ICS 67. 200. 10

CCS X14

团　　体　　标　　准

T/CCOA xx—20xx

食用油中辣椒素的测定
时间分辨荧光免疫层析法

Determination of capsaicin in edible oil

Time- resolved fluorescent immunochromatographic method

（征求意见稿）

20xx-xx-xx 发布　　20xx-xx-xx 实施

中国粮油学会　发布

前　　言

本文件按照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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国粮油学会提出。

本文件起草单位：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。

本文件主要起草人：李培武、张兆威、胡小风、吴文琴、王督、何东平、华权高、张奇、唐晓倩、姜俊、马飞、汪雪芳。

食用油中辣椒素的测定

时间分辨荧光免疫层析法

1 范围

本文件描述了时间分辨荧光免疫层析法测定食用油中辣椒素的方法。

本文件适用于大豆油、菜籽油、花生油等食用油中辣椒素的测定。

本文件辣椒素的检出限为0.4 μg/ kg。方法定量范围为0.4-12.5 μg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中辣椒素与铕乳胶标记的特异性抗体发生结合后，抑制了层析过程中抗体与硝酸纤维素膜检测线上辣椒素-BSA 偶联物的免疫反应，使检测线时间分辨荧光强度降低，通过检测时间分辨荧光强度变化进行定量测定。

5 试剂

5.1 水，按照 GB/T 6682 中的要求，二级。

5.2 甲醇（CH_3OH）。

5.3 氯化钠（NaCl）。

5.4 牛血清白蛋白（BSA）．纯度大于 98%。

5.5 吐温－20（$C_{58}H_{114}O_{26}$）。

5.6 二氯甲烷（CH_2Cl_2）。

5.7 石油醚：沸程 60～90 ℃。

5.8 氢氧化钠（NaOH）。

5.9 浓硫酸（H_2SO_4）。

5.10　pH 试纸：0～14。

5.11　铕标记辣椒素抗体溶液。

5.12　辣椒素标准液：准确称取辣椒素 2.5 mg 于 25 mL 容量瓶中，甲醇定容，配置成 100 μg/L 的溶液。-20℃保存 7 天，备用。

5.13　2%NaOH 溶液：称取 20 g NaOH（5.8）溶于 1000 mL 水中，摇匀备用。

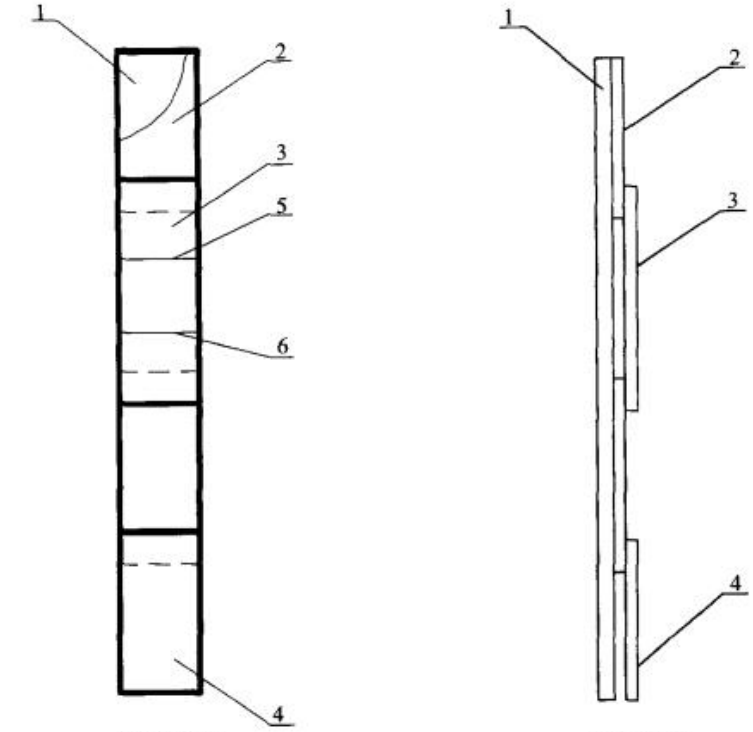
5.14　稀硫酸（1+15）溶液：取 10 mL 浓硫酸（5.9）缓缓倒入 150 mL 水中，备用。

5.15　天然辣椒素（$C_{18}H_{27}NO_3$，CAS 号：404-86-4）：纯度≥98%，或经过国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

