



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Karlo Ojdanić

3. godina Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Interakcije lijekova i biokativnih molekula

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2021. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

16. rujna 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

28. rujna 2021.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	VIII
1.1. Bioaktivne molekule.....	viii
1.2. Spektroskopija UV / VIS	viii
1.3. Fotoluminiscencija	X
§ 2. ACETILSALICILNA KISELINA	XI
2.1. Acetilsalicilna kiselina u krutom stanju	xi
2.2. Vodena otopina acetilsalicilne kiseline	xiii
2.3. Zaključak	xviii
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XVIII

§ Sažetak

Analitičke metode su danas jedna od najvažnijih komponenti kemijske analize. Stoga se uvelike koriste i u medicini, za analizu spojeva te stvaranju novih lijekova kao prevencija za bolesti. Najkorisnije metode za analizu spojeva koji ulaze u sastav lijekova su spektroskopija UV-Vis, Ramanova spektroskopija, spektroskopija NMR, fluorescencija i ostale. Spektroskopija UV-Vis se temelji na apsorpciji elektromagnetskog zračenja te praćenja promjene boje ili emisije zračenja. Tim raznim metodama se mogu odrediti kemijska i fizikalna svojstva spojeva, načini interakcija sa sličnim ili različitim spojevima, te njihova stabilnost. Ovaj eksperiment dokazuje fotorazgradnju vodenih otopina acetilsalicilne kiseline u odsutnosti i prisutnosti dodatnih tvari, te se promatraju fotoluminiscencijski spektri.

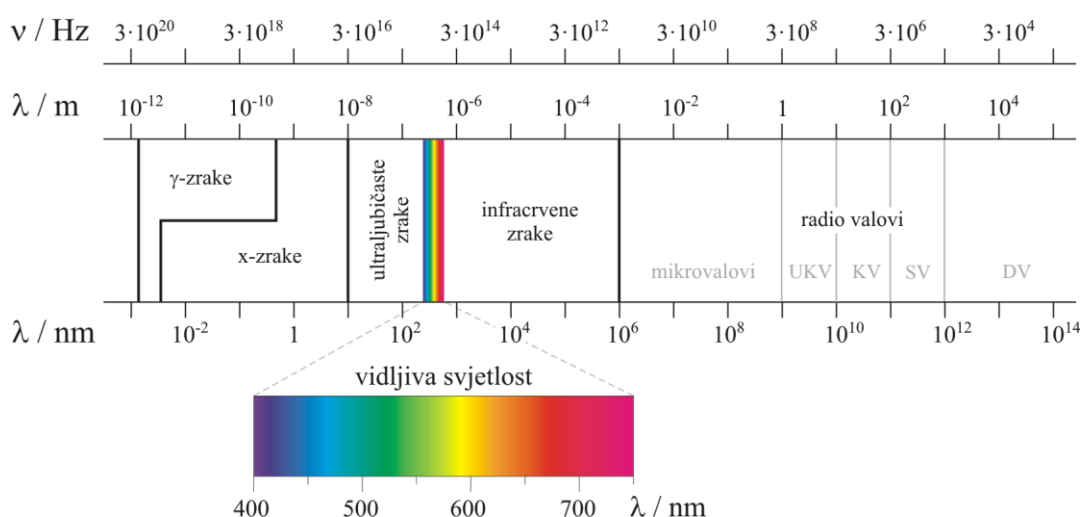
§ 1. UVOD

1.1. Bioaktivne molekule

Bioaktivne molekule su molekule koje su aktivne na uzročnike bolesti. Najčešće se mogu naći u prirodi, iako se mogu dobiti i sintetički. Interagiraju s drugim molekulama te stvaraju nove produkte koji su važni za organizam. Obično se bioaktivne molekule koriste za prevenciju i liječenje bolesti, te u prehrani. Veoma su važne, te je za bolje razumijevanje njihovog djelovanja potrebno dobro proučiti strukturu i funkcijske skupine koje su odgovorne za samo funkciju molekule. Većina bioaktivnih molekula reagira s proteinima i makromolekulama, no za veliki broj njih nije poznata funkcija.¹ Najproširenija upotreba bioaktivnih molekula danas je u stvaranju antibiotika i lijekova kao prevencija različitih bolesti. Biomolekule imaju različite strukture, većinom su to bioorganske molekule, te ih je moguće proučavati različitim analitičkim metodama, među kojima prevladavaju spektroskopija UV-Vis, fluorescencija, spektroskopija NMR i sl.

1.2. Spektroskopija UV / VIS

Spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja se odnosi na apsorpcijsku spektroskopiju ili spektroskopiju refleksije.



