

文章编号:1000-0615(2004)01-0100-06

海产品中溴酚类海洋风味素的气相色谱-质谱联用分析

徐继林, 严小军, 徐年军, 沈佳, 沈丽君

(宁波大学海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:建立了海产品中的溴酚类海洋风味素的毛细管气相色谱-质谱联用检测法。样品中溴酚类化合物在挥发油测定器中用乙酸乙酯通过循环蒸馏萃取, 浓缩后用电子轰击源在特征离子碎片扫描检测模式下进行检测。结果表明, 5种溴酚类化合物在 SBP-50 柱上得到良好的分离, 色谱出峰尖锐, 没有杂峰干扰。本方法在 2.5~40 mg·L⁻¹ 浓度范围内线性关系良好, 最低检测限低于 1 ng·mL⁻¹。当向 25.00g 样品中添加溴苯酚各 2.0 μg 时, 平均回收率分别达到 90.45% (2-BP)、60.49% (4-BP)、85.79% (2,4-DBP)、84.98% (2,6-DBP)、90.80% (2,4,6-TBP), 标准相对偏差为 1.37%~4.16%。对市场上销售的几种海洋经济动物测定, 溴酚类风味素含量在 5.40~31.38 ng·g⁻¹ 范围内, 而所测得的淡水青虾中溴酚类风味素含量只有 0.18 ng·g⁻¹。

关键词: 海产品; 溴酚; 风味素; 气相色谱质谱联用

中图分类号: TS207.3; S985 **文献标识码:** A

Analysis of bromophenol-like marine flavors in marine aquatic products by gas chromatography-mass spectrometry

XU Ji-lin, YAN Xiao-jun, XU Nian-jun, SHEN Jia, SHEN Li-jun

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: A sensitive analytical method of bromophenol-like marine flavors has been established using capillary gas chromatography-mass spectrometry. The bromophenols in the aquatic products can be extracted by essential oil analyzer effectively, and determined using EI-SIM-MS after concentration. The results indicated that five bromophenol compounds can be separated from each other on SBP-50 column, with sharp peak and rare contamination. The linearity is superior from 2.5 to 40 mg·L⁻¹, with low detection limit of 1 ng·mL⁻¹. The average recovery rate is 90.45% for 2-BP, 60.49% for 4-BP, 85.79% for 2,4-DBP, 84.98% for 2,6-DBP, and 90.80% for 2,4,6-TBP, respectively, after spiking each bromophenol 2.0 μg into 25.00 g sample. The standard deviation ranges from 1.37 to 4.16%. This method is applied to determine the bromophenol compounds in different aquatic products, with the results of 5.40-31.38 ng·g⁻¹ for seafoods including two species of shrimp, one species of clam, and one species of fish, and only 0.18 ng·g⁻¹ for fresh seafood (freshwater shrimp).

Key words: marine aquatic food; bromophenols; flavor; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

收稿日期: 2003-09-28

资助项目: 国家新药基金(2003AA2Z3511)、浙江省青年人才基金(RC02059)

作者简介: 徐继林(1965-), 男, 江苏泰州人, 助研, 主要从事海洋生物化学研究。Tel: 0574-87600458, E-mail: xjlsyf@mail.nbptt.zj.

cn

通讯作者: 严小军(1967-), 男, 教授, 博士生导师。Tel: 0574-87600458, E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

近年来对多种野生、养殖、淡水品种的比较研究发现,海洋水产品含有不同于陆地生物的特有风味物质,这类风味物质不是氨基酸、核苷酸等传统意义上的味觉物质。而且在养殖品种中这类风味物质会大量缺失,许多证据表明它们是一类含溴苯酚类化合物^[1-3],其中,2,6-二溴酚会给虾肉带来类似碘或者碘仿的味道^[2],而2-溴酚和2,4,6-三溴酚可以产生强烈的虾类风味,这3种化合物单独或者联合作用可以加强海洋食物的风味^[3]。另外两种溴酚:4-溴酚和2,4-二溴酚,带有微弱的酚类味道,它们的存在也能对一些海洋食物的可感知味道产生影响^[2]。一些学者已经开始在饵料中添加溴酚类化合物,试图改善水产品的海洋风味^[4]。为了给海洋水产品中人工养殖品种与自然品种的风味区别提供定量依据,并用以指导养殖水产品的海洋风味改良,我们建立了毛细管气相色谱质谱联用(GC/MS)法对水产品中溴酚类化合物的检测方法,并对目前市场几种常见海洋水产品进行了分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

