兽药残留消除试验指导原则

一、概述

**（一）定义与目的**

兽药残留对消费者可能产生毒害作用，从而影响人类的健康和消费安全。用于食品动物的兽药产品均需通过残留消除试验制定休药期。休药期，是指为符合食品安全国家标准动物性食品中兽药最大残留限量，使用兽药后的动物在屠宰上市或其产品（蛋、奶）允许用作人的食品前停止使用兽药的一段时间。为保障动物性食品安全，特制定本指导原则。

**（二）适用范围**

凡申请在食品动物（如牛、羊、猪、禽等）使用的兽药均需进行残留消除试验确定休药期。

二、分析方法

由于残留消除试验样品一般来自动物可食性组织或蛋、奶等产品，具有取样量少、药物浓度低、内源性物质干扰多（如激素、维生素、胆汁以及可能同服的其他药物）以及个体差异大等特点，因此必须建立灵敏、专一、精确、可靠的生物样品定量分析方法，并对方法进行确证。

分析方法可采用标准方法、非标准方法以及允许偏离的标准方法。

标准方法包括：国家标准、农业部公告、CAC、AOAC、美国FSIS、欧盟等检测方法标准。允许偏离的标准方法包括：超出标准规定范围使用的标准方法；经过扩充或更改的标准方法。

标准方法和允许偏离的标准方法按照方法学验证的要求进行验证。非标准方法需要按照兽药残留检测方法制定要求进行。

分析方法一般采用外标法，当绝对回收率达不到要求或有可能影响定量等其他因素时，建议采用内标法。优先选择待测分析物的同位素替代化合物作为内标，也可以使用不影响残留消除试验结果准确性的其他物质作为内标。

测定时一般采用标准溶液或空白基质添加标准物质溶液制备的标准曲线进行定量。使用的标准物质必须符合国家相关规定的赋值溯源。

**（一）常用分析方法**

目前常用的分析方法主要有：

1.色谱法：高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）、色谱－质谱联用法（LC-MS、LC-MS-MS，GC-MS，GC-MS-MS）等，可用于大多数药物的检测。从目前发展看，生物样品的分析一般选择色谱法，这类方法灵敏度、特异性、准确性一般都能适应残留消除研究的需要。具体选用何种分析方法应根据药物的化学结构、理化性质、仪器条件以及借鉴文献方法多方面因素来考虑确定。

2.免疫学方法：放射免疫分析法、酶免疫分析法、荧光免疫分析法等，多用于蛋白质多肽类物质的检测。

3.微生物学方法：主要用于抗生素或部分抗寄生虫药的检测，如果抗微生物药的代谢产物仍有抗菌活性，则不宜选用微生物法。

**（二）方法学验证**

方法学验证是整个残留消除研究的基础。为了保证分析方法可靠，必须对方法进行充分验证，一般应进行以下几方面的考察。

1.特异性

指在样品中存在干扰成分的情况下，分析方法能够准确、专一地测定分析物的能力。必须证明所测定物质是受试药品的原形药物或特定活性代谢物，生物样品所含内源性物质和相应代谢物、降解产物不得干扰对样品的测定，如果有几个分析物，应保证每个分析物都不被干扰。应确定保证分析方法的最佳检测条件。对于色谱法至少要考察空白生物样品色谱图、空白生物样品外加对照物质色谱图（注明浓度）及用药后的生物样品色谱图。采用LC-MS、LC-MS/MS法时应考察分析过程中的基质效应，基质效应应不超过LOQ的20%。

2.标准曲线和定量范围

标准曲线反映了所测定物质浓度与仪器响应值之间的关系，一般用回归分析法（如用加权最小二乘法等）所得的回归方程来评价。应提供标准曲线的线性方程和相关系数，说明其线性相关程度。标准曲线高低浓度范围为定量范围，在定量范围内浓度测定结果应达到试验要求的精密度和准确度。

配制标准样品应使用与待测样品相同的生物基质。不同的样品应制备各自的标准曲线。用于建立标准曲线的浓度个数取决于分析物可能的浓度范围和分析物浓度/响应值关系的性质。必须至少用5个浓度建立标准曲线，对于非线性相关可能需要更多浓度点。定量范围要能覆盖全部待测的生物样品浓度范围，不得用定量范围外推的方法求算未知样品的浓度。当所需测定样品中药物浓度超出定量范围时，应采取科学的稀释步骤，使得被测药物浓度在定量范围之内。建立标准曲线时应随测空白生物样品，但计算时不包括该点，仅用于评价干扰。当线性范围较宽的时候，推荐采用加权的方法对标准曲线进行计算，以使低浓度点计算得比较准确。标准曲线需经统计学分析，如进行相关性与回归分析。相关系数要求：色谱法应大于0.99，生物法应大于0.98。

