

РАЗНОСТНАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ СТРУКТУРЫ И СОСТАВА БИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ю. П. Войнов, В. С. Горелик, М. Ф. Умаров, С. В. Морозова

Разработан метод диагностики молекулярной структуры и состава ароматических биоактивных препаратов на примере фармацевтических объектов: анальгина, цитрамона, аспирина и парацетамола. Метод основан на волоконно-оптической регистрации спектров флуоресценции при лазерном ультрафиолетовом (266 нм) возбуждении с высоким (0.1 мм) пространственным разрешением. Установлено, что при наличии нескольких компонентов в фармацевтическом препарате наблюдается его неоднородность на расстоянии в несколько миллиметров. Построены разностные спектры флуоресценции, позволяющие устанавливать различия в составе и структуре препарата даже при близости вида их спектров флуоресценции. Разработанный метод может быть использован для контроля качества большого класса биоактивных структур, люминесцирующих под действием ультрафиолетового излучения.

Ключевые слова: флуоресценция, фармацевтические препараты, биологические объекты, лазер, ультрафиолетовое излучение, спектр, корреляционная функция.

Биоактивные препараты включают в себя большой класс веществ, оказывающих сильное воздействие на молекулярном уровне на биологические структуры и живые организмы. К ним относятся, в частности, различные фармацевтические препараты, стимуляторы процессов жизнедеятельности, аминокислоты, токсические вещества и др. Для эффективного использования биоактивных препаратов необходимо обеспечение соответствия их молекулярной структуры и состава номинальным препаратам, воздействие которых на биологические структуры и живые организмы надёжно установлено.

Учреждение Российской академии наук Физический институт им. П. Н. Лебедева РАН, 119991, Москва, Ленинский пр-т, 53; e-mail: gorelik@sci.lebedev.ru.

В связи с этим возникает задача установления на количественном уровне степени соответствия молекулярной структуры и состава реальных образцов, используемых в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и других областях, с номинальными биоактивными препаратами, характеристики которых известны и введены в базу данных. Для решения такой задачи могут быть использованы спектроскопические методы, включая флуоресцентную спектроскопию, метод комбинационного рассеяния света, нелинейно-оптической спектроскопии и т.д. Для однозначного ответа на вопрос о степени соответствия молекулярной структуры и состава анализируемого реального объекта номиналу, характеристики которого присутствуют в базе данных, необходимо провести на количественном уровне сравнение спектров анализируемого и номинального объекта.

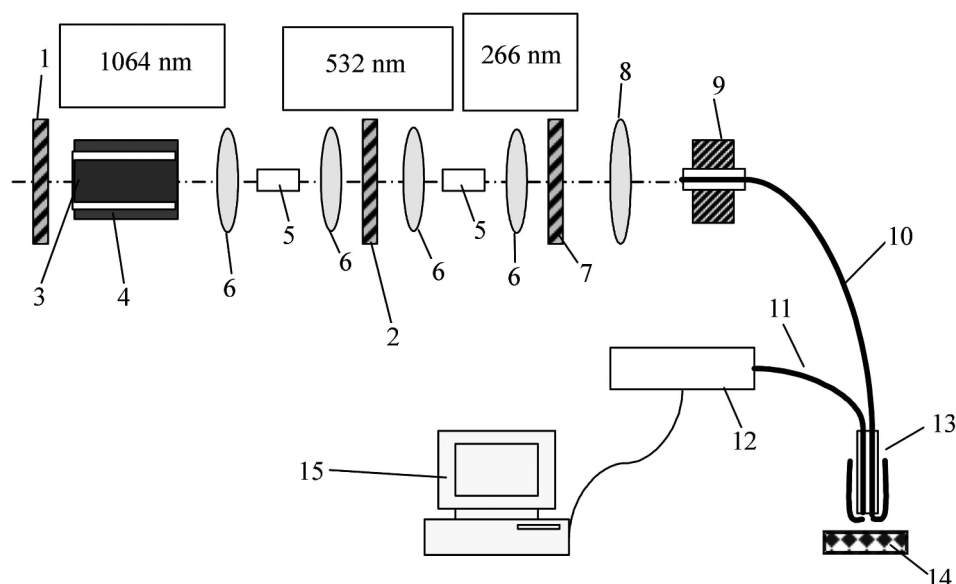
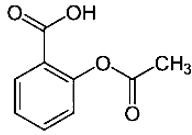
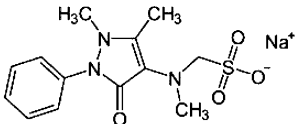
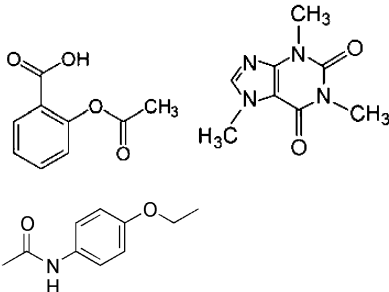
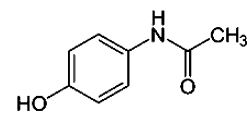


