

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.10.04

# 林可霉素注射液非法添加盐酸左旋咪唑的 HPLC 检测方法研究

郑洁, 刘雪红, 陈玲

(大连市检验检测认证技术服务中心, 辽宁大连 116037)

[收稿日期] 2021-02-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2021)10-0025-06 [中图分类号] S859.2

**[摘要]** 建立了兽用林可霉素注射液中非法添加盐酸左旋咪唑的高效液相色谱检测方法。采用 Waters Atlantis<sup>®</sup> T3 C18(4.6 × 250 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 以磷酸二氢钠溶液 - 甲醇(70:30) 作为流动相进行等度洗脱(流速 1.00 mL/min), 用二极管阵列检测器在 230 nm 波长处进行测定, 考察此色谱条件下方法的专属性、线性、回收率、精密度、检测限和耐用性。结果表明, 盐酸左旋咪唑在进样浓度为 0.02 ~ 0.4 mg/mL 时呈良好的线性关系,  $R^2 = 0.9999$ ; 重复性试验 *RSD* 为 0.6%; 平均回收率为 99.7%; 检测限为 0.0002 mg/mL, 定量限为 0.0016 mg/mL。该方法准确、简便、可行, 适用于林可霉素注射液中盐酸左旋咪唑的检测。

**[关键词]** 林可霉素注射液; 左旋咪唑; 检测

## Study on HPLC Detection of Levamisole Hydrochloride Illegally Adulterated into Lincomycin Injection

ZHENG Jie, LIU Xue-hong, CHEN Ling

(Dalian Inspection and Certification Technology Service Center, Dalian, Liaoning 116021, China)

**Abstract:** A method was established to detect the levamisole hydrochloride adulterated into veterinary lincomycin hydrochloride injection by high performance liquid chromatography (HPLC). Isocratic elution was used with the mobile phase consisted of sodium dihydrogen phosphate buffered saline solution and methanol at the volume ratio of 70:30, and its constant flow rate was 1.00 mL/min. It was performed on the Waters Atlantis<sup>®</sup> T3 (4.6 × 250 mm, 5 μm) C18 column at 230 nm by diode-array detector. Specificity, linear relation, recovery, precision, detection limit and durability were investigated under the chromatographic condition. The results showed that there was good linear relation between the levamisole hydrochloride concentrations and peak areas in the range of 0.02 mg/mL ~ 0.4 mg/mL,  $R^2 = 0.9999$ . The *RSD* of precision was 0.6%. The average recovery rate was 99.7%. Limit of detection was 0.0002 mg/mL, limit of quantitation is 0.0016 mg/mL. This method is

simple, accurate, feasible, so it is suitable for detection of levamisole hydrochloride which is illegally adulterated into lincomycin injection.

**Key words:** lincomycin injection; levamisole; detect

盐酸左旋咪唑(levamisole hydrochloride),是一种广谱抗线虫药,对马、牛、绵羊、猪、犬和鸡的大多数线虫具有活性,还能明显提高免疫反应。在兽医临床上用作牛、羊、猪、犬、猫和禽的胃肠道线虫、肺线虫以及犬心丝虫和猪肾虫感染的治疗,也用于免疫功能低下动物的辅助治疗和疫苗免疫效果<sup>[1]</sup>。但该药具有潜在的基因毒性,摄入过量对皮肤、神经、消化、心血管、免疫等多个系统造成损害,导致癌变、畸变,甚至死亡<sup>[2]</sup>。兽医临床使用剂量为每日 7.5 mg/kg,禽类为每日 7.5 mg/kg。国内对肉源性组织和生鲜乳中左旋咪唑残留已经发布了相关标准<sup>[3-4]</sup>,但饲料和兽药中非法添加左旋咪唑还缺少相关的检验标准,导致检出左旋咪唑而无法判定的情况。在 2020 年兽药检测过程中,按照《农业农村部公告 169 号》<sup>[5]</sup>筛查后,就发现一例林可霉素注射液中非法添加盐酸左旋咪唑的案例,针对出现的左旋咪唑添加物,开展方法学研究,建立林可霉素注射液非法添加盐酸左旋咪唑的 HPLC 检测方法,以期对林可霉素注射液质量控制和左旋咪唑的相关检测标准的制定提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 药品与试剂 Levamisole Hydrochloride (99.9%, TMstandard); 甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂);磷酸二氢钠(分析纯,天津市科密欧化学试剂);三乙胺(分析纯,天津市科密欧化学试剂);氢氧化钠(分析纯,天津市科密欧化学试剂);盐酸林可霉素注射液(10 mL:0.3 g):四川显华动物药业有限公司,经检测不含盐酸左旋咪唑。

