

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 8 种药物含量的同时测定 高效液相色谱-二极管阵列法

Simultaneous Determination of Eight Drugs in Veterinary Preparations by
High Performance Liquid Chromatography 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：华南农业大学、广东省农业科学院农业质量标准与监测技术研究所、

本文件主要起草人：贺利民、李亚菲、

兽药产品中 8 种药物含量的同时测定

高效液相色谱-二极管阵列法

1 范围

本文件规定了用高效液相色谱二极管阵列法同时测定兽药产品中8种兽药含量的检测方法。

本文件适用于水剂、可溶性粉和预混剂等兽药制剂中磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑、甲氧苄啶、恩诺沙星、环丙沙星、泰乐菌素、替米考星的检测。

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 6682-2008 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，在选定的色谱条件下，通过 C₁₈ 色谱柱分离兽药制剂中主成分，用二极管阵列检测器同时测定 8 种兽药，外标法定量。

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 (CH₃OH)：色谱纯；CAS 号：67-56-1。

5.1.3 乙腈 (CH₃CN)：色谱纯；CAS 号：75-05-8。

5.1.4 磷酸 (H₃PO₄)：CAS 号：7664-38-2。

5.1.5 磷酸二氢钾 (K₂HPO₄)：CAS 号：7778-77-0。

5.1.6 三乙胺 (C₆H₁₅N)：CAS 号：121-44-8。

5.2 溶液配制

5.2.1 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 3.0) 配制：准确称取磷酸二氢钾约 1.36 g，加入 4 mL 磷酸，用超纯水溶解定容至 1 L，并用三乙胺溶液调 pH 至 3.0，过 0.45 μm 滤膜。

5.3 对照品

- 5.3.1 甲氧苄啶对照品：CAS 号：738-70-5，纯度 $\geq 92.6\%$ ，见附录 A。
- 5.3.2 磺胺嘧啶对照品：CAS 号：68-35-9，纯度 $\geq 84.7\%$ ，见附录 A。
- 5.3.3 磺胺间甲氧嘧啶对照品：CAS 号：1220-83-3，纯度 $\geq 98.0\%$ ，见附录 A。
- 5.3.4 磺胺甲噁唑对照品：CAS 号：723-46-6，纯度 $\geq 95.0\%$ ，见附录 A。
- 5.3.5 环丙沙星对照品：CAS 号：85721-33-1，纯度 $\geq 99.5\%$ ，见附录 A。
- 5.3.6 恩诺沙星对照品：CAS 号：93106-60-6，纯度 $\geq 98.5\%$ ，见附录 A。
- 5.3.7 替米考星对照品：CAS 号：108050-54-0，纯度 $\geq 98.5\%$ ，见附录 A。
- 5.3.8 泰乐菌素对照品：CAS 号：1405-53-4，纯度 $\geq 99.0\%$ ，见附录 A。

5.4 标准储备溶液配制

- 5.4.1 标准储备溶液的配制：分别称取上述 8 种药物对照品 50 mg，精密称定，分别置于 10 mL 容量瓶中，使用甲醇溶解，定容、摇匀，配制成浓度均为 5 mg/mL 的标准储备溶液，储存在 -20°C ，保存 3 个月。
- 5.4.2 混合标准工作溶液的配制：分别准确量取 1 mL 上述标准储备液，于 10 mL 的容量瓶中，使用甲醇溶解并定容，配制成浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准工作液， 4°C 下冷藏保存。使用前以流动相稀释配制成系列浓度的混合标准工作溶液，现配现用。

5.5 材料

- 5.5.1 滤膜：0.45 μm 有机滤膜。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪：配二极管阵列检测器。
- 6.2 色谱柱：HPLCONE C_{18} 柱，柱长 250 mm，柱内径 4.6 mm，3 μm 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 μL 、100-1000 μL 量程。。

7 测定步骤

7.1 试样提取

7.1.1 粉剂和预混剂

称取含上述 8 种兽药成分的供试品适量（按照标示含量折算约含主成分 100 mg），于 100 mL 容量瓶中，使用甲醇溶解并定容，混匀、过滤，配制成浓度约为 1 mg/mL 的供试品溶液。再用初始流动相稀释，制备浓度约为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合供试品溶液。

7.1.2 注射液

分别移取含上述 8 种兽药成分供试品溶液适量体积，于 10 mL 容量瓶中，使用甲醇溶解并定容，逐层稀释，制备成浓度约 1 mg/mL 的供试品溶液。再用初始流动相稀释，配制浓度约为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的混合供试品溶液。

