

## 标准研讨

## 高效液相色谱法测定盐酸左旋咪唑片的有关物质及含量\*

鲍实<sup>1,2</sup>, 赵亚萍<sup>1,2</sup>, 曹全胜<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 湖北省药品监督检验研究院, 武汉 430075; 2. 湖北省药品质量检测与控制工程技术研究中心, 武汉 430075)

**摘要** 目的: 建立高效液相色谱法测定盐酸左旋咪唑片的有关物质及含量。方法: 有关物质检测采用 Thermo Hypsil C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以 0.75% 磷酸二氢铵溶液(用二异丙胺调节 pH 至 7.0) - 乙腈为流动相, 梯度洗脱; 含量测定采用 InertSustain C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.75% 磷酸二氢铵溶液(用二异丙胺调节 pH 至 7.0) - 乙腈(70:30)为流动相。流速均为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长均为 215 nm, 进样体积均为 10 μL。结果: 建立的有关物质检测方法能较好地分离盐酸左旋咪唑与 5 个已知杂质; 已知杂质 A、B、C、D、E 质量浓度在 10.87 ~ 25.37、11.62 ~ 27.10、12.38 ~ 28.90、30.89 ~ 72.07、12.41 ~ 28.95 μg · mL<sup>-1</sup> 的范围内与峰面积呈良好的线性关系 ( $r > 0.999$ ), 平均校正因子分别为 1.6、1.4、2.6、1.2、2.4, 平均回收率 ( $n = 9$ ) 分别为 98.1%、99.0%、98.6%、100.1% 和 99.9%, RSD 分别为 0.63%、0.79%、0.92%、0.96%、0.33%。建立的含量测定方法能分离盐酸左旋咪唑与相邻杂质 C; 盐酸左旋咪唑质量浓度在 0.1014 ~ 0.3043 mg · mL<sup>-1</sup> 的范围内与峰面积呈良好的线性关系 ( $r = 0.9999$ ); 盐酸左旋咪唑的平均回收率 ( $n = 9$ ) 为 100.2%, RSD = 0.52%; 盐酸左旋咪唑的定量限与检测限分别为 0.076 ng 和 0.030 ng。采用建立的方法实际测定 5 家企业生产的 10 批样品, 总杂质量为 0.05% ~ 0.62%, 含量为 99.5% ~ 104.3%。结论: 研究建立的盐酸左旋咪唑片的有关物质和含量测定的方法专属性强, 结果准确度高, 可用于盐酸左旋咪唑片中杂质的控制研究以及质量标准的提高。

**关键词:** 盐酸左旋咪唑片; 有关物质; 杂质; 校正因子; 含量测定; 高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2024) 04 - 0705 - 09

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.04.17

## Determination of related substances and assay of levamisole hydrochloride tablets by HPLC\*

BAO Shi<sup>1,2</sup>, ZHAO Ya - ping<sup>1,2</sup>, CAO Quan - sheng<sup>1,2\*\*</sup>

(1. Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430075, China; 2. Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control, Wuhan 430075, China)

**Abstract Objective:** To develop an HPLC method for the determination of related substances and assay of levamisole hydrochloride tablets. **Methods:** The chromatographic separation of related substances was performed on a Thermo Hypsil C<sub>18</sub> column (100 mm × 4.6 mm, 3 μm). A gradient elution was applied with a mobile phase composed of 0.75% monobasic ammonium phosphate solution (adjusted at pH 6.5 with diisopropylamine) and acetonitrile. The assay analytical column was packed with InertSustain C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The

\* 2016 年国家药典委员会药品标准提高课题(品种编号: 化 175)

\*\* 通信作者 Tel: 13377882239; E - mail: eqscyf@163.com

第一作者 Tel: (027) 87705265; E - mail: 635621433@qq.com

mobile phase was 70 volumes of 0.75% monobasic ammonium phosphate solution (adjusted at pH 7.0 with diisopropylamine) with 30 volumes of acetonitrile. The wavelength detection was set at 215 nm, the injection volume was 10  $\mu\text{L}$ , and the flow rate was 1.0  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . **Results:** Levamisole and its impurities were separated well by related substances HPLC method above. Impurities A, B, C, D, E showed the good linearities in the concentration ranges of 10.87–25.37  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 11.62–27.10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 12.38–28.90  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 30.89–72.07  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 12.41–28.95  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r > 0.999$ ). The average correction factors of impurities A, B, C, D, E determined by three columns and liquid chromatographies were 1.6, 1.4, 2.6, 1.2, 2.4, respectively, the recovery rates ( $n=9$ ) were 98.1%, 99.0%, 98.6%, 100.1%, 99.9% and the RSDs were 0.63%, 0.79%, 0.92%, 0.96%, 0.33%. The separation of levamisole and impurity C was good by assay HPLC method. Levamisole showed the good linearity in the concentration range of 0.1014–0.3043  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r = 0.9999$ ). The average recovery rate ( $n=9$ ) of levamisole was 100.2%, RSD = 0.52%. Ten batches levamisole hydrochloride tablets from five domestic pharmaceutical enterprises were determined by the above related substances and assay HPLC method, the total impurities mass were 0.05%–0.62%, and the assays were 99.5%–104.3%. **Conclusion:** The established method is high selection and accurate. It is suitable applied for determination of related substances and assay of levamisole hydrochloride tablets.

