

# Određivanje antioksidativne aktivnosti antibiotika HPLC-DPPH metodom

---

**Đipalo-Ban, Martina**

**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:163:661516>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Martina Đipalo-Ban**

**Određivanje antioksidativne aktivnosti  
antibiotika 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.

*Zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Danieli Amidžić Klarić, na uloženom trudu i vremenu, svakoj riječi ohrabrenja i velikoj pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

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

*Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Ani Mornar Turk što me svojim radom zainteresirala za područje rada Zavoda.*

*Veliko hvala mojoj obitelji na potpori, žrtvi i strpljenju tijekom godina studiranja.*

*Zahvaljujem svim svojim prijateljima na potpori i što su mi studentske dane učinili ljepšima, bez njih ništa ne bi bilo ovako lijepo i nezaboravno.*

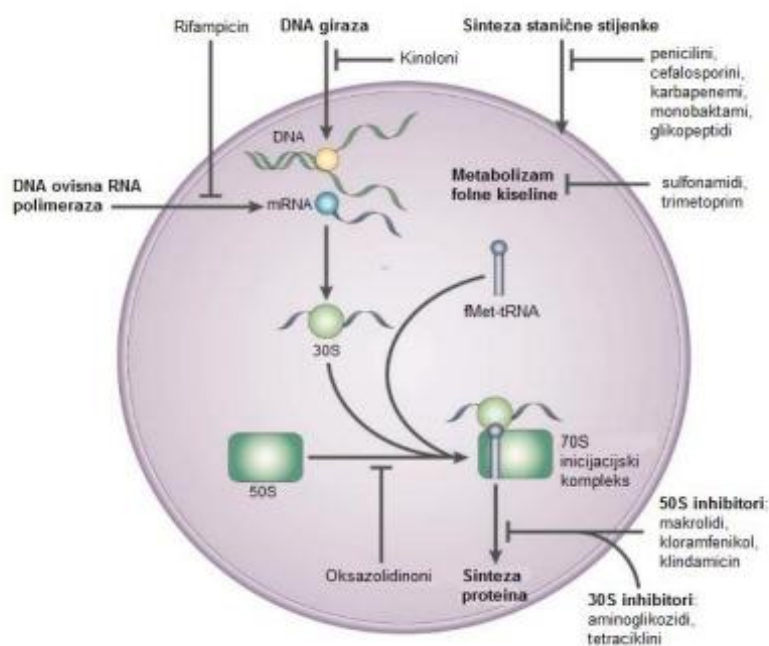
# Sadržaj

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. ANTIBIOTICI.....	2
1.2. ANTIOKSIDANSI.....	8
1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG DJELOVANJA.....	9
1.3.1. Testovi oksidacije supstrata.....	9
1.3.2. Testovi oksidacije reagensa.....	10
1.3.3. Elektrokemijske metode.....	11
1.4. DPPH.....	11
<b>2. Obrazloženje teme.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Materijali i metode.....</b>	<b>15</b>
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Kemikalije.....	16
3.1.2. Uzorci.....	16
3.1.3. Radni instrumenti.....	16
3.1.4. Pribor i posuđe.....	16
3.1.5. Računalni programi.....	17
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Priprema mobilne faze.....	17
3.2.2. Priprema standardnih otopina.....	17
3.2.3. HPLC-DPPH metoda.....	18
3.2.4. Statistička obrada podataka.....	19
<b>4. Rezultati i rasprava.....</b>	<b>20</b>
4.1. VALIDACIJA ANALITIČKE METODE.....	21
4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ANTIBIOTIKA.....	23
<b>5. Zaključak.....</b>	<b>25</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Sažetak/Summary.....</b>	<b>30</b>
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# **1. Uvod**

## 1.1. ANTIBIOTICI

Antibiotici su raznolika skupina lijekova selektivno toksičnog učinka na žive organizme. Ovi lijekovi su toksični za bakterije, a netoksični ili slabo toksični za ljudski organizam. Svojim učinkom utječu na rast i razmnožavanje bakterija (bakteriostatsko djelovanje) ili ubijaju bakterije (baktericidno djelovanje) pri čemu su mete antibiotika: stanična stijenka, citoplazmatska membrana, sinteza proteina i sinteza nukleinskih kiselina (Kalenić i sur., 2013). Na Slici 1. prikazana je podjela antibiotika prema njihovim metama u stanici bakterije.



**Slika 1.** Podjela antibiotika prema bakterijskim metama na koje djeluju (Coates i sur., 2002)

Prema ATK-klasifikaciji lijekova (Anatomska Terapijska Kemijska klasifikacija) koju propisuje SZO (Svjetska zdravstvena organizacija) antibiotici su *Lijekovi za liječenje sustavnih infekcija (izuzev infekcija uzrokovanih parazitima)*, odnosno skupina J. Antibiotici se nalaze unutar podskupina J01 *Preparati za liječenje bakterijskih infekcija za sustavnu primjenu* i J04 *Lijekovi za liječenje infekcija mikobakterijama* ([www.medicines.org.uk](http://www.medicines.org.uk)).

U Tablici 1. prikazana je podjela J01 podskupine. Svi lijekovi unutar podskupine nemaju isti mehanizam djelovanja. Tetraciklini, aminoglikozidi, kloramfenikoli, makrolidi i linkozamidi imaju zajedničku metu djelovanja, sintezu proteina, međutim različite su faze sinteze proteina na koje djeluju (translacija, inicijacija, elongacija, translokacija, transpeptidacija). Beta-

laktamski penicilini i cefalosporini u strukturi imaju beta-laktamski prsten i sprječavaju transpeptidaciju u sintezi stanične stijenke. Sulfonamidi i kinoloni sprječavaju sintezu nukleinskih kiselina različitim mehanizmima, tako da kinoloni zaustavljaju replikaciju, a sulfonamidi sintezu purina (Katzung, 2011). U podskupini J04 antibiotike nalazimo jedino pod ATK šifrom J04AB, tj. antibiotici za liječenje tuberkuloze (cikloserin, rifampicin, rifabutin).

