

响应面法优化花生中黄曲霉毒素的提取 及其在快检评价中的应用

赵 萍^{1,2}, 张盈月¹, 周家宏³, 陈 飞^{2,3}

(1. 南京师范大学食品与制药工程学院, 江苏 南京 210023)

(2. 南京师范大学南京市特色生物资源功能成分开发工程研究中心, 江苏 南京 210023)

(3. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 采用超声辅助响应面法对花生中黄曲霉毒素(Aflatoxin B1/B2/G1/G2, AFTS)的提取工艺进行优化, 得到最佳提取工艺为 65% 甲醇溶液、超声时间 15 min、超声功率 206 W、料液比 1:4 (g:mL), 利用该工艺, AFTS 的提取量可达 18.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在此最优工艺条件下提取 AFTS, 并结合高效液相色谱(HPLC)—光化学柱后衍生法作为参考方法, 对市场上主流的 8 家黄曲霉毒素 B1 定性试剂盒及 2 家黄曲霉毒素 B1 定量试剂盒进行质量评价方法的验证, 结果表明定性试剂盒检测结果灵敏度为 100%, 特异性 98%, 假阴性率 0, 假阳性率 2%; 定量试剂盒准确度及精密度较高, 线性拟合度均 >0.99 , 可满足检测需求。

[关键词] 响应面设计, 黄曲霉毒素, 快检试剂盒, 评价验证

[中图分类号] TS207.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2022)03-0072-11

Optimization of Extraction of Aflatoxin from Peanuts by Response Surface Methodology and Its Application in Rapid Detection and Evaluation

Zhao Ping^{1,2}, Zhang Yingyue¹, Zhou Jiahong³, Chen Fei^{2,3}

(1. School of Food Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. Nanjing Engineering Research Center for Functional Components Development of Featured Biological Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(3. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: The extraction process of aflatoxin (Aflatoxin B1/B2/G1/G2, AFTS) from peanuts is optimized by ultrasound-assisted response surface method. The optimum extraction process is obtained as follows: 65% methanol solution, ultrasonic time 15 min, ultrasonic power 206 W, and the ratio of material to liquid 1:4. Under this optimal condition, the extraction of AFTS is 18.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The peanut samples are pretreated with the best technology and detected by high performance liquid chromatography (HPLC) with photochemical post-column derivation method, which is used as a reference method to evaluate the quality of the rapid detection kit. There are eight quantitative kits and two qualitative kits popularized in the market to be evaluated and tested. The results show that the sensitivity of the qualitative kit is 100%, that the specificity is 98%, that the false negative rate is 0, and that the false positive rate is 2%. The accuracy and precision of the quantitative kit are high, and the linear fitting degree is more than 0.99, which can meet the detection requirements.

Key words: response surface design, aflatoxin, quick detection kit, evaluation of validation

真菌毒素对粮食的污染在全球范围内都较普遍。据联合国粮农组织统计,全世界每年约有 25% 的粮食受到真菌毒素污染,约有 2% 的农作物因污染严重而失去利用价值。黄曲霉毒素是常见的污染之一。黄曲霉毒素(Aflatoxin B1/B2/G1/G2, AFTS)主要是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)及寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)产生的次生代谢产物。黄曲霉毒素主要污染粮油及其制品,特别是花生和玉米等含水量较高的禾谷类及油料作物^[1],其中黄曲霉毒素 B1 (AFB1)毒性最大,是一种强遗传毒性致癌物。

收稿日期: 2021-10-22.

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项项目(2018YFC1603400)。

通讯作者: 陈飞, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全。E-mail: chenfei@njnu.edu.cn

国际癌症研究机构(IARC)已将 AFB1 和自然发生的 AFTS 混合物归类为第 1 类致癌物质(人类致癌物质;国际癌症研究机构,IARC 1993,2002 年)^[2]。鉴于 AFTS 的强毒性,全球已有 60 多个国家制订了食品和饲料中的 AFTS 限量标准和法规^[3-4]。国际食品法典委员会(CAC)规定,食品中 AFTS 的最大残留限量标准为 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$;欧盟规定直接食用花生中 AFB1 的限量值为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFTS 总和为 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$;美国食品与药物监督管理局(FDA)规定,食品中 AFTS 的限量值为 15.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$;我国标准规定玉米、花生中 AFB1 的限量 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,稻谷、糙米、大米中 AFB1 的限量为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,小麦及其他谷物中 AFB1 的限量为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。相比于发达国家,我国制定的限量标准只对 AFB1 总量作出规定,并无对 AFTS 总量的限制要求^[5]。

随着各种法规所规定的食品和饲料中黄曲霉毒素限量水平的降低,迫切需要开发和验证更可靠的分析方法测定真菌毒素。目前常用的分析技术包括快速筛查和确证定量^[6-10]。快速筛查主要以免疫化学为基础,如酶联免疫吸附测定、胶体金免疫渗滤法、胶体金免疫层析法等,市场上大部分关于真菌毒素的快检产品即基于上述免疫化学技术原理,这些检测方法具有快速、简便、灵敏度高等特点。确证定量主要以色谱技术为基础,如高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法等,色谱类检测结果准确性高、重现性好、灵敏度高,但对设备依赖性强,检测成本高。我国快检技术较起步较晚,技术不成熟,快检产品评价体系不完善,市场上的快检产品良莠不齐,部分产品无法满足标准要求,易出现重复性差、假阴性率高等情况,特别是对复杂基质进行额外处理导致检测过程繁琐且耗时长等缺点,造成对食品安全监管的阻碍^[11]。因此,规范试剂盒的使用,并确保所使用的快检产品符合相关质量管理与质量控制要求,成为了保障食品安全的重点之一。

