

近红外光谱一致性检验方法用于快速判断药品质量的研究

张学博, 尹利辉*

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要: 近红外光谱一致性检验技术是一种快捷的质量控制方法, 通过为每个波长点的吸光度设置 CI 阈值来检验未知样品的光谱, 以此判断未知样品与已知样品的质量是否具有 consistency。本文对该法用于对药品的质量进行快速判断的阈值设置、代表性光谱的数量、谱段选择、预处理方法等问题进行了研究和讨论, 并介绍了一致性检验的另外两种限度控制方法。

关键词: 近红外光谱; 一致性检验; 药品质量; 快速检测

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)03-0603-06

Study of near - infrared spectroscopic conformity test for rapid examination of drug quality

ZHANG Xue - bo, YIN Li - hui*

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

Abstract: Near - infrared spectroscopic conformity test is a simple method for drug quality control. The quality of unknown sample is examined by checking if all the absorption values are within the CI (Conformity Index) limit set by reference spectra of known samples. In present paper, the questions of limit setting, number of reference spectra, absorption bands to be used and the pretreatment method for this technology are studied and discussed; another two related limit control methods are also introduced.

Key words: near - infrared spectroscopy; conformity test; drug quality; rapid testing

一致性检验是一种快捷的图谱比较方法, 通过比较待测样品的光谱与已知样品的一组参考光谱是否具有 consistency, 从而判断待测样品与已知样品是否具有 consistency 的药品质量。一致性检验与一般的定性鉴别和聚类分析方法不同, 它是通过控制每个波长点的吸光度值来达到质量控制的目的。通过一致性检验, 待测样品的光谱在每个波长点的吸光度都必须处于置信区间范围内。

近红外光谱一致性检验方法最初是在 1993 年由 W. Plugge 等人^[1]提出的, 用于对三水氨苄西林的质量进行检测, 发现该法能够检测到其他建模方法所难以探查的样品化学或物理性质的变化, 可用于控制生产工艺并实现产品质量的一致性。之后, Gary 等人^[2]对一致性检验方法从准确度、精密度、粗放性、一致性等各个方面进行了考察, 结果表明该法能够满足目前的方法验证标准、可被现代严格的

指导原则所接受。

1 一致性检验方法介绍

其原理为 n 张参考光谱在某个波数点处有 n 个吸光度值, 首先计算参考光谱在每个波长点 i 处吸光度的平均值和标准偏差 σ 。其次将每个波长点的平均值加减多少倍(即 CI 限度)标准偏差 σ 作为该波长点的可信区间(即容许范围)。待测光谱在该波长点处的吸光度与参考光谱在该波长点处的平均值的差值除以标准偏差 σ , 得到的就是一致性指数(Conformity Index: CI)。一致性检验就是将待测光谱的 CI 与之前设定的 CI 限度(CI limit)进行比较, 从而快速简单的判断待测光谱与参考光谱是否具有 consistency。

检验光谱在 i 波长处的一致性指数 CI 值的计算公式如下:

国家科技支撑计划项目课题“药品现场快速鉴别技术研究”(2008BAI55B06)

通讯作者 Tel: (010) 67095316; E-mail: yinlh007@yahoo.com.cn

$$CI_i = \frac{A_{\text{sample } i} - \bar{A}_{\text{reference } i}}{\sigma_{\text{reference } i}}$$

总体而言,通过对若干参考光谱在每个波长点处的吸光度数值进行统计学分析,为每个波长点设定一个容许区间,从而在全谱范围内形成带状的“河流”,这就是一致性检验的模型,如图1。待检验光谱每个波长点的吸光度都没有超出这个带状范围,便认为待测样品与建模所用的样品具有一致性。