**Tablica 1.** Podjela antibiotika za liječenje bakterijskih infekcija za sustavnu primjenu

ATK oznaka	Skupina antibiotika	Registrirani lijek u RH
<b>J01A</b>	Tetraciklini	Tetraciklin Belupo, Hiramycin, Tygacil, Xerava
<b>J01B</b>	Kloramfenikoli	Nema registriranih lijekova u RH
<b>J01C</b>	Beta-laktamski penicilini	Acipirin, Almacin, Amoksicilin, Amoksiklav, Monoclox, Oспен, Silapen, Tazoprox, Pipertaz
<b>J01D</b>	Cefalosporini	Altaxon, Altazolin, Archifar, Axetine, Beloxim, Cayston, Cefaz, Cefazolin, Cefiksim, Cefotaksim, Ceftazidim, Ceftriaxone, Cefuroksim, Efox, Furexa, Imipenem/cilastatin, Invanz, Lendacin, Medaxone, Meropenem, Novocef, Rexocef, Xorimax, Zinnat
<b>J01E</b>	Sulfonamidi i trimetoprim	Sulotrim
<b>J01F</b>	Makrolidi i linkozamidi	Azibiot, Azimed, Azitromicin Belupo, Dalacin, Eritromicin Belupo, Fromilid, Ketek, Klaritromicin Krka, Klimicin, Klindamicin-MIP, Lekoklar, Makcin, Sumamed
<b>J01G</b>	Aminoglikozidi	Amikacin Alvogen, Bramitob, Garamycin, Gentamicin B. Braun, Gentamicin Belupo, Tobramycin PARI, Vantobra
<b>J01M</b>	Kinoloni	Avelox, Ciflox, Ciprinol, Ciprofloksacin JGL, Cipromed, Citeral, Flexid, Levalox, Levofloksacin Sandoz, Melvedok, Moksacin, Moloxin, Noflox, Nolicin, Plivamox, Quinsarin, Rivomox, Rivoxin, Trizolin
<b>J01X</b>	Ostali antibiotici (glikopeptidni antimikrobici, polimiksini, derivati imidazola, derivati nitrofurana, drugi antimikrobici)	Colixin, Cubicin, Daptomicin Hospira, Edicin, Efloran, Fomicyt, Fosfomicin JGL, Kolistin Alvogen, Linezolid, Lynz, Metronidazol, Ninur, Nitroxolin, Orbactiv, Pneumolid, Targocid, Urifos, Vancomycin Kabi, Xydalba, Zoxilid, Zyvoxid

U Tablici 2. prikazane su indikacije i doze nekih često primjenjivanih antibiotika. Farmakokinetički gledano, antibiotici se uglavnom dobro apsorbiraju nakon peroralne primjene, a izuzetak su makrolidi (azitromicin i eritromicin) i rifampicin. Distribucija antibiotika je različita. U ljudskom organizmu ova široko primjenjivana skupina lijekova nejednoliko se distribuira u tkiva i tjelesne tekućine. Tako se pojedini lijekovi slabije vežu za proteine plazme poput amoksicilina, dok se s druge strane eritromicin veže u visokom postotku (do 96%) na  $\alpha 1$  kiseli glikoprotein i albumin. Eliminacija se odvija putem urina i fecesa, a uglavnom se izlučuju nepromijenjeni ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

Antibiotici već desetljećima spašavaju ljudske živote i njihovim otkrićem znatno je povećana kvaliteta života. Međutim, pojava bakterijske rezistencije ugrožava status antibiotika kao izrazito djelotvornih lijekova u borbi protiv različitih patogena te je racionalna primjena antibiotika postala neophodna. Danas se primjenjuje veliki broj antibiotika, a 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. Od velike je koristi ukoliko lijek pokazuje neki dodatni mehanizam djelovanja koji će poboljšati učinak lijeka ili na drugi način pozitivno utjecati na ishod liječenja.

Antioksidativno djelovanje antibiotika može pridonijeti smanjenju oksidativnog stresa koji može nastati tijekom infekcije zbog mogućeg poremećaja ravnoteže slobodnih radikala i antioksidansa. Posljedično dolazi do oštećenja tkiva slobodnim radikalima što može dovesti do razvoja niza različitih bolesti. Antioksidativni učinak nekim antibioticima može dati prednost pri odabiru zbog smanjenja oštećenja organizma ili čak povećanja osjetljivosti bakterija na antibiotike.



**Tablica 2.** Podjela antibiotika prema mehanizmu djelovanja (Francetić i sur., 2015; Kalenić i sur., 2013; Katzung, 2011; www.halmed.hr).

Lijek	Skupina	Djelovanje	Farmaceutski oblik	Doze	Indikacije	
<b>amoksicilin</b>	beta-laktamski penicilin	inhibicija transpeptidacije, inhibicija sinteze stanične stijenke bakterije	prašak za oralnu suspenziju	250 mg / 5 ml, 400 mg + 57 mg / 5 ml klavulanske kiseline	infekcije šigelama, salmonela - vrućice, razne infekcije uzrokovane enterokokima i listerijom	
			tablete za oralnu suspenziju	500 mg		
			tvrde kapsule	500 mg		
			filmom obložene tablete	500 mg, 1000 mg		
			prašak za otopinu za injekciju/infuziju	500 mg + 100 mg klavulanske kiseline, 1000 mg + 200 mg klavulanske kiseline		
<b>cefradin</b>	cefalosporin 1. generacije	inhibicija transpeptidacije, inhibicija sinteze stanične stijenke bakterije	kapsule, u RH nema odobrenog lijeka	500 mg	infekcije mokraćnih puteva, infekcije uzrokovane stafilokokima i streptokokima	
<b>cefaleksin</b>			prašak za oralnu suspenziju	250 mg / 5 ml		infekcije mokraćnog sustava, dišnog sustava, infekcije kože i mekog tkiva
			kapsule	500 mg		
			filmom obložene tablete	1000 mg		
<b>oksitetraciklin</b>	tetraciklin	inhibicija	mast	30 mg/g + 10 mg/g	primarne i sekundarne kožne infekcije,	

		elongacije peptidnog lanca		hidrokortizona	opekline i dekubitusi
			tablete za rodnicu	100 mg + 100000 IU nistatina	
<b>doksiciklin</b>			tvrde kapsule	100 mg	razne infekcije uzrokovane širokim spektrom gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija i drugim mikroorganizmima
<b>kloramfenikol</b>		inhibicija transpeptidacije tijekom sinteze proteina	mast za oko	10 mg/g	aerobne i anaerobne gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, zbog teških nuspojava danas se rijetko upotrebljava
<b>azitromicin</b>	makrolidi	inhibicija translokacije tijekom sinteze proteina	prašak za oralnu suspenziju	20 mg/ml, 40 mg/ml	respiratorne infekcije, infekcije kože i mekih tkiva, spolno prenosive bolesti, ulkus i atipične infekcije mikobakterijama kod HIV-pozitivnih bolesnika
			tablete za oralnu suspenziju	1000 mg	
			prašak za koncentrat za otopinu za infuziju	500 mg	
			tvrde kapsule	250 mg	
			filmom obložene tablete	125 mg, 250 mg, 500 mg	
			kapi za oko	15 mg/g	
<b>eritromicin</b>			tvrde kapsule	250 mg	respiratorne, genitalne, neonatalne i očne infekcije uzrokovane klamidijama, infekcije uzrokovane streptokokima, stafilokokima i pneumokokima
<b>klaritromicin</b>			filmom obložene tablete	250 mg, 500 mg	infekcije HIV-pozitivnih bolesnika, streptokokne infekcije, respiratorne infekcije,

