بیستمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران
و ششمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۸ تا ۱۰ بهمن ماه۱۳۹۲ - دانشگاه صنعتی شیراز

کاهش فلورسانس نمونه‌های دارویی در طیف‌سنجی رامان با استفاده از روش بی‌رنگ سازی نوری

نجمه صادق، حسین خادم و سیدحسن توسلی

دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده لیزر وپلاسما

چکیده –در این مقاله، روشی برای بهبود نسبت سیگنال رامان به طیف فلورسانس در طیف سنجی رامان ارائه شده است. در این روش با تاباندن نور لیزر قبل از طیف گیری، فلورسنس نمونه کم می‌شود در حالیکه سیگنال رامان را به طور حداقل تحت تاثیر قرار می‌دهد و در نتیجه امکان دست یابی به نسبت سیگنال رامان به فلورسنس بالاتر را فراهم می‌کند. امکان‌سنجی این روش در مطالعه‌ی طیف رامان قرص استامینوفن که فلورسنسی قوی در طول موج استفاده شده دارد، بررسی شده است.
کلید واژه- بی‌رنگ سازی نوری، طیف‌سنجی رامان، فلورسنس

Fluorescence Suppression in Raman Spectroscopy Using Photobleaching Method for Pharmaceutical Samples

Najmeh sadegh, Hossein Khadem, Seyed Hassan Tavassoli

Shahid Beheshti University, laser and plasma institute

Abstract-in this article we offered a method for improving the ratio of signal to fluorescence in Raman spectroscopy based on photobleaching. It was demonstrated to be a simple approach to remote reduction and suppression the magnitude of the fluorescent background reduced exponentially with time. Pre-exposure to laser light significantly reduces sample autofluorescence, but minimally affects Raman signals. We demonstrated the capability of this method for Raman spectral measurements of acetaminophen tablets.

Keywords: fluorescence reduction, Photobleaching, Raman spectroscopy

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-02]

۱- مقدمه

امروزه طیف‌سنجی رامان به عنوان روشی غیر مخرب برای مطالعه‌ی ترکیب و ساختار گستره‌ی فراوانی از مواد، درسطح میکروسکوپی توجه بسیار زیادی را جلب کرده است. علیرغم اینکه طیف‌سنجی رامان یک روش مفید محسوب می‌شود؛ سطح مقطع کم سیگنال‌های رامان، باعث سختی اندازه‌گیری آنها می‌شود. این قضیه در نمونه‌هایی که دارای طیف فلورسنس شدیدی هستند مشهود است. اگر نمونه با طول موجی در نزدیکی گذار الکترونی آن برانگیخته شود معمولا سیگنال رامان با تابش پهن فلورسانس نمونه ادغام می‌شود. تابش فلورسنس چندین مرتبه قوی‌تر از پراکندگی رامان است و این مانع از آشکار شدن سیگنال رامان نمونه می‌شود؛ لذا برای تحلیل کمّی طیف رامان بسیاری از نمونه‌ها، حذف زمینه‌ی فلورسنس، از مهمترین چالشهایی است که با آن مواجه می‌شویم.

برای این منظور تاکنون روش‌های مختلفی بر مبنای رویکردهای آزمایشگاهی- ابزاری و محاسباتی به کار گرفته شده است. ساده‌ترین گزینه، استفاده از طول موج های برانگیزشی خارج از ناحیه‌ی جذب نمونه است. نمونه‌های دارویی معمولا دارای جذبی قوی در ناحیه‌ی مریی می‌باشند. استفاده از طول موج‌هایی در ناحیه‌ی فروسرخ نزدیک یا فروسرخ، موثر به نظر می‌رسد اما از آنجایی که شدت سیگنال رامان با توان چهارم فرکانس رابطه‌ی مستقیم دارد لذا سیگنال‌های رامان ضعیف‌تری خواهیم داشت. به کارگیری طول موج هایی در ناحیه‌ی فرابنفش می‌تواند سبب تجزیه‌ی شیمیایی و اثرات تخریبی روی نمونه شود [2]. در روش‌های دیگر مانند روش بازه‌ی زمانی[1]، طیف‌سنجی اختلافی رامان انتقالی(SERDS)[2] و طیف‌سنجی رامان تقویت یافته سطحی(SERS)[3]، به تجهیزات آزمایشگاهی خاص همچون لیزرهای پالسی و لیزرهایی با طول موج قابل تنظیم نیازمند هستیم. در روش SERDS دو طیف رامان بدست آمده از دو طول موج برانگیزشی نزدیک به هم از یکدیگر کم شده و با یک روند محاسباتی طیف رامان نهایی بازسازی می‌شود. در روش SERS نیاز به آماده سازی زیرلایه و روش های شیمیایی پیچیده‌ای وجود دارد. از مرور سایر روش های کاهش فلورسنس دراینجا صرف نظر می‌کنیم.

