

农产品中转基因检测抽样研究-第3部分: 从实验室样品到分析样品

徐静, 张琳, 赵禹, 邵筠乔, 汪霖, 郑江, 曹际娟*

(辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

摘要: **目的** 针对农产品中转基因检测抽样过程, 研究从实验室样品中采取和制备分析样品过程中各参数对最终结果准确性的影响。**方法** 通过5%控制RSD, 计算各粒度下的实验室样品、中间样品和分析样品的最小留样量; 并通过计算对各相关参数进行考察。**结果** 得到缩分设计及缩分引起的方差; 合成制样方差、合成实验室样品总估计方差并对其进行了最终进行实验确认。**结论** 综合考虑检验要求、分析过程和制样过程, 得出从实验室样品到分析结果全过程(实验室内过程)中各个参数的优化方案。

关键词: 转基因; 抽样; 农产品

Sampling for genetically modified organism content analysis in agricultural products-part 3: process from laboratory sample to analytical sample

XU Jing, ZHANG Lin, ZHAO Yu, SHAO Yun-Qiao, WANG Lin, ZHENG Jiang, CAO Ji-Juan*

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of process from lot to laboratory sample on the accuracy of results during sampling of genetically modified organism (GMO) content analysis in agricultural products. **Methods** By 5% control of RSD, minimum sample mass for the various particle sizes of the laboratory sample, medium samples, and the analytical samples were calculated, and the related factors were investigated. **Results** Several recommended processes and their relative variance were given. Combined with sample preparation variance, total analytical variance of laboratory sample was practically validated. **Conclusion** The optimization scheme of the whole process of the laboratory samples to the analysis results was obtained under the consideration of inspection requirements, analysis process and sample preparation process.

KEY WORDS: genetically modified organisms; sampling; agricultural products

1 引言

在过去30多年里, 转基因植物(genetically modified

organisms, GMOs)的种植面积和产量持续提升^[1], 但其对人类健康的影响尚不清楚; 一些国家认为转基因产品无害, 不必实施控制措施, 只要是经过批准的品系就可以

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项项目、转基因生物抽制样和精准检测技术项目(2014ZX08012-001)

Fund: Supported by the Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects and Genetically Modified Organisms Sample Preparation and Accurate Detection Technology Projects(2014ZX08012-001)

*通讯作者: 曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: cjj0909@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Ph.D., Professor, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China. E-mail: cjj0909@163.com

种植和生产加工;而更多的国家采取谨慎态度,对转基因产品的种植、入境和销售采取了严格程度不同的技术措施,这导致与转基因产品相关的国际贸易中经常发生纠纷,进而对转基因检测提出了越来越高的要求,作为准确检测先决条件—抽样,得到越来越多的关注^[2-7]。作为准确检测先决条件的抽样技术对检测结果的准确度起到了至关重要的作用;如何准确抽取含有转基因成分的农产品样品,成为摆在科技工作者面前的重要课题^[8]。欧盟^[9-12]、ISO^[13,14]和中国^[15]分别针对 GMO 的抽样制订了法规标准,但现行标准法规中,全部采用理论计算、计算机模拟等方法,而缺少采用实际数据研究并分析所获得的方法。

转基因产品的抽样,按照先后顺序可分为以下3个过程:从批到实验室样品(process from lot to laboratory sample),从实验室样品到分析样品(from laboratory sample to analytical sample),从分析样品到试料(from analytical sample to test portion)。本系列文章将针对以上3个过程分别开展研究。

本文将讨论从实验室样品制备分析样品的过程。实验室样品是未经粉碎处理的最后一级样品。特别地,对于某些粉状货物(例如超微玉米粕、超微玉米酒糟粕等),可能不需要破碎而成为分析样品。该过程的主要误差与实验室样品的非均匀性、各粒度级中间样品及分析样品的非均匀性、质量缩减比例等有关。涉及的问题包括不同粒度的分析样品应至少保留多大的质量,哪种制备途径引入的方差是可接受的等问题。

