

产后花生黄曲霉毒素污染监测抽样方法研究

都晓慧^{1,3,4}, 丁小霞^{1,3,4,5*}, 周海燕^{1,3,4,5}, 李培武^{1,2,3,4,5*}, 武琳霞^{1,3,4}, 印南日^{1,3,4,5}, 白艺珍^{1,3,4,5}
(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉, 430062; 2. 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉, 430062; 3. 农业部油料产品质量安全风险评估实验室(武汉), 湖北 武汉, 430062;
4. 农业部生物毒素检测重点实验室, 湖北 武汉, 430062; 5. 农业部油料及制品质量监督检验测试中心, 湖北 武汉, 430062)

摘要:以连续5年全国13个花生主产省产后花生黄曲霉毒素污染监测数据为材料,分析适合我国产后花生黄曲霉毒素污染监测的抽样方法。采用方差分析、回归分析等方法,研究了我国不同花生主产省黄曲霉毒素污染程度与其标准差和变异系数之间的相关性,并以安徽省为例,研究了在一定精确度保证下的最优抽样方案。结果显示:我国各花生主产省产后花生黄曲霉毒素污染水平差异显著,污染程度与样本标准差呈正相关。以安徽省为例,在满足一定抽样精度要求下,最优抽样方案为选取8个花生主产县市,每个县市随机选取8个村,每个村抽取1个样本。
关键词:产后花生;黄曲霉毒素;污染监测;抽样方法
中图分类号: O212.2, S379.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007 – 9084(2015)06 – 0876 – 05

Sampling method of aflatoxin in contamination monitoring of post – harvest peanut
DU Xiao – hui^{1,3,4}, DING Xiao – xia^{1,3,4,5*}, ZHOU Hai – yan^{1,3,4,5},
LI Pei – wu^{1,2,3,4,5*}, WU Lin – xia^{1,3,4}, YIN Nan – ri^{1,3,4,5}, BAI Yi – zhen^{1,3,4,5}
(1. *Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agriculture, Wuhan 430062, China*;
2. *Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China*;
3. *Laboratory of Risk Assessment for Oilseeds Products (Wuhan), Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China*;
4. *Key Laboratory of Detection for Mycotoxins, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China*;
5. *Quality Inspection and Test Center for Oilseeds Products, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China*)

Abstract: According to the monitoring data of aflatoxin contamination in national post – harvest peanut of five consecutive years. A suitable sampling method of monitoring aflatoxin contamination in post – harvest peanut in our county was analyzed. The relationship among aflatoxin contamination degree, standard deviation and variable coefficient in different main peanut producing provinces in China was studied, the adopted methods were variance analysis and regression analysis. In Anhui Province, an optimal sampling scheme under an acceptable accuracy was studied. The results revealed that the difference in aflatoxin contamination level of post – harvest peanut among Chinese main peanut producing provinces was significant and the sample variance was positively related with aflatoxin contamination degree. Under an acceptable accuracy, one sample from each village was selected as the most optimal sampling plan in Anhui Province, and there were eight villages from each of eight main peanut producing counties.
Key words: Post – harvest peanut; Aflatoxin; Contamination monitoring; Sampling method

花生是我国主要的油料作物和纯出口优势农产品,总产、单产及总产值居油料作物首位,年出口量

收稿日期:2015-01-18
基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303088);国家农产品质量安全风险评估重大项目(GJFP2015006);国家科技支撑计划(2012BAB19B09);基本科研业务费专项(0172015013)
作者简介:都晓慧(1989 –),女,硕士研究生,主要从事油料作物产品质量安全风险评估研究,E – mail:dxtree@126.com
* 通讯作者:丁小霞(1978 –),女,副研究员,博士,硕士生导师,主要从事农产品质量安全风险评估研究,E – mail:dingxiaoxia@caas.cn;
李培武(1961 –),男,研究员,博士,博士生导师,主要从事农产品质量安全标准与检测技术研究,E – mail:peiwuli@oilcrops.cn

