کالج پروژه

www.collegeprozheh.ir

دانلود پروژه های دانشگاهی

بانک موضوعات پایان نامه

دانلود مقالات انگلیسی با ترجمه فارسی

آموزش نگارش پایان نامه ، مقاله ، پروپوزال

دانلود جزوه و نمونه سوالات استخدامی

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمانشاه

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت دریافت درجهٔ دکترای حرفه ای داروسازی

عنوان:

مقایسهٔ پارامترهای برون تن و اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های مختلف لووتیروکسین موجود در بازار دارویی ایران

اساتید راهنما: پروفسور غلامرضا بهرامی - دکتر مهرعلی رحیمی

نگارش:

مهدیه بختیاری منش

سال تحصیلی ۸۹-۸۸

دی ۱۳۸۹

این نوشتار...

هدیه ای است ناچیز تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم که دستان مجسم ایثار و تجلی لطـف و مهربانینـد و همواره وجودشان مایه سرافرازی من است.

با سپاس فراوان از

استاد فرهیخته ام جناب آقای دکتر مهر علی رحیمی.

استاد اندیشمندم جناب آقای پروفسور غلامرضا بهرامی.

با تشکر از همکاری صمیمانهٔ سرکار خانم بهاره محمدی.

با تقدیر فراوان از سرکار خانم شهلا صفری.

فهرست مطالب

عنوان

صفحه

فصل اول: کلیات

۱-۱- هدف مطالعه	۴
۱-۲- اهمیت	۵
۱-۳- تاریخچه کشف غده تیروئید و هورمون های تیروئید	۶
۱-۴- تاریخچه کاربرد هورمون های تیروئید در درمان بیماری	۷
۱-۵- تولید و ترشح هورمون های تیروئید	۸
۱-۶- تبدیل تیروکسین به تری یدوتیرونین در بافت های غیر تیروئیدی	۱۲
۱-۷- اثرات فیزیولوژیک هورمون های تیروئید در بافت ها	۱۳
۱-۸- تعریف کم کاری غده تیروئید	۱۶
۱-۸-۱- تعریف کم کاری غده تیروئید اولیه	۱۷
۱-۸-۲- علل شایع کم کاری غده تیروئید	۱۷
۱-۸-۳- علائم شایع بیماری کم کاری غده تیروئید	۱۸
۱-۸-۴- تشخیص کم کاری غده تیروئید	۲۰
۱-۹- درمان کم کاری غده تیروئید اولیه	۲۱
۱-۹-۱- لووتیروکسین سدیم	۲۲
۱-۹-۲- خواص فیزیکوشیمیایی لووتیروکسین سدیم	۲۲
۱-۱۰- بررسی ارتباط ساختمان ترکیبات تیروئید با فعالیت آن	۲۳
۱-۱۰-۱- زنجیره جانبی آلیفاتیک	۲۴

۱-۱۰-۲- حلقه متصل به آلانین ۲۵

۱-۱۰-۳- اتم اتصال دهنده دو حلقه ۲۶

۱-۱۰-۴- حلقه فنول ۲۶

۱-۱۰-۵- گروه هیدروکسیل حلقه فنول ۲۷

۱-۱۱- مکانیسم اثر هورمون های تیروئید ۲۹

۱-۱۲- فارماکوکینتیک ۳۱

۱-۱۲-۱- جذب ۳۱

۱-۱۲-۲- توزیع ۳۱

۱-۱۲-۳- متابولیسم و دفع ۳۳

۱-۱۳- روش های اندازه گیری هورمون های تیروئید ۳۵

۱-۱۳-۱- روش رادیوایمونواَسی ۳۵

۱-۱۳-۲- روش RT_3Up ۳۷

۱-۱۳-۳- سنجش آزمایشگاهی عیار تیروکسین آزاد ۳۸

۱-۱۳-۴- سنجش آزمایشگاهی تیروکسین آزاد ۳۸

۱-۱۳-۵- سنجش آزمایشگاهی تری یدوتیرونین ۳۹

۱-۱۴- ضرورت انجام کار ۴۰

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- مواد ۴۳

۲-۲- دستگاه ها و وسایل ۴۳

۲-۳- مشخصات فراورده های لووتیروکسین مورد مطالعه ۴۴

۲-۴- آزمون های برون تن ۴۴

۲-۴-۱- معتبرسازی روش آنالیز ۴۴

۲-۴-۱-۱- انتخابی بودن ۴۵

۲-۴-۱-۲- خطی بودن ۴۵

۲-۴-۱-۳- صحت ۴۵

۲-۴-۱-۴- دقت ۴۶

۲-۴-۱-۴-۱- دقت دستگاه ۴۶

۲-۴-۱-۴-۲- تکرار پذیری ۴۶

۲-۴-۱-۵- حد تشخیص ۴۶

۲-۴-۱-۶- حد تعیین مقدار ۴۷

۲-۴-۲- آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص لووتیروکسین سدیم ۴۷

۲-۴-۲-۱- تهیه محلول استاندارد لووتیروکسین ۴۷

۲-۴-۲-۲- تهیه محلول استوک استاندارد داخلی ۴۷

۲-۴-۲-۳- شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۴۸

۲-۴-۲-۴- رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت ۴۸

۲-۴-۲-۵- روش کار ۴۹

۲-۴-۳- آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره در قرص لووتیروکسین سدیم ۵۰

۲-۴-۳-۱- تهیه محلول استاندارد لووتیروکسین ۵۰

۲-۴-۳-۲- تهیه محلول استوک استاندارد داخلی ۵۰

۲-۴-۳-۳- شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۵۰

۲-۴-۳-۴- رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت ۵۰

۲-۴-۳-۵- روش کار ۵۱

۲-۴-۴- آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم ۵۲

۲-۴-۴-۱- تهیه محلول های استاندارد لووتیروکسین برای آزمون انحلال ۱و ۲ ۵۲

۲-۴-۴-۲- شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا در آزمون انحلال ۱ و ۲ ۵۲
۲-۴-۴-۳- روش کار تعیین سرعت انحلال در قرص لووتیروکسین سدیم برای آزمون انحلال ۱ و ۲ ۵۳
۲-۴-۴-۴- رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت برای آزمون انحلال ۱ و ۲ ۵۴
۲-۵- شناسایی و تعیین مقدار ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۵۴
۲-۵-۱-تهیه محلول های استاندارد ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۵۴
۲-۵-۲-تهیه محلول استوک استاندارد داخلی ۵۵
۲-۵-۳- شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۵۵
۲-۵-۴- رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت ۵۶
۲-۵-۵- روش کار ۵۶
۲-۶- طیف سنجی جرمی ۵۷
۲-۶-۱- اجزاء دستگاه LC-MS/MS ۵۸
۲-۶-۱-۱- سیستم ورودی ۵۸
۲-۶-۱-۲- یونیزاسیون ۵۹
۲-۶-۱-۲-۱- یونیزاسیون الکترواسپری ۵۹
۲-۶-۱-۳- اطاقک شتاب دهنده ۵۹
۲-۶-۱-۴- اطاقک رانش ۶۰
۲-۶-۱-۵- آشکارساز ۶۰
۲-۶-۲- توان تفکیک LC-MS/MS ۶۰
۲-۶-۳- ترتیب تجزیه ای ۶۱
۲-۶-۴- طیف سنج های جرمی دنبال هم ۶۱
۲-۶-۵- تکنیک های تزویجی ۶۱
۲-۶-۶- سیستم های مختلف پایش یون ها توسط دستگاه LC-MS/MS ۶۲

۲-۶-۶-۱- پایش یون ها با روش تمام اسکن ۶۲

۲-۶-۶-۲- پایش یون ها با روش اسکن یون های دختر ۶۳

۲-۶-۶-۳- پایش یون ها با روش اسکن یک واکنش انتخابی و واکنش های انتخابی چندگانه ۶۳

۲-۷- مطالعه کیفی ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین با استفاده از متد C-MS/MS ۶۴

۲-۷-۱- شرایط دستگاه LC-MS/MS ۶۴

۲-۷-۲- روش کار ۶۴

۲-۸- مطالعات بالینی و آزمایشگاهی عملکرد غده تیروئید ۶۵

۲-۸-۱- تعریف مطالعه مداخله ای ۶۵

۲-۸-۲- روش کار مطالعه اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی ۶۶

۲-۸-۳- روش جمع آوری داده ها ۶۸

۲-۸-۴- محاسبه حجم نمونه ۶۸

۲-۸-۵- روش نمونه گیری ۶۹

۲-۸-۶- روش کور کردن مطالعه ۶۹

۲-۸-۷- محدودیت های مطالعه ۷۰

۲-۸-۸- ملاحظات اخلاقی ۷۰

۲-۹- آنالیز داده ها ۷۰

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج آزمایشات برون تن ۷۲

۳-۱-۱- آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص لووتیروکسین سدیم ۷۲

۳-۱-۱-۱- بررسی صحت آزمون تعیین مقدار ماده موثره ۷۲

۳-۱-۱-۲- بررسی دقت دستگاه کروماتوگرافی ۷۲

۳-۱-۱-۳ بررسی تکرار پذیری آزمون تعیین مقدار ماده موثره ۷۲

۳-۱-۱-۴- رسم منحنی کالیبراسیون ۷۳
۳-۱-۱-۵- محاسبه حد تشخیص و حد تعیین مقدار ۷۴
۳-۱-۱-۶- تعیین مقدار ماده موثره ۷۴
۳-۱-۲- آزمون تعیین یکنواختی میزان ماده موثره قرص های لووتیروکسین سدیم ۷۶
۳-۱-۲-۱- رسم منحنی کالیبراسیون ۷۶
۳-۱-۲-۲- محاسبه حد تشخیص و حد تعیین مقدار ۷۶
۳-۱-۲-۳- تعیین یکنواختی میزان ماده موثره ۷۶
۳-۱-۳- آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم ۷۸
۳-۱-۳-۱- رسم منحنی کالیبراسیون ۷۸
۳-۱-۳-۲- محاسبه حد تشخیص و حد تعیین مقدار ۷۹
۳-۱-۳-۳- بررسی انحلال قرص لووتیروکسین سدیم تحت شرایط ۱ ۷۹
۳-۱-۳-۴- آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم تحت شرایط ۲ ۸۰
۳-۱-۳-۵- محاسبه پارامترهای انحلال $T_{50\%}$ و D_{max} تحت شرایط ۱ و ۲ انحلال ۸۰
۳-۱-۴- تعیین مقدار ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۳
۳-۱-۴-۱- رسم منحنی کالیبراسیون ۸۳
۳-۱-۴-۲- محاسبه حد تشخیص و حد تعیین مقدار ۸۵
۳-۱-۴-۳- تعیین مقدار ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۶
۳-۱-۵- مطالعه کیفی ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین با روش LC-MS/MS ۸۸
۳-۲- نتایج مطالعات بالینی و آزمایشگاهی عملکرد غده تیروئید ۹۳
۳-۲-۱- مطالعه اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین با توجه به جنسیت بیمار ۹۳
۳-۲-۲- مطالعه اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین با توجه به سن بیمار ۹۵
۳-۲-۳- مطالعه BMI قبل و پس از مصرف فراورده کارخانه های ایران هورمون و برلین شیمی ۹۷

۳-۲-۴- مطالعه علائم بالینی قبل و بعد از مصرف فراورده دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی ۹۸

۳-۲-۵- مطالعه علائم آزمایشگاهی قبل و پس از مصرف فراورده دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی ۹۹

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث ۱۰۲

۴-۲- نتیجه گیری ۱۱۶

پیشنهادها ۱۱۷

پیوست ها ۱۱۸

منابع و مآخذ ۱۲۱

فهرست شکل ها

عنوان **شکل**

صفحه

شکل ۱-۱- ساختار مولکولی لووتیروکسین سدیم ۲۲

شکل ۱-۲- بررسی فعالیت نسبی مشتقات تیروکسین ۲۴

شکل ۱-۳ مکانیسم عمل هورمون تیروئید ۳۰

شکل ۱-۴- ساختار شیمیایی، فرمول بسته، ساختار و وزن مولکولی ترکیبات حاصل از تخریب لووتیروکسین ۳۵

شکل ۲-۱- شمایی از یک دستگاه طیف سنج جرمی ۶۰

شکل ۲-۲- شمایی از دستگاه MS/MS ۶۱

شکل ۳-۱- نمودار کالیبراسیون استاندارد لووتیروکسین به روش استاندارد داخلی در آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص لووتیروکسین سدیم ۷۴

شکل ۳-۲ نمودار ستونی جهت مقایسه میزان ماده موثره موجود در سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان در آزمون برون تن تعیین مقدار ماده موثره ۷۵

شکل ۳-۳ نمودار ستونی جهت مقایسه یکنواختی ماده موثره سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان در آزمون برون تن بررسی یکنواختی ماده موثره ۷۷

شکل ۳-۴ نمودار کالیبراسیون استاندارد لووتیروکسین در آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم ۷۸

شکل ۳-۵ نمودار شمایی درصد داروی آزاد شده ± خطای استاندارد در محیط انحلال در زمان های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ در آزمون انحلال فراورده های لووتیروکسین سدیم از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان با استفاده ازمحیط انحلال حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال و ۰/۲٪ سدیم لوریل سولفات انحلال ۷۹

شکل ۳-۶ نمودار شمایی از درصد داروی آزاد شده ± خطای استاندارد در محیط انحلال در زمان های مختلف در آزمون انحلال فراورده های لووتیروکسین سدیم از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان با استفاده ازمحیط انحلال حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال ۸۰

شکل ۳-۷ نمودار ستونی مقایسه پارامتر انحلال $T_{50\%}$ ± خطای استاندارد تحت شرایط ۱ و ۲ انحلال ۸۱

شکل ۳-۸ نمودار ستونی مقایسه پارامتر انحلال D_{max} ± خطای استاندارد تحت شرایط ۱ و ۲ انحلال ۸۲

شکل ۳-۹ نمودار کالیبراسیون استاندارد تری یدوتیرونین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۳

شکل ۳-۱۰ نمودار کالیبراسیون استاندارد دی یدوتیرونین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۴

شکل ۳-۱۱ نمودار کالیبراسیون استاندارد تری یدوتیروزین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۴

شکل ۳-۱۲ نمودار کالیبراسیون استاندارد یدوتیروزین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۴

شکل ۳-۱۳ نمودار کالیبراسیون استاندارد تیروزین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۵

شکل ۳-۱۴ نمودار کالیبراسیون استاندارد تیرونین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۵

شکل ۳-۱۵ نمودار ستونی جهت مقایسه مقدار ناخالصی حاصل از تجزیه لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم ± انحراف معیار ۸۶

شکل ۳-۱۶ کروماتوگرام های تعیین مقدار ناخالصی حاصل از تخریب لووتیروکسین به روش استاندارد داخلی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ۸۷

شکل ۳-۱۷ پایش یون ها در (a) فراورده ایران هورمون به روش تمام اسکن (b) محلول استاندارد تری یدوتیرونین به روش اسکن یون های دختر (c) فراورده ایران هورمون به روش اسکن یک واکنش انتخابی ۸۹

شکل ۳-۱۸ پایش یون ها در (a) فراورده ایران هورمون به روش تمام اسکن (b) محلول استاندارد دی یدوتیرونین به روش اسکن یون های دختر (c) فراورده ایران هورمون به روش اسکن یک واکنش انتخابی ۹۰

شکل ۳-۱۹ پایش یون ها در (a) فراورده ایران هورمون به روش تمام اسکن (b) محلول استاندارد تیروزین به روش اسکن یون های دختر (c) فراورده ایران هورمون به روش اسکن یک واکنش انتخابی ۹۱

شکل ۳-۲۰ مقایسه الگوی شکست لووتیروکسین به کمک سیستم پایش یون های دختر در (a) فراورده ایران هورمون (b) فراورده برلین شیمی ۹۲

شکل ۳-۲۱ مقایسه درصد بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در دو جنس زن و مرد پس از درمان با فراورده لووتیروکسین سدیم تولید شده در کارخانه برلین شیمی ۹۳

شکل ۳-۲۲ مقایسه درصد بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در دو جنس زن و مرد پس از درمان با فراورده لووتیروکسین سدیم تولید شده در کارخانه ایران هورمون ۹۴

شکل ۳-۲۳ مقایسه درصد افزایش و کاهش علائم آزمایشگاهی در دو جنس زن و مرد مبتلا به کم کاری تیروئید پس از درمان با فراورده های لووتیروکسین سدیم تولید شده در دو کارخانه برلین شیمی و ایران هورمون ۹۴

شکل ۳-۲۴ مقایسه درصد بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در بیماران جوان و مسن پس از درمان با فراورده لووتیروکسین سدیم تولید شده در کارخانه برلین شیمی ۹۵

شکل ۳-۲۵ مقایسه درصد بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در بیماران جوان و مسن پس از درمان با فراورده لووتیروکسین سدیم تولید شده در کارخانه ایران هورمون ۹۶

شکل ۳-۲۶ مقایسه درصد افزایش و کاهش علائم آزمایشگاهی در بیماران جوان و مسن پس از درمان با فراورده های لووتیروکسین سدیم تولید شده در دو کارخانه برلین شیمی و ایران هورمون ۹۶

شکل ۳-۲۷ نمودار ستونی مقایسه BMI واحد بر حسب کیلوگرم بر مجذور متر ± انحراف معیار، قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی و نیز مقایسه درصد کاهش BMI پس از مصرف دو فراورده تولید شده در دو کارخانه مذکور ۹۷

شکل ۳-۲۸ نمودار ستونی مقایسه درصد علائم بالینی بیماران کم کار تیروئید قبل و پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی ۹۸

شکل ۳-۲۹ نمودار ستونی مقایسه درصد کاهش علائم بالینی بیماران کم کار تیروئید پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی ۹۹

شکل ۳-۳۰ نمودار ستونی مقایسه میزان هورمون های تیروئیدی ± انحراف معیار، قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی و نیز مقایسه درصد افزایش و کاهش هورمون ها پس از مصرف دو فراورده تولید شده در دو کارخانه مذکور ۱۰۰

فهرست جداول

عنوان **جدول**

صفحه

جدول۱-۱ مقایسه دو هورمون T_3و T_4 پلاسما ۸

جدول۲-۱- مواد مورد استفاده به ترتیب حروف الفبا ۴۳

جدول۲-۲- دستگاه ها و وسایل مورد استفاده به ترتیب حروف الفبا ۴۳

جدول۲-۳- مشخصات فراورده های لووتیروکسین مورد مطالعه ۴۴

جدول ۲-۴ شرایط دستگاه دیسولوشن جهت انجام آزمون انحلال تحت شرایط ۱ و ۲ ۵۲

جدول ۲-۵ شرایط دستگاه LC-MS/MS در مطالعه کیفی ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۶۴

جدول ۳-۱ بررسی صحت آزمون تعیین مقدار ماده موثره با تزریق سه غلظت استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در سه روز متوالی و محاسبه میانگین درصد لووتیروکسین ±انحراف معیار ۷۲

جدول ۳-۲- بررسی دقت دستگاه کروماتوگرافی با تزریق سه غلظت استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر و محاسبه میزان میانگین درصد انحراف معیار نسبی حاصل تکرار پنج تزریق از هر نمونه استاندارد در یک روز ۷۲

جدول ۳-۳- بررسی تکرار پذیری آزمون تعیین مقدار ماده موثره با سه بار تهیه سه غلظت استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر و محاسبه میزان میانگین درصد انحراف معیار نسبی حاصل تکرار پنج تزریق از هر نمونه استاندارد در یک روز ۷۳

جدول ۳-۴ آنالیز غلظت های استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در برابر سطح زیر پیک لووتیروکسین به روش استاندارد داخلی ± انحراف معیار در آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص لووتیروکسین سدیم ۷۳

جدول ۳-۵ درصد ماده موثره موجود در فراورده های لووتیروکسین سدیم از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵ ،۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان در آزمون برون تن تعیین مقدار ماده موثره ۷۵

جدول ۳-۶ درصد ماده موثره موجود در فراورده های لووتیروکسین سدیم از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵ ،۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان در آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره ۷۷

جدول ۳-۷ نتایج آنالیز غلظت های استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم ۷۸

جدول ۳-۸ مدت زمان انحلال ۵۰٪ قرص لووتیروکسین سدیم برای سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵ ،۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان ۸۱

جدول ۳-۹ مقدار داروی انحلال یافته در مدت زمان ۴۵ دقیقه برای سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵ ،۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان ۸۲

جدول ۳-۱۰ نتایج آنالیز غلظت های استاندارد تری یدوتیرونین، دی یدوتیرونین، دی یدوتیروزین، یدوتیروزین، تیروزین و تیرونین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر به روش استاندارد داخلی در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۳

جدول ۳-۱۱ حد تشخیص و حد تعیین مقدار تری یدوتیرونین، دی یدوتیرونین، دی یدوتیروزین، یدوتیروزین، تیروزین و تیرونین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین ۸۵

جدول ۳-۱۲ مقدار ناخالصی حاصل از تجزیه لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم ± انحراف معیار ۸۶

جدول ۳-۱۳ میانگین BMI واحد بر حسب کیلوگرم بر مجذور متر ± انحراف معیار، قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی و نیز مقایسه درصد کاهش BMI پس از مصرف دو فراورده تولید شده در دو کارخانه مذکور ۹۷

فهرست علائم و اختصارات

BMI: Body Mass Index.
COA: Co-Activator.
COR: Co-Receptor.
DIT: 3,5-Diiodotyrosine.
D_{max}: Maximum medication at the time specified will be resolved.
FT_4I: Free T_4 Index.
HPLC: High Performance Liquid Chromatography.
IVIVC: Invitro-Invivo Correlation.
LC-MS/MS: Liquid Chromatography Mass-Mass.
LDL: Low Density Lipoprotein.
MIT: 3-Monoiodotyrosine.
RIA: Radio Immiuno Assay.
rpm: rate per minute.
RT_3: Reverse Triiodothyronine.
RT_3Up: Resin Triiodothyronine Uptake.
RXR: Retinoid x Receptor.
T_0: Thyronine.
T_2: di-iodothyronine.
T_3: 3,5,3′-Triiodo-L-thyronine
T_4: 3,3′,5,5′-Tetraiodo-L-thyronine
T_{50}: The time of 50% of drug dissolve.

TBA: Thyroid Binding Albumin.
TBG: Thyroid Binding Globulin.
TBPA: Thyroid Binding Pre Albumin.
TR: Thyroid Receptor.
TRH: Thyrotropin Releasing Hormone.
TSH: Thyroid Stimulating Hormone.
Thy: Tyrosine.
USP: United State Pharmacopeia.

خلاصه فارسی

بیماری کم کاری تیروئید یک مشکل مهم و شایع بالینی است که به علت کمبود یا فقدان ترشح هورمون های تیروئید ایجاد می شود. درمان انتخابی این بیماری جایگزین نمودن هورمون تیروکسین است. محدوده درمانی این هورمون باریک است به گونه ای که دوزهای ۲۵-۲۰٪ خارج از حریم درمانی، بیمار را در معرض خطرات زیان بار قلبی و متابولیکی قرار می دهد.

آزمون های برون تن شامل تعیین مقدار ماده موثره، یکنواختی ماده موثره و آزمون انحلال برای سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۲۰، ۷۱۴ ساخت کارخانه ایران هورمون و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ ساخت کارخانه برلین شیمی با روش HPLC انجام شد. شش ناخالصی حاصل از تخریب لوتیروکسین در قرص های لووتیروکسین سدیم به روش HPLC و LC-MS/MS شناسایی و تعیین مقدار شدند. مطالعه بالینی و آزمایشگاهی به روش کارآزمایی بالینی با طراحی متقاطع بر روی ۴۰ بیمار شامل ۱۶ مرد و ۲۴ زن با میانگین سنی ۱۲/۶۱±۳۴/۴۲ سال مبتلا به کم کاری تیروئید انجام شد. زمان مصرف هر یک از فراورده های دو کارخانه ۳ ماه و زمان پاکسازی ۴۲ روز در نظر گرفته شد. همچنین بهبود علائم بالینی، تست های عملکرد تیروئید، BMI و اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده ها با توجه به جنس و سن بیماران در دو فراورده با یکدیگر مقایسه شد.

در این بررسی مشاهده شد که آزمون تعیین مقدار و یکنواختی ماده موثره برای تمامی سری ساخت های هر دو کارخانه قابل قبول بود. مدت زمان انحلال ۵۰٪ قرص لووتیروکسین سدیم برای سری ساخت ۶۳۵ از کارخانه ایران هورمون برابر ۰/۹۴±۳/۷۱ دقیقه و برای سری ساخت ۱۵ از کارخانه برلین شیمی برابر ۲/۵۰±۷/۸۷ دقیقه می باشد که تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان می دهند. مقدار داروی انحلال یافته در مدت زمان ۴۵ دقیقه برای سری ساخت ۶۰۱ برابر ۱/۵۴±۹۳/۰۹٪ و برای سری ساخت ۶۶۵ برابر ۴/۲۳±۱۰۵/۱۳٪ است که تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان می دهند. تعیین مقدار شش ناخالصی حاصل از تخریب لوتیروکسین به روش HPLC نشان داد که در سری ساخت های ۶۳۵ و ۷۱۴ ایران هورمون میزان ناخالصی های تری یدوتیرونین و تیروزین به میزان قابل توجهی بالاست. نتایج حاصل از مطالعه کیفی ناخالصی ها به روش LC-MS/MS، مؤید نتایج بررسی کمی ناخالصی ها به روش HPLC بود. در بررسی بالینی مشاهده شد که فراورده برلین شیمی نسبت به مشابه ایرانی علائم بالینی، تست های عملکرد تیروئید و BMI بیماران را به میزان قابل قبول تری بهبود می بخشد. همچنین بیماران جوان و مردان پاسخ بهتری به درمان با هر دو فراورده مورد بررسی می دهند.

این مطالعه فراورده برلین شیمی را به علت مقدار ماده موثره، یکنواختی ماده موثره، پایداری و انحلال مناسب و نیز اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی مطلوب تر برای بیماران پیشنهاد می نماید.

واژگان کلیدی: لووتیروکسین، LC-MS/MS، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، پارامترهای برون تن.

کلیات

۱-۱- هدف مطالعه

بیماری کم کاری تیروئید یک مشکل شایع و مهم بالینی است. این بیماری بر اثر کمبود یا فقدان ترشح هورمون های تیروئید ایجاد می شود[۱]. نقص ترشح مقادیر کافی هورمون های تیروئید، کم کاری غده تیروئید اولیه نام دارد که با کاهش میزان هورمون تیروکسین و افزایش میزان هورمون تیروتروپین سرم شناخته می شود. بیماری های مربوط به غده تیروئید از جمله شایع ترین بیماری های غدد درون ریز در سراسر جهان می باشند. در ایات متحده بیش از ۶ تا ۸ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می باشند که تنها بیماری نیمی از آن ها تشخیص داده شده و درمان گردیده

است[۴-۲]. هورمون های تیروئید دارای دو اثر بسیار مهم در بافت ها شامل افزایش متابولیسم و تحریک رشد کودکان است. تمامی سلول های بدن تحت تاثیر هورمون های تیروئید قرار دارند. در نتیجه مبتلایان به این بیماری از طیف وسیعی از علائم بالینی رنج می برند. ابتلا به این بیماری در شیرخواران و کودکان موجب کندی رشد و عقب ماندگی دائمی ذهنی و حرکتی می شود. شروع کم کاری تیروئید در بزرگسالان منجر به کند شدن فرایندهای متابولیک خواهد شد[۵، ۶].

درمان این بیماری با جایگزین کردن خوراکی هورمون صورت می گیرد. بهترین جایگزین لووتیروکسین سدیم خوراکی صناعی است. این ترکیب ایزومر چپ گرد مولکول تیروکسین است که در درمان کم کاری تیروئید کاربرد دارد. لووتیروکسین صناعی به علت اثربخشی پیوسته و ایجاد درجات سرمی ثابت دو هورمون تیروکسین و تری یدوتیرونین بر سایر روش های درمانی ترجیح داده می شود[۶، ۷]. محدوده درمانی این هورمون باریک است، به گونه ای که دوزهای ۲۵-۲۰٪ خارج از حریم درمانی، بیمار را در معرض خطر عوارض جانبی ناخوشایندی مانند کم کاری و پرکاری پیشرونده تیروئید و اثرات زیان بار قلبی و متابولیکی قرار می دهد[۸، ۹].

کنترل کیفی در تمامی فرایندهای صنعتی مدرن به ویژه داروسازی صنعتی یکی از اجزاء جدایی ناپذیر قلمداد می شود[۱۰]. بررسی اثربخشی فرآورده های مختلف لووتیروکسین همچنان موضوع مهم نشست های کمیته مشورتی سازمان غذا و دارو آمریکا است. در این جلسات علت نتایج بالینی نامطلوب حاصل از درمان بیماران با فراورده های تولید شده در کارخانجات مختلف، عدم اطمینان از کیفیت و پایداری این محصولات می باشد[۱۱]. در مطالعات پایداری و بررسی های کنترل کیفی متعددی که بر روی فراورده های مختلف تجاری و ژنریک چندین کشور انجام شد، عدم پایداری برخی فرمولاسیون های دارویی، قابل قبول نبودن میزان انحلال، درصد پایین ماده موثره و عدم یکنواختی توزیع ماده موثره دارویی از دلایل اثربخشی پایین این فراورده ها بر شمرده شد[۱۶-۱۲].

مطالعه حاضر، پارامترهای برون تن و اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های مختلف لووتیروکسین موجود در بازار دارویی ایران را مورد ارزیابی و مقایسه قرار می دهد.

۱-۲- اهمیت

کم کاری تیروئید یک بیماری متابولیک با طیف وسیعی از علائم بالینی است که با افـزایش سـطح خـونی هورمـون تیروتروپین و کاهش سطح خونی هورمون های تیروئید مشخص می شود. مرکز کنتـرل و پیشـگیری از بیمـاری هـا پیش بینی نموده که گسترش این بیماری در جهان همچنان رو به افزایش اسـت. کشـور پهنـاور مـا یکـی از منـاطق آندمیک بیماری های تیروئید به شمار می رود. از سوی دیگر محدوده درمانی باریک هورمون های تیروئید به علـت ایجاد عوارض ناخوشایند قلبی و متابولیکی مسئله ای نگران کننده است[۹، ۸، ۳، ۲].

مسئله حائز اهمیت افزایش هشدار دهنده شیوع بیماری کم کاری تیروئید، اختلال تنظیم متابولیک منجر بـه تغییـرات پاتوفیزیولوژیک ثانویه در اعضاء بدن و نیز کاهش کیفیت زندگی بیماران بر اثر مصرف فراورده هـای دارویـی فاقـد کیفیت و فرمولاسیون نامناسب می باشد که بار عظیمی بر فرد مبتلا و سیستم مراقبت بهداشتی تحمیل می نمایـد. بـا این حال جای امیدواری وجود دارد. چرا که مطالعات بـالینی، آزمایشـگاهی، درون تـن و بـرون تـن فـراورده هـای مختلف تجاری و ژنریک در بهبود کیفیت فراورده ها، کنترل بهتر علائم بیمـاری و بهبـود کیفیـت زنـدگی بیمـاران، شناسایی محصولات دارویی بی کیفیت و ناپایدار، راهنمایی پزشکان جهت انتخـاب بهتـرین فـراورده بـرای درمـان بیماران و جایگزینی فراورده های مختلف تجاری و ژنریک با یکدیگر تاثیر به سزایی دارد.

۱-۳- تاریخچه کشف غده تیروئید و هورمون های تیروئید

تیروئید واژه ای یونانی به معنی سپری شکل است. در ابتدا اطلاعات زیادی در ارتباط با این غده در دسترس نبود اما با گذشت زمان مشاهده شد که علائم برخی از بیماری ها با تغییرات آشـکاری در انـدازه و شـکل غـده تیروئیـد همـراه می باشد. این تغییرات بیانگر نقش مهم غده تیروئید در عملکرد طبیعی بدن بود[۱۷].

غده تیروئید به علت برجستگی آناتومیکی خاص خود یکی از اولین غـدد درون ریـزی اسـت کـه وضـعیت بـالینی و اختلال کارکرد آن به طور صحیح با یکدیگر تطبیق داده شده است[۱۷].

قدم مهم بعدی در جهت شناخت بیشتر غده تیروئید، پی بردن به نوع عملکرد این غده در بدن بود که توسط فردی بـه نام بومن[1] برداشته شد. وی کشف کرد که غده تیروئید تنها ارگانی در بدن پستانداران است که توانایی ترکیب کردن ید را با مواد ارگانیک دارا می باشد و سرانجام جستجو جهت یافتن ترکیب فعال دارای اتم ید آغاز شد[۱۷].

هارینگتون[2] در سال ۱۹۲۶ در ساختار این ترکیب فعال، حضور چهار اتم ید و یک آمینواسید را شناسایی کرد. وی نـام این ترکیب را َ۵،۵،َ۳،۳-تترایدوتیرونین نهاد و وجود یک ترکیب تیروئید ثانویه را نیـز بـه عنـوان فرضـیه مطـرح کـرد. محققی آلمانی در سال ۱۹۵۲ این ترکیب فرضی را با نام ۵،َ۳،۳-تری یدوتیرونین معرفی کرد[۱۷].

۱-۴- تاریخچه کاربرد هورمون های تیروئید در درمان بیماری

اصطلاح"جایگزین درمانی با هورمون های تیروئید" اولین بار در سال ۱۸۹۱ توسط فردی به نام مـورای[3] مطـرح شـد. وی توانست عصاره تیروئید را از بدن گوسفند استخراج کرده و سـپس بـا تزریـق آن بـه انسـان فـرم شـدید بیمـاری کم کاری تیروئید را درمان کند[۱۸].

فردی به نام اُسلر[1] در سال ۱۸۹۸ جهت درمان فرم بسیار شدید و تضعیف کننده بیماری کم کاری تیروئید، این عصـاره تیروئید را در مقادیر خارج از محدوده درمانی به کار برد[۱۹].

1. Baumann
2. Harington
3. Murray
1. Osler

چندین دهه بعد با استفاده از مطالبی که در کتاب های مرجع آن زمان منتشر شد، جهت ماندگاری بیشتر تیروئید جدا شده از بدن گوسفند، آن را به صورت خشک و بدون آب در آورده و نگه داری می کردند. در این زمان عصاره استخراج شده از غده تیروئید به عنوان یک فرم مهم درمان دارویی شناخته شد. سپس دو هورمون مهم تیروئید با نام های ۵،۵َ،۳،۳َ-تترایدوتیرونین و ۵،۳،۳َ-تری یدوتیرونین به ترتیب در سال های ۱۹۲۶ و ۱۹۵۲ کشف شد[۲۰].

در سال ۱۹۶۰ برای اولین بار هورمون تترایدوتیرونین سنتز شد و تا سال ۱۹۷۰ هر دو فرایند سنتز و استخراج این هورمون از فرم خشک شده غده تیروئید ادامه داشت. در سال ۱۹۷۰ تیروکسین در بافت محیطی بدن به فرم دِآیودینه شده و با فعالیت زیستی بالاتری یافت شد. این ترکیب همان ۵،۳،۳َ-تری یدوتیرونین بود[۷].

همچنین اثبات شد که درمان بیماران مبتلا به کم کاری غده تیروئید با تجویز هورمون تیروکسین تنها در مقایسه با تجویز همزمان دو هورمون تیروئید، مقادیر مناسب تری از سطح هورمون را در گردش خون و بافت های بدن ایجاد می کند[۹]. چندی بعد با تجویز فراورده های هورمونی که تنها حاوی هورمون تری یدوتیرونین بودند، شیوع بیماری پرکاری تیروئید در میان مصرف کنندگان این فراورده ها به وضوح مشاهده شد. در نتیجه مصرف این فراورده ها در سال های ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰ به شدت کاهش یافت[۸].

در سال ۱۹۹۰ با انتشار دو مقاله از محققی به نام مندل[۲] تجویز هورمون تیروکسین صناعی به تنهایی به عنوان درمان انتخابی بیماری کم کاری غده تیروئید معرفی شد[۲۲، ۲۱].

در سال های بعد تحقیقات دیگری بر روی کیفیت زندگی بیماران کم کار تیروئید که تنها فراورده های تیروکسین صناعی را دریافت می کردند انجام شد. این مطالعات اثبات کرد که کیفیت زندگی این بیماران تفاوت چندانی با افراد سالمی که سابقه هیچ یک از بیماری های تیروئید را ندارند نشان نمی دهد[۲۳].

۱-۵- تولید و ترشح هورمون های تیروئید

این غده هورمون های کلسی تونین، ۵،۵َ،۳،۳َ-تترایدوتیرونین و ۵،۳،۳َ-تری یدوتیرونین و مقدار بسیار اندکی از چند هورمون ید دار مشابه دیگر را ترشح می کند که اثرات مهمی بر میزان متابولیسم بدن دارند. هورمون های تترایدوتیرونین و تری یدوتیرونین به ترتیب حاوی ۵۹٪ و ۶۵٪ ید می باشند که به عنوان یک جزء اساسی مولکول

2. Menndel

آن ها محسوب می شود. تقریباً ۹۳٪ هورمون های مترشحه با فعالیت متابولیکی بالا از غده تیروئید، تیروکسین و ۷٪ آن تری یدوتیرونین است. البته تقریباً تمام تیروکسین در نهایت در بافت ها به تری یدوتیرونین تبدیل می شود و عملکرد هر دو هورمون در بدن مهم می باشد. عملکرد این دو هورمون از نظر کیفی یکسان است اما سرعت و شدت عمل آن ها متفاوت است. تری یدوتیرونین حدود پنج تا هشت بار قوی تر از تیروکسین عمل می کند اما مقادیر خونی آن بسیار کمتر و پایداری این هورمون در خون نیز بسیار کوتاه تر از هورمون تیروکسین می باشد. مقایسه این دو هورمون تیروئید در جدول ۱-۱ آورده شده است[۶].

جدول۱-۱ مقایسه دو هورمون T_3و T_4 پلاسما[۶].

نوع هورمون	غلظت متوسط پلاسمایی(میکروگرم بر ۱۰۰ میلی لیتر)	نسبت هورمون آزاد به هورمون تام	غلظت تقریبی هورمون آزاد در پلاسما (میکروگرم بر ۱۰۰ میلی لیتر)	نیمه عمر پلاسمایی (روز)	قدرت بیولوژیکی
تیروکسین	۸	۰/۰۳	۲/۲۴	۶/۵	۱
تری یدوتیرونین	۰/۱۵	۰/۳	۰/۴۰	۱/۵	۵

تنظیم ترشح هورمون تیروئید به طور عمده توسط هورمون محرک تیروئید[1] انجام می شود. این هورمون از هیپوفیز قدامی ترشح می شود. هورمون آزاد کننده تیروتروپین[2] از هیپوتالاموس به کمک گردش خون به هیپوفیز قدامی وارد شده و در آنجا ترشح هورمون تیروتروپین را تحریک می کند. سپس هورمون تیروتروپین از طریق گردش خون به تیروئید منتقل شده و مکانیسم عمل آن را کنترل می نماید[۲۵، ۲۴].

واحد ترشحی یا عملی تیروئید، فولیکول نام دارد. تعداد فولیکول ها به بیش از یک میلیون می رسد و نقش آن ها سنتز هورمون های تیروئید است. وسط فولیکول حفره ای قرار دارد که حاوی گلیکوپروتئینی به نام تیروگلوبولین است. این ترکیب پیش ساز هورمون های تیروئید می باشد. در مجاورت فولیکول ها سلول های دیگری به نام سلول های پارافولیکولار قرار دارند که وظیفه سنتز و ترشح هورمون کلسی تونین را عهده دار می باشند. ۱۰٪ وزن تیروگلوبولین را کربوهیدرات و ۰/۲ تا ۱٪ آن را یدید تشکیل می دهد که درصد آن به ید موجود در غذا وابسته است. تقریباً تمام یدید مصرفی از دستگاه گوارش از طریق آب، غذا یا دارو وارد بدن می گردد. یدید خوراکی به سرعت جذب شده و وارد مخزن مایع خارج سلولی می شود. غده تیروئید روزانه حدود ۷۵ میکروگرم از این ید را

1. Thyroid Stimulating Hormone(Thyrotropin;TSH)
2. Thyrotropin Releasing Hormone;TRH

جهت ترشح هورمون برداشت می کند و معادل این مقدار از طریق ادرار دفع می شود. در صورتی که میزان دوز مصرفی ید افزایش یابد، نسبت برداشت ید توسط غده تیروئید کاهش خواهد یافت. ساختمان این گلیکوپروتئین حاوی ۱۱۵ بنیان تیروزین است. تیروزین سوبسترا اصلی برای ترکیب با ید و ساخت هورمون های تیروئید است که درون مولکول تیروگلوبولین ساخته می شود. این گلیکوپروتئین پیش ساز هورمون های تیروکسین و تری یدوترونین و نیز محل ذخیره این هورمون ها می باشد. تقریباً ۷۰٪ یدید موجود در تیروگلوبولین به صورت ترکیبات پیش ساز غیر فعال با نام های مونویدوتیروزین[1] و دی یدوتیروزین[2] تبدیل شده و حدود ۳۰٪ آن ریشه های یدوتیرونین یعنی هورمون های تیروکسین و تری یدوتیرونین را تشکیل می دهد. هنگامی که ید موجود در مواد غذایی به اندازه کافی باشد، نسبت ترشح هورمون تیروکسین به تری یدوتیرونین حدود ۷ به ۱ است. کمبود ید این نسبت را کاهش می دهد و ازدیاد مقادیر ید در بدن این نسبت را افزایش می دهد. تولید این هورمون ها از نظر کیفی و کمی به ورود مقدار کافی ید به غده تیروئید، انجام فعل و انفعالات طبیعی سوخت و ساز ید و نیز تولید همزمان پروتئین گیرنده ید و تیروگلوبولین بستگی دارد. ترشح هورمون های تیروئید به میزان طبیعی نیز به تولید هورمون به میزان کافی و تجزیه تیروگلوبولین که منجر به آزاد شدن اسیدهای آمینه ید دار می شود وابسته است[۲۶].

تولید و ترشح هورمون های تیروئید شامل شش مرحله می باشد که به اختصار شامل جذب فعال ید توسط سلول های فولیکولی، اکسیداسیون ید و تشکیل یدوتیروزین در مولکول تیروگلوبولین، تشکیل یدوتیرونین از یدوتیروزین، ذخیره شدن هورمون ها، پروتئولیز تیروگلوبولین و رهایی به داخل خون و در نهایت آزاد شدن ید می باشد[۲۷].

اولین قدم در سنتز هورمون های تیروئید تیروکسین و تری یدو تیرونین، برداشت فعال ید از خون توسط غده تیروئید می باشد. این انتقال توسط پمپ یدید صورت می گیرد. این پمپ توسط هورمون تیروتروپین تنظیم می گردد. ید مورد نیاز بدن به صورت یونیزه از طریق مصرف مواد غذایی، مواد دارویی و تجزیه هورمون های تیروئید وارد خون می شود. غلظت یدید در سلول های فولیکولی غده تیروئید ۲۵ الی ۴۰ برابر غلظت پلاسمایی آن است. دومین مرحله اکسیداسیون یدید است. تیروئید تنها بافتی است که توانایی اکسیداسیون یدید را برای ایجاد ظرفیت بالاتر دارا می باشد. در حقیقت در این مرحله تیروزین های موجود در تیروگلوبولین یدینه می شوند. بنابراین به طور طبیعی در

1. 3-Monoiodotyrosine;MIT
2. 3,5-Diiodotyrosine;DIT

غده تیروئید ید آزاد جمع نمی شود بلکه بلافاصله به مواد آلی متصل می شود. هماهنگ با موقعیت های لازم جهت هالوژناسیون حلقه آروماتیک، کمپلکس هیپویدات متصل به آنزیم، فرایند یدینه کردن تیروزین های موجود را انجام می دهد. علت انجام این واکنش، موقعیت بالاتر هیپویدات از نظر حالت اکسیداسیون نسبت به آنیون ید می باشد. اکسیداسیون ید به فرم فعال آن به وسیله آنزیم تیروپراکسیداز موجود در غده تیروئید انجام می شود. تیروپراکسیداز یک ترکیب پروتئینی تترامر با وزن مولکولی ۶۰ هزار دالتون است که برای اکسیداسیون به آب اکسیژنه نیاز دارد. هیدروژن پراکسید به عنوان یک عامل اکسیدانت عمل می کند. تولید هیدروژن پراکسید ظاهراً ترشح هورمون تیروتروپین را تحریک نموده و این به معنای تحریک فرایند یدینه شدن است. ید پس از اکسید شدن، در مولکول تیروگلوبولین به تیروزین متصل شده و ابتدا موقعیت سه حلقه آروماتیک و سپس موقعیت پنج آن ید دار می شوند و به این ترتیب یدوتیروزین ها تولید می شوند. یدوتیروزین ها شامل ۳-مونویدوتیروزین و ۳،۵-دی یدوتیروزین می باشد. هیچ یک از این دو ترکیب خاصیت هورمونی ندارند. این واکنش نیز توسط هورمون تیروتروپین کنترل و تشدید می شود[۲۹-۲۷].

مرحله سوم جفت شدن یدوتیروزین ها و تولید یدوتیرونین از یدوتیروزین است. این مرحله شامل جفت شدن دو مولکول دی یدوتیروزین با یکدیگر و یا یک مولکول دی یدوتیروزین با یک مولکول مونویدوتیروزین در تیروگلوبولین می باشد. این واکنش نیز نیاز به شرایط اکسیداسیون دارد و احتمالاً مانند مرحله اکسیداسیون ید از آنزیم پراکسیداز کمک می گیرد[۲۹-۲۷].

پس از انجام واکنش جفت شدن، تمام مواد ید داری که در طی واکنش ها بیان شدند تشکیل گردیده و به عبارت دیگر دی یدوتیروزین، مونویدوتیروزین، تیروکسین و تری یدوتیرونین در مولکول تیروگلوبولین مستقر هستند. سپس این مواد به درون فولیکول های غده تیروئید ترشح شده و در آنجا ذخیره می شوند. ذخیره کردن هورمون ها از مهمترین اعمال غده تیروئید به شمار می رود. کمبود مقدار ید در بدن ذخیره هورمونی تیروئید را کاهش می دهد، لذا کاهش سنتز هومون های تیروئید کاهش غلظت هورمون ها در خون را در پی دارد. حال آنکه اگر ذخایر هورمونی کافی باشد با ایجاد وقفه در ساخته شدن هورمون ها تا چند هفته ذخیره هورمونی موجود در غده تیروئید به درون

خون راه یافته و از کمبود این هورمون ها در بدن جلوگیری می کند. در حقیقت میزان کل ذخیره شده برای تامین نیاز طبیعی بدن به مدت یک تا سه ماه کفایت می کند[۲۹-۲۷].

