



## Gama ile ışınlanmış amantadin hidroklorürde oluşan serbest radikallerin simülasyon metoduyla incelenmesi

**Kerem SÜTÇÜ\***

Dicle Üniversitesi, Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi, Diyarbakır  
[ksutcu@dicle.edu.tr](mailto:ksutcu@dicle.edu.tr) ORCID: 0000-0002-5791-1492, Tel: (412) 241 10 00 (8862)

Geliş: 03.04.2018, Kabul Tarihi: 17.05.2018

### Öz

*Bu çalışmada, gama ile ışınlanmış amantadin hidroklorür numunesinde oluşan serbest radikallerin kimyasal yapıları simülasyon programı kullanılarak elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi yöntemiyle incelenmiştir. Spektruma iki radikal türünden katkı geldiği düşünülerek radikaller; radikal I (-CHCH-) ve radikal II (-CH-) olarak etiketlenmiştir. Işınlama sonrasında oluşan paramanyetik türlerin radyasyon duyarlılığını belirlemek amacıyla, amantadin hidroklorür numunesine gama ışınları 1, 4, 7, 10 ve 15 kGy dozlarında oda sıcaklığında uygulanmıştır. Gama ışınına maruz kalmış olan amantadin hidroklorür numunesinin deneysel spektrumları incelendiğinde, merkezde güçlü bir sinyal (I<sub>2</sub>) ile bu güçlü sinyalin sol (I<sub>1</sub>) ve sağ tarafında (I<sub>3</sub>) zayıf sinyaller belirgin bir biçimde tespit edilmiştir. Işınlanmış numunenin doz-cevap eğrilerini tanımlayan en yakın matematiksel denklemler belirlenmiştir. Absorbe edilen radyasyon dozuyla sinyal şiddetleri arasındaki korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Işınlama işleminin, numunenin raf ömrüne etkisini incelemek amacıyla EPR sinyallerinin değişimi belirli aralıklarla oda sıcaklığında kaydedilmiştir. Kaydedilen spektrumlar incelendiğinde 150. gün sonunda bile tüm sinyallerin gözlemlendiği belirlenmiştir. Mikrodalga gücünün bir fonksiyonu olarak, sinyal şiddetleri, 295 Kelvin sıcaklığında 0.01 ile 100 mW aralığında incelenmiştir. Gama ışınlaması ile indüklenen numunenin düşük ve yüksek sıcaklıktaki spektrumları kaydedilerek tepeden-tepeye sinyal şiddetleri ile serbest radikallerin sıcaklığa bağlı duyarlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca, radikalın spektroskopik yarılma çarpanı (g) ve aşırı ince yapı sabitleri de hesaplanmıştır.*

**Anahtar Kelimeler:** EPR; Gama-Işınlaması; Simülasyon;

\* Yazışmaların yapılacağı yazar

## Giriş

İlaç endüstrisindeki hızlı gelişmelerin ışığında ilaç hammaddelerini daha etkin ve hızlı bir şekilde sterilize etme çalışmaları gittikçe önem kazanmaktadır.

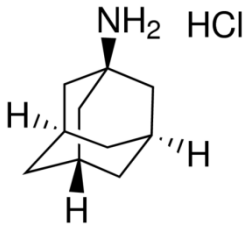
Radyosterilizasyon teknolojisinin uluslararası alandaki gelişimi, ilaç ve ilaç hammaddelerinin kontrollü ve güvenilir bir biçimde radyasyon enerjisi kullanılarak sterilize edilmelerini kolaylaştırmaktadır. Radyasyon teknolojisinin çevreye zarar vermemesi, uygulandığı numunede önemli bir sıcaklık artışında bulunmaması ve kontrolünün kolay olması, bu teknolojiyi oldukça üstün kılmaktadır. Bu üstün özelliklerinden dolayı; radyosterilizasyon teknolojisinin endüstrideki kullanımı her sene ortalama %10-15 artış göstermektedir. Gama ışınları amino asitler, gıdalar ve ilaçlar dahil olmak üzere birçok maddede ışınlama hasar merkezlerinin tanımlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Köksal vd., 1997; Diehl 2002; Osmanoğlu vd., 2017; Basly vd., 1996). Bununla birlikte, gama ışınları yüksek enerjileri nedeniyle moleküler yıkımlara neden olabilmektedir. Bu bağlamda, tüketilecek bir ilaç numunesinin herhangi bir ışınlama işlemine maruz kalıp kalmadığını tespit etmek mümkün olmalıdır; ve eğer ilaç ışınlanmışsa, ışınlama dozu hesaplanmalıdır. Ek olarak, ışınlanmış numune raf ömrü boyunca ışınlanmamış olanlardan kolayca ayırt edilebilir olmalıdır. Bu nedenlerden dolayı, radyosterilizasyon işlemine maruz bırakılacak olan bir ilaç numunesinin radyasyon duyarlılığını araştırmak gereklidir. EPR spektroskopisi, ışınlanmış gıda ve ilaç numunelerinin radyasyon duyarlılığını araştırmak için kullanılan başlıca yöntemlerden biridir (Karakirova ve Yordanov, 2015; Ambroz vd., 2000). Düşük dozlarda ışınlama işleminin numunelerde oluşabilecek radyasyon hasarını en aza indirmeye avantajına sahip olmasından dolayı, bu çalışmada maksimum 15 kGy doz şiddetinde ışınlanmış amantadin hidroklorür (AH) örnekleri kullanıldı (Gopal, 1977). AH, parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan antimikrobiyal bir ajandır (Omara ve Amin,

