《禽蛋中氟苯尼考快速检测方法》

团体标准编制说明

一、编制的目的和意义

氟苯尼考又称氟甲砜霉素，是一种兽医专用酰胺醇类广谱抗菌药，自研究成功以后立即得到广泛应用。一般由于饲料添加或者家禽疾病治疗导致残留积累在家禽体内。原农业部235公告、278公告表明：氟苯尼考（产蛋禁用），是指家禽的产蛋期禁止使用氟苯尼考，其他养殖阶段可以使用。

国家标准《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》（GB 31650—2019）中规定了氟苯尼考在牛、羊、猪、家禽等其他动物的大残留量，同时特别规定在家禽产蛋期禁用，不得检出（鲜蛋中）。虽然产蛋鸡在饲养过程中使用的治疗药物受到严格限制，但为降低疫病风险，部分养殖户滥用、误用抗生素现象十分严重，在国家食品安全抽检中，禽蛋氟苯尼考含量超标时有发生。大量研究表明，氟苯尼考具有，血液系统毒性、胚胎毒性和免疫抑制作用，但是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。而长期食用氟苯尼考残留超标的禽蛋，对人体健康会有一定的风险。

目前针对氟苯尼考的检测有《可食动物鸡肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砜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）、农业部2483号公告-8-2016、SN/T 1865-2016等标准,均采用液相—质谱联用法（ＬＣ－ＭＳ），虽然准确度稿、精密度好，但需要大型精密仪器，对实验环境要求高，仅适用于在实验室内对氟苯尼考的检测。

本标准规定的氟苯尼考的快速检测方法，在前期研究基础上，开发的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，具有简单、快速、定量的检测优势。适用于食品安全监管现场快速检，既提高了监管效率，又可以为指导禽蛋生产企业合理用药，不断提高禽蛋质量，促进禽蛋生产企业健康发展。

二、任务来源及编制原则和依据

1、任务来源

本标准根据河南省标准化协会2021年下半年团体标准制修订计划项目立项。由郑州中道生物技术有限公司提出，河南省标准化研究院、郑州大学、食品安全快速检测与智慧监管技术重点实验室、河南中标检测服务有限公司、河南省食品检测研究院、河南国昌生物科技有限公司等单位共同起草。

2、编制原则

符合国家法律、法规和政策，有利于技术进步和经济发展的原则；引入国家、行业相关标准，结合食品快速检测需要实际的原则；技术先进，经济合理，切实可行的原则。

3、编制依据

主要依据以下法律法规和标准：

GB/T 20756-2006 可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砜霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法 ；

农业部2483号公告-8-2016 饲料中氯霉素、甲砜霉素和氟苯尼考的测定 液相色谱-串联质谱法；

GB/T 22959-2008 河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中氯霉素、甲砜霉素和氟苯尼考残留量的测定 液相色谱-串联质谱法；

SN/T 1865-2016 出口动物源食品中甲砜霉素、氟甲砜霉素和氟苯尼考胺残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法；

SN/T 5114-2019 进出口食用动物、饲料氟苯尼考（氟甲砜霉素）测定 液相色谱-质谱/质谱法；

三、编制过程

（一）前期研究阶段

**第一阶段：禽蛋中****氟苯尼考快速检测方法的建立**

1.本检测方法采用时间分辨荧光免疫层析技术，将包埋了稀土元素离子螯合物的时间分辨荧光微球为免疫探针。当样品中不含氟苯尼考时，荧光微球抗体复合物会与检测带上的检测抗原结合，在365nm的激发光照射下会显示明亮的荧光条带;当样品中含有的氟苯尼考时，荧光微球抗体复合物会与样品中氟苯尼考结合而无法与检测带上的偶联物结合，在激发光照射下无荧光条带出现。在此原理的基础上，结合免疫层析技术建立氟苯尼考快速检测方法。

2. 禽蛋中氟苯尼考快速检测方法参数的优化利用实验室保存的样品，优化荧光免疫层析反应条件，确定荧光免疫层析检测程序，包括所使用的试剂规格、仪器参数等。

3. 确定方法的分析性灵敏性、特异性及重复性。

4. 分析灵敏性、特异性及重复性的验证。

5. 用添加不同梯氟苯尼考标准品的样品，验证方法的特异性。

**第二阶段：氟苯尼考快速检测方法的应用实验**

本阶段主要进行氟苯尼考快速检测方法-时间分辨荧光免疫层析法试剂盒的组装及在适用范围内的应用实验。

为了验证所建立的快速检测方法的准确性、精密度和实用性，河南中标检测服务有限公司、郑州大学、郑州中道生物技术有限公司、河南省食品检验研究院四家单位对150份禽蛋样品进行方法比对，其中河南中标检测服务有限公司、郑州大学、河南省食品检验研究院采用液相色谱-串联质谱法和高效液相方法，郑州中道采用时间分辨荧光免疫层析法，比对结果经统计分析，检测方法之间无显著差异。

（二）标准的起草阶段

**1、成立起草组，明确分工**

接到标准编制任务后，郑州中道生物技术有限公司组建了《禽蛋中氟苯尼考快速检测方法》标准编制组，确定主要负责人，明确起草组人员及相关职责，对标准各项内容的编制工作逐一进行了细化。