Slika 1. Dijelovi elektromagnetskog spektra

Molekulska spektroskopija UV-Vis se primjenjuje za određivanje različitih kemijskih vrsta, bilo organskih ili anorganskih. Najviše se koristi za kvantitativnu analizu. Pobuda UV i vidljivim zračenjem uključuje prijenos elektrona iz atomske ili molekulske orbitale niže energije u orbitalu više energije. Što se tiče organskih molekula, dvije vrste elektrona su odgovorne za apsorpciju UV-Vis zračenja :

1.) podijeljeni elektroni između dva atoma koji direktno sudjeluju u stvaranju veze

2.) nepodijeljeni vanjski elektroni koji se nalaze

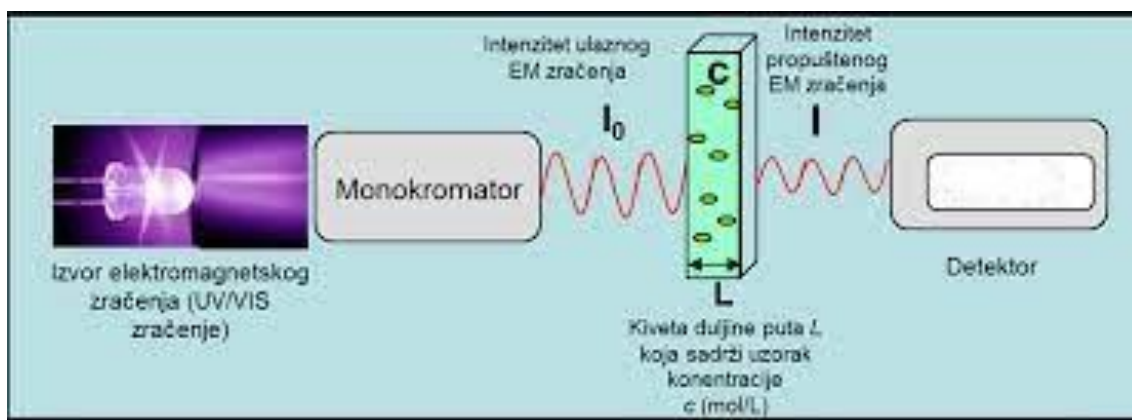
oko atoma

Ovisno o jakosti vezanja elektrona, valne duljine pri kojima organska molekula apsorbira su različite. Podijeljeni elektroni koji stvaraju jednostruku vezu su čvrsto vezani te je za njihovu pobudu potrebno više energije koja odgovara valnim duljinama u dalekom UV području (ispod 180 nm). Organske molekule s dvostrukim i trostrukim vezama imaju apsorpcijske maksimume u lako dostupnom UV području. Elektroni u takvim spojevima su slabo vezani te je potrebna manja energija za njihovu pobudu.² Nezasićene funkcijske skupine odgovorne za apsorpciju u organskim spojevima se nazivaju kromofori.

Kromofor	Primjeri	λ_{max}	Vrsta prijelaza
$>C=C<$	$C_6H_{13}CH=CH_2$	177	$\pi \rightarrow \pi^*$
$-C \equiv C-$	$C_5H_{11}C \equiv C-CH_3$	178	$\pi \rightarrow \pi^*$
$>C=O$	CH_3COCH_3	186	$n \rightarrow \sigma^*$
		280	$n \rightarrow \pi^*$
	CH_3CHO	180	$n \rightarrow \sigma^*$
		293	$n \rightarrow \pi^*$
$-COOH$	CH_3COOH	204	$n \rightarrow \pi^*$
$-CONH_2$	CH_3CONH_2	214	$n \rightarrow \pi^*$
$-N=N-$	$CH_3N=NCH_3$	339	$n \rightarrow \pi^*$
$-NO_2$	CH_3NO_2	280	$n \rightarrow \pi^*$
$-N=O$	C_4H_9NO	300	-
		665	$n \rightarrow \pi^*$

Slika 2. Apsorpcijske značajke nekih uobičajenih organskih kromofora

Instrumenti za mjerenje ultraljubičaste i vidljive apsorpcije se nazivaju fotometri i spektrofotometri.



Slika 3. Shematski prikaz fotometra za ultraljubičastu i vidljivu apsorpcijsku spektroskopiju

1.3. Fotoluminiscencija

Fotoluminiscencija (PL) je emisija svjetlosti iz neke tvari nakon apsorpcije elektromagnetskog zračenja (fotona). Fotoluminiscencija je oblik luminiscencije, a inicira se fotoeksitacijom (fotoni se pobuđuju u više energijsko stanje u atomu), nakon čega slijedi relaksacija. Procesi fotoluminiscencije se mogu karakterizirati prema raznim parametrima. Primjer, rezonantna pobuda opisuje apsorpciju fotona određene valne duljine, te emisiju ekvivalentnih fotona. Također se naziva i rezonantna fluorescencija. U otopinama tvari i u plinovitom stanju, proces pobude uključuje elektrone. Inače, više procesa se događa kada tvar prođe unutarnje prijelaze prije ponovne emisije energije.

