

Strona czasopisma: <http://analit.agh.edu.pl/>

Wysokoczułe oznaczanie lewotyroksyny metodą woltamperometrii strippingowej

High sensitive determination of levothyroxine by stripping voltammetry

Paula Kowalska^[a], Robert Piech^[a]

[a] AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

ABSTRAKT: Syntetycznie otrzymywana sól sodowa lewoskrętnej tyroksyny (T4) jest lekiem stosowanym w standardowym leczeniu przypadków niedoczynności tarczycy, niezależnie od jej przyczyny czy grupy wiekowej. Celem leczenia jest doprowadzenie do klinicznej i biochemicznej eutyreozy, monitorowanej poprzez osiągnięcie pożądanego stężenia TSH. Dawka leku zależy od szeregu różnych czynników i ustalana jest dla każdego przypadku indywidualnie. Kontrola jej ilości w preparatach farmaceutycznych i płynach ustrojowych jest ważnym lecz jednocześnie niełatwym zadaniem dla dzisiejszej chemii analitycznej.

ABSTRACT: Levothyroxine (L-T4) represents the first-line treatment in patients with hypothyroidism in different periods of life. The goal of replacement therapy is to achieve clinical and biochemical euthyroidism, monitored by resulting the desired TSH. The dose depends on a number of factors and is determined for each case individually. Control the amount of T4 in pharmaceutical preparations and body fluids is an important but also a daunting task for today's analytical chemistry.

Słowa kluczowe: tarczyca, hormon, tyroksyna, elektrochemia, woltamperometria

1. Wstęp

Tarczyca zalicza się do niezwykle ważnych gruczołów wydzielania wewnętrznego, z czego nie zdajemy sobie sprawy, do czasu, gdy nie zacznie zawodzić. W dzisiejszych czasach jest to coraz częstszy problem ludzkości, niezależnie od wieku. Dlatego warto zasięgać głębszej wiedzy, przede wszystkim na temat hormonów regulujących jej pracę, do których należy trójiodotyronina oraz tyroksyna.

Stosowanie hormonów tarczycy jest wskazane przede wszystkim przy niedoczynności tarczycy, choroby coraz częściej dotykającej współczesne społeczeństwo. Lekiem, przez wzgląd wyrównanego stężenia hormonu na skutek długiego działania, jest lewotyroksyna. Występuje w postaci tabletek, gdzie największą popularnością cieszą się Euthyrox, Eltroxin i Letrox. Monitorowanie jej ilości w środkach farmaceutycznych i płynach ustrojowych jest nieobojętym problemem współczesnej chemii analitycznej.

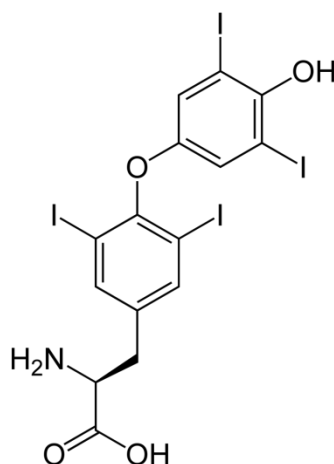
Analiza substancji leczniczych cieszy się wraz z upływem czasu rosnącym zainteresowaniem, w związku z jej rolą w kontroli jakości leków oraz w wykrywaniu i identyfikacji zawartości substancji czynnych. Ze względu na różnorodność postaci farmaceutycznych, a przede wszystkim ich złożoną budowę chemiczną jest niejednokrotnie dużym wyzwaniem dla chemika, wymagającym wielu czynności przygotowawczych.

O wyborze odpowiedniej metody analitycznej decyduje szereg czynników, jak: zawartość oznaczanej substancji, czas trwania analizy, koszty oraz oczekiwane po zakończeniu prac badawczych informacje. Ze względu na wysoką czułość, selektywność oraz nieskomplikowaną procedurę przygotowania próbki często stosowaną w laboratoriach metodą jest woltamperometria.

2. Tyroksyna

2.1. Budowa chemiczna i działanie fizjologiczne

Tyroksyna (T₄) to organiczny związek chemiczny, pochodna aminokwasu jakim jest tyrozyna. Jej masa molowa wynosi 776,87 g/mol. Dobrze rozpuszcza się w benzenie i etanolu, natomiast słabo w wodzie [1].