1.1.2 仪器设备 BS21S 电子天平(Sartorius); 2695 高效液相色谱仪(Waters); 2998 二极管阵列检测器(Waters); 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司)。

### 1.2 方 法

1.2.1 色谱条件 Waters Atlantis<sup>®</sup> T3 C18 色谱柱(4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相:磷酸二氢钠溶液(取磷酸二氢钠 3.0 g,加水 1000 mL,加三乙胺 0.5 mL,用饱和氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0) - 甲醇(70:30); 流速 1.00 mL/min; 柱温 30.0 °C; 检测波长 230 nm; 进样体积 10.0 μL。

1.2.2 供试品溶液的制备 溶剂空白溶液的制备:取甲醇试剂,过滤后作为溶剂空白溶液。对照品溶液的制备:精密称取盐酸左旋咪唑对照品适量,用甲醇溶解并稀释成 0.1 mg/mL 的溶液。样品空白溶液的制备:精密量取不含盐酸左旋咪唑的盐酸林可霉素注射液 1 mL,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 mL,置 25 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至 0.024 mg/mL 的盐酸林可霉素溶液,作为空白样品溶液。阳性添加溶液的制备:在林可霉素注射液中添加盐酸左旋咪唑对照品,用甲醇配制成含盐酸左旋咪唑 0.1 mg/mL 的溶液,作为阳性添加溶液。

1.2.3 专属性 按 1.2.1 项色谱条件,对 1.2.2 项中的试剂空白溶液、对照品溶液、样品空白溶液、阳性添加溶液分别进样,对色谱图进行比对。

1.2.4 最低检测限和定量限 按 1.2.1 项色谱条件,将对对照品溶液逐级稀释,分别配制成浓度为 0.0032、0.0016、0.0008、0.0004、0.0002、0.0001 mg/mL 的溶液注入高效液相色谱仪,同时记录色谱图及光谱图。将信噪比大于等于 2 时对应的浓度定义为最低检测限,将信噪比大于等于 10 时对应的浓度定义为定量限。

1.2.5 精密度 采用重复性试验考察,精密称取盐酸左旋咪唑对照品 10 mg,定容于 100 mL 容量瓶中,配制成浓度为 0.1 mg/mL 盐酸左旋咪唑对照品溶液,将其重复进样 6 次,进样体积为 10.0 μL,记录色谱图,计算其峰面积相对标准偏差(RSD)。

