液相色谱-串联质谱法检测玩具中的 3 种异噻唑啉酮类防腐剂

杨荣静^{1*}, 卫碧文¹, 于文佳¹, 高 欢¹, 孙晓娟²

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135 ; 2. 赛默飞世尔科技(中国) 有限公司, 上海 201206)

摘要 :建立了液相色谱-串联质谱快速测定玩具中异噻唑啉酮类防腐剂(2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮、5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和 1,2-苯并异噻唑啉-3-酮)的分析方法。样品经去离子水超声提取后进行液相色谱-串联质谱分析。色谱流动相为甲醇-水(15:85, v/v),等度洗脱,在选择反应监测(SRM)模式下定性和定量分析。3 种被分析物的工作曲线线性范围均为 2.0 ~ 1 000 $\mu\text{g/L}$,方法的定量限(信噪比大于 10)为 0.04 mg/kg,灵敏度优于欧盟玩具协调标准 EN71-11-2005 中推荐的方法。两种类型玩具样品中的加标回收率分别为 95.9% ~ 105.2% 和 94.7% ~ 102.8%,精密度分别为 3.04% ~ 4.96% 和 2.36% ~ 4.79%。应用本方法对 10 种玩具样品进行了测试,结果完全能满足欧盟玩具协调标准 EN71-9-2005 对玩具中异噻唑啉酮类防腐剂的检测要求。

关键词 :液相色谱-串联质谱;异噻唑啉酮;防腐剂;玩具

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2011)06-0513-04

Determination of 3 isothiazolinone preservatives in toys using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YANG Rongjing^{1*}, WEI Biwen¹, YU Wenjia¹, GAO Huan¹, SUN Xiaojuan²

(1. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China ;

2. ThermoFisher Scientific (China) Co., Shanghai 201206, China)

Abstract : A rapid analytical method for the determination of 3 isothiazolinone preservatives (2-methyl-4-isothiazolin-3-one, 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 1,2-benzylisothiazolin-3-one) in toys using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been developed. After ultrasonic extraction with water, the analytes in the sample were separated and analyzed by LC-MS/MS under the isocratic elution of methanol and water (15:85, v/v) and in selected-reaction monitoring (SRM) mode. The linear ranges of calibration curves for the 3 analytes were 2.0 - 1 000 $\mu\text{g/L}$. The limit of quantification was 0.04 mg/kg for all the 3 analytes, which was lower than that of the method recommended by the European Toy Safety Directive in EN71-11-2005. The recoveries of the spiked standards in the two toy samples were 95.9% - 105.2% and 94.7% - 102.8% with the relative standard deviation ranges from 3.04% to 4.96% and from 2.36% to 4.79%, respectively. The method was applied in the determination of 10 toy samples, and the results can meet the requirements of the European Toy Safety Directive in EN71-9-2005 for the determination of isothiazolinones in toys.

Key words : liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); isothiazolinones ; preservatives ; toys

异噻唑啉酮类化合物是一种广谱、高效、非氧化性杀菌防腐剂,通过杀灭细菌或者防止微生物繁殖而起到防腐的效果,在家用工业中常用作皮革清洗剂、黏合剂、纺织品柔软剂和上光剂,在水基工业中

常用作杀黏菌剂^[1-6]。其中,2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(2-methyl-4-isothiazolin-3-one, MI)、5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one, CMI)和 1,2-苯并异噻唑啉-3-酮(1,2-

* 通讯联系人:杨荣静,博士,工程师,主要研究方向为玩具中有毒有害有机物的检测。Tel : (021)38620896, E-mail : yangrj@shciq.gov.cn.

收稿日期 2011-02-04

benzylisothiazolin-3-one , BIT X 结构示意图如图 1 所示)是工业中常用的防腐剂,而 MI 和 CMI 的混合物(质量比为 1:3)是一种化妆品常用的防腐剂^[7]。

图 1 3 种异噻唑啉酮类防腐剂的结构示意图
Fig. 1 Chemical structures of three isothiazolinones

在玩具中添加异噻唑啉酮类化合物可以起到杀菌防腐的作用,但是 MI、CMI 和 BIT 对儿童有潜在的接触致敏性,能引发接触性皮炎。欧盟在 2005 年公布的玩具协调标准 EN71-9-2005 中明确限定了 MI、CMI 和 BIT 在玩具皮革、水状液体、造型黏土、含黏合剂的仿造纹身等材料中的含量,其限量分别为 10、10 和 5 mg/kg,并且 MI 和 CMI 的总限量为 15 mg/kg。玩具协调标准 EN71-10-2005 中详细说明了玩具材料样品制备和萃取过程,而 EN71-11-2005 中描述了这些化合物的分析方法,其原理是以去离子水萃取玩具材料中的防腐剂活性组分后,采用液相色谱-紫外检测进行测定。

