



# 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<sub>18</sub>色谱柱（4.6×250mm, 5μm），流速为 1.0mL/min，柱温为 30°C，进样量为 10μL，  
检测器为紫外-可见光检测器，波长为 277nm。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 0.014μg/mL，仪器定量  
限为 0.048μg/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<sup>2</sup> 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： $C_{18}$  4.6×250mm, 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。

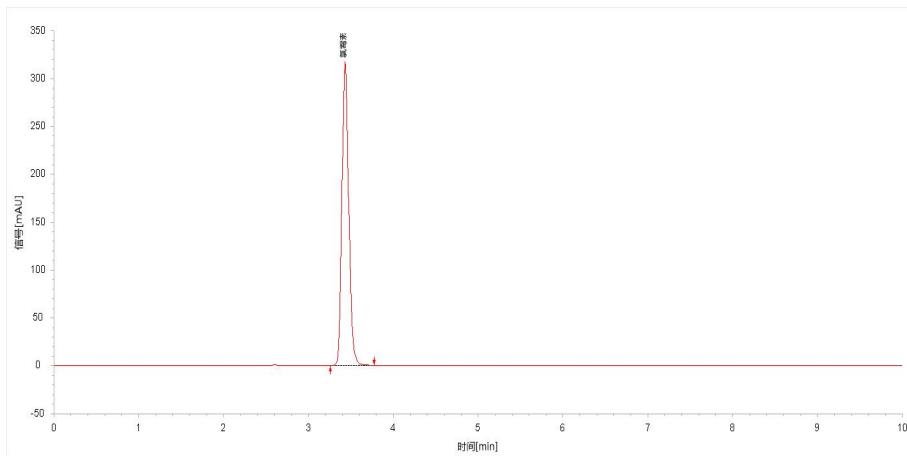


图 1 氯霉素标准溶液（浓度为 100μg/mL）的色谱图

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 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	对称/拖尾因子
氯霉素	3.433	1774.217	317.155	9013	1.24

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 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）连续进样 6 针，6 针叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

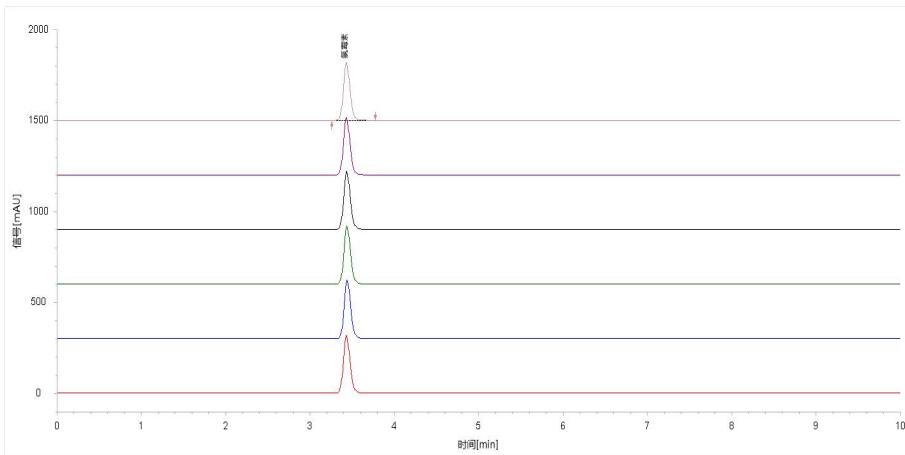


图 2 氯霉素标准溶液（浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）连续进样 6 针叠加的色谱图

表 2 氯霉素标准溶液（浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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 (min)	3.433	3.442	3.442	3.442	3.433	3.433	3.438	0.143
	峰面积 (mA.u.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 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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

灵敏度测试的谱图如图 3 所示，计算结果见表 3。

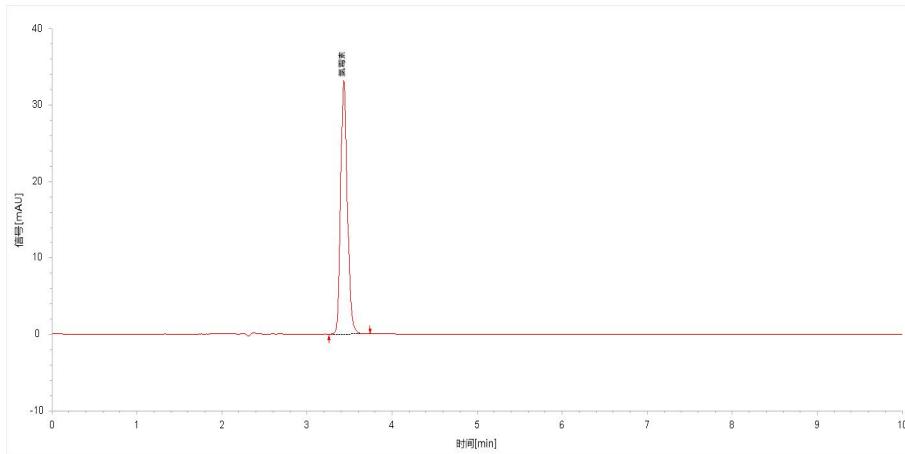


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

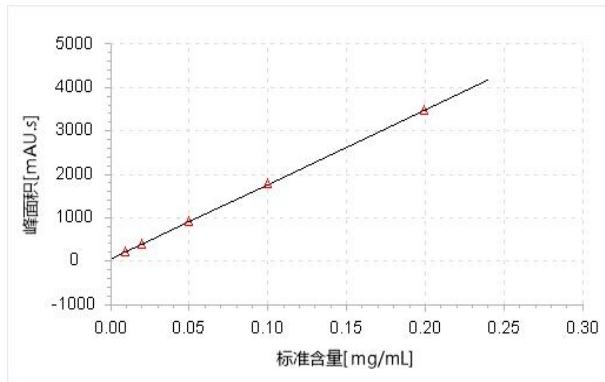
目标物	浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
氯霉素	10.0	33.186	0.016	2074.1	0.014	0.048

