

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.3.07

兔可食性组织中杆菌肽残留量 HPLC-MS/MS 测定方法

聂 贞,全家兴,王美红,张小龙,蒋 玥,卜仕金*

(扬州大学兽医学院 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏 扬州 225009)

[收稿日期] 2020-06-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 03-0038-11 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 建立兔可食性组织中杆菌肽残留标志物的 HPLC-MS/MS 检测方法。兔可食性组织(肌肉、脂肪、肝脏和肾脏)中杆菌肽残留用 0.5% 三氟乙酸水提取,10% 三氯乙酸乙腈沉淀蛋白,正己烷除脂,HLB 150 mg 固相萃取柱净化,以 0.1% 甲酸水和乙腈(0~0.5 min 15% 乙腈,7.5~8.0 min 85% 乙腈,8.1~10.0 min 15% 乙腈)为流动相进行梯度洗脱。采用电喷雾离子源(ESI),正离子扫描,多反应检测(MRM)模式测定杆菌肽含量。杆菌肽在 50~1000 ng/g 的添加浓度范围内,浓度与响应值之间线性关系良好,相关系数大于 0.99,本方法的检测限为 30 ng/g,定量限为 50 ng/g。杆菌肽平均添加回收率在 74.7%~83.8%,批内批间变异系数均小于 10%。实验建立的兔可食性组织中杆菌肽残留量的 HPLC-MS/MS 检测方法可满足兔可食性组织中杆菌肽残留量的检测要求。

[关键词] 高效液相色谱-串联质谱法;杆菌肽;可食性组织;残留检测

Determination of Bacitracin Residues in Rabbit Edible Tissue by HPLC-MS/MS

NIE Zhen, QUAN Jia-xing, WANG Mei-hong, ZHANG Xiao-long, JIANG Yue, BU Shi-jin*

(Veterinary Medicine College, Yangzhou University Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and

Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Corresponding author: BU Shi-jin, E-mail: pushijin@aliyun.com

Abstract: A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was established for determining of bacitracin residues in rabbit tissues. The rabbit tissue samples (muscle, fat, liver and kidney) were extracted with 0.5% trifluoroacetic acid water, precipitated with 10% acetonitrile trichloroacetate, fat removed with hexane, and then purified with HLB 150 mg solid-phase extraction column. Gradient elution was conducted with 0.1% formic acid water and acetonitrile (0~0.5 min 15% acetonitrile, 7.5~8.0 min 85% acetonitrile, 8.1~10.0 min 15% acetonitrile) as the gradient elution. Electrospray ion source (ESI), positive ion mode and MRM mode were used in mass spectrometry. The results showed that the linear relationship between

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

作者简介:聂贞,硕士,从事兽医药理与毒理学研究方向。全家兴,与聂贞为共同第一作者。

通讯作者:卜仕金。E-mail:pushijin@aliyun.com

the concentration and response value of bacitracin was good in the concentration range of 50 ~ 1000 ng/g (calculated by bacitracin), and the correlation coefficient was greater than 0.99. The detection limit of the method was 30 ng/g, and the quantitative limit was 50 ng/g. The average recovery rate of bacitracin was 74.7% ~ 83.8 % the relative standard deviations below 10%. The method developed in this study can meet the requirements of detection of residual bacitracin in rabbit tissues.

Key words: HPLC – MS/MS; bacitracin; edible tissue; residue detection

杆菌肽是由一组类似的多肽成分组成的混合物,其中杆菌肽 A、B₁ 和 B₂ 组分被认为最具抗微生物活性^[1-2]。兽医临床上常见以杆菌肽锌和杆菌肽亚甲基水杨酸盐形式用于畜禽促生长和防治动物的坏死性肠炎^[3-5]。在欧盟,亚甲基水杨酸杆菌肽还被推荐用于治疗由产气荚膜梭菌引起的兔坏死性肠炎。杆菌肽在猪和禽等主要生产动物的可食性组织中及奶中残留量的检测方法已有很多研究报道^[6-10],但杆菌肽在兔的可食性组织中残留量的检测分析方法至今未见报道。因此,开展兔可食性组织中杆菌肽的残留检测方法研究,对杆菌肽今后推广应用于家兔和指导临床合理用药具有重要的现实意义。研究旨在建立兔可食用组织(肌肉、脂肪、肾脏和肝脏)中杆菌肽残留标志物的高效液相色谱串联质谱联用(HPLC – MS/MS)检测法,为兔可食性组织中杆菌肽残留的监控提供技术手段,这对保障人类消费者食用动物源性食品的安全性具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 仪器:AB sciex Qtrap 6500plus 三重四极杆串联质谱仪;AB sciex ExionLC™ AC 高效液相色谱仪;XBridge® C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,3.5 μm);EppendorfCentrifuge 5810 R 台式高速冷冻离心机;QUINTIX124 – 1CN 电子天平;上海沪西 WH – 1 微型涡旋混合仪;Eppendorf 可调移液器(10 μL、100 μL、5000 μL)。

试剂:甲醇、乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);三氟乙酸(色谱纯,上海 MACKLIN 公司);甲酸、氨水(色谱纯,上海阿拉丁公司);三氯乙酸、正己烷(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);杆菌肽标准品(杆菌肽 A、B₁、B₂ 和 B₃ 总含量 84.8%,杆菌肽

A 含量 53.2%。批号:C10418000,购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司);水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

1.2 标准溶液配制 准确称取约 4.68 mg 杆菌肽标准品,置 10 mL 容量瓶中,用 0.1% 甲酸甲醇溶解并定容至刻度,即配置浓度为 0.4 mg/mL(以杆菌肽计)的储备液,于 –20 ℃ 冰箱中保存。准确吸取适量杆菌肽标准储备液,用 0.1% 甲酸水溶液稀释制备浓度为 1000、10000 ng/mL 的标准工作液,现配现用。

1.3 方法

1.3.1 液相色谱条件 XBridge® C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,3.5 μm),流速:0.4 mL/min,柱温:35 ℃,进样量:5 μL,流动相:A 为 0.1% 甲酸水,B 为乙腈,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution conditions			
时间/min	流速/(mL · min ⁻¹)	A/%	B/%
0	0.4	85	15
0.5	0.4	85	15
7.5	0.4	15	85
8.0	0.4	15	85
8.1	0.4	85	15
10.0	0.4	85	15

