。

Table 1 Statistical contents of RMP, INH and PZA

Samples	Components	Samples numbers	Average	Ranges
Rifampicin tablets	RMP	51	0.374 9	0.337 4 ~ 0.411 9
Isoniazide tablets	INH	44	0.900 4	0.805 2 ~ 0.994 7
Pyrazinamide tablets	PZA	35	0.895 0	0.804 3 ~ 0.984 0
Rifampicin and Isoniazide tablets	RMP	48	0.523 3	0.424 6 ~ 0.619 3
	INH		0.252 2	0.199 9 ~ 0.297 5
Rifampicin Isoniazide and Pyrazinamide tablets	RMP	40	0.198 7	0.150 1 ~ 0.247 4
	INH		0.139 0	0.100 1 ~ 0.177 9
	PZA		0.408 5	0.359 9 ~ 0.457 2

1.4 建立 NIRS 数学模型

应用 TQ Analyzer V6.0 商用光谱定量分析软件中的 PLS 算法, 将采集到的五种抗结核药物的近红外光谱与其相应的 RMP、INH 和 PZA 的 HPLC 测定含量值分别进行拟合建模, 以校正集的交互验证均方根误差^[16] (RMSECV) 为指标, 选择最有效的光谱区域、光谱预处理方法; 以预测残差平方和 (PRESS) 及 RMSECV 为指标, 选择最合适的因子数。以预测均方根误差 (RMSEP) 为指标评价模型预测性能。RMSECV, RMSEP 和 PRESS 的计算公式为,

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{\text{NIR}i} - C_{\text{REF}i})^2}{n}}$$

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n (C_{\text{NIR}i} - C_{\text{REF}i})^2$$

对于 RMSECV 和 PRESS, C_{NIR} 为校正集交互验证计算的含量值, C_{REF} 为校正集的 HPLC 的测定含量值, 对于 RMSEP, C_{NIR} 为模型对预测集样品预测的含量, C_{REF} 为预测集 HPLC 测定的含量。

2 实验结果与分析

2.1 光谱范围的选择

光谱范围对建立模型的性能和预测准确性有很大的影响, 光谱范围的选择过程实际就是样品各组分光谱信息的筛选过程, 它直接影响到光谱信息的利用效果。采用 TQ Analyzer V6.0 进行优化, 得到测定各组分最有效的光谱范围, 测定 RMP 含量最优的光谱范围是 1 981 ~ 2 195 nm; 测定 INH 含量最优的光谱范围是 1 540 ~ 1 717 nm 和 2 086 ~ 2 197 nm; 测定 PZA 含量最优光谱范围是 1 460 ~ 1 537 nm, 1 956 ~ 2 022 nm 和 2 268 ~ 2 393 nm。

2.2 光谱预处理方法的选择

由于采集的近红外原始光谱含有杂噪声和基线漂移的干扰, 本文采用导数平滑的方法对原始光谱进行预处理, 以期能提高光谱的信噪比和消除基线漂移的干扰, 表 2 为采用不同光谱建立的模型的 RMSECV 值, 由表 2 可以看出, 导数光谱所建立模型的 RMSECV 值较原始光谱所建模型的高, 所以采用原始光谱模型。

Table 2 RMSECV of the models which was constructed by different pretreated spectra

Pretreated spectra	Components	RMSECV
Origin	RMP	0.049 4
	INH	0.025 7
	PZA	0.030 7
1 st derivative	RMP	0.070 9
	INH	0.040 3
	PZA	0.039 1
2 nd derivative	RMP	0.117 0
	INH	0.041 8
	PZA	0.245 5

2.3 主因子数的选择

在建立 PLS 定量分析模型时,主因子数关系到模型的稳定性,主因子数太小模型会出现拟合不充分,主因子数太多会出现过拟合的现象。本文以 RMSECV 和 PRESS 为评价指标,选择最优的主因子数。主因子数对 RMSECV 和 PRESS 的影响如图 2,由图 2 可以看出,测定 RMP, INH 和 PZA 含

