

微波蒸馏-顶空固相微萃取-气质联用检测鱼体中土霉味化合物

张 婷 李 林 陈 伟 宋立荣

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要:采用微波蒸馏-顶空固相微萃取-气质联用检测鱼体中常见的两种土霉味化合物,即 2-甲基异茨醇 (2-MB) 和土腥素 (Geosmin)。研究并优化了微波蒸馏萃取过程的关键参数 (微波蒸馏时间、载气流量),结果表明微波蒸馏 6 min,载气流 70 mL/min 为土霉味化合物微波蒸馏萃取的最佳条件。在此优化的条件下,土霉味化合物能够充分地从小鱼体中蒸馏出来,再采用顶空固相微萃取的方法使馏分中的土霉味化合物吸附于纤维涂层上,将其在 250 °C 高温下解吸,并用 GC-MS 分析。基于此测定方法,鱼肉中 2-甲基异茨醇和土腥素的检测限均达到 0.1 µg/kg,且其在 1—20 µg/kg 的范围内线性关系良好,相关系数 R 分别达到 0.987、0.995。因此,用该方法分析鱼体中痕量的 (ppb 级) 的土霉味化合物,结果可靠。

关键词:微波蒸馏;顶空固相微萃取;气质联用;土霉味;2-甲基异茨醇;土腥素

中图分类号: Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207 (2009) 03-0449-06

作为世界水环境研究热点及难点之一的水体异味问题,国外自 20 世纪 50 年代就开始了大量的研究。而我国在该领域尤其是水产品异味的研究起步相对较晚,仅开始于 20 世纪初,相关研究工作也涉及较少。但近年来,我国淡水养殖业发展迅速,2007 年淡水养殖总体积已达到 2.8 万亿立方米,居世界第 6 位。由于养殖的淡水鱼常常具有鱼腥味、土霉味,致使不被广大消费者所接收,给水产养殖业造成了巨大的经济损失。因此,在我国加强水体、水产品异味问题的研究势在必行。

土霉味,主要由藻源性的萜类化合物土腥素 (Geosmin) 和 2-甲基异茨醇 (2-Methylisoborneol, 2-MB) 所引起^[1-3],其化学结构相对稳定且难以降解^[4,5]。目前,我国仅有的关于水产品土霉异味的研究^[6,7]只限于感官分析,检测结果粗略分为无异味、异味轻微和异味严重三种程度,均无法做到定量检测。据报道,人对鱼体中土霉味化合物 2-MB 和 Geosmin 的气味阈值 (OTC) 分别为 0.1—0.2 µg/kg 和 0.25—0.5 µg/kg^[8]。由于每个人的味觉程度不同,品尝出的鱼体异味程度也会有所差异^[9],而多人品尝又不是切实可行的方法。因此,建立水产品中痕量异味化合物的灵敏可靠的分析方法,对于我

国开展水体、水产品异味问题的研究及发展异味去除策略都具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 HP6890 GC-5973MSD 气质联用仪 (美国,惠普公司);色谱柱为 HP-5MS, 5% 苯甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱 (30m × 0.25mm × D 0.25 µm film, 美国, J&W)。固相微萃取 SPME 装置、聚二甲基硅氧烷/二乙烯基苯涂层纤维 (65 µm PDMS/DVB)、25 mL 带 PTFE 涂层硅橡胶垫的螺口玻璃瓶均为 Supelco (美国, Sigma-Aldrich) 公司产品。LGWP700 (MS-2040T, 1050W, 中国) 改良微波炉, Pharmacia Biotech MultiTemp II 恒温水浴 (瑞典, Pharmacia Biotech)。2-甲基异茨醇 (2-MB, 100 mg/L)、土腥素 (Geosmin, 100 mg/L)、十氢-1-萘酚 (DHN, 100 mg/L) 为 Supelco (美国, Sigma-Aldrich) 公司试剂; NaCl 为国产分析纯试剂 (99.5%, 中国, 国药沪试), 经 550 °C 烘烤 6 h 后使用。

1.2 微波蒸馏萃取方法 取待测斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 的肌肉部分, 匀浆, 称 10 g 左右, 放入 250 mL 微波萃取瓶中, 用微量进样器向鱼样

