

高效液相色谱法测定氟苯尼考粉中氟苯尼考的含量

张佳佳, 王惠玉

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 济南 250104)

摘要: 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定氟苯尼考粉中氟苯尼考的含量。色谱条件: 色谱柱为 C₁₈ 色谱柱 (4.6×250mm, 5μm), 流速为 1.0mL/min, 柱温为 25°C, 进样量为 10μL, 检测波长为 224nm。实验结果: 甲砒霉素峰与氟苯尼考峰的分度为 18.85; 氟苯尼考峰的理论塔板数为 16754; 重复性测试中, 将氟苯尼考标准溶液连续进样 7 针, 保留时间的 RSD 为 0.000%, 峰面积的 RSD 为 0.119%; 灵敏度测试中, 氟苯尼考的仪器检出限为 0.029μg/mL, 仪器定量限为 0.096μg/mL; 氟苯尼考在测定浓度范围内具有良好的线性关系, 确定系数 R² 为 0.9999; 对氟苯尼考粉进行含量测定, 其氟苯尼考的含量为 22.9%, 加标回收率为 96.4%。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪满足《中国兽药典 (2020 年版)》中氟苯尼考粉中氟苯尼考含量测定的需求。

关键词: 氟苯尼考粉; 氟苯尼考

氟苯尼考粉为白色或类白色粉末, 属于酰胺醇类抗生素, 为《中国兽药典 (2020 年版)》一部中收录的品种, 用于巴氏杆菌和大肠埃希菌感染。

1 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

乙腈: 色谱纯;

冰醋酸: 优级纯;

流动相: 乙腈-水-冰醋酸=100:197:3;

氟苯尼考对照品: 纯度为 99.5%;

甲砒霉素对照品: 纯度为 99.0%;

0.22μm 微孔有机滤膜。

2 仪器与设备

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;

分析天平: 精确到 0.0001g;

涡旋振荡器；

容量瓶：10mL、25mL，棕色带刻度。

3 测定步骤

3.1 溶液配制

3.1.1 氟苯尼考标准储备液的配制：精密称取氟苯尼考对照品（3.5）约10mg，置于10mL棕色容量瓶中，用流动相（3.4）溶解并定容至刻度，摇匀，即得氟苯尼考浓度为885.550 μ g/mL的标准储备液；

3.1.2 甲砒霉素标准储备液的配制：精密称取甲砒霉素对照品（3.6）约10mg，置于10mL棕色容量瓶中，用流动相（3.4）溶解并定容至刻度，摇匀，即得甲砒霉素浓度为1128.600 μ g/mL的标准储备液；

3.1.3 系统适用性溶液：准确吸取氟苯尼考标准储备液（5.1.1）和甲砒霉素标准储备液（5.1.2）各适量，用流动相（3.4）稀释，制得氟苯尼考和甲砒霉素浓度分别为50 μ g/mL和30 μ g/mL的系统适用性溶液；

3.1.4 氟苯尼考标准工作液的配制：吸取氟苯尼考标准储备液（5.1.1）适量，用流动相（3.4）稀释，制得氟苯尼考浓度依次为5.535 μ g/mL、11.069 μ g/mL、22.139 μ g/mL、44.278 μ g/mL、88.555 μ g/mL和177.110 μ g/mL的系列标准工作液。

3.2 样品前处理

取氟苯尼考粉适量（约相当于氟苯尼考25mg），精密称定，置于25mL容量瓶中，用流动相（3.4）溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过；精密量取续滤液适量，用流动相（3.4）稀释至适当浓度，供高效液相色谱仪测定。

3.3 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，4.6 \times 250mm，5 μ m 或者相当的色谱柱；
- b) 流动相：详见 3.4；
- c) 流速：1.0mL/min；
- d) 柱温：25 $^{\circ}$ C；
- e) 检测器：紫外检测器，检测波长：224nm；
- f) 进样量：10 μ L。

