

# ATP 生物发光法快速检测电子烟雾化液菌落总数

## Fast examination of total colony numbers in Electronic Cigarette Liquids based on adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence method

张婷婷 冯颖杰 杨宗灿 刘向真

ZHANG Ting-ting FENG Ying-jie YANG Zong-can LIU Xiang-zhen

郝辉 张东豫 朱琦 张展

HAO Hui ZHANG Dong-yu ZHU Qi ZHANG Zhan

(河南省中烟工业有限责任公司技术中心, 河南 郑州 450001)

(China Tobacco Henan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 450001, China)

**摘要:**利用三磷酸腺苷(ATP)生物发光法建立快速检测电子烟雾化液微生物菌落总数的方法并进行优化,与国家标准微生物检测方法进行对比分析。结果表明:① ATP 荧光检测仪的最优检测温度为 25 ℃,反应时间为 30 s,ATP 检出限为  $2.36 \times 10^{-12}$  mol/L, RSD 为 3.5%~8.2%,加标回收率为 97%~108%;② 滤膜过滤富集检测可实现低活菌数样品的检测,混合纤维素酯滤膜的富集检测效果优于聚碳酸酯滤膜和醋酸纤维滤膜,富集后检测 ATP 生物荧光的相对光度值与富集前活菌总数具有良好的对数线性相关关系( $r^2 > 0.96$ );③ 采用 ATP 检测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( $P > 0.05$ ),对电子烟雾化液的卫生情况评价结果一致。ATP 生物发光检测方法可快速计算电子烟雾化液菌落总数,对于电子烟安全卫生风险评估具有建设意义。

**关键词:**电子烟;菌落总数;三磷酸腺苷;生物发光

**Abstract:** In order to fast evaluate the hygiene situation of electronic cigarette liquids, the fast examination of total colony numbers in electronic cigarette liquids has been achieved which was based on the adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence method. The method has been optimized, and the examination results of total colony by ATP method was compared with the results by National standard microbial detection method. Results showed: (1) the optimal temperature for ATP examination was 25 ℃, optimal time for bioluminescence reaction was 30 s, the detection limit of ATP was  $2.36 \times 10^{-12}$  mol/L, RSD was 3.5%~8.2%, and the sample recovery rate was 97%~108%. (2) Samples with low Colony-Forming Units

(CFU) were examined after enriching with filtration membrane. Mixed cellulose ester filtration membrane had better enrichment effect than poly-carbonate membrane and cellulose acetate membrane. It showed good logarithmically linear correlation between the fluorescent light after membrane filtration and the total colony before filtration ( $r^2 > 0.96$ ). There was no significant difference on the total colony numbers calculated between the ATP method and standard plate count method ( $P > 0.05$ ). And the evaluation results of electronic cigarette liquids are identical. Therefore, ATP bioluminescence method could instantly calculate the total colony numbers in electronic cigarette liquids, which was constructive in safety and hygiene risk evaluation in electronic cigarette industry.

**Keywords:** electronic cigarette; total colony number; adenosine triphosphate (ATP); bioluminescence

近年来电子烟市场份额不断增长,越来越多的消费者尝试使用电子烟产品<sup>[1-2]</sup>。随着电子烟技术的发展,各种品牌的电子烟雾化液和消费者根据个人需求制作的 DIY 雾化液也愈加丰富。与传统烟草相比电子烟被认为具有较小危害<sup>[2]</sup>。但是,其生产过程缺乏相关的规范化标准。电子烟雾化液作为人体摄入产品,其菌落总数必须符合相关的法规限量要求<sup>[3-4]</sup>,其卫生安全逐渐成为不可忽视的问题。目前, Vincent varlet 等<sup>[5]</sup>报道了平板计数法对电子烟雾化液的部分微生物指标的检测结果。然而,平板计数法<sup>[6]</sup>通常需要 24 h 以上的细菌培养过程,耗费大量人力,且检测结果滞后,难以开展快速检测,无法实时监控电子烟雾化液的卫生情况。

三磷酸腺苷(ATP)生物发光法是一种简单、快速、灵活的活菌计数方法,检测微生物数量可在 1 min 内完成,操作简单方便,有着传统平板计数法无法比拟的优势。近年来由于便携设备的相继出现以及虫荧光素酶的量产,ATP 生物

**作者简介:**张婷婷,女,河南中烟有限责任公司工程师,硕士。  
**通信作者:**张展(1982-),男,河南中烟有限责任公司高级工程师,博士。E-mail: zhangzhan2059729@126.com

**收稿日期:**2018-03-19

发光法越来越广泛地应用于食品、医疗、环境等行业的卫生评估和检测<sup>[7-10]</sup>,但该方法用于检测电子烟雾化液菌落数还未见报道。基于此,本研究拟建立电子烟雾化液菌落总数的ATP生物发光法快速检测体系,并将检测结果与GB 4789.2—2010法测得的菌落总数进行比对分析,对检测结果进行验证。以期为电子烟产品的安全卫生风险评价提供实时监测的手段,对传统检测方法进行有效的补充。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

