

广东省分析测试协会团体标准  
《水产品中河豚毒素的快速检测  
胶体金免疫层析法》（征求意见稿）  
编制说明

《水产品中河豚毒素的快速检测 胶体金免疫层析法》编制组

2024年5月

## 目 录

<b>1. 任务来源及简要起草过程</b> .....	1
1.1 任务来源.....	1
1.2 起草单位、起草人.....	1
1.3 背景与意义.....	1
1.4 简要起草过程及技术路线.....	2
<b>2. 起草原则与其他标准、法规的关系</b> .....	2
2.1 起草原则.....	2
2.2 与其他标准、法规的关系.....	3
<b>3. 技术内容的确定</b> .....	3
3.1 方法原理.....	3
3.2 目标化合物的基本信息.....	3
3.3 确定适用范围及检出限.....	4
3.4 样品前处理.....	4
3.5 样品分析步骤的确定.....	4
3.6 结果判定方法的确定.....	5
3.7 方法性能的确定.....	6
3.8 标准品.....	6
3.9 实际用到的样品.....	6
<b>4. 方法学考察</b> .....	6
4.1 检出限.....	7
4.2 灵敏度和特异性.....	7
4.3 假阳性率和假阴性率.....	7
4.4 与参比方法一致性.....	8
4.4 其他实验室验证结果.....	9
<b>5. 采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比</b> .....	10
<b>6. 与国内现行法律、法规、政策及相关标准，特别是强制性标准的协调性</b> .	10
<b>7. 公开标准涉及专利的信息，注明专利权人的谈判许可声明</b> .....	10
<b>8. 重大意见分歧的处理依据和结果</b> .....	10
<b>9. 预期的社会经济利益及贯彻实施标准的要求、措施等建议</b> .....	11
<b>10. 其他应当说明的事项</b> .....	11

## 1. 任务来源及简要起草过程

### 1.1 任务来源

本文件方法来自申报2023年度广东省分析测试协会团体标准项目，2023年10月，获广东省分析测试协会2023年团体标准修订计划项目（第二批）（编号：GAIA/JH 20230201）立项，任务名称为《水产品中河豚毒素的快速检测 胶体金免疫层析法》。

### 1.2 起草单位、起草人

本文件起草单位：华南农业大学、深圳市卓润生物科技有限公司、广州市轻工职业技术学校、海南省检验检测研究院食品检验检测中心、广州市轻工职业技术学校、广州万联生物科技有限公司、广州市增城区农产品推广与质量安全监督所、广州市从化区农产品质量安全监督检测中心、佛山市南海区农产品质量安全检测中心、广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、广州分析测试中心科力技术开发公司

本文件主要起草人：徐振林、张赛、黄艳、李备、陈遂、雷红涛、魏静、尹青春、何健灵、徐杰伟、刘蕴欣、杨熙、江林峰、韩金治、陈伟妍、陈镜钦、邓永健、董家琿、韦天才、钟鸣

### 1.3 背景与意义

河豚毒素（Tetrodotoxin, TTX）一种低分子量的非蛋白类神经毒素，广泛存在于河豚，织纹螺等海洋生物体内。最早于20世纪10年代日本化学家田原良纯率先在河豚中发现。河豚毒素被认为是海洋中最致命的毒素之一，小鼠腹腔注射的半致死剂量（LD<sub>50</sub>）仅为10.7 μg/kg。据报道，等量的河豚毒素与氰化物相比，毒性为氰化物的数万倍，且0.5 mg的河豚毒素可致一成年人死亡。它通过选择性阻断神经，骨骼肌和心肌膜的电压门控Na<sup>+</sup>通道的动作电位而起作用。是一种强大的钠通道阻滞剂。人体摄入微量便可产生致命影响，主要导致肌肉和神经的麻痹，丧失运动能力，更严重者会出现呼吸衰竭和心血管衰竭。而在亚洲等多个国家，因为河豚具有较高的营养价值，自古以来有食用河豚的习惯。并且我国在2016年批准并建立了第一批河豚养殖基地，覆盖我国的多个地区。近年来，多次报道河豚毒素致人死亡的病例。鉴于河豚毒素确实具有严重的毒性作用且没有特效解毒剂，因此建立一种轻便，快速，灵敏，不需要大量成本投入的检测方法十分必要。

目前，水产品中河豚毒素的常用检测方法有酶联免疫法、高效液相色谱法（HPLC）、液相色谱串联质谱联用法（LC-MS/MS）等，该类仪器方法具有准确性好、灵敏度高等特点，但需要专业人员操作，检测过程复杂，时间长，成本高，不利于大量样品的现场快速筛查，也难于在基层检测单位进行推广应用。

