

直接蒸馏/4-氨基安替比林法检测淡水鱼体内挥发酚的含量

王红梅¹, 李小定^{1,*}, 熊善柏^{1,2}, 付娜¹, 胡芬¹

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070;

2. 国家大宗淡水鱼加工技术研发专业分中心(武汉), 湖北 武汉 430070)

摘要: 确定对淡水鱼中挥发酚进行提取、检测的最优条件, 并得出一种能准确检测鱼体中挥发酚含量的可靠方法。采用蒸馏水代替无酚水, 用硬脂酸做消泡剂, 采用 100g/L NaOH 溶液固定鱼样品中的挥发酚, 用硫酸酸化再用直接蒸馏法提取鱼体中挥发酚, 并用 4-氨基安替比林染色法检测鱼体中挥发酚。结果表明: 本方法的线性范围为 0.002~6mg/L, 检出限为 0.05mg/kg, 回收率为 98.4%~107.0%。与传统检测方法比较, 该方法操作简便、省时节能, 适于推广。

关键词: 挥发酚; 淡水鱼; 蒸馏; 萃取; 4-氨基安替比林

Determination of Volatile Phenols in Freshwater Fish by Direct Distillation-4-Anminoantipyrine (4-AAP) Method

WANG Hong-mei¹, LI Xiao-ding^{1,*}, XIONG Shan-bai^{1,2}, FU Na¹, HU Fen¹

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. National Professional Sub-centers of Research and Development of Bulk Freshwater Fish Processing Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to obtain a convenient method for the determination of volatile phenols in freshwater fish, the optimal extraction and determination conditions were explored in this paper. Water without phenols was replaced by distilled water. For the elimination of foam, stearic acid was used. The fixation of phenols in fish was achieved by adding NaOH at a concentration of 100 g/L. Acidification with sulfuric acid followed by direct distillation was used for sample extraction of volatile phenols from fish. The measurement of volatile phenols was performed based on 4-aminoantipyrine (4-AAP) staining method. Results indicated that the linear range, detection limit, recovery rate of this method were 0.002—6 mg/L, 0.05 mg/kg, and 98.4%—107.0%, respectively. Compared with traditional methods, direct distillation is a convenient, time-saving and energy-saving method, which is suitable for extensive applications.

Key words: volatile; freshwater fish; distillation; extraction; 4-aminoantipyrine

中图分类号: R155.55

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)04-0196-04

挥发酚是指能与水蒸气一起蒸出的酚, 通常认为沸点在 230℃ 以下为挥发酚(一般为一元酚), 沸点在 230℃ 以上为不挥发酚。挥发酚对环境和人体的危害极大。当水中含挥发酚 0.1~0.2mg/L 时该水中养殖出的鱼肉便有异味, 大于 5mg/L 时鱼会中毒死亡。而人体长期饮用被挥发酚污染的水后可引起头痛、出疹、瘙痒、贫血及各种神经系统症状^[1]。近几年, 国内外关于挥发酚污染事件层出不穷(如 2009 年 7 月的盐城市自来水事件, 2009 年 6 月南庄镇巷心村河涌遭酚类污染, 2008 年佛山市陶瓷酚水事件等)。挥发酚已成为水体环境的一个极其严

重的污染物。水中酚类主要来自炼油、炼焦、煤气洗涤、造纸、合成氨、木材防腐和化工等行业的废水及医院污水^[2]。

近来研究表明, 水产品中过量的酚能影响水产品血液中的各项酶活性^[3], 酚能通过改变链接蛋白位置来对人体肠道上皮细胞的功能产生阻碍作用^[4]。另外, 还有研究显示酚能抑制肠道乳酸菌的活性^[5]。由此看来, 挥发酚对人类的危害需引起广泛重视。因此, 建立一种操作简便, 适于推广的检测鱼体中挥发酚含量的方法势在必行。

收稿日期: 2010-03-20

作者简介: 王红梅(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品营养与安全。E-mail: hongfally001@163.com

* 通信作者: 李小定(1968—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: lixd@mail.hzau.edu.cn

目前,采用直接蒸馏法获得含挥发酚的水溶液然后用4-氨基安替比林法检测淡水鱼体中挥发酚,无论是在蒸馏还是在萃取、比色过程中都存在诸多因素影响挥发酚检测的准确性^[6]。本研究中对采用4-氨基安替比林法检测淡水鱼体内挥发酚的过程中各种可能影响其检测准确性和效率的环节进行优化,从而提高鱼体中挥发酚检测的效率和准确性。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

