

气相色谱-质谱法测定水中丁香酚类麻醉剂及其代谢物的研究

皮超凡¹, 章新奇¹, 刘峰¹, 李谭瑶²

1. 益阳市疾病预防控制中心, 湖南 益阳 413000; 2. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 建立水中丁香酚类麻醉剂及其主要代谢物的气相色谱-质谱检测方法。**方法** 待测物通过 HLB 固相萃取小柱富集, 经乙酸乙酯洗脱, 使用气相色谱-质谱法测定。**结果** 方法对丁香酚等物质的检出限可达 0.01 $\mu\text{g/L}$, 样品加标回收率为 78.6%~104%, 相对标准偏差 $\leq 7.0\%$ ($n=5$)。**结论** 新方法灵敏、准确, 可用于环境水体中丁香酚类鱼用麻醉剂及其主要代谢物污染物的检测。

关键词: 水; 丁香酚, 代谢产物; 气相色谱-质谱法

中图分类号: R286.0 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2022)09-1089-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.09.016

Determination of eugenol anesthetics and their metabolites in water by gas chromatography-mass spectrometry

PI Chao-fan¹, ZHANG Xin-qi¹, LIU Feng¹, LI Tan-yao²

1. Yiyang Municipal Center for Disease Control and Prevention, Yiyang, Hunan 413000, China;

2. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: LI Tan-yao, E-mail: 332499047@qq.com

Abstract: **Objective** To develop an analytical method based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for determination of eugenol anesthetics and their metabolites in water. **Methods** The analytes were enriched firstly by HLB solid phase extraction column, then eluted with ethyl acetate, and finally determined by GC-MS. **Results** The detection limit of the method was 0.01 $\mu\text{g/L}$. The recoveries of eugenol and related substances were 78.6%~104%, and the relative standard deviations were less than or equal to 7.0% ($n=5$). **Conclusion** The method is sensitive and accurate, and can be used to detect the contamination of eugenol fish anesthetics and their major metabolites in environmental water.

Keywords: water; eugenol; metabolite; gas chromatography-mass spectrometry

丁香酚 (eugenol, EG) 是渔用麻醉剂丁香油的主要活性成分, 占其含量的 85%~95%^[1-2]。丁香油中还含有少量异丁香酚 (isoeugenol, IEG) 和甲基丁香酚 (methyleugenol, MEG)。20 世纪 70 年代, 日本学者发现 EG 对鱼类具有强烈的麻醉作用。IEG^[3] 和 MEG^[4] 同样被证实对鱼类具有麻醉作用。美国国家毒理学计划的数据显示, 丁香油的几种主要成分—EG、MEG 和 IEG 对啮齿动物有致癌性或潜在致癌性, MEG 对哺乳动物的致癌作用尤为明确^[5-6]。因此, 作为渔用麻醉剂, EG 类物质在我国和美国等国家至今未批准使用, 但在鱼类养殖、运输和贩卖过程中, 其存在广泛使用的情况^[7]。EG 类物质滥用不可避免地造成环境和食品污染。因此, 调查和监测 EG 类物质的污染状况

是一项重要而紧迫的工作, 对维护生态系统稳定和保护环境人们身体健康, 具有重要意义。

目前, 科研工作者对 EG 类物质的检测方法研究主要集中于水产品中残留^[8-11]和暂养水^[7]中用量等方面, 环境中此类物质的检测方法研究尚未见报道。因此, 本研究在深入进行了相关文献研究的基础上, 选取了 EG、IEG、2-甲氧基-4-丙基苯酚 (4-hydroxy-3-methoxy-phenyl-propane, HMPP)、MEG 以及甲基异丁香酚 (methyl isoeugenol, MIEG) 等五种物质为检测对象, 建立了环境水体中 EG 类物质及其机体代谢产物的检测方法。新方法通过固相萃取仪自动操作, 方法灵敏准确、简便快速, 适应于水体中 EG 类物质及其代谢物的痕量检测。

