

WPLÝW OGRZEWANIA W TEMPERATURZE 180°C NA PARAMAGNETYCZNE WŁAŚCIWOŚCI DIKLOFENAKU – BADANIA EPR

PAWEŁ RAMOS, BARBARA PILAWA*, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI,
KATARZYNA CZYŻ, JAKUB ADAMCZYK

KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ,
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,
JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

* E-MAIL: BPILAWA@SUM.EDU.PL

Streszczenie

Przeprowadzono badania wolnych rodników powstających w diklofenaku podczas ogrzewania w temperaturze 180°C. Jako technikę badawczą zastosowano spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Dla wyjściowej próbki diklofenaku nie poddanego obróbce termicznej nie obserwowano widm EPR. Asymetryczne linie EPR rejestrowano natomiast w przypadku ogrzewanego diklofenaku. Zbadano wpływ czasu przechowywania na właściwości i koncentrację wolnych rodników w ogrzewanym diklofenaku. Stwierdzono, że w diklofenaku poddanym obróbce termicznej występuje duża ilość wolnych rodników ($\sim 10^{19}$ spin/g). Koncentracja wolnych rodników w ogrzewanym diklofenaku rośnie podczas przechowywania próbki. Oddziaływanie wolne rodniki – tkanki mogą być odpowiedzialne za efekty toksyczne w organizmie oraz zmiany struktury biomateriałów. Obróbkę termiczną w przypadku diklofenaku należy więc odrzucić jako metodę sterylizacji leku. W pracy opisano wpływ mocy mikrofalowej na kształt, amplitudę i szerokość linii EPR diklofenaku. Metodą ciągłego nasycenia mikrofalowego linii EPR wykazano, że w diklofenaku zachodzą wolne procesy relaksacji spin-sieć.

Słowa kluczowe: diklofenak, centra paramagnetyczne, wolne rodniki, spektroskopia EPR

[Inżynieria Biomateriałów, 87, (2009), 7-12]

Wprowadzenie

Spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) zastosowano do badań centrów paramagnetycznych w diklofenaku poddanym obróbce termicznej. Obróbka termiczna była testowana jako proces sterylizacji diklofenaku. Prawidłowo wykonany proces sterylizacji powinien prowadzić do niszczenia mikroorganizmów w substancji leczniczej [1], ale równocześnie struktura chemiczna leku oraz jego działanie terapeutyczne nie powinno być modyfikowane w tym procesie. Warunki sterylizacji termicznej ściśle określają Normy [2-4]. Spodziewamy się, iż sterylizacja termiczna powoduje generowanie wolnych rodników w lekach. Znanych jest wiele prac opisujących powstawanie wolnych rodników poprzez zrywanie wiązań chemicznych w substancjach organicznych pod wpływem wysokiej temperatury [5-10].

EFFECT OF HEATING AT 180°C ON PARAMAGNETIC PROPERTIES OF DICLOFENAC - EPR STUDIES

PAWEŁ RAMOS, BARBARA PILAWA*, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI,
KATARZYNA CZYŻ, JAKUB ADAMCZYK

DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,
JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

* E-MAIL: BPILAWA@SUM.EDU.PL

Abstract

Electron paramagnetic resonance (EPR) examinations of free radicals formed in diclofenac heated at 180°C were performed. EPR spectrum for the non-heated sample was not obtained. Asymmetrical EPR lines were measured for the studied heated drug. Properties and free radicals concentration in heated diclofenac during storage of the sample were studied. High amount of free radicals ($\sim 10^{19}$ spin/g) characterizes diclofenac after heating of the sample. Free radicals concentration in heated diclofenac increases with increasing storage time of the sample. Free radicals – tissues interactions may be accompanied by toxic effects in organisms and changes of biomaterial's structure, so thermal sterilization is rather rejected as sterilization process for diclofenac. Influence of microwave power on lineshape, amplitudes and linewidth of EPR spectra was described. Continuous microwave saturation of EPR lines points out that slow spin-lattice relaxation processes exist in the heated diclofenac.

Keywords: diclofenac, paramagnetic centers, free radicals, EPR spectroscopy

[Engineering of Biomaterials, 87 (2009), 7-12]

Introduction

Electron spin resonance (EPR) spectroscopy was used for examination of paramagnetic centers in thermally treated diclofenac. Thermal treatment as sterilization process was tested. Sterilization is expected to exterminate microorganisms in drugs [1], but chemical structure and therapeutic value of drugs should not be modified. Conditions of thermal sterilization are determined and described in the Norms [2-4]. It is expected that thermal sterilization produces free radicals in drugs. There are many works about formation of free radicals during rupturing chemical bonds in organic substances at high temperature [5-10]. The aim of this work was to determine the concentration and free radicals properties of thermally treated diclofenac. The hypothesis that sterilization of diclofenac at 180°C is too hard process for its structure was checked. It is not found in the literature information about free radicals in thermally sterilized diclofenac. A few information about EPR studies of heated diclofenac may be found in our earlier work [11]. EPR results for diclofenac were compared to results obtained for the others thermally [11-13] or radiative [14-15] sterilized drugs. Apart from high temperature and gamma rays, some other factors can lead to free radicals generation.

