

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.3.04

HPLC 法测定磷酸替米考星可溶性粉中 替米考星含量的研究

马春芳¹, 李敏¹, 张雯¹, 吴春燕¹, 陈建蓉¹, 邓亚婷¹, 王旗², 余永涛², 杨奇^{1*}

(1. 宁夏回族自治区兽药饲料监察所, 银川 750011; 2. 宁夏大学农学院 银川 750021)

[收稿日期] 2020-07-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 03-0017-08 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立了磷酸替米考星可溶性粉中替米考星含量的 HPLC 测定方法。采用高效液相色谱 (HPLC) 法, 使用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱, 以水: 乙腈: 磷酸二丁胺缓冲液: 四氢呋喃 (805: 115: 25: 55) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 25 ℃。按外标法以峰面积计算含量。在此色谱条件下, 替米考星顺式、反式异构体峰分离度良好, 磷酸替米考星可溶性粉的线性范围为 0.2 ~ 0.8 mg/mL ($R^2 = 0.9998$), 平均回收率为 97.96%, $RSD < 1.0\%$ 。本研究建立的方法分离效果好、精密度高、稳定性好, 可作为磷酸替米考星可溶性粉的质量关键控制指标。

[关键词] 磷酸替米考星可溶性粉; 高效液相色谱法; 含量测定

HPLC Method for Determining Content of Tilmicosin in Tilmicosin Phosphate Soluble Powder

MA Chun-fang¹, LI Min¹, ZHANG Wen¹, WU Chun-yan¹, CHEN Jian-rong¹,
DENG Ya-ting¹, WANG Qi², YU Yong-tao², YANG Qi^{1*}

(1. Ningxia Supervision Institute for Veterinary Drugs and Administration, Yinchuan 750011, China;

2. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Corresponding author: YANG Qi, E-mail: yangqmz@163.com

Abstract: To establish a HPLC method for the determination in tilmicosin phosphate soluble powder, HPLC was used for the column with octadecyl silane bonded silica gel as the filler, and the mobile phase was determined with water: acetonitrile: dibutylamine phosphate solution: tetrahydrofuran (805: 115: 25: 55); The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 280 nm, and the column temperature was 25 ℃ calculating content by peak area according to external standard method. Results showed that under these chromatographic conditions, the separation of cis- and trans- isomers was satisfactory. The linear range of tilmicosin phosphate soluble powder

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目“畜禽产品质量安全评价与监控技术应用研究”(2018BBF02002)

作者简介: 马春芳, 硕士, 助理研究员, 从事兽药质量检验及标准制修订等工作。

通讯作者: 杨奇. E-mail: yangqmz@163.com

was 0.2 ~ 0.8 mg/mL, $R^2 = 0.9998$. The average recovery was 97.96%, $RSD < 1.0\%$. The method established in this study has good separation effect, high precision and good stability, and can be used as a key quality control index for the tilmicodin phosphate soluble powder.

Key words: tilmicodin phosphate soluble powder; high performance liquid chromatography; content determination

磷酸替米考星可溶性粉为磷酸替米考星和无水葡萄糖或乳糖配制而成,有效成分为替米考星,属大环内酯类,畜禽专用广谱抗菌药物^[1],对革兰氏阳性菌和一些革兰氏阴性菌及支原体等有很强的抑菌作用^[2-3],主要用于治疗敏感性细菌引起的消化道、呼吸道疾病^[4-5]。现行《中国兽药典》(2015 版)^[6]对替米考星、替米考星注射液、替米考星预混剂、替米考星溶液等剂型做了详细规定,将高效液相色谱法规定为替米考星含量测定的标准方法,但不同剂型在样品制备和流动相配制上,存在一定的差异。美国兽药典(USP)中收录了替米考星、替米考星注射液的 HPLC 测定方法,与《中国兽药典》(2015 版)中替米考星含量测定方法色谱条件略有不同。现行《兽药质量标准》(2017 版)^[7]对替米考星可溶性粉做了详细规定,其含量测定方法与现行《中国兽药典》(2015 版)中规定的替米考星含量测定方法一致。但上述药典和质量标准中均未收录磷酸替米考星可溶性粉的质量标准,仅农业部 2172 号^[8]、2270 号^[9]、2440 号^[10]、2455 号公告^[11]对磷酸替米考星可溶性粉的质量标准及其检测方法作了规定。4 个公告均采用高效液相色谱法作为检测方法,均规定磷酸替米考星按替米考星含量计,含量应为标示量的 90.0% ~ 110.0%。但 4 个公告中含量测定流动相的比例、供试品及对照品处理方法均不一致,存在检测方法不准确,专属性不强等问题。根据中国兽药典委员会提出的磷酸替米考星可溶性粉中替米考星检测方法修订的要求,本研究参考《美国兽药典》^[12]中替米考星检测标准和《中国兽药典》(2015 版)中替米考星检测标准,结合 4 个公告中收录的磷酸替米考星可溶性粉质量标准及国内其他剂型中替米考星含量测定的研究^[13],对 HPLC 法测定磷酸替米考星可溶性粉中替米考星的含量进行研究及方法学验证,以期为

