

作者：
姚继军
杨仁康
陈建敏

PerkinElmer, Inc.
美国康涅狄格州谢尔顿
06484

石墨炉原子吸收 光谱法直接测定 不同乳制品中的铅

前言

牛奶及其各种制品是居民膳食构成中的基本食物。2008年中国“婴幼儿配方奶粉三聚氰胺”事件发生后公众越来越关注乳制品中可能存在的污染问题。聚焦此次奶粉污染事件，为了响应国内和国

外的民众对保护健康的迫切需求，中国政府必须改善食品安全形象，国务院发通知明确要求加强对乳制品的监管力度。众所周知，铅（Pb）对神经系统有很强的毒性，儿童神经系统正处于快速生长及成熟阶段，对铅毒性尤为敏感¹。因此，自上世纪70年代以来铅就是人们重点关注的有害重金属元素。根据现行的世界卫生组织（WHO）的标准，饮用水中铅的允许限值为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （十亿分之一，ppb）。参考目前大量的铅流行病学数据，中国卫生部国家标准将婴幼儿配方奶粉和鲜奶中铅污染物限量分别设定为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb, 湿重)和50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb)²，其中婴幼儿配方奶粉铅限量指标规定以乳为原料，以冲调后乳汁计。

石墨炉原子吸收光谱法（GFAAS）是测定痕量铅的传统方法。中国现行的食品卫生检验方法规定石墨炉原子吸收光谱法是食品中Pb含量检测的强制性仲裁方法³。为了保护消费者健康，应当采用灵敏、高效、经济的分析方法，以确保充分有效的食品安全监管。鉴于石墨炉原子吸收光谱法是一种成熟的分析技术，已被深入研究和了解，并被广大分析技术人员作为常规检测方法应用，因此非常适合进行这样的分析测试。需要注意的是，样品制备是分析测试的重要组成部分，同时也是最耗时的部分。

众所周知，牛奶是一种含有乳状或胶状脂肪小滴的水溶液。动物种属不同，其原奶的具体组成成分也不同，但不同乳制品通常都含有大量的乳糖、脂肪、蛋白质、矿物质和维生素等成分。复杂的牛奶基体组成，会对样品铅含量的准确测定造成干扰，因此在进行仪器分析前一般都要求用电热板或微波消解对样品进行前处理，以使牛奶样品全部分解。与简单对样品稀释后直接上机相比，上述两种前处理方法都非常耗时。必须关键注意的是，当所需检测的上机溶液中的铅的浓度仅在 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) 水平时，试剂本底和环境污染造成的干扰将极易影响到样品的正常分析结果，因此为了确保检测的质量，对消解过程的质量控制要求就极其严格。

为了克服样品消解面临的这些难题，本应用方法通过直接稀释进行样品前处理，采用石墨炉原子吸收光谱法自动上机进行铅含量分析。这一方法减少了样品前处理步骤，降低了潜在污染的可能，进一步提高了分析的速度，同时保证了分析的准确度。

实验条件

仪器

本实验使用PerkinElmer® PinAAcle™ 900T石墨炉原子吸收光谱仪（图1）进行不同乳制品中的铅（Pb）含量的测定。PinAAcle 900T石墨炉原子吸收光谱仪具有的横向加热石墨管（THGA）和纵向塞曼效应背景校正技术保证了温度能够恒定均匀的分布在石墨管。此石墨炉分析时使用的拥有专利的等温平台石墨炉（STPF）技术使得我们在分析复杂基体样品时能够使用水标准溶液建立标准工作曲线，直接对悬浮溶液样品进行准确、精密的分析，在取得最大原子化信号的同时，将记忆效应和潜在干扰降到最低。