7.2 仪器参考条件

- 7.2.1 色谱柱：HPLCONE C₁₈柱，柱长 250 mm，柱内径 4.6 mm，3 μm 粒径，或等同性能者。
- 7.2.2 流动相：A 为 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 3.0），B 为乙腈。
- 7.2.3 洗脱程序：梯度洗脱，如表 1。
- 7.2.4 流速：1 mL/min。
- 7.2.5 扫描波长：200 nm~300 nm。甲氧苄啶、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶及磺胺甲氧嘧检测波长选择 270 nm；环丙沙星、恩诺沙星、替米考星及泰乐菌素选择 280 nm。
- 7.2.6 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	90	10	6
1	80	20	6
6	80	20	6
8	60	40	6
12	60	40	6
14	40	60	6
16	40	60	6
18	90	10	6
20	90	10	6

7.3 标准工作曲线测定

将 25、50、75、100、150、200 μg/mL 系列浓度混合标准工作溶液按上述色谱条件进样分析。分别以药物的浓度为横坐标 x，药物的峰面积为纵坐标 y 作图，分别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，根据色谱峰面积从标准工作曲线上计算出相应的磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑、甲氧苄啶、恩诺沙星、环丙沙星、泰乐菌素、替米考星等 8 种兽药的浓度。供试品溶液中 8 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 8 种兽药对照品的典型高效液相色谱图见附录 B。

8 结果计算和表述

试样中主成分含量 X，按下式计算：

$$X = \frac{C \times V \times f}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X—试样中主成分的含量，g/g；

C—试样溶液中对应药物的主成分浓度， $\mu\text{g/mL}$ ；

V—提取溶剂的体积，mL；

m—供试试料的质量，mg；

f—稀释倍数。

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 $25\ \mu\text{g/mL}$ ~ $200\ \mu\text{g/mL}$ 添加浓度范围内，磺胺嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑、甲氧苄啶、恩诺沙星、环丙沙星、泰乐菌素、替米考星等 8 种兽药的平均回收率在 80.0%~110.0%之间。

9.2 精密度

本方法相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。

附 录 A
(资料性)

8 种兽药的分子式、相对分子质量和化学结构式

8 种兽药的分子式、相对分子质量和化学结构式，见表 A。

表 A 8 种兽药的分子式、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
甲氧苄啶 (Trimethoprim)	738-70-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290.32	
磺胺嘧啶 (Sulfadiazine)	68-35-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250.28	
磺胺间甲氧嘧啶 (Sulfamonomethoxine)	1220-83-3	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	280.3	
磺胺甲噁唑 (Sulfamethoxazole)	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253.27	
环丙沙星 (Ciprofloxacin)	85721-33-1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331.341	
恩诺沙星 (Enrofloxacin)	93106-60-6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	359.395	
替米考星 (Tilmicosin)	108050-54-0	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	869.133	
泰乐菌素 (Tylosin)	1405-53-4	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916.100	

附 录 B
(资料性)

8 种兽药对照品的典型高效液相色谱图

8 种兽药对照品的典型高效液相色谱图，见图 B。

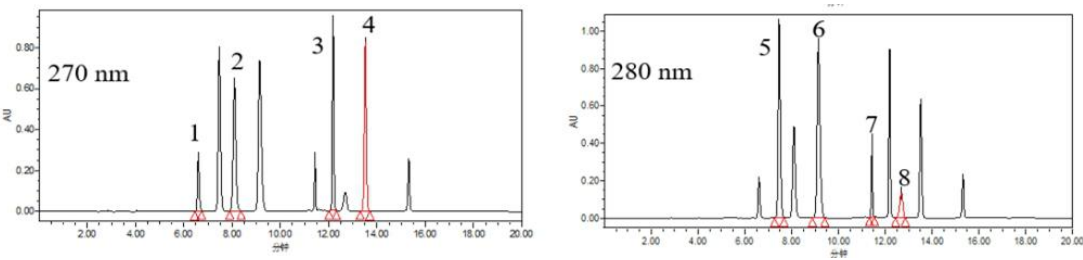


图 B 8 种兽药的典型高效液相色谱图

注：色谱峰 1~8 分别为：磺胺嘧啶；甲氧苄啶；磺胺间甲氧嘧啶；磺胺甲噁唑；环丙沙星；恩诺沙星；替米考星；泰乐菌素。