收稿日期: 2008-04-25; 修订日期: 2009-02-19

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向性项目 (No. KZCX2-YW-426); 湖北省“十一五”科技攻关项目 (No. 2006AA203A02) 资助

作者简介: 张婷 (1981—), 女, 汉族, 湖北广水市人; 博士; 主要从事藻类生理生态学研究。E-mail: tingzh@ihb.ac.cn

通讯作者: 宋立荣, E-mail: lrsong@ihb.ac.cn

中添加内标物 DHN 使用液 (10 mg/L) 5 μ L, 固定于微波炉中。冷凝循环水浴温度设为 4°C, 载气为氮气, 并用 25 mL 固相微萃取瓶收集经微波蒸馏、冷凝后的水样。微波蒸馏萃取装置 (图 1)。

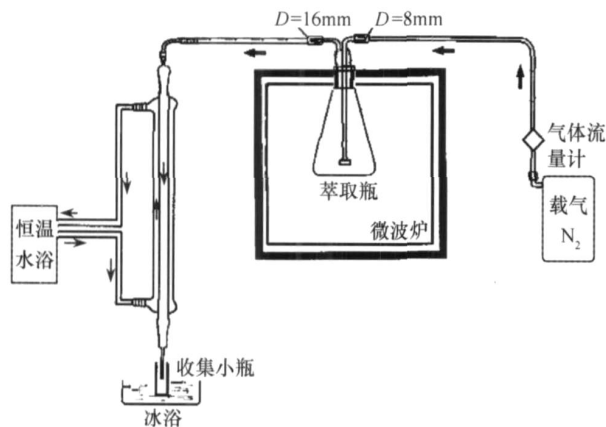


图 1 微波蒸馏萃取装置示意图

Fig. 1 Sketch map of the experiment apparatus form microwave mediated distillation

1.2.1 微波蒸馏时间的优化 向待测鱼肉中添加异味化合物 2-M B、Geosmin 标准品使用液 (10 mg/L) 和内标物 DHN (10 mg/L) 各 5 μ L。混匀, 使上述三种化合物能够充分被鱼肉所吸收。固定微波萃取瓶于微波炉中, 调节载气流量为 80 mL/min, 开启微波蒸馏装置、收集产物, 参照李林等^[8]所建立的方法对异味化合物进行检测。该实验设 8 个时间梯度, 分别为: 1、2、3、4、5、6、7、8 min, 每个时间点三个平行。

1.2.2 载气流量的优化 在优化的微波蒸馏时间条件下, 改变载气流量, 该实验设 6 个载气流量梯度, 分别为 0、20、40、60、80、100 mL/min, 每个载气流量设三个平行。

1.2.3 回归方程的确立 通过对微波蒸馏时间、载气流量的优化, 确定了微波活化萃取方法的最优条件参数。在此基础上, 求解出该方法的回归方程、线性范围、检测限及回收率。本实验设 8 组异味化合物 2-M B、Geosmin 浓度梯度, 依次为: 0.1、0.2、1、2、3、5、10、15 和 20 μ g/kg, 每个浓度设三个平行。

1.3 顶空固相微萃取方法 顶空固相微萃取方法参照李林^[8]的方法进行。

1.4 GC-MS 分析条件 载气: 高纯 He, 恒压 120 kPa; 进样口温度: 250°C; 进样方式: 2min 无分流进样; 程序升温: 初温 60°C, 保持 2min, 以 5°C/min 的速率升至 200°C, 保持 2min, 再以 20°C/min 的速率

升至 250°C, 保持 2min; 传输线温度: 280°C; 离子源温度: 230°C; 电子能量: 70 eV。鉴定鱼样中的未知化合物采用质谱全扫描方式, 质量范围为 40—350 amu。定量测定鱼样中痕量的异味化合物时, 采用质谱选择离子方式, 特征离子 m/z 95、112、136 分别作为 2-甲基异茨醇、土腥素、十氢-1-萘酚的定量离子, 同时检测特征离子 m/z 135、125、121 分别作为两种土霉异味化合物和内标物的监控离子。