分析检测在食品安全的控制和管理中起着至关重要的作用,开发改进样品中真菌毒素的提取方法一直是研究的热点,是关系着分析检测能否成功的关键因素^[12-14]。快检产品虽然具有快速、准确、简便、灵敏等特点,可用于粮油产品的质量监控,但市场上仍有部分产品无法满足标准要求,因此在快检产品使用前,有必要应用更为可靠的方法对其进行评价验证。本文提出对参考方法的提取条件利用超声辅助响应面设计的方法进行优化^[15],使样品中的黄曲霉毒素释放更加完全,毒素检测值更接近真实水平,从而提高参考方法的准确度,进一步提高快检试剂盒验证指标的准确性,可用于试剂盒评价。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

去壳花生米(河南兰考);甲醇、乙腈、乙醇(TEDIA,色谱纯);AFB1 标准品溶液、AFTS 混合标准品溶液、AFTS 免疫亲和柱(北京华安麦科生物技术有限公司);AFB1 试剂盒:定性试剂盒 8 家,定量试剂盒 2 家。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪 Agilent 1100(配有荧光检测器)(安捷伦科技有限公司);HF2500 柱后光化学衍生器(北京华安麦科生物有限公司,需另配);SCIENTZ-650E 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);D3024R 高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器有限公司);XH-A 旋涡混合器(南京大学普阳科学仪器研究所)。

1.3 实验方法

1.3.1 黄曲霉毒素的提取

花生去壳后粉碎并过 24 目筛后备用。称取上述花生样品 5 g,根据设计的体积分数及料液比加入溶剂,涡旋混匀,根据设计的不同超声时间及超声功率进行超声破碎,在 8 000 r/min 下离心 10 min,取上清备用。

1.3.2 色谱条件

色谱柱:C18(2.1 mm \times 150 mm;1.7 μm);进样量:20 μL ;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;流动相:甲醇:水=50:50;流速:1.0 mL/min。荧光检测器:激发波长:360 nm;发射波长:440 nm。另配光化学衍生器。

1.3.3 黄曲霉毒素标准溶液的制备

AFTS 标准工作溶液的制备:以浓度为 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AFTS(AFB1:AFB2:AFG1:AFG2=3:1:3:1)混合标准品溶液,溶解于甲醇,分别配制 5.2、13、26、52、104 ng/mL 不同梯度的标准工作溶液。

1.3.4 黄曲霉毒素提取工艺优化

根据相关文献[12,16-19]中关于 AFB1 的提取工艺,选择甲醇、乙腈、乙醇 3 种不同溶剂及 5 种对花生中 AFTS 提取量有较大影响的因素(不同体积分数、料液比、超声时间、超声功率)进行单因素实验。在单

因素实验的基础上,采用 Box-Benhkn Design 中心组合设计响应面法优化 AFTS 的提取工艺.

1.3.4.1 单因素实验

研究不同的溶剂及体积分数(60%甲醇、60%乙腈、60%乙醇;70%甲醇、70%乙腈、70%乙醇;80%甲醇、80%乙腈、80%乙醇)、料液比(1:3,1:4,1:5,1:6,1:7(g:mL))、超声时间(5、10、15、20、30 min)、超声功率(160、180、200、220、240 W)对花生中 AFTS 提取量的影响,重复 3 次,取均值.

1.3.4.2 响应面实验

以单因素实验结果为基础,通过 Design-Expert 11 软件,根据 Box-Benhkn Design 中心组合试验设计原理对花生中黄曲霉毒素提取的溶剂比、料液比、超声时间、超声功率进行实验设计,以 AFTS 提取量为响应值(Y),设计四因素三水平的相应实验,如表 1 所示.

表 1 响应面实验因素及水平				
Table 1 Coded levels and corresponding actual levels of independent variables for response surface experiment				
水平	因素			
	甲醇体积分数 $A/\%$	超声功率 B/W	料液比 $C/(g:mL)$	超声时间 D/min
-1	60	180	1:3	10
0	70	200	1:4	15
1	80	220	1:5	20

1.3.5 参考方法的验证

按照优化后的提取条件进行样品制备,标准工作溶液为 AFB1(浓度分别为 0.5、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0 ng/mL),以标准品浓度为横坐标、峰面积为纵坐标作图,得到标准曲线回归方程.对空白花生进行加标回收实验,加标水平为 10、15、20 $\mu g/kg$,重复 3 次,取均值,计算拟合度 R^2 和加标回收率.

1.3.6 快检试剂盒验证^[20]

根据 GB2761—2017《食品安全国家标准:食品中真菌毒素限量》,花生及其制品中黄曲霉毒素 B1 的限量指标为 20 $\mu g/kg$;将 AFB1 含量>20 $\mu g/kg$ 的样品称为阳性样品,<20 $\mu g/kg$ 的样品称为阴性样品.

1.3.6.1 定性试剂盒验证

实验方法:选择市场上 8 家不同品牌的主流 AFB1 定性试剂盒厂家的产品进行实验,依次编号 1-8,产品基本信息如表 2 所示.根据不同厂家试剂盒的说明书对样品进行相应的前处理,制备阴性样品(加标水平 10 $\mu g/kg$)、阳性样品(加标水平 30 $\mu g/kg$),平行测定 5 次.

验证指标:灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率、符合率.

1.3.6.2 定量试剂盒验证

实验方法:选购市场上两家主流的 AFB1 酶联免疫试剂盒进行评价,编号 A、B,基本信息如表 2 所示.分别评价低(加标水平 10 $\mu g/kg$)、中(加标水平 30 $\mu g/kg$)、高(加标水平 40 $\mu g/kg$) 3 个水平的样品.每个水平制备 2 个样品,每个样品重复测定 3 次,即一个水平的样品重复测定 6 次($n=6$);制备两个空白样品(不加标),每个平行测定 10 次($n=20$).

