

奶粉中羟基磷灰石成分的检测

Detection of hydroxyapatite in milk powder

朱丽娴¹ 林勤保¹ 钟怀宁² 王亮² 潘静静^{2,3}

ZHU Li-xian¹ LIN Qin-bao¹ ZHONG Huai-ning² WANG Liang² PAN Jing-jing^{2,3}

(1. 暨南大学包装工程研究所产品包装与物流广东普通高校重点实验室, 广东 珠海 519070;

2. 广东检验检疫技术中心广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广东 广州 51632;

3. 暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

(1. Key Laboratory of Product Packaging and Logistics, Institute of Packaging Engineering, Jinan University, Zhuhai, Guangdong 519070, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou, Guangdong 51632, China; 3. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

摘要:将奶粉溶于超纯水中,经超声、离心、真空冷冻干燥提取奶粉中无机成分富含物,再经 X 射线粉末衍射(X-ray powder diffraction, XRD)和傅里叶红外光谱法对其进行定性鉴别分析;于空白奶粉样品中加入不同浓度的针状纳米羟基磷灰石标准品,经与样品相同处理后进行 XRD 分析,利用扫描电子显微镜(Scanning electrons microscopy, SEM)、透射电子显微镜—能谱仪(Transmission electron microscopy-energy spectrometer, TEM-EDS)对样品及加标样品中提取成分进行了形貌和纳米尺寸表征。结果表明,加标样品 XRD 检测中确定含有羟基磷灰石成分,电镜下能观察到纳米尺寸的针状羟基磷灰石,因此验证了此方法检测纳米羟基磷灰石的可行性;5 种样品中 1 种样品含有羟基磷灰石,并含有未知结构的类似于球状的纳米成分(元素组成为碳、氧、磷、氯),3 种样品含有晶体状的方解石,1 种样品不含有晶体状羟基磷灰石。

关键词:羟基磷灰石;纳米尺寸;X 射线粉末衍射;扫描电子显微镜;透射电子显微镜

Abstract: The milk powder was dissolved in ultrapure water, and the inorganics-rich components in the milk powder were extracted

after ultrasonication, centrifugation and vacuum freeze-drying, and the inorganics-rich components in the milk powder were qualitatively analyzed by X-ray powder diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy. In addition, different concentrations of needle-like nano-hydroxyapatite reference standard were added to the blank milk powder sample, and the same preliminary treatment and analysis as the milk powder samples was carried out. The morphology and nano-size of the inorganics-rich components in sample 1 and spiked sample were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy connected with energy spectrometer (TEM-EDS). The results showed that the spiked samples were determined to contain hydroxyapatite component in the XRD test. The needle-like nano-hydroxyapatite can be observed under electron microscope, thus verifying the feasibility of this method for detecting nano-hydroxyapatite. Among five samples, one sample contained hydroxyapatite in the XRD test and a spherical nano-component with unknown structure (the element composition was C, O, P, Cl); while three samples contained crystalline calcite and one sample did not contained crystalline hydroxyapatite.

Keywords: hydroxyapatite; nano size; X-ray powder diffraction; scanning electrons microscopy; transmission electron microscopy

基金项目:广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室开放课题(编号:IQTC201804);国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(编号:2016IK057);国家重点研发计划课题(编号:2016YFF0203705)

作者简介:朱丽娴,女,暨南大学在读硕士研究生。

通信作者:林勤保(1968—),男,暨南大学研究员,博士。

E-mail:7899966@qq.com

收稿日期:2018-11-16

受国际环保团体“地球之友”委托,美国亚利桑那州立大学的纳米技术团队^[1]测试了 7 款在售的澳洲婴儿配方奶粉,其中 3 种含有纳米羟基磷灰石,2 种含有针状羟基磷灰石纳米微粒。羟基磷灰石[HA, Ca₅(PO₄)₃或者是 Ca₅(PO₄)₃(OH)]是一种常见的磷酸钙矿物质,可以作为食品中的发酵剂、牙膏中的磨光材料、蔬菜罐头中的抗氧

