

# Određivanje antioksidativne aktivnosti aminosalicilata HPLC-DPPH metodom

---

**Pavić, Borna**

**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:163:536318>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-02-28**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Borna Pavić**

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

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk.

Rad je dijelom financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost projekt: Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva [HRZZ-UIP-2017-05-3949].



*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ani Mornar Turk, na posvećenom vremenu, stručnom vodstvu i savjetima kojima mi je pomogla u uspješnoj izradi ovog diplomskog rada.*

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

*Zahvaljujem se Danieli Amidžić-Klarić, mag. pharm. i Đurđici Nestić, tehničkoj suradnici, na pomoći oko interpretacije dobivenih rezultata.*

*Najsrdanije se zahvaljujem cijelom Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova na velikoj dobroti, razumijevanju i strpljenju koje su mi pružili tijekom izrade ovog rada. Neizmjereno im hvala na svakoj toploj i iskrenoj riječi koje su mi uputili.*

*Velika hvala mojim roditeljima te braći Mislavu i Lenardu na podršci i bezuvjetnoj ljubavi koje su mi davali tijekom ovog razdoblja studiranja.*

*Zahvaljujem se i svim ostalim profesorima, asistentima i kolegama na FBF-u koji su na bilo koji način sudjelovali u mojem stjecanju znanja tijekom školovanja.*

*Hvala dragom Bogu da ove riječi mogu upisivati u rujnu 2019. godine.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Aminosalicilati</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Antioksidansi</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3. Metode određivanja antioksidativne aktivnosti</b> .....	<b>7</b>
1.3.1. Testovi oksidacije supstrata .....	7
1.3.2. Testovi oksidacije reagensa .....	8
1.3.3. Elektrokemijski testovi.....	9
<b>1.4. DPPH</b> .....	<b>10</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. Materijali</b> .....	<b>14</b>
3.1.1. Kemikalije .....	14
3.1.2. Uzorci .....	14
3.1.3. Radni instrumenti .....	14
3.1.4. Pribor i posuđe .....	14
3.1.5. Računalni programi .....	15
<b>3.2. Metode</b> .....	<b>15</b>
3.2.1. Priprema pokretne faze .....	15
3.2.2. Priprema standardnih otopina.....	15
3.2.3. HPLC-DPPH metoda .....	15
3.2.4. Statistička obrada podataka .....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>17</b>
4.1. Validacija analitičke metode.....	18
4.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti aminosalicilata.....	20
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>23</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>28</b>
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

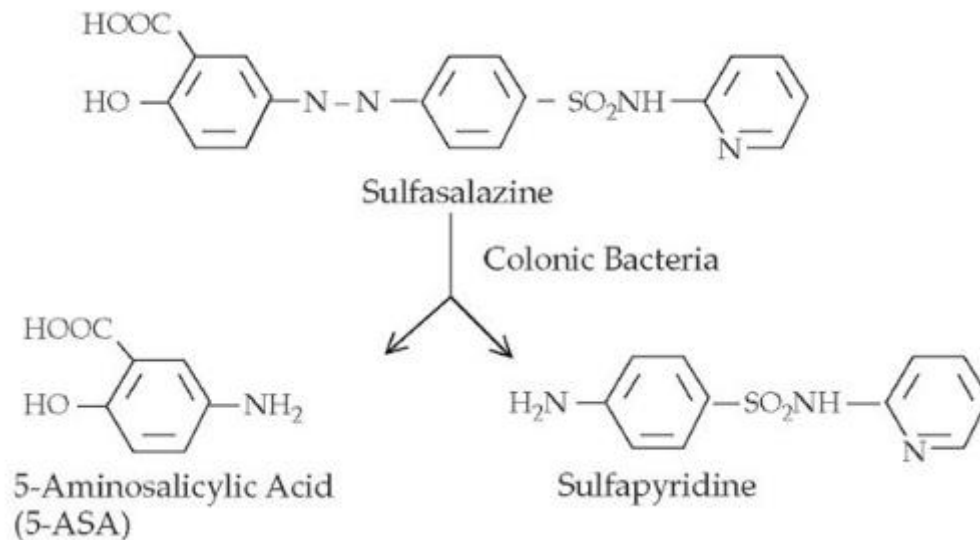
# **1. UVOD**

## 1.1. AMINOSALICILATI

Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) obuhvaćaju skupinu kroničnih poremećaja koji uzrokuju upalu i ulceraciju tankog i debelog crijeva. Etiologija IBD-a ostaje nejasna, ali se zna da oksidacijski stres ima ključnu ulogu u oštećenju tkiva i bioloških membrana. Pripada u skupinu autoimunih bolesti. Većina IBD-a može biti klasificirana kao ulcerozni kolitis i Crohnova bolest. Kod ulceroznog kolitisa dolazi do ulceracija i upala unutarnjeg pokrova kolona i rektuma, dok je kod Crohnove bolesti prisutna kronična upala gastrointestinalnog trakta (GIT) koja zahvaća većinom tanko crijevo posebno ileum (donji dio tankog crijeva) i dio debelog crijeva. Kod Chronove bolesti upala prodire u dublje slojeve stijenke i zato je po svojoj patofiziologiji opasnija od ulceroznog kolitisa. Uzrokuju slične simptome koji često podsjećaju na druga stanja poput sindrom iritabilnog crijeva, pa je postavljanje dijagnoze katkad dugotrajno. Većinom se javlja kod osoba bijele rase i životne dobi od 20 do 40 godina. Simptomi koji se javljaju kod IBD-a su: abdominalna bol, krvarenja i dijareje. IBD je bolest s složenom etiologijom tako da značajnu ulogu u razvoju imaju genetski faktori i faktori okoliša; stres, infekcije (*E.coli* i *Mycobacterium*) te pušenje. Imunosne stanice stvaraju veliku količinu citokina TNF-alfa koje onda djeluju na endotelne stanice, te tako nastaju upala i pretjerana angiogeneza (rast novih krvnih žila). Te žile lako pucaju pa posljedično nastaju velika krvarenja i krv u stolici (Ye i van Langenberg, 2015). U liječenju IBD-a koristi se niz različitih skupina lijekova.