与仪器法相比，免疫检测方法因其操作简单、检测时间短、成本低等优点收到广大一线消费者和检测人员的青睐。其中免疫层析检测方法只需提取、稀释、点样等简单步骤 5~10 min 后便可直接通过肉眼判断检测结果，无需其他专业的操作和任何专业仪器，但目前市面上暂无针对水产品中河豚毒素的快速检测标准。

本项目旨在开发一种简单快速、适用于水产品中河豚毒素的胶体金免疫层析快速检测方法来满足大量样品现场筛选和监控和提高我国食品监管部门的检测效率。

#### 1.4 简要起草过程及技术路线

本方法研究过程中查阅了国内外相关标准法规和参考文献，研究了水产品中河豚毒素胶体金免疫层析试纸条，确定了检测产品的基质适用性、检测项目、检测限、检测步骤、结果判断等内容，选择了 1 种满足检测要求的胶体金试纸条进行方法学考察。根据原国家食药总局发布的《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科[2017]43 号）的要求，对河豚毒素胶体金免疫层析试纸条进行了性能指标（灵敏度、特异性）的分析，建立了水产品中河豚毒素胶体金免疫层析试纸条快速定性检测方法，依据 GB/T 1.1《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》编写了“水产品中的河豚毒素的快速检测 胶体金免疫层析法”标准草案。

标准制定技术路线图：

## 2. 起草原则与其他标准、法规的关系

### 2.1 起草原则

本方法在起草过程中，查阅国内外有关文献资料以及各行业部门制订的同类标准方法，并按照《国家标准管理办法》的程序与基本要求进行。在方法制定的过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，严格执行国家强制性标准和行业标准。按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 的要求进行制定，与同体系标准及相关的各种基础标准互衔接，遵循政策协调统一性原则。在标准制定

过程中遵循“先进性、实用性、统一性、规范性”的原则，注重方法的可行性。

将 GB5009.206—2016《食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定》作为参比方法，并按照《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科〔2017〕43号）要求进行方法学考察。

## 2.2 与其他标准、法规的关系

国际上，2017年欧盟食品安全局（EFSA）对海洋双壳类和腹足类动物体内河豚毒素（TTX）对公共健康的风险发布意见，经过风险评估，欧盟食品安全局认为，贝肉中河豚毒素浓度低于 44  $\mu\text{g}/\text{kg}$  不会对人体产生不利影响。液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）最适合检测河豚毒素及其类似物，定量限为 0.1-25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

国内，2016年中华人民共和国国家标准发布的《食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定》（GB 5009.206-2016）中，规定了四种水产品中河豚毒素的测定方法。针对河豚鱼肌肉，肝脏，皮肤和性腺组织的小鼠生物法、液相色谱-串联质谱法以及酶联免疫吸附法检出限分别是 3.11 MU/g、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。针对河豚鱼、织纹螺、虾、牡蛎、花蛤和鱿鱼的液相色谱-荧光检测法检出限为 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。这些方法灵敏度、准确性高，但检测时间长、样品前处理复杂，不利于大量样品的现场筛查和检测。本项目针对此问题开发胶体金免疫层析方法，可用于大量样品的现场筛查和检测。

## 3. 技术内容的确定

### 3.1 方法原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中经提取后的河豚毒素与胶体金标记的河豚毒素特异性抗体结合，抑制抗体和检测卡中检测线（T线）上河豚毒素抗原的结合，从而导致检测线颜色深浅的变化。通过检测线与质控线（C线）颜色深浅比较，对样品中目标河豚毒素进行定性判定。

### 3.2 目标化合物的基本信息

表 1 河豚毒素基本信息表

中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子量
河豚毒素	Tetrodotoxin	4368-28-9	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_8\text{N}_3$	319

注：经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

### 3.3 确定适用范围及检出限

适用范围：水产品中河豚毒素的胶体金免疫层析快速筛查方法。本方法适用于河豚鱼、织纹螺、虾等水产品中的河豚毒素成分的快速筛查。

检出限：10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 3.4 样品前处理

#### 3.4.1 河豚鱼

河豚去皮去内脏，将肌肉部分用水清洗鱼体表面的污物，滤纸吸干鱼体表面的水分后用剪刀将鱼体分解成肌肉、肝脏、皮肤和性腺(精巢或卵巢)等部分，各部分组织分别用水洗去血污，滤纸吸干表面的水分后将各组织剪碎，充分均质，装入清洁容器内，并标明标记。准确称取试样  $2\text{ g} \pm 0.1\text{ g}$  于 15 mL 离心管中，加入 2 mL 对甲苯磺酸溶液，涡旋 30 s，4000 rpm 离心 2 min 使固液分离。取 200  $\mu\text{L}$  上清液于 5 mL 离心管中，加入 400  $\mu\text{L}$  样品稀释液，涡旋混合 30 s，作为待测液。

