《植物油中邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯的快速测定-纸基比色智能手机读卡法》

团体标准编制说明

（技术审查稿）

陕西师范大学

《植物油中邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯的快速测定-纸基比色智能手机读卡法》团体标准编制说明

1 工作简况

1.1 任务来源

本标准任务来源于陕西师范大学食品工程与营养科学学院食用木本油料国家重点研发计划课题组承担的项目中的相关内容。

本标准的制定工作，是由陕西省食品科学技术学会提出并归口，陕西省食品科学技术学会团体标准专业委员会负责解释。本标准由陕西师范大学负责起草。

1.2 标准制定的目的及意义

食用植物油是以富含油脂的植物种仁为原料，经清理除杂、脱壳、破碎、软化、轧坯、挤压膨化等预处理后，采用机械压榨或溶剂浸出法提取获得粗油，再经精炼后获得。根据加工的油料作物种类，植物油被分为草本食用油和木本食用油两大类。草本食用油是由草本油料加工而成，如花生、大豆、菜籽都属于草本油料，也是人们日常生活中最常食用的植物油。而木本食用油是由木本油料压榨而成，像茶籽、核桃、橄榄、牡丹籽等则属于木本油料。食用植物油中主要含有维生素 E、维生素 K、钙、铁、磷、钾、不饱和脂肪酸、必需脂肪酸等物质，是人类营养的主要来源，其品质对消费者十分重要。但诸多研究表明食用植物油中存在塑化剂含量超标问题，引发人们关注。

塑化剂是一种被广泛应用于塑料制品的用于增强柔韧性的材料助剂。商品化的塑化剂多达 100 余种，其中邻苯二甲酸酯类塑化剂（phthalic acid esters, PAEs）最为常见，超过塑化剂总量的 80%。2011 年“台湾塑化剂污染食品”事件以及 2012 年大陆白酒塑化剂污染风波使食品中的塑化剂污染问题备受关注。PAEs 作为塑化剂的代表性物质，被广泛用于塑料、汽车、化妆品、农药等行业，可通过挥发、迁移等途径进入空气、土壤、水体、生物体中。研究证明 PAEs 是一种环境激素类物质，可以代替天然激素作用于机体，导致男性雌性化，降低生殖能力，引发女性性早熟，增加乳腺癌风险。此外，PAEs 可引起生物体细胞染色体结构和数目的变化，具有致畸、致癌等诸多危害。其中，邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯（di-(2-ethylhexyl)phtha-late, DEHP）和邻苯二甲酸二丁酯（dibutyl phthalate, DBP）被联合国出版的《全球化学品统一分类和标签制度》列于 1B（具有致癌、致突变或生殖毒性）分类中。2016 年 12 月，我国国家食品药品监督管理总局在发布了关于 PAEs 的食品国家标准，对食品中 PAEs 含量限制范围做了明确规定，其中食品和食品添加剂中 DEHP、DBP、邻苯二甲酸二异壬酯（diisononyl phthalate, DINP）3 种最常见 PAEs 的最大残留限量分别为 1.5、0.3、9.0 mg/kg。

由于 PAEs 与塑料制品中的聚合物以不稳定的非共价键形式结合，极易从包装、加工设备等塑料接触材料中迁移出来，对植物油造成污染。研究发现 DBP 和 DEHP 在植物油中的总检出率为 30.7%。亦有研究表明 DEHP 在植物油中的迁移量与存储时间和油桶相关，存储时间越长，油桶中 DEHP 含量越高，植物油中 DEHP 的迁移量越大。然而我国植物油的品质评价体系尚未完善，建立 DEHP 检测技术对油脂安全控制具有重大意义。现有的测定植物油中 PAEs 含量常用的方法为气相色谱（gas chromatography, GC）、高效液相色谱（high performance liquid chromatography, HPLC）、气相色谱-质谱（gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS）、高效液相色谱-质谱（high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS），这些方法具有准确性高，稳定性强等优势，但样品前处理工作复杂，无法实现大批量、现场快速检测。

