

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.04.11

食品动物兽药残留试验注册资料评审主要内容及常见问题

孙雷, 叶妮, 王亦琳, 张骊, 李丹, 徐倩, 汪霞

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2022-12-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 04-0072-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 食品动物使用兽药后, 肉蛋奶等动物性食品中兽药残留对消费者可能产生毒害作用, 影响人类健康和消费安全, 因此, 控制动物性食品中兽药残留问题已成为兽药研发和保障食品安全的重要内容。食品动物兽药残留试验资料主要包括兽药最大残留限量标准、兽药残留检测方法标准和休药期确定三个方面内容。本文结合近年来食品动物兽药残留试验注册资料的评审主要内容及常见问题进行综述, 旨在为食品动物用兽药的研发与注册提供参考。

[关键词] 食品动物; 兽药残留; 注册资料; 评审主要内容; 常见问题

Evaluation Key Points and Common Problems in Registration Data of Veterinary Drug Residue Tests in Food – producing Animal

SUN Lei, YE Ni, WANG Yi – lin, ZHANG Li, LI Dan,

XU Qian, WANG Xia

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

Abstract: After the use of veterinary drug in food – producing animal, the veterinary drug residue in animal – derived foods such as meat, eggs and milk may have a toxic effect on consumers, affecting human health and consumption safety. Therefore, controlling veterinary drug residue in animal – derived food has become an important part of veterinary drug research and development and food safety. The veterinary drug residue test data in food – producing animal mainly include maximum residue limit standard, residue detection method standard and withdrawal time of veterinary drug. In this paper, the evaluation key points and common problems in registration data of veterinary drug residue tests in food – producing animal in recent years were reviewed, in order to provide reference for the research, development and registration of veterinary drug used in food – producing animal.

Key words: food – producing animal; veterinary drug residue; registration data; key points; common problems

兽药残留是指食品动物用药后, 动物产品的任何可食用部分中所有与药物有关的物质的残留, 包

括药物原形或/和其代谢产物^[1]。肉蛋奶等动物性食品中兽药残留对消费者可能产生毒害作用, 从而

影响人类健康和消费安全,因此,控制动物性食品兽药残留问题已成为兽药研发和保障食品安全的重要内容。从理论技术角度上,建立兽药最大残留限量标准和兽药残留检测方法标准是控制动物性食品兽药残留的两个最基本内容,而制定休药期则是加强源头治理,从养殖过程中避免兽药残留超标的重要措施。

为了加强新兽药的审批管理,保障动物用兽药对人的食品消费安全,我国农业部公告第 442 号《化学药品注册分类及注册资料要求》对残留试验资料要求说明申请的兽药或代谢物在给药动物组织中是否产生残留,残留的程度和残留时间;提供兽药的残留标志物、残留靶组织、日允许摄入量(ADI)、最大残留限量(MRL)、残留检测方法和休药期等^[2]。农业部公告第 2223 号《食品动物用兽药产品注册要求补充规定》中要求在我国申请注册用于食品动物的兽药产品,其有效成分尚无国家兽药残留限量标准和兽药残留检测方法标准的,注册申报时应提交这两项标准的建议草案;同时,还应提交两家有资质单位出具的兽药残留检测方法标准验证报告,之后再由中国兽医药品监察所进行复核检验^[3]。

从理论和法规要求两个方面可以看出,兽药残留试验资料主要包括兽药最大残留限量标准、兽药残留检测方法标准和休药期确定三个方面内容。本文结合近年来食品动物兽药残留试验注册资料中这三个方面内容的评审主要内容以及常见问题进行综述。

1 兽药最大残留限量标准

兽药最大残留限量(maximum residue limit, MRL)是指食品动物用药后,允许存在于食物表面或内部的该兽药残留的最高量/浓度(以鲜重计,表示为 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[1]。兽药 MRL 是动物性食品兽药残留是否超标,是否满足人类安全消费的一个重要判断指标。