یکی از روش های کم هزینه که در عین حال می‌تواند به طور موثر فلورسنس زمینه را کاهش دهد روش بی‌رنگ سازی نوری[4] است. در این روش در یک بازه‌ی زمانی، نور لیزر به نمونه تابانده می‌شود. به طوری که فلوروفور موجود در نمونه، توانایی تابش فلورسنس خود را در اثر تحریک شیمیایی القا شده توسط تابش فوتون از دست می‌دهد[1,2]. مکانیزم اصلی بی‌رنگ سازی نوری تاکنون مشخص نشده است اما تصور می‌شود که وقتی نمونه برای مدت نسبتا زیادی در معرض تابش نور لیزر قرار می‌گیرد، گذاری از حالت برانگیخته‌ی یگانه به تراز برانگیخته‌ی سه‌گانه رخ می‌دهد که این تراز در مقایسه با تراز برانگیخته‌ی یگانه نیمه عمر بالاتر و واکنش پذیری شیمیایی بیشتری دارد. بسیاری از واکنش های بیرنگ کننده در این اولین حالت برانگیخته‌ی سه گانه رخ میدهد؛ گذار بین این تراز با تراز های سه گانه و یگانه‌ی اتمهای مجاور سبب تخریب فلوروفور نمونه میشود و قابلیت تابش فلورسنس خود را از دست میدهند.لذا از این روش می‌توان در مواردی که فلورسانس، ناشی از ناخالصی‌های موجود در نمونه باشد بهره برد[4].

در این مطالعه، اثر بی‌رنگ سازی نوری روی کیفیت طیف رامان و اثر آن روی فلورسنس زمینه برای نمونه‌ی فلورسنت قرص استامینوفن بررسی می‌شود.

۲- روش تجربی

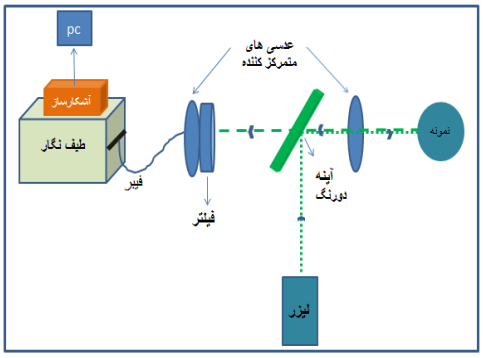
آزمایش روی نمونه‌ی شدیداً فلورسنت قرص استامینوفن انجام شد. طیف رامان با استفاده از یک طیف‌سنج OceanOptics دارای تک توری HC-1 با تعداد خط 1200 line/mm ثبت شد. از لیزر Nd:YAG پیوسته با طول موج ۵۳۲ نانومتر به عنوان منبع تابش برانگیزشی استفاده شد. طرح ساده‌ای از این چیدمان آزمایشگاهی در شکل ۱ نشان داده شده است. در این چیدمان نور پراکنده شده از نمونه در آرایش هندسی ۱۸۰ درجه توسط لنز جمع آوری و پس از عبور از یک فیلتر(برای جداکردن پراکندگی

[1] Time- gating method
[2] Shifted Excitation raman difference spectroscopy (SERDS)
[3] Surface-Enhanced Raman Spectroscopy(SERS)
[4] Photobleaching method

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-02]

غیرکشسان رامان از پراکندگی کشسان ریلی) به درون فیبر هدایت و نهایتا وارد طیف‌سنج می‌شود.

