

# HPLC 测定利巴韦林葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛的含量

曹亮, 赵锋, 周芸, 李瑞宏, 向柏\* (河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

**摘要:** 目的 建立测定利巴韦林葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛含量的高效液相色谱法。方法 采用 Diamonsil™ C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(30 : 70); 检测波长: 284 nm; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温。结果 利巴韦林和辅料均不干扰 5-羟甲基糠醛的检测, 加权最小二乘法回归结果表明, 在 0.099 4~7.949 μg·mL<sup>-1</sup> 和 0.002 0~0.198 7 μg·mL<sup>-1</sup> 内 5-羟甲基糠醛浓度与峰面积均呈现良好的线性关系( $r=0.999\ 0$  和  $0.999\ 8$ ), 定量限和检测限分别达 0.04 ng 和 0.012 ng, 平均回收率为 100.4%, RSD 为 1.8% ( $n=6$ )。结论 该方法专属性强、灵敏度高、准确性好, 适用于利巴韦林葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛的检测。

**关键词:** 利巴韦林葡萄糖注射液; 5-羟甲基糠醛; 高效液相色谱法; 加权最小二乘法

中图分类号: R917.101; R917.791

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)04-0348-03

## Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Ribavirin and Glucose Injection by HPLC

CAO Liang, ZHAO Feng, ZHOU Yun, LI Ruihong, XIANG Bai\* (College of Pharmaceutical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for the determination of 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF) in ribavirin and glucose injection. **METHODS** The HPLC method was performed on a Diamonsil C<sub>18</sub> column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with 284 nm as the detection wavelength, and methanol-water(30 : 70) was used as mobile phase. The column temperature was room temperature, and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. **RESULTS** Ribavirin and excipients did not interfere with the determination of 5-HMF. The regression results which was based on weighted least square method showed a good linearity within the range of 0.099 4~7.949 μg·mL<sup>-1</sup> and 0.002 0~0.198 7 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 0$  and  $0.999\ 8$ , respectively) for 5-HMF. The LOQ and LOD of 5-HMF were 0.04 and 0.012 ng, respectively, and the average recovery was 100.4% with RSD of 1.8% ( $n=6$ ). **CONCLUSION** The HPLC method was accurate, sensitive and suitable for determining the content of 5-HMF in ribavirin and glucose injection.

**KEY WORDS:** ribavirin and glucose injection; 5-HMF; HPLC; weighted least square method

利巴韦林葡萄糖注射液为含利巴韦林(ribavirin)和 5% 葡萄糖的灭菌水溶液, 临床主要用于病毒性上呼吸道感染及带状疱疹病毒感染等疾病的治疗。5-羟甲基糠醛(5-HMF)为葡萄糖注射液在放置及加热灭菌过程中的分解产物。由于其损害人体横纹肌和内脏, 在葡萄糖注射液类制剂中应控制含量<sup>[1]</sup>。中国药典 2005 年版二部中规定利巴韦林葡萄糖注射液中 5-HMF 的检查采用紫外分光光度法, 鉴于该法灵敏度和准确性相对较低, 本试验建立了高效液相色谱法检测利巴韦林葡萄糖注射液中 5-HMF 的含量, 为今后药品标准的修订提供参考。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Agilent Chemstation 数据处理系统。

5-HMF 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 111626-200402, 纯度>98%), 利巴韦林对照品

(中国药品生物制品检定所, 批号: 629-200202, 供含量测定用)。利巴韦林葡萄糖注射液(自制, 批号: 081020、081021 和 081022), 水为重蒸水, 甲醇为色谱纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil™ C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(30 : 70); 检测波长: 284 nm; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温。

#### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 对照品溶液的制备** 取 5-HMF 对照品适量, 精密称定, 加水溶解并稀释制成质量浓度为 172.8 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照品贮备液。精密量取此贮备液 1.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

作者简介: 曹亮, 男 Tel: (0311)86266933 E-mail: claperun@hotmail.com

\*通信作者: 向柏, 男, 硕士, 讲师 Tel: (0311)86266050

E-mail: abai2003@163.com

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密量取本品 2 mL(约相当葡萄糖 0.1 g), 转移至 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.3 方法专属性

