

# Određivanje antioksidativne aktivnosti analgetika HPLC-DPPH metodom

---

Šujansky, Lara

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:163:666534>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



Lara Šujansky

**Određivanje antioksidativne aktivnosti  
analgetika HPLC-DPPH metodom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

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 i trudu te stručnom vodstvu kojim mi je olakšala izradu ovoga diplomskog rada.*

*Želim zahvaliti i prof. dr. sc. Ani Mornar-Turk, voditeljici kolegija u okviru kojega je izrađen ovaj diplomski rad.*

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

*Veliko hvala mojoj obitelji na podršci i strpljenju koje su mi bezuvjetno pružali tijekom studiranja.*

*Zahvaljujem se i prijateljima što su mi uljepšali studentske dane.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 ANALGETICI .....	2
1.2 ANTIOKSIDANSI .....	6
1.2.1 Antioksidansi i bol .....	8
1.3 METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI .....	9
1.3.1 Testovi oksidacije supstrata .....	9
1.3.2 Testovi oksidacije relativno stabilnog reagensa .....	10
1.3.2 Elektrokemijski testovi .....	11
1.4 DPPH .....	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	14
3. MATERIJALI I METODE .....	16
3.1 MATERIJALI .....	17
3.1.1 Kemikalije .....	17
3.1.2 Uzorci .....	17
3.1.3 Radni instrumenti .....	17
3.1.4 Pribor i posuđe .....	17
3.1.5 Računalni programi .....	18
3.2 METODE .....	18
3.2.1 Priprema mobilne faze .....	18
3.2.2 Priprema standardnih otopina .....	18
3.2.3. HPLC-DPPH metoda .....	19
3.2.4 Statistička obrada podataka .....	20

4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	21
4.1	VALIDACIJA ANALITIČKE METODE.....	22
4.2	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI SLABIH ANALGETIKA ....	23
5.	ZAKLJUČAK .....	26
6.	LITERATURA.....	28
7.	SAŽETAK/SUMMARY.....	32

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION

CARD

# **1. UVOD**

Bol je neugodan senzorni i emocionalni doživljaj koji se javlja kao direktni odgovor na stvarno ili moguće oštećenje tkiva ([www.iasp-pain.org](http://www.iasp-pain.org)). Bolni osjet nastaje putem nocicepcijskog sustava i provodi se živcima do središnjeg živčanog sustava kod opasnosti od oštećenja ili već postojećih. Prilikom oštećenja tkiva dolazi do otpuštanja raznovrsnih molekula, poput tvari P, histamina, bradikinina, prostaglandina; koje mogu djelovati izravno aktiviranjem živčanih završetaka nocicepcijskog puta ili pojačavanjem njihove osjetljivosti na druge medijatore.

## 1.1 ANALGETICI

Analgetici su tvari koje u terapijskim dozama ublažuju, odnosno uklanjaju bol. Prema mehanizmu djelovanja možemo ih podijeliti na četiri glavne skupine:

1. Nesteroidni protuupalni analgetici,
2. Opioidni analgetici
3. Lokalni anestetici
4. Adjuvantni analgetici.

Slabi analgetici (analgoantipiretici; nesteroidni antiinflamatorni lijekovi - NSAIL; neopioidni analgetici) su skupina kemijski raznovrsnih molekula koje djeluju analgetski, antipiretski te protuupalno. Lijekovi iz ove skupine različitog su afiniteta i selektivnosti prema ciklooksigenazi (COX, engl. *cyclooxygenase*), enzimu čijom inhibicijom ostvaruju svoje učinke (Katzung, 2018.). Ciklooksigenaza je enzim koji katalizira nastanak medijatora upale prostaglandina, tromboksana te prostaciklina putem nestabilnih cikličnih endoperoksida. Enzim se nalazi u dva glavna izomorfna oblika. COX-1 je izoenzim koji se konstitutivno nalazi u gotovo svim tkivima vezan na endoplazmatski retikulum, a sudjeluje u produkciji prostaglandina koji reguliraju vaskularnu homeostazu, aktivaciju trombocita te želučanu i bubrežnu funkciju. Drugi izoenzim, COX-2, konstitutivan i inducibilan oblik, ima dominantnu ulogu u nastanku pro-upalnih prostaglandina. Inhibicijom ciklooksigenaze-2 slabi analgetici direktno smanjuju proizvodnju upalnih medijatora, prostaglandina, koji sudjeluju u nastanku boli, upale i vrućice. Većina slabih analgetika je

neselektivna prema COX-2 te se to smatra uzrokom njihovoj gastrotoksičnosti i kardiotoksičnosti (Knights i sur., 2010.).

Paracetamol ili acetaminofen je slabi analgetik koji se ponešto razlikuje od ostalih nesteroidnih protuupalnih analgetika. Kao svi, i on inhibira ciklooksigenazu u središnjem živčanom sustavu i tako djeluje analgetski i antipiretski, ali je iznimno slabe selektivnosti naspram ciklooksigenaza u perifernim tkivima, stoga ne posjeduje protuupalni učinak. Paracetamol se preporuča kod blage do umjerene boli, posebice kod pacijenata s hemofilijom i peptičkim ulkusom u anamnezi budući da, za razliku od acetilsalicilne kiseline, ne djeluje na agregaciju trombocita, i nije gastrotoksičan kao većina ostalih slabih analgetika (Józwiak-Bebenista i Nowak, 2014.).

S druge strane, opioidi su jaki analgetici koji svoj učinak ostvaruju djelovanjem na opioidne receptore smještene u središnjem živčanom sustavu, u mozgu i leđnoj moždini, te periferno. Njihovo najvažnije djelovanje je upravo modulacija nocicepcije putem tih receptora. Danas znamo za tri grupe opioidnih receptora:  $\mu$  (mi),  $\delta$  (delta) i  $\kappa$  (kappa). Ovisno o tome na koje receptore i kojim afinitetom djeluju, opioidi imaju različite učinke. Tako ih možemo podijeliti na agoniste, djelomične agoniste i antagoniste. Osim analgezije, opioidi dovode i to respiratorne depresije, mučnine, povraćanja, konstipacije, sedacije, bradikardije, vazodilatacije i hipotenzije, mijoze euforije i disforije itd. ([www.hdlb.org](http://www.hdlb.org)).