Aminosalicilati se koriste već 60 godina u liječenju IBD-a, te je među njima najpoznatiji sulfasalazin. U 30-im godinama 20. stoljeća, jedan švedski liječnik otkrio je sulfasalazin, te ga je koristio kod liječenja pacijenata s reumatoidnim artritismom. Neki od tih pacijenata su ujedno bolovali i od ulceroznog kolitisa, pa se uzimanjem sulfasalazina njihovo stanje začuđujuće poboljšalo. Posljedično se sulfasalazin počeo koristiti u pacijenata s IBD-om. Sulfasalazin je azo derivat salicilne kiseline i hidrofilna azo-boja koja se reducira enzimima mikroflore (azo-reduktazama) pri čemu se cijepa njegova azo veza. Tako nastaju 5-aminosalicilna kiselina (5-ASA, mesalazin kao protuupalni lijek) i sulfapiridin (antibakterijski lijek, antagonist *p*-aminobenzojeve kiseline). Reducira se u polarne, netoksične metabolite koji se brzo izlučuju. Apsorpcija sulfasalazina je polagana, pa samim time kod upalnih bolesti crijeva terapijski djeluje u debelom crijevu. Sulfapiridin se apsorbira gotovo u potpunosti u debelom crijevu i zatim acetilira u jetri te se izlučuje urinom. Apsorbirana 5-ASA se brzo acetilira u neaktivni metabolit, N-acetil-5-ASA, pomoću enzima N-acetiltransferaze-1 (NAT-1) u epitelnim

stanicama crijeva, jetre i bubrega te se izlučuje urinom. S druge strane, gotovo 50% 5-ASA se izlučuje fecesom (Ye i van Langenberg, 2015).



Slika 1. Razgradnja azo veze sulfasalazina na sulfapiridin i mesalazin djelovanjem azo-reduktaza mikroflore (preuzeto s mrežne stranice [www.medbullets.com](http://www.medbullets.com)).

Neželjene pojave kod sulfasalazina, koje potječu od sulfapiridina, su mnogobrojne zbog čega se sve manje koristi u terapiji IBD-a. Štetni učinci sulfasalazina imaju visoku pojavnost, a većina nastaje zbog sistemskih učinaka, a pogotovo u ljudi koji su spori acetilatori. Česte nuspojave su glavobolja, mučnina, povraćanje, bolovi u zglobovima i mišićima te alergijske reakcije. Nadalje, može doći do razvoja trombocitopenije. Kod upotrebe ovih lijekova potrebna je nadoknada folne kiseline jer ometaju apsorpciju folata u crijevima. Kada se promatraju nuspojave lijekova druge generacije, neželjena djelovanja su značajno rijetka pa se takvi lijekovi lakše podnose (Bonovas i sur., 2017; Polak, O'Callaghan, Oaten 2019; Jones i sur., 2019).

Zbog činjenice da se 80% 5-ASA apsorbira u proksimalnim dijelovima tankog crijeva (gornji jejunum), te da zbog toga manje od 20% dospije do distalnih dijelova tankog crijeva, a do kolona još manja količina, razvijene su formulacije koje omogućuju dolazak 5-ASA i u distalnije dijelove tankog crijeva (Ye i van Langenberg, 2015).

Glavni cilj mnogih formulacija na tržištu je postići optimalnu dostavu lijeka u debelo crijevo i minimalizirati sistemsku apsorpciju. Tako se omogućava maksimalna terapijska učinkovitost pri nižoj dozi, te se posljedično smanjuje mogućnost nastanka nuspojava.

U razvijenim formulacijama, mesalazin je sintetiziran kao prolijek na način da je vezan azo vezom s nekom transportnom molekulom ili još jednom molekulom mesalazina. Tako se sprječava apsorpcija lijeka u gornjim dijelovima gastrointestinalnog sustava. Azo veza posljedično puca djelovanjem azo reduktaza mikroflora u debelom crijevu, otpuštajući aktivnu tvar mesalazin. U ovu skupinu prolijekova spadaju sulfasalazin, olsalazin i balsalazid.

U molekuli sulfasalazina, mesalazin je aktivni dio dok je sulfapiridin neaktivna molekula nosača. Sistemska apsorpcija sulfapiridina je odgovorna za mnoge nuspojave povezane sa sulfasalazinom. Gotovo 20% pacijenata je intolerantno. Drugi prolijekovi s azo vezom su napravljeni s drugim molekulama nosača kako bi se smanjila učestalost pojave nuspojava. Olsalazin se sastoji od 2 molekule mesalazina povezane međusobno azo vezom, dok se balsalazid sastoji od mesalazina povezanog sa 4-aminobenzoil- $\beta$ -alaninom. Oba prolijeka su pokazala bolji učinak u liječenju pacijenata s ulceroznim kolitisom. Sulfasalazin, olsalazin, balsalazid (prolijekovi vezani azo vezom) se oslobađaju u kolonu. Sulfasalazin je slabo tolerantan u usporedbi s drugim oblicima mesalazina. Jedna studija je pokazala kako je 28% pacijenata liječenih sa sulfasalazinom imalo nuspojave, dok se taj postotak znatno smanjio kod pacijenata liječenih s drugim oblicima mesalazina. U zaključku se navodi kako je sulfapiridin tvar koja uzrokuje najviše nuspojava (Ye i van Langenberg, 2015).

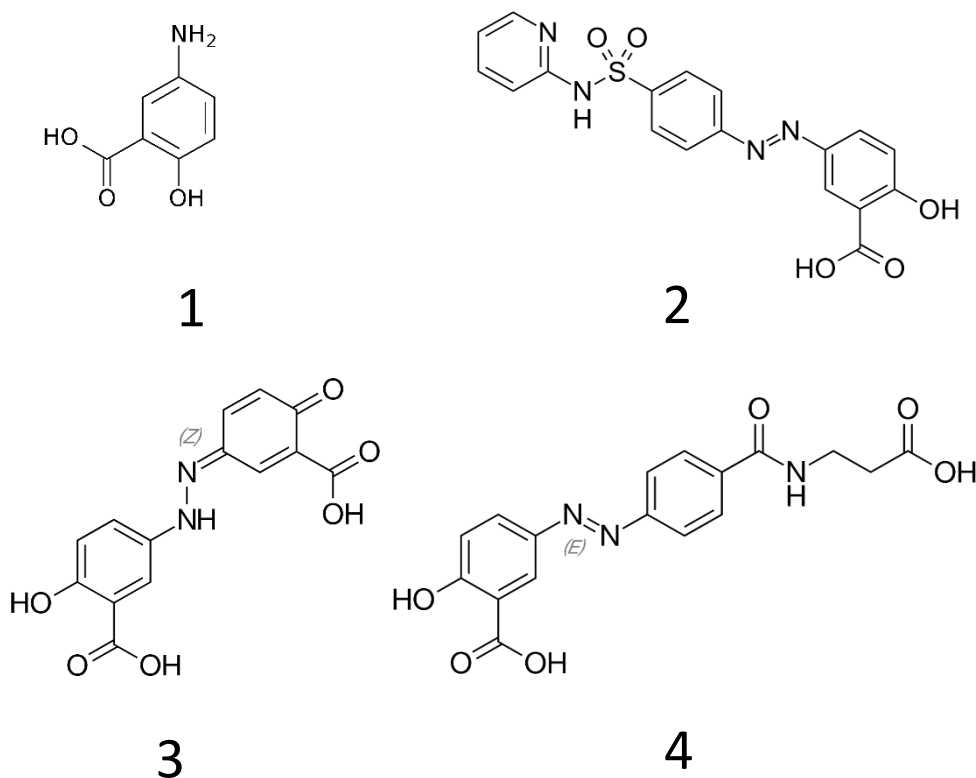
Primarni učinak 5-ASA je inhibicija sinteze prostaglandina i leukotriena putem inhibicije COX enzima i lipooksigenaze. Također, inhibira NF- $\kappa$ B koji je važan za ekspresiju proupalnih citokina. Osim toga, smanjuje kemotaksiju neutrofila i proliferaciju T-stanica, a može inhibirati i funkciju stanica prirodnih ubojica i makrofaga. Ukratko, 5-ASA lijekovi induciraju i održavaju remisiju, odnosno razdoblje bez simptoma, te se smatraju lijekovima prvog izbora u liječenju aktivnog ulceroznog kolitisa. Njihova djelotvornost ovisi o postizanju visokih doza na mjestu aktivne bolesti (Ye i van Langenberg, 2015).

