专论 Perspectives

形态定向拉曼光谱检测在混悬型鼻喷剂生物等效性研究中的应用

王 力[1]，周丽丽[2]，刘 洋[3]，邵 奇[3*]

（1. 上海医药集团股份有限公司，上海 200020；2. 浙江信谊瑞爵制药有限公司，浙江杭州 311409；
3. 上海上药信谊药厂有限公司，上海 201206）

摘要：混悬型鼻用喷雾剂的生物等效性研究对于仿制药开发者而言是一项具有挑战性的任务。研究者不仅要按照指导原则的要求，对辅料用量和制剂特性进行一致性研究，更需要通过分析工具来确定活性药物成分的粒径大小、粒度分布等关键质量属性的一致性。该文探讨了形态定向拉曼光谱法在研究鼻腔悬浮液粒度分布中的应用。该方法已被美国 FDA 批准用于替代临床终点生物等效性的研究，对降低混悬型鼻用喷雾剂类产品一致性评价的成本、加快其研发速度有重要作用。

关键词：生物等效性；形态定向拉曼光谱；粒度分布；混悬型鼻喷剂

中图分类号：R917；R944.1 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)07-0887-13

引用：王 力，周丽丽，刘 洋，等. 形态定向拉曼光谱检测在混悬型鼻喷剂生物等效性研究中的应用 [J]. 中国医药工业杂志，2024, 55(7): 887-899. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.07.001

Application of Morphologically-directed Raman Spectroscopy in the Bioequivalence Study of Suspension-based Nasal Spray

WANG Li[1], ZHOU Lili[2], LIU Yang[3], SHAO Qi[3*]

(*1. Shanghai Pharmaceuticals Holding Co., Ltd., Shanghai 200020; 2. NasPress Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 311409; 3. Shanghai Sine Pharmaceutical Laboratories Co., Ltd., Shanghai 201206*)

ABSTRACT: Bioequivalence studies of suspension-based nasal sprays are challenging tasks for generic drug developers. Researchers should not only conduct consistency studies on the dosage and formulation characteristics of excipients in accordance with the requirements of the guidelines, but also need to use analytical tools to determine the consistency of key quality attributes such as particle size and particle size distribution of active pharmaceutical ingredients. This study explored the application of morphologically-directed Raman spectroscopy in the study of particle size distribution of nasal suspensions. The method has been approved by the U.S. FDA for the studies that substitute bioequivalence of clinical endpoints, which is critical for cost reduction and faster development for consistency evaluation of suspension-based nasal spray products.

Key Words: bioequivalence; morphologically-directed Raman spectroscopy; particle size distribution; suspension-based nasal spray



【专家介绍】 邵奇，高级工程师，市级青年领军人才。2008年入职上药信谊药物研究所，现担任所长助理。曾荣获全国五一劳动奖章，市级以上相关荣誉5项。现兼职担任中国颗粒学会吸入颗粒专业委员会秘书长、上海理工大学硕士生导师等职务。主要研究方向为吸入制剂、注射液、口服液等产品的研发与产业化工作。在职期间，带领团队获国家药品监督管理局批准产品生产批件共计10项，其中气雾剂4项，雾化吸入剂2项，注射液4项；吸入制剂临床批件2项；其他在研吸入制剂（含鼻喷）6项，口服混悬液1项，软胶囊制剂2项等。在美国FDA完成申报鼻喷剂项目1项。作为第二主译参与《经口吸入产品的级联撞击器理论与实践》的编译、出版。国家授权专利11项。

对混合颗粒中特定成分颗粒的检测与形态分析是一项难题。2001 年，NELSON 等[1] 首先提出了将拉曼光谱成像与扫描电镜相结合的检测方法；2007 年，DOUB 等[2] 对该法进行改进，成功检测了混悬型鼻喷制剂中特定成分颗粒的粒度分布（particle size distribution，PSD）。

2010 年马尔文公司推出了形态定向拉曼光谱技术（morphologically-directed Raman spectroscopy，MDRS）[3]，用于区分混合样本颗粒中的淀粉颗粒与乳糖颗粒。该技术利用激光照射样本中单个颗粒的表面，然后收集散射的拉曼光谱进行成分鉴定，并结合光学显微镜观测对应颗粒的形态特征，因此能在一次检测中实现复杂混合颗粒的成分分类与 PSD 检测[4]。

传统的拉曼光谱检测仪使用单色激光照射检测样品表面，光子与表面分子产生能量交换，使散射光频率发生改变，即产生拉曼散射[5]。通过拉曼光谱可分析分子振动[6—7] 和晶体结构[8—9] 的差异，也可以形成分子指纹图谱用于样品成分的检测[10]。

将用于拉曼光谱检测的激光束进一步聚焦至直径 1 ～ 2 μm，并集成基于光学显微成像技术的颗粒形态分析与粒径检测功能，就能使拉曼光谱检测仪达到微米级的物理检测分辨率，因而被广泛应用于微米级混合药物颗粒的检验，如混悬型鼻喷剂的生物等效性（bioequivalence，BE）评价[11]、药物粉末混合的过程监控[3]、药品混合物中痕量颗粒的检测[12]、非法药品 / 假药鉴定[13]、药用干粉的颗粒改良[4]、过期药物识别等[14]。

拉曼光谱技术已被美国 FDA 收录于多项混悬型鼻喷剂的仿制药研究指导原则[15—20]。此前，仿制混悬型鼻喷剂必须进行比较临床终点的 BE 研究，而这类临床研究通常需要数千万美金的投入、耗时数年[21]。拉曼光谱技术作为体外研究试验，条件可控、重复性好，不存在受试者差异等因素，可帮助企业节省大量经费和时间成本。本文介绍了混悬型鼻喷剂的 BE 研究进展与拉曼光谱技术的基本概况，综述了拉曼光谱技术在混悬型鼻喷剂仿制药开发中的应用，以期为混悬型鼻喷剂的仿制研究提供参考。

1　混悬型鼻喷剂的 BE 研究进展

鼻喷剂是鼻腔局部给药的优势剂型，同时也具有透过鼻黏膜入血[22] 或嗅神经入脑[23] 递送药物的能力，是开发鼻炎、抑郁、癫痫等鼻脑部疾病治疗药物的潜力剂型。鼻喷剂按药液类型可细分为溶液型与混悬型。在混悬型药液中，微粉化的活性药物成分（active pharmaceutical ingredient，API）颗粒在微晶纤维素等助悬剂的存在下，能够均匀地分布并保持长时间的物理稳定。溶液型鼻喷剂则对药物的水溶性要求较高。目前，在国内外上市的主要为在水中难溶的激素类药物鼻喷剂，因此这类产品多为混悬型，如丙酸氟替卡松鼻喷剂[24]、糠酸莫米松鼻喷剂[25]、布地奈德鼻喷剂[26]、丙酸倍氯米松鼻喷剂[27] 等（表 1）。

表 1　2020—2022 年全球销售额前 10 的 FDA 批准上市的多剂量鼻喷剂产品

Tab.1　Top 10 FDA-listed Multi-dose Nasal Spray Products by Global Sales from 2020 to 2022

编号	通用名	分类		全球销售额 / 百万美元[1)]		
		药物类型	药液类型	2020 年	2021 年	2022 年
1	丙酸氟替卡松鼻喷剂	激素类	混悬型	568	456	481
2	糠酸莫米松鼻喷剂	激素类	混悬型	314	328	321
3	布地奈德鼻喷剂	激素类	混悬型	160	171	180
4	盐酸氮䓬斯汀鼻喷剂	普通化药	溶液型	112	117	107
5	丙酸倍氯米松鼻喷剂	激素类	混悬型	94.4	97.8	94.8
6	异丙托溴铵鼻喷剂	普通化药	溶液型	97.8	77	91.2
7	氮䓬斯汀氟替卡松鼻喷雾剂	激素类	混悬型	31.1	74.4	69.1
8	鲑鱼降钙素鼻喷剂	普通化药	溶液型	33.0	44.2	53.3
9	曲安奈德鼻喷剂	激素类	混悬型	52.3	50.2	49.1
10	酒石酸伐尼克兰鼻喷剂	普通化药	溶液型	—	1.58	37.35