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( $R^2$ ) 0.9998

图 4 氯霉素的校准曲线

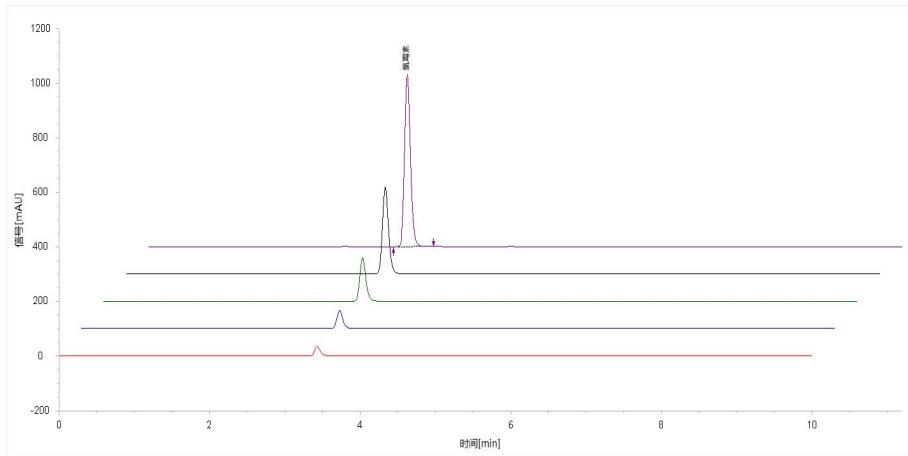


图 5 氯霉素系列标准工作液叠加色谱图

### 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。

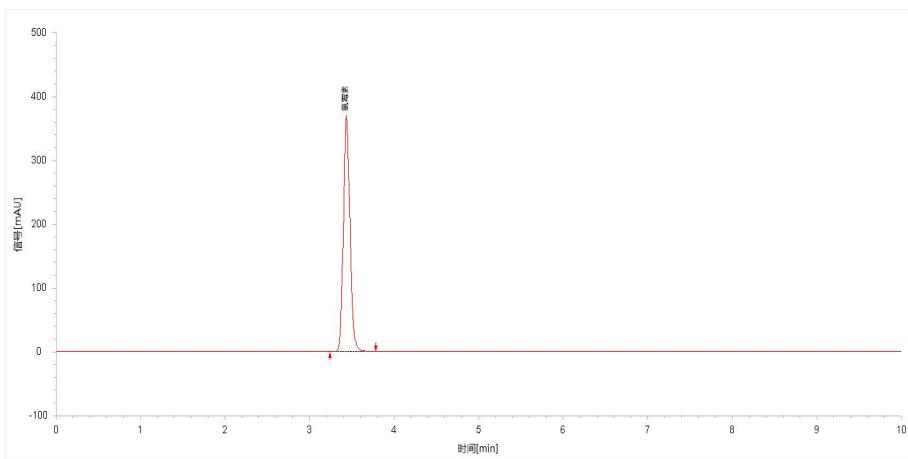


图 6 氯霉素片样品的色谱图

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

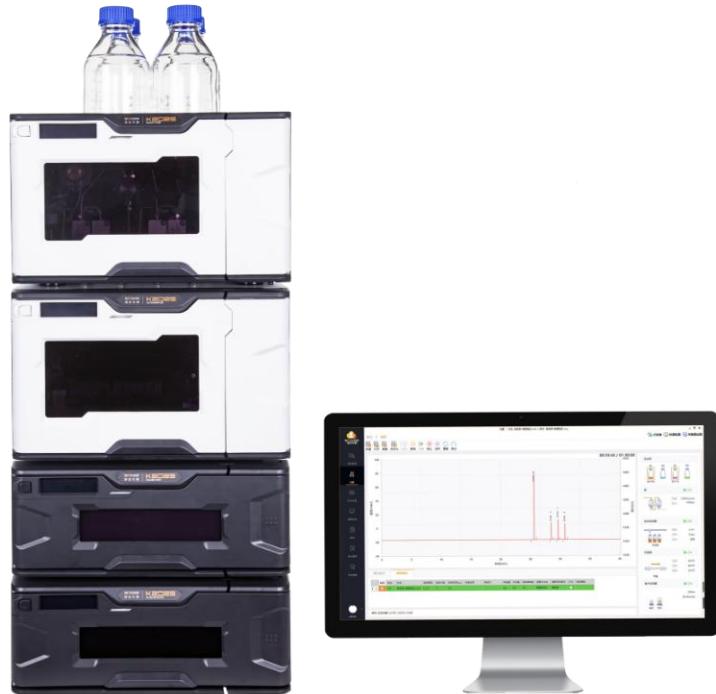


满足市售氯霉素片中氯霉素含量的测定需求。

## 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°C 至 85°C）
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