**Keywords:** levamisole hydrochloride tablets; related substances; impurities; correction factor; assay; HPLC

盐酸左旋咪唑 (levamisole hydrochloride) 是一种人工合成的咪唑类似物, 为四咪唑的左旋体<sup>[1]</sup>, 临床作为驱肠虫药和生物反应调节剂<sup>[2]</sup>, 《中华人民共和国药典》收载的剂型包括片剂、肠溶片、颗粒剂和糖浆剂, 近年来还有将左旋咪唑做成滴丸剂<sup>[3]</sup>的研究, 但片剂仍为左旋咪唑在临床使用的主要制剂形式, 并被世界卫生组织 (WHO) 收入基本药物标准清单中<sup>[4]</sup>。盐酸左旋咪唑原料和片剂的现行质量标准均收载于 2020 年版《中华人民共和国药典》二部, 片剂标准中未设置有关物质检查, 仅在原料标准中采用薄层色谱法对其杂质进行控制, 而国外药典 USP 43、BP 2020、JP 14 收载的盐酸左旋咪唑片标准中也无有关物质检查项, 仅 EP 10.0 收载的盐酸左旋咪唑原料标准中对有关物质进行控制, 并列出了盐酸左旋咪唑的 5 个特定杂质 (分子结构见图 1)。另外, 现行片剂标准的含量测定方法需先经过三氯甲烷提取, 再采用高氯酸滴定测定其中盐酸左旋咪唑的含量, 操作烦琐并对环境不友好, 且易受到制剂中辅料的干扰而导致滴定终点的判断不明确, 因此有必要建立灵敏度高, 准确度好, 操作简便的方法来测定盐酸左旋咪唑片的有关物质及含量。

查阅国内外相关文献<sup>[5-17]</sup>, 未见有文献系统地对盐酸左旋咪唑片中的多种已知杂质进行测定, 也未见同时测定有关物质和含量的方法。本文研究内

容来自国家药典委员会药品标准提高课题, 具体为采用灵敏度较高的高效液相色谱法, 建立相同的色谱流动相体系, 有关物质采用梯度洗脱方式, 含量测定采用等度洗脱方式, 采用有关物质检测条件时能将 EP 10.0 控制的 5 个特定杂质完全分离, 采用含量测定条件时能将盐酸左旋咪唑与相邻的杂质 C 分离良好。本试验建立的方法专属性强, 灵敏度高, 杂质控制全面, 可用于盐酸左旋咪唑片质量研究和标准修订, 以及其他盐酸左旋咪唑制剂相关控制项目的建立。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 液相色谱仪 (试验使用主体仪器); Ultimate 3000 液相色谱仪 (校正因子测定使用仪器); Mettler Toledo XP205 电子天平 (精确度为十万分之一); U3900 紫外分光光度计; Thermo Hypsil C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱、Dikma suprsil C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱、Waters C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱、InertSustain C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), Agilent Zorbax C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱。

二异丙胺 (Sigma - Aldrich 提供, 纯度  $\geq 99.5\%$ ); 磷酸二氢铵 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 乙腈 (Fisher 公司, 色谱纯); 高效液相色谱用水为去离子水 (Millipore, USA)。

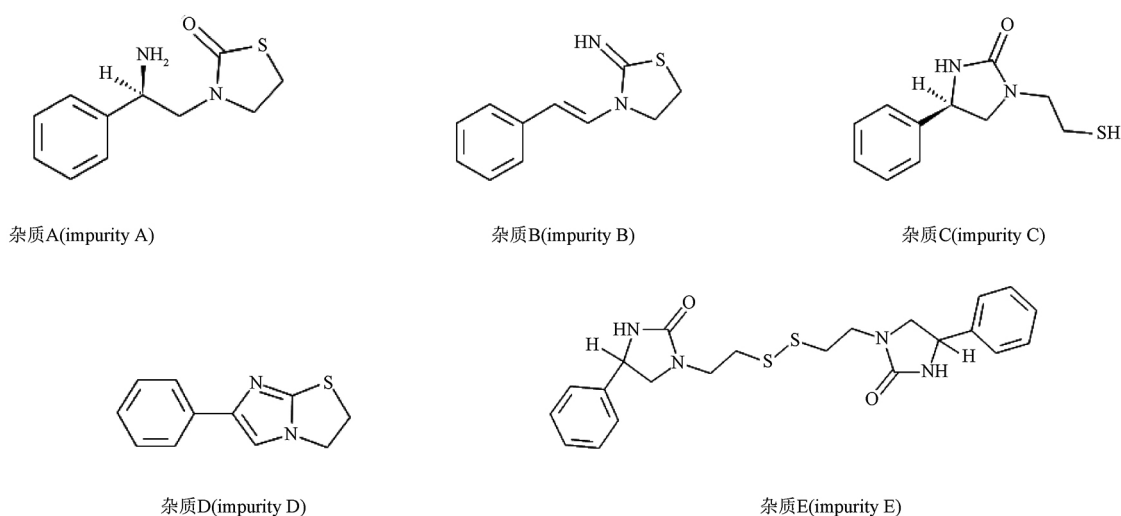


图1 左旋咪唑已知杂质 A~E 结构图

Fig. 1 Structures of the levamisole impurities A - E

对照品盐酸左旋咪唑(批号 100167 - 201203, 含量 99.9%)、杂质 D(批号 100020 - 201305, 含量 89.6%) 购自中国食品药品检定研究院; 杂质 A(批号 2608 - 060A5, 含量 98.1%)、杂质 B(批号 2668 - 085A3, 含量 99.3%)、杂质 C(批号 2667 - 062A3, 含量 99.1%)、杂质 E(批号 2667 - 020A3, 含量 97.8%) 购自 TLC Pharmaceutical Standards Ltd.。