#### 3.4.2 织纹螺

去除织纹螺体表面的泥浆及污物，打开螺壳，将其内容物剪碎，充分均质，装入清洁容器内。准确称取试样  $2\text{ g} \pm 0.1\text{ g}$  于 15 mL 离心管中，加入 2 mL 对甲苯磺酸溶液，涡旋 30 s，4000 rpm 离心 2 min 使固液分离。取 200  $\mu\text{L}$  上清液于 5 mL 离心管中，加入 400  $\mu\text{L}$  样品稀释液，涡旋混合 30 s，作为待测液。

#### 3.4.3 虾

虾去头和壳后进行取样，充分均质，装入清洁容器内。准确称取试样  $2\text{ g} \pm 0.1\text{ g}$  于 15 mL 离心管中，加入 2 mL 对甲苯磺酸溶液，涡旋 30 s，4000 rpm 离心 2 min 使固液分离。取 200  $\mu\text{L}$  上清液于 5 mL 离心管中，加入 400  $\mu\text{L}$  样品稀释液，涡旋混合 30 s，作为待测液。

### 3.5 样品分析步骤的确定

参照国家市场监督管理总局已发布的基于胶体金免疫层析原理的快速检测方法(KJ201701-KJ201703、KJ201705-KJ201710、KJ201801、KJ201901-KJ201903、KJ201905-KJ201907、KJ201910、KJ201913 等)的分析步骤进行分析。

#### 3.5.1 试纸条与金标微孔测定步骤

取 100  $\mu\text{L}$  样品待测液加入金标微孔中，使用移液枪反复吸打 6-10 次混合均匀，室温孵育 3 min，随后将试纸条插入金标微孔中反应 5 min，取出试纸条去除样品垫，进行结果判定。

注：测定步骤建议按照试剂盒说明书。

### 3.5.2 检测卡测定步骤

取 100  $\mu\text{L}$  样品待测液加入检测卡样品孔中，反应 5 min，随后进行结果判定。

注：测定步骤建议按照试剂盒说明书。

### 3.6 结果判定方法的确定

参照国家市场监督管理总局已发布基于胶体金免疫层析原理的快速检测方法（KJ201701-KJ201703、KJ201705-KJ201710、KJ201801、KJ201901- KJ201903、KJ201905-KJ201907、KJ201910、KJ201913 等）的结果判断。

通过对比质控线（C 线）和检测线（T 线）的颜色深浅进行结果判定。目视判定示意图见图 2 或 3。结果判定也可根据产品说明书进行。

#### 3.6.1 无效

质控线（C 线）不显色，表明不正确操作或试纸条/检测卡无效。

#### 3.6.2 阴性结果

质控线（C 线）显色，检测线（T 线）颜色比质控线（C 线）颜色深或检测线（T 线）颜色与质控线（C 线）颜色相当，均表示样品中不含待测组分或含量低于方法检测限，判为阴性。

