

# Određivanje antioksidativne aktivnosti beta-blokatora HPLC-DPPH metodom

---

Eterović, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:661311>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ivana Eterović**

**Određivanje antioksidativne aktivnosti beta-  
blokatora HPLC-DPPH metodom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom dr. sc. Daniele Amidžić Klarić, mag.pharm., spec. klin. farmacije.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Danieli Amidžić Klarić, na posvećenom vremenu, stručnom vodstvu i savjetima kojima mi je pomogla u uspješnoj izradi ovog diplomskog rada.*

*Također zahvaljujem Mariu-Liviu Jeličiću, mag. appl. chem. i Edvinu Brusaču, mag. pharm. na pomoći prilikom provođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Želim se zahvaliti i prof.dr.sc.Ani Mornar Turk što me svojim izvrsno strukturiranim i stručnim predavanjima na kolegiju Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda zainteresirala za područje rada Zavoda.*

*Veliko hvala mojoj obitelji, koja mi je bila bezuvjetna podrška kako tijekom studiranja, tako i uvijek u životu.*

# Sadržaj

<b>1.UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.Beta-blokatori</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.Antioksidansi</b> .....	<b>5</b>
1.2.1.Antioksidansi u kardiovaskularnim bolestima .....	4
1.2.2.Antioksidativna aktivnost beta-blokatora.....	6
<b>1.3.Metode određivanja antioksidativne aktivnosti</b> .....	<b>9</b>
1.3.1.Testovi oksidacije supstrata.....	9
1.3.2.Testovi oksidacije reagensa.....	10
1.3.3.Elektokemijski testovi .....	11
<b>1.4.DPPH</b> .....	<b>11</b>
<b>2.OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>13</b>
<b>3.MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1.Materijali</b> .....	<b>16</b>
3.1.1.Kemikalije .....	16
3.1.2.Uzorci .....	16
3.1.3.Radni instrumenti .....	16
3.1.4.Pribor i posude.....	16
3.1.5.Računalni programi .....	17
<b>3.2.Metode</b> .....	<b>17</b>
3.2.1.Priprema mobilne faze .....	19
3.2.2.Priprema standardnih otopina.....	19
3.2.3.HPLC-DPPH metoda .....	19
3.2.4.Statistička obrada podataka .....	19
<b>4.REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>20</b>
4.1.Validacija analitičke metode .....	21

4.2.Određivanje antioksidativne aktivnosti beta-blokatora .....	23
<b>5.ZAKLJUČAK.....</b>	<b>26</b>
<b>6.LITERATURA .....</b>	<b>28</b>
<b>7.SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>32</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

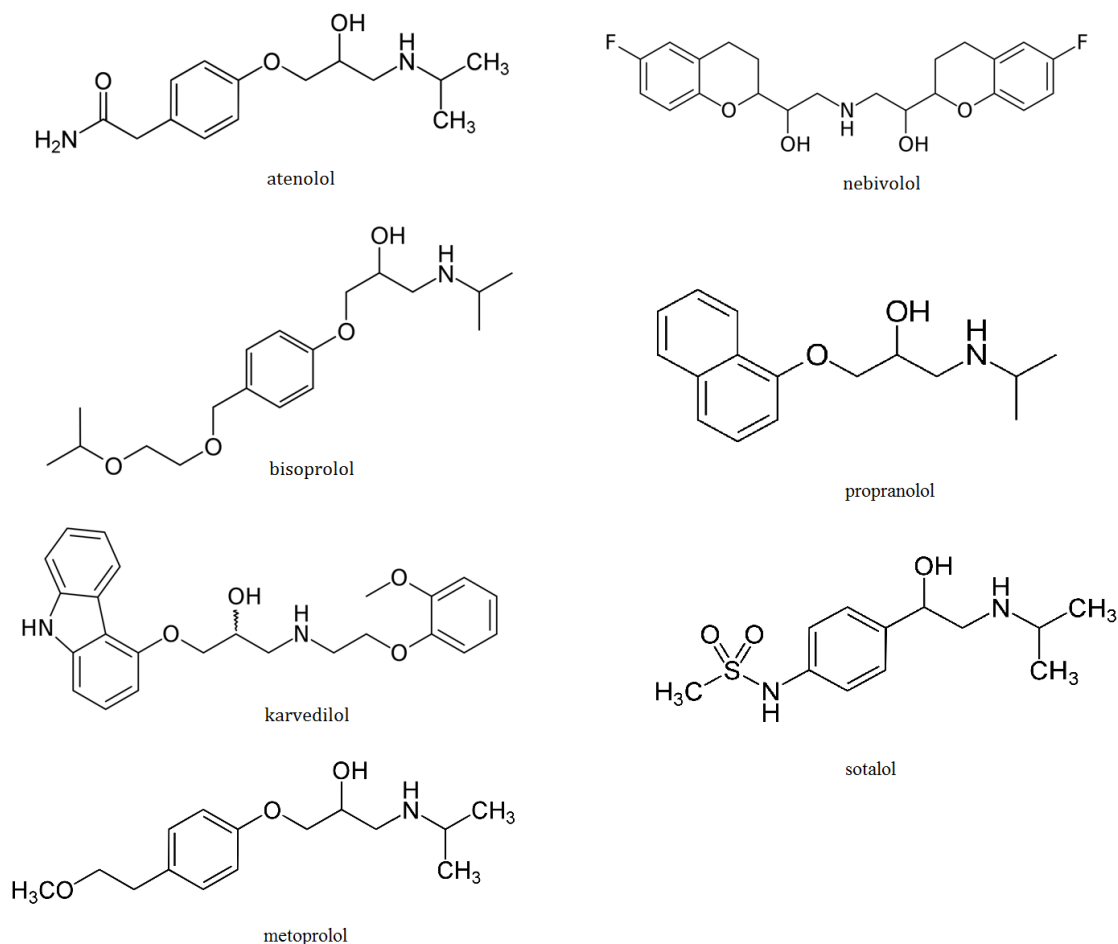
## 1.1.BETA BLOKATORI

Dobro poznavanje patofizioloških mehanizama nastanka kardiovaskularnih bolesti, koje imaju najveću prevalenciju, najveće komorbiditete i najveći mortalitet u općoj populaciji, u kombinaciji s razumijevanjem farmakoloških učinaka dostupnih lijekova temelj je uspješnog liječenja. Beta blokatori su u upotrebi više od pola stoljeća i nezamjenjivi su lijekovi u nizu indikacija poput hipertenzije, angine pektors, akutnog infarkta miokarda, sekundarne prevencije infarkta miokarda, srčane aritmije i zatajivanja srca. Na Slici 1. prikazane su kemijske strukture beta-blokatora.

Iz kemijskih struktura uočljivo je da su svi beta blokatori derivati etanolamina, pri čemu je etanolaminski dio molekule metilenoksi skupinom ( $O-CH_2$ , eterska veza) povezan s aromatskim prstenom, a jedina iznimka od odabranih lijekova je sotalol koji nema metilenoksi skupinu u strukturi već im je etanolaminski dio direktno povezan s aromatskim prstenom. Baš u tom dijelu molekule svi beta blokatori imaju asimetrični ugljikov atom, kiralni ili stereocentar, koji prema CIP (Cahn-Ingold-Prelog) pravilu može biti u R ili S apsolutnoj konfiguraciji. Ta razlika u konfiguraciji kod određenih predstavnika ove skupine uzrokuje kvantitativne i/ili kvalitativne razlike u djelovanjima na receptore u organizmu. Nadalje, svi beta blokatori su sekundarni amini čija je amino skupina supstituirana lipofilnijim supstituentima od metilne skupine prisutne u adrenalinu, što im omogućava čvršće vezanje za vezno mjesto na receptoru i lakši prolazak lipidnih barijera. S obzirom da se radi o aminima, imaju slaba bazična svojstva što znači da će se u plazmi lakše vezati za  $\alpha 1$  kiseli glikoprotein i natjecati se s drugim bazičnijim lijekovima za vezna mjesta na tom proteinu. Na temelju strukture mogu se pretpostaviti i najčešće metaboličke reakcije. Jedna od najčešćih reakcija u metabolizmu lijekova je N-dealkilacija uz oslobađanje odgovarajućeg aldehida i amina. Ta reakcija pripada u reakcije prve faze i katalizirana je porodicom CYP enzima te joj podliježu svi beta blokatori. Druga važna metabolička reakcija ove skupine lijekova je glukuronidacija ili sulfatacija hidroksilne skupine etanolaminskog lanca, a spada u reakciju druge faze i kataliziraju je enzimi iz UGT porodice (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

