

表层光谱分析的新方法光—声光谱在医药科学中的应用

Fairbrother, J. E (爱尔兰, Stiefel国际开发研究所)

表层光谱法主要用于研究和分析不透明样品的表面特性。七十年代中期发展起来的漫反射光谱法 (diffuse reflectance spectroscopy, DRS) 已经成为测定不透明样品的紫外和可见光谱特性的方法。近年来漫反射光谱法已扩展到红外区, 称为漫反射红外光谱法 (diffuse reflectance infra-red spectroscopy, DRIR), 从而能够更全面地了解不透明样品的表面特性。

另一种多年来用于研究表面特性的红外鉴定技术是衰减全反射红外光谱法 (attenuated total reflectance infra-red spectroscopy, ATR), 此方法要求样品表面与ATR池有良好的接触。常因接触不良而灵敏度降低, 改用激光作光源后灵敏度有明显改善。ATR与傅里叶变换红外分光光度计联用具有更多的优点。DRS与傅里叶变换红外联用产生了一种漫反射傅里叶变换红外光谱法 (diffuse reflectance Fourier transform infra-red spectroscopy, DRIFT) 的新技术, 它使表层光谱法得到很大的进展, 并给药物分析家提供更多的方便, 因它具有不需对样品制备或抽提就可直接测定。例如有可能对完整的压制药片直接测定其DRIFT光谱。为了证实这种可能, yeboah等对非那西汀和氯化钾混合物的粉末和压制片两者进行了检测, 发现二者的DRIFT光谱基本相同。对咖啡因进行同样的实验, 结果表明粉末和片剂的DRIFT光谱有明显差别。经证明DRIFT谱带强度随压实压力而增大。例如咖啡因粉末以18700磅/平方英寸的压力经两分钟, 则使

光谱中每个谱带的强度增大2倍。同样的压力保持10分钟使谱带强度再加倍。最初认为这种效应是由于因表面受入射光干扰产生散射系数改变的原故。可是检测粉末样品在 1666cm^{-1} 呈现的酰胺羰基伸缩频率带, 经冲压后分裂成为双重谱带, 这种现象可认为是由于咖啡因的晶型受压后发生了改变而引起的。因此曾建议用DRIFT光谱监测冲压时引起的多晶型变化, 也有可能是在压片的研究工作中利用DRIFT光谱获得其它有价值的资料。DRIFT光谱法也相当灵敏。例如咖啡因的测定, 即使含咖啡因4ppm的氯化钾压制片也能得到令人满意的光谱。这表明只要能选出适宜的特征峰, DRIFT光谱法时可用于检测样品表面中的痕迹量杂质、降解产物或污染物。

光声光谱法

虽然漫反射光谱法和漫反射傅里叶变换红外光谱法能提供典型的表层光谱, 可是它们仅仅是表面最外边分子层的反映。光声光谱法 (Photoacoustic Spectroscopy, PAS) 则能显示代表样品从表面穿透到各种不同深度的光谱。这种深部的光谱图就可提供有关样品表面结构的新信息。

光声光谱法并不是一种新技术, Alexander Graham Bell发现用快速切断的光束连续照射固体或液体材料时, 就会发出与经过调变的入射光频率相同的声音来。

七十年代初贝尔实验室的研究人员对利用光声光谱测定液体和固体样品光谱特性的可行性进行了研究。有两批研究人员分别在美国和英国首先开创了利用光声光谱作为浓

集样品的分析手段。Rosencwaig发表了一系列论文，采用这种技术检查固体样品，并应用于纯物质和生物样品的分析。Rosencwaig和Gersho对观察到的现象作出了理论性的解释，英国Kirkbright等独立地对光声效应进行了研究，并研制了一台分析用的单光束光声光谱仪。

尽管近年来仪器在不断地改进，但光声光谱仪器的基本部分不外乎单色光辐射源、强度调节器（切光器）、光声池、信号放大器及记录仪这几部分组成。经过调节的光束通过石英窗进入光声池，撞击到样品表面，由此被吸收，使样品受到激发。样品内部的激发以热力波（即转变为热能）的形式分散开来，与经调节的入射光频率相同的热力波传播到相界（即样品表面）时产生周期性温度变化，这种周期性的温度升降导致光声池中的气体产生扰动成为声波。声波通过光声池中的气体传播，被与样品成直角的灵敏微音器（麦克风）所检测，微音器发出的信号经放大，最后被记录下来。为了检测样品吸收入射光的程度需对光源波长进行扫描。同时监测光法检测器的输出信号。因此，在紫外—可见区当光源强度不随波长而变化的条件下就可获得与电子吸收光谱相似的光声光谱。

上述测定一般是用气体光声微音检测器。另外一种检测系统是将样品简单附贴到电压传感器上，样品吸收光时产生的热力强度使压电转换的发生相应的电子响应。Patel和Tam应用这种检测系统制成了一种适用于液体样品的光声池，可用于测定液体中所含低浓度的溶质。例如，用脉冲激光源和压电转换器检测，就能测出溶剂如四氯化碳或氯仿 10^{-18} 级（ppt）的吸收杂质。