4 结果

4.1 重复性测试

按照色谱条件（5.3）进行采集，系统适用性溶液的色谱图如图 1 所示，积分结果如表 1 所示。

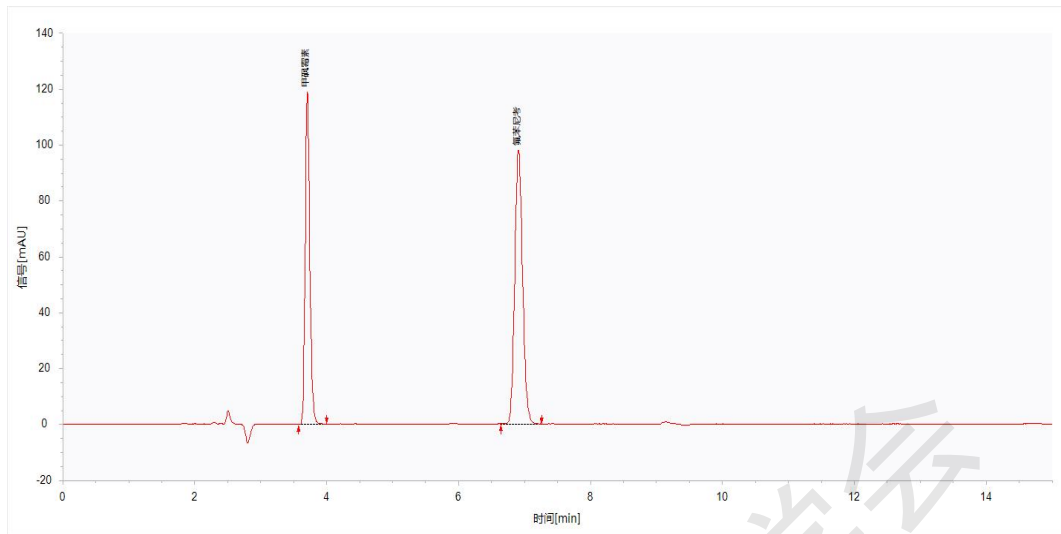


图 1 系统适用性溶液的色谱图

表 1 系统适用性溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
甲砒霉素	3.708	585.342	119.031	13712	-	1.25
氟苯尼考	6.917	802.998	98.038	16754	18.85	1.10

由表 1 中数据可知，甲砒霉素峰与氟苯尼考峰的分度为 18.85，满足《中国兽药典（2020 年版）》中规定的甲砒霉素峰与氟苯尼考峰的分度应大于 4.0 的要求；氟苯尼考峰的理论塔板数为 16754，满足《中国兽药典（2020 年版）》中规定的理论塔板数按氟苯尼考峰计算应不低于 2500 的要求。

将氟苯尼考标准溶液（浓度为 44.278 $\mu\text{g/mL}$ ）连续进样 7 针，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