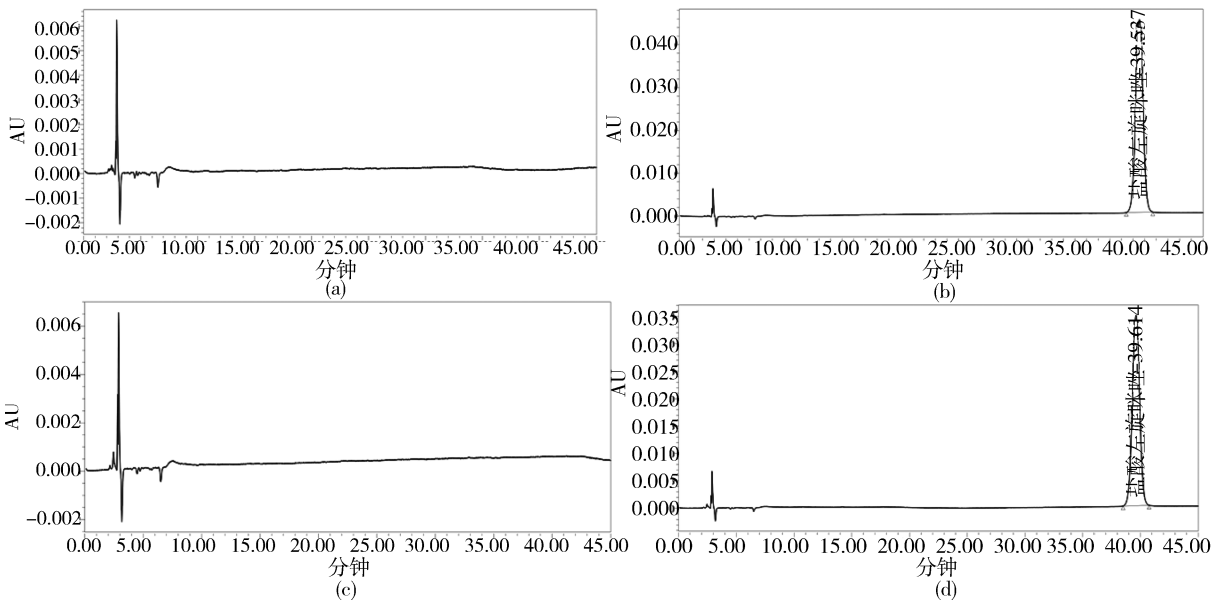
**1.2.6 线性关系** 精密称取盐酸左旋咪唑对照品 100 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 精密量取 1、2、3、5、10、20 mL 分别置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过滤后取精密量取 10.0  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图。按盐酸左旋咪唑对照品溶液浓度与对应的盐酸左旋咪唑峰面积作标准曲线, 计算回归方程和相关系数。

**1.2.7 回收率** 取 1 mL 盐酸林可霉素注射液, 添加盐酸左旋咪唑对照品 100 mg, 置 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀; 再精密量取 1 mL 置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 平行配制 6 份。对照品溶液的配制同 1.2.2 项。分别精密量取供试品和对照品溶液 10.0  $\mu$ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法计算峰面积。

**1.2.8 耐用性** 考察 3 个不同的色谱柱 (Waters Sunfire<sup>®</sup> C18 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m、Waters Atlantis<sup>®</sup> C18 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m、Waters Atlantis<sup>®</sup> T3 C18 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), 3 个不同的柱温 (20.0、25.0、30.0  $^{\circ}$ C), 3 个不同的 pH 值 (6.8、7.0、7.2), 流动相甲醇的比例分别为 28%、30%、32% 时, 对峰保留时间、理论板数等方面的影响。

## 2 结果与分析

**2.1 专属性** 结果如图 1 所示, 对照品溶液和阳性添加溶液在 39 min 左右出峰, 且光谱图无差异, 空白溶剂和盐酸林可霉素样品在 39 min 左右均无色谱峰出现。说明在此色谱条下盐酸林可霉素不影响酸左旋咪唑的检测, 甲醇溶剂对左旋咪唑的检测亦没有干扰。



a. 溶剂空白溶液 b. 对照品溶液 c. 样品空白溶液 d. 阳性添加溶液

图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatogram HPLC

**2.2 最低检测限和定量限** 对逐级稀释后的盐酸左旋咪唑溶液测定后, 结果显示, 盐酸左旋咪唑浓度为 0.0002 mg/mL 时信噪比为 2.8, 浓度为 0.0016 mg/mL 时信噪比为 11.6, 所以盐酸左旋咪唑的最低检测限为 0.0002 mg/mL, 定量限为 0.0016 mg/mL。

**2.3 精密度** 对重复性试验记录的色谱图进行处

理, 计算 6 次进样的峰面积  $RSD$  为 0.6%, 表明本方法具有良好的重复性, 符合精密度试验的要求。

**2.4 线性关系** 将浓度分别为 0.02、0.04、0.06、0.1、0.2、0.4 mg/mL 的左旋咪唑溶液色谱图进行处理, 分别计算其峰面积。以盐酸左旋咪唑浓度为横坐标  $x$ , 峰面积 (AU) 为纵坐标  $y$ , 绘制标准曲线, 其线性回归方程为  $y = 1.528 \times 10^7 x - 14689$ ,  $R^2 =$