U pogledu farmakokinetičkih svojstava većina beta-blokatora, poglavito propranolol i metoprolol, lipofilne su tvari koje se apsorbiraju u tankom crijevu, a putem prolaze intezivan metabolizam u jetri prije ulaska u sistemsku cirkulaciju. Zbog intezivnog metabolizma prvog prolaska, čak i male varijacije u jetrenom metabolizmu mogu dovesti do velikih promijena u plazmatskoj koncentraciji, poglavito pri nižim dozama lijekova, što može imati za posljedicu

nepredvidive kliničke učinke. Hidrofilni beta-blokatori poput atenolola ili sotalola imaju zanemariv ili malen metabolizam prvog prolaska u jetri i pretežno se izlučuju renalnim putem, stoga se duže zadržavaju u cirkulaciji pa se uglavnom mogu jednokratno dozirati.



Slika 1. Kemijske strukture beta-blokatora

Beta-blokatori, odnosno blokatori beta adrenergičnih receptora čine skupinu lijekova široko korištenih u liječenju kardiovaskularnih bolesti. Blokadom beta-1-receptora te djelovanjem na sinusni i AV čvor dolazi do usporavanja frekvencije srca i slabljenja kontrakcije srčanog mišića, što u konačnici dovodi do smanjenja zahtjeva srca za kisikom te prevencije angioznih bolesti, što je bila prvotna ideja pri pronalaženju ove grupe lijekova.

Osim beta-1-receptora koji su smješteni u srčanom mišiću, postoje i beta 2 koji se nalaze u glatkim mišićima bronha. Djelovanje katekolamina na beta-1-receptore dovodi do povećanja



frekvencije srca, jače kontraktilnosti te koronarne vazodilatacije, dok aktivacija beta-2-receptora dovodi do vazodilatacije i bronhodilatacije (Knežević, 2010). S obzirom na njihovu selektivnost prema određenim receptorima, beta-blokatore možemo podijeliti u nekoliko skupina kao što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Podjela beta-blokatora prema selektivnosti (prilagođeno Knežević, 2010)

Djelovanje	Selektivnost	Lijek	Farmaceutski oblik	Doze
neselektivno	beta1 i beta 2	propranolol	tablete oralna otopina	40 mg 3,75 mg/mL
		sotalol	tablete	80 mg
selektivno	beta1 > beta2	atenolol	Tablete filmom obložene tablete	25 mg 50 mg 100 mg
		bisoprolol	Tablete filmom obložene tablete	1,25 mg 2,5 mg 3,75 mg 5 mg 10 mg
			kapsule	
metoprolol	tablete	25 mg 50 mg 100 mg 200 m		
neselektivno i vazodilatatorno	beta1, beta2, alfa1	karvedilol	Tablete	3,125 mg 6,25 mg 12,5 mg 25 mg
selektivno i vazodilatatorno (preko NO)	beta1	nebivolol	Tablete	5 mg

\* Farmaceutski oblici i doze gotovih lijekova registriranih u Republici Hrvatskoj

Prihvaćene indikacije za liječenje beta-blokatorima su: hipertenzija, angina pektors, akutni infarkt miokarda, sekundarna prevencija infarkta miokarda, srčane aritmije i zatajivanje srca. U metaanalizi koja je uključivala 147 randomiziranih ispitivanja pokazano je da beta-blokatori postižu bolji učinak u liječenju hipertenzije u postinfarktne bolesnika od ostalih skupina antihipertenzivnih lijekova (Law i sur., 2009).

Najbolje je dokumentiran njihov učinak u sekundarnoj prevenciji infarkta miokarda i liječenju zatajivanja srca. U liječenju aritmija srca, posebno ventrikularnih, beta-blokatori su među najučinkovitijim lijekovima, a također imaju veliku ulogu u liječenju angine pektoris gdje po smjernicama predstavljaju prvu liniju liječenja (Knežević, 2010).

Iako svi beta blokatori dijele zajednički osnovni mehanizam djelovanja, među njima postoje određene razlike kako u farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima tako i u dodatnim mehanizmima djelovanja. Upravo te razlike mogu izdvojiti jedan ili više lijekova kao lijekove izbora u odnosu na ostale pripadnike skupine, pogotovo u osoba s komorbiditetima. Jedan od dodatnih mehanizama djelovanja koji pojedini predstavnici ove skupine lijekova pokazuju je antioksidativni učinak.

## 1.2. ANTIOKSIDANSI

Reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) su kemijski reaktivne molekule nastale redukcijom molekulskog kisika (Beckhauser i sur., 2016). Ovi spojevi u organizmu mogu biti generirani kao stanični odgovor na različite ksenobiotike, citokine ili bakterijske invazije (Ray i sur., 2012). Čak i pod normalnim okolnostima, tijekom oksidativnog metabolizma mitohondrija, dio elektrona se može odvojiti od lanca za prijenos elektrona i reagirati s molekulskim kisikom stvarajući reaktivne kisikove spojeve. Biološki važni ROS uključuju superoksidni anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), singlet-kisik ( $O_2^1\Delta_g$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritnu kiselinu (HOCl), hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) te peroksi i alkoksi radikale. Uz ROS, veliku važnost imaju i reaktivni dušikovi spojevi (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) od kojih su najvažniji radikali dušikovog monoksida ( $NO\bullet$ ) i dušikovog dioksida ( $NO_2\bullet$ ). Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi mogu na različite načine izazvati štetu u stanicama tako da dovode do oštećenja DNA, lipidne peroksidacije, oksidacije aminokiselina u proteinima ili deaktivacije enzima oksidirajući različite kofaktore. Stanice sadrže različite enzime i antioksidanse da bi spriječili štetne učinke koje ROS mogu izazvati u pojedinim staničnim odjeljcima, međutim brojni faktori (bolesti, lijekovi, zagađenje, malnutricija) mogu negativno utjecati na učinkovitost zaštitnih mehanizama što dovodi do pojave oksidativnog stresa (Niederländer i sur., 2008).

Pod pojmom antioksidans podrazumijeva se spoj, koji prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na spoj koji se oksidira, znatno odgađa ili sprječava oksidaciju te tvari. Ovi zaštitni mehanizmi djeluju zajednički, u međusobnoj suradnji, u obliku kaskade. Mnogobrojne su

podjele spojeva s antioksidacijskom aktivnošću, a klasificiraju se prema podrijetlu (endogeni, egzogeni) i mjestu djelovanja (stanični, izvanstanični, membranski), prema topljivosti (u vodi ili lipidima), na enzime i male molekule (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Prema načinu djelovanja antioksidanse možemo podijeliti na primarne, sekundarne i tercijarne. Primarni (preventivni) antioksidansi sprječavaju nastanak slobodnih radikala poput albumina, transferina i drugih. Sekundarni (čistači) uklanjaju nastale slobodne radikale (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation, vitamin C, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi). Tercijarni (enzimi popravka) popravljaju nastala oštećenja ili uklanjaju biomolekule oštećene radikalima prije nego njihovo nakupljanje uzrokuje nova oštećenja (fosfolipaze, proteaze, peptidaze, DNA polimeraza I i drugi) (Huang i sur., 2005).

Antioksidansi djeluju na različitim razinama u oksidacijskom putu koji uključuje molekule lipida. Mehanizam njihovog djelovanja uključuje mogućnost smanjivanja koncentracije kisika, uklanjanje singletnog kisika, uklanjanje metalnih iona, sprječavanje inicijacijske reakcije uklanjanjem inicijalnih radikala kao što je hidroksilni radikal, ali i poticanje raspadanja primarnih produkata oksidacije na ne-radikalne spojeve i prekid lančane reakcije (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Oksidativni stres može se definirati kao neravnoteža između stvaranja reaktivnih kisikovih radikala i antioksidativnog kapaciteta stanice. Dokazano je da je oksidativni stres podloga brojnim patološkim stanjima kao što su karcinom, ateroskleroza, Alzheimerova bolest, reumatoidni artritis i kardiovaskularne bolesti (Niederländer i sur., 2008).