在标准研制过程中，我们查阅了国内外有关 PAEs 塑化剂的相关标准、分析方法、论文等资料，PAEs 塑化剂现行有效的相关标准如下：

表 1 国内外 PAEs 塑化剂检测的相关标准

序号	标准号	标准名称	适用基质	发布日期	实施日期
1	SN/T 4902-2017	进出口化妆品中邻苯二甲酸酯类化合物的测定 气相色谱-质谱法	化妆品	2017-08-29	2018-04-01
2	GB/T 35104-2017	肥料中邻苯二甲酸酯类增塑剂含量的测定 气相色谱-质谱法	肥料	2017-12-29	2018-07-01
3	GB/T 28599-2020	化妆品中邻苯二甲酸酯类物质的测定	化妆品	2020-09-29	2021-01-01
4	GB/T 39110-2020	消费品 塑胶材料 邻苯二甲酸酯类增塑剂快速筛选	塑胶材料	2020-10-21	2020-10-21
5	HJ 1242-2022	水质 6 种邻苯二甲酸酯类化合物的测定 液相色谱-三重四极杆质谱法	水	2022-04-15	2022-11-01
6	SN/T 4606-2016	食品接触材料 高分子材料 食品模拟物中邻苯二甲酸酯类增塑剂的测定 液相色谱-质谱/质谱法	水，3%乙酸溶液，20%乙醇溶液，50%乙醇溶液，橄榄油 6 种食品模拟物	2016-08-23	2017-03-01
7	HJ 1184-2021	土壤和沉积物 6 种邻苯二甲酸酯类 化合物的测定 气相色谱-质谱法	土壤和沉积物	2021-06-03	2021-09-15

8	LS/T 6131-2018	粮油检验 植物油中邻苯二甲酸酯类化合物的测定	植物油	2018-01-08	2018-03-01
7	SN/T 2249-2009	塑料及其制品中邻苯二甲酸酯类增塑剂的测定 气相色谱-质谱法	塑料及其制品	2009-02-20	2009-09-01

以上标准中未见采用纸基比色智能手机读卡法测定食用植物油 PAEs 塑化剂中的方法。为有效防止塑化剂污染，实现对植物油中塑化剂的高效监控，本研究采用纸基比色方法联合智能手机取色软件，实现植物油中 DEHP 类塑化剂的快速检测。

1.3 标准主导单位

陕西师范大学、西安市粮油质量检验中心。

1.4 标准参与单位

陕西省粮油科学研究院、西安市产品质量监督检察院。

1.5 主要工作过程

1.5.1 标准预研

组织植物油企业相关人员及邀请行业专家对本标准制定的目的、意义与该项标准有关的国内外状况，标准的主要技术要素及参数进行论证。陕西师范大学组织成立了标准编制工作组，制定了标准编写方案，明确任务职责，确定标准制定技术路线。

1.5.2 标准起草

根据标准预研的结果，组成起草工作组进行起草准备工作，包括资料收集，国内外状况分析，样品分析测定，必要的实验验证等，依据国家标准的编写规则起草标准及标准编制说明。

1.5.3 征求意见和审查

社会公开征求意见，对征集的意见进行形成《征求意见汇总处理表》，并根据意见修改；由学会组织相关专家成立标准技术审查专家组，进行审查。

1.5.4 标准审批会

学会对团体标准报批材料进行形式审查和审批。

标准编写原则和确定标准主要内容的依据。

1.6 起草人员任务分工

主要起草人：李建科、张玉环、雷亚楠、吴丽华、孟永宏、武利梅、龚珊、王峰。

起草人员负责标准制定工作的组织、协调，相关资料的查阅、收集，标准文本及编制说明的起草、撰写，组织召开多次研讨会，通过电子邮件、传真等方式，征集、整理和归纳相关的意见和建议。