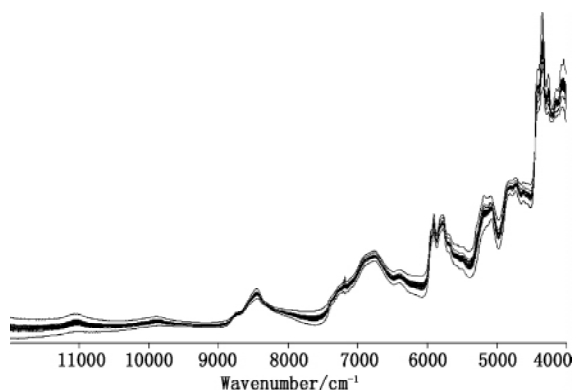


图1 对各波长点设定 CI 限度后的整体示意图(上下两条线表示上下的容许范围)

Fig 1 Plot of CI limits of all wavenumbers(twolateral lines indicate the tolerance range)

表2 不同谱段和参考光谱数量时所有波长点在总体 0.9999 概率下均不超限度应设的 CI 限度

Tab 2 CI limits of different numbers of spectral data points and reference spectra under overall confidence level of 0.9999

数据点数量(No. of data points)	参考光谱数量(No. of reference spectra)								
	6	10	20	30	60	90	120	150	180
2074(12000 ~4000 cm ⁻¹)	52.3	16.5	8.7	7.3	6.3	6.0	5.8	5.8	5.7
1504(10000 ~4200 cm ⁻¹)	49.1	15.9	8.5	7.2	6.2	5.9	5.8	5.7	5.6
1037(9000 ~5000 cm ⁻¹)	45.5	15.3	8.3	7.0	6.1	5.8	5.7	5.6	5.6
388(7000 ~5500 cm ⁻¹)	37.4	13.6	7.8	6.7	5.8	5.6	5.5	5.4	5.4
311(6200 ~5600 cm ⁻¹ 4800 ~4200 cm ⁻¹)	35.8	13.3	7.7	6.6	5.8	5.5	5.4	5.4	5.3
155(6200 ~5600 cm ⁻¹)	31.1	12.3	7.3	6.3	5.6	5.4	5.3	5.2	5.2

3 一致性检验建模时参考光谱的数量

在进行一致性检验建模过程中,必须收集足够多的代表性样品采集其光谱图,参考光谱的代表性是决定模型好坏的关键。例如针对某一批次药品来采集光谱时,尽管批次内部的差异很小,但是仍然有一个均匀性的问题,如果将这种药品差异性视为随机数据,计算测定 n 张光谱某波长点吸光度数据的标准偏差,然后重复 m 次计算测定 n 张光谱某波长点吸光度数据的标准偏差的整体标准偏差,来判断测样中随机数据分布的稳定性,依此来判定代表性参考光谱所需要的数量。对此在 MATLAB 中进行了计算,假设 F 为 0 ~ 1 之间 n 个随机数值的矩阵,重复 m 次生成这

2 一致性检验模型 CI 限度的设置

一致性检验的阈值、也就是 CI 限度的设置方法一般采取统计学上 t 分布的置信水平方法,如果测定的参考光谱数量为 30 张,那么在不同的置信水平上对某一波长点吸光度值应设置的标准偏差的倍数 (CI 限度) 见表 1。

表1 不同置信水平下应设的 CI 限度(t 值)

Tab 1 CI limits(t value) under different confidence levels

置信水平 (confidence levels)	0.95	0.99	0.995	0.999	0.9999
CI/ t	2.04	2.75	3.03	3.65	4.48

然而,仅仅计算某一波长点处的概率分布得到相应的 t 值、以其来设置整个谱段范围内的 CI 限度是不合理的,因为还要考虑整体的概率分布情况,也就是应计算所有波长点处在某一置信水平下均不超出 CI 限度的概率。因此参考文献^[3]中的方法,计算了在所选谱段范围内各个波长点处的吸光度在一定概率下均不超出的概率。在某些谱段内所有波长点的吸光度总体上达到 0.9999 概率下均不超限度应设置的 CI 值如表 2(在 Excel 中的计算命令是 $TINV((1 - 0.9999^{(1/a)}), (b - 1))$,其中 a 为波长点数 b 为参考光谱数量)。