注：[1)] 数据来源艾昆纬（IQVIA）数据库。

对仿制药开发者而言，开发混悬型鼻喷剂并通过仿制药 BE 评价是一项困难的挑战。根据美国联邦法规（Code of Federal Regulations，CFR）第 320.23(b) 条款内容[28]，仿制药必须证明相同剂量 API 成分在类似条件下给药时，仿制药与原研产品

收稿日期：2023-08-29

作者简介：王　力（1996—），男，硕士，从事吸入及鼻喷制剂的研究。

通信作者：邵　奇（1986—），男，硕士生导师，从事吸入及液体制剂的研究与开发。

E-mail：shaoqixwl@aliyun.com

的吸收率和吸收程度没有显著差异。而混悬型鼻喷剂喷出后，API 颗粒的释放过程受粒径大小、颗粒形状、辅料分散状态等因素的影响[29—31]，同时也受鼻腔环境中 pH 值、黏度、纤毛清除的影响[32—33]。仿制药的 API 颗粒如果与原研产品有些许差异，就可能导致溶出 / 释放过程的变化而无法通过 BE 评价。

鼻喷剂的 API 颗粒在鼻腔局部的吸收过程难以被直接分析[34]。尽管有大量动物模型[35]、体外评价模型[36]、数据预测模型[37—38]，但目前临床试验也仅能从药物的全身分布间接推导其鼻腔吸收过程。这不仅需要建立复杂的研究模型，而且不适用于部分难以检测血药浓度的药物。美国联邦食品药物及化妆品法案 (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act) 第 505(j) 章节建议局部作用药物研究者采用“证据权重”法[39]，即通过大量多方位的研究证据 (图 1)，综合评估仿制药和原研产品之间的 BE。根据这一法案，特定药品指导原则 (product-specific guidance，PSG) 中除了对仿制药在产品原辅料成分、装置上的一致性要求外，还要求进行全面的体外相关性研究，其中包括单喷含量 (single actuation content，SAC)、基于激光衍射法的液滴尺寸分布 (droplet size distribution，DSD)、基于撞击器 [Andersen 级联撞击器 (Andersen cascade impactor，ACI)、新一代药用撞击器 (next generation impactor，NGI)] 的微细颗粒检测、喷雾模式 (spray pattern，SP)、羽流几何形态 (plume geometry，PG)、启喷和再启喷等研究，同时需要开展体内药代动力学 (pharmacokinetic，PK) 研究以证明鼻喷剂 API 的全身暴露等效性。根据 2023 年 5 月 FDA 新草案公布前的要求，当 PK 研究和体外研究无法精准描述药物在鼻中的过程时，还建议通过比较临床终点 BE 研究来证明局部给药的等效性[15—20]。但该方法需要大量的受试者人群，价格高昂、研究周期长、结果不确定性高。因此，混悬型鼻喷剂仿制企业一直在寻求替代比较临床终点的 BE 研究方法。

API 颗粒的粒径与形状是影响局部递送、沉积和吸收速率的关键属性，通过对混悬液中 API 颗粒进行特性分析来替代临床试验的研究已有先例。如

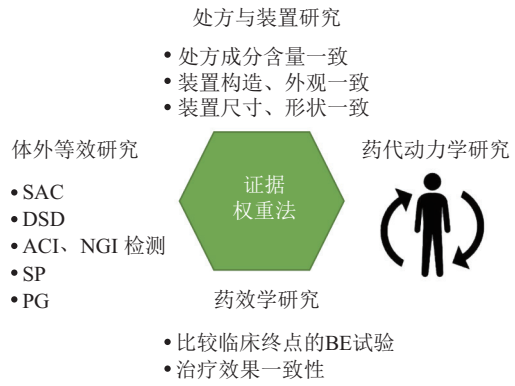


图 1 FDA 对吸入和鼻用仿制药产品的证据权重法研究要求示意图[39]

Fig.1 Schematic Diagram of FDA Weight-of-evidence Approach Research Requirements for Inhaled and Nasal Drug Generic Products[39]

2012 年，吸入用布地奈德混悬液的 PSG 文件[40] 中指出，由于布地奈德是该制剂中的唯一固体颗粒，因此通过激光粒径仪检测其 PSD，结合其他常规的体外评价试验，就可以豁免临床研究而确定仿制药与原研制剂的等效性。但是，鼻用混悬液的制剂组成通常更复杂，API 颗粒在一系列助悬剂等辅料的配合下才能均匀分散在水中[41]，而这些辅料很容易在工艺过程中形成小颗粒。然而，一般的粒径检测技术不足以将 API 颗粒从鼻用混悬液的众多辅料颗粒中区分出来，并检测其 PSD。

拉曼光谱技术的出现打破了这一僵局。2016 年 3 月，FDA 批准加拿大 Apotex 公司生产的糠酸莫米松鼻用混悬液的仿制药产品上市。该仿制产品的申报数据中首次将拉曼光谱方法应用于混悬液中 API 颗粒 PSD 的评价。FDA 接受了该 BE 研究方法，并认为 API 颗粒的拉曼光谱研究完全消除了进行比较临床终点的 BE 研究的必要性。随后，FDA 在多个混悬型鼻喷剂的仿制药开发 PSD 文件修订中，都增加了“使用拉曼光谱法代替临床终点研究的 BE 方法”的建议，涉及糠酸氟替卡松[15]、糠酸莫米松[16]、盐酸氮䓬斯汀丙酸氟替卡松复方[17]、糠酸莫米松盐酸奥洛他定复方[18]、丙酸氟替卡松[19]、曲安奈德[20] 等鼻喷剂产品。

2023 年 5 月 18 日，FDA 进一步更新了糠酸氟

替卡松鼻喷剂[15]、糠酸莫米松鼻喷剂[16]、盐酸氮䓬斯汀丙酸氟替卡松鼻喷剂[17]、丙酸氟替卡松鼻喷剂[19]这 4 个产品的 PSG 文件，明确提出通过 2 项体外研究（即对 API 颗粒的 PSD 检测和药物溶出试验）可代替 2 项临床研究（即临床药代动力学试验和药效学试验），并确认了相关试验方法的标准与 BE 评价指标。

2024 年 3 月 18 日，印度 Aurobindo 制药的仿制糠酸莫米松鼻喷剂于美国上市，成为首个通过形态定向拉曼光谱检测技术替代临床药效学研究，并成功上市的混悬型鼻喷药物。这昭示了形态定向拉曼光谱技术用于临床替代的路径已经实质性走通，进一步凸显了技术重要性。

2　拉曼光谱技术概况与检测方法建立

拉曼光谱检测方法建立的核心内容是通过在大范围混合颗粒样本中分析 API 颗粒与其他非活性物质颗粒在形态学、拉曼光谱中的区别，搭建 API 颗粒的标准拉曼光谱数据库、特征形态学参数指标（图 2）[42]。并且，通过进一步对检测参数的充分验证与优化，可提高该方法的检测速度与精度。

2.1　检测样品处理方法的建立

对于常见的鼻用混悬型喷雾剂样品，可轻轻振摇装配递送装置的产品数秒，使混悬液流体化与均匀化[43]，弃去指定次数的预喷后，收集一定喷数的喷雾产品并用移液管将一定体积的样品转移至石英显微载玻片上，覆以石英盖玻片，涂抹凡士林封边，即得待测样品。在检测前，需将待测样品静置一定时间以确保悬浮颗粒充分沉降，避免检测时颗粒出现位移。

