

鳙鱼肉中土腥味物质的测定方法

薛勇¹, 王超¹, 于刚², 黄万成³, 王玉明¹, 李兆杰¹, 徐杰¹, 薛长湖¹

(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, 广东 广州 510300; 3. 大连獐子岛渔业集团股份有限公司研发部, 辽宁 大连 116650)

摘要: 本研究通过微波蒸馏提取、固相微萃取(SPME)富集和气相色谱-质谱联用(GC/MS)分析的方法, 实现了对鳙(*Aristichthys nobilis*)鱼肉中土腥味物质的定量测定。实验对微波蒸馏提取、SPME法富集鱼肉中土腥味物质的条件进行了优化, 确定最佳条件为微波功率350 W, 10 g样品蒸馏时间为8 min, 氮气流速60 mL/min; 萃取时间30 min, 萃取温度60 °C, NaCl加入量4:1(V:W), 搅拌速度1 500 r/min。结果表明, 使用SPME富集土味素(Geosmin)时, 回收率为95.4%, 检测限为1.0 ng/L, 线性范围为5~100 ng/L; 采用优化后的微波蒸馏-SPME-GC/MS方法测定鳙鱼肉中的土味素时, 回收率为57%; 经该法测定10月份青岛市场市售鳙鱼肉中土味素平均含量为5.4 µg/L。[中国水产科学, 2010, 17(5): 1094-1100]

关键词: 微波蒸馏; 固相微萃取; GC/MS; 土味素

中图分类号: S98

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-1094-07

淡水养殖鱼类普遍具有土腥味和霉味, 造成这种不良气味的物质以土味素(Geosmin, GSM)为主, 同时还有二甲基异冰片(2-MB)、2-异丁基-3-甲氧基吡嗪(IBMP)、2-异丙基-3-甲氧基吡嗪(IPMP)和2,3,6-三氯茴香醚(TCA)^[1-2]等, 都是放线菌(Actinomycete)和蓝绿藻(Cyanobacteria)的代谢产物。这些物质通过鳃、皮肤和肠上皮细胞进入鱼体内, 从而使淡水养殖鱼类都不同程度地存在土腥味, 特别是罗非鱼(*Tilapia*)、鲤(*Cyprinus carpio* L.)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)等土腥味尤为严重。对于追求健康、营养、美味的现代人来讲, 土腥味的存在对这些淡水鱼的消费造成很大程度的负面影响。因此, 淡水鱼的土腥味问题已经成为制约淡水鱼产品消费和加工的一大障碍。

目前, 国内外对土腥味物质的检测方法主要是针对水体而言, 包括嗅觉鉴定法和仪器分析法。嗅

觉鉴定法虽然是国家标准中水体土腥味物质的检测方法, 但此法存在难以准确划分异味的类型并无法测定低于人类嗅觉阈值的异味化合物的缺点^[3-4]; 仪器分析法主要是先采用不同的前处理方法富集异味化合物, 再用气相色谱法进行定量分析, 准确度较高。由于土味素是造成土腥味和霉味的典型代表物质, 因此仪器分析法多选用土味素作为水体和淡水鱼中土腥味物质的测定指标。在国外的相关研究中曾经采用低温真空蒸馏、蒸汽蒸馏和微波蒸馏等方法使鱼肉中的土味素转移到液相状态下, 再通过液液萃取、固相萃取(Solid phase extraction, SPE)、闭环吹脱技术(Closed-loop stripping analysis, CLSA)、吹扫捕集法(Purge-and-trap)或固相微萃取(Solid phase microextraction, SPME)等手段进行富集, 最后通过GC或GC/MS测定的方法对土味素定量^[5]。但是低温真空蒸馏、闭环吹脱技术、微波蒸馏、SPME等方法都需要特殊的昂贵设备, 普通实验室很难进行测

收稿日期: 2010-01-15; 修订日期: 2010-01-23.

基金项目: 农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室开放基金课题(2008B1206).