验证指标:准确度、线性和范围、检测限和定量限、参考方法一致性.

表 2 试剂盒基本信息		
Table 2 Basic information of qualitative & quantitative kits		
厂家编号	检测限/($\mu g/kg$)	检测原理
1	20	竞争抑制胶体金免疫层析技术
2	20	
3	3~5	
4	5~50	
5	5~50	
6	2.5	
7	15~20	
8	5	
A	0.05	竞争 ELSA 方法,通过底物的颜色反应来判定有无相应的免疫反应,颜色反应的深浅与标本中相应抗体或抗原的量呈正比.
B	0.03	

1.4 数据处理

利用 Excel 及 Origin Pro 9.1 软件对实验结果进行分析;采用 Design-Expert 11 软件进行响应面中心组合试验设计,对数据进行回归拟合,作出响应曲面图,并进行线性回归和方差分析. 实验数据均为 3 次平行实验的平均值, $P < 0.05$, 为具有统计学意义的显著差异.

2 结果与分析

对按照 1.3.3 节制备的标准品溶液进行高效液相色谱检测,得到 AFTS 的标准曲线公式为 $y = 79\,768x + 53\,302$, $R^2 = 0.999\,5$.

2.1 单因素实验结果

单因素实验结果如图 1 所示. 由图 1(a)可以观察到,在相同溶剂不同的体积分数下,提取量随着体积分数的增加呈现先上升后下降的趋势,这可能是由于黄曲霉毒素难溶于水,因此有机溶剂体积分数小的提取量低,随着有机溶剂体积分数的增加花生中脂溶性等成分溶出量也会增加,这些成分影响黄曲霉毒素的溶出率,从而导致提取量低^[21]. 因此考虑 60%~80% 的溶剂体积分数为进一步的优化范围. 在相同体积分数下,甲醇、乙腈、乙醇 3 种不同溶剂对黄曲霉毒素的提取量是甲醇>乙腈>乙醇. 综上,选取 60%~80% 的甲醇溶液进行响应面优化实验.

由图 1(b)可以发现,随着料液比的增加,提取量呈现先上升后下降的现象,这可能是随着样品与溶剂的接触面积加大且伴随着溶剂浓度的增加^[22],促使样品中的黄曲霉毒素溶出率增加;增加到一定量后,溶剂趋于饱和,黄曲霉毒素的溶出趋于平衡,提取量几乎不再变化;此时再提高料液比,反而会使样品中其他杂质成分溶出,阻碍了黄曲霉毒素与溶剂的结合,导致提取量降低. 因此,本文选择料液比 1:3、1:4、1:5 (g:mL) 进行响应面优化实验.

由图 1(c)可以发现,随着超声时间增加,黄曲霉毒素提取量呈现先上升后下降趋势. 超声有助于黄曲霉毒素的提取,在一定程度上,超声时间越长,黄曲霉毒素提取量越大;超声时间大于 15 min 后,提取量反而降低,可能是过长的超声时间导致杂质溶出,影响黄曲霉毒素的释放^[23]. 因此,本文选择超声时间 10、15、20 min 进行响应面优化实验.

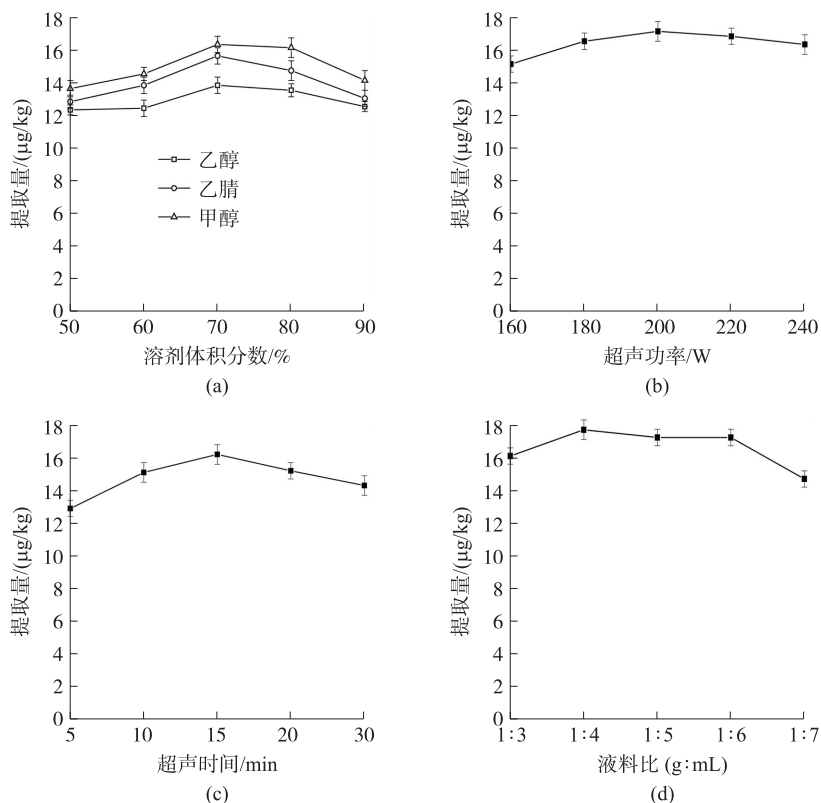


图 1 单因素实验对提取量的影响

Fig. 1 Effect of single factor experiments to extract quantity

由图 1(d)可以发现,黄曲霉毒素提取量随超声功率的加强先增加后减少. 超声有助于黄曲霉毒素的提取,随着超声频率的增加,促进了黄曲霉毒素的溶解,从而提取量增加;当超声功率增加到 220 W 后,提取量反而减少,可能是过高的频率使样品中的其他杂质溶出阻碍了黄曲霉毒素的溶解^[24]. 因此,选取 180、200、220 W 进行响应面优化实验.

