

Zastosowanie spektroskopii EPR do badania wolnych rodników generowanych termicznie w drotawerynie

Application of EPR spectroscopy for examination of thermally formed free radicals in drotaverine

Paweł Ramos, Barbara Pilawa, Maciej Adamski

STRESZCZENIE

Katedra i Zakład Biofizyki
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach

WSTĘP

Leki wymagają usunięcia drobnoustrojów podczas ich produkcji, jednak procesy sterylizacji nie powinny generować wolnych rodników. Zbadano wolne rodniki w drotawerynie. Sprawdzone, czy sterylizacja termiczna może być w tym przypadku stosowana.

MATERIAŁY I METODY

Zbadano drotawerynę ogrzewaną w 160°C metodą EPR. Wyznaczono koncentrację wolnych rodników, określono sposób ich rozmieszczenia w ogrzanej próbce, złożoność układu wolnorodnikowego oraz oddziaływania magnetyczne spin-spin. Zbadano również zmiany koncentracji wolnych rodników w drotawerynie podczas przechowywania leku po sterylizacji. Warunki sterylizacji termicznej wybrano zgodnie z obowiązującymi normami farmakopealnymi. Lek sterylizowano suchym gorącym powietrzem.

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Dr n. med. Paweł Ramos
Katedra i Zakład Biofizyki
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Jedności 8
41-200 Sosnowiec
tel: +48 32 364 11 64
fax: +48 32 364 11 60
e-mail: pawelramos@sum.edu.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2014, 68, 1, 28–37
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach
eISSN 1734-025X
www.annales.sum.edu.pl

WYNIKI

Nie uzyskano linii EPR dla drotaweryny przed sterylizacją. Wykazano, że drotaweryna po sterylizacji termicznej w temp. 160°C zawiera wolne rodniki i wykazuje widma EPR. Koncentracja wolnych rodników w drotawerynie zmienia się wraz z czasem przechowywania leku po obróbce termicznej. Za efekt ten odpowiadają prawdopodobnie oddziaływania z tlenem. Wolne rodniki w drotawerynie rozmieszczone są jednorodnie, ponieważ zaobserwowano charakterystyczne dla tego przypadku zależności amplitudy i szerokości linii EPR od mocy mikrofalowej. Wolne rodniki w drotawerynie są położone blisko siebie i silnie oddziałują dipolowo, co powoduje poszerzenie widm EPR. Ciągłe nasycenie mikrofalowe widm EPR wykazało, że w drotawerynie sterylizowanej termicznie zachodzą wolne procesy relaksacji spin-sieć. Kształt widm EPR i parametry asymetrii testowanego leku zmieniają się wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej, co wskazuje na złożony charakter układu wolnych rodników w próbce.

WNIOSKI

Drotaweryna nie powinna być sterylizowana termicznie ze względu na generowanie wolnych rodników. Uzyskane rezultaty potwierdziły przydatność spektroskopii EPR do badania leków sterylizowanych termicznie. Metoda EPR może być wykorzystana jako uzupełnienie testów mikrobiologicznych.

SŁOWA KLUCZOWE

drotaweryna, wolne rodniki, termoliza, spektroskopia EPR

ABSTRACT**INTRODUCTION**

Microorganisms should be removed from drugs during their production, however, sterilization processes should not produce free radicals. Free radicals in drotaverine were studied. The applicability of thermal sterilization for drotaverine was investigated.

MATERIAL AND METHODS

Drotaverine heated to 160°C was examined by the EPR method. Free radical concentration, their distribution in the sample, the complex character of the free radical system and magnetic spin-spin interactions in the drug were determined. Changes in the free radical concentration in drotaverine during storage after sterilization also were examined. The sterilization conditions were chosen according to pharmacopeal norms. The analysed drug was sterilized in dry hot air.

RESULTS

EPR lines were not obtained for drotaverine before sterilization. It was demonstrated that drotaverine after thermal sterilization at temperature 160°C contains free radicals and exhibits EPR spectra. The free radical concentration in drotaverine changes with storage time after thermal treatment. Interactions with oxygen are probably responsible for this effect. The free radicals are homogeneously distributed in drotaverine since characteristic correlations between the amplitudes and linewidths of the EPR lines and microwave power were observed. The free radicals are closely located to one another in drotaverine and they strongly interact in a dipolar manner, which cause broadening of the EPR spectra. Continuous microwave saturation of the EPR spectra revealed that slow spin-lattice relaxation processes occur in thermally sterilized drotaverine. The shape of the EPR spectra and asymmetry parameters of the test drug change with increasing microwave power, indicating the complex nature of the free radicals in the sample.

CONCLUSIONS

Drotaverine should not be thermally sterilized because of free radical formation. The obtained results confirmed the usefulness of EPR spectroscopy to examine thermally sterilized drugs. The EPR method may be used as a supplement to microbiological tests.

KEY WORDS

drotaverine, free radicals, thermolysis, EPR spectroscopy

WSTĘP

Sterylicacja termiczna suchym gorącym powietrzem jest jedną z metod wyjaławiania dopuszczalną w przypadku leków odpornych termicznie [1,2,3,4,5,6]. Proces ten jest prowadzony w celu uzyskania czystości mikrobiologicznej leku [1,2,3,4], a warunki i parametry

określa Farmakopea Polska [5,6]. Zgodnie z Farmakopeą, sterylicacja termiczna zapewniająca uzyskanie jałowego produktu powinna być wykonywana w temp. 160, 170 lub 180°C, zaś minimalny zalecany czas ogrzewania w tych temperaturach wynosi odpowiednio: 120, 60 i 30 min [5,6]. Dla wielu leków, szczególnie podawanych pozajelitowo, prawdopodobieństwo znalezienia mikroorganizmów (*sterility*

assurance level – SAL; wymagany poziom jałowości) po sterylizacji nie powinno być większe od 10^{-6} [1,2,3,4].

Lek stosowany w terapii medycznej nie powinien zawierać wolnych rodników, tj. cząsteczek zawierających niesparowane elektrony [7,8,9]. Wolne rodniki mogą powodować modyfikacje struktur tkankowych, gdyż jako układy paramagnetyczne są przeważnie aktywne chemicznie. Z uwagi na bezpieczeństwo substancji leczniczej względem organizmu człowieka należy przed aplikowaniem usunąć z niej drobnoustroje w sposób niepowodujący zmian w strukturze chemicznej, a także nieprzyczyniający się do produkcji wolnych rodników wskutek zrywania wiązań chemicznych.

