

# HPLC 检测他克莫司软膏剂中他克莫司的含量

李国辉<sup>1</sup>, 李磊<sup>2</sup>, 张厚才<sup>3</sup>

(1. 济南市妇幼保健院, 山东 济南 250001; 2. 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014;

3. 月旭材料科技(上海)有限公司, 上海 201203)

**【摘要】** 目的 建立并验证高效液相色谱法检测他克莫司软膏中他克莫司的含量。方法 Ultimate<sup>5</sup> XB-Diol 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为正己烷-正丁基氯-乙腈; 检测波长 225 nm; 流速 1.7 mL/min; 温度: 室温。结果 他克莫司的线性范围  $Y = 2600.7X - 583.82$ , 相关系数为 0.9999, 线性范围为 2 mg/L~200 mg/L, 平均回收率为 98.97%, RSD 为 0.47%。结论 本方法简便、灵敏、准确、重现性好、专属性强, 可用于药厂对他克莫司软膏剂中他克莫司的测定。

**【关键词】** 他克莫司; 含量测定; HPLC; Diol

**【中图分类号】** R286 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-2257(2011)02-0150-03

## Content determination of tacrolimus ointment by HPLC

LI Guo-hui<sup>1</sup>, LI Lei<sup>2</sup>, ZHANG Hou-cai<sup>3</sup>

(1. Maternity and Child Care Hospital, Jinan, Shandong 250001, China; 2. Shandong Analysis and Test Center, Jinan, Shandong 250014, China; 3. Welch Materials Inc, Shanghai 201203, China)

**【Abstract】 Objective** To develop a HPLC method for determination tacrolimus. **Methods** The analysis was carried on a Ultimate<sup>5</sup> XB-Diol (4.6×250 mm, 5 μm) column. The mobile phase was composed of hexane, t-butyl chloride, and acetonitrile and the flow rate was 1.7 mL/min. The detection wavelength was set at 225 nm and column temperature was ambient temperature. **Results** The linear range of tacrolimus was 2-200 μg/ml ( $r = 0.9999$ ) and the linear equation was  $Y = 2600.7X - 583.82$ . The average recovery ( $n = 7$ ) was 98.7%, and RSD was 0.47%. **Conclusion**

This method with strong specificity is simple, sensitive, accurate, reproducible, and can be used for the determination of tacrolimus.

**【Key words】** tacrolimus; content determination; HPLC; Diol

他克莫司(tacrolimus)又名FK506,是从链霉菌属中分离出的发酵产物,其化学结构属23元大环内酯类抗生素,为一种强力的新型免疫抑制剂,主要通过抑制白介素-2(IL-2)的释放,全面抑制T淋巴细胞的作用,较环孢素(CsA)强100倍。近年来,作为肝、肾移植的一线用药,已在日本、美国等14个国家上市。临床实验表明,其在心、肺、肠、骨髓等移植中应用有很好的疗效。同时在治疗特应性皮炎(AD)、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性眼病等自身免疫性疾病中发挥着积极的作用。目前市场有片剂、胶囊剂、注射剂、软膏剂等,其中软膏剂适用于因潜在危险而不宜使用传统疗法、或对传统疗法反应不充分、或无法耐受传统疗法的中到重度特应性皮炎患者。在软膏剂中辅料量多,主药量微,且主药理化性质较独特,含量测定较难。他克莫司软膏的含量

测定目前已有报道<sup>[1]</sup>,但是前处理不够彻底,基体干扰较大。本文采用SPE小柱对软膏基体进行净化,用Diol色谱柱进行分离,大大降低了基体的干扰,操作简单、快捷、专属性强,故该方法可用作他克莫司软膏剂的主含量测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器: 高效液相色谱仪(上海伍丰仪器, LC100二元高压系统, 紫外检测器); 色谱柱 Ultimate<sup>5</sup> XB-Diol(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Welchrom<sup>5</sup>硅胶小柱(1000 g/6L); 1/1万电子天平(上海舜宇恒平); 超声波清洗机(昆山超声波仪器厂)。

他克莫司对照品(中检所), 他克莫司软膏剂(市场购买), 乙腈(色谱纯, HoneyWell), 正己烷(色谱

纯, HoneyWell), 正丁基氯(分析纯, 国药集团), 水(重蒸馏水)。

## 1.2 色谱条件

色谱柱 Ultimate 5 XB-Diol(4.6 × 250 mm, 5 μm); 检测波长 225 nm; 流动相 正己烷-正丁基氯-乙腈 7: 2: 1; 温度室温; 流速 1.7 mL/min; 进样量: 5 μL。

