FTIR法用于药品检出菌与药品微生物检验洁净室环境菌的相关性考察

裴 琳[1,2], 胡昌勤[1*], 马仕洪[1], 戴 翠[1], 杭太俊[3]

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 青岛市药品检验所, 山东 青岛 266071;
3. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要: 应用 FTIR法对药品检出菌与微生物检验洁净室环境菌进行相关性考察,通过临界匹配值法和聚类分析法比较药品检出菌与环境菌 FTIR图谱的相似性;构建了洁净室环境菌的 FTIR光谱谱库,确定了快速判断药品检出菌是否为环境菌污染的指标,为药品无菌检查一次性报告的准确性提供了保证,并可以实现对洁净室环境微生物的动态监控;方法简便、准确、快捷,易于在药品微生物控制中推广。

关键词: FTIR; 药品无菌检查; 微生物控制; 洁净室; 相关性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)11 - 1189 - 06

Correlation of bacteria in the contaminated drug and the environmental microbes in the clean room for pharmaceutical microbial test investigated by FTIR

PEI Lin[1,2], HU Chang-qin[1*], MA Shi-hong[1], DAI Hui[1], HANG Tai-jun[3]

(*1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China; 2. Qingdao Institute for Drug Control, Qingdao 266071, China; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*)

Abstract: The FTIR method was used to investigate the correlation of bacteria in the contaminated drug and the environmental microbes in the clean room for pharmaceutical microbial test. The similarity of bacteria in the contaminated drug and environmental microbes was compared by critical hit value method and cluster analysis method. This constructed the FTIR spectra library of clean room environmental microbe, and determined the criterion to promptly judge if the bacteria isolated from pharmaceuticals were contaminated by environment or not, hence the exactness of "one-off report" of sterile test result can be guaranteed, and can be used for the dynamic monitoring of environmental bacteria of clean room. The method is proven to be simple, accurate and rapid, and can be easily spread to the pharmaceutical microbial control.

Key words: FTIR; pharmaceutical sterile test; microbial control; clean room; correlation

药品无菌和微生物限度检查是药品质量控制的重要组成部分,药品一旦受到微生物的污染,将可能对患者造成感染,甚至威胁到生命安全。在现代 GMP生产条件下,药品中微生物的污染具有高度的随机性。为保证产品的安全性,各国药典均要求对无菌检查不合格的药品不得再进行复验,即实行"一次性报告"制度。由于实验中的阳性结果还可能源于实验过程中环境的污染,因此判断检出菌与环境菌的相关性,是排除实验过程污染、减少假阳性结果、提高检验结果准确性的必不可少的环节。

目前,对微生物进行相似性分析的有效方法为分子生物学方法,即采用了根据 16S rRNA序列同源性建立的系统发育体系[1],但适用于药品微生物检验的微生物快速相似性分析方法尚未见报道。近年来傅立叶变换红外光谱(FTIR)技术结合化学计

收稿日期: 2007-06-08.

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 67095308, Fax: 86 - 10 - 65115140, E-mail: hucq@nicpbp.org.cn

量学方法在微生物分析中的应用逐渐受到关注, FTIR法测定的是无损伤微生物的红外光谱, 反应了全细胞组分的综合信息。由于这些细胞组分与基因表达有关, 因此, 所得图谱有效地反映了细胞表型和基因型信息, 国外已用于对微生物的鉴定和分类[2~7], 但在药品检验及药品生产控制中的应用尚未见报道。本文应用 FTIR技术对洁净室环境菌和药物污染菌的相似性进行比较, 建立了判断药物中检出的微生物是否为环境污染菌的方法和标准, 不仅提高了药品无菌实验"一次性报告"的准确性, 是对中华人民共和国药典无菌检查方法的补充和扩展; 同时构建的环境菌 FTIR谱库, 可以实现对洁净室环境微生物的动态监控。