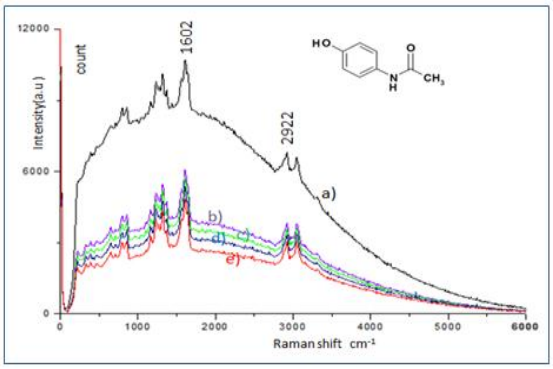
از آنجا که شدت سیگنال رامان با انرژی فرودی رابطه مستقیم دارد لذا برای بررسی اثر بی‌رنگ سازی در کاهش فلورسنس زمینه و افزایش نسبت سیگنال به فلورسانس در طیف رامان، از لیزر با توان ثابت ۱۰۰mw در تمامی مراحل اندازه‌گیری استفاده شد. به منظور قابل مقایسه بودن طیف‌های حاصله، تمامی آنها از یک نقطه‌ی نمونه به اندازه‌ی پهنای پالس لیزر بدست آمد. برای ایجاد اثر بی‌رنگ سازی، نمونه‌ی استامینوفن در پنج بازه‌ی زمانی متفاوت در معرض تابش نور لیزر قرار گرفت و سپس طیف رامان آن اندازه‌گیری شد. زمان ثبت هر طیف در هر مرتبه از آزمایش ۱۵ ثانیه بوده است.



شکل ۱- چیدمان ازمایشگاهی برای طیف سنجی رامان

۳- نتایج و بحث

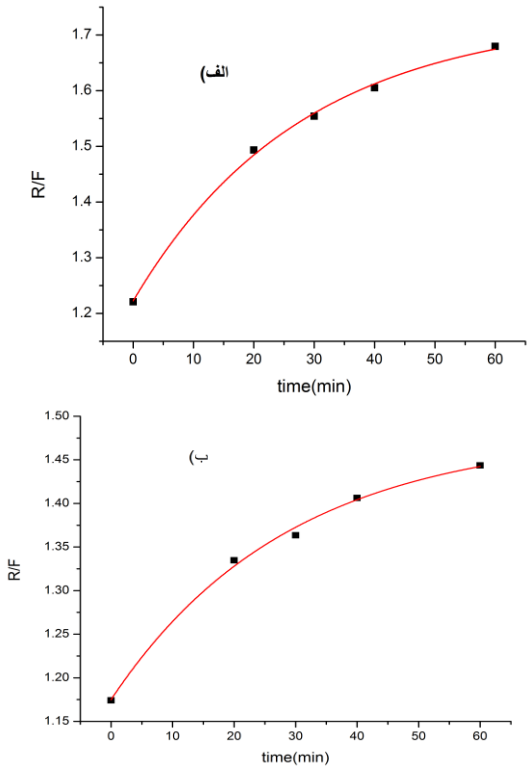
شکل ۲ طیف های رامان اندازه گرفته شده از یک نقطه‌ی خاص روی قرص استامینوفن را پس از آنکه برای



شکل ۲- طیف رامان قرص استامینوفن پس از a) t=0، b) t=20، c) t=30، d) t=40 و e) t=60 دقیقه تاباندن نور لیزر به نمونه

زمان‌های متفاوت در معرض تابش نور لیزر قرار گرفت نشان می‌دهد.