图1. 带有AS 900石墨炉自动进样器的 PinAAcle 900T 原子吸收光谱仪

PinAAcle 900T原子吸收光谱仪配置有一台AS 900石墨炉自动进样器，使用PerkinElmer Lumina™铅元素空心阴极灯（Part No. N3050157）。实验所有样品的测定都使用标准横向加热石墨管（Part No. B0504033）和1.2 mL聚丙烯进样杯（Part No. B0510397）。仪器使用直观的WinLab32™原子吸收软件操控，电脑操作系统为Microsoft® Windows® 7。PinAAcle 900T仪器具体参数设置详见表1。

表1. PinAAcle 900T原子吸收光谱仪仪器参数设置

参数	值
波长	283.3nm
狭缝宽度	0.7nm
灯电流	10mA
信号测量	峰面积
测量方式	AA-BG
积分时间	5s
重复次数	3
标准曲线	4、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{L}$
进样体积	16 μL

样品采集

本研究分析了6个不同种类乳制品的共15个样品，样品类型包括了市售的所有常见乳制品类型，主要有奶粉、脱脂奶粉、液态全脂牛奶、液态低脂牛奶、液态儿童牛奶，以及酸奶。用干净的聚乙烯密封塑料袋把所有分析的样品对原包装进行封装、贴上标签后，带回实验室后放入冰箱中保存，待测。

样品制备

实验所有溶液配制用水均使用MiliQ-Element系统制备的超纯去离子水（DI）（Millipore®，米尔福德，马塞诸塞州，美国）；浓硝酸（69-70%）， HNO_3 ，过氧化氢（30%）， H_2O_2 ，痕量金属级或更高（苏州晶瑞化学科技有限公司，江苏，中国）；聚丙烯样品管和移液器枪头，使用前用稀硝酸（~5% HNO_3 ）浸泡，并用超纯去离子水反复冲洗。

对于后续的石墨炉原子吸收光谱分析，临用现配含有0.5% HNO_3 和0.1% Triton X-100（一种非离子型表面活性去污剂，Part No. N9300260）的溶液，既作为稀释剂，同时也作为标准曲线校准空白。

准确称取1g液体牛奶或固体奶粉样品，并转移至15mL聚丙烯样品管中 (Part No. B0193233)，然后加稀释剂定容至10mL，用力摇晃数分钟以确保溶液的均质性，得到的悬浮液使用自动进样器可以立即直接进行石墨炉原子吸收光谱法测定。这种悬浮液常温下能够稳定存在至少2天。空白试样的制备也采用同样的步骤，除非另有说明，所有样品都制备平行样。

对于一些蛋白质含量高于20%的固态乳制品，如脱脂奶粉标样，或是一些特殊处理过的强化配方乳制品，如蛋白粉等，稀释剂中如果加入哪怕少量的硝酸也将导致产生蛋白质析出沉淀。因此，对于此类样品，直接使用仅含有Triton X-100的稀释剂，并可适当增加浓度至0.5%，随后超声10分钟以确保形成均匀分散的悬浮液。

校准曲线

由于牛奶样品中的Pb含量往往都非常低，实验使用的所有试剂都必须是超纯级的以控制本底污染。因此，推荐使用PerkinElmer铅单元素超纯级标准溶液 (货号: N9303748, 介质2% HNO₃) 和基体改进剂 (货号: B0190635, 10%硝酸钡; 货号: B0190634, 1%硝酸镁)。利用AS 900石墨炉自动进样器在线自动稀释20 µg/kg (ppb)的铅标准使用液制作校准工作曲线。

方法验证

本研究通过在奶粉基体中的加标回收实验和对美国国家标准与技术研究院 (NIST®) 提供的标准参考物质 (SRMs) NIST® 1549 脱脂奶粉，以及中国计量科学研究院 (NIM) 提供的GBW08509a 脱脂奶粉进行测定来评价使用石墨炉原子吸收光谱法直接测定乳制品的分析效果。标准参考物质的所有处理步骤和其他乳制品样品完全一致。

