

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.03.018

毕婷婷, 张海红, 田洪芸, 等. 花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快速检测方法的建立[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(3): 127-136.BI T T, ZHANG H H, TIAN H Y, et al. The rapid determination of aflatoxin B₁ in peanut and its products by colloidal gold method[J].

Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(3): 127-136.

花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快速检测方法的建立

毕婷婷, 张海红, 田洪芸✉, 魏可燕, 王 骏

(1. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101;

2. 国家市场监督管理总局重点实验室(肉及肉制品监管技术), 山东 济南 250101)

摘要: 通过考察市售试剂盒的绝对灵敏度和最大稀释比例, 选取 3 种效果最好的快速检测胶体金试剂盒产品, 以油炸花生、烘烤花生及花生酱为代表性基质, 优化样品的前处理条件和试剂盒的反应条件, 根据《食品快速检测方法评价技术规范》中性能指标进行统一的技术评价, 考察各品牌快检试剂盒的检测限、特异性、灵敏度、假阳性率、假阴性率、相对准确度以及参比方法一致性分析等指标, 为制定花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快速检测评价标准提供科学依据。

关键词: 花生及其制品; 黄曲霉毒素 B₁; 胶体金免疫层析; 食品安全快速检测; 评价标准

中图分类号: TS255.6; S565.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2023)03-0127-10

The Rapid Determination of Aflatoxin B₁ in Peanut and Its Products by Colloidal Gold Method

BI Ting-ting, ZHANG Hai-hong, TIAN Hong-yun✉, WEI Ke-yan, WANG Jun

(1. Shandong Institute of Food and Drug Control, Jinan, Shandong 250101, China;

2. Key Laboratory of Supervising Technology for Meat and Meat Products for State Market Regulation, Jinan, Shandong 250101, China)

Abstract: By investigating the absolute sensitivity and maximum dilution ratio of commercially available kits, three kinds of rapid detection kit products with the best effect were selected. Fried peanuts, roasted peanuts and peanut butter were taken as representative substrates to optimize the pre-treatment conditions of samples and the reaction conditions of kits. Unified technical evaluation was conducted according to the performance indexes in The Technical Specification for Evaluation of Rapid Food Detection Methods, and the detection limit, sensitivity, specificity, false negative rate, false positive rate, relative accuracy and consistency analysis of reference methods of all brands of rapid test kits were investigated. Our findings could provide scientific basis for the rapid determination and evaluation standard of aflatoxin B₁ colloidal gold in peanut and its products.

Key words: peanut and its products; Aflatoxin B₁; colloidal gold immunochromatography; rapid detection of food safety; evaluation standard

收稿日期: 2022-11-18

基金项目: 市场监督管理总局项目经费

Supported by: Project Funding of State Administration for Market Regulation

作者简介: 毕婷婷, 女, 1990 年出生, 硕士, 工程师, 研究方向为食品安全检测与研究。E-mail: Bitingtingfuture@163.com.

通讯作者: 田洪芸, 女, 1986 年出生, 硕士, 高级工程师, 研究方向为食品安全检测与研究。E-mail: sdsythy@126.com.

黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 是黄曲霉和寄生曲霉等某些菌株产生的双呋喃环类毒素, 含有一个双呋喃环和一个氧杂萜邻酮, 主要污染花生、玉米等粮食作物。黄曲霉毒素 B₁ 耐热性强, 温度达到 280 °C 才开始裂解, 故一般家庭的加工烹调温度难以将其破坏。黄曲霉毒素 B₁ 对肝脏组织的破坏性极强^[1-3], 被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 确定为毒性最强的真菌毒素之一^[4]。《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761—2017) 标准规定了花生及其制品中限量为 20 μg/kg^[5]。

目前广泛用于检测黄曲霉毒素 B₁ 的方法主要有荧光分光光度法、高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法、酶联免疫吸附法、薄层层析法、金标免疫层析检测技术等, 其中胶体金免疫层析方法目前已经是比较成熟的快速检测技术, 并且已广泛地应用于细菌、病毒、药物安全、食品安全以及其他物质等领域的检测中^[6-15]。

因为目前阶段我国的快检产品生产门槛相对较低, 也没有发布有关花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快速检测试剂盒的相关评价标准, 而且各个企业研发的水平也相差较远, 各自的生产工艺也不尽相同, 导致市面上销售的快检试剂盒的质量水平参差不齐, 并且不排除低质量的以及不合格的快检产品进入市场, 不仅影响了快检实验结果的准确率, 更是严重影响了快检方法在基层食品检测中的推广。所以进行花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒的质量评价的研究工作极具良好的社会面效益。

