

# EPR

---

## Primene u farmaciji

**BioScope Labs**

[www.bioscope.fffh.bg.ac.rs](http://www.bioscope.fffh.bg.ac.rs)

Prof. Miloš Mojović



# EPR – osnovni principi

- EPR laboratorija na FFH
- EPR – primena u: fizičkoj hemiji, biologiji, medicini, farmaciji ...

<http://www.bioscope.ffh.bg.ac.rs/eprlab/about-us/>



Izgled aparature za EPR u spektrometriju u X i L oblasti:

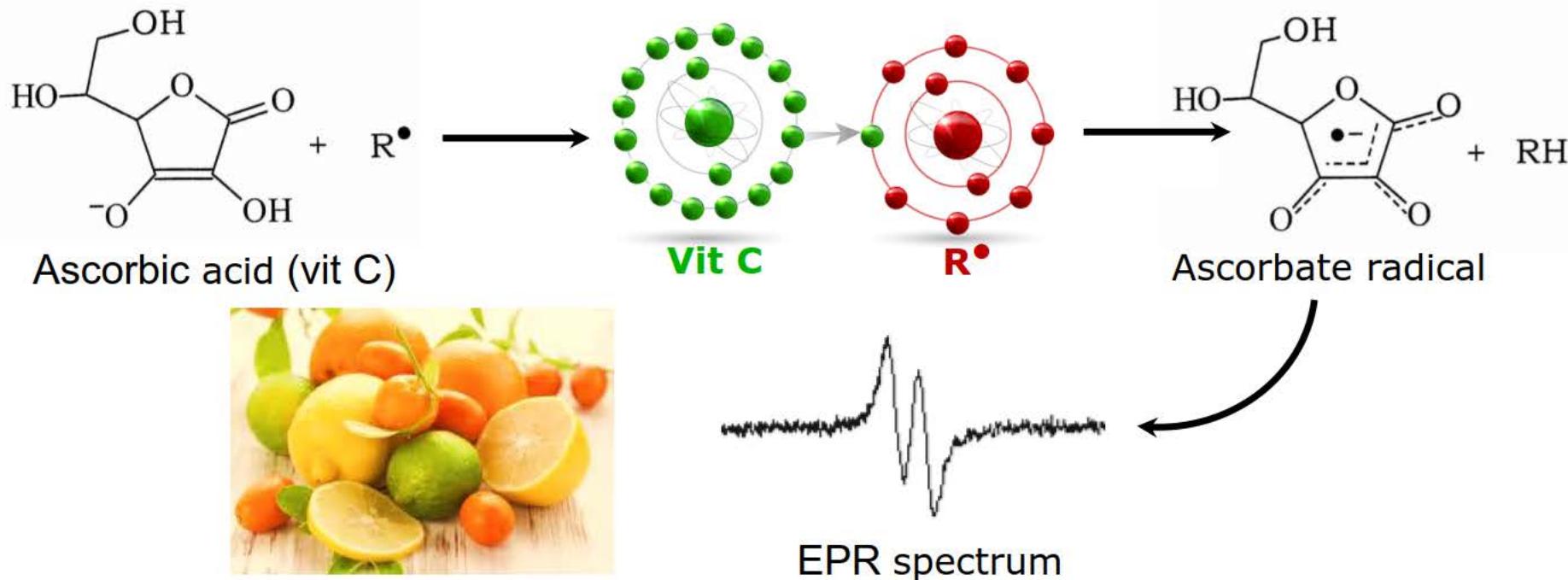
**EPR Bruker Biospin Elexsys II E540**

- X- (9.5GHz), L-band (1.2GHz)
- Rezonatori
- Različita snimanja: tN<sub>2</sub> (100-350K), tHe (4-100K)
- EPR spektroskopija i imidžing



# Šta je EPR?

- Detektujemo nesparene elektrone.
- Slobodni radikali, prelazni metali.
- Jedina poznata tehnika koja direktno detektuje slobodne radikale.

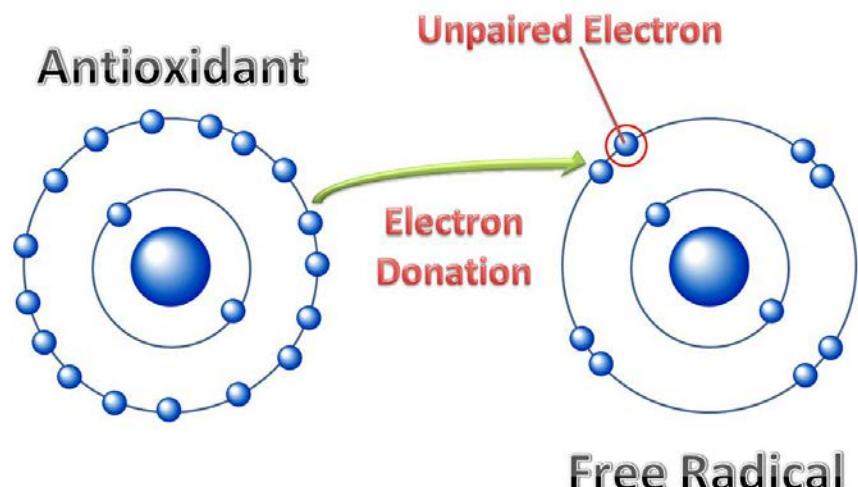




# EPR Lab

## Slobodni radikali i antioksidansi

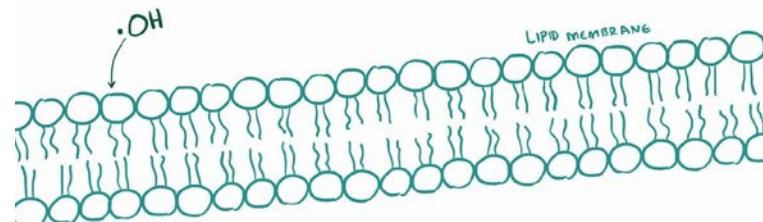
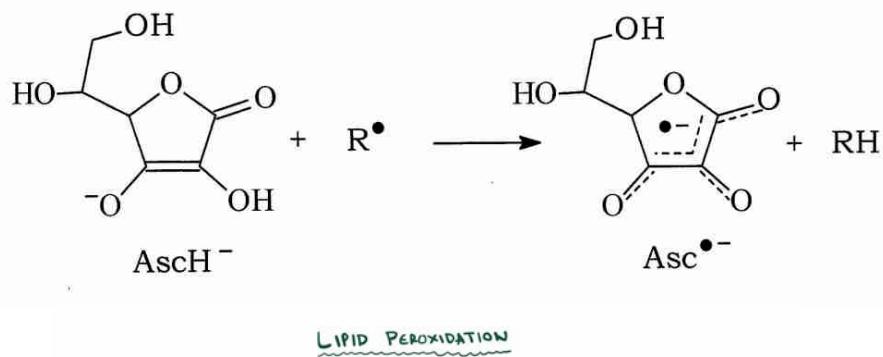
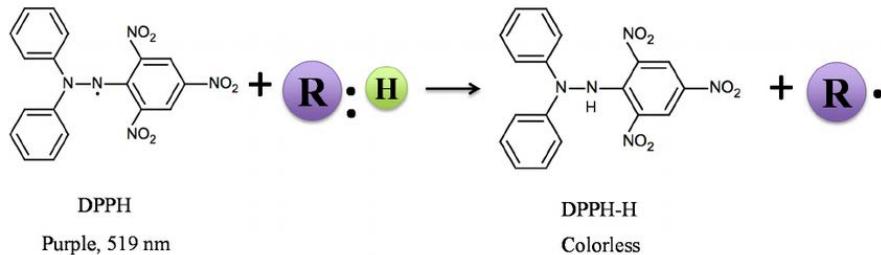
- Šta su slobodni radikali?
- Izazivaju oštećenja DNK, proteina, ćel. membrana, povezani sa patofiziološkim stanjima.
- Da li su slobodni radikali samo štetni?
- Antioksidansi.
- Sprečavaju ili usporavaju oksidaciju drugih molekula uklanjajući slob. radikale.
- Ima ih u biljkama, raznim tradicionalnim lekovima, hemijski ih generišemo ...





# EPR metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti



- EPR je **jedina pouzdana metoda** za ovu svrhu.
- Druge metode često se baziraju na uklanjanju biološki-irelevantnih radikala (npr. DPPH ili ABTS) kao i puko oslanjanje na analitiku bez konkretnih dokaza o uticaju na ROS ili RNS.
- EPR može:
  1. Odrediti kapacitet AOX da ukloni ·OH, ·O<sub>2</sub>, NO<sup>•</sup> ... (generatorski sistemi).
  2. Odrediti kapacitet AOX da ukloni dugoživeće radikale (**CC<sup>•</sup>, Asc<sup>•</sup>**).
  3. Odrediti kapacitet AOX da speči **lipidnu peroksidaciju** u membrani indukovani ROS i RNS (primenom lipozoma, micela i ćel. kultura).



# EPR metode

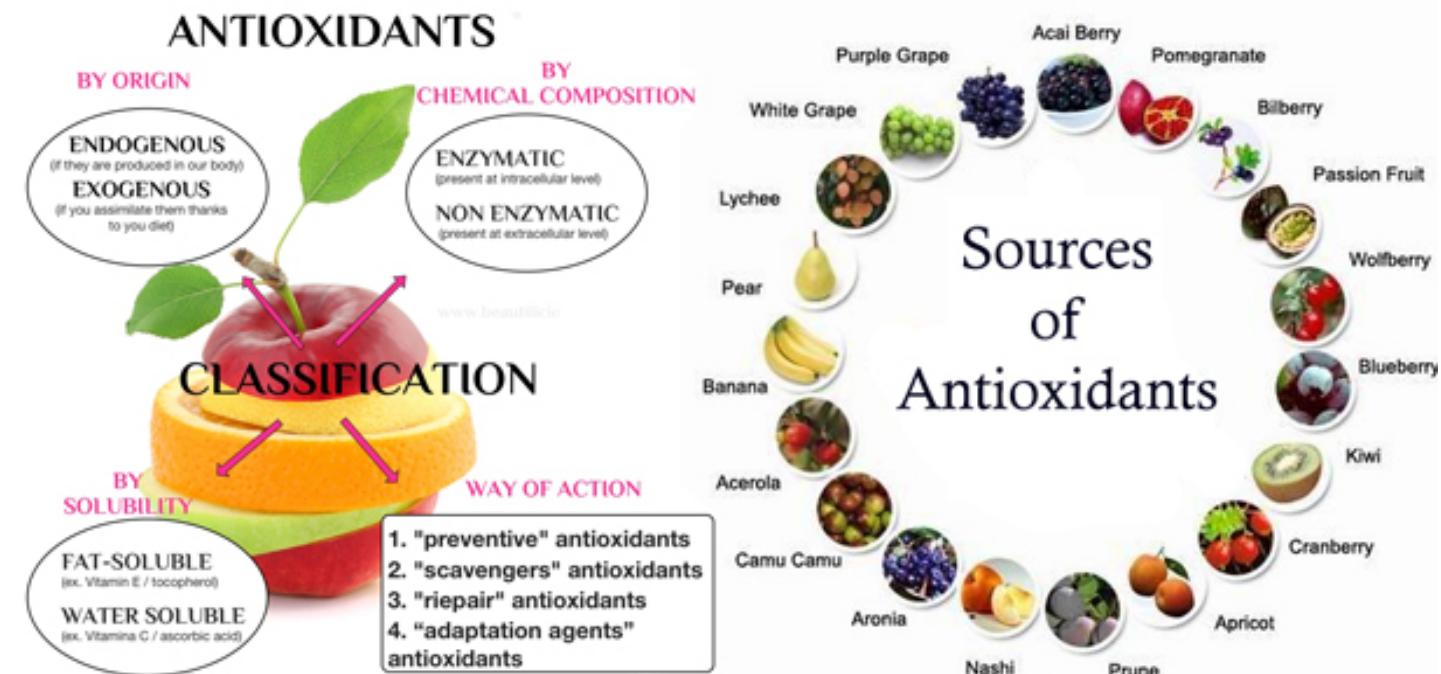
Određivanje AOX kapaciteta vodonerastvornih jedinjenja

## Šta raditi sa vodonerastvornim AOX?

- Najbolji AOX su često vodonerastvorni i ovo je problem koji se teško (ili loše) rešava.

- EPR može rešiti i ovaj problem pomoću posebne metode.
- Ova metoda je inače ekskluzivno razrađena u **EPR Lab FFH**.

Nakarada et. al. Liposomal integration method for assessing antioxidative activity of water insoluble compounds toward biologically relevant free radicals: example of avarol, J Liposome Res. 30 (2019) 218-226.



