

便携式拉曼光谱仪在药物分析中的性能比较

宋清^[I] 柳艳^[I] 于新佳^[II] 段更利^[III] 尹利辉^[III] 陆峰^[III]

[I]第二军医大学 上海, 200433 [II]复旦大学 上海, 201203 [III]中国药品生物制品检定所 北京, 100050

摘要 本文选择三家生产厂商主流型号的便携式拉曼光谱仪(分别为 Thermo TruScan 手持式拉曼光谱仪、Ocean Optics QE65000-Raman 科学级拉曼光谱仪和 B&W Tek i-Raman 系列 BWS415-785H 型拉曼光谱仪, 从仪器的表观特征、硬件性能与技术参数和软件功能方面的各项指标进行较全面的比较。在方法学评价方面, 以法国 Jobin Yvon 公司 LabRam-1b 型显微拉曼光谱仪为“金标准”, 以几种降糖药样品的不同剂型(片剂和胶囊)和其 API 对照品为工具样品, 对 3 台仪器的综合性能进行比较。Thermo 仪器在便携性、简便性和软件功能方面具有明显的优势; Ocean 仪器在拉曼光谱质量与方法学评价方面及价格方面更胜一筹; B&W 仪器在各方面的比较中均表现较好, 故从整体考虑其将会是性价比最高的仪器。

关键词 拉曼光谱, 便携式拉曼光谱仪, 药物分析, 比较研究

Comparative study of portable Raman instrumentation for pharmaceutical analysis

Abstract The paper provides comparative information about three portable Raman instruments by systematically evaluating their external characteristics, hardware performance, technical parameters, software function and analytical method validation parameters including precision, accuracy and robustness in the analysis of several pharmaceuticals. Six types of commercial hypoglycemic drugs and their corresponding reference substances of active pharmaceutical ingredient were tested by the three spectrometers and the spectra were compared with their “standards” obtained by a micro-Raman spectroscopy. For the three instruments, the portability, simplicity and software function of the Thermo are the best, while the Ocean provides the best spectral quality, the most excellent method validation parameters with the lowest price. The B&W performs quite well regarding all the comparative parameters so that it might excel in a comprehensive way.

Key words Raman spectroscopy, Portable Raman instrumentation, Pharmaceutical analysis, Comparative study

1 引言

目前, 用于药物主成分(API, Active Pharmaceutical Ingredient)及其制剂质量分析的光谱法主要有近红外光谱法^[1]、红外光谱法和拉曼光谱法^{[2][3]}等。其中, 拉曼光谱法因其光谱谱线信息丰富、特征性强, 与红外光谱互补等特点, 故能对样品进行很好的鉴别^[4]; 另外, 由于拉曼光谱可以透过玻璃、塑料等透明的药品包装或容器直接采集, 可以对其中的样品进行非接触和非破坏分析^[5]; 同时由于水的拉曼散射非常弱, 对测定结果几乎没有影响, 故十分有利于液体样品的直接测量^[6]。

近年来发展迅速的便携式拉曼光谱仪^[7]，其便携性、易操作性更为突出：CCD 检测器减少了仪器的体积和重量，有利于仪器小型化发展；光纤探针的使用，有利于拉曼光谱更好地用于现场、原位分析，这为我们提供了更为高效便捷的分析手段。

本文从仪器的表观特征、硬件性能与技术参数和软件功能方面的各项指标对三台主流的便携式拉曼光谱仪(分别为 Thermo TruScan 手持式拉曼光谱仪、Ocean Optics QE65000-Raman 科学级拉曼光谱仪和 B&W Tek i-Raman 系列 BWS415-785H 型拉曼光谱仪)的性能进行了全面的比较。在方法学评价方面，则以 6 种市售降糖药和及其 API 对照品为实验样品，考察了三台仪器的精密度、准确性、稳定性和耐用性等指标。