本研究通过对市场调研以及考察市售试剂盒的绝对灵敏度和最大稀释比例, 选取了 3 种花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测胶体金试剂盒产品, 以油炸花生、烘烤花生及花生酱为代表性的基质, 优化样品提取的前处理条件, 根据《食品快速检测方法评价技术规范》(食药监办科[2017]43 号) 中规定的性能指标, 对检测限、特异性、灵敏度、假阳性率、假阴性率和相对准确度进行统一的技术评价, 旨在为制定花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快速检测评价标准提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙腈 (C₂H₃N, 色谱纯)、无水乙醇 (C₂H₆O, 分析纯)、盐酸 (HCl, 分析纯)、三羟甲基氨基甲烷 (C₄H₁₁NO₃, 分析纯)、氯化钠 (NaCl, 分析纯)、胶体金试纸条、烘烤花生和油炸花生中黄曲霉毒素 B₁ 质控样品: 北京美正检测技术有限公司; 花生酱 (四季宝)、黄曲霉毒素 B₁ 标准品: Sigma。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪 (WatersE2695)、色谱柱 (XBridgeC18 150×4.6 mm 3.5 μm): 美国 Waters; Milli-Q 超纯水发生器: 美国 Millipore; 电子天平 (MS204TS、MS4002S): 瑞士梅特勒公司; pH 计 (PHSJ-5): 上海雷磁仪器厂; 冷冻离心机 (3-18KS)、移液枪 (10 mL、5 mL、1 mL、200 μL): 德国 Eppendorf; 涡旋仪 (QL-866): 海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

检测器: 荧光检测器 (激发波长 360 nm; 发射波长 440 nm); 衍生方式: 光衍生; 柱温: 35 °C; 流动相 (V 甲醇: V 水=40: 60); 流速 0.8 mL/min; 等度流脱; 进样体积: 10 μL。

1.3 实验方法

1.3.1 优化提取溶液

称取花生酱样品 (黄曲霉毒素 B₁ 的浓度为 5.24 μg/kg) 5 g, 分别用 40%乙醇-水溶液、50%乙醇-水溶液、60%乙醇-水溶液、70%乙醇-水溶液、80%乙醇-水溶液、90%乙醇-水溶液、95%乙醇-水溶液、无水乙醇溶液、70%甲醇-水溶液和 84%乙腈-水溶液等 10 种溶剂各 20 mL 进行提取。按《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) 标准第三法进行测定并计算提取效率, 同时称取 5 g 样品进行加标平行实验, 加标量为 11 μg/kg, 并计算回收率。

1.3.2 溶剂体积的优化

称取花生酱样品 (黄曲霉毒素 B₁ 的浓度为 5.24 μg/kg) 5 g, 分别用 50%乙醇-水溶液 8、12、15、20、30 mL, 和 20.0 mL 84%乙腈-水溶液进

行提取,按照 GB 5009.22—2016 标准第三法进行测定并计算提取效率,同时称取 5 g 样品进行加标平行实验,加标量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,并计算回收率。

1.3.3 胶体金试纸条绝对灵敏度测试

用 0.01 mol/L PBS 缓冲溶液将黄曲霉毒素 B₁ 标准品稀释成 0、0.1、0.2、0.3 ng/g 以及 0.05、0.06、0.07、0.08、0.09 ng/g 2 个梯度的标准溶液系列。按照胶体金试纸条说明书操作步骤吸取 150 μL (200 μL) 的标准品至冻金孔中,混匀孵育后插入试纸条(或者点到检测卡)。对同品牌试纸条进行颜色比对,有明显颜色变化时的黄曲霉毒素的最小浓度确定为该试纸条的绝对灵敏度。

1.3.4 优化最佳稀释比例

采用空白样品加标的方式,加标浓度为 10、16 以及 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。称取花生酱样品 5 g,加 50% 乙醇-水溶液 20 mL 进行斡旋震荡,再 4 000 r/min 离心 5 min,取 100 μL 上清液加不同体积的稀释液进行实验。

1.3.5 优化离心转速及时间

采用质控样的方式,称取 5 g 烘烤花生样品,加 20 mL 的 50%乙醇-水溶液斡旋震荡后,分别 2 000、4 000、6 000 r/min,离心 3、5、7 min 后,取 100 μL 上清液加 2 200 μL 稀释液后用试剂条检测。

1.3.6 稀释液 pH 的优化

根据企业提供的产品用缓冲液为 1 mol/L Tris (pH=8.5) +1%氯化钠,采用质控样和空白样品加标的方式,称取 5 g 油炸花生、烘烤花生及花生酱样品,加 20 mL 的 50%乙醇-水溶液斡旋震荡后,4 000 r/min 离心 5 min 取 100 μL 上清液加 2 200 μL 稀释液,pH 分别为 8.0、8.5 和 8.9,用试剂条检测。

1.3.7 优化温育温度

采用质控样和空白样品加标的方式,称取 5 g 油炸花生、烘烤花生及花生酱样品,加 20 mL 的 50%乙醇-水溶液斡旋震荡后,4 000 r/min 离心 5 min 取 100 μL 上清液加 2 200 μL 稀释液,取 200 μL 待测液于红色微孔中,多次抽吸混合均匀后,分别在 10、20、30、40、50 $^{\circ}\text{C}$ 温育条件下孵育 3 min,将试纸条插入到微孔中,反应 3 min

