

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KRSTOVA

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KRSTOVA

VREDNOTENJE ZAOSTANKA RADIKALOV IN OSTALIH FIZIKALNO-KEMIJSKIH SPREMENB POMOŽNIH SNOVI PO STERILIZACIJI Z GAMA-ŽARKI

EVALUATION OF FREE RADICAL RESIDUAL AND OTHER PHYSICOCHEMICAL CHANGES IN EXCIPIENTS AFTER GAMMA RAY STERILISATION

MASTER'S STUDY PROGRAMME INDUSTRIAL PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za Farmacevtsko kemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm za vse nasvete, vzpodbudne besede in pomoč med izdelavo magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Ana Krstova

VSEBINA

VSEBINA	I
KAZALO SLIK	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
POVZETEK	IX
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1. UVOD	1
1.1. Sterilizacija z gama-žarki	1
1.2. Radikali v pomožnih snoveh po sterilizaciji z gama-žarki	3
1.3. EPR spektroskopija	5
1.3.1. Alanin/EPR dozimetrija	10
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. Materiali	14
3.1.1. Glukoza	14
3.1.2. Magnezijev stearat	14
3.1.3. Krompirjev škrob	15
3.1.4. Mikrokristalna celuloza	15
3.1.5. Maltodekstrin	15
3.1.6. L-Alanin	16
3.2. Topila in reagenti	16
3.3. Aparature in laboratorijska oprema	16
3.4. Metode	18
3.4.1. Priprava HCl	18

3.4.2. Priprava NaOH	18
3.4.5. Priprava raztopine fenolftaleina	19
3.4.6. Priprava raztopine bromotimolno modrega.....	19
3.4.7. Priprava dušikove kisline	20
3.4.8. Priprava vode brez CO ₂	20
3.4.9. Priprava 700 µM raztopine DPPH.....	20
4. EKSPERIMENTALNO DELO	21
4.1. Standard za kvantifikacijo EPR meritve	21
4.1.1. Merjenje absorbance raztopine DPPH z UV-VIS spektrofotometrom.....	21
4.1.2. EPR meritve raztopine DPPH.....	21
4.2. EPR meritve pomožnih snovi	22
4.3. Vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti pomožnih snovi, ki jih predpisuje Evropska farmakopeja	23
4.3.1. Glukoza.....	23
4.3.2. Magnezijev stearat.....	23
4.3.3. Krompirjev škrob.....	24
4.3.4. Mikrokristalna celuloza	25
4.3.5. Maltodekstrin.....	25
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	27
5.1. EPR meritve pomožnih snovi	27
5.1.1. Glukoza.....	27
5.1.2. Magnezijev stearat.....	29
5.1.3. Krompirjev škrob.....	32
5.1.4. Mikrokristalna celuloza	35
5.1.5. Maltodekstrin.....	37
5.1.6. L-Alanin	40

5.2.	Vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti	43
5.2.1.	Glukoza.....	43
5.2.2.	Magnezijev stearat.....	44
5.2.3.	Krompirjев škrob.....	46
5.2.4.	Mikrokristalna celuloza	47
5.2.5.	Maltodekstrin.....	48
5.3.	Komentar rezultatov	49
6.	SKLEP.....	52
	LITERATURA	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv gama-žarkov na molekulo vode	3
Slika 2: Vpliv gama-žarkov na škrob – prihaja do degradacije in premreževanja	4
Slika 3: Kemijska struktura celuloze in nastanek radikala celuloze na mestu C5 po obsevanju z gama-žarki	5
Slika 4: Razcep magnetnih momentov na dva energijska nivoja	6
Slika 5: Absorpcijski spekter (zgoraj), EPR spekter, ki je prvi odvod absorpcijskega spektra (spodaj)	7
Slika 6: Primer dodatnega razcepa energijskih nivojev zaradi prisotnega jedra z magnetnimi lastnostmi ($I = 1$).....	9
Slika 7: EPR spekter alanina in graf odvisnosti absorbiranega odmerka od intenzitete EPR (18)	11
Slika 8: Prikaz cepitve alanina v stabilni radikal SAR in amonijak	11
Slika 9: Kemijska struktura glukoze.....	14
Slika 10: Kemijska struktura magnezijevega stearata	14
Slika 11: Kemijska struktura škroba.....	15
Slika 12: Kemijska struktura mikrokristalne celuloze.....	15
Slika 13: Kemijska struktura maltodekstrina.....	16
Slika 14: Kemijska struktura L-alanina	16
Slika 15: EPR spekter $700 \mu\text{M}$ DPPH raztopine v MeOH	22
Slika 16: EPR spektri glukoze pri različnih odmerkih žarčenja (6 dni po žarčenju). Ojačenje 5×10^0	27
Slika 17: Odvisnost števila paramagnetnih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri glukozi (6 dni po žarčenju)	29
Slika 18: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih glukoze po 6-ih, 10-ih, 17-ih, 24-ih, 31-ih in 140-ih dnevih po žarčenju.....	29

Slika 19: EPR spektri Mg stearata pri različnih odmerkih žarčenja (7 dni po žarčenju). Ojačenje 9×10^2	30
Slika 20: Odvisnost števila paramagnetskih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri magnezijevem stearatu (7 dni po žarčenju)	31
Slika 21: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih magnezijevega stearata po 7-ih in 147-ih dnevih po žarčenju	32
Slika 22: EPR spektri škroba pri različnih odmerkih žarčenja (7 dni po žarčenju). Ojačenje 1×10^1	32
Slika 23: Odvisnost števila paramagnetskih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri krompirjevem škrobu (7 dni po žarčenju).....	34
Slika 24: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih krompirjevega škroba po 7-ih, 10-ih, 17-ih, 24-ih, 31-ih in 147-ih dnevih po žarčenju.....	34
Slika 25: EPR spektri mikrokristalne celuloze pri različnih odmerkih žarčenja (7 dni po žarčenju). Ojačenje 3×10^1	35
Slika 26: Odvisnost števila paramagnetskih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri mikrokristalni celulozi (7 dni po žarčenju).....	37
Slika 27: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih mikrokristalne celuloze po 7-ih, 10-ih, 17-ih, 24-ih, 31-ih in 141-ih dnevih po žarčenju.....	37
Slika 28: EPR spektri maltodekstrina pri različnih odmerkih žarčenja (7 dni po žarčenju). Ojačenje 1×10^1	38
Slika 29: Odvisnost števila paramagnetskih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri maltodekstrin (7 dni po žarčenju)	39
Slika 30: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih maltodekstrina po 7-ih, 10-ih, 17-ih, 24-ih, 31-ih in 141-ih dnevih po žarčenju	40
Slika 31: EPR spektri L-alanina pri različnih odmerkih žarčenja (6 dni po žarčenju). Ojačenje 1×10^0	40
Slika 32: Odvisnost števila paramagnetskih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri L-alaninu (6 dni po žarčenju).....	42

Slika 33: Odvisnost intenzitete EPR signala od odmerek žarčenja pri L-alaninu (140 dni po žarčenju)	42
Slika 34: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih alanina po 6-ih in 140-ih dnevih po žarčenju.....	42
Slika 35: Oksidacija glukoze do glukonske kisline	43
Slika 36: Oksidacija škroba do karboksilnih kislin	46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Vzorci glukoze za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra (6 dni po žarčenju)	28
Preglednica II: Vzorci glukoze za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra (140 dni po žarčenju)	28
Preglednica III: Vzorci Mg stearata za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 7 dni po žarčenju.....	31
Preglednica IV: Vzorci Mg stearata za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 147 dni po žarčenju.....	31
Preglednica V: Vzorci krompirjevega škroba za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 7 dni po žarčenju.....	33
Preglednica VI: Vzorci krompirjevega škroba za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 147 dni po žarčenju.....	34
Preglednica VII: Vzorci MCC za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 7 dni po žarčenju.....	36
Preglednica VIII: Vzorci MCC za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 141 dni po žarčenju.....	36
Preglednica IX: Vzorci maltodekstrina za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 7 dni po žarčenju.....	39
Preglednica X: Vzorci maltodekstrina za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 141 dni po žarčenju.....	39
Preglednica XI: Vzorci alanina za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 6 dni po žarčenju.....	41
Preglednica XII: Vzorci alanina za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 140 dni po žarčenju.....	41
Preglednica XIII: Vzorci glukoze za določitev kislosti ali alkalnosti in ustreznost s farmakopejskim predpisom	43

Preglednica XIV: Vzorci Mg stearata za določitev kislosti ali alkalnosti po dodatku HCl in ustreznost s farmakopejskim predpisom	44
Preglednica XV: Vzorci Mg stearata za določitev kislosti ali alkalnosti po dodatku NaOH in ustreznost s farmakopejskim predpisom	44
Preglednica XVI: Vzorci stearinske kisline za določitev kislinskega števila (I_A) in ustreznost s farmakopejskim predpisom	45
Preglednica XVII: pH vzorcev krompirjevega škroba in ustreznost s farmakopejskim predpisom	46
Preglednica XVIII: Vzorci krompirjevega škroba za meritev oksidirajočih snovi in ustreznost s farmakopejskim predpisom	47
Preglednica XIX: pH vzorcev mikrokristalne celuloze in ustreznost s farmakopejskim predpisom	48
Preglednica XX: pH vzorcev maltodekstrina in ustreznost s farmakopejskim predpisom .	48

POVZETEK

Sterilizacija pomeni odstranitev ali uničenje vseh živih mikroorganizmov kot so glive, bakterije, virusi in spore. Pri izbiri primerne metode sterilizacije je treba upoštevati različne dejavnike, med drugimi je izbor metode pogojen z naravo farmacevtske oblike in potencialno škodljivostjo sterilizacije za material, ki ga steriliziramo. Sterilizacija z gama-žarki sodi med oficialne metode sterilizacije po Evropski farmakopeji in je hitra, cenovno ter sterilizacijsko učinkovita metoda sterilizacije. Med obsevanjem z gama-žarki pa lahko pride do neželenih sprememb fizikalno-kemijskih lastnosti materiala, česar se moramo pred izborom metode zavedati. Izbrane pomožne snovi za tabletiranje (glukoza, magnezijev stearat, krompirjev škrob, mikrokristalna celuloza, maltodekstrin) so sterilizirali z različnimi odmerki (5, 15, 25 in 40 kGy) gama-žarkov. V okviru magistrske naloge smo merili zaostanek radikalov v pomožnih snoveh z uporabo elektronske paramagnetne resonance (EPR) ter ovrednotili, kako obsevanje z gama-žarki vpliva na kakovost pomožnih snovi. EPR spada med spektroskopske tehnike, kjer najprej v magnetnem polju razcepimo sicer degenerirana magnetna (spinska) stanja snovi in nato med njimi z elektromagnetnim valovanjem vzbujamo prehode. Kot EPR dozimeter za preverjanja odmerka sevanja smo uporabili L-alanin, ki je bil pri sterilizaciji izpostavljen enakim odmerkom sevanja kot pomožne snovi. Fizikalno-kemijske lastnosti smo določili s pomočjo parametrov, ki jih predpisujejo posamezne monografije v Evropski farmakopeji. Ugotovili smo, da je za sterilizacijo z gama-žarki primeren material le magnezijev stearat. Pri magnezijevem stearatu smo določili tudi najvišji odmerek, ki je še primeren – to je 25 kGy. Za sterilizacijo z gama-žarki je po Evropski farmakopeji referenčni absorbirani odmerek ravno 25 kGy. Pri ostalih pomožnih snoveh (glukoza, krompirjev škrob, mikrokristalna celuloza in maltodekstrin) fizikalno-kemijske lastnosti po obsevanju ne ustrezajo zahtevam Evropske farmakopeje, med sterilizacijo je prišlo do zakisanosti materiala (potekajo oksidacije do -COOH skupin). Do poškodb pride že pri najnižjem uporabljenem odmerku (5 kGy), zato bi morali izbrati nižji odmerek sevanja, ki ne bi spremenil lastnosti materiala in bi pomožne snovi ustrezale farmakopejskih zahtevam, a bi hkrati morali z validacijo dokazati, da izbrani odmerek zagotavlja ustrezno in ponovljivo letalnost, kadar proces poteka rutinsko znotraj postavljenih meja.

Ključne besede: *sterilizacija z gama-žarki, EPR, Evropska farmakopeja, glukoza, magnezijev stearat, krompirjev škrob, mikrokristalna celuloza, maltodekstrin, L-alanin*

ABSTRACT

Sterilisation refers to any process that eliminates or deactivates any forms of life and other biological agents (such as fungi, bacteria, viruses and spore forms) present in pharmaceutical products. A variety of factors must be considered, before selecting an appropriate sterilisation method, among others, the choice of the method is conditioned by the nature of the pharmaceutical form and the potential harmfulness of sterilisation for the material which is sterilised. Gamma-ray sterilisation is one of the official sterilisation methods of the European Pharmacopoeia and is a fast, cost-effective and sterilisation effective sterilisation method. During gamma-ray irradiation, undesired changes in the physico-chemical properties of the material may occur, which we must be aware of before selecting the method. The selected excipients for direct compression (glucose, magnesium stearate, potato starch, microcrystalline cellulose, maltodextrine) were sterilized at different doses (5, 15, 25 and 40 kGy) of gamma-rays. In this Master's thesis, we determined the delay of radicals excipients with electronic paramagnetic resonance (EPR) and evaluated how the irradiation with gamma-rays influences the quality of the excipients. EPR is a spectroscopic technique in which we are detecting the transitions of unpaired electrons in an applied magnetic field. L-alanine, which was sterilised at the same doses of gamma-rays as an excipients, was used as an EPR dosimeter to verify radiation dose. Physico-chemical properties were determined using the parameters prescribed by individual monographs in the European Pharmacopoeia. We ascertained that only magnesium stearate is suitable for sterilisation with gamma rays. In the magnesium stearate, therehold of 25 kGy was determited. Physico-chemical properties of other excipients (glucose, potato starch, microcrystalline cellulose and maltodextrin) after irradiation do not meet the requirements of the European Pharmacopoeia. During sterilisation acidification of the material occurred. Damage occurs even at the lowest dosage used (5 kGy), so a lower radiation dose should be selected which would not alter the properties of the material and the excipients would meet the pharmacopoeial requirements, but at the same time, during validation of the sterilising dose, it has to be satisfactorily demonstrated that the dose chosen delivers an adequate and reproducible level of lethality when process is operated routinely within the set limits.

Key words: *Gamma-ray sterilisation, EPR, European Pharmacopeia, Glucose, Magnesium stearate, Potato starch, Microcrystalline cellulose, Maltodextrin, L-alanine*

SEZNAM OKRAJŠAV

CFU – kolonijsko število (*Colony forming units*)

EPR – Elektronska paramagnetna resonanca (*Electron paramagnetic resonance*)

ESP – Elektronska spinska resonanca (*Electron spin resonance*)

MCC – Mikrokristalna celuloza

SAL – Stopnja zagotavljanja sterilnosti

SAR – Stabilen alaninski radikal

1. UVOD

Zagotavljanje ustrezone mikrobiološke kakovosti v farmaciji je izredno pomembno, saj prisotni mikroorganizmi lahko vplivajo na stabilnost izdelka, nekateri mikroorganizmi izločajo toksine, encime ali druge snovi, zaradi česar so za človeka patogeni in potencialno lahko sicer za pacienta koristen farmacevtski izdelek pacientu škodi (1).

Sterilizacija pomeni odstranitev ali uničenje vseh živih mikroorganizmov, kot so glive, bakterije, virusi in spore. Poznamo različne postopke sterilizacije, a je pri izbiri treba upoštevati različne dejavnike, med drugimi je izbor metode pogojen z naravo farmacevtske oblike in potencialno škodljivostjo sterilizacije za material, ki ga steriliziramo. Pred izborom sterilizacijske metode je potrebno upoštevati tudi samo učinkovitost metode. Kadar je mogoče, izberemo postopek, s katerim steriliziramo izdelek v njegovi primarni ovojnini (t. i. končna sterilizacija) (1, 2).

Metode sterilizacije delimo na fizikalne, kemične in mehanske. Pri fizikalnih in kemijskih metodah mikroorganizme uničimo. V to skupino spadajo sterilizacija z vlažno in s suho toploto ter z ionizirajočim sevanjem. Pri mehanskih metodah pa mikroorganizme fizično odstranimo. Sem sodi membranska filtracija (1). Vsako metodo sterilizacije pa moramo primerno ovrednotiti z različnimi kriteriji. Predvsem je pomembno, da se zavedamo, kako posamezna metoda vpliva na končne lastnosti produkta (3). Niso pa vse poznane sterilizacijske metode oficialne (1). Med oficialne metode sterilizacije po Evropski farmakopeji spadajo sterilizacija s paro (ang. *Steam sterilisation*), suha sterilizacija (ang. *Dry heat sterilisation*), sterilizacija z ionizirajočim sevanjem (ang. *Ionising radiation sterilisation*), sterilizacija s plinom (ang. *Gas sterilisation*) in sterilizacija z membransko filtracijo (ang. *Filtration*) (4). V nadaljevanju se bom posvetila predvsem sterilizaciji z ionizirajočim sevanjem oziroma natančneje sterilizaciji z gama-žarki.

1.1. Sterilizacija z gama-žarki

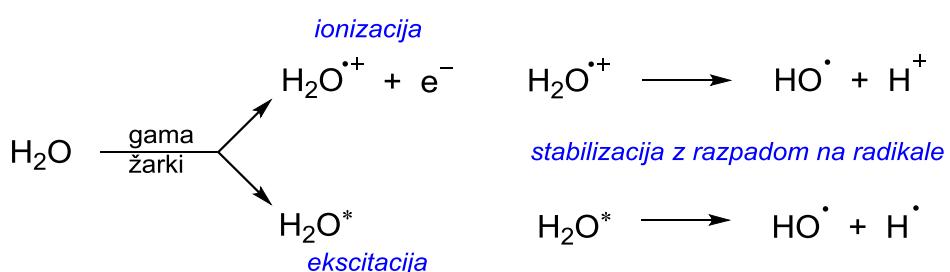
Pri sterilizaciji z ionizirajočim sevanjem izdelek steriliziramo tako, da ga izpostavimo ionizirajočemu gama sevanju iz ustrezega radioizotopnega vira (npr. kobaltovim 60 izotopom) ali toku elektronov, ki ga generira pospeševalnik elektronov. Sterilizacija z ionizirajočim sevanjem se uporablja za končno sterilizacijo farmacevtskih oblik, sterilizacijo termolabilnih praškov, za sterilizacijo materialov oziroma vsebnikov, ki se

naprej uporablja pri aseptični pripravi farmacevtskih izdelkov ter za mikrobiološko inaktivacijo tkiv in celic. Za to metodo končne sterilizacije je referenčni absorbirani odmerek 25 kGy. Lahko uporabimo nižje odmerke, če smo med validacijo dokazali, da izbrani odmerek zagotavlja ustrezeno in ponovljivo letalnost, kadar proces poteka rutinsko znotraj postavljenih meja. Sterilizacija je ustreznna, ko je vrednost stopnje zagotavljanja sterilnosti - SAL enaka ali manjša od 10^{-6} . SAL izražamo kot verjetnost prisotnosti nesterilne enote v seriji. Za parenteralne farmacevtske oblike mora biti SAL manjši ali enak 10^{-6} , kar pomeni, da največ ena enota v seriji, ki vsebuje milijon enot, lahko vsebuje največ 1 mikroorganizem. SAL določimo z ustreznimi validacijskimi študijami. Število mikroorganizmov v vzorcu izražamo s pomočjo kolonijskega števila – CFU (ang. *colony forming unit*). Biološke indikatorje uporabljam pri razvoju in validaciji sterilizacije tkiv in celičnih produktov. Med procesom sterilizacije spremljamo odmerek sevanja z uporabo dozimetričnega sistema, katere vrednosti ustrezano nacionalnim standardom (4). Dozimetrični sistemi so lahko filmi, majhni plastični vsebniki, tekočine ali pelete, ki so znano in ponovljivo odporni na odmerek sevanja. Dozimetrični sistemi morajo biti kalibrirani, kalibracija pa mora biti sledljiva nacionalnim standardom (2).