材料与方法

仪器与材料　Equinox 55型 FTIR分光光度计, OPUS 5.5分析软件 (德国 Bruker公司); 微生物 FTIR图谱测量专用的 B-module附件, 配有 DTGS检测器, 15位 ZnSe载样窗片 (德国 Bruker公司); 振动接种环 (德国 Braun公司); MAS100浮游菌采样器 (德国 Merck公司)。营养琼脂培养基和胰酪大豆琼脂 (TSA)培养基均为北京三药科技开发公司产品。标准菌株金葡菌 [*Staphylococcus aureus*, *S. aure*] CMCC(B) 26003、大肠埃希菌 [*Escherichia coli*, *E. coli*] CMCC(B) 44102和枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis*, *B. subt*] CMCC(B) 63501由中国医学细菌管理保藏中心提供; 其他参照用菌株由中国医学细菌管理保藏中心和国家细菌耐药性监测中心提供。

洁净室环境菌的采集和培养　按照医药工业洁净室 (区)沉降菌和浮游菌的测试方法[8,9], 使用营养琼脂平板对微生物检查洁净室定期进行浮游菌和沉降菌的采集; 于 35 ℃培养 48 h后, 挑选单菌落划线接种于 TSA平板上, 于 35 ℃培养 (24 ±2) h后, 进行 FTIR测定。

药品中微生物的检测与处理　按中华人民共和国药典[10]的方法对药品进行无菌检查或微生物限度检查。检出细菌先在 TSA平板上纯化形成单菌落, 然后挑选单菌落划线接种于该平板上, 于 35 ℃培养 (24 ±2) h后, 进行 FTIR测定。

FTIR测定样品的制备　用经过校正的直径为 1 mm的振动铂金接种环从 TSA培养基上菌落汇集处取 1 ~2环菌苔, 置于灭菌水 100 μL中, 启动振动开关制得均匀的菌悬液, 量取 25 μL置于 ZnSe窗片的载样处, 立即置于装有硅胶的减压干燥器中, 减压干燥使菌悬液成为透明的薄膜。

FTIR谱图采集　按中华人民共和国药典[10]的方法校准仪器。取出 ZnSe窗片, 立即置于 B-module样品腔中, 将样品腔排气后, 测定 FTIR吸收光谱图。测量参数: 波数范围 4 000 ~ 500 cm^{-1}, 扫描次数 32次, 分辨率 4 cm^{-1}。

细菌谱库的建立与分析　使用 OPUS软件提供的定性分析方法建立细菌谱库。参照相关文献[11]及德国 Bruker公司的微生物 FTIR分析用户手册, 采用 35 ℃培养 (24 ±2) h的菌株的 FTIR图谱, 按单谱图建库的方法建立细菌谱库。

参照文献[4,12]及 Bruker公司微生物 FTIR分析用户手册, 采用 1 200 ~ 900 cm^{-1}, 3 000 ~ 2 800 cm^{-1}, 1 500 ~1 400 cm^{-1}谱段组合进行微生物判别分析, 这 3个谱段分别主要代表了微生物细胞壁多聚糖、细胞膜脂肪酸以及细胞质膜蛋白质和类脂成分的信息。

分别采用临界匹配值法和聚类分析法两种方法进行分析。参照图谱库中, 每一株菌的每一原始光谱及平均光谱均分别作为独立的组; 在对未知样本的图谱进行判别时, 将未知光谱代入谱库, 按公式 (1)计算未知光谱与谱库内所有光谱之间的 Pearson相关系数 (r), 然后通过公式转化为光谱距离 (匹配值), 得到一系列匹配值。

$$r = \frac{\Sigma (X - \bar{X}) \Sigma (Y - \bar{Y})}{\sqrt{\Sigma (X - \bar{X})^2 \Sigma (Y - \bar{Y})^2}} \quad (1)$$

$$D = (1 - r) \times 1\ 000 \quad (2)$$

式中, X和 Y代表响应频率范围的原始光谱强度; D代表光谱距离。

采用临界匹配值法时, 使用重现性水平归一化法 (normal to reprolevel)计算光谱距离 (D_{NR}), 以减少微生物重复制样、测量对 FTIR图谱的影响。

$$D_{NR} = \frac{\Sigma_{i=1}^{n} \frac{D_i}{\text{Reprolevel}_i}}{n} \quad (3)$$

