

气相色谱-串联质谱联用法测定水中丁香酚残留

柯常亮,刘奇,陈洁文,甘居利,陈培基,李刘冬*

(中国水产科学研究院南海水产研究所,农业部水产品加工重点实验室;
农业部水产品贮藏与质量安全风险评估实验室(广州):广东 广州 510300)

摘要:为排查流通环节鱼用麻醉剂的潜在风险,本研究建立了水中丁香酚残留的测定方法。本方法以乙酸乙酯作为提取剂,使用气相色谱-串联质谱仪对丁香酚进行定性和定量测定。结果显示,在1.00~200.00 μg/L的浓度范围内,标准曲线方程为 $y=14.65x-7.23$,相关系数 r 为0.9994,线性拟合良好。加标浓度在5.00~100.00 μg/L范围内回收率范围为98.6%~104%,相对标准偏差范围为2.46%~5.48%。方法检测限和定量限分别为0.21和0.68 μg/L。本方法准确、简单、快捷,能够满足鱼类产品流通环节水中丁香酚残留的测定。[中国渔业质量与标准,2014,4(4):49-55]

关键词:丁香酚;气相色谱-串联质谱;水;麻醉剂

中图分类号:S94 **文献标志码:**A **文章编号:**2095-1833(2014)04-0049-07

丁香酚(eugenol)是丁香油的主要成分,占85%~95%,常作为食品添加剂、香精和鱼用麻醉剂^[1-2]。欧洲食品安全局报告认为丁香酚在大鼠体内经24 h后90%以上可经尿液排除体外,无残留,无致癌性,无遗传毒性和生殖毒性^[3]。因此,许多国家如日本、澳大利亚、智利和新西兰等国家已将丁香酚列为安全和合法的鱼用麻醉剂。其中,新西兰允许丁香酚作为鱼用麻醉剂残留限量为0.1 mg/kg,日本的残留限量值为0.05 mg/kg。但是国际上对丁香酚作为鱼用麻醉剂的安全性还存在争议。研究显示,丁香酚具有肝毒性,可以对肝脏产生危害^[4]。美国国家毒理学计划(National Toxicology Program, NTP)研究认为丁香酚与小鼠肝癌和腺瘤的发病率有关,是可疑致癌物^[5]。世界癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)认为丁香酚致癌性的证据不充分,因此将其列为第三类致癌物质^[6]。FAO/WHO联合食品添加剂专家委员会(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)推荐人体日允许摄入量(Acceptable Daily Intake, ADI)值为2.5 mg/kg b. w.^[7]。FDA认为虽然丁香油作为牙齿黏固粉和食品添加剂被认为是安全的,但这并不意味着其作为鱼用麻醉剂是安全的,因此FDA没有

批准丁香油及其成分作为鱼用麻醉剂^[8]。中国允许丁香酚作为食品添加剂,但是作为鱼用麻醉剂没有明确的法规规定^[9]。由于丁香酚易得、价廉和效果好,在水产品运输中应用比较广泛。近年来,国内研究丁香酚对鱼类的麻醉效果多有报道,已经涉及对虾、斑马鱼和鲟鳇类等多个品种^[10-14]。

目前,有关丁香酚残留测定方法研究的报道集中于药品、化妆品和中草药等领域^[15-21],主要分析方法有液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱法和气相色谱-质谱联用法等。然而,丁香酚作为一种应用广泛的鱼用麻醉剂,针对其在水和水产品中残留的分析测定方法鲜有报道。因此,本研究以活鱼运输水为目标,应用高灵敏度和高选择性的气相色谱-串联质谱,研究测定水中丁香酚残留,为排查流通环节丁香酚的潜在风险,控制丁香酚对人体健康的潜在危害提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

气相色谱-串联质谱仪 Agilent 7890A-7000B 配电子轰击式离子(EI)源;色谱柱为 Agilent J&W

收稿日期:2014-05-05;接收日期:2014-06-26

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2010TS08和2012TS15)

