

附件 1: 0400 光学分析法（第一次）

0400 光学分析法

光学分析法是基于电磁辐射作用于物质所产生的辐射信号或所引起的辐射信号变化的分析方法。这些电磁辐射包括从 γ 射线到无线电波的所有电磁波谱范围，电磁辐射与物质相互作用的方式有发射、吸收、反射、折射、散射、干涉、衍射、偏振等。根据电磁辐射与物质作用的性质不同，光学分析法可分为光谱法和非光谱法两大类。

1 非光谱法

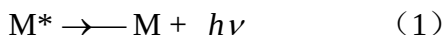
若电磁辐射和物质相互作用时，不涉及能级间的跃迁，只改变传播方向、速度或某些物理性质，以此为依据建立的光学分析方法称为非光谱法，包括基于折射的折光率测定法（通则 0622）、基于散射现象的多种分析方法如澄清度检查比浊法和粒度检查法（通则 0902）等、基于衍射的 X 射线衍射法（通则 0451）和基于偏振的旋光度测定法（通则 0621）等。

2 光谱法

当电磁辐射和物质相互作用时，物质内部发生量子化的能级跃迁，对能级跃迁产生的发射、吸收或散射的波长或强度进行测量和分析的方法称为光谱法。据此，光谱法可分为发射光谱法、吸收光谱法、散射光谱法。光谱法还有多种分类方法，如按接受电磁辐射的物质粒子单元的不同，光谱法又可分为原子光谱法和分子光谱法，等等。

2.1 发射光谱法

物质通过电致激发、热致激发或光致激发等激发过程获得能量，变为激发态原子或分子 M^* ，当从激发态过渡到低能态或基态时产生发射光谱。



通过测量物质的发射光谱的波长和强度进行定性和定量分析的方法称为发射光谱分析法，通常发射光谱范围为 400~1400nm。

发射光谱法包括原子发射光谱法，原子、分子和 X-射线荧光光谱法，分子磷光光谱法和化学发光法等，其中应用较多是原子发射光谱法和荧光发射光谱

法。

原子发射光谱法归属于原子光谱。原子光谱是利用原子在一定状态下发射或吸收特定波长电磁辐射所产生的光谱进行元素定性、定量的分析方法。原子光谱是由原子外层或内层电子能级的变化产生的，是元素的固有特征，表现形式为线光谱。原子由原子核及核外电子组成，原子核外的电子处于不同能量轨道运动时，其能量变化呈量子化，原子的运动状态可用其光谱项来表征：

$$n^M L_J \text{ 或 } n^{2S+1} L_J$$

式中： n 是主量子数； L 是总角量子数； S 是总自旋量子数； J 是内量子数；每一个原子能级（态）对应一个光谱项。只有符合光谱选律（选择规则）的谱线才是允许的；那些不符合光谱选律的谱线，称为禁戒跃迁线。

原子光谱分析主要利用 $L-S$ 间微弱耦合作用引起多重分裂造成的精细结构谱线。由于核自旋磁矩和同位素效应引起光谱支项分裂造成的极微小的谱线波长差别称为原子光谱超精细结构，是进行原子光谱同位素分析的主要依据。

在原子光谱的发射和吸收的过程中，能量最低能级的原子或能量最低的离子称为基态原子或基态离子；能量高于基态能级以上的原子或离子称为激发态原子或离子，同时也存在着亚稳态。

从激发态跃迁到基态或从基态跃迁到激发态所产生的谱线称为共振线，前者是共振发射线，后者是共振吸收线。同一元素相应的共振发射线或共振吸收线波长一致。每个元素有多条共振线，其中激发能量最低的共振线是第一共振线，余类推。在共振线中，第一共振线的强度通常最大。在原子光谱分析中通常选择共振线作为分析线。但共振线都有自吸特性，因此要注意光源的自吸现象对分析测定带来的影响。

原子在能级 j 和 i 之间的跃迁、发射或吸收辐射的频率与始末能级之间的能量差成正比。对应于一定能级间的跃迁，原子发射或吸收一定波长的辐射。原子光谱分析法研究原子光谱线的波长及其强度；光谱线的波长是定性分析的基础；光谱线的强度是定量分析的基础。

