

禽蛋类中氟苯尼考及代谢物的快速检测 方法（胶体金法）

编制说明

1. 概况

1.1. 方法起草单位与主要起草人

本方法主要起草单位：

本方法主要起草人：

1.2. 目的和意义

氟苯尼考（Florfenicol, FF）又称甲砒霉素，一种兽医专用的氯霉素类广谱抗菌药，广泛应用于水产和畜禽养殖中。研究发现，氟苯尼考具有，血液系统毒性、胚胎毒性和免疫抑制作用，过量的氟苯尼考残留会对人体造成健康威胁，并导致耐药菌的产生。

国标《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》（GB 31650—2019）规定了氟苯尼考在牛、羊、猪、家禽等其他动物的最大残留量，同时特别规定在家禽产蛋期禁用，即不得检出。近年来，市场监督管理总局在抽检过程中多次发现不合格禽蛋，如（2019年第3号）、（2019年第2号）、（2018年第15号）等通告中，均抽检出不合格禽蛋。目前针对氟苯尼考的检测国标有《可食动物鸡肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定液相色谱法-串联质谱法》（GB/T 20756-2006）和《河豚鱼、鳊鱼和烤鳊中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》（GB/T 22959-2008）等，但针对禽蛋中氟苯尼考的检测暂无标准，从而造成在监管过程中存在困难。

本方法在前期研究基础上，开发一种胶体金免疫层析试纸条用于禽蛋中氟苯尼考的快速筛查检测，该方法检测时间 10-20min，检测限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，样品前处理简单，灵敏度 $\geq 99\%$ ，特异性 $\geq 85\%$ 。该方法能够保障消费者健康安全。

2. 与国内外有关法律法规和其它标准的关系

现行有效针对氟苯尼考的检测国标有《可食动物鸡肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定液相色谱法-串联质谱法》（GB/T 20756-2006）和《河豚鱼、鳊鱼和烤鳊中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》（GB/T 22959-2008）等，暂无针对禽蛋类氟苯尼考及其代谢物检测的标准，相关方法也

与本免疫层析快速检测法不同。

3. 标准的制定与起草原则

本标准是按 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》给出的规则编写，技术内容是参照 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第 4 部分：试验方法标准》确定。

4. 各项技术内容确定的依据

4.1. 测定步骤与结果判读的确

4.1.1. 样品的前处理

准确称量样品 5.00 g 于 50 mL 离心管中，加入 25 mL 乙酸乙酯，涡旋 5 min，随后 5000 rpm/min, 4 °C 离心 5 min，在 50~60 °C 氮气下吹干，加入 2.5 mL 稀释液中，混合均匀，即得到待测溶液。

4.1.2. 样品分析步骤的确定

参照国家食药总局已发布的 9 项基于胶体金免疫层析原理的快速检测方法（KJ201701-KJ201703、KJ201705-KJ201710、KJ201801）的分析步骤进行分析。

4.1.3. 结果判断方法的确定

参照国家食药总局已发布的 9 项基于胶体金免疫层析原理的快速检测方法（KJ201701-KJ201703、KJ201705-KJ201710、KJ201801）的结果判断。

4.2. 方法性能的确定

食品安全国家标准《食品中兽药最大残留限量》（GB 31650—2019）规定了氟苯尼在家禽产蛋期禁用，即在禽蛋中不得检出。本方法的检测性能（定性限）设定为 1 µg/kg。

4.2.1. 方法性能确定实验用到的检测试剂盒

生产单位：广州万联生物科技有限公司

试剂盒名称：禽蛋类中氟苯尼考胶体金免疫层析检测试剂盒

试剂盒批号：WLHIS200108、WLHIS200116、WLHIS200118、WLHIS20019

检测药物：氟苯尼考及其代谢物

检出限：1 $\mu\text{g}/\text{kg}$

4.2.2. 方法性能确定实验用到的样品

空白样品：经仪器方法确认，氟苯尼考含量 $<1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的禽蛋。本方法中涉及三大类样品——鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋。每大类样品选取 20 个样品。

4.2.3. 方法性能确定实验中用到的标准品

标准品用甲醇溶解标准品粉末，用 PBS 稀释。

标准品：氟苯尼考（Histamine）

品牌及编号：国家标准物质网，产品编号 76639-94-6

纯度（HPLC 测定或特性量值）：98%

4.2.4. 方法性能确定实验方案

4.2.4.1 灵敏度和假阴性率的计算

食品安全国家标准《食品中兽药最大残留限量》（GB 31650—2019）规定了氟苯尼考在家禽产蛋期禁用，即在禽蛋中不得检出。本方法设定 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 为方法检出限，即关注浓度。添加水平为 1 倍关注浓度、2 倍关注浓度，考察灵敏度和假阴性率，计算方法见附表 1。

4.2.4.2 特异性和假阳性的计算

选取 20 个空白样品，以及 20 个添加水平为 0.5 倍关注浓度样品，考察特异性和假阳性率。计算方法见附表 1。

4.2.4.3 与参比方法一致性分析

选取鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋各 20 个进行方法比对，参比方法为 GB/T 20756-2006 液相色谱法-串联质谱法。

