

# 5种丁香酚类化合物的电喷雾质谱裂解规律研究

陈文君<sup>1,2</sup>, 刘平<sup>1</sup>, 范赛<sup>1</sup>, 林雨青<sup>2</sup>, 赵榕<sup>1\*</sup>

(1. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013; 2. 首都师范大学化学系, 北京 100048)

**摘要:** **目的** 研究5种渔用麻醉剂的电喷雾质谱裂解规律。**方法** 采用电喷雾离子源(ESI源), 对丁香酚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚、乙酰基异丁香酚和MS-222进行质谱分析。根据结构分为正、负2种离子检测方式(ESI<sup>+/−</sup>), 含有酚羟基的丁香酚采用负离子检测方式, 其余4种化合物采用正离子检测方式。**结果** 在正、负离子检测模式下, 5种渔用麻醉剂准分子离子分别为[M+H]<sup>+</sup>和[M-H]<sup>−</sup>。对准分子离子进行碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID), 得到特征离子碎片。分析了5种化合物在相应离子模式下的电喷雾质谱裂解途径。**结论** 本研究所提出的电喷雾质谱裂解规律, 可为同类型分子结构的渔用麻醉剂的结构分析和鉴定研究提供了参考依据。

**关键词:** 渔用麻醉剂; 丁香酚; MS-222; 电喷雾质谱; 裂解规律

## Fragmentation pattern of 5 kinds of eugenol compounds by electrospray ionization mass spectrometry

CHEN Wen-Jun<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>1</sup>, FAN Sai<sup>1</sup>, LIN Yu-Qing<sup>2</sup>, ZHAO Rong<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China; 2. Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the fragmentation pathways of 5 kinds of fish anesthetics by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). **Methods** The mass spectrometry of eugenol, methyl-eugenol, methyl-isoeugenol, acetyl-isoeugenol and MS-222 were performed by electrospray ionization source. According to the structure, the detection was divided into positive and negative ion detection methods (ESI<sup>+/−</sup>), eugenol containing phenolic hydroxyl group was tested by negative ion, and the other four compounds were tested by positive ion detection. **Results** In the positive and negative ion detection mode, the 5 kinds of fishery anaesthetic excimer ions were [M+H]<sup>+</sup> and [M-H]<sup>−</sup>. The characteristic fragment ions were gotten after collision-induced dissociation. The fragmentation pathways of 5 kinds of fish anesthetics were analyzed. **Conclusion** The investigation of the fragmentation mechanism of 5 kinds of fish anesthetics can provide references for structural analysis and detection of fish anesthetics with the same type of molecular structure.

**KEY WORDS:** fish anesthetics; eugenol; MS-222; electrospray ionization; fragmentation mechanism

**基金项目:** 北京市疾病预防控制中心 北京市预防医学研究中心科研项目培育专项(2016-BJYJ-07)、北京高等学校高水平人才交叉培养“实培计划”项目-大学生毕业设计(科研类)专项资金项目(2016年)

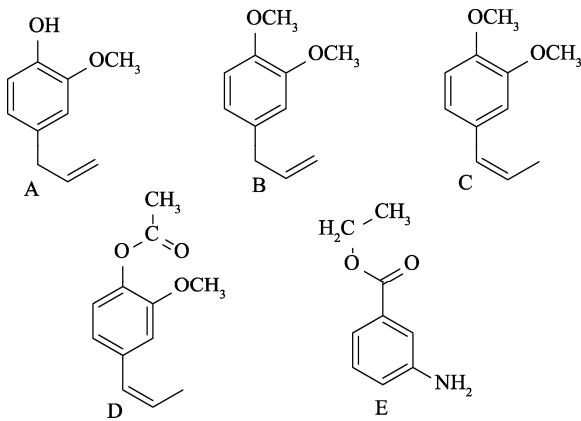
**Fund:** Supported by Beijing Center for Disease Control and Prevention-Beijing Research Center of Preventive Medicine Special Training for Scientific Research Projects (2016-BJYJ-07) and Beijing Colleges and Universities Crossing Fostering of Talents “Practical Training Projects”-College Students Graduation Projects (Scientific Research)-2016

**\*通讯作者:** 赵榕, 主任技师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: lxyue@yeah.net

**\*Corresponding author:** ZHAO Rong, Chief Technician, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China. E-mail: lxyue@yeah.net

