

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

# Woltamperometryczne oznaczanie melatoniny na elektrodach modyfikowanych

## *Voltammetric determination of melatonin at modified electrodes*

Aldona Krężel<sup>[a]</sup>, Robert Piech<sup>[a]</sup>

[a] AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Polska

---

**ABSTRAKT:** Woltamperometryczne oznaczanie melatoniny przeprowadzono z wykorzystaniem elektrody z węgla szklistego modyfikowanej warstwą nanosadzy. Pomiary wykonywane były za pomocą woltamperometrii impulsowej różnicowej w elektrolicie podstawowym składającym się z 0,75 ml 1M  $KH_2PO_4$  i 9,25 ml wody destylowanej. Poprzez opracowanie woltamperometrycznego sensora melatoniny opartego na warstwie nanosadzy, możliwe jest uzyskiwanie sygnałów melatoniny na zmodyfikowanej elektrodzie z węgla szklistego. W zoptymalizowanych warunkach oznaczania, granica wykrywalności na sensorze z warstwą sadzy wynosiła 0,08  $\mu M$ . W wyniku oznaczania melatoniny w preparatach farmaceutycznych: Melatonina Lek Am oraz Zdrowosen Melatonina, stwierdzono iż metodę można z powodzeniem stosować do oznaczania hormonu w lekach.

**ABSTRACT:** Voltammetric determination of melatonin was carried out using the glassy carbon electrode modified with a layer of nano- carbon black. The measurements were made by means of differential pulse voltammetry in the electrolyte consisting of : 0,75 ml of 1M  $KH_2PO_4$  and 9,25 ml of distilled water. By developing of the melatonin-based voltammetric sensor, it is possible to obtain signals of melatonin on the modified glassy carbon electrode in the optimized conditions for determining and the limit of quantification of the analyte on the sensor with a layer of soot was 0,08 $\mu M$ . In result of the of the performed determinations of melatonin in the chosen pharmaceutical preparations: Melatonin drug Am and Zdrowosen melatonin, it was found that the method can be successfully applied in determination of the hormone in drugs.

---

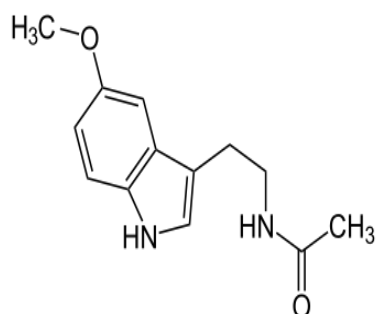
**Słowa kluczowe:** algorytmy genetyczne, funkcje sklejjane, woltamperometria, funkcje sklejjane

## 1. Melatonina

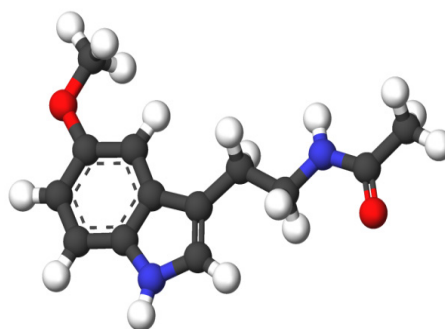
Hormon posiadający formę indoloaminy, która produkowana jest w szyszynce, czyli gromadzie komórek znajdujących się w głębi mózgu. Syntetyzowana jest również w tkankach czy narządach takich jak: siatkówka oka, gruczoły łzowe, szpik kostny czy przewód pokarmowy. Posiada wpływ przede wszystkim na stabilizację cykli biologiczny - całodobowego oraz sezonowego. Reguluje rytmy funkcji fizjologicznych. Melatoninie przydziela się również pomoc w leczeniu u osób ze schorzeniami neurodegeneracyjnymi w chorobie Alzheimera i Parkinsona bądź immunomodulatora w leczeniu u osób chorych na nowotwory. Jednak szczególnie odznaczającą się cechą charakterystyczną jest neutralizowanie wolnych rodników, czyli działanie antyoksydantów..

