

罗非鱼肉中土臭素和 2-甲基异茨醇的测定

王国超^{1,2}, 李来好^{2,*}, 郝淑贤², 杨贤庆², 辛少平², 岑剑伟², 刁石强², 黄卉², 魏涯²

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 国家水产品加工技术研发中心, 广东 广州 510300)

摘要: 通过微波蒸馏-固相微萃取-气相色谱-质谱方法测定罗非鱼肉中土腥味物质——土臭素和 2-甲基异茨醇的含量。对微波蒸馏功率、微波蒸馏时间、载气气流等实验参数进行优化。结果表明: 确立的最佳条件为微波功率 360W(仪器额定功率的 40%)、微波时间 6min、载气流速 60mL/min; 在优化条件下, 罗非鱼肉中的土腥味物质能最大限度地被检测出来, 土臭素和 2-甲基异茨醇的检测限分别达到了 0.044 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.095 $\mu\text{g/kg}$, 且它们在 0.5~20 $\mu\text{g/kg}$ 范围内呈较好的线性关系, r^2 分别达到了 0.998 和 0.991, 实验中土臭素和 2-甲基异茨醇的回收率分别为 42.7%、61.9%; 最终利用该方法测得所购罗非鱼肉中土臭素和 2-甲基异茨醇的含量分别为 4.97、1.21 $\mu\text{g/kg}$ 。

关键词: 土腥味物质; 微波蒸馏; 罗非鱼; 土臭素; 2-甲基异茨醇

Determination of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Tilapia Meat

WANG Guo-chao^{1,2}, LI Lai-hao^{2,*}, HAO Shu-xian², YANG Xian-qing², XIN Shao-ping², CEN Jian-wei²,

DIAO Shi-qiang², HUANG Hui², WEI Ya²

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. National R&D Center For Aquatic Product Processing, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: An analytical method was established for determining geosmin (GEO) and 2-methylisoborneol (MIB) as off-odor compounds in freshwater fish using gas chromatography-mass spectrum (GC-MS) based on microwave assisted distillation followed by solid phase microextraction. Such sample preparation parameters as microwave power, distillation time and carrier gas flow rate were optimized to be 360 W (40% of the maximum power), 6 min, and 60 mL/min, respectively. Under the optimized conditions, the detection limits were 0.044 $\mu\text{g/kg}$ for GEO and 0.095 $\mu\text{g/kg}$ for MIB. A good linearity was observed for GEO and MIB over the concentration range of 0.5 to 20 $\mu\text{g/kg}$ with r^2 of 0.998 and 0.991, respectively. The recoveries were 42.7% for GEO and 61.9% for MIB. Using this method, the contents of GEO and MIB in a commercially available tilapia meat sample were determined to be 4.97 $\mu\text{g/kg}$ and 1.21 $\mu\text{g/kg}$, respectively.

Key words: off-flavor compounds; microwave-assisted distillation; tilapia; geosmin; 2-methylisoborneol

中图分类号: S912

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0188-04

罗非鱼为一种中小型鱼类, 原产于非洲, 是世界水产重点培养的淡水养殖鱼类, 被誉为未来动物性蛋白质的重要来源之一。2009 年中国罗非鱼产量达到 115 万吨, 其中出口 25.9 万吨, 创造外汇约 7.1 亿美元^[1]。不过, 由于受到养殖条件及水质环境的影响, 罗非鱼同鲶鱼、鳊等一些淡水养殖的鱼类常常会有令人生厌的土腥味、泥土

味。土臭素(geosmin, GEO)和 2-甲基异茨醇(2-methylisoborneol, MIB)是造成这种不良气味的主要物质, 其结构均为环醇类物质, 它们是水体中一些藻类的代谢产物, 被鱼虾等水产动物吸收后会产生异味, 当其在鱼虾中含量超过一定数值时, 势必会降低其食用价值及经济价值^[2-3]。土腥味物质已成为阻碍水产品加工行业发展的一个不利因素。

收稿日期: 2011-06-09

基金项目: 国家农业产业技术体系项目(CARS-49); 国家农业科技成果转化项目(2010GB23260577; 2009GB2E200303; 2010GB2E000335); 广东省科技计划项目(2009A020700004; 2008A020100006; 2009B020201003); 广东省海洋渔业科技推广项目(A200899B02; A200901C01); 农业部中央级公益性科研院所基本科研项目(2010YD07)

