

# 辛伐他汀片近红外漫反射光谱定量分析模型的建立\*

陈贵斌<sup>1</sup>, 陶巧凤<sup>1</sup>, 洪利娅<sup>1</sup>, 胡昌勤<sup>2</sup>

(1. 浙江省食品药品检验所, 杭州 310004; 2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

**摘要** 目的: 采用近红外漫反射光谱分析技术和化学计量学的方法对小规格的辛伐他汀片进行快速无损的含量测定和含量均匀度检查。方法: 采集 8 个浓度梯度的各 10 批自制样品及来源于 7 个不同厂家 30 批次 4 个规格的市售样品的近红外漫反射光谱, 并通过聚类分析方法确定校正集和验证集, 光谱预处理方法为二阶导数, 谱段范围为 11995.7~5446.3  $\text{cm}^{-1}$ , 回归方法采用偏最小二乘法。结果: 92 个校正集样品经交叉验证建立校正模型, 浓度范围为 2.2%~16.9%, 交叉验证均方根误差 (RMSECV) 为 0.110, 确定系数为 0.9993, 12 个验证集市售样品的预测均方根误差 (RMSEP) 为 0.137, 预测值与真实值的相关系数为 0.9981。方法精密度 RSD 为 1.09% ( $n=6$ ), 方法稳定性 RSD 为 0.62% ( $n=5$ )。对 8 个厂家 10 批 4 个规格市售样品含量测定, 相对偏差均小于 2%。对 2 个厂家的 2 批样品的含量均匀度检查结果与 HPLC 法结果无明显差异。结论: 建立的定量模型能对不同企业生产的小规格的辛伐他汀片作出准确、快速、无损的定量分析, 可用于药品的现场快速分析和某一厂家样品的含量均匀度分析。

**关键词:** 近红外漫反射光谱; 定量分析; 含量均匀度检查; 辛伐他汀

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0989-05

## Development of quantitative models for determination of simvastatin tablets using near infrared diffuse reflectance spectroscopy\*

CHEN Gui-bin<sup>1</sup>, TAO Qiao-feng<sup>1</sup>, HONG Li-Ya<sup>1</sup>, HU Chang-qin<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control Hangzhou 310004, China)

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

**Abstract Objective** To develop a near infrared diffuse reflectance spectroscopy method for rapid determination of simvastatin tablets. **Methods** Using cluster analysis method, diffuse reflectance spectra of 10 samples per concentration of 8 concentrations of simulated samples and 30 samples of four specifications from 7 manufacturers were divided into calibration and validation set. The second derivative was selected as the preprocessing method and 11995.7-5446.3  $\text{cm}^{-1}$  was selected as the frequency range. The quantitative models were established by partial least squares (PLS) algorithm. **Results** 92 batches of simvastatin tablets samples concentration ranges of 2.2% - 16.9%, were used as calibration set. The root mean square errors of cross validation RMSECV was 0.110 and determination coefficients  $R^2$  was 0.9993. The root mean square error of prediction RMSEP of 12 batches samples in validation set was 0.137. The correlation value between prediction and true of 12 true samples was 0.9981. All the relative deviations of the true value and NIR prediction of 10 true samples from 8 manufacturers were not more than 2.0%. And the results of content uniformity test of 2 samples from 2 manufacturers were accordant with HPLC results. **Conclusion** The established NIR methods can be applied not only to accurately and fast assay the various specifications' simvastatin tablets of different manufacturers, but also can be used to test the content uniformity of a manufacturer's sample in process control.

