

超高效液相色谱-串联质谱法检测畜产品和水产品中 3-甲基喹恶啉-2-羧酸残留

吕海鸾¹, 吴聪明^{1*}, 程林丽¹, 张素霞², 沈建忠²

(中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要: 以猪肉、猪肝、猪肾、胖头鱼、对虾和蟹为试验材料,建立了喹乙醇(OLA)的残留标示物 3-甲基喹恶啉-2-羧酸(MQCA)残留的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。采用 0.2 mol/L 盐酸提取可食性组织中的分析物,经 C18 固相萃取小柱净化、35 °C 氮气吹干及含 0.1% (v/v) 甲酸的乙腈溶解后,采用超高效液相色谱分离,串联质谱法确证和定量分析。质谱检测采取正离子多反应监测模式,外标法定量。结果表明:MQCA 在 2 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系,各组织中的相关系数(r^2)均大于 0.990;猪肉、猪肝、猪肾、鱼、对虾和蟹中 MQCA 的检出限依次为 0.90、1.51、0.94、1.04、1.62 和 1.80 $\mu\text{g/kg}$,定量限依次为 3.00、5.02、3.13、3.46、5.40、6.00 $\mu\text{g/kg}$ 。从 3 ~ 100 $\mu\text{g/kg}$ 的添加浓度的检测结果可以看出,MQCA 的平均回收率均在 73.6% 与 89.0% 之间,日内相对标准偏差(RSD, $n=5$) 在 15% 以下,日间 RSD($n=3$) 为 20% 以下。该方法的灵敏度、准确度和精密度均符合兽药残留分析技术的要求,适用于动物组织中 MQCA 残留的定量分析和确证检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 喹乙醇; 3-甲基喹恶啉-2-羧酸; 残留; 动物组织; 水产品

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2012)01-0045-06

Determination of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid in animal and aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LÜ Hailuan¹, WU Congming^{1*}, CHENG Linli¹, ZHANG Suxia², SHEN Jianzhong²

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the determination of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA) in animal tissues and aquatic products. The analyte was extracted with 0.2 mol/L hydrochloric acid. The extract was cleaned up on a Bond Elut C18 cartridge. Then the eluate was collected and evaporated to dryness under nitrogen gas at 35 °C. The residue was redissolved in acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid. The identification was performed by multiple reaction monitoring in positive electrospray ionization. The quantification was done by external standard method. The calibration curves showed good linearity within the range of 2 – 500 $\mu\text{g/L}$ with the correlation coefficients (r^2) greater than 0.990. The limits of detection (LODs) of MQCA in pork, swine liver, pig kidney, fish, prawn, and crab were 0.90, 1.51, 0.94, 1.04, 1.62 and 1.80 $\mu\text{g/kg}$, respectively; and the limits of quantification (LOQs) were 3.00, 5.02, 3.13, 3.46, 5.40 and 6.00 $\mu\text{g/kg}$, correspondingly. The recoveries of MQCA in animal tissues and aquatic products were 73.6%–89.0% at the spiked levels of 3–100 $\mu\text{g/kg}$. The intra-day relative standard deviations (RSDs, $n=5$) were less than 15%, and inter-day RSDs ($n=3$) were less than 20%. The results demonstrated that the sensitivity, accuracy, and precision were fit for the requirements of veterinary drug residue analysis.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/

* 通讯联系人: 吴聪明, 博士, 副教授, 主要从事细菌耐药性研究. Tel: (010) 62733378, E-mail: wucm@cau.edu.cn.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项和国家重点基础研究发展计划“973”计划课题(No. 2009CB118801).