### 1.1. Wiadomości wstępne

Melatonina( N-acetylo-5-metoksytryptamina) jest pochodną tryptofanu, o masie cząsteczkowej 232,28 g/mol. Ma postać krystaliczną, jasnożółtą barwę i temperaturę topnienia w zakresie od 116,5 do 118 °C. Bardzo dobrze rozpuszczalna w tłuszczach. Na rysunkach 1 i 2 przedstawiono wzór strukturalny melatoniny, oraz jej projekcję przestrzenną.



Rys.1 Wzór strukturalny melatoniny

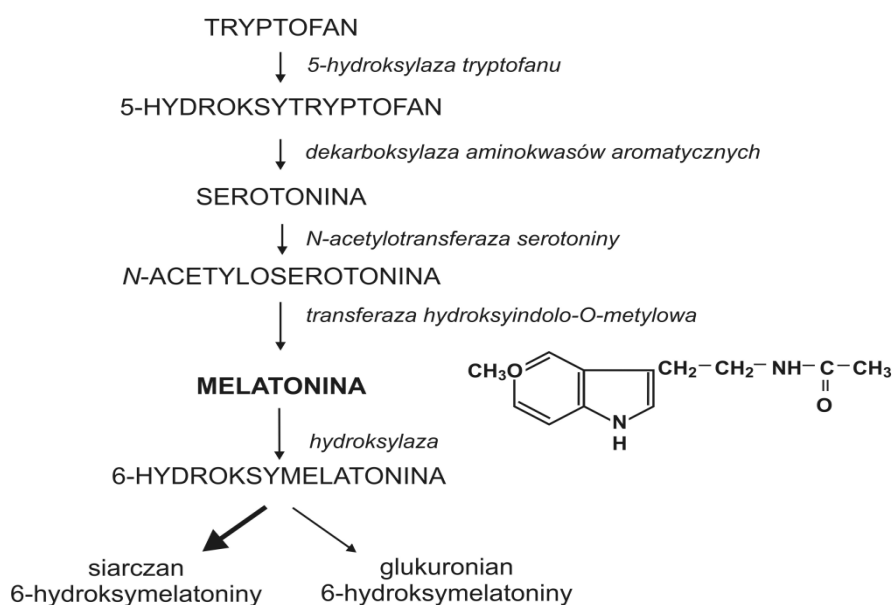


Rys.2 Projekcja przestrzenna

Po raz pierwszy melatonina odkryta została w 1958 roku przez dermatologa z Yale Aarona Lerner. Doprowadził on do oddzielenia hormonu z bydłęcej szyszynki. W roku 1959 sprecyzowano budowę chemiczną, natomiast w kolejnych latach Lerner udoskonalił swoje badania o metodą prowadzącą do określania stężenia w płynach ustrojowych danego inkretu. Kolejnymi odkrywcami byli Raikhlin i Kretnowy, którzy w roku 1974 udowodnili zawartość melatoniny w błonie śluzowej wyrostka robaczkowego.

### 1.1.1. Biosynteza i metabolizm

Produktem wyjściowym dla syntezy melatoniny jest tryptofan. Pobierany jest z krwi przez pinealocyty. Kolejno następuje hydroksylacja tryptofanu do 5-hydroksytryptofanu, przekształcającego się w wyniku dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych w serotoninę, czyli 5-hydroksytryptamina. Kolejna faza polega na zamianie N-acetylotransferazy serotoninowej na N-acetyloserotoninę, poprzez działanie acetylacji. W finalnym stadium N-acetyloserotonina drogą transferazy hydroksyindolo-O-metylowej ustępuje metylacji przy czym powstaje N-acetylo-5-metoksytryptamina – czyli oczekiwana melatonina.



Rys.1 Wzór strukturalny melatoniny.