个随机数组矩阵,然后计算这 m 个随机数组各自标准偏差的整体标准偏差。重复 m 次的标准偏差平均值、波动范围和各标准偏差的整体的标准偏差三者的分布随着 n 的变化如图 2(m 为 1000)。

从图中可以看出,随着测样数量的增加,各标准偏差的波动范围和整体的标准偏差呈曲线下降,而且在测样数量达到 30 ~ 50 之后基本趋于稳定,因此认为,测样次数应至少为 30 批次。如果要对某一品牌药建立一致性检验模型,那么需要至少 30 批次的样品;如果要对某一批次的药品建立一致性检验模型,那么应至少需要测定 30 个不同的片剂、胶囊剂或粉针剂样品,才能具有比较稳定的代表性。

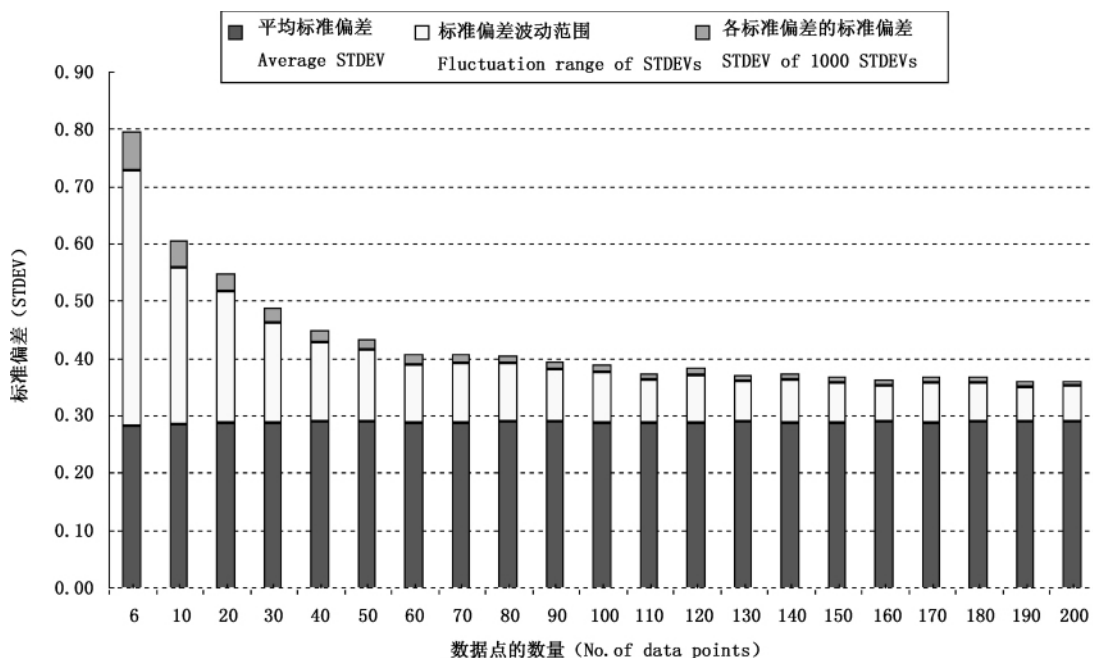


图2 重复1000次的标准偏差平均值、波动范围和各标准偏差的整体标准偏差的分布随着数据点数的变化

Fig 2 Distribution of the averages, fluctuation ranges and overall standard deviations(STDEV) of the standard deviations of repeated 1000 times under different numbers of data points