2 实验部分

2.1 样品

2.1.1 对照品：4 种，分别是格列吡嗪、格列美脲、吡格列酮和阿卡波糖，均由中国药品生物制品检定所提供。

2.1.2 降糖药样品：市售的 5 种降糖类药片和 1 种胶囊，按 API 含量低、中、高列表如下(表 1)。

表 1 降糖药样品情况列表

药品名称	批号	API 含量(%)	API 含量等级	样品代号
美吡达格列吡嗪片	071227	2.53	低(0%-3%)	T-L1
安多美格列美脲片	090202	1.17	低(0%-3%)	T-L2
格列美脲片	0708701	3.14	中(3%-5%)	T-M
盐酸吡格列酮片	08072351	12.56	高(>5%)	T-H1
拜唐平阿卡波糖片	115455	36.71	高(>5%)	T-H2
贝康宁盐酸吡格列酮胶囊	080901	13.49	高(>5%)	C-H

2.2 仪器

Thermo(即原 Ahura Scientific Inc.) TruScan 手持式拉曼光谱仪、Ocean Optics QE65000-Raman 科学级拉曼光谱仪、B&W Tek i-Raman 系列 BWS415-785H 型拉曼光谱仪和 Jobin Yvon 公司 LabRam-1b 型显微拉曼光谱仪(以下分别简称为 Thermo、Ocean、B&W 和 JY)，仪器基本参数和实验参数如下：

表 2 Thermo、Ocean、B&W 和 JY 拉曼光谱仪基本参数和实验参数

拉曼光谱仪	激发光波长	激发光源功率	分辨率	积分时间	平均计算次数
Thermo	785nm	300mW	7cm ⁻¹ -10.5cm ⁻¹	--	--
Ocean	785nm	231mW 左右	8cm ⁻¹	10 秒	3 次
B&W	785nm	100mW 左右	3cm ⁻¹ (175-2600cm ⁻¹)或选 5cm ⁻¹ (175-3200cm ⁻¹)	10 秒	3 次
JY	632.81nm	4.3mW	>3cm ⁻¹	30 秒	--

2.3 光谱采集和信息处理

2.3.1 光谱采集

对照品均为粉末状态，直接照射粉末采集数据；实验中几种药片均为无包衣片剂，直接采样；

胶囊去壳，取出其中颗粒直接进行采样。

精密度考察：分别采用 Thermo、Ocean、B&W 和 JY，按表 2 中实验参数分别采集上述所有样品的光谱数据，每天测试 3 次，连续测试 3 天。

耐用性和暗噪声考察：在室内开/关的情况下，分别用 Ocean、B&W 采集格列美脲对照品和 T-L2 光谱，以激光器开/关(用遮光罩遮光)两种模式测量 Ocean 暗噪声(积分时间 8ms-15min)与 B&W 暗噪声(积分时间 5ms-65535ms)。

2.3.2 信息处理

光谱数据分别以*.spc(Thermo)和*.txt(Ocean、B&W 和 JY)格式输出，进一步转换成*.xls 和*.csv 格式，截取 $1993.7-175.0\text{cm}^{-1}$ ，以 Excel 2003(Microsoft Co.)和 OPUS 软件(Bruker Optics Inc.)进行下述信息处理。

2.3.2.1 “JY 标准光谱”和“相对标准光谱”的设定

把 JY 采集到的光谱数据记为“JY 标准光谱”，把 Thermo、Ocean 和 B&W 第一天采集到的平均光谱数据(n=3)记为各仪器、各样品的“相对标准光谱”，作为后续数据处理的对照光谱。

2.3.2.2 图谱比对、日内和日间精密度、光谱相似性和峰位准确性

选取各样品的 3 天 9 张光谱图、“相对标准光谱”和“JY 标准光谱”分别进行比对；选取样品在每台拉曼光谱仪测得的每天的 3 张光谱与相应“相对标准光谱”分别采用 OPUS “peak picking”功能(以 5%比例)选取特征峰，选取 3 个共有的特征峰，并计算其峰位的标准偏差(SD, standard deviation)，记为“SD”，得到日内精密度结果；同样处理 3 天数据得到日间精密度结果；以“相对标准光谱”为参照标准，用 OPUS 软件对各光谱数据进行 Quick Identity Test^[8]，得到相似度计算结果(Hit Quality)，以此来考察整体光谱峰位的稳定性。