#### 3.6.3 阳性结果

质控线（C 线）显色，检测线（T 线）颜色比质控线（C 线）颜色明显浅或检测线（T 线）不显色，均表示样品中待测组分含量高于方法检测限，判为阳性。

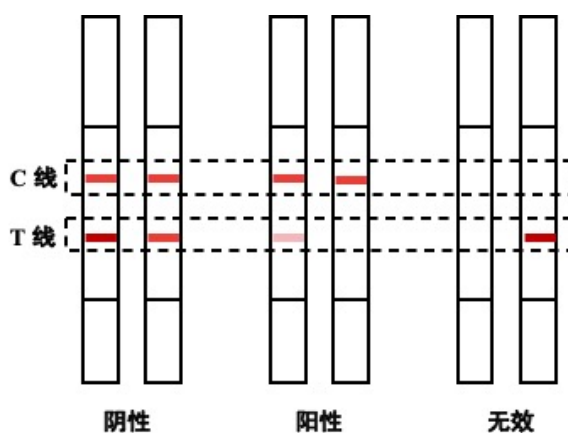


图 2 试纸条目视判定示意图

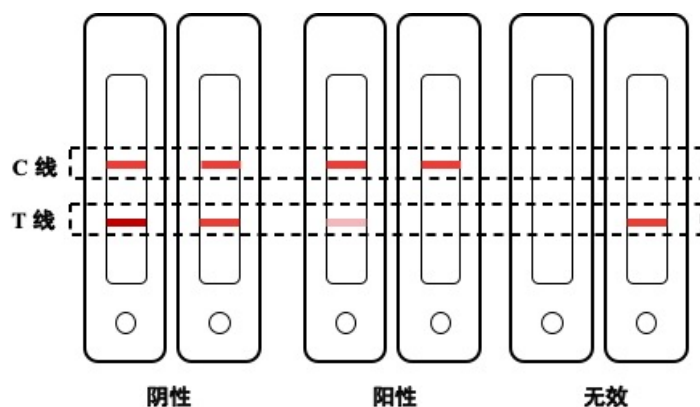


图3 检测卡目视判定示意图

### 3.7 方法性能的确

本方法的检测性能（检出限）设定为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 3.8 标准品

标准品用乙酸溶解标准品粉末，用磷酸盐缓冲液稀释。

标准品：河豚毒素（Tetrodotoxin）

### 3.9 实际用到的样品

空白样品：选用经实验室仪器检测确认不含河豚毒素的水产品作为空白样品。

加标样品：用空白样品添加标准物质的方式制备阳性样品。

## 4. 方法学考察

按照《食品快速检测方法评价技术规范》（食药监办科（2017）43号）要求进行方法学考察。

经参比方法确认河豚鱼、织纹螺、虾 3 种基质的水产品空白样品中，采用加标的方式进行方法学考察，根据检出限分别添加 0 倍检出限、0.5 倍检出限、1 倍检出限、2 倍检出限。每个浓度水平测定 50 个样品，按照《食品快速检测方法评价技术规范》附表快速检测方法性能指标计算表要求对方法的灵敏度和特异性进行计算，测定结果见表 2：

表 2 保健食品基质测定结果

基质	添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	检测结果	灵敏度	特异性	假阴性率	假阳性率



河豚鱼	0	0 (+), 50 (-)	100%	99%	0%	1%
	5	1 (+), 49 (-)				
	10	0 (-), 50 (+)				
	20	0 (-), 50 (+)				
织纹螺	0	0 (+), 50 (-)	100%	98%	0%	2%
	5	2 (+), 48 (-)				
	10	0 (-), 50 (+)				
	20	0 (-), 50 (+)				
虾	0	0 (+), 50 (-)	99%	97%	1%	3%
	5	3 (+), 47 (-)				
	10	1 (-), 49 (+)				
	20	0 (-), 50 (+)				

#### 4.1 检出限

检出限是指阳性检出率为 100 % 的空白样品中标准物质的添加浓度，实验结果表明，该项目研究的方法的检出限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

#### 4.2 灵敏度和特异性

灵敏度是指方法在实验条件下达到的实际最低检出水平时，检出阳性结果的阳性样品数占总阳性样品数的百分比；特异性是指方法在实验条件下达到的实际最低检出水平时，检出阴性结果的阴性样品数占总阴性样品数的百分比，具体计算要求见附表，评价中可描述为方法检出限下不存在干扰的百分比。

按照灵敏度和特异性计算公式，该方法针对河豚鱼等水产品的灵敏度 $\geq 99\%$ ，特异性 $\geq 97\%$ 。

#### 4.3 假阳性率和假阴性率

假阴性率是指方法在实验条件下达到的实际最低检出水平时，阳性样品中检出阴性结果的最大概率（以百分比计），假阳性率是指方法在实验条件下达到的实际最低检出水平时，阴性样品中检出阳性结果的最大概率（以百分比计），具体计算要求见附表，计算结果为方法最大假阳性率的结果。

按照假阴性率和假阳性率计算公式,该方法针对河豚鱼等水产品的假阴性率≤1%,假阳性率≤3%。

#### 4.4 与参比方法一致性

选用 2016 年中华人民共和国国家标准发布的《食品安全国家标准 水产品中河豚毒素的测定》(GB 5009.206-2016)中的第三法作为参比方法,选用三种不同基质的水产品进行方法比对,每个基质 50 个样品,测定结果见表 3。

评价方法如下:快速检测方法应与方法中规定的参比方法进行一致性比较。与参比方法一致性分析统计方法常见卡方检验,具体可见附表中显著性差异( $\chi^2$ )所示,一般:

$$\chi^2 = (|a-b|-1)^2 / (a+b)$$

a: 样品被待确认方法证实为阳性而参比方法检验为阴性的数目;

b: 样品被待确认方法证实为阴性而参比方法检验为阳性的数目。

$\chi^2 < 3.84$  表示待确认方法与参比方法的阳性确证比率在 95%的置信区间内没有显著性差异。但是如果待确认方法比参比方法存在更高的回收率,则以上两种方法的阳性确证比率存在显著性差异是可以接受的。

$\chi^2 > 3.84$  表示两种方法的阳性确认比率在 95%的置信区间内有显著性差异。

表 3 参比方法一致性分析

基质	添加浓度 (μg/kg)	本方法结果	$\chi^2$
河豚鱼	0	0 (+), 50 (-)	1
	5	1 (+), 49 (-)	
	10	0 (-), 50 (+)	
	20	0 (-), 50 (+)	
织纹螺	0	0 (+), 50 (-)	1.29
	5	5 (+), 45 (-)	
	10	2 (-), 48 (+)	
	20	0 (-), 50 (+)	
虾	0	0 (+), 50 (-)	1

