

高效液相色谱法测定牛奶及牛可食性
组织中咪唑苯脲

于慧敏, 黄显会, 杨刚, 方秋华

(华南农业大学 国家兽药残留基准实验室, 广东 广州 510642)

摘要:建立了高效液相色谱法(HPLC)测定牛奶及牛可食性组织中咪唑苯脲(IMD)残留. 牛奶或已匀浆组织先用β-葡萄糖苷酶水解, 组织用盐酸超声提取, 再用提取液萃取, 牛奶直接用提取液提取. 用乙腈-戊烷磺酸钠水溶液作为流动相, 经高效液相色谱C₁₈柱分离后用紫外检测器检测. 咪唑苯脲质量浓度在0.01~10.00 μg/mL的范围内呈现良好的线性关系, 相关系数大于0.999; 组织加标样品检出限为0.01 μg/g, 定量限为0.02 μg/g. 在定量限、最高残留限量、2倍最高残留限量添加水平下的平均回收率为80.02%~114.72%, 批内相对标准偏差为0.83%~10.92%, 批间相对标准偏差为7.45%~12.69%. 表明该检测方法简单、灵敏、可靠, 适用于牛奶及牛组织中咪唑苯脲残留的分析.

关键词:高效液相色谱; 咪唑苯脲; 残留; 牛奶; 牛可食性组织

中图分类号: S859.7 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2012)02-0239-05

Determination of Imidocarb Residues in Bovine Edible Tissues
by High-Performance Liquid Chromatography

YU Hui-min, HUANG Xian-hui, YANG Gang, FANG Qiu-hua

(National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A confirmative method has been developed to determine imidocarb (IMD) residues in edible tissues and milk of bovine by high-performance liquid chromatography (HPLC). The tissues and milk were first hydrolyzed by β-glucosidase. The tissues were extracted with hydrochloric acid, ultrasonicated and back-extracted with extract while the milk was extracted with extract only. The mobile phase was acetonitrile and 1-pentansulfonic acid sodium salt solution. The analyte was detected by UV absorptive spectroscopy after separation by C₁₈ column. The range of linearity was 0.01–10.00 μg/mL; the relevant coefficient was more than 0.999. The limit of detection (LOD) was 0.01 μg/g, and the limit of qualification (LOQ) was 0.02 μg/g. Mean recoveries from bovine tissues and milk fortified at LOQ, MRL (the maximum residue limit) and 2MRL were from 80.02%–114.72%, whereas the corresponding RSDs were from 0.83%–12.69%. In conclusion, the established method is simple, sensitive and reproducible for the determination of imidocarb residues in edible tissues and milk of bovine.

Key words: high-performance liquid chromatography; imidocarb; residue; milk; edible tissue of bovine

咪唑苯脲又称双脒苯脲或咪多卡, 属苯氨基类衍生物之一^[1]. 本品有二盐酸盐和二丙酸盐2种形式, 为新型抗梨形虫药物, 对家畜梨形虫病、无浆体病及附红细胞体病等有很好的预防效果和治疗作用^[1-4]. 由于二盐酸盐具有较强的局部刺激性, 临床上使用较多的是二丙酸咪唑苯脲. 二丙酸咪唑苯脲(Imi-

收稿日期: 2011-03-16
作者简介: 于慧敏(1985—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 黄显会(1969—), 男, 高级兽医师, E-mail: xhhuang@scau.edu.cn
基金项目: 2009年农业行业标准制修订项目