后,取出试纸条,去掉下端样品垫,并进行结果判读。

1.3.8 待测液-微孔孵育时间以及试纸条-待测液反应时间测试

采用质控样和空白样品加标的方式,称取 5 g 油炸花生、烘烤花生及花生酱样品,加 20 mL 的 50%乙醇-水溶液斡旋震荡后,4 000 r/min 离心 5 min 取 100 μL 上清液加 2 200 μL 稀释液后,取 200 μL 待测液于红色微孔中,多次抽吸混合均匀后,分别孵育 1、3、5、7 min,将试纸条插入到微孔中,分别反应 1、3、5、7 min 后,取出试纸条,去掉下端样品垫,并进行结果判读。

1.3.9 试纸条检出限测试

采用质控样和空白样品加标的方式,称取 5 g 油炸花生、烘烤花生及花生酱样品,加 20 mL 的 50%乙醇-水溶液斡旋震荡后,4 000 r/min 离心 5 min 取 100 μL 上清液加 2 200 μL 稀释液后用试剂条检测。

1.3.10 交叉反应

将脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂、黄曲霉毒素 M₁ 的标准溶液用 0.01 mol/L PBS 缓冲溶液逐步稀释(0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 0.08~0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$),进行交叉反应实验。

1.3.11 验证实验

采用质控样和空白样品加标的方式,称取 5 g 油炸花生、烘烤花生及花生酱样品,加 20 mL 的 50%乙醇-水溶液斡旋震荡后,4 000 r/min 离心 5 min 取 100 μL 上清液加 2 200 μL 稀释液后用试剂条检测。每个基质每个浓度各检测 50 个平行,并计算假阴性率、假阳性率、灵敏度、特异性、相对准确度等指标。

2 结果与分析

2.1 市场调研结果

目前市面上在售的检测黄曲霉毒素 B₁ 的胶体金试剂盒厂家较多,但其中有部分厂家是代工生产的,其中应用较广泛的为以下 16 家企业的胶体金快检产品,产品概况见表 1。

表 1 黄曲霉毒素 B₁ 快速检测产品概况

Table 1 Overview of Aflatoxin B₁ rapid detection products

序号	厂家	产品形式	判定形式	检出限/(μg/kg)	适用基质
1	A	微孔定性	比色法	20	花生酱, 花生制品
2	B	微孔定性	比色法	20	花生酱, 坚果籽类及其制品
3	C	微孔定性	比色法	20	花生酱、烘烤花生、油炸花生
4	D	微孔定性	比色法	20	粮谷类、花生及花生制品、植物油、饲料、牛奶等复合蛋白饮品
5	E	微孔定性	比色法	3~5	谷物、饲料、花生、食用油
6	F	微孔定性	比色法	20	粮油、食品、饲料
7	G	微孔定性	比色法	20	食用植物油、粮食(谷物)、饲料及酱料
8	H	微孔定性	比色法	/	谷物、食用油、饲料
9	I	微孔定性	消线法	20	小麦、玉米等谷物及饲料和食用油
10	J	微孔定性	消线法	20	粮食、饲料
11	K	微孔定性	消线法	20	粮食作物(玉米、大米、花生、小麦、面粉)、饲料及粮食发酵产物(酱油、食醋、米酒等)
12	L	微孔定性	消线法	5~50	谷物、饲料
13	M	微孔定性	消线法	5~100	谷物、饲料
14	N	免疫层析法	读数仪	2	玉米
15	O	酶联免疫定量	定量测定	5	谷物
16	P	酶联免疫定性	定性	/	谷物、坚果、调味料

目前使用比较多的黄曲霉毒素 B₁ 快速检测产品其基质多为谷物、饲料、花生和食用油, 以定性测定为主, 定量法多为酶联免疫类产品, 以比色法为主, 也有小部分消线法产品。因消线法产品不能涵盖坚果类产品, 且因消线法对金标抗体要求较为严格, 以及画线工艺 T 线处有印迹而造成结果误判, 近年来胶体金消线法产品的市场占有率在逐步下降。市场上销售的适用于花生及其制品基质的胶体金快检产品均为比色法, 因此本方法研究过程选取了比色法产品。

2.2 提取溶液的优化结果

市场调研中统计了花生及其制品的黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快检产品所采用的提取溶剂以及料

液比见表 2。

表 2 市面上所售产品所采用的提取溶液和提取料液比
Table 2 The ratio of extraction solution and extraction material to liquid for commercially available products

品牌	提取比例	提取溶液
C	5 g+20 mL	50%乙醇
B	2 g+12 mL	50%乙醇
A	5 g+30 mL	50%乙醇
G	2 g+12 mL	50%乙醇: 正己烷=5:1
M	5 g+25 mL	70%甲醇
D	5 g+15 mL	70%甲醇
H	1 g+19 mL	20%甲醇
F	1 g+4 mL	20%甲醇
E	1 g+4 mL	提取液
GB 5009.22 第三法	5 g+20 mL	84%乙醇