磷酸替米考星可溶性粉含量检测方法的修订提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 替米考星标准品,中国兽医药品监察所,含量 95.3%,批号 K0311805;磷酸替米考星可溶性粉,规格 10%,山东鲁抗舍里乐药业有限公司高新区分公司,批号 1803001、1803002、1803003;广东温氏大华农生物科技有限公司保健品厂,批号 20180101、20180102、20180103;宁夏泰瑞制药股份有限公司,批号 F83190503;河北维尔利动物药业集团有限公司,批号 18012301、18012302、1802303。

乙腈,购自 Fishow chemical,批号为 172290,色谱级;磷酸,购自天津市科密欧化学试剂有限公司,批号为 20170216,优级纯;四氢呋喃,购自天津市科密欧化学试剂有限公司,批号为 20180206,色谱级;正二丁胺,购自国药集团化学试剂有限公司,批号为 20180303,化学纯;超纯水由德国默克密理博仪器现制。

1.2 仪器 Agilent1100 (配备紫外检测器)、Agilent1260 II 高效液相色谱仪 (配备紫外检测器),购于美国 Agilent 公司;电子天平 (十万分之一) 和 FE28 - pH 计,购于德国梅特勒 - 托利多公司;KQ - 250B 型超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;ZB8/AFK - 3 水分测定仪,购于瑞士万通公司;DZF - 6090 减压干燥箱,购于上海旌派科技有限公司。

1.3 含量测定方法

1.3.1 溶液的制备

1.3.1.1 磷酸二丁胺缓冲液 用移液管量取磷酸 1 mL,用超纯水稀释至 10 mL 制成磷酸溶液;取二丁胺 16.8 mL,加磷酸溶液 70 mL,边加边搅拌,冷却后,用磷酸调节 pH 值至 2.5 ± 0.1 ,加超纯水至 100 mL,摇匀即得。

1.3.1.2 12.5 mol/L 氢氧化钠溶液 称取氢氧化钠 50 g,加少量超纯水快速搅拌使溶解,放置冷却后用超纯水稀释定容至 100 mL,摇匀,即得。

1.3.1.3 稀释液的配制 量取超纯水 900 mL,加入磷酸 5.71 g,用 12.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 2.5 ± 0.1 ,加超纯水至 1000 mL,摇匀,即得。

1.3.1.4 流动相的制备 以水-乙腈-磷酸二丁胺溶液-四氢呋喃(805:115:25:55)为流动相,调 pH 值 2.5 ± 0.1 。

1.3.1.5 储备溶液的制备 称取替米考星标准品 26.23 mg 于 25 mL 容量瓶中,加流动相配制成 1 mg/mL 的储备液,备用。

1.3.1.6 标准品溶液的制备 取替米考星标准品 26.23 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加乙腈 10 mL 超声使溶解,用磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为标准品溶液。

1.3.1.7 供试品溶液的制备 精密称取磷酸替米考星可溶性粉适量(约相当于替米考星 25 mg),置 50 mL 量瓶中,加乙腈 10 mL 超声溶解,用磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

1.3.2 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m),以水-乙腈-磷酸二丁胺溶液-四氢呋喃为流动相;检测波长为 280 nm;替米考星含量测定流速为 1.0 mL/min;理论塔板数按替米考星顺式异构体峰计算应不低于 3000,替米考星的顺式和反式异构体峰的分离度应符合要求。