docarb dipropionate salt,IMDP)是一种传统的抗寄生虫药,化学名称为二丙酸 N,N'-二[3(4,5-2H-1H-咪唑-2-基)苯基]脲,分子式为 $C_{19}H_{20}N_6O$,相对分子质量为 348.41. 该药是一种有效的抗巴贝斯虫、边虫等血液原虫感染的药物. 目前在动物有肌肉或皮下注射 2 种给药途径,一般不做静脉注射. 这主要是由于该药具有较强的抗乙酰胆碱酯酶作用,临床可能导致动物出现心血管及神经肌肉方面的副反应,有时甚至导致死亡. 同时,肌肉注射高剂量时,除上述副作用外,对局部组织还有一定的刺激性. 目前,该药已广泛应用于世界各地,为国际公认的最佳抗梨形虫药物,是美国药典唯一收录的应用于梨形虫病的治疗药物^[5]. 在动物体内,该药的主要蓄积器官是肝脏与肾脏,心脏与肌肉次之^[6],脑残留量也很高,可能产生一定的神经毒性^[7]. 欧盟药品管理局(EMA)报道的牛各组织中咪唑苯脲最高残留限量(MRL)为:牛奶和脂肪 0.05 $\mu\text{g/g}$,肌肉 0.3 $\mu\text{g/g}$,肾脏 1.5 $\mu\text{g/g}$,肝脏 2 $\mu\text{g/g}$ ^[1]. 咪唑苯脲残留检测方法少见报道. 本研究建立牛组织和牛奶中咪唑苯脲的残留量测定的高效液相色谱法,对监控牛组织和牛奶中咪唑苯脲残留量具有较好应用价值.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Dionex 3000 高效液相色谱仪;配备四联泵、色谱工作站、紫外检测器、自动进样器,美国戴安公司;AE160 型电子分析天平,瑞士 Mettler 公司;Mach 1.6R 冷冻型离心机,美国 Thermo 公司. β -葡萄糖苷酶(规格 2 mL,约 30 U/mL,产品编号 1041140002,德国 Merck 公司),乙腈、戊烷磺酸钠均为色谱纯,异戊醇、正己烷、氯化钠、乙酸铵、三乙胺、冰醋酸、盐酸、氢氧化钠均为分析纯. 咪唑苯脲原料药(纯度 98.5%,批号 20060830,紫金正天动物药业有限公司),咪唑苯脲精制品(纯度 99%,批号 080311,河北远征药业有限公司).

1.2 试液的配制

咪唑苯脲标准储备液:准确称取咪唑苯脲 100 mg,于 100 mL 容量瓶中用流动相配制成 1 mg/mL 的标准储备液,密封,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 咪唑苯脲标准工作液:准确量取标准储备液,用流动相稀释成质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液,密封,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 提取液:300 mL 正己烷与 200 mL 异戊醇混合;7.5 mmol/L 戊烷磺酸钠水溶液:准确称取 1.305 g 戊烷磺酸钠,配成 1 000 mL 水溶液,加入 1 mL 三乙胺,用冰醋酸调节 pH 至 3.0;0.2 mol/L 乙酸铵溶液:准确称取

7.708 g 乙酸铵,加水配成 500 mL 水溶液,冰醋酸调 pH 至 5.0;流动相:乙腈与 7.5 mmol/L 戊烷磺酸钠水溶液(冰醋酸调节 pH 至 3.0)按体积比 2:8 混匀.

1.3 样品前处理

1.3.1 组织前处理 已匀浆组织样品在室温下自然解冻,称取 (1 ± 0.01) g,置于 30 mL 离心管中. 加 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液 3 mL, β -葡萄糖苷酶 25 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床震荡 6 h,冷却至常温,加 1 mol/L 的盐酸 5 mL,涡旋混匀,超声 10 min,300 r/min 振荡 10 min,8 000 r/min 离心 10 min(脂肪 4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 r/min 离心 10 min),将上清液转移至 50 mL 离心管内,残渣加 1 mol/L 的盐酸 5 mL 重提 1 次,将上清液合并. 在上清液中加入 10 mol/L 氢氧化钠 2 mL,约 4 g 氯化钠,5 mL 提取液,涡旋混匀,200 r/min 振荡 15 min,8 000 r/min 离心 10 min. 取上清液置于 12 mL 玻璃管中,加入 5 mL 提取液重提 1 次,合并上清液,60 $^{\circ}\text{C}$ 空气吹干. 加流动相 1 mL 溶解,转移至 2 mL 离心管中,加 0.8 mL 正己烷除脂,涡旋混匀,300 r/min 振荡 5 min,15 000 r/min 离心 10 min,弃正己烷,再重复加正己烷 2 次,水相过 0.22 μm 膜,HPLC 检测.