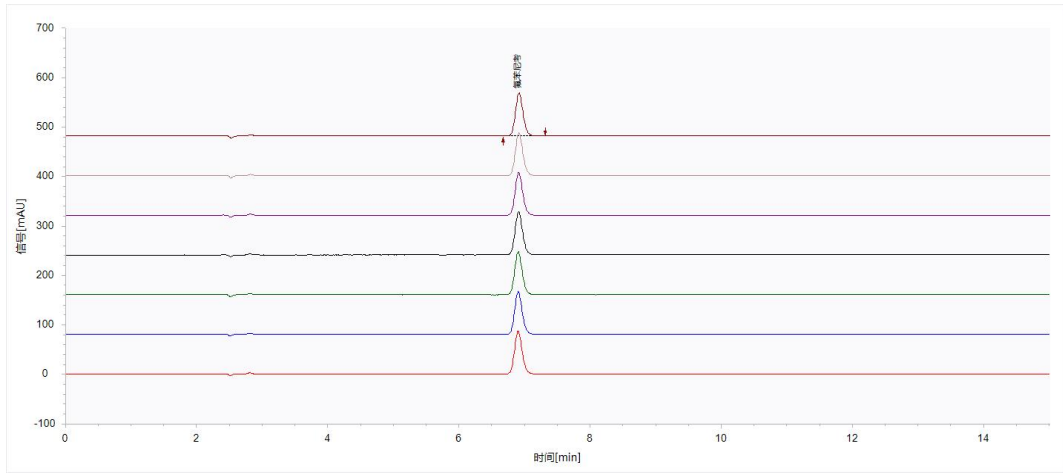


图2 氟苯尼考标准溶液连续进样7针叠加的色谱图

表2 氟苯尼考标准溶液进样7针重复性数据统计

目标物	标准品	1	2	3	4	5	6	7	均值	RSD %
氟苯尼考	保留时 间	6.908	6.908	6.908	6.908	6.908	6.908	6.908	6.908	0.00 0
	峰面积	710.7	709.7	711.7	710.2	711.6	709.6	710.8	710.6	0.119
		14	95	66	42	67	33	91	73	

连续进样7针进行重复性测试，氟苯尼考保留时间的RSD为0.000%，峰面积的RSD为0.119%，具有良好的定性定量重复性。

4.2 仪器灵敏度测试

仪器灵敏度测试的谱图如图3所示，计算结果见表3。

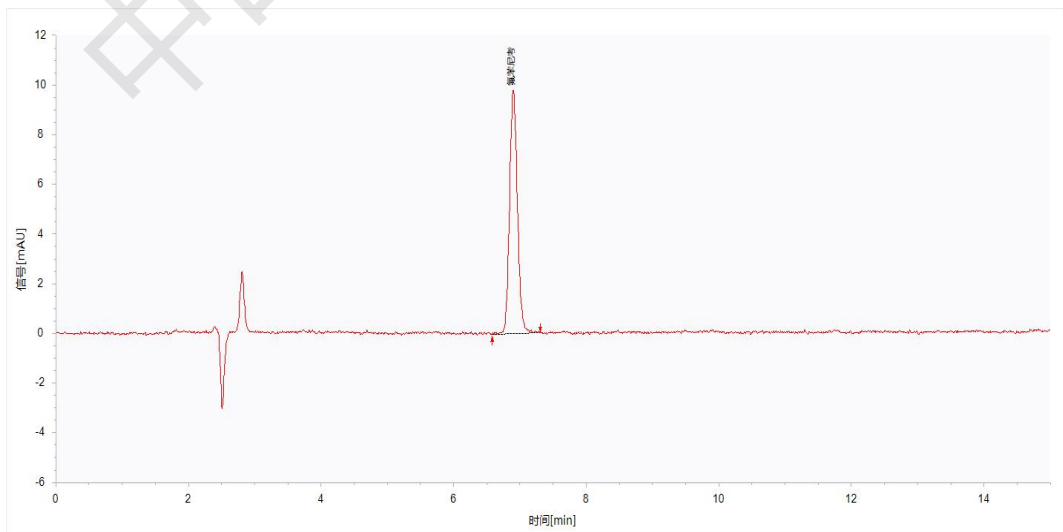


图3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

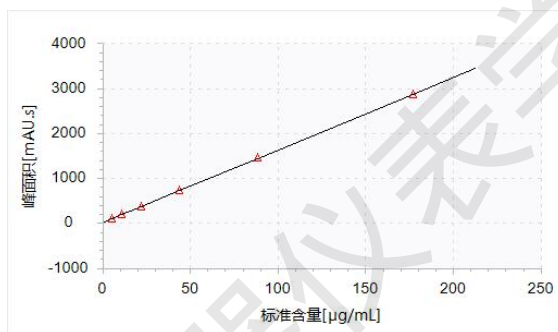
目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
氟苯尼考	5.535	9.813	0.017	577.24	0.029	0.096

通过计算，氟苯尼考的仪器检出限为 $0.029\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 $0.096\mu\text{g/mL}$ 。

4.3 含量测定

4.3.1 校准曲线

按照色谱条件（5.3），将氟苯尼考系列标准工作液（5.1.4）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。



