doi:10.11751/ISSN.1002－1280.2019.08.08

HPLC 法测定盐酸左旋咪唑片的含量研究

周芷锦，林仙军，王　彬，陈晓林

（浙江省兽药饲料监察所，杭州 311101）

［收稿日期］2019－06－04　［文献标识码］A　［文章编号］1002－1280（2019）08－0051－05　［中图分类号］S859.79

［摘　要］　建立盐酸左旋咪唑片中盐酸左旋咪唑含量测定的高效液相色谱法。采用 Agilent Eclipse XDB－C18（250 mm×4.6 mm），5 μm 色谱柱，Agilent 1260DAD 检测器，流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液（三乙胺调节 pH 值至 7.0）－乙腈（80:20，v/v）；进样量为 20 μL；柱温为 30 ℃；流速为 1.0 mL/min；检测波长为 214nm。结果表明：盐酸左旋咪唑在 1.024～102.398 μg/mL 范围内线性关系良好（r＝1.0000），高、中、低浓度回收率分别为 97.4%、99.7%、99.3%。该方法定性、定量准确，适用于盐酸左旋咪唑片中盐酸左旋咪唑的含量测定。

［关键词］　盐酸左旋咪唑片；高效液相色谱法；二极管阵列检测器

Determination of Levamisole Hydrochloride in Levamisole Hydrochloride Tablets by HPLC

ZHOU Zhi－jin，LIN Xian－jun，WANG Bin，CHEN Xiao－lin

（*Zhejiang Province Supervisory Institute of Veterinary Drug and Feed*，*Hangzhou* 311101，*China*）

Abstract：To establish a method for the determination of Levamisole Hydrochloride in Levamisole Hydrochloride Tablets by HPLC. Agilent Eclipse XDB－C18（250 mm×4.6 mm），5μm column was used. The mobile phase was potassium dihydrogen phosphatephosphoric（0.05 mol/L，pH value adjusted to 7.0 with triethylamine）－acetonitrile（80:20，v:v），the injection volume was 20 μL，the column temperature was 30 ℃，the flow rate was 1.0 mL/min and detected at the wavelength of 214 nm. The result indicated that a good linear relationship was accepted in the range of 1.024～102.398 μg/mL（r＝1.0000）. and the recovery of high，medium，low－Concentration were 97.4%，99.7%，99.3%. The method is accurate in qualitative and quantitative analysis，and suitable for the determination of Levamisole Hydrochloride Tablets.

Key words：Levamisole Hydrochloride Tablets；high performance liquid chromatography；diode array detector

左旋咪唑是一种广谱驱虫药，广泛应用于兽医临床治疗畜禽胃肠道线虫病、肺丝虫病和猪肾虫病当中。除作为驱虫药之外，盐酸左旋咪唑还具有免疫调节作用，是一种免疫增强剂，能提高巨噬细胞的吞噬能力，增强机体的体液免疫功能和细胞免疫功能[1]。研究发现，盐酸左旋咪唑可显著提高脾脏指数和法氏囊指数，对雏鸡有显著的增重效果，在一定程度上提高生长性能[2]。目前兽医使用中常

作者简介：周芷锦，从事兽药检测相关工作。E－mail：miya_zt@163.com

见的剂型包括盐酸左旋咪唑片、盐酸左旋咪唑注射液。目前盐酸左旋咪唑片在《中国兽药典(2015 年版)》一部[3],《美国药典》(USP40 - NF35)[4]中均有收入。《中国兽药典(2015 年版)》一部[3]中,含量测定标准采用氯仿提取,高氯酸滴定的方法。该方法主要存在氯仿毒性较大,且过程较为繁琐,容易出现误差较大等问题。《美国药典》[4]采用高效液相色谱法,但对实验室仪器设备有较高的要求。基于文献参考[4]-[6],本着优化简化实验条件和方法的目的,本文探讨用高效液相色谱法测定盐酸左旋咪唑片中盐酸左旋咪唑含量的方法研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器　高效液相色谱仪,Angilent 1260,配 Angilent DAD 检测器;METTLER TOLEDO XS205 电子天平;KQ - 500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);METTLER TOLEDO 320 酸度计。

1.2 试剂　乙腈、甲醇均为色谱纯,德国默克公司;磷酸二氢钾、磷酸、三乙胺均为分析纯;水为超纯水。盐酸左旋咪唑对照品来源为中国食品药品检定研究院,批号 100167 - 201203,含量 99.9%。