**Key words** near-infrared diffuse reflectance spectroscopy; quantitative analysis; content uniformity; simvastatin

近红外 (near infrared, NIR) 光谱是指介于可见光与中红外光之间, 波长范围为 780~2500 nm

\* 浙江省分析测试项目 (2007F70006)

第一作者 Tel: (0571) 86459458 Fax: (0571) 86459427 E-mail: cgh0579@126.com

(12820~4000  $\text{cm}^{-1}$ )的分子光谱,其主要谱峰反映分子中 C-H、N-H、O-H 等含氢基团的倍频和合频吸收。随着上世纪 50 年代的计算机和化学计量学的发展,利用 NIR 光谱分析技术定量和定性分析与这些基团有直接或间接关系的有效成分成为可能。目前近红外分析技术已广泛应用于石油化工、烟草、食品等领域的定量和定性分析以及过程控制<sup>[1]</sup>。由于 NIR 分析技术具有分析速度快、不需损耗样品和化学试剂、易于实现现场分析等特点,近年来在药物分析领域应用已日趋广泛<sup>[2~4]</sup>,但分析对象多为主含量高或规格较大的药物样品。本文以不同企业生产的辛伐他汀片为分析对象,进行通用性定量模型的研究建立。

辛伐他汀为 3-羟基-3-甲基-戊二酰-辅酶 A (HMG-CoA)还原酶的抑制剂,抑制内源性胆固醇的合成,为降血脂药。在治疗高脂血症和冠心病方面具有很好的疗效,因此辛伐他汀片是常用心血管药物,由进口或国内多家企业生产,该药品规格主要有 5、10、20、40 mg 等。在检验过程中,小规格药物均需要测定含量和含量均匀度,预处理麻烦,分析耗时长。本文采用近红外漫反射光谱法 (near infrared diffuse reflectance spectroscopy NIRDRS),对辛伐他汀片定量分析模型的可行性进行探讨,为今后类似样品快速检测予以指导。

## 1 仪器与试剂

MPA 型近红外光谱仪 (德国 Bruker 公司),配有光纤探头测样附件,铟加砷 (InGaAs) 检测器,OPUS 5.0 光谱分析软件。美国 Agilent 1100 系列液相色谱仪,瑞士 Satorious BP211 电子分析天平。

辛伐他汀原料药由浙江瑞新药业股份有限公司提供,各辅料由浙江省医学科学院药物研究所提供。不同含量梯度的辛伐他汀片为模拟市售样品的自制品。30 批市售样品分别来自 7 家制药企业,由浙江省食品药品检验所提供,包括 5、10、20、40 mg 4 个规格。

辛伐他汀对照品购自中国药品生物制品检定所,乙腈为色谱级,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

**2.1 自制样品的制备** 参考已市售药品的处方组成 (各厂家的主要辅料大体为微晶纤维素、羧甲基淀粉、乳糖、柠檬酸、硬脂酸镁等,仅配比有所区别),拟定了自制样品的处方。再按处方中配比称取各辅料,混合均匀,用电子分析天平准确称取一定

量的辅料混合粉 8 份,分别加入辛伐他汀原料药 (相当于 20 mg 规格辛伐他汀片原料药用量的 25%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%),混匀,制粒,用压片机压制得到 8 个含量梯度的辛伐他汀片,每个浓度梯度点压制 10 批,每批 100 片,弃去前 20 片和最后 20 片,取当中 60 片备用。

**2.2 NIR 光谱测定** 每批样品随机抽取 10 片,用仪器的漫反射光纤探头压住药片,每片正反面各测 1 次,取平均光谱做为样品光谱。光谱采集条件:以仪器内置背景为参比,扫描范围为 12000~4000  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率为 8  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数为 64 次。

**2.3 辛伐他汀片含量及含量均匀度测定** 取上述“2.2”项所用的样品,以国家药品标准收载的 HPLC 方法<sup>[4]</sup>,用电子天平分别称取片重,然后研细,高效液相色谱法测定每批或各片含量,并计算得到每批或每片的重量含量 (% ,  $\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ),作为与 NIR 光谱对应的基础数据。

**2.4 校正方法** 用 Bruker 公司 Quant 2 软件分析,为了确保校正集的代表性,首先将样品经过聚类分析,挑选具有代表性和均匀性的 80 批自制样品和 12 批市售样品作为内部验证的校正集,7 家生产厂家 18 批市售样品作为外部验证的验证集,通过分析比较不同预处理方法和不同谱段,采用偏最小二乘法 (PLS) 计算,选择建立辛伐他汀片定量分析模型。