Celem niniejszej pracy jest określenie koncentracji i właściwości wolnych rodników w diklofenaku poddanym obróbce termicznej. Sprawdzono hipotezę głoszącą, że sterylizacja diklofenaku w temperaturze 180°C jest destrukcyjnym procesem dla struktury chemicznej tego leku. W literaturze naukowej nie znaleziono informacji o badaniach metodą EPR wolnych rodników w termicznie sterylizowanym diklofenaku. Wstępne informacje o badaniach ogrzewanego diklofenaku metodą EPR można znaleźć w naszej wcześniejszej pracy [11]. Uzyskane wyniki badań EPR diklofenaku porównano z wynikami uzyskanymi dla innych leków sterylizowanych termicznie [11-13] i radiacyjnie [14-15].

Nie tylko wysoka temperatura i promieniowanie gamma powoduje powstawanie wolnych rodników w lekach. Czynnikiem sprzyjającym generowaniu wolnych rodników jest również promieniowanie UV [16,17]. Miejscowe stosowanie diklofenaku może prowadzić do powstawania fotodermatoz [16]. Zjawisko to jest wynikiem tworzenia się wolnych rodników w diklofenaku pod wpływem promieniowania UV [16]. Jest dobrze udokumentowane, że wolne rodniki i reaktywne formy tlenu biorą udział w reakcji zapalnej [16]. Dlatego zastosowanie antyoksydantów zmiatających wolne rodniki może hamować reakcje zapalne [17]. Stwierdzono również, iż diklofenak może działać neurotoksycznie [18]. Mechanizm działania neurotoksycznego diklofenaku może wynikać z indukcji apoptozy komórek w wyniku stresu oksydacyjnego [18,19]. Właściwości przeciwzapalne diklofenaku mogą być modyfikowane przez kompleksowanie z jonami metali m.in. manganu, kobaltu, niklu [20]. Widma EPR takich kompleksów wykazują charakter słabo rozdzielonej struktury nadsubtelnej [20].

Material i metody

Material

Zbadano diklofenak ogrzewany w wysokiej temperaturze. Struktura chemiczna diklofenaku jest pokazana na RYS. 1 [21]. Diklofenak jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym (NLPZ) należącym do grupy pochodnych kwasu fenylacetowego [21-25]. Jest odwracalnym inhibitorem głównie COX-1 ale hamuje również COX-2. Charakteryzuje się silnym działaniem przeciwbólowym. Słabo natomiast działa przeciwgorączkowo i przeciwagregacyjnie. Diklofenak wpływa również na przyspieszenie wydalania kwasu moczowego z ustroju. Stosowany jest w reumatycznym zapaleniu stawów, w zwyrodnieniu kręgosłupa w osteoartrozie. Działania niepożądane po zastosowaniu diklofenaku są typowe dla NLPZ i są to zaburzenia żołądkowo-jelitowe, toteż przeciwwskazany jest on w czynnej chorobie wrzodowej żołądka [21-25].

Metody

Proces ogrzewania diklofenaku wykonano dla próbki sproszkowanej w temperaturze 180°C w ciągu 30 minut zgodnie z Polskimi Normami [2-3] dotyczącymi procesu sterylizacji wysokotemperaturowej.

Dla próbki diklofenaku wyjściowego oraz ogrzewanego w temperaturze 180°C zarejestrowano widma optyczne za pomocą spektroskopu Firmy OCEAN OPTICS model USB 4000, wyposażonego w filtry OFLV oraz soczewki L4. Do pomiarów użyto światłowodów UV/VIS o średnicy 100 µm produkcji Firmy OCEAN OPTICS. Próbki z roztworami leku umieszczono w kuwetach do pomiarów absorpcji w przedziale 200-2000 nm.

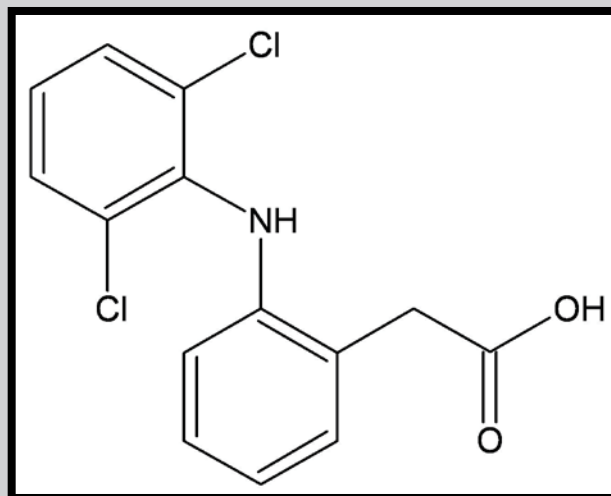
Analizy EPR dla diklofenaku wykonano 0,5 godziny, 2 i 8 dni po sterylizacji. Pomiar EPR wykonano w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem spektrometru Firmy RADIOPAN (Poznań, Poland) z częstotliwością promieniowania mikrofalowego 9,3 GHz (Pasma X).

