

凝胶渗透色谱净化-气相色谱-质谱法测定水产品中的溴酚类化合物

徐英江^{1,2}, 张世娟^{1,2}, 宫向红^{1,2},
刘慧慧^{1,2}, 邓旭修³, 张华威³, 张秀珍^{1,2}

(1. 山东省海洋水产研究所, 山东 烟台 264006; 2. 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006;
3. 烟台山水海产有限公司, 山东 烟台 264006)

摘要:建立了水产品中溴酚类化合物的气相色谱-质谱分析方法。样品中的溴酚类化合物经酸化后,用正己烷-乙醚混合溶液提取,凝胶色谱净化,乙酸酐衍生后,用正己烷提取衍生产物,在选择离子模式下用气相色谱-质谱法进行测定。结果表明,溴酚类化合物在 DB-17ms 色谱柱上得到良好的分离,色谱峰出峰尖锐,没有杂峰干扰。乙酸酐衍生后极大地提高了溴酚类化合物在检测器上的响应,灵敏度也较衍生前提高近百倍。本方法检出限为 0.3~0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在添加浓度为 0.3~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内,回收率为 70.2%~102%,相对标准偏差为 5.2%~10.3%。通过对市场上常见的水产品进行分析,发现溴酚类化合物的含量在 0.56~4.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间,其中 2,4,6-三溴苯酚的含量最高。

关键词:凝胶色谱净化;水产品;溴酚类化合物;气相色谱-质谱

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2011)06-0350-05

Determination of Bromophenols in Fishery Product by GPC and GC/MS

XU Ying-jiang^{1,2}, ZHANG Shi-juan^{1,2}, GONG Xiang-hong^{1,2},
LIU Hui-hui^{1,2}, DENG Xu-xiu³, ZHANG Hua-wei³, ZHANG Xiu-zhen^{1,2}

(1. Marine Fisheries Research Institute of Shandong Province, Yantai 264006, China;
2. Shandong Province Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai 264006, China;
3. Yantai Shanshui Seafood Co. Ltd, Yantai 264006, China)

Abstract: A method for the analysis of bromophenols in fishery product was developed. The sample was acidified to make sure that all of the bromophenol compounds were converted to molecular status. The molecular bromophenol was extracted by *n*-hexane-ethylether, purified by GPC, acetylyze by acetic anhydride, and then extracted by *n*-hexane and determined by GC/MS. The result indicated that all of the bromophenol compounds were finely separated on the DB-17ms column with good chromatographic peak, and the derivatization with acetic anhydride was enhanced the signal sensitivity by almost a hundred times. The detection limit is 0.3—0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with recoveries of 70.2%—102% and relative standard deviation

收稿日期:2011-03-24;修回日期:2011-09-26

基金项目:海洋公益性行业科研专项经费资助项目(200805031),海洋公益性行业科研专项经费资助项目(201105013),山东省水生动物营养与饲料泰山学者岗位资助项目

作者简介:徐英江(1979~),男,山东潍坊人,助理研究员。

通信作者:张秀珍。E-mail:zxz0535501@126.com

tions of 5.3%—10.3%. The proposed method is applied to the analysis of bromophenol in fishery product, and it is found that the bromophenol contents are between 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, among which 2,4,6-TBP has the highest level.