剂和结构稳定剂等。有人^[2]将碳酸钙、柠檬酸钙、羟基磷灰石等形式的含钙物质作为钙补充剂,而澳新食品标准法典不允许在婴儿奶粉中添加针状纳米羟基磷灰石,或其他形态的羟基磷灰石作为补钙剂^[3],因有研究^[4]表明纳米羟基磷灰石会造成老鼠肝细胞和肾细胞的死亡。据欧盟消费者科学委员会^[4]报告表明,针状羟基磷灰石具有潜在的毒性,应禁止用于化妆品、牙膏、漱口水等产品中,因为它的尺寸、形状和结晶度都是未知的,而美国亚利桑那州立大学的纳米技术团队^[1]的测试结果发现被禁用于化妆品和日用品的物质存在于婴儿奶粉中,引起人们的担忧。

纳米技术的发展在不同领域得到了广泛应用,纳米工程材料作为食品添加剂是其主要用途之一,二氧化硅纳米材料和二氧化钛纳米材料是食品添加剂及日用品中常见的纳米材料,有学者^[5-7]利用 ICP-MS 或 Single-particle ICP-MS 测定食品中二氧化硅和二氧化钛的含量,同时利用扫描电子显微镜、透射电子显微镜对其进行形态和纳米尺寸的表征,食品中纳米材料的检测具有一定的挑战,纳米材料的安全性评估需要更多的研究^[8-10]。中国对羟基磷灰石的研究在于其制备及表征^[11-12],王宇明等^[12]制备了纳米羟基磷灰石并利用 X 射线衍射等手段对其进行表征;对于奶粉中纳米羟基磷灰石的检测中国尚未进行研究,因针状纳米羟基磷灰石的安全性存在一定的争议,对奶粉中是否含有纳米羟基磷灰石的研究很有必要。

本研究拟选用市售 5 种奶粉(婴幼儿奶粉和成人奶粉),通过分离提取奶粉中的无机成分富含物后,利用 X 射线粉末衍射仪对其中的无机成分富含物进行定性分析,以及用电子显微镜观察提取物的尺寸和形态;同时对空白奶粉样品进行加标试验,采取相同的分离提取方法后进行 XRD 测试和电子显微镜观察表征,以验证方法的可行性。旨在为奶粉中纳米成分的检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

5 种奶粉样品:京东超市,分别标记为 S1~S5, S1 和 S2 为婴幼儿奶粉, S3~S5 为成人奶粉;

纳米羟基磷灰石标准品:纯度为 99%,针状,20 nm,北京百灵威科技有限公司。

1.2 仪器与设备

超纯水器:EPED-10TS 型,南京易普达科技发展有限公司;

超声波清洗机:LABUY-10LHT 型,杭州莱博仪器设备有限公司;

真空冷冻干燥机:LABOGENE CS55-4 型,丹麦 Labogene 公司;

双光路粉末 X 射线衍射仪:D8 ANVANCE TWIN TWIN 型,德国布鲁克 AXS 公司;

电子分析天平:FA1604N 型,精度 0.000 1 g,上海菁海仪器有限公司;

傅里叶变换红外光谱仪:Nicolet iS50 型,美国热电公司;

高速冷冻离心机:TGL-16gR 型,上海安亭科学仪器厂;

扫描电子显微镜:XL-30E 型,荷兰 Philips 公司;

透射电子显微镜(连接能谱仪):JEOL-2100F 型,日本电子株式会社。

1.3 方法

1.3.1 羟基磷灰石的提取 分别称取 S1~S5 5 种奶粉样品各 6 g(精确到 0.01 g)于 100 mL 玻璃烧杯中,加入 40 mL 超纯水后摇匀,将烧杯置于超声机中超声分散处理(功率 80 W,30 min),使得奶粉中有机成分和无机成分分散更均匀;将烧杯中样品转移至多个 10 mL 离心管中,进行离心处理(转速 10 000 r/min,温度 20 ℃,25 min),用于除去奶粉中较轻的成分,合并收集多个离心管底部的成分,并用超纯水冲洗 2~3 次;将冲洗后的底部成分置于真空冷冻干燥机中进行干燥处理(温度-50 ℃以下,12 h)^[1]。

1.3.2 粉末 X 射线衍射仪和傅里叶变换红外光谱仪分析

按照 1.3.1 的步骤提取奶粉样品中的羟基磷灰石,取适量的冷冻干燥后的样品研磨成粉末后进行 X 射线粉末衍射分析。粉末 X 射线衍射仪的工作电压和电流分别为 40 kV 和 40 mA,测量的衍射角度范围 2θ 为 $10^{\circ}\sim 70^{\circ}$,每步扫描时间为 5 s,得到的结果图与标准物质的衍射图比较^[1]。