U terapiji boli često se koriste kombinacije opioida (npr. kodein) s paracetamolom ili acetilsalicilnom kiselinom. Razlog toga je to što djeluju sinergistički, odnosno različitim mehanizmima djelovanja uzrokuju analgeziju. Zbog toga se za postizanje iste razine analgezije može koristiti manja doza pojedinog lijeka i tako se smanjuje intenzitet i učestalost neželjenih učinaka (Rang i Dale, 2015).



Tablica 1. Podjela analgetika (prilagođeno, www.halmed.hr).

SLABI ANALGETICI	LIJEK	FARMACEUTSKI OBLIK	DOZA	DJELOVANJE
	Acetilsalicilna kiselina	Tablete	100 mg	Antitrombotik
			300 mg, 500 mg	
	Paracetamol	Tablete	300 mg, 500 mg, 1000 mg	Analgetik, antipiretik, antiflogistik
		Otopina za infuziju	10 mg/ml	
		Sirup	120mg/ 5ml	
		Čepići	80 mg, 120 mg, 150 mg	
	Propifenazon	Tablete	300 mg	Analgetik, antipiretik, antiflogistik, protuupalno djelovanje
	Diklofenak	Tablete	12,5 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg	Analgetik, antipiretik, antiflogistik, protuupalno djelovanje
		Čepići	12,5 mg	
Kapi za oko		1 mg/ml		
Gel		10 mg/g, 20 mg/g, 30 mg/g		
Otopina za infuziju		75 mg/3 ml		
Ketoprofen	Gel	25 mg/g	Analgetik, antipiretik, antiflogistik, protuupalno djelovanje	
	Granule za oralnu otopinu	25 mg, 50 mg		
	Čepići	100 mg		
	Otopina za infuziju	200 mg/2 ml		
	Kapsule	50 mg, 100 mg, 150 mg		
	Sprej za kožu	100 mg/g		
Ibuprofen	Sirup	20 mg/ml, 40 mg/ml	Analgetik, antipiretik, antiflogistik, protuupalno djelovanje	
	Tablete	200 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg		
	Šumeće granule	200 mg, 400 mg, 600 mg		
	Gel	50 mg/g		
	Čepići	60 mg, 125 mg		

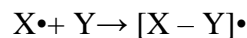
<b>OPIOIDNI ANALGETICI</b>	Tramadol	Tablete	100 mg, 150 mg, 200 mg	Umjereno jaki analgetik
		Čepići	100 mg	
		Otopina za infuziju	50 mg, 100 mg	
		Oralne kapi	100 mg/ml	
	Morfin	Tablete	10 mg, 20 mg, 30 mg, 60 mg, 100 mg	Jaki analgetik
		Otopina za infuziju	20 mg/ml	
	Fentanil	Otopina za infuziju	50 µg/ml	Jaki analgetik
		Sublingvalne tablete	100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg	
Bukalne tablete		100 µg, 200 µg, 400 µg, 600 µg, 800 µg		
Transdermalni flaster		12 µg/h, 25 µg/h, 50 µg/h, 75 µg/h, 100 µg/h		
Sprej za nos		50 µg/doza, 100 µg/doza, 200 µg/doza		
Kodein	tablete	10 mg, 30 mg	Analgetik, antitusik, antidijaroik	
<b>ADJUVANTNI ANALGETICI</b>	Kofein, u kombinaciji s analgetikom	tablete	25 mg, 50 mg, 65 mg, 75 mg	Poboljšava učinkovitost analgetika

## 1.2 ANTIOKSIDANSI

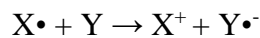
Reakcije aerobnog metabolizma stvaraju reaktivne kisikove spojeve (engl. *Reactive oxygen species, ROS*). Dio elektrona se i pod normalnim fiziološkim uvjetima može odvojiti od mitohondrijskog lanca za prijenos elektrona te reagirati s molekulskim kisikom. Neki od važnijih ROS su superoksidni anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), singletni kisik ( $O_2\ ^1\Delta_g$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritna kiselina ( $HOCl$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) te peroksi- i alkoksi- radikali (Niederländer i sur., 2008). Slično tome mogu nastati i reaktivni dušikovi spojevi (engl. *Reactive nitrogen species, RNS*): dušikov oksid ( $NO\bullet$ ), dušikov dioksid ( $NO_2\bullet$ ), nitratni radikal ( $NO_3\bullet$ ) i drugi; te reaktivni halogeni radikali (Halliwell i Gutteridge, 2015.).

Uzrok njihove reaktivnosti je nespareni elektron koji sadrže u vanjskoj ljusci. Kada se takva reaktivna molekula „susretne“ s drugom molekulom, koja nije radikal, započinje lančana reakcija, pri čemu se može dogoditi neka od sljedećih reakcija (Halliwell i Gutteridge, 2015.):

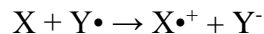
- a) nastanak adukta s nesparenim elektronom:



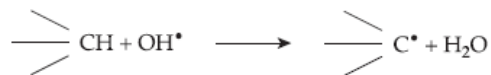
- b) radikal reducira drugu molekulu prenoseći jedan elektron na nju:



- c) radikal oksidira drugu molekulu uzimajući joj elektron:

