中国粮油学会团体标准

食用油中苯并[α]芘的测定 酶联免疫吸附定量法

编制说明

起草小组

2024 年 2 月

《食用油中苯并[α]芘的测定 酶联免疫吸附定量法》编制说明

一、工作简况：任务来源、目的意义、国内外相关标准情况、主要工作过程、标准主编单位和参编单位、人员及分工等。

（一）任务来源

任务来源于中粮油学发〔2023〕90号《关于发布中国粮油学会2023年团体标准立项公告的通知》

（二）目的意义

苯并[a]芘危害大、超标事件频发、亟需建立高灵敏快速检测技术标准加强监管。苯并[a]芘具有很强的致癌性、致畸性，是Ⅰ类致癌物，易致肝癌。我国食用油中苯并[a]芘污染范围广、程度重，严重影响食品安全及人民群众生命健康。食用油中苯并[a]芘超标事件频发，2010年，金浩茶油苯并[a]芘超标6倍，被污染茶油达42.458吨；2021年，广西山茶油苯并[a]芘超标24.8倍（248 μg/kg)。植物油脂企业生产规模小、分散经营，难以承担高额确证性检测费用，迫切需要快速检测技术方法标准。研究食用油中苯并[α]芘的测定酶联免疫吸附定量法，规范我国植物油脂生产、流通与消费，为我国植物油脂消费安全和产品出口提供检测技术支撑。国内外尚无食用油中苯并[α]芘的酶联免疫吸附定量标准，迫切需要研究建立本标准，为食用油质量安全提供关键标准支撑。

（三）国内外相关标准情况

现行有效的苯并[a]芘检测标准有GB 5009.27-2016《食品安全国家标准 食品中苯并(a)芘的测定》、GB 5009.265-2021《食品安全国家标准 食品中多环芳烃的测定》、DB 61/T 967-2015《植物油中苯并[a]芘的测定 液相色谱-荧光检测法》、DB 13/T 5189.7-2020《天然植物提取物中危害成分检测 第7部分：天然番茄红中苯并[a]芘的测定》、KJ201910《食用油中苯并(a)芘的快速检测 胶体金免疫层析法》。现有标准的技术方案主要是高效液相色谱（HPLC）法，测定结果准确、稳定。但需要大型精密仪器设备，程序繁、耗时长、费用高，对操作人员要求较高，不能满足现场高灵敏、快速、低成本的检测需求。KJ201910是定性检测，且市场缺少相应产品。目前，市场亟需食品中苯并[a]芘的快速检测产品及相应标准。通过制定磁微粒化学发光法检测食品中苯并[a]芘，能帮助推动我国食用油、畜禽肉、乳制品等产品质量安全生产，有效保障食品安全，为粮油畜禽产业高质量发展提供技术支撑。制定《食品中苯并[a]芘的测定 磁微粒化学发光法》标准是从源头上实现高效监管的基础和有效抓手，保证食品消费安全

的重要技术支撑。

（四）主要工作过程

前期工作，提案和立项。2023 年 5 月-2023 年 12 月，由中国农业科学院油料作物研究所、武汉轻工大学、武汉华美维士康生物工程有限公司成立标准工作组，启动《食用油中苯并[a]芘的测定 酶联免疫吸附定量法》制定工作。工作组通过调查研究，收集相关技术资料，确定标准框架和编写原则，完成标准初稿。向归口单位提交立项申请，并开展项目立项专家论证。开展征求意见。2024 年 1 月-2024 年 3 月，工作组就标准草案进行讨论完善后形成征求意见稿，并向相关单位征求意见。

（五）标准主编单位和参编单位

标准主编单位：中国农业科学院油料作物研究所

标准参编单位：武汉轻工大学、武汉华美维士康生物工程有限公司

（六）人员及分工等

吴文琴，中国农业科学院油料作物研究所，助理研究员，负责研究相关技术，起草标准、验证、征求意见等工作。

张兆威，中国农业科学院油料作物研究所，研究员，负责统筹标准起草、验证、征求意见等工作。

胡小风，中国农业科学院油料作物研究所，助理研究员，负责协助验证、征求意见等工作。

李培武，中国农业科学院油料作物研究所，研究员，负责指导标准研制工作。

张奇，中国农业科学院油料作物研究所，研究员，负责指导验证、征求意见等相关工作。

唐晓倩，中国农业科学院油料作物研究所，副研究员，负责研究快速检测质量关键控制点。

王督，中国农业科学院油料作物研究所，副研究员，负责研究快速检测质量关键控制点。

何东平，武汉轻工大学，教授，负责研究建立相关规范。

华权高，武汉华美维士康生物工程有限公司，董事长，负责技术规范验证。

二、标准编制原则和确定标准的主要内容(如技术指标、参数公式、性能、要求、实验方法、检验规则等)的论据:

