

拉曼光谱在药物分析中的研究进展

黄蓉, 杨永健

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 该文简述了药物分析中常用的拉曼光谱技术的分类, 如表面增强拉曼光谱技术; 激光共振拉曼光谱技术; 共焦显微拉曼激光技术; 拉曼光谱成像技术; 透射拉曼光谱技术; 综述了该技术在药物分析中的最新研究进展, 为药物分析检测的发展提供参考。

关键词 拉曼光谱技术; 药物分析; 药物检测

中图分类号 R917

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2018)01-0081-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.01.021

1923 年 Smekal 从理论上预言了物质中的分子会对入射光产生散射, 1928 年印度物理学家拉曼(Raman)在研究液体苯的散射光谱时, 发现了拉曼散射, 并获得了 1930 年度诺贝尔物理学奖。1934 年, Placzek 系统地提出了拉曼效应的基本理论并解释了拉曼光谱的发展前景。1960 年激光器问世后, 将拉曼光谱的激发光源由汞弧灯改为激光光源, 加速了拉曼光谱的研究进程。1974 年, Fleischmann 等首次发现了表面增强拉曼散射(Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)效应, 使拉曼光谱在表面科学中的应用迅速崛起。进入 20 世纪 90 年代, 激光共聚焦显微拉曼光谱仪研制成功并相继推出, 使拉曼光谱在其他许多领域也发挥着日益重要的作用。

拉曼散射光谱作为研究物质结构、分子的振动能级以及晶体中晶格的光学声子振动能级的一个强有力的工具已有七十多年的历史。现今, 拉曼光谱已被广泛应用于材料科学、生物医学、药理学、无损分析领域、农业与食品分析领域、宝石鉴定与考古领域、安全检查和刑侦领域等方面。笔者简述了药物分析中常用的几种拉曼光谱技术, 综述了该技术在药物分析中的最新研究进展, 为药物分析检测的发展提供参考。

1 药物分析中常用的拉曼光谱技术

1.1 傅立叶变换拉曼光谱技术 1964 年, 近红外(near Infrared, NIR)激发拉曼技术与傅立叶变换(Fourier transformation, FT)技术相结合的设想被 Chantry 等首次提出。1986 年, Hirschfeld 等研究并实现了近红外傅立叶变换(near infrared-Fourier transform, NIR-FT)拉曼光

谱技术。1987 年, 第一台近红外激发傅立叶变换拉曼光谱(NIR-FT-Raman)商品仪由 PerkinElmer 公司推出。NIR-FT 光谱技术采用傅立叶变换技术对信号进行收集, 干涉仪没有任何狭缝或色散原件, 因而扫描速度很快, 一次即可获得全谱。通过多次累加来提高信噪比, 并采用 1 064 nm 的近红外激发光, 使得傅立叶变换技术大大减少了光谱的荧光背景^[1]。傅立叶变换拉曼光谱已被用于无机化合物分析、有机化合物和高聚物分析、生物材料分析以及傅立叶变换-表面增强拉曼光谱(FT-SERS)联用等领域。

1.2 表面增强拉曼光谱技术 1974 年 Fleischmann 等将光滑银电极表面进行粗糙化处理后, 首次获得 Ag 电极表面的吡啶分子的高质量的拉曼光谱。1977 年, Duyne 和 Creighton 各自发现吸附在粗糙银电极表面的吡啶分子的拉曼信号要比溶液中单个吡啶分子的拉曼信号强大约 10^6 倍, 这种与粗糙表面相关的表面增强效应, 被称作表面增强拉曼散射(SERS)。表面增强拉曼解决了拉曼光谱灵敏度低的缺点, 被广泛用于表面研究、结构分析、生物活体检测^[2]、环境污染检测^[3]、国防安全^[4]、食品安全^[5]等领域。