ATP 荧光检测仪: CX-3011B 型, 上海美凯纯生物科技有限公司;

超净工作台: HS-840 型, 苏州晖途洁净科技有限公司;

高压灭菌锅: SIIA 型, 上海博讯实业有限公司;

混合纤维素酯滤膜( $d=13\text{ mm}$ , 孔径 $=0.22\text{ }\mu\text{m}$ )、聚碳酸酯滤膜( $d=13\text{ mm}$ , 孔径 $=0.20\text{ }\mu\text{m}$ )、醋酸纤维滤膜( $d=13\text{ mm}$ , 孔径 $=0.22\text{ }\mu\text{m}$ )、过滤器: 广东环凯微生物科技有限公司;

生物荧光检测试剂套装: 上海美凯纯生物科技有限公司;

电子烟雾化液样品: 尼古丁含量 $1.2\text{ mg/g}$ , 主要组成为甘油、丙二醇和水(三者体积比为 $4:4:2$ ), 河南中烟工业有限责任公司;

细菌琼脂粉、氯化钠等试剂: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 菌落总数标准曲线的绘制 菌悬液为自制枯草芽孢杆菌菌悬液, 自冷藏的斜面培养基中取枯草芽孢杆菌, 画线接种于培养皿中,  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 $24\text{ h}$ 。将 $10\text{ mL}$  无菌生理盐水注入已划线培养 $24\text{ h}$  的平皿培养基表面, 打散其上的菌落并收集到无菌玻璃试管中, 振荡摇匀, 作为菌悬液原液。 $10$  倍梯度稀释菌悬液原液, 配置成 $10^{-1}\sim 10^{-8}$  稀释菌液。将不同浓度菌液加入电子烟雾化液中制备系列样品, 参照GB 4789.2—2010, 利用平板计数检测菌落总数。并对样品进行富集操作: 将 $0.22\text{ }\mu\text{m}$  滤膜装进洁净的塑料滤器中旋紧压平, 高压灭菌( $120\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $0.1\text{ MPa}$ ,  $20\text{ min}$ )后待用。用无菌注射器取 $10\text{ mL}$  待检测样品, 连接过滤器, 保持压力恒定, 缓缓将样品压入无菌试管中。取出滤膜用 $200\text{ }\mu\text{L}$  的ATP提取试剂, 反复冲洗提取 $30\text{ s}$ , 移取 $50\text{ }\mu\text{L}$  提取液加入 $50\text{ }\mu\text{L}$  荧光反应试剂, 振荡 $5\text{ s}$ , 后置于荧光检测仪中检测, 读取ATP荧光值(RLU), 绘制预测菌落总数的标准曲线。

1.2.2 ATP标准曲线的绘制 称取 $0.1009\text{ g}$  ATP粉末溶解在 $200\text{ mL}$  灭菌蒸馏水中, 配制成 $1\text{ mmol/L}$  ATP母液, 用无菌水逐级稀释成浓度为 $10^{-8}, 5\times 10^{-9}, 10^{-9}, 5\times 10^{-10}, 10^{-10}, 5\times 10^{-11}, 10^{-11}, 5\times 10^{-12}\text{ mol/L}$  的标准溶液, 移取 $50\text{ }\mu\text{L}$  标准溶液加入 $50\text{ }\mu\text{L}$  荧光反应试剂, 振荡 $5\text{ s}$ , 置于荧光检测仪中检测, 读取ATP荧光值(RLU), 每组 $3$  个样品, 每个样品测定 $2$  次取均数, 并绘制ATP标准曲线。

1.2.3 电子烟雾化液样品菌落总数测定 通常情况下, 电子

烟雾化液中微生物含量较低<sup>[5]</sup>, 将不同浓度菌液加入电子烟雾制备 $5$  组人工菌群样品中, 用平板计数法检测菌落数, 并按照1.2.1所述富集及ATP测定步骤进行测定。

1.2.4 荧光检测温度对检测值的影响 在无茵恒温恒湿间, 利用新风空调控制系统调节房间温度, 分别设置为 $10, 15, 20, 25, 30, 35\text{ }^\circ\text{C}$ , 每个温度下仪器平衡 $24\text{ h}$ , 移取 $50\text{ }\mu\text{L}$  浓度为 $1\times 10^{-9}\text{ mol/L}$  的ATP标准溶液加入 $50\text{ }\mu\text{L}$  荧光反应试剂, 振荡 $5\text{ s}$  后置于荧光检测仪中检测, 读取ATP荧光值(RLU)。