近年来,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术快速发展,已经越来越多地被应用于化妆品、环境等领域水相样本中 MI、CMI、BIT 等异噻唑啉酮类防腐剂含量的检测^[8-10]。与气相色谱-质谱^[5]和液相色谱-紫外检测^[11-16]相比,LC-MS/MS 更加适合于复杂体系中异噻唑啉酮类化合物的测定,而且分析时间短,对于水相样品可直接进样进行分析,灵敏度高,因此受到了广泛的关注。然而,迄今为止,国内外尚无利用 LC-MS/MS 检测玩具样品中 MI、CMI、BIT 等异噻唑啉酮类防腐剂的标准和文献报道。

本文建立了一种简单、快速、准确测定玩具皮革、水状液体、造型黏土、含黏合剂的仿造纹身等材料中异噻唑啉酮类防腐剂含量的方法。以去离子水作萃取试剂,采用 LC-MS/MS 定性和定量分析提取溶液中的 MI、CMI 和 BIT 含量。该方法能够满足欧盟玩具协调标准 EN71-9-2005 的相关限量要求,而且检测速度和灵敏度均优于 EN71-11-2005 中采用的方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与样品

LC-MS/MS 系统,包括 Accela HPLC 超快速液相色谱和 TSQ Quantum Access 三重四极杆质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);T890/H 型超声波清洗机(德国 Elma 公司)。

标准品:BIT(纯度 97%,东京化成工业株式会社);MI(纯度 99%,Sigma 公司);CMI(质量浓度为 12 g/L)与 MI(质量浓度为 3 g/L)的混合标准水溶液(Fluka 公司);甲醇(色谱纯,Sigma 公司);去离子水由 Millipore 公司超纯水器制得。

10 种代表性样品:皮革类样品(玩具熊的棕色人造革外套和玩具老鼠的黑色皮腰带、白色皮背心)、液体样品(红色油画棒墨水、液体胶水、液态指甲画颜料)、橡皮泥样品(黄色橡皮泥、白色橡皮泥)和造型贴纸(玩具纹身贴、指甲贴)等。样品均为市售玩具。

1.2 标准溶液的配制

分别准确称取 10 mg(精确至 0.1 mg)BIT 和 MI 标准品于 100 mL 容量瓶中,以去离子水定容,配成质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液;取 CMI 与 MI 的混合标准水溶液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,以去离子水定容,配制成 CMI 与 MI 质量浓度分别为 120 mg/L 和 30 mg/L 的混合标准储备液。准确移取上述 3 种标准储备液,以去离子水稀释,得到 3 种防腐剂质量浓度均为 2.0、5.0、10、20、50、100、200、500、800、1 000 μg/L 的系列混合标准溶液。

1.3 LC-MS/MS 条件

LC 条件:Hypersil Gold 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.9 μm;Thermo Scientific);流动相为甲醇-水(15:85,v/v),等度洗脱,流速为 200 μL/min;柱温为室温,进样体积为 5.0 μL。

MS/MS 条件:电喷雾正离子扫描(ESI(+));电压为 4 000 V;碰撞气为高纯氩气,碰撞气压力为 0.20 Pa(1.5 mTorr);鞘气为氮气,压力为 6.00 kPa(45 Torr);毛细管温度为 350 ℃;监测模式为选择反应监测(SRM)模式。各防腐剂的质谱采集参数见表 1。

表 1 MI、CMI 和 BIT 的质谱采集参数
Table 1 MS/MS acquisition parameters for MI, CMI and BIT

Component	Tube lens/V	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Quantitative product ion (<i>m/z</i>)(Collision energy/V)	Qualitative product ions (<i>m/z</i>)(Collision energy/V)
MI	90	116.0	71.3(20)	85.2(24), 99.2(15)
CMI	96	149.9	87.2(38)	96.2(24), 115.2(17)
BIT	98	152.0	109.2(19)	105.3(22), 134.2(22)

1.4 样品制备和前处理

对于皮革、造型黏土和带黏合剂的贴纸等固体样品,从玩具上取下待测样品,不同颜色、不同材质按照不同样品处理,切割每一个测试部分使它的尺寸不超过 3 mm×3 mm;对于可接触液体样品,选取有代表性的试样,保证测试部分可以代表整个实验室样品,不同颜色的液体分开测试。准确称取约 1.0 g 测试样品于 50 mL 聚丙烯管内,加入 20 mL 水,摇动 30 s 后,在超声波清洗机中超声提取 10 min,过 0.22 μm 滤膜,滤液供 LC-MS/MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件

