

食品理化检测中假阳性结果分析及解决方法

方志娟, 叶湖, 何新叶, 李晓芹* (苏州市食品检验检测中心, 江苏苏州 215104)

摘要 食品样品基质复杂, 干扰物质多, 不确定性大, 即使完全按照检测标准操作, 也有各种因素干扰结果的准确性。检测机构要经得起考验, 获得准确、可靠的试验分析数据, 有效排除“假阳性”结果非常关键, 一旦出现疑似阳性结果, 需要反复确认。经过长期理化检验工作积累, 结合三聚氰胺、结晶紫、硝基咪唑代谢物、纳他霉素等实际案例, 从本底干扰、样品、标准选择、结果计算方式、色谱条件 5 个方面思考食品理化仪器检测过程中可能导致“假阳性”结果的因素, 并提出预防出具假阳性报告和疑似阳性结果的验证方法, 为检验员在工作中遇到类似情况时提供参考。

关键词 食品; 理化检测; 仪器分析; 假阳性; 解决方法

中图分类号 TS 207.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)18-0187-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.18.046

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Analysis and Solution of False Positive Results in Food Physical and Chemical Testing

FANG Zhi-juan, YE Hu, HE Xin-ye et al (Suzhou Institute for Food Control, Suzhou, Jiangsu 215104)

Abstract The matrix of food samples is complex and uncertain. There are various factors that interfere with the accuracy of the results, even if the operation is completely in accordance with the testing standard. It needs to be confirmed repeatedly once “false positive” results appear. The factors that may lead to “false positive” results in food physical and chemical instruments were discussed from five aspects: background interference, sample, standard selection, calculation method of results and chromatographic conditions. Meanwhile, we proposed confirmatory methods to prevent the issuance of false positive reports and suspected positive results, so as to provide reference for inspectors when they encounter similar situations at work.

Key words Food; Physical and chemistry testing; Instrument analysis; False positive; Solution

民以食为天, 食品安全越来越受重视。不断升级的抽检力度, 使得食品生产者面对的抽检压力越来越重。一旦出现阳性样品, 便会从各方面寻找检验报告中可能存在的缺陷, 因此, 检测机构对检验员的要求也是越来越高。在实际分析工作中常常会遇到成分复杂的样品, 其中可能含有与被检测项目化学性质相近的物质, 这些杂质会对被检测物质带来干扰, 容易造成假阳性现象, 直接影响结果的准确性。食品理化检验结果是允许提出复检的, 即使完全按照检测标准操作, 也会遇到复检推翻的情况。因此, 检测机构要经得起考验, 获得准确、可靠的试验分析数据, 有效排除“假阳性”结果非常关键。笔者根据自身工作经验进行总结, 以期食品检验员在工作中遇到此类情况提供参考。

1 本底干扰

每种检测手段都有其缺陷, 面对复杂的基质, 前处理过程无法完全将杂质去除, 检测结果难以避免会受到干扰物的影响, 其中本底干扰较为常见。本底干扰主要表现为空白试验和全部样品均表现出差不多的检测结果, 响应值和取样量无明显相关关系。

按照 GB/T 22388—2008^[1] 第二法液质法建立乳制品中三聚氰胺检测方法时, 发现空白试验结果过高, 提示有本底干扰^[2]。后分步骤进行空白试验, 发现试验过程中普通耗材(塑料材质)的浸泡液中均有微量三聚氰胺存在, 但未能造成明显影响检测结果的干扰信号, 造成干扰的 2 个主要因素为

定性滤纸过滤和氮吹步骤。如图 1 所示, 三聚氰胺保留时间为 1.70 min, 按照定量离子对 m/z 127>85 信号大小比较, 定性滤纸过滤后的提取液和氮吹步骤产生的干扰信号均高于 1 ng/mL 三聚氰胺标准品产生的信号, 而标准 GB/T 22388—2008 检出限为 10 μg/kg(约相当于 10 ng/mL), 极易对检测结果造成影响; 更换滤纸品牌依旧未能有效改善, 后采用不同材质的玻璃纤维滤纸, 干扰信号降至检出限以下。因检测仪器能够满足标准检出限要求, 因此省略氮吹步骤。必要时可考虑旋蒸或更换高纯氮进行浓缩操作。