Рис. 1: Схема для регистрации спектров флуоресценции с двухканальным зондом биоактивных соединений; 1, 2, 7 – зеркала; 3 – активный элемент; 4 – “накачка”; 5 – нелинейный кристалл; 6 – линза; 8 – конденсор; 9 – фиксатор световода; 10, 11 – световоды; 12 – спектрограф; 13 – зонд; 14 – анализируемый образец; 15 – компьютер.

В данной работе ставилась задача сравнения спектров анализируемых и номинальных биоактивных препаратов на примере коммерческих фармацевтических препаратов. Задача решалась на основе использования метода разностной флуоресцентной спектроскопии, развиваемого в лаборатории “Комбинационное рассеяние” ФИАН.

Т а б л и ц а 1

Химические формулы исследованных фармацевтических препаратов

Фармацевтический препарат	Химическая формула	Структурная формула
Аспирин	$C_9H_8O_4$	
Анальгин	$C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$	
Цитрамон (аспирин, кофеин, фенацетин)	$C_9H_8O_4 + C_8H_{10}N_4O_2 + C_{10}H_{13}NO_2$	
Парацетамол	$C_8H_9NO_2$	

В качестве объектов исследования нами были выбраны типичные фармацевтические препараты (цитрамон, анальгин, аспирин и парацетамол). В таблице 1 приведены химические и структурные формулы исследованных фармацевтических препаратов. Как видно из этой таблицы, в структуре всех исследованных веществ присутствуют ароматические кольца, что приводит к фундаментальному электронному поглощению в среднем ультрафиолетовом диапазоне. Соответственно в этих веществах наблюдается флуоресценция в фиолетово-красном диапазоне при возбуждении флуоресценции коротковолновым (266 нм) электромагнитным излучением. Для возбуждения и регистрации спектров флуоресценции использовалась волоконно-оптическая методика (см. работы [1–4]). Схема используемой экспериментальной установки приведена на рис. 1. При этом в качестве источника возбуждающего ультрафиолетового излучения использовалась четвёртая гармоника (266 нм) лазера на алюмоиттриевом гранате, генерирующего импульсно-периодическое излучение с длиной волны 1064 нм. Средняя мощность

возбуждающего ультрафиолетового излучения на поверхности анализируемого препарата составляла 10 мВт, что позволяло осуществлять анализ объекта без какой-либо его деструкции. Небольшое количество анализируемого вещества в виде таблетки помещалось в кювету (14) (см. рис. 1).

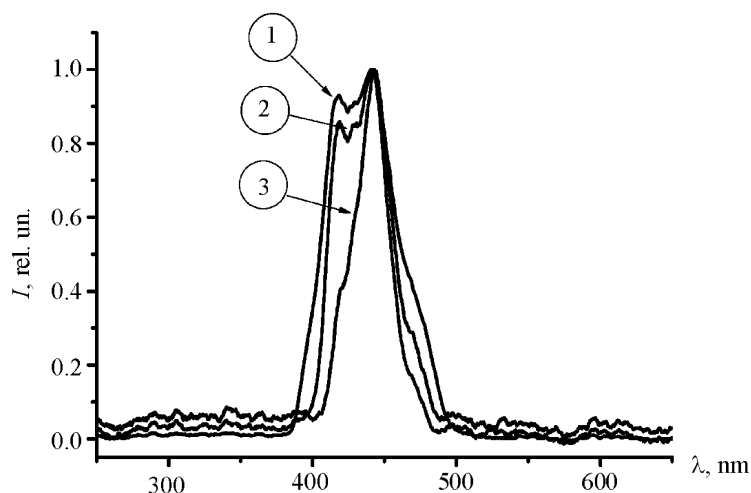


Рис. 2: Вид спектров флуоресценции от нескольких участков (кривые 1–3) анализируемой таблетки цитрамона при возбуждении ультрафиолетовым излучением (266 нм) четвёртой гармоники лазера на алюмоиттриевом гранате.