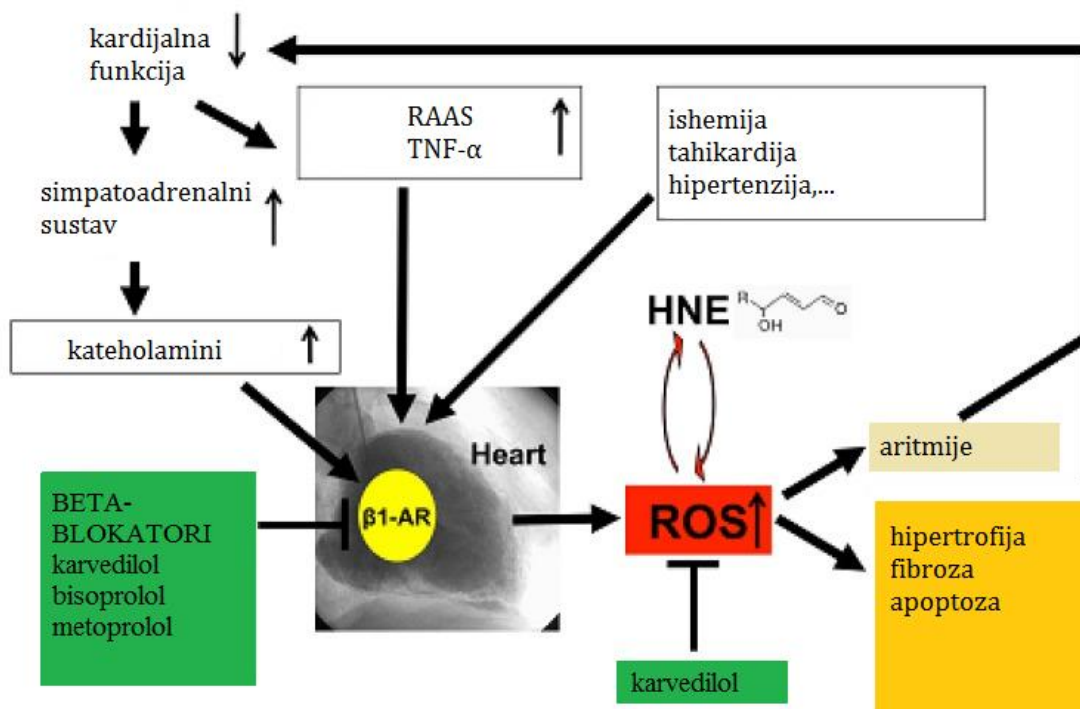
### **1.2.1. Oksidativni stres u kardiovaskularnim bolestima**

U ispitivanjima učinka oksidativnog stresa na srčano zatajenje korišten je 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG) kao marker oksidativnog oštećenja DNA. Serumske razine 8-OHdG mjerene su enzimskim imunotestom u 56 pacijenata sa kardiomiopatijom i u 20 kontrolnih sudionika ispitivanja (Kono i sur., 2006).

Razina 8-OHdG mjerena je i u urinu 194 pacijenata sa kroničnim srčanim zatajenjem i uspoređena sa rezultatima 31 zdravog ispitanika (Kobayashi i sur., 2011).

Dobiveni rezultati pokazali su da je razina oštećenja DNA iskazana koncentracijom 8-OHdG znatno veća u ispitanika sa srčanim zatajenjem što upućuje ne to da je oksidativni stres

uključen u patogenezu srčanih oboljenja. Razina oksidativnog oštećenja određena je i u miokardu bolesnika sa srčanim zatajenjem. ROS mogu izazvati oštećenje lipidnih membrana u procesu lipidne peroksidacije koji dovodi do generiranja nekoliko štetnih aldehida, uključujući 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) čija je razina mjerena imunohistokemijski u bolesnom miokardu 23 pacijenata sa kardiomiopatijom i 13 kontrolnih ispitanika. Rezultati su pokazali je da je razina HNE znatno veća u oboljelom miokardu nego u kontrolnoj grupi (Nakamura i sur., 2002). Izmjerene razine markera oksidativnog stresa u serumu, urinu i miokardu bolesnika sa srčanim zatajenjem, dovele su u vezu oksidativni stres sa kardiovaskularnim oboljenjima. Osim što služi kao marker oksidativnog stresa, HNE potiče stvaranje ROS-a, posebno  $H_2O_2$  i  $\bullet OH$  u kardiomiocitima i dovodi do nakupljanja intracelularnog kalcija. S druge strane angiotenzin II, katekolamini,  $TNF\alpha$  i ishemija induciraju stvaranje ROS-a u miokardu koji u procesu lipidne peroksidacije dovode do nakupljanje HNE. Zaustavljanje ovog štetnog kruga shematski prikazanog na Slici 2. koji vodi stvaranju slobodnih radikala je bitno u sprječavanju oksidativnog stresa u miokardu (Nakamura i sur., 2011).



Slika 2. Zaustavljanje štetnog kruga oksidativnog stresa i oslabljene srčane funkcije primjenom beta-blokatora (preuzeto i prilagođeno Nakamura i sur., 2011)

### 1.2.2. Antioksidativna aktivnost beta-blokatora

Terapeutski učinak beta-blokatora se obično opisuje blokadom beta-adenoreceptora, ometajući time vezanje prirodnih agonista adrenalina i noradrenalina. Ipak, dio njihovog pozitivnog djelovanja na kardiovaskularne događaje može se povezati sa antioksidativnim učinkom koji neki od njih posjeduju, a uzrokuju smanjenje oksidativnog stresa (Gomes i sur., 2006).

Smanjenje oksidativnog stresa beta-blokatorima ima nekoliko predloženih mehanizama:

(i) blokada beta-1 receptora

(ii) antiishemijska svojstva beta-blokatora. Ishemija može povećati razinu HNE u srcu pa su njihova antiishemijska svojstva bitna u regulaciji oksidativnog stresa

(iii) negativni kronotropni učinak. Tahikardija može inducirati stvaranje ROS-a u mitohondriju miokarda, pa se smanjenjem otkucaja srca tj. kronotropnim učinkom može smanjiti njihova razina, a time i oksidativni stres

(iv) antihipertenzivni učinak. Smanjenje krvnog tlaka beta-blokatorima smanjuje opterećenje srca i produkciju ROS-a.

Karvedilol je neselektivni beta-blokator koji uzrokuje blokadu beta-1, beta-2 i alfa-1 receptora. Budući da su svojoj strukturi sadrži karbazolnu skupinu, ovaj lijek pokazuje dodatne načine redukcije oksidativnog stresa u odnosu na druge beta-blokatore:

(i) direktni antioksidativni učinak: karvedilol inhibira  $Fe^{2+}$ -induciranu lipidnu peroksidaciju *in vitro* hvatajući slobodne radikale

(ii) inhibira prizvodnju ROS-a uzrokovanu leukocitima

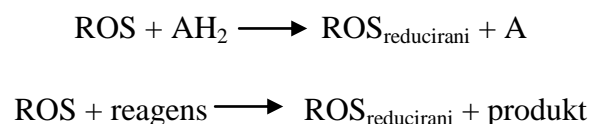
(iii) alfa-1 blokadom: Xiao i suradnici (2002) su dokazali da ventrikularni miociti uzrokuju ekspresiju komponenti NAD(P)H oksidaze koja je uključena u alfa-1-adenoreceptorom stimulirano hiopertrofično signliziranje putem ROS-posredovane aktivacije Ras-MEK1/2-ERK1/2, stoga blokada alfa-receptora može dovesti do smanjenja oksidativnog stresa (Nakamura i sur., 2011).

### 1.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Postoje brojni načini na koje možemo odrediti antioksidativnu aktivnost nekog spoja, a općenito ih možemo podijeliti u tri skupine: (i) testovi oksidacije supstrata, (ii) testovi oksidacije reagensa i (iii) elektrokemijski testovi.

