

0402 红外分光光度光谱法

红外光谱法（亦称分光光度法）是在 $4000\sim 400\text{cm}^{-1}$ 波数范围（ $2.5\sim 25\mu\text{m}$ ）内测定采集物质的吸收光谱，用于化合物的鉴别、检查或含量测定的方法。在中红外谱区，吸收带反映了官能团的分子振转信息，其中 1500cm^{-1} 以下区域称为“指纹区”，信息丰富且复杂。除部分光学异构体及长链烷烃同系物外，几乎没有两个化合物具有相同的红外光谱，据此可以对化合物进行定性和结构分析；化合物对红外辐射的吸收程度与其浓度的关系在一定条件下符合朗伯-比尔定律，是红外光谱分光光度法定量分析的依据。

红外光谱法在制药领域被广泛应用于实验室的化学和物理分析。其中，化学分析方面包括原辅料、剂型、生产中间体和包装材料的鉴别和确认；兽药中药物活性成分的定量；以及气体、无机物中的杂质定量；化学合成的反应监测等。物理分析方面主要应用于固态性质的测定，如兽药多晶型鉴别或检查。

在红外光谱中，波长（ λ ）通常以微米（ μm ）表示，波数（ ν ）以厘米倒数（ cm^{-1} ）表示。波数比波长更常用，二者的转化关系如下：

$$\nu_{\text{cm}^{-1}} = 10^4 \times \frac{1}{\lambda_{\mu\text{m}}} \quad (1)$$

一、测量模式

红外光谱常用测量模式有投射模式、衰减全反射（ATR）和漫反射三种模式。此外，在特定情况下还可以用显微镜实现上述模式。

1、透射模式

该模式是基于透射率（ T ）的测定，即样品在给定波长（波数）下透射红外光谱的能力。定义如下：

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

其中， I_0 是入射光强度， I 是透射光强度。

透射模式测得的红外光谱通常以透射率-波数表示，也可用吸光度（ A ）-波数表示，二者关系如下：

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = a \cdot b \cdot c \quad (3)$$

式中： a 为分子吸收系数， $\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ； b 为样品厚度， cm ； c 为样品浓度， $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ 。

2、衰减全反射（ATR）模式

ATR 模式是基于内反射现象测量红外光谱。其原理为：从光源发出的红外光经过光密介质（晶体，折射率 n_1 ）投射到光疏介质（样品，折射率 n_2 ）表面上，当入射角 θ 大于临界角时，入射光在晶体和样品界面发生全反射，但倏逝波会穿透样品表面一定深度，并吸收部分能量，使得全反射被衰减，得到红外吸收光谱。常用的晶体材料有硒化锌（ZnSe）、锗（Ge）、硅（Si）、金刚石等。根据光束在晶体中发生的全反射次数的不同，ATR 附件可分为单次反射 ATR 与多次反射 ATR。多次反射 ATR 附件可以提高检测信号的强度，而单次反射 ATR

附件因采样量少而更为常用。穿透深度 d_p 与波长 λ 相关，通常为 μm 数量级：

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi\sqrt{\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2}} \quad (4)$$

式中： λ 为波长， θ 为入射角， n_1 、 n_2 分别是晶体和样品的折射率， $n_1 > n_2$ 。

3、漫反射模式

从粉末或较细的颗粒样品记录的光谱称为漫反射光谱。其中大部分光谱来源于在不同样品颗粒内部经过多次的透射、折射和反射后，从样品粉末表面各个方向射出反射光；较小一部分光谱来源于在表层样品颗粒外部产生镜面反射光，即菲涅尔反射（Fresnel Reflectance）光谱。通常将样品与 90~99% 的非吸收性稀释剂（如 KBr）混合，通过稀释样品，来减小菲涅尔反射的贡献。

漫反射光谱与透射光谱相似，但漫反射光谱不遵从比尔定律，而符合 Kubelka-Munk 函数：

$$f(R_\infty) = \frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty} = \frac{k}{s} \quad (5)$$

式中： $f(R_\infty)$ 称为 K-M 函数， R_∞ 代表样品层无限厚时的漫反射率（实际有几毫米厚度即可）， K 为样品的吸光系数， S 为样品的散射系数（与样品粒度有关，粒度一定时为常数）。由于 K 与粉末样品浓度 C 成正比，由此可知， $f(R_\infty)$ 与 C 成正比，这是应用漫反射光谱定量分析的依据。

4、显微模式

对于非均相的混合物样品，无需进行化学法分离，可通过红外显微镜在微观条件下选择特定区域，直接测定红外光谱，实现微量分析和成像分析。

红外显微镜的工作原理：红外光经聚焦后通过样品的微区，通过调节可变光阑的大小对不同成分在空间上分辨并分析，包括透射模式、反射模式和 ATR 模式。红外显微镜的物镜为球面反射镜，为提高信号灵敏度，一般采用液氮制冷的碲镉汞（MCT）检测器。红外成像由配备的阵列检测器实现；当使用阵列检测器时，空间分辨率将不受光阑的限制。