为了考察每台仪器特征峰峰位的准确性，将每个样品“相对标准光谱”与相应的“JY 标准光谱”选出的色谱峰峰位进行比较，计算出相差在一定波数范围(3, 4, 5cm^{-1})内共有峰的个数。

2.3.2.3 耐用性、暗噪声和信噪比考察(仅 Ocean 和 B&W)

对“耐用性和暗噪声考察”项下采集得到的光谱数据比较得到耐用性考察结果；按照光电探测器暗噪声的均方根值计算方法得到暗噪声值，再以暗噪声值作为分母， $2^{16}(=65536)$ 作为分子，得到信噪比。

3 结果与讨论

3.1 仪器外观、硬件和软件性能比较

表 3 为三台仪器的表现特征、硬件指标和软件功能的参数。从中可知，Thermo 的主机、检测器和处理模块高度集成，所以体积和重量在三台仪器中最小；同时由于 Thermo 的外壳采用的是耐用塑

料, 其抗震性能是最高的。B&W 的主机与检测器是集成在一起的, 并可放在拉杆箱中颠簸, 但需要与安装有处理和控制系统的计算机配合使用, 故其便携性次之; Ocean 的各部件都是独立的, 可自行组装。

表 3 Thermo、Ocean 和 B&W 拉曼光谱仪外观特征、硬件和软件详细技术参数汇总

Characteristic	Thermo	Ocean	B&W
Weight (kg)	1.8	1.18 (only the host)	3.0 (the host including the laser)
Dimensions (cm×cm×cm)	30×15×7.6	182×110×47 + detector + probe head	17×34×23.4cm + probe head
Wavelength range (cm ⁻¹)	250-2875	200-2700	175-2600 or 175-3200cm ⁻¹
Resolution (cm ⁻¹)	7-10.5	8	3 or 5
Integration time range	≥100ms, automatically adjustable	8ms-15min, manually adjustable	5ms-65535ms, manually adjustable
Grating	1200 lines mm ⁻¹	1200 lines mm ⁻¹	no information available
Detector	2048×1linear CCD	back-illuminated cooled CCD (-40°C)	cooling package CCD (-14°C)
Laser	785nm diode, 300mW	785nm diode, ≤300mW, adjustable	785nm diode, >300mW, adjustable
Warm-up time	no information available	≤10min	5min
Sampling time(s)	<60	10	1-30
Database capacity(medicine)	>4000(>1000)	>8000(need to buy)	>6540(1019)
Database share	Seamless transfer	*.SPC format, *.txt format, *.XLS format	*.SPC format, *.txt format, *.XLS format, Lib database file, seamless transfer
Data communication	through cable and CF card	through USB and wireless transmission	through USB

Ocean 与 B&W 采用的探针尺寸分别为 12.7cm×10cm 和 10cm×5cm, 均可伸入常规的安瓿瓶和广口瓶来对其中的样品直接进行测量。Thermo 和 B&W 由于样品池的位置都是相对固定的(B&W 探针顶端设有固定样品端支架), 可减小了系统误差, 提高了图谱的重现性。Ocean 采用可调式样品池支架, 可根据需求手动调整探针的焦距, 对粉末和其他不规则形状样品的测量相对具有优势。

三台仪器的拉曼光谱范围和分辨率均达到常规测量的要求, 并且均采用波数校正。Thermo 采样时间根据一定的信噪比值来确定, 可无限累加, 直到获得图谱的信噪比达到设定值。Ocean 和 B&W