Wolne rodniki mogą być badane za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [7,8,9,10,11,12,13,14,15], polegającego na absorpcji przez niesparowane elektrony próbki umieszczonej w polu magnetycznym promieniowania mikrofalowego o częstotliwości odpowiednio dopasowanej do ich poziomów energetycznych [11,12,13,14,15]. W polu magnetycznym poziomy energetyczne niesparowanych elektronów ulegają rozszczepieniu w wyniku efektu Zeemana [11]. Niesparowane elektrony przechodzą na wyższe poziomy po uzyskaniu energii w postaci energii fal elektromagnetycznych. Najczęściej wykorzystywanymi w badaniach EPR falami, wywołującymi absorpcję w próbce paramagnetycznej, są mikrofałe o częstotliwości 9,3 GHz z pasma X [15]. Metoda EPR służy do wyznaczania koncentracji wolnych rodników w próbce, ich rodzaju oraz oddziaływań magnetycznych typu spin-spin i spin-sieć [7,8,9,10,11,12,13,14,15].

Spektroskopia EPR stosowana jest w farmacji do badania wolnych rodników w substancjach leczniczych po sterylizacji termicznej [16,17,18,19,20,21,22,23,24] i radiacyjnej [25,26,27], sterylizowanych ziół o właściwościach leczniczych [28], kompleksów melanin z lekami [29,30,31,32,33,34,35] oraz oddziaływań leków diamagnetycznych z wolnymi rodnikami [8,9,10,36].

Celem niniejszej pracy jest zbadanie metodą EPR właściwości i koncentracji wolnych rodników generowanych w drotawerynie podczas sterylizacji termicznej w temp. 160°C i w czasie 120 min. Określono także wpływ czasu przechowywania po sterylizacji na wolne rodniki w leku.

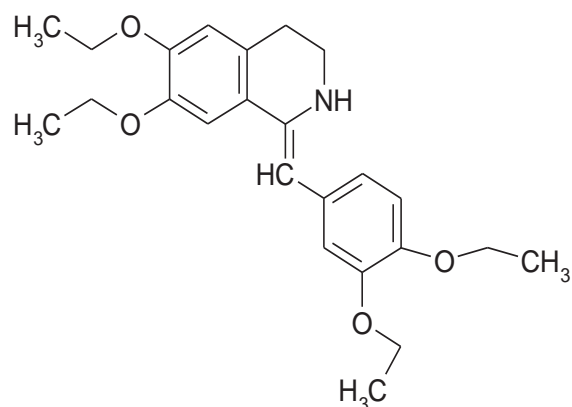
Wolne rodniki generowane w drotawerynie podczas sterylizacji termicznej suchym gorącym powietrzem nie były wcześniej badane. Drotaweryna po sterylizacji nie powinna zawierać wolnych rodników lub ich koncentracja w leku nie powinna być wysoka. Ma to szczególnie istotne znaczenie przy podawaniu pozajelitowym, kiedy lek bezpośrednio kontaktuje się z tkankami. W przypadku stwierdzenia dużej zawartości wolnych rodników w drotawerynie poddanej ob-

róbce termicznej lek należałoby sterylizować innymi metodami, np. radiacyjnie promieniowaniem gamma [1,2,3].

MATERIAŁY I METODY

Badany lek

W pracy zastosowano metodę EPR. Drotaweryna – 1-(3,4-dietoksybenzylideno)-6,7-dietoksy-1,2,3,4-tetrahydroizochinolina – jest pochodną papaweryny [37]. Strukturę chemiczną drotaweryny ilustruje rycina 1 [37].



Ryc. 1. Struktura chemiczna drotaweryny [37].
Fig. 1. Chemical structure of drotaverine [37].

Chlorowodorek drotaweryny stosowany w lecznictwie wykazuje działanie rozkurczowe, hamujące skurcze mięśni gładkich przewodu pokarmowego, dróg żółciowych oraz układu moczowo-płciowego [38,39,40,41]. Lek ten rozszerza naczynia mózgowie i wieńcowe [40,41]. Jest metabolizowany w wątrobie [40,41]. Stosuje się go w: stanach chorobowych powodujących skurcz mięśni gładkich, zapaleniu dróg żółciowych, pęcherzyka żółciowego, kamicy dróg żółciowych i kolki żółciowej, zapaleniu dróg moczowych, miedniczek nerkowych, kamicy dróg moczowych i nerek, bolesnym parciu na mocz, kolce wątrobowej i jelitowej, zespole jelita wrażliwego, zaparciach i wzdęciach spowodowanych skurczami jelit, zapaleniu żołądka, jelit, okrężnicy i trzustki, chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy, bolesnych skurczach towarzyszących menstruacji, akcji porodowej, zapaleniu jajowodów i jajników [38,39,40,41]. Jest lekiem pomocniczym w chorobie wieńcowej oraz przy skurczach naczyń powodujących bóle głowy [38,39,40,41]. Podaje się go w postaci tabletek lub roztworów [40,41], czyli doustnie, podskórnym, domięśniowo lub dożylnie [40,41].

Drotawerynę zakupiono w Firmie SIGMA-ALDRICH, a stopień jej czystości wynosił 98%.

Sterylizacja termiczna leku

Drotawerynę sterylizowano termicznie w suchym gorącym powietrzu w temperaturze 160°C, a czas ogrzewania wynosił 120 minut. Warunki i parametry sterylizacji wybrano spośród zalecanych w Farmakopei Polskiej [5,6]. Sterylizację przeprowadzono w suszarce typu SML Firmy ZALMED z termoobieganiem powietrza.

Pomiary i analiza widm EPR

Warunki aparaturowe pomiarów widm EPR

Badania wolnych rodników w drotawerynie wykonano spektrometrem elektronowym rezonansu paramagnetycznego (EPR) Firmy RADIOPAN (Poznań) o częstotliwości promieniowania mikrofalowego z pasma X (9.3 GHz). Dokładną wartość częstotliwości mikrofal mierzono detektorem MCM 101 Firmy EPRAD (Poznań). Modulacja pola magnetycznego wynosiła 100 kHz, a widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji. Do numerycznej akwizycji danych zastosowano połączony ze spektrometrem blok RAPID SCAN UNIT Firmy JAGMAR (Kraków).

Moc promieniowania mikrofalowego wytwarzanego przez klitron spektrometru wynosiła 70 mW. Widma EPR mierzono przy mocach mikrofalowych z zakresu 2,2–70 mW. Moc mikrofal zmieniano przez regulację tłumienia do 15 dB. Moc promieniowania mikrofalowego stosowanego podczas pomiaru widm EPR obliczono według wzoru [11,12,13, 14,15]:

$$\text{tłumienie (dB)} = 10 \lg (M_0/M) \quad (1)$$

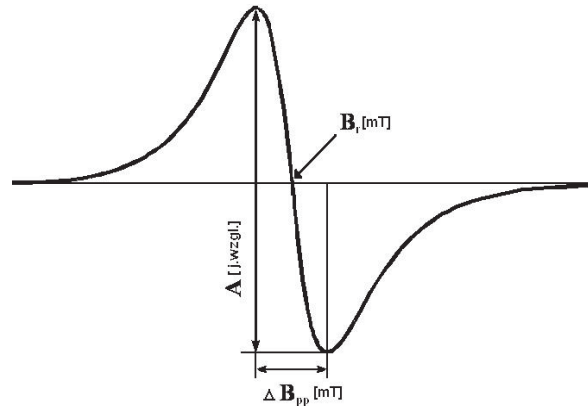
gdzie:

M_0 – moc mikrofalowa wytwarzana przez klitron (70 mW),
 M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

Widma EPR mierzono w polach magnetycznych o indukcji około 335 mT, czyli w zakresie wolnorodnikowym. W innych polach magnetycznych nie obserwowano sygnałów EPR. Indukcję magnetyczną B mierzono magnetometrem jądrowym firmy RADIOPAN (Poznań).