Mesalazin se može naći i u obliku mikrogranula s odgođenim otpuštanjem (*Pentasa*, tableta s produljenim oslobađanjem sadržava 500 mg mesalazina) ili u obliku želučanootpornih tableta (*Salofalk*, želučanootporna tableta sadrži 500 mg mesalazina). Danas su na tržištu registrirani i pripravci presvučeni pH osjetljivom smolom (*Asacol* i *Lialda*) koja se otapa pri pH 7 (distalni ileum i proksimalni dijelovi kolona). Od ostalih farmaceutskih oblika treba istaknuti kako 5-ASA postoji i u obliku čepića (*Canasa*) za liječenje proktitisa (upala sluznice rektuma) (Ye i van Langenberg, 2015).

Osim inhibicije sinteze prostaglandina i leukotriena te redukcije kemotaksije neutrofila, pokazalo se kako 5-ASA ima antioksidativna svojstva tako da uklanja slobodne radikale odgovorne za patogenezu IBD-a. Prema dostupnim literaturnim podacima 5-ASA ima najveću



antioksidativnu aktivnost, a odmah iza njega je sulfasalazin. S druge strane, balsalazid i olsalazin su pokazali značajno manju antioksidativnu aktivnost. Unatoč svemu, antioksidativna aktivnost može biti dio terapijskog učinka sulfasalazina, olsalazina i balsalazida, iako je taj učinak u obliku prolijeka puno slabiji nego kod same 5-ASA.



Slika 2. Kemijska struktura aminosalicilata:

mesalazin (1), sulfasalazin (2), olsalazin (3) i balsalazid (4)

(preuzeto s mrežne stranice [www.pubchem.com](http://www.pubchem.com)).

## 1.2. ANTIOKSIDANSI

Reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) su kemijski reaktivne molekule koje nastaju redukcijom molekuskog kisika (Beckhauser i sur., 2016). Reakcije aerobnog metabolizma stvaraju ove spojeve u organizmu, a mogu biti generirani kao stanični odgovor na različite ksenobiotike, citokine ili bakterijske invazije (Ray i sur., 2012). U normalnim fiziološkim okolnostima, tijekom oksidativnog metabolizma mitohondrija, dio elektrona se može odvojiti od lanca za prijenos elektrona i reagirati s molekulskim kisikom stvarajući reaktivne kisikove spojeve. Neki od važnijih biološki važnih ROS uključuju: superoksidni anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), singlet-kisik ( $O_2^1\Delta_g$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipokloritnu kiselinu (HOCl), hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) te peroksi i alkoksi radikale. Treba istaknuti da osim ROS, mogu nastati i reaktivni dušikovi spojevi (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) od kojih su najvažniji radikali dušikovog monoksida ( $NO\bullet$ ) i dušikovog dioksida ( $NO_2\bullet$ ) (Gomes i sur., 2006). Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi mogu na različite načine izazvati oštećenje stanice što u konačnici rezultira oštećenjem DNA, lipidne peroksidacije, oksidacije aminokiselina u proteinima ili deaktivacije enzima oksidirajući različite kofaktore. Osim toga, brojni čimbenici poput bolesti, lijekovi, malnutricije, zagađenja mogu dodatno utjecati na produkciju i djelotvornost ROS i RNS što u konačnici dovodi do pojave oksidativnog stresa (Niederländer i sur., 2008). Oksidativni stres može se definirati kao neravnoteža između stvaranja reaktivnih kisikovih radikala i antioksidativnog kapaciteta stanice. Smatra se da oksidativni stres ima značajnu ulogu u karcinogenezi, mutagenezi, procesu starenja te posreduju u nastanku niza drugih bolesti poput upalnih bolesti crijeva, ateroskleroza, Alzheimerova bolest, karcinom, reumatoidni artritis (Sies, 1993.; Niederländer i sur., 2008).

U obrani od oksidativnog stresa stanice sadrže različite enzime i antioksidanse u cilju sprječavanja štetnih učinaka koje ROS mogu izazvati u pojedinim staničnim odjeljcima. Antioksidans se definira kao tvar koja prisutna u nižoj koncentraciji u odnosu na spoj koji se oksidira, znatno odgađa, sprječava ili uklanja oksidaciju te tvari. Na taj način antioksidansi inhibiraju inicijaciju ili propagaciju lančanih reakcija oksidacije (Wang i Zheng, 2001). Ovi zaštitni mehanizmi djeluju zajednički, u međusobnoj suradnji, u obliku kaskade. Mnogobrojne su podjele spojeva s antioksidacijskom aktivnošću, a klasificiraju se prema podrijetlu (endogeni, egzogeni) i mjestu djelovanja (stanični, izvanstanični, membranski), prema topljivosti (u vodi ili lipidima), na enzime i male molekule (Čvorišćec i Čepelak, 2009). Prema načinu djelovanja antioksidanse možemo podijeliti na:

- (i) primarne (preventivni) antioksidanse koji sprječavaju nastanak slobodnih radikala poput albumina, transferina i drugih
- (ii) sekundarne (čistači) antioksidanse koji uklanjaju nastale slobodne radikale poput superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation, vitamin C, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi te
- (iii) tercijarne (enzimi popravka) antioksidanse koji popravljaju nastala oštećenja ili uklanjaju biomolekule oštećene radikalima prije nego njihovo nakupljanje uzrokuje nova oštećenja (fosfolipaze, proteaze, peptidaze, DNA polimeraza I i drugi).