2 材料与方法

2.1 实验材料

玉米、大豆、大米、油菜籽、微细玉米粕、超微细玉米粕、微细玉米酒糟粕、超微细玉米酒糟粕、苜蓿草等原料均来自大连港口装卸货轮取样。

2.2 最小样品量(minimum sample mass)的测算

按照公式:

$$s^2(SS)_{SS} \approx \left(\frac{1}{M_{SS2}} - \frac{1}{M_{LS}} \right) HI_{LS}$$

计算5%控制RSD得到各粒度下的实验室样品、中间样品和分析样品的最小理论留量,列于表1。从表中可知,在5%控制RSD下,在分析样品到试料环节推荐使用的-100目和-200目分析样品的最小留量均在100g以下。实践中通常检测的含量 $>10^{-4}$ 样品,其分析样品最小留量不超过10g,当分析样品留量超过50g时,由该粒度级引入的制样RSD不超过1.8%,这与其他RSD相比是可以忽略的,因此建议-100目分析样品的最小留量为50~100g,其制样RSD可控制在1.2%~1.8%之间。

对通常使用的中间样品(-3mm、-1mm、-60目),其最小留量受其含量和粒度影响较大。在这些粒度级中,当含量 $>10^{-3}$ 时,分别推荐使用2kg、300g、5g的最小留量,当需要检测含量约为 10^{-4} 产品时,则仅推荐使用-1mm和-60目样品,其最小留量分别推荐使用2kg和100g。各粒度级样品和含量下的推荐使用的最小留量及其对应RSD列于表2。

表1 最小样品量的测算值
Table 1 Theoretical minimum sample mass

单位: g

样品	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
玉米	800	4120	6.8E+04	7.1E+05	6.7E+06
大豆	1400	4840	9.2E+04	9.0E+05	8.0E+06
大米	80	480	7040	8.3E+04	7.6E+05
油菜籽	26	96	1680	1.83E+04	1.56E+05
微细玉米粕	0.24	0.32	7.2	96	680
超微细玉米粕	0.021	0.028	0.52	7.2	72
微细玉米酒糟粕	0.24	0.33	7.6	100	680
超微细玉米酒糟粕	0.022	0.030	0.56	7.6	76
苜蓿草	6.8	5.6	60	800	8800
-3 mm 中间样品	40	52	1240	1.2E+04	1.2E+05
-1 mm 中间样品	2.7	3.1	92	880	9360
-60 目 分析样品	0.088	0.11	2.8	29.2	268
-100 目 分析样品	0.014	0.022	0.52	6.0	68
-200 目 分析样品	0.0023	0.0026	0.052	0.80	6.4

表 2 推荐最小样品量

Table 2 Recommended minimum sample mass (M_{50})

样品类型	检测含量	M_{50}	RSD
大粒>4 mm	常规(~1%)	5 kg	~4.9%
	严格(~0.1%)	100 kg	~4.8%
中粒(1~4 mm)	常规(~1%)	1 kg	~3.8%
	严格(~0.1%)	10 kg	~4.5%
加工产品<1 mm	常规(~0.1%)	100 g	~4.8%
	严格(~0.01%)	1 kg	~4.7%
苜蓿草类	常规(~0.1%)	100 g	~3.8%
	严格(~0.01%)	1 kg	~4.5%
中间样品-3 mm	~0.1%	2 kg	~3.9%
中间样品-1 mm	~0.01%	2 kg	~3.3%
中间样品-60 目	~0.01%	100 g	~2.7%
分析样品-100 目	~0.01%	50 g	~1.7%

对于加工产品(如玉米粕和玉米酒糟粕)以及部分试料(如苜蓿草), 由于其标称粒度较小, 可以使用通常可接受的最小留量, 使 RSD 控制在可忽略的范围内。其推荐使用的最小留量及其 RSD 列于表 2。