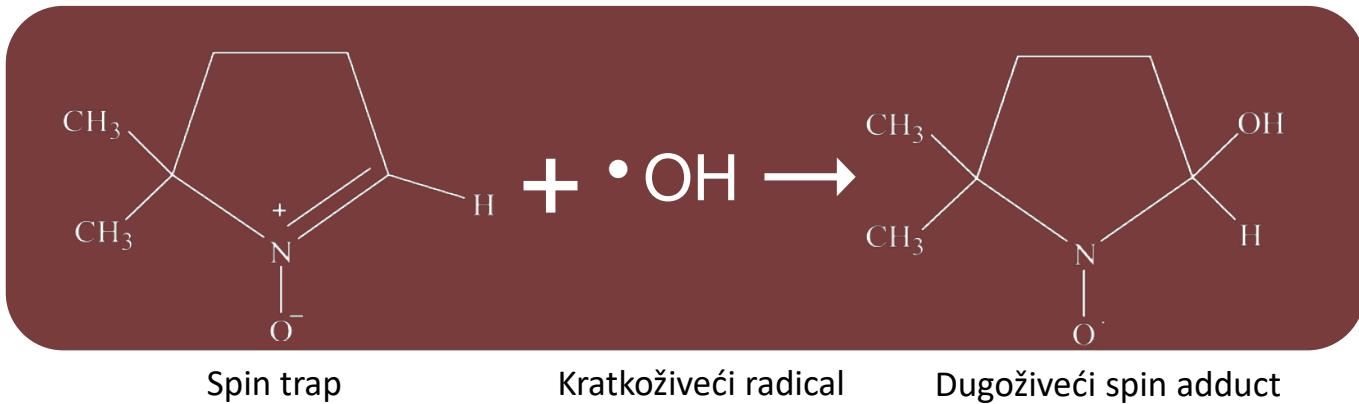


# EPR metode

Određivanje AOX kapaciteta za uklanjanje kratkoživećih radikala

## EPR spin-trapping

- Oksidativni stres je uzrok mnogih patofizioloških stanja.
- Neke metode su posredne (fluorimetrija). Ima artefakata.
- EPR može meriti  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{NO}^\cdot$  (čak i *in vivo*) pomoću spin-trap metode.
- Princip spin-trap metode.
- Ovako možemo detektovati ROS intra- i ekstracelularno.

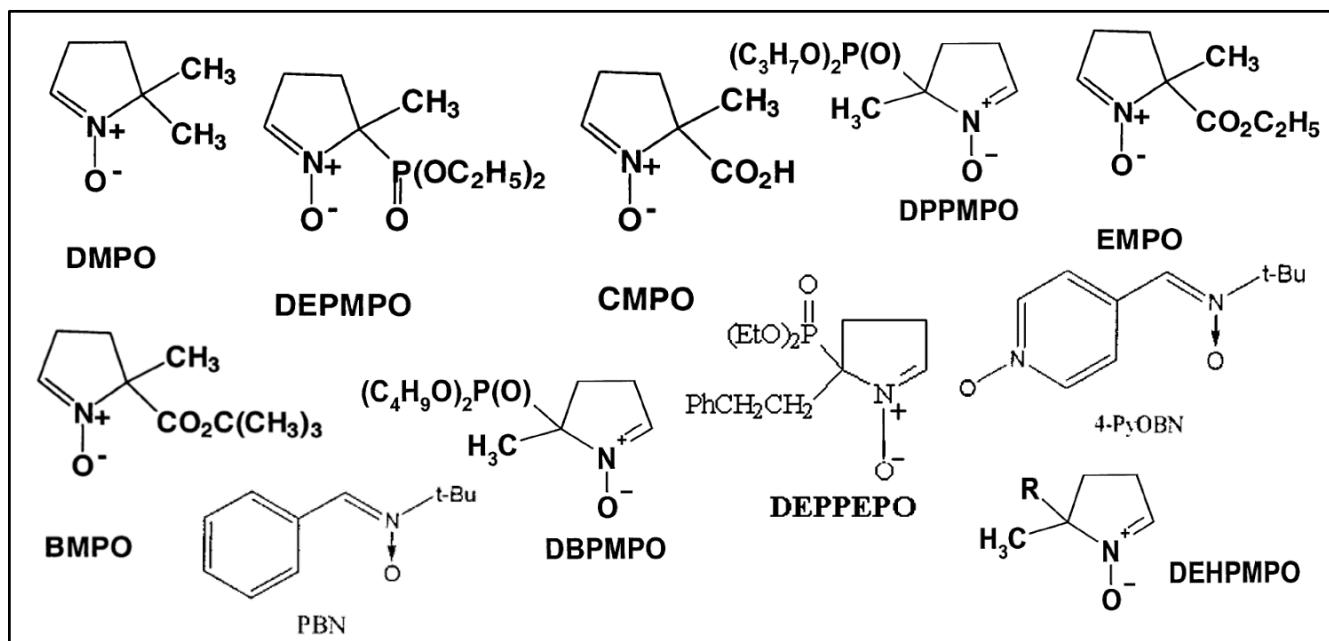




# EPR metode

## EPR spin-traping

- Šta mora da poseduje jedan dobar spin-trap?
- Spin-trap market.



## Problemi:

- Preskupi su.
- Često sadrže nečistoće.
- Degradiraju se na višim T.
- Imaju isuviše složen EPR signal.
- U višim dozama letalni.
- Adukti skloni raspadanju.
- Adukti podložni i redukciji i oksidaciji.
- Složena kinetika.

## Benefiti:

- Neprocenjivi.



# EPR metode

EPR spin-traping *in vivo?*

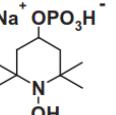
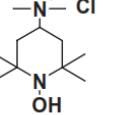
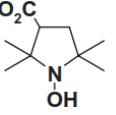
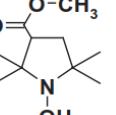
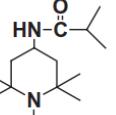
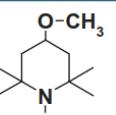
Type	Name	Structure	Lipophilicity	Lifetime of O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> Products	Detection	Applications
Spin Traps	PBN		10	-	$\text{R}^\bullet$ $\text{RO}^\bullet$	<b>Detection of R-C<sup>•</sup> in vitro and in vivo.</b>
	POBN		0.15	-		
	DMPO		0.06	0.9 min	$\text{OH}^\bullet, \text{O}_2^{\bullet-}, \text{R}^\bullet, \text{RO}^\bullet$	<b>Cell-free and extracellular detection of OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, R<sup>•</sup>, S<sup>•</sup>.</b>
	EMPO		0.33	10 min		
	DEPMPO		0.16	17 min	$\text{OH}^\bullet$ $\text{O}_2^{\bullet-}$ $\text{RO}_2^\bullet$ $\text{R}^\bullet$ $\text{S}^\bullet$	<b>Cell-free and extracellular detection of OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, R<sup>•</sup>, S<sup>•</sup>.</b>
	BMPO		-	23 min		

- Detekcija O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikala u biosistemima limitirana je sporom kinetikom O<sub>2</sub><sup>•-</sup> trapovanja ( $\sim 55 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
- Biodegradacija adukata (redukcija do HA i oksidacija u sekundarne nitrone).
- Ali, ciklični HA reaguju sa O<sub>2</sub><sup>•-</sup> 100 puta brže nego trapovi!
- Mogu se takmičiti sa ćelijskim AOX i reagovati sa intraćelijskim O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.
- Neki spicificni HA ...



# EPR metode

## Tehnika upotrebe hidroksilamina

Cyclic Hydroxylamines	PP-H		0.005	<p><b>More than 4 hours in blood plasma, in cells and tissue</b></p> <p><b>Can be used <i>in vivo i.p.</i> and <i>i.v.</i> injections</b></p>	<p><b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> <b>ONOOH</b> <b>Aryl-O<sup>•</sup></b></p> <p><b>Quantitative measurements of extracellular O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and quantification of intracellular O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in cells and tissue samples.</b></p> <p><b><i>In vivo O<sub>2</sub><sup>•-</sup> detection.</i></b></p>
CAT1-H		0.01			
CP-H		0.05			
CM-H		27			
TMT-H		35			
TM-H		43			

- Nedostatak specifičnosti HA prevazilazimo korišćenjem inhibitora proizvodnje O<sub>2</sub><sup>•-</sup> i SOD.
- Bitno je nanelektrisanje probe (katjonska, anjonska, neutralna).
- Bitna je lipofilnost i ćelijska propustljivost za specifičnu probu.
- *Site-specific* O<sub>2</sub><sup>•-</sup> detekcija sa visokom osetljivošću.
- Neki specifični spin-trapovi ...



# EPR metode

## EPR spin-trapovi

### CDMIO . K

[4-Carboxy-2,2-dimethyl-2H-imidazole-1-oxide . K]

ALX-430-089-M010	10 mg
ALX-430-089-M050	50 mg

Water soluble, **non-cell permeable spin trap**. Stable against reduction by vitamin C and thiols.

### DMPIO

[2,2-Dimethyl-4-phenyl-2H-imidazole-1-oxide]

ALX-430-088-M010	10 mg
ALX-430-088-M050	50 mg

Widely used, **cell permeable** and highly sensitive **spin trap**. Alternative to PBN (Prod. No. ALX-430-082). More lipophilic than TMIO (Prod. No. ALX-430-073). Does not trap the superoxide radical.

### TMPO

[3,3,5,5-Tetramethyl-pyrroline-N-oxide; M4PO]

ALX-430-084-M100	100 mg
ALX-430-084-M500	500 mg

Solid cell permeable spin trap.

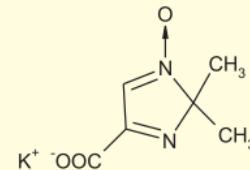
### TMIO

[2,2,4-Trimethyl-2H-imidazole-1-oxide]

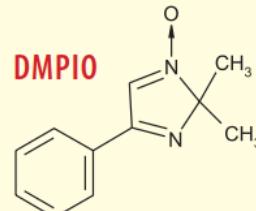
ALX-430-073-M050	50 mg
ALX-430-073-M250	250 mg
ALX-430-073-G001	1 g

Selective, **cell permeable** and non-toxic **spin trap** for peroxy nitrite and secondary O-, C-, S-, and N-centered free radicals.

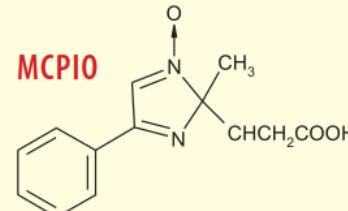
## Chemical Structures



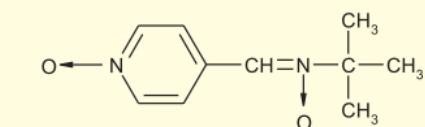
CDMIO . K



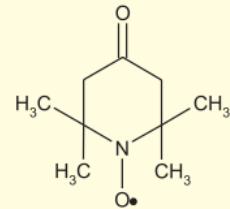
DMPIO



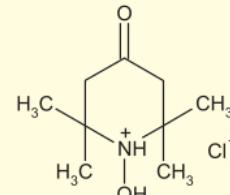
MCPIO



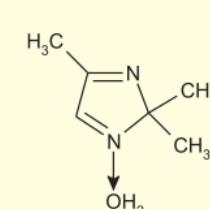
POBN (high purity)



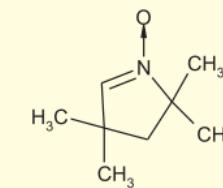
TEMPONE



TEMPONE-H . HCl



TMIO



TMPO

### MCPIO

[2-(2-Carboxyethyl)-2-methyl-4-phenyl-2H-imidazole-1-oxide]

ALX-430-083-M010	10 mg
ALX-430-083-M050	50 mg

**Cell permeable, stable spin trap.** Alternative to PBN (Prod. No. ALX-430-082).

### POBN (high purity)

[ $\alpha$ -(4-Pyridyl 1-oxide)-N-tert-butylnitronite]

ALX-430-091-M500	500 mg
ALX-430-091-G001	1 g

**Cell permeable hydrophilic spin trap for both *in vivo* and *in vitro* studies.** Water soluble analog of PBN (Prod. No. ALX-430-082). Low paramagnetic impurities.

### TEMPONE-H . HCl

[1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine . HCl]

ALX-430-071-M010	10 mg
ALX-430-071-M050	50 mg
ALX-430-071-M250	250 mg

**Very effective, cell permeable** and non-toxic **spin trap** for the detection of superoxide radical and peroxy nitrite.



