

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.2.05

高效液相色谱法测定烯丙孕素微囊中烯丙孕素的含量

王 忠, 鲍光明, 王小莺, 刘宝生, 陈文婷, 黄小晴, 彭剑玲, 王立琦*

(江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045)

[收稿日期] 2020-06-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 02-0025-07 [中图分类号] S859.3

[摘 要] 建立了烯丙孕素微囊中烯丙孕素的高效液相色谱含量测定方法, 采用 Kromasil 100-5 C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以流动相水-乙腈 (30:70, V/V)、检测波长 236 nm、流速 1.0 mL/min、柱温 30 ℃、进样量 20 μL 为色谱条件, 无水乙醇为溶剂对微囊进行加热超声提取。结果表明, 在烯丙孕素保留时间无干扰峰出现, 在 5~30 μg/mL 的浓度范围内线性关系良好 ($R^2 = 0.9993$), 回归方程为 $A = 21468C - 10887$; 总平均回收率为 $(100.96 \pm 1.14)\%$, RSD 为 1.13%; 三个浓度水平下 RSD 分别为 0.83%、1.16% 和 1.8%。该方法准确可靠、选择性好、简便、快速, 可用于烯丙孕素微囊含量测定及质量评价。

[关键词] 烯丙孕素; 微囊; 高效液相色谱法; 含量测定

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目一般项目 (GJJ180184); 国家自然科学基金项目 (31760750); 江西省重点研发计划项目 (20171BBF60054)

作者简介: 王 忠, 博士研究生, 从事兽药与动物繁殖育种研究。

通讯作者: 王立琦。E-mail: wangliqi86@126.com

(上接 24 页)

Li Yuqin. Discussion on the Problem Existed in Sterility Test and Microbial Limit Test [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2007, (12): 1011-1012.

[8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 (二部) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.

Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China (Part 2) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015.

[9] 宋 勤, 杜平华. 中成药微生物限度检查方法的探讨 [J]. 中国药事, 2006, (1): 46-48.

Song Qin, Du Pinghua. Study on Microbial Limit Test Method for Chinese Traditional Patent Medicine [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2006, (1): 46-48.

[10] 莫小林, 伍小燕, 韦振源, 等. 10 种中药制剂微生物限度检查方法的验证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, (13): 56-59.

Mo Xiaolin, Wu Xiaoyan, Wei Zhenyuan, et al. Verification of Microbial Limit Test Method for 10 Kinds of Traditional Chinese Medicine Preparations [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, (13): 56-59.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知: 中药饮片卷 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 184.

National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia Guidelines for Clinical Drug Use: Traditional Chinese Medicine Pieces Volume [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 184.

[12] 王亚婷. 薄膜过滤法在药品微生物限度检查中的应用 [J]. 河北化工, 2013, (4): 8-9.

Wang Yating. Application of Membrane Filtration in the Microbial Limit Test of Drugs [J]. Hebei Huagong, 2013, (4): 8-9.

(编辑: 侯向辉)

Determination of the Content of Altrenogest in Microcapsule by High Performance Liquid Chromatography

WANG Zhong, BAO Guang - ming, WANG Xiao - ying, LIU Bao - sheng, CHEN Wen - ting,
HUANG Xiao - qing, PENG Jian - ling, WANG Li - qi *

(College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Corresponding author: WANG Li - qi, E - mail: 394436636@qq.com

Abstract: A high performance liquid chromatography method was developed to determine the contents of altrenogest in microcapsule. A Kromasil 100 - 5C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 mm) column was used for sample separation, water - acetonitrile (30:70, V/V) was used as mobile phase, detection wavelength was 236 nm; flow rate was 1.0 mL/min; column temperature was 30 °C; and injection volume was 20 μL. Altrenogest was ultrasonically extracted from microcapsule by absolute ethanol. The results showed that there was no interference peak at the retention time of altrenogest. The linearity was good in the concentration range of 5 ~ 30 μg/mL. The regression equation was $A = 21468C - 10887$, $R^2 = 0.9993$; the average recovery rate was $(100.96 \pm 1.14)\%$, RSD is 1.13%. In conclusion, the developed method was accurate, reliable, selective, simple, fast, and can be used for the determination and quality evaluation of altrenogest microcapsule.

