磁性表面分子印迹聚合物对食品中苏丹红丨的检测

赵晨, 贾光锋, 陆文总, 任郁苗, 宫强

(西安工业大学电信学院,陕西西安 710021)

摘要:本文研究了一种对苏丹红 [的检测的新方法,即磁性表面分子印迹技术。主要是以包裹二氧化硅的磁性纳米颗粒为载体, 在其表面合成对苏丹红] 有特异性识别的磁性表面分子印迹聚合物。利用紫外分光光度计、红外光谱分析仪及透射电子显微镜对于所 制备的苏丹红 [磁性分子印迹聚合物的磁性、形态学功能、吸附性能和特异性进行检测。实验结果表明该磁性表面分子印迹聚合物的 印迹位点位于磁性载体的表层,提高与目标物质的结合能力。在外磁场条件下,磁性表面分子印迹聚合物能够轻松地达到吸附平衡并 实现磁分离,降低非特异性吸附,从而提高对苏丹红] 的吸附量和选择性。最后对辣椒中含有的苏丹红] 进行了回收率检测,回收 率达到 80%以上。说明采用磁性表面分子印迹法对食品中苏丹红] 可快速、高效的检测。

关键词:磁纳米颗粒;分子印迹聚合物;苏丹红;表面分子印迹

文章篇号:1673-9078(2016)9-302-307

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.043

Detection of Sudan I in Food using Magnetic Molecularly Imprinted

Polymer Microspheres

ZHAO Chen, JIA Guang-feng, LU Wen-zong, REN Yu-miao, GONG Qiang

(College of Electronic and Information Engineering, Xi'an Technological University, Xi'an 710021, China)

Abstract: A novel method (magnetic surface molecular imprinting technique) for the detection of Sudan I in food was investigated. A silica-wrapped magnetic nanoparticle was utilized as the carrier and on its surface the magnetic surface molecular imprinted polymer was synthesized. The magnetic properties, morphological features, adsorption properties, and specificities of the prepared Sudan I magnetic molecularly imprinted polymers were determined by ultraviolet (UV) spectrophotometry, infrared (IR) spectrometry, and transmission electron microscopy. The results showed that the imprinted sites of the magnetic surface imprinted polymer were located on the surface of the magnetic carrier, and the binding capacity with the target substance was shown to be improved. With the presence of an external magnetic field, the magnetic surface molecularly imprinted polymers easily reached adsorption equilibrium, magnetic separation was achieved, and nonspecific adsorption was reduced, thus improving the adsorption and selectivity capacity for Sudan I. Furthermore, the recovery of Sudan I in pepper was measured to be more than 80%, indicating that the magnetic surface molecular imprinting technique can be used as a novel method for the rapid and efficient detection of Sudan I in food.

Key words: magnetic nanoparticle; Sudan I; magnetic surface molecular imprinting; pepper

苏丹红是偶氮系列染色剂,其代谢产物具有致癌性,被国家标准禁止使用在食品领域。但是在日常生活中,有不少企业为改善食品色泽、降低生产成本仍将其作为食用色素,这对人们的身体造成很大的危害。因此,建立准确可靠的检测方法至关重要。目前关于苏丹红色素测定方法国内外都采用液相色谱法(HPLC)。但是在食品检测中,由于大多数食品成分复杂导致液相色谱检测出现基体杂质干扰严重、色谱峰重叠等问题,易产生假阳性结果。而我国采用的国收稿日期:2015-11-30

基金项目:陕西省自然科学基础研究计划项目(2014JQ2-8053);陕西省教 育厅专项科研计划项目(15JK1355)