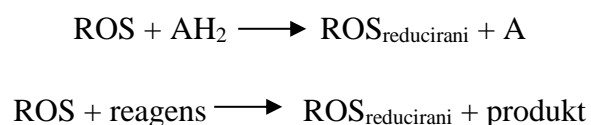
Antioksidansi djeluju na različitim razinama u oksidacijskom putu koji uključuje molekule lipida. Mehanizam njihovog djelovanja uključuje mogućnost smanjivanja koncentracije kisika, uklanjanje singletnog kisika, uklanjanje metalnih iona, sprječavanje inicijacijske reakcije uklanjanjem inicijalnih radikala kao što je hidroksilni radikal, ali i poticanje raspadanja primarnih produkata oksidacije na ne-radikalne spojeve i prekid lančane reakcije (Huang i sur., 2005; Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

### 1.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

U dostupnoj znanstvenoj literaturi postoje brojni načini određivanja antioksidativne aktivnosti različitih spojeva i složenih matrica poput biljnih ekstrakata. Ove metode mogu podijeliti u tri osnovne skupine: (i) testovi oksidacije supstrata, (ii) testovi oksidacije reagensa i (iii) elektrokemijski testovi.

#### 1.3.1. Testovi oksidacije supstrata

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



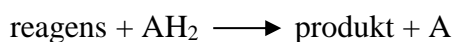
Kao reaktivni kisikovi spojevi koriste se singlet kisik, vodikov peroksid i superoksidni anion.

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

Određivanje aktivnosti antioksidansa koja se temelji na sposobnosti hvatanja vodikovog peroksida, odnosno superoksidnog aniona kao ROS temelji se na sličnom mehanizmu - kemiluminiscenciji luminola induciranoj navedenim ROS. Međutim, koriste se različite metode inicijacije. Ovaj se test zbog čestih interferencija koristi samo kao indikativna metoda ispitivanja antioksidativne aktivnosti. Nadalje, zbog slabe osjetljivosti i skupih reagensa, prednost se daje testovima oksidacije reagensa (Niederländer i sur., 2008).

### 1.3.2. Testovi oksidacije reagensa

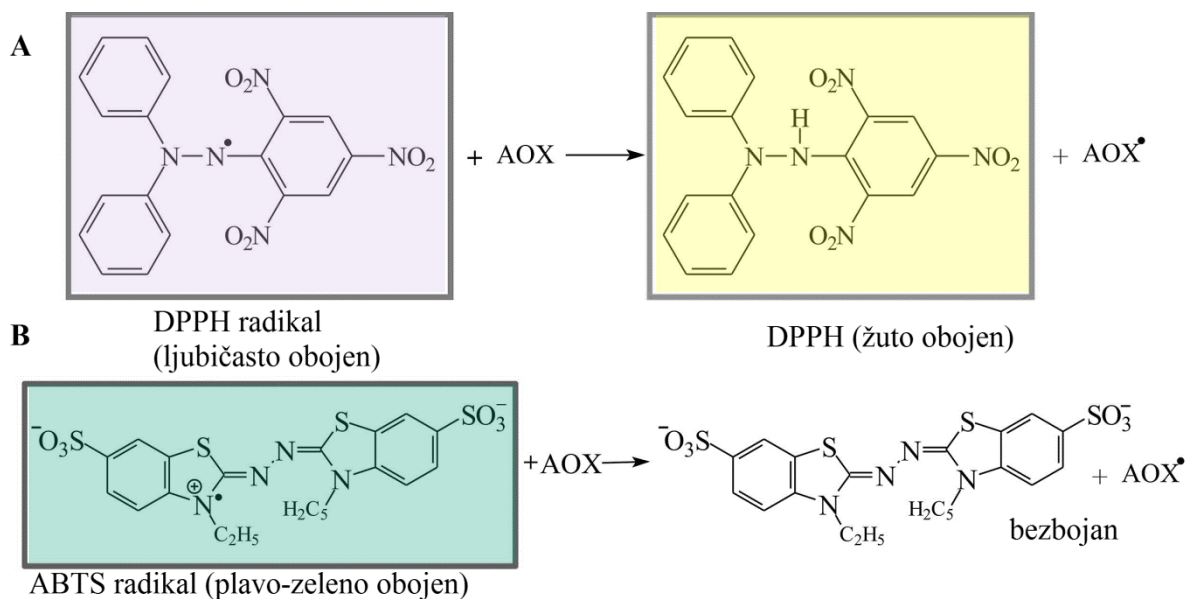
U drugoj skupini testova primjenjuju se relativno stabilni spojevi koji reagiraju s antioksidansom na specifičan način pri čemu dolazi do promjena koje možemo mjeriti poput promjene u UV-Vis apsorpcijskom spektru:



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

Nakon redukcije s antioksidansom čija se aktivnost ispituje, navedenim reagensima dolazi do pomaka u Uv-Vis apsorpcijskom spektru. Radikal DPPH<sup>\*</sup> apsorbira u vidljivom spektru ( $\lambda_{\text{max}}$  na 517 nm), dok radikal ABTS<sup>•+</sup> pokazuje maksimum apsorpcije na tri valne duljive (414, 600 i 734 nm) (Slika 3). Njihovi reducirani, ne-radikalni oblici, DPPH-H i ABTS, ne pokazuju apsorpciju iznad 400 nm. Budući da je ABTS<sup>•+</sup> radikal bolje topljiv u vodi od DPPH<sup>\*</sup>

radikala, ABTS testovi češće se koriste u analizi hidrofilnih antioksidansa (Niederländer i sur., 2008).



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

### 1.3.3. Elektrokemijski testovi

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

Među voltametrijskim testovima najčešće korišten test je ciklička voltametrija koja mjeri napon radne elektrode dok snima struju uzrokovanu antioksidansima u otopini koji se oksidiraju na površini radne elektrode. Proizvedena struja proporcionalna je koncentraciji antioksidansa. Ciklička voltametrija na ugljikovoj elektrodi je prikladna metoda određivanja antioksidativne aktivnosti zbog jednostavnosti i brzine. Kao posebna prednost metode ističe se njena mogućnosti da direktno ispituje biološke i neobrađene uzorke.

Amperometrijska metoda se zasniva na mjerenju intenziteta struje koja putuje između radne i referentne elektrode pri konstantnom potencijalu, a nastaje zbog oksidacije odnosno

redukcije elektroaktivnog analita. Osjetljivost ove metode prvenstveno određuju priroda radne elektrode i primijenjeni napon (Sochor i sur., 2013).

#### 1.4. DPPH

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

Zbog svog nesparenog elektrona DPPH radikal pokazuje jaku apsorbanciju na valnoj duljini od 517 nm, koja nakon reakcije s antioksidansom opada. Ova metoda je jednostavna, brza i široko primjenjivana metoda za mjerenje antioksidativne sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala i doniranja vodikovih atoma, te antioksidativne aktivnosti hrane. Izvodi se u otopini metanola/voda što olakšava ekstrakciju antioksidansa iz uzorka. Prednost metode je da DPPH reagira čak i sa slabim antioksidansima. Nadalje, moguće ju je koristiti za ispitivanje hidrofилnih i lipofilnih antioksidansa budući da uključuje korištenje polarnih i nepolarnih otapala. Učinkovitost antioksidansa mjeri se na sobnoj temperaturi da se izbjegne njegova razgradnja (Hung i sur., 2005). Kao glavno ograničenje metode ističe se interakcija DPPH s drugim radikalima. Također je potrebno istaknuti kako krivulja odziva vremena do stacionarnog stanja nije linearna s različitim omjerima antioksidansa (Kedare i Singh, 2011).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Upalne bolesti crijeva obuhvaćaju skupinu kroničnih poremećaja koji uzrokuju upalu i ulceraciju tankog i debelog crijeva. Etiologija IBD-a ostaje nejasna, ali se zna da oksidacijski stres ima ključnu ulogu u oštećenju tkiva i bioloških membrana ovih autoimunih bolesti koje se mogu klasificirati kao ulcerozni kolitis i Crohnova bolest.

