

原著論文

# 健康食品中のリオチロニンナトリウム及びレボチロキシニンナトリウムの HPLC 分析法

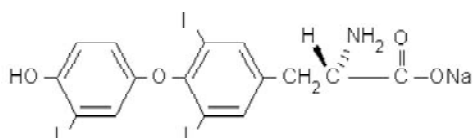
森田邦正, 毛利隆美, 中川礼子

逆相系の高速液体クロマトグラフを使って, 健康食品中のリオチロニンナトリウム及びレボチロキシニンナトリウムの分析法を検討した. 健康食品中のリオチロニンナトリウム及びレボチロキシニンナトリウムは 0.1 %酢酸メタノールを用いて抽出し, 固相抽出法(Bond Elut Certify カートリッジ)を用いて, 2 %アンモニア水-メタノール溶液でクリーンアップした. 高速液体クロマトグラフはカラムに Inertsil ODS-3 (4.6 x 150 mm, 5 µm)を, 移動相に水:アセトニトリル:酢酸 (650:350:5, v/v)を用い, 測定波長 230 nm で分析した. 本法による健康食品からのリオチロニンナトリウム及びレボチロキシニンナトリウムの回収率は 77 ~ 82%, 定量下限値は リオチロニンナトリウムが 0.5 µg/g, レボチロキシニンナトリウムが 0.7 µg/g であった.

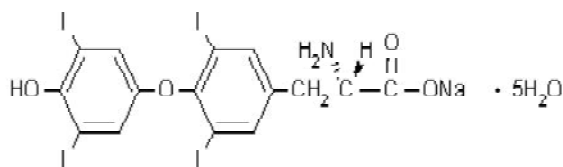
[キーワード: リオチロニンナトリウム, レボチロキシニンナトリウム, HPLC, 固相抽出法, 健康食品]

## 1 はじめに

リオチロニンナトリウム (T<sub>3</sub>Na) 及びレボチロキシニンナトリウム (T<sub>4</sub>Na) は合成甲状腺ホルモンである. 白色粉末でエタノールにややとけにくく, 水にほとんど溶けない. 水酸化ナトリウム試液やアンモニア試液に溶ける. 化学式は T<sub>3</sub>Na が C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>I<sub>3</sub>NNaO<sub>4</sub> (m. w. 672. 96), T<sub>4</sub>Na が C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>I<sub>4</sub>NNaO<sub>4</sub> (m. w. 798. 86) である<sup>1-2)</sup>.



リオチロニンナトリウム (T<sub>3</sub>Na)



レボチロキシニンナトリウム (T<sub>4</sub>Na)

T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na は組織の基礎代謝を増大させ, 粘液水腫, クレチン病, 甲状腺機能低下症, 慢性甲状腺炎の治療薬として適応される. T<sub>3</sub>Na は初回量5~25 µg/day から開始し, 1~2週間で漸次増量し, 維持量25~75 µg/day とする. T<sub>3</sub>Na は他の甲状腺ホルモン製剤より効果の持

続が短い (生物学的半減期2日以内), 発現が早く, 活性も T<sub>4</sub>Na の約4倍である. T<sub>4</sub>Na は初回量25~100 µg/day から投与を開始し, 維持量100~400 µg/day まで増量する<sup>1-2)</sup>. 体内の T<sub>4</sub>Na は約80%が T<sub>4</sub>から T<sub>3</sub>に脱ヨード化反応を受け活性を発現し, 生物学的半減期が6~7日と長い. 血中の甲状腺ホルモンの99%以上がグロブリンやアルブリンと結合し, 肝臓でジヨードチロニンに脱ヨード化, あるいはグロクロン酸及び硫酸抱合体に代謝され胆汁及び消化管内に排泄された後, 腸管循環される<sup>3)</sup>. 甲状腺ホルモンは初期に腎臓から排泄され, 結腸に達した抱合体は糞中に排泄される. T<sub>3</sub>Na はサイロニン, チロナミンの製品名で5 µg 及び25 µg 含まれる錠剤が販売され, T<sub>4</sub>Na はチラージン S の製品名で1錠中25 µg 及び50 µg 含まれる錠剤と 1g 中100 µg 含まれる散剤が販売されている<sup>4)</sup>, 肥満の治療のために使用される医薬品ではない.

T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na の過剰投与により, 心悸亢進, 脈拍増加, 不整脈, 狭心症等の循環器症状, 振戦, 不眠, 頭痛, めまい, 発汗, 神経過敏, 興奮, 不安感, 躁うつ等の精神症状, 食欲不振, 嘔吐, 下痢等の消化器症状や筋肉痛, 月経障害, 体重減少, 脱力感, 皮膚の潮紅等の症状が現れることがある. またまれに肝機能障害がある<sup>1-2)</sup>.