4.4. 方法性能验证结果

检测方法 样品		GB/T 20756-2006	快速检测方法
鸡蛋	鸡蛋 1	ND	-
	鸡蛋 2	ND	-
	鸡蛋 3	ND	-
	鸡蛋 4	5.8	+
	鸡蛋 5	ND	-
	鸡蛋 6	ND	-
	鸡蛋 7	ND	-
	鸡蛋 8	ND	-
	鸡蛋 9	ND	-
	鸡蛋 10	1.6	+
	鸡蛋 11	ND	-
	鸡蛋 12	ND	-
	鸡蛋 13	3.1	+
	鸡蛋 14	2.5	+
	鸡蛋 15	ND	-
	鸡蛋 16	ND	-
	鸡蛋 17	ND	-
	鸡蛋 18	2.5	+
	鸡蛋 19	ND	-
	鸡蛋 20	ND	-
鸭蛋	鸭蛋 1	5.3	+
	鸭蛋 2	ND	-
	鸭蛋 3	ND	-
	鸭蛋 4	10.9	+
	鸭蛋 5	ND	-
	鸭蛋 6	ND	-
	鸭蛋 7	ND	-
	鸭蛋 8	ND	-
	鸭蛋 9	ND	-
	鸭蛋 10	ND	-

	鸭蛋 11	ND	-
	鸭蛋 12	ND	-
	鸭蛋 13	ND	-
	鸭蛋 14	ND	-
	鸭蛋 15	ND	-
	鸭蛋 16	1.8	+
	鸭蛋 17	ND	-
	鸭蛋 18	1.7	+
	鸭蛋 19	ND	-
	鸭蛋 20	ND	-
鹅蛋	鹅蛋 1	ND	-
	鹅蛋 2	ND	-
	鹅蛋 3	ND	-
	鹅蛋 4	ND	-
	鹅蛋 5	2.1	+
	鹅蛋 6	ND	-
	鹅蛋 7	ND	-
	鹅蛋 8	ND	-
	鹅蛋 9	ND	-
	鹅蛋 10	1.4	+
	鹅蛋 11	1.9	+
	鹅蛋 12	ND	-
	鹅蛋 13	ND	-
	鹅蛋 14	ND	-
	鹅蛋 15	ND	-
	鹅蛋 16	ND	-
	鹅蛋 17	3.1	+
	鹅蛋 18	ND	-
	鹅蛋 19	ND	-
	鹅蛋 20	2.7	+

4.4.1 灵敏度和假阴性率

检测对象	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测结果	灵敏度 (%)	假阴性率 (%)	总体灵敏度 (%)	总体假阴性率 (%)
鸡蛋	1	0(+), 20(-)	100	0	100	0
	2	0(+), 20(-)				
鸭蛋	1	0(+), 20(-)	100	0		
	2	0(+), 20(-)				
鹅蛋	1	0(+), 20(-)	100	0		

	2	0(+), 20(-)			
--	---	-------------	--	--	--

4.4.2 特异性和假阳性

检测对象	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测结果	特异性 (%)	假阳性率 (%)	总体特异性 (%)	总体假阳性 率(%)
鸡蛋	0	0(+), 20(-)	85	15	86.67	13.33
	0.5	6(+), 14(-)				
鸭蛋	0	0(+), 20(-)	87.5	12.5		
	0.5	5(+), 15(-)				
鹅蛋	0	0(+), 20(-)	87.5	12.5		
	0.5	5(+), 15(-)				

4.5. 方法性能验证结论

本研究采用胶体金免疫层析方法禽蛋雷中氟苯尼考及其代谢物进行检测。检测结果表明检出限设定为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 该方法灵敏度 $\geq 99\%$, 特异性 $\geq 85\%$, 假阴性率 $\leq 1\%$, 假阳性率 $\leq 15\%$ 。

附表 1

快速检测方法性能指标计算表

表 A.1 性能指标计算方法

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	N11	N12	N1.=N11+N12
阴性	N21	N22	N2.=N21+N22
总数	N.1=N11+N12	N.2=N21+N22	N=N1.+N2.或 N.1+N.2
显著性差异(X ²)	X ² =(N12-N21 -1) ² /(N12+N21), 自由度 (df)=1		
灵敏度 (p+, %)	p+=N11/N1.		
特异性 (p-, %)	p-=N22/N2.		
假阴性率 (pf-, %)	pf-=N12/N1.=100-灵敏度		
假阳性率 (pf+, %)	pf+=N21/N2.=100-特异性		
相对准确度, % ^c	(N11+N22)/(N1.+N2.)		
^a 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公认值结果; ^b 由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。 N 任何特定单元的结果数, 第一个下标指行, 第二个下标指列。例如: N11 表示第一行, 第一列, N1.表示 所有的第一行, N.2 表示所有的第二列; N12 表示第一行, 第二列。			