1.3 样品　实验样品由杭州新港动物药业有限公司等四家单位提供,4 个批次 25mg 规格的样品批号分别为:20190101,180529,190122,20180703;2 个批次 50 mg 规格的样品批号分别为:170901,190301。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液配制　取盐酸左旋咪唑对照品约 10 mg,精密称定,置 200 mL 容量瓶中,加入适量流动相溶解,并用流动相稀释至刻度,摇匀。

2.1.2 供试品溶液配制　取本品 20 片,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于盐酸左旋咪唑 50 mg),置 100 mL 容量瓶中,加入流动相适量,超声 10 min 溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀;过滤,精密量取续滤液 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,用流动相定容,摇匀。

2.2 色谱条件及系统适应性试验　采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(Agilent Eclipse XDB - C18,4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(三乙胺调节 pH 值至 7.0) - 乙腈(80:20,v/v);进样量:20 μL;柱温:30 ℃;流速:1.0 mL/min;用二极管阵列检测器在 190 ~ 400 nm 范围内进行扫描,记录 214 nm 波长处的色谱图。盐酸左旋咪唑对照品光谱图(图 1),盐酸左旋咪唑对照品溶液色谱图(图 2),供试品溶液色谱图(图 3)。

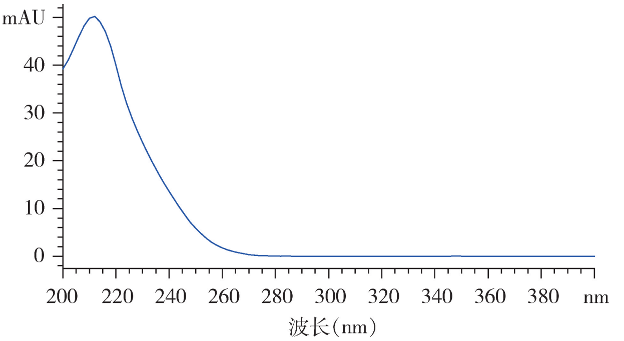

图 1　盐酸左旋咪唑对照品溶液光谱图

Fig 1　Spectrogram of Levamisole Hydrochloride reference substance

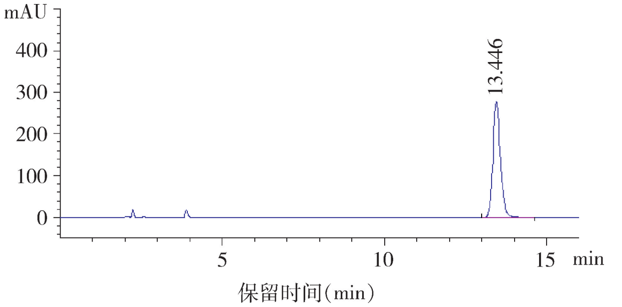

图 2　盐酸左旋咪唑对照品溶液色谱图

Fig 2　Solution chromatogram of Levamisole Hydrochloride reference substance

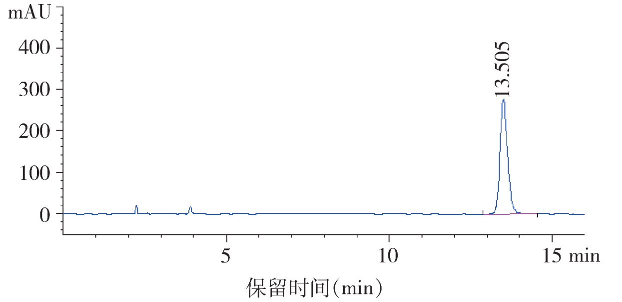

图 3　供试品溶液色谱图

Fig 3　Solution chromatogram of the sample

2.3　线性关系考察　取盐酸左旋咪唑对照品，精密称定，加流动相制成 100 μg/mL 的溶液，并配制成 1、2.5、5、10、25、50、100 μg/mL 等一系列浓度的对照品溶液。分别精密吸取 20 μL，注入色谱仪，测定。以对照品浓度（X）为横坐标，峰面积值（Y）为纵坐标进行线性回归，绘制标准曲线。在 1.024 ~ 102.398 μg/mL 范围内线性关系良好，线性回归方程为 Y = 89.715X + 14.765，线性相关系数为 1.0000。

2.4　回收率试验　以批号 190301 的样品作为本底样品，精密称取 9 份，每三份为一组，称取量为应称取样品量的一半（约相当于盐酸左旋咪唑 25 mg），置 100 mL 容量瓶中；另精密称取盐酸左旋咪唑对照品，高、中、低浓度对照品加入量按照应称取量的 80 %、100 %、120% 的比例加入上述的三组 100 mL 容量瓶中，并按照 2.1.2 的方法配制回收率试验用溶液。按照 2.2 色谱条件，精密量取 20 μL，注入色谱仪中，记录色谱图。计算回收率，回收率 =（实测量/加入量）×100 %，实测添加量 = 测得总量 − 本底盐酸左旋咪唑量。回收率结果如表 1 所示，平均回收率为 97.4 %、99.7 %、99.3 %，说明检测方法的准确度良好。

