

同位素稀释质谱法用于 CCQM - K21 (鱼油中 p, p' - DDT) 关键比对测量

徐蓓* 邵明武 方向 徐锐锋 陈大舟 马康
(国家标准物质研究中心 北京 100013)

[摘要]应用先进的 GPC 前处理技术去除鱼油中 99 % 的油脂基体,浓硫酸破坏残余油脂,利用 GC - MS - SIM 选择测量样品中 p, p' - DDT 及加入的¹³C₁₂ - p, p' - DDT 的碎片离子峰面积比值,通过括号法计算得到样品中 p, p' - DDT 的准确含量,测量结果的不确定度小于 0.6 %。在各国报出的测量结果中,我们的测量结果最准确,不确定度最小。

关键词: GPC GC - MS - SIM CCQM - K21 鱼油 p, p' - DDT 同位素稀释

1 引言

1.1 测量比对简介

为配合经济全球化进程,配合各国加入 WTO 的形势,1999 年 10 月全球 38 个国家的计量院院长签署了各国标准及证书互认协议(Mutual Recognition Arrangement),从此掀开了全球计量事业的新篇章。我们知道油脂基体中有机化合物的测量难度较大,六六六、DDT 是有机氯农药的典型代表,是各国食品进出口贸易要测量和控制的目标物,因此被选为检验各国化学计量测量能力的代表物。在经过了一系列前期测量比对后,鱼油中 DDT 的测量被 CCQM(国际物质质量咨询委员会)定为关键比对,编号为 CCQM - K21。关键比对数据库,可从 BIPM 网站上查询得到。

1.2 测量技术简介

油脂基体中含氯农药的测定在国内的发展处于非常低的水平,即使在国际中也只是仅采用浓硫酸处理一至两遍,然后用气相色谱电子捕获检测器测量,而且还很少有实验室真正开展常规检测。

GPC 样品前处理技术系统,主要包括泵、GPC 柱、检测器及进样系统,可根据实验室的经济状况采用简易的配置或利用制备色谱仪本身,还可以利用已有的液相色谱仪,易于自动化,可大量处理样品,减少中间环节,减少污染,是鱼油中 DDT 准确测量的首选前处理方法。

同位素稀释质谱法是利用目标测量物的同位素类似物作为内标物,用色谱 - 质谱联

2001 - 1 - 07 收

*通讯联系人

用的测量手段,检测相应分子离子或相应碎片离子峰面积强度的比值,通过单点校正,括号内插或精确匹配来定量。由于采用的内标物与目标测量物具有几乎完全一致的物理化学性质,在前处理各步骤中带来的影响将几乎为零。前处理的样品又经过气相色谱分离,质谱选择离子测量,各种可能的干扰降至最低。因此,在挑选合适的同位素类似物和测量过程及精细地调整仪器参数后,这种方法就很自然地成为了目前复杂基体微量成份测量中最准确的方法,也是在计量界研究得较多并被计量界认可的准基准测量方法。

2 实验部分

2.1 主要仪器和试剂

天平:Mettler M₃,最小分度 0.001 mg; L-200D 0.05 mg;振荡混合器 GPC 系统;液相色谱 Waters 公司 590

玻璃制备柱:350 mm × 20 mm 带聚四氟接头,内填充 Bio-beads S-X3,200-400 目

紫外检测器:日本岛津公司产品

GC-MS 系统:HP-5890 气相色谱仪,SE-30 毛细管柱 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm,VG-70SE 磁质谱仪

¹³C₁₂-p,p'-DDT 溶液:浓度 11.06 μg/g,英国 LGC 实验室提供

p,p'-DDT 标准物质:纯度 99.9%,国家标准物质研究中心提供

二氯甲烷、正己烷:高压液相色谱纯,Fisher 公司产品

2.2 初级标准溶液的制备

用 50 mL 试管在分度为 0.00005 g 的天平称量异辛烷 20 g。用分度为 0.001 mg 天平称量 p,p'-DDT 标准物质 5 mg,投入已称好的 20 g 异辛烷中。超声波溶解,振荡混合器混合,溶液浓度用质量浓度 μg/g 表示。由于样品中 p,p'-DDT 含量较低,初级标准溶液需再稀释,浓度仍用质量浓度 μg/g 表示,最终使用的标准溶液(通常称为校正液)为 DDT0.60689 μg/g,标记 DDT0.53778 μg/g。

2.3 样品前处理过程

每次用 10 mL 离心试管称量 2 g 鱼油,加入适量同位素标记物溶液(均准确称量至 0.00005 g),小心振荡,混合均匀,用异辛烷稀释至 10 mL,摇匀。每次取 1 mL 手动注入 GPC 系统,二氯甲烷:正己烷 = 1:1 为流动相,流速 mL/min,紫外检测 210 nm,接收 22 min 至 30 min 段的馏出物。馏出液用氮气吹干,用 2 mL 正己烷洗出残留物并转移至 5 mL 离心试管中,加 0.5 mL 浓硫酸振荡半分钟,离心分离,吸出上清液,氮气吹至一定体积,使 p,p'-DDT 浓度大约不低于 1 μg/g。