**2.3.1 阴性对照试验** 取辅料和利巴韦林对照品适量, 按处方比例加水溶解稀释作为阴性对照, 分别精密量取此阴性对照、5-HMF 对照品溶液和供试品溶液 20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 结果 5-HMF 主峰与其他色谱峰分离度良好, 表明辅料和利巴韦林在此色谱条件下对 5-HMF 的测定无干扰, 见图 1。

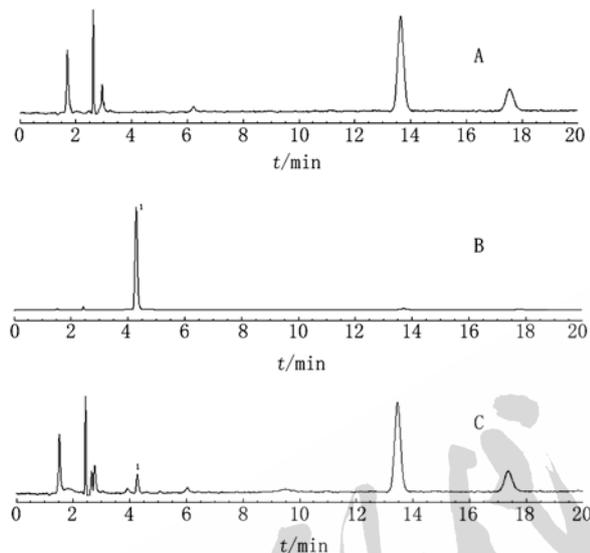


图 1 高效液相色谱图  
A-阴性对照; B-5-HMF 对照品溶液; C-供试品溶液; 1-5-HMF  
Fig 1 HPLC chromatograms  
A-blank solution; B-control of 5-HMF; C-sample; 1-5-HMF

**2.3.2 破坏性试验** 取自制本品 5 份分别进行如下破坏, 酸破坏: 加入  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸适量, 水浴加热 30 min, 冷至室温, 用  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液调至中性, 加蒸馏水至规定体积; 碱破坏: 加入  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠适量, 水浴加热 30 min, 冷至室温, 用  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸调至中性, 加蒸馏水至规定体积; 氧化破坏: 加双氧水适量, 水浴加热 30 min, 冷至室温, 加蒸馏水至规定体积; 光破坏: 置 4500 Lx 强光下照射 2 d, 加蒸馏水至规定体积; 高温破坏: 水浴加热 30 min, 冷至室温, 加蒸馏水至规定体积。将上述 5 份溶液照“2.1”色谱条件进样, 结果显示 5-HMF 色谱峰和酸、碱、氧、光、高温破坏样品中其他成分色谱峰分离良好, 其中酸破坏和高温破坏样品中 5-HMF 的含量显著增大。

### 2.4 线性关系考察

精密量取上述对照品贮备液适量, 加水稀释制

成系列浓度溶液, 精密量取 20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积。

鉴于标准溶液浓度范围过宽, 采用一条标准曲线难以获得理想的准确度, 故将整个浓度范围分为高低两个浓度区间(Range I 和 Range II), 每个浓度区间 6 个点(2 区间中间 2 点重复), 采用加权最小二乘法, 以  $A_{5\text{-HMF}}$  (5-HMF 峰面积)对  $C_{5\text{-HMF}}$  进行线性回归, 得标准曲线见表 1。

表 1 5-HMF 线性关系结果

Tab 1 The linearity results of 5-HMF

$C_{5\text{-HMF}}$ 范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	标准曲线	$r(n=6)$
0.002 0-0.198 7	$A_{5\text{-HMF}} = 165.37 C_{5\text{-HMF}} + 0.27$	0.999 0
0.099 4-7.949	$A_{5\text{-HMF}} = 176.68 C_{5\text{-HMF}} - 1.34$	0.999 8

### 2.5 定量限和检测限

将“2.4”项下 5-HMF 最低浓度( $0.002 0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 溶液按“2.1”项下色谱条件进样分析, 结果主峰信噪比(S/N)约为 10, 即得定量限为 0.04 ng( $n=6$ , RSD=2.9%); 取该溶液进一步稀释, 同法分析, 在主峰信噪比(S/N)约为 3 时测得检测限为 0.012 ng。