1.3 激光共振拉曼光谱技术 基于共振原理发展而来的拉曼技术称作共振拉曼光谱(resonance Raman spectroscopy, RRS)。当激光频率接近或等于分子的电子跃迁频率时, 可引起强烈的吸收或共振, 导致分子的某些拉曼谱带强度达到正常拉曼带的 $10^4 \sim 10^6$ 倍, 这就是共振拉曼效应。共振拉曼光谱灵敏度比正常拉曼光谱高, 适用于低浓度和微量样品检测, 以及生物大分子样品检测。共振拉曼光谱目前已被用于环境污染物的监测, 液态煤组分的检测, 人工合成金刚石的检测以及蛋白质二级结构的鉴定等。

1.4 共焦显微拉曼激光技术 使光源、样品和探测器三点共轭聚焦, 有效地排除焦平面之外其他层信号的干扰, 消除来自样品的离焦区域的杂散光, 使拉曼光谱信

收稿日期 2016-12-19 修回日期 2017-03-07

作者简介 黄蓉(1987-), 女, 江苏泰州人, 药师, 硕士, 研究方向: 药物分析。电话: 025-50798189, E-mail: huangrong505@126.com。

通信作者 杨永健(1964-), 男, 江苏南京人, 主任药师, 博士, 研究方向: 药物分析。电话: 025-50798189, E-mail: yongjianyang@163.com。

号增强 $10^4 \sim 10^6$ 倍,合理地将拉曼光谱分析与显微分析技术结合起来的应用技术叫显微拉曼光谱技术。它具有灵敏度高、所需样品浓度低、信息量大等特点,已被用于检测电化学反应过程中溶液成分的变化,研究液/气界面水溶性卟啉的聚集,拉曼成像以及宝石鉴定。

1.5 拉曼光谱成像技术 由于激光器、单色仪以及弱光信号探测技术的不断发展,拉曼光谱除了能够根据特征拉曼频率分辨微量混合物间的各种化学成分信息,还能够分析出各成分的空间分布信息,这种快速、高精度的拉曼光谱技术就是拉曼光谱成像技术。目前其成像的空间分辨率已达到了 0.5 nm,使分子内部结构和分子表面的吸附类型得以被人类所识别^[6]。拉曼光谱成像技术已被用于研究固体药物中活性成分及辅料的颗粒大小、分布和形态研究,且通过化学计量学可确定药物中多组分的相对含量。

1.6 透射拉曼技术 透射拉曼技术 (transmission Raman technique, TRS) 是一种新型的无损检测技术,具有整体采样、快速无损等优点。在透射拉曼形式中,激光束从所探测药物的一侧入射,拉曼光从对面收集^[7],透视模式贯穿整个样品取样,没有二次取样和表面偏差的问题。显微拉曼可以获得药片表面各成分的分布信息,而透射拉曼则能获得整个药片的平均信息,可以对整个药片进行准确的定性、定量分析^[8-9]。透射拉曼光谱还可用于多晶型混合物的定量分析^[7]。AINA 等^[7]研究表明透射拉曼光谱可以用于混合物大容量的准确测量,且不受系统性或随机抽样问题的干扰。透射拉曼光谱对于多晶型混合物的定量测定的准确性远远超过传统的后向散射模式。对于无模型拟合,使用 TRS 技术得到的 R^2 为 0.996,后向散射模式得到的 R^2 为 0.802;对于单一组分的偏最小二乘拟合,使用 TRS 技术得到的 R^2 为 0.985,后向散射模式得到的 R^2 为 0.804。

1.7 SERS 及其联用技术 SERS 技术虽然已被广泛的应用于表面科学、生物医学诊断、食品安全等众多领域,但因其自身仍然存在一些缺点和不足,为了适应更复杂的检测需要,仍需发展与其优势互补的联用技术。例如 SERS 和毛细管电泳联用技术, SERS 和薄层色谱联用技术^[10], SERS 和高效液相色谱联用技术^[11]等,在体内药物检测、痕量药物检测、中药分析、疾病诊断等方面已有了较广泛的应用。