约占世界花生贸易量的 40% 左右^[1],在我国农业生产和国民经济发展中具有重要地位。但花生极易受黄曲霉毒素污染^[2~6],是影响我国花生消费的主要风险因子之一。据 RASFF 通报数据统计,2004 年至 2012 年,我国出口花生每年因黄曲霉毒素超标遭预警通报批次占全部通报食品批次的 10% 以上,其中 2008 年高达 45%^[1]。黄曲霉毒素污染可发生在生产、储藏、加工等环节,产后花生(收获一个月内的花生)黄曲霉毒素监测对于掌握当年花生黄曲霉毒素污染现状,开展进一步污染控制、脱毒与分类应用具有重要意义。而我国花生种植面积广,不可能全面检测花生黄曲霉毒素含量,因而,采用科学的抽样方法,获取科学的检测数据至关重要。

欧盟、美国、日本等开展了花生黄曲霉毒素抽样方法研究,主要基于进口的大型货柜样品或大型农场生产的花生样品,具有单批次样品量大的特点,以随机抽样为基础,研究了单次抽样误差、样品量和抽样方法对花生黄曲霉毒素检测结果的影响,分别制(修)订了 Reg 401/2006《Sampling and analysis for Mycotoxins》和日本食品卫生法第 6(2)条等法规。Whitaker 等对花生黄曲霉毒素检测结果及其变异性进行了研究,认为黄曲霉毒素检测结果误差主要来源有 3 个:抽样误差、制样误差和分析误差,而抽样误差为主要误差来源^[7~10],抽样方法对花生黄曲霉毒素检测结果影响最大^[11~12]。国内还未见开展花生抽样方法的研究报道,在其他农产品抽样方法研究方面,如王伟等^[13]探讨了江苏省稻米重金属监测多级抽样最优试验方案。本文以连续 5 年全国 13 个花生主产省产后花生黄曲霉毒素污染监测数据为材料,以黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)为主要参数^[14],开展产后花生黄曲霉毒素污染监测抽样方法研究,对准确掌握我国花生黄曲霉毒素污染状况、开展黄曲霉毒素污染防控和预警、保障消费安全将具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 不同花生主产省省间产后花生黄曲霉毒素污染程度与标准差分析 2009 年至 2013 年,每年从辽宁、山东、河南、河北、四川、湖南、湖北、江西、江苏、安徽、广东、广西、福建等 13 个花生主产省(13 省花生种植面积和产量占全国 90% 以上^[15]),结合各省花生生产面积,采用分层随机抽样方法抽取代

表性样品,各省取样点数分别为 524、1 347、1 330、691、459、448、443、448、412、619、470、393、380,每个取样点取混合样 1 份,共计 7 964 份样品,每份样品量 3kg^[16,17]。

1.1.2 安徽省花生黄曲霉毒素监测抽样方案研究

2013 年,从泗县、明光、肥东、埇桥、怀远、肥西、砀山、五河、固镇、灵璧、南谯、蒙城、定远、凤阳、濉溪等 15 个花生主产县市,每个县随机抽取 10 个村,每村随机选择 1 个取样点,每个取样点取混合样 1 份,共计 150 份样品,每份样品量 3kg。

1.2 方法

1.2.1 单点混合样取样方法 在选取的取样点,随机抽样 30kg,混匀,采用四分法抽取代表性样品 3kg,为 1 个样本,密封,一周内运回实验室检测。

1.2.2 制样方法 样品抵达实验室后,去杂、去土,全部脱壳,切片机切片至 0.5mm 左右,再经样品粉碎机粉碎,过 0.42mm 筛,装入样品瓶中备用,一周内完成样品黄曲霉毒素含量检测。