Rys.1 Wzór strukturalny tyroksyny lewoskrętnej [2].

Prohormon, za który jest uważana, wytwarza się, kumuluje, a w dalszym ciągu uwalnia poprzez tyreocyty oraz koloid pęcherzyków. Istotną kwestią jest jej przemiana w tkankach, polegająca na odjodowaniu cząsteczki. Dzięki konwersji T₄ powstaje hormon właściwy, aktywny metabolicznie - trijodotyronina T₃, dla którego tarczyca jest bezpośrednim źródłem tylko w około 20%. Tetrajodotyronina posiada cztery atomy jodu w pozycjach 3, 3', 5 i 5', z kolei trijodotyronina 3 atomy w pozycjach 3, 3' i 5. W regulowaniu wydzielania hormonów tarczycy bierze udział układ podwzgórze - przysadka [3-5].

Na procesy fizjologiczne, w których tyroksyna odgrywa zasadniczą rolę, składa się stymulacja zarówno procesu utleniania w tkankach, jak również rozpadu tłuszczów na wolne kwasy i glicerol. Odpowiada za intensyfikację wchłaniania glukozy oraz jej zużycia przez komórki. Istotny wpływ wywiera na czynności gruczołów płciowych oraz łojowych, co z kolei polepsza kondycję skóry i włosów. Tyroksyna razem z trójiodotyroniną rzutują na szybkość przemiany materii, sprzyjają wydalaniu toksyn z organizmu, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie szczupłej sylwetki [3, 4].

2.2. Objawy niedoboru

Najczulszym badaniem dowodzącym o niewłaściwym funkcjonowaniu tarczycy jest oznaczenie poziomu tyreotropiny we krwi, czyli test TSH. Wartości referencyjne dla stanu eutyreozy wahają się w granicach od 0,4 do 4,0 mIU/l. Wyniki mogą różnić się w zależności od: wieku, metody pomiaru i płci. Aktualnie czułość testu pozwala na wskazanie nawet bezobjawowych zaburzeń czynności tarczycy. Daje możliwość odróżnienia nasilonej supresji wydzielania TSH < 0,01 mIU/l typowej dla choroby Gravesa od supresji łagodnej, w zakresie wartości 0,01-0,1 mIU/l, obecnej przy nadczynności tarczycy [6].

Stosowanie hormonów pożądane jest głównie w substytucyjnym leczeniu niedoczynności tarczycy, ponadto łącznie z lekami stosowanymi na nadczynność tarczycy, jak również profilaktycznie po tyreidektomii [3].

Niedoczynność tarczycy jest schorzeniem, którego leczenie trwa przeważnie całe życie. W pierwszej kolejności opiera się na uzupełnianiu brakujących hormonów, których gruczoł nie jest w stanie wyprodukować w dostatecznej ilości. Ciężko nieraz przychodzi lekarzom zidentyfikowanie problemu, ze względu na objawy mogące być oznaką menopauzy, długotrwałego stresu, czy po prostu starzenia się organizmu [4, 7].

Choroba przejawia się spowolnieniem przemiany materii oraz pojawieniem obrzęku śluzowego, co prowadzi do przeróżnych negatywnych skutków ubocznych. Jednym z symptomów są pogrubione rysy twarzy, która staje się napuchnięta. Obserwujemy generalny przyrost masy ciała pomimo niewzmożonego apetytu, ponadto suchą, szorstką skórę i osłabione włosy. Osoby cierpiące na niedobór tyroksyny skarżą się na zmiany związane z ogólnym samopoczuciem. Czują się zmęczone, senne, mają problemy z pamięcią i koncentracją. Naturalnym zjawiskiem jest zachowanie człowieka w depresji i brak wiary w siebie. Dolegliwość odbija się także na bólach stawów, sztywności mięśni, a przede wszystkim dotyka najważniejszego ludzkiego organu - serca. Prowadzi do spowolnienia jego akcji, zmniejszenia ciśnienia, a nawet sptyczenia oddechu. Niski poziom tyroksyny zwiększa wrażliwość na zimno, szczególnie w przypadku dłoni i stóp. Prowadzi także do zmiany barwy głosu na bardziej ochryplą [5, 7, 8].