1.3.3 系统适用性试验 精密称取替米考星标准品 25 mg,置 50 mL 容量瓶中,加乙腈 10 mL,超声使溶解,再用磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。精密量取溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪,连续进样 5 次,记录色谱图。

1.3.4 专属性考察 将配置好的替米考星标准品溶液、供试品溶液、溶剂空白、辅料空白(磷酸溶液、无水葡萄糖、乳糖),按含量测定项下方法精密量取 10 μ L 注入液相色谱仪进行测定,记录色谱图,按外标法以替米考星峰面积计算。

1.3.5 线性考察 取替米考星对照品 52.47 mg,

精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加乙腈 10 mL 溶解,加磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,作为储备液。分别吸取储备液 2、4、5、6、8 mL 于 10 mL 的容量瓶中,分别用磷酸溶液稀释至刻度,摇匀,配制成浓度分别为 0.2、0.4、0.5、0.6、0.8 mg/mL 的溶液。取以上每个浓度的溶液各 10 μ L,分别注入高效液相色谱仪,记录色谱图,以替米考星(顺式+反式)峰面积与对照品浓度做回归曲线。

1.3.6 定量限和检测限 将替米考星储备液逐步稀释,配制成不同浓度标准品溶液,测定相应信噪比,以信噪比 3:1 时的浓度为检测限,信噪比 10:1 时的浓度为定量限。

1.3.7 精密度试验

1.3.7.1 方法精密度 精密称取磷酸替米考星可溶性粉 0.25 g,置 50 mL 容量瓶中,超声使其溶解,制成供试品溶液,称取 6 份依次编号,分别精密量取 10 μ L 注入高效液相色谱仪,记录色谱图,计算 6 次检测的磷酸替米考星可溶性粉中替米考星的含量和相对标准偏差,按《中国兽药典》(2015 版)中规定,待测成分含量 10 % 时,精密度 *RSD* 应 $\leq 1.5\%$ 。

1.3.7.2 仪器精密度 为了确定所用仪器在相同色谱条件下多次测定结果的重现程度。试验选用 Agilent 1100 和 Agilent1260 II 高效液相色谱仪对供试品溶液进行考察,取 10 μ L 标准品溶液分别注入两台高效液相色谱仪,连续进样 5 次,记录色谱图至替米考星色谱保留时间的 2 倍,计算磷酸替米考星可溶性粉中替米考星含量的相对标准偏差。

1.3.8 准确度试验 取磷酸替米考星可溶性粉空白辅料,称取 9 份,分别加入精密称定的替米考星标准品 10、12.5、15 mg 各 3 份,置于 50 mL 容量瓶中,加磷酸溶液适量,加乙腈 10 mL,超声溶解,加磷酸溶液稀释至刻度,制备出浓度分别为 80%、100%、120% 的低、中、高三个浓度水平的溶液,精密量取各溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪,照含量测定法进行测定,记录色谱图,分别计算回收率与标准偏差。

1.3.9 稳定性试验 将磷酸替米考星可溶性粉制

成 50 μg/mL 供试品溶液,在室温下分别放置 0、2、4、6、8、12、16、20、24、36、48 h,采集不同时间段的色谱图,考察供试品溶液变化情况。

1.3.10 耐用性试验 通过改变柱温、流速以及不同品牌的色谱柱对色谱条件进行微调,检测磷酸替米考星可溶性粉在不同色谱条件下含量变化,考察其方法的可行性。

2 结果与分析

表 1 方法系统适用性结果

样品序号	1	2	3	4	5	平均值	RSD/%
理论塔板数(顺式峰)	5792	5793	5797	5792	5790	5793	0.04
分离度	2.31	2.31	2.30	2.31	2.30	2.31	0.24
替米考星峰面积(顺式+反式)	5472	5473	5469	5472	5473	5472	0.03
替米考星保留时间(顺式/min)	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	0.00