式中, D_i根据公式 (1) (2)计算得到; n为所选谱段的数目; Reprolevel_i为重现性水平值,

$$\text{Reprolevel} = \bar{D} + 2\sigma \quad (4)$$

式中, $\bar{D}$和 σ值分别为多次实验中相同菌株的 FTIR图谱, 根据公式 (1) (2)计算得到的距离平均值和标准偏差。D_{NR}值越小, 相似性越高; 将 D_{NR}值与预先确定的临界值进行比较, 确定未知光谱与谱

库内光谱是否相关,进而判别药物检出菌与环境菌的相关性。

采用聚类分析方法时,首先对光谱进行一阶导数处理以消除基线差异并提高分辨率,利用谱库中的所有平均光谱和未知菌光谱一同进行聚类分析,根据公式(1)和(2)计算 D 值,采用平均链接算法进行聚类分析,并根据 D 值进行归属判断。当 $r \geqslant 0.95$ 时,认为两变量存在显著性相关;此时,相应的 $D \leqslant 50$;故确定临界值为 50,即 $D \leqslant 50$ 时两株菌被认为具有高度相似性。

结果与讨论

1　FTIR谱库的建立

1.1　实验条件对细菌 FTIR光谱的影响

1.1.1　培养温度的影响　将 *S. aure*, *E. coli* 和 *B. subt* 分别于 25和 35 ℃培养 24 h,测定其 FTIR图谱。先对 FTIR图谱进行一阶导数和矢量归一化预处理,选择谱段 1 200 ~ 900, 3 000 ~ 2 800和 1 500 ~ 1 400 cm^{-1},采用平均链接(average linkage)算法,以第一谱段归一化法(scaling to 1st range)计算光谱距离,进行聚类分析形成的系统树状图(图 1)。可以看出,同种细菌在不同培养温度下,所得的 FTIR图谱存在差异,但这种差异小于种间差异,因此通过固定培养温度可以避免。

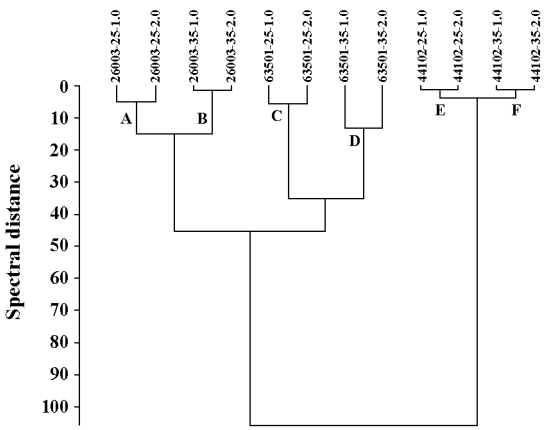

Figure 1　Dendrogram formed by cluster analysis of the FTIR spectra of 3 strains cultivated in different temperature. A: *S. aure* 25 ℃; B: *S. aure* 35 ℃; C: *B. subt* 25 ℃; D: *B. subt* 35 ℃; E: *E. coli* 25 ℃; F: *E. coli* 35 ℃

1.1.2　培养时间的影响　从环境中采集蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, *B. cere*)培养 24, 48, 96, 120和 144 h后分别测定其 FTIR图谱。培养 48 h后,其在 1 280, 1 579, 1 057, 830, 764, 720, 702和 653 cm^{-1} 表现出吸收峰或峰值增强,并随着培养时间的延长而增强;而 1 092和 1 252 cm^{-1} 处的吸收值则随着培养时间的延长逐渐降低。前者被认为与芽孢的萌生相一致[3,12],而后者的两个波数分别代表核酸分子磷酸二酯键的对称($\nu^{s}_{P=O}$)和反称伸缩振动吸收($\nu^{as}_{P=O}$)[12],反映培养过程中菌体内的核酸降解过程。由此可见,不同的培养时间,相同菌株的 FTIR图谱差异较大,故标准操作规程应固定培养时间。