Key words: altrenogest; microcapsule; HPLC; content determination

烯丙孕素 (Altrenogest) 为 C19 - 去甲睾酮的衍生物, 是一种动物用合成孕激素, 通过抑制促性腺激素 (黄体生成激素和促卵泡成熟激素) 的分泌阻断母畜发情和排卵, 调控发情周期。美国、欧盟等国家已批准其用于马和猪的同期发情、调节猪的批次生产节律。该药口服吸收快, 主要分布于肝脏, 经 II 相代谢, 主要排泄途径为粪便, 其次为尿液。由于该药难溶于水, 在环境中易光解^[1], 现有产品为油性溶液, 需喷挤口服给药, 使用不便利。微囊化技术是利用天然或合成的高分子成膜材料把液体或固体药物包嵌形成直径 1 ~ 500 μm 微小胶囊的技术^[2]。该技术是近四十年来应用于药物制剂的新方法, 在兽药领域也得到了广泛应用。将药物制成微囊有以下作用: (1) 掩盖药物的不良气味, 如恩诺沙星微囊、替米考星微囊等; (2) 提高药物稳定性, 如鱼肝油微囊; (3) 防止药物在胃内失活或减少对胃的刺激性。微囊技术提高药物稳定性的原理为: 囊心 (即药物) 被包裹而与外界环境隔离, 可使其免受外界的湿度、氧气、紫外线等因素的影响, 从

而保证了药物的稳定。服用后壁材降解, 药物又能被释放出来^[3]。采用复凝聚法制得烯丙孕素微囊, 提高了其对光和热的稳定性, 药物贮存的稳定性, 以及给药方式的多样化选择。微囊制剂中药物含量的测定需要解决的主要问题是使药物完全释放, 这对于微囊制剂的质量控制非常重要^[4-5]。为了对自制烯丙孕素微囊制剂进行含量检测及质量评价, 以对其进行质量控制, 有必要建立准确可靠的含量检测方法。目前, 关于烯丙孕素测定方法的研究多集中在生物样品如血液、动物组织中, 制剂方面仅见口服液中烯丙孕素含量检测方法的建立。关于微囊中烯丙孕素的含量检测尚无相关研究报道。本文拟建立一种高效液相色谱法用于测定通过复凝聚法制得的微囊中烯丙孕素的含量, 并根据《兽用化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则》对该方法的专属性、线性、准确度及精密度进行验证。

1 材料与方法

1.1 仪器 Waters 1525 高效液相色谱仪, 美国

Waters 公司;FB224 自动内校电子分析天平,舜宇恒平科学仪器有限公司;SB25-12DTD 超声波清洗仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;XW-80A 旋涡混合仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;超纯水制备系统:F3PN33491 型,美国 Millipore 公司。

1.2 药品与试剂 烯丙孕素原料药(含量 99.9%),江苏远大信宜药业有限公司;烯丙孕素微囊,自制;无水乙醇,分析纯,西陇化工股份有限公司;甲醇、乙腈,色谱纯,美国天地有限公司。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制

1.3.1.1 烯丙孕素乙醇溶液的配制 精密称取 10 mg 烯丙孕素原料药于 10 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成 1 mg/mL 烯丙孕素原料药母液。用无水乙醇稀释母液获得不同浓度工作液,现配现用。

1.3.1.2 烯丙孕素微囊溶液及空白微囊溶液的配制 精密称取 10 mg 烯丙孕素微囊于 10 mL 棕色容量瓶中,用无水乙醇 30 °C 温度条件下超声溶解 15 min 后,定容至刻度,摇匀,配制成 1 mg/mL 烯丙孕素微囊母液。用无水乙醇稀释母液获得不同浓度烯丙孕素微囊工作溶液。用同样的方法配制空白微囊溶液母液及工作液。

1.3.2 色谱条件 色谱柱为 Kromasil 100-5C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 mm);流动相为水-乙腈(30:70, V/V);流速 1.0 mL/min;柱温 30 °C;检测波长 236 nm;进样量 20 μL。

1.3.3 专属性试验 分别取不含烯丙孕素的空白微囊辅料溶液、烯丙孕素原料药溶液(20 μg/mL)、以及已知浓度微囊提取液中添加烯丙孕素原料药溶液(0.1 mg/mL),按 1.3.2 项色谱条件进样分析,记录色谱图,以考察空白微囊辅料对烯丙孕素是否有干扰。

1.3.4 标准曲线的建立 用无水乙醇稀释 1 mg/mL 的烯丙孕素原料药母液,配制 1、2、5、10、20、50、100 mg/mL 的烯丙孕素系列标准溶液,用 0.22 mm 的针筒式过滤器过膜后,按 1.3.2 项的色谱条件进样分析。以测得的烯丙孕素色谱峰面积为纵坐标,