1.2.3 检测方法 采用免疫亲和层析净化、液相色谱分离、荧光检测器检测的方法分析花生中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 含量。称取 5g 经充分粉碎过的试样至 50mL 试管中,加入 15mL 乙腈水溶液(乙腈 + 水 = 84 + 16)提取,漩涡振荡 30s 后,在 50℃ 水浴中超声提取 10min,定性滤纸过滤,取 4mL 滤液于 10mL 试管中,加入 2mL 石油醚,漩涡振荡 30s,静置 15~20min,取下层水溶液 3mL,加 8mL 纯水后,用 0.45μm 有机相滤膜过滤。移取上述提取液 8mL,过黄曲霉毒素免疫亲和柱净化,再用 10mL 纯水淋洗,最后用 1mL 甲醇洗脱。1mL 甲醇洗脱液于 60℃ 下氮气吹干,加入正己烷 200μL 和三氟乙酸 100μL,密闭混匀 30s,40℃ 烘箱中衍生 20min。氮气吹干,以 1mL 乙腈水溶液(乙腈 + 水 = 15 + 85)溶解,混匀,转移至样品瓶中,供测定用。采用 3 倍信噪比作为黄曲霉毒素的检出限,本方法的检出限分别为:AFB₁ 检出限 0.01μg/kg, AFB₂ 检出限 0.01μg/kg, AFG₁ 检出限 0.09μg/kg, AFG₂ 检出限 0.05μg/kg。

1.2.4 数据分析方法 采用方差分析、回归分析等方法,不同花生主产省省间产后花生黄曲霉毒素污染程度与标准差分析中,将每个省看成一个组,共有 13 个组;安徽省抽样方法研究中,采用多级抽样、单项系统分组,15 个花生主产县市为一级抽样($r_A = 15$),即 15 个组;每个县市随机抽取 10 个样点村作为二级抽样($r_B = 10$),即每个组内有 10 个个体。

2 结果与分析

2.1 不同花生主产省产后花生黄曲霉毒素污染差异性分析

采用回归分析、方差分析等方法分析了连续 5 年我国 13 个花生主产省产后花生黄曲霉毒素 B₁ 污染数据。结果显示,各主产省产后花生黄曲霉毒素 B₁ 污染数据平均值和最大值差异显著,不同省份黄曲霉毒素 B₁ 平均值最大相差 32.91 μg/kg,最大值相差 774.36 μg/kg。7 964 个花生黄曲霉毒素 B₁ 污染数据,未检出值(ND)占 74.7%,5 ng/g 以下检测值占 92.7%,5 ng/g ~ 20 ng/g 之间的数据仅占 2.5%,100 ng/g 以上的数据仅占 2.3%,整体数据呈现明显的左偏分布。

以省为单位将数据分类汇总后进行方差分析,结果显示,F = 18.51,在 α = 0.05 水平下差异显著,即各省 AFB₁ 污染程度差异显著。

对 13 个省的产后花生 AFB₁ 平均值与标准差进行了回归分析(图 1),结果显示相关系数 R = 0.969,呈显著正相关,说明随着不同地区花生样本黄曲霉毒素污染平均值的增大,样本标准差也会相应增大。但将各个省份污染数据的平均值与变异系数做散点图(图 2),经过曲线拟合,各个花生主产省的花生 AFB₁ 污染数据的平均值与变异系数的幂函数方程的相关系数为 R = 0.817 9,说明平均值越大,样本数据变异系数越小,即数据的离散程度越低。这与 Whitaker^[7-13] 等人研究结果相符。综合上

述可见,花生样本黄曲霉毒素 B₁ 抽样检测数据的平均值与标准差呈显著正相关,但与变异系数呈显著负相关。

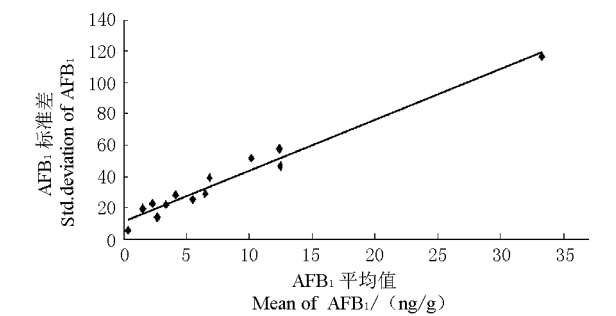


图 1 13 省平均值与标准差回归分析
Fig.1 Regression analysis of mean and std. deviation in 13 provinces

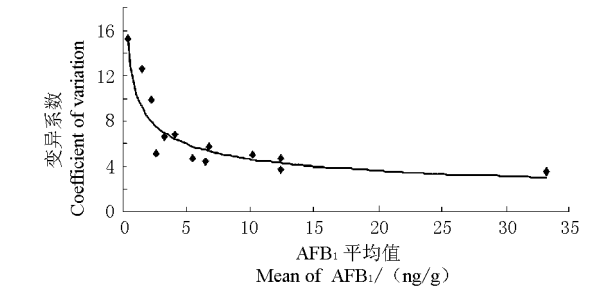


图 2 13 省平均值与变异系数散点图
Fig.1 Scatter diagram of mean and variable coefficient in 13 provinces

