

LC-MS/MS 法测定水基胶中的 3 种异噻唑啉酮类防腐剂

卢昕博, 肖卫强, 许高燕, 史春云, 蒋健, 周国俊

浙江中烟工业有限责任公司, 杭州市西湖区科海路118号 310024

摘要: 建立了测定水基胶中 3 种异噻唑啉酮的液相色谱 - 串联质谱 (LC-MS/MS) 方法。水基胶样品经水萃取、离心后进行 LC-MS/MS 分析, 内标法定量。结果表明: MI、CMI 在浓度范围 2.5~250 ng/mL、BIT 在浓度范围 5~500 ng/mL 内, 线性关系良好 ($R^2 \geq 0.9996$), 3 个加标水平的加标回收率在 96.3%~109.6% 之间, 平均相对标准偏差 (RSD) 在 1.5%~6.7% 之间, 方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别为 0.011~0.015 mg/kg 和 0.035~0.051 mg/kg。该方法适用于水基胶中 MI、CMI、BIT 的快速测定。

关键词: 异噻唑啉酮; LC-MS/MS; 水基胶

引用本文: 卢昕博, 肖卫强, 许高燕, 等. LC-MS/MS 法测定水基胶中的 3 种异噻唑啉酮类防腐剂 [J]. 中国烟草学报, 2015, 21 (4)

异噻唑啉酮类化合物是一类高效、广谱防腐剂, 对细菌、真菌、藻类等具有良好的杀灭效果, 被广泛应用于工业循环冷却水、胶黏剂、纺织、涂料、造纸等领域^[1-4]。

水基胶是通过乳液聚合而成的含水胶乳, 易受微生物侵袭, 在水基胶中添加异噻唑啉酮可以起到杀菌防腐的作用。异噻唑啉酮类化合物, 尤其是 5-氯-2-甲基-异噻唑啉-3-酮 (CMI) 和 2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮 (MI) 具有皮肤刺激性, 并且是强过敏源, 即使在规定浓度范围仍有可能导致过敏^[5-7]。欧盟指令规定化妆品中 CMI/MI(3:1) 混合物的添加上限为 0.0015%, MI 的添加上限为 0.01%^[8]。烟用水基胶由于可能会直接接触消费者的口腔, 其安全性非常重要, 因此有必要建立水基胶中异噻唑啉酮含量的测定方法。

已报道的异噻唑啉酮类化合物分析方法的研究主要集中在家居产品、护肤品、环境水监测、纸制品等领域^[9-12]。异噻唑啉酮的检测方法主要有紫外分光光度法^[13]、气相色谱法 (GC)^[14]、气相色谱-质谱联用法 (GC-MS)^[15]、液相色谱法 (HPLC)^[16-17] 和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[18] 等。已有报道采用高效液相色谱法测定水基胶中异噻唑啉酮^[19,20], 但高效液相色谱法分析时间长、灵敏度不高, 相比之下 LC-MS/MS 分析时间短、节省溶剂、灵敏度高, 选择性好,

更加适合复杂体系中异噻唑啉酮类化合物的测定。本文建立了同时测定水基胶中 3 种异噻唑啉酮类防腐剂的 LC-MS/MS 方法, 旨在快速准确测定水基胶中异噻唑啉酮的含量。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

市购水基胶样品。

2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮 (MI)、5-氯-2-甲基-异噻唑啉-3-酮 (CMI)、1,2-苯并异噻唑基-3(2H)-酮 (BIT) (纯度 $\geq 98.0\%$, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司), 内标 1,2-苯并异噻唑基-3(2H)-酮- $^{13}\text{C}_6$ (BIT- $^{13}\text{C}_6$) (纯度 $\geq 98.0\%$, 加拿大 Tornado Research Chemical 公司) 标样, 甲醇、甲酸 (色谱纯, 美国 Dikma 公司), 水为自制超纯水。

Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra 三重四极杆质谱仪、Thermo Scientific Surveyor Plus 高效液相色谱系统 (美国 Thermo Fisher 公司); CORTECS C18+ 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 2.7 μm , 90 $\text{\AA}$, 美国 Waters 公司); Sigma 4-16K 高速离心机 (德国 Sigma 公司); KQ500-DB 超声波发生器 (江苏昆山超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); XP205 电子天平 (感量: 0.0001 g, 瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

作者简介: 卢昕博 (1981—), 博士, 工程师, 主要从事烟草化学研究工作, Email: luxb@zjtobacco.com

通讯作者: 周国俊 (1973—), 博士, 研究员, 主要从事烟草化学研究工作, Email: zhougj@zjtobacco.com

收稿日期: 2015-02-14

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确称取 50 mg MI、CMI、BIT 于各自的 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得到浓度为 1 mg/mL MI、CMI、BIT 的标准储备液; 分别取 1 mL BIT, 0.5 mL 的 MI、CMI 标准储备液于 100 mL 容量瓶中, 以水定容, 得到 MI、CMI、BIT 浓度分别为 5 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL 的混合标准溶液; 准确称取 1 mg 内标 BIT- $^{13}\text{C}_6$ 于 10 mL 容量瓶中, 用水定容, 得到浓度为 100 μ g/mL 的内标溶液。

1.2.2 样品处理与分析

准确称取 1 g 样品于 100 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 水及 20 μ L 内标溶液振荡萃取 10 min, 以 10000

rpm 转速离心 15 min, 取上层清液, 经 0.22 μ m 水相滤膜过滤后直接进样分析。

LC-MS/MS 条件为: 色谱柱: CORTECS C18+ 色谱柱, 配有预柱 (2.1 $\times$ 5 mm, 2.7 μ m, 90 $\text{\AA}$); 流动相: A 为甲醇, B 为水; 洗脱梯度: 0~4 min, 30%A $\rightarrow$ 60%A; 4.1~6 min, 100%A; 6.1~8 min, 30%A; 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 10 μ L; 离子源: 电喷雾电离源 (ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 选择反应监测 (SRM); 电喷雾电压: 4000 V; 离子源温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 气化温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞气为高纯氩气, 压力为 0.20 Pa; 鞘气、辅助气为氮气, 鞘气流量: 10 L/min, 辅助气流量: 5 L/min; 各防腐剂及内标的质谱采集参数如表 1 所示。

表 1 MI、CMI、BIT、BIT- $^{13}\text{C}_6$ 的质谱采集参数
Tab. 1 MS/MS acquisition parameters for MI, CMI, BIT and BIT- $^{13}\text{C}_6$

化合物	离子对 (M/Z)	碰撞能 /V	透镜补偿电压 /V
MI	116.1/101.1 (定量离子对)	25	75
	116.1/99.1 (定性离子对)	19	
	116.1/53.2 (定性离子对)	40	
CMI	150.0/87.1 (定量离子对)	41	94
	150.0/135.1 (定性离子对)	26	
	150.0/115.1 (定性离子对)	21	
BIT	152.0/134.1 (定量离子对)	24	97
	152.0/109.1 (定性离子对)	21	
	152.0/77.2 (定性离子对)	35	
BIT- $^{13}\text{C}_6$	158.1/140.1 (定量离子对)	24	94
	158.1/115.2 (定性离子对)	29	
	158.1/83.2 (定性离子对)	35	

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的建立

MI、CMI、BIT 均是含氮杂环化合物, 易于结合氢离子形成正离子, 因此选择正离子模式进行检测。将异噻唑啉酮标准储备液及内标溶液稀释一定倍数, 得到浓度为 1 μ g/mL 的标准样品。通过注射泵将标