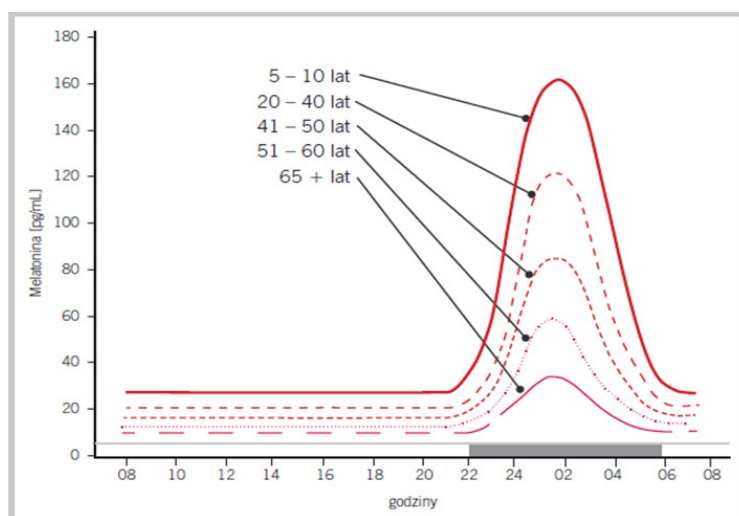
### 1.1.2. Mechanizm działania

W tym kontekście warto podkreślić, że nie istnieje wyłącznie jeden mechanizm. W odniesieniu do problemu możemy mówić o działaniu endokrynnym, występującym w obecności receptorów, oraz takim które następuje bez ich udziału. Należy jeszcze uwzględnić funkcjonowanie parakrynnie oraz autokrynnie, a także „zmiatacza wolnych rodników” i przeciwutleniacza. Przedstawione wyżej opinie wskazują na kluczowe działania takie jak:

- 1) Wiązanie z białkami (np. kalmoduliną),
- 2) Wiązanie z receptorami sierocymi - jądrowymi (które nie posiadają endogennego liganda),
- 3) Wiązanie z receptorami melatoninowymi,
- 4) Działanie przeciwutleniacza.

### 1.2. Rola w funkcji systemu okołodobowego

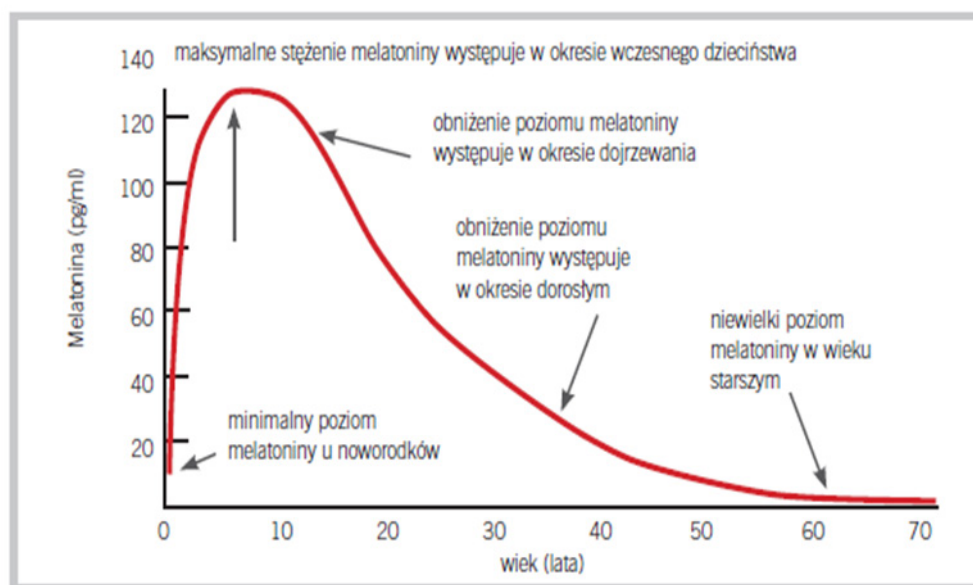
Jak już wcześniej wspomniano melatonina jest ważnym hormonem wpływającym na rytmikę okołodobową i sezonową, dlatego też często nazywana jest hormonem snu. Uważa się, że mechanizm wydzielania hormonu powiązany jest z cyklem światło – ciemność. Najwyższe zawartości melatoniny produkowane są w okresie nocny, a jako stadium najwyższe szacuje się godziny od 24 do 3, w których osiąga się stężenie 80-120 pg/ml. W porze dziennej natomiast wartości sięgają od 5 do 20 pg/ml, więc zakres jest niewielki. Szacuje się, że okres półtrwania melatoniny we krwi wynosi 10-40 min, podczas gdy produkowane jest od 12,3 do 28,8 µg/24h melatoniny. Koncentrując się nadal na danych stężenia hormonu we krwi, w przypadku ludzi starszych mieszczą się one w pułapie 18-40pg/ml, zaś dla ludzi młodszych 54-75pg/ml. Na rysunku 4 przedstawiono dobowy rytm wydzielania melatoniny.