## 3 实验结果

### 3.1 近红外模型的建立

#### 3.1.1 校正集样品的选择和模型建立

辛伐他汀片、原料药和辅料的近红外漫反射光谱图如图 1 所示。由于辛伐他汀片规格小、辅料量大,其光谱图与原料药相差显著,与辅料相似,直接观察选择谱段困难,需借助计算机软件进行计算。而借助计算机软件进行回归时,校正集和预测集的选择直接关系到模型的稳定性<sup>[3]</sup>。为了确保校正集和预测集样本的代表性,首先将样品采用全谱段、矢量归一方法进行聚类分析,分成 10 类,结果见图 2 所示。分别从中挑取具有代表性的 18 批市售样品作为外部验证的验证集,其余样品作为校正集。

选择全谱段 (12000~4000  $\text{cm}^{-1}$ ),分别采用仪器 OPUS 软件包中定量软件中的 11 种预处理方法,将 92 个校正集样品光谱数据进行偏最小二乘法回归,建立校正模型,再经过外部验证的试验结果按均方根误差 (RMSEP) 由小到大排列如表 1 所示。

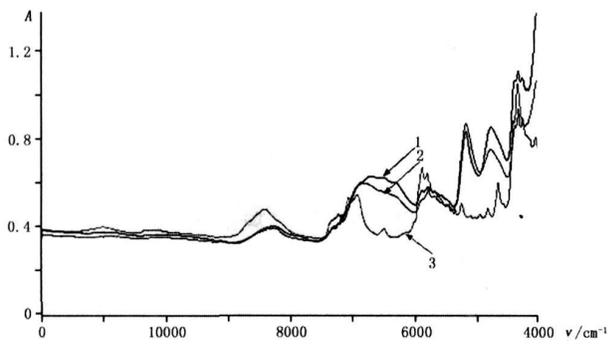


图1 辛伐他汀片、原料和辅料的近红外漫反射光谱图  
Fig 1 NIRDRS of simvastatin tablets, raw material and excipients

1. 辛伐他汀片(simvastatin tablets) 2. 辅料(excipients)  
3. 原料(raw material)

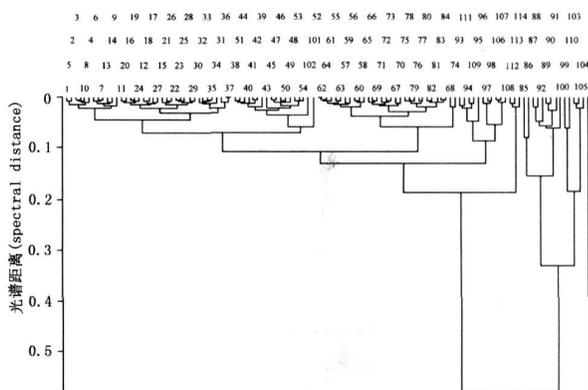


图2 辛伐他汀片近红外图谱的聚类分析图  
Fig 2 Cluster analysis of simvastatin tablets' NIRDRS

表 1 辛伐他汀片的校正模型  
Tab 1 Selection of calibration models

校正模型 (calibration model)	频率范围段 (regions of frequency) / $\text{cm}^{-1}$	预处理方法 (preprocessing)	主成分维数 (rank)	校正集 均方根误差 (RMSECV)	校正集 确定系数 ( $R^2$ )	验证集 均方根误差 (RMSEP)	验证集 相关系数 ( $R^2$ )
1	11995.7~ 5446.3	二阶导数 (second derivative)	8	0.110	99.93	0.137	99.81
2	11995.7~ 4597.7	二阶导数 (second derivative)	9	0.113	99.93	0.143	99.75
3	7502.2~ 5446.3	二阶导数 (second derivative)	9	0.161	99.86	0.153	99.71
4	11995.7~ 7498.3 6105~ 5446.3	二阶导数 (second derivative)	8	0.129	99.91	0.154	99.71
5	6105~ 5446.3	二阶导数 (second derivative)	8	0.175	99.83	0.158	99.69
6	11995.7~ 7498.3 6105~ 4597.7	二阶导数 (second derivative)	8	0.125	99.91	0.179	99.60