0.9999(图2)。表明盐酸左旋咪唑在浓度 0.02 ~ 0.4 mg/mL 时,线性关系良好。

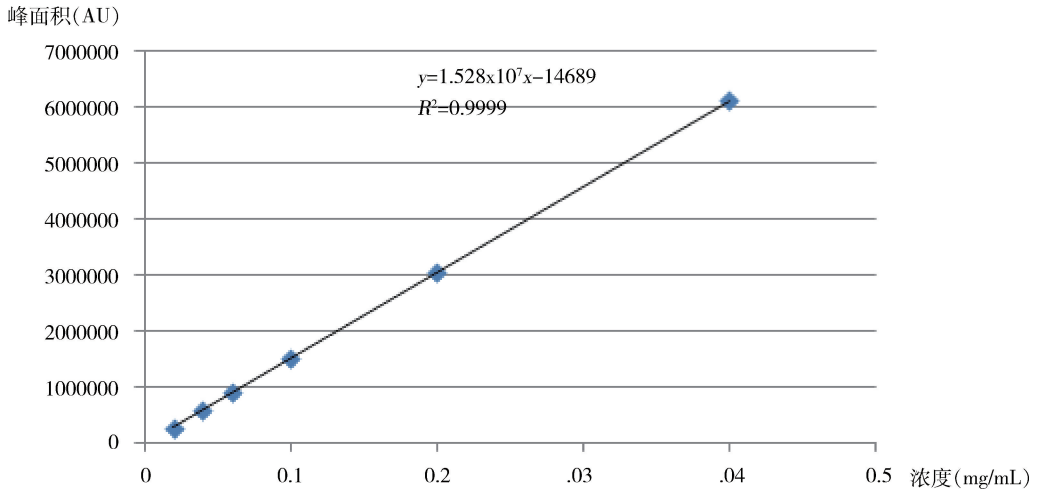


图2 盐酸左旋咪唑标准曲线

Fig 2 Standard curve of levamisole hydrochloride

2.5 回收率 将6份添加浓度为0.08 mg/mL的供试品溶液的色谱图进行处理,分别计算峰面积值,按外标法计算盐酸左旋咪唑的含量,平均回收率为99.7%,RSD为0.8%。结果见表1。

表1 盐酸林可霉素注射液中盐酸左旋咪唑回收率试验结果(n=6)

Tab1 Recovery test of levamisole hydrochloride illegally adulterated into lincomycin hydrochloride injection

Additional amount/mg	Detected amount/mg	Recovery rate/%	Average recovery rate/%	RSD/%
100.5	100.0	99.50	99.7	0.8
101.1	100.2	99.10		
99.5	99.8	100.30		
99.9	99.3	99.39		
100.8	99.9	99.10		
99.6	100.5	100.90		

2.6 耐用性 试验结果显示,使用3种色谱柱分离后结果显示,T3色谱柱的理论板数和峰形明显优于其它色谱柱,分析T3色谱柱具有亲水性强的特点,当流动相水相占比例较大时,采用此种色谱柱可以有效提高盐酸左旋咪唑的理论板数;柱温的升高可以使盐酸左旋咪唑的保留时间略有提前,但3个柱温条件下无明显差异(保留时间差值小于1 min),柱温的提高有利于增加盐溶液的溶解性,

提高其流动性、降低流路压力,但柱温的设定还需要参考实验室内的室温,避免与室温相差太大;3个pH值条件下,盐酸左旋咪唑的保留时间差小于1 min、峰面积相对偏差小于1.5%、理论板数相对偏差小于1.5%,均无明显差异,提示pH的变化对实验影响不大;流动相中有机相甲醇的比例升高可以缩短目标峰的出峰时间,但由于无机相为盐溶液,有机相比比例的升高会加大色谱柱的柱压,甚至导致管路堵塞,在有机相甲醇比例为30%以下时,能达到稳定的柱压,甲醇比例在28%时保留时间较30%时延后,且理论板数降低,说明甲醇比例在30%时系统稳定性和理论板数最好。