表 1　回收率结果表

Tab 1　Results of recovery tate

添加浓度	本底称样量/g	本底含量/mg	对照品添加量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
80%	0.1010	24.83	15.35	39.77	97.3	97.4	0.9
	0.1024	25.17	15.52	40.16	96.5		
	0.1013	24.90	15.44	40.08	98.3		
100%	0.1018	25.03	25.08	49.82	98.8	99.7	0.8
	0.1019	25.05	24.98	50.02	99.9		
	0.1015	24.95	24.93	49.97	100.4		
120%	0.1017	25.00	34.72	59.44	99.2	99.3	0.6
	0.1023	25.15	35.21	59.91	98.7		
	0.1016	24.98	34.97	59.90	99.9		

2.5　精密度　取回收率试验的 9 份样品测定，*RSD* 值按照高、中、低浓度三组分别为 0.9%，0.8%，0.6%，说明精密度良好。

2.6　稳定性试验　取重复性试验的供试品溶液，在 0，1.5，3，6，12，16 h 时间点进样，测得器峰面积分别为 4483.87744，4474.66260，4492.76318，4482.00439，4516.70264，4501.69922，其检测结果的 *RSD* 为 0.3%，说明在 16 h 内供试品溶液基本稳定。

2.7　耐用性试验　采用三台不同的液相和三根不同品牌的色谱柱分三组对批号为 20190101 的样品进行含量测定。A 组为 Agilent 1260 DAD 液相色谱仪，配 Agilent C18（4.6 mm × 250 mm，5 μm）色谱柱；B 组为 Agilent 1260 VWD 液相色谱仪，配Waters C18（4.6 mm × 250 mm，5 μm）色谱柱；C 组为 Waters 2695 − 2487 液相色谱仪，配 Agilent C18（4.6 mm × 150 mm，5 μm）液相色谱柱。样品配制方法如 2.1.2，色谱条件见 2.2，含量测定结果如表 2所示，同一样品三组含量测定结果分别为 100.5%，101.3%，101.2%，*RSD* 值为 0.5%，说明该检测方法对液相和色谱柱品牌无特殊要求，耐用性良好。

2.8　实际样品含量测定　取 1.3 中的所有样品，每个样品平行 3 次，依法测定其含量，结果见表 3。

表 2　不同液相与不同品牌色谱柱的含量测定比较

Tab 2　Comparison of content determination of different HPLC and different brand columns

组别	称样量/g	含量/%	平均含量/%	组内 *RSD*/%	组间 *RSD*/%
A	0.1813	100.59	100.5	0.3	0.5
	0.1821	100.14			
	0.1812	100.63			
B	0.1813	100.72	101.3	0.5	
	0.1821	101.44			
	0.1812	101.73			
C	0.1813	101.06	101.2	0.3	
	0.1821	101.08			
	0.1812	101.60			

表 3　液相测定结果

Tab 3　Determination results of HPLC

批号	规格/mg	称样量/g	含量/%	平均含量/%	*RSD*/%
20190101	25	0.1813	100.59	100.5	0.3
		0.1821	100.14		
		0.1812	100.63		
180529	25	0.1371	100.14	100.2	0.1
		0.1345	100.27		
		0.1341	100.32		
190122	25	0.2289	99.57	99.9	0.3
		0.2295	100.16		
		0.2292	100.06		
20180703	25	0.2237	106.31	105.8	0.8
		0.2256	106.29		
		0.2250	104.75		
170901	50	0.2269	107.65	106.9	0.7
		0.2264	106.87		
		0.2264	106.13		
190301	50	0.2042	102.26	101.8	0.5
		0.2038	102.01		
		0.2041	101.22		

3　讨论与结论

3.1　与容量分析结果比较　取 6 批次样品,按照《中国兽药典(2015 年版)》一部中盐酸左旋咪唑片的含量测定项下的滴定法进行测定,结果见表 4,并与高效液相色谱法比较,两者相对偏差均不超过 1.0%,结果无显著差异。但滴定法存在以下问题:一是需使用毒性较大的三氯甲烷进行提取;二是步骤过长过多,实验误差较大;三是终点蓝色难以判断,容易过终点误读,导致实验结果偏高。相比较而言,高效液相色谱法更简便,也无需三氯甲烷、醋酐等危险化学试剂,更有利于实验的开展,实验结果也更为准确可靠。