Sterilizacija z gama-žarki je hitra, cenovno in sterilizacijsko učinkovita metoda za sterilizacijo (3, 5). Uporabljam jo pod varnimi, dobro definiranimi in kontroliranimi parametri. Gama-žarki spadajo med elektromagnetno valovanje (skupaj s svetlobo, infrardečim in ultravijoličnim sevanjem), a imajo nižjo valovno dolžino in posledično višjo energijo. Absorbirano energijo med sevanjem merimo v kilograjih (kGy) (5). Prednost sterilizacije z gama-žarki je, da sam proces sterilizacije ne zahteva vnosa toplove in vlage, kar omogoča sterilizacijo termolabilnih materialov in materialov, ki so občutljivi na vлагo. Pri sterilizaciji z gama-žarki nimamo zaostanka rezidualov, kot jih imamo pri sterilizaciji z etilen oksidom. Prav tako po žarčenju ne zaostaja radioaktivnost (3, 5). Z gama-žarki lahko steriliziramo farmacevtski izdelek v končni obliki, torej v primarni ovojnini, kar predstavlja veliko prednost saj s tem izključimo možnost sekundarne kontaminacije izdelka. Gama-žarki z visoko energijo (to so fotoni) povzročijo želen učinek - uničenje mikroorganizmov, hkrati pa lahko pride do potencialno neželenih učinkov, kot so spremembra molekul produkta ali nastanek stranskih produktov. Fotoni nimajo naboja ali mase, kar jim omogoča penetriranje globoko v material (tudi v izdelke z visoko relativno gostoto). Fotoni med penetracijo v material lahko povzročijo izbitje elektrona, nastanek

radikalov ali ne nazadnje cepitev kovalentne vezi. Ravno zato pride do spremembe makromolekul, kot so DNA in encimi, kar omogoči uničenje mikroorganizmov (sterilizacija) (3).

Vplivi gama-žarkov na žive organizme se kažejo v kemijskih spremembah, so pa odvisni tudi od fizikalnih dejavnikov, torej od odmerka sevanja, porazdelitve odmerka sevanja in njegove kakovosti. Prav tako pa so pomembni tudi zunanji dejavniki, kot so temperatura, prisotnost vlage in koncentracija kisika. Vpliv ionizirajočega sevanja na DNA mikroorganizmov lahko razdelimo na posredne in neposredne dejavnike. Ionizirajoče sevanje lahko vpliva neposredno na DNA mikroorganizmov ali posredno z interakcijo sevanja z drugimi atomi ali molekulami v celicah, kot je na primer voda. Na sliki 1 vidimo radiolitične produkte vode, ki nastanejo kot posledica posrednega vpliva gama-žarkov na vodo. Iz vode pod vplivom gama-žarkov nastanejo hidroksilni radikal, vodikov radikal in e^- . Ravno hidroksilni radikal je odgovoren za pomemben del posrednih vplivov. Nastali radikali difundirajo v mikroorganizme in poškodujejo DNA, ki se ne morejo več razmnoževati in posledično mikroorganizmi odmrejo. Na ta način izdelek steriliziramo. Radikali, ki nastanejo v hidratacijski plasti okoli DNA molekule, so odgovorni za 90 % poškodb DNA mikroorganizmov. Ocenjeno je, da obsevanje žive celice z odmerkom 1 gray povzroči 1000 cepitev enojnih vezi, 40 cepitev dvojnih vezi, 150 prečnih povezav med DNA in proteini ter 250 oksidacij timina (2, 5).



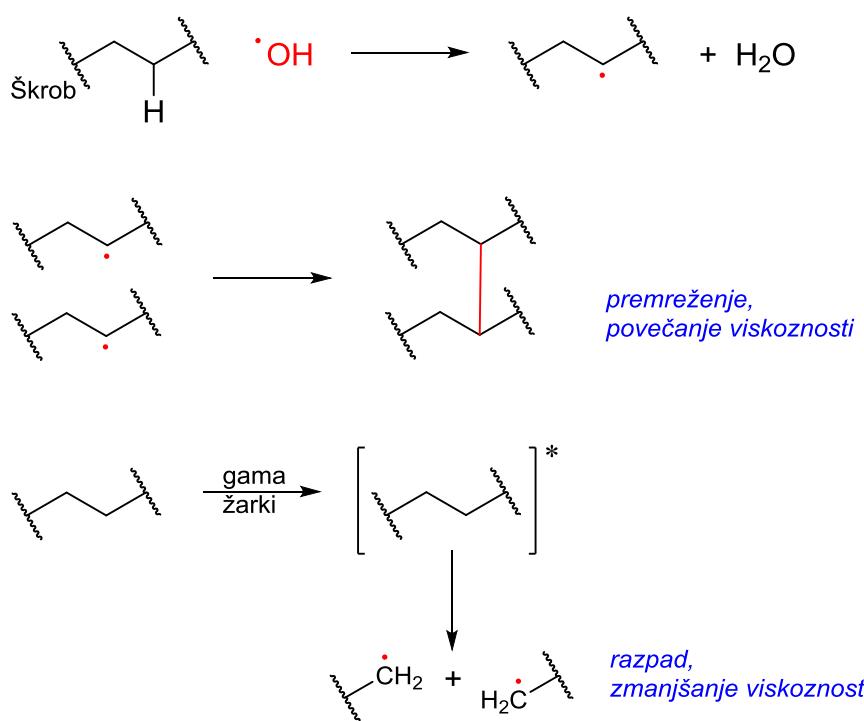
Slika 1: Vpliv gama-žarkov na molekulo vode

1.2. Radikali v pomožnih snoveh po sterilizaciji z gama-žarki

Tablete so zmes zdravilne učinkovine, ki predstavlja 2 – 10 % celotne mase tablete, in pomožnih snovi, ki jih je v tableti preostalih 90 – 98 %. Ravno zato predstavljajo pomožne snovi pomemben del farmacevtske formulacije. Interakcije med zdravilno učinkovino in pomožnimi snovmi lahko tako stabilizirajo kot destabilizirajo formulacijo, zato je primeren

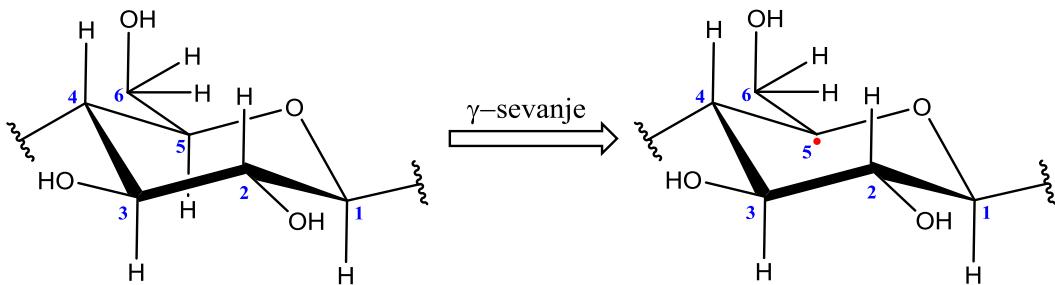
izbor pomožnih snovi izredno pomemben (6). Sterilizacija pomožnih snovi (in zdravilne učinkovine) z gama-žarki lahko povzroči spremembe v materialu, česar se moramo zavedati pri razvoju končne farmacevtske oblike. Gama-žarki povzročijo nastanek radikalov v pomožnih snoveh, ki vodi v nestabilnost izdelka. Radikali, ki so odgovorni za razpad obsevanih materialov, so vzrok za spremembo fizikalno – kemijskih lastnosti steriliziranega proizvoda, zmanjšajo učinkovitost zdravila z delnim razkrajanjem med sterilizacijo in so potencialno toksični (3).

Shematski prikaz na sliki 2 prikazuje nastanek radikalov v molekuli škroba (amilopektin) po sterilizaciji z gama-žarki. Splošno sprejeto je, da gama-žarki povzročijo premreževanje škroba, kar vodi v spremembo fizikalno-kemijskih lastnosti škroba, tako da pride do povečanja viskoznosti. Sterilizacija škroba pa lahko vodi tudi v razpad molekule (pretrganje verig), kar povzroči zmanjšanje viskoznosti (7).



Slika 2: Vpliv gama-žarkov na polimere škroba – prihaja do degradacije in premreževanja

Kemijska struktura celuloze in radikala celuloze po sevanju je prikazana na sliki 3. EPR spekter celuloze po sevanju z gama-žarki je v obliki tripleta, zaradi interakcije med vodikovima atomoma na mestu C6 glukoze z nesparjenim elektronom, ki nastane pod vplivom sevanja – pride do nastanka radikala na mestu C5 (8).



Slika 3: Kemijska struktura celuloze in nastanek radikala celuloze na mestu C5 po obsevanju z gama-žarki

1.3. EPR spektroskopija

Elektronska paramagnetna resonanca (ang. *Electron paramagnetic resonance*, EPR) ali elektronska spinska resonanca (ang. *Electron spin resonance*, ESP) spada med magnetne resonanse. Analiziramo zvrsti z enim ali večimi nesparjenimi elektronimi, kot so radikali, spojine z elementi prehodnih kovin in njihovi kompleksi ter elektronski defekti v kristalnih rešetkah. EPR spada med spektroskopske tehnike, kjer najprej v magnetnem polju razcepimo sicer degenerirana magnetna (spinska) stanja snovi in nato med njimi z elektromagnetnim valovanjem (mikrovalovi) vzbujamo prehode. Vsak elektron ima lastno vrtilno količino ali spin ($s = 1/2$) in posledično magnetni moment. Magnetni momenti elektronov se v zunanjem magnetnem polju skoraj naključno porazdelijo na dva energijska nivoja. Na energijskem nivoju z nižjo energijo so elektroni, ki so poravnani z zunanjim magnetnim poljem ($m_s = 1/2$). Ko je sistem v termičnem ravovesju, jih je nekoliko več na energijskem nivoju z nižjo energijo, saj sledijo Boltzmannovi porazdelitvi. Elektroni, ki precesirajo v nasprotni smeri glede na zunanje magnetno polje, so na energijskem nivoju z višjo energijo in so poravnani antiparalelno ($m_s = -1/2$) (9, 10, 11).

Energijska nivoja opišemo s pomočjo elektronskega spina in z njim povezanega magnetnega momenta. Za molekule s po enim nesparjenim elektronom velja, da ko apliciramo zunanje magnetno polje, pride do porazdelitve elektronov v dva energijska nivoja. V zunanjem energijskem polju je razlika med elektronskima energijskima nivojema enaka:

$$\hbar\nu_0 = \Delta E = g_e \mu_B B_0$$

\hbar = Planckova konstanta ($6,626 \times 10^{-34}$ Js)

ΔE = energijska razlika

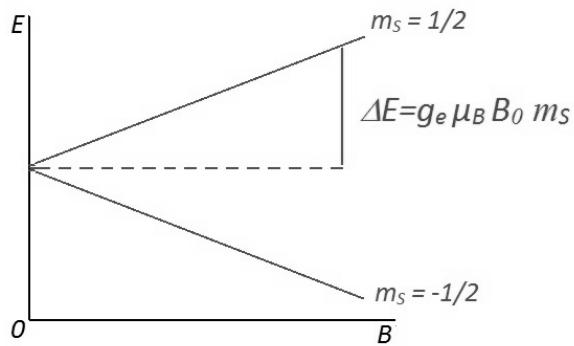
v = frekvenca (GHz ali MHz)

g_e = sorazmernostni faktor (Zeemanov skloplitveni faktor)

μ_B = Bohrov magneton ($\mu_B = 9,2741 \times 10^{-21}$ erg. G $^{-1}$ = $9,274009994(57) \times 10^{-24}$ J·T $^{-1}$)

B_0 = gostota magnetnega polja (G ali mT)

Iz enačbe je razvidno, da je razlika med elektronskima energijskima nivojema neposredno povezana z gostoto magnetnega polja, kar je prikazano tudi na sliki 4 (10, 12, 13).



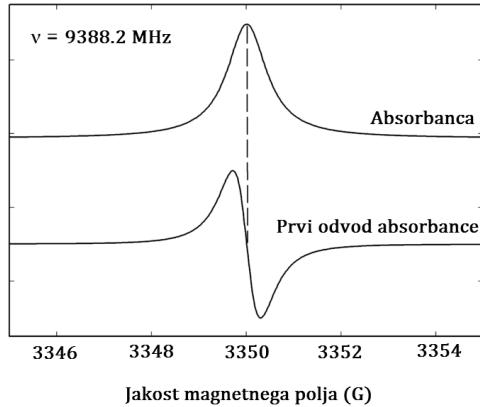
Slika 4: Razcep magnetnih momentov na dva energijska nivoja

Nesparjen elektron lahko med energijskima nivojema prehaja z absorpcijo ali emisijo fotonov. S povečevanjem gostote zunanjega magnetnega polja se razlika med energijskima nivojema veča, dokler se ne izenači z energijo elektromagnetnega valovanja. Paramagnetni vzorec tako v zunanjem magnetnem polju absorbira elektromagnetno valovanje (mikrovalove), kar vodi v EPR prehod. Ker je več elektronov na energijskem nivoju z nižjo energijo, saj sledijo Boltzmannovi porazdelitvi, na spektru zaznamo absorpcijo mikrovalov. Do absorpcije mikrovalov pride, ko je izpoljen resonančni pogoj: pri izbrani frekvenci mikrovalov je ustrezna gostota magnetnega polja.

Resonančni pogoj:

$$hv = g_e \mu_B B_0$$

Temu sledi relaksacija, elektronski spini se vrnejo na nižji nivo in hkrati oddajo energijo v obliki toplote. Zgornji graf na sliki 5 predstavlja absorpcijski spekter, spodnji graf pa je prvi odvod absorpcijskega spektra mikrovalov (10, 12).



Slika 5: Absorpcijski spekter (zgoraj), EPR spekter, ki je prvi odvod absorpcijskega spektra (spodaj)

Sorazmernostni faktor g (Zeemanov sklopitveni faktor) je jakost magnetnega polja, ki je izmerjen iz sredine signala:

$$g = \frac{h\nu}{\mu_B B}$$

Ze elektron je sorazmernostni faktor $g_e = 2,00232$. Pri spojinah z elementi prehodnih kovin pa so vrednosti za faktor g različne, zaradi sklopitev s spinskimi orbitalami, kar omogoča razlikovanje med prehodnimi kovinami ($g_e = 1,4 - 3,0$) (10).

Komercialno se v EPR spektroskopiji uporablja EPR spektrometer z izvorom mikrovalov v kontinuiranem načinu delovanja (ang. *Continuous wave method*), pri katerem spremojamo gostoto magnetnega polja, medtem ko je frekvenca elektromagnetnega valovanja (mikrovalov) konstanta (10). Velika večina EPR meritev je v območju mikrovalov s frekvencami od 1 do 100 GHz, kar ustreza magnetnemu polju med 390 do 33 600 G. (Jakost magnetnega polja 0,3 T (3000 G) pomeni, da za resonančni pogoj potrebujemo frekvenco mikrovalov 9 GHz) (10, 14).

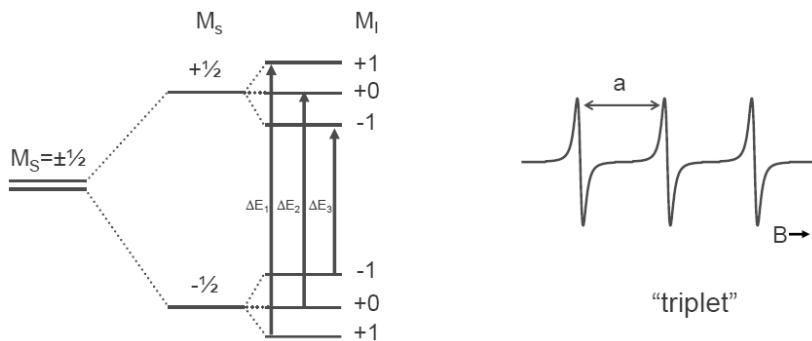
EPR spektrometer je sestavljen iz izvora elektromagnetnega valovanja (t.i. mikrovalovni most), odprtine za vzorec, rezonatorja (ki ojača mikrovalove), elektromagneta (ki ustvari magnetno polje) in detektorja. Najpogosteje se EPR spektroskopija uporablja za raziskavo trdnih in tekočih paramagnetičnih vzorcev, redkeje za plinaste vzorce (11).

Površina integriranega absorpcijskega spektra EPR je neposredno proporcionalna številu nesparjenih elektronov v vzorcu. Če spekter vsebuje le en vrh, pomeni, da je v strukturi le en nesparjen elektron, ki se ne sklaplja z nobenim drugim elektronom ali atomskim

jedrom. Pri kvantitativnih analizah lahko površine spektrov vzorca primerjamo s površino spektra standarda z znano količino nesparjenih elektronov in na ta način ugotovimo, koliko nesparjenih elektronov imamo v vzorcu (11).

Za EPR spektre je značilna hiperfina interakcija, ki jo povzročijo interakcije med elektroni in prisotnimi sosednjimi jedri. Magnetni momenti elektronov se ob odsotnosti drugih jeder, v zunanjem magnetnem polju porazdelijo na dva energijska nivoja ($m_s = 1/2, m_s = -1/2$), kar vidimo v EPR spektru z enim vrhom (prikazano na sliki 5). Ko pa je ob elektronu prisotno dodatno jedro z magnetnimi lastnostmi, pa dobimo EPR spekter z več vrhovi. Med elektronom in jedrom gre v osnovi za magnetno dipol – dipol interakcijo. V interakcijo z elektronom pa ne vstopajo vsa jedra. Do dodatnega razcepa energijskih nivojev elektrona bo prišlo v primeru, da ima izotop jedrsko spinsko kvantno število različno od nič ($I \neq 0$). Skupno spinsko kvantno število jedra nekega izotopa je odvisno od števila protonov in nevronov, iz katerega je sestavljeno jedro. Do sklapljanja z elektronom pride, če ima izotop liho atomsko število (število protonov) ter sodo masno število (vsota protonov in nevronov, $I = 1$) in če ima izotop liho masno število ($I = \frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}, \dots$) (12).

Na sliki 6 vidimo dodatni razcep energijskih nivojev zaradi prisotnega jedra z magnetnimi lastnostmi. Jedrno spinsko kvantno število jedra je $I = 1$, kar povzroči razcep elektronov na tri dodatne energijske nivoje ($m_I = +1, 0, -1$), kar enostavno izračunamo z enačbo $2NI + 1$, kjer je I jedrsko spinsko kvantno število in N število ekvivalentnih jedr. EPR spekter ima v tem primeru 3 črte, ki so enako intenzivne, saj v interakciji vstopa le eno jedro. Relativne intenzitete so torej določene s številom jeder, ki vstopajo v interakcijo. V primeru, da v interakciji vstopa le eno jedro, imajo vse črte enako intenziteto. V primeru, da v interakciji vstopa več jeder, pa so distribucije izpeljane na podlagi spina. Za spin $S = 1/2$, ki je najpogosteji, sledijo interakcije binominalni porazdelitvi, za spin $S = 1$ pa trinomski porazdelitvi (12).



Slika 6: Primer dodatnega razcepa energijskih nivojev zaradi prisotnega jedra z magnetnimi lastnostmi ($I = 1$).

