

Razvoj i validacija RP-HPLC metode za određivanje trijodtironina i tiroksina u biološkom uzorku

Jovanović, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:854785>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Mihaela Jovanović

**Razvoj i validacija RP-HPLC metode za
određivanje trijodtironina i tiroksina u
biološkom uzorku**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji pod stručnim vodstvom dr. sc. Ruže Frkanec i suvoditeljstvom dr.sc. Davora Šakića. Rad je napravljen u okviru projekta “Sinteza supramolekulskih samo-udruženih nanostruktura za izgradnju naprednih funkcionalnih materijala“ (SUPeRNANO, IP-2018-01-6910) kojega financira Hrvatska zaklada za znanost.

Zahvalila bih se prije svega svojoj dragoj mentorici dr.sc. Ruži Frkanec na ogromnom strpljenju, pomoći i podršci kao i njevoj asistentici Marceli. Također zahvalila bih se dr.sc. Davoru Šakiću na savjetima te cijelom Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu koji mi je omogućio stjecanje znanja da radim ono što volim. Veliko hvala mojoj obitelji, prijateljima i Filipu bez kojih ovaj Diplomski rad ne bi bio moguć. Hvala svima od srca.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Hormoni	2
1.1.1. Endokrini sustav	2
1.1.3. Hipotireoza	7
1.1.4. Određivanje hormona štitnjače u kliničkim laboratorijima	9
1.1.5. Terapije hipotireoze	11
1.1.6. Prednosti i nedostaci kombinirane terapije	13
1.2. Kromatografija	15
1.2.1. Kromatografske metode	15
1.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	17
1.2.3. Upotreba HPLC metode u analizi hormona štitnjače	20
1.3. Razvoj i validacija bioanalitičkih metoda	21
1.3.1. Razvoj bioanalitičkih metoda	21
1.3.2. Validacija bioanalitičkih metoda	22
1.3.2.1. Specifičnost metode	23
1.3.2.2. Točnost metode	24
1.3.2.3. Preciznost metode	24
1.3.2.4. Linearnost metode	25
1.3.2.5. Limit detekcije i limit kvantifikacije	25
1.3.2.6. Robusnost metode	26
1.4. Postupak kvantifikacije	27
2. OBRAZLOŽENJE TEME	28
3. MATERIJALI I METODE	30
3.1. Materijali	31
3.1.1. Instrumenti	31
3.1.2. Pribor	31
3.1.3. Uzorci	31
3.1.4. Kemikalije	32
3.2. Metode	33
3.2.1. HPLC-UV-Vis metoda za određivanje T3 i T4	33
3.2.2. Priprema standardnih otopina T3, T4 i antrakinaona	34
3.2.3. Priprema uzorka biološkog materijala za analizu	34
3.2.4. Statistička obrada podataka	35
4. REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1. Validacija RP-HPLC metode	37
4.1.1. Specifičnost i selektivnost RP-HPLC metode	37
4.1.2. Preciznost RP-HPLC metode	40
4.1.3. Točnost RP-HPLC metode	43
4.1.4. Linearnost RP-HPLC metode	44

4.1.5. Limit detekcije i limit kvantifikacije RP-HPLC metode	46
4.2. Kvantitativna analiza T3 i T4 u komercijalnom tiroidnom pripravku	47
5. ZAKLJUČCI	54
6. LITERATURA	56
7. SAŽETAK/SUMMARY	61
PRILOZI	64
8.1. POPIS KRATICA	65
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	68

1. UVOD

1.1. Hormoni

1.1.1. Endokrini sustav

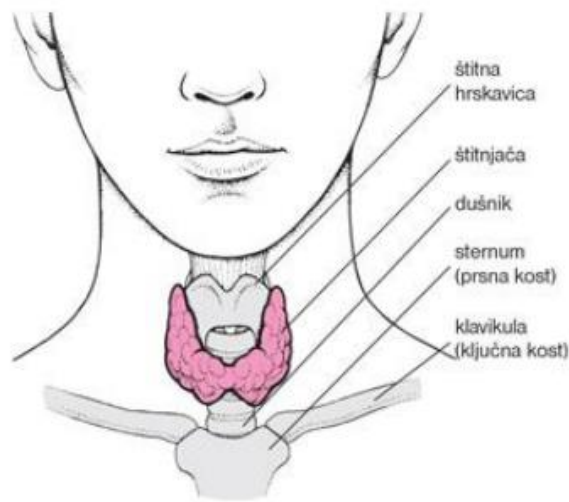
Hormoni su organski kemijski spojevi koje proizvode i izlučuju stanice ili žlijezde u tjelesne tekućine nakon specifičnog podražaja s ciljem regulacije i kontrole brojnih fizioloških funkcija (Bukovec Megla i sur., 2017). Općenito, možemo ih podijeliti na egzokrine i endokrine. Endokrini hormoni se prenose krvožilnim sustavom po čitavom organizmu, dok egzokrini imaju posebne odvodne kanaliće i djeluju lokalno. Endokrinologija je znanost koja proučava hormone, njihovu funkciju, aktivnost, sintezu i regulaciju, te stanice i žlijezde koje ih sintetiziraju i izlučuju. (Štraus i sur., 2009). Prema području djelovanja razlikujemo hormone koji djeluju na sve stanice u organizmu i na hormone koji djeluju na specifične stanice. Primjer regulacije svih stanica su hormoni štitnjače, u čijem nedostatku se usporava metabolizam. Za razliku od hormona štitnjače, primjer za specifične stanice je tireotropin oslobađajući hormon (TRH, engl. *Thyrotropine-releasing hormone*) koji djeluje na stanice žlijezde adenohipofize, što posljedično dovodi do lučenja tireotropina (tireoidni stimulirajući hormon, eng. *thyroid-stimulating hormone*, TSH). TSH djeluje na receptore stanica štitnjača zbog čega dolazi do povećanja sinteze i sekrecije hormona štitnjače trijodtironina (3,5,3'-trijodtironin, T3) i tiroksina (3,5,3',5'-tetrajodtironin, T4) (Štraus i sur., 2009).

Hormoni, iako različiti po kemijskoj strukturi, mogu se podijeliti na tri skupine: polipeptidne i proteinske, stereoide i derivati aminokiseline tirozina. U polipeptidne i proteinske ubrajaju se hormoni hipotalamusa, prednjeg i stražnjeg režnja hipofize, gušterače (inzulin i glukagon), paratireoidne žlijezde (paratireoidni hormon) i drugi. Steroidi se luče iz kore nadbubrežnih žlijezde (kortizol i aldosteron), jajnika (estrogen i progesteron), testisa (testosteron) i posteljice (estrogen i progesteron) te su derivati kolesterola. U derivate aminokiseline tirozina spadaju hormoni koji se luče iz štitnjače i srži nadbubrežnih žlijezda (adrenalin i noradrenalin). Tirozin je uvjetno esencijalna aminokiselina jer nastaje hidroksilacijom fenilalanina koja je esencijalna aminokiselina (Štraus i sur., 2009). Unatoč velikim razlikama u građi hormona, endokrini sustav ima zajedničku ulogu kontrole svih tjelesnih funkcija koje uključuju rast, razvoj, metabolizam, razmnožavanje, ravnotežu vode i elektrolita pa čak i ponašanje i raspoloženje.

1.1.2. Hormoni štitnjače

Štitnjača je endokrina žlijezda koja je smještena neposredno ispod grkljana, s obje strane dušnika te ispred njega (Slika 1.). Nalikuje leptiru, ima dva režnja koja su spojena istmusom

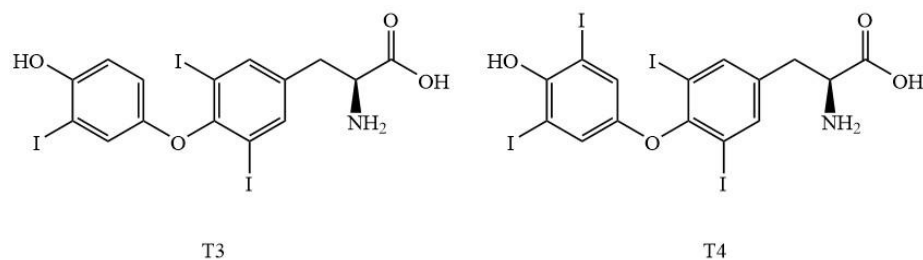
sačinjenog od parenhimnog tkiva. Jedna je od najvećih endokrinih žlijezdi mase od 15 g do 20 g u odraslih ljudi (Beynon i Pinneri, 2016).



Slika 1. Anatomski položaj štitnjače (preuzeto s: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/hormonski-poremecaji/poremecaji-stitnjace>, datum pristupa 21.03.2022).

Štitnjača je jedinstvene fiziološke građe, sastoji se od velikog broja folikula koji su ispunjeni koloidom. Koloid je obložen kubičnim epitelnim stanicama preko kojih se odvija promet hormona i joda. Glavni sastojak koloida je glikoprotein tireoglobulin (Tg) koji je nosač hormona štitnjače (Arrangoiz i sur., 2018). Za normalnu funkciju štitnjače i za stvaranje primjerenih količina hormona potrebna je adekvatna količina joda koje iznose otprilike 1 mg tjedno (Guyton i sur., 2007). On se osigurava putem hrane bogatom jodidom. Kako bi se osigurao unos joda putem prehrane kuhinjska sol se jodira.

Štitnjača luči dva važna hormona, T4 i T3 koji se sastoje od tirozinske jezgre s vezanim atomima joda (Slika 2). Oba hormona važna su za održavanje bazalnog metabolizma. Potpuni nedostatak hormona štitnjače smanjuje bazalni metabolizam za 40% do 50% ispod homeostatskih vrijednosti (Guyton i sur., 2007).



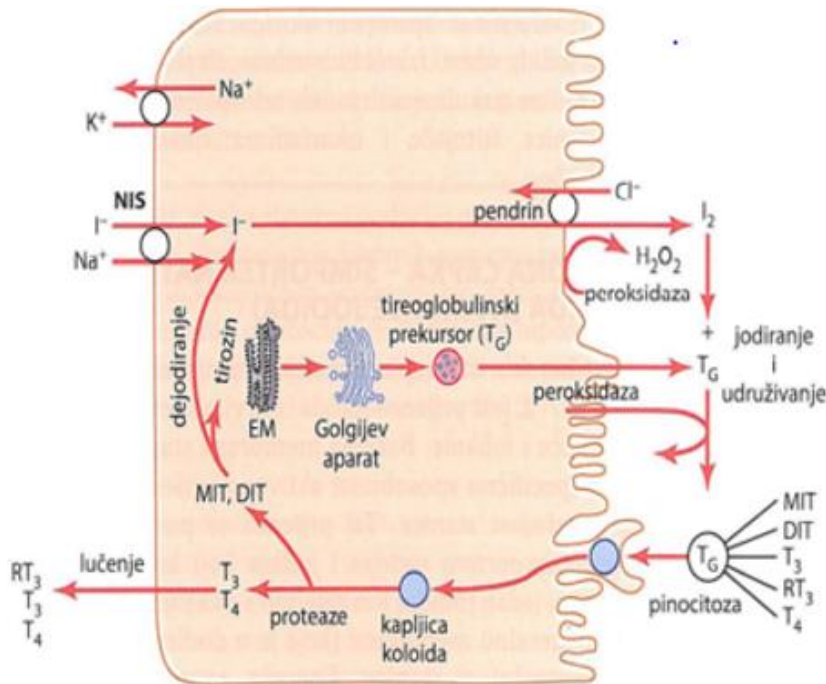
Slika 2. Kemijska struktura hormona T3 i T4.

T3 i T4 su kvalitativno jednaki što znači da vrše istu funkciju u organizmu, no razlikuju se po brzini i intenzitetu djelovanja. T3 je 4-5 puta biološki aktivniji od T4 (Štraus i sur., 2009). Štitnjača je jedini izvor T4, te ga značajno više luči od T3 (93 % naspram 7 %). T3 nastaje perifernom konverzijom iz T4 zbog čega se tiroksin može shvatiti kao prekursor T3 koji nastaje samo po potrebi. Tiroksin T4 je prekursor iz kojeg perifernom konverzijom nastaje T3 ukoliko se u organizmu ukaže potreba. Trijodtironina, ima ga značajno manje u cirkulaciji od tiroksina, te djeluje mnogo kraće (Guyton i sur., 2007).

Stvaranje hormona štitnjače započinje prijenosom jodida iz krvotoka u folikule. Taj proces se naziva hvatanje jodida. Da bi jod dospio u folikul mora proći bazolateralnu membranu djelovanjem simportera natrija i joda (NIS). Jodid zajedno s dva iona natrija prelazi u unutrašnjost stanice, a gradijent se osigurava Na/K ATPazom. Nakon toga jodid prolazi apikalnu membranu da bi došao u folikul pomoću jodid/klorid antiporta. Nakon unosa jodida (I^-) slijedi njegova oksidacija u jod ($2I^- \rightarrow I_2 + 2e^-$) koji se onda može vezati za tirozinske ostatke tireoglobulina. Proces oksidacije ubrzava enzim peroksidaza pa u slučaju mutacije peroksidaze kao i ATPaze dolazi do potpunog zakoćenja funkcija štitnjače. Peroksidaza, i njoj pridruženi vodikov peroksid, nalaze se na apikalnoj membrani što omogućuje lako vezivanje oksidiranog joda i tireoglobulina iz Golgijeva aparata (GA). Endoplazmatska mrežica (EM) i Golgijev aparat epitelnih stanica štitnjače stvaraju i luče velike količine tireoglobulina koji je izvor tirozina, prekursora T3 i T4. T4 i T3 stvaraju se unutar molekule tireoglobulina te nakon sinteze ostaju vezani za njega i pohranjeni u folikularnom koloidu do izlučivanja u krvotok. Proces organifikacije tireoglobulina je vezivanje joda s molekulom tireoglobulina (Guyton i sur., 2007). Jod se veže za tirozinske ostatke tireoglobulina pri čemu prvo nastaje monojodtirozin (MIT), a zatim dijodtirozin (DIT). Tiroksin nastaje spajanjem dviju molekula dijodtirozina. Manjim djelom nastaje trijodtironin koji nastaje spajanjem jedne molekule monojodtirozina i dijodtirozina, ali u mnogo većoj količini nastaje (14/15) dejodiranjem tiroksina nakon otpuštanja (Guyton i sur., 2007). Spajanjem dijodtirozina i monojodtirozina nastaju i male količine reverznog T3 (rT3, 3,3',5'- trijodtironin) koji nema fiziološkog učinka. Njegovo nastajanje nije do kraja razjašnjeno, ali je primjećeno da je povišen u stanjima stresa i bolesti (Arrangoiz i sur., 2018). Zalihe hormona dostatne su za dva do tri mjeseca (Štraus i sur., 2009) što je razlog zašto su fiziološki učinci manjka hormona vidljivi tek mjesecima nakon zakoćenja u sintezi.

Hormoni se izlučuju iz štitnjače odcjepljivanjem od molekula tireoglobulina. Apikalnom stranom tireocita pružaju se izdanci poput pseudopodija koji obavijaju koloid s

tireoglobulinima. Nastaju pinocitozni mjehurići koje preuzimaju lizosomi koji sadrže velike količine proteaza čime probavljaju tireoglobulin i otpuštaju slobodni T3 i T4 dok se jod, MIT i DIT recikliraju (Slika 3.). Nakon otpuštanja, T4 se sporo dejodiniira u T3 čime se osiguravaju njegove dostatne količine (Guyton i sur., 2007; Arranngoiz i sur., 2018). Zalihe hormona u štitnjači dostatne su za dva do tri mjeseca u održavanju homeostaze (Štraus i sur., 2009) što je razlog zašto su fiziološki učinci manjka hormona vidljivi tek mjesecima nakon prestanka sinteze.



Slika 3. Stanični mehanizmi štitnjače (preuzeto iz: Guyton i sur., 2007).

Periferna konverzija T4 u T3 kontrolirana je grupom enzima koji se nazivaju dejodinaze. Postoje tri tipa dejodinaza: tip 1 (D1), tip 2 (D2) i tip3 (D3). D1 i D2 kataliziraju dejodinaciju T4 u T3 pri čemu D2, zbog najvećeg afiniteta prema supstratu, ima ključnu ulogu. D3 djeluje antagonistički zaustavljajući djelovanje štitnjače inaktivacijom T3 i T4, te dodatno, katalizira nastajanje rT3. Dejodinaze imaju centralnu ulogu u održavanju plazmatske koncentracije T3 (Bianco i Drigo, 2011), a kodirane su DIO1, DIO2 i DIO3 genima koji su podložni genskim polimorfizmima (McAninch i Bianco, 2016).

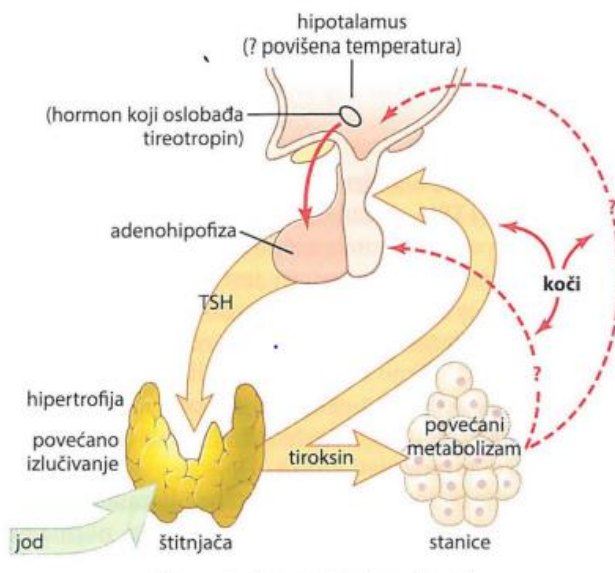
Više od 99 % T3 i T4 u krvi je vezano za proteine plazme, pretežito za globuline koji vežu tiroksin (engl. *thyroxine-binding globulin*, TBG), a mnogo manje za albumine i prealbumine koji vežu tiroksin. Otpuštanje u tkivo je sporo zbog velikog afiniteta hormona štitnjače za

proteinima plazme. Nakon ulaska u tkivo opet se vežu za proteine, odnosno dolazi do njihove ponovne pohrane.

Fiziološke funkcije hormona štitnjače ostvaraju se poticanjem transkripcije velikog broja gena vezivanjem za unutrašnje receptore u jezgri. Posljedično dolazi do sinteze velikog broja enzima, građevnih i prijenosnih proteina. Djelovanje hormona štitnjače može se podijeliti na opće, koji djeluju na razini čitavog metabolizma i specifične. Najvažnija opće djelovanje je povećanje metaboličke aktivnosti svih stanica povećanjem iskorištenja hranjivih tvari za dobivanje energije te povećanja broja i veličine mitohondrija. Također, dolazi do povećanja aktivnog prijenosa zbog povećanja aktivnosti enzima Na/K ATPaze i povećanja propusnosti za ione. Specifične funkcije hormona štitnjače su raznovrsne i uključuju složene i/ili nepotpuno razjašnjene procese. Primjerice, oni pospješuju metabolizam ugljikohidrata djelujući na svim razinama: pospješuju ulazak glukoze u stanicu, glukoneogenezu i glikolizu, apsorpciju ugljikohidrata iz probavnog sustava i posljedično pojačano lučenje inzulina. Imaju ulogu i u metabolizmu lipida, povećavajući koncentraciju slobodnih masnih kiselina u plazmi. Hormoni štitnjače kontroliraju koncentraciju kolesterola potičući njihovo izlučivanje u žuč, odnosno feces. Insuficijencija štitnjače može se očitovati kao povećanje koncentracije kolesterola i triglicerida iznad referentnih ili preporučenih vrijednosti (referentni interval kolesterola: < 6 mmol/L, preporučena vrijednost triglicerida: < 1.7 mmol/L). Uslijed ubrzane transkripcije gena i sinteze enzima, potaknuto hormonima štitnjače, potreba za vitaminima u tijelu je povećana. Ubrzanjem metabolizma, dolazi do potrošnje veće količine kisika i posljedično dolazi do bržeg rada srca. Osim povećanja snage srčane kontrakcije dolazi do općenitog povećanja kontrakcije ostalih mišića, uključujući glatke mišiće probavnog sustava te je veća pokretljivost probavnog sustava. Ujedno se time namiruje i povećana potreba za hranjivim tvarima. Žene s hipotireozom imaju česte menstrualne cikluse bez ovulacije pa im je smanjena fertilitet dok se ne uspostave normalne razine hormona. Djelovanje hormona štitnjače na rast je vrlo značajno. Njihovo djelovanje se najbolje očituje kod djece. Kod hipotireoze u djece dolazi do smanjenog rasta, a kod hipertireoze do početnog povećanog rasta, no konačnog manjeg rasta. Ključni su za poticanje rasta i razvoja mozga tijekom fetalnog razvoja te prvih nekoliko mjeseci života. Ako fetus ne luči dostatnu količinu hormona ili se štitnjača uopće ne razvije bez hormonske terapije mozak se ne razvije do kraja pa dolazi do trajnog mentalnog zaostajanja (Guyton i sur., 2007; Štraus i sur., 2009).