Key words: GPC; fishery product; bromophenols; GC/MS

近年来,以 2-溴苯酚、4-溴苯酚、2,4-二溴苯酚、2,6-二溴苯酚、2,4,6-三溴苯酚为代表的海洋中溴化物受到越来越多的关注。溴酚类化合物是半挥发性物质,有着强烈的气味,具有调味的性质,被认为是鱼类、软体动物、甲壳类和藻类等海产品中关键风味化合物的重要组成部分。溴酚类物质具有非常低的感觉阈限(ng/g),当其以低浓度存在时,能够产生一种令人愉悦的海洋风味或者提高海产品中已有的风味;而当其以高浓度存在时,则能产生令人不快的气味,从而使海产品质量下降^[1]。海产品风味的特性和强度取决于其含有的溴酚单体类型、浓度及其所处的海洋环境的特性。据资料显示,所有的野生对虾中,溴酚总含量在 9.5~1 114 ng/g 之间,其含量因对虾的种类、地点和捕获季节的不同而不同^[2],而人工养殖的水产品多数不含有这几种溴酚,因此也就缺乏可以与野生水产品相媲美的海洋风味。人们试图在饵料中添加溴酚类物质以使得人工养殖的水产品具有海洋风味,但是目前很少有人能够成功的做到这一点。无论是在饵料中添加溴酚还是其盐类,都无法提高其在人工养殖海产品中的含量^[2]。人工养殖的鱼虾获取溴酚的唯一途径就是进食含有高浓度天然溴酚的鱼虾以及海洋蠕虫。而有研究表明,海洋蠕虫因其高浓度的溴酚含量已经对海洋沉积物造成了污染,甚至对深海底层生物群落的结构和活性造成很大影响^[3]。因此建立灵敏快捷的溴酚检测方法不仅能为海产品的风味研究提供依据,还能够及时地对溴酚类化合物的海洋污染进行监控。

目前溴酚类化合物的测量方法多数采用液相色谱法和气相色谱-质谱法^[1,4]。多数方法采用的前处理过程均为酸化后放置 12 h 以上,然后进行水蒸气蒸馏,之后用 GC 或 GC/MS 进行分析。水蒸气蒸馏样品消耗量大、前处理过程时间长、效率低,而溴酚类物质不加衍生直接进行气相色谱分析灵敏度较低。本研究采用在水浴中酸化条件下,正己烷-乙醚混合溶液提取、GPC 凝胶净化、乙酸酐衍生的方法,测定水产品中的

溴酚类化合物,并对市场上的常见海产品进行分析。

1 实验部分

1.1 主要试剂

2-溴苯酚(2-bromophenol, 2-BP, 纯度 $\geq 98\%$)、2,4-二溴苯酚(2,4-dibromophenol, 2,4-DBP, 纯度 $\geq 98\%$)、2,6-二溴苯酚(2,6-dibromophenol, 2,6-DBP, 纯度 $\geq 99\%$)、2,4,6-三溴苯酚(2,4,6-tribromophenol, 2,4,6-TBP, 纯度 $\geq 99\%$)标准品:美国 Sigma-Aldrich 公司产品;4-溴苯酚(4-bromophenol, 4-BP, 纯度 $\geq 98\%$)标准品:瑞士 Fluka 公司产品;衍生试剂:乙酸酐(分析纯);正己烷、环己烷和二氯甲烷均为农残级试剂;乙醚为色谱纯;实验用水均为超纯水。

1.2 实验仪器

6890N/5973i 气相色谱-质谱仪:美国 Agilent 公司产品;Milli-Q Gradient 纯水仪:法国 Millipore 公司产品;TGL-10C 离心机:上海安亭仪器有限公司产品;N-EVAPTM112 氮吹仪:美国 Organomation Associates 公司产品;Laborota 4001 旋转蒸发仪:德国 Heidolph 公司产品;AccuPrepTM 凝胶渗透色谱系统:美国 J2 Scientific 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理 称取 4.0 g 匀浆后样品于离心管中,加入 12 mL 硫酸水溶液,振荡混匀,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温 30 min,冷却后加 10 mL $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醚})=9:1$ 溶液,振摇提取 10 min,离心后取上清液于梨形瓶中,残渣再加入 10 mL 正己烷-乙醚混合溶液,重复提取 1 次,合并上清液,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至近干,用 10 mL $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{环己烷})=1:1$ 溶液溶解残留物,GPC 进行净化,紫外检测波长 254 nm,以 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{环己烷})=1:1$ 溶液为流动相,流速 4.72 mL/min,收集 10~15 min 的洗脱液。