由表 1 可用看出, 各模型优化的预处理方法主要是二阶导数, 说明二阶导数对消除辛伐他汀片的基线漂移具有良好效果。而各模型的谱区范围有所差异, 主要集中在  $11995.7 \sim 4597.7 \text{ cm}^{-1}$ 。一个稳健模型校正集和验证集的均方根误差不仅应当最小, 而且应当接近, 因此在模型选择时, 必须综合考虑校正集和验证集的各个参数。考虑到模型 1 校正集和验证集的均方根误差均为最小, 确定系数  $R^2$  均优于其他模型, 且主因子数 Rank 值适中, 不会造成过拟合现象, 故选择模型 1 作为辛伐他汀片的定量模型, 其内部验证的校正曲线如图 3 所示。考察不同平滑点数对模型的影响, 结果见表 2。表 2 结果表明, 平滑点数并非越高越好, 越高反而可能消除部分样品的近红外信息。故模型选择最佳平滑点数为 9。

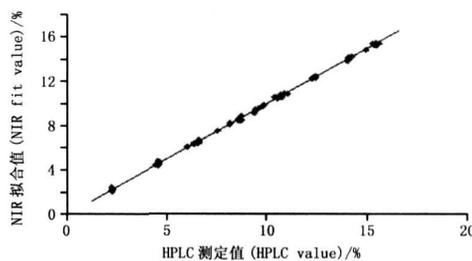


图 3 校正集的拟合曲线  
Fig 3 Calibration curve of calibration

表 2 平滑点数对模型的 RMSECV 和 RMSEP 的影响  
Tab 2 Effect of smooth point on RMSECV and RMSEP

序号 (No.)	平滑点数 (smoothing point)	内部验证 均方根误差 (RMSECV)	校正集 确定系数 ( $R^2$ )	验证集 均方根误差 (RMSEP)	验证集 相关系数 ( $R^2$ )
1	9	0.110	99.93	0.137	99.64
2	13	0.207	99.76	0.221	99.40
3	17	0.166	99.84	0.294	98.93
4	21	0.133	99.90	0.312	98.80

3.1.2 外部验证结果 用建立的模型对验证集样品的辛伐他汀片的含量进行预测, 结果见图 4 和表 3

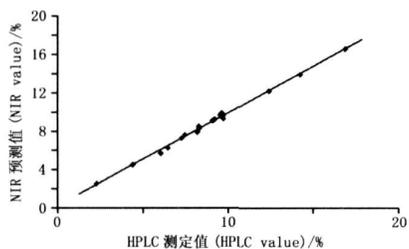


图 4 辛伐他汀片 HPLC 测定结果与 NIR 外部验证测试结果相关性图  
Fig 4 HPLC ( abscissa ) and NIR prediction ( ordinate ) relativity graph of the contents of simvastatin tablets

表 3 预测集中辛伐他汀的预测结果  
Tab 3 The prediction results of validation

序号 (No)	HPLC 测定值 (HPLC value) %, mg · mg <sup>-1</sup>	NIR 预测值 (NIR prediction) %, mg · mg <sup>-1</sup>	绝对误差 (difference)	相对误差 (relative error) %
1	12.410	12.320	0.091	0.73
2	14.242	13.950	0.288	2.02
3	9.600	9.768	-0.168	-1.75
4	9.696	9.758	-0.0623	-0.64
5	9.712	9.543	0.169	1.74
6	9.566	9.461	0.105	1.10
7	8.248	8.190	0.0581	0.70
8	4.375	4.480	-0.105	-2.40
9	6.008	5.972	0.0355	0.59
10	9.531	9.555	-0.0233	-0.24
11	9.084	9.132	-0.0487	-0.54
12	16.873	16.550	0.321	1.90
13	7.456	7.621	-0.164	-2.20
14	7.244	7.210	0.0345	0.48
15	6.401	6.332	0.0689	1.08
16	9.220	9.285	-0.0653	-0.71
17	8.255	8.386	-0.131	-1.59
18	8.162	8.102	0.0599	0.73

