

动物源性肉制品中氯霉素测定方法的优化

卞 华, 宁啸骏*, 杜茹芸

(上海市质量监督检验技术研究院 上海 200233)

摘要 复合式净化体系结合超高效液相色谱-串联质谱技术可对动物源性肉制品中的氯霉素进行精确定量分析。基质经超纯水分散溶解,由乙酸乙酯提取,采用正己烷液液萃取,ProElut PLS-A 通过式固相萃取先后对提取液进行净化。目标物经 AtlantisT₃ 色谱柱,以乙腈和 0.1% 氨水溶液为流动相进行梯度分离,在负离子 (ESI-) 多反应监测 (MRM) 模式下进行定量分析。基于 ISO 国际标准化组织和 AOAC 美国分析化学家协会对实验室数据结果的验证要求,所建立的方法进行实验室内部验证,和国内外 10 家权威机构的实验室间比对。本方法确保氯霉素在 0.5~10.0 ng/mL 范围内线性关系良好,线性相关系数 (R^2) ≥ 0.9986 。5 种基质不同加标水平的回收率在 73.34%~91.23% 之间,相对标准偏差 (RSD) 在 0.66%~2.91% 之间,回收率稳定、重现性良好。同时,验证数据均通过 Mandel、Cochran 和 Grubbs 组合统计模型的检验,10 家实验室的结果既满足实验室间测试结果的准确度,也满足实验室内测试结果的精密度。所建立的方法普适性强,灵敏度高,准确性和重复性优良,且操作简易,因此被 ISO/TC34/SC6 国际标准化组织/食品技术委员会/肉禽蛋鱼及其制品分技术委员会修订为最新的国际标准,已于 2021 年 8 月 27 日在全球发布,为世界各国制定相关检测标准提供参考。

关键词 复合式净化体系; ISO 国际标准化体系; Mandel 统计量; Cochran 统计量; Grubbs 统计量

文章编号 1009-7848(2023)02-0296-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.029

氯霉素 (Chloramphenicol, CAP) 作为第一个人工合成的广谱抗生素,因对多种病原菌有显著的抑制作用,曾被广泛用于世界各国的畜牧养殖业中。然而,随着动物源性食品在食品安全领域受到广泛地关注,各国专家发现氯霉素会对人体造血机能产生不可逆的严重副作用,并且抑制骨髓细胞中蛋白质的合成,还会导致细菌产生耐药性,造成机体正常菌群失调等^[1-3]。国际食品法典委员会 (Codex Alimentarius Commission, CAC)、国际标准化组织 (International Organization for Standardization, ISO) 对动物源性肉制品中氯霉素残留做了十分严格的要求。欧盟 (Comité Européen de Normalisation, CEN)^[4]、美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA)、日本临床实验室标准委员会 (Japan Committee for Clinical Laboratory Standards, JCCLS)^[5]、加拿大标准委员会 (Standards Council of Canada, SCC) 等相关监管部门先后规定其为非法添加物质。为

加强我国兽药残留监控工作,保证动物性食品卫生安全,根据《兽药管理条例》规定,中华人民共和国农业部 235 号公告也明确将氯霉素列为禁用物质^[6]。

世界各国对氯霉素检测方法的研究在不断更新迭代中,国际标准化领域中,ISO 促进各国标准化及其相关活动的发展,担负着制修订经全球协商一致的国际标准的任务,是各个国家标准的参照基础。氯霉素在 ISO 体系下的标准为 1998 发布的液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC): 肉与肉制品中氯霉素测定的——推荐性方法 (Meat and meat products—Determination of Chloramphenicol content—Reference method)^[7]。由于抗生素种类不断增多,而 HPLC 法仅依据保留时间定性,并且抗干扰能力差,故容易出现假阳性的检测结果。同时,HPLC 法的灵敏度和检测数量级已经达不到氯霉素实际添加量的要求,无法满足兽药残留检测的要求。因此,在 ISO 体系中重新修订氯霉素的分析方法以供世界各国标准委员会参照是非常必要的。超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 具有高通量性、高选择性和高精度的独特优势^[8-9],相比于普通高效液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS),UPLC-MS/MS

收稿日期: 2022-02-03

项目基金: 上海市科学技术委员会科研计划基金项目
(19DZ2202400)

第一作者: 卞华,男,硕士,工程师

通信作者: 宁啸骏 E-mail: ningxj@sqi.org.cn

柱效更大,分离效果更好,分离时间更短。

欧盟的 WC-083 (ACA-10) 公告,美国的 LIB No. 4306 发文的和我国的国家推荐性标准 GB/T22338-2008《动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定》^[10] 均采用 LC-MS/MS 方法测定肉制品中氯霉素的残留量。本文参考国际上不同氯霉素残留的检测标准和相关研究文献,并根据世界各国检测水平和条件的差异,优化提取和净化步骤,旨在开发一套定量准确,操作简洁,适用于全球不同国家使用的检测方法,并通过统计学分析对方法的精确度、重复性、再现性进行实验室内部验证和实验室国际间比对,以确保试验结果满足 ISO 5725-2:2019^[11] 标准的要求。最终通过主导重要国际标准的制(修)订工作,掌握各国在食品领域的先进检测技术,提升我国在食品卫生安全问题上的国际影响力和决定权。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

氯霉素液体标样 (CAP, 100.2 mg/L, 99.5%)、氯霉素固体内标 (CAP-D5, 94.89%), 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。氯霉素内标储备液质量浓度均配制为 100.0 mg/L。

乙酸乙酯、正己烷、甲醇、乙腈均为色谱纯级,美国 Thermo Fisher Chemical 公司;甲酸、氨水色谱纯级,美国 ACS 色谱试剂;ProElut PLS-A 6cc/200mg, 德国 Merck 公司。

Waters XEVO TQ-XS 三重四极杆串联质谱仪、电喷雾离子源 (ESI)、AcquityUPLC H-CLASS 液相色谱系统, 美国 Waters 公司;MSZO 204S 型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司;C9NK-SK1200BTU 超声波清洗机, 中国 KUDOS 公司;D-91126 多管涡旋振荡器, 德国 Heidolph 公司;Centrifuge 5804 高速离心机, 德国 Eppendorf 公司;EZ-2.3 Elite 快速溶剂蒸发仪, 英国 Genevac 公司;Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 方法提要 动物源性肉制品中的氯霉素 (CAP) 利用乙酸乙酯提取, 正己烷脱脂, ProElut PLS-A 固相萃取柱净化, 液相色谱-串联质谱仪测定和确认, 同位素 (CAP-D5) 内标法定量。