（一）标准编制原则

本标准按照 GB/T 1.1—2020 给出的规则起草。

（二）确定标准的主要内容

1 主要内容

1.1 适用范围

本标准规定了酶联免疫吸附定量法测定油脂中苯并[a]芘含量的原理、试剂、仪器、试样制备、操作步骤、结果表示和精密度等。试样经正己烷稀释，分子印迹小柱提取并净化，浓缩至干，甲醇溶解并稀释后通过酶联免疫吸附定量法测定，利用抗原抗体特异性结合的免疫反应进行定量检测。

本标准适用于大豆油、菜籽油、花生油等食用油中苯并[a]芘的测定。

1.2 主要原理

本方法采用免疫竞争法原理。试样经正己烷稀释，分子印迹小柱提取并净化，浓缩至干，甲醇溶解并稀释后通过酶联免疫吸附定量法测定，利用抗原抗体特异性结合的免疫反应进行定量检测。

1.3 性能及评价

本标准苯并[ａ]芘的检出限为 4.0 μg/ kg。

方法定量范围为 4-108 μg/kg。

2 前处理条件的优化

2.1 取样量的优化

对食用油取样量进行优化，以大豆油、菜籽油、花生油为例，研究部分实验结果见表 1。

取样量为 1 g 时，3 次重复检测结果的相对标准偏差（RSD%）分别为 3.84%、1.97%、5.88%，显著低于取样量为 0.2 g、0.4 g 时 3 次重复检测结果的相对标准偏差，与取样量为 1.5 g 和 2.0 g 时 5 次重复检测结果的平均值和相对标准偏差均无显著差异，相对标准偏差在 10%以内，重复性符合检测要求。综合考虑取样的代表性、前处理时间和试剂用量等因素，选择最佳取样量为 1 g.

表 1　食用植物油取样量对样品检测结果重复性的影响

样品	取样量 g	检测结果，μg/kg			平均值 μg/kg	相对标准偏差 %
		1	2	3		
大豆油（8.0）	0.2	4.34	8.8	6.41	6.52	34.25
	0.4	7.76	9.9	8.25	8.64	12.98
	1.0	8.36	8.31	8.9	8.52	3.84

样品	取样量 g	检测结果，μg/kg			平均值 μg/kg	相对标准偏差 %
		1	2	3		
	1.5	10.13	9.58	8.53	9.41	8.64
	2.0	8.76	10.22	9.42	9.47	7.72
菜籽油（9.0）	0.2	7.38	6.56	9.69	7.88	20.61
	0.4	7.45	9.56	6.94	7.98	17.40
	1.0	9.21	8.98	8.86	9.02	**1.97**
	1.5	8.23	9.46	9.79	9.16	8.98
	2.0	9.66	8.07	8.87	8.87	8.97
花生油（6.0）	0.2	4.23	3.28	5.66	4.39	27.29
	0.4	5.98	4.32	5.03	5.11	16.30
	1.0	6.03	6.41	5.70	6.05	5.88
	1.5	6.02	6.22	5.79	6.01	3.58
	2.0	6.55	5.41	5.99	5.98	9.53

2.2 提取溶剂选择和用量

2.2.1 提取溶剂选择

测定大豆油、菜籽油和花生油等食用植物油中苯并[a]芘，主要使用的提取溶剂有：甲醇、乙腈、正己烷、环己烷。其中，甲醇和乙腈提取时油样分散不均匀，正己烷和环己烷可以是液态样品分布均匀，正己烷与环己烷相比，正己烷更加环保，考虑到检测方法的适用性和环境友好性，选择提取溶剂为正己烷。

2.2.2 提取溶剂量优化

选择大豆油、菜籽油和花生油为例，分别用正己烷 1.0 mL、3.0 mL、5.0 mL、8 mL 和 10.0 mL 提取，进行 5 次重复实验，比较不同正己烷用量的提取效果。主要实验结果见表 2。

表 2　提取溶剂量对样品检测结果重复性的影响

样品（加标浓度 μg/kg）	正己烷用量									
	1.0 mL		3.0 mL		5.0 mL		8 mL		10.0 mL	
	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
大豆油	42.9	19.7	68.0	16.3	77.1	6.3	90.4	9.8	99.1	6.5

