

## 鸡组织中氢溴酸常山酮残留的 UPLC-MS/MS 检测法及其消除规律

孙晓娟 梁雪燕 郝祖慧 李建成\*

(中国农业大学 动物医学院,北京 100193)

**摘要** 为探索鸡组织中氢溴酸常山酮残留量及其消除规律,选取 25~30 日龄 AA 肉鸡 100 只,体重约 1.0 kg,按氢溴酸常山酮推荐剂量 3 mg/kg 给药。于最后一次给药后第 0 d、6 h、1 d、2 d、3 d、5 d 和 8 d 等每个时间点处死 10 只鸡,并采集每只鸡的胸肌、皮肤+脂肪、全肝和双肾,分别装入密封袋,做好标记-20 °C 保存。鸡组织试样经胰蛋白酶酶解,乙酸乙酯提取,正己烷脱脂,固相萃取净化,采用超高效液相色谱-串联质谱检测,外标法定量,并采用 WT1.4 软件处理,从而推算其休药期。结果表明:该方法检测限为 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;4 种组织的添加回收率为 74.8%~91.1%,批内、批间变异系数均 $<11.5\%$ ;残留检测结果表明肌肉和皮肤+脂肪组织的休药期为 0 d,肾脏组织的休药期为 4 d,肝脏组织的休药期为 5 d。因此,本研究中检测方法操作简单,灵敏度较高,可用于鸡组织中氢溴酸常山酮残留的检测和分析。考虑到饲养环境和个体差异等因素的影响,建议氢溴酸常山酮的休药期暂定为 5 d。

**关键词** AA 肉鸡; 氢溴酸常山酮; 超高效液相色谱-串联质谱; 残留消除

中图分类号 S859.84

文章编号 1007-4333(2019)03-0072-06

文献标志码 A

## Determination of halofuginone residue and its depletion in chicken tissue by UPLC-MS/MS

SUN Xiaojuan, LIANG Xueyan, HAO Zuhui, LI Jiancheng\*

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

**Abstract** The purpose of this research was to determinate the halofuginone residue and its depletion in chicken tissue. A total of 100 AA broilers aged 25 - 30 d and weighted about 1.0 kg were selected and fed with recommended halofuginone dosage of 3 mg/kg. Ten chickens of each timepoint were sampled at 0 d, 6 h, 1 d, 2 d, 3 d, 5 d and 8 d after the last time administration. Their pectoral muscle, skin + fat, liver and kidney were then respectively collected and stored at -20 °C. The samples were extracted with ethyl acetate after enzymatic hydrolysis of trypsin solution, degreased with n-hexane, and purified on solid phase extraction column. UPLC-MS/MS was used to detect the halofuginone residue. External standard method was used for quantitative analysis, and the data of the residues were processed using WT1.4 software to calculate the withdrawal time. The results showed that: The detection limit and quantitative limit of this method were 1.5 and 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The recovery rates of these four different tissues were ranged from 74.8% to 91.1%, and the coefficients of variation were less than 11.5%. The residues test results showed that withdrawal time was 0 d for muscle and skin + fat tissues, 4 d for kidney and 5 d for liver. In conclusion, this method was simple for operation with higher sensitivity, and could be used for the detection and analysis of halofuginone residues in chicken tissues. Considering the influence of environment and individual differences, the withdrawal period of halofuginone was determined 5 d tentatively.

**Keywords** AA broilers; halofuginone; UPLC-MS/MS; residue elimination

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272604)

第一作者: 孙晓娟, 硕士研究生, E-mail: sun1462380324@163.com

通讯作者: 李建成, 副教授, 主要从事兽药残留检测研究, E-mail: horse20@cau.edu.cn

氢溴酸常山酮(Halofuginone)是一种高效抗球虫药,其治疗效果较好、副作用较少,并且具有特殊的化学结构不容易产生交叉耐药性,故在畜禽养殖上广泛应用于预防和治理球虫病<sup>[1]</sup>。正是由于常山酮在畜禽养殖上的大量使用,建立可靠的动物性食品中常山酮残留量检测方法,科学推测休药期,保证食品安全显得极为重要。目前,国内对常山酮在动物性食品中的检测方法和残留消除试验的研究尚少,直至2004年,才建立了鸡肝中常山酮的高效液相色谱检测方法<sup>[2]</sup>。国外有关常山酮检测方法的研究很多,最常见的是液相色谱法,多见于抗球虫药的综合研究及在饲料中氢溴酸常山酮的检测,而针对常山酮在肉鸡4种组织(肝脏、肾脏、肌肉、皮肤+脂肪)中的残留检测较少<sup>[3-5]</sup>。已报道的常山酮检测方法的检测限和定量限最低的分别是10和30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[6-8]</sup>。本试验拟采用超高效液相色谱-串联质谱法,以期更加灵敏的、更加精确的测定在肉鸡体内4种组织中氢溴酸常山酮的残留量,并使用WT1.4软件对数据进行处理,推算其休药期,为临床指导用药及用药安全提供依据,降低动物耐药性的产生,从而保证动物性食品的食用安全。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 试验动物