盐酸左旋咪唑片(A 企业提供 3 批, 批号 151201、170403、170404; B 企业提供 1 批, 批号 20170308; C 企业提供 3 批, 批号 141001、141202、170201; D 企业提供 1 批, 批号 140201; E 企业提供 2 批, 批号 170102、170201), 规格均为 25 mg。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 盐酸左旋咪唑对照品溶液** 精密称取盐酸左旋咪唑对照品约 20 mg, 加 80% 甲醇溶液溶解并定量稀释成每 1 mL 中约含盐酸左旋咪唑 0.2 mg 的溶液, 即得。

**2.1.2 混合对照品溶液** 精密称取杂质 A 对照品 9.06 mg 置 50 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得杂质 A 对照品储备液; 分别精密称取杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E 的对照品 4.84、5.16、4.71、5.17 mg, 分别置 4 个 25 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E 的对照品储备液; 精

密称取盐酸左旋咪唑对照品 103.7 mg 置 10 mL 量瓶中, 分别加入上述 5 个杂质的对照品储备液各 1 mL, 用 80% 甲醇溶液稀释至刻度, 即得混合对照品溶液。

**2.1.3 分离度考察溶液** 精密称取杂质 C 的对照品 5.16 mg 置 25 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得杂质 C 对照品储备液; 精密称取盐酸左旋咪唑对照品 10.23 mg 置 10 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得盐酸左旋咪唑对照品储备液; 精密量取上述杂质 C 和盐酸左旋咪唑的对照品储备液各 2 mL 置同一 10 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 中约含杂质 C 0.04 mg 和盐酸左旋咪唑 0.2 mg 的混合溶液, 即得。

**2.1.4 供试品溶液** 精密称取本品片剂研成的细粉约 150 mg, 用 80% 甲醇溶液溶解并稀释制成每 1 mL 中约含盐酸左旋咪唑 10 mg 的溶液, 作为有关物质检测用供试品溶液。精密称取本品片剂研成的细粉约 50 mg, 加 80% 甲醇溶液溶解并定量稀释成每 1 mL 中约含盐酸左旋咪唑 0.2 mg 的溶液, 作为含量测定用供试品溶液。

**2.1.5 对照溶液** 精密量取有关物质检测用供试品溶液 1 mL 置 200 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

### 2.2 色谱条件

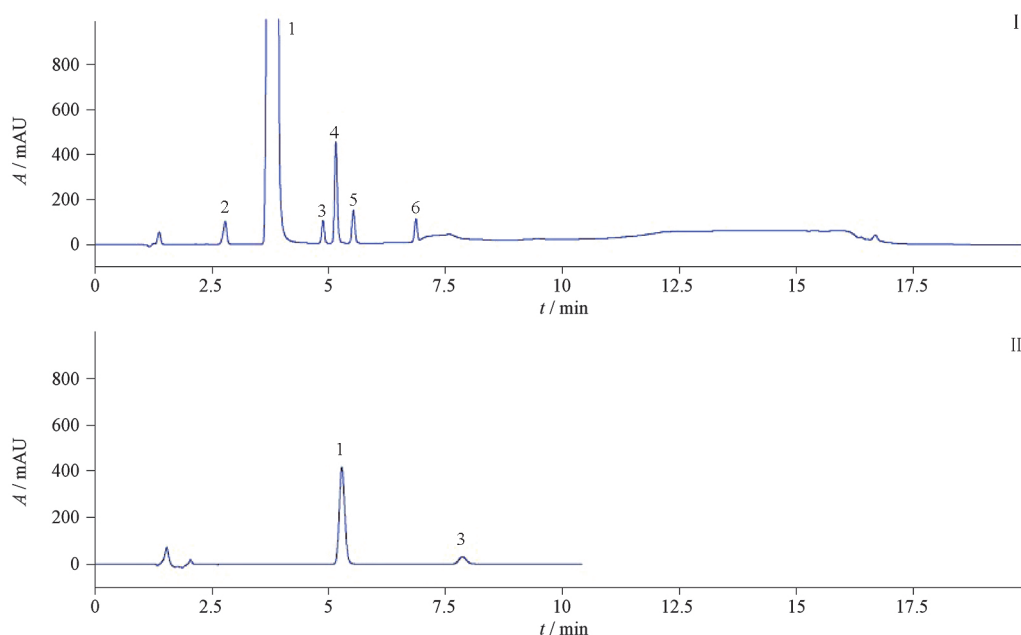
**2.2.1 有关物质检测** 采用 Thermo Hypsil C<sub>18</sub>

(100 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以 0.75% 磷酸二氢铵溶液(用二异丙胺调节 pH 至 7.0)(A) - 乙腈(B) 为流动相, 按表 1 梯度洗脱, 流速 1.0 min · mL<sup>-1</sup>, 检测波长 215 nm, 进样体积 10 μL。在上述色谱条件下测定“2.1.2”项下混合对照品溶液, 杂质 A、左旋咪唑、杂质 C、杂质 D、杂质 B、杂质 E 依次洗脱, 各色谱峰之间的分离良好。见图 2 - I。

表 1 有关物质梯度洗脱表

Tab. 1 Gradient elution of related substances

时间 (time)/min	流动相比比例(ratio of mobile phase)/%	
	流动相(mobile phase) A	流动相(mobile phase) B
0 ~ 10	80 → 20	20 → 80
10 ~ 14	20	80
14 ~ 15	20 → 80	80 → 20
15 ~ 20	80	20