作者简介: 王国超(1987—), 男, 硕士研究生, 主要从事水产品加工与贮藏研究。E-mail: gcwang10@163.com

* 通信作者: 李来好(1963—), 男, 研究员, 博士, 主要从事水产品加工与质量安全研究。E-mail: laihaoli@163.com

研究表明,人体对土臭素和2-甲基异莰醇的嗅觉阈值分别为 $0.9 \mu\text{g/kg}$ ^[4]和 $0.6 \mu\text{g/kg}$ ^[5]。目前,国内已有吴德好^[6]、张锡辉^[7]等建立了饮用水中土臭素和2-甲基异莰醇含量的测定方法,而对于鱼肉中土腥味物质方面的研究则很少,只有薛勇等^[8]和张婷等^[9]进行了鳊鱼鱼肉中土腥味物质含量的测定。国外虽也有一些水产品土腥味物质测定的研究,但其所采用的真空蒸馏、闭环吹脱技术等所需的仪器设备都较复杂昂贵^[10]。所以,建立一种简便有效地测定鱼肉中土腥味物质含量的方法,对于未来水产品土腥味物质检测及脱除研究都将会积极的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜活罗非鱼(体质量约 0.5kg)、冷冻罗非鱼片(约 110g)均购于广州。

土臭素标准品、2-甲基异莰醇标准品(均为色谱纯) 美国 Supleco 公司; 甲醇(色谱纯, 99.9%) 美国 Sigma-Aldrich 公司; 无水氯化钠(分析纯, 99.5%) 广州化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

固相微萃取装置、PDMS/DVB 萃取头 美国 Supelco 公司; 超纯水机 美国 Millipore 公司; 2010plus GC-MS 日本 Shimadzu 公司; DB-5MS 色谱柱 美国 Agilent 公司; 冷凝水循环机 宁波新芝生物科技股份有限公司; T25 basic 型匀浆机 德国 IKA 公司; 电子天平 上海上天精密仪器有限公司; 微波炉(额定输出功率 900W) 格兰仕集团; 微波蒸馏设备^[11] 自制。

1.3 方法

1.3.1 微波蒸馏萃取方法

10g 待测罗非鱼肉, 匀浆, 放入微波萃取瓶中, 采用微波炉加热, 冷凝循环水的温度设定在 5°C , 载气为氩气, 并用 15mL 固相微萃取瓶收集萃取样品。自制微波蒸馏装置如图1所示。

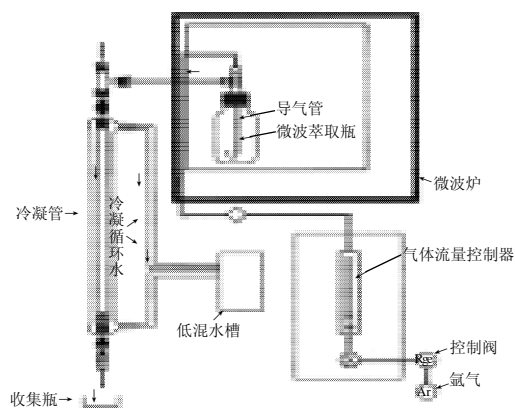


图1 微波蒸馏装置示意图

Fig.1 Diagram of microwave-assisted distillation device used in this study

1.3.2 微波蒸馏功率的优化

取 10g 待测罗非鱼肉, 向其中分别加入 $10\mu\text{L}$ 的土臭素标准品(1mg/L)和 $10\mu\text{L}$ 的2-甲基异莰醇(1mg/L), 匀浆, 使样品充分融入鱼肉中, 之后将样品加入微波萃取瓶, 固定, 微波加热 5min 。研究不同火力档位对萃取效果的影响, 实验重复3次, 取3个平行的峰面积平均值进行分析。

1.3.3 微波蒸馏时间的优化

在优化微波功率的条件下, 调节气流为 60mL/L 。实验设置了7个时间点, 即2、3、4、5、6、7、 8min , 每个时间点做3组平行, 取3个平行的峰面积平均值。

1.3.4 固相微萃取方法

参考 Zhu 等^[11]的方法, 向 15mL 萃取瓶中加入 2g 无水 NaCl, 采用 PDMS/DVB 萃取头进行顶空萃取, 萃取时间 30min 、萃取温度 60°C 、转子转速 1150r/min 。