兽药的安全性、使用范围和分析方法是建立 MRL 的基础,其中安全性是决定因素。兽药 MRL 的建立步骤主要包括:确定最大无作用剂量(NO-

EL)、确定日允许摄入量(ADI)、确定残留标志物和总残留、食物消费系数和 MRL 计算等。需要制定 MRL 的动物性食品主要包括动物肌肉、肝脏、肾脏、脂肪等常见可食组织以及奶、蛋、蜂蜜等产品。食品动物用兽药有的需要制定 MRL,有的对动物和人类无任何毒副作用,或在动物体内代谢迅速,不会形成有效的药物残留,不需要制定 MRL。

1.1 已有 MRL 的药物 对于仿制药或改良型新兽药,官方已经发布了有效成分的 MRL 及相关内容,包括 ADI、残留标志物、动物种类、可食组织及 MRL 值,注册时可以直接进行引用。目前,已发布的兽药 MRL 主要来自:(1)我国农业农村部与国家卫生健康委员会、国家市场监督管理总局联合发布的《食品中兽药最大残留限量》(GB 31650 - 2019)和《食品中 41 种兽药最大残留限量》(GB 31650.1 - 2022)以及农业部或农业农村部相关公告;(2)国际食品法典委员会(CAC)的限量标准(CX/MRL 2 - 2018);(3)欧盟 EMA 的限量标准((EU) No 37/2010);(4)美国 FDA 的限量标准(21CFR556 Part B);(5)日本肯定列表以及加拿大、澳大利亚等其他国家的限量标准。

1.2 需制定 MRL 的药物 对于国内外官方均未发布又需要制定 MRL 的药物,注册时就要提供 MRL 标准及其制定过程。我国已初步起草了兽药 MRL 标准制定技术规范,目前还未正式发布。因此,MRL 的制定仍然参考国际上已有方法,国际上认可的有影响力的 MRL 制定方法有:(1)JECFA 的方法;(2)欧盟 EMA 的方法;(3)美国 FDA 的方法。国内新制定 MRL 时,大都参考这三种方法进行计算,然后比较三种方法得到的 MRL 值,一般将数值较低者确定为最终拟定的 MRL 标准。

食物消费系数和计算方法的差异是导致上述三种方法计算结果差异的主要因素。WHO 推荐的食物消费系数为一个 60 kg 体重的人一天的动物性食物消费量:哺乳动物或禽肉 500 g(其中:肌肉 300 g,肝脏 100 g,肾脏 50 g,脂肪 50 g);或者鱼肉 300 g;另加蛋 100 g,奶 1500 g,蜂蜜 50 g。由于饮食习惯的差异,我国居民在动物性食品消费量上远

达不到 WHO 推荐的食物消费系数,但本着最小化食品安全风险的原则,目前我国制订 MRL 时仍采用 WHO 推荐的食物消费系数^[4]。

1.3 兽药 MRL 的外推 兽药 MRL 在不同动物间的外推最早是通过鱼类间外推提出的,后来延伸到反刍动物间、非反刍哺乳动物间和禽类间的外推。兽药 MRL 外推既可以保证动物性食品安全,又可以降低研发成本。兽药 MRL 进行外推的前提是药物在已知动物体内的代谢与待外推动物体内的代谢相似,主要代谢途径和主要代谢产物的产生比例相似;已知动物的残留标志物与待外推动物的残留标志物一致,如果残留标志物为原形药物,则更适合外推。

目前,我国尚未制定兽药 MRL 外推的方法,国际上已发布的兽药 MRL 外推方法有:(1)CAC 的外推方法^[5];(2)欧盟的外推方法((EU)2017/880)。进口注册产品满足已发布外推方法的前提条件,通过外推得到的 MRL,也是认可的。