One of them is UV radiation [16,17]. Local application of diclofenac can effect photosensitization. This phenomenon is caused by free radicals generation during UV rays irradiation [16]. It is well documented that free radicals and reactive oxygen species take part in inflammatory reactions activation [17]. Therefore, antioxidants applying free radicals scavenging inhibits inflammatory reactions [17]. Diclofenac can also cause neurotoxic effects [18]. Diclofenac mechanism of neurotoxicity results from induction of cells apoptosis during oxidative stress [18,19]. Anti-inflammatory properties of diclofenac can be modifying by metal ions (i.e. manganese, cobalt, nickel) complexion [20]. EPR spectra of metal ion – diclofenac present poorly resolvable hyperfine structure [20].

Material and methods

Material

Diclofenac heated at high temperature was analyzed. Chemical structure of diclofenac is shown in FIG. 1 [21]. Diclofenac is non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) which belongs to derivative group of phenylacetic acid. It is reversible inhibitor mainly COX-1 but it brakes also COX-2. It has a strong analgesic action. However, antifebrile and antiaggregaticly it acts slightly. Diclofenac also affects acceleration of expelling uric acid from organism. It is used in rheumatic inflammation of joints, in degeneration of backbone in osteoarthrosis. Overdose symptoms of diclofenac are typical for NSAID. There are stomach-intestine disturbances that's why it is contraindicated in effective peptic ulcer disease [21-25].



RYS. 1. Struktura chemiczna diklofenaku [21].
FIG. 1. Chemical structure of diclofenac [21].

Methods

Heating process of powdered diclofenac sample was done at temperature of 180°C during 30 minutes according to Polish Norms [2-3] for thermal sterilization.

For the original sample of diclofenac and for drug heated at 180°C optical spectra were measured by spectroscope of OCEAN OPTICS Firm model USB 4000 with OFLV filters and L4 lens. Optical UV/VIS fibers with diameter of 100 µm produced by OCEAN OPTICS Firm were used. Solution of the studied samples were placed in cuvettes for absorption measurements in the range of 200-2000 nm.

EPR analysis for diclofenac was done 0.5 hour, 2 and 8 days after sterilization. EPR measurements at room temperature were done by the use of RADIOPAN (Poznań, Poland) spectrometer with microwave frequency 9.3 GHz (X-band).

Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem MCM101 (EPRAD, Luboń-Poznań, Polska). Widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej w zakresie mocy mikrofalowej od 2,2 mW do 70 mW. Dla widm EPR wyznaczono współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g , amplitudę (A), intensywność integralną (I) oraz szerokość linii (ΔB_{pp}). Analizowano następujące parametry kształtu linii: A_1 - A_2 and B_1 - B_2 . Parametry te są zdefiniowane i pokazane dla przykładowego widma EPR diklofenaku na RYS. 2.

Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g obliczono z warunku rezonansu jako [26-28]:

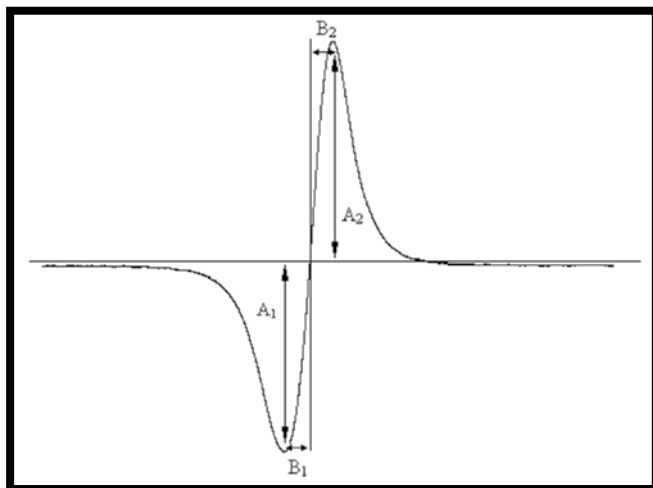
$$g = hv/\mu_B B_r,$$

gdzie: h – stała Plancka, v – częstotliwość mikrofalowa, μ_B – magneton Bohra, B_r – rezonansowa indukcja magnetyczna [26-28].

Koncentrację wolnych rodników (N) wyznaczono jako:

$$N = N_u[(W_s A_u)/I_u]/[I/(W A m)],$$

gdzie: N_u oznacza liczbę centrów paramagnetycznych w ultramarynie, W i W_u są wzmocnieniami dla próbki i ultramariny, A i A_u są amplitudami sygnału rubinu dla próbki i ultramariny, I i I_u są intensywnościami integralnymi dla próbki i ultramariny, m jest masą próbki. Jako wzorce koncentracji wolnych rodników zastosowano ultramarinę i kryształ rubinu.



