

国产氢型阳离子交换 (磺酸型) HPLC 色谱柱 在利巴韦林注射液分析中的应用-I^{*}

魏荣卿 杨 洋 张婷婷 刘晓宁^{**}

南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009

摘要:采用国产的氢型强阳离子交换 (磺化苯乙烯-二乙烯基苯共聚物) 色谱柱测定了利巴韦林注射液的含量。色谱柱为国产的氢型强阳离子麦科菲色谱柱 (MKF-CIS), 流动相为水 (稀硫酸调至 $\text{pH}=2.5\pm0.1$), 检测波长 207nm, 流速 1.0mL/min, 温度 65 $^{\circ}\text{C}$ 。结果表明, MKF-CIS 色谱柱可以较准确的测定利巴韦林注射剂含量, 在 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 其浓度与峰面积的线性相关性良好 ($r=0.9999$), 平均回收率 99.8%, RSD=0.558%。由此, 国产麦科菲 MKF-CIS 色谱柱可以简便、准确、重复性好地用于利巴韦林测定, 代替传统的 C₁₈ 硅胶柱及进口的同类型色谱柱。

关键词:利巴韦林; 氢型强阳离子交换色谱柱; HPLC; 麦科菲色谱柱

中图分类号: TQ028 文献标示码: A

1 前 言

利巴韦林 (病毒唑, 三氮唑核苷, RTC, Virazole, RBV) 是一类广谱抗病毒药物。是鸟苷、次黄嘌呤核苷类似物, 分子式为 C₈H₁₂N₄O₅, 分子量 244.250。结构式如图 1。

利巴韦林对 DNA 和 RNA 病毒均有抑制作用。药品进入细胞后可形成利巴韦林单磷酸, 竞争性地抑制肌苷-5'-单磷酸脱氢酶活性, 从而抑制多种 DNA 和 RNA 病毒的复制^[1]。尤其是在 2003 年, 全世界范围内爆发的变种的冠状病毒 SARS 期间, 大约有 80%以上的 SARS 病人用过利巴韦林和干扰素等药物^[2]。

HPLC 法被广泛应用于利巴韦林的生产和研究中^[3]。如今, 国家卫生部药品标准^[4]、美国药典 23 版^[5]和英国药典 1998 年版^[6]收载的原料和制剂的含量测定均采用 HPLC 法^[2]。

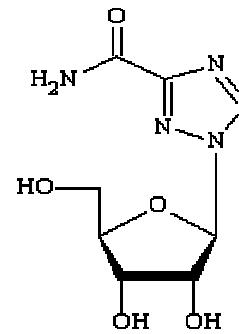


Fig. 1 The Molecular Structure of Ribavirin

* 收稿日期: 2005 年 10 月 14 日

项目基金: 科技部创新基金 (No. 05C26213200578); 南京市创新基金 (编号: 200407011)

作者简介: 刘晓宁(1953~), 男, 博士, 博士生导师. 025-83587347, E-mail: xiaoningliu@163.com,

传统的 HPLC 法均采用十八烷基键合硅胶色谱柱^[7]检测利巴韦林，但是该柱填料存在一些缺点。一方面硅胶填料键合的 C₁₈ 链会脱落，在较高的 pH 条件下，硅胶基质易降解；另一方面，由于利巴韦林分子结构上含有有机氨基团，在硅胶基材的色谱柱中，会因色谱柱填料中残存的硅羟基与有机氮结构产生氢键吸附，导致样品部分地粘附在色谱柱的填料上，从而造成峰形拖尾和柱压升高^[8]。

美国 25 版药典和欧洲药典 EP52^[9]中收载的利巴韦林含量测定同样也采用 HPLC 法，所不同的是美国药典采用的是磺化的苯乙烯-二乙烯基苯共聚的氢型强阳离子交换色谱柱 (100mm×7.8mm)^[10]。同时，中国 2005 版药典也从 2005 年 7 月 1 日使用新法，即参照美国 25 版药典做了相应的改动^[11]。这就要求国内有关利巴韦林检测的科研单位和生产厂家必须使用这种新型的高效色谱柱，但是，国内这种色谱柱大多依赖国外进口，且价格昂贵。为降低企业成本，共建节约型社会，就需要研究开发国产的聚合物型色谱柱。

