

央)使贴壁吸痰的可能性降至最低,减少了损伤黏膜的可能性,使吸痰操作最大限度地安全进行。本组患者采用密闭式吸痰气管损伤,肺部感染率明显低于开放式吸痰,说明了密闭式吸痰对患者的气道损伤小,能减少肺部感染的发生,但缺点是增加了患者的医疗费用。

参 考 文 献

[1] Maggiore SM, Lellouche F, Pigeot J, et al. Prevention of endotrache-

al suctioning ~ induced alveolar derecruitment in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(9): 1215-1224.

[2] Johnson KI, Kearney Pat, Johnson SB, et al. Closed versus open endotracheal suctioning! Costs and physiologic consequences. *Crit Care Med*, 1994, 22(4): 658-666.

[3] 王晓萍. 传统吸痰法与密闭式吸痰方式的临床比较. *中国实用护理杂志*, 2004, 20(4): 41.

高效液相色谱法测定他克莫司滴眼液的含量

王延东 陈茂玲 梁光江 唐细兰 叶成添

【摘要】 目的 建立测定他克莫司滴眼液含量的高效液相色谱法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱;流动相为乙腈-水-磷酸(600:400:1);流速为 2.0 ml/min;检测波长为 215 nm;柱温为 50℃。结果 他克莫司在 6.25 ~ 200 mg/L 浓度范围内线性关系良好($r = 0.9999$), 平均回收率为 99.68%, RSD 为 0.78%, 方法重现性的 RSD 为 1.28% ($n = 6$)。结论 该方法简便、快速、灵敏,可用于该制剂的质量控制。

【关键词】 高效液相色谱法;他克莫司;滴眼液;含量测定

Content determination of tacrolimus eye drops by HPLC WANG Yan-dong, CHEN Mao-ling, LIANG Guang-jiang, et al. *Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510060, China*

【Abstract】 Objective To establish a HPLC method for the content determination of tacrolimus eye drops. **Methods** The separation was performed on Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water-phosphonic acid(600:400:1) with the flow rate of 2.0 ml/min, the detection wavelength was at 215 nm and column temperature was 50℃. **Results** The calibration curve of tacrolimus was linear within the concentration range of 6.25 ~ 200 mg/L, $r = 0.9999$. The average recovery rate of tacrolimus was 99.68% (RSD = 0.78%), and the RSD of the repeatability test was 1.28% ($n = 6$). **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and sensitive, and suitable for the quality control of tacrolimus eye drops.

【Key words】 HPLC; Tacrolimus; Eye drops; Content determination

他克莫司(Tacrolimus)是一种新型强效免疫抑制剂,用于防治各种器官移植术后的免疫排斥反应及自身免疫性疾病的治疗,成为难治性排斥或出现环孢素毒副作用时的首选治疗药物^[1-3]。关于他克莫司的检测分析,先后有报道将高效液相色谱法与 ELISA、MEIA 免疫法或与 MS 检测器联用^[4,6],但生物测定法往往操作过程复杂,影响因素多,误差较大,而与质谱仪的联用因其缺乏通用性、仪器过于昂贵所限,尚停留在血药监测等基础临床研究上,对他克莫司及其制剂质量控制方法的研究则鲜见报道。本文对他克莫司滴眼液进行相关研究,建立了简便、高效、适用的 HPLC 分析方法,用于制剂的含量测定,可有效控制产品质量。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括 G1314A 紫外检测器, G1311A 四元泵, G1316A 柱温箱, G1322A 真空脱气机, G1329A 带温控自动进样器(美国 Agilent 公司); Agilent 化学工作站。电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

他克莫司对照品(浙江省食品药品检验所,批号:061101-FK-BZ,含量:97.5%),他克莫司滴眼液(中山大学中山眼科中心制剂室提供,规格:2 ml: 1 mg,批号:090305,090310,

090325),乙腈为色谱纯,水为注射用水,其余试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水-磷酸(600:400:1);流速为 2.0 ml/min;检测波长为 215 nm;柱温为 50℃;进样量为 50 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取他克莫司对照品适量,加流动相溶解并稀释制成每 1 ml 中含他克莫司 50 μg 的对照品溶液。

2.2.2 样品溶液 精密吸取他克莫司滴眼液 1 ml,置 10 ml 量瓶中,加流动相稀释定容至刻度,摇匀,作为样品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例称取除他克莫司外的其他基质,按该制剂制备工艺制成滴眼液,照“2.2.2”项下方法制成阴性样品溶液。

2.3 系统适应性试验 在上述色谱条件下,分别记录他克莫司对照品溶液、样品溶液以及阴性样品溶液 HPLC 图谱,见图 1,他克莫司的保留时间约为 13.2 min,辅料对主药测定无干扰,主成分峰能够达到很好的分离。