收稿日期: 2011-09-06

MS); olaquinox; 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid; residue; animal tissues; aquatic products

喹乙醇(olaquinox,OLA)属于喹恶啉类药物,是一种理想的兽药和饲料添加剂,具有抗菌与蛋白质同化作用,兼有促进生长作用^[1]。研究表明,喹乙醇及其代谢物具有光敏毒性^[2]、遗传毒性^[3]、致突变性、致癌作用、生态毒性^[4,5]等毒性作用。过量使用喹乙醇会造成蓄积,蓄积浓度过高时就会危害到动物机体的健康,同时也对人类的健康造成极大的负面影响。欧盟已于1999年禁止了在食品动物生产中使用喹乙醇作为促生长添加剂^[6];《中国兽药典》(2005版)也有明确规定,喹乙醇被禁止用于家禽及水产养殖。喹乙醇本身不稳定,在动物体内能够短时间内代谢成十多种产物,其中3-甲基喹恶啉-2-羧酸(MQCA)是主要代谢物之一,其在体内相对稳定。国际联合国粮农组织(FAO)/世界卫生组织(WHO)食品添加剂联合专家委员会(JECFA)于1995年将MQCA定为喹乙醇在动物体内代谢的残留标示物。2003年我国农业部规定肌肉和肝脏组织中MQCA的最大残留限量分别为4 μg/kg和50 μg/kg。目前,在我国喹乙醇仍然作为抗菌促生长添加剂被广泛使用^[7]。因此,研究建立喹乙醇残留标示物3-甲基喹恶啉-2-羧酸的残留检测技术具有重要意义。

目前有关MQCA残留检测方法比较多,如高效液相色谱法(HPLC)、高效液相色谱-紫外光谱(HPLC-UV)^[8]、气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[9]、液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)^[10,11]、实时定量聚合酶链式反应(PCR)^[12]、免疫分析法等。这些方法一般都是先水解、再过固相萃取柱净化后检测,并且普遍存在检出限高,回收率较低,操作繁琐和耗时长^[13]。与一般的HPLC相比,超高效液相色谱(UPLC)是最近新发展的技术,它有分辨率更高、反应更灵敏、分析速度更快等特点^[14-16]。因此,我们拟采用UPLC-MS/MS分析方法,建立简单、准确、高效的残留检测技术,能够极大地缩减其前处理过程和仪器分析过程中所需的时间,同时分析猪肉、猪肝、猪肾、鱼、虾和蟹中MQCA残留,以适用于对多品种、大批量样品的残留监控检测。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

ACQUITY UPLC™液相色谱仪(美国Waters公司),串联Quattro LC三级四极杆质谱仪(英国

Micromass公司); Bond Elut C18固相萃取柱(规格为500 mg/6 mL,美国Varian公司);微孔滤膜,0.22 μm。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯;其他试剂均为国产分析纯;水为超纯水。实验所用的猪组织和水产品均购自北京某超市,将其可食用部分经高速组织捣碎机绞碎匀浆作为检测用样品,并于-20℃冰箱中贮存备用。

1.2 标准工作液的配制

配制MQCA标准储备液(100 mg/L):准确称取(10±0.01) mg的3-甲基喹恶啉-2-羧酸标准品(纯度94%,德国Dr. Ehrenstorfer公司),用甲醇溶解并转移到棕色容量瓶中定容至100 mL。标准工作液:根据需要使用,用甲醇将标准储备液稀释成不同浓度的标准工作液,在4℃冰箱中保存,可使用2周。复溶液:含0.1%(v/v)甲酸的乙腈。

1.3 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC™ BEH C18(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL。流动相由0.1%甲酸水和含0.1%甲酸的甲醇组成,梯度洗脱,具体设定条件见表1。采用外标法定量。

表1 MQCA的流动相梯度洗脱条件
Table 1 Gradient conditions for the analysis of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA)

t/min	φ(H ₂ O) ¹⁾ /%	φ(Methanol) ¹⁾ /%	Gradient change
0	95	5	6
1	95	5	6
3	40	60	6
5	95	5	6

1) Containing 0.1% (v/v) formic acid.

1.4 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);离子化方式:正离子;扫描方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:2.8 kV;离子源温度:150℃;脱溶剂温度:300℃;碰撞气:氦气。碰撞气压为0.40 Pa,脱溶剂气流速为478 L/h。锥孔电压:15 V;MQCA母离子为m/z 189,子离子为m/z 171,m/z 145和m/z 143。其中m/z 145为定量分析离子。

1.5 样品处理

准确称取2.5 g(精确到0.01 g)组织样品于50 mL离心管中,加入5 mL 0.2 mol/L HCl溶液,涡旋混匀,振荡提取2 min,以6 000 r/min的速率离心10 min后倾出上清液,置于另一50 mL离心管中。