作者简介:柯常亮(1980-),男,助理研究员,研究方向为水产品质量安全与风险评估,kechangliang80@163.com

通信作者:李刘冬,研究员,研究方向为水产品质量安全,168LLD@163.com

Scientific DB-17ms (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); 电子天平(± 0.01 g, 常州万通 WT5200); 马弗炉(Yamato, FO510C)。

丁香酚标准物质(纯度大于 99.6%, 美国 Accustandard); 甲醇、乙酸乙酯(色谱纯, Sigma-Aldrich); 无水硫酸钠(分析纯, 广州化学试剂厂, 450 °C 烘烤 4 h); 氯化钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 实验用水为自来水, 经 24 h 曝氧除氯。

1.2 样品前处理

量取 20 mL 水样于 50 mL 塑料离心管中, 依次加入 2.0 g 氯化钠和 5.00 mL 乙酸乙酯, 漩涡混合, 静置分层, 取上清液于 10 mL 比色管中。加 5.00 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并提取液, 将提取液定容 10.0 mL。加入 1.0 g 无水硫酸钠, 涡旋混合, 取 1.0 mL 提取液至进样瓶中气相色谱-串联质谱仪定量分析。

丁香酚标准物质 100 mg 以甲醇溶解稀释成 1 000 mg/L 标准储备液。移取一定体积的丁香酚标准使用液于 20 mL 水中, 乙酸乙酯提取后, 定容 10.0 mL, 配制成浓度为 1.00、2.00、10.0、20.0、100.0 和 200 μg/L 的工作曲线。

添加一定体积的丁香酚标准溶液于水样中, 考察方法准确度和精密密度。加标后水样中丁香酚含量为 5.00、10.0 和 100 μg/L, 每个加标浓度进行 6 平行实验。

1.3 仪器条件

进样口温度为 260 °C; 进样量为 1 μL, 不分流进样; 氦气(99.999%) 为载气, 流速为 1 mL/min; 接口温度为 280 °C。初始柱温为 80 °C, 保持 2 min, 以 15 °C/min 升至 250 °C 保持 5 min。离子源和四级杆温度分别为 230 °C 和 150 °C; 电子轰击能为 70 eV; 氦气为碰撞气, 流速 1.5 mL/min; 氦气为淬灭气, 流速 2.25 mL/min。

本方法采用多反应监测(Multiple reaction monitoring, MRM)模式进行, 以响应最高的 m/z 149 作为定量离子对目标物进行定量, 并以离子 m/z 104 和 m/z 77 辅助定性。离子监测参数见表 1。

2 结果与讨论

2.1 丁香酚定性检测

与液相色谱-串联质谱联用相比, 气相色谱-质谱联用对化合物的定性上具有一定优势。目前, 美国国家标准技术研究所(National Institute of Standards

and Technology, NIST) 以 EI 为离子源, 70 eV 轰击能量建立了 20 多万种化合物的标准谱库, 对目标化合物的定性具有十分重要的参考意义。本研究以全扫描模式(full scan) 采集浓度为 1.00 mg/L 的丁香酚标准溶液总离子色谱图(图 1)。依据丁香酚的摩尔质量, 提取 m/z 164 离子色谱图(图 2) 及其质谱图(图 3) 与 NIST 标准谱库进行匹配度检查。结果显示, 本实验中保留时间在 7.67 min 时质谱图与标准谱库图谱的匹配率为 92.8%。因此可以确定此处化合物为丁香酚。

表 1 丁香酚离子监测参数

Tab. 1 Monitoring parameters for eugenol detection in mass spectrometry

母离子(m/z) Precursor ion	子离子(m/z) Products ion	碰撞能/eV Collision energy	驻留时间/ms Dwell time
	149	10	100
164	104	10	100
	77	30	100