检测样品制备时应注意，需选择合适的浓度以

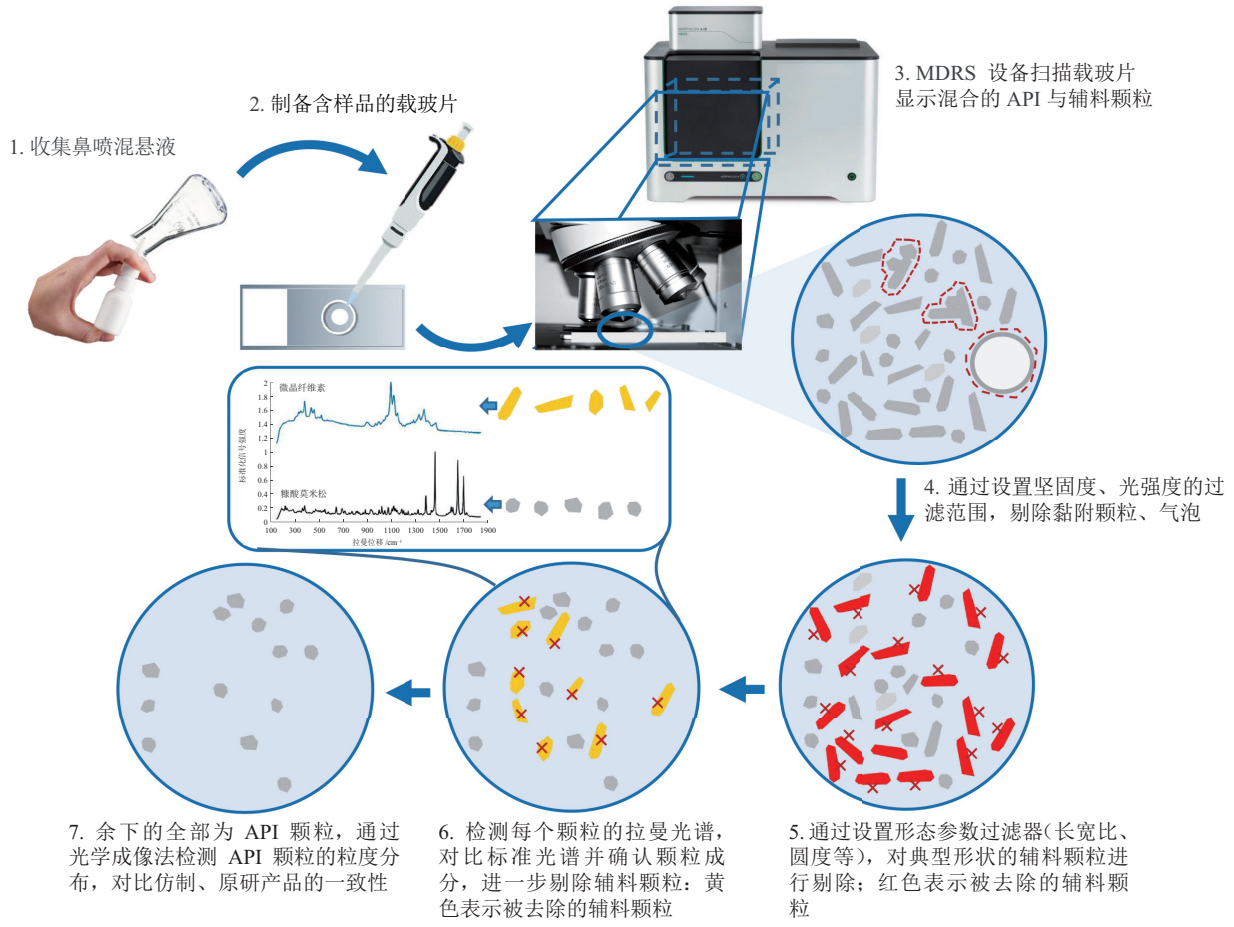


图 2　形态定向拉曼光谱检测混悬型鼻喷剂的基本流程[42]

Fig.2　Basic Operating Steps of Morphologically-directed Raman Spectroscopy for Suspension-based Nasal Spray[42]

确保药物颗粒能均匀分散和沉降，避免颗粒的重叠或聚团。FDA 要求对样品的准备过程进行充分的参数研究，并需要提交详细的流程及参数验证 / 优化数据[44]，其中包括：样品分散技术选择（如振摇或超声使混悬液混匀[45]）、不同喷雾方法选择（如正置、倒置、斜置等[46]）、样品体积选择、喷雾次数选择、样品稀释方法选择、样品静置沉降时间选择（需证明静置后的悬浮颗粒已充分沉降固定）、颗粒去团聚时表面活性剂的使用[47]、盖玻片放置方式，以及样品环境选择、样品保存条件选择等。

2.2 仪器自动成像方法的建立

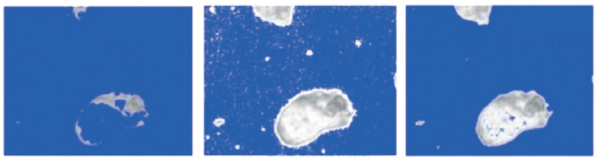
以使用 Morphologi 4 型检测设备为例，对鼻用混悬型喷雾剂样本进行检测，将待测样品按要求放入仪器，根据颗粒大小设置观测度较好的物镜，再选择合适的对焦方式，设定照射光强与照射光方向、确定有效的扫描区域、设置图像像素。Morphologi 4 型拉曼光谱仪的粒径检测下限为 1 μm，因此该仪器可设置为自动过滤等效圆直径 <1 μm 的颗粒。设置完成后，仪器将对整个扫描区域进行顺序扫描成像，并将所有图像合并成一张整体光学图像。根据 FDA 的要求，为避免扫描过程中视野边缘区域变形引起颗粒成像准确性的降低，需设置一定的图像边缘重合比率；为保证收集颗粒的代表性，方法学研究时收集的颗粒应不少于 10 000 个[44,48]。

2.3 颗粒图像识别方法的建立

采用 Morphologi 4 型仪器对鼻用混悬型喷雾剂样本进行光学成像后，需手动设定区分颗粒与背景的光强度阈值。当采用由下至上的底部光源进行照射成像时，空白背景处的光线易透过且光强较高，颗粒所在位置的光强较弱。因此通过设置合适的光强度最大阈值，仪器即可自动从背景中框选出需要研究的颗粒图像。

FDA 在相关报告[42,44,48]中提出，研究者应当通过设定图像的光强度阈值，确定颗粒的边缘，记录观察到颗粒的 *X*、*Y* 坐标并编号。如图 3 所示，将图像识别的光强度阈值设定为 174，所得图像被认为是可识别的标准图像[44]；将阈值参数设定为 109 时，颗粒中较亮的部位与背景一起被剔除，无法清晰确定颗粒边界；将阈值参数设定为 174 时，背景中较暗部分被一起选中，干扰颗粒边缘的确定；将阈值参数设定为 156 时，颗粒有清晰的边界。此外，Morphologi 4 型仪器的制造商英国 Malvern 公司，也提供了关于阈值设定的类似参数与意见[49]。

FDA 要求光强度阈值的设定需要提供验证性数据，即需要在更广泛的阈值范围下进行验证，包括不同阈值下的颗粒数量、单个颗粒的大小及图像效果。这对于研究者而言是一个耗时的挑战，不仅需要提供优化数据以证明所选择的阈值（及其边缘数值）是经过优化的，还需要验证数据说明该参数下被纳入的颗粒均拥有灰色边缘及完整周长[44]。



A B C

图像为采用×50倍物镜拍摄后选取单一颗粒局部放大。

A—光强度阈值设定为 109；B—光强度阈值设定为 174；C—光强度阈值设定为 156。

图 3 FDA 提供的不同光强度阈值下的颗粒图像[44]

Fig.3 Particle Images at Different Light Intensity Thresholds Provided by FDA[44]