仪器与设备 QP2010 气相色谱-质谱分析仪,带 AOC-20 自动进样器(日本 SHIMADZU 公司);30m×0.25mm×0.25 μm SPB-50 色谱柱(美国 SUPELCO 公司);国产挥发油测定器、高速分散匀质机、旋转蒸发仪等。

药品与试剂 2-溴苯酚(2-bromophenol, 2-BP, 纯度 ≥ 98%, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司)、4-溴苯酚(4-bromophenol, 4-BP, 纯度 ≥ 98%, 瑞士 FLUKA 公司)、2,4-二溴苯酚(2,4-dibromophenol, 2,4-DBP, 色谱纯, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司)、2,6-二溴苯酚(2,6-dibromophenol, 2,6-DBP, 纯度 ≥ 99%, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司)、2,4,6-三溴苯酚(2,4,6-tribromophenol, 2,4,6-TBP, 纯度 ≥ 99%, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司)。乙酸乙酯(色谱纯, 美国 TEDIA 公司),其他试剂为国产分析纯。

实验材料 购自宁波水产品市场的鲜活水产品,虾类去头、壳,贝壳类去壳,鱼类去骨。取肌肉用高速分散匀质机匀浆,备用。

1.2 实验方法

标准溶液的配制 在乙酸乙酯中加入 50mg

2-BP(32 μL)、50mg 4-BP、50mg 2,4-DBP、50mg 2,6-DBP 和 50mg 2,4,6-TBP,定容至 50mL,配制成分别含 1mg·mL⁻¹溴苯酚的标准储备液,密封冷藏于 4℃ 冰箱中。制作工作曲线时,根据水产品中五种溴酚类化合物的大致含量范围^[2,3],取此储备液用乙酸乙酯配制一系列合适的浓度,再进行 GC/MS 分析。

样品前处理及定量分析 取 25.0 g 高速分散匀质机匀浆后的样品放入 200mL 水中,搅拌机搅匀,10mol·L⁻¹硫酸调节至 pH < 1,20℃ 下放置过夜,转入挥发油测定器的蒸馏烧瓶中。挥发油测定器的收集器部分预先加入 20mL 乙酸乙酯,在电热煲上回流蒸馏 3 h,取乙酸乙酯相用无水硫酸钠脱水,真空浓缩到小于 0.5 mL,再用乙酸乙酯定容到 1.00mL,进行 GC/MS 分析。

根据样品中所含各溴苯酚的特征离子信号响应强度,用外标法求出各溴苯酚的含量。

分析条件 GC 条件:进样口温度 250℃,载气为 99.999% 的高纯氮,总流速 80 mL·min⁻¹,柱流速 1.50 mL·min⁻¹,柱前压 85.0 kPa,柱起始温度 40℃,保持 1 min,以 15℃·min⁻¹升至 225℃,再以 40℃·min⁻¹升至 280℃,保持 5 min。分流进样 1 μL,分流比为 10:1。MS 条件:用电子轰击(electron impact, EI)源分析,电子能量为 70 eV,离子源温度 200℃,接口温度 250℃,选取全程离子碎片扫描(SCAN)模式时,质量扫描范围为 40~400,溶剂延迟 3.5 min。选取特征离子碎片扫描(SIM)模式时,2-溴苯酚和 4-溴苯酚选择 m/z 172、174 和 65 作为特征碎片离子;2,4-二溴苯酚和 2,6-二溴苯酚选择 m/z 252、250 和 63 作为特征碎片离子;2,4,6-三溴苯酚选择 m/z 330、332 和 62 作为特征碎片离子,每组特征碎片离子中,前一个离子作为定量时的目标离子,后两个离子作为定性时的参考离子。