1.8 小型拉曼光谱仪 近年来由于生物医学、环境监测、科技农业、以及工业流程监控等领域的现代化发展,分析仪器的小型化,轻量化被迫切需求。得益于光纤,光电成像器件以及计算机的飞速发展,小型拉曼光谱仪的出现成为了可能。美国 Ocean Optics 公司、

Photo Research 公司、牛津仪器公司以及国内各高校和研究所^[12]相继研制出了小型拉曼光谱仪。小型光谱仪的成熟和应用为药品快速检测及药品生产过程控制提供了有效的工具。

1.9 空间位移拉曼光谱 (spatially offset Raman spectroscopy, SORS) 技术 SORS 是一项新的专利拉曼技术,可以穿透覆盖层深入检测到高质量拉曼光谱信号,且无需繁琐费力的取样。它可以明确区分物料和容器的拉曼光谱,实现物料和容器的同时鉴别,从而分析不透明样品内部的化学信息,容器类型包括透明塑料袋、不透明或有颜色的 HDPE (high density polyethylene, 高密度聚乙烯) 塑料容器、有颜色或透明的玻璃容器、麻袋、多层纸质袋等。空间位移拉曼技术能够有效地消除来自表面层的荧光,真正实现原辅料快检。SORS 不但具有拉曼光谱的化学专属性,而且能提供样品深层的信息,有着巨大而广阔的应用前景。此外, SORS 也有希望成为检测乳腺肿瘤的深入非侵入性医疗诊断方法。

2 拉曼光谱在药物检测领域的应用

2.1 拉曼光谱在化学研究领域的应用 无机物、有机物、聚合物的分析现已广泛使用拉曼光谱进行研究。无机化合物中金属离子与配位体之间形成的共价键显示拉曼活性,根据拉曼光谱可以确定配合物的结构,组成面稳定性等相关信息。拉曼光谱可以用来进行成分的鉴别,晶体结构的测定,晶体的结晶取向,温度和应力的测量等。拉曼位移是鉴定有机物的官能团和化学键的重要依据,因此拉曼光谱被广泛用于鉴别有机物的官能团。拉曼光谱在聚合物材料和物理学上也有广泛的应用。

庄志萍等^[13]根据密度泛函理论计算了 2-巯基苯并咪唑与银配合物 (2-MBMZ-Ag) 的拉曼光谱,根据 GaussView 对 2-MBMZ 拉曼光谱及其相应的 SERS 进行了归属。刘扬涛等^[14]对 1,3-二甲基尿嘧啶 (1,3-Dimethyluracil, DMU) 的拉曼光谱进行了研究,并利用量子化方法 B3PW91/6-31G 计算 DMU 分子的拉曼光谱,并以 DMU 和 1,3-二甲基尿嘧啶的环丁烷二聚体为模型化合物,研究其拉曼光谱及振动动力学,以获得有助于对脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA) 碱基的紫外光损伤的拉曼光谱分析。蔡然等^[15]总结了近年来拉曼光谱对液态水氢键结构的研究进展,由于改变水的温度,压强和电解质会对水团簇氢键网络结构产生影响,通过拉曼光谱可以观察到水分子间的振动频率变化,进而推断其水氢键结构的变化。吴娟霞等^[16]研究了拉曼光谱技术在石墨烯结构表征中应用

的一些最新进展,介绍了石墨烯的典型拉曼特征,讨论了其特征峰在石墨烯的层数指认和石墨烯边缘与缺陷态分析中的应用,以及石墨烯的层间堆垛方式等对其电子能带结构的影响。

2.2 拉曼光谱在药物领域的应用 由于拉曼光谱对于药物分子骨架结构、空间排列等变化极其敏感,因此在药物固态特征分析方面应用广泛,可以用于药物的成盐形式、水合物、晶型、光学异构体等方面的研究。拉曼光谱相比红外光谱而言谱峰清晰尖锐,具有无损测量,无需对样品前处理,水的信号很弱等优点,在药物定性定量检测以及假药辨别等方面应用广泛。拉曼光谱分析速度快,且对药物具有指纹性,可以应用于分子结构研究,因此也可以用于药用辅料的质量控制及现场快检。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)也已将拉曼光谱检测原辅料的方法写入《美国药典》。