准样品以 5 μ L/min 的流速导入质谱仪, 同时以 30% 甲醇溶液做流动相并设置流速为 0.2 mL/min, 进行一级质谱分析, 使待测化合物的准分子离子峰峰强度为 10^6 左右, 优化透镜补偿电压、喷雾电压、鞘气压力、辅助气压力、离子源温度、气化温度获得待测化合物稳定的准分子离子峰。之后选择碰撞气压力为 0.2 Pa, 分别对分子离子进行二级质谱碎片分析, 优化碰

撞能量, 找到强度较大的 3 个子离子, 其中丰度最高的特征子离子作为定量离子, 其它两个作为定性离子 (表 1)。定性条件为: 样品中待测物质的保留时间与标准品的保留时间偏差在 6s 之内; 具有 1 个定量离子、2 个定性离子; 待测样品定性离子的相对丰度与浓度临近的标准工作溶液定性离子的相对丰度之间的偏差应在 20% 以内。

2.2 流动相的选择

以甲醇-水作为流动相, 考察了在 0%~0.2% 浓度范围内甲酸对目标化合物质谱响应的影响。采用 1.2.2 的梯度洗脱程序, 调节流动相中的甲酸浓度, 待系统平衡后, 进样浓度为 25 ng/mL 的异噻唑啉酮混合标准样品, 平行进样 6 次, 取平均值, 结果如图 1 所示。随着甲酸浓度的增加, 目标化合物的质谱响应降低, 因此, 采用甲醇-水溶液作为流动相。

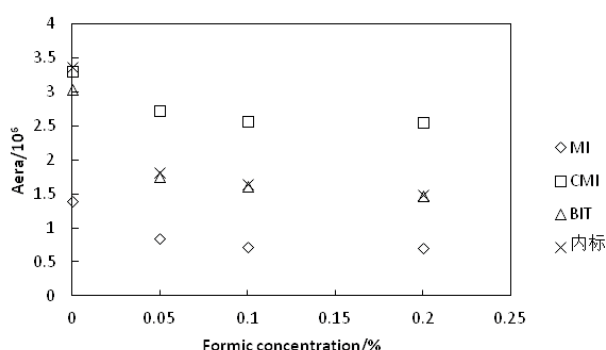


图 1 甲酸浓度对异噻唑啉酮质谱响应的影响

Fig. 1 Effect of formic acid concentration on the MS response to isothiazolinones

2.3 前处理条件的确定

2.3.1 萃取溶剂的选择

异噻唑啉酮在水及醇中溶解性都较好, 但采用高浓度甲醇溶液萃取会产生以下两个问题: 水基胶中的异噻唑啉酮得到的萃取溶液与流动相不匹配, 在流动相中会有不溶物析出; 高浓度甲醇做萃取溶剂得到的样品, 由于溶剂效应会导致样品峰变型、柱效降低。本文考察了水、30% 甲醇、50% 甲醇溶液对萃取效果的影响。选取市购含有 3 种异噻唑啉酮的水基胶样品, 分别称取样品 1 g, 加入 20 mL 溶剂萃取, 在其他条件不变的情况下按 1.2.2 方法处理后进样分析,

结果如图 2 所示: 不同浓度的甲醇溶液对萃取效果影响不明显。由于, 水基胶在水溶液中的分散性更好, 并且以水做溶剂萃取样品经济、环保, 因此本文选择水作为萃取溶剂。

