

混合模式吸附剂固相萃取-气相色谱-质谱法 测定皮革中的磷酸三(2-氯乙基)酯

张伟亚^{1*}, 朱玉玲², 王成云¹, 李丽霞¹, 张珺清², 邢 钧^{2*}

(1. 深圳出入境检验检疫局工业品检测技术中心, 广东 深圳 518067;

2. 生物医学分析化学教育部重点实验室, 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要:磷酸三(2-氯乙基)酯(TCEP)是一种皮革生产中常用的加工助剂,其具有致癌、神经毒性和生殖毒性,被欧洲化学品管理局列入禁用的第二批授权物质清单。由于皮革产品基质复杂,采用常用的固相萃取(SPE)方法提取对TCEP的回收率不高。Silica-WCX是一种自制的含有羧基与烷基的新型混合模式吸附剂。研究表明,通过在酸性条件下使其羧基保持质子化状态,能有效增强Silica-WCX对极性化合物TCEP的萃取性能,使TCEP的回收率得到明显提高。本文以Silica-WCX为SPE材料,建立了测定皮革中TCEP的SPE-GC-MS方法。该方法的线性范围为0.10~100.0 $\mu\text{g/L}$,定量限($S/N=10$)为44.46 ng/kg,不同添加水平下TCEP的平均回收率在91.45%~99.98%之间,相对标准偏差(RSD)在4.33%~5.97%之间。该方法简便快捷,灵敏度高,定量限低于欧盟《化学品的注册、评估、授权和限制》(registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals, REACH)法规的限量要求,适用于皮革及其制品中TCEP的测定。

关键词:混合模式吸附剂;固相萃取;气相色谱-质谱法;磷酸三(2-氯乙基)酯;皮革

中图分类号:O658

文献标识码:A

文章编号:1000-8713(2014)10-1157-06

Determination of tris(2-chloroethyl) phosphate in leather by gas chromatography-mass spectrometry coupled with mixed-mode sorbent solid phase extraction

ZHANG Weiya^{1*}, ZHU Yuling², WANG Chengyun¹, LI Lixia¹, ZHANG Junqing², XING Jun^{2*}

(1. Testing and Technology Center for Industrial Products, Shenzhen Entry-Exit Inspection and

Quarantine Bureau, Shenzhen 518067, China; 2. Key Laboratory of Analytical Chemistry for

Biology and Medicine (Ministry of Education), College of Chemistry and Molecular

Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Leather is one of the important exporting products to European Union (EU), and tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP) is a commonly used flame retardant in leather and leather products. Recently, TCEP has been classified as a kind of substance of very high concern (SVHC) by EU for its carcinogenicity and reproductive toxicity. But to date, there is not a recognized method for the determination of TCEP in leather and leather products due to the serious matrix interferences and relatively low recovery of TCEP. In this work, a home-made mixed-mode sorbent (Silica-WCX) with carboxyl and alkyl groups was tested as the sorbent of solid phase extraction (SPE) to extract TCEP from leather. The results demonstrated that, making the carboxyl groups protonized under acidic condition, Silica-WCX exhibited better extraction performance towards TCEP over some frequently used commercial sorbents tested. After the optimization of the SPE conditions based on Silica-WCX, a method of gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) was established for the determination of TCEP in leather samples. The linear range for TCEP ranged from 0.10 to 100.0 $\mu\text{g/L}$ and the limit of quantification (LOQ, $S/N=10$) was 44.46 ng/kg. The recoveries of TCEP spiked in samples at varied

* 通讯联系人.E-mail:zwyciq@163.com(张伟亚);gc-ms@263.net(邢钧).

基金项目:国家质检总局科研项目(2011IK105).

收稿日期:2014-09-05

levels were in the range of 91.45%–99.98% with the relative standard deviations (RSDs) of 4.33%–5.97%. The method is simple, sensitive and reliable for the analysis of TCEP in leather and leather products.