1.3.2 衍生化 洗脱液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转缓慢蒸发至干,加入 2 mL 甲醇溶解残留物,再加入 3 mL

0.1 mol/L 碳酸钾溶液和 100 μ L 乙酸酐,漩涡混合 1 min 进行衍生化反应,加入 1 mL 正己烷提取衍生产物,无水硫酸钠脱水后,供 GC/MS 分析。

1.3.3 气相色谱-质谱法测定 DB-17MS 毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m),载气为高纯氦气(纯度 $>$ 99.999%);进样口温度 300 $^{\circ}$ C,恒流模式(1.0 mL/min),不分流进样,进样量 1 μ L;升温程序:起始温度 100 $^{\circ}$ C,保持 2 min,以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 200 $^{\circ}$ C,再以 20 $^{\circ}$ C/min 升至 280 $^{\circ}$ C,保持 4 min。

电子轰击源(EI),电离能 70 eV;电离能离子源温度 230 $^{\circ}$ C;四极杆温度 150 $^{\circ}$ C;接口温度 280 $^{\circ}$ C;溶剂延迟 5 min;测定模式为选择离子监测(SIM)模式,溴酚类物质衍生物的特征离子列于表 1。

表 1 溴酚衍生物的特征离子

Table 1 Characteristic ions of bromophenol compounds

化合物	定量离子/(<i>m/z</i>)	定性离子/(<i>m/z</i>)
2-BP	172	174,216
4-BP	172	174,216
2,4-DBP	252	254,294
2,6-DBP	252	254,294
2,4,6-TBP	330	332,374

2 结果与讨论

2.1 提取试剂的选择

分别实验了乙酸乙酯、正己烷、乙醚、正己烷-丙酮溶液、正己烷-乙醚溶液和石油醚-乙醚溶液的提取效果,结果发现,乙酸乙酯和乙醚对 5 种溴酚化合物几乎完全回收; $V(\text{石油醚}):V(\text{乙醚})=7:3$ 溶液只能提取其中的 2 种物质;正己烷、正己烷-丙酮溶液、正己烷-乙醚溶液能够同时提取 5 种溴酚化合物,其中以正己烷-乙醚混合溶液的提取效果最好。另外,本工作研究了正己烷和乙醚的混合溶液不同体积比对提取效率的影响,结果发现, $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醚})=9:1$ 溶液的提取效果最好,因此选择 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醚})=9:1$ 的溶液作为提取试剂。

2.2 提取方法的选择

传统的溴酚提取方法均为水蒸气蒸馏,需要的样品量较大,一般为几十到几百克样品加入到 1 L 水中,酸化后进行水蒸气蒸馏提取,样品消

耗大且不易实现批量分析。本研究试验了将样品 pH 值调至 1 之后,静置过夜,然后加入提取试剂进行提取,再用乙酸酐衍生分析,发现直接加标样品回收良好,但在做实际样品时,测定结果偏低,回收率均低于 50%。可能是因为酸化程度不够导致溴酚仍有部分以结合态存在,不能够被完全提取,导致测量值偏低。为使溴酚类物质能够充分地转化成分子态,本研究采用加入硫酸水溶液,并用水浴加热的酸化方式,发现效果良好,回收率得到了较大的提高,均能达到 70% 以上。

2.3 净化条件的选择

水产品基质复杂,需要经过有效的净化步骤以消除脂肪、色素等杂质的影响^[5-6]。浓硫酸磺化净化方法简单、效果显著,常用于氯代苯系物的前处理过程。本研究试验了浓硫酸磺化对溴酚的净化效果,结果发现,经浓硫酸净化后的谱图干净,二溴苯酚、三溴苯酚的回收率良好,但是对 4-溴苯酚几乎无回收。经研究发现,4-溴苯酚溶于浓硫酸,因此浓硫酸磺化无法作为 5 种溴酚化合物的同时净化方法。弗罗里硅土和氧化铝小柱对水产品有良好的净化效果,经过实验发现,采用弗罗里硅土净化的谱图干净,但洗脱液在氮吹浓缩时损失较大,一溴苯酚无回收。考虑到水产品尤其是虾类产品中脂肪色素含量较大,而 GPC 凝胶净化系统能够有效地去除这类杂质的特性,本研究选用 GPC 凝胶净化系统,实验表明,净化效果明显,回收率高,结果列于表 2。