1 引言

丁香酚类化合物, 主要包括丁香酚、异丁香酚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚、乙酰基异丁香酚等<sup>[1]</sup>, 具有麻醉、抑菌、抗氧化等多种药理作用<sup>[2]</sup>。与其他种类麻醉剂相比, 渔用麻醉剂具有成本低、效果好<sup>[3]</sup>以及残留期短<sup>[4]</sup>的特点。澳大利亚、新西兰、智利等国家已将丁香酚类化合物列为合法的渔用麻醉剂, 并制定了限量标准及休药期<sup>[5]</sup>。但国际上对丁香酚类化合物作为食用鱼麻醉剂的安全性问题存在争议。如美国国家毒理学计划认为丁香酚是可疑致癌物<sup>[6]</sup>。我国已批准使用的 7 类 104 种水产养殖用药中并不包括渔用丁香酚类麻醉剂药物, 且我国对渔用麻醉剂的使用尚无明确规定, 因此, 对丁香酚类化合物的快速鉴定和分析显得尤为重要。MS-222 是 3-氨基苯甲酸乙酯的甲基磺酸盐的俗称, 别名鱼安定<sup>[7]</sup>, 是一种常见的渔用麻醉剂<sup>[8]</sup>。在美国和加拿大, MS-222 是唯一合法使用的麻醉剂<sup>[9]</sup>。电喷雾质谱 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)<sup>[10]</sup>是一种软电离方法, 电喷雾可以得到化合物的相对分子质量, 与质谱联用则能得到较为丰富的碎片结构信息<sup>[11-13]</sup>, 在化合物结构解析中的应用很广泛<sup>[14-16]</sup>。本文以丁香酚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚、乙酰基异丁香酚和 MS-222 为例, 探讨 5 种渔用麻醉剂的 ESI-MS/MS 裂解途径, 并根据 CID 碰撞后的碎片信息推测其裂解规律, 为快速鉴定和痕量分析该 5 种渔用麻醉剂提供参考。5 种化合物结构如图 1 所示。



A.丁香酚; B.甲基丁香酚; C.甲基异丁香酚;  
D.乙酰基异丁香酚; E.MS-222

图 1 5 种渔用麻醉剂的结构

Fig. 1 Structures of 5 kinds of fish anesthetics

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

UPLC-Xevo TQ-D 超高效液相色谱-电喷雾-串联四极

杆质谱仪(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

2.2 材料与试剂

丁香酚(xStandard™, CAS: 97-53-0, 纯度: 98.5%, DiKMA 公司); 甲基丁香酚(CAS: 93-15-2, 纯度: 99.5%, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 甲基异丁香酚(CAS: 93-16-3, 纯度: 99%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 乙酰基异丁香酚(CAS: 93-29-8, 纯度: ≥ 97.0%, 美国 Fluka 公司); MS-222(CAS: 886-86-2, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲醇(色谱纯, Fisher Scientific 公司)。

2.3 样品制备及处理

各称取 10 mg 标准品, 用甲醇定容到 10 mL, 制得 1 mg/mL 的标准储备液。取 100 μL 的 1 mg/mL 的标准储备液, 用甲醇定容到 10 mL, 制得 10 μg/mL 的标准溶液。依次取不同单标的甲醇溶液(10 μg/mL), 经流动注射泵进入 ESI 离子源, 进行电喷雾质谱碎片离子扫描分析。

2.4 质谱条件

通过流动注射泵系统进样 10 μg/mL 以乙腈-水溶液(50:50, V:V)为溶剂的单标标准溶液, 并同时开启液相色谱, 设定其流动相为乙腈-水溶液(50:50, V:V), 流速为 100 μL/min。在此条件下对质谱参数如毛细管电压、锥孔电压、干燥器气流速等参数进行了正负离子优化, 优化结果见表 1。毛细管电压 2.50 kV; 脱溶剂气流 N<sub>2</sub>, 流速 800 L/h; 脱溶剂温度 500 °C; 锥孔气流 N<sub>2</sub>, 流速 50 L/h; 离子源温度 150 °C; 碰撞气体: 氩气。通过 MS scan 扫描确定母离子, 在确认了母离子之后, 再将碰撞能量由低到高进行 Daughter scan 扫描, 母离子强度逐渐降到最低, 碎片也呈现规律性变化, 选取强度最高的 2~3 个作为定性离子进行裂解途径分析。

表 1 5 种渔用麻醉剂的质谱参数(Waters Xevo TQ-D)  
Table 1 Mass spectrometric parameters of 5 kinds of fish anesthetics (Waters Xevo TQ-D)

| 渔用麻醉剂   | ESI   | 母离子<br>( <i>m/z</i> ) | 子离子<br>( <i>m/z</i> ) | 锥孔电压<br>(V) | 碰撞能量<br>(eV) |
|---------|-------|-----------------------|-----------------------|-------------|--------------|
| 丁香酚     | (-)   | 163                   | 148                   | 20          | 24           |
|         |       |                       | 121<br>93             |             |              |
| 甲基丁香酚   | (+) ) | 179                   | 164                   | 14          | 12           |
|         |       |                       | 138                   |             |              |
| 甲基异丁香酚  | (+) ) | 179                   | 164                   | 14          | 15           |
|         |       |                       | 151                   |             |              |
| 乙酰基异丁香酚 | (+) ) | 207                   | 165                   | 14          | 15           |
|         |       |                       | 137                   |             |              |
| MS-222  | (+) ) | 166                   | 138                   | 24          | 18           |
|         |       |                       | 94                    |             |              |
|         |       |                       | 77                    |             |              |