Wyniki i dyskusja

Stwierdzono, że widma optyczne nie są pomocne w określeniu różnic pomiędzy wyjściową próbką diklofenaku oraz lekiem ogrzewanym w temperaturze 180°C. Do badań ogrzewanego diklofenaku zaproponowano spektroskopię EPR. Nie stwierdzono znaczących różnic w przypadku widm optycznych dla diklofenaku wyjściowego i ogrzewanego w zakresie UV/VIS. W przypadku nieogrzewanymi próbek diklofenaku nie rejestrowano widm EPR. Efekt ten jest zgodny z oczekiwaniami i wskazuje na brak wolnych rodników w wyjściowych próbkach testowanego leku. Pomiar EPR potwierdził, iż niesparowane elektrony nie występują w chemicznej strukturze diklofenaku (RYS. 1) [21]. Podczas ogrzewania diklofenaku w temperaturze 180°C dochodzi do zrywania wiązań chemicznych oraz do pojawienia się wolnych rodników w próbce. Dla leku ogrzewanego w 180°C otrzymano silne widma EPR. Stwierdzono wzrost amplitudy widm EPR diklofenaku ze wzrostem czasu po wykonaniu sterylizacji. Widma EPR diklofenaku charakteryzuje asymetryczny kształt (RYS. 2). Wartości parametrów kształtu linii A_1 - A_2 oraz B_1 - B_2 , które zostały pokazane na RYS. 3 i 4, różnią się od zera. Parametry A_1 - A_2 (RYS. 3) i B_1 - B_2 (RYS. 4) znacznie zależą od mocy mikrofalowej. Obserwowano zmniejszenie wartości tych parametrów wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej.

Microwave frequency was measured by MCM101 recorder (EPRAD, Przeźmierowo-Poznań, Poland). EPR spectra were recorded as first derivative lines in the range of microwave power from 2.2 mW to 70 mW. g -Factor, amplitudes (A), integral intensities (I), and linewidth (ΔB_{pp}) of the spectra were determined. The following shapes parameters were analyzed: A_1 - A_2 and B_1 - B_2 . These parameters are defined and shown for the exemplary EPR spectrum of heated diclofenac in FIG. 2.

g -Factor was calculated from resonance condition as [26-28]:

$$g = hv/\mu_B B_r,$$

where: h – Planck constant, v – microwave frequency, μ_B – Bohr magneton, B_r – resonance magnetic induction [26-28].

Free radical concentration (N) was determined as follow:

$$N = N_u[(W_s A_u)/I_u]/[I/(W A m)],$$

where: N_u is the number of paramagnetic centers in ultramarine, W and W_u are the receiver gains for sample and ultramarine, A and A_u are the amplitudes of ruby signal for the sample and ultramarine, I and I_u are the integral intensities for the sample and ultramarine, and m is the mass of the sample. Ultramarine and a ruby crystal were used as the references during measurements of free radical concentration.

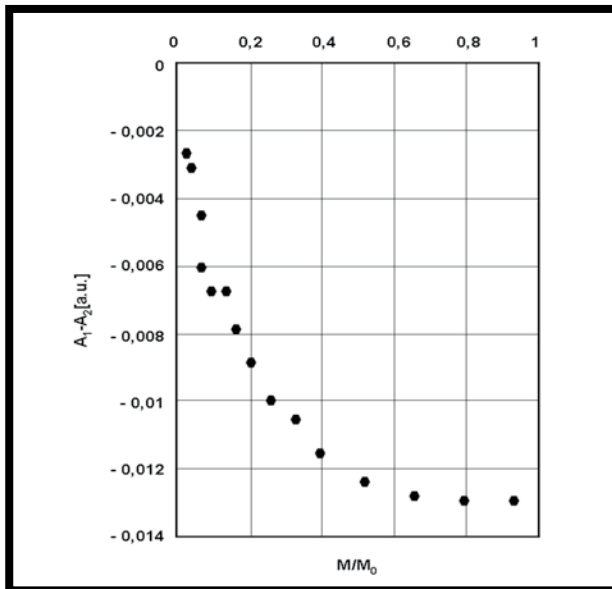
RYS. 2. Widmo EPR diklofenaku zarejestrowane jako pierwsza pochodna absorpcji oraz analizowane parametry widmowe: amplituda (A), szerokość linii (ΔB_{pp}) oraz parametry asymetrii (A_1 , A_2 , B_1 , B_2). Widmo zostało zmierzone przy tłumieniu 15 dB (2,2 mW) w temperaturze pokojowej [1].

FIG. 2. The first-derivative EPR spectrum of diclofenac and the analysed parameters: amplitude (A), linewidth (ΔB_{pp}), and asymmetry parameters (A_1 , A_2 , B_1 , B_2). The spectrum was recorded with attenuation of 15 dB (2.2 mW) at room temperature [1].