2.2 响应面实验结果

根据单因素试验结果确定因素与水平,以黄曲霉毒素提取量为响应值,采用中心组合设计响应面试验优化黄曲霉毒素提取工艺,设计与结果见表 3.

表 3 黄曲霉毒素提取的响应面实验设计与结果
Table 3 Experimental design and results for response surface analysis

实验组	甲醇体积分数 A/%	超声功率 B/W	料液比 C/(g:mL)	超声时间 D/min	提取量 Y/(μg/kg)
1	0	0	1	-1	16.905±0.32
2	1	0	0	-1	17.404±0.43
3	0	0	0	0	17.345±0.38
4	1	-1	0	0	17.065±0.24
5	0	-1	0	1	17.221±0.12
6	-1	0	1	0	16.927±0.27
7	1	1	0	0	17.265±0.23
8	-1	0	0	-1	16.947±0.27
9	0	1	1	0	17.369±0.38
10	0	0	0	0	17.349±0.31
11	1	0	-1	0	17.164±0.14
12	0	1	0	-1	17.487±0.46
13	0	-1	-1	0	17.296±0.23
14	0	0	0	0	17.351±0.40
15	1	0	0	1	17.424±0.38
16	0	-1	1	0	17.508±0.72
17	0	0	-1	-1	17.623±0.68
18	0	1	-1	0	17.314±0.25
19	-1	0	-1	0	17.188±0.19
20	-1	1	0	0	17.310±0.40
21	0	0	0	0	17.369±0.32
22	0	0	0	0	17.202±0.15
23	0	0	-1	1	16.959±0.28
24	1	0	1	0	17.310±0.25
25	-1	0	0	1	17.164±0.21
26	-1	-1	0	0	17.081±0.30
27	0	1	0	1	17.215±0.16
28	0	-1	0	-1	17.227±0.14
29	0	0	1	1	17.140±0.29

利用 Design-Expert 11 软件对试验结果进行多元回归拟合,得到二次多项回归模型方程:
 $Y=7.307\ 04+0.072\ 192A+0.056\ 850B+0.352\ 667C+0.059\ 233D-0.000\ 012AB+0.000\ 375AC+1.927\ 92\times 10^{-17}AD+0.000\ 18BC+0.000\ 027BD-0.000\ 600CD-0.000\ 505A^2-0.000\ 130B^2-0.051\ 875C^2-0.002\ 090D^2$.

从表 4 结果可知,模型 P 值<0.050 0,说明模拟项显著,表明回归模型达到显著水平^[23]. 在这种情况下, A 、 B 、 D 、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 都是重要的模型项. 失拟项的 P 值大于 0.050 0,表示失拟项不显著,模型不失拟,选择合理. 预测的 R^2 为 0.943 7,与调整后的 R^2 差值小于 0.2,说明模型符合,能够用于对花生中 AFTS 的提取工艺条件进行分析和预测^[25].

表 4 回归方程的方差分析
Table 4 Analysis of variance(ANOVA) for regression equation

方差来源	平方和	自由度	方差均值	F 值	P 值
模型	15.42	14	1.1	16.75	<0.000 1
A-甲醇体积分数	0.357 4	1	0.357 4	5.43	0.035 2
B-超声功率	0.769 1	1	0.769 1	11.69	0.004 1
C-料液比	0.060 8	1	0.060 8	0.924 1	0.052 7
D-超声时间	0.864 6	1	0.864 6	13.15	0.002 8
AB	0.164	1	0.164	2.49	0.136 6
AC	0.001 8	1	0.001 8	0.027 5	0.870 7
AD	0.25	1	0.25	3.8	0.071 5
BC	0.257 6	1	0.257 6	3.92	0.067 8
BD	0.249 5	1	0.249 5	3.79	0.071 8
CD	0	1	0	0.000 5	0.981 7
A ²	6.66	1	6.66	101.29	<0.000 1
B ²	1.19	1	1.19	18.13	0.000 8
C ²	7.7	1	7.7	117.13	<0.000 1
D ²	1.99	1	1.99	30.26	<0.000 1
残差	0.920 8	14	0.065 8		
失拟项	0.828 8	10	0.082 9	3.61	0.113 9
误差	0.091 9	4	0.023		
总变异	16.34	28			

$R^2 = 0.943\ 7$ $R^2_{Adj} = 0.887\ 3$

等高线的形状反映出交互效应的强弱大小,圆形表示两种因素交互作用不显著,而椭圆形则与之相反^[26]. 由图 2 可知,甲醇体积分数、超声功率、料液比和超声时间之间的交互作用对花生中 AFTS 提取效果的影响均出现抛物面型关系,所得到的响应面都存在一个极大值点.

经过响应面优化,根据拟合二阶模型公式得到理论上花生中黄曲霉毒素的最佳提取工艺条件为:甲醇溶液浓度 65.578%,超声功率 206.696 W,料液比 1:4.064,超声时间 14.700 min. 在此最优条件下,AFTS 提取量的理论值为 18.346 $\mu\text{g}/\text{kg}$. 考虑到实际操作的可行性,将上述最优条件调整为甲醇体积分数 65%,超声功率 206 W,料液比 1:4,超声时间 15 min. 为了验证该模型的有效性及其实用性,在此最佳提取条件下对该模型做 3 次重复验证试验,花生中 AFTS 的提取量均值为 18.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$,与预测结果基本一致. 可见,该模型能较好地预测实际黄曲霉毒素的提取情况^[27],因此后续实验中使用该最佳提取工艺条件.