مرحله بعد پروتئولیز تیروگلوبولین ها و آزاد سازی یدوتیرونین ها می باشد. در این مرحله هورمون تیروتروپین فرایند اندوسیتوز را تحریک می کند. ترشح هورمون تیروتروپین باعث می شود که سلول های فولیکولی با عمل پینوسیتوز، قطرات تیروگلوبولین را از داخل فولیکول به درون خود انتقال دهند. از ترکیب این قطرات با لیزوزوم های داخل سلول، فاگولیزوزوم تشکیل می شود که در آن مولکول تیروگلوبولین توسط آنزیم های پروتئاز و پپتیداز هضم می شود و یدوتیروزین ها و هورمون های تیروئید آزاد می گردند. پس از ملحق شدن لیزوزوم به فاگوزوم به علت تغییر اسیدیته محیط لیزوزوم از اسیدی به قلیایی، آنزیم ها امکان فعالیت پیدا می کنند. پروتئولیز تیروگلوبولین و آزاد سازی هورمون ها توسط ترشح هورمون تیروتروپین تشدید و توسط یدید مهار می شود. در نهایت پروتئولیز تیروگلوبولین ها منجر به آزاد سازی دی یدوتیروزین، مونویدوتیروزین، تیروکسین و تری یدوتیرونین می شود. در این هنگام اگرچه دی یدوتیروزین و مونویدوتیروزین تشکیل شده اند اما آن ها غده تیروئید را ترک نمی کنند و به طور انتخابی به تیروزین دِآیودینه شده متصل خواهند شد و تیروزین مجدداً چرخه ورود به یک مولکول تیروگلوبولین جدید را طی می کند. از سوی دیگر تیروکسین و تری یدوتیرونین از درون سلول فولیکولی به داخل گردش خون ترشح می شوند. تقریباً در هر روز۵۰ میکروگرم از هورمون های تیروئید ید دار از غده تیروئید به داخل گردش خون آزاد می شود. با توجه به میزان متوسط جذب ید در روده ها، مقدار مورد نیاز ید در هر روز ۱۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم می باشد[۲۹، ۲۸].

در مرحله آخر هورمون های تیروئید ید دار که شامل تیروکسین و تری یدوتیرونین می باشند، بدون تغییر شکل وارد گردش خون می شوند. تقریباً ۷۵٪ تیروزین ید دار شده در مولکول تیروگلوبولین، هیچ گاه به هورمون های تیروئید تبدیل نمی شوند بلکه به فرم یدوتیروزین باقی می مانند. سپس این تیروزین های ید دار توسط آنزیم جدا کننده ید، ید خود را از دست می دهند و این ید مجدداً جهت سنتز هورمون ها مورد استفاده قرار می گیرد. فرایند آزاد شدن ید نیز توسط هورمون تیروتروپین تشدید می شود. ید آزاد شده از یدوتیروزین ها یکی از ذخایر مهم ید داخل تیروئید است و با یدی که از گردش خون وارد غده تیروئید می شود متفاوت است. در شرایط طبیعی بدن میزان ید ورودی و خروجی از غده تیروئید متناسب می باشد[۲۹-۲۷، ۶، ۵].

۱-۶- تبدیل تیروکسین به تری یدوتیرونین در بافت های غیر تیروئیدی

تیروکسین مهمترین هورمون ترشح شده از غده تیروئید است. تبدیل تیروکسین به تری یدوتیرونین توسط آنزیم ها برای عملکرد فیزیولوژیک هورمون های تیروئید در بیشتر بافت های خارج تیروئید یک فرایند ضروری به شمار می رود. تری یدوتیرونین یک هورمون محیطی است که میزان تمایل آن به گیرنده های سلول های هدف ۱۰ برابر تیروکسین می باشد. از این رو اندکی از دانشمندان بر این باورند که تری یدوتیرونین از نظر متابولیکی شکل فعال هورمون تیروکسین است. تری یدوتیرونین تقریباً به میزان ۲۰٪ مستقیماً از تیروئید ترشح می شود و ۸۰٪ آن در بافتهای محیطی خارج تیروئید از دِآیودینه شدن تیروکسین حاصل می گردد. در طی این فرایند حدود ۳۳٪ از تیروکسین ترشح شده از غده تیروئید وارد بافت های محیطی می شود و سپس واکنش ۵-دِآیودیناسیون بر روی هورمون تیروکسین رخ می دهد و به این ترتیب تری یدوتیرونین تولید می شود. ۴۰٪ دیگر هورمون تیروکسین دچار دِآیودیناسیون حلقه داخلی شده و حاصل انجام واکنش ۵-دِآیودیناسیون تولید تری یدوتیرونین معکوس[1] غیرفعال می باشد. فرایند دِآیودیناسیون هورمون تیروکسین یک فرایند احیایی کاتالیز شده به وسیله یک گروه آنزیمی به نام یدوتیرونین دِآیودیناز می باشد. همچنین این آنزیم به وسیله هورمون تیروتروپین تنظیم می شود. در بیماری کم کاری غده تیروئید افزایش میزان هورمون تیروتروپین موجب تحریک آنزیم دِآیودیناز می گردد[۶].

۱-۷- اثرات فیزیولوژیک هورمون های تیروئید در بافت ها

1. 3,5,5′-Triiodothyronine(Reverse Triiodothyronine;RT_3)

هورمون های تیروئید دارای دو اثر عمده در بافت ها شامل افزایش متابولیسم و تحریک رشد کودکان است که به ترتیب تحت عنوان اثرات متابولیکی و اثرات عمومی شناخته می شوند. اثرات متابولیک این هورمون ها مربوط به مصرف اکسیژن و اثرات عمومی با سنتز پروتئین ها در بدن مرتبط می باشد. بیشترین اثرات هورمون های تیروئید به فعال سازی ژن مربوط به اتصال هورمون با میل چسبندگی بالا به گیرنده های هسته سلول مربوط است. اثر هورمون های تیروئید بر فرایند تنفس سلولی حدود یک قرن پیش کشف شد. همچنین تغییرات تنفس سلولی در بیماران مبتلا به کم کاری تیروئید به صورت کاهش یافته تشخیص داده شد. کاهش تنفس سلولی ناشی از کمبود هورمون های تیروئید موجب کاهش سرعت متابولیسم می شود. بیشتر انرژی تولید شده به وسیله تنفس سلولی به صورت گرما ظاهر می شود. بنابراین هورمون های تیروئید علاوه بر کنترل متابولیسم پایه بدن، فرایند پیدایش گرما در بدن را نیز کنترل می کنند. مهمترین اثر متابولیسمی هورمون های تیروئید افزایش مصرف اکسیژن در بدن است. این اثر در تمامی اندام های بدن به جز مغز و غدد جنسی مشاهده می شود. هورمون های تیروئید فعالیت متابولیکی بیشتر بافت های بدن به جز مغز، شبکیه، طحال، بیضه ها و ریه ها را افزایش می دهند و نیز باعث افزایش سنتز پروتئین ها، افزایش تعداد آنزیم ها و میتوکندری ها می شوند. یکی از این آنزیم های مذکور، آنزیم سدیم-پتاسیم آدنوزین تری فسفاتاز می باشد. این آنزیم سبب افزایش انتقال سدیم و پتاسیم می شود. فردی به نام اِدلمن[1] بیان کرد که بیشترین انرژی سلول جهت راه اندازی پمپ سدیم-پتاسیم آدنوزین تری فسفاتاز مصرف می شود. هورمون های تیروئید تعداد واحد های این پمپ را افزایش داده و به فعالیت آن می افزاید. این پمپ در تمامی سلول های بدن وجود دارد. بنابراین تمامی سلول های بدن به هورمون های تیروئید پاسخ می دهند. در نتیجه مصرف آدنوزین تری فسفات افزایش می یابد که با ازدیاد مصرف اکسیژن از طریق اکسیداسیون فسفریلاتیو همراه می باشد. این فرایند پایه و اساس مکانیسم اثر متابولیک هورمون های تیروئید را تشکیل می دهد[۳۰،۳۱].

اثر هورمون تیروئید بر رشد بدن به طور عمده در کودکان در حال رشد تظاهر پیدا می کند. در کودکان مبتلا به کم کاری تیروئید سرعت رشد به شدت کند می شود. اثر هورمون های تیروئید بر پیشبرد رشد و نمو بدن بر پایه میزان توانایی این هورمون ها بر پیشبرد سنتز پروتئین ها در بدن استوار است. نقش هورمون های تیروئید در افزایش پروتئین

1. Edelman

سازی از طریق اثر هورمون ها بر رونویسی ژن های خاص قابل توجیه است. در این مورد میان دو دسته از هورمون ها که نقش اساسی در رشد بدن ایفا می کنند و شامل هورمون های تیروئید و خود هورمون رشد است، پیوستگی قابل ملاحظه ای به چشم می خورد. هورمون های تری یدوتیرونین و گلوکوکورتیکوئیدها رونویسی ژن تولید کننده هورمون رشد را افزایش می دهند. بنابراین هورمون رشد بیشتری تولید خواهد شد. به نظر می رسد که اثر متابولیسمی تری یدوتیرونین بر پروتئین سازی و رشد بدن نیز از این طریق صورت می پذیرد[۳۱، ۵].

هورمون های غده تیروئید بر متابولیسم کربوهیدرات، لیپید، ویتامین ها و در نتیجه کنترل وزن بدن موثر است. از سوی دیگر این هورمون ها بر سیستم های قلبی-عروقی، عصبی، تنفسی، گوارشی، عضلانی و اسکلتی بدن اثر گذار می باشند این هورمون ها همچنین تمامی جنبه های متابولیسم لیپیدها را نیز تشدید می کند. ذخایر لیپیدی در بافت چربی از ذخایر نگه دارنده طولانی مدت انرژی برای بدن می باشند که توسط این هورمون ها تحلیل می روند. در نتیجه غلظت اسیدهای چرب آزاد پلاسما افزایش می یابد. هورمون های تیروئید همچنین عمل اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد درون سلول ها را سرعت می بخشند. بنابراین تحت تأثیر هورمون های تیروئید، میزان کلسترول، تری گلیسرید و فسفولیپیدهای خون کاهش خواهد یافت. یکی از مکانیسم های کاهش غلظت کلسترول تحت تأثیر هورمون های تیروئید، افزایش قابل ملاحظه میزان ترشح کلسترول به درون صفرا و دفع آن از طریق مدفوع است. یک مکانیسم احتمالی برای افزایش ترشح کلسترول به درون صفرا، افزایش تعداد گیرنده های LDL[1] موجود بر روی غشا سلول های کبد می باشد. این امر باعث برداشت سریع LDL از پلاسما و ترشح متعاقب کلسترول لیپوپروتئینی از سلول های کبد می شود. هورمون های تیروئید همچنین مقدار بسیاری از آنزیم های مختلف بدن را افزایش می دهد و از آنجایی که ویتامین ها از اجزا ضروری برخی از آنزیم ها و کوآنزیم ها به شمار می روند لذا هورمون های تیروئید موجب افزایش نیاز به ویتامین ها می گردد. پس در افزایش بیش از حد هورمون های تیروئید، ممکن است کمبود ویتامین ها پیش آید[۳۲].

اثر هورمون های تیروئید بر سیستم قلبی-عروقی به دلیل اثر وازودیلاتاسیون در عروق بیشتر بافت های بدن به دنبال آزاد شدن مقادیر فراوان فراورده های متابولیسم در همین بافت ها و در نتیجه افزایش برون ده قلب می باشد. افزایش

1. Low Density Lipoprotein

برون ده قلب همچنین موجب افزایش فشار شریانی می شود. پاسخ فشار خون شریانی ناشی از ازدیاد ترشح هورمـون تیروئید با سن افراد ارتباط دارد. در نتیجه افزایش ترشح این هورمون ها سبب افزایش بارزتر فشار خون شریانی افـراد جوان تر می شود. این پدیده احتمالاً به دلیل حساسیت بالاتر گیرنده های آدرنالین در این افراد می باشد. البته هورمون های تیروئید، تعداد گیرنده های بتا را نیز افزایش می دهد و شخص را نسبت به اثرات مستقیم سـمپاتیک حسـاس تـر می کند. در پی افزایش برون ده قلب، تعداد ضربان قلب نیز افزایش می یابد. تعداد ضربان قلب یکی از حساس تـرین نشانه ها جهت تعیین افزایش یا کاهش میزان ترشح هورمون های تیروئید است. همچنـین بـا افـزایش هورمـون هـای تیروئید، قدرت ضربان قلب به میزان اندکی بیش از حد نرمال افزایش می یابد ولی هنگامی که میزان این هورمـون هـا به میزان قابل توجهی بالا می رود به علت کاتابولیسم بیش از اندازه پروتئین هـای بـدن، قـدرت عضـله قلـب کـاهش می یابد. اثر هورمون های تیروئید بر گویچه های قرمز خون، افزایش میزان ترکیب ۲،۳–دی فسفوگلیسرات موجـود در این گویچه های سرخ خواهد شد و به این ترتیب جدایی اکسیژن از هموگلوبین و دسترسی بافت ها به اکسیژن بیشـتر خواهد شد[۱۵].

افزایش میزان هورمون های تیروئید میزان ترشح آنزیم ها و تحرک دستگاه گوارش را افزایش می دهـد و غالبـاً سـبب اسهال می شود. بنابراین فقدان یا کمبود این هورمون ها یبوست ایجاد می کند[۳۰].

همچنین با افزایش ترشحات دستگاه گوارش میزان اشتها و میل به غذا در افـراد تحـت تـأثیر افـزایش هورمـون هـای تیروئید در بدن افزایش می یابد[۳۱].

هورمون های تیروئید جهت تکامل سیستم اعصاب مرکزی لازم و ضروری می باشند. کودکان متولـد شـده فاقـد غـده تیروئید در صورتی که در مدت کوتاهی پس از تولد درمان نشـوند، دچـار عقـب مانـدگی ذهنـی غیـر قابـل برگشـت خواهند شد. همچنین به علت اثر این هورمون ها بر عضلات و سیستم اعصاب مرکزی، بیمـاران پرکـار تیروئیـد غالبـاً یک احساس خستگی دائمی دارند اما به علت اثرات تحریک کننـده هورمـون هـای تیروئیـد بـر روی سـیناپس هـای عصبی، خوابیدن برای آن ها مشکل است. از سوی دیگر خواب آلودگی شدید یکی از علائم بارز بیماران مبتلا بـه کـم کاری تیروئید است به طوری که فرد حدوداً ۱۲ تا ۱۴ ساعت در شبانه روز می خوابد[۳۳].

افزایش مختصر هورمون های تیروئید باعث انقباض عضلات با قدرت و توان بیشتر می شود اما با افزایش بیش از حد مقدار هورمون در خون به علت کاتابولیسم بیش از اندازه پروتئین ها، ضعف عضلانی رخ می دهد. فقدان یا کمبود این هورمون ها سبب کندی حرکت عضلات می شود به گونه ای که پس از یک انقباض، به آهستگی به حالت استراحت برمی گردند. افزایش ترشح هورمون های تیروئید باعث ایجاد یک لرزش عضلانی ظریف می گردد که با فرکانس زیاد و حدود ۱۰ تا ۱۵ بار در ثانیه به وجود می آید. وجود هورمون های تیروئید جهت رشد و تکامل سیستم اسکلتی بدن نیز لازم و ضروری است[۳۳-۳۰، ۵].

۱-۸- تعریف کم کاری غده تیروئید

بیماری کم کاری تیروئید یک اختلال شایع و مهم بالینی است که به علت کمبود یا فقدان ترشح هورمون های تیروئید عارض می گردد[۱]. این بیماری مجموعه ای از اختلالات بالینی و بیوشیمیایی است که در نتیجه کاهش هورمون های تیروئید در بافت های بدن به وجود می آید. این بیماری در ایران شیوع رو به رشدی دارد[۴-۲]. از دلایل کمبود ترشح هورمون های تیروئید می توان به نارسایی این غده درون ریز و اختلال هیپوفیز یا هیپوتالاموس و همچنین مقاومت گیرنده های هورمون تیروئید به این هورمون ها اشاره کرد. تظاهرات بالینی کم کاری تیروئید به سن شروع بیماری و شدت اختلال تیروئید وابسته است. بیماری کم کاری تیروئید در شیرخواران و کودکان موجب کندی رشد و نمو و عقب ماندگی دائمی ذهنی و حرکتی می شود. شروع کم کاری تیروئید در بزرگسالان منجر به کند شدن فرایندهای متابولیک می شود. این بیماران معمولاً قبل از اثبات تشخیص قطعی دچار خستگی، خواب آلودگی و افزایش وزن تدریجی می باشند. علائم کم کاری تیروئید با کاهش میزان هورمون تیروکسین و افزایش هورمون تیروتروپین سرم همراه است[۳۶-۳۴].

۱-۸-۱- تعریف کم کاری غده تیروئید اولیه

نقص ترشح مقادیر کافی هورمون های تیروئید، کم کاری غده تیروئید اولیه نام دارد. این اختلال مـی توانـد در نتیجـه نقص عملکرد غده تیروئید، آتروفی ابتدایی غده تیروئید، عدم وجود کامل یا نسبی مادرزادی غده تیروئید و یـا فقـدان کامل یا قسمتی از غده تیروئید که در اثر عواملی چون جراحی یا درمان با ید رادیواکتیـو و یـا داروهـای ضـد تیروئیـد همراه یا بدون وجود گواتر به وجود آید. این بیماری با کاهش میزان هورمـون تیروکسـین و افـزایش میـزان هورمـون تیروتروپین سرم همراه است که در این حال هورمون تیروتروپین سبب تحریک و بزرگ شدن این غده مـی شـود کـه این حالت گواتر نامیده می شود. علل کم کاری غده تیروئید اولیه را می توان بیماری های خود ایمنـی، داروهـا، علـل اِیاتروژنیک و دلایل مادرزادی نام برد. کم کاری غده تیروئید اولیه اِیاتروژنیک به معنای تخریـب غـده تیروئیـد توسـط پزشک معالج می باشد که می تواند ناشی از برداشتن غده تیروئید طی عمل جراحی و یا دادن ید رادیواکتیـو بـه بیمـار باشد. همچنین مصرف داروهایی مانند آمیودارون، لیتیم، اینترفرون آلفا، داروهای ضد تیروئید، کمبود و یا ازدیاد ید نیـز از جمله دلایل دارویی می باشد. علل مادرزادی بیماری را نیز می توان شامل تخریب و کوچـک شـدن غـده تیروئیـد، فقدان تشکیل بافت تیروئید و یا ایجاد غده تیروئید نا به جا برشمرد[۳۸-۳۶].

۱-۸-۲- علل شایع کم کاری غده تیروئید

اولین علت شایع کم کاری غده تیروئید در دنیا کمبود ید است. همچنین در مناطقی که کمبود ید وجود نـدارد بیمـاری التهاب خودایمنی غده تیروئید از جمله علل شایع کم کاری تیروئید محسوب می شود. غالباً در این بیماران گواتر قابـل لمس است. یکی دیگر از عوامل ایجاد کننده کم کاری تیروئید، درمـان پرکـاری تیروئیـد مـی باشـد بـه گونـه ای کـه ۹۰-۱۰٪ افراد یک سال پس از درمان دچار کم کاری تیروئید می شوند. کم کاری تیروئید دائمی در بیمارانی کـه قـبلاً به پرکاری تیروئید مبتلا بوده اند و با دارو و ید غیر آلی و یا عوامل ضد تیروئید درمان شده اند، مشاهده می شود[۳۹]. برخی داروها در ساخت هورمون های تیروئید ایجاد اختلال می کنند. داروهای ضد تیروئید به وضوح قـادر بـه انجـام این کـار مـی باشـند. از سـایر داروهـای ایجـاد کننـده کـم کـاری تیروئیـد مـی تـوان بـه رزورسـینول، کتوکونـازول، پاراآمینوسالسیلیک اسید و کلرید کبالت اشاره کرد. اخیراً اینترلوکین۲ به عنوان عامل ایجـاد کننـده کـم کـاری تیروئیـد شناخته شده است که نقش خود را در این رابطه از طریق التهاب خودایمنی غده تیروئیـد ایفـا مـی کنـد. تقریبـاً ۵-۳٪ بیماران مبتلا به سایکوز مانیک-دپرسیو که تحت درمان با لیتیم می باشند، دچار کم کاری تیروئید و گواتر مـی شـوند.

افرادی که قبل از درمان با لیتیم، آنتی بادی های ضد تیروئید در گردش خونشان یافت شـده اسـت بیشـتر در معـرض خطر ابتلا به کم کاری تیروئید می باشند. نیمی از بیماران مصرف کننده لیتیم در پاسخ بـه تزریـق هورمـون آزاد کننـده تیروتروپین مقادیر غیر طبیعی و بالای تیروتروپین در خونشان ظاهر می شود. علت دیگر ابـتلا بـه بیمـاری کـم کـاری تیروئید مصرف مقادیر بالا و مداوم کلم، کلم پیچ، شلغم و سایر سبزیجات حاوی میزان بالا ید و واجد خاصـیت ضـد تیروئید است. به بیان دیگر مقادیر زیاد ید غیر آلی کم کاری تیروئید ایجاد می کند. این عمل به دلیـل ممانعـت از آزاد سازی هورمون های ذخیره شده در غده تیروئید و نیز تقابل با فرایند آلی شدن ید می باشد[۳۴، ۴۰].

یکی از مکان هایی که مقادیر بالای ید توسط شخص دریافت می شود، بیمارستان ها به ویژه دپارتمان های رادیولوژی است. در این مراکز مقادیر فراوانی مواد ید دار جهت انجام فرایندهای تشخیصی استفاده می شود. تومورهای هیپوفیزی ۶۰٪ علل کم کاری تیروئید مرکزی را شامل می شود. یکی از دلایل ذکر شده جهت کم کاری غده تیروئید اخـتلال در سنتز هورمون تیروئید می باشد. اگرچه بروز این علت نادر است اما دومین علت شایع کم کاری غده تیروئید مادرزادی است که معمولاً به صورت آتوزوم مغلوب منتقل می شود و بیشتر در اثر نبود و یا عدم فعالیت آنزیم های سنتز کننـده هورمون های تیروئید می باشد. در این موارد کم کاری غده تیروئید بـا تیروکسـین پـایین و تیروتـروپین بـالا و گـواتر مشهود همراه است. اختلال سنتز هورمون تیروئید می تواند به علت اختلال در هر یک از شش مرحله تولیـد و ترشـح هورمون های تیروئید ایجاد شود[۳۴].

۱-۸-۳- علائم شایع بیماری کم کاری غده تیروئید

از نشانه های شایع کم کاری تیروئید پر خوابی است. اغلب بیماران هنگام خواب دچار تنگـی نفـس مـی شـوند و در صورت چاقی بیمار، این عارضه محتمل تر است. علامت تنگی نفس در این بیماران به دلیل ازدیاد وزن، کـاهش بـازده قلبی، آنمی و یا ترکیبی از این دلایل است. در اغلب موارد پس از درمان بیمار با داروی لووتیروکسـین علامـت تنگـی نفس کاهش می یابد. از دیگر نشانه های معمول این اختلال عدم تحمل به سرما و کـاهش شـدید میـزان تعریـق بـدن می باشد. آلوپسی و نازک شدن مو کمتر شایع است. این عارضه شامل کاهش رشد مو و شکنندگی لایه داخلـی ریشـه مو می باشد. شکنندگی، شیار دار شدن و رشد کند ناخن ها علامت بالینی شایع دیگری از ایـن بیمـاری اسـت. نشـانه بعدی گرفتگی و تغییر آوا صدا بیمار به علت بزرگی زبان و تورم طناب های صوتی مـی باشـد. افـزایش وزن در ایـن

بیماران تقریباً معادل ۴ تا ۸ کیلوگرم خواهد بود. علائم مغزی از دمانس و افسردگی تا انواع شدید سایکوز متغیر است. سایکوز ایجاد شده به علت کم کاری تیروئید در موارد طولانی مدت بیماری دیده می شود. کند ذهنی و عدم قدرت تصمیم گیری نیز به طور معمول در این افراد مشهود است. در برخی بیماران علائم مخچه ای مانند آتاکسی، نیستاگموس، لرزش حین فعالیت مشاهده می شود. همچنین نوروپاتی نیز از علائم شایع است. بررسی های هدایت عصبی وجود اختلال در اعصاب حسی و حرکتی را نشان می دهد. یکی از مشکلات عصبی-عضلانی شاخص، شروع ناگهانی کرامپ های عضلانی در بیمارانی است که بلافاصله پس از تیروئیدکتومی و درمان با ید رادیواکتیو دچار کم کاری تیروئید می شوند. این مشکل ناشی از کم کاری تیروئید نمی باشد و مکانیسم آن مشخص نیست. در این بیماران ضعف عضلات پروگسیمال بسیار شایع است. اگرچه این نشانه چندان شدید نیست اما به ندرت احتمال هیپرتروفی این عضلات وجود دارد. درد و تورم مفاصل به ویژه مفصل زانو در بیماران مشاهده می شود. از علائم ناشایع در این بیماران گالاکتوره است. همچنین در این بیماران میزان سدیم سرم اغلب پایین است در صورتی که میزان سدیم کل بدن بالا است. هایپوناترمی به همراه احتباس آب منجر به کاهش ترشح هورمون آنتی دیورتیک می شود. در افراد مبتلا به سندروم داون احتمال ایجاد کم کاری تیروئید زیاد است. در ۵۰٪ موارد کم کاری تیروئید مرکزی ناشی از تومورهای هیپوفیز، علامت سردرد و نقایص میدان بینایی رخ می دهد. کم کاری تیروئید مرکزی می تواند بزرگی هیپوفیز و حفره آن را ایجاد کند. همچنین بیماران مبتلا به کم کاری تیروئید خود به خود، اکثراً علائم بالینی غیر اختصاصی و تدریجی شامل خستگی، ضعف، افسردگی و افزایش وزن را دارا می باشند. برخی از دانشمندان تظاهرات تیپیک کم کاری تیروئید را عجیب بودن آن می دانند. در افراد مبتلا به این بیماری همچنین برادی کاردی شایع است در صورتی که نبض بیماران منظم است. اگرچه فرم های شدید کم کاری تیروئید آریتمی های بدخیم مثل بلوک قلبی و فیبریلاسیون بطنی می تواند ایجاد کند، افزایش احتمال ابتلا به بیماری های عروق کرونر در بیماران کم کار تیروئید همچنان مورد تردید می باشد. ابتلا به درجات پیشرفته بیماری کم کاری تیروئید احتمال ابتلا به بیماری های عروق کرونر پیشرفته را افزایش می دهد. در بیماری کم کاری تیروئید شیوع آنژین صدری معمول نیست و این مسأله احتمالاً به دلیل کاهش نیاز بافت ها به اکسیژن و کاهش بازده قلب می باشد. در مبتلایان به کم کاری تیروئید فشار خون بالا

نیز از علائم شایع است و در برخی موارد در صورت نرمال شدن عملکرد غده تیروئید این اختلال بهبود می یابد[۴۳-۴۱].

۱-۸-۴- تشخیص کم کاری غده تیروئید

پس از تطابق علائم بیمار با نشانه های بالینی بیماری کم کاری تیروئید، انجام تست های آزمایشگاهی جهت اثبات این تشخیص لازم و ضروری می باشد. کم کاری تیروئید غالباً با سایر مقادیر آزمایشگاهی غیر طبیعی به صورت افزایش کلسترول خون، افزایش کراتین فسفوکیناز و لاکتات دهیدروژناز سرم همراه با برادی کاردی و موج T پهن یا معکوس در نوار قلب به چشم می خورد[۱۵].

میزان عیار تیروکسین آزاد در کم کاری تیروئید اولیه کاهش می یابد و افزایش میزان هورمون تیروتروپین رخ می دهد. این موضوع در همه موارد شدید و متوسط بیماری وجود دارد. در برخی موارد در فرم های خفیف جبران شده بیماری مقدار تیروکسین سرم طبیعی و مقدار هورمون تیروتروپین بیشتر از میزان طبیعی است که در این حالت به آن کم کاری تیروئید تحت بالینی جبران شده گفته می شود. کاهش میزان عیار تیروکسین آزاد به همراه تیروتروپین طبیعی در افراد سالم شایع نیست[۱۵].

در درمان بیماران مبتلا به کم کاری غده تیروئید به طور معمول، آزمایش های عیار تیروکسین آزاد و تیروتروپین همراه با یکدیگر درخواست می شود زیرا ترکیب آن ها سبب ارزیابی محور هیپوفیز-تیروئید می شود. در اکثر مبتلایان به کم کاری غده تیروئید میزان هورمون تری یدوتیرونین نرمال است که این به دلیل افزایش میزان تری یدوتیرونین ناشی از میزان بالا تیروتروپین سرم است. افزایش میزان هورمون تیروتروپین بیانگر وجود عارضه در غده تیروئید است. در کم کاری تیروئید چنانچه میزان هورمون تیروتروپین پایین یا نرمال باشد و در آزمایش مجدد در ۲ تا ۴ هفته بعد نیز مقدار آن طبیعی باقی بماند، دلالت بر مرکزی بودن کم کاری تیروئید است. در صورت اثبات ابتلا به کم کاری تیروئید مرکزی، مرحله بعد تشخیص محل ضایعه در هیپوفیز یا هیپوتالاموس است زیرا اختلالات در هیپوفیز معمولاً به دلیل وجود یک ضایعه فضا گیر که نیاز به درمان اختصاصی دارد می باشد و نیاز به درمان جایگزین نیست. افتراق مکان ضایعه در هیپوفیز یا هیپوتالاموس بر اساس پاسخ به هورمون آزادکننده تیروتروپین به سادگی قابل تشخیص است. در ضایعات هیپوفیز در پاسخ به هورمون آزادکننده تیروتروپین، افزایش میزان تیروتروپین مشاهده نمی شود. این در حالی

است که در اختلالات هیپوتالاموس میزان هورمون تیروتروپین افزایش مـی یابـد. بـا ایـن وجـود بعضـی مبتلایـان بـه ضایعات هیپوفیز پس از تزریق هورمون آزادکننده تیروتروپین افزایش واضح هورمون تیروتروپین را نشان مـی دهنـد و برخی مبتلایان به ضایعات هیپوتالاموس این افزایش را نشان نمی دهند. ابتلا به کم کاری تیروئیـد بـه صـورت مـزمن می تواند موجب بزرگی هیپوفیز به دلیل هیپرپلازی و هیپرتروفی تیروتروپ ها شود. اگرچه بـروز ایـن پدیـده از نظـر بالینی چندان شایع نیست[۱۵].

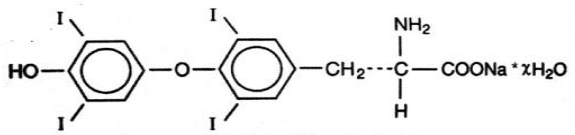
۱-۹- درمان کم کاری غده تیروئید اولیه

درمان این بیماری با جایگزین کردن هورمون ها صورت می گیرد. درمان خوراکی هورمـون هـا در سـال ۱۸۹۲ بـرای اولین بار به کار گرفته شد. تیروکسین و تری یدوتیرونین هر دو از هورمون های فعال غده تیروئید می باشـند. اگرچـه غده تیروئید هر دو هورمون را ترشح می کند اما در افرادی که دارای عملکرد نرمـال تیروئیـد هسـتند، قسـمت عمـده تری یدوتیرونین از هورمون تیروکسین در بافت ها ایجاد می شود. بیماران فاقد غـده تیروئیـد کـه بـا مقـادیر متناسـب هورمون تیروکسین درمان می شوند، در وضع ثابتی باقی مانده و غلظت تیروکسین و تری یدوتیرونین خـون آن هـا در نهایت نرمال می شود در حالی که در بیمارانی که فراورده های حاوی تیروکسین و تری یدوتیرونین را به طور همزمان دریافت می کنند در وضعیت مطلوبی از نظر غلظت هورمون های تیروئید در خون قرار ندارند. علت این امر عـوارض نامطلوب مانند سردرد، عصبانیت و آریتمی بر اثر مصرف مقادیر بالا هورمون تری یدوتیرونین اسـت. بنـابراین وجـود تری یدوتیرونین موجود در قرص های تیروئید به ویژه در افراد مسن و مبتلا به بیماری های قلبـی-عروقـی نامناسـب است. از سوی دیگر درمان منفرد با هورمون تری یدوتیرونین به عنوان جایگزین طولانی مدت، در درمان ایـن بیمـاری کاربرد چندانی ندارد زیرا نیمه عمر کوتاه آن مصرف دوزهای سه یا چهار بار در روز را ایجـاب مـی کنـد و ایـن نـوع درمان با نوسانات تری یدوتیرونین خون همراه خواهد بود. در نتیجه می تـوان گفـت کـه جـایگزین درمـانی تنهـا بـا هورمون تیروکسین جهت درمان بیماری کم کاری تیروئید اولیه ارجح مـی باشـد[۴۸-۴۴]. عوامـل درمـانی بـه عنـوان جایگزین درمانی هورمون تیروئید شامل ترکیبات بیولوژیک مانند تیروئید خشک شده و یا یک فراورده صـناعی ماننـد هورمون تیروکسین کریستالی می باشد. ترکیبات طبیعی هورمون تیروئید شامل عصاره خام تیروئید بـه صـورت قـرص تیروئید است. در گذشته غده تیروئید گاو یا خوک به فرم خشک شده، بدون چربی و پروتئین به صورت فراورده خـام

تهیه می شد که حاوی تیروکسین و تری یدوتیرونین بود. ترکیبات تیروئید خشک شده به صورت قرص های خوراکی متراکم شده است. خشک کردن تیروئید موجب خلوص و ثبات کم هورمون های تیروئید می شود. از سوی دیگر نسبت هورمون تیروکسین به تری یدوتیرونین در گونه های مختلف حیوانات متفاوت است لذا لووتیروکسین صناعی غلظت خونی دقیق تری از هورمون نسبت به تیروئید طبیعی به وجود می آورد و ارجح است. هورمون های تیروئید کریستالی صناعی بیشتر از ترکیبات بیولوژیک جذب می شوند و سطح ثابتی از هورمون تیروتروپین ایجاد می کنند. این فراورده ها شامل لووتیروکسین که حاوی هورمون تیروکسین، لیوتیرونین که حاوی هورمون تری یدوتیرونین و لیوتریکس که حاوی هر دو هورمون است، می باشد[۶].

۱-۹-۱- لووتیروکسین سدیم

نام شیمیایی و ساختار مولکولی ترکیب لووتیروکسین سدیم در شکل ۱-۱ آورده شده است[۲۹].



3,3′,5,5′-Tetraiodo-L-thyronine,T_4,3-[4-(4-Hydroxy-3,5-diiodophenoxy)-3,5-diiodophenyl]-L-alanine Monosodium Salt

شکل ۱-۱ ساختار مولکولی لووتیروکسین سدیم[۲۹].

فرمول بسته این ترکیب $C_{15}H_{10}I_4NNaO_4.xH_2O$ است. جرم مولکولی آن ۷۹۸/۸۶ گرم بر مول می باشد[۲۹، ۴۹].

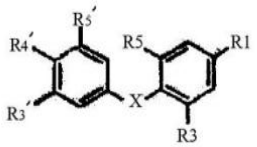
۱-۹-۲- خواص فیزیکوشیمیایی لووتیروکسین سدیم

لووتیروکسین سدیم نمک سدیم ایزومر چپ گرد تیروکسین است که به صورت طبیعی و صناعی بدست می آید. این ترکیب پودر کریستال به رنگ زرد روشن، بدون بو و جاذب رطوبت است. همچنین این ماده به نسبت ۱ در ۷۰۰ در آب و ۱ در ۳۰۰ در الکل و محلول های رقیق هیدروکسید قلیایی حل می شود. در استون، کلروفرم و اتر نامحلول و یا بسیار کم محلول است. شرایط نگه داری پودر در دمای ۸ درجه سانتیگراد و دور از نور می باشد[۵۰].

۱-۱۰- بررسی ارتباط ساختمان ترکیبات تیروئید با فعالیت آن

ارزیابی بیولوژیک و صناعی تعداد وسیعی از آنالوگ های دو هورمون تیروکسین و تری یدوتیرونین یک رابطه مشخص و مهم بین ساختمان مولکولی با فعالیت هورمونی ترکیبات بیان می کند. این

ترکیبات با جایگزینی هسته فنیل-x-فنیل دارای خاصیت و فعالیت مشخصی از هورمون تیروئید می باشند. ترکیبات تک حلقه مانند دی یدوتیروزین و مشتقات متعدد از اتر آلیفاتیک، هیچ گونه فعالیت شبه تیروکسین در تست آنتی گواتر رَت که در شکل ۱-۲ آورده شده است نشان نمی دهد. این آزمون روشی جهت تعیین فعالیت تیرومیمتیک ترکیبات است [۲۹].



No	R 1	R 3	R 5	X	R3′	R5′	R4′	anti goiter activity
1. L-T_4	L-Ala	I	I	O	I	I	OH	100
2. D-T_4	D-Ala	I	I	O	I	I	OH	17
3. L-T_3	L-Ala	I	I	O	I	H	OH	37
4. D-T_3	D-Ala	I	I	O	I	H	OH	41
5.	COOH	I	I	O	I	I	OH	0.1
6.	COOH	I	I	O	I	H	OH	0.4
7.	CH_2COOH	I	I	O	I	I	OH	50
8.	CH_2COOH	I	I	O	I	H	OH	36
9.	$(CH_2)_2COOH$	I	I	O	I	I	OH	15
10.	$(CH_2)_2COOH$	I	I	O	I	H	OH	20
11.	$(CH_2)_3COOH$	I	I	O	I	I	OH	4
12.	$(CH_2)_3COOH$	I	I	O	I	H	OH	5
13.	$(CH_2)_2NH_2$	I	I	O	I	I	OH	0.6
14.	$(CH_2)_2NH_2$	I	I	O	I	H	OH	6
15.	L-Ala	I	I	O	I	I	OH	<0.01
16.	L-Ala	I	I	O	I	H	OH	<0.01
17.	DL-Ala	H	H	O	I	H	OH	93
18.	L-Ala	H	H	O	iPr	H	OH	166
19.	L-Ala	Br	Br	O	Me	H	OH	3
20.	L-Ala	Br	Br	O	iPr	H	OH	20
21.	DL-Ala	Me	Me	O	I	H	OH	0
22.	DL-Ala	Me	Me	O	I	H	OH	0
23.	DL-Ala	iPr	iPr	—	I	I	OH	0
24.	DL-Ala	sBU	sBU	S	I	H	OH	132
25.	DL-Ala	I	I	CH_2	I	H	OH	300
26.	L-Ala	I	I	O	H	H	OH	5
27.	L-Ala	I	I	O	OH	H	OH	1.5
28.	L-Ala	I	I	O	NO_2	H	OH	<1
29.	DL-Ala	I	I	O	F	H	OH	6
30.	L-Ala	I	I	O	Cl	H	OH	27
31.	DL-Ala	I	I	O	Br	H	OH	132
32.	L-Ala	I	I	O	Me	H	Oh	80
33.	L-Ala	I	I	O	Et	H	OH	517
34.	L-Ala	I	I	O	iPr	H	OH	786
35.	L-Ala	I	I	O	nPr	H	OH	200
36.	DL-Ala	I	I	O	Phe	H	OH	11
37.	DL-Ala	I	I	O	F	F	OH	2.3
38.	L-Ala	I	I	O	Cl	Cl	OH	21
39.	L-Ala	I	I	O	I	H	NH_2	<1.5
40.	DL-Ala	I	I	O	I	H	H	>150
41.	DL-Ala	I	I	O	CH_3	H	CH_3	0
42.	L-Ala	I	I	O	I	H	CH_3O	225

شکل ۱-۲ بررسی فعالیت نسبی مشتقات تیروکسین[۲۹].

۱-۱۰-۱- زنجیره جانبی آلیفاتیک

هورمون های طبیعی از لووتیروزین بیوسنتز شده اند. زنجیره جانبی دارای ساختار آلانین چپ گرد می باشد. ایزومر چپ گرد دو هورمون تیروکسین و تری یدوتیرونین فعال تر از ایزومر راست گرد این ترکیبات هستند. همچنین یون کربوکسیلات و برخی دیگر از اتم های مرتبط با حلقه برای فعالیت مهم تر از آلانین زویتریونیک[1] زنجیره جانبی است. در بین یون های کربوکسیلات، بیشترین فعالیت مربوط به زنجیره جانبی حاوی استیک اسید دو کربنه است اما همین زنجیره جانبی به صورت آنالوگ اسید فرمیک که طول زنجیره کوتاه تری دارد یا آنالوگ هایی با بوتیریک اسید و پروپیونیک اسید با طول زنجیره بلندتر فعالیت را کاهش می دهد. آنالوگ های هورمون های تیروکسین و تری یدوتیرونین که دارای زنجیره جانبی اتیل آمین می باشند فعالیت کمتری نسبت به آنالوگ های حاوی کربوکسیلیک اسید دارند. به علاوه ایزومرهای هورمون تری یدوتیرونین که زنجیره جانبی حاوی آلانین آن با استخلاف موقعیت ۳ جا به جا شده و یا موقعیت ۲ را اشغال کرده است، در تست آنتی گواتر رَت غیر فعال می باشند. در نتیجه یک موقعیت حیاتی برای زنجیره جانبی موقعیت یک در حلقه داخلی شناسایی شده است[۴۹، ۲۹].

۱-۱۰-۲- حلقه متصل به آلانین

حلقه فنیل متصل شده به زنجیره جانبی آلانین، حلقه داخلی یا حلقه آلفا نام دارد که باید در موقعیت ۳ و ۵ در مولکول های هورمون های تیروکسین و تری یدوتیرونین استخلاف داشته باشند. جا به جایی هر دو اتم ید از حلقه داخلی به موقعیت ۳َ و ۵َ ازدی یدوتیرونین یا موقعیت ۳َ از مونویدوتیرونین موجب کاهش فعالیت شبه تیروکسین در آنالوگ های مشتق شده، به دلیل از دست دادن کانفورماسیون دی فنیل اتر می باشد. حفظ فعالیت مشهود در جایگزینی اتم های ید در موقعیت ۳ و ۵ با برم نشان دهنده این است که تنها اتم های ید در فعالیت هورمون های تیروئید نقش ندارند. اتم های کوچک تر از برم فعالیت هورمونی ترکیب را بی اثرمی کنند. به علاوه یک محدوده کلی از فعالیت هورمون را به وسیله آنالوگ های فاقد هالوژن مشخص کرده اند. به این ترتیب حضور یک اتم هالوژن برای فعالیت

1. zwitterion

ضروری نمی باشد. در مقابل تری یدوتیرونین، ´۳-ایزوپروپیل-۶،۳دی متیل-L- تیرونین توانایی عبور از جفت را دارا می باشد و اثرات تیرومیمتیک را در جنین بعد از تجویز به مادر اعمال می کند. این نکته ثابت می کند که این ترکیب در درمان کمبود یا نقص هورمون تیروئید جنین و القاء تکامل ریه به وسیله تحریک ریه ها برای سنتز فسفولیپیدهای خاصی به نام سورفکتانت که برای انجام عملکرد ریه جنین در حین تولد لازم است، بلافاصله قبل از تولد زودرس می تواند مفید واقع شود. جانشینی در موقعیت ۳ و ۵ به وسیله گروه های آلکیل بزرگ تر و غیر متقارن تر از گروه های متیل مانند ایزوپروپیل و S-بوتیل، آنالوگ های غیر فعال ایجاد می کنند. این نتایج نشان می دهد که جانشینی موقعیت های ۳و ۵ به وسیله گروه های متقارن لیپوفیلیک و هم اندازه اتم ید، برای فعالیت این ساختار ضروری می باشد[۴۹، ۲۹].

۱-۱۰-۳- اتم اتصال دهنده دو حلقه

آنالوگ های متعددی با برداشتن پل اکسیژن اتری یا جایگزین نمودن این پل به وسیله اتم های دیگر ساخته شده است. آنالوگ بای فنیل تیروکسین که به وسیله برداشته شدن پل اکسیژن ساخته می شود ترکیبی غیر فعال در تست آنتی گواتر رَت می باشد. شکل فضایی خاص برای حفظ اثر الزامی است. بنابراین ساختار بای فنیل خطی یک تغییر موثر و قوی می باشد. از کانفورماسیون های دی فنیل اتر نرمال که در هورمون های طبیعی موجود یافت شده است، جایگزین کردن پل اتم اکسیژن به وسیله سولفور یا گروه متیلن، آنالوگ قوی تری را تولید کرده است. تلاش برای آماده سازی آنالوگ های تیروکسین و تری یدوتیرونین با پل آمینی و کربونیلی ناموفق بود[۴۹، ۲۹].

۱-۱۰-۴- حلقه فنول

حلقه فنول هسته های تیرونین که حلقه خارجی یا حلقه بتا نیز نام دارد برای فعالیت هورمونی لازم و ضروری است. تنوع در جایگزینی موقعیت های ´۳ یا ´۳ و ´۵ روی حلقه فنول اثرات برجسته ای در فعالیت بیولوژیک و میل اتصال به گیرنده های هسته ای دارد. ساختار اصلی غیر جانشین شده ازاین سری، L-دی یدوتیرونین است که دارای فعالیت بالینی می باشد. جایگزینی در موقعیت ´۳ به وسیله هیدروکسیل قطبی یا گروه های نیترو به دلیل لیپوفیلیسیته پایین و پیوند هیدروژنی بین ملکولی با موقعیت ´۴-هیدروکسیل سبب کاهش فعالیت مولکول شده و بالعکس، جایگزینی به وسیله هالوژن غیر پلار یا گروه های آلکیل سبب افزایش فعالیت می شود که به طور مستقیم در ارتباط با حجیم بودن

و لیپوفیلیسیته گروه های جایگزین است. بنابراین در ناحیه ´۳ استخلاف لیپوفیل نیاز است و هر قدر کشندگی آن بیشتر باشد، نسبت فنولات و اسیدیته افزایش می یابد و تمایل گلوبولین به آن بیشتر شده و میزان هورمون آزاد کمتر می شود که در نتیجه این اتفاق کاهش اثر مشاهده می شود. از آنجایی که در ساختار مولکول تیروکسین دو عدد ید الکترون کشنده وجود دارد، به علت افزایش یونیزاسیون میزان فنولات بیشتر شده و اتصال به پروتئین افزایش می یابد. در نتیجه فرم آزاد کمتر دیده می شود و اثر کاهش می یابد. بنابراین در این ناحیه استخلاف لیپوفیل نیاز است و هر قدر کشندگی کمتر باشد قدرت بیشتر می شود[۲۹، ۴۹].