2.4 鉴定颗粒化学成分的拉曼光谱法的建立

使用拉曼光谱功能进行颗粒化学成分鉴定，应首先设定需进行拉曼光谱检测的颗粒数量。FDA 要求拉曼光谱检测需对每个颗粒单独曝光 20 s 以上以获得较好的信噪结果。考虑到至少数百个 API 颗粒的检出数量要求及 API 颗粒在总颗粒中较低的占比，这一步骤成为整个检测流程中最耗时的环节[50]。在实际检测前应通过预先设定的形态学筛选参数，初步剔除与 API 颗粒形态差距较大的辅料颗粒，提高 API 颗粒在所有颗粒中的占比，降低检测所需的颗粒数与检测时间。但在方法学建立阶段的首次拉曼扫描中，没有可供参考的形态学参数，因此 FDA 要求首次需选择至少 2 000 个未分类的颗粒进行拉曼光谱扫描。

然后需要设定拉曼光谱检测的波长范围。通过

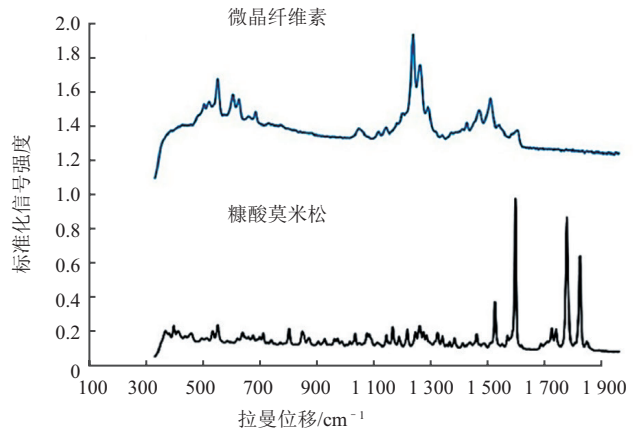
化学数据库或对标准物质进行测量，可以获取 API 分子的标准拉曼光谱作参照；还需要选择包括足够多特征峰的拉曼光谱检测范围，该范围通常为 1 500 ～ 1 800 cm^{-1}[51]，如糠酸莫米松鼻喷剂的检测选择了 1 350 ～ 1 750 cm^{-1} 范围内 1 395、1 470、1 660、1 710 cm^{-1} 的 4 个特征峰以确认 API 颗粒成分。FDA 要求提供验证数据以支持筛选与优化的拉曼光谱位移范围。

将扫描颗粒获得的拉曼光谱数据与空白载玻片的背景光谱数据相减后，即得各个颗粒可供比较的拉曼光谱[52]。仪器可自动计算各颗粒拉曼光谱与 API 颗粒标准拉曼光谱的化学相关系数，系数越高则表明光谱的相似度越高。FDA 提供的不同化学相关系数的图谱范例[48]如图 4 所示。通常 API 颗粒与标准拉曼光谱的化学相关系数在 0.900 以上，可根据实际结果设置鉴定为 API 颗粒的化学相关系数范围。FDA 要求提供验证数据，以确认在设置的化学相关系数范围内不存在非 API 颗粒[44]。

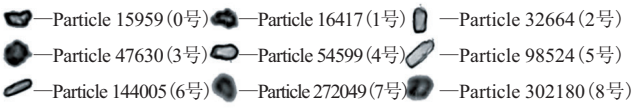
2.5　颗粒的 PSD 及形态学研究

Morphologi 4 型仪器可以根据收集的颗粒图像数据自动计算每个颗粒的粒径与形态学参数。如图 5[49] 所示，图右侧为各颗粒光学图像及所选颗粒的各项形态学参数，左侧为颗粒整体的形态学参数分布。在方法开发的过程中，对颗粒显微图像进行形态学分析的目的是结合拉曼光谱数据，归纳不同成分颗粒的形态学特征，从而在实际拉曼光谱检测的拉曼光谱扫描步骤前凭借光学图像，大致区分并预先剔除与 API 颗粒形态差距较大的部分辅料颗粒、团聚颗粒、气泡等，尽量降低拉曼光谱检测的耗时。

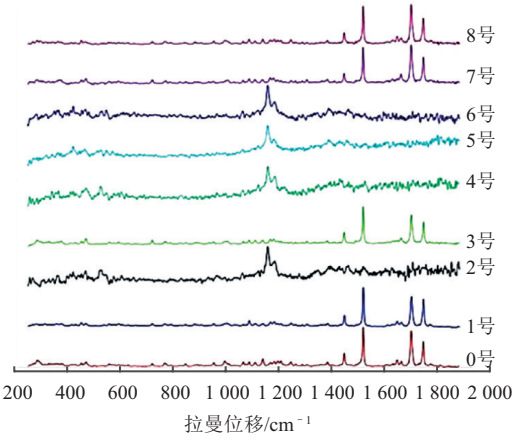
拉曼光谱形态学研究的参数[53]有伸长率［颗粒短径与长径之比（aspect ratio，AR）］、光强均值（intensity mean，IM）、圆度［即形状与圆形近似度（circularity）］、等效圆直径［即颗粒截面积换算为圆形的直径（circular equivalent diameter）］、凸度［即颗粒相比圆形的外凸程度（convexity）］、密实度［即颗粒相比圆形的内凹程度（solidity）］等，均可由仪



A



B



C

光谱相关系数	颗粒编号								
	0号	1号	2号	3号	4号	5号	6号	7号	8号
API	0.975	0.980	0.086	0.983	0.052	0	0.001	0.976	0.981
辅料	0	0	0.709	0	0.697	0.689	0.707	0	0

D

A—拉曼光谱；B—9 个不同颗粒的光学图像；C—9 个颗粒的拉曼光谱（0 ～ 8 号依次对应 B 图中的颗粒 15959 至 302180）；D—与 API、辅料标准光谱对比的光谱相关系数，显示了各颗粒的成分归属。

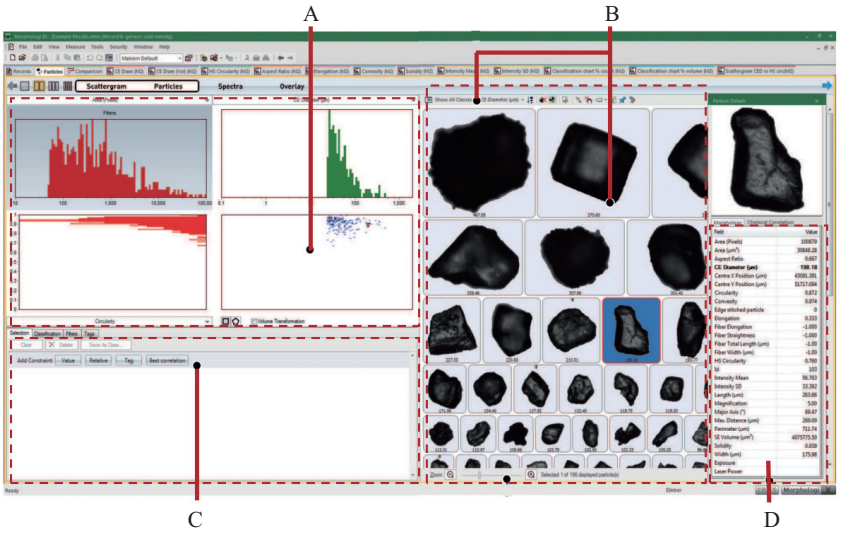
图 4　糠酸莫米松颗粒与辅料颗粒的表征[48]

Fig.4　Characterization of Mometasone Furoate Particles and Excipient Particles[48]

器计算得出。FDA 也给出了手动计算的具体算法[54]。

拉曼光谱仪器的供应商提供了去除气泡与团聚颗粒的方法。如图 6 所示[49]，在颗粒数据库中选择等效圆直径与光强度 2 项参数，对所有颗粒制作散点图，大部分颗粒聚集于 1 个集群内，等效圆直径或光强度明显异常的颗粒可以视为气泡或团聚颗粒去除。