本文使用国产的南京麦科菲高效分离载体有限公司提供的高聚物磺酸型色谱柱，并对该色谱柱性能进行了各项考察，以促进这种国产的高聚物型色谱柱代替国外同种类型的色谱柱，有效并节约地应用于我国的科学的研究和制药工业。

2 实验部分

2.1 仪器与试药

Dionex (戴安) 高效液相色谱仪：型号 Summit，色谱系统由 P680 HPLC 泵、UVD-170U 可变波长紫外检测器、柱温箱 TCC-100 (Thermostatted Column Compartment) 组成。利巴韦林标准品 (中国药品生物制品检定所，批号：629-2002)；利巴韦林注射液 (江苏鹏鹞药业有限公司，批号：0407161、0408161、0409161，规格 100mg/mL)；水为超纯水；硫酸为分析纯 (上海化学试剂有限公司)。工作站：美国戴安 Chromeleon。

2.2 色谱操作条件^[11]

色谱柱：磺化苯乙烯-二乙烯基苯共聚物的离子交换柱 (100mm×7.8mm, 7μm, 南京麦科菲高效分离载体有限公司提供，型号 MKF-CIS)。流动相：水 (硫酸调 pH=2.5±0.1)，流动相在使用前用 0.45μm 的水膜过滤，并且超声振荡 30min；检测波长：207nm^[10]。

2.3 溶液的配制^[7]

2.3.1 标准品溶液 (1mg/mL) 的配制

精密称取利巴韦林标准品 25mg 置于 25mL 容量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，配制得到标准品溶液，备用。

2.3.2 供试品溶液 (1mg/mL) 的配制

取 1mL 利巴韦林注射液置于 100mL 容量瓶中，加流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，

配制得到供试品溶液，备用。

3 结果与讨论

3.1 有机相的梯度变化对柱压的影响

早期聚合物色谱柱由于在有机相中的溶胀难于进行梯度淋洗，原因是柱压会随流动相中有机相含量的增加而陡增，导致柱压偏高，无法进行高效液相色谱的分离分析。而一般硅胶色谱柱则不同，其柱压随流动相中有机相含量的增加呈先增加后减少的变化，这是因为流动相的粘度变化所致，与柱填料的溶胀无关^[12,13]。本文通过对 MKF-CIS 聚合物色谱柱柱压与有机相的梯度变化 [甲醇/水(V/V) 0~100%，20min] 的考察显示，MKF-CIS 柱的柱压变化与硅胶色谱柱相同，也是随流动相中有机相含量的增加先增加后减少。这说明 MKF-CIS 聚合物色谱柱克服了以前聚合物色谱柱的缺点，柱压稳定，穿透性良好^[12]。见图 2。

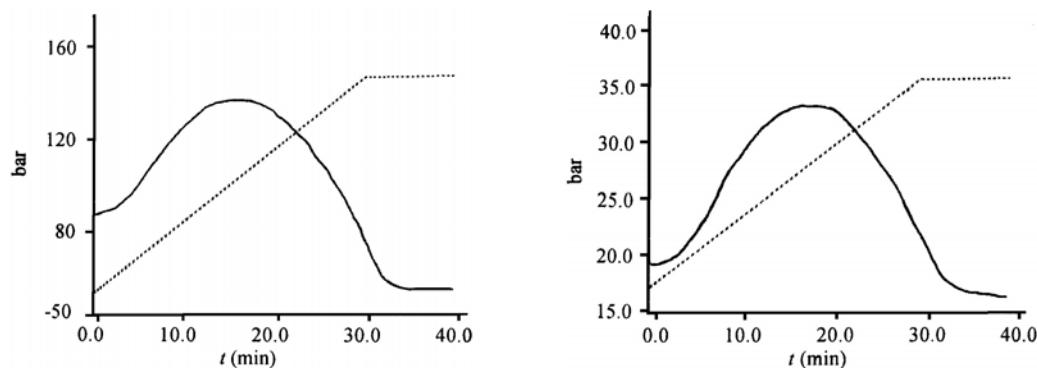


Fig. 2 Influence of Solvent Composition on the Column Back Pressure for the Silica Column (left) and Polymer Column (right).