1.2　环境菌 FTIR光谱库的建立

分别构建了总体环境菌和近期环境菌的 FTIR谱库:每个月定期采集洁净室内的环境菌(约 20株),共采集 12个月;挑选典型菌落测定 FTIR图谱,构成环境菌谱库;将近 3个月的图谱作为近期环境菌谱库,并按月不断调整,即不断加入新的采集菌图谱,剔除最初月份的图谱,使该谱库能够动态地反映近期洁净室的微生物状态;其余 9个月的图谱作为总体环境菌谱库(目前约包括 175株细菌的 890张光谱);由近期环境菌谱库剔出的图谱汇入总体环境菌谱库,同时从总体环境菌谱库中剔除最初月份的图谱。

洁净室内的微生物主要来源于外环境。虽然在特定时期,洁净室内的微生物与外环境微生物的分布可能不同,但由于人员流动、物品传输等因素,长期积累后总体环境菌谱库中的微生物分布情况应与外环境的微生物分布情况基本一致。故总体环境菌库基本代表了外环境微生物的分布情况,而近期环境菌谱库代表的是特定时期洁净室内微生物的分布情况。

2　FTIR法判别药物检出菌与环境菌的相关性

采用临界匹配值法和聚类分析法两种方法判别药物检出菌与环境菌的相关性。

2.1　临界匹配值法

该方法是参考模式识别中的 K最近邻域法(KNN法)[13]而建立的,是一种有监督的模式识别方法。首先比较未知样本图谱与谱库中所有样本图谱的距离;选择距离最小者再与临界值进行比较,当匹配值大于临界值时,二者不相关,反之,匹配值小于临界值时,二者相关;进而判断未知样本的归属。本方法的准确性与临界值的选择有关。本文通过对实验数据的统计确定临界值。

2.1.1　识别谱段及重现性水平值(reproducibility level, Reprolevel)的确定　为定义每一识别谱段的重现性水平值,选择了 3株细菌,经多次制样,采集

图谱,计算出不同谱段的重现性水平值(表 1);最终实验中用到的 3个谱段(3 000 ~2 800, 1 200 ~900 和 1 500 ~1 400 cm^{-1})的重现性水平值分别为 5,10 和 20。

Table 1　Determination of reproducibility level

Strain	Spectral band / cm^{-1}				
	3 000 ~ 2 800	1 200 ~ 900	1 500 ~ 1 400	1 500 ~ 1 200	900 ~ 700
B. subt(*n* =15)	4.4	8.7	25.5	22.2	62.5
S. aure(*n* =15)	5.8	10.4	23.4	24.4	190.9
E. coli(*n* =18)	3.5	14.4	7.2	13.4	83
Average	5	11	19	20	112

2.1.2　临界值的确定　从总体环境谱库 890张光谱中随机抽取 192张原始光谱进行交叉验证,这些图谱应均能够被正确识别;根据分别得到的一系列从小到大排列的匹配值列表,利用得到的 192个最小匹配值,汇总,绘制直方图和累积百分率(图 2A),确定能正确识别全部 192张光谱的最大匹配值。选取 184张未包括在谱库内的其他来源的非环境菌光谱进行定性分析,理论上这些图谱应均不能被正确识别;用总体环境谱库对该 184张光谱进行分析,得到的一系列从小到大排列的匹配值列表,利用得到的 184个最小匹配值,汇总,绘制直方图和累积百分率(图 2B),确定不能被总体环境谱库识别的最小匹配值。由图 2可见,匹配值为 1.0时,192张谱库内部图谱均能被总体环境谱库识别;184张外部图谱中的 183张(99.46%)不能被总体环境谱库识别;故确定谱库的临界值为 1.0。该值基本保证了 99%以上的图谱能被正确判断。