对于中粒谷物(如油菜籽等), 除非特殊要求, 仅建议检测含量 10^{-3} 以上的产品。

对大粒产品(如玉米、大豆), 在通常的检测要求(含量约 1%), 推荐使用 5 kg 以上的实验室样品, 而当需要检测含量约 0.1% 的产品时, 推荐使用 100 kg 以上实验室样品。

鉴于实验室样品中包括了保留样品, 因此, 在实际留样时应在表 2 的基础上至少多一倍。

3 结果与分析

3.1 几种推荐制样过程

在通常的实验室中, 样品制备过程经过 1~3 个缩分—破碎的子过程, 使用的粉碎设备包括: 粮食粉碎机、旋风粉碎机、磨面机等, 其出口分别有 3 mm、1 mm、60 目、100 目、200 目等不同筛孔控制其出口粒度(常见制样设备所提供的出口粒度大致相同)。综合考虑制样设备、控制 RSD 和可行性等因素, 设计并推荐使用以下几种制样过程:

1)大粒产品(严格要求 10^{-3})100 kg—>3 mm 缩分至约 3 kg—>60 目缩分至约 350 g—>100 目缩分至约 80 g;

2)大粒产品(常规要求 10^{-2})5 kg—>60 目缩分至约 300 g—>100 目缩分至约 70g;

3)中粒产品(严格要求 10^{-3})10 kg—>1 mm 缩分至 2.5 kg—>60 目缩分至约 300g—>100 目缩分至约 70 g;

4)中粒产品(常规要求 10^{-2})1 kg—>60 目缩分至约 250 g—>100 目缩分至约 60 g;

5)小粒产品及加工产品(严格要求 10^{-4})1 kg—>60 目缩分至约 250 g—>100 目缩分至约 60 g;

6)小粒产品及加工产品(常规要求 10^{-3})100 g—>100 目 100 g;

7)苜蓿草等轻质饲料(严格要求 10^{-4})1 kg—>60 目缩分至约 250 g—>100 目缩分至约 60 g;

8)苜蓿草等轻质饲料(常规要求 10^{-3})100 g—>100 目 100 g。

3.2 缩分方差(deviation variance)

按 2.3.1 中推荐的制样过程, 分别采用添加的方法, 按照要求的含量分别添加转基因产品, 分别检测和数据分折, 缩分过程对应的典型方差(RSD)列于表 3。

表 3 缩分过程对应的典型方差($n=3$)

Table 3 RSD of recommended division processes ($n=3$)

制样过程	RSD
1)	0.11%
2)	1.1%
3)	0.12%
4)	0.4%
5)	0.7%
6)	--
7)	0.6%
8)	---

3.3 制样方差合成

将样品的固有方差与缩分方差合成为制样方差, 列于表 4。

表 4 合成制样方差($n=3$)

Table 4 RSD of recommended sample preparation processes($n=3$)

样品类型	检测含量	M_{50}	RSD
大粒>4 mm	常规(~1%)	5 kg	~4.9%
	严格(~0.1%)	100 kg	~4.9%
加工产品<1 mm	常规(~1%)	1 kg	~3.8%
	严格(~0.1%)	10 kg	~4.5%
苜蓿草	常规(~0.1%)	100 g	~4.9%
	严格(~0.01%)	1 kg	~4.7%
苜蓿草	常规(~0.1%)	100 g	~3.8%
	严格(~0.01%)	1 kg	~4.5%

3.4 实验室样品总估计方差合成

日常检验中,采用本系列文章中(第2部分:从分析样品到试料)推荐的检测方法,3.1推荐的制样方法,参照文献^[16],合成实验室样品总估计方差,列于表5。

表5 实验室样品总估计方差($n=3$)
Table 5 Routine total analytical RSD of laboratory sample ($n=3$)

