

注射用单磷酸阿糖腺苷近红外快速定量方法的建立

王小亮, 张秉华, 苏珂, 马泉荔

(陕西省食品药品检验所, 西安 710065)

摘要 目的: 采用近红外光谱分析技术结合化学计量学建立注射用单磷酸阿糖腺苷快速定量分析方法。**方法:** 以 17 个厂家生产的 133 批注射用单磷酸阿糖腺苷为分析对象, 其中 68 批作为校正集, 含量范围为 46.79%~97.25%; 65 批作为验证集, 含量范围为 47.89%~94.49%。首先采集样品的近红外漫反射光谱, 同时按法定标准测定样品含量, 最后采用偏最小二乘法建立定量模型。**结果:** 采用外部验证建立模型。建模谱段为 $7\,502.3\sim6\,098.2\text{ cm}^{-1}$ 和 $5\,450.2\sim4\,597.8\text{ cm}^{-1}$; 预处理方法为一阶导数及多元散射校正; 维数为 7; 内部交叉验证决定系数为 96.82%, 均方根误差为 2.64%; 外部验证决定系数为 97.54%; 均方根误差为 2.29%。**结论:** 所建立的定量模型可对注射用单磷酸阿糖腺苷进行准确、快速定量分析, 绿色, 环保, 可用于药品的快速分析和检验。

关键词: 单磷酸阿糖腺苷; 嘌呤核苷类化合物; 磷酸化产物; 近红外光谱; 偏最小二乘法; 快速分析; 定量模型

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 02-0352-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.02.25

Rapid quantification for “vidarabine monophosphate for injection” using near infrared diffuse reflection spectroscopy

WANG Xiao-liang, ZHANG Bing-hua, SU Ke, MA Quan-li

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China)

Abstract Objective: To develop a quantitative method for quick determination of vidarabine monophosphate for injection by near infrared diffuse reflection spectroscopy technology and chemometrics. **Methods:** A total of 135 batches of vidarabine monophosphate for injection from 17 different manufactures were enrolled for analysis, among which, 68 batches were used as the calibration set with the active pharmaceutical ingredient (API) from 46.79%–97.25%, and 65 batches were used as the validation set with the API from 47.89%–94.49%. Firstly, the near infrared diffuse reflection spectrum of the samples were collected. Secondly, the API contents by official method were determined. Finally, the model with the partial least square (PLS) algorithm available in the Quant 2 was developed. **Results:** Our model was established based on test set validation. The spectra ranges were $7\,502.3\sim6\,098.2\text{ cm}^{-1}$ & $5\,450.2\sim4\,597.8\text{ cm}^{-1}$; the pretreatment method was first derivative & multiplicative scattering correction; the rank was 7. In the cross validation, the values of R_2 and RMSECV were 96.82% and 2.64%, respectively. In the test

set validation, the values of R^2 and RMSEP were 97.54% and 2.29%, respectively. **Conclusion:** The quantitative model built in this study can analyze the vidarabine monophosphate for injection accurately, quickly, greenly and environmentally-friendly.

Keywords: vidarabine monophosphate; purine nucleoside compounds; phosphorylation products; near infrared spectroscopy; partial least square method; quick analysis; quantitative model

单磷酸阿糖腺苷属于人工合成的嘌呤核苷类化合物,是阿糖腺苷的磷酸化产物,目前已成为继干扰素后销量最大的治疗乙型肝炎用药,比更昔洛韦更受欢迎的治疗疱疹病毒感染及性病用药^[1-2]。其质量标准采用国家食品药品监督管理总局新药转正标准,17个生产厂家各自标准不同,其含量测定的方法主要采用高效液相色谱法及紫外分光光度法。当前,为了更好地控制药品的质量,国家大力倡导发展快检事业,建立现场、快速、简便的药品测定方法势在必行。

近红外漫反射光谱(near infrared diffuse reflectance spectroscopy, NIRDRS)分析技术是集光谱分析技术、计算机技术和化学计量学技术为一体的现代光谱技术,主要用于样品的无损、快速分析。近年来我国开始将NIR光谱分析技术用于食品、药品快速定性、定量、水分控制及在线检测等方面^[3-5],对药品的监管具有特别的意义。

本文采用近红外漫反射光谱法及偏最小二乘法^[6-7]建立多厂家注射用单磷酸阿糖腺苷通用性定量分析模型。模型一经建立,可现场快速测定任一厂家注射用单磷酸阿糖腺苷的含量,几分钟便可完成,不破坏样品,不消耗试剂,操作简单,结果准确。