从开机、预热、采样、处理数据到输出结果一般可在 10min 之内完成，可以说整个光谱测量过程非常快速。

三台仪器自带的软件均具有数据采集和数据基本处理(包括噪声扣除、手动和自动基线校正、光谱平滑方法等)的功能。Thermo 提供“运行”与“采集”两种模式，前者采集时间较短，光谱质量较差，后者采集时间较长，光谱质量较高，可直接用来建立谱图库，并可对光谱直接进行真假(pass 与 fail)判断(失败时进行数据库搜索)。Ocean 和 B&W 可自定义扫描测量次数，用户可以根据采集样品的需要进行选择。其中，B&W 采用七种匹配方法进行光谱匹配识别和真假判别，并支持新建数据库和数据库的修改。

3.2 方法学评价

3.2.1 图谱比对

3.2.1.1 API 对照品图谱比对

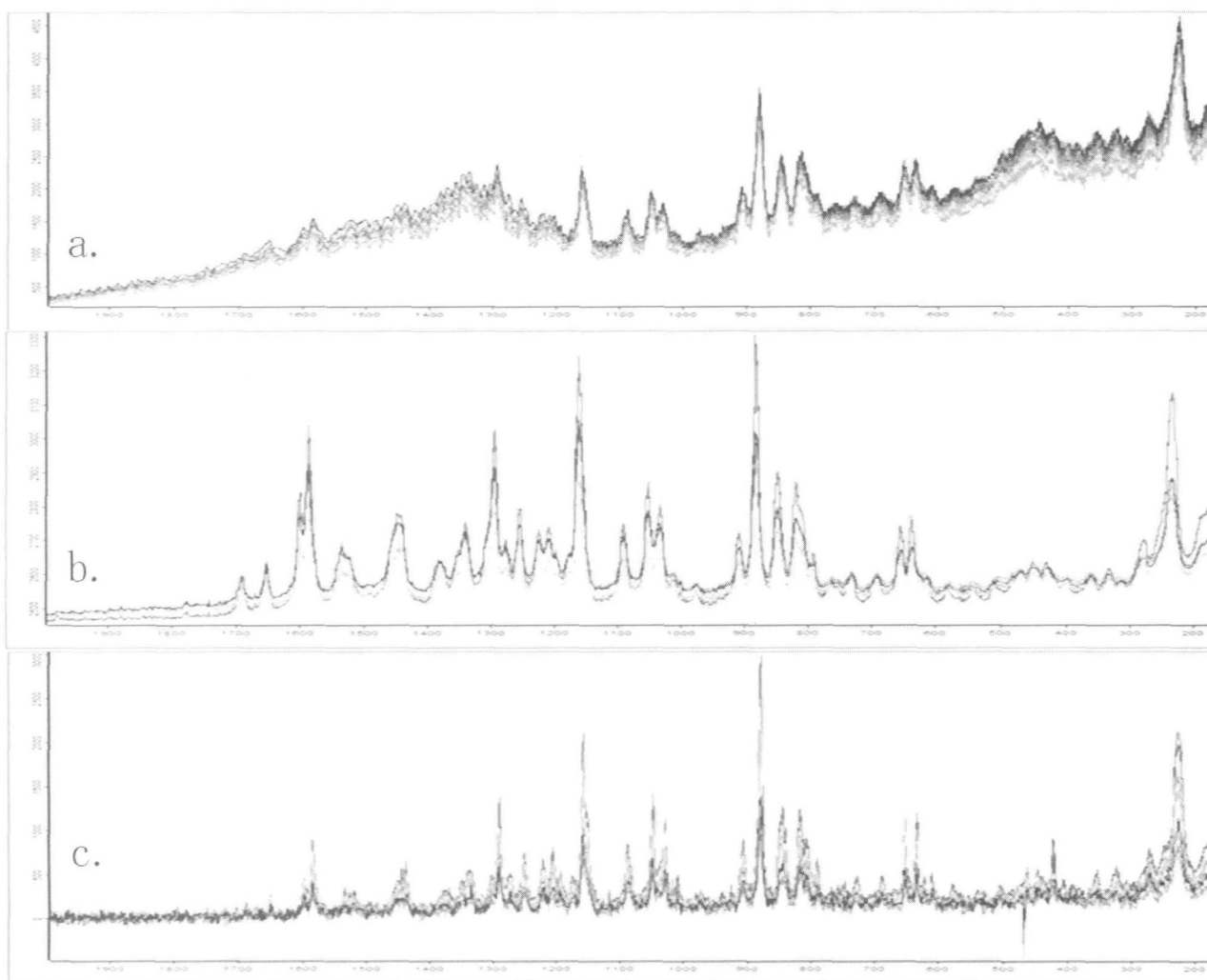


图1 格列吡嗪对照品在 Thermo(a)、Ocean(b)和 B&W(c)得到的 3 天 9 张光谱比较

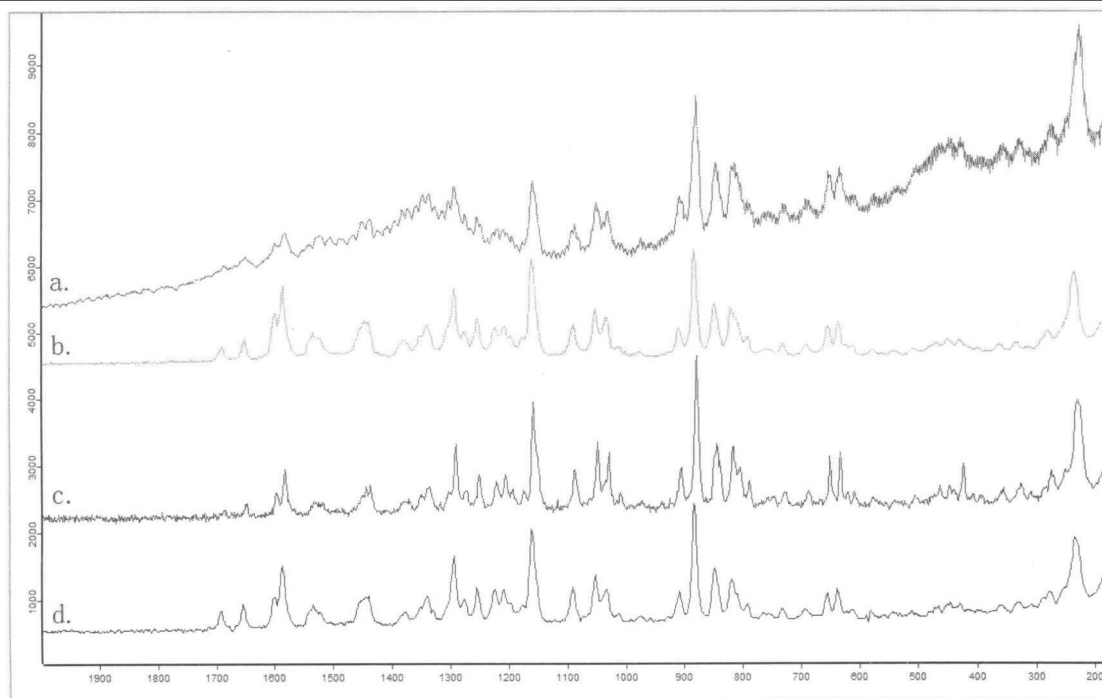


图2 格列吡嗪对照品在 Thermo(a)、Ocean(b)和 B&W(c)得到的“相对标准光谱”和在 JY(d)得到的“JY 标准光谱”比较

在 API 对照品图谱比对中，格列吡嗪对照品在三台仪器上采集到的图谱峰形均较好，每台仪器 3 天 9 张图谱呈现一系列的共有散射峰；相比之下，阿卡波糖对照品光谱峰形较差，散射峰不明显；在散射峰强度方面，每种对照品的谱线均有不同程度的漂移，其中，格列吡嗪对照品谱线的纵向漂移相对较小，而格列美脲对照品和吡格列酮对照品谱线的纵向漂移较大。