二、仪器及性能确认

1、仪器装置

傅里叶变换型红外光谱仪（简称 FT-IR）是目前最常用的红外光谱仪器类型，由光源、干涉仪、样品室、检测器和数据处理系统组成。其中光源常采用导电陶瓷棒，干涉仪使用 KBr 分束器，样品室中使用附件，如透射样品架、ATR 附件等。满足性能要求的其他类型红外光谱仪均可使用。红外光谱仪可与红外显微镜联用，用于微观样品或化学成像的研究。红外光谱还可与其他分析技术联用，如热分析、色谱法等。

2、仪器性能确认

为确保仪器能达到预期的应用目的，应采用标准参比物质（如聚苯乙烯薄膜）对仪器的性能进行确证。例如，制定 SOP 定期进行校验，并在使用中通过自检确保仪器的适用性。校验参数可包括本底光谱能量分布、光谱分辨率、波数准确性、波数重复性、透射率重复性、100%线平直度、100%噪声等。

波数准确性和光谱分辨率为关键参数，必须进行确认。下述测试可用于仪器确认，也可

用作系统适用性试验：

~~仪器及其校正~~

~~可使用傅里叶变换红外光谱仪或色散型红外分光光度计。~~用聚苯乙烯薄膜（厚度约为0.04mm）校正仪器，~~绘制采集~~其光谱图，用 3027cm^{-1} ， 2851cm^{-1} ， 1601cm^{-1} ， 1028cm^{-1} ， 907cm^{-1} 处的吸收峰对仪器的波数进行校正。傅里叶变换红外光谱仪在 3000cm^{-1} 附近的波数误差应不大于 $\pm 5\text{cm}^{-1}$ ，在 1000cm^{-1} 附近的波数误差应不大于 $\pm 1\text{cm}^{-1}$ 。

用聚苯乙烯薄膜校正时，仪器的分辨率要求在 $3110\sim 2850\text{cm}^{-1}$ 范围内应能清晰地分辨出7个峰，峰 2851cm^{-1} 与谷 2870cm^{-1} 之间的分辨深度不小于18%透光率，峰 1583cm^{-1} 与谷 1589cm^{-1} 之间的分辨深度不小于12%透光率。仪器的标称分辨率，除另有规定外，应~~不低于~~优于 2cm^{-1} 。

仪器的校验应定期进行，并应在维修光路或更换光学部件（如光源或采样附件）后及时进行。仪器性能校验与自检过程应根据仪器类型、测量方式以及所需要验证的参数选择标准参比物质，并应该在光路中不存在滤光片的配置下，选择合适的校验与自检方法。

三、定性和定量方法

1、鉴别

通过将供试品的红外光谱与对照图谱进行比对实现定性鉴别。其中，对照图谱可为对照品的红外光谱、《兽药红外光谱集》中的标准光谱或质量标准所附对照图谱。鉴别时，实测谱带的波数误差应小于规定值的 $\pm 5\text{cm}^{-1}$ 或0.5%。可以存储当前批次对照品的红外光谱以供后续使用。

~~供试品的制备及测定~~

~~通常采用压片法、糊法、膜法、溶液法和气体吸收法等进行测定。对于吸收特别强烈或不透明表面上的覆盖物等供试品，可采用如衰减全反射、漫反射和发射等红外光谱方法。对于极微量或需微区分析的供试品，可采用显微红外光谱方法测定。~~

~~1、原料药鉴别~~除另有规定外，应按照中国兽药典委员会编订的《兽药红外光谱集》收载的各光谱图所规定的方法制备样品。具体操作技术参见《兽药红外光谱集》的说明。各品种项下规定“应与对照的图谱一致”，系指《兽药红外光谱集》所收载的图谱。

~~采用固体制样技术时，最常碰到的问题是多晶现象，固体样品的晶型不同，其红外光谱往往也会产生差异。当供试品的实测光谱与对照品或《兽药红外光谱集》所收载的标准光谱不一致时，应考虑晶型的影响。除另有规定外，应在排除各种可能影响光谱的外在或人为因素后，应按该兽药光谱图中备注的方法或各品种项下规定的方法进行预处理，再绘制光谱，比对。如未规定该品种供药用的晶型或预处理方法，则可使用对照品，并采用适当的溶剂对供试品与对照品在相同的条件下同时进行重结晶，制样，并采集然后依法绘制光谱，进行比对。如已规定特定的药用晶型，则应采用相应晶型的对照品依法比对。~~

当采用固体制样技术不能满足鉴别需要时，可改用溶液法~~绘制采集~~光谱后与对照品在相同条件下~~绘制采集~~的光谱进行比对。

~~2、制剂鉴别~~ 品种鉴别项下应明确规定制剂的前处理方法，通常采用溶剂提取法。提取时应选择适宜的溶剂，以尽可能减少辅料的干扰，避免导致可能的晶型转变。提取的样