有些分析（如微生物分析）可能需要对数（log）转换才能达到线性，而其他分析[如酶联免疫吸附测定法（ELISA）、放射免疫测定法（RIA）]可能需要更复杂的数学函数以确立浓度与响应值之间的关系。也应通过评价选定函数生成的残差确认使用该函数时的可接受性。

3.检测限和定量限

建立分析方法时，应测定背景信号（噪音）的标准偏差，确定方法的检测限（limit of detection，LOD）和定量限（limit of quantitation，LOQ）。LOD为噪音均值加3倍标准差，LOQ为噪音均值加10倍标准差。LOQ一般是标准曲线的最低浓度，表示测定样品中符合准确度和精密度要求的最低药物浓度。LOQ原则上应低于1/2MRL。

4.准确度与精密度

准确度指分析物实际浓度值与用该方法得到的平均结果之间接近的程度。准确度与系统误差（分析方法偏差）和分析物回收率（以回收率%测量）密切相关。残留物分析法的建议准确度随分析物浓度变化而变化。准确度应符合下述范围：

|  |  |
| --- | --- |
| 分析物浓度\* | 准确度的可接受范围 |
| <1μg/kg | 50%～120%（-50%至+20%） |
| ≥1μg/kg、<10μg/kg | 60%～120%（-40%至+20%） |
| ≥10μg/kg、<100μg/kg | 70%～110%（-30%至+10%） |
| ≥100μg/kg | 80%～110%（-20%至+10%） |

\*μg/kg = ng/g = ppb

精密度是指在确定的分析条件下，相同基质中相同浓度样品的一系列测量值的分散程度。通常用质控样品的批内和批间RSD来考察方法的精密度。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 分析物浓度 | 批内，%CV | 批间，%CV\* |
| <1μg/kg | ≤30% | ≤45% |
| ≥1μg/kg、<10μg/kg | ≤25% | ≤32% |
| ≥10μg/kg、<100μg/kg | ≤15% | ≤23% |
| ≥100μg/kg | ≤10% | ≤16% |

\*按照Horwitz公式计算：CV=2(1-0.5logC)，式中，C=以小数表示的浓度（例如，1μg/kg输入为10-9）。

一般要求选择高、中、低3个浓度的质控样品同时进行方法的精密度和准确度考察。低浓度选择标准曲线的最低浓度；高浓度接近于标准曲线的上限；中间选一个浓度。在测定批内精密度时，每一浓度至少制备并测定5个样品。为获得批间精密度应至少在不同天连续制备并测定3个分析批，至少45个样品。

5．样品稳定性

根据具体情况，对含药生物样品在室温、冰冻和冻融条件下以及不同存放时间进行稳定性考察，以确定生物样品的存放条件和时间。还应注意考察储备液的稳定性以及样品处理后的溶液中分析物的稳定性，以保证检测结果的准确性和重现性。

（1）基质中稳定性

残留物消除研究中采集的样品（组织、乳汁、蛋或蜂蜜）一般在分析前冷冻储存。分析前需确定这些样品可在拟定储存条件下储存的时间。作为验证程序的一部分或作为单独研究时，需进行稳定性研究确定储存条件（如4℃、-20℃或-70℃）及样品分析前储存时间。

应向样品添加已知量的分析物，并在适当条件下储存。可在规定时间分析样品（例如，开始时、1周、1个月、3个月）。如果冻存样品，应进行冻融研究（至少冻融3次，每天1次）。或者，可在初始分析中使用真实样品测定起始浓度。基质中稳定性评估的建议方案为对接近验证范围上限和下限的2个不同浓度重复分析3次。在确立的准确度验收标准内，如果在规定稳定性时间点得到的平均浓度与初始分析或刚刚添加对照样品的分析结果一致，判定基质中稳定性为可接受。

（2）处理样品的稳定性

样品一般处理1天并在次日分析，如果出现仪器故障，可多储存几天，如1周。必要时可测定在处理样品储存条件下的稳定性。储存条件示例为室温储存4～24小时和4℃冷藏48小时等。可按照方法要求研究其他储存条件。处理样品稳定性评估的建议方案为对接近验证范围上限和下限的2个不同浓度重复分析3次。在确立的准确度验收标准内，如果在规定稳定性时间点得到的平均浓度与初始分析或刚刚添加并处理的对照样品分析结果一致，判定处理样品的稳定性为可接受。