为了进一步验证直接进样分析的可靠性，本研究还使用了ICP-MS进行仪器比对验证测定，即本研究所有分析的3个标准物质与15个采集的乳制品样品，都通过传统的基于样品基质完全消解的前处理步骤，并使用NexION® 300X ICP-MS (PerkinElmer公司, 谢尔顿, 康涅狄格州) 测定铅含量的结果进行比较。ICP-MS分析的前处理采用Multiwave™ 3000高压微

波消解系统 (PerkinElmer公司, 谢尔顿, 康涅狄格州)，使用HNO₃ 和 H₂O₂混酸体系完全分解牛奶样品基质。ICP-MS仪器操作参数的设置与常规测定时设置的参数一致。

结果和讨论

分析过程须对铅元素分析的升温程序进行优化，以使得在不损失待测物质的前提下最大限度减少基体干扰。石墨炉升温程序详见表2。

由于考虑到乳制品基体复杂，因此本研究的石墨炉升温程序多加入了一步预灰化程序，通过在这一步时添加干燥的压缩空气，有效避免了单批次分析超过50个以上样品时产生的石墨管积碳现象。PinAAcle 900T原子吸收光谱仪配置的TubeView™石墨管彩色观测系统为检查进样针在石墨管中的相对位置提供了极大的便利，这对于监控和制定没有经过消解的复杂的牛奶基体的干燥和热解过程提供了简单调节，从而确保样品不会发生沸腾或飞溅损失 (图2)。

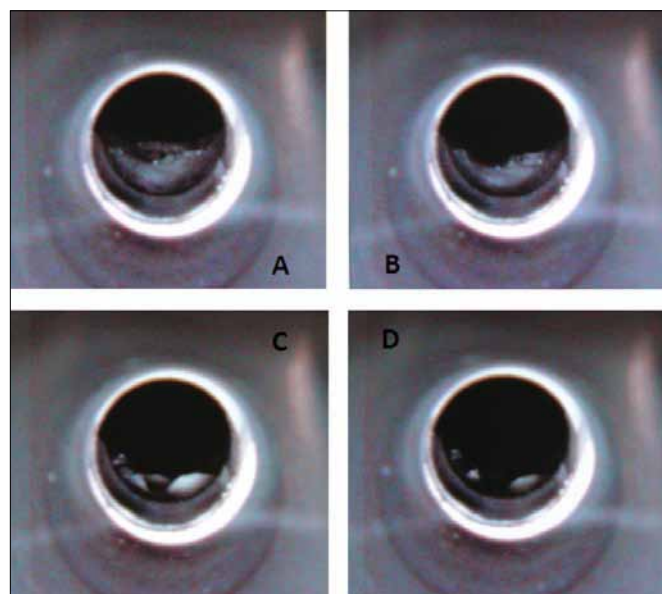


图2. 使用TubeView石墨管彩色观测系统拍摄的无须消解的含复杂基体的牛奶样品在石墨管中的干燥过程。

表2. 使用采用横向加热石墨管 (THGA) 的PinAAcle 900T原子吸收光谱仪直接测定牛奶样品中铅含量时的石墨炉升温程序

步骤		温度 (°C)	升温时间 (秒)	保持时间 (秒)	气流量	读数	气体类型
1	干燥	130	5	30	250		正常
2	干燥	150	15	30	250		正常
3	预灰化	450	15	15	50		压缩空气
4	灰化	600	10	20	250		正常
5	原子化	1600	0	3	0	X	正常
6	清洗	2500	1	5	250		正常

从清晰的图像结果可以体验优化石墨炉升温程序变得更为简单和快速。

对于铅的测定，没有必要将牛奶的基体组分完全消解，基于使用了PerkinElmer成熟的等温平台石墨炉 (STPF) 技术和专利的横向加热石墨管 (THGA) 设计能够确保样品受热的均匀一致，从而具有无与伦比的原子化效率和干扰校正能力，确保了最佳的准确度、精确度和检出限。每个样品的测定结果都是重复读取3次后计算均值得到的，单次结果计算采用峰面积拟合 (吸光度拟合)。图3显示了各种不同溶液的典型峰值分布的叠加谱图。等温平台石墨炉 (STPF) 技术一个特有的优势在这里得到了清楚的展现：即使没有在全相同的时间出峰，但计算峰面积结果仍然能够始终获得准确稳定的结果。