1 仪器及试剂

1.1 仪器

Matrix-F 近红外光谱仪(德国 Bruker 公司),配有 1.5 m 长固体光纤探头测样附件,铟镓砷(InGaAs)检测器,OPUS5.5 光谱分析软件(德国 Bruker 公司)。

Lambda-35 双光束紫外分光光度计(美国 PE 公司),高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 样品

17个厂家生产的133批注射用单磷酸阿糖腺苷,均为陕西省食品药品检验所抽验样品;单磷酸阿糖腺苷对照品(中国食品药品检定研究院,0350-200001,651 u·mg⁻¹,规格:200 mg)。

2 实验方法

2.1 含量测定

照各企业执行标准,分别采用紫外分光光度法及高效液相色谱法测定。

2.2 NIR 光谱测定

采用漫反射采样方式。以固体光纤探头抵住西林瓶底部,采集样品的 NIR 漫反射光谱。光谱采集条件:光谱扫描范围为 12 000~4 000 cm⁻¹,分辨率 8 cm⁻¹,室温,扫描次数 64 次,每批样品测定 6 瓶作为原始光谱,再求平均光谱作为建模光谱。

2.3 定量模型的建立

采用 OPUS5.5 光谱分析软件附带的定量 2 软件包,运用偏最小二乘法建立初步的定量校正模型。模型预测准确性用交叉验证均方根误差(root mean square errors of cross validation, RMSECV)(式 1)和外部验证均方根误差表示(root mean square errors of prediction, RMSEP)表示(式 2)。

$$\text{RMSECV} = \sum_{i=1}^{N_c} \frac{(\hat{Y}_{\text{CV}i} - Y_i)^2}{N_c} \quad (\text{式 1})$$

式 1 中, $\hat{Y}_{\text{CV}i}$: 交叉验证中样品 i 的预测值; Y_i : 同一样品的真实测定值; N_c : 校正集样品的数量。

$$\text{RMSEP} = \sum_{i=1}^{N_i} \frac{(\hat{Y}_i - Y_i)^2}{N_i} \quad (\text{式 2})$$

式 2 中, $\hat{Y}_i$ 和 Y_i 分别为外部验证中样品 i 的真实测定值及预测值; N_i 验证集样品数量。

3 结果与讨论

3.1 校正集和验证集样品的选择

由于建模样品量较大,采用外部验证法建模。根据软件自带的自动分离原理从收集到的 133 批样品中选择了 68 批作为校正集样本,含量范围为 46.79%~97.25%;剩余 65 批样品作为验证集样本,含量范围为 47.89%~94.49%。

随机选取校正集和验证集样本^[8]时,所建立定量校正模型的 RMSECV 和 RMSEP 值均大于 5%,显

见是由于校正集样本的性质未涵盖所有验证样品的特性。尽管不同厂家、不同批次的注射用单磷酸阿糖腺苷的活性成分相同,但是制剂中辅料的种类、数量以及生产工艺仍存在差异。自动分离^[9]采用“主成分重心法”,即利用样品光谱的主成分特征向量,与样品平均光谱的主成分特征向量之间的距离值,按从小到大排序,并按一定间隔来挑选样品的方法。因此,实验中按照自动分离的原理来合理分配校正集和验证集样本,挑选 68 批有代表性的样品作为训练集建立模型,其余 65 批样品作为验证集。最终,所建模型的 RMSECV 和 RMSEP 分别减小到 2.24% 和 2.69%。

3.2 NIR 校正模型

选取特定建模谱段、适当的光谱预处理方法及合

理的化学计量学方法以突出活性成分的信息,建立稳健的 NIR 校正模型。

3.2.1 建模谱段的选择 样品近红外光谱大于 10 000 cm^{-1} 的末端吸收较弱且容易形成噪音干扰,小于 4 200 cm^{-1} 会因为边缘效应和噪音形成干扰,故选择建模谱段时避开此区域^[10-12],同时,优先选择有活性吸收的谱段。谱段 10 000~7 500 cm^{-1} 图谱较平,此区域吸收活性吸收较小,谱段 7 502.3~6 098.2 cm^{-1} 和 5 450.2~4 597.8 cm^{-1} 主要为 C-H、N-H 基团的倍频振动吸收区,由活性成分吸收引起,结合模型各项参数优劣,最终选取该谱段作为建模谱段,见图 1。