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源,正离子扫描,多反应监测(MRM),喷雾电压 5500.0 V,去簇电压 120.0 U/V,离子化温度 550 ℃,气帘气压力 30.0 Psi,碰撞室压力 8 Psi。根据杆菌肽离子扫描结果,确定监测离子对见表 2。

表 2 杆菌肽 A、杆菌肽 B 定性、定量离子对及碰撞能

Tab 2 Mass spectrometry detection parameters of bacitracin A、B			
检测物	保留时间 /min	定性离子对 (碰撞能)	定量离子对 (碰撞能)
杆菌肽 A	3.74	711.6 > 227.0 (50.2)	711.6 > 199.1 (58)
杆菌肽 B	3.56/3.68	705.0 > 227.0 (50)	705.0 > 199.0 (46.1)

1.3.3 样品前处理 准确称取 2.0 (±0.01) g 匀浆的兔组织样品于 50 mL 离心管 A 内,加入 2 mL 10% 三氯乙酸乙腈溶液,涡旋一分钟,加入 5 mL 0.5% 三氟乙酸水,涡旋五分钟,接着 10000 r/min 离心 5 min,取上清至离心管 B。重复提取一次,合并提取液上清于离心管 B 中。向离心管 B 中加入 5 mL 正己烷并 10000 r/min 离心 5 min,弃去上层有机相以及中间乳化层,待净化。将 OASIS® PRiME HLB 3cc 150 mg 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化后,将离心管 B 中处理完的样品液过柱,待样品液全部流出后,依次用 3 mL 氨水甲醇和 3 mL 1% 甲酸乙酸乙酯淋洗,微微抽干,用 2 mL 甲醇乙腈洗脱并抽干收集于 10 mL 指形管中。向指形管加入 2 mL 0.1% 甲酸水,混匀后过 0.22 μm 有机滤膜过滤,滤液待 HPLC-MS/MS 检测。

1.4 定性方法 定性需满足以下条件:①空白样品中不出现与阳性对照相同的离子峰;②特征离子峰信噪比(S/N)≥3;③样品中杆菌肽的保留时间与标准溶液保留时间的偏差在±2.5%之内;④定性离子对的相对丰度与浓度相当的基质标准的相对丰度一致,偏差满足 2002/657/EC^[11]中的要求。

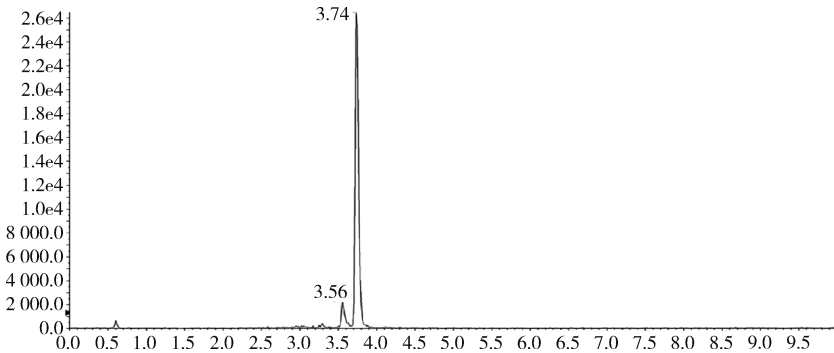


图 1 标准品中杆菌肽 A 总离子流图(杆菌肽 50 ng/g)

Fig 1 Total ion flow diagram of BTC A (BTC 50 ng/g)

1.5 定量方法的确立

1.5.1 基质标准曲线的制备 制备空白肌肉、脂肪、肝脏和肾脏样品各 6 份,经前处理后加入适量的标准工作液配成浓度为 50、75、150、300、600、1000 ng/g 的基质匹配标准溶液,在本试验所建立条件下,按照浓度从低至高的顺序依次进样。使用测得的杆菌肽特征离子峰面积作为纵坐标,对应的标准溶液浓度作为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。

1.5.2 检测限、定量限的测定 用标准储备液分别制备兔肌肉、脂肪、肝脏和肾脏的空白基质添加样品,再按 1.3 项下的条件进行处理、分析,取 S/N ≥3 时杆菌肽的浓度为方法的检测限(LOD),S/N ≥10 时杆菌肽的浓度为定量限(LOQ),每个浓度 5 个平行。

1.5.3 准确度和精密度的测定 准确称取 2 g 空白兔肌肉、脂肪、肝脏和肾脏,添加适量的杆菌肽标准工作液,使其浓度分别为 50、100、300、800 ng/g。按照 1.3.3 的方法进行处理后,分别进样 5 μL 进行 HPLC-MS/MS 测定。测定的结果带入各自标准曲线中,与真实值比较,以计算回收率。每批次每浓度做 6 个平行样品,共进行三个批次分三天完成。

2 结果与分析

2.1 方法专属性 在优化的色谱条件下,杆菌肽标准品溶液中杆菌肽 A 出峰时间约为 3.74 min,杆菌肽 B 的出峰时间约为 3.56 min 和 3.68 min,峰型良好。见图 1 和图 2。

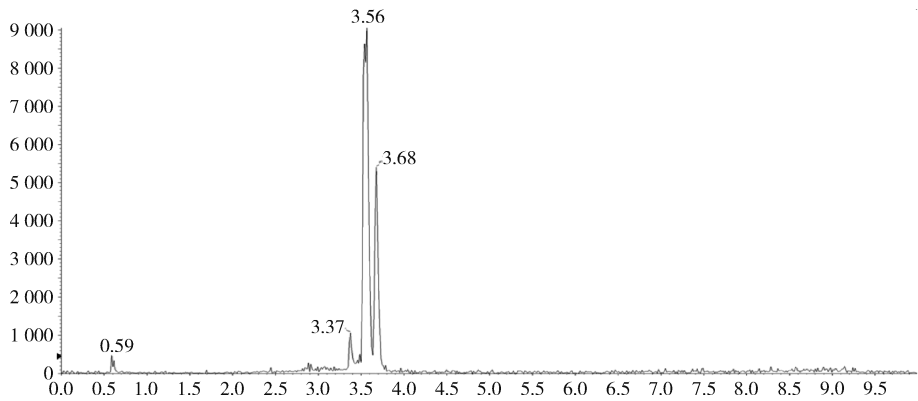


图 2 标准品中杆菌肽 B 总离子流图(杆菌肽 50 ng/g)