谱线强度的定量测定与光谱谱线的轮廓有很大关系。所谓谱线的轮廓，即指谱线的强度按频率的分布值。原子光谱为锐线光谱，但并不只是一条几何线，而是具有一定宽度和外观轮廓的谱线。无论是发射谱线或吸收谱线均非单一频率，

而是具有一定的频率范围，即谱线具有一定的宽度。谱线的轮廓是单色光强度随频率（或波长）的变化曲线，它由谱线的自然宽度、热变宽、碰撞变宽、共振变宽、电致变宽、磁致变宽、自吸变宽等决定。

灵敏线：一般均是指强度较大的一些谱线，通常具有较低的激发能和较大的跃迁几率，多是一些共振线，而激发能最低的共振线通常是理论上的最灵敏线。通常是根据元素灵敏线进行元素的检出和测定。元素灵敏线及其波长分布，同样与原子或离子的能级结构间存在规律性联系，取决于参加辐射跃迁的高低能级的能量差，越易激发的元素，其灵敏线的波长越长，越难激发的元素，其灵敏线的波长越短。

最后线：是当样品中某元素含量逐渐减小时，最后仍能观察到的谱线。以此可以估计某元素存在的大致含量。

分析线：用于分析的灵敏线称为分析线。在进行光谱分析时一般只需找出一根或几根灵敏线即可。

由于采用不同的激发源，原子发射光谱法已发展成为多种分析技术：如火焰发射光谱法（又称火焰光度法）（通则 0407）、电感耦合等离子体发射光谱法（通则 0411）和激光诱导击穿光谱法等。

荧光发射（激发）光谱法是应用活性物质经光照射产生发射光分布光谱图的特性进行分析的方法。荧光激发光谱是激发光分布光谱图，它以被激发物质发射光的强度为纵坐标，以入射（激发）光波长为横坐标。如同在吸收光谱中一样，有机化合物荧光所覆盖的电磁波光谱重要的区域包括紫外区、可见区和近红外区等，在 250-800nm 范围。当分子吸收光辐射后，能量以热能的方式消散或以与吸收波长相同或更长的光辐射释放。光的吸收和发射都是由于电子在分子不同能级间、不同轨道间发生跃迁造成的。在光的吸收和发射间存在一个时间延迟，对于大多数有机荧光化合物溶液，这一时间间隔也就是分子位于激发态的时间，大约为 10^{-9} - 10^{-8} 秒。荧光的寿命很短，可与磷光相区别，后者寿命要长许多，一般为 10^{-3} 秒到几分钟。

2.2 吸收光谱法

当物质所吸收的电磁辐射能与该物质的原子核、原子或分子的两个能级间跃迁所需的能量满足 $\Delta E = h\nu$ 的关系时，将产生吸收光谱。



根据吸收光谱所在的光谱区和能量传递方法不同,吸收光谱法可分为:原子吸收光谱法(通则 0406)、紫外-可见光谱法(通则 0401)、近红外光谱法(通则 04XX)、中红外光谱法(通则 0402)、远红外光谱法和核磁共振波谱法(通则 0441)。

原理和术语

单色光辐射穿过被测物质溶液时,在一定的浓度范围内被该物质吸收的量与该物质的浓度和液层的厚度(光路长度)成正比,其关系可以用朗伯-比尔定律表述如下:

$$A = \log \frac{1}{T} = Ecl$$

式中 A 为吸光度;

T 为透光率;

E 为吸收系数,常用的表示方法 $E_{1cm}^{1\%}$,其物理意义为当溶液浓度为 1% (g/ml),液层厚度为 1 cm 时的吸光度数值;

c 为 100ml 溶液中所含物质的重量(按干燥品或无水物计算),g;

l 为液层厚度,cm;

上述公式中吸收系数也可以摩尔吸收系数 ϵ 来表示,其物理意义为溶液浓度 c 为 1mol/L 和液层厚度为 1cm 时的吸光度数值。在最大吸收波长处摩尔吸收系数表示为 $\epsilon_{\max}$ 。