进行结晶紫检测时, 任何接触过记号笔的耗材, 都有可能产生假阳性结果^[3]。进行邻苯二甲酸酯类测定时, 全过程使用玻璃耗材能明显降低本底值, 提取用的正己烷最好为新开启或专用试剂。

本底干扰主要为试验过程中耗材带入目标物或目标类似物, 常见的包括试验用水、非首次开启的试剂等。使用非一次性耗材未清洗彻底, 尤其是重复使用上样小瓶时, 带来的污染是非常明显的。空白试验非常必要, 尤其出现疑似阳性结果时, 空白试验是避免假阳性结果非常有效的手段。

2 样品

已做空白试验, 未发现异常情况时, 依旧出现假阳性, 此时应该考虑制样过程或样品性质等是否对结果造成影响。

2.1 交叉污染 目前检测实验室制备固体样品时, 一般采用大块切小块, 然后搅拌机绞碎, 制样后砧板或搅拌机未充分清洗, 甚至制样员未戴手套, 称样时检验员未及时清理称样勺, 都可能造成样品的交叉污染。交叉污染对痕量检测影响比较大。

2.2 制样不符合标准要求 样品制备的目的在于保证样品均匀, 使分析时取任何部分都能代表全部被测物质的成分,

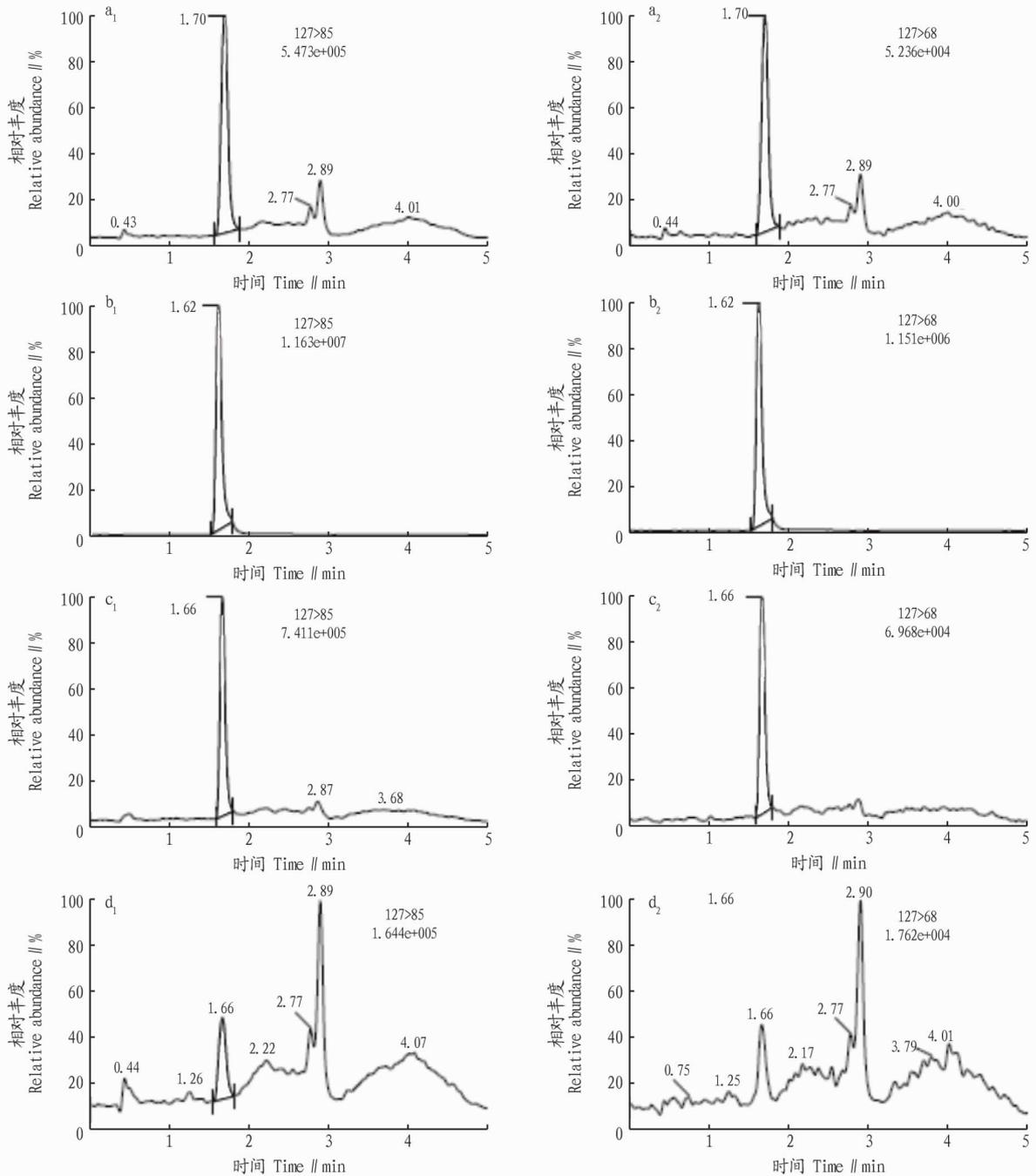
基金项目 苏州市科技计划项目(SS2019039); 江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ196038)。