1.4 兽药 MRL 评审常见问题 兽药 MRL 标准评审时常见问题主要有:(1)不提供 MRL 标准,或不需要制定 MRL 又未提供充分的理由;(2)提供的不是最新的 ADI 或 MRL;(3)新制定 MRL 时确定的残留标志物不合理;(4)新制定 MRL 的计算过程不详细,或者只采用一种方法计算得出较高的 MRL 值;(5)提供的 MRL 标准范围不全,缺少某种可食组织的 MRL 又未提供充分的理由;(6)进口注册产品的 MRL 高于我国现行 MRL 标准,相关试验未执行我国的 MRL 标准等。

2 兽药残留检测方法标准

这里说的兽药残留检测方法标准是指兽药批准上市后,对市场上肉蛋奶等动物性食品进行食品安全抽检所使用的残留检测方法标准,应区别于残留消除试验不同时间点样品检测所使用的方法。因此,应严格按照农业部公告第 2223 号要求,对有效成分尚无国家兽药残留检测方法标准的产品制定残留检测方法标准,在批准兽药注册时,和兽药质量标准一并发布实施。

2.1 直接引用已有残留检测方法标准 目前,我

国已发布的动物性食品中兽药残留检测方法标准有 500 余项,主要以 GB、GB/T、农业部或农业农村部公告、S/N 等多种形式发布。官方已发布的或正在社会征求意见的残留检测方法标准,如果适用范围包含了申报产品的靶动物可食组织,且方法灵敏度满足当前的 MRL 标准,都可以直接进行引用,将标准文本附在注册资料中即可。如果已发布了相关残留检测方法标准,但适用范围缺少靶动物某种可食组织,就需要按照下面的方法补充制定缺少组织的残留检测方法标准。

2.2 需制定残留检测方法标准 对于官方没有发布过,或者适用范围缺少某种可食组织的药物,需要制定相应的残留检测方法标准。制定时要对样品前处理、仪器条件以及方法特异性、灵敏度、线性、回收率和精密度等技术参数进行考察。方法定量限一般应达到 0.1MRL,实在达不到,至少应低于 1/2MRL;测定时采用单点法,或纯溶剂标准溶液或空白基质匹配标准溶液制备的标准曲线法进行定量,如 LC 法采用纯溶剂标准曲线,LC-MS/MS 外标法采用基质匹配标准曲线,同位素内标法采用纯溶剂标准曲线等;标准曲线的线性范围应包括定量限和 2MRL(1.5MRL)所对应的浓度;回收率和精密度考察一般选择低、中、高三个添加浓度即可,低浓度为方法定量限,中、高浓度为 MRL、2MRL(1.5MRL),也可增加 1/2MRL 浓度。各项技术参数原则上应满足我国农牧发[2003]1 号文^[6]或欧盟 2021/808^[7]对动物性食品兽药残留检测方法的性能要求。方法灵敏度和回收率还要结合药物 MRL 大小、样品前处理过程、仪器种类和定量方法等多方面进行评价,结果稳定可靠,基本满足方法性能要求,也是认可的。

2.3 残留检测方法标准评审常见问题 兽药残留检测方法标准评审时的问题相对较多,目前常见的有:(1)缺少标准储备液和标准工作液的保存有效期,新化合物未进行稳定性考察;(2)样品称样量偏低,缺乏代表性,一般应 2 g 或 5 g;(3)结合态药物缺少酶等水解步骤,或水解的温度时间不合适;(4)内标法选择的内标物不科学,对药物检测造成干

扰;(5)样品提取液体积过大或过小,所用 SPE 柱规格不匹配;(6)标准曲线类型选择错误,或曲线范围窄,不能涵盖定量限和 2MRL(1.5MRL)对应的浓度;(7)仪器条件不全,如色谱条件缺少柱温,质谱条件缺少电压、温度或气速等关键参数或不同品牌仪器的参数混淆,仅监测一对离子等;(8)结果计算公式有误,如样品前处理过程中体积发生变化未在公式中体现;(9)方法灵敏度与回收率试验矛盾,如回收率试验添加低浓度小于方法定量限,定量限浓度又未考察回收率;(10)附录附图过多或过少,目前要求提供基质相对复杂样品(如肝脏)的一套图谱,包括空白样品、空白添加样品以及相应类型的标准溶液三个图谱;(11)标准文本格式或两家单位验证报告不符合当前要求或者相互之间不一致等。