2.2 专属性试验 专属性结果见图 1。结果表明,将溶剂空白(a)、辅料空白(磷酸溶液 b、无水葡萄糖 c、乳糖 d)、替米考星对照品(e)和供试品(f),按

含量测定项下方法进行测定,溶剂空白、辅料空白对磷酸替米考星可溶性粉色谱峰均无干扰,供试品与标准品色谱峰保留时间一致,专属性好。

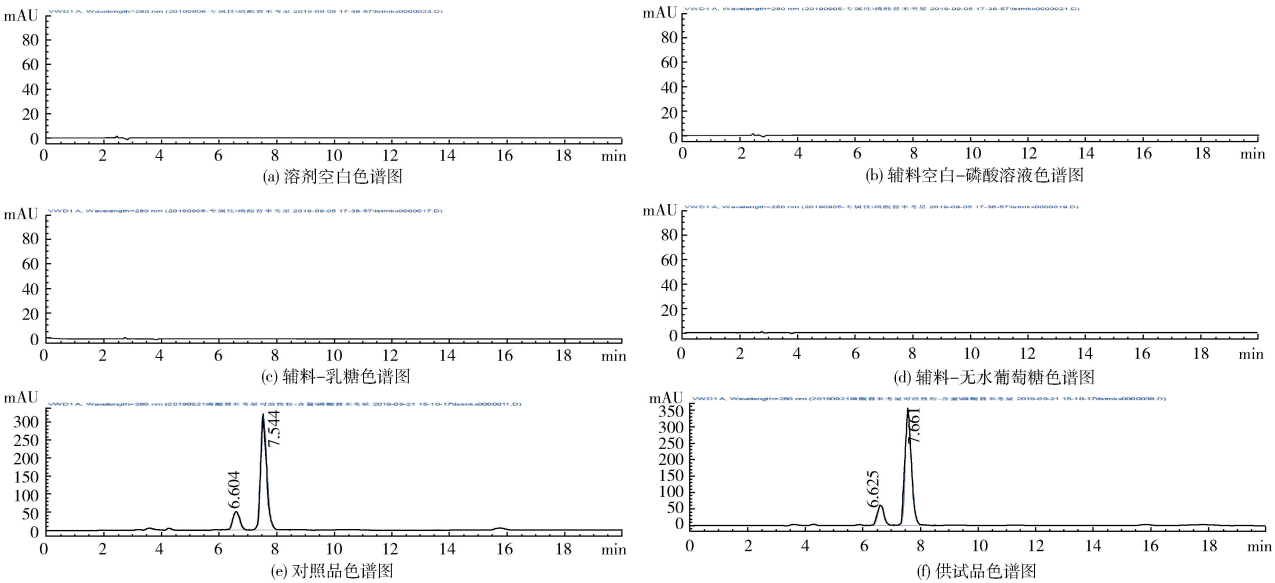


图 1 专属性 HPLC 色谱图

Fig 1 Specific HPLC chromatogram

2.3 线性 标准曲线如图 2 所示。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,用最小二乘法做线性回归,替米考星(顺式+反式)峰面积与对照品浓度呈线性

关系的回归方程为 $y = 12048x - 77.676$,其相关系数为 $R^2 = 0.9998$,该结果表明替米考星在浓度为 0.2~0.8 mg/mL 范围内线性关系良好。

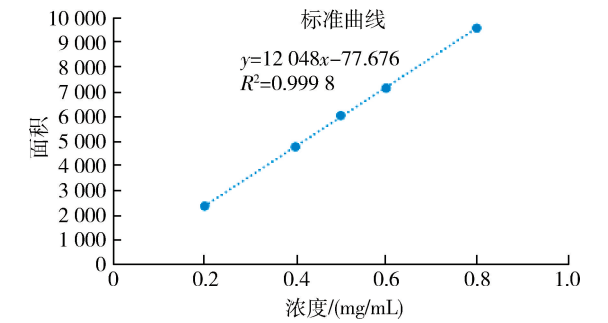


图 2 替米考星标准品线性关系图

Fig 2 Linear relationship diagram of tilmicosin standard products

2.4 精密度试验 计算 6 次检测的磷酸替米考星可溶性粉中替米考星含量、反式异构体及顺式异构体峰的保留时间相对标准偏差分别为 1.1%、0.06% 及 0.15%，均在可接受范围内。替米考星反式异构体峰和顺式异构体峰的相对保留时间为

0.9 min 和 1.0 min，方法精密度良好，符合兽药典中规定的样品待测成分含量 10% 时，*RSD* 为 1.5% 范围要求(表 2)。

2.5 定量限和检测限 按上述色谱条件，将标准品溶液稀释，以信噪比 3:1 测得磷酸替米考星检测限为 0.08 μg/mL(0.08%)，信噪比 10:1 时的浓度定量限为 0.3 μg/mL(0.3%)。