（8.0）										
菜籽油（9.0）	50.2	25.4	72.8	18.4	78.6	7.2	82.7	10.1	81.4	8.7
花生油（6.0）	45.9	20.4	70.1	15.8	76.4	5.9	81.8	6.6	83.9	9.8

从表 2 可看出，提取大豆油、菜籽油和花生油样品，随着正己烷用量增大，提取越完全，正己烷超过 8.0 mL 后检测结果无显著差异，考虑绿色环保及节约试剂，因此，选择 8.0 mL 的正己烷作为提取溶剂。

2.3 提取方式、时间选择

选择大豆油、菜籽油和花生油为例，采用旋涡混合、振摇提取和超声波提取 3 种提取方式，比较不同的提取时间对检测结果影响。

不同提取方式、不同提取时间效果比较：

采用旋涡混合、振摇提取和超声波提取 3 种提取方式，分别在 0.5 min、1 min、5 min、10 min、20 min 提取时间下对大豆油、菜籽油和花生油进行 5 次重复检测，实验结果见表 3 所示。

结果表明：样品采用旋涡混合方式提取 0.5 min 时检测回收率符合要求，且检测回收率数值随提取时间增加区别不大。此外，大豆油、菜籽油和花生油样品用振摇提取、超声波提取与旋涡混合提取对比，区别不大。因此为了操作更简易、食用植物油样品采用旋涡混合方式提取 0.5 min。

表 3　不同提取方式、不同提取时间条件下提取效果比较

提取方式	提取时间	样品（加标浓度 μg/kg）		
		大豆油（8.0）	菜籽油（9.0）	花生油（6.0）
旋涡提取方式(测试回收率%)	0.5 min	86.1	91.2	82.1
	1 min	82.3	87.7	88.7
	5 min	90.1	84.3	89.3
	10 min	87.7	98.3	90.3
	20 min	85.2	80.9	89.6
振摇提取方式(测试回收率%)	0.5 min	81.1	94.6	100.3
	1 min	87.6	89.0	98.2

	5 min	88.8	88.9	90.9
	10 min	82.5	100.2	89.7
	20 min	100.7	83.9	80.5
25℃超声波提取方式(测试回收率%)	0.5 min	72.3	70.9	78.3
	1 min	79.6	70.7	79.5
	5 min	74.5	80.9	80.4
	10 min	81.2	90.9	88.2
	20 min	87.9	86.3	89.6
40℃超声波提取方式(测试回收率%)	0.5 min	83.3	82.0	80.2
	1 min	85.2	81.3	79.6
	5 min	87.6	89.6	80.5
	10 min	99.8	80.3	83.4
	20 min	90.1	101.9	87.6
50℃超声波提取方式(测试回收率%)	0.5 min	82.3	89.0	80.4
	1 min	82.4	80.9	88.6
	5 min	81.6	88.5	89.1
	10 min	83.9	86.8	90.9
	20 min	90.9	94.06	92.7
70℃超声波提取方式(测试回收率%)	0.5 min	83.5	80.5	80.3
	1 min	80.8	85.0	88.7
	5 min	84.9	94.0	86.5
	10 min	91.0	94.3	84.2
	20 min	100.9	97.2	88.4

2.4　苯并[a]芘分子印迹柱净化条件优化

2.4.1 净化柱选择

净化柱净化效果如表 4 所示，从净化时流速、复溶后复溶液的澄清度、已经准确度等方面进行综合考虑，其中净化柱 3#净化时流速较快，不费时，复溶后复溶液较澄清，且测试结果的相对标准偏差为 3.14%,低于另外几种净化柱，因此选择净化柱 3#为最优净化柱进行后续实验。

表 4　不同净化效果比较

样品	净化柱	流速	复溶	检测结果 μg/kg			平均值 μg/kg	相对标准偏差 %
				重复 1	重复 2	重复 3		
大豆油	净化柱 1#	慢	澄清	12.13	12.58	10.04	11.58	11.70
	净化柱 2#	快	浑浊	8.90	8.50	9.78	9.06	7.23
	净化柱 3#	快	澄清	11.22	11.35	11.90	11.49	3.14
	净化柱 4#	慢	澄清	11.92	12.29	11.09	11.77	5.22
	净化柱 5#	快	浑浊	6.14	4.36	3.92	4.81	24.46

