



## Impact of UVC radiation on interaction of selected antifungal drugs (azole derivatives) with model DPPH free radical

Wpływ promieniowania UVC na oddziaływanie z modelowym wolnym rodnikiem DPPH wybranych leków przeciwgrzybiczych pochodnych azoli

Paweł Ramos , Piotr Pepliński, Barbara Pilawa 

Department of Biophysics, Faculty of Pharmaceutical Sciences in Sosnowiec, Medical University of Silesia, Katowice, Poland

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Fungal lesions are accompanied by inflammation, during which large amounts of free radicals are formed. Antifungal drugs, which have an additional antioxidant effect, could contribute to a faster recovery. An important role in ensuring effective and safe pharmacotherapy of fungal lesions is played by proper drug storage and appropriate patient actions during treatment. Ultraviolet radiation can generate free radicals in a drug due to photolysis. A drug containing free radicals may cause toxic effects in the body.

The aim of the study was to research the antioxidant properties of selected antifungal drugs of azole derivatives. Additionally, the impact of UVC radiation on the tested drugs and their interaction with the DPPH free radical was studied.

**MATERIAL AND METHODS:** The tested azole samples were exposed to 24-hour UVC radiation. The interaction of drug samples with a model DPPH free radical, before and after exposure to UV radiation, was studied. UV-Vis spectroscopy and colourimetry in the CIE Lab colour analysis system were used as the research techniques.

**RESULTS:** Among the initial samples of the tested drugs only ketoconazole interacted with the DPPH free radical, causing its extinction. Exposure to UVC radiation increased the antioxidant properties in ketoconazole and miconazole. The CIE Lab parameters, UV spectra and interaction kinetics of those two drugs with DPPH were different after UVC exposure, which may indicate changes in ketoconazole and miconazole. The highest stability to ultraviolet radiation was shown by fluconazole, whose CIE Lab parameters, UV spectra and interaction with DPPH did not change after exposure of the sample to light radiation.

**CONCLUSIONS:** The research using UV-Vis spectrophotometry and colourimetry enabled the impact of UVC radiation on selected antifungal drugs to be evaluated, including evaluation of their interaction with the model DPPH free radical. It is recommended to protect ketoconazole and miconazole from exposure to light. It is also advisable to protect patients from the sun during pharmacotherapy with these drugs.

### KEY WORDS

antifungal drugs, free radicals, UVC radiation, UV-Vis spectrophotometry, colourimetry

Received: 06.11.2018

Revised: 31.10.2019

Accepted: 12.11.2019

Published online: 04.05.2020

**Address for correspondence:** Dr hab. n. farm. Paweł Ramos, prof. SUM, Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec, tel. +48 32 364 11 62, e-mail: pawelramos@sum.edu.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
www.annales.sum.edu.pl



## STRESZCZENIE

**WSTĘP:** Zmianom grzybiczym towarzyszy stan zapalny, w trakcie którego wytwarzane są duże ilości wolnych rodników. Leki działające przeciwgrzybiczo, wykazujące dodatkowo działanie antyoksydacyjne, mogłyby się przyczynić do szybszego powrotu do zdrowia. Ważną rolę w zapewnieniu skutecznej i bezpiecznej farmakoterapii zmian grzybiczych odgrywają prawidłowe przechowywanie leku oraz odpowiednie postępowanie pacjenta w trakcie leczenia. Promieniowanie ultrafioletowe może generować wolne rodniki w leku w procesie fotolizy. Lek zawierający wolne rodniki może powodować efekty toksyczne w organizmie.

Celem pracy było zbadanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych leków przeciwgrzybiczych pochodnych azoli. Dodatkowo sprawdzono wpływ promieniowania UVC (*ultraviolet C*) na badane leki oraz ich oddziaływanie z modelowym wolnym rodnikiem DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

**MATERIAŁ I METODY:** Badane próbki azoli poddano 24-godzinnej ekspozycji na promieniowanie UVC. Zbadano oddziaływanie próbek leków z modelowym wolnym rodnikiem DPPH przed i po naświetlaniu ich promieniowaniem ultrafioletowym. Jako techniki badawcze zastosowano spektroskopię UV-Vis (*ultraviolet-visible*) oraz kolorymetrię w układzie analizy barwy CIE Lab.

**WYNIKI:** Spośród wyjściowych próbek badanych leków tylko ketokonazol oddziaływał z wolnym rodnikiem DPPH, powodując jego wygaszenie. Ekspozycja na promieniowanie UVC powodowała wzrost właściwości antyoksydacyjnych w ketokonazolu oraz w mikonazolu. Parametry CIE Lab, widma UV oraz kinetyka oddziaływania z DPPH obu leków były odmienne po naświetlaniu promieniowaniem UVC, co może wskazywać na zmiany zachodzące w ketokonazolu i mikonazolu. Największą stabilność na promieniowanie ultrafioletowe wykazywał flukonazol, którego parametry CIE Lab, widma UV oraz oddziaływanie z DPPH nie zmieniły się po naświetlaniu próbki.

**WNIOSKI:** Badania z zastosowaniem spektrofotometrii UV-Vis oraz kolorymetrii pozwoliły na ocenę wpływu promieniowania UVC na wybrane leki przeciwgrzybicze, w tym na ocenę ich oddziaływania z modelowym wolnym rodnikiem DPPH. Zaleca się ochronę ketokonazolu i mikonazolu przed światłem. Wskazana jest również ochrona przed słońcem pacjentów w trakcie farmakoterapii tymi lekami.

## SŁOWA KLUCZOWE

leki przeciwgrzybicze, wolne rodniki, promieniowanie UVC, spektrofotometria UV-Vis, kolorymetria

## INTRODUCTION

The use of immunomodulating and anticancer drugs by patients and the occurrence of diseases impairing the immune system contributes to an increase in the incidence of fungal infections [1,2,3,4,5,6]. The treatment of fungal diseases poses many difficulties, e.g. due to difficult diagnosis and selection of an appropriate drug to which the pathogen will be susceptible [1,2,3,4,5,6,7]. Antifungal therapy is usually long-lasting, which is accompanied by numerous side and toxic effects on the body [5,6,8,9]. Fungal lesions are always accompanied by inflammation. During inflammation, large amounts of free radicals are formed [10]. Antifungal drugs with an additional antioxidative effect could facilitate inflammation alleviation, which would result in faster patient recovery.

Azoles are synthetic antifungal drugs most commonly used in the treatment [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10]. They constitute a chemically heterogeneous group. They include both imidazole and triazole derivatives which exhibit a similar mechanism [1,2,3,4]. The antifungal effect of azoles is associated with inhibiting lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase in the biosynthesis of steroid hormones of fungi [1,2,3,5,6,8]. The consequence is a reduction in the amount of ergosterol, which is the main sterol building fungal cell membranes. Furthermore, azoles cause the accumulation of methylated groups at position 14 of  $\alpha$  sterols,

## WSTĘP

Stosowanie przez pacjentów leków immunomodulujących oraz przeciwnowotworowych, a także występowanie chorób upośledzających układ odpornościowy przyczynia się do wzrostu zachorowalności na infekcje grzybicze [1,2,3,4,5,6]. Leczenie schorzeń grzybiczych stwarza wiele trudności, m.in. ze względu na trudne rozpoznanie oraz dobór odpowiedniego leku, na który patogen będzie wrażliwy [1,2,3,4,5,6,7]. Terapia przeciwgrzybicza zazwyczaj jest długotrwała, co sprawia, że towarzyszą jej liczne skutki uboczne, może też działać toksycznie na organizm [5,6,8,9]. Zmianom grzybiczym zawsze towarzyszy stan zapalny, podczas którego wytwarzane są duże ilości wolnych rodników [10]. Leki działające przeciwgrzybiczo, wykazujące dodatkowo działanie antyoksydacyjne, mogłyby przyspieszać łagodzenie stanu zapalnego, co wpłynęłoby na szybszą rekonwalescencję pacjenta.

Do syntetycznych leków przeciwgrzybiczych najczęściej stosowanych w leczeniu należy grupa azoli [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10], stanowiących niejednorodną grupę pod względem chemicznym. Należą do nich zarówno pochodne imidazolu, jak i pochodne triazolowe wykazujące podobny mechanizm działania [1,2,3,4]. Działanie przeciwgrzybicze azoli wiąże się z hamowaniem 14 $\alpha$ -demetylasy lanosterolu w biosyntezie hormonów steroidowych grzybów [1,2,3,5,6,8]. Następstwem tego jest zmniejszenie ilości ergosterolu, stanowiącego



which leads to disorder in their polarity and makes it difficult to build them into the cell membrane bilayer [4,5,6,8]. As a result, it leads to derangement of the spatial structure in the fungal cell membrane [1,2,3,4,5,6,8]. Azoles have a very broad spectrum of activity. They are applied externally in particular; topically in infections of the skin and mucous membranes [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10]. As some types of mycosis occur on bare body parts, they are exposed to ultraviolet radiation [11]. In order to ensure safe and effective pharmacotherapy of fungal lesions, it is very important that the drug is properly stored, and the patient acts appropriately during the treatment. Ultraviolet radiation may lead to photolysis [12,13,14]. In this way, the molecules of the drug-forming chemical compound may be damaged or chemically modified [12,13,14]. Photolysis takes place in a direct and indirect way. In direct photolysis, the medicinal substance is transformed by the absorption of energy. This process causes, among others, the formation of free radicals as well as drug disintegration and degradation [14]. In indirect photolysis, the energy supplied to a body system in the form of ultraviolet radiation affects another substance, e.g. an excipient, and modifies it forming a free radical. The free radical, formed in this way as a highly reactive molecule, interacts with a medicinal substance and modifies it [12,13,14]. Antifungal drugs are also susceptible to photolytic degradation, which has been proven in numerous scientific papers [15,16,17].