### 3 结果与分析

根据5种渔用麻醉剂的结构差异, 检测方式分为正、负2种离子形式; 第1种为含有酚羟基的丁香酚, 其较易失去一个质子得到 $[M-H]^-$ 准分子离子, 在负离子检测方式下灵敏度较高; 第2种为不含酚羟基的甲基丁香酚、甲基异丁香酚、乙酰基异丁香酚和MS-222, 在正离子检测方式下响应较好, 选择正离子检测方式进行质谱分析。

#### 3.1 丁香酚的裂解途径分析<sup>[10]</sup>

丁香酚含有酚羟基, 属于弱极性化合物, 在ESI离子源方式下易失去一个质子, 形成 $m/z$  163  $[M-H]^-$ 的准分

子离子, 故采用负离子模式进行检测。值得注意的是, 丁香酚 $C_4$ 位烯丙基的双键不能与苯环形成 $\pi-\pi$ 共轭, 在碰撞诱导解离下, 双键容易丢失。以 $m/z$  163  $[M-H]^-$ 准分子离子为母离子, 进行碰撞诱导解离, 得到丁香酚的离子碎片, 见图2。该条件下 $m/z$  163母离子发生碎裂, 产生一系列碎片离子, 分别为 $m/z$  148、 $m/z$  121、 $m/z$  93。对质谱图中碎片峰进行质谱解析。首先,  $[M-H]^-$ 母离子 $C_2$ 位上的甲氧键断裂失去 $CH_3\cdot$ 得到 $m/z$  148碎片峰; 继续碰撞, 失去 $C_4$ 位上的乙烯基, 得到 $m/z$  121碎片峰。最后在O的诱导下发生 $\alpha$ 裂解, 丢失CO中性分子, 得到 $m/z$  93碎片峰。其可能的质谱碎裂途径, 见图3。

