

# کاربردهای میکروسکوپ رامان کنفوکال در داروسازی

دکتر فرناز خالصه<sup>۱</sup>، دکتر فرناز منجمزاده<sup>۲</sup>

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز  
۲. مرکز تحقیقات ایمنی غذا و دارو دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

## ■ خلاصه

اسپکتروسکوپی رامان نوعی روش آنالیز اسپکتروسکوپیک نشری است که نور پراکنده شده حاصل از برخورد یک نور تک‌رنگ به یک نمونه غیر جاذب را مورد بررسی قرار می‌دهد. با تلفیق اسپکتروسکوپی رامان با میکروسکوپ هم‌کانون (کنفوکال)، می‌توان آنالیز دقیق نمونه‌ها را در زمینه علوم مختلف انجام داد. در این مقاله، علاوه بر مرور مزایا و معایب این روش آنالیتیکال، مقایسه آن با سایر روش‌های اسپکتروسکوپی مثل مادون قرمز صورت گرفته و کاربردهای میکروسکوپ رامان کنفوکال در داروسازی مرور شده است.

## ■ اساس اسپکتروسکوپی رامان

اسپکتروسکوپی رامان یک تکنیک آنالیز شیمیایی غیرمخرب است که اطلاعات دقیق در مورد ساختار شیمیایی، پلی‌مورف‌ها، درجه کریستالی، تعاملات

مولکولی و گروه‌های عاملی به‌دست می‌دهد. به‌طور کلی اساس اسپکتروسکوپی، تعامل نور با پیوندهای شیمیایی یک ماده است که یک ابزار آنالیتیکال قوی به حساب می‌آید. وقتی نوری به یک نمونه برخورد می‌کند سرنوشت‌های متفاوتی دارد. یا جذب می‌شود و یا منعکس و یا پراکنده می‌گردد. هرگاه یک نور تک‌فام با فرکانس خاص به یک نمونه غیرجاذب تابیده شود، قسمتی از آن نور پراکنده می‌شود. اگر نور پراکنده شده را آنالیز کنیم، مشاهده می‌شود که قسمت اعظم نور، فرکانسی برابر فرکانس نور تابیده شده دارد که پراش رابلی نامیده می‌شود و درصد کمی از این نور پراکنده، فرکانس متفاوتی خواهد داشت که به نام پراش رامان شناخته شده است. در این میکروسکوپ پراکندگی رامان سنجیده می‌شود. پراکندگی رابلی که دقیقاً فرکانس مشابه با نور تابیده دارد، مد نظر رامان نیست. میزان پراش رامان خیلی کم

و به اندازه ۱ در ۱۰۷ فوتون تابیده شده است. این تغییر فرکانس ممکن است به صورت افزایش یا کاهش فرکانس باشد. باندهای قوی رامان در گروه‌های غیرقطبی به ویژه حلقه‌های آروماتیکی مشاهده می‌شود، زیرا ارتعاش آن باعث تغییر در قطبیت‌پذیری مولکول می‌شود. طیف رامان حاصل به صورت عدد موجی (عکس سانتی‌متر) و به شکل تفاوت انرژی فوتون‌های برانگیخته و ساطع شده می‌باشد که همان طیف ارتعاشی مولکول می‌باشد. به طور کلی، این اثر بسیار ضعیف است زیرا احتمال تبادل انرژی کم می‌باشد.

اثر رامان در سال ۱۹۲۸ توسط آقای رامان هندی کشف شد ولی به علت این که برای تولید پراش رامان به نور با شدت بالا نیاز است، تا زمان کشف لیزر، اسپکتروسکوپی روتین رامان به شکل امروزی قابل استفاده نبود. به این منظور نور لیزر با طول موج‌های مختلف استفاده می‌شود که ظرفیت و کارایی اسپکتروسکوپی بستگی زیادی به همین طول موج لیزر دارد. در اغلب موارد خصوصاً در زمینه فارماسیوتیکال از طول موج ۷۸۵ نانومتر استفاده می‌شود.

