

ANALIZA UKŁADU CENTRÓW PARAMAGNETYCZNYCH W TERMICZNIE STERYLIZOWANYM DIKLOFENAKU

BARBARA PILAWA, PAWEŁ RAMOS, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI, KATARZYNA CZYŻ

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

Wolne rodniki mogą powstawać m.in. w procesie fotolizy, radiolizy, termolizy i sonolizy oraz w wybranych reakcjach chemicznych [1-3]. Termoliza jest procesem polegającym na homolitycznym rozpadzie wiązania kowalencyjnego w cząsteczce w wyniku zaabsorbowanej energii cieplnej [2,3]. Zjawisko takie może zachodzić podczas termicznej sterylizacji leków, a produkty rozpadu cząsteczki, w tym szczególnie niebezpieczne wolne rodniki, mogą zanieczyszczać sterylizowaną substancję leczniczą. Wolne rodniki zawarte w substancji leczniczej mogą powodować w organizmie efekty toksyczne. Nie znane są właściwości wolnych rodników w większości sterylizowanych substancji leczniczych. W niniejszej pracy wykonano analizę układu wolnych rodników w sterylizowanym termicznie diklofenaku.

Diklofenak należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych - NLPZ [4]. Wykazuje silne działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwgorączkowe. Diklofenak wiąże się z dwoma izoformami cyklooksygenazy (COX 1 i COX 2) poprzez co blokują syntezę prozapalnych prostaglandyn z kwasu arachidonowego.

Techniką pozwalającą na ocenę koncentracji wolnych rodników zanieczyszczających termicznie sterylizowane substancje lecznicze jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR. Pomiar EPR wykonano za pomocą spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9.3GHz) produkcji RADIOPAN-Poznań. Zastosowano modulację pola magnetycznego wynoszącą 100kHz. Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem MCM 101 produkcji RADIOPAN-Poznań.

Widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji przy wysokim tłumieniu 15B, aby uniknąć nasycenia mikrofalowego linii. W pracy wykonano badania wolnych rodników w diklofenaku sterylizowanym termicznie. Sterylizację termiczną leku prowadzono w sterylizatorze z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 180°C. Próbkę ogrzewano w czasie 30 minut.

Dla diklofenaku wyjściowego nie poddanego obróbce termicznej nie rejestrowano widm EPR. Oznacza to, że w badanej substancji leczniczej nie występują wolne rodniki. Widma EPR diklofenaku ogrzewanego w temperaturze 180°C charakteryzowała wysoka asymetria. W pracy zbadano zmiany tej asymetrii w zależności od stosowanej mocy mikrofalowej. Zdefiniowano następujące parametry asymetrii poddane analizie: A_1/A_2 , A_1-A_2 , B_1/B_2 , B_1-B_2 . Zasady wyznaczania parametrów asymetrii pokazano na RYSUNKU 1.

FREE RADICALS SYSTEM ANALYSIS IN THERMALLY STERILIZED DICLOFENAC

BARBARA PILAWA, PAWEŁ RAMOS, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI, KATARZYNA CZYŻ

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

Free radicals can be generated in photolysis, radiolysis, thermolysis and sonolysis processes and during some chemical reactions [1-3]. Thermolysis is defined as homolytic dissociation of covalent bond as result of thermal energy absorption [2,3]. This phenomenon can proceed during thermal drug sterilization, and degradation products, especially dangerous free radicals, can decontaminate of medicinal substance. Free radicals in medicinal substance can cause toxic effects in human body. Properties of free radicals in the most of sterilized medicinal substances are unknown. In the present study free radicals system of thermally sterilized diclofenac was performed.

Diclofenac belongs to non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) [4]. Diclofenac has analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities. Diclofenac binds to and chelates both isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2), thereby blocking the conversion of arachidonic acid (AA) to pro-inflammatory prostaglandins.