作者简介: 皮超凡 (1980-), 男, 湖南益阳人, 主要从事理化检测工作。

通信作者: 李谭瑶, E-mail: 332499047@qq.com。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂 7890B GC system/5977A MSD

气相色谱质谱联用仪(美国 Agilent 公司); DIONX Auto Trace 280 自动固相萃取仪(美国 Thermo Scientific 公司); BT125D 型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); TTL-DCII 型氮吹仪(北京同泰有限公司)。

EG、IEG、HMPP、MEG、MIEG 均为液体标样,纯度大于 98.5%(上海阿拉丁试剂有限公司); Oasis HLB 固相萃取小柱 6cc 500 mg(美国 Waters 公司),甲醇、乙酸乙酯为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:DB-5MS, 30 m×0.25 mm×0.25 μm;载气:He;恒流,柱流量:1 ml/min;10:1 分流进样;进样量:1.0 μl;进样口温度:250 ℃;柱温:60 ℃停留 1 min,以 20 ℃/min 程序升温至 80 ℃,以 5 ℃/min 程序升温至 150 ℃,以 20 ℃/min 程序升温至 280 ℃,保持 10 min。分析用衬管、色谱柱为新品老化后使用。

1.2.2 质谱条件 离子源:EI 源;离子源温度:230 ℃;四级杆温度:150 ℃;色谱-质谱接口温度:280 ℃;EM 电压:1 359 V;扫描方式:选择离子模式;溶剂延迟:8 min。EG 等物质的保留时间、监测离子见表 1。

表 1 EG 等物质保留时间、定量及定性离子

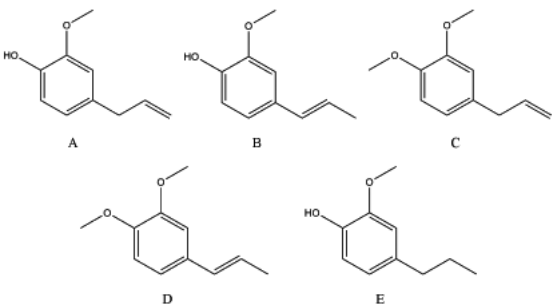
物质名称	保留时间(min)	定量离子 (m/z)	定性离子 (m/z)
EG	13.192	164	131, 149, 164
HMPP	13.448	137	122, 137, 166
MEG	14.363	178	147, 163, 178
IEG	15.538	164	131, 149, 164
MIEG	16.601	178	147, 163, 178

1.3 样品处理 清洁水样直接进行固相萃取,含杂质、泥沙较多的水样过中速定量滤纸后进行固相萃取。HLB 固相萃取小柱先用 5 ml 甲醇活化,再用 20 ml 超纯水完全置换小柱中甲醇,然后取 1 000 ml 水样以 15 ml/min 流速通过小柱,弃去流出液;上样后,小柱氮吹 30 min,然后以 1.5 ml/min 流速用乙酸乙酯洗脱小柱 6.0 ml,收集洗脱液于刻度试管中,收集液氮气吹至弱小于 1 ml;取出放置与室温平衡,加乙酸乙酯定容至 1.0 ml,上机分析。

2 结果

2.1 检测对象的确立 进行 EG 类物质水体污染监测,选择合适的对象是本研究重要内容。文献研究表明,水产养殖行业除了使用以 EG 为主要成分的丁香油外,也使用以 IEG 为主要成分的渔用麻醉剂 AQUI-S。此二者是目前使用最广泛的 EG 类麻醉

剂^[3]。EG、IEG 互为同分异构体,结构式见图 1A 和图 1B。在丁香油和 AQUI-S 中,EG、IEG 均同时存在,只是含量主次不同。除此之外,这类商品中还常混有 MEG^[3],结构如图 1C 所示。因此,在研究过程中,把 EG、IEG 和 MEG 列为主要检测对象。