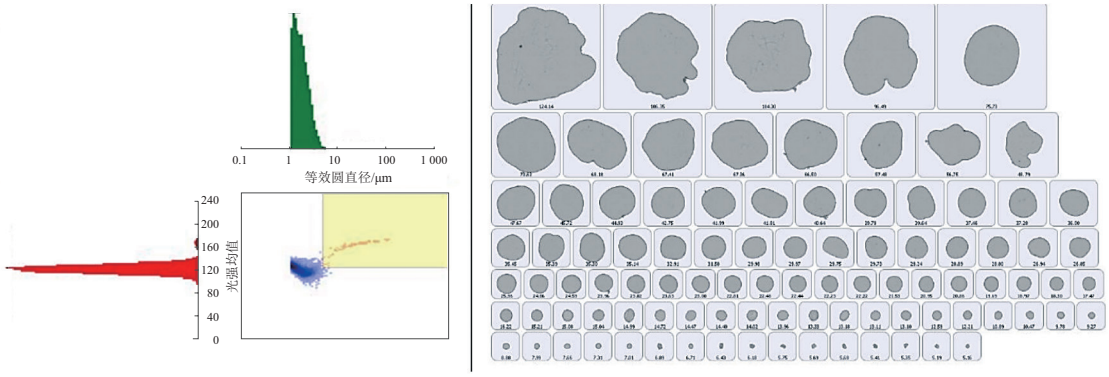
对于辅料颗粒的去除，FDA 在指导原则中提供了糠酸莫米松混悬型鼻喷剂的拉曼光谱检测中得到的各类典型颗粒形态及其对应的各项形态学参数，如表 2[49] 所示。由表 2 可见，不同颗粒在形态上差异巨大，可以通过伸长率、光强均值等特异性较高



A—颗粒形态散点图，选择 2 个形态学参数为横、纵坐标，每个散点对应 1 个颗粒，若该参数组合可区分不同类型的颗粒，则散点图会形成 2 个或多个有分离度的颗粒群，此时选择对应颗粒区域的参数范围即可从数据库中分离特定颗粒；B—显示筛选后颗粒的光学图像，按粒径降序排布；C—载入、保存各类颗粒对应的参数筛选方法；D—显示选定单一颗粒的详细形态参数。

图 5 仪器对光学成像后的颗粒进行形态学参数自动计算的界面[49]

Fig.5 The Interface for Automatic Calculation of Morphological Parameters of Particles after Optical Imaging by the Instrument[49]



A—以光强均值为纵坐标、等效圆直径为横坐标对各颗粒进行散点图绘制，颗粒可分为明显的蓝色、红色 2 个集群；B—将 A 图散点图中的红色颗粒群对应的颗粒扫描图像，显示明显的气泡特征。

图 6 通过形态学参数筛选与去除颗粒中的气泡及团聚颗粒[49]

Fig.6 Screening and Removing Foaming and Agglomerated Particles in Particles by Morphological Parameters[49]

的形态学数值进行区分。

在实际操作中，提高 API 颗粒占比的形态学筛选方法可按 FDA 提供的以下步骤建立。首先，通过对整体样本粒子的拉曼光谱数据进行分析，提取其中 API 颗粒与辅料颗粒对应的形态学参数。如图 7 所示，对于该样本，伸长率和光强均值是 API 颗粒与辅料颗粒曲线下面积重合最少的2个形态学参数，因此可以作为区分 2 类颗粒的参数。

其次，是确定合适的参数范围，在保留足够多 API 颗粒的同时，筛选去除最多的辅料颗粒。在颗粒数据库中，选择不同的伸长率和光强均值参数范围，筛选后的 API 及辅料颗粒占比如表 3 所示。FDA 要求 API 颗粒的保留率高于 85% [44]，因此参数 AR>0.6、IM<160 与参数 AR>0.55、IM<155 均符合要求。

最后，需要确认筛选前后，API 颗粒的 PSD 数据是否有显著偏差。对比不同伸长率和光强均值参数范围下筛选后所得 API 颗粒的 PSD 数据，结果如表 4 所示。FDA 要求筛选前后 API 颗粒相应的 D_{mean}、D_{10}、D_{50}、D_{90}、跨度的改变量均小于 3% [44]。最终确

表 2　形态定向拉曼光谱检测得到的糠酸莫米松混悬液中各类典型颗粒的形态图及形态学参数 [49]

Tab.2　Morphological Images and Parameters of Various Typical Particles in Mometasone Furoate Suspension Detected by Morphologically-directed Raman Spectroscopy[49]

形态图及参数	颗粒编号					
	1	2	3	4	5	6
形态图						
等效圆直径 /μm	2.28	4.69	2.53	8.91	7.36	6.85
伸长率	0.740	0.460	0.822	0.418	0.709	0.585
圆度	0.965	0.860	0.974	0.853	0.937	0.795
光强均值	124	155	115	154	107	108
凸度	0.994	0.974	0.994	0.986	0.988	0.923
密实度	0.997	0.986	0.998	0.994	0.990	0.886

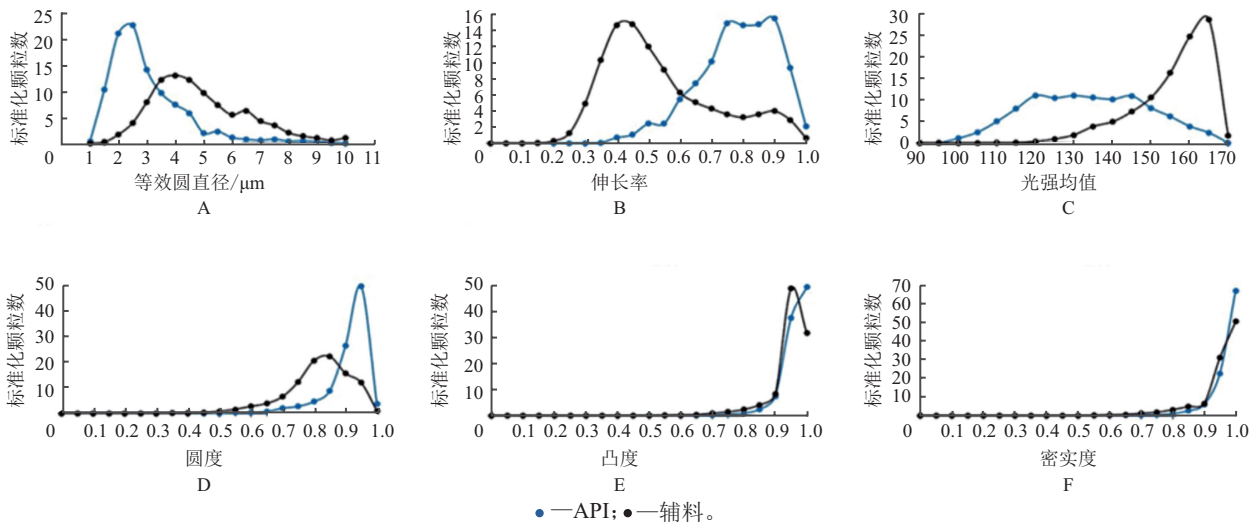


图 7　数据库中 API 颗粒及辅料颗粒的等效圆直径（A）、伸长率（B）、光强均值（C）、圆度（D）、凸度（E）、密实度（F）的分布曲线 [49]

Fig.7　Distribution Curves of API Particles and Excipient Particles in the Database in Circular Equivalent Diameter (A), Aspect Ratio (B), Intensity Mean (C), Circularity (D), Convexity (E), and Solidity (F) [49]

表 3 应用不同的伸长率和光强均值参数过滤前后的样品中 API 颗粒和辅料颗粒数量 [48]

Tab.3 The Number of API Particles and Excipient Particles in Samples before and after Filtration with Different Elongation and Light Intensity Mean Parameters[48]