Кварцевые световоды (10, 11) использовались для подведения ультрафиолетового излучения к веществу и для отведения возникающего в анализируемой пробе флуоресцентного излучения к малогабаритному спектрографу (12) типа FSD8. При этом пространственное разрешение на поверхности анализируемой пробы составляло 0.1 мм. Используемый тип малогабаритного спектрографа позволял осуществлять регистрацию спектров флуоресценции исследуемых таблеток в диапазоне 200–1200 нм при экспозициях 0.01–0.1 с. От мини-спектрометра цифровая информация о спектре вторичного излучения передавалась на компьютер. После компьютерной обработки нами были построены нормированные спектры флуоресценции фармацевтических препаратов. Рис. 2 иллюстрирует вид спектров флуоресценции таблетки цитрамона от нескольких точек на поверхности образца, отстоящих друг от друга на расстоянии 3–4 мм. Как видно из этого рисунка, молекулярный состав анализируемой таблетки цитрамона оказывается различным для областей поверхности, расположенных на расстоянии несколько миллиметров друг от друга. Это свидетельствует о неоднородности молекулярного состава анализируемой пробы.

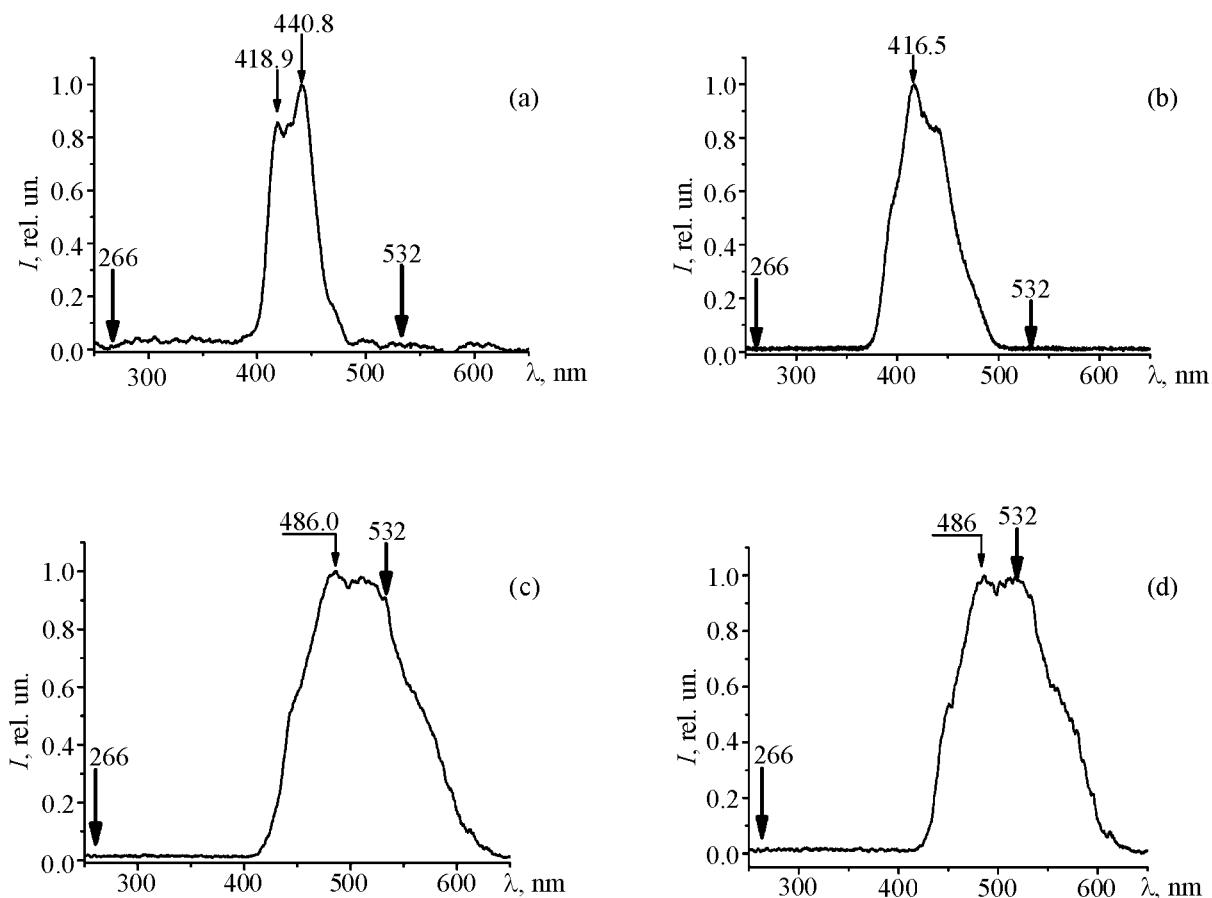


Рис. 3: Нормированные спектры флуоресценции цитрамона (а), аспирина (b), анальгина (с) и парацетамола (d), полученные при возбуждении ультрафиолетовым излучением четвёртой гармоники (266.0 нм) импульсно-периодического лазера на алюмоиттриевом гранате.

На рис. 3(а)-(d) приводятся для сравнения спектры флуоресценции всех четырёх изучаемых препаратов. Как видно из рис. 3(а)-(d), для всех анализируемых фармацевтических препаратов наблюдаются структурированные полосы флуоресценции в фиолетово-красной области спектра, форма которых несущественно отличается, по крайней мере, для цитрамона и аспирина, а также для анальгина и парацетамола. Для установления количественного отличия спектров, полученных от различных фармацевтических препаратов, нами были построены разностные функции (см. рис. 4) с

