**湖南省地方标准编制说明**

**项目来源：湖南省市场监督管理局**

**标准名称：《蚕砂中氯霉素残留量的测定》**

**承担单位：长沙海关技术中心**

**2022年1月**

**《蚕砂中氯霉素残留量的测定》**

**湖南省地方标准编制说明**

**一、项目背景**

氯霉素 (chloramphenicol，CAP) 属广谱抗生素，对革兰氏阳性、阴性菌均有抑制作用，曾广泛用于畜禽疾病的防治。但临床研究已证实，氯霉素有较强的毒副作用，会造成骨髓造血功能的抑制毒性、神经毒性、遗传毒性等，还会产生灰婴综合征。此外，长期微量摄入氯霉素，会造成沙门氏菌、大肠杆菌的耐药性，引起机体正常菌群失调，使身体易患各种疾病。因此很多国家禁止其在动物饲养和治疗中使用，并规定在动物性食品中不得检出氯霉素。我国2002年农业部第235号公告《动物源性食品中兽药最高残留限量》中也明确规定氯霉素被禁止使用，在动物性食品中不得检出。

蚕砂，也叫蚕沙，为蚕蛾科昆虫家蚕的干燥粪便，具有祛风除湿，活血定痛之功效，是我国传统特色中药材，在历代本草多有收录。同时，蚕砂中含有一系列丰富的营养物质和药用成分，如叶绿素、类胡萝卜素、植醇、三十烷醇、果胶、叶蛋白等，常被用作食品、饮料、化妆品、医药等领域的提取原料。此外，蚕砂富含各族维生素及烟酸，可预防畜禽有关维生素缺乏症和治疗眼疾、贫血、白肌病等，还被用作猪、羊、禽、鱼等动物饲料。近年来，蚕砂在食品药品、动物饲料等方面的开发利用日益广泛，但蚕砂中蚕药残留问题还未引起重视。在家蚕饲养中，细菌病为常见病害，一直以来，蚕农沿用添食氯霉素来防治，具有显著的预防和治疗效果。但氯霉素残留毒副作用大，我国已在包括家蚕的所有动物饲养过程中禁用，然而实际饲养中仍然存在严重的滥用现象，造成蚕砂中氯霉素残留，并通过食物链传递，给消费者的健康带来一定的潜在危害。为了保护蚕砂产业的良性发展、保障消费者的健康，亟需开发出一种蚕砂中氯霉素残留量的测定方法，对蚕砂进行监测管理，预防氯霉素的污染。

目前，国内外文献中还未见蚕砂中氯霉素检测的报道，基于氯霉素的检测方法大多仅限于动物源食品及饲料，样品基质相对简单，干扰较小，较易测定。而蚕砂成分复杂，若采用现有食品或饲料中氯霉素残留检测的方法，容易出现假阳性和假阴性结果。因此，亟需开发出一种新的适用于蚕砂中氯霉素检测的样品前处理方法，尤其是适用于液-质联用检测的高效、灵敏的样品前处理方法。

**二、工作简况**

1 任务来源

2020年1月，由湖南省食用菌研究所申请地方标准立项，湖南省市场监督管理局批准《蚕砂中氯霉素残留量的测定》地方标准的制定。

2 起草单位、协作单位

起草单位：长沙海关技术中心；

协作单位：中国海关科学技术研究中心。

3 主要起草人

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 姓名 | 性别 | 职务 | 从事专业 | 项目分工 |
| 1 | 焦艳娜 | 女 | 高级工程师 | 食品分析 | 项目负责人、项目总体协调安排、修改审查 |
| 2 | 朱绍华 | 男 | 高级工程师 | 食品分析 | 标准文本编写、编制说明编写、检测方法开发设计及优化 |
| 3 | 齐鹤鸣 | 女 | 工程师 | 食品分析 | 项目总体协调安排、修改审查 |
| 4 | 肖中宁 | 男 | 无 | 法学 | 项目总体协调安排、修改审查 |
| 5 | 梁香 | 女 | 工程师 | 食品分析 | 检测方法开发设计及优化 |
| 6 | 尹雪花 | 女 | 初级工程师 | 分析化学 | 标准文本修改 |
| 7 | 唐会智 | 男 | 工程师 | 化学工程与工艺 | 标准文本修改 |
| 8 | 成婧 | 女 | 高级工程师 | 食品分析 | 标准文本编写 |
| 9 | 付善良 | 男 | 高级工程师 | 食品分析 | 征求意见汇总 |
| 10 | 陆静 | 女 | 工程师 | 食品分析 | 征求意见汇总 |
| 11 | 陈练 | 女 | 研究员 | 食品分析 | 项目总体协调安排、修改审查 |