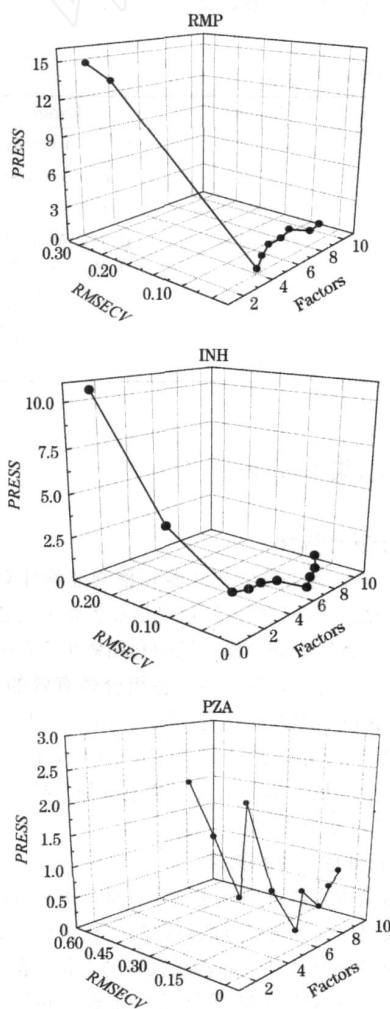


Fig 2 Influence of different numbers of factors on RMSECV and PRESS of PLS calibration models for determination of RMP, INH and PZA

量的最适的主因子数分别为 4, 7 和 6。

2.4 最优模型的内部交互验证

采用最优的条件,建立测定五种抗结核药物中主成分含量的最优模型,为了评价模型的稳定性和拟合效果,对最优模型进行内部交互验证,结果如图 3 所示, RMP, INH 和 PZA 含量的交互验证预测值与 HPLC 测定值间的相关系数 (r_v) 分别为 0.972 9, 0.987 6 和 0.996 2, RMSECV 值分别为 0.049 4, 0.0257 和 0.030 7, 说明交互验证预测值与 HPLC 测定值接近,说明模型的稳定性和拟合效果非常好。

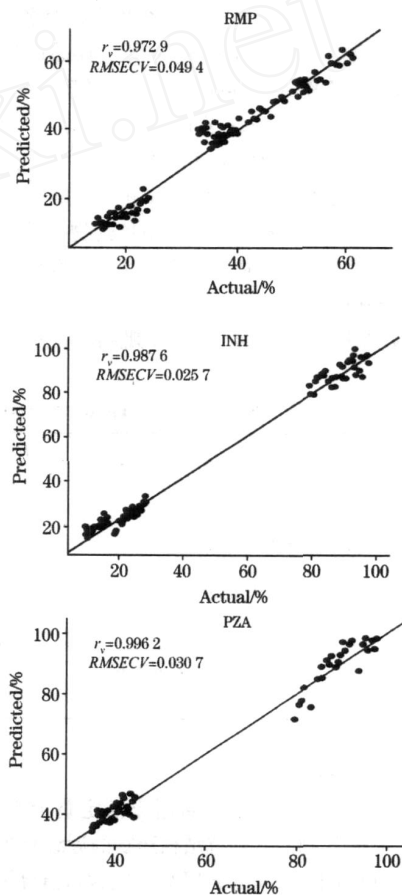


Fig 3 Correlation between actual values and NIR predicted values obtained by cross-validation

2.5 最优模型的外部验证

在最优模型建立后,采用外部验证方法对所建模型实际预测效果进行评价检验,预测集样品各组分的预测值与 HPLC 法测定值进行成对数据双边 t 检验(见表 3),各组分 HPLC 测定值和模型预测值间的 t 检验值均未达到显著水平,表明预测值与 HPLC 测定值间无显著差异。

3 讨论

本文应用近红外光谱结合 PLS 法建立测定五种抗结核药物中 RMP, INH 和 PZA 含量定量分析模型,模型经过选择最有效的光谱区域和最适的主因子数,得到最优的模型,应用最优的模型对预测集样品中的 RMP, INH 和 PZA 的含

量进行预测, 预测值与 HPLC 法所测含量值进行 t 检验, 两者之间无显著差异。结果表明该方法预测精度能满足抗结核药物生产定量分析的要求, 该方法方便快捷、无污染、无破