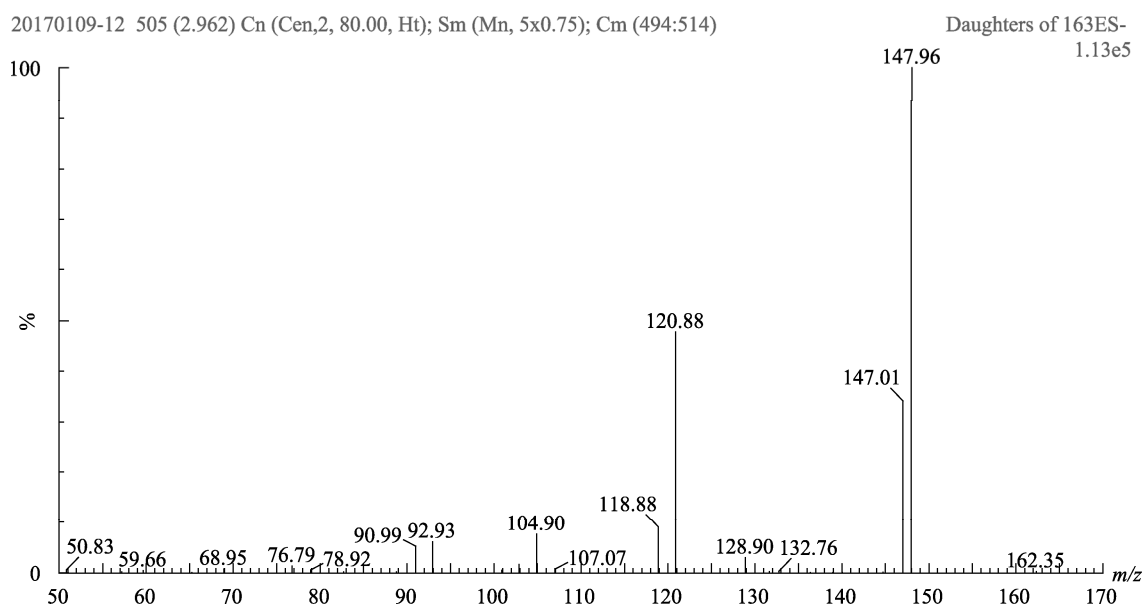


图2 丁香酚的二级质谱图

Fig.2 ESI-MS/MS spectrum of eugenol

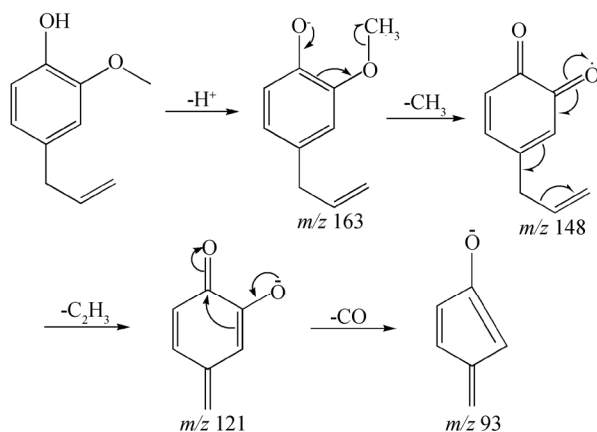


图3 丁香酚的裂解规律

Fig.3 Fragmentation pathways of eugenol

### 3.2 甲基丁香酚的裂解途径分析

甲基丁香酚  $-\text{OCH}_3$  的 O 上有两对孤对电子, 能接受  $\text{H}^+$  得到  $m/z$  179  $[\text{M}+\text{H}]^+$  准分子离子, 故采用正离子模式检测, 具有较高灵敏度。以  $m/z$  179  $[\text{M}+\text{H}]^+$  为母离子进行碰撞诱导解离, 得到 2 个丰度较高的碎片离子, 分别为  $m/z$  164、 $m/z$  138, 二级质谱图见图 4。经推测,  $m/z$  164 碎

片离子是在  $\text{O}^+$  的诱导下, 母离子发生  $\alpha$  解离, 失去  $\text{C}_2$  位上  $\text{CH}_3\cdot$  得到的; 在氦气的继续碰撞下, 烯丙基的端 H 重排到  $\text{C}_3$  位, 引起电子云的转移, 丢失  $\text{CH}\equiv\text{CH}$  分子得到  $m/z$  138 碎片离子。可能是由于烯丙基上的双键未与苯环形成共轭体系, 双键易丢失。其可能的质谱碎裂途径, 见图 5。

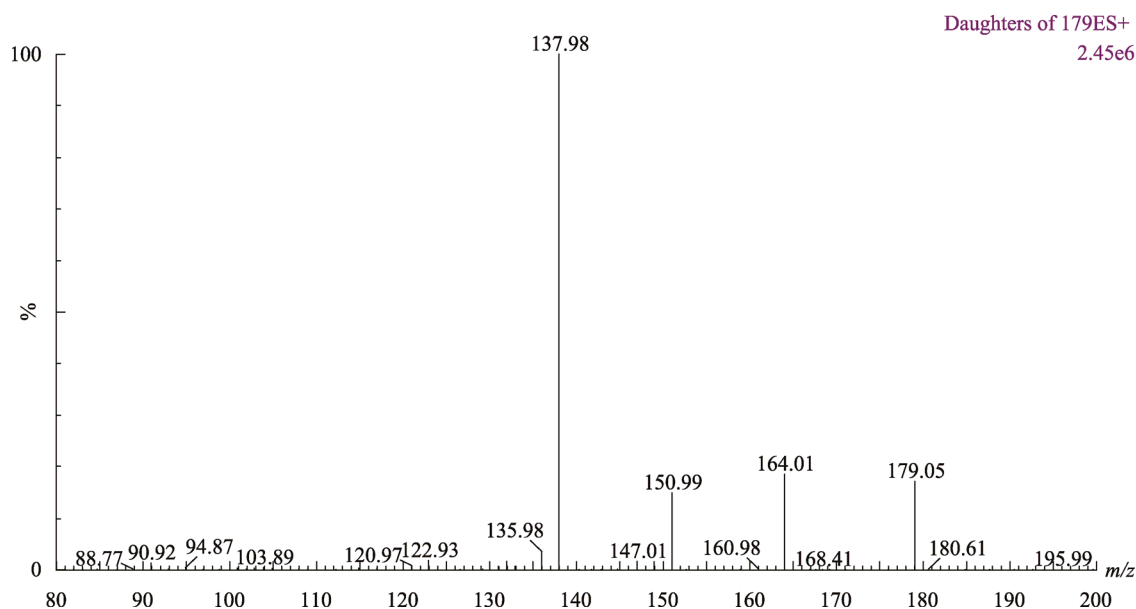


图 4 甲基丁香酚的质谱图

Fig. 4 ESI-MS/MS spectrum of methyl-eugenol

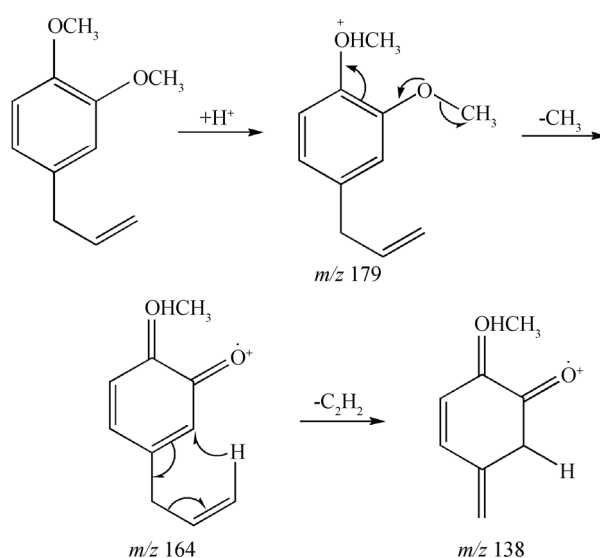


图 5 甲基丁香酚的裂解规律

Fig. 5 Fragmentation pathways of methyl-eugenol

### 3.3 甲基异丁香酚的裂解途径分析

甲基异丁香酚中, 丙烯基的双键与苯环  $\pi$ - $\pi$  共轭, 形成稳定的共轭体系, 导致双键不易丢失。在 ESI 正离子模式下, 得到甲基异丁香酚准分子离子峰  $m/z$  179  $[M+H]^+$ 。对其进行碰撞诱导解离, 二级质谱图中出现 2 个丰度较高的碎片离子

