

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200315001

http://www.yykxjz.cn/

张艳红, 李德祥, 张凤枰, 邹昌健. 固相微萃取-气质联用法测定鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 167-175

ZHANG Y H, LI D X, ZHANG F P, ZOU C J. Determination of geosmin and 2-methylisoborneol in fish muscle by gas chromatography-mass spectrometry. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 167-175

固相微萃取-气质联用法测定鱼肉中 土臭味素和 2-甲基异莰醇*

张艳红^{1,2,3} 李德祥^{1,2,3} 张凤枰^{1,2,3}① 邹昌健^{1,2,3}

(1. 四川威尔检测技术股份有限公司 四川 成都 610041; 2. 通威股份有限公司水产畜禽营养与健康养殖农业农村部重点实验室 四川 成都 610093; 3. 通威股份有限公司水产健康养殖四川省重点实验室 四川 成都 610093)

摘要 采用顶空固相微萃取法建立了以顺式-十氢-1-萘酚为内标物、气相色谱质谱法测定鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇的定性定量测定方法。考察了鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇提取和定量方法,优化了顶空固相微萃取条件,并通过实际样品的测定,考察方法的适应性。结果显示,在 0.1~10.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内,土臭味素和 2-甲基异莰醇峰面积与内标物峰面积的比值均与质量浓度的比值呈良好的线性关系,相关系数 $r^2 > 0.999$,检出限分别为 0.018 和 0.023 $\mu\text{g/kg}$,定量限分别为 0.059 和 0.076 $\mu\text{g/kg}$,3 个浓度梯度添加平均回收率分别在 68.67%~80.30%、62.67%~83.40%之间,相对标准偏差分别在 2.35%~6.53%、3.16%~6.80%之间,该方法灵敏度高、重复性好,可用于批量鱼肉样品中土臭味素和 2-甲基异莰醇的定量测定。

关键词 顶空固相微萃取; 气相色谱质谱法; 鱼肉; 土臭味素; 2-甲基异莰醇

中图分类号 O655.9; TS201.6 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)05-0167-09

水产品是人类食品中优质动物蛋白的主要来源之一。我国是水产养殖第一大国,2019 年全国水产品总产量为 6450 万 t,其中,养殖产量为 5050 万 t。然而,部分养殖水产品的土腥味令消费者很难接受,是困扰水产养殖业已久的问题,直接影响到水产品的消费和养殖经济效益。据研究,土臭味素(geosmin, GSM)和 2-甲基异莰醇(2-methylisoborneol, 2-MIB)是易引起水产品肉质产生土腥味最常见的 2 种化合物,是放线菌(*Actinomycetes*)、蓝藻(*Cyanobacteria*)、细菌(*Bacteria*)和真菌(*Fungi*)等微生物的次级代谢产物在

萜烯合成酶的作用下产生的,参与这些生物合成的酶和基因最早是在链霉菌(*Streptomyces*)上发现的,后来也在蓝藻中发现(Cane *et al*, 2006; Dickschat *et al*, 2007; Ludwig *et al*, 2007)。研究表明,人体对土臭味素和 2-甲基异莰醇的嗅觉阈值分别为 0.9 和 0.6 $\mu\text{g/kg}$ (Robertson *et al*, 2005; Persson, 1980);水体中 4~10 ng/L 的土臭味素和 9~42 ng/L 的 2-甲基异莰醇就能使水体及水产品产生异味;当鱼肉组织中的这 2 种化合物浓度超过 0.7 $\mu\text{g/kg}$ 时,就不再适合零售(徐立蒲, 2009)。国内外相关研究人员采用臭氧(薛勇, 2006; 杜国伟,

* 四川省青年科技创新研究团队专项计划项目(2019JDTD0025)和成都市技术创新研发项目(2018-YF05-00794-SN)共同资助 [This work was supported by Youth Science and Technology Innovation Team Program of Sichuan Province (2019JDTD0025), and Technology Innovation Research and Development Project of Chengdu (2018-YF05-00794-SN)]. 张艳红, E-mail: zhangyh@willtest.cn