1.2.2 试样制备 后腿或者里脊部位的原料肉 (猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉) 分别于绞肉机中绞碎, 选取 10 kg 绞碎肉。根据不同基质以及不同加标水平, 加入相应的氯霉素液体标样 (0.1 mg/mL), 充分均质为肉糜状后, 通过冷冻干燥技术制备成冻干粉末, 进行 30 目筛分, 留下过筛的冻干粉, 收集后送入三维混合机, 充分混合 24 h 后, 装入玻璃容器保存 (注: 生鲜肉不符合各国出入境相关法规, 不适合国际间实验室比对)。每瓶样品净含量为 12 g, 每种基质样品 2 瓶, 共 10 瓶 (检测 1 瓶, 备用 1 瓶)。如数据重复性良好, 无需进行复测, 否则使用备用样品再次检测, 备用样品和检测样品在取样和检测方法上相同。(样品保存于 4 ℃ 的干燥器内, 2 个月内完成试验)。

1.2.3 试样处理 称样前, 需保证样品的均匀性。等待冻干粉末恢复至室温, 充分摇匀后, 称取干粉 $m_0=1$ g, 精确至 0.0001 g, 移入 50 mL 具塞离心管中。称取 4 倍干粉质量的超纯水 (m_1) 将冻干粉末复溶, 等干粉复水膨胀并平衡约 10 min 后 ($m_{待测}=m_0+m_1$), 按照前处理步骤处理样品。

1.2.3.1 提取 向复溶后的试样基质中加入 50.0 μ L (500.0 ng/mL) CAP-D5 内标, 加入 5 mL 水进一步溶解分散基质, 均质 1 min, 加入 25 mL 乙酸乙酯, 涡旋振荡 5 min, 超声 5 min, 9 000 r/min 离心 5 min, 取上清液转移至另外一个离心管中, 再次加入 15 mL 乙酸乙酯, 重复上述操作, 合并两次上清液, 混合均匀, 待净化。

1.2.3.2 净化 将上清液转移至快速溶剂蒸发仪中, 在 45 ℃、10 000 Pa 的条件下, 浓缩至干, 加入 5 mL 乙腈和 5 mL 正己烷, 涡旋 2 min, 超声 2 min, 以 9 000 r/min 离心 2 min, 弃去上层杂质溶液, 再加入 5 mL 正己烷, 重复上述操作。

将乙腈溶液转移至 ProElut PLS-A 固相萃取柱中, 减压过滤并保持流速为 1~2 滴/s, 直接收集过滤液, 过 0.22 μ m PETF 滤膜, 供 UPLC-MS/MS 检测。

1.2.4 标准溶液配制 将 100 mg/L 的氯霉素液标和氯霉素内标储备液 (CAP-D5), 用定容液逐级稀释至 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 ng/mL (CAP-D5 的质量浓度均为 5.0 ng/mL) 的氯霉素标准工作液, 备用。

1.2.5 仪器条件

1.2.5.1 液相色谱条件 色谱柱:Waters Atlantis T₃(100 mm×2.1 mm, 3 μm)或相当者。流动相 A:0.1%氨水溶液;流动相 B:乙腈;流速:0.4 mL/min。梯度洗脱:0~0.75 min,10% B;0.75~2 min,10%~90% B;2~3 min,90% B;3~4 min,10% B。柱温:30 ℃。进样量:10 μL。

1.2.5.2 质谱仪器条件 离子源:电喷雾离子源(ESI⁻);检测方式:多反应监测;毛细管压力:3 000 V;锥孔电压:50 V;脱溶剂气温度:500 ℃;脱溶剂气流速:800 L/h;雾化气压力:0.7 MPa;碰撞气流速:150 L/h;离子源温度:150 ℃;母离子、子离子、去簇电压(DPs)、碰撞能(CEs)见表1。

1.2.6 统计学验证 试验方法需要依据 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》,进行实验室内部方法验证,主要包括检出限、定量限、线性相关性、回收率和相对标准偏差等精密度的系统性研究。

在通过实验室内部统计学方法验证后,为确定方法的有效性和可比性,需要依据 ISO5725-2:2019《测量方法与结果的准确度(正确度和精密度的)》,进行国际间实验室比对。采用 Mandel-*h/k* 统计分析法验证原始数据的一致性,结合 Cochran 和 Grubbs 统计学模型对数据的有效性进一步进行了验证,旨在明确数据中的歧离值和离散值,并尽可能地保留超临界数据^[12],使统计结果更为真实、可靠,确保试验方法在全球范围内使用时准确和有效。

2 结果与讨论

2.1 色谱-质谱条件的优化

根据氯霉素的结构与性质,以及肉制品复杂的基质情况,在方法研制过程中,比较了 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈、Thermo Accucore™ C₁₈、Waters Atlantis T₃、Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 4类色谱柱对目标物分离度和灵敏度的影响。结果表明,Accucore™ C₁₈ 较容易受到杂质干扰,峰型不理想,不符合正态分布;ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 目标物出峰时间较早,目标物保留时间时常会发生向前漂移;ZORBAX SB-C₁₈ 响应低,伴有明显的拖尾和分叉现象;Atlantis T₃ 色谱柱峰

表1 氯霉素化合物的母离子、子离子、去簇电压和碰撞能

Table 1 Parent ions, product ions, declustering potentials and collision energies of CAP				
化合物	母离子/ $m \cdot z^{-1}$	子离子/ $m \cdot z^{-1}$	去簇电压/ V	碰撞能/eV
CAP	321.0	256.9	-20	-10
		152.0*	-20	-18
CAP-D5	326.0	157.1	-20	-18

注:*为氯霉素定量离子。

形尖锐对称,灵敏度更高,出峰时间也更合适(如图1),其对填料的孔径大小、端基封口以及 C₁₈ 的键合密度都进行了针对性地优化,不仅能保留和分离水溶性的极性小分子有机化合物,还提供了更宽泛的 pH 值适应条件^[13],从而使 Atlantis 色谱柱对氯霉素保留能力更强,使其在水流动相中性能更加稳定。

试验选用乙腈、甲醇作为备选有机相,2种极性有机溶剂都能较好洗脱目标物,而氯霉素在乙腈溶液中被保留的时间更合适,也更加稳定,液相系统压力也更低。同时,微量的氨水可以提供基质离子化所需的负离子,提高离子化效率,促使更强的灵敏度,获得更好的峰型。因此以 0.1%氨水溶液和乙腈作为本试验的流动相。

配制质量浓度为 10.0 ng/mL 的标准工作溶液,采用注射泵直接进样的方式注入质谱仪。采用 ESI-扫描方式进行一级质谱分析,优化 DP,确定氯霉素母离子 [M-H] m/z - 321.0 和氯霉素内标 D5 母离子 [M-H] m/z - 326.0。对母离子进行二级质谱扫描,优化 CE,选取相对丰度较高且稳定的两个特征碎片离子作为定性、定量离子 [M-H] m/z - 321.0/256.9、[M-H] m/z - 321.0/152.0* 和内标特征碎片离子 [M-H] m/z - 326.0/157.1(见图1),以满足欧盟 657/2002/EEC 指令规定,即禁用药物定性检测必须达到 1 个母离子和至少 2 个子离子共 4 个确证点的要求^[14-15]。