Rys .4 Rytm dobowy wydzielania melatoniny.

Należy także uwzględnić rytm sezonowy, który jest ściśle uzależniony od pór roku. Wskazano na znacznie wyższe zawartości hormonu zimą i latem, a niższe wiosną i jesienią, co jest przyczyną zróżnicowanej porcji światła w danych porach. Jak się okazuje występuje również powiązanie stężenia melatoniny z wiekiem. Chodzi o to, że zawartość związku w płynie ustrojowym, a mianowicie we krwi jest silnie uwarunkowana od wieku, jednak jego stężenie podczas dnia nie wykazuje zasadniczej modyfikacji łącznie z długością życia. Zaczynając od okresu niemowlęcego dobowy rytm wydzielania hormonu inicjuje się pośród 6 a 9 tygodniem, mimo to w pełni funkcjonuje w 6 miesiącu życia. Z biegiem czasu gwałtownie wzrasta stężenie melatoniny w fazie

ciemnej (nocy), a maksymalny poziom następuje pomiędzy 3 - 6 rokiem. W okresie dojrzewania zauważa się widoczny spadek zawartości hormonu, miarowo obniżający się do 40 roku życia ulegając dalszemu pomniejszeniu w późniejszym stadium. Wynika z tego, iż osoby dorosłe posiadają w porze nocnej niedużą obecność melatoniny i dobowy rytm wydzielania praktycznie przemija, co przedstawiono na rysunku 5.



Rys.5 Uwalnianie melatoniny w zależności od wieku.

### 1.3. Objawy niedoboru

Niedobór melatoniny przyczynia się do dysfunkcji rytmów dobowych, prowadząc do bezsenności i trudności z zasypianiem, co w konsekwencji wpływa na ogólne pogorszenie samopoczucia oraz zdrowia ludzi. Z powyższym problemem związany jest efekt „jet lag”, choroba pracowników posiadających zmianowy czas pracy, przewlekły cykl opóźnionego zasypiania, bądź dolegliwości występujące u osób niewidomych. W odniesieniu do zjawiska „jet lag” jest to ogół objawów ukazujących się na skutek nieprzystosowania się do zmiany stref czasowych wynikających z podróży samolotem wzdłuż równoleżnika. Rytm wytwarzania melatoniny podczas podróżowania w kierunku zachodnim jest opóźniony, natomiast u podróżujących w kierunku przeciwnym zwiększony. Przyczynia się to do zaburzenia rytmiki snu, osłabienia organizmu a także pogorszenia nastroju. Dolegliwości związane ze zmianą stref czasowych mogą być skutecznie łagodzone poprzez przyjmowanie odpowiednich dawek melatoniny. Aplikowanie hormonu u ludzi z zespołem opóźnionej fazy snu przyspiesza usypianie o około 2-3h. Dzięki temu osoba cierpiąca na dane schorzenie pozbywa się problemów z zasypianiem i zbyt późnym wybudzaniem, spowodowanym obniżeniem poziomu wydzielania melatoniny. Problem ten dotyka również osoby zamieszkujące rejony koła podbiegunowego. Ze względu na niedobór wzmożonego światła, mieszkańcy popadają w depresję, która szczególnie nasila się w porze zimowej. Niedobór melatoniny dotyczy również pracowników zmianowych. Badania wskazują u nich na rozregulowanie dobowego procesu produkowania, objawiającego się zakłóceniami ze snem. Stwierdzono również, że zaburzenia te spowodowane są zbyt długim czasem kontaktu człowieka ze sztucznym oświetleniem podczas pracy w nocy. W celu uregulowania poziomu hormonu należy przyjmować go w porze nocnej, doprowadzi to do zniwelowania uczucia senności w ciągu dnia i poprawy kondycji snu.

Rozregulowanie wydzielania hormonu objawia się także u osób niewidomych. Rytm dobowy sięgał od około 24 do 25h. Dozowanie melatoniny pozwala ustabilizować cykl dzień-noc, od którego nie jest w tym przypadku uzależnione wydzielanie związku.