① 通讯作者: 张凤枰, 教授级高级工程师, E-mail: fengpingzhang@163.com

收稿日期: 2020-03-15, 收修改稿日期: 2020-05-06

2006; Schrader *et al.*, 2010; 王国超, 2012; Zhang *et al.*, 2016)、乙酸(Lindholm-Lehto *et al.*, 2019)、调节水质(Schrader *et al.*, 2010; 王赛, 2012)和暂养(杨玉平, 2010)等方法脱除或降低养殖水产品中的土腥味物质。目前, 有关土臭味素和 2-甲基异莰醇等的测定方法主要为感官分析法(Grimm *et al.*, 2004; Howgate, 2004; Robin *et al.*, 2006)、气相色谱法(Howgate, 2004)和气相色谱-质谱联用法(GC-MS) (陈依萍等, 2020)。GB/T 32470-2016 (张振伟等, 2016)规定了顶空固相微萃取-气相色谱质谱联用法测定生活饮用水及其水源水中的土臭味素和 2-甲基异莰醇。相关研究(张婷等, 2009; 王国超等, 2011; Deng *et al.*, 2012; 周梦海, 2015)报道了采用微波蒸馏-固相微萃取-气相色谱质谱联用法测定鲶鱼(*Silurus asotus*)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)肌肉中的土臭味素和 2-甲基异莰醇。Ruan 等(2013)采用搅拌棒吸收萃取-热脱附-气相色谱质谱联用法(SBSE-TD-GC-MS)测定大西洋鲑(*Salmo salar*)肌肉中的土臭味素和 2-甲基异莰醇含量, 土臭味素加标回收率达 93%~96%, 但 2-甲基异莰醇加标回收率仅为 23%~30%, 不满足检测需求。为准确测定水产品中的土臭味素和 2-甲基异莰醇含量, 本研究采用顶空固相微萃取法(headspace solid-phase microextraction, HS-SPME)提取鱼肉中的土腥味物质, 以顺式-十氢-1-萘酚为内标、气相色谱质谱联用法进行定性和定量测定, 旨在建立鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇的检测方法, 为养殖水产品异味物质脱除提供检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂和材料

7890A-5975C气相色谱-质谱联用仪, G1701EA 质谱工作站: Agilent公司, 美国; T10 均质仪, IKA 公司, 德国; SPME手柄、65 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头, Sigma-Aldrich公司, 美国; DF-II 集热式磁力加热搅拌器, 江苏金坛市医疗仪器厂; 40 mL 顶空瓶, 上海安谱科学仪器有限公司; LD6100-1 电子天平, 沈阳龙腾电子有限公司。

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 土臭味素和 2-甲基异莰醇混和标准溶液, 顺式-十氢-1-萘酚标准物质: Sigma-Aldrich 公司, 美国; 甲醇: 色谱纯; 水为 Milli-Q Gradient 去离子水。

肌肉样品: 鲫鱼(*Carassius auratus*)、乌鱼(*Channa argus*)、罗非鱼、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)、花鲢(*Aristichthys nobilis*)、

鲤鱼(*Cypriniformes* spp)和武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*), 在四川省成都白家水产品批发市场购买, 随机取 10 尾, 均为健康鲜活个体, 样品采集后立即装袋、充氧, 0.5 h 后运送到实验室, 致死后取肌肉部分, 去皮后切成 2~3 cm 肉片, 用均质仪打成肉糜, 置于密封袋中, 并于-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中冷冻保存, 分析时取出流水解冻后使用。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 准确称取样品 10 g (精确至 0.1 g) 于 40 mL 顶空瓶中, 加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺式-十氢-1-萘酚溶液 10 μL 作为内标, 加入 10 mL 去离子水, 用均质器均质 3 min, 将样品完全破碎, 放入微型搅拌子, 备用。