供试品溶液色谱图中如出现与盐酸左旋咪唑对照品色谱峰保留时间一致的峰(差异小于等于5%),且为单一物质峰;在200~400 nm范围波长内,二者紫外光谱图一致,最大吸收波长无明显差异(差异小于等于±2 nm),判为检出盐酸左旋咪唑。供试品溶液色谱图中的峰保留时间与盐酸左旋咪唑对照品峰相同,但峰面积小于检测限峰面积,判定为未检出盐酸左旋咪唑。

### 3 讨论与结论

3.1 添加目的分析 盐酸林可霉素临床用于治疗猪痢疾的常用药物<sup>[6]</sup>,抗菌谱广,对敏感葡萄球菌

属、链球菌属、肺炎链球菌及一些敏感性厌氧菌所致的呼吸道感染、肠道感染、皮肤软组织感染都有效果。同时在联合交叉用药时,不会产生耐药性<sup>[7]</sup>。盐酸左旋咪唑针对动物肠道球虫病所致的感染有增效作用<sup>[8-9]</sup>,还可以提高免疫<sup>[10-11]</sup>。林可霉素制剂中添加盐酸左旋咪唑的问题鲜有报道,我院也是首次在林可霉素注射液中检出盐酸左旋咪唑,林可霉素与此抑菌药配伍后,可以显著增强其药用效果。但添加的剂量无法控制,超量易导致动物死亡<sup>[12-14]</sup>。

3.2 检测波长的选择 将二极管阵列检测器记录的盐酸左旋咪唑的 3D 色谱图放大,可以看到在 230 nm 处左旋咪唑的峰强度最强,响应值最大,且无干扰,所以在 230 nm 通道监测和记录。

3.3 方法评价 盐酸林可霉素注射液在与盐酸左旋咪唑对照品相同的保留时间处无色谱峰出现,说明林可霉素对盐酸左旋咪唑的检查无干扰,即本检查法适用于盐酸林可霉素注射液。与传统的容量分析法和气相、液质等方法相比,高效液相法具有方便迅速、灵敏度高、线性关系良好、精密度高的优点,是国内外普遍使用的方法<sup>[15-17]</sup>。由于林可霉素注射液的基质效应弱,缓冲盐的洗脱能力好,可以达到较高的回收率(99.7%),有利于对非法添加物质进行定量分析。在实际监测过程中,结合现有的筛查标准还可以实现多组份同时筛查添加物质,省时省力。

建立了高效液相色谱法测定盐酸林可霉素注射液中非法添加盐酸左旋咪唑的检查方法。试验结果表明,本方法专属性、精密度、线性、回收率试验均符合《中国兽药典 2015 年版一部》<sup>[18]</sup>的要求,能有效检测盐酸林可霉素注射液中是否添加盐酸左旋咪唑及添加量。

## 参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典, 兽药使用指南[S].  
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, guidelines for the use of veterinary drugs[S].

[2] 杨学志, 郑荣远, 殷为勇, 等. 左旋咪唑上市后安全性再评价Ⅲ: 风险预防对策[J]. 药物流行病学杂志, 2007, 16(6): 335-337.  
Yang X Z, Zheng R Y, Yin W Y, *et al.* Re-evaluation of post-marketing safety for levamisole Ⅲ: Risk Prevention countermeasures [J]. Chinese journal of pharmacoepidemiology, 2007, 16(6): 335-337.

[3] 食品安全国家标准. 牛奶中左旋咪唑残留量的测定 高效液相色谱法[S].  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Determination of Livamisole residues in milk by High Performance Liquid Chromatographic method[S].

[4] 中华人民共和国农业部. 出口肉及肉制品中左旋咪唑残留量检验方法 气相色谱法[S].  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Method for the determination of levamisole residues in meat and meat products for export—Gas chromatography[S].

