

牛奶中氯霉素残留量测定能力验证结果分析

王亦琳, 孙 雷, 尹 晖, 叶 妮, 李 丹, 王鹤佳*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

摘 要: **目的** 对牛奶中氯霉素残留量测定的能力验证结果进行分析。**方法** 按照中国合格评定国家认可委员会规定的方法进行均匀性检验和稳定性检验。以 Z 比分数作为统计量对参加实验室的检测结果进行评价, 选择全部参加实验室上报结果的中位值作为指定值、标准化四分位距作为能力评定标准差。**结果** 牛奶中氯霉素残留检测项目能力验证实验室满意率为 84.8%, 可疑结果率为 0, 不满意率为 15.2%。国家级和省级检验机构的满意率相对较高。**结论** 在本次能力验证中, 大多数实验室均能准确检测牛奶中氯霉素的残留。对不达标机构, 通过本次能力验证查找存在的问题, 可以帮助实验室整改, 进一步提升检验能力。

关键词: 能力验证; 牛奶; 氯霉素; 残留

Proficiency testing results and analysis for determination of chloramphenicol residues in milk

WANG Yi-Lin, SUN Lei, YIN Hui, YE Ni, LI Dan, WANG He-Jia*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the proficiency testing results for determination of chloramphenicol residues in milk. **Methods** The uniformity test and stability test were carried out in accordance with the procedure prescribed by China National Accreditation Service for Conformity Assessment. Z-scores were used as the statistic to evaluate the test results of the participating laboratories. The median value of the results reported by all participating laboratories was selected as the specified value, and the norm interquartile range was used as the standard deviation of ability evaluation. **Results** The satisfactory rate of the laboratory for verifying the capability of chloramphenicol residue in milk was 84.8%, the suspicious result rate was 0, and the dissatisfaction rate was 15.2%. The satisfactory rate of national and provincial inspection institutions was relatively high. **Conclusion** In this proficiency test, most laboratories can accurately detect chloramphenicol residues in milk. For substandard institutions, the existing problems can be found through this proficiency test, which can help the laboratory to rectify and further improve the inspection ability.

KEY WORDS: proficiency testing; milk; chloramphenicol; residue

0 引 言

氯霉素(chloramphenicol)是由委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)产生的一种广谱抗生素,也是第

一种采用化学合成法生产的抗生素。它能抑制细菌蛋白质的合成,对革兰氏阳性菌和阴性菌均有良好的抑制作用,曾广泛应用于畜牧业和兽医临床,治疗多种动物传染性疾病^[1-3]。然而,随着氯霉素的应用范围越来越广,人们陆续

*通信作者: 王鹤佳, 副研究员, 主要研究方向为兽药残留和食品安全。E-mail: pharhejia@163.com

*Corresponding author: WANG He-Jia, Associate Professor, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China. E-mail: pharhejia@163.com

发现其对人体具有较强的毒副作用,主要是抑制人体骨髓的造血功能,可能引起剂量或频率依赖性的血细胞减少,再生障碍性贫血和“灰婴综合征”等严重疾病,如在动物性食品中有低浓度的氯霉素残留,还有诱发敏感菌产生耐药性的可能,对人类健康造成潜在威胁^[4-6]。美国和欧盟等国家均已将氯霉素列为禁用兽药^[7]。我国农业农村部 250 号公告^[8]中也再次明确了将氯霉素列为禁用兽药,禁止用于一切食品动物。因此,有效提高动物性食品中氯霉素药物残留的检测能力和水平,对保护广大人民的身体健康,保障我国动物性食品进出口贸易具有十分重要的意义。

能力验证(proficiency testing)是指依据预先制定的准则,采用检验检测机构间比对的方式,评价参加者的能力。能力验证是评价实验室技术能力的重要技术手段,也是实验室重要的外部质量保证手段,可以促进实验室质量管理体系的持续改进^[9-11]。

2019 年,受中国食品药品检定研究院委托,我们组织和开展牛奶中氯霉素残留量测定的能力验证工作(计划编号为 NIFDC-PT-198)。本研究通过分析此次能力验证活动参加者的结果与指定值之间的相对偏差,了解相关实验室开展牛奶中氯霉素残留检测的整体水平,以促进实验室动物源食品中兽药残留检测技术水平进一步提升。