2 编制原则

本标准符合国家法律、法规和政策，遵循经济社会发展需求原则、技术先进和经济合理原则、适应贸易全球化需求原则、维护公众利益原则、协商一致原则、广泛参与和公开透明原则、有利于技术进步和经济发展的原则，并引入国家、行业相关标准，结合食品快速检测需要实际的原则：技术先行、经济合理、切实可行的原则。

本标准的编写规则是按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的要求进行。

3 主要内容

本标准主要规定了植物中邻苯二甲酸酯类塑化剂纸基比色智能手机读卡方法检测的适用范围、原理、检测设备、样品前处理及检测程序、检测条件优化、线性范围及检测限、方法准确性及重复性、方法特异性验证等内容。本标准包括 R 值读卡检测法和基于 Python 语言的塑化剂浓度检测系统（PDCS）智能读卡检测法。

3.1 适用范围

本标准适用于各种植物油中 DEHP 含量的快速检测。

3.2 规范性引用文件

无

R 值读卡检测法

3.3 方法原理

本检测方法采用智能手机纸基比色技术，将纳米金作为显色探针，将塑化剂适配体作为塑化剂的特异性识别因子，以提升该检测方法的灵敏度和选择性。具体检测原理如下：纳米金在不同离散条件下由于局域表面等离子共振效应会导致溶液颜色发生变化，这是比色检测方法的基础。当纳米金胶体暴露于一定浓度的 NaCl 溶液时，纳米金表面的双电层被破坏，其稳定性显著降低，从均匀分散状态转变为聚集状态，同时溶液颜色从红色变为蓝色。若在体系中加入适量的对塑化剂具有特异性识别作用的 DNA 适配体，由于纳米金对适配体的吸附，纳米金胶体稳定性增强，在相同浓度的 NaCl 溶液诱导条件下纳米金胶体仍然保持红色。在加入目标物塑化剂后，塑化剂分子与适配体发生特异性结合，竞争性争夺纳米金表面吸附的适配体，降低纳米金胶体对 NaCl 溶液的稳定性，胶体颜色由红色变成蓝色，颜色变化程度可由 RGB 颜色模型中的 R 值表示，R 值大小与塑化剂含量呈负相关函数关系。以纸芯片为显色基底，采用手机软件读取纸芯片颜色信息，获取 R 值并根据函数关系计算得到浓度数值，实现对 DEHP 含量的快速检测。

3.4 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DEHP检测技术进行研究，设计出纸基比色智能手机读卡法。检测所用试剂和设备主要包括滤纸条、纳米金、塑化剂的适配

体、NaCl 溶液、智能手机、安装Colorassist软件，可直接读取图片的R、G、B数值。

3.5 样品前处理及检测程序

样品制备：植物油样品于 4 ℃冰箱保存，测试时可以直接取样称量。

样品提取液制备：本标准参考 LS/T 6131 粮油检验 植物油中邻苯二甲酸酯类化合物的测定。准确称取样品 1 g±0.01g 于具塞玻璃试管中，准确加入 5 mL 二甲基亚砜，涡旋振荡 1 min，于 4000 r/min 下离心 3 min，收集上清液。重复提取 1 次，合并上清液待测，提取液置于 4 ℃ 冰箱中避光保存，5 天内测定。

纳米金溶液的制备：用柠檬酸钠还原法制备纳米金：将 50 mL 1 mmol/L $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 加入 100 mL 水中，加热至 70 ℃，在搅拌条件下，迅速加入 5 mL 38.8 mmol/L 柠檬酸钠溶液，持续加热 20 min 后，将溶液缓慢冷却至室温，将纳米金储存在棕色试剂瓶中，置于 4℃ 冰箱冷藏备用。

DEHP 标准曲线测定法检测步骤：在滤纸条上滴加 5 μL 纳米金，再滴加 5 μL 300 nmol/L DEHP 适配体，5 min 后，滴加 10 μL 不同浓度的 DEHP 标准工作液，孵育 5 min，滴加 5 μL 50 mmol/L NaCl 溶液，显色后用智能手机拍照，用 Colorassist 软件读取图片的 R 值，确定 DEHP 标准工作液浓度与 R 值之间的线性关系。