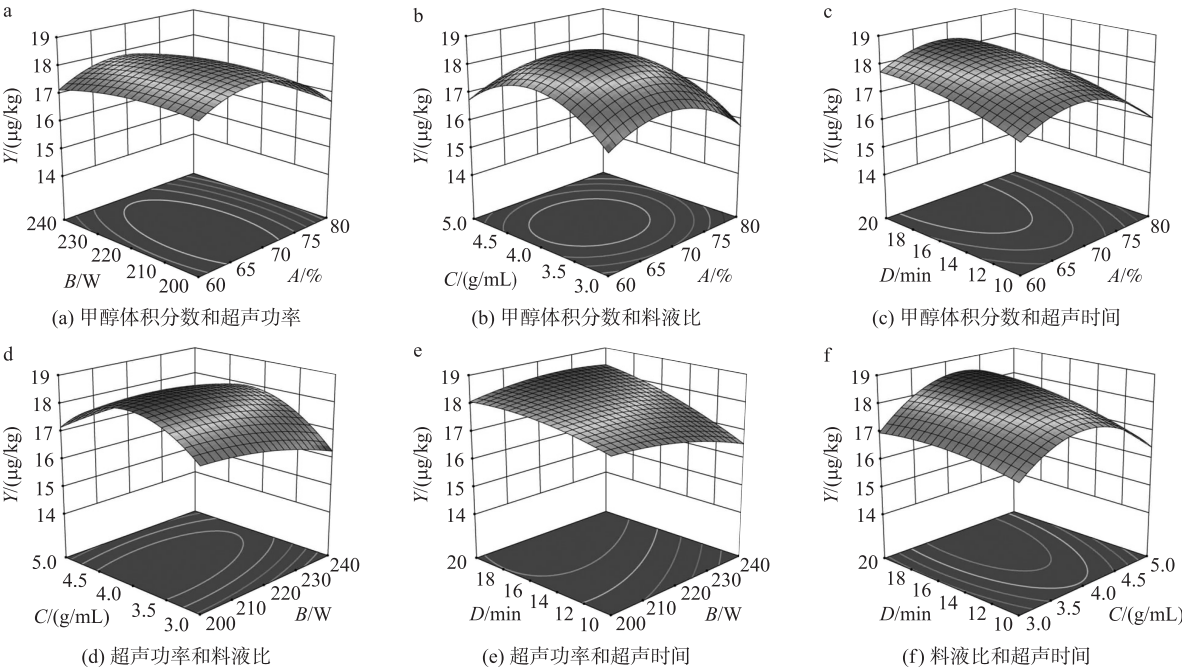


图 2 两因素交互作用对 AFTS 提取效果影响的响应面和等高线
Fig. 2 Response surface and contour plots showing the interactive effects of variable variables on organic acid extraction

2.3 参考方法验证

以标准品浓度为横坐标、峰面积为纵坐标作图,得到标准曲线回归方程如图 3 所示. 标准品工作液的线性关系良好, $R^2=0.999\ 7$,能够满足检测的要求.

2.3.1 基质实验

选取花生样品按照参考方法处理后进行检测,重复 3 次,计算后发现基质样品中的 AFB1 值低于检测限,说明样品中 AFB1 含量极少,可用于后续实验.

2.3.2 加标回收实验

对优化后的参考方法进行加标回收验证,如表 5 所示,参考方法的 3 种加标水平的平均回收率在 90%~100%,符合回收率允许限. 与其他检测黄曲霉毒素的方法相比,回收率相当,如姚誉阳等^[28]通过优化提取条件、净化方法和色谱条件建立了 QuEChERS-高效液相色谱-柱后光化学衍生法检测粮谷类食品中的 AFTS,对阴性样品进行 3 种水平的添加回收实验,回收率均值在 86.4%~97.8%;Li 等^[29]采用一种表面增强拉曼散射传感策略来用于花生样品中 AFB1 的定量测定,回收率在 89%~121%之间;Jia 等^[30]建立了一种基于量子点纳米棒的横向流动荧光条免疫传感器,对低、中、高 3 种添加水平的莲子的 AFB1 进行测定,回收率在 94.0%~116.0%之间. 说明优化后的参考方法可靠性较高,可采用此参考方法对试剂盒进行评价验证.

2.4 AFB1 定性试剂盒验证

首先采用参考方法对两种不同加标水平的花生样品中 AFB1 的含量进行确证,结果如表 6 所示. 表 7 所示为定性试剂盒检测结果. 如表 8 所示,经统计分析,AFB1 定性试剂盒检测结果的灵敏度为 100%,特异性为 0.98,假阴性率为 0,假阳性率为 2%;卡方检验结果为 $0<3.84$,表示试剂盒检测方法 with 参考方法的阳性确证比率在 5%的置信区间内,无统计学差异,说明试剂盒检测结果与现有方法一致.