注:A:EG;B:IEG;C:MEG;D:MIEG;E:HMPP。

图 1 EG 等物质结构式

作为丁香油的主要成分——EG 的机体代谢产物有 EG、HMPP(结构式如图 1E 所示)、顺式和反式异 EG 等^[13],IEG、MEG 的代谢产物则未见相关研究报道。因此,渔业使用丁香油时,环境污染监测物质可选择 EG、IEG、HMPP 等。由于 IEG 也是 EG 的一种机体代谢产物,并且两者互为同分异构体,因此 IEG 可能与 EG 有相似的代谢途径和相同的代谢产物,在 IEG 没有针对性的代谢物监测对象的情况下,EG 代谢物可能有反应 AQUI-S 使用的监测价值。以 EG 的另一种代谢产物 HMPP 为例,他就是 EG、IEG 的丙烯基烷基化的共同产物。另外,由于丁香油和 AQUI-S 的常混成分 MEG 的代谢产物不得而知,但鉴于其对哺乳动物的毒性更加明确,因此本研究把 MEG 的同分异构体——MIEG(结构如图 1D 所示)也纳入到检测对象中,也有文献直接将 MIEG 归为 EG 类麻醉剂^[14]。综上所述,为考察 EG 类物质对环境的污染及转归情况,本研究选取 EG、IEG、MEG、MIEG 以及 HMPP 等五种成分为检测目标,以确保研究对象有较好的代表性和监测价值。

2.2 惰性化的分析环境 由图 1A、B、E 结构式所知,EG、IEG 和 HMPP 等三个待测物均含有较为活泼的酚羟基。酚羟基化合物在气相色谱-质谱分析时,容易与系统中(主要是衬管和色谱柱)存在的活性位点结合,导致待测物损失甚至完全检测不到。为了避免这一现象的产生,文献多采用衍生化的方式解决酚羟基的活性问题^[15-16]。但衍生化操作过程繁琐、耗时,并且同样会造成待测物损失,导致回收率不稳定等问题。因此,为了较好地解决酚羟基活性问题并避免采取衍生化操作,本研究采用高惰性化的分析环境,强调使用新衬管、新色谱柱进行实验。新衬管内壁经硅烷化惰

性处理,而新色谱柱内壁均匀涂抹了高惰性固定相涂层,在新启用状态下,两者自身的活性位点可以忽略,同时也没有过往分析残留物及其碳化后形成的活性位点。在此状态下,EG、IEG 和 HMPP 等酚羟基化合物在气相色谱-质谱的分析过程中,几乎没有截流损失,可以获得如衍生化后检测同样的对称性色谱峰形。因此,本研究选用高惰性的衬管和色谱柱开展 EG 类物质及其主要代谢产物检测。

2.3 固相萃取柱的选择 进行 EG 类物质的固相萃取研究,选用 Supelco ENVI-18 小柱(6cc 1 g),Oasis

C8 小柱(6cc 1 g),Oasis HLB 小柱(6cc 500 mg)等三种常用于水体有机物萃取的固相萃取小柱进行试验。由于待测物在水体中浓度非常低,考虑到固相萃取小柱对不同物质都有不同最低富集浓度,本实验重点考察不同种类的固相萃取小柱在超低水体浓度下,对待测物的萃取性能。本研究分别进行了三种小柱在 5.0、0.50、0.050 $\mu\text{g/L}$ 三个浓度的水样加标回收实验,每个浓度分析 5 个平行样,并以空白样品处理液制作标准曲线定量,计算测定加标回收率均值(average recovery,AR),见表 2。

表 2 三种固相萃取小柱不同浓度下待测物 AR 及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)($n=5$,%)

