

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240126003

基于激光诱导荧光光谱技术检测花生中 黄曲霉毒素 B₁

王成宏^{1,2}, 何学明^{1,2}, 都立辉^{1,2}, 沈飞^{1,2*}

(1. 南京财经大学食品科学与工程学院, 南京 210023;
2. 江苏高校现代粮食流通与安全协同创新中心, 南京 210023)

摘要: **目的** 探究激光诱导荧光(laser induced fluorescence, LIF)技术检测花生中黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)的可行性, 定性和定量分析花生中的 AFB₁。 **方法** 制备不同浓度梯度的污染花生, 经 LIF 系统采集荧光光谱, 平滑后分析光谱数据结构。基于全波长光谱使用 5 种不同建模方法对污染花生定性判别, 采用偏小二乘法回归(partial least squares regression, PLSR)和 BP 神经网络(BP neural networks, BPNN)进行定量预测。通过竞争性自适应重加权采样(competitive adaptive reweighted sampling, CARS)提取特征波长, 研究其对定性和定量预测的影响。 **结果** 对于全波长光谱数据, 线性核函数的支持向量机[support vector machine with linear kernel function, SVM(Linear)]建立的判别模型效果最优, 预测正确率 100.00%。PLSR 和 BPNN 均获得较好的定量预测效果, 剩余预测偏差(residual predictive deviation, RPD)>3.0, 检出限(limit of detection, LOD)<20 μg/kg; 对于特征光谱数据, SVM(Linear)定性判别预测正确率 93.94%, F₁ 值为 0.94, 受试者工作特征(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.989。建立的 PLSR 模型性能优于未提取特征波长的两种定量模型, RPD 为 3.36, LOD 为 14.76 μg/kg。 **结论** LIF 技术检测花生中的 AFB₁ 简单快速, 定性定量预测模型准确性好, 具有一定可行性。

关键词: 激光诱导荧光; 荧光光谱法; 黄曲霉毒素 B₁; 花生

Detection of aflatoxin B₁ in peanuts based on laser induced fluorescence spectroscopy

WANG Cheng-Hong^{1,2}, HE Xue-Ming^{1,2}, DU Li-Hui^{1,2}, SHEN Fei^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China;
2. Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the feasibility of the laser induced fluorescence (LIF) technique for the detection of aflatoxin B₁ (AFB₁) in peanuts, and to qualitatively and quantitatively analyze AFB₁ in peanuts.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1102600)、国家自然科学基金项目(32172306)、江苏省自然科学基金面上项目(BK20211291)、江苏省与浙江省重点研发计划项目(BE2023347, 2022C02020)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1102600), the National Natural Science Foundation of China (32172306), the National Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20211291), and the Key Research and Development Program of Jiangsu and Zhejiang Province (BE2023347, 2022C02020)

*通信作者: 沈飞, 博士, 教授, 主要研究方向为粮油检测与加工技术与装备。E-mail: shenfei@nufe.edu.cn

*Corresponding author: SHEN Fei, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering of Nanjing University of Finance and Economics, No.3, Wenyuan Road, Qixia District, Nanjing 210023, China. E-mail: shenfei@nufe.edu.cn

Methods Different concentration gradients of contaminated peanuts were prepared, fluorescence spectra were collected by the LIF system, and the spectral data structure was analyzed after smoothing. Qualitative discrimination of contaminated peanuts based on full wavelength spectroscopy using five different modeling approaches, Partial least squares regression (PLSR) and BP neural networks (BPNN) were used for quantitative prediction. Feature wavelengths were extracted by competitive adaptive reweighted sampling (CARS) to investigate its effect on qualitative and quantitative prediction. **Results** For full wavelength spectral data, the discriminant model built by support vector machine with linear kernel function [SVM(Linear)] was the most effective, with a 100.00% correct prediction rate, and both PLSR and BPNN obtained better quantitative prediction results, the residual predictive deviation (RPD) was >3.0 and the limit of detection (LOD) was <20 $\mu\text{g}/\text{kg}$; for the feature spectral data, the SVM(Linear) qualitative discriminant predicted 93.94% correctly, F_1 value was 0.94 and the area under the curve (AUC) of receiver operating characteristic curve (ROC) was 0.989. The performance of the established PLSR model was better than the two quantitative models without extracting the characteristic wavelengths, the RPD was 3.36 and the LOD was 14.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The detection of AFB₁ in peanut by LIF technique is simple and rapid, and the qualitative and quantitative prediction model has good accuracy, which has certain feasibility.

KEY WORDS: laser induced fluorescence; fluorescence spectroscopy; aflatoxin B₁; peanut

0 引言

花生是我国重要的油料和经济作物,在我国黄淮海流域、长江流域、东南沿海、东北区域广泛种植^[1]。据联合国粮农组织(Food and Agricultural Organization, FAO)数据库统计数据,2022我国花生总产量为1838.05万t,位居世界第一^[2]。花生有着丰富的蛋白质、脂质和纤维素等营养素,成为了霉菌的天然“培养基”,在收获、加工、储存和运输过程中由于受到环境改变或者一些人为因素的影响^[3](比如在收获前遭遇干旱、高温、虫害等威胁,收获后受到机械损伤,干燥不彻底,储存环境未控制好湿度等影响^[4]),导致其极易受到黄曲霉毒素的侵袭。黄曲霉毒素(aflatoxins)是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)或集峰曲霉(*Aspergillus nomius*)产生的次生代谢产物,受黄曲霉毒素污染的花生外观改变、营养物质流失、品质下降、产量降低,给农民带来巨大经济损失^[5]。目前已经发现的黄曲霉毒素衍生物约有20种,其中黄曲霉毒素B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)是最主要的一种,它对人及动物肝脏组织具有强烈致癌作用,还会导致急性和严重的慢性疾病^[6]。被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)认定为I类致癌物^[7]。无论是直接食用AFB₁污染的食物,还是间接摄入接触过AFB₁污染饲料的牲畜制品(肉类、蛋类、奶类),都会在人体组织中积累,造成危害^[8]。为了保证食品安全,降低AFB₁对人类的危害,世界各国均对花生及其制品中AFB₁的含量进行了严格的监控与限量^[9]。我国在GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中规定,花生及其制品中AFB₁的限量为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前已有多种方法用于检测 AFB₁,传统检测方法主