			tablete s produljenim oslobađanjem	500 mg	djeluje i na atipične mikobakterije
			filmom obložene tablete s produljenim oslobađanjem	500 mg	
			granule za oralnu suspenziju	125 mg / 5 ml	
<b>ciprofloksacin</b>	kinoloni	inhibicija sinteze nukleinskih kiselina, inhibicija transkripcije i replikacije	otopina za infuziju	2 mg/ml	infekcije uzrokovane gram-negativnim kokcima, komplicirane infekcije mokraćnog sustava, akutni i kronični prostatitis, osteomijelitis, bolnička pneumonija, proljev na putovanju, bakterijski gastroenteritis, dijabetičko stopalo uz lijek za anaerobe
			koncentrat za otopinu za infuziju	100 mg / 10 ml	
			kapi za oko i uho, otopina	3 mg/ml	
			filmom obložene tablete	250 mg, 500 mg	
<b>sulfametoksazol</b>	sulfonamidi	inhibicija sinteze nukleinskih kiselina	tablete	100 mg + 20 mg trimetoprim, 400 mg + 80 mg trimetoprim, 800 mg + 160 mg trimetoprim	kožne infekcije, infekcije mekog tkiva, infekcije mokraćnih puteva, kronični bronhitis, gonoreja, bruceloza, kuga, kolera, salmoneloza
			oralna suspenzija	200 mg + 40 mg / 5 ml	
<b>rifampicin</b>	rifamicini	inhibicija sinteze nukleinskih kiselina	tvrde kapsule	300 mg	tuberkuloza

## 1.2. ANTIOKSIDANSI

Slobodni radikali su kemijske vrste koje imaju jedan nespareni elektron i stoga su vrlo reaktivne. U cilju nastanka stabilnog spoja, slobodni radikali stupaju u reakcije s proteinima, lipidima, ugljikohidratima i nukleinskim kiselinama što dovodi do oštećenja u organizmu (Štraus, 2009).

Čak i u normalnim fiziološkim okolnostima u mitohondrijima, endoplazmatskom retikulumu i peroksisomima nastaje mala količina reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Reaktivne kisikove vrste mogu biti radikali ili ne/radikali koji nastaju parcijalnom redukcijom kisika (Ray i sur., 2012).

Biološki značajni ROS su superoksidni anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), singlet kisika ( $O_2^1 \Delta_g$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritna kiselina (HOCl), hidroksidni radikal ( $OH^{\bullet}$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), peroksi i alkoksi radikali. Kako bi se zaštitila od njihovog štetnog djelovanja stanica sadrži različite enzime i antioksidanse (Niederländer i sur., 2008).

Antioksidanski djeluju tako da u vrlo niskoj koncentraciji sprječavaju oksidaciju drugih molekula različitim mehanizmima:

1. Sprječavaju nastanak slobodnih radikala održavanjem niskog tlaka kisika u tkivima, odvajanjem enzima odgovornih za stvaranje radikala u posebne organele (peroksisomi, lizosomi, mitohondriji) ili kompleksiranjem slobodnih iona željeza i bakra s proteinima kao što su npr. transferin, feritin.
2. Uklanjaju reaktivne vrste pomoću specifičnih enzima (SOD, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation-reduktaza itd.) ili antioksidansima (vitamin C i E, selen, glutation itd.).
3. Uklanjaju oštećene molekule ili popravljaju oštećenje.

Antioksidansi se dijele prema podrijetlu (endogeni i egzogeni), mjestu djelovanja (stanični, izvanstanični, membranski), topljivosti (topljivi u vodi ili lipidima), načinu djelovanja (preventivni, čistači, enzimi popravka), a mogu biti enzimi ili male molekule (Štraus, 2009).

Antioksidativno djelovanje tijekom infekcija je vrlo važno jer, pod utjecajem bakterijskih produkata i fagocita, NADPH-oksidaza stvara veliku količinu superoksid anion radikala. Također se djelovanje makrofaga i neutrofila temelji na produkciji superoksidnih radikala i vodikovog peroksida što je ključno u borbi protiv patogena (Puertollano i sur., 2011).

Dakle, tijekom infekcije nastaju velike količine slobodnih radikala i antioksidansi su neophodni za održavanje ravnoteže kako ne bi došlo do oksidacijskog stresa. Ukoliko dođe do poremećaja ravnoteže i značajno poraste koncentracija slobodnih radikala, dolazi do oštećenja

zdravog tkiva i razvoja bolesti kao što su rak, ateroskleroza, Alzheimerova bolest, upala, astma, reumatoidni artritis (Gerald, 1993; Niederländer i sur., 2008).

Zbog važnosti sprječavanja oksidativnog stresa, antioksidansi su u posljednje vrijeme predmet intenzivnog istraživanja (Niederländer i sur., 2008). Također, prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, postoji povezanost antioksidansa s osjetljivošću bakterija na antibiotike. Pokazalo se kako antioksidansi na osjetljivost bakterija mogu djelovati u oba smjera, odnosno neki povećavaju, a neki smanjuju osjetljivost (Goswami i sur., 2011).

### **1.3. METODE ZA ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG DJELOVANJA**

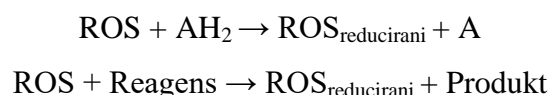
Zbog važnosti antioksidansa za organizam, razvijen je niz metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti. Metode se temelje na različitim mehanizmima, neki od njih su prijenos atoma vodika (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT), prijenos elektrona (engl. *electron transfer*, ET), kelacija metala i dr (Niederländer i sur., 2008). Zbog lakše usporedbe rezultata koristi se termin antioksidativna aktivnost koji se odnosi na kinetiku reakcije antioksidansa i radikala (Shahidi, Zhong, 2015).

Metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti mogu se podijeliti u tri grupe:

1. Testovi oksidacije supstrata
2. Testovi oksidacije reagensa i
3. Elektrokemijske metode

#### **1.3.1. Testovi oksidacije supstrata**

Metode se temelje na dodatku oksidirajuće tvari u čijem prisustvu dolazi do oksidacije supstrata tako da se može mjeriti koncentracija supstrata ili njegovog oksidiranog oblika. Uvođenjem antioksidansa u sustav dolazi do smanjenja oksidacije supstrata zbog kompeticije supstrata i antioksidansa za ROS. U ovoj skupini metoda kao izvor ROS korišteni se singlet kisika, superoksidni anion i vodikov peroksid (Niederländer i sur., 2008).



