

# 氯霉素片中氯霉素含量的测定

## 高效液相色谱法

### 一、摘要

本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定市售氯霉素片中氯霉素的含量。色谱条件： $C_{18}$  色谱柱（ $4.6 \times 250\text{mm}$ ， $5\mu\text{m}$ ），流速为  $1.0\text{mL/min}$ ，柱温为  $30^\circ\text{C}$ ，进样量为  $10\mu\text{L}$ ，检测器为紫外-可见光检测器，波长为  $277\text{nm}$ 。实验结果：氯霉素的理论塔板数为 9013，拖尾因子为 1.24；重复性测试中，氯霉素标准溶液连续进样 6 针，保留时间的 RSD 为 0.143%，峰面积的 RSD 为 0.749%；灵敏度测试中，氯霉素的仪器检出限为  $0.014\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为  $0.048\mu\text{g/mL}$ ；氯霉素在测定浓度范围内具有良好的线性关系，确定系数  $R^2$  为 0.9998；对样品进行测试，市售氯霉素片中氯霉素含量为 79.3%。

### 二、背景

氯霉素为白色结晶性粉末，是一种酰胺醇类抗生素；易溶于甲醇、乙醇、丙醇及乙酸乙酯，微溶于乙醚及氯仿，不溶于石油醚及苯。主要用于伤寒、副伤寒和沙门菌属感染。

### 三、实验过程

#### 1 范围

适用于氯霉素片中氯霉素含量的测定。

#### 2 原理

氯霉素在 277nm 处有紫外吸收, 使用高效液相色谱法进行测定, 外标法定量。

### 3 试剂与材料

3.1 水: 符合 GB/T6682 的一级水;

3.2 磷酸二氢钾: 分析纯;

3.3 庚烷磺酸钠: 分析纯;

3.4 三乙胺: 分析纯;

3.5 磷酸: 色谱纯;

3.6 甲醇: 色谱纯;

3.7 0.01mol/L 庚烷磺酸钠缓冲溶液: 取庚烷磺酸钠 (3.3) 2.1g, 加水溶解并定容至 1L, 加入磷酸二氢钾 (3.2) 6.8g, 再加三乙胺 (3.4) 5mL, 混匀, 用磷酸 (3.5) 调节 pH 至 2.5;

3.8 流动相: 0.01mol/L 庚烷磺酸钠缓冲溶液: 甲醇=68: 32;

3.9 氯霉素对照品: 纯度为 99.6%;

3.10 氯霉素片样品。

### 4 仪器与设备

4.1 高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站;

4.2 分析天平: 精确到 0.0001g;

4.3 涡旋振荡器;

4.4 超声波清洗机;

4.5 容量瓶: 10mL、100mL, 棕色带刻度;

4.6 pH 计: 精确至 0.01。

## 5 测定步骤

### 5.1 标准溶液配制

#### 5.1.1 氯霉素标准储备液的配制

精确称取10mg氯霉素标准品 (3.9) , 置于10mL棕色容量瓶中, 加1mL甲醇 (3.6) 使溶解, 用流动相 (3.8) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为1000 $\mu$ g/mL的氯霉素标准储备液。

#### 5.1.2 氯霉素系列标准工作液的配制

将上述标准储备液 (5.1.1) 用流动相 (3.8) 稀释, 制得氯霉素浓度分别为10 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL、200 $\mu$ g/mL的系列标准工作液。

### 5.2 样品前处理

精密称定市售氯霉素片 10 片, 精密称定后研细, 精密称取适量, 加甲醇适量 (每 10mg 氯霉素加甲醇 1mL) 使氯霉素溶解, 再用流动相定量稀释制成每 1mL 中含氯霉素 0.1mg 的溶液, 滤过, 取续滤液。

### 5.3 色谱条件

a) 色谱柱:  $C_{18}$  4.6 $\times$ 250mm, 5 $\mu$ m 或者相当的色谱柱;

b) 流动相: 详见 3.8;

- c) 柱温: 30 °C;
- d) 进样量: 10μL;
- e) 流速: 1.0mL/min;
- f) 检测器及波长: 紫外-可见光检测器, 检测波长为 277nm。

6 结果

6.1 重复性测试

按照上述色谱条件 (5.3) 进行采集, 氯霉素标准溶液 (浓度为 100μg/mL) 的色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