Časovno okno EPR spektroskopije zaradi rotacij molekul (10-30 G) ustreza Larmorjevim frekvencam 30-100 MHz, kar generira časovno okno 10 ns. Če je življenski čas vzbujenih stanj nesparjenega elektrona (radikala) krajši od EPR časovnega okna, takih stanj ne moremo videti direktno. Kratkožive radikale lahko spinsko ulovimo in spremenimo v dolgožive radikalske adukte, ki jih lahko detektiramo z EPR (15). Pogosto se uporabljujo spinske pasti, ki povzročijo nastanek paramagnetnega adukta, ki ga je mogoče zaznati z uporabo EPR. Paramagnetni adukt ima običajno značilen EPR spekter, značilen za radikal, ki je ujet. Z analizo spektra EPR paramagnetnih adukov, kot so vrednost g in hiperfina interakcija, lahko identificiramo začetni radikal, ki smo ga ujeli (12, 16).

Da lahko z EPR opazujemo neparamagnetne vzorce, jih moramo najprej spinsko označiti. Glede na heterociklični obroč najpogosteje uporabljamo nitroksidne radikale pirolinskega, piperidinskega, pirolidinskega, oksazolidinskega in imidazolidinskega tipa, katerih EPR spekter je odvisen od nesparjenega elektrona. Gre za stabilen radikal, saj dostop do nesparjenega elektrona nitroksidnega radikala sterično ovirajo štiri metilne skupine (-CH₃), ki se nahajajo na *alfa* položaju glede na dušik in so odgovorne za dolgotrajno stabilnost radikala. Možnost substitucije na drugih položajih omogoča raznovrstno uporabo nitroksida kot spinskega označevalca. S pomočjo nitroksidnih radikalov kot spinskih označevalcev dobimo uporabne informacije o vsebnosti kisika, polarnosti, pH-ju, viskoznosti in urejenosti vzorca (12, 16).

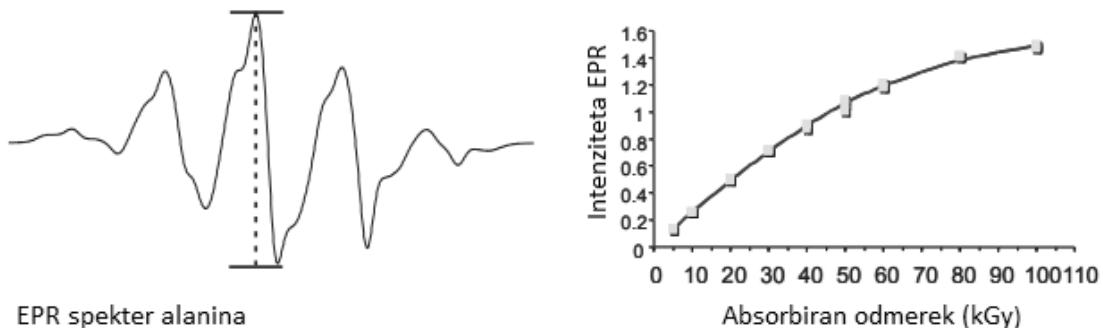
EPR spektroskopija se v farmaciji uporablja na najrazličnejših področjih. S pomočjo EPR signalov detektiramo in vrednotimo razgradnjo zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi ter na ta način določamo rok uporabnosti zdravil in optimiziramo stabilnost. S pomočjo EPR spektroskopije lahko spremljamo reakcije, kar je ključnega pomena za razumevanje

procesa, optimizacijo in povečanje obsega (ang. *scale up*). Preko faktorja g z EPR odkrivamo in prepoznavamo sledi prehodnih kovin in na ta način identificiramo paramagnetne nečistote, ki so odgovorne za številne neželene učinke, kot so zmanjšanje terapevtskega učinka, skrajšanje roka uporabnosti in potencialno toksičnost. Na primer v pomožni snovi bentonit (ki se v tabletah uporablja kot polnilo) se v sledovih kot nečistoči pojavljata mangan in železo, ki jih lahko detektiramo s pomočjo EPR. Problem večje količine kovinskih ionov je predvsem v tem, da pospešijo degradacijo zdravilne učunkovine in pomožnih snovi. EPR spektroskopija pa se ne uporablja le v farmaciji, temveč tudi v prehrambni industriji. Obsevanje hrane z gama-žarki zmanjša tveganje za zdravje, saj na tak način uničimo patogene mikroorganizme in podaljšamo rok uporabnosti živil. Prav tako je to pomemben fitosanitarni ukrep, s katerim preprečujemo prenos rastlinskih patogenov. Z obsevanjem v hrani nastanejo radikali, ki so v suhem okolju dovolj stabilni, da takšne radikale detektiramo s pomočjo EPR. Spremembe, ki jih gama-žarki povzročijo v hrani, so zelo podobne spremembam, ki se pojavi pri navadnem kuhanju. Obsevanje ne povzroči toksičnih, mutagenih ali teratogenih učinkov in ne pušča kemijskih ostankov v hrani. Najpogostejsa kemijska reakcija med obsevanjem hrane je pretvorba vode v vodikov peroksid. Regulatorno so dovoljeni minimalni odmerki, ki so potrebni za doseganja namena samega obsevanja hrane (11, 17).

1.3.1. Alanin/EPR dozimetrija

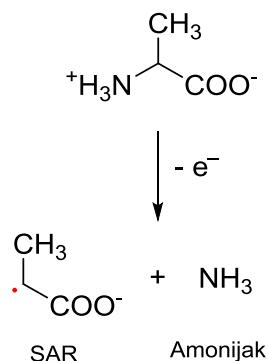
EPR dozimetrija se uporablja za preverjanje odmerka ionizirajočega sevanja, kot najpogostejsi dozimeter pa v praksi uporabljam alaninski dozimeter (18).

L- α -alanin je aminokislina, iz katere ob obsevanju z gama-žarki nastanejo stabilni radikali, ki dajo značilen EPR spekter, ki nima šuma, če uporabimo alanin v kristalni obliki (18, 19). EPR spekter ima 5 linij in sredinski črti določimo amplitudo, prikazano na sliki 7 (18). Intenziteta EPR signala (površina pod absorpcijsko krivuljo ali v prvem približku višina sredinske črte) obsevanega kristaliničnega alanina je proporcionalna koncentraciji radikalov, ki nastanejo zaradi sevanja, kar pa je proporcionalno odmerku sevanja (19, 20). Radikali v alaninu so stabilni zaradi kristalne oblike in v čisti suhi obliki alanina se signal v prvem letu po obsevanju zmanjša le za 4 %. Alaninski dozimeter ima linearen odziv pri odmerku sevanja od 1 Gy do 10^4 Gy (20).



Slika 7: EPR spekter alanina in graf odvisnosti absorbiranega odmerka od intenzitete EPR (18)

Alanin je aminokislina, ki obstaja v dveh strukturnih oblikah: α in β . Kot dozimeter se uporablja le α -alanin (v obliki iona dvojčka), ker le-ta tvori stabilne radikale. α -alanin pa obstaja v treh strukturnih oblikah: L- α -alanin (optično aktiven), D- α -alanin (optično aktiven) in DL- α -alanin (racemat). Vse oblike se lahko uporablajo kot dozimeter, ampak se zaradi ekonomskih razlogov uporablja le DL- α -alanin. Med obsevanjem z gama-žarki pride do cepitve šibke C-N vezi in iz alanina nastane NH_3 (amonijak, stabilna molekula) in stabilen alaninski radikal (SAR), kar prikazuje slika 8 (18).



Slika 8: Prikaz cepitve alanina v stabilni radikal SAR in amonijak

Na podlagi zelo stabilnega radikala SAR, ki nastane iz kristalnega α -alanina, dobimo alanin/EPR dozimetrični sistem. Absorbiran odmerek je proporcionalna številu radikalov (18).

Razlikovanje med odmerki sevanja je stabilno, ponovljivo, kumulativno, nedestruktivno, netoksično, linearno in neodvisno od fotonske energije, kakovosti sevanja, minimalnih razlik v temperaturi in ostalih zunanjih dejavnikov. Zaradi vseh teh prednosti je alaninski EPR dozimeter zanesljiva tehnika za preverjanje tako visokih kot nizkih odmerkov sevanja

(18, 19). Alaninski dozimetrični sistem je stabilen več let, prav tako pa je signal neodvisen glede na sevanje (ali gre za sevanje z gama-žarki ali z virom elektronov) (18).

Alaninske dozimetre najdemo v obliki gelov, filmov in pelet, ki so komercialno dostopni za merjenje odmerkov sevanja. Za pripravo teh oblik uporabljam različna veziva, kot sta parafin in acetatni polivinil. Slabost veziv je, da lahko vplivajo na ozadje EPR signala ali se vežejo na nastale stabilne radikale. Zato alternativno lahko uporabimo čisti polikristalinični alanin brez veziv kot EPR dozimeter (21).

2. NAMEN DELA

Mikrobiološka kakovost tablet je v farmaciji izjemnega pomena, saj prisotni mikroorganizmi vplivajo na stabilnost izdelka. Poznamo različne metode sterilizacije, a je pri izboru treba upoštevati različne dejavnike, med drugimi je izbor metode pogojen z naravo farmacevtske oblike in potencialno škodljivostjo sterilizacije za material, ki ga steriliziramo. Med sterilizacijo se lahko lastnosti materiala spremenijo, česar se moramo pred izborom metode zavedati. Izbrane pomožne snovi za tabletiranje (magnezijev stearat, glukoza, mikrokristalna celuloza, maltodekstrin, krompirjev škrob) so predhodno sterilizirali z različnimi odmerki (5, 15, 25 in 40 kGy) gama-žarkov (Mediscan GmbH & Co KG, Seibersdorf, Avstrija). V okviru magistrske naloge bomo merili zaostanek radikalov v pomožnih snoveh po sterilizaciji z gama-žarki z uporabo elektronske paramagnetne resonance in ovrednotili, kako obsevanje z gama-žarki vpliva na kakovost pomožnih snovi in njihovo stabilnost.

V prvem sklopu magistrske naloge želimo ugotoviti, kakšna je vsebnost radikalov v pomožnih snoveh po obsevanju z določenimi odmerki gama-žarkov. EPR meritve pomožnih snovi bomo določali v različnih časovnih točkah in skušali ugotoviti, kako stabilni so nastali radikali. Kot EPR dozimeter za preverjanja odmerka sevanja bomo uporabili L-alanin, ki je bil pri sterilizaciji izpostavljen enakim odmerkom sevanja, kot pomožne snovi. V drugem sklopu magistrske naloge nas zanima, kako gama-žarki vplivajo na kakovost pomožnih snovi za tabletiranje in ali je stabilnost odvisna od odmerka sevanja. Fizikalno-kemijske lastnosti bomo ovrednotili s pomočjo parametrov, ki jih predpisujejo posamezne monografije v Evropski farmakopeji. V okviru magistrske naloge želimo ugotoviti, ali je gama sevanje primerna metoda sterilizacije za izbrane pomožne snovi in določiti varen odmerek sevanja, ki bistveno ne poslabša kakovosti materiala.

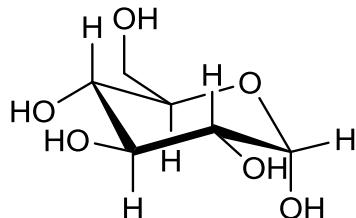
3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

V raziskovalnem delu naloge smo uporabili različne trdne pomožne snovi za tabletiranje - glukoza, magnezijev stearat, krompirjev škrob, mikrokristalna celuloza, maltodekstrin, ki smo jih predhodno sterilizirali z različnimi odmerki gama-žarkov. Kot EPR dozimeter smo uporabili L-Alanin.

3.1.1. Glukoza

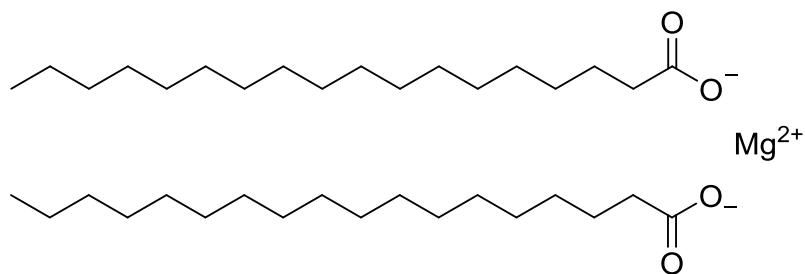
Dextrose anhydrous (C*Dex 02402) proizvajalca ECSA chemicals, Švica. Kemijska struktura glukoze je prikazana na sliki 9.



Slika 9: Kemijska struktura glukoze

3.1.2. Magnezijev stearat

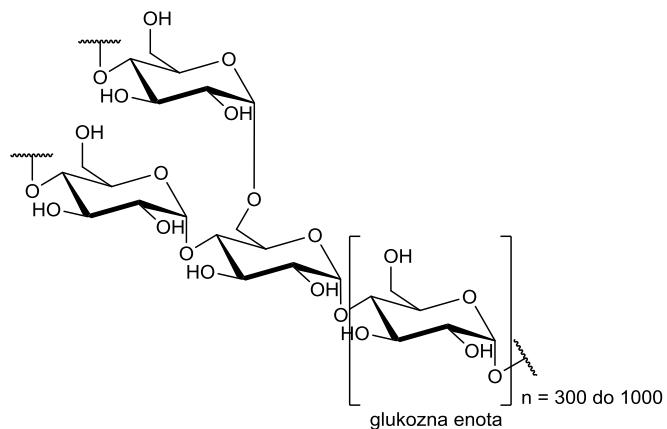
Mg stearate (Ligamed MF-2-K, Mg stearate Kosher) proizvajalca Peter Greven GmbH & Co.KG, Nemčija. Kemijska struktura magnezijevega stearata je prikazana na sliki 10.



Slika 10: Kemijska struktura magnezijevega stearata

3.1.3. Krompirjev škrob

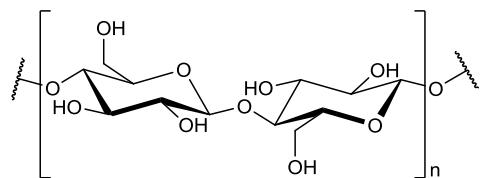
Potato starch (Pharma M6/K10/500445). Kemijska struktura krompirjevega škroba je prikazana na sliki 11.



Slika 11: Kemijska struktura škroba

3.1.4. Mikrokristalna celuloza

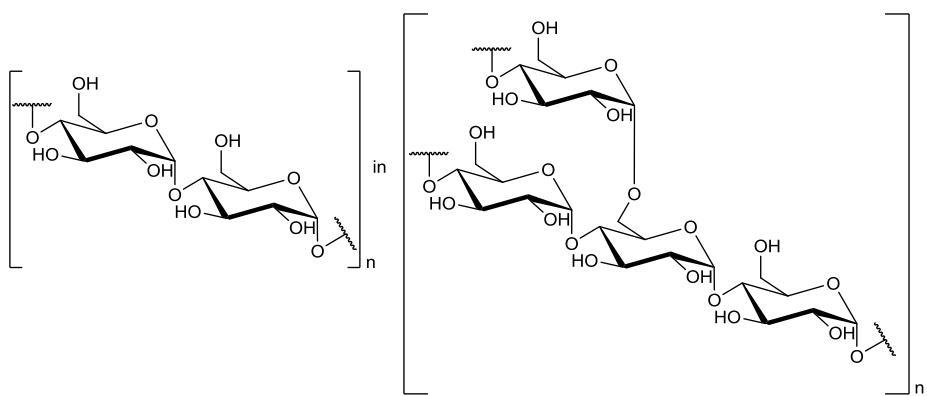
MCC NF (VIVAPUR® 112, PhEur, JP) proizvajalca JRS PHARMA, Avstrija. Kemijska struktura mikrokristalne celuloze je prikazana na sliki 12.



Slika 12: Kemijska struktura mikrokristalne celuloze

3.1.5. Maltodekstrin

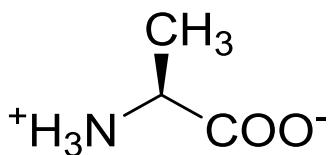
Maltodextrin DE 12/13 (PhEu, USP) proizvajalca FOODINC. Kemijska struktura maltodekstrina je prikazana na sliki 13.



Slika 13: Kemijska struktura maltodekstrina

3.1.6. L-Alanin

L-Alanine, 99%, ustreza zahtevam Evropske farmakopeje, proizvajalca Acros organics, Belgija. EPR dozimeter za preverjanje odmerka sevanja. Kemijska struktura L-alanina je prikazana na sliki 14.



Slika 14: Kemijska struktura L-alanina

3.2. Topila in reagenti

Pri izvedbi farmakopejskih predpisov smo uporabili topila in reagente različnih proizvajalcev: Aldrich, Tokyo chemical industry (TCI), Emsure, Merck, Acros organics, Carlo Erba Reagents S.A.S, Sigma-aldrich in Kemika. Deionizirana voda, ki smo jo uporabili pri analizah, je bila pripravljena na Fakulteti za farmacijo. Reagentov nismo dodatno prečistili.

3.3. Aparature in laboratorijska oprema

- Analitska tehnika: Mettler Toledo AG245 (Švica)
- Precizna tehnika: Mettler Toledo PB403 (Švica)
- Polavtomatske pipete: Brand (Nemčija)
- Merilne in polnilne pipete
- pH meter: SevenMulti, Mettler Toledo (Švica)

- Stresalnik: Vibromix 403 EVT, Tehnica (Slovenija)
- Rotavapor: Büchi 461 WaterBath (Švica)
- Magnetno mešalo: IKA (Nemčija)
- Ultrazvočna kopel: Sonis 3 Iskra (Slovenija)
- UV-VIS spektrofotometer: Hewlett Packard 8453 (Nemčija)
- EPR spektrofotometer: MiniScope MS400, Magnettech (Nemčija)

3.4. Metode

3.4.1. Priprava HCl

1 M HCl

1 M HCl smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom iz poglavja Volumetrične raztopine (ang. *Volumetric solutions*). V 100 mL merilno bučko smo natehtali 10,3 g koncentrirane raztopine HCl (37%) in do oznake dopolnili z vodo. Sledi standardizacija, v kateri smo 1 g natrijevega karbonata raztopili v 50 mL vode, nato smo dodali 1 mL raztopine metilno oranžnega in titrirali s pripravljenim HCl, dokler se barva raztopine ni spremenila iz rumene v rumeno-rdečo, ki je obstojna tudi po vretju. 1 mL 1 M HCl je ekvivalenten 53,0 mg Na₂CO₃. Do spremembe barve smo titrirali z 18 mL 1 M HCl (22).

0,1 M HCl

0,1 M HCl smo pripravili iz 10 mL 1 M HCl, ki smo jo razredčili do 100 mL z vodo (22).

3.4.2. Priprava NaOH

1 M NaOH

1 M NaOH smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom iz poglavja Volumetrične raztopine (ang. *Volumetric solutions*). V 100 mL merilno bučko smo natehtali 4,2 g NaOH in do oznake dopolnili z vodo. Sledi standardizacija, v kateri smo 20 mL 1 M HCl titrirali z 1 M NaOH, kot indikator pa smo uporabili 0,5 mL fenolftaleina, ki HCl obarva v roza raztopino. Končna točka titracije je, ko se raztopina HCl z indikatorjem razbarva. Med HCl in NaOH pride do reakcije nevtralizacije (volumna baze in kisline sta enaka – 20 mL) (22).

0,1 M NaOH

0,1 M NaOH smo pripravili iz 10 mL 1 M NaOH, ki smo jo razredčili do 100 mL z vodo (22).

3.4.3. Priprava natrijevega tiosulfata

0,1 M Na-tiosulfat

0,1 M Na-tiosulfat smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom iz poglavja Volumetrične raztopine (ang. *Volumetric solutions*). 25 g natrijevega tiosulfata in 0,2 g natrijevega karbonata smo natehtali v 1000 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z vodo. Sledi standardizacija, v kateri smo 10 mL 0,033 M kalijevega bromida dodali 40 mL vode, 10 mL kalijevega jodida in 5 mL HCl. Z mešanico smo titrirali narejeni Na-tiosulfat, kot indikator pa smo uporabili 1 mL škrobovice (22).

0,002 M Na-tiosulfat

0,002 M Na-tiosulfat smo pripravili iz 20 mL 0,1 M Na-tiosulfata, ki smo ga razredčili do 1000 mL z vodo v merilini bučki (22).