颗粒数量或占比	无过滤	AR>0.6、IM<150[1)]	AR>0.6、IM<155	AR>0.6、IM<160	AR>0.55、IM<155	AR>0.50、IM<150
API 颗粒数	1 335	1 035	1 120	1 170	1 170	1 110
辅料颗粒数	9 500	470	830	1 380	1 070	840
总颗粒数	10 835	1 505	1 950	2 550	2 240	1 950
筛选后 API 颗粒占比 /%	12.3	68.8	57.4	45.9	52.2	56.9
剔除的 API 颗粒数	0	300	215	165	165	225
剔除的辅料颗粒数	0	9 030	8 670	8 120	8 430	8 660
保留的 API 颗粒比例 /%	100	77.5	83.9	87.6	87.6	83.1
剔除的辅料颗粒比例 /%	0	95.0	91.3	85.5	88.7	91.2

注：[1)] 指保留颗粒的形态参数范围，AR 指长宽比，IM 指光强均值。

表 4 应用不同的伸长率和光强均值参数过滤前后的样品中 API 颗粒的 PSD 数据 [48]

Tab.4 PSD Data for API Particles in Samples before and after Applying Different Elongation and Light Intensity Mean Parameters[48]

颗粒粒径及发布	无过滤	AR>0.6、IM<150[1)]	AR>0.6、IM<155	AR>0.6、IM<160	AR>0.55、IM<155	AR>0.50、IM<150
D_{mean}	3.00	3.10 (3.3%)	3.03 (1.0%)	2.98 (0.7%)	3.06 (2.0%)	3.15 (5.0%)
D_{10}[2)]	1.71	1.90 (11%)	1.83 (7.0%)	1.75 (2.3%)	1.84 (7.6%)	1.91 (12%)
D_{50}	2.60	2.69 (3.5%)	2.61 (0.4%)	2.56 (1.5%)	2.64 (1.5%)	2.73 (5.0%)
D_{90}	4.60	4.63 (0.7%)	4.60 (0.0%)	4.54 (1.3%)	4.61 (0.2%)	4.67 (1.5%)
跨距	1.11	1.01 (9.0%)	1.06 (4.5%)	1.09 (1.8%)	1.05 (5.4%)	1.01 (9.0%)

注：[1)] 指保留颗粒的形态参数范围，AR 指长宽比，IM 指光强均值；[2)] D_{10}、D_{50}、D_{90} 指颗粒按从小到大排列后，对应百分比处的颗粒粒径；括号内数字表示应用过滤设置后相比无过滤的数值变化比例，应小于 3%。

定符合要求的形态学过滤参数为 AR>0.60、IM<160。

2.6 检测所需最少颗粒数的确定

拉曼光谱检测的耗时与检测的颗粒数成正比，因此在方法学建立时需考虑统计学上可接受的最少检测颗粒数，以减少检测所需时间。在前述步骤检测的总样本颗粒数据库中随机选取一定数量的颗粒数据，若其统计学结果与总样本数据的偏差在可接受限度内，则满足该要求的最少颗粒数，即为 FDA 认可的每次检测所需检测的最少 API 颗粒数。

FDA 提供的方法及要求如下[44]：从 API 颗粒数据库（即方法学建立时检测的总计 10 000+ 颗粒中的 API 颗粒）中随机选择 X 个粒子，模拟 1 次检出 X 个 API 粒子的拉曼光谱检测，该过程由计算机模拟，随机重复 5 次；计算该 X 数值下 5 次结果的 D_{mean}、D_{10}、D_{50}、D_{90}、分布宽度的平均值与 RSD 值。验收标准为该检测平均值与整体样本数据差距 <3%，5 次检测结果的 RSD<5%。

FDA 提供了 1 次总颗粒数为 3 946 的拉曼光谱检测示例[48]，数据如表 5 所示，其颗粒的 PSD 随选取样本颗粒数的变化情况如图 8 所示。当从数据库中单次随机选取的颗粒数从 1 000 个降低至 400 个时，均符合 3% 的数据误差要求及 5% 的 RSD 要求；当颗粒数进一步下降时，5 次重复检测所得 D_{90} 的 RSD 大于 5%；当颗粒数下降至 200 以下时，D_{90} 数据误差大于 3%。因此，最终该批颗粒实际检测的最少检测颗粒选择为 400。

表 5　计算机模拟下 API 颗粒的 PSD 数据随检测颗粒数变化的数据 [1)] [48]

Tab.5　The PSD Data for API Particles Changing with the Number of Detected Particles in Computer Simulation[48]

颗粒数	D_{10}/μm	D_{50}/μm	D_{90}/μm	D_{mean}/μm	跨距
10	1.35 (11.3%) *	2.60 (15.8%)	3.93 (14.4%)	2.75 (12.6%)	0.99 (12.9%)
25	1.57 (8.8%)	2.31 (7.1%)	4.05 (14.0%)	2.61 (5.5%)	1.08 (23.5%)
50	1.45 (5.2%)	2.48 (5.6%)	4.34 (7.9%)	2.78 (6.0%)	1.17 (11.5%)
100	1.49 (3.7%)	2.44 (4.6%)	4.68 (6.7%)	2.82 (5.0%)	1.31 (13.1%)
150	1.52 (6.0%)	2.47 (4.9%)	4.62 (6.3%)	2.85 (3.2%)	1.26 (9.3%)
200	1.56 (2.7%)	2.47 (3.2%)	4.22 (3.2%)	2.75 (1.9%)	1.08 (5.0%)
250	1.48 (3.0%)	2.45 (2.5%)	4.40 (8.8%)	2.76 (4.1%)	1.19 (13.2%)
300	1.53 (2.2%)	2.51 (2.0%)	4.35 (6.3%)	2.78 (2.9%)	1.12 (9.8%)
350	1.50 (1.4%)	2.48 (2.0%)	4.39 (6.1%)	2.79 (2.6%)	1.16 (7.7%)
400	1.51 (3.2%)	2.48 (2.6%)	4.26 (1.8%)	2.76 (1.6%)	1.11 (1.5%)
500	1.50 (1.8%)	2.47 (1.7%)	4.28 (1.8%)	2.74 (0.9%)	1.13 (4.1%)
600	1.52 (1.4%)	2.49 (2.5%)	4.40 (1.8%)	2.78 (1.9%)	1.16 (2.3%)
700	1.53 (1.9%)	2.45 (1.5%)	4.30 (1.1%)	2.74 (1.0%)	1.13 (3.4%)
800	1.50 (1.5%)	2.46 (1.3%)	4.35 (2.2%)	2.75 (1.6%)	1.16 (3.1%)
900	1.54 (1.0%)	2.48 (1.8%)	4.39 (2.7%)	2.79 (1.9%)	1.15 (2.3%)
1000	1.53 (1.9%)	2.52 (0.9%)	4.36 (1.9%)	2.80 (0.8%)	1.12 (3.5%)
3946	1.52	2.47	4.33	2.76	1.14

注：[1)] 括号内数字表示对应项目 5 次检测的 RSD；标红的数字表示数据误差或 RSD 超出可接受标准。

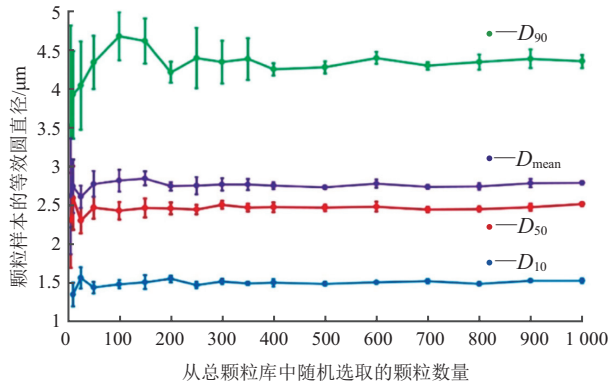


图 8　计算机模拟下 API 颗粒的 PSD 数据随检测颗粒数变化的数据图 [48]

Fig.8　The PSD Data of API Particles Changing with the Number of Detected Particles in Computer Simulation[48]