再向残渣中加入 5 mL 0.2 mol/L HCl 溶液再重复提取二次,合并 3 次上清液。然后于 4 °C 以 7 000 r/min 的速率离心 15 min。将上清液再转移至另一 50 mL 离心管中,放入 -20 °C 低温环境中 30 min。

将 C18 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇和 3 mL 0.2 mol/L HCl 活化,将放置在低温的提取液全部过柱。再依次用 2 mL 水和 1 mL 甲醇淋洗,用吸耳球加压挤干固相萃取小柱,用 4 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液,并于 35 °C 氮气吹干。然后用 1.0 mL 复溶液溶解,以 12 000 r/min 的速率离心 10 min,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,供 UPLC-MS/MS 测定。

1.6 标准曲线的制备

用标准贮备液或各组织样品经样品前处理过程后获得的基质空白溶液配制成 2、5、10、50、100、200 和 500 μg/L 的系列标准溶液,取 10 μL 进样分析。分别以 MQCA 的峰面积为纵坐标(y),MQCA 的质量浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,并求回归方程和相关系数。各组织样品中 MQCA 的浓度采用各组织样品的基质添加标准曲线法测定。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择和优化

目前在用色谱法进行 MQCA 残留检测的样品制备中,对于残留物的提取有多种方法,主要有水提取^[15-17],氢氧化钠溶液水解、乙酸乙酯重复提取^[18,19],偏磷酸甲醇溶液、乙酸乙酯及磷酸盐缓冲液依次提取^[8,20],以及蛋白酶酶解、盐酸溶液或乙酸乙酯提取^[10,11,21]。另外,还有采用乙腈和乙酸乙酯提取的报道^[22]。在本研究中比较了盐酸溶液、氢氧化钠溶液、乙酸乙酯有机溶剂提取以及这些提取液的不同组合提取,并比较了提取液的用量、用时、温度、次数和 pH 值。结果表明,仅采用 0.2 mol/L 盐酸溶液水解即可将 MQCA 从动物性组织以及水产品组织中分离提取出来,既避免了使用有机溶剂,减少了环境污染,又简化了步骤缩短操作时间。实验证明,MQCA 在盐酸中稳定,而且方法回收率多数在 80% 以上,-20 °C 冷藏 30 min 后能够有效沉淀蛋白质,不用乙酸乙酯萃取即可过 C18 小柱。

2.2 固相萃取条件的选择和优化

在 MQCA 残留检测的样品制备过程中,提取液的纯化技术基本上是采用固相萃取法,并以使用 MAX 小柱和 SCX 小柱为主。本实验采用的是固相萃取法,并对 MAX、MCX、HLB、C18、中性氧化铝柱等几种小柱的净化效果进行了比较,结果发现 C18 小柱能较好地保留 MQCA。在实验中同时也对淋

洗液和洗脱液的种类及用量进行了筛选和优化。结果表明,用 2 mL 超纯水和 1 mL 甲醇淋洗,4 mL 乙腈洗脱即可达到较好的净化效果和较高的方法回收率。在净化过程中一般不需要用正己烷进行脱脂,这是因为猪肉以及水产品组织的含脂量极低,对检测基本不存在干扰现象,可不必进行脱脂;同时,也为了尽量避免不必要的损失。在实际工作中若发现含脂量较大而干扰正常检测时,就必须采用适量的正己烷进行脱脂,一般可在氮吹残渣复溶后用 2 mL 正己烷脱脂即可获得满意的效果。

2.3 色谱条件的选择和优化

由于在 MQCA 的残留分析中使用的色谱柱多是 C18 柱,因此,本实验便直接选用了色谱性能较好的 ACQUITY UPLC™ BEH C18 柱。但在不同的研究中所使用的流动相存在着很大的差别。经过对比发现,相关实验中所使用的流动相多是由水相和有机相混合而成的。水相一般是纯水或低浓度甲酸水溶液;有机相一般是甲醇、乙腈或二者都有,而且一般都采用等度或梯度洗脱。因此,在选定色谱柱之后,本实验对以水、甲酸水、甲醇及乙腈组成的不同组合流动相进行了比较。结果表明,以 0.1% 甲酸水溶液和含 0.1% 甲酸的甲醇为流动相时分离效果较好。并且当采用本实验所设计的流动相洗脱条件时,MQCA 的保留时间和峰形均非常理想,且与干扰峰之间能获得很好的分离结果。