### 1.3.1.1. SINGLET KISIKA

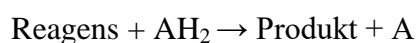
Izvor singleta kisika je fotokemijski reaktor u kojem dolazi do prijenosa energije s fotosenzitizatora na molekularni kisik u osnovnom stanju. Nadalje, singlet kisik reagira sa supstratom (1,2-dietoksieten) i stvara četveročlani heterociklički peroksid (3,4-dietoksi-1,2-diooksetan) pri čemu se koncentracija produkta prati kemiluminescencijom. Uvođenjem antioksidansa u sustav dolazi do kompeticije antioksidansa i singleta kisika za supstrat i nastaje negativni pik na pozadinskom kemiluminescencijskom signalu jer se smanjuje koncentracija produkta kojeg pratimo. Intenzitet tog pika odgovara koncentraciji i učinkovitosti antioksidansa. Jedan od nedostataka ove metoda je složenost provođenja zbog potrebne opreme i kemikalija, ali se zbog dobre procjene smatra vrijednom metodom u određivanju antioksidativnog djelovanja (Niederländer i sur., 2008).

### 1.3.1.2. VODIKOV PEROKSID I SUPEROKSIDNI ANION

Metode koje koriste vodikov peroksid ili superoksidni anion u ispitivanju antioksidativnog djelovanja temelje se na kemiluminescenciji luminola koja je potaknuta ROS-om. Antioksidativna aktivnost se procjenjuje iz smanjenja intenziteta kemiluminescencije nakon uvođenja antioksidansa. Novije metode koja uključuje vodikov peroksid i superoksidni anion temelje se na fluorescenciji, a ne na kemiluminescenciji kao načinu detekcije signala. Za razliku od ostalih metoda, prednost ove metode je što može detektirati i antioksidanse i prooksidanse. S druge strane cijeli postupak provođenja je vrlo kompleksan i zahtijeva skupe reagense, a dobiveni pikovi su široki uz malu osjetljivost (Niederländer i sur., 2008).

## 1.3.2. Testovi oksidacije reagensa

Ova skupina testova temelji se na promjeni boje otopine slobodnog radikala u prisustvu antioksidansa. Testovi oksidacije reagensa u kojima se koriste DPPH (1,1,-difetil-2-pikrilhidrazil) i ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) slobodni radikali najčešće su korištene metode, dok se metoda kompleksiranja fosfomolibdena dosta rijetko koristi. U usporedbi s prethodnim metodama, ovi testovi su jednostavniji i lakši za provođenje (Niederländer i sur., 2008).



### 1.3.3. Elektrokemijske metode

Elektrokemijske metode mogu biti kulometrijske i amperometrijske (Niederländer i sur., 2008).

#### 1.3.3.1. KULOMETRIJSKE METODE

Metoda se temelji na mjerenju napona uzorka nakon kromatografskog odjeljivanja. Kao detektor se koristi CAD (engl. *coulometric array detector*) koji se sastoji od niza elemenata s rastućim naponom. Ukupna površina kromatografskih pikova razmjerna je ukupnoj količini elektrona koju uzorak može donirati. Dobiveni rezultat upućuju na ukupni sadržaj skupina koje se mogu oksidirati iz čega nam proizlazi i antioksidativna aktivnost. Metoda dobro razlikuje lako oksidirajuće tvari od onih koje se teško oksidiraju, ali dobiveni oksidacijski potencijal se teško korelira s antioksidacijskom aktivnosti (Niederländer i sur., 2008).

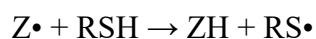
#### 1.3.3.2. AMPEROMETRIJSKE METODE

Amperometrijskom metodom se određuje antioksidacijska aktivnost na temelju pretpostavke da oksidacijski potencijal daje procjenu energije potrebne za prijenos elektrona. Što je oksidacijski potencijal niži, spoj lakše donira elektron i njegova antioksidacijska aktivnost je veća. Metoda je prikladna za dobro razlikovanje lako oksidirajućih tvari od onih koje teško oksidiraju (Niederländer i sur., 2008).

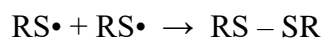
## 1.4. DPPH

DPPH je stabilan slobodni radikal koji ima delokaliziran elektron i ne dimerizira za razliku od ostalih slobodnih radikala. Zbog delokalizacije otopina DPPH je tamnoljubičaste boje, a jedna od velikih prednosti je što pokazuje snažne apsorpcijske vrpce na 256 i 517 nm i pri niskim koncentracijama.

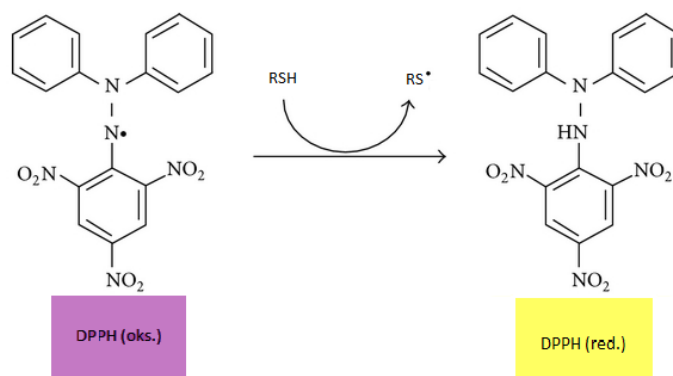
Originalnu metodu je osmislio Marsden Blois 1958. godine. Kao antioksidans je koristio tiolnu skupinu aminokiseline cistein. Prikazujući DPPH radikal kao Z•, a molekulu cisteina kao RSH reakcija je izgledala ovako



Dalje, nastali slobodni radikal  $RS\cdot$  reagira s drugim slobodnim radikalom koji je nastao u paralelnoj reakciji (Molyneux, 2004).



Dokazano je da, ovom metodom, DPPH oksidira cistein, glutation, askorbinsku kiselinu, tokoferol, polihidroksi aromatske spojeve i aromatske amine, ali nema dovoljno veliki oksidacijski potencijal da bi oksidirao glukozu, purine, pirimidine ili aromatske spojeve s jednom hidroksilnom skupinom (Slika 2). Prednosti metode su što je brza, jednostavna i nije skupa pa se široko primjenjuje za određivanje antioksidativne aktivnosti (Karunakar i sur., 2003).