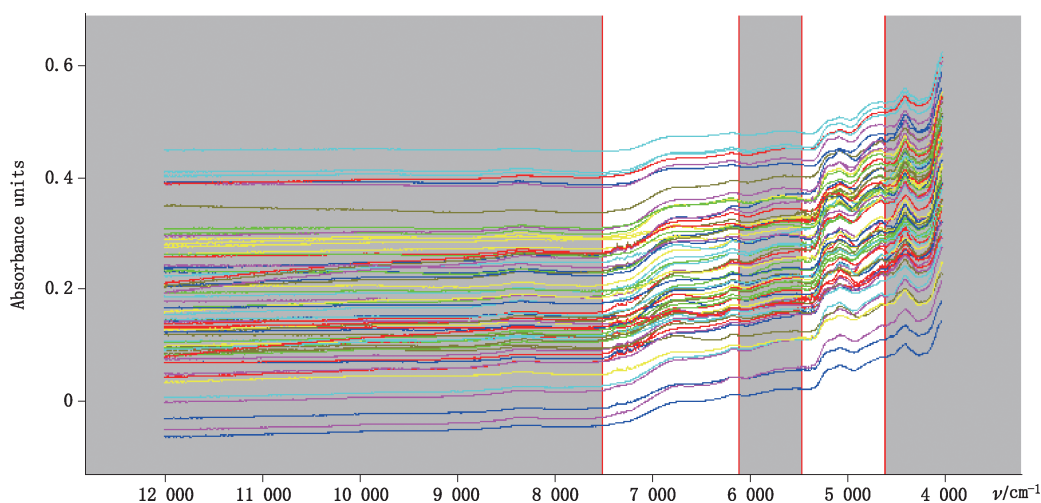


图 1 建模谱段选取图

Fig. 1 Picture of different spectral range

选取不同谱段建立 NIR 模型并根据 RMSECV、 R^2 及 Rank 值做一比较,结合 OPUS 软件自动优化的结果,最终选取 7 502.3~6 098.2 cm^{-1} 和 5 450.2~4 597.8 cm^{-1} 为建模谱段,其 RMSECV 及 RMSEP 最小, R^2 最大且 Rank 值^[13]在 6~10 之间,预测准确性及稳健性均良好。表 1 为选取不同谱段的建模结果,表明模型 1 所选谱段最优。

3.2.2 光谱预处理方法的选择 实验选取一阶导数 (first derivative, FD) 与多元散射校正 (multiple scattering correction, MSC) 相结合的预处理方法,13 点平滑。FD 与 MSC 相结合的预处理方法有效地消除散射影响,增强了与成分含量相关的光谱吸收信息。同时,可改善背景干扰,分辨重叠峰,提高分辨率和灵敏度;平滑处理是消除噪声常用的方法。建模样品的原始 NIR 漫反射光谱如图 2 所示,经 FD、MSC

表 1 选取不同谱段的建模结果

Tab. 1 The calibration models constructed using different spectral ranges

校正模型 (calibration model)	谱段范围 (range of spectra)/ cm^{-1}	RMSEP/ %	R^2 /%	Rank ^b
1	7, 502.3~6, 098.2 cm^{-1} & 5, 450.2~4, 597.8 cm^{-1}	2.29	97.54	7
2	11, 992~6, 098.2 cm^{-1}	4.46	90.65	3
3	11, 992~7, 498.4 cm^{-1} & 5, 450.2~4, 597.8 cm^{-1}	3.99	92.52	4
4	10, 000~7, 498.4 cm^{-1} & 4, 601~4, 247 cm^{-1}	5.02	88.17	5

注 (note): a. 决定系数 (determination coefficient); b. PLS 矢量数⁻¹ (PLS vector number⁻¹)

及平滑预处理后的光谱如图 2 所示,可知光谱经过预处理之后,降低了背景及噪声干扰,提高了信噪比,增强了光谱特征。

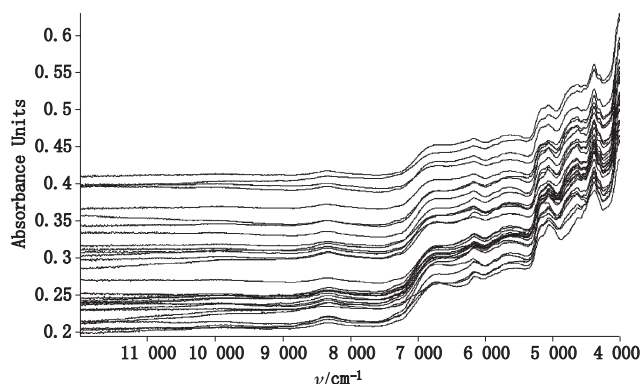


图 2 建模样品原始 NIR 图谱

Fig. 2 Original NIR diffuse reflection spectra of vidarabine monophosphate for injection