作者简介: 薛勇(1976-), 男, 讲师, 博士, 主要从事水产品加工方面的研究. E-mail: xueyong@ouc.edu.cn

定,因此建立一种方便实用的以土味素为代表的鱼肉中土腥味物质的定量测定方法对于鱼肉中土腥味物质的检测及其去除都具有十分重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 原料 活鳙,体长 50 cm,体质量 $(1\,500 \pm 230)$ g, 10月份购自青岛南山水产品市场。

1.1.2 试剂 硫代硫酸钠,碘化钾,土味素(GSM),

标准品为Sigma公司产品。

1.1.3 仪器与设备 微波蒸馏装置为自制(图1); PDMS/DVB萃取头固相微萃取装置(Agilent,美国); 6890/5973i气相色谱-质谱仪(Agilent,美国); Anke GL-20G-II高速冷冻离心机(上海安亭仪器公司); RE52CS真空旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); BS 210 S电子天平(北京赛多利斯公司); HH·S 21-Ni恒温水浴锅(北京长安仪器公司); SQ1119粉碎机(菲利普电器有限公司)。

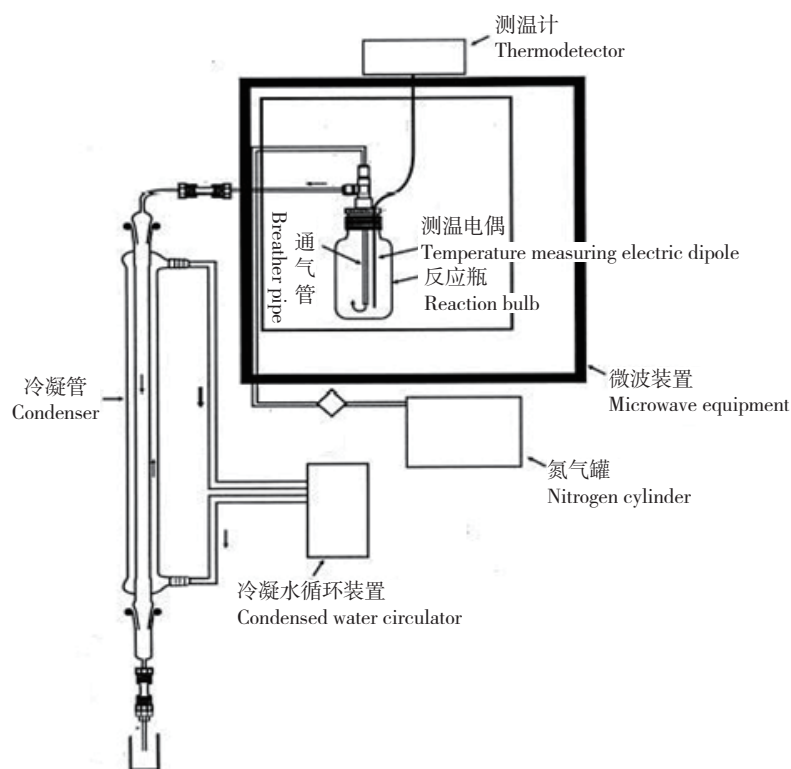


图1 微波蒸馏提取装置示意图

Fig. 1 Sketch map of experiment apparatus for microwave mediated distillation

1.2 实验方法

1.2.1 微波辅助蒸馏提取鱼肉中土腥味物质 鳙去内脏,经采肉机采肉,去除鱼肉糜中的刺及结缔组织。准确称取一定质量鱼肉,置于250 mL自制蒸馏瓶中,密封,放入微波蒸馏装置(图1),向蒸馏瓶中通入流速为60 mL/min的助推氮气,调节微波加热功率为350 W,加热一定时间,通过低温(5℃)冷凝装置对馏分降温,收集瓶置于冰水浴中收集馏分。

1.2.2 固相微萃取富集馏分中的土腥味物质 微波辅助蒸馏得到的馏分中按4:1(V:W)加入NaCl,使用PDMS/DVB萃取头(65 μm)顶空方式萃取,萃取温度60℃,萃取时间30 min,搅拌速度1 500 r/min,萃取富集后做气相色谱-质谱联用(GC/MS)分析。

1.2.3 气相色谱-质谱联用仪(GC/MS)测定土腥味物质 色谱柱:HP-5MS毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);进样口温度250℃,热解析10 min;程序升

温: 初温40℃, 保持2 min, 以8℃/min升温至250℃, 保持10 min; 载气: He, 流量: 0.8 mL/min, 不分流; 质谱条件: 离子源温度230℃, 传输线温度280℃。数据采集: TIC (Total Ion Chromatograms, 总离子流色谱图); EIC (Extract Ion Chromatograms, 选择离子色谱图), GSM的特征性 m/z 为112.0。