要包括:化学分析法^[10]、免疫分析法^[11]与仪器分析法^[12]。这些方法虽然有着非常高的精度,但是仪器成本较高,需要花费大量的时间,样品处理有破坏性,难以实现样本毒素的在线检测。而各种光学技术因具有快速和在线识别的潜力受到广泛关注,在农产品品质和理化分析方面得到了良好的效果^[13]。在农产品黄曲霉毒素检测方面,常用的光学技术有近红外光谱、中红外光谱、荧光光谱、拉曼光谱、机器视觉、多光谱和高光谱成像等。荧光光谱作为其中的一种,因其高灵敏度而备受青睐。通过激发黄曲霉毒素产生荧光^[14-15],传统光源被更强、单色性更好的激光所取代,这种方法被称作激光诱导荧光(laser induced fluorescence, LIF)法,并被引入化学计量学方法来分析冗杂的光谱数据,可以有效的运用于检测花生油、坚果谷物等的 AFB₁ 的污染。CHEN 等^[16]利用 375 nm 激发的 LIF 系统检测不同品牌的食用油,结果显示与 AFB₁ 相关的 LIF 光谱在判别分析和回归分析中都具有良好的验证精度,4 种品牌花生油的正确分类率为 98%至 100%,真阳性率(true positive rate, TPR)为 96%至 100%,真阴性率(true negative rate, TNR)为 100%,决定系数(coefficient of determination, r^2)为 0.97 至 0.99。SMEESTERS 等^[17]采用单光子和双光子 LIF 系统正确区分健康($\text{AFB}_1 < 0.8 \mu\text{g}/\text{kg}$)和污染($\text{AFB}_1 > 70 \mu\text{g}/\text{kg}$)玉米, BERTANI 等^[18]采用便携式荧光光谱设备,基于核函数为径向基函数的支持向量机[support vector machine with RBF kernel function, SVM(RBF)]判别掺杂了污染杏仁的杏仁浆,检测阈值设置为 6.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时正确率达到 94%。WU 等^[19]利用 LIF 系统,结合 SVM 对不同品种人工污染的开果进行分类,正确率达 92.3%~100%,并且对混合品种的分类正确率到达 98.4%。

尽管 LIF 技术已经在农产品中检测 AFB₁ 方面发挥作

用,但在检测过程中仍面临诸多挑战。目前商业化的筛选设备主要针对外观缺陷和严重霉变的籽粒^[20],只能间接剔除 AFB₁ 污染的籽粒。这些设备的毒素检测特异性较低,检出限较高,并且以整体污染情况为指标,缺乏对单个籽粒的污染检测能力。此外,已有的研究主要集中在定性分析方面,对于定量分析的研究较少。

针对以上问题,本研究结合多种化学计量学方法处理花生 LIF 光谱,定性和定量分析单粒花生中的 AFB₁,并探索 LIF 技术检测 AFB₁ 污染花生的可行性,以期实现对花生中 AFB₁ 的定性定量检测,为 LIF 技术的进一步发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花生样品购于淘宝网诚信农产店,花生品种为花育 17,产地山东。

AFB₁ 标准品(纯度≥98%,上海源叶生物科技有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,德国默克公司);乙酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);甲酸(色谱纯,阿拉丁试剂有限公司);CNW 分散固相萃取纯化管(上海安谱实验科技股份有限公司);实验用水均为超纯水。

1.2 仪器与设备

WatersH-Class/Xevo TQ-S 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国沃特世科技有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);NMSG-12 多管混合器(泰州诺米医疗科技有限公司);0.22 μm 尼龙滤膜(美国颇尔公司);PRACTUM224-1CN 电子分析天平(精度 0.1 mg,塞利多斯科学仪器北京有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

本研究选取 2022 年新采收花生为对象,经超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法^[21]检测,未检出 AFB₁。将花生去皮放置于 4℃ 储藏。自然污染的样品在真菌生长过程中通常会有一些物理特性的变化,包括表面和内核颜色、荧光基质结构、反射率和透射率等变化^[22],自然霉变样品的光谱受到诸多因素的影响。而产黄曲霉毒素的霉菌是需氧菌,黄曲霉毒素通常分布在花生的表面。因此本研究采用人工滴加 AFB₁ 溶液到花生表面的方法,制备毒素污染样品模拟自然污染的花生,相较于自然污染样品,采用加标样品更具有可控性和可重复性,能够更准确地模拟和研究黄曲霉毒素的影响。

用乙腈溶解 AFB₁ 标准品制作 10000 μg/kg 标准品母液,将母液放置于 -20℃ 储藏备用。随机选取 120 粒花生,分为 6 组每组 20 个作为空白组样本,花生平均重量为

1.2029 g。在花生表面中心位置做好标记(约为 3 mm 的圆形标记),在标记处采集光谱后备用。加标方式参照 KIMULI 等^[23]的方法,用乙腈将母液稀释到 0.6015、1.2029、2.4058、3.6087、6.0145 μg/mL,移液枪分别取 10 μL 不同浓度梯度的工作液滴加在空白组样本的标记位置,获得污染水平为 5、10、20、30、50 μg/kg 的花生样本,每个污染水平的花生有 20 个,剩余 20 个空白花生仅滴加 10 μL 乙腈作为对照样本。