3. Lewotyroksyna w leczeniu niedoczynności tarczycy

3.1. Charakterystyka produktu, preparaty

Bazową substancją, wykorzystywaną podczas kuracji, jest sól sodowa lewoskrętnej tyroksyny. Całkowitą dobową dawkę leku przyjmuje się rano, co najmniej pół godziny przed posiłkiem. Posiada długi okres półtrwania. Ważnym jest, by czynność powtarzać regularnie, najlepiej o tej samej porze każdego dnia. Poprawa dostrzegalna jest zazwyczaj dość szybko, działanie terapeutyczne aktywuje się w ciągu 3 do 5 dni [3, 9, 10].

Prawidłowo przyjęty lek jest wchłaniany w 80%. Najwyższe stężenie w surowicy krwi obserwuje się po około 6 godzinach od przyjęcia. Lewotyroksyna rozkładana jest zasadniczo w wątrobie, mózgu, nerkach oraz mięśniach. Ze względu na bardzo silne wiązanie z białkami osocza z organizmu usuwana jest w niewielkich ilościach. Klirens metaboliczny sięga 1,2 l osocza na dobę. Jej temperatura topnienia równa jest 223°C [9, 11, 12].

Wszystkie preparaty lewotyroksyny dostępne w sprzedaży są weryfikowane pod względem efektywności działania, co w praktyce umożliwia rozpoczęcie terapii od wszelkiego dostępnego w Polsce preparatu. Do popularnych marek w Europie należą: Eltroxin, Euthyrox, Letrox, Levaxin, Thyrox i Thyrox Duotab. Zaletą niektórych z nich jest dostępność pośrednich, nietypowych dawek lub brak w zawartości np. laktozy, nietolerancyjnej dla wielu pacjentów [2].

3.2. Dawkowanie

Dawka hormonu, ustalana pod odpowiednią kontrolą, jest w każdym przypadku kwestią indywidualną. Na ogół leczenie zaczyna się od niewielkiej ilości, która jest stopniowo zwiększana, aż do uzyskania efektu terapeutycznego. Regularne badania poziomu hormonów we krwi pozwala kontrolować właściwe funkcjonowanie tarczycy, co pozwala na modyfikację dawki przyjmowanego leku, w celu zastosowania najefektywniejszego leczenia [3].

Przeciętna dawka lewotyroksyny potrzebna do uzyskania eutyreozy u osób dorosłych to 1,6 μg na 1 kg masy ciała na dobę. Dawkę początkową i późniejsze jej modyfikacje dostosowuje się, biorąc pod uwagę kilka ważnych czynników. Poza masą ciała znaczenie ma również wiek, stan układu sercowo-naczyniowego, współistniejące choroby, przyczyna choroby, czy ciąża w przypadku kobiet [10, 12].

Rozpoczęcie leczenia zaczyna się zwykle od 50-100 μg na dobę, przy czym po około 6 tygodniach, wykonując pomiar TSH, stwierdza się możliwość jej zwiększenia. Wzrost, do osiągnięcia dawki podtrzymującej, zawiera się zazwyczaj w przedziale 25-50 μg . Zapotrzebowanie zmniejsza się wraz z wiekiem. U osób starszych stosowane są mniejsze dawki, jak również ich zwiększanie odbywa się stosunkowo wolniej. W przypadku ludzi młodych terapię zaczyna się dynamicznie, od przyjmowania dużych porcji, których potrzebują dodatkowo kobiety w ciąży oraz w okresie pomenopauzalnym [3, 12-14].

3.3. Interakcje

Zakłócenia wchłaniania tyroksyny spowodowane są przez żywność, suplementy przyjmowane w tym samym czasie lub różne inne substancje. Zmniejszenie absorpcji powodują posiłki wysokobłonnikowe, produkty sojowe, kawa, sok grejpfrutowy, ponadto preparaty zawierające wapń, magnez i żelazo, z którym tyroksyna tworzy stabilne kompleksy. Do leków, które wymagają zwiększenia dawki L-T4 lub długich przerw pomiędzy przyjmowaniem, zalicza się: leki zobojętniające zawierające glin, uspokajające, przeciwdrgawkowe, przeciwnowotworowe, antydepresanty, tabletki antykoncepcyjne i inne. Na hamowanie konwersji T4 do T3 wpływają blokery pompy protonowej, sterydy czy propylotiouracyl. Problemy w przyswajaniu stanowią również sukralfat, kolestypol oraz żywice jonowymienne np. cholestyramina. Hormony tarczycy nasilają działanie leków przeciwzakrzepowych - pochodnych hydroksykumaryny i przeciwcukrzycowych o działaniu hipoglikemizującym [13, 14].