Aminosalicilati se koriste više od 60 godina u liječenju IBD-a. U dosadašnjim istraživanjima pokazano je da 5-ASA posjeduje antioksidativna svojstva i potencijalno je sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala koji su odgovorni za patogenezu IBD.

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 te
- (ii) utvrditi antioksidativnu aktivnost aminosalicilata (mesalazina, sulfasalazina, olsalazina i balsalazida) u *in vitro* uvjetima mjereći njihovu sposobnost hvatanja slobodnog radikala DPPH radikala koristeći navedenu metodu.



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

### **3.1.MATERIJALI**

#### **3.1.1. Kemikalije**

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

#### **3.1.2. Uzorci**

- mesalazin, sulfasalazin, olsalazin i balsalazid, European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard, (Sigma-Aldrich, Njemačka)

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

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

#### **3.1.4. Pribor i posuđe**

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Boce za pokretnu 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 aminosalicilata provedeno je primjenom HPLC-DPPH metode.

### 3.2.1. Priprema pokretne faze

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

### 3.2.2. Priprema standardnih otopina

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

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 pokretnoj fazi. Koncentracije radnih otopina TROLOX-a bile su u rasponu od 0,05 do 0,30 mM u 6 koncentracijskih razina.

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

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

### 3.2.3. HPLC-DPPH metoda

Sposobnost hvatanja DPPH radikala određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Kromatografski uvjeti navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. 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 $\mu\text{m}$ )
Temperatura kolone	25 °C
Pokretna faza	metanol:ultra čista voda 80:20 (V/V)
Protok	1 mL/min
Volumen injektiranja	20 $\mu\text{L}$
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)

U Eppendorf epruvetu otpipetira se 250  $\mu\text{L}$  DPPH otopine i 1 mL otopine lijeka, promućka na miješalici te ostavi na tamnom mjestu (30 minuta). Potom se otopina filtrira kroz 0,20  $\mu\text{m}$  injekcijski filter te provede injektiranje u kromatografski sustav i izokratna elucija prema gore navedenim kromatografskim uvjetima. Određivanje antioksidativne aktivnosti aminosalicilata provedeno je u triplikatu.

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

#### 3.2.4. Statistička obrada podataka

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

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

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1.VALIDACIJA ANALITIČKE METODE

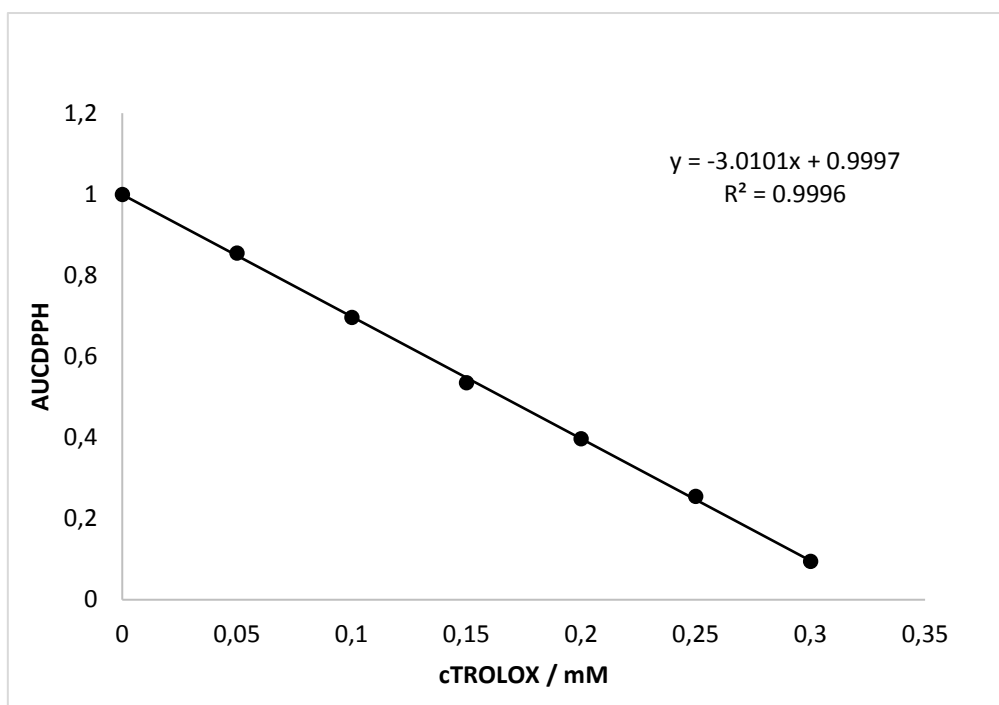
Kako bih osigurali ponovljive i točne rezultate mjerenja, HPLC-DPPH metodu za određivanje antioksidativnih svojstava aminosalicilata potrebno je prethodno validirati. Metoda je validirana prema ICH smjernicama. Kada se razvijene metode preuzimaju te primjenjuju na drugom instrumentu nije potrebna potpuna validacija metode te je metodu je potrebno verificirati ispitivanjem parametara poput specifičnosti, linearnosti, točnosti i preciznosti. Iz tog razloga navedeni parametri su ispitani u ovom radu.

Linearnost predstavlja mogućnost metode da u određenom koncentracijskom rasponu može predviđati koncentraciju analita. U ovom radu linearnost metode ispitana je pripremom i analizom otopina poznate koncentracije na šest koncentracijskih razina u rasponu od 0.05 do 0.3 mM TROLOX-a, pri čemu je uzeta u obzir i slijepa proba (bez dodatka TROLOX-a). Analizom pripremljenih uzoraka dobiveni su odzivi instrumenta, gdje izmjerena površina pika (AUC) predstavlja količinu preostalog DPPH nakon reakcije. Dobivene vrijednosti površina DPPH su normalizirane i prikazane u ovisnosti o koncentraciji TROLOX-a u obliku regresijskog pravca. Svaki pravac je opisan jednadžbom pravca i koeficijentom determinacije ( $R^2$ ) (Slika 4). Koeficijent determinacije iznosio je 0,9996 što govori da je linearnost modela zadovoljavajuća. Također, odsječak na osi y koji iznosi 0.9997 upućuje na odsutnost sustavne pogreške. Vrijednosti provedenog mjerenja prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Ovisnost površine ispod pika (AUC) o koncentraciji TROLOX-a ( $C_{\text{TROLOX}}$ ).