作者简介:赵晨(1981-),女,博士,讲师,研究方向:生物医学工程

标方法即氧化铝柱净化,操作繁琐,实验条件要求苛 刻,结果重复性差。效果好的大气压化学电离质谱— 同位素稀释法则由于仪器和试剂昂贵而难以普及。本 实验采用磁性表面分子印迹聚合法对食品中苏丹红 I进行检测。分子印迹技术^[1-2]是近年来发展起来的一 种与多学科交叉的学科技术,利用分子印迹聚合物模 拟酶-底物或抗体之间的相互作用,对印迹分子进行特 异性识别,因此由于其具有预定性、识别性和实用性 而发展迅速。目前关于苏丹红的分子印迹检测已多有 报道^[3],但是多为三维聚合物,存在目标产物包埋过 深、不易洗脱和再聚合物的现象。而表面分子印迹法 使分子聚合发生在载体表面,形成二维聚合物,易于 洗脱和再聚合^[4-6]。且本课题组已针对该方法有多篇文 献报道^[7-9]。本文将载体 SiO₂ 改为包裹一层 SiO₂ 的磁 性颗粒 Fe₃O₄,形成 SiO₂@Fe₃O₄。在其表面进行分子 聚合,得到带有磁性的表面分子印迹聚合物。该聚合 物可有效地利用磁纳米粒子的磁性在检测中实现快速 磁分离,同时具有分子印迹的特异识别性。因此具有 高灵敏、可回收利用、强记忆效应等特性,特别适合 水溶液中分子的分离、富集^[10-11]。因此在食品有害物 质苏丹红 I 的检测中具有非常重要的应用价值。

1 材料与方法

- 1.1 材料
- 1.1.1 主要试剂

FeCl₂·4H₂O, FeCl₃·6H₂O, 乙醇, 氨水, 异丙醇, 正硅酸乙酯(TEOS), 甲基丙烯酸(MAA), 丙酮, 过硫酸铵, 苏丹红I, 苏丹红IV, 乙二醇二缩水甘油 醚(EGDE), 均购买于梯稀爱上海化成发展有限公司。 甲烷磺酸(上海国药集团化学试剂有限公司), 乙烯基 三乙氧基硅烷(TTS, sigma-alorich), 氯仿(上海中 国医药公司) 均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

集热式恒温加热磁力搅拌器(DF-101S,郑州长 城工贸有限公司),隔膜真空泵(GM-0.33 II,天津市 津藤实验设备有限公司),电热鼓风干燥箱(101型, 北京科伟永兴仪器有限公司),透射电镜(JEM-2100F, 日本),旋转蒸发仪(RE5298A,上海亚荣生化仪器 厂),傅立叶红外光谱仪(Fourier transform infrared, 2Rprestige-21,日本),紫外分光光度计(2100UV, Amersham Biosciences)。

1.2 实验方法

1.2.1 苏丹红 [磁性分子印迹聚合物的制备 1.2.1.1 磁纳米颗粒 (Fe₃O₄) 的制备

1.72 g FeCl₂·4H₂O、4.72 g FeCl₃·6H₂O和80 mL去 离子水于烧瓶中,连续通入氮气,并在集热式恒温加 热磁力搅拌器中搅拌加热。当温度升高至80 ℃时,缓 慢滴加氨水10 mL,并反应30 min,得到黑色沉淀物。 将产物用去离子水洗涤4~6次,以去除未反应的物质 和杂质,并干燥得Fe₃O₄纳米颗粒。

1.2.1.2 二氧化硅包裹的磁性纳米颗粒(SiO₂@Fe₃O₄)的合成

300 mg磁纳米颗粒、4 mL去离子水和50 mL异丙 醇混合,并超声处理15 min。依次加入5 mL氨水和2 mL正硅酸乙酯,在室温下连续搅拌反应12 h。反应后 将产物用蒸馏水清洗4~6次,干燥,得到二氧化硅包 裹的磁性纳米颗粒,即SiO₂@Fe₃O₄。

1.2.1.3 磁性分子印迹聚合物(MIP@ Fe₃O₄)的制备

10 g SiO₂@Fe₃O₄ 在甲烷磺酸溶液(质量分数为 50%)中浸泡 24 h,并用丙酮和蒸馏水进行冲洗,干 燥,得活化颗粒。30 mL 乙烯基三乙氧基烷(TTS)、 20 g 活化 SiO₂@Fe₃O₄纳米颗粒和 400 mL(乙醇:水 =1:1)于圆底烧瓶内,50 ℃反应 31 h。产物用乙醇和 蒸馏水冲洗,干燥,得 TTS-SiO₂@Fe₃O₄。将 3 g TTS-SiO₂@Fe₃O₄,10 g 甲基丙烯酸(MAA)以及 200 mL 蒸馏水,0.018 g 过硫酰胺于圆底烧瓶内,70 ℃反 应 7 h,所得产物用乙醇和蒸馏水冲洗,干燥。将得到 的产物和 4 mmol/L 苏丹红 I 溶于 100 mL 的氯仿(去 阻)溶液,通氮气 5 min,振荡 6 h 后加入交联剂乙二 醇二缩水甘油醚(EGDE),50 ℃搅拌 8 h,洗脱(洗 脱液配制为 V Zmi:V 平mi:V *=2:7:1),烘干。同时,非印 迹聚合物在制备过程中不加入目标物质苏丹红 I,其 余步骤与印迹聚合物一致。