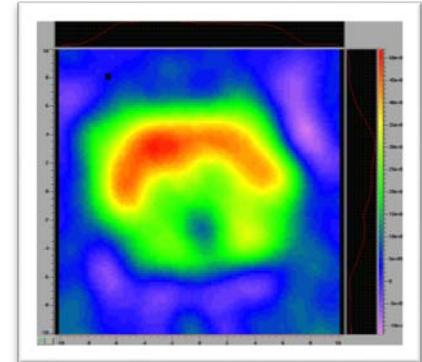
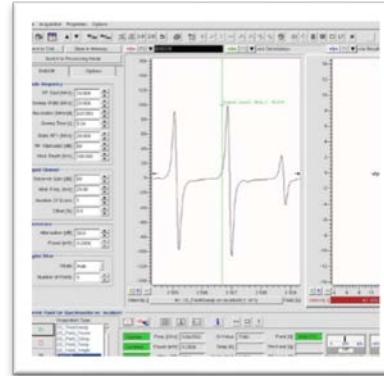
# EPR metode

Određivanje antioksidativne aktivnosti *in vivo*

## Da li su mogući *in vivo* EPR eksperimenti?

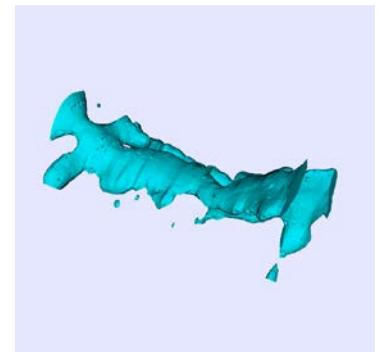
- Da li možemo vizualizovati performanse jednog antioksidansa *in vivo*?
- Možemo, upotrebom kombinovane EPR spektroskopije i imidžinga.
- Koriste se spinske probe ili NO trapovi (za sada).

Slobodni radikali *in vivo*  
EPR spektroskopija



*In vivo* EPR merenje

Slobodni radikali *in vivo*  
2D EPR imidžing



Slobodni radikali *in vivo*  
3D EPR imidžing

- L-band EPR spektroskopija i imidžing.
- Svi eksperimenti sa životinjama moraju se izvoditi u skladu sa domaćim i međunarodnim zakonima “Animal testing regulation laws”.



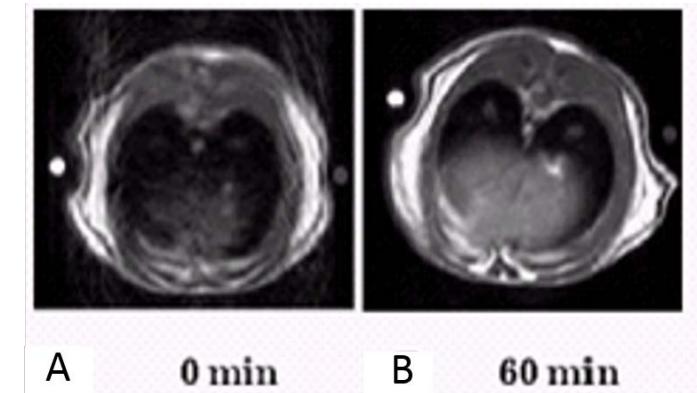
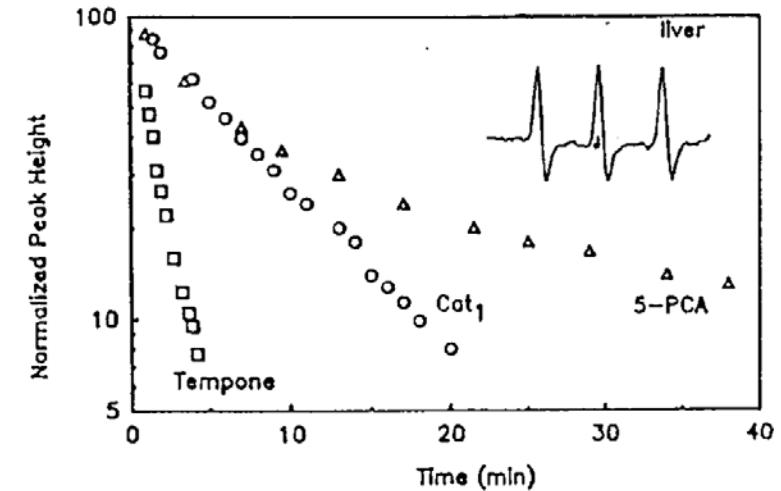
# EPR metode

*In vivo* spektroskopija malih životinja za detekciju NO i ROS



## Ispitivanje farmakokinetike nitroksida

- L-band EPR rezonatori u koje smeštamo male životinje.
- EPR signal se smanjuje pod uticajem ispiranja probe ili delovanjem endogenih antioksidanasa.
- Možemo pratiti BBB propustiljnost ili totalni antioksidativni kapacitet tkiva i organa.
- Rezultati se porede sa onima koji se dobijaju kada se aplicira potencijalni lek.
- Paramagnetski efekat nitroksida može istovremeno poslužiti i kao MRI kontrastni agens.



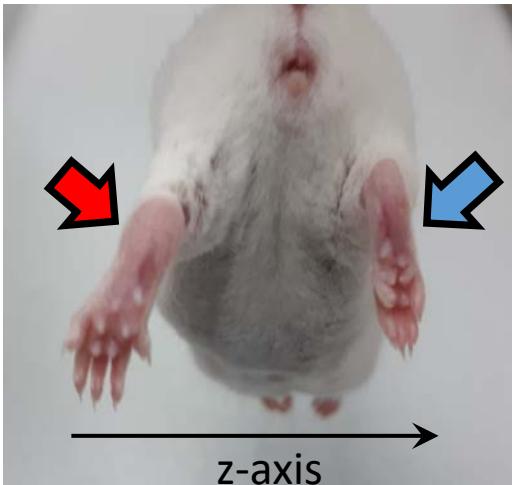


# EPR metode

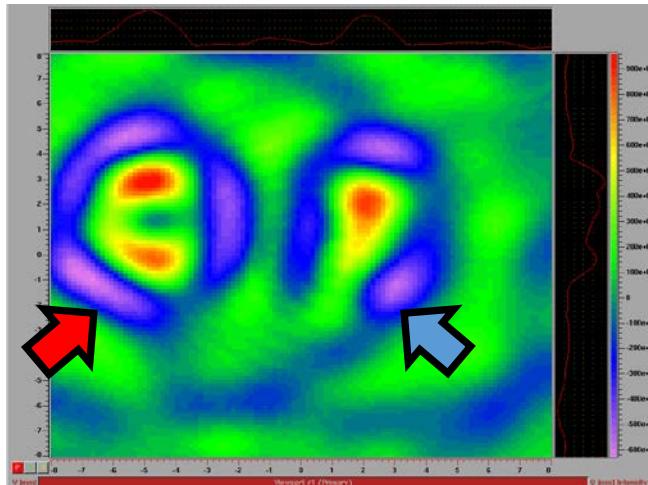
Određivanje efikasnosti antiinflamatornih lekova *in vivo*

## Inflamacija

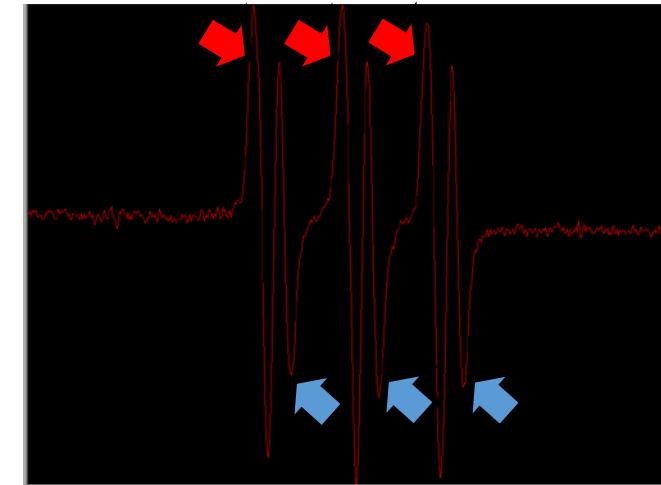
- Indukujemo inflamaciju (npr. pomoću LPS ili lokalno).
- Snima se redukcija signala spinske probe *in vivo* kao posledice poremećenog redoks statusa.
- Može se raditi i EPR spektroskopija i *imaging*.



Miš - 2.5 meseci starosti  
(indukovana inflamacija leve noge)



*In vivo* 2D EPR slika u x-z ravni koja prikazuje inflamiranu i zdravu nogu



*In vivo* 1D gradijentni EPR spektrum duž z-ose, snimljen posle 10 min



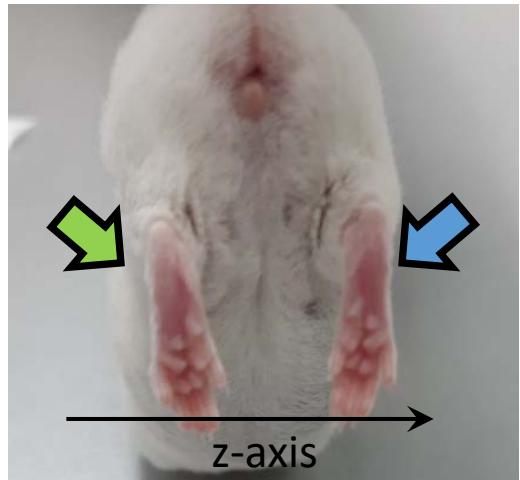
# EPR metode

Određivanje efikasnosti antiinflamatornih lekova *in vivo*

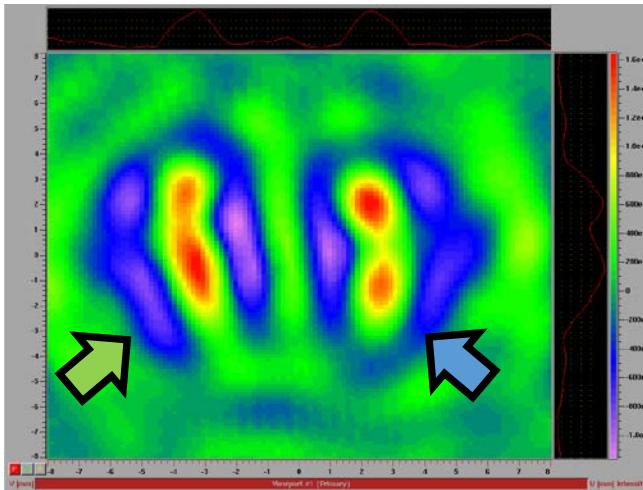


## Delovanje antiinflamatornog leka

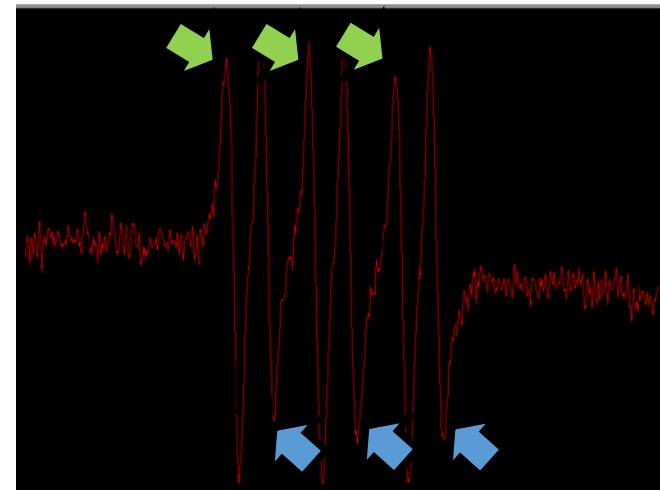
- Tretiramo inflamaciju.
- Snima se redukcija signala spinske probe *in vivo* kao posledice poremećenog redoks statusa.
- Može se raditi i EPR spektroskopija i *imaging*.