2011). Literatür incelendiğinde, parkinson hastalığına bağlı ilaçların radyasyon duyarlılığını inceleyen EPR çalışmalarının sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. EPR spektroskopisini kullanarak parkinson hastalığı tedavisinde kullanılan selegilin ve pergolid mesilat ilaç numuneleri EPR spektroskopisi yöntemiyle incelenmiştir (Köseoğlu vd., 2003). Çalışmada, örnekler için bazı EPR parametreleri  $g = 2.0039$ ,  $a_{\beta}^{(1,2)} = 2.1-1.8\text{mT}$ ,  $a_{\alpha} = 1.5\text{ mT}$ ,  $a_N = 0.5\text{ mT}$ , çizgi genişliği ( $\Delta H$ ) = 0.6 mT ve  $g = 2.0033$  olarak hesaplanmıştır. Bugün, parkinson hastalığı görülme oranlarının sıklığı gittikçe artmaktadır. Sonuç olarak, parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlara yönelik radyasyon duyarlılığı çalışmaları oldukça önemli hale gelmiştir. Bu nedenle, belirli dozlarda ışınlanan AH örneğinin yapısında oluşan serbest radikallerin radyasyon duyarlılığı incelenmiş ve bu radikallerin kimyasal yapıları simülasyon programı kullanılarak tespit edilmiştir.

## Materyal ve Yöntem

Çalışma amacı için, AH numunesi, Sigma-Aldrich firmasından toz halinde satın alınmıştır. AH numunesinin kimyasal formülü ve moleküler ağırlığı tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** AH numunesinin kimyasal özellikleri

<b>KİMYASAL FORMÜL</b>	$C_{10}H_7N.HCl$
<b>MOLEKÜLER AĞIRLIK</b>	187.71 (g/mol)
<b>MOLEKÜLER YAPI</b>	

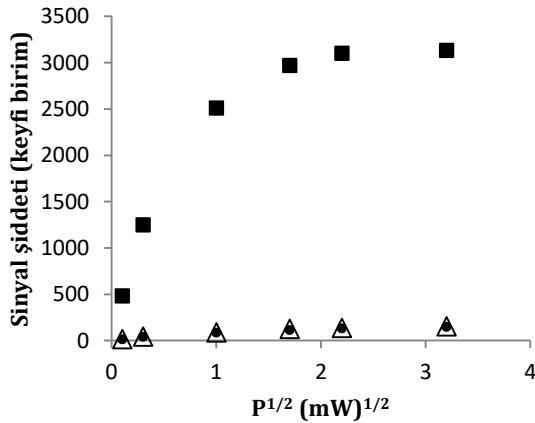
AH numunesi, 1785 Gy/Sa. doz hızında çalışan  $^{60}\text{Co}$ -gama kaynağı (izotop, Ob-Servo Sanguis) ile 15 kGy'e kadar oda sıcaklığında ışınlanmıştır. Numunede oluşan serbest radikallerin stabilitelerini takip etmek için

birkaç ay boyunca belirli aralıklarla EPR spektrumları kaydedilmiştir. EPR ölçümleri, 1 mW mikrodalga gücünde çalışan Jeol JES-FA300 X-band EPR spektrometresinde, 9.2 GHz'lik mikrodalga frekansında gerçekleştirilmiştir. Simülasyon spektrumları EPR-WINSIM:NIEHS simülasyon programı kullanılarak elde edilmiştir (Nih 2012).