作者简介 方志娟(1987—), 女, 江苏南通人, 工程师, 硕士, 从事食品检测与质量管理工作。* 通信作者, 高级工程师, 硕士, 从事食品安全检测与分析工作。

收稿日期 2021-04-12; **修回日期** 2021-05-29

制样人员需熟悉制样要求。不同样品、不同标准对取样有不同要求。GB 2760—2014^[4]、GB 2761—2017^[5]、GB 2762—2017^[6]一般是取可食部分,GB 2763—2016^[7]附录 A 规定了

不同类别食品的测定部位,例如,核果类水果需测定全果(去柄和果核),残留量计算应计入果核的重量,西瓜制样时,西瓜皮、香蕉皮也是需要一同制样的。



注: a_1 、 a_2 为 1 ng/mL 三聚氰胺标准品; b_1 、 b_2 为滤纸造成的干扰; c_1 、 c_2 为氮吹造成的干扰; d_1 、 d_2 为去除主要干扰因素

Note: a_1 and a_2 are 1 ng/mL melamine standards; b_1 and b_2 are interference caused by filter paper; c_1 and c_2 are interference caused by nitrogen blowing; d_1 and d_2 are the main interference factors

图 1 过滤和氮吹造成的干扰以及去除过滤和氮吹干扰因素后的三聚氰胺分析结果谱图

Fig.1 The analysis result spectrum of melamine of the interference caused by filtration and nitrogen blowing and after removing the interference factors of filtration and nitrogen blowing

对于存在个体差异的水产品、肉制品、蛋制品,甚至水果、蔬菜等,样品间的差异非常明显,制样均匀非常关键。此时,样品出现疑似阳性时,需与制样人员再次确认制样是否准确,是否需要重新制样再进行判定。

2.3 样品成分 对于调味品,天然成分复杂,干扰物质增多。孙姗姗等^[8]采用三重四级杆质谱仪对火锅底料中常添加的 23 种香料分别进行了罂粟壳成分评估,结果发现有 6 种香料可造成疑似阳性的结果,通过离子丰度比差异和高分辨质谱

排除假阳性。

辣椒粉、火锅底料等调味品中的天然色素对苏丹红检测影响严重, 辛辣香料、茶叶里的天然挥发物在气相和气质检测中也造成很大干扰。在国家连续多年的食品监督抽检高压下, 苏丹红、碱性橙、塑化剂等非法添加已不常见, 遇到此类阳性样品时最好采用高端设备进一步验证。

3 标准选择

3.1 判定标准 出具检验结果时, 需要透彻了解判定标准, 须知晓带入原则、不得添加和不得检出的区别。在食品生产过程中, 有时会用到各种类型的原材料, 而原材料对该添加剂的规定很有可能是允许在一定范围内添加的, 检验员需保持敏感性, 一旦遇到少量检出时, 首先考虑原料带入的可能性。经常出现原料带入的包括着色剂、防腐剂、甜味剂等。这类假阳性一般特点是有检出, 检出值不高或添加剂量达不到该添加剂的效果, 需引起检验员注意。