3 兽药残留消除试验与休药期的确定

休药期(withdrawal time, WT)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^[8]。休药期是依据药物在动物体内的残留消除规律确定的,随动物种属、药物种类、制剂形式、给药途径及给药剂量等不同而有差异,一般约为几小时、几天到几周不等。目前,基本按照农业农村部公告第 326 号^[8]和 VICH 相关指导原则^[9]开展残留消除试验,确定科学合理的休药期(包括弃奶期和弃蛋期),并在产品标签说明书中明确标示出来。

3.1 残留检测方法学验证 这里说的残留检测方法是用于靶动物残留消除试验不同时间点样品检测所用的方法,应区别于上述食品安全监管用的残留检测方法标准。具体可以采用标准方法、允许偏离的标准方法以及文献或自建的非标准方法等。为了保证分析方法准确可靠,必须对分析方法进行充分的方法学验证。验证时需从方法特异性、检测限和定量限、标准曲线和定量范围、准确度和精密度等方面进行验证。方法定量限一般是标准曲线的最低浓度,原则上应低于 1/2MRL;测定时一般采用纯溶剂标准溶液或空白基质添加标准溶液制备

的标准曲线法进行定量,如 LC-MS/MS 同位素内标法选用纯溶剂标准曲线,LC 法或 LC-MS/MS 外标法采用空白基质添加标准曲线,如选用其他类型标准曲线,应确保方法的绝对回收率;标准曲线的高低浓度范围为定量范围,不能用定量范围外推的方法计算未知样品浓度;准确度和精密度考察一般选择低、中、高三个添加浓度进行考察,低浓度为标准曲线的最低浓度,高浓度接近标准曲线上限,中浓度选标准曲线中间一浓度,各浓度点应涵盖实际样品检测浓度。各项技术参数原则上应满足农业农村部公告第 326 号要求。

3.2 残留消除实验设计 残留消除试验一般在实际生产条件下,采集动物给药后一段时间内不同时间点的样品并检测药物在样品中的残留量变化,以 MRL 标准为依据,采用科学的统计方法,一般用 WT1.4 或 WTM1.4 软件来制定休药期或弃奶期。如果实际残留数据无法统计分析,可以用定义法确定休药期,即所有可食组织中药物残留量都低于 MRL 的时间,考虑到动物个体差异,需再估算一段安全间隔时间即可。实验设计时,给药方案通常选用推荐的最大给药剂量和最长给药疗程;受试药物、动物及饲养管理、采样时间、采样部位、样品检测和数据统计分析等要满足农业农村部公告第 326 号要求。

3.2.1 可食组织休药期 一般在主要品种的健康靶动物体内进行残留消除试验,获得的试验数据有时候可以外推到次要品种的动物: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、羊的数据一般情况下可以外推到犏牛和羔羊。试验时至少选择 4 个采样点,每个采样点猪牛羊至少 4 个动物,禽至少 6 只动物。给药途径和方式须按照标签说明书规定进行,多次注射给药的产品须在动物身体左右两侧的不同部位交替进行。测定的可食组织一般包括动物肌肉、肝脏、肾脏和脂肪(或皮+脂),肌注和皮下注射的药物必须采集最后一次给药注射位点的肌肉,浇泼剂等其他经皮给药的药物也要采集给药部位的肌肉、皮下脂肪等。此时,休药期的计算应充分考虑肌注、皮下注

