

HPTLC-SERS 快速检定葡萄汁中苏丹染料掺假

Screening of Sudan dyes adulteration in grape juice based on HPTLC-SERS detection

王 了¹ 叶之阳¹ 王天楠¹ 徐学明^{1,2}

WANG Liao¹ YE Zhi-yang¹ WANG Tian-nan¹ XU Xue-ming^{1,2}

陈益胜^{1,2} 杨 哪^{1,2} 吴凤凤^{1,2} 金亚美^{1,2}

CHEN Yi-sheng^{1,2} YANG Na^{1,2} WU Feng-feng^{1,2} JIN Ya-mei^{1,2}

(1. 江南大学食品学院食品科学国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;
2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要: 建立并优化一种基于高效薄层色谱和表面增强拉曼联用检测技术的方法, 用于快速准确定性定量检测葡萄汁中的苏丹染料掺假。使用石油醚/丙酮/乙酸(9/1/0.1, 体积比)作为流动相在硅胶板上对目标物进行色谱分离, 考察纳米银胶体浓度、外加电解质种类、浓度以及入射激光波长等参数对检测信号质量的影响。结果表明, 10 倍浓缩的纳米银胶体, 633 nm 入射激光, 辅以 0.5~1.0 mol/L NaCl 最适合 4 种目标物的检测。优化检测条件后, 检测灵敏度可达 0.01~0.05 mg/kg; 在 1~20 mg/kg 浓度范围内, 检测结果表现出良好的线性关系, $R^2 > 0.996$ 。不仅如此, 对葡萄汁样品的测试中, 该方法也表现出良好的准确性(添加回收率 72%~104%)和精密度(RSD 4.5%~9.6%), 因此特别适于大批量饮料和食品样品中非法色素添加的筛选。

关键词: 表面增强拉曼; 高效薄层色谱; 热点; 苏丹染料; 果汁
Abstract: This paper presented a fast screening method for determining Sudan dye adulteration in grape juice, based on the combination of High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) and Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). Chromatography separation was achieved on silica gel plates using petroleum/acetone/acetic acid (9/1/0.1) as the mobile phase. After that, key factors including silver nano particle concentrations, electrolyte types/concentrations and incident laser wavelength was investigated with

regarding to their effects on the quality of SERS results. Under optimized conditions, the method sensitivity reached to 0.01~0.05 mg/kg, while remarkable linearity ($R^2 > 0.996$) was obtained within the range of 1~20 mg/kg. Apart from that, the established method showed satisfactory accuracy (standard-spiking recovery rates 72%~104%) and precision (RSD 4.5%~9.6%) in the validation with the grape juice sample.

Keywords: surface enhanced Raman spectroscopy; high performance thin-layer chromatography; hot spots; sudan dye; fruit juice

苏丹红属于偶氮化合物, 分子结构中含有一个或多个偶氮基团(—N=N—)。苏丹红颜色鲜亮且对光热稳定不易褪色, 是一种重要的合成染料, 被广泛应用到皮革、印刷和纺织工业中。现代毒理学研究^[1-2]表明, 苏丹红类化合物对人体的肝肾器官具有明显的毒性作用, 具有强烈的致突变性和致癌性。国际癌症研究机构将苏丹红号列为三类致癌物, 其初级代谢产物“磷氨基偶氮甲苯”和“磷甲基苯胺”均列为二类致癌物。鉴于此, 世界范围内都禁止将苏丹红用作食品用途的色素添加剂。然而, 在经济利益的驱动下, 使用苏丹红染料替代天然色素对加工食品进行着色的报道近年来时有发生。最为著名的是 2006 年被媒体披露的“红心鸭蛋”事件。而欧盟早在 2003 年就来自印度的辣椒中检测出苏丹 I。这是欧盟食品和饲料快速预警系统(RASFF)成立后首次对成员国发出警报。接下来, 越来越多的产品被发现含有违禁的脂溶性偶氮色素如苏丹 I~IV 和苏丹红 7B[在国际癌症研究总署(IARC)被划为三类致癌物], 以及苏丹红 B、苏丹橙 G 和对位红。仅自 2008 年至 2009 年上半年, 就有 60 多起案例被 RASFF 通报^[3]。除了故意掺假, 少量苏丹红也可能以迁移的方式从包装材料中进入食品, 造成污染。

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2017YFF0207800); 江苏省自然科学基金(编号: BK20170177); 中国博士后基金(编号: 2017M610298)

作者简介: 王了, 女, 江南大学在读博士研究生。

通信作者: 陈益胜(1985—), 男, 江南大学副教授, 博士。

E-mail: chen.yisheng@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-03-26

目前,基于高效液相色谱联用光谱/质谱检测器的方法是控制实验室中分析食品苏丹红掺伪的主要工具^[4-6]。虽然可以提供令人满意的灵敏度和可靠的精度,但该类方法的缺点也十分突出。通量低是所有液质联用检测技术固有的问题;此外,后续的质谱检测对样品的清理条件要求很高,否则极易造成样品基质对目标物检测信号的屏蔽效应,甚至造成色谱柱堵塞或者质谱检测器损坏。这些缺陷在控制实验室短时间内需要处理大量样品的时候显得尤为突出。

