

0421 拉曼光谱法

~~拉曼光谱法是利用化合物分子受激光照射后所产生的散射光与入射光能级差及其与化合物振动频率、转动频率间关系,对化合物进行定性、定量分析方法。~~

拉曼光谱法研究化合物分子受光照射后所产生的非弹性散射,散射光与入射光能级差及化合物振动频率、转动频率间关系。与红外光谱类似,拉曼光谱是一种振动光谱技术。所不同的是,前者与分子振动时偶极矩变化相关,而拉曼效应则是分子极化率改变的结果。

拉曼光谱采用激光作为单色光源,将样品分子激发到某一虚态,随后受激分子弛豫跃迁到一个与基态不同的振动能级,此时,散射辐射的频率将与入射频率不同。这种“非弹性散射”光被称之为拉曼散射,频率之差即为拉曼位移(以 cm^{-1} 为单位),实际上等于激发光的波数减去散射辐射的波数,与基态和终态的振动能级差相当。频率不变的散射称为弹性散射,即瑞利散射。如果产生的拉曼散射频率低于入射频率,则称之为斯托克斯散射。反之,则称之为反斯托克斯散射。实际上,几乎所有的拉曼分析都是测量斯托克斯散射。

用拉曼散射信号强度对拉曼位移作图得到拉曼光谱图。由于化合物的官能团或化学键的拉曼位移与它们在红外光谱中的吸收波数相一致,所以拉曼谱图的解析也与红外吸收光谱相类似。然而,通常在拉曼光谱中出现的强谱带在红外光谱中却成为弱谱带甚至不出现,反之亦然。所以,这两种光谱技术常互为补充。

和红外光谱一样,拉曼光谱记录的光谱范围通常在 $400\sim 4000\text{cm}^{-1}$ 间,然而,用于不同目的的拉曼光谱仪设定的光谱范围稍有不同,多数台式拉曼光谱仪可采集频率低至 $100\sim 200\text{cm}^{-1}$ 的光谱,特殊设计的拉曼光谱仪的光谱范围低至太赫兹光区($0.10\sim 10\text{THz}$ 约 $5\sim 100\text{cm}^{-1}$)。对于大多数常规分析而言,频率在 100cm^{-1} 以上拉曼光谱足以提供充分的信息用于定性、鉴别和表征。然而,频率在 100cm^{-1} 以下仍有一些对完整表征样品非常有意义的特征光谱,在某些情况下,这些低波数特征拉曼光谱是鉴别化合物或晶型的重要信息之一。

拉曼光谱的优点在于它的快速、准确,测量时通常不破坏样品(固体、半固体、液体或气体),样品制备简单甚至不需样品制备。谱带信号通常处在可见或近红外光范围,可以有效地和光纤联用;这也意味着谱带信号可以从包封在任何对激光透明的介质(如玻璃、石英或塑料内)中,或将样品溶于水中获得。

拉曼光谱能够脱单机、联机、现场或在线用于过程分析，当使用长距离光纤，适用于远距离检测。现代拉曼光谱仪使用简单，分析速度快（几秒到几分钟），性能可靠。因此，拉曼光谱与其他分析技术联用比其他光谱联用技术从某种意义上说更加简便（可以使用单变量和多变量方法以及校准）。

拉曼光谱既适合于化学鉴别、结构分析和固体性质如晶型转变的快速和非破坏性检测，也能够用于假药检测和质量控制，例如：

化学分析：原料药活性成分、辅料的鉴别和定量；

物理分析：固态（如多晶、和水合物和溶剂化物）和晶型的鉴别和定量；

过程分析：生物和化学反应，合成、结晶、制粒、混合、干燥、冻干、压片、装填胶囊和包衣。

除常规的拉曼光谱外，还有一些较为特殊的拉曼技术。它们是共振拉曼光谱，表面增强拉曼光谱，拉曼旋光，相关-反斯托克拉曼光谱，拉曼增益或减失光谱以及超拉曼光谱等。其中，在药物分析应用相对较多的是共振拉曼和表面增强拉曼光谱法。拉曼光谱包含许多方法，如背散射拉曼光谱、透射拉曼光谱（TRS）、共振（RR）拉曼光谱、表面增强拉曼光谱（SERS）、针尖增强拉曼光谱（TERS）、空间位移拉曼光谱（SORS）、拉曼光活性（ROA）、相关-反斯托克斯拉曼光谱（CARS）、受激拉曼光谱（SRS）和共聚焦（CF）拉曼光谱，以及拉曼成像技术。