[5] 中华人民共和国农业农村部公告第 169 号. 兽药中非法添加药物快速筛查法[S].  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Announcement of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Proclamation No. 169: Screening for substances illegally added to veterinary drugs[S].

[6] 陈秋致. 林可霉素在治疗猪痢疾上的临床应用[J]. 福建畜牧兽医, 2019, 41(6): 19-23.  
Chen Q Z. Clinical application of lincomycin in the treatment of porcine dysentery[J]. Fujian Journal of animal husbandry and veterinary medicine, 2019, 41(6): 19-23.

[7] 高迎春, 薄永恒, 魏秀丽, 等. 我国宠物用药现状与思考[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(11): 62-64.  
Gao Y C, Bo Y H, Wei X L, *et al.* Ideas on the Situations of Pet Medication in China[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(11): 62-64

[8] 张海英, 刘世辉. 盐酸左旋咪唑驱除绵羊肠道线虫试验[J]. 中兽医学杂志, 2008, 2: 60.  
Zhang H Y, Liu S H. Exorcism test of nematodes in sheep by levamisole hydrochloride[J]. Chinese journal of traditional veterinary science, 2008, 2: 6.

[9] 黄太耀. 盐酸左旋咪唑治疗犊牛新蛔虫病的临床分析[J]. 甘肃畜牧兽医, 2014, 44(8): 26-27.  
Huang T Y. Clinical analysis of treatment on new ascariasis of calves by levamisole hydrochloride [J]. Gansu husbandry and veterinary, 2014, 44(8): 26-27.

[10] 叶雪丹, 徐彤彤, 陆园园, 等. 盐酸左旋咪唑对免疫低下小鼠

- 免疫功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(6): 550 - 552.
- Ye X D, Xu T T, Lu Y Y, *et al.* Effect of levamisole hydrochloride on immune function in immunocompromised mice [J]. Chinese journal of clinical pharmacology, 2019, 35(6): 550 - 552.
- [11] 张倩. 左旋咪唑的免疫增强效应[J]. 畜牧兽医科技信息, 2017, 4: 22 - 23.
- Zhang Q. Immune - enhancing effect of levamisole [J]. Chinese journal of animal husbandry and veterinary medicine, 2017, 4: 22 - 23.
- [12] Bénédicte Lelièvre, Benoit Suply, Francis Schmitt, *et al.* A fatal case after an intravenous injection of levamisole [J]. Forensic Science, Medicine and Pathology, 2020 - 12 published online
- [13] Lauren Strazzula B A, Katherine K. Brown M D, Joaquin C. , *et al.* Levamisole toxicity mimicking autoimmune disease [J]. Journal of the American academy of dermatology, 2013, 69(6): 954 - 959.
- [14] 刘化广, 贾国泉, 施辛. 左旋咪唑致急性播散性脑脊髓炎的不良反应分析[J]. 抗感染药理学, 2007, 4(4): 181 - 183.
- Liu H G, Jia G Q, Shi X. Analysis of ADR of acute disseminated encephalomyelitis caused by levamisole therapy [J]. Journal of anti - infectious pharmacology, 2007, 4(4): 181 - 183.
- [15] Siegrid De Baere, Marc Cherlet, Siska Croubels, *et al.* Liquid chromatographic determination of levamisole in animal plasma: ultraviolet versus tandem mass spectrometric detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 215 - 224.
- [16] Howaida El - Kholy, Barbara W. Kempainen. Liquid chromatographic method with ultraviolet absorbance detection for measurement of levamisole in chicken tissues, eggs and plasma [J]. Journal of Chromatography B, 2003, 796: 371 - 377.
- [17] 周芷锦, 林仙军, 王彬, 等. HPLC 法测定盐酸左旋咪唑片的含量研究 [J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(8): 1002 - 1208.
- Zhou Z J, Lin X J, Wang B, *et al.* Determination of levamisole hydrochloride in levamisole hydrochloride tablets by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(8): 1002 - 1208.
- [18] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版 [S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia, volume 1, 2015 Edition [S].

(编辑: 侯向辉)