

# RP-HPLC 法检测左旋甲状腺素钠片剂含量及溶出度

伍杰雄, 任斌, 唐蕾

(中山医科大学附属第一医院药学部, 广东 广州 510080)

**摘要:** 【目的】建立左旋甲状腺素钠反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定法, 检测和比较 2 种进口的左旋甲状腺素钠片剂的含量和溶出度。【方法】用 RP-HPLC 法测定 2 种片剂中左旋甲状腺素钠含量, 依照美国药典第 23 版溶出度测定 II 法测定左旋甲状腺素钠片剂溶出度。色谱条件: Hypersil BDS C18 柱; 流动相: 0.85 (mL/100mL) 磷酸溶液-甲醇(40:60); 检测波长: 225 nm; 流速: 1.5 mL/min。【结果】2 种片剂含量占标示量百分率分别为 107.74% 和 99.72%。两种片剂溶出 50% 和 63.2% 所需的时间及  $m$  值均有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。【结论】两种进口左旋甲状腺素钠片剂的含量无差异, 但溶出度存在显著性差异。

**关键词:** 左甲状腺素/分析; 高压液相色谱法

中图分类号: R914.1; R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2001)03-0238-03

## Determination of Content and Dissolution of Levothyroxine Sodium Tablet by RP-HPLC

WU Jie-xiong, REN Bin, TANG Lei

(Department of Pharmacology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To determine the content and dissolution of two imported levothyroxine sodium tablets. 【Method】The content of levothyroxine sodium was assayed on a Hypersil BDS C18 column with a mobile phase consisting of methanol-0.85% phosphoric acid (60:40) at a flow rate of 1.5 mL/min and detected at 225 nm. The study on dissolution was conducted according to the method II of dissolution apparatus in USP (23). 【Results】The average content of two formulations was 107.74% and 99.72%, respectively. The value of  $T_{50}$ ,  $T_d$  and  $m$  of two tablets differed significantly ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】There was a significant dissolution difference between two levothyroxine sodium tablets.

**Key words:** levothyroxine sodium/analysis; RP-HPLC

左旋甲状腺素钠 (levothyroxine sodium), 即: 四碘甲状腺原氨酸钠 ( $L-T_4$ ), 是治疗甲状腺功能低下患者的常用药, 其含量及溶出度测定方法国内尚未见文献报道, 我国药典也未载。本实验建立反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 法, 对 2 种进口左旋甲状腺素钠片剂进行含量及溶出度检测和比较, 以期检测左旋甲状腺素钠制剂含量和溶出度提供测定方法, 以及为临床选用优质品种提供有价值的实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪 器

美国 Waters 高效液相色谱系统 (600 型低压梯度泵, 486 型紫外检测器, 717 型自动进样器), ZRS-8 智能溶出实验仪 (天津大学无线电厂)。

### 1.2 药品与试剂

左旋甲状腺素钠标准品 (美国新百利药业有限公司提供, 批号: ITR301B); A 片 (德国生产, 规格: 100  $\mu$ g/片, 批号: 1399802); B 片 (英国生产, 规格: 100  $\mu$ g/片, 批号: 7H34TP)。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C18 柱 (4.6 mm  $\times$  150

收稿日期: 2000-03-21

作者简介: 伍杰雄 (1959-), 男, 湖南新化人, 硕士, 副教授。 <http://www.cnki.net>

mm, 5  $\mu$ m); 柱温: 25  $^{\circ}$ C; 流动相: 0.85% (mL/100 mL) 磷酸溶液-甲醇(40:60); 流速: 1.5 mL/min; 检测波长: 225 nm。

#### 1.4 储备液

L-T<sub>4</sub> 标准品 10 mg 置于 100 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液-甲醇(37:13)的混合液溶解并定容, 得浓度为 100 mg/L 的储备液 I。吸取储备液 I 2 mL 置 100 mL 容量瓶中, 用 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液(pH=7.4)定容, 得浓度为 2 mg/L 的储备液 II。

#### 1.5 含量测定<sup>[1]</sup>

1.5.1 标准曲线制备方法 吸取储备液 I 0.12、0.16、0.20、0.24、0.28 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用 0.1 mol/L NaOH 溶液-甲醇(37:13)混合液稀释至 10 mL, 制得一系列不同浓度的标准溶液。各吸取 50  $\mu$ L 进样, 记录色谱图, 测定 L-T<sub>4</sub> 峰面积。以 L-T<sub>4</sub> 峰面积  $Y_1$  为纵坐标, 相应 L-T<sub>4</sub> 浓度  $C_1$  (mg/L) 为横坐标进行线性回归, 求标准曲线方程。