定性和含量测定

1、定性鉴别

拉曼光谱可提供样品分子中官能团的信息，所以可用于鉴别试验和结构解析。在相同的测定条件下，绘制供试品与对照品的拉曼光谱并进行比对，若相同，除立体异构体外，即可鉴别为同一化合物。如遇多晶现象，可参照红外鉴别的相关内容进行处理。

2、含量测定

拉曼谱带的强度与待测物浓度的关系遵守比尔定律：

$$I_V = KLCI_0$$

其中 I_V 是给定波数处的峰强，

~~K 代表仪器和样品的参数；—~~

~~L 是光路长度；—~~

~~C 是样品中特定组分的摩尔浓度；—~~

~~I_0 是激光强度。—~~

实际工作中，~~光路长度被更准确的描述为样品体积，这是一种描述激光聚焦和采集光学的仪器变量。上述等式是拉曼光谱用于定量的基础。—~~

对于配置测量光学功率检测器的仪器（如 FT-拉曼仪），**拉曼峰信号强度与分析物浓度**有如下定量关系：

$$S_v = k\sigma_v(\nu_L - \nu_\beta)^4 P_0 C$$

式中， S_v 是给定的波数 ν 处的拉曼信号强度， C 是分析物的浓度， k 是与激光束直径、采集光路、样品体积和温度有关的常数， σ_v 是特定振动模式的拉曼散射截面， ν_L 是激光波数， ν_β 是振动模式的波数， P_0 是激光功率。拉曼散射截面 σ_v 是特定振动模式的表征。

对于测量每秒光子数（如带 CCD 检测器）的拉曼光谱仪，**拉曼峰信号强度与分析物浓度**有如下定量关系：

$$S_v = k\sigma_v \nu_L (\nu_L - \nu_\beta)^3 P_0 C$$

上述公式，都表明峰信号强度与浓度呈正比关系，是拉曼光谱定量测定的基础。

实际工作中，光路长度被更准确的描述为样品体积，这是一种描述激光聚焦和采集光学的仪器变量。

定量测定时，要求对照品和供试品在同一激光强度和频率下，同一物理状态（如液态、固态），且在同一浓度范围测量。对于固体和悬浮物，拉曼信号强度受基质影响（如荧光和自吸收）。拉曼信号强度还与物质反射指数折射率，粒径及其分布（小颗粒拉曼散射比大颗粒强），填充强度，散射截面和吸收截面等有关。

3、影响定量测定的因素

最主要的干扰因素是荧光、样品的热效应和基质或样品自身的吸收。在拉曼

光谱中，荧光干扰表现为一个典型的倾斜宽背景。因此，荧光对定量的影响主要为基线的偏离和信噪比的下降，荧光的波长和强度取决于荧光物质的种类和浓度。与拉曼散射相比，荧光通常是一种量子效率更高的过程，甚至很少量不纯物质杂质的荧光也可以导致显著的拉曼信号降低。使用更长的波长例如 785nm、830nm 或 1064nm 的激发光可使荧光显著减弱。然而，拉曼信号的强度与 λ^{-4} 成比例， λ 是激发波长。通过平衡荧光干扰、信号强度和检测器响应可获得最佳信噪比。

测量前将样品用激光照射一定时间，固态物质的荧光也可得以减弱。这个过程被称为光致漂白，是通过降解高吸收物质来实现的。光致漂白作用在液体中并不明显，可能是由于液体样品流动性，或荧光物质不是痕量。

激光对样品的加热效应会造成一系列的问题，例如物理状态的改变（熔化），晶型的转变或样品的烧灼，这是有色的、具强吸收或低热传导的小颗粒物质常出现的问题。激光对样品加热的影响通常是可观察的，表现在一定时间内拉曼光谱或样品的表现变化。除了减少激光通量，有许多种方法可用来降低热效应，例如在测量过程中移动样品或激光，或者通过热接触或液体浸入或大光斑设计等来改善样品的热传导。

基质或样品本身也可吸收拉曼信号。在长波傅里叶变换拉曼系统中，拉曼信号可以与近红外的泛频吸收重叠。这种影响与仪器的光学系统以及样品的形态有关。样品的装填和颗粒大小的差异而引起的固体散射的可变性与这种效应有关。然而，由于在拉曼光谱中样品的有限穿透深度和相对狭窄的波长范围，所有这些效应的大小都没有近红外光谱严重。