样品中 DEHP 含量的测定：在滤纸条上滴加 5 μL 纳米金，再滴加 5 μL 300 nmol/L DEHP 适配体，5 min 后，滴加 10 μL 样品提取液，反应 5 min，滴加 5 μL 50 mmol/L NaCI 溶液，显色后用智能手机拍照，根据标准曲线计算出 DEHP 浓度。重复检测两次，以两次测量的平均值作为最终测定结果。

3.6 检测条件优化

3.6.1 NaCl溶液浓度的优化

在所设计的纸基比色智能检测方法中，NaCl 浓度对 AuNPs 的团聚有重要影响。NaCl 浓度对 AuNPs 体系的 R 值的影响如图 1 所示。结果表明，随着 NaCl 浓度从 0 mmol/L 增加至 50 mmol/L，体系的 R 值由 144 显著降低至 90。当 NaCl 浓度进一步增大，R 值的变化则趋于平坦，这表明 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时，已使体系中的 AuNPs 发生明显团聚，故选择 50 mmol/L 的 NaCl 用于后续检测。

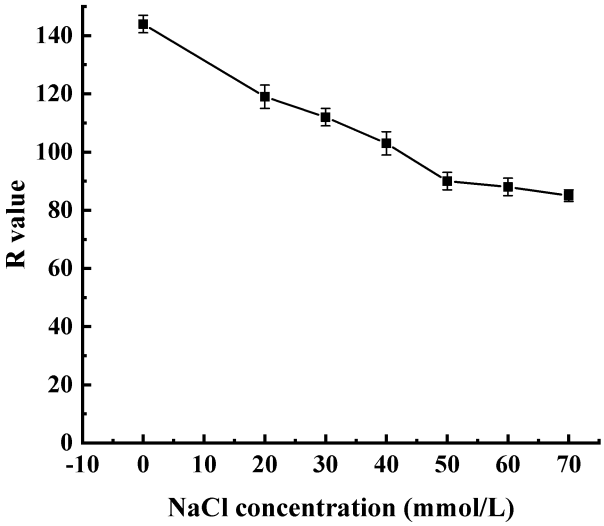

图1 不同NaCl浓度下AuNPs的R值变化

3.6.2 适配体浓度的优化

适配体浓度对快速检测的灵敏性与稳定性有重要影响。DEHP 适配体浓度对体系 R 值的影响如图 2 所示。结果表明，当 DEHP 适配体浓度从 0 nmol/L 增加至 300 nmol/L，体系的 R 值从 82 增加至 91，随着适配体浓度的进一步增大，体系的 R 值显著增加。这是由于，低浓度的 DEHP 适配体不足以保护 AuNPs，所以 AuNPs 在 NaCl 溶液诱导下仍然产生聚集，故体系的 R 值相对较小。当增加 DEHP 适配体浓度后，有利于保护 AuNPs 避免盐诱导聚集，故体系的 R 值显著增加。DEHP 适配体达到 300 nmol/L 时，吸附于 AuNPs 表面的适配体趋于饱和，继续增加 DBP 适配体浓度后，溶液中游离的适配体增加并与目标物 DEHP 结合，故从 AuNPs 表面脱落与目标物结合的适配体数量越少，AuNPs 表面剩余的适配体相对较多，有助于粒子稳定性的保持，即使在 NaCl 的作用下，AuNPs 发生团聚的程度相对减小，体系颜色从红色到蓝色的变化较弱，导致检测限较高。因此，DEHP 适配体的最佳浓度为 300 nmol/L。