1.5.2 含量测定 分别充分研磨 A 片和 B 片各 20 片, 称取相当于各片剂 L-T<sub>4</sub> 标示量 100  $\mu$ g 的粉末, 置 50 mL 容量瓶中, 加入 0.1 mol/L NaOH-甲醇(37:13)溶液 25 mL, 超声浴 10 min 后, 再加入上述 NaOH-甲醇溶液至 50 mL, 以 2 500 r/min 速度离心 15 min, 取上清液过滤, 弃去初滤液, 留取续滤液。吸取续滤液 50  $\mu$ L 进样, 记录色谱图, 测定 L-T<sub>4</sub> 峰面积。以 L-T<sub>4</sub> 峰面积值代入标准曲线方程, 计算样品 L-T<sub>4</sub> 含量。

1.5.3 加样回收率及精密度检测 分别称取相当于 A 片或 B 片 L-T<sub>4</sub> 标示量 100  $\mu$ g 的片剂粉末, 再分别加入储备液 I 0.9、1.0、1.1 mL (即: 分别加入相当于标示量 90%、100% 和 110% 的标准 L-T<sub>4</sub>), 按上述“含量测定”项的余下步骤操作获取续滤液。吸取续滤液 5 mL, 加 NaOH-甲醇溶液至 10 mL。吸取 50  $\mu$ L 进样, 记录色谱图, 测定 L-T<sub>4</sub> 峰面积。

#### 1.6 溶出度测定<sup>[2]</sup>

1.6.1 标准曲线制备方法 分别吸取储备液 II 0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 mL 各以 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液(pH=7.4)稀释至 10 mL, 得不同浓度的标准溶液。吸取 200  $\mu$ L 进样, 记录色谱图, 测定 L-T<sub>4</sub> 峰面积。以 L-T<sub>4</sub> 峰面积  $Y_2$  为纵坐标, 相应 L-T<sub>4</sub> 浓度  $C_2$  ( $\mu$ g/L) 为横坐标进行线性回归, 求标准曲线方程。

1.6.2 溶出度测定 取样品 6 片, 照美国药典第

23 版溶出度测定 II 法<sup>[3]</sup> 操作, 加 0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液(pH=7.4) 500 mL 为溶出介质, 搅拌浆转速 100 r/min, 温度 (37  $\pm$  0.5)  $^{\circ}$ C。A 片于 5、10、20、30、40、60、80、100、120、150、180 min, B 片于 5、10、20、30、40、60、80 min 时取溶出液 5 mL, 同时立即补充上述缓冲液 5 mL。溶出液以 0.25  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 吸取续滤液 200  $\mu$ L 进样, 记录色谱图, 测定 L-T<sub>4</sub> 峰面积。以各 L-T<sub>4</sub> 峰面积值代入标准曲线方程, 计算各溶液 L-T<sub>4</sub> 浓度, 计算 A 片和 B 片不同时间的累积溶出百分率。

## 2 结果

### 2.1 色谱条件评价

在选定的色谱条件下, L-T<sub>4</sub> 与片剂辅料及杂质分离良好, 其保留时间为 7.28 min。色谱图见图 1。

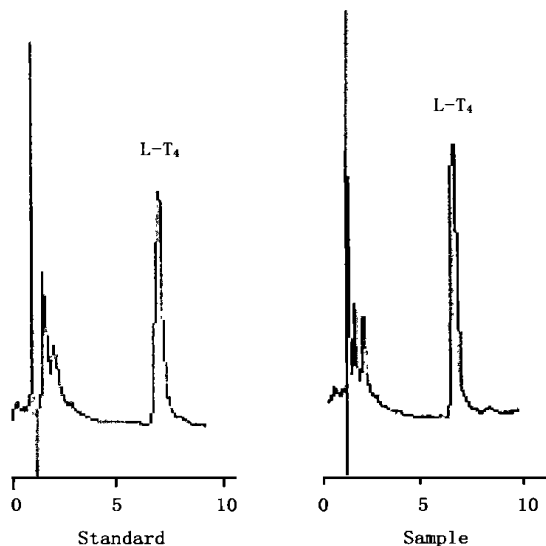


图1 左旋甲状腺素高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of levothyroxine

### 2.2 含量测定

2.2.1 标准曲线 标准曲线方程为:  $Y_1 = 80674C_1 + 3419.62$ ,  $r = 0.9996$ 。表明 L-T<sub>4</sub> 在 1.2~2.8 mg/L 浓度范围内, L-T<sub>4</sub> 峰面积与 L-T<sub>4</sub> 浓度有良好的线性关系。

2.2.2 含量测定 A、B 片含量占标示量百分率分别为 107.74% 和 99.72%。

2.2.3 回收率及精密度 A 片、B 片的平均加样回收率分别为 99.5% 和 99.3%, RSD 分别为 1.5% 和 1.6% ( $n = 15$ )。详情见表 1。