Key words: mixed-mode sorbent; solid phase extraction (SPE); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); tris(2-chloroethyl)phosphate (TCEP); leather

磷酸三(2-氯乙基)酯(TCEP, 结构式见图 1a)是一种常用于皮革生产加工的助剂。近年的研究结果证明, TCEP 具有致癌、神经毒性和生殖毒性^[1,2], 因此各国纷纷立法对 TCEP 的使用进行限制^[3,4]。2010 年 1 月 13 日, 欧洲化学品管理局《化学品的注册、评估、授权和限制》(registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals, REACH)法规将 TCEP 列入禁用的第二批授权物质清单。根据欧盟 REACH 法规的有关规定, 在欧盟销售的产品必须满足 REACH 法规对高关注物质的规定, 否则产品将面临召回的风险, 甚至有可能被要求撤出欧盟市场。欧盟一直是我国皮革及制成品出口的重要目的地, 因此研究皮革中 TCEP 的测定方法对于保护我国正常的对外贸易具有特别重要的意义。

现有研究主要集中于纺织品中 TCEP 的检测^[5-8], 对皮革及其制品中 TCEP 的研究尚未见文献报道, 其原因在于皮革及其制品的组成更为复杂, 基质干扰也更为严重。固相萃取(SPE)是目前应用十分广泛的一种高效样品前处理技术, 曾成功应用于纺织品及皮革^[9-11]等样品中其他目标物的分离、富集, 但对于皮革中的 TCEP, 常见的商品 SPE 小柱存在回收率较低的问题, 严重影响方法的灵敏度。

本文作者近期通过点击反应合成了混合模式吸附剂(Silica-WCX)^[12,13], 其结构(见图 1b)特点是在吸附剂表面同时含有烷基和羧基, 因此能够通过憎水作用和离子交换作用两种模式与目标物发生作用, 从而有效增强吸附剂的选择性。从分子结构角度看, TCEP 是一种含有酯基的极性化合物, 因此有可能通过氢键与吸附剂发生相互作用, 有利于增强 TCEP 对吸附剂的亲和力。本文以自制的 Silica-WCX 作为 SPE 吸附剂, 在酸性条件下使羧基保持质子化状态, 增强了 Silica-WCX 与 TCEP 的相互作用。对比结果表明, Silica-WCX 对 TCEP 的回收率明显优于多种常见商用吸附剂。本文在优化 SPE 条件的基础上, 建立了测定皮革中 TCEP 的 SPE-GC-MS 方法。该方法简便快捷, 灵敏度高, 定量限优于 REACH 法规的限量要求, 适用于皮革及其制品中 TCEP 的测定。

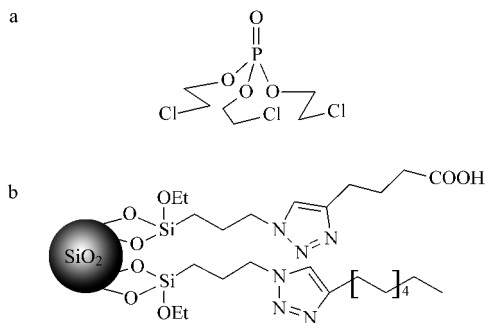


图 1 (a) TCEP 和 (b) Silica-WCX 的结构示意图
Fig. 1 Structures of (a) tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) and (b) Silica-WCX

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 7890A-7000B 三重四极杆气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); AS 20500AT 超声波清洗器(Auto Science 公司); SmarVapor RE501 旋转蒸发仪(德国 Dechem-Tech 公司); 氮吹仪(青岛海科仪器有限公司); 固相萃取真空抽滤装置(美国 Supelco 公司); 10 μ L 微量进样器(上海高鸽工贸有限公司)。

浓盐酸、甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷、甲苯、二甲基甲酰胺均为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司); 色谱纯甲醇(美国 Media 公司); 分析纯二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲醇、乙酸乙酯、乙醇、乙腈(广州化学试剂厂)。

