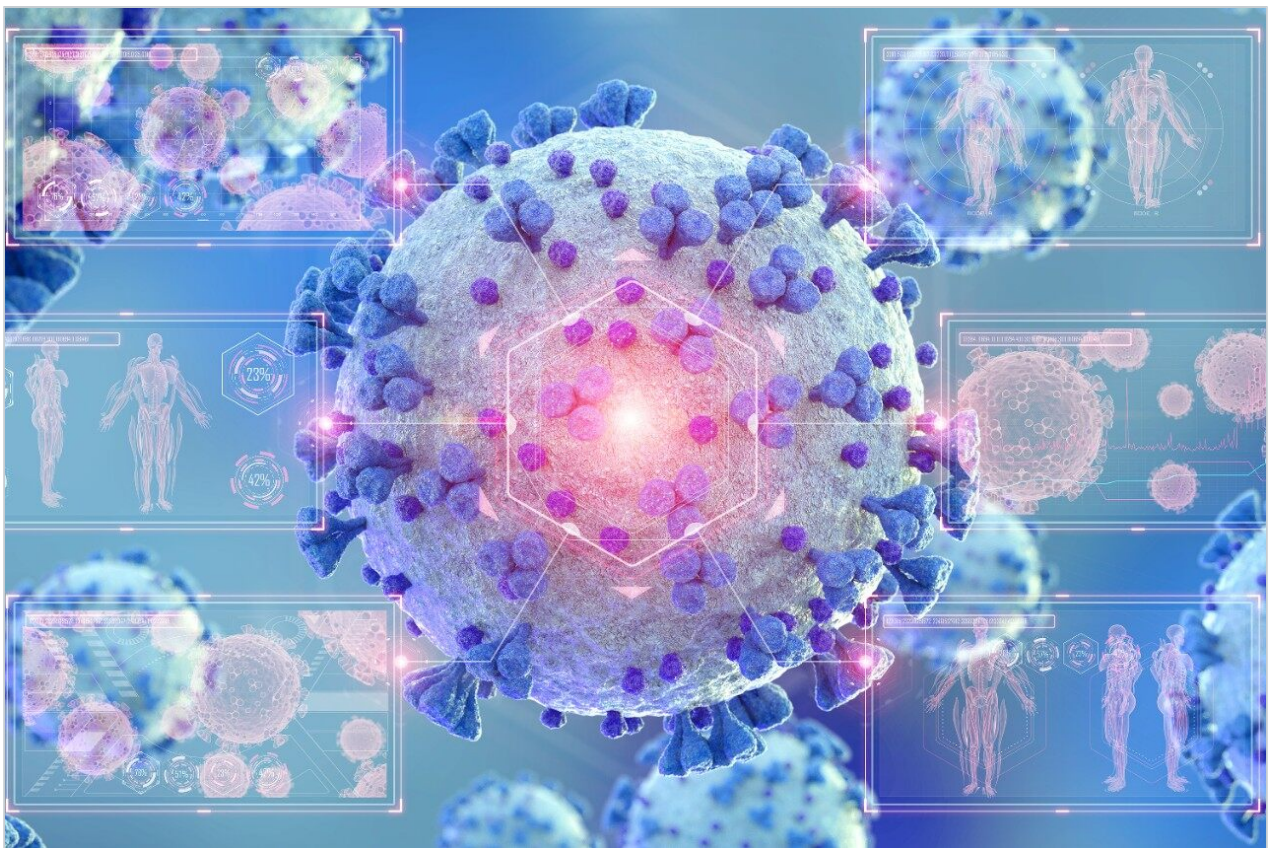


应用纪要

剖析新型冠状病毒病(COVID-19)：使用亲水作用色谱法快速分析利巴韦林与相关化合物

Kenneth D. Berthelette, Thomas Walter, Sherri Naughton, Jonathan E. Turner, Nick Zampa

Waters Corporation



需要帮助？ 如需详细了解沃特世如何为您抗击新型冠状病毒肺炎(COVID-19)提供助

力，请联系 [新型冠状病毒肺炎\(COVID-19\)疫情创新响应团队](#)

摘要

在当前COVID-19大流行疫情的驱动下，研究人员使用亲水作用色谱(HILIC)和ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱开发出用于利巴韦林与四种相关化合物的分离方法。虽然可以使用USP专论中所述的反相色谱法和特定条件分离这些化合物，但也可以使用HILIC法保留极性分析物进行分析。使用HILIC的优势包括MS灵敏度高且与SPE等样品前处理技术的相容性更好^{1,2}。