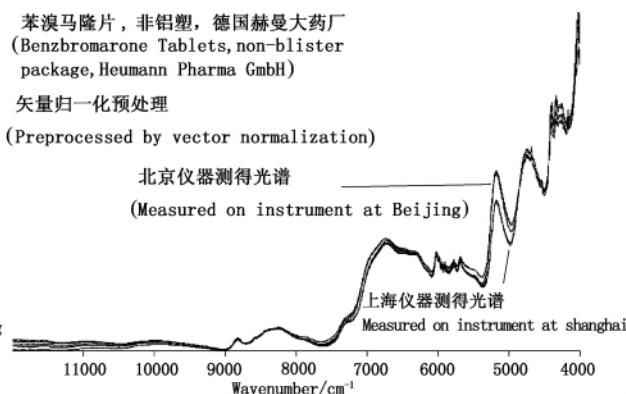
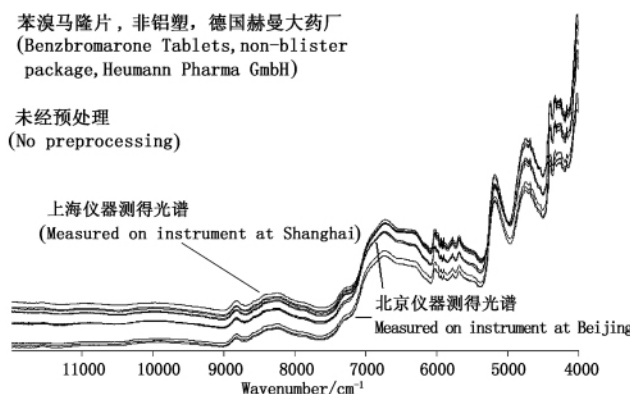
4 一致性检验光谱预处理方法和建模谱段的选择

由于一致性检验对待测光谱的要求非常苛刻,因此必须对光谱进行一定的预处理,尽量消除各种物理和电子噪音信号的干扰。

在不同仪器上测定的近红外光谱图,可能会因为仪器条件的原因,导致对同一样品测得的光谱会稍有差异,这种差异主要表现为基线的偏移和旋转。对于基线偏移,可以通过矢量归一化或者一阶导数化来消除;对于基线旋转,可以采用一阶导数化结合矢量归一化处理来消除,或使用二阶导数化。

图3 分别为对同一批次片剂在北京和上海两

台仪器的两种仪器条件(不同的分辨率、样品累计扫描次数和增益)下测得的光谱在三种不同预处理条件下的结果,可以看出,矢量归一化处理后基线的旋转没有消除,一阶导数化结合矢量归一化基本消除了基线偏移和旋转带来的影响,只是在5000~5600和7500~6900 cm^{-1} 左右的水峰谱段有一些差异,而二阶导数化结合矢量归一化的效果更加显著,使得同一样品在不同仪器上测得光谱具有很好的一致性。但是二阶导数化容易放大噪音和散射光带来的影响,因此平滑点不宜太少,以13或17为宜,也不宜太多,否则会导致平滑掉一些光谱信息。