1.2.5 荧光反应时间对检测值的影响 吸取 $50\text{ }\mu\text{L}$  浓度为 $1\times 10^{-9}\text{ mol/L}$  的ATP标准溶液加入 $50\text{ }\mu\text{L}$  荧光反应试剂, 振荡 $5\text{ s}$  后, 置于荧光检测仪中分别在 $10, 30, 50, 70, 120\text{ s}$  时读取ATP荧光值(RLU)。

1.2.6 卫生评价 依据相关标准<sup>[3-4]</sup>, 以菌落总数不超过 $100\text{ CFU/mL}$  判定为卫生合格, 反之判定不合格。

1.2.7 数据分析 采用Minitab16软件进行数据统计分析, ATP和平板计数检测的定量结果采用配对 $t$ 检验, 卫生状况评价定性结果采用 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 ATP 荧光检测

2.1.1 检测温度的影响 从图1可以看出, 温度对于检测结果具有较大影响, 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$  时检测的相对光度值最高, 因此检测温度以 $25\text{ }^\circ\text{C}$  为宜。

2.1.2 反应时间的影响 采用相同标样考察了反应时间对检测结果的影响, 如图2所示, 随着反应时间的延长, 样品的相对光度值呈下降趋势,  $1\text{ min}$  内相对光度值降低超过 $20\%$ ,

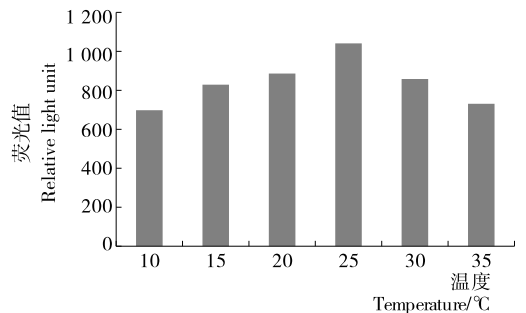


图1 温度对荧光检测值的影响

Figure 1 Effect of temperature on fluorescence detection

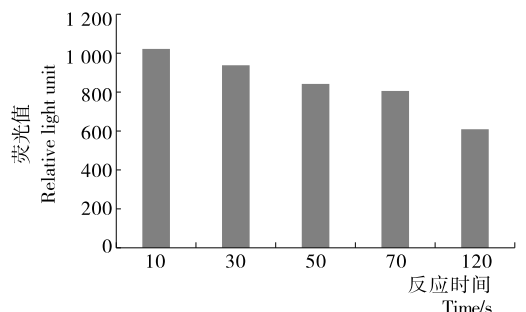


图2 反应时间对荧光检测值的影响

Figure 2 Effect of reaction time on fluorescence detection

因此应尽快测试。考虑到实际操作和检测流程时间,测试最佳反应时间在 30 s 为宜。

2.1.3 ATP 检测标准曲线 分别配置不同浓度的 ATP 标准溶液,采用荧光光度仪检测 RLU 值。以  $\lg [\text{ATP} (\text{pmol}/\text{L})]$  为 Y 值, $\lg (\text{RLU})$  为 X 值,绘制标准检测曲线见图 3。由图 3 可见,二者具有良好的线性关系,线性方程为  $Y = 0.983 2X + 0.012$ ,  $r^2 > 0.99$ 。重复测定空白样品 12 次,RLU 标准偏差为 0.798。根据检出限定义为信噪比 3:1 时的检出浓度,结合前述回归方程计算检出限为  $2.36 \times 10^{-12} \text{ mol}/\text{L}$ 。分别稀释设置高中低 3 个样品梯度重复测定 6 次,计算精密度和回收率见表 1。从表 1 可以看出,RSD 为 3.5%~8.2%,回收率为 97%~108%。

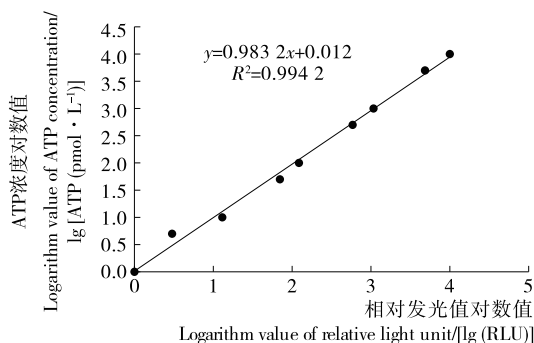


图 3 ATP 浓度与相对光度值的关系

Figure 3 Relations between ATP concentration and RLU

表 2 不同材质滤膜过滤后检测结果

Table 2 Testing results after filtration by membranes of different materials ( $n=6$ )