3.2 检测标准 硝基咪唑代谢物在不同的标准中前处理不同, 有的需要洗涤^[9-11]后进行测试, 此时测试的主要是结合态的硝基咪唑类代谢物; 另一类不需要洗涤, 即主要测试游离态和结合态的硝基咪唑类代谢物。刘正才等^[12]的研究也提出了这一点, 洗涤和不洗涤结果差异显著, 尤其是咪唑西林代谢物氨基脒(SEM)。

还有一种情况, 尤其是对于发酵产品, 发酵过程中会产生复杂的代谢物。例如, 黄酒在发酵过程中可能产生环己醇等类似物质, 会与亚硝酸反应生成环己醇亚硝酸酯。按照 GB 5009.97—2016^[13]第一法气相色谱法进行测定时, 就是检测生成的环己醇亚硝酸酯, 因此造成假阳性结果^[14]。例如葡萄酒, 按照 GB 5009.97—2016^[13]采用液质法进行检测样品时, 检出限较低, 也会出现甜蜜素检出的情况, 但检出值比较低, 是否能以“不得添加”为判定依据判定阳性也是值得商

榷的。

4 结果计算方式

我国很多的检验标准中对目标物的描述一般采用中文名, 无明确 CAS 号, 往往造成歧义, 新接触此领域的检验员需注意判断目标物。以孔雀石绿为例, 按标准 GB/T 19857—2005^[15]并不能确定孔雀石绿的“真实身份”。购买孔雀石绿标准品时, 往往拿到的是一支分子量为 927 的孔雀石绿草酸盐, 分子式为 $2C_{23}H_{25}N_2 \cdot 2C_2HO_4 \cdot C_2H_2O_4$, 很难从中判断孔雀石绿的真实身份。实际上, 孔雀石绿的真正身份是 $C_{23}H_{26}N_2O$, CAS:510-13-4。认错了孔雀石绿的真实身份, 容易导致检测结果偏差, 尤其当检出值在检出限附近时, 特别需要注意。

当检出值在临界值附近时, 出具报告需要考虑测量不确定度。每个检测过程都会引入一定的不确定度, 真正的检验结果应该是一个范围值。当限值超出“检验结果±不确定度”时, 再考虑是否为阳性结果。

5 色谱条件

按照我国现行标准, 多数的食品添加剂采用液相色谱仪进行检测, 保留时间定性, 光谱性质辅助, 峰面积或峰高定量。面对复杂的食品样品, 前处理往往只是沉淀蛋白、去脂肪等非专一性操作, 难以避免有“共流出现象”。沃特世色谱仪有峰纯度测试功能, 也能很好地佐证这一点。在不能有其他类型的仪器进行证明时, 建议更换不同类型的洗脱条件^[16-17]或色谱柱^[18]进行确证。

以纳他霉素为例, 按照 GB/T 21915—2008^[19]检测某样品时, 流动相条件为甲醇:5%乙酸=60:40(V:V), 1.0 mL/min 等度洗脱时, 标准品和样品的色谱峰如图 2 所示, 根据保留时间定性, 纳他霉素应该有检出。但能明显看出样品峰基线抬高, 峰形不完全对称, 有拖尾现象, 提示可能有共流出峰。

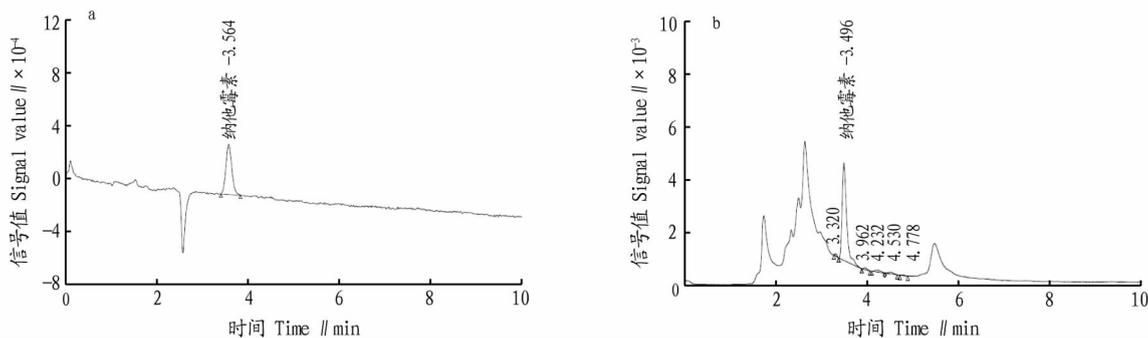


图2 甲醇:5%乙酸等度洗脱时检测标准品和样品中纳他霉素液相色谱图

Fig.2 The liquid chromatogram of natamycin in the standard and sample detected when isocratic elution with methanol:5% acetic acid