Fig.2 Total ion flow diagram of BTC B (BTC 50 ng/g)

对比兔的可食性组织(肌肉、脂肪、肝脏、肾脏)空白基质图谱与空白基质添加杆菌肽标准品的图谱,可以看出标准品中杆菌肽 A、杆菌肽 B 都与基质杂质分离良好,互不干扰,可用于定量分析。扫描空白基质与空白基质添加药物(50 ng/g)样品中

杆菌肽 A 定量离子对(711.6 > 199.1)的离子流图见图 3 ~ 图 10,扫描空白基质与空白基质添加药物(50 ng/g)样品中杆菌肽 B 定量离子对(705.0 > 199.0)的离子流图见图 11 ~ 图 18。

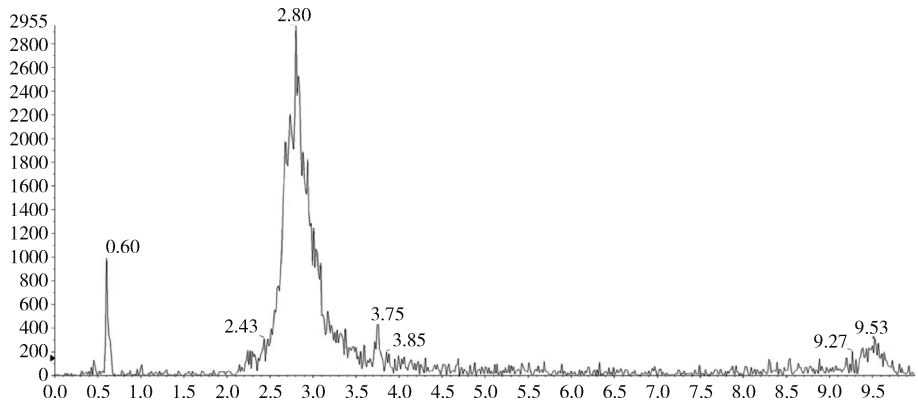


图 3 空白肌肉中杆菌肽 A 总离子流图

Fig 3 Total ion flow diagram of BTC A in blank muscle

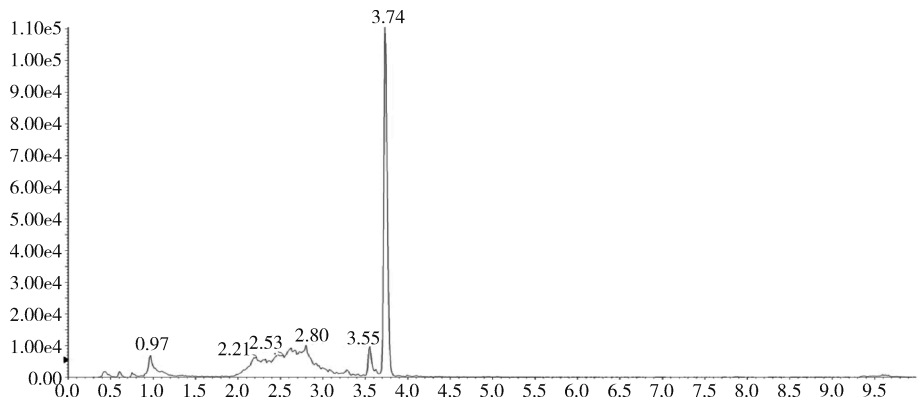


图 4 添加标准品的肌肉中杆菌肽 A 总离子流图(杆菌肽 50 ng/g)

Fig 4 Total ion flow diagram of BTC A in spiked muscle (BTC 50 ng/g)

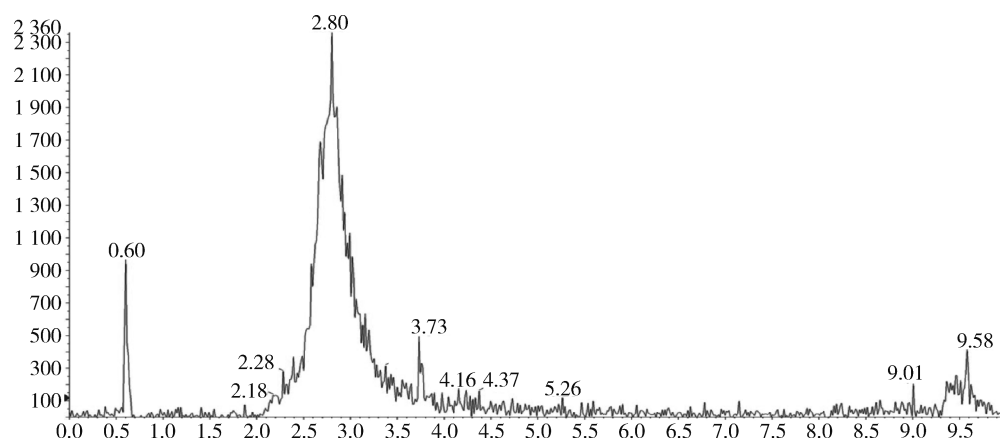


图 5 空白脂肪中杆菌肽 A 总离子流图

Fig 5 Total ion flow diagram of BTC A in blank fat

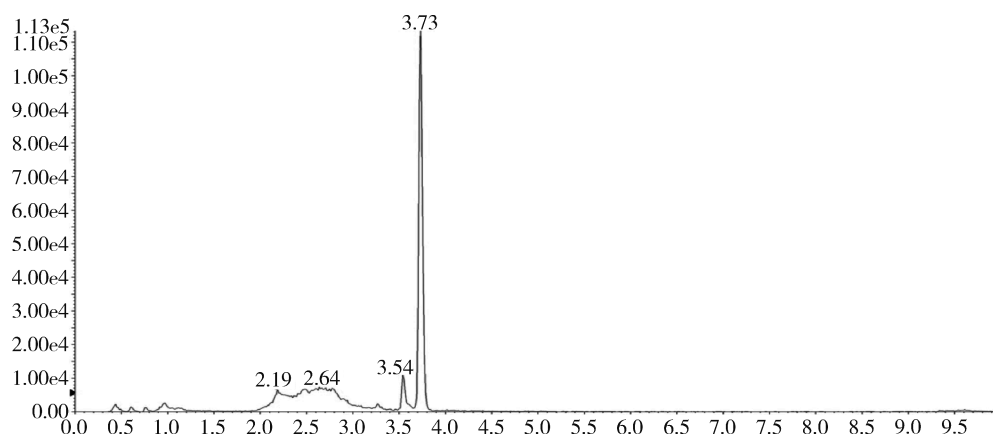


图 6 添加标准品的脂肪中杆菌肽 A 总离子流图 (杆菌肽 50 ng/g)