3.2 系统适用性实验

按照《中华人民共和国药典》2005 年版二部的要求及色谱条件^[13]，理论塔板数应不低于 3000，拖尾因子 (Asym.) 应在 0.95~1.05 之间。在此条件下，标准品和供试品的实验结果见表 1 和图 3。由表 1 及图 3 可见，标准样品和供试品的出峰时间相近，拖尾因子在 0.95~1.05 之间，理论塔板数在 3000 以上，均达到药典 2005 版要求。

3.3 线性相关性试验

吸取 2.3.1 项下的标准品溶液 1.25mL、2.5mL、5mL、7.5mL、10mL、25mL、50mL 分别置入 7 只 100mL 容量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀。配制成 12.5μg/mL、25μg/mL、50μg/mL、75μg/mL、100μg/mL、250μg/mL、500μg/mL 的标准品溶液。精密吸取 20μL 进样，根据面积积分法测得其峰面积，实验结果见表 2。由表 2 可知，在 7 个不同浓度下，测得的峰面积不断增大，所测得的拖尾因子和理论塔板数都达到药典 2005 版要求。线性回

归得方程: $C=1.092 \times A + 0.216$, ($r=0.9999$)。所以, 进样量在 $0.25\mu\text{g} \sim 10\mu\text{g}$ 之间线性关系良好。

Table 1 The Determination of Ribavirin Standard and Ribavirin Sample

| | t_R (min) | Asym. | Theoretical plates |
|----------|-------------|-------|--------------------|
| Standard | 4.254 | 1.02 | 3746 |
| Sample | 4.229 | 1.05 | 3522 |

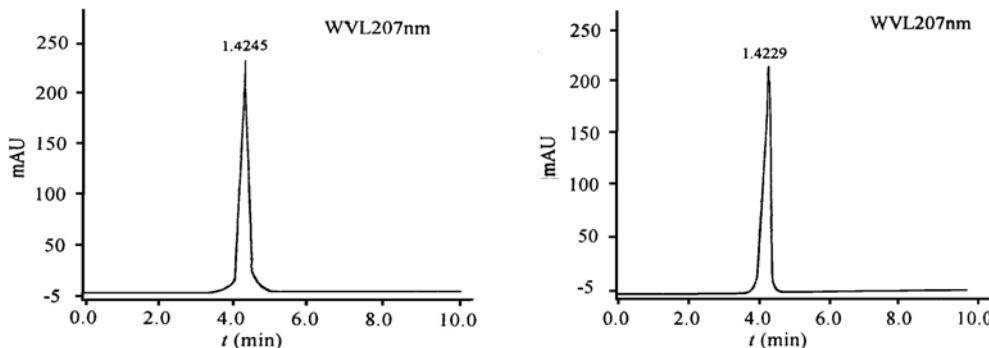


Fig. 3 The HPLC Chromatograms of Ribavirin Standard (left) and Ribavirin Sample (right)

Table 2 The Determination of Different Concentration Ribavirin Standard

| C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Aera ($\text{mAU} \cdot \text{min}$) | Asym. | Theoretical plates |
|---------------------------------|--|-------|--------------------|
| 12.5 | 11.18 | 1.02 | 3759 |
| 25 | 22.95 | 1.02 | 3782 |
| 50 | 45.54 | 1.02 | 3746 |
| 75 | 68.25 | 1.03 | 3799 |
| 100 | 91.51 | 1.03 | 3755 |
| 250 | 226.78 | 1.03 | 3828 |
| 500 | 443.77 | 1.05 | 3597 |

3.4 标准品精密度实验

取 2.3.1 项下的标准品溶液, 稀释至 $50\mu\text{g}/\text{mL}$, 精密吸取 $20\mu\text{L}$, 重复进样 5 次, 实验结果, 峰面积的 R.S.D=0.433%, 理论塔板数的 R.S.D=0.345%, 精密度良好。