1.2.2 对于磁性分子印迹聚合物结合能力及特 异性的检测

1.2.2.1 测定苏丹红 I 磁性分子印迹聚合物的结合率

首先制作苏丹红 I 标准曲线, 然后配制不同浓度 的苏丹红 I 溶液。分别将 0.05 g 苏丹红 I 分子印迹聚 合物加入苏丹红 I 溶液中, 震荡 2 h, 使印迹聚合物 与苏丹红 I 充分结合。取出混合溶液中的上层清液, 用紫外分光光度法检测反应后溶液的紫外吸收值。根 据标准曲线, 推算出反应后溶液的浓度,并根据公式 (1) 计算 O 值, 即

$$Q = \frac{V(c_1 - c_2)}{m} \tag{1}$$

式中: c₁为初始时苏丹红 [溶液浓度/ (mg/L); c₂为平衡 时苏丹红溶液浓度/ (mg/L); V 为苏丹红 [溶液的体积/L; m 为 MIP@ Fe₃O₄的质量/g; Q 为平衡时单位质量 MIP@ Fe₃O₄ 结合的苏丹红 [的量 (g/g)。

非印迹聚合物的结合率的测定与印迹聚合物测定 方法相同,只是在苏丹红 I 溶液中加入的是非印迹聚 合物。

1.2.2.2 测定苏丹红 I 磁性分子印迹聚合物的特异性

选取苏丹红 I 结构类似物苏丹红IV作为苏丹红 I 特异性检测的对照物。制备苏丹红IV标准溶液,并 配制不同浓度的苏丹红IV溶液,分别将 0.05 g 苏丹红 I MIP@ Fe₃O₄加入苏丹红IV溶液中,震荡 2 h。取出 溶液中的上层清液,用紫外分光光度法检测反应后溶 液的紫外吸收值。根据标准曲线,推算出反应后溶液 的浓度。根据公式(1)计算 Q 值。

1.2.3 分子印迹法对食品中苏丹红 [的检测

取苏丹红 I 1.25 mg、2.5 mg、3.75 mg、4.5 mg 和 5.65 mg 混入三份辣椒面中, 使五份辣椒面的总质量 均为1g。再称取1g不添加苏丹红 I的辣椒面,均配 成 100 ml 溶液, 再稀释 10 倍。各取出 5 ml 稀释的溶 液,测得溶液中苏丹红 I 紫外吸收值。然后,在溶液 中分别放入 0.05 g 合成的苏丹红 I MIP@ Fe₃O₄, 震荡 2h, 使磁性分子印迹聚合物与溶液中的苏丹红 I 充分 结合,达到吸附平衡。用磁铁分离磁性分子印迹聚合 物,取上层清液,用紫外分光光度法检测该溶液苏丹 红 I 紫外吸收值。根据苏丹红 I 的标准曲线, 推算出 反应前和反应达到平衡时溶液中苏丹红 I 的浓度, 计 算 0.05 g MIP@Fe₃O₄ 吸收苏丹红 I 的量。根据公式(2) 可得辣椒中苏丹红 I 的回收率 I。同时用非印迹聚合 物对辣椒面进行了检测,作为对照试验。

$$I = \frac{(c_1 - c_0)V - (c_2 - c_0)V}{m}$$
(2)

式中: c_1 为加入苏丹红 [的辣椒面溶液浓度/ (mg/L); c_2 为平衡时加入苏丹红 [的辣椒面溶液浓度/ (mg/L); c0 为没有 苏丹红 [的辣椒面溶液浓度/ (mg/L); c0'为平衡时没加入苏丹 红 [的辣椒面溶液浓度; V 为辣椒面溶液的体积/L; m 为加入 的苏丹红的质量/mg; 1为辣椒中苏丹红的回收率。