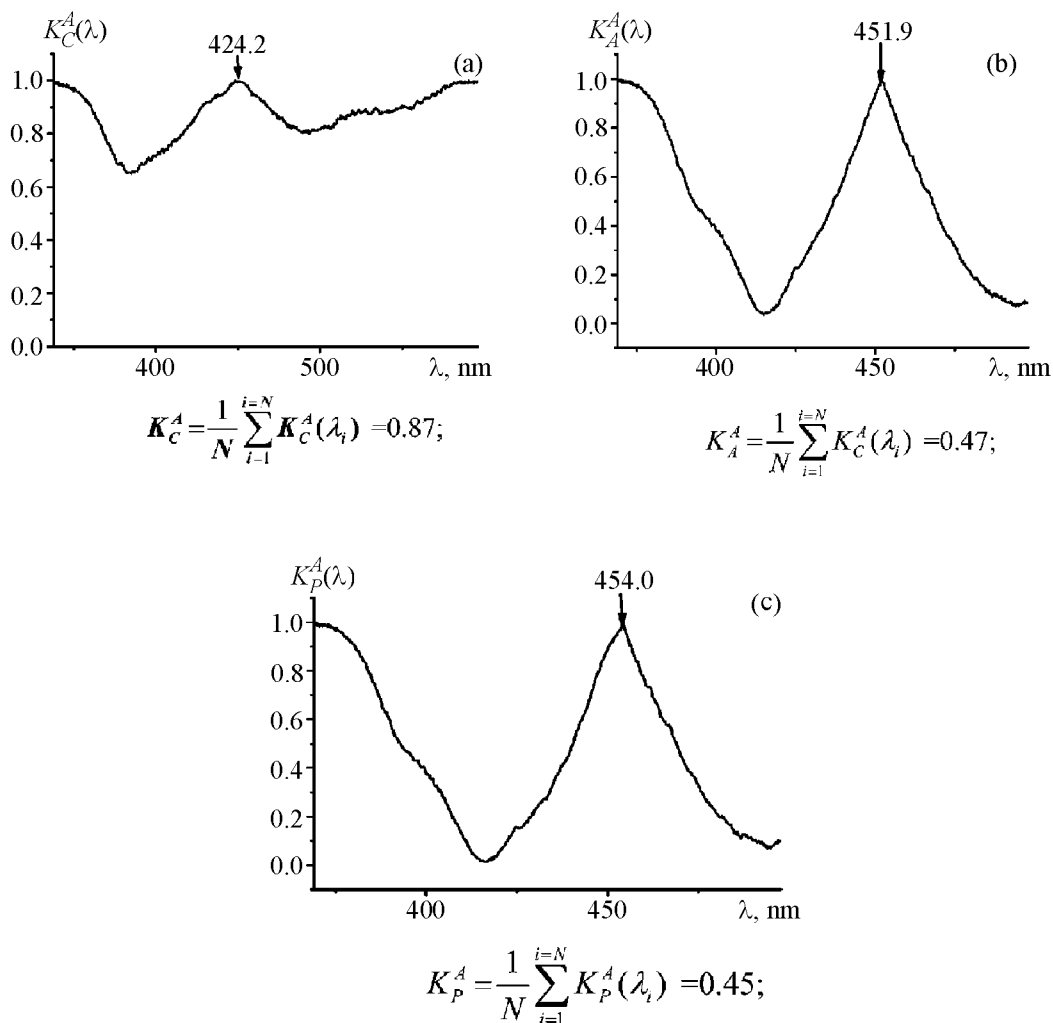


Рис. 4: Разностные спектры анализируемых фармацевтических препаратов (а – цитрамона; б – анальгина; с – парацетамола) при их сравнении со спектром флуоресценции аспирина.

использованием следующего соотношения:

$$K_X^A(\lambda) = 1 - |i_X(\lambda) - i_A(\lambda)|. \quad (1)$$

Здесь $i_X(\lambda), i_A(\lambda)$ – нормированные спектры флуоресценции анализируемого препарата (X) и аспирина (A). Соответствующие спектры приведены на рис. 4(а)-(с). Разностные спектры строились в диапазоне длин волн $\Delta\lambda = 369 - 468$ нм с интервалом разбиения $\Delta\lambda_i = 0.26$ нм. Кроме того, были вычислены соответствующие разностные спектры (приведены на рис. 4) анализируемых препаратов по отношению к аспирину по форму-

ле:

$$K_X^A = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{i=N} K_X^A(\lambda_i). \quad (2)$$

Близость вида спектров флуоресценции цитрамона и аспирина обусловлена присутствием в них одного и того же компонента. В то же время различия в спектрах флуоресценции от различных областей поверхности цитрамона (см. рис. 2) обусловлена неравномерным распределением в нём (см. Табл. 1) компонентов (кофеина и фенацетина). Уширение полосы флуоресценции анальгина по сравнению со спектром парацетамола можно объяснить более сложной молекулярной структурой анальгина.