TSH ili tireotropin je hormon adenohipofize koji je funkcionalno povezan s T3 i T4. TSH se veže za transmembranske receptore u tireocitima čime pokreće kaskadu reakcija preko

sekundarnog glasnika cAMP pri čemu dolazi do višestruke fosforilacije i otpuštanja T₃ i T₄ u cirkulaciju proteolizom tireoglobulina, povećanim hvatanjem jodida, povećanim jodiranjem tirozina te povećanjem funkcionalne sposobnosti i broja stanica štitnjače. Ukupni učinak jest povećanje sekrecije hormona i broja stanica štitnjače. Lučenje TSH je regulirano hormonom iz hipotalamusa TRH te negativnom povratnom spregom. TRH luče živčani završeci hipotalamusa, a do adenohipofize dolazi hipotalamus-hipofiznim krvnim žilama. Po kemijskoj strukturi je peptid kao i TSH. Mehanizam djelovanja TRH uključuje vezivanje na transmembranske receptore hipofiznih stanica čime potiče sekreciju TSH. Povećanjem koncentracije hormona štitnjače smanjuje se lučenje TSH preko mehanizma negativne povratne sprege (Slika 4.) (Guyton i sur., 2007; Štraus i sur., 2009).



Slika 4. Regulacija lučenja hormona štitnjače (preuzeto iz: Guyton i sur., 2007).

1.1.3. Hipotireoza

U najčešće bolesti endokrinološkog sustava ubrajaju se poremećaji funkcije štitnjače (Čepelak i sur., 2004) U poremećaje funkcije štitnjače spadaju hipotireoza, hipertireoza, promjene hormona štitnjače u teškim stanjima i bolestima nevezanim za štitnjaču (engl. *euthyroid sick syndrome*) te poremećaji izazvani lijekovima (Čepelak i sur., 2004). Hipotireoza je patološko stanje koje se javlja zbog smanjenja stvaranja i lučenja hormona štitnjače te je češće incidencije od hipertireoze. Zbog negativne povratne sprege dolazi do povišenih plazmatskih razina TSH.

Autoimune bolesti štitnjače jedne su od najčešćih autoimunih bolesti. Najčešći autoimuni poremećaj vezan za štitnjaču je Hashimotova bolest ili kronični limfocitni tireoiditis. U ovom poremećaju, između ostalog, u krvi bolesnika prisutne su povišene koncentracije jednog ili oba protutijela usmjerenih na djelove štitnjače (anti-TPO i/ili anti-Tg). Anti-TPO je protutijelo usmjereno je na tiroidnu peroksidazu (TPO) dok je anti-Tg protutijelo usmjereno na tireoglobulin pri čemu dolazi do njihovog blokiranja i uništenja. Kao posljedica javlja se upala te dolazi do infiltracije polimorfonuklearnim stanicama, ponajviše limfocitima te plazma stanicama. U konačnici dolazi do fibroze tkiva i nemogućnosti sinteze hormona (Beynon i Pinneri, 2016).

Drugi oblici hipotireoze dovode do povećanja štitnjače te razvijanja guše. Dva su glavna oblika guše. Endemska koloidna guša te idiopatska netoksična koloidna guša. Uzrok endemske koloidne guše je manjak joda, a karakterističan je za krajeve gdje je hrana siromašna jodom, i sol se ne jodira. Posljedica manjka joda je smanjena sinteza T3 i T4 zbog čega ne dolazi do njihovog inhibicijskog djelovanja na lučenje TSH. Bez povratne sprege, TSH nekontrolirano djeluje na stanice štitnjače povećavajući veličinu štitnjače. Patofiziologija idiopatske netoksične koloidne guše nije do kraja razjašnjena. Obično se javljaju simptomi blaže hipotireoze zbog čega dolazi do povećanja lučenja TSH. To objašnjava nastajanje čvororva jer neki dijelovi štitnjače rastu, dok drugi diejlovi se raspadaju po utjecajem upale (Beynon i Pinneri, 2016; Štraus i sur., 2009).

Ostali uzroci primarne hipotireoze mogu biti subakutni postpartalni tireoiditis, uklanjanje štitnjače, konatalne hipotireoze u novorođenčadi zbog autonomno-recesivnih poremećaja, ageneze (odsustva) ili hipoplazije štitnjače i hipopituitarizma (smanjen rad hipofize) (Štraus i sur., 2009).

Sekundarna hipotireoza je uzrokovana poremećajem hipofize ili hipotalamusa čime preko hipotalamus-hipofiza-štitnjača puta dolazi do zakočenja sinteze hormona. Mnogo je rjeđa i očituje se smanjenim vrijednostima T4, T3, ali i TSH ako je problem na razini hipofize i TRH ukoliko je problem u hipotalamusu (Beynon i Pinneri, 2016; Štraus i sur., 2009).

Tvari koje potiskuju lučenje hormona iz štitnjače nazivaju se antitireoidnim tvarima. Lijekovi i hrana mogu biti izvor antitireoidnim tvarima unutar organizma. Najpoznatije su tiocijanatni ion (SCN⁻), propiltiouracil te velike količine anorganskih jodida. Jodidna crpka koja aktivno prenosi jodide u stanice također ima afinitet za tiocijanatne ione pa dolazi do kompetitivne inhibicije u velikim količinama tiocijanata. Tireostatici su lijekovi koji se koriste za liječenje

hipertireoze, među kojima su najpoznatiji, propiltiouracil i metimazol. Mehanizam djelovanja tih lijekova je njihovo jodiranje umjesto tirozinskih ostataka na molekuli tireoglobulina. Propiltiouracil ima dodatni učinak da inhibira periferno dejodiranje T4 u T3. Među lijekovima koji loše djeluju na štitnjače su i antiaritmik amiodaron i stabilizator raspoloženja litijev karbonat (Li_2CO_3). Amiodaron, zbog iznimne lipofilnosti, ima veliki volumen distribucije te se posljedično jako zadržava u štitnjači i uzrokuje hipo/hipertireozu. Litijev karbonat, koji se koristi u liječenju bipolarnog poremećaja, može kao nuspojavu imati poremećaj rada štitnjače pri čemu češće uzrokuje hipotireozu. Dopamin, glukokortikoidi i retinoidi negativno djeluju na adenohipofizu. Uzbudjenje, tjeskoba i stres također smanjuju akutno lučenje TSH (Čakmak i sur., 2015). Velike koncentracije jodida smanjuju aktivnost i veličinu štitnjače.

Stupnjevi hipotireoidizma su hipertireoza, eutireoza, rana subklinička hipotireoza, blaga hipotireoza, umjerena hipotireoza, jaka hipotireoza i miksedemska koma. Neke osobe u početku Hashimotove bolesti imaju znakove hipertireoze jer dolazi do uništenja stanica štitnjače protutijelima i otpuštanja povećanih količina hormona. Eutireoza je stanje normalne funkcionalne aktivnosti štitnjače. Subklinička hipotireoza je stanje kada su razine TSH izvan RI, a T3 i T4 su unutar RI. Blaga hipotireoza je stanje kada su vrijednosti TSH i T4 abnormalne, a vrijednost T3 fiziološka. Umjerena hipotireoza je karakterizirana niskim razinama i T3 i T4, a povišenim vrijednostima TSH. Kod jake hipotireoze dolazi do izraženih simptoma depresije, propadanja kognitivnih funkcija, bolova u mišićima i zglobovima te infertilnosti kod žena. Miksedemska koma je zadnji stupanj hipotireoze, pacijent se nalazi u životnoj opasnosti, stoga je potrebna hitna medicinska intervencija.

1.1.4. Određivanje hormona štitnjače u kliničkim laboratorijima

Prije uvođenja imunokemijskih metoda za određivanje TSH, T4 i T3, ispitivanje funkcije štitnjače se temeljilo na određivanju bazalnog metabolizma (engl. *basal metabolic rate*, BMR) i koncentracije proteinski vezanog joda (engl. *protein bound iodine*, PBI). Problem je bio što su BMR i PBI davali međusobno nedosljedne rezultate. One su zamijenjene kompetitivnim radioimunokemijskim metodama (engl. *radioimmunoassay*, RIA). Danas se u kliničkim laboratorijima rutinski koriste automatizirane kemiluminiscentne imunokemijske metode s mikročesticama (engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*, CMIA,) na automatskim analizatorima.

Tablica 1. Referentne vrijednosti u analizi hormona štitnjače (preuzeto iz: Bukovec Megla i sur., 2017).

Analit	Referentne vrijednosti
TSH	0,4 – 4,0 mIU/L
NEVEZANI T4 (FT4)	9 – 22 pmol/L
NEVEZANI T3 (FT3)	4,0 – 7,5 pmol/L
Anti-TPO	do 50 kIU/L
Anti-Tg	do 100 kIU/L

Za određivanje slobodnih frakcija T3 i T4 koriste se neizravne i izravne metode. Neizravne metode se temelje na određivanju globulina koji veže tiroksin (engl. *thyroxine-binding globulin*, TBG) i izračunavanje omjere T3/TBG ili T4/TBG te mjerenje unosa T3 (engl. *T3 uptake test*). Mjerenjem unosa T3 mjeri se količina slobodnih mjesta na proteinskim nosačima. Određivanje se temelji na kompeticiji T3 iz seruma i dodanog radioaktivno obilježenog T3 (^{125}I). U uzorak se također dodaje adsorbens, dio slobodnog T3 se veže za slobodna mjesta na proteinima, a ostatak za adsorbens. Količina slobodnih mjesta na proteinima se određuje indirektno, mjerenjem radioaktivnosti adsorbensa (Štraus i sur., 2009).

Izravne metode se dijele na ravnotežnu dijalizu i imunokemijske metode. Ravnotežna dijalaza je referentna metoda, a princip metode temelji se na propuštanju seruma kroz polupropusnu membranu, kroz koji prolaze hormoni štitnjače (Štraus i sur., 2009). Koncentracija slobodnih hormona se odredi imunokemijskim metodama nakon propuštanja. Nedostatak ove metode je što je nepraktična za rutinski rad te se koristi samo u iznimnim situacijama.

Imunokemijske metode su danas najčešće korištene metode u kliničkim laboratorijima. Vrlo su osjetljive zbog čega su sposobne mjeriti vrlo male koncentracije slobodnih hormona izravno u serumu. Temelje se na specifičnim antigen-protutijelo interakcijama. Monoklonska protutijela vezana su za čvrstu fazu na koje se veže slobodni T3/T4 iz uzorka te obilježeni analozi T3/T4. Što je veća koncentracija hormona u uzorku oni se više vežu na monoklonska protutijela i manji je signal hormonskih analoga. Izmjerena koncentracija hormona može se razlikovati ovisno o proizvođaču i vrsti reagensa, stoga rezultati dobiveni različitim imunokemijskim metodama

nisu usporedivi (Bukovec Megla i sur., 2017). Referentni intervali analita pokazatelja funkcije štitnjače dobivene imunokemijskim mjerenjem prikazani su u tablici 1.

Različiti čimbenici mogu utjecati na funkciju štitnjače. Među kojima su starost, gladovanje, trudnoća, netireoidne bolesti, nasljedni poremećaji te promijenjena koncentracije serumskih proteina. Pri intepretaciji laboratorijskih nalaza treba se uzeti u obzir sve navedene čimbenike, kao i sve druge komorbidite koji mogu utjecati na određivanje funkcije štitnjače. Prema preporuci Hrvatske komore medicinskih biokemičara, TSH je glavna pretraga u probiru poremećaja štitne žlijezde te se daljnja laboratorijska ispitivanja provode ako je nalaz TSH izvan referentnog intervala (Čepelak i sur., 2004). TSH se smatra dobrim pokazateljom funkcije štitnjače osim u slučaju izloženosti velikim dozama glukokortikoida i dopamina (Cakmak i sur., 2015). Ako se vrijednost TSH nalazi unutar referentnog intervala pacijent se nalazi u eutireozu. Povećana vrijednost TSH, uz FT4 unutar referentnog intervala ukazuje na dijagnozu subkliničke hipotireoze. Kod pacijenata s već dijagnosticiranom bolešću i propisanom terapijom, određuje se TSH i FT4. Iznimno kod nejasne dijagnoze i diferencijacije pojedinih bolesti izvode se druge pretrage primjerice TRH i T3. U specijalističke laboratorijske pretrage spadaju određivanje rT3, proteina koji vežu hormone u serumu (TBG i tiroksin-vezujući prealbumin ili transtiretin), omjer T4/TBG te testovi za autoimune bolesti štitnjače, odnosno određivanje anti-TPO i anti-Tg kod hipotireoze (Čepelak i sur., 2004).

1.1.5. Terapije hipotireoze

Pacijenti s hipotireozom su se liječili i prije 1500 godine. Kineska kultura je liječila kongenitalnu hipotireozu (kretinizam) u šestom stoljeću nove ere (Slater, 2011). Prve terapije su bile uglavnom neučinkovite i suportivne te su uključivale konzumaciju štitnjače ili intravensko, peroralno i subkutano unošenje tiroidnog ekstrakta (McAninch i Bianco, 2016). Subkutane injekcije tiroidnog ekstrakta su se na Zapadu počele primjenjivati tek od 1891. godine (Slater, 2011).

Danas se koristi hormonska nadomjesna terapija koja oponaša fiziološke uvjete organizma. Primjenjuje se u svim slučajevima hipotireoze uz izuzetak kada je moguće ukloniti antitireoidnu tvar. Općenito se mogu svrstati u tri glavne kategorije: kombinirana terapija s T3 i T4, terapija s levotiroksinom (LT4) i terapija liotironinom (LT3).

Kombinirana terapija podrazumijeva istovremenu primjenu hormona T3 i T4. Može se podijeliti na prirodne pripravke štitnjače i sintetske pripravke. U prirodne pripravke štitnjače spada ekstrakt štitnjače, tiroidni prah štitne žlijezde svinje ili goveda (engl. *dessicated thyroid*)

i izolirani protein tireoglobulin. Takva terapija je dugo bila zlatni standard za liječenje hipotireoze te zahvaljujući njoj došlo je do značajnog pada smrtnosti zbog miksedema. Kombinirana terapija također može biti sintetskog podrijetla. Ona podrazumijeva istovremenu primjenu kemijski proizvedenih T3 i T4 koji mogu biti zajedno u jednoj tableti ili u obliku zasebnih tableta (McAninch i Bianco, 2016).

Prihvaćana terapija svih vodećih društava za liječenje (*American Academy of Clinical Endocrinologists* (AACE), *American Thyroid Association* (ATA), *British Thyroid Association* (BTA), *European Thyroid Association* (ETA)) je levotiroksin. Prikladan je zbog dobrog sigurnosnog profila, održavanja normalne razine TSH i uklanjanja simptoma kod većine pacijenata. Levotiroksin je sintetski pripremljen oblik tiroksina i od samog hormona se strukturno ne razlikuje. Adekvatna doza varira ovisno o dobi i kilaži. Novorođenčad i djeca zahtijevaju veće doze u odnosu na odrasle. Dugi polživot od sedam dana u plazmi omogućuje doziranje jednom tabletom dnevno (Cakmak i sur., 2015). Važno je da se primjenjuje ujutro prije jela ili četiri sata nakon jela ili prije spavanja jer hrana, kava i neki lijekovi (primjerice inhibitori protonske pumpe) smanjuju apsorpciju. Primjenjuje se u obliku natrijeva levotiroksina pod nazivima Letrox R i Euthyrox R. Potrebno je dugo vremena (6-8 tjedana) da se dosegnu adekvatne doze u plazmi nakon započinjanja terapije pa nagla promjena doze nije preporučljiva.

Liotironin (T3) se primjenjuje kad je potreban brz učinak. Primjerice, primjenjuje se kod miksedemske kome (Cakmak i sur., 2015). Tada se svi potrebni agensi unose intravenski zbog kontrole nad dozama primijenjenih lijekova. Liotironin, u usporedbi s levotiroksinom ima veću potentnost naspram levotiroksina, ali i veću toksičnost. U nuspojave lijeka ubraja se opasna kardiotoksičnost, stoga se rijetko koristi kao terapija.

Toksičnost hormonske nadomjesne terapije izravna je posljedica povećanja razina hormona štitnjače iznad preporučenih/referentnih intervala, te dovodi do hipertireoze. Znakovi toksičnosti u djece su insomnija, nemir, ubrzani razvoj kostiju i rast dok je kod odraslih povećana nervoza, osjetljivost srca, tahikardija, palpitacija i neobjašnjeni gubitak težine. Srce je jako osjetljivo na razine hormona štitnjače pa u slučaju javljanja angine pectoris ili aritmija potrebno je odmah reagirati i prilagoditi terapiju. Kronična predoziranost može imati za posljedicu fibrilaciju atrijsku i osteoporozu (Cakmak i sur., 2015).

1.1.6. Prednosti i nedostaci kombinirane terapije

Suhi prah štitnjače je od kraja 19. stoljeća do 70-ih godina 20. stoljeća bio glavno terapijsko sredstvo u liječenju hipotireoze. Unatoč tome već tada postojala je klinička zabrinutost oko nekonzistentnosti u aktivnosti prirodnih tiroidnih pripravaka. Na tržištu su postojali pripravci sa smanjenom aktivnosti, ali i oni koji su imali dva puta veću aktivnost od predviđene što objašnjava česte slučajeve tireotoksičnosti i perzistentne hipotireoze (Mangieri i Lund, 1970). Također, zabilježeni su slučajevi da pacijenti uopće ne reagiraju na terapiju jer su pripravci bili bez ikakve aktivnosti (McAninch i Bianco, 2016). Osim razlika u sadržaju pripravaka, upitna je bila i njihova stabilnost, naročito u uvjetima povećane vlažnosti (Werner, 1962). Opravdanost korištenja kombiniranih prirodnih pripravaka temeljila se na činjenici da oni najbolje kontroliraju razinu PBI i nadoknađuju manjak T3. Pronalaskom TSH kao pouzdanijeg i osjetljivijeg markera i mehanizma konverzije T4 u T3, PBI se više ne koristi u dijagnozi o praćenju uspješnosti terapije. TSH je postao 70-ih godina 20. stoljeća zlatni standard u laboratorijskoj dijagnostici i terapijskom praćenju hipotireoze. Zahvaljujući tome terapijske doze se značajno snižavaju te sintetski levotiroksin postaje standardna terapija. Navedene smjernice i danas su osnova dijagnoze, terapije i terapijskog praćenja hipotireoze (McAninch i Bianco, 2016).

Prihvatanje levotiroksina kao monoterapije u dozama koje normaliziraju serumski TSH nije riješilo sve probleme terapije hipotireoze. Naime, identificirana je skupina pacijenata koji unatoč dozama levotiroksina, koje normaliziraju TSH, imaju ostalne simptome hipotireoze te je njihov broj u porastu (Cooper i Biondi, 2012). Tipični simptomi pacijenata liječenih levotiroksinom su umor, dobitak na težini, dislipidemija, depresija i kognitivni problemi (Wiersinga, 2017).

Nekoliko je mogućih razloga zašto levotiroksin ne djeluje jednako kod svih pacijenata. Proučavanjem animalnih modela zaključeno je da samo kombinirana terapija vraća eutireozu svim tkivima. Aplikacijom levotiroksina, mozak, jetra i mišići štakora pokazuju znakove lokalizirane hipotireoze (Escobar-Morreale i sur., 1995). Mogući razlog neučinkovitosti levotiroksina kod nekih pacijenata je genski polimorfizam dejodinaze 2 Thr92Ala koji onemogućava adekvatnu pretvorbu T4 u T3 (Castagna i sur., 2017). Proizvodnja T3 u štitnjači je od manjeg značenja od periferne konverzije, ali svejedno doprinosi serumskoj razini T3. Terapija levotiroksinom ne nadoknađuje manjak T3 podrijetlom iz štitnjače, stoga kombinirana

terapija često dovodi do koncentracija FT4 i FT3 koje više nalikuju zdravim pacijentima (Wiersinga, 2017).