摩尔质量为 M 的摩尔吸收系数 ϵ 和百分吸收系数 $E_{1cm}^{1\%}$ 有如下换算关系:

$$\epsilon = \frac{M}{10} E_{1cm}^{1\%}$$

物质对光的选择性吸收波长,以及相应的吸收系数是该物质的物理常数。在一定条件下,物质的吸收系数是恒定的,且与入射光的强度、吸收池厚度及样品浓度无关。当已知某纯物质在一定条件下的吸收系数后,可用同样条件将该供试品配成溶液,测定其吸光度,即可由上式计算出供试品中该物质的含量。在可见光区,除某些物质对光有吸收外,很多物质本身并没有吸收,但可在一定条件下加入显色试剂或经过处理使其显色后再测定,故又称之为比色分析。

化学因素或仪器变化可引起对朗伯-比尔定律的偏离。由于溶质间或溶质与

溶剂的缔合、及溶质解离等引起溶质分子浓度改变，将产生明显的朗伯-比尔定律的偏离。非单色入射光、狭缝宽度效应和杂散光等仪器因素都会造成朗伯-比尔定律的偏离。

原子吸收光谱法吸收过程除可用朗什-比尔定律描述外，还遵循原子发射光谱中所描述的原子光谱的基本原理。

除原子吸收光谱法和核磁共振波谱法外，其它的吸收光谱法属于分子光谱法。分子光谱法是由分子中电子能级、振动和转动能级的变化产生的，表现形式为带光谱，是光谱法的重要组成部分，分子光谱法主要有紫外-可见光谱法，近红外光谱法、红外光谱法，拉曼光谱法(通则 0421)，分子荧光光谱法(通则 0405)和分子磷光光谱法等。拉曼光谱虽属于分子光谱，但不是吸收光谱，而是一种散射光谱。

2.3 散射光学与散射光谱法

光散射法是测量由于溶液亚微观的光学密度不均一产生的散射光，这种方法在测量分子量由 1000 到数亿的多分散体系的平均分子量和粒度分布方面有重要作用。

频率为 ν_0 的单色光照射物质，会发生散射现象。如果这种散射是光子与物质分子发生能量交换引起，即不仅光子的运动方向发生变化，它的能量也发生变化，则称为拉曼(Raman)散射。这种散射光的频率(ν_m)与入射光的频率之差，称为拉曼位移。拉曼位移的大小与分子的振动和转动的能级有关，利用拉曼位移研究物质结构的方法称为拉曼(Raman)光谱法。拉曼光谱法是一种非弹性光散射法，是指被测样品在强烈的单色光(通常是激光)照射下光发生散射时，分析被测样品发出的散射光频率位移的方法。

拉曼散射活性是一种分子特性(单位 cm^4/g)，它决定随机取向样品中所观察的拉曼谱带强度。拉曼散射活性由产生的分子极化所决定，极化使分子运动而产生拉曼位移谱带。一般，拉曼谱带的强度与样品的浓度呈正比关系。

2.4 其它

质谱法(通则 0431)是在离子源中将样品分子离解成气态离子，测定生成离子的质量和强度(质谱)，进行成分的结构和定量分析的一种常用的谱学分析方法。严格地讲，质谱法不属于光谱法范畴，但基于其谱图表达的特征性与光谱

法的类似,故通常将其与光谱法归为一类。电感耦合等离子体质谱法(通则 0412)是以电感耦合等离子体作为激发源,激发元素使其原子化或电离,采用质谱分析器检测电离离子,属于一种无机质谱法,也可以将其视为电感耦合等离子体原子发射光谱与质谱联用技术。

通常还将原子质谱法归为原子光谱法,但其检测的是元素离子的质量。

上述常用光谱方法所用的电磁辐射波长范围主要从紫外光区至红外光区。为了叙述方便,光谱范围大致分成紫外区(190~400nm),可见光区(400~760nm),近红外区(760~2500nm),红外区(2.5~40 μm 或4000~250 cm^{-1})。基于采用分光技术,紫外-可见光谱法、(近、中、远)红外光谱法、荧光光谱法和原子吸收光谱法又习惯成为紫外-可见分光光度法、(近、中、远)红外分光光度法、荧光分光光度法和原子吸收分光光度法,它们所使用的相应仪器则称为分光光度计。