表 2 净化方式对回收率的影响

Table 2 Influence of purification method to recovery

化合物	回收率/%			
	浓硫酸 净化	弗罗里 硅土净化	中性氧化 铝净化	GPC 凝胶 净化系统
2-BP	50	0	0	80
4-BP	2	0	0	81
2,4-DBP	80	25	20	82
2,6-DBP	82	23	18	86
2,4,6-TBP	92	45	43	90

2.4 水浴温度对提取效率的影响

为使样品酸化充分并加快酸化速度,实验采用水浴加热酸化,实验过程发现,当水浴温度为 80 $^{\circ}$ C 时,2-溴苯酚的回收率仅为 50%。对 5 种溴酚化合物的性质分析发现,2-溴苯酚的饱和蒸

汽压大,87.3℃时已经达到1.73kPa,高温下2-溴苯酚有很大一部分变成气体逸出,因此水浴过程中应避免高温,但低温易造成样品酸化不充分,经过优化最终选择水浴温度为60℃,既能保证样品充分酸化又不会造成2-溴苯酚的过多损失。因此实验过程中应保持温度小于60℃,且所有浓缩步骤的速度应保持缓慢,否则也会造成2-溴苯酚的损失,水浴温度对提取效率的影响列于表3。

表 3 水浴温度对提取效率的影响
Table 3 Influence of water bath temperature to extraction efficiency

化合物	回收率/%		
	40℃	60℃	80℃
2-BP	52.6	82.2	50.8
4-BP	54.0	80.9	70.2
2,4-DBP	60.8	87.3	80.2
2,6-DBP	65.8	88.1	85.3
2,4,6-TBP	70.7	95.9	92.7

2.5 衍生化对相应信号的影响

溴酚类物质若不经衍生直接进样,灵敏度低,经乙酸酐衍生后灵敏度提高近百倍,示于图1。

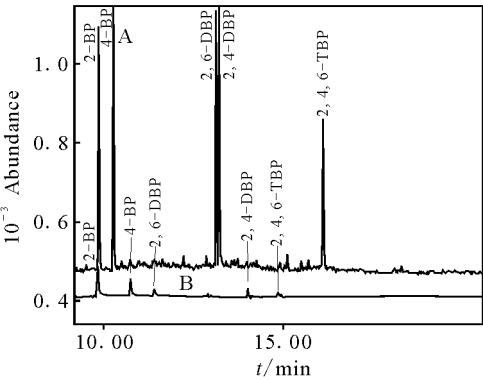


图 1 衍生反应对灵敏度的影响
Fig. 1 Influence of derivatization on signal sensitivity

2.6 衍生试剂的选择

研究了硅烷化试剂,七氟丁酸酐和五氟丙酸酐、乙酸酐的衍生化效果,结果表明,乙酸酐的衍生效果最好,不需加热,毒性小,最终选用乙酸酐作为衍生化试剂。经乙酸酐衍生后的选择离子流图示于图2。

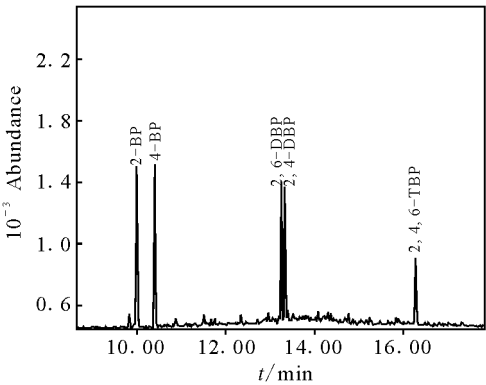


图 2 溴酚类的选择离子流图
Fig. 2 SIM chromatogram of bromophenols

2.7 定量标准曲线

配制浓度分别为1.0、5.0、10.0、50.0、100μg/L溴酚混合标样,衍生后在SIM模式下进行定量检测。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,结果表明,各组分皆能保持良好的线性关系,列于表4。