2.4.1　活化柱子溶剂及用量选择

测定大豆油、菜籽油和花生油等食用植物油中苯并[a]芘，主要使用的分子印迹活化柱子的溶剂有：二氯甲烷、正己烷、甲醇、乙腈。其中，二氯甲烷对苯并[a]芘的溶解度高于乙腈、甲醇和正己烷，因此首先选用二氯甲烷第一次活化柱子，洗去分子印迹模板分子中残留的物质。其次，选用甲醇、乙腈、正己烷来第二次活化柱子，洗去残留的二氯甲烷，由于大豆油、菜籽油和花生油等食用植物油中苯并[a]芘的提取液为正己烷，为了衔接样品提取液的净化，第二次的活化溶液选择正己烷。

常用的分子印迹柱是 6 mL 规格，为了尽可能洗去分子模板残留，将活化阶段分别加入 3 mL、5 mL、7 mL、10 mL（超过 5 mL 加 2 次）测试结果如表 5 所示，加入 7 mL 时测试结果回收率在 80-120%范围，加入满足要求，加入 3 mL、5 mL 时的回收率高于 120%，可能是分子印迹柱中含有残留的苯并[a]芘分子，加入 10 mL 的结果与 7 mL 溶剂活化对测试结果没有差异，因此选用 7 mL 的二氯甲烷和 6 mL 正己烷作为活化溶剂。

表 5　活化柱子溶剂及用量选择效果比较

样品	加标浓度 (μg/kg)	测试回收率%			
		3 mL	5 mL	7 mL	10 mL
大豆油	8.0	127.5	129.6	95.6	94.5
菜籽油	9.0	137.2	129.5	90.6	93.3
花生油	6.0	129.4	122.2	89.9	90.0

2.4.2　淋洗柱子溶剂及用量选择

由于大豆油、菜籽油和花生油等食用植物油中苯并[a]芘的提取液为正己烷，正己烷还可以稀释脂溶性样品，为了衔接样品提取液的净化，淋洗柱子的溶剂选择正己烷。正

己烷淋洗用量效果见表 6 所示。当加入 1 mL、3 mL 正己烷时，样品淋洗不干净，有杂质残留，最终导致测试结果假阳，回收率高于 120%，当正己烷的用量加大到 6 mL 时，测试回收率满足要求。考虑试剂成本等因素，最终选用 6 mL 正己烷作为净化时的淋洗液。

表 6　淋洗柱子溶剂用量效果比较

样品	加标浓度 (μg/kg)	测试回收率%			
		1 mL	3 mL	6 mL	10 mL
大豆油	8.0	136.6	124.8	95.9	90.5
菜籽油	9.0	132.8	128.3	94.5	95.3
花生油	6.0	129.6	124.8	96.6	94.3

2.4.3　洗脱溶剂及用量选择

由于苯并[a]芘易溶于苯、甲苯、二甲苯、丙酮、乙醚、氯仿、二甲基亚砜等有机溶剂，但这些试剂都是管控试剂，有毒有害，难以采购；二甲基亚砜沸点高，作为洗脱溶剂时不能吹干，因此这些试剂都不适合作为洗脱溶剂。苯并[a]芘在二氯甲烷中的溶解度高于甲醇、乙腈等试剂，且易挥发，因此选用二氯甲烷作为洗脱溶剂。

二氯甲烷洗脱溶剂用量效果见表 7 所示。当加入 1 mL、3 mL 二氯甲烷时，样品洗脱不完全，回收率低，当二氯甲烷的用量加大到 6 mL 时，测试回收率满足要求。考虑试剂成本等因素，最终选用 6 mL 二氯甲烷作为净化时的洗脱液。

表 7　洗脱溶剂用量效果比较

样品	加标浓度 (μg/kg)	测试回收率%			
		1 mL	3 mL	6 mL	10 mL
大豆油	8.0	70.7	75.2	86.8	85.4
菜籽油	9.0	70.0	76.5	90.3	89.7
花生油	6.0	69.6	78.8	89.6	90.6

2.4.4 二氯甲烷洗脱液挥干方式选择

净化洗脱后的二氯甲烷，分别采用氮吹装置、恒温装置、常温静置等 3 种方式，进

行 5 次重复实验，比较挥干方式对检测结果影响。部分实验结果见表 8。

表 8　不同挥干方式对测定结果的影响

样品名称	浓度(μg/kg)	氮吹装置，40 ℃			恒温装置，40℃			常温静置		
		回收率（%）	RSD%	耗时min	回收率（%）	RSD%	耗时min	回收率（%）	RSD%	耗时min
大豆油	8.0	86.6	9.0	3-5	91.5	9.5	3-5	80.2	6.6	5-10
菜籽油	9.0	83.3	9.9	3-5	88.1	7.5	3-5	89.1	7.9	5-10
花生油	6.0	82.2	10.2	3-5	89.4	9.3	3-5	89.9	9.6	5-10