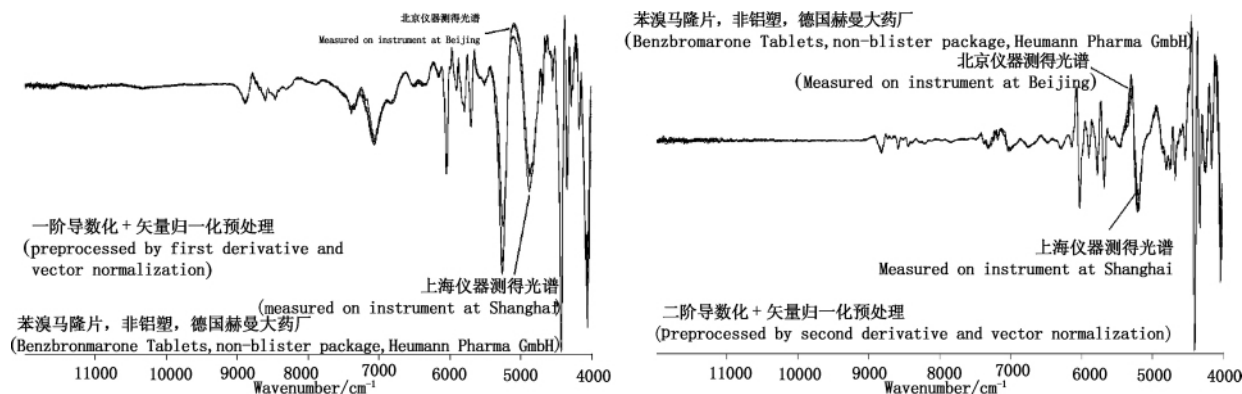


图3 不同预处理方法对不同仪器测得光谱的处理效果

Fig 3 Effects of different preprocessing methods on the spectra measured on different instruments

图4是在同一近红外光谱仪上采用不同条件对某一批次药品测得的光谱图。可见,不同增益测得的光谱基本相似,尤其是B和C增益得到的光谱几乎完全一致。但是Ref和A增益测得的光

谱中 9000 cm^{-1} 以上、 4500 cm^{-1} 以下很容易受到噪音等干扰因素的影响,而且 9000 cm^{-1} 以上也基本上没有样品吸收信号,因此不适合一致性检验方法。

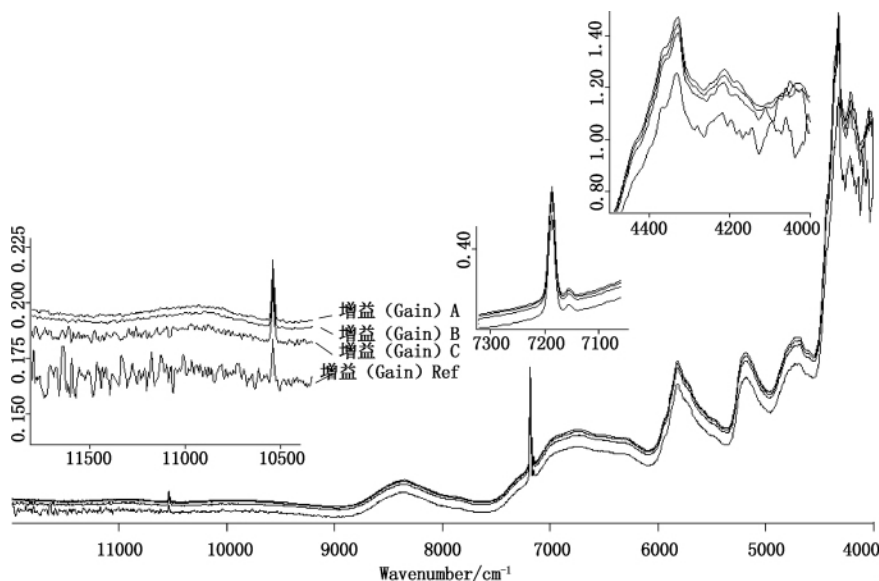


图4 同一仪器不同增益条件下测得光谱的差异

Fig 4 Spectra of one sample in different preamplification gains on one instrument

同时也注意到,在 $5000\sim 5600\text{ cm}^{-1}$ 和 $6900\sim 7500\text{ cm}^{-1}$ 这两个与水分子吸收有关的谱段,尤其是在 $5000\sim 5600$ 波数,某些制剂的光谱容易受到环境中水分含量不同带来的影响,在不同仪器和条件下测得的光谱会有所差异。其实,粉针剂的光谱是比较容易在这两个谱段出现问题的,即使同一批次粉针剂,在不同的时间测定多次,在这两个谱段也会有所不同,而其余的谱段内基本是非常相似的,这就说明空气中的水分变化对这两个谱段的影响是比较大的,因此不适合参与建立一致性检验模型。