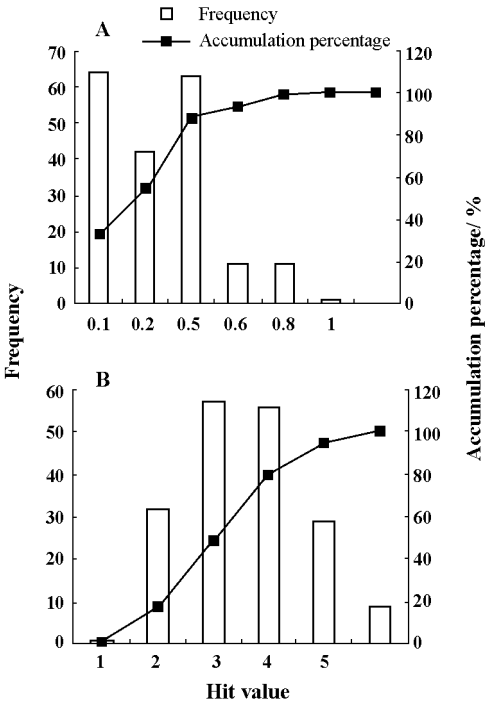

Figure 2　Histograms which determined the critical hit value. A: 100.0% of hit values of library enclosed spectra are less than 1.0; B: 99.46% of hit values of library unclosed spectra are bigger than 1.0

2.1.3　临界值的验证　将 59株分离自肉类、酒类、人体等非洁净室环境源细菌的 FTIR光谱代入总体环境菌库,得到的最小匹配值均大于 1.0,判断正确率为 100%。

2.2　聚类分析法[2,4,13]

2.2.1　聚类分析方法　聚类分析属于无监督的模式识别方法,尤其适用于样品类别未知的情况。它用于判断药品检出菌和环境菌的 FTIR图谱的相似性分析时,将相似图谱按组或簇分类,可以明确地表示出药品检出菌在树状图中的位置,以及该菌的最近邻域。

利用近期环境菌库对 5株药品检出菌进行聚类分析,结果见图 3。5株检出菌与环境菌的最小 *D* 值均大于 50,即 *r*值均小于 0.95,表明二者之间无显著相关,说明这些检出菌均不是环境污染菌。

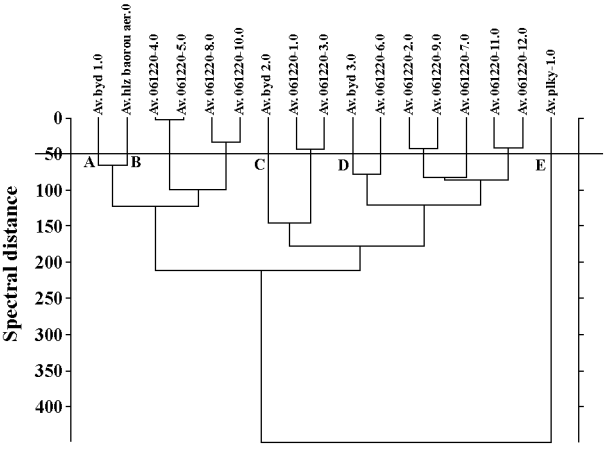

Figure 3　Example of cluster analysis of bacteria isolated from pharmaceuticals and airborne microbe. A - E: Five strains isolated from drug separately

2.2.2　临界值的验证　将 59株分离自肉类、酒类、人体等非洁净室环境源的细菌的 FTIR光谱分别代入总体环境菌库进行聚类分析,所有的 *D*值均大于 50,判断正确率为 100%(59/59),说明本方法具有较强的判别能力。

2.3　分析流程

一般采用临界匹配值法对药品检出菌进行分析,判断其是否为环境菌,并通过近期环境菌库和总体环境菌库进一步判断污染来自洁净室或外环境。也可以采用聚类分析法进行分析,以获得较为直观的系统树状图。

以临界匹配值法为例说明具体分析过程(图4):将药品检出菌的 FTIR图谱代入总体环境菌库进行检索,将得到的最小匹配值(D)与临界值(1.0)进行比较,若 $D>1.0$,判断为非环境菌污染,提示药品检出菌来自药品本身,检验结果成立;若 $D\leqslant 1.0$,判断为药品检出菌与环境菌相关,然后将该图谱代入近期环境菌谱库中检索,若 $D\leqslant 1.0$,判断为与内环境菌相关,提示该检出菌与洁净室内细菌相关,提示该次检验结果可能无效,此时,一方面需要对洁净室进行清洁和消毒后再重新试验,另一方面应进一步进行相似菌的 DNA同源性比较,进一步确证 FTIR的结果;若 $D>1.0$,判断为与近期环境菌不相关,提示该检出菌不是洁净室内细菌,但与外环境菌存在较高的相似性,此时对检验结果的处理应慎重,需仔细回顾实验过程,才能判断检验结果是否成立。