由表中大豆油、菜籽油和花生油样品的苯并[a]芘测定结果和相对标准偏差可以看出：三种挥干方式所得检测结果无显著差异，且相对标准偏差均能满足检测重复性要求。耗时上氮吹装置和恒温装置耗时较短，但恒温装置无需专门氮气和专用装置，适合现场快速检测，因此，选择恒温装置挥干。

2.4.5 挥干后重新溶解溶剂选择

提取二氯甲烷层挥干后，分别 1.0 mL 甲醇、1.0 mL 乙腈、1.0 mL 二甲基亚砜和 1.0 mL 水重新溶解，进行 5 次重复实验，比较挥干方式对检测结果影响。部分实验结果见表 9。

由表中大豆油、菜籽油和花生油样品的苯并[a]芘测定结果和相对标准偏差可以看出：不同重新溶解溶剂中，1.0 mL 甲醇和 1.0 mL 乙腈重新溶解后测得结果回收率和相对标准偏差能满足检测重复性要求，1.0 mL 二甲基亚砜回收率偏高，可能是溶解了部分杂质进去，1.0 mL 水样为未检出，这是因为苯并[a]芘不溶于水的缘故。考虑溶剂与试剂盒中抗原抗体的亲和性，最终选择用 1.0 mL 甲醇作为重新溶解溶剂。

表 8　不同重新溶解溶剂对测定结果的影响

样品名称（加标浓度μg/kg）	1mL 甲醇		1mL 乙腈		1mL 二甲基亚砜		1mL 水	
	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
大豆油（8.0）	885	6.9	81.0	8.4	132.1	8.9	未检出	/
菜籽油（9.0）	90.2	7.7	90.4	9.2	120.9	8.3	未检出	/
花生油	92.5	9.2	86.9	9.0	124.6	11.9	未检	/

（6.0）							出	

3 稀释溶液及比例的优化

3.1 稀释溶液选择

选择大豆油、菜籽油和花生油等样品，分别采用 10%DMSO、10% 甲醇水、10% 甲醇水+两亲试剂、缓释液作为稀释液，并进行 5 次重复实验，比较稀释液对检测结果的影响。部分实验结果见表 10。

由表中数据可知，采用缓释液稀释，其 RSD 值均优于其它几种溶液。

表 10　稀释液对检测结果的影响

样品名称（加标浓度μg/kg）	10%DMSO		10% 甲醇水		10% 甲醇水+两亲试剂		缓释液	
	测定平均值	RSD%	测定平均值	RSD%	测定平均值	RSD%	测定平均值	RSD%
大豆油（8.0）	9.28	22.06	7.4	15.63	9.28	10.15	8.06	5.25
菜籽油（9.0）	10.69	23.57	8.67	16.12	9.48	9.78	8.89	4.32
花生油（6.0）	7.34	19.26	5.2	16.03	7.83	11.23	6.01	8.65

3.2 稀释液比例选择

苯并[a]芘酶联免疫吸附试剂盒中抗体对提取溶液中有机溶剂浓度的耐受能力小于 35%，且在反应中，基质效应对检测效果和结果的重复性均有影响，因此，待测液中有机溶剂的浓度是影响检测结果的重要因素。选择大豆油、菜籽油和花生油等样品，使用缓释液以不同比列稀释样品净化后溶液，进行 5 次重复实验，比较稀释比例对检测结果影响。部分实验结果见表 11。

由表中数据可知：当稀释比例从 1:1 至 1:9 逐渐增大时，检测结果的相对标准偏差较大，重复性较差；当稀释比例为 1:9 时相对标准偏差降低，重复性较好。从 1:9 至 1:14 逐渐增大时，检测结果的相对标准偏差增大，重复性较差。这是由于在稀释比列为 1:1 时，待测液中甲醇浓度大于苯并[a]芘检测装置中的要求，使检测靶标分布不均匀或弥

散，造成结果重复性差；在稀释比例为 1:9 时，由于稀释比例的增大，降低了基质干扰，降低了相对偏差和提高了结果的重复性；当稀释比例太高时，有机相浓度减小，苯并[a]芘溶解度降低，结果重复性差因此选择稀释比例为 1:9。