标准品磷酸三(2-氯乙基)酯(纯度>99%)由日本东京化成公司提供。

混合型吸附剂 Silica-WCX 由武汉大学化学与分子科学学院邢钧课题组合成, 方法见文献^[12]。

1.2 标准溶液的配制

称取 0.05 g TCEP 于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配制成质量浓度约 2 000 mg/L 的标准储备溶液。使用时, 用正己烷溶剂稀释, 得到系列浓度的标准溶液, 摇匀, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中恒温保存。

1.3 固相萃取柱的制备

固相萃取柱以玻璃注射器(规格 5 mL)为柱管。首先将注射器及隔垫依次用洗洁精、蒸馏水、无水乙醇及去离子水超声清洗干净, 于 100 $^{\circ}$ C 下烘干

备用。准确称取合成的 Silica-WCX 200 mg,小心倒入柱管内,并在顶部塞入垫片,小心敲打管壁使填料分布均匀,最后将玻璃柱直立并压下顶部的垫片,制得 SPE 小柱。

1.4 固相萃取过程

(1)活化:先用 5 mL 甲醇活化 SPE 小柱,再用 5 mL 0.01 mol/L 的 HCl 溶液酸化,然后用 7 mL 丙酮和 10 mL 正己烷润洗小柱。(2)上样:在填料湿润状态下,取 20 mL 样品溶液,以 2.5 mL/min 的流速通过小柱,使目标物吸附在固体填料上。(3)洗脱:低真空下抽干 SPE 小柱,用 8 mL 丙酮/乙酸乙酯(8:2, v/v)混合溶剂充分洗脱被保留的目标物,洗脱液用氮气吹干,用 0.5 mL 甲醇重新溶解并定容,供 GC-MS 测定。

1.5 皮革样品预处理

称取 0.5 g 剪碎的样品,用 15 mL 甲醇于 40 °C 下超声 20 min,过滤,收集滤液于 50 mL 圆底烧瓶中。残渣再用 15 mL 甲醇超声萃取两次,过滤。合并滤液,并将其旋转蒸发至近干,用氮气吹干,加入 20 mL 正己烷溶解,过 SPE 柱净化并富集。

1.6 气相色谱-质谱分析条件

GC 条件 色谱柱:Agilent HP-5 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气:氦气(纯度大于 99.999%),流速 1.0 mL/min;进样方式:不分流进样,1.5 min 后开阀,流量 20 mL/min;进样量:1 μL;进样口温度:250 °C;传输线温度:200 °C;程序升温:初始温度 100 °C,保持 1 min;以 25 °C/min 升温至 280 °C,保持 1 min。

MS 条件 电离方式:电子轰击离子源(EI);电离能量:70 eV;扫描方式:分段扫描,0~3.2 min,溶剂延迟;3.2~9.2 min 为全离子扫描模式;4.0~7.0 min 为选择离子监测(SIM)模式,监测离子为 m/z 143、205、223、249(丰度比为 480:503:311:999),其中定量离子为 m/z 249。

2 结果与讨论

2.1 超声萃取条件的确定

影响超声萃取效率的主要因素是萃取溶剂种类和萃取时间。

取 5 份自制阻燃皮革样品,除了分别超声萃取 5、10、15、20、25、30 min 外,其他按 1.5 节方法进行处理,按 1.4 节方法进行固相萃取柱净化后,按 1.6 节条件进行 GC-MS 分析,计算萃取效率。结果表明,随着超声萃取时间的增加,TCEP 的萃取量也逐渐增加;当超声萃取时间为 20 min 时,萃取量达到

最大值;继续增加超声萃取时间,发现萃取量反而稍微下降,因此确定超声萃取时间为 20 min。

分别选择丙酮、甲醇、乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷、正己烷 6 种不同极性的溶剂为萃取溶剂,采用超声萃取法对 2 个阻燃皮革制品中的 TCEP 进行萃取。结果表明,甲醇的萃取效果最好,因此最终选择甲醇为萃取溶剂。