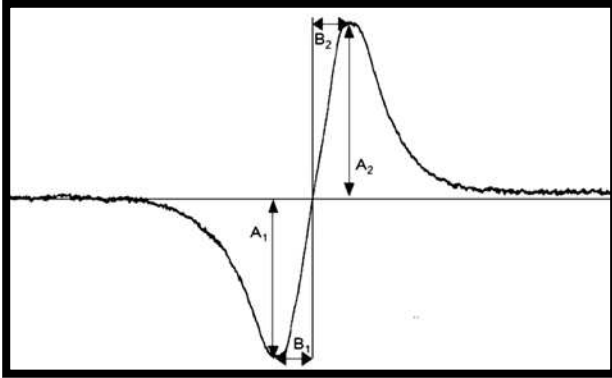
Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) was applied as the experimental technique to evaluate concentration of free radicals decontaminating thermally sterilized medicinal substance. Measurements of EPR spectra were done by the use of EPR spectrometer at X-band (9.3GHz) produced by RADIOPAN Firm (Poznań). Modulation of magnetic field of 100kHz was applied. Microwave frequency was evaluated using MCM 101 frequency recorder produced by RADIOPAN - Poznań.

The first-derivative EPR spectra were recorded with high microwave power attenuation 15dB to avoid the microwave saturation. In the present study free radicals in thermally sterilized diclofenac were studied. Thermal sterilization of the drug was performed in hot air oven with air circulating at 180°C. Sample was heated during 30 minutes.

Samples of diclofenac not heated with high temperature gave no EPR signals. It indicates that stable free radicals do not exist in initial medicinal substance. The EPR spectra of high temperature operated diclofenac are characterized by high asymmetry. In present study dependence of asymmetry on microwave power was investigated. Following parameters of asymmetry were analyzed: A_1/A_2 , A_1-A_2 , B_1/B_2 , B_1-B_2 . Principles of asymmetry parameters determination were performed on FIGURE 1.

On FIGURE 1 dependence of EPR lines A_1/A_2 (a) and B_1/B_2 parameters on microwave power M/M_0 in relative units stated were performed.

It was shown that these parameters strongly depend on microwave power. Changes of asymmetry line parameters indicates presence of a few types of free radicals in thermally sterilized diclofenac.



RYS. 1. Analizowane parametry asymetrii (A_1 , A_2 , B_1 , B_2) widm EPR diklofenaku sterylizowanego termicznie.

FIG. 1. Analyzed asymmetry parameters (A_1 , A_2 , B_1 , B_2) for EPR spectra of thermally sterilized diclofenac.

Na RYSUNKU 1 a i b przedstawiono zależność parametrów A_1/A_2 i B_1/B_2 , od mocy mikrofalowej wyrażonej w jednostkach względnych (M/M_0).

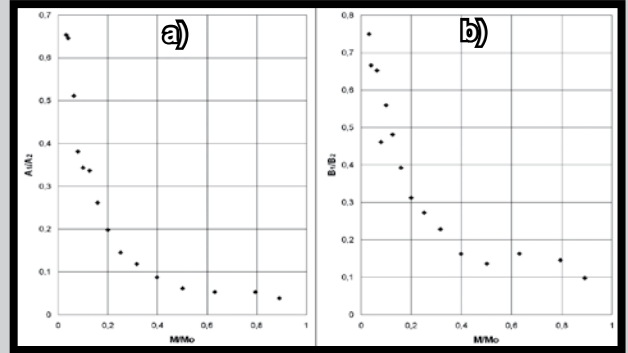
Widać wyraźnie, że parametry te zależą w znacznym stopniu od mocy mikrofalowej. Wszystkie zbadane parametry maleją ze wzrostem mocy mikrofalowej. Zmiana parametrów asymetrii kształtu linii EPR wskazuje na występowanie więcej niż jednej grupy wolnych rodników w sterylizowanym termicznie diklofenaku. Średni współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g wynoszący 2,0027 świadczy, że niesparowane elektrony zlokalizowane są na atomach tlenu.