坏性, 且可实现在线检测, 在药物生产的原位检查和在线质量控制方面有很大的发展前景。

Table 3 Evaluation of the prediction models with validation sets

Components	Samples	Actual average/ %	Predicted average/ %	r	t Values	$t_{0.05/n=60}$	RMSEP
RMP	55	22.23	22.15	0.986 4	- 0.081 98	2.000	0.034 9
INH	55	26.85	27.12	0.998 9	- 0.135 43	2.000	0.016 6
PZA	55	23.59	23.36	0.999 3	0.132 89	2.000	0.013 4

参 考 文 献

- [1] Phillip O, Graham A, Rook W. Nature Reviews, 2004, 2: 930.
- [2] Panchagnula R, Agrawal S. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 271: 1.
- [3] Agrawal S, Kaur KJ, Singh I, et al. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 233: 169.
- [4] Panchagnula R, Sancheti P, Rungta S, et al. Pharmacological Research, 2003, 48: 383.
- [5] Espinosa-Mansilla A, Acedo-Valenzuela M I, Pena A M, et al. Talanta, 2002, 58: 273.
- [6] Calleri E, Lorenzi E D, Furlanetto S, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 29(6): 1089.
- [7] Argekar A P, Kunjir S S, Purandare K S. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1996, 14(11): 1645.
- [8] Espinosa-Mansilla A, Acedo-Valenzuela M I, Munoz A., et al. Analytica Chimica Acta, 2001, 427: 129.
- [9] McClure W F. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2003, 11(6): 487.
- [10] GUO Wei-liang, MENG Qing-fan, LU Jia-hui, et al. The 2006 International Conference on Computational Science and Its Applications, Lecture Notes in Computer Science 3980, 2006. 938.
- [11] TENG Le-sheng, NIAN Zong-qian, LU Jia-hui, et al (滕乐生, 年综潜, 逯家辉, 等). Journal of Jilin University (Engineering and Technology Edition) (吉林大学学报, 工学版), 2006, 36(3): 443.
- [12] MENG Qing-fan, ZHANG Yi-bo, LU Jia-hui, et al (孟庆繁, 张益波, 逯家辉, 等). Chinese Pharmaceutical Journal (中国药学杂志), 2007, 42(4): 304.
- [13] Blanco M, Coello J, Iturriaga H. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2000, 50: 75.
- [14] NILI-jun, ZHU Jing, ZHANG Li-guo (倪力军, 朱 静, 张立国). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(1): 67.
- [15] LIU Li-ying, CHEN Hong-zhang (刘丽英, 陈洪章). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2007, 27(2): 275.
- [16] Eriksson L, Johansson E, Muller M, et al. Chemometrics, 2000, 14: 599.

Application of Near Infrared Spectroscopy in Rapid and Simultaneous Determination of Essential Components in Five Varieties of Anti-Tuberculosis Tablets

TENG Le-sheng, WANG Di, SONG Jia, ZHANG Yi-bo, GUO Wei-liang, TENG Li-rong^{*}
College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China

Abstract Since 1980s, tuberculosis has become increasingly serious. Rifampicin tablets, isoniazide tablets, pyrazinamide tablets, rifampicin and isoniazide tablets and rifampicin isoniazide and pyrazinamide tablets are currently relatively efficacious anti-tuberculosis drugs. In the present paper, near infrared spectroscopy (NIRS) with partial least squares (PLS) was applied to the simultaneous determination of rifampicin (RMP), isoniazide (INH) and pyrazinamide (PZA) contents in 5 varieties of anti-tuberculosis tablets. As the results showed, all of the models for the determination of RMP, INH and PZA contents applied the original NIR spectra. The most efficacious wavelength range for the determination of RMP contents was 1 981-2 195 nm, it was 1 540-1 717 nm and 2 086-2 197 nm for the determination of INH contents, and it was 1 460-1 537 nm, 1 956-2 022 nm and 2 268-2 393 nm for determination of PZA contents. The root mean square error of the calibration set obtained by cross-validation (RMSECV) of the optimum models for the quantitative analysis of RMP, INH and PZA contents was 0.049 4, 0.025 7 and

0.030 7, respectively. Using these optimum models for the determination of RMP, INH and PZA contents in prediction set, the root mean square error of prediction set (RMSEP) was 0.018 2, 0.016 6 and 0.013 4, respectively. The correlation coefficient (r_p) between the predicted values and actual values was 0.986 4, 0.998 9 and 0.999 3, respectively. These results demonstrated that this method was precise and reliable, and is significative for in situ measurement and the on-line quality control for anti-tuberculosis tablets production.