取少量 1.3.1 冷冻干燥后的样品与溴化钾混合研磨成粉末后压片进行傅里叶变换红外光谱仪分析,光谱范围为 $400\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ ^[13]。

1.3.3 电子显微镜分析 扫描电子显微镜样品处理,取少量 1.3.1 冷冻干燥后的样品和加标样品于粘有导电胶的铜台上,进行喷金处理增加样品的导电性,置于扫描电子显微镜中进行观察。

透射电子显微镜样品处理,取少量 1.3.1 冷冻干燥后的样品和加标样品于离心管中,加入适量的无水乙醇,振荡摇匀,并吸取少量滴到铜网上,待干燥后进行透射电镜观察,并对确定部位使用能谱仪进行元素成分分析。

1.3.4 加标试验 称取空白奶粉样品(S2)并加入针状纳米羟基磷灰石标准品(20 nm)共 6 g 于 100 mL 玻璃烧杯中,使得加入的羟基磷灰石标准品与空白奶粉样品的质量比分别为 0.1%,0.3%,0.8%,经 1.3.1 步骤进行处理后,进行粉末 X 射线衍射仪分析、扫描电子显微镜和透射电子显微镜(连接能谱仪)观察。

1.4 数据处理

X 射线粉末衍射图及红外光谱图的图像处理均采用美国 OriginLab 公司的 Origin 9.0 版本。

2 结果与分析

2.1 方法验证

图 1 为空白加标样品的 X 射线粉末衍射图,可以看出羟基磷灰石标准品在 2θ 衍射角度 $10^{\circ}\sim 70^{\circ}$ 时具有多个特征衍射峰,其中 $30^{\circ}\sim 35^{\circ}$ 时出现的 3 个衍射峰和 $25^{\circ}\sim 26^{\circ}$ 时出现的 1 个衍射峰相对于其他衍射峰高,这 4 个衍射峰对应的衍射角度是羟基磷灰石的特征峰角度(与国际衍射数据中心,ICDD 数据库中羟基磷灰石标准物质的衍射图相同)。3 种加标浓度 0.1%,0.3%,0.8% (羟基磷灰石标品与空白奶粉样品的质量比)样品的 X 射线粉末衍射图与羟基磷灰石标准品的衍射图相近,均在 $25^{\circ}\sim 26^{\circ}$ 时 1 个角度和 $30^{\circ}\sim 35^{\circ}$ 时的 3 个角度出现了衍射特征峰,且加标空白样品中的其他衍射峰与羟基磷灰石的相对应(图中 * 标出的峰),可以判定 3 种加标空白样品的 X 射线粉末衍射图即为羟基磷灰石的衍射图。加标试验结果表明,空白样品中添加不同浓度的纳米羟基磷灰石样品,经过超声分散、离心、冷冻干燥等处理后没有对羟基磷灰石的化学结构造成改变,且加标浓度为 0.1% 时,经过一系列提取处理后,加标空白样品中仍能检测出羟基磷灰石标准品。由此,加标试验验证了超声分散、离心、冷冻干燥等步骤提取奶粉中的羟基磷灰石,利用 X 射线粉末衍射仪测定羟基磷灰石的方法可行。

图 2、3 可以看出添加了羟基磷灰石标准品后的空白样品 S2 经 1.3.4 步骤处理后提取到的成分,在电子显微镜下能观察到纳米针状羟基磷灰石标准品,透射电子显微镜下能清楚地看到添加到空白样品中的羟基磷灰石标

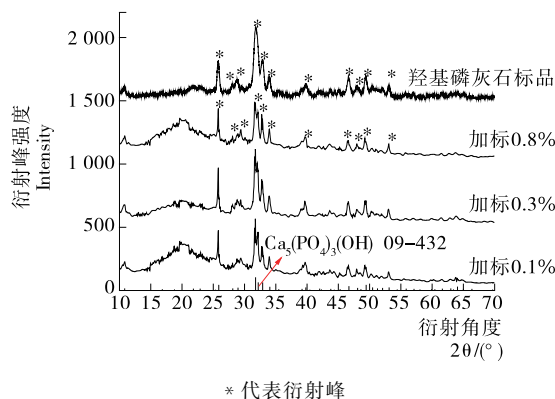


图 1 空白加标样品中提取的矿物质成分和羟基磷灰石标准品 X 射线衍射图

Figure 1 X-ray diffraction patterns of dominant mineral content separated from blank added labeling sample and hydroxyapatite standard reference