1.5 数据分析 所有数据利用 Origin 6.1 (美国, OriginLab Corporation) 进行分析处理。

2 结果

2.1 微波蒸馏时间的优化

结果显示, 异味化合物 2-M B 和 Geosmin 与内标物 DHN 含量的比值 ($M B/DHN$, $Geosmin/DHN$) 与微波蒸馏时间呈二次曲线关系 (图 2), 其回归方程分别为 $Y_{MB/DHN} = 0.48839 + 0.13274x - 0.01105x^2$ 、 $Y_{Geosmin/DHN} = 2.23838 + 0.21104x - 0.01813x^2$, 相关系数的平方 R^2 分别达到 0.959、0.964, 其 p 值均小于 0.001。对上述两个回归方程求出 Y_{max} 所对应的时间点, 发现 $Y_{MB/DHN}$ 和 $Y_{Geosmin/DHN}$ 最大值分别发生在 $x = 6.0$ 和 5.8 时, 即微波蒸馏 6min 和 5.8min 可分别获得异味化合物 2-M B 和 Geosmin 萃取量的最大值。由于对水产品中异味化合物 2-M B 和 Geosmin 的检测是同步进行的, 且 5.8min 与 6min 相差不大, 也可近似看作 6min。因此, 选取 6min 作为微波萃取的最优时间。

2.2 载气流量的优化

结果显示, 异味化合物 2-M B 和 Geosmin 与内标物 DHN 含量的比值 ($M B/DHN$, $Geosmin/DHN$) 与载气流量也呈二次曲线关系 (图 3), 其回归方程分别为 $Y_{MB/DHN} = 0.68739 + 0.00303x - 1.83482 \times 10^{-5}x^2$ 、 $Y_{Geosmin/DHN} = 2.38382 + 0.01288x - 1.0317 \times 10^{-4}x^2$, 相关系数的平方 R^2 分别达到 0.871、0.965, 其 p 值均小于 0.001。同 2.1, 对这两个回归方程求出 Y_{max} 所对应的载气流量, 发现 $Y_{MB/DHN}$ 和 $Y_{Geosmin/DHN}$ 最大值 (0.812, 2.785) 分别发生在 $x = 80$ 和 60 时, 即载气流量为 80 mL/min 和 60 mL/min 时可分别获得异味化合物 2-M B 和 Geosmin 萃取量的最大值。而当 $x = 70$ 时, $Y_{MB/DHN} = 0.810$, $Y_{Geosmin/DHN} = 2.780$, 分别与上述相应的最大值比较, 可见差异并不显著。所以, 可以取其均值 70 mL/min 作为最佳载气流量。

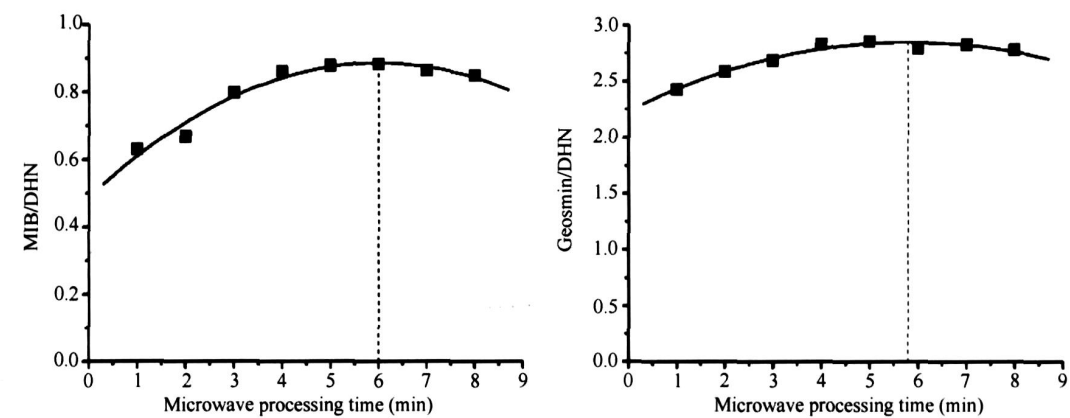


图 2 不同的微波活化时间对异味化合物萃取量的影响
Fig. 2 Effect of different microwave processing time on the extraction of off-flavor compounds