Таким образом, в данной работе на примере близких по структуре фармацевтических препаратов (цитрамона, аспирина, анальгина и парацетамола) показано, что для количественного неразрушающего контроля молекулярного состава и структуры биоактивных препаратов, содержащих ароматические кольца, может быть эффективно использован метод флуоресцентного анализа, дополненный построением соответствующих разностных функций. Возбуждение спектров флуоресценции осуществлялось четвертой гармоникой лазера на алюмоиттриевом гранате с использованием волоконно-оптического зонда и малогабаритного светосильного спектрографа. Разработанная методика обеспечивает получение информации от небольшого количества анализируемой пробы с высоким пространственным разрешением по поверхности образца 0.1 мм при времени экспозиции, равном 0.01–0.1 с.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Гос. контракт № 16.513.11.3116), Программы Президиума РАН № 22, а также РФФИ (гранты № 10-02-00293, 10-02-90042, 10-02-90404, 11-02-00164 и 11-02-12092).

Л И Т Е Р А Т У Р А

- [1] К. С. Бортников, В. С. Горелик, А. А. Есаков, Неорганические материалы **43**(12), 1458 (2007).
- [2] V. S. Gorelik, Yu. P. Voinov, V. D. Zvorykin, et al., Journal of Russian Laser Research **31**(1),80 (2010).
- [3] В. С. Горелик, Л. И. Злобина, О. А. Троицкий, Р. И. Чаниева, Неорганические материалы **44**(1), 64 (2008).
- [4] В. В. Грязнов, В. С. Горелик, Н. И. Юрасов, Краткие сообщения по физике ФИАН **37**(5), 22 (2010).

Поступила в редакцию 31 января 2011 г.