样品类型	检测含量	M_{S0}	n_{TP}	RSD
大粒>4 mm	常规(~1%)	5 kg	2	~10.4%
	严格(~0.1%)	100 kg	2	~10.4%
中粒(1~4 mm)	常规(~1%)	1 kg	2	~10.0%
	严格(~0.1%)	10 kg	2	~10.2%
加工产品<1 mm	常规(~0.1%)	100 g	2	~10.4%
	严格(~0.01%)	1 kg	3	~8.9%
苜蓿草	常规(~0.1%)	100 g	2	~10.0%
	严格(~0.01%)	1 kg	3	~8.7%

3.5 实验室样品总分析方差的实验确认

由于在抽样和分析前无法获知批中待测转基因成分的含量范围,因此实践中难以按照3.1和表5推荐的方法统一实施实验室样品的制备和分析工作。

使用本系列文章中(第2部分:从分析样品到试料)推荐的样品分析方法,固定分析样品中采取试料个数为3,采用10 kg、5 kg、2 kg、1 kg、500 g这些日常检验工作中常用的实验室样品留量,按照(10 kg或5 kg)→(-1 mm缩分至2.5 kg)或2 kg或1 kg或500 g→(-60目缩分至200 g以上)→-100目缩分至约60~80 g的统一样品制备方法,对添加样品(1%、0.1%、0.01%)的实验估计,结果列于表6。

从表6中可知,采用统一的制样和分析过程,可在含量 $>10^{-4}$ 时控制实验室样品的总分析RSD(TAE)_{LS}在11.5%以下,但对 10^{-5} 及以下含量的实验室样品,其总分析RSD很难降低到40%以下。

表6 实验室样品总分析方差($n=3$)
Table 6 Practical estimation of total analytical RSD of laboratory samples ($n=3$)

M_{S0}	1%	0.1%	0.01%	0.001%
10 kg	7.7%	7.9%	11.5%	45.1%
5 kg	7.6%	8.1%	11.1%	44.8%
2 kg	7.2%	8.5%	10.9%	49.8%
1 kg	7.8%	7.6%	10.5%	53.2%
500 g	7.3%	8.5%	9.9%	47.7%

4 总结

对实验室样品使用不同处置方法所得到的结果准确性差别很大。另一方面,对某一含量区间的实验室样品采取类似或统一的制备和分析方法,可获得大致相同的总分析方差,因此,将样品制备和分析过程进行整理和优化,将有利于上述复杂过程的标准化。

表7 从实验室到分析样品的优化方案
Table 7 Optimized protocol for laboratory samples

范围	0.01% (大粒及中粒样品 0.1%)		
实验室/中间样品粒度	-1 mm	-60 目	-100 目
最小留样量	2 kg	200 g	50 g
分析样品制备	-100 目, 100 mg, $n_{TP}=3$, $n_{IT}=5$, $n_{EXT}=1$, $n_{PCR}=1$		
RSD(TAE) _{LS}	11.5%		