2.6 准确度试验 准确度试验结果如表 3 所示。拟定方法下测定的磷酸替米考星可溶性粉的回收率在 97.27% ~98.91% 之间，三个不同浓度水平溶液的平均回收率为 97.96%，相对标准偏差为 0.96%，替米考星的回收量与添加量一致，偏差为 0.03%；符合《中国兽药典》(2015 版)中规定的当样品中待测成分含量 10% 时，回收率限度应为 95.0% ~102.0% 的要求。

表 2 方法精密度计算结果

Tab 2 Method precision calculation results								
序号	1	2	3	4	5	6	平均值	<i>RSD</i> /%
替米考星含量/%	102.3	103.4	104.2	102.1	102.1	104.7	103.1	1.1
反式异构体峰保留时间/min	7.141	7.144	7.138	7.144	7.139	7.148	7.142	0.06
顺式异构体峰保留时间/min	8.232	8.240	8.236	8.222	8.232	8.235	8.233	0.15

表 3 加标回收率结果

Tab 3 Spike recovery results			
浓度 Concentration	替米考星添加量/g Enoxacin addition (g)	替米考星回收量/g Enoxacin recycling amount (g)	替米考星回收率/% Enoxacin recovery rate(%)
80%	1	0.01005	98.91
	2	0.01003	97.81
	3	0.01017	98.61
100%	1	0.01250	97.56
	2	0.01253	99.00
	3	0.01253	97.65
120%	1	0.01500	97.27
	2	0.01525	97.73
	3	0.01524	97.76
平均回收率/%			97.96
<i>RSD</i> /%			0.96

2.7 溶液的稳定性 试验结果，磷酸替米考星可溶性粉供试品溶液放置 24 h 内峰面积未发生明显变化，溶液较稳定，*RSD* 小于 1.5%；放置 36 ~48 h 时，峰面积增宽增大，计算峰面积的含量不在标示

量范围，相对偏差大于 1.5%，溶液不稳定，流动相中四氢呋喃与二丁胺溶液易挥发，挥发后有机相浓度缩小供试品浓度增加，可能造成峰面积增大峰型增宽。

2.8 耐用性试验 耐用性试验结果见表 4。使用 Aiglent ZORB(150×4.6 mm 5 μm)色谱柱时,色谱峰分离度最低,含量为 105.30%;使用 Aiglent ZORBA SB C18(250×4.6 mm 5 μm)色谱柱时,分离度高,含量为 105.40%,使用两种色谱柱测定的结果均符合《中国兽药典》(2015 版)中 90.0%~110.0%标示量范围的要求。在不同柱温下进行测定,结果显

示测定的含量均在药典规定范围内,但色谱峰保留时间有差异,温度高出峰快,保留时间短。不同流速下测定结果显示,三个不同流速条件下的含量相对标准偏差为 1.2%,pH 值测定含量平均为 105.06%,检测结果在可接受范围内,方法耐用性好,替米考星顺式与反式异构体分离度均大于 1.5%。

表 4 方法耐用性结果

Tab 4 Method durability results				
变动因素		理论塔板数	分离度	含量/%
色谱柱	Waters symmetry C18 250×4.6 mm 5 μm	6601	2.56	104.5
	岛津 Intertsustain C18 250×4.6 mm 5 μm	5582	2.39	104.4
	AiglentZORBA SB C18 150×4.6 mm 5 μm	4003	1.94	105.3
	Aiglent ZORBA SB C18 250×4.6 mm 5 μm	6021	2.38	105.4
	RSD/%		0.50	
柱温	30 ℃	6138	2.28	104.5
	25 ℃	6021	2.38	105.0
	20 ℃	5504	2.14	104.3
	RSD/%		0.34	
流速	1.2 mL/min	6168	2.19	104.1
	1.0 mL/min	6034	2.38	102.8
	0.8 mL/min	6495	2.24	105.3
	RSD/%		1.20	
pH	2.3	6097	2.21	104.7
	2.5	6028	2.38	105.0
	2.7	6059	2.29	106.5
	RSD/%		0.92	