6．微生物学分析

上述分析方法确证的很多参数和原则也适用于微生物学或免疫学分析，但在方法确证中应考虑到它们的一些特殊之处。微生物学或免疫学分析的标准曲线本质上是非线性的，所以应采用比化学分析更多的浓度点来建立标准曲线。结果的准确度是关键因素，如果重复测定能够改善准确度，则应在方法确证和未知样品测定中采用同样的步骤。

微生物学或免疫学分析方法确证实验应包括在几天内进行的6个分析批，每个分析批包括4个浓度（LOQ，低、中、高浓度）的质控双样本。

7．质量控制

应在生物样本分析方法确证完成以后开始测定未知样品。在测定生物样品中的药物浓度时应进行质量控制，以保证所建立的方法在实际应用中的可靠性。推荐由独立的分析人员配制不同浓度的质控样品对分析方法进行考核。

每个未知样品一般测定一次，必要时可进行复测。来自同一个体的生物样品最好在同一批中测定。每个分析批生物样品测定时应建立新的标准曲线，并随行测定高、中、低3个浓度的质控样品。每个浓度至少双样本，并应均匀分布在未知样品测试序列中。当一个分析批中未知样品数目较多时，应增加各浓度质控样品数，使质控样品数大于未知样品总数的5%。质控样品测定结果的偏差一般应小于15%，低浓度点偏差一般应小于20%。如质控样品测定结果不符合上述要求，则该分析批样品测试结果不可采用。

标准曲线的范围不能外延，任何浓度高于定量上限的样品，应采用相应的空白基质稀释后重新测定。对于浓度低于定量限的样品，在进行休药期分析时，应以无法定量（Not detectable，ND）计算。

整个分析过程应当遵从预先制订的实验室SOP以及GLP、GCP原则。

三、试验设计

**（一）受试药物**

受试药物应与拟上市的制剂完全一致、同一剂型，有完整的产品质量标准，有符合规定格式的说明书。受试药物应来源于同一批号，由申报单位自行研制并在符合GMP条件下的车间生产，并提供产品检验合格报告。

**（二）动物及饲养管理**

应选择具有代表性的商业品种和靶动物群，要提供动物来源、体重、健康状况、年龄和性别等数据。

产品适用的不同靶动物应分别进行消除试验。在肉牛进行的试验结果可以应用于非泌乳奶牛，反之亦可。成年反刍动物牛、羊的数据可以外推到犊牛和羔羊，若有证据表明反刍动物反刍前和成年之间的代谢有明显不同，需要单独进行反刍前犊牛和羔羊的消除试验。

对于泌乳期奶牛/羊需单独进行奶中的残留消除试验，制定弃奶期。

用于乳房内灌注研究的奶牛必须是无乳房炎的健康奶牛。

所有动物在试验前必须有足够的适应期，饲养过程尽可能接近商业正常的方式。动物自由采食和饮水。

**（三）动物数量**

不同动物的消除试验每个采样点对动物的要求如下：

1．牛、羊及猪体内组织残留消除试验

最少16只动物分4个采样点进行残留消除试验。每个采样点至少4个动物。建议动物体重分别为：牛约250～400kg、羊约30～60kg、猪约40～80kg。

2．奶中残留消除试验

对于泌乳期的动物，高产奶量动物和低产奶量动物每组至少各10头；对于干乳期的动物，至少应有20头动物。

3．禽的残留消除试验

组织残留消除试验必须保证至少4个采样点，每个点6只动物；蛋中残留试验必须保证至少4个采样点，每个采样点收集10枚或以上的蛋。

**（四）给药**

给药途径和方式必须按照标签、说明书进行，如用于注射的产品，要遵守给药部位和给药方法的规定。对于多次给药的产品，注射给药必须在动物的左右两侧相同部位交替给药。

给药剂量采用标签推荐最高的剂量，给药时间采用标签推荐最长的给药疗程时间，对于连续或长期使用的药物，选择残留标示物在动物体内可食性组织中达到稳态的时间。可以预先进行一个残留标示物达到稳态浓度的测定试验，以确定残留标示物在动物体内可食性组织中达到稳态的时间。

