

# T/GDNB

## 广东省农业标准化协会团体标准

T/GDNB XXXX—2023

### 兽药产品中 4 种氨基糖苷类兽药含量的同时测定 高效液相色谱-蒸发光散射法

Simultaneous determination of four aminoglycosides in veterinary drug products by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering method

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

广东省农业标准化协会 发布



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省农业标准化协会提出并归口。

本文件起草单位：广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所、华南农业大学

本文件主要起草人：李亚菲、贺利民、



# 兽药产品中 4 种氨基糖苷类兽药含量的同时测定

## 高效液相色谱-蒸发光散射法

### 1 范围

本文件规定了氨基糖苷类兽药产品中主成分含量检测的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于氨基糖苷类兽药产品中（大观霉素、卡那霉素、安普霉素、新霉素）主成分含量的检测。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

### 4 检测原理

采用高效液相色谱，在选定的工作条件下，通过 Acclaim AmG C<sub>18</sub> 色谱柱分离样品溶液中多种兽药，用蒸发光散射检测器检测，外标法定量，实现 4 种氨基糖苷类药物的同时分析，测定主成分含量的同时监测未标示物的添加。

### 5 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯。

#### 5.1 试剂

5.1.1 水：符合 GB/T 6682-2008 规定的一级水指标。

5.1.2 甲醇 (CH<sub>3</sub>OH)：色谱纯；CAS 号：67-56-1。

5.1.3 三氟乙酸 (C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)：CAS 号：76-05-1。

#### 5.2 溶液配制

5.2.1 三氟乙酸的配制：准确量取三氟乙酸 3.8 mL，用超纯水定容至 1 L。充分混匀后即得浓度为 0.05 mol/L 的三氟乙酸溶液。

### 5.3 对照品

5.3.1 卡那霉素对照品：CAS 号：8063-07-8，纯度 $\geq 95.4$ ，见附录 A。

5.3.2 安普霉素对照品：CAS 号：37321-09-8，纯度 $\geq 95.0$ ，见附录 A。

5.3.3 大观霉素对照品：CAS 号：1695-77-8，纯度 $\geq 95.5$ ，见附录 A。

5.3.4 新霉素对照品：CAS 号：1404-04-2，纯度 $\geq 90.0$ ，见附录 A。

### 5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准溶液的配制：准确称取上述 4 种氨基糖苷类抗生素对照品约 10 mg，分别置于 10 mL 容量瓶中，依次用超纯水溶解并定容，配制成浓度为 5 mg/mL 的标准储备溶液，置于-20 °C 下保存。

5.4.2 混合标准工作溶液的配制：准确移取 1 mL 上述 4 种药物 5 mg/mL 的标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中，超纯水定容，配制成浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  混合标准工作液，于 4 °C 冷藏保存。根据实际需要用超纯水稀释配制成一系列浓度，现配现用。

### 5.5 材料

5.5.1 滤膜：0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜。

## 6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：Waters 2695 型高效液相色谱仪配备 2424 蒸发光散射检测器。

6.2 色谱柱：Acclaim AmG C<sub>18</sub> 柱，柱长 150 mm，柱内径 4.6 mm，5  $\mu\text{m}$  粒径，或等同性能者。

6.3 分析天平：感量 0.1 mg。

6.4 容量瓶：1000 mL、100 mL、10 mL。

6.5 微量移液器：20-200  $\mu\text{L}$ 、100-1000  $\mu\text{L}$  量程。

## 7 测定步骤

### 7.1 试样提取

粉剂和预混剂样品：称取大观霉素、卡那霉素、安普霉素和新霉素试品适量（按标示含量折算约含主成分 100 mg），于 100 mL 容量瓶中，用超纯水溶解并定容，混匀、过滤，配制成浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液，再用初始流动相比比例稀释配制成浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的混合供试品溶液。