## Bulgular ve Tartışma

### Mikrodalga Çalışması

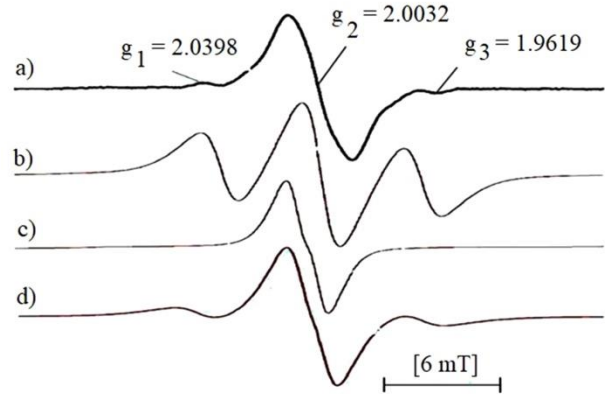
AH numunesinin mikrodalga doyum özellikleri, 0-100 mW'lık mikrodalga gücünde incelenmiştir. 15 kGy ışınlanmış AH numunesinden elde edilen EPR spektrumlarına birden fazla radikalden katkı geldiği tespit edilmiştir. AH numunesinin kaydedilen EPR spektrumundaki sinyal şiddetlerinin mikrodalga gücüne bağlı değişimi şekil 1'de gösterilmiştir. Şekil 1 incelendiğinde,  $I_2$  sinyalinin mikrodalga doyum özelliklerinin  $I_1$  ve  $I_3$ 'ten oldukça farklı olduğu görülmektedir.  $I_2$  sinyalinin en iyi uyumu logaritmik fonksiyonla ( $R^2 = 0.9830$ ) gösterdiği, ancak  $I_1$  ve  $I_3$  sinyallerinin en iyi uyumu polinom fonksiyonlarıyla gösterdiği belirlenmiştir ( $R^2 = 0.9918$ ,  $R^2 = 0.9945$ ) (Polat ve Korkmaz, 2006).



Şekil 1. Işınlanmış AH numunesinin sinyal şiddetinin mikrodalga gücüne (P) bağlı değişimi. Sinyal  $I_1$ (Δ), Sinyal  $I_2$ (■), Sinyal  $I_3$ (●)

### EPR Çalışması

Gama ile 15 kGy ışınlanmış AH numunesinin kaydedilen EPR spektrumu şekil 2'de gösterilmiştir. Deneysel spektrumlar incelendiğinde, aşırı ince yapı sabitlerinin belirlenmesinin oldukça zor olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle spektroskopik parametreleri elde edebilmek için simülasyon metodu kullanılmıştır.



Şekil 2. (a) 15 kGy ışınlanmış AH numunesinin 295 Kelvin sıcaklığında kaydedilmiş deneysel EPR spektrumu

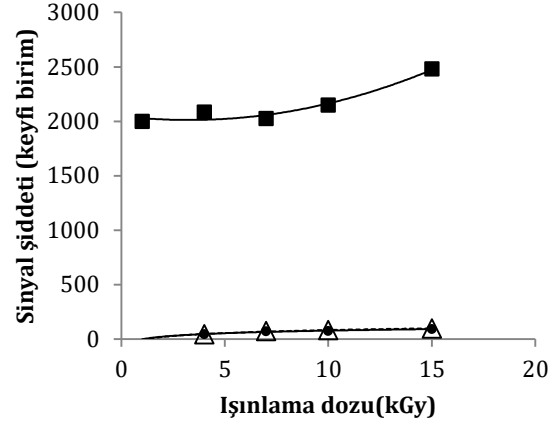
- (b)  $-ĈHCH-$  radikalinin simülasyon spektrumu  
(c)  $-ĈH-$  radikalinin simülasyon spektrumu  
(d)  $-ĈHCH-$  +  $-ĈH-$  simülasyon spektrumu