各种淡水鱼为市购,买后即时检测(如需保存则需于-20℃条件下保存不超过7d)。

苯酚、NaOH等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

722型可见分光光度计 天津市普瑞斯仪器有限公司;500mL全玻璃蒸馏器、500mL碘量瓶、500mL带刻度梨形分液漏斗和500mL可调温电热套。

1.3 溶液的配制

缓冲液:称取20g NH₄Cl溶于100mL氨水中,pH 10.7、4℃冷藏;2% 4-氨基安替比林溶液:称取2g 4-氨基安替比林(C₁₁H₁₃N₃O)溶于水中,稀释至100mL,4℃冷藏,可使用1周;8%铁氰化钾溶液:称取8g铁氰化钾(K₃[Fe(CN)₆])溶于水中,稀释至100mL,4℃冷藏,可使用1周;高质量浓度苯酚标准储备溶液^[7]:迅速称取1.0000g无色重蒸苯酚溶于蒸馏水中,定容至500mL,配制成2.00g/L高质量浓度苯酚标准储备溶液,4℃避光保存至少可以稳定1个月;苯酚中间液:吸取5.00mL上述苯酚标准储备溶液,用蒸馏水定容至1000mL,配制成10mg/L苯酚中间液,现用现配;苯酚标准使用液:吸取10.00mL上述苯酚标准储备溶液,用蒸馏水定容至100mL,配成1μg/L标准使用液,2h内使用。

1.4 标准曲线回归方程制作

分别吸取1.00μg/mL酚标准使用液0.00、0.50、1.00、3.00、5.00、7.00、10.00、15.00mL置于预先盛有100mL蒸馏水的500mL分液漏斗中,然后再加水至总体积为250mL,混匀。向各分液漏斗中加入2.0mL缓冲溶液,混匀,加入2mL 2g/100mL 4-氨基安替比林溶液,混匀,再加入1.5mL 8g/100mL铁氰化钾溶液,使之充分混合,然后静置10min,加入10mL三氯甲烷,剧烈振摇2min(边振边放气),静置,待明显分层后,用滤纸擦干分液漏斗颈部内的水珠,然后用一小团滤纸塞进分液漏斗的颈部,最后把氯仿层通过分液漏斗颈部的滤纸团过滤放入比色皿中。在460nm波长处,用1cm比色皿比色。

1.5 样品前处理

将从市场上买的鱼去鳞去皮后取鱼背肌肉,然后用绞肉机将鱼背肌肉绞碎,于-20℃保存待测。

1.6 样品蒸馏

称取绞碎后的鱼肌肉样品10g左右于500mL烧杯中,加入75mL 100g/L NaOH溶液,剧烈搅拌10min,滴入3~5滴甲基橙指示剂,然后加入9.2mol/L硫酸至溶液呈橙红色(即pH<4),加入100g/L硫酸铜溶液5mL,再加入一小匙硬脂酸,加蒸馏水至300mL,搅拌混匀。将烧杯内样品液移入500mL蒸馏烧瓶中,用温控电热套小火加热,同时在冷凝管端下放入一个250mL锥形瓶收集蒸馏液,收集馏出液240mL左右时停止加热,并用蒸馏水把冷凝管中残留的蒸馏液洗入锥形瓶直至蒸馏液达到250mL。一般蒸馏液中会含有悬浮物,过滤去除。蒸馏完毕后,检查蒸馏残杂液是否呈酸性,如不呈酸性则重新蒸馏并加大酸的加入量。

1.7 样品蒸馏液的萃取和比色

将上述馏出液移入500mL带刻度梨形分液漏斗中,然后操作方法与1.3节相同。根据鱼样品所测得的吸光度(A),从标准曲线查得相应的挥发酚含量(x),从而计算样品中挥发酚的含量。

$$\text{挥发酚含量}/(\text{mg/kg}) = \frac{A - A_0 - a}{kG}$$

式中:A₀为不加鱼肉样品蒸馏、比色所测得的吸光度即样品空白值;a为标准曲线截距;k为标准曲线斜率;G为鱼肉样品质量/g。

1.8 数据分析

统计数据采用SAS软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 方法线性和灵敏度

本实验方法在0.002~6mg/L范围内线性良好,线性方程为y=0.0196x-0.0008,相关系数R²=0.9995;灵敏度即校准曲线斜率k为0.0196。

2.2 检出限

进行11次空白实验,经计算得批内标准差为0.005,该方法的检测限为0.05mg/kg。

2.3 回收率实验

表1 挥发酚检测回收率结果

Table 1 Recovery rates for phenols in fish meat with spiked standard

样品编号	取样量/g	样品含挥发酚量/μg	加标量/mL	加标样品含挥发酚量/μg	回收率/%
1	10.02	1.317	1	2.388	107.0
2	10.00	1.316	1	2.337	102.0
3	10.30	1.338	15	16.214	99.2
4	10.11	1.328	15	16.061	98.4