3.4.4. Priprava škrobovice

Vodotopni škrob

Vodotopni škrob smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom iz poglavja Reagenti (ang. *Reagents*). 20 g škroba v obliki belega do skoraj belega prahu raztopimo v vroči vodi (23).

Škrobovica

1 g vodotopnega škroba smo zmešali z majhno količino hladne vode. Narejeno mešanico smo dodali 200 mL vrele vode in dodali še 0,25 g salicilne kisline ter vse skupaj vreli 3 minute (23).

3.4.5. Priprava raztopine fenolftaleina

Raztopino fenolftaleina smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom iz poglavja Reagenti (ang. *Reagents*). V 100 mL merilno bučko smo natehtali 1 g fenolftaleina in s 96 % etanolom dopolnili do oznake (23).

3.4.6. Priprava raztopine bromotimolno modrega

Raztopino bromotimolno modro smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom iz poglavja Reagenti (ang. *Reagents*). 100 mg bromotimolno modrega smo raztopili v enakem volumskem deležu 96 % etanola in vode ter do 100 mL dopolnili z enakim topilom (23).

3.4.7. Priprava dušikove kisline

Dušikovo kislino smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom iz poglavja Reagenti (ang. *Reagents*). V 250 mL merilno bučko smo odmerili 36 mL HNO₃ (70 %) in do oznake dopolnili z vodo (23).

3.4.8. Priprava vode brez CO₂

Vodo brez CO₂ (ang. *carbon dioxide-free water*) smo pripravili v skladu s farmakopejskim predpisom iz poglavja Reagenti (ang. *Reagents*). Pripravili smo jo tako, da smo MiliQ vodo za HPLC prevreli za 5 min in ohladili v atmosferi argona (23).

3.4.9. Priprava 700 µM raztopine DPPH

Za pripravo 700 µM raztopine DPPH smo v 25 mL merilno bučko natehtali 7,05 mg DPPH, raztopili v metanolu (pomagali smo si s soniciranjem z ultrazvokom) in dopolnili do oznake z metanolom. Pripravljeno raztopino DPPH smo petkrat redčili, tako da smo odmerili 4 mL metanola in dodali 1 mL 700 µM raztopine DPPH. Dobimo 140 µM raztopino DPPH.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Standard za kvantifikacijo EPR meritev

4.1.1. Merjenje absorbance raztopine DPPH z UV-VIS spektrofotometrom

V plastično kiveto ($l = 1 \text{ cm}$) smo odmerili 1 mL 140 μM raztopine DPPH in dodali 1 mL metanola. Končna koncentracija raztopine DPPH v kiveti je bila 70 μM . Z UV-Vis spektrofotometrom smo posneli absorpcijski spekter. Najvišji vrh v spektru dobimo pri $\lambda_{\max} = 516 \text{ nm}$ z $A_{516} = 0,864$.

Literaturne vrednosti za molarni absorpcijski koeficient (ϵ) za DPPH v metanolu ali etanolu so različne ter se gibljejo od $1,09 \times 10^4$ (24, 25), $1,16 \times 10^4$ (24, 25) in $1,25 \times 10^4$ (24, 25). Če vzamemo vrednost $\epsilon = 1,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in iz izmerjene absorbance izračunamo koncentracijo DPPH po formuli:

$$c = \frac{A}{I_\epsilon}$$

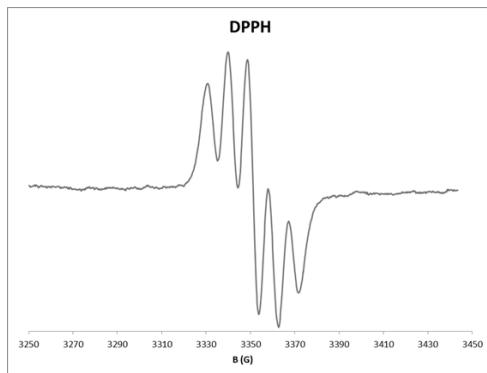
dobimo vrednost za $c = 69,07 \mu\text{M}$, kar je zelo blizu predvideni koncentraciji 70 μM .

4.1.2. EPR meritev raztopine DPPH

Kapilaro z notranjim premerom 1 mm smo napolnili s 700 μM raztopine DPPH v metanolu in zamašili s plastelinom. EPR spektre smo posneli pri naslednjih nastavitevah EPR instrumenta (MiniScope MS400, Magnettech):

- magnetno polje B_0 (ang. *B₀-field*) = 3344,23 G,
- območje skeniranja (ang. *sweep*) = 200 G,
- čas skeniranja (ang. *sweep time*) = 60 s,
- modulacija (ang. *modulation*) = 1000 G,
- moč mikrovalov (ang. *MW atten*) = 10 dB,
- število ponovitev (ang. *number of pass*) = 3,
- ojačenje (ang. *gain*) = 3×10^2 .

EPR spektre smo dvakrat integrirali, da smo dobili površino pod absorpcijsko krivuljo, to pa delili s faktorjem ojačenja: $215/3 \times 10^2 = 0,7166$ enot za prvo časovno točko (oziroma $174,75/3 \times 10^2 = 0,5825$ enot za zadnjo časovno točko). Vrednost je premo sorazmerna številu paramagnetskih centrov v merilnem območju rezonatorja: volumen raztopine v kapilari je $50 \mu\text{L}$ do oznake pri višini $8,60 \text{ cm}$, višina merilnega območja v rezonatorju pa znaša $2,30 \text{ cm}$. Iz tega sledi, da je efektivni volumen vzorca v rezonatorju $13,37 \mu\text{L}$. V tem volumnu $700 \mu\text{M}$ DPPH raztopine je po enačbi $n = c \times V$ $9,36 \times 10^{-9} \text{ mol}$ paramagnetskih centrov. Če to vrednost delimo s površino pod krivuljo EPR spektra, dobimo razmerje med enoto površine in številom paramagnetskih centrov v rezonatorju. Enota površine ustreza $1,607 \times 10^{-8} \text{ mol}$ ali $9,677 \times 10^{15}$ paramagnetskih centrov pri meritvah v zadnji časovni točki, v prvi časovni točki pa enota površine ustreza $1,306 \times 10^{-8} \text{ mol}$ ali $7,761 \times 10^{15}$ paramagnetskih centrov.



Slika 15: EPR spekter $700 \mu\text{M}$ DPPH raztopine v MeOH

4.2. EPR meritve pomožnih snovi

Vzorce pomožnih snovi smo ob enakomerinem stresanju nasuli v predhodno stehtane kvarčne EPR cevke ($h = 40 \text{ cm}$, notranji polmer = $1,5 \text{ mm}$). Vzorce v cevkah smo stehtali in jim izračunali zbito gostoto. EPR spektre smo posneli pri naslednjih nastavitevah EPR instrumenta (MiniScope MS400, Magnettech):

- magnetno polje B_0 (ang. *B₀-field*) = $3344,23 \text{ G}$,
- območje skeniranja (ang. *sweep*) = 200 G ,
- čas skeniranja (ang. *sweep time*) = 60 s ,
- modulacija (ang. *modulation*) = 1000 G ,
- moč mikrovalov (ang. *MW atten*) = 10 dB ,
- število ponovitev (ang. *number of pass*) = 3 .

Ojačenje (ang. *gain*) smo pri vsakem vzorcu določili posebej, tako da je bilo najvišje možno pri vzorcu z obsevalnim odmerkom 40 kGy (signal vzorca je v merilnem območju instrumenta, EPR spekter je popolnoma razširjen). Vse ostale vzorce enake pomožne snovi smo nato posneli pri istem ojačenju. Ojačenje je navedeno pri vsaki pomožni snovi posebej.

EPR spektre smo dvakrat integrirali, da smo dobili površino pod absorpcijsko krivuljo, to pa delili s faktorjem ojačenja. Vrednost je premo sorazmerna številu paramagnetnih centrov v merilnem območju rezonatorja – enoto smo umerili z raztopino radikala DPPH v metanolu in ustrezna $1,306 \times 10^{-8}$ mol v prvi časovni točki ter $1,607 \times 10^{-8}$ mol v zadnji časovni točki.

4.3. Vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti pomožnih snovi, ki jih predpisuje Evropska farmakopeja

4.3.1. Glukoza

Teste smo izvedli v skladu s farmakopejskim predpisom iz monografije za brezvodno glukozo (ang. *Glucose, anhydrous*) (26).

Kislost ali alkalinost

6,0 g vzorca glukoze smo natehtali v 25 mL merilne bučke in do oznake dopolnili z vodo brez CO₂ (ang. *carbon dioxide-free water*). V vsak vzorec smo dodali 0,3 mL fenolftaleina. Raztopine so bile brezbarvne. Postopoma smo s pipeto dodajali 20 µL 0,1 M NaOH in med mešanjem opazovali spremembo barve. Po farmakopeji je dovoljeno za spremembo barve indikatorja v rožnato manj kot 0,15 mL 0,1 M NaOH (26).

4.3.2. Magnezijev stearat

Teste smo izvedli v skladu s farmakopejskim predpisom iz monografije za magnezijev stearat (ang. *Magnesium stearate*) (27).

Kislost ali alkalinost

1,0 g vzorca magnezijevega stearata smo natehtali v 20 mL merilne burčke in do oznake dopolnili z vodo brez CO₂ (ang. *carbon dioxide-free water*) in ob stalnem mešanju segrevali pri temperaturi vrelišča 1 min. Vzorce smo ohladili in filtrirali. 10 mL filtrata smo dodali 0,05 mL raztopine bromotimolno modrega (2 paralelki). Raztopine so bile obarvane zelenkasto-modro. Nato smo postopoma s pipeto dodajali 0,1 M HCl ali 0,1 M NaOH in med mešanjem opazovali spremembo barve. Po farmakopeji je dovoljeno za spremembo barve indikatorja v temno modro manj kot 0,05 mL 0,1 M NaOH in za spremembo barve indikatorja v rumeno manj kot 0,05 mL 0,1 M HCl (27).

Kislinsko število (2.5.1)

Izolacija stearinske kisline (predpis Solution S): K 5,0 g vzorca magnezijevega stearata smo dodali 50 mL dietiletra (ang. *peroxide-free ether R*), 20 mL razredčene dušikove kisline (ang. *diluted nitric acid R*) in 20 mL vode. Bučko smo opremili s povratnim vodnim hladilnikom in refluktirali na oljni kopeli pri 60 °C, dokler se vzorci ne raztopijo. Zmes smo ohladili na sobno temperaturo in izvedli ekstrakcijo z lijem ločnikom. Ločili smo vodno fazo od organske faze in organsko fazo še dvakrat sprali s po 4 mL vode. Organski fazi smo nato z rotavaporjem uparili topilo (eter) in vzorce stearinske kisline sušili 4 ure v sušilniku pri 105 °C. Vzorce smo pred tehtanjem ohladili na sobno temperaturo (27).

V erlenmajerice smo približno natančno natehtali po 0,200 g (m v g) posušene stearinske kisline (po 3 paralelke za vsak vzorec) in jih raztopili v 20 mL mešanice topil enakih volumnov 96 % etanola in petroletra z vreliščem med 40 °C in 70 °C ter dodali 0,5 mL fenolftaleina kot indikatorja. Vzorce smo med stalnim mešanjem segreli do temperature vrelišča, da se je stearinska kislina hitreje raztopila. Nato smo izvedli titracijo z 0,1 M NaOH do stabilnega rožnatega obarvanja (n v mL). Kislinsko število smo izračunali po enačbi (28):

$$I_A = \frac{5,610 n}{m}$$

4.3.3. Krompirjev škrob

Teste smo izvedli v skladu s farmakopejskim predpisom iz monografije za krompirjev škrob (ang. *Potato starch*) (29).

pH (2.2.3)

V 25 mL merilno bučko smo natehtali 5,0 g vzorca krompirjevega škroba in do oznake dopolnili z vodo brez CO₂ (ang. *carbon dioxide-free water*) in 60 s stresali na stresalniku. Suspenzijo smo pustili 15 min, da so se delci posedli. Nato smo pomerili pH supernatantu v 3 paralelkah. Predhodno smo pH meter kalibrirali z dvema pufroma (pH 4,00 in pH 7,00) (29).

Oksidacija (2.5.30)

V 125 mL erlenmajerico smo natehtali približno natančno 4,0 g vzorca krompirjevega škroba in dodali 50 mL vode. Erlenmajerice smo zaprli in stresali na stresalniku 5 min. Suspenzijo smo pustili stati 15 min, da so se delci posedli. Nato smo 30 mL supernatanta prenesli v 125 mL erlenmajerico in dodali 1 mL ocetne kisline (ang. *glacial acetic acid*) ter od 0,5 do 1,0 mL kalijevega jodida (ang. *potassium iodide*). Vsebino smo z rahlim kroženjem premešali in pustili stati v temi 30 min. Nato smo dodali 1 mL škrobovice (ang. *starch solution*) in titrirali z 0,002 M raztopino natrijevega tiosulfata (ang. *sodium thiosulfate*) do razbarvanja (30).

4.3.4. Mikrokristalna celuloza

Teste smo izvedli v skladu s farmakopejskim predpisom iz monografije za mikrokristalno celulozo (ang. *Microcrystalline cellulose*) (31).

pH (2.2.3)

5 g vzorca mikrokristalne celuloza s 40 mL vode brez CO₂ (ang. *carbon dioxide-free water*) smo na stresalnu stresali 20 min. Suspenzijo smo pustili stati 5 min, da so se delci posedli. Supernatant smo previdno prelili v 3 čaše in pomerili pH. pH meter smo predhodno kalibrirali z dvema pufroma (pH 4,00 in pH 7,00) (31).

4.3.5. Maltodekstrin

Teste smo izvedli v skladu s farmakopejskim predpisom iz monografije za maltodekstrin (ang. *Maltodextrin*) (32).

pH (2.2.3)

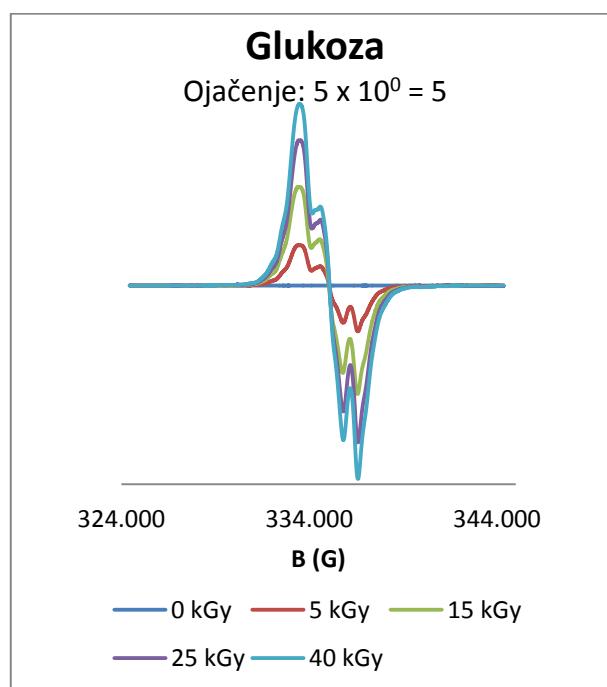
12,5 g vzorca maltodekstrina smo natehtali v 50 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z vodo brez CO₂ (ang. *carbon dioxide-free water*). Iz vsake bučke smo odpipetirali 30 mL pripravljene raztopine maltodekstrina in dodali 1 mL 223,6 g/l KCl (ang. *potassium chloride*) in pomerili pH (3 paralelke). pH meter smo predhodno kalibrirali z dvema pufroma (pH 4,00 in pH 7,00) (32).

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. EPR meritve pomožnih snovi

5.1.1. Glukoza

Glukoza brez kristalno vezane vode je pomožna snov za pripravo raztopin za intravensko infuzijo in injekcije ter polnilo za farmacevtske oblike za peroralno uporabo. Glukoza v aldehidni obliki lahko po Maillardovi rekaciji reagira z amini, amidi, aminokislinami, peptidi in proteini. Glukoza je v obliki zrnatega belega prahu s sladkim okusom brez vonja. Je nekompatibilna z močnimi bazami (33).



Slika 16: EPR spektri glukoze pri različnih odmerkih žarčenja (6 dni po žarčenju). Ojačenje 5×10^0

Vzorci glukoze se med seboj razlikujejo že po videzu. Neobsevan vzorec, ki je bil slepa kontrola, je snežno bele barve, medtem ko je vzorec, ki je obsevan z najvišjim odmerkom, obarvan rumeno. EPR spektri glukoze pri različnih odmerkih žarčenja so prikazani na sliki 16. Iz preglednic I in II je razvidno, da je v vzorcih glukoze približno dva do trikrat manj radikalov kot v alaninu, kar je relativno veliko in njihova vsebnost narašča sorazmerno z odmerkom sevanja, kar je prikazano na sliki 17. Radikali, ki nastanejo v brezvodni glukozi, so dokaj stabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 140 dneh le malo pada v primerjavi z meritvami po 6 dneh, kar vidimo na sliki 18. Nekoliko bolj EPR intenziteta

upade pri vzrocih, ki so obsevani z višjim odmerkom sevanja. Nastali radikali so stabilni, saj je glukoza v obliki kristala, zato so molekule manj gibljive in radikali med seboj težje reagirajo, prav tako je oviran dostop vode in kisika.

