

中药关键质量属性快速评价研究专题

日本药局方“近红外分光光度法”简介

乔延江 薛 忠 徐 冰 戴胜云 吴志生 史新元

(北京中医药大学中药信息工程研究中心,北京,100029)

摘要 本文旨在翻译并介绍《日本药局方》(第 16 版)收录的近红外分光光度法的相关内容,包括近红外分光光度法的原理、方法、设备、以及其在定量和定性分析中的应用等,以期为我国更好的研究和应用近红外光谱法提供有益参考。

关键词 日本药局方近红外分光光度法(NIRS);定性定量分析;光谱仪

Introduction to Near Infrared Spectrometry in Japanese Pharmacopoeia

Qiao Yanjiang, Xue Zhong, Xu Bing, Dai Shengyun, Wu Zhisheng, Shi Xinyuan

(Research Center of Traditional Chinese Medicine Information Engineering, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract This paper was aimed to translate and introduce the principles, methods, equipment, and applications to quantitative and qualitative analysis of near infrared spectrometry(NIRS) in the Japanese Pharmacopoeia the Sixteenth Edition, and to provide a useful reference for better research and application of Near Infrared Spectrometry in our country.

Key Words Japanese Pharmacopoeia; Near infrared spectrometry; Qualitative and quantitative analysis; Spectrophotometer

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.11.001

近红外分光光度法(Near Infrared Spectrometry, NIRS)是一种快速无损的分析方法,已被中国、美国、日本、欧盟等多个国家和地区的药典所收录,广泛应用于制剂分析、化学分析、物理分析和过程分析等领域。为了更好的推广和规范近红外分光光度法,本文对《日本药局方》(第 16 版)中“一般信息”项下收录的近红外分光光度法进行了详细的介绍,以期为我国近红外分光光度法的研究和应用提供有益参考。

2010 版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)二部附录中收录了近红外分光光度法指导原则,但与《日本药局方》(第 16 版)收录的近红外分光光度法相比存在以下几点差异:1)《日本药局方》介绍了近红外光谱仪器的类型、组成及功能,《中国药典》只简单介绍了仪器的组成;2)《日本药局方》中介绍了透射法、漫反射法、透反射法三种模式,而《中国药典》中只介绍了透射法和漫反射法两种模式;3)《日本药局方》中更加详细的介绍了影响近红外光谱的主要因素,《中国药典》只是简单列出了影响因素;4)在近红外定性定量应用方面,《中国药典》介绍了定性定量应用的主要步骤,而《日本药局方》强调了方法的验证。

近红外分光光度法是一种通过分析物质在近红外

范围内对光的吸收产生的数据,来对物质进行定量定性评价的光谱方法。近红外谱区位于可见光区和红外光区之间,典型波长(波数)在 750 和 2500 nm(13333~4000 cm^{-1})之间。近红外光主要产生于来自含氢基团(如 O-H, N-H, C-H 及 S-H)在红外谱区(4000~400 cm^{-1})正常振动的倍频或合频吸收,例如 N-H 键不对称分子伸缩振动发生在波数 3400 cm^{-1} 附近,但是第一激发态的吸收发生在波数 6600 cm^{-1} (波长 1515 nm)附近,将近两倍于 3400 cm^{-1} 。

近红外光谱的吸收强度远低于红外光谱的基频振动。此外,与可见光相比,近红外光的波长更长,使得近红外光能够穿透包括颗粒在内的固体样品几毫米深。因此这种方法经常被用作无破坏的分析,在分析过程中光谱吸收(透射光或反射光)的变化可提供关于样品的物理和化学信息。

传统的光谱分析法,如校正曲线法,作为分析近红外光谱吸收的方法是可行的。但是,一般采用化学计量学方法来分析。化学计量学方法一般涉及化学数据的定量,以及信息化、智能化的数值计算和统计分析步骤。适用于近红外光谱分析的化学计量学方法涉及不同类型的多变量分析手段,如多变量回归分析,用来完

成活性物质的定性和定量评价。

近红外分光光度法作为一种快速且无破坏性的分析方法,在进行水分测定和物质检验时,可以代替传统的分析方法。在将近红外分光光度法作为日常质量评价方法前,有必要将近红外分光光度法和已有的分析方法进行比较,以验证其和已有方法的等效性。

近红外分光光度法在医药领域的应用包括成分、添加剂以及活性物质或制剂中水分含量的定量定性分析。此外,近红外光谱法同样可以用来对物质的物理性质进行分析,如晶型、结晶度、粒径。近红外光谱法能够通过光纤实现远程分析,而无需采样,是一种有效的药品生产过程的在线控制手段。