称取 10g 左右样品放入 500mL 烧杯中, 向烧杯中加入不同量的挥发酚标准使用液(1.00 $\mu\text{g/mL}$), 操作同 1.7 节和 1.8 节, 得到回收率如表 1 所示。

在 10g 鱼样中加入 1 μg 挥发酚标样, 挥发酚检测回收率在 102.0%~107.0% 之间; 加入挥发酚标准液为 15 μg 时, 挥发酚检测回收率在 98.4%~99.2% 之间。由此说明, 采用此方法测鱼样中挥发酚准确性较好。

2.4 样品蒸馏的条件优化

2.4.1 实验用水

实验分别采用无酚水(无酚水的制备: 实验室蒸馏水中加入 NaOH 溶液使 $\text{pH} \geq 11$ (呈强碱性), 并滴加高锰酸钾溶液至水呈紫红色, 再移入全玻璃蒸馏器中加热蒸馏, 收集蒸馏液储存于玻璃容器中)和蒸馏水进行空白对比实验, 结果如表 2 所示。由表 2 可以看出, 用蒸馏水和无酚水进行空白实验的吸光度差别不大, 但制备无酚水过程繁琐, 因此在本实验中完全可以用蒸馏水代替无酚水。

表 2 蒸馏水和无酚水空白实验对比

Table 2 Comparison of distilled water and water without phenol

样品	吸光度			
	1	2	3	4
蒸馏水	0.052	0.053	0.053	0.054
无酚水	0.051	0.054	0.053	0.055

2.4.2 蒸馏装置的选择

战培荣等^[8]和 Bartak^[9]采用水蒸气蒸馏装置研究鱼体中挥发酚的检测方法。水蒸气蒸馏法与本研究采用的直接蒸馏法蒸馏耗时都为 90min 左右, 但水蒸气蒸馏装置连接较复杂, 需两个加热装置, 同时加热耗能大, 故本实验用直接蒸馏代之。本实验采用直接蒸馏法提取鱼体中的挥发酚, 能得到较高的回收率和较低的检出限。

2.4.3 防暴沸和消泡条件的选择

在样品蒸馏过程中若不采取任何防暴沸和消泡措施, 在蒸馏后期会随着温度升高而产生大量气泡, 导致实验失败。因此, 本实验在蒸馏之前向样品液中加入一小匙硬脂酸来做消泡剂。马运宏等^[10]用添加硬脂酸和没添加硬脂酸的样品在同等条件下进行实验, 结果显示添加硬脂酸后对实验并无显著影响。另外, 本实验中硬脂酸的加入量只需 0.5g, 即每次一小匙, 硬脂酸加

过多易堵塞冷凝管。添加硬脂酸后的样品在蒸馏过程中不会发生爆沸现象, 因此无需添加玻璃珠或沸石来防爆沸。

2.4.4 NaOH 质量浓度的选择

在对样品前处理时要用一定质量浓度的 NaOH, 此处 NaOH 有两方面的作用。一是作为强碱来破坏鱼的细胞组织, 从而让挥发酚更充分地进入溶液中; 另外是 NaOH 能起到固定挥发酚的作用。罗若荣等^[11]采用 10g/L NaOH 来浸泡鱼肉样品过夜, 用这种方法虽然方便但是蒸馏过程开始后一段时间会产生大量气泡, 影响实验的顺利进行(即使加了消泡剂(硬脂酸)还会有大量气泡生成)。可能是由于 NaOH 质量浓度太低, 不能完全破坏鱼肉组织, 致使蒸馏时产生大量气泡。所以本实验采用向鱼肉样品中加入 100g/L NaOH 75mL 然后剧烈搅拌 10min, 这样既可以让鱼肉细胞组织中的酚充分溶出, 又可以防止蒸馏过程中过量气泡的产生。

2.5 实际样品分析

抽样选择 7 种不同鱼类, 各取样 10g 左右按本方法检测其中挥发酚含量, 结果如表 3 所示。

由检测结果可以看出, 实验检测的水产品已经受到挥发酚的污染。其中翘嘴红鲌体内挥发酚的含量已经超出了中国渔业标准规定的值($\leq 0.2\text{mg/kg}$)。可能是由于一般翘嘴红鲌不是人工饲养, 而是由湖泊中打捞, 所以挥发酚含量较高。另外从检测结果可以看出青鱼、鲤鱼等体内挥发酚含量较鲫鱼、武昌鱼高, 这很可能是因为青鱼、鲤鱼等生活在水体的中下层(挥发酚在水体中呈垂直型递增, 下层水体含挥发酚量高于上层水体), 而且它们的饲养时间较长, 导致挥发酚在体内蓄积得比鲫鱼等多。由此可以看出, 样品鱼中除翘嘴红鲌体内含挥发酚超标外, 其他鱼虽然没有超标, 但是挥发酚含量也不少。