乐健等^[17]采用激光共焦拉曼光谱仪对 3 种规格的氨茶碱注射液无水茶碱和乙二胺进行了测定,建立了运用拉曼光谱技术快速测定氨茶碱注射液中无水茶碱和乙二胺的方法。陈莉等^[18]建立了拉曼光谱法测定注射用头孢他啶溶液含量的方法。VEIJ 等^[19]利用拉曼光谱对 43 种常用药用辅料进行测定,将其按结构分为 8 类,并对这 8 类辅料进行了结构分析,并推断根据辅料的的不同可以区别原研药与仿制药。曹玲等^[20]利用拉曼光谱对羧酸类及其衍生物药用辅料进行研究,并和相应的红外光谱进行比较,建立了羧酸类及其衍生物药用辅料的拉曼光谱定性鉴别方法。钱小峰等^[21]收集了络活喜片剂常用辅料的拉曼光谱,建立辅料库,计算待检样品和原研药的辅料相似度,并结合特征峰,建立了基于拉曼光谱的鉴别苯磺酸氨氯地平仿冒药的方法。BOIRET 等^[22]阐述了通过拉曼图像的初始数据,运用独立成分分析技术(independent component analysis, ICA)提取纯净信号,从而诊察药片的活性成分和主要辅料的分布。

2.3 拉曼光谱在中药领域的应用 中药复方是中医中药的特色和精髓,面对复杂的混合体系,拉曼光谱具有指纹性,对测试样品状态无要求,无损害,简单快捷,对中药进行的全组分测定获取全貌整体信息,不破坏配伍性等优点,在中药检测领域应用广泛。利用拉曼基团频率振动峰峰形与强度差异,可以测定出各种药材的标准谱并进行分类,编制图谱库,建立检测系统,对药材品种进行鉴定,辨识药材的真伪。拉曼光谱不仅可以分类,还可以鉴别产地,对药材进行定性定量分析,对药材的稳定性进行研究,以及对重要产品进行质量控制。

冯尚源等^[23]测试研究了党参中药材不同部位的拉曼光谱,通过测试党参煎剂、银胶以及党参煎剂与银胶混合体的吸收光谱,对党参煎剂的 SERS 信号进行了初步谱峰归属。黄浩等^[24]利用基于银纳米粒子的 SERS 技术对黄芪饮片样本进行检测,获取并分析了黄芪饮片样本的常规拉曼光谱和 SERS,对所获得的黄芪饮片 SERS 信号进行了初步谱峰归属。万秋娥等^[25]利用激光拉曼光谱对人参及其伪品进行了很好的区分,再结合二阶导数拉曼光谱,对人参及其拟伪品峨参、北沙参、桔梗进行了进一步说明。卫程华等^[26]利用拉曼光谱对三七药材粉末、三七水提和醇提样品进行了解析,建立了快速分析三七有效成分的表面拉曼光谱法。