1 仪器设备

近红外光谱仪包括色散型近红外光谱仪和傅里叶变换型近红外光谱仪^[1]。干涉滤光片型近红外光谱仪也是有效的,但是这种类型的仪器很难在药物质量控制领域应用。

1.1 色散型近红外光谱仪 仪器组成包括光源、样品表达系统、分光系统、光度测定系统、信号处理系统、数据处理系统、显示-记录-输出系统。卤灯、钨灯、光电二极管和其他这类能够以固定模式发出高强度近红外光的仪器用做光源。样品表达系统由样品室和样品台组成。设备的光纤部分由光纤和准直器组成,这部分的功能是传递光到样品表达系统,可延长样品表达系统与光谱仪之间的距离。光纤材料一般用石英做成。

分光系统是用色散元件将所需波长的光分出,由狭缝、反光镜和色散元件组成。可用的色散元件包括棱镜、衍射光栅、声光可调滤波器(AOTF)和液晶可调滤波器(LCTF)。

光度测定系统由检测器和放大器组成。传感器包括半导体探测器(硅、硫化铅、铟-镓-砷、铟-锑)及光电倍增管。半导体探测器可用来实现单点检测或阵列检测。阵列检测器可以同时检测多个波长(波数)。信号处理系统的功能是把测量需要的信号从放大器产生的信号中分离出来,并输出这些分离的信号。数据处理系统完成数据转换和光谱分析等功能。显示-记录-输出系统输出数据,分析结果并打印。

1.2 傅里叶变换型近红外光谱仪 傅里叶变换型近红外光谱仪的配置除了分光系统和信号处理系统外,其他部分与在1.1节中描述的色散型仪器基本上是一样的。

分光系统由干涉器、抽样信号生成器、探测器、放大器、A/D转换器等组成。干涉仪包括迈克逊干涉仪、

耳堂干涉仪和偏振干涉仪。信号处理系统除基本功能外,还可将获取的干涉波采用傅里叶变换的方法转换为吸收光谱。

2 测定

近红外分光光度法有三种类型的测定方法:透射法、漫反射法和透反射法。测定方法的选择是由样品的形状和应用需求决定的。透射法或漫反射法适用于固体样品,包括细颗粒。透射法或透射反射法适用于液体样品。

2.1 透射法 光源产生的入射光通过样品后的光强的衰减程度用透射率 $T(\%)$ 或吸光度 A 来表示。样品位于光源和检测器的光路上,这种布置和典型的分光光度法是一样的。

$$T = 100t$$

$$T = I/I_0 = 10^{-acl}$$

I_0 :入射光强度

I :透射光强度

a :吸光系数

c :溶液浓度

l :吸收池长度(样品厚度)

$$A = -\log t = \log(1/t) = \log(I_0/I) = acl$$

此方法适用于液体样品的测量。检测池为石英皿或流通池,光程为1~5 mm。此外,透射法同样适用于包括细颗粒在内的固体样品,又称作漫透射法,选择合适的光程对该方法至关重要,因为透射光强度的变化由样品粒子的大小和表面条件决定。

2.2 漫反射法 在漫反射法中,样品发散的反射光强度比 I 范围很大,由物质表面发散的反射光强度 I_r 用 $R(\%)$ 表示。近红外光可以穿透包括细颗粒在内的固体样品数毫米深。在这个过程中,透射、折射、反射、散射重复发生,漫反射随之产生,但一部分漫反射光从样品表面再次发出并被检测器捕获。漫反射吸光度(A_r)的光谱一般能够通过绘制反射率倒数的对数与波长(波数)之间的的关系曲线得到。

$$R = 100r$$

$$r = I/I_r$$

I :漫反射光的反射光强

I_r :参考物表面发出的控制反射光强度

$$A_r = \log(1/r) = \log(I_r/I)$$

漫反射光谱的强度同样可以用 Kubelka - Munk (K - M) 方程来表达。K - M 方程的推导是基于样品有足够的厚度,用光的散射系数表示,而光的散射系数由吸光度、粒子大小、形状和填充程度决定。

这种方法适用于包括细颗粒在内的固体样品,但

需要一个漫反射镜。

2.3 透反射法 透反射法是透射法和漫反射法的组合。一面镜子将通过样品的反射光再反射,以此测定透反射率 T^* (%)。光程是样品厚度的两倍。另一方面,镜子的反射光进入检测器后可作为参比光。然而当透反射法应用于悬浮样品时,应使用具有粗糙表面的金属板或陶瓷反射器来代替镜子使用。

透反射吸光度由下面的公式获得:

$$T^* = 100t^*$$

$$t^* = I/I_T$$

I : 在有样品的情况下,透射和反射光强度

I_T : 在没样品的情况下,反射光强度

$$A^* = \log(1/t^*)$$

此方法适用于包括细颗粒在内的固体样品,也适用于液体和悬浮样品。当应用于固体样品时,样品的厚度必须经过调整,一般调整吸光度在 0.1 到 2 (透光率 79% ~ 1%) 之间,以提供最好的线性和检测器的 S/N 比。样品池的厚度取决于细颗粒的大小,应用前应进行考察。