گروه ´۳-ایزوپروپیل تیرونین در میان همه ترکیبات شناخته شده قوی تر و حدود ۱/۴ برابر فعال تر از n-پروپیل تیرونین و تری یدوتیرونین چپ گرد است. این ترکیب حدود یک چهارم فعالیت ایزوپروپیل را به دلیل ساختمان شدیداً فشرده اش دارا می باشد. ترکیب قوی تر از تری یدوتیرونین ترکیبی است که در موقعیت ´۳ به جای ید، ایزوپروپیل داشته باشد. همچنین با جایگزین کردن گروه بسیار حجیم ´۳-فنیل فعالیت کاهش می یابد. از سوی دیگر جایگزینی هالوژن های یکسان در دو موقعیت ´۳ و ´۵ سبب کاهش فعالیت این ترکیبات نسبت به آنالوگ های ´۳-مونو تک استخلافی می شود. کاهش فعالیت به علت افزایش یونیزاسیون گروه هیدروکسیل فنولیک و در نتیجه افزایش اتصال به گلوبولین به عنوان اولین حامل هورمون های تیروئید می باشد. به طور کلی دومین جایگزینی در مجاورت گروه عاملی هیدروکسیل فنولی در موقعیت ´۵، فعالیت را نسبت به اندازه اش کاهش می دهد. بنابراین عدم استخلاف در این موقعیت به نفع فعالیت ترکیب است. علت اول ایجاد ممانعت فضایی در این ناحیه توسط استخلاف های بزرگتر و علت دیگر برقراری پیوند هیدروژنی گروه هیدروکسیل ناحیه ´۴ با گیرنده می باشد که در ساختار فضایی به سمت موقعیت ´۵ جهت گیری کرده است. بنابراین وجود یک استخلاف در این ناحیه امکان برقراری این پیوند را کمتر می کند[۲۹، ۴۹].

۱-۱۰-۵- گروه هیدروکسیل حلقه فنول

حضور یک گروه عاملی هیدروکسیل فنول در موقعیت ´۴ برای فعالیت هورمونی اُپتیمم ضروری است. جایگزینی ´۴-هیدروکسیل با یک گروه آمین به دلیل توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی ضعیف، فعالیت را کاهش می دهد. حفظ فعالیت مشاهده شده با ترکیب غیر جانشین در موقعیت ´۴ در داخل بدن مدرکی برای متابولیزه شدن

۴َ-هیدروکسیلاسیون به عنوان یک مرحله فعال سازی می باشد در صورتی که در موقعیت برون تن به دلیل کم شدن تمایل به گیرنده اثر کاهش می یابد. جانشینی موقعیت ۴َ با گروهی که نمی تواند مقلد گروه هیدروکسیل باشد مانند گروه متیل، یک ترکیب فعال به حساب نمی آید. فعالیت تیرومیمتیک ۴َ-متیل اتر به دلیل شکسته شدن ترکیب در اثر متابولیسم و تبدیل شدن به آنالوگ فعال ۴َ-هیدروکسیل می باشد و با گذاشتن استخلاف متیل هم در درون تن و هم در برون تن اثر کاهش می یابد[۲۹، ۴۹].

مقدار pK_a برای گروه هیدروکسیل ۴َ-فنولی ۶/۷ بوده که در اسیدیته برابر ۷/۴ به میزان ۹۰٪ یونیزه شده و برای تری یدوتیرونین حدود ۸/۵ می باشد و تقریباً ۱۰٪ یونیزه می شود. بیشترین اسیدیته برای تیروکسین به دلیل بازتاب میل اتصال قوی تر برای پروتئین های پلاسما و در نتیجه نیمه عمر طولانی تر در پلاسما می باشد[۲۹، ۴۹].

در نتیجه رابطه ساختار و فعالیت به طور خلاصه عبارتست از:

۱- در ناحیه R_1 حضور گروه L-آمینواسید برای فعالیت ترکیب، حیاتی نمی باشد. در نتیجه گروه آمینو می تواند به طور کلی حذف شود.

۲- برای آنالوگ هایی با جایگزینی در ناحیه R_3 و R_6 اطلاعات نسبتاً کمی در دسترس است.

۳- موقعیت های R_3 و R_5 همیشه با هالوژن ها و یا گروه های آلکیل کوچک جانشین می شوند.

۴-اتصال دهنده x یک تک اتم می باشد. در این جایگاه حضور اکسیژن بیشتر عمومیت دارد اما سولفور و متیلن نیز قابل پذیرش است.

۵-در حلقه خارجی دو گروه R_2^- و R_6^- به ندرت جایگزین می شوند، اگرچه جایگزینی موفق در R_2^- و R_3^- به وسیله جا به جایی با یک ترکیب تتراهیدرونفتیل یا حلقه نفتیل گزارش شده است.

۶-ناحیه R_3^- مناسب برای گروه های ید یا ایزوپروپیل می باشد و درجه های متفاوتی از میل اتصال به گیرنده مناسب می تواند با گروه های غیر قطبی آلکیل و یا آریل حفظ شود. به هر حال گروه های قطبی در ناحیه R_3^- سبب کاهش میل اتصال به گیرنده می شود.

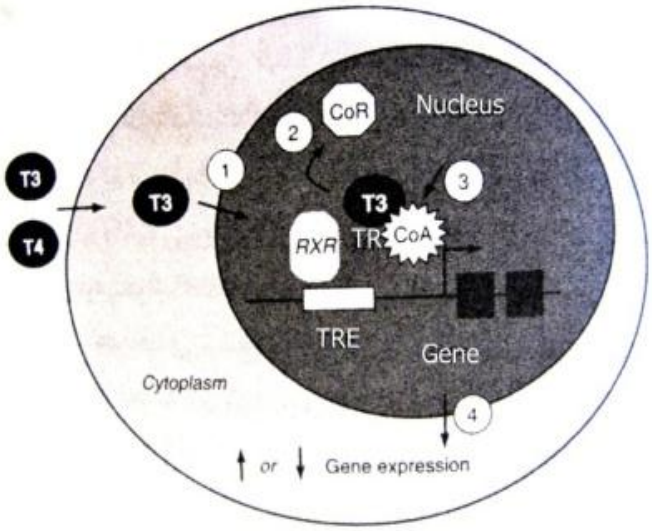
۷-جایگزینی در ناحیه R_3^- و R_5^- به طور همزمان منجر به کاهش تمایل اتصال به گیرنده می شوند.

۸-گروه هیدروکسیل فنولیک در R_4^- هم برای اتصال و هم برای فعالیت آگونیستی ضروری می باشد و یک نقش ساختاری و عملکردی در اتصال هیدروژنی با حلقه ایمیدازول زنجیره های جانبی هیستیدین موجود در گیرنده ایفا می کند[۲۹، ۴۹].

۱-۱۱- مکانیسم اثر هورمون های تیروئید

هورمون های تیروئید به گیرنده ای خاص در هسته سلول هدف با میل ترکیبی بالا متصل می شوند. میل ترکیبی اتصال تری یدوتیرونین ۱۰ برابر تیروکسین است و فعالیت بیولوژیک بیشتری دارد. هورمون های تیروئید همچنین به جایگاه های پروتئینی با میل ترکیبی پایین در سیتوپلاسم نیز اتصال می یابند اما به نظر می رسد که این پروتئین شباهتی به گیرنده های هسته ای ندارد. احتمالاً این اتصال هورمون در سیتوپلاسم، هورمون های تیروئید را در مجاورت هسته سلول نگه می دارد. نقش اصلی دو هورمون تیروکسین و تری یدوتیرونین افزایش کلی سنتز پروتئین ها و ایجاد تعادل نیتروژن مثبت است. هورمون های تیروئید مانند استروئیدها از طریق افزایش یا کاهش رونویسی ژن ها باعث القا یا توقف تولید پروتئین ها می شوند. این کمپلکس گیرنده-لیگاند به عناصر پاسخ به هورمون های تیروئید در ژن های هدف اتصال می یابند تا میزان سنتز مولکول mRNA خاص را تنظیم نمایند. به این ترتیب مقدار فعالیت پروتئین وابسته تغییر کرده و این امر به نوبه خود میزان یک فرایند متابولیک راتغییر می دهد. هورمون های تیروئید از طریق اتصال به گیرنده های هسته ای موسوم به گیرنده های هورمون تیروئید آلفا و بتا عمل می کنند. هر دو گیرنده آلفا و بتا در اغلب بافت ها بروز می یابند اما سطوح نسبی آن ها در ارگان های مختلف متفاوت است، به گونه ای که گیرنده آلفا مشخصاً در مغز، کلیه، گنادها، عضله وقلب به وفور یافت می شود در حالی که بروز گیرنده ی بتا در هیپوفیز و کبد نسبتاً بالا می باشد. ایزومر گیرنده بتا-یک به صورت انتخابی در هیپوتالاموس و هیپوفیز بروز می کند و در این مکان ها در کنترل فیدبک محور تیروئید دخالت دارد. ایزوفرم گیرنده آلفا-دو نیز مانع اتصال هورمون تیروئید می گردد. گیرنده ها به صورت هومودیمر یا هترودیمر با گیرنده های x رتینوئیک اسید اتصال می یابند. گیرنده های فعال شده از توانایی تحریک نسخه برداری مانند زنجیره آلفا سنگین میوزین و یا مهار نسخه برداری مانند ژن زیر واحد بتا از هورمون تیروتروپین برخوردارند و این اعمال را بر اساس طبیعت عناصر تنظیم کننده ژن هدف انجام می دهند. هورمون های تیروئید با میل ترکیبی یکسان به گیرنده آلفا و بتا متصل می شوند. با این حال میل

ترکیبی تری یدوتیرونین به گیرنده حدوداً ۱۰ تا ۱۵ برابر میل ترکیبی تیروکسین است. این مسأله قدرت بالای این هورمون را تفسیر می کند. هر چند میزان تولید تیروکسین بیش از تری یدوتیرونین است ولی به سبب تبدیل محیطی تیروکسین به تری یدوتیرونین دسترسی بیولوژیک بیشتر به تری یدوتیرونین در پلاسما و میل ترکیبی بیشتر تری یدوتیرونین به گیرنده ها، اغلب گیرنده ها به وسیله تری یدوتیرونین اشغال می گردد. هورمون تیروئید پس از اتصال به گیرنده های هورمون تیروئید تغییرات ساختاری در گیرنده ها به وجود می آورد که واکنش متقابل آن ها به فاکتورهای نسخه برداری فرعی را تنظیم می نماید. در غیاب اتصال هورمون تیروئید، آپورسپتور به پروتئین مهار کننده کمکی متصل می شوند که این امر از نسخه برداری ژن جلوگیری می نماید. اتصال هورمون، مهار کننده ها را جدا نموده و امکان به کارگیری مجدد فعال کننده هایی که نسخه برداری را تحریک می کنند را فراهم می سازد. کشف واکنش های متقابل گیرنده های هورمون تیروئید، بروز ژن را در غیاب اتصال هورمون خاموش می نماید. در نتیجه کمبود هورمون نقش عمیقی بر بروز ژن بر جای می گذارد زیرا این مسأله موجب سرکوب شدن ژن و از دست رفتن تحریک وابسته به هورمون می گردد. مکانیسم عمل هورمون های تیروئید در شکل ۱-۳ آورده شده است[۳۶، ۳۱، ۶].



شکل ۱-۳ مکانیسم عمل هورمون تیروئید: گیرنده هورمون تیروئید (TR) وگیرنده x رتینوئید (RXR) در مناطق پروموتر ژن های هدف اتصال می یابند. در غیاب هورمون، گیرنده هورمون تیروئید به پروتئین کورپرسور (COR) متصل می شوند که بروز ژن را مسکوت می گذارد. اعداد موجود در شکل به مجموعه واکنش های متوالی اشاره دارد که در پاسخ به هورمون رخ می دهد(۱) T_3 و T_4 وارد هسته می شود (۲) اتصال T_3 موجب تفکیک پروتئین کورپرسور از گیرنده هورمون تیروئید می گردد (۳) کواکتیواتورها (COA) به سمت گیرنده متصل به T_3 جلب می شوند (۴) بروز ژن تغییر می یابد[۱۵].

۱-۱۲- فارماکوکینتیک

۱-۱۲-۱- جذب

کینتیک هورمون های تیروئید تجویز شده به فرم خوراکی به واسطه مطالعات بالینی مورد ارزیابی قرار می گیرد. در حیوانات بیشترین محل های فعال جذب در ژوژنوم ابتدایی و میانی می باشد. به نظر می رسد که در حیوانات هیچ جذبی از قسمت دیستال روده کوچک صورت نمی گیرد. تعدادی از مطالعات انسانی اهمیت ایلئوم و ژوژنوم واقعی را برای جذب تیروکسین تأیید کرده اند و مقداری جذب از دئودنوم را نیز نشان داده اند. جذب در حالت ناشتا افزایش می یابد و در مواردی نظیر سندروم های سوء جذب میزان جذب کاهش خواهد یافت. جذب همچنین ممکن است با افزایش سن کاهش پیدا کند. فیبر رژیمی میزان فراهمی زیستی تیروکسین را کاهش می دهد. هورمون ها به فرم صناعی نیز مانند هورمون های طبیعی جذب می شوند. کاهش میزان جذب می تواند در نتیجه مصرف همزمان لووتیروکسین سدیم با ترکیباتی مانند سولفات آهن، آلومینیوم هیدروکساید، سوکرالفیت، ترکیبات سویا و غیره رخ دهد[۵۱].

۱-۱۲-۲- توزیع

هورمون عمده مترشحه از غده تیروئید تیروکسین است. هورمون تری یدوتیرونین یک هورمون محیطی است که به طور عمده از تیروکسین موجود در گردش خون مشتق می شود. بیش از ۹۹٪ هورمون های موجود در گردش خون به پروتئین های سرم متصل می شوند. عملکرد پروتئین های اتصالی سرم شامل افزایش ذخیره هورمون در گردش، تأخیر در کلیرانس هورمون و احتمالاً تنظیم انتقال هورمون به مکان های انتخاب شده می باشد[۵۱].

تیروکسین در پلاسما به وسیله سه پروتئین انتقال می یابد. سه حامل پروتئینی مذکور شامل گلوبولین[1]، پره آلبومین[2] و آلبومین[3] است[۵۱، ۱۵].

1. Thyroid Binding Globulin(TBG)
2. Thyroid Binding Pre Albumin(TBPA)

به علت میل اتصال بالاتر گلوبولین برای تیروکسین، گلوبولین اولین پروتئین اتصالی سرم می باشد. پروتئین عمده گلیکوپروتئینی با وزن ملکولی ۵۵ هزار دالتون، واجد یک زنجیره پلی پپتیدی منفرد و یک محل اتصال برای هورمون تیروئید می باشد[۱۵، ۵۱].

پره آلبومین در اسیدیته ۸/۶ حدود ۱۰ مرتبه بیشتر از گلوبولین به تیروکسین متصل می شود اما در اسیدیته طبیعی میزان این اتصال کمتر است. غلظت گلوبولین نسبتاً پایین و حدود ۲ میلی گرم بر دسی لیتر می باشد در صورتی که میل ترکیبی بالایی به هورمون های تیروئید دارد. از سوی دیگر آلبومین دارای میل ترکیبی نسبتاً اندکی به هورمون های تیروئید می باشد در حالی که از غلظت بالاتری در سرم برخوردار است. تحت شرایط فیزیولوژیک ۸۰٪ تیروکسین در خون به وسیله گلوبولین و ۱۰٪ آن به همراه مقدار مختصری از تری یدوتیرونین به وسیله پره آلبومین و ۱۰٪ تیروکسین و تری یدوتیرونین به وسیله آلبومین نقل و انتقال می یابد. هنگامی که تیروکسین به پروتئین ها متصل می شود از نظر فیزیولوژیک فعال نخواهد بود اما یک ذخیره ای از هورمون تیروئید برای مدت زمان دو تا سه ماه را می تواند تأمین کند. نیمه عمر تیروکسین شش تا هفت روز می باشد. گلوبولین یک میل اتصال بالاتری برای تیروکسین نسبت به تری یدوتیرونین دارد. میل اتصال پایین پروتئین های پلاسما به تری یدوتیرونین یک فاکتور مهم در عملکرد سریع و نیمه عمر بیولوژیکی کوتاه تر برای تری یدوتیرونین است. هورمون های تیروئید به وسیله انتشار تسهیل شده و یا انتقال فعال به سلول ها برده می شوند. دو هورمون تیروکسین و تری یدوتیرونین به طور یکنواخت در سلول های بدن منتشر نمی شوند. مقدار بیشتری از تیروکسین در کبد و کلیه ذخیره می شوند در حالی که تری یدوتیرونین بیشتر در ماهیچه ها و مغز ظاهر می شوند. درصد کمی از هورمون های تیروئید به پروتئین متصل نبوده و به صورت آزاد می باشد. حدود ۰/۰۳٪ هورمون تیروکسین و ۰/۳٪ هورمون تری یدوتیرونین به صورت آزاد باقی می ماند. تیروکسین آزاد از لحاظ فیزیولوژیک فعال بوده و ترشح هورمون تیروتروپین هیپوفیز را کنترل می کند. میزان ترشح تیروکسین توسط غده تیروئید حداقل ۲۰ برابر بیشتر از تری یدوتیرونین است. هنگامی که اثرات پروتئین های اتصالی مختلف با یکدیگر ترکیب می شوند، حدود ۹۹/۹۸٪ از تیروکسین و ۹۹/۷٪ از تری یدوتیرونین به پروتئین ها اتصال می یابند. از آنجایی که اتصال تری یدوتیرونین در مقایسه با تیروکسین ضعیف تر است، میزان تری یدوتیرونین آزاد نسبت به

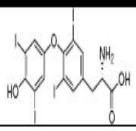
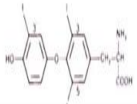
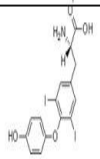
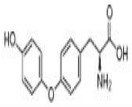
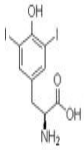
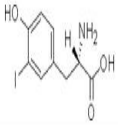
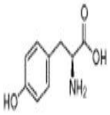
3. Thyroid Binding Albumin(TBA)

تیروکسین بیشتر خواهد بود. غلظت هورمون های آزاد تیروئید تقریباً مطابق با ثابت های اتصال گیرنده هورمونی در مورد این دو هورمون است. تعدادی از هورمون ها و داروها بر سنتز سه پروتئین سنتز شده در کبد اثر گذارند. از جمله این داروها می توان به استروژن ها اشاره کرد که سنتز گلوبولین را افزایش می دهند. آندروژن ها، گلوکوکورتیکوئیدها و بیماری های کبدی سنتز گلوبولین را کاهش می دهند. فنی توئین و سالیسیلات ها برای ترکیب با گلوبولین با دو هورمون تیروکسین و تری یدوتیرونین رقابت می کنند به گونه ای که دو دارو مذکور به جای هورمون های تیروئید به گلوبولین متصل می شوند. درنتیجه مقدار کل هورمون بدون اثر بر مقدار هورمون آزاد کاهش می یابد. در بیماری سندرم نفروژنیک که پروتئین از طریق کلیه دفع می شود سطح گلوبولین در خون کاهش می یابد. با افزایش و کاهش گلوبولین میزان کل تیروکسین و تری یدوتیرونین افزایش و کاهش می یابد. البته مقدار آزاد تیروکسین و تری یدوتیرونین ممکن است به غده تیروئید مربوط نبوده بلکه به علت افزایش یا کاهش گلوبولین باشد[۵۱].

۱-۱۲-۳- متابولیسم و دفع

هورمون تیروئید پس از ایفای نقش بیولوژیک با توجه به نیمه عمر خود کاتابولیزه می شوند و از بین می روند. مراحل کاتابولیسم هورمون تیروئید شامل کنژوگاسیون، دِکربوکسیلاسیون، دِآمیناسیون و دِآیودیناسیون است. در غده تیروئید و هم در بافت های محیطی از دست دادن ید صورت می گیرد. آنزیم یدوتیروزین دِآیودیناز در غده تیروئید نقش مهمی در استفاده مجدد ید دارد. این آنزیم با یدوتیروزین دِآیودیناز بافت های محیطی متفاوت است. این آنزیم روی یدوتیروزین عمل نمی کند و در بافت های کبد، کلیه، ماهیچه، هیپوفیز، مغز و تیروئید قرار دارد. دو آنزیم یودوتیروکسین دِآیودیناز متفاوت وجود دارد که مونودِآیودیناسیون را در حلقه بیرونی فنولی و یا حلقه درونی تیروزین کاتالیز می کند که سبب ایجاد تری یدوتیرونین و تری یدوتیرونین معکوس می شوند. بنابراین دِآیودیناسیون حلقه خارجی به وسیله آنزیم َ۵-دِآیودیناز منجر به تشکیل تری یدوتیرونین شده و دِآیودیناسیون حلقه داخلی به وسیله آنزیم ۵-دِآیودیناز منجر به تشکیل تری یدوتیروزین معکوس می شود که برای این فرم، عملکرد بیولوژیکی شناخته نشده است. در بعضی شرایط نظیر گرسنگی و افزایش ترشح کورتیزول و آدرنال و نیز در دوره نوزادی تشکیل تری یدوتیروزین معکوس بیش از تری یدوتیروزین است. کبد و کلیه سهم عمده ای در دِآیودینه شدن دو هورمون

تیروکسین و تری یدوتیرونین دارند. در بدن انسان مهمترین روش متابولیکی هورمون، دِآیودیناسیون است. مراحل بعدی متابولیسم ممکن است روی زنجیره آلانین باشد و این تغییرات شامل دِآمیناسیون و دِکربوکسیلاسیون زنجیره جانبی است. محصولات حاصل شامل مشتقات اسید پیرویک و اسید استیک است. اگرچه واکنش های فوق در کلیه، ماهیچه و مغز انجام می شود اما کبد در این فرایند نقش برجسته و خاصی دارد. آنزیم های مربوطه شامل ترانس آمیناز و دِکربوکسیلاز که منجر به تشکیل تیرواستیک اسید و تیرواِتان دی اُل می شود. تقریباً ۴۴٪ تیروکسین نشان دار تزریق شده به صورت تترایدوتیرواستیک اسید در می آید. کبد ترکیبات فوق را به صورت سولفاته و گلوکورونیده در می آورد به صورتی که هم تیروکسین و هم تری یدوتیرونین با گلوکورونید یا سولفات از طریق گروه هیدروکسیل فنولی کنژوگه می شوند. محصول کنژوگه شده یدوتیرونین از طریق صفرا به روده دفع می شود و در آنجا توسط باکتری ها هیدرولیز شده و به عنوان یک ماده آزاد در مدفوع دفع می گردد. همچنین به سمت گردش خون اِنتروهپاتیک مهاجرت کرده و با هیدرولیز در روده آزاد می شود و دوباره جذب می شود. تیروکسین کنژوگه با سولفات در کلیه و کبد یک سوبسترای مناسب برای آنزیم َ۵-دِآیودیناز است که در تنظیم متابولیسم تیروکسین موثر است. همچنین شکاف در اتصال دی فنیل اتر هم در برون تن و هم درون تن قابل دستیابی است[۴۹، ۲۹]. ترکیبات حاصل از تخریب هورمون های تیروئید شامل تری یدوتیرونین معکوس حاصل از هورمون تیروکسین توسط آنزیم ۵-دِآیودیناز، دی یدوتیرونین حاصل از تری یدوتیرونین معکوس به وسیله آنزیم َ۵-دِآیودیناز و یا حاصل از تری یدوتیرونین به وسیله آنزیم ۵-دِآیودیناز، ۳-مونویدوتیرونین و َ۳-مونویدوتیرونین که هر دو حاصل از دی یدوتیرونین به ترتیب توسط آنزیم های َ۳-دِآیودیناز و ۳-دِآیودیناز و نهایتاً تیرونین حاصل از هر دو ترکیب ۳-مونویدوتیرونین و َ۳-مونویدوتیرونین به ترتیب توسط آنزیم های ۳-دِآیودیناز و َ۳-دِآیودیناز می باشد. این واکنش ها هم در درون تن و هم در برون تن قابل انجام است. همچنین دی یدوتیرونین می تواند به مشتقات تیروزین شامل دی یدوتیروزین، یدوتیروزین و تیروزین تبدیل شود. البته تولید سه ترکیب اخیر تنها در برون تن بر اثر تخریب هورمون های تیروئید تحت شرایط نامناسب نگه داری این فراورده ها انجام می شود[۵۲، ۵۱]. ساختار شیمیایی، فرمول بسته، ساختار مولکولی و وزن مولکولی ترکیبات حاصل از تخریب لووتیروکسین در شکل ۱-۴ نمایش داده شده است.

Name	Synonym	Stracture	Linear Formula	Molecular Weight
L-Thyroxine	3,3′,5,5″-Tetraiodo-L-thyronine, T_4, 3-[4-(4-Hydroxy -3,5-diiodophenoxy)-3,5-diiodophenyl]-L-alanine		$HOC_6H_2(I)_2OC_6H_2(I)_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$	776.87
Triiodo Thyronine	3,5,3′-Triiodo-4-(4-hydroxyphenoxy)-L-phenylalanine, O-(4-Hydroxyphenyl)-3,5-diiodo-L-tyrosine		$C_{15}H_{12}I_3NO_4$	650.97
Diiodothyronine	3,5,3-Diiodo-4-(4-hydroxyphenoxy)-L-phenylalanine, O-(4-Hydroxyphenyl)-3,5-diiodo-L-tyrosine		C15H13I2NO4	525.08
Thyronine	3-(p-[p-Hydroxyphenoxy]phenyl)-L-alanine		$C_{15}H_{15}NO_4$	273.28
Diiodotyrosine	3,5-Diiodo(S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, 3-(4-Hydroxyphenyl)-L-alanine		C9H9I2NO3 · 2H2O	469.01
Monoiodotyrosine	3-Monoiodo-(S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, 3-(4-Hydroxyphenyl)-L-alanine		IC_6H_3-4-$(OH)CH_2CH(NH_2)CO_2H$	307.09
Tyrosine	(S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, 3-(4-Hydroxyphenyl)-L-alanin		4(HO)C6H4CH2CH(NH2)CO2H	181.19

شکل ۱-۴ ساختار شیمیایی، فرمول بسته، ساختار مولکول و وزن مولکولی ترکیبات حاصل از تخریب لووتیروکسین[۱۵].

۱-۱۳- روش های اندازه گیری هورمون های تیروئید

لازم است که تشخیص بالینی اختلالات تیروئید با تست های آزمایشگاهی نیز تأیید شود. پیدایش روش های اندازه گیری هورمون تیروکسین به وسیله متدهای شیمیایی و در سال های اخیر با استفاده از ید رادیواکتیو کمک شایانی به شناسایی فیزیولوژی غده تیروئید و بررسی و تفسیر آزمایشات و بررسی چگونگی فعالیت این غده نموده است[۳۳].

۱-۱۳-۱- روش رادیوایمونوآسی

رادیوایمونوآسی جهت اندازه گیری غلظت آنتی ژن یا هاپتن هایی به کار می رود که توانایی نشان دار شدن توسط مواد رادیواکتیو را دارا باشند. اساس این تکنیک رقابت بین مواد نشان دار شناخته شده و مواد بدون نشان بر سر آنتی بادی ویژه می باشد. پس از جدا نمودن کمپلکس های تشکیل شده بین آنتی ژن نشان دار و آنتی بادی، از سایر مواد به کمک رسوب دادن کمپلکس و سپس سانتریفیوژ می توان میزان رادیواکتیویته را اندازه گیری کرد. غلظت آنتی ژن بدون نشان از مقایسه نتایج بدست آمده از غلظت های متعدد یک آنتی ژن استاندارد از پیش شناخته شده تعیین می گردد. رادیوایمونوآسی روشی نسبتاً حساس برای ارزیابی هورمون ها یا داروهای موجود در سرم می باشد. این روش جدیدترین و دقیق ترین تکنیک رایج آزمایشگاه های بالینی جهت تعیین مقدار ترکیباتی با غلظت های نانوگرم و پیکوگرم در مایعات زیستی بدن است. این تکنیک به طور همزمان ویژگی های روش های ایمونولوژیکی و دقت روش رادیوشیمیایی را دارا است. انواع رادیوایمونوآسی به صورت مایع و جامد انجام می شود. در حالت جامد آنتی ژن یا آنتی بادی از طریق جذب سطحی یا پیوند کووالانسی به ماده زمینه اتصال می یابد. در فاز مایع اساس کار اتصال رقابتی است. در این روش از سه جزء استفاده می شود که شامل غلظت مشخصی از آنتی ژن غیر نشان دار، آنتی ژن نشان دار شده با مواد رادیواکتیو به عنوان ردیاب و مقدار مشخصی از آنتی بادی سرم که با دو آنتی ژن مذکور وارد واکنش می شود. هر چه میزان آنتی ژن غیر نشان دار بیشتر باشد، آنتی ژن نشان دار کمتری وارد واکنش با آنتی بادی می شود و این رقابت تا زمان رسیدن واکنش به حالت تعادل ادامه دارد. سپس کمپلکس های آنتی ژن-آنتی بادی و آنتی ژن نشان دار-آنتی بادی را از آنتی ژن بی نشان و نشان دار آزاد جدا نموده و میزان رادیواکتیویته آنتی ژن نشان دار آزاد و یا رادیواکتیویته کمپلکس آنتی ژن نشان دار-آنتی بادی را اندازه می گیرند[۵۳، ۵۱، ۱۵، ۹].

از سال ۱۹۴۰ کاربرد ایزوتوپ ها در بیوشیمی معمول شد. برای نخستین بار دو محقق آمریکایی با کـاربرد دوتـریم بـه جای یکی از هیدروژن های ترکیبات، آن ترکیب را تعیین مقدار می کردند. ایزوتوپ ها توسط رأکتـور اتمـی تولیـد و ضمن سنتز ترکیبات شیمیایی در ساختار آن ها قرار می گیرد. با قرار دادن ایزوتوپ در محـیط کشـت سـلولی، جسـم سنتز شده نشان دار می شود. در کاربرد ایزوتوپ ها، اندازه گیری ها بر اساس فعالیت مخصوص یا شمارش در دقیقـه است. تعریف فعالیت مخصوص، تعداد اتم های رادیواکتیو به مجموع اتم های یک عنصر می باشد. بـه جـای فعالیـت مخصوص می توان فعالیت مخصوص نسبی را به کار برد که به معنای میزان رادیواکتیویته بر حسـب میلـی کـوری یـا میکروکوری و یا شمارش در دقیقه نسبت به واحد وزن می باشد. میزان رادیواکتیویته با کمک دستگاه های مخصـوص اندازه گیری می شود و بر حسب دقت دستگاه درصد معین از رادیواکتیویته تام را معلوم می نمایـد. ایـن مقـدار بـازده دستگاه مانیده می شود. در این دستگاه ها مقدار رادیواکتیویته بر حسـب تعـداد شـمارش در دقیقـه تعیـین مـی شـود. ایزوتوپ های زیادی در این امر به کار گرفته می شود و رادیواکتیویته ذرات بسته به نوع اشعه تولید شده اندازه گیـری می شود. در صورتی که اشعه ساتع شده گاما باشد، دستگاه گاماکانتر و اگر اشعه بتا باشـد، دسـتگاه بتـا کـانتر بـه کـار گرفته می شود. در این مورد باید خطرات ناشی از رادیواکتیویته مورد توجه قرار گیرد و نیز از ایزوتوپ هـایی اسـتفاده شود که نیمه عمر کوتاه تری دارند. جهت نشان دار کردن هورمون های تیروئید، بیشتر از ید رادیواکتیـو ۱۲۵ بـه دلیـل دارا بودن نیمه عمر ۶۰ روزه و استقامت بالا استفاده می شود. کاربرد ید به جهت میل ترکیبی بالای آن به تیـروزین بـه عنوان اسید آمینه موجود در تمامی هورمون های پلی پپتیدی با قابلیت شمارش بالامی باشد. اشعه گامـا حاصـل از یـد رادیواکتیو ۱۲۵ قدرت نفوذ بالایی دارد در حالی که اشعه بتا حاصل از ید رادیواکتیو ۱۲۵ با قـدرت نفـود کـم چنـدان قابل استفاده نیست[۹، ۱۵، ۵۱، ۵۳].

۱-۱۳-۲- روش RT_3Up[1]

اساس این روش بدین شرح است که از مکان های خالی پروتئین جاذب تیروکسین شـامل گلوبـولین، آلبـومین و پـره آلبومین استفاده می شود. ۹۵٪ پروتئین جاذب این هورمون گلوبولین است. در این روش میل ترکیبی گلوبولین به تری

1. Resin Triiodothyronine Uptake

یدوتیرونین نشان دار اندازه گیری می شود. در حقیقت در این روش تری یدوتیرونین خون تعیین مقدار نمـی گـردد و به غلط این آزمون به نام تست RT_3Up مشهور شده است[۱۵].

بخشی از گلوبولین به تیروکسین متصل شده و بخشی دیگر هنوز دارای محل های خالی در مولکول خود برای اتصال می باشد. لذا این آزمون بر اساس میزان اشباع نشده گلوبولین استوار است. در عمل سرم را با مقدار مشخصی تری یدوتیرونین نشان دار مخلوط و در حرارت مناسب قرار می دهند تا واکنش به حالت تعادل برسد. سپس مقداری از یک جسم خنثی مانند گلبول قرمز و رزین که تنها توانایی جذب مقادیر اضافی تری یدوتیرونین را دارد، جهت استخراج هورمون آزاد به محیط افزوده و با سانتریفیوژ آن را خارج می سازند. سپس میزان رادیواکتیویته آن را اندازه گیری می نمایند. به این ترتیب هر چه تعداد محل های اتصال آزاد روی گلوبولین بیشتر باشد، تیروکسین یا تری یدوتیرونین کمتری توسط رزین برداشت می شود. این آزمایش همزمان روی سرم تست و سرم شاهد انجام گرفته و نتیجه به صورت درصد بیان می شود[۵۱، ۵۳].

این آزمون به تنهایی به ویژه در موارد تشخیص کم کاری تیروئید، از حساسیت لازم برخوردار نمی باشـد بلکـه ارزش عمده این آزمون محاسبه عیار تیروکسین آزاد[1] است. محاسبه مقدار عیار تیروکسین آزاد بـا اسـتفاده از میـزان RT_3Up مطابق رابطه ۱-۱ می باشد[۵۱].

$$\text{عیار تیروکسین آزاد} = \frac{\text{درصد تری یدوتیرونین جذب شده به رزین} \times \text{تیروکسین تام سرم}}{\text{میانگین تری یدوتیرونین جذب شده به رزین سرم}} \qquad (۱-۱)$$

فاکتورهایی نظیر از دست دادن گلوبولین در افراد مبتلا به سندرم نفروتیک، کاهش سنتز گلوبولین، داروهایی که با هورمون تری یدوتیرونین درجایگزین شدن روی گلوبولین رقابت می کنند، سبب افزایش میزان RT_3Up می شوند. همچنین داروهای ضد انعقاد مانند هپارین و کومارین با مکانیسم های نامشخص موجب افزایش میزان RT_3Up خواهند شد. کاهش میزان RT_3Up نیز در صورت افزایش سنتز گلوبولین رخ خواهد داد[۵۱، ۵۳].

1. Free T_4 Index(FT_4I)

۱-۱۳-۳- سنجش آزمایشگاهی عیار تیروکسین آزاد

این آزمون روش دقیق بررسی وضعیت غده تیروئید است. مقدار عیار تیروکسین آزاد مطابق رابطه ۱-۲ برابر است با تفاضل تیروکسین تام و گلوبولین که تیروکسین باند شده به پروتئین است. در این مورد عدد ثابت واکنش مطابق قانون اثر جرم ها محاسبه می شود. به عبارت دیگر در حالت تعادل شیمیایی، قانون اثر جرم بین غلظت هورمون های سرم برقرار می شود[۵۱].

غلظت تیروکسین آزاد سرم × غلظت تیروگلوبولین غیر متصل به تیروکسین= ثابت واکنش × غلظت تیروگلوبولین متصل به تیروکسین(۱-۲)

افزایش تیروکسین و تیروگلوبولین آزاد باعث افزایش محصول آن ها یعنی غلظت تیروگلوبولین متصل به تیروکسین خواهد شد. بنابراین باید تدبیری اندیشید که افزایش تیروکسین آزاد و یا تیروگلوبولین آزاد به طور افتراقی معلوم گردد. بهترین راه تعیین مقدار تیروکسین آزاد است. راه دیگر محاسبه عیار تیروکسین آزاد می باشد[۵۳، ۵۱].

بر طبق رابطه ۱-۳ با به کار بردن غلظت تیروکسین پلاسما و برداشت رزین، میزان عیار تیروکسین آزاد محاسبه می شود. هدف این رابطه کاهش تغییرات مربوط به هورمون تیروگلوبولین تغییر یافته می باشد[۵۱].

عیار تیروکسین آزاد= برداشت رزین × غلظت تیروکسین پلاسما (۱-۳)

به علت اثرات متغیر پروتئین متصل شونده، بررسی تیروکسین بایستی ترجیحاً همراه با آزمایش برداشت رزین هورمون تیروکسین و تری یدوتیرونین انجام گیرد و عیار تیروکسین آزاد محاسبه گردد[۵۳، ۵۱].

۱-۱۳-۴- سنجش آزمایشگاهی تیروکسین آزاد

تغییر غلظت پروتئین های باند کننده تیروکسین، میزان این هورمون در سرم را افزایش و کاهش می دهد. در شرایطی که دارو یا سایر عوامل منجر به افزایش ظرفیت اتصالی پروتئین ها می شوند، میزان تیروکسین سرم افزایش می یابد. این تغییرات با تغییر وضعیت بالینی بیمار مطابقت نمی کند. در چنین شرایطی تیروکسین آزاد، ارتباط بسیار نزدیک تری با وضعیت بالینی بیمار نشان می دهد. روش اندازه گیری در این تست، رادیوایمنواَسی است. در این مورد تیروکسین آزاد واجد ید رادیواکتیو را به صورت استاندارد از متصل ساختن به پروتئین و دیالیز کردن به وسیله کلرور منیزیم رسوب می دهند و میزان رادیواکتیویته را با دستگاه گاما کانتر اندازه می گیرند. روش رادیوایمونواَسی برای

اندازه گیری تیروکسین آزاد، اختلالات مربوط به پروتئین های بانـد کننـده هورمـون را بهتـر از عیـار تیروکسـین آزاد اصلاح می کند[۵۳، ۵۱].

۱-۱۳-۵- سنجش آزمایشگاهی تری یدوتیرونین

مقدار تری یدوتیرونین سرم معمولاً توسط روش های ایمونواَسی با استفاده از آنتی سرم های بسیار اختصاصی بر ضـد تری یدوتیرونین که واکنش متقاطع آن ها با تیروکسین کم است و یک ماده بلوک کننـده نظیـر سالیسـیلات سـدیم بـه منظور جلوگیری از اتصال اندوژن تری یدوتیرونین به پروتئین اندازه گیـری مـی شـود. تـری یـدوتیرونین نسـبت بـه تیروکسین اتصال سست تری به پروتئین های سرم داشته و مقدار نسـبتاً بیشـتری از تـری یـدوتیرونین در مقایسـه بـا تیروکسین به شکل آزاد و قابل انتشار وجود دارد. حدود ۰/۳٪ تری یدوتیرونین به فرم آزاد و غیر متصـل بـه پـروتئین می باشد. تری یدوتیرونین آزاد سرم مشابه روش های اندازه گیری تیروکسـین آزاد سـرم تعیـین مقـدار مـی شـود. از آنجایی که در ۲۰ تا ۳۰٪ بیماران کم کار تیروئید مقدار تری یدوتیرونین سرم نرمال است، بنـابراین در افـراد مشـکوک به این بیماری اندازه گیری تری یدوتیرونین سرم چندان مفید نمی باشد. مقدار تری یدوتیرونین سرم تنهـا در بیمـاران مبتلا به فرم شدید بیماری کم کاری تیروئید که میزان هورمون تیروکسین در آن ها کمتر از ۲ میکروگرم بر دسـی لیتـر می باشد کاهش می یابد. علاوه بر این کاهش تری یدوتیرونین سرم همراه با تغییرات دیگـری در آزمایشـات عملکـرد تیروئید ممکن است در بیماران مبتلا به انواع مختلفی از بیماری های غیر تیروئیـد مشـاهده گـردد. در افـراد مبـتلا بـه بیماری های حاد نظیر انفارکتوس میوکارد، تری یدوتیرونین سرم به سرعت کاهش یافتـه و طـی مـدت چهـار روز بـه نصف میزان طبیعی خود می رسد. غلظت تری یدوتیرونین در خون بند ناف نیز پایین بوده اما در طـی اولـین سـاعات زندگی به سرعت افزایش یافته و به مقادیر بیش از افراد بالغ سالم نیـز خواهـد رسـید. بـا افـزایش سـن غلظـت تـری یدوتیرونین سرم به طور پیشرونده ای کاهش می یابد. بیمارانی که داروهای تیروئیـد حـاوی تـری یـدوتیرونین ماننـد فراورده های حاصل از خشک کردن تیروئید و یا مخلوطی از تری یدوتیرونین و تیروکسین صناعی مصرف می کنند و یا بیمارانی که تنها با هورمون تری یدوتیرونین درمان می شوند نتایج حاصل از اندازه گیری تری یدوتیرونین در آن ها غیر قابل تفسیر است. مگر در صورتی که زمان مصرف هورمون مشخص باشد. مصرف تری یدوتیرونین باعث افزایش غلظت تری یدوتیرونین خون می شود که حداکثر این افزایش بین دو تا چهار ساعت رخ می دهد. در بیمارانی که تنها

تحت درمان با دوزهای روزانه هورمون تیروکسین هستند، میزان تری یدوتیرونین سرم پس از مصرف دارو به صورت پیک افزایش ناگهانی نمی یابد و مقادیر ثابت این هورمون در سرم که ناشی از تبدیل محیطی تیروکسین به تری یدوتیرونین می باشد چند هفته پس از درمان حاصل می شود[۵۱، ۵۳].

۱-۱۴- ضرورت انجام کار

از میان مسائل و مشکلات بشری، صنعت داروسازی به دلیل اثرات مهم و قابل توجه در سلامت بشر جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص می دهد. مطالعه کیفی و بررسی اثربخشی فراورده های دارویی بر علائم بالینی و آزمون های آزمایشگاهی بیماران به دلیل نشان دادن اختلاف فرمولاسیون های ارائه شده توسط کارخانجات متعدد اهمیت ویژه ای دارد. اختلاف فرمولاسیون فراورده های دارویی مشابه تولید شده در کارخانجات مختلف تفاوت های زیادی در اثرات درمانی آن ها ایجاد می کند. این مسئله به ویژه در مورد داروهایی با شاخص درمانی پایین مانند لووتیروکسین سدیم اهمیت دارد. با توجه به شیوع رو به رشد بیماری کم کاری تیروئید، عدم وجود اطلاعات کافی در مورد کنترل کیفی فراورده های لووتیروکسین موجود در بازار دارویی ایران، مطالعات اندک اثربخشی این محصولات بر علائم بالینی و آزمایشگاهی در ایران و عدم اطمینان پزشکان در جایگزین نمودن فراورده های مختلف لووتیروکسین موجود در بازار دارویی با یکدیگر نیاز به انجام این گونه مطالعات احساس شد. در سال ۱۹۹۱ در کالیفرنیا دو فراورده تجاری و ژنریک مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند. آنالیز این قرص ها با روش HPLC نشان داد که محتوی دارو ژنریک ۳۰٪ کمتر از مقدار استاندارد تأیید شده توسط سازمان غذا و دارو آمریکا است. این بررسی مقدار ماده موثره استاندارد مطابق کتاب مرجع USP را در محدوده ۱۱۰-۹۰٪ ذکر می کند[۱۴]. دکتر فرهنگی در سال ۱۳۸۶ سرعت انحلال، مقدار و یکنواختی ماده موثره فراورده های لووتیروکسین تولید شده در دو کارخانه ابوریحان و برلین شیمی را مورد ارزیابی قرار داد. در این بررسی سرعت انحلال دارو ایرانی با دارو خارجی تفاوت معنی داری داشت اما مقدار و الگوی یکنواختی ماده موثره در قرص های ایرانی تفاوت معنی داری با مقدار و الگوی یکنواختی ماده موثره در قرص های برلین شیمی نشان نداد[۱۵]. دکتر ابراهیم خمسه طی کارآزمایی بالینی به روش طراحی متقاطع و تصادفی برای مقایسه اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین ساخت دو کارخانه ایرانی و آلمانی به روش رادیوایمنواَسی مشاهده کرد که دارو ایرانی با مشابه خارجی از نظر اثربخشی بالینی و ابعاد تیروئید تفاوت معنی داری

ندارند[۱۶]. در سال ۲۰۰۶ در استرالیا ناخالصی های حاصل از تخریب چهار فراورده تجاری لووتیروکسین با روش LC-Mass اندازه گیری شد. در این بررسی مشاهده شد که دو ترکیب مونویدوتیرونین و تیرونین به مقدار زیادی در فرمولاسیون دو دارو تجاری موجود است[۵۲].

در مطالعه حاضر پارامترهای برون تن و اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های مختلف لووتیروکسین موجود در بازار دارویی کشور با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روشها

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲-۱ آورده شده است.

جدول ۲-۱ مواد مورد استفاده به ترتیب حروف الفبا

نام ماده	نام شرکت و کشور سازنده
آب دیونیزه	-
استونیتریل	مرک – آلمان
اسید فسفریک	مرک – آلمان
اسید کلریدریک	مرک – آلمان
پودر استاندارد تئوفیلین	مرک – آلمان
پودر استاندارد لووتیروکسین	سیگما – آمریکا
پودر استاندارد تری یدوتیرونین	سیگما – آمریکا
پودر استاندارد تیروزین	سیگما – آمریکا
پودر استاندارد تیرونین	سیگما – آمریکا
پودر استاندارد دی یدوتیروزین	سیگما – آمریکا
پودر استاندارد مونویدوتیروزین	سیگما – آمریکا
پودر استاندارد دی یدوتیرونین	سیگما – آمریکا
سدیم لوریل سولفات	مرک – آلمان
سدیم هیدروکسید	مرک – آلمان
متانول	مرک – آلمان

۲-۲- دستگاه ها و وسایل

دستگاه ها و وسایل مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۲-۲ آورده شده است.

جدول ۲-۲ دستگاه ها و وسایل مورد استفاده به ترتیب حروف الفبا

نام وسیله و دستگاه	Mark
التراسونیک	FUNGILAB US-9
بن ماری	Memmert
pH متر	CORNING
ترازوی دیجیتال	Sartorius Basic BA-110
دیسولوشن	ERWEKA DT-60
دیونیزاتور	MAXIMA USF ELGA
سانتریفیوژ لوله	Hettich Zentrifugen ROTOFIX-32
ستون HPLC	Shimadzu-Shim-Pack CLC-ODS
سرنگ همیلتون	COSGE 25F-LC
سمپلر	BIOHIT PROLIN 20-200 microlitere
سمپلر	BIOHIT PROLIN 1000 microlitere
فیلتر	0.45 micro meter KURABO
کاغذ صافی	Whatman Ashless Circles 125 mm Dia
کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا	Shimadzu LC-6A
ورتکس	ZX³ VELP Scientifica
هیتر-استیرر	ZX³ VELP Scientifica

۲-۳- مشخصات فراورده های لووتیروکسین مورد مطالعه

مشخصات فراورده های لووتیروکسین مورد مطالعه در جدول ۲-۳ آورده شده است.