1. 左旋咪唑(levamisole) 2. 杂质 A(impurity A) 3. 杂质 C(impurity C) 4. 杂质 D(impurity D) 5. 杂质 B(impurity B) 6. 杂质 E(impurity E)  
I. 混合对照品溶液(有关物质检测)[mix reference solution(related substances HPLC method)] II. 分离度考察溶液(含量测定)[separation solution(assay HPLC method)]

图 2 左旋咪唑与已知杂质分离色谱图

Fig. 2 The chromatograms of the separation of levamisole and its impurities

**2.2.2 含量测定** 采用 InertSustain C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.75% 磷酸二氢铵溶液(用二异丙胺调节 pH 至 7.0) - 乙腈(70:30) 为流动相, 检测波长 215 nm, 流速 1.0 min · mL<sup>-1</sup>, 进样体积 10 μL。在上述色谱条件下测定“2.1.3”项下分离度考察溶液, 结果见图 2 - II, 左旋咪唑主峰与主峰后相邻杂质 C 能达到良好的分离。

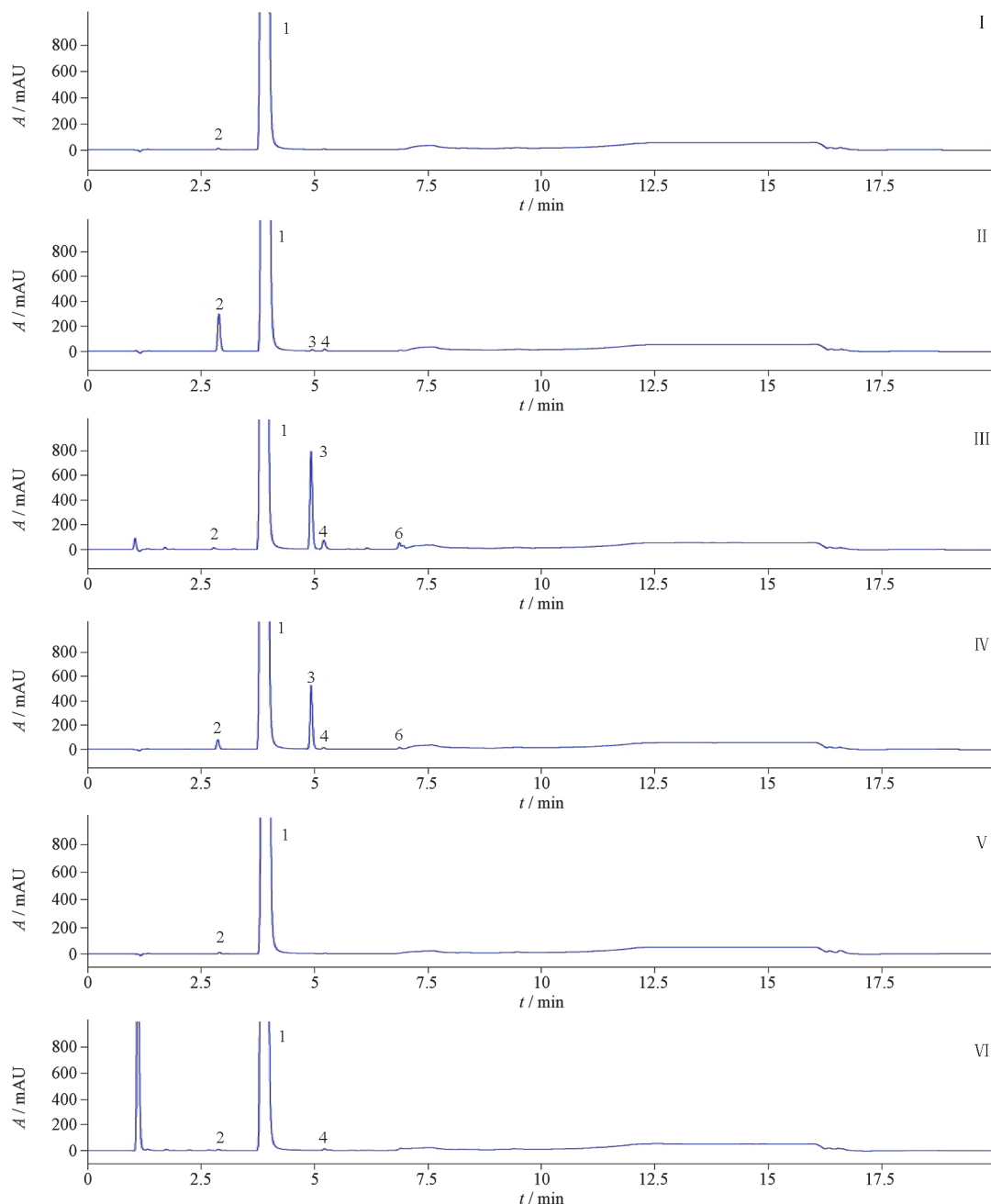
### 2.3 有关物质检测方法学验证

**2.3.1 强制降解试验考察** 取盐酸左旋咪唑片剂细粉(B 企业, 批号 20170308) 10 mg 置 10 mL 量瓶中, 分别进行强酸降解(2 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 1 mL,

