

# 罗非鱼肉中土臭素和 2-甲基异茨醇的测定

王国超<sup>1,2</sup>, 李来好<sup>2,\*</sup>, 郝淑贤<sup>2</sup>, 杨贤庆<sup>2</sup>, 辛少平<sup>2</sup>, 岑剑伟<sup>2</sup>, 刁石强<sup>2</sup>, 黄卉<sup>2</sup>, 魏涯<sup>2</sup>

(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、载气流速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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 0.095  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 且它们在 0.5~20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

**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<sup>1,2</sup>, LI Lai-hao<sup>2,\*</sup>, HAO Shu-xian<sup>2</sup>, YANG Xian-qing<sup>2</sup>, XIN Shao-ping<sup>2</sup>, CEN Jian-wei<sup>2</sup>,

DIAO Shi-qiang<sup>2</sup>, HUANG Hui<sup>2</sup>, WEI Ya<sup>2</sup>

(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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for GEO and 0.095  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for MIB. A good linearity was observed for GEO and MIB over the concentration range of 0.5 to 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 1.21  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2-3]</sup>。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课题项目(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: laihao1@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 $0.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[4]</sup>和 $0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[5]</sup>。目前,国内已有吴德好<sup>[6]</sup>、张锡辉<sup>[7]</sup>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,而对于鱼肉中土腥物质方面的研究则很少,只有薛勇等<sup>[8]</sup>和张婷等<sup>[9]</sup>进行了鳙鱼鱼肉中土腥物质含量的测定。国外虽也有一些水产品土腥物质测定的研究,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<sup>[10]</sup>。所以,建立一种简便有效地测定鱼肉中土腥物质含量的方法,对于未来水产品土腥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Supelco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<sup>[11]</sup> 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 $5^\circ\text{C}$ ,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。

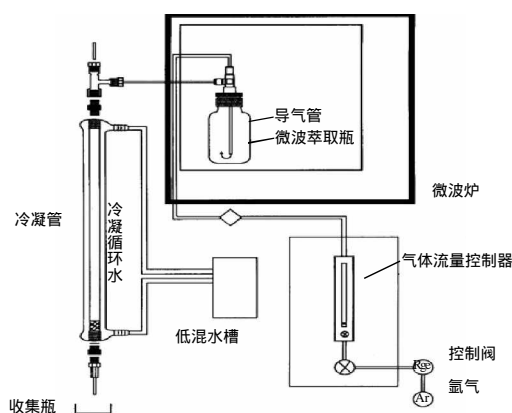


图1 微波蒸馏装置示意图

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 $60\text{mL}/\text{L}$ 。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<sup>[11]</sup>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 $60^\circ\text{C}$ 、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、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $250^\circ\text{C}$ ,解析5min。载气:高纯氩(99.9%),进样模式:不分流进样,载气流速: $1\text{mL}/\text{min}$ ,程序升温:初始温度 $60^\circ\text{C}$ ,保持4min,以 $8.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $200^\circ\text{C}$ ,保持15min,然后以 $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 $250^\circ\text{C}$ ,保持2min。离子源温度: $230^\circ\text{C}$ ,传输线温度: $250^\circ\text{C}$ ,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 $60\text{mL}/\text{min}$ 的恒定氩气流。