2.2 提取条件的优化

试验选取甲醇、乙腈和乙酸乙酯作为兽药残留的备选提取溶剂。其中,甲醇极性过强,可能会同时提取出(除了氯霉素外)其它杂质,对净化过程会造成一定的干扰;乙腈虽然具有极性范围宽,分子质量小,基质穿透能力强,对糖、脂肪、蛋白质

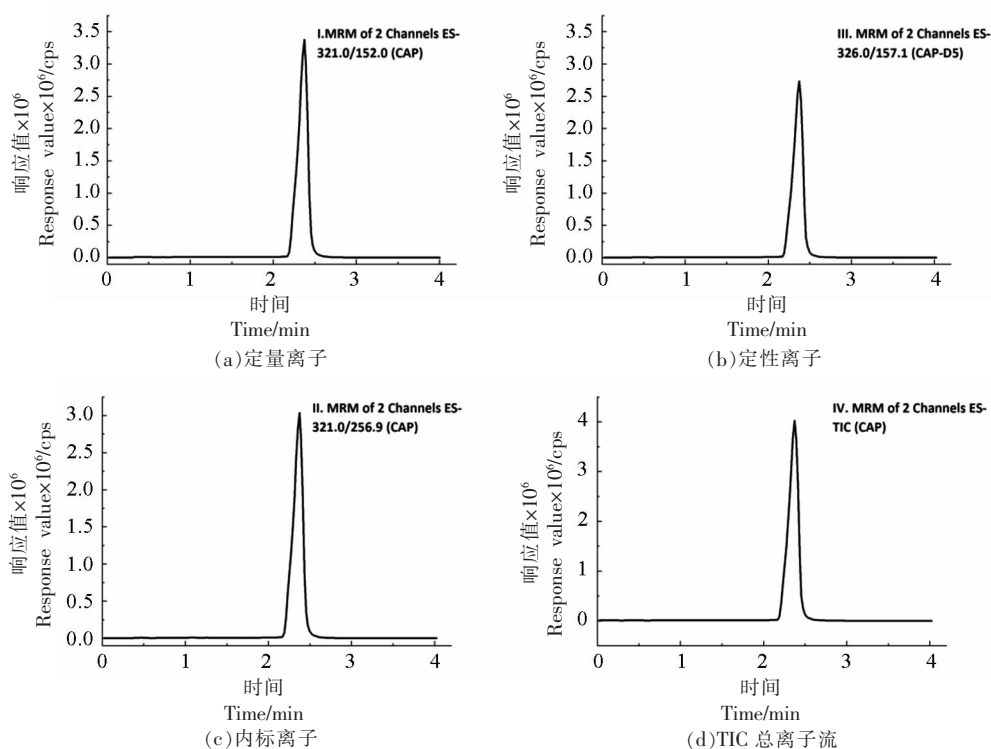


图 1 氯霉素多反应监测图和总离子流图色谱图 (10.0 ng/mL)

Fig.1 Chromatograms of the representative target ions with MRM and TIC mode (10.0 ng/mL)

类化合物的沉淀效果较好,但对于肉制品基质来说,同样会在提取过程中带入共萃取杂质^[6]。乙酸乙酯的极性相对较弱,毒性较低,挥发更快,可作为氯霉素合适的提取溶剂。同时,肉制品需要加少许水进行基质分散,水具有良好的组织渗透性,能分散样品,涡旋匀浆后能增加溶剂与样品的接触面积,防止肉制品中的蛋白质在有机溶剂的影响下直接变性,从而紧缩成一团,包裹住目标化合物^[7],乙酸乙酯与水相不溶,能更彻底从水相中萃取出氯霉素。

本试验采用正己烷,Aglient AccuBond C₁₈, Waters Oasis HLB, Waters Oasis PRiME HLB, ProElut PLS-A 固相萃取柱对最为复杂的猪肉基质提取液进行净化,其结果见表 2。经过 ProElut PLS-A 净化,基质中氯霉素的回收率能达到 85% 以上。作为通透式固相萃取小柱,ProElut PLS-A 与 Oasis PRiME HLB 的作用相似,通过特殊的筛板制作工艺,使样品经提取后直接过柱,将杂质保留在特殊填料中,较大程度地降低氯霉素在洗脱过程中的损失率。同时,整个进化过程较为稳定,

样品更加洁净,相对于传统的反相 SPE,其相对标准偏差(RSD)结果也较为理想。对于基质复杂的肉制品来说,ProElut PLS-A 对于非极性酯类杂质的保留更强,使过滤液更加纯净,目标物的回收率更高。试验进一步考察了复合式净化方式,先用正己烷除去普通油脂类杂质,再用 ProElut PLS-A 除去较为复杂的磷脂类杂质,其结果要比单一净化方式进一步提升 2.7% 左右。

表 2 不同净化方式对氯霉素回收率的影响 (n=6)

Table 2 Effect of different purification methods on the recoveries of CAP (n=6)

净化方式	回收率/%	RSD/%
正己烷	62.1	1.67
Aglient AccuBond C ₁₈	70.7	1.59
Waters Oasis HLB	80.1	2.02
Waters Oasis PRiME HLB	83.4	0.93
ProElut PLS-A	85.9	0.86
复合式净化	88.6	0.43

注:CAP 添加量为 1.0 μg/kg。

2.3 实验室内部验证

2.3.1 检出限、定量限和线性相关 肉制品基质复杂,本试验选择鸡、鸭、牛、羊、猪空白样品作为考察对象。在上述空白基质中添加一定浓度的氯霉素对照品,按照本方法进行试验。依据定量离子

信号与噪声比例,即 $S/N \geq 3$ 的浓度为检出限(LOD), $S/N \geq 10$ 的浓度为定量限(LOQ)的原则,确定了本方法的检出限为 $0.03 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。图2为牛肉基质的空白和加标 TIC 色谱图。

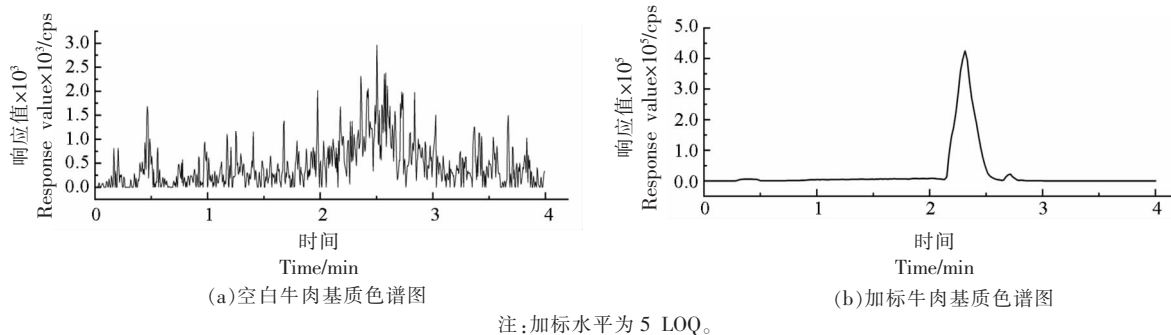


图2 空白牛肉基质和加标牛肉基质的色谱图

Fig.2 Chromatograms of the blank bovine matrix and 5-LOQ spiked bovine matrix

精密取适量氯霉素标准工作液,用定溶液将其稀释至质量浓度为 $0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 \text{ ng}/\text{mL}$ 的标准曲线系列工作溶液,以各组分目标物与内标峰面积之比对其质量浓度绘制标准曲线,计算线性方程、线性范围及相关系数。氯霉素在 $0.5 \sim 10.0 \text{ ng}/\text{mL}$ 范围内线性良好,线性相关系数(R^2)为 0.9988 ,其质量浓度与峰面积的线性方程为: $Y = 0.093292X + 0.0056696$ (见图3)。