Fluorescencija je oblik luminiscencije, odnosno emisija svjetlosti nakon što je tvar apsorbirala elektromagnetsko zračenje. Emitirana svjetlost ima veću valnu duljinu, nižu energiju fotona u odnosu na apsorbirano zračenje.

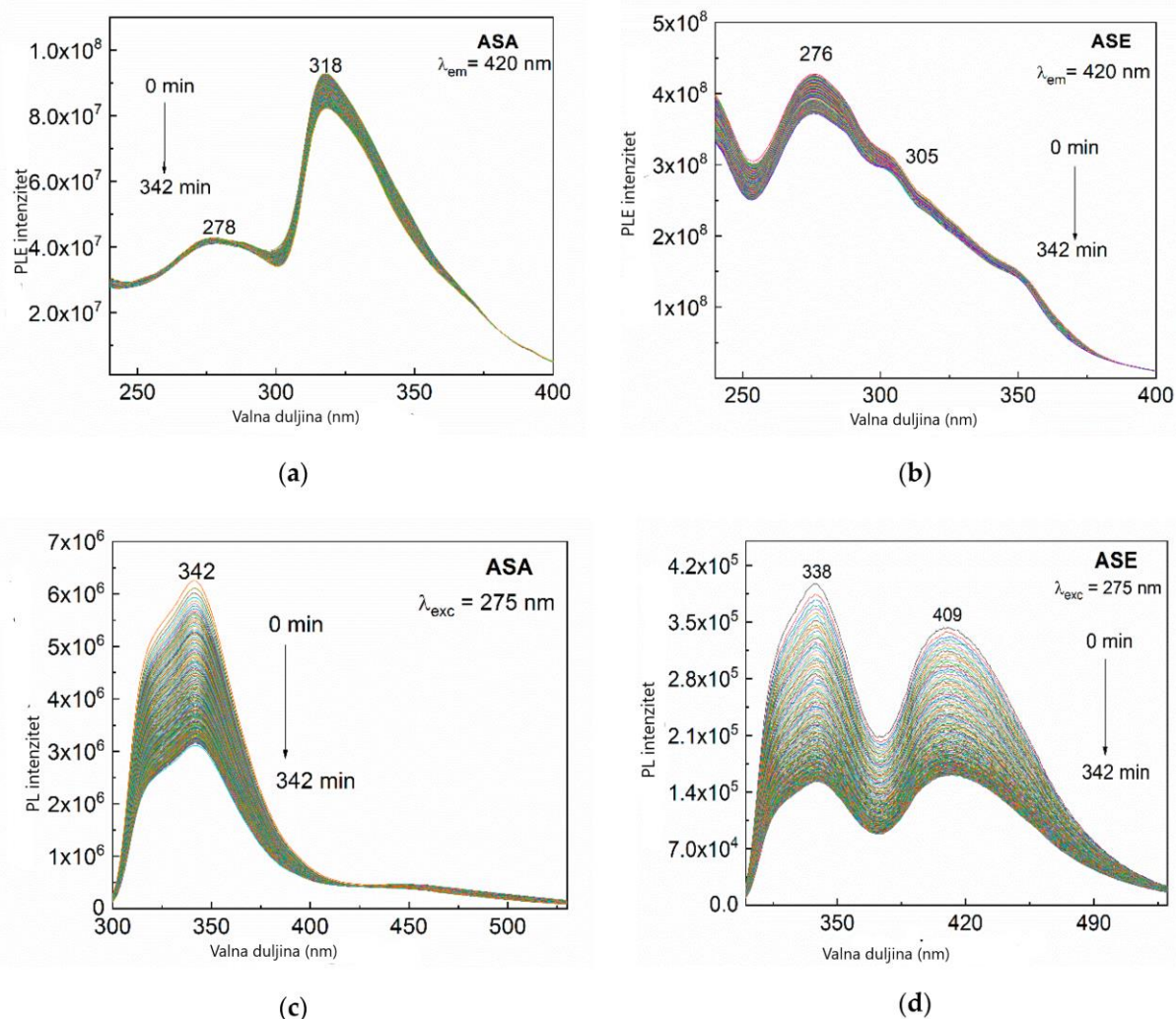
Fosforescencija je također oblik luminiscencije, nakon izlaganja elektromagnetskom zračenju, tvar apsorbira zračenje te je emitira na većoj valnoj duljini. Fosforescentne tvari, za razliku od fluorescentnih, ne emitiraju zračenje u istom trenutku primanja, nego apsorbiraju te imaju mogućnost zadržati ga te onda emitirati.^{3,4}