1.3.5 工作曲线的建立

按照上述方法得到最佳微波蒸馏条件后, 确立线性范围, 建立工作曲线, 并实验得到检测限与回收率。实验 GEO 标准品和 MIB 标准品分别设立 0.5 、 1 、 2.5 、 5 、 10 、 $20 \mu\text{g/kg}$ 六个浓度梯度, 每个浓度梯度重复3次。

1.3.6 气相色谱质谱方法

进样口温度设置为 250°C , 解析 5min 。载气: 高纯氩(99.9%), 进样模式: 不分流进样, 载气流速: 1mL/min , 程序升温: 初始温度 60°C , 保持 4min , 以 8.5°C/min 升至 200°C , 保持 15min , 然后以 20°C/min 升至 250°C , 保持 2min 。离子源温度: 230°C , 传输线温度: 250°C , 电子能量 70eV 。质谱全扫描范围 $60\sim 300\text{u}$, 对已知化合物土臭素和2-甲基异莰醇采用选择离子监测(selected ion monitoring, SIM)模式, 土臭素和2-甲基异莰醇的定性离子碎片 m/z 分别为 125 、 112 、 97 和 135 、 108 、 95 , 土臭素和2-甲基异莰醇的定量离子 m/z 分别为 112 、 95 。

2 结果与分析

2.1 载气气流的优化

载气气流是影响萃取结果的一个重要因素, 由于微波加热的间歇循环性, 当气流过小时, 有可能导致样品馏分蒸汽回流, 影响最终结果; 与此同时, 由于本实验所用微波设备的馏分样品收集处于一个开放的状态, 当气流过大时, 会造成样品馏分逃逸, 使样品中的土味素物质不能完全液化, 降低回收率。所以经过多次实验, 本实验载气最终选择 60mL/min 的恒定氩气流。

2.2 微波蒸馏功率的优化

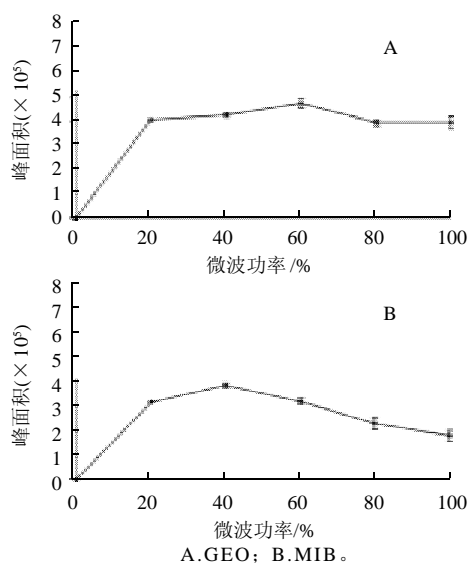


图2 微波功率对土腥味物质萃取量的影响

Fig.2 Effect of microwave power on extraction yields of GEO and MIB

由图2可知,随着微波功率的不断增加,蒸馏萃取物的峰面积也随之升高,GEO和MIB的萃取物峰面积分别在额定微波功率的60%和40%时达到最大值,不过在实验中发现,当采取60%加热方式时,会有黄色的油状物产生,一方面会黏附在通气的冷凝管道上,影响正常的蒸馏萃取过程,另一方面发现这时的萃取产物中杂质很多,会对GEO和MIB的分析产生影响;而在40%时回收率虽稍有所降低,但不会产生上述类似的现象,所以最终采取额定功率的40%(360W)作为实验条件。

2.3 微波蒸馏时间的优化

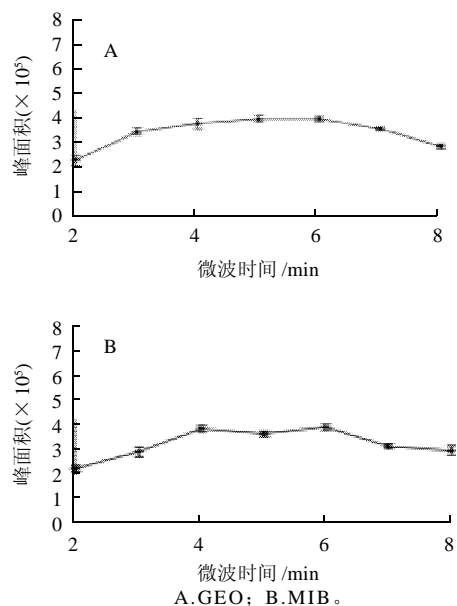


图3 微波时间对土腥味物质萃取量的影响

Fig.3 Effect of microwave treatment time on extraction yields of GEO and MIB

由图3可以看出,目标物峰面积在2~6min之间会随着微波时间的延长而增加,而在6~8min时间段则会下降,目标物的回收率降低。其原因有可能是随着微波时间的延长,微波萃取瓶中样品的水份已实现完全蒸馏,继续加热造成样品变黑变黄,进而影响最终收集的蒸馏产物,干扰了固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)的萃取。所以本实验最终采取微波时间6min。