表 4　液相含量测定与容量分析结果比较

Tab 4　Comparisons between HPLC and volumetric analysis

样品批号	规格/mg	液相含量/%	滴定含量/%	相对偏差/%
20190101	25	100.5	101.0	0.2
180529	25	100.2	100.2	≤0.05
190122	25	99.9	98.2	0.9
20180703	25	105.8	105.0	0.4
170901	50	106.9	107.6	0.3
190301	50	101.8	102.5	0.3

3.1　提取方式的选择　在提取溶剂选择上，分别采用了65%甲醇、甲醇和流动相三种溶剂进行超声提取。结果表明纯甲醇提取后样品峰形较差，65%甲醇和流动相提取后的样品峰形较好，本文采用了流动相提取。在是否过滤的选择上，过滤与不过滤峰面积相对偏差为 0.2%，对含量测定影响不大，由于过滤后溶液更澄清，更有利于第二步配制，本文采用了过滤的方法。在超声时间的选择上，实验过程中分别采用了超声 5、10、20 min 三种方式，峰面积分别为 5255.33350，5262.27686，5247.13623，*RSD* 为 0.1%，因此选择超声时间为 10 min。

3.2　检测波长的选择　对盐酸左旋咪唑溶液在 190～400 nm 波长范围内扫描，扫描结果表明在 212 nm 波长处有最大吸收，结合文献[5]-[6]报道中基本选择 214 nm 为检测波长，基于 212 和 214 nm 属于光谱扫描误差内，因此还是选择 214 nm 为检测波长，与文献保持一致。

3.3　流动相的选择　本文采用了甲醇－0.2%磷酸溶液以及乙腈－0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液两种流动相配比进行试验，供试品溶液采用流动相进行稀释配制成 50 μg/mL 的溶液。结果表明，甲醇－0.2%磷酸溶液流动相下的盐酸左旋咪唑峰峰形不理想，峰形有较明显的拖尾现象，且有较明显的溶剂吸收峰，出峰时间在 8 min 左右，理论板数在 8000 左右。而乙腈－0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液（三乙胺调节 pH 值至 7.0）（20∶80，v/v）的流动相下的盐酸左旋咪唑峰峰形对称性良好，无干扰，无拖尾，出峰时间在 13 min 左右更为合理，无明显的溶剂吸收峰，理论板数在 10000 以上。因此选择后者作为流动相更适宜。

采用高效液相色谱法对盐酸左旋咪唑片中盐酸左旋咪唑的含量进行测定，对提取溶剂，提取方式和色谱条件进行了研究和优化，方法学验证结果表明该方法定量准确，与现行有效标准的含量结果一致，为盐酸左旋咪唑片的质量控制提供了更快捷、便利的操作方法。

参考文献：

[1]　林燕飞，张　琴，高芳芳. 盐酸左旋咪唑对免疫低下小鼠免疫功能的影响.[J]. 食品与药物，2018，20(6)：460－464.
Lin Y F, Zhang Q, Gao F F. Determination of rheological properties of butenafine hydrochloride gel by rotational rheology[J]. Chinese Journal of Food and Drug, 2018, 20(6): 460－464.

[2]　郭　洋，刘敏跃，李　鹏，等. 盐酸左旋咪唑对雏鸡免疫功能及生长性能影响的研究[J]. 饲料工业，2015，36(10)：10－12.
Guo Y, Liu M Y, Li P, *et al*. Effects of levamisole on immunological function and growth performance in chickens[J]. Chinese Journal of Feed Industry, 2015, 36(10): 10－12.

[3]　中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 2015 年版一部[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, volume 1, 2015 Edition[S].

[4]　美国药典 40.[S]. 2017
USP40－NF35[S]. 2017.

[5]　刘素梅，李华岑，韩　立，等. 万乳康中盐酸左旋咪唑含量测定方法的研究[J]. 中国兽药杂志，2010，44(2)：26－28.
Liu S M, Li H C, Han L, *et al*. Determination of levamisole hydrochloride in Wan Rukang[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2010, 44(2): 26－28.

[6]　李忠红，张　玫，樊夏雷，等. 三国药典盐酸左旋咪唑片含量测定方法比较[J]. 中国药事，2011，25(5)：497－499.
Li Z H, Zhang M, Fan X L, *et al*. Comparison of determination methods of levamisole tablets in three pharmacopoeias[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Affair, 2011, 25(5): 497－499.

（编　辑：陈　希）