2.4 拉曼光谱在生物领域的应用 蛋白质分子三维空间折叠和卷曲构成的特有的空间构象和核酸的有序结构是它们各自发挥功能的结构基础。拉曼光谱测定核酸的有序结构及主链构象,侧链残基构型,从来获得蛋白质或多肽的一级结构。水的拉曼光谱较弱,通过研究溶液中生物大分子的构象、分子骨架的构象以及碱基对的信息,可以研究氨基酸、蛋白质的二级结构,核苷酸以及它们与药物的相互作用。吴元菲等^[27]利用电化学伏安法和 SERS 技术研究了胞嘧啶在粗糙银电极和金电极表面上的吸附行为。崔丽等^[28]利用表面增强光谱对 4 种 DNA 碱基与高氯酸根在金纳米粒子表面的共吸附行为进行了研究,探讨了吸附能力、电位、其他共存离子对共吸附的影响。KRISHNA 等^[29]阐述了如何采用显微拉曼光谱与 FT-红外拉曼结合技术在混合型细胞中随机鉴别出一种细胞类型。由于 MCF7 和 HL60 间的光谱差异比 MCF7 和 Mes-sa 细胞间的差别显著,说明细胞不同区域其拉曼信号存在不同,而对样品光谱物质主要成分的分析检验,对混合型细胞中的单细胞类型的分析结果给出了合理的解释。NAKASHIMA 等^[30]通过红外和共振拉曼光谱对细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase, CCO)的质子泵和氧化还原机制进行了阐述。ORELIO 等^[31]运用拉曼光谱对洋葱伯克菌(*B. cepacia*)和铜绿假单胞菌菌株进行了表型分析,40 种菌株的拉曼光谱显示出较高的相似性,表明拉曼光谱不能用于区分这两类菌种。

3 展望

拉曼光谱除了在药物分析方面的应用,在环境、食品、宝石鉴定及文物考古方面也有广泛的应用。随着激光技术的不断发展,拉曼光谱将被应用到更多的学科。随着拉曼光谱技术的不断改进和完善,会有越来越多的新技术应用到拉曼技术,拉曼光谱在药物分析领域的前景也会更加光明和广阔。