Miš - 2.5 meseci starosti  
Tretirana inflamirana leva noga



*In vivo* 2D EPR slika u x-z ravni koja prikazuje tretiranu i zdravu nogu



*In vivo* 1D gradijentni EPR spektrum duž z-ose, snimljen posle 10 min



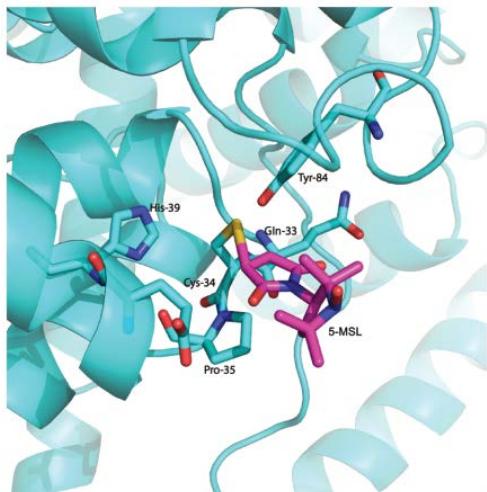
# EPR metode

## Spinsko obeležavanje

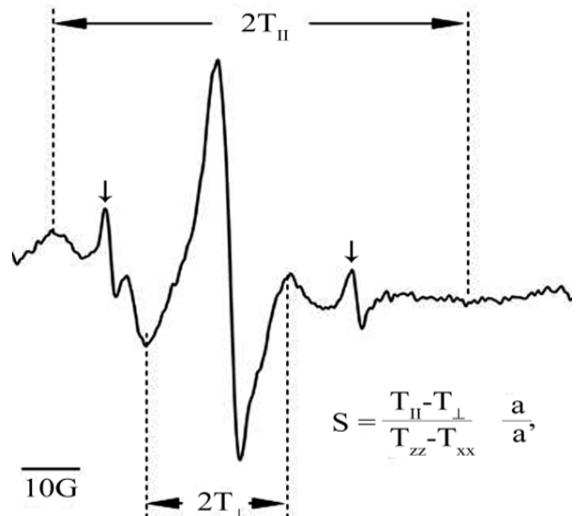
Pavićević et. al. J. Phys. Chem. B, 10898–10905, 118 (2014).

### EPR spinsko obeležavanje membrana i proteina

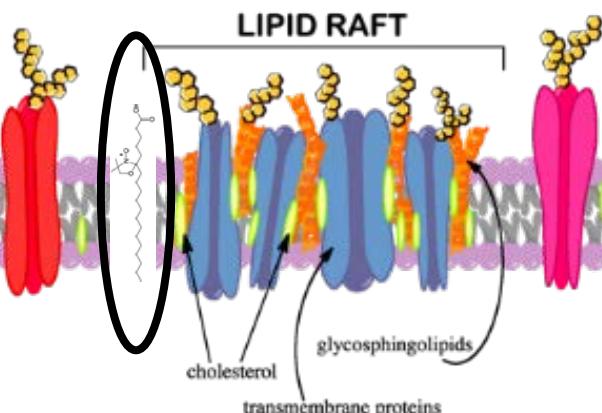
- Koristimo specijalno dizajnirane EPR-aktivne molekule (spinske obeleživače).
- Obeležavamo membrane i proteine.
- Možemo detektovati lipidnu peroksidaciju od strane ROS/RNS.
- Možemo ispitivati konformacione promene proteina (npr. u interakciji sa lekovima)
- Primer: Praćenje efikasnosti terapije Gošeove bolesti (obeležavanje membrana PBMC)



Spin-label 5-MSL kovalentno vezan za Cys-34 od BSA



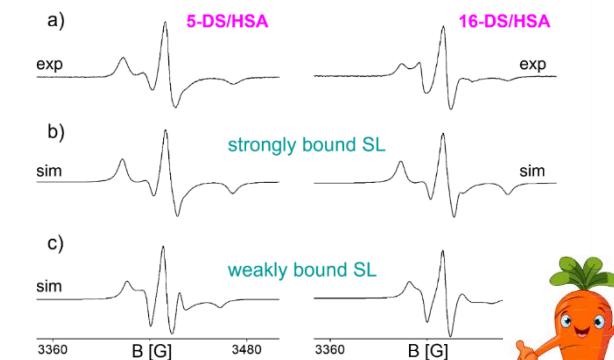
EPR spektar 5-MSL vezan za BSA



5-DS i 16-DS ugrađeni u membranu PBMC

	Strongly bound (SB)	Weakly bound (WB)	Ratio SB/WB
5-DS / control-HSA	0.79 ± 0.08*	0.15 ± 0.02	5.3 ± 0.5
16-DS / control-HSA	0.63 ± 0.06	0.33 ± 0.03	1.9 ± 0.2
5-DS / LABC-HSA	0.49 ± 0.05	0.44 ± 0.04	1.1 ± 0.1
16-DS / LABC-HSA	0.43 ± 0.04	0.39 ± 0.04	1.1 ± 0.1

\*The mean value of 15 simulations. The goodness of fits for all simulations was <5.

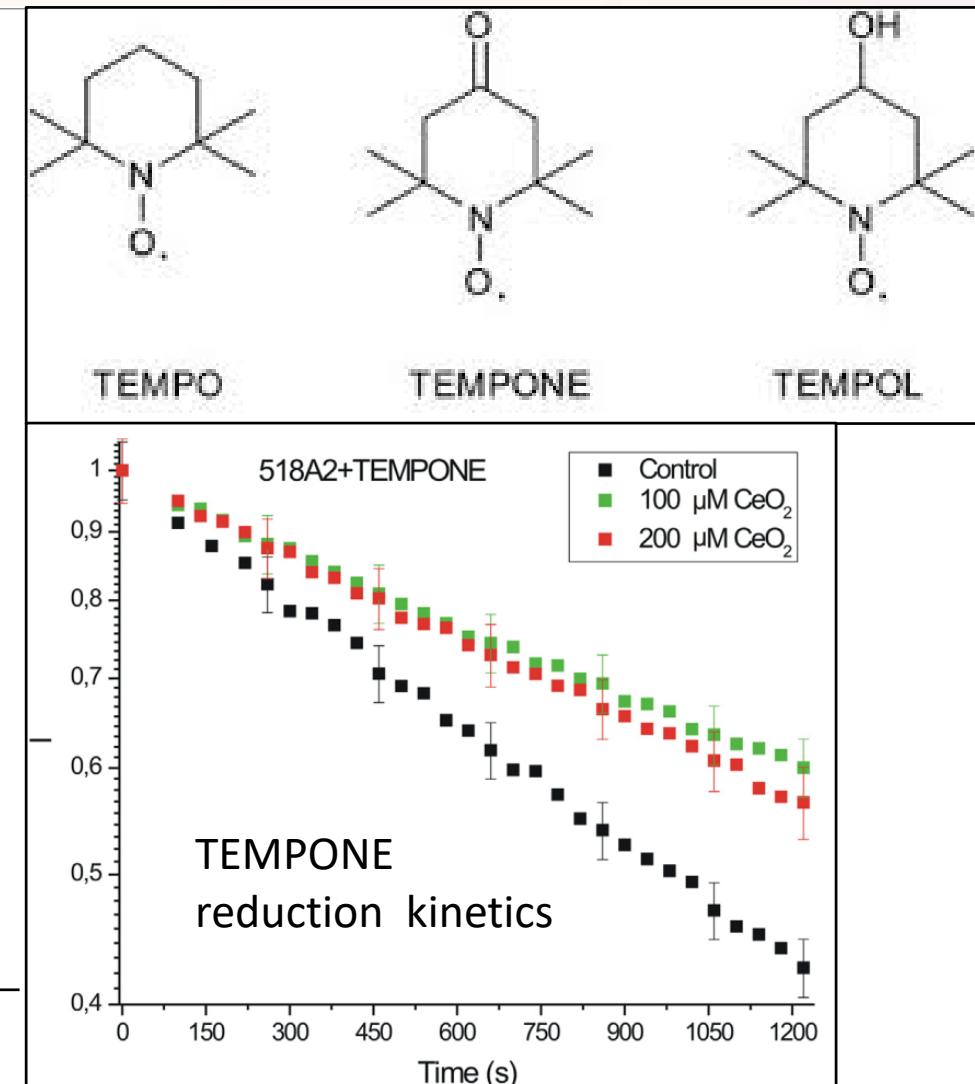




# EPR metode

## Ispitivanje ćelija kancera

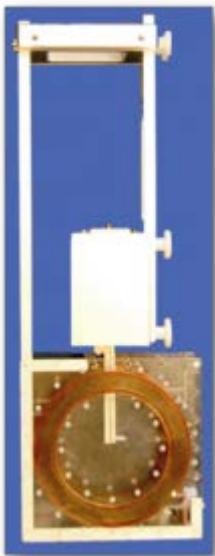
- Efakt leka na proizvodnju ROS od ćelijskih linija melanoma 518A2 i kolorektalnog adenocarcinoma HT-29.
- **EPR metoda spin-proba** pomoću TEMPONE.
- Kinetika redukcije spinske probe povezuje se sa količinom slobodnih radikala u sistemu.
- Rezultati pokazuju potencijal novih lekova u smislu oštećenja antioksidativnog kapaciteta kancer ćelija.
- CONP (cerium oxide nanoparticles) pokazuju nisku inhiborsku aktivnost za zdrave humane ćelije.





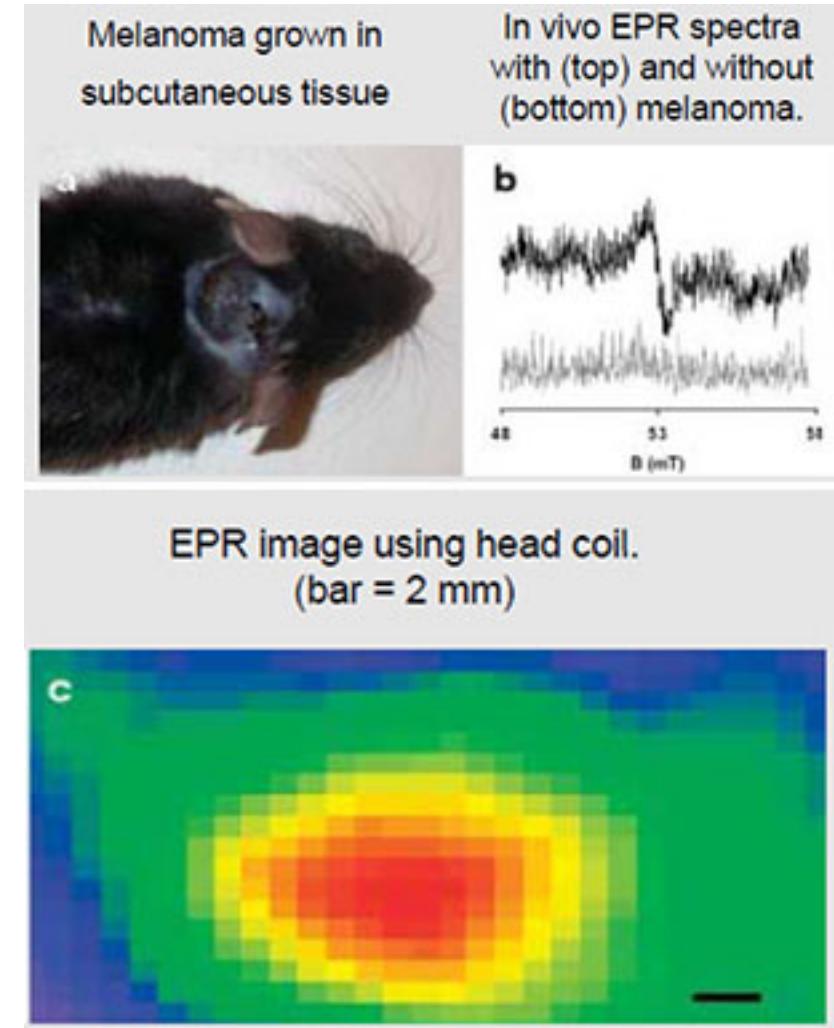
# EPR metode

## EPR spektroskopija i imidžing - koža



### Primena u farmaciji - koža

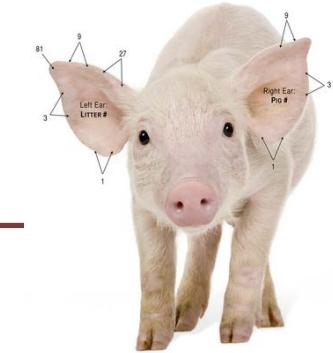
- Direktino ispitivanje uticaja leka na prisustvo slobodnih radikala u koži.
- Lek može ili namerno generisati radikale ili ih uklanjati.
- Ispitavanje delovanja UV zračenja na kožu (sa i bez leka).
- Ispitivanje isporuke lekova kroz kožu (integrisanih u lipozome ili micle).
- Praćenje kontrolisane isporuke lekova kroz kožu.