随机挑选健康AA肉鸡100只,在中国农业大学河北涿州畜禽养殖基地饲养至25日龄,体重 $1.0\pm 0.3\text{ kg}$ 。自由饮水、采食,饲喂不含药物的饲料,饮水中也不添加任何药物。适应性饲养7d后开始正式试验,每日给与拌有氢溴酸常山酮预混剂3.0 mg/kg的全价饲料,连用15d。

#### 1.1.2 试验药品和试剂

氢溴酸常山酮对照品,纯度达99.2%,山西美西林药业有限公司;氢溴酸常山酮预混剂(质量分数:0.6%),批号:20151101,山西美西林药业有限公司;甲醇、乙腈、甲酸,色谱级,Fisher公司;水为符合GB/T 6682规定的一级水;其他试剂都为分析纯。

#### 1.1.3 主要仪器设备

超高效液相色谱仪,美国Waters公司;质谱仪,QUATTRO LC;离心机,ependorf Centrifuge 5804R,德国ependorf公司;旋涡混合仪,北方同正公司。

#### 1.1.4 主要溶液配制

1 mg/mL 氢溴酸常山酮标准储备液:精确称取

氢溴酸常山酮相当于药物10 mg的对照品,于10 mL容量瓶中,用50%乙腈水溶解并定容至刻度,配成1 mg/mL氢溴酸常山酮标准储备液,装于棕色瓶中,密封,用铝箔包住,4℃避光保存,可稳定6个月。

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氢溴酸常山酮添加液的配制:从冰箱中取出标准储备液放至室温,移取100  $\mu\text{L}$ 于100 mL棕色容量瓶中,用50%乙腈水溶液稀释标准储备液为1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为标准添加液,密封,用铝箔包住,4℃避光保存,可稳定6个月。

氢溴酸常山酮标准工作液的配制:用移液管量取适量的标准储备液于容量瓶中,用流动相稀释并定容,配制成5、10、50、100、500、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液。现用时配制。

0.125 mol/L 乙酸铵缓冲溶液的配制:准确称取9.64 g乙酸铵于1 L的容量瓶中,加15 mL的冰醋酸,用纯水溶解并稀释至刻度。

3.0 mg/kg 氢溴酸常山酮预混剂饲料的配制:按照0.375 mg/kg体重(以氢溴酸常山酮计)准确称量适量氢溴酸常山酮预混剂,配成含有氢溴酸常山酮预混剂3.0 mg/kg的全价饲料。

UPLC 流动相:流动相由A(0.1%甲酸水溶液,取1.0 mL甲酸加水定容到1.0 L)和B(0.1%甲酸乙腈溶液,取1.0 mL甲酸加乙腈定容到1.0 L)组成。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 组织中氢溴酸常山酮提取

称取试样 $2.00\pm 0.05\text{ g}$ 于50.0 mL离心管内,加入2.0 mL胰蛋白酶水溶液(25 mg/mL),用10%的碳酸钠溶液调pH 7~8,置于40℃水浴锅中酶解过夜。取出放至室温,加10%碳酸钠溶液1.0 mL混匀,加乙酸乙酯10.0 mL,涡动1 min,在冰水混合物中静置3 min,立即在4℃,5 000 r/min离心3 min,将上清液转入另一干净的离心管中,置于冰水混合物中。乙酸乙酯10.0 mL重复提取1次,合并乙酸乙酯层。加0.125 mol/L乙酸铵缓冲溶液7.5 mL,涡动1 min,在冰水混合物中静置3 min,立即在4℃下,5 000 r/min离心3 min,收集水层置于冰水混合物中,用0.125 mol/L乙酸铵缓冲溶液7.50 mL再提取乙酸乙酯层1次。合并水层,加正己烷5.0 mL,轻微振摇20 s,5 000 r/min离心3 min,除去多余的乙酸乙酯,弃去正己烷层,下层溶液再加正己烷5.0 mL脱脂,弃去正己烷层,下层溶

