

## 【论 著】

毛细管电泳法测定消毒剂与抗菌制剂  
中的利巴韦林王 萍<sup>1</sup>, 丁晓静<sup>1,2</sup>

(1 北京市疾病预防控制中心 北京市预防医学研究中心, 北京 100013;

2 首都医科大学公共卫生学院)

**摘要 目的** 建立一种消毒剂与抗菌制剂中非法添加成分利巴韦林的检测方法。**方法** 采用毛细管电泳法, 建立消毒剂和抗菌制剂中利巴韦林的检测方法。**结果** 通过对毛细管电泳法检测波长、样品量和缓冲体系的选择, 确定了最佳检测条件。检测产品中利巴韦林在一定质量浓度范围内与校正峰面积的良好线性关系。相关系数( $r$ )为0.999 9, 方法检出限为膏体剂型中 20  $\mu\text{g/g}$  和其他剂型中 8  $\mu\text{g/g}$ ; 方法定量限为膏体剂型中 70  $\mu\text{g/g}$ , 其他剂型中 30  $\mu\text{g/g}$ , 加标回收率在 84.1% ~ 105.9% 范围, 相对标准偏差(RSD)均小于 5%。**结论** 本研究建立的反转电流毛细管电泳法适用于消毒剂与抗菌制剂中抗病毒药物利巴韦林的检测, 方法简便, 结果准确可靠。

**关键词** 毛细管电泳法; 利巴韦林; 消毒产品; 检测

**中图分类号:** R187

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7658(2019)08-0568-04

**DOI:** 10.11726/j.issn.1001-7658.2019.08.003

**Determination of ribavirin in disinfectants and antibacterial products by capillary electrophoresis**WANG Ping<sup>1</sup>, DING Xiao-jing<sup>1,2</sup>

(1 Beijing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013; 2 School of Public Health, Capital Medical University, China)

**Abstract Objective** To study the detection method for ribavirin, an illegal additive in disinfectants and antibacterial products. **Methods** Capillary electrophoresis was used to establish a method for detection of ribavirin in disinfection and antibacterial products. **Results** The optimal detection conditions were determined by the established capillary electrophoresis method for detecting the wavelength, sample size and buffer system. A good linear relationship between ribavirin and the corrected peak area in a certain mass concentration range was detected in the product. The correlation coefficient ( $r$ ) was 0.999 9, and the limit of detection was 20  $\mu\text{g/g}$  for the ointment dosage form and 8  $\mu\text{g/g}$  for the other dosage forms; the limit of quantitation was 70  $\mu\text{g/g}$  for the ointment dosage form and 30  $\mu\text{g/g}$  for the other dosage forms. The recoveries of the low, medium and high quality concentrations ranged from 84.1% to 105.9% with the relative standard deviation (RSD) all lower than 5%. **Conclusion** The flow reversal capillary electrophoresis method established in this study is suitable for detection of the antiviral drug ribavirin in disinfection and antibacterial products. The method is simple and accurate, and the results are accurate and reliable.

**Key words** capillary electrophoresis; ribavirin; disinfection products; detection

利巴韦林又名病毒唑、三氮唑核苷, 是一种人工合成的核苷类广谱强效抗病毒药物<sup>[1]</sup>, 能抑制多种核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)病毒, 对HIV病毒也有较强的抑制作用, 能用于多种病毒感染的治疗<sup>[2,3]</sup>。利巴韦林不仅具有良好的抗病毒作

用, also 具有很强的抗菌效果且价格低廉, 一些企业将其不法添加于消毒剂和抗菌制剂中, 这属于违禁用药, 不仅不符合我国法规, 还会造成病毒耐药性<sup>[4]</sup>。目前, 在消毒产品评审注册放开的情况下, 市场监管尚无相应消毒剂与抗菌制剂中利巴韦林的检测方法, 因而无法实现对这些消毒产品的有效监管。虽然有紫外分光、液(气)相色谱等多种方法都可以检测利巴韦林<sup>[5-12]</sup>, 但这些方法一般都用于药物制剂的测定, 未见用于消毒剂和抗菌制剂的

〔作者简介〕 王萍(1965-), 女, 北京人, 本科, 主任技师, 从事卫生检验工作。

〔通讯作者〕 丁晓静, Email: dxj666@aliyun.com

测定。本研究初步建立一种精密度与准确度均较好的外标毛细管电泳法(CE)测定消毒剂与抗抑菌制剂中的利巴韦林,并进行了实际样品使用测定观察。现将研究结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用样品来自国内市场合法上市产品,包括标注抑菌、除癣、止痒和保持菌群平衡等作用的产品;剂型包括喷剂、洗剂、乳膏和凝胶等共 6 种消毒剂和抗抑菌制剂及液体、颗粒和喷剂 3 种剂型的利巴韦林药品。