2.3.2 回收率和精密度 选取鸡、鸭、牛、羊、猪的空白基质,进行为期1个月的加标回收率和精密度实验(5基质 \times 6平行 \times 4批次),样品分别添加低、中、高3个浓度的标准溶液,计算平均回收率及相对标准偏差,测定结果如表3~表7所示,鸡肉基质中氯霉素各浓度的批内回收率为 $83.74\% \sim 90.60\%$,RSD为 $0.66\% \sim 1.31\%$,批间回收率为 $79.78\% \sim 88.47\%$,RSD为 $1.17\% \sim 1.89\%$;鸭肉基质中氯霉素各浓度的批内回收率为 $78.24\% \sim 83.35\%$,RSD为 $1.67\% \sim 1.98\%$,批间回收率为 $77.47\% \sim 83.59\%$,RSD为 $1.65\% \sim 2.43\%$;牛肉基质中氯霉素各浓度的批内回收率为 $85.24\% \sim 91.23\%$,RSD为 $0.67\% \sim 1.03\%$,批间回收率为 $86.96\% \sim 90.39\%$,RSD为 $0.75\% \sim 1.29\%$;羊肉基质中氯霉素各浓度的批内回收率为 $74.28\% \sim 80.24\%$,RSD为 $1.80\% \sim 2.36\%$,批间回收率为 $73.34\% \sim 81.57\%$,RSD为 $1.82\% \sim 2.91\%$;猪肉基质

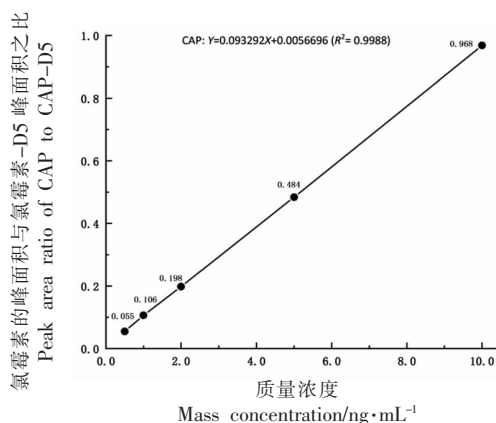


图3 氯霉素工作液标准曲线

Fig.3 The calibration curve of CAP standard solution

中氯霉素各浓度的批内回收率为 $78.12\% \sim 80.74\%$,RSD为 $1.84\% \sim 2.85\%$,批间回收率为 $77.62\% \sim 78.99\%$,RSD为 $2.02\% \sim 2.43\%$ 。结果均符合《兽药残留检测标准操作规程》和《GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范》相应要求。

通过实验室内部方法学验证可知,该方法的线性范围为 $0.5 \sim 10.0 \text{ ng}/\text{mL}$,线性相关性良好。线性相关系数($R^2 \geq 0.9986$)。5种基质的批内加标回收为 $74.28\% \sim 91.23\%$,RSD为 $0.66\% \sim 2.85\%$,批间加标回收为 $73.34\% \sim 90.39\%$,RSD为 $0.75\% \sim 2.91\%$,其中,牛肉和鸡肉的加标试验结果较为理想,回收率较高,稳定性较强。鸭肉、猪肉和羊肉因

表 3 鸡肉基质中氯霉素的加标回收率及相对标准偏差 ($n_{\text{内}}=6, n_{\text{间}}=4$)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of CAP in chicken matrix ($n_{\text{intra}}=6, n_{\text{interval}}=4$)

添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	批内平均回收率/%	批内 RSD/%	批间平均回收率/%	批间 RSD/%
0.1	83.74	1.31	79.78	1.89
0.2	86.57	1.24	84.34	1.38
1.0	90.60	0.66	88.47	1.17

表 4 鸭肉基质中氯霉素的加标回收率及相对标准偏差 ($n_{\text{内}}=6, n_{\text{间}}=4$)

Table 4 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of CAP in duck matrix ($n_{\text{intra}}=6, n_{\text{interval}}=4$)

添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	批内平均回收率/%	批内 RSD/%	批间平均回收率/%	批间 RSD/%
0.1	78.24	1.98	77.47	1.65
0.2	80.22	1.67	81.96	2.10
1.0	83.35	1.83	83.59	2.43

表 5 牛肉基质中氯霉素的加标回收率及相对标准偏差 ($n_{\text{内}}=6, n_{\text{间}}=4$)

Table 5 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of CAP in bovine matrix ($n_{\text{intra}}=6, n_{\text{interval}}=4$)

添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	批内平均回收率/%	批内 RSD/%	批间平均回收率/%	批间 RSD/%
0.1	85.24	0.98	87.47	0.75
0.2	86.11	0.67	86.96	1.10
1.0	91.23	1.03	90.39	1.29

表 6 羊肉基质中氯霉素的加标回收率及相对标准偏差 ($n_{\text{内}}=6, n_{\text{间}}=4$)

Table 6 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of CAP in ovine matrix ($n_{\text{intra}}=6, n_{\text{interval}}=4$)

添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	批内平均回收率/%	批内 RSD/%	批间平均回收率/%	批间 RSD/%
0.1	74.28	2.31	73.34	2.89
0.2	79.48	1.80	81.38	1.82
1.0	80.24	2.36	81.57	2.91

表 7 猪肉基质中氯霉素的加标回收率及相对标准偏差 ($n_{\text{内}}=6, n_{\text{间}}=4$)

Table 7 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of CAP in porcine matrix ($n_{\text{intra}}=6, n_{\text{interval}}=4$)

添加量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	批内平均回收率/%	批内 RSD/%	批间平均回收率/%	批间 RSD/%
0.1	78.12	2.85	77.62	2.23
0.2	80.74	1.84	78.25	2.02
1.0	79.86	2.02	78.99	2.43

为复合脂类含量较多,虽受到基质效应的影响,各自回收率略低约 3%左右,稳定性也略有浮动,但均满足我国的食物质量规范技术要求和美国分析化学家协会 (Association of Official Analytical Chemists, AOAC) 关于方法学准确度的要求^[18]。