以仪器化和自动化为特征的高效薄层色谱(High performance thin-layer chromatography, HPTLC)克服了传统手工薄层色谱精度低和可重复性差的缺点,又保留了其通量高,基质耐受能力强的优点。尤其可贵的是,HPTLC具有其他柱色谱分析方法所不拥有的兼容性,因此已经成为食品分析领域的有力工具。Kandler等^[7]研究了使用HPTLC作为分离工具联用光密度扫描的办法定量辣椒粉中苏丹红掺伪的方法,研究表明,该方法对样品制备的要求低且具有极高的分析通量。然而,光密度法不能区分食品中天然色素与苏丹红分子的斑点,因此检测方法的特异性低,很容易得到假阳性结果。鉴于此,如何增强HPTLC分离结果检测的选择性,是实现苏丹红可靠筛检的关键。

将HPTLC的分离结果与表面增强拉曼(Surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)检测联用是分析化学领域的一个新兴热点前沿。表面增强拉曼是一种特殊的拉曼散射效应,其形成的前提是目标物分子吸附在纳米尺度的贵金属(金、银或铜)颗粒上。因此,这一检测方式无法与传统的柱色谱兼容。而HPTLC则为SERS检测提供了理想的平台:当色谱分离结束,各种被分离的物质停留在薄层板上固定的位置,而不是像柱色谱那样进入了废液缸。SERS作为一种分子振动光谱,其谱图蕴含了丰富的分子机构信息,因此检测结果具有很强的选择性,可以分辨相似分子结构之间细小的差别^[8]。此外,SERS检测还具有极高的灵敏度。在活性基底合适的条件下,甚至可以检测到单分子的SERS光谱信号^[9]。目前,HPTLC-SERS联用检测技术已经被成功地应用到食品中生物胺的快速可靠定量和定性筛检中^[10-11]。

本研究拟利用HPTLC作为平台,联用SERS检测法建立4种常见苏丹红分子的快速定性和定量检测方法,用于葡萄汁中苏丹红掺伪的高通量筛检。重点探讨不同的无机盐种类和浓度添加对SERS检测的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

苏丹 I~IV:分析纯,美国 Aladdin 公司;

NaCl、NaSO₄、NaNO₃:分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;

高效薄层硅胶板:分析型,规格 10 cm × 20 cm,德国 Merck 公司;

葡萄汁样品:市售;

电子天平:MB104E型,瑞士 Mettler-Toledo 公司;

半自动薄层点样仪:Linomat 5型,瑞士 CAMAG 公司;
全自动薄层展开仪:ADC-2型,瑞士 CAMAG 公司;
光密度扫描仪:Scanner 3型,瑞士 CAMAG 公司;
薄层成像仪:DD70型,德国 Biostep 公司;

共聚焦拉曼光谱仪:LabRAM HR型,法国 HORIBA 公司。

1.2 方 法

1.2.1 纳米银胶体制备 采用一锅法^[12]制备纳米银胶体作为 SERS 活性基底。在分析天平上精确称取 18.0 mg AgNO₃溶于 100 mL 超纯水中,将得到的 AgNO₃水溶液在磁力搅拌的条件下加热至沸腾;迅速向沸腾的溶液中滴加 1% 柠檬酸三钠 2 mL;保持磁力搅拌条件,继续加热溶液 1 h,期间可以观察到澄清透明的溶液逐渐变为灰褐色;停止加热保持磁力搅拌至溶液冷却到室温,即可得到纳米银胶体溶液。随后,通过离心的方式,将初始纳米银胶体溶液分别浓缩 2,5,10,20 倍,4 ℃ 避光保存备用。此外,使用电子显微镜对获得的纳米银形态进行表征。

1.2.2 样品制备 分别精确称取 10.0 mg 4 种苏丹红标准物质,溶于 10 mL 丙酮中,得 1 mg/mL 的标准储备液。在分析之前,将标准储备液进一步稀释至 0.010 0, 0.001 0, 0.000 1 mg/mL 用于薄层板点样。

使用移液管精确量取 10 mL 葡萄汁于 50 mL 容量烧杯中。将烧杯置于超声波清洗仪中脱气 10 min,同时用 28% 氨水调节样品溶液的 pH 至 7.0。随后,将样品液于 5 000 r/min 离心 5 min。取离心后所得上清液 2 mL 经注射器通过 0.45 μm 纤维素薄膜过滤,排除其中的固体微粒后可以直接点样。

1.2.3 HPTLC 色谱条件和检测 样品溶液通过半自动薄层点样仪在 0.5 MPa 氮气流吹扫下,以条带的形状点在薄层板上,条带宽度 6 mm,距离薄层板底边 8 mm,液流吹扫速度 100 μL/s,预排体积 0.2 μL。第 1 个条带中心距离薄层板左边缘 15 mm,所有条带位置通过软件自动计算得出。薄层板展开在全自动薄层展开仪中进行。流动相配比石油醚/丙酮/乙酸(9/1/0.1,体积比),展开距离 60 mm。色谱分离条件:预加热 30 s,展开缸气氛饱和 5 min,相对湿度控制 1 min(饱和氯化镁溶液鼓泡调节 RH 至 35%左右),薄层板预平衡 10 min,整个展开过程耗时约 35 min。待流动相前沿到达预定高度,将薄层板取出,放在薄层加热器上 80 ℃ 烘烤 3 min,以挥发残留的有机溶剂。此后,通薄层成像仪对色谱结果进行拍照成像,相机参数设定为:底部透射光,自动对焦和校正。