标准品利巴韦林,纯度 > 96%,为德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 产品。

试验仪器主要有 P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪及配套二极管阵列检测器和 Millipore Milli-Elix/Ri-Os 型超纯水器和 Vortex Genie 2 涡旋振荡器;以上均为国外进口产品。KQ - 500DV 医用超声波清洗器和未涂层熔融石英毛细管均为国内产品。

### 1.2 试验方法

1.2.1 分离缓冲液的配制 称取硼酸 0.309 g、硼砂 1.144 g 和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) 0.009 g,置于同一塑料离心管中,加 40 ml 水溶解,再加水至 50 ml 刻度,混匀;配制成含有 100 mmol/L 硼酸、60 mmol/L 硼砂和 0.5 mmol/L CTAB 的分离缓冲溶液。

1.2.2 样品提取液的配制 将分离缓冲溶液用水稀释 10 倍。

1.2.3 样品前处理 膏状剂型样品称取约 0.2 g,其余剂型样品均称取约 0.5 g,置于 10 ml 具塞带小玻璃珠离心管(比色管)中,加入样品提取液至刻度,涡旋振荡混匀,超声 10 min,试液供毛细管电泳仪测定。

1.2.4 电泳条件 分离柱:未涂层熔融石英毛细管,70 cm(有效长度为 60 cm);电压: - 29 kV;进样压力及时间:3.448 kPa、20s;检测波长:214 nm。清洗程序:新装毛细管在使用前分别用 1 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗 20 min,水冲洗 5 min,分离缓冲溶液冲洗 5 min。每次进样前依次用 1 mol/L 氢氧化钠溶液冲洗 1.5 min,水冲洗 1.5 min,分离缓冲溶液冲洗 1.5 min。

## 2 结果

### 2.1 样品量的确定

最初所有剂型的样品均称取 0.5 g,经加标回收试验发现,膏体剂型样品的回收率偏低(60% ~

80%)。分析原因可能是因为样品提取液由水配制,不含具有增溶作用的十二烷基硫酸钠,因此如果称样量较大,提取样品时乳化现象严重,导致被测物质被乳粒包裹而使回收率下降。经试验测定,将样品稀释倍数控制在 50 倍左右,即将膏体剂型的称样量降至 0.2 g,回收率结果即可符合要求。

### 2.2 检测波长选择

依据中国药典二部,利巴韦林的最大吸收波长为 207 nm,经二极管阵列检测器在线扫描分离,缓冲溶液中利巴韦林的最大吸收波长确定为 207 nm。但考虑到 214 nm 是毛细管电泳仪标准配备的滤光片,从利巴韦林的紫外吸收光谱图(图 1)上可见,207 nm 和 214 nm 处的吸光度差别不大,况且 207 nm 处检测特异性较差,综合考虑仪器的通用性、分析的灵敏度及基体干扰等因素,故选择紫外检测器的 214 nm 作为检测波长。