3 影响光谱的因素

在应用近红外分光光度法,特别是在进行定量分析时,以下是必须考虑的影响光谱的因素。1) 样品温度: 温度变化几度 (°C) 就会产生重大的变化 (如波长漂移)。必须小心对待,特别是在样品为液体或样品含水的时候。2) 水分或残留溶剂: 样品中的水分或残留溶剂会像环境中的水分 (湿度) 一样,严重影响近红外光谱的吸收带。3) 样品厚度: 样品的厚度是光谱变化的影响因素之一,因此需要控制到确定的厚度。一定样品厚度对漫反射法来说可能是适当的,但当厚度小于某个值时,如在进行透反射法测定时,此样品就需要被放在一个具有高反射率的支撑盘上。4) 样品的填充条件: 在测定固体或细颗粒样品时,样品的填充条件对光谱具有潜在影响。在向样品池填装固体样品时,需采用合适的方法填装确定量的样品。5) 样品的光学特征: 当样品的物理、化学和光学特征不均衡时,必须用尺寸较大的光束,必须进行多个样品的测量,对于同一样品必须测定多个点,或将样品粉末化以使样品均一化。颗粒粒子大小、填充条件、以及表面粗糙程度都会影响样品的测量。6) 晶型: 晶体结构 (晶型) 的变化会影响光谱。在多种晶型存在的条件下,必须考虑样品的特征,保证用于校正曲线法的标准样品和用于分析的样品具有相似的分布。7) 样品特征随时间的变化: 在采样以后由于时间的推移或是储藏的原因,样品的可能经历化学、物理或光学的变化,而这些变化会在细

微之处影响光谱。即使是相同的样品,如果经过的时间不同,它们的近红外光谱也会发生显著的变化。因此,实验室的测量工作必须在线下完成,制造过程的测量工作必须在线上完成,校正曲线法所用的样品在测定之前必须充分考虑时间推移带来的影响。

4 设备性能控制^[2-3]

4.1 波长的准确度 设备的波长 (波数) 准确度取决于某物质特定吸收峰所对应的波长 (波数) 误差,如聚苯乙烯、稀土氧化物混合物 (镓、钪和铒; 1: 1: 1) 或者水蒸气等,可从设备上显示的数据得出。通常将 3 个峰附近的容限值设置如下:

$$1200 \pm 1 \text{ nm} (8300 \pm 8 \text{ cm}^{-1})$$

$$1600 \pm 1 \text{ nm} (6250 \pm 4 \text{ cm}^{-1})$$

$$2000 \pm 1.5 \text{ nm} (5000 \pm 4 \text{ cm}^{-1})$$

由于吸收峰位置的变化取决于物质所使用的参考物,所以吸收峰对应的波长与上面 3 个峰最接近的被选作适用性评价。例如,一个稀土氧化物的混合物在波长 1261 nm、1681 nm 和 1971 nm 处显示其特征吸收峰。

当使用二氯甲烷作参比并采用透射法测量时,可以使用 1155 nm、1417 nm、1649 nm 和 2352 nm (光程: 1.0 mm) 的吸收峰。在使用傅里叶变换型分光光度计时,可以使用 7306.7 cm^{-1} 处的蒸汽吸收峰,因为此处具有较高的波长分辨率。

其他物质也可以用作参比物质,但它们必须得到充分的验证。

4.2 光谱的线性 合适的标准板,比如具有不同浓度碳的板状聚合物 (碳掺杂聚合物标准),能够评价光谱的线性。但是,为了保证线性,必须使用不低于 4 个浓度水平且反射比为 10% ~ 90% 的标准板。当期望测量的吸光度不小于 1.0 时,就需要增加反射比为 2% 和 (或) 5% 的标准板。

为了绘制这些标准板在波长 1200 nm、1600 nm 和 2000 nm 的吸光度 (A_{OBS}) 与每个标准板的参比吸光度 (A_{REF}) 之间的关系曲线,必须确保每个波长处的线性梯度在 (1.0 ± 0.05) 范围内,并且纵坐标截距在 (0 ± 0.05) 之间。

4.3 光谱光度噪音 采用合适的反射标准板,如白色反射瓷砖或反射式热塑性树脂 (如聚四氟乙烯),可以检查设备的光谱光度测量噪音。

4.3.1 高通量噪音 光谱光度噪音的评估是利用高反射比的标准板,比如 99% 的反射比。标准板用来测量样品和对照样品。通常,可在 1200 ~ 2200 nm 波长范围内计算每 100 nm 间隔的噪音的均方根 (RMS) 的