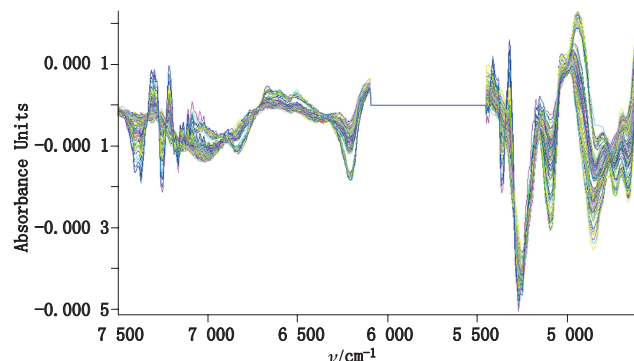


图 3 建模样品经过 FD 和 MSC 预处理后的 NIR 漫反射光谱

Fig. 3 NIR spectra of vidarabine monophosphate for injection pretreated by FD and MSC

3.2.3 最优模型的确定 结合 OPUS 软件自动优化结果、模型稳健性理论及外部验证结果,在多次尝试后,认为最优模型的参数如表 2 所示。其外部验证相关性结果如图 4、图 5 所示。

表 2 最优模型的各项参数

Tab. 2 Characteristics of the final calibration model

参数 (parameters)	注射用单磷酸阿糖胞苷 (vidarabine monophosphate injection)	
	校正集 (calibration set)	验证集 (validation set)
批数 (batches)	68	65
光谱 (spectra)	408 (68 × 6)	390 (65 × 6)
含量范围 (concentration range) / %	47.89~94.49	
谱段范围 (wavelength range) / cm ⁻¹	7 502.3~6 098.2 & 5 450.2~4 597.8	
光谱预处理 (spectral pretreatment)	FD+MSC	
维数 (rank)	7	
R ² / %	97.54	
RMSECV / %	2.29	

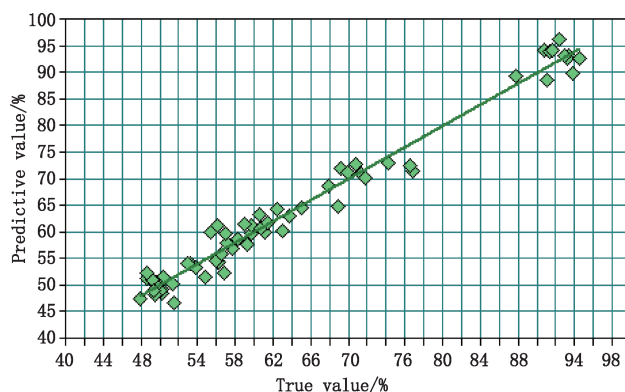


图 4 注射用单磷酸阿糖胞苷 NIR 定量模型外部验证结果相关性图

Fig. 4 The external validation results for vidarabine monophosphate for injection

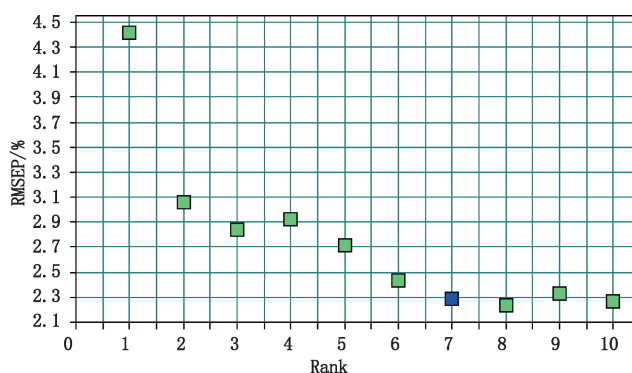


图 5 注射用单磷酸阿糖胞苷 NIR 定量模型 Rank & RMSEP 相关性图

Fig. 5 RMSEP vs. Rank value of vidarabine monophosphate for injection

3.3 模型验证

3.3.1 准确性 选取未参与建模的 5 个不同厂家的 15 批注射用单磷酸阿糖胞苷来测试所建模型的准确性。NIR 预测值与真值比较,平均偏差为 0.36%,最大偏差为 2.73%;平均相对偏差为 0.65%,最大相对偏差为 3.60%。均小于近红外快速检测对于偏差的限度要求 5%。同时,将验证集样品 NIR 结果与 HPLC 方法结果在 95% 可信区间内进行配对 *t* 检验,在 95% 可信区间范围内,*p* 值为 0.642,大于 0.05,表明所建模型 NIR 预测结果与参考方法结果没有显著性差异,结果见表 3。