2.2 以安徽省为例,产后花生黄曲霉毒素监测最优抽样方案研究

以安徽省为例,探讨了安徽省产后花生黄曲霉毒素监测抽样最优方案。2013 年对安徽 15 个花生主产县抽取的产后花生样品黄曲霉毒素 B₁ 污染监测结果分析见表 1。

表 1 安徽省 15 个主产县产后花生黄曲霉毒素 B₁ 污染数据方差分析
Table 1 Variance analysis results of post-harvest peanut aflatoxin B₁ in 15 main production counties of Anhui Province

变异来源 Sources of variation	平方和 SS	自由度 df	方差 MS	期望均方 EMS	F 值 F
县市间 City	335 479.9	14	23 962.85	$\sigma_{eB}^2 + 10\sigma_{eA}^2$	19.516 07 * *
误差 Error	164 532.2	134	1 227.852	σ_{eB}^2	
总变异 Total variation	500 012.1	148			

注: * * 表示 0.05 水平差异显著
Note: * * indicates significance at 0.05 level

由表 1 可知,省内各主产县间花生 AFB₁ 污染差异显著,不同主产县产后花生黄曲霉毒素 B₁ 平均值范围为:ND ~ 62.66 μg/kg,标准差范围为 ND ~ 116.52,县市间差异达到极显著水平,根据期望均方公式计算(表 1),第二阶抽样误差 $\sigma_{eB}^2 \approx 1\,227.852$,第一阶抽样误差为 $\sigma_{eA}^2 \approx 2\,273.5$,说明安徽花生黄曲霉毒素抽样误差主要来自县市间。

2.2.1 考虑样本容量和精确度时抽样方案的探讨
为了确定最佳样本容量,首先计算各级抽样中每

增加一次重复时,误差方差减少的效率,即各阶抽样每增加一次重复时,对于提高试验精确度的效率(表 2)。结果显示:在县市间和样村间每增加一次重复对于减少各阶抽样误差的效率,根据二级抽样变异模型 $S^2 = \frac{\sigma_{eA}^2}{r_A} + \frac{\sigma_{eB}^2}{r_B}$,当 $r_A = r_B = 1$ 时,总抽样变异为 $S = 59.172$,但是当 $r_A = 2, r_B = 1$ 时, $S = 48.627$,抽样变异明显减小,因为增加县市与增加样点村对于减少抽样总误差的效率不同,讨论增加县

市与增加样点村对于抽样总误差的减少效率(表3)。结果显示,若固定样点村(r_B)为1个,县市的抽样数量(r_A)为8时抽样总变异的减少开始变缓,这意味着,若样点村只取1个,当县市增加到8个后,抽取县市的数量若继续增加总变异的减小程度就很弱了,这时增加样点村的数量,到8个样点村时总变异的减少程度再次变缓。此时总变异为 $S_{y1} = 20.920\ 54$,因此仅考虑精度时其中一个抽样方案为:

$$r_A = 8, r_B \geq 8 \tag{1}$$

若固定县市为1个时,样点村增加到6个时总变异的变化开始缓慢,在此基础上增加县市到10时,总变异变化情况开始变缓,此时总变异为 $S_{y2} = 20.784\ 42$ 。因此,也可以选择抽样方案为:

$$r_B = 8, r_A \geq 10 \tag{2}$$

但是实际操作时抽样成本也是很重要的限制因素,以上两个抽样方案的选择和具体参数的拟定还

需要结合抽样成本来计算。
2.2.2 考虑成本和精确度时抽样方案的探讨 现以上述花生黄曲霉毒素预抽样的结果为基础来探讨考虑调查费用时的最佳抽样方案。调查总费用用 c 表示,则 $c = r_A c_A + r_B c_B$,其中: c_A = 一个县市的调查费(元);
 c_B = 一个样点村的调查费(元);
假设 $c_A = 6$ 元, $c_B = 362$ 元,则方案(1)和(2)需要调查费用分别为:

$$C_1 = 8 \times 6 + 8 \times 8 \times 362 = 23\ 216(\text{元})$$

$$C_2 = 10 \times 6 + 10 \times 8 \times 362 = 29\ 020(\text{元})$$

结合2.2.1中精度的计算可知,方案(1)与(2)的精度相差仅为 $S_{y1} - S_{y2} = 0.136\ 12$,相对相差仅为0.65%,低于5%,因此可以认为两个方案在精度上没有差异,但是在经费上却相差5 804元,因此认为方案(1)更优,即取8个县市,8个样点村为安徽省最优抽样方案。

表2 各抽样环节增加(重复)对于减少各阶误差方差的效率

Table 2 Efficiency in reducing the error variance of each stage by increasing steps r (repeat) in each sampling

r_i	环节 Operations			
	A		B	
	$\frac{\hat{\sigma}_{eA}^2}{r_A}$	r 每增加1所减少的方差	$\frac{\hat{\sigma}_{eB}^2}{r_B}$	r 每增加1所减少的方差
		Reduced variance with increasing of r		Reduced variance with increasing of r
1	2 273. 50	—	1 227. 85	—
2	1 136. 75	1 136. 75	613. 93	613. 93
3	757. 83	378. 92	409. 28	204. 64
4	568. 38	189. 46	306. 96	102. 32
5	454. 70	113. 68	245. 57	61. 39

表3 增加县与样点村对减少抽样总变异的效率

Table 3 Efficiency in reducing the total sampling error variance by increasing the number of counties

r_B	r_A										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	59. 17	48. 63	44. 56	42. 38	41. 02	40. 08	39. 40	38. 88	38. 48	38. 15	37. 87
2	53. 73	41. 84	37. 04	34. 39	32. 69	31. 51	30. 64	29. 97	29. 44	29. 00	28. 65
3	51. 80	39. 32	34. 16	31. 27	29. 39	28. 07	27. 09	26. 33	25. 73	25. 23	24. 82
4	50. 80	38. 00	32. 63	29. 59	27. 60	26. 19	25. 13	24. 31	23. 66	23. 12	22. 66
5	50. 19	37. 18	31. 68	28. 53	26. 46	24. 99	23. 88	23. 02	22. 32	21. 75	21. 27
6	49. 78	36. 63	31. 02	27. 80	25. 68	24. 16	23. 01	22. 11	21. 38	20. 78	20. 28
7	49. 49	36. 22	30. 55	27. 27	25. 10	23. 54	22. 37	21. 44	20. 69	20. 07	19. 55
8	49. 26	35. 92	30. 19	26. 87	24. 66	23. 07	21. 87	20. 92	20. 15	19. 51	18. 98
9	49. 09	35. 68	29. 90	26. 55	24. 31	22. 70	21. 48	20. 51	19. 72	19. 07	18. 52

3 讨论与结论

基于2.1中的分析可以看出,2009 – 2013 年我国花生普查样本的7 964个黄曲霉毒素 B_1 检测结果显示,花生样本黄曲霉毒素 B_1 抽样检测数据的平均值与标准差呈显著正相关,但与变异系数呈显著负相关。并且样本标准差数值普遍高于样本平均

值,这与 Whitaker^[7,9,11,13]的研究结果相符。因为花生为粒状作物,并且颗粒较大,根据 Whitaker^[7,9,11,13]的研究,粒状粮食的黄曲霉毒素 B_1 检测结果的标准差在数值上普遍大于其平均值,但是当抽样量增加时标准差会减小。
我国花生生产量大、面广,且花生黄曲霉毒素分析过程复杂、成本高,若要对全国的产后花生进行全

检测基本不可行,制定科学的抽样方法意义重大。本研究基于连续5年从全国13个花生主产省抽取的7964份产后花生样品黄曲霉毒素 B_1 检测数据,分析了我国产后花生黄曲霉毒素 B_1 污染特征,结果显示,我国各花生主产省花生黄曲霉毒素污染差异显著,因此不适合用简单随机抽样的方式进行抽样。本文基于以上研究,提出了我国产后花生宜采用分层的多级取样方法,先确定花生主产省,对于产后 AFB_1 平均值越大的主产省,即该省产后花生 AFB_1 污染数据的离散程度越大,需要更多的样品量来保证其取样精度,这为风险监测方案制定提供了理论依据。本研究中7964个花生黄曲霉毒素污染数据的特征与Whitaker^[7]等人对花生黄曲霉毒素污染数据特征的研究结果一致,因此具有代表性。