#### 1.3.1. Testovi oksidacije supstrata

Prva skupina testova koristi se za oksidaciju supstrata čiju koncentraciju možemo lako mjeriti. Aktivnosti antioksidansa povezana je sa smanjenjem stvaranja oksidiranog produkta s obzirom da dolazi do kompeticije između supstrata i antioksidansa za ROS:



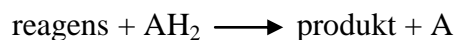
U ovoj skupini testova kao reaktivni kisikovi spojevi korišteni su singlet kisik, vodikov peroksid i superoksidni anion.

Singlet kisik reagira sa supstratom 1,2-dietoksietenom stvarajući prstenasti heterociklički peroksid 3,4-dietoksi-1,2-dioksetan. Koncentracija peroksidnog produkta može se mjeriti kemiluminiscencijom u prisutnosti fluorofora. Antioksidans, koji djeluje kao hvatač reaktivnih kisikovih spojeva, u ovom slučaju kompetira sa supstratom za singlet kisik što rezultira promjenom u piku kemiluminiscentnog signala. Ova metoda pokazala se vrijednim alatom za određivanje antioksidativne aktivnosti, ali nije široko primjenjiva s obzirom da zahtjeva posebnu opremu i kemikalije.

Određivanje aktivnosti antioksidansa koja se temelji na sposobnosti hvatanja vodikovog peroksida, odnosno superoksidnog aniona kao ROS temelje se na sličnom mehanizmu, a to je kemiluminiscencija luminola inducirana navedenim ROS, samo se koriste različite metode inicijacije. Zbog čestih interferencija, ovaj se test koristi samo kao indikativna metoda ispitivanja antioksidativne aktivnosti. Zbog slabe osjetljivosti i skupih reagensa, prednost se daje testovima oksidacije reagensa (Niederländer i sur., 2008).

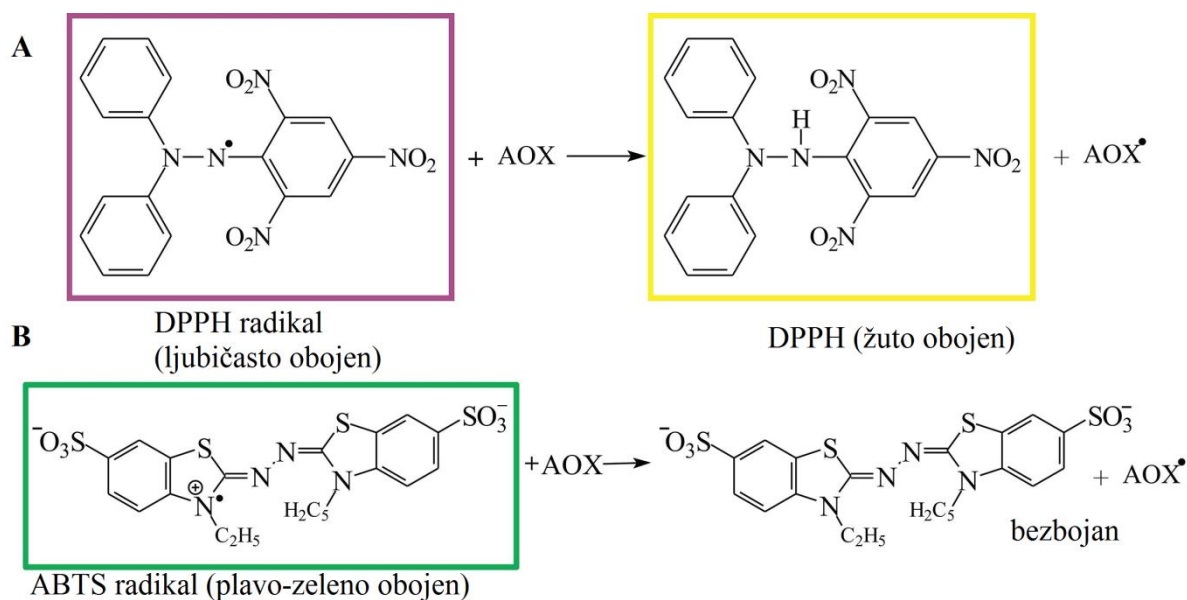
### 1.3.2. Testovi oksidacije reagensa

U drugoj skupini testova koriste se relativno stabilni spojevi koji reagiraju s antioksidansom na specifičan način pri čemu dolazi do promjena koje možemo mjeriti, npr. promjene u UV-Vis apsorpcijskom spektru:



Najčešće korištena metoda ispitivanja aktivnosti antioksidansa je obezbojenje stabilnih slobodnih radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH<sup>•</sup>) i 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS<sup>•+</sup>). U ovu skupinu testova ubraja se i ispitivanje promjene apsorbanције fosfomolibdenskog kompleksa iako nije radikal kao prethodna dva spoja.

Nakon redukcije sa antioksidansom čija se aktivnost ispituje, navedenim reagensima dolazi do pomaka u Uv-Vis apsorpcijskom spektru. DPPH<sup>•</sup> apsorbira u vidljivom spektru s  $\lambda_{\text{max}}$  na 517 nm, dok ABTS<sup>•+</sup> pokazuje maksimum apsorbancije na 414, 600 i 734 nm (Slika 3). Njihovi reducirani, ne-radikalni oblici (DPPH-H i ABTS) ne pokazuju apsorbanciju iznad 400 nm. ABTS<sup>•+</sup> radikal je bolje topljiv u vodi od DPPH<sup>•</sup> radikala pa se ABTS testovi češće koriste u analizi hidrofilnih antioksidansa (Niederländer i sur., 2008).



Slika 3. Promjena boje A) DPPH i B) ABTS radikala nakon reakcije s antioksidansom (prilagođeno <http://www.scielo.br>)

### 1.3.3. Elektrokemijski testovi

Elektrokemijski testovi direktno povezuju antioksidativnu aktivnost s oksidacijskim potencijalom koji se određuje amperometrijski ili voltometrijski.

Najčešće korišten elektrokemijski test u ispitivanju antioksidativne aktivnosti je ciklička voltometrija koja mjeri napon radne elektrode dok snima struju uzrokovanu antioksidansima u otopini koji se oksidiraju na površini radne elektrode. Proizvedena struja proporcionalna je koncentraciji antioksidansa. Ciklička voltometrija na ugljikovoj elektrodi je prikladna metoda određivanja antioksidativne aktivnosti zbog jednostavnosti, brzine i mogućnosti da direktno ispituje biološke i neobrađene uzorke.

Amperometrijska metoda se temelji na mjerenju intenziteta struje koja putuje između radne i referentne elektrode pri konstantnom potencijalu. Struja nastaje zbog oksidacije ili redukcije elektroaktivnog analita, a mjeri se kao funkcija koncentracije elektroaktivne vrste. Priroda radne elektrode i primijenjeni napon određuju osjetljivost ove metode (Sochor i sur., 2013).

### 1.4. DPPH

DPPH metoda temelji se na sposobnosti uklanjanja slobodnog radikala antioksidansom, a razvijena je 1958. godine kada je Blois (1958) pokušao odrediti antioksidativnu aktivnost korištenjem DPPH radikala. Osnovni princip metode je da antioksidans donira vodik dušiku koji sadrži jedan nesparesni elektron odgovarajućeg hidrazina molekule radikala DPPH<sup>•</sup> pri čemu on prelazi u svoju neradikalni oblik DPP(H). DPPH radikal je stabilni radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule pa on ne dimerizira kao ostali slobodni radikali. Delokalizacija uzrokuje ljubičastu boju apsorbancijom na valnoj duljini od 520 nm u otopini etanola. Tijekom reakcije DPPH radikala sa spojem koji može donirati vodikov atom, nastaje njegova stabilna forma pri čemu dolazi do gubitka ljubičaste, odnosno promjene boje. Primarna reakcija DPPH radikala i antioksidansa (AH) prikazana je na Slici 3.