$m/z$  分别为 164 和 151, 见图 6。推测为在  $O^+$  的诱导下, 发生  $\alpha$  解离。C<sub>2</sub> 位甲氧基丢失  $CH_3$ , 得到  $m/z$  164 碎片离子; 由于丙烯基与苯环形成  $\pi$ - $\pi$  共轭, 双键不易丢失。在氧自由基的诱导下, C<sub>4</sub> 位端 H 发生重排, 引起次甲基的消除反应, 得到  $m/z$  151 碎片离子。其可能的质谱碎裂途径, 见图 7。

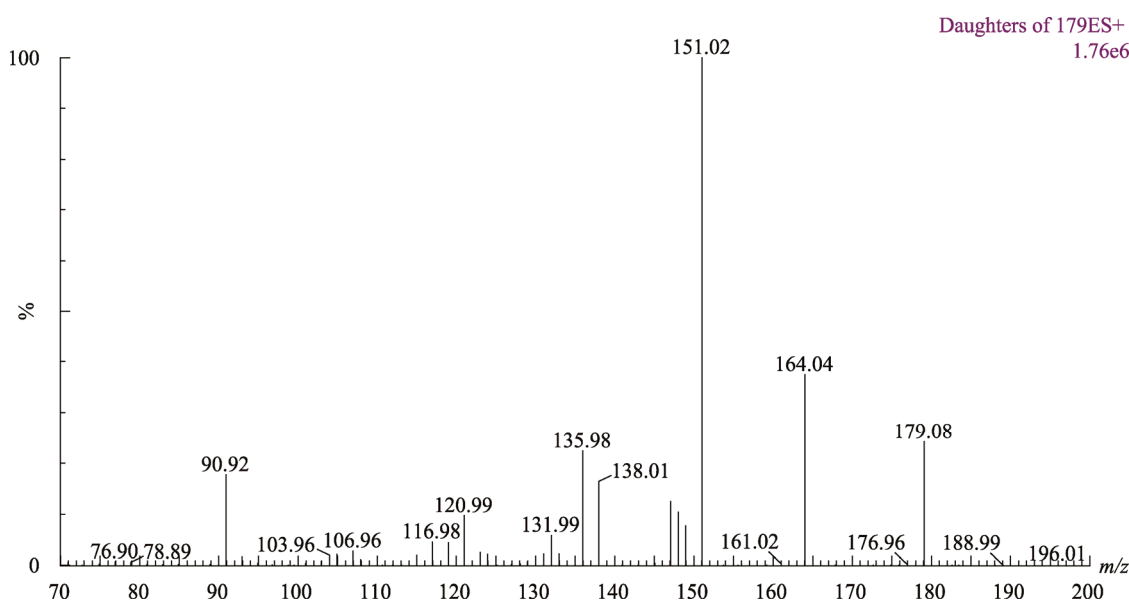


图 6 甲基异丁香酚的二级质谱图

Fig. 6 ESI-MS/MS spectrum of methyl-isoeugenol

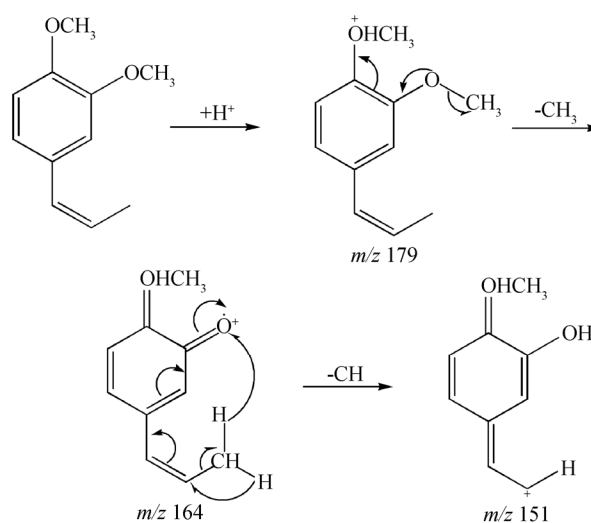


图 7 甲基异丁香酚的裂解规律

Fig. 7 Fragmentation pathways of methyl-isoeugenol

3.4 乙酰基异丁香酚的裂解途径分析

乙酰基异丁香酚中, 乙酰基的羰基氧 O-n 电子能接受  $H^+$ , 在 ESI 正离子模式下, 得到  $m/z$  207  $[M+H]^+$  准分子离子峰。对  $[M+H]^+$  准分子离子进行碰撞诱导解离(CID), 出现 2