3.3.2 专属性 所建模型的马氏距离阈值为 0.21,选择 10 批注射用单磷酸阿糖腺苷(T)测试模型的专属性。所有样品测试结果均为通过,其马氏距离均小于 0.21。另取结构相似,同剂型品种注射用三磷酸胞苷二钠(S)测试,3 批样品均未通过,其马氏距离均大于模型阈值,见表 4。表明模型的专属性良好。

表 3 30 批样品模型准确性预测结果

Tab. 3 The predictive results of model accuracy for 30 batches of samples

样品 (samples)	质量分数 (mass fraction) /%		绝对偏差 (deviation) / %	相对偏差 (relative deviation) /%
	HPLC	NIR		
1	49.92	48.90	1.02	2.04
2	59.26	57.73	1.53	2.58
3	50.13	49.04	1.09	2.17
4	50.18	49.07	1.11	2.21
5	59.88	59.88	0.00	0.00
6	93.42	92.99	0.43	0.46
7	93.19	92.60	0.59	0.63
8	61.19	59.94	1.25	2.04
9	56.13	54.36	1.77	3.15
10	50.23	48.42	1.81	3.60
11	71.34	70.91	0.43	0.61
12	50.43	51.38	-0.95	-1.88
13	62.49	64.21	-1.72	-2.75
14	91.13	88.50	2.63	2.89
15	69.2	71.93	-2.73	-3.95
16	53.29	54.10	-0.81	-1.52
17	49.69	50.41	-0.72	-1.45
18	59.65	59.57	0.08	0.13
19	74.31	73.06	1.25	1.68
20	59.72	61.07	-1.35	-2.26
21	47.89	47.32	0.57	1.20
22	53.75	53.22	0.53	0.98
23	87.82	89.32	-1.50	-1.71
24	56.28	54.28	2.00	3.55
25	50.08	48.90	1.18	2.36
26	52.88	54.04	-1.16	-2.19
27	92.94	93.17	-0.23	-0.25
28	49.53	48.05	1.48	2.99
29	60.74	60.77	-0.03	-0.05
30	55.94	54.62	1.32	2.36

表 4 模型专属性预测结果

Tab. 4 The predictive results of model specificity

样品 (samples)	马氏距离 (mahalanobis distance)	限度 (threshold)
T1	0.049	< 0.21
T2	0.054	
T3	0.045	
T4	0.025	
T5	0.084	
T6	0.05	
T7	0.036	
T8	0.024	
T9	0.1	
T10	0.033	
S1	0.64	> 0.21
S2	0.62	
S3	3.3	

3.3.3 线性 近红外为二级方法,一般采用多元回归,通常用待分析物的 NIR 预测结果与参考值之间的关系来评价其线性。线性方程:

$$Y=0.9991X-0.0822 \quad r=0.9880 \quad (3)$$

3.3.4 精密度 本文以重复性和中间精密度来考察该方法的精密度,方法及结果见表 5。

4 结论

所建立的注射用单磷酸阿糖腺苷近红外定量分析模型专属性、预测准确性、稳健性及重复性均良好。实际应用时,仅需测量未知样品光谱,代入模型,数分钟便可得出其含量值,较之传统检测方法具有快速、简便,不消耗试剂,可现场检测等优势。可用于市场、偏远地区的药品打假及质量控制,也可用于生产企业在监测药品质量。

表 5 注射用单磷酸阿糖腺苷模型精密度结果

Tab. 5 Precision of the model for vidarabine monophosphate injection

精密度 (precision)	方法 (procedure)	结果 (results)
重复性 (repeatability)	同一操作者、同一样品、同一天测定 6 次 (six measurements of the same sample by the same operator on the same day) 可信区间 (confidence interval) $\text{avg.} \pm t \times S/\sqrt{n}$	参考值含量为 48.66% (reference assay was 48.66%) 平均值 (average) = 49.1%; 标准偏差 (standard deviation) = 1.45; 置信区间 (confidence interval) = 47.6%~50.6%
中间精密度 (intermediate precision)	2 个操作者,同一样品,3d。置信区间及方差分析 (measurements of the same sample by two different analysts in three days, confidence interval and ANOVA)	参考值含量为 59.65% (reference assay was 59.65%) 平均值 (average) = 58.6; 标准偏差 (standard deviation) = 2.2; 置信区间 (confidence interval) = 57.2%~60.0%; $P>0.05$, 时间和操作者无显著性影响 (the factors of day and operator did not significantly influence)