Şekil 2a incelendiğinde gama ile ışınlanmış AH numunesinin 295 K'de kaydedilen üç tepe noktasına sahip EPR spektrumunun 14 mT'lık bir alana yayıldığı görülmektedir. Spektruma iki radikal türünden katkı geldiği düşünülerek radikaller radikal I ve radikal II olarak etiketlenmiştir. Şekil 2b'de üçlü bir bileşen gösteren simülasyon spektrumu için spin hamiltoniyen parametreleri  $a^{(1)}_{CH} = a^{(2)}_{CH} = 2.5$  mT olarak hesaplanmıştır. Eşlenmemiş elektronun bir  $\alpha$  protonu ve bir  $\beta$  protonu ile etkileşimi sonucu paramanyetik merkez  $-ĈHCH-$  radikaline (radikal I) atfedilmiştir. Radikal I'in spektrumu 1: 2: 1 şiddetine sahip üç sinyal tepesine sahiptir. Simülasyon yöntemi kullanılarak elde edilen singlet yapıdaki spektrum şekil 2c'de gösterilmiştir.  $a_H = 0.69$  mT ve çizgi genişliği  $\Delta H = 0.55$  mT olan bu

spektrum,  $\dot{\text{C}}\text{H}$ - radikaline (radikal II) atfedilmiştir. Radikal II' de  $a_{\text{H}}$  değeri çizgi genişliğine yakın olduğundan dolayı dublet yapıda çözünmesi gereken spektrumun singlet yapıda kaldığı belirlenmiştir. Benzer singlet yapıdaki spektrumlar oda sıcaklığında ve 77 K'de çeşitli ilaçlarda tespit edilmiştir (Ambroz vd., 2002; Basly vd., 1998). Deneysel spektruma  $\dot{\text{C}}\text{HCH}$ -radikalinin katkısı yaklaşık % 54.5 ve  $\dot{\text{C}}\text{H}$ - radikalinin katkısı ise % 45.5 olarak hesaplanmıştır. Radikal I ve radikal II'nin simülasyon spektrumuna toplam katkısı şekil 2'de verilmiştir. Deneysel ve simüle spektrum arasında oldukça iyi bir uyum olduğu görülmektedir. Deneysel spektrumun g değeri  $g = 2.0032 \pm 0.0005$  olarak hesaplanmıştır. Deneysel spektrumun g değerinin literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir (Köseoğlu vd., 2003).

### Doz-Cevap Çalışması

EPR spektroskopisi, ışınlanmış numunenin absorbe ettiği doz miktarını belirlemede ve kalitatif tespit için kullanılabilir (Basly vd., 1998). Bu nedenle artan radyasyon dozunun AH numunesinden elde edilen spektrumların sinyal şiddetleri üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Artan radyasyon dozuna rağmen, spektrum formunda hiçbir değişiklik gözlenmemiş, ancak sinyal şiddetlerinde önemli ölçüde artış meydana gelmiştir. EPR spektrum sinyallerinin tepeden-tepeye sinyal şiddetlerinde gözlenen artışlar, ışınlama işleminden sonra numunede oluşan serbest radikal miktarında artış olduğunu göstermektedir. Farklı dozlarda ışınlanmış numunelerden elde edilen deneysel spektrumlar ayrı ayrı incelendiğinde, absorbe edilen radyasyon miktarı artmasına rağmen ölçülen g ve  $\Delta\text{H}$  değerlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. AH numunesinin doz-cevap eğrisini elde etmek için, 1, 4, 7, 10 ve 15 kGy doz değerlerinde gama ile ışınlanmış örnekler kullanılmıştır. Şekil 3'te gösterilen işaretler ( $\Delta$ ,  $\blacksquare$ ,  $\bullet$ ) deney sonuçlarını tanımlarken; eğriler ise deneysel sonuçlarına en yakın matematiksel denklemleri ifade etmektedir.



Şekil 3. Işınlanmış AH numunesinin sinyal şiddetinin ışınlama dozuna bağlı değişimi  
Sinyal  $I_1(\Delta)$ , Sinyal  $I_2(\blacksquare)$ , Sinyal  $I_3(\bullet)$

Doz-cevap eğrisini tanımlayan matematiksel denklemleri belirlemek oldukça önemlidir, ancak bu seçim için tek bir analitik yöntem bulunmamaktadır (Aydaş vd., 2008; Baasly vd., 1997). AH örneğinden elde edilen spektrumlar incelenerek yapılan hesaplamalarda,  $I_2$  sinyalinin doz-cevap eğrisinin polinom fonksiyonu ile en iyi uyumu ( $R^2 = 0.9511$ ) gösterdiği, ancak  $I_1$  ve  $I_3$  sinyallerinin en iyi uyumu ise logaritmik fonksiyonlarla ( $R^2 = 0.9747$ ,  $R^2 = 0.9754$ ) gösterdiği belirlenmiştir. AH örneğinin doz-cevap eğrilerinin en iyi uyumlu olduğu matematiksel fonksiyonlar tablo 2'de verilmiştir.