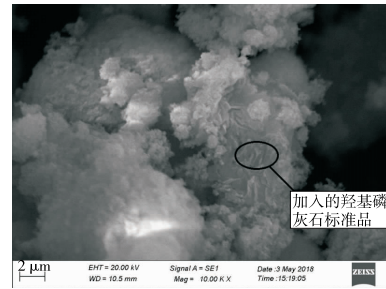


图 2 空白样品 S2 加 HA 标品提取的矿物质成分 SEM 图(加标 0.3%)

Figure 2 SEM of dominant mineral content separated from blank sample S2 added hydroxyapatite standard reference



图 3 空白样品 S2 加 HA 标品提取的矿物质成分 TEM 图(加标 0.3%)

Figure 3 TEM of dominant mineral content separated from blank sample S2 added hydroxyapatite standard reference

准品的形态(针状)和尺寸(20 nm 左右)。

2.2 奶粉样品检测

2.2.1 X 射线粉末衍射 5 种奶粉样品的 X 射线粉末衍射图如图 4 所示。从图 4 中可以看出,S1 的 X 射线衍射图在 $25^{\circ}\sim 26^{\circ}$ 时的 1 个角度和 $30^{\circ}\sim 35^{\circ}$ 时的 3 个角度均

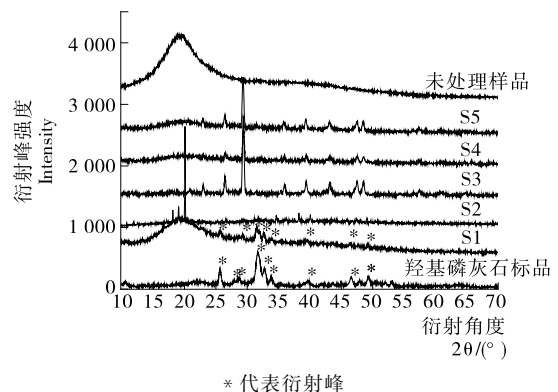


图 4 样品 S1~S5 中提取的矿物质成分和羟基磷灰石标准品 X 射线衍射图

Figure 4 X-ray diffraction patterns of dominant mineral content separated from sample S1 ~ S5 and hydroxyapatite standard reference

出现了衍射特征峰,与羟基磷灰石标准品的特征峰对应的特征衍射角度相近,可以初步推断奶粉样品 S1 中含有羟基磷灰石这种物质。而奶粉样品 S2、S3、S4 和 S5 的 X 射线衍射图中没有出现羟基磷灰石标准品对应的特征衍射峰,因此不含有羟基磷灰石。奶粉样品 S3、S4 和 S5 的衍射图相似,都在 $29^{\circ} \sim 30^{\circ}$ 时出现了特征衍射峰,对比 ICDD 数据库中方解石 01-081-2027 标准物质的衍射图,可以初步确定样品 S3、S4 和 S5 中含有碳酸钙的方解石晶体。由图 4 可知,未经超声、离心处理的奶粉样品的 XRD 粉末衍射图中没有出现尖的衍射峰,而是无定形样品的小鼓包,说明奶粉样品直接做 XRD 粉末衍射测试时,其中的晶态成分会被无定形的成分裹住而干扰了晶态成分的衍射。

2.2.2 傅里叶红外光谱 图 5 为羟基磷灰石标准品和提取的奶粉样品 S2、S3 在波数为 $400 \sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 时的红外光谱图($1\,800 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ 时的样品和标品的光谱图相近,无特殊官能团的峰出现), $565, 604\text{ cm}^{-1}$ 时出现的 2 个峰为 PO_4^{3-} 离子反对称变形振动引起的,而 963 和 $1\,040\text{ cm}^{-1}$ 出现的峰是 PO_4^{3-} 离子反对称伸缩振动引起的^[13],从样品 S2 和 S3 的红外光谱图可以看出样品中均含有 PO_4^{3-} 离子,是因为奶粉样品中含有磷酸盐类成分。从红外光谱图的结果并不能分辨出样品中是否存在羟基磷灰石,因为羟基磷灰石红外光谱图没有比较精细的峰出现,其振动峰也主要是由于 PO_4^{3-} 离子的反对称变形振动和反对称伸缩振动引起的,因而不能辨别其中的成分是羟基磷灰石还是其他的磷酸盐类物质;傅里叶红外光谱结果表明奶粉样品中含有磷酸盐类物质。