2.9 不同公告方法检测供试品含量 取四家执行不同公告企业生产的样品 4 批,将选择的样品分别采用公告 2270、2455、2440、2172 及拟定方法进行含量测定(表 5),结果显示应用 2440、2172、2455、2270 号公告中的检测方法时,替米考星色谱峰保留

时间不一致,但在本研究拟定方法下色谱峰保留时间一致,含量测定结果一致,相对标准偏差均小于 1%。应用本研究拟定方法,4 批样品的检测结果均符合 4 个公告中标示量的 90.0%~110.0%的要求。

表 5 不同公告方法样品测定结果

Tab 5 Different announcement of sample determination results								
厂家	批号	2172 公告 含量/%	2440 公告 含量/%	2455 公告 含量/%	2270 公告 含量/%	拟定方法 含量/%	平均值/%	RSD/%
江西省特邦动物药业有限公司	20180402	90.9	90.4	90.0	90.3	90.1	90.3	0.39
山东鲁抗舍里乐药业有限公司高新区分公司	1803001	100.6	100.9	100.4	101.6	101.9	101.1	0.64
广东温氏大华农生物科技有限公司动物保健品厂	20180101	101.6	101.9	102.8	103.3	102.3	102.3	0.67
宁夏泰瑞制药股份有限公司	F83190503	102.2	102.0	103.9	102.2	102.8	102.6	0.76

加粗字体为各企业执行相应公告结果

2.10 样品测定 采用拟定方法对四家企业的 11 批样品进行了含量测定,并与各企业原公告方法的结果进行了对比,结果一致(表 6)。11 批样品含磷酸替米考星按替米考星计,含量均在标示量的 90.0% ~ 110%。

表 6 样品含量测定结果
Tab 6 Sample content determination results

供试品生产厂家	批号	执行方法	替米考星含量/%
广东温氏大华农生物科技有限公司保健品厂	20180101	2440 号公告	101.9
		拟定方法	102.3
		拟定方法	107.5
		拟定方法	106.1
宁夏泰瑞制药股份有限公司	F83190503	2172 号公告	102.2
		拟定方法	102.8
河北维尔利动物药业集团有限公司	18012301	拟定方法	107.2
		拟定方法	106.6
		拟定方法	106.2
		拟定方法	101.9
保定冀中药业有限公司	201803001	2455 号公告	100.4
		拟定方法	101.9
		拟定方法	104.5
		拟定方法	105.1

3 讨论与结论

3.1 色谱条件的考察 《中国兽药典》(2015 版)、《美国兽药典》及四个公告中替米考星含量测定项色谱系统一致,均以水 - 乙腈 - 磷酸二丁胺溶液 - 四氢呋喃为流动相,仅比例不同,各比例下测定样品结果一致。仅 2440 号公告流动相比比例配比超过 1000,实验操作不便。经过反复试验,采用水 - 乙腈 - 磷酸二丁胺溶液 - 四氢呋喃 = 805: 115: 25: 55 为流动相,磷酸替米考星可溶性粉中替米考星顺式反式异构体峰分离度良好,且与《中国兽药典》中替米考星原料药含量测定流动相比比例是一致的。

3.2 对照品处理方法的考察 四个公告中对对照品处理方法有三种,2172 号公告采用乙腈和流动相处理,因流动相中已含有乙腈,故此条件下处理增加了乙腈的用量,流动相中还含有四氢呋喃,有刺激性气味。对人体危害性较大,且对色谱柱有腐蚀作用;2240 号公告使用磷酸溶液处理,因对照品为替米考星,不溶于水,在磷酸溶液中溶解较缓慢;2270

和 2455 号公告均采用乙腈和磷酸溶液处理,与《中国兽药典》替米考星原料药对照品处理方法一致,本研究采用此法处理,结果准确可靠,在保证控制产品质量的基础上,减少了有毒试剂四氢呋喃和乙腈的使用。

3.3 供试品处理方法考察 各公告下处理的样品所测得结果基本一致,方法间 *RSD* 均小于 2.0%。但 2172 号公告采用乙腈和流动相处理样品,增加了有毒试剂四氢呋喃和乙腈的使用。并且实验中偶尔会出现色谱峰前伸现象。本研究采用了同 2445 号公告和 2270 号公告一致的处理方法,即选择乙腈和磷酸溶液处理供试品,而且与对照品处理方法保持一致,减小了测定误差,有效分离出了替米考星的顺反式异构体,辅料空白试验对色谱峰保留时间无干扰。