表 10 稀释液比例对检测结果影响

浓度 μg/kg）	稀释比例									
	1:1		1:4		1:9		1:12		1:14	
	测定平均值	RSD%	测定平均值	RSD%	测定平均值	RSD%	测定平均值	RSD%	测定平均值	RSD%
大豆油（8.0）	4.9	18.9	7.3	14.0	8.1	10.2	7.1	13.2	6.2	22.0
菜籽油（9.0）	7.7	17.3	8.2	10.8	9.2	6.4	8.5	18.2	7.5	27.5
花生油（6.0）	5.1	20.2	5.6	12.1	6.1	8.8	5.8	15.4	4.9	21.6

4 试剂和材料

4.1 标准溶液配制及标准曲线的绘制

苯并[a]芘标准品（$C_{20}H_{12}$，CAS 号：50-32-8）：纯度≥99.0%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

警告———苯并[a]芘是一种已知的致癌物质，测定时应特别注意安全防护！测定应在通风柜中进行并戴手套，尽量减少暴露。如已污染了皮肤，应采用 10%次氯酸钠水溶液浸泡和洗刷，在紫外光下观察皮肤上有无蓝紫色斑点，一直洗到蓝色斑点消失为止。

4.1.1 苯并[a]芘标准储备液(100 μg/mL)：

准确称取苯并[a]芘标准品 1 mg（精确到 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲苯溶解，定容。溶液转移至试剂瓶中后，在-20 ℃下避光保存，保存期 1 年。临用前通过液相或液质测试进行浓度校准。

4.1.2 苯并[a]芘标准中间液(1.0 μg/mL)：

吸取 0.10 mL 苯并[a]芘标准储备液（100 μg/mL），用乙腈定容到 10 mL。避光保存在 0℃~5℃的冰箱中，保存期 1 个月。

4.1.3 苯并[a]芘标准工作液及标曲的建立：

准确吸取苯并[a]芘标准中间液（1.0 μg/mL），配制浓度范围分别为：0.2 μg/mL，

0.6 μg/mL，1.8 μg/mL，5.4 μg/mL，16.2 μg/mL 的系列标准品。标准曲线中每个浓度点重复 3 次，以系列标准工作液被测组分的浓度为横坐标、以 Logit(OD 值)为纵坐标，绘制标准曲线。标准曲线如下图所示，y=-2.63x+1.3，R^2=0.9984。

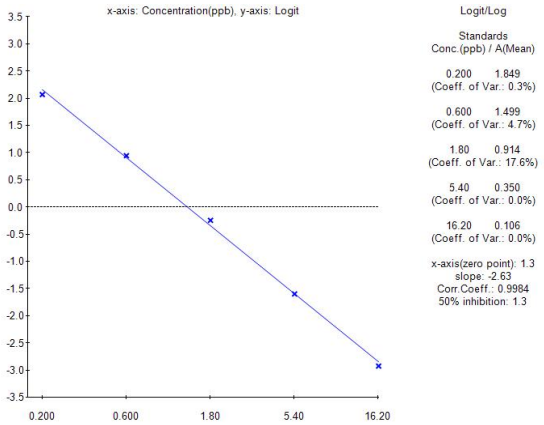

图 1 标准曲线图

4.2 试样溶液的测定

将待测液在便携 ELISA 测定仪上进行测定，得到苯并[a]芘的 OD 值。根据标准曲线计算待测液中苯并[a]芘的浓度。

4.3 结果计算

样品中苯并[a]芘的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \quad (1)$$

式中：

X ——试样中苯并[a]芘的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

ρ ——待测液中苯并[a]芘含量的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——样品测定液体积的数值,单位为毫升(mL)；

f ——在前处理过程中的稀释倍数；

m ——试样的称样量，单位为克（g）；

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

5 方法性能评估

准确性评价：结合样本的参考浓度，对结果的准确性进行评价；精密度评价：选取同一样本平行重复试验，对结果的精密度进行评价

苯并（α）芘测试样品共计 8 个：

（1）大豆油：DDY1（0.75 μg/kg）、DDY2（3.58 μg/kg）、DDY3（9.45 μg/kg）、DDY4

（21.30 μg/kg）

（2）菜籽油：CZY1（1.49 μg/kg）、CZY2（6.25 μg/kg）、CZY3（10.95 μg/kg）、CZY4（20.65 μg/kg）

（3）花生油：HSY1（2.46 μg/kg）、HSY2（6.33 μg/kg）、HSY3（9.28 μg/kg）、HSY4（20.12 μg/kg）

5.1 准确度测定

标准起草小组将苯并（α）芘测试样品进行测定，测定结果与参考浓度进行比较，评价方法测定准确度。测试结果如表 11 所示，RSD 在 5.0%-9.8%之间，说明该方法准确度较好。