Analizowane parametry widm EPR

Analizowano amplitudę (A [j.wzgl.]) (ryc. 9), a także szerokość linii (ΔB_{pp} [mT]), intensywność integralną linii (I [j.wzgl.]) oraz współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g . Parametry te zostały pokazane na przykładowym widmie EPR (ryc. 2).



Ryc. 2. Amplituda (A), szerokość linii (ΔB_{pp}) oraz rezonansowa indukcja magnetyczna B .
Fig. 2. Amplitude (A), line width (ΔB_{pp}) and resonant magnetic induction B .

Dokładność wyznaczonych parametrów linii EPR wynosiła $\pm 0,01$ [j.wzgl.] dla amplitudy, $\pm 0,02$ [mT] dla szerokości linii, $\pm 0,02$ [j.wzgl.] dla intensywności oraz $\pm 0,0002$ dla współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g .

Do analiz spektroskopowych zastosowano programy komputerowe firm JAGMAR (Kraków) oraz LabVIEW 8.5 National Instruments.

Amplituda (A) i intensywność integralna (I) linii EPR zależą od koncentracji wolnych rodników w próbce i rosną ze wzrostem jej wartości [11,12,13,14,15]. Intensywność integralna (I) linii pierwszej pochodnej jest uzyskiwana przez jej 2-krotne całkowanie. Szerokość (ΔB_{pp}) linii EPR zależy od oddziaływań magnetycznych w próbce, jej wartość rośnie ze wzrostem oddziaływań dipolowych między wolnymi rodnikami, zachodzących przy mniejszych odległościach między nimi [11,12,13,14,15].

Wyznaczono rodzaj poszerzenia linii EPR drotaweryny, określając wpływ mocy mikrofalowej (2,2–70 mW) na amplitudę i szerokość jej linii EPR. W przypadku linii poszerzonej jednorodnie amplituda po osiągnięciu wartości maksymalnej maleje, a szerokość linii rośnie ze wzrostem mocy mikrofalowej [15]. Dla linii poszerzonej niejednorodnie amplituda po osiągnięciu wartości maksymalnej utrzymuje stałą wartość, niezależnie od mocy mikrofalowej, a szerokość linii jest jednakowa dla różnych mocy mikrofalowych [15].

Oceniono szybkość procesów relaksacji spin-sieć w drotawerynie, badając zmiany amplitudy linii EPR ze wzrostem mocy mikrofalowej. Zgodnie z teorią elektronowego rezonansu paramagnetycznego, dla wolnych procesów relaksacji spin-sieć linie EPR nasycają się przy niskich mocach mikrofalowych [11, 12,15]. Linia EPR nasyca się, gdy amplituda linii maleje ze wzrostem mocy mikrofalowej.

Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g zależy od lokalizacji niesparowanych elektronów w wolnych rodnikach [11,12,15]. Współczynnik g wyznaczono wprost z warunku rezonansu według wzoru [15]:

$$g = hv/\mu_B B_r \quad (2)$$

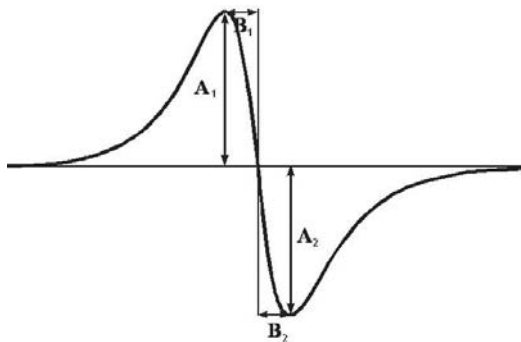
gdzie:

h – stała Plancka,
 ν – częstotliwość promieniowania mikrofalowego,
 μ_B – magneton Bohra,
 B_r – rezonansowa indukcja magnetyczna.

Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g nie zależy od mocy mikrofalowej, gdyż jest związany tylko z rodzajem wolnego rodnika [11,12,13,14,15]. Rezonansowa indukcja magnetyczna B_r nie zmienia się w miarę wzrostu mocy mikrofalowej.

Parametry kształtu widm EPR

W pracy analizowano także kształt widm EPR drotaweryny. Zbadano asymetrię linii EPR zarejestrowanych w zakresie mocy mikrofalowych 2,2–70 mW. Dla widm EPR drotaweryny zmierzonych przy różnych mocach mikrofalowych wyznaczono parametry kształtu: A_1 , A_2 , B_1 i B_2 (ryc. 3).



Ryc. 3. Analizowane parametry kształtu widm EPR: A_1 , A_2 , B_1 i B_2 .
 Fig. 3. Analyzed shape parameters of EPR spectra: A_1 , A_2 , B_1 i B_2 .

Następnie obliczono wartości parametrów asymetrii widm EPR: A_1 - A_2 , A_1/A_2 , B_1 - B_2 oraz B_1/B_2 . Sprawdzone, czy parametry asymetrii widm EPR drotaweryny zależą od mocy mikrofalowej. Kształt widma EPR zależy od mocy mikrofalowej dla próbek, w których występuje kilka rodzajów wolnych rodników [11,12,15].

Koncentracja wolnych rodników w próbce

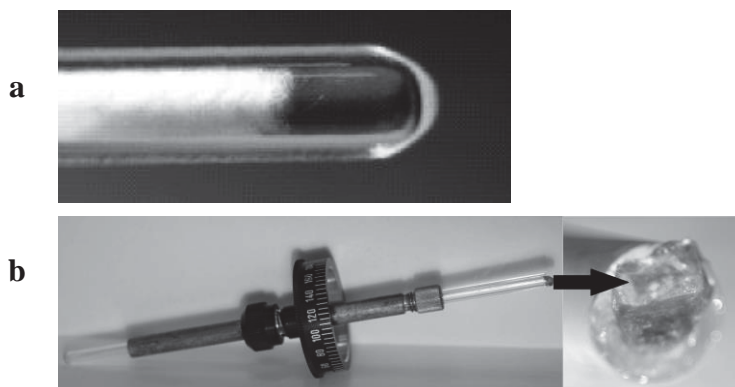
Koncentrację wolnych rodników w drotawerynie wyznaczono porównując parametry jej widma EPR z parametrami widm EPR wzorca. Jako wzorec koncentracji zastosowano ultramarynę – glinokrzemian sodowy zawierający siarkę (ryc. 4a). Jako wzorec pomocniczy wykorzystano kryształ rubinu – $Al_2O_3:Cr^{3+}$ (ryc. 4b). Koncentrację wolnych rodników (N) w drotawerynie sterylizowanej termicznie obliczono według wzoru: [15]:

$$N = n_u(I_p A_{ru} W_u)/(I_u A_{rp} W_p m) \quad (3)$$

gdzie:

n_u – liczba centrów paramagnetycznych w ultramarynie ($n_u = 1,2 \times 10^{19}$ spin),
 I_p, I_u – intensywność integralna linii EPR leku i ultramaryny,
 A_{rp}, A_{ru} – amplituda linii EPR rubinu rejestrowanej przy tym samym wzmocnieniu dla leku i ultramaryny w rezonatorze,
 W_p, W_u – wzmocnienie linii EPR leku i ultramaryny,
 m – masa badanej próbki.

Masę leku wyznaczono za pomocą wagi Firmy Sartorius. Koncentrację wolnych rodników (N) w drotawerynie wyznaczono po 15 minutach od sterylizacji termicznej, a następnie zbadano wpływ czasu przechowywania na koncentrację wolnych rodników w próbce, dokonując pomiarów 7, 14 i 30 dni po wyjaławianiu. Próbkę sterylizowanej drotaweryny przechowywano w temperaturze pokojowej przy dostępie powietrza.

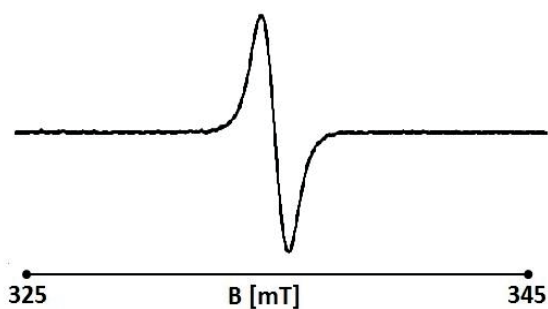


Ryc. 4. Stosowane wzorce: a – ultramaryna w rurce do pomiarów widm EPR, b – kryształ rubinu umocowany na goniometrze.
 Fig. 4. Applied models: a – ultramarine in tube for measurement of EPR spectra, b – ruby crystal mounted on goniometer.

WYNIKI

Parametry widm EPR i koncentracja wolnych rodników w drotawerynie sterylizowanej termicznie

Metodą EPR potwierdzono czystość paramagnetyczną niesterylizowanej drotaweryny. Wykazano, że próbka wybrana do badań nie zawierała zanieczyszczeń paramagnetycznych oraz defektów strukturalnych sieci. Przed ogrzewaniem nie obserwowano sygnałów EPR, stwierdzono natomiast, że wolne rodniki generowane są w drotawerynie w procesie sterylizacji termicznej w suchym gorącym powietrzu, przeprowadzonej w temp. 160°C w czasie 120 min. Dla drotaweryny sterylizowanej termicznie zarejestrowano widma EPR przy wszystkich stosowanych mocach mikrofalowych, czyli od 2,2 do 70 mW. Widmo EPR drotaweryny potraktowanej termicznie, zarejestrowane przy niskiej mocy mikrofalowej wynoszącej 2,2 mW, przedstawia rycina 5. Wyznaczony z widma współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g dla drotaweryny wynosi 1,9899 i jest typowy dla wolnych rodników organicznych.



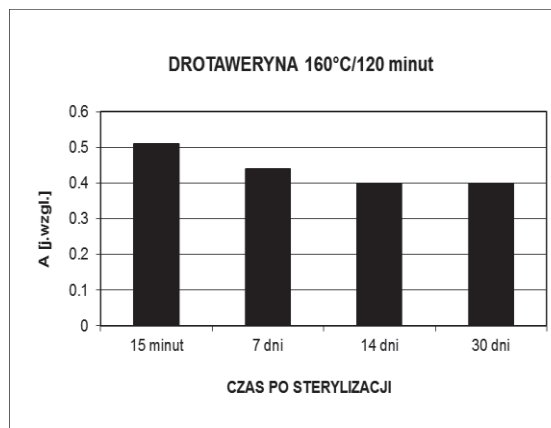
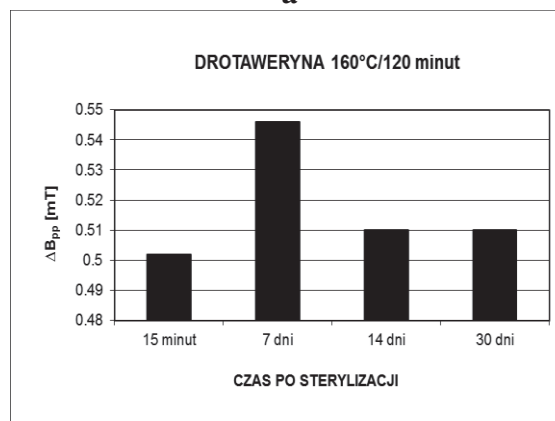
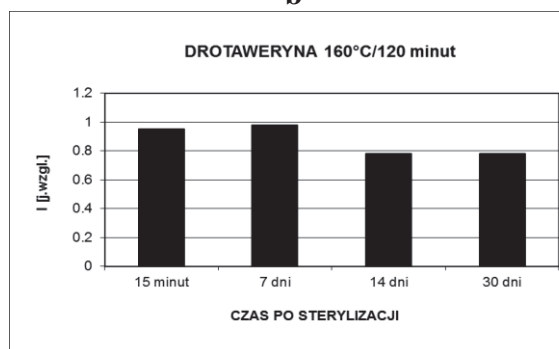
Ryc. 5. Widmo EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie w temperaturze 160°C przez 120 minut. Pomiar wykonano po 15 minutach od ogrzewania próbki, a stosowana moc mikrofalowa wynosiła 2,2 mW. **B** – indukcja pola magnetycznego wytwarzanego przez elektromagnes.

Fig. 5. EPR spectrum of drotaverine thermally sterilized at 160°C for 120 minutes. Measurement was performed 15 minutes after heating of sample and applied microwave power was 2.2 mW. **B** – induction of magnetic field generated by electromagnet.

Stwierdzono, że parametry widm EPR drotaweryny zależą od czasu przechowywania leku po sterylizacji termicznej. Wpływ czasu przechowywania leku na amplitudę (A), szerokość (ΔB_{pp}) i intensywność integralną (I) linii EPR ilustruje rycina 6, ujmująca wartości wymienionych parametrów widm EPR dla pomiarów wykonanych w dniu sterylizacji termicznej drotaweryny oraz 7, 14 i 30 dni po tym procesie.