浓度为横坐标,进行线性回归,得到回归方程、相关系数及标准曲线图。

1.3.5 精密度试验 用无水乙醇稀释 1 mg/mL 烯丙孕素微囊母液,配制成 20、30、40 mg/mL 三个浓度的烯丙孕素微囊溶液,用 0.22 mm 的针筒式过滤器过膜后,按 1.3.2 项的色谱条件进样分析。每个浓度 3 个平行。计算相对标准偏差(*RSD*)。相对标准偏差(*RSD*) = 标准偏差(*SD*)/计算结果的算术平均值($\bar{X}$) × 100%。

1.3.6 准确度试验 精密移取 10、20、30 mg/mL 烯丙孕素原料药溶液各 0.5 mL,添加至 0.5 mL 30 mg/mL 的烯丙孕素微囊提取液中,制备成 5.0、10、15 mg/mL 三个浓度的供试液,每个浓度平行制备三份。旋涡混匀后,用 0.22 mm 的针筒式过滤器过膜,按 1.3.2 项的色谱条件进样分析,记录峰面积,计算 3 个不同添加浓度的加样回收率、平均回收率、*RSD*。其中,加样回收率 = 加样后测定值/加入原料药含量 × 100%,*RSD* 按 1.3.5 项所列公式进行计算。

1.3.7 稳定性试验 取 20 μg/mL 的烯丙孕素原料药溶液,分别于 0、2、4、8、12 h,按 1.3.2 项的色谱条件进样分析,以峰面积计算烯丙孕素的(*n* = 5)的 *RSD*。

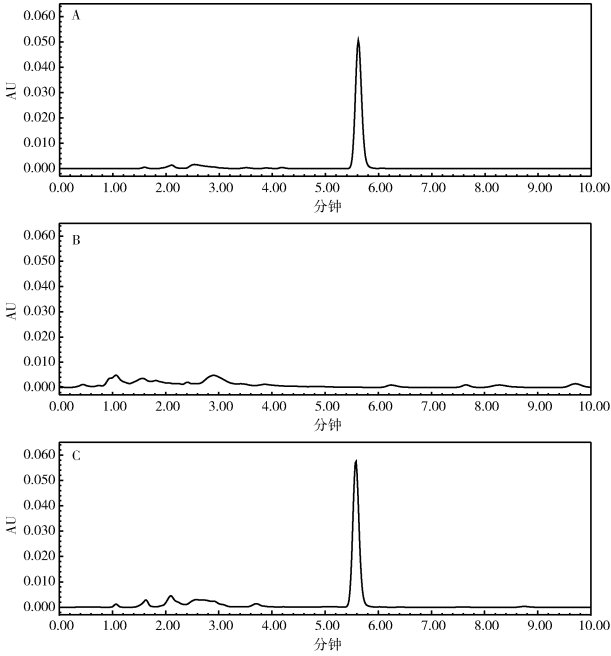
1.4 数据处理 所有数据采用 Excel 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 专属性试验 烯丙孕素原料药溶液、微囊提取液及空白辅料中烯丙孕素的典型色谱图如图 1 所示。由图可见,烯丙孕素保留时间为 5.591 min。在烯丙孕素保留时间 2.5% 范围内,无干扰峰出现。说明该方法的专属性良好。

2.2 标准曲线的制备 烯丙孕素在 5~30 mg/mL 浓度范围内,线性关系良好,标准曲线方程为 $A = 21468C - 10887$, $R^2 = 0.9993$,满足检测要求。烯丙孕素原料药标准曲线如图 2 所示。

2.3 精密度试验 以烯丙孕素的峰面积计算,三个浓度的 *RSD* 分别为 0.83%、1.16% 和 1.8% (表 1),符合方法学 *RSD* 不大于 2% 的要求。



A 为烯丙孕素原料药溶液 (50 mg/mL) ;B 为空白辅料;
C 为已知微囊提取液中添加烯丙孕素原料药溶液
(添加浓度为 5 mg/mL,实际浓度为 17.67 mg/mL)

A represents active pharmaceutical ingredient of altrenogest solution (50 mg/mL) , B represents accessory;C rpresents extraction of known microcapsule spiked with active pharmaceutical ingredient of altrenogest solution(the spiked level is 5 mg/mL and the actual conenctration is 17.67 mg/mL)