Burada I ve D sırasıyla, EPR spektrumlarından hesaplanan sinyallerin tepeden-tepeye sinyal şiddetlerini ve numuneye uygulanan ışınlama doz miktarını belirten sabitlerdir. Elde edilen matematiksel denklemlerin literatürle oldukça uyumlu olduğu belirlenmiştir (Polat ve Korkmaz 2008). AH örneğinde  $I_2$  sinyalinin değişimi göz önüne alındığında, ışınlama dozuna bağlı sinyal şiddetinin yaklaşık % 95'lik bir doğrulukla tahmin edilebilirken, bu oran  $I_1$  ve  $I_3$  sinyalleri için yaklaşık % 97 olarak hesaplanmıştır.

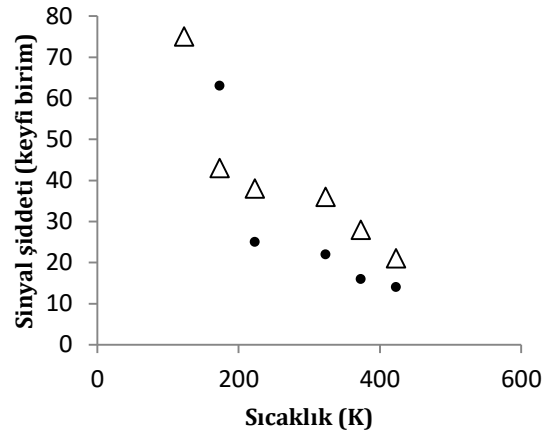
**Tablo 2.** Işınlanmış AH numunesinin doz-cevab eğrisi için hesaplanan matematiksel fonksiyonlar

Fonksiyonlar	Parametreler	Sinyal I <sub>1</sub>	Sinyal I <sub>2</sub>	Sinyal I <sub>3</sub>
I=ae <sup>bD</sup>	a	39.264	1925	39.658
	b	0.0663	0.0144	0.0596
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.8244</b>	<b>0.7959</b>	<b>0.8709</b>
I=aD+b	a	4.5606	32.068	3.9848
	b	33.205	1910.5	34.136
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9003</b>	<b>0.7872</b>	<b>0.9307</b>
I=aln(D)+b	a	39.697	-	34.127
	b	-	-	-
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9747</b>	-	<b>0.9754</b>
I=aD <sup>2</sup> +bD+c	a	-	3.3462	-0.226
	b	0.3754	-	8.3409
	c	4.6902	2048.1	16.969
<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9689</b>	<b>0.9511</b>	<b>0.9644</b>	
I=aD <sup>b</sup>	a	20.755	-	22.782
	b	0.5917	-	0.5229
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0.9385</b>	-	<b>0.9582</b>

### Sıcaklık Çalışması

15 kGy'de ışınlanmış AH numunesinin, EPR sinyal şiddetinin ve g değerinin sıcaklığa bağlı değişimlerini incelemek için 123-423 K sıcaklık aralığında incelenmiştir. Numune, oda sıcaklığından 123 K'e kadar soğutulmuş ve daha sonra 423 K'e kadar yükseltilmiştir. Bu süreçte kaydedilen spektrum şekillerinde önemli değişiklikler gözlenmemiştir. Ancak I<sub>1</sub> ve I<sub>3</sub> sinyal şiddetlerinde bazı değişiklikler gözlemlenmiştir. Çeşitli sıcaklıklarda soğutma ve ısıtma işlemlerinin, ışınlanmış numunede yeni radikaller oluşturmadığı, ancak numunenin yapısında oluşan serbest radikal konsantrasyonunu değiştirdiği şeklinde yorumlanmıştır (Çolak ve Korkmaz, 2004). Her ne kadar soğutma ve ısıtma işlemleri elde edilen spektrumlarda sinyal şiddetlerini değiştirmiş olsa da, deneysel spektrumun g-faktörü ve çizgi genişliği üzerinde anlamlı değişikliklere neden olmadığı tespit edilmiştir. 123-423 K sıcaklık aralığında elde edilen spektrumlarda I<sub>2</sub> sinyalinin şiddetinde kayda değer bir değişiklik

gözlenmemiştir. Bu nedenle, Şekil 4'teki grafiği çizerken I<sub>1</sub> ve I<sub>3</sub> sinyalleri dikkate alınmıştır.