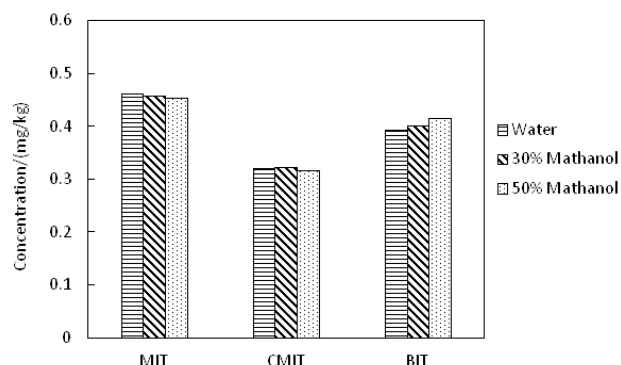


图 2 不同浓度甲醇水溶液对异噻唑啉酮萃取效果的影响

Fig. 2 Effect of methanol concentration on the extraction of isothiazolinones

2.3.2 萃取方式和时间的选择

其他条件不变的情况下对样品分别进行超声萃取 30 min 和振荡萃取 30 min, 结果如图 3 所示。两种萃取方式测得的异噻唑啉酮浓度接近, 根据目测效果, 振荡萃取更有利于水基胶的分散, 因此选择振荡萃取方式。

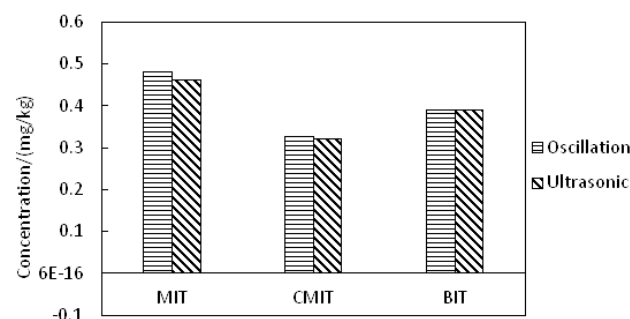


图 3 萃取方式对异噻唑啉酮萃取效果的影响

Fig. 3 Effect of different extraction methods on the extraction of isothiazolinones

其他条件不变的情况下对样品分别进行振荡萃取 10 min、20 min、30 min, 结果如图 4 所示。由于水基胶在水中分散性好, 延长萃取时间对萃取效果没有影响, 因此, 选择萃取时间为 10 min。

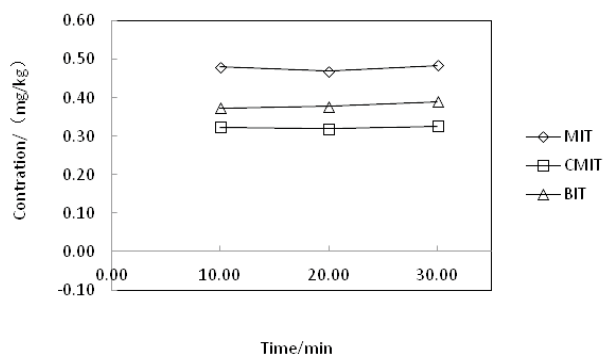


图4 萃取时间对异噻唑啉酮萃取效果的影响

Fig. 4 Effect of extraction time on the extraction of isothiazolinones

2.4 方法评价

2.4.1 标准工作曲线、检出限与定量限

准确移取 0.025 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.25 mL、0.5

mL、1 mL、2.5 mL 的混合标准溶液，置于 50 mL 容量瓶中，然后准确加入 50 μ L 浓度为 100 μ g/mL 的内标溶液，以水定容至刻度，即得 MI、CMI 浓度范围为 2.5~250 ng/mL BIT 浓度范围为 5~500 ng/mL 的系列标准工作溶液。按照 1.2.2 节所述条件进行 LC-MS/MS 分析，标准溶液及样品溶液选择离子色谱图如图 5、图 6 所示。以异噻唑啉酮和内标物峰面积比对其相应浓度进行回归，得到 3 种异噻唑啉酮的标准曲线，结果如表 2 所示。由表 2 可知，在所采用的色谱条件下，3 种异噻唑啉酮均具有较好的相关性 ($R^2 \geq 0.9996$)，适合于定量分析。将最低浓度的标准工作溶液重复进样 10 次，计算标准偏差，以 3 倍标准偏差为方法的检出限 (LOD)，10 倍标准偏差为定量限 (LOQ)。异噻唑啉酮的 LOD 范围为 0.011~0.015 mg/kg，LOQ 范围为 0.035~0.051 mg/kg。