参考文献

- [1] 余汉华,周莉红. 高效液相色谱法测定单磷酸阿糖腺苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(5): 633
YU HH, ZHOU LH. Assay of vidarabine monophosphate for injection by high performance liquid chromatography[J]. Chin Hosp Pharm J, 2006, 26(5): 633
- [2] 朱国光. 高效液相色谱法测定注射用单磷酸阿糖腺苷有关物质的含量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2015, 15(07): 857
ZHU GG. Determination of the related substances in vidarabine monophosphate for injection by HPLC[J]. Eval Anal Drug-use Hosp China, 2015, 15(7): 857
- [3] 王小亮,傅强,绳金房,等. 近红外光谱分析技术在制药过程分析中的应用进展[J]. 西北药学杂志, 2009, 24(3): 228
WANG XL, FU Q, SHENG JF, et al. Advanced on process analytical technology in pharmaceutics using near infrared spectroscopy technology[J]. Pharm Northwest J, 2009, 24(3): 228
- [4] WANG XL, FU Q, SHENG JF, et al. Construction of a universal quantitative model for ibuprofen sustained-release capsules from different manufactures using near-infrared diffuse reflection[J]. Vibrat Spectrosc, 2010, 53(2): 214
- [5] 王小亮,贾建忠,杨欣,等. 近红外透射光谱法快速测定布洛芬缓释胶囊释放度[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1898
WANG XL, JIA JZ, YANG X, et al. Quick analysis of the releasing rate for ibuprofen sustained-release capsules using near infrared transmission spectroscopy technology[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(10): 1898
- [6] 李朋成,朱军桃,马云栋,等. 基于偏最小二乘法的近红外光谱分析应用[J]. 测绘地理信息, 2015, 40(2): 53
LI PC, ZHU JT, MA YD, et al. Near infrared spectral analysis based on partial least squares[J]. J Geomat, 2015, 40(2): 536
- [7] 张琳,张黎明,李燕,等. 偏最小二乘法在傅里叶变换红外光谱中的应用及进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(10): 1610
ZHANG L, ZHANG LM, LI Y, et al. Application and improvement of partial-least-squares in Fourier transform infrared spectroscopy[J]. Spectrosc Spect Anal, 2005, 25(10): 1610
- [8] 詹雪艳,赵娜,林兆洲,等. 校正集选择方法对于积雪草总苷中积雪草苷 NIR 定量模型的影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(12): 3267
ZHAN XY, ZHAO N, LIN ZZ, et al. Effect of algorithms for calibration set selection on quantitatively determination of asiaticoside content in centella total glucosides by near infrared spectroscopy[J]. Spectrosc Spect Anal, 2014, 34(12): 3267
- [9] 严衍禄. 近红外光谱分析基础与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 177
YAN YL. Basis and Application of Near Infrared Spectroscopy Analysis[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005: 177
- [10] FENG YC, YANG XL, YANG ZH, et al. Monitoring the quality of drugs in circulation using rapid NIR spectral comparison methods[J]. J Chin Pharm Sci, 2011, 20(3): 290
- [11] 柳艳云,胡昌勤. 近红外分析中光谱波长选择方法进展与应用[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 968
LIU YY, HU CQ. Progress and application of spectral wavelength selection methods in NIR analytical technique[J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(5): 968
- [12] 洪明坚,温泉,温志渝. 一种基于蒙特卡罗方法的近红外波长选择算法[J]. 光学学报, 2010, 30(12): 3637
HONG MJ, WEN Q, WEN ZY. New near infrared wavelength selection algorithm based on monte-carlo method[J]. Acta Optica Sin, 2010, 30(12): 3637
- [13] 周熙艳,岳勇,王涛,等. PLS 因子数对定量模型性能稳定性的影响分析[J]. 计算机工程与设计, 2014, 35(5): 1788
ZHOU XY, YUE Y, WANG T, et al. Analysis of PLS component number on impact of stability of quantitative model[J]. Comp Eng Design, 2014, 35(5): 1788

(本文于 2016 年 2 月 16 日收到)