2.4　应用

中国药品生物制品检定所微生物实验室 2006年 8月至 12月间共检测到 20株药品检出菌。采用临界匹配值法检验,将其 FTIR图谱分别代入总体环境菌谱库进行检索,结果见表 2,其中 11株 $D>1.0$,判断为非环境菌污染;采用聚类分析法分析,这 11株菌与环境菌的最小 D值均大于 50,结果与临界匹配值法一致,提示药品检出菌来自药品本身,检验结果成立。其他 9株检出菌的 $D\leqslant 1.0$,被判断为与环境菌相关;将这些菌株图谱代入到检出月近期环境菌谱库中进一步检索,其中 3株检出菌(菌株 18,19,20)的最小 D值分别为 0.77,0.16和 0.15,均小于 1.0,被判断为与洁净室内细菌相关;采用聚类分析法分析,这 3株菌与环境菌的最小 D值分别为 41.5、12.2和 8.3,结果与临界匹配值法一致;按本实验室的标准化操作方法(SOP),对该样品重新进行了检验,但检验中未再检出同类细菌,提示检出菌(菌株 18,19,20)系实验中污染。另 6株检出菌(菌株 12,13,14,15,16,17)的最小 D值分别为 2.87,1.95,2.49,2.10,5.82和 4.57,均大于 1.0,被判断为与近期环境菌不相关,但与外环境存在较高的相似性;采用聚类分析法分析,这 6株菌与环境菌的最小 D值均大于 50,结果与临界匹配值法一致;经对药品进入洁净室时操作过程的回顾,判断检验结果有效。

临界匹配值法和聚类分析法进行微生物相关性分析,本质上都是应用 Pearson相关系数比较变量之间相似或不相似的程度,故能够达到相同的分析结果。但临界匹配值法属于有监督的模式识别方法,而聚类分析法属于无监督的学习方法,二者的距离生成方式、距离计算方法均不同,因此理论上二者可以起到互相补充的作用。实际应用中何种方法最适用于药品微生物的相似性分析?两种方法在应用中

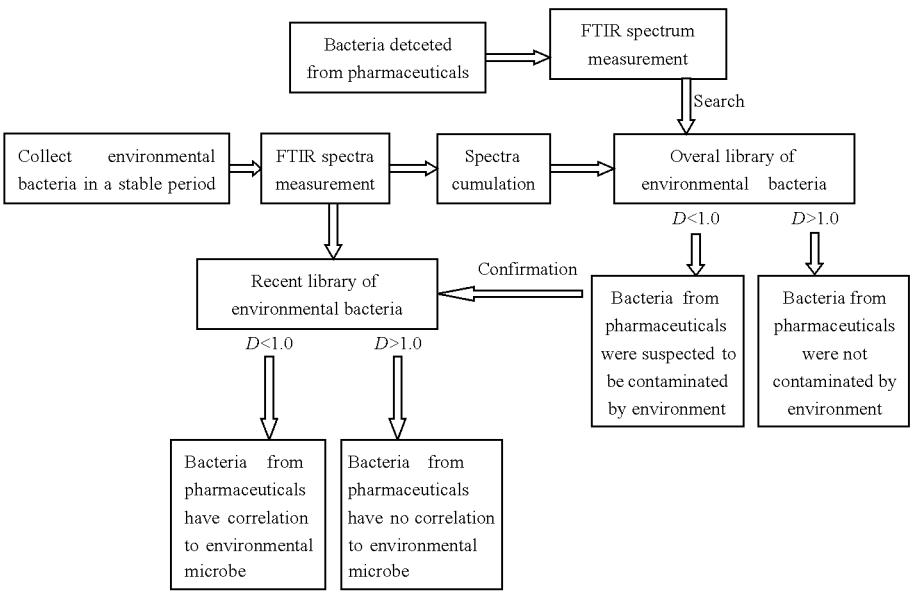

Figure 4　Procedures to judge the correlation of bacteria from drug and environment

Table 2　Examples of critical hit value method in similarity analysis of bacteria isolated from pharmaceuticals and airborne microbes