健康食品中の T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na の分析法は報告されていない. T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na の測定方法として逆相カラムと移動相にアセトニトリル/水/リン酸 (40:60:0. 5, v/v)<sup>4)</sup>, アセトニトリル/水 (60:40, v/v)<sup>5)</sup>, メタノール/水/リン酸 (50:50:0. 1, v/v)<sup>6)</sup>を用いた HPLC 法が報告され

ている。しかし、いずれも錠剤の試験法であり、健康食品に適用するにはクリーンアップ法の検討が必要である。

## 2 実験方法

### 2・1 試薬

T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na 標準原液は T<sub>3</sub>Na (Sigma 製) を10.0 mg, T<sub>4</sub>Na5水和物 (Sigma 製) を11.1mg 秤量し、2%アンモニア水-メタノールを加えて100 ml とし冷暗所に保存した。用時、標準原液1~5ml をとり2%アンモニア水-メタノールを加えて50ml としたものを標準溶液とした。

メタノールは和光純薬工業 (株) 製の HPLC 分析用を用いた。固相抽出には Varian 製の Bond Elut Certify カートリッジ (LRC, 300mg, 10ml) を用いた。

2%アンモニア水-メタノール溶液はアンモニアを2%含むアンモニア水-メタノール溶液を調整した。

### 2・2 装置

紫外吸光度検出器 (SPD-10AV) 及びデータ処理装置 (C-R3A) 付 HPLC は島津製作所 (株) 製の LC10A を、カラムは GL サイエンス (株) 製の InertsilODS-3 (4.6×150mm, 5μm) を使用した。

### 2・3 実験操作

#### 2・3・1 T<sub>3</sub>Na及びT<sub>4</sub>Naの分析法

健康食品0.1g を10ml の試験管に秤量し、0.1%酢酸メタノール2ml を加え、10分間振とう抽出する。2500 rpm で遠心分離した後、メタノール層を採取する。残渣に0.1%酢酸メタノール2ml を加え、さらに1回抽出する。抽出液を合わせ、水を加えて10ml とする。Bond Elut Certify カートリッジ (LRC, 300mg, 10ml) にメタノール2ml, 水2ml, 酢酸 (1→1000) 2ml を順次流しコンデショニングする。抽出溶液10ml を Bond Elut Certify カートリッジに流し T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na を保持させた後、水2 ml 及びメタノール2ml で洗浄する。2%アンモニア水-メタノール溶液4ml を流し T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na を溶出する。初液1ml を捨て、2-4ml を採取する。溶出液は窒素ガス気流下40~50℃で乾固し、2%アンモニア水-メタノール溶液0.5ml を加え、試料溶液とする。

#### 2・3・2 T<sub>3</sub>Na及びT<sub>4</sub>NaのHPLC測定条件

|       |                                                    |
|-------|----------------------------------------------------|
| カラム   | InertsilODS-3 (4.6×150mm)                          |
| 移動相   | 水/アセトニトリル/酢酸<br>(65:35:0.5, v/v)                   |
| 流量    | 1 ml/min                                           |
| カラム温度 | 40℃                                                |
| 注入量   | 10 μl                                              |
| 測定波長  | 230 nm                                             |
| 保持時間  | T <sub>3</sub> Na : 4.5分, T <sub>4</sub> Na : 8.0分 |

## 3 結果及び考察

### 3・1 共存物質の除去

試料抽出液中の共存物質を Bond Elut Certify カートリッジを用いて除去する方法を検討した。T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na をそれぞれ40μg Bond Elut Certify に保持させ、2%アンモニア水-メタノール溶液の溶出量を検討した。その結果、2%アンモニア水-メタノール溶液0~1ml では T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na 溶出量は添加量のそれぞれ0%であった。溶出液1~2ml ではそれぞれ82.1%及び89.0%, 2~3ml では7.1%及び8.1%, 3~4ml ではそれぞれ1.3%, 溶出液4~5ml では T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na 溶出量は添加量のそれぞれ1%以下であった。このことからクリーンアップ操作において、2%アンモニア水-メタノール溶出量は4ml とした。実試料の測定時には溶出液を窒素ガス気流下で乾固した後、2%アンモニア水-メタノール溶液を加え0.5ml にした。図1に標準溶液及び添加回収試験で得られた健康食品 A の HPLC クロマトグラムを示した。このクリーンアップ操作によって共存物質を効果的に除去することができた。