#### 1.4. Działanie lecznicze

##### 1.4.1. Przeciwutleniacz i „zmiatacz” wolnych rodników

Jedną z najbardziej kontrowersyjnych właściwości melatoniny jest jej działanie jako przeciwutleniacza oraz „zmiatacza” wolnych rodników. Zanim przejdę do omawiania powyższej problematyki nawiążę najpierw do wyjaśnienia pojęcia wolnych rodników. Wolne rodniki są to reaktywne cząsteczki, które na swojej zewnętrznej orbicie zawierają pojedynczy elektron. W organizmie ludzkim istnieje wiele ich form. Stwierdzono zobojętniające działanie pochodnej tryptofanu na rodniki występujące w reaktywnej formie tlenu takie jak: rodnik hydroksylowy ( $\cdot\text{OH}$ ), tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ), kwas podchlorawy ( $\text{HClO}$ ), anion kwasu nadtlenoazotowego ( $\text{ONOO}^-$ ) oraz kwas nadtlenoazotowy ( $\text{ONOOH}$ ). Należy również wspomnieć, iż melatonina jest dobrze rozpuszczalna w lipidach jak i wodzie, więc może odgrywać funkcję przeciwutleniacza hydrofilowego jak i hydrofobowego. Dotychczasowe badania wskazują na kilkukrotnie większą niezawodność indoloaminy w usuwaniu wolnych rodników w przeciwieństwie do dotychczas przyjętego pierwszorzędowego przeciwutleniacza hydrofilowego o nazwie glutation, oraz hydrofobowego – witaminy E. Jak się okazuje melatonina jest również lepszym antyoksydantem przez wzgląd na jej wzorową umiejętność penetracji komórki. Prace badawcze wskazują na fakt powiększającej się aktywności najistotniejszych enzymatycznych mechanizmów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), reduktaza glutationowa (GR), peroksydaza glutationowa (GPx). Dotychczasowa analiza pozwala wskazać na obronne oddziaływanie hormonu w mechanizmie powstawania chorób. Nawiązując do wypowiedzi są to m.in.: działanie na leki i metale ciężkie, wstrząs endotoksyczny, zaburzenia powiązane z niedokrwistością i inne.

##### 1.4.2. Choroby nowotworowe

Obecnie istnieje wiele pogłosek dotyczących uzdrawiającego wpływu melatoniny w chorobach nowotworowych. Wykonano wiele badań i analiz, z których duża część przeprowadzona została na zwierzętach. Z powyższym problemem łączy się efekt zmniejszania stężenia melatoniny wraz z wiekiem u osób starszych. Badacze wskazują na większą ilość zachorowań w tej części populacji. Kolejnym istotnym czynnikiem wiążącym schorzenie z hormonem jest jego wzrost jego stężenia w początkowym stadium choroby, a następnie jego zmniejszanie się wraz z czasem jej trwania.

Przeprowadzono również badania melatoniny w powiązaniu z jedną z metod leczących nowotwory – chemioterapią. Okazało się, że znacznie perspektywistyczne wyniki tą metodą uzyskiwały osoby, u których po jej przeprowadzeniu podwyższał chorobach neurodegeneracyjnych. Jak się okazuje osoby dotknięte schorzeniem Alzheimera, posiadają niedobory melatoniny i mają problemy z zaburzeniami cyklu sen-czuwanie. Kolejnym problemem jest upośledzenie funkcji poznawczych. Przedstawione dolegliwości znacznie ustępują po zażyciu melatoniny. Prawdopodobnie hormon ma również swój udział w neutralizowaniu uszkodzeń komórek nerwowych. Obecnie prowadzi się również badania w przypadku choroby Parkinsona. Wstępne raporty dowodzą, że hormon ma swój udział w neutralizowaniu uszkodzeń komórek nerwowych podczas procesu autooksydacji dopaminy, który często występuje w chorobie Parkinsona.

##### 1.4.3. Układ immunologiczny i układ krążenia

Swoje lecznicze działanie melatonina wykazuje również w oddziaływaniu na układ immunologiczny. Udowodniono że wykazuje on zbliżony dobowy rytm wydzielania. Szacuje się

wpływ pochodnej tryptofanu na wzrost ilości komórek NK, wydzielanych przez wymieniony układ, które chronią przed patogenami i komórkami nowotworowymi. Zapobiega również apoptozie komórek układu. W przypadku układu krwionośnego melatonina reguluje nadmiar cholesterolu we krwi, oraz wyrównuje ciśnienie. Należy przy tym zaznaczyć, że oddziałuje korzystnie na chorobę niedokrwinną serca.