2 结 果

2.1 溴苯酚类化合物的气相色谱分离

实验结果表明,对于含有 5 种溴酚类化合物的混合标样,分别采用 SCAN 模式和 SIM 模式,各组可以在 SPB-50 柱子上得到良好的分离(图 1),保留时间分别为 8.03min(2-BP)、10.67min(4-BP)、11.36min(2,4-DBP)、11.84min(2,6-DBP)和 14.23min(2,4,6-TBP)。从色谱图上也可以看出,SIM 模式下色谱峰更尖锐干扰峰大大减少。

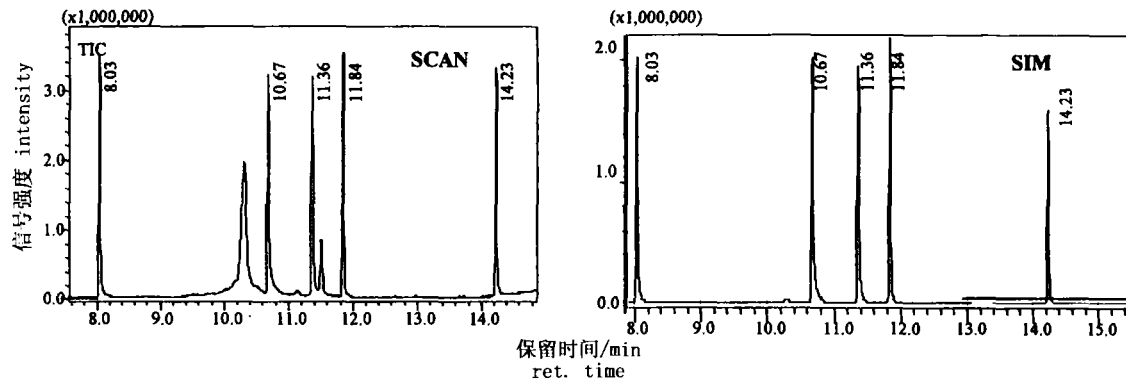


图1 标准溴苯酚在不同模式下的 GC-MS-TIC

Fig.1 GC-MS-TIC chromatogram of authentic bromophenols in different analytical modes

2.2 定量标准曲线

配制分别含 $40.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 各溴苯酚的混合标样,在 1.2 条件下采用 SIM 模式进行 GC/MS 分析,以各组分所选定量用目标离子的峰面积对浓度作工作曲线,在 $2.5\sim 40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内各组分均呈良好的线性关系(表 1)。

2.3 回收率和精密度的测定

向 25.00g 已知溴苯酚含量的人工养殖南美白对虾肌肉中加入溴苯酚各 $2.0\mu\text{g}$,按照 1.2 步骤和分析条件测定该样品中各溴苯酚的总含量,平行测定 3 次,求得回收率和精密度(表 2)。除 4-BP 外,其他 4 种溴苯酚回收率良好,且相对标准偏差均小于 5%,说明此方法稳定性较好。

表 1 5 种溴苯酚的线性方程

Tab.1 Linear calibration equations of five bromophenol compounds

溴苯酚 bromophenol	线性方程 calibration equation	回归系数 regression coefficient	浓度范围($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) range of concentration
2-BP	$Y = 17154X$	0.9991	2.5 ~ 40.0
4-BP	$Y = 18166X$	0.9997	2.5 ~ 40.0
2,4-DBP	$Y = 8682X$	0.9994	2.5 ~ 40.0
2,6-DBP	$Y = 8850X$	0.9991	2.5 ~ 40.0
2,4,6-TBP	$Y = 11485X$	0.9992	2.5 ~ 40.0