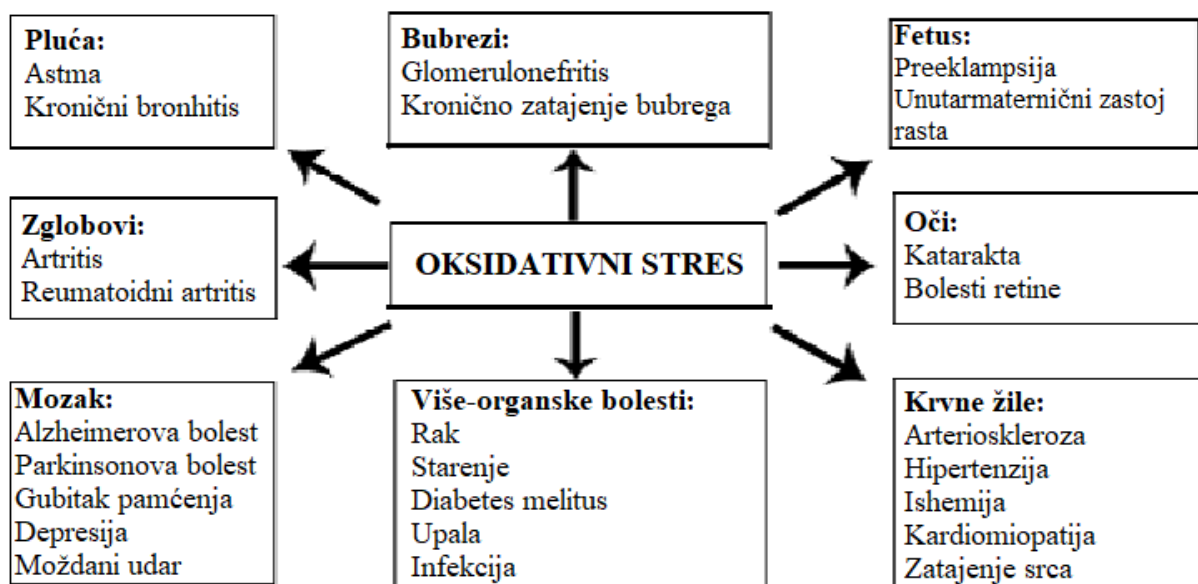


- d) radikal može izdvojiti vodikov atom iz C-H ili N-H veze:



U normalnim fiziološkim uvjetima unutarstanični ROS imaju važne uloge, npr. zaštita od patogena, te je njihovo stvaranje strogo kontrolirano. Međutim, u različitim patološkim stanjima se povećava koncentracija takvih spojeva i dolazi do oštećenja unutar stanice. To može pogoditi različite biološke makromolekule, uključujući: DNA, lipide, ugljikohidrate i proteine. Smatra se da oksidativni stres na taj način ima ulogu u karcinogenezi, mutagenezi, procesu starenja,

peroksidaciji lipida i oštećenju membrana, oksidaciji i degeneraciji proteina i ugljikohidrata i da tako posreduju u nastanku niza bolesti (Slika 1) (Sies, 1993.).



Slika 1. Primjeri bolesti induciranih oksidativnim stresom (prilagođeno; Mehta i Gowder, 2015.)

Antioksidansi su tvari koje, pri nižoj koncentraciji u odnosu na supstrat, odgađaju, sprječavaju ili uklanjaju oksidativni stres tako što inhibiraju inicijaciju ili propagaciju lančanih reakcija oksidacije (Wang i Zheng, 2001). Mogu biti sintetizirani *in vivo* ili uneseni iz okoliša, npr. putem hrane.

Takvi spojevi mogu djelovati antioksidativno suprimirajući produkciju reaktivnih spojeva, reducirajući hidroperokside, kompleksirajući metalne ione ili djelovati kao „scavengeri“, tj. čistači reaktivnih spojeva uzrokujući terminaciju lančane reakcije. Neki dodatno mogu poticati biosintezu drugih antioksidansa. Prema mehanizmu djelovanja mogu se podijeliti na endogene enzimske antioksidanse, ne-enzimske, metal-kompleksirajuće proteine, te egzogene fitokemikalije i nutrijente (Kalva i sur., 2011).

Dvije su glavne skupine antioksidansa: primarni tj. fenolni te sekundarni, kelirajući i antioksidansi „čistači“. Fenolni antioksidansi preveniraju nastanak slobodnih radikala, a mogu

biti prirodni (tokoferoli, flavonoidi, različiti proteini i peptidi iz npr. mlijeka, jaja i ribe) te sintetski (butilhidroksianisol, BHA, butilhidroksitoluen, BHT, terc-butilhidrokinon, TBHQ). Primarnom antioksidansu je glavna uloga prenijeti proton slobodnom radikalu čime se smanjuje njegova reaktivnost. Sekundarni antioksidansi se također nazivaju i sinergistički. Usprkos tome što posjeduju malu ili nikakvu antioksidativnu aktivnost, kada su korišteni u kombinaciji s njima, mogu znatno povećati učinkovitost fenolnih antioksidansa. To postižu na nekoliko načina: regeneracijom primarnog antioksidansa, prevencijom raspadanja peroksida koje prati oksidaciju antioksidansa, inaktivacijom metalnog katalizatora ili smanjenjem koncentracije slobodnih radikala. Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylen diamine tetraacetic acid, EDTA*), limunska i vinska kiselina te polifosfati su najpoznatiji kelirajući antioksidansi. U svojoj strukturi imaju nesparene elektrone pa mogu stvarati stabilne komplekse s metalnim ionima koji djeluju kao katalizatori u reakcijama koje generiraju reaktivne slobodne radikale. Askorbinska kiselina, sulfiti, neprobavljivi ugljikohidrati (npr. fruktani, arabinoksilani,  $\beta$ -glukani) su primjeri antioksidansa čistača. Oni reagiraju sa slobodnim molekulama kisika prisutnima u mediju te tako nisu više dostupni u reakcijama oksidacije. Osim molekularnog kisika, takvi antioksidansi mogu reagirati i ukloniti i reaktivne kisikove spojeve (ROS) donirajući svoj elektron i reducirajući ih (Bazinet i Doyen, 2015.).

### **1.2.1 Antioksidansi i bol**

Smatra se da je oksidativni stres impliciran u patofiziologiju boli kod niza kroničnih bolesti, kardiovaskularnih, respiratornih, neurodegenerativnih, gastrointestinalnih te karcinoma. Iako se još ne zna točan mehanizam kojim ublažavaju bol, nizom studija dokazani su pozitivni učinci uporabe antioksidansa u terapiji kroničnih bolesti. Kod pacijenata koji su u terapiji imali antioksidanse uočen je značajno manji broj bolnih dana, zatim intenzitet boli je smanjen, kao i potreba za uzimanjem analgetika, kako nesteroidnih protuupalnih, tako i opioda. (Acharya i sur., 2009.; Chung i sur., 2006.; Blaise i Taha, 2012.; Kim i sur., 2004.).

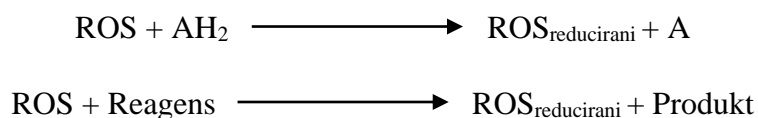
## 1.3 METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Brojne su metode kojima se može odrediti antioksidativna aktivnost, a mogu se grupirati u 3 skupine:

1. Metode koje uključuju stvarne oksidacije supstrata nekim ROS
2. Metode oksidacije relativno stabilnog reagensa i
3. Elektrokemijske metode određivanja antioksidativne aktivnosti.