**三、主要起草过程**

为了科学编制《蚕砂中氯霉素残留量的测定》，2021年1月-2021年2月完成湖南省蚕砂中氯霉素残留情况的调研工作，完成蚕砂中氯霉素残留检测方法的具体开发规划；2021年3月-2021年9月，对检测方法技术路线中各环节进行优化，前处理方法中的各项操作进行优化，仪器方法各参数进行优化；2021年10月-2021年12月，完成相关标准文本及编制说明的编写，并实施标准验收。长沙海关技术中心于2021年9月成立标准编制起草小组，编制组召开标准编制起草会议，制定《蚕砂中氯霉素残留量的测定》编写方案，按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》的规定，依据规程的技术要素内容的确定方法要求进行编写。并根据规程的主要内容进行讨论，确定了标准制定的步骤、分工和实施方案。编制组按照起草会议的计划，在总结前期研究成果基础上，广泛查阅相关国家标准、其他相关省市地方标准、文献资料，并对省内外蚕砂中氯霉素残留情况进行调研，在综合分析的基础上，于2021年11月编写形成了《蚕砂中氯霉素残留量的测定》地方标准初稿。编制组对《蚕砂中氯霉素残留量的测定》初稿进行反复修改形成征求意见稿，印发至相关监管部门、检测实验室、科研单位、行业协会等有关方面广泛收集意见和建议。在征求了许多宝贵的修改意见后，于2022年1月编写完成，形成了《蚕砂中氯霉素残留量的测定》送审稿。

**四、标准编制原则**

本标准的制定依据《中华人民共和国标准化法》、《中华人民共和国标准化法实施条例》、《湖南省企业产品标准备案管理办法》的要求，按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》的规定，立足我省蚕砂中氯霉素残留现状，以相关科研成果为依据，通过查阅文献资料和标准，组织专家论证而制定。

1. **主要条款的说明**

本标准共分9节，主要包括范围、规范性引用文件、方法提要、试剂与材料

、仪器与设备、试样制备、分析测定、结果计算和方法的线性范围、灵敏度、精密度、准确度。

1、**仪器条件优化**

分析氯霉素常用的流动相为甲醇、乙腈、水三种，通过优化，甲醇水体系和乙腈水体系都可达到分析目的，考虑到成本、试剂毒性等因素，本方法采用甲醇水为流动相，选用ACQUITY UPLC BEH C18（2.1 mm×100 mm，1.7μm）色谱柱，达到理想的分离效果。

最终确定色谱条件如下所示：

a) 色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C18，2.1 mm×100 mm，1.7μm或相当者；

b) 流动相：甲醇-水（流动相梯度见表1）；

c) 柱温：35 ℃；

d) 进样量：5μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 时间/min | 流速/（mL/ min） | 水（%） | 乙腈/（%） |
| 0 | 0.2 | 70 | 30 |
| 5.0 | 0.2 | 5 | 95 |
| 7.0 | 0.2 | 5 | 95 |
| 7.1 | 0.2 | 70 | 30 |
| 8.0 | 0.2 | 70 | 30 |

本试验分别考察了离子源温度、电喷雾电压、去簇电压、碰撞电压和碰撞室出口电压及气帘气压力、雾化气压力等质谱参数。试验表明，去簇电压对质谱图上对象物质的结构信息和定性有很大的关系，改变离子源的去簇电压可以获得与结构信息有关的碎片离子。一般去簇电压越高，碎片离子越多。为了得到最大灵敏度需要较少的碎片离子，但是得到较多的结构信息则需要较多的碎片离子，因此选择最优锥孔电压时需要在结构信息和灵敏度之间平衡。

最终确定的质谱参数如下所示。

a) 离子源：电喷雾离子源；

b) 扫描方式：负离子扫描；

c) 离子源温度：550℃；

d)电喷雾电压：-4500V；

e)气帘气(CUR)：40 psi；

f)雾化气(GS1)：40 psi；

g) 辅助气(GS2)：50 psi；

h)碰撞气(CAD)：8 psi；

i)检测方式：多反应监测（MRM）

j) 氯霉素质谱参数见表2.

表2 氯霉素质谱参数

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 化合物 | 母离子 | 子离子 | 驻留时间（msec） | 去簇电压(DP)V | 碰撞电压(CE)V | 碰撞室出口电压（CXP）V |
| 氯霉素 | 321 | 151.7\* | 100 | 74 | 24 | 10 |
| 256.8 | 100 | 74 | 17 | 10 |
| 氘代氯霉素 | 326.2 | 157.2\* | 100 | 94 | 24 | 10 |
| 261.9 | 100 | 94 | 17 | 10 |