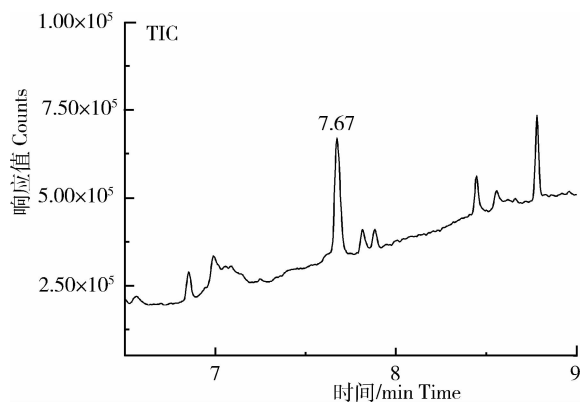


图 1 全扫描总离子流图(1.00 mg · L⁻¹)
Fig. 1 Total ion chromatogram in full scan mode for eugenol(1.00 mg · L⁻¹)

2.2 色谱图分析

化合物、色谱柱和溶剂等因素的极性影响目标物在色谱图上的行为。用非极性的 HP-5ms 色谱柱进行分离时, 目标化合物的峰出现拖尾现象(图 4B), 改用弱极性的 DB-17ms 色谱柱后, 峰型明显改善。结果显示, 应用 DB-17ms 色谱柱后在 7.67 min 所出目标峰对称、尖锐。由此可见, DB-17ms 色谱柱更适合丁香酚的分析测定。这可能与丁香酚的极性相关。丁香酚属于弱极性化合物, 根据相似相容的原理, 在色谱分离过程选择极性接近的柱子有利于得到谱峰对称和峰宽较小的目标物色谱峰^[22-24]。

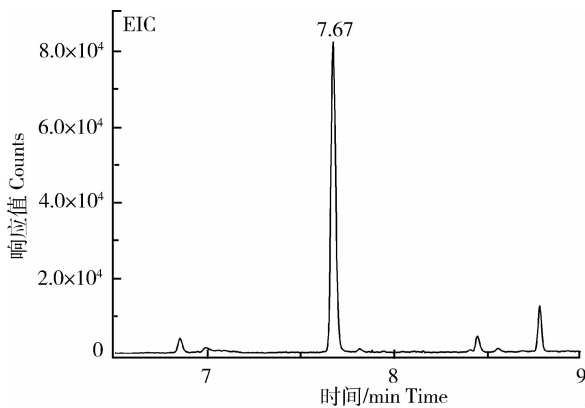


图2 m/z 164 提取离子图 ($1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 2 Extracted ion chromatogram in full scan mode for m/z 164 ($1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

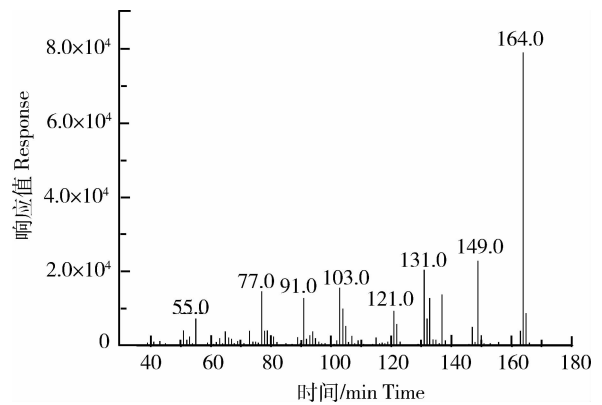


图3 丁香酚质谱图 ($1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Fig. 3 The spectrum extracted for eugenol ($1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

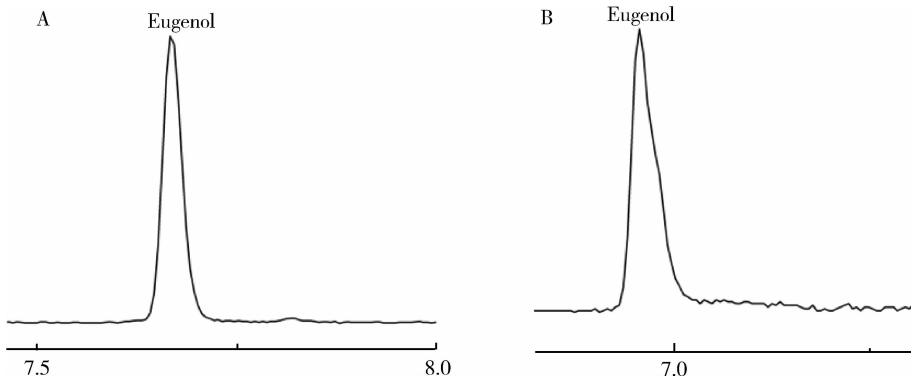


图4 丁香酚在色谱柱 DB-17ms(A) 和 HP-5ms(B) 的谱图

Fig. 4 Chromatogram of eugenol on DB-17ms(A) and HP-5ms(B)