光声光谱在色谱法中的应用

Rosencwaig和Hall将样品经薄层色谱分离后用光声光谱法检定。不论是从预制塑料薄层板上切割下来的完整部分，还是从

薄板上刮取的试料，它们的测定结果都相同，但这些结果都是定性。Castleden等将这种方法扩大应用于硅胶板上荧光斑点的定量测定，在 $0.2 \sim 2 \mu\text{g}$ 工作范围内呈线性响应，检测极限为 2 ng 。存在的问题是，从铝质薄层板上切割色斑时很难避免硅胶从色斑周边脱落，由于这种硅胶的损失导致的铝板的暴露会对光声信号产生不良影响。这个问题通过用Mulhern设计的真空粉末收集器从玻璃板上吸取硅胶得到了解决，从而明显地提高了回收率。

早先已经注意到被分析物在弱吸收剂，如硅胶或氧化镁表面的分散，可被利用来避免强吸光物质的光谱饱和现象。人们在对薄层板上的色斑进行光密度法定量测定时会考虑由于光散色产生的麻烦。其实这反倒是件好事，薄层板表面的高度光散射实际上有助于加强光声光谱信号。

光声光谱应用于薄层色谱定量时涉及的有关理论方面的研究，Burggraf和Leyden将Rosencwaig和Gersho关于光声光谱的理论扩大到光散射效应的研究。关于这种效应King等对分散在硅胶或氧化镁薄层上的样品用Kubelka-Munk校正公式加以处理使光谱的振幅大小与样品浓度呈直线关系。

实际应用方面，Ashworth等验证了果胶抽提物中萜类色素混合物经薄层色谱分离后，用光声光谱对剥离下来的色斑进行定量分析。一般色斑中含约 $1 \sim 60 \text{ ng}$ 的浓度范围内的这些色素都呈线性响应。

前面提到的试验都是将样品从薄层板上移取下来置于气体光声池中进行测定。Fishman和Bard试图在薄层板上直接测定物质的光声光谱。他们设计了可以直接放到薄层板表面一侧的开口气体光声微音器池。用这种样品池作为定性工具，分别测试了含有棕榈酸或玫瑰红色素的色斑的光声光谱。用这种终端开路的光学纤维连接光声池在薄层板上直接定量的研究尚待进一步报告。光声

池的尺寸大小与薄层板接触时的密封等问题有待完善解决。

值得注意的是用一台专门改进的分光计测得的光声光谱与漫反射光谱极其相似。前者的信噪比(S/N)比后者的稍低,一般认为对于测定如氧化钛之类的试料两种方法的结果类似。

为了描绘蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶超薄层等电聚焦的分布设计了一台激光扫描光声分光计。结果表明具有较佳的信噪比和轻微的本底散射光的吸收。然而都观察到由光声光谱绘得的蛋白质分布图与常用方法绘得的分布图存在着一些差别。

正如惯常一种新技术出现的情况一样,光声光谱也被考虑用于高效液相色谱的检测。最可能的检测方式是采用压电转换器池(PZT)。Sawada和Oda研究了应用这类检测系统的可能,首先设计了一台双光束激光诱导压电转换光声分光计(PZT-PA)检测液体样品,后来成为一种灵敏的液相色谱检测器。此检测系统用经过调节的氩离子激光激发,而压电转换器池与Patel和Tam设计的一样,但容量仅为20 μ l,用此系统检测氯-4-(二甲氨基)偶氮苯异构物的结果表明,光声光谱检测比紫外检测的灵敏度要提高25倍,且无损于谱带宽和重现性。

另外一种用于高效液相色谱的由光声光谱流动池、N₂激光激发的荧光、光声、光致电离三联无窗组成的检测器。用此流动池与同一仪器中的静态池分别检测多环烃类化合物,结果表明流动池的灵敏度不如静态池,光声检测不如荧光检测,据认为多环烃类化合物特别适于用荧光检测,而对于另外一些化合物光声光谱可能更适用。上述检测池也曾用于吡啶、萘、N-乙基咪唑等类化合物的高效液相色谱测定,同时对三种检测方式的有关性能进行了比较。

傅里叶变换红外光声光谱的应用

傅里叶变换红外光声光谱(FTIR--

PAS或PAFTIR)是从当前为人们所瞩目的傅里叶变换红外法的基础上发展起来的一种新技术,是傅里叶变换红外—衰减全反射(FTIR-ATR)和傅里叶变换红外—漫反射光谱(FTIR-DRS)这类方法的一种补充手段。FTIR-ATR和FTIR-DRS作为不透明样品表面的非破坏性检验方法各有其不足之处,如衰减全反射法测定时要求与样品表面有良好的接触,而用漫反射法时样品要先经适当处理。相反光声光谱法则很少甚至无需对样品进行处理,而且能适应形状不规则的样品表面,这些优点已被傅里叶变换红外光声光谱法测得的新断裂的煤炭样品表面的光谱所证实。