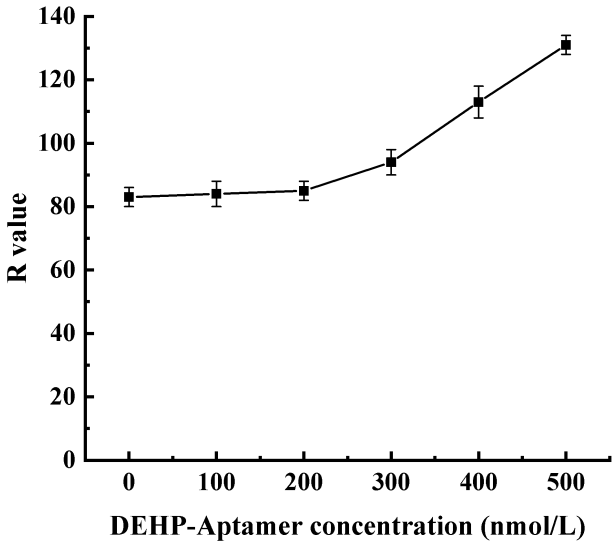

图2 不用DEHP适配体浓度对体系R值的影响

3.6.3 NaCl孵育时间的优化

NaCl 与体系的孵育时间会影响 AuNPs 聚集，故在优化的 NaCl 及适配体浓度的基础上，研究 NaCl 的孵育时间对 DEHP 体系 R 值的影响，结果如图 3 所示。结果表明，随着样品体系与 NaCl 孵育时间的延长，体系的 R 值逐渐减小，随后变化趋缓。表明随着作用时间的延长，AuNPs 的团聚程度增加，孵育 5 min 时大部分 AuNPs 可形成团簇。故后续试验中 NaCl 与体系孵育时间定为 5 min。

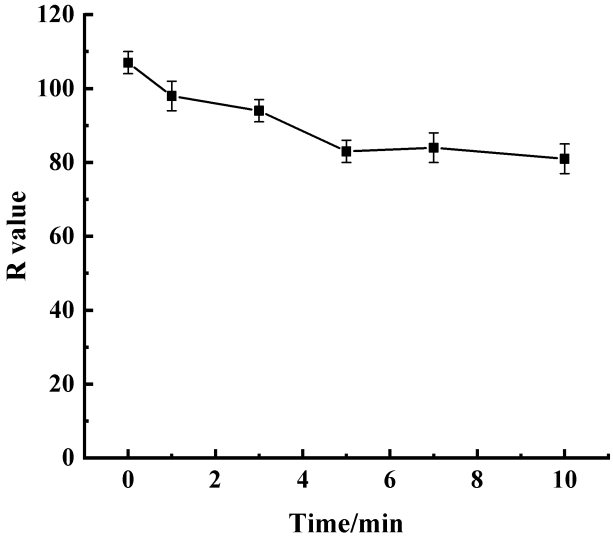

图3 NaCl孵育时间对DEHP体系R值的影响

3.6.4 线性范围及检测限

配制 0.00 mg/mL、0.05 mg/mL、0.10 mg/mL、0.15 mg/mL、0.20 mg/mL、0.25 mg/mL 的 DEHP 标准工作液，显色后用智能手机拍照，并读取图片的 R 值。以智能手机读取图片的 R 值为纵坐标(Y)，DEHP 标准溶液的浓度为横坐标(X)，绘制标准曲线，如图 4。结果汇

总列于表 2。选取橄榄油、山茶油各三份，并按照本标准进行样本处理和检测。检测限=3S_b/S，S_b 为空白样品的标准偏差，S 为校准曲线的斜率。DEHP 的检出限为 0.0069 mg/mL。