个丰度较高的碎片离子, 分别为  $m/z$  165 和  $m/z$  137, 见图 8。推测  $m/z$  165 的来源是羰基氧上  $H^+$  重排, 紧接着发生消除反应丢失  $CH_2=C=O$  形成的碎片峰; 继续碰撞后, 丢失 CO 分子得到  $m/z$  137 碎片峰。其可能的质谱碎裂途径, 见图 9。

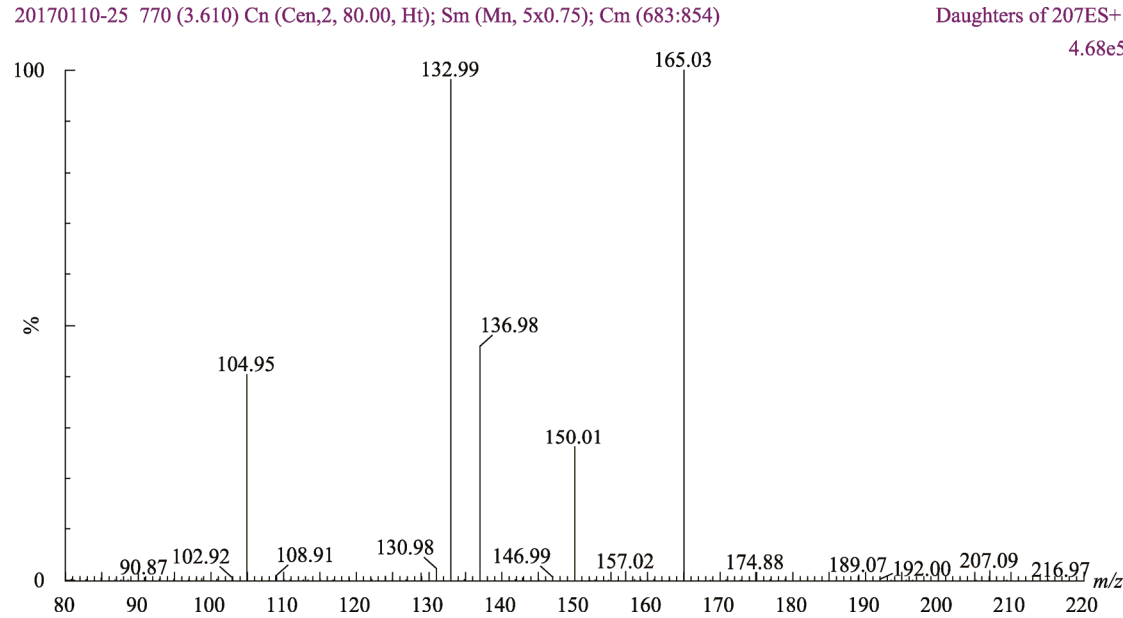


图 8 乙酰基异丁香酚的二级质谱图  
Fig. 8 ESI-MS/MS spectrum of acetyl-isoeugenol

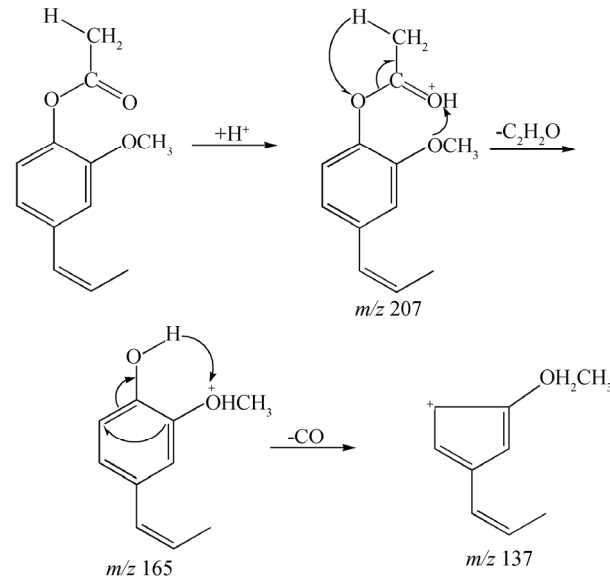


图 9 乙酰基异丁香酚的裂解规律  
Fig. 9 Fragmentation pathways of acetyl-isoeugenol

### 3.5 MS-222 的裂解途径分析

MS-222 分子苯环的大  $\pi$  键、氨基氮 N-n 电子以及氧 O-n 电子形成共轭体系, 分子体系较为稳定。由于其存在  $\pi$  电子和孤对 n 电子, 其电离能较低。在电喷雾离子源下, 氨基氮 N 的 n 电子, 能接受一个  $H^+$  形成  $m/z$  166 $[M+H]^+$  准分子离子。在 ESI 正离子模式下进行碰撞诱导解离 (CID), 得到 3 个丰度较高的碎片离子, 分别为  $m/z$  138、 $m/z$  94、 $m/z$  77, 如图 10 所示。 $m/z$  138 为在羰基氧的诱导下, 甲基上的 H 重排至羰基氧上, 丢失乙烯分子形成