2.2 固相萃取条件的优化

Silica-WCX 作为富集材料应用于实际样品分析时,要获得理想的准确度和精密度,必须优化影响其富集效果的各种因素,如吸附剂用量、上样流速、上样容量等;而为了能够把吸附在富集材料上的待测物质尽量完全洗脱下来,还必须选择合适的洗脱剂,确定足够大的洗脱体积等。实验采用 2 μg/L 的 TCEP 正己烷标准溶液进行固相萃取条件的优化。

2.2.1 吸附剂用量

在确定样品处理过程中吸附剂用量时,不但要考虑吸附剂对目标分析物的保留容量,还要考虑样品中可能会发生共保留的干扰组分。足够大的吸附剂用量是保证样品中目标物浓度较高时获得理想回收率的基本条件。但考虑到用于对比的商品化固相萃取小柱的规格是 200 mg/3 mL,为了保证实验结果的可比性,本文选择用 200 mg 吸附剂填充固相萃取小柱。

2.2.2 上样流速

由于适当的上样流速不仅可以获得理想的萃取率,还可以保证整个萃取过程的效率,实验对固相萃取过程的上样流速进行了考察。用 2 μg/L 的 TCEP 正己烷溶液上样,分别以 1.5、2.5、3.5、4.5 mL/min 的流速通过小柱,并分别以对应的流速洗脱,考察目标物峰面积随流速的变化,得到的结果见图 2。因此,实验在包括上样、淋洗和洗脱在内的萃取过程严格控制流速为 2.5 mL/min。

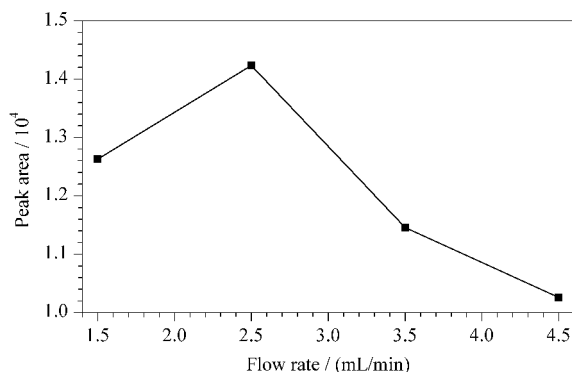


图 2 上样流速对萃取效率的影响

Fig. 2 Effect of loading flow rate on the extraction efficiency

2.2.3 吸附剂的活化条件

吸附剂活化时,溶剂的 pH 值会直接影响 Silica-WCX 上羧基的存在状态,因此考察了不同条件下 Silica-WCX 对目标物的萃取性能。在其他条件不变的情况下,对比了分别用 5 mL 0.01、0.001、0.000 1 mol/L 的 HCl 酸化和不酸化条件下的结果。用 2 $\mu\text{g/L}$ 的 TCEP 正己烷标准溶液上样,收集自然流出的溶液,并测定其中所含目标物峰的面积(记为 S_1);再以直接进样方式测得上样溶液(TCEP, 2 $\mu\text{g/L}$)中目标物的峰面积(记为 S_0),然后计算酸化条件下目标物的损失率($(S_0-S_1)/S_0$)。酸化条件与目标物损失率之间的关系见图 3。从图 3 中可以看出,使用 5 mL 0.01 mol/L 的 HCl 酸化时损失率最低,只有 2.7%,因此选用 5 mL 0.01 mol/L 的 HCl 作为酸化条件。