جدول ۲-۳ مشخصات فراورده های لووتیروکسین مورد مطالعه

ردیف	نام و شکل دارویی	کارخانه و کشور تولید کننده	مقدار ماده موثره در شکل دارویی	سری ساخت	تاریخ انقضاء
۱	قرص لووتیروکسین سدیم	ایران هورمون- ایران	۱۰۰ میکروگرم	۶۰۱	۰۷ / ۲۰۱۰
۲	قرص لووتیروکسین سدیم	ایران هورمون- ایران	۱۰۰ میکروگرم	۶۳۵	۰۷ / ۲۰۱۰
۳	قرص لووتیروکسین سدیم	ایران هورمون- ایران	۱۰۰ میکروگرم	۶۶۵	۰۷ / ۲۰۱۰
۴	قرص لووتیروکسین سدیم	ایران هورمون- ایران	۱۰۰ میکروگرم	۷۱۴	۰۹ / ۲۰۱۰
۵	قرص لووتیروکسین سدیم	ایران هورمون- ایران	۱۰۰ میکروگرم	۷۲۰	۰۹ / ۲۰۱۰
۶	قرص لووتیروکسین سدیم	برلین شیمی- آلمان	۱۰۰ میکروگرم	۱۵	۰۹ / ۲۰۱۰
۸	قرص لووتیروکسین سدیم	برلین شیمی- آلمان	۱۰۰ میکروگرم	۱۶	۰۹ / ۲۰۱۰

۲-۴- آزمون های برون تن

۲-۴-۱- معتبرسازی روش آنالیز

معتبرسازی روش های آنالیز برای پیشرفت صنعت داروسازی امری حیاتی است. معتبرسازی فرایندی است که سبب اطمینان یافتن از تناسب روش طراحی شده برای هدف مورد نظر می شود و برای کارهای مشابه قابل اطمینان و تکرار پذیر است. در فرایند معتبرسازی روش آنالیز شاخص های انتخابی بودن، خطی بودن، صحت، دقت، حد تشخیص، حد تعیین مقدار مورد ارزیابی قرار می گیرد که هر کدام به طور مختصر توضیح داده می شود.

۲-۴-۱-۱- انتخابی بودن[3]

این مفهوم توانایی روش آنالیز برای شناسایی یک آنالیت در حضور سایر مواد بی اثر به کار رفته در فرمولاسیون، اکسیپیان ها، مواد حاصل از تخریب ماده موثره و ناخالصی ها می باشد به گونه ای که این مواد جانبی در پاسخ حاصل از ماده آنالیز شونده تداخلی ایجاد نکنند. به عبارت دیگر در یک روش انتخابی تنها یک پاسخ از ماده آنالیز شونده مشاهده می شود. در کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا انتخابی بودن روش آنالیز با انتخاب ستون مناسب و تنظیم شرایط کروماتوگرافی از قبیل ترکیب فاز متحرک، دمای ستون و طول موج مناسب دتکتورحاصل می شود[۵۵،۵۴].

۲-۴-۱-۲- خطی بودن[4]

این مفهوم به معنای ارتباط مستقیم و خطی پاسخ دستگاه و غلظت نمونه است. جهت بررسی خطی بودن یک روش، غلظت هایی از ماده استاندارد در محدوده ۱۵۰-۵۰٪ غلظت ماده هدف با استفاده از روش مربوط به دستگاه آنالیزگر تزریق شده و پاسخ دستگاه سنجیده می شود. سپس با ترسیم منحنی کالیبراسیون که رسم نمودار پاسخ دستگاه در برابر غلظت استاندارد می باشد، معادله منحنی مربوطه و ضریب رگرسیون محاسبه می شود. در صورتی که ضریب رگرسیون بیشتر از ۰/۹۹ باشد، روش و کالیبراسیون خطی است[۵۶،۵۴].

۲-۴-۱-۳- صحت[5]

صحت به معنای نزدیک بودن مقدار اندازه گیری شده حاصل از یک بررسی به مقدار واقعی در یک نمونه می باشد. یکی از روش های رایج ارزیابی صحت، آنالیز یک نمونه با غلظت مشخص است. صحت قابل قبول بستگی به ماتریکس نمونه، روش آماده سازی نمونه و غلظت ماده آنالیز شونده دارد. جهت بررسی صحت آزمون در سه روز متوالی سه نمونه از هر یک از سه غلظت استاندارد ۸، ۱۰ و ۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر لووتیروکسین تهیه شد. سپس این نمونه های استاندارد تعیین مقدار شد و درصد لووتیروکسین در هر محلول استاندارد محاسبه گردید. محدوده صحت قابل قبول ۱۰۲٪-۹۸ در نظر گرفته شد[۵۷،۵۴].

1. Selectivity
2. Linearity
3. Accuracy

۲-۴-۱-۴- دقت[1]

دقت یک روش، نزدیک بودن نتایج حاصل از تعیین مقدار یک ماده آنالیز شونده را پس از تکرار روش بیان می کند. دقت روش با توجه به فاکتورهای مورد نظر به چند گروه تقسیم می شود:

۲-۴-۱-۴-۱- دقت دستگاه کروماتوگرافی

جهت بررسی دقت دستگاه در یک روز پنج تزریق از سه غلظت متفاوت انجام شد. سپس درصد انحراف معیار نسبی محاسبه شد و انحراف معیار نسبی کمتر یا مساوی ۱٪ قابل قبول در نظر گرفته شد[۵۸،۵۴].

۲-۴-۱-۴-۲- تکرار پذیری[2]

تکرار پذیری روش آنالیز در یک آزمایشگاه و توسط یک فرد و یک نوع دستگاه و در مدت زمان نسبتاً کوتاه تعیین می شود. لذا از هر یک سه غلظت استاندارد، سه بار تهیه شد و هر یک از نمونه ها پنج بار تعیین مقدار گردید. سپس درصد انحراف معیار نسبی محاسبه شد. انحراف معیار نسبی کمتر یا مساوی ۲٪ قابل قبول در نظر گرفته شد[۵۹،۵۴].

۲-۴-۱-۵- حد تشخیص[3]

غلظتی از ماده آنالیز شونده که توسط روش طراحی شده در نمونه مربوط شناسایی شود، حد تشخیص نام دارد. در کروماتوگرافی، حد تشخیص حد قابل شناسایی غلظتی از ماده آنالیز شونده است که پیکی با ارتفاع سه برابر نویز دستگاه نشان می دهد[۶۰،۵۴].

1. Precision
2. Repeatability
3. Limit of Detection

۲-۴-۱-۶- حد تعیین مقدار[1]

حداقل غلظتی از ماده آنالیز شونده که توسط روش طراحی شده در دامنه مربوط به طور دقیق تعیین مقدار شود، حد تعیین مقدار نام دارد. این مفهوم در کروماتوگرافی، غلظتی از ماده آنالیز شونده است که پیکی با ارتفاع ۱۰ برابر نویز دستگاه نشان می دهد[۵۴،۶۰].

۲-۴-۲- آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص لووتیروکسین سدیم

تعیین مقدار ماده موثره یکی از آزمون های برون تن رایج کنترل کیفی است. هدف این آزمون بررسی میزان ماده موثره موجود در فراورده های دارویی تولید شده و مقایسه نتیجه بدست آمده از این آزمون با مقادیر استاندارد، جهت بررسی کفایت کمی میزان ماده موثره به کار رفته در هر یک از خط تولیدهای متعدد کارخانجات مختلف، بدون بررسی مقدار ماده موثره در هر واحد دوز دارویی است[۵۴].

۲-۴-۲-۱- تهیه محلول استاندارد لووتیروکسین

۵۰ میلی گرم پودر استاندارد لووتیروکسین در یک بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتری پوشیده شده با فویل آلومینیوم در ۱۰ میلی لیتر متانول حل و به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه شد. سپس با متانول به حجم می رساندیم. به این ترتیب محلول استوک استاندارد ۲۰۰ میکروگرم بر ۱۰ میلی لیتر لووتیروکسین سدیم بدست آمد. از این استوک به کمک فاز متحرک رقت های ۶۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰، ۱۴۰ میکروگرم بر ۱۰ میلی لیتر تهیه شد. سپس در هر یک از رقت های استاندارد تهیه شده به کمک یک سمپلر دقیق معادل ۱۰۰ میکرولیتر محلول استوک تئوفیلین افزودیم[۵۴،۱۵].

۲-۴-۲-۲- تهیه محلول استوک استاندارد داخلی

۵۰ میلی گرم پودر استاندارد تئوفیلین توزین شد و در ۲۵۰ میلی لیتر آب و متانول به نسبت ۱ به ۱ کاملاً حل شد. از این استوک استاندارد بدست آمده به وسیله یک سمپلر دقیق معادل ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به هر یک از تیوپ های سانتریفیوژ حاوی لووتیروکسین سدیم تست و استاندارد افزودیم[۵۴].

۲-۴-۲-۳- شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

مدل دستگاه: Shimadzu LC-6A

1. Limit of Quantification

ستون: Shim-Pack CLC-ODS(6mm ID×15cm)

فاز متحرک: متانول–اسید فسفریک ۰/۱٪ به نسبت ۶۰:۴۰ با اسیدیته ۳/۴

سرعت فاز متحرک: ۲ میلی لیتر بر دقیقه

سیستم ردیاب: ماوراء بنفش

طول موج: ۲۲۵ نانومتر

دمای ستون: ۶۰ درجه سانتیگراد[۵۴،۱۵].

۲-۴-۲-۴- رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت

چنانچه محور عمودی را محور غلظت و محور افقی را محور پاسخ پیک دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا بر حسب سطح زیر پیک و به صورت یک کسر در نظر بگیریم، صورت کسر سطح زیر پیک نمونه تست تزریق شده و مخرج کسر سطح زیر پیک استاندارد تئوفیلین است. رسم منحنی کالیبراسیون با تزریق هفت رقت استاندارد لووتیروکسین تهیه شده که هر یک از این رقت ها حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محلول استوک استاندارد داخلی نیز می باشند، انجام شد. از هر یک از رقت های ساخته شده حجم ۲۰ میکرولیتر توسط سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق شد. تزریق هر یک از رقت ها جهت بررسی تکرار پذیری، شش مرتبه برای هر نمونه انجام شد. به این ترتیب سطح زیر پیک هر یک از رقت های تزریق شده به همراه سطح زیر پیک استاندارد داخلی همان نمونه استاندارد به دست آمد. حاصل تقسیم دو سطح زیر پیک و رسم آن در برابر رقت های ساخته شده منحنی کالیبراسیون رسم گردید[۵۴].

۲-۴-۲-۵- روش کار

۲۰ عدد قرص لووتیروکسین سدیم از چند خط تولید هر یک از کارخانجات ایرانی و خارجی یک به یک به دقت توزین شد و وزن میانگین ۲۰ عدد قرص از هر سری ساخت محاسبه شد. سپس قرص های هر سری ساخت را جداگانه به طور کاملاً یکنواخت پودر نمودیم. از هر سری ساخت، پنج نمونه و هر یک معادل وزن میانگین هر ۲۰ قرص، جهت انجام آزمون تعیین مقدار ماده موثره تهیه شد. مراحل انجام این آزمون به این شرح است که وزن میانگین ۲۰ قرص هر سری ساخت که معادل ۱۰۰ میکروگرم لووتیروکسین سدیم است به یک تیوپ سانتریفیوژ منتقل کرده و معادل ۱۰۰ میکرولیتر از استوک استاندارد داخلی تئوفیلین به پودر داروی تست می افزاییم و با ۱۰ میلی لیتر از متانول

حدود سه دقیقه ورتکس نموده و بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه شد. سپس نمونه ها به مدت پنج دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی شفاف بدست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد. نمونه به دست آمده بلافاصله به دستگاه تزریق شد. تمامی مراحل تعیین مقدار ماده موثره در محلول تست، در شرایط دور از نور و گرما انجام شد. نمونه ها با فویل آلومینیوم تا حد امکان حفاظت شدند. در صورت فاصله افتادن زمان تهیه نمونه و زمان تزریق، نمونه ها در دمای ۴ درجه نگه داری شدند. سپس معادل ۲۰ میکرولیتر از محلول تست تهیه شده که حاوی استاندارد داخلی می باشد، به دستگاه تزریق نمودیم و با استفاده از منحنی کالیبراسیون، مقدار لووتیروکسین موجود در نمونه های مورد آزمایش محاسبه شد. سپس درصد ماده موثره لووتیروکسین در هر تزریق و میانگین درصد ماده موثره فراورده های تولید شده در هر دو کارخانه ایرانی و خارجی و نیز هر یک از سری ساخت های این کارخانجات محاسبه شد. مطابق کتاب مرجع USP 31، درصد ماده موثره استاندارد برای هر سری ساخت معادل ۱۱۰-۹۰٪ می باشد[۵۴،۱۵].

تعیین مقدار ماده موثره قرص های لووتیروکسین برای هر یک از فراورده های تولید شده در کارخانه ایران هورمون از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ و همچنین کارخانه برلین شیمی آلمان از سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ انجام شد.

۲-۴-۳- آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره در قرص لووتیروکسین سدیم

تعیین یکنواختی ماده موثره یک آزمون برون تن رایج جهت بررسی کیفی فراورده های تولید شده در کارخانجات مختلف و مقایسه آن با مقادیر استاندارد می باشد. هدف از انجام این آزمون تعیین مقدار ماده موثره موجود در هر واحد دوز دارویی تولید شده در هر سری ساخت به صورت مجزا می باشد. به این ترتیب همگونی و یکنواختی مقدار ماده موثره موجود در هر واحد دوز دارویی مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت[۵۴].

۲-۴-۳-۱- تهیه محلول استاندارد لووتیروکسین

تهیه محلول استاندارد برای انجام آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره مطابق توضیحات بیان شده در بخش ۲-۴-۲-۱ می باشد[۵۴،۱۵].

۲-۴-۳-۲- تهیه محلول استوک استاندارد داخلی

تهیه محلول استوک استاندارد داخلی برای انجام آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره مطابق توضیحات بیان شده در بخش ۲-۴-۲-۲ می باشد.

۲-۴-۳-۳- شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

شرایط دستگاه کروماتوگرافی برای انجام آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره مطابق توضیحات بیان شده در بخش ۲-۴-۲-۳ می باشد.

۲-۴-۳-۴- رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت

رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت برای انجام آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره مطابق توضیحات بیان شده در بخش ۲-۴-۲-۴ می باشد.

۲-۴-۳-۵- روش کار

مطابق روش ۹۰۵ موجود در کتاب USP 31 و با توجه به عدم وجود روکش در فرمولاسیون قرص های لووتیروکسین سدیم و دوز کمتر از ۲۵ میلی گرم در هر عدد قرص، روش کانتنت یونی فورمیتی[1] جهت بررسی یکنواختی ماده موثره موجود در فراورده های دارویی لووتیروکسین سدیم مورد آزمایش انجام شد.

تعداد ۱۰ قرص لووتیروکسین سدیم از هر سری ساخت هر یک از کارخانجات ایرانی و خارجی مورد بررسی قرار گرفت. هر یک از قرص های هر سری ساخت را جداگانه به صورت انفرادی و کاملاً یکنواخت پودر نمودیم. جهت انجام آزمون یکنواختی ماده موثره یک عدد قرص لووتیروکسین سدیم پودر شده را به یک تیوپ سانتریفیوژ منتقل کردیم و توسط یک سمپلر دقیق حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استوک استاندارد داخلی تئوفیلین به پودر داروی تست افزودیم و با ۱۰ میلی لیتر از متانول حدود سه دقیقه ورتکس نموده و بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه کردیم. سپس نمونه ها به مدت سه دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی شفاف بدست آمده را از کاغذ صافی عبور دادیم. تمامی مراحل تعیین محلول تست در شرایط دور از نور و گرما انجام شد و نمونه ها با فویل آلومینیوم تا حد امکان حفاظت شدند. در صورت فاصله افتادن زمان تهیه نمونه و زمان تزریق، نمونه ها در دمای ۴

1. Content Uniformity

درجه نگه داری شدند. جهت آنالیز نمونه ها، حجم ۲۰ میکرولیتر از محلول تست تهیه شده که حاوی استاندارد داخلی می باشد به دستگاه تزریق نموده و با استفاده از منحنی کالیبراسیون، مقدار لووتیروکسین و یکنواختی میزان ماده موثره در نمونه های مورد آزمایش محاسبه شد. سپس درصد ماده موثره لووتیروکسین برای هر یک از قرص های تولید شده در هر خط تولید توسط هر یک از کارخانه های ایرانی و خارجی محاسبه شد. همچنین میانگین درصد ماده موثره فراورده ها گزارش شد. بررسی یکنواختی ماده موثره قرص های لووتیروکسین برای هر یک از فراورده های تولید شده در کارخانه ایران-هورمون از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ و همچنین کارخانه برلین-شیمی آلمان از سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ انجام شد[۵۴،۶۰].

۲-۴-۴- آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم

آزمون برون تن انحلال قرص لووتیروکسین سدیم مطابق مرجع USP 31 تحت دو شرایط انجام شد. در آزمون شماره ۱ محیط انحلال حاوی اسید و سورفاکتانت می باشد. شرایط آزمون ۲ انحلال تقریباً شبیه به آزمون انحلال قبل و با محیط انحلال حاوی اسید، فاقد سورفاکتانت و دور گردش بیشتر دستگاه دیسولوشن مطابق جدول ۲-۴ طراحی شده است[۵۴].

جدول ۲-۴ شرایط دستگاه دیسولوشن جهت انجام آزمون انحلال تحت شرایط ۱ و ۲ [۵۴].

	آزمون انحلال ۱	آزمون انحلال ۲
نوع دستگاه	Paddel , USP Type II	Paddel , USP Type II
سرعت چرخش(rpm)	۵۰	۷۵
محیط انحلال	اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال حاوی ۰/۲ ٪ سدیم لوریل سولفات	اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال
حجم محیط انحلال(میلی لیتر)	۵۰۰	۵۰۰
دمای انحلال(درجه سانتیگراد)	۳۷/۵±۰/۵	۳۷/۵±۰/۵
زمان انحلال(دقیقه)	۴۵	۴۵

۲-۴-۴-۱- تهیه محلول های استاندارد لووتیروکسین برای آزمون انحلال تحت شرایط ۱ و ۲

با استفاده از پودر استاندارد لووتیروکسین، یک محلول استوک با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در حلال متانول تهیه شد. این استوک در حجم ۵۰۰ میلی لیتر محیط انحلال رقیق شد. سپس با استفاده از محیط انحلال، رقت های ۰/۱۴، ۰/۱۶، ۰/۱۸، ۰/۲۰، ۰/۲۲، ۰/۲۴ و ۰/۲۶ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد[۵۴].

۲-۴-۴-۲- شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای آزمون انحلال تحت شرایط ۱ و ۲

شرایط دستگاه کروماتوگرافی برای انجام آزمون انحلال تحت شرایط ۱ و ۲ مطابق توضیحات بیان شده در بخش ۲-۴-۲-۳ می باشد. تنها فاز متحرک تست ۲ انحلال شامل آب-استونیتریل-اسید اورتو فسفریک ۸۵٪ به نسبت ۷۰۰: ۵۰۰: ۲ می باشد[۵۴].

۲-۴-۴-۳- روش کار تعیین سرعت انحلال در قرص لووتیروکسین سدیم برای آزمون انحلال ۱ و ۲

ابتدا به وسیله یک بالن ژوژه ۵۰۰ میلی لیتری حجم های یکسان آب مقطر درون وسل[1] های دستگاه دیسولوشن ریخته و پس از رسیدن دمای آب درون وسل به ۰/۵±۳۷ درجه سانتیگراد، جهت تهیه محیط انحلال آزمون ۱ به کمک یک سمپلر دقیق حجم ۲۷۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۱۸ نرمال به آب درون وسل افزودیم تا غلظت اسید به ۰/۰۱ نرمال برسد. سپس به کمک ترازوی دیجیتال ۱ گرم سدیم لوریل سولفات به عنوان سورفاکتانت محیط انحلال توزین شد و به محیط انحلال اضافه شد. به این ترتیب محیط انحلال آزمون ۱ حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال و ۰/۲٪ سدیم لوریل سولفات تهیه شد. همچنین جهت تهیه محیط انحلال آزمون ۲ مجدداً به کمک یک سمپلر دقیق حجم ۲۷۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۱۸ نرمال به آب درون وسل افزودیم تا غلظت اسید به ۰/۰۱ نرمال برسد. به این ترتیب محیط انحلال آزمون ۲ حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال و بدون سورفاکتانت حاصل گردید. برای انجام آزمون انحلال ۱ دستگاه دیسولوشن با دور گردش ۵۰ rpm و برای آزمون انحلال ۲ دستگاه با دور گردش ۷۵ rpm تنظیم شد. در طول انجام آزمون دمای آب درون وسل دائماً توسط دماسنج کنترل شد. سپس دستگاه دیسولوشن را روشن نموده و به طور همزمان شش عدد قرص لووتیروکسین سدیم را در هر یک از وسل ها انداخته و در بازه های زمانی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه از سطحی ترین قسمت محیط انحلال نمونه برداری نمودیم. پس از فیلتر کردن نمونه بلافاصله پس از نمونه گیری جهت بررسی سرعت انحلال فراورده مورد آزمایش، حجم ۲۰ میکرولیتر توسط سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق شد. حجم برداشت نمونه از محیط انحلال در هر مرتبه برداشت ۲ میلی لیتر بوده و بلافاصله پس از برداشت نمونه معادل حجم برداشت شده، محیط انحلال به وسل اضافه شد تا در نهایت حجم کلی

1. Vessel

محیط انحلال در طول انجام آزمایش ثابت بماند. جهت بررسی صحت داده های حاصل از انجام هر دو نوع آزمون دیسولوشن هر یک از نمونه های فیلتر شده، پنج مرتبه تزریق گردید. حجم تزریق به دستگاه ۲۰ میکرولیتر است. به این ترتیب مقدار لووتیروکسین موجود در نمونه های مورد آزمایش جهت انجام هر دو آزمون دیسولوشن با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه شد. در تمام مراحل محلول تست در شرایط دور از نور و گرما نگه داری شد و دستگاه دیسولوشن و ظروف حاوی نمونه با فویل آلومینیوم حفاظت شدند. در صورت فاصله افتادن زمان نمونه گیری و زمان تزریق، نمونه ها در دمای ۴ درجه نگه داری شدند. در این آزمون برون تن دو پارامتر انحلال شامل مدت زمان انحلال ۵۰٪ قرص لووتیروکسین سدیم[1] و مقدار داروی انحلال یافته در مدت زمان ۴۵ دقیقه[2] برای تمامی سری ساخت های هر دو کارخانه محاسبه شد[۶۱]. بررسی سرعت انحلال جهت انجام هر دو آزمون دیسولوشن برای ۱۸ عدد قرص لووتیروکسین سدیم از هر یک از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ از کارخانه ایران-هورمون و ۱۸ عدد قرص لووتیروکسین سدیم از هر یک از سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ کارخانه برلین شیمی آلمان انجام شد.

۲-۴-۴-۴- رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت برای آزمون انحلال ۱ و ۲

محور عمودی به عنوان محور غلظت ها و محور افقی همچنین محور پاسخ پیک دستگاه، بر حسب سطح زیر پیک در نظر گرفته می شود. رسم منحنی کالیبراسیون با تزریق هفت رقت استاندارد لووتیروکسین تهیه شده انجام شد. از هر یک از رقت های ساخته شده حجم ۲۰ میکرولیتر توسط سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق می شود. جهت بررسی تکرار پذیری طی سه روز متوالی شش مرتبه تکرار تزریق از هر یک از رقت ها انجام می شود. به این ترتیب سطح زیر پیک هر یک از رقت های تزریق شده به دست آمده و با رسم منحنی سطح زیر پیک در برابر غلظت، منحنی کالیبراسیون رسم گردید. از معادله به دست آمده از منحنی کالیبراسیون و قرار دادن سطح زیر پیک هر یک از نمونه ها در معادله کالیبراسیون، غلظت نمونه های تست محاسبه می شود[۵۴].

1. $T_{50}\%$
2. D_{max}

۲-۵- تعیین مقدار ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین با استفاده از متد HPLC

۲-۵-۱- تهیه محلول های استاندارد ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

۵۰ میلی گرم از هر یک از پودرهای استاندارد تیرونین، تیروزین، دی یدوتیرونین، دی یدوتیروزین، مونویدوتیروزین و تری یدوتیرونین را به دقت توزین نموده و هر یک را به طور مجزا در مخلوط متانول-سود ۰/۰۱ مولار به نسبت ۱:۱ حجمی-حجمی در یک بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری پوشیده شده با فویل آلومینیوم کاملاً حل می نماییم. جهت اطمینان از انحلال کامل پودرهای استاندارد در حلال مذکور، هر بالن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سونیکه می شود. سپس توسط حلال هر یک از بالن ها را به حجم می رسانیم. به این ترتیب محلول استوک استاندارد هر شش ترکیب با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بدست می آید. از هر استوک به کمک حلال رقت های ۵، ۲/۵، ۱/۶، ۱/۲۵، ۰/۸، ۰/۶۲۵، ۰/۴، ۰/۳۱، ۰/۲ و ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه می نماییم. سپس به کمک یک سمپلر دقیق حجم ۲۰ میکرولیتر محلول استوک تئوفیلین به حجم ۲ میلی لیتر از هر یک از رقت های استاندارد تهیه شده می افزاییم. در شرایطی که تزریق بلافاصله بعد از تهیه نمونه انجام نمی شود، محلول های استاندارد حفاظت شده در فویل آلومینیوم در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده می شوند. سپس جهت آنالیز نمونه حجم ۲۰ میکرولیتر از نمونه های استاندارد تهیه شده به دستگاه HPLC تزریق شد[۶۳-۶۱].

۲-۵-۲- تهیه محلول استوک استاندارد داخلی

۱۰ میلی گرم از پودر استاندارد تئوفیلین توزین نموده و در حجم ۲۵۰ میلی لیتر آب و متانول به نسبت ۱ به ۱ کاملاً حل می نماییم. از این استوک استاندارد بدست آمده معادل ۵۰ میکرولیتر به هر یک از تیوپ های سانتریفیوژ حاوی لووتیروکسین سدیم تست و محلول استاندارد می افزاییم[۶۲].

۲-۵-۳- شرایط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

به علت شباهت ساختاری ناخالصی های حاصل از تخریب لووتیروکسین جهت جلوگیری از هم پوشانی پیک های این ترکیبات و نیز تنظیم مدت زمان آنالیز، کروماتوگرافی به روش گرادیان با تنظیم نسبت فاز متحرک و سرعت جریان انجام می شود. فاز متحرک مورد استفاده متانول-اسید فسفریک ۰/۱٪ دیونیزه می باشد. در بازه زمانی ۰ تا ۱۵

دقیقه فاز متحرک متانول–اسید فسفریک ۰/۱٪ دیونیزه به نسبت ۷۰:۳۰ با سرعت جریان ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه می باشد. سپس در بازه زمانی ۱۵ تا ۲۶ دقیقه فاز متحرک متانول–اسید فسفریک ۰/۱٪ دیونیزه به نسبت ۶۵:۳۵ با سرعت جریان ۱/۸ میلی لیتر بر دقیقه می باشد. پس از اتمام آنالیز هر نمونه، برای قرار دادن سیستم در شرایط اولیه، فاز متحرک و سرعت جریان به مدت ۱۰ دقیقه تحت شرایط اولیه قرار داده می شود. آنالیز نمونه با استفاده از ستون Shim-Pack CLC-ODS(6mm ID×15cm) در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد انجام شد. همچنین سیستم ردیاب از نوع ماوراء بنفش و در طول موج ۲۴۰ نانومتر می باشد[۶۳–۶۱].

۲–۵–۴– رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه غلظت

چنانچه محور عمودی، محور غلظت ها و محور افقی را محور پاسخ پیک دستگاه بر حسب سطح زیر پیک و به صورت یک کسر در نظر بگیریم، صورت کسر سطح زیر پیک نمونه تست تزریق شده و مخرج کسر سطح زیر پیک استاندارد تئوفیلین می باشد. رسم منحنی کالیبراسیون با تزریق ۱۰ غلظت استاندارد لووتیروکسین تهیه شده که هر یک از این رقت ها حاوی ۵۰ میکرولیتر محلول استوک استاندارد داخلی نیز می باشند، انجام می شود. حجم ۲۰ میکرولیتر از هر یک از رقت های ساخته شده توسط سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق می شود. تزریق هر یک از رقت ها جهت بررسی تکرار پذیری، طی سه روز متوالی ۱۸ مرتبه برای هر نمونه انجام شد. به این ترتیب سطح زیر پیک هر یک از رقت های تزریق شده به همراه سطح زیر پیک استاندارد داخلی به دست آمد. در نتیجه تقسیم این دو و رسم آن در برابر غلظت های ساخته شده منحنی کالیبراسیون رسم می گردد[۵۴].

۲–۵–۵– روش کار

برای آماده سازی نمونه ابتدا ۱۰ عدد قرص از هر یک از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ از کارخانه ایران–هورمون و ۱۵ و ۱۶ از کارخانه برلین– شیمی آلمان به طور تصادفی انتخاب شد. سپس هر ۱۰ عدد قرص جداگانه توزین شد و میانگین وزن ۱۰ عدد قرص برای هر سری ساخت محاسبه می شود. پس از پودر نمودن هر ۱۰ قرص از هر سری ساخت به صورت مجزا از یکدیگر، معادل میانگین یک عدد قرص از هر سری ساخت به دقت توزین شد و در ۵ میلی لیتر از مخلوط متانول–سود ۰/۰۱ مولار به نسبت ۱:۱ حجمی–حجمی به روش گرادیان با انجام عمل ورتکس به مدت ۵ دقیقه کاملاً پراکنده شد. سپس این سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق

سونیکه می شود. در نهایت پس از سانتریفیوژ نمودن نمونه های تهیه شده با دور ۴۰۰۰ به مدت سه دقیقه، ذرات غیرمحلول توسط فیلتر از محلول جدا می شود. در تمامی این مراحل تیوپ سانتریفیوژ حاوی محلول توسط فویل آلومینیوم از نور محافظت می شود. همچنین در شرایطی که تزریق بلافاصله بعد از تهیه نمونه انجام نمی شود، محلول در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس برای آنالیز نمونه حجم ۲۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده به دستگاه HPLC تزریق شد[۶۳-۶۱].

۲-۶- طیف سنجی جرمی

طیف سنجی جرمی روشی تجزیه ای است که اطلاعات کمی و کیفی درباره وزن و ساختار مولکولی ترکیبات آلی و معدنی را در اختیار بشر قرار می دهد[۶۵].

دستگاه های طیف سنج جرمی قابلیت جداسازی تک تک ذراتی مانند اتم ها و مولکول های یونیزه شده را بر اساس تفاوت جرم آن ها از یکدیگر دارا می باشند. در این روند ابتدا مولکول ها و اتم ها با الکترون ها مانند آنچه در معادله ۲-۱ نشان داده شده است بمباران می شوند[۶۵].

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e \qquad (۲-۱)$$

$$E = ev \qquad (۲-۲)$$

$$E = \frac{1}{2} m v^2 \qquad (۲-۳)$$

سپس یون های بوجود آمده در یک میدان الکتریکی شتاب می گیرند. انرژی ذره برابر با حاصل ضرب بار ذره در ولتاژ است که در رابطه ۲-۲ ذکر گردیده است. همچنین انرژی ذره را می توان به صورت انرژی جنبشی نیز اندازه گیری کرد که در رابطه ۲-۳ نشان داده شده است. در نتیجه مقدار این دو انرژی با یکدیگر مطابق رابطه ۲-۴ برابر است[۶۵].

$$eV = \frac{1}{2} m v^2 \rightarrow v = \left(\frac{2eV}{m}\right)^{1/2} \qquad (۲-۴)$$

پارامترهای سه رابطه بالا شامل: e= بار یک الکترون، V= ولتاژ شتاب دهنده، m= جرم ذره و v= سرعت ذره می باشد. بنابراین می توان گفت که سرعت یک ذره به جرم آن بستگی دارد[۶۵].

پس از شتاب گرفتن ذرات، ذره های باردار توسط یک ولتاژ اعمال شده با زاویه قائمه وارد میدان مغناطیسی همگن B می شوند. این میدان با اعمال نیرو بر ذرات، آن ها را وادار می کند تا در یک مسیر دایره ای شکل حرکت کنند. نیروی

جاذبه مغناطیسی برابر با Bev است و نیروی گریز از مرکز متعادل کننده ذره برابر با $\frac{m v^2}{r}$ می باشد. همچنین r شعاع مسیر طی شده دایره ای شکل است. هنگامی که ذره در مسیر دایره ای حرکت یکنواخت می کند، این دو نیرو طبق رابطه ۲-۵ برابرند. در نتیجه با استفاده از رابطه ۲-۴ و جایگزین کردن آن در رابطه ۲-۵ رابطه ۲-۶ بدست می آید[۶۵].

$$\frac{m v^2}{r} = Bev \quad (۲-۵)$$

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad (۲-۶)$$

شعاع مسیر دایره ای ذره به ولتاژ شتاب دهنده، میدان مغناطیسی و نسبت جرم به بار ذره بستگی دارد. در صورت ثابت در نظر گرفتن ولتاژ شتاب دهنده و میدان مغناطیسی، شعاع مسیر دایره ای شکل به جرم مولکول یونیزه شده وابسته است[۶۵،۶۴].

در طیف سنج جرمی با مغناطیس بزرگ، ولتاژ شتاب دهنده تغییر می کند در حالی که میدان مغناطیسی اعمال شده ثابت نگه داشته می شود. اطاقک رانش، تنها به یون های موجود در مسیر دایره ای با شعاع r اجازه عبور می دهد. در نتیجه برای یک ولتاژ خاص تنها یون هایی که دارای جرم هایی هستند که در معادله ۲-۶ صدق می کند از اطاقک خارج می شوند. در نتیجه برای مقادیر متفاوتی از ولتاژ، یون هایی با جرم های متفاوت از اطاقک عبور خواهند کرد. هر اندازه ولتاژ پایین تر باشد، یون هایی با جرم بزرگ تر عبور می کنند و به آشکارساز خواهند رسید. همچنین با تغییر ولتاژ می توان گستره جرمی کلیه یون های نمونه را پویش کرد[۶۵،۶۴].

۲-۶-۱- اجزاء دستگاه LC-MS/MS[1]

۲-۶-۱-۱- سیستم ورودی

برای موفقیت در عمل یونیزاسیون و شتاب دادن ذرات، ابتدا باید تمامی نمونه ها به حالت گاز در آیند. به همین منظور سیستم ورودی را معمولاً بسته به توانایی بخار شدن نمونه تا دمای ۴۰۰ درجه سانتیگراد حرارت می دهند. برای جلوگیری از تجزیه نمونه های ناپایدار قبل از ورود به دستگاه، این نمونه ها را در درجه حرارت های بالا قرار

1. Liquid Chromatography Mass-Mass

نمی دهیم. همچنین در طول تجزیه، سرعت ورود نمونه به اطاقک یونیزاسیون باید ثابت نگه داشته شود تا فراوانی نسبی اندازه گیری شده در ابتدا و پایان تجزیه ثابت بماند[۶۶].

۲-۶-۱-۲- یونیزاسیون

فرایند یونیزاسیون در اطاقک یونیزاسیون انجام می شود. در این اطاقک با افزایش ولتاژ، باریکه ای از الکترون ها از یک طرف به طرف دیگر مولکول های نمونه و به طرف آند شتاب می گیرند و مولکول ها یونیزه می شوند. هر یک از این مولکول ها پس از یونیزه شدن به صورت تک باری در دستگاه پیش می روند. جهت ممانعت از ترکیب مجدد اجزاء باید تعداد برخوردهای بین اجزاء یا مولکول های داخل سلول یونیزاسیون را کاهش داد که با ثابت نگه داشتن سیستم در یک فشار پایین این هدف قابل دستیابی است[۶۶].

۲-۶-۱-۲-۱- یونیزاسیون الکترواسپری

در صورت یونیزه شدن مولکول های بزرگ به M^+، نسبت جرم به بار آن ها بسیار بالا است و سرعت یون ترک کننده اطاقک شتاب دهنده بسیار کم است. در نتیجه مولکول های بزرگ مختلف، سرعت تقریباً مشابه دارند و مشکل می توان آن ها را از یکدیگر تفکیک کرد. این مشکل توسط یک دانشمند آلمانی که توانست مولکول ها و اجزاء با بار چندگانه بوجود آورد تقلیل یافت. وی از مفهوم جرم واقعی که حاصل ضرب جرم ظاهری هر یون در بار آن می باشد، استفاده کرد. در این سیستم نمونه با لوله مویین از راه یک سری صفحاتی که هر یک ولتاژ متفاوتی دارند که باعث یونیزاسیون چندگانه می شود، وارد می شوند. این روش یونیزاسیون موجب گسترده تر شدن محدوده جرم مولکولی طیف سنج جرمی می شود. یونیزاسیون الکترواسپری برای ترکیباتی با گروه های عاملی اسید، آمین، فنول، الکل، استر و همچنین ترکیبات قطبی، فرار و پایدار یا ناپایدار در دمای بالا انتخابی است[۶۶].

۲-۶-۱-۳- اطاقک شتاب دهنده

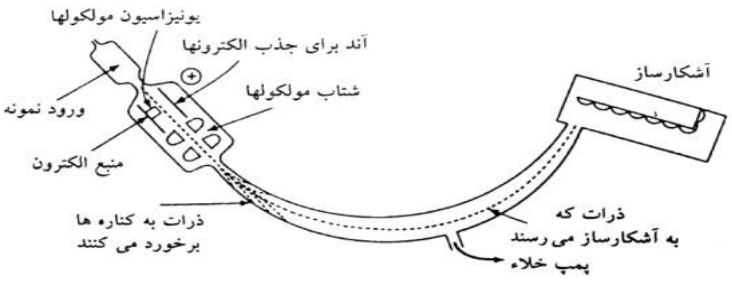
ذرات یونیزه شده وارد شده به این محفظه تحت تاثیر ولتاژ شتاب دهنده قرار می گیرد. شکل شبکه های شتاب دهنده مانند شکاف ها است به طوری که باریکه ای موازی از اجزاء مولکولی تشکیل می شود و هر جزئی که از مسیر باریکه منحرف می شود به کناره شکاف برخورد می کند و حذف می شود[۶۶].

۲-۶-۱-۴- اطاقک رانش

اجزاء یونی شتاب دار حاصل از شکستن مولکول، در اطاقک رانش تحت تاثیر میدان مغناطیسی قرار می گیرند. این محفظه جهت جلوگیری از برخورد اجزاء با یکدیگر یا مولکول های موجود اضافی تحت خلاء بالا قرار دارد[۶۶].

۲-۶-۱-۵- آشکارساز

یکی از رایج ترین آشکارسازها الکترون مالتی پلایر است که یک تقویت کننده دی نود دارای سطح پرتاب کننده الکترون می باشد و شروع جریان با برخورد یک جزء به سطح دی نود انجام می شود و این برخورد موجب آزادی چندین الکترون از سطح می شود که به سمت دومین دی نود شتاب می گیرند و از هر الکترون که آن را بمباران می کند، تعداد زیادی الکترون آزاد می شود(شکل ۲-۱). در نتیجه تعداد بی شماری الکترون به جمع کننده می رسد[۶۶،۶۷].



شکل ۲-۱ شمایی از یک دستگاه طیف سنج جرمی[۶۶].

۲-۶-۲- توان تفکیک LC-MS/MS

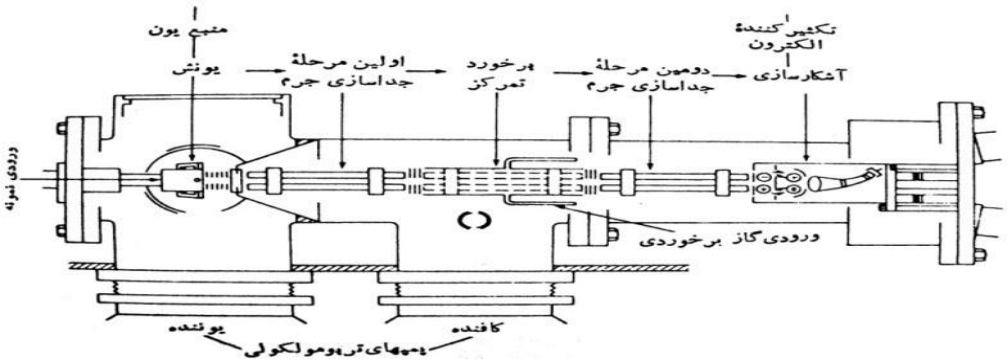
توان تفکیک به معنای توانایی یک طیف سنج جرمی برای جدا کردن دو ذره با جرم های متفاوت است که ارزش نهایی یک دستگاه طیف سنج به این ویژگی وابسته است، به گونه ای که هر اندازه توان تفکیک دستگاه بالاتر باشد، کارایی تجزیه ای آن نیز بیشتر است[۶۸].

۲-۶-۳- ترتیب تجزیه ای

در صورت بالا بودن ولتاژ شتاب دهنده تنها ذراتی با جرم کوچک به اندازه کافی با مغناطیس منحرف می شوند و سپس به آشکارساز رسیده و شمارش می شوند. سپس با کاهش تدریجی ولتاژ شتاب دهنده همزمان ذرات بر حسب افزایش جرم به آشکارساز می رسند. هنگامی که ولتاژ شتاب دهنده به صفر برسد، ثبت پخش جرم ها در نمونه تکمیل و به صورت یک طیف جرمی ارائه می شود[۶۸].

۲-۶-۴- طیف سنج های جرمی دنبال هم[1]

در اواخر ۱۹۸۰ شیمیدان ها شروع به کشف امکان اتصال یک طیف سنج جرمی به طیف سنج جرمی دیگر کردند(شکل ۲-۲). در این حالت ابتدا تمامی اجزای یک مخلوط توسط یک منبع یونش، یونیزه می شود و سپس این یون ها به طور متوالی بر اساس جرم بر روی یک شکاف خروجی متمرکز می شوند و سپس از داخل این شکاف به داخل محفظه ای وارد می شوند که در آن بر اثر برخورد با مولکول های گازی در یک فشار نسبتاً بالا و یا در اثر برخورد با الکترون ها، قطعه قطعه شدن انجام می شود. مهمترین مزایای طیف سنج های جرمی دنبال هم شامل سرعت و حساسیت بالای تجزیه آن است. علاوه بر این به دلیل عدم نیاز رقیق کردن نمونه با مقادیری از فاز متحرک احتمال وارد شدن آلودگی را به شدت کاهش می دهد[۶۹].



طیف سنج جرمی یک وسیله قدرتمند برای شناسایی ترکیبات خالص است در حالی که کارایی آن برای تجزیه مستقیم کیفی و کمی تمام مخلوط ها به دلیل تولید تعداد بسیار زیادی قطعه با مقادیر مختلف m/e محدود می باشد. همچنین تفسیر طیف های پیچیده حاصل غالباً دشوار است. به همین دلیل طیف سنج های جرمی معمولاً با دستگاه های کروماتوگرافی گازی یا مایع جفت می شوند تا اجزایی که از ستون کروماتوگرافی خارج می شوند، شناسایی شوند. تزویج طیف سنج جرمی با کروماتوگرافی مایع به ویژه برای موادی با فراریت پایین کاربرد دارد[۷۰].

1. Tandem mass spectrometry or Mass/Mass

۲-۶-۶- سیستم های مختلف پایش یون ها توسط دستگاه LC-MS/MS

متداول ترین آنالیزگری که در دستگاه LC-MS/MS مورد استفاده قرار می گیرد، سیستم های چهار قطبی[1] است. علت این امر سهولت استفاده، محدوده جرمی مناسب، قابلیت تفکیک جرمی مناسب و کیفیت بالای طیف جرمی ایجاد شده است. سیستم چهار قطبی شبیه به یک فیلتر جرمی عمل می کند و یون های ورودی به داخل آن بر اساس m/e از یکدیگر تفکیک شده و به این ترتیب جرم آن ها تعیین می شود. برای انجام این کار، در سیستم چهار قطبی از چهار میله به صورت موازی که در رئوس یک مربع قرار گرفته اند، استفاده می شود. در فضای بین چهار الکترود یک میدان الکترومغناطیسی ایجاد می شود به گونه ای که بر روی یک جفت از الکترودها که رو به روی یکدیگر قرار دارند، پتانسیل الکتریکی مثبت و بر روی جفت الکترود دیگر پتانسیل الکتریکی منفی ایجاد می شود. پتانسیل اعمال شده بر روی هر یک از جفت الکترودهای مقابل، مجموعه ای از یک ولتاژ مستقیم و یک ولتاژ متناوب است. پتانسیل مستقیم اعمال شده بر روی یک جفت الکترود دقیقاً برابر پتانسیل مستقیم اعمال شده بر روی جفت الکترود دیگر است. همین امر در مورد ولتاژ متناوب نیز صادق است. این سیستم چهار قطبی به چند صورت مورد استفاده قرار می گیرد[۶۸].

۲-۶-۶-۱- پایش یون ها با روش تمام اسکن[2]

در این حالت مقادیر ولتاژهای مستقیم و متناوب از مقدار خاصی شروع و به تدریج افزایش می یابد و سریعاً به سطح بعدی ولتاژ مستقیم و متناوب تغییر می کند. لازم به ذکر است که هر یک از مقادیر ولتاژ مستقیم و متناوب برای عبور یون خاصی مناسب خواهد بود. لذا سیستم چهار قطبی مدت زمان کمی را جهت پایش یک یون خاص در اختیار دارد. در نتیجه از مجموعه یون هایی که یک m/e خاص دارند تنها قسمتی از آن ها پایش می شود و قسمت عمده این یون ها از دست می رود. به همین دلیل پایش یون ها به این روش از حساسیت چندانی برخوردار نیست. اما این روش اطلاعات زیادی در مورد ماهیت جسم مورد نظر فراهم می نماید و برای تشخیص و آنالیز کیفی مواد از توانایی بالایی برخوردار است. در این روش چهار قطبی اول عمل تفکیک یون های اولیه را انجام می دهد و چهار قطبی دوم و سوم تنها به عنوان محل عبور عمل نموده و باعث تفکیک یون ها به سوی آشکار ساز می شود[۶۸].

1. Quadrupole
2. Full Scan

۲-۶-۶-۲- پایش یون ها با روش اسکن یون های دختر[1]

در این حالت یون های حاصل از شکسته شدن یون دختر مورد پایش قرار می گیرند. سیستم چهار قطبی اول تنها برای عبور دادن یک یون خاص تنظیم می شود. در سیستم چهار قطبی دوم یون اولیه به مولکول های پر انرژی آرگون برخورد نموده و متلاشی می شود و در چهار قطبی سوم یون های حاصل از شکست یون اولیه تفکیک شده و به ترتیب به آشکار ساز تحویل داده می شود[۶۸].