**Slika 2.** Redukcija DPPH radikala antioksidansom RSH (Teixeira i sur., 2013)

DPPH radikal je topljiv samo u organskim otapalima poput niskomolekulskih alkohola tako da je ova metoda ograničene primjenjivosti pri određivanju hidrofilnih antioksidansa. Osim toga, prisutnosti vode u otapalu može dovesti do agregacije ili koagulacije DPPH radikala, zbog čega postaje teže dostupan za reakciju s antioksidansima što u konačnici dovodi do pogrešnih rezultata. Treba istaknuti da utjecaj svjetla također može utjecati na dobivene rezultate, jer svojim djelovanjem smanjuje apsorbanciju DPPH radikala pri 517 nm (Kedare, Singh, 2011).



## **2. Obrazloženje teme**

Razvoj infekcija uzrokovanih patogenima koji postaju rezistentni na postojeće antibiotike su globalni zdravstveni problem. U cilju rješavanja problema ispituju se novi mehanizmi djelovanja te obraća pozornost na odabir antibiotika. U odabiru 'pravoga' među mnoštvom različitih antibiotika uvelike pomažu poznata farmakokinetička i farmakodinamička svojstva antibiotika te dodatni mehanizmi djelovanja pojedinih predstavnika ove skupine lijekova široko primjenjivane u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Obzirom na prethodno navedeno, cilj ovog diplomskog rada bio je:

- i. ispitati odabrane validacijske parametre HPLC-DPPH metode prema ICH smjernicama (smjernice Međunarodne konferencije o harmonizaciji, prema engl. *International Conference of Harmonization*) prethodno razvijene na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova,
- ii. odrediti antioksidativnu aktivnost antibiotika (amoksicilin, cefradin, cefaleksin, ciprofloksacin, azitromicin, eritromicin, klaritromicin, sulfametoksazol, oksitetraciklin, doksiciklin, kloramfenikol, rifampicin) u *in vitro* uvjetima mjereći njihovu sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala koristeći navedenu metodu.

# **3. Materijali i metode**

## 3.1. MATERIJALI

### 3.1.1. Kemikalije

Pri izvođenju analiza uporabljene su sljedeće 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

12 uzoraka različitih antibiotika:

- amoksicilin, azitromicin, eritromicin, klaritromicin, doksiciklin (Pliva, Hrvatska)
- cefradin, cefaleksin (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- oksitetraciklin, ciprofloksacin, sulfametoksazol, kloramfenikol, rifampicin (Fluka, Švicarska)

### 3.1.3. Radni instrumenti:

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

### 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)

## 3.2. METODE

Određivanje antioksidativne aktivnosti navedenih antibiotika provedeno je primjenom HPLC-DPPH metode.

### 3.2.1. Priprema mobilne faze

Mobilna faza pripravljena 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 otopina TROLOX-a pripravljena je otapanjem odgovarajuće količine ovog sintetskog antioksidansa u metanolu kako bi se postigla koncentracija 1 mM.

Otopine TROLOX-a korištene kao radne standardne otopine za izradu baždarnog pravca pripravljene su iz navedene standardne otopine. U odmjernu tikvicu klase A (10 ml) otpipetiran je odgovarajući volumen standardne otopine TOLOX-a te nadopunjen mobilnom fazom do oznake. Koncentracije radnih otopina TROLOX-a iznosile su u rasponu od 0,05 do 0,30 mM u 6 koncentracijskih razina.

DPPH otopina pripravljena 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 (10 mL).

### 3.2.3. HPLC-DPPH metoda

Za procjenu sposobnosti hvatanja DPPH radikala kao tehnika izbora odabrana je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

Ukratko, u Eppendorf epruvetu otpipetira se 1 mL otopine lijeka i 250  $\mu$ L DPPH otopine, dobro promućka na Vortex miješalici te ostavi 30 minuta na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, reakcijska otopina se filtrira kroz 0,20  $\mu$ m filter te provede injektiranje i izokatna elucija prema navedenim kromatografskim uvjetima (Tablica 3). Određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih antibiotika provedeno je u triplikatu.

Sposobnost hvatanja DPPH radikala određena je iz razlike površine pika početne otopine samog radikala ( $AUC_0$ ) i otopine radikala nakon reakcije s uzorkom ( $AUC_{UZORAK}$ ) te izraženo na TEAC.

**Tablica 3.** 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 $\mu$ m)
Temperatura kolone	25 °C
Mobilna faza	metanol:ultra čista voda 80:20 (v/v)
Protok	1 ml/min
Volumen injektiranja	20 $\mu$ l
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)

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

Dobiveni eksperimentalni podaci analizirani su primjenom deskriptivne statistike. Pomoću regresijske analize dobivena je jednadžba pravca i pripadajući koeficijent 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).