Najmniejszą amplitudę linii EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie zaobserwowano po przechowywaniu próbki przez 14 i 30 dni, a największą w dniu sterylizacji, po 15 min od ogrzewania leku (ryc. 6a). Najmniejsza szerokość linii EPR charakteryzuje widmo drotaweryny po 15 min od sterylizacji termicznej,

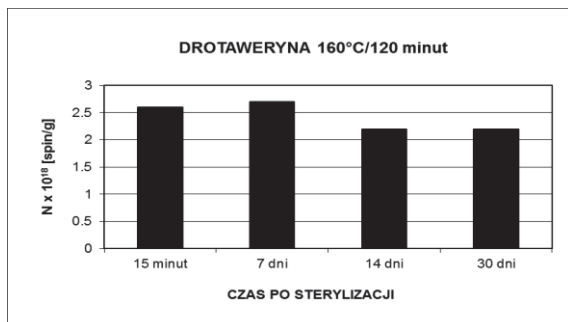
a największa po 7 dniach od ogrzewania (ryc. 6b). Wszystkie linie EPR drotaweryny, niezależnie od czasu przechowywania leku, są szerokie, co wskazuje na silne oddziaływania dipolowe w próbce. Najmniejsza intensywność integralna linii EPR drotaweryny jest obserwowana po przechowywaniu sterylizowanej próbki przez 14 i 30 dni, a największa po 7 dniach od ogrzewania leku (ryc. 6c).

**a****b****c**

Ryc. 6. Wpływ czasu przechowywania leku na: a – amplitudę (A), b – szerokość (ΔB_{pp}) oraz c – intensywność integralną (I) linii EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie. Dane dla widm EPR zarejestrowanych przy mocy mikrofalowej 2,2 mW.

Fig. 6. Influence of drug storage time on: a – amplitude (A), b – line width (ΔB_{pp}) and c – integral intensity (I) EPR line of thermally sterilized drotaverine. Data for EPR spectra recorded at microwave power of 2.2 mW.

Zmiany koncentracji (N) wolnych rodników z czasem przechowywania drotaweryny po sterylizacji termicznej ilustruje rycina 7. Koncentracja wolnych rodników w drotawerynie osiąga największą wartość po 7 dniach od sterylizacji termicznej, a najmniejszą po 14 i 30 dniach od wyjąłowania w suchym gorącym powietrzu.



Ryc. 7. Wpływ czasu przechowywania leku na koncentrację wolnych rodników (N) w drotawerynie sterylizowanej termicznie.
Fig. 7. Effect of drug storage time on concentration of free radicals (N) in thermally sterilized drotaverine.

Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę i szerokość linii EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie

Parametry linii EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie zmieniają się ze wzrostem mocy mikrofalowej użytej do pomiaru widm. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) i szerokość (ΔB_{pp}) linii EPR drotaweryny prezentuje rycina 8, wyniki dotyczą pomiarów wykonanych w dniu sterylizacji w zakresie mocy mikrofalowych 2,2–70 mW.

Amplituda (A) linii EPR drotaweryny ogrzanej w temp. 160°C przez 120 min rośnie ze wzrostem mocy mikrofalowej, osiąga wartość maksymalną i następnie maleje (ryc. 8a). Nasycenie mikrofalowe linii EPR drotaweryny występuje przy niskich mocach mikrofalowych, więc w testowanym leku zachodzą wolne procesy relaksacji spin-sieć. Zmiany amplitudy linii EPR drotaweryny wraz ze stosowaną mocą mikrofalową są charakterystyczne dla linii poszerzonych jednorodnie.

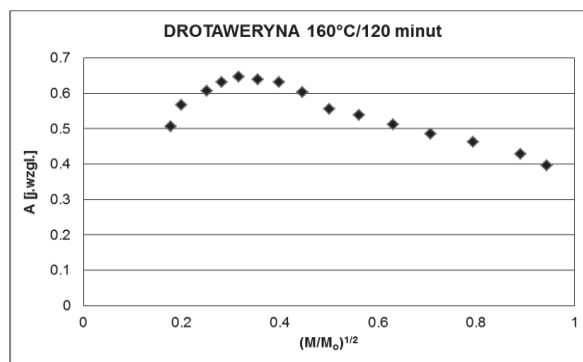
Szerokość (ΔB_{pp}) linii EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie w temp. 160°C przez 120 min rośnie ze wzrostem mocy mikrofalowej (ryc. 8b). Zmiany szerokości linii EPR są nie duże – rzędu kilku setnych mT. Zależność ta jest typowa dla linii poszerzonych jednorodnie.

Wpływ mocy mikrofalowej na kształt widm EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie

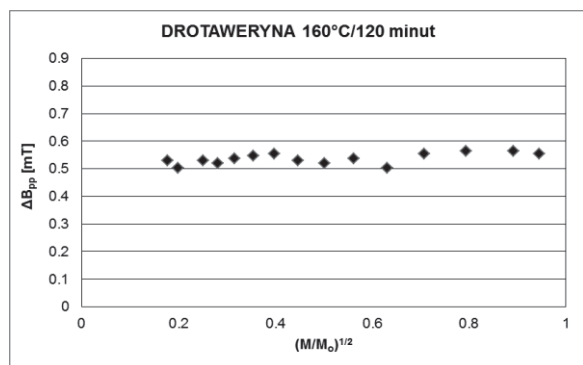
Wykazano, że kształt widm EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie zależy od mocy mikrofalowej

stosowanej podczas pomiaru sygnałów. Wszystkie testowane parametry asymetrii linii EPR drotaweryny (A_1-A_2 , A_1/A_2 , B_1-B_2 , B_1/B_2) zależą od mocy mikrofalowej. Zmiany analizowanych parametrów asymetrii widm EPR drotaweryny wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej ilustrują ryciny 9 i 10.

Parametr asymetrii A_1-A_2 (ryc. 9a) oraz A_1/A_2 (ryc. 9b) wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej wykazuje tendencję spadkową (ryc. 9a). Parametr B_1-B_2 wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej zmienia się nieregularnie, bez wyraźnej tendencji przyrostu lub spadku, jednak brak jego stałej wartości jest wyraźnie widoczny (ryc. 10a). Parametr B_1/B_2 w miarę wzrostu mocy mikrofalowej wykazuje nieco słabsze zmiany (ryc. 10b). Zmiana parametrów asymetrii linii EPR drotaweryny wskazuje na występowanie w ogrzonym leku kilku rodzajów wolnych rodników.