注: n_{TP} -重复分析次数; n_{IT} -构成试料的份样数; n_{EXT} -DNA提取次数; n_{PCR} -PCR次数

综合考虑检验要求、分析过程和制样过程,本文给出从实验室样品到分析结果全过程(实验室内过程)的优化方案,列于表7。

参考文献

- [1] ISAAA Brief 49-2014 [EB/OL]. <http://www.isaaa.org>. 2015-08-20.
- [2] 盛耀, 许文涛, 罗云波. 转基因生物产业化情况[J]. 农业生物技术学报, 2013, 12: 1479-1487.
Sheng Y, Xu WT, Luo YB. Commercialization of genetically modified organisms [J]. J Agric Biotech, 2013, 12: 1479-1487.
- [3] 刘培磊, 李宁, 周云龙. 美国转基因生物安全管理体系及其对我国的启示[J]. 中国农业科技导报, 2009, 5: 49-53.
Liu PL, Li N, Zhou YL. Safety administration system for transgenic organism in America and its enlightenment for China [J]. J Agric Sci Tech, 2009, 5: 49-53.
- [4] James C. 2014 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 1: 1-14.
James C. The 2014 global biotech/gm crops commercialization development situation [J]. China Biotechnol, 2015, 1: 1-14.
- [5] Barbau-Piednoir E, Stragier P, Roosens N, et al. Inter-laboratory testing of GMO detection by combinatory SYBR® green PCR screening (Co SYPS) [J]. Food Anal Methods, 2014, 8: 1719-1728.
- [6] Twardowski T, Malyska A. Uninformed and disinforming society and the GMO market [J]. Trends Biotechnol, 2015, 1: 1-3.
- [7] 韩永明, 翟广谦, 徐俊锋. 欧盟转基因生物管理法规体系的演变及对我国的启示[J]. 浙江农业科学, 2013, 11: 1482-1485.
Han YM, Zhai GQ, Xu JF. The evolution of the eu regulation system of transgenic organisms and the enlightenment to our country [J]. J Zhejiang Agric Sci. 2013, 11: 1482-1485.
- [8] Emslie KR, Whaites L, Griffiths KR, et al. Sampling plan and test protocol for the semiquantitative detection of genetically modified canola (Brassica napus) seed in bulk canola seed [J]. J Agric Food Chem, 2007, 11: 4414-4421.
- [9] Kay S, Paoletti C. Sampling Strategies for GMO detection and/or Quantification, EC Directorate General JRC [Z]. 2001.

- [10] ISO 542:1990 Oilseeds-Sampling [S].
- [11] ISO 13690:1999 Cereals, pulses and milled products-Sampling of static batches [S].
- [12] Kay S, Eede GVD. The limit of GMO detection [J]. Nat Biotech, 2001(19): 405-409.
- [13] ISO 24333:2009 Cereals and cereal products-Sampling [S].
- [14] ISO DTR29263 Cereals and cereal products-Sampling studies [S].
- [15] GB/T 19495.7-2004 转基因产品检测 取样和制样方法[S].
GB/T 19495.7-2004 Detection of genetically modified organisms and derived products-Methods for sampling preparation [S].
- [16] Pierre GY. Sampling for analytical purposes, translated by A. G. Royle [M]. New York: John Wiley and Sons, 1998.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



徐 静, 博士, 高级工程师。主要研究方向为食品安全色谱检测的研究。
E-mail: jingxu99@163.com



曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测与研究。
E-mail: cjj0909@163.com

“食品加工中的安全控制”专题征稿函

食品安全问题一直是公众最关心的话题之一。而且随着发展已经出现了很多食品安全事件, 自 2015 年 10 月 1 日起实施的新《食品安全法》也从“加大处罚力度、特殊食品特殊对待、监管网络食品交易”等方面对食品安全实行了更加严格的管控, 食品在加工中的安全控制是食品安全的重要环节。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品加工中的安全控制”专题, 由西北农林科技大学岳田利教授担任主编, 岳教授现任西北农林科技大学食品科学与工程学院院长, 兼任现任国务院学位委员会食品科学与工程学科评议组成员, 国家杨凌农业综合试验工程技术研究中心主任, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(杨凌)主任, 农业部食品质量监督检验测试中心(杨凌)常务副主任, 农业部植物 DUS 测试中心(杨凌)常务副主任。农业部农产品质量安全专家组成员, 国家食品药品监督管理总局餐饮食品安全专家组成员等职。专题主要围绕**食品加工全链条中安全危害因子的来源识别与过程节点的存在状态解析(微生物污染, 毒素污染, 植物源农药残留, 动物源兽药残留, 植物激素, 过量添加剂等)**、**加工全链条中有毒有害物质的控制方法**、**加工全链条的安全控制体系及系统解决方案**等或您认为本领域有意义的问题展开讨论, 计划在 2016 年 6 月出版。

本刊编辑部和岳田利教授欢迎各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部