2.3 检测限和定量限

通常用信噪比 (signals to noise ratio, S/N) 来考察检测方法的灵敏度,以 3 倍信噪比定义方法检测限,10 倍信噪比定义方法定量限。本研究以丁香酚加标浓度为 $1.00 \mu\text{g}/\text{L}$ 的信号响应考察方法检测限。噪音时间点选取 6.8 ~ 8.1 min 之间 (图 5 中基线标黑部分),信噪比由 Masshunter 工作站软件计算得出。结果显示,加标量均为 $1.00 \mu\text{g}/\text{L}$ 的 3 个平行 A、B 和 C 的平均信噪比为 14.6 (图 5)。依此计算得出本方法的检测限为 $0.21 \mu\text{g}/\text{L}$,定量限为 $0.68 \mu\text{g}/\text{L}$ 。与单级质谱相比,串联质谱采用 MRM 模式可显著降低背景噪声进而提高灵敏度。Quintana 等^[25] 研究水中天然和合成激素测定方法时发现,串联质谱的灵敏度明显高于单级质谱,定量限为单级质谱的 1/2。

2.4 线性方程

本方法以丁香酚标准溶液添加于待测水样中,经乙酸乙酯提取并定容,配制成标准工作溶液,浓度范

围为 $1.00 \sim 200.00 \mu\text{g}/\text{L}$ 。结果显示,线性方程为 $y = 14.65x - 7.23$,线性相关系数 r 为 0.999 4,表明浓度范围内丁香酚信号响应线性良好。

2.5 回收率及精密度

本研究采用 3 个浓度 6 个水平加标实验 (表 2),对方法的加标回收率和精密度进行考察。结果显示,各浓度组的回收率范围在 98.6% ~ 104.0%。相对标准偏差范围为 2.46% ~ 5.48%。因此,方法的准确度和精密度满足水中丁香酚残留测定的要求。

2.6 样品前处理

本研究选取样品量为 20 mL,与通常情况下测定水样所需的量不同。这是由方法的灵敏度和丁香酚实际应用的浓度决定的。研究显示,丁香酚作为麻醉剂对成鱼达到麻醉效果的浓度从 40 至 $200 \text{ mg}/\text{L}$ 不等^[10, 12, 26-30]。因此,根据本方法的灵敏度,取用 20 mL 来分析丁香酚在成鱼流通环节用水中的残留完全满足要求。