90 °C 加热破坏 3 h)、强碱降解(2 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 2 mL, 90 °C 加热破坏 3 h)、光照降解(4 500 lx 照度的强光下照射 116 h)、高温降解(90 °C 加热破坏 3 h)、氧化降解(3% 过氧化氢溶液 1.5 mL, 放置 2 min), 酸碱降解进行中和, 得到各降解样品。各降解样品加 80% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得破坏后的专属性供试溶液。取空白溶液(80% 甲醇溶液)、有关物质检测用供试品溶液和破坏后的专属性供试溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 见图 3。结果显示: 未破坏的样品中有已知杂质 A、杂质

C、杂质 D、杂质 E, 及少量主峰前的未知杂质; 盐酸左旋咪唑在多数破坏条件下易发生降解, 特别是在酸、碱、加热、氧化条件下极易产生降解杂质, 在光照条件下较为稳定; 与已知杂质的保留时间比较, 在酸破坏的条件下极易降解出已知杂质 A 和杂质

C, 在碱性条件下易降解出杂质 C 和杂质 D, 在加热条件下, 杂质 A、杂质 C、杂质 D、杂质 E 的量均有所增加, 在氧化破坏条件下, 主峰前产生较多的未知杂质, 但杂质量较低; 建立的液相色谱条件能较好地分离已知杂质和降解出的未知杂质。



1. 左旋咪唑 (levamisole) 2. 杂质 A (impurity A) 3. 杂质 C (impurity C) 4. 杂质 D (impurity D) 5. 杂质 B (impurity B) 6. 杂质 E (impurity E)  
 I. 未破坏 (undegradation) II. 酸破坏 (acid degradation) III. 碱破坏 (alkali degradation) IV. 加热破坏 (heat stress degradation) V. 光照破坏 (fluorescent lamp degradation) VI. 氧化破坏 (oxidative degradation)

图 3 强制降解试验色谱图

Fig. 3 The chromatograms of forced degradation testing

**2.3.2** 已知杂质的线性与校正因子 采用不同厂家的色谱柱在不同的液相色谱仪上测定各已知杂质的线性并计算校正因子。取“2.1.2”项下各杂质储备液和“2.1.1”项下对照品溶液适量,用80%甲醇按表2中线性溶液浓度范围进行稀释,制备5个浓度点的线性溶液,分别采用试验条件1[Thermo Hypsil C<sub>18</sub>柱(100 mm×4.6 mm, 3 μm), Agilent 1260液相色谱仪]、条件2[Waters C<sub>18</sub>柱(100 mm×4.6 mm,

3 μm), Ultimate 3000液相色谱仪]、条件3[Dikma suprsil C<sub>18</sub>(100 mm×4.6 mm, 3 μm), Ultimate 3000液相色谱仪],按“2.2.1”项下有关物质检测色谱条件进样分析,记录色谱图,以质量浓度( $X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为横坐标,峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制曲线,以各杂质线性方程斜率与左旋咪唑线性方程斜率的比值计算相对校正因子,结果见表2,左旋咪唑与5个杂质的线性关系良好。

表2 采用不同仪器、不同色谱柱得到的线性回归方程和校正因子

Tab.2 Linear regression equations and correction factors obtained by different instruments and chromatographic columns

化合物 (compound)	试验条件 (condition)	线性范围 (liner range)/(μg·mL <sup>-1</sup> )	线性回归方程 (regression equation)	$r$	校正因子(correction factors)	
					结果(result)	平均值(average)
杂质 A (impurity A)	1	10.87 ~ 25.37	$Y = 29\ 758X - 7.840\ 6$	0.999 5	1.67	1.6
	2		$Y = 310.52X + 0.078\ 4$	0.999 5	1.58	
	3		$Y = 321.1X + 0.052\ 2$	0.999 9	1.55	
杂质 B (impurity B)	1	11.62 ~ 27.10	$Y = 31\ 798X + 1.089\ 4$	1.000	1.56	1.4
	2		$Y = 363.41X + 0.003\ 8$	0.999 9	1.35	
	3		$Y = 365.24X + 0.011\ 2$	0.999 9	1.36	
杂质 C (impurity C)	1	12.38 ~ 28.90	$Y = 18\ 829X + 5.019\ 5$	0.999 6	2.63	2.6
	2		$Y = 190.37X - 0.107\ 5$	0.999 9	2.57	
	3		$Y = 188.39X - 0.394\ 2$	0.999 7	2.64	
杂质 D (impurity D)	1	30.89 ~ 72.07	$Y = 36\ 992X + 11.38\ 1$	0.999 9	1.34	1.2
	2		$Y = 411.78X + 0.281\ 7$	0.999 9	1.19	
	3		$Y = 416.83X + 0.294\ 7$	0.999 7	1.19	
杂质 E (impurity E)	1	12.41 ~ 28.95	$Y = 19\ 552X + 37.43\ 5$	0.999 5	2.54	2.4
	2		$Y = 214.09X + 0.103\ 8$	0.999 8	2.29	
	3		$Y = 218.74X + 0.443\ 5$	0.999 3	2.27	
左旋咪唑(levamisole)	1	10.51 ~ 94.59	$Y = 49\ 580X - 7.240\ 8$	1.000	-	-
	2		$Y = 489.96X + 0.139\ 6$	1.000	-	
	3		$Y = 497.44X + 0.051\ 8$	1.000	-	