项目主持人：付燕峰，主持本项团体标准的制定与编写。

参加者：

赵林萍：郑州中道生物技术有限公司，负责标准的制定和试验技术推广。

屈凌波：郑州大学，负责标准的制定、校订和检测方法的建立。

秦廷瑞：河南省食品检验研究院，负责标准的校订和测方法的建立。

赵雪峰：河南中标检测服务有限公司，负责标准的制定、校订和优化。

苗银萍：郑州中道生物技术有限公司，负责标准的制定和检测方法的优化。

樊国强：河南国昌生物科技有限公司，负责标准的制定和检测方法的优化。

陈金标：新乡市中标检验检疫创新研究院，负责标准的制定和检测方法的优化。

**2、标准的起草**

在系统统计、科学分析、试验验证的基础上，起草组成员收集了相关行业标准、技术规范，组织有关专家起草了《禽蛋中氟苯尼考快速检测方法》标准草案，通过对来自不同来源的样品进行检测应用，并与其它方法的对照实验，同时经征求国内相关专家意见，对获取的实验数据进行科学统计分析，力求标准客观公正、真实科学、易于操作、便于推广，体现先进性，增强其指导性。经过起草组成员反复修改和研讨后，形成了标准的征求意见稿。

四、主要内容的确定

本文件主要规定了禽蛋中氟苯尼考残留的方法原理、仪器设备、试剂耗材、操作步骤、结果判定等内容。

1. 范围

结合大量试验验证结果，界定了本标准的适用范围为各种家禽生产的，未经加工或仅用冷藏法、液浸法、涂膜法、消毒法、气调法、干藏法等处理的带壳蛋中的氟苯尼考的快速检测。

1. **方法原理**

本方法采用时间分辨荧光免疫层析技术原理。样品中的氟苯尼考与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制抗体和试纸条或检测卡中检测线(T 线)上抗原的结合，从而导致检测线颜色深浅的变化。通过检测线与控制线(C 线)颜色深浅比较，对样品中氟苯尼考进行定性判定。

1. **检测设备**

为保证标准的可推广性和应用范围，本标准对国内外氟苯尼考检测技术进行研究，设计出时间分辨荧光免疫层析试剂盒。试剂盒包括检测卡、样品稀释液。检测卡包括吸水纸、NC膜、结合垫、滤膜、样品垫依次搭接的粘贴于PVC胶板的检测条和带有读数视窗的卡壳组成，反应部件包括荧光探针和包被在NC膜上的检测区和质控区；其中荧光探针为时间分辨荧光微球偶联氟苯尼考抗体。

**（四）样品的检测及判定**

明确检测范围为：0μg/kg～150μg/kg。

制备样品：取适量样品，充分搅拌混匀，分别装入洁净容器作为试样和留样，密封，标记，于4 ℃冰箱保存。

样品稀释提取：称取1.0 g±0.05 g混合均匀后的样品于10 mL离心管中；加入4.0 g±0.05 g氟苯尼考提取液，高速震荡30 s至混合均匀；（如无条件配漩涡混匀器的情况下，可上下大力摇晃约1 min至混合均匀）；震荡混匀后即为待测液。

检测：吸取100μL上述待测液滴入荧光免疫层析试纸条中反应8 min～10 min插入荧光读卡仪进行结果判定。

**（五）稳定性**

将时间分辨荧光试纸条放入45 ℃烘箱内加速老化，分别在老化第0、1、3、7、15天测定氟苯尼考添加量为2.0 μg/kg的禽蛋样品，每个样品3 次平行，考察试纸条荧光强度、T/C比值及加标回收率的变化。室温干燥条件下，有效期12个月。

**（六）检测限的确定**

选取氟苯尼考阴性禽蛋样品（鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑蛋及其他禽蛋各20 份，按照本标准进行样本处理和检测。20 份空白样本测定结果的平均值加10 倍标准偏差即为本方法的定量限。

**（七）特异性实验**

通过空白样本梯度加标实验，分别建立氟苯尼考、氯霉素和甲砜霉素竞争抑制曲线，分别计算结合率，求出与氟苯尼考类似物的50%抑制浓度（half inhibitory concentration，IC50）（空白样本对应的T/C值）时的添加量，然后根据计算公式计算。



式中：

B为IC50时氟苯尼考添加量/（μg/kg）；

B0为IC50时氟苯尼考结构类似物添加量/（μg/kg）。

**（八）准确度和精密度测定**

取均质后的禽蛋空白样本，分别依次添加不同浓度的氟苯尼考标准溶液，使氟苯尼考最终添加量分别为1、2、4 μg/kg，每个梯度3 个平行，进行样本前处理和检测，计算加标回收率，将上述实验在不同工作日内重复3 次，分别统计批内变异系数和批间变异系数。

五、与国家法律法规和强制性标准的关系

本标准是为了更好地贯彻《中华人民共和国食品安全法》以及有关的法律法规，加快我国食品快速检测标准化工作进程，适应食品安全快速检测需要，填补禽蛋中氟苯尼考快速检测方法的空白，与现行的国家法律法规和强制性标准协调统一，无冲突。

六、标准实施的建议

1、广泛宣传

该项技术标准的制定，试验数据充分，科学性强，并经过了长期大量实际应用，方法准确度、精密度、灵敏度均较高，性能稳定且不需要大型仪器和严格的实验环境，适用于基层实验室，也适用于食品安全监管工作中进一步推广应用。

2、完善和发展

在标准应用过程中及时跟踪调查，收集标准应用过程出现的问题，提出切实可行的对策，不断完善标准的技术内容。