Smjernice udruga endokrinologa ATA, BTA i ETA najznačajnije su u definiranju, dijagnostici i terapiji bolesti štitnjače te su implementirane u većinu protokola za liječenje hipotireoze. Od 1995. do 2012. cilj terapije je normalizacija TSH, uz preporuku izbjegavanja terapija s T3, bilo kao monoterapija ili u kombinaciji s T4. Veliki zaokret je bila 2012. godina kada je ETA promijenila svoje smjernice te je uvažila da neki pacijenti na levotiroksinu uz normalne razine TSH mogu imati perzistentne simptome. ETA propisuje i specifične smjernice za propisivanje eksperimentalnih terapijskih pristupa koji koriste i kombinirane prirodne pripravke (Wiersinga, 2012).

Ispitivanjem zadovoljstva pacijenata s terapijom levotiroksina, uočena je preferencija prema prirodnim tiroidnim pripravcima (Wiersinga, 2017). U zadnja dva desetljeća broj korisnika kombinirane terapije prirodnim suhim pripravkom štitnjače svinje ili goveda, naglo se povećao u razvijenim zemljama. Kombinirana terapija je bitno utjecala na kliničku praksu te se prirodni tiroidni pripravci često zahtjevaju od strane pacijenata. Nabava i primjena takvih pripravaka idu često bez stručnog i medicinskog nadzora narudžbama putem intereta i samodoziranjem (Michaelsson i sur., 2015). Farmaceutska industrija se ponovno priključila proizvodnji i prodaji kombinirane terapije što je rezultiralo pojavom različitih pripravaka na tržištu. Istraživanja o učincima, nuspojavama i doziranju prirodnih tiroidnih pripravaka se često međusobno ne slažu te još nije potpuno jasno koja populacija pacijenta bi imala najviše koristi od prirodnih tiroidnih pripravaka.

Osnovni problemi prirodnih tiroidnih pripravaka su nekonzistentnost sadržaja hormona i nedokumentirana stabilnost povezana s kratkim rokom trajanja. Unatoč popularizaciji takve terapije ti problemi nisu riješeni, a kako je terapija tiroksinom široko prihvaćena među liječnicima, u literaturi je relativno malo studija koja se bave problematikom kombinirane terapije. Stabilnost, način pohrane i utjecaj pomoćnih tvari na potentnost levotiroksina također je dovedena u pitanje više puta (Lowe, 2009; Kaur i Suryanarayanan, 2021). Suhi prah štitne žlijezde ima složeni mikrookoliš, stoga T3 i T4 mogu stupati u interakciju s brojnim tvarima koji različito mogu utjecati na njihovu stabilnost. Prije 1980., standard prema kojemu je Farmakopeja Sjedinjenih Država (engl. *United States Pharmacopeia*, USP) (1985) procjenjivala snagu hormona štitnjače i tableta ekstrakta štitnjače temeljio se na njihovom sadržaju joda i smatralo se da proizvodi zadovoljavaju taj standard ako je sadržaj joda bio unutar

propisane granice. Svaki je proizvođač na osnovu vlastitih proizvodnih procesa kreirao formulacije za održavanje hormona unutar zadanih granica joda bez nadzora Agencije za hranu i lijekove (engl. Food and drugs administration, FDA), međutim ovaj neregulirani proces rezultirao je značajno proturječnim rezultatima kada su različiti pripravci međusobno uspoređivani, pa čak i među različitim serijama unutar istog proizvođača.

1.2. Kromatografija

1.2.1. Kromatografske metode

Kromatografija je separacijska metoda koja se koristi za razdvajanje komponenata smjese. Sastoji se od niza tehnika koje se koriste za razdvajanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje analita u smjesi. Postoje različite kromatografske tehnike, no osnovni princip zajednički svim kromatografskim tehnikama je razdvajanje analita na temelju raspodjele molekula između stacionarne i mobilne faze. Upravo različiti afinitet prema stacionarnoj i mobilnoj fazi dovodi do razlika u brzini putovanja što kao posljedicu ima razdvajanje i mogućnost identifikacije molekula u smjesi (Skoog i sur., 2016).

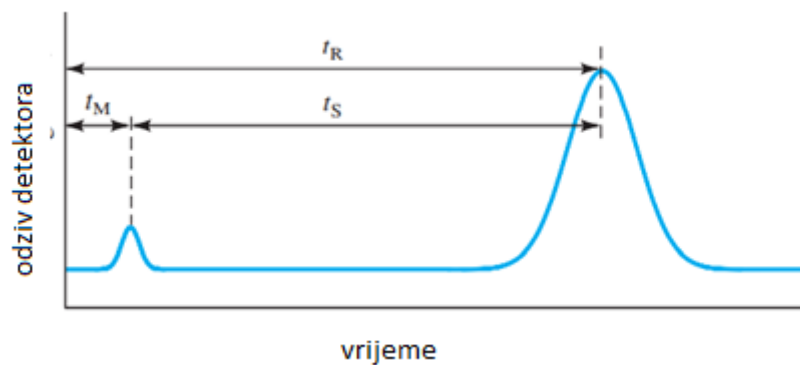
Kromatografiju je prvi fizikalno-kemijski objasnio i primjenio ruski botaničar Mikhail Tswett početkom dvadesetog stoljeća. Koristio je kromatografiju za razdvajanje biljnih pigmenata propuštajući ih kroz staklenu cijev napunjenu s kalcijevim karbonatom. Razdvojeni pigmenti na stupcu su se mogle uočiti kao različito obojene vrpce od čega potječe ime kromatografija (grč. *chroma* – boja, grč. *graphein* – pisati). Kromatografske metode su se počele naglo razvijati sredinom prošlog stoljeća zbog sve većih zahtjeva za specifičnom karakterizacijom složenih smjesa (Thammana, 2016). Zahvaljujući tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*) tekućinska kromatografija danas čini nezamjenjivi dio modernih laboratorija.

Kromatografske metode se mogu podijeliti na kvalitativne i kvantitativne dok je druga podijela na analitičke i preparativne metode. Glavna razlika analitičke i preparativne kromatografije je što se preparativna kromatografija koristi za izoliranje i pročišćavanje tvari iz uzoraka, a analitička za razdvajanje i identifikaciju komponenata uzoraka (Skoog i sur., 2016).

S obzirom na različite kriterije kromatografske tehnike se mogu podijeliti na više načina. Jedna od njih jest podjela prema izvedbi, odnosno prema nosaču stacionarne faze prema kojoj se dijeli na planarnu kromatografiju i kromatografiju u koloni. Kod planarne kromatografije mobilna faza se kreće tankom površinom dok kod kromatografije na koloni stacionarna faza se nalazi

unutar uske cijevi (Skoog i sur., 2016). Druga podjela se temelji na vrsti mobilne i stacionarne faze prema kojoj se razlikuje tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC), plinska kromatografija (engl. *gass chromatography*, GC) i kromatografija superkritične tekućine (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC).

Mobilna faza u tekućinskoj kromatografiji u koloni je tekućina koja provodi otopljeni uzorak duž stacionarne faze pod utjecajem gravitacije, kapilarnih sila ili visokog tlaka te ispire analizirane sastojke. Stacionarna faza u tekućinskoj kromatografiji je čvrsti adsorbens. Dvije faze se biraju na temelju svojstava komponente smjese s ciljem da se komponente uzorka rasporede između te dvije faze. Uzorak se veže za stacionarnu fazu zbog čega dolazi do njegovog usporavanja to jest retencije (Gilbert, 1987). Komponente u uzorku koje se snažno vežu za stacionarnu fazu kreću se sporije mobilnom fazom i dulje se zadržavaju na koloni. Nasuprot tome komponente koje su slabo vezane za stacionarnu fazu putuju brzo nošene mobilnom fazom jer se kretanje otopine uzorka događa samo unutar mobilne faze. Nastaju razlike u brzini migracije zbog čega se komponente razdvajaju u vrpce ili zone. Vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (t_R) je vrijeme zadržavanja analita na koloni uslijed interakcija sa stacionarnom i mobilnom fazom, pod definiranim uvjetima temperature i brzine protoka. Retencijsko vrijeme je zbroj mrtvog vremena (t_M) i vremena provedenog u interakciji sa stacionarnom fazom (t_S) (Slika 5.). Kromatografski maksimum („pik“) je dio kromatograma pri kojem je došlo do najvećeg odaziva korištenog detektora. Podatak o položaju kromatografskog maksimuma na vremenskoj osi koristi se za identifikaciju spojeva, a podatak o površini ispod kromatografskog maksimuma za izračunavanje količine ispitivanog analita u iniciranom uzorku. Kromatogram je grafički zapis signala detektora u ovisnosti o vremenu, a iz njega se mogu dobiti retencijska vremena na temelju kromatografskih maksimuma (Slika 5.) (Skoog i sur., 2016).

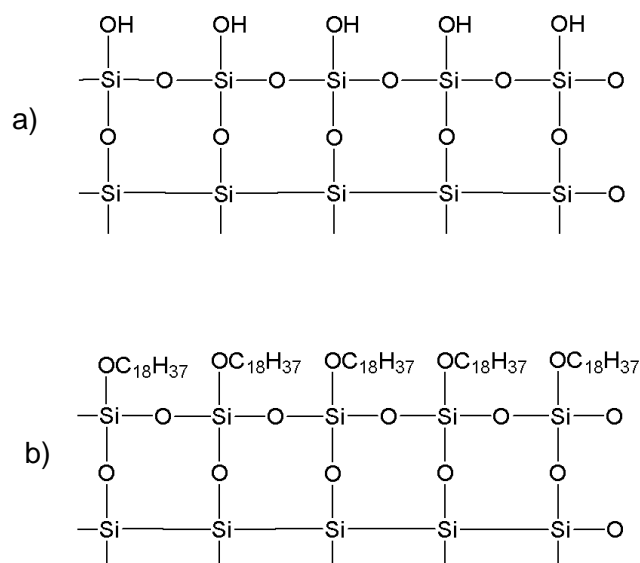


Slika 5. Izgled kromatograma (preuzeto i prilagođeno iz: Skoog i sur., 2016).

1.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC je visoko učinkovita tekućinska kromatografija koja se koristi u istraživačkim laboratorijima. Često se upotrebljava pri razvoju novih lijekova, ali i u kontroli kvalitete različitih farmaceutskih pripravaka. Karakterizira je specifičnost, selektivnost, brzina analize te visoki stupanj automatizacije što smanjuje mogućnost ljudske pogreške (Patil i Gyan, 2017). Razvila se iz klasične tekućinske kromatografije smanjivanjem veličina čestica kromatografskog materijala stacionarne faze što je povećalo efikasnost razdvajanja na koloni. Smanjivanje veličine čestica uzrokuje veći otpor mobilne faze te je istu potrebno potiskivati pod visokim tlakom. Potreba za postizanjem visokih tlakova (400-500bara) potaknulo je razvoj softicerane tehnologije (Thammana, 2016). Tijekom zadnja dva desetljeća razvile su se novi oblici HPLC nazvani *ultra-high-performance (pressure) liquid chromatography* (UHPLC).

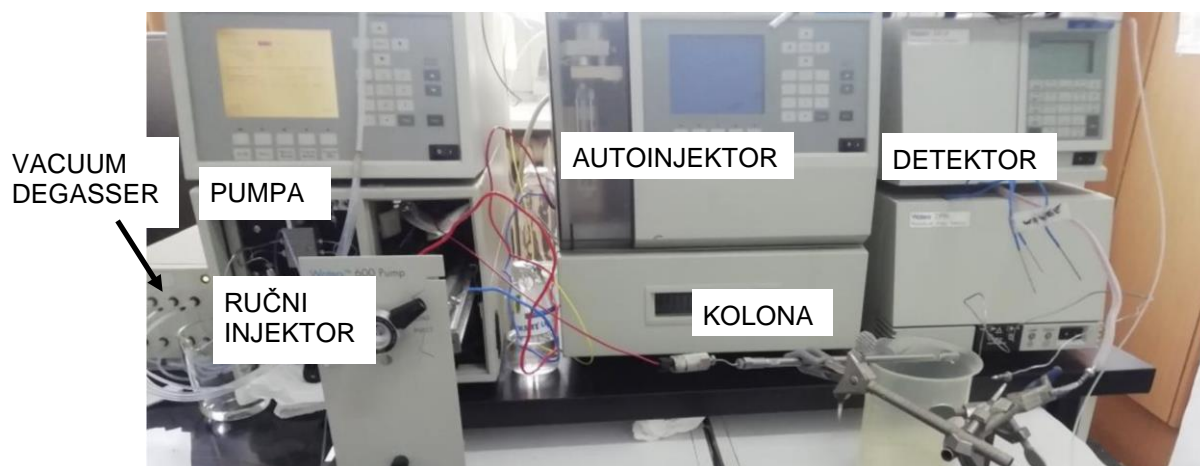
Osnovna podjela HPLC tehnika, na temelju relativne polarnosti stacionarne i mobilne faze, je na kromatografiju normalnih (engl. *normal phase*) i obrnutih faza (engl. *reverse phase*, RP-HPLC) (Patil i Gyan, 2017). Kromatografija normalnih faza se sastoji od polarnije (hidrofilnije) stacionarne faze te nepolarnije (hidrofobnije) mobilne faze. Stacionarna faza je najčešće silikagel koji je polarne prirode (Slika 6.), a mobilna faza manje polarna organska otapala primjerice heptan, heksan, izooktan, itd. Polarne molekule smjese se zbog interakcije sa stacionarnom fazom duže zadržavaju od nepolarnih. Kromatografija obrnutih faza sastoji se od nepolarnije stacionarne faze te polarnije mobilne faze (Thammana, 2016). Prednost kromatografije obrnutih faza je što se kao mobilna faza može koristiti voda kao jeftino, netoksično otapalo, kompatibilno s biološkim tekućinama. Kromatografija obrnutih faza trenutno je najkorišteniji tip tekućinske kromatografije. Stacionarna faza je silikagel koji je funkcionaliziran hidrofobnih lancima različite duljine (Slika 6.). Najčešće se koriste lanci C4, C8, C12 i C18 koji prekrivaju inače polarni silikagel. Mobilna faza je polarna tekućina primjerice voda, metanol, acetonitril, tetrahidrofuran uz različite kombinacije i dodatke ovisno o prirodi analita koji se određuje (Skogg i sur, 2016).



Slika 6. Shematski prikaz strukture normalne, polarne (a) i obrnute, nepolarne (b) stacionarne faze (preuzeto iz: Skoog i sur., 2016).

Prema tipu propuštanja mobilne faze razlikuje se izokratna i gradijentna elucija. Izokratna elucija koristi jedno otapalo ili otapalo konstantnog sastava kao mobilnu fazu, dok kod gradijentne elucije mobilna faza se sastoji od dva ili više otapala, a udio pojedinog otapala se mijenja s vremenom (Skoog i sur., 2016). Također se, osim sastava mobilne faze, može mijenjati temperatura na kojoj je razdvajanje odvija. Instrument za HPLC sastoji se od spremnika mobilne faze, pumpe, injektora, kolone, detektora i računala s odgovarajućim programskim paketom, koji upravlja analitičkim postupkom i koji služi za obradu podataka, kromatograma (Slika 7.). Injektor unosi uzorak u sustav uz visoku reproducibilnost pod visokim tlakom i bez unosa zraka i nečistoća. Također, injektor mora unijeti uzorak bez da poremeti tlak sustava. Može biti ručni i automatizirani, autoinjektor. Pumpa pod tlakom prenosi mobilnu fazu kroz kolonu (stacionarnu fazu) gdje dolazi do razdvajanja komponenta smjese koje se detektiraju na detektoru. Analitička kolona se izabire prema vrsti uzorka i tipu kromatografije, a međusobno se razlikuju po punilu i dimenzijama (duljina, unutrašnji promjer i veličini čestica). Osim analitičke kolone uobičajeni dio HPLC instrumentacije su predkolone. To je kratka kolona koja je ispunjena sličnim materijalom kao analitička kolona. Njezina svrha je spriječiti ulazak nečistoća u analitičku kolonu i time produžiti njen životni vijek (Skoog i sur., 2016). Nakon prolaska kroz kolonu razdvojene komponente ulaze u detektor. Detektori moraju biti visoko selektivni, precizni, imati visoki raspon linearnosti, biti reproducibilni, jednostavni za korištenje i stabilni te ne smiju značajno interferirati sa separacijskim postupkom u koloni. Detektori koji se koriste u kromatografiji su

spektrofotometri, fluorimetri, kemiluminiscentni, konduktometrijski, elektrokemijski i maseni spektrometri. Izbor detektora ovisi o analitu koja se analizira. UV-Vis detektori su među prvim korištenim detektorima u tekućinskoj kromatografiji te se i danas često koriste. Koristi se ako analit sadrži kromofor koji apsorbira propuštenu svjetlost na definiranoj valnoj duljini (Gilbert, 1987). Količina apsorbirane svjetlosti na definiranoj valnoj duljini stvara signal proporcionalan koncentraciji analita prema Beer-Lambertovom zakonu.



Slika 7. Komponente HPLC instrumenta.

Otopljeni plinovi i mjehurići zraka u mobilnoj fazi mogu uzrokovati smetnje u radu pumpe i ireverzibilne promjene u brzini protoka mobilne faze te izgledu kromatograma, te ih je stoga potrebno ukloniti. Degaziranje je postupak uklanjanja otopljenih plinova iz tekućina (Gilbert, 1987) koji se može provesti na nekoliko načina, degaziranje ultrazvukom, propuštanjem helija kroz otapalo i vakumom. Uređaj koji se najčešće koristi je *vacuum degasser* koji je sastavni dio HPLC instrumenta (Slika 7).

HPLC se, zbog opisanih dobrih svojstava, rutinski koristi u znanstvenim, istraživačkim i zdravstvenim laboratorijima u svrhu razdvajanja i identifikacije različitih aktivnih spojeva (Skoog i sur., 2016). U farmaceutskoj industriji se koristi u ispitivanju stabilnosti i topljivosti lijekova. U forenzici za otkrivanje nezakonitih supstancija kao droga ili steroida. U toksikologiji za kontrolu onečišćenja i vode. U kliničkim laboratorijima za analizu krvi ili urina primjerice za određivanja koncentracije lijekova, sredstava ovisnosti, vitamina i hormona. Važan je kod praćenja kontrole šećerne bolesti određivanjem udjela HbA1c pomoću ionsko izmjenjivačke kromatografije. Zahvaljujući širokim mogućnostima izbora stacionarne i mobilne faze, primjeren je za analizu organskih, anorganskih i bioloških supstancija. Najveći nedostatak je visoka cijena instrumenata i prateće opreme, analitičkih kolona i visokopročišćenih otapala.

1.2.3. Upotreba HPLC metode u analizi hormona štitnjače

Dokazivanje i određivanje hormona štitnjače i njihovih metabolita neophodna je u kliničkoj dijagnostici bolesti štitne žlijezde. Također se koriste za strukturne i funkcionalne studije proteina tireoglobulina (Tg) kao i srodnih proteina u štitnjači. Analitičke metoda opisane u literaturi uključuju: tankoslojnu kromatografiju, kromatografiju na papiru (Faircloth i sur., 1965; Cieri i Illuminati, 1977), elektroforezu (Miller i Horster, 1976), radioimunoesej (Rees-Jones i Larsen, 1977), plinsku kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC) (Bilous i Windheuser, 1973; Docter i Hennemann, 1971; Manius i sur., 1978; Nihei i sur., 1971; Petersen i sur., 1977) i GC-MS (engl. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) (Heki i sur., 1976). Nedostatak tehnika tankoslojne kromatografije, kromatografije na papiru i elektroforeze je njihova nepreciznost (Rapaka i sur., 1979). Radioimunoesejska tehnika, iako visoka osjetljiva, zahtijeva upotrebu radioaktivnih obilježavača obično ^{125}I , koji emitira gama zračenje te je izuzetno zahtjevna metoda (Rapaka i sur., 1979). Imunokemijske metode za određivanje hormona štitnjače su često korištene u zdravstvenim laboratorijima. Temelje se na specifičnoj interakciji antigen-protutijelo, stoga se odlikuju velikom specifičnosti. Ograničavajući faktor jest složeni postupak sinteze monoklonskih protutijela. Kod određivanja hormona imunokemijskim metodama preciznost i točnost rezultata ovisi o referentnim standardnim antigenima i vrsti protutijela koji se koriste. Javljaju se interferencije kao posljedica križne reaktivnosti i prozorskog učinka (Hookov efekt) (Bukovec Megla i sur., 2017).