注射液样品：准确移试品溶液溶液适量体积，置于 10 mL 容量瓶中，以超纯水溶解并定容，配制成浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液，再用初始流动相比比例稀释配制成浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的混合供试品溶液。

### 7.2 仪器参考条件

#### 7.2.1 液相色谱参考条件

7.2.1.1 色谱柱：Acclaim AmG C<sub>18</sub> 柱，柱长 150 mm，柱内径 4.6 mm，5 μm 粒径，或等同性能者。

7.2.1.2 流动相：A 为：0.05 mol/L 三氟乙酸水，B 为：甲醇。

7.2.1.3 洗脱程序：梯度洗脱（梯度洗脱程序见表 1）。

7.2.1.4 流速：0.5 mL/min。

7.2.1.5 柱温：25 °C。

7.2.1.6 进样量：10 μL。

表 1 梯度洗脱程序表

时间 (min)	A 相 (%)	B 相 (%)	变化曲线
0	99	1	6
3	95	5	6
7	95	5	6
10	99	1	6

## 7.2.2 ELSD 参数

7.2.1.1 雾化气体压力 (Nebulizer gas pressure)：30 psi。

7.2.1.2 漂移管温度 (Drift-tube temperature)：50 °C。

7.2.1.3 喷雾器模式 (Impactor mode)：加热。

7.2.1.4 雾化器温度 (nebulizer temperature)：36 °C。

7.2.1.5 动力级别：60%。

7.2.1.6 增益 (Gain)：50。

7.2.1.7 采集频率：1。

7.2.1.8 时间常数：慢速。

## 7.3 色谱分析条件标准工作曲线测定

分别准确移取混合标准储备液，用初始流动相稀释为浓度为 25, 50, 75, 100, 150, 200 μg/mL 的混合标准工作液，按上述色谱条件进样。分别以药物的浓度的对数值为横坐标 x，药物峰面积的对数为纵坐标 y 作图，获得标准曲线方程及相关系数 (r)。如果 r 大于 0.999 表明该方法在药物浓度在所选浓度范围内线性良好。

## 7.4 试样测定

将供试品溶液（见 7.1）按色谱条件（见 7.2）进行测定，记录色谱峰的保留时间和峰面积，由色谱峰面积从标准工作曲线上计算出相应的 4 种兽药浓度。供试品溶液 4 种兽药的响应值应在仪器测定的线性范围内，否则应重新调整浓度后测定。本方法 4 种氨基糖苷类兽药对照品的典型高效液相色谱图见附录 B。

## 7.5 平行试验

按以上步骤，对同一试样进行平行试验测定。

## 8 结果计算

试样中氨基糖苷类药物主成分的含量  $X$  ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )，按公式 (1) 计算：

$$X = \frac{C \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$X$ —试样中氨基糖苷类药物主成分的含量， $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；

$C$ —试样溶液中相应的氨基糖苷类药物的浓度， $\text{ng}/\text{mL}$ ；

$V$ —提取溶剂的体积， $\text{mL}$ ；

$m$ —供试试料的质量， $\text{g}$ 。

注：计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算数平均值表示，保留三位有效数字。

## 9 检测方法的准确度和精密度

### 9.1 准确度

在实验浓度  $0.25 \text{ mg}/\text{mL} \sim 1 \text{ mg}/\text{mL}$  内，4 种氨基糖苷类药物的平均回收率在  $91.0\% \sim 109.0\%$  之间。