همان‌طور که اشاره شد، اسپکتروسکوپی رامان دقت و صحت بالایی دارد، به همین دلیل در علوم و صنایع مختلف از جمله علوم دارویی، زمین‌شناسی و کانی‌شناسی، تشخیص‌های پزشکی و مشخصه‌یابی بیومارکرها، آنالیز مواد و ساختارهای کربنی و نیمه رساناها کاربرد دارد.

### ■ مزایای اسپکتروسکوپی رامان

✧ برای آنالیز، نمونه نیازی به آماده‌سازی ندارد.  
 ✧ نمونه‌های جامد، مایع و گازی قابل

آنالیز هستند.

✧ به علت این که آب پراش رامان ضعیفی دارد محلول‌های آبی قابل آنالیز هستند.

✧ طیفی که می‌دهد بسیار اختصاصی است به‌صورتی که می‌تواند یک اثر انگشت برای نمونه باشد.

✧ طیف‌گیری بسیار سریع است.

✧ پیوند لیگاند‌های فلزی که در محدوده  $100-700 \text{ cm}^{-1}$  هستند، به راحتی قابل آنالیز هستند.

### ■ محدودیت‌های اسپکتروسکوپی رامان

✧ احتمال پراکنش رامان خیلی کم و در نتیجه اثر آن ضعیف است و غلظت‌های بالایی از نمونه‌ها مورد نیاز است.

✧ فلزات خاص پراش رامان ندارند، بنابراین، قابل آنالیز نخواهند بود.

✧ روشی مقرون به صرفه نخواهد بود.

✧ ممکن است نمونه در اثر گرمای ایجاد شده با لیزر تخریب شود.

### ■ مقایسه اسپکتروسکوپی رامان با

#### اسپکتروسکوپی مادون قرمز و فلورسانس

اثر رامان مشابه فلورسانس بوده اما وابسته به طول موج نبوده و نیازمند مولکول‌های دارای کروموفور نیست. شیفت انرژی در مقیاس  $\text{cm}^{-1}$  ناشی از پراکندگی غیرقابل انعطاف امواج لیزر اندازه‌گیری می‌شود که مشابه شماره موج‌های نوار طیف middle-IR مولکول خواهد بود. اگر بخواهیم دو

## ■ کاربردهای اسپکتروسکوپی رامان در داروسازی

با استفاده از این تکنیک، نمونه‌های داخل بسته‌بندی یا یک دارو در فرمولاسیون قابل آنالیز هستند. به این ترتیب که با روش‌های نرم‌افزاری و حذف طیف ماتریکس (محیط احاطه‌کننده نمونه) از طیف کل نمونه، اسپکتروم مربوط به دارو به دست می‌آید که با داروی خالص قابل مقایسه است. به این ترتیب کنترل کیفیت نهایی قرص‌های بسته‌بندی شده در پلیستر امکان‌پذیر خواهد بود. تغییرات ایجاد شده در نمونه مثل تغییر در ساختار سه بعدی پروتئین‌ها قابل بررسی است.

به علت این که اسپکتروم رامان به صورت اثر انگشت برای هر ترکیب عمل می‌کند، از آن می‌توان برای شناسایی ترکیبات مختلف به‌عنوان روش مکمل برای IR استفاده کرد.

## ■ میکروسکوپ رامان کنفوکال

میکروسکوپ کنفوکال از دو عدسی تشکیل شده است که یک حفره ریز برای تشکیل تصویر نقطه به نقطه از نمونه دارد. مزیت این میکروسکوپ، علاوه بر کنتراست بالا، امکان تشکیل تصویر سه بعدی است که با میکروسکوپ‌های معمولی امکان‌پذیر نیست. با ادغام کردن اسپکتروم رامان با اساس نشر با میکروسکوپ کنفوکال، یک اسپکتروم رامان کامل در هر پیکسل از تصویر ایجاد می‌شود. هر تصویر رامانی ده هزاران اسپکتروم دارد که با ادغام کردن یک لاین رامان مشخص در تمام اسپکتروم‌ها یک تصویر ایجاد می‌شود. شدت رامان مستقیماً با غلظت گروه‌های عاملی متناسب است اما عوامل مختلفی وجود دارند که در نتایج کمی خطا ایجاد