品再经适当干燥后依法进行红外光谱鉴别。

药物制剂经提取处理并依法采集光谱，比对时应注意以下四种情况：（1）辅料无干扰，待测成分的晶型不变化，此时可直接与原料药的标准光谱进行比对；（2）辅料无干扰，但待测成分的晶型有变化，此种情况可用对照品经同法处理后的光谱比对；（3）待测成分的晶型无变化，而辅料存在不同程度的干扰，此时可参照原料药的标准光谱，在指纹区内选择3~5个不受辅料干扰的待测成分的特征谱带作为鉴别的依据；（4）待测成分的晶型有变化，辅料也存在干扰，此种情况一般不宜采用红外光谱鉴别。

~~3. 多组分原料药鉴别 不能采用全光谱比对，可借鉴【附注】“2（3）”的方法，选择主要成分的若干个特征谱带，用于组成相对稳定的多组分原料药的鉴别。~~应考虑干扰、晶型、基质等对鉴别的影响。可采用溶剂提取法；或选择主要成分的若干个特征谱带，进行谱图比对；也可使用化学计量学方法，在一定波数范围内建立光谱特征判别模型或指纹图谱。

谱图比对和结果判断方法 可以利用全谱区或特定谱区进行谱图比对。可使用软件的数学计算实现光谱比较，但需预先设定结果判断的标准，如阈值。常用方法包括：

- （1）基于吸收峰峰位和相对强度的目视比较，进行判断；
- （2）计算两个光谱之间的相关系数，通过预先设定的阈值进行判断，其中阈值的设定应符合专属性要求；
- （3）通过化学计量学方法（如欧氏距离、马氏距离、分类方法）进行判断；该类方法的建立、评估和验证应符合化学计量学的一般原则。

由于各种型号的仪器性能不同，供试品制备时研磨程度的差异或吸水程度不同等原因，均会影响光谱的形状。因此，进行光谱比对时，应考虑各种因素可能造成的影响。

同一物质的ATR光谱与透射光谱的吸收峰位置、强度或形状上有可能存在一定的差异。因此，在鉴别时，ATR光谱不能与透射光谱进行直接比较。

2、定量分析

~~4. 晶型、异构体限度检查或含量测定 供试品制备和具体测定方法均按各品种项下有关规定操作。~~采用红外光谱法可对不同晶型、异构体原料药或固体制剂进行定量分析。可采用相对峰强度法：配制一系列不同比例的混合对照品，选取不同晶型（或异构体）特有且互不干扰的红外光谱吸收峰，建立特征吸收峰的响应值（吸收度、峰高或峰面积）的比值与晶型（或异构体）含量间的线性关系（或对数线性关系），绘制标准曲线，对混合样品中各晶型（或异构体）进行定量分析。也可采用归一化法进行纯度分析：选取不同晶型（或异构体）特有且互不干扰的红外光谱吸收峰，对各晶型（或异构体）特征吸收峰进行积分获得峰高或峰面积，计算各晶型的归一化纯度。

样品制备条件（如压力、溶剂）可能会改变表现出多态性物质的结晶形式。对压力可致晶型状态改变的样品，优先考虑采用漫反射模式。

【附注】

- ~~1. 各品种项下规定“应与对照的图谱一致”，系指《兽药红外光谱集》所载的图谱。~~
- ~~2. 药物制剂经提取处理并依法绘制光谱，比对时应注意以下四种情况：~~

- ~~(1) 辅料无干扰，待测成分的晶型不变化，此时可直接与原料药的标准光谱进行比对。~~
- ~~(2) 辅料无干扰，但待测成分的晶型有变化，此种情况可用对照品经同法处理后的光谱比对。~~
- ~~(3) 待测成分的晶型无变化，而辅料存在不同程度的干扰，此时可参照原料药的标准光谱，在指纹区内选择3~5个不受辅料干扰的待测成分的特征谱带作为鉴别的依据。鉴别时，实测谱带的波数误差应小于规定值的 $\pm 5\text{cm}^{-1}$ (0.5%)。~~
- ~~(4) 待测成分的晶型有变化，辅料也存在干扰，此种情况一般不宜采用红外光谱鉴别。~~
- ~~3. 由于各种型号的仪器性能不同，供试品制备时研磨程度的差异或吸水程度不同等原因，均会影响光谱的形状。因此，进行光谱比对时，应考虑各种因素可能造成的影响。~~

四、测定法

应根据样品的物理状态选择合适的测量模式和制备方法。透射模式适用于透明样品，如液体、溶液、气体、薄膜、溴化钾压片等。液态样品和气态样品可装载于固定或可变光程的液体池或气体池中测量，溴化钾压片应使用样品支架置于光路中。ATR 模式适用于固态和液态样品的测量。漫反射模式适用于粉末样品的测量。对于极微量或需微区分析的供试品，可采用显微红外光谱方法测定。制备方法应符合兽药兽药检验标准规程的一般规定操作，保证红外图谱的质量。