Fig 6 Total ion flow diagram of BTC A in spiked fat (BTC 50 ng/g)

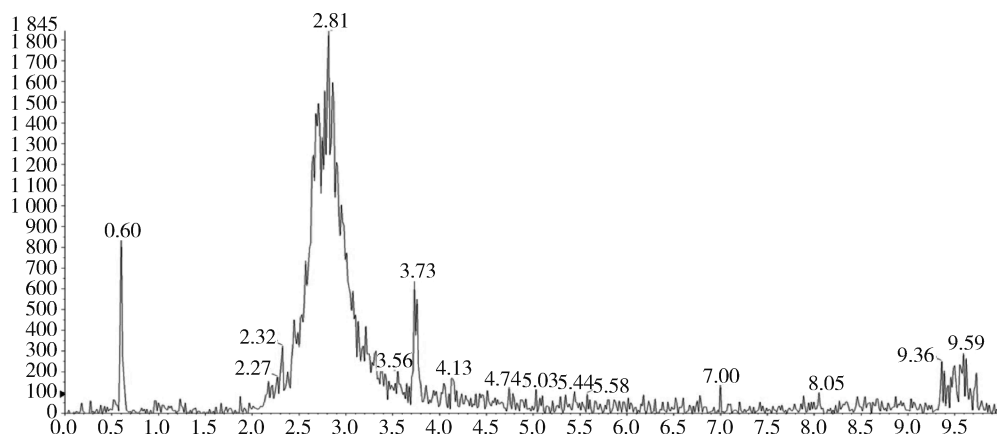


图 7 空白肾脏中杆菌肽 A 总离子流图

Fig 7 Total ion flow diagram of BTC A in blank kidney

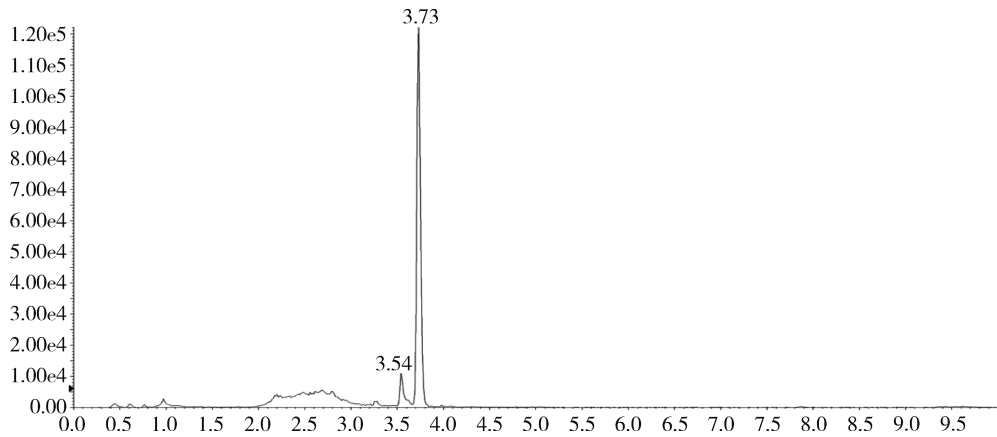


图 8 添加标准品的肾脏中杆菌肽 A 总离子流图(杆菌肽 50 ng/g)

Fig 8 Total ion flow diagram of BTC A inspiked kidney (BTC 50 ng/g)