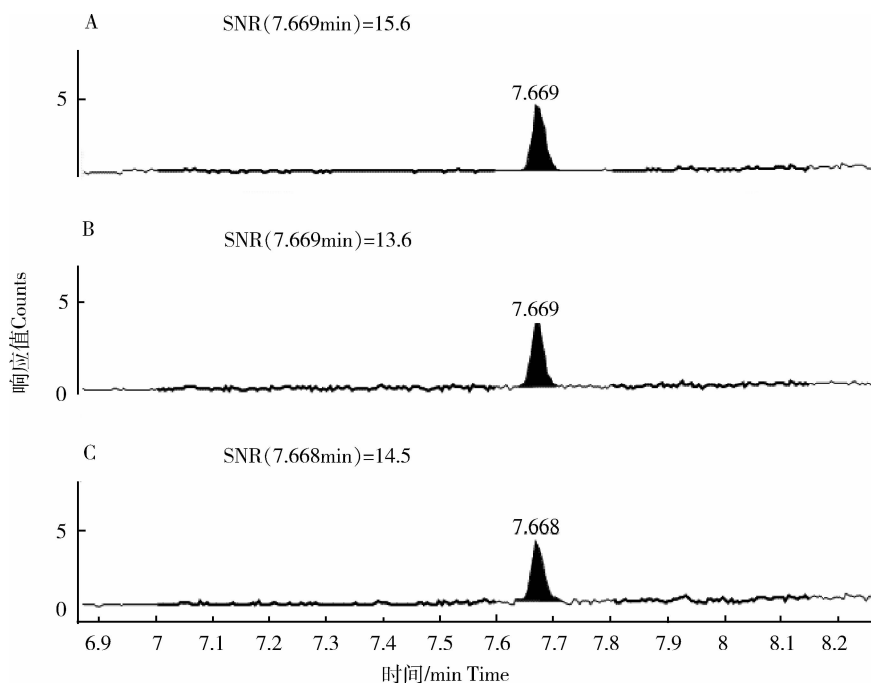


图5 A、B、C 3 平行加标量均为 $1.00 \mu\text{g}/\text{L}^{-1}$ 时丁香酚信噪比

Fig. 5 Ratio of signal to noise for eugenol spiked at $1.00 \mu\text{g}/\text{L}^{-1}$ for A, B and C respectively

表2 丁香酚测定方法回收率和精密度

Tab.2 The recovery and precision for eugenol determination in water

加标量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ Spiking concentration	检测值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ Detection value	平均值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ Average	回收率/% Recovery	相对标准偏差/% RSD
5.00	4.90	4.93	98.6	2.46
	4.78			
	4.55			
	5.18			
	5.20			
	4.95			
10.00	10.60	10.40	104.0	5.48
	11.20			
	9.80			
	10.20			
	10.80			
	9.78			
100.00	106.00	103.00	103.0	4.12
	104.00			
	96.70			
	108.00			
	102.00			
	99.90			

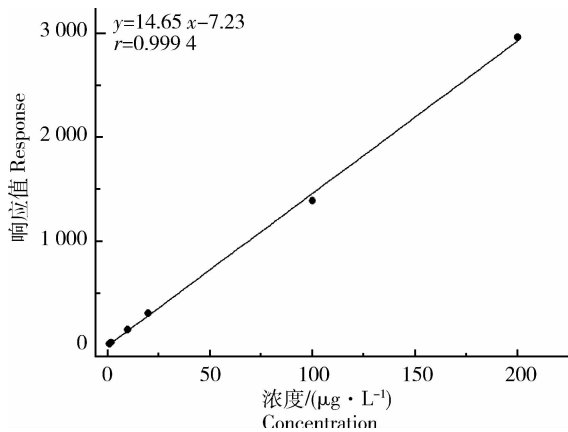


图6 丁香酚标准工作曲线

Fig. 6 Calibration curve for eugenol determination

流通环节中为提高运输鱼的成活率,均采用清洁干净的水(地下水、井水或充分曝氧处理的自来水)。因此,样品前处理净化的压力小,主要是选择提取效率高的有机溶剂。由于丁香酚难溶于水(20℃,溶解度为1.85 mg/L^[3]),易溶于甲醇、乙醇和乙酸乙酯等有机溶剂。由于甲醇、乙醇与水混溶,因此提取溶剂考虑二氯甲烷、乙酸乙酯和正己烷。结果显示,正己烷作为提取剂时回收率范围在50%左右,这可能由于正己烷的极性与丁香酚相差较大。二氯甲烷和乙酸乙酯提取时回收率满足要求。但是,考虑到静置分层后提取液的转移和化学试剂对人体的危害,本研究选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