采用检测辣椒面相同的方法,对番茄中苏丹红 I 回收率也进行了检测,该结果作为平行实验进行对比。 1.2.4 数据统计分析

对苏丹红I磁性分子印迹聚合物的结合率和特 异性数据结果采用 SPSS 13.0 进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 苏丹红 I MIP@ Fe₃O₄ 磁性检测

将磁纳米颗粒、SiO2@Fe3O4、MIP@Fe3O4均匀 的混于水中,形成浑浊液。通过磁铁的吸附可以明显 的看出溶液中的颗粒在外加磁场作用下,被吸附致安 培瓶一侧, 溶液变澄清。证明实验室所制备的纳米颗 粒、SiO₂@ Fe₃O₄和 MIP@ Fe₃O₄均是具有磁性的。

2.2 磁性分子印迹聚合物红外光谱分析

如图 1 所示, Fe₃O₄ 的红外光谱在 561 cm⁻¹ 处有一 宽强的吸收峰,为 Fe₃O₄的 Fe-O 键, 1400 cm⁻¹ 处对 应其表面羟基-OH 的弯曲振动峰。与 Fe₃O₄标准波数 580 cm⁻¹ 谱图对照, 该法制得 Fe₃O₄ 晶体的 IR 光谱"紫 移",原因是制得的纳米级Fe₃O₄晶体颗粒尺寸减小的 结果,如图1(a)所示。而图1(b)表示SiO2@Fe3O4 的红外光谱在 1093 cm⁻¹ 处的强吸收峰为 Si-O-Si 的不 对称伸缩振动吸收峰, 798 cm⁻¹ 处和 467 cm⁻¹ 处分别

对应 Si-O-Si 的对称伸缩振动和弯曲振动,表明复合 物中形成了 SiO2。Fe3O4 表面包覆了 SiO2 和交联剂及 单体后 Fe-O 特征峰从 561 cm⁻¹ 处移动到了 560 cm⁻¹ 处。最后,在图1(c)中,1636 cm⁻¹处为羰基 C=O 伸缩振动峰,3423 cm⁻¹处为羧基-COOH 伸缩振动吸 收峰,证明 MIP@ Fe₃O₄ 聚合物中单体甲基丙烯酸的 存在。



图 1 Fe₃0₄(a)、Si0₂@Fe₃0₄(b)和MIP@Fe₃0₄(c)的红外光谱 分析

Fig.1 Infrared spectra of Fe₃O₄ nanoparticles (a), SiO₂@Fe₃O₄ (b), and MIP@Fe₃O₄ (c)

2.3 磁性分子印迹聚合物透射电镜分析

图 2 是磁纳米颗粒、SiO2@ Fe3O4 和苏丹红 I 磁 性分子印迹聚合物在透射电镜下的图片。可以明显看 出磁纳米颗粒的粒径分布基本均匀,且粒径在 50 nm 左右, 见图 2 (a)。而在图 2 (b) 中, SiO₂@ Fe₃O₄ 的粒径在100 nm 左右,说明 SiO2 包裹磁纳米颗粒后, 粒径增大。在图2(c)中可看到苏丹红磁性分子印迹 聚合物的粒径则在 200 nm 左右, 这表明以 SiO₂@ Fe₃O₄ 为载体,在其表面通过交联剂、功能单体等物 质合成了表面分子印迹聚合物,使颗粒粒径增大。



图 2 磁纳米颗粒(a)、SiO2@Fe3O4(b)和苏丹红磁性分子印迹 聚合物(c)的透射电镜图

Fig.2 TEM images of Fe₃O₄ nanoparticles (a), SiO₂@Fe₃O₄ (b), and MIP@Fe₃O₄ (c)

苏丹红 I 磁性分子印迹聚合物结合能力 2.4

2.4.1 磁性印迹和非印迹聚合物的结合率测定

根据苏丹红 I 浓度与所测得的紫外吸收值可制 作标准曲线,得到标准曲线的方程式如公式(3)所示:





Fig.3 Adsorption isotherm of Sudan $\,I\,$ on $MIP@Fe_{3}O_{4}$ and $NIP@Fe_{3}O_{4}$

