附件10

食用油中苯并（a）芘的快速检测

胶体金免疫层析法

（征求意见稿）

1. 范围

本方法规定了食用油中苯并（a）芘的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于食用油中苯并（a）芘的快速测定。

1. 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中的苯并（a）芘经提取后与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制抗体和试纸条或检测卡中检测线（T线）上抗原的结合，从而导致检测线颜色深浅的变化。通过检测线与控制线（C线）颜色深浅比较，对样品中苯并（a）芘进行定性判定。

1. 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的二级水。

* 1. 试剂
		1. 正己烷：色谱纯。
		2. 乙腈：色谱纯。
		3. 二甲基亚砜（DMSO）。
		4. NaH2PO4•2H2O。
		5. Na2HPO4•12H2O。
		6. 氯化钠。
		7. 吐温-20。
		8. 氢氧化钠溶液（2 mol/L）：称取80g氢氧化钠用水溶解，并定容至1L。
		9. PBST溶液：称取0.2965g NaH2PO4•2H2O、2.9g Na2HPO4•12H2O、8.76g氯化钠与0.55g吐温-20用水溶解并定容至1L。
	2. 参考物质

苯并（a）芘参考物质的中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子质量见表1，纯度均≥95%。

表1 苯并（a）芘参考物质中文名称、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 | C20H12 | 252.32 |

注：或等同可溯源物质。

* 1. 标准溶液的配制

苯并（a）芘标准储备液（0.1 mg/mL）：精密称取苯并（a）芘标准品（3.2）适量，置于10 mL容量瓶中，用乙腈（3.1.2）溶解并稀释至刻度，摇匀，制成浓度为0.1 mg/mL的苯并（a）芘标准储备液；或可直接购买苯并（a）芘标准储备液。0 ℃~5 ℃避光保存备用，有效期1年。

* 1. 材料

苯并（a）芘胶体金免疫层析试剂盒，适用基质为食用油。

3.4.1金标微孔（含胶体金标记的特异性抗体）。

3.4.2 试纸条或检测卡。

1. 仪器和设备
	1. 移液器：100µL、1 mL、5mL和10mL。
	2. 涡旋混合器。
	3. 离心机：转速≥4000 r/min。
	4. 电子天平：感量为0.01 g。
	5. 氮吹仪或空气吹干仪（带温度控制）。
2. 分析步骤
	1. 试样制备

取适量有代表性样品充分混匀。

* 1. 试样提取和净化除脂

称取10g油样于离心管中，加入5mL 正己烷（3.1.1）和15mL DMSO（3.1.3）并混合均匀。漩涡振荡2min，然后4000 r/min离心2min。弃去上层正己烷层。加入5mL 正己烷（3.1.1），漩涡振荡30s，然后4000 r/min离心30s。弃去上层正己烷层。加入10mL 氢氧化钠溶液（2 mol/L）（3.1.8）和15mL正己烷（3.1.1），漩涡振荡30s，然后4000 r/min离心30s。吸取上层正己烷层于15mL离心管，4000 r/min离心2min。取全部正己烷层于氮吹管中，50℃氮吹或空气吹10min，吹干后加入200μL DMSO（3.1.3）复溶，混合均匀，此为待测液。

* 1. 测定步骤

 打开试纸筒，取出所需数量的红色反应微孔（取出微孔后，立即盖好桶盖，以防受潮）。往微孔中加入200μL的PBST溶液，再加入50μL待测液，上下抽吸5-10次至微孔试剂混合均匀，室温（20-25℃）反应7min。将已做好标记的试纸条插入至上述红色微孔中，使样品垫充分进入样品中，并计时7min。从微孔中取出试纸条，弃去试纸条下端的样品垫，进行结果判定。

* 1. 质控试验

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

* + 1. 空白试验

称取空白试样，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

* + 1. 加标质控试验

准确称取空白试样（精确至0.01g）置于玻璃试剂瓶中，加入一定体积的苯并（a）芘标准储备液（0.1mg/mL）（3.3.1），使试样中苯并（a）芘浓度为10μg/kg，按照5.2和5.3步骤与样品同法操作。

1. 结果判定方式

由于长时间放置会引起质控线（C线）与检测线（T线）颜色的变化，需在规定时间内进行结果判定。试纸条与检测卡如图1所示。结果判定也可根据产品说明书进行。

* 1. 读数仪测定结果

通过读数仪对结果进行判读，根据不同厂家仪器规定进行判读。

无效：质控线（C线）不显色，无论检测线（T线）是否显色，均表示实验结果无效。

阳性：若检测结果显示“+”（阳性），表示试样中含有待测组分且其含量大于等于方法检出限。

阴性：若检测结果显示“-”（阴性），表示试样中不含待测组分或其含量低于方法检出限。

* 1. 目视判定

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。

无效：质控线（C线）不显色，无论检测线（T线）是否显色，均表示实验结果无效。

阳性：质控线（C线）显色，若检测线（T线）不出现或出现但颜色浅于质控线（C线），表示试样中含有待测组分且其含量高于方法检出限，判为阳性。

阴性：质控线（C线）显色，若检测线（T线）颜色深于或等于质控线（C线），表示试样中不含待测组分或其含量低于方法检出限，判为阴性。

* 1. 质控实验要求

空白试验测定结果应为阴性，加标质控试验测定结果应为阳性。

C

T

S

C

S

T

C

T

S

C

T

S

C

T

S

C

T

S

加样孔

无效

阴性

阳性

B．检测卡

吸水纸

NC膜

样品垫

无效

阴性

阳性

C线

T线

A．试纸条

图1目视判定示意图

1. 结论

当检测结果为阳性时，应对结果进行确证。

1. 性能指标
	1. 检测限：10μg/kg。
	2. 灵敏度：≥95%。
	3. 特异性：≥85%。
	4. 假阴性率：≤5%。
	5. 假阳性率：≤15%。

注：性能指标计算方法参见附录A。

1. 其他

本方法分析步骤和结果判定可以根据厂家试剂盒的说明书进行，但应符合或优于本方法规定的性能指标。

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不做限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前，须对其进行考察，应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比标准为GB 5009.27-2016《食品安全国家标准 食品中苯并（a）芘的测定》。

本方法使用试剂盒可能与苯并（a）蒽、苯并（b）荧蒽、苯并（e）芘、苯并（j）荧蒽等物质存在交叉反应，当结果判定为阳性时应对结果进行确证。

附录A

定性方法性能计算表

表A.1性能指标计算方法

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品情况a** | **检测结果b** | **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+N21 | N.2=N12+N22 | N=N1.+N2.或N.1+N.2 |
| 显著性差异（χ2） | χ2=（|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，%c | （N11+N22）/(N1.+N2.) |
| 注：a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。b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.表示所有的第一行，N.2表示所有的第二列；N12表示第一行，第二列。C为方法的检测结果相对准确性的结果，与一致性分析和浓度检测趋势情况综合评价。 |

本方法负责起草单位：广东省食品检验所。

验证单位：成都市食品药品检验研究院、中国农业科学院油料作物研究所。

本方法主要起草人：熊含鸿、王立亚、简德威、陈思敏、雷毅