实验室内部验证结果说明该方法的准确性和精密度均较为理想,能够满足肉制品中氯霉素的定量检测要求。

2.4 国际实验室间比对验证

本研究组织了国内外 10 家权威实验室进行

了实验室间对比验证。10 家验证单位均按照《ISO Ring test study protocol》协议,在收到冻干样品后,存放于 4℃ 的干燥器中,并在 2 周之内完成比对试验。试验过程需要按照本方法操作步骤进行。最终由牵头实验室收集原始数据,并运用 4 种统计学模型(Mandel 模型、Cochran 模型、Grubbs 模型和 Dixon 模型)对原始数据进行分析,考查此方法的精密度和普适性,并确定其有效性。其中, Mandel 模型^[19-20]可以检验实验室间检测结果的准确度和实验室内检测结果的精密度,能简洁明了

地统计出各个实验室测试结果的偏离程度; Cochran 模型^[19-20]用于更进一步判断实验室内各自检测结果的精密度; Grubbs 模型^[19-20]与 Dixon 模

型^[19-20]用于更进一步明确实验室间测试结果的准确度。10家实验室原始数据、平均值和标准偏差见表8和表9。

表8 实验室间氯霉素检测结果的原始数据($p=10, n=2$)

Table 8 Raw data of the international ring comparison test for CAP ($p=10, n=2$)

实验室	鸡肉		鸭肉		牛肉		羊肉		猪肉	
	结果1	结果2	结果1	结果2	结果1	结果2	结果1	结果2	结果1	结果2
1	0.215	0.219	1.19	1.18	0.630	0.571	1.84	1.95	1.00	1.01
2	0.229	0.237	1.21	1.23	0.614	0.615	1.74	1.83	1.05	1.01
3	0.263	0.237	1.24	1.20	0.662	0.588	2.16	1.92	1.10	1.04
4	0.253	0.248	1.24	1.21	0.681	0.661	2.03	1.95	1.05	1.08
5	0.226	0.219	1.24	1.20	0.562	0.546	1.74	1.71	0.976	1.00
6	0.251	0.261	1.23	1.20	0.543	0.622	1.73	1.80	1.05	0.968
7	0.276	0.278	1.33	1.27	0.578	0.552	1.82	2.08	1.05	1.07
8	0.299	0.313	1.24	1.24	0.633	0.613	1.95	1.96	1.04	1.02
9	0.244	0.222	1.31	1.23	0.641	0.622	1.97	2.08	1.01	1.00
10	0.253	0.256	1.16	1.21	0.650	0.598	1.50	1.59	1.02	0.96

表9 实验室间氯霉素结果的平均值和标准偏差

Table 9 Mean recovery and relative standard deviations (RSDs) of the international ring comparison test for CAP

实验室	鸡肉		鸭肉		牛肉		羊肉		猪肉	
	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%	平均值	RSD/%
1	0.217	1.30	1.19	0.60	0.601	6.95	1.90	4.10	1.00	0.70
2	0.233	2.43	1.22	1.16	0.615	0.12	1.79	3.57	1.03	2.75
3	0.250	7.35	1.22	2.32	0.625	8.37	2.04	8.32	1.07	3.97
4	0.251	1.41	1.23	1.73	0.671	2.11	1.99	2.84	1.07	1.99
5	0.223	2.22	1.22	2.32	0.554	2.04	1.73	1.23	0.988	1.72
6	0.256	2.76	1.22	1.75	0.583	9.59	1.77	2.80	1.01	5.75
7	0.277	0.51	1.30	3.26	0.565	3.25	1.95	9.43	1.06	1.33
8	0.306	3.24	1.24	0.00	0.623	2.27	1.96	0.36	1.03	1.37
9	0.233	6.68	1.27	4.45	0.632	2.13	2.03	3.84	1.01	0.70
10	0.255	0.83	1.19	2.98	0.624	5.89	1.55	4.12	0.991	4.29

2.4.1 Mandel 检验 原始数据的有效性首先需要经过 Mandel 检验验证,剔除对结果可能产生干扰的离群值,再进行平均值和精密度等参数的统计和计算。

Mandel(h)统计量是检验实验室间检测结果的准确度,即单个实验室结果均值与所有实验室结果均值的偏差。某个实验室 h 值越大,则表明检测结果的准确度越低^[21]。 h 值计算方式见式(1)。

$$h = \frac{X_i - \bar{X}}{S_{\bar{X}}} \quad (1)$$

式中, X_i ——各实验室的数据, \bar{X} ——各实验室结果的平均值, $S_{\bar{X}}$ ——各实验室间结果的标准偏差。

$h_{\text{crit}, \alpha}$ 为衡量实验室检测结果准确度的检验临界值。10家实验室结果的 h 值与 $h_{\text{crit}, \alpha}$ 比较结果如图4。其中,7家实验室的所有结果均 $\leq h_{5\%}$ 临界值,结果为可信值。实验室4的牛肉基质结果($h=1.826$)、实验室7的鸭肉基质结果($h=2.118$)和实验室8的鸡肉基质结果($h=2.168$)在 $h_{5\%} \sim h_{1\%}$ 的临界区间,

结果为歧离值,但没有离群数据出现。根据 ISO 5725-2:2019-2《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 2 部》的规定,试验结果最终为歧离值时,不应该被剔除,只有当 h 值 $>h_{1\%}$ 临界值,

结果为离群值,才需要被剔除。因此,10 家实验室所有基质的数据均通过 Mandel(h)统计模型的验证。

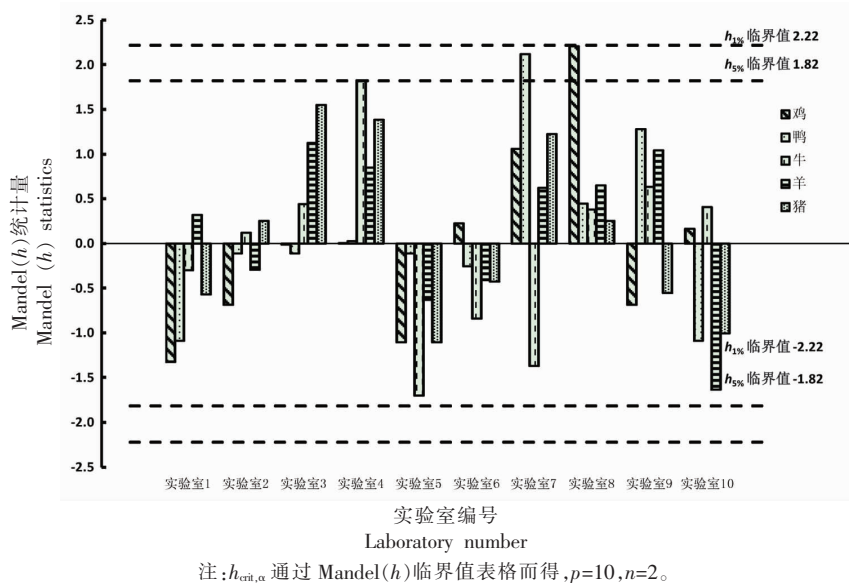


图 4 Mandel(h) 统计量检验(鸡肉、鸭肉、牛肉、羊肉、猪肉)

