

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^[1-4]。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@sheiq.gov.cn.

收稿日期: 2011-02-04

benzylisothiazolin-3-one, BIT) (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]。

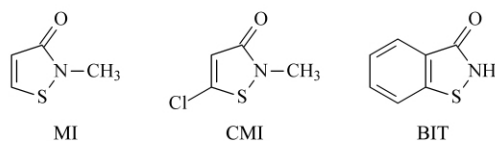


图 1 3 种异噻唑啉酮类防腐剂的结构示意图
Fig. 1 Chemical structures of three isothiazolinones

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 EN71-40-2005 中详细说明了玩具材料样品制备和萃取过程,而 EN71-41-2005 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^[9]和液相色谱-紫外检测^[11-14]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 EN71-41-2005 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 $\mu\text{g/L}$ 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 $\times$ 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 $\mu\text{L/min}$;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;碰撞气为高纯氦气,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 $^{\circ}\text{C}$;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 (m/z)	Quantitative product ion (m/z) (Collision energy/V)	Qualitative product ions (m/z) (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

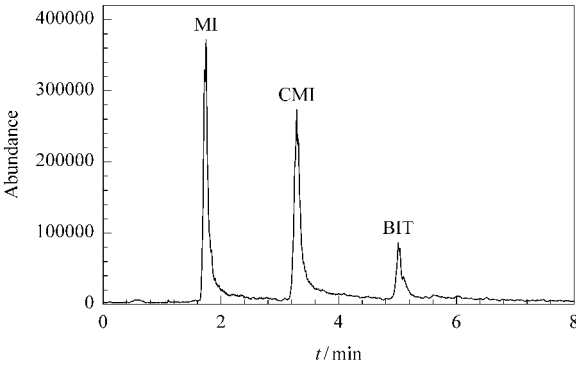


图 2 SRM 模式下 MI、CMI、BIT 的总离子流色谱图
Fig. 2 Total ion current chromatogram of MI, CMI and BIT in SRM mode

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] Ráfoth 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