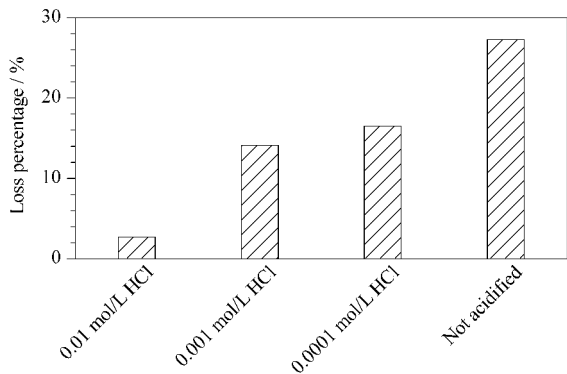


图 3 酸化对 TCEP 萃取的影响

Fig. 3 Effect of acidification on extraction of TCEP

2.2.4 洗脱剂的种类

对已经吸附在富集材料上的 TCEP 进行脱附是整个富集过程重要的一个环节,洗脱剂的选择关系到萃取柱的净化效果和目标物的回收率。本文分别对不同极性的洗脱剂的洗脱效果进行了考察。用 2 $\mu\text{g/L}$ 的 TCEP 正己烷标准溶液上样,然后分别用 8 mL 的甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、丙酮/乙酸乙酯(8:2, v/v)、丙酮/乙酸乙酯(5:5, v/v)进行洗脱,洗脱液用柔和的氮气吹干,用甲醇溶解并定容至 0.5 mL,GC-MS 分析结果如图 4 所示。可见以丙酮/乙酸乙酯(8:2, v/v)为洗脱剂时目标物的峰面积最大,因此本文选择其作为洗脱剂。

2.2.5 洗脱剂的体积

为了减少样品前处理中有机溶剂的使用量,实验在保证洗脱效果的前提下,确定洗脱剂的最小体积。用 2 $\mu\text{g/L}$ 的 TCEP 正己烷标准溶液上样,用 12 mL 丙酮/乙酸乙酯(8:2, v/v)混合溶剂洗脱,依

次收集流出的 4、2、2、2、2 mL 的洗脱液,考察目标物峰面积随洗脱剂体积的变化,得到的结果见图 5。从第 4 份洗脱液开始(亦即当洗脱剂体积大于 8 mL),洗脱液中目标物峰面积的信噪比小于 3,故本文选择洗脱剂的体积为 8 mL。

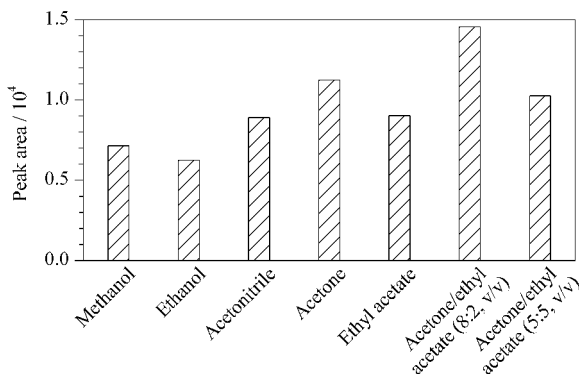


图 4 不同溶剂对 TCEP 的洗脱性能

Fig. 4 Performance of different elution solvents tested

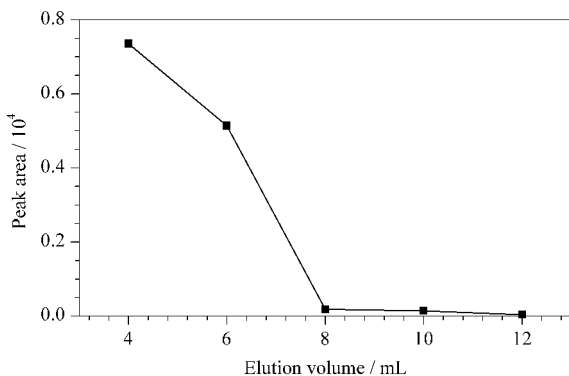


图 5 洗脱体积对 TCEP 洗脱效果的影响

Fig. 5 Effect of elution solvent volume on the elution of TCEP

2.3 Silica-WCX 与商用吸附剂的比较

SPE 的技术核心是其吸附剂,本文在上述优化的条件下,将自制的 Silica-WCX 与几种商用吸附剂进行了比较。

图 6 给出了用 Silica-WCX 填料制成的 SPE 柱和其他常见商用柱对 TCEP 的绝对回收率。结果表明,本文所用混合型吸附剂对目标物的吸附能力远大于其他商用吸附剂,回收率明显提高,原因在于: Silica-WCX 除了拥有烷基,可与 TCEP 发生憎水作用外,其中的羧基在酸性条件下以质子形式存在,还可以与 TCEP 中的酯基之间形成氢键相互作用,因此能够有效增强吸附剂对 TCEP 的萃取性能。