在针对每个主产省确定抽取的花生数量与取样点时,需要同时考虑抽样的精确度和抽样成本问题。但抽样精确度和抽样成本是一对矛盾,刘爱芹^[18]对随机抽样中抽样量、抽样精确度和抽样成本之间的关系进行了研究,认为抽样量越大,抽样精确度越高,同时抽样成本也就越高。我们在实际监测抽样方案制定时,通过优化各级的抽样样本数,使得在满足一定的抽样精确度条件下,所支出的抽样费用最低,即达到了最优抽样方案设计的目的,我们在安徽省产后花生抽样方案设计时,在同时考虑抽样精确度和抽样成本的前提下,采用随机选取8个花生主产县市,每个县市随机选取8个村,每个村随机重复2次,抽取1个样本为最优方案。当然,抽样方案的设计需要根据经费投入等实际情况和具体要求,通过相关部门共同商讨决定。

参考文献:

[1] 中国技术贸易措施网[OL]. <http://www.tbtsps.gov.cn/Pages/home.aspx>.

[2] Horn B W, Dörner J W. Regional differences in production of aflatoxin B_1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999, 65(4):1444-1449.

[3] Zorzete P, Reis T A, Felício J D, et al. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field[J]. Food Chemistry, 2011, 129(3):957-964.

[4] Ali N, Hashim N H, Saad B, et al. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins

in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia[J]. Food & Chemical Toxicology, 2005, 43(12):1763-1772.

[5] Romagnoli B, Menna V, Gruppioni N, et al. Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy[J]. Food Control, 2007, 18:697-701.

[6] Tirmenstein M A, R Mangipudy. Aflatoxin. Encyclopedia of toxicology (Third Edition) [M]. P. Wexler. Oxford, Academic Press, 2014. 104-106.

[7] Whitaker T B, Dickens J W, Monroe R J. Variability of aflatoxin test results[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1974, 51(5):214-218.

[8] Whitaker T B, Dickens J W. Errors in aflatoxin analyses of raw peanuts by thin layer chromatography[J]. Peanut Science, 1981(2):89-92.

[9] Whitaker T B, Dörner J W, Dowell F E, et al. Variability associated with chemically testing screened farmers stock peanuts for aflatoxin 1[J]. Peanut Science, 1992, 19(2):88-91.

[10] Whitaker T B, F E Dowell, W M Hagler, et al. Variability associated with sampling, sample preparation, and chemical testing of farmers stock peanuts[J]. J Assoc Off Anal Chem Int, 1994, 77:107-116.

[11] Whitaker T B, Dickens J W, Monroe R J, et al. Comparison of the observed distribution of aflatoxin in shelled peanuts to the negative binomial distribution[J]. Journal of Oil & Fat Industries, 1972, 49(10):590-593.

[12] Whitaker T B, Jeremy Wu, F E Dowell, et al. Effects of sample size and sample acceptance level on the number of aflatoxin-contaminated farmers stock lots accepted and rejected at the buying point[J]. J Assoc Off Anal Chem Int, 1994, 77:1672-1680.

[13] 王伟,宋雯,尹双义,等.江苏省稻米重金属镉检测多级抽样最优试验方案的探讨[J]. 作物学报, 2014, 11:2052-2056.

[14] 丁小霞. 中国产后花生黄曲霉毒素污染与风险评估方法研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2011.

[15] 中华人民共和国国家统计局[OL]. www.stats.gov.cn/.

[16] Kaisuhiko Y. Statistical analysis of mycotoxins in sampling inspection of agricultural products[J]. Journal of Hygienics, 1991, 32(6):487-497.

[17] 刘爱芹. 随机抽样中样本容量确定的影响因素分析[J]. 山东财政学院学报, 2006(5):60-64.