§ 2. ACETILSALICILNA KISELINA

Farmaceutski spojevi (lijekovi) se pripravljaju tako da specifično djeluju na određene organe, metaboličke puteve ili receptore za moduliranje fizioloških funkcija, u svrhu liječenja bolesti. Acetilsalicilna kiselina, poznatija kao aspirin, sadrži protuupalna, analgetska i antipiretička svojstva. Zbog tih učinaka, koristi se za ublažavanje nekih simptoma kod virusnih infekcija. Aspirin je korišten u istraživanjima s virusom COVID-19, te je ustanovljeno da je stopa smrtnosti manja kod zaraženih pacijenata koji su njime liječeni.⁵

Kako bi se dobro znala djelotvornost acetilsalicilne kiseline, koja djeluje kao bioaktivna molekula u organizmu, interagirajući s ostalim molekulama u tijelu sprječavajući bol, potrebno je dobro proučiti njenu strukturu. Za određivanje strukture i funkcije acetilsalicilne kiseline tijekom povijesti korištene su različite metode, od kojih su najvažnije za istaknuti UV-Vis apsorpcijska spektroskopija, fluorescencija, rentgenska difrakcija praha, FT-Ramanova spektroskopija, spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR).

2.1. Acetilsalicilna kiselina u krutom stanju



Slika 4. Prikaz spektara fotoluminiscencijske pobude acetilsalicilne kiseline bez dodataka (na slici ASA) i s dodacima (na slici ASE) pri valnoj duljini od 420 nm te 275 nm⁶

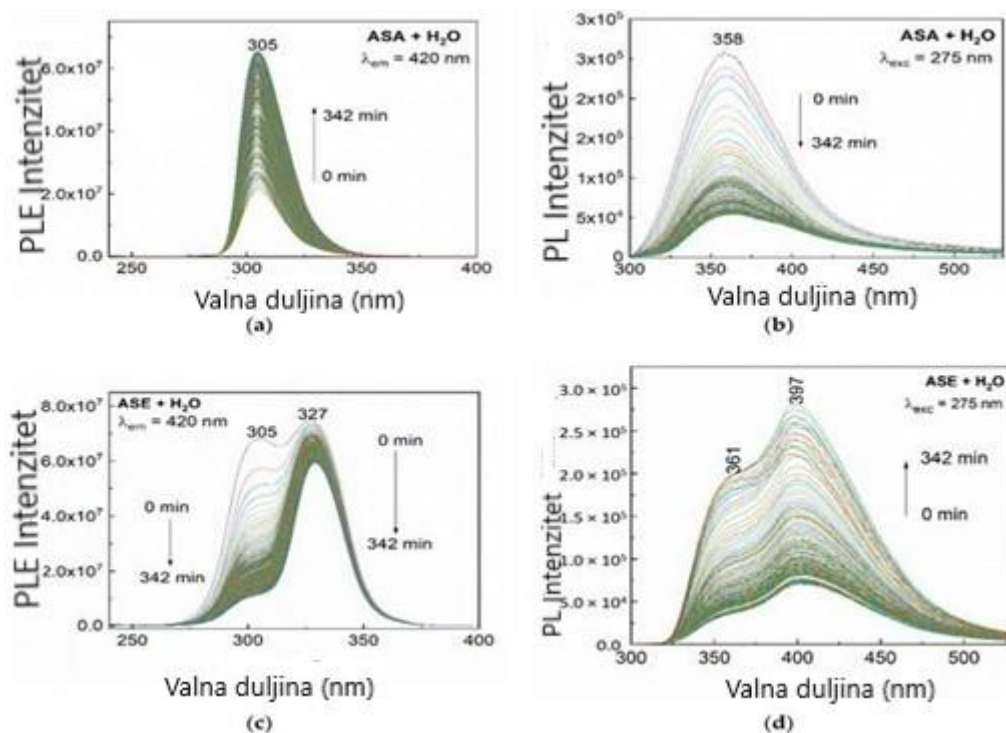
Prikazan je eksperiment u kojem su čista acetilsalicilna kiselina (ASA) i acetilsalicilna kiselina s dodacima (ASE), obje u krutom stanju, izložene UV svjetlosti, te je zabilježen intenzitet fotoluminiscencije (PL) i fotoluminiscencijske pobude (PLE). Na slici 4. u primjeru a) acetilsalicilna kiselina je izložena UV svjetlosti pri 420 nm u vremenu od 342 minute, te se može vidjeti traka s maksimumom fotoluminiscencijske pobude na 318 nm i još jedna nižeg intenziteta na 278 nm, dok u slučaju b) gdje je uzeta acetilsalicilna kiselina s dodacima maksimum je zabilježen pri 276 nm, te jedan slabiji intenzitet pri 305 nm. Omjer intenziteta PLE traka za slučaj acetilsalicilne kiseline (I_{318}/I_{278}) je približno jednak 2,17 (Slika 4., primjer a), dok u slučaju acetilsalicilne kiseline s dodacima omjer intenziteta (I_{305}/I_{276})

iznosi približno 0,72 (Slika 4., primjer b)). Izloženost UV svjetlu u vremenu od 342 minute izazvala je promjenu u PLE spektrima promjenu omjera intenziteta od 1,95.

