

# PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI WOLNYCH RODNIKÓW W STREPTOMYCYNIE STERYLIZOWANEJ RADIACYJNIE I TERMICZNIE

SŁAWOMIR WILCZYŃSKI<sup>1\*</sup>, PAWEŁ RAMOS<sup>1</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>,  
MARTA PTASZKIEWICZ<sup>2</sup>, JAN SWAKOŃ<sup>2</sup>, PAWEŁ OLKO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY,  
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC

<sup>2</sup>ZAKŁAD FIZYKI RADIACYJNEJ I DOZYMETRII,  
INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ PAN,  
RADZIKOWSKIEGO 152, 31-342 KRAKÓW

\*MAILTO: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

## Streszczenie

*Sterylność substancji leczniczej jest niezwykle istotną z punktu widzenia bezpieczeństwa farmakoterapii. Sterylizacja leków może powodować powstawanie wolnych rodników. Porównano właściwości wolnych rodników powstających pod wpływem promieniowania termicznego (180°C/30 minut) i promieniowania gamma (25kGy) w streptomycynie. Badania przeprowadzono przy użyciu techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR na pasmo X. Zarówno dla próbek sterylizowanych termicznie jak i radiacyjnie zarejestrowano szerokie linie EPR. Obydwie metody sterylizacji prowadzą do powstania wysokich koncentracji wolnych rodników ( $10^{16}$ – $10^{18}$  spin/g). Porównanie parametrów linii EPR dla sterylizacji termicznej i radiacyjnej wskazuje na podobne właściwości wolnych rodników w sterylizowanej próbce – niesparowane elektrony zlokalizowane na atomie tlenu. Więcej wolnych rodników, w przypadku zastosowanych parametrów sterylizacji, powstaje w próbkach sterylizowanych radiacyjnie.*

**Słowa kluczowe:** wolne rodniki, sterylizacja termiczna, sterylizacja radiacyjna, streptomycyna, EPR  
[*Inżynieria Biomateriałów, 89-91, (2009), 171-173*]

## Wstęp

W nowoczesnej medycynie opracowano i rozwinięto szereg metod sterylizacji substancji leczniczych, między innymi: wyżarzanie, spalanie, sterylizacja suchym gorącym powietrzem, sterylizacja nasyconą parą wodną, sterylizacja przez sączenie, sterylizacja promieniowaniem (m.in. jonizującym, UV), sterylizacja gazami (m.in. tlenkiem etylenu, formaldehydem) oraz sterylizacja roztworami środków chemicznych [1-5]. Wszystkie te metody mogą prowadzić do powstawania wolnych rodników w sterylizowanym materiale. Powstające wolne rodniki mogą powodować efekty toksyczne w organizmie pacjenta podczas farmakoterapii. W związku z powyższym idealnym warunkom sterylizacji powinna towarzyszyć jak najmniejsza koncentracja wolnych rodników w sterylizowanej substancji.

## Materiały i metody

Porównano właściwości wolnych rodników powstających w streptomycynie pod wpływem sterylizacji termicznej i radiacyjnej. Streptomycyna jest antybiotykiem aminoglikozy-

# COMPARISON OF FREE RADICALS PROPERTIES IN RADIOSTERILISED AND THERMAL STERILIZED STREPTOMYCIN

SŁAWOMIR WILCZYŃSKI<sup>1\*</sup>, PAWEŁ RAMOS<sup>1</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>,  
MARTA PTASZKIEWICZ<sup>2</sup>, JAN SWAKOŃ<sup>2</sup>, PAWEŁ OLKO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, SCHOOL OF PHARMACY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF RADIATION PHYSICS AND DOSIMETRY,  
INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS,  
152 RADZIKOWSKIEGO STR., 31-342 CRACOV, POLAND

\*MAILTO: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

## Abstract

*Sterility of medical substances plays significant role from the point of view of pharmacotherapy safety. Drugs sterilization can cause free radicals forming. It was compared free radicals properties forming in streptomycin under the influence thermal radiation (180°C/30 minutes) and gamma radiation (25kGy). Presented studies were performed by use of X band electron paramagnetic spectrometer. Both for thermal sterilized samples as well as for radiosterilized broad EPR lines were recorded. Both methods of sterilization lead to forming of high concentrations of free radicals ( $10^{16}$ – $10^{18}$  spin/g). Comparing of EPR lines parameters for thermal sterilization and radiosterilization point at similar free radicals properties in the studied samples – unpaired electrons located on oxygen atoms. More free radicals, in case of used sterilization parameters, create in radiosterilized samples.*