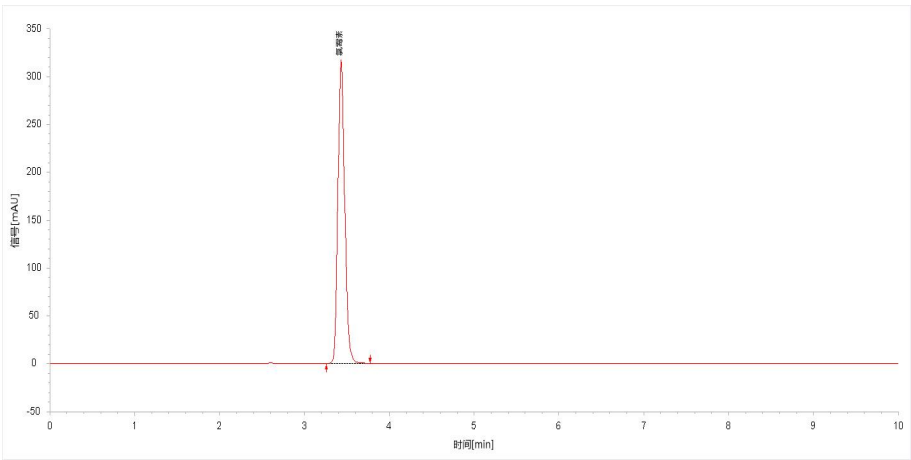


图 1 氯霉素标准溶液 (浓度为 100μg/mL) 的色谱图

表 1 氯霉素标准溶液 (浓度为 100μg/mL) 色谱图积分结果

| 目标物 | 保留时间<br>(min) | 峰面积<br>(mAU.s) | 峰高<br>(mAU) | 理论塔板数 | 对称/拖尾因子 |
|-----|---------------|----------------|-------------|-------|---------|
| 氯霉素 | 3.433         | 1774.217       | 317.155     | 9013  | 1.24    |

\*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。  
\*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

由表 1 中数据可知，氯霉素的理论塔板数为 9013，拖尾因子为 1.24，具有良好的峰形。

将氯霉素标准溶液（浓度为 100μg/mL）连续进样 6 针，6 针叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

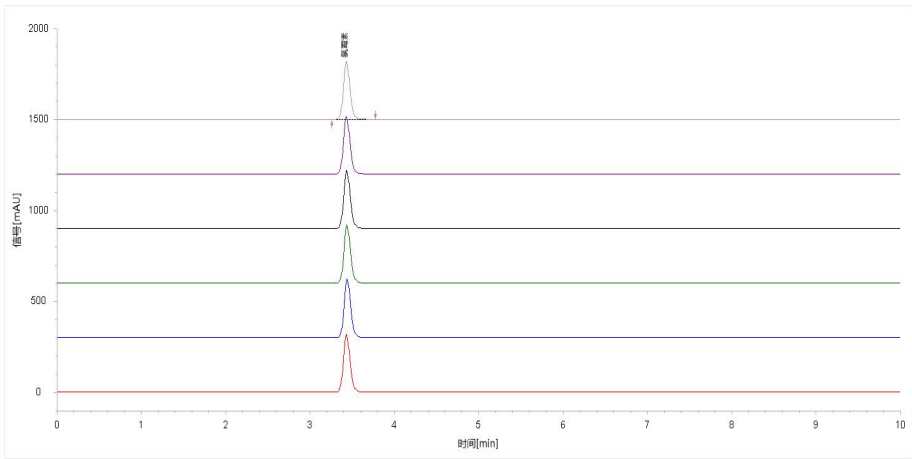


图 2 氯霉素标准溶液（浓度为 100μg/mL）连续进样 6 针叠加的色谱图

表 2 氯霉素标准溶液（浓度为 100μg/mL）进样 6 针重复性数据统计

| 目标物 | 标准品            | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        | 平均值      | RSD%  |
|-----|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| 氯霉素 | 保留时间<br>(min)  | 3.433    | 3.442    | 3.442    | 3.442    | 3.433    | 3.433    | 3.438    | 0.143 |
|     | 峰面积<br>(mAu.s) | 1773.011 | 1770.512 | 1770.556 | 1766.962 | 1761.370 | 1760.024 | 1767.073 | 0.301 |

由表 2 中数据可知，氯霉素标准溶液（浓度为 100μg/mL）连续进样 6 针重复性测试，保留时间的 RSD 为 0.143%，峰面积的 RSD 为 0.301%，具有良好的定性定量重复性。

6.2 仪器灵敏度测试

\*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。  
\*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