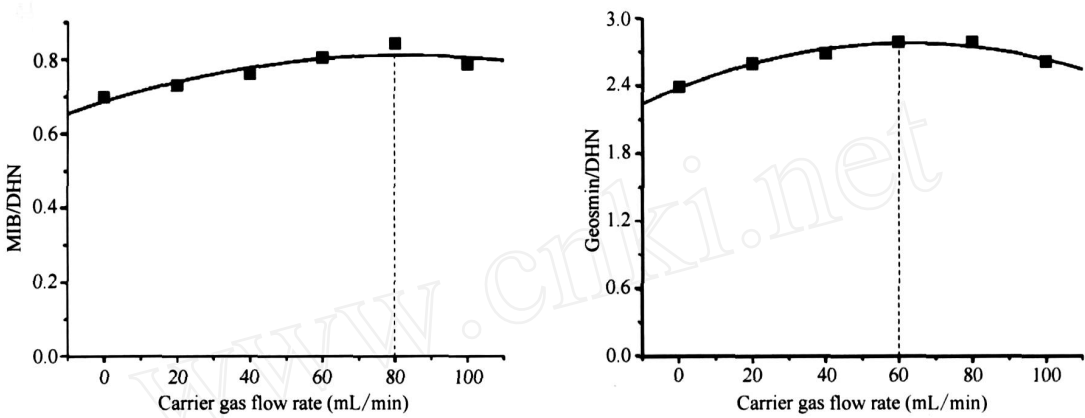


图 3 不同的载气流量对异味化合物萃取量的影响
Fig. 3 Effect of different carrier gas flow rate on the extraction of off-flavor compounds

2.3 方法的回归方程、线性范围及检测限

结果显示,异味化合物 2-M B 和 Geosm in 与内标物 DHN 含量的比值 (M B /DHN, Geosm in /DHN) 与异味化合物浓度呈正相关 (图 4),其线性回归方程分别为 $Y_{\text{M B /DHN}} = 0.18026 + 0.11796 x$ 、 $Y_{\text{Geosm in /DHN}} = 0.45351 + 0.04548 x$,相关系数 R 分

别达到 0.987、0.995,其 p 值均小于 0.0001。此结果表明:MWDE-SPME-GC-MS 方法测定水产品中异味化合物 2-M B 和 Geosm in,在 1—20 $\mu\text{g/kg}$ 线性范围内测量结果准确可靠、灵敏度高,最低检出限 ($S/N = 3$) 达到 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。

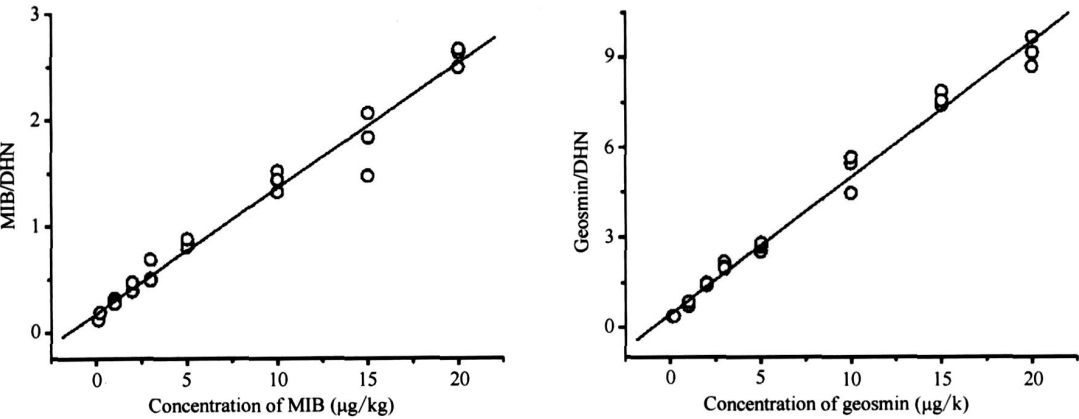


图 4 水产品异味化合物检测方法的线性方程
Fig. 4 Linear equation for the analysis of off-flavors in aquatic products