#### 1.4.4. Procesy starzenia

Proces starzenia niewątpliwie wzbudził wiele kontrowersji odnoszących się do melatoniny. Prowadzi się coraz więcej badań aby określić jej wpływ na ten nieunikniony w życiu każdego człowieka etap. Mówi się, że na proces starzenia może mieć wpływ niedobór melatoniny, a także jej spadek wraz z wiekiem. Osoby w podeszłym wieku są bardziej narażone na występowanie wszelakich chorób, w tym nowotworowych czy neurodegeneracyjnych oraz problemów z zasypianiem. Z tego powodu zaleca się im stosowanie indoloaminy.

#### 1.5. Zastosowanie

Wyróżnia się trzy podstawowe względy do zastosowania melatoniny które są klinicznie udowodnione: zaburzenia snu u osób starszych, regulacja cyklu sen-czuwanie u osób przekraczających strefy czasowe oraz zaburzenia rytmów dobowych u niewidomych. Najnowsze badania, choć jeszcze nie kompletne i w pełni nie potwierdzone wskazują, że melatonina z powodzeniem może być stosowana także w procesach fizjologicznych, neurologicznych czy psychiatrycznych. Jak wcześniej wspomniano wykorzystywana jest przy chorobie Alzheimera, Parkinsona, oraz jako immunomodulator w terapii nowotworowej. Najnowszym zastosowaniem jest usuwanie wolnych rodników.

##### 1.5.1. Dawkowanie

Dawkowanie hormonu oraz czas przyjmowania uwarunkowane są od przyczyn stosowania i dobierane indywidualnie dla każdej osoby. Standardowa dawka leku mieści się w zakresie od 1 do 6 mg.

Dla przykładu w zaburzeniach rytmu dobowego u osób niewidomych:

- 1-6 mg raz dziennie przed snem ok. godziny 21-22.

W zaburzeniach snu związanych ze zmianą stref czasowych:

- loty na wschód – 2 dni przed planowanym wylotem 1-6 mg ok. godziny 19, a następnie przez 4 dni 1-6 mg godzinę przed snem
- loty na zachód – 1-6 mg godzinę przed snem przez 4 dni po przylocie.

W zaburzeniach snu związanych z zaburzeniami rytmu snu i czuwania:

- 1-6 mg godzinę przed snem.

## 2. Przegląd metod oznaczanie melatoniny

### 2.1. Chromatografia cieczowa i woltamperometria

Do ilościowego oznaczania melatoniny w lekach wykorzystano dwie metody analityczne - chromatografię cieczową (HPLC) oraz woltamperometrię. Jako elektrolit podstawowy wykorzystano bufor fosforanowy o pH 3,0. W przypadku chromatografii cieczowej liniowość uzyskano w zakresie stężeń pomiędzy 0,125 i 1,0 µg/ml, a granica wykrywalności wynosiła 0,065 µg/ml. Natomiast dla woltamperometrii zakres liniowości obejmował od 6,25 do 50 µg/ml, a granica oznaczalności

wynosiła 2,5 µg/ml. Obie metody okazały się odpowiednie do oznaczania melatoniny w preparatach farmaceutycznych.

### 2.2 Oznaczanie woltamperometryczne z wykorzystaniem elektrod modyfikowanych nanorurkami węglowymi i grafenem

Elektrochemiczne oznaczanie melatoniny zrealizowano przy użyciu elektrod modyfikowanych nanorurkami węglowymi i grafenem. Pomiary wykonano techniką woltamperometrii cyklicznej oraz impulsowej różnicowej. Jako elektrolit podstawowy zastosowano bufor fosforanowy o pH 7,6. Wyznaczono zakres liniowości zawierający się w przedziale 0,005 - 3 mM. Najniższa osiągnięta granica wykrywalności wyniosła 1,1 µM. Wykazano, że elektrody modyfikowane nanomateriałami węglowymi są niezawodne do wykrywania i oznaczania melatoniny.