一般情况下,混合模式吸附剂主要是利用离子交换作用实现目标物的富集,本文结果证明,通过使 Silica-WCX 上的羧基质子化,混合模式吸附剂在不可离解的极性化合物富集中也具有良好的应用前景。

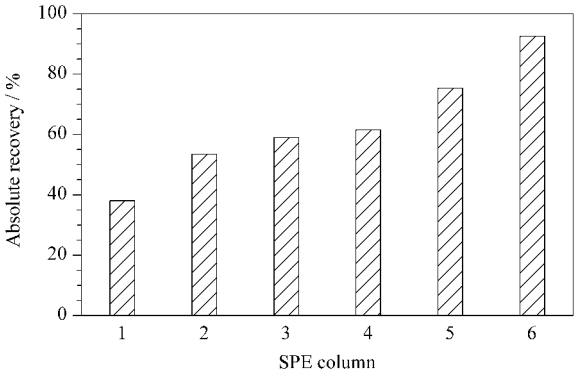


图 6 不同 SPE 柱对 TCEP 的绝对回收率
Fig. 6 Absolute recovery of TCEP on different SPE columns

1. AccuBOND II SPE Alumina-N (200 mg/3 mL); 2. Supelclean™ LC-18 (200 mg/3 mL); 3. Oasis HLB (200 mg/3 mL); 4. Supelclean™ LC-Florisil® SPE 6 mL tubes (1 g/ 6 mL); 5. Waters Sep-pak® Vac C18 Cartridges (200 mg/3 mL); 6. Silica-WCX (200 mg/3 mL).

2.4 Silica-WCX 的吸附容量

动力学吸附饱和容量是评价富集材料吸附性能的一项重要指标,吸附饱和容量越大则材料的性能越好。一般情况下,任何一种固相萃取填料对于目标物都有一定的饱和吸附限度,若所富集目标物总量超过该限度,多余的目标物将不再被吸附,会随着富集液流失,影响目标物回收率,降低方法的准确性。

实验考察了用 200 mg Silica-WCX 制备的 SPE 小柱对 TCEP 的动力学吸附饱和容量(用每单位质量的富集材料吸附目标物的绝对量来表示)。将 30 μg/L 的 TCEP 标准溶液以 2.5 mL/min 的速度通过 SPE 小柱,每次上样 10 mL,收集流出液,定容后测定目标物的峰面积。以目标物峰面积对上样总体积作图,得到该材料对 TCEP 的动态吸附曲线(见图 7)。当上样溶液体积累计达到 110 mL 时,流出液中目标物峰面积陡增,该峰面积与上样溶液中目标物峰面积(10 mL 上样溶液直接吹干并定容为 0.5 mL 后测定)比值为 13.9%,说明该 SPE 小柱对 TCEP 的吸附在此时已达到了突破值,折算得到 Silica-WCX 对 TCEP 动态饱和和吸附量为 16.5 μg/g。

2.5 线性范围及定量限

在最优的萃取条件下评价了该方法的线性范围和定量限。用不同质量浓度 TCEP 的标准溶液上样,用 TCEP 的峰面积(y)对质量浓度(x, μg/L)作图,在 0.10~100 μg/L 范围内,峰面积与质量浓度呈线性关系,线性方程为 $y = 7\,155x + 408.4$,线性相关系数为 0.999 9。逐级稀释标准溶液,以 10 倍信噪比确定方法的定量限为 44.46 ng/kg。结果表

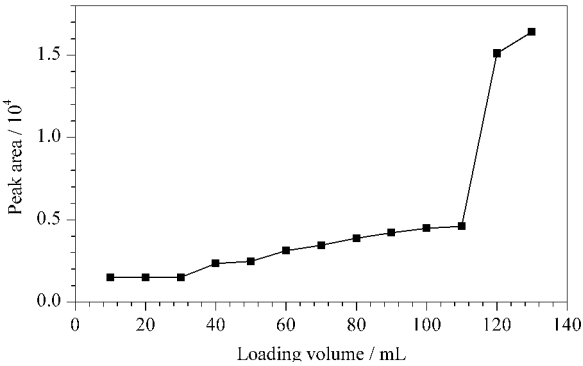


图 7 Silica-WCX SPE 小柱对 TCEP 的动态吸附曲线
Fig. 7 Kinetic adsorption plot of TCEP on Silica-WCX SPE column