1.3.2 加标样品毒素浓度验证

为确保人工滴加毒素方法可靠性,对滴加标品的样品进行毒素验证。由于本研究中含有大量果仁,考虑到成本和处理的样本较多,以及光谱采集过程可能会使毒素含量下降,因此使用同样加标方法制备了 12 粒加标样品。称取每粒样品重量,用研钵和研杵单独研磨每粒花生^[24],放入离心管中。在离心管中加入 4 mL 乙腈-水-乙酸溶液(V₁:V₂:V₃=80:19:1),振荡 2 min 后放置于 4℃ 冰箱平衡 15 min 后拿出。取 2.4 mL 上清液于装有 0.4 g 分散固相萃取填料的 7 mL 离心管中,10000 r/min 离心 2 min。将 1 mL 上清液通过 0.22 μm 有机滤膜过滤至进样瓶,采用外标法测定 AFB₁ 的含量。

1.3.3 光谱采集

本研究所用到的激光诱导荧光系统由实验室自主搭建^[25],激发波长为 375 nm,输出功率为 25 mW,入射光束与接收端的夹角为 60°,样品表面的激发光斑为直径 5 mm 的圆形可以完全激发样品受污染区域。对于不同的空白组、对照组和污染组,均选择花生表面标记位置采集荧光光谱,因为花生表面形态不一,为了避免花生采集时产生微小震动改变位置形态,确保采集到标记位置,在采集台上放置一块带凹槽的标准白板,采集光谱时,将花生置于凹槽上,荧光光谱通过 OceanView 软件采集得到,采集范围 400~900 nm,积分时间设置为 1000 ms,平滑与平均次数为 2,每个样本采集 3 次光谱,每个样本的最终光谱由 3 次光谱平均得到,整个采集过程于暗室中进行。

使用随机抽样法(random sampling, RS)按照 2:1 的比例将数据集划分为训练集和测试集。

1.4 数据处理

采用 UnscramblerX 10.4 和 Matlab2023a 对采集到的荧光光谱分析处理。主成分分析(principal component analysis, PCA)、样本划分和偏最小二乘回归(partial least squares regression, PLSR)预测在 UnscramblerX 10.4 软件中进行,线性判别分析(linear discriminate analysis, LDA)、K-近邻算法(K-nearest neighbor, KNN)、SVM 和 BP 神经网络(BP neural networks, BPNN)和模型评估、参数优化以及特征提取算法在 Matlab2023a 软件中处理。使用交叉验证方法对定量和定性模型进行验证,并使用外部数据集进行测试。

利用总分类正确率(correct classification rate, CCR)、假阳性率(false positive rate, FPR)、假阴性率(false negative rate, FNR)、精确率和召回率调和值(F_1 值)^[26]以及受试者工作特征(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线下面积(area under the curve, AUC)^[27]对定性模型进行评估; 利用校正集决定系数(R_c^2)、预测集决定系数(R_p^2)、校正集均方根误差(root mean squared error of calibration set, RMSEC)、预测集均方根误差(root mean squared error of prediction set, RMSEP)、预测集标准偏差与预测标准偏差的比值(residual predictive deviation, RPD)、预测集预测值与参考值线性拟合的斜率以及检出限(limit of detection, LOD)以及预测值与参考值的显著性水平(significance, Sig)对定量模型进行评估。

其中 F_1 值与 AUC 数值越接近于 1, 说明定性模型效果越好; r^2 越接近 1, RMSEC、RMSEP 越小说明定量模型越好。当 RPD 的值大于或等于 3.0 时, 说明该模型的预测能力很好, 定量预测准确度较高。

竞争性自适应重加权采样(competitive adaptive reweighted sampling, CARS)算法, 采用 5 倍交叉验证获得最佳变量数, 蒙特卡罗运行次数设置为 50 次。

2 结果与分析

2.1 毒素浓度验证

采用与研究污染花生同样的制备手段制备了 0、5、20、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度梯度的花生共 12 粒, 通过超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法检测, 以确保人工滴加操作正确污染样品。毒素回收率 74.04%~110.17%, 平均回收率为 94.56%, 图 1 是样品加标的毒素值(X)和仪器检测后得到的毒素值(Y)的线性拟合, 拟合方程为 $Y=0.9065X+0.7586$, r^2 为 0.9909, 表明二者之间线性相关。斜率接近 1, 表明人工滴加毒素正确污染了样品, 因此后续建立定量模型时响应值设置的是参考毒素。

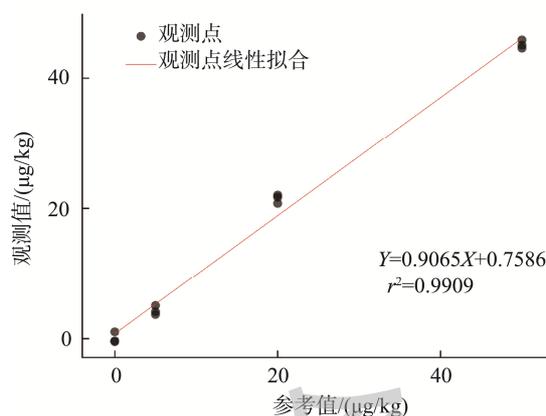
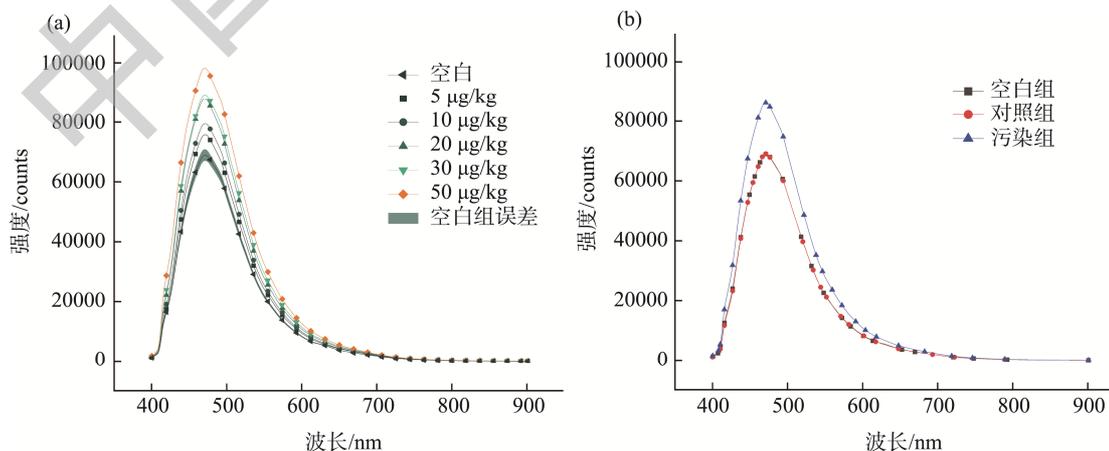