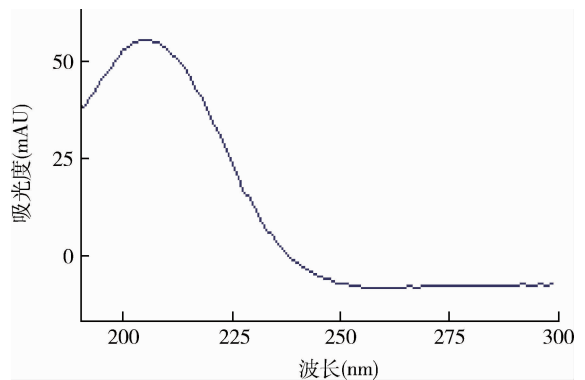


图 1 利巴韦林的紫外吸收光谱图

### 2.3 分离缓冲体系的选择

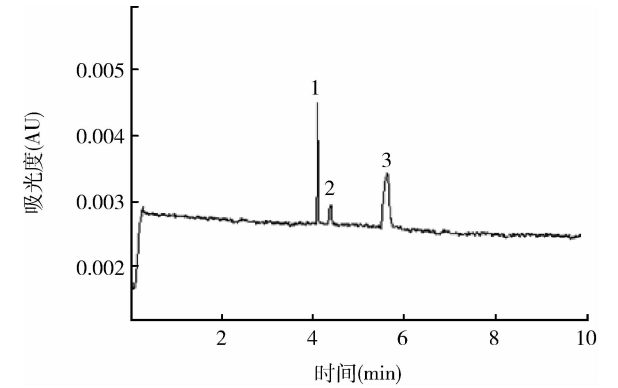
CE 的分离缓冲体系主要有磷酸盐、碳酸盐和硼酸盐缓冲体系等,好的缓冲体系需要有足够的缓冲容量、良好的紫外透光性(紫外区)和较低的背景吸收。磷酸盐和硼酸盐由于具有这些优势,因此是最常用的分离缓冲溶液。根据利巴韦林的性质及结构特点,本研究选用硼砂缓冲体系,用硼酸来调节缓冲体系的 pH,由于硼砂使中性的利巴韦林带上负电荷<sup>[13]</sup>,因此在缓冲液中加入了 CTAB,使电渗流反转。本研究使用以硼酸、硼砂配制的分离缓冲体系测定利巴韦林,获得了较为满意的分离度及灵敏度。5 mg/L 利巴韦林标准电泳图见图 2。

### 2.4 利巴韦林药品检测结果

在选定的最佳条件下,以利巴韦林的质量浓度为横坐标,校正峰面积为纵坐标,绘制校准曲线。利巴韦林校准曲线的线性范围为 1.5 mg/L ~ 50 mg/L;回归方程为  $y = 87.635x + 21.356$ ;相关系数( $r$ )为 0.999 9。检出限和定量限分别以  $S/N = 3$  和  $S/N = 10$  计算。膏体剂型样品取 0.2 g 时,检出

限和定量限分别为 20 μg/g 和 70 μg/g;其他剂型样品取 0.5 g 时,检出限和定量限分别为 8 μg/g 和 30 μg/g。

加标回收试验结果表明,不同剂型样品低、中、高回收率范围在 84.1% ~ 105.9%。不同剂型利巴韦林低、中和高质量浓度加标回收率的相对标准偏差(RSD)均小于 5%(表 1)。



注:1 为利巴韦林(5 mg/L),2 为未知峰,3 为系统峰,电泳条件见 1.2.4

图 2 利巴韦林标准溶液电泳图

表 1 利巴韦林 3 种基质样品加标回收率检测结果				
剂型	加标量 (mg/L)	平均回收率 (%)	回收率范围 (%)	相对标准偏差 (%)
液体	2	98.6	96.2 ~ 101.9	2.7
	10	102.7	98.0 ~ 105.9	2.8
	20	97.1	96.6 ~ 97.8	0.5
膏体	2	94.0	92.6 ~ 102.0	4.7
	10	90.0	84.1 ~ 94.6	4.8
	20	88.2	85.1 ~ 91.3	2.9
凝胶	2	98.2	92.2 ~ 100.6	3.2
	10	97.5	94.9 ~ 100.6	2.2
	20	103.0	99.0 ~ 105.3	2.3

2.5 实际样品测定结果

采用本研究建立的电渗流反转的 CE 对 6 件不同剂型的复方化学消毒剂与抗抑菌制剂样品目标物进行测定,均未检出利巴韦林。为进一步证明该方法的准确性,对从药店及医院购买的利巴韦林滴眼液、喷剂及颗粒进行了测定。结果分别为 1.04%、25.1 mg/g 和 59.5 mg/g,与标识值 1%、25 mg/g 和 59.5 mg/g 吻合很好,证明了本方法的准确性。

3 讨论

缓冲体系的选定在 CE 检测利巴韦林中起着决定性作用。由于利巴韦林在大部分的 pH 范围内为中性,因此,要用 CE 进行分离需要让利巴韦林带上一些电荷。利巴韦林的结构含有多元羟基,它可以和硼酸盐发生键合作用形成带负电的络合物<sup>[13]</sup>,因