Razvijene su i metode visoko učinkovite tekućinske kromatografije za brzu i preciznu analizu hormona štitnjače i njihovih analoga (De la Vieja i sur., 1997; Riccheimer i Jensen, 1985; Samanidou i sur., 2000; Rapaka i sur., 1979). Prednost HPLC metode je osjetljivost, preciznost, ne zahtijeva prevođenje u plin (oput GC) niti upotrebu radioaktivnih izotopa (poput radioimunoeseja). RP-HPLC metoda pogodna je za separaciju jodiranih kompleksa. Kao mobilna faza koriste se smjese polarnih organskih otapala i vodenih otopina kiselina primjerice metanol : voda : fosforna kiselina (Rapaka i sur., 1979), metanol : voda : trifluorocena kiselina (Samanidou i sur., 2000; De la Vieja i sur., 1997), acetoniril : voda : fosforna kiselina (Riccheimer i Jensen, 1985). Organska faza je ključna za otapanje nepolarnih spojeva T3 i T4 koji u svojoj strukturi sadrže benzenski prsten, dok dodatak kiseline pridonose efektu ionskog sparivanja analita s mobilnom fazom i bolje separacije strukturno sličnih spojeva. Hormoni štitnjače u svojoj strukturi sadrže kromofor, benzenski prsten i atom joda te imaju specifični

maksimum absorpcije između 250 – 350 nm (De la Vieja i sur., 1997), stoga je primjerena upotreba UV-Vis detektora.

Nedostatak HPLC analize je potreba prethodnog pročišćavanja na čvrstom nosaču (engl. *solid phase extraction*, SPE) kompleksnih bioloških uzoraka (krv, tkivo) prije same analize (Samanidou i sur., 2000). Poteškoće se javljaju i zbog loše topljivosti hormona štitnjače što otežava ekstrakciju i pročišćavanje. Netopivi su u vodi i mnogim organskim otapalima dok im se topljivost povećava povećanjem pH. Snažno vezivanja T3 i T4 na staklene površine također utječe na analitički postupak (Rapaka i sur., 1979). Odabir odgovarajućeg unutarnjeg standarda za HPLC analizu je izazov: istovremeno je potrebno da on posjeduje slična svojstva kao analizirani jodotironini, uz dobru topljivost. Obično se biraju molekule steroidne građe čija topljivost u mobilnoj fazi je često problematična (Rapaka i sur., 1979). Budući da HPLC analiza zahtjeva predobradu biološkog materijala, mogući su gubici, jer su jodotironini osjetljivi na svjetlost i kiselu sredinu (Kaur i Suryanarayanan, 2021). Zbog složenog sastava biološkog materijala potreban je učinkoviti ekstrakcijski protokol i osjetljiv detektor (Rupaka i sur., 1979).

1.3. Razvoj i validacija bioanalitičkih metoda

1.3.1. Razvoj bioanalitičkih metoda

Bioanalitičke metode su one metode koje za cilj imaju kvantitativno određivanje ksenobiotika, metabolita ili biomarkera u biološkom uzorku (Tijare i sur., 2016). Razvoj analitičke metode i njena validacija ključni su za razvoj i proizvodnju farmaceutika (Aurora i Gangadharappa, 2016). Razvoj svake bioanalitičke metode uključuje pripremu uzorka, separaciju komponenata i njihovu identifikaciju ili kvantifikaciju.

Osnova svake bioanalitičke metode je odabir analitičke tehnike. Za odabir kromatografske tehnike važna su svojstva ispitivanog analita. Kada je metoda izbora visoko učinkovita tekućinska kromatografija, a cilj je kvantifikacija analita, na temelju fizikalno-kemijskih svojstava analita treba izabrati unutarnji ili interni standard. Interni standard treba biti što sličniji analitu, no ujedno se mora postići dobra separacija signala od analita (Aurora i Gangadharappa, 2016). Podešavanje uvjeta metode uključuje odabir stacionarne faze, kolone, mobilne faze, brzine protoka, te izokratne ili gradijentne elucije. Prije analize analita u biološkom matriksu korisno je ispitati ponašanje standardnih preparata određenog analita u postavljenim uvjetima

(Aurora i Gangadharappa, 2016). Puno je lakše vršiti ispravke u kromatografskim uvjetima i detekciji u početnoj fazi nego kada se analizira biološki uzorak.

Plazma, serum, i urin su najčešći biološki uzorci. Nakon uspostave početnih uvjeta metode upotrebom standarda važno je naći optimalni način obrade, odnosno pročišćavanja biološkog uzorka kako bi se uklonio matriks koji može smetati u analitičkoj metodi. U obzir je potrebno uzeti zahtjeve analitičke metode te obraditi uzorke u skladu s tim zahtjevima pazeći na njihovu stabilnost. Najčešće korištene tehnike obrade uzoraka su precipitacija proteina, tekućina-tekućina ekstrakcija (engl. *liquid phase extraction*, LPE) i ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE).

Ispitivanje analitičke metode u biološkom matriksu predstavlja posljednji korak koji pokazuje je li metoda podesna za kvantitativnu analizu analita. Ako su zadovoljeni preliminarni zahtjevi slijedeći korak je dizajniranje detaljnog validacijskog plana koji prethodi samom postupku validacije.

1.3.2. Validacija bioanalitičkih metoda

Validacija je postupak dokazivanja da je metoda pouzdana i podesna za željenu primjenu (Lazarić, 2014), stoga se svaka analitička metoda za primjenu u farmaceutskoj industriji mora validirati. Sakupljanjem dokaza o sukladnosti svih koraka određenog postupka analitičar dobiva sigurnost u svoj ispravni rad, a ostali u vjerodostojnost njegovih rezultata. U interesu svakog laboratorijskog rada jest osigurati da on konstantno daje rezultate u skladu s postavljenim standardima kvalitete. Validacija metode je temelj garancije uspješnog radnog procesa, stoga se sve više pozornosti i sredstava ulaže u njeno uspješno provođenje. Validaciju je potrebno provesti kada se uvodi nova bioanalitička metoda, ali također i kada se ispituje novo svojstvo tvari, kada se mijenja analitička metodologija, pri promjeni biološkog uzorka (primjerice analit umjesto u plazmi određuje se u urinu), pri transferu bioanalitičke metode između laboratorija te pri izmjeni postojeće metode. U takvim uvjetima dovoljno je isplanirati djelomičnu validaciju već validirane metode. Svaka analitička tehnika ima specifične zahtjeve pri validaciji. Pristup validaciji je različit ovisno jeli metoda kvalitativna ili kvantitativna te ona također ovisi o složenosti matriksa u kojem se nalazi analit.

Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*, ICH) donosi smjernice za izvršenje validacije analitičkih postupaka. ICH (2005) definira proces validacije kao sredstvo osiguravanja i pružanja dokumentiranih dokaza da su procesi izvršeni

unutar unaprijed definiranih parametara te da se koristeći te procese pouzdano dobiva odgovarajuće kvalitetan rezultat.

Temeljni validacijski parametri su:

- specifičnost /selektivnost (engl. *specificity / selectivity*)
- točnost (engl. *accuracy*)
- preciznost (engl. *precision*) koja razlikuje:
 - ponovljivost (engl. *repeatability*)
 - međupreciznost (engl. *intermediate precision*)
- linearnost (engl. *linearity*)
- limit detekcije (engl. *limit of detection, LOD*)
- limit kvantifikacije (engl. *limit of quantification, LOQ*)
- robusnost (engl. *robustness*)

Na temelju navedenih parametara planira se validacija. Obavezni kriteriji koje je potrebno zadovoljiti da bi se metoda smatrala validiranom jesu specifičnost, točnost i preciznost (Lazarić, 2014). Dobro okarakteriziran referentni materijal s dokumentiranim stupnjem čistoće bi se trebao koristiti tijekom validacijskog ispitivanja, a sami stupanj čistoće ovisi o samoj svrsi upotrebe (ICH smjernice, 2005).

1.3.2.1. Specifičnost metode

Specifičnost i selektivnost karakteristike su metode da se nedvojbeno odredi analit od interesa u prisustvu ometajućih tvari kao komponenata matriksa, degradirajućih produkata, slijepih proba i slično (Kakad i sur., 2020). Iako se u praksi često poistovjećuju, specifičnost i selektivnost dva su različita svojstva metode (Lazarić, 2014). Specifična metoda je ona koja je sposobna odrediti samo jedan analit, odnosno signal predstavlja jedinstveni odaziv samo jednog analita. Metoda je selektivna ako može odrediti više analita istovremeno pod uvjetom da analiti međusobno ne reagiraju. Postoji vrlo mali broj metoda koje su apsolutno specifične za jedan analit, stoga je selektivnost metode primjereniji pojam. Svrha određivanja specifičnosti i selektivnosti je dvojaka: dokazivanje da metoda uspješno identificira željeni analit te određivanje onečišćenja. Selektivnost i specifičnost se dokazuje usporedbom odziva (signala)

referentnog materijala (standarda) i analita u ispitivanom uzorku (Lazarić, 2014). Reprezentativni kromatogram za kromatografske postupke se koristi za dokazivanje selektivnosti na temelju rezolucije analita sa sličnim retencijskim vremenima. Na specifičnost metode, osim samog analita u uzorku, utječu i radni uvjeti, stoga je važno držati ih konstantnima i optimalnima. Osnovni kromatografski uvjeti su stacionarna faza, mobilna faza, valna duljina detektora, tlak i temperatura kolone (Lazarić, 2014).

1.3.2.2. Točnost metode

Točnost metode (engl. *accuracy*) je slaganje srednje vrijednosti rezultata kvantitativnih analiza analita i vrijednosti referentnog standardnog materijala koji ima točno definiranu vrijednost (Kakad i sur., 2020). U praksi se ona definira kao slaganje srednje vrijednosti dobivene ispitivanom metodom koja se ponavlja određeni broj puta sa stvarnom. Može se definirati pomoću sustavnog odstupanja (engl. *bias*) koji se računa oduzimanjem aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti (Lazarić, 2014). Eksperiment se provodi za najmanje tri koncentracije analita koje su unutar radnog područja, svake u triplikatu (ICH smjernice, 2005)

Točnost metode moguće je procijeniti na više načina. Usporedbom rezultata dobivenih metodom koja se ispituje s rezultatima dobivenih prihvaćene referentnom metodom, analizom standarda to jest uzorka unaprije poznate koncentracije i „cijepljenjem“ matrice ili uzorka (engl. *spike*) što znači da se u uzorak dodaje poznata koncentracija analita (Lazarić, 2014). Rezultati se prikazuju kao omjer srednje vrijednosti izmjerene i stvarne koncentracije analita izražene u postotku (%) što predstavlja iskorištenje (*recovery*) ili analitički prinos:

$$\text{Iskorištenje} = \frac{\text{izmjerena koncentracija analita}}{\text{stvarna koncentracija analita}} \times 100 \%$$

1.3.2.3. Preciznost metode

Ponavljanjem mjerenja istog homogenog uzorka pod jednakim uvjetima testira se preciznost metode. Ako se rezultati takvog mjerenja podudaraju metoda je precizna. Ovisno o uvjetima koji se mijenjaju razlikuje se ponovljivost, međupreciznost. Ponovljivost (engl. *repeatability*) podrazumijeva jednog analitičara, jednaki postupak mjerenja, jednake radne uvjete, jednaku lokaciju u kratkom razdoblju (Kakad i sur., 2020). Obično se provjerava ponavljanjem metode

šest puta s uzorkom iste ili slične koncentracije (ICH smjernice, 2005). Naziva se i intra-testna preciznost ili preciznost unutar serije. Međupreciznost se ostvaruje unutar istog laboratorija tijekom duljeg perioda (Kakad i sur., 2020). Kako se radi o duljem razdoblju unutar kojeg se provode analize, javljaju se različiti izvori varijabilnosti kao promjena analitičara, instrumenata, korištenje reagensa različitih serija, zamjena dijelova i slično. Međupreciznost naziva se i inter-testna preciznost ili intermedijarna preciznost te dugoročna unutarlaboratorijska preciznost (Kakad i sur., 2020). Rezultati preciznosti dobivaju se eksperimentalno i prikazuju najčešće kao relativna standardna devijacija (%RSD) koja se još naziva i koeficijent varijacije i opisuje rasipanje podataka u odnosu na aritmetičku sredinu. Da bi uvjet preciznosti bio zadovoljen RSD mora biti manja od 5% (ICH smjernice, 2005).

Svrha ispitivanja preciznosti je uočavanje slučajnih pogrešaka, mogućih interferencija i izvora varijabilnosti. Prilikom planiranja eksperimenata za određivanje preciznosti važno je da se mjerenja provodi u uvjetima što sličniji rutinskima. Posebno je važno obratiti pažnju na stabilnost analita kod određivanje međupreciznosti jer se provodi kroz dulji vremenski period. Ako analit nije stabilan u periodu u kojem se ispituje preciznost rezultati će biti znatno drugačiji za uzorke mjerene u prvom i posljednjem danu eksperimenta, dakle preciznost neće biti zadovoljavajuća. Uzorak koji se koristi u eksperimentima preciznosti mora biti homogen i autentičan. Eksperiment podrazumijeva izvođenje postupka onako kako se očekuje da će se raditi u praksi. Broj ponavljanja ovisi o statističkim zahtjevima ali uobičajeno je analizirati uzorak u heksaplikatu.

1.3.2.4. Linearnost metode

Linearnost metode je osnova kvantitativnog određivanja analita jer polazi od pretpostavke o izravno proporcionalanom odnosu koncentracije analita i odgovora detektora (signala) u ispitivanom području. (Lazarić, 2014). Uobičajeno se linearnost određuje mjerenjem signala detektora pri poznatim koncentracijama referentnog materijala. Smjernice propisuju ispitivanje linearnosti za minimalno pet koncentracija standarda u triplicatu (ICH smjernice, 2005). Niz koncentracija dobiva se razrijeđivanjem standarda poznate koncentracije. Matematički se korištenjem metode linearne regresije odredi nagib i odsječak jednadžbe pravca i izračuna koeficijent korelacije (k ili R^2) koji je u idealnom slučaju 1 (ICH smjernice, 2005).

1.3.2.5. Limit detekcije i limit kvantifikacije

Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) su od ključnog značaja kod razvoja svake bioanalitičke metode. Limit detekcije jest najmanja koncentracija analita koja se može

detektirati. Ne mora se nužno pouzdano kvantificirati. Limit kvantifikacije je najmanja količina analita koja se može pouzdano i točno kvantificirati (Lazarić, 2014). Kod jako osjetljivih metoda može se dogoditi da se prva detektabilna koncentracija analita također može i pouzdano i točno kvantificirati pa su LOD i LOQ jednaki. Informacija o LOD i LOQ se dobiva ispitivanjem mogućnosti detekcije signala pri postupnom razrjeđivanju osnovne otopine. Rezultati se procjenjuju vizualno, pomoću omjera signala/šum i statističkom obradom podataka. Vizualna detekcija se može koristiti kod kvalitativnih metoda, a i rjeđe kod kvantitativnih metoda. Koriste se uzorci poznate koncentracije i određuje se najmanja koncentracija gdje je vidljiv signal. Omjer signal/šum se koristi kod analitičkih postupaka za koje je poznato da imaju pozadinski šum. Temelji se na uspoređivanju signala slijepe probe i poznatih niskih koncentracija analita pri čemu se definira najmanje koncentracije u kojoj se analit može pouzdano detektirati /kvantificirati. Omjer signal : šum od 3 ili 2 : 1 se generalno smatra prihvatljivim za određivanja detekcijskog limita, a omjer 10 : 1 je tipičan za limit kvantifikacije (ICH smjernice, 2005). Kod statističke obrade podataka potrebno je izračunati nagib pravca (a) i standardnu devijaciju (S_d) iz kalibracijskog pravca. Množenjem standardne greške i korijena broja elemenata uzorka izračuna se standardna devijacija te se odredi LOD i LOQ prema navedenim formulama:

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{S_d}{a} \quad \text{LOQ} = 10 \times \frac{S_d}{a}$$

$$S_d = S_e \cdot \sqrt{N}$$

a - nagib regresijskog pravca

S_e - standardna greška

S_d - standardna devijacija

N - broj elemenata uzorka

1.3.2.6. Robusnost metode

Robusnost ili izdržljivost je osobitost metode da je otporna na male promjene radnih uvjeta. Metoda je robusna ako pri tim promjenama daje i dalje pouzdane rezultate zadovoljavajuće točnosti i preciznosti (Lazarić, 2014). Ključan je dio uvođenja metode jer se tako otkrivaju optimalni uvjeti izvedbe metode. Tipičan parametar koji se ispituje jest stabilnost otopine. Kod tekućinske kromatografije ispituje se varijacije sastava i pH mobilne faze, temperature, protoka, volumena injektiranja i različitih kolona na održivost rezultata (Lazarić, 2014). Važno je mijenjati radne uvjete unutar realnih granica. Promjenom radnog uvjeta koji ne utječe bitno na rezultat, taj uvjet se svrstaju u područje robusnosti metode. S druge strane ako se uoči da uvjet bitno utječe na rezultat potrebno ga je jasno naznačiti u opisu metode.

1.4. Postupak kvantifikacije

Kvantifikacija se najčešće provodi pomoću jedne od dvije metode: kalibracije i metode unutarnjeg standarda. Kalibracija je uspostavljanje odnosa između signala instrumenta i koncentracije analita. Taj odnos se uspostavlja mjerenjem koncentracija u uzorcima s poznatom koncentracijom analita, odnosno kalibratora na temelju kojih se izrađuje kalibracijski pravac. Pomoću kalibracijskog pravca mjerenjem odgovora detektora na analit dobiva se informacija o koncentraciji analita.

Metoda internog standarda temelji se na činjenici da omjer koncentracije analita i unutarnjeg standarda ostaju konstantni unatoč promjenama kao gubici pri obradi uzorka (Skoog i sur., 2016). Omjer signala analita i internog standarda također je konstantan čime se kompenzira greška detektora. Na temelju kemijske strukture te fizikalno-kemijskih svojstava (polarnost, topljivost, funkcionalne grupe, disocijacijske konstante) analita od interesa izabire se interni standard (Aurora i Gangadharappa, 2016). Cilj je da su unutarnji standard i analit od interesa što sličniji kako bi se što lakše prilagodili uvjeti analize bioanalitičke metode za analite i standard. Određivanje faktora korelacije (engl. *internal response factor*, IRF) koristi se za izračunavanje koncentracije analita u uzorku u koji se dodaje poznata količina internog standarda.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tiroidni pripravak koji je po sastavu suhi prah štitne žlijezde svinje predstavlja kombiniranu terapiju jer podrazumijeva istovremenu primjenu T3 i T4 u svrhu nadoknađivanja njihovog manjka kod hipotireoze. Takva terapija dugo vremena je bila prvi izbor u stanjima sniženog stvaranja, izlučivanja i djelovanja hormona štitnjače različite patogeneze. U drugoj polovici 20. stoljeća istisnuo ga je sintetski levotiroksin jer se smatra manje podložnim varijacijama u aktivnosti te da uzrokuje manje nuspojava. Unatoč tome u zadnja dva desetljeća ponovno se javio interes za prirodne tiroidne pripravke, no problem sa sadržajem T3 i T4 u takvom biološkom uzorku još nije riješen.

U literaturi postoji mali broj radova koji se bavi se problematikom analize T3 i T4 u složenom biološkom materijalu kakav je tiroidni prah štitne žlijezde. Glavni cilj ovog diplomskog rada je razviti i validirati metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti za analizu i kvantifikaciju T3 i T4 u komercijalno dostupnom tiroidnom pripravku, odnosno suhom prahu štitne žlijezde svinje. Odabrana je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti koja se sve više koristi u određivanju hormona zbog svoje brzine, selektivnosti i preciznosti. U tu svrhu razvijena je RP-HPLC metoda uz UV-Vis detekciju.

Specifični cilj ovog rada je razviti poboljšanu RP-HPLC metodu za istovremenu kvantitativnu analizu ukupnog sadržaja T3 i T4, koja je pogodna za kvantifikaciju hormona u tiroidnom pripravku štitne žlijezde svinje bez prethodnog pročišćavanja uzorka.