定量拉曼光谱与许多其它的光谱技术不同，它是单光束零背景测量的光谱技术，样品浓度的微小变化会导致拉曼信号水平比例的变化。谨慎地进行样品测定以及使用设计合理的仪器可以使这种变异减到最小，但是并不能全部消除。所以，绝对的拉曼信号强度很难直接用于待测物的定量。其它变异的潜在来源是样品的不透明性和样品的不均匀性、照射样品的激光功率的变化以及光学几何学或样品位置的变化。这些影响可以通过能重复重现的或有代表性的样品处置方式予以减小测量方式，以及使用设计合理的仪器予以减小，但是并不能完全消除。

由于拉曼信号绝对强度的波动，应尽可能地使用内标。可以有目的地加入一

种内标，该内标应具有与待测物互不干扰的特征谱带以便检测。在溶液中，也可利用溶剂的特征谱带，因为溶剂随样品不同将相对保持不变。另外，在制剂中，如果赋形剂量大大超过待测组分，则可以使用该赋形剂的峰。在假设激光和样品定位的改变将会同等地影响全光谱的前提下，全光谱同样可以用作参比。**在满足测定的准确度和精密度要求时，也可以不使用内标。**

样品测定中需考虑的重要因素还有光谱的污染。拉曼是一种可以被许多外源影响掩蔽的弱效应。普通的污染源包括样品支持物（容器或基质）和周围光线。通常，这些问题可以通过细致的实验方法来识别和解决。

仪器装置

根据获得光谱的方式，拉曼光谱仪可分为 ~~FT 拉曼光谱仪和色散型拉曼光谱仪~~色散型和傅立叶变换（FT）型，根据使用需求不同，还可将拉曼光谱仪分为实验用台式（包括配置显微镜）仪器，和适合现场检测的便携式、手持式仪器。但所有的现代拉曼光谱仪均包括激光光源、样品装置、滤光器、单色器（或干涉仪）和检测器等。

（1）激光光源 下表列出了几种在药学应用中经常使用的激光。**紫外激光有时也有特殊应用，但是由于种种原因在常规分析中很少采用。**

表 药学应用中的主要激光光源

激光波长 λ /nm (近似整数) ①	类型	激光典型功率	波长范围/ nm 斯托克斯区域 (100~3000 cm ⁻¹)	注释
近红外激光 1064	固态 (钕-Nd: YAG)	最大 3W	1075~1563	常在傅里叶变换仪器中使用
830	二极管	最大 300 MW	827~980	拉曼位移常低于 2000 cm ⁻¹ ；不及其它激光器应用广泛
785	二极管	最大 500MW	791~1027	在多数色散拉曼仪中配置
紫外-可见光 488~632.8	离子气和固态，双 频率激光	最大 1W	488~781	荧光风险

紫外-可见光	染料激光器	可调	在紫外和可见光区可调	荧光风险 ^②
--------	-------	----	------------	-------------------

注：①不同仪器商提供的激光波长常与表中值有差异；②紫外区激光可适当地减少荧光风险。

(2) **样品装置** 可有各种各样的样品放置方式，包括直接的光学界面，显微镜，不接触光纤探针（不接触或光学浸入）和样品室（包括特殊的样品盛器和自动样品转换器）。样品光路也可设计成能获得偏振相关拉曼光谱，这种光谱通常包含附加信息。样品装置的选择应根据待测物的具体情况（如样品的状态、体积等）以及测量的速度，激光的安全性和样品图谱的质量要求等决定。

(3) **滤光装置** 激光波长的散射光（瑞利光）要比拉曼信号强几个数量级，必须在进入检测器前滤除。普遍采用的是陷波滤波器，它具有滤波效果好和体积小等优点。另外，为防止样品不被外辐射源（如房间灯光、激光等离子体）照射，需要设置适宜的滤波器或者物理屏障。

(4) **光波处理装置** 光波拉曼信号可通过光栅色散或者迈克尔逊干涉仪（傅里叶变换）来处理。任何合格仪器都适用于定性鉴别。然而，选择定量测定用仪器时，应注意色散和动态线性响应可能在整个波谱范围内并不均衡（例如当使用阶梯光栅分光镜时）。

(5) **检测器** 硅质电荷耦合探测器（CCD）是色散型仪器中最常用的检测器。这种冷却的阵列矩阵型检测器允许在低噪声下快速全光谱扫描，常与通常使用的 785nm 和 830nm 二极管激光器配合使用。傅里叶变换仪器通常采用单通道锗或铟-镓-砷化合物(InGaAs)检测器以配合钕：钇-铝-石榴红(Nd:YAG)1064nm 的激光器在近红外区使用。

仪器校正

拉曼仪器的校准包括三个要素：初始波长（X 轴）、激光波长以及强度（Y 轴）。

仪器供应商应提供可由用户可以执行的对仪器相关参数校准的方法。除另有规定外，使用者应根据仪器所提供的校准方法制定具体的 SOP，并严格按照 SOP 对上述参数进行验证。