表 2 5 种溴苯酚回收率的测定结果

Tab.2 Results of recovery of 5 bromophenols

溴苯酚 BP	回收率 1 recovery 1	回收率 2 recovery 2	回收率 3 recovery 3	均值 $X \pm SD$	相对标准偏差 RSD(%)
2-BP	88.13	93.10	90.12	90.45 ± 2.04	2.76
4-BP	57.68	62.54	61.25	60.49 ± 2.52	4.16
2,4-DBP	84.14	85.22	88.00	85.79 ± 1.99	2.32
2,6-DBP	84.42	86.32	84.20	84.98 ± 1.17	1.37
2,4,6-TBP	90.09	94.12	88.20	90.80 ± 3.02	3.33

2.4 最低检测限测定

采用将对应信噪比为 3 的标准物浓度^[5],作为仪器检测限计算依据。用 QP2010 气相色谱-质谱分析仪随机所载 SNRATIO 软件,计算出各标

准溴苯酚浓度(C)为 $2.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的信噪比(S/N),按式 $MDL = 3CN/S$ 计算出仪器的最低检测限可见(表 3),对 5 种溴苯酚而言,仪器检测限均小于 $1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,类似于 Whitfield 等^[5]的结果。

2.5 样品中溴酚类化合物的定量测定

根据上述条件,对四种海洋水产品 and 一种淡水虾进行了分析,每一样品均平行测定三次,取均值(表 4)。在测定的 4 种海洋水产品中,两种虾类所含溴酚类风味素量要比鱼类和贝类多,其含量范围与文献[2,3,5]报道一致。而测定的一种淡水青虾溴酚类风味素含量非常少,进一步验证了这类风味物质是属于海产品特有的海洋风味^[1]。

表 4 几种水产品中 5 种溴苯酚的含量

Tab.4 Content of five bromophenol compounds in some aquatic products

名称 name	南美白对虾 (<i>Penaeus vannamei</i>)	鹰爪虾 (<i>Trachypenaeus curvirostris</i>)	银鲱 (<i>Pampus argentus</i>)	缢蛏 (<i>Sinonvacula constricta</i>)	青虾 (<i>Macrobrachium nipponense</i>)
2-BP	1.48	ND	0.24	0.12	ND
4-BP	2.16	17.92	1.84	0.56	0.06
2,4-DBP	5.84	8.20	1.60	0.68	0.12
2,6-DBP	5.76	0.92	1.16	0.40	ND
2,4,6-TBP	12.02	4.34	4.30	3.64	ND
total	27.26	31.38	9.14	5.40	0.18

注:ND 指在本方法的仪器检测限下未检出 Notes: ND not detected at the detection level of the method

3 讨论

3.1 样品中溴酚类风味素提取方式的选择

挥发性物质的测定大多采用水蒸气蒸馏法^[6,7]收集馏液,再通过液液萃取或固相微萃取后进行 GC 分析。但此方法回收率较低(均低于 70%),而要将蒸馏出的溴苯酚萃取完全,需萃取剂乙酸乙酯的量太大(超过 1L),稳定性也太差;Whitfield 等^[5]采用了一种水蒸气蒸馏-溶剂萃取联合装置(combined steam distillation-solvent extraction, SDE),可以使蒸馏和萃取两个过程循环进行;我们采用普通的挥发油测定器,在收集器部分预先加入 20mL 乙酸乙酯,蒸馏过程中冷凝液可以通过乙酸乙酯相再回流到蒸馏瓶中,同样可以实行蒸馏和萃取的循环。可见,2.3 方法的回收率和精密度均良好。

3.2 蒸馏时间的选择

向 25.00g 已知溴苯酚含量的人工养殖的南美白对虾肌肉中加入溴苯酚各 2.0 μg ,按照 1.2 步骤,分别回流蒸馏萃取 10、30、60、90、120、180、240min,测定不同蒸馏时间下的回收率,从图 2 可见,随着蒸馏时间的增加各溴苯酚的回收率不断增加,当蒸馏时间增加到 180 min 后,各溴苯酚的

表 3 5 种溴苯酚的检测限

Tab.3 The detection limit of five bromophenol compounds

溴苯酚 BP	信噪比 S/N	检测限 MDL ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
2-BP	30094	0.25
4-BP	19542	0.38
2,4-DBP	41838	0.18
2,6-DBP	8386	0.89
2,4,6-TBP	18791	0.40