**2.3.3** 回收率试验 分别精密量取“2.1.2”项下的各杂质对照品储备液2、1、3 mL各3份,分别置25、10、25 mL预先装有处方量空白辅料的量瓶中,用80%甲醇溶液溶解并稀释至刻度,配制成80%、100%、120%(低、中、高)3个浓度水平的回收率供试溶液。按“2.2.1”项下有关物质检测色谱条件进样分析,记录色谱图,按各杂质外标法计算回收率。杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E的平均回收率分别为98.1%、99.0%、98.6%、100.1%、99.9%,RSD分别为0.63%、0.79%、0.92%、0.96%、0.33%。

**2.3.4** 已知杂质检测限与定量限 取“2.1.2”项下各杂质储备液和“2.1.1”项下对照品溶液适量,用

80%甲醇逐步稀释至表3中待测溶液浓度,按“2.2.1”项下有关物质检测色谱条件进样分析,记录色谱图。以信噪比为3时的质量为检测限,信噪比为10时的质量为定量限,结果见表3。

**2.3.5** 稳定性考察 取盐酸左旋咪唑片剂细粉(B企业,批号20170308)适量,按“2.1.4”项下方法制备有关物质检测用供试品溶液,放置0、2、4、6、8 h后,按“2.2.1”项下有关物质检测色谱条件进样分析,记录色谱图,考察杂质的变化对样品的稳定性的影响。杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E检出量的RSD分别为3.8%、5.2%、1.3%、2.7%、1.0%,考察结果显示供试品溶液在8 h内稳定。

表3 左旋咪唑和5个已知杂质的定量限与检测限  
Tab.3 LOQ and LOD of levamisole and five impurities

化合物 (compound)	待测溶液浓度 (concentration of the determined solution)/(mg · mL <sup>-1</sup> )	定量限 (LOQ)/ng	检测限 (LOD)/ng
杂质 A(impurity A)	$1.778 \times 10^{-5}$	0.355 6	0.177 8
杂质 B(impurity B)	$1.922 \times 10^{-5}$	0.384 4	0.192 2
杂质 C(impurity C)	$2.045 \times 10^{-5}$	0.409 0	0.204 5
杂质 D(impurity D)	$4.613 \times 10^{-5}$	0.461 2	0.230 6
杂质 E(impurity E)	$2.022 \times 10^{-5}$	0.404 4	0.202 2
左旋咪唑(levamisole)	$1.143 \times 10^{-5}$	0.457 2	0.114 3

**2.3.6 精密度考察** 取盐酸左旋咪唑片剂细粉(B企业,批号20170308),按“2.1.4”项下方法制备有关物质检测用供试品溶液,按“2.2.1”项下有关物质检测色谱条件进样分析,重复进样6次,记录色谱图,杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E检出量的RSD分别为1.3%、4.8%、1.1%、5.8%、1.6%,考察结果显示方法的精密度良好。

**2.3.7 耐用性考察** 取“2.1.2”项下的混合对照品溶液,按“2.2.1”项下有关物质检测色谱条件,分别采用Thermo Hypsil C<sub>18</sub>(100 mm × 4.6 mm, 3 μm)色谱柱和Dikma suprsil C<sub>18</sub>(100 mm × 4.6 mm, 3 μm)色谱柱进行分析,考察方法的耐用性。结果与左旋咪唑色谱峰相邻的杂质A与杂质C的色谱峰的分度均能达到3.0以上,杂质C、杂质D、杂质B、杂质E色谱峰之间分离度符合要求,显示本方法的耐用性较好。

#### 2.4 含量测定方法学验证

**2.4.1 线性考察** 精密称取盐酸左旋咪唑对照品50.76 mg,置100 mL量瓶中,用80%甲醇溶液溶解并定量稀释至刻度,摇匀,分别精密量取适量,用80%甲醇溶液稀释成质量浓度为0.101 0、0.152 1、0.202 8、0.253 5、0.304 3 mg · mL<sup>-1</sup>的溶液,按“2.2.2”项下含量测定色谱条件进样分析,记录色谱图,以质量浓度(A, mg · mL<sup>-1</sup>)为横坐标,峰面积(C)为纵坐标绘制曲线,左旋咪唑回归方程为

$$A = 48\ 438C - 34.714 \quad r = 0.999\ 9$$

结果显示左旋咪唑质量浓度在0.101 4 ~ 0.304 3 mg · mL<sup>-1</sup>的范围内线性关系良好。

**2.4.2 回收率试验** 分别精密称取盐酸左旋咪唑对照品,置100 mL的量瓶中,加80%甲醇溶液配制质量浓度约为0.16、0.20、0.24 mg · mL<sup>-1</sup>的溶液

各3份,同时加入各企业提供处方量的空白辅料,配制回收率供试溶液。按“2.2.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,按外标法计算左旋咪唑的回收率。结果该方法的平均回收率为100.2%,RSD为0.52%。

**2.4.3 精密度试验** 取盐酸左旋咪唑片剂细粉(B企业,批号20170308),按“2.1.4”项下方法配制含量测定用供试品溶液,按“2.2.2”项下含量测定色谱条件进样分析,记录色谱图,连续进样6次的左旋咪唑含量分别为103.0%、102.9%、103.6%、103.2%、103.9%、104.0%,RSD为0.45%,表明方法精密度良好。

**2.4.4 稳定性考察** 取盐酸左旋咪唑片剂细粉(B企业,批号20170308),按“2.1.4”项下方法配制含量测定用供试品溶液,放置0、1、2、3、4、6、8 h后,按“2.2.2”项下含量测定色谱条件进样分析,记录色谱图,左旋咪唑含量分别为103.0%、104.0%、103.5%、104.6%、105.2%、104.9%,RSD为0.83%,表明方法稳定性良好。