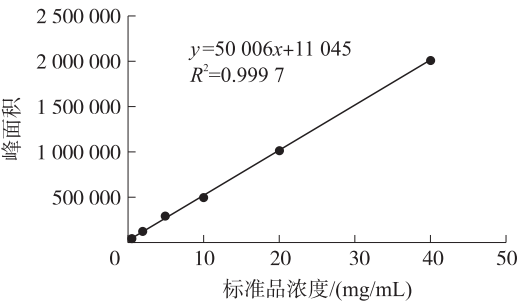


图 3 AFB1 标准曲线图
Fig. 3 Standard curve of AFB1

表 5 参考方法的加标回收率

Table 5 The spiked recovery of the reference method		
AFB1 理想提取量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AFB1 实际提取量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率/%
10	9.16 \pm 0.29	91.61 \pm 0.03
15	14.65 \pm 0.15	97.66 \pm 0.01
20	19.98 \pm 0.80	99.89 \pm 0.04

注: AFB1 实际提取量为平均值($n=3$)

表 6 参考方法检测结果($n=5$)
Table 6 Results of reference methods($n=5$)

编号	AFB1 提取量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)									
	阴性样品					阳性样品				
1	8.26	8.19	8.16	8.35	8.13	25.77	25.89	25.77	25.94	25.83
2	8.23	8.18	8.24	8.21	8.19	25.78	25.82	25.88	26.05	25.89
3	8.13	8.21	8.33	8.36	8.16	25.88	25.92	25.85	25.79	25.78
4	8.22	8.15	8.12	8.33	8.21	25.82	25.78	25.90	25.95	25.92
5	8.36	8.23	8.33	8.28	8.18	25.88	25.89	25.92	25.89	25.90
6	8.28	8.30	8.24	8.39	8.21	25.86	25.88	25.89	25.97	25.86
7	8.16	8.12	8.27	8.17	8.26	25.91	25.85	25.78	25.85	25.86
8	8.20	8.19	8.14	8.21	8.28	25.92	25.88	25.98	25.79	25.89

表 7 AFB1 定性试剂盒测定结果($n=5$)
Table 7 AFB1 qualitative kit test results($n=5$)

编号	阴性样品					阳性样品				
1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	无效	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+

注: 阴性结果表示为“-”; 阳性结果表示为“+”

从检测结果看,市场上的 AFB1 定性快检技术已相对成熟,与实验室参考方法较为一致. 但实际检测过程中仍存在问题. 由于胶体金法不能进行准确定量,只通过 T 线和 C 线的显色判断结果,若抗原浓度在小范围波动时难以准确读取测定结果,当样品的毒素含量在产品检出限水平附近时,可能会因检验人员的主观因素导致不同的判断结果,从而导致结果呈现假阳性或假阴性的可能^[31-32]. 实验室参考方法对花生中黄曲霉毒素的前处理进行优化后,无需复杂的试剂及仪器,加标样品的回收率>85%,说明优化后的提取方式能够使样品中的黄曲霉毒素尽可能地全部释放出来,使检测结果更接近样品中黄曲霉毒素的实际值. 可见,试剂盒的质量不仅体现于试纸条的灵敏度,还需要对样品前处理方法进行把控,使其在快速简便的基础上保证更大程度地提取样品中的毒素量,从而提高结果的准确度.

2.5 AFB1 定量试剂盒验证

图 4 所示为两家 AFB1 定量试剂盒的标准曲线图. 如表 9 所示,试剂盒检测空白(未加标)样品的值均<1 μg/kg<20 μg/kg. 从表 10 和 11 可以看出,定量试剂盒检测的结果与参考方法之间的偏倚程度较小,说明试剂盒方法可靠性较高;两家试剂盒的平均回收率都在 85%以上,说明试剂盒准确度较高. 根据试剂盒自带不同浓度的标准溶液进行检测,得到 A 厂家试剂盒定量的线性范围为 0.03~2.43 μg/kg; B 厂家试剂盒定量的线性范围为 0.1~8.1 μg/kg. 两家试剂盒的检测限分别为 1.706 和 2.261 μg/kg,远低于《食品安全国家标准:食品中真菌毒素限量标准》中的黄曲霉毒素限量标准值;定量限分别为 1.909 和 2.274 μg/kg,均在线性范围内;RSD 分别为 0.02 和 0.07,由此可知试剂盒的精密密度较高且重复性较好.

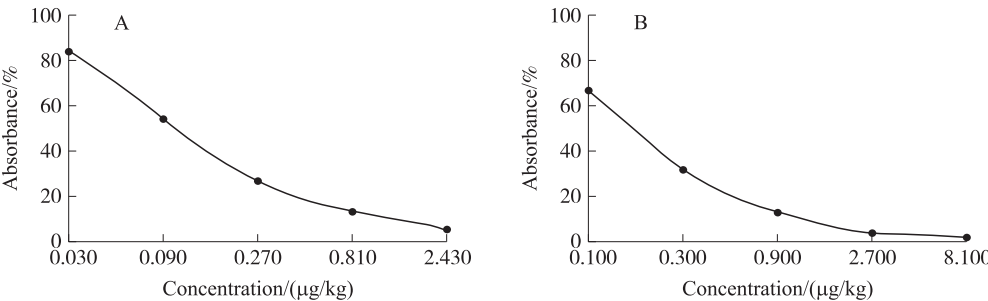


图 4 AFB1 定量试剂盒标准曲线图
Fig. 4 Standard curve of AFB1 quantitative kit

表 9 参考方法与 AFB1 定量试剂盒检测结果(空白样品)对比

Table 9 Comparison of reference method and AFB1 quantitative kit test results(blank samples)					
空白样品检测结果/(μg/kg)			空白样品检测结果/(μg/kg)		
试剂盒 A	<0.2	0.213	试剂盒 B	<0.5	<0.5
	<0.2	<0.2		<0.5	0.612
	<0.2	<0.2		<0.5	0.514
	<0.2	<0.2		<0.5	0.525
	<0.2	<0.2		0.516	<0.5
	<0.2	<0.2		<0.5	<0.5
	<0.2	<0.2		<0.5	0.601
	<0.2	<0.2		0.528	0.595
	<0.2	<0.2		<0.5	<0.5
	<0.2	<0.2		0.774	0.591
参考方法	ND	ND	参考方法	ND	ND

注:数据分析采用 ridawinDotNet 软件;ND 表示未检出.