Zbog svog nesparesnog elektrona DPPH radikal pokazuje jaku apsorbanciju na valnoj duljini od 517 nm, koja nakon reakcije s antioksidansom znatno opada. DPPH metoda je jednostavna, brza i široko primjenjivana metoda za mjerenje antioksidativne sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala i doniranja vodikovih atoma, te antioksidativne aktivnosti hrane. Metoda je prikladna i za određivanje antioksidativne sposobnosti cisteina, glutationa, askorbinske



kiseline, tokoferola i polihidroksi aromatskih spojeva. Metoda se izvodi u otopini metanola/voda što olakšava ekstrakciju antioksidansa iz uzorka. Prednost metode je da DPPH reagira čak i sa slabim antioksidansima i može se koristiti za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa s obzirom da uključuje korištenje polarnih i nepolarnih otapala. Učinkovitost antioksidansa mjeri se na sobnoj temperaturi da se izbjegne njegova razgradnja. Ograničenja metode su ta da DPPH ulazi u interakciju s drugim radikalima, a krivulja odziva vremena do stacionarnog stanja nije linearna s različitim omjerima antioksidansa (Kedare i Singh, 2011).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Dobro poznavanje patofizioloških mehanizama nastanka kardiovaskularnih bolesti, koje nedvojbeno imaju najveću prevalenciju, najveće komorbiditete i najveći mortalitet u općoj populaciji, u kombinaciji s razumijevanjem farmakoloških učinaka dostupnih lijekova temelj je uspješnog liječenja. Beta blokatori su u upotrebi više od pola stoljeća i nezamjenjivi su lijekovi u indikacijama kao što su hipertenzija, angina pektoris, akutni infarkt miokarda, sekundarna prevencija infarkta miokarda, srčane aritmije i zatajivanje srca. Iako svi beta blokatori dijele zajednički osnovni mehanizam djelovanja, među njima postoje određene razlike kako u farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima tako i u dodatnim mehanizmima djelovanja. Upravo te razlike mogu izdvojiti jedan ili više lijekova kao lijekove izbora u odnosu na ostale pripadnike skupine, pogotovo u osoba s komorbiditetima. Jedan od dodatnih mehanizama djelovanja koji pojedini predstavnici ove skupine lijekova pokazuju je antioksidativni učinak.

Cilj ovog diplomskog rada bio je

- (i) ispitati odabrane validacijske parametre DPPH-HPLC metode prema ICH smjernicama (smjernice Međunarodne konferencije o harmonizaciji, prema engl. *International Conference of Harmonization*) prethodno razvijene na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova te
- (ii) odrediti antioksidativnu aktivnost beta-blokatora (atenolola, bisoprolola, karvedilola, nebivolola i propranolola) u *in vitro* uvjetima mjereći njihovu sposobnost hvatanja slobodnog radikala 1,1,-difetil-2-pikrilhidrazil radikala koristeći navedenu metodu.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1.MATERIJALI**

#### **3.1.1. Kemikalije**

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH, slobodni radikal, 95 % (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina, TROLOX (Sigma-Aldrich, Švicarska)
- Metanol, čistoće za tekućinsku kromatografiju (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Pročišćena voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (WaterPro, Bedford, MA, SAD)

#### **3.1.2. Uzorci**

- atenolol, bisoprolol, karvedilol, nebivolol hidroklorid i propranolol hidroklorid (Sigma-Aldrich, Njemačka)

#### **3.1.3. Radni instrumenti**

- Sustav za pročišćavanje vode (Milipore, Bedford, MA, SAD)
- Tekućinski kromatograf (Agilent 1100 Chromatograph, Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) (Slika 4)

#### **3.1.4. Pribor i posuđe**

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Boce za mobilnu fazu sustava za tekućinsku kromatografiju
- Tresilica Lab Dencer- vortex (Ika- Werke GMBH&CO.KG, Njemačka)
- Filter za špricu (Chromafil Xtra 0,2  $\mu\text{m}$ , 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka)
- Automatske jednokanalne pipete podesivog volumena za pipetiranje uzoraka (Rainin, Švicarska)
- Kolona za tekućinsku kromatografiju XBridge C18, dimenzija 150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford, SAD)
- Tamne odmjerne tikvice klase A (ISOLAB, Wertheim Njemačka)
- Eppendorf epruvete 2,0 mL (Eppendorf Corporate, Hamburg, Njemačka)

### 3.1.5. Računalni programi

- ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- Microsoft Office Excel (Microsoft, Seattle, WA, SAD)
- Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD)



Slika 4. Tekućinski kromatograf Agilent 1100

## 3.2.METODE

Određivanje antioksidativne aktivnosti beta blokatora provedeno je primjenom HPLC-DPPH metode.

### 3.2.1. Priprema mobilne faze

Mobilna faza pripremljena je miješanjem 80 : 20 volumnih dijelova *metanola* čija čistoća odgovara kromatografskim zahtjevima i *ultra-čiste vode* dobivene pročišćavanjem WaterPro sustavom.

### 3.2.2. Priprema standardnih otopina

Standardna otopine TROLOX-a pripremljena je otapanjem prikladne mase ovog sintetskog antioksidansa u metanolu (1 mM).

Otopine TROLOX-a korištene kao radne standardne otopine za izradu baždarnog pravca pripravljene su iz navedene standardne otopina antioksidansa pipetiranjem odgovarajućih volumena i otapanjem do željene radne koncentracije u mobilnoj fazi. Koncentracije radnih otopina TROLOX-a iznosile su 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 i 0,30 mM.

DPPH otopina pripremljena je otapanjem 25 mg DPPH u metanolu korištenjem tamne odmjerne tikvice klase A (25 mL) neposredno prije pripreme.

Za pripremu 1mM otopine lijeka odvagana je prikladna masa lijeka te otopljena prethodno pripremljenom mobilnom fazom u odmjernoj tikvici klase A od 10 mL.

### 3.2.3. HPLC-DPPH metoda

Spodobnost hvatanja DPPH radikala određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) pod uvjetima navedenim u Tablici 2.

Tablica 2. Kromatografski uvjeti primijenjene HPLC-DPPH metode.

Instrument	Agilent 1100
Detektor	detektor s nizom dioda (engl. <i>Diode Array Detector</i> , DAD)
Kolona	XBridge C18 (150 mm x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 µm)
Temperatura kolone	25 °C
Mobilna faza	metanol:ultra čista voda 80:20 (V/V)
Protok	1 mL/min
Volumen injektiranja	20 µL
Valna duljina detekcije DPPH	517 nm
Vrijeme zadržavanja DPPH	3,83 min
Ukupno vrijeme analize	4,5 min
Otapalo za DPPH	Metanol
Otapalo za uzorke lijekova	metanol:ultra čista voda 80:20 (V/V)

U Eppendorf epruvetu otpipetira se 250  $\mu$ L DPPH otopine i 1 mL otopine lijeka, dobro promućka na Vortex mješalici te ostavi 30 minuta na tamnom mjestu. Nakon toga, otopina se filtrira kroz 0,20  $\mu$ m filter te provede injektiranje i izokatna elacija prema navedenim kromatografskim uvjetima. Određivanje antioksidativne aktivnosti lijeka provedeno je u triplikatu.

Sposobnost hvatanja DPPH radikala određena je iz razlike površine pika (AUC, engl. *Area Under the Curve*) početne otopine samog radikala (AUC<sub>0</sub>) i otopine radikala nakon reakcije s uzorkom (AUC<sub>UZORAK</sub>) te izraženo na TEAC.

#### **3.2.4. Statistička obrada podataka**

Dobiveni eksperimentalni podaci analizirani su primjenom deskriptivne statistike. Pomoću regresijske analize dobivena je jednadžbe pravca i pripadajući koeficijenti determinacije  $r^2$ .

Za obradu svih eksperimentalnih podataka korišteni su računalni programi Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, SAD) i Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD).



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1.VALIDACIJA ANALITIČKE METODE

Prije provođenja samog analitičkog postupka određivanja antioksidativne aktivnosti beta-blokatora, predložena HPLC-DPPH metodom validirana je prema ICH smjernicama u cilju prikladnosti odabrane analitičke metode za navedenu primjenu. Prilikom provođenja postupka validacije nije nužno uvijek ispitati sve parametre. Ovisno o namjeni metode, dovoljno je ispitati samo neke od navedenih parametara. Tako je primjerice kod analitičke metode za identifikaciju željene tvari dovoljno ispitati samo specifičnost te metode. No, ako je metoda namijenjena za određivanje sadržaja određene tvari, potrebno je ispitati, pored specifičnosti, i još neke parametre poput linearnosti, radnog područja, točnosti i preciznosti (ponovljivost, srednju preciznost).