**2.4.5 检测限与定量限** 取“2.1.1”项盐酸左旋咪唑对照品溶液适量,用80%甲醇溶液稀释浓度至 $1.521 \times 10^{-8}$  g · mL<sup>-1</sup>,按“2.2.2”项下色谱条件分别进样5和2 μL进行分析,测得信噪比S/N分别为11.5和3.1,定量限与检测限分别为0.076 ng和0.030 ng。

**2.4.6 耐用性** 分别采用InertSustain C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱和Agilent Zorbax C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱考察耐用性。取“2.1.3”项下分离度考察溶液,按“2.2.2”项下含量测定色谱条件进样分析,结果显示左旋咪唑在上述2种色谱柱上的保留时间分别为5.615和5.296 min,杂质C的保

留时间分别为 7.094 和 7.873 min,二者在填料与长度不同的色谱柱上的保留行为存在一定差别,但是二者的分离情况均良好,分离度分别为 7.5 和 10.0,表明方法耐用性较好。

### 2.5 实际样品测定

取 5 家企业共 10 批盐酸左旋咪唑片,采用

“2.1.4”项下方法分别制备有关物质检测用和含量测定用供试品溶液,按“2.2”项下相应的色谱条件分别进样测定,记录色谱图。杂质的量按含校正因子主成分自身对照法计算,低于 0.05% 限度的未知杂质忽略不计,按外标法计算左旋咪唑含量结果,具体结果见表 4。

表 4 实际样品有关物质和含量测定

Tab. 4 Determination of the related substance and assay of levamisole hydrochloride tablets

企业 (enterprise)	批号 (batch)	有关物质的量 (amount of related substance)/%							含量 (assay)/ %
		杂质 A (impurity A)	杂质 B (impurity B)	杂质 C (impurity C)	杂质 D (impurity D)	杂质 E (impurity E)	未知杂质 (unknown impurities)	总杂质 (total impurities)	
A	151201	0.009	0.000 6	0.04	0.07	0.03	≤0.05	0.16	103.4
	170403	0.009	0.000 5	0.02	0.07	0.02	≤0.05	0.13	102.1
	170404	0.007	0.000 3	0.02	0.07	0.02	≤0.05	0.12	102.0
B	20170308	0.008	0.000 1	0.009	0.02	0.009	≤0.05	0.05	103.0
C	141001	0.03	未检出 (not detected)	0.01	0.1	0.01	≤0.05	0.19	100.7
	141202	0.04	0.000 2	0.007	0.2	0.03	≤0.05	0.27	99.5
	170201	0.01	0.000 4	0.004	0.1	0.02	≤0.05	0.18	101.1
D	140201	0.11	0.002	0.09	0.2	0.22	≤0.05	0.62	104.1
E	170102	0.04	0.000 7	0.12	0.04	0.08	≤0.05	0.29	104.1
	170201	0.05	0.002	0.09	0.05	0.17	≤0.05	0.36	104.3

## 3 讨论

### 3.1 流动相 pH 调节剂的选择

本研究建立有关物质及含量测定的方法采用二异丙胺调节流动相 pH,这种有机胺通过减弱碱性溶质(左旋咪唑为碱性物质)与硅醇基的强相互作用,可以消除峰拖尾现象,故检出的左旋咪唑主峰的对称性较好。采用三乙胺和二异丙胺调节流动相 pH 至 7.0 后,左旋咪唑和杂质 A、B、C、D、E 的洗脱时间基本一致,无明显差别,但是三乙胺的碱性较强使得基线的波动较大,采用二异丙胺调节后基线的波动较为平缓。

### 3.2 杂质的限度

采用 ADMET Predictor 药物吸收/毒性性质预测软件对已知杂质 A、B、C、D、E 的毒性进行预测。预测结果 TOX\_Risk(毒性风险系数)越大表示化合物的毒性越不理想,一般 ≤2,说明化合物的毒性较小,根据此预测规则,杂质 B 的毒性风险系数为 2.192,而其余杂质的毒性风险系数均 ≤2,尽管预测出杂质 B 毒性较大,应对其严格控制,但实际样品测定结果表明杂质 B 的量极低,说明本品片剂的安全性较好。

另外,杂质 D 为 2020 年版《中华人民共和国药典》收录的盐酸左旋咪唑原料标准中采用薄层色谱法控制的特定杂质,实际样品中的检出量较其他已知杂质高,说明国内企业生产中易产生该杂质,但杂质 D 的毒性预测结果显示,杂质 D 毒性较小,因此可延续 2020 年版《中华人民共和国药典》中 0.5% 的限度规定。

### 3.3 已知杂质的校正因子

采用不同的液相色谱仪测定杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E 的校正因子基本相同,因此可取不同液相色谱仪测定出的杂质校正因子的平均值作为上述已知杂质的校正因子,在标准制修订时可采用加校正因子的主成分外标法计算各已知杂质,保证结果的准确。

### 3.4 含量测定与有关物质色谱条件的比较

采用 Thermo Hypsil C<sub>18</sub> (100 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱以含量测定的等度洗脱色谱条件检测,也能将左旋咪唑与 5 个已知杂质良好分离,但左旋咪唑主峰的保留时间极短(2.294 min),不适合含量