### 2.2 微波蒸馏功率的优化

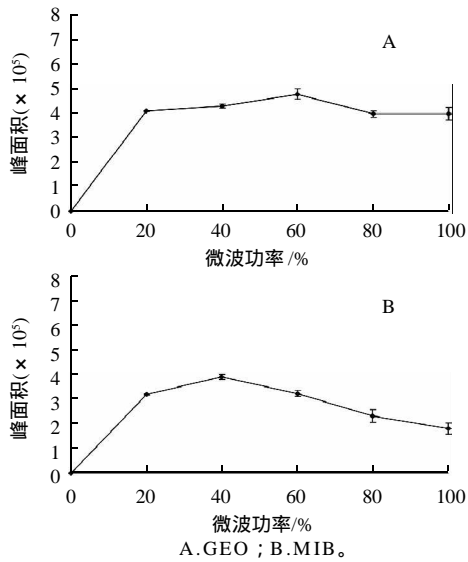


图2 微波功率对土腥味物质萃取量的影响

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

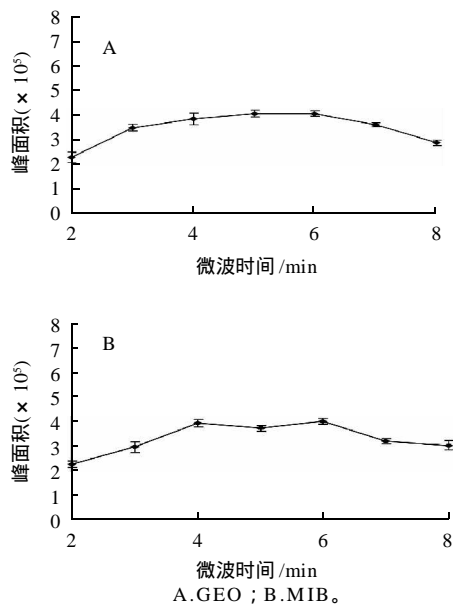


图3 微波时间对土腥味物质萃取量的影响

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

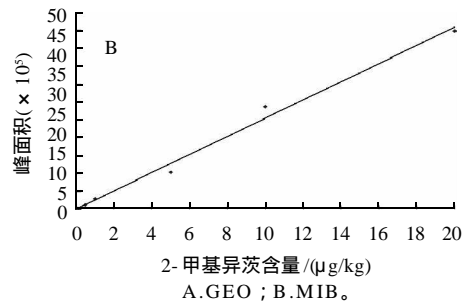
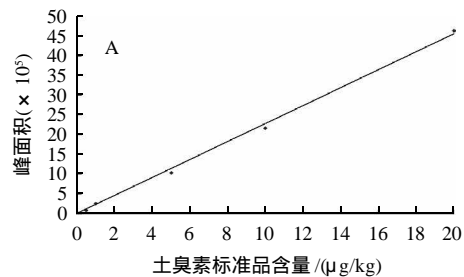


图4 罗非鱼肉中GEO和MIB检测的校准曲线

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0.5~20μg/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1μg/kg的土味素进行GC-MS精密度测定实验( $n = 6$ ),结果相对标准偏差为0.662%。对土臭素和2-甲基异茨醇分别进行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0.044μg/kg和0.095μg/kg,在 $R_{SN}$ 为10时,其定量限分别为0.198μg/kg和0.429μg/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-甲基异茨醇进行检测,其色谱图如图5所示,最后测得样品中土臭素和2-甲基异茨醇的平均含量分别为4.97μg/kg,1.21μg/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%。

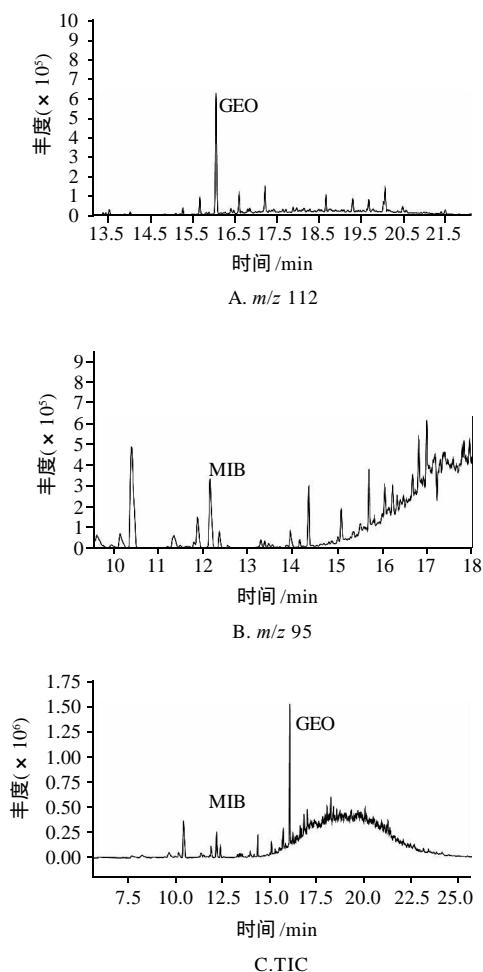


图5 在不同模式测定条件下的罗非鱼样品中 GEO 和 MIB 的离子色谱图

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

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	$6.87 \pm 0.10$	39.3	2.0
	MIB	1.13	1	$1.75 \pm 0.08$	62.4	8.0
2	GEO	5.12	5	$7.29 \pm 0.12$	43.5	2.4
	MIB	1.08	1	$1.66 \pm 0.05$	58.2	5.0
3	GEO	4.72	5	$6.98 \pm 0.10$	45.2	2.1
	MIB	1.34	1	$1.99 \pm 0.06$	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<sup>[11]</sup>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<sup>[8]</sup>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-气相色谱质谱方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 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]. 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 aromatic 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.