2.7　辅助正交检测方法的建立

拉曼光谱检测仪的显微拉曼光谱组件能将激光聚焦至直径 1 ～ 2 μm，并收集颗粒受激光照射时散射的拉曼光谱。但拉曼光谱本身较为微弱，强度仅为照射激光的几千分之一 [5]，此时若颗粒粒径明显小于激光直径，受激光照射的面积不足，拉曼散射信号的信噪比将不满足要求 [55]。即使最先进的拉曼光谱仪器也无法保证能对粒径 1 μm 以下颗粒进行准确检测 [49]。因此在应用拉曼光谱方法时，通常需要使用其他辅助正交评价方法来评估亚微米级 API 颗粒的 PSD 情况，或证明亚微米级 API 颗粒对整体药物释放性能影响较小而免于检测。

若采用其他颗粒粒度检测技术，FDA 则要求选择的检测方法应能从辅料颗粒中筛选出 API 颗粒，并且需提供验证数据以证明其足够用于仿制药与原研产品 PSD 的一致性评价 [44]。例如，当拉曼光谱仅检测等效圆直径大于 2 μm 的颗粒时，则另需提供：(1) 使用拉曼光谱检测得到的 1 ～ 2 μm 内 API 颗粒的 PSD 数据；(2) 开发其他颗粒粒度检测方法辅助表征 1 μm 以下的颗粒，如在糠酸莫米松鼻混悬型喷雾剂的开发中，采用的正交方法之一是采用缺少拉曼光谱功能但能够测量粒径 0.5 μm 颗粒的 Morphologi G3 型仪器进行检测；(3) 报告小于 1 μm 的原料药和辅料的颗粒数量百分比。

若测定粒径 1 μm 以下的颗粒在仿制药和原研产

品中的占比均<1%，则FDA认为亚微米级API颗粒对药物治疗的贡献可被忽略，此时仅需采用拉曼光谱方法即可比较仿制药和原研产品API颗粒的等效性。但若有大量粒径<1 μm的颗粒，或仿制药和原研产品中粒径<1 μm的颗粒百分比不同，则需要额外方法比较API颗粒的等效性。

目前FDA认可的额外方法有鼻用混悬型产品的体外溶出度测试[49]、流变学测试[55]等。其中，体外溶出度试验已被收载入FDA于2023年5月18日更新的多款混悬型鼻喷剂PSG文件[15—17,19]中，作为拉曼光谱的必要补充检测方法。同时，FDA也表态支持开发新的检测方法。

3 总结与展望

FDA认可经全面验证的拉曼光谱研究用于代替体内临床终点BE研究，并确定混悬型鼻喷剂产品可采用以下2条途径之一进行BE评价方式：(1) 采用拉曼光谱及体外溶出度检测法；(2) 采用临床药代动力学及药效学试验。由于前者的资金及时间投入远低于后者，因此拉曼光谱技术预期将成为未来混悬型鼻喷剂仿制药BE评价的主流检测方式。

拉曼光谱技术的难点在于方法开发过程的复杂度较高，FDA通报的常见拉曼光谱研究缺陷均与方法学的开发、验证过程相关。因此在方法学开发的过程中，需要为选定的检测参数提供充分的支持性验证数据，以避免因拉曼光谱的方法学缺陷而使BE评价工作停滞。

拉曼光谱检测方法仍有一定局限性。即使是目前最先进的拉曼光谱仪器，对粒径小于2 μm的颗粒的检测精度也较低，且完全不适用于粒径小于1 μm的颗粒。因此，对于检测限外的颗粒，仍只能采用传统检测方法或补充进行溶出度试验。但随着采用拉曼光谱数据的申报药物品种增多，以及相关研究标准的制定，拉曼光谱检测技术还会得到进一步开发，如采用表面增强拉曼散射[56]、傅里叶变换红外光谱等技术[57]，进一步提高检测精度，取得更好的泛用性。虽然目前国内并没有采用拉曼光谱技术用于混悬型鼻喷剂或其他药物的申报案例，但随着国内外的技术交流及药品申报标准的更新，该技术未来也有望在国内鼻喷剂仿制药申报中占有重要地位。

参考文献：

[1] NELSON M P, ZUGATES C T, TREADO P J, *et al*. Combining Raman chemical imaging and scanning electron microscopy to characterize ambient fine particulate matter [J]. *Aerosol Sci Technol*, 2001, **34**(1): 108-117.

[2] DOUB W H, ADAMS W P, SPENCER J A, *et al*. Raman chemical imaging for ingredient-specific particle size characterization of aqueous suspension nasal spray formulations: a progress report [J]. *Pharm Res*, 2007, **24**: 934-945.

[3] LEVOGUER C L, KIDDER L, HABER K. Morphologically directed Raman spectroscopy as a novel tool to monitor changes in particle size and shape in solid dosage blends and formulations [J]. *Sci Pharm*, 2010, **78**(3): 713.

[4] KINNUNEN H, HEBBINK G, PETERS H, *et al*. Extrinsic lactose fines improve dry powder inhaler formulation performance of a cohesive batch of budesonide via agglomerate formation and consequential co-deposition [J]. *Int J Pharm*, 2015, **478**(1): 53-59.

[5] DAS R, AGRAWAL Y. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications [J]. *Vib Spectrosc*, 2011, **57**(2): 163-176.

[6] KARKI B, FREELON B, RAJAPAKSE M, *et al*. Strain-induced vibrational properties of few layer black phosphorus and MoTe2 via Raman spectroscopy [J]. *Nanotechnology*, 2020, **31**(42): 425707.

[7] IBACETA-JANA J, MUYDINOV R, ROSADO P, *et al*. Vibrational dynamics in lead halide hybrid perovskites investigated by Raman spectroscopy [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, **22**(10): 5604-5614.

[8] YANG D Q, ZHU L Q, WANG J L, *et al*. Band structure and lattice vibration of elemental tellurium investigated by temperature-dependent mid-and-far infrared transmission and Raman spectroscopy [J]. *Phys Status Solidi*, 2022, **259**(7): 2100625.

[9] DOUMENG M, MAKHLOUF L, BERTHET F, *et al*. A comparative study of the crystallinity of polyetheretherketone by using density, DSC, XRD, and Raman spectroscopy techniques [J]. *Polym Test*, 2021, **93**: 106878.

[10] ALALI H, AI Y, PAN Y L, *et al*. A collection of molecular fingerprints of single aerosol particles in air for potential identification and detection using optical trapping-Raman spectroscopy [J]. *Molecules*, 2022, **27**(18): 5966.

[11] DIXON-NAISH E, PARRY M, RAMJEEAWON M, *et al*.

New *in-vitro* bioequivalence approaches for generic nasal suspension products [J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Delivery*, 2021, **34**(3): 10-11.

[12] KAMMRATH B W. Combining spectroscopy with microscopy for advancing the analysis of forensically relevant traces [J]. *Spectroscopy*, 2020, **35**(7): 33-36.

[13] KOUTRAKOS A, LEARY P, KAMMRATH, B. Illicit and counterfeit drug analysis by morphologically directed Raman spectroscopy [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, **1810**: 13-27.

[14] ZHANG S, CHEN H, LI R, *et al*. Raman spectroscopy and mapping technique for the identification of expired drugs [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2020, **224**: 117407.

[15] Food and Drug Administration. Draft guidance on fluticasone furoate [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_02 2051. pdf.

[16] Food and Drug Administration. Draft guidance on mometasone furoate [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_020 762. pdf.

[17] Food and Drug Administration. Draft guidance on azelastine hydrochloride; fluticasone propionate [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. accessdata. fda. gov/drug satfda _docs/psg/PSG_202236. PDF.

[18] Food and Drug Administration. Draft guidance on mometasone furoate; olopatadine hydrochloride [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. accessdata. fda. gov/ drugsatfda_ docs/psg/PSG_211746. pdf.

[19] Food and Drug Administration. Draft guidance on fluticasone propionate [EB/OL]. [2023-07-10]. https:// www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/psg/ PSG_020121. pdf.