待测物	5.0 $\mu\text{g/L}$						0.50 $\mu\text{g/L}$						0.050 $\mu\text{g/L}$					
	ENVI-18		C8		HLB		ENVI-18		C8		HLB		ENVI-18		C8		HLB	
	AR	RSD	AR	RSD	AR	RSD	AR	RSD	AR	RSD	AR	RSD	AR	RSD	AR	RSD	AR	RSD
EG	92.4	7.3	90.1	7.1	96.2	3.6	80.2	8.1	74.2	6.4	94.3	3.8	51.6	7.2	64.1	8.6	80.6	6.1
HMPP	88.6	5.8	92.3	5.8	93.5	6.2	86.6	4.7	86.6	5.2	91.6	5.4	76.2	9.6	58.2	7.1	91.2	5.7
MEG	96.1	5.2	94.5	3.4	98.3	3.2	91.3	5.2	90.3	4.1	95.1	5.1	80.2	6.6	73.9	9.5	92.4	6.2
IEG	91.6	4.8	91.1	4.2	94.3	4.7	78.6	7.1	82.2	6.8	89.4	6.0	60.4	8.5	70.3	7.6	86.3	7.4
MIEG	96.6	6.1	95.6	5.4	95.1	3.4	92.4	6.6	88.4	4.9	92.9	4.4	84.2	5.7	81.1	5.6	92.5	4.4
平均值	93.1	/	92.7	/	95.5	/	85.8	/	84.3	/	92.7	/	70.5	/	69.5	/	88.6	/

由上述结果可知:HLB 固相萃取小柱在处理 5.0、0.50、0.050 $\mu\text{g/L}$ 的加标样时,所有物质的平均回收率分别为 95.5%、92.7%、88.6%,各浓度回收率都优于 ENVI-18 的 93.1%、85.8%、70.5% 和 C8 的 92.7%、84.3%、69.5%的,尤其是在低浓度组,优势更加明显。因此,本实验选用 HLB 固相萃取小柱进行水体中待测物的萃取。

2.4 样品前处理条件 确定固相萃取柱后,实验探讨了活化条件、上样体积、氮吹时间及洗脱体积等因素对实验结果的影响。

2.4.1 活化条件选择 本研究考察了三组活化条件试验。第一组:5 ml 二氯甲烷、5 ml 乙酸乙酯、5 ml 甲醇、20 ml 水;第二组:5 ml 乙酸乙酯、5 ml 甲醇、20 ml 水;第三组:5 ml 甲醇、20 ml 水。实验结果表明,三种活化条件所得待测物检测结果没有明显差别。初步推测:HLB 小柱填料在甲醇的作用下,即可完全活化,再用 20 ml 水将活化用的甲醇完全置换出小柱,即能消除有机溶液对待测物吸附的影响。

2.4.2 上样体积选择 本实验需要考察待测物吸附在固相萃取柱上后,大体积的水样流出是否造成待测物的损失或其他变化。因此,取 5 根 HLB 固相萃取小柱,均上样 1.0 ml 0.050 $\mu\text{g/ml}$ 加标水样,再分别加注 0.20、0.50、1.0、1.5、2.0 L 超纯水。实验发现,各加注超纯水体积对待测物的检测结果无明显影响。在上样到 2.0 L 后,水样仍不会将吸附在固相萃取小柱上的待测物带出小柱而造成明显的损失。因此,在样品分

析中,选择上样量为 1.0 L。

2.4.3 氮吹时间选择 取 5 根 HLB 固相萃取小柱,均上样 1.0 L 0.050 $\mu\text{g/L}$ 水样,再氮气高速吹入柱体脱水。试验了氮吹 20、25、30、35、40 min 后待测物测定值变化,发现氮吹时间达 40 min 时,仍不会造成待测物明显损失,而氮吹达 30 min 时能充分保证柱体中水分吹干,因此选择上样后氮吹 30 min 脱水。

2.4.4 洗脱条件选择 HLB 固相萃取小柱均上样 1.0 L 5.0 $\mu\text{g/L}$ 加标样并氮吹后,分别试验了甲醇、乙酸乙酯、正己烷等三种不同极性的有机溶剂加入 2.0 ml 时对待测物的洗脱效果。结果表明,甲醇和乙酸乙酯对待测物的洗脱效率明显优于正己烷,而两者之间没有明显差别。考虑到乙酸乙酯对色谱柱的固定相作用更为温和,选用乙酸乙酯洗脱待测物。