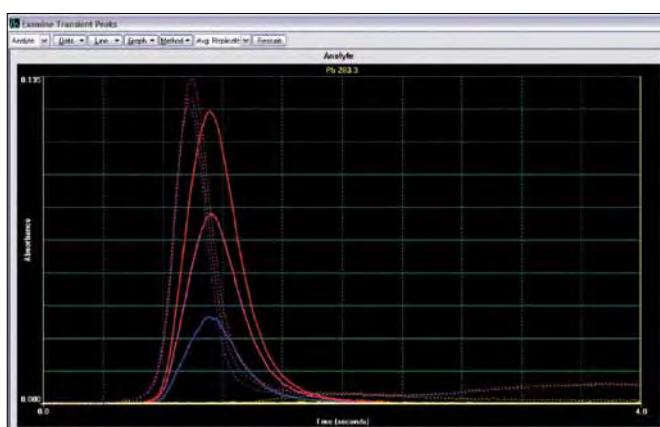


图3. 脱脂奶粉标准物质的典型铅原子吸收峰与背景吸收峰的叠加谱图。蓝色实线代表脱脂奶粉标准物质，紫色实线代表标准物质加标，红色实线代表浓度为25 µg/kg的标准溶液，而坐标轴底步的黄色实线代表稀释剂空白的响应值，虚线则代表背景吸收。

为了验证方法的可靠性，本文分别对美国国家标准与技术研究院NIST 1549脱脂奶粉标准物质和中国计量科学研究院NIM GBW08509a脱脂奶粉标准物质中的Pb元素进行了分析。这两种标准物质的石墨炉直接进样的分析结果表明，检测值与标准推荐值完全吻合 (结果详见表3)，因此验证了本研究采用的简单稀释后直接测定的方法提供了可靠的结果和仪器稳定的性能。此外，选择标准参考物质GBW08509a作为实际样品，分别用Pb单元标准储备溶液按照样品实际含量的50、100、200%浓度进行基体中得加标回收实验，得到Pb元素的回收率结果非常稳定，都落在95-101%之间 (详见表3)。

表3. 原子吸收光谱法直接测定NIST 1549 和 GBW08509a的结果 (单位均为µg/kg)

样品	证书标准值	加标量	期望平均值	实测平均值	回收率 (%)
NIST 1549	19 ± 3	0	19	19	101
GBW08509a	24 ± 6	0	24	23	95
GBW08509a	24 ± 6	12	36	35	96
GBW08509a	24 ± 6	24	48	48	99
GBW08509a	24 ± 6	48	72	71	98

方法检出限 (MDLs)，定义为乳制品中微克每千克 (ppb) 级浓度的待测元素产生的吸光度值与空白值测定存在的统计学差异，其值由3倍稀释剂空白吸光度值标准偏差 (SD) 除以灵敏度计算得到。本方法的显著益处是将样品进行10倍稀释后即可直接进样分析，因此方法的空白值可以控制到很低，使用进样量16µL即可得到0.25 µg/kg (ppb)的方法检出限 (MDL)。因此，使用乳制品经本法石墨炉直接进样分析测得的方法检出限 (MDL) 要比奶粉标准物质的证书标准值 (约为20 µg/kg) 低两个数量级，这表明本方法非常适合测定各种乳制品中的Pb。

为了比对本方法，本研究还将所有的乳制品样品进行传统的混酸体系微波密闭高压消解，然后使用ICP-MS进行测定。各乳制品样品中铅含量检测值列于表4。

表4. 石墨炉原子吸收光谱法直接测定和传统ICP-MS消解后测定法分析市售乳制品样品中铅含量的结果 (表中数据均为平均值± 标准偏差, 单位均为 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