Veće promjene su uočene u slučaju PL spektra za acetilsalicilnu kiselinu sa i bez dodataka. Prikaz na slici 4. primjeri c) i d). Prije izlaganja UV svjetlu, PL spektri su okarakterizirani za dva slučaja : 1.) acetilsalicilna kiselina s emisijskim pojasom maksimalno 342 nm i 2.) acetilsalicilna kiselina s dodacima s dva pojasa s dva maksimuma na otprilike 338 i 409 nm. Podaci maksimuma za PL spektar, objavljeni za salicilnu kiselinu (SAL) te za acetilsalicilnu kiselinu, su pri 341 nm odnosno 404 nm.⁷

Na površini tableta dolazi do djelomične pretvorbe acetilsalicilne kiseline s dodacima u salicilnu kiselinu, u prisutnosti vodenih para iz zraka. Vrijeme izlaganja UV svjetlu je određeno zbog nestabilnosti acetilsalicilne kiseline u različitim biološkim tekućinama. Vrijeme poluraspada acetilsalicilne kiseline hidrolizom iznosi između 0,5 do 1,9 sati. U ljudskom tijelu i krvi to vrijeme iznosi između 16 i 17 sati.⁸ No, nakon 342 minute izlaganja UV svjetlosti, odnosno 5,7 sati, nisu primjećene nikakve promjene PLE i PL spektara.

2.2. Vodena otopina acetilsalicilne kiseline

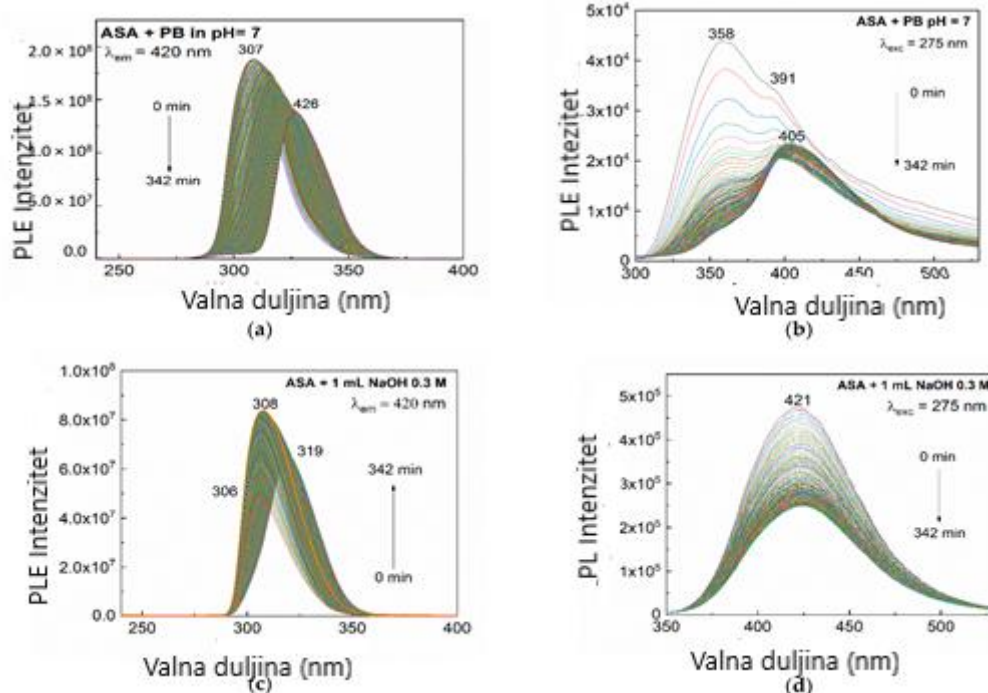


Slika 5. PLE i PL spektri snimljeni za vodene otopine acetilsalicilne kiseline sa i bez dodataka pri 420 nm i 275 nm, $c(\text{ASA}) = 0,3 \text{ mol/L}$ te $c(\text{ASE}) = 0,3 \text{ mol/L}$