Koncentracijska razina	$C_{\text{TROLOX}}$ (mM)	AUC (mAU)	Norm
0 (SP)	0,00	2993	1,00
1	0,05	2560	0,86
2	0,10	2084	0,70
3	0,15	1602	0,54
4	0,20	1210	0,40
5	0,25	764	0,26
6	0,30	284	0,09

Legenda: SP – slijepa proba; STD - radna standardna otopina za izradu baždarnog pravca;  $A_0$  - početna otopina samog DPPH radikala



Slika 4. Kalibracijska krivulja ovisnosti površine DPPH radikala o dodatku TROLOX-a.

Kako bih se ispitala predikcijska moć kalibracijskog pravca testira se točnost analitičke metode. Točnost se ispituje pripremom uzoraka u triplikatu na tri koncentracijske razine. Kako bih se ispitala točnost kalibracijskog pravca, u cijelom njegovom području, pripremljene su otopine s poznatim dodatkom TROLOX-a od 0,05, 0,15 te 0,30 mM. Izmjerene vrijednosti površine korištene su kako bih se izračunale koncentracije TROLOX-a. Te se vrijednosti izražavaju kao analitički prinos (AP), odnosno omjer dobivene i stvarne vrijednosti izražene u postotcima (Nigović i sur., 2014). Dobivene vrijednosti analitičkog prinosa su u zadovoljavajućim granicama te su njihove srednje vrijednosti prikazane u Tablici 3.

Tablica 3. Točnost metode ispitana je računanjem analitičkog prinosa (AP) na tri različite koncentracijske razine sintetskog antioksidansa u triplikatu.

	0,05 mM		0,15 mM		0,30 mM	
	cTROLOX (mM)	AP (%)	cTROLOX (mM)	AP (%)	cTROLOX (mM)	AP (%)
	0,049	<b>97,4</b>	0,168	<b>112,2</b>	0,290	<b>96,8</b>
	0,047	<b>95,0</b>	0,154	<b>102,7</b>	0,298	<b>99,3</b>
	0,049	<b>97,4</b>	0,158	<b>105,4</b>	0,298	<b>99,3</b>
Srednja vrijednost AP		<b>96,6</b>		<b>106,8</b>		<b>98,5</b>

Kako bih se osiguralo da je odziv instrumenta isti kada se ponavljaju mjerenja istog uzorka potrebno je ispitati preciznost metode. Preciznost metode se mjeri unutar jednog dana s višestrukom pripremom i mjerenjem uzorka, te drugi dan kako bih se osigurala ponovljivost metode neovisno o vremenu. Prvi dan uzorci su pripremljeni na jednoj koncentracijskoj razini u heksaplikatu te su izmjereni. Drugi dan, uzorci su pripremljeni i izmjereni još tri puta. Svi uzorci su pripremljeni na srednjoj koncentracijskoj razini koja je ekvivalentna 0.15 mM TROLOX-a. Dobiveni rezultati su izraženi kao relativna standardna devijacija (RSD). Prvi dan RSD vrijednost šest mjerenja iznosila je 3,53% dok je srednja preciznost, koja uzima u obzir mjerenja prvog i drugog dana, iznosila 5,81% što upućuje na zadovoljavajuću ponovljivost mjerenja.

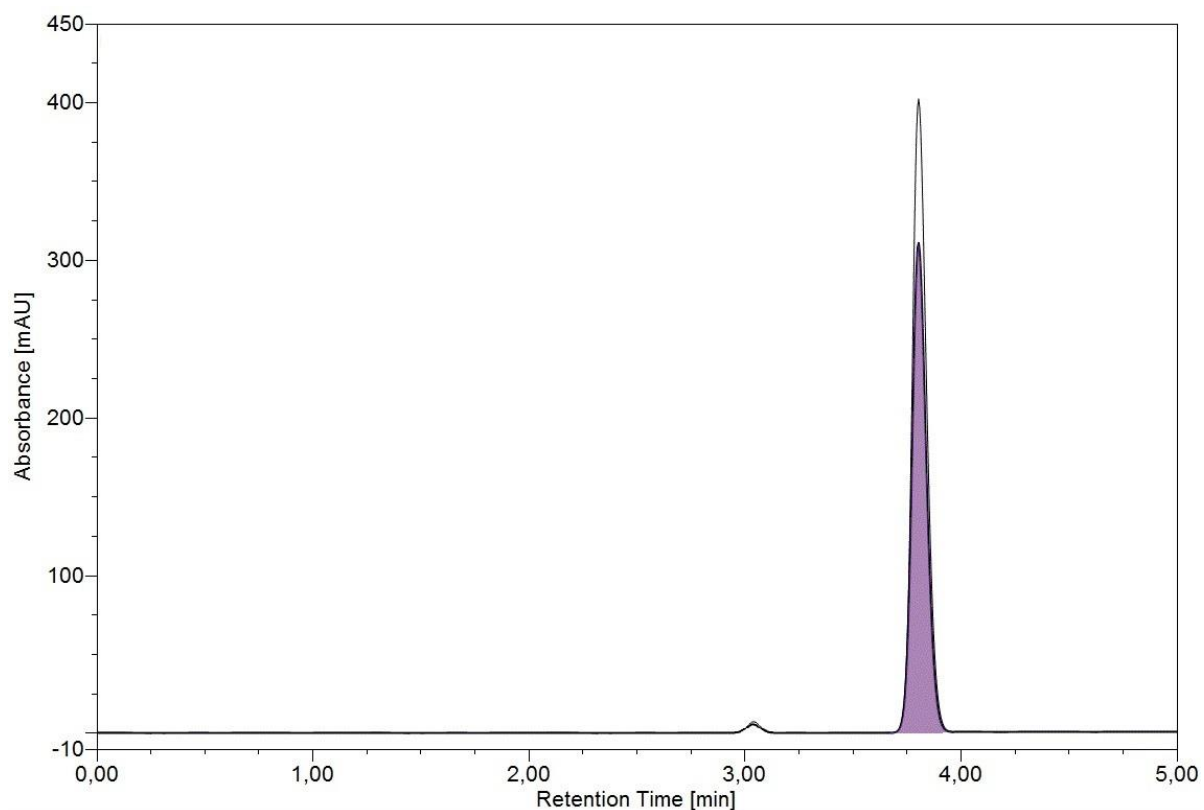
#### **4.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI AMINOSALICILATA**

Nakon postupka validacije prethodno prikazane metode određena je antioksidativna aktivnost četiri lijeka iz skupine aminosalicilata u *in vitro* uvjetima. U ovom radu sposobnost hvatanja DPPH radikala procijenjena je korištenjem otopine aktivne farmaceutske tvari: mesalazina, sulfasalazina, olsalazina i balsalazida.