**Key words:** free radicals, thermal sterilization, radiosterilization, streptomycin, EPR  
[*Engineering of Biomaterials, 89-91, (2009), 171-173*]

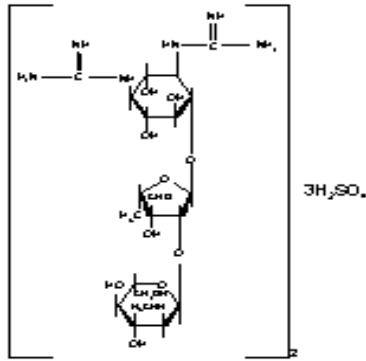
## Introduction

In modern medicine a lot sterilization methods of medicines were devised and developed inter alia: annealing, burning, dry hot air sterilization, saturated steam sterilization, sterile filtration, radiation sterilization (i.a. ionizing radiation, UV), gas sterilization (i.a. ethylene oxide, formaldehyde) and chemical sterilization [1-5]. All this methods can lead to free radicals appearing in sterilized material. These appearing free radicals can cause toxic effects in patients organism during pharmacotherapy. In connection with above mentioned facts, ideal sterilization conditions should be associated with minimal free radicals concentration in sterilized substance.

## Materials and methods

Free radicals creating in streptomycin under the influence of thermal and radiosterilisation were compared. Streptomycin the natural origin aminoglycoside antibiotic. In treatment its sulphate is the most common used. It acts bactericidal and its activity increase with its concentration. The most important application of streptomycin is tuberculosis healing. Chemical structure of streptomycin is presented on FIG.1.

Radiosterilisation was performer by gamma irradiation.



**RYS.1. Struktura chemiczna streptomycyny [8].**

**FIG.1. Chemical structure of streptomycin [8].**

dowym pochodzenia naturalnego. W leczeniu stosuje się najczęściej siarczan streptomycyny. Działa bakteriobójczo, a jej aktywność rośnie wraz ze stężeniem. Najważniejszym zastosowaniem streptomycyny jest leczenie gruźlicy [6,7]. Strukturę chemiczną streptomycyny przedstawiono na RYS.1.

Steryлизację radiacyjną próbki przeprowadzono przez gamma napromie-

niowanie. Próbki zostały napromieniowane przy użyciu aparatu kobaltowego THERATRON 780E zawierającego izotop kobaltu  $^{60}\text{Co}$ . Zgodnie z normą PN-EN 552 [9] dawka promieniowania pochłonięta przez wszystkie badane antybiotyki wynosiła 25kGy. Przed napromieniowaniem próbki poddano tabletkowaniu.

W niniejszej pracy sterylizacja wysokotemperaturowa antybiotyków wykonywana została w temperaturze 180°C oraz w czasie ogrzewania leku wynoszącym 30 minut [10]. Steryлизację sproszkowanej próbki przeprowadzono w suszarce z wymuszoną cyrkulacją suchego powietrza.

Widma EPR rejestrowano w temperaturze pokojowej. Pomiar widm EPR badanych antybiotyków wykonano za pomocą spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego typu SE/X z modulacją pola magnetycznego 100kHz (RADIOPAN, Poznań). Zastosowano promieniowanie mikrofalowe z zakresu pasma X o częstotliwości 9.3GHz. Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem typu MCM 101 (EPRAD, Poznań)

Widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji. Zastosowano promieniowanie mikrofalowe o mocy wynoszącej 2mW. Całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron wynosiła 70mW.

W pracy wyznaczono i analizowano następujące parametry widm EPR (TABELA 1):

- koncentrację wolnych rodników (N),
- szerokość linii ( $\Delta B_{pp}$ ),
- współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g.

## Wyniki

Zarówno promieniowanie jonizujące w zastosowanej dawce jak i energia termiczna powoduje powstawanie wolnych rodników w streptomycynie. W TABELI 1 przedstawiono parametry widm EPR i koncentracje wolnych rodników dla badanych próbek.