2.4 UPLC-MS/MS 分析

对 MQCA 标准品进行 m/z 100~300 范围内的质谱全扫描分析,获得 MQCA 的分子离子峰 m/z 189.06。对该分子离子进行进一步的子离子扫描,结果如图 1 所示, m/z 145.11 和 m/z 143.15 的丰度最高,因此以 m/z 189.06 为多反应监测的母离子 m/z 145.11 作为定量分析离子。经过对锥孔电压、碰撞能等质谱参数进一步优化,确定了 MQCA 的质谱分析条件(见 1.4 节)。图 2 中的 a、b、c 分

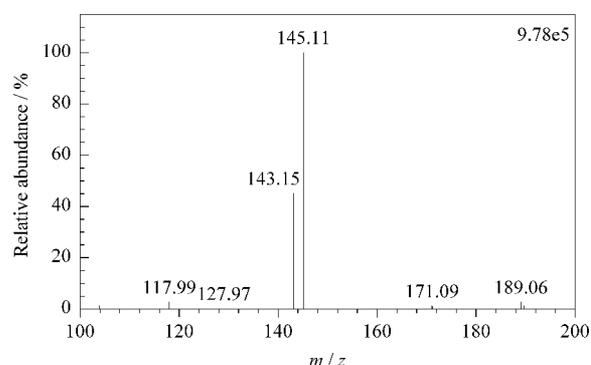


图 1 MQCA 的子离子扫描质谱图
Fig. 1 MS/MS spectrum of MQCA

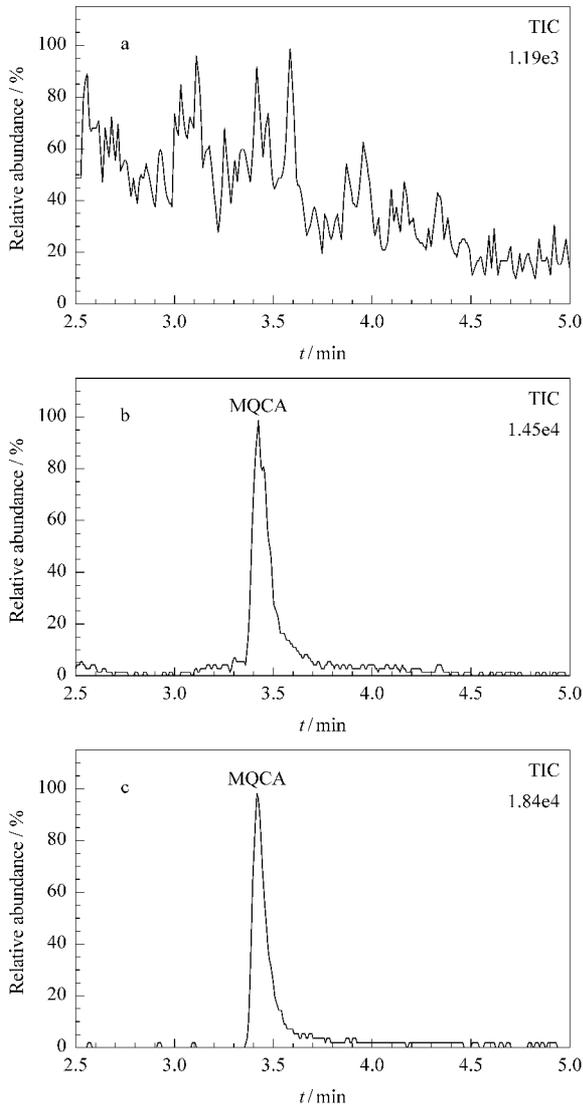


图 2 (a) 猪肉空白样品、(b) 猪肉空白样品添加 MQCA (40 µg/kg) 和 (c) 猪肉基质添加 MQCA (40 µg/kg) 的 TIC 色谱图