3.5 麦科菲色谱柱的性能考查

3.5.1 供试品浓度对麦科菲色谱柱柱性能的影响

分别吸取 2.3.2 项下的供试品溶液 1.25mL 、 2.5mL 、 5mL 、 7.5mL 、 10mL 置于 5 只 100mL 的容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摆匀。配制成 $12.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $75\mu\text{g}/\text{mL}$

和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液，精密吸取 20 μL 进样，测得其峰面积，实验结果见表 4。

Table 3 The Precision of the Method

| NO. | t_R (min) | Aera (mAU*min) | Theoretical plates |
|-----------|-------------|----------------|--------------------|
| 1 | 4.245 | 45.76 | 3730 |
| 2 | 4.246 | 45.56 | 3745 |
| 3 | 4.247 | 45.59 | 3747 |
| 4 | 4.243 | 45.47 | 3736 |
| 5 | 4.244 | 45.22 | 3764 |
| R.S.D (%) | | 0.433 | 0.345 |

Table 4 The Experiment of Different Concentration Sample

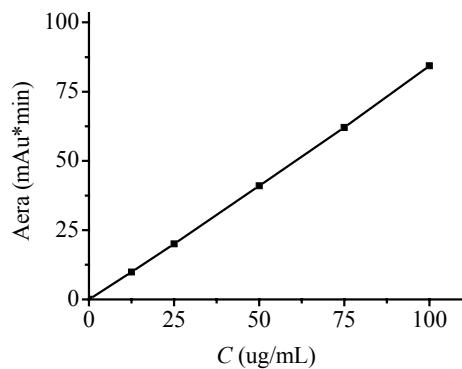
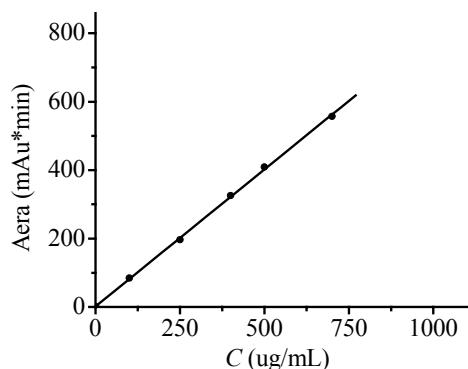
| C ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Theoretical plates | R.S.D (%) |
|---------------------------------|--------------------|-----------|
| 12.5 | 3519 | |
| 25 | 3538 | |
| 50 | 3522 | 0.65 |
| 75 | 3577 | |
| 100 | 3540 | |

由表 4 可见，随着浓度的增大，峰面积不断增大；理论塔板数稳定在 3500 以上，相对标准偏差 (R.S.D) 为 0.65%。以浓度 C 对峰面积 A 作图，得到供试品曲线（见图 4），线性回归得方程： $C = 1.1767 \times A + 1.3661$ ($r = 0.9999$)。由此可见，供试样品浓度在 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，线性良好，柱效稳定，柱性能良好。

3.5.2 麦科菲色谱柱最大上样量实验

分别吸取 2.3.2 项下的 1 mg/mL 的供试品溶液 10 mL 、25 mL 、40 mL 、50 mL 、70 mL 置于 100 mL 容量瓶中，加流动相稀释至刻度。配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液，连同 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液，精密吸取 20 μL 分别进样，测得其峰面积，实验结果见表 5。