W streptomycynie zarówno sterylizowanej termicznie jak i radiacyjnie występuje duża ilość wolnych rodników ( $\sim 10^{16}$ - $10^{18}$ spin/g). Większe koncentracje centrów paramagnetycznych stwierdzono dla próbek sterylizowanych metodą radiacyjną. Duże wartości szerokości linii EPR ( $\Delta B_{pp}$ : 1.00 i 1.86 mT) wskazują na niewielkie odległości pomiędzy wolnymi rodnikami w próbkach. Wyznaczone średnie wartości współczynnika g dla zarejestrowanych widm EPR pozwoliły na dokonanie oceny rodzaju wolnych rodników głównie występujących w badanych próbkach. Współczynnik g wskazuje na lokalizację niesparowanych elektronów (g: 2.0044 i 2.0053) na atomach tlenu.

Próbka Sample	N [spin/g]	$\Delta B_{pp}$ [mT]	g [ $\pm 0.0002$ ]
Streptomycyna sterylizowana radiacyjnie Gamma irradiated streptomycin	$5.1 \cdot 10^{18}$	1.00	2.0053
Streptomycyna sterylizowana termicznie Thermal sterilized streptomycin	$4.0 \cdot 10^{16}$	1.86	2.0044

**TABELA 1. Koncentracja (N) wolnych rodników w sterylizowanym antybiotyku oraz parametry widm EPR: szerokość linii ( $\Delta B_{pp}$ ) i współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g. Dane dotyczą widm EPR rejestrowanych przy mocy mikrofalowej 2mW w dniu napromieniowania próbki.**

**TABLE 1. Free radicals concentration (N) in the sterilized antibiotic and EPR spectra parameters: linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ) and g factor. Presented data are applied for 2mW microwave power in the day of sample irradiation.**

Samples were irradiated in THERATRON 780E containing isotope  $^{60}\text{Co}$ . According to the norm of PN-EN 552 [2] dose of gamma irradiation of 25kGy was used. Before irradiation samples were tableted.

The EPR spectra were recorded at room temperature. The EPR spectra of investigated samples were recorded by electron paramagnetic spectrometer SE/X type with field modulation of 100kHz (RADIOPAN, Poznań). Microwave radiation from X band (9.3GHz) were applied. Frequency of microwave radiation were recorded by use of MCM 101 measurer (EPRAD, Poznań).

EPR spectra were recorded as the second derivative of absorption. Microwave radiation with power attenuation of 2mW were used. The total microwave power produced by klistron was 70mW.

The following parameters of EPR spectra were determined and analyzed (TABLE 1):

- free radicals concentration (N),
- linewidth ( $\Delta B_{pp}$ ),
- g factor.

## Results

Both ionizing radiation at the used dose as well as thermal energy cause free radicals appearing in streptomycin. In the table 1 it was presented EPR spectra parameters and free radicals concentrations.

Both in thermal sterilized streptomycin as well as in radiosterilized streptomycin high amount of free radicals ( $10^{16}$ - $10^{18}$ spin/g) are found. Higher paramagnetic centers concentrations were stated for radiosterilized samples. Broad EPR lines ( $\Delta B_{pp}$ : 1.00 i 1.86 mT) point at short distance between free radicals. Average values of g factors for recorded EPR spectra allow to estimate type of free radicals existing in the studied samples. g factor (g=2.0044 and 2.0053) indicates that unpaired electrons are located on oxygen atoms.

## Wnioski

- Zarówno promieniowanie gamma jak i promieniowanie termiczne powodują powstawanie wolnych rodników ( $\sim 10^{16}$ – $10^{18}$ spin/g) w streptomycynie.
- Silne oddziaływania dipolowe spin-spin poszerzające rejestrowane linie EPR wskazują na niewielkie odległości pomiędzy wolnymi rodnikami w badanych próbkach
- Zarówno sterylizacja termiczna jak i radiacyjna powodują powstawanie podobnych wolnych rodników – z niesparowanym elektronem zlokalizowanym na atomie tlenu o czym świadczy porównywalna wartość współczynnika g.