样品测定结果和回收率情况详见图 1。

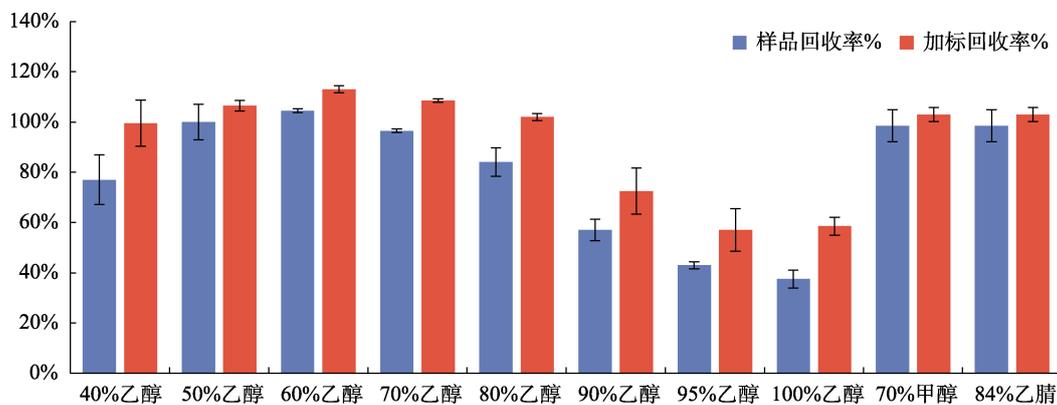


图 1 不同提取溶液的提取效率
Fig. 1 Extraction efficiency of different extraction solutions

由图 1 可知,随着提取溶液中乙醇浓度的增加,黄曲霉毒素 B₁ 的提取效率呈先上升后下降的趋势,在 60%乙醇浓度时达到最高。而在 GB 5009.22—2016 第三法中使用的 84%乙腈溶液和 70%的甲醇溶液的提取效率为 98%,加标回收率为 103%。通过柱形图可以得出 50%乙醇浓度时提取效率为 100%,加标的回收率为 107%,与 GB 5009.22—2016 第三法的溶剂回收率更接近,而 60%乙醇浓度的加标回收率高达 112%,误差较

大。考虑到快检操作现场环境条件,GB 5009.22—2016 方法用的乙腈-水溶液和甲醇-水溶液的毒性较大,因此在满足本方法对提取效率要求的前提下,本方法选取 50%乙醇-水溶液作为提取溶液,但不做限定,可依据各厂家产品说明书规定的提取溶液进行操作。

2.3 提取用溶剂体积的优化结果

不同体积的 50%乙醇-水溶液测定结果和回收率结果详见图 2。

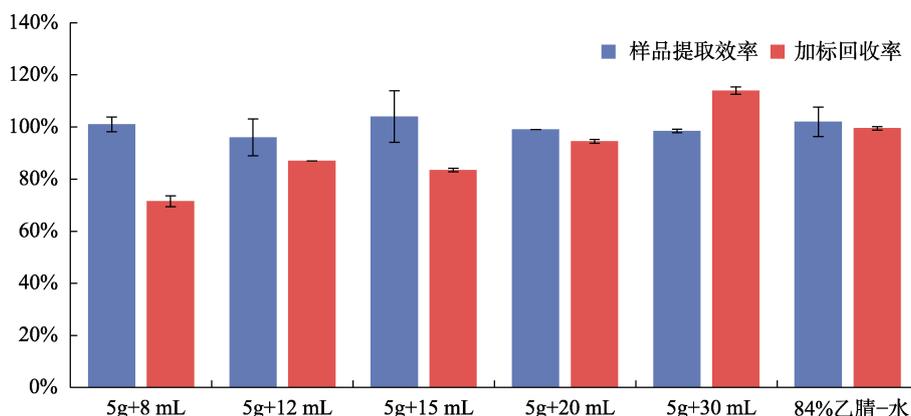


图 2 不同提取比例的回收率

Fig.2 Recovery rates of different extraction proportions

由图 2 可知不同体积的乙醇-水溶液测定结果的提取效率都在 96%~104%之间,参比方法 84%乙腈-水溶液的提取效率为 102%,而加标组的回收率随着提取溶液体积的增加呈上升的趋势,提取溶液体积为 30 mL 时,加标回收率为 114%,误差较大,而参比方法 84%乙腈-水溶液的加标回收率为 99%。对比发现当称样量为 5 g,提取溶液体积为 20 mL 时,样品提取效率和加标回收率均与参比方法 84%乙腈-水溶液结果接近,因此,确定本方法的 50%乙醇-水提取溶液的体积为 20 mL,但不做限定,可依据不同厂家产品说明书规定的提取比例进行操作。