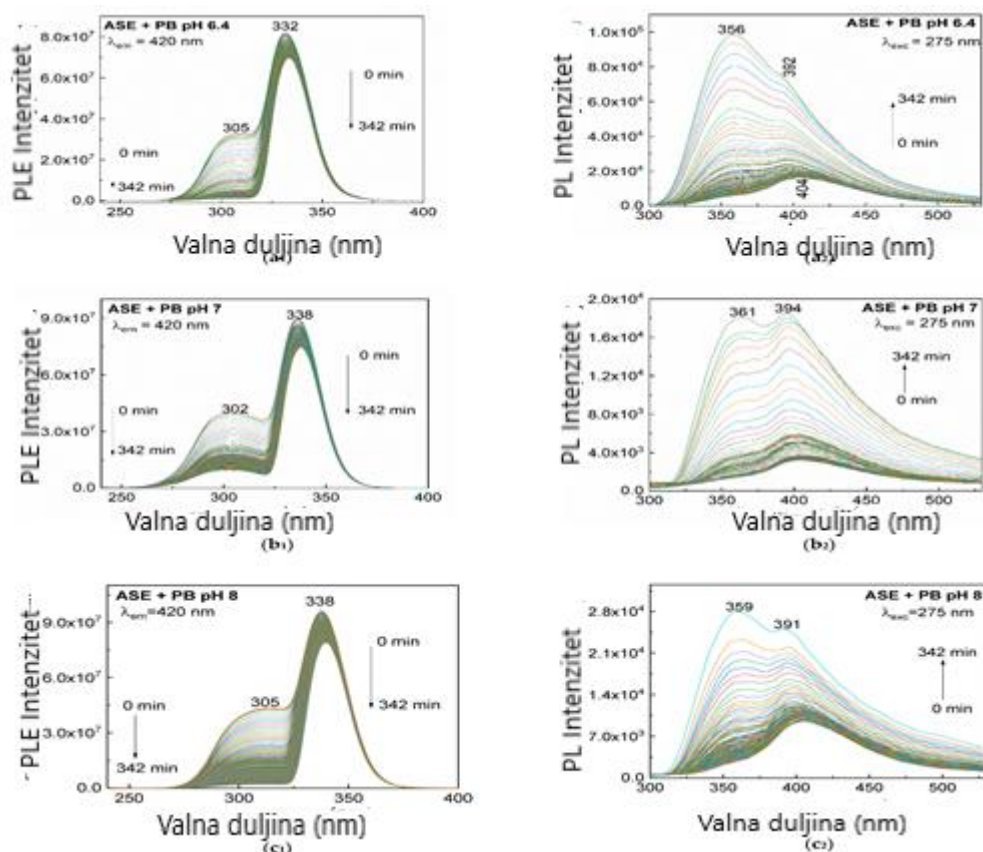
U slučaju vodene otopine acetilsalicilne kiseline, prilikom izlaganja UV svjetlosti od 420 nm, spektri PL i PLE su pomaknuti na 358 nm i 305 nm (slika 5. primjeri a i b), dok u slučaju acetilsalicilne kiseline s dodacima spektar PLE ima dva maksimuma pri 305 i 327 nm.

Omjer intenziteta dviju vrpca postaje jednak, na 305 i 327 nm, i iznosi približno 0,91. PL spektar acetilsalicilne kiseline s dodacima ima maksimum na 403 nm i jednu slabiju vrpcu na 358 nm (slika 5, primjer d). Omjer intenziteta vrpca na 403 i 358 nm iznosi 0,48.

Slika 6. PLE i PL spektri acetilsalicilne kiseline koncentracije $0,3 \text{ mol/L}$ u prisutnosti fosfatnog pufera (PB) s $\text{pH} = 7$ (primjeri a i b) i nakon interakcije s $0,3 \text{ mol/L}$ NaOH (primjeri c i d), pri valnoj duljini od 420 i 275 nm



- a) Acetilsalicilna kiselina u fosfatnom puferu s pH=7, dolazi do povećanja intenziteta PLE spektra s $1,68 \cdot 10^8$ na $1,88 \cdot 10^8$ točaka po sekundi, nakon nekog vremena dolazi do pada intenziteta na $1,38 \cdot 10^8$ točaka po sekundi, te istodobni pomak maksimuma trake s 307 nm na 426 nm (slika 6. primjer a)
- b) Acetilsalicilna kiselina u fosfatnom puferu s pH=7, PL spektar ima dva maksimuma na 358 i 391 nm, čiji se intenzitet smanjivao s 43,807 točaka/sec i 34,644 točaka/sec na 6,612 točaka/sec i 22,863 točaka/sec, te se intenzitet postupno smanjuje (slika 6. primjer b)
- c) U reakciji acetilsalicilne kiseline s 0,3 mol/L NaOH došlo je do povećanja intenziteta PLE spektra, te je došlo do pomicanja PLE trake s 306 na 319 nm (slika 6. primjer c)
- d) Također u interakciji acetilsalicilne kiseline s 0,3 mol/L NaOH dolazi do smanjenja intenziteta PL spektra s $4,33 \cdot 10^5$ točaka/sec na $2,5 \cdot 10^7$ točaka/sec (slika 6. primjer d)