### 2.6 仪器精密度试验

取 5-HMF 对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 测定峰面积, 得 5-HMF 峰面积 RSD 为 1.4%( $n=6$ )。

### 2.7 稳定性试验

按照“2.2.1”项下方法配制 5-HMF 对照品溶液, 在室温条件下分别配制后于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 精密量取 20  $\mu\text{L}$ , 进样测定, 结果 5-HMF 峰面积的 RSD 为 1.7%。表明在 10 h 内溶液的稳定性良好。

### 2.8 重复性试验

同一批样品(批号: 081020), 照“2.2”项下方法平行制备对照品溶液和供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 量取供试品溶液色谱图中与对照品溶液色谱图主峰保留时间一致色谱峰的峰面积, 代入“2.4”项下标准曲线计算, 结果 5-HMF 含量的 RSD 为 3.0%( $n=6$ ), 表明本法重复性良好。

### 2.9 回收率试验

分别取 5-HMF 对照品适量及处方量辅料和葡萄糖, 精密称定, 加水溶解并稀释制成相当于 5-HMF 限度浓度(葡萄糖标示浓度 0.1%)80%, 100% 和 120% 的溶液, 每个浓度平行制备 3 份。按“2.8”项下方法操作分析, 代入“2.4”项下标准曲线计算回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 2 Results of recovery test ( $n=9$ )

加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/%	平均回收 率/%	RSD/%
0.994 8	1.022 7	102.8		
0.994 8	1.021 7	102.7		
0.994 8	0.977 9	98.3		
1.243 5	1.219 9	98.1		
1.243 5	1.233 6	99.2	100.4	1.8
1.243 5	1.248 5	100.4		
1.492 2	1.496 7	100.3		
1.492 2	1.487 7	99.7		
1.492 2	1.525 0	102.2		

### 2.10 样品中 5-HMF 的测定

按照“2.8”项下方法操作,进一步求得 5-HMF 相对于葡萄糖的含量(%),结果见表 3。

表 3 样品中 5-HMF 检测结果( $n=2$ )

Tab 3 Results of 5-HMF determination in sample ( $n=2$ )

批号	081020	081021	081022
含量平均值/%	0.001 64	0.001 71	0.001 48

## 3 讨论

经方法学验证,本试验建立了高效液相色谱法测定利巴韦林葡萄糖注射液中 5-HMF 的含量,该方法未见文献报道。试验结果显示,上述色谱条件下,利巴韦林色谱峰的保留时间在 2.5 min 左右,与 5-HMF 色谱峰(保留时间 4.29 min)实现良好分离,满足测定要求。

试验发现,该法测定 5-HMF 的定量限较小,为满足定量要求所需线性范围过大,最高点浓度约为最低点浓度的 4 000 倍,采用一条标准曲线难以获得理想的准确度,故本试验参考文献报道<sup>[2]</sup>,在绘制标准曲线时,将整个浓度范围(共 10 个点)分成 2 个区间,每个区间 6 个点,中间 2 个点重复,以  $1/(C_{5-HMF})^2$  为权重系数,分别对这 2 个区间的点进行加权最小二乘法回归,求得 2 条标准曲线,提高了定量分析的准确度,分段加权线性回归在已知杂质检测线性关系考察中的应用未见文献报道。

中国药典 2005 年版中利巴韦林葡萄糖注射液项下规定,精密量取本品 2.0 mL(相当于葡萄糖 0.1 g),置 50 mL 加水稀释至刻度,摇匀,照紫外分光光度法(附录 IV A),在 284 nm 波长处测定 5-HMF,其吸光度不得大于 0.25。参照上法,取 5-HMF 对照品适量,加水溶解稀释后在 284 nm 处测定吸光度,当溶液稀释至浓度约为  $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,吸光度为 0.25,故本品中 5-HMF 的限度可定为 0.1%。如表 3 所示,3 批自制样品中 5-HMF 含量均在限度之内。

## REFERENCES

- [1] HE W, LING X. Study on limit of 5-hydroxymethyl furfural in glucose injections [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2008, 39(1): 47-49.
- [2] ZHONG D F. Some aspects in establishing standard curves for bioanalysis with weighted least squares linear regression [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 1996, 16(5): 343-346.