۲-۶-۶-۳- پایش یون ها با روش اسکن یک واکنش انتخابی[2] و اسکن واکنش های چند گانه[3]

این روش توانایی منحصر به فرد طیف سنج جرمی در شناسایی ترکیبات شیمیایی است. در طیف سنجی جرمی نحوه شکسته شدن مولکول ها و قطعاتی که ایجاد می نماید شاخصی برای شناسایی آن ها می باشد زیرا نحوه شکسته شدن، تابع ساختمان جسم مورد نظر است. در این روش چهارقطبی اول، فیلتر جرمی یون پیش ساز است. چهار قطبی دوم محل شکسته شدن یون پیش ساز با مولکول های پر انرژی آرگون و چهار قطبی سوم فیلتر جرمی یون حاصل از شکست یون پیش ساز است. در این روش چهار قطبی اول و سوم تمامی زمان خود را صرف پایش یک یون خاص می نماید. در نتیجه این دو چهار قطبی با بیشترین حساسیت خود مشغول پایش یون های مورد نظر خواهند بود. همچنین در حالتی که سیستم چهار قطبی اول پایش دو یا چند یون پیش ساز و چهارقطبی سوم پایش دو یا چند یون محصول را انجام دهد، این حالت را سیستم پایش واکنش های چند گانه می نامند. این دو روش حساس ترین حالتی است که با یک سیستم چهار قطبی سه گانه قابل دستیابی است[۶۸].

1. Product ion scanning
2. Selected Reaction Monitoring(SRM)
3. Multiple Reaction Monitoring(MRM)

۲-۷- مطالعه کیفی ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین با استفاده از متد LC-MS/MS

۲-۷-۱- شرایط دستگاه LC-MS/MS

جدول ۲-۵ شرایط دستگاه LC-MS/MS در مطالعه کیفی ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

فاز یونیزاسیون الکترواسپری	منفی
سرعت جریان(میلی لیتر بر دقیقه)	۰/۶
فاز متحرک	متانول – اسید فرمیک ۰/۰۵٪ به نسبت ۱۵:۸۵ با اسیدیته ۵/۸
دمای ستون(درجه سانتیگراد)	۴۵
ستون HPLC	MS-C_{18} (6mm ID×12.5cm)
دمای گاز(درجه سانتیگراد)	۳۰۰
سرعت جریان گاز(لیتر بر دقیقه)	۱۰
نبولایزر (psi)	۲۰
کاپیلاری(ولت)	۳۸۴۳
طول موج(نانومتر)	۲۲۵
تصادم گاز	روشن

۲-۷-۲- روش کار

برای آماده سازی نمونه ابتدا ۱۰ عدد قرص از هر یک از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ از کارخانه ایران-هورمون و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ از کارخانه برلین- شیمی آلمان به طور تصادفی انتخاب شد. سپس هر ۱۰ عدد قرص جداگانه توزین شد و میانگین وزن ۱۰ عدد قرص برای هر سری ساخت محاسبه شد. پس از پودر نمودن هر ۱۰ قرص از هر سری ساخت به صورت مجزا از یکدیگر، معادل میانگین یک عدد قرص از هر سری ساخت به دقت توزین شد و در ۵ میلی لیتر از مخلوط متانول-سود ۰/۰۱ مولار به نسبت ۱:۱ حجمی-حجمی با انجام عمل ورتکس به مدت ۵ دقیقه کاملاً پراکنده شد. سپس این سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سونیکه شد. در نهایت پس از سانتریفیوژ نمودن نمونه های تهیه شده با دور ۴۰۰۰ به مدت سه دقیقه، ذرات غیرمحلول توسط فیلتر از محلول جدا می شود. در تمامی این مراحل تیوپ سانتریفیوژ حاوی محلول توسط فویل آلومینیوم از نور محافظت می شود. همچنین در شرایطی که تزریق بلافاصله بعد از تهیه نمونه انجام نمی شود، محلول ها در دمای

۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. به منظور آنالیز نمونه، حجم ۵ میکرولیتر از نمونه تهیه شده از تمامی سری ساخت ها به دستگاه LC-MS/MS تزریق شد و به روش های پایش تمام اسکن و پایش یک واکنش انتخابی مورد بررسی قرار گرفت. سپس حجم ۵ میکرولیتر از محلول استاندارد هر یک از ناخالصی ها به روش پایش یون های دختر بررسی شدند. همچنین الگوی شکست مولکول لووتیروکسین موجود در دو فراورده دو کارخانه مورد بررسی با یکدیگر مقایسه شد. مطالعه کیفی ناخالصی های حاصل از تخریب لووتیروکسین با روش LC-MS/MS به منظور تأیید نتایج حاصل از بررسی کمی این ناخالصی ها توسط روش HPLC می باشد[۵۲].

۲-۸- مطالعات بالینی و آزمایشگاهی عملکرد غده تیروئید

۲-۸-۱- تعریف مطالعه مداخله ای

در این نوع مطالعه با ایجاد تغییر در نمونه، عکس العمل نمونه مورد پژوهش مورد بررسی قرار می گیرد. مطالعه مداخله ای شامل دو گروه تجربی و نیمه تجربی می باشد[۷۳-۷۱].

مطالعه تجربی قوی ترین نوع مطالعه برای اثبات رابطه علیتی میان علت و معلول است. در این نوع مطالعه افراد به صورت تصادفی، حداقل به دو گروه تقسیم می شوند. یک گروه تحت تأثیر مداخله قرار گرفته و در گروه دیگر به عنوان شاهد، هیچ گونه مداخله ای صورت نمی گیرد و نهایتاً نتایج مطالعه با مقایسه دو گروه ارزیابی می شود. در نتیجه سه ویژگی مهم مطالعات تجربی شامل مداخله، دارا بودن گروه کنترل و انتخاب تصادفی نمونه مورد ارزیابی است. در مطالعه نیمه تجربی حداقل یکی از خصوصیات مطالعه تجربی حذف می گردد. در مطالعه حاضر گروه کنترل حذف گردیده است. در نتیجه مطالعه از نوع نیمه تجربی می باشد. چنانچه مطالعه مداخله ای بر روی انسان انجام گیرد، کارآزمایی بالینی نامیده می شود. امروزه کارآزمایی بالینی به عنوان قوی ترین روش علمی برای سنجش روش های مختلف درمانی و مقایسه فراورده های مختلف دارویی با یکدیگر پذیرفته شده است[۷۱].

یکی از انواع کارآزمایی های بالینی، کارآزمایی متقاطع است. مطالعه متقاطع طرحی قوی و مطمئن برای بررسی روابط علیتی می باشد. از فواید این روش این است که چون دو روش درمانی برای یک گروه تکرار می شود، به حجم نمونه کمتری نیاز خواهد بود و تمایز نتایج در یک گروه ارزشمندتر است. همچنین این طرح در بیماری های مزمنی که پس از درمان اول کاملاً بهبود نمی یابند مانند بیماری های تیروئیدی، دیابت، فشار خون کاربرد دارد. در این طرح از دو

گروه بیمار استفاده می شود. گروه اول دریافت کننده داروی اول و گروه دوم دریافت کننده داروی دوم می باشد. سپس برای از بین رفتن اثرات احتمالی درمانی داروی مصرفی، داروی تجویز شده برای هر دو گروه، پس از یک دوره درمان قطع می شود و بیماران طی این دوره هیچ گونه درمانی دریافت نمی کنند. این دوره قطع درمان را دوره پاکسازی[1] می نامند و زمان آن منطبق با زمان از بین رفتن اثر دارویی است. سپس درمان هر دو گروه را جا به جا می کنند به گونه ای که گروه اول داروی دوم و گروه دوم داروی اول را دریافت می کنند. مطالعه حاضر به روش متقاطع با ۴۰ بیمار در دو گروه ۲۰ نفره طراحی شده است. زمان پاکسازی برای این مطالعه ۴۲ روز در نظر گرفته شده است[۷۴-۷۱].

۲-۸-۲- روش کار مطالعه اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی

پس از اولین مراجعه افراد به کلینیک تخصصی مهدیه، شرح حال افراد مشکوک به ابتلا به بیماری کم کاری تیروئید به طور دقیق توسط پژوهشگر سوال شد. در این شرح حال دلیل شکایت بیمار از حال عمومی خویش ارزیابی شد و مجموعه ای از علائم بالینی مربوط به بیماری کم کاری غده تیروئید مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایشات پاراکلینیک همواره یکی از مهمترین ابزارها جهت تشخیص بیماری برای پزشک می باشد. در نتیجه تمامی افراد مشکوک به بیماری کم کاری تیروئید، توسط پزشک به مرکز پزشکی هسته ای کوثر جهت انجام آزمایش های پاراکلینیک T_4، FT_4I، T_3Rup و TSH با استفاده از روش رادیوایمنوآسی جهت تشخیص قطعی بیماری کم کاری تیروئید معرفی شدند. کسب اطمینان از ابتلا به بیماری کم کاری تیروئید در افراد مشکوک، از طریق قرار دادن علائم بالینی و نتایج آزمایشات پاراکلینیک در کنار یکدیگر توسط پزشک معالج جناب آقای دکتر مهرعلی رحیمی صورت گرفت[۷۶-۷۴].

پس از توضیحات مربوط به مراحل و اهداف انجام مطالعه مذکور برای هر بیمار فرم مربوط به رضایت کامل بیماران مبنی بر شرکت در این طرح پژوهشی و تعهد مبنی بر رعایت کامل اصول حاکم بر پژوهش جهت کسب نتایج واقعی و دقیق تر مطابق فرم شماره یک تکمیل شد. سپس نام و نام خانوادگی بیمار، شماره تلفن و آدرس محل سکونت، سن، جنس، میزان تحصیلات، تاریخ تکمیل پرسشنامه، قد، وزن، BMI[1]، نام کارخانه تولید کننده لووتیروکسین سدیم

1. Wash out time
1. Body Mass Index

تجویز شده برای بیمار به همراه شماره سری ساخت کارخانه و نتایج آزمایشات پاراکلینیک به همراه علائم بالینی ناشی از ابتلا به بیماری کم کاری غده تیروئید در پرسشنامه دموگرافی مربوط به هر بیمار به عنوان علائم بالینی و تست های آزمایشگاهی عملکرد تیروئید بیمار قبل از مصرف هر نوع فراورده لووتیروکسین سدیم در فرم شماره دو درج گردید[۷۶-۷۴].

سپس بر حسب توصیه های استاندارد به میزان ۱/۶ میکروگرم بر کیلوگرم هر یک از فراورده های مختلف لووتیروکسین سدیم مورد مطالعه ساخت کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی به مدت سه ماه با روش طراحی متقاطع، برای هر بیمار تجویز شد[۷۴]. مطالعه حاضر بر روی ۴۰ بیمار شامل ۱۶ مرد و ۲۴ زن منقسم به دو گروه ۲۰ نفره با میانگین سنی ۱۲/۶۱±۳۴/۴۲ مبتلا به کم کاری تیروئید انجام شد. ۲۰ نفر از بیماران ابتدا به مدت سه ماه داروی ایرانی و ۲۰ نفر دیگر نیز همزمان به مدت سه ماه داروی خارجی مصرف نمودند. پس از گذشت سه ماه از آغاز درمان با هر یک از فراورده های ایرانی و خارجی، هر یک از بیماران از نظر بهبود علائم بالینی، عملکرد تیروئید و BMI بررسی مجدد شدند. پس از گذشت سه ماه مدت زمان ۴۲ روز به عنوان زمان پاکسازی دارو از بدن در نظر گرفته شد. پس از گذراندن زمان پاکسازی، ۲۰ بیمار دریافت کننده داروی ایرانی به مدت سه ماه دیگر داروی خارجی دریافت نمودند. همچنین ۲۰ بیمار دریافت کننده داروی خارجی به مدت سه ماه دیگر داروی ایرانی دریافت کردند. در نتیجه پس از گذشت ۲۲۲ روز از آغاز درمان و دریافت هر یک از فراورده های ایرانی و خارجی برای هر یک از گروه های ۲۰ نفره، اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده ها با یکدیگر مقایسه شد. هر دو نوع فراورده مورد بررسی به طور رایگان و در جعبه های یکسان در اختیار بیماران قرار داده شد[۷۶-۷۴].

برای رسیدن به دوز مناسب روزانه فاکتورهای مخدوشگری که سبب کاهش جذب و یا افزایش کلیرانس لووتیروکسین سدیم می گردند از مطالعه حذف شدند. این فاکتورها شامل داروها و بیماری های مزمنی نظیر مکمل های آهن، رزین، سوکرالفیت، لووستاتین، کلسیم کربنات، آنتی اسیدها، مهارگران پمپ پروتون، پروتئین سویا و میزان بالای فیبر که موجب کاهش جذب دارو می شوند، می باشد. همچنین فنی توئین و کاربامازپین در صورت مصرف همزمان با داروی لووتیروکسین به علت افزایش کلیرانس متابولیک این دارو جزء فاکتورهای مخدوشگر محسوب می شوند. از سوی دیگر بیماری هایی نظیر بی کفایتی پانکراس، بیماری های انسدادی و سیروز کبد افزایش کلیرانس متابولیک دارو را

باعث می شوند و نیز آلودگی به هلیکو باکتر پیلوری ثانویه به گاستریت آتروفیک موجب افزایش القا جذب داروی لووتیروکسین سدیم می شود. مصرف تمامی این مواد دارویی، مکمل ها و مواد غذایی مخدوشگر مطالعه مذکور به دقت توسط پزشک بررسی شد و در لیست کاملی مطابق فرم شماره سه توسط پژوهشگر در اختیار بیماران قرار داده شد[۷۷، ۷۸].

مطالعه حاضر یک کارآزمایی بالینی از نوع مطالعه متقاطع می باشد. جهت از بین رفتن اثر داروی اول، با توجه به زمان شروع اثر و زمان پاکسازی این دارو، برای تمامی بیماران مدت زمان ۴۲ روز عدم مصرف دارو برای پاکسازی داروی اول از بدن در نظر گرفته شد. انجام آزمایشات پاراکلینیک و بررسی علائم بالینی بیمار پس از ۹۰ روز از آغاز درمان با هر یک از فراورده های ایرانی و خارجی انجام شد[۱۶، ۱۵]. در این مطالعه دو فراورده تولید کارخانه ایران هورمون از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ و فراورده تولید کارخانه آلمانی برلین شیمی از سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ با یکدیگر مقایسه شدند.

۲-۸-۳- روش جمع آوری داده ها

مصاحبه مطمئن ترین و بهترین شیوه جمع آوری اطلاعات است. همچنین پرسشنامه شامل تعدادی سوال در راستای رسیدن به اهداف تحقیق می باشد. در این پژوهش روش جمع آوری داده ها، مصاحبه به همراه پر کردن پرسشنامه است. در حین مصاحبه عین سوالات موجود در پرسشنامه توسط پژوهشگر برای بیمار مطرح شد[۷۱].

۲-۸-۴- محاسبه حجم نمونه

به کمک نرم افزار EPI Info با استفاده از فرمول محاسبه حجم نمونه برای مقایسه نسبت ها، مطابق رابطه ۲-۷ و با توجه به طراحی متقاطع کارآزمایی بالینی با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪، میزان خطای ۰/۰۵، دقت ۰/۰۴، توان آزمون ۸۰٪ و با اهتمام به نظر کارشناس ارشد آمار زیستی سرکار خانم شهلا صفری و پزشک معالج جناب آقای دکتر مهرعلی رحیمی تعداد ۴۰ بیمار کم کار تیروئید منقسم به دو گروه ۲۰ نفره به صورت کاملاً تصادفی نمونه گیری شدند[۱۶].

$$n = \frac{2\left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} - Z_{1-\beta}\right)^2 [P(1-P)]}{d^2} \qquad (۲-۷)$$

پارامترهای رابطه فوق شامل d= دقت، α= میزان خطا، 1-α= سطح اطمینان، 1-β=توان آزمون، p = نسبت فاکتورهای مورد بررسی در مطالعات قبلی و n= حجم نمونه می باشد.

۲-۸-۵- روش نمونه گیری

نمونه گیری به صورت تصادفی از میان افراد مشکوک به کم کاری غده تیروئید مراجعه کننده به کلینیک تخصصی مهدیه در شهر کرمانشاه انجام شد. معیار ورود مثبت برای شرکت در این مطالعه بیماران کم کار تیروئیدی هستند که بیماری آن ها برای اولین بار تشخیص داده می شود و تا کنون هیچ یک از فراورده های لووتیروکسین را دریافت نکرده اند. معیار خروج از پژوهش شامل فاکتورهای مخدوشگری است که سبب کاهش جذب و یا افزایش کلیرانس داروی لووتیروکسین سدیم می گردند[۷۴-۷۲].

۲-۸-۶- روش کور کردن مطالعه

اعتماد بیمار به پزشک و روش درمانی، تلقی او نسبت به درمان، شرایط خارجی و ظاهر دارو از عوامل تأثیر گذار در پاسخ غیر اختصاصی بیمار به دارو می باشند. از سوی دیگر نحوه تلقی درمانگر و نظر او نسبت به فرآیند درمانی نیز بر روی نظر درمانگر نسبت به وضعیت بیمار موثر است. در این کارآزمایی بالینی سعی بر این بود که این تأثیر پذیری ها به حداقل برسند تا اثرات فارماکولوژیک داروها به طور خالص مورد بررسی قرار گیرند. به همین منظور روشی که در کارآزمایی بالینی به کار گرفته شد، روش کور کردن است. در طی انجام این پژوهش سعی بر این بود که بیمار و پزشک معالج جناب آقای دکتر مهرعلی رحیمی از ایرانی یا خارجی بودن داروی لووتیروکسین سدیم تجویز شده بی اطلاع باشند و هیچ ایده قبلی نسبت به آن نداشته باشند. به این ترتیب مطالعه به صورت دوسوکور انجام شد[۷۲].

۲-۸-۷- محدودیت های مطالعه

جهت جلوگیری از خروج نمونه ها از مطالعه، دسترسی به بیمار و یادآوری زمان انجام آزمایشات پاراکلینیک با مراجعه به مرکز پزشکی هسته ای کوثر و مراجعه نزد پزشک معالج جناب آقای دکتر مهرعلی رحیمی، چند روز قبل از

موعد مقرر با استفاده از شماره تلفن بیمار که در همان مراجعه اول به کلینیک در فرم دموگرافی درج نمودیم، با وی تماس گرفته شد.

۲-۸-۸- ملاحظات اخلاقی

پژوهش مذکور از بیانیه اخلاقی هلسینکی تبعیت می کند. مطابق اصول این بیانیه انتخاب افراد در طرح با اطلاع و رضایت ایشان صورت گرفت، بدین نحو که پس از توضیحات مربوط به مراحل و اهداف انجام مطالعه مذکور برای هر بیمار، فرم مربوط به رضایت کامل بیماران مبنی بر شرکت در این طرح پژوهشی و تعهد مبنی بر رعایت کامل اصول حاکم بر پژوهش جهت کسب نتایج واقعی و دقیق تر مطابق فرم شماره یک تکمیل گردید. همچنین پژوهش مذکور از سوی کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی کرمانشاه مورد تأیید قرار گرفت.

۲-۹- آنالیز داده ها

مقایسه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 18 انجام شد. همچنین آزمون های آماری آنالیز واریانس، آزمون T، آزمون مربع کای، جداول توافقی و جداول فراوانی به کار گرفته شد و در تمامی آزمون ها $P<0.05$ به عنوان آستانه معنی دار بودن داده ها در نظر گرفته شد.

نتایج

۳-۱- نتایج آزمایشات برون تر

۳-۱-۱- آزمون تعیین مقدار ما

۳-۱-۱-۱- بررسی صحت آزم

به استناد کتاب مرجع USP 31 محدوده صحت قابل قبول ٪۱۰۲-۹۸ است. در نتیجه مطابق جدول ۳-۱ آزمون مذکور واجد صحت لازم است.

جدول ۳-۱ بررسی صحت آزمون تعیین مقدار ماده موثره با تزریق سه غلظت استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در سه روز متوالی و محاسبه میانگین درصد لووتیروکسین ± انحراف معیار[۶۲].

غلظت های استاندارد / روز های تزریق	۸	۱۰	۱۲
روز اول	۹۸/۳۱±۰/۱۳	۹۹/۹۱±۰/۰۹	۱۰۰/۷۱±۰/۰۱
روز دوم	۹۸/۵۸±۱/۲۹	۹۹/۴۳±۰/۹۶	۱۰۰/۳۸±۰/۶
روز سوم	۱۰۰/۲۶±۱/۲۳	۱۰۰/۷۵±۰/۴۳	۱۰۱/۱۱±۰/۰۵

۳-۱-۱-۲- بررسی دقت دستگاه کروماتوگرافی

محدوده درصد انحراف معیار نسبی قابل قبول برای تأیید دقت دستگاه کروماتوگرافی کمتر یا مساوی ۱٪ است. در نتیجه مطابق جدول ۳-۲ دستگاه کروماتوگرافی واجد دقت لازم است.

جدول ۳-۲ بررسی دقت دستگاه کروماتوگرافی با تزریق سه غلظت استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر و محاسبه میزان میانگین درصد انحراف معیار نسبی حاصل تکرار پنج تزریق از هر نمونه استاندارد در یک روز[۶۲].

غلظت های استاندارد	۸	۱۰	۱۲
میانگین درصد انحراف معیار نسبی	٪۰/۹۷	٪۱/۰۱	٪۰/۸۲

۳-۱-۱-۳- بررسی تکرار پذیری آزمون تعیین مقدار ماده موثره

محدوده درصد انحراف معیار نسبی قابل قبول برای تأیید تکرار پذیری کمتر یا مساوی ۲٪ است. در نتیجه آزمون مذکور مطابق جدول ۳-۳ تکرار پذیر است.

جدول ۳-۳ بررسی تکرار پذیری آزمون تعیین مقدار ماده موثره با سه بار تهیه سه غلظت استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر و محاسبه میزان میانگین درصد انحراف معیار نسبی حاصل تکرار پنج تزریق از هر نمونه استاندارد در یک روز[۶۲].

غلظت های استاندارد / شماره نمونه استاندارد	۸	۱۰	۱۲
۱	۱/۰۹	۱/۴۵	۰/۹۶
۲	۲/۴۴	۱/۸۰	۱/۳۷
۳	۱/۵۲	۱/۶۹	۱/۶

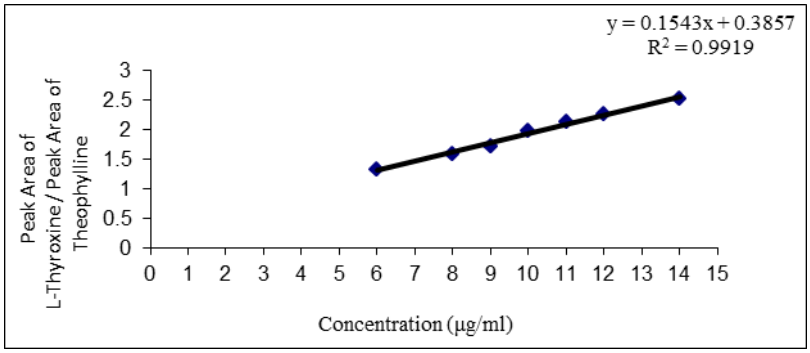
۳-۱-۱-۴- رسم منحنی کالیبراسیون

نتایج آنالیز غلظت های استاندارد لووتیروکسین به روش استاندارد داخلی بر اساس انتگرال سطح زیر پیک و نیز انحراف معیار هر یک در قالب جدول ۳-۴ آورده شده است.

جدول ۳-۴ آنالیز غلظت های استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در برابر سطح زیر پیک لووتیروکسین به روش استاندارد داخلی ± انحراف معیار در آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص لووتیروکسین سدیم

غلظت های استاندارد لووتیروکسین	سطح زیر پیک لووتیروکسین/سطح زیر پیک استاندارد داخلی ± انحراف معیار
۶	۱/۳۳±۰/۰۶۴
۸	۱/۵۹±۰/۰۷۸
۹	۱/۷۲±۰/۰۸۲
۱۰	۱/۹۷±۰/۰۵۷
۱۱	۲/۱۲±۰/۰۷۰
۱۲	۲/۲۵±۰/۰۸۳
۱۴	۲/۵۲±۰/۰۹۸

همچنین منحنی کالیبراسیون جهت انجام آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص های لووتیروکسین سدیم، در شکل ۳-۱ نشان داده شده است.



شکل ۳-۱ نمودار کالیبراسیون استاندارد لووتیروکسین به روش استاندارد داخلی در آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص لووتیروکسین

۳-۱-۱-۵- محاسبه حد تشخیص و حد تعیین مقدار

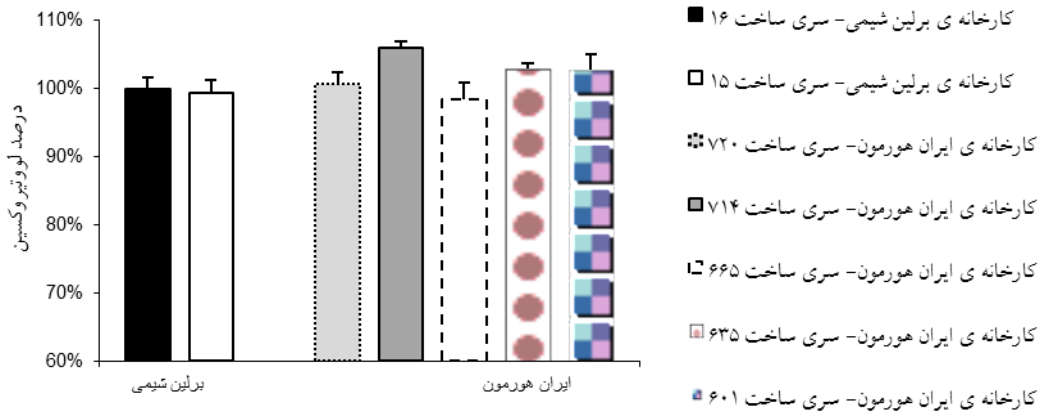
با در نظر گرفتن نسبت سیگنال به نویز دستگاه HPLC، حد تشخیص و حد تعیین مقدار به ترتیب معادل ۰/۲ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر حاصل گردید.

۳-۱-۱-۶- تعیین مقدار ماده موثره

میزان درصد ماده موثره استاندارد مطابق USP 31 محدوده ۱۱۰-۹۰٪ است. در نتیجه مقدار ماده موثره بدست آمده در تمامی سری ساخت های هر دو کارخانه ایرانی و آلمانی در آزمون تعیین مقدار ماده موثره قابل قبول می باشد. نتایج تعیین مقدار ماده موثره قرص های لووتیروکسین سدیم در جدول ۳-۵ آورده شده است. همچنین نمودار ستونی جهت مقایسه میزان ماده موثره موجود در فراورده های مورد بررسی در شکل ۳-۲ ارائه شده است.

جدول ۳-۵ درصد ماده موثره موجود در فراورده های لووتیروکسین سدیم از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان در آزمون برون تن تعیین مقدار ماده موثره

سری ساخت / شماره تزریق	۱۶	۱۵	۷۲۰	۷۱۴	۶۶۵	۶۳۵	۶۰۱
۱	٪۹۸/۳۷	٪۹۸/۱۲	٪۱۰۰/۰۲	٪۱۰۷/۰۱	٪۹۹/۳۹	٪۱۰۱/۹۳	٪۱۰۵/۷۴
۲	٪۱۰۰/۰۲	٪۹۷/۴۸	٪۱۰۲/۵۶	٪۱۰۶/۳۸	٪۹۶/۲۱	٪۱۰۳/۸۴	٪۱۰۰/۰۲
۳	٪۱۰۱/۲۹	٪۹۹/۳۹	٪۱۰۱/۹۳	٪۱۰۵/۱۱	٪۹۹/۳۹	٪۱۰۲/۶۹	٪۱۰۱/۹۳
۴	٪۱۰۱/۹۳	٪۱۰۰/۰۲	٪۹۸/۳۷	٪۱۰۵/۰۹	٪۹۵/۵۸	٪۱۰۲/۵۶	٪۱۰۱/۲۹
۵	٪۹۸/۱۲	٪۱۰۱/۹۳	٪۱۰۰/۰۲	٪۱۰۶/۳۸	٪۱۰۱/۲۹	٪۱۰۳/۲۰	٪۱۰۴/۴۷
میانگین	٪۹۹/۹۴	٪۹۹/۳۸	٪۱۰۰/۵۸	٪۱۰۵/۹۹	٪۹۸/۳۷	٪۱۰۲/۸۴	٪۱۰۲/۶۹
± انحراف معیار	۱/۷۰	۱/۷۳	۱/۶۷	۰/۸۵	۲/۴۰	۰/۷۲	۲/۳۵
± خطای استاندارد	۰/۷۶	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۳۸	۱/۰۷	۰/۳۲	۱/۰۵
± درصد انحراف معیار نسبی	٪۱/۷۰	٪۱/۷۴	٪۱/۶۶	٪۰/۸	٪۲/۴۴	٪۰/۷	٪۲/۲۹



شکل ۳-۲ نمودار ستونی جهت مقایسه میزان ماده موثره موجود در سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان در آزمون برون تن تعیین مقدار ماده موثره

۳-۱-۲- آزمون تعیین یکنواختی میزان ماده موثره قرص های لووتیروکسین سدیم

۳-۱-۲-۱- رسم منحنی کالیبراسیون

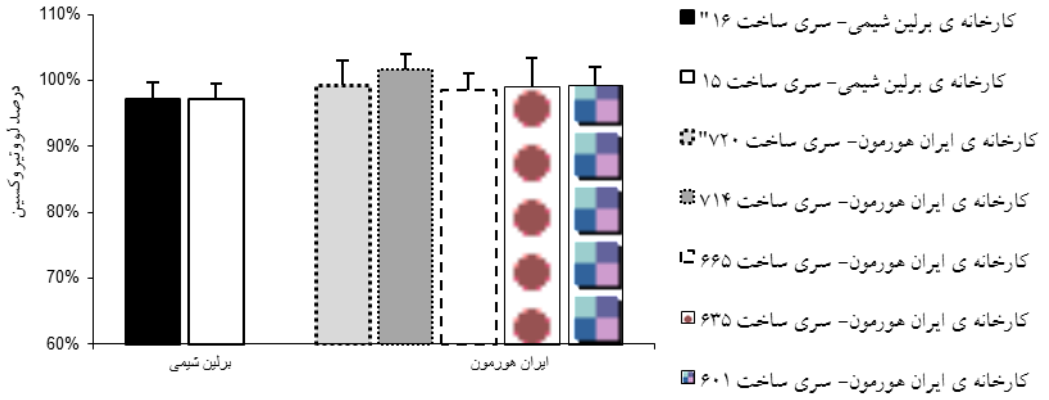
با توجه به یکسان بودن شرایط انجام آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره و آزمون تعیین مقدار ماده موثره در قرص های لووتیروکسین سدیم، غلظت های استاندارد مطابق جدول ۳-۴ و ترسیم منحنی کالیبراسیون این آزمون مطابق شکل ۳-۱ می باشد.

۳-۱-۲-۲- محاسبه حد تشخیص و حد تعیین مقدار

این دو غلظت در آزمون یکنواختی ماده موثره به ترتیب معادل ۰/۲ و ۱ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

۳-۱-۲-۳- تعیین یکنواختی میزان ماده موثره

میزان یکنواختی ماده موثره استاندارد مطابق USP 31 محدوده ۱۱۰-۹۰٪ است. در نتیجه مقدار ماده موثره بدست آمده در تمامی سری ساخت های هر دو کارخانه ایرانی و آلمانی در آزمون یکنواختی میزان ماده موثره قابل قبول می باشد. نتایج تعیین یکنواختی میزان ماده موثره قرص های لووتیروکسین سدیم در جدول ۳-۶ آورده شده است. همچنین نمودار ستونی جهت مقایسه یکنواختی ماده موثره موجود در فراورده های مورد بررسی در شکل ۳-۳ ارائه شده است.



شکل ۳-۳ نمودار ستونی جهت مقایسه یکنواختی ماده موثره سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان در آزمون برون تن بررسی یکنواختی ماده موثره

جدول ۳-۶ درصد ماده موثره موجود در فراورده های لووتیروکسین سدیم از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان در آزمون تعیین یکنواختی ماده موثره

سری ساخت / تعداد قرص	۱۶	۱۵	۷۲۰	۷۱۴	۶۶۵	۶۳۵	۶۰۱
۱	٪۹۷/۴۶	٪۹۴/۳۰	٪۱۰۲/۵۶	٪۱۰۲/۶۹	٪۹۸/۱۲	٪۱۰۳/۸۴	٪۹۵/۵۸
۲	٪۹۸/۳۷	٪۹۶/۲۱	٪۹۸/۳۷	٪۱۰۱/۲۹	٪۱۰۱/۹۳	٪۹۶/۲۱	٪۹۸/۱۲
۳	٪۹۴/۹۴	٪۹۹/۲۶	٪۱۰۵/۱۱	٪۱۰۲/۵۶	٪۹۸/۳۷	٪۹۷/۴۸	٪۱۰۱/۲۹
۴	٪۹۳/۶۷	٪۱۰۰/۰۲	٪۱۰۴/۴۷	٪۹۸/۱۲	٪۱۰۳/۸۴	٪۹۳/۰۳	٪۹۶/۲۱
۵	٪۹۵/۵۸	٪۹۸/۱۲	٪۹۶/۲۱	٪۱۰۱/۲۹	٪۹۶/۸۵	٪۱۰۲/۵۶	٪۹۸/۳۷
۶	٪۹۴/۳۰	٪۹۶/۸۵	٪۹۵/۵۸	٪۱۰۱/۹۳	٪۹۵/۵۸	٪۹۶/۲۱	٪۹۵/۵۸
۷	٪۹۶/۹۵	٪۹۳/۰۳	٪۹۳/۹۰	٪۱۰۶/۳۸	٪۱۰۰/۰۲	٪۹۴/۹۴	٪۱۰۰/۰۲
۸	٪۱۰۱/۲۹	٪۹۶/۹۵	٪۹۹/۳۸	٪۹۹/۳۹	٪۹۶/۹۵	٪۹۹/۹۴	٪۱۰۲/۶۹
۹	٪۹۹/۹۴	٪۹۸/۳۷	٪۹۹/۹۴	٪۹۹/۳۹	٪۹۷/۴۸	٪۱۰۵/۱۱	٪۱۰۲/۵۶
۱۰	٪۹۹/۳۹	٪۹۹/۳۸	٪۹۷/۴۸	٪۱۰۳/۸۴	٪۹۵/۵۸	٪۱۰۲/۵۶	٪۱۰۱/۹۳
میانگین	٪۹۷/۲۰	٪۹۷/۲۵	٪۹۹/۳۰	٪۱۰۱/۶۹	٪۹۸/۴۷	٪۹۹/۱۸	٪۹۹/۲۶
± انحراف معیار	۲/۵۶	۲/۲۶	۳/۷۷	۲/۴۰	۲/۷۰	۴/۱۷	۲/۸۱
± خطای استاندارد	۰/۸۱	۰/۷۱	۱/۱۹	۰/۷۶	۰/۸۵	۱/۳۱	۰/۸۹
درصد انحراف معیارنسبی	٪۲/۶۳	٪۲/۳۲	٪۳/۸۰	٪۲/۳۶	٪۲/۷۴	٪۴/۲۰	٪۲/۸۳

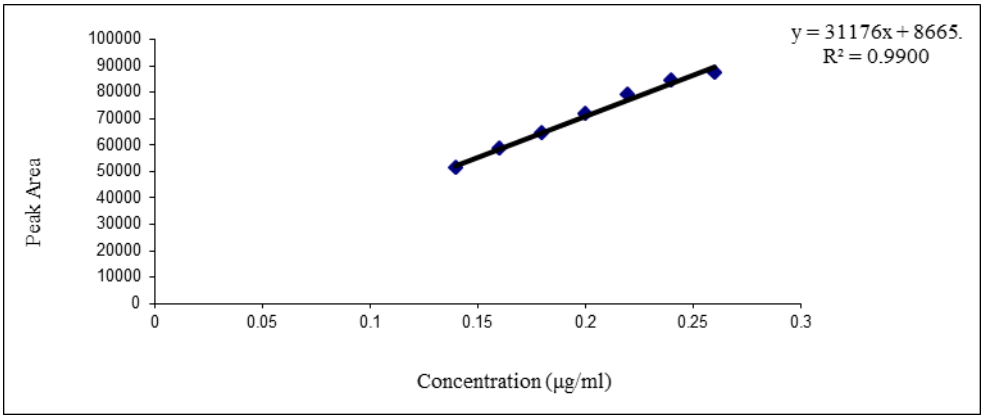
۳-۱-۳- آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم

۳-۱-۳-۱- رسم منحنی کالیبراسیون

نتایج آنالیز غلظت های استاندارد لووتیروکسین بر اساس انتگرال سطح زیر پیک و نیز انحراف معیار هر یک از غلظت ها در قالب جدول ۳-۷ آورده شده است. همچنین منحنی کالیبراسیون جهت انجام آزمون انحلال قرص های لووتیروکسین سدیم، در شکل ۳-۴ نشان داده شده است.

جدول ۳-۷ نتایج آنالیز غلظت های استاندارد لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم

غلظت های استاندارد لووتیروکسین	سطح زیر پیک لووتیروکسین ± انحراف معیار
۰/۱۴	۵۱۲۳۲/۱±۷۱۷/۵
۰/۱۶	۵۸۸۶۷/۳±۷۰۹/۰
۰/۱۸	۶۴۴۵۱/۷±۶۸۴/۳
۰/۲	۷۱۶۵۰/۲±۹۶۵/۶
۰/۲۲	۷۸۹۵۵/۹±۹۳۶/۲
۰/۲۴	۸۴۴۲۳/۴±۳۹۵/۷
۰/۲۶	۸۷۵۵۶/۹±۶۱۰/۵



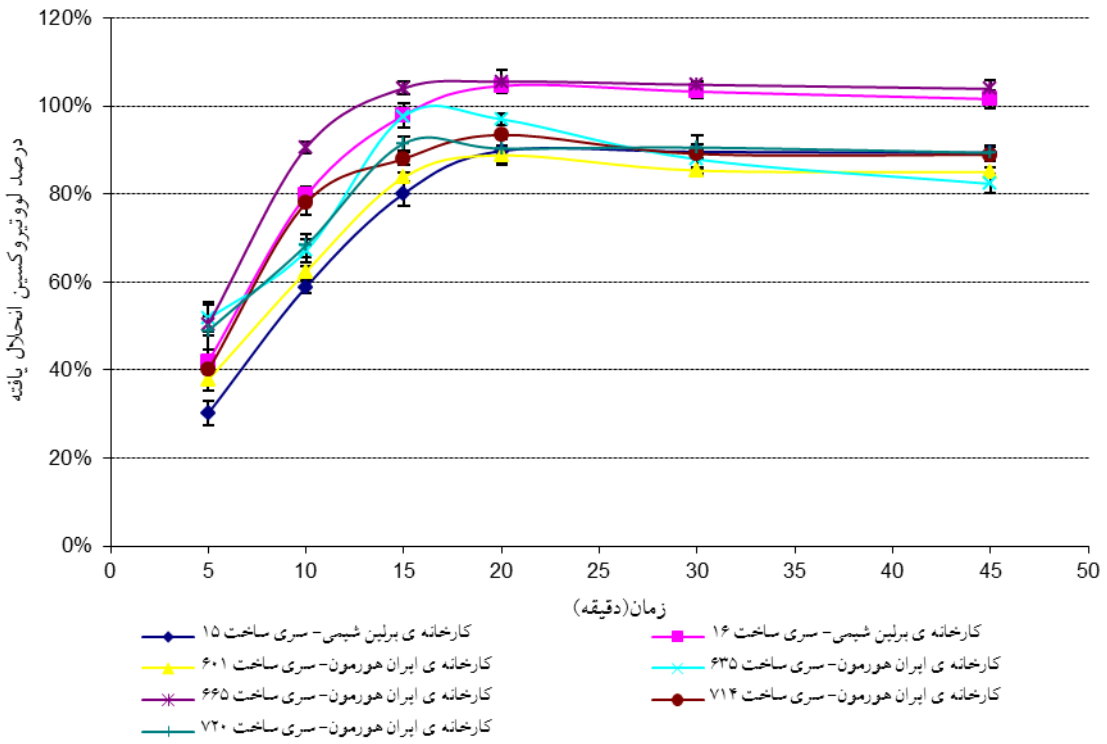
شکل ۳-۴ نمودار کالیبراسیون استاندارد لووتیروکسین در آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم

۳-۱-۳-۲- محاسبه حد تشخیص و حد تعیین مقدار

با در نظر گرفتن نسبت سیگنال به نویز دستگاه HPLC، حد تشخیص و حد تعیین مقدار به ترتیب معادل ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر حاصل گردید.

۳-۱-۳-۳- بررسی انحلال قرص لووتیروکسین سدیم تحت شرایط ۱

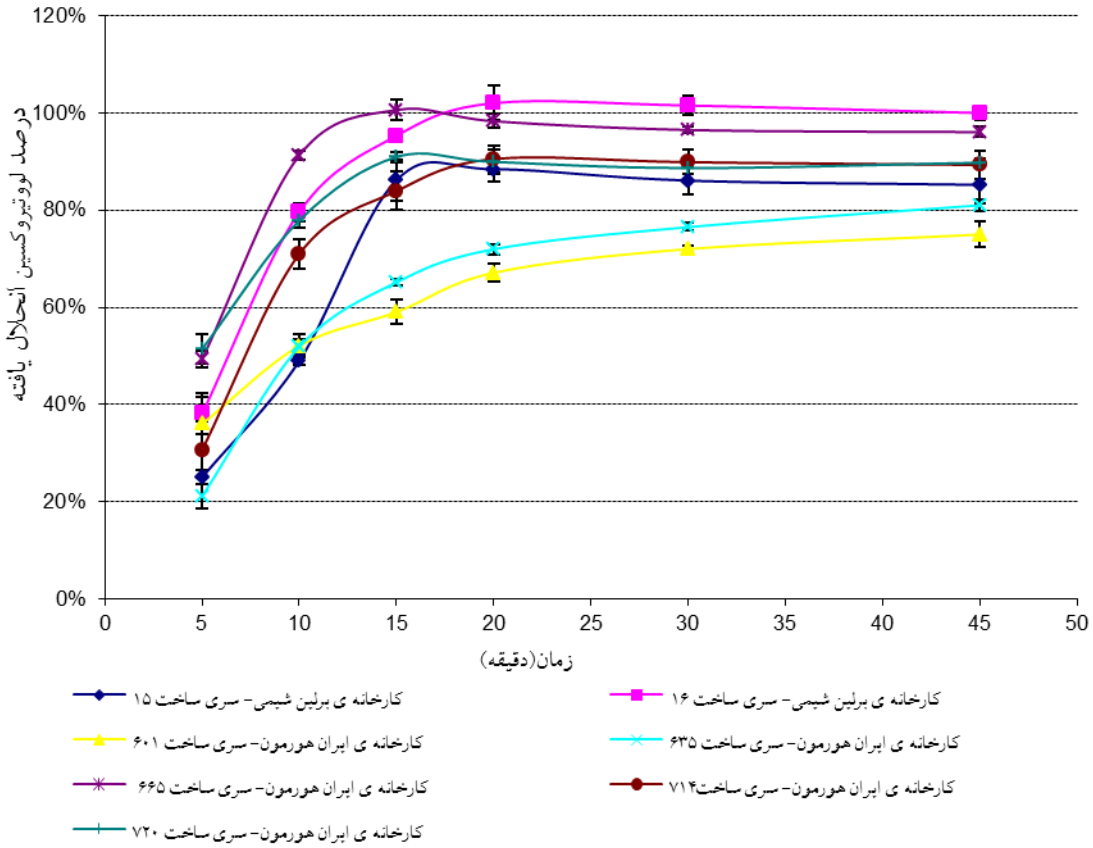
درصد انحلال فراورده های مذکور تحت شرایط ۱ در شکل ۳-۵ نمایش داده شده است. با توجه به استانداردUSP 31 باید مقدار ۷۰٪ دارو در زمان ۴۵ دقیقه در آزمون ۱ انحلال یابد. در نتیجه تمامی سری ساخت های داروهای ایرانی و آلمانی تحت شرایط ۱ انحلال قابل قبول می باشند.



شکل ۳-۵ نمودار شمایی درصد داروی آزاد شده ± خطای استاندارد در محیط انحلال در زمان های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ در آزمون انحلال فراورده های لووتیروکسین سدیم از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان با استفاده ازمحیط انحلال حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال و ۰/۲٪ سدیم لوریل سولفات انحلال

۳-۱-۳-۴- آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم تحت شرایط ۲

درصد انحلال فراورده های مذکور تحت شرایط ۲ در شکل ۳-۶ نشان داده شده است. با توجه به استاندارد USP 31 باید مقدار ۸۰٪ دارو در زمان ۴۵ دقیقه در آزمون ۲ انحلال یابد. در نتیجه تنها سری ساخت ۶۰۱ از کارخانه ایران هورمون تحت شرایط ۲ انحلال غیر قابل قبول است.



شکل ۳-۶ نمودار شمایی از درصد داروی آزاد شده ± خطای استاندارد در محیط انحلال در زمان های مختلف در آزمون انحلال فراورده های لووتیروکسین سدیم از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان با استفاده ازمحیط انحلال حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال

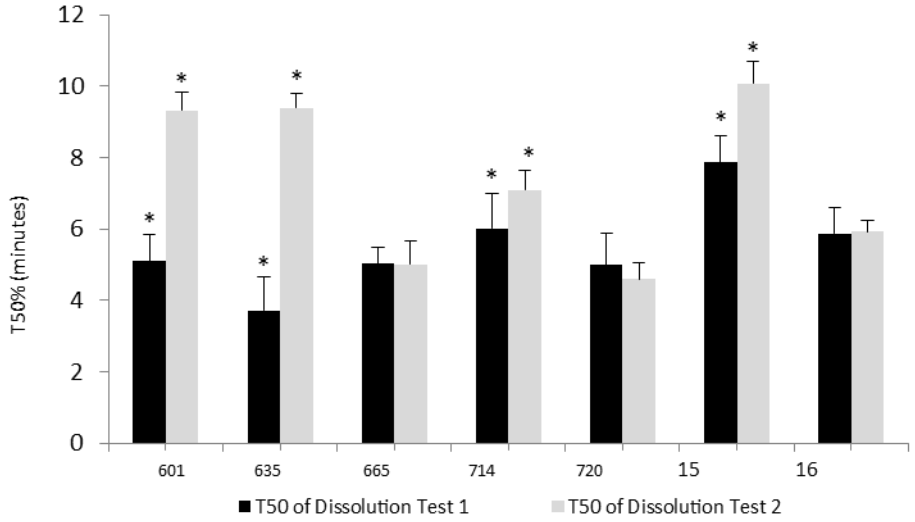
۳-۱-۳-۵- محاسبه پارامترهای انحلال $T_{50\%}$ و D_{max} تحت شرایط ۱ و ۲ انحلال

با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس، مدت زمان انحلال ۵۰٪ قرص لووتیروکسین سدیم برای سری ساخت ۶۳۵ از کارخانه ایران هورمون برابر ۳/۷۱±۰/۹۴ دقیقه و برای سری ساخت ۱۵ از کارخانه برلین شیمی برابر ۷/۸۷±۲/۵۰ دقیقه می باشد که تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. همچنین آزمون آماری T نشان داد که افزایش

مدت زمان انحلال ۵۰٪ این فراورده ها در سری ساخت هـای ۶۰۱، ۶۳۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ از کاخانـه ایـران هورمـون و سری ساخت ۱۵ از کارخانه برلین شیمی تحت شرایط ۱ و ۲ انحلال تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. در هر دو این آزمون های آماری $P<0.05$ به عنوان آستانه معنی دار بودن داده ها در نظر گرفته شد. این نتـایج در جـدول ۳-۸ و شکل ۳-۷ ارائه شده است.