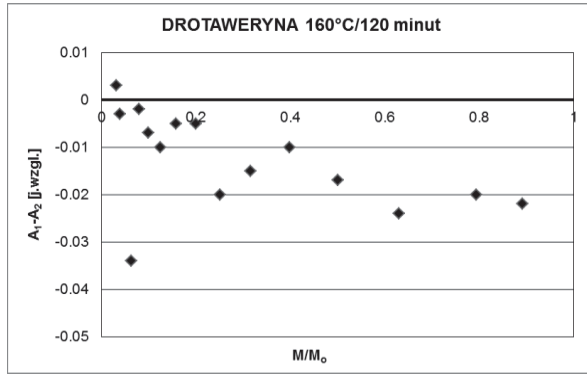


a

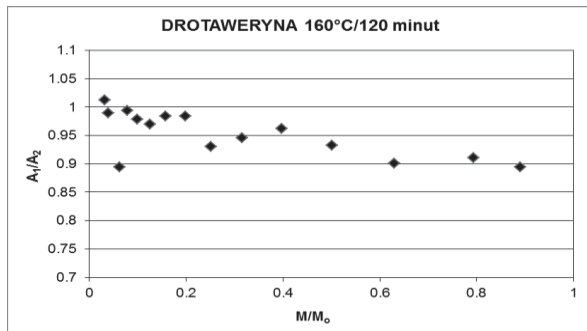


b

Ryc. 8. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na: a – amplitudę (A), b – szerokość (ΔB_{pp}) linii EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR, M_0 – maksymalna moc mikrofalowa (70 mW).
Fig. 8. Effect of microwave power (M/M_0) on: a – amplitude (A) and b – EPR line width (ΔB_{pp}) of thermally sterilized drotaverine. M – microwave power used during measurement of EPR spectra, M_0 – maximum microwave power (70 mW).



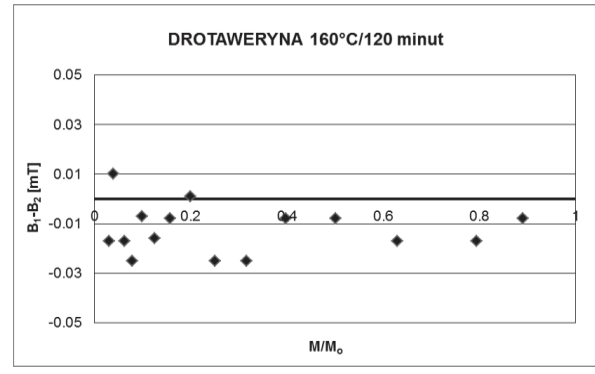
a



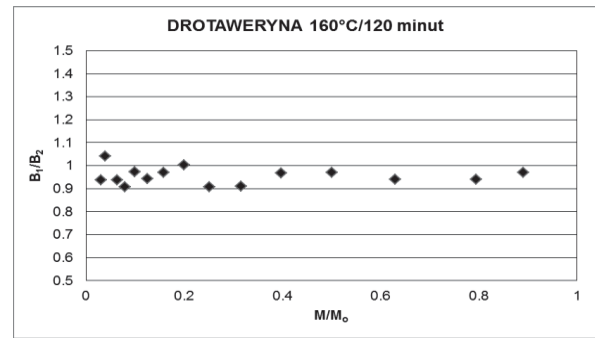
b

Ryc. 9. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na parametry: a – A_1-A_2 oraz b – A_1/A_2 linii EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR, M_0 – maksymalna moc mikrofalowa (70 mW).

Fig. 9. Effect of microwave power (M/M_0) on parameter: a – A_1-A_2 and b – A_1/A_2 in EPR line of thermally sterilized drotaverine. M – microwave power used during measurement of EPR spectra, M_0 – maximum microwave power (70 mW).



a



b

Ryc. 10. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na parametry: a – B_1-B_2 oraz b – B_1/B_2 linii EPR drotaweryny sterylizowanej termicznie. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR, M_0 – maksymalna moc mikrofalowa (70 mW).

Fig. 10. Effect of microwave power (M/M_0) in the parameter: a – B_1-B_2 and b – B_1/B_2 in EPR line of thermally sterilized drotaverine. M – microwave power used during measurement of EPR spectra, M_0 – maximum microwave power (70 mW).

DYSKUSJA

Badania drotaweryny z wykorzystaniem spektroskopii EPR wykazały, że działanie na diamagnetyczny lek suchym gorącym powietrzem o temp. 160°C przez 120 min powoduje zrywanie wiązań chemicznych oraz powstawanie wolnych rodników, co nadaje próbce właściwości paramagnetyczne. Dla leku wyjściowego przed sterylizacją termiczną nie obserwowano sygnałów EPR, natomiast dla leku poddanego obróbce termicznej pojawiały się linie EPR w wyniku absorpcji promieniowania mikrofalowego przez niesparowane elektrony umieszczone w polu magnetycznym elektromagnesu spektrometru.

W niniejszej pracy po raz pierwszy przedstawiono właściwości wolnych rodników w drotawerynie ogrzewanej termicznie.

Ogrzewana drotaweryna dawała silne sygnały EPR w polu magnetycznym oraz przy częstotliwości promieniowania mikrofalowego z pasma X (9,3 GHz) o wartościach charakterystycznych dla wolnych rodników o typowym współczynniku rozszczepienia spektroskopowego g bliskim 2,00 (ryc. 5). Niesparo-

wane elektrony w wolnych rodnikach drotaweryny są zlokalizowane na atomach węgla lub tlenu. Wolne rodniki przy pomiarach spektroskopowych w paśmie X dają linie EPR w polu magnetycznym o indukcji magnetycznej 335 mT [11,12,13,14,15]. Nie stwierdzono w drotawerynie obecności innych centrów paramagnetycznych niż wolne rodniki. Badania spektroskopowe nie wykazały absorpcji mikrofal w polach magnetycznych o wartościach poza zakresem wolnorodnikowym.

Ogrzewanie drotaweryny w temp. 160°C powoduje powstanie różnych rodzajów wolnych rodników w leku w wyniku termolizy. Badania wpływu mocy mikrofalowej na kształt widm EPR wykazały, że układ wolnych rodników sterylizowanej termicznie drotaweryny jest złożony, co jest wynikiem zrywania różnych wiązań chemicznych w strukturze leku pod wpływem wysokiej temperatury.

Widmo EPR drotaweryny jest superpozycją linii EPR poszczególnych wolnych rodników występujących w próbce leku. Zmiana mocy mikrofalowej powoduje odmienne zmiany parametrów poszczególnych linii EPR pochodzących od różnych rodzajów wolnych rodników, a to odpowiada za zmiany asymetrii widma

drotaweryny towarzyszące wzrostowi mocy mikrofalowej (ryc. 9 i 10).

Złożone układy wolnorodnikowe znaleziono także w innych lekach sterylizowanych metodami termiczną [16,17,18,19,20,21,22,23,24] i radiacyjną [25]. W innych pracach [16,17,18,19,20,21,22,23,24] przedstawiono też analizę parametrów kształtu A_1-A_2 , A_1/A_2 , B_1-B_2 oraz B_1/B_2 zmiany mocy mikrofalowej. Wilczyński [25] zastosował analizy numeryczne kształtu widm EPR za pomocą funkcji teoretycznych o kształcie Gaussa i Lorentza.