3.2 模型的验证

3.2.1 专属性 用样品的马氏距离与限定值进行比较检验异常样品<sup>[6]</sup>:

$$\text{限定值} = \text{Factor} \times \text{Rank } M$$

式中, Rank 为阶数即主成分维数; M 为建模样品数, Factor 为因子。本实验因子数选择 2。利用建立模型测定与辛伐他汀结构相似的洛伐他汀片, 其马氏距离均大于限定值(限定值为 0.17)。说明所建立的辛伐他汀片定量模型具有较好的专属性。

3.2.2 线性关系考察 近红外方法为二级分析方

法, 其线性主要考察预测结果与一级方法之间的关系。在 2.22% ~ 16.87% 的浓度范围内, 以 NIR 预测值 (Y) 和 HPLC 测定值 (X) 求得线性方程为:

$$Y = 0.9649X + 0.3004 \quad r = 0.9983$$

3.2.3 精密度试验 取其中 1 个厂家 1 个批次样品重复测量 6 次其近红外光谱, 分别用建立辛伐他汀片定量分析模型计算得到辛伐他汀的含量, 考察方法的精密度, 结果 RSD 为 1.1%。

3.2.4 准确性 校正基样品经内部交叉验证, 交叉验证均方差 (RMSEV) 为 0.110%, 与 HPLC 测定结果相比, NIR 测定结果平均相对偏差为 1.35%, 最大相对误差为 3.98%。外部验证均方差为 0.137%, 与 HPLC 测定结果相比, NIR 测定结果平均相对偏差为 1.51%, 最大相对偏差为 2.47%。将验证集样品 NIR 结果与参考方法 (HPLC 法) 在 95% 置信区间内进行配对 t 检验, NIR 检测与参考方法结果无显著差异。

3.2.5 稳定性实验 取其中 1 个厂家的 1 个批次实际样品, 5 d 内每天测定光谱, 用模型分析其含量, 考察其稳定性。结果 RSD 为 0.62%。说明模型具有良好稳定性。

3.3 实际样品含量分析 用建立的辛伐他汀片近红外模型分析未参与建模的 8 家生产企业不同规格的样品, 并将结果与 HPLC 测量值比较, 结果见表 4。将 NIR 测定的结果与 HPLC 方法测定的结果在 95% 可信区间内进行配对 t 检验, NIR 方法与 HPLC 测定方法间无显著差异。

表 4 模型对不同厂家、不同规格样品分析结果  
Tab 4 Assay of samples of various specifications from different manufacturers

厂家 (manufacturer)	批号 (batch No)	规格 (specification) /mg	HPLC 法 (HPLC) %	近红外法 (NIR) %	偏差 (deviation) %	相对偏差 (relative deviation) %
A	N1068	40	9.62	9.66	-0.04	-0.42
B	0805201	10	8.54	8.55	-0.01	-0.12
B	0611231	10	8.60	8.63	-0.03	-0.35
C	061201	5	4.82	4.81	0.01	0.21
C	080103	10	9.13	8.98	0.15	1.64
D	070601	20	9.62	9.48	0.14	1.46
E	20080531	10	10.77	10.59	0.18	1.67
F	20070201	10	7.26	7.23	0.03	0.41
G	20080102	20	9.20	9.14	0.06	0.65
H	07080201	10	4.17	4.25	-0.08	-1.92

3.4 实际样品的含量均匀性分析 用建立的辛伐

他汀片近红外模型分析 2 个厂家各 1 批辛伐他汀片含量均匀性, 并按中国药典 2005 年版附录 X E 计算, 结果见表 5。从表 5 可以看出, 2 批市售样品的含量均匀度均符合规定, 采用 HPLC 法和用近红外模型预测市售样品的含量均匀性具有一致性的结果。

表 5 模型对不同厂家样品的含量均匀性分析结果 (%)