特别需要注意的是，激光波长变化可影响仪器的波长精度和光度（强度）精度。即使是最稳定的激光器，在使用过程中其输出波长也会有轻微变化。所以，

激光波长必须经校正以确保拉曼位移的准确性。可以使用仪器供应商提供的拉曼位移标准参考物质进行定期校正。某些仪器可以用一种拉曼内标物与初级光路分离，外在校准装置通过散射辐射准确地重现这一光路。

推荐使用外部参考标准对仪器进行校正。

对不同光谱分辨率的拉曼光谱仪，其波数精度应与样品采集所需的光学分辨率相适应，台式、便携式和手持式仪器可有不同的波数精度要求。所有用于拉曼测量的光栅都应确认拉曼位移的准确性。

方法验证

必须对方法进行验证，至少应考察准确度、精密度等主要指标。但这些指标受诸多可变因素的影响，其中荧光可能是影响方法适用性的主要因素。样品中荧光杂质的存在完全随样品而异。所以，方法必须能适应不同的样品体系，必须足以将杂质的影响降到最小。

检测器的线性必须适应可能的信号水平范围。荧光可能使信号基线比验证时高，这时必须设法将荧光减弱或者使验证的方法适应较高的荧光水平。这一要求对方法的精密度、检测限（LOD）和定量限（LOQ）同样适用，因为基线噪声的增加会对这些数值产生影响。

由于荧光使基线漂移可能同样会影响定量，所以使用时，同样需要在不同的光漂白作用水平进行可接受的定量验证。

必须确定激光是否对样品造成影响。在不同激光功率和暴露时间的条件下，对样品目视检查和仔细审视测得的拉曼光谱可以确定样品是否改变（而不是光漂白作用）。观察的依据是谱带位置、峰强和谱带宽度是否改变或者背景强度是否有明显变化。

影响方法精密度的因素还包括样品的位置和固体、液体样品的形态，在校正模型中必须严密控制或说明。样品的制备方法或样品室的形状可能影响测量灵敏度，而且，该灵敏度会随着仪器的激发光和采集光学设置的不同而不同。

测定法

测定拉曼光谱可以采用以下任一物质态：结晶态、无定型态、液体、气体或等离子体。

液体能够在玻璃管或石英管（或池）中直接测量。无定型和微晶固体也可充

填入玻璃管或石英管中直接测定。为了获得较大的拉曼散射光强度，通常使照射在样品上的入射光与所检测的拉曼散射光之间的夹角为 0° 、 90° 和 180° 。样品池的放置可有多种方式。

除另有规定外，一般用作鉴别的样品不必制样，用晶体型、异构体限度检查或含量测定时，供试品的制备和具体测定方法可按正文中各品种项下有关规定操作。

某些特殊样品技术可被应用于表面增强拉曼光谱和显微拉曼光谱测量。

为防止样品分解，常采用的办法是旋转技术。利用特殊的装置使激光光束的焦点和样品的表面做相对运动，从而避免了样品的局部过热现象。样品旋转技术除能防止样品分解外，还能提高分析的灵敏度。

常采用内标法定量，在激光照射下，加入的内标也产生拉曼光谱，选择其一条拉曼谱带作为标准，将样品的拉曼谱带强度与内标谱带的强度进行比较（通常比较谱带的面积或高度）。由于内标和样品完全处于相同的实验条件下，一些影响因素可以相互抵消。

所选择的内标应满足以下要求：①化学性质比较稳定，不与样品中被测成分或其它成分发生化学反应；②内标拉曼谱带和待测物的拉曼谱带互不干扰；③内标应比较纯，不含有被测成分或其他干扰成分；~~对于非水溶液，常用的内标为四氯化碳(459cm^{-1})；而~~对于水溶液，常用的内标是硝酸根离子（ 1050cm^{-1} ）~~和高氯酸根离子；对于非水溶液，可选择环境和健康友好的物质成分作为内标；~~对于固体样品，有时选择样品中某一拉曼谱带作为自身对照内标谱带。

具有多晶现象的固体药品，由于晶型不同，可能导致所收集的供试品光谱图与对照品光谱图或标准光谱集所收载的光谱图不一致，遇此情况，应按该品种项下规定的方法进行预处理后再绘制比对。

光谱的形状与所用的仪器型号和性能、激发波长、样品测定状态及吸水程度等因素相关。因此，进行光谱比对时，应考虑各种因素可能造成的影响。