Złożone widmo EPR zmienia kształt z mocą mikrofalową, ponieważ niesparowane elektrony należące do różnych rodzajów wolnych rodników oddają zaabsorbowaną energię promieniowania mikrofalowego do sieci molekularnej leku w innym czasie. Niesparowane elektrony o szybkich procesach relaksacji spin-sieć oddają energię w krótszym czasie niż elektrony o wolnych procesach relaksacji spin-sieć [16,17,18].

Złożone układy wolnorodnikowe i asymetryczne widma EPR stwierdzono wcześniej dla antybiotyków aminoglikozydowych i β -laktamowych, sterylizowanych w suchym gorącym powietrzu w temp. 160, 170 i 180°C [16]. Poszczególne leki różniły się kształtem widm EPR, wartościami parametrów asymetrii oraz ich zmianami w miarę wzrostu mocy mikrofalowej. Asymetryczne widma EPR przejawiały także leki glikortykosteroidowe [17] oraz niektóre leki stosowane w dermatologii [18] po sterylizacji termicznej również w temp. 160, 170 i 180°C.

Stosując ciągle wysycanie mikrofalowe linii EPR wykazano, że wolne rodniki w drotawerynie sterylizowanej termicznie są rozmieszczone jednorodnie. Amplituda (ryc. 8a) oraz szerokość (ΔB_{pp} , ryc. 8b) linii EPR drotaweryny z mocą mikrofalową zmieniają się typowo dla jednorodnego rozmieszczenia wolnych rodników w próbce. Jednorodne rozmieszczenie wolnych rodników w drotawerynie wskazuje na to, że powstawały one podczas ogrzewania w całej objętości próbki, a więc warunki sterylizacji leku były prawidłowe i gorące powietrze oddziaływało na całą próbkę. Należy w tym miejscu podkreślić, iż spektroskopii EPR może być użyta do oceny prawidłowego przebiegu procesu sterylizacji.

Linie EPR wolnych rodników drotaweryny sterylizowanej termicznie nasycają się przy niskich mocach mikrofalowych (ryc. 8a), co wskazuje na wolne procesy relaksacji spin-sieć w leku. Wolne oddawanie zaabsorbowanej energii mikrofalowej przez niesparowane elektrony wolnych rodników do sieci w drotawerynie powoduje spadek amplitudy linii EPR przy zwiększającej się mocy mikrofalowej w badanym zakresie mocy 2,2–70 mW [11,12,15].

Sterylizacja termiczna testowanego leku suchym gorącym powietrzem w temp. 160°C przez 120 min powo-

duje generowanie wolnych rodników, a ich koncentracja jest wysoka, sięgając 10^{18} spin/g (ryc. 7).

Ważnym wnioskiem wynikającym z przeprowadzonych badań spektroskopowych jest więc stwierdzenie, że sterylizacja termiczna w tych warunkach nie powinna być prowadzona dla drotaweryny. Można zaproponować np. sterylizację radiacyjną z wykorzystaniem przenikliwego promieniowaniem gamma. Ogrzanie drotaweryny w temp. 160°C niszczy w niej drobnostrój, powoduje jednak zmiany strukturalne, które mogą zmniejszyć skuteczność leku i wywołać efekty toksyczne w organizmie. Można więc zaproponować dodatkowe badania spektroskopowe leków sterylizowanych metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego, aby uniknąć defektów w ich strukturze chemicznej wywołanych w procesie sterylizacji.

Wykazano, że widma EPR zmieniają parametry w miarę upływu czasu przechowywania drotaweryny po sterylizacji termicznej (ryc. 6), co wskazuje na ewolucję w jej układzie wolnorodnikowym. Podczas przechowywania leku po ogrzaniu w suchym gorącym powietrzu koncentracja wolnych rodników maleje (ryc. 7), mimo to nie można proponować stosowania sterylizowanej termicznie drotaweryny po dłuższym czasie przechowywania, gdy koncentracja wolnych rodników spadnie znacząco, gdyż zmiany wolnorodnikowe oznaczają zmiany struktury chemicznej leku. Lek taki może negatywnie oddziaływać na organizm podczas terapii.

Zmiany parametrów widm EPR (ryc. 6) oraz koncentracji wolnych rodników w drotawerynie w miarę upływu czasu po sterylizacji termicznej (ryc. 7) są prawdopodobnie skutkiem oddziaływania leku z tlenem znajdującym się w otoczeniu próbki. Są one możliwe na drodze reakcji chemicznych lub oddziaływań fizycznych, polegających na tworzeniu kompleksów quasi-chemicznych między niesparowanym elektronem wolnego rodnika leku a niesparowanym elektronem molekuly tlenu [15]. Kompleksy te nie są trwałe. Zmiany chemiczne w leku powodują trwałe modyfikacje jego struktury. Oddziaływania wolnych rodników substancji leczniczych z tlenem obserwowano metodą EPR także w przypadku innych leków sterylizowanych termicznie [16] i radiacyjnie [25]. Oddziaływania te powodowały zmiany amplitudy, szerokości i intensywności integralnej linii EPR.

Można stwierdzić, że przeprowadzone w niniejszej pracy badania dostarczyły informacji na temat generowania wolnych rodników w drotawerynie oraz poszerzyły wiedzę o wpływie procesu sterylizacji na defekty paramagnetyczne w lekach. Uzyskane rezultaty mają też istotny aspekt praktyczny, ponieważ potwierdzono, że spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego jest przydatna w testowaniu warunków sterylizacji termicznej leków.

WNIOSKI

1. Drotaweryna poddana działaniu suchego gorącego powietrza w temp. 160°C w czasie 120 min zawiera wolne rodniki ($\sim 10^{18}$ spin/g) i wykazuje szerokie widma EPR charakterystyczne dla silnych oddziaływań dipolowych w próbce oraz niewielkich odległości między wolnymi rodnikami.
2. Parametry widma EPR i koncentracja wolnych rodników w sterylizowanej termicznie drotawerynie zmieniają się podczas przechowywania leku,

co jest prawdopodobnie skutkiem oddziaływania próbki z tlenem.

3. Zmiany parametrów widm EPR drotaweryny towarzyszące wzrostowi mocy mikrofalowej są charakterystyczne dla jednorodnego rozmieszczonej wolnych rodników w próbce oraz wolnych procesów relaksacji spin-sieć.
4. Kształt i parametry asymetrii widm EPR testowanego leku zależą od mocy mikrofalowej, co dowodzi złożoności układu wolnych rodników w próbce.
5. Potwierdzono przydatność spektroskopii EPR w badaniu substancji leczniczych sterylizowanych termicznie.

Podziękowania

Badania wolnych rodników w drotawerynie metodą EPR były finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach w ramach badań własnych i statutowych (umowy KNW-1-002/P/2/0 oraz KNW-1-137/K/3/0).