2.4 校准曲线的建立

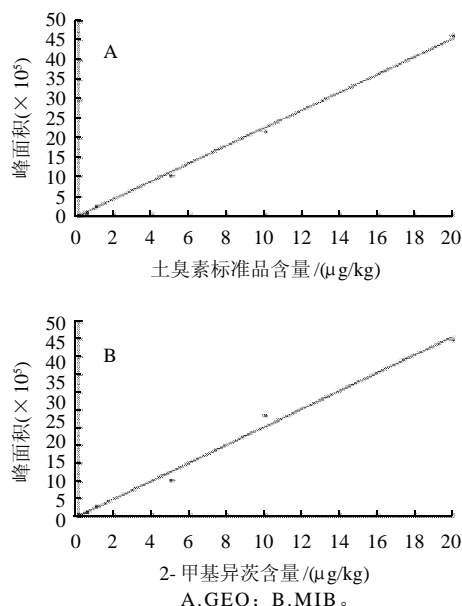


图4 罗非鱼肉中 GEO 和 MIB 检测的校准曲线

Fig.4 Calibration curves of GEO and MIB

图4显示,土腥味物质GEO和MIB的峰面积与其含量呈正相关,在0.5~20 $\mu\text{g/kg}$ 范围内呈较好线性关系,GEO和MIB的线性方程分别为 $y = 227504x + 4312$ ($r^2 = 0.998$)、 $y = 253136x + 12329$ ($r^2 = 0.991$)。

对1 $\mu\text{g/kg}$ 的土味素进行GC-MS精密测定实验($n = 6$),结果相对标准偏差为0.662%。对土臭素和2-甲基异莰醇分别进行GC-MS检测限实验,在信噪比(R_{SN})为3时,其检测限分别达到了0.044 $\mu\text{g/kg}$ 和0.095 $\mu\text{g/kg}$,在 R_{SN} 为10时,其定量限分别为0.198 $\mu\text{g/kg}$ 和0.429 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.5 样品分析

根据优化的条件,对所购罗非鱼肉中的土臭素和2-甲基异莰醇进行检测,其色谱图如图5所示,最后测得样品中土臭素和2-甲基异莰醇的平均含量分别为4.97 $\mu\text{g/kg}$,1.21 $\mu\text{g/kg}$ 。实验中微波蒸馏-固相微萃取-气相色谱质谱的加标回收率结果如表1所示,两种物质回收率的相对标准偏差小于等于5%。

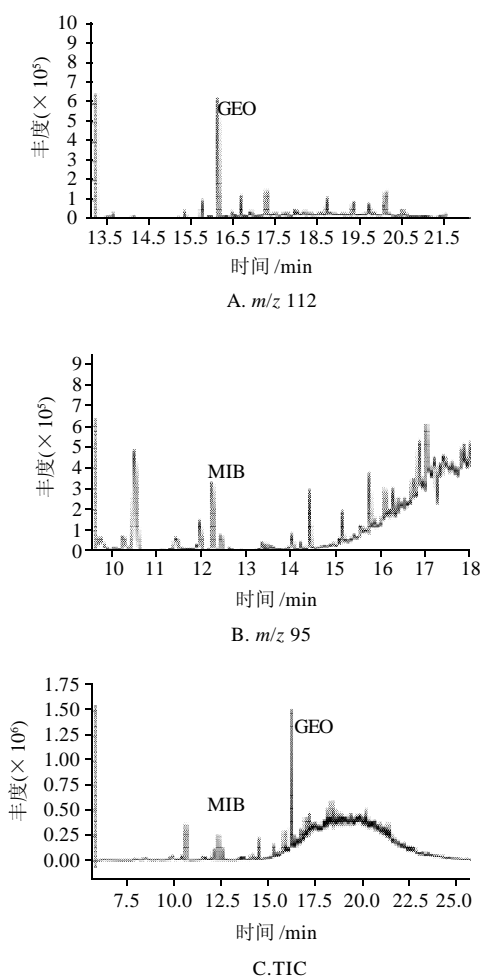


图5 在不同模式测定条件下的罗非鱼样品中 GEO 和 MIB 的离子色谱图

Fig.5 Chromatograms of GEO and MIB in fish extracts under selective ion monitoring ($m/z = 112, 95$) mode and total ion monitoring mode