Preglednica I: Vzorci glukoze za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra (6 dni po žarčenju): $m_{meritev} = \frac{23 \text{ mm}}{h} \times m_{vzorec}$, $EPR_{int.} = \frac{\text{intenziteta}}{\text{obječenje}}$,

$n_{p\text{-centrov}} = EPR \text{ int.} \times (1,306 \times 10^{-8} \text{ mol})$, $n_{p\text{-centrov}}/m_{meritev}$ (enako pri vseh preglednicah za prvo časovno točko)

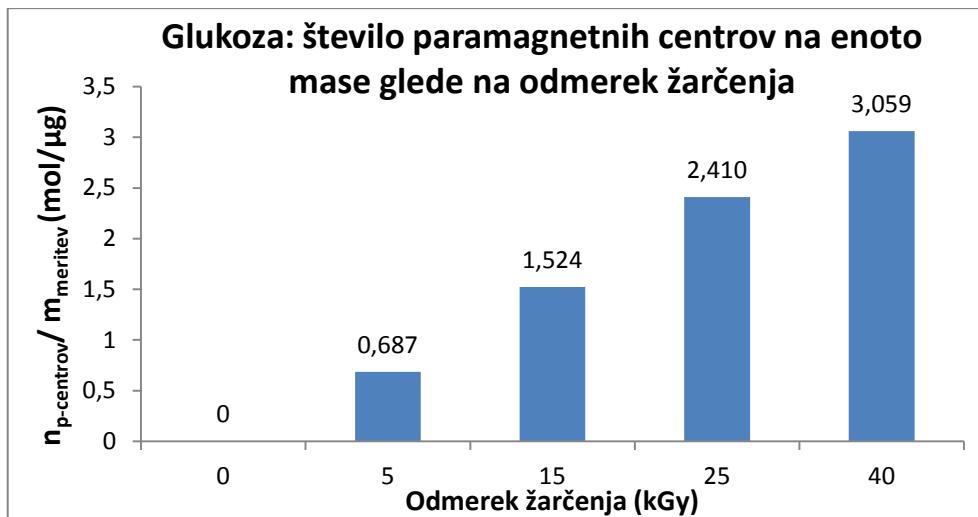
Odmerek (kGy)	$m_{meritev}$ (g)	h (mm)	V (μL)	P_{zbita} (g/L)	EPR int.	$n_{p\text{-centrov}}$ (mol)	$n_{p\text{-centrov}}/m_{meritev}$ (mol/g)
0	0,1641	64	452,4	1,009	0	0	0
5	0,1521	79	558,4	0,936	8,0	$1,05 \times 10^{-7}$	$6,87 \times 10^{-7}$
15	0,1645	75	530,1	1,012	19,2	$2,51 \times 10^{-7}$	$1,52 \times 10^{-6}$
25	0,1518	112	791,7	0,933	28,0	$3,66 \times 10^{-7}$	$2,41 \times 10^{-6}$
40	0,1486	104	735,1	0,914	34,8	$4,55 \times 10^{-7}$	$3,06 \times 10^{-6}$

Preglednica II: Vzorci glukoze za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR

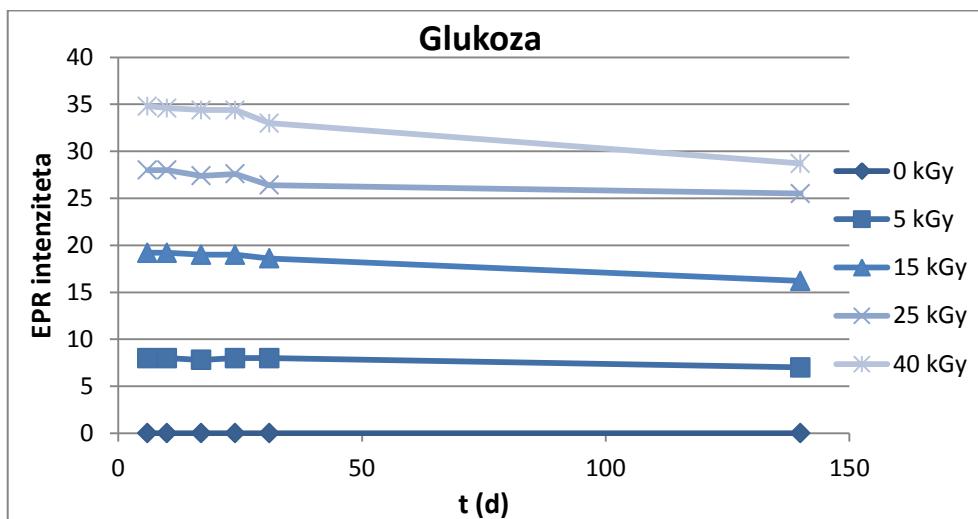
spektra (140 dni po žarčenju): $m_{meritev} = \frac{23 \text{ mm}}{h} \times m_{vzorec}$, $EPR_{int.} = \frac{\text{intenziteta}}{\text{obječenje}}$,

$n_{p\text{-centrov}} = EPR \text{ int.} \times (1,607 \times 10^{-8} \text{ mol})$, $n_{p\text{-centrov}}/m_{meritev}$ (enako pri vseh preglednicah za zadnjo časovno točko)

Odmerek (kGy)	$m_{meritev}$ (g)	h (mm)	V (μL)	P_{zbita} (g/L)	EPR int.	$n_{p\text{-centrov}}$ (mol)	$n_{p\text{-centrov}}/m_{meritev}$ (mol/g)
0	0,1594	131	925,98	980,58	0	0	0
5	0,1477	117	827,02	908,68	7,0	$1,13 \times 10^{-7}$	$7,61 \times 10^{-7}$
15	0,1497	122	862,37	920,61	16,2	$2,60 \times 10^{-7}$	$1,74 \times 10^{-6}$
25	0,1637	129	911,85	1007,08	25,5	$4,10 \times 10^{-7}$	$2,50 \times 10^{-6}$
40	0,1418	134	947,19	871,95	28,7	$4,61 \times 10^{-7}$	$3,25 \times 10^{-6}$



Slika 17: Odvisnost števila paramagnetičnih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri glukozi (6 dni po žarčenju)

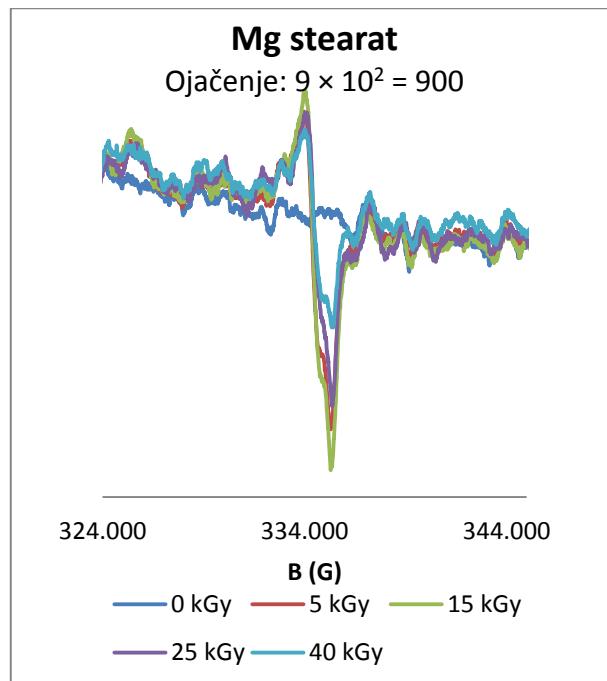


Slika 18: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih glukoze po 6-ih, 10-ih, 17-ih, 24-ih, 31-ih in 140-ih dnevih po žarčenju

5.1.2. Magnezijev stearat

Magnezijev stearat je zmes magnezijevih soli različnih trdnih organskih kislin, ki so večinoma sestavljena iz magnezijevega palmitata, ki ga pridobimo iz živalskih ali rastlinskih virov. Magnezijev stearat je v obliki drobnega, oborjenega ali zmletega belega ali svetlo rumenega prahu, ki je masten na otip. Uporabljamo ga v vlogi maziva in antiadheziva pri tabletah in kapsulah. Magnezijev stearat je nekompatibilen z močnimi kislinami, bazami in železovimi solmi. Ne uporablja se v zdravilih, ki vsebujejo acetilsalicilno kislino, nekatere vitamine in večino alkaloidnih soli. Magnezijev stearat izdelamo z reakcijo vodne raztopine magnezijevega klorida z natrijevim stearatom ali z

reakcijo magnezijevega oksida, hidroksida ali karbonata s stearinsko kislino pri povišani temperaturi (33, 34).



Slika 19: EPR spektri Mg stearata pri različnih odmerkih žarčenja (7 dni po žarčenju). Ojačenje 9×10^2

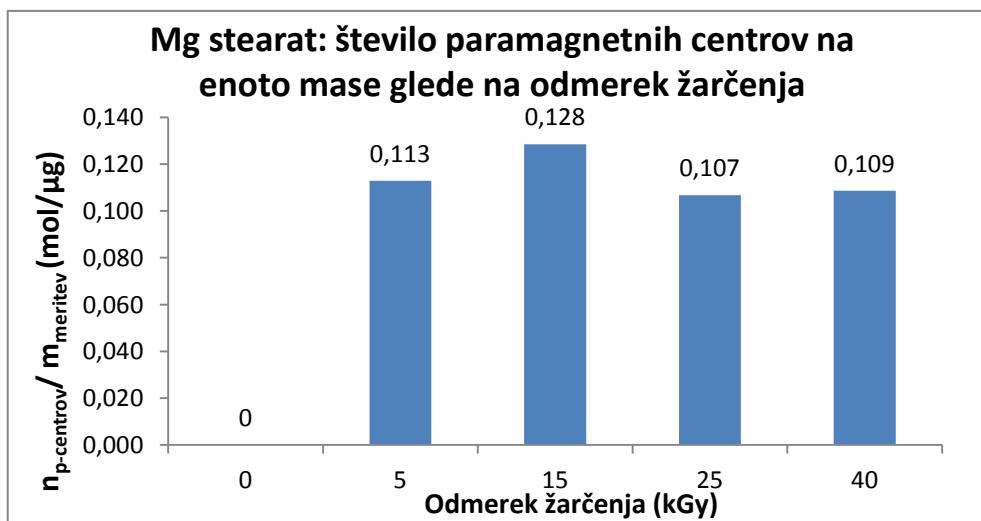
Vzorci magnezijevega stearata se med seboj po videzu ne razlikujejo. Tako neobsevani vzorec kot vzorec, ki je obsevan z najvišjim odmerkom, sta bele barve. EPR spektri vzorcev so bili posneti pri najvišjem ojačenju instrumenta in so zato zelo zašumljeni, kar je razvidno tudi iz slike 19. V vzorcih magnezijevega stearata je sodeč po številu paramagnetskih centrov na enoto mase, ki je zelo nizko, zelo malo radikalov, kar je prikazano v preglednicah III in IV. Razlike med EPR intenziteto med različnimi odmerki sevanja so zelo majhne, kar lahko vidimo na sliki 20. Radikali, ki nastanejo v magnezijevem stearatu, so nestabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 147 dneh pada na polovične vrednosti v primerjavi z meritvami po 7 dneh, kar je prikazano na sliki 21.

Preglednica III: Vzorci Mg stearata za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 7 dni po žarčenju

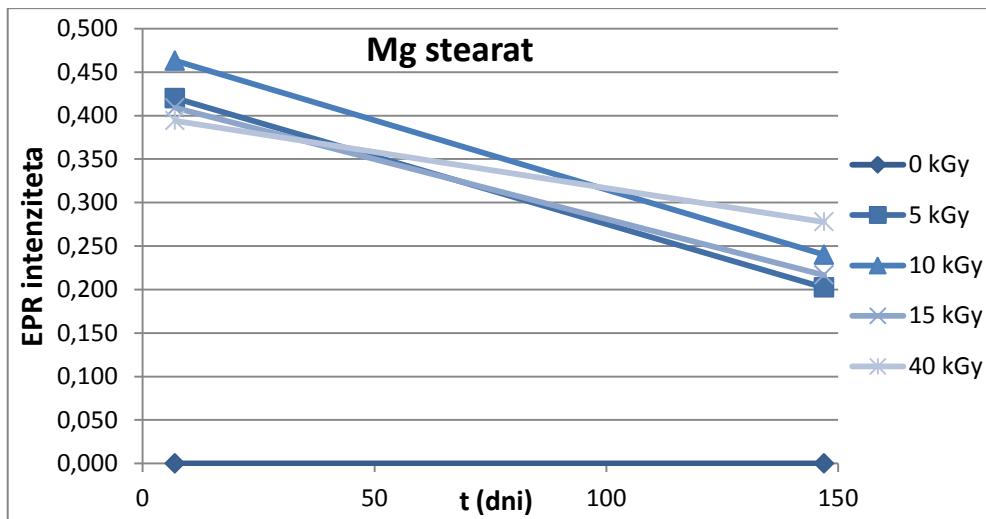
Odmerek (kGy)	m _{meritev} (g)	H (mm)	V (µL)	P _{zbita} (g/L)	EPR int.	n _{p-centrov} (mol)	n _{p-centrov} /m _{meritev} (mol/g)
0	0,0492	105	742,2	0,302	0	0	0
5	0,0486	120	848,2	0,299	0,420	$5,49 \times 10^{-9}$	$1,13 \times 10^{-7}$
15	0,0471	99	699,8	0,290	0,463	$6,05 \times 10^{-9}$	$1,28 \times 10^{-7}$
25	0,0501	126	890,6	0,308	0,409	$5,34 \times 10^{-9}$	$1,07 \times 10^{-7}$
40	0,0474	138	975,4	0,292	0,394	$5,15 \times 10^{-9}$	$1,09 \times 10^{-7}$

Preglednica IV: Vzorci Mg stearata za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 147 dni po žarčenju

Odmerek (kGy)	m _{meritev} (g)	h (mm)	V (µL)	P _{zbita} (g/L)	EPR int.	n _{p-centrov} (mol)	n _{p-centrov} /m _{meritev} (mol/g)
0	0,0422	110	777,54	259,54	0	0	0
5	0,0394	120	848,23	242,27	0,202	$3,25 \times 10^{-9}$	$8,25 \times 10^{-8}$
15	0,0430	101	713,93	264,45	0,240	$3,86 \times 10^{-9}$	$8,97 \times 10^{-8}$
25	0,0416	115	812,89	256,12	0,217	$3,48 \times 10^{-9}$	$8,36 \times 10^{-8}$
40	0,0435	102	721,00	267,82	0,278	$4,46 \times 10^{-9}$	$1,03 \times 10^{-7}$

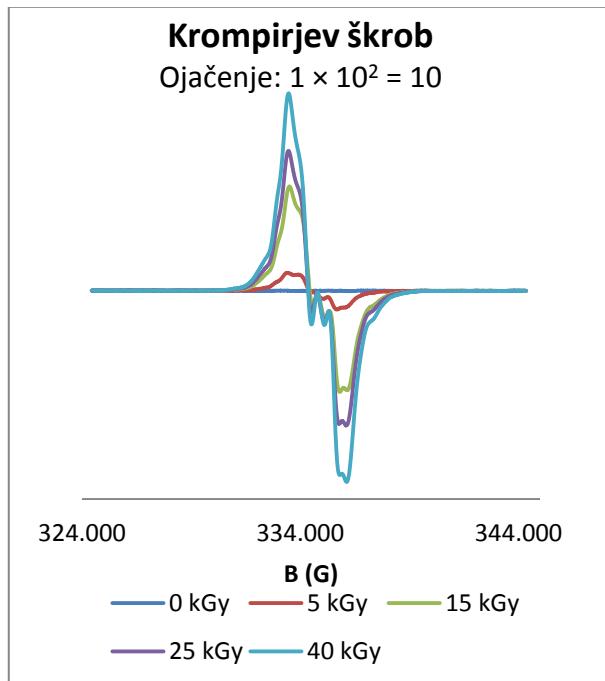


Slika 20: Odvisnost števila paramagnetnih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri magnezijevem stearatu (7 dni po žarčenju)



Slika 21: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih magnezijevega stearata po 7-ih in 147-ih dnevih po žarčenju

5.1.3. Krompirjev škrob



Slika 22: EPR spektri škroba pri različnih odmerkih žarčenja (7 dni po žarčenju). Ojačenje 1×10^1

Škrob je naravni polisaharid, sestavljen iz povezanih glukoznih enot. Škrob je v obliki drobnega belega prahu, brez vonja in okusa. Sestavljen je iz majhnih sferičnih ali ovalnih granul ali zrnc, katerih velikost in oblika sta odvisni od botanične raznolikosti. Uporabljamo ga kot razgrajevalo z nabrekanjem, vezivo in zgoščevalo. Škrob je nekompatibilen z močnimi oksidanti. Reagira z jodom in tvoriobarvane raztopine. Škrob

pridobivajo iz različnih žit in krompirja. Po mokrem mletju ga iz tkiv izperejo z vodo, ločijo od ostalih sestavin in posušijo (33, 34).

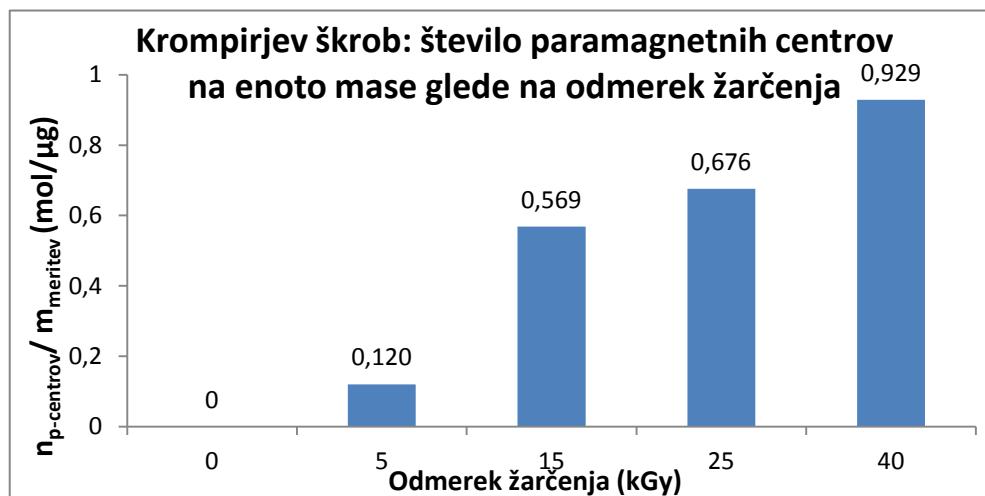
Vzorci krompirjevega škroba se med seboj razlikujejo že po videzu. Neobsevan vzorec, ki je bil slepa kontrola, je snežno bele barve, medtem ko je vzorec, ki je obsevan z najvišjim odmerkom, obarvan svetlo rumeno. EPR spektri škroba pri različnih odmerkih žarčenja so prikazani na sliki 22. Števila paramagnetskih centrov krompirjevega škroba na enoto mase so zelo nizka, kar pomeni, da je v vzorcih zelo malo radikalov, kar je prikazano na preglednicah V in VI. S povečevanjem odmerka sevanja narašča množina paramagnetskih centrov v materialu, kar je prikazano na sliki 23. Radikali, ki nastanejo v krompirjevem škrobu, so zelo nestabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 147 dneh zelo pada v primerjavi z meritvami po 7 dneh (desetkrat nižje vrednosti), kar je prikazano na sliki 24. Kinetika pretvorbe v diamagnetne produkte je hitra in je enako hitra pri vseh odmerkih sevanja. Med obsevanjem z gama-žarki nastajajo radikali škroba, ki med seboj reagirajo, kar vodi v premreževanje škroba – nastanek neradikalnih produktov, ki so EPR neaktivni, kar je prikazano na sliki 2 (7).