明,皮革样品中的 TCEP 能检测至 ng/kg 级水平,因此 Silica-WCX 可用于 TCEP 的痕量检测。

2.6 方法的回收率与精密度

为了评价所建立方法的应用价值,对实际空白皮革样品进行加标回收实验,测定方法的回收率与精密度。

分别添加 0.4、2.0、16 μg/L TCEP 正己烷标准溶液 1 mL,使其在空白皮革样品中的添加水平分别达到 0.8、4.0、32 μg/kg,在优化条件下,每个加标水平平行测定 7 次。结果表明,TCEP 的平均回收率分别为 91.45%、98.84%、99.98%,相对标准偏差(RSD)分别为 5.97%、4.62%、4.33%。

图 8 是采用本文方法检测添加了 TCEP 标准品的某皮革样品的 GC-MS 谱图。

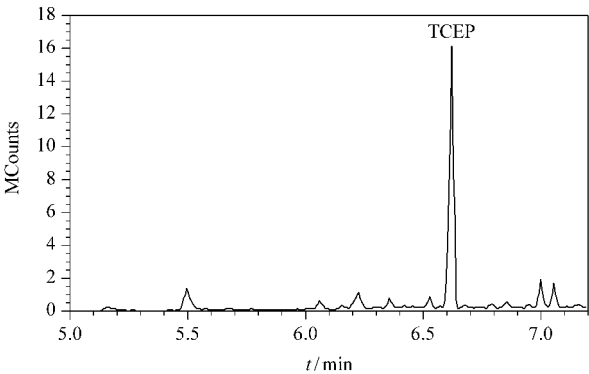


图 8 添加 TCEP 标准品的皮革样品的 SPE-GC-MS 谱图

Fig. 8 Chromatogram of a real leather sample spiked with TCEP standard by SPE-GC-MS

3 结论

本文采用自制的混合模式吸附剂 Silica-WCX 作为固相萃取柱填料,通过酸性环境使 Silica-WCX 上的羧基保持质子化状态,使得吸附剂与 TCEP 发

生氢键相互作用,可有效改善吸附剂对极性目标物 TCEP 的萃取性能。Silica-WCX 对 TCEP 的绝对回收率明显优于所测试的商用固相萃取吸附剂。基于 Silica-WCX 建立的 SPE-GC-MS 方法可用于皮革中 TCEP 的测定。

参考文献:

- [1] Song F Y, Yan Y J, Zhao X L, et al. Toxicology, 2009, 258: 94
- [2] Follmann W, Woher J. Toxicol Lett, 2006, 161: 124
- [3] BS EN 71-9: 2005
- [4] Oeko-tex Standard 100
- [5] Wang C Y, Xie T T, Xiao L L, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (王成云, 谢堂堂, 肖来龙, 等. 分析试验室), 2011, 30(12): 38
- [6] Wang C Y, Li L X, Xie T T, et al. Journal of Instrumental Analysis (王成云, 李丽霞, 谢堂堂, 等. 分析测试学报), 2014, 32(8): 890
- [10] Chen T, Wen Y Y, Ou Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (陈婷, 温裕云, 欧延, 等. 色谱), 2014, 32(1): 89
- [11] Li T B, Liu W, Wang C L, et al. West Leather (李天宝, 刘炜, 王春利, 等. 西部皮革), 2010, 32(23): 32
- [12] Zhu Y L, Zhang W Y, Xing J, et al. Anal Methods, 2014, 6(7): 2102
- [13] Zhu Y L, Yang S W, Xing J, et al. J Chromatogr A, 2014, 1354: 101