AFB1 是常见的一类真菌毒素,市场上关于 AFB1 的酶联免疫试剂盒技术相对成熟,检测结果与实验室参考方法对比进行指标评价后呈现较一致且良好的结果. 在实际检测过程中对实验室设备专业性、实验人员操作熟练度要求较高,否则易出现标准曲线拟合度较差、检测结果呈假阴性或假阳性的情况. 本文在参考方法中以超声辅助提取对花生样品的前处理进行了优化,检测结果的回收率>85%. 提高 AFB1 检测结果的真实水平不仅依赖于仪器的精密度以及酶联免疫试剂盒中检测试剂的质量,更需从源头提高样品中 AFB1 的提取量,减小因操作熟练度等造成的误差^[33].

表 10 参考方法与 AFB1 定量试剂盒检测结果(加标样品)对比

Table 10 Comparison of reference method and AFB1 quantitative kit test results(mark samples)

加标样品检测结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)				加标样品检测结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
低水平			中水平	高水平	低水平		
试剂盒 A	7.93	23.99	32.99		试剂盒 B	7.38	32.40
	7.49	17.99	30.76			6.65	29.33
	7.80	23.99	32.89			6.57	26.68
	6.84	21.51	31.18			7.81	27.01
	6.89	23.49	35.01			7.08	30.35
	6.56	24.87	32.06			7.10	25.88
平均值	7.26	22.64	32.48		平均值	7.09	28.61
参考方法	8.26	25.77	33.66		参考方法	8.26	25.77
	8.35	25.78	34.24			8.35	25.78
	8.16	25.89	33.89			8.16	25.89
	8.20	25.88	33.92			8.20	25.88
	8.13	25.92	34.28			8.13	25.92
	8.12	25.90	33.92			8.12	25.90
平均值	8.21	25.86	33.99		平均值	8.21	25.86

表 11 定量试剂盒验证指标结果

Table 11 Results of quantitative kit verification results

厂家编号	A	B
线性拟合度 R^2	0.990 5	0.997 7
平均加标回收率/%	87.4	89.8
检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.706	2.261
定量限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.909	2.274
相对标准偏差/%	0.02	0.07
相对误差(绝对值)	1.89	2.82

3 结论

本文通过单因素实验及超声辅助响应面实验对花生中 AFTS 提取方法进行了优化,通过高效液相色谱—光化学柱后衍生法检测花生中 AFTS 的提取量,结合实际操作可行性,确定了最优的提取方式:甲醇体积分数 65%,超声波功率 206 W,料液比 1:4,超声时间 15 min. 利用上述最佳提取工艺并结合高效液相色谱—光化学柱后衍生法对花生中 AFB1 进行检测,结果表明花生中 AFB1 的低、中、高 3 种水平的加标回收率均>85%,说明此法可作为 AFB1 胶体金快检方法和酶联免疫快检方法的参考方法.

本文对胶体金和酶联免疫快检方法进行评价验证,经数据分析可知 AFB1 定性及定量试剂盒的检测结果基本能满足市场监管要求;但在实际检测过程中,部分厂家的试剂盒存在前处理耗时过长、试剂不常规且专业设备依赖性强,从而失去了快速现场检测的意义;有些产品定性检测判读可视信号不明显,易出现假阴性、假阳性情况. 因此,不仅要的对快检方法的试剂及试纸条进行质量监管,还要注意快检产品对样品前处理方式的要求,在保证溶剂常规化的情况下要尽量优化提取步骤,使样品中毒素的提取量尽可能接近真实水平,减小因仪器、人员操作等问题产生的误差,从而提高检测效率.

本文通过响应面实验优化提取方法来提高花生中 AFTS 的提取量和检测效率,同时增强了参考方法的可靠性,提高了对快检方法评价验证指标的要求. 本文认为,有必要进行试剂盒样品基质处理方式对检

测结果干扰等方面的研究,尤其是检测含有油脂类的复杂基质,样品的前处理方式对结果的准确性影响尤为显著. 本文从样品处理方式对 AFTS 检测结果进行了研究,其他因素对于商品化试剂盒质量的影响仍需进一步的研究,从而使商品化试剂盒质量的评价验证体系越来越完善,以切实保障食品安全.

[参考文献] (References)