Preglednica V: Vzorci krompirjevega škroba za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenzitetu EPR spektra 7 dni po žarčenju

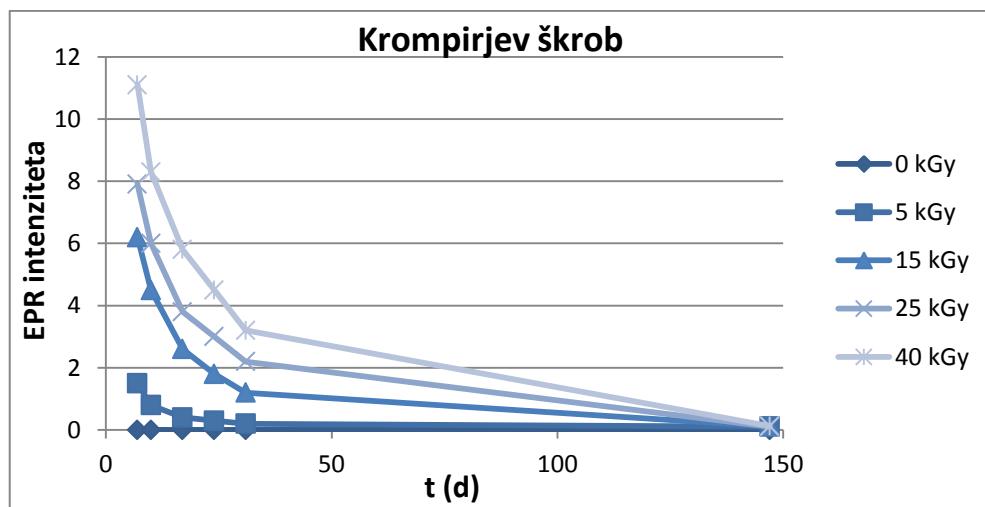
Odmerek (kGy)	m_{meritev} (g)	h (mm)	V (μL)	P_{zbita} (g/L)	EPR int.	$n_{\text{p-centrov}}$ (mol)	$n_{\text{p-centrov}}/m_{\text{meritev}}$ (mol/g)
0	0,1458	158	1116,8	0,897	0	0	0
5	0,1633	156	1102,7	1,004	1,5	$1,96 \times 10^{-8}$	$1,20 \times 10^{-7}$
15	0,1424	172	1215,8	0,876	6,2	$8,10 \times 10^{-8}$	$5,69 \times 10^{-7}$
25	0,1527	172	1215,8	0,939	7,9	$1,03 \times 10^{-7}$	$6,76 \times 10^{-7}$
40	0,1560	161	1138,0	0,960	11,1	$1,45 \times 10^{-7}$	$9,29 \times 10^{-7}$

Preglednica VI: Vzorci krompirjevega škroba za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 147 dni po žarčenju

Odmerek (kGy)	m _{meritev} (g)	h (mm)	V (µL)	P _{zbita} (g/L)	EPR int.	n _{p-centrov} (mol)	n _{p-centrov} /m _{meritev} (mol/g)
0	0,1364	145	1024,94	838,78	0	0	0,0
5	0,1312	134	947,19	806,81	0,110	$1,77 \times 10^{-9}$	$1,35 \times 10^{-8}$
15	0,1315	120	848,23	809,10	0,119	$1,91 \times 10^{-9}$	$1,45 \times 10^{-8}$
25	0,1164	133	940,12	715,97	0,108	$1,73 \times 10^{-9}$	$1,49 \times 10^{-8}$
40	0,1295	118	834,09	796,43	0,123	$1,98 \times 10^{-9}$	$1,53 \times 10^{-8}$



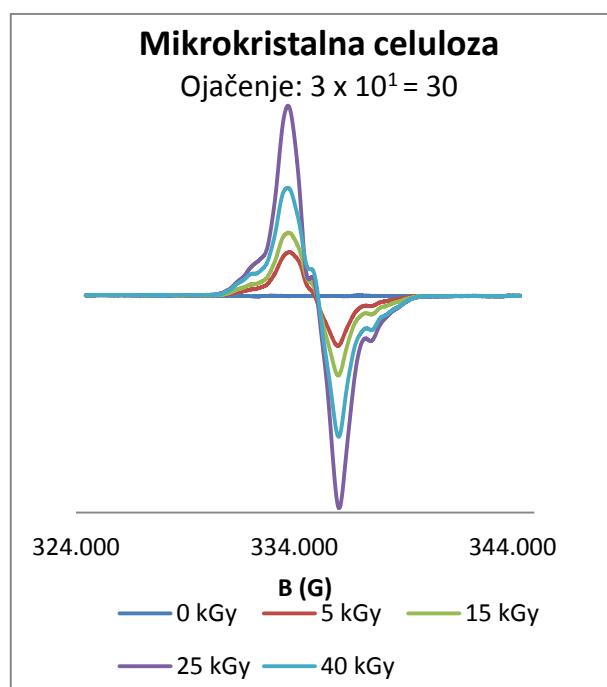
Slika 23: Odvisnost števila paramagnetnih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri krompirjevem škrobu (7 dni po žarčenju)



Slika 24: Upadanje intenzitete EPR signalov pri vzorcih krompirjevega škroba po 7-ih, 10-ih, 17-ih, 24-ih, 31-ih in 147-ih dnevih po žarčenju

5.1.4. Mikrokristalna celuloza

Mikrokristalna celuloza (MCC) je prečiščena, delno depolimerizirana celuloza, ki je pripravljena iz celuloze s postopkom kisle hidrolize. Mikrokristalna celuloza je v obliki drobnega ali zrnatega belega prahu, ki je brez vonja in okusa. Delci so porozni, z veliko specifično površino in hidrofilnim značajem. Komercialno so na voljo delci različnih velikosti (od 20 do 150 µm) in vsebnosti vlage, kar jim da različne lastnosti in možnosti uporabe. Uporablja se kot vezivo in polnilo v tabletah, v kapsulah in v peletah, ima pa tudi sposobnosti drsila in razgrajevala v tabletah. Kot adsorbent se uporablja tudi v kozmetologiji. Mikrokristalna celuloza je nekompatibilna z močnimi oksidanti (33, 34).



Slika 25: EPR spektri mikrokristalne celuloze pri različnih odmerkih žarčenja (7 dni po žarčenju). Ojačenje 3×10^1

Vzorci mikrokristalne celuloze se med seboj razlikujejo že po videzu. Neobsevan vzorec, ki je bil slepa kontrola, je snežno bele barve, medtem ko so vzorci, ki so obsevani z gama-žarki, rahlo rumenkasto obarvani. EPR spektri mikrokristalne celuloze pri različnih odmerkih žarčenja, so prikazani na sliki 25. Števila paramagnetnih centrov MCC na enoto mase so zelo nizka, kar pomeni da je v vzorcih malo radikalov, kar je prikazano v preglednicah VII in VIII. Z večanjem odmerka sevanja narašča množina paramagnetnih centrov v materialu, a le do odmerka 25 kGy, kar je prikazno na sliki 26. Pri vzorcu, ki je bil obsevan s 40 kGy, je množina paramagnetnih centrov nižja od množine paramagnetnih

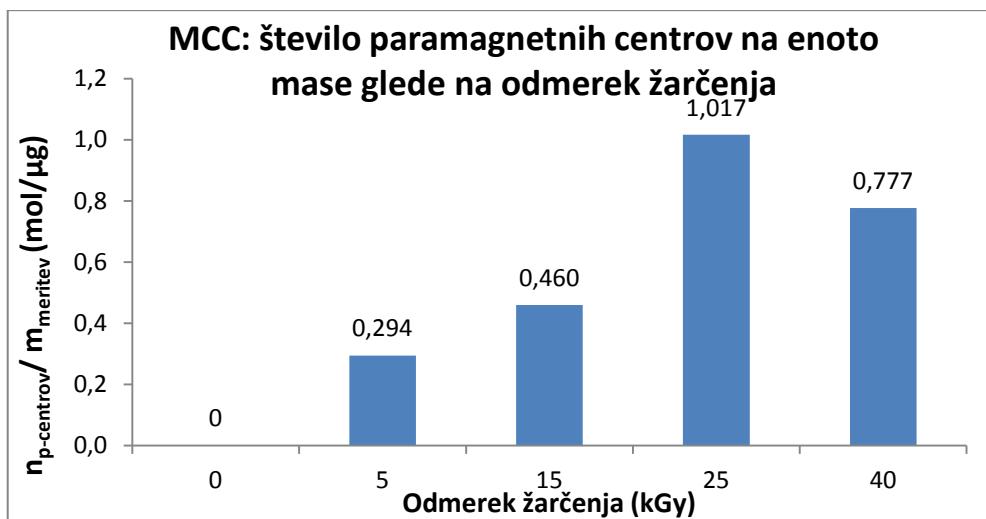
centrov vzorca, ki je obsevan s 25 kGy. Vzrok za to je najverjetneje različna kinetika, s katero se radikali pretvarjajo v diamagnetne produkte: izrazito hitreje namreč upada intenziteta EPR signala pri vzorcih, ki so bili obsevani z višjimi odmerki. Radikali, ki nastanejo v mikrokristalni celulozi, so dokaj nestabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 141 dneh pade v primerjavi z meritvami po 7 dneh (šestkrat nižje vrednosti), kar je prikazano na sliki 27.

Preglednica VII: Vzorci MCC za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 7 dni po žarčenju

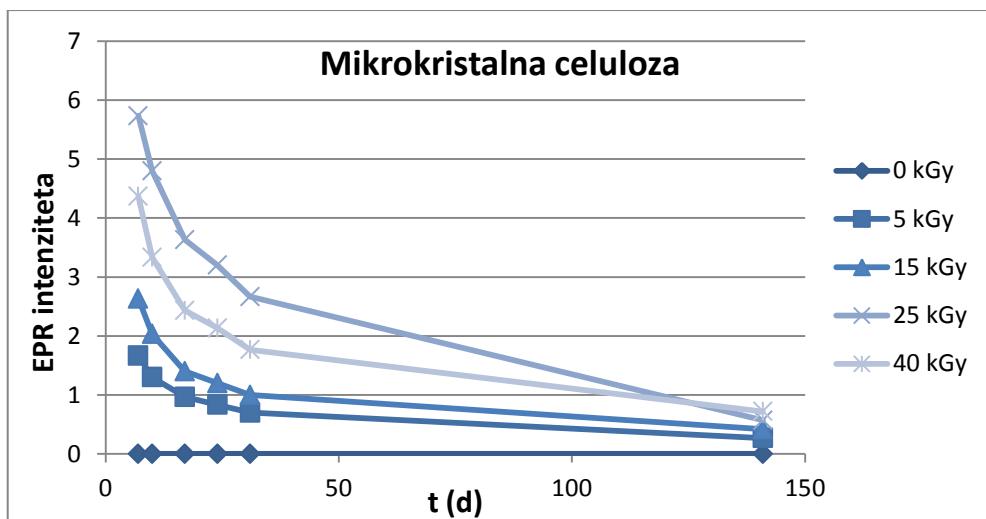
Odmerek (kGy)	m _{meritev} (g)	h (mm)	V (µL)	P _{zbita} (g/L)	EPR int.	n _{p-centrov} (mol)	n _{p-centrov} /m _{meritev} (mol/g)
0	0,0762	145	1024,9	0,469	0	0	0
5	0,0740	162	1145,1	0,455	1,67	$2,18 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$
15	0,0748	164	1159,2	0,460	2,63	$3,44 \times 10^{-8}$	$4,60 \times 10^{-7}$
25	0,0737	154	1088,5	0,453	5,73	$7,49 \times 10^{-8}$	$1,02 \times 10^{-7}$
40	0,0734	146	1032,0	0,452	4,37	$5,70 \times 10^{-8}$	$7,77 \times 10^{-7}$

Preglednica VIII: Vzorci MCC za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 141 dni po žarčenju

Odmerek (kGy)	m _{meritev} (g)	h (mm)	V (µL)	P _{zbita} (g/L)	EPR int.	n _{p-centrov} (mol)	n _{p-centrov} /m _{meritev} (mol/g)
0	0,0726	121	855,30	446,51	0	0	0
5	0,0733	127	897,71	450,81	0,273	$4,39 \times 10^{-9}$	$5,99 \times 10^{-8}$
15	0,0740	123	869,44	455,35	0,420	$6,75 \times 10^{-9}$	$9,12 \times 10^{-8}$
25	0,0646	125	883,57	397,14	0,567	$9,11 \times 10^{-9}$	$1,41 \times 10^{-7}$
40	0,0709	136	961,33	436,27	0,723	$1,16 \times 10^{-8}$	$1,64 \times 10^{-7}$



Slika 26: Odvisnost števila paramagnetnih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri mikrokristalni celulozi (7 dni po žarčenju)

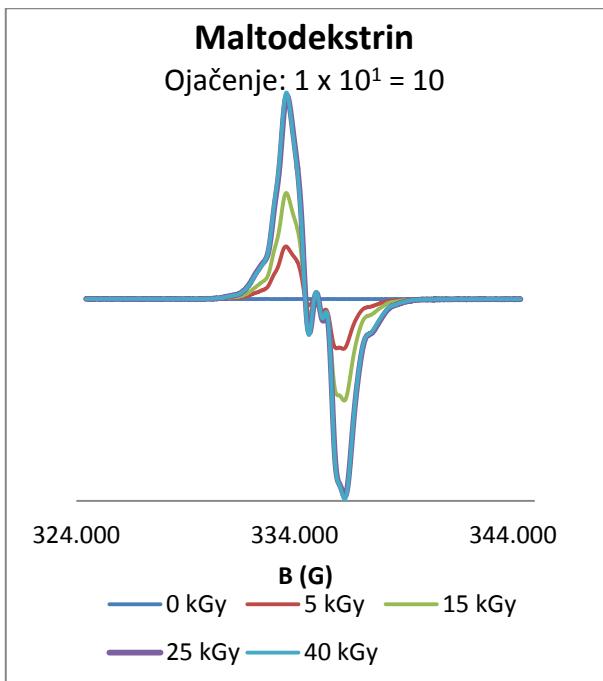


Slika 27: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih mikrokristalne celuloze po 7-ih, 10-ih, 17-ih, 24-ih, 31-ih in 141-ih dnevih po žarčenju

5.1.5. Maltodekstrin

Maltodekstrin je zmes glukoze, oligosaharidov in polisaharidov iz D-glukoznih enot, povezanih z 1,4- α in 1,6- α glikozidnimi vezmi, ki ga pridobivamo z delno hidrolizo škroba. Stopnja hidrolize, ki je izražena kot ekvivalent dekstroze (ang. dextrose equivalent), je manj kot 20. Maltodekstrin je bel ali kremno bel higroskopen prah ali zrnca s sladkim okusom in brez vonja. Uporabljam ga kot korigens okusa, polnilo v tabletah in kapsulah, vezivo pri tabletah, zgoščevalo v raztopinah in kot pomožno snov za preprečevanje kristalizacije v sirupih. Maltodekstrin je nekompatibilen z močnimi

oksidanti. Maltodekstrin pri določenem pH in določeni temperaturi po Maillardovi reakciji reagira z aminokislinami (33, 34).



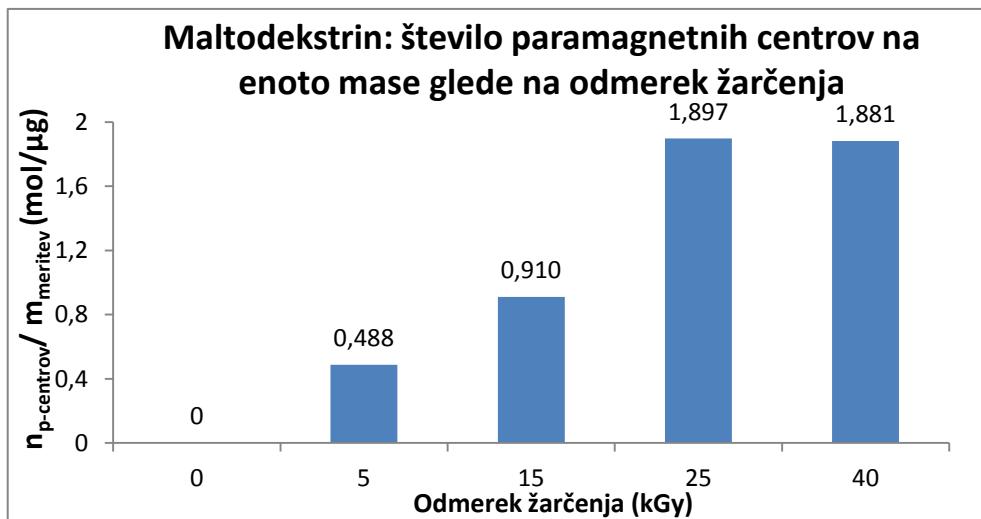
Slika 28: EPR spektri maltodekstrina pri različnih odmerkih žarčenja (7 dni po žarčenju). Ojačenje 1×10^1 . Vzorci maltodekstrina se med seboj po videzu ne razlikujejo. Neobsevan vzorec in obsevani vzorci so bele barve. EPR spektri maltodekstrina pri različnih odmerkih žarčenja so prikazani na sliki 28. Števila paramagnetnih centrov maltodekstrina na enoto mase so zelo nizka, kar pomeni da je v vzorcih malo radikalov, kar je prikazano v preglednicah IX in X. Radikali, ki nastanejo v mikrokristalni celulozi, so dokaj nestabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 141 dneh pade v primerjavi z meritvami po 7 dneh (petkrat nižje vrednosti). Podobno kot pri škrobu tudi pri maltodekstrinu (pridobivamo ga s delno hidrolizo škroba) z obsevanjem z gama-žarki nastanejo radikali maltodekstrina, ki med seboj reagirajo in tvorijo neradikalske produkte, ki so EPR neaktivni (7). Podobno kot pri MCC z večanjem odmerka sevanja narašča množina paramagnetnih centrov v materialu, a le do odmerka 25 kGy, kar je prikazno na sliki 29. Pri vzorcu, ki je bil obsevan s 40 kGy, je množina paramagnetnih centrov nižja od množine paramagnetnih centrov vzorca, ki je obsevan s 25 kGy. Vzrok za to je najverjetneje različna kinetika, s katero se radikali pretvarjajo v diamagnetne produkte: izrazito hitreje namreč upada intenziteta EPR signala pri vzorcih, ki so bili obsevani z višjimi odmerki.

Preglednica IX: Vzorci maltodekstrina za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 7 dni po žarčenju

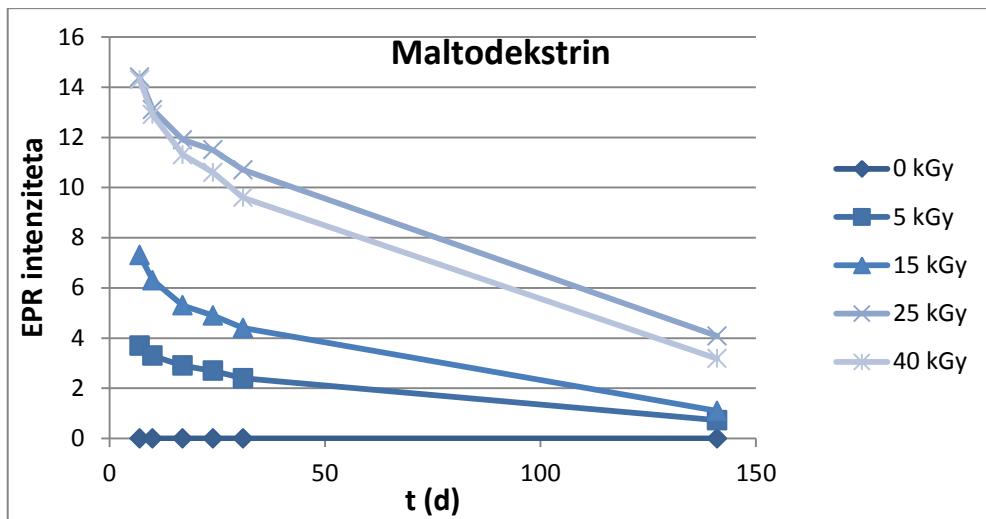
Odmerek (kGy)	m _{meritev} (g)	h (mm)	V (µL)	P _{zbita} (g/L)	EPR int.	n _{p-centrov} (mol)	n _{p-centrov} /m _{meritev} (mol/g)
0	0,1011	90	636,2	0,622	0	0	0
5	0,0991	130	918,9	0,609	3,7	$4,83 \times 10^{-8}$	$4,88 \times 10^{-7}$
15	0,1047	145	1024,9	0,644	7,3	$9,53 \times 10^{-8}$	$9,10 \times 10^{-7}$
25	0,0991	153	1081,5	0,610	14,4	$1,88 \times 10^{-7}$	$1,90 \times 10^{-6}$
40	0,0993	157	1109,8	0,611	14,3	$1,87 \times 10^{-7}$	$1,88 \times 10^{-6}$

Preglednica X: Vzorci maltodekstrina za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenziteto EPR spektra 141 dni po žarčenju

Odmerek (kGy)	m _{meritev} (g)	h (mm)	V (µL)	P _{zbita} (g/L)	EPR int.	n _{p-centrov} (mol)	n _{p-centrov} /m _{meritev} (mol/g)
0	0,0886	132	933,05	544,88	0	0	0
5	0,0919	136	961,33	565,36	0,73	$1,17 \times 10^{-8}$	$1,27 \times 10^{-7}$
15	0,0998	138	975,46	614,07	1,10	$1,77 \times 10^{-8}$	$1,77 \times 10^{-7}$
25	0,0977	152	1074,42	600,88	4,08	$6,55 \times 10^{-8}$	$6,70 \times 10^{-7}$
40	0,1033	115	812,89	635,51	3,18	$5,10 \times 10^{-8}$	$4,94 \times 10^{-7}$



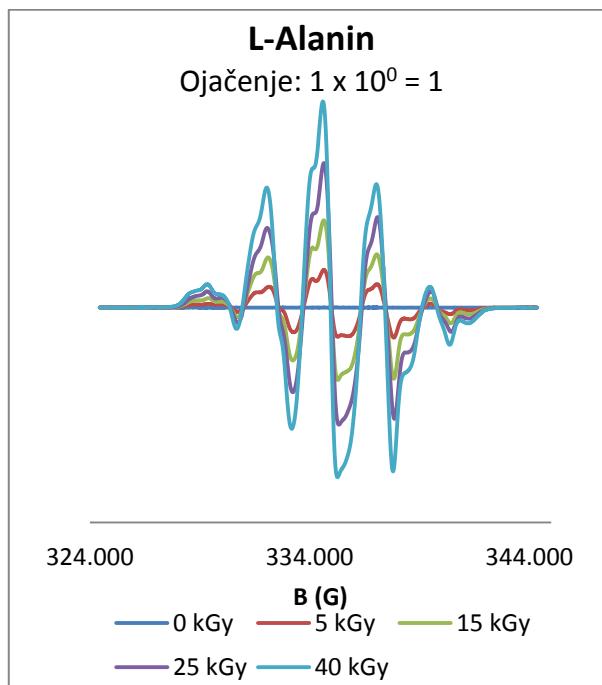
Slika 29: Odvisnost števila paramagnetičnih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri maltodekstrin (7 dni po žarčenju)



Slika 30: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih maltodekstrina po 7-ih, 10-ih, 17-ih, 24-ih, 31-ih in 141-ih dnevih po žarčenju

5.1.6. L-Alanin

L-alanin smo uporabili kot EPR dozimeter za preverjanje odmerka sevanja.