### 1.3.1 Testovi oksidacije supstrata

Metode iz ove skupine podrazumijevaju reakciju oksidansa i supstrata čija se koncentracija (ili koncentracija njegovog oksidiranog oblika) može lako pratiti. Kao oksidansi se koriste reaktivne tvari koje su ujedno aktivne i u biološkim sustavima, singletni kisik, superoksidni anion i vodikov peroksid. Aktivnost dodanog antioksidansa direktno je povezana sa smanjenjem oksidacije supstrata uslijed njihove kompeticije za reaktivne kisikove spojeve.

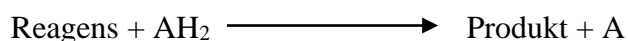


Reakcijom supstrata (1,2-dietoksieten) i singletnog kisika nastaje četveročlani heterociklički peroksid (3,4-dietoksi-1,2-dioksetan) čija se koncentracija može pratiti kemiluminiscencijski u prisustvu fluorofora. Prisustvom u sustavu, antioksidans djeluje kao hvatač singletnog kisika natječući se sa supstratom za njega, što se može vidjeti kao negativni pik na konstantnom kemiluminiscencijskom signalu. Intenzitet pika se može smatrati dobrim pokazateljem koncentracije i aktivnosti antioksidansa. Međutim, mnogo je mogućih interferencija u ovoj metodi koje mogu utjecati na rezultat. Iako se taj problem može ukloniti još jednim setom mjerenja, zbog toga se rijetko koristi, kao i zbog potrebe za dodatnom opremom i kemikalijama. No ipak, ova se metoda pokazala dobrim odabirom za procjenu antioksidativne aktivnosti.

U procjeni antioksidativne aktivnosti može se koristiti vodikov peroksid ili superoksidni anion, a navedene metode se temelje na kemiluminiscenciji luminola potaknutoj reaktivnim kisikovim spojevima. Jedina je razlika što se koriste različiti mehanizmi inicijacije. Najjednostavnija metoda obuhvaća samo luminol i vodikov peroksid u odgovarajućem mediju, dok postoje kombinacije vodikovog peroksida s mikroperoksidazom te hipoksantina i ksantin oksidaze uz korištenje katalaze koja sprječava kemiluminiscenciju vodikovog peroksida. U ovim slučajevima, aktivnost antioksidansa se može uočiti iz smanjenja intenziteta kemiluminiscencije. Ove se kompleksne metode također rijetko koriste zbog velike mogućnosti interferencija te loše osjetljivosti i potrebom sa skupim reagensima (Niederländer i sur., 2008.).

### 1.3.2 Testovi oksidacije relativno stabilnog reagensa

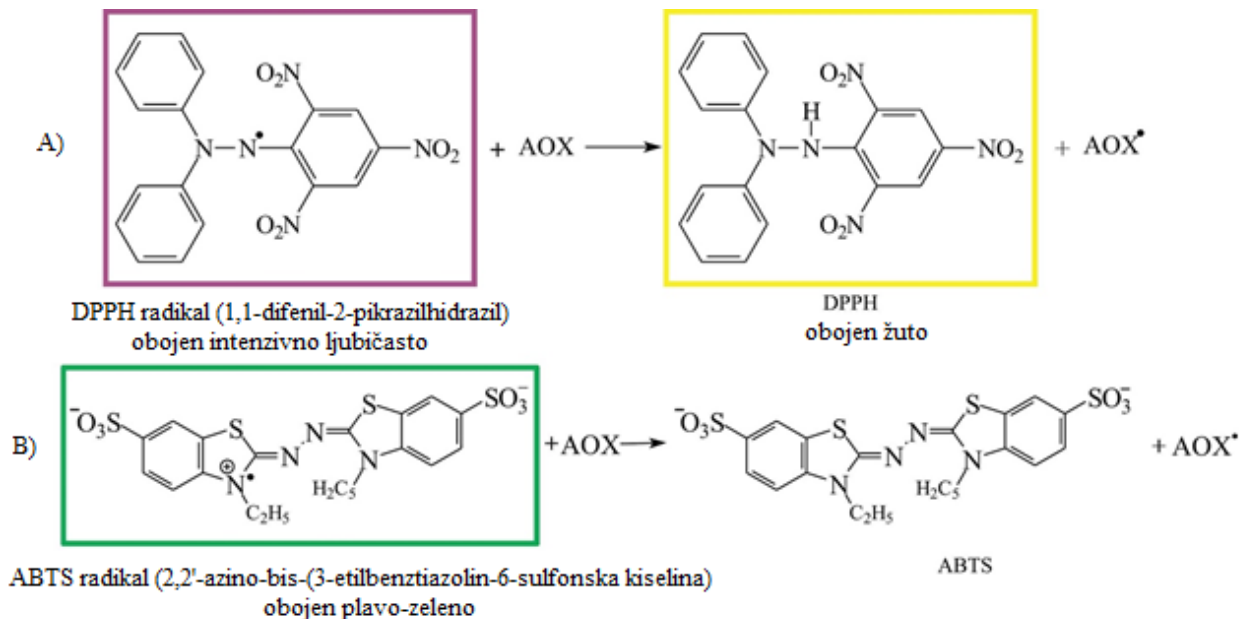
U drugoj kategoriji testova koristi se relativno stabilan reagens, koji igra ulogu stvarnog „pritiska“ oksidansa. Kada je antioksidans prisutan u reakcijskom sustavu, takav stabilni reagens specifično reagira s njim, pri čemu mu se razlika u koncentraciji može spektrofotometrijski mjeriti iz promjene u npr. apsorbanciji. Sama aktivnost antioksidansa je izravno povezana s brzinom i obimom konverzije reagensa.



Najčešće korištene metode su one koje podrazumijevaju obezbojenje stabilnih slobodnih radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH•) te 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS•<sup>+</sup>). Dodatno se u ovu skupinu ispitivanja može svrstati i metoda sa kompleksom molibdena (VI) i fosfata, koji, iako nije pravi radikal, rezultate postiže jednakim mehanizmom.