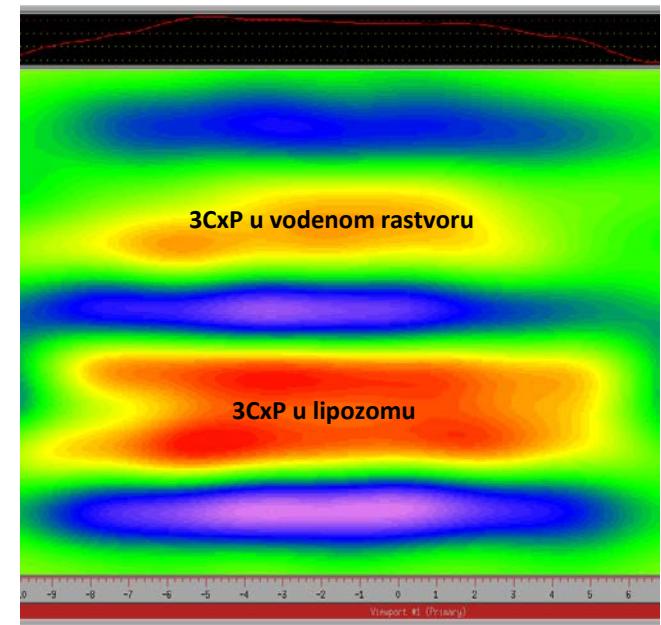
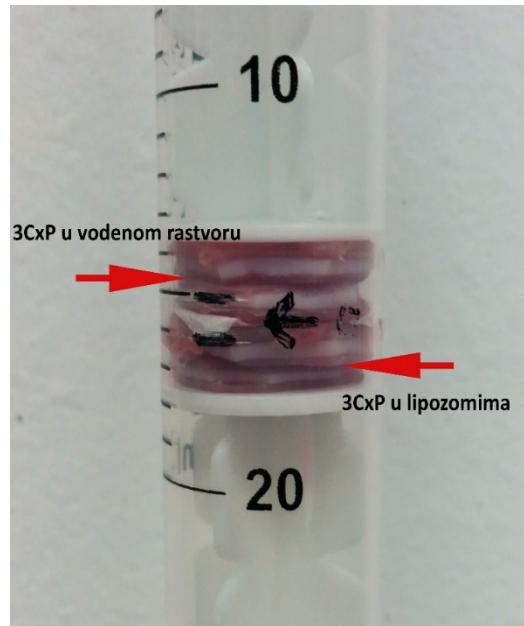
# EPR metode

Ispitivanje prodiranja kozmetičkih preparata i kožu *ex vivo*



## Primer: primena u farmaciji – prodiranje u kožu

- Ispitivanje signala 3CxP probe kao zamene za aktivnu komponentu leka.
- Cilj je ispitivanje isporuke lekova kroz kožu (razlika: vodenim rastvorom leka i lekova integriranih u lipozome).
- Krajnji cilj je kontrolisana isporuke lekova kroz kožu.



Osim toga što je evidentno dublje prodiranje lipozoma kroz kožu (nego vodenog rastvora), primetna je i razlika u nivou redukcije signala 3CxP probe askorbatom.



# Još neke primene u farmaciji

Zašto je potrebno detektovati slobodne radikale u lekovima?



- Ima 5 oblasti gde nam EPR može pomoći:

## I. Detekcija i procena degradacije

- Foto
- Termalna
- Hemijska

## II. Optimizacija stabilnosti & rok trajanja

- Stabilnost leka
- Antioksidansi
- Efikasnost

## III. Praćenje hem. reakcija

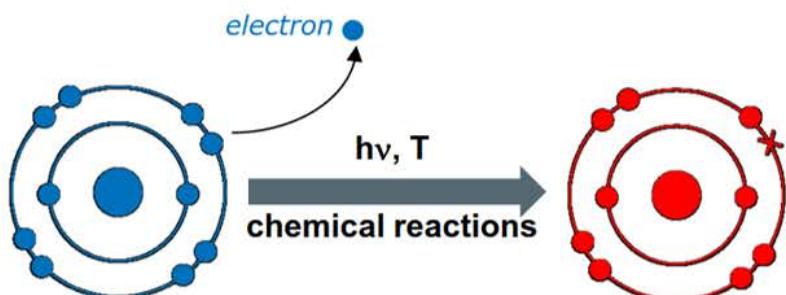
- Optimizacija  
prinosa
- Zelena hemija
- Hemikalije

## IV. Praćenje sterilizacije

- Ozračivanje
- Termalna

## V. Dtetecija nečistoća

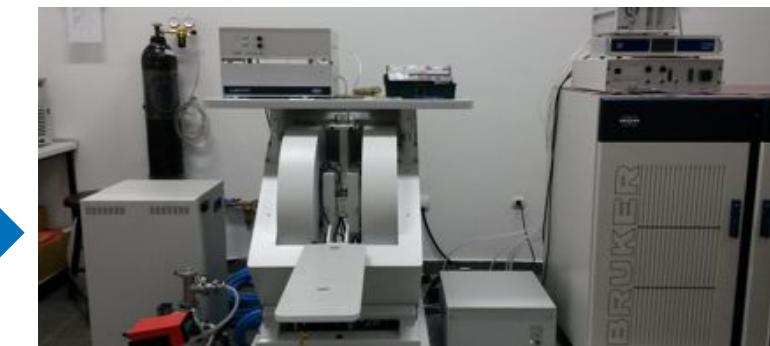
- Elementi u  
tragovima
- Toksični nus-  
proizvodi



Stabilni  
molekul

Slobodni  
radikal

Slobodi  
radikali i  
prelazni  
metali





# Još neke primene u farmaciji

## I. Praćenje degradacije leka

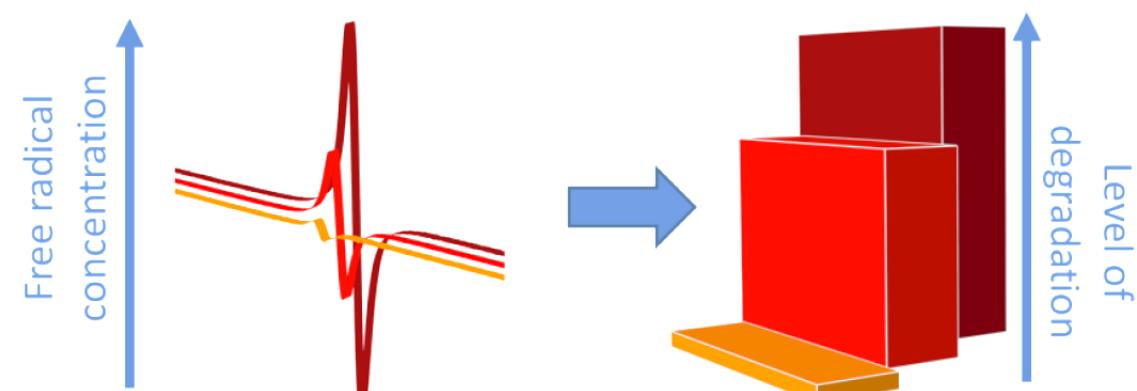


### Faktori koji utiču na stabilnost farmaceutskog preparata:

- Toplota
- Svetlost (UV, VIS)
- Kiseonik
- Vлага
- Proces sterilizacije
- Nečistoće
- Pomoćni sastojci

**Svi ovi faktori utiču na degradaciju API-ja, dodatka leku ili formulacija**

- Degradacioni procesi često uključuju učešće slobodnih radikala i prelaznih metala
- Degradacija se koreliše sa EPR signalom





# Još neke primene u farmaciji

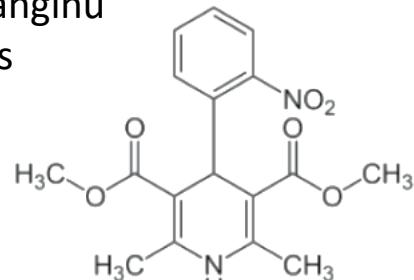


## I. Praćenje degradacije leka

- **Kako EPR ovde može pomoći?**

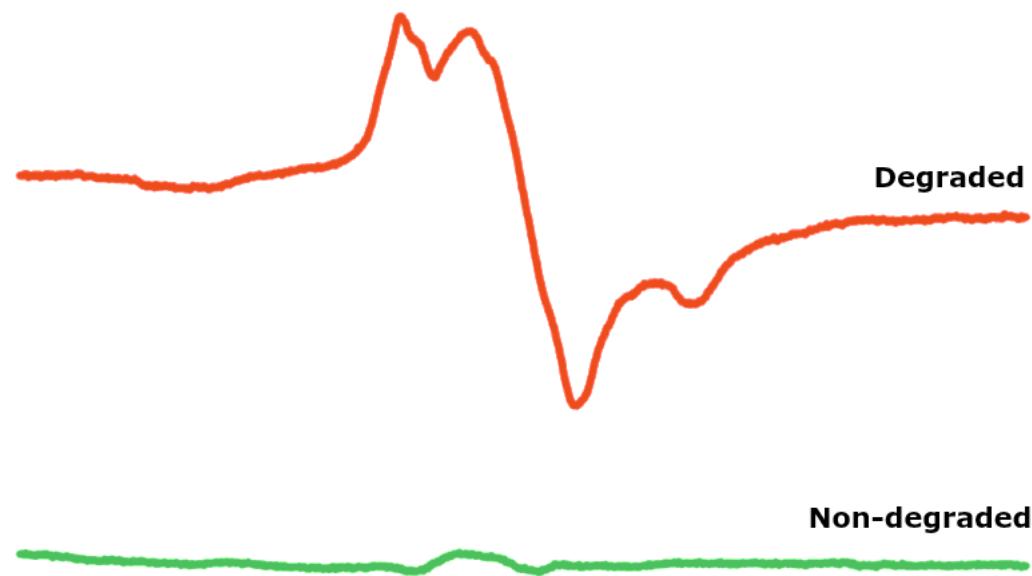
- Merenjem tj. određivanjem uzročnika degradacije leka
- Merenjem nivoa degradacije API-ja, dodataka leku ili formulacija
- Predvideti rok trajanja tj. stabilnost API-ja, dodataka leku ili formulacija

Lek za anginu  
pectoris



Nifedipine

Photodegradation of Nifedipine after exposure to light shows the formation of N-based free radical. The amount of free radicals corresponds to the level of degradation