Bioanalitička metoda bit će razvijena te će biti provedena validacija za parametre kao što su točnost, preciznost, specifičnost, linearnost, granica detekcija i kvantifikacije metode. U okviru zadane teme bit će razvijena metodologija obrade uzorka tiroidnog praha štitne žlijezde kako bi se omogućilo kvantitativno određivanje ukupnog sadržaja T3 i T4 u uzorku. T3 i T4 su uspješno analizirani i kvantificirani korištenjem antrakinaona kao unutarnjeg standarda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Instrumenti

- HPLC sustav koji se sastoji od slijedećih komponenti:
 - 1) *Waters In-line Degasser AF* (vakuum degaser mobilne faze)
 - 2) *Waters 600 Pump* (visokotlačna pumpa)
 - 3) *Waters 2996 UV-Vis Detector* (UV-Vis detektor)
 - 4) *Waters 717 puls Autosampler* (autoinjektor)
 - 5) Računalo s *Waters HPLC* programom *Empower*
- Uređaj za pročišćavanje vode (*Milipore Simplicity 185*, SAD)
- Analitička vaga XSR205 (*Mettler Toledo*, Švicarska)
- Ultrazvučna kupelj (*Branson 3510*, SAD)
- Termostatirana vodena kupelj (*HETO*, Danska)
- Centrifuga LC320 (*Tehtnica Železniki*, BiH)
- pH metar *SevenEasy* (*Mettler Toledo*, Švicarska)

3.1.2. Pribor

- HPLC kolona (*Symmetry*, C18, 5 μ m, 25 cm x 4.6 mm, *Waters*, SAD)
- Filter 0,45 μ m (*Milipore*, SAD)
- Varijabilne automatske pipete (*Eppendorf*, Njemačka)
- Laboratorijsko posuđe

3.1.3. Uzorci

Komercijalno dostupan tiroidni pripravak koji je sadržavao 97,5 mg suhog praha štitne žlijezde svinje deklariranog sadržaja hormona 55,5 μ g T4, 12,6 μ g T3 u roku trajanja i pripravak koji je bio izvan roka trajanja, a koji je sadržavao 32,5 mg suhog praha štitne žlijezde dok je deklarirani sadržaj hormona bio 4,50 μ g T3 i 19,75 μ g T4.

Tiroidni pripravak, suhi prah štitne žlijezde svinje formuliran je u hidroksilpropil metilceluloza kapsuli (HPMC). Kao pomoćna tvar u prah se dodaje mikrokristalična celuloza. Suhi prah štitne žlijezde je složenog biološkog sastava i sadrži različite proteine te anorganske tvari.

3.1.4. Kemikalije

- Metanol (CH₃OH), HPLC čistoće (*Merck*, Njemačka)
- Acetonitril (CH₃CN), HPLC čistoće (*Merck*, Njemačka)
- Trifluoroctena kiselina (TFA, CF₃COOH), HPLC čistoće (*Sigma-Aldrich*, SAD)
- Natrij klorid (NaCl), za analizu (*Kemika*, Hrvatska)
- Tris(hidroksimetil)aminometan (C₄H₁₁NO₃), za analizu (*Kemika*, Hrvatska)
- 2-merkaptio-1-metilimidazol (C₄H₆N₂S), za analizu (*Aldrich*, SAD)
- Fosforna kiselina (H₃PO₄), za analizu (*Kemika*, Hrvatska)
- Klorovodična kiselina (HCl), za analizu (*Kemika*, Hrvatska)
- Standardi:
- Standard T4 (*L-Thyroxine* >98% HPLC, *Sigma Aldrich*, SAD)
- Standard T3 (*3,3,5 Triiodo-L-thyronine* >95%, *Sigma Aldrich*, SAD)
- Standard antrakinon (*Anthraquinone* 97%, *Sigma Aldrich*, SAD)

Enzim:

- Pronase (*Millipore*, SAD, *Pronase*, *Protease*, *Streptomyces griseus*, 65269,5 PUK/g)

Pronase je komercijalno dostupna smjesa različitih proteaza izoliranih iz *Streptomyces griseus* (Richheimer i Jensen, 1985). Aktivnost Pronase iznosi 65269,5 PUK/g, (45000,0 PUK/g – 7000,0 PUK/g). Enzimska jedinica je definirana kao količina enzima koji će osloboditi digestijski produkt ekvivalentan 25 g tirozina po minuti na 40°C pri pH = 7,5 (*Certificate of Analysis, Millipore Corporation*). Djeluje u blago alkalnim uvjetima pri pH 8,4 – 8,6. Nalazi se u čvrstom praškastom obliku te kao takva pohranjuje se na temperaturi od +2 do +8 °C

Puferi i otopine:

- Inkubacijski pufer:

Inkubacijski pufer je otopina u kojoj se događa preteolička razgradnja uzorka. U tu svrhu koristi se inkubacijski pufer koji je smjesa NaCl (0,11mol/dm³, Tris(hidroksimetil)aminometana (0,04mol/dm³) i 2-merkaptio-1-metilimidazola (0,05 mol/dm³). Za pripremu ovog pufera potrebno je izvagati adekvatne količine pojedinog

sastojka analitičkom vagom te otopiti ih u odgovarajućem volumenu destilirane vode. Vrijednost pH se podesi na 8,6 s 0,5 mol/dm³ HCl. Pripremljena otopina čuva se na temperaturi hladnjaka od +2 do +8 °C.

- Otopina za zaustavljanje enzimske reakcije:

Reakcija se zaustavlja zakiseljavanjem sredine pri čemu se gubi aktivnost enzima. Kiselina snižava pH dok acetonitril taloži proteine (Richheimer i Jensen, 1985). Otopina se sastoji od fosforne kiseline i acetonitrila u volumnom omjeru 1 : 100. Pripremljen je miješanjem adekvatnih volumena pojedine komponente. Pripremljena otopina čuva se na sobnoj temperaturi.

3.2. Metode

3.2.1. HPLC-UV-Vis metoda za određivanje T3 i T4

Analiza T3 i T4 izvodi se na HPLC sustavu na reverznoj fazi uz UV-Vis detekciju. Mobilna faza se sastoji od metanola i vode s 0,025 % trifluoroctenom kiselinom (TFA) u volumnom udjela 65 : 35 (V : V). Za pripremu mobilne faze koristi se visokopročišćena *Milli-Q* voda. Za pripremu takve visokokvalitetne vode koja je primjerena za HPLC analize pročišćena je destilirana voda uređajem *Milipore Simplicity 185*. Elucija je izokratna s protokom mobilne faze 1 mL/min. Za kvantificiranje je korišten antrakinon kao unutarnji standard. Kromatografski uvjeti prikazani su u tablici 2.

Tablica 2 Kromatografski uvjeti.

Kolona:	C18, 5 μ m, 25 cm x 4,6 mm
Mobilna faza:	MiliQ H ₂ O x 0,025 % TFA : metanol u omjeru 35:65 (V:V)
Protok mobilne faze	1 mL/min
Detektor	UV-Vis
Eluiranje	izokratno
Temperatura	23 – 25 °C
Vrijeme trajanja analize	25 min
Injektirani volumen	100 μ L
Valna duljina detekcije	240nm

3.2.2. Priprema standardnih otopina T3, T4 i antrakinona

Otopine standardnih uzoraka T3 (100 μ g/mL), T4 (100 μ g/mL) i antrakinona (100 μ g/mL) pripremljeni su otapanjem u metanolu. Standardi koji se nalaze u čvrstom praškastom obliku izvagani su, otopljeni u metanolu i profiltrirani kroz filtre veličine pora 0,45 μ m. Tako pripremljene standardne otopine čuvaju se na temperaturi od -20 °C do provođenja analize.

3.2.3. Priprema uzorka biološkog materijala za analizu

Sadržaj jedne kapsule tiroidnog pripravka prebačen je u epruvetu te je dodana odgovarajuća količina hidrolitičkih enzima, Pronase (0,13 mg enzima /g tiroidnog pripravka). U epruvetu je dodano 5 mL inkubacijskog pufera te je uzorak inkubiran preko noći na 37 °C u termostatiranoj kupelji uz povremeno miješanje. Sljedeći dan uzorak je izvađen iz termostatirane kupelji te je dodano 2 mL otopine za zaustavljanje enzimske reakcije. Uzorak je centrifugiran 30 minuta na 2000 rpm. Supernatant je odvojen i profiltriran kroz filter 0,45 μ m. Tako pripremljen uzorak je čuvan na -20 °C do analize.

3.2.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je korištenjem *Microsoft Office Excel 2016* (*Microsoft, Redmond, SAD*).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija RP-HPLC metode

Validacija je najpouzdanija garancija u vjerodostojnost i točnost dobivenih rezultata. Time se mogućnost pogreške bitno umanjuje. Metoda je validirana ispitivanjem točnosti, specifičnosti, osjetljivosti, linearnosti, LOD i LOQ. Svi parametri validacije su određene prema ICH smjernicama. Provođenjem validacije dokazano je da je opisana metoda primjerena za određivanje T3 i T4 u suhom prahu štitne žlijezde svinje.

4.1.1. Specifičnost i selektivnost RP-HPLC metode

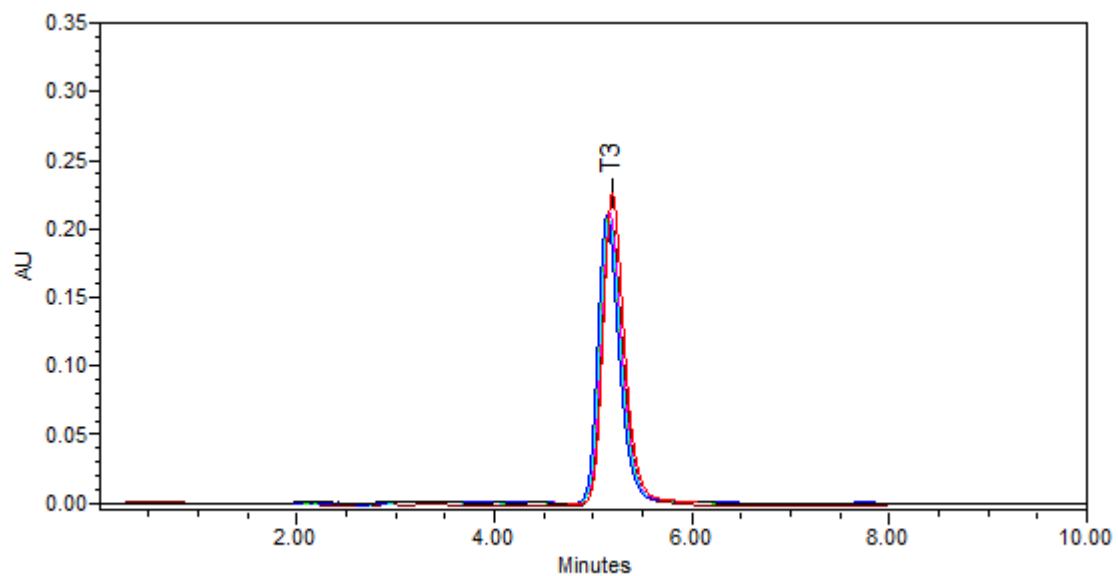
Provjera selektivnosti, uz provjeru preciznosti i točnosti, je nužan kriterij koji je potrebno zadovoljiti da bi metoda bila prihvaćena. Selektivnost je provjerena tako da se prvo odrede retencijska vremena i kromatografski maksimumi standarada, a zatim tih istih analita u traženom uzorku. Metoda se smatra selektivnom ako se retencijska vremena poklapaju i ne postoje interferirajući kromatografski maksimumi u kromatogramu u području gdje se nalaze retencijska vremena analita.

Selektivnost metode se ispita tako da se pripreme standardi T3 i T4 od 20 µg/mL. Standardi se pripreme razrjeđivanjem T3 i T4 (100 µg/mL) u mobilnoj fazi do 20 µg/mL. Odrede se retencijska vremena za T3 i T4 u standardnoj otopini u heksaplikatu. Cilj je da se retencijska vremena šest uzoraka T3/T4 što više preklapaju. Izračuna se srednja vrijednost, standardna devijacija (S_d) i relativna standardna devijacija (RSD).

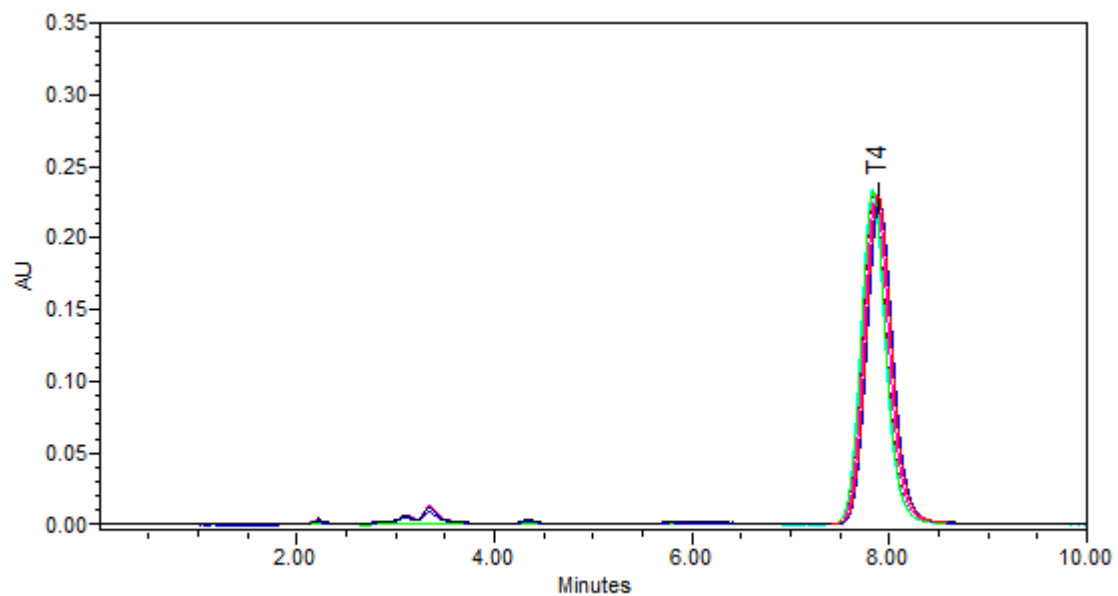
U tablici 2. prikazana su retencijska vremena standardi T3(20 µg/mL) i T4(20 µg/mL) uz naznačena aritmetičke sredine, standardne devijacije i relativne standardne devijacije. Injektiranjem uzoraka u heksaplikatu dobivaju se približno jednaka retencijska vremena što je vidljivo i na kromatogramima T3 (Slika 8.) i T4 (Slika 9.) i prikazano u tablici 3. Kromatografski maksimumi (pikovi) za T3 i T4 imaju različita vremena zadržavanja pa se jasno mogu razaznati pri istovremenoj analizi. Retencijska vrremina su izražena kao aritmetička sredina retencijskih vremena heksaplikata pri čemu za T3 iznosi 5,164 min, a za T4 7,859 min pri čemu odstupanja u retencijskim vremenima su prihvatljiva ($\pm 0,02$).

Tablica 3. Retencijska vremena standardnih otopina T3 (20 µg/mL) i T4 (20 µg/mL) u heksaplikatu, aritmetičke sredine, standardne devijacije i relativne standardne devijacije.

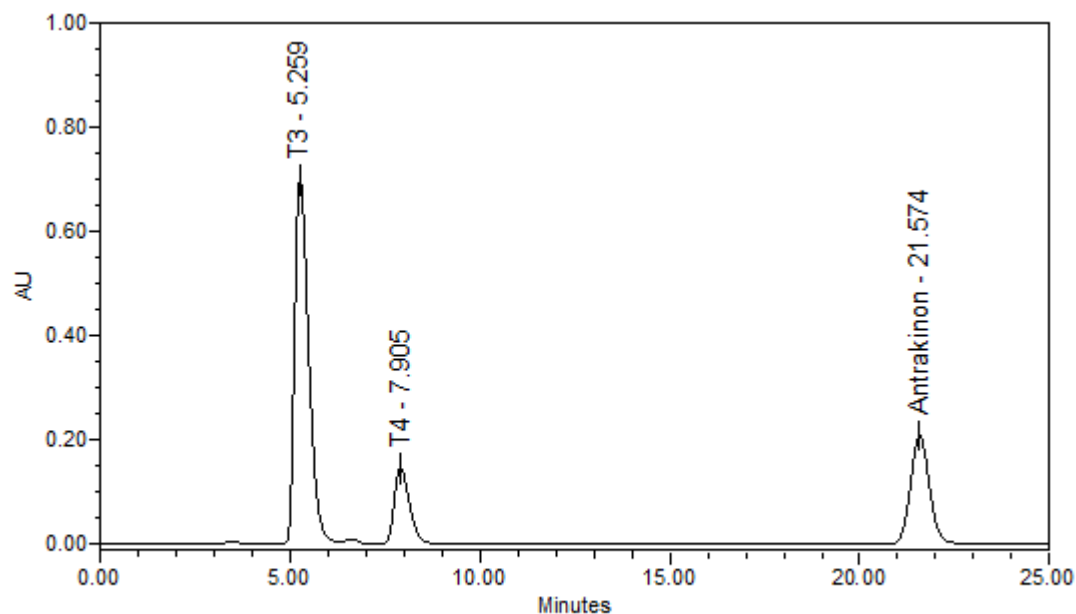
Replikat	RETENCIJSKO VRIJEME (min)	
	T3	T4
1.	5,195	7,829
2.	5,141	7,838
3.	5,143	7,841
4.	5,158	7,864
5.	5,166	7,886
6.	5,181	7,898
\bar{X}_{sr}	5,164	7,859
S_d	0,02126	0,02807
RSD	0,41170 %	0,35716 %



Slika 8. Kromatogram standardne otopine T3 (20 $\mu\text{L}/\text{min}$) u heksaplikatu, retencijsko vrijeme $5,164 \pm 0,02 \text{ min}$.



Slika 9. Kromatogram standardne otopine T4 (20 $\mu\text{L}/\text{min}$) u heksaplikatu, retencijsko vrijeme $7,859 \pm 0,02 \text{ min}$.



Slika 10. Reprezentativni kromatogram istovremene analize standarda T3 (100 $\mu\text{g/mL}$), T4 (100 $\mu\text{g/mL}$) i antrakinsona (100 $\mu\text{g/mL}$).

Retencijsko vrijeme za T3 je 5,259 min, T4 je 7,905 min, a antrakinson (AntraQ) 21,574 min (Slika 10.). Na temelju kromatograma može se zaključiti da je rezolucija izvrsna, veća od 1, za T3 i T4 dok je retencijsko vrijeme AntraQ bitno različito od analiziranih hormona što omogućuje primjereno razlikovanje analita.

4.1.2. Preciznost RP-HPLC metode

Preciznost je slaganja rezultata niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod jednakim uvjetima te ukazuje na slučajne pogreške tijekom mjerenja (Lazarić, 2014). Tijekom validacije opisane metode ispitivala se dnevnu preciznost (intra-preciznost) i međudnevnu preciznost (inter-preciznost). Dnevna preciznost zahtjeva ponavljanje analize unutar istog dana, izvodi se tako da se uzorak stalne koncentracije injektira u heksaplikatu (ICH smjernice, 2005).

Međudnevna preciznost se provodi unutar duljeg perioda, u ovom radu provedena je ponavljanjem analize uzorka stalne koncentracije u heksaplikatu unutar tri dana.

Rezultati preciznosti iskazuje se kao srednja vrijednost ispitivanja (X_{sr}), standardna devijacija (S_d) i relativna standardna devijacija (%RSD). Standardna devijacija je statistički pojam koji označava mjeru raspršenosti podataka oko vrijednosti aritmetičke sredine. RSD je također statistička veličina koja se koristi kao mjera preciznosti u analizi podataka, a računa se prema formuli :

$$\text{RSD (\%)} = \frac{S_d}{X_{sr}}$$

pri čemu je X_{sr} aritmetička sredina svih dobivenih rezultata, a S_d je eksperimentalno standardno odstupanje (standardna devijacija).

Preciznost metode određena je sa standardima T3, T4 i AntraQ tako da se tijekom tri dana za svaki uzorak odredi površina ispod kromatografskog maksimuma u heksaplikatu. Standardi (20 µg/mL) su dobiveni razrjeđivanjem u mobilnoj fazi početnih standarda (100 µg/mL). Nakon svakog heksaplikata za pojedini uzorak standarda, odnosno nakon svakog dana, odredi se srednja vrijednost površine ispod kromatografskog maksimuma, S_d i RSD za unutartestnu preciznost i onda se ti podaci koriste za međutestnu preciznost.