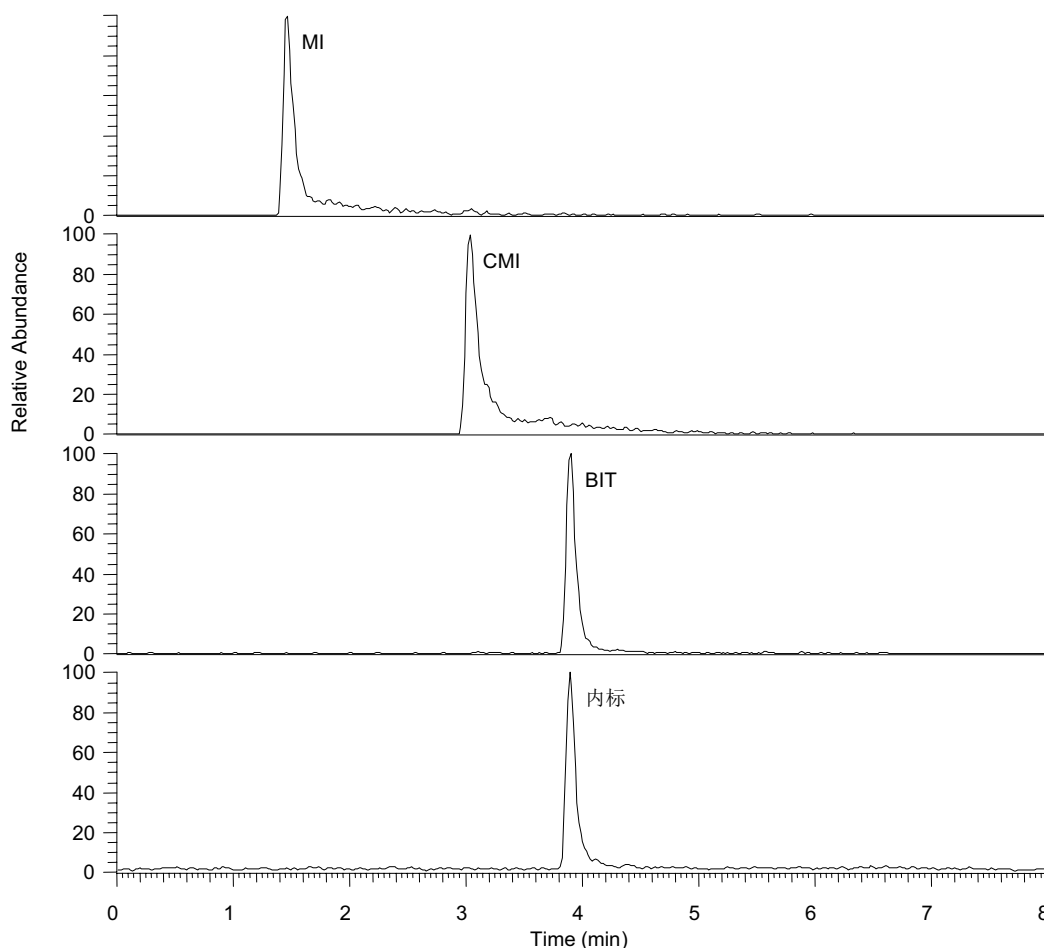


图5 异噻唑啉酮标准溶液 SRM 色谱图

Fig. 5 SRM chromatograms of isothiazolinones standards

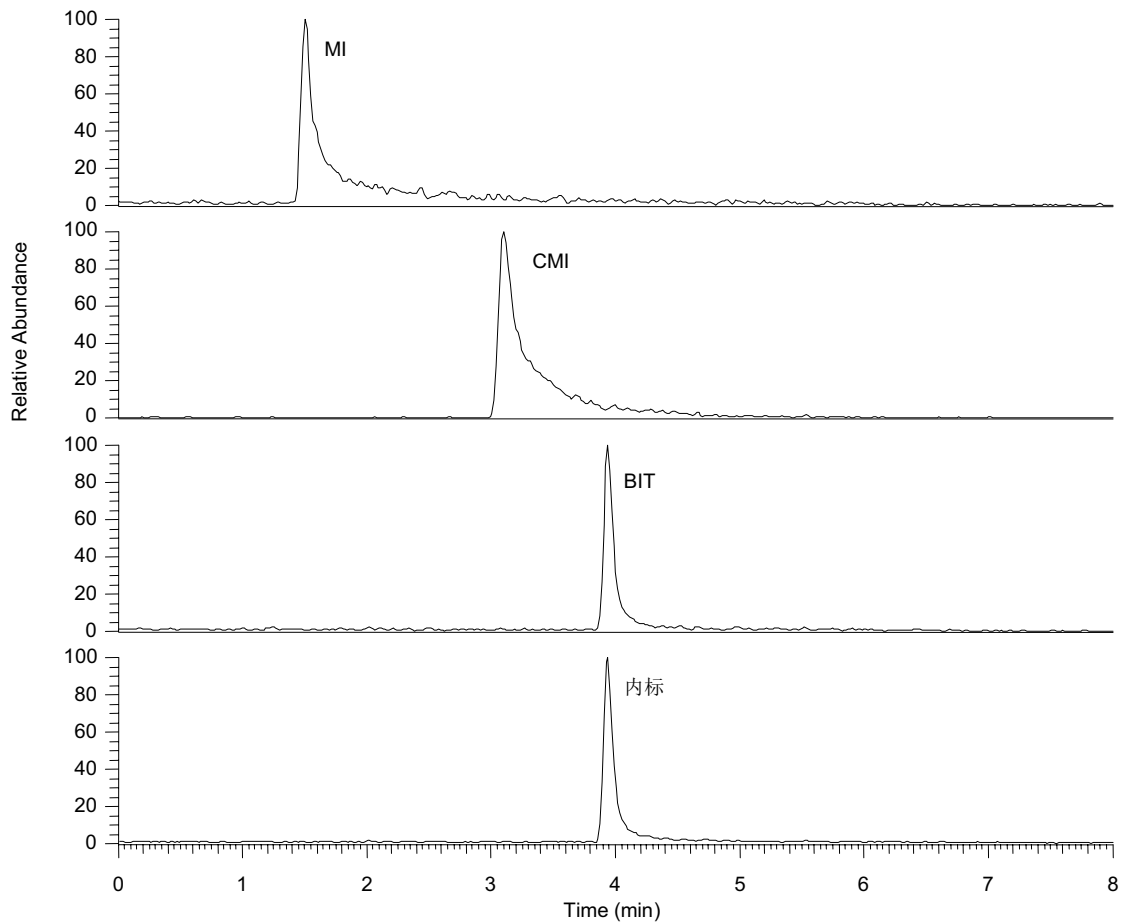


图 6 样品溶液 SRM 色谱图

Fig. 6 SRM chromatograms of isothiazolinones samples

表 2 MI、CMI、BIT 的回归方程、检出限及定量限

Tab. 2 Regression equations, LOD and LOQ of MI, CMI and BIT

化合物	回归方程	R ²	检出限 / (mg/kg)	定量限 / (mg/kg)
MI	$Y = 6.26860 \times 10^{-3}X + 6.08975 \times 10^{-4}$	0.9996	0.015	0.051
CMI	$Y = 1.41778 \times 10^{-2}X + 2.67784 \times 10^{-3}$	0.9998	0.011	0.035
BIT	$Y = 1.17456 \times 10^{-2}X + 2.00325 \times 10^{-4}$	0.9998	0.015	0.049