表 11 苯并（α）芘样品测定结果

样品名称	测定值/μg/kg（3 次重复）			平均值/μg/kg	相对标准偏差（RSD）%
DDY1	未检出	未检出	未检出	未检出	/
DDY2	4.39	3.98	3.87	4.08	6.7
DDY3	8.52	8.88	10.11	9.17	9.1
DDY4	16.55	18.22	18.99	17.92	7.0
CZY1	未检出	未检出	未检出	未检出	/
CZY2	5.28	5.06	4.36	4.90	9.8
CZY3	10.62	9.23	9.04	9.63	9.0
CZY4	14.38	14.93	15.87	15.06	5.0
HSY1	未检出	未检出	未检出	未检出	/
HSY2	6.03	6.23	6.55	6.27	4.18
HSY3	9.18	9.15	9.38	9.24	1.35
HSY4	20.22	21.19	18.87	20.09	5.80

5.2 重现性测定

在同一时间对大豆油阴性和阳性样品分别进行了 5 次重复测定，以考查方法的重复性，实验数据见表 13。由表数据可见，5 次测定相对标准偏差在 5.4%以内，没有出现假阴性和假阳性，表明方法重复性好，能满足食用油中苯并[a]芘的快速测定的重复性要求。

表 13 苯并（α）芘重复性测定结果

样品名称	测量值/ μg/kg					平均值/μg/kg	相对标准偏差（RSD）
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5		
DDY1	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	/	/
DDY3	7.91	7.06	7.02	7.17	7.65	7.36	5.4%

5.3 日内重复性、日间再现性测定

对大豆油、菜籽油、花生油分别进行了 5 次日内重复性测定，以考查方法的日内重复性，实验数据见表 14。由表数据可见，5 次测定相对标准偏差在 4.68％以内，表明方法重复性好，能满足食用油中苯并[a]芘的快速测定的重复性要求。

表 14 苯并（α）芘日内重复性

样品	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	平均值（μg/kg）	RSD%
DDY3	9.43	9.13	9.24	9.58	9.02	9.28	2.43
CZY3	10.94	10.36	10.9	10.87	10.76	10.77	2.20
HSY3	9.28	9.21	9.15	9.04	10.13	9.36	4.68

此外，对大豆油、菜籽油、花生油分别进行了 10 天日间再现性测定，以考查方法的日间再现性，实验数据见表 15。由表数据可见，10 天内测定相对标准偏差在 15％以内，表明方法日间再现性好，能满足食用油中苯并[a]芘的快速测定的再现性要求。

表 15 苯并（α）芘日间再现性

样品	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 8 天	第 10 天	平均值（μg/kg）	RSD%
DDY3	9.43	9.36	9.42	8.78	8.99	9.20	3.20
CZY3	10.94	10.88	10.66	9.5	9.48	10.29	7.19
HSY3	9.28	9.25	10.43	11.33	11.53	10.36	10.47

日间再现性 RSD 小于 9%，满足现场快检需求

5.4 检出限

根据 GB/T 5009.1－2003 （附录 A 检验方法中技术参数和数据处理），检出限计算见公式（2）：

$$L = \frac{X_1 \times \overline{X_i}}{b} \times \frac{k_s}{b} \qquad (2)$$

式中：

L ——方法检出限；

X_L ——全试剂空白响应值；

$\overline{X_i}$ ——测定 n 次空白溶液的平均值（ n≥20 ）；

b ——单位标准溶液峰面积响应值；

S ——n 次空白值的标准偏差；

Ks ——一般为 3。

标准起草小组分别对大豆油、菜籽油和花生油等空白样品进行了 20 次重复实验，用便携式酶标仪读取了 OD 值，将 OD 值，带入标准曲线方程，20 次测定结果的标准偏差的 3 倍所对应的浓度即为检出限。

大豆油、菜籽油和花生油等样品 20 次重复测定结果中苯并[a]芘酶联免疫吸附定量法的检出限为：4.01-4.21 μg/kg。

5.5 实验室内比对验证

标准起草小组在不同时间先后 5 批次对加标的大豆油、菜籽油和花生油等样品的苯并[a]芘进行了测定，以考查方法的再现性，实验数据见表 16。

表 16　苯并芘检测技术实验室内比对验证

检测对象	回收率（%）	不同样品、不同人、不同地点批间 CV（%）	同样品、不同地点批内 CV（%）	累计人次
苯并[α]芘	81.91%-116.64%	7.30%-14.7%	2.61%-6.36%	29