1.3.2 牛奶前处理 称取 (1 ± 0.01) g 牛奶于 15 mL 离心管内,加 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液, β -葡萄糖苷酶 25 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床震荡 6 h,冷却至常温,加 2 mol/L 氢氧化钠溶液,约 1 g 氯化钠固体,涡旋混匀,加 5 mL 提取液,200 r/min 振荡 20 min,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 12 mL 玻璃管中,加 5 mL 提取液重提 1 次,合并上清液,60 $^{\circ}\text{C}$ 空气吹干. 加 1 mL 流动相溶解,转移至 2 mL 离心管中,加 0.8 mL 正己烷,涡旋混匀,300 r/min 振荡 5 min,15 000 r/min 离心 10 min,弃正己烷,重复此操作 2 次,水相过 0.22 μm 膜,HPLC 检测.

1.4 检测限与定量限

称取 1 g 空白匀浆组织或牛奶,依次加入 100 μL 不同质量浓度(0.1、0.2、0.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$)标准工作液,旋涡混匀,使得样品中咪唑苯脲分别为 0.01、0.02、0.05、0.10 $\mu\text{g/mL}$,以加入 100 μL 双蒸水的样品作对照. 按“1.3”方法进行处理.

1.5 回收率与精密度

采用在空白样品中加标的方法进行回收率和精密度的测定. 根据欧盟对咪唑苯脲制定的最高残留限量^[1]及残留控制要求,将不同质量浓度(0.2、0.5、3.0、6.0、15.0、20.0、30.0、40.0 $\mu\text{g/mL}$)标准工作液 100 μL 加入至 1 g 不同空白匀浆组织或牛奶中,涡旋混匀,使样品的添加量为定量限(LOQ)、1MRL、2MRL 3 个添加水平,即肌肉中添加质量比为

0.02、0.30、0.60 μg/g,肾脏中添加质量比为0.02、1.50、3.00 μg/g,肝脏添加质量比为0.02、2.00、4.00 μg/g,脂肪和牛奶添加量为0.02、0.05、0.10 μg/g.按“1.3”方法进行处理,每个质量比或质量浓度样品平行5份同日测定,连续做5 d.

1.6 色谱条件

色谱柱为德国CNW公司C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,粒度5 μm);流动相采用梯度洗脱,A液为乙腈,B液为7.5 mmol/L戊烷磺酸钠水溶液,0~4 min,16% A,84% B;4~11 min,20% A,80% B;11~13 min,16% A,84% B;流速为1 mL/min;检测波长为260 nm;柱温30 ℃;进样量20 μL.

2 结果

2.1 线性范围

量取适量标准工作液,用流动相稀释成0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 μg/mL,每一质量浓度测5次,按所得峰面积平均值(γ)对相应质量浓度(x)做标准曲线,得回归方程 $\gamma = 1.8642x + 0.0215$,相关系数 $R^2 = 0.9991$,如图1,标准溶液色谱图如图2.