回收率趋于稳定,所以选取 180 min 作为蒸馏的时间。

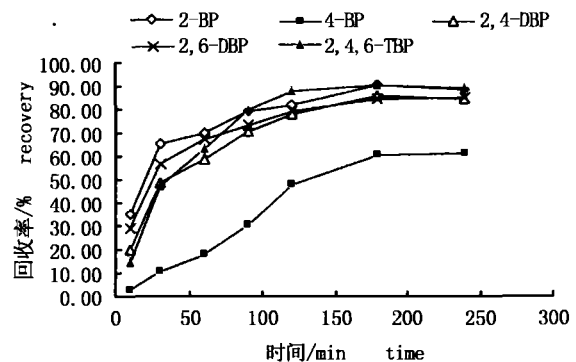


图 2 蒸馏时间对溴酚类化合物回收率的影响
Fig.2 The recovery of five bromophenol compounds at different distillation time

3.3 溴酚类化合物的定性定量分析

水产品中溴酚类化合物的定性基于两点。一是在相同的色谱条件下与标准色谱图(图 1)进行对照,根据保留时间确定样品中的溴酚类化合物;再就是通过质谱图(图 3)进行定性。由图 1 也可以看出,采用同样的测定条件,SIM 模式下的色谱图中背景峰明显比 SCAN 模式下的色谱图中背景峰少,说明采用 SIM 模式可以明显提高方法的灵

灵敏度。所以我们分析中采用 SIM 模式进行定量分析。为了最大限度地提高方法的灵敏度,一般 SIM 模式中都是选取化合物质谱图中信号强度较大的离子碎片作为目标离子。而为了确保特定保留时间上的峰是目标化合物的离子强度信号,须

再分别选取另外两个强度相对较大的离子作为参考离子,只有当目标离子和参考离子的相对丰度与标准物一致时,才认为该化合物是我们需要检测的化合物。1.2 分析条件中各化合物特征离子正是根据图 3 进行选择的。