1.2.4 HPTLC-SERS 检测 通过肉眼检视确定目标物的斑点位置,并用铅笔进行标记。使用毛细玻璃管分别将 1 μL 纳米银和 1 μL 电解质溶液依次点到标记的位置。然后使用共聚焦拉曼光谱仪对斑点进行检测。首先使用与 100 倍放大显微镜相连的 CCD 相机将光路与瞄准斑点中心位置对齐,随后选择 3 种不同波长的激光,分别为 532 (Nd:YAG 光源),633 (He:Ne 光源),785 (diode 光源) nm 对目标物斑点进行激发检测。每次检测拉曼散射信号检测时间为 10 s。

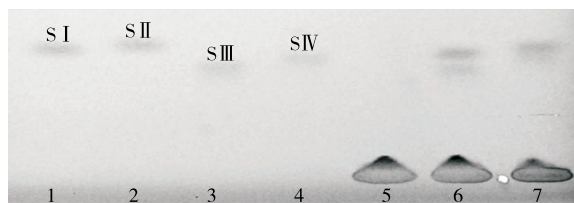
最后使用 LabSpec5 software (9.10.27 版)对获得的拉曼光谱信号进行降噪、基线校正和积分等操作。

2 结果与讨论

2.1 HPTLC 方法建立和优化

以往相关文献^[7]检索结果表明,已经有很多基于 HPTLC 的方法被应用到食品中非法添加色素的检测。在本研究中,色谱固定相种类的选择基于 2 个原则:效费比和 SERS 兼容性。因此,试验选用硅胶作为目标物的分离固定相,尽管有研究^[7]表明烷基改性硅胶(RP-18)薄层板对结构相似的苏丹红分子表现出更好的分离度。为了进一步优化色谱分离能力,预试验比较了不同配比的流动相对目标物分离结果的影响。相比之下,石油醚/丙酮/乙酸为 9/1/0.1 (体积比)表现出最好的分离结果。必须注意的是,选用的流动相极性极低,在展开的时候,薄层板两侧区域的石油醚特别容易挥发。这种挥发所产生的牵引力叠加到溶液上行的毛细管作用力会引起靠近边缘区域的流动相前沿峰倾斜扭曲,形成 U 形的展开结果。所以,在正式开始展开之前将薄层板与展开缸气氛充分预平衡(>15 min)以避免“边缘效应”是十分必要的。

尽管使用了优化的流动相配比和自动化的色谱设备,还是难以在同一轨道实现对分子结构高度相似的 4 种目标物的同时分离,见图 1。鉴于此,将 4 种苏丹红分为 2 组:苏丹 I 和苏丹 II,苏丹 III 和苏丹 IV。通过对葡萄汁样品的分析验证了这一分离体系的实用性。如图 1 所示,葡萄汁样品中可能对目标物检视造成干扰的天然色素因为极性较大的缘故,在色谱展开之后留在了原点,而 4 种苏丹红分子则实现了肉眼可检视的分离。尽管这一色谱结果的分离度 <1.5 ,并不适合光密度扫描定量检测,但是考虑到 SERS 检测的激光直径仅为 0.5 mm 左右,后续的操作也可以得到较为满意的分辨率。



1~4. 苏丹红标准溶液 5. 葡萄汁空白样品 6~7. 添加苏丹红的葡萄汁样品

图 1 4 种目标物分子和葡萄汁样品色谱展开结果

Figure 1 Chromatographic results of the four targeted compounds and grape juice sample

2.2 纳米银胶体浓度优化

本研究选用了 Lee 等^[12]提出的基于柠檬酸钠还原硝酸银的反应制备纳米银胶体作为检测的活性基底。以往的研究^[11]表明,溶胶中的纳米银密度越高,激发产生的表面增强效应越强烈。因此本研究使用离心的方法对制备得到的纳米银粗产品进行浓缩。如图 2 所示,不同程度的浓缩不仅增加了纳米银颗粒在胶体溶液中的密度,也对其分散性产生了

显著的影响。随着离心浓缩倍数的增加,纳米银颗粒之间的聚集度越来越高;过度的离心浓缩会造成纳米银颗粒不可逆的团聚。例如,在 20 倍浓缩之后,产生了肉眼可见的絮凝和沉淀。这一变化使得大部分纳米银颗粒变成宏观固体颗粒沉积到试管的底端,彻底丧失 SERS 拉曼增强活性。鉴于此,10 倍浓缩的纳米银胶体被用于后续的试验。