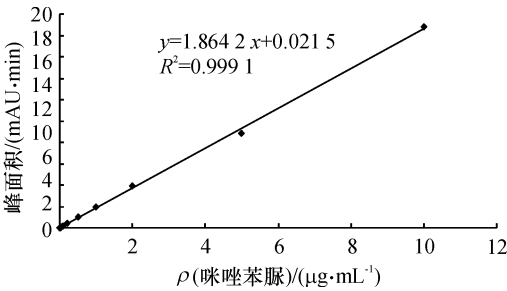


图1 标准曲线
Fig.1 Standard curve

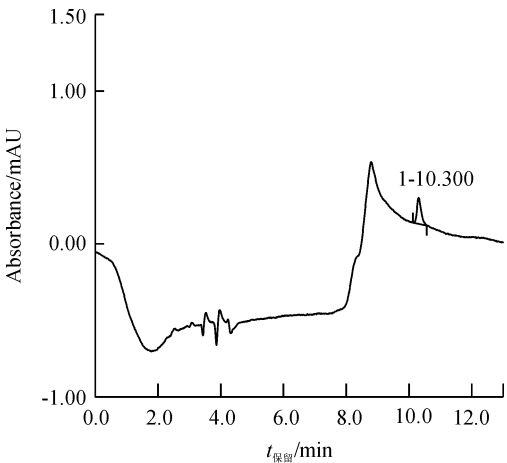
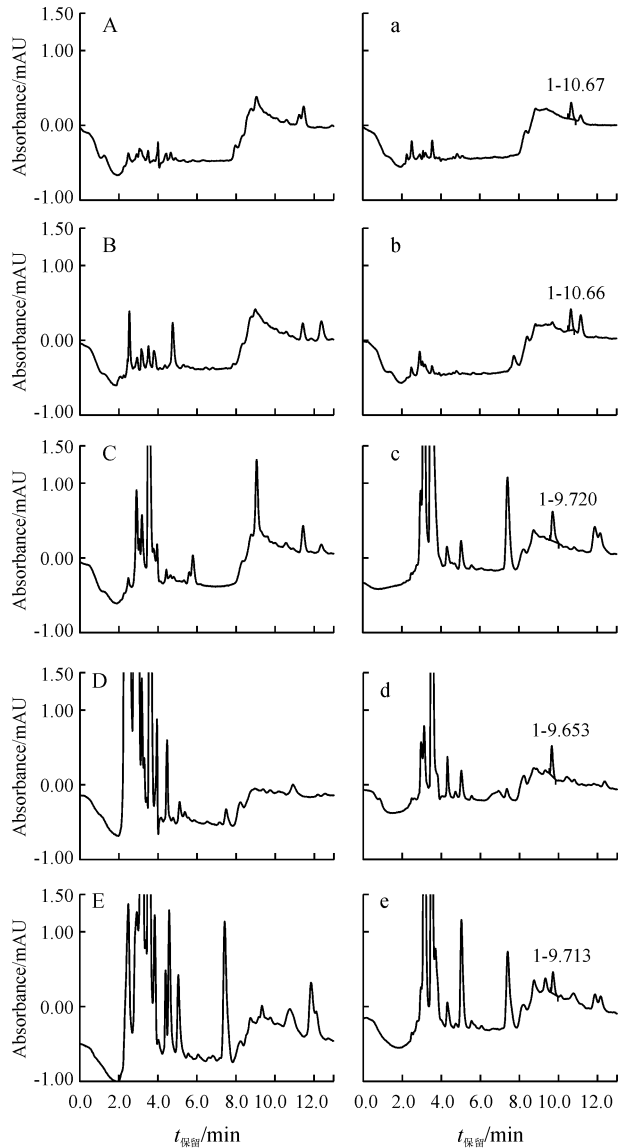


图2 咪唑苯脲标准溶液高效液相色谱图(0.02 μg/g)
Fig.2 HPLC chromatograms of standard solution(0.02 μg/g)

2.2 检测限与定量限

分别以3倍信噪比、10倍信噪比计算方法的检测限和定量限,得到空白组织标准添加的检测限为0.01 μg/g,定量限为0.02 μg/g,如图3,低于 EMEA^[1]报道的最大残留限量值.



A、a:牛奶;B、b:脂肪;C、c:肝脏;D、d:肌肉;E、e:肾脏.

图3 空白(A~E)及空白添加咪唑苯脲(0.02 μg/g,a~e)色谱图
Fig.3 HPLC chromatograms of blank (A-E) and spiked with 0.02 μg/g of imidocarb (a-e)

2.3 回收率与精密度

按“1.6”进行检测,得回收率为80.02%~114.72%,批内相对标准偏差(RSD)为0.83%~10.92%,批间RSD为7.45%~12.69%.结果见表1.