جدول ۳-۸ مدت زمان انحلال ۵۰٪ قرص لووتیروکسین سـدیم بـرای سـری سـاخت هـای ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولیـد شـده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان

سری ساخت	$T_{50\%}$ ± خطای استاندارد تحت شرایط ۱ انحلال	$T_{50\%}$ ± خطای استاندارد تحت شرایط ۲ انحلال	آزمون T
۶۰۱	۵/۱۰±۱/۶۵	۹/۳۲±۰/۴۹	P<0.05
۶۳۵	۳/۷۱±۰/۹۴	۹/۳۷±۱/۲۴	P<0.05
۶۶۵	۵/۰۳±۱/۴۴	۵/۰۱±۰/۶۷	p>0.05
۷۱۴	۶/۲۴±۱/۵۸	۷/۱±۱/۹۲	P<0.05
۷۲۰	۵/۳۳±۱/۸۹	۴/۸۲±۱/۰۵	p>0.05
۱۵	۷/۸۷±۲/۵۰	۱۰/۰۷±۲/۷۶	P<0.05
۱۶	۵/۸۸±۰/۷۲	۵/۹۳±۳/۳۴	p>0.05

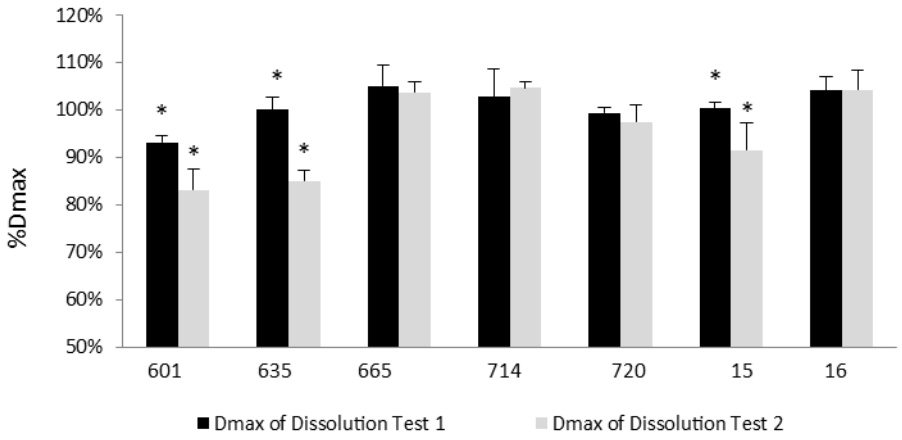


شکل ۳-۷ نمودار ستونی مقایسه پارامتر انحلال $T_{50\%}$ ± خطای استاندارد تحت شرایط ۱ و ۲ انحلال

با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس، مقدار داروی انحلال یافته در مدت زمان ۴۵ دقیقه برای سری ساخت ۶۰۱ از کارخانه ایران هورمون برابر ۹۳/۰۹±۱/۵۴ و برای سری ساخت ۱۶ از کارخانه برلین شیمی برابر ۱۰۵/۱۸±۲/۹۵ می باشد که تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. همچنین با استفاده از آزمون آماری T، مقدار داروی انحلال یافته در مدت زمان ۴۵ دقیقه هر یک از سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵ از کارخانه ایران هورمون و سری ساخت ۱۵ از کارخانه برلین شیمی تحت شرایط ۱ و ۲ انحلال، تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. در این آزمون آماری $P<0.05$ به عنوان آستانه معنی دار بودن داده ها در نظر گرفته شد. این نتایج در جدول ۳-۹ و شکل ۳-۸ ارائه شده است.

جدول ۳-۹ مقدار داروی انحلال یافته در مدت زمان ۴۵ دقیقه برای سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ تولید شده در کارخانه ایران هورمون از کشور ایران و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ تولید شده در کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان

سری ساخت	D_{max} ± خطای استاندارد تحت شرایط ۱ انحلال	D_{max} ± خطای استاندارد تحت شرایط ۲ انحلال	آزمون T
۶۰۱	۹۳/۰۹±۱/۵۴	۸۳/۱۱±۴/۵۵	P<0.05
۶۳۵	۱۰۰/۱۲±۲/۶۶	۸۵/۰۸±۲/۳۰	P<0.05
۶۶۵	۱۰۴/۱۳±۴/۲۳	۱۰۳/۶۵±۲/۳۷	p>0.05
۷۱۴	۱۰۲/۸۰±۵/۸۶	۱۰۴/۷۵±۱/۲۹	p>0.05
۷۲۰	۹۹/۴۵±۱/۰۶	۹۷/۴۴±۳/۵۸	p>0.05
۱۵	۱۰۰/۳۸±۱/۲۶	۹۱/۵۳±۵/۷۴	P<0.05
۱۶	۱۰۵/۱۸±۲/۹۵	۱۰۴/۲۲±۴/۲۷	p>0.05



شکل ۳-۸ نمودار ستونی مقایسه پارامتر انحلال Dmax ± خطای استاندارد تحت شرایط ۱ و ۲ انحلال

۳-۱-۴- تعیین مقدار ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

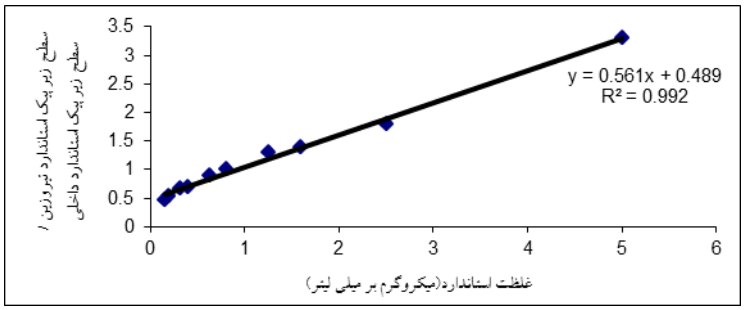
۳-۱-۴-۱- رسم منحنی کالیبراسیون

نتایج آنالیز غلظت های استاندارد تری یدوتیرونین، دی یدوتیرونین، دی یدوتیروزین، یدوتیروزین، تیروزین و تیرونین به روش استاندارد داخلی بر اساس انتگرال سطح زیر پیک در جدول ۳-۱۰ آورده شده است.

جدول ۳-۱۰ نتایج آنالیز غلظت های استاندارد تری یدوتیرونین، دی یدوتیرونین، دی یدوتیروزین، یدوتیروزین، تیروزین و تیرونین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر به روش استاندارد داخلی در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

غلظت استاندارد	سطح زیر پیک استاندارد / سطح زیر پیک استاندارد داخلی					
	T3	T2	DIT	MIT	Tyr	T0
۰/۱۵۶	۰/۴۰۲	۰/۱۰۴	۰/۰۵۵	۰/۰۴۳	۰/۰۳۹	۰/۱۲۰
۰/۲۰۰	۰/۵۶۱	۰/۱۷۶	۰/۰۹۸	۰/۰۶۵	۰/۰۵۷	۰/۲۲۰
۰/۳۱۲	۰/۶۳۹	۰/۳۱۰	۰/۱۵۳	۰/۰۸۶	۰/۰۶۴	۰/۲۷۶
۰/۴۰۰	۰/۶۹۹	۰/۴۴۱	۰/۲۲۲	۰/۱۱۷	۰/۰۷۸	۰/۳۷۷
۰/۶۲۵	۰/۸۹۶	۰/۶۲۰	۰/۳۵۷	۰/۱۹۸	۰/۱۲۹	۰/۶۳۴
۰/۸۰۰	۱/۰۲۱	۰/۷۶۶	۰/۴۳۱	۰/۲۲۱	۰/۲۳۱	۰/۷۵۴
۱/۲۵	۱/۳۴۷	۰/۹۶۴	۰/۵۰۴	۰/۳۸۷	۰/۳۰۷	۱/۱۹
۱/۶۰	۱/۵۷۲	۱/۵۶۸	۰/۸۲۷	۰/۴۰۸	۰/۴۴۰	۱/۳۵
۲/۵	۱/۸۱۴۹	۱/۹۴۰	۱/۱۲۹	۰/۶۷۵	۰/۵۶۲.	۲/۲۱
۵	۳/۳۶۱	۳/۷۶۴	۲/۸۲	۱/۲۲۷	۱/۲۵۹	۳/۴۶

منحنی کالیبراسیون تری یدوتیرونین در شکل ۳-۹ نشان داده شده است.

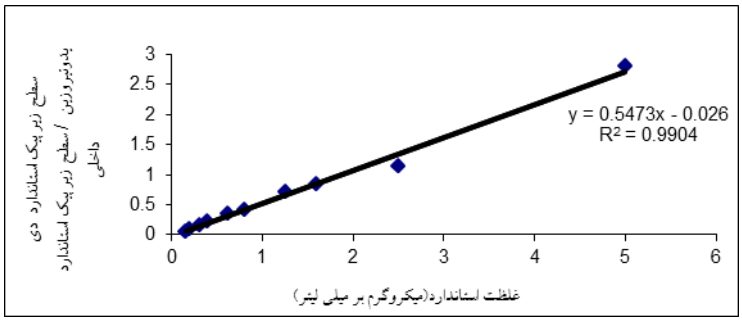


شکل ۳-۹ نمودار کالیبراسیون استاندارد تری یدوتیرونین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

منحنی کالیبراسیون دی یدوتیرونین در شکل ۳-۱۰ نشان داده شده است.

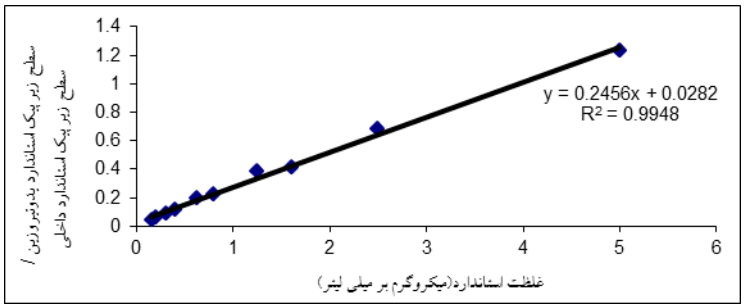
شکل ۳-۱۰ نمودار کالیبراسیون استاندارد دی یدوتیرونین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

منحنی کالیبراسیون دی یدوتیروزین در شکل ۳-۱۱ نشان داده شده است.



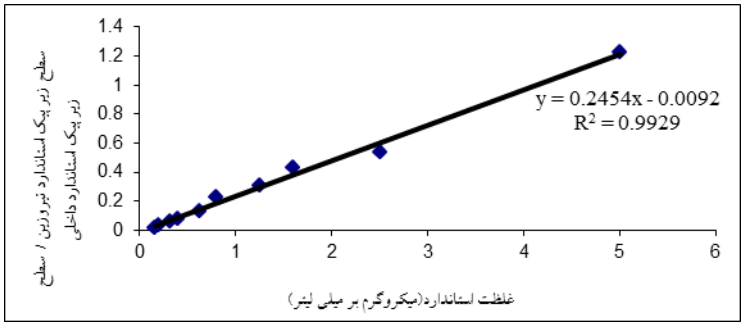
شکل ۳-۱۱ نمودار کالیبراسیون استاندارد تری یدوتیروزین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

منحنی کالیبراسیون یدوتیروزین در شکل ۳-۱۲ نشان داده شده است.



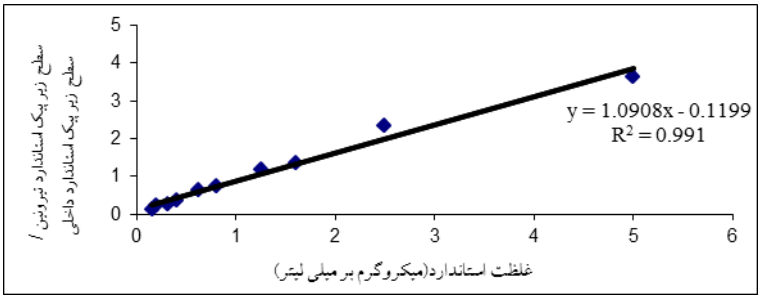
شکل ۳-۱۲ نمودار کالیبراسیون استاندارد یدوتیروزین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

منحنی کالیبراسیون تیروزین در شکل ۳-۱۳ نشان داده شده است.



شکل ۳-۱۳ نمودار کالیبراسیون استاندارد تیروزین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

منحنی کالیبراسیون تیرونین در شکل ۳-۱۴ نشان داده شده است.



شکل ۳-۱۴ نمودار کالیبراسیون استاندارد تیرونین در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

۳-۱-۴-۲- محاسبه حد تشخیص و حد تعیین مقدار

با در نظر گرفتن نسبت سیگنال به نویز دستگاه HPLC، حد تشخیص و حد تعیین مقدار هر یک از ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین مطابق جدول ۳-۱۱ محاسبه گردید.

جدول ۳-۱۱ حد تشخیص و حد تعیین مقدار تری یدوتیرونین، دی یدوتیرونین، دی یدوتیروزین، یدوتیروزین، تیروزین و تیرونین واحد بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر در آزمون اندازه گیری ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

	T3	T2	DIT	MIT	Tyr	T0
حد تشخیص	۰/۰۵	۰/۰۷	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۰۷
حد تعیین مقدار	۰/۲	۰/۷	۱	۱	۱	۰/۷

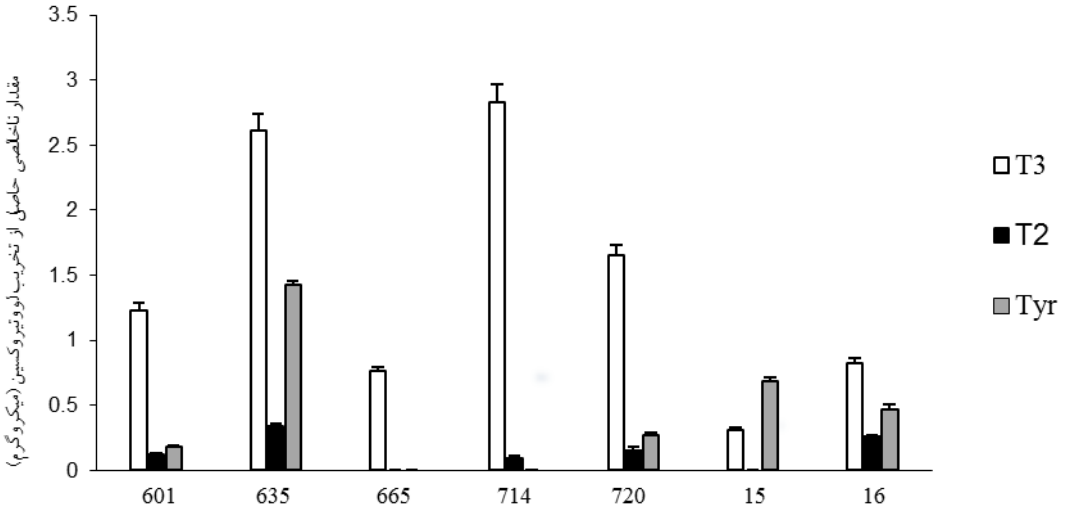
۳-۱-۴-۳- تعیین مقدار ناخالصی های حاصل از تجزیه لووتیروکسین

مقادیر ناخالصی حاصل از تجزیه لووتیروکسین در جدول ۳-۱۲ آورده شده است. همچنین نمودار مقایسه ای این مقادیر در شکل ۳-۱۵ ارائه شده است.

جدول ۳-۱۲ مقدار ناخالصی حاصل از تجزیه لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم ± انحراف معیار

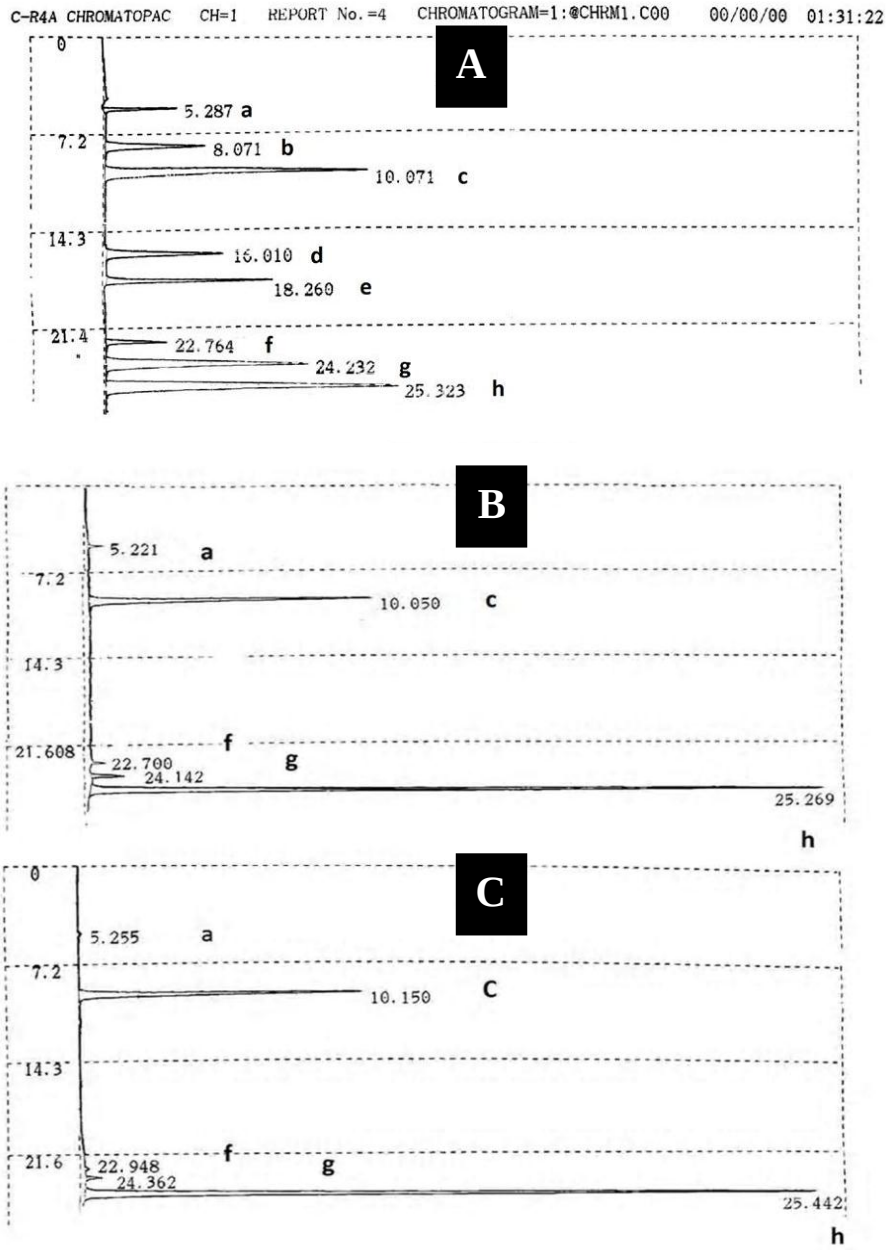
	مقدار ناخالصی ± انحراف معیار					
شماره سری ساخت	T3	T2	DIT	MIT	Tyr	T0
۶۰۱	۱/۲۳±۰/۱۴۹	۰/۱۲±۰/۰۰۸	ND	ND	۰/۱۸±۰/۰۱۱	ND
۶۳۵	۲/۶۱±۰/۵۱۹	۰/۳۴±۰/۰۱۶	ND	ND	۱/۴۳±۰/۰۲۹	ND
۶۶۵	۰/۷۶±۰/۰۹۵	ND	ND	ND	ND	ND
۷۱۴	۲/۸۹±۰/۳۸۱	۰/۰۹±۰/۰۱۷	ND	ND	ND	ND
۷۲۰	۱/۶۵±۰/۰۵۲	۰/۱۵±۰/۰۳۲	ND	ND	۰/۲۷±۰/۰۲۵	ND
۱۵	۰/۳۱±۰/۰۷۱	ND	ND	ND	۰/۶۹±۰/۰۳۱	ND
۱۶	۰/۸۲±۰/۱۸۳	۰/۲۶±۰/۰۰۸	ND	ND	۰/۴۷±۰/۰۳۹	ND

ND= No Detect



شکل ۳-۱۵ نمودار ستونی جهت مقایسه مقدار ناخالصی حاصل از تجزیه لووتیروکسین واحد بر حسب میکروگرم ± انحراف معیار

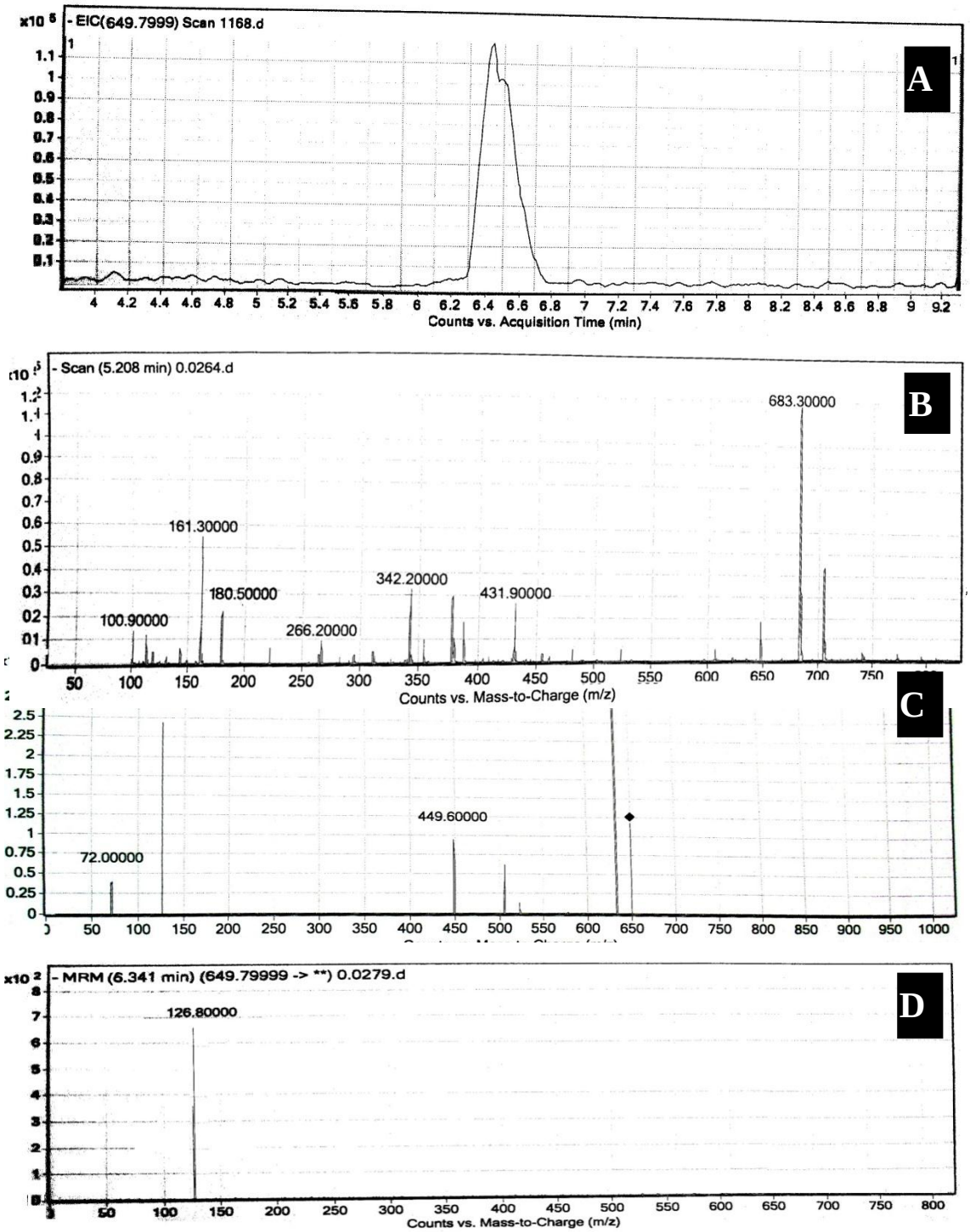
کروماتوگرام های تعیین مقدار ناخالصی حاصل از تخریب لووتیروکسین به روش استاندارد داخلی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا در شکل ۳-۱۶ آورده شده است.



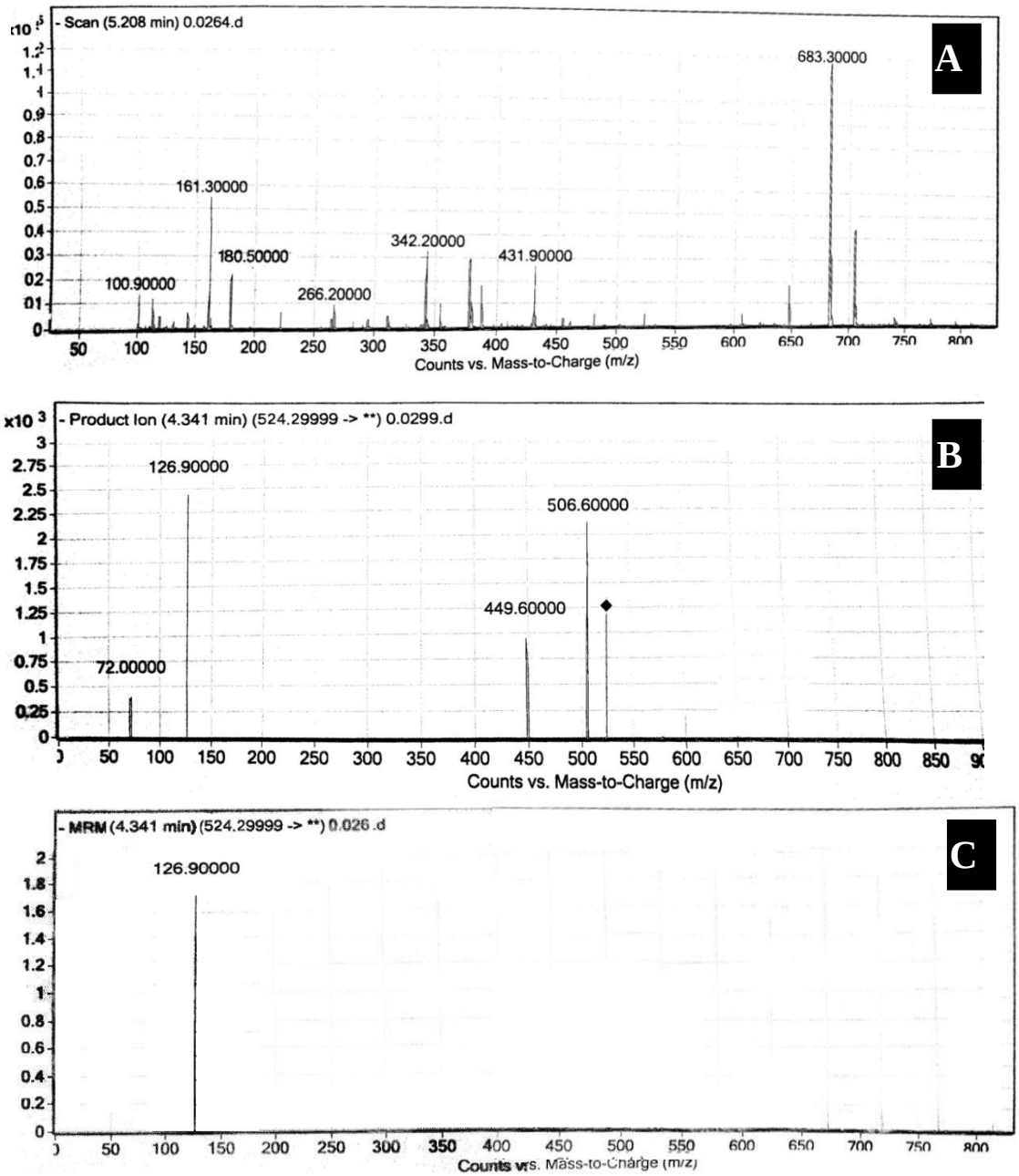
در پایش یون به روش تمام اسکن، در سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵ و ۷۲۰ از کارخانه ایران هورمون و سری ساخت ۱۵ از کارخانه برلین شیمی مقدار اندکی از ناخالصی های تری یدوتیرونین با وزن مولکولی ۶۴۹/۸، دی یدوتیرونین با وزن مولکولی ۵۲۴/۳ و تیروزین با وزن مولکولی ۱۸۰/۵ مشاهده شد. در سری ساخت ۶۶۵ از کارخانه ایران هورمون تنها مقدار اندکی از ناخالصی تری یدوتیرونین با وزن مولکولی ۶۴۹/۸ مشاهده شد. همچنین بررسی سری ساخت ۷۱۴ از کارخانه ایران هورمون در این روش پایش نشان داد که مقدار اندکی از ناخالصی های تری یدوتیرونین با وزن مولکولی ۶۴۹/۸ و دی یدوتیرونین با وزن مولکولی ۵۲۴/۳ در ترکیب دارو وجود دارد. همچنین در مطالعه سری ساخت ۱۵ از کارخانه برلین شیمی مقدار اندکی از ناخالصی های تری یدوتیرونین با وزن مولکولی ۶۴۹/۸ و تیروزین با وزن مولکولی ۱۸۰/۵ مشاهده شد. تمامی نتایج حاصل از این مطالعه کیفی به روش تمام اسکن، مؤید نتایج حاصل از بررسی کمی ناخالصی ها به روش HPLC است.

در پایش یون ها به روش اسکن یون های دختر، تری یدوتیرونین استاندارد با انرژی شکست ۱۳۵/۲۵، یون دختری با وزن مولکولی ۱۲۷ ایجاد کرد. همچنین دی یدوتیرونین استاندارد با انرژی شکست ۱۳۵/۲۰، یون دختری با وزن مولکولی ۱۲۷ و تیروزین استاندارد با انرژی شکست ۱۳۵/۷، یون دختری با وزن مولکولی ۱۱۹ ایجاد کرد.

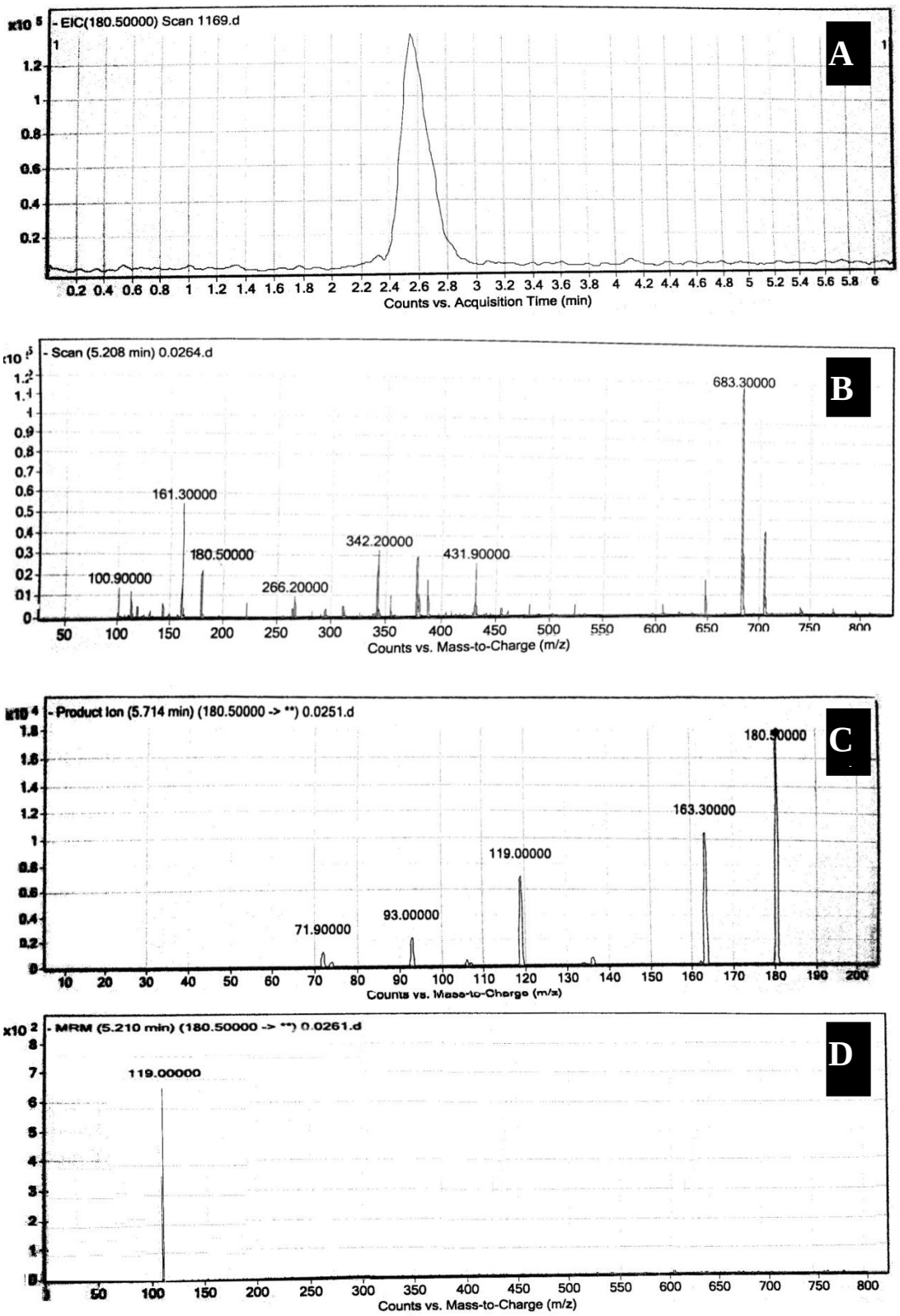
پایش یون ها به روش اسکن یک واکنش انتخابی نشان داد که در تمامی سری ساخت های هر دو کارخانه ترکیب تری یدوتیرونین با وزن مولکولی ۶۴۹/۸ با انرژی شکست ۱۳۵/۲۵بیشترین یون دختر را با وزن مولکولی ۱۲۷ ایجاد می کند. در سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ از کارخانه ایران هورمون و ۱۶ از کارخانه برلین شیمی ترکیب دی یدوتیرونین با وزن مولکولی ۵۲۴/۳ با انرژی شکست ۱۳۵/۲۰بیشترین یون دختر را با وزن مولکولی ۱۲۷ ایجاد می کند. همچنین سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵ و ۷۲۰ از کارخانه ایران هورمون و سری ساخت ۱۵ و ۱۶ از کارخانه برلین شیمی ترکیب تیروزین با وزن مولکولی ۱۸۰/۵ با انرژی شکست ۱۳۵/۷بیشترین یون دختر را با وزن مولکولی ۱۱۹ ایجاد می کند. مقایسه سه روش پایش یون ها برای سه ناخالصی تری یدوتیرونین، دی یدوتیرونین و تیروزین به ترتیب در شکل های ۳-۱۷، ۳-۱۸ و ۳-۱۹ نمایش داده شده است.



(D) اسکن یک واکنش انتخابی.

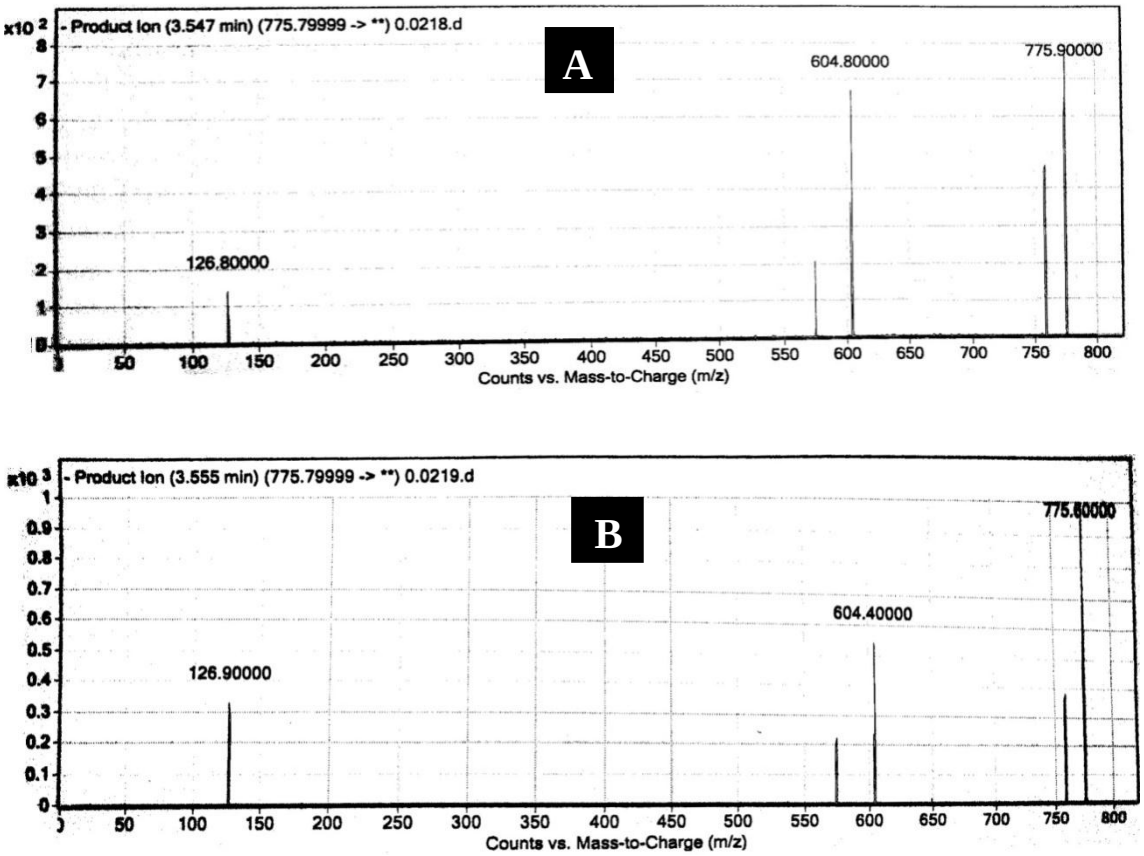


شکل ۳–۱۸ پایش کیفی یون های دی یدوتیرونین با دستگاه LC-MS/MS به روش (A) تمام اسکن، (B) اسکن یون های دختر، (C) اسکن یک واکنش انتخابی.



شکل ۳-۱۹ پایش کیفی یون های تیروزین با دستگاه LC-MS/MS به روش (A) EIC، (B) تمام اسکن، (C) اسکن یون های دختر، (D) اسکن یک واکنش انتخابی.

بررسی الگوی شکست مولکول لووتیروکسین هر دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی به کمک سیستم پایش یون های دختر نشان داد که این الگوی شکست در هر دو فراورده یکسان بود. مقایسه این دو الگوی شکست در شکل ۳-۲۰ مشاهده می شود.

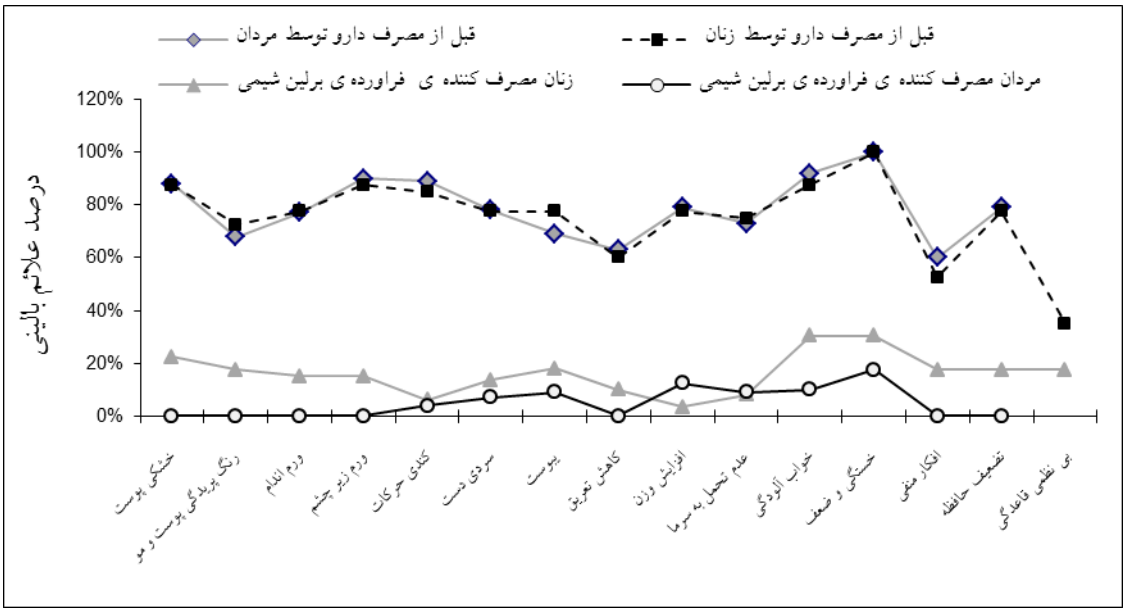


شکل ۳-۲۰ مقایسه الگوی شکست مولکول لووتیروکسین موجود در فراورده های دو کارخانه (A) ایران هورمون و (B) برلین شیمی

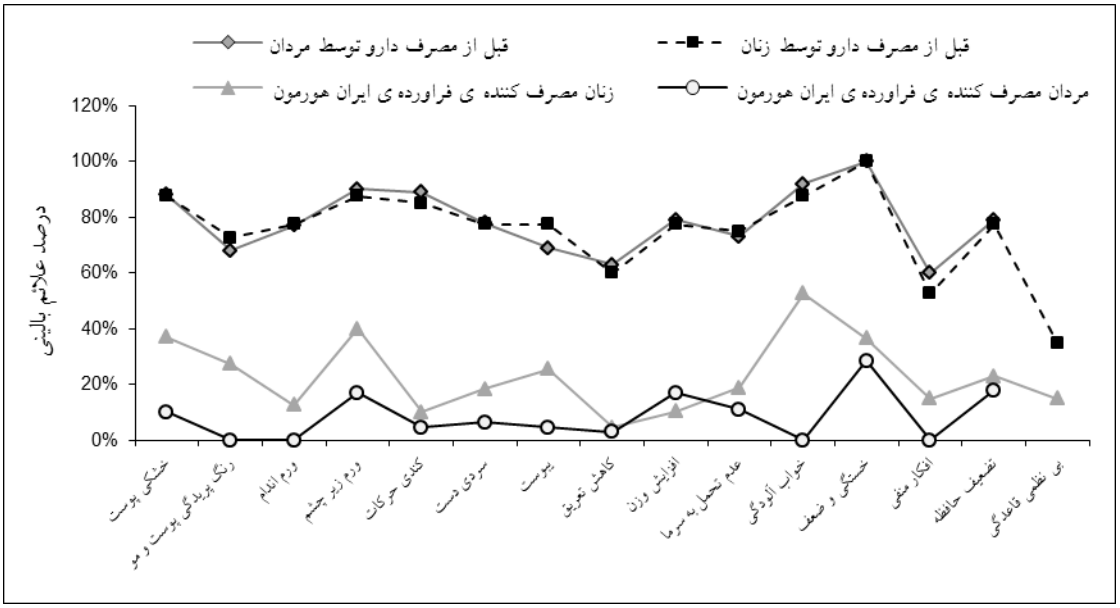
۳-۲- نتایج مطالعات بالینی و آزمایشگاهی عملکرد غده تیروئید

۳-۲-۱- مطالعه اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین با توجه به جنسیت بیمار

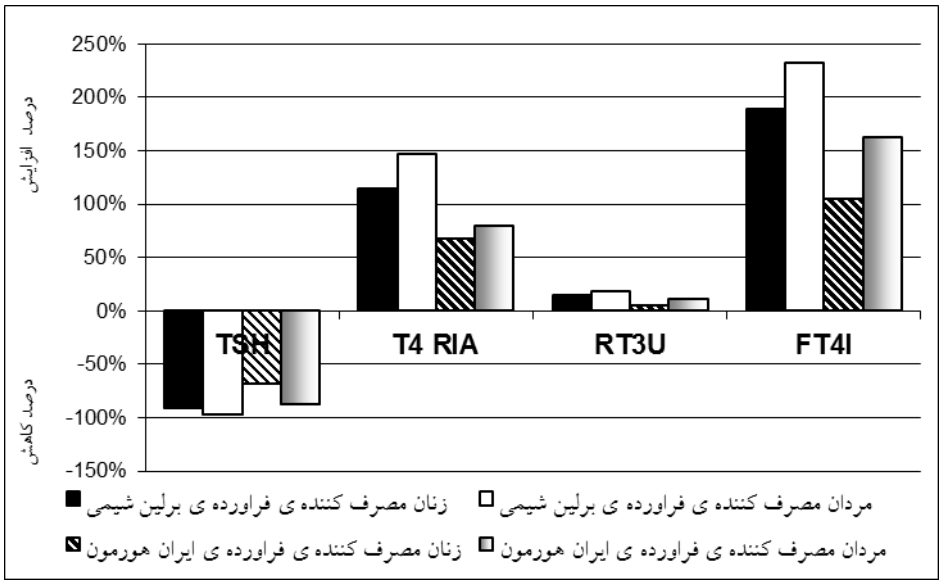
نتایج بررسی بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در دو جنس زن و مرد، پس از درمان با داروی لووتیروکسین سدیم تولید شده در دو کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان و ایران هورمون از کشور ایران به ترتیب در شکل های ۳-۲۱ و ۳-۲۲ ارائه شده است. مطابق این نتایج تقریباً تمامی علائم بالینی در مردان بیمار پس از درمان با هر دو فراورده تولید شده در دو کارخانه مذکور بیشتر از زنان بهبود می یابد. در این میان تنها علامت بالینی افزایش وزن در زنان بیمار بیشتر از مردان کنترل می شود. از سوی دیگر علائم آزمایشگاهی عملکرد تیروئید در مردان مصرف کننده هر دو فراورده مذکور نسبت به زنان درصد تغییرات و روند بهبود بیشتری نشان می دهد. نتایج بررسی علائم آزمایشگاهی در شکل ۳-۲۳ آورده شده است. در نتیجه مردان نسبت به زنان پاسخ بهتری به درمان با فراورده های لووتیروکسین نشان می دهند و علائم بالینی و آزمایشگاهی بیماری در مردان بهتر کنترل می شود.