[20] Food and Drug Administration. Draft guidance on triamcinolone acetonide [EB/OL]. [2023-07-10]. https:// www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_ 020468. pdf.

[21] VELDEMAN L, MADANI I, HULSTAERT F, *et al*. Evidence behind use of intensity-modulated radiotherapy: a systematic review of comparative clinical studies [J]. *Lancet Oncol*, 2008, **9**(4): 367-375.

[22] BJÖRKMAN S, RIGEMAR G, IDVALL J. Pharmacokinetics of midazolam given as an intranasal spray to adult surgical patients [J]. *Br J Anaesth*, 1997, **79**(5): 575-580.

[23] KASHYAP K, SHUKLA R. Drug delivery and targeting to the brain through nasal route: mechanisms, applications and challenges [J]. *Curr Drug Delivery*, 2019, **16**(10): 887-901.

[24] KAISER H B, NACLERIO R M, GIVEN J, *et al*. Fluticasone furoate nasal spray: a single treatment option for the symptoms of seasonal allergic rhinitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, **119**(6): 1430-1437.

[25] ZITT M, KOSOGLOU T, HUBBELL J. Mometasone furoate nasal spray: a review of safety and systemic effects [J]. *Drug Saf*, 2007, **30**: 317-326.

[26] CHUDIWAL S S, DEHGHAN M H G. Quality by design approach for development of suspension nasal spray products: a case study on budesonide nasal suspension [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, **42**(10): 1643-1652.

[27] CHERVINSKY P. Clinical review of once-daily beclomethasone dipropionate for seasonal allergic rhinitis [J]. *Clin Ther*, 1996, **18**(5): 790-796.

[28] Food and Drug Administration. Bioavailability and bioequivalence requirements [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. accessdata. fda. gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/ CFRSearch. cfm?fr=320. 23.

[29] SCHERLIE R. Nasal formulations for drug administration and characterization of nasal preparations in drug delivery [J]. *Ther Delivery*, 2020, **11**(3): 183-191.

[30] ANAND U, FERIDOONI T, AGU R U. Novel mucoadhesive polymers for nasal drug delivery [J]. *Recent Adv Novel Drug Carrier Syst*, 2012, **1**: 315-330.

[31] AMBRUS R, GIESZINGER P, GÁSPÁR R, *et al*. Investigation of the absorption of nanosized lamotrigine containing nasal powder via the nasal cavity [J]. *Molecules*, 2020, **25**(5): 1065.

[32] KUSHWAHA S K S, KESHARI R K, RAI A K. Advances in nasal trans-mucosal drug delivery [J]. *J Appl Pharm Sci*, 2011, **1**: 21-28.

[33] INOUE D, TANAKA A, KIMURA S, *et al*. The relationship between *in vivo* nasal drug clearance and *in vitro* nasal mucociliary clearance: application to the prediction of nasal drug absorption [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, **117**: 21-26.

[34] CHEN J, MARTIN A R, FINLAY W H. Recent *in vitro* and in silico advances in the understanding of intranasal drug delivery [J]. *Curr Pharm Des*, 2021, **27**(12): 1482-1497.

[35] ERRECALDE J, LIFSCHITZ A, VECCHIOLI G, *et al*. Safety and pharmacokinetic assessments of a novel ivermectin nasal spray formulation in a pig model [J]. *J Pharm Sci*, 2021, **110**(6): 2501-2507.

[36] BARTOS C, SZABÓ-RÉVÉSZ P, HORVÁTH T, *et al*. Comparison of modern *in vitro* permeability methods with the aim of investigation nasal dosage forms [J]. *Pharmaceutics*,

2021, **13**(6): 846.

[37] CHARI S, SRIDHAR K, WALENGA R, *et al*. Computational analysis of a 3D mucociliary clearance model predicting nasal drug uptake [J]. *J Aerosol Sci*, 2021, **155**: 105757.

[38] LE GUELLEC S, EHRMANN S, VECELLIO L. *In vitro-in vivo* correlation of intranasal drug deposition [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2021, **170**: 340-352.

[39] Food and Drug Administration. FDA embraces emerging technology for bioequivalence evaluation of locally acting nasal sprays [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. fda. gov/media/97705/download.

[40] Food and Drug Administration. Draft guidance on budesonide [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. accessdata. fda. gov/drugsatfda_docs/psg/Budeso nide_Inhalation_ Sus_20929_RC_09-12. pdf.

[41] LI B V, JIN F, LEE S L, *et al*. Bioequivalence for locally acting nasal spray and nasal aerosol products: standard development and generic approval [J]. *AAPS J*, 2013, **15**: 875-883.

[42] LIU Q, ABSAR M, SALUJA B, *et al*. Scientific considerations for the review and approval of first generic mometasone furoate nasal suspension spray in the United States from the bioequivalence perspective [J]. *AAPS J*, 2019, **21**: 14.

[43] SHARPE S A, SANDWEISS V, TUAZON J, *et al*. Comparison of the flow properties of aqueous suspension corticosteroid nasal sprays under differing sampling conditions [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2003, **29**(9): 1005-1012.

[44] Food and Drug Administration. Common bioequivalence deficiencies of morphologically directed Raman spectroscopy study in generic orally inhaled and nasal drug products [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. fda. gov/media/168945/download.

[45] LIU S. Particle dispersion for suspension flow [J]. *Chem Eng Sci*, 1999, **54**(7): 873-891.

[46] GROBUSCHEK N, LECNIK O, SCHMID M G, *et al*. Mass uniformity of nasal sprays [J]. *Sci Pharm*, 2003, **71**(3): 151-164.

[47] PU Y, MEDENDORP J P, YONZON C R. Real-time monitoring of active ingredient dispersion in a pharmaceutical aqueous suspension using Raman spectroscopy [J]. *J Raman Spectrosc*, 2011, **42**(11): 1994-1999.

[48] BRANDON J, MOHAMMAD A, RENISHKUMAR D, *et al*. Analytical method development for characterizing ingredient-specific particle size distributions of nasal spray suspension products [J]. *J Pharm Sci*, 2021, **110**(7): 2778-2788.

[49] MALVERN P. Morphologi 4 user manual [EB/OL]. [2023-07-10]. https://www. malvernpanalytical. com//en/learn/knowledge-center/user-manuals/man0595en.

[50] CLARKE J, GAMBLE J F, JONES J W, *et al*. Alternative approach for defining the particle population requirements for static image analysis based particle characterization methods [J]. *Adv Powder Technol*, 2019, **30**(5): 920-929.

[51] WANG H, BORAEY M A, WILLIAMS L, *et al*. Low-frequency shift dispersive Raman spectroscopy for the analysis of respirable dosage forms [J]. *Int J Pharm*, 2014, **469**(1): 197-205.

[52] WANG T, DAI L. Background subtraction of Raman spectra based on iterative polynomial smoothing [J]. *Appl Spectrosc*, 2017, **71**(6): 1169-1179.

[53] MIKLI V, KAERDI H, KULU P, *et al*. Characterization of powder particle morphology [J]. *Proc Est Acad Sci Eng*, 2001, **7**(1): 22-34.

[54] FARIAS G, SHUR J, PRICE R, *et al*. A systematic approach in the development of the morphologically-directed Raman spectroscopy methodology for characterizing nasal suspension drug products [J]. *AAPS J*, 2021, **23**: 73.

[55] FARIAS G, HUCK-JONES R P D, SHUR J. Investigating orthogonal *in vitro* analytical approaches to demonstrate bioequivalence of nasal suspension formulations [J]. *J Pulm Drug Delivery*, 2018, **31**(2): 30-31.

[56] LANGER J, JIMENEZ DE ABERASTURI D, AIZPURUA J, *et al*. Present and future of surface-enhanced Raman scattering [J]. *ACS Nano*, 2019, **14**(1): 28-117.

[57] DUTTA A. Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Spect Meth Nano Char*, 2017, **1**: 73-93.