图 1 烯丙孕素典型色谱图

Fig 1 Typical chromatogram of altrenogest

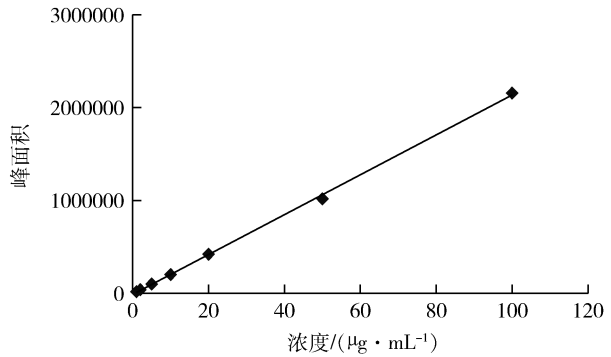


图 2 烯丙孕素原料药标准曲线

Fig 2 Calibration curve of active pharmaceutical ingredient of altrenogest

表 1 三个浓度水平烯丙孕素微囊溶液的精密度

Tab 1 Precision of altrenogest in microcapsule at three concentration level

序号 No.	烯丙孕素 微囊浓度 Concentration of altrenogest microcapsule /(mg · mL ⁻¹)	峰面积 Peak area (mAu. s)	平均峰面积 Average peak area (mAu. s)	RSD/%
1	20	353762		
2	20	357545		
3	20	359579	356962.00 ± 2952.00	0.83
4	30	530385		
5	30	519853		
6	30	519974	523404.00 ± 6046.03	1.16
7	40	762134		
8	40	735639		
9	40	744663	747478.67 ± 13470.05	1.80

2.4 准确度试验 在 5、10、10 mg/mL 添加浓度下,每个浓度做 3 个重复,对烯丙孕素的加样回收率进行评价。结果如表 2 所示,5、10、10 mg/mL 三个浓度下烯丙孕素的平均回收率分别为 101.25%、99.82% 和 101.81%,RSD 分别为 1.09、0.60 和 0.69,符合方法学的要求。

2.5 稳定性试验 通过对 1、5、20 μg/mL 的烯丙孕素原料药溶液,分别于 0、2、4、8、12 h 进行测定,以峰面积计算烯丙孕素的(n = 5)的 RSD 分别为 1.30%、0.55%、0.48%,表明供试样品随着样品浓度的升高稳定增加,但三个浓度在 12 h 内均稳定(表 3)。

3 讨论与结论

当前,在规模化养猪场,后备母猪发情率偏低、断奶问题母猪久不发情等情况普遍存在。母猪同期发情主要是指利用外源激素诱导母畜群体在同一时期内集中排卵和发情的技术,该技术可有效提高后备母猪发情率、配怀率以及窝均产仔数,显著提高猪场的生产管理水平。国外已将烯丙孕素作

表 2 三个添加浓度下烯丙孕素的回收率

Tab 2 Recovery of altrenogest in microcapsule at three concentration level						
序号 No.	烯丙孕素添加浓度 Spiked level of altrenogest/(mg · mL ⁻¹)	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery/%	RSD/%	总平均回收率 Total average recovery/%	RSD/%
1	5	100.28				
2	5	101.01	101.25 ± 1.10	1.09		
3	5	102.45				
4	10	100.11				
5	10	100.22	99.82 ± 0.59	0.60	100.96 ± 1.14	1.13
6	10	99.14				
7	15	101.01				
8	15	102.31	101.81 ± 0.70	0.69		
9	15	102.11				

表 3 三个浓度水平烯丙孕素原料药溶液的稳定性

Tab 3 Stability of altrenogest in microcapsule at three concentration level				
烯丙孕素 微囊浓度 Concentration of altrenogest microcapsule/ (mg · mL ⁻¹)	时间 Time	峰面积 Peak area (mAu. s)	平均峰面积 Average peak area (mAu. s)	RSD/%
1	0	18970		
	2	19290		
	4	19322	19195.20 ± 249.33	1.30
	8	19491		
	12	18903		
5	0	100925		
	2	100340		
	4	99805	100136.80 ± 554.75	0.55
	8	100154		
	12	99460		
20	0	421775		
	2	424274		
	4	426890	424465.4 ± 2055.67	0.48
	8	426044		
	12	423344		

由于烯丙孕素存在对光、热不稳定等缺点,因此,开发微囊制剂以提高烯丙孕素在用药过程中的稳定性以及便利性十分有意义。建立微囊中烯丙孕素的含量检测方法,则有利于对该制剂进行质量控制。