为进一步确证, 更换色谱洗脱条件, 流动相为甲醇:0.5%乙酸, 1.0 mL/min 梯度洗脱, 起始 30%甲醇, 8 min 80%甲醇, 9 min 30%甲醇, 运行 15 min, 得到色谱结果如图 3 所示。从图 3 可以看出, 更换色谱洗脱后, 纳他霉素保留时间延后, 基线变化为流动相比比例更改带来的有规律性的变化, 目标物和共流出成分得到初步分离。最终结果显示未检出, 加标后得到与加标量相适应的回收值, 共流出成分对最终结果影响可以忽略。

进行阳性样品确证时, 要排除色谱性质相似的物质对目标物的干扰, 不能以单一色谱系统定性, 必须在 2 个以上不同类型的色谱系统中得到证明^[20]。如果采用上述方式得不到理想结果, 尤其是在需要定性确证时, 可以考虑用高端仪器如质谱、高分辨质谱进行判定。

6 总结

食品检验人必须始终秉承科学严谨的态度, 对检验数据要多角度全方位进行思考分析, 充分利用现有的技术、能力

和经验验证可疑数据。假阳性结果的出现不仅会严重损害企业的经济利益,同时也影响检验方的信誉。如2015年“椰岛鹿龟酒事件”的起因便是检验方检出产品含有非法添加

物^[21],后来导致产品下架,生产企业申请复检后复检结果却是未检出非法添加物。

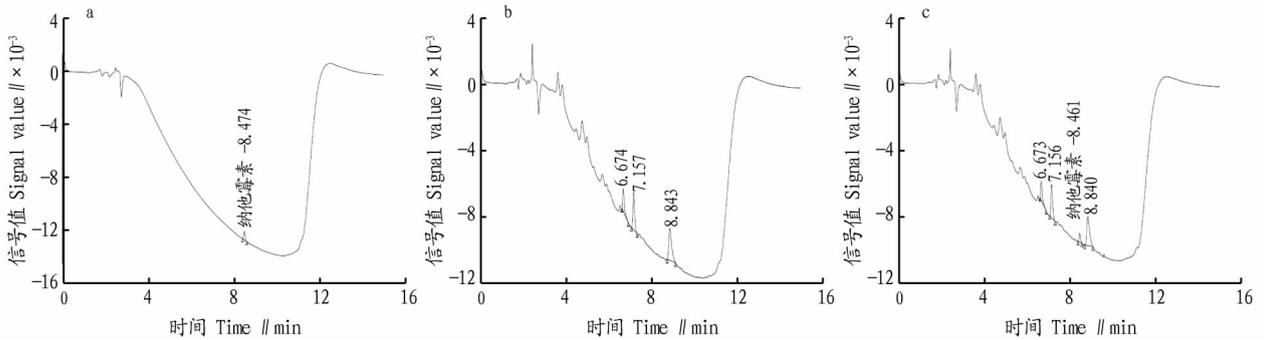


图3 甲醇:0.5%乙酸梯度洗脱时检测标准品(a)、样品(b)和样品加标(c)中纳他霉素液相色谱图

Fig.3 The liquid chromatogram of natamycin in the standard (a), sample (b) and sample spike (c) detected when gradient elution with methanol:0.5% acetic acid

一般情况下,一旦遇到疑似阳性样品,首先考虑的因素有判定是否合理,检测方法选择是否正确,制样是否准确,是否随做空白试验、加标试验,有无异常现象。排除这些因素后,最好调试色谱条件进行复验,在可能的情况下使用不同种类的检测器或高端仪器进一步确证。食品检验人员面临的样品种类繁多,成分不确定性大,需要在检测过程中不断积累经验,小心陷阱,细心观察,耐心探索。