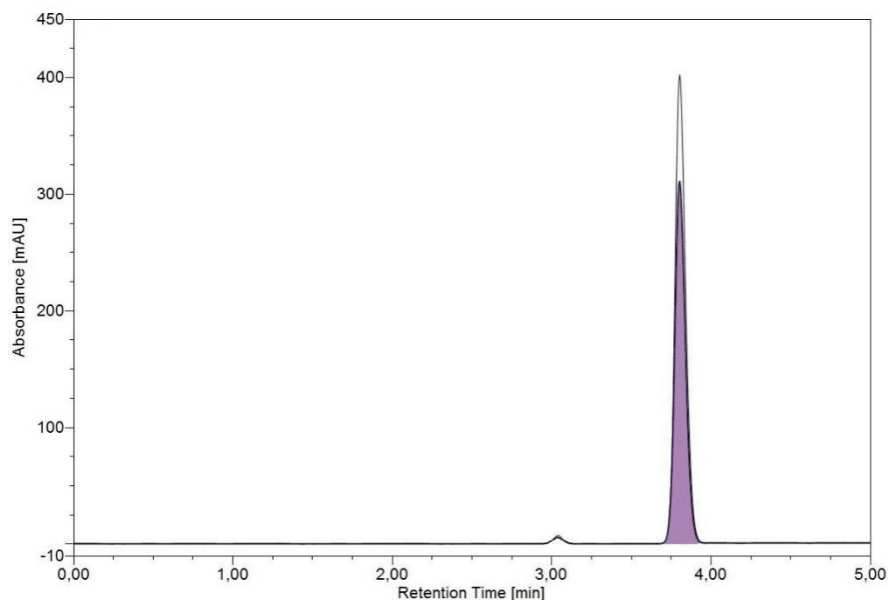
## **4. Rezultati i rasprava**



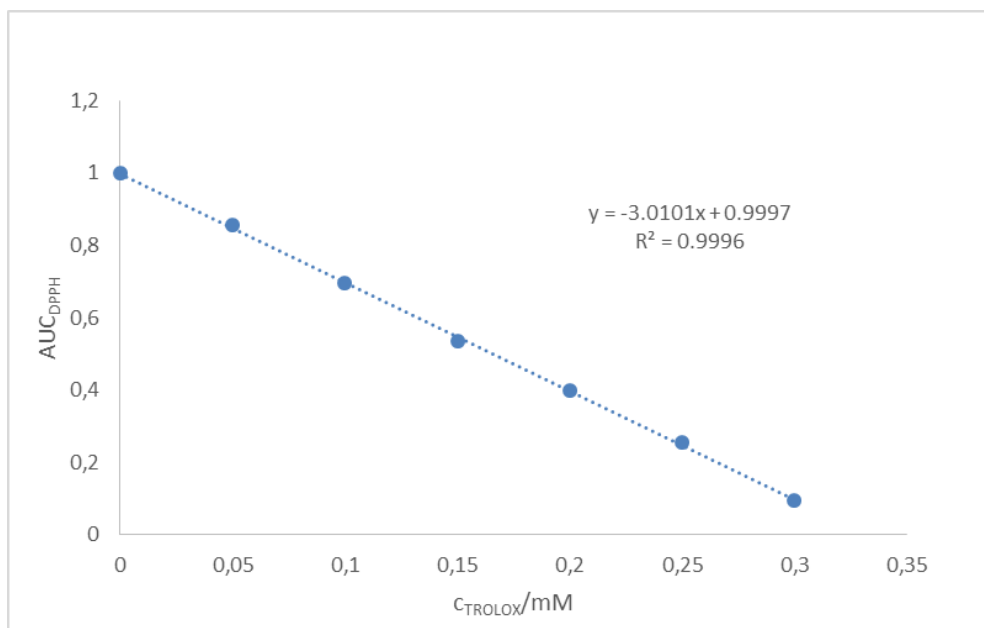
## 4.1. VALIDACIJA ANALITIČKE METODE

U cilju potvrde prikladnosti navedene analitičke metode provedena je validacija metode prema ICH smjernicama. Odabir validacijskih parametara koje je potrebno ispitati ovisi o namjeni analitičkog postupka. Tako je primjerice kod identifikacije potrebno ispitati samo specifičnost metode dok se kod određivanja sadržaja ispituje specifičnost, točnost, preciznost, linearnost i radno područje. Za validaciju predložene HPLC-DPPH metode ispitani su parametri: linearnost, radno područje, preciznost i točnost.

Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog intervala daje rezultate koji su proporcionalni koncentraciji analita. U ovom radu za određivanje linearnosti korišteno je 6 različitih koncentracija standarda TROLOX-a (raspon od 0,05 mM do 0,30 mM) te mjerena jakost analitičkog signala, odnosno površina pika (engl. *Area Under Curve*, AUC) (Slika 3.). Za svaku koncentraciju provedena su 3 mjerenja. Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca koji mora biti veći od 0,999 ( $R^2 > 0,999$ ) (Nigović i sur., 2014). Provedenim mjerenjem dobiven je koeficijent korelacije koji iznosi 0,9996 (Slika 4.) iz čega proizlazi da odabrana metoda zadovoljava validacijski parametar linearnosti u navedenom radnom području.



**Slika 3.** Kromatogram otopine DPPH bez dodatka antibiotika (bijeli pik) i nakon dodatka antibiotika (ljubičasti pik) pri optimalnim kromatografskim uvjetima.



**Slika 4.** Kalibracijska krivulja standarda TROLOX-a dobivena HPLC-DPPH metodom za određivanje antioksidativne aktivnosti.  $AUC_{\text{DPPH}}$  - površina pika otopine radikala nakon reakcije s radnom standardnom otopinom sintetskog antioksidansa.

Preciznost je parametar koji pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Preciznost se iskazuje kao ponovljivost, srednja preciznost ili obnovljivost, a izražava se kao standardna devijacija (SD), relativna standardna devijacija (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti (Nigović i sur., 2014). Za odabranu metodu preciznost je iskazana kao ponovljivost primjenom 0,15 mM otopine TROLOX-a. U ovom postupku provedeno je 6 mjerenja za odabranu koncentraciju te ponovljena u kratkom vremenskom razdoblju (dva uzastopna dana). Dobiveni rezultat izražen kao RSD (%) iznosio je 3,53%, odnosno 5,81%.

Točnost se određuje u radnom području metode nakon ispitivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti. Ovaj validacijski parametar pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti tako da se analiziraju uzorci poznatih koncentracija i uspoređuju se izmjerene i stvarne vrijednosti (Nigović i sur., 2014). U ovom postupku mjerene su 3 različite koncentracije (0,05 mM, 0,15 mM i 0,30 mM) u radnom području metode i za svaku koncentraciju provedeno mjerenje u triplikatu te točnost izražena kao analitički prinos (engl. *recovery*). Analitički prinos za 3 različite koncentracije TROLOX-a u triplikatu bio je u rasponu od 96,6 % do 106,8 %.

## 4.2. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ANTIBIOTIKA

Nakon provedenog validacijskog postupka HPLC-DPPH metode provedeno je mjerenje antioksidativne aktivnosti antibiotika (amoksicilin, cefradin, cefaleksin, ciprofloksacin, azitromicin, eritromicin, klaritromicin, sulfametoksazol, oksitetraciklin, doksiciklin, kloramfenikol, rifampicin) u *in vitro* uvjetima.

Ukratko, otopina oksidiranog (radikalnog) oblika DPPH intenzivne je ljubičaste boje (Slika 2). Reakcijom DPPH radikala i antioksidansa dolazi do smanjenja intenziteta boje slobodnog radikala, odnosno do smanjenja površine pika. Mjerenjem su dobiveni kromatogrami kao na Slici 4., a rezultati mjerenja za analizirane antibiotike izraženi su u ekvivalentima TROLOX-a (engl. *TROLOX Equivalent Antioxidant Capacity*, TEAC) i prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Antioksidativna aktivnosti ispitivanih antibiotika.

Lijek	Koncentracija otopine antibiotika (mM)	TEAC (mM)	RSD (%)
amoksicilin	1,094	0,085	18,71
cefradin	0,996	0,152	14,28
cefaleksin	1,065	0,170	26,35
ciprofloksacin	0,990	0,155	3,83
azitromicin	1,009	0,037	3,61
eritromicin	0,982	0,080	6,63
klaritromicin	1,043	0,044	15,32
sulfametoksazol	1,054	0,077	21,51
oksitetraciklin	1,060	0,299	17,39
doksiciklin	1,068	0,302	32,20
kloramfenikol	0,954	0,041	9,33
rifampicin	0,988	0,292	21,65

Dobiveni rezultati pokazali su kako antioksidativna aktivnost ispitivanih antibiotika varira u rasponu od 0,037 mM (azitromicin) do 0,302 mM (doksiciklin) TEAC. Predloženom HPLC-DPPH metodom nije pokazana mjerljiva antioksidacijska aktivnost azitromicina, klaritromicina i kloramfenikola. Nadalje, reakcija DPPH radikala i ispitivanih lijekova možda neće pokazati potpuno obezbojenje otopine, što je slučaj kod amoksicilina, eritromicina i sulfametoksazola, ali predložena HPLC metoda je osjetljivija te može ukazivati na male promjene u odnosu na standard. Zanimljivo je za istaknuti kako prema dobivenim rezultatima

izraženu antioksidativnu aktivnost pokazuju: cefradin, cefaleksin, ciprofloksacin, dok su oksitetraciklin, doksiciklin i rifampicin pokazali potpunu dekolorizaciju otopine DPPH, te imaju iznimno izraženu antioksidacijsku aktivnost.