目前,关于烯丙孕素测定方法的研究多集中在生物样品如血液、动物组织、尿液中,包括药动学研究中采用高效液相色谱-串联质谱(High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)法测定马^[8-10]和猪^[11-12]血浆中烯丙孕素浓度,以及残留消除研究中采用(Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)法测定组织样品^[13-16]、尿液^[17-18]中烯丙孕素的浓度。制剂方面,姜淋洁等^[7]用异丙醇-正己烷(5:20)对烯丙孕素口服液进行前处理后,采用正相高效液相色谱法测定其含量。

3.1 微囊处理条件的优化 由于烯丙孕素作为芯材被包裹在明胶和阿拉伯胶形成的微囊中,因此,要检测微囊中烯丙孕素的含量,首先要将微囊破坏,使其从微囊中释放出来。微球中药物含量测定一般采用酶解法、溶剂提取法、超声处理、研磨提取法等^[5]。酶解法可将载体材料的网状结构破坏,从而使药物完全释放出来^[19],但耗时较长,且酶的价

为养猪生产中必不可少的同期发情剂,且指出无替代产品^[6]。目前烯丙孕素制剂主要为口服液^[7],以及用于马的 5% 注射剂(Readysolve® Injection)等。

格昂贵。研磨提取法则具有微囊用量较大,且需要从研钵中转移,造成药物的损失等缺点。蔡杰等^[20]采用研磨-超声法萃取微囊中的天然维生素 E,需要称取 1 g 左右微囊于研钵中,加适量水和正己烷进行研磨后,置超声波清洁器中振荡,定量转移到 125 mL 的分液漏斗中,再用正己烷进行萃取。本文采用溶剂-超声法对烯丙孕素进行萃取。由于烯丙孕素易溶于甲醇、乙腈、乙醇等有机溶剂,难溶于水^[21],因此,对比了甲醇与无水乙醇作为溶剂进行萃取,发现二者萃取效果相当,最终选择毒性更小的无水乙醇作为萃取溶剂。研究过程中发现,常温下超声,萃取效果较差,将超声温度提高到 30 ℃ 时,则可以有效提高萃取率。同时,考察了超声时间对微囊的破坏情况,发现 10 min 左右可以使微囊全部破裂,故本试验选择超声 15 min。此外,由于烯丙孕素对光和热不稳定,萃取温度不可设置过高,且应注意避光操作。

3.2 高效液相色谱条件的选择 通过对烯丙孕素进行紫外-可见光全波长扫描,并参考文献报道的色谱条件^[21],最终选择 236 nm 作为烯丙孕素的检测波长。对比了高立会等^[21]采用的乙腈:0.01% 磷酸水=(7:3, V/V)和乙腈:水(7:3, V/V)作为流动相对色谱峰峰形的影响,发现二者均可获得较好峰形,差异较小,因此,最终选择无需配制的乙腈:水(7:3, V/V)作为流动相。

本文建立了一种测定烯丙孕素微囊含量的高效液相色谱法,该方法具有专属性强、线性关系良好、准确度高和重复性好等特点,符合方法学验证的要求。且样品萃取方法简单、所需试剂价格便宜,便于应用。该含量测定方法可用于烯丙孕素微囊中烯丙孕素的含量测定,以期对微囊的质量评价和质量标准的制定奠定基础,并为其进一步研究和开发提供依据。

参考文献:

[1] [1] Wammer K H, Anderson K C, Erickson P R, *et al.* Environmental Photochemistry of Altrenogest: Photoisomerization to a Bioactive Product with Increased Environmental Persistence via

Reversible Photohydration[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016,50(14):7480-7488.

[2] 丁飞. 兽用微囊制剂的研究进展[J]. *中国动物保健*, 2011, 13(3):30-33.

Ding F. Development in the research of veterinary microcapsule preparation[J]. *China Animal Health*, 2011,13(3):30-33.

[3] 甄振生. 叶黄素微囊的研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2009.

Zhen Z S. Study on lutein microcapsules [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2009.

[4] 张李琦, 郑明学, 苏晓晴, 等. 替米考星明胶微囊含量测定方法研究[J]. *山西农业科学*, 2016, (12):1848-1852.

Zhang L Q, Zheng M X, Su X Q, *et al.* Study on the methods for determination of the content of timicosin gelatin microcapsules [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2016, (12):1848-1852.