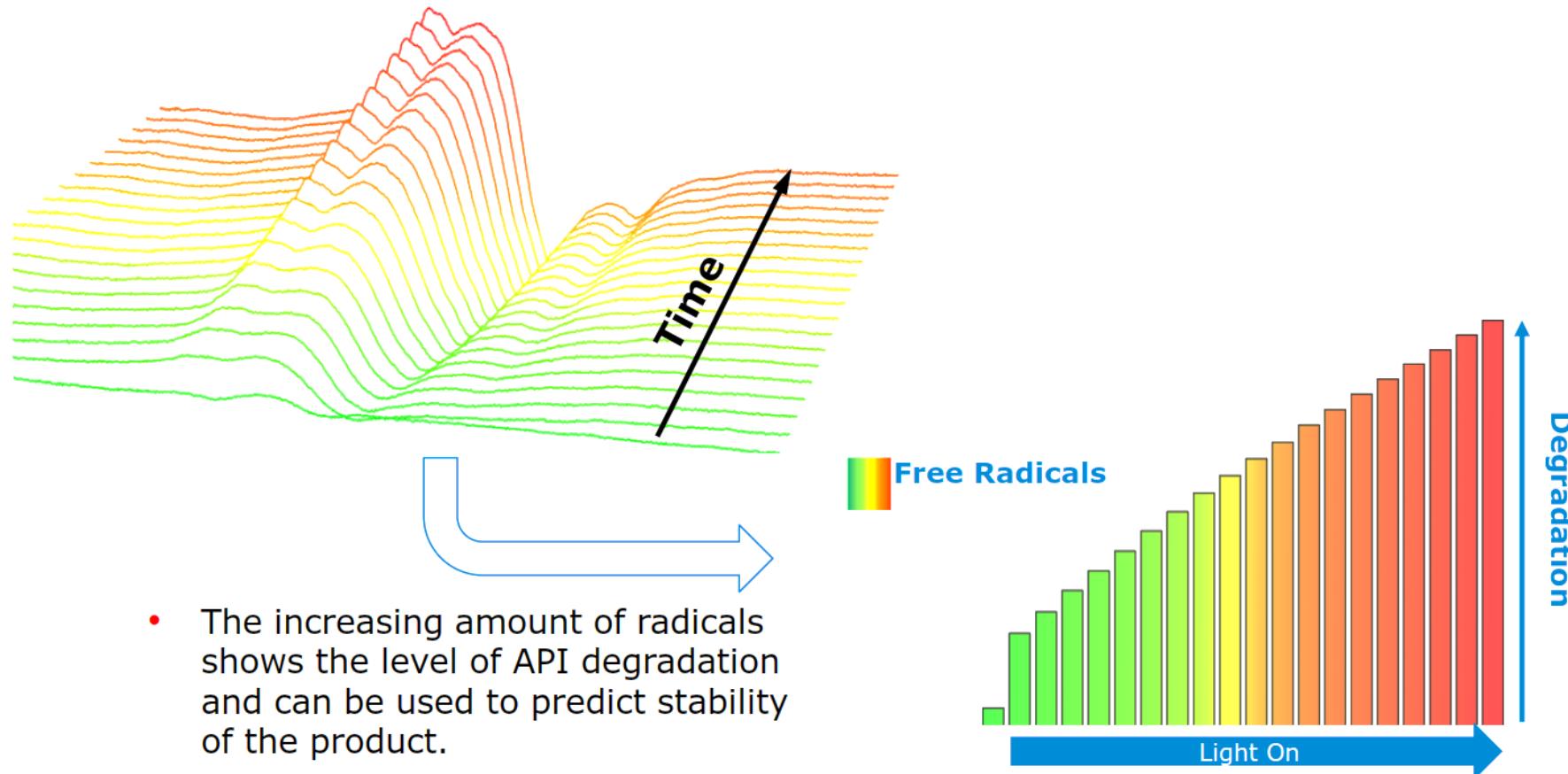


# Još neke primene u farmaciji



## I. Praćenje degradacije leka

- Vremenska zavisnost visine EPR pika radikala dobijenog degradacijom API-ja



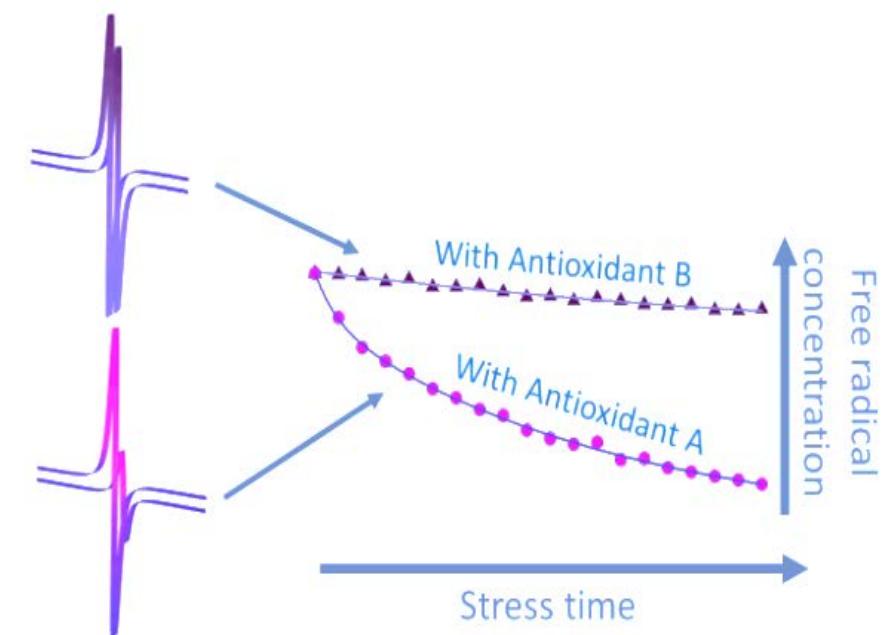
Williams H.E. and Claybourn M. (AstraZeneca), Predicting the photostability characteristics of active pharmaceutical ingredients using electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Drug Dev. Ind. Pharm.* (2012) 38(2) 200

# Još neke primene u farmaciji

## II. Optimizovanje stabilnosti i roka trajanja leka

- Ispitivanje kako indukovani oksidativni stres utiče na oksidaciju/degradaciju u cilju predviđanja stabilnosti leka.
- Tokom testa na stres, lek se podvrgava toploti, delovanju svetlosti i hemijskim agensima
- Na ovaj način se postiže:
  - Bolje razumevanje mehanizama degradacije
  - Određivanje svojstvene stabilnosti i roka trajanja
  - Razvijanje stabilnijih formulacija

Antioxidant A is more effective than antioxidant B at quenching the free radicals in the drug formulation





# Još neke primene u farmaciji

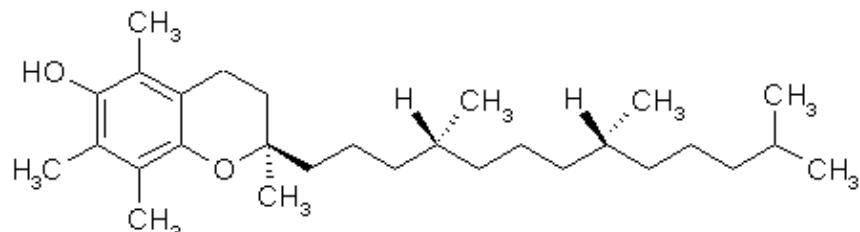
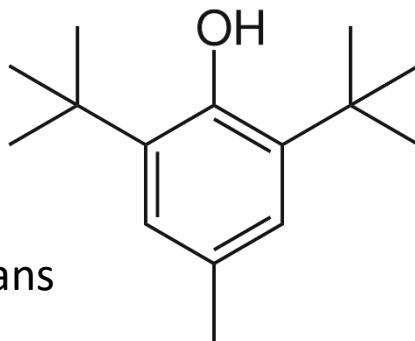
## II. Optimizovanje stabilnosti i roka trajanja leka



- **Kako EPR ovde može pomoći?**

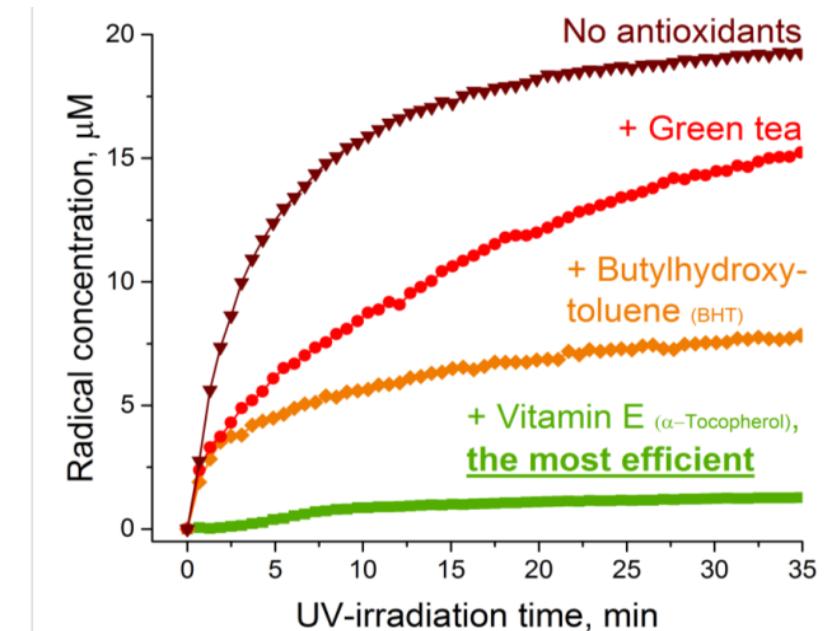
- Praćenjem procesa koji uključuju proizvodnju slobodnih radikala, što može pomoći u predviđanju dugotrajne foto-, termo- i hemijske stabilnosti leka.
- Za ispitivanja su potrebne izuzetno male količine leka (važno za početne faze razvoja leka).
- Određivanje antioksidativne efikasnosti leka za uklanjanje slobodnih radikala pomoću ranije ustanovljenih eseja.

BHT - lipofilni antioksidans



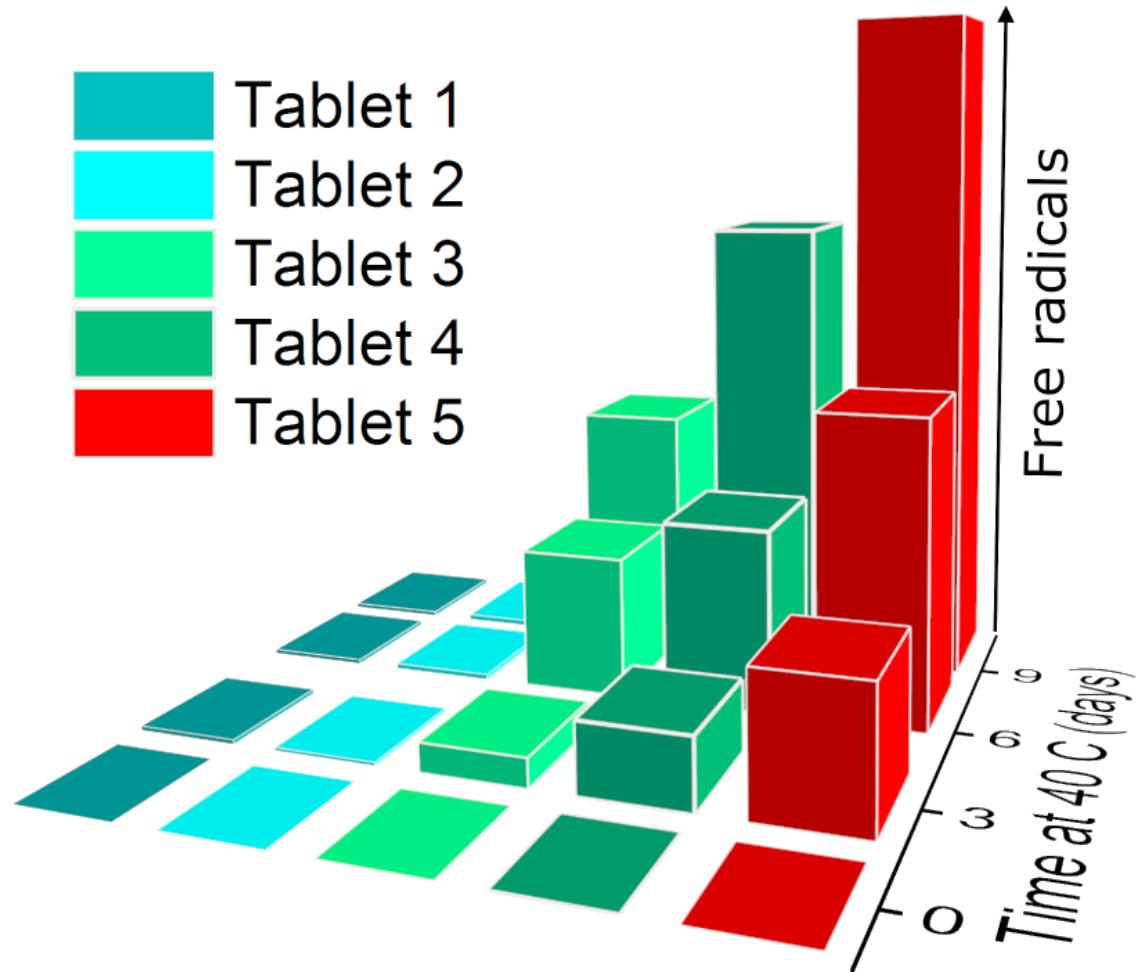
$\alpha$ -tokoferol iz vitamina E

Evaluation of antioxidants' effect on a skin care product during UV-irradiation shows vitamin E to be the most efficient antioxidant.



# Još neke primene u farmaciji

## II. Optimizovanje stabilnosti leka i roka trajanja leka



### Određivanje roka trajanja:

- Pet formulacija u obliku tableta se testiraju na temperaturski stres od 40°C, tokom perioda od 10 dana.
- Povećana koncentracija slobodnih radikala u tabletama 3-5, pokazuje skraćen rok trajanja leka.
- Tablete 1&2, koje imaju nisku koncentraciju slobodnih radikala, pokazuju bolji potencijal za dalji razvoj leka.