参考文献

- [1] FERRARO J R, NAKAMOTO K, BROWN C W. Introductory Raman spectroscopy [M]. 2nd ed. New York: Elsevier/Academic Press, 2003: 83-94.
- [2] 孙美娟, 陶站华. 表面增强拉曼光谱技术在生物学中的应用[J]. 广西师范学院学报(自然科学版), 2014, 31(4): 27-31.
- [3] 刘文婧, 杜晶晶, 景传勇. 表面增强拉曼光谱技术应用于环境污染物检测的研究进展[J]. 环境化学, 2014, 33(2): 217-228.
- [4] 张倩慈, 刘权卫, 李定明, 等. 拉曼光谱在核领域研究中的应用[J]. 化学分析计量, 2011, 20(1): 92-95.
- [5] 陈蓓蓓, 陆洋, 马宁, 等. 表面增强拉曼光谱技术在食品安全快速检测中的应用[J]. 贵州科学, 2012, 30(6): 24-29.
- [6] ZHANG R, ZHANG Y, DONG Z C, et al. Chemical mapping of a single molecule by plasmon-enhanced Raman scattering[J]. Nature, 2013(498): 82-86.
- [7] AINA A, HARGREAVES M D, MATOUSEK P, et al. Transmission Raman spectroscopy as a tool for quantifying polymorphic content of pharmaceutical formulations[J]. Analyst, 2010, 135(9): 2328-2333.
- [8] ZHANG Y, MCGEORGE G. Quantitative analysis of pharmaceutical bilayer tablets using transmission Raman spectroscopy[J]. J Pharm Inn, 2015, 10(2): 269-280.
- [9] GRIFFENA J A, OWEN A W, BURLEY J, et al. Rapid quantification of low level polymorph content in a solid dose form using transmission Raman spectroscopy[J]. J Pharm Biom Ana, 2016, 128(1): 35-45.
- [10] ZHANG Z M, LIU J F, LIU R, et al. Thin layer chromatography coupled with surface-enhanced Raman scattering as a facile method for on-site quantitative monitoring of chemical reactions[J]. Anal Chem, 2014, 86(15): 7286-7292.
- [11] WANG W, XU M M, GUO Q H, et al. Rapid separation and on-line detection by coupling high performance liquid chromatography with surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. RSC Adv, 2015, 5(59): 47640-47646.
- [12] 孙振华, 余镇岗, 黄梅珍, 等. 小型化拉曼光谱仪的优化设计及应用[J]. 光电子·激光, 2015, 26(6): 1132-1137.
- [13] 庄志萍, 杨丽敏, 陈玉峰, 等. 2-巯基苯并咪唑表面增强拉曼光谱的密度泛函理论研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(10): 293-294.
- [14] 刘扬涛, 吕选忠, 于宙, 等. 1,3-二甲基尿嘧啶的拉曼光谱及其量子化学从头算(DFT)研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(12): 1579-1583.
- [15] 蔡然, 杨宏伟, 和劲松, 等. 液态水氢键结构的拉曼光谱研究进展[J]. 化工环保, 2010, 30(6): 492-495.
- [16] 吴娟霞, 徐华, 张锦. 拉曼光谱在石墨烯结构表征中的应用[J]. 化学学报, 2014, 72(3): 301-318.
- [17] 乐健, 李珺婵, 陈桂良, 等. 拉曼光谱法快速测定氨茶碱注射液中的无水茶碱和乙二胺的含量[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 23(3): 141-145.
- [18] 陈莉, 钱啸, 朱乃军. 拉曼光谱法快速测定注射用头孢他定溶液的含量[J]. 中国药事, 2015, 25(8): 874-878.
- [19] VEIJ M D, VANDENABEELE P, BEER T D. Reference database of Raman spectra of pharmaceutical excipients[J]. Raman Spectroscopy, 2009, 40(2): 297-307.
- [20] 曹玲, 石蓓佳, 吴莉, 等. 常用羧酸类及其衍生物药用辅料的拉曼光谱鉴别[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 484-490.
- [21] 钱小峰, 柳艳, 陈辉, 等. 基于药用辅料的拉曼光谱鉴别络活喜仿冒药的研究[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(4): 334-337.
- [22] BOIRET M, RUTLEDGE D N, GORRETTA N, et al. Application of independent component analysis on Raman images of a pharmaceutical drug product: pure spectra determination and spatial distribution of constituents[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 94(1): 58-64.
- [23] 冯尚源, 陈荣, 李永增, 等. 党参煎剂表面增强拉曼光谱[J]. 中国激光, 2010, 37(1): 121-124.
- [24] 黄浩, 陈荣, 陈伟伟, 等. 黄芪表面增强拉曼光谱研究[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(12): 843-846.
- [25] 万秋娥, 刘汉平, 张鹤鸣, 等. 激光拉曼光谱法无损鉴别人参及其伪品[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(4): 989-992.
- [26] 卫程华, 陈娟, 许曼翎, 等. 表面增强拉曼光谱法快速分析中药三七的有效成分[J]. 江苏大学学报, 2015, 25(3): 263-267.
- [27] 吴元菲, 李剑锋, 吴德印, 等. 胞嘧啶吸附于粗糙银和金电极上的表面增强拉曼光谱[J]. 光散射学报, 2006, 18(4): 297-301.
- [28] 崔丽, 任斌, 田中群. DNA 碱基与高氯酸根共吸附行为的表面增强拉曼光谱研究[J]. 物理化学学报, 2010, 26(2): 397-402.
- [29] KRISHNA C M, SOCKALINGUM G D, KEGELAER G, et al. Micro-Raman spectroscopy of mixed cancer cell populations[J]. Vibrat Spectros, 2005, 38(1): 95-100.
- [30] NAKASHIMA S, OGURA T, KITAGAWA T. Infrared and Raman spectroscopic investigation of the reaction mechanism of cytochrome oxidase[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1847(1): 86-97.
- [31] ORELIOA C C, BEIBOERA S H, MORSINKA M C, et al. Comparison of Raman spectroscopy and two molecular diagnostic methods for *Burkholderia cepacia* complex species identification[J]. J Microb Methods, 2014, 107(1): 126-132.