**Şekil 4.** Işınlanmış AH numunesinin sinyal şiddetinin sıcaklığa bağlı değişimi Sinyal I<sub>1</sub>(Δ), Sinyal I<sub>3</sub>(•)

Şekil 4 incelendiğinde; AH numunesi 123 K'den 373 K'e ısıtıldığında, I<sub>1</sub> sinyalinin şiddetindeki azalma yaklaşık % 62.7 ve I<sub>3</sub> sinyalindeki azalma ise % 67.8 olarak hesaplanmıştır.

### Sönüm Çalışması

İlaçların ışınlanmasına bağlı olarak oluşan sinyallerin raf ömrü boyunca test edilebilir olması gerekmektedir. Bu amaçla gama ile 15 kGy ışınlanmış AH tozunda oluşan serbest radikallerin oda sıcaklığındaki kararlılıkları incelenmiştir. AH numunesinin EPR sinyal şiddetlerinin oda sıcaklığında zamana bağlı değişimi şekil 5'te verilmiştir.

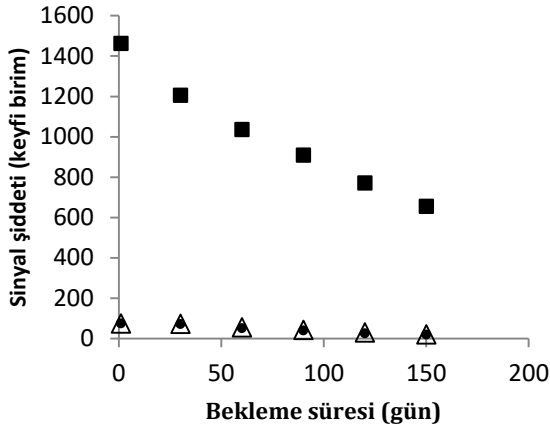
AH örneğinin I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> ve I<sub>3</sub> sinyallerinin bozunma eğrileri, sırasıyla aşağıda verilen polinom ve üstel regresyonlarla simüle edilmiştir.

$$\text{Serbest Radikal (\%)} I = -0.0002(t^2) - 0.3562(t) + 78,315 \text{ Sinyal } I_1 \text{ (R}^2 = 0.9799)$$

$$\text{Serbest Radikal (\%)} I = 1440.9e^{-0.005(t)}$$

$$\text{Sinyal } I_2 \text{ (R}^2 = 0.9972)$$

$$\text{Serbest Radikal (\%)} I = 0.0001(t^2) - 0.4299(t) + 77,994 \text{ Sinyal } I_3 \text{ (R}^2 = 0.9706),$$



Şekil 5. Işınlanmış AH numunesinin sinyal şiddetinin bekleme süresine bağlı değişimi  
Sinyal I<sub>1</sub>(Δ), Sinyal I<sub>2</sub>(■), Sinyal I<sub>3</sub>(●)

Verilen denklemlerde I değeri sinyal şiddetini, t ise depolanma süresini göstermektedir. I<sub>1</sub> ve I<sub>3</sub> sinyallerinin polinom fonksiyonuyla; I<sub>2</sub> sinyalinin ise üstel fonksiyonla olan uyumu, AH numunesinin ışınlanmasından sonra yapısında en az iki farklı radikal oluştuğunu bir kez daha ortaya koymuştur. Bu sonuç, mikrodalga doygunluk verisiyle ve simülasyon sonucu elde edilen verilerle uyum göstermiştir [19]. AH örneğinin ışınlama işleminin ardından 150. gün sonunda kaydedilen spektrumları incelendiğinde; I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> ve I<sub>3</sub> sinyallerinin tepeden tepeye sinyal şiddetlerinin sırasıyla % 72, % 55.2 ve % 74.3 oranında azaldığı hesaplanmıştır. Sönüm sonuçları EPR spektroskopisinin, ışınlanmış AH numunelerini, ışınlanmamış olan AH numunelerinden 150 gün sonra bile rahatlıkla ayırt edebileceğini göstermiştir.