## 1.3 样品溶液的制备

供试样品溶液的制备: 取他克莫司软膏样品 1 g 置于有封盖的离心管中, 用 5 mL(正己烷-乙酸乙酯 10: 1) 混合溶液溶解、振荡, 使之成为悬浊液, 离心(3 000 r/min) 5 min, 取出上清液, 向离心管中再次加入 5 mL(正己烷-乙酸乙酯 10: 1) 混合溶液, 振荡, 使之成为悬浊液, 再次离心, 取出上清液。合并两次上清液, 将其通过活化的硅胶小柱后, 用 5 mL(正己烷-乙酸乙酯 10: 1) 混合溶液洗涤 6 次。再用 5 mL 乙酸乙酯和 5 mL 乙腈依次洗脱, 收集乙腈洗脱液, 氮气吹干, 残渣加入 1 mL(正己烷-正丁基氯-乙腈 1: 1: 1) 混合溶液溶解即得。

硅胶小柱的活化: 取 1 000 g/6L 硅胶小柱, 用 5 mL 乙腈润洗, 再用(正己烷-乙酸乙酯 10: 1) 混合溶液每次 5 mL 冲洗两次, 备用。

标准溶液储备液的制备: 精密称取他克莫司对照品适量, 用(正己烷-正丁基氯-乙腈 1: 1: 1) 混合溶液溶解, 配置成浓度为 1 g/L 的他克莫司标准溶液。

标准溶液的配制: 精密量取他克莫司对照品储备液 1 mL, 用(正己烷-正丁基氯-乙腈 1: 1: 1) 混合溶液定容到 10 mL, 配置成浓度为 0.1 g/L 的他克莫司标准溶液。

阴性样品溶液: 取不含他克莫司的阴性样品适量, 按供试品溶液处理方法进行处理。

## 2 结果

### 2.1 色谱图

取他克莫司标准品溶液、他克莫司样品溶液和阴性样品溶液各 20 μL, 按照 1.2 项条件测试, 谱图如图 1~ 3。

### 2.2 精密度实验

取他克莫司对照品溶液 20 μL, 按照 1.2 项色谱条件, 连续进样 6 针, 计算其峰面积的相对标准偏差 RSD 为 0.30%, 说明该方法精密度良好。

### 2.3 重复性试验

取他克莫司软膏, 按照 1.3 项方法, 同时制备 6

份样品溶液, 按照 1.2 项色谱条件, 各取 20 μL 进样测定, 同时对照品溶液进行检测, 按照外标法定量, 6 份样品检测结果平均含量为 0.1007%, 计算其相对标准偏差 RSD 为 0.93%, 说明该方法重复性良好。