MI、CMI 和 BIT 的结构中均有含氮基团(如图 1 所示),有利于结合质子得到正离子,因此选择正离子模式进行检测。将质量浓度为 5.0 mg/L 的 MI、CMI 和 BIT 标准品通过注射泵引入离子源,在不加碰撞气压力的情况下进行一级质谱分析(Q1 扫描),结果表明这 3 种化合物的最强峰均为其准分子离子峰,因此选择准分子离子[*M*+*H*]⁺为母离子,通过优化喷雾电压、离子传输管温度、鞘气压力、辅助气压力、透镜补偿电压等参数使得母离子强度最大。之后选择碰撞气压力 0.20 Pa,分别对分子离子进行二级质谱分析(子离子扫描),得到碎片的离子信息,找到强度较大的 3 个子离子,优化其碰撞能量,其中强度最大的一个子离子用作定量离子,另外两个用作定性离子,得到的特征子离子和碰撞能量信息如表 1 所示。

2.2 防腐剂的定性

各防腐剂的保留时间及特征离子峰可作为实际样品测定的定性依据。按上述优化条件对 3 种防腐剂标准品进样分析,MI、CMI 和 BIT 的保留时间分别为 1.75、3.32、5.07 min,得到总离子流色谱图如图 2 所示。MI 的定量和定性离子(*m/z* 71.3、85.2、99.2)的丰度比为 100:45:99,CMI 的定量和定性离子(*m/z* 87.2、96.2、115.2)的丰度比为 100:20:30,BIT 的定量和定性离子(*m/z* 109.2、105.3、134.2)的丰度比为 100:39:78。定性标准:1)保留时间偏差在 6 s 以内;2)定量离子和两个定性离子均可找到;3)每个定性离子相对丰度的偏差均在 20% 以内。

2.3 标准曲线和定量限

配制 MI、CMI、BIT 质量浓度均为 2.0、5.0、10、20、50、100、200、500、800、1 000 μg/L 的系列混合标准溶液,并对其分别进行测定(每个浓度的样品测

图 2 SRM 模式下 MI、CMI、BIT 的总离子流色谱图
Fig. 2 Total ion current chromatogram of MI, CMI and BIT in SRM mode

定 7 次),以目标物的峰面积 *Y* 对其质量浓度 *X* (μg/L)进行回归分析,得到各防腐剂组分的线性回归方程,结果如表 2 所示。

表 2 MI、CMI、BIT 的线性回归方程和相关系数
Table 2 Regression equations and correlation coefficients for MI, CMI and BIT

Component	Regression equation	Correlation coefficient
MI	$Y = 5437.4X + 9861.9$	0.9995
CMI	$Y = 9612.3X - 6532.7$	0.9991
BIT	$Y = 2843.8X + 2221.5$	0.9996

Y: peak area; *X*: mass concentration, μg/L.

按信噪比(*S/N*)大于 10 来确定 MI、CMI 和 BIT 的仪器定量限均为 2.0 μg/L,方法的定量限均为 0.04 mg/kg。欧盟玩具协调标准 EN71-11-2005 中采用高效液相色谱-紫外检测法对玩具材料中的 BIT 进行检测,其定量限为 5 mg/kg。因此,本方法优于 EN71-11-2005 中所推荐的方法。

2.4 实际样品中防腐剂的加标回收率和重复性

准确称取棕色人造革样品和液体胶水样品,定量分析提取溶液。棕色人造革样品中检出 BIT 质量浓度为 503.2 μg/L,MI 和 CMI 未检出;液体胶水样品中检出 MI 和 CMI 的质量浓度分别为 211.0 和 669.5 μg/L。以这两个样品为本底,添加 3 种不同质量浓度的混合标准溶液,添加水平分别为 100、200 和 500 μg/L,每个添加水平按照优化的实验条件平行测定 7 次。结果表明,棕色人造革中 3 种防腐剂的回收率为 95.9%~105.2%,相对标准偏差(RSD)为 3.04%~4.96%(见表 3);液态胶水中 3 种防腐剂的回收率为 94.7%~102.8%,RSD 为 2.36%~4.79%(见表 4)。均满足定量分析要求。

2.5 实际样品测定

应用所建立的方法对 10 种样品中的异噻唑啉酮类防腐剂进行了测定,结果表明,玩具熊的棕色人造革外套样品中检出了 BIT,其含量为 10.3

mg/kg ,超出了欧盟玩具标准规定的 5 mg/kg 的限量要求 ;对该样品重复测试 7 次 ,RSD 为 4. 91% ;液体胶水中检出了 CMI 和 MI ,其含量分别为 14. 5 mg/kg 和 4. 57 mg/kg ,CMI 的含量超出了限量要