U svim slučajevima antioksidans reducira reagens, što uzrokuje značajan pomak u njegovom UV-Vis spektru. DPPH• pokazuje apsorpcijski maksimum na valnoj duljini  $\lambda_{\text{max}}$  od 517 nm, dok ABTS•<sup>+</sup> daje tri maksimuma na valnim duljinama od 414, 600 i 734 nm. S druge strane, njihovi reducirani oblici (DPPH-H i ABTS) ne pokazuju značajnu apsorbanciju u području iznad 400 nm

(Slika 2). U trećem slučaju, reakcijski produkt (plavo-zeleni kompleks fosfata i molibdena (V)) apsorbira pri valnoj duljini od 598 nm, a ne sami reaktant (Niederländer i sur,2008).



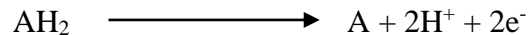
Slika 2. Shematski prikaz reakcija i promjena boje a) DPPH i b) ABTS radikala s antioksidansom (prilagođeno scielo.br)

Metode u kojima se koriste navedeni reagensi često se koriste upravo zbog jednostavnosti postavljanja i korištenja. Nadalje, HPLC-ABTS testovi su pokazali veću osjetljivost od HPLC-DPPH. S obzirom da je  $ABTS^{\bullet+}$  više topljiv u vodi nego  $DPPH^{\bullet}$ , ABTS testovi se češće koriste u analizi hidrofilnih spojeva (Koleva i sur., 2001).

### 1.3.2 Elektrokemijski testovi

Treća skupina metoda određivanja antioksidativnog učinka, elektrokemijski testovi, direktno povezuju aktivnost antioksidansa s oksidacijskim potencijalom, tj. lakoće oksidacije antioksidansa s ROS, a detektira se kulometrijski ili amperometrijski.





Antioksidansi djeluju kao reducensi, te se u otopinama lako oksidiraju na unutarnjim elektrodama. Mjerenje promjene potencijala na elektrodi daje informaciju o aktivnosti antioksidansa. Najčešće korištena elektrokemijska metoda je ciklička voltometrija, a uključuje praćenje napona radne elektrode istovremeno mjereći struju koju proizvode antioksidansi u otopini oksidirajući se na radnoj elektrodi. Proizvedena struja proporcionalna je koncentraciji antioksidansa. S obzirom na svoju jednostavnost, brzinu i mogućnost direktnog određivanja u neobrađenom biološkom uzorku, ova se metoda pokazala najprikladnijom za određivanje antioksidativne aktivnosti (Sochor i sur., 2013.).

Temelj amperometrijske metode je mjerenje električne struje koja se javlja kao posljedica oksidacije tvari na površini radne elektrode određenog potencijala. Osjetljivost ove metode određena je prirodom tvari od koje je radna elektroda izrađena te njenim potencijalom (Sochor i sur., 2013.).

#### 1.4 DPPH

DPPH ili 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal paramagnetska je molekula koja sadrži nespareni elektron na dušikovom atomu zbog čega pokazuje snažnu apsorbciju u otopini metanola pri 517 nm. Reakcijom s antioksidansom koji mu donira atom vodika nastaje stabilan hidrazinski oblik DPPH-H, što se uočava promjenom boje iz ljubičaste u žutu (shematski prikazano na slici 2) pa dolazi i do pada apsorbcije (Chandrasekar i sur., 2006.).

Metodu određivanja antioksidativne aktivnosti korištenjem DPPH radikala prvi je razvio Blois 1958. godine, a temelji se na mjerenju kapaciteta hvatanja radikala antioksidansa. DPPH sadrži karakterističan nespareni elektron koji je, za razliku od drugih radikala, delokaliziran oko cijele molekule, zbog čega ne dimerizira. DPPH se može lako reducirati primanjem elektrona ili vodikovog radikala čime nastaje stabilna dijamagnetična molekula, no vrlo se teško oksidira, a

ako se to i dogodi, ireverzibilno je. Obezbojenje uslijed redukcije radikala je u stehiometrijskom odnosu s količinom primljenim elektrona (Blois, 1958.).

Reakcija uzorka i DPPH odvija se u otopini metanol/voda budući da to olakšava ekstrakciju antioksidansa iz uzorka. Najčešće se ispitivanje izvodi pri sobnoj temperaturi kako bi se izbjegla termalna razgradnja ispitivanih tvari. Prednost ove metode je sposobnost DPPH radikala da reagira sa cijelim uzorkom, a može reagirati i sa slabim antioksidansima. Obzirom da reakcijski medij čine metanol i voda, može se koristiti za ispitivanje i hidrofilnih i lipofilnih tvari. Apsorbancija DPPH u otopini metanola ili acetona se smanjuje pod utjecajem svjetla, pa se ispitivani uzorci moraju čuvati u na tamnom mjestu. Ograničenja metode su moguće interakcije DPPH i drugih radikala, a krivulja odaziva vremena do stacionarnog stanja je nelinearna za različite odnose antioksidansa i DPPH.

Ova metoda ima niz prednosti poput brzine, jednostavnosti i niske cijene, zbog čega se široko primjenjuje za određivanje sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, doniranja vodika, kao i za procjenjivanje antioksidativne aktivnosti hrane. Nadalje, njome se mogu kvantificirati antioksidansi u kompleksnim biološkim sustavima, koristeći tekuće ili krute uzorke. Osim toga, prikladna je i za antioksidativna ispitivanja cisteina, glutaciona, askorbinske kiseline, tokoferola i polihidroksi aromatskih tvari (Kedare i Singh, 2011.).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Analgetici su jedna od najčešće korištenih skupina lijekova u svijetu, koji se koriste u svrhu ublažavanja i uklanjanja boli kod niza stanja i bolesti različite etiologije. Obzirom na njihovu široku primjenu, korisno je ispitati imaju li pojedini predstavnici ove skupine lijekova neke dodatne mehanizme djelovanja poput antioksidativnog učinka. Zanimljivo je istaknuti kako je uočena dobrobit korištenja antioksidansa u kombinaciji s analgeticima u terapiji i kontroli kronične boli.

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti antioksidativnu aktivnost slabih analgetika (ketoprofena, prokain hidroklorida, salicilne kiseline, kofeina, ibuprofena, O-acetisalicilne kiseline, paracetamola, kodein-fosfata i propifenazona) u *in vitro* uvjetima mjerenjem njihove sposobnosti hvatanja 1,1-difenil-2-pikrazilhidrazil slobodnog radikala primjenom prethodno razvijene DPPH-HPLC metode.