2.4 胶体金试纸条绝对灵敏度测试结果

该研究选择了 7 个品牌的试剂盒,其中包含了大中小不同规模的企业,绝对灵敏度测定结果见表 3。

首先使用 0、0.1、0.2、0.3 ng/g 浓度梯度,其中品牌 B、A、I、C、E 等品牌在 0~0.1 ng/g 之

表 3 不同品牌快检产品绝对灵敏度

Table 3 Absolute sensitivity of quick-check products of different brands ng/g

序号	品牌	绝对灵敏度
1	B	0.05~0.06
2	A	0.05~0.06
3	I	0.07~0.08
4	C	0.08~0.10
5	E	0.09~0.10
6	F	0.10~0.20
7	M	0.20~0.30

间都有明显的颜色变化,品牌 F 和 M 等品牌明显的颜色变化则出现在 0.1~0.3 ng/g。因此再用 0.05、0.06、0.07、0.08、0.09 ng/g 梯度进行实验,品牌 B、A 在 0.05~0.06 ng/g 之间出现明显的颜色变化,品牌 I 在 0.07~0.08 ng/g 之间出现明显的颜色变化,品牌 C 明显的颜色变化是在 0.08~0.1 ng/g,品牌 E 是在 0.09~0.1 ng/g 之间。品牌 F 在 0.1~0.2 ng/g 之间有明显的颜色变化,品牌 M 是在 0.2~0.3 ng/g 之间。以上各品牌试纸条的稀释液各不相同,使用厂家配置的稀释液可能有不同表现。

2.5 最佳稀释比例优化

本研究通过 0.5 倍检出限和 1 倍检出限时的测定结果分别来确定试纸条的最小稀释比例和最大稀释比例, 结果如表 4 所示。

表 4 不同品牌产品稀释比例比较

Table 4 Comparison of dilution ratio of different brands

序号	品牌	最小稀释比例	最大稀释比例
1	B	100 : 1 700	100 : 2 900
2	A	100 : 1 200	100 : 2 900
3	C	100 : 1 200	100 : 2 600
4	I	100 : 1 100	100 : 2 000
5	M	100 : 1 700	100 : 2 500
6	D	100 : 1 070	100 : 1 830
7	H	100 : 670	100 : 2 200
8	F	100 : 500	100 : 1 000

由表可知, 各个品牌的稀释比例范围各不相同, 差距较大, 其中稀释比例较高的是 B、A, 最大稀释比例高达 29 倍, 而 F 的最大稀释比例为 10。考虑到市售胶体金试纸条的测定结果的误差范围大约为 20%, 因此本方法又考察了选取品牌的 0.8 倍检出限浓度的最大稀释比例。结果如表 5 所示。

由表 5 可知, B 和 A 试纸条 0.5 倍检出限浓度在 16 倍稀释比例下 C 线颜色深于 T 线颜色是阳性结果, 而 17 倍稀释比例下 T 线与 C 线颜色一样为阴性, 因此最小稀释比例为 17, 而 0.8 倍检出限浓度在 26 倍稀释比例下, T 线与 C 线颜色一样, 结果为阴性, 而 25 倍稀释比例下 C 线颜色深于 T 线颜色, 结果为阳性, 因此确定其最大

表 5 不同品牌产品最小稀释比例和最大稀释比例

Table 5 Minimum dilution ratio and maximum dilution ratio of different brands

品牌	0.5 倍检出限	0.8 倍检出限	1 倍检出限
B			
A			
C			

稀释比例为 25 倍。C 试纸条 0.5 倍检出限浓度时 10 倍稀释比例下 C 线颜色深于 T 线颜色, 是阳性结果, 而 12 倍稀释比例下 T 线与 C 线颜色一样为阴性, 因此最小稀释比例为 12, 而 0.8 倍检出限浓度在 26 倍稀释比例下, T 线与 C 线颜色一样, 结果为阴性, 而 25 倍稀释比例下 C 线颜色深于 T 线颜色, 结果为阳性, 因此确定其最大稀释比例为 25 倍。

按照确定的最大稀释比例 25 倍进行产品验证时发现, 1 倍检出限的假阴性率较高。通过上表中 0.8 倍检出限浓度的结果发现, 进行 23 倍、24 倍以及 25 倍稀释比例时, 试纸条颜色变化梯度不明显, 而 22 倍稀释比例与其颜色变化的梯度明显, 因此本方法最终选取了 22 倍稀释比例进行实验。