表 4 各组分标准曲线
Table 4 The calibration curve of five bromophenols

化合物	曲线方程	相关系数	浓度范围/(μg/L)
2-BP	$y=7.48x+33.5$	0.997	1.0~100
4-BP	$y=12.368x+200$	0.997	1.0~100
2,4-DBP	$y=6.18x+26.9$	0.997	1.0~100
2,6-DBP	$y=8.08x+46.2$	0.998	1.0~100
2,4,6-TBP	$y=10.02x+58.7$	0.999	1.0~100

2.8 回收率、精密度与检出限

以虾为研究对象,考察了方法的回收率与精密度。在空白样品中添加4种不同浓度的溴酚类物质标准溶液,按照本方法进行回收率实验,每个浓度重复测定6次,计算其回收率和精密度,结果列于表5。从表5可以看出,在加标浓度0.3~5μg/kg范围内,方法的平均回收率为70.2%~102%,相对标准偏差为5.2%~10.3%。分别在空白样品中添加溴酚类物质,按信噪比大于3计算其检出限,信噪比大于10计算定量下限,结果列于表5。

2.9 样品分析

对市场上常见的南美白对虾和中国对虾进行测定,其中在南美白对虾(淡水)中均未检出溴

酚类物质,南美白对虾(海水)、中国对虾中均检出溴酚类物质,结果列于表 6。

表 5 方法的加标回收率、相对标准偏差、检出限与定量下限($n=6$)
Table 5 Spiked recoveries, relative standard deviations, limits of detection and limits of quantification of bromophenols

化合物	加标浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	相对标准偏差/%	检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量下限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
2-BP	0.3	71.8	10.2	0.1	0.3
	1	77.8	7.4		
	2	82.6	7.0		
	5	102	5.8		
4-BP	0.3	76.8	9.8	0.1	0.3
	1	83.6	8.7		
	2	90.2	6.3		
	5	95.1	6.1		
2,4-DBP	0.3	73.5	8.1	0.1	0.3
	1	86.2	6.6		
	2	89.1	7.4		
	5	92.9	6.0		
2,6-DBP	0.3	70.2	9.5	0.1	0.3
	1	86.5	6.4		
	2	78.9	6.6		
	5	91.2	5.2		
2,4,6-TBP	0.5	75.2	9.7	0.2	0.5
	1	82.5	9.5		
	2	88.7	9.2		
	5	92.8	7.0		

表 6 水产品中溴酚含量
Table 6 Bromophenols concentrations in fishery product

样品	南美白对虾(淡)			南美白对虾(海水)			中国对虾			鲤鱼			真鲷		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
2-BP	ND	ND	ND	0.56	0.90	0.73	1.12	1.30	1.59	ND	ND	ND	0.45	0.78	0.55
4-BP	ND	ND	ND	0.68	1.06	0.82	1.08	1.52	1.84	ND	ND	ND	0.28	0.59	0.49
2,4-DBP	ND	ND	ND	0.79	1.14	0.85	0.84	0.89	1.04	ND	ND	ND	6.81	5.32	7.06
2,6-DBP	ND	ND	ND	0.60	1.25	0.76	1.83	1.92	3.25	ND	ND	ND	8.46	8.09	9.32
2,4,6-TBP	ND	ND	ND	1.83	4.44	2.68	2.43	2.76	4.08	ND	ND	ND	11.5	12.7	10.7