	5	3 (+), 47 (-)
	10	1 (-), 49 (+)
	20	0 (-), 50 (+)

由测定结果可知,使用该方法对水产品中的河豚毒素进行测定,胶体金测定结果与参比方法测定结果无显著性差异。

#### 4.4 其他实验室验证结果

##### 4.4.1 验证单位

方法建立过程中选取汕头海关技术中心、厦门市食品药品质量检验研究院、海南省食品检验检测中心 3 家机构,对产品进行评价,评价样品基质为东方鲀、织纹螺、花甲、草鱼。

##### 4.4.2 验证结果

本次验证对东方鲀、织纹螺、花甲、草鱼基质空白、1 倍检出限、2 倍检出限 3 个浓度梯度(每个浓度 50 批次)样品进行验证,3 家机构的验证结果汇总如下。

表 4 三家机构验证结果

项目名称	汕头海关技术中心			厦门市食品药品质量检验研究院			海南省食品检验检测中心		
	验证结果		总数	验证结果		总数	验证结果		总数
	阳性	阴性		阳性	阴性		阳性	阴性	
阳性	60	0	60	300	0	300	160	0	160
阴性	1	59	60	0	300	300	3	157	160
总数	61	59	120	300	300	600	163	157	320
灵敏度	p+=60/60=100%			p+=300/300=100%			p+=160/160=100%		
特异性	p-=59/60=98.3%			p-=300/300=100%			p-=157/160=98.1%		
假阳性率	pf+=1/60=1.7%			pf+=0/300=0%			pf+=3/160=1.9%		
假阴性率	pf-=0/60=0%			pf-=0/300=0%			pf-=0/160=0%		

由 3 家机构验证结果可知,该方法的灵敏度 $\geq 99.9\%$ ,特异性 $\geq 98.1\%$ ,假阳性率 $\leq 2.0\%$ ,假阴性 $\leq 0.01\%$ 。

## 5. 采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

目前已经报道的河豚毒素定性和定量分析方法主要包括生物分析法、仪器分析法、免疫分析方法等。但是已经立项为标准只有仪器检测法如液相色谱-串联质谱法、液相色谱-荧光检测法和小鼠生物法。本方法是基于河豚毒素抗体与河豚毒素特异性识别而建立起来的胶体金免疫检测方法，原理与仪器法和小鼠生物法不同。在标准制定过程中，采用了仪器检测方法中涉及样品处理的部分方法，本方法的检出限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，灵敏度略低于液相色谱-串联质谱法的 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，但远高于液相色谱法的 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法作为一种补充，可以与现有国际标准和国外先进标准相互补充。

## 6. 与国内现行法律、法规、政策及相关标准，特别是强制性标准的协调性

河豚毒素污染的严重性受到了全世界的关注，尤其是亚洲，一些政府已经禁止或限制了带有河豚毒素的海产品的消费和贸易。许多国家制定了具体的立法。日本是立法最明确的国家，自 1958 年以来，规定厨师必须有许可证才能烹饪以河豚为原料的菜肴。除日本外，中国、泰国、台湾、越南、美国和欧洲也出台了相应法规对河豚毒素进行了限制。其中，欧洲食品安全协会（EFSA）对 TTX 的限量标准为 44  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前，关于河豚毒素的残留限量和检测方法均无强制性标准，仅有河豚毒素的检测方法标准《食品安全国家标准水产品中河豚毒素的测定》（GB5009.206—2016）。本项目方法作为一种仪器方法的补充，与现有国际标准和国外先进标准相互补充。法律法规、政策无冲突，具有良好的协调下。

## 7. 公开标准涉及专利的信息，注明专利权人的谈判许可声明

目前公开涉及河豚毒素的快速检测专利主要包括：一种快速灵敏检测河豚毒素 TTX 的方法（CN201811019418）、一种河豚毒素检测试剂盒（CN201410251894）、一种金磁纳米颗粒的制备及其结合表面增强拉曼光谱法快速检测河豚毒素（CN201710307359）等。本项目所采用的方法均与上述专利无相关，不涉及任何许可。

## 8. 重大意见分歧的处理依据和结果

在标准制定过程中未有重大意见分歧。

## **9. 预期的社会效益及贯彻实施标准的要求、措施等建议**

本项标准预期建立一种河豚毒素的快速检测方法，该方法不仅使用方便，且成本低、结果可靠，特别是检测时间<30min，非常适合现场的快速检测。现有仪器检测方法通常需要 5-7 个工作日，无法现场出结果。本标准的立项可以推进河豚毒素快速检测方法的使用，对于防止河豚毒素中毒和保障消费者身心健康具有重要的作用。