在确定乙酸乙酯作为洗脱溶液后,进一步开展了洗脱体积试验。取三支 HLB 固相萃取小柱,均上样 1.0 L 5.0 $\mu\text{g/L}$ 加标样并氮吹后,各柱均先后分四次,每次用 2.0 ml 乙酸乙酯洗脱同一小柱,分别收集洗脱液,测定每次洗脱液中待测物含量。结果表明,在仪器对各待测物检出限为 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 左右的情况下,第一洗脱液将绝大部分待测物洗出,第二脱液能检出少量待测物,第三、第四洗脱液完全检不出待测物。因此,选用加入 6.0 ml 乙酸乙酯洗脱待测物。

2.5 线性范围及检出限 用空白样品处理液将浓度均为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 EG 等物质的标准混合溶液稀释,配制成浓度为 0.020、0.040、0.10、0.20、0.40、1.0 $\mu\text{g/ml}$

的混合标准系列进行测定。EG 等五种物质的选择离子色谱图如图 2 所示。以 EG 类物质浓度对色谱峰面积做线性回归,五种物质均呈良好的线性关系。以 3 倍信噪比所对应的溶液浓度确定仪器的检出限,10 倍信噪比溶液浓度确定仪器定量限,考虑样品前处理进行浓缩的情况下,方法检出限和定量限见表 3。

表 3 EG 等物质的检出限、定量限、线性范围、线性方程及相关系数

待测物	检出限	检测限	线性关系		
	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	线性范围($\mu\text{g/L}$)	线性方程	系数
EG	0.01	0.03	0.03~1.0	$y=2\ 780x-163.3$	$R=0.9991$
HMPP	0.01	0.02	0.03~1.0	$y=8\ 116x-138.9$	$R=0.9992$
MEG	0.01	0.03	0.03~1.0	$y=2\ 040x-134.2$	$R=0.9998$
IEG	0.01	0.03	0.03~1.0	$y=2\ 271x-183.0$	$R=0.9992$
MIEG	0.01	0.03	0.03~1.0	$y=2\ 089x+140.9$	$R=0.9997$

表 4 水样中 EG 等物质的加标回收率和精密度($n=5$)

待测物	本底值	加标浓度(0.10 $\mu\text{g/L}$)			加标浓度(1.0 $\mu\text{g/L}$)		
	($\mu\text{g/L}$)	测定值($\mu\text{g/L}$)	回收率(%)	RSD(%)	测定值($\mu\text{g/L}$)	回收率(%)	RSD(%)
EG	<0.01	0.0786~0.0925	78.6~92.5	7.0	0.942~1.02	94.2~102	3.4
HMPP	<0.01	0.0825~0.0921	82.5~92.1	5.1	0.874~0.986	87.4~98.6	4.6
MEG	<0.01	0.0800~0.0934	80.0~93.4	6.6	0.923~1.02	96.0~104	4.5
IEG	<0.01	0.0799~0.0916	79.9~91.6	5.9	0.867~0.992	86.7~99.2	5.4
MIEG	<0.01	0.0821~0.0910	82.1~91.0	4.2	0.884~0.986	88.4~98.6	4.8

3 结 论

EG、AQUI-S 等是一类未经许可,但在我国鱼类养殖业中广泛应用的渔用麻醉剂。具有潜在致癌性,在目前尚未有针对水体中 EG 等物质环境污染检测方法的情况下,本研究提出以固相萃取技术为样品前处理方式,以气相色谱-质谱技术为检测手段,建立了 EG 类及其主要代谢物的水体污染检测方法。研究过程中,重点考虑了检测对象对水体污染监测的代表性,并注重解决环境水体中超低浓度水平的富集浓缩问题,通过采用惰性化分析环境有效解决了该类物质中酚羟基产生的分析影响,建立简单、快速、灵敏的检测水体中 EG 类物质及其主要代谢物的新方法。新方法的检出限为 0.01 $\mu\text{g/L}$,样品加标回收率为 78.6%~104%,RSD 值小于 7.0%。新方法简单、准确、快速,可为 EG 类物质的环境污染监测和生态影响研究提供有力的技术支持。