Podaci u tablicama 4, 5, 6 prikazuju srednje vrijednosti površina T3, T4 te AntraQ za tri radna dana, RSD se kreće od 0,20 % - T4, prvi radni dan do 4,54 %- AntraQ, drugi radni dan. Međutestna preciznost (tablica 7) je zadovoljena jer RSD ni u jednom mjerenju ne prelazi maksimum od 5 % koji je postavljen kao kriterij za preciznost HPLC-a (Lazarić, 2014).

Tablica 4. Unutartestna preciznost – 1. dan.

Površina ispod kromatografskog maksimuma			
Replikat	T3 20 µg/mL	T4 20 µg/mL	AntraQ 20 µg/mL
1.	3576796,00	4080859,00	1048636,00
2.	3730242,00	4088810,00	1037382,00
3.	3723985,00	4081261,00	1038550,00
4.	3730358,00	4088482,00	1042675,00
5.	3796128,00	4092997,00	1050386,00
6.	3757435,00	4102635,00	1060051,00
X_{sr}:	3719157,33	4089174,00	1046280,00
S_d:	74736,93	8101,60	8531,98
RSD (%)	2,00	0,20	0,81

Tablica 5. Unutartestna preciznost – 2. dan.

Površina ispod kromatografskog maksimuma			
Replikat	T3 20 µg/mL	T4 20 µg/mL	AntraQ 20 µg/mL
1.	3735748,00	4175404,00	1107547,00
2.	3941678,00	4159309,00	1116328,00
3.	3865143,00	4184539,00	1130388,00
4.	3869046,00	4200078,00	1171523,00
5.	3883324,00	4156070,00	1045996,00
6.	3888202,00	4171521,00	1190712,00
X_{sr}:	3863856,83	4174486,83	1127082,33
S_d:	68510,21	16340,98	51199,44
RSD (%)	1,77	0,39	4,54

Tablica 6. Unutartestna preciznost – 3. dan.

Površina ispod kromatografskog maksimuma			
Replikat	T3 20 µg/mL	T4 20 µg/mL	AntraQ 20 µg/mL
1.	3795496,00	4109607,00	1085555,00
2.	3803321,00	4114786,00	1110472,00
3.	3836553,00	4105101,00	1137800,00
4.	3822258,00	4132717,00	1170031,00
5.	3821562,00	4121686,00	1227388,00
6.	3838203,00	3909136,00	1174298,00
X_{sr}:	3819565,50	4082172,00	1150924,00
S_d:	17264,95	85322,57	50675,19
RSD (%)	0,45	2,09	4,40

Tablica 7. Međutestna preciznost.

Rezultat-prosječna površina ispod kromatografskog maksimuma			
Test:	T3 (20 µg/mL)	T4(20 µg/mL)	AntraQ(20 µg/mL)
1. (N = 6)	3719157,33	4089174,00	1046280,00
2. (N = 6)	3863856,83	4174486,83	1127082,33
3. (N = 6)	3819565,50	4082172,17	1150924,00
X_{sr}:	3800859,89	41155277,67	1108095,44
Sd:	74141,16	51396,01	54844,95
RSD (%):	1,95	1,25	4,95

4.1.3. Točnost RP-HPLC metode

Točnost metode jest stupanj slaganja između teoretske, izračunate vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta (Lazarić, 2014). Izvodi se minimalno u triplicatu za tri koncentracije analita. Izražava se u obliku iskorištenja, odnosno kao omjer teoretske i srednje vrijednosti dobivih rezultata.

Budući da prikazani eksperiment koristi metodu internog (unutarnjeg) standarda (engl. *internal standard*, IS) pomoću faktora korelacije (engl. *internal response factor*, IRF) se kvantificira svaki metabolit. Faktor korelacije je vrijednost koja povezuje odziv detektora, površinu ispod kromatografskog maksimuma, IS te analiziranog analita s poznatim koncentracijama IS i zadanog analita prema formuli:

$$IRF = \frac{površina(IS) \times masa(analit)}{površina(analit) \times masa(IS)}$$

Točnost u navedenom eksperimentu određena je usporedbom teoretske, poznate količine koja je aplicirana na kolonu s količinom određenom nakon obrade kromatografskih maksimuma pojedine analize. Prvi korak je određivanje IRF. Za računanje IRF uzorci T3/T4 (10 µg/mL) i AntraQ (20 µg/mL) analizirani su u triplicatu te se nakon obrade kromatograma iz poznatih vrijednosti koncentracija analiziranih uzoraka T3, T4 i AntraQ izračuna faktor korelacije, IRF koji se koristi u provjeri točnosti metode. Točnost metode je testirana za tri različite koncentracije analita, T3 i T4, 7,5 µg/mL, 10 µg/mL i 20 µg/mL, dok je koncentracija AntraQ uvijek bila 20 µg/mL. Cilj je provjeriti slaganje teoretske količina analita T3 i T4 s količinom

izračunatom pomoću faktora korelacije, IRF iz obrađenih kromatograma te utvrditi podudarnost rezultata i točnost metode. Rezultati su prikazani u tablici 8.

Tablica 8. Parametri točnosti metode.

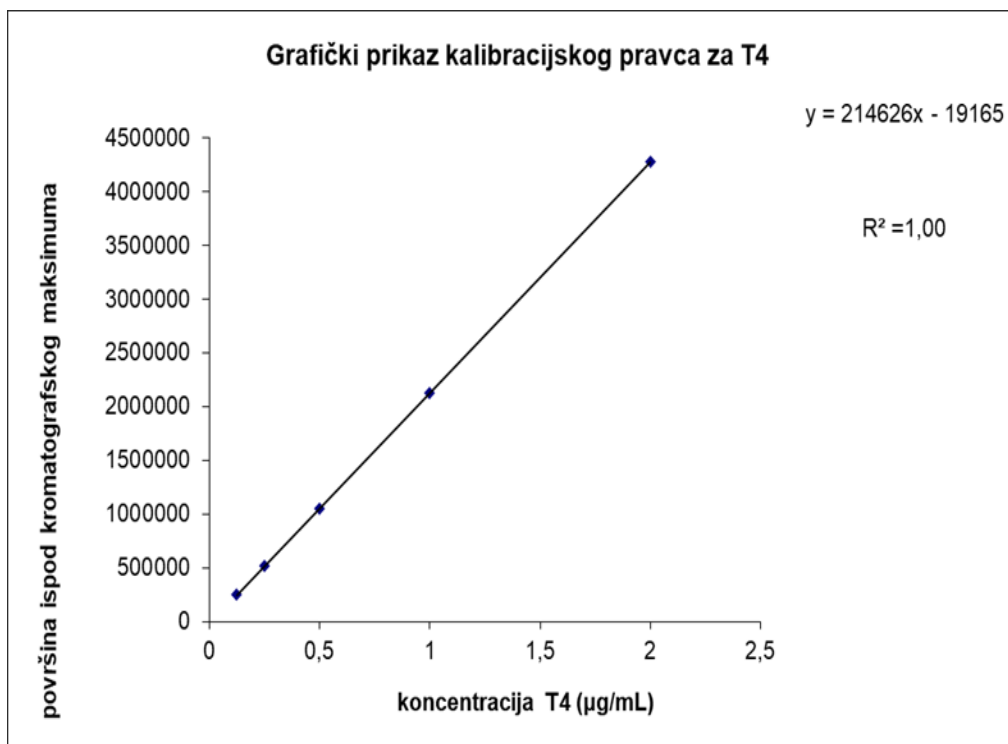
IRF	7,5 µg/mL		10 µg/mL		20 µg/mL	
	Analitički prinos(%)	RSD(%)	Analitički prinos(%)	RSD(%)	Analitički prinos(%)	RSD(%)
T3 0,71	116,65	0,94	116,81	0,09	103,29	2,38
T4 0,64	111,73	0,34	112,39	1,97	109,41	0,19

Dobiveni rezultati su u skladu s prihvatljivim granicama za točnost metode. Analitički prinos (iskorištenje) je od 103,29 % za T3 (20 µg/mL) do 116,81 % za T3 (10 µg/mL) uz maksimalni RSD 2,38 %.

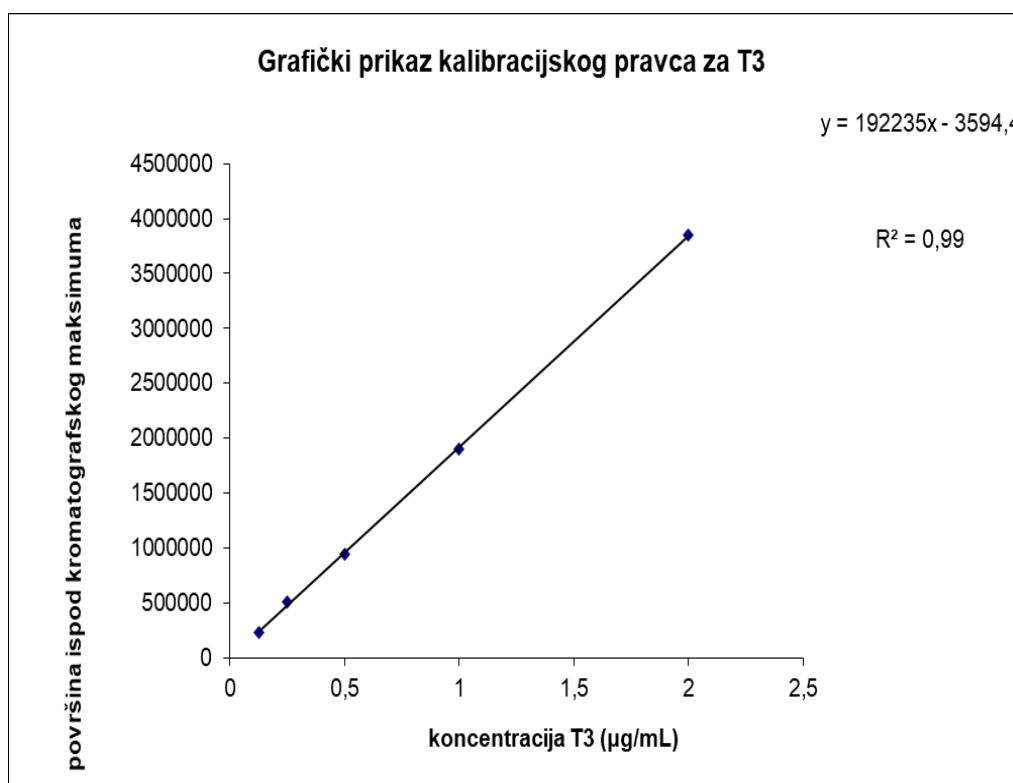
4.1.4. Linearnost RP-HPLC metode

Linearnost metode je svojstvo metode da unutar određenog područja daje signal, tj. odgovor detektora izravno proporcionalan koncentraciji analita u uzroku (Lazarić, 2014). Ispituje se tako da se odredi baždarni pravac u ispitivanom rasponu koncentracija za T3 i T4. Baždarni pravac prikazuje ovisnost odgovora detektora o koncentraciji hormona. Metoda se smatra linearnom ako je odgovor detektora direktno proporcionalan koncentraciji analita. Na temelju baždarnog dijagrama dobiva se jednadžba, a metodom najmanjih kvadrata odredi se koeficijent korelacija (k ili R^2). Da bi se metoda smatrala linearnom k mora biti iznad 0,98 (ICH smjernice, 2005).

Linearnost metode ispitana je korištenjem pet koncentracija T3 i T4 u triplikatu. Izabrane koncentracije su 2,0 µg/mL, 1,0 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL i 0,125 µg/mL za T3 i T4 koje su priređene binarnim razrijeđenjem iz početne koncentracije. Iz pravca koji prikazuje ovisnost odgovora detektora, površine ispod kromatografskih maksimuma i koncentracije analita izračunat je faktor korelacije. Rezultati ispitivanja linearnosti za T4 prikazani su na slici 11. i za T3 na slici 12. te u tablici 9. Koeficijent korelacije veći je od 0,999 za oba analita, T3 i T4 čime je zadovoljen kriterij linearnosti metode.



Slika 11. Kalibracijski pravac za T4.



Slika 12. Kalibracijski pravac za T3.

Tablica 9. Parametri linearnosti.

Metabolit	Područje linearnosti µg/mL	Jednadžba pravca	Koeficijent korelacije
T4	0,125 – 2,0	$y = 214626x - 19165$	1,0000
T3	0,125 – 2,0	$y = 192235x - 3594,4$	0,9998

4.1.5. Limit detekcije i limit kvantifikacije RP-HPLC metode

LOD i LOQ je određen statističkom obradom podataka kalibracijskog pravca za T3 i T4, izračunat je nagib pravca (a) i standardna devijacija (S_d). Kalibracijski pravac je konstruiran za ovisnost odgovora detektora, površine ispod kromatografskog maksimuma i 5 različitih koncentracije analita T3 i T4 0,0001 µg/mL, 0,001 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL i 1,0 µg/mL. Prema prethodno opisanim formulama, množenjem standardne greške i korijena broja elemenata uzorka izračuna se standardna devijacija te se odredi LOD i LOQ. Rezultati su prikazani tablici 10.

Tablica 10. Izračunati parametri za LOD i LOQ za T3 i T4.

Metabolit	S_e	S_d	LOD (µg/ mL)	LOQ (µg/ mL)
T3	1843,42	4122,01	0,080	0,243
T4	2459,40	5499,40	0,084	0,256

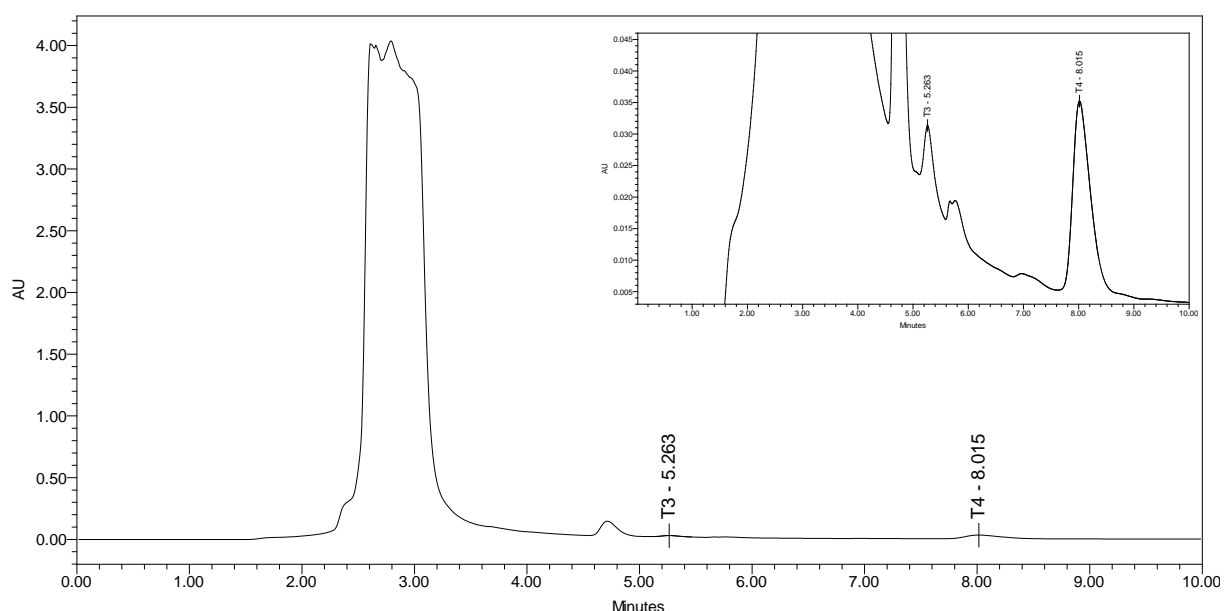
Iz tablice je vidljivo da su vrijednosti granice detekcije i granice kvantifikacije za T3 i T4 slične, 80 i 84 ng/mL za granicu detekcije, te 243 i 256 ng/mL za granicu kvantifikacije. U literaturi opisane metode tekućinske kromatografije, razlikuju se po osjetljivosti i limitu kvantifikacije. Navedene se vrijednosti i literaturi nalaze u rasponu od 2 do 500 ng/mL (De la Vieja, 1997; Samanidou i sur., 2000). Dobiveni rezultati potvrđuju da je razvijena metoda visoko specifična i osjetljiva te pogodna za kvantifikaciju T3 i T4 u suhom tiroidnom pripravku, i eksperimentom je zaključak potvrđen.

Razvijena RP-HPLC metoda za kvantitativnu analizu T3 i T4, UV-Vis detekcijom pri $\lambda = 240$ nm, uz korištenje mobilne faze sastavljene od metanola i vode uz dodatak trifluoroctene kiseline kao *ion-pair* reagensom, te uz AntraQ kao unutarnjeg standarda, u potpunosti je zadovoljila

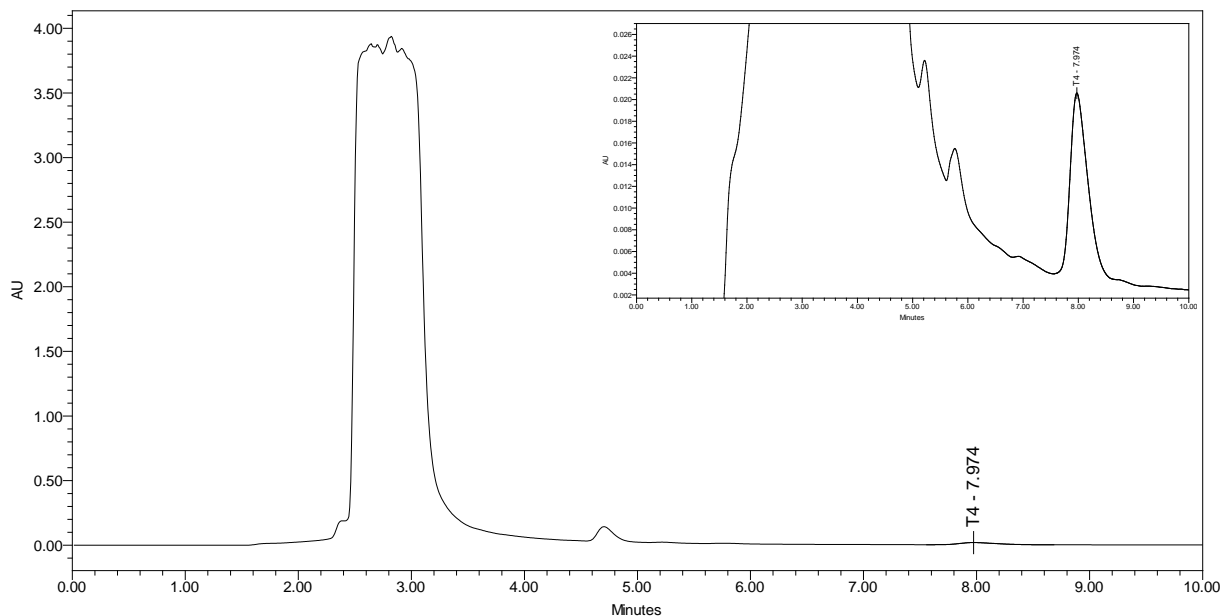
postavljene validacijske parametre. Postignuta je visoka rezolucija, specifičnost, točnost i osjetljivost metode u postupku validacije.

4.2. Kvantitativna analiza T3 i T4 u komercijalnom tiroidnom pripravku

Razvijena i validirana metoda primijenjena je za kvantitativno određivanje T3 i T4 u komercijalno dostupnom tiroidnom pripravku, suhom pripravku štitne žlijezde svinje. Analizirana su dva uzorka, uzorak 1, koji je bio u roku trajanja, i uzorak 2, kojemu je u trenutku analize istekao rok trajanja. Točan sastav suhog praha tiroidnog pripravka nije poznat. Uzorak je opisan Farmakopeji Sjedinjenih Država kao očišćena, osušena i u prahu usitnjena štitnjača iz koja je prethodno uklonjeno vezivno tkivo i mast, a dobivena je od domaćih životinja koje čovjek koristi za hranu, u posljednje vrijeme najčešće svinje (USP, 1985). Tako pripremljen suhi tiroidni prah formuliran je u kapsulama uz dodatak mikroceluloze kao nosača. Analiziran je ukupni sadržaj T3 i T4. Prije analize je bilo potrebno ukloniti mikrocelulozu i hidrolitičkim enzimima obraditi tiroidni pripravak, kako bi oslobodili T3 i T4 vezane na proteine. Tablete tiroidnog pripravka su obrađene kako je navedeno u poglavlju 3 Eksperimentalni dio, odlomak „Priprema uzorka biološkog materijala za analizu“ (3.2.3.). Nakon hidrolize uzorci su analizirani HPLC metodom. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slikama 13. i 14.