图1 加标样品毒素检测值与参考值拟合

Fig.1 Spiked sample toxin detection values fitted to reference values

2.2 原始光谱分析

污染组、空白组以及对照组的花生平均荧光光谱如图 2 所示, 采集到的原始荧光光谱范围为 400~900 nm, 对照组与空白组样品的光谱曲线相同并且重叠, 表明仅滴加乙腈对光谱采集的结果无影响, 对比空白组与污染组花生的光谱图可以发现, 受到 AFB₁ 污染的花生有更高的荧光强度, 并且在污染组中荧光强度随着污染程度的增加呈上升趋势, 由于花生表面只添加了 AFB₁, 这表明花生的荧光光谱与污染浓度有一定的线性关系。所有花生的光谱均呈现单一峰, 位于 400~600 nm 之间, 峰值在 470 nm 附近, 主要由花生蛋白、酚类物质和核黄素等成分所致。有研究表明, 365 nm 激发波长下 AFB₁ 的主要特征荧光峰在 428 nm 处。而在光谱图中并没有显示出 AFB₁ 的特征峰, 这是因为 AFB₁ 含量远低于花生中有荧光特性的化学组分, 这些化学组分在光谱信息中占主导部分, AFB₁ 的荧光信号被覆盖。需要借助化学计量学的方法进一步分析得到关键光谱信息。



注: (a)不同污染浓度样本光谱强度; (b)空白、对照、污染组光谱强度。激发波长375 nm, 狭缝25 μm 。

图2 花生原始光谱

Fig.2 Original spectrum of peanut

2.3 PCA 分析

为了去除冗余信息,直观地观察光谱数据结构,采用 PCA 对污染组与空白组花生的聚类趋势进行分析^[28]。在提取主成分之前,对原始光谱使用 S-G 滤波器(savitzky-golay, S-G)进行平滑处理以去除噪声影响,模式设置为二次项,平滑点 3。图 3(a)~(e)为单一污染水平与空白样本的 PCA 得分图。总体上看,各组 PC1 和 PC2 之和均在 90%以上,能够对整体光谱数据进行概括,各组间沿 X 轴方向都呈现了

一定的分离趋势,随着污染水平的提高这种分离趋势更加明显,除了 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组能与空白组完全区分,其余污染组和空白组有一部分样品重叠并不能完全的区分开,原因是因为荧光光谱变化受背景荧光主导^[29],随着污染浓度的上升,背景荧光的主导位置削弱。图 3(f)为未污染样本和污染样本的 PCA 得分图,二者之间显示了一定的分离趋势,但是重叠部分的样本难以区分。PCA 属于无监督分析算法,可以看出样本间的聚类趋势,但并不能获得具体的分类结果,后续将采用监督算法对污染与未污染的样本进行判别。