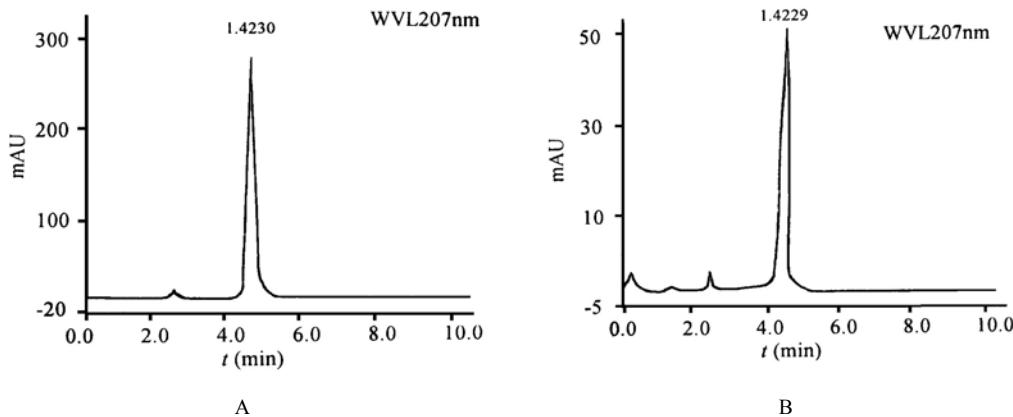
由表 5 可见，当浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，拖尾因子符合药典要求，而达到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，拖尾因子超过 1.05，不再符合药典的要求；当浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，理论塔板数符合药典大于 3000 的要求，而达到 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，理论塔板数为 2507，不再符合药典对理论塔板数的要求。以浓度 C 对峰面积 A 作图线性回归，得方程 $C = 1.253 \times A - 4.073$ ($r = 0.9995$)（见图 5）。由图 5 可见，浓度在 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以内，峰面积与浓度线性关系良好，当浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的时候，偏离直线。因此，国产麦科菲色谱柱在用于分析检测利巴韦林时，色谱柱的最大上样量的浓度约为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，即 8 μg 左右。

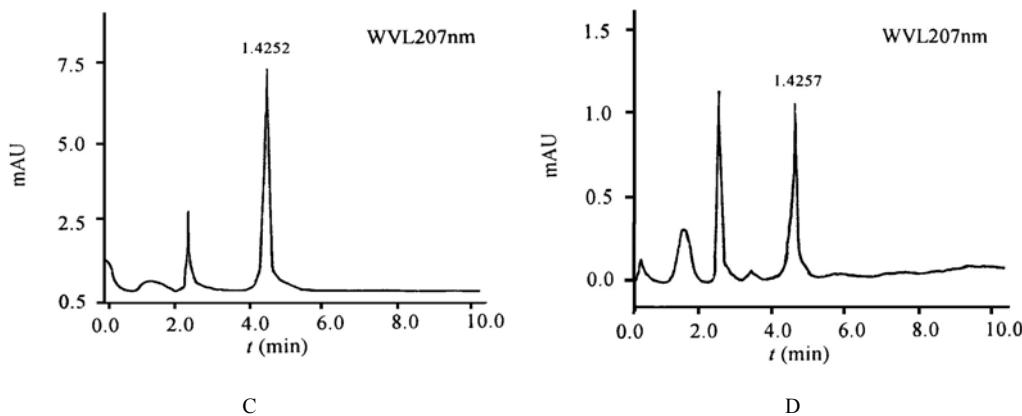
**Fig. 4** The Curve of Sample**Fig. 5** The Max Column Capacity Experiment**Table 5** The Max Column Capacity Experiment

| C (ug/mL) | Asym. | Theoretical plates |
|-----------|-------|--------------------|
| 100 | 1.05 | 3540 |
| 250 | 1.05 | 3587 |
| 400 | 1.05 | 3590 |
| 500 | 1.08 | 3400 |
| 700 | 1.09 | 3071 |
| 1000 | 1.18 | 2507 |

3.5.3 样品检测限实验^[14]

精密吸取 2.3.2 项下的供试品溶液 5mL，置 100mL 容量瓶中，加流动相稀释至刻度，得到的供试品浓度为 50μg/mL，摇匀，精密吸取 20μL，测其峰面积。不断降低供试品浓度，直到信噪比 (S/N) 为 3 为止，结果见图 6。由图 6 可知，在国产磷酸强阳离子交换型麦科菲柱上检测利巴韦林注射液的最低检测限约为 2ng。



**Fig. 6** The Detectability Chromatograms of Ribavirin Sample

A: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chromatograms of ribavirin sample; B: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chromatograms of ribavirin sample;
C: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chromatograms of ribavirin sample; D: 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chromatograms of ribavirin sample

3.5.4 流速对麦科菲色谱柱柱性能的影响

在 0.5ml/min、0.8ml/min、1.0ml/min、1.5ml/min 4 个不同的流速下, 精密吸取 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液 20 μL 进样, 实验结果见表 6。由表 6 可知, 随着流速的增大, 柱压增大, 保留时间减少; 流速在 1.5mL/min 时, 理论塔板数已经低于 3000, 不再符合药典的要求。因此, 流速在 0.5~1.0 之间兼可选用 (药典建议选择流速为 1.0mL/min)。