A medicinal substance that contains free radicals may cause many toxic effects in the body during pharmacotherapy [14,18]. As reactive molecules, free radicals have the ability to interact with any type of molecule that builds a living organism, causing its damage. As a result of free radical activity, lipids that build the body's cell membranes undergo a multistage peroxidation process [14,18,19,20]. This process may result in the formation of carcinogenic products, e.g. malondialdehyde [14,20]. Under the influence of free radicals, protein structures in the body may change spatially, which affects their bioactivity [14,18,19,20,21]. Free radicals may also interact with DNA and RNA, for which the hydroxyl radical is the most hazardous [14,18]. Free radicals react with any structure that builds DNA, i.e. with phosphate residues, ribose, deoxyribose and nitrogenous bases, which in turn, results in many structural abnormalities in DNA and proteins and leads to the initiation of mutations and thus neoplastic processes [14,18,19].

The aim of this study was to research the antioxidant properties using the model DPPH free radical of selected synthetic antifungal drugs belonging to the group of azoles. Additionally, the impact of UVC radiation on the tested drugs and their interaction with the DPPH free radical was tested.

główny sterol budujący błony komórkowe grzybów. Dodatkowo azole powodują nagromadzenie grup metylowanych w pozycji  $14\alpha$  steroli, co prowadzi do zaburzenia ich polarności oraz utrudnia ich wbudowywanie do podwójnej warstwy błony komórkowej [4,5,6,8]. W konsekwencji dochodzi do zaburzenia struktury przestrzennej błony komórkowej grzybów [1,2,3,4,5,6,8].

Azole mają bardzo szerokie spektrum działania. Stosowane są głównie zewnętrznie, miejscowo w zakażeniach skóry i błon śluzowych [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10]. Ponieważ niektóre rodzaje grzybiczy występują na odsłoniętych częściach ciała, miejsca te są narażone na działanie promieniowania ultrafioletowego [11]. Aby zapewnić bezpieczną i skuteczną farmakoterapię zmian grzybiczych, bardzo istotne jest prawidłowe przechowywanie leku oraz odpowiednie postępowanie pacjenta w trakcie leczenia. Promieniowanie ultrafioletowe może doprowadzić do fotolizy [12,13,14]. Cząsteczki związku chemicznego tworzącego lek mogą w ten sposób zostać uszkodzone lub podlegać modyfikacji chemicznej [12,13,14]. Wyróżnia się dwa rodzaje tego procesu – fotolizę bezpośrednią i pośrednią. W fotolizie bezpośredniej substancja lecznicza ulega przekształceniu w wyniku zaabsorbowania energii. Proces ten powoduje m.in. powstawanie wolnych rodników oraz rozpad leku i jego degradację [14]. Podczas fotolizy pośredniej energia dostarczona do układu w postaci promieniowania ultrafioletowego oddziałuje na inną substancję, np. pomocniczą, co prowadzi do jej modyfikacji, powstania wolnego rodnika. Wygenerowany w ten sposób wolny rodnik jako cząstka wysoce reaktywna oddziałuje z substancją leczniczą i modyfikuje ją [12,13,14]. Na rozpad fotolityczny wrażliwe są także leki przeciwgrzybicze, co zostało udowodnione w licznych pracach naukowych [15,16,17].

Substancja lecznicza, która zawiera wolne rodniki, może w trakcie farmakoterapii powodować wiele efektów toksycznych w organizmie [14,18]. Wolne rodniki jako cząsteczki reaktywne mają zdolność oddziaływania z każdym typem molekuł, które budują żywy organizm, powodując ich uszkodzenia. W wyniku działania wolnych rodników lipidy budujące błony komórkowe organizmu ulegają wieloetapowej peroksydacji [14,18,19,20]. Proces ten może w konsekwencji doprowadzić do powstania kancerogennych produktów, np. dialdehydu malonowego [14,20]. Struktury białkowe znajdujące się w organizmie pod wpływem wolnych rodników mogą ulegać zmianom przestrzennym, co wpływa na ich aktywność biologiczną [14,18,19,20,21]. Wolne rodniki mogą również oddziaływać z DNA i RNA, dla których najbardziej niebezpieczny jest rodnik hydroksylowy [14,18]. Wolne rodniki reagują z każdą strukturą budującą DNA, tj. z resztami fosforanowymi, rybozą, deoksyrybozą oraz z zasadami azo-

**MATERIALS AND METHODS****Tested antifungal drugs**

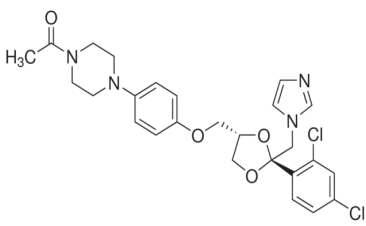
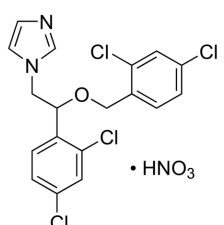
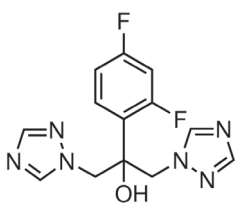
Three synthetic antifungal drugs, belonging to the group of azoles, i.e. ketoconazole, miconazole (imidazole derivatives) and fluconazole (the group of triazole derivatives) were analysed in this paper [1,2,3,4,5,6,22]. The chemical structure and basic physicochemical parameters of the tested substances are given in Table I [22,23,24,25]. All the drugs analysed in this study were purchased from Sigma-Aldrich.

towymi, co z kolei powoduje wiele nieprawidłowości w budowie DNA oraz białek i prowadzi do inicjacji mutacji, w związku z tym również procesów nowotworowych [14,18,19].

Celem niniejszej pracy było zbadanie właściwości antyoksydacyjnych z zastosowaniem modelowego wolnego rodnika DPPH wybranych syntetycznych leków przeciwgrzybiczych należących do grupy azoli. Dodatkowo sprawdzono wpływ promieniowania UVC (*ultraviolet C*) na badane leki oraz ich oddziaływanie z wolnym rodnikiem DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

**Table I.** Structural and molecular formula, molar mass and melting point of analysed antifungal drugs belonging to group of azoles [22,23,24,25]

**Tabela I.** Wzór strukturalny i sumaryczny, masa molowa oraz temperatura topnienia analizowanych leków przeciwgrzybiczych należących do grupy azoli [22,23,24,25]

Drug name/Nazwa leku	Structural formula/Wzór strukturalny	Molecular formula/Wzór sumaryczny	Molar mass/Masa molowa	Melting point/Temperaturę topnienia
Ketoconazole/Ketokonazol		$C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$	531.43 g/mol	147°C
Miconazole/Mikonazol		$C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$	416.13 g/mol	135°C
Fluconazole/Flukonazol		$C_{13}H_{12}F_2N_6O$	306.27 g/mol	138–140°C

Ketoconazole is a synthetic drug belonging to the azoles of imidazole derivatives [1,2,3,5,6,9]. Ketoconazole is used for the treatment of both superficial and systemic mycoses [1,2,3,4,5,6]. Additionally, it can be used in candidiasis, histoplasmosis and blastomycosis [5,6,9]. Ketoconazole has a broad spectrum of activity and is used in the case of resistance to other antifungal drugs [1,2,3,4,5,6]. Ketoconazole is easily absorbed from the digestive tract in the presence of an acidic environment [4,5,6]. The most dangerous side effect of taking ketoconazole is liver necrosis; therefore, during long-term therapy with high doses of the drug, liver function tests and complete blood count are recommended [1,2,3,4,5,6].

**MATERIAŁ I METODY****Badane leki przeciwgrzybicze**

Analizie poddano trzy leki przeciwgrzybicze pochodzenia syntetycznego, należące do grupy azoli, tj. ketokonazol, mikonazol (z grupy pochodnych imidazolowych) i flukonazol (z grupy pochodnych triazolowych) [1,2,3,4,5,6,22]. Struktura chemiczna oraz podstawowe parametry fizykochemiczne badanych substancji zestawiono w tabeli I. Wszystkie analizowane w pracy leki pochodzą od firmy Sigma-Aldrich.

Ketokonazol jest lekiem syntetycznym z grupy pochodnych imidazolowych [1,2,3,5,6,9]. Stosuje się go



Miconazole, like ketoconazole, is a synthetic, antifungal drug of imidazole derivatives [1,2,3,4,5,6,7]. Nowadays, miconazole is rarely used for the treatment of systemic and organ mycoses [4,5,6]. Miconazole in the form of cream, gel, globules or powder is more often used for the treatment of superficial mycoses of the skin and mucous membranes [1,2,3,4,5,6,7]. Miconazole is a drug poorly absorbed from the digestive tract [4]. It is often used together with hydrocortisone in complex preparations [1,2,3,5,6]. The side effects of miconazole mainly include allergic reactions [1,2,3,4,5,6]. Another synthetic, antifungal drug is fluconazole. It belongs to azoles, but to triazole derivatives [1,2,3,4,5,6,8,9]. Fluconazole is a broad-spectrum antifungal [1,2,3,4,5,6]. It is very well absorbed from the digestive tract [4,5,6]. It also shows good penetrating abilities in body tissues [5,6]. Fluconazole is characterised by very good bioavailability after oral administration (94%) and low bonding to plasma proteins (11–12%), which means that its half-life is long – up to 30 hours [4,5,6]. It is an alternative to the treatment of fungal infections susceptible to amphotericin B because it is less toxic than amphotericin B and shows the same spectrum [5,6]. The side effects, which occur very rarely after fluconazole treatment, include abdominal pain, nausea and headache [1,2,3,4,5,6].

#### Exposure of tested drugs to UV radiation

Ketoconazole, miconazole and fluconazole were exposed to 24-hour UVC radiation. For this purpose, drugs in the form of a thin layer of powder were placed in Petri dishes and exposed to UV radiation from a distance of 20 cm and with wavelength  $\lambda = 254$  nm. For this test, a UVC lamp (Active, UK) equipped with one 8W emitter was used.

#### Model DPPH free radical

The DPPH free radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) is a model compound used for research on the antioxidant properties of substances of synthetic and natural origin [14,19,26]. The structural formula of the DPPH free radical with an unpaired electron, located on a nitrogen atom forming a nitrogen bridge, is shown in Fig. 1 [19].