Sposobnost hvatanja DPPH radikala određena je iz razlike površine pika otopine samog radikala ( $AUC_{DPPH}$ ) i otopine ispitivanog lijeka ( $AUC_{UZORAK}$ ) i izražena na ekvivalent TROLOX-a (TEAC, engl. *TROLOX Equivalent Antioxidant Capacity*). Dobiveni kromatogrami prikazani su na Slici 5, dok su rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnost aminosalicilata prikazani u Tablici 4.

Na temelju dobivenih rezultata mjerljivu antioksidativnu aktivnost pokazali su sulfasalazin i mesalazin, dok antioksidativna aktivnost olsalazina i balsalazida nije bila mjerljiva predloženom HPLC-DPPH metodom. Reakcija DPPH radikala i sulfasalazina nije pokazala potpuno obezbojenje otopine, ali je predložena HPLC metoda dovoljno osjetljivija te može ukazivati na promjene u antioksidativnoj aktivnosti ovog aminosalicilata u odnosu na standard. Zanimljivo je za istaknuti kako je izraženu antioksidativnu aktivnost pokazala 1 mM otopina 5-ASA pri čemu je došlo do potpune dekolorizacije otopine DPPH tako da je pripremljena i analizirana 0,1 mM otopina 5-ASA pokazala najjaču antioksidativnu aktivnost (0,273 mM).





Slika 5. Kromatogram otopine DPPH prije reakcije (bijelo) i nakon reakcije s aminosalicilatima (ljubičasto) pri optimalnim kromatografskim uvjetima.

Tablica 4. Rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnost aminosalicilata.

Analit	c (mM)	TEAC (mM)	RSD (n=3, %)
balsalazid	1,0	0,008	0,62
mesalazin	0,1	0,272	8,30
olsalazin	1,0	0,002	1,12
sulfasalazin	1,0	0,076	4,20

U dostupnoj stručnoj i znanstvenoj literaturi nalaze se podaci o izraženom antioksidativnom učinku mesalazina. Rafael i sur. (2007) u svom su istraživanju koristili DPPH radikal pri analizi 5-ASA u svrhu kvantificiranja sadržaja lijeka u gotovim tržišno dostupnim farmaceutskim oblicima primjenom spektrofotometrijske metode. Pri tome su, DPPH metodu usporedili s drugim metodologijama predloženim za kvantificiranje mesalazina.

Pored navedenog istraživanje provedena su i još daljnja istraživanja (Dinis, Madeira, Almeida, 1994.) koja su pokazala su da 5-ASA ima izraženu antioksidativnu aktivnost u usporedbi s drugim antipiretskim i protuupalnim lijekovima. Treba istaknuti da je intezitet antioksidativnog učinka mesalazina bio sličan kao askorbat, za razliku od salicilata koji nije reagirao s DPPH radikalom.

Nadalje, ovi rezultati upućuju na činjenicu da veći dio antioksidativne aktivnosti aminosalicilata potječe iz 5-ASA. Oslobađanjem iz strukture prolijeka zbog enzimske razgradnje azo veze, antioksidativna aktivnost mogla bi biti dio terapijskog učinka sulfasalazina, olsalazina i balsalazida, čak i ako bi njihova aktivnost u obliku prolijeka bila mnogo slabija od same 5-ASA.

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

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

## **5. ZAKLJUČAK**

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

- (i) HPLC-DPPH metoda pokazala se brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti aminosalicilata,
- (ii) predložena metoda je validirana prema važećim smjericama te je utvrđeno kako je metoda linearna, točna i ponovljiva,
- (iii) mesalazin i sulfasalazin su pokazali izraženiju antioksidativnu aktivnost u *in vitro* uvjetima,
- (iv) rezultati ovog istraživanja u skladu su s malobrojnim dostupnim literaturnim podacima za analizirane aminosalicilate te
- (v) potrebna su daljnja istraživanja antioksidativne aktivnosti aminosalicilata primjenom drugih metoda.

## **6. LITERATURA**

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

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

Bonovas S, Fiorino G, Lytras T, Nikolopoulos G, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Systematic review with meta-analysis: use of 5-aminosalicylates and risk of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 1179 – 1192.

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

Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315 (1), 161-169.

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

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

Jones JL, Nguyen GC, Benchimol EI, Bernstein CN, Bitton A, Kaplan GG, Murthy SK, Lee K, Cooke-Lauder J, Otley AR. The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: Quality of Life. *J Can Assoc Gastroenterol*, 2019, S42-S48.

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

Ye B, van Langenberg DR. Mesalazine preparations for the treatment of ulcerative colitis: Are all created equal? *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2015, 6(4), 137-144.

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

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

Polak EJ, O'Callaghan F, Oaten M. Perceptions of IBD within patient and community samples: a systematic review. *Psychol Health*, 2019, 1-24.

Rafael JA, Jabor JR, Casagrande R, Georgetti SR, de Fátima Borin M, Fonseca MJV. Validation of HPLC, DPPH• and nitrosation methods for mesalaminedetermination in pharmaceutical dosage forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 43 (1), 97-103.

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

SciELO - Scientific Electronic Library Online, 1999, <http://www.scielo.br>, pristupljeno 25. 09. 2019.

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

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

## **7. SAŽETAK/SUMMARY**



Upalne bolesti crijeva obuhvaćaju skupinu kroničnih poremećaja koji uzrokuju upalu i ulceraciju tankog i debelog crijeva. Većina IBD-a može biti klasificirana kao ulcerozni kolitis i Crohnova bolest. Etiologija IBD-a i dalje ostaje nejasna, ali poznato je da oksidativna oštećenja bioloških membrana imaju važnu ulogu u oštećenju tkiva. Aminosalicilati se koriste više od 60 godina u liječenju IBD-a, a njihov najpoznatiji predstavnik je sulfasalazin. Osim inhibicije sinteze prostaglandina i leukotriena i smanjenja kemotaksije neutrofila, pokazano je da 5-ASA posjeduje antioksidativna svojstva i potencijalno je sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala koji su odgovorni za patogenezu IBD.

Cilj ovog rada bio je utvrditi antioksidativnu aktivnost 5-ASA i njegovih prolijekova mjerenjem sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala. Antioksidativna aktivnost (pro)lijekova određena je primjenom HPLC-DPPH metode, pri čemu je sintetski antioksidans, TROLOX, korišten kao standard, a dobivena vrijednost izražena kao ekvivalent TROLOX (TEAC).

Na temelju dobivenih rezultata 0,1 mM otopina 5-ASA pokazala je najjaču antioksidativnu aktivnost, a zatim 1 mM otopina sulfasalazina. S druge strane, 1 mM otopina balsalazida i olsalazina pokazale su značajno manju antioksidativnu aktivnost.