# **3. MATERIJALI I METODE**

## **3.1 MATERIJALI**

### **3.1.1 Kemikalije**

- 1,1-difenil-2-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**

- ibuprofen, ketoprofen (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- kodein-fosfat, kofein, prokain hidroklorid, salicilna kiselina (Kemika, Hrvatska)
- O-acetilsalicilna kiselina, paracetamol, propifenazon (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, Grefensee, 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 slabih analgetika ispitano je korištenjem HPLC-DPPH metode.

### 3.2.1 Priprema mobilne faze

Mobilna faza je pripravljena miješanjem *metanola* čistoće koja odgovara kromatografskim zahtjevima i *ultra-čiste vode* pročišćene WaterPro sustavom u omjeru 80:20.

### 3.2.2 Priprema standardnih otopina

Standardna otopina TROLOX-a pripravljena 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 otopine antioksidansa pipetiranjem odgovarajućih volumena i otapanjem do željene radne koncentracije u mobilnoj fazi. Koncentracije radnih otopina TROLOX-a iznosile su u rasponu od 0,05 do 0,30 mM u 6 koncentracijskih razina.

Otopine ispitivanih analgetika priređene su vaganjem odgovarajuće mase lijeka i otapanjem u prethodno pripravljenoj mobilnoj fazi u odmjerne tikvici klase A od 10 ml do konačne koncentracije od 1mM.

Otopina DPPH radikala pripravljena je otapanjem 25 mg DPPH reagensa u metanolu u tamnoj odmjerne tikvici klase A od 25 ml. Otopina se priprema neposredno prije uporabe i čuva na tamnom mjestu.

### 3.2.3. HPLC-DPPH metoda

Antioksidativna aktivnost uzoraka, odnosno njihova sposobnost hvatanja DPPH radikala, određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Uvjeti analize navedeni su 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, veličine čestica 3,5 μm)
MOBILNA FAZA	Metanol : ultra čista voda (80:20)
TEMPERATURA KOLONE	25°C
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)

U Eppendorf epruvetu otpipetira se 250 μl DPPH otopine i 1 ml otopine lijeka te se sadržaj dobro izmiješa na Vortex mješalici i ostavi na tamnom mjestu 30 minuta. Zatim se reakcijska otopina filtrira kroz 0,20 μm filter i injektira u tekućinski kromatograf. Izokratna elucija se provede pod uvjetima navedenim u Tablici 2.

Antioksidativna aktivnost se odredi iz razlike površine pika (engl. *Area under the curve*, AUC) otopine samog slobodnog radikala ( $AUC_0$ ) i otopine nakon reakcije radikala i uzorka ( $AUC_{uzorak}$ ), a izražava se kao ekvivalent TROLOX-a (TEAC, engl. *TROLOX equivalent antioxidant capacity*).



### **3.2.4 Statistička obrada podataka**

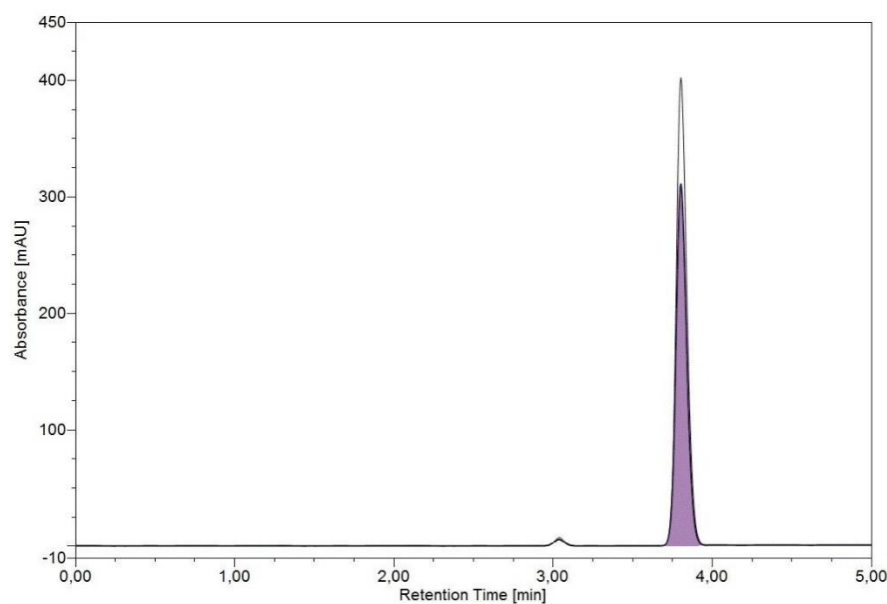
Dobiveni rezultati analizirani su pomoću deskriptivne statistike. Regresijskom analizom dobiveni su jednadžba pravca i koeficijent determinacije  $r^2$ . Računalni programi korišteni za obradu podataka bili su Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, SAD) i Statistica 12.1 (StatSoft, Inc., SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1 VALIDACIJA ANALITIČKE METODE

Prije procjene antioksidativne aktivnosti slabih analgetika, predložena HPLC-DPPH metoda je validirana prema ICH smjernicama (smjernice Međunarodne konferencije o harmonizaciji, prema engl. *International Conference of Harmonization*) s ciljem utvrđivanja njene prikladnosti te su u tu svrhu ispitani slijedeći validacijski parametri: linearnost, radno područje, točnost i preciznost.

Linearnost su definira kao mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. U ovom radu linearnost je određena mjerenjem površine pika ( $AUC_{\text{standarda}}$ ) na 6 različitih koncentracija standardnih otopina TROLOX-a u rasponu od 0,05 do 0,30 mM (Slika 3). Linearnost se može procjenjuje na dva načina: grafički i matematički. I dok je grafički prikaz ovisnosti signala o koncentraciji analita značajan zbog mogućeg vizualnog nadzora, linearnost se matematički preko linearne regresije izražava jednadžbom pravca i izračuna koeficijentom determinacije ( $r^2$ ).



Slika 3. Kromatogram otopine DPPH bez dodatka otopine TROLOX-a (bijeli pik) i nakon dodatka otopine sintetskog antioksidansa (ljubičasti pik) pri optimalnim kromatografskim uvjetima.

Nakon provedenih mjerenja u triplikatu i izračuna dobivena je jednačba pravca  $y = -3,0101x + 0,9997$  i  $r^2 = 0,9996$ . Budući da po zahtjevu koeficijentom determinacije mora iznositi više od 0,999, može se zaključiti da korištena metoda zadovoljava ovaj validacijski parametar u ispitivanom radnom području (Nigović i sur., 2014).