Strain	Sample	Test time	Minimum hit value in overall library
1	Clindamycin phosphate injection	2006-8	2.49
2	Clindamycin phosphate injection	2006-8	2.37
3	Clindamycin phosphate injection	2006-8	2.15
4	Liuwei dihuang pill	2006-9	2.32
5	Liuwei dihuang pill	2006-9	2.09
6	Liuwei dihuang pill	2006-9	1.11
7	Shexiangquwu aerosol	2006-11	1.24
8	Boyun ding eye drop	2006-12	1.85
9	Boyun ding eye drop	2006-12	2.39
10	Xiaoer zhike syrup	2006-12	2.25
11	Xiaoer zhike syrup	2006-12	1.34
12	Shexiangquwu aerosol	2006-11	0.52
13	Shexiangquwu aerosol	2006-11	0.39
14	Huo lingzhing oral solution	2006-11	0.88
15	Boyun ding eye drop	2006-12	0.4
16	Procaine injection	2006-12	0.82
17	Xiaoer zhike syrup	2006-12	0.74
18	Xiaoer zhike syrup	2006-12	0.77
19	Liuwei dihuang pill	2006-9	0.16
20	Liuwei dihuang pill	2006-9	0.15

是否会出现矛盾？是否可以首先采用临界匹配值法对药品检出菌进行分析，再通过聚类分析法对结果进一步确证，以获得较为直观的系统树状图？将在今后的实际应用中被进一步的比较、总结和验证。

谱库的有效性和可传递性是本方法的关键。由于不同的培养条件会导致微生物细胞组分和细胞结构的变化，从而造成其 FTIR图谱的差异；不同的操作方法，也会带入随机误差。因此为获得高重现性的 FTIR图谱，规定采用 35 ℃培养 (24 ±2) h的菌株的 FTIR图谱建立细菌谱库；对实验中的制样和测量等过程，均应制定严格的 SOP;以保证谱库的有效性和可传递性。此外，系统地探讨 FTIR谱段与微生物物种、培养条件等关系，选择合理的谱段及图谱预处理方法特异的表征细菌的特征，减少培养条件等影响，是保证本方法应用的另一关键，将在今后继续研究。

结论

本文建立的比较药品检出菌与环境菌 FTIR图谱相似性的方法，具有简便、快捷、直观、环保的特点，可作为快速判断药品检出菌是否为环境菌的常规方法，为我国现行药典无菌 微生物限度检查法的重要补充和扩展。

References

[1] Dong XZ, Cai MY. Manual for System Identification of Common Bacteria (常见细菌系统鉴定手册) [M]. Beijing: Science Press, 2001: 4 - 5.

[2] Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbioloical characterizations by FT-IR spectroscopy [J]. Nature, 1991, 351: 81 - 82.

[3] Helm D, Naumann D. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy [J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 126: 75 - 80.

[4] Helm D, Labischinski H, Schallehn G, et al. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy [J]. J Gen Microbiol, 1991, 137: 69 - 79.

[5] Kirschner C, Maquelin K, Pina P, et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study [J]. J Clin Microbiol, 2001, 5: 1763 - 1770.

[6] Oberreuter H, Seiler H, Scherer S. Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52: 91 - 100.

[7] Mouwen DJM, Weijtens MJBM, Capita R, et al. Discrimination of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR types of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Fourier-transform infrared spectroscopy [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 4318 - 4324.

[8] Bureau of Quality and Technical Supervision. GB/T 16293 - 1996 (中华人民共和国国家标准) [S]. Beijing: Standard Press of China, 1996.

[9] Bureau of Quality and Technical Supervision. GB/T 16294 - 1996 (中华人民共和国国家标准) [S]. Beijing: Standard Press of China, 1996.

[10] State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2005 ed. Part II. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: Appendix, 23 - 99.

[11] Kummerle M, Scherer S, Seiler H. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-Transform infrared spectroscopy [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2207 - 2214.

[12] Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology [M]//Meyers RA. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000: 102 - 131.

[13] Xu L, Shao XG. Method of Chemometrics (化学计量学方法) [M]. 2 ed. Beijing: Science press, 2004: 344 - 364.