## Sonuçlar

Gama ile ışınlanmış toz halindeki AH numunesinin radyasyon duyarlılığı EPR spektroskopisi ve simülasyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Gama ile ışınlanmış AH numunesinde simülasyon yardımıyla elde edilen EPR parametreleri sonucunda iki farklı radikal (- $\dot{C}HCH$ - ve - $\dot{C}H$ - radikalleri) oluştuğu kanaatine varılmıştır. Numunenin mikrodalga-

doyum, doz-cevap ve sönüm çalışmaları da ışınlama sonucunda yapıda iki radikal oluştuğu sonucunu desteklemiştir. Işınlama sonucu oluşan paramanyetik türlerin stabilitesi 150 gün boyunca kontrol edilmiştir ve yapılan analizlere göre, ışınlanmış ve ışınlanmamış AH numunelerini ayırt etmede EPR spektroskopisinin oldukça etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sebeple ilaç endüstrisinde; ilaçları sterilize etmede kullanılan radyasyonun yıkıcı etkisi sonucunda ilaçların kimyasal yapılarında oluşacak serbest radikalleri belirlemede EPR spektroskopisi ve simülasyon metodu oldukça verimli sonuçlar ortaya çıkaracaktır.

## Teşekkür

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi DÜBAP ZGEF15007 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Ambrož, H. B., Kornacka, E. M., Marciniak, B., Przybytniak, G., (2002). Radical decay in irradiated drugs: Flutamide, ifosfamide, *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 254, 293-298.
- Ambroz, H.B., Kornacka, E.M., Marciniak, B., Ogrodowczyk, M., Przybytniak, G.K., (2000). EPR study of free radicals in some drugs  $\gamma$ -irradiated in the solid state, *Radiation Physics and Chemistry*, 58, 357-366.
- Aydaş, C., Polat, M., Korkmaz, M., (2008). Identification and dosimetric features of  $\gamma$ -irradiated cefadroxil by electron spin resonance, *Radiation Physics and Chemistry*, 77, 79-86.
- Basly, J.P., Basly, I., Bernard, M., (1998). Electron spin resonance identification of irradiated ascorbic acid: dosimetry and influence of powder fineness, *Analytica chimica acta*, 372, 373-378.
- Basly, J.P., Duroux, J.L., Bernard, M., (1996). Radiosterilization dosimetry by ESR spectroscopy application to terbutaline, *International journal of pharmaceuticals*, 142, 247-249.
- Basly, J.P., Longy, I., Bernard, M., (1997). ESR identification of radiosterilized pharmaceuticals: latamoxef and ceftriaxone, *International journal of pharmaceuticals*, 158, 241-245.

- Basly, J.P., Longy, I., Bernard, M., (1998). Radiosterilization dosimetry by electron-spin resonance spectroscopy: Cefotetan, *Analytica chimica acta*, 359, 107-113.
- Çolak, Ş., Korkmaz, M., (2004). Spectroscopic features of radiolytic intermediates induced in gamma irradiated sulfatiazole: an ESR study, *International journal of pharmaceutics*, 285, 1-11.
- Diehl, J.F., (2002). Food irradiation—past, present and future. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 211-215.
- Gopal, N.G.S., (1977). Radiation sterilization of pharmaceuticals and polymers, *Radiation Physics and Chemistry*, 12, 35-50.
- Karakirova, Y., Yordanov, N., (2015). Mannitol as a radiation sensitive material for electron paramagnetic resonance dosimetry, *Bulgarian Chemical Communications*, 47, 144-148.
- Köksal, F., Osmanoğlu, Ş., Kartal, I., Uzun, F., (1997). EPR of gamma irradiated N $\alpha$ -acetyl L-glutamic acid and N $\alpha$ -acetyl L-glutamine, *Radiation Physics and Chemistry*, 49, 537-539.
- Köseoğlu, R., Köseoğlu, E., Köksal, F., (2003). Electron paramagnetic resonance of some  $\gamma$ -irradiated drugs, *Applied radiation and isotopes*, 58, 63-68.
- NIH. 2012. Public Electron Paramagnetic Resonance Software Tools, <https://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/tox-pharm/tools/index.cfm>
- Omara, H.A., Amin, A.S., (2011). Spectrophotometric microdetermination of anti-Parkinsonian and antiviral drug amantadine HCl in pure and in dosage forms, *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 287-292.
- Osmanoğlu, Y.E., Tokatlı, A., Sütçü, K., Osmanoğlu, Ş., Uzun, F., (2017). Conformational, IR, NMR, and EPR analysis of ifosfamide by density functional theory calculation, *Monatshefte für Chemie*, 148, 227-236.
- Polat, M., Korkmaz, M. (2008). Detection of irradiated black tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by ESR spectroscopy, *Food chemistry*, 107, 956-961.
- Polat, M., Korkmaz, M., (2006). Effect of gamma radiation on amlodis and its potential for radiosterilization, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 882-888.