2 结果与分析

2.1 微波辅助蒸馏法提取鱼肉中土腥味物质方法的优化

微波蒸馏过程中可调节的影响因素主要有微波功率、微波加热时间和氮气流速。经本研究发现, 加热过程中鱼肉样品越干, 土味素回收越多。但是, 微波加热时间过长、温度过高会导致鱼肉组织的高温分解, 从而产生油状的提取物, 这种提取物进行GC分析时会导致进样口和分离柱的污染。所以在实验中需对温度进行监测, 使样品在加热过程中温度低于120℃, 确保达到这种温度的合适的微波加热功率为350 W。鱼肉样品蒸馏8 min后, 可以将10 g鱼肉组织中的水分充分蒸馏出来。因此, 本实验中微波蒸馏装置采用的功率为350 W, 10 g样品蒸馏时间为8 min。

当鱼肉开始进行微波加热时, 鱼肉迅速产生蒸汽, 进而在冷凝管中形成馏分流出, 但由于微波启动的循环间歇, 蒸馏瓶气体会因为冷却而压力降低, 从而导致产生的蒸汽回流。实验中发现, 当不使用氮气时, 蒸馏出来的馏分会小于加入一定流速的氮气时的馏分, 因此在蒸馏过程中向蒸馏瓶中流速为60 mL/min的恒定氮气流。

2.2 SPME法富集水中土腥味物质方法优化

SPME是一种集萃取、浓缩、解吸、进样于一体的样品前处理技术, 适合于土腥味化合物的测定。在使用SPME萃取过程中, 萃取效率主要受到萃取头类型、萃取方式、萃取时间、加热温度、搅拌速度、溶液离子强度等因素影响。在本实验中, 根据土味素特性及萃取头种类, 选择PDMS/DVB萃取头进行萃取。

2.2.1 萃取方式和萃取时间对萃取效果的影响 以

1 $\mu\text{g/L}$ 的土味素标准样品溶液, 加入2 g NaCl作为离子强度调节剂, 温度为60℃, 选用PDMS/DVB萃取头时, 测定不同萃取方式及萃取时间的峰面积—时间对应关系, 如图2所示。从图中可以看出, 顶空方式萃取的萃取量高。萃取时间不足30 min时, 萃取量随萃取时间增加而增加, 超过30 min时, 萃取量随时间变化不大, 因此本实验选择顶空萃取方式, 萃取时间为30 min。

2.2.2 搅拌速率和盐浓度对萃取效果的影响

通过搅拌可以提高分析物质的传递速度, 从图3可以看出, 萃取过程中的搅拌速率达到1 500 r/min时即可达到理想的萃取效率。在萃取时, 提高溶液离子浓度可以增加土味素的萃取量, 但过高的盐浓度会影响扩散速度, 使萃取难以达到平衡状态, 因此, 实验选择4:1 (V:W)加入NaCl, 搅拌速率为1 500 r/min。

2.2.3 萃取温度对萃取效果的影响

从图4中可以看出, 萃取温度升高会增加萃取量, 但考虑到温度过高时会产生水蒸气, 不利于萃取的进行, 因此实验选择萃取温度为60℃。

2.2.4 最适萃取条件的确定

根据以上分析可知, 使用SPME法测定馏分中的土味素的最适条件为: PDMS/DVB萃取头、顶空式萃取、萃取时间30 min, 萃取温度60℃、NaCl加入量4:1 (V:W)、搅拌速度1 500 r/min。

使用上述最佳萃取条件测定水中土味素的检出限(S/N=3)为1.0 mg, 线性范围为5~100 ng/L, 相关系数 R 为0.996。对浓度为100 ng/L的土味素溶液进行精密测定实验($n=6$), 相对标准偏差为5.2%。采集水样测定土味素含量, 通过加入标准样得到SPME法对土味素测定的回收率为95.4%。

2.3 微波蒸馏提取-SPME-GC/MS法测定鱼肉中土腥味物质

根据以上优化的微波蒸馏和SPME萃取条件, 对鲮鱼肉中的土腥味进行定量测定, GC/MS采用选择离子检测法, 鲮鱼肉中土味素的离子色谱图如图5所示, 质谱图如图6所示, 土味素的质荷比 $m/z=112$ 。经6次测定, 10月份青岛市场市售鲮鱼肉中土味素平均含量