2.4.2 回收率与重复性

取水基胶样品 3 份，分别按照低、中、高三个水平加入 3 种异噻唑啉酮标准溶液，每个添加水平重复测定 5 个样品，并由加标量以及加标测定量计算回收

率，结果见表 3。从表 3 可知，3 种异噻唑啉酮的平均加标回收率在 96.3%~109.6% 之间，平均相对标准偏差(RSD)在 1.5%~6.7% 之间，表明本方法回收率高，重复性好，适合定量。

表 3 方法的回收率与精密度
Tab. 3 Recoveries and precisions of the method

化合物	原含量 / (mg/kg)	加标量 / (mg/kg)	回收率 /%	RSD/%
MI	0.48	0.23	96.3	6.7
		0.47	98.8	5.7
		0.94	109.6	3.8
CMI	0.32	0.17	104.2	6.5
		0.33	107.2	1.5
		0.67	108.1	4.6
BIT	0.37	0.19	104.2	2.0
		0.37	100.9	3.3
		0.74	97.1	4.8

2.5 实际样品分析

采用本方法测定了 10 个市购样品。10 个样品中均检出 MI，含量范围为 0.13~2.47 mg/kg；有 8 个样品检出 CMI，含量范围为 0.22~1.16 mg/kg；有 1 个样品检出有 BIT，含量为 0.37 mg/kg，其中，BIT 不在欧盟指令化妆品防腐许可使用名单内。10 个水基胶样品中 MI 和 CMI 含量之和小于 3.63 mg/kg，小于欧盟指令规定化妆品中 CMI/MI 混合物的添加上限。

3 结论

建立了水基胶中 3 种异噻唑啉酮类防腐剂的液相色谱 - 串联质谱联用 (LC-MS/MS) 分析方法。该方法线性良好 ($R^2 \geq 0.9996$)，加标回收率在 96.3%~109.6% 之间，平均相对标准偏差 (RSD) 在 1.5%~6.7% 之间，检出限范围为 0.011~0.015 mg/kg，定量限范围为 0.035~0.051 mg/kg。相比液相色谱法^[19,20]，该方法分析时间短、节省溶剂、灵敏度高、选择性好，适合水基胶中 MI、CMI、BIT 的快速测定。

参考文献

- [1] 付忠叶, 王庆, 贾兰妮, 等. 异噻唑啉酮衍生物近 10 年的制备和应用研究进展 [J]. 材料导报, 2012, 26(5): 291-296.
- [2] 王向辉, 贺永宁, 盘茂东, 等. 异噻唑啉酮类衍生物的合成及应用研究进展 [J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2008, 26(4): 372-377.
- [3] Reinhard E, Waeber R, Niederer M, *et al.* Preservation of

products with MCI/MI in Switzerland [J]. Contact Dermatit. 2001, 45(5): 257-264.

- [4] Critchley M, Bentham R. The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae [J]. J Appl Microbiol. 2009, 106(3): 784-789.
- [5] Fewings J, Menné T. An update of the risk assessment for methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone (MCI/MI) with focus on rinse-off products [J]. Contact Dermatit. 1999, 41(1): 1-13.
- [6] García-Gavín J, Vansina S, Kerre S, *et al.* Methylisothiazolinone, an emerging allergen in cosmetics [J]. Contact Dermatit. 2010, 63(2): 96-101.
- [7] Isaksson M, Gruvberger B, Bruze M. Occupational contact allergy and dermatitis from methylisothiazolinone after contact with wallcovering glue and after a chemical burn from a biocide [J]. Dermatit. 2004, 15(4): 201-205.
- [8] European Parliament, Council, Regulation, EC: 1223/2009[EB/OL]. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/;ELX_SESSIONID=L4b4JsBf5LGxThhMhjGhr91pGJsIPRzYkDbjt7RpD73hPGG6xwrT!-717403053?uri=CELEX:32009R1223
- [9] Alvarez-Rivera G, Dagnac T, Lores M, *et al.* Determination of isothiazolinone preservatives in cosmetics and household products by matrix solid-phase dispersion followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A. 2012, 1270: 41-50.
- [10] 简龙海, 闻宏亮, 孙健, 等. 液相色谱 - 串联质谱法同时测定化妆品中的甲基异噻唑啉酮和甲基氯异噻唑啉酮 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(11): 2652-2653.
- [11] Bester K, Lamani X. Determination of biocides as well as some biocide metabolites from facade run-off waters