1.2.2 顶空固相微萃取提取土臭味素和 2-甲基异莰醇 萃取头老化: 第一次使用 DVB/CAR/PDMS 萃取头时, 需置于气相色谱进样口 250 $^{\circ}\text{C}$ 下老化 2 h (氮气保护下); 之后使用时, 需在 250 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 30 min, 以确保脱去可能吸附的挥发性成分。

SPME 提取: 将装有样品的顶空瓶置于磁力搅拌台上, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中平衡 10 min, 将 SPME 针管插入顶空瓶中(含 65 $\mu\text{m}/30 \mu\text{m}$ DVB/CAR/PDMS 萃取头, 使用前于 250 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 30 min, 以确保脱去可能吸附的挥发性成分), 固定萃取头在顶空瓶中的位置, 搅拌速度为 1000 r/min 左右, 顶空萃取 30 min 后取出, 迅速插入气相色谱仪的进样口, 解吸 5 min, 使 SPME 纤维头涂膜吸附的挥发性成分在高温下迅速热解吸, 即可通过 GC-MS 进行分析鉴定。

1.2.3 土臭味素和 2-甲基异莰醇标准工作溶液

0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 土臭味素和 2-甲基异莰醇混合标准储备液: 准确移取 100 μL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 土臭味素和 2-甲基异莰醇混合标准溶于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释、定容, 摇匀, 备用。

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺式-十氢-1-萘酚内标储备液: 准确称取顺式-十氢-1-萘酚标准物质 10 mg 于 1000 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释、定容, 摇匀, 备用。

土臭味素和 2-甲基异莰醇混合标准系列工作液: 称取 10 g 去离子水于 40 mL 顶空瓶中, 加入 10 mL 去离子水, 分别加入 10、20、50、100、200 和 1000 μL 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 土臭味素和 2-甲基异莰醇混合标准储备液, 10 μL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺式-十氢-1-萘酚内标储备液, 摇匀, 得到浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2 和 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 土臭味素和 2-甲基异莰醇系列标准工作液。

1.2.4 仪器工作条件 色谱柱: HP-5 ms 弹性毛细管柱(30.00 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 程序升温: 柱初温 60 $^{\circ}\text{C}$, 保持 4 min, 然后以 8.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 200 $^{\circ}\text{C}$,

保持 15 min, 以 20°C/min 升至 250°C, 保持 2 min; 进样口温度 250°C; 载气: He, 流量 1.0 mL/min; 解吸温度 250°C, 解吸时间 5 min, 不分流模式进样。

传输线温度 260°C; 离子源温度 230°C; 四极杆温度 150°C; 电子能量 70 eV。扫描方式: SIM 选择性离子扫描; 土臭味素扫描离子为 125、112 和 97; 2-甲基异莰醇的扫描离子为 135、108 和 95; 顺式-十氢-1-萘酚的扫描离子为 136、94 和 121。

1.2.5 标准工作曲线绘制和样品分析 按照上述色谱质谱条件和方法, 进行 GC-MS 分析, 以标准液中被测组分的峰面积和内标峰面积的比值为纵坐标, 以标准液中被测组分的浓度和内标浓度的比值为横坐标绘制标准工作曲线。在相同条件下测定样品, 从标准工作曲线上求得样品中土臭味素和 2-甲基异莰醇的含量。

2 结果与讨论

2.1 提取方法的选择

国内外有关土臭味素和 2-甲基异莰醇的提取方法主要有微波蒸馏-固相微萃取、顶空固相微萃取和搅拌棒吸收萃取-热脱附等(张婷等, 2009; 王国超等, 2011; Deng *et al.*, 2012; 周梦海, 2015; 张振伟等, 2016)。微波蒸馏提取需对微波萃取功率、微波蒸馏时间和载气气流等参数进行确认, 由于微波萃取所用的仪器大多为家用微波炉, 不同品牌和型号的微波炉使用功率不一致, 很难统一微波萃取功率和固化实验条件。前期准备实验时发现, 鱼肉中含有 70%~80% 的水分, 微波萃取时, 鱼肉中的水分汽化为水蒸气,