的碎片离子; 氧自由基的强烈配对倾向, 使得  $CO_2$  中性分子丢失, 得到  $m/z$  94 碎片峰; 最后,  $-N^+H_3$  吸引电子转移, 丢失  $NH_3$  分子得到  $m/z$  77 碎片峰。其可能的质谱碎裂途径, 见图 11。

## 4 结 论

本文对丁香酚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚、乙酰基异丁香酚和 MS-222 共 5 种渔用麻醉剂进行 ESI-MS/MS 研究, 根据主要碎片构成情况, 推测了最可能的碎裂途径。

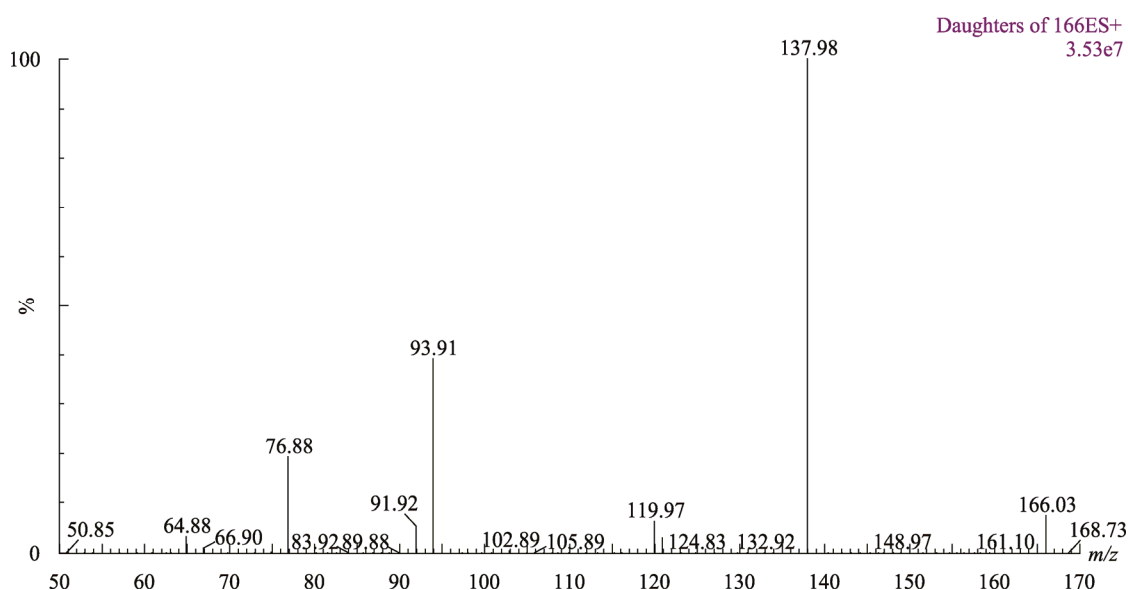


图 10 MS-222 的二级质谱图

Fig. 10 ESI-MS/MS spectrum of MS-222

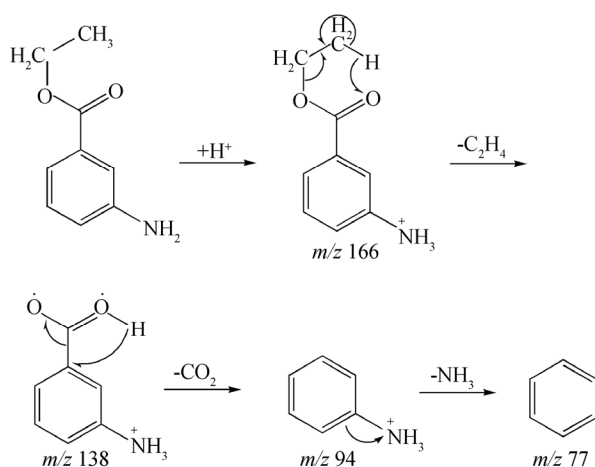


图 11 MS-222 的裂解规律

Fig. 11 Fragmentation pathways of MS-222

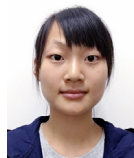
结果表明, 5 种渔用麻醉剂由于结构相似性, 其裂解途径可能具有以下规律: 碰撞诱导解离过程中, 常发生 H 重排, 得到特征碎片离子; 分子离子在二级质谱中易脱去 C<sub>2</sub> 位上的甲基自由基; 丁香酚和甲基丁香酚 C<sub>4</sub> 位烯丙基的双键未与苯环共轭, 易失去乙基; 相反, 甲基异丁香酚和乙酰基异丁香酚 C<sub>4</sub> 位的丙烯基与苯环发生共轭, 分子体系更加稳定, 易失去端甲基。这些质谱特征有助于该 5 种渔用麻醉剂的结构分析和鉴定。