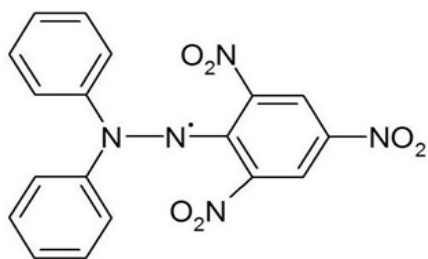


Fig. 1. Chemical structure formula of DPPH free radical with unpaired electron located on nitrogen atom [19].

Ryc. 1. Wzór strukturalny modelowego wolnego rodnika DPPH z niesparowanym elektronem znajdującym się na atomie azotu [19].

w leczeniu zarówno grzybic powierzchniowych, jak i układowych [1,2,3,4,5,6], dodatkowo w drożdżycy, histoplazmozie oraz blastomikozie [5,6,9]. Charakteryzuje się szerokim spektrum działania i stosowany jest w przypadku oporności na inne leki przeciwgrzybicze [1,2,3,4,5,6]. Łatwo się wchłania z przewodu pokarmowego w obecności kwaśnego środowiska [4,5,6]. Najbardziej niebezpiecznym skutkiem ubocznym stosowania ketokonazolu jest martwica wątroby, dlatego w trakcie długotrwałej terapii dużymi dawkami leku zaleca się wykonywanie prób czynnościowych wątroby oraz morfologii krwi [1,2,3,4,5,6].

Mikonazol również należy do syntetycznych leków przeciwgrzybiczych pochodnych z grupy imidazolowych [1,2,3,4,5,6,7]. Aktualnie rzadko jest stosowany w leczeniu grzybic układowych oraz narządowych [4,5,6]. Częściej stosuje się go w postaci kremu, żelu, globulek lub zasypek w leczeniu grzybic powierzchniowych skóry i błon śluzowych [1,2,3,4,5,6,7]. Słabo wchłania się z przewodu pokarmowego [4]. Często stosowany jest łącznie z hydrokortyzonem w preparatach złożonych [1,2,3,5,6]. Do niepożądanych działań leku zalicza się głównie reakcje alergiczne [1,2,3,4,5,6].

Kolejnym syntetycznym lekiem przeciwgrzybiczym jest flukonazol, należący do pochodnych triazolowych [1,2,3,4,5,6,8,9]. Ma szeroki zakres działania przeciwgrzybiczego [1,2,3,4,5,6]. Bardzo dobrze ulega wchłanianiu z przewodu pokarmowego [4,5,6], wykazuje również zdolność penetrowania do tkanek organizmu [5,6]. Flukonazol cechuje się bardzo dobrą biodostępnością po podaniu doustnym (94%) oraz niskim wiązaniem z białkami osocza (11–12%), co sprawia, że jego okres półtrwania jest długi, do 30 godzin [4,5,6]. Jest alternatywą dla leczenia infekcji grzybiczych wrażliwych na amfoterycynę B, gdyż jest mniej toksyczny przy takim samym zakresie działania [5,6]. Do bardzo rzadkich działań niepożądanych po leczeniu można zaliczyć bóle brzucha, nudności i bóle głowy [1,2,3,4,5,6].

#### Ekspozycja badanych leków na promieniowanie ultrafioletowe

Ketokonazol, mikonazol oraz flukonazol zostały poddane 24-godzinnej ekspozycji na promieniowanie UVC. W tym celu leki w postaci cienkiej warstwy proszku umieszczono na szalkach Petriego i naświetlano z odległości 20 cm promieniowaniem ultrafioletowym o długości fali  $\lambda = 254$  nm. Jako źródło promieniowania zastosowano lampę UVC firmy Active (Wielka Brytania), która jest wyposażona w 1 promiennik o mocy 8 W.

#### Modelowy wolny rodnik DPPH

Wolny rodnik DPPH jest modelowym związkem stosowanym do badania właściwości antyoksydacyjnych substancji pochodzenia syntetycznego i naturalnego [14,19,26]. Wzór strukturalny wolnego rodnika DPPH z niesparowanym elektronem, na atomie azotu tworzącym mostek azotowy pokazano na rycinie 1 [19].

Wolny rodnik DPPH pod wpływem działania antyoksydantu ulega redukcji w wyniku przyjęcia elektronu



Under the influence of antioxidant, the DPPH free radical is reduced as a result of the reception of an electron [14,19,26]. Depending on the analytical method used, this results in a decrease in the amplitude of the EPR DPPH signal spectrum (EPR spectroscopy method), a decrease in the absorbance at a certain wavelength (UV-Vis spectrophotometric method) or a change in colour from violet to yellow (colourimetric method) [14,18,19,26].

### Preparatory procedures for samples

In this study, a methyl solution of the DPPH free radical was used since this compound forms durable alcoholic solutions. For this purpose, an 0.5 mM DPPH methyl solution was prepared. Subsequently, 10 mg of the tested drug was weighed with a CPA analytical balance (Sartorius, Germany) and placed in a test tube. Then, the 0.5 mM methyl DPPH solution was added to a 2.5 ml test tube, stoppered and mixed. At a further stage, the contents of the test tube were poured into a polystyrene cuvette with an optical path of 1 cm, which was placed inside the spectrophotometer. The change in absorbance of the tested sample was measured at wavelength  $\lambda = 515$  nm. Those measurements were performed at 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minute(s) of interaction between the tested substance and DPPH. The control sample was a pure 0.5 mM DPPH solution. The measurement was repeated threefold and the results were averaged.

### Measurement of antioxidant properties by means of UV-Vis spectrophotometry

UV-Vis spectrophotometry was used to study the interaction of the tested antifungal drugs, both the initial ones (non-exposed to ultraviolet radiation) and those exposed to 24-hour UVC radiation, with the model DPPH radical. For this purpose, the UV-Vis Thermo Genesys 10S spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) was used. The absorbance spectra of DPPH and DPPH in contact with the tested substances were recorded in the wavelength range from 450 nm to 600 nm, using VISIONlite software (Thermo Scientific, USA). Using Origin 2015 software (OriginLab, USA), the obtained spectra were analysed and the absorbance variation at wavelength  $\lambda = 515$  nm was evaluated [14].

### Research using colourimetry

In the experiment, colourimetric measurement was performed with the NH 310 colourimeter (3nh, China). Analysis of ketoconazole, miconazole and fluconazole colour change before UVC radiation (initial samples) and after 24-hour exposure to UVC radiation was performed. The spatial analysis model of the CIE Lab colour system was applied [27,28]. In this system, a change in the 'L' component is responsible for the brightness of the preparation. Black has the value of 0, while white – 100 [27,28]. The component of parameter 'a' describes the proportion of colours from green (negative values)

[14,19,26]. W zależności od zastosowanej metody analitycznej powoduje to spadek amplitudy sygnału widma EPR DPPH (spektroskopia EPR), spadek absorbancji przy określonej długości fali (metoda spektrofotometryczna UV-Vis) lub zmianę zabarwienia z fioletowej na żółtą (metoda kolorymetryczna) [14,18,19,26].

### Preparatyka próbek

W pracy wykorzystano metylowy roztwór wolnego rodnika DPPH, gdyż związek ten tworzy trwałe roztwory alkoholowe. W tym celu przygotowano 0,5 mM metylowy roztwór DPPH. Następnie za pomocą wagi analitycznej CPA firmy Sartorius (Niemcy) odważano 10 mg badanego leku i umieszczano w probówce, do której z kolei dodawano 2,5 ml 0,5 mM metylowego roztworu DPPH, zatykano korkiem i mieszano. Na dalszym etapie zawartość próbki przelewano do kuwety polistyrenowej o drodze optycznej 1 cm, którą umieszczano we wnętrzu spektrofotometru. Mierzono zmianę absorbancji badanej próbki przy długości fali  $\lambda = 515$  nm. Pomiary te wykonywano w 1., 3, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minucie oddziaływania badanej substancji z DPPH. Próbę kontrolną stanowił czysty 0,5 mM roztwór DPPH. Pomiary powtórzono 3-krotnie, a wyniki uśredniono.

### Pomiary właściwości antyoksydacyjnych za pomocą spektrofotometrii UV-Vis

W celu zbadania oddziaływania z modelowym rodnikiem DPPH badanych leków przeciwgrzybiczych, zarówno wyjściowych (niepoddanych działaniu promieniowania ultrafioletowego), jak i naświetlanych przez 1 dobę, zastosowano spektrofotometrię UV-Vis (*ultra-violet-visible*). Wykorzystano spektrofotometr UV-Vis Thermo Genesys 10S firmy Thermo Scientific (USA). Widma absorbancji DPPH oraz DPPH w kontakcie z badanymi substancjami były rejestrowane w zakresie długości fali 450–600 nm za pomocą oprogramowania VISIONlite firmy Thermo Scientific (USA). Analizę otrzymanych widm oraz ocenę zmiany absorbancji przy długości fali  $\lambda = 515$  nm przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania Origin 2015 firmy OriginLab (USA) [14].

### Badania za pomocą kolorimetrii

W doświadczeniu wykonane zostały pomiary kolorymetryczne za pomocą kolorimetru NH 310 firmy 3nh (Chiny). Przeprowadzono analizę zmiany barwy ketoconazolu, mikonazolu i flukonazolu przed działaniem promieniowania UVC (próbki wyjściowe) oraz po 24-godzinnym naświetlaniu. Zastosowano model analizy przestrzennej układu barw CIE Lab [27,28]. W układzie tym zmiana składowej „L” odpowiada za poziom jasności preparatu. Wartość 0 przyjmuje barwa czarna, wartość 100 barwa biała [27,28]. Składowa parametru „a” opisuje udział barw od zielonego (wartości ujemne) do czerwonego (wartości dodatnie), natomiast składowa parametru „b” udział barw od niebieskiego (war-



to red (positive values). The component of parameter 'b' describes the proportion of colours from blue (negative values) to yellow (positive values) [27,28]. Before each measurement, the device was calibrated using the enclosed white standard. Each measurement was performed threefold and the results were averaged.

### UV-Vis measurement of tested drugs

Additionally, the UV spectra of the tested antifungal drugs (non-exposed and exposed to 24-hour ultraviolet radiation) were analysed in the study. For this purpose, 1 mg of the tested drug was dissolved in 100 ml of methyl alcohol [29]. The samples were then thoroughly mixed and poured into a quartz cuvette with an optical path of 1 cm, which was placed in a spectrophotometer. UV absorbance spectra were recorded in the wavelength range from 200 to 380 nm [9,29,30]. A UV-Vis Thermo Genesys 10S spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) with VISIONlite software (Thermo Scientific, USA) was used for measurement.