表1 两种进口左旋甲状腺素钠片剂含量测定的精密度与回收率

Table 1 Recovery and accuracy of content determination of two imported levothyroxine sodium tablets (n = 5)

Amount added( $\mu\text{g}$ )	Tablet A			Tablet B		
	Amount determined( $\mu\text{g}$ )	Recovery(%)	RSD(%)	Amount determined( $\mu\text{g}$ )	Recovery(%)	RSD(%)
90	90.16 $\pm$ 0.96	100.2	1.1	90.50 $\pm$ 0.79	100.6	0.9
100	99.60 $\pm$ 1.37	99.6	1.4	98.99 $\pm$ 0.90	99.0	0.9
110	108.71 $\pm$ 2.11	98.8	1.9	108.34 $\pm$ 2.23	98.5	2.1

### 2.3 溶出度测定

2.3.1 标准曲线 标准曲线方程为:  $Y_2 = 245.99C_2 + 2.95$ ,  $r = 0.9994$ 。表明 L-T<sub>4</sub> 在 20 ~ 220  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内, L-T<sub>4</sub> 峰面积与 L-T<sub>4</sub> 浓度有良好的线性关系。

2.3.2 溶出度测定 A 片和 B 片的溶出曲线见图 2, 采用 SPSS 7.0 统计学软件, 根据威布尔分布模型计算而得的 T<sub>50</sub>、T<sub>d</sub>、m 等溶出参数见表 2。经方差分析, 二者 T<sub>50</sub>、T<sub>d</sub>、m 值均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ,  $n = 6$ )。

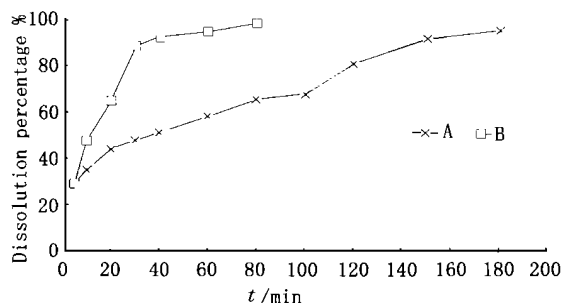


图2 两种进口左旋甲状腺素钠片剂溶出曲线

Fig. 2 Dissolution profile of two imported levothyroxine sodium tablets

表2 两种左旋甲状腺素钠片的溶出参数

Table 2 Dissolution parameters of two imported levothyroxine sodium tablets

Parameters	Tablet A	Tablet B	P
T <sub>50</sub> (min)	26.8 $\pm$ 3.1	8.8 $\pm$ 1.0	< 0.01
T <sub>d</sub> (min)	54.1 $\pm$ 9.8	12.4 $\pm$ 1.5	< 0.01
m	0.54 $\pm$ 0.08	1.04 $\pm$ 0.15	< 0.01

## 3 讨论

Garnick 等<sup>[1]</sup> 在实验中用流动相作为溶剂提取

片剂中 L-T<sub>4</sub>, 由于 L-T<sub>4</sub> 在流动相中溶解度低, 以致提取回收率较低。本实验改为先用 NaOH-甲醇溶液作为提取溶剂, 然后才进行 RP-HPLC 检测, 显示结果重现性好、回收率高、精密度符合要求。表明我们建立的 RP-HPLC 法适于 L-T<sub>4</sub> 含量检测。

A 片与 B 片的含量占标示量百分率及 80 min 累积溶出百分率, 均符合美国药典第 23 版相应的质量规定。但两种片剂溶出 50% 和 63.2% 所需的时间 (T<sub>50</sub>、T<sub>d</sub>) 存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ,  $n = 6$ ), 显示 B 片溶出速度明显快于 A 片。这应与二者所采用的辅料及生产工艺等不同有关。其中 A 片含有较多的脂溶性辅料, 与 B 片采用的水溶性相比, 不利于溶出介质对片剂颗粒的浸润, 以致其溶出速度较慢。由于溶出度是影响生物利用度及临床疗效的重要因素, 因此, A 片、B 片的溶出度差异必将导致二药体内吸收速度和生物利用度的差异, 从而引起临床疗效的差异。

### 参考文献:

- [1] Garnick R L, Burt G F, Long D A, *et al.* High-performance liquid chromatographic assay for sodium levothyroxine in tablet formulations: content uniformity applications [J]. *J Pharm Sci*, 1984, 73(1): 75.
- [2] Wood R W, Mantis L, Gillum A W, *et al.* *In vitro* dissolution and *in vivo* bioavailability of commercial levothyroxine sodium tablets in the hypothyroid dog model [J]. *J Pharm Sci*, 1990, 79(2): 124.
- [3] The U. S. Pharmacopial Convention, Inc. The United States Pharmacopeia [M]. 23rd ed. USA: Rand McNally, 1995. 883~885.

(编辑 黄小延)