[5] 苏晓晴, 张李琦, 郑明学, 等. 紫外分光光度法测定恩诺沙星微囊含量方法的建立[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2017, (4):258-262.

Su X Q, Zhang L Q, Zheng M X, *et al.* Determination of enrofloxacin gelatin microcapsules content by UV spectrophotometry [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences (Natural Science edition)*, 2017, (4):258-262.

[6] EMA, Questions and answers on veterinary medicinal products containing altrenogest to be administered orally to pigs and horses [EB/CD]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Altrenogest_35/WC500212665.pdf, 2016-07-29.

[7] 姜淋洁, 崔志刚, 杨雪, 等. 高效液相色谱法测定烯丙孕素口服液中烯丙孕素的含量[J]. *中国兽药杂志*, 2020,54(3):21-25.

Jiang L J, Cui Z G, Yang X, *et al.* Content determination of altrenogest oral solution by HPLC[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2020,54(3):21-25.

[8] Machnik M, Hegger I, Kietzmann M, *et al.* Pharmacokinetics of altrenogest in horses[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2007,30(1):86-90.

[9] Ellis K E, Council-Troche R M, Von Dollen K A, *et al.* Pharmacokinetics of Intrarectal Altrenogest in Horses[J]. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2019,72:41-46.

[10] 王双, 李艳艳, 杨海峰, 等. 两种烯丙孕素口服液在猪体内的比较药动学研究[J]. *畜牧与兽医*, 2018,50(7):45-50.

Wang S, Li Y Y, Yang H F, *et al.* Comparative pharmacokinetic study of two kinds of altrenogest oral solutions for sows [J]. *Chi-*

- nese Journal of Animal & Veterinary Sciences, 2018,50(7):45-50.
- [11] Xiao H, Sun P, Sun F, *et al.* Pharmacokinetics of altrenogest in gilts[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2019,42(6):660-664.
- [12] Li Y, Yang H, Xia L, *et al.* Comparative pharmacokinetic study of two kinds of altrenogest oral solutions for sows[J]. Animal Biotechnology, 2020;1-7.
- [13] 王双, 杨海峰, 余波, 等. 烯丙孕素口服液在猪体内的残留消除研究[J]. 畜牧兽医学报, 2018,49(9):2005-2014.
Wang S, Yang H F, Yu B, *et al.* Elimination study of altrenogest oral solution in pigs[J]. Chinese Journal of Animal & Veterinary Sciences, 2018,49(9):2005-2014.
- [14] Li Y, Yang H, Qiu S, *et al.* Investigations on residual elimination of altrenogest oral solution in pigs and the withdrawal time[J]. Animal Biotechnology, 2019;1-8.
- [15] Rejtharova M, Rejthar L. Development and validation of an LC-MS/MS method for the determination of six gestagens in kidney fats[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013,30(6):995-999.
- [16] Zhang D, Park J A, Kim S K, *et al.* Determination of residual levels of naloxone, yohimbine, thiophanate, and altrenogest in porcine muscle using QuEChERS with liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2016,39(5):835-841.
- [17] Lampinen-Salomonsson M, Beckman E, Bondesson U, *et al.* Detection of altrenogest and its metabolites in post administration horse urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry—increased sensitivity by chemical derivatisation of the glucuronic acid conjugate[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technology in Biomedicine and Life Sciences, 2006,833(2):245-256.
- [18] Star-Weinstock M, Williamson B L, Dey S, *et al.* LC-ESI-MS/MS analysis of testosterone at sub-picogram levels using a novel derivatization reagent[J]. Analytical Chemistry, 2012,84(21):9310-9317.
- [19] 王德智. 酒石酸泰乐菌素明胶微球制备及药动学研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
Wang D Z. Preparation and pharmacokinetic study of tartrate tylosin gelatin microspheres[D]. Haerbin. Northeast Agricultural University, 2007.
- [20] 蔡杰, 蔡静月, 李琼. 天然维生素E微囊的制备及含量测定[J]. 实用医技杂志, 2005,(16):2212-2213.
Cai J, Cai J Y, Li Q. Preparation and content determination of natural vitamin E microcapsules[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2005,(16):2212-2213.
- [21] 张立会, 姜淋洁, 王建, 等. 一种烯丙孕素含量的高效液相色谱检测方法. 中国, CN105699517A[P]. 2016-01-28.
Zhang L H, Jiang L J, Wang J, *et al.* Study on the methods for determination of the content of altrenoges. China. CN105699517A[P]. 2016-01-28.

(编辑:侯向辉)