Ovi rezultati upućuju na činjenicu da veći dio antioksidativne aktivnosti aminosalicilata potječe iz 5-ASA. Oslobađanjem iz strukture prolijeka zbog enzimske razgradnje azo veze, antioksidativna aktivnost mogla bi biti dio terapijskog učinka sulfasalazina, olsalazina i balsalazida, čak i ako bi njihova aktivnost u obliku prolijeka bila mnogo slabija od same 5-ASA. Predložena HPLC-DPPH metoda pokazala se brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti aminosalicilata s ciljem ispitivanja dodatnih mehanizama djelovanja pojedinih predstavnika ove široko primjenjivane skupine lijekova u kliničkoj praksi.

The inflammatory bowel disease (IBD) involves chronic inflammation of digestive tract and it is determined either as Crohn's disease, that takes place anywhere on the linings of the digestive tract, or ulcerative colitis, that causes inflammation only in the colon. Etiology of IBD remains unclear, but it is known that oxidative damage to biological membranes plays an important role in tissue damaging. Aminosalicylates have been in use for over 60 years in treatment of IBD and their most known representative, sulfasalazine.

Besides the inhibition of prostaglandin and leukotriene synthesis and reduction of neutrophil chemotaxis it has been shown that 5-ASA possesses antioxidative properties and is a potential scavenger of free radicals that are responsible for the pathogenesis of IBD.

Thus, the aim of this work was to determine the antioxidative power of 5-ASA and its prodrugs. The antioxidative potential of the drugs was determined using HPLC-DPPH method. Scavenging strength of compounds was shown using TROLOX as standard antioxidant and it was expressed as TROLOX equivalent antioxidant capacity (TEAC).

Based on the results obtained, 0.1 mM 5-ASA solution showed the strongest antioxidant activity, and than 1 mM sulfasalazine solution. On the other hand, 1 mM solutions of balsalazide and olsalazine showed significantly low antioxidant activity.

These results may imply that majority of the antioxidative power of aminosalicylates originate from 5-ASA. It is released from the structure of prodrugs due to enzymatic breakdown of azo bound, therefore, antioxidative effect could be part of therapeutic benefit of sulfasalazine, olsalazine and balsalazide even if their power in produg form was much weaker than 5-ASA itself.

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

# Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

## Određivanje antioksidativne aktivnosti aminosalicilata HPLC-DPPH metodom

**Borna Pavić**

### SAŽETAK

Upalne bolesti crijeva obuhvaćaju skupinu kroničnih poremećaja koji uzrokuju upalu i ulceraciju tankog i debelog crijeva. Većina IBD-a može biti klasificirana kao ulcerozni kolitis i Crohnova bolest. Etiologija IBD-a i dalje ostaje nejasna, ali poznato je da oksidativna oštećenja bioloških membrana imaju važnu ulogu u oštećenju tkiva. Aminosalicilati se koriste više od 60 godina u liječenju IBD-a, a njihov najpoznatiji predstavnik je sulfasalazin. Osim inhibicije sinteze prostaglandina i leukotriena i smanjenja kemotaksije neutrofila, pokazano je da 5-ASA posjeduje antioksidativna svojstva i potencijalno je sredstvo za uklanjanje slobodnih radikala koji su odgovorni za patogenezu IBD. Cilj ovog rada bio je utvrditi antioksidativnu aktivnost 5-ASA i njegovih prolijekova mjerenjem sposobnosti hvatanja slobodnog DPPH radikala. Antioksidativna aktivnost (pro)lijekova određena je primjenom HPLC-DPPH metode, pri čemu je sintetski antioksidans, TROLOX, korišten kao standard, a dobivena vrijednost izražena kao ekvivalent TROLOX (TEAC). Na temelju dobivenih rezultata 0,1 mM otopina 5-ASA pokazala je najjaču antioksidativnu aktivnost, a zatim 1 mM otopina sulfasalazina. S druge strane, 1 mM otopina balsalazida i olsalazina pokazale su značajno manju antioksidativnu aktivnost. Ovi rezultati upućuju na činjenicu da veći dio antioksidativne aktivnosti aminosalicilata potječe iz 5-ASA. Oslobođanjem iz strukture prolijeka zbog enzimске razgradnje azo veze, antioksidativna aktivnost mogla bi biti dio terapijskog učinka sulfasalazina, olsalazina i balsalazida, čak i ako bi njihova aktivnost u obliku prolijeka bila mnogo slabija od same 5-ASA. Predložena HPLC-DPPH metoda pokazala se brzom i učinkovitom za određivanje antioksidativne aktivnosti aminosalicilata s ciljem ispitivanja dodatnih mehanizama djelovanja pojedinih predstavnika ove široko primjenjivane skupine lijekova u kliničkoj praksi.

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

Rad sadrži: 30 stranica, 5 grafička prikaza, 4 tablica i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: aminosalicilati, antioksidativna aktivnost, HPLC-DPPH metoda

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar Turk**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Željko Maleš**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić**, poslijedoktorandica 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 aminosaliclates by HPLC-DPPH method

**Borna Pavić**

#### SUMMARY

The inflammatory bowel disease (IBD) involves chronic inflammation of digestive tract and it is determined either as Crohn's disease, that takes place anywhere on the linings of the digestive tract, or ulcerative colitis, that causes inflammation only in the colon. Etiology of IBD remains unclear, but it is known that oxidative damage to biological membranes plays an important role in tissue damaging. Aminosaliclates have been in use for over 60 years in treatment of IBD and their most known representative, sulfasalazine. Besides the inhibition of prostaglandin and leukotriene synthesis and reduction of neutrophil chemotaxis it has been shown that 5-ASA possesses antioxidative properties and is a potential scavenger of free radicals that are responsible for the pathogenesis of IBD. Thus, the aim of this work was to determine the antioxidative power of 5-ASA and its prodrugs. The antioxidative potential of the drugs was determined using HPLC-DPPH method. Scavenging strength of compounds was shown using TROLOX as standard antioxidant and it was expressed as TROLOX equivalent antioxidant capacity (TEAC). Based on the results obtained, 0.1 mM 5-ASA solution showed the strongest antioxidant activity, and than 1 mM sulfasalazine solution. On the other hand, 1 mM solutions of balsalazide and olsalazine showed significantly low antioxidant activity. These results may imply that majority of the antioxidative power of aminosaliclates originate from 5-ASA. It is released from the structure of prodrugs due to enzymatic breakdown of azo bound, therefore, antioxidative effect could be part of therapeutic benefit of sulfasalazine, olsalazine and balsalazide even if their power in prodrug form was much weaker than 5-ASA itself. The proposed HPLC-DPPH method has been shown to be rapid and effective in determining the antioxidant activity of the aminosaliclate with the purpose of testing additional mechanisms of action of individual representatives of this widely used drug group in clinical practice.

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

Thesis includes: 30 pages, 5 figures, 4 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: aminosaliclates, antioxidant activity, HPLC-DPPH method

Mentor: **Ana Mornar Turk, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

The thesis was accepted: September 2019.