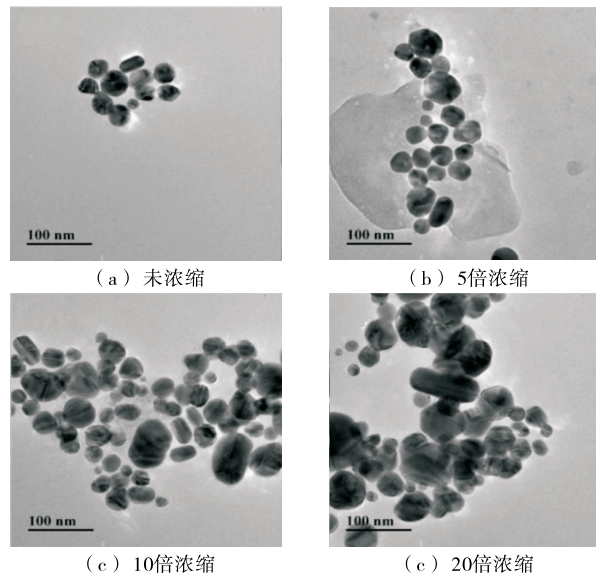


图 2 离心浓缩程度对纳米银颗粒聚集度的影响

Figure 2 Effect of centrifuge concentration on the aggregation of AgNPs

2.3 电解质类型的影响

研究者^[13]很早就注意到,将纳米银等 SERS 活性基底与电解质混合可以显著增强拉曼散射信号的强度。一般来说,这一增强效应被归结为外源电解质中和了吸附在纳米银表面的离子所带的电荷,降低颗粒之间的静电排斥力。而相互靠近的纳米银颗粒极易形成一种特殊的强电磁场叠加效应,被称为“热点”效应^[14-16]。Maher 等^[17]的研究结果证明,“热点”结构贡献了整个活性基底对拉曼散射信号增强权重的 90% 以上。不过,在常规溶液状态的 SERS 检测体系中,通过加入电解质的方式实现对 SERS 检测信号增强的过程是不可控的,因为过量的电解质可能造成纳米银的过度凝聚而絮凝沉淀到检测容器的底部,使得检测过程无法进行。与之相反,在薄层板上则不存在这个问题。

本研究比较了 3 种常见的用于 SERS 检测增强的电解质(包括 NaCl、NaSO₄ 和 NaNO₃)对信号质量的影响。如图 3 所示,添加外源电解质后,检测到的拉曼散射信号强度显著增强。这一现象证明了电解质确实有助于纳米银“热点”微观结构的形成。其次,4 种目标物分子都在 1 240 cm⁻¹ 位置给出一个强烈的拉曼散射峰。根据分子结构推测,这个峰可能与 N=N 双键有关,因为通常氮原子对纳米银表现出强力的吸附作用。

虽然 4 种目标物的分子结构和色谱行为高度相似,但是其拉曼散射信号表现出非常规律的指纹特征。在外源电解质的作用下,目标物的拉曼散射信号强度不仅大幅度增强,

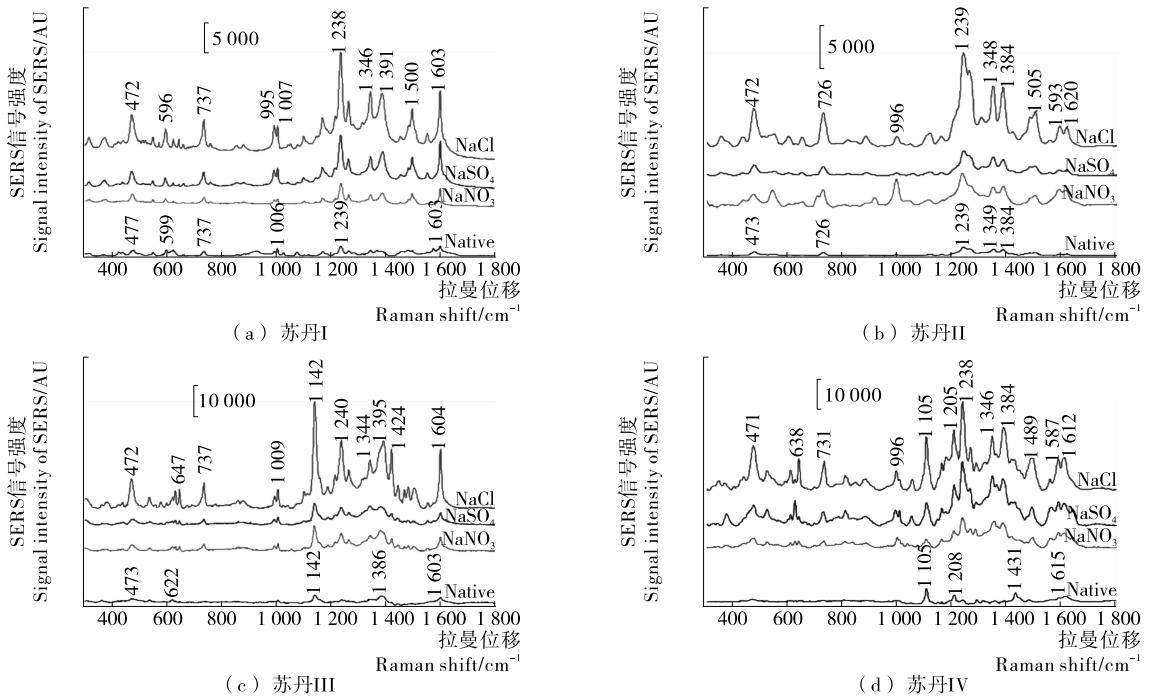


图3 电解质的种类(1 mol/L)对 HPTLC-SERS 检测结果的影响
Figure 3 Effect of different electrolyte types on HPTLC-SERS results