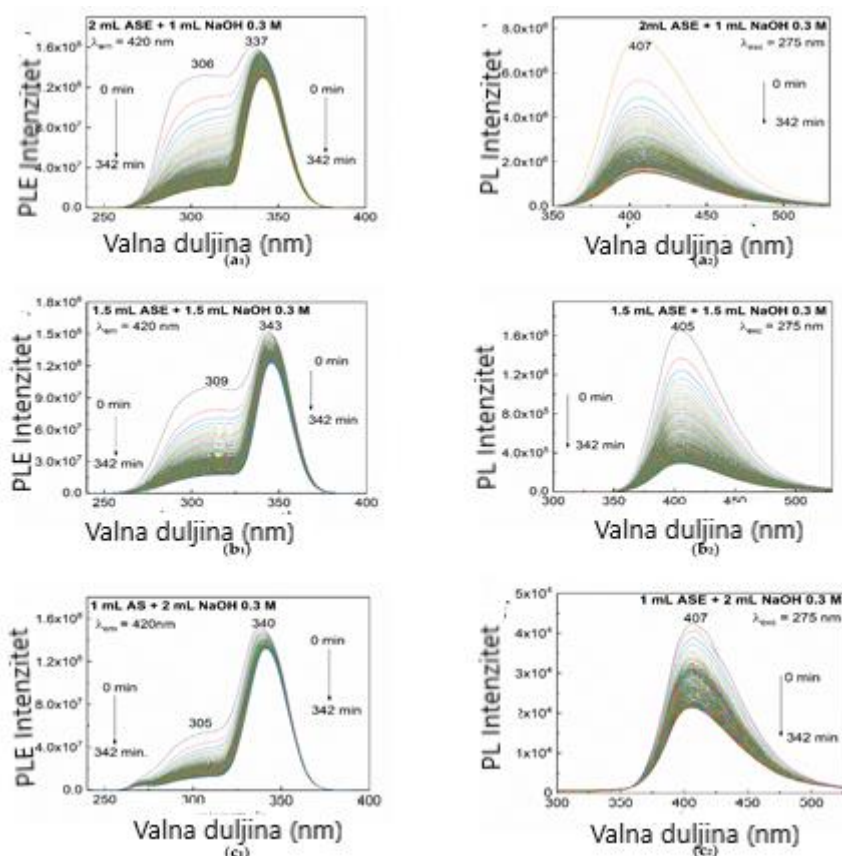
Slika 7. PLE i PL spektri acetilsalicilne kiseline s dodacima snimljeni u prisutnosti fosfatnog pufera (PB) i pri pH=6,4 (primjer a1 i a2), pH=7 (primjer b1 i b2) i pH=8 (primjer c1 i c2), pri valnoj duljini emisije od 420 nm i valnoj duljini pobude od 275 nm

Prije izlaganja UV svjetlu, sve spektre PLE acetilsalicilne kiseline s dodacima karakterizira vrpca s maksimumom na oko 332-338 nm, s intenzitetima $8,18 \cdot 10^7$ točaka/sec, $9 \cdot 10^7$ točaka/sec i $9,61 \cdot 10^7$ točaka/sec, uz povećanje pH s 6,4 na 7 i 8. (Slika 7, primjeri a₁, b₁, c₁)

Također, uočena je vrpca s pregibom na oko 302-305 nm. Prije izlaganja, acetilsalicilne kiseline s dodacima u fosfatnom puferu s pH 6,4, 7 i 8, UV zračenju omjer intenziteta, s maksimumima 302-305 nm i 332-338 nm, iznosi 0,4, 0,44 i 0,45. Kako je izlaganje UV zračenju teklo, dolazilo je do smanjenja intenziteta. Nakon zračenja omjer intenziteta je iznosio 0,017, 0,016 i 0,12.

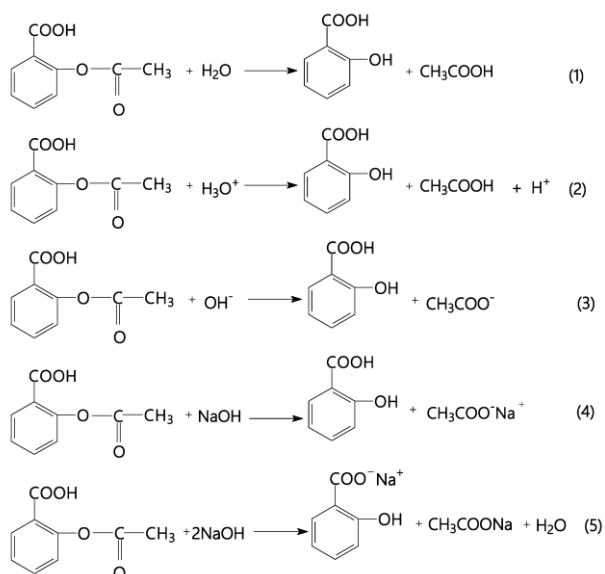
Što se tiče PL spektara, prije izlaganja UV zračenju primjećene su dvije vrpce s maksimumima pri 356-361 nm i 403-404 nm. Omjer intenziteta dviju vrpca iznosi 0,3, 0,4 i 0,3. Nakon nekog vremena izlaganja UV svjetlu došlo je do pomaka emisijske

vrpce s 403-404 nm na 391-394 nm. Postupnim povećanjem vremena izlaganja UV zračenju do 342 min, omjer intenziteta PL traka je postao 1,3 , 1 i 1,1.