优势

- 同量异位化合物和结构相似的化合物可实现基线分离
- 分析物在6 min的分析时间内实现完全分离

简介

利巴韦林是一种抗病毒前药，可治疗丙型肝炎、人呼吸道合胞病毒和某些病毒性出血热等感染。由于出现COVID-19大流行疫情，研究人员启动了将利巴韦林与其它抗病毒药物联用的临床研究。其中一项研究报告称，治疗组合中含有利巴韦林可缩短SARS-CoV-2病毒脱落的时间³。无论利巴韦林作为新型冠状病毒治疗药物的临床结果如何，分析细胞中的利巴韦林对于了解其作用机制以及疗程均具有重要意义。尿苷等内源性化合物会干扰利巴韦林的分析，因为两者的结构非常相似并且属于同量异位化合物。因此，如果要对利巴韦林进行定量分析，就必须先对这些化合物进行色谱分离。本应用纪要介绍了一种使用HILIC分离利巴韦林与相关化合物的方法。

实验

样品描述：纯标准品购自Sigma Aldrich。用50:50乙腈:水溶液配制浓度为1 mg/mL的储备液。合并储备液并进行稀释，使溶液的最终组成为90:10乙腈:水。混合溶液中利巴韦林、尿苷和利巴韦林相关化合物A的浓度为

100 µg/mL。尿嘧啶的浓度为30 µg/mL，利巴韦林相关化合物D的浓度为10 µg/mL。

方法条件：

LC条件

LC系统： 配备CHA、PDA的ACQUITY
UPLC H-Class

检测条件： UV 230 nm

样品瓶： TruView LCMS认证最大回收
样品瓶

色谱柱： ACQUITY UPLC BEH Amide,
2.1 x 50 mm, 1.7 µm

柱温： 30°C

样品温度： 15 °C

进样体积： 2 µL

流速： 0.5 mL/min

流动相A： 水

流动相B： 乙腈

流动相D： 100 mM碳酸氢铵，pH 10.0

梯度表：

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B	%D	曲线
0.00	0.5	5	90	5	6
1.50	0.5	5	90	5	6
3.00	0.5	25	70	5	6
4.00	0.5	25	70	5	6
4.01	0.5	5	90	5	6
6.00	0.5	5	90	5	6

数据管理

色谱软件： Empower 3 Feature Release
4

MS软件： N/A

信息学软件： N/A

结果与讨论

利巴韦林与相关化合物均具有亲水性，很难保留在传统反相色谱柱上，因此分析非常棘手。如图1所示，这些化合物的cLogD值(pH 10)小于-1.5，表明其在水中的溶解度非常高⁴。虽然使用反相色谱法能够分离利巴韦林与相关化合物，但HILIC更适用于保留这些高极性分析物。在HILIC中，分析物通过多种方式（包括分配和离子相互作用）与固定相相互作用⁵⁻⁷。这样就有机会通过调整相互作用来优化保留性能、分离度和峰形。



图1.利巴韦林与相关化合物的结构和cLogD值。*RC*（相关化合物）*A*和*D*或在结构上与利巴韦林相似，或为利巴韦林的片段。

在定量分析血浆等生物基质中的利巴韦林时，还面临另一项挑战。内源性化合物尿苷与利巴韦林是同量异位化合物，因此无法通过质量数鉴定利巴韦林。为准确定量利巴韦林，必须将其与尿苷完全分离，以便通过保留时间鉴定利巴韦林。在某些方法开发案例中，即使在最终样品中未检测到尿苷，也需要将其纳入考量，确保与利巴韦林分离⁸。这两种化合物均含有连接至杂环结构的核糖基团，因此具有相似的化学性质，并且与固定相的相互作用也类似。

选择BEH Amide色谱柱分析这些化合物。该色谱柱的固定相采用杂化颗粒，可耐受高pH流动相条件，并具有中性配体结构，与未键合杂化颗粒和硅胶颗粒相比，表现出更好的保留性能。在230 nm紫外检测下得到的化合物分离结果见图2。