注:ND 指在本方法的仪器检测限下未检出

3 结论

本研究建立了水产品中溴酚类化合物的气相色谱-质谱测定方法,样品消耗少、处理方法简单,采用乙酸酐衍生化反应能有效提高方法的灵敏度。本方法检出限为 0.3~0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在添

加水平 0.3~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内,回收率为 70.2%~102%,相对标准偏差为 5.2%~10.3%,适用于水产品中溴酚类化合物的测定。
(下转第 366 页)

- als in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to Coumarin. The EFSA Journal, 2004, 104: 1-36.
- [3] VANDENBROUCKE V, BOUSQUET-MELOU A, DE BACKER P, et al. Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2008, 31(5): 437-445.
- [4] PIOTR ADAMOWICZ, MARIA KAFKA. LC-MS and LC-MS/MS determination of six anticoagulant rodenticides in blood[J]. Problems of Forensic Sciences, 2009, 77: 53-63.
- [5] 秦 旻, 徐友宣, 杨树民. 液相色谱-质谱联用在兴奋剂检测中的应用及进展[J]. 色谱, 2008, 26(4): 431-436.
- [6] MUSILIYU A, KHAN M F, COOPERWOOD J S. Synthesis and antiproliferative activity of coumarin-estrogen conjugates against breast cancer cell lines. Musa[J]. Lett Drug Des Discov, 2009, 6(2): 133-138.
- [7] VANDENBROUCKE V, DESMET N, DE BACKER P. Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 869(1/2): 101-110.
- [8] 席海为, 马 强, 王 超. 高效液相色谱法对化妆品中 17 种香豆素类化学成分的同时测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(12): 1168-1172.
- [9] SPROLL C, RUGE W, ANDLAUER C. HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods [J]. Food chemistry, 2008, 109(2), 462-469.
- [10] JIN M C, REN Y P, XU X M. Determination of bromadiolone in whole blood by high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Forensic Science International, 2007, 171(1): 52-56.
- [11] JIN M C, CHEN X H. Rapid determination of three anticoagulant rodenticides in whole blood by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006; 20(18): 2741-2746.
- [12] Equine Consulting Services. Protein quality and requirements in exercising and growing horses [2011-06-19] [J/OL]. http://equineconsulting-services.com.au/admin/images_nutrition_pdf/2009_Dec0465Protein%20quality%20and%20requirements%20in%20exercising%20and%20growing%20horses3.pdf.
- [13] YU N H, HO E N M, TANG F P W, et al. Comprehensive screening of acidic and neutral drugs in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1189(1/2): 426-434.
- [14] LEUNG G N W, LEUNG D K K, W AN T S M, et al. High throughput screening of sub-ppb levels of basic drugs in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1156(1/2): 271-279.

=====

(上接第 354 页)

参考文献:

- [1] DA SILVA V M, DA CUNHA VELOSO M C, DE OLIVEIRA A S, et al. Determination of simple bromophenols in marine fishes by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) [J]. Talanta, 2005, 68(2): 323-328.
- [2] WHITFIELD F B, HELIDONIS F, SMITH D. Role of feed ingredients in the bromophenol content of cultured prawns[J]. Food Chemistry, 2002, 79(3): 355-365.
- [3] LINCOLN D E, FIELMAN K T, MARINELLI R L, et al. Bromophenol accumulation and sediment contamination by the marine annelids *Noto-mastus lobatus* and *Thelepus crispus*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2005, 33(6): 559-570.
- [4] 徐继林, 严小军, 徐年军, 等. 海产品中溴酚类海洋风味素的气相色谱-质谱联用分析[J]. 水产学报, 2004, 28(1): 100-105.
- [5] 徐英江, 任传博, 田秀慧, 等. 海产品中硝基呋喃类原药的超高效液相色谱串联质谱测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(4): 327-330.
- [6] 徐英江, 宫向红, 张秀珍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定海水及沉积物中三聚氰胺[J]. 质谱学报, 2009, 30(2): 70-73.