PIŚMIENNICTWO

1. Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji. Red. S. Janicki, A. Fiebig, M. Szmitowska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2006.
2. Podstawy mikrobiologii lekarskiej. Podręcznik dla studentów. Red. L. Jabłoński. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1986.
3. Woźniak-Parnowska W. Mikrobiologia farmaceutyczna. Problemy produkcji i kontroli leków. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998.
4. PN-EN 556. Sterylizacja wyrobów medycznych. Wymagania wyrobów medycznych określanych jako sterylne.
5. Farmakopea polska, wydanie IX. PTFarm, Warszawa 2011.
6. Farmakopea polska, wydanie VIII. PTFarm, Warszawa 2009.
7. Rozancew E.G., Sholle W.D. Chemia organiczna wolnych rodników. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1985.
8. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
9. Józwiak Z., Bartosz G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
10. Biofizyka. Podręcznik dla studentów. Red. F. Jaroszyk. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
11. Stankowski J. Radiospektroskopia ciała stałego. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1975.
12. Stankowski J., Hilczer W. Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
13. Kęcki Z. Podstawy spektroskopii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
14. Kirmse R., Stach J. Spektroskopia EPR. Zastosowania w chemii. Uniwersytet Jagielloński, Kraków 1994.
15. Wertz J.E., Bolton J.R. Electron Spin Resonance Theory and practical Applications. New York, London 1986.
16. Ramos P. Wolne rodniki w wybranych antybiotykach aminoglikozydowych i β -laktamowych sterylizowanych termicznie. Praca doktorska. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice 2009.
17. Kościelniak-Ziemniak M. Wolne rodniki w wybranych lekach glikortykosteroidowych sterylizowanych termicznie. Praca doktorska. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice 2010.
18. Czyżyk D. Wpływ sterylizacji termicznej na właściwości wolnorodnikowe substancji czynnych kosmetyków i leków. Praca doktorska. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice 2012.
19. Skowrońska A., Wojciechowski M., Ramos P., Pilawa B., Kruk D. EPR studies of Paramagnetic Centers in Pharmaceutical Materials – Cefalor and clarithromycin as an example. Acta Phys. Polon A 2012; 121: 514–517.
20. Kościelniak-Ziemniak M., Pilawa B. Application of EPR spectroscopy for examination of free radical formation in thermally sterilized betamethasone, clobetasol, and dexamethasone. Appl. Magnet Reson. 2012; 42: 519–530.
21. Ramos P., Pilawa B. Wpływ temperatury i czasu sterylizacji na generowanie wolnych rodników w diazotanie izosorbitolu. Farm. Przegł. Nauk. 2009; 7(5): 28–33.
22. Ramos P., Pilawa B. The EPR examination of free radicals formation in thermally sterilized β -lactam antibiotics. Curr. Top. Biophys. 2010; 33(suppl. A): 183–187.
23. Ramos P., Pilawa B., Wilczyński S., Czyż K., Adameczyk J. Wpływ ogrzewania w temperaturze 180°C na paramagnetyczne właściwości diklofenaku – badania EPR. Inz. Biomater. 2009; 12(87): 7–12.
24. Zdybel M., Pilawa B., Kościelniak-Ziemniak M., Czyżyk D., Adameczyk J. Application of EPR spectroscopy to examination of free radicals in thermally sterilized chlortalidone. Farm. Przegł. Nauk. 2009; 7(2): 21–25.
25. Wilczyński S. Właściwości wolnych rodników w wybranych gamma napromieniowanych antybiotykach. Praca doktorska. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice 2008.
26. Wilczyński S., Pilawa B., Koprowski R. i wsp. EPR studies of free radicals decay and survival in gamma irradiated aminoglycoside antibiotics: sisomicin, tobramycin and paromomycin. Eur. J. Pharm. Sci. 2012; 24: 254–261.
27. Wilczyński S., Ramos P., Pilawa B., Ptaszkiewicz M., Swakoń J., Olko P. Porównanie właściwości wolnych rodników w streptomycynie sterylizowanej radiacyjnie i termicznie. Inz. Biomater. 2009; 89–91: 171–173.
28. Kurzeja E., Stec M., Ramos P., Pilawa B., Pawłowska-Góral K. The influence of sterilization on free-radical generation, discoloration and the antioxidant properties of certain spice herbs. Ital. J. Food Sci. 2012; 24: 254–261.
29. Beberok A., Buszman E., Zdybel M., Pilawa B., Wrześniok D. EPR examination of free radical properties of DOPA-melanin complexes with ciprofloxacin, lomefloxacin, norfloxacin and sparfloxacin. Chem. Phys. Lett 2010; 497: 115–122.
30. Najder-Kozdrowska L., Pilawa B., Buszman E. i wsp. Triplet states in DOPA-melanin and in its complexes with kanamycin and copper Cu(II) ions. Acta Phys. Polon. A 2010; 118: 613–618.
31. Najder-Kozdrowska L., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., Więckowski A.B. Electron paramagnetic resonance (EPR) study of DOPA-melanin complexes with kanamycin and copper(II) ions. Spectroscopy 2011; 25(3/4): 197–205.
32. Buszman E., Pilawa B., Zdybel M., Wrześniok D., Grzegorzczak A., Wilczok T. Paramagnetic center in DOPA-melanin-dihydrostreptomycin complexes. Acta Phys. Polon A 2005; 108: 353–356.
33. Chodurek E., Zdybel M., Pilawa B., Dzierżewicz Z. Examination by EPR spectroscopy of free radicals in melanins isolated from A-375 cells exposed on valproic acid and cisplatin. Acta Pol. Pharm. Drug. Res. 2012; 69: 1334–1341.
34. Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., Krzyminiwski R., Kruczyński Z. EPR studies of DOPA-melanin complexes with netilmicin and Cu(II) at temperatures in the range of 105–300 K. Appl. Magnet Reson. 2012; 43: 341–351.
35. Matuszczyk M., Buszman E., Pilawa B., Witoszyńska T., Wilczok T. Cd²⁺ effect on free radicals in *Cladosporium cladosporioides* – melanin tested by EPR spectroscopy. Chem. Phys. Lett. 2004; 394: 366–371.
36. Rzepecka-Stojko A., Pilawa B., Ramos P., Stojko J. Antioxidative properties of bee pollen extracts examined by EPR spectroscopy. J. Apic. Sci. 2012; 56: 23–31.
37. Chemia leków. Podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów. Red. A. Zejc, M. Gorczyca. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
38. Farmakodynamika. Podręcznik dla studentów farmacji. Red. W. Janiec, J. Krupińska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.
39. Kostowski W., Herman Z. Farmakologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
40. Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A. Leki współczesnej terapii. Medical Tribune, Warszawa 2010.
41. Pharmindex. Kompendium leków. UBM Medica, Warszawa 2013.