2.4 样品分析和回收率

采集枣阳熊河水库、新洲养殖鱼池中的鱼样，按优化的微波蒸馏-顶空固相微萃取条件富集鱼体中的异味化合物，再用 GC-MS 分析。回收率是样品中加入一定量土霉异味化合物标准品得到的，

各样品的回收率基本都在 70%—120% 正常范围内 (表 1)。图 5 是经微波蒸馏、顶空固相微萃取后的加标鱼样和异味化合物标准品的色谱峰保留时间和标准质谱图对比，确定了鱼体中土霉异味化合物的存在。

表 1 鱼样分析结果及回收率

Tab. 1 Analytical results of fish samples and recovery

样品 Sample	土霉异味化合物 Earthy-musty compounds	含量 Content (μg/kg)	加入量 Add (μg/kg)	实测量 Found (μg/kg)	回收率 Recovery (%)
1	2-甲基异茨醇 2-MIB	13.80	10.0	21.58	90.67
	土腥素 Geosmin	0	5.0	4.51	90.20
2	2-甲基异茨醇 2-MIB	0	10.0	9.86	98.62
	土腥素 Geosmin	6.76	5.0	10.66	90.65
3	2-甲基异茨醇 2-MIB	9.13	10.0	18.13	94.77
	土腥素 Geosmin	3.32	5.0	7.34	88.22
4	2-甲基异茨醇 2-MIB	12.16	10.0	22.09	99.68
	土腥素 Geosmin	4.40	5.0	9.19	97.77