此选定硼酸盐作为缓冲体系。起初试图利用早期建立的 CE 测定阿昔洛韦等 3 种核苷类抗病毒药物<sup>[14]</sup>方法中使用的硼酸盐缓冲体系(硼砂-磷酸二氢钠-十二烷基硫酸钠体系,(pH = 7.41))进行分离,目的是尽可能在一种条件下同时测定利巴韦林和阿昔洛韦等 3 种药物。试验结果发现,在此条件下,利巴韦林的峰型较差,虽然通过加入甲醇使利巴韦林的峰型有所改善,但阿昔洛韦等 3 种药物的峰型变差,证明此种分离体系不能同时分析利巴韦林和阿昔洛韦等 3 种抗病毒药物。由于利巴韦林与硼酸盐结合而带负电,使得被测物与电渗流方向相反,为了获得高效快速分离,需要将电渗流反转<sup>[13,15]</sup>, Michael C<sup>[13]</sup>等在硼酸盐缓冲体系中加入精胺作为电渗流反转剂,但是,使用比精胺更长碳链、能提供更多正电荷的 CTAB 作为电流反转剂则可以以更小的浓度使电流反转,这样可避免溶液黏度的增加,还可降低焦耳热,同时形成的双电层也更稳定<sup>[15,16]</sup>。因此,决定使用 CTAB 作为电流反转剂,同时使用硼酸调节 pH。最终确定的缓冲体系为硼砂-硼酸-CTAB。

对缓冲体系中 CTAB、硼砂和硼酸的浓度进行了选择。CTAB 作为电流反转剂其浓度为 0.5 mmol/L<sup>[15]</sup>时足以使电流反转,因此确定 CTAB 的浓度为 0.5 mmol/L。固定硼酸和 CTAB 浓度不变,对硼砂的浓度进行选择。当设定硼酸和 CTAB 的浓度值时,变换硼砂浓度,考察利巴韦林标准溶液的峰形及灵敏度结果表明,随着硼砂浓度的增加,利巴韦林与其中的未知峰的分离越来越不好,通过不断调整选定硼砂的浓度为 60 mmol/L。

保持分离缓冲体系中浓度不变,考察利巴韦林标准溶液在硼酸浓度为 60 mmol/L ~ 240 mmol/L 范围内设定的 9 组浓度时的峰形及分离情况表明,随着硼酸浓度的增加,利巴韦林与其中的未知峰的分离度基本不变。

本研究选用电流反转的 CE 方法对消毒剂与抗抑菌制剂中可能添加的抗病毒药物利巴韦林进行测定,方法样品前处理简单、仪器分析快速,且方法的精密度及准确度能够满足日常检测的需求。

参考文献

[1] 魏法山,巩阿娜,盖圣美,等. 利巴韦林在畜禽体内的代谢规律与检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(10):3966-3972.

[2] 祝玲玲. 带状疱疹 30 例治疗体会[J]. 中国社区医师(医学专业),2013,10(8):22.

[3] 高永富. 病毒唑外用治疗传染性软疣 152 例分析[J]. 疑难病杂志,2003,2(3):138.

消毒剂是试验成功的关键环节<sup>[12,13]</sup>。本研究中含氯消毒剂与过氧化物类消毒剂可用硫代硫酸钠中和,而季铵盐类消毒剂苯扎溴铵和双癸基二甲基溴化铵,资料介绍用 1% 甘氨酸 + 3% 吐温 80 + 0.3% 卵磷脂的生理盐水,但有研究报道,卵磷脂和吐温不仅本身对细胞生长有一定的影响,而且其与任何消毒剂形成的中和产物都会对试验细胞造成较大的危害<sup>[13]</sup>。本试验前期预试验也证实其对 CEF 毒性较大,所以改用过滤法去除季铵盐类消毒剂的残留<sup>[14]</sup>。CEF 本身对化学消毒剂的耐受力较低,在预试验时发现 5 种消毒剂的推荐使用浓度均对 CEF 细胞有毒性,故在消毒剂残留去除试验中没有设置消毒剂 + 病毒悬液组。

一般消毒剂对病毒的灭活效果受有机物影响比较大,常规消毒工作中,待消毒的物品或多或少都存在有机干扰物。因此,在评价消毒效果时,需要在病毒悬液中加入有机干扰物。本研究采用病毒悬液和用硬水稀释的消毒剂作用后再接种细胞,因此未加有机干扰物,得到的病毒灭活效果是理想状态,得出的有效浓度可能远远低于常规实际使用浓度,建议在实际使用中加大使用浓度。

本文筛选出了 5 种常用消毒剂残留的去除方法,测定了其对 NDV 的有效杀灭浓度。结果发现 5 种常用消毒剂在一定浓度下能有效杀灭 NDV,且二氯异氰尿酸钠杀灭 NDV 需要的有效含量最低。试验结果对新城疫防控消毒剂的筛选和生产,以及新城疫实际的消毒有积极的指导意义。

参 考 文 献

[1] 邓紫艳,项勋,段纲,等. 新城疫病毒分子生物学研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2017(1):11-13.

[2] 刘艳华,温芳,王学伟,等. 兽用消毒剂二氧化氯检测方法的研究进展[J]. 中国兽药杂志,2011,45(2):51-54.