### 2.3 Oznaczanie woltamperometryczne z wykorzystaniem elektrody węglowej

Oznaczanie melatoniny przeprowadzono techniką woltamperometrii cyklicznej w 0,02 M kwasie nadchlorowym. Jako elektrodę pracującą wykorzystano elektrodę z pasty węglowej. Zależność liniową metody osiągnięto w zakresie stężeń od  $3 \cdot 10^{-6}$  M do  $5,5 \cdot 10^{-4}$  M. Granica wykrywalności wyniosła 2,3 µM. Metoda okazała się czuła, szybka, prosta i niezawodna do analizy melatoniny w lekach.

### 2.2. Wstrzykowa analiza przepływowa woltamperometria cykliczna

Detekcję melatoniny w farmaceutykach przeprowadzono przy użyciu dwóch metod elektrochemicznych: woltamperometrii cyklicznej oraz wstrzykowej analizy przepływowej. Odpowiednie przygotowanie elektrody z pasty węglowej w pierwszym przypadku oraz zastosowanie dużej szybkości przepływu w drugim umożliwiło osiągnięcie bardzo dobrej powtarzalności. Dla FIA-ED zależność liniową uzyskano w zakresie stężeń  $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M, a granica wykrywalności wynosiła  $8 \cdot 10^{-9}$  M. Dla CV liniowość obejmowała od  $6 \cdot 10^{-8}$  do  $8 \cdot 10^{-7}$  M, a granica wykrywalności równa była  $3 \cdot 10^{-8}$  M.

## Literatura

- [1] Krasek M., *Szyszynka i melatonina*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
- [2] Tafil- Klawe M., Klawe J., *Wykłady z fizjologii człowieka*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.
- [3] Wikipedia, <http://pl.wikipedia.org/wiki/Melatonina>, odwiedzona : 16.01.2016r.
- [4] Lewiński A., Karbownik – Lewińska M., *Znaczenie kliniczne i zastosowanie terapeutyczne – obecny stan wiedzy*, Folia Medica Lodziensia, 2010, 37/1:111-150
- [5] Adamczak Ratajczak A., Rozprawa doktorska - Rytmy okołodobowe melatoniny i kortyzolu w wybranych chorobach neurologicznych, Poznań 2014
- [6] Iwanek K., *Melatonina w leczeniu zaburzeń*, Lek w Polsce nr 5, 2014
- [7] Skwarło – Sońta K., Majewski P., Melatonina, wielofunkcyjna cząsteczka sygnałowa w organizmie ssaka: miejsce biosyntezy, funkcje, mechanizmy działania, Folia Medica Lodziensia, 2010, 37/1:15-55
- [8] Bilski B., Perz S., Perz K., Czy egzogenna melatonina może być skuteczna w profilaktyce i leczeniu zaburzeń związanych z pracą nocną i zmianową, *Medycyna Pracy*, 2005;56(3):257 — 261
- [9] Bukowska A., Rola melatoniny w procesach antynowotworowych – potencjalne mechanizmy, *Medycyna Pracy* 2011;62(4):425-434
- [10] Gustaw K., Melatonina, nietypowy antyoksydant. Rola w patofizjologii choroby Alzheimera. Propozycje terapii, *FARMAKOTERAPIA W PSYCHIATRII I NEUROLOGII*, 2003, 4, 59-69
- [11] Portal leków, [http://bazaleków.mp.pl/leki/doctor\\_subst.html?id=1757](http://bazaleków.mp.pl/leki/doctor_subst.html?id=1757), odwiedzono 20.01.2016
- [12] Raggi M.A., Bugamelli F., Pucci V., *Determination of melatonin in galenic preparations by LC and voltammetry*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 2002.

- [13] Gomez F.J., Martin A., Silva M.F., Escarpa A., Screen-printed electrodes modified with carbon nanotubes or graphene for simultaneous determination of melatonin and serotonin, Wien2015
- [14] Beghiet G., Radi A., Voltammetry of melatonin at carbon electrodes and determination in capsules, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45, 1998
- [15] Corujo-Antuna J.L., Abad-Villar E.M., Fernandez-Abedul M.T., Costa- Garcia A., *Voltammetric and flow amperometric methods for the determination of melatonin in pharmaceutical*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13, 2003.