Fig. 2 Total ion current (TIC) chromatograms of (a) blank pork, (b) blank pork spiked with MQCA (40 µg/kg) and (c) pork matrix spiked with MQCA (40 µg/kg)

别为猪肉空白样品、猪肉空白样品添加 MQCA (40 µg/kg)、猪肉基质添加 MQCA (40 µg/kg) 的总离子流(TIC) 色谱图,其中猪肉空白添加是指在准确称量猪肉空白样品之后加入标准品,然后再将猪肉进行酸解、液液萃取和固相萃取来制备的;猪肉基质添加是指添加适量标准品于空白基质,空白基质是通过将猪肉进行酸解、液液萃取和固相萃取来制备的。图3、图4 分别为猪其他组织以及水产品空白样品添加 MQCA (40 µg/kg) 的 TIC 色谱图。由图3和图4可知 猪肉样品中的 MQCA 的保留时间处无杂峰干扰。通过对鱼、虾、蟹的空白样品检测可知,在这些样品中的 MQCA 保留时间处也没有杂峰

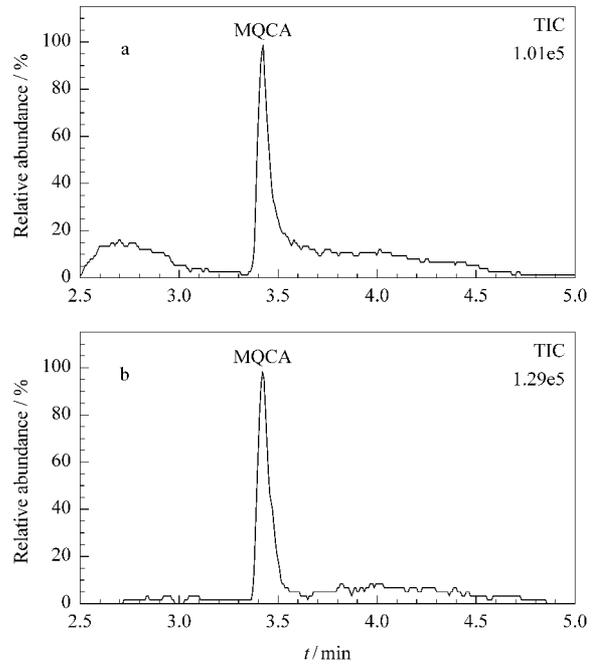


图 3 猪组织空白样品添加 MQCA (40 µg/kg) 的 TIC 色谱图
Fig. 3 TIC chromatograms of blank animal tissues spiked with MQCA (40 µg/kg)
a. liver; b. kidney.

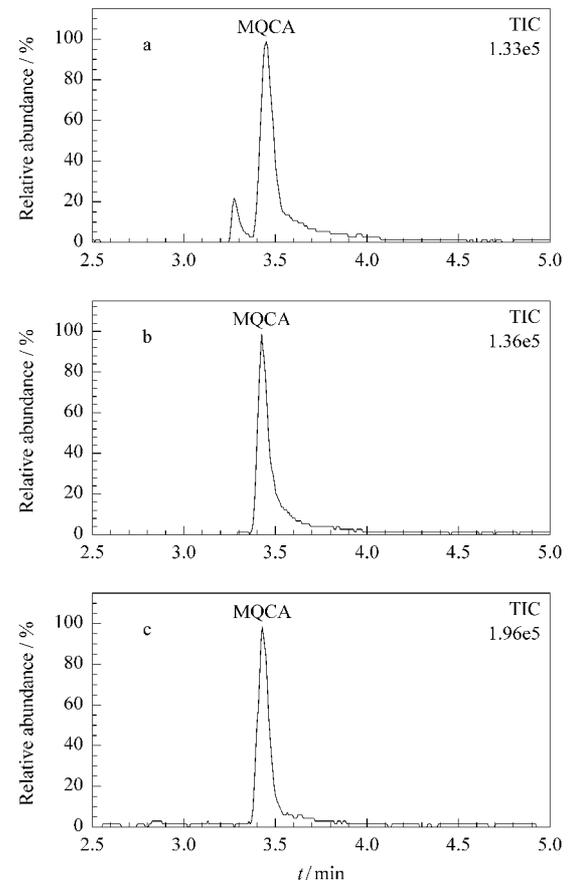


图 4 水产品空白样品添加 MQCA (40 µg/kg) 的 TIC 色谱图
Fig. 4 TIC chromatograms of blank aquatic products spiked with MQCA (40 µg/kg)
a. prawn; b. crab; c. fish.