Table 6 The Effect of Flow Rate on Determination

| Flow rate (mL/min) | Pressure (bar) | t_R (min) | Theoretical plates |
|--------------------|----------------|-------------|--------------------|
| 0.5 | 9 | 8.226 | 3414 |
| 0.8 | 13 | 5.237 | 3693 |
| 1.0 | 16 | 4.223 | 3595 |
| 1.5 | 24 | 2.863 | 2656 |

Table 7 The Effect of Temperature on Ribavirin Determination

| Temperature (°C) | Pressure (bar) | t_R (min) | Asym. | Theoretical plates |
|------------------|----------------|-------------|-------|--------------------|
| 25.0 | 25.0 | 6.745 | 1.77 | 818 |
| 40.0 | 19.0 | 5.372 | 1.41 | 1644 |
| 55.0 | 16.0 | 4.594 | 1.14 | 2778 |
| 65.0 | 14.0 | 4.240 | 1.03 | 3549 |

3.5.5 柱温对麦科菲色谱柱柱性能的影响

在 25°C、40°C、55°C、65°C 4 个不同的柱温下, 考查柱温对柱性能的影响。由表 7 可

见，随着柱温的升高，柱压下降，保留时间减少，拖尾因子改善，理论塔板数升高。当柱温上升到 65 ℃时，理论塔板数达到 3549，拖尾因子为 1.03，完全达到药典的要求。

3.5.6 样品重复性实验

取浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的利巴韦林供试品溶液，精密吸取 20 μL ，重复进样 5 次，实验结果见表 8。由表 8 可得，峰面积的 R.S.D=0.787%，柱效的 R.S.D=0.258%，供试品重复性良好。

Table 8 The Experiment of Repetition

| NO. | t_R (min) | Aera (mAU*min) | Theoretical plates |
|-------|-------------|----------------|--------------------|
| 1 | 4.230 | 44.93 | 3595 |
| 2 | 4.228 | 44.91 | 3597 |
| 3 | 4.228 | 45.29 | 3593 |
| 4 | 4.228 | 44.87 | 3592 |
| 5 | 4.227 | 44.66 | 3574 |
| R.S.D | | 0.787 | 0.258 |

3.5.7 加样回收率实验^[15]

分别吸取 3.5.1 项下的 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液各 5mL，置于 10mL 的容量瓶中，再分别加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准样品溶液 2.5mL，再加流动相定容。分别精密吸取 20 μL 进样，测其峰面积，由外标法得其含量，并计算其回收率（结果见表 9）。结果测得其平均回收率为 99.8%，R.S.D=0.558%。

Table 9 The Experiment of the Recovery

| Sample (μg) | Added (μg) | Detected (μg) | Recovery (%) | Average (%) | R.S.D (%) |
|--------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------|-------------|-----------|
| 0.125 | 0.5 | 0.627 | 100.4 | | |
| 0.25 | 0.5 | 0.749 | 100.2 | | |
| 0.5 | 0.5 | 0.996 | 99.2 | 99.8 | 0.558 |
| 0.75 | 0.5 | 1.246 | 99.2 | | |
| 1 | 0.5 | 1.499 | 99.8 | | |

3.5.8 样品含量测定^[15]

按 2.3.2 项下的方法精密量取 3 个不同批次的供试品溶液 0.5mL，分别置入 3 只 10mL 的容量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，0.45 μm 的微孔滤膜过滤，配制成约 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液，精密吸取 20 μL 进样，按外标法测得该 3 个不同批次供试品的含量，结果见表 10。由表 10 可得，3 个不同批号的供试品的含量基本一致，RSD=0.418%。

Table 10 The Results of Determination of Sample

| NO. | Content (mg/mL) | Percentage of injection (%) |
|---------|-----------------|-----------------------------|
| 0407161 | 97.8 | 97.8 |
| 0408161 | 98.6 | 98.6 |
| 0409161 | 98.4 | 98.4 |
| R.S.D | 0.418 | 0.418 |