1 材料与方法

1.1 仪器

Shimadzu 30A 液相色谱仪(日本岛津公司); QTRAP 6500 质谱仪(配电喷雾离子源,美国 AB SCIEX 公司); AE240 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); SIR4 涡旋混合器(德国 IKA 公司); Biofuge Strators 高速冷冻离心机(德国贺利氏公司); 20 孔固相萃取装置(美国 Waters 公司); Organomation Associates 氮吹仪(日本 Jnc 公司)。

1.2 药品和试剂

氯霉素对照品(含量 99.24%, 英国 LGC 公司); 氯霉素-D₅ 对照品(含量 99.7%, 广州硕谱生物科技有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 氯化钠、乙酸乙酯、正己烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); C₁₈ 固相萃取柱(500 mg/3 mL, 美国 Agilent 公司); 实验所用水为超纯水。

1.3 能力验证样品

1.3.1 样品的设计

本次能力验证样品通过空白添加法制备得到。样品设计添加氯霉素含量约为 2 μg/kg。制样过程中,要特别关注样品的均匀性。从匀质范围和匀质时间等多种因素加以考虑,最终制备的考核样品必须经充分混匀后得到。

1.3.2 样品的制备

本次能力验证样品为从北京市的超市购买的 3 种不

同品牌的全脂纯牛奶,依据 GB 29688—2013《食品安全国家标准 牛奶中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[12]进行检测,选择无氯霉素药物残留,且基质中杂质较少的同批次牛奶样品进行样品制备。按照实验设计,向适量的空白牛奶样品中添加适宜浓度的氯霉素对照品溶液,使样品中添加的氯霉素含量约为 2 μg/kg,并充分搅拌均匀,作为备用样品,分装于 50 mL 塑料离心管内(每管约 30 mL),密封并标记之后,置于-20 °C 冰箱内冷冻保存。

为保证样品的均匀性,添加时采取了分次逐步添加的方法。每次向混合容器中倒入预计制备样品总体积约 1/5 的空白牛奶样品和相应体积比例的氯霉素对照品溶液,涡旋搅拌 5 min 之后,再次添加 1/5 体积的牛奶和氯霉素对照品溶液,涡旋搅拌 5 min,以此类推。全部样品添加完毕之后,再搅拌 10 min,使得制备的添加牛奶样品尽可能均匀。

1.3.3 样品均匀性考察

从分装好的样品中随机抽取 10 份进行检测,每个样品在重复的条件下按随机次序测试 2 次。采用单因子方差分析法对结果进行统计。

1.3.4 样品稳定性考察

在正式制备考核样品之前,配制一批小试样品用于稳定性考察。将稳定性考察的样品,模拟能力验证样品在运输过程中的实际状态进行保存,分别于-20 °C 保存后的第 7、14 d 以及 21 d(假设收到反馈回来的能力验证结果的天数)进行检测。同时为模拟运输中冷链损坏的情况,本研究考察了样品在室温保存条件下的稳定性。由于实施该能力验证的时间为 6 月份,天气炎热,故将样品置于 30 °C 放置 3 d 后测定含量变化。检测结果的统计数据处理采用 *t* 检验法。

1.3.5 样品发放

本次能力验证按照随机抽取方式向每个参加实验室发放一份样品,检测样品采用冷冻保存方式包装,均通过专业冷链物流公司邮寄。同时将作业指导书、样品状态确认表和结果报告单等文件一起发放。

1.4 参加实验室情况

全国 25 个省、自治区、直辖市共 46 家实验室报名参加本次能力验证计划。其中市场监管系统 24 家,农业系统 14 家,企业 8 家。每个参加实验室均拥有唯一性代码,结果统计以实验室代码给出,不显示实验室名称。

1.5 样品检测方法

本次能力验证计划推荐的方法为 GB 29688—2013^[12],也可采用实验室日常使用的其他标准方法。如采用非标方法或实验室自制方法,需在结果报告单中详细说明该方法的样品前处理步骤和仪器检测条件。

1.6 结果统计方法

本次能力验证的结果统计采用稳健统计方法中的中

位值和标准化四分位距法^[13]。涉及的统计量有结果总数、中位值、标准化四分位距(norm interquartile range, NIQR)、稳健变异系数(coefficient of variation, CV)、极小值、极大值和极差等。采用中位值作为指定值, NIQR 为变动性度量值(目标标准偏差)计算各实验室检测结果的 Z 比分数(Z 值), 并以之作为评价其结果满意度的依据。Z 比分数的大小代表实验室的结果与中位值的偏离程度, 符号“+”与“-”表示与中位值的偏离方向。 $|Z| \leq 2$ 为满意结果, $2 < |Z| < 3$ 为可疑结果, $|Z| \geq 3$ 为不满意结果(离群值)。