U validacijskom smislu, preciznost je parametar koji pokazuje slaganje između niza provedenih mjerenja iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. U ovom postupku provedeno je šest mjerenja koncentracijske razine 0,15 mM TROLOX-a u dva uzastopna dana te su dobiveni rezultati izraženi kao relativna standardna devijacija (RSD) iznosili 3,53%, odnosno 5,81%. Kriteriji prihvatljivosti za ovaj validacijski parametar ovise o koncentraciji analita koji se određuje, zatim matrici uzorka te vrsti analize.

Nakon utvrđivanja selektivnosti, linearnosti i preciznosti ispitana je točnost metode mjerenjem tri koncentracijske razine (0,05 mM, 0,15 mM i 0,30 mM) raspoređene unutar radnog područja u triplikatu. Točnost metode izražena kao analitički prinos (engl. *recovery*) bila je u rasponu između 97,9 % i 105,1%. Svi navedeni validacijski parametri odgovarali su propisanim zahtjevima.

## 4.2 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI SLABIH ANALGETIKA

Ispitana je sposobnost hvatanja DPPH radikala korištenjem navedene validirane metode u *in vitro* uvjetima za slijedećih devet slabih analgetika: ketoprofen, prokain hidroklorid, salicilna kiselina, kofein, ibuprofen, O-acetilsalicilna kiselina, paracetamol, kodein fosfat te propifenazon. Antioksidativna aktivnost određena je iz razlike površine pika otopine DPPH radikala ( $AUC_{DPPH}$ ) i otopine nakon reakcije DPPH radikala i uzorka ( $AUC_{UZORAK}$ ) te je izražena na TAEC. Dobiveni rezultati analize prikazani su u Tablici 3.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako se antioksidativna aktivnost ispitivanih analgetika kretala u intervalu od 0,005 mM do 0,247 mM TROLOX-a. Predloženom HPLC-DPPH metodom utvrđena je izražena antioksidativna aktivnost paracetamola u odnosu na ostale ispitivane analgetike.

Tablica 3. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti slabih analgetika.

<b>LIJEK</b>	<b>KONCENTRACIJA (mM)</b>	<b>TEAC (mM)</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>KETOPROFEN</b>	1,104	0,010	2,04
<b>PROKAIN HIDROKLORID</b>	1,014	0,045	7,93
<b>SALICILNA KISELINA</b>	1,043	0,044	8,73
<b>KOFEIN</b>	1,118	0,008	1,99
<b>IBUPROFEN</b>	1,068	0,010	1,82
<b>O- ACETILSALICILNA KISELINA</b>	1,127	0,025	6,01
<b>PARACETAMOL</b>	1,036	0,247	16,43
<b>KODEIN FOSFAT</b>	1,017	0,022	4,56
<b>PROPIFENAZON</b>	1,014	0,005	2,08

Ovi rezultati su u skladu s malobrojnim dostupnim literaturnim podacima. Borges i sur. (2014) su u svom istraživanju procjenjivali antioksidativnu aktivnost paracetamola i salicilne kiseline u eksperimentalnim i teorijskim studijama. U zaključku navode da je, iako su oba spoja fenolni derivati, paracetamol pokazao izraženija antioksidativnih svojstava od salicilne kiseline na nekoliko modela koji su uzrokovani oksidativni stres. Jedan od teorijskih mehanizama pokazao je kako je prijenos vodika odgovoran za izraženiji antioksidativni učinak kod paracetamola.

S druge strane, u dostupnoj stručnoj i znanstvenoj literaturi brojni su primjeri toksičnosti paracetamola koji se široko koristi kao analgetik i antipiretik. Iako naizgled siguran, ako se koristi u normalnim terapijskim dozama, veće doze paracetamola mogu uzrokovati ozbiljna oštećenja jetre i/ili bubrega kod ljudi i pokusnih životinja. Kao što je navedeno u uvodu, uočena je dobrobit kombinirane upotrebe analgetika i antioksidansa kod terapije kronične boli (Acharya i sur., 2009.; Chung i sur., 2006.; Blaise i Taha, 2012.; Kim i sur., 2004.).

Budući da se u dostupnoj stručnoj literaturi ne nalaze jasni podaci o antioksidativnoj aktivnosti slabih analgetika, potrebno je provesti dodatna istraživanja drugim metodama te uključiti i druge predstavnike ove široko primjenjivane skupine lijekova. Osim toga potrebno je dodatno naglasiti da je predložena HPLC-DPPH metoda bila učinkovita, jednostavna i brza za ispitivanje antioksidativnog učinka slabih analgetika.

# **5. ZAKLJUČAK**

Cilj ovog rada obrazložen je u poglavlju 2. Na temelju provedene analize i dobivenih rezultata moguće je zaključiti slijedeće:

- (i) Predložena HPLC-DPPH metoda validirana je prema važećim ICH smjericama te je utvrđeno kako je metoda linearna, točna i ponovljiva u ispitivanom radnom području.
- (ii) HPLC-DPPH metoda pokazala se brzom i prikladnom za određivanje antioksidativne aktivnosti slabih analgetika.
- (iii) Paracetamol je pokazao izraženu antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uvjetima.
- (iv) U narednim istraživanjima potrebno je ispitati antioksidativnu aktivnost drugih analgetika.
- (v) Potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti analgetika primjenom drugih metoda.



# **6. LITERATURA**

Baza Lijekova, 2019, www.halmed.hr, pristupljeno 11.09.2019.

Bazinet L, Doyen A. Antioxidants, mechanisms and recovery by membrane processes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2015, 57(4), 4-11.

Bhardwaj P, Garg PK, Maulik SK, Saraya A, Tandon RK, Acharya SK. A randomized controlled trial of antioxidant supplementation for pain relief in patients with chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 2009, 136(1), 149-159.

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

Borges RS, Barros1TG, Pereira GAN, Batista J, Beleza Filho RFGP, Veiga AAS, Hamoy M, Mello VJ, da Silva ABF, Barros CAL. A structure and antioxidant activity study of paracetamol and salicylic acid. *Pharmacology & Pharmacy*, 2014, 5, 1185-1191.

Chandrasekar D, Madhusudhana K, Ramakrishna S, Diwan PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(2), 460-464.

Gao X, Kim HK, Chung JM, Chung K. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. *Pain*, 2007, 131, 262-271.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, 2015, 77-79.

Józwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. *Acta pol pharm*, 2014, 71, 11-23.