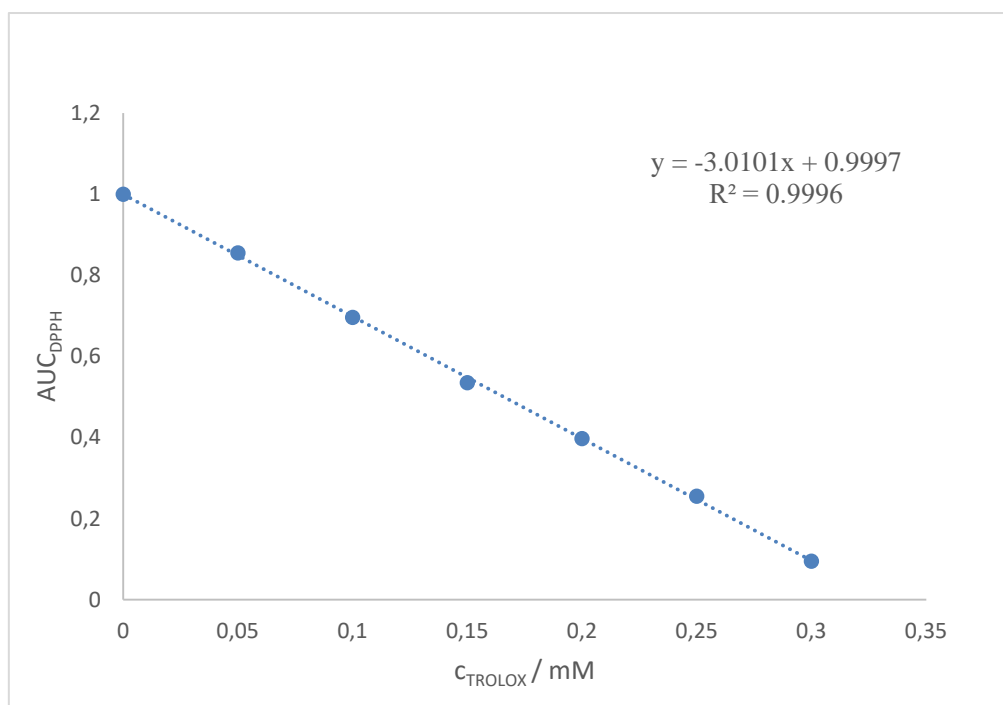
U ovom radu ispitani su sljedeći validacijski parametri: linearnost, radno područje, točnost, i preciznost.

Linearnost analitičke metode predstavlja njezinu mogućnost da unutar određenog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Linearnost metode određena je grafički mjerenjem jakosti analitičkog signala (AUC) u ovisnosti o različitim koncentracijama TROLOX-a na osnovu čega je konstruirana kalibracijska krivulja. Linearnost metode ispitana je na šest različitih koncentracijskih razina standarda u rasponu od 0,05 do 0,30 mM TROLOX-a. Sva mjerenja provedena su u triplikatu, a dobiveni podaci prikazani su u Tablici 3. Linearnost metode izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca koji po zahtjevu mora biti veći od 0.999 (Nigović i sur., 2014). Koeficijent korelacije regresijskog pravca provedenog mjerenja iznosi 0.9997 (Slika 5), dakle korištena metoda zadovoljava validacijski parametar linearnosti.

Tablica 3. Ovisnost površine ispod pika (AUC) o koncentraciji TROLOX-a ( $c_{\text{TROLOX}}$ ).

	$c_{\text{TROLOX}}$ (mM)	AUC (mAU)	Norm
A0	0	2993	1
STD 1	0,05	2560	0,86
STD 2	0,10	2084	0,70
STD 3	0,15	1602	0,54
STD 4	0,20	1210	0,40
STD 5	0,25	764	0,26
STD 6	0,30	284	0,09

STD - radna standardna otopina za izradu baždarnog pravca; A0 - početna otopina samog radikala



Slika 5. Kalibracijska krivulja standarda TROLOX-a dobivena HPLC-DPPH metodom za određivanje antioksidativne aktivnosti.  $\text{AUC}_{\text{DPPH}}$  - površine pika otopine radikala nakon reakcije s radnom standardnom otopinom sintetskog antioksidansa.

Točnost analitičke metode pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Za utvrđivanje točnosti provedena su tri mjerenja uzorka za tri različite koncentracijske razine (0,05, 0,15 i 0,30 mM) u radnom području metode. Odstupanje od stvarne vrijednosti najčešće se iskazuje kao analitički prinos (engl. *recovery*) (Nigović i sur., 2014).

Tablica 4. Točnost metode ispitana je računanjem analitičkog prinosa (AP) na tri različite koncentracijske razine sintetskog antioksidansa u triplikatu.

	0,05 mM		0,15 mM		0,30 mM	
	$c_{\text{TROLOX}}$ (mM)	AP (%)	$c_{\text{TROLOX}}$ (mM)	AP (%)	$c_{\text{TROLOX}}$ (mM)	AP (%)
	0,049	<b>97,4</b>	0,168	<b>112,2</b>	0,290	<b>96,8</b>
	0,047	<b>95,0</b>	0,154	<b>102,7</b>	0,298	<b>99,3</b>
	0,049	<b>97,4</b>	0,158	<b>105,4</b>	0,298	<b>99,3</b>
Srednja vrijednost AP (n=3) (%)	<b>96,6</b>		<b>106,8</b>		<b>98,5</b>	

Jedan od specifičnih ciljeva ovog rada bili su ispitati preciznost analitičke metode, na razini ponovljivosti i srednje preciznosti.

Preciznost analitičke metode pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost je izražena statističkom veličinom kao relativno standardno odstupanje (RSD, %) (Nigović i sur., 2014)

Ponovljivost metode ispitana je primjenom standardne otopine 0,15 mM TROLOX-a unutar istog dana te između dva uzastopna dana. Izračunata je srednja vrijednost niza ponovljenih mjerenja (n=6) za koncentraciju sintetskog antioksidansa, a preciznost izražena kao RSD vrijednost iznosila je redom 3,53% i 5,81%.

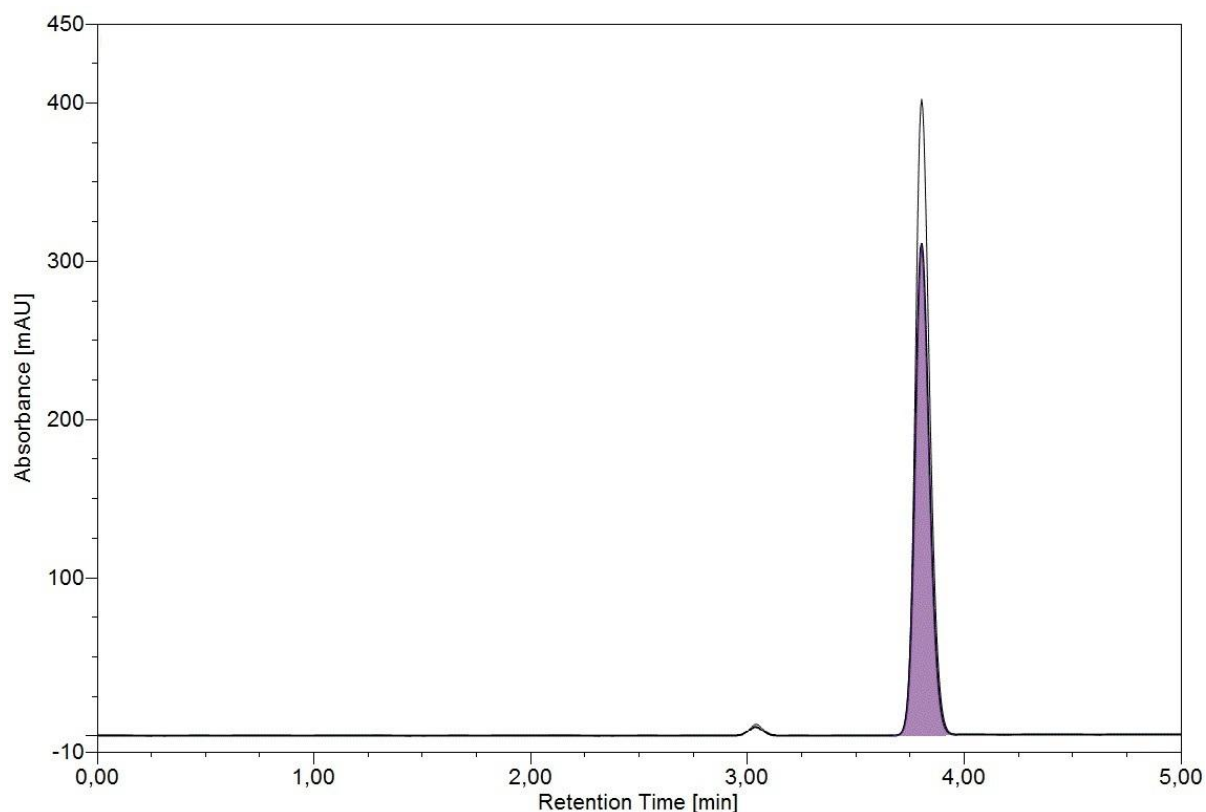
#### **4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI BETA-BLOKATORA**