综上所述,要建立一致性检验模型,可选择一阶

或二阶导数化+矢量归一化预处理方法,平滑点数13或17个,谱段为 $9000\sim 7500\text{ cm}^{-1}$ 、 $6900\sim 5600\text{ cm}^{-1}$ 和 $5000\sim 4250\text{ cm}^{-1}$,这三个谱段反映了CH和NH的合频和倍频吸收,信息量比较丰富;根据计算结果,在分辨率为 4 cm^{-1} 下共888个波长点,如果参考光谱数量为30张,则CI限度应设置为7。

以琥乙红霉素非铝塑片剂为例,选取西安利君制药有限公司2008年11月份生产的利君沙牌琥乙红霉素片某一批次,采集30张光谱作为参考光谱,同时设置4个检验光谱集,分别为该品牌药2008年5月至2009年4月期间生产的40批次药品的平均光谱40张、参考光谱所用样品在19台光谱仪上由

不同人员测定的 57 张光谱、22 个其他厂家生产的琥乙红霉素片剂非铝塑光谱 22 张、其他品种的大环内酯类药品非铝塑光谱 19 张, 一共 138 张检验光谱。采用矢量归一化预处理、全谱段建模(图 5a)与采用一阶导数化 + 矢量归一化、上述谱段建模(图 5b)两种方式(CI 限度均为 7), 来比较效果。由于

矢量归一化无法消除基线的旋转带来的一定的影响, 从而导致参考光谱自身的一致性稍差, 进而使得标准偏差增大、光谱差异的容许度增大, 所以造成了对不同厂家产品和不同品种药品的许多误判, 而采用本文建议的参数, 能够很好的区分该品牌药与其他厂家产品以及其他同系物品种的药品。