液作为备用液。

### 1.2.2 固相萃取净化

HLB固相萃取小柱依次用3.0 mL甲醇、3.0 mL水和0.125 mol/L乙酸铵缓冲溶液3.0 mL平衡,取全部备用液过柱,用纯水3.0 mL洗涤,然后用甲醇8.0 mL洗脱,并收集洗脱液于10.0 mL离心管中,45 °C氮气下吹干,加流动相溶解并定容至0.5 mL,充分漩涡混匀,上清液过0.2 μm滤膜后,供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

### 1.2.3 残留消除试验设计

试验用25~30日龄AA肉鸡100只,体重约1.0 kg,随机分为给药组(10只)和空白组(20只)。适应性饲养7 d后开始正式试验,每日给与拌有氢溴酸常山酮预混剂3 mg/kg的全价饲料,自由采食和饮水,连用15 d。与最后一次给药后0 d、6 h、1 d、2 d、3 d、5 d和8 d等时间点,每个时间点10只鸡,进行放血处死,采集每只鸡的胸肌100~200 g,皮肤+脂肪100 g,全肝和双肾,分别装入密封袋,做好标记-20 °C保存,采用已经建立好的UPLC-MS/MS检测方法检测。

### 1.2.4 基质加标标准曲线绘制

分别准确量取1 μg/mL氢溴酸常山酮标准工作液2.5、5.0、25.0 μL,10 μg/mL氢溴酸常山酮标准工作液5.0、25.0、50.0 μL,依次加入6份经提取和净化处理的空白试料浓缩液中,加流动相定容至0.5 mL,充分混匀,配成浓度为5、10、50、100、500和1 000 μg/kg的基质匹配系列标准溶液,离心过滤膜后供超高效液相色谱-串联质谱测定。以测得特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。

### 1.2.5 检测限和定量限测定

对空白试料按照上述1.2.1的步骤进行处理

后,供超高效液相色谱-串联质谱测定,结果表明:在相应的保留时间,空白试料对药物无干扰。根据6个空白的基线噪音值,求其平均值,按信噪比 $S/N=3$ 计算,求得鸡组织(肌肉、肝脏、肾脏、皮肤+脂肪)中的常山酮残留量的检测限(LOD),按信噪比 $S/N=10$ 计算得鸡组织(肌肉、肝脏、肾脏、皮肤+脂肪)中常山酮的定量限(LOQ)。

### 1.2.6 准确度和精密度测定

为考察方法的准确度、精密度,进行添加回收试验。在空白鸡组织中添加氢溴酸常山酮标准工作溶液,使添加后浓度为定量限(LOQ)、最高残留限量(MRL)和2倍最高残留限量(2 MRL)。每批各浓度分别制备样品6份,每个浓度制备3批样品。按上述前处理方法和测定方法测定其药物的含量,分别计算回收率、日内变异系数和日间变异系数。

### 1.2.7 氢溴酸常山酮残留量计算

组织经过1.2.1的前处理方法和1.2.2的净化方法处理,通过超高效液相色谱-串联质谱仪进行测定,并按下式计算组织中氢溴酸常山酮的浓度:

$$C = \frac{AC_s}{A_s}$$

式中: $A_s$ 为基质标准溶液中氢溴酸常山酮的峰面积; $C_s$ 为基质标准溶液中氢溴酸常山酮的浓度,μg/L; $A$ 为试样溶液中氢溴酸常山酮的峰面积。

## 1.3 测定条件

### 1.3.1 色谱条件

WatersAcquity UPLC分离系统,采用Quattro LC三重四极杆串联质谱仪进行质谱分析:

色谱柱:C18,50.0 mm×2.1 mm,粒径1.7 μm;

流动相:A,0.1%甲酸水溶液;B,0.1%甲酸乙腈溶液;

梯度洗脱:梯度洗脱程序见表1;

表1 梯度洗脱程序

Table1 Gradient elution procedures

时间/min Time	流速/(mL/min) Flow rate	流动相 A/% Mobile phase A	流动相 B/% Mobile phase B	梯度变化曲线 Gradient curve
0	0.3	90	10	—
0.5	0.3	90	10	6
1.0	0.3	5	95	6
1.5	0.3	5	95	6
3.0	0.3	90	10	1