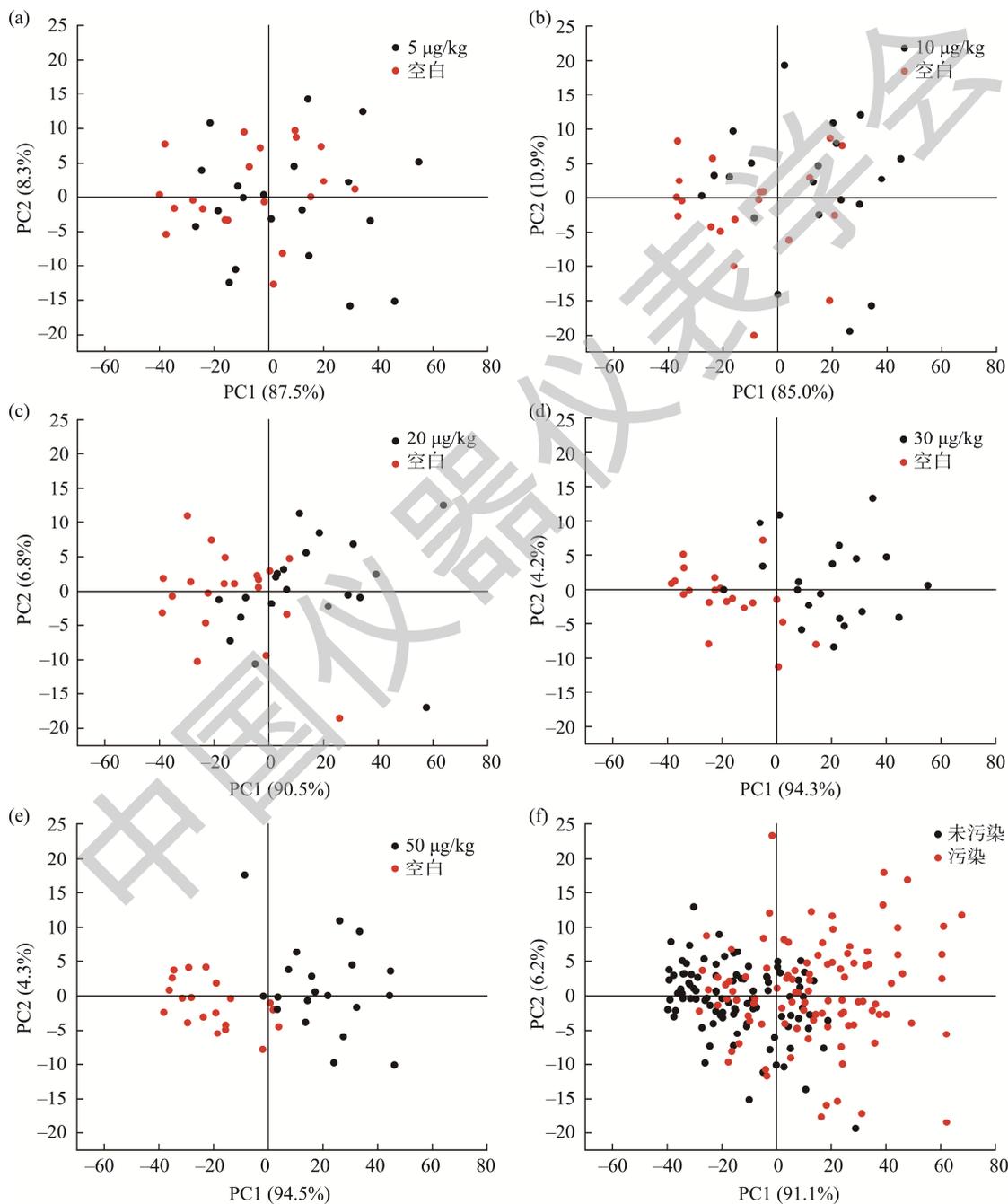


图3 不同污染组与空白组的PCA得分

Fig.3 PCA scores of different contamination groups and blank group

2.4 定性判别分析

将样本按 2:1 的比例分为训练集和预测集。使用不同建模方法[LDA、KNN、SVM(Linear)、SVM(Polynomial)与 SVM(RBF)]对未污染与污染花生进行定性判别分析。整体光谱数据作为输入值, 样本类型作为响应值, 不同模型的评价结果如表 1 所示。除 KNN 模型外, 其余 4 种模型的 F_1 值和 AUC 都接近于 1, 代表模型具有正确区分花生是否污染的能力。KNN 的分类效果相比于其他 4 种模型最差, 训练集和预测集的 CCR 均在 80% 以下, 这可能是由于输入值为全波段的光谱, KNN 方法并不适用于这种高维特征计算^[30], 并且有很高的 FNR, FNR 高表明在判别过程中将污染的样本错认为未污染样本, 因为 AFB₁ 对人体危害极大, 因此在实际应用中, 应当避免这样的误判出现。相比于其他模型, 由 SVM(Linear)建立的是否污染的判别模型结果最优, 训练集 CCR 为 98.51%, FNR 为 0.00%, 预测 CCR 达到 100.00%, AUC 为 1.00, 能够正确的区分污染与未污染样品。表明污染花生与未污染花生的光谱数据线性可分,

此时模型的参数为框约束级别为 150.97, 核尺度为 7.08。

2.5 回归分析

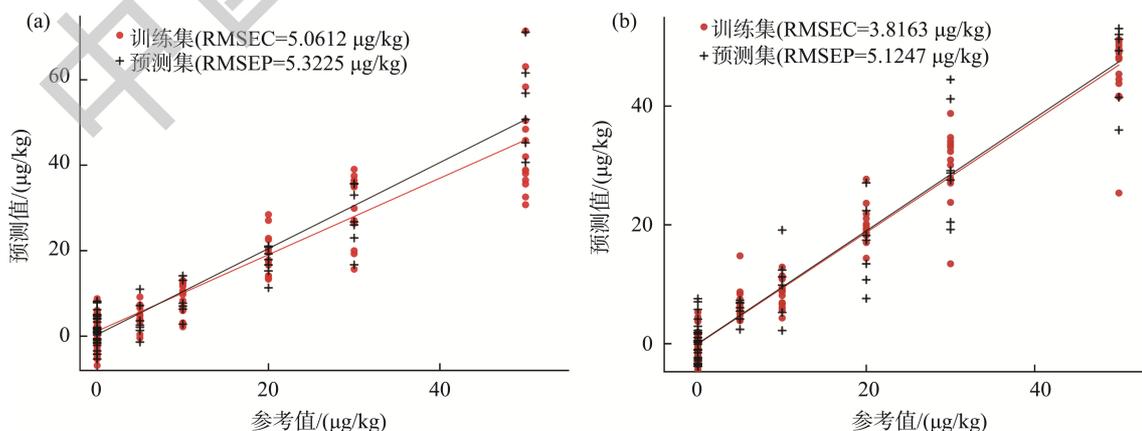
为了进一步探讨花生荧光光谱数据与 AFB₁ 浓度之间的相关性, 采用 PLSR 和 BPNN 两种回归算法来建立定量模型。PLSR 的因子数设置为 7; BPNN 模型经过调整, 隐含层设置为 5, 误差阈值为 10^{-6} , 迭代次数 1000 次。两种方法鉴定污染籽粒的回归预测结果如表 2 所示。两种模型均取得了不错的效果, 都有着较低的预测集均方根误差 (PLSR:RMSEP=5.3225; BPNN:RMSEP=5.1247), RPD 均大于 3.0, 说明模型的预测能力很好, 定量预测准确度较高, 两种模型的参考值和预测值差异无统计学意义(Sig>0.05), 此外两种模型的检出限(limit of detection, LOD)均小于国标规定的阈值 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。图 4 为 PLSR 和 BPNN 的回归曲线图, 两种模型的 R_c^2 和 R_p^2 的值均大于或等于 0.88, 有良好的拟合度。本研究选用了两种常用的回归预测方法, 获得了良好预测能力, 表明激光诱导荧光技术有定量检测污染花生籽粒的潜力。