2.4 测量条件

载气:高纯 He,柱前压 10 kPa

色谱条件:汽化温度 260,柱温程序 120 起始,升温速率 15 /min 至 250,停留 10 min,不分流进样 1 μL

质谱条件:传输线温度 240, EI70 eV;加速电压 6000 V,源温 220;电子倍增器 2800 V,打拿极 4500 V;响应时间 0.3 ms,放大器增益 1×10^{-7} ;分辨率约 500,调整 PFK m/z 69 峰为平顶峰;选择离子扫描 m/z,234.99、246.99。



图1 p,p'-DDT在210 nm处出峰
色谱图出峰时间23 min~30 min

图2 鱼油在210 nm处出峰色谱图
油脂安全流出检测器时间23.5 min

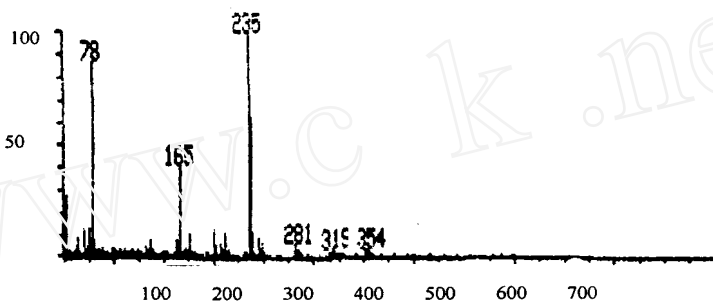


图3 p,p'-DDT EI质谱图

2.5 测量过程

样品先用单点校正法得出浓度估计值,然后按估计值添加适量的标记 DDT 溶液,配制两份测量用标准,使 DDT 与标记 DDT 的质量比值包住样品中 DDT 与标记 DDT 的质量比值。这两份标准分别称为低标和高标,测量时按低标 - 样品 - 高标 - 样品 - 低标的顺序进样,结果按下式计算。

$$C = \left[\frac{(RA_{\text{高}} - RA_{\text{低}})(R_{\text{高}} - R_{\text{低}})}{RA_{\text{高}} - RA_{\text{低}}} + R_{\text{低}} \right] \times \frac{M_{\text{标记}}}{M_{\text{样}}} \quad (1)$$

$$= \left[\frac{RA_{\text{样}} - RA_{\text{低}}}{RA_{\text{高}} - RA_{\text{低}}} RW_{\text{高}} + \frac{RA_{\text{高}} - RA_{\text{样}}}{RA_{\text{高}} - RA_{\text{低}}} RW_{\text{低}} \right] \times \frac{W_{\text{标记}}}{W_{\text{样}}} \times C_{\text{校}}$$

R:未标记与标记 p,p'-DDT 的质量比

RM:未标记与标记 p,p'-DDT 的质量比

RA:测量到的峰面积比

M:质量

RW:称量的未标记与标记 p,p'-DDT 溶液的重量比

W:溶液或样品重量值

C_校:校正液的浓度

样、高、低、标记分别表示样品、高标、低标、标记 p,p'-DDT

3 测量结果

3.1 本实验测量结果

按比例测量的要求,鱼油 A 样、B 样,每种样品各两瓶,要求每瓶测两次,每次测量给出 2 个测量值。因此每种样品共有 8 个测量值,平均值为测量结果,表 1 为 A 样及 B 样测量值及测量结果。

表 1 国家标准物质研究中心测量结果

	测量值(μg/ g)	平均值(μg/ g)	相对标准偏差	标准不确定度	扩展不确定度
样品 A	0.0722 0.0724 0.0723 0.0724 0.0722 0.0727 0.0721 0.0727	0.0724	0.28 %	0.20 %	0.60 %
样品 B	0.1649 0.1648 0.1656 0.1656 0.1660 0.1661 0.1662 0.1660	0.1656	0.14 %	0.16 %	0.48 %

3.2 参加比对测量各国结果

此次参加 CCQM - K21 测量的共有 9 个国家的 9 个实验室,各实验室报出结果见表 2。

表 2 各实验室测量结果 *

实验室 名 称	A 样测量结果 (μg/ g)	A 样测量扩展 不确定度(μg/ g)	B 样测量结果 (μg/ g)	B 样测量扩展 不确定度(μg/ g)
BAM(德国)	0.0732	0.0014	0.1633	0.0030
KRISS(韩国)	0.0794	0.0019		
LGC(英国)	0.0756	0.0027	0.1674	0.0050
NAEL(澳大利亚)	0.0736	0.0025	0.1644	0.0030
NIMC(日本)	0.0711	0.0013	0.1637	0.0051
NIST(美国)	0.0739	0.0008	0.16773	0.0017
NRC(加拿大)	0.0725	0.0008	0.1649	0.0017
NRCCRM(中国)	0.0724	0.0004	0.1656	0.0006
VNIM(俄罗斯)	0.0768	0.0009	0.1670	0.0050

* 不确定度按 95 %置信水平给出。
样品 A 总平均值 0.0743 μg/ g,标准偏差 0.0026 μg/ g,RSD = 3.5 %。
样品 B 总平均值 0.1655 μg/ g,标准偏差 0.0016 μg/ g,RSD = 0.99 %。