Slika 31: EPR spektri L-alanina pri različnih odmerkih žarčenja (6 dni po žarčenju). Ojačenje 1×10^0

Vzorci alanina se med seboj razlikujejo že po videzu. Neobsevan vzorec, ki je bil slepa kontrola, je snežno bele barve, pri obsevanih vzorcih pa se pojavi rumenkasto obarvanje, ki je bolj intenzivna pri višjih odmerkih sevanja. Števila paramagnetskih centrov alanina na enoto mase so dokaj visoka, kar pomeni da je v vzorcih veliko radikalov, kar je prikazano

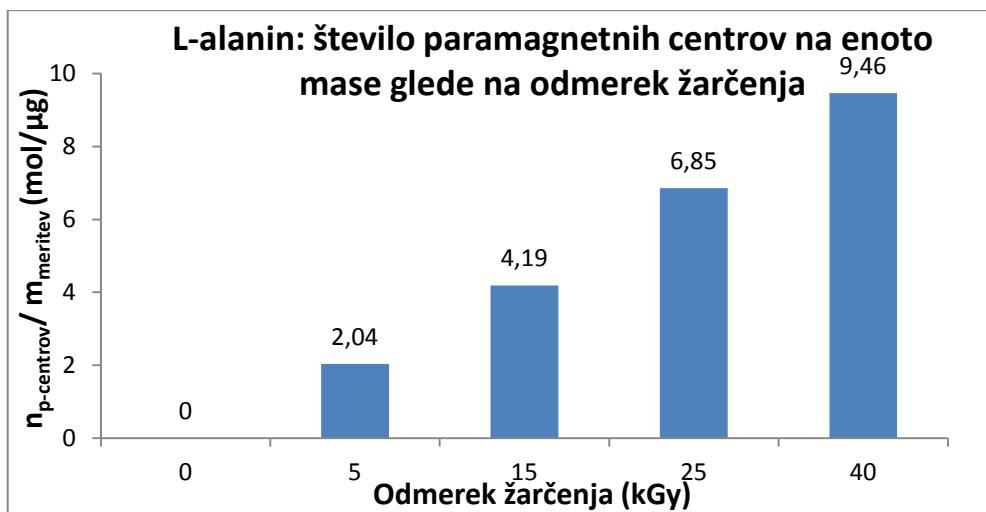
v preglednicah XI in XII ter na sliki 32. Vzorci alanina imajo značilen EPR spekter, kar lahko vidimo na sliki 31. Takšni EPR spektri so značilni za polikristalinične vzorce, ki vsebujejo stabilne alaninske radikale (18). Radikali v alaninu so stabilni zaradi kristalne oblike in v čisti suhi obliki alanina se signal v prvem letu po obsevanju zmanjša le za 4 %, zato se uporablja v EPR dozimetrih (20). Iz slike 33 je razvidno, da so alaninski radikali stabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 140 dneh pade za približno 6 % v primerjavi z meritvami po 6 dneh. Nekoliko bolj EPR intenziteta upade pri vzrocih, ki so obsevani z višjim odmerkom sevanja. Intenziteta ni linearno odvisna od odmerka obsevanja, se pa precej približa premici (vrednosti R^2 blizu 1), kar je razvidno iz slike 32. Alaninski dozimeter ima linearen odziv pri odmerku sevanja od 1 Gy do 10^4 Gy (20).

Preglednica XI: Vzorci alanina za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenzitetu EPR spektra 6 dni po žarčenju

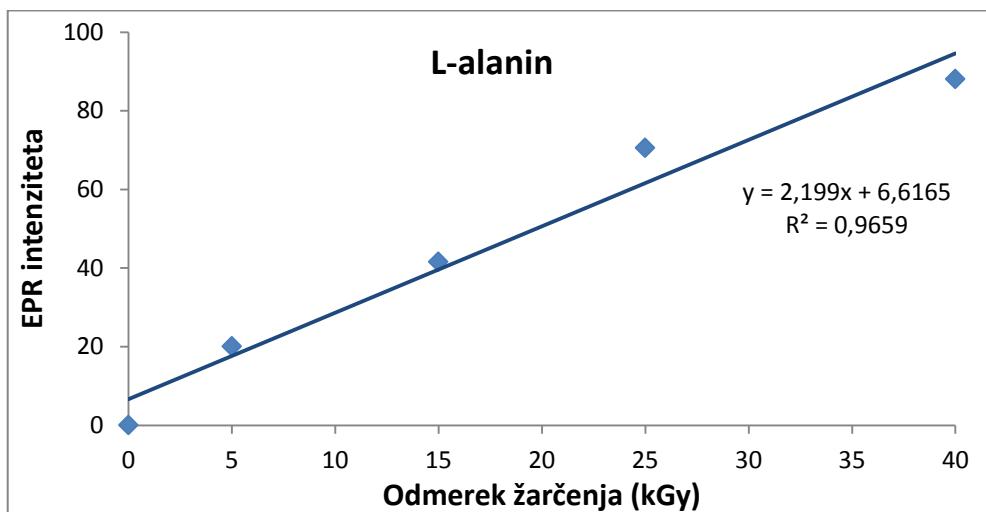
Odmerek (kGy)	m_{meritev} (g)	H (mm)	V (μL)	P_{zbita} (g/L)	EPR int.	$n_{\text{p-centrov}}$ (mol)	$n_{\text{p-centrov}}/m_{\text{meritev}}$ (mol/g)
0	0,1384	53	374,6	0,851	0	0	0
5	0,1282	61	431,2	0,788	20	$2,61 \times 10^{-7}$	$2,04 \times 10^{-6}$
15	0,1404	64	452,4	0,863	45	$5,88 \times 10^{-7}$	$4,19 \times 10^{-6}$
25	0,1448	68	480,7	0,891	76	$9,93 \times 10^{-7}$	$6,85 \times 10^{-6}$
40	0,1408	68	480,7	0,866	102	$1,33 \times 10^{-6}$	$9,46 \times 10^{-6}$

Preglednica XII: Vzorci alanina za EPR meritev z izračunano zbito gostoto in izmerjeno intenzitetu EPR spektra 140 dni po žarčenju

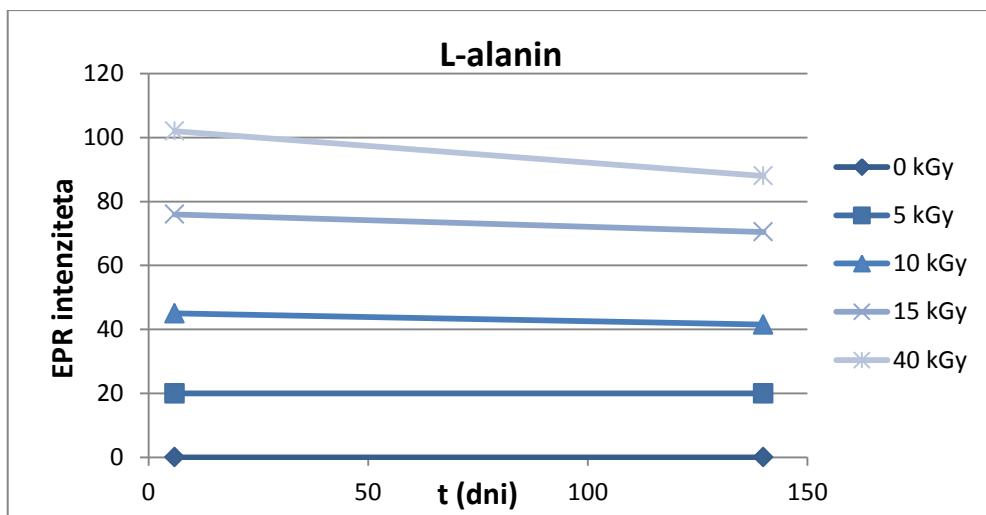
Odmerek (kGy)	m_{meritev} (g)	H (mm)	V (μL)	P_{zbita} (g/L)	EPR int.	$n_{\text{p-centrov}}$ (mol)	$n_{\text{p-centrov}}/m_{\text{meritev}}$ (mol/g)
0	0,1558	108	763,41	958,20	0	0	0
5	0,1290	101	713,93	793,36	20,0	$3,21 \times 10^{-7}$	$2,49 \times 10^{-6}$
15	0,1280	104	735,13	787,20	41,5	$6,67 \times 10^{-7}$	$5,21 \times 10^{-6}$
25	0,1121	106	749,27	689,47	70,5	$1,13 \times 10^{-6}$	$1,01 \times 10^{-5}$
40	0,1314	118	834,09	808,30	88,0	$1,41 \times 10^{-6}$	$1,08 \times 10^{-5}$



Slika 32: Odvisnost števila paramagnetnih centrov na enoto mase glede na odmerek žarčenja pri L-alaninu (6 dni po žarčenju)



Slika 33: Odvisnost intenzitete EPR signala od odmerek žarčenja pri L-alaninu (140 dni po žarčenju)



Slika 34: Upadanje intenzitete EPR signala pri vzorcih alanina po 6-ih in 140-ih dnevih po žarčenju

Za optimalno spremljanje zgodnje kinetike zmanjševanja radikalov v vzorcih bi morali EPR spekture posneti takoj po opravljeni sterilizaciji, kar pa v našem primeru ni bilo mogoče zaradi dolgega prevoza iz mesta sterilizacije do fakultete.

5.2. Vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti

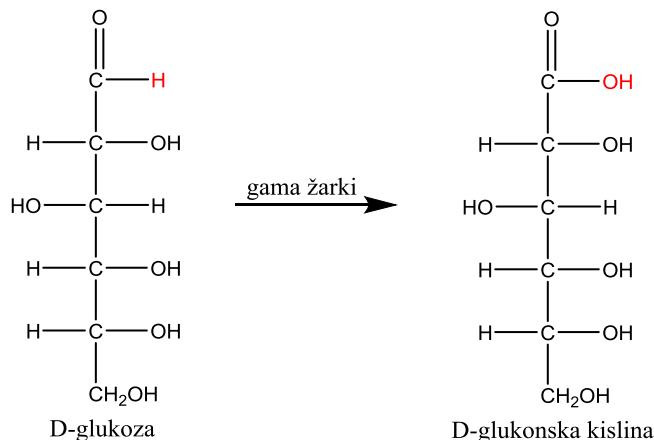
5.2.1. Glukoza

Kislost ali alkalinost

Preglednica XIII: Vzorci glukoze za določitev kislosti ali alkalinosti in ustreznost s farmakopejskim predpisom

Odmerek (kGy)	Masa vzorca (g)	Volumen (mL)	Parameter ustreza zahtevam PhEur
0	6,0	0,04	DA
5	6,0	0,54	NE
15	6,0	1,2	NE
25	6,0	1,8-1,9	NE
40	6,0	2,4	NE

Kislost glukoze narašča z večanjem odmerka sevanja (za spremembo barve indikatorja v rožnato smo dodali več kot 0,15 mL 0,1 M NaOH), kar je prikazano v preglednici XIII. V vzorcih potekajo oksidacije do karboksilnih kislin, kar prikazuje slika 35. Glukoza zaradi zakisanosti materiala ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.



Slika 35: Oksidacija glukoze do glukonske kisline

5.2.2. Magnezijev stearat

Kislota ali alkalnost

Kislota ali alkalnost vzorcev magnezijevega stearata se zaradi obsevanja z gama-žarki ne spremeni (za spremembo barve smo dodali manj kot 0,05 mL 0,1 M NaOH oziroma manj kot 0,05 mL 0,1 M HCl), kar je prikazano v preglednicah XIV in XV. Vzorci magnezijevega stearata ustrezano farmakopejskim zahtevam in pri obsevanju z gama-žarki ne pride do zakisanosti materiala.

Preglednica XIV: Vzorci Mg stearata za določitev kislosti ali alkalnosti po dodatku HCl in ustreznost s farmakopejskim predpisom

Odmerek (kGy)	Masa vzorca (g)	Volumen <u>0,1 M HCl</u> (µL) do rumene	Parameter ustreza zahtevam PhEur
0	1,0020	4	DA
5	1,0202	6	DA
15	0,9999	10	DA
25	1,0047	10	DA
40	1,0201	12	DA

Preglednica XV: Vzorci Mg stearata za določitev kislosti ali alkalnosti po dodatku NaOH in ustreznost s farmakopejskim predpisom

Odmerek (kGy)	Masa vzorca (g)	Volumen <u>0,1 M NaOH</u> (µL) do rumene	Parameter ustreza zahtevam PhEur
0	1,0010	2	DA
5	1,0020	3	DA
15	0,9999	3	DA
25	1,0195	2	DA
40	1,0031	2	DA

Kislinsko število (2.5.1): 195 do 210

V preglednici XVI je razvidno, da kislinsko število vzorcev magnezijevega stearata, ki so bili obsevani z 5, 15 in 25 kGy gama-žarki, ustreza farmakopejskim zahtevam (kislinsko število med 195 in 210). Vzorec, ki je bil obsevan z najvišjim odmerkom, 40 kGy, pa ima kislinsko število 191, kar pomeni, da farmakopejskim zahtevam ne ustreza. V tem primeru je prišlo do nastanka prostih maščobnih kislin iz stearinske kisline zaradi vplivov gama-žarkov nad dovoljeno mejo in takšen odmerek sevanja ni primeren za sterilizacijo magnezijevega stearata. Nižji odmerki sevanja pa so primerni za sterilizacijo Mg stearata.

Preglednica XVI: Vzorci stearinske kisline za določitev kislinskega števila (I_A) in ustreznost s farmakopejskim predpisom

Odmerek (kGy)	Masa vzorca (g)	Volumen 0,1M NaOH (mL)	I_A	Povprečje I_A	Parameter ustreza zahtevam PhEur
0	0,2008	7,10	198,36	196,70	DA
	0,2007	6,95	194,27		
	0,2162	7,61	197,47		
5	0,2071	7,25	196,39	195,67	DA
	0,2218	7,70	194,76		
	0,2406	8,40	195,86		
15	0,2030	7,20	198,98	200,79	DA
	0,2133	7,78	204,62		
	0,1984	7,03	198,78		
25	0,1977	6,89	195,51	196,17	DA
	0,2069	7,36	199,56		
	0,1975	6,81	193,44		
40	0,2134	7,40	194,54	191,84	NE
	0,2282	7,59	186,59		
	0,2176	7,54	194,39		

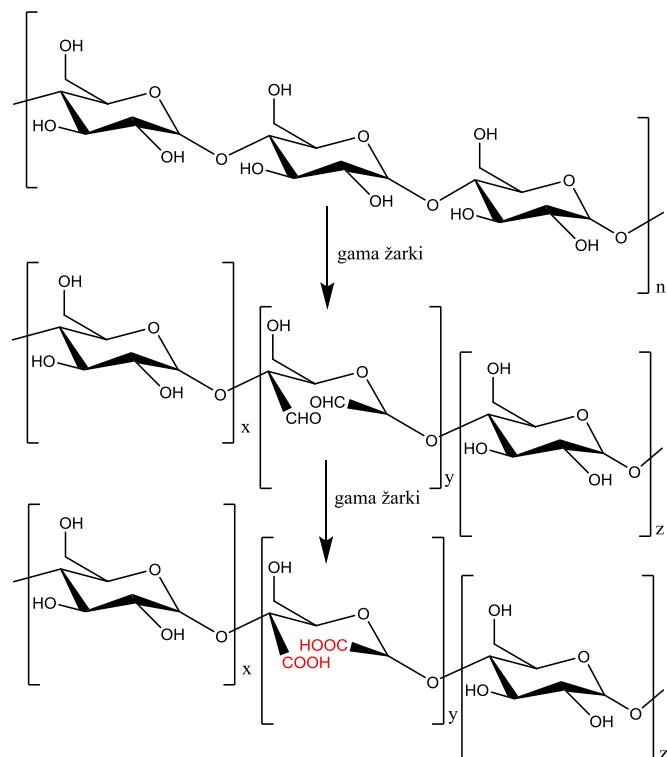
5.2.3. Krompirjev škrob

pH (2.2.3): 5,0 do 8,0

Preglednica XVII: pH vzorcev krompirjevega škroba in ustreznost s farmakopejskim predpisom

Odmerek (kGy)	pH	Parameter ustreza zahtevam PhEur
0	6,89	DA
5	4,94	NE
15	4,88	NE
25	4,28	NE
40	3,98	NE

Iz preglednice XVII je razvidno, da pH vzorcev krompirjevega škroba z večanjem odmerka sevanja pada, kar pomeni, da kislost materiala narašča. Podobne rezultate najdemo tudi v literaturi (35, 36). V vzorcih prihaja do oksidacije do karboksilnih kislin, kar je prikazano na sliki 36 (37, 38).



Slika 36: Oksidacija škroba do karboksilnih kislin

Oksidacija (2.5.30): maksimalno do 20 ppm, preračunano na H₂O₂

Preglednica XVIII: Vzorci krompirjevega škroba za meritev oksidirajočih snovi in ustreznost s farmakopejskim predpisom

Odmerek (kGy)	Masa vzorca (g)	Masa KI (g)	Volumen (2 mM Na ₂ S ₂ O ₃) (mL)	Parameter ustreza zahtevam PhEur
0	4,0200	0,9349	0	DA
5	4,0379	0,9357	0	DA
15	4,0006	0,9318	0	DA
25	4,0111	0,9550	0	DA
40	4,0362	0,9708	0	DA
slepa	0	0,9704	0	/

Po dodatku škrobovice raztopine krompirjevega škroba ne spremenijo barve, kar pomeni, da v vzorcih ni oksidirajočih snovi in posledično titracija z raztopino natrijevega tiosulfata ni mogoča, kar je prikazano v preglednici XVIII. Postopek smo preverili tako, da smo v vzorce dodali kapljico 30 % H₂O₂. Pri tem je prišlo do temno vijoličnega obarvanja. Po dodatku Na₂S₂O₃ se je raztopina vzorca povsem razbarvala. V vzorcih krompirjevega škroba tako ni oksidirajočih snovi (torej ne nastanejo stabilni peroksidi). Na podlagi tega lahko sklepamo, da radikali škroba ne reagirajo s kisikom do peroksilnih radikalov, ki vodijo v nastanek peroksidov. Prevladujoč mehanizem radikalske reakcije je tako nastanek karboksilnih skupin na molekuli glukoze, kar vodi v zakisanost materiala. Ravno zaradi neustreznih pH meritev krompirjev škrob ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.

5.2.4. Mikrokristalna celuloza

pH (2.2.3): 5,0 do 7,5

Iz preglednice XIX je razvidno, da pH vzorcev mikrokristalne celuloze z večanjem odmerka sevanja pada, kar pomeni, da kislost materiala narašča. Podobne rezultate najdemo tudi v literaturi (35, 36). V vzorcih prihaja do oksidacije do karboksilnih kisiln. Mikrokristalna celuloza zaradi zakisanosti ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.