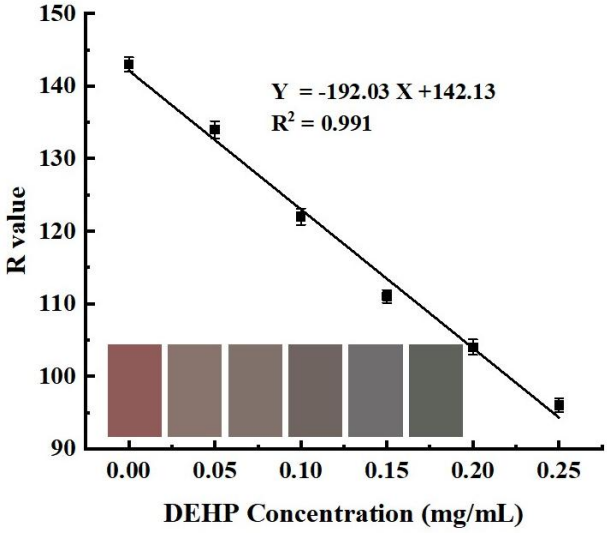

图4 DEHP标准曲线谱图

表2 方法的线性范围及检出限

待测物	线性范围 (mg/mL)	线性方程	相关系数 (r)	方法检出限 (mg/mL)
DEHP	0~0.25	y=-192.03x+142.13	0.991	0.0069

3.6.5 方法准确性与精密度

选取橄榄油、山茶油样品，添加 3 个浓度水平的 DEHP 标准溶液，每个浓度水平做 3 个平行，进行回收率实验，结果见表 3。结果显示，DEHP 的回收率在 81.3%～87.6%之间，DEHP 的相对标准偏差（relative standard deviation, RSD）均小于 5%，表明方法的良好的准确性和精密度。

表 3 橄榄油和山茶油加标回收率及精密度（n=3）

测试样品	添加量(mg/mL)	测得量(mg/mL)	平均回收率(%)	RSD(%)
橄榄油	0	ND	-	-
	0.1	0.078～0.085	81.7	4.30
	0.15	0.128～0.135	87.6	2.67
	0.2	0.163～0.171	83.2	2.50
山茶油	0	ND	-	-
	0.1	0.079～0.086	83.0	4.34
	0.15	0.124～0.133	85.8	3.50
	0.2	0.159～0.168	81.3	2.90

3.6.6 方法特异性验证

为验证本方法的特异性，我们选用其他邻苯二甲酸酯类塑化剂，邻苯二甲酸二甲酯（dimethyl phthalate, DMP）、邻苯二甲酸二乙酯（diethyl phthalate, DEP）和 DINP，作为对照进行分析。如图 5 所示，只有检测 DEHP 时，R 值会有明显的下降，而该方法检测 DMP、DEP、DINP 和 DBP 时其 R 值没有明显的变化。表明该方法具有较好的选择性，可用于 DEHP 的特异性检测。

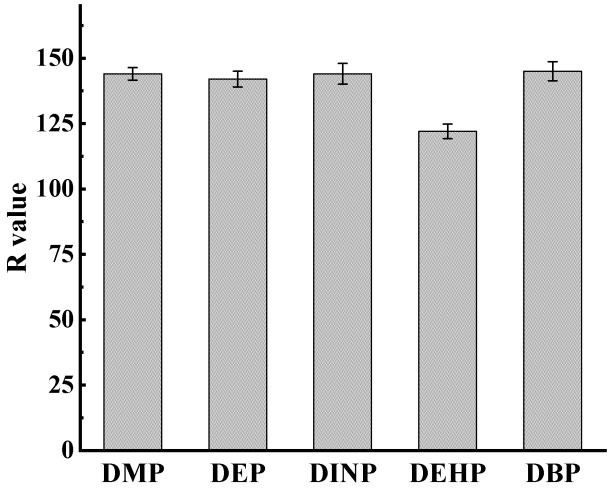

图5 智能手机比色传感器检测DEHP的特异性评估

PDCS 软件智能读卡检测法

3.7 方法原理

纳米金在不同离散条件下由于局域表面等离子共振效应会导致溶液颜色发生变化，这是比色检测方法的基础。当纳米金胶体暴露于一定浓度的 NaCl 溶液时，纳米金表面的双电层被破坏，其稳定性显著降低，从均匀分散状态转变为聚集状态，同时溶液颜色从红色变为蓝色；若在体系中加入适量的对塑化剂具有特异性识别作用的 DNA 适配体，由于纳米金对适配体的吸附，纳米金胶体稳定性增强，在相同的 NaCl 浓度诱导条件下纳米金胶体仍然保持红色。在加入目标物塑化剂后，塑化剂分子与适配体发生特异性结合，竞争性争夺纳米金表面吸附的适配体，降低纳米金胶体对 NaCl 溶液的稳定性，胶体颜色由红色变成蓝色，颜色变化程度可由 RGB 颜色模型中的 R 值表示，R 值大小与塑化剂含量呈线性相关函数关系。基于该原理开发基于 Python 语言的塑化剂浓度检测手机软件-PDCS，该软件可读取纸芯片显色基底的色值信息，直接输出 DEHP 浓度，实现 DEHP 含量的快速检测。