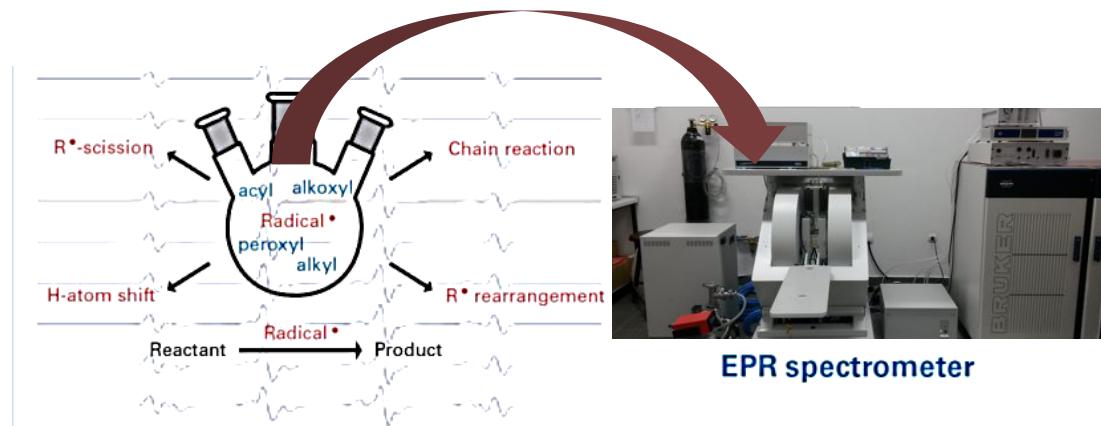


# Još neke primene u farmaciji

## III. Praćenje toka hemijskih reakcija – proizvodnja leka



- Praćenje reakcije je kritično za proces razumevanja, optimizacije i unapređenje procesa proizvodnje leka.
- Razumevanje reakcionih mehanizama vodi smanjenju troškova i očuvanju kvaliteta finalnog proizvoda.
- Informacije dobijene iz proučavanja kinetike i modelovanja, omogućavaju predviđanje uslova sinteze leka, što dovodi do optimizacije i kontrole procesa proizvodnje leka, kao i proceni rizika.
- Detaljno poznavanje hemijskih mehanizama proizvodnih procesa, koji uključuju radikale i prelazne metale, su važni za povećanje prinosa i ekološkim aspektima proizvodnje leka.



EPR spectrometer

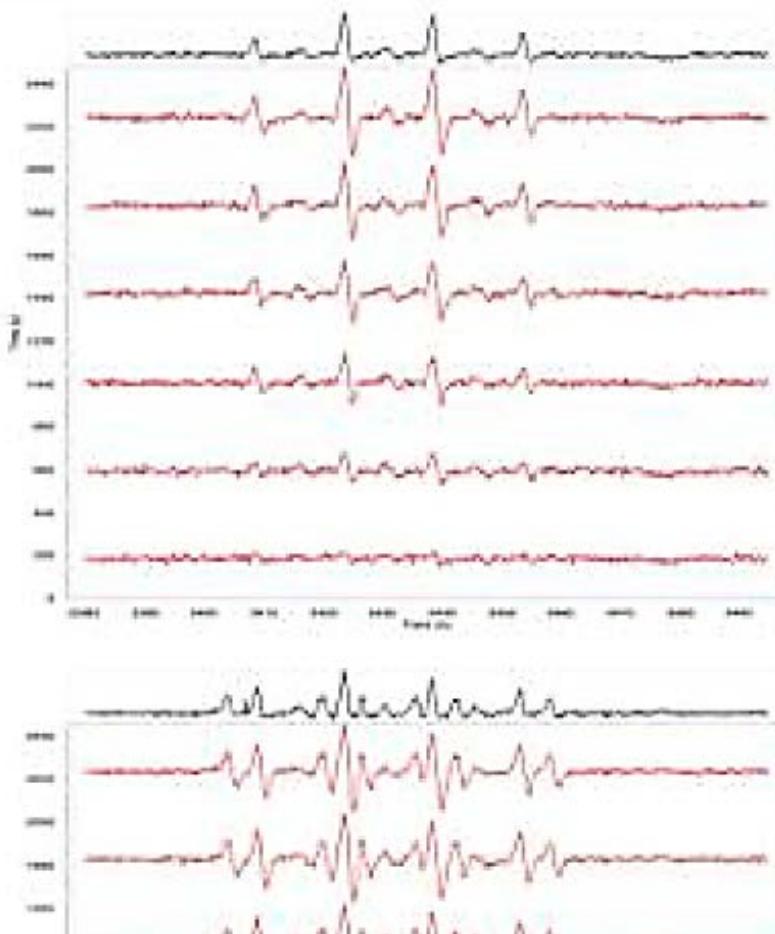


# Još neke primene u farmaciji

## III. Praćenje toka hemijskih reakcija



- Kako EPR ovde može pomoći?



- Identifikacija reakcionih intermedijera (slobodnih radikala i prelaznih metala) daje informacije o mehaničkim svojstvima leka.
- Dobijaju se odgovori na dva osnovna pitanja: reakcioni prinos i reakciona kinetika.
- Dobijaju se podaci za kreiranje kinetičkih modela.
- Kvantifikacija količine slobodnih radikala i metala tokom reakcije.

### Hydroxyl Radical Generation by Ultrasonic Irradiation

As an example of closed loop reaction analysis, the radical generation initiated by ultrasonic irradiation was analyzed. When hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is added to water and ultrasonic irradiation is performed, OH radicals are generated. These OH-radicals can be observed by using the spin trapping reagent DMPO (Fig. 4 upper). When methanol is added, both OH- and carbon centered radicals are generated from the water and methanol (Fig. 4 lower). The radical identities were determined by SpinFit and their concentration by SpinCount. The kinetics are analyzed by the Xenon software.

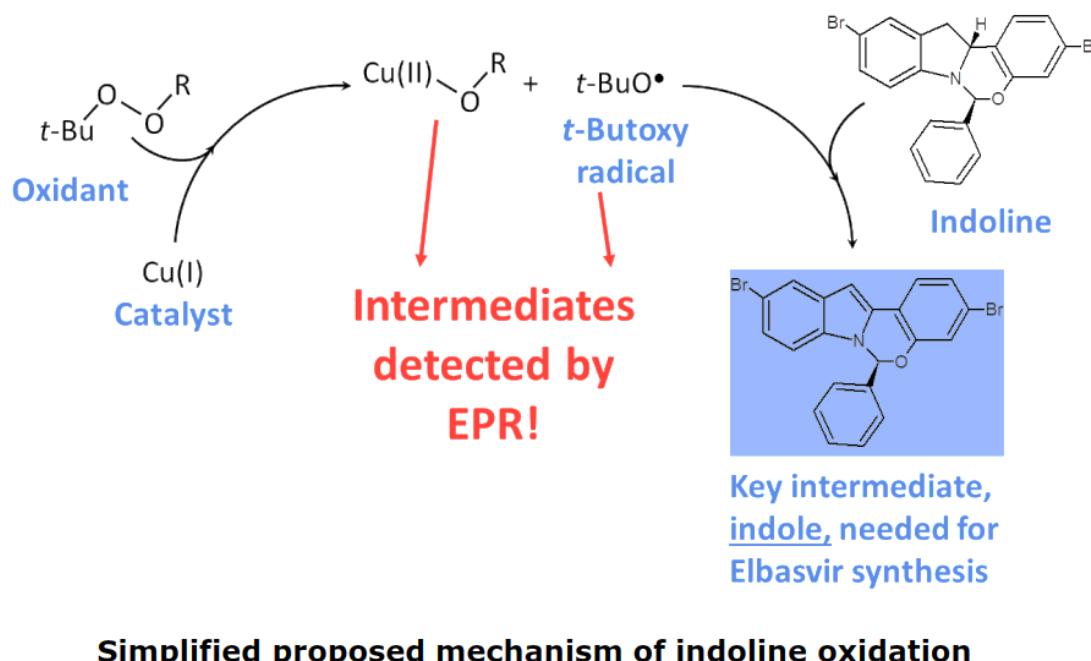


# Još neke primene u farmaciji

## III. Praćenje toka hemijskih reakcija

### Još jedan primer istraživanja kompanije MERCK:

- Praćenje da li se generišu EPR aktivni intermedijeri prilikom proizvodnje novog leka za Hepatitis C (Elbasvir).
- Predloženi mehanizam pretpostavlja da je Cu(I) katalizator, pri čemu se oksiduje u Cu(II) i tert-butoksi radikal.
- Prati se efikasnost sinteze leka koja bi trebala da bude >92%.



Peng F. et. al. (Merck), A mild Cu(I)-catalyzed oxidative aromatization of indolines to indoles, *J. Org. Chem.* (2016) 81 10009



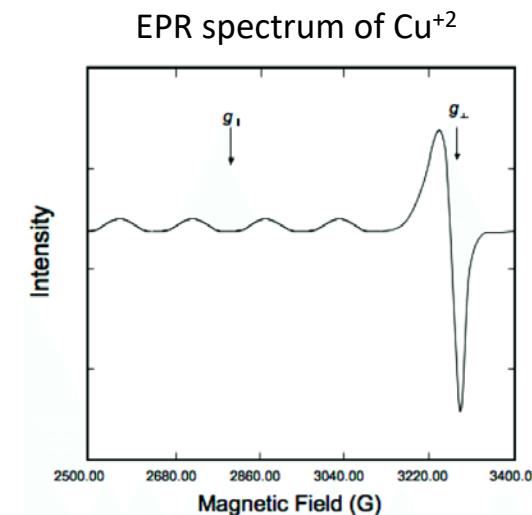
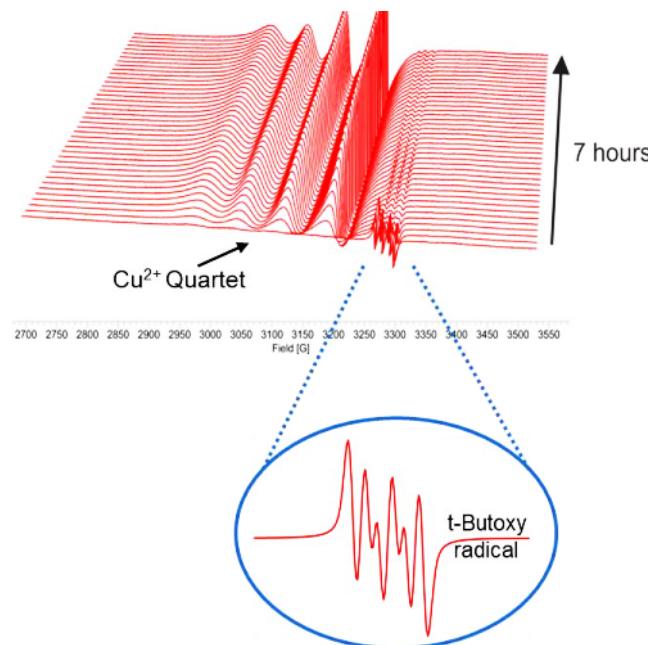
# Još neke primene u farmaciji



## III. Praćenje toka hemijskih reakcija

### Primer kompanije MERCK:

- Praćenje reakcije potvrđuje oksidaciju EPR neaktivnog Cu(I) u EPR aktivni Cu(II).
- EPR signal Cu(II) dostiže plato posle oko 3 sata što ukazuje na kraj reakcije.
- t-Butoksi radikal se takođe detektuje putem EPR spin-trap metode.
- Kvantitativna EPR analiza oba intermedijera daje informaciju o efikasnošću sinteze leka.



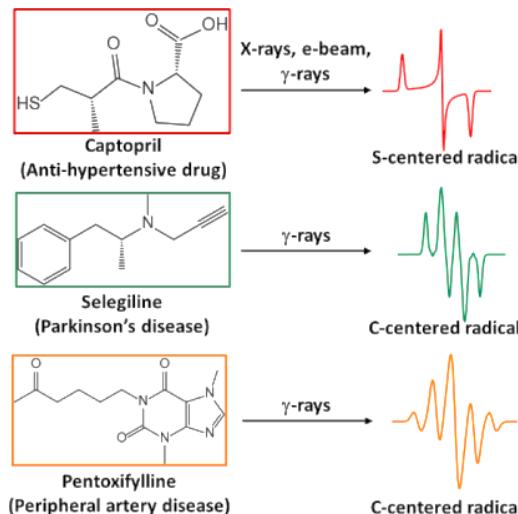
Peng F. et. al. (Merck), A mild Cu(I)-catalyzed oxidative aromatization of indolines to indoles, *J. Org. Chem.* (2016) 81 10009

# Još neke primene u farmaciji

## IV. Praćenje procesa sterilizacije

- Ispravna sterilizacija API-ja, dodataka leku, finalne formulacije leka, laboratorijske opreme i medicinskih uređaja su veoma važni za proizvođače lekova.
- Međutim, proces sterilizacije može rezultovati stvaranjem radikala koji:
  - Su odgovorni za degradaciju ozračenog materijala
  - Su odgovorni za promenu fizičkohemijskih osobina sterilisanog proizvoda
  - Smanjuju efikasnost leka zbog njegove delimične degradacije tokom procesa sterilizacije
  - Mogu predstavljati toksikološku opasnost