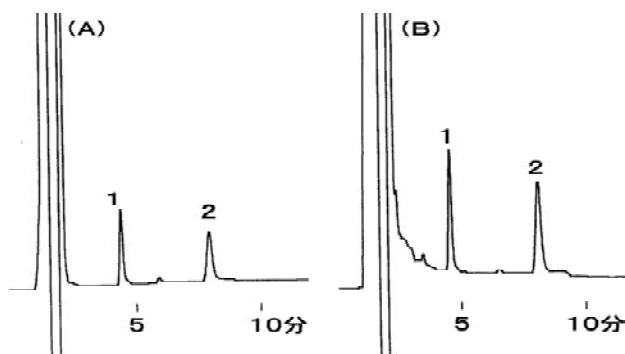


図1 標準溶液 (A, T<sub>3</sub>Na及びT<sub>4</sub>Na各々25ng) 及び健康食品A(B)の HPLCクロマトグラム 1, T<sub>3</sub>Na; 2, T<sub>4</sub>Na

### 3・2 T<sub>3</sub>Na及びT<sub>4</sub>Naの回収率と再現性

市販されている健康食品 A 及び B (納豆菌を含有するダイエット用健康食品) を用いて添加回収試験を行った。健康食品0.1 g に T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na をそれぞれ2.5μg を添加し実験操作に従って回収率を求めた。繰り返し実験は5回行い、その結果を表1に示した。

健康食品 A の回収率は T<sub>3</sub>Na が76.7% (72.9~80.5%), T<sub>4</sub>Na が77.8% (76.0~80.5%) であった。健康食品 B の回収率は T<sub>3</sub>Na が81.2% (74.9~85.9%), T<sub>4</sub>Na が81.7% (75.7~86.5%) であった。変動係数はいずれも5%以内でありほぼ満足する結果を得た。本法による定量下限値は T<sub>3</sub>Na が0.5μg/g, T<sub>4</sub>Na が0.7μg/g であった。本法を用いてダイエット用健康食品5種類について応用したが、いずれも未検出であった。

**表 1** 健康食品からのT<sub>3</sub>Na及びT<sub>4</sub>Naの  
添加回収試験結果

|         | T <sub>3</sub> Na | T <sub>4</sub> Na |
|---------|-------------------|-------------------|
|         | 回収率±標準偏差**        |                   |
| 健康食品 A* | 76.7±3.0          | 77.8±1.9          |
| 健康食品 B* | 81.2±4.1          | 81.7±4.1          |

\* 健康食品A及びBにおいてT<sub>3</sub>Na及びT<sub>4</sub>Naは未検出であった。

\*\*健康食品0.1gを採り、T<sub>3</sub>Na及びT<sub>4</sub>Naをそれぞれ2.5 µg添加した。実験回数 (n=5)

#### 4 まとめ

健康食品中の T<sub>3</sub>Na 及び T<sub>4</sub>Na の HPLC 分析法を検討した。その結果、Bond Elut Certify カートリッジを用い効果的に共存物質を除去することができた。また、回収率、再現性ともにほぼ満足する結果を得た。

#### 文献

- 1) 日本薬局方解説書編集委員会：第13改正日本薬局方解説書，(pp. C2642-2646)；東京：廣川書店，1998.
- 2) 日本薬局方解説書編集委員会：第13改正日本薬局方解説書，(pp. C2838-2844)；東京：廣川書店，1998.
- 3) FDA Talk Paper on Unithyroid Approval，(8/22/2000)，1-14，2000.
- 4) 日本医薬情報センター：日本医薬品集；東京：薬業時報社，2000.
- 5) R. L. Garnick et al. : J. Pharm. Sci. , 73, 75-77, 1984.
- 6) S. L. Richheimer & T. M. Amer : J. Pharm. Sci. , 72, 1349-1351, 1983.
- 7) R. S. Rapaka et al. : J. Pharm. Sci. , 70, 131-134, 1981.

## Analysis of Liothyronine Sodium and Levothyroxine Sodium in Health Foods by HPLC

**Kunimasa MORITA, Takami MOHRI and Reiko NAKAGAWA**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,  
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

A reverse-phase HPLC method for determining liothyronine sodium (T<sub>3</sub>Na) and levothyroxine sodium (T<sub>4</sub>Na) in health foods is described. T<sub>3</sub>Na and T<sub>4</sub>Na in health foods was extracted with 0.1% acetic acid in methanol. The sample solution for HPLC was applied to solid phase extractions (Bond Elut Certify) with 2% ammonium hydroxide in methanol as mobile phase. The HPLC analysis was carried out on a column of Inertsil ODS-3 (4.6 x 150 mm, 5 µm) with H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>3</sub>COOH (650:350:5, v/v) as mobile phase and the eluate was monitored by UV detection at 230 nm. The recovery of T<sub>3</sub>Na and T<sub>4</sub>Na from the health food sample was 77-82%. The quantitation limits of this method of T<sub>3</sub>Na and T<sub>4</sub>Na were 0.5 and 0.7 µg/g, respectively.

[Key words; Liothyronine sodium, Levothyroxine sodium, HPLC, Solid phase extractions, Health Food]