**图1氯霉素标准溶液液相色谱-串联质谱谱图**



**图2氯霉素内标标准溶液液相色谱-串联质**

2、**样品前处理**

由于样品的复杂性和氯霉素在样品中的痕量水平，本方法中采用液液萃取、固相萃取和超声萃取相结合的方式对样品进行处理。

**2.1 液液萃取条件**

本方法考察了乙酸乙酯、乙腈、甲醇及酸化的有机溶剂对样品中氯霉素的提取情况，结果表明，乙酸乙酯提取效率较高，因此本方法选用乙酸乙酯作为提取溶剂。

为了提高萃取效率，液液萃取时加入了无水硫酸镁和氯化钠，本方法对其用量对回收率的影响进行了考察。在加入MgSO4分别为0.5 g、1.0 g、1.5 g、2.0 g时，回收率分别为68.4%、96.4%、55.5%、79.1%，加入NaCl分别为0.5 g、1.0 g、1.5 g、2.0 g时，回收率分别为66.8%、79.3%、71.8%、41.1%。实验数据显示，无水硫酸镁和氯化钠的加入量均为1.0 g时，氯霉素回收率最好。

**2.2 净化条件**

由于蚕砂样品的复杂性，其中含有大量的叶绿素等物质，本方法通过加入石墨化炭黑（GCB）对液液萃取溶液进行初步净化。本方法对其用量对回收率的影响进行了考察。加入GCB分别为0.1 g、0.3 g、0.5 g、1.0 g时，回收率分别为36.8%、52.1%、76.9%、64.9%。数据显示，GCB的加入量为0.5 g时，氯霉素回收率最好。

**2.3固相萃取条件**

本方法考察了不同的固相萃取条件对提取效率的影响。本方法考察了不用固相萃取柱、C18固相萃取柱、HLB固相萃取柱的效果。不用固相萃取柱，平均回收率为58.9%，HLB柱平均回收率为77.1%，C18柱平均回收率为98.9%，实验数据显示，C18固相萃取柱具有最好的净化效果，能够有效的减少基质效应，提高氯霉素的回收率。

**2.4方法的线性范围、灵敏度、准确度、精密度**

精密量取氯霉素标准工作液和内标标准工作液，用流动相逐级稀释，得到不同浓度氯霉素标准溶液，内标浓度为1 ng/mL，按浓度从低到高依次经液相色谱-串联质谱测定，以测得特征离子质量色谱峰外标和内标峰面积比为纵坐标、对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。本方法氯霉素线性范围为0.02 μg/L-5.0μg/L。



图3 氯霉素线性范围

取信噪比(S/N)等于3所对应的待测物浓度作为检出限，信噪比(S/N)等于10所对应的待测物浓度作为定量限。该方法氯霉素的检出限和定量限分别为0.1μg/kg、0.3 μg/kg。

以未检出待测组分的样品作为空白基质，进行加标回收试验。在空白基质样品中分别添加四个浓度(低、中、高)的氯霉素标准溶液，平行测定6次，计算回收率。结果如表二显示，添加浓度为0.1 μg/kg、0.3 μg/kg、1.0μg/kg、2.0μg/kg的四个浓度水平的回收率在74.7-103%之间，变异系数小于10 %。

表3氯霉素的回收率及其标准偏差

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Compound | Added (μg/kg) | Recovery/% | RSD/% |
| 氯霉素 | 0.1 | 79.1-103.0 | 9.64 |
| 0.3 | 74.7-82.7 | 5.34 |
| 1.0 | 79.0-97.2 | 7.57 |
|  | 2.0 | 81.0-89.8 | 4.36 |

**六、技术经济论证及预期的社会经济效果**

1、本标准的起草来源于湖南省质量技术监督局项目，标准的集成性、先进性和可操作性强。

2、本方法的应用不仅可以促使我省蚕砂产品的质量提升，还可以规范养蚕业的兽药使用，提升经济效益、生态效益和社会效益，促进蚕砂和相关蚕产品产业可持续发展。

**七、重大意见分歧的处理依据和结果**

标准制定过程中未出现重大分歧意见。

**八、采用国际标准和国外先进标准的程度及水平对比**

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。标准的名称、内容及指标与现行的国家标准之间不存在包含、重复、交叉问题。

**九、标准性质的建议说明（推荐性标准还是强制性标准）**

建议《蚕砂中氯霉素残留量的测定》作为推荐性地方标准发布实施。

**十、贯彻标准的要求、措施和建议**

1、首先应在实施前保证标准文本的充足供应，让相关检测企业、检测实验室等使用对象都能及时得到标准文本，这是保证新标准贯彻实施的基础。

2、发布后、实施前应将信息在省科技厅、省农业农村厅等政府网站及食品伙伴网等专业网站上公开发布，进行广泛而有效的宣传。

3、建议在宣传的同时，在网上举办相关标准实施技术指导讲座，针对具体技术问题进行指导及对使用过程中易出现问题进行答疑解释。

4、质量监管部门应加大对市场上的蚕砂的监督检验，确保相关产品质量。

**十一、废止现行相关地方标准的建议**

本标准为首次发布。

**十二、其他应予以说明的事项**

主要参考资料：

[1] 中华人民共和国国家标准GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》

[2] 中华人民共和国国家标准GB/T 1.4《标准编写第四部分：化学分析方法》

[3] 《统计学在化学分析测量中的应用》韩永志《全国分析测试体系的建立与完善》项目办公室 2004年10月