方程式 $Y=16.14600*X+2.36485$

相关系数(R) 0.9999

确定系数(R^2) 0.9999

图 4 氟苯尼考的校准曲线

由图 4 可知，氟苯尼考在测定浓度范围内呈现良好的线性关系，确定系数 R^2 为 0.9999。

氟苯尼考系列标准工作液叠加的色谱图如图 5 所示。

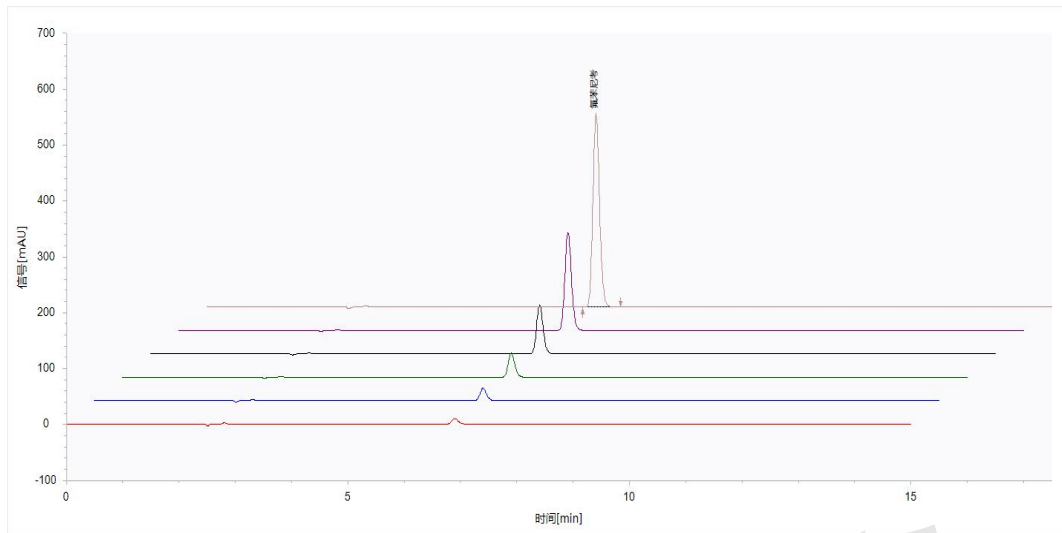


图 5 氟苯尼考系列标准工作液叠加的色谱图

4.3.2 含量测定

以氟苯尼考粉作为试样，按照流程（5.2）对其进行处理，并进行加标回收实验。依据公式（1）计算氟苯尼考粉中氟苯尼考的含量。

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

式中： ω ----为试样中氟苯尼考的含量，单位为百分数（%）；

C ----为通过校准曲线得到的试样中氟苯尼考的浓度，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 、 100 ----为换算系数。