Dobiveni rezultati se mogu usporediti s rezultatima drugih autora. Kladna i sur. (2011) ispitivali su antiradikalno djelovanje tetraciklina, među kojima su oksitetraciklin i doksiciklin, koristeći DPPH i hidroksil radikal ESR (engl. *electron spin resonance*), kemiluminescencijskim i spektrofotometrijskim tehnikama. Dobiveni rezultati su pokazali visoku antiradikalnu aktivnost tetraciklina u rasponu od 26-96% pri koncentraciji 2,5 mmol/l.

Karunakar i sur. (2003) su koristili HPLC-DPPH metodu za određivanje antioksidativne aktivnosti lijekova, između ostalih i rifampicina. Rezultati su pokazali da u prisustvu rifampicina dolazi do smanjena površine DPPH pika ovisno o koncentraciji. Postotak redukcije pika na 256 nm iznosio je 6,25%, 11,74% i 32,77% za 50 ng, 100 ng i 200 ng rifampicina u 100 µl metanola. Nadalje, Kalpana i sur. (2001) su mjerenjem antioksidativne aktivnosti također dobili rezultate prema kojima rifampicin ima sposobnost hvatanja radikala. U ispitivanju su koristili DPPH radikal, a za usporedbu askorbinsku kiselinu.

Treba istaknuti kako je usporedba rezultata i literaturnih podataka otežana zbog razlika u korištenim metodama i načinu prikaza rezultata. Tako su primjerice Karunakara i sur. (2003) u svom istraživanju koristili HPLC-DPPH metodu u određivanju antioksidativne aktivnosti rifampicina, ali rezultati tog istraživanja su iskazani u postotcima redukcije površine DPPH pika. S obzirom na dosadašnje literaturne spoznaje dostupan je mali broj podataka o ovoj temi, ali iz postojećih se može zaključiti da tetraciklini i rifampicin imaju izraženu antioksidativnu aktivnost tako da su rezultati ovog rada u skladu s dostupnim literaturnim podacima.

S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti da cefradin, cefaleksin, ciprofloksacin, oksitetraciklin, doksiciklin i rifampicin pokazuju 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 antibiotika s ciljem ispitivanja dodatnih mehanizama djelovanja pojedinih predstavnika ove široko primjenjivane skupine lijekova u kliničkoj praksi.

## **5. Zaključak**

Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- i. HPLC-DPPH metoda pokazala se brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti antibiotika.
- ii. Predložena metoda je validirana prema važećim smjernicama te je utvrđeno kako je metoda linearna, točna i ponovljiva u promatranom rasponu koncentracija.
- iii. Cefradin, cefaleksin, ciprofloksacin, oksitetraciklin, doksiciklin i rifampicin su pokazali izraženiju antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uvjetima.
- iv. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s malobrojnim dostupnim literaturnim podacima za analizirane antibiotike.
- v. Potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti antibiotika primjenom drugih metoda.

## **6. Literatura**

1. Amoksicilin Belupo 1000 mg filmom obložene tablete, 2019., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
2. ATK klasifikacija, 2019., <http://www.mediatelly.co>, pristupljeno 28.08.2019.
3. Azitromicin Belupo 250 mg filmom obložene tablete, 2014., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
4. Cefaleksin Belupo 500 mg kapsule, 2014, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
5. Ciprofloksacin JGL 500 mg filmom obložene tablete, 2019., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
6. Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 895-910.
7. Doksiciklin Belupo 100mg tvrde kapsule, 2018., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 13. 05. 2019.
8. Eritromicin Belupo 250 mg tvrde kapsule, 2016., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
9. Francetić I i suradnici. Farmakoterapijski priručnik. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 300, 388, 391, 399, 410-413, 419, 436, 773.
10. Keusch GT. Antioxidants in infection. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1993, 23-33.
11. Baza lijekova, 2019., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
12. Niederländer HAG, van Beek TA, Bartasiute A, Koleva II. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, 121-134.
13. Hassett DJ, Imlay JA. Bactericidal antibiotics and oxidative stress: A Radical Proposal. *ACS Chem Biol*, 2007, 708-710.
14. Goswami M, Mangoli S, Jawali N. Antibiotics and antioxidants: friends or foes during therapy? *BARC Newsl*, 2011, 42-46.
15. Kalenić S i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 97-115.
16. Kalpana T, Karunakar N, Reddy MS, Prabhakar MC, Krishna DR. Assessment of antioxidant activity of some antileprotic drugs. *Arzneimittelforschung*, 2001, 633-637.
17. Karunakar N, Prabhakar MC, Krishna DR. Determination of antioxidant activity of some drugs using high-pressure liquid chromatography. *Arzneim-Forsch*, 2003, 254-259.
18. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 775, 781, 783-789, 796, 802-804, 815-820.



19. Kedare SB, RP Singh. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J Food Sci Technol*, 2011, 412-422.
20. Kladna A, Michalska T, Berczynski P, Kruk I, Aboul-Enein YH. Evaluation of the antioxidant activity of tetracycline antibiotics *in vitro*. *Luminescence*, 2012, 249-255.
21. Klaritromicin Krka 250 mg filmom obložene tablete, 2018., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
22. Klindamicin-MIP 300 mg filmom obložene tablete, 2016, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 13. 05. 2019.
23. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 2004, 211-219.
24. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. *Analitika lijekova-praktikum*, 2014, 135-137.
25. Olszewska M. Oxytetracycline-mechanism of action and application in skin diseases. *Wiad Lek*, 2006, 829-833.
26. Puertollano MA, Puertollano E, de Cienfuegos GÁ, de Pablo MA. Dietary antioxidants: immunity and host defence. *Curr Top Med Chem*. 2011, 1752-1766.
27. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell signal*, 2012, 981-990.
28. Rimactan 300 mg tvrde kapsule, 2013, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
29. Fereidoon S, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods*, 2015, 757-781.
30. Sulotrim 100 mg + 20 mg tablete, 2017., <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 28. 08. 2019.
31. Štraus B, Petrik J. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 638-643.
32. Teixeira JCS, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, 2013, 251754.