注: Content 为实测的样品含量, Percentage 为实测出来的利巴韦林的含量占厂家的产品标示量的比例, 厂家的产品标示量为 100mg/mL。

4 结 论

本文使用国产磷酸型麦科菲色谱柱, 按照我国药典 2005 版规定的色谱条件对利巴韦林进行了检测, 检测结果: 无论是理论塔板数 (>3000) 还是拖尾因子 (0.95~1.05) 都可满足药典的要求; 通过考查柱温、上样浓度、流速等色谱条件对国产麦科菲色谱柱检测利巴韦林时的影响, 其结果同样表明, 各项参数都满足药典的要求; 最后, 对标准样品线性关系的研究、精密度实验、重复性实验、加样回收率实验以及样品的含量测定等结果表明, 各项实验数据良好, 均符合药典要求。

综上所述, 国产麦科菲磷酸型色谱柱在检测利巴韦林时效果良好, 完全达到药典要求, 可用于高效液相色谱法检测利巴韦林的工作。

参考文献

- [1] 郑虎, 药物化学 第5版 [M], 北京: 人民卫生出版社, 2000, p308~309.
- [2] 刘忠良, 赵庆华, 药物分析杂志 [J], 2004, 24(1): 82~83.
- [3] 吴韶铭, 陈向阳, 中国药事 [J], 1999, 13(3): 191.
- [4] 国家药典委员会 编, 卫生部药品标准, 二部, 第六册 (生化药品第一分册) [S], 北京: 卫生部药典委员会, 1998, p49.
- [5] The United States Pharmacopeial Convention, *The USP Pharmacists' Pharmacopoeia*, The 2003 edition [M], Philadelphia: National Publishing, 2003, p1377~1378.
- [6] British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia*, The 1998 edition [M], London: Stationery office, 1998, p1325~1326.
- [7] 陈艾霞, 陈斌, 南昌大学学报 [J], 1998, 22(1): 81~83.
- [8] 刘国诠, 余兆楼, 色谱柱技术 [M], 北京: 化学工业出版社, 2001, p269~276.
- [9] European Pharmacopoeia Commission, *European Pharmacopoeia 5.1*, The 2005 edition [M], Ligue: Aubin, 2005, p3002~3004.
- [10] USP. Compiled, *The USP Pharmacists' Pharmacopoeia*, The 2005 edition [M], Philadelphia:

- National Publishing, p5927.
- [11] 国家药典委员会编, 中华人民共和国药典 2005 年版 (二部) [M], 北京: 化工工业出版社, 2005, p260.
- [12] 左育民, 朱伯儒, 廖云 等, 高等学校化学学报 [J], 1993, 14(3): 358~359.
- [13] Yang Y. B., Verzele M., *J. Chromatogr.* [J], 1987, 387(1): 197~205.
- [14] 李莉, 李铜铃, 华西医药杂志 [J], 2003, 18(3): 196~198.
- [15] 郝翔, 华西医药杂志 [J], 2004, 19(4): 303~304.

DETERMINATION OF RIBAVIRIN INJECTION BY HPLC WITH HOMEMADE CATION (STRONGLY ACIDIC) CHROMATOGRAM COLUMN -I

WEI Rongqing, YANG Yang ZHANG Tingting LIU Xiaoning

*College of Life Science and Pharmaceutical Engineering,
Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China*

Abstract: The homemade MKF-CIS chromatograph column can be used for examining the concentration of ribavirin injection. The column was offered by MKF co., mobile phase was water (using H_2SO_4 to control $pH=2.5\pm0.1$), temperature was 65 $^{\circ}C$, the wavelength was 207nm and the flow rate was 1.0 ml/min. The result indicated that MKF-CIS column can determinate ribavirin injection exactly. The linearity was good within the range of $12.5\mu g/mL\sim500\mu g/mL$ ($r=0.9999$), the average recovery was 99.8% and RSD was 0.558%. Therefore, the homemade MKF-CIS chromatograph column can be used for examining the concentration of ribavirin injection correctly, conveniently and have a good repetition, it is able to take place of silica gel C₁₈ column and imported same type column.

Key words: Ribavirin; Cation ion-exchange column; HPLC; MKF-CIS column.