### 9.2 精密度

本方法的相对标准偏差  $\leq 5.3\%$ 。

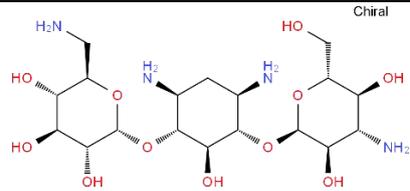
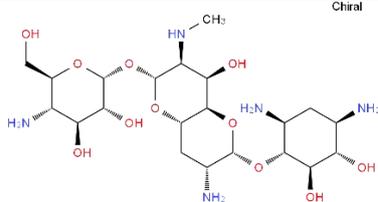
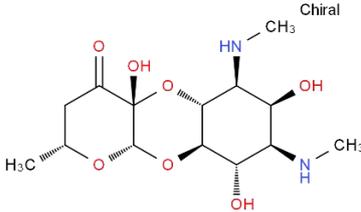
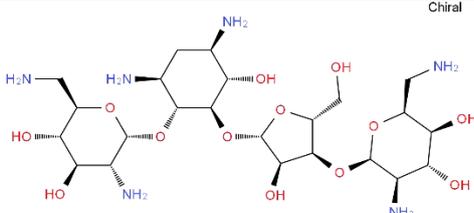
## 附录 A

(资料性)

## 4 种氨基糖苷类兽药的分子式、相对分子质量和化学结构式

4 种氨基糖苷类兽药的分子式、相对分子质量和化学结构式，见表 A。

表 A 4 种氨基糖苷类兽药的分子式、相对分子质量和化学结构式

中文名 (英文名)	CAS 号	分子式	相对分子质量	化学结构式
卡那霉素 (Kanamycin)	8063-07-8	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	484.499	
安普霉素 (Apramycin)	37321-09-8	$C_{21}H_{41}N_5O_{11}$	539.583	
大观霉素 (Spectinomycin)	1695-77-8	$C_{14}H_{24}N_2O_7$	332.35	
新霉素 (Neomycin)	1404-04-2	$C_{23}H_{46}N_6O_{13}$	908.879	

## 附录 B

(资料性)

### 4 种氨基糖苷类兽药对照品的典型高效液相色谱图

4 种氨基糖苷类兽药对照品的典型高效液相色谱图，见图 B。

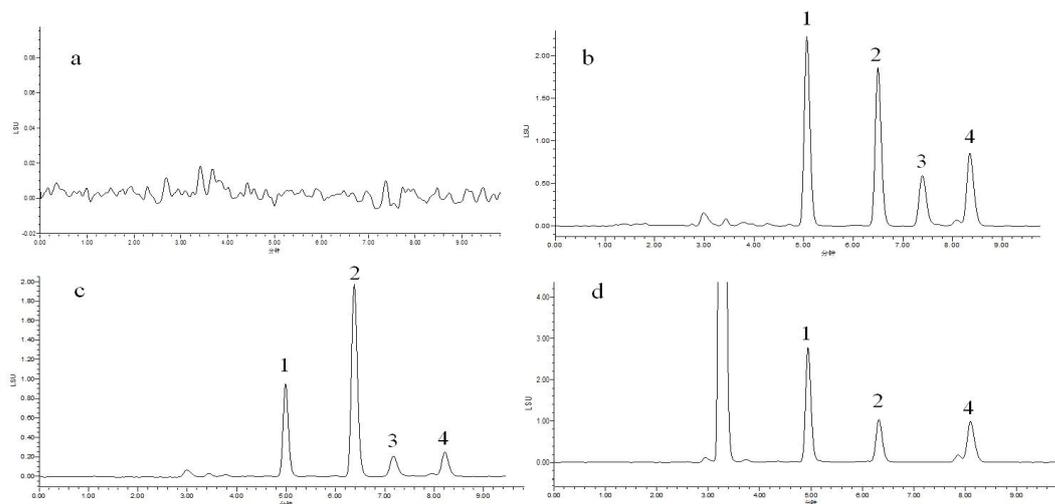


图 B 4 种氨基糖苷类兽药对照品的典型高效液相色谱图

注：a、b、c、d 分别代表：空白对照溶液；混合标准溶液（100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）；硫酸安普霉素注射液中浓度添加混合标准溶液样品溶液（100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）；硫酸卡那霉素中浓度添加安普霉素和新霉素原料药样品溶液（100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。色谱峰 1 4 分别为：卡那霉素；安普霉素；大观霉素；新霉素。