射或浇泼给药部位的残留消除试验数据,结合肌肉 MRL 或其他参考值,制定给药部位的休药期,再与肌肉等其他可食组织的休药期进行比较,选择最长休药期作为药物最终监管用的休药期。总之,在休药期时间点,所有可食组织中的药物残留量都应低于法规规定的 MRL 或 ISSRV;如果没有 MRL 或 ISSRV,可以选用其他的参考值,如 ADI 或暴露限量等^[10]。

3.2.2 弃奶期 弃奶期是指泌乳动物从停止给药到所产奶许可上市的间隔时间。一般而言,对泌乳期动物进行治疗的药物均需确定弃奶期。奶中药物残留消除试验应选择泌乳期的动物进行,一般高产奶量动物(泌乳早期)和低产奶量动物(泌乳晚期)每组至少各 10 头。乳房灌注制剂给药时必须同时给予 4 个乳区药物。关于奶样采集,我国目前仅规定每日两次采取 4 个乳区的混合奶作为检测样本。对于多次给药的产品,应从最后一次给药后采样。定义为零日弃奶期的药物,在给药期间也要采集奶样。对于干乳期动物至少应有 20 头,给药必须在最后一次泌乳后和下一次分娩前进行。

3.2.3 弃蛋期 弃蛋期是指蛋鸡从停止给药到所产的蛋许可上市的间隔时间。由于鸡蛋的形成过程与可食组织不同,因此弃蛋期评价也有其自身特点。鸡蛋黄的形成时间约 12 日,且不同时期的蛋黄形成是套叠过程,因此弃蛋期不为零日的药物无法合理执行弃蛋,这使得只有零日弃蛋期的药物才能批准用于产蛋鸡^[11]。鸡蛋中药物的残留标志物可能与可食组织不同,因此,鸡蛋的残留消除试验要单独进行。蛋的采样要在停药至蛋黄形成时间(12 日)保证至少 4 个时间点,每个时间点采样不少于 10 枚蛋;多次给药的产品,在给药期间也要采集蛋样。检测时蛋白和蛋黄混在一起检测。

3.2.4 水产动物休药期 水产动物休药期是指水产动物停止给药到许可起捕上市的间隔时间。药物在水产动物体内休药期的评价过程与一般评价规则相似,但也有其自身特点,水产动物属于变温动物,休药期与水温密切相关。因此,水产药物的休药期一般用度日表示,如 500 度日是指水温

20 ℃ 时休药期为 25 天,25 ℃ 时休药期为 20 天。水产动物残留消除试验设计时,要保证试验水环境相对稳定,不受外界环境突然变化或污染影响。目前,我国批准用于水产动物的药物大多以粉剂、预混剂或溶液剂为主。在给药过程中,药物如何被水产动物快速摄入体内是需要考虑的因素,应在适应期进行测试,确定群体摄食率和体重,以确定合理给药剂量。

3.3 残留消除试验与休药期确定评审常见问题
残留消除试验与休药期确定评审时常见问题主要有:(1)方法学验证时未考察定量限的回收率和精密度;(2)选用的标准曲线类型错误,或曲线范围不合适;(3)缺少样品中药物或样品处理后药物稳定性考察,或考察时间偏短;(4)未按照推荐的最大给药剂量和最长给药疗程给药;(5)采样时间点不合理,未在停药当天采样,或最后一个采样点药物浓度仍高于 MRL;(6)可食组织采样不规范,如猪禽脂肪应是带皮的脂肪,牛羊脂肪应是肾周围脂肪;(7)样品检测对象不是残留标志物,未进行平行双样测定或质控样品结果不符合要求;(8)软件计算休药期时未采用认可的最新的 MRL 标准;(9)肌肉、皮下注射或浇泼给药未对给药部位采样检测,或休药期计算时未执行肌肉 MRL 或其他参考值;(10)生物等效的仿制药计算得出的休药期较原研产品休药期短,未执行原研产品较长的休药期;(11)未明确不得用于奶牛泌乳期的牛用药或不得用于蛋鸡产蛋期的鸡用药,未制定弃奶期或弃蛋期等。