## RESULTS

The analyses which were conducted in this study using the model DPPH free radical, ketoconazole, miconazole and fluconazole non-exposed to UVC ultraviolet radiation for 24-hours, show differences in the ability to interact with the DPPH free radical. Only for the ketoconazole initial sample, non-exposed to ultraviolet radiation, was a decrease in absorbance at wavelength  $\lambda = 515$  nm observed when compared with the absorbance standard. This indicates the antioxidant properties of ketoconazole (Fig. 2a). Those properties increased for the sample exposed to 24-hour ultraviolet radiation (Fig. 2b).

No decrease in absorbance at the tested wavelength ( $\lambda = 515$  nm) was observed for the miconazole initial sample, non-exposed to UV radiation. This shows the inability to reduce the DPPH free radical by the initial miconazole (Fig. 3a). 24-hour exposure of the miconazole sample to UVC radiation resulted in the drug's ability to interact with DPPH. This was manifested by a decrease in absorbance at the wavelength of 515 nm (Fig. 3b).

The tested fluconazole samples, neither the non-exposed nor exposed to 24-hour UVC radiation, showed any abilities to interact with the DPPH free radical. No decrease in the absorbance values was observed for those samples when compared with the standard – the pure alcoholic solution of DPPH at wavelength  $\lambda = 515$  nm (Fig. 4a and 4b). This indicates the lack of antioxidant capacity of the tested fluconazole samples. For the tested antifungal drugs from the group of azole derivatives, the interaction kinetics with the model DPPH free radical was studied. The same time points for absorbance measurement at the wavelength of 515 nm were used for all the analysed drugs. The measurements were performed at 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minute(s) of interaction between the tested sample

tości ujemne) do żółtego (wartości dodatnie) [27,28]. Przed wykonaniem każdego z pomiarów urządzenie było kalibrowane za pomocą załączonego wzorca białego. Każdy z pomiarów wykonano 3-krotnie, a wyniki uśredniono.

### Pomiary widm UV badanych leków

Dodatkowo wykonano analizy widm UV badanych leków przeciwgrzybiczych niepoddanych i poddanych 24-godzinnemu naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym. W tym celu rozpuszczano 1 mg badanego leku w 100 ml alkoholu metylowego [29]. Następnie próbki dokładnie mieszano i przelewano do kuwety kwarcowej o drodze optycznej wynoszącej 1 cm, którą umieszczano w spektrofotometrze. Widma absorbancji UV rejestrowano w przedziale długości fali wynoszącym 200–380 nm [9,29,30]. Do pomiarów użyto spektrofotometru UV-Vis Thermo Genesys 10S firmy Thermo Scientific (USA) z oprogramowaniem VISIONlite firmy Thermo Scientific (USA).

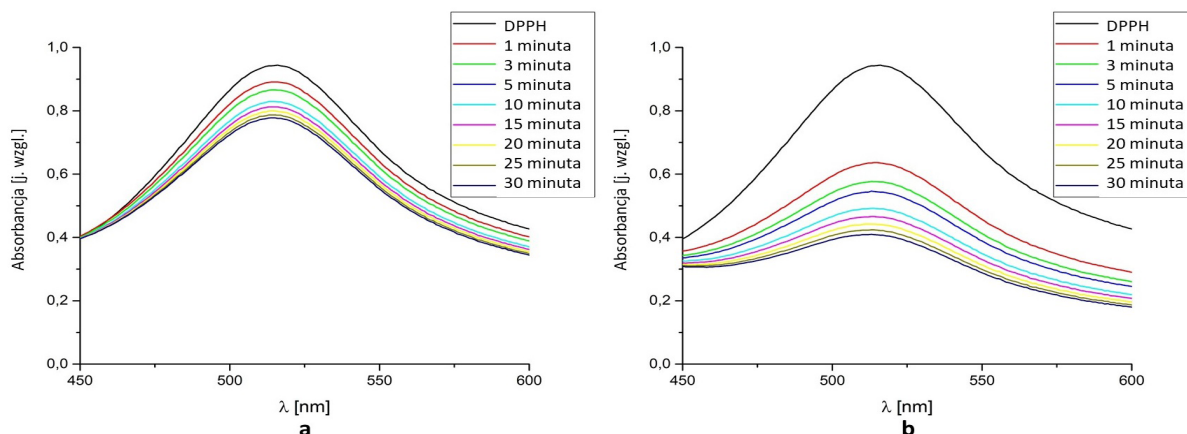
## WYNIKI

Analizy z wykorzystaniem modelowego wolnego rodnika DPPH oraz ketokonazolu, mikonazolu i flukonazolu niepoddanych oraz poddanych 24-godzinnej ekspozycji na promieniowanie UVC wykazały różnice w zdolnościach oddziaływania z wolnym rodnikiem DPPH. Jedynie dla próbki wyjściowej ketokonazolu, nienaświetlanej promieniowaniem ultrafioletowym, zaobserwowano obniżenie absorbancji przy długości fali  $\lambda = 515$  nm w porównaniu z absorbancją wzorca, co świadczy o właściwościach antyoksydacyjnych leku (ryc. 2a). Właściwości te rosły dla próbki poddanej przez dobę naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym (ryc. 2b).

Dla próbki wyjściowej mikonazolu, niepoddanej działaniu promieniowania ultrafioletowego, nie obserwowano obniżenia absorbancji przy badanej długości fali ( $\lambda = 515$  nm). Świadczy to o braku zdolności do redukcji wolnego rodnika DPPH przez wyjściowy mikonazol (ryc. 3a). Naświetlanie promieniowaniem UVC próbki mikonazolu przez 1 dobę wykazało jego zdolność oddziaływania z DPPH, co manifestowało się obniżeniem wartości absorbancji przy długości fali 515 nm (ryc. 3b).

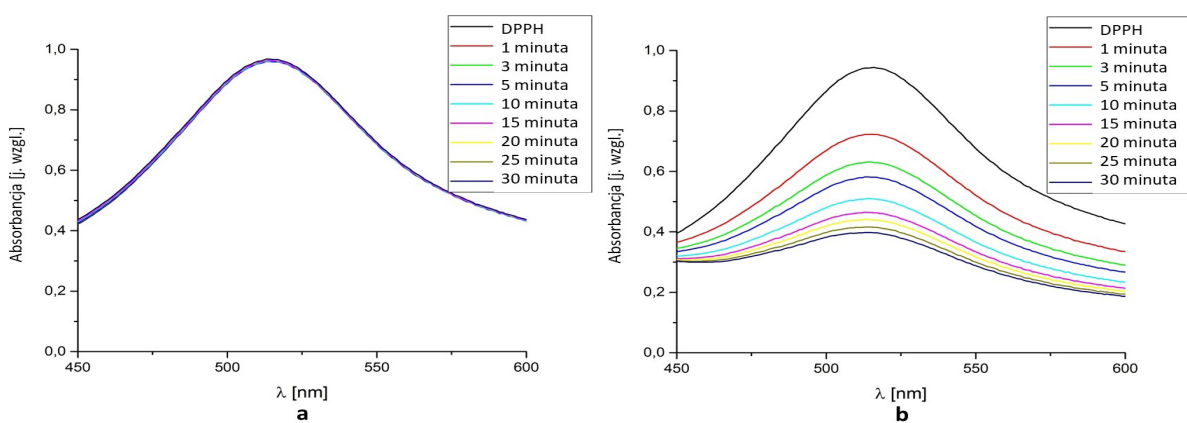
Próbki flukonazolu, zarówno niepoddana działaniu promieniowania UVC, jak i naświetlana przez 24 godziny, nie wykazywały zdolności oddziaływania z wolnym rodnikiem DPPH. Dla próbek tych nie obserwowano obniżenia wartości absorbancji w porównaniu z wzorcem, jaki stanowił czysty alkoholowy roztwór DPPH przy długości fali  $\lambda = 515$  nm (ryc. 4a i 4b). Świadczy to o braku zdolności antyoksydacyjnych testowanych próbek.

Dla leków przeciwgrzybiczych pochodnych azoli wykonano badania kinetyki oddziaływania z modelowym wolnym rodnikiem DPPH. Dla wszystkich analizowanych leków stosowano takie same punkty czasowe



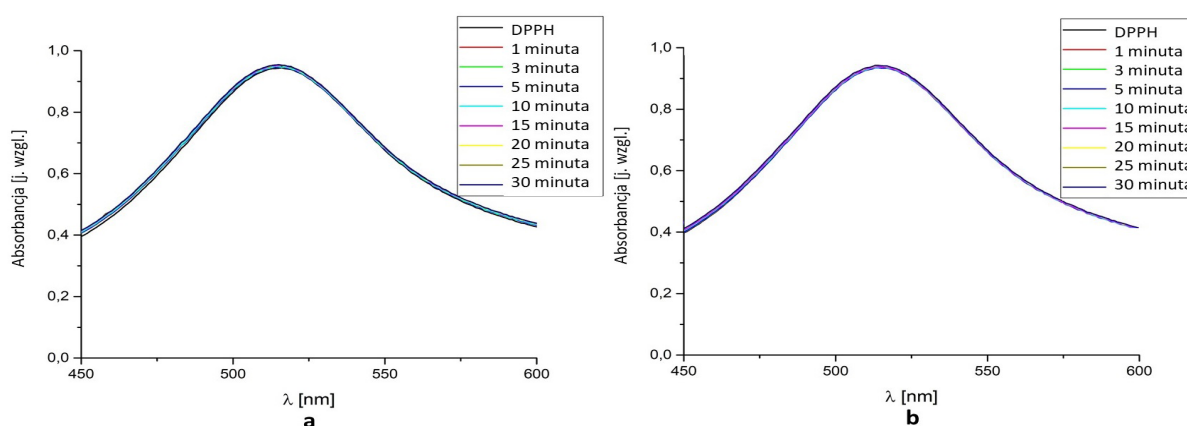
**Fig. 2.** UV-Vis DPPH absorbance spectrum interacting with ketoconazole (a) non-exposed to UVC radiation and (b) exposed to 24-hour UVC radiation. Absorbance was measured at room temperature.