流速:0.3 mL/min;  
柱温:30 ℃;  
进样量:10 μL。

### 1.3.2 质谱条件

离子源,电喷雾离子源;扫描方式,正离子扫描;检测方式,多反应监测;电离电压,3.0 kV;离子源温度,100 ℃;雾化温度,350 ℃;锥孔气流速,25 L/h;雾化气流速,650 L/h;其定性离子对为 416.1 > 138.3,定量离子对为 416.1 > 99.7;锥孔电压 20 V,碰撞能量 18 eV。

## 2 结果与分析

### 2.1 定量限和检测限

根据上述 1.2.5 的步骤对空白试料进行处理后,按信噪比  $S/N=3$  计算,计算出鸡组织(肌肉、肝脏、肾脏、皮肤+脂肪)中的常山酮残留量检测限(LOD)为 1.5 μg/kg。按信噪比  $S/N=10$  计算出鸡组织(肌肉、肝脏、肾脏、皮肤+脂肪)中常山酮的定量限(LOQ)为 5.0 μg/kg。氢溴酸常山酮的特征离子流色谱图色谱峰峰形尖锐且对称,样本中杂质分离良好,无明显的干扰峰。

### 2.2 基质加标标准曲线

肉鸡组织基质加标标准曲线和相关系数见表 2。氢溴酸常山酮在 5~1 000 μg/kg 的浓度范围内呈现良好的线性关系,相关系数均 > 0.99(表 2)。

表 2 氢溴酸常山酮的标准曲线及相关系数

Table 2 Standard curve and correlation coefficient of halofuginone

肉鸡组织 Chicken tissue	标准曲线 Standard curve	相关系数 $r$ Correlation $r$
肌肉 Muscle	$Y=106.410X+169.3$	0.999 2
肾脏 Kidney	$Y=17.028X+102.6$	0.999 8
肝脏 Liver	$Y=77.724X+753.22$	0.999 2
皮肤+脂肪 Skin and fat	$Y=87.777X+449.34$	0.999 7

若分析样品时,浓度超出此范围,则稀释溶液上机即可。

### 2.3 准确度和精密度

在空白组织中添加常山酮标准工作溶液,使添加后浓度为定量限(LOQ)、最高残留限量(MRL)和 2 倍的最高残留限量(2MRL)。肝脏和肾脏组织添加后浓度为 5.0、130.0 和 260.0 μg/kg,皮肤+脂肪组织添加后浓度为 5.0、200.0 和 400.0 μg/kg,肌肉组织添加后浓度为 5.0、100.0 和 200.0 μg/kg。每批各浓度分别制备样品 6 份,每个浓度制备 3 批样品。按上述前处理方法和测定方法测定其药物的含量,分别计算回收率、批内变异系数和批间变异系数(表 3)。

表 3 鸡组织中氢溴酸常山酮的添加回收率和变异系数( $n=6$ )

Table 3 Recovery and variation coefficient of halofuginone in the chicken tissues ( $n=6$ )

样品 Sample	添加量/ (μg/kg) Addition	批内 Intraday		批间 Interday	
		平均回收率/% Average recovery	变异系数/% CV	平均回收率/% Average recovery	变异系数/% CV
肝脏 Liver	5.0	76.3	6.0	78.1	7.2
	130.0	85.4	11.5	84.4	8.6
	260.0	75.2	6.6	76.0	5.7
肾脏 Kidney	5.0	89.9	7.3	90.7	7.6
	130.0	76.2	3.4	75.7	6.3
	260.0	76.5	7.0	76.6	6.8
皮肤+脂肪 Skin+fat	5.0	75.0	8.0	75.6	8.9
	200.0	71.3	5.2	71.8	4.8
	400.0	76.8	5.6	77.8	5.8
肌肉 Muscle	5.0	91.1	6.3	90.7	7.6
	100.0	92.8	2.5	90.7	6.3
	200.0	74.8	3.4	74.7	3.5

由表3中数据可以看出,鸡肝组织在5.0、130.0和260.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3个添加浓度常山酮的平均回收率为75.2%~85.4%,批内变异系数为6.0%~11.5%,批间变异系数为5.7%~8.6%;鸡肾组织在5.0、130.0和260.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3个添加浓度常山酮的平均回收率为76.2%~89.9%,批内变异系数为3.4%~7.3%,批间变异系数为6.3%~7.6%;鸡皮肤+脂肪样品在5.0、200.0和400.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3个添加浓度常山酮的平均回收率为75.0%~76.8%,批内变异系数为5.2%~8.0%,批间变异系数为4.8%~8.9%;鸡肌肉样品在5.0、100.0和200.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3个添加浓度常山酮的平均回收率为74.8%~91.1%,批内变异系数为