灵敏度测试的谱图如图 3 所示, 计算结果见表 3。

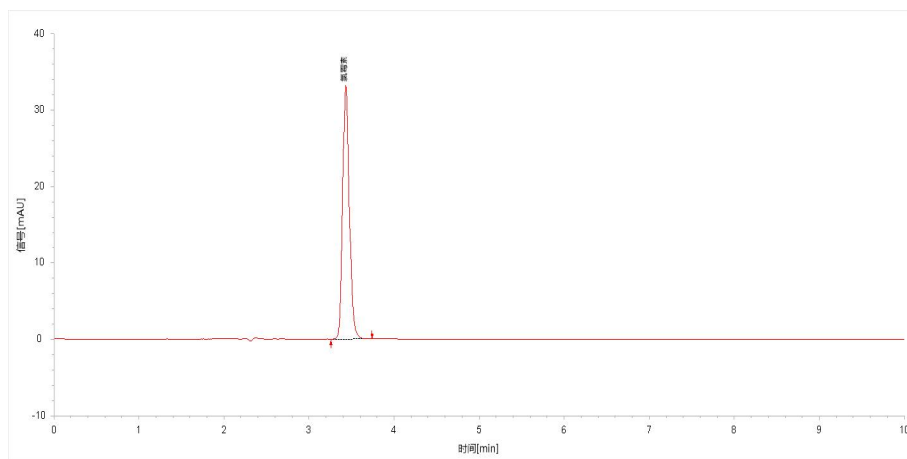


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

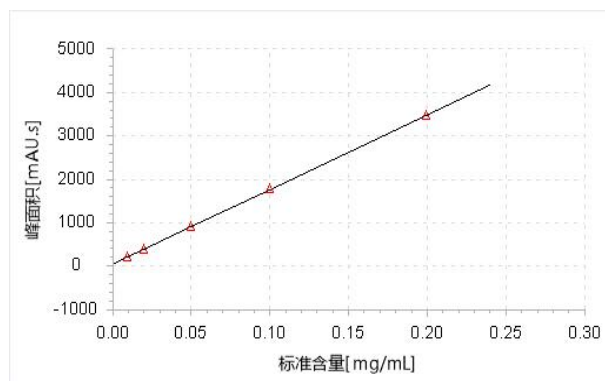
| 目标物 | 浓度<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 峰高<br>(mAU) | 噪声<br>(mAU) | S/N    | LOD<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | LOQ<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-----|----------------------------|-------------|-------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| 氯霉素 | 10.0                       | 33.186      | 0.016       | 2074.1 | 0.014                       | 0.048                       |

通过计算, 氯霉素的仪器检出限为  $0.014 \mu\text{g/mL}$ , 仪器定量限为  $0.048 \mu\text{g/mL}$ 。

### 6.3 含量测定

#### 6.3.1 校准曲线

按照上述色谱条件 (5.3) 进行采集, 将氯霉素系列标准工作液上机测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线, 线性方程和确定系数如图 4 所示。由图 4 可知, 氯霉素在测定浓度范围内呈现良好的线性关系, 确定系数  $R^2$  在 0.999 以上。氯霉素系列标准工作液叠加的色谱图如图 5 所示。



---

方程式  $y=17193.17485*x+24.15113$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R<sup>2</sup>) 0.9998

---

图 4 氯霉素的校准曲线

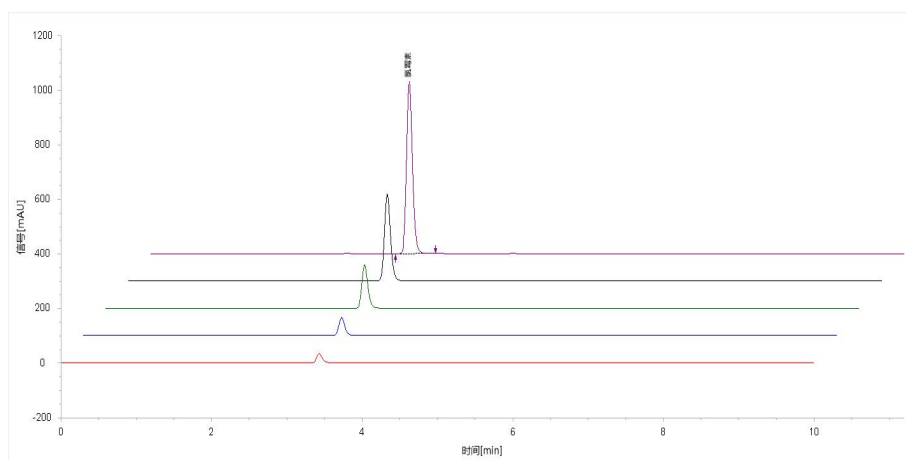


图 5 氯霉素系列标准工作液叠加色谱图

### 6.3.2 含量测定

按照步骤 5.2 对市售氯霉素片进行处理。依据公式 (1) 进行计算, 氯霉素片样品的色谱图如图 6 所示。

$$\omega = \frac{C \times V}{m \times 10^6} \times 100 \quad \text{----公式 (1)}$$

式中:  $\omega$ ---为试样中氯霉素的含量, 单位为百分数 (%);