Keywords NIRS; PLS; Anti-tuberculosis tablets; Essential components

(Received May 6, 2007; accepted Aug. 12, 2007)

* Corresponding author

全国第 2 届近红外光谱学术会议通知 (第二轮)

为全力展示我国近红外光谱领域所取得的最新进展及成果,增进广大近红外光谱科技工作者和广大近红外分析工作者之间的交流与合作,进一步促进我国近红外光谱事业的发展,中国仪器仪表协会近红外光谱分会拟于 2008 年 11 月 20~22 日在长沙主办全国第 2 届近红外光谱学术会议。俞汝勤院士、陆婉珍院士担任大会主席。届时邀请国内有丰富经验的近红外光谱分析专家、学者和仪器专家作专题报告和进行近红外光谱分析技术交流,并邀请国外知名学者和海外华裔学者与会。热忱欢迎光谱学界专家教授及广大从事分析测试技术工作的科技人员踊跃撰稿。会议将表彰为近红外事业做出卓越贡献的先进个人和集体,进行优秀论文评选,并推荐优秀论文在《Chemometrics & Intelligent Laboratory Systems》、《光谱学与光谱分析》(SCI 收录)、《分析测试学报》及《现代科学仪器》等杂志上发表。现将有关事项通知如下:

一、大会主席团成员名单

主 席:俞汝勤 陆婉珍 副主席:王顺昌 陈星旦 闫成德

二、学术委员会成员名单

主 任:陆婉珍 俞汝勤

副主任:袁洪福 梁逸曾 韩东海 徐可欣 邵学广 吴海龙 王 健

委 员:(按姓氏笔划为序)

丁海曙 王小如 王京华 王家俊 王艳斌 卢家炯 石春海 田松柏 冯新泸 孙素琴 孙岩峰 任玉林
吕 进 应义斌 吴玉田 杜一平 陈 斌 张卓勇 张存洲 李 华 金少鸿 林 君 罗国安 范世福
杨曙明 相秉仁 修连存 黄玉东 蒋士强 蒋建晖 谢洪平 谢益民 彭玉魁 褚小立 熊春华 廖延彪
瞿 军 瞿海斌

三、组织委员会成员名单

主 任:梁逸曾

副主任:吴海龙 蒋建晖

委 员:(按姓氏笔划为序)

易伦朝 王 兵 范 伟 张志敏 徐 路 付海燕

四、论文集编辑出版

将提供会议论文集,优秀论文推荐到《分析测试学报》、《光谱学与光谱分析》、《Chemometrics & Intelligent Laboratory Systems》及《现代科学仪器》杂志上出版,相关内容如下:

(1)截稿日期:2008 年 7 月 25 日。应征论文可通过 e-mail 发至大会筹备组委会电子信箱,或通过挂号信(含磁盘)寄至大会筹备组委会(见六、联系方式)。来稿请注明论文联系人、电话、传真、电子信箱及个人简介,并注明“全国第 2 届近红外光谱学术会议征文”。

(2)论文录用:筹备组将邀请和组织国内有关专家对应征论文进行评审,2008 年 8 月 15 日前发出论文录用通知,2008 年 9 月 20 日前确认会议召开的具体时间、地点和相关事宜。请自留底稿,恕不退稿。

(3)论文格式要求:

全文一份(含图表在内的文字字数一般不超过 8 000 字),包括中英文题目、中英文摘要、中英文关键词、中英文作者姓名、单位和单位所在地、第一作者简介(50 字左右),以及中文正文和参考文献。也接受全英文稿。

(下转 1831 页)