6　仪器设备与材料

6.1　时间分辨荧光检测仪：激发波长（365±5） nm ，检测波长（615±5） nm。

6.2　辣椒素时间分辨荧光免疫层析装置：固定有辣椒素-BSA 偶联物，用于样品中辣椒素与铕标记抗体预反应后再与辣椒素-BSA 偶联物反应的载体（见图 1）。



(a)正视图　　(b)侧视图

说明：

1——底板；

2——吸水垫；

3——硝酸纤维素膜；

4——样品垫；

5——质控线；

6——检测线。

图 1 辣椒素免疫层析装置示意图

6.2.1　辣椒素-BSA 偶联率为 1:5~1:20（BSA：辣椒素）。

6.2.2　样品垫：玻璃纤维、酯纤维或纸质薄片。

6.2.3　硝酸纤维素膜：4 cm 毛细时间不小于 135 s。

6.2.4　吸水纸。

6.2.5　底板。

6.2.6　连接胶带。

6.3　离心机：4000r/min。

6.4　分析天平：感量 0.01 g。

6.5　恒温装置：温控范围为（37.0 士 2.0）℃。

6.6　漩涡混匀仪。

6.7　微量移液器：10 μL~200 μL,100 μL~1000 μL。

6.8　量筒：10 mL。

6.9　辣椒素抗体溶液包被微孔：取 150 μL 铕标记辣椒素抗体溶液，冻干备用。

6.10　滤膜：0.22 μm，水系。

6.11　注射器：2 mL。

6.12　手持读数仪。

6.13　耗材：枪头、离心管、50mL 量筒、计时器等。

7　分析步骤

7.1　用 10 mL 离心管称取 2.00±0.01 g 食用油，然后使用滴管在分析天平（6.4）上称取 2.65±0.03 g 二氯甲烷加入其中。

7.2　用移液枪准确加入 2mL 试剂 2%NaOH 溶液（5.13），漩涡混匀仪（6.6）充分提取 5min（注意：保证上下充分混匀），以 4000 g 的转速离心 3min。

7.3　用移液枪缓慢取上清液 1.5 mL 加入至含 0.28 g NaCl（5.2）的 10 mL 离心管内（注意：尽量避免取到分层界面处杂质），充分涡旋混匀至试剂 NaCl（5.2）全部溶解。

7.4　使用注射器吸取全部液体过 0.22 μm 水系滤膜净化后，移液枪取净化后 1 mL 液体至 10 mL 离心管内，再加入 200 μL 稀硫酸（1+15）溶液（5.14）混匀。

7.5　使用滴管称在分析天平（6.4）上取 1.29±0.02 g 石油醚（沸程 60-90ºC）加入其中后混匀 1 分钟，静置分层。

7.6　使用滴管称在分析天平（6.4）上称取 0.64±0.01 g 石油醚上清液至 10 mL 离心管内氮吹/空气吹干后，加入 150 μL 纯水涡旋充分混匀 1 分钟，取 100 μL 用试纸条检测。

7.7　取待测液（7.6）100 μL 垂直滴加于冻干微孔中（6.9），缓慢吸打 5 次以上使充分混匀，37℃反应 5 min 后将试纸条按箭头方向插入微孔中，盖上孵育器盖子，37℃再反应 5 分钟后取出试纸条，用纸巾吸干样品垫残留液体，立即使用手持读数仪（6.12）判读结果。

7.8　标准曲线。用制备好的辣椒素加标的食用油系列梯度阳性样本（0.5 μg/kg，1.5 μg/kg，2.5 μg/kg，5 μg/kg，7.5 μg/kg，10 μg/kg，12.5 μg/kg）作为标准曲线建立的样本。由低浓度到高浓度进行检测，根据检测线 T 信号值与质控线 C 信号值的比值（T/C）和标准工作溶液浓度的自然对数值（Inc）建立标准曲线。

8　结果表示

试样中辣椒素含量以质量分数 X 计，数值以微克每千克（μg/kg）表示，按式（1）计算。

$$X = \frac{\rho \times V \times n}{m}$$

式中：

ρ—从标准曲线上查得的测定液中辣椒素含量的数值，单位为纳克每毫升（mg/mL）；

V—样品测定液体积的数值，单位为毫升（mL）；

n—试样稀释倍数的数值；

m—试样质量的数值，单位为克（g）。

计算结果保留至小数点后两位。

9　精密度

9.1　重复性

在重复性条件下辣椒素含量不大于 10.0 μg/kg 时，两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 20%；辣椒素含量大于 10.0 μg/kg 时，两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 15%。

9.2　再现性

在再现性条件下，辣椒素含量不大于 10.0 μg/kg 时，两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 30%；辣椒素含量大于 10.0 μg/kg 时，两次独立测定结果的绝对差不得超过算数平均值的 20%。