为进一步贯彻实施标准，需要加强对基层以及执法机构的科普以及使用方法的培训，加强标准的宣贯等措施。

## **10. 其他应当说明的事项**

无。

附表 1

## 快速检测方法性能指标计算表

附表 1 性能指标计算方法

样品情况 <sup>a</sup>	检测结果 <sup>b</sup>		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 <sup>2</sup> )	$X^2=( N12-N21 -1)^2/(N12+N21),$ 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, % <sup>c</sup>	(N11+N22)/(N1.+N2.)		
<sup>a</sup> 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果; <sup>b</sup> 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			

《水产品中河豚毒素的快速检测方法  
胶体金免疫层析法》  
验证报告

委托单位 华南农业大学

验证单位 海南省食品检验检测中心



## 一、原理

采用胶体金免疫层析竞争抑制法原理。样品中的河豚毒素药物在微孔中与胶体金标记的特异性抗体结合，通过层析流动抑制抗体与固相载体膜上的河豚毒素-大分子蛋白偶联物的结合，从而导致检测线（T线）颜色深浅变化。当样品中没有药物或者药物含量低于检出限时，T线红颜色深于或等于质控线（C线）；而药物超过检出限时，T线不出现红色或出现但颜色浅于C线。而无论样品中是否含有药物，质控线（C线）都会显色，表示检测有效。

## 二、材料

河豚毒素胶体金免疫层析检测卡及配套试剂、验证样品均为委托方提供。

河豚毒素标准品由成都曼思特生物科技公司提供（Lot No.: 21090505）。

## 三、操作流程

取东方鲀、织纹螺等水产品样品，去皮去壳去内脏，洗净并用纸巾去除血水后匀浆，称取  $2.0 \pm 0.1$  g，加入 2 mL 提取液，震荡 1~2 min 至组织均匀分散，室温下 4000 rpm 离心 2 min，取上清液即为样品待测液。准确量取 100  $\mu$ L 待测液滴加于检测微孔中，孵育 3min 后点样，5-8 min 后进行结果判读。

## 四、验证方法及结果

### 4.1 灵敏度和假阴性率的计算

以委托方设定的方法的检出限 10  $\mu$ g/kg 为关注浓度。添加水平为 1、2 倍检出限制备阳性样品，考察灵敏度和假阴性率。

检测对象	添加浓度 ( $\mu$ g/kg)	检测结果 (N=20)
东方鲀	10	+
	20	+
织纹螺	10	+
	20	+



花甲（贵州）	10	+
	20	+
草鱼（贵州）	10	+
	20	+

结果：灵敏度为 100%，假阴性率为 0%

#### 4.2 特异性和假阳性的计算

以空白样品和添加 0.5 倍检出限水平作为阴性样品，考察特异性和假阳性率。

检测对象	添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	检测结果 (N=20)
东方鲀	0	- (20)
	5	- (20)
织纹螺	0	- (20)
	5	- (19), + (1)
花甲	0	- (20)
	5	- (18), + (2)
草鱼	0	- (20)
	5	- (20)

结果：该方法检测空白样品均为阴性，检测 0.5 倍关注浓度时，有 3 个样品呈现假阳性，总体特异性为 98.1%，假阳性率为 1.9%。

## 五、结论

该方法在  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  的检出限下，检测水产品中河豚毒素的灵敏度为 100%，假阴性率为 0%，特异性为 98.1%，假阳性率为 1.9%。

验证单位（签章）：



2017年8月17日

# 评价报告

送检单位：广州万联生物科技有限公司  
华南农业大学

产品名称：河豚毒素快速检测试剂盒



汕头海关技术中心

## 评价报告

产品名称	河豚毒素快速检测试剂盒		
生产单位	广州万联生物科技有限公司、华南农业大学		
规格、生产日期	10T/盒、2023年03月20日		
储藏条件、质保期	常温、一年		
适用范围	水产品		
检测项目	灵敏度、准确度		
评价指标依据	市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见（国市监食检规[2023]1号）； 假阳性率：≤15%；假阴性率：≤5%		
盲样组成	盲样数：阴性样品20份，阳性样品20份		
盲样典型基质	东方鲀		
加标浓度	0.0 μg/kg, 10 μg/kg, 20 μg/kg		
加标浓度依据	《GB2763-2021 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量》		
技术指标	检出限	10 μg/kg	符合
	假阴性率	0%	符合
	假阳性率	2%	符合
	检测时间	20分钟	符合
评价结论	符合评价方案要求		
备注	本结果仅对本次送检产品负责		

评价人：陆美娜

汕头海关技术中心

2023年07月11

检验检测专用章

(1)