روش اسپکتروسکوپی رامان و مادون قرمز را مقایسه کنیم می‌توانیم موارد زیر را نام ببریم: اسپکتروسکوپی رامان نوعی طیف سنجی نشری است که به علت پراش نور و در آن دسته از لرزش‌های مولکولی اتفاق می‌افتد که باعث تغییر در پلاریته می‌شوند، به علاوه، مولکول نباید یک ممان دوقطبی ثابت داشته باشد، تهیه نمونه نیاز به مهارت خاصی ندارد و در هر حالتی که باشد قابل آنالیز است حتی اگر حلال آن آب باشد، در حالی که در اسپکتروسکوپی مادون قرمز یک طیف‌سنجی جذبی است، اسپکتروم حاصل، نتیجه جذب نور توسط لرزش‌های مولکولی می‌باشد و مشابه IR باید تغییر در ممان دو قطبی اتفاق بیفتد، نمونه نیاز به آماده‌سازی دارد و باید در حالت غیرگازی و فاقد آب باشد اما این روش مقرون به صرفه‌تر از اسپکتروسکوپی رامان می‌باشد. مقایسه طیف‌های رامان و FTIR نمایانگر این واقعیت است که شیف رامان برای یک گروه خاص از نظر انرژی مشابه انرژی جذب IR آن گروه در محدوده میانی - مادون قرمز (Mid IR) است. دو طیف، اطلاعات مکمل را فراهم می‌کنند. قانون کلی این است که آن دسته از باندهایی که در ناحیه میانی - IR جذب ضعیفی دارند، در محدوده رامان جذب شدیدی خواهند داشت و بالعکس. برای مثال، گروه‌های C-H آروماتیک که جذب IR تابشی ضعیفی دارند، اثر رامان قوی‌ای نشان می‌دهند در حالی که گروه C=O با جذب IR قوی اثر رامان ضعیفی نشان می‌دهند (۱).

می‌کنند. بنابراین، اشکال عمده این روش، عدم امکان به‌دست آوردن نتایج کمی است. این نوع میکروسکوپ در علوم گوناگون از جمله باستان‌شناسی، داروسازی و پزشکی قانونی استفاده می‌شود که تأکید این مقاله بر کاربردهای میکروسکوپ رامان کنفوکال در زمینه فراماسیوتیکال است.

اسپکتروسکوپی IR نیز قابل آنالیز هستند اما لرزش‌هایی که از صفحات کریستالی و اسکلت کربنی ایجاد می‌شوند در رامان سیگنال قوی‌تری خواهند داشت.

❖ در اشکال دارویی آهسته رهش و طولانی رهش، توزیع هموزن دارو اهمیت زیادی دارد، زیرا توزیع غیرهموزن منجر به رهش تأخیری یا خیلی سریع دارو می‌شود که مطلوب نخواهد بود. از آن‌جا که در میکروسکوپ کنفوکال امکان تمایز اجزا یک فرمولاسیون از طریق اختصاص رنگ‌های مختلف به هر جز از طریق نرم‌افزار مربوط و بر اساس طیف رامان وجود دارد، توزیع دارو در فرمولاسیون را می‌توان بررسی کرد. بنابراین، این تکنیک برای بررسی هموزنیسته فرمولاسیون دارویی نیز قابل استفاده می‌باشد. به‌عنوان مثال، اگر رنگ قرمز برای دارو انتخاب شود و اجزای ماتریکس قرص به‌عنوان مثال با رنگ‌های زرد و سبز و آبی مشخص شوند در تصویر میکروسکوپ کنفوکال متصل به رامان پخش ذرات دارو به رنگ قرمز در ماتریکس قابل بررسی است.