**Ryc. 2.** Widmo absorpcji UV-Vis DPPH oddziałującego z ketokonazolem niepoddanym (a) oraz poddanym 24-godzinnej ekspozycji na promieniowanie UVC (b). Pomiary absorpcji wykonano w temperaturze pokojowej.



**Fig. 3.** UV-Vis DPPH absorbance spectrum interacting with miconazole (a) non-exposed to UVC radiation and (b) exposed to 24-hour UVC radiation. Absorbance was measured at room temperature.

**Ryc. 3.** Widmo absorpcji UV-Vis DPPH oddziałującego z mikonazolem niepoddanym (a) oraz poddanym 24-godzinnej ekspozycji na promieniowanie UVC (b). Pomiary absorpcji wykonano w temperaturze pokojowej.



**Fig. 4.** UV-Vis DPPH absorbance spectrum interacting with fluconazole (a) non-exposed to UVC radiation and (b) exposed to 24-hour UVC radiation. Absorbance was measured at room temperature.

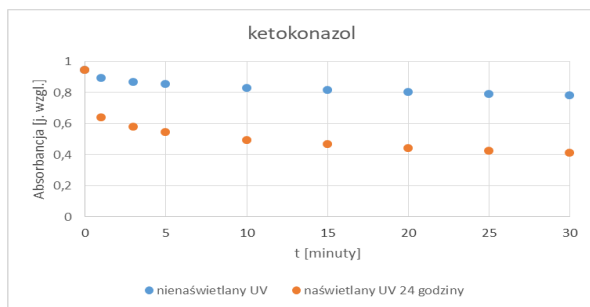
**Ryc. 4.** Widmo absorpcji UV-Vis DPPH oddziałującego z flukonazolem niepoddanym (a) oraz poddanym 24-godzinnej ekspozycji na promieniowanie UVC (b). Pomiary absorpcji wykonano w temperaturze pokojowej.





and DPPH. A sample of the standard, which was the pure methyl solution of DPPH, was marked as time point 0.

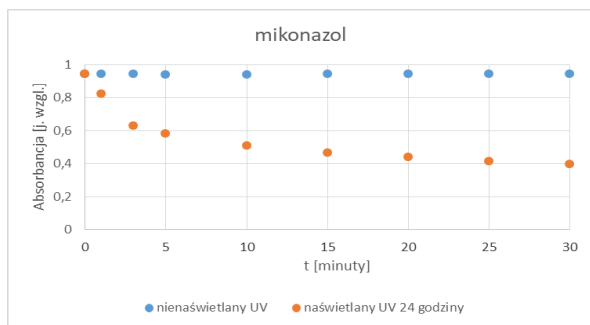
In the case of the ketoconazole sample, it can be observed that the absorbance for the drug non-exposed and exposed to UVC radiation decreases with the time of interaction with the model DPPH free radical (Fig. 5). The absorbance values at each measurement point for the non-UV-exposed ketoconazole adopt lower values in comparison with the initial ketoconazole. This indicates a stronger interaction of this drug with DPPH, occurring after its exposure to UVC radiation.



**Fig. 5.** Interaction kinetics of DPPH with ketoconazole non-exposed and exposed to 24-hour UVC radiation. Tested absorbance variation at wavelength  $\lambda = 515$  nm, measured at 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minute(s) of exposure.

**Ryc. 5.** Kinetyka oddziaływania DPPH z ketokonazolem niepoddanym oraz poddanym działaniu promieniowania UVC przez 24 godziny. Badana zmiana absorbancji przy długości fali  $\lambda = 515$  nm, mierzona w 1., 3, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minucie oddziaływania.

By analysing the kinetics of the miconazole sample, it can be observed that the absorbance for a drug non-exposed to UVC radiation is constant over time and adopts the absorbance value of the standard (Fig. 6). This fact indicates the inability to reduce the DPPH free radical by the initial miconazole. The 24-hour exposure of miconazole to UVC radiation resulted in the drug's ability to reduce the model DPPH free radical. The absorbance value for miconazole exposed to UV radiation decreases significantly with the time of interaction with DPPH (Fig. 6).



**Fig. 6.** Interaction kinetics of DPPH with miconazole non-exposed and exposed to 24-hour UVC radiation. Tested absorbance variation at wavelength  $\lambda = 515$  nm, measured at 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minute(s) of exposure.

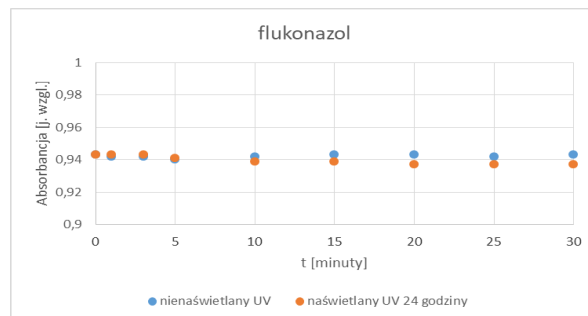
**Ryc. 6.** Kinetyka oddziaływania DPPH z mikonazolem niepoddanym oraz poddanym działaniu promieniowania UVC przez 24 godziny. Badana zmiana absorbancji przy długości fali  $\lambda = 515$  nm, mierzona w 1., 3, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minucie oddziaływania.

pomiaru absorbancji przy długości fali 515 nm. Wykonano pomiar w 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 oraz 30 minucie oddziaływania badanej próbki z DPPH. Jako czas 0 zaznaczono próbkę wzorca, jaki stanowił czysty metylowy roztwór DPPH.

W przypadku próbki ketokonazolu można zaobserwować, że absorbancja dla leku nienaświetlanego i naświetlanego promieniowaniem UVC ulega obniżeniu wraz z czasem oddziaływania z modelowym wolnym rodnikiem DPPH (ryc. 5). Wartości absorbancji w każdym punkcie pomiaru dla ketokonazolu poddanego działaniu promieniowania ultrafioletowego przyjmują niższe wartości w porównaniu z ketokonazolem wyjściowym. Świadczy to o silniejszym oddziaływaniu tego leku z DPPH, występującym po ekspozycji na promieniowanie UVC.

Analizując kinetykę próbki mikonazolu, można zaobserwować, że absorbancja dla leku nienaświetlanego promieniowaniem UVC jest stała w czasie i przyjmuje wartość absorbancji wzorca (ryc. 6), co świadczy o braku zdolności do redukcji wolnego rodnika DPPH przez mikonazol wyjściowy. Poddanie mikonazolu 24-godzinnemu działaniu promieniowania UVC wpłynęło na zdolność leku do redukcji modelowego wolnego rodnika DPPH. Wartość absorbancji dla mikonazolu poddanego działaniu promieniowania ultrafioletowego wraz z czasem oddziaływania z DPPH ulega wyraźnemu obniżeniu (ryc. 6).

Kinetyka oddziaływania flukonazolu, zarówno wyjściowego, jak i poddanego działaniu promieniowania UVC, jest zbliżona (ryc. 7). Można zaobserwować, że lek nie wykazuje zdolności do redukcji rodnika DPPH nawet po 24-godzinnym naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym, o czym świadczą niezmiennie w czasie wartości absorbancji (ryc. 7).



**Fig. 7.** Interaction kinetics of DPPH with fluconazole non-exposed and exposed to 24-hour UVC radiation. Tested absorbance variation at wavelength  $\lambda = 515$  nm, measured at 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minute(s) of exposure.

**Ryc. 7.** Kinetyka oddziaływania DPPH z flukonazolem niepoddanym oraz poddanym działaniu promieniowania UVC przez 24 godziny. Badana zmiana absorbancji przy długości fali  $\lambda = 515$  nm, mierzona w 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 minucie oddziaływania.

Analizując ostatnią minutę pomiaru wszystkich badanych leków, można zauważyć, że leki przeciwgrzybicze poddane działaniu promieniowania UVC przez 24 godziny cechują się silniejszymi zdolnościami oddziaływania z wolnym rodnikiem DPPH (ryc. 8). W porównaniu ze wzorcem (metylowy roztwór DPPH) absorbancja tych próbek była znacznie niższa w przy-



The interaction kinetics of fluconazole, both the initial one and exposed to UVC radiation, is similar (Fig. 7). It can be observed that this drug does not show any abilities to reduce DPPH radicals even after 24-hour exposure to UV radiation, as evidenced by the absorbance values that remain constant over time (Fig. 7).

By analysing the last minute of the measurement for all tested drugs, we can observe that antifungal drugs exposed to UVC radiation for 24 hours are characterised by a stronger capability to interact with the DPPH free radical (Fig. 8). In comparison with the standard (methyl DPPH solution), the absorbance of those samples was significantly lower for ketoconazole and miconazole. Among the initial drugs, only ketoconazole showed the ability to reduce the DPPH free radical. The miconazole and fluconazole output compounds did not have antioxidant properties (Fig. 8). For all the tested antifungal drugs belonging to the azole group, colourimetric analyses were conducted in the CIE Lab colour space system (Tab. II).

The ketoconazole and miconazole samples were characterised by significant differences in the CIE Lab system, occurring after their 24-hour exposure to UV radiation. In the case of ketoconazole, the 'L' parameter, after exposure to UVC radiation, adopted lower values for the sample, which proves that it was brightened. The 'a' parameter, on the other hand, adopted more positive values, which indicates a higher proportion of red colour in the analysed drug after exposure to UV radiation.

padku ketokonazolu i mikonazolu. Spośród leków wyjściowych zdolności do redukcji wolnego rodnika DPPH wykazywał jedynie ketokonazol. Wyjściowe związki mikonazolu i flukonazolu nie posiadały właściwości antyoksydacyjnych (ryc. 8).