$C$ ---为通过校准曲线得到的试样中氯霉素的浓度, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$V$ ---为试样的定容体积, 单位为毫升 (mL);

$m$ ---为试样的质量, 单位为克 (g);

$10^6$  和 100---为换算系数。

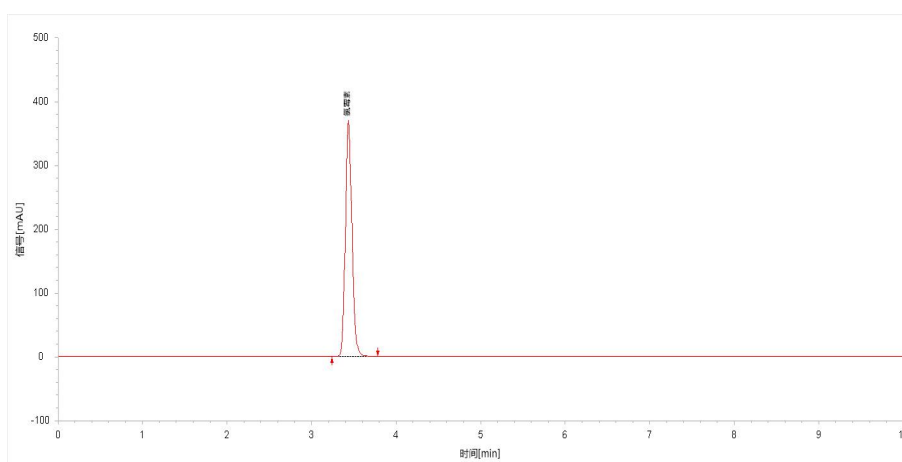


图 6 氯霉素片样品的色谱图

由氯霉素校准曲线计算氯霉素片样品中氯霉素的含量, 该样品中氯霉素的含量为 79.3%。

## 7 结论

通过对氯霉素的分离度、重复性、灵敏度、线性的测试以及对氯霉素片样品中氯霉素的含量进行测定, 实验结果表明, 氯霉素的理论塔板数为 9013, 拖尾因子为 1.24, 具有良好的峰形; 氯霉素标准溶液连续进样 6 针, 保留时间的 RSD 为 0.143%, 峰面积的 RSD 为 0.749%, 具有良好的定性定量重复性; 灵敏度测试中, 氯霉素的仪器检出限为  $0.014\mu\text{g/mL}$ , 仪器定量限为  $0.048\mu\text{g/mL}$ ; 氯霉素在测定浓度范围内具有良好的线性关系, 确定系数  $R^2$  为 0.9998; 对样品进行测试, 市售氯霉素片的含量为 79.3%。因此, Wooking K2025 可以

满足市售氯霉素片中氯霉素含量的测定需求。

# 附 1: 仪器配置清单

| 序号             | 单元   |
|----------------|--|
| K2025 二元高压梯度系统 |  |
| A)             | <u>Pump Unit 泵单元</u>                               |
| 1              | 62MPa 二元高压输液泵（内置溶剂托盘）                              |
| 2              | 流动相瓶（肖特瓶，1L）                                       |
| 3              | 脱气机  |
| 4              | 四通道溶剂切换阀   |
| 5              | 自动在线清洗系统   |
| B)             | <u>Sample Injector 进样器</u>                         |
| 1              | 自动进样器  |
| 2              | 样品瓶（2mL，含瓶盖）                                       |
| 3              | 脱气组件   |
| 4              | 100μL 定量环  |
| C)             | <u>Column Oven 柱温箱</u>                             |
| 1              | 色谱柱恒温箱（室温以下 10℃至 85℃）                              |
| 2              | 色谱柱: Kromasil 100-5-C <sub>18</sub> 4.6×250mm, 5μm |
| D)             | <u>Detector 检测器</u>                                |
| 1              | 紫外-可见光检测器  |
| E)             | <u>Workstation 工作站</u>                             |
| 1              | Wookinglab（中文版）                                    |

附 2: 悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)



报告人: 张帆

联系方式: 15120069384