在各“相对标准光谱”的峰形方面，Ocean 得到的谱图整体谱线平滑度最好，散射峰较显著；B&W 得到的谱图平滑度次之，散射峰显著，分辨率较好，但基线平滑度较差；由于 Thermo 采用的是“运行”模式得到的图谱较为粗糙，质量不高。三台待测仪器和 JY 仪器得到的图谱散射峰峰位均有较好的匹配，其中 B&W 和 JY 得到的图谱整体谱线匹配程度最高。

3.2.1.2 降糖药样品图谱比对

从整体和与“JY 标准光谱”的比较中，降糖类药片的图谱质量最佳的是 API 含量较低的 T-L1，API 含量中等的 T-M 次之，API 含量最高的 T-H1 图谱质量在三者中最差。

通过肉眼分析，三台仪器中，B&W 测得的图谱散射峰最为丰富，信噪比较高，Ocean 次之，Thermo 得到的图谱散射峰信息在三者中最弱；从峰位的匹配程度上，Ocean 与 JY 得到的图谱匹配程度较高，而 Thermo 与 B&W 匹配程度次之。

3.2.2 日内精密度、日间精密度、图谱相似性和峰位准确性

表4 日内精密度和日间精密度考察结果汇总

Sample	Instrument	SD of peak positions		Average of Hit Quality
		Within-day	Between-day	
Glimepiride	Thermo	0.02-0.13	0.10-0.13	0.14
	Ocean	0.01-0.05	0.10-0.11	0.05
	B&W	0.01-0.03	0.05-0.05	0.15
T-L1	Thermo	0.04-0.17	0.12-0.14	0.15
	Ocean	0.01-0.07	0.10-0.17	0.08
	B&W	0.00-0.08	0.10-0.12	0.14
T-M	Thermo	0.01-0.08	0.08-0.13	0.18
	Ocean	0.01-0.15	0.18-0.24	0.16
	B&W	0.01-0.20	0.15-0.19	0.34
T-H1	Thermo	0.03-0.07	0.06-0.07	0.19
	Ocean	0.02-0.19	0.12-0.25	0.18
	B&W	0.04-0.13	0.15-0.17	0.22
T-H2	Thermo	0.03-0.33	0.11-0.74	0.20
	Ocean	0.04-0.19	0.19-0.43	0.20
	B&W	0.19-0.77	0.58-0.66	0.47
C-H	Thermo	0.03-0.09	0.08-0.12	0.16
	Ocean	0.00-0.07	0.10-0.16	0.12
	B&W	0.03-0.09	0.12-0.16	0.25

表5 不同匹配窗口水平 (3, 4, 5 cm^{-1}) 下的特征峰匹配个数

Sample \ Instrument	Thermo			Ocean			B&W		
	3 cm^{-1}	4 cm^{-1}	5 cm^{-1}	3 cm^{-1}	4 cm^{-1}	5 cm^{-1}	3 cm^{-1}	4 cm^{-1}	5 cm^{-1}
格列吡嗪	8	24	30	30	32	32	9	21	24
格列美脲	8	17	32	30	30	31	10	21	27
吡咯列酮	13	23	25	29	29	29	15	19	21
阿卡波糖	9	12	14	7	8	10	3	3	5

从表4中结果可以看出,在日内精密度考察方面,SD最小值为0,出现在Ocean仪器C-H样品和B&W仪器T-L1样品上。SD的最大值为0.77,出现在T-H2上,所用的仪器为B&W。从整体上看,在Ocean拉曼光谱仪得到的日内精密度考察结果最优,B&W拉曼光谱仪次之,Thermo拉曼光谱仪由于采用“运行”模式,结果较差。在日间精密度考察方面,仍以Ocean结果最优,B&W次之,Thermo的结果较差。