شکل ۳-۲۱ مقایسه درصد بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در دو جنس زن و مرد پس از درمان با فراورده لووتیروکسین سدیم تولید شده در کارخانه برلین شیمی



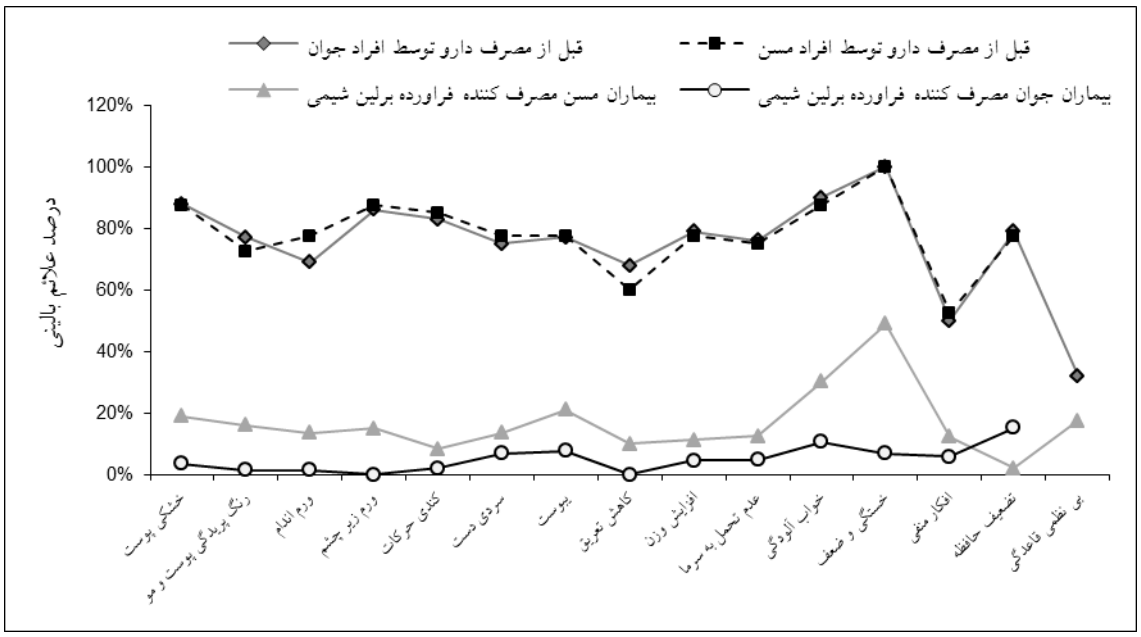
شکل ۳-۲۲ مقایسه درصد بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در دو جنس زن و مرد پس از درمان با فراورده لووتیروکسین سدیم تولید شده در کارخانه ایران هورمون



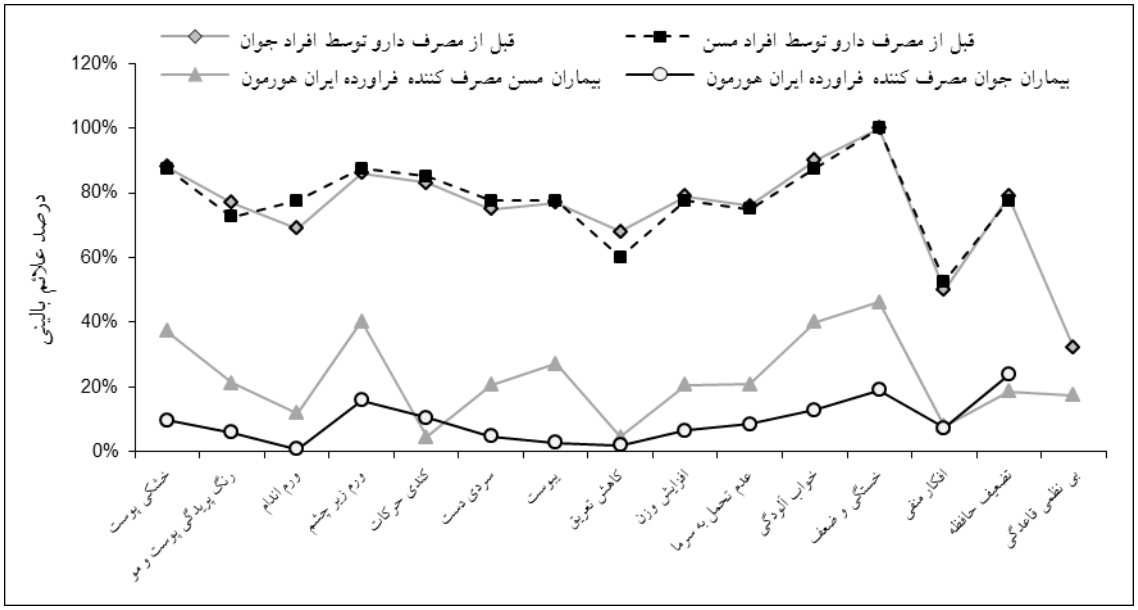
شکل ۳-۲۳ مقایسه درصد افزایش و کاهش علائم آزمایشگاهی در دو جنس زن و مرد مبتلا به کم کاری تیروئید پس از درمان با فراورده های لووتیروکسین سدیم تولید شده در دو کارخانه برلین شیمی و ایران هورمون

۳-۲-۲- مطالعه اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین با توجه به سن بیمار

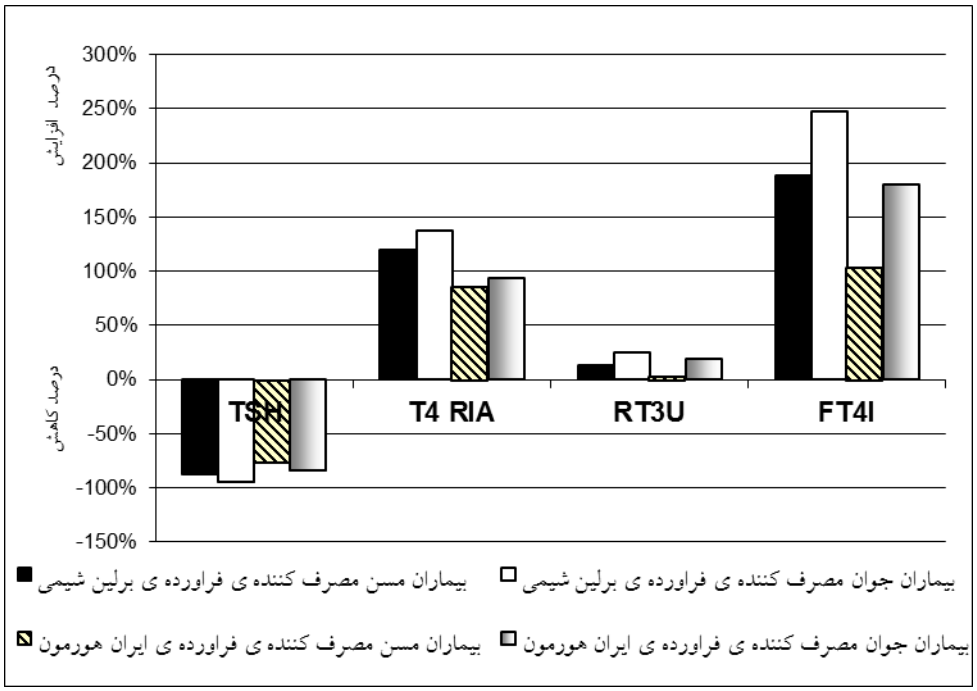
نتایج بررسی بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در بیماران جوان و مسن، پس از درمان با داروی لووتیروکسین سدیم تولید شده در دو کارخانه برلین شیمی از کشور آلمان و ایران هورمون از کشور ایران به ترتیب در شکل های ۳-۲۴ و ۳-۲۵ ارائه شده است. مطابق این نتایج تقریباً تمامی علائم بالینی در بیماران جوان پس از درمان با هر دو فراورده تولید شده در دو کارخانه مذکور بیشتر از افراد مسن بهبود می یابد. در این میان تنها علامت بالینی تضعیف حافظه در بیماران مسن بیشتر از جوانان کنترل می شود. از سوی دیگر علائم آزمایشگاهی در بیماران جوان مصرف کننده هر دو فراورده مذکور نسبت به بیماران مسن درصد تغییرات و روند بهبود بیشتری دارد. نتایج بررسی علائم آزمایشگاهی در شکل ۳-۲۶ آورده شده است. در نتیجه بیماران جوان تر پاسخ بهتری به درمان با فراورده های لووتیروکسین نشان می دهند و علائم بالینی و آزمایشگاهی بیماری در این افراد بهتر کنترل می شود.



شکل ۳-۲۴ مقایسه درصد بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در بیماران جوان و مسن پس از درمان با فراورده لووتیروکسین سدیم تولید شده در کارخانه برلین شیمی



شکل ۳-۲۵ مقایسه درصد بروز علائم بالینی بیماری کم کاری تیروئید در بیماران جوان و مسن پس از درمان با فراورده لووتیروکسین سدیم تولید شده در کارخانه ایران هورمون



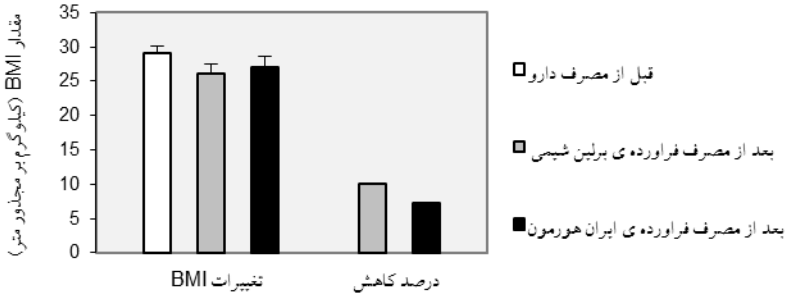
شکل ۳-۲۶ مقایسه درصد افزایش و کاهش علائم آزمایشگاهی در بیماران جوان و مسن پس از درمان با فراورده های لووتیروکسین سدیم تولید شده در دو کارخانه برلین شیمی و ایران هورمون

۳-۲-۳- مطالعه BMI قبل و پس از مصرف فراورده کارخانه های ایران هورمون و برلین شیمی

با انجام آزمون آماری آنالیز واریانس مشخص گردید که مقدار BMI بیماران مورد مطالعه قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر دو فراورده دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. همچنین با انجام آزمون آماری T برای مقایسه درصد کاهش BMI پس از مصرف دو فراورده از دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی و بدست آمدن $P<0.05$ اثبات شد که درصد کاهش BMI دو فراورده تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند به گونه ای که فراورده برلین شیمی مقدار BMI بیماران را بیشتر کاهش می دهد. میانگین این مقادیر در جدول ۳-۱۳ آورده شده است. همچنین نمودار مقایسه کننده BMI بیماران قبل و پس از مصرف دو فراورده در شکل ۳-۲۷ نمایش داده شده است.

جدول ۳-۱۳ میانگین BMI واحد بر حسب کیلوگرم بر مجذور متر ± انحراف معیار، قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی و نیز مقایسه درصد کاهش BMI پس از مصرف دو فراورده تولید شده در دو کارخانه مذکور

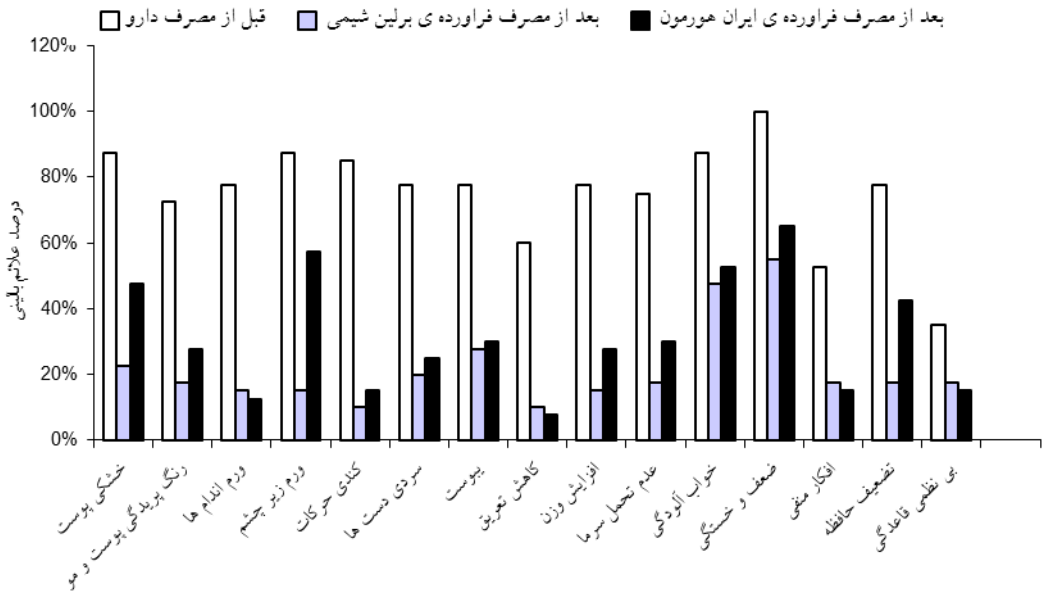
	میانگین	± انحراف معیار	± خطای استاندارد	٪ کاهش
قبل از مصرف دارو	۲۹/۱۰	۳/۵۶	۰/۷۴	_
پس از مصرف فراورده ایران-هورمون	۲۶/۹۸	۲/۲۴	۰/۶۸	۷/۲۸
پس از مصرف فراورده برلین-شیمی	۲۶/۱۹	۲/۱۸	۰/۶۷	۱۰/۱۰



شکل ۳-۲۷ نمودار ستونی مقایسه BMI واحد بر حسب کیلوگرم بر مجذور متر ± انحراف معیار، قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی و نیز مقایسه درصد کاهش BMI پس از مصرف دو فراورده تولید شده در دو کارخانه مذکور

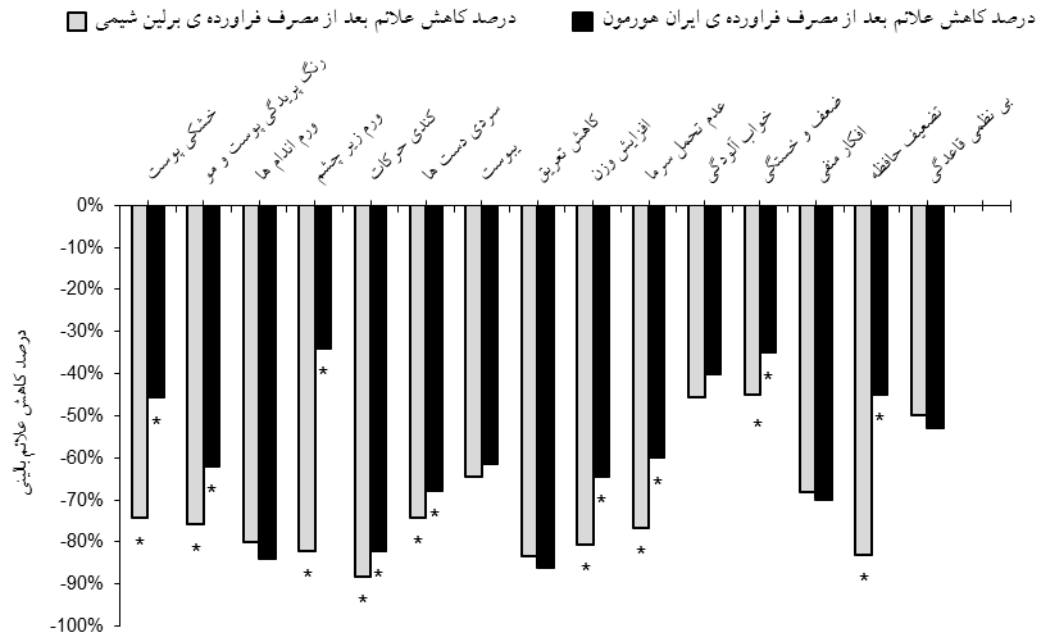
۳-۲-۴- مطالعه علائم بالینی قبل و بعد از مصرف فراورده های دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی

با انجام آزمون آماری کیفی مربع کای مشخص گردید که کاهش علائم بالینی بیماران مورد مطالعه، قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر دو فراورده دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. همچنین میزان کاهش تمامی علائم بالینی پس از مصرف دو فراورده از دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی جز شش علامت ورم اندام، یبوست، کاهش تعریق، خواب آلودگی، بی نظمی قاعدگی، تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند به گونه ای که در اغلب موارد فراورده برلین شیمی علائم بالینی بیمار را بیشتر کاهش می دهد. در این آزمون آماری $P<0.05$ به عنوان آستانه معنی دار بودن داده ها در نظر گرفته شد. این مقایسه ها در شکل های ۳-۲۸ و ۳-۲۹ نمایش داده شده است.



شکل

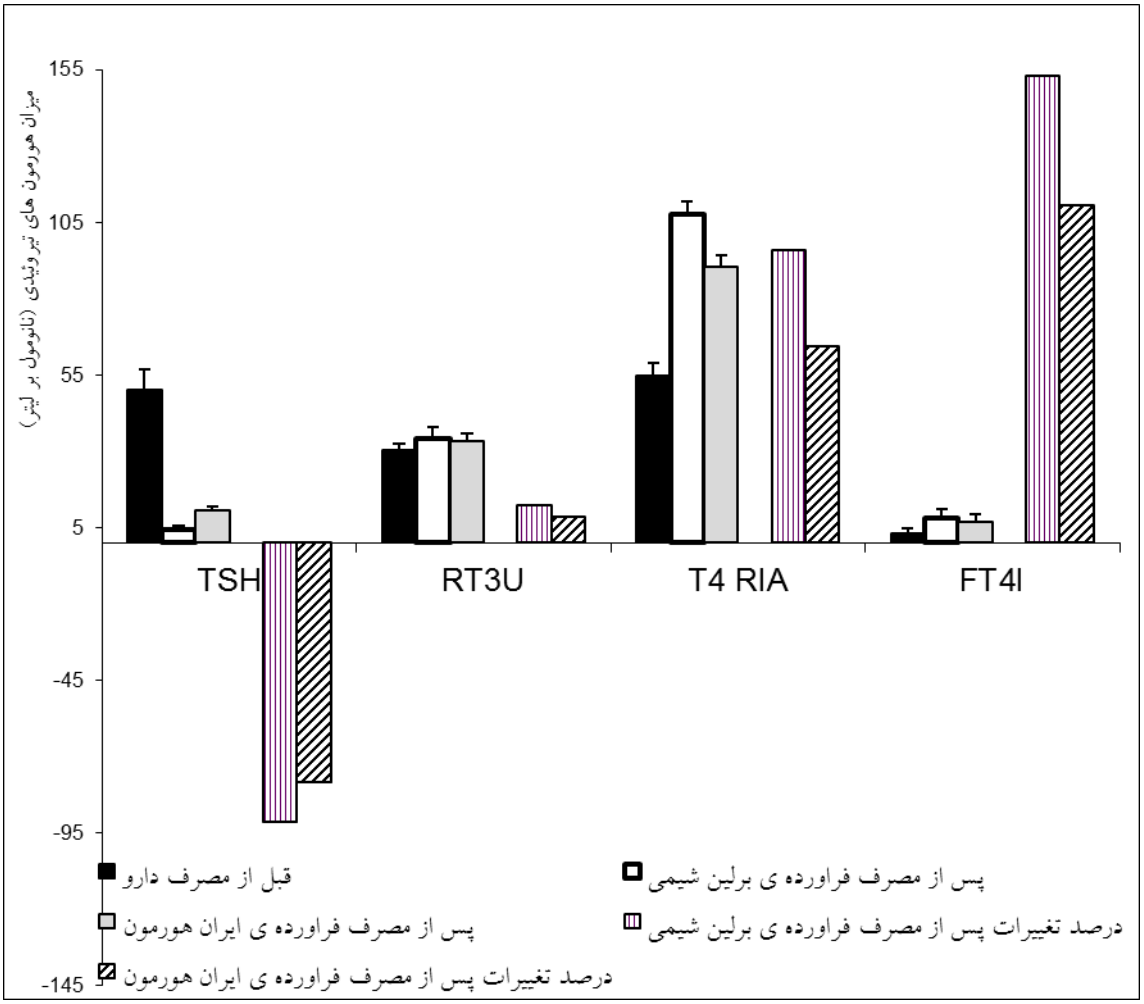
۳-۲۸ نمودار ستونی مقایسه درصد علائم بالینی بیماران کم کار تیروئید قبل و پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی



شکل ۳-۲۹ نمودار ستونی مقایسه درصد کاهش علائم بالینی بیماران کم کار تیروئید پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی

۳-۲-۵- مطالعه علائم آزمایشگاهی قبل و پس از مصرف فراورده های دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی

نتایج مقایسه علائم آزمایشگاهی قبل و پس از مصرف فراورده های دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی در شکل ۳-۳۰ ارائه شده است. در این مطالعه به کمک آزمون های آماری آنالیز واریانس و آزمون T مشاهده شد که میزان هورمون های TSH، T_3، T_4 و FT_4I قبل و پس از مصرف دارو به طرز معنی داری تغییر می کند. همچنین درصد کاهش هورمون TSH و درصد افزایش هورمون های T_3، T_4 و FT_4I توسط فراورده برلین شیمی به طور معنی داری بیشتر از درصد تغییرات این هورمون ها توسط فراورده ایران هورمون است. در این آزمون آماری $P<0.05$ به عنوان آستانه معنی دار بودن داده ها در نظر گرفته شد.



شکل ۳-۳۰ نمودار ستونی مقایسه میزان هورمون های تیروئیدی ± انحراف معیار، قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر یک از فراورده های تولید شده در دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی و نیز مقایسه درصد افزایش و کاهش هورمون ها پس از مصرف دو فراورده تولید شده در دو کارخانه مذکور

بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث

تیروئید بزرگ ترین غده درون ریز بدن است که هورمون های ۵،۵،۳،۳،َ-تترایدوتیرونین و ۵،۳،۳،َ-تری یدوتیرونین و مقدار بسیار اندکی از چند هورمون ید دار مشابه دیگر را ترشح می کند. این دو هورمون اثرات فیزیولوژیک مهمی در حفظ رشد و نمو، حفظ دمای طبیعی بدن، حفظ سطح طبیعی انرژی بدن، متابولیسم، سنتز ترکیبات مختلف بدن و انجام بسیاری از واکنش های بیوشیمیایی بدن ایفا می کنند[۱۵]. هورمون های تیروئید همچنین دارای دو اثر عمده در بافت ها شامل افزایش متابولیسم و تحریک رشد کودکان است که به ترتیب تحت عنوان اثرات متابولیک و اثرات عمومی شناخته می شوند. اثرات متابولیک این هورمون ها مربوط به مصرف اکسیژن و اثرات عمومی با سنتز پروتئین در بدن مرتبط می باشد. تمامی سلول های بدن به هورمون های تیروئید پاسخ می دهند[۳۰، ۳۱]. در نتیجه مبتلایان به بیماری های تیروئید از طیف وسیعی از علائم رنج می برند[۵، ۶]. بیماری های مربوط به غده تیروئید از جمله شایع ترین بیماری های غدد درون ریز در سراسر جهان می باشد. کشور پهناور ما یکی از مناطق آندمیک بیماری های تیروئید به شمار می رود[۱۶].

بیماری کم کاری تیروئید مجموعه ای از اختلالات بالینی و بیوشیمیایی است که به علت کمبود یا فقدان ترشح هورمون های تیروئید ایجاد می شود. سرعت متابولیسم پایه در این بیماری به علت ارتباط این هورمون ها با وضعیت اکسیداتیو و آنتی اکسیداتیو ارگان ها پایین است[۱]. کم کاری تیروئید در شیرخواران و کودکان موجب کندی رشد و نمو و عقب ماندگی دائمی ذهنی و حرکتی می شود. شروع کم کاری تیروئید در بزرگسالان منجر به کند شدن فرایندهای متابولیک می شود. این بیماران معمولاً قبل از اثبات تشخیص قطعی دچار خستگی، خواب آلودگی و افزایش وزن تدریجی می باشند. علائم کم کاری تیروئید با کاهش میزان هورمون تیروکسین و افزایش هورمون تیروتروپین سرم همراه است[۲، ۳، ۳۴، ۳۵].

مطابق پیش بینی مرکز کنترل و پیش گیری از بیماری های کشور، گسترش این بیماری همچنان رو به افزایش است [۴-۲]. بر اساس مطالعات جمعیت تخمین زده می شود که در آمریکا بیش از ۶ تا ۸ میلیون نفر به بیماری کم کاری غده تیروئید مبتلا باشند و تنها بیماری نیمی از آن ها تشخیص داده شده و درمان گردیده است. این بیماری با افزایش

سن شیوع بیشتری پیدا می کند. همچنین بررسی ها نشان می دهد بیماری کم کاری تیروئید در زنان بالای ۴۰ سال به نسبت ۱ به ۱۰ دیده می شود. کم کاری تیروئید در زنان پنج بار بیشتر از مردان دیده می شود[۱۵]. شایع ترین علت کم کاری غده تیروئید در دنیا کمبود ید است. همچنین در مناطقی که کمبود ید وجود ندارد بیماری التهاب خودایمنی غده تیروئید از جمله علل شایع کم کاری تیروئید محسوب می شوند[۳۹].

در بیماری های خودایمنی تیروئید یا سایر بیماری هایی که کمبود ترشح این هورمون مشاهده می شود، هورمون های تیروئیدی جایگزین می شوند[۶].

در گذشته غده تیروئید حیوانات، به فرم خشک شده، بدون چربی و بدون پروتئین به صورت فراورده خام تهیه می شد که حاوی هورمون های تیروئیدی تیروکسین و تری یدوتیرونین بود. معایب این فراورده های بیولوژیک شامل خلوص و ثبات کم هورمون های تیروئید بر اثر خشک کردن غده تیروئید، متفاوت بودن نسبت ترشح تیروکسین به تری یدوتیرونین از غده تیروئید در گونه های مختلف حیوانات، خاصیت آنتی ژنی، ناپایداری و دشواری در پایش آزمایشگاهی است[۶].

هورمون تری یدوتیرونین پنج تا هشت بار فعال تر از لووتیروکسین است. معایب این فراورده شامل بهای بالاتر، دشوارتر بودن تعیین سطح سرمی آن، نیمه عمر کوتاه ۲۴ ساعته و در نتیجه لزوم تجویز دوزهای متعدد روزانه است. علاوه بر این به دلیل فعالیت هورمونی زیاد و اثرات خطرناک سمی روی قلب این فراورده برای درمان جایگزین کردن هورمون به کار نمی رود اما به ندرت جهت سرکوب کوتاه مدت تیروتروپین به کار رود. لذا ایزومر چپ گرد مولکول تیروکسین صناعی به علت اثربخشی پیوسته و ایجاد درجات سرمی ثابت تیروکسین و تری یدوتیرونین، شروع اثر آهسته، مدت اثر طولانی تر، پایداری، محتوای یکنواخت، قیمت ارزان، نیمه عمر طولانی هفت روزه که امکان تجویز یک بار در روز را فراهم می کند، غلظت خونی دقیق تری از هورمون نسبت به تیروئید طبیعی به وجود می آورد. علاوه بر این تبدیل تیروکسین به تری یدوتیرونین در داخل سلول باعث شده که تجویز هورمون لووتیروکسین به تنهایی میزان مورد نیاز هر دو هورمون را تأمین نماید. در نتیجه لووتیروکسین سدیم خوراکی صناعی بر سایر فراورده های درمانی ترجیح داده می شود[۶]. لووتیروکسین یک محدوده درمانی باریک دارد، به گونه ای که دوزهای

۲۵-۲۰٪ خارج از حریم درمانی می تواند بیمار را در معرض عوارض جانبی ناخوشایند و شدیدی مانند کم کاری و پرکاری پیشرونده تیروئید و اثرات زیان بار قلبی و متابولیکی قرار دهد[۹ ،۸].

تنظیم مقدار دوز دارو و اطمینان از وجود مقدار ماده موثره دارویی به مقدار استاندارد، یکنواختی ماده موثره در فراورده تولید شده و دارو رسانی با دوز مناسب فراورده دارویی به بدن، در بهبود اثربخشی این فرآورده ها و عدم بروز عوارض جانبی ضروری است[۲۲]. هدف از تعیین مقدار ماده موثره، بررسی میزان ماده موثره موجود در فراورده های دارویی تولید شده و مقایسه نتیجه بدست آمده از این آزمون با مقادیر استاندارد، جهت بررسی کفایت کمی میزان ماده موثره به کار رفته در هر یک از سری ساخت های متعدد کارخانجات مختلف می باشد. همچنین هدف از انجام بررسی یکنواختی ماده موثره، تعیین مقدار ماده موثره موجود در هر واحد دوز دارویی تولید شده به صورت مجزا در هر سری ساخت می باشد. بدین ترتیب همگونی مقدار ماده موثره موجود در هر واحد دوز دارویی مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت[۵۴].

در مطالعه حاضر آزمون های برون تن کنترل کیفی تعیین مقدار و یکنواختی ماده موثره مطابق دستورالعمل ارائه شده در کتاب مرجع USP 31 با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از دتکتور ماوراءبنفش در طول موج ۲۲۵ نانومتر با ستون C_{18}، به کمک فاز متحرک متانول-اسید فسفریک ۰/۱٪ به ترتیب به نسبت ۶۰:۴۰ درصد حجمی-حجمی و با استفاده از استاندارد داخلی تئوفیلین انجام شد. در این بررسی سری ساخت های ۶۰۱، ۶۳۵، ۶۶۵، ۷۱۴ و ۷۲۰ از کارخانه ایران هورمون و سری ساخت های ۱۵ و ۱۶ از کارخانه برلین شیمی آلمان مورد ارزیابی کیفی قرار گرفت. مقدار ماده موثره و یکنواختی ماده موثره استاندارد مطابق USP 31 در محدوده ۱۱۰-۹۰٪ قرار داشت. در نتیجه مقدار ماده موثره بدست آمده در تمامی سری ساخت های هر دو کارخانه ایرانی و آلمانی در آزمون تعیین مقدار و یکنواختی میزان ماده موثره قابل قبول بود. محققی به نام دانگ[1] در سال ۱۹۹۱ در کالیفرنیا دو فراورده تجاری و دو فراورده ژنریک را مورد ارزیابی کیفی قرار داد. آنالیز این قرص ها با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از دتکتور ماوراءبنفش در طول موج ۲۲۳ نانومتر و ستون C_{18}، به کمک فاز متحرک متانول-اسیدفسفریک-آب به ترتیب به نسبت ۷۱، ۰/۱، ۲۸/۹ درصد حجمی-حجمی-حجمی و با استفاده از استاندارد

1. Dong

داخلی تئوفیلین نشان داد که محتوی داروی ژنریک ۳۰٪ کمتر از مقدار استاندارد تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا است. این بررسی مقدار ماده موثره استاندارد مطابق کتاب مرجع USP را در محدوده ۱۱۰-۹۰٪ ذکر می کند. این پژوهش علت اختلاف زیاد مقدار ماده موثره اندازه گیری شده با مقدار استاندارد را دوز پایین و مقدار اکسیپیان بالای دارو، همچنین عدم تجهیز برخی کارخانه ها برای اندازه گیری های دقیق دوزهای پایین بیان می کند [۱۴]. در پژوهشی دیگر که در سال ۱۳۸۶ توسط دکتر فرهنگی در مرکز تحقیقات انستیتو غدد تهران انجام شد، مقدار و یکنواختی ماده موثره دو داروی لووتیروکسین ۱۰۰ میکروگرمی تولید شده در دو کارخانه ابوریحان از کشور ایران و برلین شیمی از کشور آلمان مورد ارزیابی قرار گرفت. این بررسی با پیروی از دستورالعمل ارائه شده در کتاب مرجع USP 28 به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از دتکتور ماوراءبنفش در طول موج ۲۵۵ نانومتر با ستون C_{18}، به کمک فاز متحرک متانول-اسید فسفریک ۰/۱٪ به ترتیب به نسبت ۶۰:۴۰ درصد حجمی-حجمی و بدون استفاده از استاندارد داخلی مورد مطالعه قرار گرفت. در این بررسی مقدار ماده موثره و الگوی یکنواختی ماده موثره در قرص های ایرانی مورد آزمایش تفاوت معنی داری با مقدار ماده موثره و الگوی یکنواختی ماده موثره در قرص های برلین شیمی نشان نمی دهند و اختلاف آن ها در حد تعیین شده توسط USP 28 است. مقدار ماده موثره و یکنواختی ماده موثره استاندارد مطابق USP 28 در محدوده ۱۱۰-۹۰٪ قرار دارد. همچنین علت انجام این بررسی نظر برخی پزشکان مبنی بر اثربخشی پایین فراورده های تولید شده در کشور بر بیماران کم کار تیروئید می باشد[۱۵]. کتاب مرجع USP بهترین طول موج برای انجام مطالعات برون تن فراورده های مختلف لووتیروکسین را ۲۲۵ نانومتر ذکر می کند[۵۴] و این در حالی است که در کتاب مرجع کلارک بهترین طول موج برای انجام بررسی های برون تن این دارو، ۳۲۵ نانومتر بیان شده است[۷۹]. در مطالعه استوفر[۶] و همکاران در سال ۱۹۹۷ در ایتالیا به علت گزارش های متعدد اثربخشی پایین فراورده های تجاری لووتیروکسین سدیم، محتویات قرص لوتیروکسین سدیم یک فراورده تجاری با دو فراورده ژنریک مقایسه شد. این فراورده ها توسط سه بیمار کم کار تیروئید مصرف شد. در این بررسی مقدار ماده موثره در محصول تجاری تنها ۷۸٪ آنچه ادعا شده، گزارش شد اما ضریب تغییرات محتوی فراورده تجاری از فراورده های ژنریک کمتر بود. همچنین در بررسی اثربخشی سه فراورده بر بیماران، مشاهده شد که با

1. Stoffer

جایگزینی فراورده های ژنریک با محصولات تجاری، مقادیر هورمون های تیروتروپین و تیروکسین آزاد سرم بیرون از محدوده استاندارد قرار گرفت. علت این امر عدم نظارت کافی بر فراورده های تجاری لووتیروکسین بیان شد[۸۰].

مطالعه ویژگی فرمولاسیون ها شامل آزادسازی دارو، سرعت و وسعت انحلال در بررسی میزان کیفیت فرآورده ها و فعالیت دارویی ماده موثره جایگاه به سزایی دارد[۲۴ ،۲۳]. جذب خوراکی داروهایی به فرم جامد به آزادسازی دارو از فرمولاسیون وابسته است[۸۱].

در مطالعه حاضر آزمون انحلال قرص لووتیروکسین سدیم مطابق کتاب مرجع USP 31 با استفاده از دستگاه دیسولوشن پدل II و تحت دو شرایط در قالب دو تست انجام شد. اسیدیته، زمان و حجم محیط انحلال در هر دو تست یکسان در نظر گرفته شد. تفاوت تست ها در به کار بردن سورفاکتانت در محیط انحلال ۱ و عدم کاربرد آن در محیط انحلال ۲ است به گونه ای که محیط انحلال ۱ حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال حاوی ۰/۲٪ سدیم لوریل سولفات و محیط انحلال ۲ حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال می باشد. تفاوت دیگر نوع فاز متحرک و دور گردش دستگاه دیسولوشن تحت دو شرایط است. فاز متحرک تست ۱ شامل متانول-اسید فسفریک ۰/۱٪ دیونیزه به نسبت ۴۰:۶۰ و همچنین دور گردش دستگاه در این تست ۵۰ rpm در نظر گرفته شد. از سوی دیگر فاز متحرک تست ۲ شامل آب-استونیتریل-اسید اورتو فسفریک ۸۵٪ به نسبت ۷۰۰: ۵۰۰: ۲ درصد حجمی-حجمی و دور گردش دستگاه ۷۵ rpm قرار داده شد. مدت زمان انحلال ۵۰٪ قرص لووتیروکسین برای سری ساخت ۶۳۵ از کارخانه ایران هورمون برابر ۰/۹۴±۳/۷۱ دقیقه و برای سری ساخت ۱۵ از کارخانه برلین شیمی برابر ۲/۵۰±۷/۸۷ دقیقه می باشد که تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان می دهند. مقدار داروی انحلال یافته در مدت زمان ۴۵ دقیقه برای سری ساخت ۶۰۱ برابر۱/۵۴±۹۳/۰۹٪ و سری ساخت ۶۶۵ برابر۴/۲۳±۱۰۵/۱۳٪ بود که به طور معنی داری با یکدیگر متفاوت بودند.

در مطالعه انجام شده توسط پابلا[1] در سال ۲۰۰۸ میزان انحلال دو فرآورده تجاری و یک فراورده ژنریک لووتیروکسین سدیم با استفاده از دستگاه دیسولوشن پدل II با دور گردش ۵۰ rpm و محیط انحلال حاوی اسیدکلریدریک ۰/۰۱ نرمال در حضور ۰/۰۵ درصد وزنی-وزنی سورفاکتانت سدیم لوریل سولفات و با استفاده از فاز متحرک

1. Pabla

متانول–اسید فسفریک ۰/۱٪، و تحت شرایط انحلال شامل محیط انحلال حاوی اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال بدون حضور سورفاکتانت با دور گردش ۷۵ rpm، با استفاده از فاز متحرک آب–استونیتریل–اسید اورتو فسفریک بررسی شد. در این پژوهش پارامترهای انحلال $T_{50\%}$ و D_{max} محاسبه شد. بررسی های آماری نشان داد که در حضور سورفاکتانت میزان انحلال فراورده ها اندکی افزایش می یابد که این افزایش معنی دار نمی باشد. همچنین مشاهده شد که اسیدیته محیط انحلال یک نقش مهم در میزان انحلال فرآورده های مختلف لووتیروکسین ایفا می کند، به گونه ای که تغییر در اسیدیته به روشنی موجب تغییر در میزان انحلال هر سه فرآورده مورد بررسی می شود. در این مطالعه انحلال هر سه فرآورده مورد بررسی با افزایش اسیدیته کاهش یافت. در این پژوهش همچنین بیان شد که حضور سورفاکتانت در محیط انحلال و افزایش دور گردش دستگاه دیسولوشن میزان محلولیت دارو در محیط انحلال را افزایش می دهد. در نتیجه انحلال دارو تحت این دو شرایط تسهیل می شود. همچنین در این بررسی بیان شد که به کار بردن فاز متحرک آب–استونیتریل–اسید اورتو فسفریک نسبت به فاز متحرک متانول–اسید فسفریک ۰/۱٪ موجب ظهور سریع تر، تقارن و تیزی بیشتر پیک ها می شود[۶۱]. مطالعه انجام شده توسط ولپاتو[1] در سال ۲۰۰۴ بیان می کرد که به کار بردن اسیدهای معدنی قوی مانند اسیدکلریدریک و مقادیر بالای سورفاکتانت به میزان ۰/۲٪ در محیط انحلال موجب آزادسازی سریع دارو می شود. بنابراین نتیجه آزمون های انحلال تحت این شرایط توانایی تمایز بین فراورده های مختلف لووتیروکسین با فراهمی زیستی متفاوت را ندارند. همچنین این بررسی به کار بردن دتکتور ماوراءبنفش به دلیل عدم حساسیت لازم برای تعیین مقدار تیروکسین در حجم های بالای محیط انحلال را از ایرادهای کتاب مرجع USP برشمرده است. این مطالعه همچنین بیان می کند که استفاده از اسید فسفریک به جای اسید کلریدریک و استفاده از مقادیر بسیار کم سورفاکتانت در محیط انحلال موجب نزدیکی بیشتر نتایج انحلال و فراهمی زیستی داروی لووتیروکسین می شود[۸۲]. در پژوهش دکتر فرهنگی در سال ۱۳۸۶ در انستیتو غدد تهران، سرعت انحلال فراورده لووتیروکسین کارخانه ابوریحان با فراورده برلین شیمی با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از دتکتور ماوراءبنفش در طول موج ۲۵۵ نانومتر و ستون C_{18}، به کمک فاز متحرک متانول– اسید فسفریک ۰/۱٪ به ترتیب به نسبت ۴۰:۶۰ درصد حجمی–حجمی و بدون استفاده از استاندارد داخلی مقایسه شد. سرعت

1. Volpato

انحلال فراورده ها با استفاده از دستگاه دیسولوشن پدل II با دور گردش ۵۰ rpm تحت محیط انحلال اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال حاوی ۰/۲ ٪ سدیم لوریل سولفات و در طول موج ۲۵۵ نانومتر اندازه گیری شد. در این پژوهش پارامترهای انحلال $T_{50\%}$ و D_{max} محاسبه شد. مقدار D_{max} برای فراورده ایرانی ۱/۲۲±۱۰۹/۲۲ و برای فراورده خارجی ۱۳/۶۳±۸۹/۶ به دست آمد. همچنین $T_{50\%}$ برای فراورده ایرانی ۰/۱۷± ۳/۶۳ و برای فراورده خارجی ۱/۷۲±۷/۸۲ محاسبه شد. در نتیجه مشاهده شد که سرعت انحلال داروی ایرانی با داروی خارجی تفاوت معنی داری داشت. همچنین این پژوهشگر بررسی های فراهمی زیستی، سرعت حذف دارو از بدن و حداکثر غلظت سرمی داروی ایرانی با داروی خارجی را مقایسه کرد. با انجام این بررسی مشاهده شد که سرعت حذف دارو از بدن و حداکثر غلظت سرمی داروی ایرانی با داروی خارجی تفاوت معنی داری داشت[۱۵]. آزمون های فراهمی زیستی به تعیین مقدار داروی مورد بررسی در خون افراد می پردازند. از آنجایی که مقدار فیزیولوژیک هورمون تیروئید از مقادیر فارماکولوژیک آن قابل تمایز نیست، در نتیجه با این روش اندازه گیری مقدار هورمون تیروکسین کل که شامل دوز فیزیولوژیک و فارماکولوژیک می باشد، محاسبه می شود. این مسئله از معایب و محدودیت های مطالعه فراهمی زیستی این فراورده محسوب می شود و در نتیجه ارزش مطالعات برون تن جهت کنترل کیفی این محصولات را دو چندان می کند[۸۳]. از سوی دیگر روش رایج تعیین مقدار هورمون های تیروئیدی رادیوایمنوآسی است. این روش چندان انتخابی نیست. همچنین برای انجام این آزمون نیاز به انجام مراحل طولانی و زمان بر است. همچنین محدودیت زمانی برای انجام این روش به علت نیمه عمر مواد رادیواکتیو و افزایش احتمال خطا به علت پیچیدگی مراحل انجام کار از معایب این روش به شمار می رود[۸۵، ۸۴]. کاربرد آزمون انحلال جهت پیش بینی فراهمی زیستی یا بررسی کیفی فراورده دارویی با معیار IVIVC[1] بیان می گردد. معیار IVIVC داروی لووتیروکسین سدیم از رده C می باشد که به معنای کاربرد آزمون انحلال تنها جهت کنترل کیفی فراورده ها است[۸۲].

پایداری یکی از مهم ترین ملزومات تضمین کیفیت فراورده های دارویی است. تنها فرآورده های پایدار توانایی دارورسانی کامل و دقیق به بدن بیمار را دارا می باشند و غلظت مناسبی در بدن ایجاد می کنند. لووتیروکسین یکی از فرآورده های بسیار ناپایداری است که به شدت تحت تاثیر عوامل نامساعد محیطی تخریب می شود[۸۶].

1. Invitro-Invivo Correlation

پژوهش های متعددی مؤید اثربخشی نامطلوب فرآورده های مختلف لووتیروکسین می باشند که منجر به بررسی موضوع پایداری فراورده های مختلف تجاری و ژنریک موجود در بازار دارویی بسیاری از کشورها و نیز گسترش انجام این مطالعات توسط محققین شدند[۶۳-۶۱].

در پژوهش حاضر برای شناسایی و تعیین مقدار ناخالصی های حاصل از تخریب لووتیروکسین قرص های پودر شده در مخلوط متانول-سود ۰/۰۱ مولار به نسبت ۱:۱ حجمی-حجمی رقیق شدند. تعیین مقدار کمی این مطالعه با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با استفاده از دتکتور ماوراءبنفش در طول موج ۲۴۰ نانومتر و ستون C_{18}، به کمک فاز متحرک متانول-اسید فسفریک ۰/۱٪ به روش گرادیان، با حضور استاندارد داخلی تئوفیلین انجام شد. همچنین مطالعه کیفی این ناخالصی ها در قرص های لووتیروکسین سدیم با روش آنالیز LC-MS/MS با صورت دقیق تر و برای تأیید نتایج حاصل از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا انجام شد. در بررسی کمی ناخالصی ها در سری ساخت های ۶۳۵ و ۷۱۴ از کارخانه ایران هورمون میزان ترکیب تری یدوتیرونین به ترتیب معادل ۰/۲۱۹±۲/۶۱ و ۰/۳۸۱±۲/۸۹ میکروگرم بود که این میزان بیش از مقدار استاندارد ذکر شده در کتاب مرجع USP 31 می باشد. همچنین مقدار تیروزین در سری ساخت ۶۳۵ معادل ۰/۰۲۹±۱/۴۳ میکروگرم می باشد که این مقدار به میزان قابل توجهی بالاست. مقدار استاندارد ترکیب تری یدوتیرونین در قرص های لووتیروکسین سدیم در کتاب مرجع کمتر یا مساوی ۲٪ بیان شده است. بررسی کیفی این ناخالصی ها با دستگاه LC-MS/MS به کمک پایش یون ها به روش های تمام اسکن، اسکن یون های دختر و اسکن یک واکنش انتخابی انجام شد. تمامی نتایج حاصل از این بررسی مؤید نتایج حاصل از بررسی کمی با دستگاه HPLC بود.

یک پژوهش قدیمی در سال ۱۹۹۲ نشان می دهد که فرم های دارویی قدیمی لووتیروکسین سدیم به شدت مستعد تخریب می باشند. علت این مسئله ناپایداری هورمون لووتیروکسین، حساسیت زیاد آن به شرایط نامساعد محیطی، عدم کشف فرمولاسیون مناسب جهت تهیه این فراورده ها، عدم شناسایی اکسپیان های سازگار با این دارو و یا استفاده از مقادیر بسیار اندک اکسپیان بیان شد[۸۷]. همچنین گزارش های متعددی مبنی بر اثبات تخریب لووتیروکسین در دمای بالا و تحت اثر اسیدیته های افراطی ارائه گردیده است[۶۱ ،۶۰]. در مطالعات متعددی، پایداری هورمون لووتیروکسین و حساسیت آن به نور، دما، رطوبت، اسیدیته و اکسیداسیون مورد بررسی قرار گرفت[۹۰-۸۸].