乳房灌注的药物制剂必须同时给予4个乳区。干乳期给药必须在最后一次泌乳后和下一次分娩前进行。

如果一个产品可以用于多种肠道外途径给药，则要求分别进行残留消除试验。如果休药期是依据注射位点的消除数据制定，这时不需要再进行静注给药的消除试验。

用于全身治疗作用具有多个经皮肤给药途径（如浸渍、喷雾和浇泼）的产品，应选择药物吸收量和程度最佳的皮肤给药途径进行残留消除试验。

动物屠宰采用商业方式，一般采用放血处死。不允许采用化学处死方法。

**（五）采样**

在停药当天（牛、羊、猪组织8～12小时，家禽组织2～6小时，奶2～12小时）必须有一个采样点，最后一个采样点应低于残留限量。

在每个采样点，要采集足够量的样品。采集的样品不得进行任何洗涤或处理，所取样品应立即均匀分成若干等份、包装并做好标记，保存于-20℃冰箱，对于残留物有可能不稳定的样品应置于相应要求的温度下存放至测定。

推荐的可食性组织采样方式见表1。

表1 残留消除试验中推荐的可食性组织采样方式

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 可食性  组织  样品类型 | 动物品种 | | |
| 牛/羊 | 猪 | 家禽 |
| 肌肉 | 背长肌 | 背长肌 | 胸肌 |
| 注射位点  肌肉 | 以注射点为中心，取样约0.5kg；肌注：10cm（直径）×6cm（深）；皮下注射：15cm（直径）×2.5cm（深） | 以注射点为中心，取样约0.5kg；肌注：10cm（直径）×6cm（深）；皮下注射：15cm（直径）×2.5cm（深） | 收集整个给药部位样品，如整个脖子、整个胸部肌肉、整个腿部。体型较大的取样不超过0.5kg |
| 肝 | 外缘纵切 | 外缘纵切 | 全部 |
| 肾 | 双肾各取等量 | 双肾各取等量 | 双肾取全量 |
| 脂肪 | 肾周脂肪（Peri-renal） | — | — |
| 皮肤/脂肪 | — | 带皮的脂肪 | 带皮的脂肪 |
| 奶 | 全部 | — | — |
| 蛋 | — | — | 洗净蛋壳，取蛋白和蛋黄混合 |

肌注和皮下注射给药的产品，必须采集最后一次给药注射位点的肌肉。其他经皮给药的药物也要进行给药位点的药物残留测定，比如浇泼剂要采集给药部位的肌肉、皮下脂肪等。

如果分析的样品为两种或两种以上的复合样品，如带皮的脂肪（猪、禽），则不再单独进行脂肪、皮的测定。牛、羊的脂肪样品仅指肾周脂肪，猪和禽应采集皮脂。

乳样应该在最后一次给药后按照每日两次的挤奶程序的间隔时间下采集。在每个时间点，将每头动物所有乳区的全部奶混合在一起后，进行采样。对于多次给药的产品，乳样应该从最后一次给药后采集。

给药和采样要考虑蛋黄的形成时间（一般为12天）。蛋白和蛋黄要混在一起进行分析检测。对于多次给药的产品，在给药期间也要进行蛋样采集。

**（六）休药期为零天的残留消除试验**

代谢试验预测休药期为0天的产品，无论单次给药、多次给药，还是连续给药，都可以通过单时间点采样试验进行证实。

进行单时间点采样试验的动物数量最低要求为：禽12羽，牛、羊、猪6头，产奶动物10头。

采样时间设置，最短不能少于3小时，最长不超过12小时。一般来说，家禽约6小时，牛、羊、猪约12小时；奶约12小时。

**（七）样品测定**

样品中残留量必须采用经验证的定量检测方法进行检测。每种组织均进行平行双样品测定。

**（八）数据汇总与分析**

编制靶动物残留消除规律数据汇总表，列出每个时间点的全部实测数据。

靶动物组织中残留休药期可以采用WT1.4软件（Withdrawal-Time Calculation Program）或相当的程序进行计算，奶中残留休药期可以采用WTM1.4软件（Withdrawal-Time Calculation Program for Milk）或相当的程序进行计算。确定制定休药期的靶组织和最终推荐的休药期。

四、试验报告

残留检测方法的确认试验可以和残留消除试验合并撰写报告，也可以单独按照《兽药残留检测方法验证指导原则》规定的格式撰写报告。报告应符合GLP和GCP的质量管理要求。