将磁性印迹(MIP@Fe₃O₄)与磁性非印迹聚合物 (NIP@Fe₃O₄)前后溶液的紫外吸收值代入公式(3) 中,可计算出反应前后溶液的浓度值,根据公式(1) 可得到磁性印迹和磁性非印迹聚合物对不同浓度苏丹 红 I 溶液的结合率。绘制出苏丹红 I 磁性分子印迹聚 合物结合率的等温曲线图,如图 3 所示。从图中可看 到,非分子印迹聚合物的结合能力明显低于磁性分子 印迹聚合物,苏丹红 I 磁性分子印迹聚合物随着苏丹 红 I 溶液浓度的升高,磁性分子印迹聚合物结合能力 提高,而当浓度达到 3.0 mg/L 时,结合能力逐渐饱和, 在图 3 中可见结合曲线趋于平缓。证明实验室所制备 的苏丹红 I 磁性分子印迹聚合物的对于苏丹红 I 的 结合性能良好。

2.4.2 苏丹红 [磁性分子印迹聚合物的特异性



图 4 苏丹红 I (a)和苏丹红Ⅳ(b)的结构式 Fig.4 Chemical structure of Sudan I (a)and Sudan Ⅳ(b)





Fig.5 Adsorption isotherm of Sudan I and Sudan IV on MIP@Fe₃O₄

苏丹红 I 和苏丹红 IV 是结构相似的两种不同物 质,如图 4 所示。用制备的苏丹红 I 磁性分子印迹聚 合物对结构类似的两种化合物进行检测,从图 5 中可 以看到苏丹红 I 磁性分子印迹聚合物对于苏丹红 I 的结合效果很好,而对于苏丹红 IV 结合率很低,随着 溶液浓度的变化,结合率基本没有发生变化。所以苏 丹红 I 磁性分子印迹聚合物具有很高的特异性。

2.5 食品中苏丹红 I 回收率的测定

根据公式(2),可得到磁性表面分子印迹聚合物 /非印迹聚合物对苏丹红 I 的回收率,如表 1 所示。表 1 中,在辣椒面或番茄酱中加入苏丹红 I 的质量为公 式(2)中的m值,与印迹聚合物/非印迹聚合物结合 的苏丹红质量为公式中(c₁-c₀)V-(c₂-c₀')V 的值。通 过计算得到,制备的苏丹红 I 磁性表面分子印迹聚合 物对于食品中苏丹红 I 的回收率为 80%~101%。同时, 非印迹聚合物对苏丹红 I 检测的回收率很低,均在 10%以下。该结果说明制备的苏丹红 I 磁性分子印迹 聚合物可以有效地检测中食品中是否含有苏丹红 I, 且该方法具有特异性。

2.6 讨论

目前关于食品中苏丹红检测的方法中,主要采用 高效液相法进行检测。如肖潇等^[12]报道的对食品中苏 丹红的检测,采用高效液相色谱仪,检测限为 0.5 mg/L,回收率在 75.9%以上。在本文中苏丹红的检测 限也为 0.5 mg/L,回收率在 80.8%以上。同高效液相 色谱相比,对苏丹红的检测能力相似,但在高效液相 法中,物质检测时需要进行样品的预处理,且制备的 分析柱易受干扰,不易于保护,且不具有特异性。而 采用磁性分子印迹法对苏丹红检测具有方法操作简 便,分子印迹聚合物可重复使用,价格便宜,易于推

现代食品科技

表1 回收率的测定

٢,	具有特异性识别等优点。
, ,	

Table 1 Measurement of recoveries							
	的苏丹红质量/mg	的苏丹红质量/mg					
辣椒面	1.25	1.01	80.80	0.12	9.60		
	2.50	2.02	80.80	0.234	9.36		
	3.75	3.07	81.90	0.361	9.63		
	4.50	4.49	99.78	0.444	9.87		
	5.65	5.66	101.42	0.557	9.86		
番茄酱	1.25	1.10	88.00	0.118	9.44		
	2.50	2.19	87.60	0.245	9.8		
	3.75	3.31	88.20	0.367	9.79		
	4.50	4.46	99.11	0.439	9.76		
	5.65	5.75	101.1	0.541	9.58		