Results and discussions

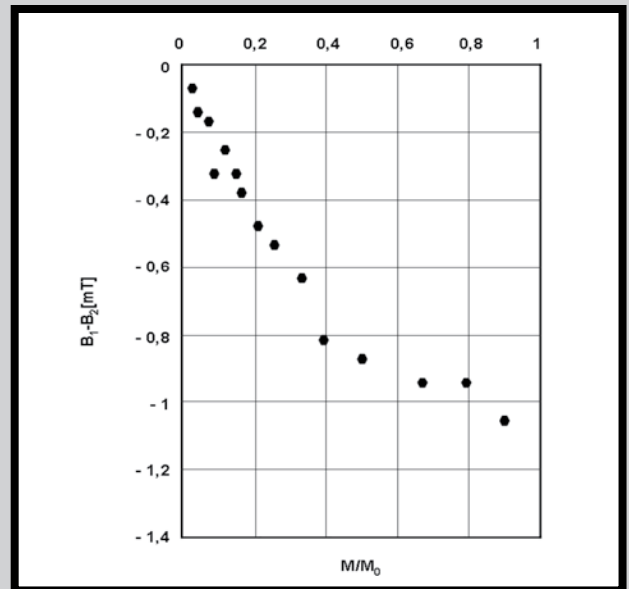
It was stated that optical spectra are not useful to determination of differences between the original diclofenac and the drug heated at 180°C. EPR spectroscopy is proposed to examination of the heated drugs. EPR spectra were not obtained for the original non-heated diclofenac. As it was expected, free radicals do not exist in the original diclofenac sample. Unpaired electrons are not found in its chemical structure (FIG. 1) [21]. During heating of diclofenac at 180°C chemical bonds are ruptured and free radicals appear. Strong EPR spectra appear after heating of this drug at 180°C. Amplitudes of these spectra increase with increasing of time after sterilization. Asymmetrical shape characterizes diclofenac's EPR spectra (FIG. 2). The values of lineshape parameters A_1 - A_2 and B_1 - B_2 differ from zero, as presented in FIG. 3 and 4. Parameters A_1 - A_2 (FIG. 3) and B_1 - B_2 (FIG. 4) strongly changes with microwave power. Decrease of these parameters with increasing of microwave power was observed.

Free radicals concentrations and EPR parameters of heated diclofenac for different storage times are presented in TABLE 1. High values of free radicals concentrations ($\sim 10^{19}$ spin/g) are characteristic for the studied heated samples. The amount of free radicals increases with increasing time of the heated drug storage, so it can be concluded that destruction of molecular structure in diclofenac during storage occurs.



RYS. 3. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na parametr kształtu (A_1-A_2) widma EPR diklofenaku ogrzewanego w temperaturze 180°C . M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma, M_0 – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70 mW).

FIG. 3. Influence of microwave power (M/M_0) on parameter of lineshape (A_1-A_2) of EPR spectrum of diclofenac heated at 180°C . M – microwave power during the measurement of the spectrum, M_0 – total microwave power produced by klystron (70 mW).



RYS. 4. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na parametr kształtu (B_1-B_2) widma EPR diklofenaku ogrzewanego w temperaturze 180°C . M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma, M_0 – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klistron (70 mW).

FIG. 4. Influence of microwave power (M/M_0) on parameter of lineshape (B_1-B_2) of EPR spectrum of diclofenac heated at 180°C . M – microwave power during the measurement of the spectrum, M_0 – total microwave power produced by klystron (70 mW).

Koncentracje wolnych rodników oraz parametry widm EPR diklofenaku dla kilku wybranych różnych czasów przechowywania próbki po obróbce termicznej przedstawiono w TABELI 1. Wysokie wartości koncentracji wolnych rodników ($\sim 10^{19}$ spin/g) są charakterystyczne dla ogrzewanego badanego próbek. Ilość wolnych rodników rośnie wraz ze wzrostem czasu przechowywania ogrzanego leku, co można tłumaczyć destrukcją struktury molekularnej diklofenaku w procesie jego przechowywania.

Dla ogrzewanego diklofenaku niezależnie od czasu przechowywania otrzymano podobne wartości współczynników rozszczepienia spektroskopowego g oraz szerokości linii EPR (TABELA 1). Wartość współczynnika g równa 2,0036 (TABELA 1) oraz chemiczna struktura leku (RYS. 1, [21]) wskazuje na to, że niesparowane elektrony w wolnych rodnikach odpowiedzialne za widma EPR diklofenaku są zlokalizowane głównie na atomach azotu i tlenu. Prawdopodobnie dodatkowo niesparowane elektrony zlokalizowane na atomach węgla występują także w analizowanej próbce. Złożony charakter układu centrów paramagnetycznych ogrzewanego diklofenaku odpowiada za asymetrię jego linii EPR (RYS. 2) oraz za zależność asymetrii kształtu od mocy mikrofalowej (RYS. 3-4).