2.2.3 电子显微镜观察 奶粉样品 S1 提取物在透射电子显微镜下未能观察到针状纳米尺寸的羟基磷灰石,但含有未知结构的类似于球状的纳米成分(图 6),能谱仪(Energy Disperse Spectroscopy, EDS)结果显示该纳米颗

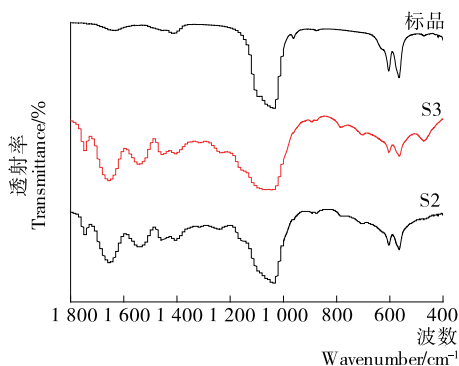


图 5 样品 S2、S3 中提取的矿物质成分和羟基磷灰石标准品傅里叶红外光谱图

Figure 5 FTIR spectra of dominant mineral content separated from S2, S3 and hydroxyapatite standard reference

粒的元素组成为 C、O、P、Cl(图 7),因羟基磷灰石结构中钙、磷元素的含量应较多,与图 7 中纳米颗粒的元素组成比例不同,可见该纳米成分并非羟基磷灰石,其具体结构有待进一步深入研究。

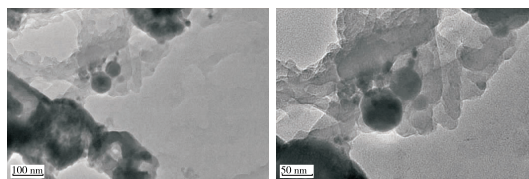


图 6 样品 S1 提取的矿物质成分 TEM 图

Figure 6 TEM of dominant mineral content separated from sample S1

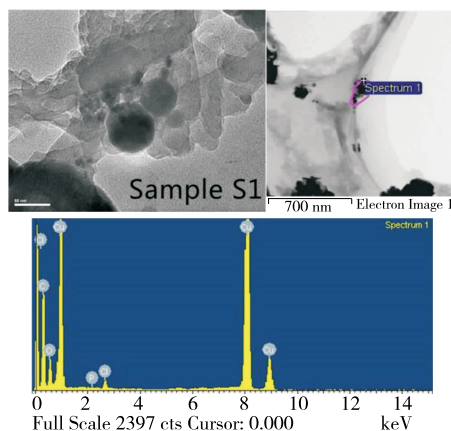


图 7 样品 S1 提取的矿物质成分 TEM 图及 EDS 图

Figure 7 TEM and EDS of dominant mineral content separated from sample S1

3 结论

针状纳米羟基磷灰石的安全性存在着一定的争议,本研究通过超声分散、离心、冷冻干燥,分离提取奶粉中富含无机物的成分,利用 X 射线粉末衍射仪对提取物进行定性分析,并用电子显微镜观察提取物尺寸和形态;所检测的奶粉样品中,样品 S1 中含有羟基磷灰石(非纳米尺寸),并含有类似球状未知结构的纳米成分(元素组成为 C、O、P、Cl),样品 S2 未发现含有晶体状羟基磷灰石,初步确定样品 S3、S4、S5 含有碳酸钙的方解石晶体。由于纳米成分的小尺寸效应等使得其理化性质不同于常规尺寸的物质;奶粉(特别是婴幼儿奶粉)的安全性直接影响着婴儿的健康,对于奶粉中纳米尺寸成分的检测需要引起学者的更多关注。

由于 EDS 只能确定样品中的元素组成及各元素所占比例,本研究未能对 S1 中出现的球状纳米成分进行定性分析;对于其他样品中可能存在的纳米成分分析同样可选择本研究的方法进行探究,同时根据样品中可能存在的纳米尺寸物质进行排查筛选。