从各国所报数据来看,在样品 B 的测量中,我们的结果最为接近平均值,不确定度最小。

4 测量结果不确定度的评估

测量不确定度分为 A 类和 B 类不确定度

A 类不确定度是通过统计的方法来估计的,一般用测量结果的标准偏差来表示(为方便有时用相对标准偏差来表示)。

在我们的测量中样品测量平均值的相对标准偏差按 4 次称量测量来估计:

$$A \text{ 样}: 0.28 \times \frac{1}{\sqrt{4}} = 0.14 \%$$

$$B \text{ 样}: 0.14 \times \frac{1}{\sqrt{4}} = 0.07 \%$$

括号法计算的测量结果 B 类不确定度(无特殊说明均指标准不确定度)按(1)式考虑有:

(1) 校正溶液的不确定度,包括

a. p, p' - DDT 纯品定值不确定度 0.01 %

b. 初级标准溶液配制不确定度

$$\frac{0.003}{5} = 0.06 \%$$

c. 从初级到使用和校正溶液的稀释不确定度两级稀释最小称样量分别为 0.7 g 和 1.4 g

$$\sqrt{\left(\frac{0.00015}{0.7}\right)^2 + \left(\frac{0.00015}{1.4}\right)^2} = 0.023 \%$$

(2) 每次测量鱼油的称量不确定度

$$\frac{0.00015}{2} = 0.008 \%$$

(3) 每次测量加入标记 p, p' - DDT 的称量不确定度,最少加入量为 0.37 g

$$\frac{0.00015}{0.34} = 0.044 \%$$

(4) 测量用高低标配制称量不确定度

p, p' - DDT 和标记 p, p' - DDT 溶液的最低称样量分别为 0.69 g 和 0.46 g。

此项不确定度为:

$$\sqrt{\left(\frac{1.00015}{0.69}\right)^2 + \left(\frac{0.00015}{0.46}\right)^2} = 0.039 \%$$

将以上 4 项及 A 类不确定度合并,得总标准不确定度,

A 样为:

$$u = \sqrt{0.14^2 + 0.12^2 + 0.008^2 + 0.044^2 + 0.039^2 + 0.039^2} \\ = 0.20 \%$$

B 样为:

$$u = \sqrt{0.07^2 + 0.12^2 + 0.008^2 + 0.044^2 + 0.039^2 + 0.039^2}$$
$$= 0.16 \%$$

取扩展因子 $k = 3$ (按置信水平 99 %) , 得 A 样、B 样测量总不确定度:

$$U_A = 0.60 \% \quad U_B = 0.48 \%$$

参 考 文 献

- 1 Chamberlain S.J. Analyst ,115 ,1161 ~ 1165 (1990)
- 2 Stalling D L ,Tindle R C and Johnson J L.J. Assoc. Off. Anal. Chem. ,55 ,P32 ~ 38 (1972)
- 3 Johnson L D ,Waltz R H,Ussary J P and Kaiser F E. J. Assoc. Off. Anal. Chem. ,59 ,P174 ~ 187 (1976)
- 4 Committee for Analytical Methods for Residues of Pesticides in Foodstuffs of the Ministry of Agriculture ,Fisheries And Food ,Analyst ,117 ,P1451 ~ 1455 (1992)

www.cnki.net

Isotope Dilution Mass Spectrometry Applied for the Key Comparison of CCQM - K21 (Determination of p,p'-DDT in Fish Oil)

Xu Bei ,Shao Mingwu ,Fang Xiang ,Xu Ruifeng ,Chen Dazhou ,Ma Kang
(National Research Center for Certified Reference Materials ,Beijing 100013 ,China)

Received 2001 - 11 - 07

Abstract

Weigh fish oil 2 g and add $^{13}\text{C}_{12}$ -p,p'-DDT with almost the same amount as the p,p'-DDT in the weighed fish oil. Mix and add octane till the total volume is 10 mL. Applied the technique of GPC for removing 99 % of lipids in fish oil. The GPC system is consisted of a glass preparation column (350 mm $\times$ 20 mm) with filled material (Bio - beads S - X3 ,200 - 400 mesh) ,a HPLC pump and an UV detector. CH_2Cl_2 :hexane = 1 :1 as eluent and flow rate is 4 mL/min. Per - injection of the sample into GPC system is 1mL. Detection wavelength is 210 nm. The collected solution from Gpc is blown to dry by N_2 . 2 mL hexane washes the residue and 0.5 mL of concentrated sulfuric acid destroys the remained lipids. GC - MS - SIM measured the ratio of p,p'-DDT(m/z 234.99) and $^{13}\text{C}_{12}$ -p,p'-DDT(m/z 246.99) . A HP SE - 30MS capillary column is used. Bracketing is used as quantitative method. Uncertainties of measurement results are not more than 0.6 %. Our results are the best ones with the smallest uncertainties in the nine national laboratories.

Keywords : GPC ; GC - MS - SIM ; CCQM - K21 ; Fish Oil ; p,p'-DDT ; IDMS