绝对灵敏度高的胶体金产品, 说明所使用的原料金标抗原抗体较好。而灵敏度较低的胶体金产品, 说明其所使用的原料金标抗原抗体较差, 在检出限相同的情况下, 提取液的稀释比例同样会比较小, 基质干扰相应的提高, 如果本方法选用绝对灵敏度较低的胶体金产品为研究对象, 则降低了该类对原料金标抗原抗体的要求, 市场准入条件降低, 在此前提下, 灵敏度较高的产品在相同的实验条件下, 其检出限会低于标准检出限, 从而该类产品会出现假阳性较高的问题。如果快检标准方法制定时采用低灵敏度试纸条为研究对象, 则容易出现灵敏度高的产品带来的假阳性率较高的现象, 因此为了后期规范快检市场, 以及促进企业开发更高特异性的原料金标抗原抗体, 本方法选用绝对灵敏度相对较高和稀释比例较高的 A、B 以及 C 作为本方法研究对象进行方法学研究 and 后期验证实验。

2.6 离心转速及时间优化结果

从表 6 试纸条显色结果上看, 离心 3 min, 随转速增加, 烘烤花生样品试纸条 T 线颜色变浅, C 线和 T 线对比度增加; 离心 5 min 和 7 min 时, 随转速增加, 烘烤花生样品试纸条 T 线颜色先变浅后变深, 在 4 000 r/min 时 T 线颜色最浅; 而在 4 000 r/min 时, 随离心时间增加, 烘烤花生样品

试纸条 T 线颜色先变浅后变深, C 线和 T 线对比度增加, 在 5 min 时 T 线颜色最浅。根据试纸条显色结果, 本方法建议离心转速为 4 000 r/min, 离心时间为 5 min, 但不做限定, 可依据产品说明书规定的试纸条-待测液反应时间进行操作。

表 6 烘烤花生不同离心转速及时间试纸条的显色结果
 Table 6 Color rendering results of test strips at different centrifugal speeds and times of roasted peanuts

实验条件	2 000 r/min	4 000 r/min	6 000 r/min
3 min			
5 min			
7 min			

2.7 稀释液 pH 优化结果

不同 pH 条件下的显色情况, 见表 7。

由表 7 可知, 1 mol/L +1%氯化钠 Tris 溶液下 pH 分别为 8.0、8.5、8.9 时, 随 pH 增加, 油炸花生、烘烤花生及花生酱样品试纸条 T 线颜色先变浅后变深, 在 pH 8.5 时, T 线颜色最浅, C 线和 T 线对比度最高。根据试纸条显色结果, 本方法建议 1 mol/L Tris (含 1%氯化钠) 溶液 pH 为 8.5, 但不做限定, 可依据产品说明书规定的稀释溶液进行操作。

表 7 不同 pH 值缓冲溶液试纸条显色情况

Table 7 Color development of buffer solution test strips at different pH values

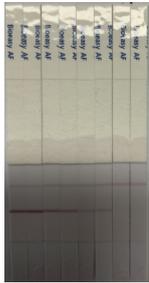
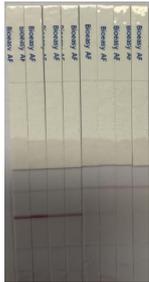
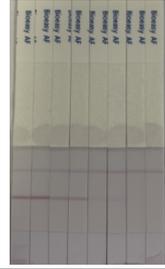
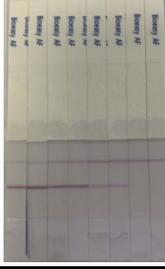
实验条件	pH8.0	pH8.5	pH8.9
烘烤花生			
油炸花生			
花生酱			

表 8 试纸条不同温育温度下显色情况

Table 8 Color development of test strips at different incubation temperatures

温育温度/°C	油炸花生 显色效果	烘烤花生 显色效果	花生酱 显色效果
10			
20			
30			
40			
50			

2.8 温育温度优化结果

在 10、20、30、40、50 °C 温育条件下试纸条的显色结果，见表 8。

结果显示：随着温度增加，油炸花生基质、烘烤花生基质和花生酱基质 C 线与 T 线显色逐渐加深。低温下（10 °C），试纸条 C 线与 T 线显色不明显，结果不好判定，而 20~50 °C 试纸条阴阳性可明显识别，且阴阳性结果判别准确。综合 C 线与 T 线显色可识别度，以及试纸条检测准确性及操作环境舒适度，A 黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快速检测产品建议实验操作环境温度为 20~40 °C。方法文本中可依据各产品厂家进一步实验确认后说明书规定的反应温度条件进行操作。

2.9 待测液-微孔孵育时间以及试纸条-待测液反应时间优化结果

根据表 9 试纸条 T 线与 C 线显色结果显示，待测液-微孔孵育时间建议为 3 min，但不作限定。

试纸条-待测液反应时间建议为 3 min，但不作限定。可依据产品说明书规定的待测液-微孔孵育时间、试纸条-待测液反应时间进行操作。

2.10 试纸条检出限测试结果

烘烤花生黄曲霉毒素 B₁ 四个浓度的质控样

表 9 待测液-微孔孵育时间以及试纸条-待测液反应时间优化结果

Table 9 Optimization results of liquid-to-microwell incubation time and reaction time of test strip to liquid-to-test min