3 结 论

3.1 在蒸馏过程过用蒸馏水代替无酚水效果良好; 用硬脂酸做消泡剂有效地消除了直接蒸馏时气泡难以控制的缺点; 而采用较高质量浓度的 NaOH 不仅可以帮助鱼肌肉中的酚更好地溶入水中, 而且能起到固定酚的作用。另外, 在萃取过程中一定要注意铁氰化钾溶液的加入量, 不得小于 1.5mL, 但也不得大于 1.8mL^[12]。也

表 3 实际样品分析结果

Table 3 Analytical results of actual samples

鱼种类	鲫鱼	鳊鱼	鲤鱼	斑点叉尾鲶	翘嘴红鲌	白鲢	青鱼
取样量/g	9.83, 9.65, 10.01	10.45, 10.08, 10.02	10.30, 10.21, 10.15	10.39, 10.04, 10.21	10.91, 10.26, 10.18	10.13, 11.51, 10.59	10.53, 11.02, 10.39
挥发酚量/(mg/kg)	0.086, 0.083, 0.085	0.097, 0.099, 0.102	0.167, 0.165, 0.170	0.172, 0.175, 0.169	0.209, 0.213, 0.210	0.146, 0.145, 0.143	0.178, 0.180, 0.175

要保证 4-氨基安替比林的纯度以及防止其因光照而分解,对于 4-氨基安替比林,可以采用苯或氯仿对其进行纯化^[13]。

3.2 采用直接蒸馏 4-氨基安替比林法检测鱼体中挥发酚的含量具有良好的线性关系、回收率和检出限,而且操作简便,检测速度较水蒸汽蒸馏法快,适于推广。但是为了进一步提高挥发酚检测的准确性,还可以在探索一种蒸馏过程中有助挥发酚跟其他一些难挥发组分的分离方法,以达到使蒸馏液杂质进一步减少,最后达到减少因蒸馏而引起误差的目的^[14-15]。

参考文献:

- [1] 宋亮. 4-氨基安替比林光度法测定水中的挥发酚的方法及改进[J]. 内蒙古环境科学, 2008, 20(3): 30-33.
- [2] 成毅, 王雁卿. 4-AAP 法测定饮用水中挥发酚应注意的几个问题[J]. 山西职业医学院学报, 2004, 14(2): 56-56.
- [3] ROCHE H, BOGÉ G. *In vivo* effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology: Part C, 2000, 125(3): 345-353.
- [4] McCALL I C, BETANZOS A, WEBER D A, et al. Effects of phenol on barrier function of a human intestinal epithelial cell line correlate with altered tight junction protein localization[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 241(1): 61-70.
- [5] NOWAK A, LIBUDZISZ Z. Influence of phenol, *p*-cresol and indole on growth and survival of intestinal lactic acid bacteria. Ecology/environmental microbiology[J]. Anaerobe, 2006, 12(2): 80-84.
- [6] 田红, 李玉梅. 提高挥发酚测量准确度的方法探讨[J]. 青海石油, 2008, 26(2): 77-80.
- [7] 陈景秀. 用高浓度苯酚储备液省略标定过程的探讨[J]. 环境检测管理与技术, 1996(6): 40-41.
- [8] 战培荣, 王海涛, 陈中祥, 等. 鱼体中挥发酚的提取与残留分析[J]. 农业环境学学报, 2008, 27(2): 801-804.
- [9] BARTÁK P, FRNKOVÁ P, CÁP L. Determination of phenols using simultaneous steam distillation-extraction[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 867(1/2): 281-287.
- [10] 马运宏, 范少强. 挥发酚测定中硬脂酸作为消泡剂的应用[J]. 甘肃环境研究与监测, 1999(3): 130-132.
- [11] 罗若荣, 陈凯, 陈方舟, 等. 深圳市不同鱼体中挥发酚污染及评价[J]. 中国公共卫生, 2008(6): 689-690.
- [12] 于光祥, 王墨. 4-氨基安替比林分光光度法检测饮用水中的挥发酚的影响效果分析[J]. 宁夏医学杂志, 2009(10): 954-955.
- [13] 潘凤燕, 许宝弟, 陈海宇. 4-氨基安替比林分光光度法测定水中挥发酚的影响因素[J]. 四川环境, 2009(5): 26-27.
- [14] 张素荣. 挥发酚的蒸馏损失[J]. 工业安全与环保, 2006, 32(8): 31-32.
- [15] HILAL N, YOUSEF G, LANGSTON P. The reduction of extractive agent in extractive distillation and auto-extractive distillation[J]. Chemical Engineering and Processing, 2001, 41(8): 673-679.