表 1 不同方法判别污染籽粒结果
Table 1 Results of different methods to identify contaminated peanuts

方法	训练集					预测集				
	CCR/%	FPR/%	FNR/%	F_1	AUC	CCR/%	FPR/%	FNR/%	F_1	AUC
LDA	98.51	1.49	1.49	0.99	0.99	96.97	3.03	3.03	0.97	0.97
KNN	76.12	7.46	40.30	0.73	0.82	78.79	3.03	39.39	0.75	0.86
SVM(Linear)	98.51	2.99	0.00	0.98	0.99	100.00	0.00	0.00	1.00	1.00
SVN(Polynomial)	94.78	4.48	5.97	0.95	0.98	96.97	6.06	0.00	0.97	1.00
SVM(RBF)	91.04	5.97	11.94	0.91	0.96	100.00	0.00	0.00	1.00	1.00

表 2 不同方法鉴定污染籽粒回归预测结果
Table 2 Regression prediction results of different methods to identify contaminated peanuts

建模方法	R_c^2	RMSEC/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	R_p^2	RMSEP/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	RPDs	LODs/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	Sig
PLSR	0.90	5.0612	0.90	5.3225	3.15	15.82	0.875
BPNN	0.95	3.8163	0.89	5.1247	3.08	16.11	0.84



注: a为PLSR曲线; b为BPNN曲线。

图4 模型回归曲线图

Fig.4 Model regression curves

2.6 特征波长提取

为了减少数据的维度、去除冗余信息^[31],使用 CARS 对的原始光谱全波段进行特征提取,以提取关键特征并保留数据的重要结构。CARS 可以消除非信息变量并进行波长选择,从而建立高性能的校准模型^[32]。CARS 算法的运行结果如图 5 所示,CARS 是一种基于回归系数的波长选择方法,随着抽样次数的增加,一些不相关的波长被剔除,变异数减少^[33],RMSECV 总体呈下降趋势,而抽样次数到达 35 之后,RMSECV 达到最低值,之后呈上升趋势,这是因为波长继续减少一些重要信息也被删除。在变量选择过程中,每个波长变量的回归系数路径如图 5(c) 所示。当抽样次数为 35 次时波长集为最佳波长集,共提取了 12 个特征变量,分别为 429.82、455.46、457.01、457.79、458.56、466.31、470.96、501.11、502.65、523.45、524.99、577.14 nm。提取的特征波长全部位于 400~600 nm

之间,有研究表明,受黄曲霉毒素污染的花生发射峰位于 440~460 nm^[34]。HAN 等^[35]的研究表明,410、420、440、450、460、490、600 nm 在识别黄曲霉毒素污染花生的研究具有重要的贡献。本研究中 CARS 提取的特征波长获得了类似的结果。

结合以上结果,将这 12 个波长作为输入值,基于 SVM (Linear)对污染花生籽粒进行定性判别,基于 PLSR 和 BPNN 对污染花生籽粒进行定量判别。表 3 和表 4 分别为定量和定性的结果,与模型输入是全波段光谱数据相比,PLSR 获得了最佳的回归结果,有更低的预测集均方根误差 RMSEP=5.0106,最低检出限为 14.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。是否污染的定性判别模型能力虽然有所下降,但仍然是比较准确的状态,总体正确率可达 93.94%。特征提取后,只需要输入 12 个特征值,大大减少了计算量,并且获得不错的结果,表明 LIF 技术运用于 AFB₁ 污染花生的广阔前景。

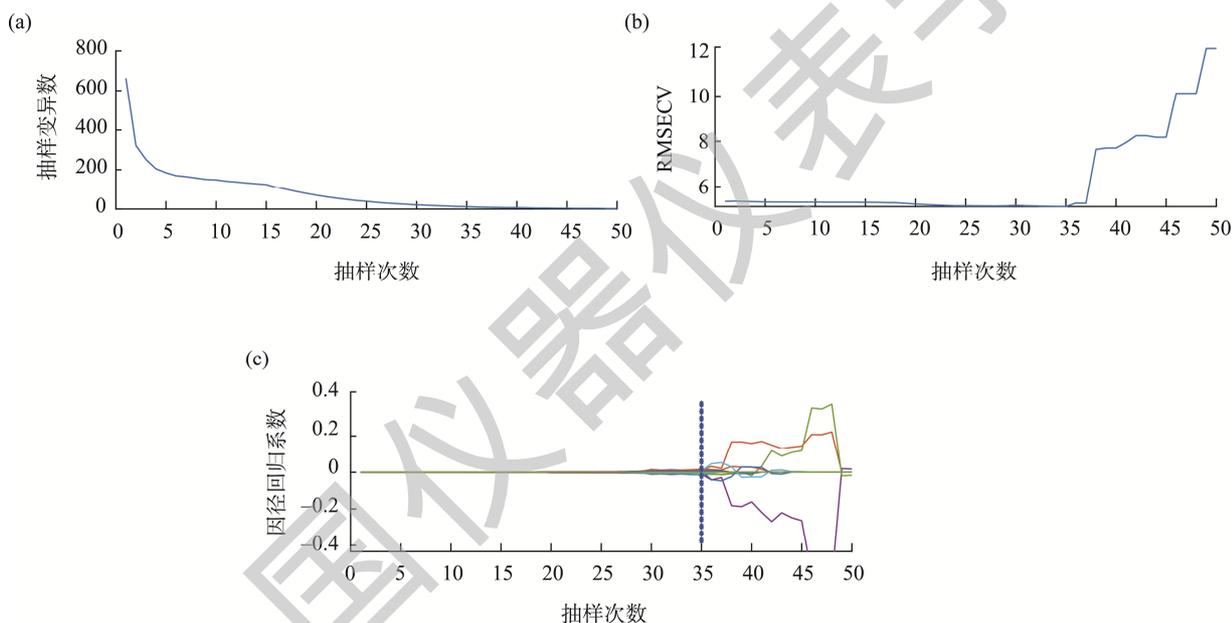


图5 CARS提取特征波长

Fig.5 CARS extracted feature wavelength

表 3 基于特征波长的污染籽粒回归预测结果

Table 3 Regression prediction results of contaminated peanuts based on characteristic wavelengths