求 ,并且 CMI 和 MI 的总含量也超出了限量要求 ;对该样品重复测试 7 次 ,得到 CMI 和 MI 的 RSD 分别为 3. 78% 和 4. 09% ;其他测试样品中均未检出 MI、CMI 和 BIT。

表 3 棕色人造革样品中 3 种防腐剂的含量、加标回收率及精密度($n = 7$)

Table 3 Backgrounds , spiked recoveries and precisions (RSD , $n = 7$) of MI , CMI and BIT in brown artificial leather					
Component	Background/($\mu\text{g/L}$)	Added/($\mu\text{g/L}$)	Found/($\mu\text{g/L}$)	Recovery/%	RSD/%
MI	not detected	100	105. 2	105. 2	4. 96
		200	203. 9	102. 0	4. 37
		500	490. 0	98. 0	3. 04
CMI	not detected	100	103. 9	103. 9	4. 51
		200	193. 4	96. 7	3. 88
		500	487. 2	97. 4	3. 49
BIT	503. 2	100	599. 1	95. 9	3. 98
		200	697. 8	97. 3	3. 62
		500	987. 6	96. 9	3. 45

表 4 液体胶水样品中 3 种防腐剂的含量、加标回收率及精密度($n = 7$)

Table 4 Backgrounds , spiked recoveries and precisions (RSD , $n = 7$) of MI , CMI and BIT in liquid glue					
Component	Background/($\mu\text{g/L}$)	Added/($\mu\text{g/L}$)	Found/($\mu\text{g/L}$)	Recovery/%	RSD/%
MI	211. 0	100	307. 5	96. 5	4. 58
		200	413. 4	101. 2	3. 91
		500	700. 7	97. 9	2. 36
CMI	669. 5	100	764. 2	94. 7	3. 77
		200	875. 2	102. 8	3. 90
		500	1160. 2	98. 1	3. 45
BIT	not detected	100	95. 6	95. 6	4. 73
		200	195. 8	97. 9	4. 79
		500	493. 1	98. 6	3. 02

3 结论

建立了 LC-MS/MS 快速测定玩具中 3 种异噻唑啉酮类防腐剂的 分析方法。应用本方法对 10 种玩具样品进行检测 ,结果显示该方法能够在 8 min 内完成欧盟玩具协调标准中限定的 3 种异噻唑啉酮类防腐剂的检测 ,不但节省测试时间 ,测试精密度也完全满足欧盟玩具标准的要求 ,并且方法的灵敏度优于欧盟玩具标准所推荐的方法。本方法适用于玩具材料中 MI、CMI 和 BIT 含量的检测。

参考文献 :

[1] Nielsen H. Contact Dermatitis , 1994 , 31 : 18
[2] Fewings J , Menné T. Contact Dermatitis , 1999 , 41 : 1
[3] Martínez K , Ferrer I , Barceló D. J Chromatogr A , 2000 , 879 : 27
[4] Reinhard E , Waeber R , Niederer M , et al. Contact Dermatitis , 2001 , 45 : 257
[5] Rafoth A , Gabriel S , Sacher F , et al. J Chromatogr A , 2007 , 1164 : 74

[6] Critchley M , Bentham R. J Appl Microbiol , 2009 , 106 : 784
[7] Emmett E A , Ng S K , Levy M A , et al. Contact Dermatitis , 1989 , 20 : 21
[8] Speksnijder P , van Ravestijn J , de Voogt P. J Chromatogr A , 2010 , 1217 : 5184
[9] Bester K , Lamani X. J Chromatogr A , 2010 , 1217 : 5204
[10] Singer H , Jaus S , Hanke I , et al. Environ Pollut , 2010 , 158 : 3054
[11] Yin X F , Fan C X. Chinese Journal of Chromatography (尹喜凤 , 范崇旭. 色谱) , 1988 , 6(6) : 378
[12] Iob A , Al-Yousef F , Tawabini B S , et al. J Chromatogr A , 1994 , 661 : 245
[13] Wu T , Wang C , Wang X , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (武婷 , 王超 , 王星 , 等. 分析化学) , 2007 , 35(10) : 1439
[14] Wang C , Zhang Q , Wang X. Journal of Environment and Health (王超 , 张青 , 王星. 环境与健康杂志) , 2007 , 24 (6) : 449
[15] Liu W G , Li Y Z , Shi R C , et al. Journal of Anhui Agricultural Sciences (刘文光 , 李云芝 , 石瑞常 , 等. 安徽农业科学) , 2009 , 37(32) : 15667
[16] Feng L , Ying Y , Tan Y , et al. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (冯靓 , 应英 , 谭莹 , 等. 中国卫生检验杂志) , 2010 , 20(9) : 2171