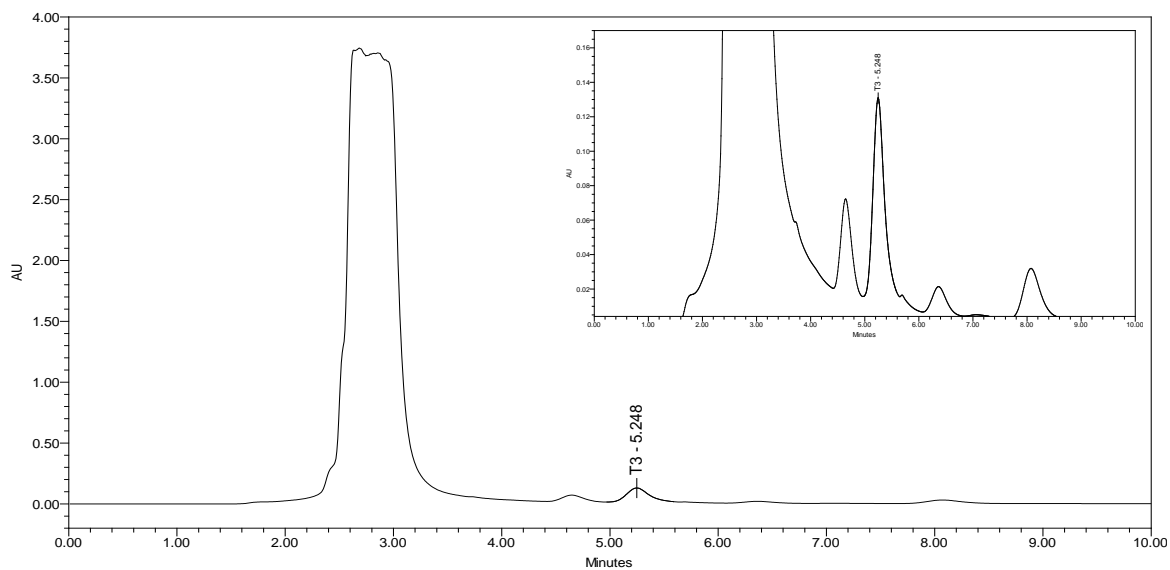


Slika 13. Kromatogram hidrolizata komercijalnog tiroidnog pripravka u roku trajanja, uzorak 1.

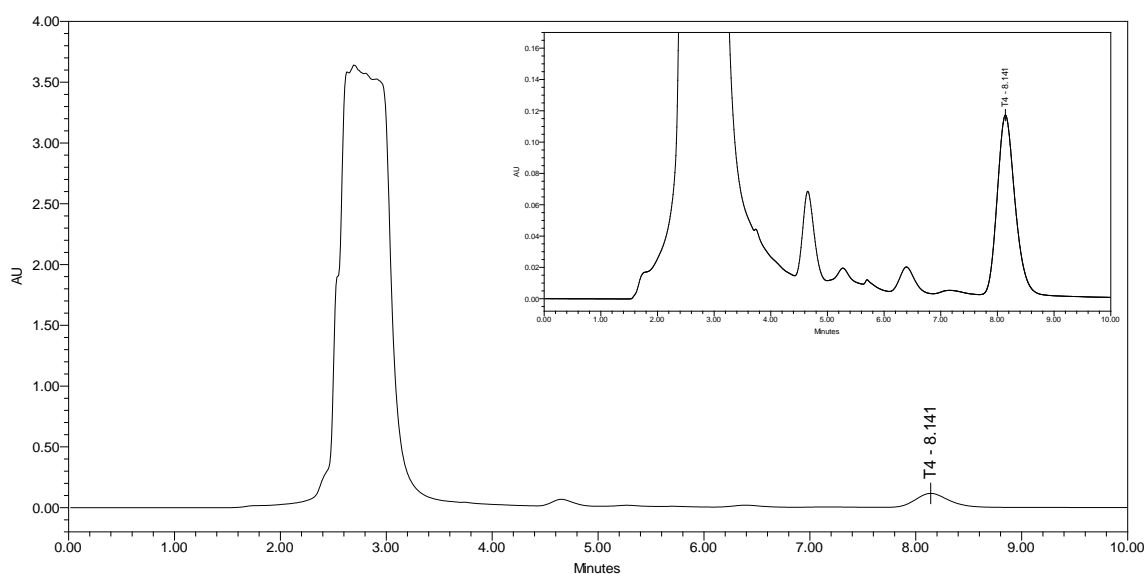


Slika 14. Kromatogram hidrolizata komercijalnog tiroidnog pripravka izvan roka trajanja, uzorak 2.

Kako bi pouzdano potvrdili retencijska vremena i pripadajuće kromatografske maksimume za T3 i T4 u hidrolizatu tiroidnog pripravka, u aliquote uzorka hidrolizata dodani su standardi T3 i T4 odnosno uzorci su podvrgnuti cijepljenju, tj. dodatku poznate količine standarda analita. Na osnovi povećanja kromatografskog maksimuma nakon dodatka standarda T3 i T4 određena su retencijska vremena T3 i T4 u hidrolizatu uzorka. Potvrđeno je kako retencijska vremena T3 i T4 odgovaraju retencijama standarda. Prikazani su reprezentativni kromatogrami tiroidnog pripravka unutar roka trajanja, uzorak 1, koji je cijepljen sa standardom T3 (Slika 15.) i standardom T4 (Slika 16.).

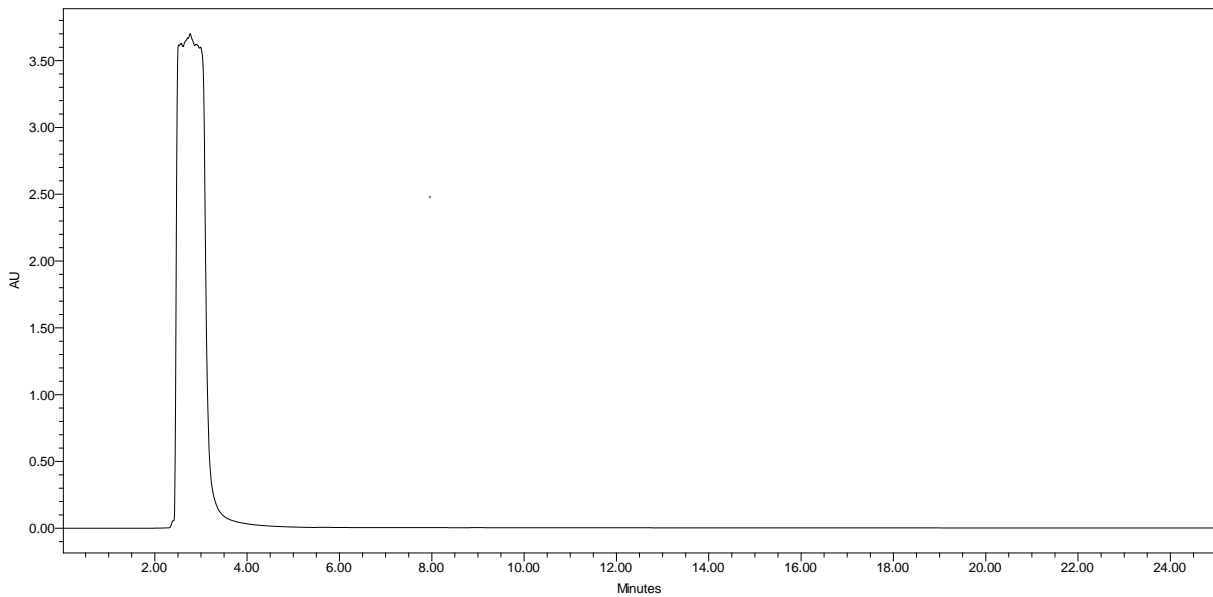


Slika 15. Reprezentativni kromatogram hidrolizata tiroidnog pripravka cijepljen sa standardom T3.



Slika 16. Reprezentativni kromatogram hidrolizata tiroidnog pripravka cijepljen sa standardom T4.

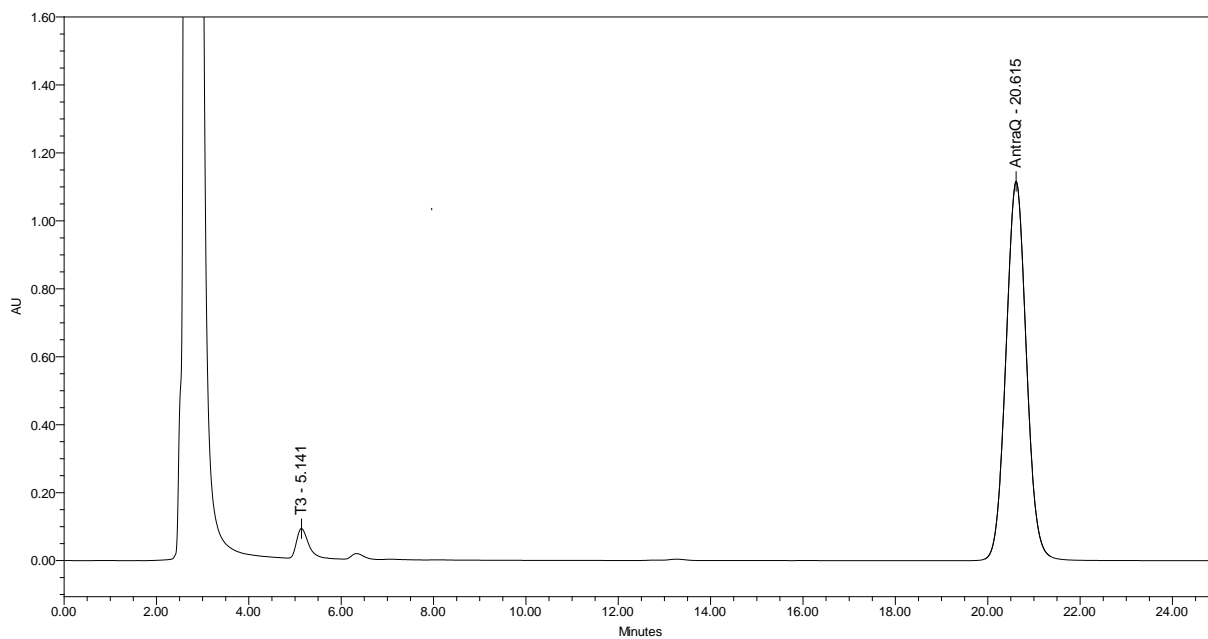
Na kromatogramima je vidljiv i široki kromatografski maksimum koji ima retencijsko vrijeme oko 3 minute i koji pripada inkubacijskom puferu u kojem se provodi hidroliza tiroidnog pripravka, što je potvrđeno kada je kroz kolonu propuštena smjesa inkubacijskog pufera (NaCl/ Tris (hidroksimetil) aminometil/ 2-merkaptio-1-metilimidazola) i otopine za zaustavljanje enzimske reakcije (fosforna kiselina/acetoni-tril) što je prikazano na slici 17. Kromatografski maksimum pufera nije ometao analizu T3 i T4, kao ni IS.



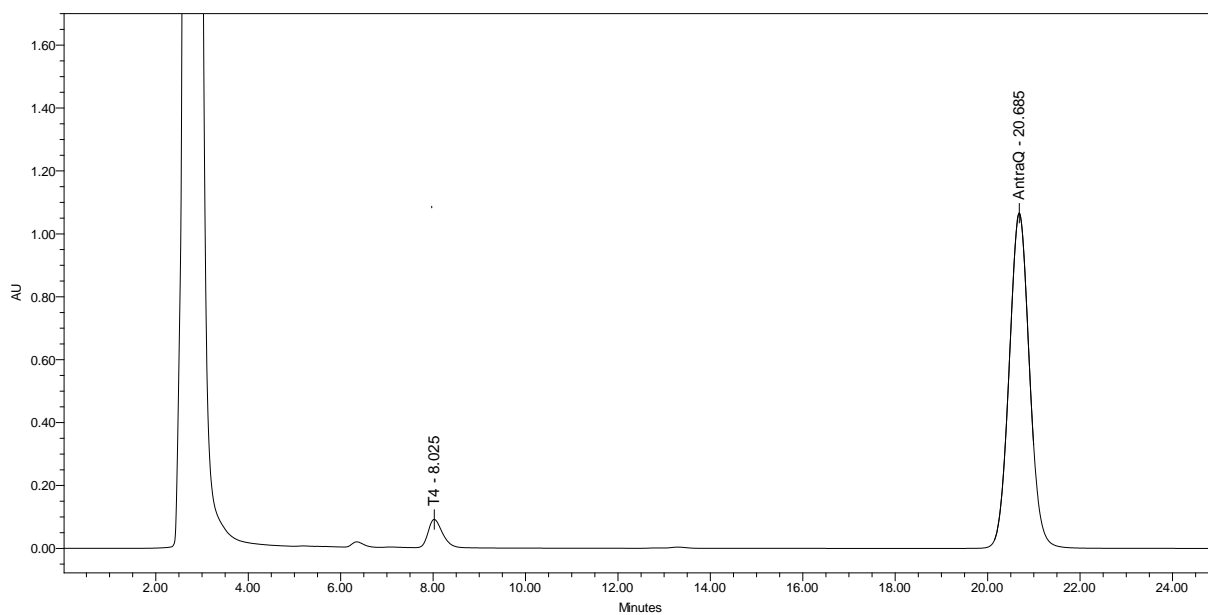
Slika 17. Kromatogram smjese inkubacijskog pufera i otopine za zaustavljanje enzimske reakcije.

Nakon što su analizirani hidrolizati tiroidnih pripravaka i što je cijepjenjem hidrolizata standardima potvrđeno da se retencijska vremena T3 i T4 ne mijenjaju, slijedeći korak je bio izračunati faktor korelacije za T3 i T4 kako bi kvantificirali analite u hidrolizatu tiroidnog pripravka. Standard T3 i IS u inkubacijskom puferu analizirani su pod istim kromatografskim uvjetima kao i hidrolizati tiroidnog pripravka. Dobiveni kromatogram je prikazan na slici 18. Isti postupak je ponovljen za T4 i IS, a kromatogram je prikazan na slici 19. Iz dobivenih kromatograma izračunat je IRF koji je korišten za kvantifikaciju T3 i T4 u hidrolizatima tiroidnog pripravka. Rezultati kvantitativnog određivanja, postotka iskorištenja i deklarirane vrijednosti sadržaja T3 i T4 su prikazani u tablici 11.

Sadržaj T4 u tiroidnom pripravku koji je bio u roku valjanosti je gotovo u potpunosti odgovarao deklariranom sadržaju, kao i sadržaj T3 te se nalazi unutar prihvatljivih granica odstupanja metode. U uzorku 2 koji je u trenutku analize bio izvan roka valjanosti vidljiva je manja količina T4 dok je količina T3 bila ispod granice kvantifikacije. Uzorak 2, koji je bio izvan roka trajanja sadržavao je i znatno manju količinu tiroidnog praha u jednoj kapsuli, tri puta manju količinu, a sukladno tome i manju količinu hormona T3 i T4.



Slika 18. Reprezentativni kromatogram standarda T3 i AntraQ u inkubacijskom puferu.



Slika 19. Reprezentativni kromatogram standarda T4 i AntraQ u inkubacijskom puferu.

Tablica 11. Kvantitativni sastav testiranih tiroidnih pripravaka.

	UZORAK 1		UZORAK 2	
	T3	T4	T3	T4
Deklarirano (µg)	12,6	55,5	4,50	19,75
Nađeno * (µg)	12,56	52,25	-	12,01
Iskorištenje (%)	99,71	95,00	-	60,76

*Srednja vrijednost tri mjerenja

Dobiveni preliminarni rezultati analiza pokazali su kako je razvijena i validirana RP-HPLC metoda prikladna za određivanje sadržaja T3 i T4 u komercijalnim tiroidnim pripravcima. Potvrđeno je značajno smanjenje sadržaja hormona T3 i T4 u pripravku kojemu je istekao rok valjanosti, koji je sadržavao 32,5 mg tiroidnog praha u jednoj kapsuli, a deklarirana količina T3 bila je 4,5 µg i T4 19,75 µg. Pregledom dostupne literature uspostavljen je poboljšani protokol enzimske hidrolize tiroidnog pripravka kako bi hidrolizirali proteine na koje su vezani T3 i T4 u pripravku. Iz literature je poznato da postoje problemi s iskorištenjem (engl. *recovery*) T3 i T4, ovisno o uvjetima enzimske hidrolize kao što su vrijeme inkubacije, volumen inkubacijske otopine, vrste proteolitičkih enzima, pH inkubacijske otopine, različiti dodaci u tabletama tiroidnog pripravka (Richheimer i Jensen, 1985).

Korištenje komercijalnog pripravka Pronase, proteaza izoliranih iz *Streptomyces griseus* enzimske aktivnosti 65269,5 PUK/g, u povećanom volumenu pufera od 5 mL, pokazala su da je moguće dobiti visoko iskorištenje (engl. *recovery*) T3 i T4. Tris -pufer s dodatkom NaCl i 2-merkaptio-1-metil-imidazola kojem je pH podešen na 8,6 pogodan je za inkubaciju i hidrolizu proteina u tiroidnom pripravku. Mikroceluloza koja je korištena kao punilo u kapsulama, uklonjena je centrifugiranjem nakon što je završena hidroliza kako ne bi došlo do gubitka T3 i T4.

U literaturi je opisana adsorpcija T3 i T4 na proteaze tijekom hidrolize proteina u tiroidnom pripravku (Rees-Jones i Larsen, 1977) što je također smanjivalo iskorištenje (engl. *recovery*) hormona T4 i posebno T3. Kako bi se to izbjeglo koristili smo opisani protokol u kojem se u

hidrolizat nakon inkubacije s proteazama dodaje otopina za zaustavljanje enzimske reakcije, smjesa acetonitrila i fosforne kiseline, kako bi uklonili proteine i spriječili vezanje T3 i T4 na proteaze (Richheimer i Jensen, 1985). Standarde T3 i T4 inkubirali smo sa i bez proteaza te nije bilo značajnog gubitka u količini, dok je iskorištenje bilo unutar granica metode.

Različiti sadržaj tiroidnog praha formuliran u kapsulama ili tabletama koje su komercijalno dostupne za terapiju i različiti odnos s količinom punila, stabilizatora te drugih dodataka može također značajno utjecati na rezultate analize (Kang, 2013). Kada je količina punila i ostalih ekscipijensa prevelika u odnosu na malu količinu tiroidnog praha nije moguće do kraja provesti hidrolizu što utječe na rezultate.

Preliminarni pokusi određivanja sadržaja hormona T3 i T4 u komercijalnim pripravcima tiroidnog praha štitne žlijezde svinje metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na reverznoj fazi pokazali su prednosti razvijene i validirane metode, veliku preciznost, točnost i selektivnost. Analize su brze i nije potrebno pročišćavanje uzorka nakon hidrolize, a prije analize. Potreban analitički pribor je dostupan u većini laboratorija i sama analiza ne zahtijeva visoke troškove.

5. ZAKLJUČCI

1. Razvijena je brza, jednostavna, precizna i točna metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na reverznoj fazi s UV-Vis detekcijom za istovremenu detekciju i kvantifikaciju trijodtironina i tiroksina u komercijalnim pripravcima tiroidnog praha pomoću metode unutarnjeg standarda.
2. Metoda je validirana prema ICH smjernicama korištenjem standarda tiroksina, trijodtironina i antrakina. Dobiveni rezultati zadovoljavaju postavljene kriterije točnosti (analitički prinos 103,29 % – 116,81 %), linearnosti ($k > 0,999$), selektivnosti ($RSD < 0.41170\%$) i preciznosti ($RSD < 5\%$).
3. Uspostavljena je metoda enzimске hidrolize tiroidnog pripravka kako bi se hormoni T3 i T4 oslobodili iz proteina na koji su vezani prilikom pohrane u štitnoj žlijezdi i kako bi se mogao dokazati i odrediti ukupni sadržaj količina tiroksina i trijodtironina u uzorku.
4. Validirana tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti na reverznoj fazi je uspješno primijenjena u kvantitativnoj analizi sadržaja dva komercijalna tiroidna pripravka i određena je količina tiroksina i trijodtironina u uzorku.
5. Pokazano je kako se deklarirane vrijednosti sadržaja tiroksina i trijodtironina podudaraju s rezultatima kvantitativne analize tiroidnog pripravka koji je bio unutar roka trajanja, dok je kvantitativna analiza uzorka koji je bio izvan roka trajanja pokazala smanjenu količinu tiroksina i trijodtironina.
6. Preliminarni rezultati istraživanja su pokazali kako je razvijenu metodu moguće primijeniti za kvantitativno određivanje sadržaja tiroksina i trijodtironina u komercijalno dostupnim pripravcima kao i za praćenje stabilnosti takvih pripravaka.