3.4 不同仪器保留时间考察 分别使用 Agilent1260 和 Agilent1100 两台仪器对供试品溶液在同一条件下进行检测,Agilent1260 色谱仪中主峰

保留时间都在 8.2 min 左右,理论塔板数最低可达 30467,峰面积 RSD 为 0.1%,保留时间 RSD 小于 2%;Agilent1100 色谱仪中主峰保留时间为 7.8 min 左右,理论塔板数最低可达 11874,峰面积 RSD 为 0.21%,保留时间 RSD 小于 2%;对比分析两台仪器测定结果,色谱峰保留时间存在一定差异,但不同仪器上标准品色谱峰保留时间与供试品色谱峰保留时间一致。

本研究建立的 HPLC 法测定磷酸替米考星可溶性粉中替米考星含量的分析方法,通过与 4 个公告对比分析,该方法专属性强、准确性高、重复性好,回收率、精密度和稳定性较理想,可为磷酸替米考星可溶性粉的质量标准的建立提供科学依据,可用于磷酸替米考星可溶性粉整体质量的控制和评价。

参考文献:

- [1] 吴俊伟,廖兰,韦玉勇,等. 磷酸替米考星可溶性粉对人工感染鸡毒支原体的疗效试验[J]. 中国畜牧杂志, 2007,43(15):60-64.
Wu J W, Liao L, Wei Y Y, *et al.* Treatment Test of Tilmicosin Phosphate Soluble Powder on Chicken Mycoplasma gallisepticum by Artificial Inducement, Chinese Journal of Animal Science[J]. 2007,43(15):60-64.
- [2] Abiola F A, Aka K. Preliminary pharmacokinetics of sulfadimidine in healthy Sahelian sheep and cows[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1990,13(2):220-222.
- [3] Jeffery R M, Verdel K D, Willam H, *et al.* Liquid chromatographic determination of sarafloxacin residues in channel catfish muscle[J]. AOAC Int, 2002,77(4):871-875.
- [4] 范建华,何友义,韦玉勇,等. 磷酸替米考星可溶性对人工感染鸡支原体的疗效试验[J]. 中国兽药杂志, 2014,48(6):58-61.
Fan J H, He Y Y, Wei Y Y, *et al.* Treatment Test of Tilmicosin Phosphate Soluble Powder on Chicken Mycoplasma gallisepticum by Artificial Inducement [J]. Chinese Journal of Veterinary

Drug, 2014, 48(6):58-61.

- [5] Li J, Hao H, Cheng G, *et al.* The effects of different enrofloxacin dosages on clinical efficacy and resistance development in chickens experimentally infected with *Salmonella typhimurium* [J]. Sci Reports, 2017,7(1):1-12.
- [6] 中国兽药典委员会. 中国兽药典(一部)[M]. 北京:中国农业出版社, 2015.
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the people's Republic of China [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2015.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药质量标准[M]. 北京:中国农业出版社, 2017.
China Veterinary Pharmacopoeia Committee. Quality standard of veterinary drugs of the people's Republic of China [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2017.
- [8] 中华人民共和国公告农业部第 2172 号公告[S].
Notice no. 2172 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].
- [9] 中华人民共和国公告农业部第 2270 号公告[S].
Notice no. 2270 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].
- [10] 中华人民共和国公告农业部第 2440 号公告[S].
Notice no. 2440 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].
- [11] 中华人民共和国公告农业部第 2445 号公告[S].
Notice no. 2445 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].
- [12] The United States Pharmacopeial Convention. U. S. Pharmacopeia[M]. United States Pharmacopeia, 2017:6476-6478.
- [13] 李超,赵海旭,周凯翔,等. HPLC 法检测替米考星纳米内服混饮剂含量的方法学研究[J]. 动物保健品研究, 2019, (15):124-127.
Li C, Zhao H X, Zhou K X, *et al.* A methodological study on determination of The content of Timicoxacin nanocomposite by HPLC[J]. Research on animal health products, 2019, (15):124-127.

(编辑:侯向辉)