## Investigation of free radicals formed in gamma-irradiated amantadine hydrochloride by simulation method

### Extended abstract

In this study, gamma rays were applied to the amantadine hydrochloride (AH) in the dose range of 1-15 kGy, in order to detect radiosensitivity of paramagnetic species, which are formed after irradiation by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. When the experimental spectra of the gamma-irradiated sample were examined, one strong signal ( $I_2$ ) and two weak signals at the left ( $I_1$ ) and right ( $I_3$ ) of the strong signal were clearly seen, while all signals were detectable for more than 150 days. The intensities of signals as a function of microwave power were investigated in the range of 0.01 to 100 mW at 295 K. Subsequently, dosimetric features of free radicals at low and high temperatures induced by gamma irradiation were determined. Furthermore, the g value and the hyperfine coupling constants of the radical were also calculated.

For the study purpose, AH sample was supplied from Sigma-Aldrich in powder form. Powder of AH, was irradiated at different doses of up to 15 kGy by a  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  ray source at room temperature (293K) at the Sarayköy Establishment of Turkish Atomic Energy Agency in Ankara. EPR measurements were carried out on samples at room temperature with a Jeol JES-FA300 X-band spectrometer operating at microwave power 1 mW, microwave frequency of 9.2 GHz.

Firstly the changes in signal intensities depending on microwave power of AH sample, which is irradiated by gamma rays within a dose of 15 kGy, were investigated. Considering Figure 1, the curve obtained from the signal labeled with  $I_2$  showed a logarithmic development, whereas curves labeled with  $I_1$  and  $I_3$  showed polynomial development. According to these datas, it is possible to think that at least two types of free radicals are formed in the AH sample after irradiation.

The EPR spectrum of gamma-irradiated AH exhibited three signals with a spacing of 14 mT at 295 K (Fig. 2a). The spectrum in AH sample indicated the presence of two different radical species (radical I and II). The spectrum in Fig. 2b may be attributed to a  $-\dot{\text{C}}\text{HCH}-$  radical (radical I) due to the hyperfine interaction of the unpaired electron with one  $\alpha$  proton and one  $\beta$  proton. The doublet of  $-\dot{\text{C}}\text{HCH}-$  was not resolved

and only a broad singlet was determined as shown in Fig. 2c. The contribution of the  $-\dot{\text{C}}\text{HCH}-$  radical is approximately 54.5 % and  $-\dot{\text{C}}\text{H}-$  radical is 45.5 % to the experimental spectrum.

The effect of increasing radiation dose on the spectra of AH sample was studied. Sample irradiated within certain intervals between 0-15 kGy are used in order to obtain dose-response curves. The signal intensities of the sample increased significantly depending on increase in irradiation doses. This proves that the increase in amount of radiation absorbed by sample also increases the number of free radicals formed in sample. In the calculations, although the dose of irradiation has reached up to 15 kGy, g spectroscopic splitting factor and linewidth were determined to remain approximately same.

The sample of AH irradiated at 15 kGy was studied in the temperature range of 123-423 K to see the variations of the EPR signal intensity and g factor. The sample was cooled from room temperature down to 123 K with 50 K steps and then the temperature was increased up to 423 K with the same increments. When the sample was heated to 373 K from 123 K, the decrease in the intensity of signal  $I_1$  is about 62.7% and, signal  $I_3$  is 67.8% for AH sample.

EPR spectra of AH sample was recorded at room temperature within regular intervals in the daily process of 150 days. In the spectra obtained, no significant changes in the shape of EPR signals and g values were observed, while significant decrease was identified in the signal intensities. According to spectra of AH sample recorded at the end of 150<sup>th</sup> day after irradiation, peak to peak signal intensity of  $I_2$  signal was reduced by 55.2%, whereas it was reduced by 72% for  $I_1$  and 74.3 for  $I_3$ .

It has been concluded that at least two types of free radicals are formed in AH sample since peak to peak signal intensity of  $I_2$  showed different development compared to  $I_1$  and  $I_3$  signals as microwave power and radiation dose were increased. Investigation of radical decay curves and simulation method also support this result. The high correlation between experimental results of the sample on the dose-response curves and mathematical equations allows us to calculate the signal intensity of the sample obtained in any dose value.

In the pharmaceutical industry; the EPR spectroscopy with simulation method can easily use for determining the structures of free radicals in drug compounds.

**Keywords:** EPR, gamma-irradiation, simulation