- [1] HE S, HUANG Q T, ZHANG Y, et al. Magnetic beads-based multicolor colorimetric immunoassay for ultrasensitive detection of aflatoxin B1[J]. Chinese Chemical Letters, 2020, 32(4): 1462–1465.
- [2] GILL C, VAN DE WIJERT J H, BLOW F, et al. Evaluation of lysis methods for the extraction of bacterial DNA for analysis of the vaginal microbiota[J]. PLOS ONE, 2016, 11(9): e0163148.
- [3] YU L L, ZHANG Y, HU C Y, et al. Highly sensitive electrochemical impedance spectroscopy immunosensor for the detection of AFB1 in olive oil[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 22–26.
- [4] 范蓓, 李庆鹏, 哈益明. 关注黄曲霉毒素国内外限量标准, 完善食品安全保障措施[J]. 食品工业科技, 2010(12): 26–28.
- [5] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理局. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量: GB 2761—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [6] WILKOWSKA A, BIZIUK M. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology[J]. Food Chemistry, 2011, 125(3): 803–812.
- [7] 张洪歌. 果蔬食材中剧毒鼠药和氰化物快速检测方法的优化应用[D]. 北京: 中国人民公安大学, 2019.
- [8] GABALDÓN J A, CASCALES J M, MORIAS S, et al. Determination of atrazine and carbaryl pesticide residues in vegetable samples using a multianalyte dipstick immunoassay format[J]. Food Additives & Contaminants, 2003, 20(8): 707–715.
- [9] HEIDENREICH B, PÖHLMANN C, SPRINZL M, et al. Detection of escherichia coli in meat with an electrochemical biochip[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(11): 2025–2033.
- [10] 谢刚, 叶金, 王松雪. 食品安全快速检测方法评价技术研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 270–274.
- [11] 刘婷, 曹进, 王钢力, 等. 市售食品快速检测产品的应用评价与分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(7): 2439–2447.
- [12] GBASHI S, NJOBEH P B, DE SAEGER S, et al. Development, chemometric-assisted optimization and in-house validation of a modified pressurized hot water extraction methodology for multi-mycotoxins in maize[J]. Food Chemistry, 2019, 307: 125526.
- [13] DONG H, XIAN Y P, XIAO K J, et al. Development and comparison of single-step solid phase extraction and QuEChERS clean-up for the analysis of 7 mycotoxins in fruits and vegetables during storage by UHPLC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2019, 274: 471–479.
- [14] DU L J, CHU C, WARNER E, et al. Rapid microwave-assisted dispersive micro-solid phase extraction of mycotoxins in food using zirconia nanoparticles[J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1561: 1–12.
- [15] GBASHI S, NJOBEH P, STEENKAMP P, et al. The effect of temperature and methanol-water mixture on pressurized hot water extraction (PHWE) of anti-HIV analogues from *Bidens pilosa*[J]. Chemistry Central Journal, 2016, 10(1): 37.
- [16] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理局. 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定: GB 5009.22—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [17] NAKHJAVAN B, AHMED N S, KHOSRAVIFARD M. Development of an improved method of sample extraction and quantitation of multi-mycotoxin in feed by LC-MS/MS[J]. Toxins, 2020, 12(7): 462.
- [18] HUANG Z P, HE J, LI H Y, et al. Synthesis and application of magnetic-surfaced pseudo molecularly imprinted polymers for zearalenone pretreatment in cereal samples[J]. Food Chemistry, 2019, 308: 125696.
- [19] 潘振朝. 花生及花生油中黄曲霉毒素 B1 检测方法优化及危害分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [20] 国家质量监督检验检疫总局. 商品化食品检测试剂盒评价方法: SN/T 2775—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [21] 于筱雨, 方佳兴, 向琴, 等. 响应面法优化郫县豆瓣中有机酸的提取工艺及 HPLC 定量分析[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 286–291.
- [22] YU M, WANG B, QI Z, et al. Response surface method was used to optimize the ultrasonic assisted extraction of flavonoids from *Crinum asiaticum*[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(8): 2079–2084.
- [23] WANG L T, LU W H, LI J L, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and purification of zeaxanthin and lutein in corn gluten meal[J]. Molecules, 2019, 24(16): 2994.

- [24] 陈文娟,陈建福. 超声辅助提取血柚皮多糖工艺优化及其对自由基的清除作用[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2014,37(1):141-146.
- [25] CIRIC A,KRAJNC B,HEATH D,et al. Response surface methodology and artificial neural network approach for the optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from garlic[J]. Food and Chemical Toxicology,2020,135:110976.
- [26] 陆文娟,喻晨,王美菊,等. 响应面法优化提取干巴菌多糖的工艺研究[J]. 南京师范大学学报(工程技术版),2015,15(3):84-92.
- [27] WU L,QIU L J,ZHANG H J,et al. Optimization for the production of deoxynivalenol and zearalenone by fusarium graminearum using response surface methodology[J]. Toxins,2017,9(2):57.
- [28] 姚誉阳,顾妍丽,吴宇伉,等. QuEChERS-高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定粮谷类食品中黄曲霉毒素[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(9):3497-3502.
- [29] LI Q,LU Z C,TAN X C,et al. Ultrasensitive detection of aflatoxin B1 by SERS aptasensor based on exonuclease-assisted recycling amplification[J]. Biosensors and Bioelectronics,2017,97:59-64.
- [30] JIA B Y,LIAO X F,SUN C N,et al. Development of a quantum dot nanobead-based fluorescent strip immunosensor for on-site detection of aflatoxin B1 in lotus seeds[J]. Food Chemistry,2021,356:129614.
- [31] 张威,张文中,郭平,等. 食用油中黄曲霉毒素 B1 快速检测试纸的评价[J]. 食品科学,2020,41(12):326-331.
- [32] 程楠,何景,董凯,等. 试纸法在食品安全快速检测中的研究进展[J]. 食品科学,2015,36(1):256-261.
- [33] 师邱毅,纪其雄,许莉勇. 食品安全快速检测技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2010.

[责任编辑:严海琳]

(上接第 44 页)

- [13] DEVLIN J,CHANG M W,LEE K. BERT:pretraining of deep bidirectional transformers for language understanding[J]. arXiv Preprint arXiv:1810.04805,2019.
- [14] NGUYEN T H,CHO K,GRISHMAN R. Joint event extraction via recurrent neural networks[C]//Proceedings of the 2016 Conference of the North American Chapter of the Association for Computational Linguistics:Human Language Technologies. California, USA,2016.
- [15] 张江英,郝矿荣,王直杰. 基于 Lattice LSTM-CRF 模型的中文紧急事件抽取[C]//2020 中国自动化大会(CAC2020)论文集. 上海:中国自动化学会,2020.

[责任编辑:陈 庆]