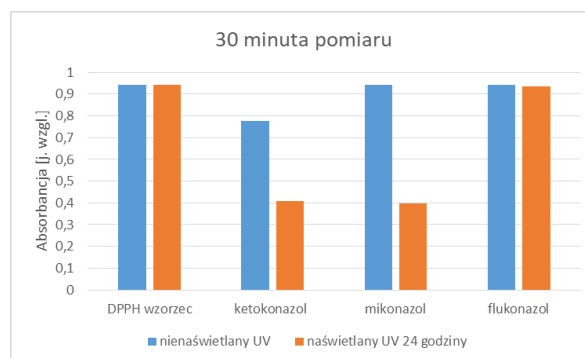


Fig. 8. Absorbance variation at wavelength  $\lambda = 515$  nm for tested azoles non-exposed and exposed to UVC radiation for 24 hours. Measurement performed at room temperature.

Ryc. 8. Zmiana absorbancji przy długości fali  $\lambda = 515$  nm dla badanych azoli nienaświetlanych oraz naświetlanych promieniowaniem UVC przez 24 godziny. Pomiary wykonane w temperaturze pokojowej.

Dla wszystkich badanych leków przeciwgrzybiczych należących do grupy azoli wykonano analizy kolorymetryczne w układzie przestrzennym barw CIE Lab (tab. II).

Table II. Change in CIE Lab parameters for tested antifungal drugs non-exposed and exposed to 24-hour UVC radiation. Analysed parameters: L (brightness), a (proportion of red and green colours), b (proportion of yellow and blue colours)

Tabela II. Zmiana parametrów CIE Lab dla badanych leków przeciwgrzybiczych niepoddanych i poddanych działaniu promieniowania UVC przez 24 godziny. Analizowane parametry: L (jasność), a (udział barw czerwonej i zielonej), b (udział barw żółtej i niebieskiej)

Studied parameter/ Badany parametr	Ketoconazole/Ketokonazol		Miconazole/Mikonazol		Fluconazole/Flukonazol	
	non-UV-exposed/ nienaświetlany uv	UV-exposed for 24 hours/ naświetlany UV 24 godziny	non-UV-exposed/ nienaświetlany UV	UV-exposed for 24 hours/ naświetlany UV 24 godziny	non-UV-exposed/ nienaświetlany UV	UV-exposed for 24 hours/ naświetlany UV 24 godziny
L SD [ $\pm 0.50$ ]	26.32	36.47	46.42	35.13	35.89	36.17
a SD [ $\pm 0.04$ ]	1.59	1.89	0.13	1.90	-0.52	-0.55
b SD [ $\pm 0.04$ ]	3.92	7.75	2.83	11.34	2.02	1.99

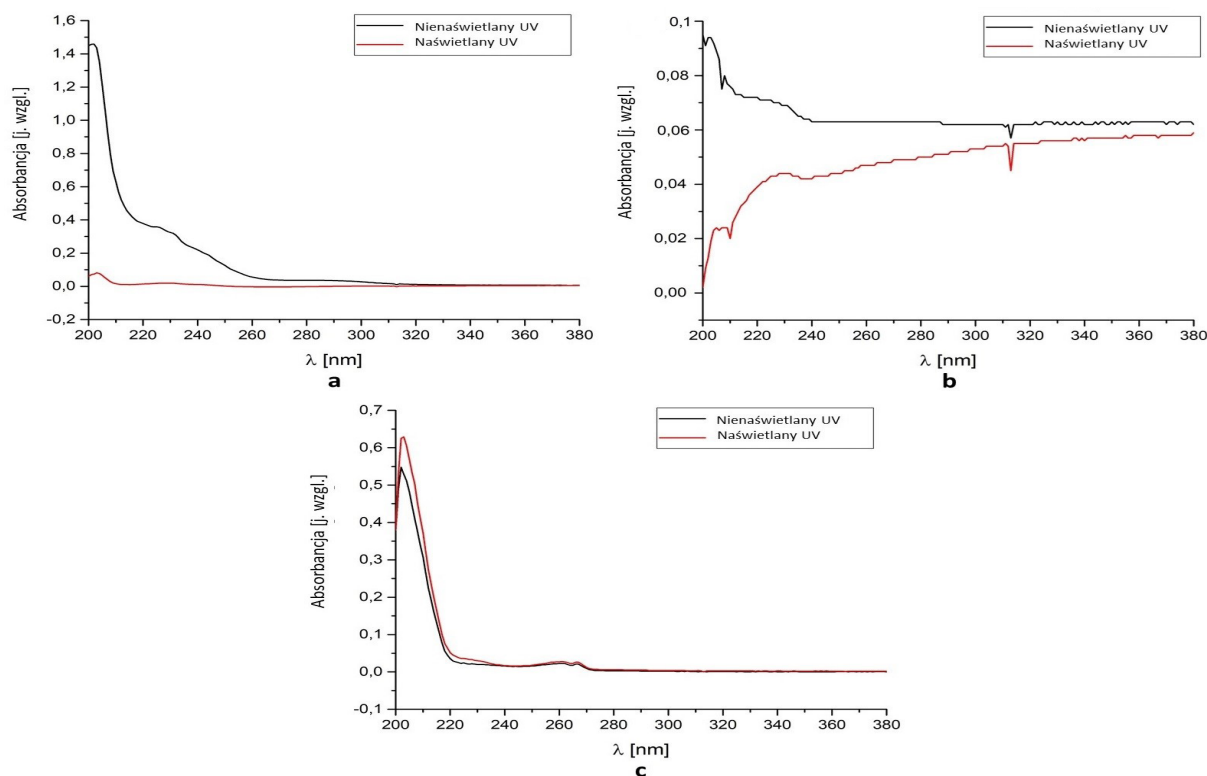
SD – odchylenie standardowe

The 'b' parameter also adopted more positive values, which indicates a higher yellow component in the tested sample occurring after exposure to UVC radiation. In the case of miconazole, the 'L' parameter adopted lower values after exposure to UV radiation, which indicates darkening of the sample. Both the 'a' and 'b' parameters adopted many more positive values in the CIE Lab colour system after exposure to UV radiation in the tested miconazole sample. This indicates an increase in red and yellow components in the drug.

None of parameters of the CIE Lab system for the tested fluconazole after its exposure to UV radiation changed significantly. This shows that the sample did not change its colour after exposure to UVC radiation (Tab. II).

Próbki ketokonazolu oraz mikonazolu cechowały istotne różnice w układzie CIE Lab, występujące po 24-godzinnym działaniu promieniowania ultrafioletowego. W przypadku ketokonazolu parametr „L” po ekspozycji na promieniowanie UVC przyjmował wartości niższe, co świadczy o rozjaśnieniu próbki. Natomiast parametr „a” przyjmował bardziej dodatnie wartości, wskazując na większy udział barwy czerwonej po naświetlaniu promieniowaniem UVC. Parametr „b” również przyjmował bardziej dodatnie wartości, co wskazuje na większy udział w badanej próbce barwy żółtej po ekspozycji na promieniowanie UVC.

W przypadku mikonazolu parametr „L” przyjmował po ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe niższe



**Fig. 9.** UV absorbance spectrum of (a) ketoconazole, (b) miconazole and (c) fluconazole non-exposed and exposed to 24-hour UVC radiation. Absorbance was measured at room temperature.

**Ryc. 9.** Widmo absorancji UV ketokonazolu (a), mikonazolu (b) i flukonazolu (c) niepoddanych i poddanych działaniu promieniowania UVC przez 24 godziny. Pomiar absorancji wykonano w temperaturze pokojowej.

For ketoconazole, miconazole and fluconazole, both exposed and non-exposed to UVC radiation, UV absorbance spectrum analyses were conducted in the wavelength range from 200 to 380 nm. Differences in the appearance of the absorbance spectra for drugs exposed to 24-hour UVC radiation can be observed for ketoconazole (Fig. 9a) and miconazole (9b). In the case of fluconazole, these differences are the least visible (Fig. 9c).

## DISCUSSION

The analyses conducted in the experiment of selected antifungal drugs (belonging to the group of azoles) before and after exposure to UVC radiation showed differences in interaction with the model DPPH free radical. Among the initial drugs, i.e. non-exposed to ultraviolet radiation, only ketoconazole showed antioxidant properties. Similar properties were observed by the authors of study [31], in which they demonstrated that ketoconazole inhibits lipid peroxidation in the liver, cerebral tissue and colon of tested rats. Ketoconazole also inhibited lipid peroxidation in microsomes, which was induced by the Fe(III)ADP/NADPH system [31]. The authors also tested other antifungal drugs, i.e. miconazole and clotrimazole [31]. They showed that these drugs inhibit

wartości, co wskazuje na ciemnienie próbki. Parametry „a” oraz „b” w układzie barw CIE Lab przyjmowały po tej ekspozycji znacznie bardziej dodatnie wartości, co świadczy o wzroście udziału odpowiednio barwy czerwonej i żółtej.

Żadne parametry układu CIE Lab dla flukonazolu po zadziałaniu na lek promieniowania ultrafioletowego nie uległy znaczącej zmianie. Świadczy to o braku zmiany barwy próbki po ekspozycji na promieniowanie UVC. Dla ketokonazolu, mikonazolu oraz flukonazolu, poddanych oraz niepoddanych naświetlaniu promieniowaniem UVC, wykonano analizy widma absorancji UV w zakresie długości fali 200–380 nm. Różnice w wyglądzie widm absorancji dla leków poddanych 24-godzinnej ekspozycji na promieniowanie UVC można zaobserwować w przypadku ketokonazolu (ryc. 9a) i mikonazolu (9b). W przypadku flukonazolu różnice te są najmniej widoczne (ryc. 9c).

## DYSKUSJA

Analizy wybranych leków przeciwgrzybiczych, należących do grupy azoli, przed i po naświetlaniu promieniowaniem UVC wykazały różnice w oddziaływaniu z modelowym wolnym rodnikiem DPPH. Spośród leków wyjściowych, czyli niepoddanych działaniu pro-



lipid peroxidation in a negligible way [31]. This confirms the results obtained in this study for the initial miconazole, as it did not have a reducing effect on the DPPH radical (Figs. 6, 8). Kus C. et al. also proved in their study that some benzimidazole derivatives with antifungal properties have antioxidant characteristics [32]. Out of 12 benzimidazole derivative compounds tested by them, 3 showed antioxidant properties, which directly contributed to better antifungal properties of those compounds [32].