OPUS软件的Quick Identity Test(快速相似度检测)的Hit值来考察图谱间整体的相似度,其中Hit Quality值越小,说明匹配程度越高,零则表明完全匹配。从表4的结果中可知,Hit Quality最小值为0.05,出现在格列美脲对照品,所用仪器为Ocean,Hit Quality最大值为0.47,出现在T-H2,所用仪器为B&W。

根据USP<1120>相关规定,本文采用四种对照品在三台仪器与JY仪器中测得的拉曼光谱中共

有特征峰的峰位, 进行窗口分别为 3, 4, 5cm^{-1} 的比较, 其结果见表 5。从表中可知, 除了阿卡波糖外, 对于其余三个对照品 Ocean 仪器结果最好。Thermo 和 B&W 仪器匹配结果相接近, 其匹配数量为 Ocean 仪器的一半。由此可知, 在峰位准确性方面, Ocean 仪器最好, 这也与裸眼观察结果相一致。

3.2.3 耐用性考察

表 6 耐用性考察数据处理结果汇总

instrument	sample	conditions	SD of peak positions	Average of Hit Quality
Ocean	格列美脲	Light off	0.10-0.11	0.05
Ocean	格列美脲	Light on	0.07-0.09	0.36
Ocean	T-L2	Light off	0.04-0.08	0.06
Ocean	T-L2	Light on	0.06-0.09	0.37
B&W	格列美脲	Light off	0.05-0.05	0.15
B&W	格列美脲	Light on	0.03-0.04	0.17
B&W	T-L2	Light off	0.03-0.07	0.08
B&W	T-L2	Light on	0.03-0.08	0.12

从表 6 中可以看出, 对 Ocean 和 B&W 来讲, 室内开关灯的测试条件对测试结果的日间精密度和峰强稳定性影响不是很明显, 室内开灯情况下的 SD、RSD 和 Hit Quality 值与室内关灯情况下的对应数值相比无显著差别; 而对 Ocean 来讲, 环境的光线变化对图谱相似性的结果影响较大, 在开灯条件下得到的 9 张光谱的 Hit Quality 的平均值比在关灯条件下得到的相应结果要大很多; 总体来讲, B&W 在耐用性考察方面的表现优于 Ocean, 由于 Thermo 探测头的全封闭避光设计, 所以没有对其进行此项考察。

3.2.4 暗噪声和信噪比考察

Ocean 的暗噪声测量分为激光器关闭和激光器打开(用遮光罩遮光)两种模式, 计算得到两者的暗噪声分别为 2229.3 和 25848.4, 信噪比分别为 29.4 和 2.5, 说明遮光罩产生了不小的拉曼吸收, 使采集到的信号增强, 前者不能单纯反映光谱仪在光路系统不工作的情况下仪器内的暗电流情况, 所以暗噪声数据以后者为准; 而 B&W 的软件自带测试暗噪声功能, 可以直接采集数据, 计算得到其暗噪声为 3453.0, 信噪比为 19.0, 相比 Ocean 的暗噪声图谱, B&W 测得的暗噪声图谱波动范围较大, 而前者则更为平滑; 由于 Thermo 在“运行”模式下, 积分时间、平均计算次数等参数无法人为设定, 依据上述方法无法测得其暗噪声和信噪比, 因此不做此项考察。

4 结论

本文通过采用 Thermo、Ocean 和 B&W 三种拉曼光谱仪对 6 种降糖药品及其 API 对照品进行光谱的采集和比较, 借助 JY 拉曼光谱仪作为“JY 标准”(看是否要改下)进行对比测试, 从仪器的表现特征、硬件性能与技术参数、软件功能和方法学评价指标等方面对三台便携式拉曼光谱仪进行了