而且指纹特征更加明显。如图 4 和表 1 所示,通过在 1 600 cm⁻¹ 附近峰型的特征可以非常清晰地实现对苏丹 I/苏丹 III 和苏丹 II/苏丹 IV 2 组分子的辨别;而 2 个组内目标物分子拉曼散信号在 1 238 ~ 1 142 cm⁻¹ 和 1 239 ~ 1 105 cm⁻¹ 等位置细微而明显差异可以作为区别其分子种类的直观证据。这些发现进一步证明了 HPTLC-SERS 作为一种高效可靠的食物中分子结构解析和确证工具的实用性。

除此以外,试验中测试 3 种电解质对 SERS 检测的增强能力有显著差异,增强顺序依次为 NaCl > NaSO₄ > NaNO₃。这一发现证明不同的电解质对 SERS 检测的增强机理是相似的,但是可能由于其离子半径等因素造成促进纳米银聚集成“热点”效应的能力是不一样的。因此选择信号增强能力最高的 NaCl 作为后续优化步骤使用的凝聚剂。

2.4 电解质浓度的影响

为了确定优化的添加量,采用了控制体积,改变浓度的办法,研究不同浓度 NaCl 溶液对检测结果的影响。通过考

表 1 HPTLC-SERS 检测获得的 4 种目标物具有区分意义的指纹峰位置和峰型

Table 1 Distinguishing fingerprint pattern of HPTLC-SERS detection

分析物	特征指纹峰位置(cm ⁻¹)和峰型
苏丹 I	1 606(尖峰),1 238(尖峰)
苏丹 II	1 591~1 661(驼峰),1 239(肩峰)
苏丹 III	1 604(尖峰),1 142(尖峰)
苏丹 IV	1 598~1 612(驼峰),1 105(尖峰)

察 SERS 图谱中强度最高的特征指纹峰(苏丹 I 1 238 cm⁻¹, 苏丹 II 1 239 cm⁻¹, 苏丹 III 1 142 cm⁻¹, 苏丹 IV 1 105 cm⁻¹)峰面积积分数字变化规律来实现对拉曼散射信号强度变化趋势的量化比较。如图 5 所示,随着 NaCl 浓度的增加,4 种目标物分子的拉曼散射信号强度均呈现先上升后下降的趋势。对于苏丹 I 和苏丹 II,当 NaCl 浓度为 1 mol/L 时,检测到的信号强度达到峰值;而对于苏丹 III 和苏丹 IV,最佳 NaCl 浓度则为 0.5 mol/L。由此,这 2 个最优浓度的 NaCl 添加量被固定用于后续优化步骤。

2.5 入射激光波长的选择

除了纳米银“热点”结构,入射激光的波长也对 SERS 检测效果有显著的影响。本试验研究了 3 种不同光源发射的激光对苏丹红分子 SERS 检测结果的影响。如图 6 所示,3 种不同波长激光所得到的 SERS 信号强度依次为:633 nm > 785 nm > 532 nm。因此推测 633 nm 激发光的能量正好与目标物分子的电子跃迁能级重叠,其传递的能量会被目标分子——纳米银电耦合体系吸收,激发纳米银表面等离子体共振。