خط‌های نسبتا قوی $1602\ cm^{-1}$ و $2922cm^{-1}$ که به ترتیب به مدهای ارتعاشی کششی C-C ومتقارن CH_3 نسبت داده می‌شوند[3]؛ به عنوان پیک‌های مشخصه برای مقایسه انتخاب شدند. برای این دوخط نسبت سیگنال به فلورسنس زمینه (R/F) محاسبه شد و سپس تغییرات آن به صورت تابعی از زمان رسم شد (شکل۳).



شکل ۳: نمودار نسبت سیگنال رامان به زمینه‌ی فلورسنس برای الف) پیک $1602cm^{-1}$ و ب) پیک $2922cm^{-1}$ برای نمونه‌ی قرص استامینوفن

همانطور که شکل ۲ نشان می‌دهد؛ طیف اولیه دارای فلورسنس زمینه‌ی قابل توجهی است و هر چه نمونه مدت زمان بیشتری در معرض تابش نور لیزر قرار می‌گیرد نسبت سیگنال رامان به زمینه‌ی فلورسنس(R/F) تقریبا به صورت یک تابع نمایی افزایش می‌یابد به طوریکه تنها پس از ۲۰ دقیقه تاباندن نور به نمونه ،کاهش قابل توجهی در فلورسنس زمینه مشاهده شد و تقریبا به حدود ۵۰٪ مقدار اولیه‌اش رسید. ادامه دادن این روند نوردهی درنهایت منجر به وضوح بیشتر خط‌های رامان و پدیدار

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-02]

شدن پیک‌های کوچکتر همچون cm^{-1} ۷۱۲ و cm^{-1}۳۹۴ و cm^{-1} ۳۳۲ شده است.

لازم است متذکر شویم زمان تابش مورد نیاز برای هر نمونه متفاوت است و باید به طور آزمایشگاهی تعیین شود. همچنین تاباندن بیش از حد لیزر به نمونه می‌تواند سبب تغییر ساختاری وشیمیایی نمونه شود[1].

نتیجه گیری:

نمونه‌های دارویی و بیولوژیکی دارای طیف جذب بسیار قوی در ناحیه‌ی مرئی هستند. این جذب قوی، خود را به صورت طیف زمینه‌ی فلورسنس شدیدی در طیف‌سنجی رامان نشان می‌دهد. برای کاهش طیف زمینه‌ی فلورسنس و افزایش نسبت سیگنال رامان به فلورسنس(R/F) روش‌های متعددی وجود دارد که در این مقاله از روش بی‌رنگ سازی نوری استفاده شد. در این روش نور لیزر در بازه‌های زمانی مختلف به نمونه تابانده شد و ملاحظه شد که با افزایش زمان نوردهی، نسبت R/F بصورت نمایی افزایش می‌یابد. اما این افزایش برای زمان‌های نوردهی خیلی زیاد به حالت ثابتی میل می‌کند. بنابراین الزاما با افزایش خیلی زیاد زمان نوردهی، نسبت R/F زیاد نخواهد شد. لازم به ذکر است که این روش صرفا برای نمونه‌هایی مناسب است که نسبت به تابش نور لیزر حساس نباشند.

پیشنهادات:

- بررسی وابستگی نرخ اثر بیرنگ سازی نوری به شدت های مختلف فرودی بر نمونه
- بررس وابستگی اثر بیرنگ سازی نوری در دماهای متفات و اکسیژن محیط

مراجع

[1] Macdonald M.A.,Wyeth P.,"on the use of photobleaching to reduce fluorescence background in raman spectroscopy to improve the reliability of pigment identification on painted textiles", **J. Raman Spectrosc**. **37(**2006) 830–835

[2] callender,sahar,mandair,golcuk,"Is photobleaching necessary for raman imagaing of bone tissue using a green laser**?" Biochimica et Biophysica Acta**, 1758 (2006) 868–873

[3] Kolesov, Mikhail,Mikhailenko,Boldyrev, Morris,Dynamics of the intermolecular hydrogen bonds in the polymorphs of paracetamol in relation to crystal packing and conformational transitions***,Phys.Chem.Chem.Phys***.,13(2011),14243–14253

[4]http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/fluorescence/photobleaching

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-02]