Fig.4 Mandel (h) statistical test (chicken, duck, bovine, ovine, porcine)

Mandel(k) 统计量是检验实验室内检测结果的精密度,用来进行结果离散性的统计分析,即单个实验室内各试验结果与试验结果均值在相比其它实验室下比较结果的偏差。某个实验室的 k 值越大,表明其实验室检测结果精密度越低^[22]。 k 值计算方式见式(2)。

$$k_i = \frac{S_i \sqrt{p}}{\sqrt{\sum_i^p S_i^2}} \quad (2)$$

式中, p ——参加验证的实验室总数, S_i 为——各实验室内结果的标准偏差。

$k_{crit,\alpha}$ 为衡量某个实验室内检测结果精密度的检验临界值。10 家实验室结果的 k 值与 $k_{crit,\alpha}$ 比较结果如图 5。其中,8 家实验室的所有结果均 $\leq k_{5\%}$ 临界值,结果为可信值。实验室 3 的鸡肉基质结果 ($k=2.136$) 和实验室 7 的羊肉基质结果 ($k=1.996$) 在 $k_{5\%} \sim k_{1\%}$ 的临界区间。结果为歧离值,同样没有离群数据出现。根据 ISO5725-2:2019-2《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 2 部》的规定,试验结果最终为歧离值时,不应该被剔除,只有当 k 值 $>k_{1\%}$ 临界值,结果为离群值,才需要被剔

除。因此,10 家实验室所有基质的数据也均通过 Mandel(k) 统计模型的验证。

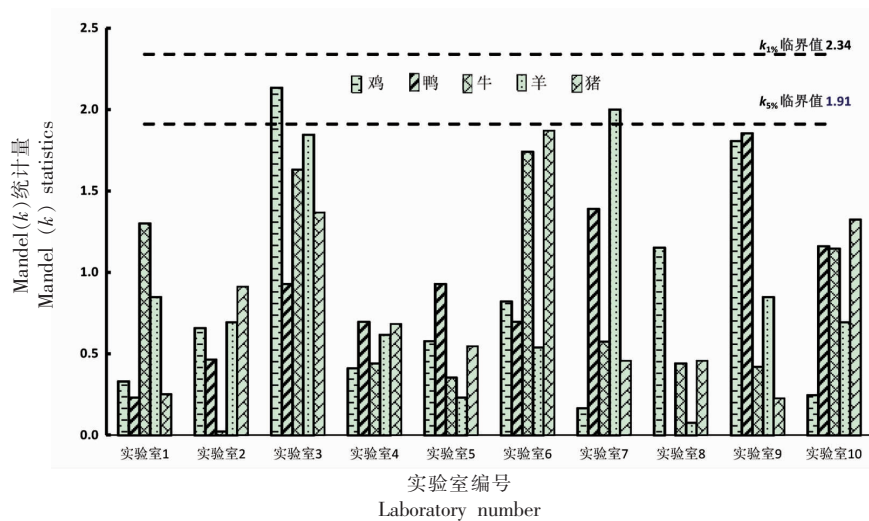
通过 Mandel(h/k) 统计检验可知,10 家实验室数据的重复性结果没有较大的浮动,均通过了有效性验证,均满足 ISO 5725-2:2019-2《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 2 部》对于准确度的要求。无需采用数值离群法对原始数据作进一步分析。

2.4.2 Cochran 检验 实验室间比对数据有效性有一项重要假设,即各实验室所提交数据的各自方差没有显著差异^[23]。依据检测方法和结果准确度分析关于 ISO5725-2:2019-2《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 2 部》的要求,原始数据的有效性还需要经过 Cochran 检验验证,剔除对方差结果可能产生干扰的离群值。

Cochran 模型是对标准差的最大值进行评估,属于单侧检验^[24],其计算方式见式(3)。

$$C_i = \frac{S_{i\max}^2}{\sum_i^p S_i^2} \quad (3)$$

式中, S_i 为——各实验室内结果的标准偏差,



注： $k_{crit,\alpha}$ 通过 Mandel(k) 临界值表格而得， $p=10, n=2$ 。

图5 Mandel(k) 统计量检验 (鸡肉、鸭肉、牛肉、羊肉、猪肉)

Fig.5 Mandel(k) statistical test (chicken, duck, bovine, ovine, porcine)

S_{max} 为—— S_i 中的最大值。

$C_{crit,\alpha}$ 是进一步衡量某个实验室内检测结果精密度的检验临界值,当 C_{max} 值 $\leq C_{5\%}$ 临界值,结果为可信值;当 C_{max} 值在 $C_{5\%} \sim C_{1\%}$ 的临界区间内,结果为歧离值;当 C_{max} 值 $> C_{1\%}$ 临界值,结果为离群值,如果标准偏差的最大值是离群值,则将该值舍去后对剩余的标准差重新计算 Cochran 统计量。从表 10 可知,5 种基质结果的 C_{max} 均远 $< C_{5\%}$ 临界值 0.602,判定该方法检验各实验室内检测结果均无歧离值和离群值。

通过 Cochran 统计检验可知,10 家实验室数据的精密度结果没有较大的浮动,均通过了一致性验证,满足 ISO 5725-2:2019-2《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 2 部》对于精密度的要求。

2.4.3 Grubbs 检验 Grubbs 统计量是针对实验室间数据一致性的进一步数理检验,分为单个离群值循环检验和双个离群值循环检验^[25]。

2.4.3.1 单个离群值检验(单侧检验) Grubbs 单个离群值检验模型用于明确一组数据中最大值或最小值是否为离群值,属于双侧检验^[26]。Grubbs 单个离群值检验的最大和最小统计量计算方法见式(4)和(5)。

$$G_p = \frac{X_p - \bar{X}}{S} \tag{4}$$

表 10 Cochran 统计量检验

	鸡肉	鸭肉	牛肉	羊肉	猪肉
C_{max}	0.414	0.312	0.275	0.363	0.318
$C_{5\%}$	0.602	0.602	0.602	0.602	0.602
$C_{1\%}$	0.718	0.718	0.718	0.718	0.718

$$G_1 = \frac{\bar{X} - X_1}{S} \tag{5}$$

式中, X_p ——各实验室间结果的最大值, X_1 ——各实验室间结果的最小值, \bar{X} 为——各实验室间结果的平均值, S ——各实验室间结果的标准偏差。

$G_{crit,\alpha}$ 是进一步衡量某个实验室检测结果准确度的检验临界值,当 G_p 或 G_1 值 $\leq G_{5\%}$ 临界值,结果为可信值;当 G_p 或 G_1 值 $> G_{5\%}$ 但 $\leq G_{1\%}$ 临界值,结果为歧离值;当 G_p 或 G_1 值 $> G_{1\%}$ 临界值,结果为离群值,从表 11 可知,单个离群值循环检验中的 G_p 或 G_1 均远 $< G_{5\%}$ 临界值 2.290,说明此方法检验各实验室内检测结果均无歧离值和离群值。