建模方法	R_c^2	RMSEC/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R_p^2	RMSEP/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RPD	LODs/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Sig
PLSR	0.88	5.3141	0.91	5.0106	3.36	14.76	0.988
BPNN	0.91	4.7736	0.89	5.1312	3.05	16.23	0.787

表 4 基于特征波长的 SVM(Linear)判别污染籽粒结果

Table 4 Results of SVM (Linear) discriminating contaminated peanuts based on characteristic wavelengths

分类	CCR/%	FPR/%	FNR/%	F_1	AUC
训练集	92.54	4.48	10.45	0.92	0.9826
预测集	93.94	6.06	6.06	0.94	0.989

3 结 论

本研究采用多种化学计量学方法, 基于 LIF 技术检测人工污染的花生中的 AFB₁, 建立了对单粒花生 AFB₁ 浓度的分类和预测模型。结果显示, SVM(Linear)方法建立的定性模型能够准确判别花生是否受 AFB₁ 污染, 全波段光谱数据建立的 PLSR 和 BPNN 模型预测精度高, 检出限低于 20 μg/kg。基于 CARS 方法提取的特征光谱建立的 PLSR 模型获得了更低的检出限。表明采用 LIF 技术检测 AFB₁ 污染花生具有可行性, 能够准确鉴别污染花生籽粒, 并且提取特征波长可获得更优的定量模型。相较于以往研究, 本研究着重于对单粒花生中 AFB₁ 污染进行定性和定量分析, 利用 LIF 技术特异性检测 AFB₁, 证明了其检测花生中 AFB₁ 污染的可行性。考虑到本研究是针对加标样品进行检测, 对于自然污染样品的识别准确度还有待确定。因此, 计划在后续研究中对自然污染的 AFB₁ 以及不同种类的花生样品进行更深入的研究。并且本研究观察到样品姿态对光谱的影响很大, 对单点单一方向光谱的采集也难以获得全表面光谱信息, 针对这一问题, 后续的研究可以考虑采用多探头或者扫描式检测系统。

参考文献

- [1] 高秀芬, 荫士安, 计融. 中国部分地区花生中 4 种黄曲霉毒素污染调查[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(5): 541–542.
GAO XF, YIN SAN, JI R. Investigation of four types of aflatoxin contamination in peanuts in some regions of China [J]. Chin J Public Health, 2011, 27(05): 541–542.
- [2] 联合国粮食及农业统计. 农作物和畜产品[EB/OL]. [2023-06-22]. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [2023-10-20].
United Nations Food and Agriculture Statistics. Crops and livestock products [EB/OL]. [2023-06-22]. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [2023-10-20].
- [3] CIEGLER A. Fungi that produce mycotoxins: Conditions and occurrence [J]. Mycopathologia, 1978, 65(1-3): 5–11.
- [4] 王海鸥, 陈守江, 胡志超, 等. 花生黄曲霉毒素污染与控制[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 270–273.
WANG HOU, CHEN SJ, HU ZC, *et al.* Contamination and control of peanut aflatoxin [J]. Jiangsu Agric Sci, 2015, 43(1): 270–273.
- [5] HABSCHIED K, KRSTANOVIĆ V, ZDUNIĆ Z, *et al.* Mycotoxins biocontrol methods for healthier crops and stored products [J]. J Fungi, 2021, 7(5): 348.
- [6] KUMAR P, GUPTA A, MAHATO DK, *et al.* Aflatoxins in cereals and cereal-based products: Occurrence, toxicity, impact on human health, and their detoxification and management strategies [J]. Toxins, 2022, 14(10): 687.
- [7] 刘晓晗, 白艺珍, 岳晓凤, 等. 农产品及食品黄曲霉毒素污染研究[J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(4): 729–738.
LIU XH, BAI YZ, YUE XF, *et al.* Research on aflatoxin contamination of agricultural products and foodstuffs [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2022, 44(4): 729–738.
- [8] GRACE D, MAHUKU G, HOFFMANN V, *et al.* International agricultural research to reduce food risks: Case studies on aflatoxins [J]. Food Secur, 2015, 7: 569–582.
- [9] 王龔, 管乐, 韩紫怡, 等. 我国花生黄曲霉毒素污染影响因素分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(19): 7818–7825.
WANG Y, GUAN L, HAN ZY, *et al.* Analysis of factors affecting peanut aflatoxin contamination in China [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(19): 7818–7825.
- [10] 王宏亮. 薄层层析法测定饲料中黄曲霉毒素 B₁ 方法的改进[J]. 粮食与饲料工业, 1998, (1): 42–44.
WANG HL. Improvement of the method for the determination of aflatoxin B₁ in feed by thin-layer chromatography [J]. Cereal Feed Ind, 1998, (1): 42–44.
- [11] 陈萍, 邓冬云, 欧阳静茹, 等. 酶联免疫吸附法(ELISA)测定花生油中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(3): 658–659.
CHEN P, DENG DY, OUYANG JR, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in peanut oil by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 22(3): 658–659.
- [12] SHEN MH, SINGH RK. Determining aflatoxins in raw peanuts using immunoaffinity column as sample clean-up method followed by normal-phase HPLC-FLD analysis [J]. Food Control, 2022, 139: 109065.
- [13] TAO F, YAO H, HRUSKA Z, *et al.* Recent development of optical methods in rapid and non-destructive detection of aflatoxin and fungal contamination in agricultural products [J]. Trac Trend Anal Chem, 2018, 100: 65–81.
- [14] MA H, RAN C, LI M, *et al.* Graphene oxide-coated stir bar sorptive extraction of trace aflatoxins from soy milk followed by high performance liquid chromatography-laser-induced fluorescence detection [J]. Food Addit Contam A, 2018, 35(4): 773–782.
- [15] HRUSKA Z, YAO H, KINCAID R, *et al.* Fluorescence excitation-emission features of aflatoxin and related secondary metabolites and their application for rapid detection of mycotoxins [J]. Food Bioprocess Technol, 2014, 7: 1195–1201.
- [16] CHEN M, HE X, PANG Y, *et al.* Laser induced fluorescence spectroscopy for detection of aflatoxin B₁ contamination in peanut oil [J]. J Food Meas Charact, 2021, 15: 2231–2239.
- [17] SMEESTERS L, MEULEBROECK W, RAEYMAEKERS S, *et al.* Optical detection of aflatoxins in maize using one-and two-photon induced fluorescence spectroscopy [J]. Food Control, 2015, 51: 408–416.
- [18] BERTANI FR, BUSINARO L, GAMBACORTA L, *et al.* Optical detection of aflatoxins B in grained almonds using fluorescence spectroscopy and machine learning algorithms [J]. Food Control, 2020, 112: 107073.
- [19] WU Q, XU J, XU H. Discrimination of aflatoxin B₁ contaminated pistachio kernels using laser induced fluorescence spectroscopy [J]. Biosyst Eng, 2019, 179: 22–34.
- [20] LIU JJ, CAI Z, LIAO Y, *et al.* Validation of a laser based in-line aflatoxin sorting technology in Spanish type raw peanut in factory-scale production