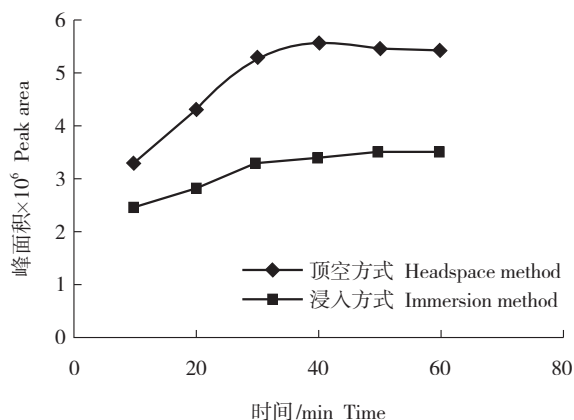


图2 萃取方式和萃取时间对萃取量的影响

Fig. 2 Influence of extraction modes and extraction time on extraction yield

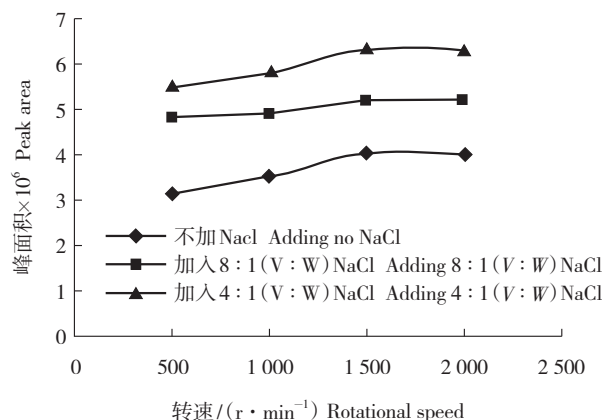


图3 搅拌速率和盐浓度对萃取量的影响

Fig. 3 Influence of rotational speed and salt concentration on extraction yield

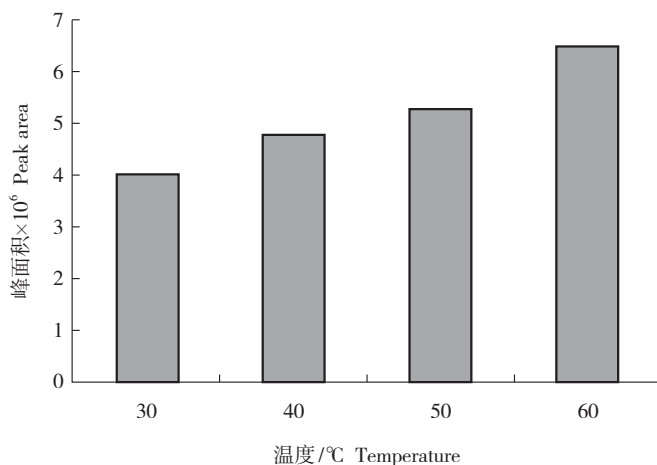


图4 萃取温度对萃取量的影响

Fig. 4 Influence of extraction temperature on extraction yield

为5.4 μg/L。因为土味素是一种脂溶性的半极性化合物,与鱼肉以结合状态存在,很难进行分离,因此该测定方法对鱼肉中土味素的回收率仅为57%。

3 讨论

土味素为十一碳醇类,是微极性脂溶性化合物,在室温下具有半挥发性。它的产生菌主要为放线菌(以链霉菌为主),另外还有一些藻类、真菌等。在水中,土味素的味觉阈值为20 ng/L^[6],而在鱼体中,土味素的味觉阈值为μg/L级^[7-8],由于鱼体中土腥味物质的含量极低,且以结合状态存在,所以其提取和富集都十分困难,其定量检测也成为了一个难题。

在国外,闭环吹脱技术(CLSA)被看作是一种标准的水中土味素分析方法,但是这种方法需要特殊的设备,而且提取1个样品至少需要2 h,具有费用高、操作复杂、耗时较长的特点^[1]。Johnsen等^[9]建立了一种简单的提取方法,水或发酵液经过滤得到500 mL滤液,加入标样,再用50 mL光谱纯二氯甲烷萃取,有机相经过离心后,脱去水分,收集液在室温用液氮浓缩,最后进行气相色谱分析。Hassett等^[10]用一种多通道硅橡胶带代替以前CLSA中使用的碳过滤器来收集水或发酵液中的挥发性物质,减少了溶剂提取步骤,也是一种较好的分析方法。