2 结果与分析

2.1 样品均匀性与稳定性评价

按照 CNAS-GL 003:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》^[13]的规定, 本研究采用单因子方差分析法(F 检验)和 t 检验法对样品进行均匀性和稳定性检验。统计结果表明, 在均匀性检验中, 氯霉素所计算的 F 值为 1.98, 小于临界值 $[F_{0.05}(9,10)=3.02]$ 。表明在 $P < 0.05$ 显著性水平时, 测试样品的均匀性符合要求。稳定性检验中氯霉素在上述几种条件下检测结果的 t 值在 0.013 ~ 0.740 之间, 均小于 t 临界值 $[t_{0.05}(10)=2.228]$, 表明在 0.05 显著性

水平时, 样品中的氯霉素是稳定的, 能够满足能力验证测试的要求。

2.2 能力验证结果统计

2.2.1 能力验证结果的统计参数

本次能力验证共收回 46 家检测实验室的结果。采用稳健统计法对数据进行处理, 具体参数见表 1。从表 1 中可以看出, 此次能力验证的检测结果分散程度小, 数据相对集中, 说明参加本次能力验证的实验室平均水平较高。

2.2.2 能力验证结果评价

图 1 展示的是各个实验室的 Z 值分布图。通过分布图可以明显地看出本次能力验证中, 所有参加实验室的结果整体上呈正态分布, 因此可以采用基于正态分布的稳健统计方法评价检测结果^[14]。经过统计, 有 39 家实验室结果满意, 满意率 84.8%; 有 7 家实验室结果不满意, 不满意率 15.2%; 没有可疑结果的实验室。按照实验室级别分析检测结果, 数据见表 2。表 2 中的结果在一定程度上可以体现出目前我国各个级别的食物检测实验室所拥有的牛奶中氯霉素的检测能力。总体上看, 国家级和省级检验机构的检测能力较强, 地市级的机构检测能力稍弱, 今后可以对相关检测项目开展有针对性的学习培训, 促使检验能力的提高。

表 1 氯霉素能力验证的统计参数
Table 1 Statistical parameters of the proficiency testing

药物	结果总数	中位值/(μg/kg)	标准四份位距/(μg/kg)	稳健变异系数/%	极大值/(μg/kg)	极小值/(μg/kg)	极差/(μg/kg)
氯霉素	46	2.060	0.137	6.660	4.260	0.210	4.050