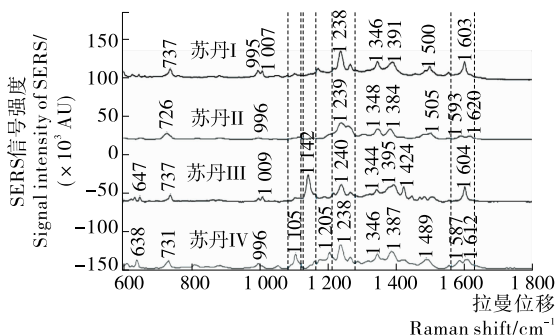


图 4 4 种苏丹红分子的特征指纹峰信号

Figure 4 SERS fingerprints of the four targeted compounds

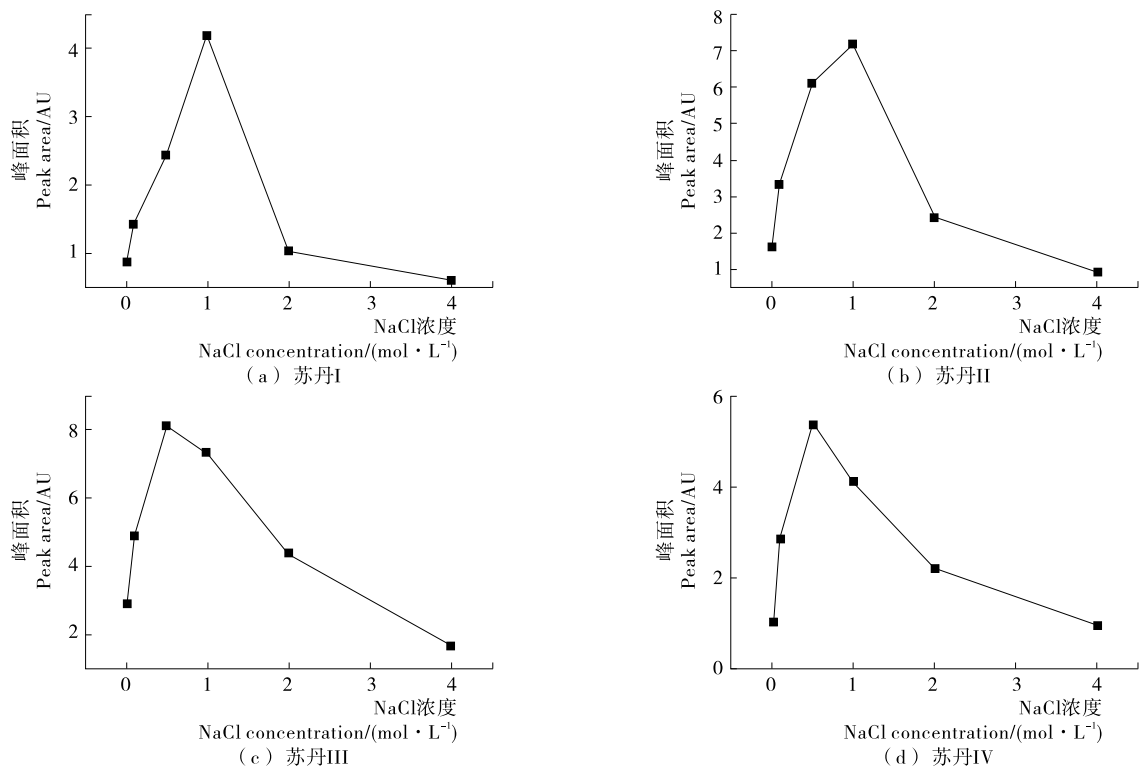


图 5 不同 NaCl 浓度对 SERS 信号强度的影响

Figure 5 Effect of NaCl concentrations on the SERS signal intensities

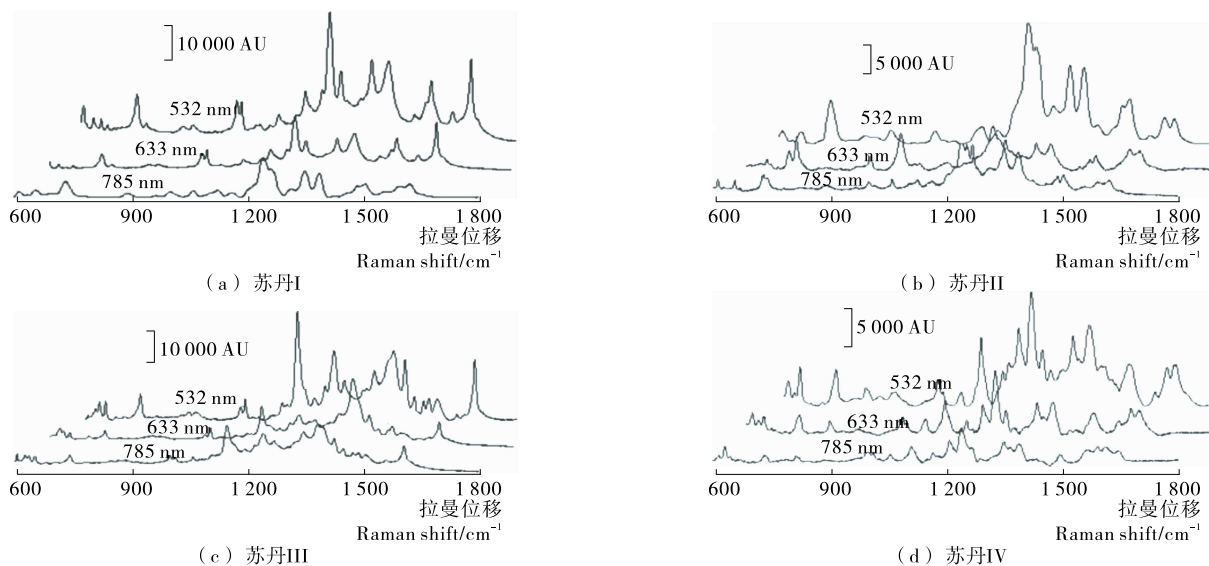


图 6 不同入射光波长对 SERS 信号强度的影响

Figure 6 Effect of incident laser wavelength on the SERS signal intensities

这种共振可以与常规的表面增强拉曼散射形成协同效应,从而实现更大程度的拉曼散射信号增强。

2.6 方法验证

2.6.1 方法定量能力 在优化的检测条件下,继续考察方法的检测限(LOD)、定量限(LOQ)以及物质浓度—检测信号之间的线性相关度。首先通过信噪比方法测定方法的 LOD ($S/N=3$)和 LOQ ($S/N=3$),如表 2 所示,苏丹 I 和苏丹 II 的 LOD 为 0.01~0.05 mg/kg。通常 HPTLC 分离后苏丹红的肉眼检视极限为 0.1~0.5 mg/kg。证明,本检测方法可以

检测到肉眼无法识别的果汁中痕量浓度苏丹红。这一点也是非常有意义的,因为除了故意的掺假之外,少量的苏丹红染料也可能通过食品包装物质迁移到果汁样品中,对人体健康形成潜在的危害。假设果汁样品的最大点样量为 10 μ L,则该 LOD 对应的相对浓度为 50~10 μ g/kg,比 Kandler 等^[7]建立的吸光光度法检测能力(LOD 为 2 mg/kg)低约 2 个数量级,达到了常规 LC-MS 检测方法的水平(LOD 为 10 μ g/kg)。其次,以 4 种目标化合物的指纹特征峰面积为纵坐标(y , AU),质量浓度为横坐标(x , ng/zone)绘制标准