Krishnan曾报导多用途Digilab傅里叶变换红外装置用于光声光谱测定,扩展了差示光谱的应用。如分别记录阿司匹林,非那西汀粉末以及二者等量混合物的傅里叶变换红外光声光谱。从混合物和纯阿司匹林光谱得到的差示光谱与纯非那西汀的光谱一致。药物分析家在药剂处方的设计研究工作中就可用这种求得差示光谱的求导得到药物粉末表层内分解产物的光谱。

所有上述的应用都是定性的。在傅里叶变换红外光声光谱法发展的早期Rockley及其同事已注意到样品粉末颗粒的大小对光声信号的强度有明显影响,但他们认为这种技术终究会应用于定量分析。近来Lowry等用傅里叶变换红外光声光谱法研究了氨基甲酸酯类杀虫剂(Thiofanox)与一种颗粒性粘土载体Agisorb的相互作用,结果表明氨基甲酸酯氮上的氢与粘土载体结构中的水合硅酸盐成键结合。傅里叶变换红外光声光谱在此试验中仅为了定性,但作者认为如果对光谱测定中的可变因素获得更深的了解和掌握就有可能进行定量测定。

Lloyds等进一步用傅里叶变换红外光声光谱法在薄层板上直接测定样品,并对气体微音器和压电转换器两种检测方法的结果

进行了比较。虽然光声信号对浓度呈线性响应,但是作为一种薄层色谱定量方法来说灵敏度比较差。

光声光谱法在药物分析及其它方面的应用

除上面提到光声光谱在紫外、可见及红外光谱法中的应用外,光声光谱也可用于圆二色谱的测定。从左和右圆偏振光之间调节得到的光声信号,是由它们的吸收(即圆二色性谱)之间的差产生的。光声圆二色谱的优点之一是,能够容易地测得大块结晶的圆二色谱,而用透射法测定时要求制成光学薄的样品。

用压电转换器检测的光声光谱法曾用于溶液中痕量多环烃类化合物的检出。并对光声光谱或荧光检测的灵敏度作了比较。

光声光谱还具有其它用途,迄今已知它能代替声发射作为检查细微裂缝的探伤工具,也曾用于探查半导体缺陷。光声法可用作显象技术,激光扫描装置提供的光学薄膜的热波图象能用来研究厚度为 $6\sim 70\mu\text{m}$ 的薄膜片,测定时照射样品的正面,以考查塑料薄片和漆层。该作者认为这种技术可应用于如皮肤病学和聚合物等学科的研究,也可用于检查压制药片的层压平面。

光声光谱技术还可作为比色法测定光量

子效应。曾被用于测定水杨酸钠以及其它一些物质的量子效应。

有两篇文章独立地论述了光声光谱在医药方面的应用,都是有关测定心得安的问题。未包衣的心得安片置玛瑙乳体中研磨,然后将粉末装入封闭于气体微音器光声池中的铝质样品盘中,分别测定近红外及紫外光谱。乳糖以及碳酸镁对心得安的近红外测定有干扰,碳酸镁的干扰程度较轻,但它们在紫外区仅有轻微的干扰。正是由于这种缘故,所述方法不适于作常规分析之用。另外一篇文章考查了心得安和碳酸镁混合物的近红外和紫外光声光谱。在紫外区光声信号与浓度不呈线性关系,这是由于两种成分的颗粒之间发生了相互作用。然而,于 $2.2\mu\text{m}$ 或 $1.72\mu\text{m}$ 波长处的近红外测定可得到线性结果,不过在这些波长处的干涉使得测定复杂化。这些经验趋向于表明在光声光谱法发展的现阶段,这种技术主要是一种探索性定性工具,还不能应用于定量测定。据报道通过求导出一阶和二阶导数光谱可使紫外光声光谱的分辨能力得到提高。

[The Pharmaceutical Journal《药学杂志》,230(6218):326~329,1983(英文)]

沈克温译 韩永平校 戴富宝审

旋光法测定维生素C注射液含量

解放军第118医院

韩保民

维生素C注射液含量测定目前大都采用碘量法,此法准确但测定时间较长,且易受注射液中附加成分的干扰,用于注射液的快速分析仍不方便、迅速。根据维生素C具有旋光性的特点,我们试用旋光法测定其含量,通过实验,结果满意。

实验部分

一、仪器与试剂

1. WZZ-1型自动指示旋光仪。精度 0.01° (上海光学仪器修理厂)
2. 维生素C、注射用(批号:80040889上海第二制药厂)
3. 维生素C注射液、10%(本院自制)
4. 乙二胺四乙酸二钠、亚硫酸氢钠