## Conclusions

- Both gamma radiation as well as thermal radiation cause formation of free radicals ( $10^{16}$ – $10^{18}$ spin/g) in streptomycin.
- Strong dipole spin-spin interactions broadening the EPR lines point at short distance between free radicals in the studied sample.
- Both thermal sterilization as well as radiation sterilization cause formation of similar free radicals – with unpaired electron localized on oxygen atoms what testify to comparable g factor values.

## Piśmiennictwo

- [1] Basly JP, Longy I, Bernard M. ESR identification of radiosterilized pharmaceuticals: latamoxef and ceftriaxone. *Int J Pharm* 1997; 158: 241 – 245.
- [2] Basly JP, Basly I, Bernard M. ESR spectroscopy applied to the study of pharmaceuticals radiosterilization: cefoperazone. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17: 871 – 875.
- [3] Basly JP, Basly I, Bernard M. Influence of radiation treatment on dobutamine. *Int J Pharm* 1998; 170: 265 – 269.
- [4] Gibella M, Crucq AS, Tilquin B, Stocker P, Lesgards G, Raffi J. Electron spin resonance of some irradiated pharmaceuticals. *Radiat Phys Chem* 2000; 58: 69 – 76.
- [5] Varshney L, Dodke PB. Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization. *Radiat Phys Chem* 2004; 71: 1103 – 1111.

## References

- [6] Janiec W, red. Kompendium farmakologii. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2001.
- [7] Dzierzanowska D. Antybiotykoterapia praktyczna. Warszawa: Wydawnictwo α-press; 2000.
- [8] Zejc A, Gorczyca M, red. Chemia leków. Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2002
- [9] PN-EN 552. Sterylizacja wyrobów medycznych. Walidacja i rutynowa kontrola sterylizacji metodą napromieniowania. Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny; 1999.
- [10] Farmakopea polska, wydanie VII. Warszawa 2006.

## PARAMAGNETYZM UPIGMENTOWANYCH GRZYBÓW GLEBOWYCH CLADOSPORIUM HERBARUM

MAGDALENA ZDYBEL<sup>1\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>,  
TERESA WITOSZYŃSKA<sup>2</sup>, BEATA BROTON<sup>1</sup>

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZNY LABORATORYJNEJ:

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI,

UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup>KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII I ANALIZY LEKÓW,

UL. JAGIELLOŃSKA 4, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

\*MAILTO: MZDYBEL@SUM.EDU.PL

### Streszczenie

Zbadano właściwości centrów paramagnetycznych upigmentowanych grzybów glebowych *Cladosporium herbarum* metodą EPR. Stwierdzono stabilny paramagnetyzm *Cladosporium herbarum* wynikający z obecności w próbce głównie eumelaniny. W widmach EPR obserwowano dominującą linię eumelaniny oraz dodatkowo linię feomelaniny o niewielkiej amplitudzie. o-Semichinonowe wolne rodniki ( $\sim 10^{17}$ spin/g) odpowiadają za paramagnetyzm *Cladosporium herbarum*.

**Słowa kluczowe:** paramagnetyzm, wolne rodniki, melanina, *Cladosporium herbarum*, EPR

[*Inżynieria Biomateriałów*, 89-91, (2009), 173-175]

## PARAMAGNETISM OF PIGMENTED SOIL FUNGI CLADOSPORIUM HERBARUM

MAGDALENA ZDYBEL<sup>1\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>,  
TERESA WITOSZYŃSKA<sup>2</sup>, BEATA BROTON<sup>1</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE:

SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY,

4 JAGIELLOŃSKA STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

\*MAILTO: MZDYBEL@SUM.EDU.PL

### Abstract

Properties of paramagnetic centers in pigmented soil fungi *Cladosporium herbarum* were studied by EPR method. Stable paramagnetism of *Cladosporium herbarum*, mainly resulted from existence of eumelanin in the sample, was stated. Dominant line of eumelanin and additionally line of pheomelanin with the low amplitude were observed in EPR spectra. o-Semiquinone free radicals ( $\sim 10^{17}$ spin/g) are mainly responsible for paramagnetism of *Cladosporium herbarum*.

**Keywords:** paramagnetism, free radicals, melanin, *Cladosporium herbarum*, EPR

[*Engineering of Biomaterials*, 89-91, (2009), 173-175]