基质	孵育时间		反应时间	
	考察时间	确定时间	考察时间	确定时间
烘烤花生	1、3、5、7	3	1、3、5、7	3
油炸花生	1、3、5、7	3	1、3、5、7	3
花生酱	1、3、5、7	3	1、3、5、7	3

品 0、12.6、19.6、39.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，油炸花生黄曲霉毒素 B_1 四个浓度的质控样品 0、10.6、19.4、36.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，花生酱基质采用加标水平为 0、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，T 线比 C 线显色深或一致为阴性，T 线比 C 线显色浅为阳性，结果见图 3。由图可见，浓度为空白浓度、0.5 倍检出限时，试纸条测定为阴性；浓度为 1 倍检出限、2 倍检出限时，试纸条测定为阳性，则试纸条检出限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

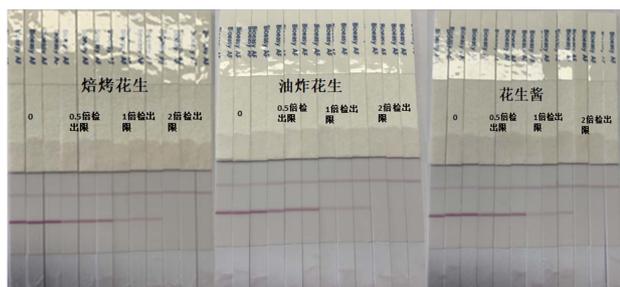


图 3 试纸条检出限测试

Fig. 3 Detection limit test of strip

2.11 交叉反应

将脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B_2 、黄曲霉毒素 G_1 、黄曲霉毒素 G_2 、黄曲霉毒素 M_1 的标准溶液用 0.01 mol/L PBS 缓冲溶液逐步稀释 (0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 0.08~0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$)，进行交叉反应实验。

根据公式：交叉反应率(%)= $C_{\text{黄曲霉毒素 } B_1}/C_{\text{待测物}} \times 100\%$ ，可知脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 与黄曲霉毒素 B_1 无交叉反应，B、A 品牌胶体金试纸条黄曲霉毒素 B_1 检出限浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，对黄曲霉毒素 B_2 、黄曲霉毒素 G_1 、黄曲霉毒素 G_2 、黄曲霉毒素 M_1 呈现阳性时的浓度分别为：0.125、0.125、0.125、0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，交叉反应率分别为：80%、80%、80%、20%，C 品牌胶体金

试纸条黄曲霉毒素 B_1 检出限浓度为 0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，对黄曲霉毒素 B_2 、黄曲霉毒素 G_1 、黄曲霉毒素 G_2 、黄曲霉毒素 M_1 呈现阳性时的浓度分别为：0.312 5、0.312 5、0.312 5、1.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，交叉反应率分别为：80%、80%、80%、20%，如表 10。

表 10 交叉反应验证结果

Table 10 Cross-reaction verification results

标准物质	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	检测结果			交叉反应率/%		
		B	A	C	B	A	C
脱氧雪腐镰刀菌 烯醇	0.1	—	—	—			
	1	—	—	—	0	0	0
	10	—	—	—			
	100	—	—	—			
玉米赤霉烯酮	0.1	—	—	—			
	1	—	—	—	0	0	0
	10	—	—	—			
	100	—	—	—			
赭曲霉毒素 A	0.1	—	—	—			
	1	—	—	—	0	0	0
	10	—	—	—			
	100	—	—	—			
黄曲霉毒素 B_2	0.1	—	—	—			
	1	+	+	+	80	80	80
	10	+	+	+			
	100	+	+	+			
黄曲霉毒素 G_1	0.1	—	—	—			
	1	+	+	+	80	80	80
	10	+	+	+			
	100	+	+	+			
黄曲霉毒素 G_2	0.1	—	—	—			
	1	+	+	+	80	80	80
	10	+	+	+			
	100	+	+	+			
黄曲霉毒素 M_1	0.1	—	—	—			
	1	+	+	—	20	20	20
	10	+	+	+			
	100	+	+	+			

注：“—”表示阴性，“+”表示阳性。

Note: “—” means negative, “+” means positive.

2.12 验证实验结果

油炸花生、烘烤花生及花生酱样品四个浓度的结果按照《食品快速检测方法评价技术规范》(食药监办科[2017]43 号)附表快速检测方法性能指标计算表要求计算，详见表 11。

使用本文建立的方法进行评价，所选取的品牌 A、B、C 对于油炸花生、烘烤花生及花生酱 3 种基质，验证结果为方法灵敏度为 100%；相对准确度为 100%；假阴性率和假阳性率为 0%，详见表 12。

表 11 快速检测方法性能指标评价结果

Table 11 Performance index evaluation results of rapid detection methods

基质	A					B					C				
	灵敏度	特异性	相对准确度	假阴性率	假阳性率	灵敏度	特异性	相对准确度	假阴性率	假阳性率	灵敏度	特异性	相对准确度	假阴性率	假阳性率
烘烤花生	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0
油炸花生	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0
花生酱	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0