### Examples:

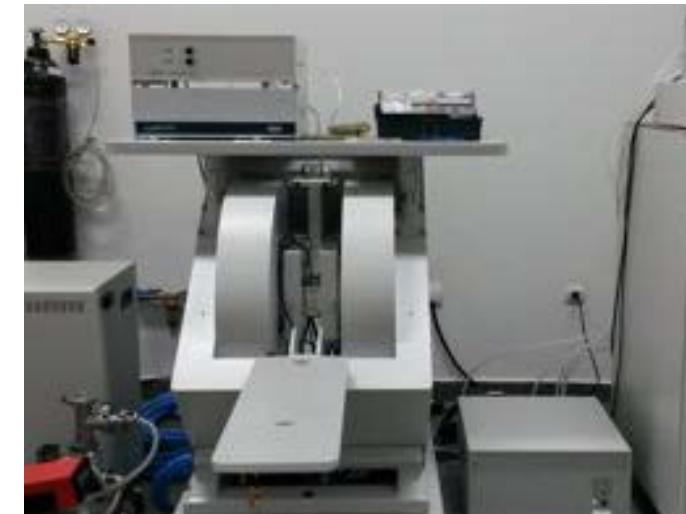
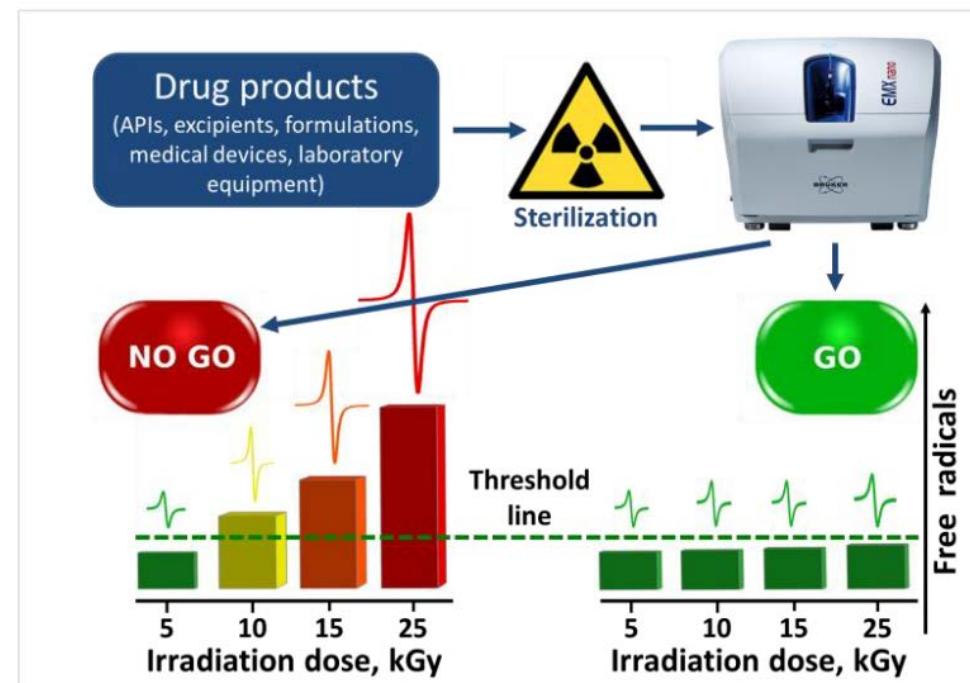


- Ozračivanje leka gama-zracima u čvrstom stanju (Captopril, Selegiline, Pentoxifylline) indukuje generisanje S- ili C-centriranih slobodnih radikala.
- Identifikacija vrste radikala daje uvid u bolje razumevanje mehanizma radiolize.
- Kvantifikacija radikalског prinosa koristi se za uspostavljanje granične vrednosti doze prilikom radiosterilizacije lekova.

# Još neke primene u farmaciji

## IV. Praćenje procesa sterilizacije

- Kako EPR ovde može pomoći?
- Određuje se stabilnost leka nakon sterilizacije.
- Može se vršiti karakterizacija slobodnih radikala i identifikacija njihovog izvora.
- Omogućava donošenje važnih odluka tokom proizvodnje leka baziranih na kvantifikaciji slobodnih radikala tokom provjere kvaliteta leka.



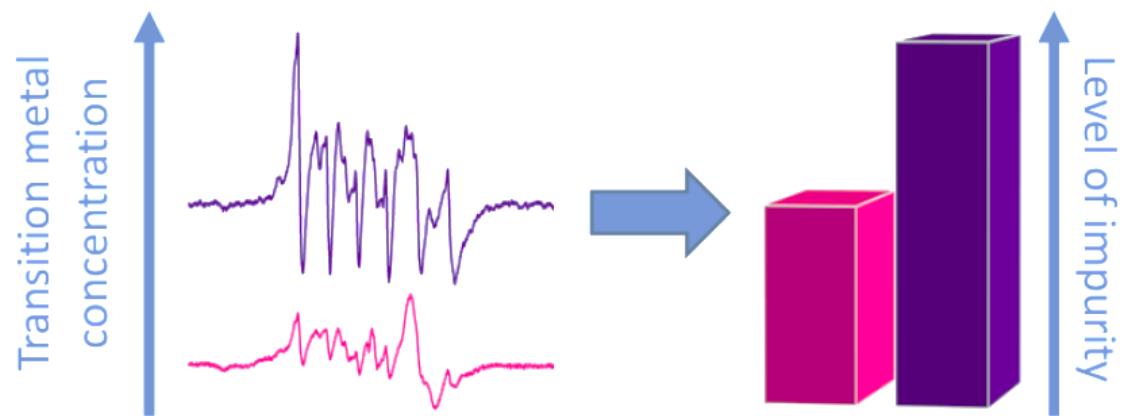


# Još neke primene u farmaciji

## V. Detekcija farmaceutskih nečistoća



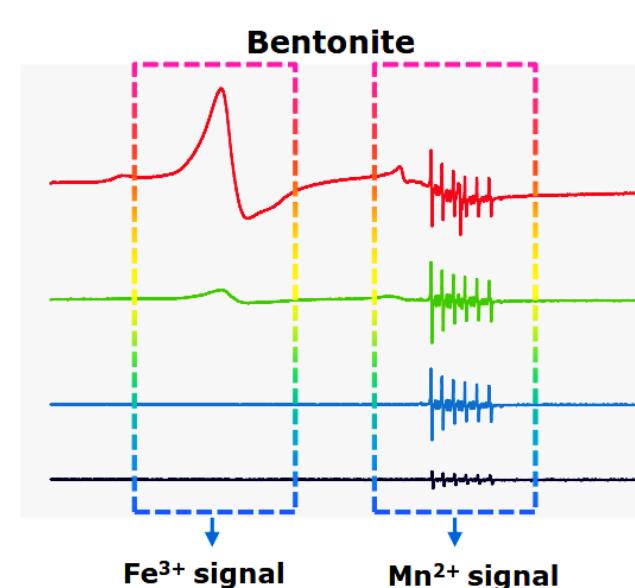
- Nečistoće u leku potiču ili od API-ja, ili dodataka leku, ili od oba od ovih izvora.
- Nečistoće se takođe mogu uneti tokom procesa formulacije leka, tokom pakovanja ili skladištenja.
- Postojanje nečistoća može imati više neželjenih efekata, kao što su:
  - Smanjenje terapeutskog efekta leka
  - Skraćenje roka trajanja
  - Pojave toksičnosti leka



# Još neke primene u farmaciji

## V. Detekcija farmaceutskih nečistoća

- Kako EPR ovde može pomoći?
  - Detektovanje i identifikacija prelaznih metala u tragovima.
  - Praćenje procesa degradacije leka koji uključuju proizvodnju slobodnih radikala.
  - Proučavanje proizvodnje slobodnih radikala, katalisane prelaznim metalima ili nečistoćama.



### Analiza tragova nečistoća i kontrola kvaliteta leka:

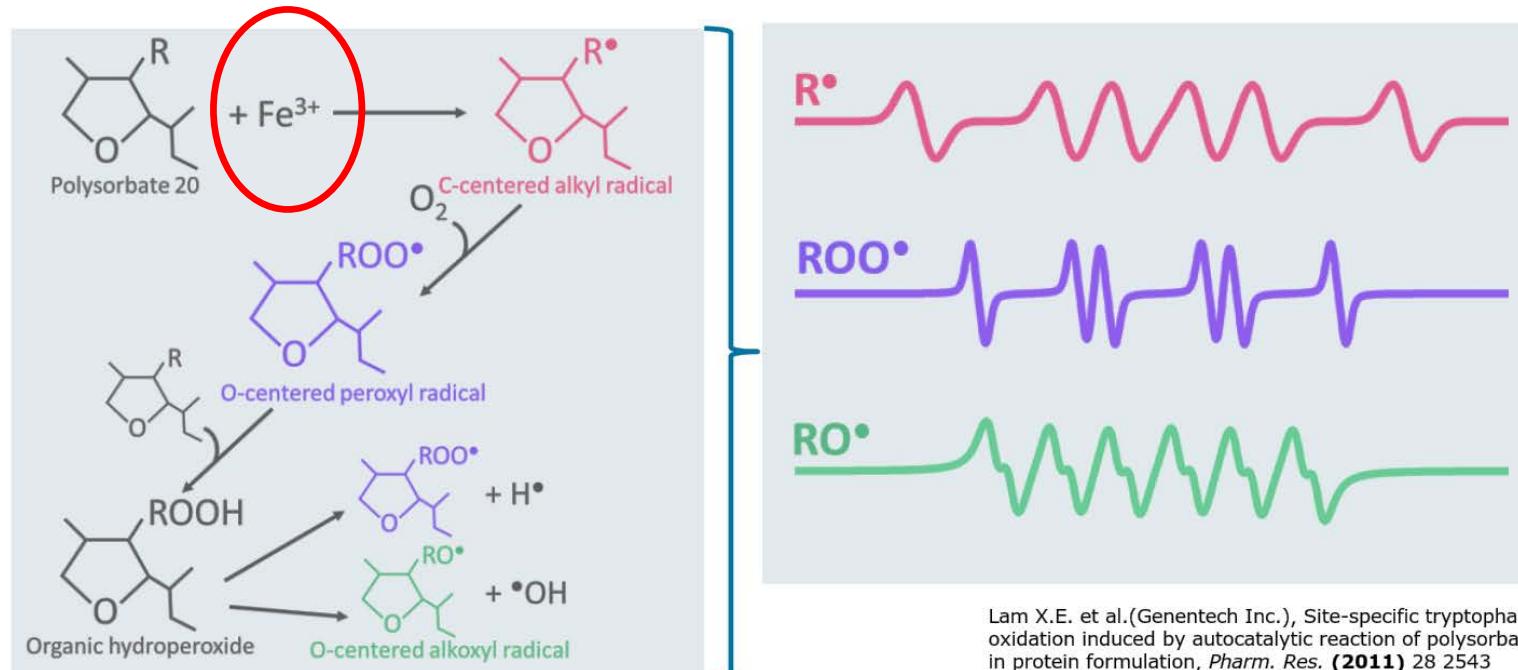
- Mangan ( $Mn^{+2}$ ) i gvožđe ( $Fe^{+3}$ ) su prisutni u tragovima u bentonitu koji se koristi kao aditiv (filer) u tabletama.
- Povećana količina metala ubrzava proces degradacije API-ja, kao i nužnih dodataka leku.

# Još neke primene u farmaciji

## V. Detekcija farmaceutskih nečistoća

### Studija za jednu farmaceutsku kuću:

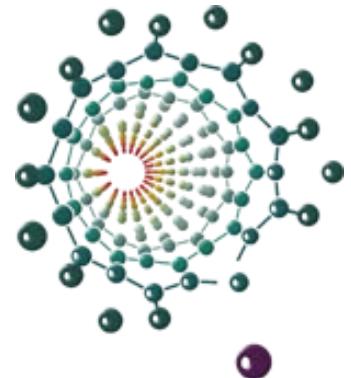
- Polisorbat 20, koji se prilikom formulacije leka koristi kao stabilizator, podleže atooksidaciji.
- Autooksidacija je katalisana prelaznim metalima što kao rezultat daje sporednu reakciju tokom koje se formiraju slobodni radikali.
- Pomoću EPR-a, mogu se detektovati identifikovati i kvantifikovati slobodnoradikaliske nečistoće.





# EPR Lab

---



- Za više informacija posetite naš sajt:

A promotional banner for BioScope Labs. On the left, there is a cluster of five circular icons representing various scientific fields: a DNA helix, a radiation symbol, binary code, a flame, and a battery. The background is a light gray with a faint hexagonal molecular lattice pattern. The text "BioScope Labs" is written in a large, stylized, light gray font. Below it, the website address "www.bioscope.ffh.bg.ac.rs" is displayed in a smaller, dark red font.