- by solid phase extraction and high performance liquid chromatographic separation and tandem mass spectrometry detection [J]. *J Chromatogr A*. 2010, 1217(32): 5204-5014
- [12] Lin QB, Wang TJ, Song H, *et al*. Analysis of isothiazolinone biocides in paper for food packaging by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2010, 27(12): 1775-1781.
- [13] 郑静, 陈燕青, 龚晨, 等. 紫外分光光度法用于杀菌剂 1,2- 苯并异噻唑啉 -3- 酮的分析 [J]. *郑州大学学报: 理学版*, 2011, 43(1): 122-124.
- [14] Nakashima H, Matsunaga I, Miyano N, *et al*. Determination of Antimicrobial Agents in Non-Formalin Adhesives for Wallpaper [J]. *Journal of Health Science*, 2000, 46(6) : 447-454.
- [15] Raftery A, Gabriel S, Sacher F, *et al*. Analysis of isothiazolinones in environmental waters by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*. 2007, 1164(1-2): 74-81.
- [16] 林芳, 毛树禄, 陈斌, 等. 皮革中异噻唑啉酮防霉剂的检测方法 [J]. *中国皮革*, 2011, 40(7): 5-10.
- [17] 王超, 张青, 王星. 化妆品中甲基异噻唑啉酮及其氯代物的高效液相色谱测定法 [J]. *环境与健康杂志*, 2007, 24(6): 449-450.
- [18] 杨荣静, 卫碧文, 于文佳, 等. 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 [J]. *色谱*, 2011, 29(6): 513-516.
- [19] 周晓, 李小兰, 陈志燕, 等. 高效液相色谱法测定水基胶黏剂中 3 种异噻唑啉酮类杀菌剂 [J]. *色谱*, 2015, 33(1): 75-79.
- [20] Rosero-Moreano M, Canellas E, Nerín C. Three-phase hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with HPLC-UV for the determination of isothiazolinone biocides in adhesives used for food packaging materials[J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(3): 272-280.

Determination of 3 isothiazolinone preservatives in water-based adhesive by LC-MS/MS method

LU Xinbo, XIAO Weiqiang, XU Gaoyan, SHI Chunyun, JIANG Jian, ZHOU Guojun
China Tobacco Zhejiang Industrial Co., LTD., Hangzhou 310024, China

Abstract: A method for determining 3 isothiazolinone preservatives in water-based adhesive by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed. The sample was extracted with water, centrifuged, and then analyzed by LC-MS/MS and quantified by internal standard method. Results showed that: the linear relationship was good with determination coefficients $R^2 \geq 0.9996$ in the MI and CMI concentration range of 2.5~250 ng/mL and in the BIT concentration range of 5~500 ng/mL. The recoveries of standard addition ranged from 96.3% to 109.6% with relative standard deviation (RSD) of 1.5%~6.7%. The limit of detection was between 0.011 and 0.015 mg/kg, and that of quantification was between 0.035 and 0.051 mg/kg. It was concluded that this method was suitable for the determination of 3 isothiazolinone preservatives in water-based adhesive.

Keywords: isothiazolinone; LC-MS/MS; water-based adhesive

Citation: LU Xinbo, XIAO Weiqiang, XU Gaoyan, et al. Determination of 3 isothiazolinone preservatives in water-based adhesive by LC-MS/MS method [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2015, 21(4)