Nakon postupka validacije prethodno prikazane metode određena je antioksidativna aktivnost pet beta-blokatora u *in vitro* uvjetima. U ovom radu sposobnost hvatanja DPPH radikala procijenjena je korištenjem otopine aktivne farmaceutske tvari: atenolola, bisoprolola, karvedilola, nebivolola i propranolola.

Sposobnost hvatanja DPPH radikala određena je iz razlike površine pika otopine samog radikala ( $AUC_{DPPH}$ ) i otopina uzoraka ( $AUC_{UZORAK}$ ) i izražena na ekvivalent TROLOX-a (TEAC, engl. *TROLOX Equivalent Antioxidant Capacity*). Kromatogrami dobiveni nakon HPLC-DPPH analize prikazani su na Slici 6, dok su rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti beta-blokatora prikazani u Tablici 5.

Na temelju dobivenih rezultata mjerljivu antioksidativnu aktivnost pokazali su atenolol i karvedilol. Treba istaknuti da su rezultati dobiveni u ovom radu u skladu s dostupnim literaturim podacima (Gomes i sur., 2006). Gomes i sur. (2006) ispitivali su sposobnost hvatanja ROS i RNS u *in vitro* uvjetima 8 beta blokatora.

Rezultati tog istraživanja pokazali su značajnu sposobnost atenolola u hvatanju  $\cdot NO$  i HOCl-tako da je ovaj selektivni, hidrofilni beta-blokator i jedan od češće upotrebljivanih lijekova u liječenju koronarne bolesti, hipertenzije i aritmija srca istaknut kao predstavnik s potencijalnim antioksidativnim učinkom i mogućim dodatnim mehanizmom djelovanja.



Slika 6. Kromatogram otopine DPPH prije reakcije (bijelo) i nakon reakcije s beta-blokatora (ljubičasto).

Tablica 5. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnost beta-blokatora.

Lijek	c (mM)	TEAC (mM)	RSD (%)
Atenolol	0,998	0,037	1,70
Karvedilol	1,005	0,028	1,15
Propranolol	1,053	0,006	1,39
Bisoprolol	1,000	0,008	1,53
Nebivolol	1,020	0,017	1,91

Osim atenolola, u dostupnoj stručnoj i znanstvenoj literaturi nalaze se podaci o izraženom antioksidativnom učinku karvedilola, neselektivnog beta-blokator s agonističkim učinkom na alfa-receptore te posljedičnim vazodilatatornim učinkom. Tadolini i Franconi (1998) ispitivali su učinak karvedilola na lipidnu peroksidaciju te zaključili kako je učinak lijeka na inhibiciju

procesa vjerojatno povezan s njegovom sposobnošću keliranja željeza. Osim navedenog, rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su snažan učinak karvedilola u uklanjanja HOCl, peroksinitrita (ONOO<sup>-</sup>), ·NO (Aruoma i sur., 1997, Mak i Weglicki 1998, Gomes i sur., 2006, Malig i sur., 2017).

S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti da karvedilol pokazuje antioksidativnu aktivnost te je potrebno provesti dodatna istraživanja radi detaljnijeg utvrđivanja ovog dodatnog mehanizma djelovanja.

I na kraju treba istaknuti da se predložena HPLC-DPPH metoda pokazala brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti beta-blokatora s ciljem ispitivanja dodatnih mehanizama djelovanja pojedinih predstavnika ove široko primjenjivane skupine lijekova u kliničkoj praksi.

## **5. ZAKLJUČAK**

Ciljevi ovog rada obrazloženi su u poglavlju 2. Iz dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- (i) Prema literaturnim podacima do sada nije objavljena niti jedna HPLC-DPPH metoda za određivanje antioksidativnog učinka beta blokatora.
- (ii) HPLC-DPPH metoda pokazala se brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti beta-blokatora.
- (iii) Predložena metoda je validirana prema važećim smjernicama te je utvrđeno kako je metoda linearna, točna i ponovljiva.
- (iv) Potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti beta blokatora primjenom drugih metoda.



## **6. LITERATURA**

Aruoma OI, Smith C, Cecchini R, Evans PJ, Halliwell B. Free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation by  $\beta$ -blockers and by agents that interfere with calcium metabolism: a physiologically-significant process? *Biochem Pharmacol*, 1991, 42, 735-743.

Aruoma OI. Scavenging of hypochlorous acid by carvedilol and ebselen *in vitro*. *Gen Pharmacol*, 1997, 28, 269-272.

Beckhauser TF, Francis-Olivera J, De Pasquale R. Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity. *J Exp Neurosci*, 2016, 10 (1), 23-48.

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958, 181, 1199-1200.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinka biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 642-643.

Gomes A, Costa D, Lima JLFC, Fernandes E. An effect mediated by scavenging reactive oxygen and nitrogen species? *Bioorg Med Chem*, 2006, 4568-4457.

Hung D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 2005, 53, 1841-1856.

Kedare BS, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 412-422.

Knežević A. Beta-blokatori i njihova klinička primjena. *Medicus*, 2010, 123-129.

Kobayashi S, Susa T, Tanaka T, Wada Y, Okuda S, Doi M, Nao T, Yoshiga Y, Yamada J, Okamura T, Ueyama T, Kawamura S, Yano M, Matsuzak M. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin reflects symptomimatic status and severity of systolic dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2011, 13, 29-36.

Kono Y, Nakamura K, Kimura H, Nishii N, Watanabe A, Banba K, Miura A, Nagase S, Sakuragi S, Kusano KF, Matsubara H, Ohe T. Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circ J*, 2006, 70, 1001-1005.

Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: Meta analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*, 2009; 338:b1665.

Malig TC, Ashkin MR, Burman AL, Barday M, Heyne BJM, Back TGB. Comparison of free-radical inhibiting antioxidant properties of carvedilol and its phenolic metabolites. *Medchemcomm*, 2017, 8(3): 606–615.

Mak IT, Weglicki WB. Protection by beta-blocking agents against free radical-mediated sarcolemmal lipid peroxidation. *Circ Res*, 1988, 63, 262-262.

Nakamura K, Kusano K, Nakamura Y, Kakishita M, Ohta K, Nagase S, Yamamoto M, Miyaji K, Saito H, Morita H, Emori T, Matsubara H, Toyokuni S, Ohe T. Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation*, 2002, 105, 2867-2871.

Nakamura K, Murakami M, Miura D, Yunoki K, Enko K, Tanaka M, Saito Y, Nishii N, Miyoshi T, Yoshida M, Oe H, Toh N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Matsubara H, Kusano KF, Ohe T, Ito H. Beta-blockers and oxidative stress in patients with heart failure, *Pharmaceuticals*, 2011, 1088-1100.