表 1 回收率及相对标准偏差
Tab. 1 Recoveries and RSDs

组织	$w(\text{咪唑苯脲})_{\text{添加}}/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	批内回收率($n=5$)/%					批内 RSD/%					批间回收率($n=25$)/%	批间 RSD/%
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
肌肉	0.60	95.01 ± 7.79	89.04 ± 6.21	80.06 ± 7.53	80.02 ± 2.29	83.01 ± 4.59	8.20	6.98	9.41	2.87	5.53	85.43 ± 8.10	9.48
	0.30	88.40 ± 7.41	91.26 ± 8.10	80.08 ± 6.25	80.11 ± 3.96	80.99 ± 2.76	8.38	8.88	7.84	4.95	3.40	84.17 ± 7.33	8.91
	0.02	91.98 ± 9.37	90.94 ± 9.87	102.16 ± 3.90	95.52 ± 5.36	99.28 ± 8.33	9.18	8.85	3.82	5.61	8.39	95.98 ± 8.28	9.63
脂肪	0.10	105.55 ± 6.19	99.93 ± 8.49	82.83 ± 4.18	81.98 ± 3.90	87.23 ± 1.27	5.87	8.50	5.04	4.76	1.45	91.50 ± 10.88	11.89
	0.05	96.58 ± 7.98	95.74 ± 6.91	104.15 ± 3.54	91.65 ± 3.88	101.16 ± 8.16	8.27	7.21	3.40	4.23	8.07	97.86 ± 7.36	8.52
	0.02	90.58 ± 8.49	101.39 ± 7.78	89.14 ± 4.34	94.03 ± 8.26	96.76 ± 8.79	9.37	7.67	4.87	8.79	9.09	94.38 ± 8.35	9.84
奶	0.10	95.00 ± 3.71	93.83 ± 3.61	103.20 ± 5.64	96.31 ± 6.86	97.81 ± 5.92	3.91	3.85	5.47	7.12	6.05	97.23 ± 5.88	7.45
	0.05	95.89 ± 5.73	83.79 ± 7.02	97.57 ± 9.40	114.72 ± 7.27	99.16 ± 10.04	5.98	8.37	9.63	6.33	10.12	98.23 ± 12.47	12.69
	0.02	94.08 ± 9.41	93.52 ± 6.40	88.97 ± 3.80	101.30 ± 5.04	94.34 ± 5.80	9.01	6.85	4.27	4.97	6.14	94.80 ± 7.46	9.87
肝脏	4.00	101.98 ± 3.45	105.22 ± 8.62	108.97 ± 1.71	89.89 ± 8.65	96.05 ± 2.64	3.38	8.19	1.57	9.62	2.75	101.52 ± 9.40	9.66
	2.00	94.72 ± 3.98	88.99 ± 4.44	98.98 ± 6.98	82.79 ± 8.46	94.96 ± 3.22	4.20	4.99	7.05	9.22	3.39	91.37 ± 8.48	9.28
	0.02	94.75 ± 6.97	94.65 ± 10.33	105.11 ± 9.86	106.26 ± 10.43	97.81 ± 2.71	7.36	9.91	9.38	9.81	2.77	100.19 ± 10.39	10.37
肾脏	3.00	94.35 ± 9.94	99.20 ± 10.83	92.80 ± 5.17	106.24 ± 9.47	103.48 ± 4.90	10.53	10.92	5.57	8.92	4.73	99.21 ± 9.33	11.40
	1.50	100.45 ± 11.78	95.75 ± 8.78	98.59 ± 4.19	105.97 ± 5.09	99.15 ± 3.50	9.72	9.17	4.25	4.80	3.53	99.98 ± 7.55	10.55
	0.02	92.49 ± 10.00	87.24 ± 0.73	98.40 ± 10.70	93.88 ± 9.06	97.38 ± 5.60	9.81	0.83	8.87	9.65	5.76	93.88 ± 8.44	9.99

3 讨论

3.1 提取条件的优化

3.1.1 酶解条件 咪唑苯脲属于脂溶性的弱碱,易于因细胞内、外液的 pH 差而以解离态集聚于细胞内^[8-9],此外,该药能与组织细胞中的生物大分子结合^[10-11],提取液不能将药物全部提取出来,回收率低且不稳定,故先采用β-葡萄糖苷酶处理,使药物与组织细胞解离。