Katzung BD. Basic and clinical pharmacology. San Francisco, McGraw-Hill Education, 2018, 643-644.

Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 2011, 48(4), 412-422.

Kim HK, Park SK, Zhou JL, Taglialatela G, Chung K, Coggeshall RE, Chung JM. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 2004, 111, 116-124.

Knights KM, Mangoni AA, Miners JO. Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2010, 3, 769-776.

Koleva II, Niederländer HA, van Beek TA. Applications of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Anal chem*, 2001, 73(14), 3373-3381.

Mehta SK, Gowder SJT. Members of antioxidant machinery and their functions. U: Basic principles and clinical significance of oxidative stress. Gowder, IntechOpen, 2015, 17.

Niederländer HAG, van Beek TA, Bartasiute A, Koleva II. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, 1210(2), 121-134.

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

Pain terms, 2017, [www.iasp-pain.org](http://www.iasp-pain.org), pristupljeno 06.08.2019.

Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale's Pharmacology. Elsevier, 2016, 527.

Rao PS, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free Rad Antiox*, 2011, 4, 2-5.

Sies H. Strategies of antioxidant defence. *Eur J Biochem*, 1993, 215, 213-219.

Smjernice o uporabi opioida za liječenje kronične nekarcinomske boli, 2014, [www.hdlb.org](http://www.hdlb.org), pristupljeno 06.08.2019.

Sochor J, Dobes J, Krystofova O, Ruttikay-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, 8, 8464-8489.

Taha R, Blaise GA. Update on the pathogenesis of complex regional pain syndrome: role of oxidative stress. *Can J Anaesth*, 2012, 59, 875-881.

Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 5165-5170.

# **7. SAŽETAK/SUMMARY**

Bol je složen, neugodan senzorni i emocionalni doživljaj koji se javlja kao direktni odgovor na stvarno ili potencijalno oštećenje tkiva. Analgetici se koriste u svrhu ublažavanja i uklanjanja boli kod niza stanja i bolesti različite etiologije. Obzirom na njihovu široku i čestu primjenu, korisno je ispitati imaju li predstavnici ove skupine lijekova dodatna mehanizme djelovanja poput antioksidativnog učinka.

Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidativnu aktivnost devet analgetika u *in vitro* uvjetima mjerenjem njihove sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala.

U ovom radu je za procjenu antioksidativne aktivnosti 1 mM otopine analgetika korištena HPLC-DPPH metoda, koja se temelji na mjerenju sposobnosti hvatanja slobodnog radikala u prisustvu ispitivanog lijeka. Antioksidativna aktivnost izražena je kao ekvivalent standarda TROLOX-a.

Dobiveni rezultati ukazuju na izraženu antioksidativnu aktivnost paracetamola.

Korištena HPLC-DPPH metoda pokazala se jednostavnom, brzom i učinkovitom za ispitivanje antioksidativne aktivnosti slabih analgetika s ciljem ispitivanja njihovog dodatnog mehanizma djelovanja.

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage. Analgesics are used for relieving or removing pain in number of conditions and illnesses with various etiology. Since they are widely and frequently used, it is useful to examine if they potentially have additional effects, especially antioxidant.

The aim of this thesis was to examine antioxidant properties of nine nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by measuring their ability to scavenge DPPH radical *in vitro*.

Method used for estimating antioxidant activity of 1 mM analgesic solutions in this research was HPLC-DPPH method, which is based on measuring the ability to scavenge free radicals in the presence of sample. Antioxidant capacity is expressed as the TROLOX equivalent.

Experimental data indicate that paracetamol has antioxidant activity.

The HPLC-DPPH method has been proven as simple, fast and efficient for antioxidant activity assays of NSAIDs with the purpose of examining their potential additional mechanisms of action.

## 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 ANALGETIKA HPLC-DPPH METODOM

Lara Šujansky

#### SAŽETAK

Bol je složen, neugodan senzorni i emocionalni doživljaj koji se javlja kao direktni odgovor na stvarno ili potencijalno oštećenje tkiva. Analgetici se koriste u svrhu ublažavanja i uklanjanja boli kod niza stanja i bolesti različite etiologije. Obzirom na njihovu široku i čestu primjenu, korisno je ispitati imaju li predstavnici ove skupine lijekova dodatna mehanizme djelovanja poput antioksidativnog učinka. Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidativnu aktivnost devet analgetika u *in vitro* uvjetima mjerenjem njihove sposobnosti hvatanja DPPH slobodnog radikala. U ovom radu je za procjenu antioksidativne aktivnosti 1 mM otopine analgetika korištena HPLC-DPPH metoda, koja se temelji na mjerenju sposobnosti hvatanja slobodnog radikala u prisustvu ispitivanog lijeka. Antioksidativni aktivnost izražen je kao ekvivalent standarda TROLOX-a. Dobiveni rezultati ukazuju na izraženu antioksidativnu aktivnost paracetamola. Korištena HPLC-DPPH metoda pokazala se jednostavnom, brzom i učinkovitom za ispitivanje antioksidativne aktivnosti slabih analgetika s ciljem ispitivanja njihovog dodatnog mehanizma djelovanja.

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

Rad sadrži: 34 stranice, 3 grafička prikaza, 3 tablice i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: analgetici, 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. Biljana Nigović**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Cvijeta Jakobušić Brala**, *docentica 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 ANALGESICS BY HPLC-DPPH METHOD

Lara Šujansky

#### SUMMARY

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage. Analgesics are used for relieving or removing pain in number of conditions and illnesses with various etiology. Since they are widely and frequently used, it is useful to examine if they potentially have additional effects, especially antioxidant. The aim of this thesis was to examine antioxidant properties of nine nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by measuring their ability to scavenge DPPH radical *in vitro*. Method used for estimating antioxidant activity of 1 mM analgesic solutions in this research was HPLC-DPPH method, which is based on measuring the ability to scavenge free radicals in the presence of sample. Antioxidant capacity is expressed as the TROLOX equivalent. Experimental data indicate that paracetamol has antioxidant activity. The HPLC-DPPH method has been proven as simple, fast and efficient for antioxidant activity assays of NSAIDs with the purpose of examining their potential additional mechanisms of action.

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

Thesis includes: 34 pages, 3 figures, 3 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Analgesics, 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  
**Biljana Nigović, Ph.D.** / *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Cvijeta Jakobušić Brala, Ph.D.** / *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.