表2 HPTLC-SERS 检测方法的定量能力
Table 2 Quantitative capacity of HPTLC-SERS

分析物	定量峰信号/cm ⁻¹	检测限/(mg·kg ⁻¹)	定量限/(mg·kg ⁻¹)	定量范围/(mg·kg ⁻¹)	线性 R ²
苏丹 I	1 238	0.05	0.10	1~20	0.997
苏丹 II	1 239	0.05	0.10	1~20	0.996
苏丹 III	1 143	0.01	0.04	1~20	0.997
苏丹 IV	1 105	0.01	0.04	1~20	0.998

曲线,检测结果在各自范围内线性关系良好,相关系数(R²)均>0.996。

2.6.2 准确度和精密度 从超市中随机购买一种葡萄汁样品,首先进行添加回收率分析以确定所建方法的准确性。如表3所示,空白葡萄汁样品中的苏丹红浓度低于检测限。随

后在空白葡萄汁样品中分别进行 0.5,1.0,2.0 mg/kg 3 个不同添加水平的加标回收率试验,每个添加水平重复 3 次。计算结果表明,4 种目标化合物的标准添加回收率整体在 72%~104%,相对标准偏差为 4.5%~9.6%,表明方法具有良好的准确度和精密度。

表3 添加回收率数据
Table 3 Data of spiking-recovery rates

分析物	原有浓度/(mg·kg ⁻¹)	添加浓度/(mg·kg ⁻¹)	检测浓度/(mg·kg ⁻¹)	添加回收率/%	RSD/%
苏丹 I	<LOD	0.5	0.40	80.0±5.1	6.4
		1.0	0.82	72.0±5.6	7.8
		2.0	1.71	85.5±6.3	7.4
苏丹 II	<LOD	0.5	0.42	84.0±4.8	5.7
		1.0	0.86	86.0±3.9	4.5
		2.0	1.65	82.5±5.5	6.7
苏丹 III	<LOD	0.5	0.65	84.0±5.1	6.1
		1.0	0.87	87.0±6.4	7.4
		2.0	1.81	90.5±8.0	8.8
苏丹 IV	<LOD	0.5	0.52	104.0±9.7	9.3
		1.0	0.82	82.0±7.9	9.6
		2.0	1.73	81.5±7.1	8.7

3 结论

本研究建立了基于 HPTLC-SERS 联用检测技术的葡萄汁中 4 种苏丹红染料掺伪的定性定量分析技术。与传统的柱色谱方法相比,本方法具有简单、快速、灵敏度高和通量大等优点。考虑到 SERS 图谱的指纹性,检测人员可以在没有参照物的前提下,对目标物分子进行确凿地识别。在控制实验室的常规应用中,该方法具有同时实现 20 个样品分离和检测的潜力,因此特别适于大批量饮料和食品样品中非法色素添加的筛检。

参考文献

- [1] OOKA M, KOBAYASHI K, ABE T, et al. Determination of genotoxic potential by comparison of structurally related azo dyes using DNA repair-deficient DT40 mutant panels [J]. Chemosphere, 2016, 164: 106-112.
- [2] LI Tong, HAO Min-lu, PAN Jie, et al. Comparison of the toxicity of the dyes Sudan II and Sudan IV to catalase [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2017, 31(10): e21 943.
- [3] European Union. RASSF 2016 annual report [R/OL]. (2017-01-

01) [2018-06-18]. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2016.pdf.

- [4] REJCZAK T, TUZIMSKI T. Application of High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector for Simultaneous Determination of 11 Synthetic Dyes in Selected Beverages and Food-stuffs [J]. Food Anal Method, 2017, 10(11): 3 572-3 588.
- [5] AMELIN V G, KOROTHOV A I, ANDORALOV A M. Simultaneous determination of dyes of different classes in aquaculture products and spices using HPLC-high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Anal Chem, 2017, 72 (2): 183-190.
- [6] WEISZ A, JAMES I C, TAE C J, et al. Determination of Sudan I and a newly synthesized Sudan III positional isomer in the color additive D&C Red No. 17 using high-performance liquid chromatography [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2017, 34(11): 1 831-1 841.
- [7] KANDLER H, BBLEISCH M, WIDMER V, et al. A validated HPTLC method for the determination of illegal dyes in spices and spice mixtures [J]. J Liq Chromatogr Related Technol, 2009, 32(9): 1 273-1 288.