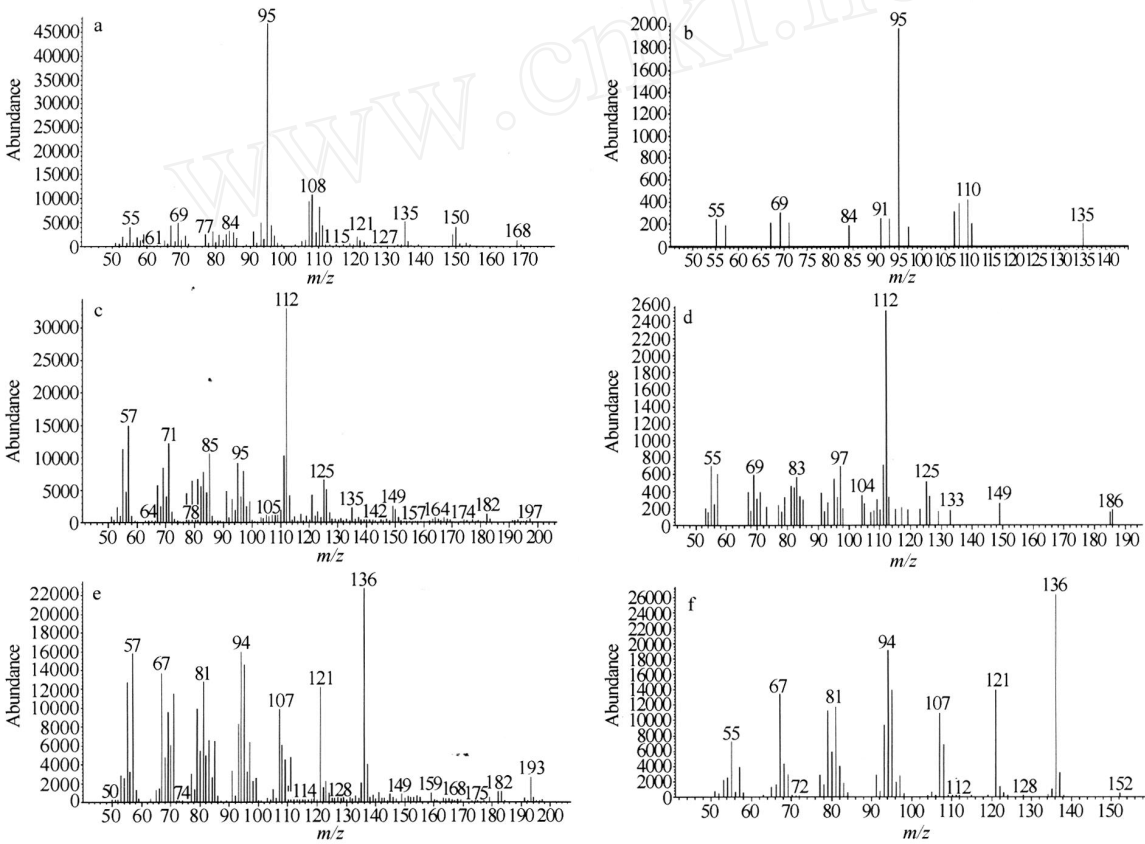


图 5 鱼样中待测成分和对照标准品的质谱图比较

Fig. 5 Comparison of component mass spectrogram of fish sample and that of standards

a. 鱼样中 2-甲基异茨醇; b. 2-甲基异茨醇标准品; c. 鱼样中土腥素; d. 土腥素标准品; e. 鱼样中十氢萘酚; f. 十氢萘酚标准品
a. 2-MIB in fish sample; b. 2-MIB; c. Geosmin in fish sample; d. Geosmin; e. DHN in fish sample; f. DHN

3 讨 论

据悉 40余种藻类,特别是蓝藻,可在水生态系统中产生土霉味化合物 Geosmin 和 2-MB^[10-13]。水体中的这两种土霉味化合物主要通过直接穿越鱼鳃的方式进入鱼体内并积累于脂肪组织中,也可通过鱼类对产土霉异味藻细胞的摄取、皮肤的吸收等方式进入其体内^[14,15]。由于其与脂肪细胞的物理结合作用,使得鱼肉内待分析的异味化合物很难从样品基质中挥发出来,这给水产品异味化合物仪器分析方法的研究带来了一定难度。

李林等的研究所建立的水中异味化合物顶空固相微萃取 气相色谱 质谱 (SPME-GS/MS) 分析方法^[16]虽然能精确有效地分析水中痕量的异味化合物,但并不能有效地萃取复杂样品基质中的化合物,如土壤、肌肉组织等。采用微波蒸馏 (MWDE) 就可以克服这一问题^[17],分析物可以完全从基质中蒸发出来,再经冷凝循环水浴就可收集样品。这一技术有效地将分析物由气相转换为水相,为 SPME 分析做好了准备。本研究所建立的方法就是利用微波蒸馏萃取鱼体中的异味化合物,并对微波蒸馏萃取过程的关键参数(微波蒸馏时间、载气流量)进行优化,再结合李林等所建立的方法,就可对水产品中的异味化合物进行精确地定量分析。结果显示,优化后的方法对水产品中异味的检测能获得准确可靠的结果。

参考文献:

- [1] Song L R, Li L, Chen W, et al. Research progress on the off-flavors and secondary metabolites of algae in the aquatic environment [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(4): 434—439 [宋立荣, 李林, 陈伟, 等. 水体异味及其藻源次生代谢产物研究进展. 水生生物学报, 2004, **28**(4): 434—439]
- [2] Tucker C S, Martin J F. Water quality in aquaculture [A]. In: Tomaso J R, Brune D (Eds.), *World aquaculture books* [C]. Baton Rouge, LA, 1991, 133—179
- [3] Lovell R T, Lelana I Y, Boyd C E, et al. Geosmin and musty-muddy flavors in pond raised channel catfish [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1986, **115**: 485—489
- [4] Peter A, von Gunten U. Oxidation kinetics of selected taste and odor compounds during ozonation of drinking water [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, **41**: 626—631
- [5] Westerhoff P, Nalinakumari B, Pei P. Kinetics of M B and geosmin oxidation during ozonation [J]. *Ozone: Science and Engineering*, 2006, **28**: 277—286
- [6] Yin S R, Xu L P. A preliminary study on the relationship between fresh water algae and the off-flavor in fishes [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2003, **2**(18): 156—157 [殷守仁, 徐立蒲. 淡水浮游藻类与鱼体异味关系的初步研究. 大连水产学院学报, 2003, **2**(18): 156—157]
- [7] Yin S R, Zhao W, Xu L P, et al. A sensory methods and practices of off-flavor in common carp [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, **19**(4): 264—267 [殷守仁, 赵文, 徐立蒲, 等. 鲤土腥味的感官检测与实践. 大连水产学院学报, 2004, **19**(4): 264—267]
- [8] Grimm C C, Lloyd S W, Zimba P V. Instrumental versus sensory detection of off-flavors in farm-raised channel catfish [J]. *Aquaculture*, 2004, **236**: 309—319
- [9] Rimando A M, Schrader K K. Off-flavor in aquaculture: an overview [A]. In: Rimando A M, Schrader K K (Eds.), *Off-flavors in aquaculture* [C]. Washington: Oxford University Press, 2003. 1—14
- [10] Zimba P V, Dionigi C, Millie D. Evaluating the relationship between photopigment synthesis and 2-methylisoborneol accumulation in cyanobacteria [J]. *Journal of Phycology*, 1999, **35**: 1422—1429
- [11] Paerl H W, Millie D E. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria [J]. *Phycologia*, 1996, **36**: 160—167
- [12] Tucker C S. Off-flavor problems in aquaculture [J]. *Reviews in Fisheries Science*, 2000, **8**(1): 45—88
- [13] Zimba P V, Khoo L, Gaunt P, et al. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis toxins* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2001, **24**: 41—48
- [14] Lovell R T. Off-flavors in pond-cultured channel catfish [J]. *Water Science and Technology*, 1983, **15**: 67—73
- [15] From J, Horlyck V. Sites of uptake of geosmin, a cause of earthy flavor in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1984, **41**: 1224—1226
- [16] Li L, Song L R, Gan N Q, et al. Determination of odorous compounds in water by headspace solid-phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, **33**(8): 1058—1062 [李林, 宋立荣, 甘南琴, 等. 顶空固相微萃取 气相色谱 质谱测定水中异味化合物. 分析化学, 2005, **33**(8): 1058—1062]
- [17] Conte E D, Shen C Y, Miller D W, et al. Microwave distillation-solid phase adsorbent trapping device for the determination of off-flavors, geosmin and methylisoborneol, in catfish tissue below their rejection levels [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, **68**: 2713—2716

ANALYSIS OF OFF-FLAVORS IN FISH BY MICROWAVE MEDIATED DISTILLATION WITH HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTRUM

ZHANG Ting, LILin, CHEN Wei and SONG Li-Rong

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Aquaculture the rearing of fish and other aquatic animals is the best approach for meeting the increasing demand for aquaculture products worldwide. However, the problem of off-flavor has been documented as a serious setback to aquaculture. Though there are many off-flavors can result in a fish being objectionable, approximately 80% of the rejected fish have the earthy-musty odor, which is primary caused by the presence of either 2-methylisoborneol (2-MB) or geosmin. Based on the fact that the detection of earthy-musty odorous compounds in fish mainly relied on the sensory method in China, the present study established the instrumental method to detect 2-MB and geosmin by microwave mediated distillation with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrum (MWDE-SPME-GC-MS). Through investigating the effects of the key parameters, microwave processing time and carrier gas flow rate, in microwave mediated distillation on extracts, it is concluded that 6 min of microwave time and 70 mL/min nitrogen flow were the optimized condition on which earthy-musty odorous compounds could be completely distilled from fish flesh. Then the earthy-musty odorous compounds were absorbed in the fiber under HS-SPME, and were finally desorbed at 250 °C and determined by GC-MS. The limits of detection for 2-MB and geosmin in fish were both 0.1 µg/kg. There were significant linear correlation in the range of 1—20 µg/kg for the two earthy-musty odorous compounds, with calibration coefficients at 0.987 and 0.995, respectively. Therefore, trace levels of earthy-musty odorous compounds at ppb in fish could be quantified by this method with credible results.

Key words: Microwave mediated distillation; Headspace solid-phase microextraction; GC-MS; Off-flavors; 2-Methylisoborneol; Geosmin