3 结论

本文制备了一种具有磁性的表面分子印迹聚合物,可对食品中苏丹红进行检测。该分子印迹聚合物 以被二氧化硅包裹的磁性颗粒为载体,在其表面合成 分子印迹聚合物。并通过透射电镜、红外光谱和结合 率实验对其形态学、吸附作用和识别特性进行了检测。 结果证明该分子印迹聚合物具有高吸附性能和低非特 定吸附性能。且在外在磁场作用下,能过轻松达到平 衡,实现磁分离,简化操作步骤。同时,对食品中苏 丹红 I 的回收率进行测定,回收率达到 80.8%以上。 证明制备的磁性表面分子印迹聚合物具有良好的回收 率,可对食品中的苏丹红 I 进行检测,且具有较高的 特异性和灵敏性。

参考文献

- [1] Rebelo T S C R, Almeida S A A, Guerreiro J R L, et al. Trimethoprim-selective electrodes with molecularly imprinted polymers acting as ionophores and potentiometric transduction on graphite solid-contact [J]. Microchemical Journal, 2011, 98: 21-28
- [2] Davoodi D, Hassanzadeh-Khayyat M, Rezaei M A, et al. Preparation, evaluation and application of diazinon imprinted polymers as the sorbent in molecularly imprinted solid-phase extraction and liquid chromatography analysis in cucumber and aqueous samples [J]. Food Chem., 2014, 158: 421-428
- [3] ZHAO Chuan-de, ZHAO Ting, LIU Xiao-yan, et al. A novel molecularly imprinted polymer for simultaneous etraction and determination of Sudan dyes by on-line solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J].

Journal of Chromatography A, 2010, 1217(45): 6995-7002

- [4] GONG Xiao-yan, CAO Xue-jun. Preparation of molecularly imprinted polymers for artemisinin based on the surfaces of silica gel [J]. Journal of Biotechnology, 2011, 153(1/2): 8-14
- [5] Baggiani C, Baravalle P, Giovannoli C, et al. Binding behavior of molecularly imprinted polymers prepared by a hierarchical approach in mesoporous silica beads of varying porosity [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(14): 1828-1834
- [6] LIU Yan, LIU Zhan-chao, GAO Jie, et al. Selective adsorption behavior of Pb (II) by mesoporous silica SBA-15-supported Pb (II)-imprinted polymer based on surface molecularly imprinting technique [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 186(1): 197-205
- [7] ZHAO Chen, WU Dao-cheng. Rapid detection assay for the molecular imprinting of gossypol using a two-layer PMAA/SiO₂ bulk structure with a piezoelectric imprinting sensor [J]. Sensors & Actuators: B. Chemical, 2013, 181: 104-113
- [8] 赵晨,贾光锋,陆文总,等.罗丹明B表面分子印迹聚合物制 备及其荧光检测[J].食品科学,2014,35(20):236-241
 ZHAO Chen, JIA Guang-feng, LU Wen-zong, et al. Preparation and fluorescence microscopic characterization of surface molecularly imprinted polymer of Rhoda mine B [J].
 Food Science, 2014, 35(20): 236-241
- [9] 赵晨,贾光锋,陆文总,等.表面分子印迹法制备棉酚印迹聚 合物及其性能检测[J].科学技术与工程,2014,14(16):88-93
 ZHAO Chen, JIA Guang-feng, LU Wen-zong, et al. Preparation of gossypol surface molecular imprinting polymer and detection [J]. Science Technology and

现代食品科技

Modern Food Science and Technology

Engineering, 2014, 14(16): 88-93

- [10] Chen L G, Liu J, Zeng Q L. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the separation of tetracycline antibiotics from egg and tissue samples [J]. J. Chromatogr. A, 2009, 1216: 3710-3719
- [11] Li L, He X W, Chen L X. J. Preparation of core-shell magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for recognition of bovine hemoglobin [J]. Chem. Asian, 2009, 4:

286-293

[12] 肖潇,程晓华,王国庆.高效液相色谱法测定食品中苏丹红 染料的方法改进[J].疾病预防控制通报,2015,30(6):57-58
XIAO Xiao, CHEN Xiao-hua, WANG Guo-qing. Improvement of detection for Sudan I-IV in foou based on high performance liquid chromatography method [J]. Bull Dis. Control Prev, 2015, 30(6): 57-58