《水产品中河豚毒素快速检测胶体金免疫层析法》

方法验证结果报告表

方法验证单位名称(盖章): 厦门市食品药品质量检验研究院



方法验证试剂盒厂家名称: 广州万联生物科技有限公司

验证实验按照华南农业大学所给《水产品中河豚毒素快速检测胶体金免疫层析法》方法验证说明及广州万联生物科技有限公司提供的河豚毒素快速检测试剂盒使用说明书进行, 共验证东方鲀、织纹螺、花甲、草鱼四种基质, 每种基质三个添加水平, 每种基质每个添加水平各50份, 共计600份样本, 验证结果见附表。

方法验证人员(签名): 叶孙玉

验证时间: 2023年10月10日~10月20日

验证样品名称:		东方鲀		检测结果(+为阳性, -为阴性)	
样品编号	空白	样品编号	1倍检测限	样品编号	2倍检测限
A001	-	B001	+	C001	+
A002	-	B002	+	C002	+
A003	-	B003	+	C003	+
A004	-	B004	+	C004	+
A005	-	B005	+	C005	+
A006	-	B006	+	C006	+
A007	-	B007	+	C007	+
A008	-	B008	+	C008	+
A009	-	B009	+	C009	+
A010	-	B010	+	C010	+
A011	-	B011	+	C011	+
A012	-	B012	+	C012	+
A013	-	B013	+	C013	+
A014	-	B014	+	C014	+
A015	-	B015	+	C015	+
A016	-	B016	+	C016	+
A017	-	B017	+	C017	+
A018	-	B018	+	C018	+
A019	-	B019	+	C019	+
A020	-	B020	+	C020	+
A021	-	B021	+	C021	+
A022	-	B022	+	C022	+
A023	-	B023	+	C023	+
A024	-	B024	+	C024	+
A025	-	B025	+	C025	+
A026	-	B026	+	C026	+
A027	-	B027	+	C027	+

验证样品名称:		东方鲀		检测结果(+为阳性, -为阴性)	
样品编号	空白	样品编号	1倍检测限	样品编号	2倍检测限
A028	-	B028	+	C028	+
A029	-	B029	+	C029	+
A030	-	B030	+	C030	+
A031	-	B031	+	C031	+
A032	-	B032	+	C032	+
A033	-	B033	+	C033	+
A034	-	B034	+	C034	+
A035	-	B035	+	C035	+
A036	-	B036	+	C036	+
A037	-	B037	+	C037	+
A038	-	B038	+	C038	+
A039	-	B039	+	C039	+
A040	-	B040	+	C040	+
A041	-	B041	+	C041	+
A042	-	B042	+	C042	+
A043	-	B043	+	C043	+
A044	-	B044	+	C044	+
A045	-	B045	+	C045	+
A046	-	B046	+	C046	+
A047	-	B047	+	C047	+
A048	-	B048	+	C048	+
A049	-	B049	+	C049	+
A050	-	B050	+	C050	+

验证样品名称:		织纹螺	检测结果(+为阳性, -为阴性)		
样品编号	空白	样品编号	1倍检测限	样品编号	2倍检测限
D001	-	E001	+	F001	+
D002	-	E002	+	F002	+
D003	-	E003	+	F003	+
D004	-	E004	+	F004	+
D005	-	E005	+	F005	+
D006	-	E006	+	F006	+
D007	-	E007	+	F007	+
D008	-	E008	+	F008	+
D009	-	E009	+	F009	+
D010	-	E010	+	F010	+
D011	-	E011	+	F011	+
D012	-	E012	+	F012	+
D013	-	E013	+	F013	+
D014	-	E014	+	F014	+
D015	-	E015	+	F015	+
D016	-	E016	+	F016	+
D017	-	E017	+	F017	+
D018	-	E018	+	F018	+
D019	-	E019	+	F019	+
D020	-	E020	+	F020	+
D021	-	E021	+	F021	+
D022	-	E022	+	F022	+
D023	-	E023	+	F023	+
D024	-	E024	+	F024	+
D025	-	E025	+	F025	+
D026	-	E026	+	F026	+
D027	-	E027	+	F027	+

验证样品名称		织纹螺	检测结果(+为阳性, -为阴性)		
样品编号	空白	样品编号	1倍检测限	样品编号	2倍检测限
D028	-	E028	+	F028	+
D029	-	E029	+	F029	+
D030	-	E030	+	F030	+
D031	-	E031	+	F031	+
D032	-	E032	+	F032	+
D033	-	E033	+	F033	+
D034	-	E034	+	F034	+
D035	-	E035	+	F035	+
D036	-	E036	+	F036	+
D037	-	E037	+	F037	+
D038	-	E038	+	F038	+
D039	-	E039	+	F039	+
D040	-	E040	+	F040	+
D041	-	E041	+	F041	+
D042	-	E042	+	F042	+
D043	-	E043	+	F043	+
D044	-	E044	+	F044	+
D045	-	E045	+	F045	+
D046	-	E046	+	F046	+
D047	-	E047	+	F047	+
D048	-	E048	+	F048	+
D049	-	E049	+	F049	+
D050	-	E050	+	F050	+