Preglednica XIX: pH vzorcev mikrokristalne celuloze in ustreznost s farmakopejskim predpisom

Odmerek (kGy)	pH	Parameter ustreza zahtevam
		PhEur
0	5,97	DA
5	3,86	NE
15	3,61	NE
25	3,32	NE
40	3,29	NE

5.2.5. Maltodekstrin

pH (2.2.3): 4,0 do 7,0

Iz preglednice XX je razvidno, da pH vzorcev maltodekstrina z večanjem odmerka sevanja pada, kar pomeni, da kislota materiala narašča. Podobne rezultate najdemo tudi v literaturi (35, 36). V vzorcih prihaja do oksidacije do karboksilnih kisiln. Maltodekstrin zaradi zakisanosti ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.

Preglednica XX: pH vzorcev maltodekstrina in ustreznost s farmakopejskim predpisom

Odmerek (kGy)	pH	Parameter ustreza zahtevam
		PhEur
0	4,61	DA
5	3,61	NE
15	3,28	NE
25	3,06	NE
40	3,04	NE

5.3. Komentar rezultatov

Glukoza: V vzorcih glukoze je relativno veliko radikalov v primerjavi z alaninom, ki so stabilni, saj se EPR intenziteta vzorcev s časom le malo zniža. Glukoza je monomerna kristalinična oblika, zato so molekule manj gibljive in radikali med seboj težje reagirajo. Radikali, ki nastanejo v brezvodni glukozi, so torej dokaj stabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 140 dneh le malo pade v primerjavi z meritvami po 6 dneh (prikazano na sliki 18). Nekoliko bolj EPR intenziteta upade pri vzorcih, ki so obsevani z višjim odmerkom sevanja. Kislost glukoze z odmerkom narašča, prihaja do oksidacij do karboksilnih kislin, zato glukoza zaradi zakisanosti materiala ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.

Magnezijev stearat: Magnezijev stearat se od ostalih pomožnih snovi (ki so strukturno zelo podobne) razlikuje predvsem v tem, da je sestavljen iz dolgih nerazvezanih alkilnih verig stearinske kisline, ki niso dovezne za obsevanje z gama-žarki, kar vidimo tudi v številu paramagnetnih centrov na enoto mase, ki je zelo nizko, kar pomeni, da je v vzorcih zelo malo radikalov. Razlike med EPR intenzitetom med različnimi odmerki sevanja pa so zelo majhne. Nastali radikali so prav tako zaradi relativne fleksibilnosti in sterične neoviranosti alkilnih verig nestabilni in hitro reagirajo do diamagnetnih produktov (zato EPR intenzitete vzorcev po 147 dneh padejo na polovične vrednosti v primerjavi z meritvami po 7 dneh, prikazano na sliki 21). Kislost magnezijevega stearata se zaradi gama-žarkov ne spremeni ne glede na odmerek sevanja. Vzorci magnezijevega stearata ustrezajo farmakopejskim zahtevam in pri obsevanju z gama-žarki ne pride do zakisanosti materiala. Kislinsko število vzorcev magnezijevega stearata, ki so bili obsevani s 5, 15 in 25 kGy gama-žarkov, ustrezajo farmakopejskim zahtevam in takšni odmerki so primerni za sterilizacijo z gama-žarki. Nasprotno pa kislinsko število vzorca magnezijevega stearata, ki je bil obsevan z najvišjim odmerkom gama-žarkov (40 kGy) ne ustreza farmakopejskim zahtevam, zato takšen odmerek sevanja ni primeren za sterilizacijo, saj pride do prevelikih poškodb materiala. Določili smo mejo sevanja (ang. *threshold*), ki je še primerna za sterilizacijo magnezijevega stearata – 25 kGy.

Krompirjev škrob: Števila paramagnetnih centrov krompirjevega škroba na enoto mase so zelo nizka, kar pomeni, da je v vzorcih zelo malo radikalov. Radikali so zelo nestabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 147 dneh zelo pade v primerjavi z meritvami po 7 dneh (desetkrat nižje vrednosti kar je prikazano na sliki 24). Škrob je polimer, ki je sestavljen iz

enot glukoze. V nasprotju s čisto glukozo pa glukoza v škrobu ni v obliki kristala, zato je bolj gibljiva in posledično tudi bolj dovezeta za poškodbe, ki jih povzročijo gama-žarki. Med obsevanjem z gama-žarki nastajajo radikali škroba, ki med seboj reagirajo, kar vodi v premreževanje škroba – nastanek neradikalnih produktov, ki so EPR neaktivni. pH krompirjevega škroba z večanjem odmerka pada, kar pomeni, da je prišlo do zakisanosti materiala, zato krompirjev škrob ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki. Podobne rezultate najdemo tudi v literaturi (35, 36). V vzorcih pa ni oksidirajočih snovi (torej ne nastanejo stabilni peroksiidi), zato lahko sklepamo, da je prevladujoč mehanizem radikalne reakcije nastanek -COOH skupin (pričazano na sliki 36).

Mikrokristalna celuloza: Mikrokristalna celuloza je prav tako polimer, ki je sestavljen iz enot glukoze, ki niso v obliki kristala, zato je MCC bolj občutljiva na gama-žarke. Števila paramagnetnih centrov MCC na enoto mase so zelo nizka, kar pomeni da je v vzorcih malo radikalov. Pri obsevanjem z gama-žarki nastanejo nestabilni radikali mikrokristalne celuloze, ki s časom med seboj reagirajo in tvorijo neradikalne produkte, ki so EPR neaktivni. Z večanjem odmerka sevanja narašča množina paramagnetnih centrov v materialu, a le do odmerka 25 kGy. Pri vzorcu, ki je bil obsevan s 40 kGy, je množina paramagnetnih centrov nižja od množine paramagnetnih centrov vzorca, ki je obsevan s 25 kGy, kar je pričazano na sliki 26. Vzrok za to je najverjetnej različna kinetika, s katero se radikali pretvarjajo v diamagnetne produkte: izrazito hitreje namreč upada intenziteta EPR signala pri vzorcih, ki so bili obsevani z višjimi odmerki. Tukaj je material bolj poškodovan, kar vpliva na večjo mobilnost molekul, ki hitreje reagirajo do neradikalnih produktov. pH mikrokristalne celuloze z večanjem odmerka pada, kar pomeni, da je prišlo do zakisanosti materiala. Ker prihaja do oksidacij polimera do novih karboksilnih kislin, mikrokristalna celuloza ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.

Maltodekstrin: Maltodekstrin je prav tako polimer, ki je sestavljen iz enot glukoze, ki niso v obliki kristala, zato je maltodekstin bolj občutljiv na gama-žarke. Števila paramagnetnih centrov maltodekstrina na enoto mase so zelo nizka, kar pomeni, da je v vzorcih malo radikalov. Z večanjem odmerka sevanja narašča množina paramagnetnih centrov v materialu, a le do odmerka 25 kGy. Pri vzorcu, ki je bil obsevan s 40 kGy, je množina paramagnetnih centrov nižja od množine paramagnetnih centrov vzorca, ki je obsevan s 25 kGy. Vzrok za to je najverjetnej različna kinetika, s katero se radikali pretvarjajo v diamagnetne produkte. Radikali, ki nastanejo v mikrokristalni celulozi, so

dokaj nestabilni, saj EPR intenziteta vzorcev po 141 dneh pade v primerjavi z meritvami po 7 dneh (prikazano na sliki 30). pH maltodekstrina z večanjem odmerka pada, kar pomeni, da je prišlo do zakisanosti materiala, prihaja do oksidacij do karboksilnih kislin, zato maltodekstrin ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.

Ugotovili smo, da je za sterilizacijo z sterilizacijo z gama-žarki primeren material le magnezijev stearat. Pri magnezijevem stearatu smo določili tudi najvišji odmerek, ki je še primeren – to je 25 kGy. Za sterilizacijo z gama-žarki je po Evropski farmakopeji referenčni absorbirani odmerek ravno 25 kGy. Pri ostalih pomožnih snoveh bi morali izbrati nižji odmerek sevanja, ki ne bi spremenil lastnosti materiala in bi pomožne snovi ustrezale farmakopejskim zahtevam, a bi hkrati morali z validacijo dokazati, da izbrani odmerek zagotavlja ustrezno in ponovljivo letalnost, kadar proces poteka rutinsko znotraj postavljenih meja.

6. SKLEP

V predstavljenem raziskovalnem delu smo izmerili zaostanek radikalov v pomožnih snoveh po sterilizaciji z različnimi odmerki gama-žarkov (5, 15, 25 in 40 kGy) z uporabo elektronske paramagnetne resonance (EPR) in ovrednotili, kako obsevanje z gama-žarki vpliva na kakovost pomožnih snovi in njihovo stabilnost. S pomočjo parametrov, ki jih predpisujejo posamezne monografije v Evropski farmakopeji, smo določili ali je sterilizacija z gama-žarki primerna metoda izbora za izbrane pomožne snovi. Kot EPR dozimeter za preverjanja odmerka sevanja smo uporabili L-alanin, ki je bil pri sterilizaciji izpostavljen enakim odmerkom sevanja kot pomožne snovi. Za izbrane pomožne snovi za tabletiranje smo ugotovili:

- **Glukoza:** V vzorcih glukoze je relativno veliko radikalov v primerjavi z alaninom, ki so stabilni, saj se EPR intenziteta vzorcev s časom le malo zniža. Glukoza je v obliki kristala, zato so molekule manj gibljive in radikali med seboj težje reagirajo. Kislost glukoze z odmerkom narašča, zato glukoza zaradi zakisanosti materiala ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.
- **Magnezijev stearat:** Intenzitete EPR signala vzorcev 147 dni po žarčenju so zelo nizke, kar pomeni, da je v vzorcih malo radikalov, ki so zelo nestabilni. Kislost magnezijevega stearata se zaradi gama-žarkov ne spremeni ne glede na odmerek sevanja. Kislinsko število vzorcev magnezijevega stearata, ki so bili obsevani s 5, 15 in 25 kGy gama-žarkov, ustrezajo farmakopejskim zahtevam in takšni odmerki so primerni za sterilizacijo z gama-žarki. Nasprotno pa kislinsko število vzorca magnezijevega stearata, ki je bil obsevan z najvišjim odmerkom gama-žarkov (40 kGy) ne ustreza farmakopejskim zahtevam, zato takšen odmerek sevanja ni primeren za sterilizacijo, saj pride do poškodb materiala. Določili smo mejo sevanja (ang. *threshold*), ki je še primerna za sterilizacijo Mg stearata - 25 kGy.
- **Krompirjev škrob:** EPR intenzitete krompirjevega škroba 147 dni po žarčenju so zelo nizke, kar pomeni, da je v vzorcih zelo malo radikalov. Radikali so zelo nestabilni, kinetika pretvorbe v diamagnetne produkte pa je zelo hitra. Med obsevanjem z gama-žarki nastajajo radikali škroba, ki med seboj reagirajo, kar vodi v premreževanje škroba – nastanek neradikalnih produktov, ki so EPR neaktivni. pH krompirjevega škroba z večanjem odmerka pada, kar pomeni, da je prišlo do zakisanosti materiala, zato krompirjev škrob ni primeren material za sterilizacijo z

gama-žarki. V vzorcih pa ni oksidirajočih snovi, zato lahko sklepamo, da je prevladujoč mehanizem radikalske reakcije nastanek -COOH na molekuli glukoze.

- **Mikrokristalna celuloza:** EPR intenzitete mikrokristalne celuloze 141 dni po žarčenju so nizke, kar pomeni, da je v vzorcih malo radikalov. Z obsevanjem z gama-žarki nastanejo nestabilni radikali mikrokristalne celuloze, ki med seboj reagirajo in tvorijo neradikalske produkte, ki so EPR neaktivni. Z večanjem odmerka sevanja narašča množina paramagnetičnih centrov v materialu, a le do odmerka 25 kGy. Pri vzorcu, ki je bil obsevan s 40 kGy, je množina paramagnetičnih centrov nižja od množine paramagnetičnih centrov vzorca, ki je obsevan s 25 kGy. Vzrok za to je najverjetneje različna kinetika, s katero se radikali pretvarjajo v diamagnetne produkte: izrazito hitreje namreč upada intenziteta EPR signala pri vzorcih, ki so bili obsevani z višjimi odmerki. pH mikrokristalne celuloze z večanjem odmerka pada, kar pomeni, da je prišlo do zakisanosti materiala, zato mikrokristalna celuloza ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.
- **Maltodekstrin:** EPR intenzitete maltodekstrina 141 dni po žarčenju so nizke, kar pomeni, da je v vzorcih malo radikalov. Podobno kot pri MCC z večanjem odmerka sevanja narašča množina paramagnetičnih centrov v materialu, a le do odmerka 25 kGy. Pri vzorcu, ki je bil obsevan s 40 kGy, je množina paramagnetičnih centrov nižja od množine paramagnetičnih centrov vzorca, ki je obsevan s 25 kGy. Vzrok za to je najverjetneje različna kinetika. pH maltodekstrina z večanjem odmerka pada, kar pomeni, da je prišlo do zakisanosti materiala, zato maltodekstrin ni primeren material za sterilizacijo z gama-žarki.

Ugotovili smo, da je za sterilizacijo z gama-žarki primeren material le magnezijev stearat. Pri magnezijevem stearatu smo določili tudi najvišji odmerek, ki je še primeren – to je 25 kGy. Za sterilizacijo z gama-žarki je po Evropski farmakopeji referenčni absorbirani odmerek ravno 25 kGy. Pri ostalih pomožnih snoveh bi morali izbrati nižji odmerek sevanja, ki ne bi spremenil lastnosti materiala in bi pomožne snovi ustrezale farmakopejskih zahtevam, a bi hkrati morali z validacijo dokazati, da izbrani odmerek zagotavlja ustrezno in ponovljivo letalnost, kadar proces poteka rutinsko znotraj postavljenih meja. Vsekakor se moramo zavedati, da je zagotavljanje ustrezne mikrobiološke kakovosti v farmaciji izredno pomembno, saj v nasprotnem primeru lahko hitro sicer za pacienta koristen farmacevtski izdelek postane pacientu zelo škodljiv.

LITERATURA

- (1) Aulton M. E.: Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines, 5. Izdaja, Elsevier, 2018: 268 – 295
- (2) Adrovic F.: Gamma Radiation - Sterilization by Gamma Irradiation, InTech, 2012: 171 – 206 (<https://www.intechopen.com/books/gamma-radiation/sterilization-by-gamma-irradiation>, dostopano 09.05.2018)
- (3) PharmTech: Gamma Irradiation in the Pharmaceutical Manufacturing Environment, <http://www.pharmtech.com/gamma-irradiation-pharmaceutical-manufacturing-environment>, dostopano 09.05.2018)
- (4) Methods of preparation of sterile products (07/2017:50101), European pharmacopeia 9.2. Council of Europe, Strasbourg, 2017: 4334 – 4335
- (5) Buerkle: What is gamma ray sterilisation, <https://www.buerkle.de/en/knowhow/gamma-ray-sterilisation>, dostopano 09.05.2018)
- (6) Aleksieva K. and Nicola D.Yordanov: EPR investigation of some gamma-irradiated excipients. Radiation Effects & Defects in Solids 2012; 167: 685 – 689
- (7) Bhat R., Karim A.A.: Impact of Radiation Processing on Starch. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2009; 8: 44 – 58
- (8) Kameya H., Ukai M.: Analysis of Relaxation Behavior of Free Radicals in Irradiated Cellulose Using Pulse and Continuous-Wave Electron Spin Resonance. Cellulose – Fundamental Aspects 2013; 285 – 302
- (9) Bruker: What is EPR, <https://www.bruker.com/products/mr/epr/what-is-epr.html>, dostopano 09.05.2018)
- (10) Weil J.A., Bolton J. R.: Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications, 2. Izdaja, Wiley, New Jersey, 2007: 1 – 15
- (11) A. Lund: Principles and Applications of ESR Spectroscopy, 1. Izdaja, Springer Netherlands, 2011: 3 – 28

- (12) Opšta teorija elektronske paramagnetne rezonancije. Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2006
- (13) R. Sudha, Chawla R, Kumar R.: Electron paramagnetic resonance spectroscopy in radiation research: Current status and perspectives. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 2010; 2: 80 – 87
- (14) Principles of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, <http://iiith.vlab.co.in/?sub=19&brch=206&sim=583&cnt=1022>, dostopano 09.05.2018
- (15) Spletni vir: http://lbf.ijs.si/Downloads/EPR_Strancar_Rogla2011_splet.pdf, dostopano 09.05.2018
- (16) Štrancar J., Kavalenka A., Ziherl P.: Analysis of side chain rotational restrictions of membrane-embedded proteins by spin-label ESR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* 2009; 197: 245 – 248
- (17) Bruker: Food Irradiation Control - https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/EPR_brochures/e-scan_food_irradiation_control.pdf (dostopano 05.06.2018)
- (18) Stuglik Z.: Alanine – EPR dosimetry system. Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Laboratory for Measurement of Technological Doses, Warsaw, Poland, http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/39/066/39066524.pdf, dostopano 09.05.2018
- (19) Al-Karmia A.M., Morsy M.A.: EPR of gamma-irradiated polycrystalline alanine-in-glass dosimeter. *Radiation Measurements* 2008; 43: 1315 – 1318
- (20) Olsson S., Bergstrand E.S.: Calibration of alanine dosimeters. Department of Medicine and Care Radio Physics Faculty of Health Sciences, <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:327962/FULLTEXT01.pdf>, dostopano 09.05.2018
- (21) Morsy M.A.: Simple EPR/Alanine Dosimeter for Medical Application. *Open Journal of Radiology* 2012; 2: 120 – 125
- (22) Volumetric solutions (04/2010:40202), European pharmacopeia 8.0 Council of Europe, Strasbourg, 2014: 546 – 550

- (23) Reagents (01/2014:40101), European pharmacopeia 8.0 Council of Europe, Strasbourg, 2014: 425 – 550
- (24) Kedare S.B., Singh R.P.: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology 2011; 4: 412 – 422
- (25) Molyneux P.: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology 2004; 26: 211 – 219
- (26) Glucose, anhydrous (01/2008:0177), European pharmacopeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014: 2340 – 2341
- (27) Magnesium stearate (07/2010:0229), European pharmacopeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014: 2680 – 2682
- (28) Acid value (01/2008:20501), European pharmacopeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014: 155
- (29) Potato starch (01/2014:0355), European pharmacopeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014: 3078
- (30) Oxidising substances (01/2008:20530), European pharmacopeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014: 164
- (31) Cellulose, microcrystalline (01/2009:0316), European pharmacopeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014: 1824 - 1828
- (32) Maltodextrin (07/2009:1542), European pharmacopeia 8.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014: 2689 – 2690
- (33) Obreza A., Bevc B., Baumgartner S.: Pomožne snovi v farmaciji: od njihovega poimenovanja do vloge v zdravilu, Spletni učbenik za študente farmacije, industrijske farmacije in kozmetologije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo in SAZU, Ljubljana, 2015: 95 – 166 (Spletni vir: http://wwwffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/e-knjige/Pomozne_snovi.pdf, dostopano 15.05.2018)

- (34) Rowe R.C., Quinn M.E., Sheskey P.J: Handbook of pharmaceutical excipients, 6. Izdaja, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009: 131 – 132, 404 – 405, 418 – 420, 685 – 690
- (35) Pimpa B.: Effect of electron beam irradiation on physicochemical properties of sago starch. The Journal of Science and Technology 2007; 29: 759 – 768
- (36) Brașoveanu M.: Electron-Beam Processed Corn Starch: Evaluation of Physicochemical and Structural Properties and Technical-Economic Aspects of the Processing. Brazilian Journal of Chemical Engineering 2013; 30: 847 – 856
- (37) Chen Q.; Yu H.: Recent progress in chemical modification of starch and its applications. The Royal Society of Chemistry 2015; 5, 67459 – 67474
- (38) Beg M.D.H.: Environmentally degradable sago starch filled low-density polyethylene. Journal of Polymer Engineering 2015: 1 – 13