4 结束语

综上所述,为保证动物性食品安全,制定科学合理的兽药最大残留限量标准、兽药残留检测方法和休药期,已成为食品动物用兽药相对于宠物用兽药在产品研发时必须解决的问题。本文就目前国内食品动物兽药残留试验注册资料的评审主要内容及常见问题进行了综述,希望能为我国食品动物用兽药的研发和注册提供参考。

参考文献:

[1] 《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》

- (GB 31650-2019)[S].
National food safety standard - Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods(GB 31650-2019)[S].
- [2] 中华人民共和国农业部公告第 442 号《兽药注册分类及注册资料要求》,2004.12.22[S].
Announcement No. 442 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China - Registration Classification and Registration Data Requirements of Veterinary Drugs,2004.12.22 [S].
- [3] 中华人民共和国农业部公告第 2223 号《食品动物用兽药产品注册要求补充规定》,2015.3.2[S].
Announcement No. 2223 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China - Supplementary Provisions on the Registration Requirements of Veterinary Drugs for Food-producing Animal,2015.3.2[S].
- [4] 安肖,孙雷,黄耀凌,等. 安乃近在羊组织中最大残留限量标准制定研究[J]. 中国兽药杂志,2020,54(11):50-56.
An X, Sun L, Huang Y L, *et al.* Study on Drafting Maximum Residue Limits of Dipyrone in Goat [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2020,54(11):50-56.
- [5] 孙雷,张玉洁,王亦琳,等. CAC 关于兽药最大残留限量在不同动物间外推的方法及示例[J]. 中国兽药杂志,2022,56(7):30-34.
Sun L, Zhang Y J, Wang Y L, *et al.* Extrapolation Approaches and Examples of Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs to One or More Species by CAC[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2022,56(7):30-34.
- [6] 中华人民共和国农牧发[2003]1 号《兽药残留试验技术规范(试行)》,2003.1.22[S].
Agriculture and animal husbandry announcement[2003] No. 1 of the People's Republic of China - Technical Specification for Veterinary Drug Residue Test (Trial),2003.1.22[S].
- [7] 孙雷,王亦琳,叶妮,等. 欧盟关于食品动物用药理活性物质残留分析执行条例(EU)2021/808 概述[J]. 中国兽药杂志,2022,56(6):77-81.
Sun L, Wang Y L, Ye N, *et al.* Overview of Commission Implementing Regulation (EU)2021/808 on the Analysis for Residues of Pharmacologically Active Substances Used in Food-producing Animals [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2022,56(6):77-81.
- [8] 中华人民共和国农业农村部公告第 326 号《兽药残留消除试验指导原则》,2020.8.26[S].
Announcement No. 326 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China - Guideline for Veterinary Drug Residue Depletion Test,2020.8.26[S].
- [9] 顾进华,梁先明,曲鸿飞,主译.《兽药注册的国际技术要求》,中国农业出版社,2020.4.
Gu J H, Liang X M, Qu H F, main translator. International Technical Requirements for Veterinary Drug Registration, China Agricultural Press,2020,4.
- [10] 孙雷,王亦琳,叶妮,等. 欧盟食品动物注射部位兽药残留指南概述[J]. 中国兽药杂志,2023,57(1):108-114.
Sun L, Wang Y L, Ye N, *et al.* Overview of European Guideline on Injection Site Residues of Food Producing Animals [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2023,57(1):108-114.
- [11] 徐倩,杨大伟,刘艳华,等. 浅析产蛋鸡用药物零日弃蛋期的制定[J]. 中国兽药杂志,2020,54(12):66-70.
Xu Q, Yang D W, Liu Y H, *et al.* Analysis on Establishment of the Zero-Egg Withdrawal Period for Veterinary Medicine Used in Laying Hens [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug,2020,54(12):66-70.

(编辑:陈希)