由表数据可见，先后 5 批次，累计 29 人次的比对验证结果显示，测试回收率（%）为 81.91%-116.64%，不同样品、不同人、不同地点批间 CV（%）为 7.30%-14.7%，小于 15%，同样品、不同地点批内 CV（%）为 2.61%-6.36%。表明方法再现性好，能满足食用油中苯并[a]芘测定的再现性要求。

5.6 实验室间再现性

为检验本标准测定食品中苯并[a]芘含量的实验室间再现性，由湖北省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、湖北省粮油食品质量监督检测中心、油料所等 3 家实验室对大豆油、菜籽油和花生油等食品样品中苯并[a]芘进行了比对检测，检测结果汇总见表 17；由表数据可见，3 家验证单位，累计 13 人次的比对验证结果显示，测试回

收率（%）为84.38%-119.47%，不同样品、不同人、不同地点批间CV（%）为5.71%-14.91%，小于15%，同样品、不同地点批内CV（%）为5.67%-6.24%。表明方法再现性好，能满足食用油中苯并[a]芘测定的再现性要求。

验证汇总结果表明，制定的食品中苯并[a]芘的测定重复性好，再现性强，不同单位（操作环境）和不同操作人员应用，均能得到抑制的检测结果，可用于现场食品中苯并[a]芘筛查检测。

表17　苯并芘检测技术实验室间比对验证

检测对象	回收率（%）	不同样品、不同人、不同地点，批间CV（%）	同样品、不同地点，批内CV（%）	累计人次
苯并[α]芘	84.38%-119.47%	5.71%-14.91%	5.67%-6.24%	13

三、主要试验、验证结果，预期的经济效果

（一）主要试验、验证结果

1、方法验证方案

选择有资质的验证单位，向单位提供方法草案、验证方案、标准溶液和验证报告格式。验证单位按照方法草案在规定时间内完成验证工作并反馈验证结果。

2、验证方案

定量限：分别取6份大豆油、菜籽油和花生油空白样品，加入4.0 μg/kg标样，经前处理后酶联免疫吸附定量法测定并计算平均值和相对标准偏差。

精密度：分别取6份大豆油、菜籽油和花生油空白样品，加入6.0 μg/kg、20.0 μg/kg标样，进行精密度测定，经前处理后酶联免疫吸附定量法测定并计算平均值和相对标准偏差。

准确度：分别取6份大豆油、菜籽油和花生油空白样品，加入6.0 μg/kg、20.0 μg/kg标样，进行准确度测定，经前处理后酶联免疫吸附定量法测定并计算回收率。

3 方法验证结论

定量限：4.0 μg/kg加标样品,经处理后进行测定，大豆油、菜籽油和花生油的平均回收率为92.8%、104.6%、91.3%；相对标准偏差为12.6%，9.4%,13.2%。

精密度：6.0 μg/kg、20.0 μg/kg加标样品,经处理后测试大豆油、菜籽油和花生油时的相对标准偏差分别为5.3%、6.9%、3.8%。

准确度：6.0 μg/kg、20.0 μg/kg加标样品,经处理后测定大豆油、菜籽油和花生油时的平均回收率分别为92.6%、97.3%、97.8%。

（二）预期的经济效果

1、促进油料油脂产业发展。我国现有油脂生产经营企业 2.7 万家，其中规模化生产企业 1600-1800 家，每家规模化企业相关检测设备成本约 300-500 万元，据专家预测，通过该标准及技术的实施，仅配套仪器设备实现 30%的迭代，产值可达 78 亿元，给企业节约成本，促进了油脂企业行业发展。

2、为食用油苯并[α]芘等政府监管提供关键技术支撑，保护消费者利益。该标准及检测技术的建立可实时监测粮油中苯并[a]芘污染状况，可在食用油流通的各个环节随时随地进行苯并[ａ]芘监控，将极大降低苯并芘超标的食用油流向市场。实现早预警、早阻控对保障粮油安全以及人民生命健康具有重要意义。

四、标准涉及的相关知识产权说明

不涉及专利，不是由地标或其他标转化。

五、采用国际标准的程度及水平，与现行有关法律法规和强制性标准的关系

不采用国际标准。

参考国家标准：GB2762—2022《食品安全国家标准 食品中污染物限量》中食用油中苯并芘的限量值选择设置加标浓度点。

六、重大意见分歧的处理（包括处理过程、依据和结果。）

无重大意见分歧。

七、其它应予说明的事项。

无

《食用油中苯并[α]芘的测定 酶联免疫吸附定量法》团体标准起草组

2024 年 2 月 20 日