样品菌落总数/ (CFU · mL <sup>-1</sup> )	混合纤维素酯滤膜		聚碳酸酯滤膜		醋酸纤维滤膜	
	RLU	RSD/%	RLU	RSD/%	RLU	RSD/%
32	3	9.5	3	13.1	2	22.1
$3.2 \times 10^2$	40	5.6	38	6.7	34	13.2

采用混合纤维素酯滤膜的过滤活菌数多。且检测稳定性更好。因此,优选滤膜为混合纤维素酯滤膜。

2.2.2 菌落总数与相对荧光检测值的关系 在电子雾化液中添加不同浓度的菌悬液配置成活菌数不同的待测样品,进行 ATP 荧光检测。以过滤后的  $\lg (\text{RLU})$  为 X 值,样品的  $\lg (\text{CFU}/\text{mL})$  为 Y 值,绘制标准曲线,见图 4。从图 4 可以看到,二者具有较好的线性相关关系,线性方程为  $Y = 0.862 9X + 1.038 2$ ,决定系数  $R^2 > 0.96$ 。

### 2.3 电子雾化液样品检测

为了验证 ATP 检测方法的有效性,制备了不同活菌含量的电子雾化液样品,并分别采用 ATP 检测方法和平板计数检测方法检测活菌总数,结果见表 3。从表 3 可以看出,2 种方法的检测结果较为一致。将二者检测结果进行配对 T 检验统计比较, $t$  值为 1.58, $P$  值为 0.212,说明 2 种检测结果没有显著差异。根据检测结果评估,1~3 号样品检测合格,4,5 号样品检测不合格,二者检测判定结果一致。从“统计—表格—交叉分组表和卡方”入口,将卫生状况判定和检测方法作为“行”及“列”将菌落数做为频数输入,进行卡方检

表 1 ATP 检测方法的精密度和加标回收率

Table 1 RSD and recovery rate of samples ( $n=6$ )

样品	ATP 加标量/(mol · L <sup>-1</sup> )	RSD/%	回收率/%
1	$5 \times 10^{-12}$	8.2	102
2	$5 \times 10^{-11}$	3.5	97
3	$5 \times 10^{-10}$	4.3	108

### 2.2 菌落总数检测

2.2.1 滤膜材质的影响 通常情况下电子雾化液中微生物含量较低<sup>[5]</sup>。而根据文献[7]报道每个细菌的 ATP 含量约为 1~2 fg,由此估算本方法中 ATP 荧光检测仪的菌落总数检出限约为  $10^3 \text{ CFU}/\text{mL}$ 。因此,检测电子雾化液中的菌落总数时,需要对检测样品进行浓缩富集处理才能有效检测。滤膜过滤是微生物检测常见的富集方法<sup>[11-12]</sup>。试验在电子雾化液样品中添加不同浓度的菌悬液,制备了 2 组不同活菌含量的检测样品。由于细菌的直径一般为 0.5~5.0  $\mu\text{m}$ <sup>[7]</sup>,故分别采用 0.22  $\mu\text{m}$  不同材质的混合纤维素酯滤膜、聚碳酸酯滤膜和醋酸纤维滤膜对样品进行过滤富集,并用平板计数法对过滤后的电子雾化液中细菌数进行测定,发现只有极少数细菌能被培养出来,说明 3 种滤膜均能将电子雾化液中的细菌全部截留,过滤后 ATP 荧光检测结果见表 2。从表 2 可以看出,采用混合纤维素酯滤膜过滤富集后,ATP 荧光检测的 RLU 较高,且检测结果的 RSD 较低,说明

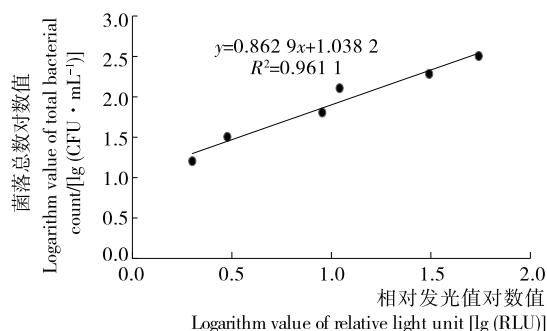


图 4 菌落总数与滤膜检测相对光度值的关系

Figure 4 Relationship between RLU and total colony number

验,结果显示 Pearson 卡方值为 2.064, $P$  值为 0.151 ( $P > 0.05$ ),结果表明 2 种检测方法对卫生状况的判定无显著性差异。

## 3 结论

本研究构建了基于 ATP 荧光的电子雾化液菌落总数快速检测方法,该方法的检测温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,反应时间为

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 <sup>-1</sup> )	结果 判定	菌落总数/ (CFU · mL <sup>-1</sup> )	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 <sup>2</sup>	不合格
5	50	319	不合格	3.0×10 <sup>2</sup>	不合格

30 s, ATP 检出限为  $2.36 \times 10^{-12}$  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] CARRASCOSAA 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)