表 12 参比方法一致性分析情况

Table 12 Consistency analysis of reference methods

基质	烘烤花生				油炸花生				花生酱			
	空白	12.6	19.6	39.4	空白	10.6	19.4	36.8	空白	11.3	20.6	37.2
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

三种基质四个浓度水平的花生样品的 50 次平行测定结果，与参比方法《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) 第三法光化学柱后衍生法结果无显著性差异。

3 结论

本研究通过市场调研市售花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 快检试剂盒情况，优化了样品提取的前处理条件，对比了市售试剂盒的绝对灵敏度和最大稀释比例，选取了绝对灵敏度高、稀释比例大的三个品牌的产品作为研究对象，结合优化后的前处理条件，进一步优化了试剂盒操作的反应条件，在此基础上研究了花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 快检评价的标准。进而开展对 3 个品牌产品性能的评价，结果显示，建立的方法可满足花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 胶体金快速检测产品快速检测的要求。

参考文献:

[1] ABDEL-HADI A, SCHMIDTHEYDT M, PARRA R, et al. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2012, 9(69): 757-767.

[2] SCHMIDT-HEYDT M, ABDEL-HADI A, MAGAN N, et al. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *A. flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 135(3): 231-7.

[3] MEDINA A, RODRIGUEZ A, MAGAN N, et al. Climate change factors and *A. flavus*: effects on gene expression, growth and aflatoxin production[J]. *World Mycotoxin Journal*, 2014, 8(2): 171-179.

[4] HOJNIK N, MODIC M, WALSH J L, et al. Unravelling the

pathways of air plasma induced aflatoxin B₁ degradation and detoxification[J]. *Journal of Hazardous Aterials*, 2021, 403: 123593.

[5] 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量: GB 2761—2011[S]. National food safety standard maximum levels of mycotoxins in foods: GB 2761—2011[S].

[6] 李少晖, 任丹丹, 谢云峰, 等. 食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(4): 1108-1115.

LI S H, REN D D, XIE Y F, et al. Research progress on determination methods of aflatoxins in foodstuffs[J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(4): 1108-1115.

[7] 赵亮. 粮油食品中的黄曲霉毒素检测技术分析[J]. *现代食品*, 2021, (14): 47-49.

ZHAO L. Analysis of aflatoxin detection technology in cereals, oils and foods[J]. *Modern food*, 2021, (14): 47-49.

[8] 翟雪华. 粮油食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. *现代食品*, 2019, (1): 120-121.

ZHAI X H. Research progress on detection methods of aflatoxins in cereals, oils and foods[J]. *Modern food*, 2019, (1): 120-121.

[9] 叶群, 姚刚, 张绍英. 污染黄曲霉毒素花生的检测及分选技术研究进展[J]. *农业工程*, 2014, 4(6): 59-63.

Y Q, YAO G, ZHANG S Y. Development of detection and sorting technology for aflatoxins contaminated peanuts[J]. *Agricultural Engineering*, 2014, 4(6): 59-63.

[10] 黄洁. 黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. *化学分析计量*, 2013, (3): 100-104.

HUANG J. Research progress in detecting methods of aflatoxins[J]. *Chem Anal Meterage*, 2013, (3): 100-104.

[11] 罗小虎, 王韧, 王莉, 等. 高效液相色谱快速测定玉米中黄曲霉毒素的研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, (6): 99-103.

LUO X H, WANG R, WANG L, et al. Rapid detection of aflatoxins in corns by high performance liquid chromatography[J]. *J Chin Cereal Oil Assoc*, 2014, (6): 99-103.

[12] 李可, 丘汾. 免疫亲和层析-超高效液相色谱法测定大米中 4 种黄曲霉毒素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, (16): 2328-2330.

LI K, QIU F. Determination of four kinds of aflatoxins in rice by immunoaffinity chromatography-UPLC[J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, (16): 2328-2330.

[13] YIBADATIHAN S, JINAP S, MAHYUDIN N A. Simultaneous determination of multi-mycotoxins in palm kernel cake (PKC) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. *Food AdditContam*, 2014, 31(12): 2071-2079.

[14] 孙娟, 李为喜, 张妍, 等. 用超高效液相色谱串联质谱法同时测定谷物中 12 种真菌毒素[J]. *作物学报*, 2014, 40(4): 691-701.

SUN J, LI W X, ZHANG Y, et al. Simultaneous determination of twelve mycotoxins in cereals by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *ACTA AGRO-NOMICA SINICA*, 2014, 40(4): 691-701.

[15] 成亚倩, 高志贤, 周焕英, 等. 食品中黄曲霉毒素比色生物检测技术研究进展[J]. *分析实验室*, 2021, 40(8): 966-976.

CHENG Y Q, GAO Z X, ZHOU H Y, et al. Recent advance in colorimetric bioassay for detection of aflatoxins in food[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2021, 40(8): 966-976. 完

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。