大部分β-葡萄糖苷酶的最适 pH 都在酸性范围,且变化不大,一般在 3.5~5.5 之间,最适温度在 40~110℃之间都有分布.在文献^[12-13]的基础上,对酶解方法加以改进.分别添加 20、25、30、35、40、50、60 μL 酶,37℃水浴震荡 12 h,发现仅添加 20 μL 酶量的峰面积偏小,其他各组峰面积基本相同;加酶 25 μL,37、50、60℃条件,分别均水浴振荡 3、6、12 h,对比发现 37℃,6 h 条件的酶解效果最好.最后确定酶解条件,即酶量 25 μL,温度 37℃,时间 6 h.

3.1.2 组织的提取条件 咪唑苯脲是弱的有机碱,组织中的咪唑苯脲残留以原型药物为主,极性较低.尝试用 0.82 mol/L 盐酸^[6,14]、丙酮^[7]、甲醇、乙腈、0.2 mol/L 乙酸、0.12 mol/L 三氯乙酸甲醇、碱化后

直接用提取液^[23-24]提取,试验发现以 0.12 mol/L 三氯乙酸甲醇、提取液和丙酮为提取液时杂质含量较高,且甲醇、乙腈与 0.2 mol/L 乙酸作提取液的回收率较低;盐酸可与药物形成盐,回收率高,且杂质含量低,故选择盐酸为提取液,并对比试验结果后将其浓度提高到 1 mol/L,超声能使药物水溶性增加,减少萃取损失,故以超声辅助提取.

3.1.3 牛奶的提取条件 取 2 g 牛奶,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL,8 mL 提取液,离心取有机相,以 1 mol/L 盐酸 1 mL 萃取,水相过膜,检测^[15],回收率偏低,约 60%,且杂质较多;将氢氧化钠浓度提高到 2 mol/L,以 5 mL 提取液提取 2 次,回收率显著提高,同时杂质减少;加过量固体氯化钠(约 0.4 g),能减少乳化现象.试验发现,低温离心会出现乳化现象,常温离心能有效防止乳化.

3.2 净化条件的优化

样品前处理上清液中咪唑苯脲与盐酸形成盐,加 10 mol/L 氢氧化钠溶液^[7] 1 mL 调碱性(pH 约 12),回收率低,约 50%,将氢氧化钠体积提高到 2 mL(pH 约 13),回收率显著提高;加过量氢氧化钠调碱性后,加固体氯化钠,能有效防止乳化,降低药物在水相中的溶解度,而且对蛋白质盐析作用,可以减

少萃取液中的杂质,提高回收率和加强净化效果;用氯仿^[7]、提取液^[15]等溶剂反相萃取试验,结果以提取液为萃取溶剂时回收率高,杂质少;试验发现,振荡速度不超过 200 r/min 能有效减少乳化现象。

提取液中的正己烷能溶解脂类物质,所以残渣用流动相溶解后,需除去脂溶性杂质。分别用正己烷和三氯甲烷^[15]作为除脂溶剂试验,对比发现正己烷效果优于三氯甲烷。

3.3 色谱条件的选择

以体积分数 1% 的三氟乙酸水溶液-乙腈(体积比为 89:11)作流动相^[12],检测不出药物峰。咪唑苯脲是一种弱极性有机碱,与戊烷磺酸钠的阴离子结合,形成离子对。Crescenzo 以含 0.1% 三乙胺, pH 为 3.2 的 0.005 mol/L 戊烷磺酸钠为流动相来分离咪唑苯脲^[17]。为更好地改善峰形,本研究将戊烷磺酸钠浓度提高到 7.5 mmol/L,并以冰醋酸调 pH 至 3.0。初期以乙腈:戊烷磺酸钠(体积比为 15:85)流动相,出峰时间在 15~16 min;为调整药物出峰时间以获得更好的峰形,并尽量减少杂质峰干扰,采用梯度洗脱方法,对 Crescenzo 梯度比例^[17]加以改进,出峰时间调整在 10 min 左右,药物峰与杂质峰能分离良好,峰形明显改善,且杂质峰显著减少。