表1 罗非鱼样品中土腥味物质的加标回收率

Table1 Spike recovery of GEO and MIB from tilapia fish samples

样品	土腥味化合物	含量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 %	相对标准偏差 %
1	GEO	4.91	5	6.87 ± 0.10	39.3	2.0
	MIB	1.13	1	1.75 ± 0.08	62.4	8.0
2	GEO	5.12	5	7.29 ± 0.12	43.5	2.4
	MIB	1.08	1	1.66 ± 0.05	58.2	5.0
3	GEO	4.72	5	6.98 ± 0.10	45.2	2.1
	MIB	1.34	1	1.99 ± 0.06	65.0	6.0

实验的回收率相对较低, 主要原因可能是由于整个装置系统处于开放的状态, 有些蒸馏成分会损失, 而且土腥味物质与鱼肉结合非常紧密, 未能实现完全分离。Zhu 等^[11]采用相同的方法获得的 GEO 和 MIB 回收

率也分别只有 30.4% 和 81.4%, 薛勇等^[8]采用类似的方法实验, 所得 GEO 的回收率为 57%。

3 讨论

本实验采用微波蒸馏-固相微萃取-气相色谱质谱法测定罗非鱼肉中的土腥味物质。此方法简便快捷, 利用微波加热在短时间内将鱼肉中难以提取的土臭素和 2-甲基异茨醇以气体方式蒸馏出来, 然后经过冷凝水系统将其由气态变为液态, 之后利用固相微萃取富集提取, 并用 GC-MS 分析。本实验采用自制微波蒸馏设备优化了微波时间、微波功率、载气气流等参数。运用该法测得所购罗非鱼肉中土臭素和 2-甲基异茨醇的平均含量分别为 $4.97 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $1.21 \mu\text{g}/\text{kg}$, 本方法的建立为水产品中土腥味物质含量的测定提供借鉴和参考。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 2010中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 9-10.
- [2] 殷守仁, 徐立蒲. 淡水浮游藻类与鱼体异味关系的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 2003, 2(18): 156-157.
- [3] BENANOU D, ACOBAS F, DE ROUBIN M R. Optimization of stir bar sorptive extraction applied to the determination of odorous compounds in drinking water[J]. Water Sci Technol, 2004, 49(9): 161-170.
- [4] ROBERTSON R F, JAUNCEY K, BEVERIDGE M C M, et al. Depuration rates and the sensory threshold concentration of geosmin in responsible for earthy-musty taint in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2005, 245(4): 89-99.
- [5] PERSSON P E. Sensory properties and analysis of two muddy odour compounds, geosmin and 2-methylisoborneol, in water and fish[J]. Water Research, 1980, 14(8): 1113-1118.
- [6] 吴德好. 固相微萃取-气相色谱-质谱联用测定饮用水中的嗅、味化合物[J]. 化学工程师, 2005, 11(4): 25-26.
- [7] 张锡辉, 伍婧娉, 王治军, 等. HS-SPME-GC 法测定水中典型嗅味物质[J]. 中国给水排水, 2007, 23(2): 78-82.
- [8] 薛勇, 王超, 于刚, 等. 鲮鱼肉中土腥味物质的测定方法[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1094-1100.
- [9] 张婷, 李林, 陈伟, 等. 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[J]. 水生生物学, 2009, 33(3): 449-454.
- [10] SELLI S, RANNOU C, PROST C, et al. Characterization of aroma-active compounds in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eliciting an off-odor[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(25): 9496-9502.
- [11] ZHU Ming, FRANCISCO J A, ERIC D C, et al. Microwave mediated distillation with solid-phase microextraction: determination of off-flavors, geosmin and methylisoborneol, in catfish tissue[J]. Journal of Chromatography A, 1999, 833(2): 223-230.
- [12] ERIC D C, SHEN C Y, PETER W P, et al. Determination of geosmin and methylisoborneol in catfish tissue (*Ictalurus punctatus*) by microwave-assisted distillation-solid phase adsorbent trapping[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(3): 829-835.