4. Metody oznaczania lewotyroksyny

Przemysł farmaceutyczny nastawiony jest głównie na opracowywanie nowych, skuteczniejszych, często złożonych preparatów dla pacjentów. Priorytetem jest ich bezpieczeństwo, tzn. pewność składu, dawki składnika aktywnego oraz czystości [15].

W efekcie najbardziej restrykcyjnym procesem jest kontrola jakości leków. Stąd też pojawia się ciągła potrzeba opracowywania nowych, jednocześnie szybkich, ale dokładnych metod analitycznych, wykorzystywanych jako alternatywne dla obecnie stosowanych bądź jako metody odniesienia.

Najpopularniejszymi metodami do oznaczania tyroksyny są techniki woltamperometryczne, charakteryzujące się prostotą oraz szybkością pomiarów [15].

4.1. Oznaczanie woltamperometryczne z wykorzystaniem pastowej elektrody węglowej z fenylohydrazyną

Elektrochemiczne oznaczanie lewotyroksyny sodowej zbadano, stosując jako elektrodę pracującą pastową elektrodę węglową z fenylohydrazyną w roli mediatora. Pomiar przeprowadzono przy użyciu techniki woltamperometrii cyklicznej. Jako elektrolit podstawowy zastosowano 0,1 M HCl. Optymalnym stężeniem fenylohydrazyny uznano 0,1 mM, przy którym wyznaczono zakres liniowości lewotyroksyny zawierający się w przedziale 0,025-0,1 mM. Współczynnik korelacji wyniósł 0,997, a granica wykrywalności 2,5 μM . Stwierdzono, iż metodę można z powodzeniem zastosować do oznaczania T4 w tabletkach [16].

4.2. Oznaczanie woltamperometryczne z wykorzystaniem elektrody z grafitu pirolitycznego

Elektrochemiczną reakcję lewotyroksyny sodowej na elektrodzie z grafitu pirolitycznego (EPPG) zbadano stosując technikę woltamperometrii cyklicznej w obecności 0,1 M HCl jako elektrolitu podstawowego. T4 uległa całkowitemu, nieodwracalnemu procesowi utleniania i uzyskano dobrze ukształtowany pik przy 821 mV. W stosunku do sygnałów otrzymanych w optymalnych warunkach na węglu szklistym i elektrodach z pasty węglowej zaobserwowano znaczne zwiększenie wartości prądu T4 na EPPG. Zoptymalizowano warunki doświadczalne. Zależność prądu utleniania od stężenia przedstawiona została zależnością liniową od 0,01 do 10 mM. Granicę oznaczalności 3 nM otrzymano przy 250 sekundowej akumulacji na poziomie 0,3 V. Badania wykazały, że czujnik ten cechuje się dobrą selektywnością i wysoką czułością w oznaczaniu T4 w próbkach biologicznych i klinicznych [17].

4.3. Oznaczenie woltamperometryczne z wykorzystaniem elektrody z węgla szklistego modyfikowanej nanorurkami węglowymi

Zbadano efekt wpływu bromku cetylotrimetyloamoniowego (CTAB) na zachowanie tyroksyny stosując elektrodę z węgla szklistego (GCE) modyfikowaną nanorurkami węglowymi (SWNT). Osiągnięto dobrze zdefiniowany pik utleniania tyroksyny przy 0,78 V. Do badania mechanizmu reakcji redukcji użyto chronokulometrii. Tyroksyna tworzy kompleks poprzez oddziaływanie atomów jodu z jonami bromku, co powoduje wzrost stężenia tyroksyny na powierzchni elektrody modyfikowanej oraz zwiększenie szybkości przemieszania elektronów. Do badań wykorzystano różne techniki m.in. woltamperometrię cykliczną i liniową. Najniższą granicę wykrywalności, wynoszącą $2 \cdot 10^{-8}$ mol/L, uzyskano przy 2 minutowej akumulacji na 0,9 V. SWNT pokrywające GCE miały dobrą stabilność i powtarzalność [18].