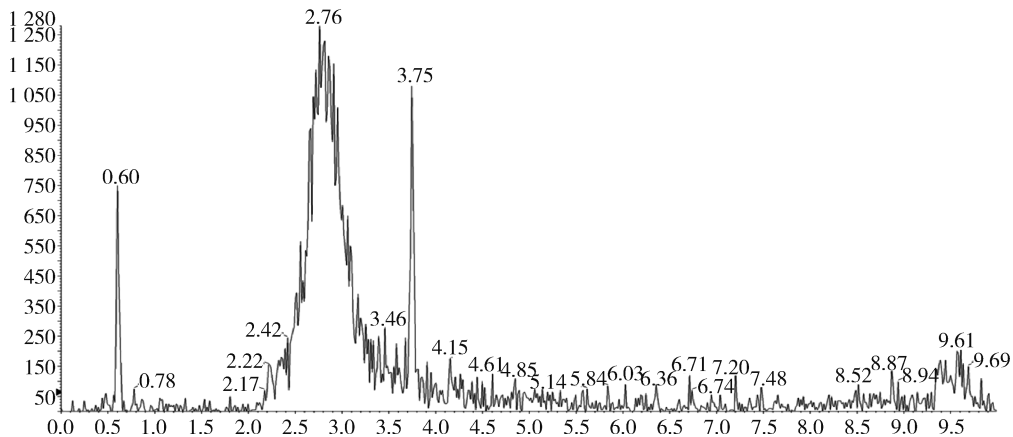


图 9 空白肝脏中杆菌肽 A 总离子流图

Fig 9 Total ion flow diagram of BTC A in blank liver

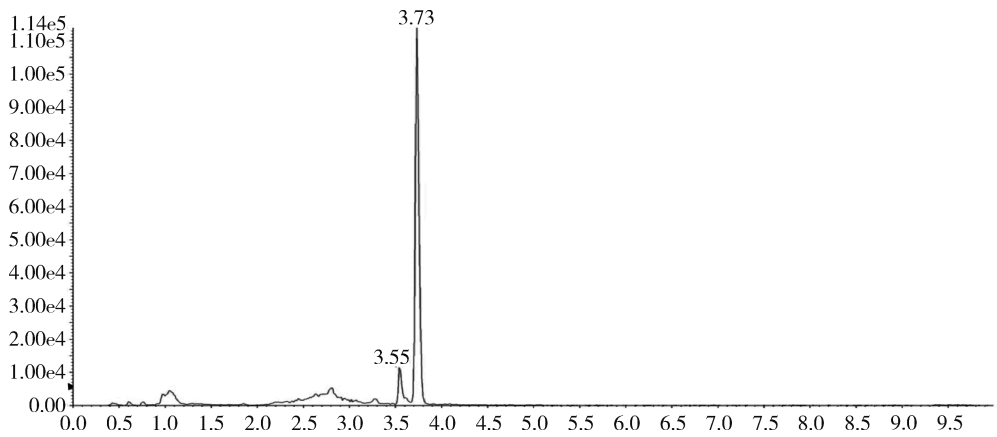


图 10 添加标准品的肝脏中杆菌肽 A 总离子流图(杆菌肽 50 ng/g)

Fig 10 Total ion flow diagram of BTC A inspiked liver (BTC 50 ng/g)

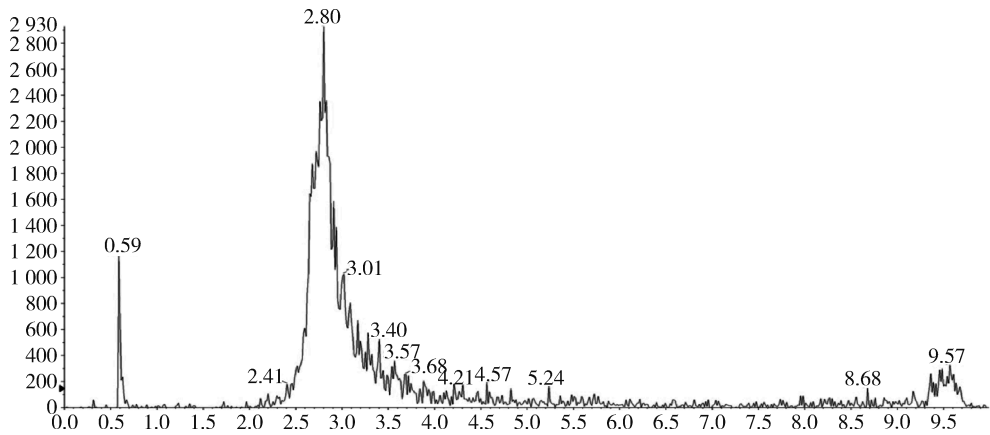


图 11 空白肌肉中杆菌肽 B 总离子流图

Fig 11 Total ion flow diagram of BTC B in blank muscle

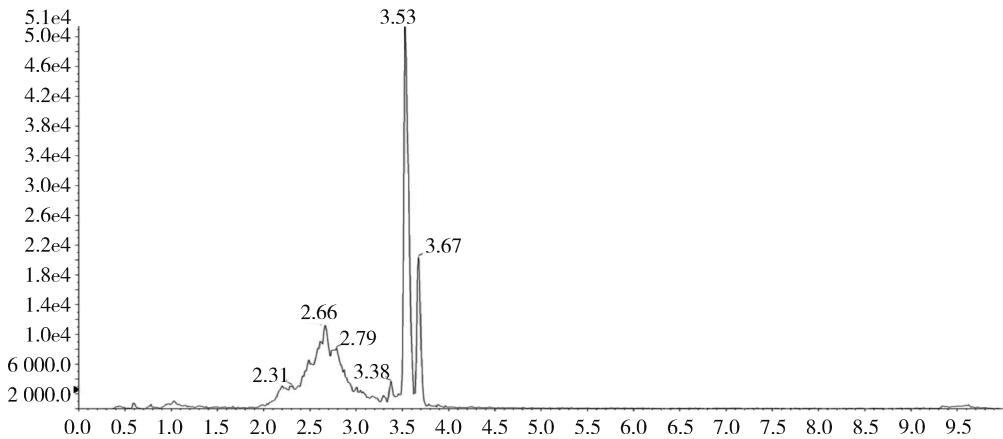


图 12 添加标准品的肌肉中杆菌肽 B 总离子流图(杆菌肽 50 ng/g)

Fig 12 Total ion flow diagram of BTC B in spiked muscle (BTC 50 ng/g)