氟苯尼考粉试样的色谱图及试样加标的色谱图如图 6 及图 7 所示。

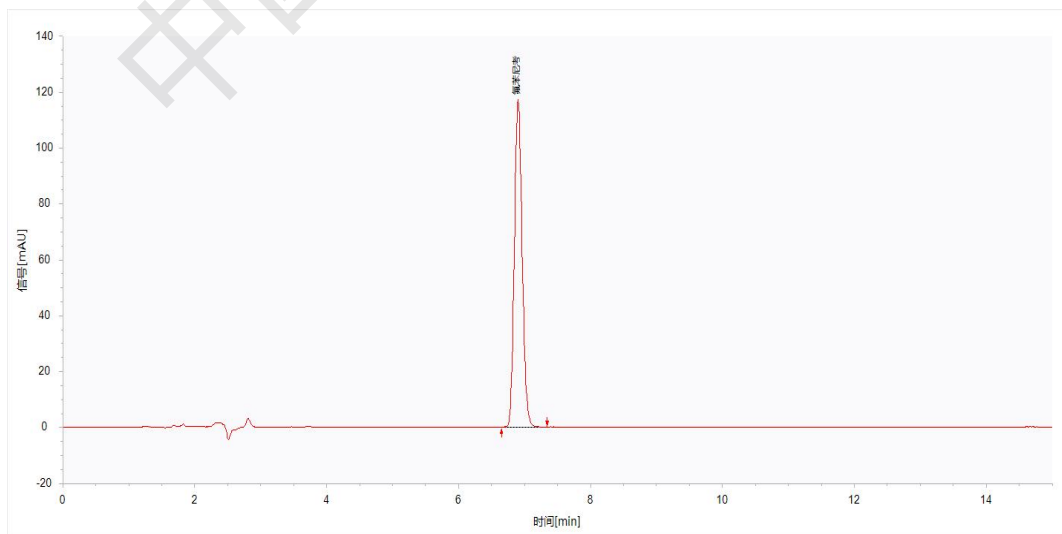


图 6 氟苯尼考粉的色谱图

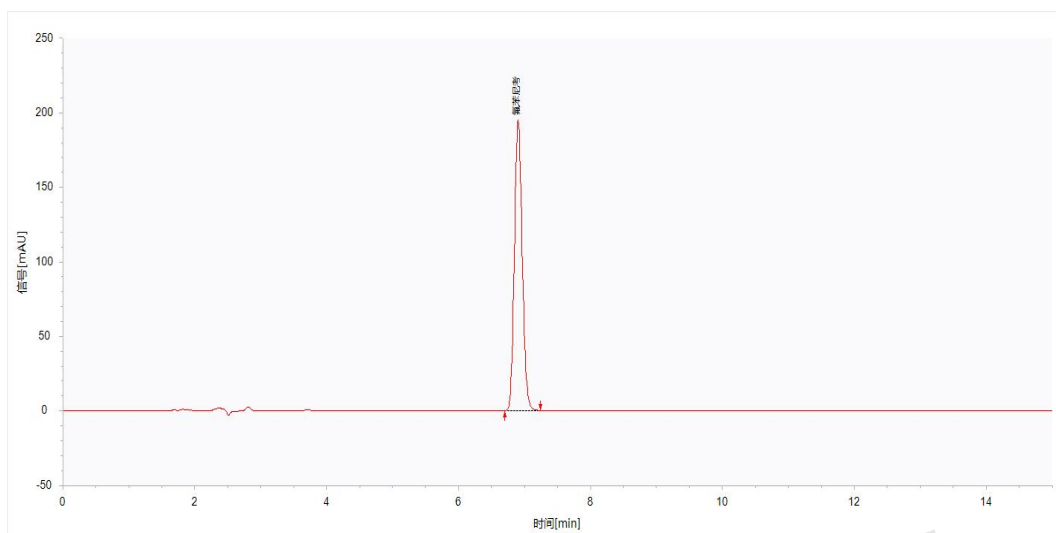


图 7 氟苯尼考粉加标的色谱图

依据公式(1)进行计算, 氟苯尼考粉中氟苯尼考的含量为 22.9%, 加标回收率为 96.4%。

5 结论

通过对氟苯尼考的理论塔板数、分离度、重复性、灵敏度、线性的测试以及对氟苯尼考粉中氟苯尼考的含量进行测定, 实验结果: 氟苯尼考峰的理论塔板数为 16754, 满足《中国兽药典(2020年版)》中规定的理论塔板数按氟苯尼考峰计算应不低于 2500 的要求; 甲砒霉素峰与氟苯尼考峰的分度为 18.85, 满足《中国兽药典(2020年版)》中规定的甲砒霉素峰与氟苯尼考峰的分度应大于 4.0 的要求; 重复性测试中, 将氟苯尼考标准溶液连续进样 7 针, 保留时间的 RSD 为 0.000%, 峰面积的 RSD 为 0.119%, 具有良好的定性定量重复性; 灵敏度测试中, 氟苯尼考的仪器检出限为 0.029 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 仪器定量限为 0.096 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 氟苯尼考在测定浓度范围内具有良好的线性关系, 确定系数 R^2 为 0.9999; 对氟苯尼考粉进行含量测定, 其氟苯尼考的含量为 22.9%, 加标回收率为 96.4%。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪满足《中国兽药典(2020年版)》中氟苯尼考粉中氟苯尼考含量测定的需求。

附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<i>Pump Unit</i> 泵单元
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	100 μ L 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 ₁₈ 4.6 \times 250mm, 5 μ m
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)