4.4. Wstrzykowa metoda przepływowa do oznaczania lewotyroksyny przez zahamowanie dehydrogenazy glutaminianowej

Rola tyroksyny jako inhibitora dehydrogenazy glutaminianowej została wykorzystana do jej detekcji dzięki opracowaniu prostej, o wysokiej powtarzalności metody przepływowej. Określone zostały optymalne warunki pomiarowe, jak pH elektrolitu podstawowego, którym był bufor fosforanowy (0,05 M; pH 7,8), czas inkubacji i temperatura. Badając wpływ stężenia NADH, wykazano że hamowanie zwiększało się wraz z jego wzrostem do wartości $1,2 \cdot 10^{-4}$ M. Uzyskano liniową zależność w zakresie stężeń $0,2-8 \cdot 10^{-5}$ M. Granica wykrywalności osiągnęła wartość $9 \cdot 10^{-7}$ M. Metoda jest dość oporna na oznaczanie tyroksyny w osoczu, jednak dostatecznie wrażliwa na detekcję w preparatach farmaceutycznych [19].

Literatura

- [1] PubChem - Chemistry Database, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-thyroxine#section=Top>, odwiedzone: 28.03.2016 r.
- [2] Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Levothyroxine>, odwiedzone: 28.03.2016 r.
- [3] Mutschler E., Gesslinger G., Kroemer H.K., Ruth P., Schäfer-Korting M., Farmakologia i toksykologia, MedPharm, Wrocław 2012.
- [4] Tyroksyna - co trzeba o niej wiedzieć? <http://tarczycyca.net.pl/2010/12/17/tyroksyna-co-trzeba-o-niej-wiedziec>, odwiedzone: 28.03.2016 r.
- [5] Gąsiorowski W., Tyreologia praktyczna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1994: 16–20.
- [6] Abbott Voice, Udział laboratorium w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorób tarczycy cz. 3, Nr 1 (7), Kwiecień 2004.

- [7] Niedoczynność tarczycy: przyczyny, objawy, leczenie, http://www.poradnikzdrowie.pl/sprawdz-sie/sygnaly-ciala/niedoczynnosc-tarczycy-przyczyny-objawy-leczenie_33584.html, odwiedzone 28.03.2016 r.
- [8] Orzechowska-Pawłój A., Lewczuk A., Sworczak K., Wpływ hormonów tarczycy na poziom homocysteiny w aspekcie ryzyka rozwoju zmian miażdżycowych *Endokrynologia Polska*, Tom 56, Nr 2/2005.
- [9] Encyklopedia leków, <http://medycyna.anauk.net/1-0-2624-LETROX.Encyklopedia.Lekow.html>, odwiedzone: 28.03.2016 r.
- [10] Ponichtera A., Borowiak E., Choroby tarczycy jako poważny problem medyczny w Polsce, *Problemy Pielęgniarstwa* 2008, tom 16.
- [11] Karta charakterystyki - L-Thyroxine, Sigma Aldrich
- [12] Speroff L., Fritz M. *Kliniczna endokrynologia ginekologiczna i niepłodność*, Medipage, Warszawa 2007.
- [13] Charakterystyka produktu leczniczego – Letrox.
- [14] Charakterystyka produktu leczniczego – Eltroxin.
- [15] Koper M., *Metody woltamperometryczne w oznaczaniu wybranych leków i ich metabolitów*, Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny, Gliwice 2012.
- [16] Gowda C.S, Electro-catalytic oxidation of sodium levothyroxine with phenyl hydrazine as a mediator at carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study., *Article in Journal Of Electroanalytical Chemistry*, June 2010.
- [17] Khafaji M, Shahrokhian S., Ghalkhani M., *Electrochemistry of Levo-Thyroxin on Edge-Plane Pyrolytic Graphite Electrode: Application to Sensitive Analytical Determinations*, *Electroanalysis* 23, 2011.
- [18] Wang F., Fei J., Hu S., The influence of cetyltrimethyl ammonium bromide on electrochemical properties of thyroxine reduction at carbon nanotubes modified electrode, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39, 2004.
- [19] Ghous T., Townshend A., Flow injection method for the determination of thyroxine by inhibition of glutamate dehydrogenase, *Analytica Chimica Acta* 411, 2000.