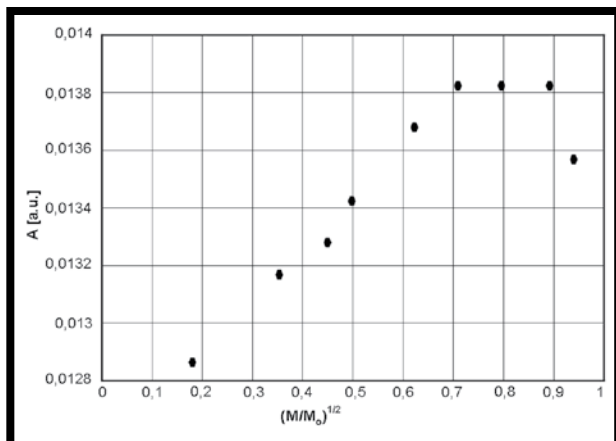
Zmiany amplitudy i szerokości linii EPR diklofenaku podczas ciągłego nasycenia mikrofalowego widm próbki w dniu sterylizacji pokazano na RYS. 5 i 6. Amplituda linii EPR rośnie ze wzrostem mocy mikrofalowej, a po osiągnięciu wartości maksymalnej maleje (RYS. 5). Uzyskano nasycenie mikrofalowe linii EPR dla niskich mocy mikrofalowych (RYS. 5). Obserwowano poszerzenie linii EPR ogrzewanego diklofenaku wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej (RYS. 6). Biorąc pod uwagę korelacje przedstawione na RYS. 5 i 6 oraz teorię nasycenia mikrofalowego można stwierdzić, że widma EPR diklofenaku są poszerzone jednorodnie.

Similar values of g -factor and linewidth are obtained independently on storage time (TABLE 1). g -Value of 2.0036 (TABLE 1) and chemical structure (FIGURE 1, [21]) indicate that unpaired free radicals with unpaired electrons localized on nitrogen or oxygen atoms mainly are responsible for EPR spectra of diclofenac. Probably unpaired electrons localized on carbon atoms also exist in this sample. Complex character of paramagnetic system in heated diclofenac is responsible for asymmetry of its EPR lines (FIG. 2) and dependence of the asymmetry on microwave power (FIG. 3-4).

TABELA 1. Wpływ czasu przechowywania na koncentrację wolnych rodników (N), współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g oraz szerokość linii (ΔB_{pp}) widm EPR diklofenaku ogrzewanego w temperaturze 180°C . W tabeli przedstawiono dane dla widm EPR mierzonych z wykorzystaniem mocy mikrofalowej wynoszącej 2,2 mW.

TABLE 1. Effect of storage time on free radical concentration (N), g -factor, and linewidth (ΔB_{pp}) of EPR spectra of diclofenac heated at 180°C . Data for EPR spectra measured with microwave power of 2.2 mW.

Czas po obróbce termicznej diklofenaku Time after thermal treatment of diclofenac	$N \times 10^{19}$ [spin/g]	g [± 0.0002]	ΔB_{pp} [± 0.02 mT]
0,5 godziny / 0.5 hour	3.2	2.0036	0.80
2 dni / 2 days	5.0	2.0036	0.80
8 dni / 8 days	6.6	2.0036	0.80



RYS. 5. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na amplitudę (A) linii EPR diklofenaku ogrzewanego w temperaturze 180°C. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma, M_0 – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron (70 mW). **FIG. 5.** Influence of microwave power (M/M_0) on amplitude (A) of EPR line of diclofenac heated at 180°C. M – microwave power during the measurement of the spectrum, M_0 – total microwave power produced by klystron (70 mW).

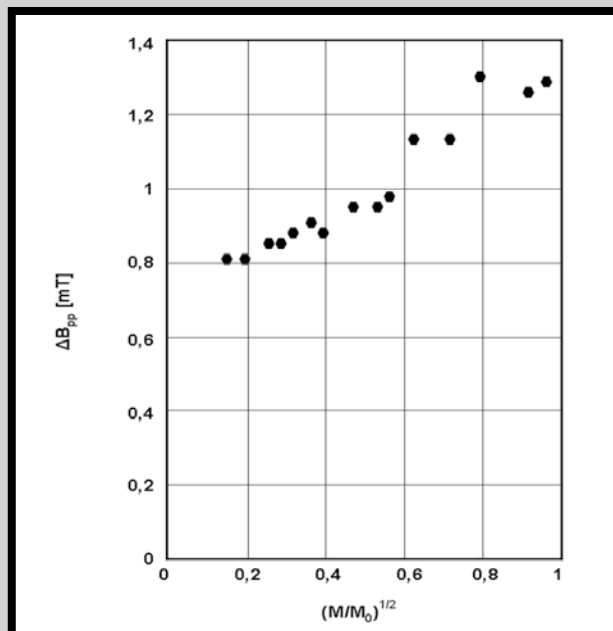
Typowe korelacje pomiędzy parametrami widm EPR i mocą mikrofalową są omówione w pracach [26-28]. Można stwierdzić, że w diklofenaku nie występują izolowane pakiety spinowe [26-28].