参考文献

- [1] SCHOEPP J J, BI Yu-qiang, KIDD J, et al. Detection and dissolution of needle-like hydroxyapatite nanomaterials in infant formula[J]. *Nanoimpact*, 2017, 5: 22-28.
- [2] STRAUB D A. Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications[J]. *Nutr Clin Pract*, 2007, 22(3): 286-296.
- [3] Board of Food Standards Australia New Zealand. F2017C00343. Australia New Zealand Food Standards Code-Schedule 29-Special purpose foodss; Permitted forms of vitamins, minerals and electrolytes in infant formula products, food for infants and food for special medical purposes[S/OL]. 2017. [2018-10-10]. <https://www.legislation.gov.au/details/f2017c00343>.
- [4] Scientific Committee of Consumer Safety-SCCS, UIRIKE B. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS): Revision of the Opinion on hydroxyapatite (nano) in cosmetic products[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2018, 98: 274-275.
- [5] YANG Yu, FAUST J J, SCHOEPP J, et al. Survey of food-grade silica dioxide nanomaterial occurrence, characterization, human gut impacts and fate across its lifecycle[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 565: 902-912.
- [6] WEIR A, WESTERHOFF P, FABRICIUS L, et al. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(4): 2 242-2 250.
- [7] BI Xiang-yu, LEE Sun-yun, RANVILLE J F, et al. Quantitative resolution of nanoparticle sizes using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry with the K-means clustering algorithm[J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014, 29(9): 1 630.
- [8] PICÓ Y. Challenges in the determination of engineered nanomaterials in foods[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 84: 149-159.
- [9] CONTADO C. Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2015, DOI: 10.3389/fchem.2015.00048.
- [10] JAIN A, RANJAN S, DASGUPTA N, et al. Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues[J]. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(2): 297-317.
- [11] 蔡汝汝, 杨云, 孙珍珍, 等. 牡蛎壳纳米羟基磷灰石的制备与表征[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2010(5): 666-670.
- [12] 王宇明, 刘志辉, 程凤梅, 等. 纳米羟基磷灰石的制备及表征[J]. *化工科技*, 2010(6): 13-16.
- [13] RODRIGUES M I C, DASILVA J H, SANTOS F E P, et al. Physicochemical analysis of Permian coprolites from Brazil[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 189: 93-99.
- (上接第 66 页)
- [4] LIU Nian, HAN Jun-wei. DHSNet: deep hierarchical saliency network for salient object detection [C]// *Proceedings of the 2016 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. Washington, DC: IEEE Computer Society, 2016: 678-686.
- [5] WANG Xin, NING Chen, XU Li-zhong. Spatiotemporal saliency model for small moving object detection in infrared videos[J]. *Infrared Physics & Technology*, 2015, 69: 111-117.
- [6] 张军国, 冯文钊, 胡春鹤, 等. 无人机航拍林业虫害图像分割复合梯度分水岭算法[J]. *农业工程学报*, 2017, 33(14): 93-99.
- [7] 王帅帅. 基于高光谱成像的鲜桃虫害检测特征向量的选取[J]. *信阳农林学院学报*, 2015, 25(4): 119-123.
- [8] 田有文, 程怡, 王小奇, 等. 基于高光谱成像的苹果虫害检测特征向量的选取[J]. *农业工程学报*, 2014, 30(12): 132-139.
- [9] PIPAUD I, LEHMKUHL F. Object-based delineation and classification of alluvial fans by application of mean-shift segmentation and support vector machines[J]. *Geomorphology*, 2017, 293: 178-200.
- [10] LITJENS G, KOOI T, BEJNORDI B E, et al. A survey on deep learning in medical image analysis[J]. *Medical Image Analysis*, 2017, 42(9): 60-88.
- [11] 窦立君. 激光雷达图像中的林区虫害区域分割与识别[J]. *激光杂志*, 2017, 38(1): 115-118.
- [12] 丁勇, 李楠. 基于高维度特征分析的非局部图像质量评价方法[J]. *电子与信息学报*, 2016, 38(9): 2 365-2 370.
- [13] 赵坤, 史学舜, 刘长明, 等. 用于探测器中红外绝对光谱响应度测量的激光光源[J]. *红外与激光工程*, 2016, 45(7): 74-80.
- [14] 周靖鸿, 周瑾, 朱建军, 等. 基于非下采样轮廓波变换遥感影像超分辨率重建方法[J]. *光学学报*, 2015, 35(1): 106-114.
- [15] BHARADI V A, PADOLE L. Performance comparison of hybrid wavelet transform-I variants and contrast limited adaptive histogram equalization combination for image enhancement[C]// *Proceedings of the 2017 14th International Conference on Wireless and Optical Communications Networks*. Piscataway, NJ: IEEE, 2017: 1-8.
- [16] LV Du-liang, JIA Zhen-hong, YANG Jie, et al. Remote sensing image enhancement based on the combination of nonsubsampled shearlet transform and guided filtering[J]. *Optical Engineering*, 2016, 55(10): 103-104.