The research conducted in this experiment has shown that in the case of ketoconazole and miconazole, i.e. imidazole derivatives, the antioxidant properties of these drugs improved after their exposure to the 24-hour UVC radiation factor (Figs. 5, 6, 8). A similar relationship was noted by Stanjek-Cichoradzka A. et al. for rapamycin (sirolimus), mycophenolate mofetil, cisplatin and tacrolimus (fujimycin) [33]. After exposure to the factor in the form of ultraviolet radiation, the antioxidant properties of those drugs were also improved in comparison with the initial samples [33]. This fact may result from the photolytic effect of UVC radiation on ketoconazole and miconazole [12,13]. As a result of exposure of the tested imidazole derivatives to UV radiation, it is likely that chemical bonds were broken and free radicals were formed [12,13,14]. As a result of the formation of free radicals in the tested drugs, faster recombination with a model DPPH radical might have occurred, which manifested itself in a decrease in absorbance values, i.e. improvement of antioxidant properties. Skiba M. et al. showed in their research that one of the decomposition products of ketoconazole is free radicals. They proved that the addition of antioxidants to aqueous formulations of ketoconazole affected the drug stability and inhibited its decomposition [34]. Therefore, an increase in the antioxidant capacity of ketoconazole and miconazole exposed to UVC radiation is probably due to the occurrence of photolytic degradation products in the form of free radicals. This in turn, may contribute to toxic effects in the body during pharmacotherapy with such drugs [14,35,36].

Ketoconazole and miconazole also showed differences in colourimetric tests. After their 24-hour exposure to a UVC agent, the imidazole derivatives were characterised by changes in the CIE Lab system, in comparison with the initial drugs. The obtained UV absorbance spectra in a wavelength range from 200 to 380 nm were different for those drugs before and after exposure to UV radiation. The results obtained by colourimetry and UV spectrophotometry may indicate changes in ketoconazole and miconazole under the influence of ultraviolet radiation. The research conducted by Stabu I. et al. has shown that ketoconazole is susceptible to decomposition under the influence of UVA and UVC radiation [37]. The aforementioned authors suggested storing this drug away from light [37]. The photodegradable effect of ultraviolet radiation in the UVC range ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) on climbazole, an antifungal drug belonging to the group of azoles, was proved by Wang-Rong L. et al. [38]. They showed that radicals ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ ) and

mieniowania ultrafioletowego, tylko ketokonazol wykazywał właściwości antyoksydacyjne. Podobne właściwości zaobserwowali inni autorzy wykazując, że ketokonazol hamuje peroksydację lipidów w wątrobie, tkance mózgowej oraz okrężnicy badanych szczurów [31]. Ketokonazol inhibował również peroksydację lipidów w mikrosomach, indukowaną przez układ Fe(III) ADP/NADPH. Ponadto autorzy ci testowali inne leki przeciwgrzybicze, tj. mikonazol i klotrimazol, wykazując, że leki te w sposób znikomy hamują peroksydację lipidów. Potwierdza to wyniki uzyskane w niniejszej pracy dla mikonazolu wyjściowego, który nie wykazywał działania redukującego w stosunku do rodnika DPPH. Kus i wsp. [32] również udowodnili antyoksydacyjne właściwości niektórych pochodnych benzimidazolowych [32]. Spośród testowanych przez nich 12 związków 3 wykazywały właściwości antyoksydacyjne, co bezpośrednio przekładało się na ich lepsze właściwości przeciwgrzybicze.

Z przeprowadzonych w niniejszym eksperymencie badań wynika, że w przypadku ketokonazolu oraz mikonazolu, czyli pochodnych imidazolowych, po 24-godzinnym działaniu promieniowania UVC nastąpiło polepszenie właściwości antyoksydacyjnych tych leków. Podobną zależność zarejestrowali Stanjek-Cichoradzka i wsp. [33] dla rapamycyny, mikofenolanu mofetynu, cisplatiny oraz takrolimusu. Po zadziałaniu czynnika w postaci promieniowania ultrafioletowego obserwowano polepszenie właściwości antyoksydacyjnych w porównaniu z próbkami wyjściowymi. Może to wynikać z fotolitycznego działania promieniowania UVC na ketokonazol i mikonazol [12,13]. W wyniku promieniowania ultrafioletowego w lekach tych doszło prawdopodobnie do rozerwania wiązań chemicznych i utworzenia wolnych rodników [12,13,14]. Rezultatem tego mogła być szybsza rekombinacja z modelowym rodnikiem DPPH, co manifestowało się obniżeniem wartości absorbancji, czyli polepszeniem właściwości antyoksydacyjnych. Skiba i wsp. [34] wykazali, że jednym z produktów rozkładu ketokonazolu są wolne rodniki. Udowodnili ponadto, że dodatek antyoksydantów do wodnych formułacji ketokonazolu wpływał na wzrost stabilności leku i hamował jego rozkład. W związku z tym wzrost zdolności antyoksydacyjnych ketokonazolu oraz mikonazolu poddanych działaniu promieniowania UVC prawdopodobnie wynika z obecności w lekach produktów degradacji fotolitycznej w postaci wolnych rodników. To z kolei może być przyczyną efektów toksycznych w organizmie podczas farmakoterapii takimi lekami [14,35,36].

Ketokonazol oraz mikonazol wykazywały również różnice w badaniach kolorymetrycznych. Pochodne imidazolu poddane działaniu czynnika UVC przez jedną dobę cechowały się zmianami w układzie CIE Lab w porównaniu z lekami wyjściowymi. Otrzymane widma absorbancji UV w zakresie długości fali 200–380 nm były odmienne dla tych leków przed ekspozycją na promieniowanie ultrafioletowe i po. Otrzymane z badań kolorimetrii oraz spektrofotometrii UV wyniki mogą wskazywać na zmiany zachodzące w ketokona-



singlet oxygen are formed during climbazole photodegradation [38]. Da Silva JP. et al. also proved in their research the degrading effect of UVC and UVA radiation on drugs belonging to the azole group, i.e. triadimefon and triadimenol [39]. In the case of these compounds, free radicals were the photodegradation product as well [39]. In their research, Ahmed S. et al. observed the susceptibility of aqueous solutions containing sodium sulfacetamide to UV radiation [40]. The researchers observed a change in the colour of preparations stored within reach of ultraviolet radiation [40]. Using chromatography, they demonstrated that the sulfacetamide preparation decomposed with first order kinetics during its storage in the presence of UV radiation [40]. They found that the addition of antioxidant substances to sulfacetamide drops inhibits the decomposition process, which indicates that free radicals are formed in the drug during the photodegradation process [40].

In the conducted research, fluconazole was characterised by the highest stability. After 24-hour exposure to UV radiation, no significant differences or changes in the CIE Lab parameters (Tab. II), nor in the UV absorbance spectrum (Fig. 9c), were noted. The interaction kinetics of fluconazole with the DPPH free radical did not change, compared to the initial drug, after exposure to UVC radiation (Fig. 7). This proves the lack of antioxidant properties of fluconazole (Fig. 8).

## CONCLUSIONS

The following conclusions can be drawn from the studies conducted using ultraviolet–visible spectroscopy (UV-Vis) and colourimetry:

1. Among the tested antifungal azole derivatives drugs, only ketoconazole had antioxidant properties.
2. UVC radiation increased the ability to reduce the DPPH free radical in the case of ketoconazole and miconazole. This may indicate the photolysis of these drugs under the influence of ultraviolet radiation.
3. For ketoconazole and miconazole exposed to UVC radiation, some differences in the CIE Lab parameters and UV absorbance spectra were observed.
4. Fluconazole was characterised by the highest stability to UVC radiation among the tested antifungal drugs. No significant differences in the CIE Lab parameters, UV absorbance spectra or interaction kinetics with the model DPPH radical were observed for fluconazole exposed to UVC radiation.
5. Ketoconazole and miconazole should be stored out of reach of ultraviolet radiation.
6. Patient exposure to sunlight during the application of preparations containing ketoconazole and miconazole is not recommended.

## Acknowledgments

The research was financed by the Medical University of Silesia in Katowice. Contract no. KNW-2-019/D/6/N.

zolu oraz mikonazolu pod wpływem promieniowania ultrafioletowego. Badania Staub i wsp. [37] wykazały, że ketokonazol jest podatny na rozkład pod wpływem promieniowania UVA oraz UVC. Wspomniani autorzy zaproponowali przechowywanie tego leku bez dostępu do światła. Fotodegradacyjny wpływ promieniowania UVC ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) na klimebazol, lek przeciwwgrzybiczy należący do grupy azoli, udowodnili Liu i wsp. [38], wykazując, że podczas fotodegradacji klimebazolu powstają rodniki ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ ) i tlen singletowy. Również Da Silva i wsp. [39] udowodnili degradacyjny wpływ promieniowania UVC i UVA na leki z grupy azoli, tj. triadimefon i triadimenol; w przypadku tych związków produktem fotodegradacji również były wolne rodniki. Ahmed i wsp. [40] zaobserwowali wrażliwość – zmianę zabarwienia – wodnych roztworów zawierających sulfacetamid sodu na promieniowanie ultrafioletowe. Za pomocą chromatografii wykazali, że preparat sulfacetamidu w trakcie przechowywania w obecności promieniowania UV ulega rozkładowi z kinetyką I rzędu. Zauważyli, że dodatek substancji antyoksydacyjnych do kropli z sulfacetamidem hamuje proces rozkładu, co świadczy, że w leku podczas fotodegradacji powstają wolne rodniki [40].

Największą stabilnością w przeprowadzonych badaniach charakteryzował się flukonazol. Po 24-godzinnej ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe nie zarejestrowano istotnych różnic ani w zmianie parametrów CIE Lab, ani w widmie absorbancji UV. Kinetyka oddziaływania flukonazolu z wolnym rodnikiem DPPH po ekspozycji na promieniowanie UVC nie uległa zmianie w porównaniu z lekiem wyjściowym. Świadczy to o braku zdolności antyoksydacyjnych flukonazolu.

## WNIOSKI

Przeprowadzone badania z zastosowaniem spektroskopii UV-Vis oraz kolorymetrii pozwalają wyciągnąć następujące wnioski.