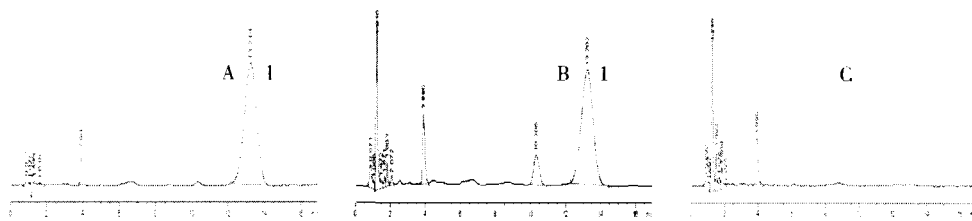


图 1 高效液相色谱

A. 对照品; B. 样品; C. 阴性样品; 1. 他克莫司

2.4 标准曲线的绘制 精密称取他克莫司对照品 25.00 mg, 置 25 ml 量瓶中, 加流动相溶解定容至刻度, 摇匀, 得到质量浓度为 1.00 mg/L 的他克莫司储备液, 继续以流动相稀释, 配制浓度为 6.25、12.5、25、50、100、200 mg/L 的对照品溶液, 分别取溶液 50 μ l 注入色谱仪, 在上述色谱条件下记录色谱图, 量取峰面积。将峰面积(A)与质量浓度(C)做线性回归, 得他克莫司的线性回归方程为: $A = 12.2980C - 7.2541$, 相关系数 $r = 0.9999$ 。结果表明, 他克莫司在 6.25 ~ 200 mg/L 浓度范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 按本品制剂处方, 配制低(12.5 mg/L)、中(50 mg/L)、高(200 mg/L)三种含量模拟内容物, 并于日内的不同时间和不同的日间分别进样 5 次, 计算日内精密度分别为 0.38%、0.30%、0.09%, 日间精密度分别为 1.12%、1.38%、1.26%。

2.6 重现性试验 精密量取同一批号样品 6 份, 照“2.2.2”项下方法制成样品溶液, 分别精密吸取 50 μ l 进样测定, 记录峰面积, 根据回归方程计算含量。结果, 他克莫司含量的 RSD 为 1.28%。

2.7 稳定性试验 取他克莫司对照品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 测定其峰面积, 他克莫司的 RSD 为 0.74%。结果表明, 对照品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的他克莫司样品, 精密加入一定量的对照品溶液, 测定峰面积, 计算回收率, 平均回收率为 99.68%, RSD 为 0.78%, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验 (n=9)

样品 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
	3.92	8.29	99.40		
	3.92	8.39	100.60		
	3.92	8.36	100.24		
	4.90	9.31	99.89		
4.42	4.90	9.16	98.28	99.68	0.78
	4.90	9.12	97.85		
	5.88	10.31	100.10		
	5.88	10.33	100.29		
	5.88	10.35	100.49		

2.9 样品含量测定 按样品溶液配制方法制备样品溶液, 摇匀, 滤过, 进样 50 μ l, 测定 3 批他克莫司滴眼液的含量, 本品含他克莫司应为标示量的 90% ~ 110%。结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果 (n=3)

批号	含量 (%)	RSD (%)
090305	97.02	0.77
090310	99.29	0.61
090325	102.67	0.34

3 讨论

目前他克莫司的质量浓度测定有高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用、ELISA、微粒子酶免疫测定、放射免疫分析等^[4,6]。但药典中制剂的含量测定多采用高效液相色谱法, 而且采用高效液相色谱法测定制剂的含量较为简便、准确、精密, 重现性好, 为了更加有效地控制该制剂的含量, 本研究建立并改良了他克莫司滴眼液的高效液相色谱检测方法。

经回收率和精密度试验证实, 采用该色谱条件测定他克莫司滴眼液的含量, 峰形较好, 主峰窄而尖, 空白样品在相同的波长上并没有吸收, 主成分峰分离较好, 灵敏度高, 专一性强, 测定结果稳定, 回收完全, 可以有效控制产品的质量。

参 考 文 献

- [1] Attas-Fox L, Barkana Y, Iskhakov V, et al. Topical tacrolimus 0.03% ointment for intractable allergic conjunctivitis: an open-label pilot study. *Curr Eye Res*, 2008, 33(7):545.
- [2] 史伟云, 刘廷, 谢立信, 等. FK506 缓释系统前房植入抑制兔高危角膜移植术后的免疫排斥反应. *中华眼科杂志*, 2006, 42(4):299.
- [3] Keiko OI, Hiroshi K, Hiroshi G, et al. Upregulation of neurotrophic factor-related gene expression in retina with experimental autoimmune uveoretinitis by intravitreal injection of tacrolimus (FK506). *Br J Ophthalmol*, 2007, 91(11):1537.
- [4] Staatz CE, Taylor PJ, Tett SE. Comparison of an ELISA and an LC/MS/MS method for measuring tacrolimus concentrations and making dosage decisions in transplant recipients. *Ther Drug Monit*, 2002, 24(5):607.
- [5] Freire A, Hermida J, Tutor JC. Comparison of blood tacrolimus concentrations in liver and kidney transplant recipients using ACMA and MEIA immunoassays. *Ups J Med Sci*, 2008, 113(1):103.
- [6] Westley IS, Taylor PJ, Salm P, et al. Cloned enzyme donor immunoassay tacrolimus assay compared with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and microparticle enzyme immunoassay in liver and renal transplant recipients. *Ther Drug Monit*, 2007, 29(5):584.