3 结论

研究结果显示,本方法在1.00~200.00 µg/L浓度范围内丁香酚信号响应线性良好,回收率范围98.6%~104.0%,平行样品相对标准偏差范围2.46%~5.48%。因此,无论是准确度,还是精密度,均满足流通环节水体中丁香酚残留的测定要求。当然,方法还存在不足,仅建立了丁香油中丁香酚成分的检测方法。丁香油中虽然主要成分为丁香酚(85%~95%),但是还包括异丁香酚和甲基丁香酚。其中,甲基丁香酚是已经被确认为基因性致癌物(genotoxic carcinogen)^[3,5],被IARC划分为2B类致癌物质^[31]。研究表明,一定剂量的异丁香酚对Sprague-Dawley(CD)鼠产生发育毒性^[32]。因此,下一步有必要深入研究丁香酚及其同系物的多残留检测方法,有助于更加明确地排查和预防丁香酚类化合物的人体暴露风险。

参考文献:

- [1] Becker A G, Parodi T V, Heldwein C G, et al. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba* [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2012, 38(3):789-796.
- [2] Guenette S A, Helie P, Beaudry F, et al. Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*) [J]. *Vet Anaesth Analg*, 2007, 34(3):164-170.
- [3] European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance eugenol [J]. *EFSA J*, 2012, 10(11):2914-2960.
- [4] Thompson D C, Barhoumi R, Burghardt R C. Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1998, 149(1):55-63.
- [5] National Institutes of Health. National toxicology program technical report series no. 223 carcinogenesis studies of eugenol [R]. North Carolina: U. S. Department of Health and Human Services (1983-12) [2014-04-30]. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr223.pdf.
- [6] International Agency for Research on Cancer (IARC). Summaries & evaluations volume 36: eugenol [EB/OL]. (1998-04-20) [2014-04-30]. <http://archive-chem.org/page/504645/2012-10-23/http://www.inchem.org/documents/iarc/vol36/eugenol.html>.
- [7] Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series 934: evaluation of certain food additives, page 49-54 [R]. Geneva: World Health Organization, 2006. [2014-04-30]. http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_934_eng.pdf.
- [8] U. S. Food and Drug Administration. USFDA Guidance for Industry Concerns Related to the use of Clove Oil as an Anesthetic for Fish [EB/OL] (2007-04-24) [2014-04-30]. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm052520.pdf>.
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2007 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
- [10] 陈德芳,汪开毓,廖国平,等. 丁香酚对斑马鱼麻醉效果的研究[J]. *水产科技情报*, 2013, 40(4):193-198.
- [11] 黄雪芹,孔杰,张天时,等. 丁香酚对中国对虾幼虾麻醉效果的研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(22):9572-9574.
- [12] 刘长琳,李继强,陈四清,等. 丁香酚麻醉半滑舌鳎