验证样品名称:		花甲	检测结果(+为阳性, -为阴性)		
样品编号	空白	样品编号	1倍检测限	样品编号	2倍检测限
G001	-	H001	+	I001	+
G002	-	H002	+	I002	+
G003	-	H003	+	I003	+
G004	-	H004	+	I004	+
G005	-	H005	+	I005	+
G006	-	H006	+	I006	+
G007	-	H007	+	I007	+
G008	-	H008	+	I008	+
G009	-	H009	+	I009	+
G010	-	H010	+	I010	+
G011	-	H011	+	I011	+
G012	-	H012	+	I012	+
G013	-	H013	+	I013	+
G014	-	H014	+	I014	+
G015	-	H015	+	I015	+
G016	-	H016	+	I016	+
G017	-	H017	+	I017	+
G018	-	H018	+	I018	+
G019	-	H019	+	I019	+
G020	-	H020	+	I020	+
G021	-	H021	+	I021	+
G022	-	H022	+	I022	+
G023	-	H023	+	I023	+
G024	-	H024	+	I024	+
G025	-	H025	+	I025	+
G026	-	H026	+	I026	+
G027	-	H027	+	I027	+

验证样品名称:		花甲	检测结果(+为阳性, -为阴性)		
样品编号	空白	样品编号	1倍检测限	样品编号	2倍检测限
G028	-	H028	+	I028	+
G029	-	H029	+	I029	+
G030	-	H030	+	I030	+
G031	-	H031	+	I031	+
G032	-	H032	+	I032	+
G033	-	H033	+	I033	+
G034	-	H034	+	I034	+
G035	-	H035	+	I035	+
G036	-	H036	+	I036	+
G037	-	H037	+	I037	+
G038	-	H038	+	I038	+
G039	-	H039	+	I039	+
G040	-	H040	+	I040	+
G041	-	H041	+	I041	+
G042	-	H042	+	I042	+
G043	-	H043	+	I043	+
G044	-	H044	+	I044	+
G045	-	H045	+	I045	+
G046	-	H046	+	I046	+
G047	-	H047	+	I047	+
G048	-	H048	+	I048	+
G049	-	H049	+	I049	+
G050	-	H050	+	I050	+

验证样品名称:		草鱼		检测结果(+为阳性, -为阴性)	
样品编号	空白	样品编号	1倍检测限	样品编号	2倍检测限
J001	-	K001	+	L001	+
J002	-	K002	+	L002	+
J003	-	K003	+	L003	+
J004	-	K004	+	L004	+
J005	-	K005	+	L005	+
J006	-	K006	+	L006	+
J007	-	K007	+	L007	+
J008	-	K008	+	L008	+
J009	-	K009	+	L009	+
J010	-	K010	+	L010	+
J011	-	K011	+	L011	+
J012	-	K012	+	L012	+
J013	-	K013	+	L013	+
J014	-	K014	+	L014	+
J015	-	K015	+	L015	+
J016	-	K016	+	L016	+
J017	-	K017	+	L017	+
J018	-	K018	+	L018	+
J019	-	K019	+	L019	+
J020	-	K020	+	L020	+
J021	-	K021	+	L021	+
J022	-	K022	+	L022	+
J023	-	K023	+	L023	+
J024	-	K024	+	L024	+
J025	-	K025	+	L025	+
J026	-	K026	+	L026	+
J027	-	K027	+	L027	+

验证样品名称:		草鱼		检测结果(+为阳性, -为阴性)	
样品编号	空白	样品编号	1倍检测限	样品编号	2倍检测限
J028	-	K028	+	L028	+
J029	-	K029	+	L029	+
J030	-	K030	+	L030	+
J031	-	K031	+	L031	+
J032	-	K032	+	L032	+
J033	-	K033	+	L033	+
J034	-	K034	+	L034	+
J035	-	K035	+	L035	+
J036	-	K036	+	L036	+
J037	-	K037	+	L037	+
J038	-	K038	+	L038	+
J039	-	K039	+	L039	+
J040	-	K040	+	L040	+
J041	-	K041	+	L041	+
J042	-	K042	+	L042	+
J043	-	K043	+	L043	+
J044	-	K044	+	L044	+
J045	-	K045	+	L045	+
J046	-	K046	+	L046	+
J047	-	K047	+	L047	+
J048	-	K048	+	L048	+
J049	-	K049	+	L049	+
J050	-	K050	+	L050	+