的干扰。

2.5 线性关系、检出限与定量限

不同动物组织中喹乙醇代谢物的基质添加标准曲线方程及相关系数见表 2。由表 2 可知,在 2 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内,各标准曲线的浓度与峰面积均呈线性相关,相关系数均大于 0.990,符合兽药残留分析的相关要求。实验采用在空白组织中添加目标组分的方法,以特征离子色谱峰的信噪比(S/N)大于 3 为检出限(LOD), S/N 大于 10 为定量限(LOQ),确定各动物组织中的检出限和定量限(见表 2)。根据中华人民共和国农业部公告第 235 号文件《动物性食品中兽药最高残留限量》,喹乙醇的残留标示物 MQCA 在猪肝组织中的最大残留限量是 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在猪肉组织中的最大残留限量是 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此本方法的定量限低于国内对 MQCA 的最大残留限量规定,符合对动物组织中该药物的检测要求。根据我国农业行业标准 NY5070-2002《无公害食品水产品中渔药残留限量》文件规定,水产品中不得检出喹乙醇,但该标准中未对其标示物进行明确规定。本方法对水产品中喹乙醇残留标示物的检出限为 1.04 ~ 1.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 2 不同动物组织中 MQCA 的基质添加标准曲线、相关系数、检出限(LOD)和定量限(LOQ)

Table 2 Calibration curves, correlation coefficients (r^2), limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) in the different animal tissue matrix spiked with MQCA

Matrix source	Linear equation ²⁾	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Acetonitrile ¹⁾	$y = 15.78x + 88.25$	0.996	-	-
Pork	$y = 18.97x + 157.9$	0.998	0.90	3.00
Liver	$y = 37.11x + 286.2$	0.997	1.51	5.03
Kidney	$y = 34.57x + 519.7$	0.992	0.94	3.13
Fish	$y = 38.76x + 227.1$	0.998	1.04	3.46
Prawn	$y = 5.574x + 78.77$	0.999	1.62	5.39
Crab	$y = 15.18x + 40.35$	0.996	1.80	5.99

1) containing 0.1% formic acid. 2) y : peak area; x : mass concentration, $\mu\text{g}/\text{kg}$. Linear range: 2 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{L}$.

2.6 回收率与精密度

准确称取 2.5 g(精确至 0.01 g)空白组织样品,猪肉样品以 3、10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度水平进行 4 个浓度的添加回收试验,其他样品以 10、50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度水平进行 3 个浓度的添加回收试验。按 1.5 节方法前处理后进行 UPLC-MS/MS 测定。每个浓度设 5 个平行样品,连续做 3 天,计算日内相对标准偏差(RSD)和日间 RSD。结果如表 3 所示,各组织中 MQCA 的平均回收率为 73.6% ~ 89.0%;日内 RSD 为 10.2% ~ 14.6%,均小于 15%;日间 RSD 为 12.6% ~ 18.2%,均小于 20%。

表 3 动物组织中 MQCA 的回收率及相对标准偏差(RSDs)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of MQCA in different tissues

Sample	Added/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery / % ($n = 5$)	RSD / %	
			Intra-day ($n = 5$)	Inter-day ($n = 3$)
Pork	3	78.2	11.8	15.4
	10	83.6	14.6	14.8
	50	81.7	10.2	16.9
	100	89.0	13.3	16.2
Liver	10	84.5	12.7	12.8
	50	73.6	13.9	14.8
	100	78.4	14.0	13.6
Kidney	10	76.5	12.8	15.3
	50	88.1	10.7	14.8
	100	80.4	13.6	18.2
Fish	10	75.5	11.5	12.6
	50	78.9	14.2	14.5
	100	82.6	12.9	16.4
Prawn	10	76.9	13.5	14.7
	50	80.2	11.6	13.5
	100	84.6	12.2	16.0
Crab	10	79.3	14.0	14.1
	50	84.6	12.5	15.7
	100	87.5	10.9	16.6