- conditions [J]. *Food Saf*, 2019, 39(2): e12611.
- [21] 熊超平. 江苏省小麦中呕吐毒素的影响因素研究及污染预警模型的建立[D]. 南京: 南京财经大学, 2021.
XIONG CP. Study on the influencing factors of vomitoxin in wheat and the establishment of pollution early warning model in Jiangsu Province [D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and Economics, 2021.
- [22] LAVRINENKO IA, DONSKIKH AO, MINAKOV DA, *et al.* Analysis and classification of peanuts with fungal diseases based on real-time spectral processing [J]. *Food Addit Contam A*, 2022, 39(5): 990–1000.
- [23] KIMULI D, WANG W, LAWRENCE KC, *et al.* Utilisation of visible/near-infrared hyperspectral images to classify aflatoxin B₁ contaminated maize kernels [J]. *Biosyst Eng*, 2018, 166: 150–160.
- [24] FEMENIAS A, LLORENS-SERENTILL E, RAMOS AJ, *et al.* Near-infrared hyperspectral imaging evaluation of fusarium damage and DON in single wheat kernels [J]. *Food Control*, 2022, 142: 109239.
- [25] 陈敏. 花生油中黄曲霉毒素 B₁ 激光诱导荧光检测方法研究[D]. 南京: 南京财经大学, 2021.
CHEN M. Determination of aflatoxin B₁ in peanut oil by laser-induced fluorescence detection [D]. Nanjing: Nanjing University of Finance and Economics, 2021.
- [26] ZHU H, ZHAO Y, YANG L, *et al.* Pixel-level deep spectral features and unsupervised learning for detecting aflatoxin B₁ on peanut kernels [J]. *Postharvest Biol Technol*, 2023, 202: 112376.
- [27] BRADLEY AP. The use of the area under the ROC curve in the evaluation of machine learning algorithms [J]. *Pattern Recogn*, 1997, 30(7): 1145–1159.
- [28] 何学明, 陈敏, 杨小云, 等. AFB₁ 污染花生油激光诱导荧光信号受温度干扰规律及温度全局模型研究[J]. *中国粮油学报*, 2022, 37(10): 7–13.
HE XM, CHEN M, YANG XY, *et al.* Laser-induced fluorescence signal of AFB₁ contaminated peanut oil by temperature interference law and temperature global modeling study [J]. *J Chin Cere Oils Assoc*, 2022, 37(10): 7–13.
- [29] WU Q, XU H. Application of multiplexing fiber optic laser induced fluorescence spectroscopy for detection of aflatoxin B₁ contaminated pistachio kernels [J]. *Food Chem*, 2019, 290: 24–31.
- [30] 孙凉艳. 基于 K 近邻集成算法的分类挖掘研究[D]. 西安: 西北大学, 2010.
SUN LY. Research on classification mining based on K nearest neighbor integration algorithm [D]. Xi'an: Northwest University, 2010.
- [31] HAN J, GUO J, ZHANG Z, *et al.* The rapid detection of trash content in seed cotton using near-infrared spectroscopy combined with characteristic wavelength selection [J]. *Agriculture*, 2023, 13(10): 1928.
- [32] LI H, LIANG Y, XU Q, *et al.* Key wavelengths screening using competitive adaptive reweighted sampling method for multivariate calibration [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 648(1): 77–84.
- [33] ZHANG S, YIN Y, LIU C, *et al.* Discrimination of wheat flour grade based on PSO-SVM of hyperspectral technique [J]. *Spectrochim Acta A*, 2023, 302: 123050.
- [34] CHEN WL, XING D, CHEN WG. Rapid detection of *Aspergillus flavus* contamination in peanut with novel delayed luminescence spectra [J]. *Photochem Photobiol*, 2005, 81(6): 1361–1365.
- [35] HAN ZZ, DENG LM. Application driven key wavelengths mining method for aflatoxin detection using hyperspectral data [J]. *Comput Electron Agric*, 2018, 153: 248–255.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



王成宏, 硕士研究生, 主要研究方向为粮油质量安全检测技术。

E-mail: 15077839113@163.com



沈飞, 博士, 教授, 主要研究方向为粮油检测与加工技术与装备。

E-mail: shenfei@nufe.edu.cn