[3] Steinmann J. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants[J]. J Hosp Infect,2004,56:S49-S54.

[4] 房大学,王彦辉,王建举,等. 中草药在鸡胚成纤维细胞(CEF)上对新城疫病毒的作用研究[J]. 中国动物保健,2010,12(3):31-32.

[5] 杨洪,高文凤,刘衡川,等. 过氧化氢消毒液的中和剂筛选试验研究[J]. 中国消毒学杂志,2010,27(2):132-133.

[6] 徐继英,陈化琦,王瑜,等. 新型消毒剂消特威对鸡新城疫病毒杀灭效果研究[J]. 中兽医医药杂志,2016(3):61-63.

[7] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 2002.

[8] 佟海山,陈遇英. 我国兽用消毒剂的应用现状与对策[J]. 中国兽医杂志,2017(9):121-123.

[9] 邱梅,郝智慧,庞云露,等. 国内外兽用消毒剂的研究现状与发展趋势[J]. 中国兽药杂志,2011,45(6):43-47.

[10] 李朋朋,周德刚,卞愧,等. 过氧化氢溶液对鸡新城疫病毒的杀灭效果试验[J]. 中国兽医杂志,2018,54(5):101-103.

[11] 史晨婕,郝利华,白瑞,等. 过氧乙酸戊二醛复方消毒剂对 NDV 和 IBDV 的杀灭试验[J]. 中国兽医杂志,2017,53(4):33-35.

[12] 韩杰,魏秋华. 化学消毒剂的中和剂研究现状[J]. 中国消毒学杂志,2013,30(12):1165-1168.

[13] 赵斌秀,张流波. 消毒剂消毒效果评价中残留物去除技术[J]. 中国消毒学杂志,2016,33(3):271-276.

[14] 于礼,王劲,刘国栋,等. 超滤法在病毒灭活试验中去除残留消毒剂的应用[J]. 中国消毒学杂志,2017,34(6):504-506.

(收稿日期:2018-11-20)

(上接第 570 页)

[4] 刘敬先,杜柏林,王丽娜. 浅谈利巴韦林[J]. 黑龙江医药科学,2013,36(5):24-25.

[5] 刘亚军,谢燕萍. 紫外分光光度法测定利巴韦林葡萄糖注射液中的利巴韦林的含量[J]. 海峡药学,2000,12(2):32-33.

[6] 林红,徐咏. 紫外分光光度法测定利巴韦林颗粒的含量[J]. 儿科药科学杂志,2003,9(5):21-22.

[7] 肖七琪,周其超,张悦. 利巴韦林注射液中间产品含量快速测定方法[J]. 科技视界,2013,3(9):161-162.

[8] 李宇,王术皓,刘洪海,等. 流动注射化学发光法测定利巴韦林[J]. 光谱实验室,2005,22(2):238-241.

[9] 武晓红,肖娴,赵辉. 高效液相色谱法测定滴眼液中利巴韦林和诺氟沙星的含量[J]. 河南大学学报:医学版,2013,32(1):32-34.

[10] 李维超,佟若菲,张囡,等. HPLC 法测定复方盐酸林可霉素滴鼻剂中盐酸林可霉素和利巴韦林[J]. 现代药物与临床,2015,30(1):33-35.

[11] 罗伟,李旻华,林秋凤. 健康产品中非法添加利巴韦林的分散

固相萃取-高效液相色谱筛查及质谱确证[J]. 儿科药科学杂志,2017,23(1):39-42.

[12] 木其尔,赵英奎. 用氨基柱的 HPLC 法测定利巴韦林片含量[J]. 今日药学,2018,28(4):249-251.

[13] Breadmore MC, Theurillat R, Thormann W. Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis[J]. Electrophoresis,2004,25(10-11):1615-1622.

[14] 王萍,李梦琦,赵丽媛,等. 基于均匀和正交试验设计的胶束电动毛细管色谱法同时测定消毒剂和抗抑菌产品中 3 种核苷类抗病毒药物[J]. 色谱,2018,36(9):931-937.

[15] Tavares MFM, Colombara R, Massaro S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis Evaluation of electrolyte systems for anion analysis[J]. J Chromatogr A,1997,772(1-2):171-178.

[16] Melanson JE, Barylka NE, Lucy CA. Dynamic capillary coatings for electroosmotic flow control in capillary electrophoresis[J]. Trends Anal Chem,2001,20(6-7):365-374.

(收稿日期:2018-12-10)