3 结论

本实验采用 UPLC-MS/MS 对动物性产品以及水产品中残留的 MQCA 进行检测。检测方法主要是用稀盐酸提取动物组织以及水产品中残留的目标物,经过 C18 固相萃取小柱净化,并对流动相的配比进行优化,最后采用 UPLC-MS/MS 进行测定。本方法具有快速简便、专属性强、灵敏度高的特点,并且可操作性强、重复性好,符合兽药残留分析方法的性能要求,适用于基层质检机构对动物性产品和水产品中 MQCA 残留的检测。

参考文献:

- [1] Luo M G, Chen Y Z. Meat Research (罗明刚,陈一资. 肉类研究), 2010(9): 36
- [2] Schauder S, Schroder W, Geier J. Contact Dermatitis, 1996, 35: 344
- [3] WHO, Food Additives Series 27. Carbadox. World Health Organization, 1990a
- [4] Chen H G, Li Z L, Xu Y, et al. Journal of Nanjing University: Natural Sciences (陈海刚,李兆利,徐韵,等. 南京大学学报:自然科学), 2006, 42(4): 435
- [5] Wei R C, Bao H D, Zheng Q, et al. Journal of Agro-Environment Science (魏瑞成,包红朵,郑勤,等. 农业环境科学学报), 2009, 28(9): 1800
- [6] Commission Regulation (EC) No. 2788/98. Official Journal of the European Communities, 1998, L347(31/32): 12
- [7] Hao L H, Chen Q, Xiao X L. Mutation Research, 2006, 599: 21

- [8] Wu Y J, Yu H, Wang Y L, et al. *J Chromatogr A*, 2007, 1146: 1
- [9] Lynch M J, Mosher F R, Schneider R P, et al. Determination of Carbadox-Related Residues in Swine Liver by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Ion Trap Detection. [2011-10-13]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1917808>
- [10] Hutchinson M J, Young P B, Kennedy D G. *J Chromatogr B*, 2005, 816: 15
- [11] Boison J O, Lee S C, Gedir R G. *Anal Chim Acta*, 2009, 637: 128
- [12] Chen W, Jiang Y, Ji B Q, et al. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 2858
- [13] Qiu Y S, Yuan Z H, Fan S X, et al. *Chinese Journal of Veterinary Science* (邱银生,袁宗辉,范盛先,等. *中国兽医学报*), 2003, 23(4): 363
- [14] Wu Y, Engen J R, Hobbins W B. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17: 163
- [15] Ai X H, Liu C Z, Wen H. *Journal of Hubei Agricultural College* (艾晓辉,刘长征,文华. *湖北农学院学报*), 2003, 23(4): 266
- [16] Yu H J, Bi S C, Huang D M, et al. *Journal of Analytical Science* (于慧娟,毕士川,黄冬梅,等. *分析科学学报*), 2004, 20(3): 281
- [17] Zeng J, Zhu K Z, Wang P, et al. *Chinese Journal of Food Hygiene* (曾静,朱宽正,王鹏,等. *中国食品卫生杂志*), 2006, 18(5): 423
- [18] Wang X Y, Zhang L F, Xue F Q, et al. *Veterinary Science in China* (王霄旸,张丽芳,薛飞群,等. *中国兽医科学*), 2007, 37(8): 718
- [19] Zhang L F, Xue F Q, Liu Y Y, et al. *Journal of Instrumental Analysis* (张丽芳,薛飞群,刘元元,等. *分析测试学报*), 2006, 25(5): 63
- [20] Wu Y J, Chen D M, Tao Y F, et al. *Journal of Analytical Science* (吴玉杰,陈冬梅,陶燕飞,等. *分析科学学报*), 2009, 25(4): 427
- [21] Hutchinson M J, Young P B, Kennedy D G. *Food Addit Contam*, 2005, 22(2): 113
- [22] Yin J Y, Ni M L, Shou C J, et al. *Chinese Journal of Veterinary Drug* (殷居易,倪梅林,寿成杰,等. *中国兽药杂志*), 2006, 40(1): 11