Zarejestrowano również wpływ mocy mikrofalowej na podstawowe parametry linii EPR termicznie sterylizowanego diklofenaku. Amplituda linii EPR rośnie ze wzrostem mocy mikrofalowej, osiąga wartość maksymalną, a następnie maleje ze wzrostem mocy mikrofalowej. Szerokość linii EPR diklofenaku rośnie ze wzrostem mocy mikrofalowej. Zależności te są charakterystyczne dla wolnych rodników rozmieszczonych jednorodnie w próbce. Oznacza to, że wykonany proces sterylizacji termicznej powoduje generowanie wolnych rodników w całej objętości próbki.

Otrzymane wyniki badań spektroskopowych z wykorzystaniem metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego wskazują na silne oddziaływanie magnetyczne spin-spin w sterylizowanym diklofenaku. Oddziaływania te poszerzają linie EPR ($\Delta B_{pp} = 0,80 \text{ mT}$) i są charakterystyczne dla wolnych rodników położonych blisko siebie w strukturze molekularnej leku.

Przeprowadzone analizy pozwalają wyciągnąć następujące wnioski: sterylizacja termiczna diklofenaku w temperaturze 180°C powoduje powstawanie wolnych rodników w leku. Wolne rodniki nie występują w diklofenaku nie poddanym sterylizacji. Zmian asymetrii linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej jest charakterystyczna dla złożonego układu wolnych rodników w próbce. Wolne rodniki w sterylizowanym termicznie diklofenaku są rozmieszczone jednorodnie, na co wskazuje charakter zmian parametrów linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej. Wolne rodniki w sterylizowanym termicznie diklofenaku są rozmieszczone blisko siebie, na co wskazuje poszerzenie dipolowe linii EPR. W diklofenaku sterylizowanym termicznie zachodzą wolne procesy relaksacji spin-sieć. Spektroskopia EPR jest metodą przydatną do oceny właściwości wolnorodnikowych sterylizowanego termicznie diklofenaku.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-82, (2008), 57-58]



RYS. 2. Zależność parametrów A_1/A_2 (a), B_1/B_2 (b) linii EPR od mocy mikrofalowej M/M_0 dla badanej próbki diklofenaku sterylizowanej termicznie.

FIG. 2. Dependence of EPR lines A_1/A_2 (a), B_1/B_2 (c) parameters on microwave power M/M_0 for thermally sterilized diclofenac.

Mean g -factor with 2.0027 value indicates that unpaired electrons are located on oxygen atoms.

Influence of microwave power on basis EPR parameters for thermally sterilized diclofenac was recorded. Amplitude rises with microwave power increase, reaches maximum value and then decreases with microwave power increase. This kind of relationship indicates that free radicals are homogeneously spread in whole sample. It means that thermal sterilization processes generate free radicals in whole volume of the sample.

Received spectroscopic results obtained by electron paramagnetic spectroscopy application indicates on strong spin-spin magnetic interactions in sterilized diclofenac. This interactions causing broadening EPR lines ($\Delta B_{pp} = 0,80 \text{ mT}$) are characteristic for close located free radicals in molecular structure of the drug.

The results of the conducted studies allow the statement that: thermal sterilization at 180°C produce free radicals in diclofenac. Free radicals do not exist in non-sterilized diclofenac. Changes of line asymmetry are characteristic for complex free radicals system in the sample. Changes of EPR line parameters indicate on homogenous spread of free radicals in thermally sterilized diclofenac. Broadening EPR lines inform that free radicals are close located to each other. Slowly spin-lattice relaxation processes proceed in thermally sterilized diclofenac. EPR spectroscopy is useful technique to evaluation free radicals properties in thermally sterilized diclofenac.

[Engineering of Biomaterials, 81-82, (2008), 57-58]

Piśmiennictwo

References

- [1] Martyn S., Spektroskopia EPR w chemii i biochemii. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 1987; 136-141.
- [2] Rozancew E., Szolle W., Chemia organiczna wolnych rodników. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 1985; 14-53.
- [3] Bartosz G., Druga twarz tlenu. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2003; 58-62.
- [4] Podlewski J., Chwalibogowska-Podlewski A., Leki współczesnej terapii. Warszawa: Split Trading; 2007; 221-222.