4 结论

本方法的检测限为 0.01 $\mu\text{g/g}$,定量限为 0.02 $\mu\text{g/g}$,远低于 EMEA 的最高残留限量值。在各添加水平下的回收率为 80.02%~114.72%,RSD 为 0.83%~12.69%,批内 RSD $\leq$ 10.92%,批间 RSD $\leq$ 12.69%,均符合农业部农发[2003]1 号关于发布《兽药残留实验技术规范(试行)》的规定要求,能满足样品的检测及监控的要求,同时也为咪唑苯脲药代动力学和残留研究提供了一种可靠的分析检测方法。

参考文献:

[1] U K. European Medicines Agency. Committee for veterinary medicinal products: Imidocarb Summary Report(1): MRL/444/98-FINAL[R]. London:EMEA,2004.

[2] AYOOB A L, HACKNER S G, PRITTIE J. Clinical management of canine babesiosis[J]. J Vet Emer Crit Care, 2010,20(1):77-89.

[3] 陈声国,索勋,聂浩,等.二丙酸咪唑苯脲对猪附红细胞体病的疗效试验[J].中国兽医寄生虫病,2008,16(1):1-6.

[4] RASHID A, KHAN J A, KHAN M S, et al. Prevalence and chemotherapy of babesiosis among lohi sheep in the

livestock experiment station, qadirabad,pakistan and environs[J]. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, 2010,16(4):587-591.

- [5] 李光壁.一种抗梨形虫药物咪唑苯脲及其盐的合成研究[D].济南:山东大学,2006.
- [6] 沈春岚,吴弋麋,宋鲁敏,等.国产咪唑苯脲二丙酸盐在牛体内的药代动力学及组织残留[J].中国兽医学报,1987,7(2):115-120.
- [7] ALIU Y O, DAVIS P H, CAMP B J, et al. Absorption, distribution and excretion of imidocarb dipropionate in sheep[J]. Am J Vet Res,1977,38(12):2001-2007.
- [8] BELLOLI C, CRESCENZO G, LAI O, et al. Pharmacokinetics of imidocarb dipropionate in horses after intramuscular administration[J]. Equine Vet J,2002,34(6):625-629.
- [9] BELLIOI C, LAI O, ORMAS E J. Pharmacokinetics and mammary elimination of imidocarb in sheep and goats[J]. Dairy Sci,2006,89(7):2465-2472.
- [10] COLDHAM N G, MOORE A S, SIVEAPATHASUNDARA M S, et al. Imidocarb depletion from cattle liver and mechanism of retention in isolated bovine hepatocytes[J]. Analyst, 1994,119(12):2549-2552.
- [11] MOORE A S, COLDHAM N G, SANER M J. A cellular mechanism for imidocarb retention in edible tissues[J]. Txicology Letters,1996,87(2-3):61-68.
- [12] SU Dan,LI Xiu-bo,WANG Zhong-jie, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of imidocarb dipropionate in swine[J]. J Vet Pharmacol Therap, 2007, 30(4):366-370.
- [13] WANG Zhong-jie, LI Xiu-bo, SU DAN, et al. Residue depletion of imidocarb in swine tissue[J]. J Agric Food Chem,2009,57,2324-2328.
- [14] 何宏轩,张西成,王静敏,等.咪唑苯脲缓释剂在黄牛体内的药代动力学及组织残留量测定[J].中国兽医科技,2000,30(7):10-13.
- [15] TARBIN J A, SHEARER G. High-Performance liquid chromatographic determination of imidocarb in cattle kidney with cation-exchange clean-up[J]. J Chromatogr, 1992,577(2):173-179.
- [16] 王兆学,毕可东,高光平,等.紫外系数倍率法测定盐酸咪唑苯脲缓释剂在奶牛中的血药浓度[J].中国奶牛,2008(5):11-14.
- [17] CRESCENZO G, LAI O R, BELLOLI C, et al. Validation of analytical methods or the determination of imidicarb in tissues and milk of cattle, sheep and goats[J]. Ital J Food Sci, 2002,14(2):99-111.