Zmiany amplitudy widm EPR diklofenaku wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej (RYS. 5) są typowe dla układu paramagnetycznego, w którym zachodzą wolne procesy relaksacji spin-sieć [26-28]. W przypadku wolnych procesów relaksacji spin-sieć spadek amplitudy linii EPR jest obserwowany dla niskich wartości mocy mikrofalowej [26-28]. W wolno relaksującym układzie występuje inwersja obsadzeń poziomów energetycznych przez niesparowane elektrony. Silne oddziaływania dipolowe [26-28] mogą być odpowiedzialne za linie EPR diklofenaku (ΔB_{pp} : 0,80 mT) (TABELA 1). Podobne efekty obserwowano wcześniej dla innych sterylizowanych leków [12-15].

Przeprowadzone badania spektroskopowe paramagnetyzmu ogrzewanego diklofenaku wskazują na to, że obróbka termiczna diklofenaku w temperaturze 180°C powinna być odrzucona jako metoda sterylizacji tego leku. Wysoka zawartość wolnych rodników oraz powstawanie wolnych rodników podczas przechowywania próbki może być niebezpieczna dla tkanek poddanych terapii oraz może przyczynić się do zmian strukturalnych biomateriałów.

Wnioski

- Badania EPR ogrzewanego diklofenaku wykazały, że:
- 1) Diklofenak ogrzany w temperaturze 180°C charakteryzuje silny paramagnetyzm.
 - 2) Podczas przechowywania próbki w diklofenaku powstają wolne rodniki.
 - 3) Złożony układ centrów paramagnetycznych o asymetrycznych widmach EPR oraz o średniej wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g wynoszącej 2,0036 występuje w diklofenaku.
 - 4) Widma EPR diklofenaku są poszerzone jednorodnie.
 - 5) Wolne procesy spin-sieć oraz silne oddziaływania dipolowe zachodzą w diklofenaku.
 - 6) Proces sterylizacji termicznej nie jest zalecany w przypadku diklofenaku.



RYS. 6. Wpływ mocy mikrofalowej (M/M_0) na szerokość (ΔB_{pp}) linii EPR diklofenaku ogrzewanego w temperaturze 180°C. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma, M_0 – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron (70 mW). **FIG. 6.** Influence of microwave power (M/M_0) on linewidths (ΔB_{pp}) of EPR line of diclofenac heated at 180°C. M – microwave power during the measurement of the spectrum, M_0 – total microwave power produced by klystron (70 mW).

The changes of amplitude and linewidth of EPR diclofenac's spectra during continuous microwave saturation of spectra in the day of sterilization are presented in FIG. 5 and 6. Amplitude of EPR line increases with increasing of microwave power and after reaching the maximal value it decreases (FIG. 5). Saturation at low microwave power was obtained (FIG. 5). Broadening of EPR line of heated diclofenac with increasing of microwave power was observed (FIG. 6). Correlations in FIG. 5-6 and theory of saturation effect indicate that EPR spectra of diclofenac are homogeneously broadened. Typical correlation between parameters of EPR spectra and microwave power are described in [26-28]. As result in paramagnetic diclofenac isolated spin packets do not exist [26-28].

Changes of amplitude of diclofenac's EPR spectra with increasing of microwave power (FIG. 5) are typical for paramagnetic systems with slow spin-lattice relaxation processes [26-28]. For slow spin-lattice relaxation decrease of EPR amplitude at low microwave power appears [26-28]. Inversion of the amount of unpaired electrons on energy levels exist in the relaxing system. Strong dipolar interactions [26-28] may be responsible for broadening of EPR lines of diclofenac (ΔB_{pp} : 0,80 mT) (TABLE 1). Similar effects were observed for the others sterilized drugs [12-15].

The performed spectroscopic studies of paramagnetism of heated diclofenac indicate that thermal treatment at 180°C should be rejected as sterilization method for this drug. High contents of free radicals and their formation during storage of the sample may be dangerous for tissues during therapy. Changes of biomaterial structure by free radicals of diclofenac are expected.

Conclusions

EPR studies of heated diclofenac indicate that:

- 1) Strong paramagnetism characterizes diclofenac heated at 180°C.
- 2) During storage free radicals are formed in diclofenac.
- 3) Complex paramagnetic centers system with asymmetrical EPR spectra and with apparent g value of 2.0036 exist in diclofenac.
- 4) EPR spectra of the diclofenac are homogeneously broadened.
- 5) Slow spin-lattice relaxation processes and strong dipolar interactions characterize diclofenac.
- 6) Thermal sterilization process is not recommended for diclofenac.