序号	标准物质/样品	标准值	检测结果	
			GFAAS	ICP-MS
1	GBW08509a (脱脂奶粉)	24 ±6	23.3 ±0.7	23.9 ±1.7
2	GBW10017 (奶粉)	70 ±20	23.9 ±2.7	25.7 ±8.7
3	NIST*1549 (无脂肪奶粉)	19 ±3	19.1 ±1.3	19.3 ±6.5
4	奶粉	-	40.2 ±1.8	42.1 ±1.9
5	脱脂奶粉	-	25.7 ±1.3	23.3 ±6.1
6	全脂奶粉 (品牌1)	-	4.46 ±0.32	4.57 ±0.60
7	全脂奶粉 (品牌2)	-	2.75 ±0.07	2.73 ±0.09
8	全脂奶粉 (品牌3)	-	6.13 ±0.07	6.78 ±0.49
9	全脂奶粉 (品牌4)	-	5.65 ±0.11	5.85 ±0.37
10	低脂奶粉 (品牌1)	-	2.34 ±0.09	2.39 ±0.38
11	低脂奶粉 (品牌2)	-	0.53 ±0.02	0.58 ±0.21
12	儿童牛奶 (品牌1)	-	1.70 ±0.09	1.73 ±0.22
13	儿童牛奶 (品牌2)	-	0.22 ±0.01	0.54 ±0.15
14	酸奶 (品牌1)	-	1.89 ±0.16	2.02 ±0.18
15	酸奶 (品牌2)	-	1.36 ±0.02	1.61 ±0.33

需要重点强调的是, 这两种前处理和上机测定都各自独立开展的乳制品分析测定结果并没有显著差异, 这更进一步证明了本研究方法的准确性。然而, 由表4结果可见, 经过传统微波密闭高压消解后ICP-MS测定的结果的相对标准偏差总体偏高。这极有可能是因为ICP-MS上机测定前样品必须消解引入的稀释因子较大造成的。虽然ICP-MS技术比石墨炉原子吸收的灵敏度要高很多, 但是稀释后上机分析时的样品中极低的Pb浓度也给测定带来了更多不确定因素。由实验结果可见, 没有必要将乳制品样品都进行消解以完全破坏基体就可以得到准确的含量数据, 而且用最少的前处理步骤分析这些样品带来的额外益处是分析过程将更快速且经济。

由表4还可以看到, 本研究中使用石墨炉原子吸收光谱法直接测定和微波全消解ICP-MS测定方法分析国家质量监督检验检疫总局 (AQSIQ) 发布的GBW10017奶粉标准参考物质中Pb浓度结果分别为 $23.9 \pm 2.7 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $25.7 \pm 8.7 \mu\text{g}/\text{kg}$, 这两个测定结果均明显低于证书的标准推荐值 ($70 \pm 20 \mu\text{g}/\text{kg}$)。这一差异同样也在其他购买了这一标准参考物质的实验室中独立测定时被重复发现。查看这一标准物质证书上标注的铅含量的不确定度为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$, 因此定值的相对误差达到29%, 表明定值时数据的离散度较大。因此, 国家质检总局发布的GBW10017奶粉标准参考物质的Pb标准推荐值还需要进行进一步的确认, 剔除不在置信区间的离群数据确保奶粉标准物质所给出的证书标准值能够吻合实际测量值。

