ICS 67. 200. 10

CCS X14

团　　体　　标　　准

T/CCOA xx—20xx

食用油中苯并[a]芘的测定
酶联免疫吸附定量法

Determination of benzo[a]pyrene in edible oil

Enzyme-linked immunosorbent assay

（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、吴文琴、张兆威、胡小风、张奇、唐晓倩、王督、何东平、华权高。

食用油中苯并[a]芘的测定

酶联免疫吸附定量法

1 范围

本文件规定了酶联免疫吸附定量法测定食用油中苯并[a]芘的原理、试剂、仪器、试样制备、分析步骤、结果计算和精密度等。

本文件适用于大豆油、菜籽油、花生油等食用油中苯并[a]芘的测定。

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

GB/T 5524 动植物油脂 扦样

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 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对苯并[ａ]芘含量进行测定。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用的试剂均为分析纯，试剂配制用水为GB/T 6682规定的二级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲苯（C_7H_8）：色谱纯。

5.1.2 乙腈（C_2H_3N）：色谱纯。

5.1.3 二氯甲烷（CH_2Cl_2）：色谱纯。

5.1.4 正己烷（C_6H_{14}）：色谱纯。

5.1.5 甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

5.1.6 样本稀释液：由酶联免疫吸附定量检测试剂盒配套提供，或根据产品说明书配制。

5.2 标准品

苯并[a]芘标准物质的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子质量见表1，纯度不小于99.0%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

表 1 苯并[a]芘标准物质中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子质量

中文名称	英文名称	CAS登录号	分子式	相对分子质量
苯并[a]芘	Benzo(a)pyrene	50-32-8	$C_{20}H_{12}$	252.32

警示——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。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 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。

5.3.2 苯并[a]芘标准中间液(1.0 μg/mL)：吸取 100 μL 苯并[a]芘标准储备液(100 μg/mL)，用乙腈定容到 100 mL。此溶液密封后避光－20 ℃下保存，3 个月有效。

5.3.3 苯并[a]芘标准工作液：把苯并[a]芘标准中间液（1.0 μg/mL）用甲醇稀释得到浓度为 0.2 μg/mL, 0.6 μg/mL, 1.8 μg/mL, 5.4 μg/mL, 16.2 μg/mL 的标准品，临用现配。

5.4 材料

5.4.1 苯并[a]芘分子印迹柱：500 mg，6 mL。使用前依次用7 mL二氯甲烷及6 mL正已烷活化。

5.4.2 苯并[a]芘酶联免疫吸附定量检测试剂盒：需冷藏储存，具体储存条件参照使用说明书。

6 仪器

6.1 分析天平：感量为 0.01 g 和 0.00001 g。

6.2 移液器：10 μL，100 μL，1 mL。

6.3 漩涡混匀仪。

6.4 氮气或空气吹干装置（带温度控制）。

6.5 恒温震荡孵育器。

6.6 酶标测定仪。

7 试样制备与保存

7.1 制样

样品按照GB/T 5524进行扦样和取样。

7.2 保存

试样于（0～4）℃冰箱中避光保存。

8 分析步骤

使用不同厂商的试剂盒，在样品提取和测定的操作方面可能略有不同，应该按照供应商所提供的操作说明书要求进行操作。

警示——整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光（直射阳光）、具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中，实验废弃物应按照接触有毒物的要求分类存放。

8.1 样本前处理

8.1.1 **样本稀释：**称取 1 g（精确到 0.01 g）试样，加入 8 mL 正己烷，待净化。

8.1.2 **提取并净化：**将待净化液转移进已活化柱子，待液面降至柱床时，用 6 mL 正己烷淋洗柱子，弃去流出液。用 6 mL 二氯甲烷洗脱并收集净化液到试管中。将净化液在 40 ℃下氮气或空气吹干，准确吸取 1 mL 甲醇涡旋复溶 0.5 min。准确吸取 50 μL 复溶液，加入 450 μL 样本稀释液中涡旋混匀 0.5 min 供酶联免疫吸附法分析测定。

8.2 试样溶液的测定

将待测液在酶标测定仪上使用苯并[a]芘酶联免疫吸附定量检测试剂盒进行测定，通过孵育、清洗、显色、终止反应读数得到苯并[a]芘的浓度。

9 结果计算

样品中苯并[a]芘的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \tag{1}$$

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。

10 精密度

10.1 重复性

在重复性条件下，两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

10.2 再现性

在再现性条件下，两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 25%。

11 检出限与线性范围

本文件方法苯并[a]芘的检出限是4.0 μg/ kg，线性范围4-108 μg/kg。