测定,另外在此条件下,杂质 E 的保留时间较长(约在左旋咪唑峰的 7 倍时间出峰),且色谱峰裂峰,响应低,说明杂质 E 与主成分的极性差别较大,无法采用含量测定的等度洗脱条件进行有关物质检测,尽管含量测定的灵敏度优于有关物质,但是有关物质的检测限达到  $10^{-10}$  数量级,已能够充分满足杂质检出的灵敏度要求。最后改用常规的 InertSustain C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行含量测定,结果显示主峰的保留时间约为 5 min,且与相邻杂质 C 的分离良好,适合含量测定。含量测定确定的供试品溶液质量浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,仅为有关物质检测确定的供试品溶液质量浓度  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 1/50,因此其中的杂质质量较低,对含量测定的结果影响较小,故含量测定时可不考虑其他已知杂质的检出情况。

#### 参考文献

- [1] 窦晓群, 卫延辉, 郭学军. 左旋咪唑临床应用进展及免疫调节机制探讨[J]. 现代免疫学, 2021, 41(2):173  
DOU XQ, WEI YH, GUO XJ. Progress in the clinical application of levamisole and its immunomodulatory mechanism[J]. Curr Immunol, 2021, 41(2):173
- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 1078  
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 1078
- [3] 丁莉倩. 盐酸左旋咪唑滴丸的制备与含量测定[J]. 化工设计通讯, 2022, 48(8):192  
DING LQ. Preparation and content determination of levamisole hydrochloride dropping pills [J]. Chem Eng Design Commun, 2022, 48(8):192
- [4] WHO. Model List of Essential Medicines – 23rd List [DB/OL]. World Health Organization (2023 – 07 – 26) [2024 – 01 – 31]. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2023.02>
- [5] KUMAR L, YADAV YS, RATHNANAND M. simultaneous determination of linezolid and levamisole hydrochloride in a fixed dose combination [J]. Indian J Pharm Educ Res, 2017, 51(4):613
- [6] ABDEL-AZIZ O, HUSSEIN EM, KOSASY AM, et al. Comparative study of univariate spectrophotometry and multivariate calibration for the determination of levamisole hydrochloride and closantel sodium in a binary mixture [J]. J AOAC Int, 2016, 99(4):941
- [7] 邢亚非, 钱小燕. 盐酸左旋咪唑中对甲苯磺酞氯杂质测定方法的建立 [J]. 中国医药指南, 2014, 12(19):107  
XING YF, QIAN XY. Established of a method for the determination of toluenesulphthalide chloride in levamisole hydrochloride [J]. Guide China Med, 2014, 12(19):107
- [8] 郭江红, 赵亚萍, 吴蔚. HPLC 法测定盐酸左旋咪唑中有关物质 [J]. 中国药师, 2012, 15(4):512  
GUO JH, ZHAO YP, WU W. Determination of related substances in levamisole hydrochloride by HPLC [J]. China Pharm, 2012, 15(4):512
- [9] 郭江红, 赵亚萍. HPLC 法测定复方甲苯咪唑片中甲苯咪唑和盐酸左旋咪唑的含量 [J]. 中国药品标准, 2010, 11(3):219  
GUO JH, ZHAO YP. Content determination of mebendazole and levamisole hydrochloride in compound mebendazole tablets by HPLC [J]. Drug Stand China, 2010, 11(3):219
- [10] 陆兴毅. HPLC 法测定盐酸左旋咪唑糖浆的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(10):1753  
LU XY. HPLC determination of levamisole hydrochloride syrup [J]. Chin J Pharm Anal, 2008, 28(10):1753
- [11] 李洁, 林慧菁. HPLC 法测定盐酸左旋咪唑糖浆的含量 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(19):22  
LI J, LIN HJ. HPLC determination of levamisole hydrochloride syrup [J]. Chin J Mod Drug Appl, 2009, 3(19):22
- [12] 邱涵. GC 法测定盐酸左旋咪唑片的含量 [J]. 中国药品标准, 2007, 8(5):45  
QIU H. Determination of levamisole hydrochloride in levamisole hydrochloride tablets by gas chromatography [J]. Drug Stand China, 2007, 8(5):45
- [13] 侯爱荣, 邹爱玲, 黄桂玲, 等. 对盐酸左旋咪唑片增加旋光度检查的建议 [J]. 中国药品标准, 2004, 5(3):16  
HOU AR, ZOU AL, HUANG GL, et al. Suggested to increase the optical rotation of levamisole hydrochloride tablets [J]. Drug Stand China, 2004, 5(3):16
- [14] 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  
LI ZH, ZHANG M, FAN XL, et al. Comparison of determination methods of levamisole tablets in three pharmacopoeias [J]. Chin Pharm Aff, 2011, 25(5):497
- [15] 王勇忠. 高效液相色谱法测定盐酸左旋咪唑搽剂的含量 [J]. 海峡药学, 2007, 19(12):52  
WANG YZ. Determination the content in of levamisole hydrochloride liniment by HPLC [J]. Strait Pharm J, 2007, 19(12):52
- [16] 杨林, 丁莉坤, 周伦. 左旋咪唑 2 种搽剂的人体药动学及生物等效性 [J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(9):694  
YANG L, DING LK, ZHOU L. Pharmacokinetics and bioequivalence of two kinds of levamisole liniment in healthy volunteers [J]. Chin J New Drugs Clin Remed, 2011, 30(9):694
- [17] 郭萌. 三种方法检验盐酸左旋咪唑片剂含量的方法比较 [J]. 安徽医药, 2011, 15(9):1080  
GUO M. A comparison among three kinds of methods to test the content of levamisole hydrochloride tablets [J]. Anhui Med Pharm J, 2011, 15(9):1080

(本文于 2024 年 3 月 29 日修改回)