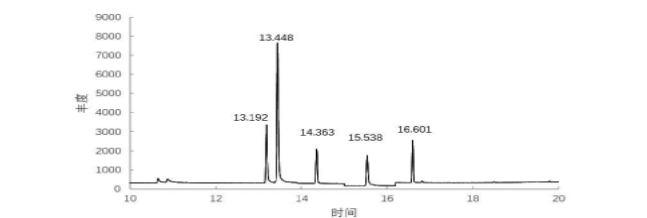
参考文献

[1] Park GD, Mitchel JT. Working with the U. S. Food and Drug Administration to obtain approval of products under the animal rule [J]. Ann N Y Acad Sci, 2016, 1374(1):10-16.

[2] Bowker J, Trushenski J, Tuttlelau M, et al. Guide to using drugs, biologics, and other chemicals in aquaculture [M]. America: American Fisheries Society Fish Culture Section, 2011:1-15.

[3] 金元,何雅静,程波,等. 丁香酚类麻醉剂的安全性探讨[J]. 食品安全质量检测学报,2017, 8(1):33-40.

[4] 杨华,徐风,万丹,等. 甲基丁香酚镇痛抗炎作用及机制研究[J].



注: 13.192 min—EG; 13.488 min—HMPP; 14.363 min—MEG; 15.538 min—IEG; 16.601 min—MIEG。

图 2 EG 等物质的选择离子色谱图

2.6 方法精密度与回收率 对环境空白水样进行加标回收实验,分别取浓度为 0.10、1.0 $\mu\text{g/ml}$ EG 等物质的混合标准溶液 1.0 ml 加入到 1.0 L 空白水样中,每组平行做 5 份,同时做空白,按 1.3 处理后测定,并计算平均回收率,见表 4。

中药新药与临床药理. 2017, 28(3):292-297.

[5] National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies on methyleugenol (CAS No. 93-15-2) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies) [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2000, 491:1-412.

[6] European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance eugenol[J]. EFSAJ, 2010, 8(4):1542.

[7] 赵东豪,王强,王旭峰,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测鱼肉和暂养水中丁香酚残留量[J]. 食品科学,2016,37(24):252-256.

[8] 石芳,寿旦,金米聪,等.分散固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中 7 种麻醉剂[J]. 色谱,2022,40(2):139-147.

[9] 邓颖,林青兰,杜伟锋,等. 分散固相萃取-气相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速测定鲜鱼中的 5 种酚类麻醉剂[J]. 食品安全质量检测学报,2021,21(12):8488-8493.

[10] 王兴益,陈彦龙,李攻科. 氟化共价有机聚合物固相微萃取-高效液相色谱测定水产品中丁香酚类麻醉剂[J]. 色谱,2022,39(9):1012-1020.

[11] 王强,王旭峰,赵东豪,等. 化学发光酶免疫分析法检测水产品中残留的麻醉剂丁香酚[J]. 分析测试学报,2022,41(3):354-360.

[12] Flostrand L, Schweigert JF. Pacific herring anesthetic trials with eugenol, isoeugenol and MS-222 in association with coded wire tagging study [R]. Nanaimo - British Columbia; Fisheries and Oceans Canada, 2005:1-20.

[13] Fischer IU, von Unruh GE, Dengler HJ. The metabolism of eugenol in man [J]. Xenobiotica, 1990, 20(2):209-222.

[14] 倪峥飞,顾晔,冯永巍,等. 同时测定水产品中 4 种丁香酚类麻醉剂残留量[J]. 质谱学报, 2018, 39(4):451-458.

[15] 高永刚,张艳艳,高建国,等. 衍生化气相色谱-质谱法测定玩具和食品接触材料中双酚 A[J]. 色谱,2012,30(10):1017-1020.

[16] 秦冲,冉卓,邹佳洁,等. 微波萃取-衍生化-气相色谱质谱联用法测定土壤中酚类化合物[J]. 冶金分析,2022,42(3):59-65.