3.8 检测设备

检测所用试剂和设备主要包括滤纸条、纳米金、塑化剂的适配体、NaCl 溶液、智能手机、根据上述R值读卡检测法取得的标准曲线（3.6.4）为依据自主开发的PDCS软件，PDCS软件可自动识别显色位点的颜色信息，提取R值，并转化为DEHP浓度数值输出。

3.9 样品前处理及检测程序

试样制备：植物油样品于 4 ℃冰箱保存，测试时可以直接取样称量。

样品提取液制备：称取样品 1 g±0.01g 于具塞玻璃试管中，加入 5 mL 二甲基亚砜，涡旋振荡 1 min，于 4000 r/min 下离心 3 min，收集上清液。重复提取 1 次，合并上清液待测，提取液置于 4 ℃ 冰箱中避光保存，5 天内测定。

纳米金溶液的制备：用柠檬酸钠还原法制备纳米金：将 50 mL 1 mmol/L $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 加入 100 mL 水中，加热至 70 ℃，在搅拌条件下，迅速加入 5 mL 38.8 mmol/L 柠檬酸钠溶液，持续加热 20 min 后，将溶液缓慢冷却至室温，将纳米金储存在棕色试剂瓶中，置于 4℃ 冰箱冷藏备用。

检测步骤：在滤纸条上滴加 5 μL 纳米金，再滴加 5 μL 300 nmol/L DEHP 适配体，5 min 后，滴加 10 μL 样品提取液，反应 5 min，滴加 5μL 50 mmol/L NaCl 溶液，显色后用智能手机拍照，利用 PDCS 读取数据，输出 DEHP 浓度。重复检测两次，以两次测量的平均值作为最终测定结果。

3.10 检测条件优化

PDCS 智能读卡检测法的检测条件优化与上述 3.6.1-3.6.4 的操作一致。

3.11 方法准确性与精密度

选取橄榄油、山茶油样品，添加 3 个浓度水平的 DEHP 标准溶液，每个浓度水平做 3 个平行，进行回收率实验，结果见表 4。结果显示，DEHP 的回收率在 82.5%～84.2%之间，DEHP 的 RSD 均小于 5%，表明方法的良好的准确性和精密度。

表 4 橄榄油和山茶油加标回收率及精密度（n=3）

测试样品	添加量(mg/mL)	测得量(mg/mL)	平均回收率(%)	RSD(%)
橄榄油	0	ND	-	-
	0.1	0.081～0.087	83.7	3.65
	0.15	0.122～0.129	83.6	2.80
	0.2	0.161～0.169	82.5	2.42
山茶油	0	ND	-	-
	0.1	0.079～0.084	82.0	3.23
	0.15	0.124～0.131	84.2	3.19
	0.2	0.161～0.173	82.6	4.03

4 标准实施建议

建议标准实施前有 6 个月以上的实施前的宣贯培训期、缓冲期和过渡准备时间。

5 标准知识产权说明

本标准涉及一项基于 Python 语言的塑化剂浓度检测系统的软著作权，未涉及除本课题研究成果之外的其它知识产权。

6 重大意见分歧处理

无

7 其他应予说明的事项

无

8 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

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，填补植物油中邻苯二甲酸酯类塑化剂快速检测方法的空白，所涉及的引用标准均为本行业现行有效的国家标准及行业标准。与相关法律、法规、规章及相关标准协调一致，没有冲突。

陕西师范大学

2022 年 11 月 28 日