为保证测量的精密度和准确度,所用仪器应按照国家计量检定规程或药典各光谱法通则和分析仪器确证指导原则中的相应规定,实施仪器确证并满足相应要求。

3 各光谱法相对适用性

对于多数药物,紫外-可见光谱法定量测量的准确度和灵敏度要比近红外和红外光谱法高。物质的紫外-可见光谱通常专属性差,但是很适合作定量分析,对于大多数物质也是有用的辅助鉴别方法。近年来,近红外光谱法的应用日益广泛,特别是在大量样品的快速鉴别和水分测定方面。近红外光谱法尤其适合测定羟基和氨基,例如乙醇中的水分,胺基存在时的羟基,碳氢化合物中的乙醇,以及叔胺存在时的伯胺和仲胺等。

在不含光学异构体的情况下,任何一个化合物都有一个特定红外光谱,光学异构体具有相同的中红外光谱。但是,某些化合物在固态时会表现出多晶型,多晶型会导致红外光谱的差异。通常,结构中微小的差别会使红外光谱有很明显的差别。在红外光谱中呈现大量的吸收峰,有时不需进行预先分离,也可以定量测定成份已知的混合物中的某个特定成分。

虽然拉曼光谱和红外光谱的强度受不同的分子性质所决定,但两种光谱提供相似的分子振转动信息。拉曼和红外光谱对于不同的官能团表现不同的相对灵敏度,例如,拉曼光谱对碳硫键和碳碳键特别灵敏,且用拉曼光谱更容易鉴别某些

芳香化合物。水有很强的红外吸收但其拉曼散射却特别弱。因此，拉曼光谱几乎不受水的影响，适合于含水物的检测。拉曼光谱有两个主要不足：一是常规拉曼光谱最低检测浓度通常为 $10^{-1} \sim 10^{-2} \text{ mol/L}$ ，二是如物质中存在荧光杂质将干扰拉曼散射信号的检测。

光反射测量法与发射光测量法提供的红外光谱信息相似。由于光反射测量法仅探测样品的表面成分，克服了与光学厚度和物质散射性相关的困难。因此，反射测量更适用于强吸收物质的检测更容易。一种常用的红外光反射检测技术被称为衰减全反射（ATR），也被称为多重内反射（MIR）。

当品种项下给出红外光谱或拉曼光谱数据时，字母 S、M、W 分别代表强峰、中等强度峰和弱峰；sh 为肩峰，bd 为宽峰，v 表示非常的意思。

荧光分光光度法比紫外吸收分光光度法的灵敏度高。在荧光光谱中，空白溶液的信号很低，以致由背景发射产生的干扰要小得多。通常，浓度低于 10^{-5} mol/L 的化合物几乎不能用吸收光谱测定，而荧光光谱的测定浓度可以低至 $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。

4 光谱法测定时的对照品使用

在鉴别、检查和定量测定中，使用对照品进行比较时，应保证供试品和对照品在相同的条件下进行测量。这些条件包括波长（或波数）的设定，狭缝宽度的调整，样品（池）的位置和校正以及光谱响应水平。例如，紫外-可见分光光度法使用吸收池在不同波长下的透光率可能会有差异，必要时，应对吸收池进行多波长点的校正。

“同法制备”及“相同溶液”等描述，实际上是指对照样品（通常是对照品）和供试样品应同法制备，同法检测。在制备对照品溶液时，制备的溶液浓度（例如 10% 以内）只是期望浓度的近似值，而光谱响应的计算则以精确的称量为基础；如果没有使用预先烘干的对照品，光谱响应则应按无水物计算。

“同时测定”及“同时测量”等描述，是指特定空白溶液的光谱响应、对照品溶液的光谱响应和供试品溶液的光谱响应立即依序测定。

起草单位：江苏省食品药品监督检验研究院

复核单位：中国药科大学、浙江大学、北京市药品检验研究院

主要起草人及联系方式：王玉、曹玲、李睿，13851847568@163.com