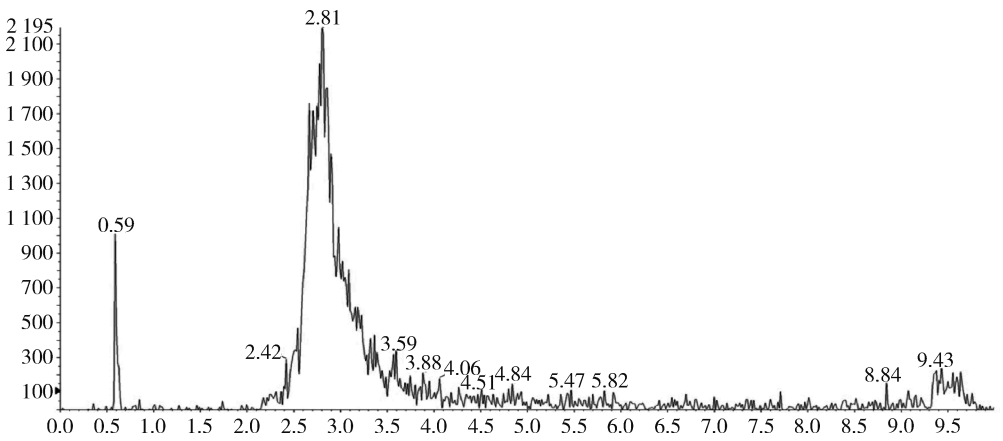


图 13 空白脂肪中杆菌肽 B 总离子流图

Fig 13 Total ion flow diagram of BTC B in blank fat

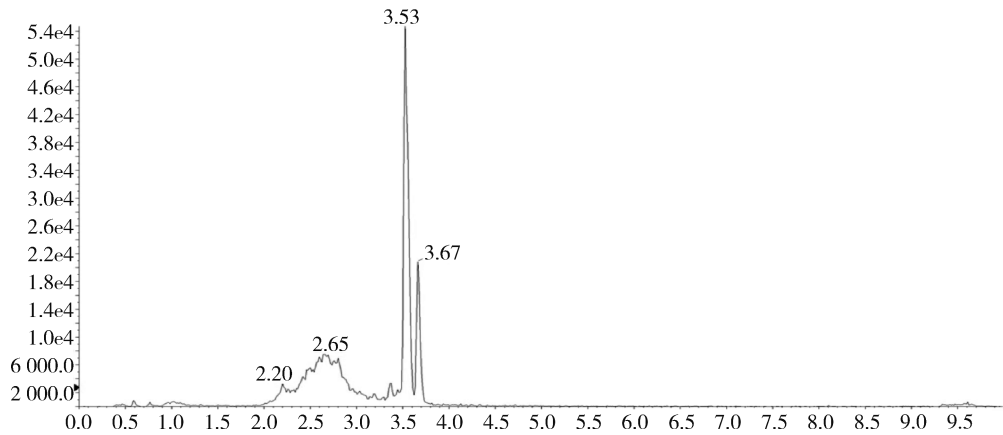


图 14 添加标准品的脂肪中杆菌肽 B 总离子流图 (杆菌肽 50 ng/g)

Fig 14 Total ion flow diagram of BTC B in spiked fat (BTC 50 ng/g)

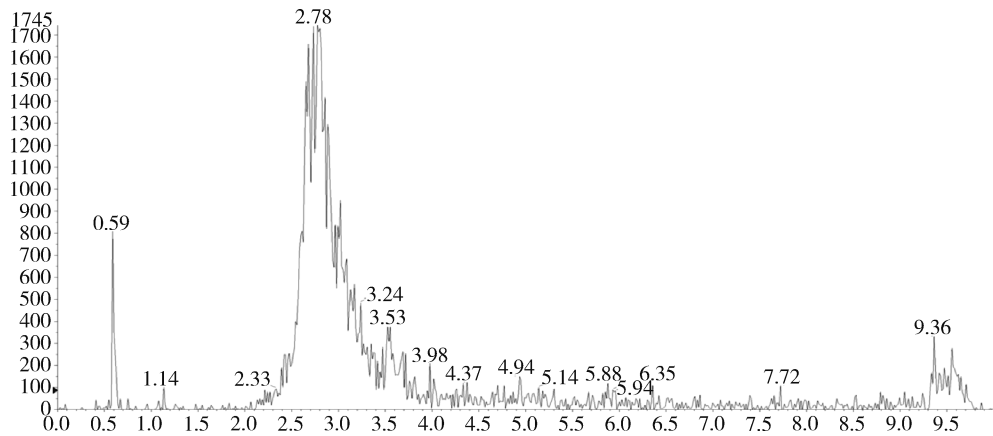


图 15 空白肾脏中杆菌肽 B 总离子流图

Fig 15 Total ion flow diagram of BTC B in blank kidney

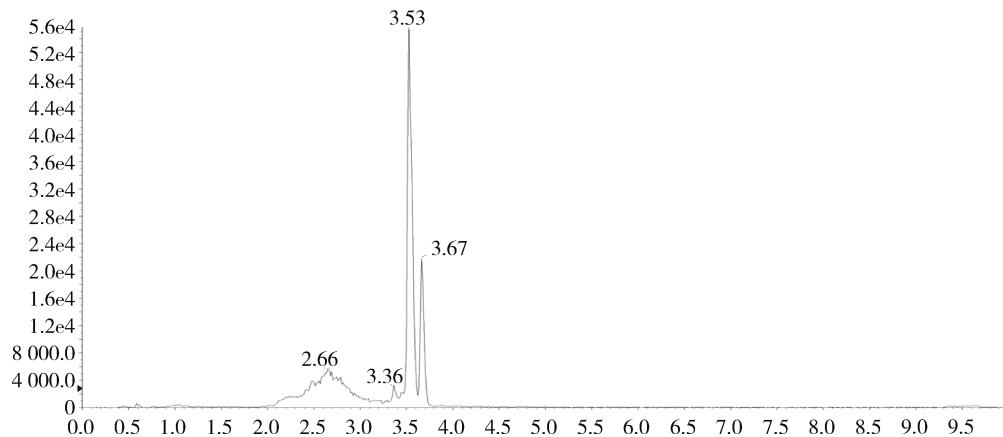


图 16 添加标准品的肾脏中杆菌肽 B 总离子流图 (杆菌肽 50 ng/g)

Fig 16 Total ion flow diagram of BTC B in spiked kidney (BTC 50 ng/g)