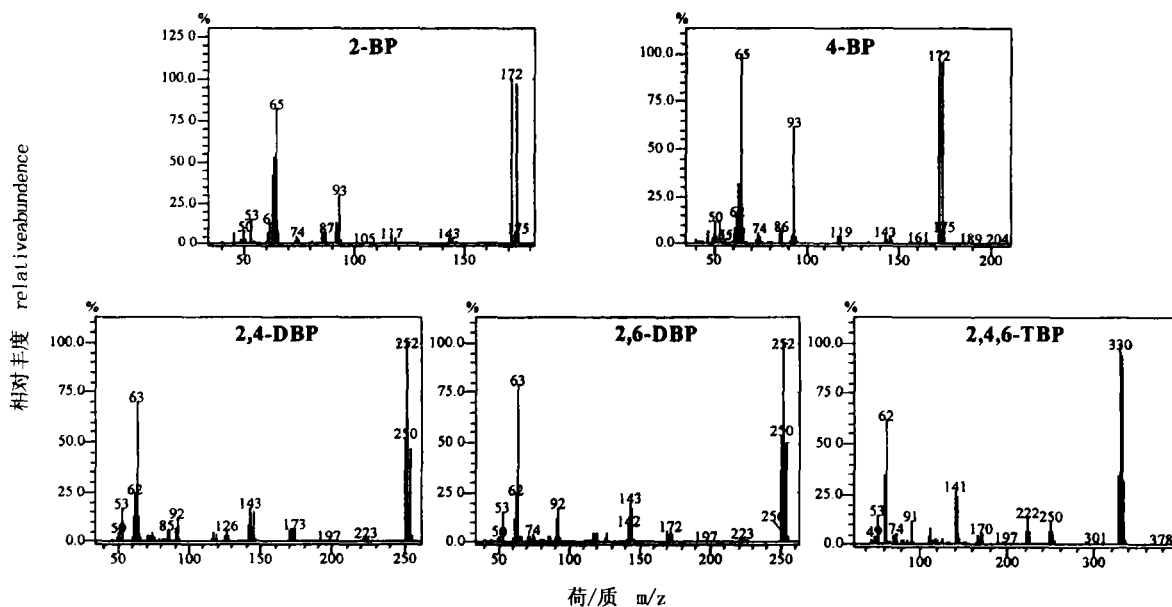


图 3 溴苯酚化合物的质量谱图

Fig. 3 Mass spectrum of five bromophenol compounds

对于有着比较复杂前处理的定量分析,常采用内标法⁸,即在做工作曲线和样品时加入内标校正,但所用的内标与目标化合物的性质必须相似,保留时间也要尽量接近。对于本实验而言,由于 5 种溴酚类化合物的性质特别是挥发性相差很大,很难找到一个合适的内标。曾经使用了苯酚、2-氯苯酚、2,4-二氯苯酚作为内标,结果都不理想。Whitfield 等¹⁵使用了 2,6-二溴苯酚-氘这种氢的同位素化合物作为内标,但这种化合物价格昂贵,其回收率也分别只有 94% (2-BP)、41% (4-BP)、74% (2,4-DBP)、81% (2,6-DBP) 和 74% (2,4,6-TBP);而通过改进提取方式,我们使用外标法同样可以得到比较理想的提取效率(表 2),除 2-BP 与 Whitfield 等的结果相似外,其他 4 个溴酚类化合物的回收率都有不同程度的提高。

4 结论

在所选实验条件下,5 种溴酚类化合物在 SPB-50 柱上得到良好的分离。利用 EI 源在 SIM 检测模式下,对标准品和样品进行检测,色谱出峰尖锐,没有杂峰干扰。方法在 2.5 ~ 40 mg·L⁻¹ 浓度范围内线性关系良好,方法的最低检测限低于 1 ng·mL⁻¹。当向 25.00g 样品中添加溴苯酚各 2.0 μg 时,平均回收率分别达到 90.45% (2-BP)、60.49% (4-BP)、85.79% (2,4-DBP)、84.98% (2,6-DBP)、90.80% (2,4,6-DBP),标准相对偏差为 1.37% ~ 4.16%。用此方法对市场销售的几种海洋经济动物测定,溴酚类风味素含量在 5.40 ~ 31.38 ng·g⁻¹,而淡水青虾中溴酚类风味素含量只有 0.18 ng·g⁻¹。

参考文献:

- [1] Boyle J L, Lindsay R C, Stuibler D A. Occurrence and properties of flavor-related bromophenols found in the marine environment: a review [J]. *J Aquat Food Prod Technol*, 1993, 2: 75 - 112.
- [2] Whitfield F B, Shaw K J, Walker D I, et al. 2, 6 - Dibromophenol: the cause of an iodoform-like off-flavour in some Australian crustacea [J]. *J Sci Food Agric*, 1988, 46: 29 - 42.
- [3] Boyle J L, Lindsay R C, Stuibler D A. Contributions of bromophenols to marine-associated flavors of fish and seafood [J]. *J Aquat Food Prod Technol*, 1992, 1: 43 - 53.
- [4] Whitfield F B, Helidoniotis F, Drew M. Effect of diet and environment on the volatileflavour components of crustaceans[C]. *Fish Res Dev Corp*, 1997. Project 92/075 .
- [5] Whitfield F B, Helidoniotis F, Shaw K J, et al. Distribution of bromophenols in Australian wild-harvested and cultivated prawns [J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45, 4398 - 4405.
- [6] Negueruela A V, Alonso M J P, Paz P L P, et al. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil from the aerial parts of *Pimpinella junoniae* Ceb. & Ort., gathered in La Gomera, Canary Islands, Spain [J]. *J Chromatog A*, 2003, 1011: 241 - 244.
- [7] Loziene K, Vaiciuniene J, Venskutonis P R. Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus Pulegioides*) growing wild in Lithuania [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, 31: 249 - 259
- [8] Wang Z F. Qualitative and quantitative analysis of chromatography [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 170 - 172. [汪正范. 色谱定性定量[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 170 - 172.]