2.4.3.2 双个离群值检验(双侧检验) Grubbs 双个离群值检验模型用于明确一组数据中最大两个值或最小两个值是否为离群值,属于双侧检验^[27]。Grubbs 双个离群值检验的最大和最小统计量计算方法见式(6)和(7)。

$$G_{\min} = \frac{S_{p-1,p}^2}{S_0^2} \quad (6)$$

$$G_{\max} = \frac{S_{1,2}^2}{S_0^2} \quad (7)$$

式中, $S_{p-1,p}^2$ ——除去两个最大值后余下实验室内检测结果的标准偏差, $S_{1,2}^2$ ——除去两个最小值后余下实验室内检测结果的标准偏差, S_0^2 ——各实验室内结果的方差。

双个离群值检验模型是除去两个最值后进行计算的统计量, 因此其与单个离群值检验模型的判定法则相反, 当 G 值 $\geq G_{5\%}$ 临界值, 结果为可信值; 当 G 值 $< G_{5\%}$ 但 $\geq G_{1\%}$ 临界值, 结果为歧离值; 当 G 值 $< G_{1\%}$ 临界值, 结果为离群值, 从表 11 可知, 双个离群值循环检验中的 G 均远大于 $G_{5\%}$ 临界值 0.1864, 明确该方法检验各实验室内测试结果均无歧离值和离群值。

通过 Grubbs 统计检验可知, 10 家实验室的数据均为通过数理统计检验的有效数据, 满足 ISO 5725-2:2019-2《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第 2 部》对于准确度的要求。

经过 Mandel、Cochran 和 Grubbs 组合统计模型的检验可知, 10 家实验室的结果同时满足实验室内检测结果的准确度和实验室内检测结果的精密度, 无异常值需要进行 Dixon 模型检验。本研究采用的统计学模型均适用于分析动物源性肉制品中氯霉素结果的有效性和一致性。

2.4.4 平均值和标准差的分析 通过对数据有效性和一致性的统计检验, 将 10 个实验室检测结果的平均值(m)、重复性标准差(S_r)和再现性标准差(S_R)进行了计算, 结果如表 12 所示。

由表 12 的数据可知, 标准差与平均值之间没有显著的线性关系或者对数线性关系。根据 ISO 5725-2:2019-2《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第 2 部》的规定, 可以采用各基质 S_r 和 S_R 的平均值来表征该方法的精密度^[28], 即对于动物源性肉制品中氯霉素含量的重复性标准偏差 S_r 和再现性标准差 S_R 分别为 3.88×10^{-2} 和 6.73×10^{-2} 。

表 11 Cochran 检验结果

	单侧最低 值(G_l)	单侧最高 值(G_p)	双侧最低 值(G_{\min})	双侧最高 值(G_{\max})
鸡肉	1.323	2.206	0.6376	0.2839
鸭肉	1.091	2.118	0.7091	0.2587
牛肉	1.703	1.826	0.4173	0.5590
羊肉	1.636	1.127	0.3454	0.7121
猪肉	1.104	1.547	0.7274	0.4729
$G_{5\%}$	2.290	2.290	0.1864	0.1864
$G_{1\%}$	2.482	2.482	0.1150	0.1150

表 12 实验室间比对结果的平均值(m), 重复性标准差(S_r)和再现性标准差(S_R)Table 12 Mean, repeatable standard deviation (S_r), reproducibility standard deviation (S_R) of the international ring comparison test for CAP

	鸡肉	鸭肉	牛肉	羊肉	猪肉
离群值	0	0	0	0	0
平均值	0.250	1.220	0.610	1.840	1.020
重复性标准差	0.009	0.031	0.032	0.092	0.031
再现性标准差	0.026	0.042	0.040	0.191	0.038

3 结论

本文结合了氯霉素的理化性质和不同肉类基质的特点, 对前处理方法进行了开发, 对仪器方法进行了优化, 建立了一套定量准确, 操作简洁, 适用于国际上不同国家使用的高效液相色谱-串联质谱法。对实验室内试验结果进行了验证, 5 种不同基质的动物源性肉制品的低、中、高加标回收率在 73.34%~91.23% 之间, RSD 在 0.66%~2.91% 之间, 回收率稳定、重现性良好。同时, 组织了国内外 10 家权威实验室进行了国际间实验室比对, 采用 Mandel、Cochran 和 Grubbs 统计学模型对试验结果的准确性和精确性进行了验证, 数理统计结果表明该方法的适用性广泛, 精密度良好。故被参与国标委员会专家认可, 经 ISO/TC34/SC6 委员会同意, 将此方法修订为 ISO 13493:2021 Meat and meat products - Determination of Chloramphenicol content-reference method (《肉与肉制品中氯霉素的测定-推荐性方法》)^[29], 已于 2021 年 8 月 27 日在全球发布, 为世界各国标委会制定相关检测标准提供参考。

致谢:

感谢上海市科学技术委员会项目基金对本实验的支持;感谢 ISO/TC34/SC6 委员会对本实验方法的支持;并感谢美国奥本大学生物系统工程系教授向本实验提出的宝贵建议和指导。

感谢上海市食品研究所,为方法学验证进行试样制备;并感谢 AB SCIEX、Agilent、SGS、Thermo technology、Intertek、广州检验检测认证集团等国内外著名企业参与国际间实验室比对工作。

参 考 文 献

- [1] 罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. QuEChERS/液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中 30 种激素类及氯霉素类药物残留[J]. 分析测试学报, 2011, 30(12): 1329-1337.
- LUO H T, HUANG X L, WU H Q, et al. Simultaneous determination of 30 hormones and chloramphenicol residues in fish using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2011, 30(12): 1329-1337.
- [2] WANG L, HAI Y, ZHANG C, et al. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 619(1): 54-58.
- [3] KIKUCHI H, SAKAIT, TESHIMA R, et al. Total determination of chloramphenicol residues in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2017, 230: 589-593.
- [4] IX-EURLEX. Commission Regulation (EC) No 1442/95 of 25 June Amending Annexes I, II, III, and IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in food[S]. (1995-06-25)[2022-08-23]. <https://www.lawinsider.com/dictionary/commission-regulation>.
- [5] 卞华, 刘振宇, 周泽琳. 氟虫腈检测技术及国内外标准制定研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(16): 5227-5234.
- BIAN H, LIU Z Y, ZHOU Z L. Research progress on detection technology and domestic and foreign standard formulation of fipronil[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(16): 5227-5234.
- [6] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号[EB/OL]. (2002-12-24)[2022-08-29]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201006/t20100606_1535491.htm. Ministry of Agriculture. No 235 bulletin of ministry of agriculture of the People's Republic of China[EB/OL]. (2002-12-24)[2022-08-29]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201006/t20100606_1535491.htm.
- [7] IX-ISO. Meat and meat products-Determination of chloramphenicol content-Method using liquid chromatography: ISO 13493:1998[S]. Geneva: ISO, 1998.
- [8] BARRETO F, RIBEIRO C, HOFF R B, et al. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1449: 48-53.
- [9] ZHANG P J, ZHANG X S, RONG Y T, et al. Simultaneous determination of sulfonamides and chloramphenicol residues in aquatic products by QuEChERS-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(20): 5403-5409.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定: GB/T 22338-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of chloramphenicol residues in food of animal origin: GB/T 22338-2008 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.
- [11] IX-ISO. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method: ISO 5725-2:2019[S]. Geneva: ISO, 2019.
- [12] 张亮亮. 实验室间比对结果的数据处理及测量不确定度评定[J]. 数码设计, 2017, 6(6): 102-106.
- ZHANG L L. Data processing of inter-laboratory comparison results and evaluation of measurement uncertainty[J]. Peak Data Scienc, 2017, 6(6): 102-106.