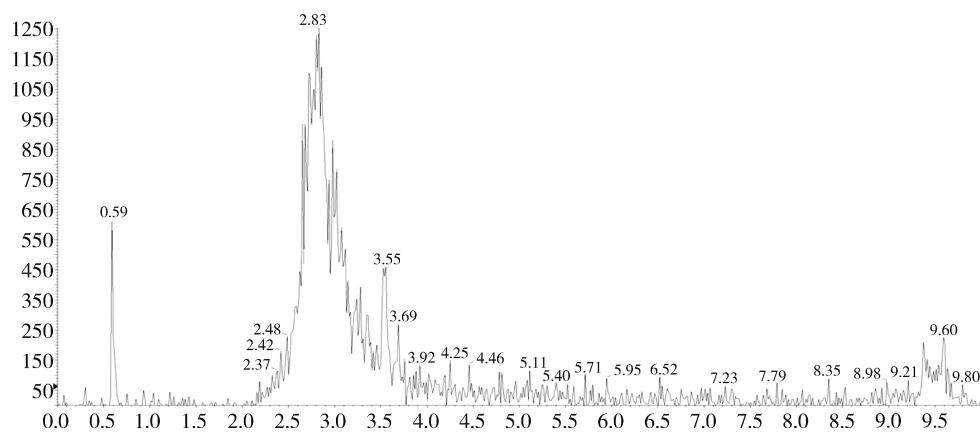


图 17 空白肝脏中杆菌肽 B 总离子流图

Fig 17 Total ion flow diagram of BTC B in blank liver

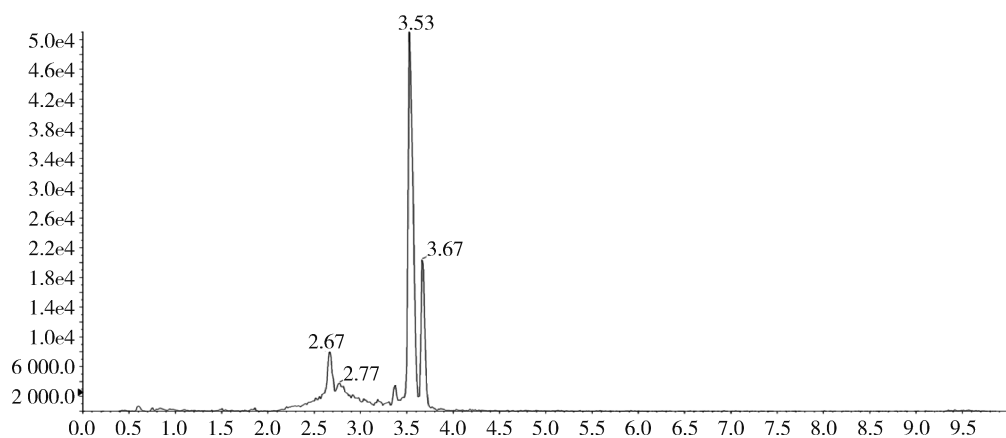


图 18 添加标准品的肝脏中杆菌肽 B 总离子流图 (杆菌肽 50 ng/g)

Fig 18 Total ion flow diagram of BTC B in spiked liver (BTC 50 ng/g)

2.2 线性结果 杆菌肽在 50 ~ 1000 ng/g 添加浓度范围内, 药物浓度与峰面积呈良好的线性关系, 线性回归方程相关系数(R^2) ≥ 0.99 (见表 3)。

表 3 杆菌肽在兔可食性组织线性方程

Tab 3 The curvilinear equation of Bacitracin for rabbits edible tissues

基质	线性范围(ng/g)	线性回归方程	相关系数(R^2)
肌肉	50 ~ 1000	$y = 2544.1x + 12998$	0.9997
脂肪	50 ~ 1000	$y = 2263.1x + 4967.8$	0.9991
肝脏	50 ~ 1000	$y = 2279.3x + 7211.7$	0.9990
肾脏	50 ~ 1000	$y = 2270.4x + 7561.5$	0.9993

2.3 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 取 $S/N \geq 3$

时浓度为最低检测限, 该方法检测限为 30 ng/g; 根据精密度和准确度试验结果, 取信噪比 $S/N \geq 10$ 时浓度为最低定量限为 50 ng/g。

2.4 准确度和精密度 样品中杆菌肽 HPLC - MS/MS 测定方法的结果表明, 兔可食性组织中杆菌肽在 50、150、300、800 ng/g 四个添加水平下测定的平均回收率 (以杆菌肽 A 与杆菌肽 B 之和计算) 在 74.7% ~ 83.8%。见表 4。

2.5 定性试验 通过考察来源于 6 只不同兔的组织的测定结果, 兔可食性组织中内源性杂质不干扰样品中杆菌肽 A、杆菌肽 B 含量的测定。基质添加标准品的杆菌肽 A、杆菌肽 B 相对离子丰度符合 2002/657/EC 规定的范围要求。

表 4 杆菌肽加标回收率与相对标准偏差 ($n=6$)

Tab 4 The rcoveries and RSD of bacitracin($n=6$)

组织	添加浓度 (ng/g)	批内平均回收率/%			批内变异系数/%			批间平均回收率/%	批间变异系数/%
肌肉	50	81.0	81.0	74.7	8.4	9.2	3.6	78.9	8.1
	150	83.6	81.5	80.5	8.1	5.7	5.1	81.8	6.3
	300	77.9	77.4	78.4	3.3	6.1	4.9	77.9	4.6
	800	79.4	78.7	80.4	4.4	7.3	4.5	79.5	5.3
脂肪	50	80.8	76.7	79.5	6.4	6.1	6.0	78.7	6.1
	150	76.5	79.7	77.6	2.5	6.2	2.8	77.9	4.4
	300	81.7	81.2	80.0	3.9	7.2	4.5	81.0	5.1
	800	79.8	79.9	81.2	2.6	4.5	0.9	80.3	3.0
肝脏	50	82.2	79.1	78.6	3.4	3.7	3.2	80.0	3.8
	150	80.5	80.8	78.5	7.4	6.5	4.4	79.9	6.0
	300	82.2	79.3	80.6	5.0	5.6	5.4	80.7	5.2
	800	81.7	80.5	81.5	7.2	6.3	5.0	81.2	5.9
肾脏	50	77.4	77.3	76.5	5.8	4.3	3.2	77.0	4.3
	150	81.9	82.2	80.8	6.6	4.7	7.1	81.6	5.9
	300	77.8	83.2	80.9	5.3	5.3	4.6	80.7	5.5
	800	83.0	81.6	83.8	3.3	5.2	5.0	82.8	4.5

3 讨 论

3.1 前处理方法的优化 前处理条件优化中,通过比较 0.5% 甲酸甲醇水(1:1)、0.5% 甲酸甲醇乙腈(1:1)、0.5% 甲酸乙腈水(1:1)、0.5% 甲酸乙腈水(3:7)、0.1% 甲酸水等提取方法,并参照 GB/T 20743-2006 给出的方法净化后进样分析,结果显示,采用 0.5% 甲酸甲醇水(3:7)和 0.5% 三氟乙酸水提取能够获得较好的回收率,但需除杂净化。优化后最终确定提取液为使用 5 mL 0.5% 三氟乙酸水提取 2 次。动物组织中含有大量的蛋白与脂肪,会严重影响 HPLC-MS/MS 系统的分析定量。目前对动物可食性组织或环境中杆菌肽提取液的净化大多采用 OASIS® HLB 3cc 60 mg 或 200 mg 固相萃取柱净化。试验中比较了 OASIS® HLB 3cc 60 mg、150 mg、200 mg, OASIS® PRiME HLB 3cc 60 mg、150 mg 和 Agilent Bond Elut-ENV 200 mg 3 mL 几种不同规格的固相萃取柱在 6 mL 水、3 mL 甲醇:5% 氨水溶液(V/V 20/80)加 3 mL 1% 甲酸乙酸乙酯、3 mL 甲醇:5% 氨水溶液(V/V 10/90)加