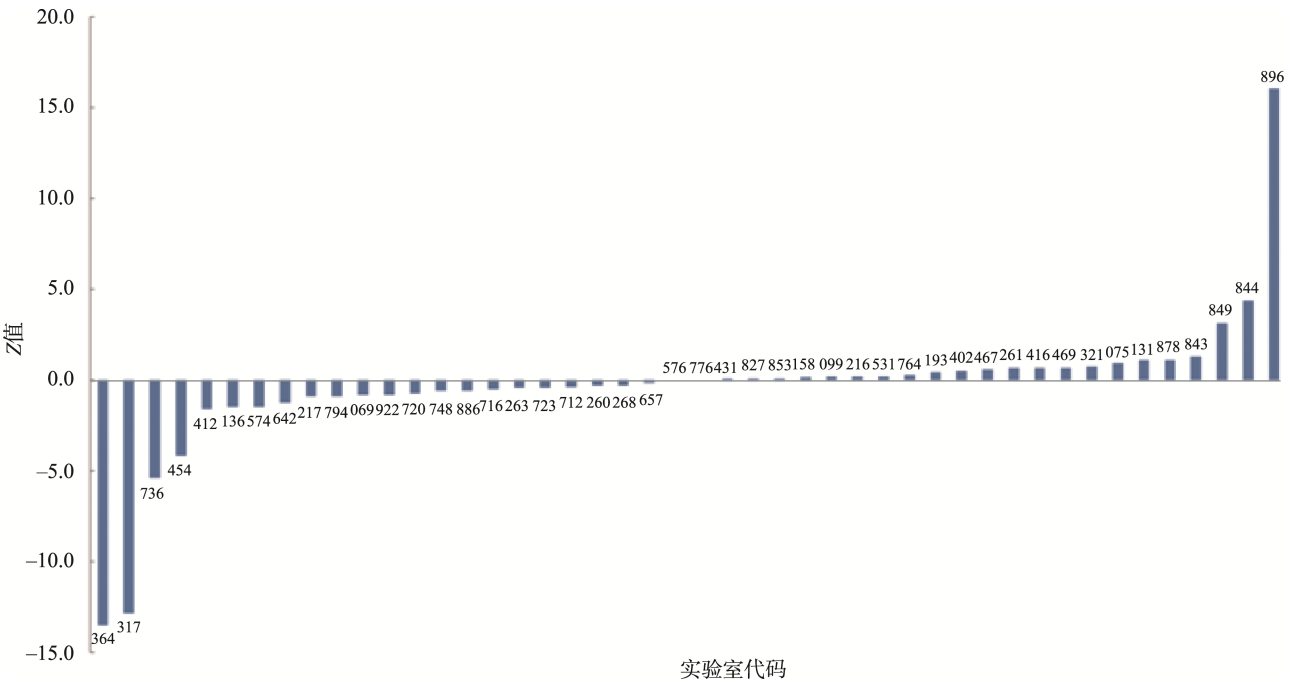


图 1 各实验室的 Z 值分布图
Fig.1 Distribution of Z-scores of laboratories

表 2 不同级别实验室的能力验证结果
Table 2 Proficiency testing results of laboratories of different levels

实验室级别	参加数量 /家	结果满意数量 /家	结果满意率 /%
国家级检验机构	2	2	100
省级检验机构	17	16	94.1
地市级检验机构	19	14	73.7
企业	8	7	87.5

2.3 不满意结果分析

2.3.1 采用不同检测方法的影响

本次能力验证计划推荐的方法为 GB 29688—2013^[12]。考虑到参加能力验证的实验室来自不同的检测领域和地区,实验室之间硬件条件差异较大,故没有强制指定方法,实验室可根据自身实际情况,采用日常使用的方法进行检测。实验室检测所用方法的统计结果见表 3。从反馈的结果和信息看,绝大多数参加实验室采用了推荐的 GB 29688—2013,少数实验室采用了 GB/T 22338—2008《动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定》^[15],还有 1 家实验室采用了非标方法。由于这 3 种方法的具体操作步骤和难易程度不同,而且前处理过程也存在很大差异,各实验室对方法的掌握和熟练操作情况各异,造成使用不同方法报出结果的差异。从本次考核的结果来看,选择国标方法的实验室考核结果更好,并且采用针对牛奶中氯霉素残留检测的国标方法(GB 29688—2013),结果满意率相对更高。提示在日常的检验工作中应该针对待测组分和具体的动物样品种类,选择合适的标准方法。如采用非标方法,应对非标方法进行确认,以保证该方法的灵敏度、准确度和精密度等各项指标可以满足残留检测的要求。

表 3 检测所用方法标准汇总表

Table 3 The Summary table of standards used in determination

采用标准	实验室数量/家	结果满意数量/家
GB 29688-2013	39	34
GB/T 22338-2008	6	5
非标方法	1	0

2.3.2 样品前处理过程的影响

影响各参加实验室检测结果准确性的因素有实验人员、仪器设备、检测方法、环境条件、所用试剂和标准物质等。实验室在检测开始前应对上述因素进行核查,以确认这些因素都得到有效控制,确保在适宜的实验环境中由具有相关实验资质的实验人员进行检测。下面针对样品前处理经常遇到的几个问题加以说明。

样品称取量的问题方面:1 家结果不满意实验室采用的非标方法,样品称取量只有 1 g,缺乏代表性。可能会在称样时由于没有摇匀待测样品,使得最终的检测结果产生较大偏差。而 2 个国标 GB 29688—2013 和 GB/T 22338—2008 的称样量分别为 10 g 和 5 g,更能较好地反映待测样品的真实情况。

样品前处理过程一般包括提取、净化和浓缩 3 大步骤。(1)提取:对于氯霉素的提取大多数方法都使用乙酸乙酯或乙腈进行提取,不论用哪种溶剂进行提取,在提取时都要充分,否则容易出现提取不充分引起结果偏低的现象;(2)净化:针对提取后的净化过程,GB 29688—2013 标准采用了 C₁₈柱净化,GB/T 22338—2008 标准采用了 LC-Si 硅胶小柱进行净化,但是不同生产商、型号、批次的 C₁₈ 柱和 LC-Si 硅胶小柱可能会存在差异,一定程度地影响检测结果。此外也要特别注意固相萃取柱本身的特殊要求,如说明书中提到该种萃取柱不能跑干,则在净化操作中要特别注意固相萃取小柱的液面高度,避免干涸;(3)浓缩:定容所用的溶剂种类和定容后是否能充分溶解,这 2 个方面对结果影响较大。一般采用的定容溶剂要与进样标准溶液所用溶剂一致才会使结果更加准确,定容后残渣溶解是否充分也会对结果造成一定的影响。因此要考虑定容溶剂的体积是否能有效充分地溶解残渣。