Niederländer HAG, van Beek TA, Bartasiute A, Koleva II. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, 121-134.

Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova-praktikum, 2014, 135-137.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 2012, 24(5), 981-990.

Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 64-68, 76-77, 328.

SciELO - Scientific Electronic Library Online, 1999, <http://www.scielo.br>, pristupljeno 21. 05. 2019.

Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review. *J Funct Foods*, 2015, 18, 820-897

Sochor J, Dobes J, Krystofova O, Ruttkay-Nedecky B, Babula P, Pohanka M, Jurikova T, Zitka O, Adam V, Klejdus B, Kizek R. Electrochemistry as a tool for studying antioxidant properties. *Int J Electrochem Sci*, 2013, 8464 – 8489.

Tadolini B, Franconi F. Carvedilol inhibition of lipid peroxidation. A new antioxidative mechanism. *Free Radical Res*, 1998, 29, 377-387.

Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, Sawyer DB. Role of reactive oxygen species and nad(p)h oxidase in alpha(1)-adenoreceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002, 282, C926-C934

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

Kardiovaskularne bolesti imaju najveću prevalenciju i komorbiditete te najveći mortalitet u općoj populaciji. Dobro poznavanje patofizioloških mehanizama nastanka u kombinaciji s razumijevanjem farmakoloških učinaka dostupnih lijekova temelj je uspješnog liječenja. Beta-blokatori su nezamjenjivi lijekovi u indikacijama poput hipertenzije, angine pektoris, akutnog infarkta miokarda, sekundarne prevencije infarkta miokarda, srčane aritmije i zatajenja srca. Iako svi beta-blokatori dijele zajednički osnovni mehanizam djelovanja, među njima postoje određene razlike, kako u farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima, tako i u dodatnim mehanizmima djelovanja. Upravo te razlike mogu izdvojiti jedan ili više lijekova kao lijekove izbora u odnosu na ostale pripadnike skupine, pogotovo u osoba s komorbiditetima.

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativni učinak beta-blokatora (atenolola, bisoprolola, karvedilola, nebivolola i propranolola) mjereći njihovu sposobnost hvatanja slobodnog 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala.

Korištena DPPH metoda temelji se na sposobnosti hvatanja slobodnog radikala potencijalnim antioksidansom (beta-blokatorom) pri čemu dolazi do smanjenja apsorbancije DPPH<sup>•</sup>. Analize su provedene tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Svi uzorci pripremljeni su kao 1 mM otopine i analizirani u triplicatu, a rezultati izraženi kao antioksidativni kapacitet ekvivalentan standardu TROLOX-a.

Na temelju dobivenih rezultata mjerljivu antioksidativnu aktivnost pokazali su atenolol i karvedilol.

HPLC-DPPH metoda pokazala se brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti beta-blokatora s ciljem ispitivanja dodatnih mehanizama djelovanja pojedinih predstavnika ove široko primjenjivane skupine lijekova u kliničkoj praksi.

Cardiovascular diseases have the highest prevalence and comorbidities as well as the highest mortality in the general population. Good knowledge of pathophysiological mechanisms of action combined with understanding the pharmacological effects of available drugs is the basis of successful treatment. Beta blockers are irreplaceable drugs in indications such as hypertension, angina pectoris, acute myocardial infarction, secondary myocardial infarction, cardiac arrhythmia and heart failure. Although all beta-blockers share a common basic mechanism of action, there are some differences between them, both in pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, as well as in additional mechanisms of action. Those differences can distinguish one or more drugs as a drug of choice compared to other members of the group, especially in patients with comorbidities.

The aim of this work was to examine the antioxidant effect of beta-blockers (atenolol, bisoprolol, carvedilol, nebivolol and propranolol) by measuring their ability to scavenge free 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.

The DPPH method is based on the ability to capture free radicals with potential antioxidants (beta-blocker), which reduces DPPH<sup>•</sup> absorption. All samples were prepared as 1 mM solution and analyzed in triplicate and the results expressed as antioxidant capacity equivalent to TROLOX standard.

Based on the obtained results, measurable antioxidant activity was demonstrated by atenolol and carvedilol.

The HPLC-DPPH method has been shown to be rapid and effective in determining the antioxidant activity of the beta-blocker with the purpose of testing additional mechanisms of action of individual representatives of this widely used drug group in clinical practice.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Određivanje antioksidativne aktivnosti beta-blokatora HPLC-DPPH metodom

Ivana Eterović

### SAŽETAK

Kardiovaskularne bolesti imaju najveću prevalenciju i komorbiditete te najveći mortalitet u općoj populaciji. Dobro poznavanje patofizioloških mehanizama nastanka u kombinaciji s razumijevanjem farmakoloških učinaka dostupnih lijekova temelj je uspješnog liječenja. Beta-blokatori su nezamjenjivi lijekovi u indikacijama poput hipertenzije, angine pektoris, akutnog infarkta miokarda, sekundarne prevencije infarkta miokarda, srčane aritmije i zatajenja srca. Iako svi beta-blokatori dijele zajednički osnovni mehanizam djelovanja, među njima postoje određene razlike, kako u farmakokinetičkim i farmakodinamičkim svojstvima, tako i u dodatnim mehanizmima djelovanja. Upravo te razlike mogu izdvojiti jedan ili više lijekova kao lijekove izbora u odnosu na ostale pripadnike skupine, pogotovo u osoba s komorbiditetima. Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativni učinak beta-blokatora (atenolola, bisoprolola, karvedilola, nebivolola i propranolola) mjereći njihovu sposobnost hvatanja slobodnog 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala. Korištena DPPH metoda temelji se na sposobnosti hvatanja slobodnog radikala potencijalnim antioksidansom (beta-blokatorom) pri čemu dolazi do smanjenja apsorbancije DPPH•. Analize su provedene tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Svi uzorci pripremljeni su kao 1 mM otopine i analizirani u triplikatu, a rezultati izraženi kao antioksidativni kapacitet ekvivalentan standardu TROLOX-a. Na temelju dobivenih rezultata mjerljivu antioksidativnu aktivnost pokazali su atenolol i karvedilol. HPLC-DPPH metoda pokazala se brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti beta-blokatora s ciljem ispitivanja dodatnih mehanizama djelovanja pojedinih predstavnika ove široko primjenjivane skupine lijekova u kliničkoj praksi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 36 stranica, 6 grafička prikaza, 5 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: beta-blokatori, antioksidativna aktivnost, HPLC-DPPH metoda

Mentor: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Ana Mornar Turk**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Ivana Perković**, *docetica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: lipanj 2019.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Determination of antioxidant activity of beta-blockers by HPLC-DPPH method

Ivana Eterović

#### SUMMARY

Cardiovascular diseases have the highest prevalence and comorbidities as well as the highest mortality in the general population. Good knowledge of pathophysiological mechanisms of action combined with understanding the pharmacological effects of available drugs is the basis of successful treatment. Beta blockers are irreplaceable drugs in indications such as hypertension, angina pectoris, acute myocardial infarction, secondary myocardial infarction, cardiac arrhythmia and heart failure. Although all beta-blockers share a common basic mechanism of action, there are some differences between them, both in pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, as well as in additional mechanisms of action. Those differences can distinguish one or more drugs as a drug of choice compared to other members of the group, especially in patients with comorbidities. The aim of this work was to examine the antioxidant effect of beta-blockers (atenolol, bisoprolol, carvedilol, nebivolol and propranolol) by measuring their ability to scavenge free 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. The DPPH method is based on the ability to capture free radicals with potential antioxidants (beta-blocker), which reduces DPPH• absorption. All samples were prepared as 1 mM solution and analyzed in triplicate and the results expressed as antioxidant capacity equivalent to TROLOX standard. Based on the obtained results, measurable antioxidant activity was demonstrated by atenolol and carvedilol. The HPLC-DPPH method has been shown to be rapid and effective in determining the antioxidant activity of the beta-blocker with the purpose of testing additional mechanisms of action of individual representatives of this widely used drug group in clinical practice.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 36 pages, 6 figures, 5 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: beta-blockers, antioxidant activity, HPLC-DPPH method

Mentor: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Daniela Amidžić Klarić, Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Ivana Perković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2019.