## **7. Sažetak/Summary**

Budući da bakterijska rezistencija ugrožava status antibiotika kao iznimno djelotvornih lijekova u borbi protiv patogena, racionalna primjena antibiotika postala je nužna. Danas se u kliničkoj praksi primjenjuje mnoštvo različitih antibiotika, stoga dobro poznavanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava može biti od velike pomoći pri odabiru najprikladnijeg lijeka. Antioksidativno djelovanje antibiotika može pridonijeti smanjenju oksidativnog stresa koji može nastati tijekom infekcije zbog mogućeg poremećaja ravnoteže slobodnih radikala i antioksidansa. Posljedično dolazi do oštećenja tkiva slobodnim radikalima što može dovesti do razvoja niza različitih bolesti. Antioksidativni učinak nekim antibioticima može dati prednost pri odabiru zbog smanjenja oštećenja organizma ili čak povećanja osjetljivosti bakterija na antibiotike.

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativni učinak 12 antibiotika mjereći njihovu sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala.

Antioksidativna aktivnost mjerena je HPLC-DPPH metodom. Korištene su 1mM otopine antibiotika uz dodatak otopine DPPH radikala pri čemu dolazi do smanjenja površine pika.

Dobiveni rezultati pokazali su kako antioksidativna aktivnost ispitivanih antibiotika varira u rasponu od 0,037 mM (azitromicin) do 0,302 mM (doksiciklin) TEAC.

Na temelju dobivenih rezultata izraženu antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uvjetima pokazali su: cefradin, cefaleksin, ciprofloksacin, oksitetraciklin, doksiciklin i rifampicin te se korištena metoda pokazala brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti antibiotika.

Since bacterial resistance compromises the status of antibiotics as potent drugs in the fight against pathogens and rational administration of antibiotics is necessary. Many different antibiotics are used in clinical practice today, therefore a good knowledge of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties can be of great help in selecting the most appropriate drugs. The antioxidant activity of antibiotics can contribute to the reduction of oxidative stress that can occur during infection due to the possible disruption of the balance of free radicals and antioxidants. As a result, tissue damage to free radicals can occur which can lead to various diseases. The antioxidant properties of some antibiotics may be advantageous in selection because of reducing damage or even increasing bacterial susceptibility to antibiotics.

The aim of this work was to investigate the antioxidant activity of 12 antibiotics by measuring its ability to trap free DPPH radical.

Antioxidant activity was measured by the HPLC-DPPH method. A 1mM solution of antibiotics was used with the addition of a DPPH radical solution reducing the peak area. The results are expressed in TROLOX equivalents.

The results obtained showed that the antioxidant activity of the investigated antibiotics varied from 0.037 mM (azithromycin) to 0.302 mM (doxycycline) TEAC.

Based on the results obtained, it can be concluded the antioxidant activity was demonstrated by cefradine, cephalexin, ciprofloxacin, oxytetracycline, doxycycline and rifampicin. Also, HPLC-DPPH method has been proved to be rapid and efficient for determination of antioxidative activity of antibiotics.

# 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 antibiotika HPLC-DPPH metodom

**Martina Đipalo-Ban**

### SAŽETAK

Budući da bakterijske rezistencije ugrožava status antibiotika kao iznimno djelotvornih lijekova u borbi protiv patogena, racionalna primjena antibiotika postala je nužna. Danas se u kliničkoj praksi primjenjuje mnoštvo različitih antibiotika, stoga dobro poznavanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava može biti od velike pomoći pri odabiru najprikladnijeg lijeka. Antioksidativno djelovanje antibiotika može pridonijeti smanjenju oksidativnog stresa koji može nastati tijekom infekcije zbog mogućeg poremećaja ravnoteže slobodnih radikala i antioksidansa. Posljedično dolazi do oštećenja tkiva slobodnim radikalima što može dovesti do razvoja niza različitih bolesti. Antioksidativni učinak nekim antibioticima može dati prednost pri odabiru zbog smanjenja oštećenja organizma ili čak povećanja osjetljivosti bakterija na antibiotike. Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativni učinak 12 antibiotika mjereći njihovu sposobnost hvatanja slobodnog DPPH radikala. Antioksidativna aktivnost mjerena je HPLC-DPPH metodom. Korištene su 1mM otopine antibiotika uz dodatak otopine DPPH radikala pri čemu dolazi do smanjenja površine pika. Dobiveni rezultati pokazali su kako antioksidativna aktivnost ispitivanih antibiotika varira u rasponu od 0,037 mM (azitromicin) do 0,302 mM (doksiciklin) TEAC. Na temelju dobivenih rezultata izraženu antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uvjetima pokazali su: cefradin, cefaleksin, ciprofloksacin, oksitetraciklin, doksiciklin i rifampicin te se korištena metoda pokazala brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti antibiotika.

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

Rad sadrži: 32 stranice, 4 grafička prikaza, 4 tablice i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: antibiotici, 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. Ivan Pepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 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 antibiotics by HPLC-DPPH method

**Martina Đipalo-Ban**

#### SUMMARY

Since bacterial resistance compromises the status of antibiotics as potent drugs in the fight against pathogens and rational administration of antibiotics is necessary. Many different antibiotics are used in clinical practice today, therefore a good knowledge of pharmacokinetic and pharmacodynamic properties can be of great help in selecting the most appropriate drugs. The antioxidant activity of antibiotics can contribute to the reduction of oxidative stress that can occur during infection due to the possible disruption of the balance of free radicals and antioxidants. As a result, tissue damage to free radicals can occur which can lead to various diseases. The antioxidant properties of some antibiotics may be advantageous in selection because of reducing damage or even increasing bacterial susceptibility to antibiotics. The aim of this work was to investigate the antioxidant activity of 12 antibiotics by measuring its ability to trap free DPPH radical. Antioxidant activity was measured by the HPLC-DPPH method. A 1mM solution of antibiotics was used with the addition of a DPPH radical solution reducing the peak area. The results are expressed in TROLOX equivalents. The results obtained showed that the antioxidant activity of the investigated antibiotics varied from 0.037 mM (azithromycin) to 0.302 mM (doxycycline) TEAC. Based on the results obtained, it can be concluded the antioxidant activity was demonstrated by cefradine, cephalixin, ciprofloxacin, oxytetracycline, doxycycline and rifampicin. Also, HPLC-DPPH method has been proved to be rapid and efficient for determination of antioxidative activity of antibiotics.

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

Thesis includes: 32 pages, 4 figures, 4 tables and 32 references. Original is in Croatian language.

Keywords: antibiotics, 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  
**Ivan Pepić, Ph.D.** / *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.