1. Spośród badanych leków przeciwwgrzybiczych pochodnych azoli tylko ketokonazol miał właściwości antyoksydacyjne.
2. Promieniowanie UVC zwiększało zdolność do redukcji wolnego rodnika DPPH w przypadku ketoconazolu oraz mikonazolu, co może świadczyć o fotolizie tych leków.
3. Dla ketokonazolu oraz mikonazolu poddanych działaniu promieniowania UVC zaobserwowano różnice w parametrach CIE Lab oraz w widmach absorbancji UV.
4. Spośród badanych leków przeciwwgrzybiczych flukonazol cechował się największą stabilnością na promieniowanie UVC. Nie zaobserwowano też istotnych różnic w parametrach CIE Lab, widmie absorbancji UV oraz w kinetyce oddziaływania z modelowym rodnikiem DPPH.
5. Ketokonazol i mikonazol powinny być przechowywane w miejscu uniemożliwiającym ekspozycję na działanie promieniowania ultrafioletowego.



---

**Author's contribution**

Study design – P. Ramos, B. Pilawa, P. Pepliński  
Data collection – P. Ramos, P. Pepliński, B. Pilawa  
Data interpretation – P. Ramos, B. Pilawa, P. Pepliński  
Statistical analysis – P. Ramos, P. Pepliński, B. Pilawa  
Manuscript preparation – P. Ramos, P. Pepliński, B. Pilawa  
Literature research – P. Ramos, P. Pepliński, B. Pilawa

---

**REFERENCES**

1. Janiec K.W., Pytlík M., Cegięła U. Leki układu immunologicznego (leki immunotropowe). W: Kompendium farmakologii. Red. W. Janiec. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2016, s. 435–440.
2. Cegięła U., Janiec W., Pytlík M. Leki stosowane w leczeniu nowotworów. W: Kompendium farmakologii. Red. W. Janiec. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2016, s. 451–454.
3. Janiec W., Nowińska B., Śliwiński L. Leki stosowane w zakażeniach i chorobach inwazyjnych. W: Kompendium farmakologii. Red. W. Janiec. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2016, s. 510–515.
4. Gomulka W.S. Farmakodynamika leków stosowanych w zakażeniach i chorobach inwazyjnych. W: Farmakodynamika. Red. W. Janiec. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2008, s. 880–888.
5. Rewerski W., Filipiak K.J. Leki przeciwgrzybicze. W: Farmakologia. Red. W. Kostowski, Z. Herman. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2004, s. 359–366.
6. Tarchalska-Kryńska B. Farmakologia układu immunologicznego. W: Farmakologia. Red. W. Kostowski, Z. Herman. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2004, s. 390–444.
7. Abbas N., Arshad M.S., Hussain A., Irfan M., Ahsan M., Rasool M.F., ur Rehman M.H. Development and validation of a spectroscopic method for the simultaneous analysis of miconazole nitrate and hydrocortisone acetate in pharmaceutical dosage form. *Trop. J. Pharm. Res.* 2017; 16(2): 413–420.
8. Lamb D.C., Warrilow A.G., Rolley N.J., Parker J.E., Nes W.D., Smith S.N., Kelly D.E., Kelly S.L. Azole Antifungal Agents To Treat the Human Pathogens *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* through Inhibition of Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51). *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(8): 4707–4713, doi: 10.1128/AAC.00476-15.
9. Chen Z.F., Ying G.G., Jiang Y.X., Yang B., Lai H.J., Liu Y.S., Pan C.G., Peng F.Q. Photodegradation of the azole fungicide fluconazole in aqueous solution under UV-254: kinetics, mechanistic investigations and toxicity evaluation. *Water Res.* 2014; 52: 83–91, doi: 10.1016/j.watres.2013.12.039.
10. Girish M.B., Patil P.A. The influence of some azoles on wound healing in albino rats. *Indian J. Pharmacol.* 2005; 37(4): 247–250, doi: 10.4103/0253-7613.16572.
11. Jakubowicz O., Luczkowska M., Żaba R., Adamski Z. Tinea cutis glabrae: causes of diagnostic challenge. *Postepy Dermatol. Alergol.* 2014; 31(6): 421–424, doi: 10.5114/pdia.2014.40950.
12. Yoshioka S., Stella V.J. Stability of drugs and dosage forms. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow 2002.
13. Ahmad I., Ahmed S., Anwar Z., Sheraz M.A., Sikorski M. Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products. *Int. J. Photoenergy* 2016; ID 8135608: 1–19, doi: 10.1155/2016/8135608.
14. Bartosz G. Strategia ataku. W: Bartosz G. Druga twarz tleny. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2003, s. 58–61, 84–91, 99–119.
15. Castro G., Casado J., Rodríguez I., Ramil M., Ferradás A., Cela R. Time-of-flight mass spectrometry assessment of fluconazole and climbazole UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradability: Kinetics study and transformation products elucidation. *Water Res.* 2016; 88: 681–690, doi: 10.1016/j.watres.2015.10.053.
16. Thoma K., Kübler N. Photostability of antifungal agents. 2. Photostability of polyene antibiotics. *Pharmazie* 1997; 52(4): 294–302.
17. Chen Z.F., Ying G.G. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. *Environ. Int.* 2015; 84: 142–153, doi: 10.1016/j.envint.2015.07.022.
18. Gwoździński M. Wolne rodniki, antyutleniacze oraz uszkodzenia lipidów, białek i kwasów nukleinowych. W: Józwiak Z., Bartosz G. Biofizyka. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2005, s. 423–451.
19. Tirtzitis G., Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim. Pol.* 2010; 57(2): 139–142.
20. Zvezdanović J.B., Marković D.Z., Cvetković D.J., Stanojević J.S. UV-induced change in the antioxidant activity of quercetin toward benzophenone-initiated lipid peroxidation. *J. Serb. Chem. Soc.* 2012; 77(11): 1571–1588.
21. Jurzak M., Ramos P., Pilawa B. The influence of genistein on free radicals in normal dermal fibroblasts and keloid fibroblasts examined by EPR spectroscopy. *Med. Chem. Res.* 2017; 26(6): 1297–1305, doi: 10.1007/s00044-017-1848-3.
22. Łucka-Sobstel B. Leki przeciwgrzybicze. W: Chemia leków. Red. A. Zejc, M. Gorczyca. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 2009, s. 703–706.
23. Ketokonazol (karta charakterystyki substancji), <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/k0600000?lang=pl&region=PL> [dostęp: 10.11.2016].
24. Mikonazol (karta charakterystyki substancji), <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/m1900000?lang=pl&region=PL> [dostęp: 10.11.2016].
25. Flukonazol (karta charakterystyki substancji), <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0000557?lang=pl&region=PL> [dostęp: 04.10.2016].
26. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004; 26(2): 211–219.
27. Rój A., Przybyłowski P. Ocena barwy jogurtów naturalnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2012; 45(3): 813–816.
28. Harbourne N., Jacquier J.C., O’Riordan D. Optimisation of the extraction and processing conditions of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) for incorporation into a beverage. *Food Chem.* 2009; 115(1): 15–19, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.044.
29. Suwiński J. Łączne użycie metod spektroskopowych w celu ustalenia struktury związków. W: Zieliński W., Rajca A. Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne. Warszawa 1995, s. 520–553.
30. Alizadeh N., Rezakhani Z. Extractive spectrophotometric determination of ketoconazole, clotrimazole and fluconazole by ion-pair complex formation with bromothymol blue and picric acid. *J. Chil. Chem. Soc.* 2012; 57(2): 1104–1108.
31. Wiseman H., Smith C., Amstein H.R., Halliwell B., Cannon M. The antioxidant action of ketoconazole and related azoles: comparison with tamoxifen and cholesterol. *Chem. Biol. Interact.* 1991; 79(2): 229–243.
32. Kus C., Sozudonmez F., Can-Eke B., Coban T. Antioxidant and antifungal properties of benzimidazole derivatives. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 2010; 65(9–10): 537–542.
33. Stanjek-Cichoracka A., Żegleń S., Ramos P., Pilawa B., Wojarski J. Effect of ultraviolet irradiation on free radical scavenging activity of immunosuppressants used in lung transplantation and comparative electron paramagnetic resonance study of kinetics of their interactions with model free radicals. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2018; 43(3): 385–392, doi: 10.1111/jcpt.12668.
34. Skiba M., Skiba-Lahiani M., Marchais H., Ducloux R., Arnaud P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations. *Int. J. Pharm.* 2000; 198(1): 1–6.
35. Stohs S.J. The role of free radicals in toxicity and disease. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 1995; 6(3–4): 205–228.
36. Halliwell B., Gutteridge J.M. Reactive species can be poisonous. In: Halliwell B., Gutteridge J.M. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. United Kingdom 2015, p. 463–510.
37. Staub I., Flores L., Gosmann G., Pohlmann A., Fröhlich P.E., Schapoval E.E., Bergold A.M. Photostability studies of ketoconazole: isolation and structural elucidation of the main photodegradation products. *Lat. Am. J. Pharm.* 2010; 29(7): 1100–1106.
38. Liu W.R., Ying G.G., Zhao J.L., Liu Y.S., Hu L.X., Yao L., Liang Y.Q., Tian F. Photodegradation of the azole fungicide climbazole by ultraviolet irradiation under different conditions: Kinetics, mechanism and toxicity evaluation. *J. Hazard. Mater.* 2016; 318: 794–801, doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.06.033.
39. Da Silva J.P., Da Silva A.M., Khmelinskii I.V., Martinho J.M., Vieira Ferreira L.F. Photochemistry and photochemistry of azole fungicides: triadimefon and triadimenol. *J. Photochem. Photobiol. A* 2001; 142: 31–37.
40. Ahmed S., Anwar N., Sheraz M.A., Ahmad I. Degradation kinetics of sulfacetamide sodium in ophthalmic preparations in dark and light. *Sci. Technol. Dev.* 2017; 36(4): 206–210, doi: 10.3923/std.2017.206.210.

6. W trakcie stosowania preparatów zawierających ketokonazol oraz mikonazol nie zaleca się ekspozycji pacjentów na promieniowanie słoneczne.

**Finansowanie**

Badania były finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, umowa nr KNW-2-019/D/6/N.