6. LITERATURA

- Arrangoiz R, Cordera F, Caba D, Muñoz M, Moreno E, de León EL. Comprehensive review of thyroid embryology, anatomy, histology, and physiology for surgeons. *Int J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2018, 29,160-188.
- Aurora K i Gangadharappa HV. An approach to bioanalytical method development and validation: a review. *Int J Pharm Sci Res*, 2016, 11, 2291-2301.
- Beynon ME, Pinner K. An Overview of the Thyroid Gland and Thyroid-Related Deaths for the Forensic Pathologist. *The official publication of the NAME*, 2016, 20, 217-236.
- Bianco AC, Drigo RF. Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *Int J BiochemCell Biol*, 2011, 10, 1433-1439.
- Bilous R, Windheuser JS. Determination of liothyronine and thyroxine in dried thyroid by GLC. *J Pharm Sci*, 1973, 4, 274-277.
- Bukovec Megla Ž, Mirošević G. Endokrinološke i metaboličke bolesti. U: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi, Topić E urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 54-61.
- Cakmak H, Long RK. Endocrine drugs. U: Basic & clinical pharmacology. Katzung BG, Trevor AJ, urednici, New York, McGraw-Hill, 2015, str. 974-990.
- Castagna MG, Dentice M, Cantara S, Ambrosio R, Maino F, Porcelli T, Marzocchi C, Garbi C, Pacini F i Salvatore D. DIO2 Thr92Ala reduces deiodinase-2 activity and serum-T3 levels in thyroid-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2017, 8, 1623-1630.
- Cieri UR, Iluminati JC. Detection and semiquantitative estimation of thyroxine and diiodothyronine in liothyronine sodium. *J Assoc Off Anal Chem*, 1977, 7, 628-634.
- Cooper DS, Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*, 2012, 13, 1142-1154.
- Čepelak I, Štraus B, Dodig S, Labar B. Endokrinološke bolesti. U: Medicinsko-biokemijske smjernice. Štraus B, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 111-118.
- De la Vieja A, Calero M, Santisteban P, Lamas L. Identification and quantitation of iodotyrosines and iodothyronines. *J Chromatogr B*, 1997, 688, 143-149.
- Docter R, Hennemann G. Estimation of thyroid hormones by gas-liquid chromatography. *Clin Chim Acta*, 1971, 7, 297-303.
- Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey, Morreale de Escobar FG. Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *J Clin Invest*, 1995, 96, 2828-2838.
- Faircloth MA, A.D. Williams AD i Florsheim WH. Thin-Layer Chromatographic method for the analysis of thyroidal iodoamino acids in proteins. *Anal Biochem*, 1965, 7, 437-443.

Gilbert MT. HPLC Columns and Packings. U: High performance liquid chromatography. Gilber MT, urednik, Bristol, Wright, 1987, str. 12-52.

Guyton AC, Hall JE. Metabolički hormoni štitnjače. U: Medicinskoj fiziologiji. Andreis I, Kukolja S, Taradi M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2007, str. 951-964.

Heki N, Noto M, Hosojima H. Analysis of thyroid hormones in serum and urine by mass fragmentography using GC-MS. *Folia endocrinol jap*, 1976, 52, 149-157.

ICH Harmonized tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1) International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005., <http://www.ich.org> , pristupljeno 23.5.2022.

Kakad SB, Kolhe MH, Dukre TP. A Review on Pharmaceutical Validation. *J Pharm Sc*, 2020, 5, 274-277.

Kang GY, Parks JR, Fileta B, Chang A, Abdel-Rahim MM, Burch HB, Bernet VJ, Thyroxine and Triiodothyronine Content in Commercially Available Thyroid Health Supplements, *THYROID*, 23(10), 2013.

Kaur N, Suryanarayanan R. Levothyroxine sodium pentahydrate tablets – formulation consideration. *J Pharm Sc*, 2021, 110, 3743-3756 . .

Lazarić K. Validacija analitičkih metoda-osnovna načela. *Svijet po mjeri*, 2014, 4, 61-64.

Lowe JC. Stability, Effectiveness, and Safety of Desiccated Thyroid vs Levothyroxine: A Rebuttal to the British Thyroid Association. *Thyroid Sci*, 2009, 13, 1-12.

Mangieri CN, Lund MH. Potency of United States Pharmacopeia desiccated thyroid tablets as determined by the antigoytrogenic assay in rats. *J Clin Endocrinol Metab*. 1970, 3, 102-104.

Manius GJ, Fallon P, Tscherne R. Identification and determination of thyroxine using gas-liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1978, 10, 496-505.

McAninch AE, Bianco CA. The history and future of treatment of hypothyroidism. *Ann Intern Med*, 2016, 164, 50-56.

Michaelsson LF, Borregaard Medici B, Lerche la Cour J, Selmer C, Røder M, Perrild H, Knudsen N, Faber J, Nygaard B. Treating Hypothyroidism with Thyroxine/Triiodothyronine Combination Therapy in Denmark: Following Guidelines or Following Trends? *Eur Thyroid J*, 2015, 5, 4(3),175-179.

Miller A, Horster FA. High voltage electrophoretic separation of iodoamino acids from tissue of thyroid neoplasms and non-malignant thyroid changes. *Clin Oncol*, 6, 1976, 47-52.

Nihei NN, Gershengorn MC, Mitsuma T, Stringham LR, Cordy A, Kuchmy B, Hollander CS. Measurements of triiodothyronine and thyroxine in human serum by gas-liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1971, 15, 433-445.

Patil PN, Gyan S. HPLC method development-a review. *J.pharm educ res*, 2017, 243-260.

Petersen BA, Giese RW, Larsen PR, Karger BL. Measurement of free thyroid hormones in serum by dialysis and gas chromatography. *Clin Chem*, 1977, 8, 1389-1396.

Rapaka RS, Knight PW, Shah VP, Prasad VK. Analysis of Thyroidal Amino Acids in Pharmaceutical Preparations-Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography Analysis of Sodium Liothyronine from Tablets. *Anal Lett*, 1979, 1201-1215.

Rees-Jones RW i Larsen PR, Triiodothyronine and thyroxine content of desiccated thyroid tablets, *Metabolism*, 1977, 1213-1218.

Richheimer SL, Jensen CB. Determination of Liothyronine and Levothyroxine in Thyroid Preparations by Liquid Chromatography. *J Pharm Sci*, 1985, 75, 215-217.

Samanidou VF, Gika HG, Papadoyannis IN. Rapid HPLC analysis of thyroid gland hormones tri-iodothyronine (T3) and thyroxine (T4) in human biological fluids after SPE. *J Liq Cromatogr Relat Technol*, 2000, 13, 681-692.

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Separation methods. U:Principles of instrumental analysis. Dawn Giovanniello D, Rosener M, Dodd E, urednici, Boston, Cengage Learning, 2016, str. 696-700, 746-778.

Slater S. The discovery of thyroid replacement therapy Part 1: The beginning. *J R Soc Med*, 2011, 104, 15-18.

Štraus B, Plavšić V. Hormoni. U: Štrausova medicinska biokemija. Štraus B, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 355-360.

Thammana M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J Pharm Anal*, 2016, 22-25.

The United States Pharmacopeia, 21st rev. US Pharmacopeial Convention:Rockville, MD 1985, 1061-1062.

Tijare LK, Rangari NT, Mahajan UN. A review on bioanalytical method development and validation. *Asian J Pharm Clin Res*, 2016, 9, 1-9.

Werner SC. Pharmacology treatment. U: The thyroid: A Fundamental and Clinical Text. Werner SC, urednik, New York, Harper& Row, 1962, str.817-825.

Wiersinga WM, Duntas L, Fadeyev V, Nygaard B, Vanderpump MP. 2012 ETA guidelines: the use of L-T4 + L-T3 in the treatment of hypothyroidism. *Eur Thyroid*, 2012, 25, 55-71.

Wiersinga WM. T4+T3 combination therapy: is there a true effect? *Eur Thyroid J*, 2017, 177, 288-296.

7. SAŽETAK/*SUMMARY*

Hipotireoza je patološko stanje koje se javlja zbog smanjenja stvaranja i lučenja hormona štitnjače. Terapija hipotireoze oslanja se na primjenu levotiroksina, no identificirana je subgrupa pacijenata s ostatnim simptomima unatoč toj terapiji. Zbog toga u zadnja dva desetljeća sve veći broj pacijenata poseže za tiroidnim pripravcima koji osim tiroksina sadrže i trijodtironin. Prirodni tiroidni pripravci su po sastavu suhi prah štitne žlijezde. Problem njihovog korištenja su neriješena pitanja sadržaja koji se razlikuje između proizvođača, ali i između pojedinih serija istog proizvođača. Do sada mali se broj istraživanja bavio utvrđivanja u tiroidnim pripravcima i stabilnosti T3 i T4 u njima. Stoga je cilj ovog rada razviti i validirati brzu, specifičnu i pouzdanu metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na reverznoj fazi s UV-Vis detekcijom za istovremeno kvantificiranje T3 i T4 u takvom biološkom uzorku. Antrakinin je korišten kao unutarnji standard za kvantifikaciju T3 i T4. Metoda je validirana ispitivanjem točnosti, preciznosti, specifičnosti, linearnosti te granice detekcije i granice kvantifikacije. Razvijena metoda je visoko specifična (RSD 0,41170 % za T3 i 0,35716 % za T4) i točna (analitički prinos 103,29 % – 116,81 %). Metoda je linearna u ispitivanom koncentracijskom području (0,125 – 2,5 µg/mL). Intra i inter-testna preciznost je visoka (RSD za T3 i T4 te unutarnjeg standarda bio niži od 5 %). LOQ i LOD niski su za oba analita (LOD 80 ng/mL, LOQ 243 ng/mL). Metoda je primijenjena za kvantitativnu analizu T3 i T4 u komercijalnom tiroidnom pripravku unutar i izvan roka trajanja. Rezultati kvantitativne analize tiroidnog pripravka koji je bio unutar roka valjanosti slažu se s deklariranim vrijednostima sadržaja dok je analiza uzorka izvan roka trajanja pokazala smanjenu količinu T3 i T4.

SUMMARY

Hypothyroidism is a pathological condition that occurs due to a decrease in the formation and secretion of thyroid hormones. Hypothyroidism therapy relies on the use of levothyroxine, but a subgroup of patients with residual symptoms has been identified despite this therapy. That is why in the last two decades an increasing number of patients are resorting to thyroid preparations that contain triiodothyronine in addition to thyroxine. Natural thyroid preparations are by composition dry powder of the thyroid gland. The problem of their use is unresolved issues of content that differs between manufacturers but also between individual series of the same manufacturer. A small number of studies have been done so far with the aim of solving this issue, so the aim of this paper is to develop and validate a fast, specific and reliable method of High-performance liquid chromatography on the reverse phase with UV-Vis detection for simultaneous quantification of T3 and T4 in such biological sample. Anthraquinone was used as an internal standard for quantifying T3 and T4. The method is validated by examining the accuracy, precision, specificity, linearity and limit of detection limit of quantification. The developed method is highly specific (RSD 0.41170 % for T3 and 0.35716 % for T4) and accurate (analytical yield 103.29 % - 116.81 %). The method is linear in the concentration area studied (0.125-2.5 µg/mL). Intra and inter-test accuracy is high (RSD for T3 and T4 and internal standard was lower than 5%). Limit of detection and limit of quantification are low for both analytes (LOD 80 ng/mL, LOQ 243 ng/mL). The method was applied for quantitative analysis of T3 and T4 in a commercial thyroid preparation inside and outside the shelf life. The results of quantitative analysis of the thyroid preparation that was within the shelf life correspond to the declared content values, while the sample analysis outside the shelf life showed a decreased amount of T3 and T4.

PRILOZI

8.1. POPIS KRATICA

^{125}I – radioaktivni jod

α -nagib pravca

Anti-Tg – protutijela na tireoglobulin

Anti-TPO – protutijela na tireoidnu peroksidazu

AntraQ – antrakinon

ATA – Američke udruge za štitnjaču (engl. *American thyroid association*)

AACE – Američka akademija kliničke endokrinologije (engl. *American Academy of Clinical Endocrinologists*)

BMR – brzina bazalnog metabolizma (engl. *basal metabolic rate*)

BTA – Britanske udruge za štitnjaču (engl. *British thyroid association*)

CMIA – kemiluminiscentne imunokemijske metode s mikročesticama (engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*)

D1,D2,D3 – dejodinaza 1,2,3

DIO1, DIO2, DIO3 – geni koji kodiraju D1, D2, D3

DIT – dijodtirozin

ER – Endoplazmatska mrežica

ETA – Europske udruge za štitnjaču (engl. *European thyroid association*)

FDA-Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and drugs administration*)

FT3 – nevezani trijodtironin

FT4 – nevezani tiroksin

GA – Golgijev aparat

GC – plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*)

GC-MS – plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (engl. *gas chromatography – mass spectrometry*)

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*)

HPMC – hidroksilpropil metilceluloza

ICH – Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*)

IRF – faktor korelacije (engl. *internal response factor*)

IS – unutarnji standard (engl. *Internal standard*)

k – koeficijent korelacije

LC – tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)
LOD – granica detekcije (engl. *limit of detection*)
LOQ – granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*)
LPE-tekućina-tekućina ekstrakcija (engl. *liquid phase extraction*)
LT3 – liotironin
LT4 – levotiroksin
MIT – monojodtirozin
N – broj elemenata uzorka
NIS – simporter natrija i joda
PBI – proteionsko vezani jod (engl. *protein bound iodine*)
RI – referentni interval
RIA – radioimunoesej(engl. *radioimmunoassay*)
RSD – relativna standardna devijacija
rT3 – reverzni trijodtironin
RP-HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza (engl. *reverse phase High-performance liquid chromatography*)
 R^2 – koeficijent korelacije
RT – retencijsko vrijeme
 SCN^- – tiocijanat
 S_d – standardna devijacija
 S_e – standardna greška
SFC – kromatografija superkritične tekućine (engl. *supercritical fluid chromatography*)
SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction*)
T3 – trijodtironin
T4 – tiroksin
TBG – globulin koji veže tiroksin (engl. *thyroxine-binding globulin*)
TFA – triflouoctena kiselina
Tg-tireoglobulin
 t_M – mrtvo vrijeme
TPO- tiroidna peroksidaza
TRH – hormon koji oslobađa tiroksin (engl. *thyrotropin-releasing hormone*)
 t_R – retencijsko vrijeme
TSH – tireotropin (engl. *thyroid stimulating hormone*)

t_s – vrijeme provedeno na stacionarnioj fazi

UHPLC-ultra-visoko učinkovita tekućinska kromatografija (engl. *ultra-high-performance (pressure) liquid chromatography*)

USP- Farmakopeja Sjedinjenih Država (engl. *United States Pharmacopeia*)

X_{sr} – aritmetička sredina

σ – standardna devijacija

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA
KARTICA/*BASIC DOCUMENTATION
CARD***

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za Analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ I VALIDACIJA RP-HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE TRIJODTIRONINA I TIROKSINA U BIOLOŠKOM UZORKU

Mihaela Jovanović

SAŽETAK

Hipotireoza je patološko stanje koje se javlja zbog smanjenja stvaranja i lučenja hormona štitnjače. Terapija hipotireoze oslanja se na primjenu levotiroksina, no identificirana je subgrupa pacijenata s ostatnim simptomima unatoč toj terapiji. Zbog toga u zadnja dva desetljeća sve veći broj pacijenata poseže za tiroidnim pripravcima koji osim tiroksina sadrže i trijodtironin. Prirodni tiroidni pripravci su po sastavu suhi prah štitne žlijezde. Problem njihovog korištenja su neriješena pitanja sadržaja koji se razlikuje između proizvođača, ali i između pojedinih serija istog proizvođača. Do sada mali se broj istraživanja bavio utvrđivanjem u tiroidnim pripravcima i stabilnosti T3 i T4 u njima. Stoga je cilj ovog rada razviti i validirati brzu, specifičnu i pouzdanu metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na reverznoj fazi s UV-Vis detekcijom za istovremeno kvantificiranje T3 i T4 u takvom biološkom uzorku. Antraknon je korišten kao unutarnji standard za kvantifikaciju T3 i T4. Metoda je validirana ispitivanjem točnosti, preciznosti, specifičnosti, linearnosti te granice detekcije i granice kvantifikacije. Razvijena metoda je visoko specifična (RSD 0,41170 % za T3 i 0,35716 % za T4) i točna (analitički prinos 103,29 % – 116,81 %). Metoda je linearna u ispitivanom koncentracijskom području (0,125 – 2,5 µg/mL). Intra i inter-testna preciznost je visoka (RSD za T3 i T4 te unutarnjeg standarda bio niži od 5 %). Limit detekcije i limit kvantifikacije niski su za oba analita (LOD 80 ng/mL, LOQ 243 ng/mL). Metoda je primijenjena za kvantitativnu analizu T3 i T4 u komercijalnom tiroidnom pripravku unutar i izvan roka trajanja. Rezultati kvantitativne analize tiroidnog pripravka koji je bio unutar roka valjanosti slažu se s deklariranim vrijednostima sadržaja dok je analiza uzorka izvan roka trajanja pokazala smanjenu količinu T3 i T4.

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

Rad sadrži: 68 stranica, 19 grafičkih prikaza, 11 tablica i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: tiroidni prah, T3, T4, RP-HPLC, validacija

Mentor: **Dr. sc. Ruža Frkanec**, znanstveni savjetnik, Sveučilišta u Zagrebu, Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji
Dr. sc. Davor Šakić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ruža Frkanec**, znanstveni savjetnik Sveučilišta u Zagrebu, Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji
Dr. sc. Davor Šakić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Srpanj, 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Analytical chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE RP-HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF TRIIODOTHYRONINE AND THYROXINS IN A BIOLOGICAL SAMPLE

Mihaela Jovanović

SUMMARY

Hypothyroidism is a pathological condition that occurs due to a decrease in the formation and secretion of thyroid hormones. Hypothyroidism therapy relies on the use of levothyroxine, but a subgroup of patients with residual symptoms has been identified despite this therapy. That is why in the last two decades an increasing number of patients are resorting to thyroid preparations that contain triiodothyronine in addition to thyroxine. Natural thyroid preparations are by composition dry powder of the thyroid gland. The problem of their use is unresolved issues of content that differs between manufacturers but also between individual series of the same manufacturer. A small number of studies have been done so far with the aim of solving this issue, so the aim of this paper is to develop and validate a fast, specific and reliable method of High-performance liquid chromatography on the reverse phase with UV-Vis detection for simultaneous quantification of T3 and T4 in such biological sample. Anthraquinone was used as an internal standard for quantifying T3 and T4. The method is validated by examining the accuracy, precision, specificity, linearity and limit of detection limit of quantification. The developed method is highly specific (RSD 0.41170 % for T3 and 0.35716 % for T4) and accurate (analytical yield 103.29 % - 116.81 %). The method is linear in the concentration area studied (0.125-2.5 µg/mL). Intra and inter-test accuracy is high (RSD for T3 and T4 and internal standard was lower than 5%). Limit of detection and limit of quantification are low for both analytes (LOD 80 ng/mL, LOQ 243 ng/mL). The method was applied for quantitative analysis of T3 and T4 in a commercial thyroid preparation inside and outside the shelf life. The results of quantitative analysis of the thyroid preparation that was within the shelf life correspond to the declared content values, while the sample analysis outside the shelf life showed a decreased amount of T3 and T4.

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

Thesis includes: 68 pages, 19 figures, 11 tables and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Thyroid powder, T3, T4, RP-HPLC, validation

Mentor: **Dr. sc. Ruža Frkanec**, scientific advisor, University of Zagreb, Center for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology
Dr. sc. Davor Šakić, Ph.D, Assistant Professor University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ph.D. Ruža Frkanec**, Scientific Advisor, University of Zagreb, Center for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology
Ph.D Davor Šakić, Ph.D, Assistant Professor University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ph.D Lidija Bach-Rojecky Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2022.