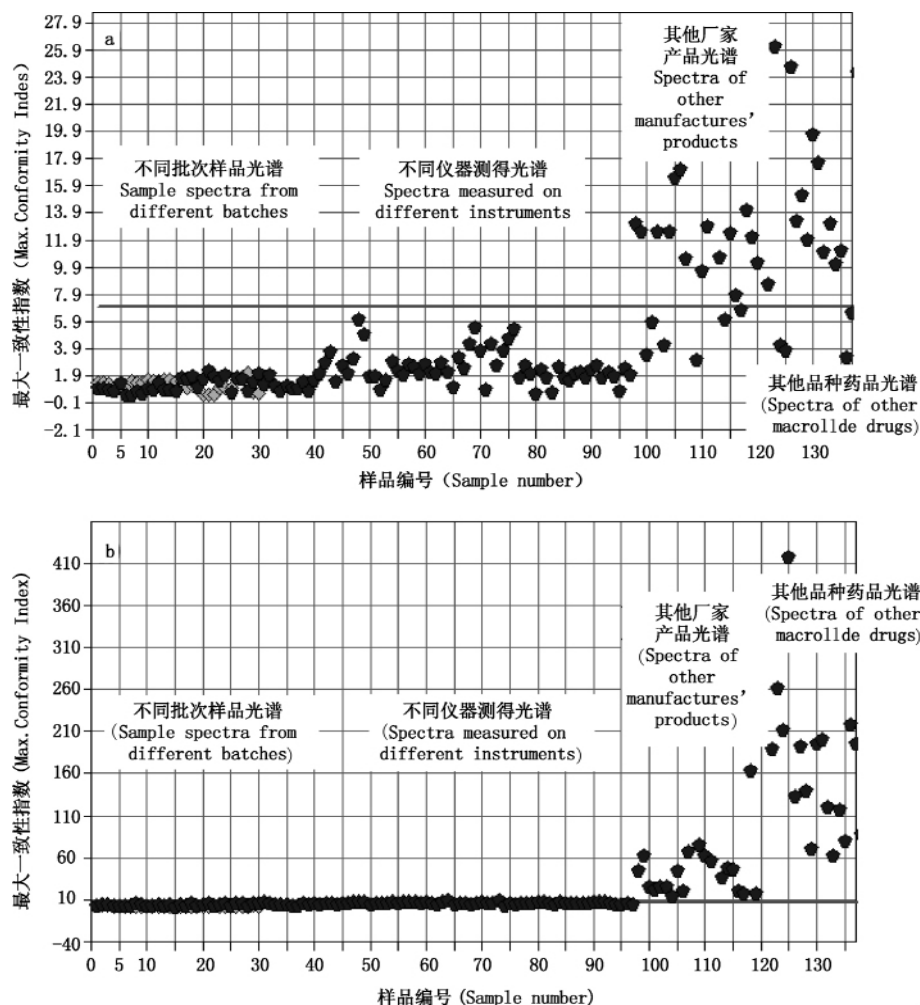


图5 采用两种方式建立一致性检验模型的效果比较

Fig 5 Comparison of the effects by two ways to develop conformity test methods

5 一致性检验中其他限度控制方法介绍

一致性检验除了可以使用 CI 限度来控制、对比待分析光谱与建模参考光谱的一致性之外, 还有两种限度控制方法, 分别为 Sum1 和 Sum2 值。Sum1 值是待分析光谱各个波长点处所有 CI 值超出 CI 限度的部分之和除以所选谱段内的波长点个数得到的数值, 而 Sum2 值与 Sum1 值计算公式的分子相同, 只是分母为所选谱段内超过 CI 限度的波长点的个数, 然后可选择 Sum1 值或 Sum2 值来设定其限度。Sum1 和 Sum2 值能够在整体上容许个别的若干波长点出现异常的超出 CI 限度的情况, 适合于参考光谱采集量较少的情况, 但是因为二者的限度确定缺

乏理论依据, 而且经实际考察, 对不同品种制剂所应设置的 Sum1 或 Sum2 值限度也不相同, 因此在实际中应用很少。

一致性检验不仅具有定性鉴别的作用, 还具有一定的定量判别的效果, 例如“注射用头孢呋辛钠 - 编号 22 - 广州天心药业”该批次的药品经过温度 80 °C、湿度 50% 的条件下加速, 并在不同时间点取出, 测定近红外光谱和头孢呋辛含量值, 并在一致性检验中以未加速的样品光谱作为参考光谱(图 6 中两条横线内的 6 张光谱), 将不同加速时间取出的光谱作为检验光谱, 谱段为 10000 ~ 4200 cm^{-1} , 预处理方法为矢量归一化, 各参考光谱和检验光谱