在国内,马晓雁等^[11]采用液液微萃取,再经气

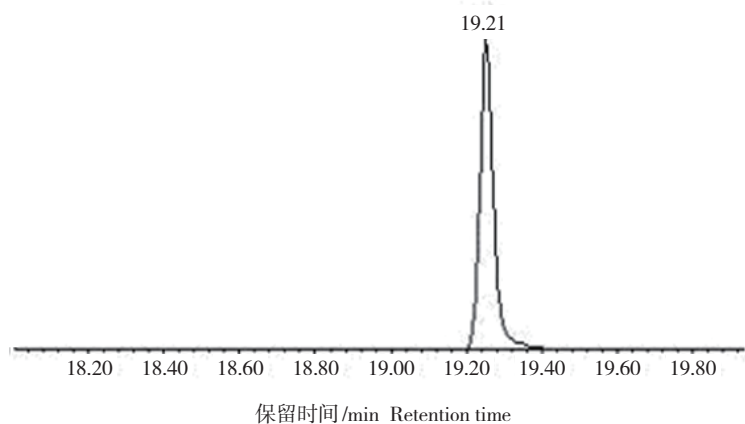


图5 提取的鳙鱼肉中土味素的离子色谱图
Fig. 5 EIC map of geosmin extracted from fish meat

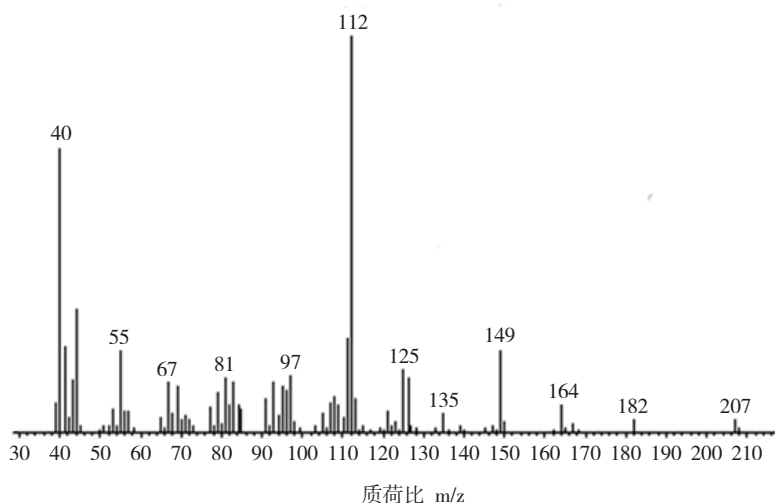


图6 提取的鳙鱼肉中土味素的质谱图
Fig. 6 Component mass spectrogram of geosmin extracted from fish meat

相色谱来检测水中的异嗅物质;张锡辉等^[12]采用HS-SPME来对水样中异嗅味物质进行前期富集处理,经处理后的异嗅味物质可适用于气相色谱仪进行检测。但以上都是针对水中的异嗅味物质进行的定性检测,对于鱼肉中土味素的提取、分析及定量检测的研究还很少见。

在本实验的研究过程中,曾先后采用了比较常规的水蒸汽蒸馏法、溶液提取法、液液萃取法、固相萃取法进行了实验,但因为提取效果较差、吸附背景较高、杂质干扰较大等原因都无法实现对鱼肉中土

味素的定量测定。基于此,本研究根据文献[13-14]中介绍的微波蒸馏装置的基本原理,进行了大量的试验,并自制了微波蒸馏提取装置,结合SPME富集和GC/MS的测定手段,最终完成了对鱼肉中土味素的定量测定。通过此法测定的10月份青岛市场市售鳙鱼肉中土味素平均含量为5.4 $\mu\text{g/L}$,测定方法的加标回收率为57%。此法的建立为淡水鱼中土腥味物质的定量测定,以及脱除土腥味技术的效果评定提供了有力的手段和依据。

参考文献:

- [1] 吴德好. 固相微萃取-气相色谱-质谱联机测定饮用水中的嗅、味化合物[J]. 化学工程师, 2005, 11(4): 25-26.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Rimando A M, Schrader K K. Off-flavors in aquaculture [C]. Washington: Oxford University Press, 2003: 1-14.
- [5] 赵洪娟, 张月琴. 来源于微生物的易挥发性物质-Geosmin [M]. 国外医药抗生素分册, 2001, 22: 105-108.
- [6] Hepplewhite C, Newcombe G, Knappe D R. NOM and MIB, who wins in the competition for activated carbon adsorption sites [J]. Water Sci Technol, 2004, 49(9): 257-265.
- [7] Persson P E. Sensory properties and analysis of two muddy odor compounds in water and fish [J]. Water Res, 1980, 14: 1113-1118.
- [8] Yukowski M, Tabachek J L. Identification, analysis, and removal of geosmin from muddy flavored trout [J]. J Fish Res Board Can, 1974, 31: 1851-1858.
- [9] Johnsen P B, Kuan J W. Simplified method to quantify geosmin and 2-methylisoborneol concentrations in water and microbiological cultures [J]. J Chromatogr, 1987, 409: 337.
- [10] Hassett A J, Rohwer E R. Analysis of odorous compounds in water by isolation by closed-loop stripping with a multichannel silicone rubber trap followed by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr, 1999, 849A: 521.
- [11] 马晓雁, 高乃云, 李青松, 等. 气相色谱法测定饮用水中痕量土臭素和二甲基异冰片 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(2): 267-269.
- [12] 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.
- [13] Ming Z, Francisco J, Aviles, et al. Microwave mediated distillation with solid-phase microextraction: determination of off-flavors, geosimin and methylisoborneol, in catfish tissue [J]. J Chromatogr, 1999, 833A: 223-230.
- [14] Yurkowski M, Tabachek J L. Identification, analysis and removal of geosmin from muddy-flavored trout [J]. J Fish Res Board Can, 1974, 31: 1851-1858.

Determination of earthy-musty odorous compound in bighead carp meat

XUE Yong¹, WANG Chao¹, YU Gang², HUANG Wancheng³, WANG Yuming¹, LI Zhaojie¹, XU Jie¹, XUE Changhu¹

(1.College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2.South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 3. Research Department of Dalian Zhangzidao Island Fishery Group Corporation, Dalian 116650, China)

Abstract: Geosmin is the main cause of earthy-musty odor in freshwater aquaculture products, which seriously hinders their popularity and development. As food safety, nutrition and flavor has become equally important to general consumers, the presence of this earthy compound, to a certain extent, has a negative impact on the consumption of cultured bighead carp. Hence, attention has been paid to the establishment of a method to detect and remove geosmin. The threshold of the odor for geosmin in water is 20 ng/L, but it is lower (measured by $\mu\text{g/L}$) in fish, which determines the arduous nature of the extraction and enrichment of geosmin. Most of the existing technologies focus on the detection of geosmin in water, such as HS-SPME-GC method, by which the typical odor compounds can be tested with the detection limit of 0.4 ng/L, and SPME-GC-MS method, and so on. The present study established an instrumental method to detect geosmin by microwave mediated distillation with headspace solid-phase micro-extraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrum (GC-MS). Through the improvement for the parameters in microwave distillation and solid-phase micro-extraction, the optimum conditions are defined as follows: the power of microwave is 350 W, and the time of distillation is 10 min, with 70 mL/min nitrogen flow. The time and temperature for extraction is 30 min and 60 °C, with the stirring speed being 1 500 r/min. The determination method has low detection limit which is 1.0 ng/L for geosmin in fish. In addition, there is significant linear correlation in the range of 5–100 ng/L for geosmin, with the correlation coefficient being 0.996. Live bighead carp with body length of 50 cm and body weight of $(1\,500 \pm 230)$ g were bought from Nanshan Fish Market in Qingdao in October and were taken as experiment material. With this determination method, the average content of geosmin in bighead carp meat was measured to be 5.4 $\mu\text{g/L}$. The establishment of this method has far-reaching significance for general determination of earthy-musty odors in aquaculture product and it also provides an effective way to remove geosmin in aquaculture products. [*Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17 (5): 1094–1100]

Key words: microwave mediated distillation; SPME; GC-MS; geosmin