平均值,并规定该平均值不超过 0.3×10^{-3} ,个体值不超过 0.8×10^{-3} 。

$$RMS = \{ 1/N \cdot \sum (A_i - A_m)^2 \}^{1/2}$$

N :100 nm 间隔内测定点的数目

A_i :100 nm 间隔内每个测定点的吸光度值

A_m :100 nm 间隔内的平均吸光度值

4.3.2 低通量噪音 当光量低时,光谱光度噪音的评价可使用低反射比的标准板,如 10% 的反射比。这种情况下,光源、光学系统、探测器和电路系统都会对噪音产生影响。与高通量噪音相似,在 1200 ~ 2200 nm 波长范围内,规定 100 nm 间隔内的噪音均方根的平均值不得大于 1.0×10^{-3} ,个体值不得超过 2.0×10^{-3} 。

5 定性定量分析的应用

与红外光谱不同,近红外光谱主要是倍频峰和合频峰。这些吸收光谱经常表现为分子官能团和原子基团吸收谱带的叠加。因此,近红外光谱法与传统分析法存在差异,它通常需要建立与每个应用相对应的分析方法,并使用化学计量学方法,如多变量分析,来建立分析模型。

必须重视近红外光谱的特征,必须采用数学预处理方法,如一阶、二阶导数或归一化法,来减少光谱复杂性以及吸收谱带的重叠,这些预处理方法对于通过化学计量学手段来建立分析方法有至关重要的作用。虽然有很多化学计量学方法和数学预处理方法可用来进行数据预处理,但是必须选择适当的与预期分析目的相匹配的方法组合。

当建立一个近红外分析方法时,需要结合分析参数进行方法有效性验证,参数的选择必须满足应用的需要。此外,为适应近红外光谱分析的需要,尚须考虑以下问题。1) 在给定条件下,特定分析法中的波长(波数)是否适用于样品特征的评价。2) 方法是否足够稳健,以应对来自样品处理过程和样品基质的变异。3) 与已有的标准分析方法相比,是否能够得到同样水平的精度和准确度。4) 分析方法一旦建立,其维护和管理至关重要。因此,必须开展持续的和系统的方法

维护与检查工作。此外,当生产过程或原料出现变化,或对设备的主要元件进行更换时,必须决定是否要采取变更控制或变更后的分析方法重验证。5) 若使用特定设备,当从原设备到另一台设备进行模型传递时,应有合适的评价方法来确认分析方法传递的有效性。

5.1 定性分析 定性分析,如物质的鉴别,可在建立参比样品库后执行。参比样品库包括容许范围内的批间变异,以及化学计量学方法,如多变量分析。此方法也可用来估计批次间的微小质量特征波动。

此外,多变量分析方法包括将波长(波数)和吸光度作为变量的直接分析法(如波长相关法、残差平方和、范围平方和),以及因子分析法、聚类分析法、判别分析法、SIMCA(软独立模式分类)法等。另外,也可以考虑把整个近红外吸收光谱作为一种单独的模式,并将通过多变量分析识别得来的参数,或将样品物质的特征峰波长(波数)作为监控指标,来进行活性物质或制剂的生产过程控制。

5.2 定量分析 定量分析是通过化学计量学的方法,利用一组样品的光谱和采用已有分析法测得的分析值,来建立定量关系模型,并通过定量模型来计算待测样品组分的浓度和属性值。可用来建立定量分析模型的化学计量学方法包括多元回归分析法、主成分回归分析法和偏最小二乘回归分析法(PLS)等。

在样品组分简单的情况下,样品中组分的浓度可通过校正曲线计算,该校正曲线表征特定波长(波数)的吸光度或参数和浓度之间的相关性,并使用已知浓度的样品来绘制(校正曲线法)。

参考文献

- [1] General Rules for Near - infrared Spectrophotometric Analysis, JIS K 0134(2002), Japanese Industrial Standards.
- [2] Near - infrared Spectrophotometry, 2.2.40, European Pharmacopoeia 5.0 (2005).
- [3] Near - infrared Spectrophotometry, < 1119 >, US Pharmacopoeia 30 (2007).

(2013 - 10 - 30 收稿)

投稿须知:关于作者署名和单位

作者署名和单位,置于题目下方。作者姓名要全部依次列出。作者单位需写全称(包括具体科室、部门),并注明省份、城市、路名、门牌号和邮政编码。在每篇文章的作者中,视第一作者为通讯作者,在论文首面脚注第一作者姓名以及联系电话、E-mail 地址或传真号。

各类文稿均须附英文题目和全部作者姓名汉语拼音,以便编制目次。汉语拼音姓在前,名在后。姓的首字母大写;名的第 1 个汉字汉语拼音的首字母大写,其余均小写。

文稿若有英文摘要,需将全部作者姓名的汉语拼音、单位的英文名、单位的英文地址,置于英文题目的下方。