的最大 CI 值分布如图 6。

在使用 Sum1 值和 Sum2 值进行计算、分析时，

由于 Sum1 值的分母太大，所以 Sum1 值太小，而

Sum2 值的分布情况如图 7。

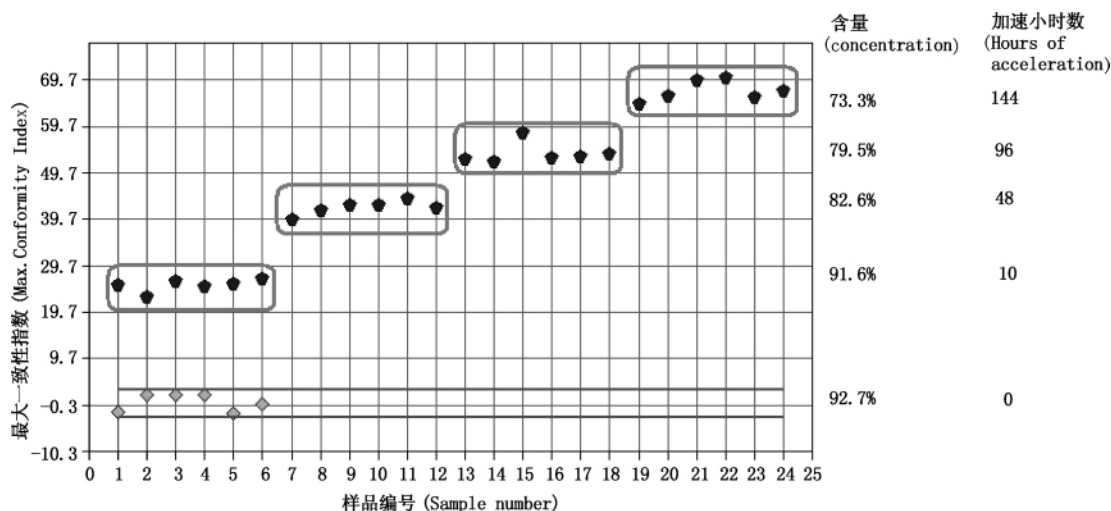


图 6 不同加速时间所得样品光谱的最大 CI 值分布图

Fig 6 Distribution of maximum CI of the sample spectra under different acceleration hours

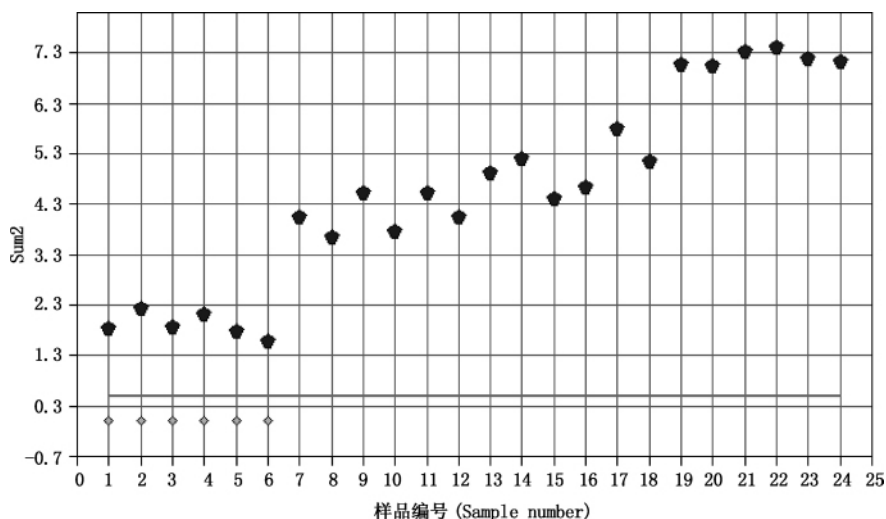


图 7 不同加速时间所得样品光谱的 Sum2 值分布图

Fig 7 Distribution of Sum2 values of the sample spectra under different acceleration hours

可以看出，一致性检验中的最大 CI 值、Sum2 值能够在一定程度上反映样品的化学组成的含量变化情况，但是这种反映并不是很好的线性关系。

6 总结

近红外光谱一致性检验方法可以方便、快捷的判断药品的质量，该法需要事先对已知样品测定一定数量的参考光谱，来获得一个光谱吸光度的容许范围，以此来检查待测样品与已知样品的质量是否具有 consistency。除了 CI 限度控制方法外，还有 Sum1 和 Sum2 两种方法，它们的数值变化能够在一定程度上反映样品的化学组成的含量变化情况。

参考文献

- 1 Plugge W, Van Der Vlies C. Near - infrared spectroscopy as an alternative to assess compliance of ampicillin trihydrate with compendial specifications. *J Pharm Biomed Anal* 1993 11(6): 435
- 2 Ritchie GE, Mark H, Ciurczak EW. Evaluation of the conformity index and the Mahalanobis distance as a tool for process analysis: a technical note. *AAPS Pharm Sci Tech* 2003 4(2): E24
- 3 Gemperline PJ, Boyer NR. Classification of near - infrared spectra using wavelength distances: comparison to the mahalanobis distance and residual variance methods. *Anal Chem* 1995 67(1): 160

(本文于 2010 年 5 月 24 日收到)