Slika 8. Prikaz PL i PLE spektara acetilsalicilne kiseline s dodacima u interakciji s 0,3 mol/L NaOH u omjeru 2:1 (primjer a1 i a2), 1,5 :1,5 (primjer b1 i b2) i 1:2 (c1 i c2), pri valnoj duljini emisije od 420 nm, te pobude od 275 nm

U početku, prije izlaganja UV svjetlu, povećanjem udjela NaOH i jednakom masom acetilsalicilne kiseline s dodacima, intenzitet vrpce se smanjuje na 306 nm, te je omjer intenziteta vrpca pri 305-349 nm i 335-343 nm promijenjen s 0,91 (slika 5.) na 0,8 (slika 8, primjer a₁), 0,65 (slika 8, primjer b₁) i 0,35 (slika 8, primjer c₁). Dužim izlaganjem na UV svjetlu dolazi do smanjenja intenziteta vrpce, što dovodi do promjene omjera intenziteta (I₃₀₅₋₃₀₉/I₃₃₅₋₃₄₃) s 0,19 (slika 5.) na 0,14 (slika 8, primjer a₁), 1,37 (slika 8, primjer b₁) i 1,5 (slika 8, primjer c₁). Intenzitet PL spektra se smanjuje povećanjem dodatka NaOH.^{9,10}



Slika 9. Reakcije acetilsalicilne kiseline s vodom i NaOH

2.3. Zaključak

Rezultati ovog istraživanja pomažu shvatiti da je fotoluminiscencija (PL) važna metoda za određivanje salicilne kiseline u lijekovima. Također, praćenjem hidrolize otopine acetilsalicilne kiseline u fosfatnom puferu, s pH= 6,4 , pH=7 , pH=8 , ustanovljeno je postupno povećanje intenziteta fotoluminiscencijskog spektra pobude, dok se intenzitet fotoluminiscencijskog spektra smanjivao. Interakcija acetilsalicilne kiseline s NaOH dovela je do smanjenja esterskih skupina u korist karboksilnih skupina. Nakon izlaganja otopine acetilsalicilne kiseline UV svjetlu, uočeno je smanjenje intenziteta fotoluminiscencijskog spektra, u prisutnosti fosfatnog pufera. U drugom slučaju, prilikom izlaganja acetilsalicilne kiseline s dodacima, uočeno je povećanje fotoluminiscencijskog spektra u fosfatnom puferu. Te razlike uzrokuje salicilna kiselina koja reagira s NaOH.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. David Gfeller, Olivier Michielin, Vincent Zoete, Shaping the interaction landscape of bioactive molecules, *Bioinformatics*, Volume 29, Issue 23, 1 December 2013, Pages 3073–3079
2. Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1988). *Fundamentals of analytical chemistry*. New York: Saunders College Pub.

3. Novak, P. & Jednačak, T. Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama. (TIVA, 2013).
4. Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1988). *Fundamentals of analytical chemistry*. New York: Saunders College Pub.
5. Bianconi, V.; Violi, F.; Fallarino, F.; Pignatelli, P.; Sahebkar, A.; Pirro, M. Is Acetylsalicylic Acid a Safe and Potentially Useful Choice for Adult Patients with COVID-19? *Drugs* **2020**, *80*, 1383–1396.
6. Daescu, M.; Iota, M.; Serbschi, C.; Ion, A.C.; Baibarac, M. The Influence of UV Light on Photodegradation of Acetylsalicylic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4046.
7. Singh, R.; Tiwari, M.K.; Gangopadhyay, D.; Mishra, P.C.; Mishra, H.; Srivastava, A.; Singh, R.K. Detection and monitoring of in vitro formation of salicylic acid from aspirin using fluorescence spectroscopic technique and DFT calculations. *J. Photoch. Photobiology B* **2018**, *189*, 292–297.
8. Thiessen, J.J. Aspirin: Plasma concentration and effects. *Thromb. Res.* **1983**, *29* (Suppl. IV), 105–111.
9. Kozma, L.; Hornak, I.; Eroshtak, I.; Nemet, B. Study of the fluorescent properties of salicylic acid derivatives on solutions. *Transl. Zheermal Prikl. Spektroskopii* **1990**, *53*, 259–269.
10. Dumitrescu, V.; Surmeian, M.; Doneanu, C.; Stanescu, S. Computer program for the determination of salicylic acid content in aspirin by derivative spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *333*, 181–186.