系统的评价，结果如表 7 所示。

表 7 Thermo、Ocean 和 B&W 拉曼光谱仪仪器特性的总结

Characteristic	Thermo	Ocean	B&W
便携性	+++++	+++	++++
操作简便性	++++	+++	+++
价格	+++	+++++	++++
集成性	+++++	+++	+++
功能多样性	++++	++	+++
CCD 检测器性能	+++	++++	+++
软件功能	+++++	++++	++++
内置谱库搜索	Yes	No	Yes
用户自定义	++	++++	++++
图谱质量	++	++++	+++
日内精密度	++	++++	+++
日间精密度	++	++++	+++
图谱相似性	+++	++++	+++
图谱分辨率	++	+++	++++
准确度	++	++++	+++
耐用性	--	+++	++++
暗噪音	--	++++	+++
信噪比	--	++++	+++

Thermo 集成性很高，整体设计简约大方，在便携性方面表现最佳；B&W 次之；Ocean 采用模块化设计，集成化程度不高，因此不便于携带。对于近距离样品的无损、非破坏性分析（如假劣药品的快速检测），Thermo 是很好的选择；但若样品距离较远（如在线检测），或样品物态为粉末或处于小容器内（如 API 对照品），因 Ocean 和 B&W 仪器采用了光纤探针技术，在此方面更有优势。

在参数设置方面，对于 Ocean 和 B&W，用户可根据实际需要各项仪器参数进行设置，对中高端用户来说，参数选择的自由度比较高，但对于低端用户而言，则有可能无法很快找到最佳参数。Thermo 采用自动调节的动态参数，比 Ocean 和 B&W 由用户自行选择参数的做法可能更高效一些，但参数是否最佳、是否会使得分析更可靠，则需要对更大样本量的判断结果做一个更详尽的比较才能下结论。

方法学评价指标方面，Ocean 仪器图谱的总体质量较好，并且日内精密度、日间精密度、图谱相似性和峰位准确性方面均优于其他两台仪器。

在软件方面，Thermo 提供的“采集”模式可得到质量较高的光谱图，可直接用来建立光谱数据库，“运行”模式可以直接给出真假(通过与失败)判断，失败时进行数据库搜索。这样既扩大了数据库的容量，又能对已知和未知的物质进行快速判别，给用户带来了极大的方便和便捷，提高了工作效率。

虽然本文在实验设计上试图模拟假劣药品的快速检测过程，但由于尚未能收集到足够多的假药，且无法做到“盲测”(由第三方提供大量经过法定方法验证、已知结果的样品)，所以未能对软件的判别能力做一综合评价(我们的下一步工作)，只能在一定程度上体现它们的实战能力。

每台仪器的硬件和软件都会有各自的优缺点，对用户而言，不能把眼光局限在仪器的单项性能上，更为关键的是仪器的综合性能，即现场的实战能力。一台好的便携式拉曼光谱仪要能够在不同的环境和各种复杂的样品状态下，稳定、快速、高效地给出恰当的分析解决方案或结果，惟其如此，用户才能将自身需求与仪器的特点结合起来，发挥其最大的优势，成为药物分析，尤其是现场假药快速检测的强有力工具。

参考文献

- [1] L. Alvarenga, D. Ferreira, D. Altekruze, J.C. Menezes, D. Lochmann. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48(2008)62-69.
- [2] O.Ye. Rodionova, A.L. Pomerantsev. *Trends in Analytical Chemistry*.29(2010)795-803.
- [3] Vankeirsbilk. T, Vercauteren. A, Baeyens.W, et al. *Trends in Analytical Chemistry*. 2002, 21(12):869
- [4] David E. Bugay, Robert C. Brush. *Applied Spectroscopy*, 2010, 64(5):467
- [5] Eman Atefa, Harsh Chauhana, Michelle Ceresiab, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53 (2010) 852–859.
- [6] Minjung Kima, Hoeil Chunga, Youngah Woo, et al. *Analytica Chimica Acta* 2007, 587:200
- [7] Keith Carron. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(9):3419
- [8] S. Wartewig. *Die Deutsche Bibliothek*, 2000.