2.5%~6.3%,批间变异系数为3.5%~7.6%,满足兽药残留试验技术规范准确度与精密度的要求。

## 2.4 氢溴酸常山酮在组织中的消除

利用前面建立的测定方法测定肉鸡组织(肌肉、肝脏、肾脏和皮肤+脂肪)的常山酮残留,残留量测定结果见表4。

使用WT1.4软件对表4中4种组织的残留消除数据进行处理,计算出氢溴酸常山酮在肉鸡体内的休药期,结果表明,肌肉和皮肤+脂肪组织的休药期为0 d,肾脏组织的休药期为3.04 d,肝脏组织的休药期为4.04 d。因为不是整数,所以顺延至下一天,即氢溴酸常山酮的休药期可定为5 d。

表4 鸡组织中氢溴酸常山酮残留量( $n=10$ )

Table 4 Halofuginone residues in the chicken tissues ( $n=10$ )  $\mu\text{g}/\text{kg}$

时间 Time	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	皮肤+脂肪 Skin+fat	肌肉 Muscle
0 d	460.1±246.2	373.5±191.5	32.2±12.8	17.1±6.9
6 h	636.4±216.3	257.4±70.2	29.2±7.2	16.7±3.4
1 d	402.5±132.4	164.2±67.2	25.1±9.4	12.5±4.0
2 d	212.1±77.2	78.2±27.6	15.6±5.4	9.4±3.3
3 d	70.9±33.9	37.8±20.2	<LOQ	<LOQ
5 d	12.7±5.6	20.6±11.9	<LOQ	<LOQ
8 d	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

注:LOQ为定量限。

Note:LOQ, limits of quantitation.

## 3 讨论与结论

本试验中,采用UPLC-MS/MS法检测肉鸡体内4种可食用组织的氢溴酸常山酮残留量,其基质加标标准曲线在5.0~1 000.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的范围内,呈线性相关,相关系数均 $>0.99$ 。该方法的检测限为1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,灵敏度更高,并且其色谱图在出峰时间附近无干扰,峰形较好。贾涛<sup>[9]</sup>采用液相色谱-串联质谱测定饲料中氢溴酸常山酮,其检测限为25.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为50.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,相比之下本试验使用的方法更加灵敏。本方法在空白鸡肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织中进行5.0~400.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度,回收率达70%~120%,批

内、批间相对标准偏差均 $<20\%$ ,说明回收率和重复性良好。由于目前还没有肾脏组织的最大残留量规定,本试验中按照肝脏的最大残留限量来测定残留量。本试验酶解过程中对pH要求严格,若pH不在7~8范围内,就会影响到药物出峰时间,且pH的调节或多或少都会造成试样损失,导致误差,是进一步的试验有待改良之处。吴宁鹏等<sup>[10]</sup>发现常山酮在乙酸乙酯中不稳定,容易降解,因此试验时应尽可能快速地完成其提取过程。然而,在本试验过程中发现,将乙酸乙酯提取后的溶液保持在低温环境或延长置于冰水混合物中的时间后,也可以降低其降解的速率,得到较高的回收率。样品的净化在已有研究的试验摸索中,由于初期使用了国产HLB固相萃取小柱,即便控制了流速,其回收率也比较