3 结 论

本研究对全国 46 家实验室开展了牛奶中氯霉素残留量测定的能力验证工作,结果满意率较高,为 84.8%,说明我国大部分兽药残留检测实验室具备较好的检测该项目的的能力。在本次能力验证中,部分实验室的检测能力较弱,建议实验室一方面加强对检测技术的培训,另一方面要持续提升自身的质量管理水平,并通过持续参加能力验证活动,不断发现检验中存在的问题,提升检验能力。

参考文献

[1] 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.
LI JS, QIU YM, WANG C. Veterinary drug residue analysis [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2002.
[2] LIU C, DENG DD, XU D, *et al.* Development of a monoclonal antibody based ELISA for the detection of chloramphenicol in shrimp, feed and milk samples and validation by LCMS/MS coupled with immunoaffinity clean-up [J]. Anal Method, 2019, (11): 507–516.
[3] ZHAO MT, LI XL, ZHANG YL, *et al.* Rapid quantitative detection of chloramphenicol in milk by microfluidic immunoassay [J]. Food Chem, 2020, 339: 127857.
[4] SATHYA A, PRABHU T, RAMALINGAM S. Structural, biological and pharmaceutical importance of antibiotic agent chloramphenicol [J]. Heliyon, 2020, 6(3): 1–18.

- [5] LIAN Z, WANG JT. Selective detection of chloramphenicol based on molecularly imprinted solid-phase extraction in seawater from Jiaozhou bay, China [J]. *Mar Pollut Bull*, 2018, (133): 750–755.
- [6] ARMENTA S, GUARDIA MDL, ABAD-FUENTES A, *et al*. Highly selective solid-phase extraction sorbents for chloramphenicol determination in food and urine by ion mobility spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(29): 1–9.
- [7] STOLKER AAM, BRINKMAN UAT. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-A review [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1067(1-2): 15–53.
- [8] 农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告第 250 号[EB/OL]. [2020-04-14]. http://www.moa.gov.cn/nybg/2020/202002/202004/t20200414_6341556.htm.
Ministry of Agriculture and Rural Areas. Announcement No. 250 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China [EB/OL]. [2020-04-14]. http://www.moa.gov.cn/nybg/2020/202002/202004/t20200414_6341556.htm.
- [9] 毛燕, 闫林. 实验室参加能力验证活动的意义分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(9): 2958–2961.
MAO Y, YAN L. Benefits analysis of the laboratories participation in proficiency testing programs [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(9): 2958–2961.
- [10] 石云. 能力验证在实验室质量管理中的作用[J]. *现代食品*, 2017, (15): 43–44.
SHI Y. The role of competence verification in laboratory quality management [J]. *Mod Food*, 2017, (15): 43–44.
- [11] 陈茵茵, 陈科. 浅谈食品药品检验检测机构开展能力验证的质量控制[J]. *食品与发酵科技*, 2018, 54(3): 97–100.
CHEN YY, CHEN K. Discussion on the quality control of the ability verification of the food and drug inspection and testing organization [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2018, 54(3): 97–100.
- [12] GB 29688—2013 食品安全国家标准 牛奶中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB 29688—2013 National food safety standard-Determination of chloramphenicol residues in milk-Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method [S].
- [13] CNAS-GL 002:2018 能力验证结果的统计处理和能力评价指南[S].
CNAS-GL002: 2018 Guidance on statistic treatment of proficiency testing results and performance evaluation [S].
- [14] 张帆, 刘胜楠, 王海涛, 等. 能力验证中的稳健统计方法应用浅析[J]. *标准科学*, 2018, (2): 61–64.
ZHANG F, LIU SN, WANG HT, *et al*. Application of robust statistical methods in proficiency testing [J]. *Stand Sci*, 2018, (2): 61–64.
- [15] GB/T 22338—2008 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定[S].
GB/T 22338—2008 Determination of multi-residues of chloramphenicols in animal-original food [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



王亦琳, 助理研究员, 主要研究方向为兽药残留和食品安全。
E-mail: 61266976@qq.com



王鹤佳, 副研究员, 主要研究方向为兽药残留和食品安全。
E-mail: pharhejia@163.com