参考文献

- [1] 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.原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法:GB/T 22388—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [2] 康燕玉,廖富荣,曾志杰,等.高效液相色谱法测定三聚氰胺假阳性结果的原因及其对策分析[J].福建分析测试,2010,19(1):6-9.
- [3] 李轩,曾丽珠,张昊.市售油性记号笔对水产品中结晶紫检测污染研究[J].现代食品,2016(24):91-92.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品添加剂使用标准:GB 2760—2014[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量:GB 2761—2017[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中污染物限量:GB 2762—2017[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,中华人民共和国农业部,中华人民共和国国家食品药品监督管理总局.食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量:GB 2763—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [8] 孙姗姗,覃玲,梁瑞强,等.火锅食品中罂粟壳成分检测结果的假阳性研究[J].食品安全质量检测学报,2017,8(7):2531-2542.
- [9] 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.猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品中硝基喹啉类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB/T 20752—2006[S].北京:中国标准出版社,2007.
- [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.动物源性食品中硝基喹啉类药物代谢物残留量检测方法 高效液相色谱/串联质谱法:GB/T 21311—2007[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [11] 中华人民共和国农业部.动物源性食品中硝基喹啉类代谢物残留量的测定 高效液相色谱-串联质谱法:农业部 781 号公告-4—2006[S].北京:中国农业出版社,2006.
- [12] 刘正才,杨方,余孔捷,等.硝基喹啉类代谢物残留量检测标准的比较[J].分析实验室,2011,30(11):43-47.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品中环己基氨基磺酸钠的测定:GB 5009.97—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [14] 姜文良,钱玉根,杨民.GC-MS 法测定黄酒中的甜蜜素[J].中国食品添加剂,2008(5):156-158.
- [15] 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.水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定:GB/T 19857—2005[S].北京:中国标准出版社,2005.
- [16] 郑成荣,范艳红,孙洪峰,等.干燥蒜粉中苯甲酸检测的假阳性分析[J].食品研究与开发,2009,30(7):113-117.
- [17] 陈俊.高效液相色谱法检测水产品中甲基睾酮的假阳性分析[J].南方水产,2010,6(6):74-76.
- [18] 蒋迎,鲁成银,汪庆华,等.茶叶中拟除虫菊酯类农药残留双柱气相色谱检测技术初探[J].中国茶叶加工,2005(3):41-42,44.
- [19] 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.食品中纳他霉素的测定 液相色谱法:GB/T 21915—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [20] 常建华,董琦功.波谱原理及解析[M].北京:科学出版社,2010:7-9.
- [21] 食品药品监管总局办公厅.食品药品监管总局办公厅关于同意恢复生产销售椰岛鹿牌龟酒的复函:食药监办稽函[2015]529号[A].2015.
- [11] JAHANIAN E, MAHDAVI A H, ASGARY S, et al. Effect of dietary supplementation of mannanoligosaccharides on hepatic gene expressions and humoral and cellular immune responses in aflatoxin-contaminated broiler chicks[J]. Preventive veterinary medicine, 2019, 168: 9-18.
- [12] 孟维彬,胡志和,王丽娟,等.添加乳蛋白水解物配方奶粉的免疫功能评价[J].食品科学,2010,31(23):360-365.
- [13] 张伟云,王玉,王旭东,等.蛹虫草对小鼠细胞免疫及巨噬细胞吞噬功能影响[J].长春工业大学学报,2019,40(6):534-539.
- [14] 王慧明,李可可,刘洁,等.松乳菇多糖多肽免疫增强注射剂对小鼠免疫调节的影响[J].经济动物学报,2020,24(2):111-114,124.
- [15] MURCIA-BELMONTE A, ALVAREZ D, ORTEGA N, et al. Effect of progesterone on the vaccination and immune response against Chlamydia abortus in sheep[J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2019, 213: 1-9.
- [16] JANKOWSKI J, KOZŁOWSKI K, OGNIK K, et al. The effect of the dietary inclusion levels and sources of zinc on the performance, metabolism, redox and immune status of turkeys[J]. Animal feed science and technology, 2019, 252: 103-114.

(上接第179页)