低。因此,本试验决定采用 Oasis HLB 固相萃取小柱,4 种组织的添加回收率均达 70% 以上,变异系数也 <15%,满足了兽药残留试验技术规范准确度与精密度的要求<sup>[11]</sup>。目前对氢溴酸常山酮在鸡组织中的残留消除的研究还比较少。肉鸡给药 3 mg/kg 的氢溴酸常山酮 21 d 后,停止给药,4 d 后测得肉鸡肝脏内的药物残留量已在 38  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之下<sup>[12]</sup>。在本试验中:肌肉和皮脂组织在停药 0 d 后,其残留量已低于各自的最大残留限量(MRLs);肝脏和肾脏分别在停药 5 和 4 d 后,其残留量才低于各自的最大残留限量(MRLs)(表 4)。氢溴酸常山酮抗球虫效果较优,主要在肝脏代谢,后经粪便和胆汁排泄,其在各组织中的浓度依次是:肝脏>肾脏>皮肤+脂肪>肌肉,在组织中降解很快<sup>[13-14]</sup>。通过残留消除试验发现氢溴酸常山酮在肝脏中消除时间比肾脏长,也表明肝脏是其靶器官。肝脏组织中,第 6 小时残留量增多,可能是因为在肝肠循环,导致其含量有 1 次明显升高。使用 WT1.4 软件对 4 种组织的残留消除数据进行处理,预测得到休药期。因此,考虑到品种、个体差异、饲养环境等因素,可将氢溴酸常山酮的休药期定为 5 d,与吴宁鹏等<sup>[9]</sup>研究发现的常山酮休药期 5 d 基本一致。在临床用药过程中,严格执行其休药期,确保动物性食品的安全<sup>[15]</sup>。

## 参考文献 References

[1] 王贤玉. 抗球虫药氢溴酸常山酮的研究进展[J]. 养禽与禽病防治, 2012(1):39-40  
Wang X Y. Progress in the study of the coccidiostats halofuginone[J]. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 2012 (1):39-40 (in Chinese)

[2] 曹莹, 黄士新, 沈富林, 孙亚云, 王蓓. 高效液相色谱法测定鸡肝组织中的氢溴酸常山酮残留[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(4): 11-13  
Cao Y, Huang S X, Shen F L, Sun Y Y, Wang B. Determination of halofuginone hydrobromide residues in chicken liver by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2004, 38(4):11-13 (in Chinese)

[3] Analytical Methods Committee. Collaborative study of a method for the determination of residues of halofuginone in chicken tissue[J]. *Analyst*, 1984, 109(2):171-174

[4] Galarini R, Fioroni L, Moretti S, Pettinacci L, Dusi G. Development and validation of a multiresidue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 700(1-2):167-176

[5] 李丹, 孙雷, 毕言锋, 徐倩, 王鹤佳, 徐士新. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉和牛肉中五种常用抗球虫药[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(4):38-41  
Li D, Sun L, Bi Y F, Xu Q, Wang H J, Xu S X. Determination of five coccidiostats in chicken and beef by UPLC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2013, 47(4):38-41 (in Chinese)

[6] Anderson A, Christopher D H, Woodhouse R N. Analysis of the anti-coccidial drug, halofuginone, in chicken feed using gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1979, 168(2):471-480

[7] Yamamoto Y, Kondo F. Determination of halofuginone and amprolium in chicken muscle and egg by liquid chromatography [J]. *Journal of AOAC International*, 2001, 84(1):43-46

[8] Dubois M, Pierret G, Delahaut P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2004, 813(1-2):181-189

[9] 贾涛. 液相色谱-串联质谱法检测饲料中氢溴酸常山酮的探讨[J]. 饲料广角, 2015(6):16-19  
Jia T. Study on the determination of halofuginone in feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Feed China*, 2015(6):16-19 (in Chinese)

[10] 吴宁鹏, 王建平, 杜向党, 沈建忠. 鸡组织中常山酮残留的 ELISA 与 HPLC 检测方法比较[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(9):68-69  
Wu N P, Wang J P, Du X D, Shen J Z. Determination of halofuginone residues in chicken tissues by ELISA and HPLC assays[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, 43(9):68-69 (in Chinese)

[11] Beier R C, Dutko T J, Buckley S A, Muldoon M T, Holtzapple C K, Stanker L H. Detection of halofuginone residues in chicken liver tissue by HPLC and a monoclonal-based immunoassay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(3):1049-1054

[12] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002:20-22  
Li J S, Qiu Y M, Wang C. *Veterinary Drug Residue Analysis* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002:20-22 (in Chinese)

[13] Opinion S, Efsagmouk R, Seeds S, Panel E. European food safety authority (EFSA)[J]. *Nutrition & Food Science*, 2010(6)

[14] Ding S Y, Hou Y L, Wu N P, Shen J Z. Residue analysis for halofuginone in sturgeon muscle by immunoaffinity cleanup and liquid chromatography[J]. *Journal of AOAC International*, 2005, 88(6):1644-1648

[15] 么红霞. 休药期与动物性食品安全[J]. 畜牧兽医科技信息, 2014(4):29-29  
Yao H X. Withdraw time and animal food safety[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2014(4):29-29 (in Chinese)