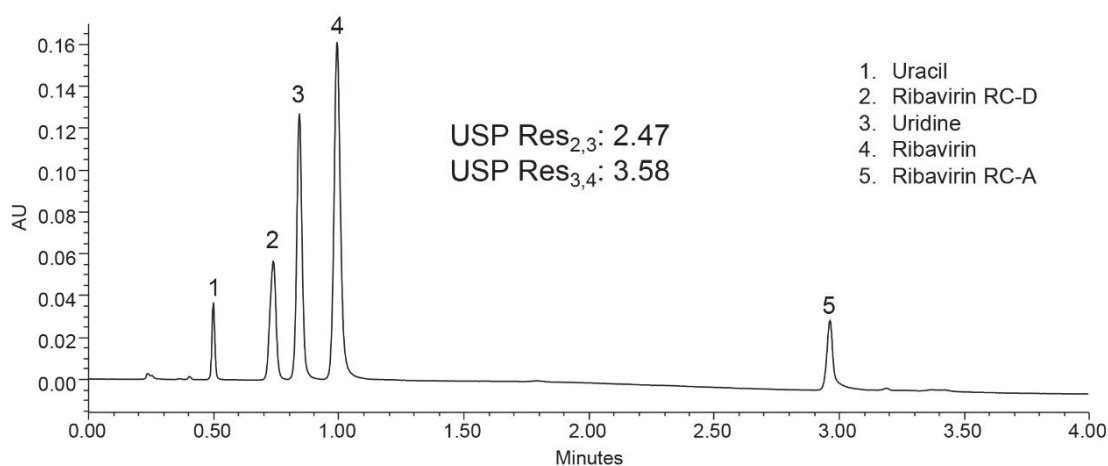


图2.使用ACQUITY BEH Amide色谱柱(2.1 × 50 mm, 1.7 μm)得到的利巴韦林与相关化合物的分离结果

在6分钟的分析时间内，所有分析物均实现了基线分离。化合物3和4（分别为尿苷和利巴韦林）实现完全分离，USP分离度为3.58。这些化合物还获得了良好的峰对称性和窄峰，有助于实现色谱峰的准确积分和可靠的定量分析。需要注意的是，利巴韦林相关化合物A的保留时间明显长于其它化合物。查看cLogD值发现，该化合物在所有分析物中亲水性最强，因此预期在分配机制中具有最大的保留。充分了解主要保留机制有助于在需要时更好地进行方法优化和开发。

结论

使用HILIC和ACQUITY UPLC BEH Amide色谱柱展示了一种快速分离利巴韦林与相关化合物的方法。利巴韦林与尿苷之间获得了优异的分度，这对于使用LC-MS定量分析利巴韦林至关重要，因为尿苷是同量异位化合物。此方法可用于各种应用，包括利巴韦林的纯度测定和治疗药物监测。COVID-19大流行疫情进一步推动了开发改进版利巴韦林分析方法的需要，无论利巴韦林作为COVID-19治疗药物的临床结果如何，改进利巴韦林的色谱分析方法都极具价值。

参考文献

1. Periat A, Boccard J, Veuthey JL, Rudaz S, Guillarme D. Systematic Comparison of Sensitivity between Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and Reversed Phase Liquid Chromatography. *J. Chrom. A*, 2013, 1312 49–57.
2. HILIC Separations, A Practical Guide to HILIC Mechanisms, Method Development and Troubleshooting. Thermo Scientific Technical Guide. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/TG-21003-HILIC-Separations-TG21003-EN.pdf> Accessed 9-July-2020 <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/TG-21003-HILIC-Separations-TG21003-EN.pdf%20Accessed%209-July-2020>>
3. Hung, I. F.-N. Triple Combination of Interferon beta-1b, lopinavir-Ritonavir, and Ribavirin in the Treatment of Patients Admitted to Hospital with COVID-19: An Open-label, Randomized, Phase 2 Trial, *Lancet*, 2020, 395, 1695–1704.
4. cLogD值参考网站: <https://chemicalize.com/welcome> <<https://chemicalize.com/welcome>>

5. McCalley D. Understanding and Manipulating the Separation in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography.*J.Chrom.A*, 2017, 1523, 49–71.
 6. Guo Y. Recent Progress in the Fundamental Understanding of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC).*Analyst*, 2015, 140, 6452-6466.
 7. Periat A, Debrus B, Rudaz S, Guillarme D. Screening of the Most Relevant Parameters for Method Development in Ultra-High Performance Hydrophilic Interaction Chromatography.*J. Chrom.A*, 2013, 1282, 72-83.
 8. Danso D, Langman LJ, Snozek C. LC-MS/MS Quantitation of Ribavirin in Serum and Identification of Endogenous Isobaric Interferences.*Clin.Chim.Acta*.2011, 412, 2332–2335.
-

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

Empower 3色谱数据软件 <<https://www.waters.com/10190669>>

720006957ZH, 2020年7月