- [13] 张小刚, 王霞, 戴春风, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 6 种头孢菌素类抗生素残留[J]. 色谱, 2018, 36(4): 345-350.
ZHANG X G, WANG X, DAI C F, et al. Determination of six cephalosporin residues in milk by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(4): 345-350.
- [14] 张凯, 秦宇, 卞华, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法检测羊肉中 8 种抗真菌药[J]. 色谱, 2018, 36(10): 999-1004.
ZHANG K, QIN Y, BIAN H, et al. Determination of 8 antifungal drug in mutton by QuEChERS coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(10): 999-1004.
- [15] IX-EURLEX. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Result[S]. (2002-08-12)[2022-08-29]. <https://www.scrip.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1989044>.
- [16] 秦燕, 朱柳明, 张美金, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法测定动物肌肉组织中的氯霉素残留[J]. 分析测试学报, 2005, 24(4): 17-20.
QIN Y, ZHU L M, ZHANG M J, et al. Determination of chloramphenicol residues in animal muscles by liquid chromatography-Electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2005, 24(4): 17-20.
- [17] 卞华, 秦宇, 虞成华, 等. 复合式提取净化体系结合超高效液相色谱-串联质谱法检测畜禽肉中 120 种抗生素药物残留[J]. 色谱, 2019, 37(2): 50-64.
BIAN H, QIN Y, YU C H, et al. Simultaneous determination of 120 veterinary antibiotics in meat by combined pretreatment system coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(2): 50-64.
- [18] 褚佳玥, 葛淑丽, 马跃龙. 肉制品中总磷含量测定及国际标准制定研究[J]. 中国质量与标准导报, 2022, 2(2): 45-53.
CHU J Y, GE S L, MA Y L. Determination of total phosphorous content in meat products and the development of international standard[J]. China Quality and Standards Review, 2022, 2(2): 45-53.
- [19] WILRICH P T. Critical values of Mandel's h and k , the Grubbs and the Cochran test statistic[J]. AS-tA Advances in Statistical Analysis, 2013, 97: 1-10.
- [20] 邓勃. 测试数据统计处理中的一些问题探讨[J]. 化学计量, 1993, 2(1): 21-32.
DENG B. Some problems in the statistical treatment of analytical data[J]. Chemicometerage, 1993, 2(1): 21-32.
- [21] JOHN T, BERNERT P J III, DAVID B H, et al. Interlaboratory comparability of serum cotinine measurements at smoker and nonsmoker concentration levels: A round-robin study[J]. Nicotine & Tobacco Research, 2009, 11(12): 1458-1466.
- [22] 吴波伟, 钱么. 检验实验室间比对测试结果中离群值的方法探讨[J]. 中国纤检, 2020, 547(4): 82-86.
WU B W, QIAN M. Discussion on the method of outliers in the test results of inter-laboratory comparison[J]. China Fiber Inspection, 2020, 547(4): 82-86.
- [23] American Society for Testing and Materials. Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method: ASTM E691-16 [S]. Philadelphia: American Society for Testing and Materials, 2016: 1-10.
- [24] RUE' L. Scrutiny of variance results for outliers: Cochran's test optimized[J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 659(1/2): 68-84.
- [25] GRUBBS F E. Procedures for detecting outlying observations in samples-Technometrics [J]. Taylor & Francis, 1969, 11(1): 1-21.
- [26] GRUBBS F E, BECK G. Taylor & Francis Online: Extension of sample sizes and percentage points for significance tests of outlying observations[J]. Technometrics, 1972, 14(4): 847-854.
- [27] 章明洪, 储德韧, 刘刚. 尿基肥料中缩二脲含量测定及国际标准制定研究[J]. 化肥工业, 2017, 44(3): 1-10.
ZHANG M H, CHU D R, LIU G. Determination of biuret content in urea-based fertilizers and the development of related international standard[J]. Chemical Fertilizers Industry, 2017, 44(3): 1-10.
- [28] 范宾, 储德韧, 商照聪. 肥料中水溶性钾含量测定的四苯硼酸钾重量法改进及国际标准制定[J]. 科技导报, 2014, 32(28/29): 32-38.
FAN B, CHU D R, SHANG Z C. Improvement on

determination of water-soluble potassium content in fertilizers by potassium tetraphenylborate gravimetric method & development of related international standard[J]. Science Guide, 2014, 32(28/29): 32-38.

[29] IX-ISO. Meat and meat products-Determination of chloramphenicol content-Reference method: ISO: 13493-2021[S]. Geneva: ISO, 2021.

Optimization on the Determination of Chloramphenicol in Animal-derived Meat Products

Bian Hua, Ning Xiaojun*, Du Ruyun

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233)

Abstract A combined purification pretreatment was developed, coupled with the ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) technique on chloramphenicol detection. The matrixes were dissolved and dispersed by ultrapure water, extracted by ethyl acetate, and cleaned using the hexane purification, followed by the ProElut PLS-A SPE system. The residue targets were achieved on Waters Atiantis T₃ column with gradient elution of ultra-pure H₂O containing 0.1% ammonium hydroxide and acetonitrile as mobile phases, and detected by UPLC-MS/MS with MRM mode via ESI- ionization. An intra-laboratory validation was tested on this method, while an international ring comparison test involved with 10 famous worldwide laboratories was also conducted. The chloramphenicol revealed good linear ranged from 0.5 to 10.0 ng/mL, while the correlation coefficient (R^2) was better than 0.9986. The average recoveries on three levels of 5 matrixes (chicken, duck, bovine, ovine, porcine) ranged from 73.34% to 91.23%, with RSD from 0.66% to 2.91%, exhibiting great recovery and repeatability. The composite statistical models by Mandel, Cochran, and Grubbs magnitudes on the data from 10 laboratories verified that all results satisfied the accuracy requirements of inter-laboratory study and the precision requirement of intra-laboratory study. Statistical analysis showed the new method is universal, precise, and simple, thus it had been approved by the ISO/TC34/SC6 committee as the next generation recommended international method for the chloramphenicol determination. And it has been published in international standardization organization system in August 27, 2021, to provide the reference for the global standards committee to formulate relevant detection standards.

Keywords comprehensive purification pretreatment; ISO international standardization organization system; Mandel statistics; Cochran statistics; Grubbs statistics