(下转第 77 页)

表3 电子烟液样品检测结果

Table 3 Testing results of e-liquid samples

样品	ATP 检测			平板检测	
	RLU	预测活菌总数/ (CFU · mL ⁻¹)	结果 判定	菌落总数/ (CFU · mL ⁻¹)	结果 判定
1	1	11	合格	<1	合格
2	5	44	合格	27	合格
3	12	93	合格	85	合格
4	32	217	不合格	2.0×10 ²	不合格
5	50	319	不合格	3.0×10 ²	不合格

30 s, ATP 检出限为 2.36×10^{-12} mol/L, RSD 为 3.5% ~ 8.2%, 加标回收率为 97% ~ 108%。为保证雾化液中活菌数在 ATP 检测限内, 采用混合纤维素酯滤膜对样品进行富集。本方法估算的活菌总数结果与平板计数检测结果没有显著性差异 ($P > 0.05$), 对电子烟雾化液评价结果一致。

本方法与传统的平板计数检测法相比, 准确度相差不大, 而检测时间大大缩短, 是对电子烟相关卫生检测方法的有效补充。方法使用的 ATP 荧光检测仪、检测试剂以及混合纤维素酯滤膜价格低廉, 使用方便, 适宜在相关检测中推广。

参考文献

- [1] BROWN J, WEST R, BEARD E, et al. Prevalence and characteristics of e-cigarette users in Great Britain: Findings from a general population survey of smokers[J]. *Addictive Behaviors*, 2014, 39(6): 1120-1125.
- [2] HAJEK P, ETTER J F, BENOWITZ N, et al. Electronic cigarettes: review of use, content, safety, effects on smokers and potential for harm and benefit[J]. *Addiction*, 2014, 109(11): 1801-1810.
- [8] LI Hao, ZHU Qing-xia, CHWEE Tsz Sian, et al. Detection of structurally similar adulterants in botanical dietary supplements by thin-layer chromatography and surface enhanced Raman spectroscopy combined with two-dimensional correlation spectroscopy [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 883: 22-31.
- [9] NIS S, EMORY S R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering [J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1102-1106.
- [10] WANG Liao, XU Xue-ming, CHEN Yi-sheng, et al. HPTLC-FLD-SERS as a facile and reliable screening tool: Exemplarily shown with tyramine in cheese [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2): 688-695.
- [11] XIE Zheng-jun, WANG Yang, CHEN Yi-sheng, et al. Tuneable surface enhanced Raman spectroscopy hyphenated to chemically derivatized thin-layer chromatography plates for screening histamine in fish [J]. *Food Chem*, 2017, 230: 547-552.
- [12] LEE P C, MEISEL D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols [J]. *J Phys Chem*, 1982, 86

- [3] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5750.12—2006 生活饮用水标准检验方法 微生物指标[S]. 北京: [出版者不详], 2006: 1-36.
- [4] 中华人民共和国深圳出入境检验检疫局. SZDB/Z157—2015 电子烟雾化液产品通用技术要求[S]. 深圳: [出版者不详], 2015: 1-7.
- [5] VARLET V, FARSALINOS K, AUGSBURGER M, et al. Toxicity assessment of refill liquids for electronic cigarettes[J]. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 2015, 12(5): 4796-4815.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.2—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: [出版者不详], 2010: 1-12.
- [7] PISTELOK F, POHL A, STUCZYNSKI T, et al. Using ATP tests for assessment of hygiene risks[J]. *Ecological Chemistry & Engineering S*, 2016, 23(2): 259-270.
- [8] WHITELEY G S, DERRY C, GLASBEY T, et al. The perennial problem of variability in adenosine triphosphate (ATP) tests for hygiene monitoring within healthcare settings[J]. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2015, 36(6): 658-663.
- [9] MORRIS H C. The benefits of rapid microbiological testing of finished products using ATP bioluminescence[J]. *International Journal of Cosmetic Science*, 2010, 20(1): 63-67.
- [10] CARRASCOSA C, MILLÁN R, JABER J R, et al. Monitoring of cleanliness and disinfection in dairies: Comparison of traditional microbiological and ATP bioluminescence methods[J]. *Food Control*, 2012, 28(2): 368-373.
- [11] COSTA P D, ANDRADE N J D, PASSOS F J V. ATP-bioluminescence as a technique to evaluate the microbiological quality of water in food industry[J]. *Brazilian Archives of Biology & Technology*, 2004, 47(3): 399-405.
- [12] HECKER W, MEIER R, THEVENIN J P, et al. Comparative studies of gelatin and cellulose ester membrane filters for their suitability in determining the microorganism count in the air[J]. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B*, 1983, 177(5): 375-393.
- [13] OTTO A, BRUCKBAUER A, CHEN Yi-xing. On the chloride activation in SERS and single molecule SERS [J]. *J Mol Struct*, 2003, 661-662: 501-514.
- [14] CHEN Xiao-min, GU Huai-min, SHEN Gao-shan, et al. Spectroscopic study of surface enhanced Raman scattering of caffeine on borohydride-reduced silver colloids [J]. *J Mol Struct*, 2010, 975(1/2/3): 63-68.
- [15] DONG Xiao, GU Huai-min, KANG Jian, et al. Comparative study of surface-enhanced Raman scattering activities of three kinds of silver colloids when adding anions as aggregating agents [J]. *Colloids Surf A*, 2010, 368(1/2/3): 142-147.
- [16] DONG Xiao, GU Huai-min, KANG Jian, et al. Effects of the surface modification of silver nanoparticles on the surface-enhanced Raman spectroscopy of methylene blue for borohydride-reduced silver colloid [J]. *J Mol Struct*, 2010, 984(1/2/3): 396-401.
- [17] MAHER R C. SERS Hot Spots [M]//KUMAR C S S R. Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 215-260.

(上接第 64 页)