هیمانشو[1] در سال ۲۰۰۳ بیان کرد که تخریب داروی لووتیروکسین سدیم به علت دوز کم و میزان اثربخشی بالای آن بر مبنای میزان فعالیت و اثربخشی این دارو بیان می شود. وی همچنین بیان کرد که در ساختار مولکول لووتیروکسین سه موقعیت قابل یونیزاسیون شامل گروه کربوکسیل(pk_a =۲/۴)، گروه فنولیک(pk_a = ۶۲/۸) و گروه آمینو (pk_a = ۹/۹۶) وجود دارد. این سه جایگاه موجب ناپایداری ساختار مولکول می گردد[۱۱]. دکتر کاظمی فرد در سال ۲۰۰۶ در مقاله خود نوشت، ترکیبات تری یدوتیرونین، دی یدوتیرونین، مونویدوتیرونین، تیرونین، تری یدوتیروزین و تری یدوتیروزین معکوس بر اثر واکنش دِآیودیناسیون از تخریب لووتیروکسین ایجاد می شوند. تری یدوتیرونین حدود پنج تا هشت بار فعال تر از هورمون تیروکسین است اما به علت عوارض سمی روی قلب وجود این ترکیب در قرص های لووتیروکسین بیش از ۲٪ مجاز شمرده نشده است. تیرونین یک نقش شبه تیروئید بسیار کم و یا غیرقابل اندازه گیری در مقایسه با هورمون های فعال تیروئید دارد. برای ترکیبات دی یدوتیرونین، مونویدوتیرونین، تیرونین، تری یدوتیروزین و تری یدوتیروزین معکوس عملکرد بیولوژیکی چندانی شناخته نشده است. ترکیبات تیرواستیک اسید و تیروِاتان دی اُل به واسطه واکنش های دِآمیناسیون و دِکربوکسیلاسیون حاصل می شوند. این ترکیبات نیز فاقد عملکرد زیستی می باشند. ترکیبات دی یدوتیروزین، یدوتیروزین و تیروزین بر اثر جدا شدن حلقه فنیل از ترکیبات تیرونینی بوجود می آیند. دی یدوتیرونین، تیروزین، یدوتیروزین و دی یدوتیروزین هیچ یک فعالیت شبه تیروکسین ندارند اما این سه ترکیب در فرآیند تولید هورمون تیروکسین شرکت می کنند و همچنین از متابولیسم تیروکسین حاصل می شوند. در نتیجه حضور مقادیر بالایی از هر یک از این ناخالصی های حاصل از تخریب لووتیروکسین در قرص های لووتیروکسین سدیم بیانگر فرمولاسیون نامناسب فراورده و عدم شناسایی اکسپیان های سازگار با این دارو و در نتیجه تخریب لووتیروکسین تحت شرایط نامساعد محیطی است. اهمیت بیولوژیک و فارماکولوژیک این گروه از ترکیبات یکی از پراهمیت ترین موضوعات مورد بررسی توسط محققین در سالهای اخیر بوده است[۵۲]. هیمانشو[1] در سال ۲۰۰۳ بیان کرد که مکانیسم تخریب داروی لووتیروکسین سدیم در فرم محلول دِآیودیناسیون و در فرم جامد دِآمیناسیون است. در این مطالعه همچنین اثر افزایش اسیدیته بر کاهش میزان تخریب مولکول لووتیروکسین به اثبات رسید[۱۱]. در پژوهش انجام شده در سال ۱۹۹۲ تعیین مقدار یدوتیرونین در بافت بدن و مایعات بیولوژیک حیوانات

1. Himanshu

با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و فاز متحرک آب، استونیتریل و بافر فسفات به ترتیب به نسبت ۷۲، ۲۸ و ۱ به روش گرادیانت روی ستون C_{18} و دتکتور فلورسانس انجام شد. نمونه های مورد بررسی توسط ۵-دی متیل آمینو نفتالن-۱-سولفونیل کلراید مشتق سازی شدند[۹۱]. پژوهشی دیگر به تعیین مقدار لووتیروکسین در نمونه سرم با استفاده از دتکتور الکتروشیمیایی و ستون C_{18} پرداخت. در این مطالعه لووتیروکسین با استفاده از o-فتالآلدئید-n-استیل سیستئین پس از شستشو با متانول-اسیدفسفریک-آب به ترتیب به نسبت ۷۱، ۰/۱، ۲۸/۹ در صد حجمی-حجمی-حجمی مشتق سازی شد[۹۲]. برایانت[1] در سال ۲۰۰۸ یک روش تعیین مقدار بر پایه روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای شناسایی و تعیین مقدار هر یک از ناخالصی های حاصل از تخریب لووتیروکسین بیان کرد. در این روش ترکیب های مورد نظر در ۱۰ میلی لیتر سود ۰/۰۱ مولار و متانول پراکنده شده و پس از سونیکه کردن سوسپانسیون مذکور در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه و جدا کردن ذرات نامحلول توسط فیلتر، آنالیز نمونه انجام خواهد شد. این روش یک روش ساده، قابل اطمینان و بدون نیاز به مشتق سازی با هدف اندازه گیری هورمون های غده تیروئید و ناخالصی های حاصل از تخریب آن ها در فرمولاسیون های دارویی، سرم، ادرار و بافت بدن است[۶۰]. در بررسی دیمپل[2] در سال ۲۰۰۹ بیان شد که داروی لووتیروکسین کاملاً محلول در آب است و در اسیدیته یک تا سه میزان محلولیت آن در آب کاهش یافته و در حلال های قلیایی بالای هفت، افزایش انحلال آن به وضوح مشاهده می شود[۶۱]. در پژوهش انجام شده در سال ۲۰۰۸ در آمریکا با استفاده از استاندارد داخلی تئوفیلین و با قرار دادن فراورده ها تحت شرایط استرس محیطی، اجزاء ناخالص حاصل از تخریب لوتیروکسین شامل تیرونین، تیروزین، دی یدوتیرونین، دی یدوتیروزین، یدوتیروزین، تترایدوتیرواستیک اسید و تری یدوتیرواستیک اسید در حضور اکسپیان های فرمولاسیون با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا جداسازی شدند. فاز متحرک کروماتوگرافی شامل تری فلئورواستیک اسید ۰/۱٪ حجمی-حجمی با اسیدیته ۳ و استونیتریل بود که به روش گرادیانت با استفاده از ستون C_{18} با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد آون و دتکتور دآیودآری، در طول موج ۲۲۳ نانومتر انجام شد. تمامی نمونه ها در محلول سود متانولیک با غلظت ۰/۰۱ مولار رقیق شدند[۶۰].

1. Briant
2. Dimpel

کتاب مرجع USP 31 برای رسیدن به تقارن پیک های حاصل، قدرت تفکیک بالای این پیک ها و کاهش زمان ظاهر شدن پیک ها از یک ترکیب اسیدی، ترجیحاً اسید فسفریک به همراه یک ترکیب آلی شامل متانول یا استونیتریل را پیشنهاد می کند[۵۴]. در مقابل این نظر پژوهش انجام شده در سال ۲۰۰۸ بیان می کند که به کار بردن یک حلال آلی شامل متانول یا استونیتریل در کنار تری فلوئورواستیک اسید به جای اسیدفسفریک نتایج کارآمدتری از نظر تقارن پیک، قدرت تفکیک پیک ها و زمان ظهور پیک نشان می دهد. در این مطالعه همچنین بیان شده است که ترتیب زمان ظهور پیک های ناخالصی حاصل از تخریب لووتیروکسین مطابق افزایش هیدروفوبیسیته این ترکیبات نمی باشد بلکه باید متذکر شد که در صورت اسیدی شدن فاز متحرک تمامی آنالیت ها به فرم یون دو قطبی با پروتونه شدن گروه آمینو و یونیزه شدن گروه کربوکسیل درآمده است. تداخل یونی با مازاد گروه سیلانول سطح سیلیکا ترتیب ظهور پیک های آنالیت را رقم می زند[۶۰].

مطالعات بالینی و بررسی تست های عملکرد تیروئید بیماران مبتلا به کم کاری تیروئید همگام با بررسی های درون تن و برون تن، برای بررسی کیفیت فراورده های تیروئیدی لازم و ضروری است[۱۵].

مطالعه حاضر به صورت کارآزمایی بالینی با طراحی متقاطع بر روی ۴۰ بیمار شامل ۱۶ مرد و ۲۴ زن با میانگین سنی ۱۲/۶۱±۳۴/۴۲ مبتلا به کم کاری تیروئید انجام شد. مدت زمان مصرف هر فراورده ۳ ماه و زمان پاکسازی دارو از بدن ۴۲ روز در نظر گرفته شد.

در مطالعه انجام شده توسط دکتر ابراهیم خمسه در بیمارستان فیروزگر تهران در سال ۱۳۸۷، تعداد ۲۶ بیمار مبتلا به کم کاری تیروئید شامل ۹ مرد و ۱۷ زن مورد مطالعه قرار گرفتند. آن ها دو داروی لووتیروکسین سدیم ساخت شرکت ایرانی و لووتیروکسین ساخت شرکت برلین شیمی از کشور آلمان را به روش طراحی متقاطع و تصادفی طی یک کارآزمایی بالینی بررسی کردند. بیماران به طور تصادفی در ۲ گروه ۱۳ نفره قرار گرفتند و پس از ۲ ماه مصرف هر یک از فراورده ها و نیز گذراندن ۲۸ روز بدون مصرف دارو به عنوان زمان پاکسازی، داروی آن ها تعویض شد[۱۶]. در مطالعه انجام شده توسط دکتر فرهنگی زمان پاکسازی داروی لووتیروکسین از بدن ۳۵ روز در نظر گرفته شد[۱۵].

هنسی[1] در سال ۱۹۸۵ اثربخشی آزمایشگاهی دو داروی لووتیروکسین تجاری ساخت دو کارخانه مختلف را بررسی

1. Hennessey

کرد. این بررسی باروش طراحی متقاطع بر روی ۳۴ بیمار انجام شد. بیماران هر دارو را برای ۲ ماه دریافت می کردند. زمان پاکسازی در این مطالعه ۳۰ روز در نظر گرفته شد. مقدار لووتیروکسین آزاد سرم در بیماران درمان شده با یکی از فراورده های تجاری مشاهده شد[۹۳]. در بررسی ساوین و همکاران طی یک کارآزمایی بالینی با طراحی متقاطع تعداد ۳۲ بیمار کم کار تیروئید دو نوع لووتیروکسین خوراکی تجاری را مصرف کردند تا اثربخشی بالینی این دو فراورده مقایسه شود. زمان پاکسازی در این بررسی ۲۸ روز در نظر گرفته شد. در این بررسی مشاهده شد که با مصرف یکی از این فراورده های تجاری، میزان هورمون تیروکسین سرم در هر ۳۲ بیمار کمتر از مصرف فراورده دیگر بود. همچنین اندازه گیری مقدار تیروکسین قرص ها نشان داد که دوز قرص لووتیروکسین کم اثر حدود ۲۰-۳۰٪ کمتر از محتوی استاندارد است و بیان شد که محتوی کمتر تیروکسین در این محصول منجر به کاهش فعالیت بیولوژیک و اثربخشی بالینی آن می شود[۹۴].

در مطالعه حاضر بر اساس توصیه های استاندارد میزان ۱/۶ میکروگرم بر کیلوگرم از هر یک از فراورده های مختلف لووتیروکسین سدیم مورد مطالعه ساخت دو کارخانه برای هر بیمار تجویز شد.

بررسی های متعدد نشان می دهد که مقدار دوز تجویز شده برای هر بیمار وابسته به درجه پیشرفت بیماری کم کاری تیروئید، وزن بیمار، سن و جنس وی می باشد[۹۷-۹۵]. در سال ۲۰۰۵ در آمریکا تعداد ۷۵ بیمار مبتلا به کم کاری تیروئید به دو صورت تحت درمان با لووتیروکسین سدیم قرار گرفتند. در یک گروه درمان بیماران با دوز کامل، معادل ۱/۶ میکروگرم بر کیلوگرم آغاز شد. در گروه دیگر در ابتدای درمان یک دوز کم برابر ۲۵ میکروگرم برای بیماران تجویز شد و افزایش دوز در پایان هر ۴ هفته انجام شد. در هر دو گروه پس از گذشت ۶ ماه از آغاز درمان شدت علائم بالینی بیماری کاهش یافت. سطح دو هورمون تری یدوتیرونین و اندیس تیروکسین آزاد در مصرف کنندگان دوز کامل بیشتر بود اما پس از گذشت ۱۲ هفته از آغاز درمان، سطح دو هورمون مذکور در هر دو گروه یکسان گزارش شد. سطح هورمون محرک تیروتروپین در گروه دریافت کننده دوز کامل بیشتر بود اما پس از گذشت ۵ ماه سطح هورمون در هر دو گروه یکسان شد[۷۴]. در مطالعه دکتر خمسه و همکاران دوز تجویز شده بر حسب توصیه های استاندارد به میزان ۱/۶ میکروگرم بر کیلوگرم بود[۱۶].

در پژوهش حاضر اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین ساخت دو کارخانه مذکور با یکدیگر مقایسه شدند. انجام مطالعه بالینی نشان داد که کاهش علائم بالینی بیماران مورد مطالعه، قبل از مصرف دارو و پس از مصرف هر دو فراورده دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند. همچنین میزان کاهش تمامی علائم بالینی پس از مصرف دو فراورده از دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی جز شش علامت ورم اندام، یبوست، کاهش تعریق، خواب آلودگی، بی نظمی قاعدگی، تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان داد به گونه ای که در اغلب موارد فراورده برلین شیمی علائم بالینی بیمار را بهبود بیشتری می دهد. مقایسه علائم آزمایشگاهی با روش رادیوایمنواَسی قبل و پس از مصرف فراورده های دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی نشان داد که میزان هورمون های TSH، T_3، T_4 و FT_4I قبل و پس از مصرف دارو به طرز معنی داری تغییر می کند. همچنین درصد کاهش هورمون TSH و درصد افزایش هورمون های T_3، T_4 و FT_4I توسط فراورده برلین شیمی به طور معنی داری بیشتر از درصد تغییرات این هورمون ها توسط فراورده ایران هورمون است.

دکتر ابراهیم خمسه طی کارآزمایی بالینی به روش طراحی متقاطع و تصادفی برای مقایسه اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین ساخت دو کارخانه ایرانی و آلمانی به روش رادیوایمنواَسی مشاهده کرد که داروی ایرانی با مشابه خارجی از نظر اثربخشی کلینیکی و سایز تیروئید تفاوت معنی داری ندارند[۱۶]. دکتر فرهنگی در سال ۱۳۸۶ اثربخشی آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین تولید شده در دو کارخانه ابوریحان از کشور ایران و برلین شیمی از کشور آلمان را به روش رادیوایمنواَسی طی یک کارآزمایی بالینی به روش طراحی متقاطع مورد ارزیابی قرار داد. در نتیجه این بررسی اثربخشی آزمایشگاهی هر دو دارو موثر و یکسان اعلام شد[۱۵].

در مطالعه حاضر مقدار BMI بیماران قبل از مصرف دارو و بعد از مصرف هر یک از فراورده های لووتیروکسین ساخت دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار BMI بیماران قبل از مصرف دارو برابر ۳/۵۶±۲۹/۱۰، پس از مصرف فراورده کارخانه ایران هورمون برابر ۲/۲۴±۲۶/۹۸ و پس از مصرف فراورده برلین شیمی برابر ۲/۱۸±۲۶/۱۹ می باشد. مقدار درصد کاهش BMI بعد از مصرف فراورده ایران هورمون ۷/۲۸ و بعد از مصرف فراورده برلین شیمی برابر ۱۰/۱۰ بدست آمد. مشاهده شد که درصد کاهش BMI دو فراورده تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند به گونه ای که فراورده برلین شیمی مقدار BMI بیماران را بیشتر کاهش می دهد.

همچنین اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های لووتیروکسین با توجه به جنس و سن بیمار مورد مطالعه قرار گرفت. در نتیجه این پژوهش اثبات شد که مردان و جوانان بیمار بیشتر تحت تاثیر فراورده دارویی قرار گرفته و علائم بالینی و آزمایشگاهی این افراد پس از درمان با هر دو فراورده برلین شیمی و ایران هورمون به طور معنی داری بیشتراز زنان بیمار و افراد مسن بهبود می یابد. علت این امر شیوع چاقی کمتر در میان مردان و جوانان می باشد به گونه ای که ترکیب بافت منطقه ای بدن مردان جوان بیمار معمولاً لاغرتر است و انباشته بافت چربی تام و محیطی بدن این افراد کمتر است. در نتیجه بدن این افراد بهترین ارتباط را با دوز مورد نیاز لووتیروکسین نشان می دهد.

از نظر فیزیولوژیکی پارامترهایی مانند سن، جنس، حالت مزاجی، زمان تجویز دارو، زمان تخلیه معده و میزان جذب دارو در میزان اثربخشی فراورده های مختلف دارویی موثر است[۹۸]. فروسیو[1] و همکاران در دانشگاه پیزا در ایتالیا تعداد ۵۰ بیمار کم کار تیروئید مراجعه کننده به واحد اندوکرین دانشگاه را مورد مطالعه قرار دادند. تمامی این بیماران در گذشته مبتلا به سرطان غده تیروئید بودند که تیروئیدکتومی شده و در زمان انجام پژوهش کاملاً سالم به نظر می رسیدند. محققین افراد را در سه گروه وزن نرمال، دارای اضافه وزن و چاق دسته بندی کردند. در این بررسی در میان بیماران جوان شیوع چاقی کمتر مشاهده شد. در افراد میانسال افزایش نیاز روزانه به دریافت هورمون لووتیروکسین در افرادی که اضافه وزن داشتند در مقایسه با افرادی با وزن نرمال وجود داشت. در این مطالعه بیان شد که یک ارتباط مشخص بین وزن کل بدن و دوز مورد نیاز لووتیروکسین وجود دارد. همچنین دوز مصرفی روزانه در مردان بیشتر از زنان بیمار بود. مشاهده شد که در صورت محاسبه مقدار داروی مورد نیاز در هر روز به صورت دوز بر کیلوگرم، نیاز به میزان دوز مصرفی روزانه در هر دو جنس یکسان بود. سپس بیان شد که افزایش نیاز مردان به دارو به علت وزن بالای آن ها نسبت به زنان است. اندازه گیری ترکیب بافت منطقه ای بدن این بیماران نشان داد که جرم بدن افراد جوان لاغر بهترین ارتباط را با دوز مورد نیاز لووتیروکسین نشان می دهد[۷۵]. همچنین در مطالعه جکسون[1] در سال ۱۹۷۸ در آمریکا بیان شد که BMI بالاتر از ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع یک فاکتور مخدوشگر خروج نمونه در مطالعه بالینی محسوب می شود[۹۹].

1. Ferruccio
1. Jackson

۴-۲- نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در بخش برون تن این پژوهش، مقدار و یکنواختی ماده موثره برای تمامی سری ساخت های هر دو کارخانه ایران هورمون و برلین شیمی قابل قبول و در محدوده استاندارد ۱۱۰-۹۰٪ است. مدت زمان انحلال ۵۰٪ قرص لووتیروکسین برای سری ساخت ۶۳۵ از کارخانه ایران هورمون برابر ۳/۷۱±۰/۹۴ دقیقه و برای سری ساخت ۱۵ از کارخانه برلین شیمی برابر ۷/۸۷±۲/۵۰ دقیقه می باشد که تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان می دهند. مقدار داروی انحلال یافته در مدت زمان ۴۵ دقیقه برای سری ساخت ۶۰۱ برابر ۹۳/۰۹±۱/۵۴٪ و سری ساخت ۶۶۵ برابر ۱۰۵/۱۳±۴/۲۳٪ بدست آمد که تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان می دهند. تعیین مقدار شش ناخالصی حاصل از تخریب لوتیروکسین به روش استاندارد داخلی نشان داد که در سری ساخت های ۶۳۵ و ۷۱۴ از کارخانه ایران هورمون میزان ترکیب تری یدوتیرونین به ترتیب معادل ۲/۶۱±۰/۲۱۹ و ۲/۸۹±۰/۳۸۱ میکروگرم بود که این میزان بیش از مقدار استاندارد ذکر شده در کتاب مرجع USP 31 می باشد. مقدار استاندارد این ترکیب در کتاب مرجع کمتر از ۲٪ بیان شده است. همچنین مقدار تیروزین به در سری ساخت ۶۳۵ معادل ۱/۴۳±۰/۰۲۹ میکروگرم می باشد که این مقدار به میزان قابل توجهی بالاست. فراورده برلین شیمی نسبت به مشابه ایرانی علائم بالینی، تست های عملکرد تیروئید و BMI بیماران را به میزان قابل قبول تری بهبود می بخشد و همچنین علائم بالینی و تست های عملکرد تیروئید بیماران جوان و مردان نسبت به بیماران مسن و زنان با مصرف هر دو فراورده بهتر کنترل می شود.

این مطالعه فراورده برلین شیمی را به علت مقدار ماده موثره، یکنواختی ماده موثره و میزان انحلال مناسب، پایداری بیشتر و اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی بهتر برای بیماران پیشنهاد می کند.

پیشنهادها

از آنجایی که هدف از انجام این پژوهش ارزیابی کیفی و اثربخشی فراورده های مورد بررسی بر علائم بالینی و تست های عملکرد تیروئید می باشد، لذا جهت بررسی بیشتر انجام مطالعات بیواکی والانسی این فراورده ها پیشنهاد می گردد. از سوی دیگر انجام سایر بررسی های کیفی مانند تعیین درصد رطوبت فراورده ها، تعیین مقدار اِنانتیومرهای لووتیروکسین و تری یدوتیرونین در فراورده های دارویی، بررسی انحلال فراورده ها در محیط های انحلال با اسیدیته های مختلف، بررسی پایداری فراورده ها تحت شرایط استرس و مقایسه فرمولاسیون آن ها با یکدیگر می تواند موضوع پژوهش های آتی باشد.

پیوست۱: فرم رضایت نامه بیمار

فرم شماره ۱

عنوان طرح تحقیقاتی: مقایسه پارامترهای برون تن و اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های مختلف لووتیروکسین موجود در بازار دارویی ایران

اینجانب ..... رضایت خود را مبنی بر شرکت در این طرح پژوهشی با توجه به مطالب توضیح داده شده توسط پژوهشگر و مجری طرح اعلام می نمایم. همچنین متعهد می شوم که در مدت زمان شرکت در طرح پژوهشی مذکور از کلیه اصول حاکم بر انجام طرح تبعیت نمایم. همچنین اطلاعات لازم درباره اهداف و نحوه شرکت در پژوهش، نحوه مصرف دارو و سایر مواد غذایی و فراورده های مداخله گر در اثربخشی داروی مذکور در اختیارم قرار داده شده است.

تاریخ:

امضاء بیمار:

پیوست۲: پرسشنامه دموگرافی طرح تحقیقاتی

فرم شماره ۲

مقایسه پارامترهای برون تن و اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های مختلف لووتیروکسین موجود در بازار دارویی ایران

شمارهٔ پرسشنامه :		
نام ونام خانوادگی:	سن:	میزان تحصیلات:
جنس : مرد ☐ زن ☐		
محل سکونت : تلفن:		
قد:	وزن:	BMI
علائم بالینی: خشکی پوست☐ رنگ پریدگی پوست و مو☐ ورم اندامها☐ ورم زیر چشم ☐ کندی حرکات ☐ سردی دستها☐ یبوست ☐ کاهش تعریق☐ افزایش وزن ☐ عدم تحمل به سرما☐ خواب آلودگی☐ بی حالی و ضعف و خستگی☐ احساس نومیدی و افکار منفی☐ کاهش توانایی ذهنی و قدرت تمرکز و تضعیف حافظه☐ بی نظمی عادت ماهانه ☐		
علائم آزمایشگاهی: TSH …..… T4 ……... T3Rup…….. FT4I …….		
ملاحظات:		
نوع داروی لووتیروکسین مصرفی..... مدت مصرف.....		

پیوست۳: فرم اظهار نامه بیمار

فرم شماره ۳

عنوان طرح تحقیقاتی: مقایسه پارامترهای برون تن و اثربخشی بالینی و آزمایشگاهی فراورده های مختلف

لووتیروکسین موجود در بازار دارویی ایران

اینجانب ..... با توجه به اهمیت بیماری ها، رژیم غذایی و داروهای مصرفی بیماران مبتلا به کم کاری تیروئید در اثربخشی فراورده های لووتیروکسین متعهد می شوم که در آغاز شرکت در این پژوهش با توجه کامل جدول ذیل را مطالعه نمایم و تمامی سوابق بیماری و نوع داروهای مصرفی را به اطلاع پزشک معالج برسانم. همچنین قبل از مصرف هر گونه فراورده دارویی در طول انجام این پژوهش با پزشک خود مشورت نمایم.

داروهایی که جذب داروی لووتیروکسین را کاهش می دهند و در مدت زمان شرکت در این طرح تحقیقاتی نباید مصرف شوند:

آهن، کلسیم کربنات، کلسیم-د، آلومینیوم-ام-جی، منیزیم هیدروکسید، سوکرالفیت، رانیتیدین، فاموتیدین، امپرازول، پنتوپرازول، سایمتیکون، لووستاتین، رزین، کلستیرامین، کلستیپول، کلوفیبرات، فنی توئین، کاربامازپین، دیازپام، لیتیم، فنوباربیتال، آمی تریپتیلین، هپارین، وارفارین، ریفامپین، تئوفیلین، استروژن، متوکلوپرامید، رزورسینول، فوروزماید، فنیل بوتازون.

غذاهایی که جذب داروی لووتیروکسین را کاهش می دهند و در مدت زمان شرکت در این طرح تحقیقاتی نباید به مقدار زیاد مصرف شوند:

سویا، کلم، شلغم، ید.

بیماری های که در هنگام عضویت در این طرح تحقیقاتی باید به اطلاع پزشک معالج برسد:

بیماری های کبدی، کلیوی، پانکراس، گوارشی.

تاریخ:

امضاء بیمار:

منابع و مآخذ

1) Alturfun E, Zengin N, Dariyli E, Altorfan MK, Gumustas E. Investigation of Zinc and Copper Levels in Methimazole-Induced Hypothyroidism Relation with the Oxidant-Antioxidant Status. Jour of ins.of Sciences & Management. Sci. Turkey, 12, 2007, No. 53, P: 183-188.

۲) مرادی صدیقه، هدایتی مهدی، عزیزی فریدون. اثرات درمانی لووتیروکسین بر علائم بالینی و آزمایشگاهی موجود در کم کاری تیروئید. مجله غدد درون ریز و متابولیسم.ایران، سال ۶، شماره ۱، بهار ۱۳۸۳، ص: ۲۷-۲۸.

۳) هاشمی پور مهین، امینی مسعود. شیوع بالای کم کاری مادرزادی تیروئید در اصفهان. مجله غدد درون ریز و متابولیسم ایران، سال ۹، شماره ۵، ۱۳۸۶، ص: ۱۳-۱۹.

4) Swin CT, Castellin WP, Hereshman JM. The agained thyroid.thyroid difficiency in the Faringam study. Jour of Arch Intern MED. USA, 1985, No. 145, P: 1386-1388.

5) Gayton AC. Medical Physiology. 5st ed, Saunders, London, 2003, p: 858-868.

6) Katzung BG. Basic pharmacology. 5st ed, New York, Williams, 2006, p: 720-729.

7) Braverman LE, Ingbar SH, Sterling K. Conversion of thyroxine (T4) to triiodothyronine in athyreotic human subjects. Jour of Clin Invest. Londone, 2000, No. 49, P: 855-864.

8) Kaufman SC, Gross TP, Kennedy DL. Thyroid hormone use trends in the United States from 1960 through 1988. Jour of Thyroid. USA, 1991, No. 1, P: 285-291.

9) Surks MI, Schadlow AR, Oppenheimer JH. A new radioimmunoassay for plasma L-triiodothyronine: measurements in thyroid disease and in patients maintained on hormonal replacement. Jour of Clin Invest. . Londone, 1998, No. 51, P: 3104-3113.

10) David G. Pharmaceutical Analysis. 2st ed, Harcourt, New York, 2005, P: 187-212.

11) Himanshu P, Apryll S, Richard D, Adel SL. The effect of excipients on the stability of levothyroxine sodium pentahydrate tablets. Jour of Pharmaceutics. USA, 2003, No. 264, P: 35-43.

12) Vaisman M, Spina LD, Eksterman LF, Santos MJ. Comparative bioavailability of two oral thyroxine formulations after multiple dose administration in patients with hypothyroidism and its relation with therapeutic endpoints and dissolution profiles. Jour of Serviço de Endocrinologia (HUCFF). Rio de Janeiro, Brazil, 2004, NO. 3, P: 246-252.

13) Guillermo D, Girolamo MD. Bioequivalence of Two Levothyroxine Tablet Formulations Without and With Mathematical Adjustment for Basal Thyroxine Levels in Healthy ArgentinianVolunteer A Single-Dose, Randomized, Open-Label, Crossover Study. Jour of Clin Ther Excerpta Medica Inc. USA, 2008, NO. 30, P: 2015-2023.

14) Dong B. Hypothyroidism resulting from generic levothyroxine failure. Jour of Thyroid. California, San Francisco, 1997, NO. 4, P: 167-170.

۱۵) فرهنگی خاطره. "بررسی فراهمی زیستی قرص لووتیروکسین سدیم ساخت ایران در مقایسه با نمونه استاندارد". پایان نامه دکتری حرفه ای داروسازی. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی؛ ۱۳۸۶. ص: ۵۸-۱۵.

۱۶) خداپرست نرگس، زارع سمیه. "مقایسه اثربخشی داروی لووتیروکسین ایرانی با مشابه خارجی در بیماران هیپوتیروئیدیسم در بیمارستان فیروزگر تهران در سال ۸۵-۸۶ در ایران". پایان نامه دکتری پزشکی. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خدمات درمانی بهداشتی ایران؛ ۱۳۸۷. صفحات ۶۲-۵۰.

17) Kendall EC. American Chemical Society Monograph. 4st ed, New York, Williams, 2004, P: 720-729.

18) Murray GR. Treatment of myxoedema by hypodermic injections of an extract of the thyroid gland of a sheep. Jour of BMJ. England, 1891, No. 2, P: 796-797.

19) Osler W. The Principles and Practice of Medicine. 3st ed. New York, Appleton, 1898, P: 29-31.

20) Means JH, Groot LJ, Stanbury JB. The Thyroid and Its Diseases. 3st ed. New York, McGraw-Hill, 1963, P: 523-525.

21) Mandel SJ, Brent GA, Larsen PR. Levothyroxine therapy in patients with thyroid disease. Jour of Ann Intern Med. England,1999, No. 119, P: 492-502.

22) Singer PA, Cooper DS, Levy EG. Treatment guidelines for patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. Jour of JAMA. England, 1995, No. 273, P: 808-812.

23) Petersen K, Bengtsson C, Lapidus L, Lindstedt G. Morbidity, mortality,and quality of life for patients treated with levothyroxine. Jour of Arch Intern Med. Germany, 1997, No. 150, P: 2077-2081.

24) William SR. endocrinology. 7st ed, New York, saumders, 2000, P:.684-685

۲۵) عزیزی فریدون. فیزیولوژی غدد درون ریز. انتشارات جهاد دانشگاهی، تهران، ۱۳۶۵، چاپ اول، ص: ۴۶-۴۳.

۲۶) محمدی حسن. بیوشیمی بالینی-آزمایشگاهی. نشر دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۷۷، چاپ چهارم، ص: ۷۴۲-۷۴۹.

27) Junquera NJ. Basic Histology. 2st ed. California, McGraw-Hill, 1986, P: 321-323.

۲۸) عزیزی فریدون. اختلالات ناشی از کمبود ید. انتشارات مجله دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ۱۳۸۳، چاپ دوم، ص: ۶۷-۶۶.

29) Harrod M. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5st ed. USA, Lippinocott Williams and Wilkins, 2002, P: 718-735.

30) Emill Smith. Principles of Biochemistry. 7st ed. London, Biochemistry,2004, P:.416-440.

۳۱) مارتین دیوید آ، سیز پیتر آ، رادول ویکتور س، گرانر داریل ک. مروری بر بیوشیمی هارپر. ترجمه دکتر محسن فیروز، دکتر اسماعیل کوچکی شلمانی. ویرایش سوم. تهران: جهاد دانشگاهی: ۱۳۶۹. ص. ۹۵-۷۸.

32) Yoshihiro K, Shin CH, Miura B. Effect of Levothyroxine on total Lipid Profile in a patient with Hypothyroidism. Jour of Endocrine. Japan, 2006, No. 53, P: 865-868.

33) Andres P, Micheal G. Management of patients with thyroid disease. Jour of Jada. USA, 2009, No. 133, P: 845-847.

34) Dougall C. Thyroid disease in clinical practice. 3st ed. USA, chapman and Hall, 1992, P: 164-190.

35) Castle M. Hypothyroidism Classic symptoms plus the unexpected Geriatrics . Jour of Jama. England, 1989, No. 13, P: 133-138.

۳۶) دنیس کاسپر س. اصول طب داخلی هاریسون ۲۰۰۵. ترجمه دکتر مجتبی حسین زاده، دکتر محمد هادی زاده، دکتر فرزین رویناسی زاده. ویرایش اول. تهران: نشر طبیب: ۱۳۸۴. ص. ۲۱۲-۱۸۱.

37) Pittman J.A. Hypothalamic Agent hypothyroidism. Jour of Engle Med. USA, 1971, No. 285, P: 844-845.

38) Kefetoff S. Resistance to thyroid hormones. 1st ed. England, J.H.oppenheimer, 1980, P: 109-111.

۳۹) اسکندری حمید. "بررسی شیوع گواتر و عوامل موثر بر آن در دانش آموزان راهنمایی شهر تهران". پایان نامه دکتری پزشکی. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی کرمانشاه؛ ۱۳۷۵. صفحات ۱۹-۱۱.

۴۰) بنت کارپنتر ب، پلام آ، آندره لی. مبانی طب داخلی سیسیل ۲۰۰۶. ترجمه دکتر هومان اکتایی، دکتر شهرام مفاضی. ویرایش هیجدهم. تهران: نشر حیان: ۱۳۷۶. ص۸۹-۸۱.

41) Vanheal L, Bastence P. Heart and Coronary heart disease in. hypothyroidism. Jour of AM Heart. India, 1998, No. 76, P: 846-848.

42) Fowler B. Premyxedema Cause of Preventable Coronary Heart disease. . Jour of Proc.Roy.Soc.Med. England, 1977, No. 70, P: 297-299.

43) Tudhopoe G. The thyroid and Hie Blood Pressure. 1st ed. London, Heineman Medical books, 2001, P: 127-128.

44) Arthur J, Prang R. Effect of thyroxine as compared with thyroxine plus triiodothyronine in patients with hypothyroidism. Jour of Medicine. England, 1999, No. 6, P: 425-429.

45) David SC. Board Combined T4 and T3 Therapy Back to the Drawing. Jour of Jama. Iran, 2009, No. 22, P: 302-305.

46) Rodriguez DS. Substitution of Liothyronine at a 1:5 Ratio for a Portion of Levothyroxine Effect on Fatigue Symptoms of Depression, and Working Memory Versus Treatment with Levothyroxine Alone. Jour of Ins. of Math. & Comp. Sci. (Math. Ser.), India, 2006, No. 2, P: 41-48.

47) Taylor S, Kapur M, Adie R. Combined thyroxine and triiodothyronine for thyroid replacement therapy. Jour of BMJ. USA, 1970, No. 2, P: 270–271.

48) Smith RN, Taylor SA, Massey JC. Controlled clinical trial of combined triiodothyronine and thyroxine in the treatment of hypothyroidism. Jour of BMJ. USA, 1970, No. 4, P:145–148.

49) Sanjay R, Chemburkar G, Kris C, Deming R. Chemistry of thyroxine: an historical perspective and recent progress on its synthesis. Jour of Tetrahedron. USA, 2010, No. 66, P: 1955–1962.

50) Weetman sean C., editor . Martindale : the complete drug reference . London: pharmaceutical press : 2005. pp 876,235,987.

51) Shargel L, Alan H. Comprehensive Pharmacy Review. 5st ed. Londne, 2004, P: 1059-1080.

52) Kazemifard A, Douglas E. Identification and quantitation of sodium-thyroxine and its Degradation products by LC using electrochemical and MS detection. Jour of Pharmaceu and Biomed Anlys Medical Sci. Australia, 2006, No. 27, P: 697-711.

۵۳) پروفسور زیلوا، پروفسور پانال. ایمونولوژی و بیوشیمی بالینی در تشخیص و درمان بیماری ها. ترجمه دکتر محمد رهبانی، دکتر علی رحیمی. ویرایش اول. تهران: نشر خنیا: ص. ۲۸۹–۲۶۵

54) United States Pharmacopeial Convention. 31th ed. Baltimore: Williams & Wilkins :2006, P:1248-1249.

55) Miller JC. Statistics for Analytical Chemistry. 1st ed. Horwood, Ellis Elsevier, 1993, P: 171-173.

56) Burgess C. Specrtoscopy Europe . 3st ed. London, Chichester, 1994, P: 10-13.

57) Robard V, Hadded P, Jakson E. Principle and Practice of Modern Chromatography. 2st ed. London, Academic Press Inc, 2007, P: 166-170.

58) Lunn G, Schmuff N. HPLC Methods for Pharmeceutical Analysis. 2st ed. London, Wiley Interscience, 1997, P: 11-16.

59) Riley C, Wainter W. Pharmeceutical and Biomedical Applications of Liquid Chromatophy. 6st ed. Amesterdam, Elsevier, 1998, P: 7-12.

60) Shaha R, Bryanta A, Collier J, Habibb M. Stability indicating validated HPLC method for quantification of levothyroxine with eight degradation peaks in the presence of excipients. Journal of Pharmaceutics. USA, 2008, No. 360, P: 77–82.

61) Dimple P, Akhlaghi F, Zia H. comparative pH-dissolution profile study of selected commercial levothyroxine products using inductively coupled plasma mass spectrometry. Jour of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. USA, 2009, No. 72, P: 105–110.

62) Helen G, Gika H, Victoria F, Samanidou N. Development of a validated HPLC method for the determination of iodotyrosines and iodothyronines in pharmaceuticals and biological samples using solid phase extraction. Jour of Chromatography B, Greece, 2005, No. 814, P: 163–172.

63) Sasi S, Kannamkumarath T, Rodolfo G. Determination of levothyroxine and its degradation products in pharmaceutical tablets by HPLC-UV-ICP-MS. Jour of At Spectrom. USA, 2004, No. 19, P: 107–113.

64) Kaibara A, Hirose M. Chromatographia. 1st ed. New York, Elsevier, 1990, P: 99-102.

65) Smit R, Stivart J. pharmaceuticals Analysis. 2st ed. Philidelphia, Lea & Febiger, 1991, P: 276-280.

66) Poulter NJ. Biological Mass Spectrometey. 1st ed. Amesterdam, Elsevier, 1990, P: 867-868.

67) Lovell G, Corran H. Chromatography. Jour of Chromatography B, Greece, 1990, No. 525, P: 287-296.

۶۸) کبارفرد فرزاد، عمیدی سلیمه. مبانی و کاربرد کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، زمستان ۱۳۸۷، چاپ اول، ص: ۸۰-۶۹.

۶۹) حسن زاده خیاط محمد. روش های تجزیه دستگاهی. چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ۱۳۸۷، چاپ اول، ص: ۲۹۵-۲۹۳.

۷۰) افشاری سلیمان. روش های نوین تجزیه دستگاهی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ۱۳۷۲، چاپ سوم، ص: ۸۳-۸۰.

۷۱) رضایی منصور، مرادی بهیه. کلیات روش تحقیق در علوم پزشکی. نشر چشمه دانش و هنر و دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ۱۳۸۳، چاپ اول، ص: ۲۱۶-۲۱۴.

۷۲) چهری علی، مقیمی علی. اصول پایه روش تحقیق در علوم پزشکی. نشر نور دانش دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی ایران، تهران، ۱۳۸۱، چاپ اول، ص: ۷۲-۵۱.

۷۳) ساده مهدی. روش تحقیق با تاکید بر جنبه های کاربردی. نشر مولف، تهران، ۱۳۷۵، چاپ اول، ص: ۵۷-۵۱.

74) Annemieke R, Suzanne P, Linn T, Domburg D. The Starting Dose of Levothyroxine in Primary Hypothyroidism Treatment, A Prospective, Randomized, Double-blind Trial. Jour of Arch Intern Med.USA, 2005, No. 165, P: 1714-1720.

75) Ferruccio S, Aldo P, Alessandro M, Giovanni C, Mariag G. Lean Body Mass Is a Major Determinant of Levothyroxine Dosage in the Treatment of Thyroid Diseases Department of Endocrinology. Jour of Clinical Endocrinology & Metabolism. Italy, 2005 , NO. 90, P: 124–127.

۷۶) حاج شیخ الاسلامی فرهاد، بیرانوند محمدرضا، معینی علی، صادقی قهرودی محسن. شیوع بیماریهای عملکرد تیروئید در بیماران بستری در CCU. مجلهٔ غدد درون ریز و متابولیسم ایران، سال ۲، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۷۹، ص: ۱۶۸-۱۵۹.

77) Benvenga S, Bartolone L, Squadrito S et al. Delayed intestinal absorption of levothyroxine. Jour of Thyroid. USA, 1995, No. 5, P: 249–253.

78) Vanderschueren-Lodeweyckx M, Eggermont E, Cornette C et al. Decreased serum thyroid hormone levels and increased TSH in infants with celiac disease. Jour of Clinical Endocrinology, Manchester, 1997, No. 6, P: 361–367.

79) Laurent Y. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. . 3st ed. USA, Pharmaceutical Press, 2005, P: 433-435.

80) Stoffer S, Szpunar W. Potency of brand name and generic levothyroxine. Jour of JAMA. Siena, Italy, 1997, NO. 15, P: 1704-1725.

81) Moore W, Flanner J. Mathematical comparison of dissolution profiles. Jour of Pharm Tech. USA, 1996, No. 20, P: 64–74.

82) Volpato M, Silva L, Brito A, Goncalves J, Vaisman M. level C in vitro/in vivo correlation of dissolution profiles of two L-thyroxine tablets with pharmacokinetics data obtained from patients treated for hypothyroidism. Jour of Pharm. Sci. Eur, 2004, No. 21, P: 655–660.

83) Klein I, Danzi S. Evaluation of the therapeutic efficacy of different levothyroxine preparations in the treatment of human thyroid disease. Jour of Thyroid. Germany, 2003, No. 13, P: 1127–1132.

84) Takaku S, Masuda T, Igarashi I. Iodine determination in natural and tap water using inductively coupled plasma mass spectrometry. Jour of Anal Chem. 1995, No. 11, P: 823–827.

85) Tohn B, Henry H. Clinical Diagnosis Management. 18st ed. USA, 2001, P: 862-881.

86) Graham J, Banes D, Biesemeyer E, Nadkarni A. Analysis of sodium levothyroxine or sodium liothyronine in tablets. Jour of Pharm Sci. USA, 1974, No. 63, P: 763–766.

87) Garnick R, Burt G, Long D, Bastian W. High-performance liquid chromatography assay for sodium levothyroxine in tablet formulations: content uniformity applications. Jour of Pharm Sci. USA, 1997, No. 62, P: 43535–43538.

88) Post A, Warren R. Analytical Profiles of Drug Substances Sodium levothyroxine. Jour of In Florey academic press. New York, 1976, No. 5, P: 226–281.

89) Won C. Kinetics of degradation of levothyroxine in aqueous solution and in solid state. Jour of Pharm. England, 1992, No. 9, P: 131–139.

90) Wortsman J, Papadimitriou D, Broges M, Defesche, C. Thermal inactivation of l-thyroxin. Jour of Clin. Chem, New York, 1989, No. 35, P: 90–95.

91) Lovell G, Corran P. High-performance liquid chromatography assay for sodium levothyroxine in tablet formulations. Jour of Chromatogr. USA, 1990, No. 525, P: 287-293.

92) Hendrich C, Berdecia-Rodriguez, Wiedermeir S. Derivatisation
of the compounds by 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl chloride, Jour of Chromatogr. USA, 1992, No. 577, P: 19-24.

93) Hennessey J, Burman K, Wartofsky H. The equivalency of two L-thyroxine preparations. Jour of Ann Intern Med. USA, 1985 Jun, NO. 102, P: 770-773.

94) Sawin S. Oral thyroxine: variation in biologic action and tablet. Jour of Am Board Fam Pract. USA, 1984, NO. 100, P: 641-645

95) Roberts CGP, Ladenson PW. Hypothyroidis.Jour of m. Lancet,2004,NO. 363,P:793–8033.

96) Fish L, Schwartz H, Cavanaugh J, SteffesMW, Bantle JP, Oppenheimer JH Replacement dose, metabolism, and bioavailability of levothyroxine in the treatment of hypothyroidism. Role of triiodothyronine in pituitary feedback in humans. N Engl Jour of Med,USA, 1987,NO.316,P:764–770.

97) Sawin C, Geller A, Hershman JM, Castelli W. Bacharach PThe aging thyroid. The use of thyroid hormone in older persons.Jour of JAMA, 1989,NO.261,P:2653-2655.

۹۸) کبیری خدارحم. "پروفایل خونی قرص های دیپیریدامول". پایان نامه دکتری حرفه ای داروسازی. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان؛ ۱۳۷۳. صفحات ۷-۶..

99) Cobb E, Jackson M. Drug therapy reviews: management of hypothyroidism. Jour of Am Hosp Pharm Jan; USA ,1978, NO.1, P:8-51.

Abstract

Hypothyroidism is an important and common clinical problem that is caused due to the dificiency or absence of thyroid hormones. Preferred treatment for this disease is replacing the hormone thyroxine. Levothyroxine has a narrow therapeutic index, so 20-25% dose outside of therapeutic index, exposes patients to harmful cardiovascular and metabolic risks.

Invitro tests consist of assay, content uniformity and dissolution profiles of batch numbers 601, 635, 665, 714, 720 made by the Iran-Hormone Co. and batch numbers 15 and 16 made by the Berlin Chimie Co were performed by HPLC method. Quantitation and identification were performed for Six degredation product of Levothyroxine in Levothyroxine Sodium tablets by HPLC and LC-MS/MS analysis method. Clinical and paraclinical study using crossover design clinical trial on 40 patients included 16 males and 24 females with mean age 34.42 ± 12.61 patients with hypothyroidism were studied. Time consumed by each of the products of the two factories is considered to be 3 months and wash out time is considered to be 42 days. Also clinical symptoms, thyroid function tests, BMI and the clinical efficacy and paraclinical products were compared according to age and sex of patients in the two products.

In this study observed that assay and uniformity dosage form tests for all batch numbers of both factories were acceptable. $T_{50\%}$ for batch number 635 of Iran-Hormone was 3.71 ± 0.94 minutes and 15 of Berlin Chimie was 7.87 ± 2.50 minutes which showed a significant difference. D_{max} for batch number 601 of Iran-Hormone was 93.09 ± 1.54% and batch number 665 was 105.13 ± 4.23% which showed a significant difference. Determination of six impurities resulting from the degredation of Levothyroxine showed that in 635 and 714 series made by Iran-Hormone Co, Triiodotyronine and Tyrosine levels are significantly high. Results from qualitative study of impurities by LC-MS/MS method, confirms the results of some impurities by HPLC method. Clinical symptom, thyroid function tests and BMI acceptable levels are significantly improved by Berlin Chimie preparation. This clinical study observed young patients and men respond better to treatment with both products which are studied.

This study suggests the Berlin Chimie products due to the amount of active material, active material uniformity, stability and appropriate dissolution and a more pleasant clinical and paraclinical effectiveness.

Keywords: Levothyroxine, LC-MS/MS, HPLC, Invitro parameters.

Kermansheh University of Medical Sciences

Faculty of Pharmacy

Thesis title:

Comparison of invitro parameters and clinical and paraclinical efficacy of different Levothyroxine preparations available in Iran's drug market.

By: Mahdie Bakhtiari Manesh

Under Supervision of
Prof. Gholamreza Bahrami-Dr Mehrali Rahimi

A thesis submitted to the Graduate Studies Office in partial fulfillment of the requirements for the degree of Pharm. D

December 2010