## ■ کاربردهای میکروسکوپ رامان کنفوکال در داروسازی

❖ این تکنیک برای کنترل کیفیت قرص‌های دارویی استفاده می‌شود. به این منظور، اطلاعاتی در مورد توزیع و مقدار نسبی دارو و افزودنی‌ها حاصل می‌شود.

❖ همچنین امکان آنالیز مستقیم دارو در پکیج پلیمری وجود دارد. بنابراین، با استفاده از این روش در کنترل کیفیت فرمولاسیون‌ها، به میزان زیادی می‌توان در هزینه و زمان صرفه‌جویی کرد.

❖ امکان شناسایی قرص‌ها و کپسول‌های تقلبی در بین انواع مختلف بسته‌بندی‌ها بدون باز کردن بسته‌بندی وجود دارد.

❖ مطالعه اینترکشن داروهای آنتی‌تومور با DNA عموماً از طریق روش‌هایی مانند میکروسکوپ فلورئورنس و اسپکتروسکوپی IR صورت می‌گیرد اما هرکدام محدودیت‌هایی دارند اما اسپکتروسکوپی رامان به‌علت حساسیت بالایی که دارد اطلاعات فراماکولوژیک کاربردی به ما می‌دهد.

❖ میحث پراکندگی یکنواخت اجزای فرمولاسیون در پوشش قرص‌ها نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا اگر پراکندگی اجزای پوشش قرص یکنواخت نباشد بر رهش دارو از فرمولاسیون تأثیرگذار خواهد بود. بررسی پراکندگی اجزای پوشش قرص‌ها نیز توسط میکروسکوپ رامان کنفوکال امکان‌پذیر خواهد بود.

❖ مورد دیگری که در کنترل فرمولاسیون‌های دارویی ضروری است، بررسی یکنواختی محتوای ترکیبات می‌باشد. به‌عنوان مثال، می‌توان به این

❖ از مهم‌ترین کاربردهای این تکنیک، آنالیز فاز جامد (solid state) است. این مطالعات توسط

فرمولاسیون، آنالیزهای زیستی، توزیع دارو در فرآورده‌های فارماسیوتیکال، شناسایی و تشخیص ترکیبات تقلبی، تعیین کیفیت مواد اولیه و ... می‌باشد (۵، ۲).

منظور پودرهای استنشاقی را توسط میکروسکوپ رامان کنفوکال آنالیز کرد.

علاوه بر ارزیابی محصولات نهایی، کنترل کیفیت ترکیبات قبل از پروسه تولید هم توسط این میکروسکوپ امکان‌پذیر است. مثلاً می‌توان تغییرات پلی‌مورفیک داروها را طی پروسه گرانولاسیون، که تأثیر زیادی بر نوع پلی‌مورف دارو می‌گذارد، مشاهده و بررسی کرد.

### نتیجه‌گیری

میکروسکوپ رامان کنفوکال یک تکنیک اسپکتروسکوپی ادغام شده با میکروسکوپ هم‌کانون است که در علوم مختلف کاربرد دارد که در این مقاله کاربرد آن در داروسازی مورد بحث قرار گرفت. مهم‌ترین مزایای این روش اختصاصی بودن بالا و امکان بررسی نمونه‌های حاوی آب است اما روشی هزینه‌بر است و امکان آنالیز فلزات خاص وجود ندارد. کاربردهای عمده این تکنیک در حیطه داروسازی شامل شناسایی ترکیبات، مطالعات پیش

### منابع

1. Watson DG. Pharmaceutical analysis E-book: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. New york: Elsevier Health Sciences;2012
2. Bumbrah GS. and Sharma RM. Raman spectroscopy–Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. Egypt Forensic Sci 2016; 6(3): 209-215.
3. Dieing T. Hollricher O. and Toporski J. Confocal Raman Microscopy. first ed. Berlin: springer;2011
4. Paudel A. Rajjada D. and Rantanen J. Raman spectroscopy in pharmaceutical product design. Adv drug Delivery Rev 2015; 89: 3-20.
5. Turrell G. and Corset J. Raman Microscopy, Developements and applications. New york: Elsevier;1996