Tab 5 Test of content uniformity of different manufacturers

样品编号 (No.)	C(061201)		B(0805201)	
	HPLC	NR	HPLC	NR
1	98.15	98.19	105.93	106.59
2	96.71	97.02	102.34	102.22
3	97.31	97.66	101.48	100.98
4	95.02	95.29	102.52	102.27
5	95.60	95.36	102.94	103.74
6	96.30	96.23	105.27	105.43
7	98.27	97.62	98.41	97.76
8	98.24	97.58	102.77	103.53
9	94.78	94.93	105.04	105.28
10	99.27	99.45	102.60	102.11
平均含量 (average)	96.97	96.93	102.93	102.99
S	1.53	1.45	2.16	2.54
A+1.80S	4.56	4.52	5.09	5.53

## 4 讨论

4.1 不同厂家的样品, 生产工艺、辅料种类和多少、药品规格及片子的形状等方面均有所不同, 造成其近红外光谱相差显著, 因此建立能同时测定不同厂家不同规格样品的近红外模型具有一定挑战性。本文通过选择辛伐他汀的特征谱段以及预处理方法, 消除不同厂家生产工艺和辅料等方面的差异, 建立了能准确测定各个厂家辛伐他汀片含量的通用性定量分析模型, 不仅能快速监测市场上不同厂家的辛伐他汀片含量, 节约成本, 保证抽样的针对有效性; 也能同时测定某一厂家样品的含量均匀度, 减少预处理和实验分析的时间。

4.2 近红外光谱的特点是穿透能力相对比较强, 但在灵敏度方面存在一定的局限性<sup>[6]</sup>。因此对小规格的药品, 尤其是主药在药片所占重量百分比比较

少的药品, 用近红外定量存在一定困难。本文所建立的模型能准确测定辛伐他汀片主药占药片重量百分比范围约为 2.2% ~ 16.8%, 说明近红外漫反射对固体样品的定量限可达 2%, 而针对单一厂家的样品所建立的近红外模型, 由于原辅料相同, 定量可能更精确。

4.3 在建立近红外定量模型时, 校正集和预测集的选择直接关系到模型的稳定性<sup>[3]</sup>。为了确保校正集和预测集样本的代表性, 本文首先将样品经过聚类分析, 分别挑选具有代表性的 80 批自制样品和 12 批市售样品作为内部验证的校正集, 18 批市售样品作为外部验证的预测集, 所建立辛伐他汀片的定量模型不仅校正集和预测集的均方根误差都较小, 而且两者均方根相似, 确保模型的稳定性。

## 参考文献

- 1 LU Wan-zhen(陆婉珍), YUAN Hong-fu(袁洪福), XU Guang-tong(徐广通), et al. *Modern Near Infrared Spectroscopy Analysis Technology* (现代近红外光谱分析技术). Beijing(北京): China Petrochemical Press(中国石化出版社), 2001. 19
- 2 WANG Na(王娜), YANG Xin(杨欣), ZUO Yan(佐燕), et al. Determination of erythromycin A in erythromycin enteric-coated tablets by near infrared diffuse reflectance spectrophotometry(近红外漫反射光谱法测定红霉素肠溶片中红霉素 A 的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27(3): 335
- 3 Pang HH, Feng Yan, Zhang XB et al. Construction of universal quantitative models for the determination of cefoperazone sodium/sulbactam sodium for injection from different manufacturers using near-infrared reflectance spectroscopy. *J Chin Pharm Sci* 2008, 17: 22
- 4 LIU Xu-ping(刘绪平), FENG Yan-chun(冯艳春), HU Chang-qin(胡昌勤), et al. Construction of universal quantitative models for determination of cefradine capsules(头孢拉定胶囊通用性定量分析模型的建立). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28(5): 722
- 5 Drug Specification Promulgated by the State Drug Administration, P.R. China(国家药品标准). WS1-(X-066)-2003Z
- 6 LUO Su-qin(罗苏秦), ZHANG Shi-ying(张世英). Near-infrared spectroscopy and its application(近红外光谱仪器之分析技术及其应用). *New Knowledge Sci Instrum* (科仪新知), 1999, 25(5): 13

(本文于 2009 年 2 月 3 日收到)