- 成鱼的试验研究[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(3):50-56.
- [13] 游欣欣, 曾凡荣, 王军, 等. 丁香酚对日本囊对虾麻醉效果的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2010, 49(6):893-896.
- [14] 赵艳丽, 杨先乐, 黄艳平, 等. 丁香酚对大黄鱼麻醉效果的研究[J]. 水产科技情报, 2002, 29(4):163-165.
- [15] Fischer I U, Dengler H J. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of eugenol in body fluids[J]. J Chromatogr A, 1990, 525(2):369-377.
- [16] Myint S, Daud W R, Mohamad A B, et al. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves[J]. J Chromatogr B, 1996, 679(1/2):193-195.
- [17] 李得恩. 保健食品中丁香酚的毛细管气相色谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(7):574-574.
- [18] 徐本明. 气相色谱法测定牙痛水中樟脑和丁香酚的含量[J]. 色谱, 1990, 8(5):339-340.
- [19] 张忠, 任飞, 张盼. 液-液萃取-液相色谱-串联质谱法测定“地沟油”中辣椒碱类化合物及丁香酚[J]. 色谱, 2012, 30(11):1108-1112.
- [20] 赵祥升, 黄立标, 杨海建, 等. GC法同时测定肉豆蔻中丁香酚、异丁香酚、肉豆蔻醚和榄香脂素的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9):1569-1573.
- [21] 周相娟, 江改青, 李伟. 气相色谱-质谱法测定香水中的甲基丁香酚[J]. 分析试验室, 2013, 32(5):104-106.
- [22] 戴素贤, 穆显良. 不同极性色谱柱对茶叶香气物质分离的影响[J]. 广东茶业, 2002, (5):15-16.
- [23] 宋淑玲, 胡蔻蔻, 饶竹. 进样溶剂极性对地下水中有有机氯农药色谱行为的影响[J]. 岩矿测试, 2009(1):21-24.
- [24] 唐双双. 色谱柱极性对测定食用油中溶剂残留的影响[J]. 农业机械, 2013, 4(11):51-52.
- [25] Quintana J B, Carpinteiro J, Rodriguez I, et al. Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection[J]. J Chromatogr A, 2004, 1024(1/2):177-185.
- [26] 蔡净, 董宏标, 王军, 等. 浓度和温度对丁香酚麻醉日本囊对虾效果的影响[J]. 海洋科学, 2012, 36(3):29-36.
- [27] 陈德芳, 汪开毓, 肖丹, 等. 丁香酚对鲫鱼麻醉效果的研究[J]. 水产科技情报, 2010, 37(6):288-291.
- [28] 何新龙, 傅洪拓, 龚永生, 等. 丁香酚对日本沼虾麻醉效果的研究[J]. 中国农学通报, 2007, 23(9):620-623.
- [29] 孟庆磊, 董学飒, 朱永安, 等. 丁香酚对澳洲长鳍鳎麻醉效果的研究[J]. 农学学报, 2011, 1(9):46-50.
- [30] 张富林, 吕世明, 韩俊伟. 丁香酚对鲤的麻醉作用[J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(6):504-507.
- [31] International Agency for Research on Cancer (IARC). Summaries & evaluations volume 101: isoeugenol [EB/OL]. (2004-09-17) [2014-06-29]. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-013.pdf>.
- [32] George J D, Price C J, Marr M C, et al. Evaluation of the developmental toxicity of isoeugenol in Sprague-Dawley (CD) rats[J]. Toxicol Sci, 2001, 60(1):112-120.

Determination of eugenol in water using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry

KE Changliang, LIU Qi, CHEN Jiewen, GAN Juli, CHEN Peiji, LI Liudong*

(Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture; Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: In order to investigate the potential risk of anesthetic application in fish transportation, the method was developed to determine residue of eugenol in water. The target compound in water sample was extracted using ethyl acetate, and then conducting the qualitative and quantitative determination by using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). As shown, within 1.00~200.00 $\mu\text{g/L}$ concentration range of the standard curve equation $y = 14.65x - 7.23$, correlation coefficient (r) is 0.9994, the linear fit is good. While spiked concentration from 5.00 to 100.00 $\mu\text{g/L}$, the recoveries of eugenol ranged from 98.6% to 104%, and the relative stand-

ard deviation (RSD) were ranged from 2.46% to 5.48%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were 0.21 and 0.68 $\mu\text{g/L}$, respectively. It can be concluded that the method is accurate, simple, fast and qualified to detect eugenol residue in water during fish transporting. [Chinese Fishery Quality and Standards, 2014, 4(4):49-55]

Key words: eugenol; GC-MS/MS; water; anesthetic

Corresponding author: LI Liudong, 168LLD@163.com



《中国渔业质量与标准》刊期变更启事

《中国渔业质量与标准》是由农业部主管、中国水产科学研究院主办的学术刊物,自2014年起,由季刊变更为双月刊,每逢双月出版。

本刊发表渔业领域质量、食品安全和标准等相关研究方向的学术论文,内设栏目包括质量安全监管、标准研究、风险评估、检验与检测、质量认证、病害与渔药、环境质量、生产过程质量和产品质量等。对于国家自然科学基金或其他重点科研项目资助的论文,经专家评审确为高水平的,将优先发表,并适当提高稿酬。另外,论文一经录用,可应作者要求在中国知网上进行优先数字出版。

欢迎广大作者踊跃投稿。

网 址: www.cafsqs.com

邮 箱: cafsqs@cafs.ac.cn

电 话: 010-68690728

地 址: 北京丰台区永定路南青塔150号《中国渔业质量与标准》编辑部

邮 编: 100141