为了让方法间的比较更为直观, 更具说明性, 利用图4的测量平均值柱状图可以清楚的看到Pb浓度结果和分析精密度的差异。图4很清楚地直观显示了样品经简单稀释处理后通过石墨炉原子吸收光谱法直接精确测定Pb浓度的巨大优势。因为测定乳制品原样中如此低浓度的Pb元素含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度级) 需要对试剂、环境和实验过程都进行非常严格的控制, 这对于哪怕是经验丰富的专业技术人员来讲, 也是非常具有挑战性的, 因为如果采用耗时、耗力的酸消解步骤将会无法避免引入较大的稀释倍数, 放大各个干扰对分析结果可靠性的影响。需要指出的是: 实际检测值与GBW10017标准参考物质证书推荐值的不吻合也很好地证明了这一点, 标准物质的定值通常都是由分析经验丰富的研究型实验室高水平的专业人员操作得到的结果。

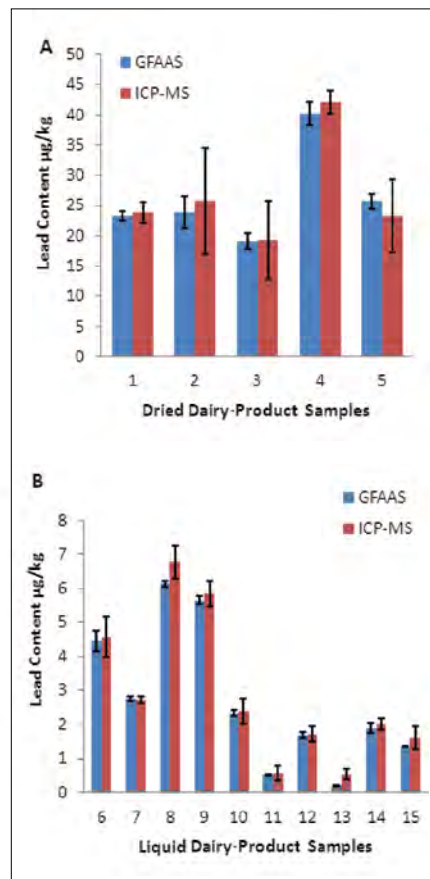


图4. 利用两种不同检测方法测定不同乳制品中铅含量的结果比较: A) 固态奶粉样品; B) 液体牛奶样品。

结论

综上所述，本研究建立了一种利用PinAAcle 900T石墨炉原子吸收光谱法准确测定不同乳制品中Pb的快速方法，该方法仅对样品进行简单稀释，就能够适用自动进样分析。样品处理步骤的简化也降低了样品损失或被污染的可能。拥有专利的横向加热石墨管（THGA）技术将基体化学干扰的可能降到了最低，这也使得方法检出限远低于正常样品中可能出现的Pb浓度范围。该方法同样也适用于对脂肪含量相当，以及类似复杂基质的能形成均匀悬浮液的样品进行直接分析重金属含量。

ICP-MS具有多元素同时分析和灵敏度高等优点，但仪器初始购置成本较高，而且与石墨炉原子吸收光谱仪相比，其运行成本也较高，因此对于样品中所需分析的元素种类较少时，ICP-MS技术并不一定就是最佳的选择。石墨炉原子吸收光谱法不仅具有选择性高，灵敏度高，操作简单等特点，而且对于高复杂基质也具有耐受性。悬浮液直接进样不需要进行复杂的样品前处理操作，本研究结果表明石墨炉原子吸收光谱法更适合作为一种常规监测技术对乳制品中一些有毒元素进行快速简单测定，保障食品安全有利人体健康。

参考文献

1. Hilary Arnold Godwin, 2001. The biological chemistry of lead. Current opinion in chemical biology 5, 223-227.
2. GB2762-2005 Maximum levels of contaminants in foods. China National standard.
3. GB5009.12-2010 Determination of lead in foods. China National food safety standard.

PerkinElmer, Inc.

珀金埃尔默仪器(上海)有限公司
地址：上海张江高科园区李冰路67弄4号
邮编：201203
电话：800 820 5046 或 021-38769510
传真：021-50791316

www.perkinelmer.com.cn

要获取全球办事处的完整列表，请访问 <http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2012, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是 PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。

009829_01_CN