## 2.4 稳定性试验

制备他克莫司软膏样品溶液分别于 0、1、2、3、

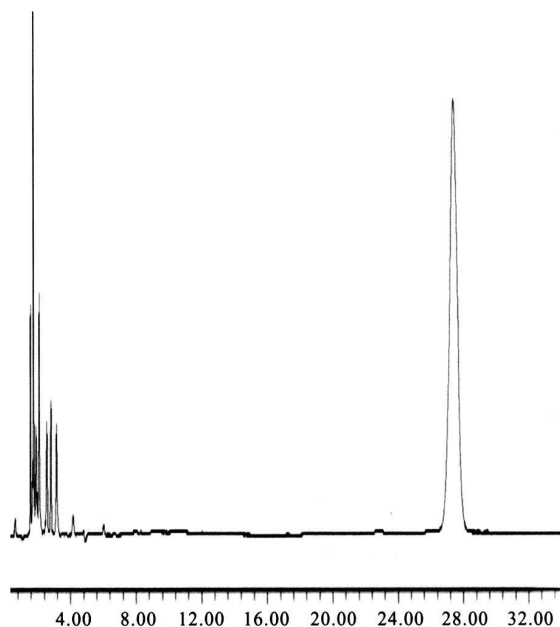


图 1 他克莫司标准品溶液

Fig. 1 Tacrolimus standard solution

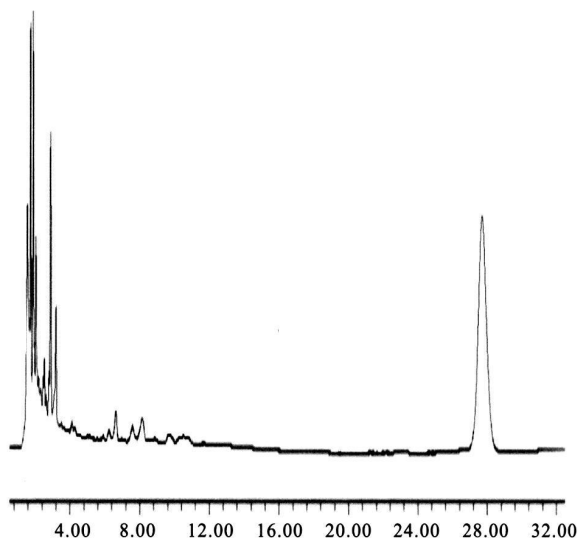


图 2 他克莫司样品溶液

Fig. 2 Tacrolimus sample solution

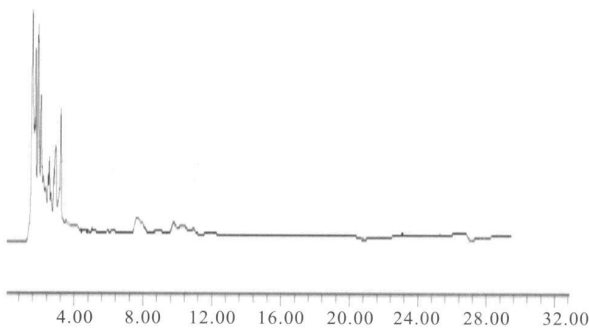


图 3 阴性样品溶液

Fig. 3 Negative sample solution

5、6、8、10 h 检测, 其峰面积没有明显的变化, 其相对标准偏差 RSD 为 0.49%, 说明该样品溶液在 10 h 内稳定。

### 2.5 线性试验

取他克莫司对照品适量, 用(正己烷-正丁基氯-乙腈 1:1:1)混合溶液作为溶剂, 配置成浓度分别为 2、5、10、50、70、100、200 mg/L, 按 1.3 项色谱条件依次分析各标准溶液, 以峰面积(A)对进样量( $\mu\text{g}$ ) 得他克莫司的线性回归方程及相关系数分别为  $Y = 2600.7x - 583.82$ , 相关系数为 0.9999, 线性范围为 2 mg/L ~ 200 mg/L。

### 2.6 回收率试验

取他克莫司软膏, 称取 9 份, 每份为 0.5 g, 每 3 份为 1 组, 第一组加入他克莫司对照品 0.4 mg, 第二组加入 0.5 mg, 第三组加入 0.6 mg 到 100 mL 容量瓶中, 按照 1.3 项样品溶液项方法处理, 照 1.2 项色谱条件检测, 其平均回收率为 98.97%, RSD 为 0.47%。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

取他克莫司对照品溶液进行紫外扫描, 在紫外

波长 225 nm 有最大吸收, 参考相关文献, 选择 225 nm 为检测波长。

### 3.2 色谱柱的选择

因为本品极性较大, 参考相关文献<sup>[2]</sup> 考察了硅胶柱、氨基柱、二醇基柱、C18 柱, 最后在 Diol 色谱柱上都有较好的保留和峰形, 与杂质能很好地分离, 故选择 Diol 色谱柱。

### 3.3 色谱条件的选择

参考相关文献, 考察了乙腈-异丙醇-磷酸, 甲醇-异丙醇-磷酸, 正己烷-正丁基氯-乙腈体系在不同比例下的分离效果, 最后在正己烷:正丁基氯:乙腈 = 7:2:1 体系中主峰峰形好, 并且样品与杂质能很好的分离, 柱温的适当变化对分离均没有影响。

### 3.4 净化条件的选择

考察了硅胶小柱的不同规格, 因为软膏基体复杂, 需要硅胶质量较多, 最后选择了 1000 g/6L 的规格; 在淋洗时, 使用了多个体积的淋洗液, 最后使用了 5 mL, 回收率高, 挥干较快。

对该方法进行考察验证时, 各项试验均满足药品含量测定检测方法的验证要求, 故该方法简单可行, 专属性强。

本方法采用的高效液相色谱法<sup>[3,4]</sup> 检测他克莫司软膏剂中主成分含量, 简便、灵敏、准确、重现性好, 可应用于他克莫司软膏剂的含量测定。

### 参考文献

- [1] 许明哲, 尹利辉, 胡昌勤. HPLC 法测定他克莫司软膏含量及含量均匀度[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(12): 748-751.
- [2] 周明昊, 姚彤炜. 反相高效液相色谱法测定他克莫司软膏含量[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 10, 32(10): 615-617.
- [3] 顾吉晋, 邓英杰, 王浩, 等. RP-HPLC 法测定大鼠血浆中姜黄素含量[J]. 成都医学院学报, 2009, 4(4): 241-244.
- [4] 李宏, 赵波, 刘静, 等. RP-HPLC 测定川明参药材中香豆素含量[J]. 成都医学院学报, 2010, 5(2): 122-125.

(2011-04-18 收稿, 2011-05-18 修回)