Piśmiennictwo

- [1] Farmakopea Polska VI. PTFarm: Warszawa 2005.
- [2] PN-EN 552. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1999.
- [3] PN-EN 552. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2002.
- [4] ISO 11137. International Organization for Standardization, Genewa 2006.
- [5] Stankowski J., Kuczyński W., Kaczmarek W.: Badanie metodą EPR efektu tlenowego w procesie karbonizacji sacharozy. *Fizyka Dielektryków i Radiospektroskopia* 1968, 4, 249-253.
- [6] Pilawa B., Pietrzak R., Wachowska H., Babel K.: EPR studies of carbonized cellulose – oxygen interactions. *Acta Phys. Polon. A* 2005, 108(2), 151-154.
- [7] Krzesińska M., Pilawa B., Pusz S., Ng J.: Physical characteristics of carbon materials derived from pyrolysed vascular plants. *Biomass & Bioenergy* 2006, 30(2), 166-176.
- [8] Pilawa B., Więckowski A. B.: EPR studies of thermally decomposed macerals. *Karbo* 2002, 57(5), 140-142.
- [9] Pilawa B., Bartłomiejczyk S., Krzesińska M., Pusz S., Zachariasz J., Wałach W.: Influence of oxygen O₂ on microwave saturation of EPR lines of plants carbonized at 650°C and potential application in medicine. *Engineering of Biomaterials* 2008, 73, 7-9.
- [10] Bartłomiejczyk S., Pilawa B., Krzesińska M., Pusz S., Zachariasz J., Wałach W.: Comparative EPR analysis of oxygen interactions with plants carbonized at different temperatures. *Engineering of Biomaterials* 2008, 73, 1-3.
- [11] Pilawa B., Ramos P., Wilczyński S., Czyż K.: Free radicals system analysis in thermally sterilized diclofenac. *Engineering of Biomaterials* 2008, XI(81-84), 57-59.
- [12] Kościelniak M., Pilawa B., Wilczyński S.: Application of EPR spectroscopy to examination of thermally sterilized dexamethasone. *Engineering of Biomaterials* 2008, XI(81-84), 55-57.
- [13] Kościelniak M., Wilczyński S., Pilawa B.: Free radicals in thermally sterilized prednisolone. *Engineering of Biomaterials* 2008, XI(81-84), 61-63.
- [14] Wilczyński S., Pilawa B., Ptaszkiwicz M., Swakoń J., Olko P.: Free radicals properties of gamma irradiated solid forms of drugs. *Engineering of Biomaterials* 2008, XI(81-84), 52-55.
- [15] Wilczyński S., Lekki J., Kwiatek W., Chodurek E., Pilawa B.: Formation of paramagnetic center in sterilized gentaminin and neomycin irradiated by protons, *Polish Journal of Environmental Studies* 2006, 15(4A), 216-218.
- [16] Moore D.E.: Mechanisms of photosensitization by phototoxic drugs, *Mutation Research* 1998, 422, 165-173.

References

- [17] Kourounakis P.N., Tsiakitzis K., Kourounakis A.P., Galanakis D.: Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs, *Toxicology* 2000, 144, 205-210.
- [18] Hickey E.J., Raje R.R., Reid V.E., Gross S.M., Ray S.D.: Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress-mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death, *Free Radicals Biology & Medicine* 2001, 31(2), 139-152.
- [19] Inoue A., Muranaka S., Fujita H., Kanno T., Tamai H., Utsumi K.: Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on reactive oxygen species, akt, bid, cytochrome C and caspase pathway, *Free Radicals Biology & Medicine* 2004, 37(8), 1290-1299.
- [20] Kovala-Demertzi D., Hadjikakou S.K., Demertzi M. A., Deligiannakis Y.: Metal ion-drug interactions. Preparation and properties of manganese (II), cobalt (II) and nickel (II) complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity: Behavior in the oxidation of 3,5-di-tetr-butyl-o-catechol, *Journal of Inorganic Biochemistry* 1998, 69, 223-229.
- [21] Mutschler E.: *Farmakologia i toksykologia*, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2004.
- [22] Janiec W. (Ed.): *Kompendium farmakologii*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2005.
- [23] Przybylski P., Kiś J., Burdan F.: Ocena prenatalnej tolerancji diklofenaku. *Polski Merkuriusz Lekarski* 2007, 22, 229-231.
- [24] Chmielewski Z., Józwiak A.: Przewlekłe stosowanie niesterydowego leku przeciwzapalnego. *Geriatra Polska* 2006, 2, 171-174.
- [25] Sarifakioglu E.: Nicolau syndrome after diclofenac injection. *Journal of Academy of Dermatology and Venerrology* 2007, 21(2), 266-267.
- [26] Stankowski J., Hilczer W.: *Pierwszy krok ku spektroskopii rezonansów magnetycznych*, Ośrodek Wydawnictw Naukowych PWN, Poznań, 2006.
- [27] Wertz J. E., Bolton J. R.: *Electron Spin Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*, New York, London, 1986.
- [28] Eaton G. R., Eaton S. S., Salikhov K. M.: *Foundations of modern EPR*, World Scientific, Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, 1998.
- [29] Bartosz G.: *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.