## 参考文献

- [1] 陈焕, 黄和, 高平, 等. 高效液相色谱法测定水产品中丁香酚类麻醉剂的残留量[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(12): 156–160.  
Chen H, Huang H, Gao P, *et al.* Determination of clove phenol drug residues in aquatic products by high performance liquid chromatography [J]. Food Ferment Ind, 2014, 40(12): 156–160.
- [2] 高平, 黄和, 刘文侠, 等. 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定水产品中 4 种丁香酚类化合物[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 56–61.  
Gao P, Huang H, Liu WX, *et al.* Determination of four eugenol derivatives in aquatic products by SPE-HPLC-FLD[J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(1): 56–61.
- [3] Iversen M, Finstad B, McKinley RS, *et al.* The efficacy of metomidate, clove oil, Aquil-S (TM) and Benzoak (R) as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity[J]. Aquaculture, 2003, 221(1–4): 549–566.
- [4] Kildea MA, Allan GL, Kearney RE. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUIL-S (TM) from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*)[J]. Aquaculture, 2004, 232(1–4): 265–277.
- [5] 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.  
Jin Y, He YJ, Cheng B, *et al.* Research on safety of eugenol derivatives anesthetics[J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(1): 33–40.
- [6] Thompson DC, Barhoumi R, Burghardt RC. Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays[J]. Toxicol Appl Pharmacol., 1998, 149(1): 55–63.
- [7] 苏明明, 孙兴权, 杨春光, 等. 渔用麻醉剂 MS-222、丁香酚在鲜活水产品运输中的应用及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 25–29.  
Su MM, Sun XQ, Yang CG, *et al.* Progress of the research and application of fish anesthetics MS-222 and eugenol in fresh seafoods transportation [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(1): 25–29.
- [8] Chambel J, Pinho R, Sousa R, *et al.* The efficacy of MS-222 as anaesthetic agent in four freshwater aquarium fish species [J]. Aquac Res, 2015, 46(7): 1582–1589.
- [9] Dong C, Pan L, He D, *et al.* The Efficacy of MS-222 as anesthetic agent in largemouth bronze gudgeon *coreius guichenoti* [J]. N Am J Aquacult, 2017, 79(1): 123–127.
- [10] 李晋成, 刘欢, 马兵, 等. 丁香酚的电喷雾负离子质谱裂解规律研究[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 11–14.  
Li JC, Liu H, Ma B, *et al.* Cleavage pathways of eugenol by negative electrospray ionization mass spectrometry [J]. Chin Fish Qual Standard, 2013, 3(4): 11–14.
- [11] Scalbert A, Brennan L, Fiehn O, *et al.* Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research [J]. Metabolomics, 2009, 5(4): 435–458.
- [12] 董洁, 冀娇娇, 王加利, 等. N-烷基酰胺类化合物电喷雾质谱裂解机制的研究[J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 83–88.  
Dong J, Ji JJ, Wang JL, *et al.* Fragmentation pathways and patterns of N-alkylamides by ESI-MS<sup>n</sup>[J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2017, 38(1): 83–88.
- [13] 李晋成, 刘欢, 张静, 等. 3-氨基苯甲酸乙酯的电喷雾正离子质谱裂解规律[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3615–3619.  
Li JC, Liu H, Zhang J, *et al.* The cleavage pathways of 3-aminobenzoic acid ethyl ester by positive electrospray ionization mass spectrometry[J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(11): 3615–3619.
- [14] 谭鹏, 邓欣祺, 李飞, 等. 乌头碱电喷雾质谱裂解机制的研究[J]. 中国测试, 2014, 40(1): 43–46.  
Tan P, Deng XQ, Li F, *et al.* Study on fragmentation behavior of aconitine by ESI-MS<sup>n</sup>[J]. Chin Meas Test, 2014, 40(1): 43–46.
- [15] 王春国, 刘勇, 石晋丽, 等. 5 种缬草素类成分电喷雾质谱裂解规律研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 578–584.  
Wang CG, Liu Y, Shi JL, *et al.* Mass spectrum characterization of five valopatriates by electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Chin J Chin Mater Med, 2013, 38(4): 578–584.
- [16] 詹雪艳, 张燕玲, 张加余, 等. 积雪草苷和羟基积雪草苷的电喷雾质谱裂解机制研究[J]. 质谱学报, 2015, 36(4): 289–295.  
Zhan XY, Zhang YL, Zhang JY, *et al.* Fragmentation pathways and patterns of asiaticoside and madecassoside in ESI-MS<sup>n</sup>[J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2015, 36(4): 289–295.

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



陈文君, 主要研究方向为分析检测。  
E-mail: 1285932309@qq.com



赵 榕, 主任技师, 主要研究方向  
为食品理化检验。  
E-mail: lxyue@yeah.net