3 mL 1% 甲酸乙酸乙酯等不同淋洗条件下的净化效果,结果表明,在使用甲醇:5% 氨水溶液(V/V 20/80)和 1% 甲酸乙酸乙酯作为淋洗液时,OASIS® PRiME HLB 小柱表现得更好,能够有效减少杂质且不会损耗过多杆菌肽。筛选洗脱液时,甲醇和乙腈差异不显著。最终确定使用乙腈沉淀蛋白,正己烷除脂,OASIS® PRiME HLB 150 mg 固相萃取柱净化,淋洗条件为 3 mL 甲醇:5% 氨水溶液(V/V 20/80)加 3 mL 1% 甲酸乙酸乙酯,洗脱液为 2 mL 甲醇乙腈(V/V 20/80),可获得较好的回收率,且杂质不影响定量。

3.2 色谱条件的优化 在使用针泵进样对杆菌肽标准品进行离子扫描时,杆菌肽离子化会出现不同的状态,因此,在不同的实验中会依照实验条件选择不同的电荷状态。本试验条件下,选择杆菌肽双电荷状态即杆菌肽 A 的母离子质荷比为 712、杆菌肽的 B 母离子质荷比为 705 时,具有更加稳定的响应值和更低的基线。因此本试验在离子扫描时选择双电荷状态作为杆菌肽特征离子。

大多数文献报道中,液相条件都是使用甲酸水乙腈体系,偶有其他类型的流动相体系。在尝试选择对人危害较小且更加经济的甲酸水甲醇体系时发现,杆菌肽在 8 min 的流动相体系中,虽然出峰时间约为 2.8 min 且具有较好的峰形和峰高,但与兔组织中的杂质峰严重重叠,干扰定量。进一步优化后,最终选择依旧甲酸水乙腈体系,在该体系条件下可获得较好的峰形,且不与杂质相互干扰,利于定量分析。

4 结 论

本试验建立了兔可食性组织中杆菌肽的提取、净化及含量的 HPLC - MS/MS 检测法。兔可食性组织中杆菌肽残留使用 0.5% 三氟乙酸水提取,10% 三氯乙酸乙腈沉淀蛋白,正己烷除脂,固相萃取柱净化,以 0.1% 甲酸水和乙腈为流动相进行梯度洗脱。质谱采用电喷雾离子源 (ESI),正离子模式,多反应检测 (MRM) 模式。结果表明,杆菌肽在 50 ~ 1000 ng/g 添加浓度范围内,浓度与响应值之间线性关系良好,相关系数大于 0.99,方法的检测限为 30 ng/g,定量限为 50 ng/g。杆菌肽平均添加回收率在 74.7% ~ 83.8%,批内批间变异系数均小于 10%。依据 EMEA 规定的兔可食性组织中杆菌肽 MRL 标准,试验制定的兔可食性组织中杆菌肽残留标志物的 HPLC - MS/MS 测定方法,适用于兔可食性组织中杆菌肽残留量。

参考文献:

- [1] Kiyoshi T, Robertson J. High - pressure liquid chromatographic analysis of novobiocin [J]. Journal of chromatography, 1975. 112: 663 - 672.
- [2] V Pavli, V Kmetec. Optimization of HPLC method for stability testing of bacitracin [J]. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2001. 24: 977 - 982.
- [3] 沈建忠,肖希龙,杨汉春,等. 亚甲基双水杨酸杆菌肽对鸡坏死性肠炎的药效观察[J]. 中国兽医杂志, 1998(05): 3 - 5.
Shen J Z, Xiao X L, Yang H C, Cha Z L. Effect of methylene bisalicylic acid bacitracin on chicken necrotizing enteritis [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1998(05): 3 - 5.
- [4] Sims M D, Dawson K A, Newman K E *et al.* Effects of dietary

mannan oligosaccharide, bacitracin methylene disalicylate, or both on the live performance and intestinal microbiology of turkeys [J]. Poultry Science, 2004: 1148 - 1154.

- [5] Proctor A, Phillips G. Differential effects of bacitracin methylene disalicylate (BMD) on the distal colon and cecal microbiota of young broiler chickens [J]. frontiers in Veterinary Science, 2019. 6(114).
- [6] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. 出口禽肉中杆菌肽残留量检验方法 - 杯碟法 [S]. 中华人民共和国进出口商品检验行业标准 SN 0295 - 93, 1994.
National Import and Export Commodity Inspection Bureau of the People's Republic of China. Method for the determination of Bacitritin Residues in Poultry exports - Cup and saucer method [S]. Industrial Standard of the People's Republic of China for The Inspection of Import and Export Commodities SN 0295 - 93, 1994.
- [7] 郭桂芳, 贺文庆, 李维静, 等. 猪可食性组织中杆菌肽残留量测定的微生物学方法[J]. 中国兽医杂志. 2014. 50(02): 76 - 78.
Guo G F, He W Q, Li W J, *et al.* Microbiological method for the determination of bacitracin residues in edible pig tissues [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine. 2014. 50(02): 76 - 78.
- [8] 钱卓真, 罗冬莲, 罗方方, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定养殖环境沉积物中多肽类抗生素残留量[J]. 分析化学. 2016. 44(06): 870 - 875.
Qian Z Z, Luo D L, Luo F F, *et al.* Determination of residues of polypeptide antibiotics in cultured sediments by High performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry. 2016. 44(06): 870 - 875.
- [9] Wan E C, Ho C, Sin D W *et al.* Detection of residual bacitracin A, colistin A, and colistin B in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2006. 385(1): 181 - 8.
- [10] Xie S Y, Pan Y H, Chen D M, *et al.* Quantitative Analysis of Bacitracin in Porcine Edible Tissues by High - Performance Liquid Chromatography - Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry and Its Application to Residue Depletion Study [J]. Food Analytical Methods, 2016. 10(2): 539 - 548.
- [11] Commission Decision of 12 August 2002 Implementing the Council Directive 96/23/EC. Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC) [J]. Official Journal of the European Communities L221, Brussels, Belgium, 2002. 8.

(编辑:陈希)