在载气吹扫和冷凝水冷却双重作用下, 水蒸气在管道中冷凝下来, 附着在冷凝管上, 影响土臭味素和 2-甲基异莰醇的收集, 导致回收率偏低, 多次实验结果的重复性、稳定性差。本方法选择顶空固相微萃取提取土臭味素和 2-甲基异莰醇, 称取样品后加入等体积的超纯水均质, 采用 60°C 顶空固相微萃取法对目标化合物进行提取和富集, 该前处理操作简单、易标准化, 加标回收实验、实际样品测定结果表明, 采用该提取方法具有良好的重现性, 可满足鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇的检测需求。

2.2 固相微萃取条件的选择和优化

2.2.1 萃取头的选择 Sung等(2005)对土臭味素和 2-甲基异莰醇提取过程中萃取头的选择进行了研究, 分析了 PDMS、PDMS/DVB、PA、CAR/PDMS、CW/DVB 和 DVB/CAR/PDMS 等 6 种不同吸附材质对水中土腥味物质的吸附效果。结果表明, DVB/CAR/PDMS 对土臭味素和 2-甲基异莰醇的萃取效果最好, 实验最终选择 DVB/CAR/PDMS 作为土臭味素和 2-甲基异莰醇提取的萃取头。

2.2.2 NaCl 的选择 固相微萃取中, 一般来说, 加入 NaCl 将获得较高的萃取效果, 但由于鱼肉样品挥发性风味成分较多, 加入 NaCl 会导致鱼肉中多种易吸附的挥发性成分吸附于萃取头, 使萃取头容易达到饱和, 从而减少土臭味素和 2-甲基异莰醇的吸附, 降低土臭味素和 2-甲基异莰醇的回收率, 最终影响土臭味素和 2-甲基异莰醇的准确定量, 纤维头的寿命也会因此显著下降, 比较实验结果见图 1。实验最终选择萃取过程中不添加 NaCl。

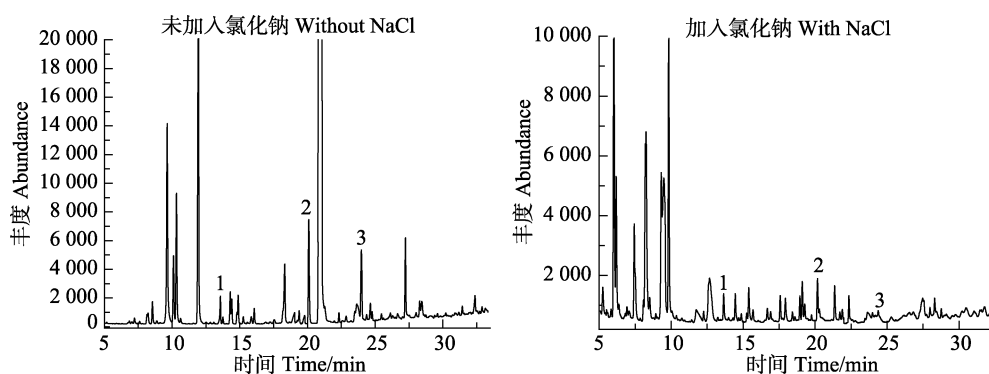


图 1 未加入 NaCl 和加入 NaCl 总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms without/with NaCl

1: 2-甲基异莰醇; 2: 顺式-十氢-1-萘酚; 3: 土臭味素 1: 2-MIB; 2: *cis*-Decahydro-1-naphthol; 3: GSM

2.2.3 搅拌速率对萃取效果的影响 设定搅拌时间 30 min, 萃取温度为 60°C, 考察搅拌速度分别为 300、600、900、1200、1500 和 2000 r/min 对萃取效果

的影响, 实验结果见图 2。结果表明, 土臭味素和 2-甲基异莰醇的回收率随着搅拌转速的增大而增大, 当搅拌速率达到 1500 r/min 之后, 回收率基本趋于稳定。

实验最终确定搅拌速率为 1500 r/min。

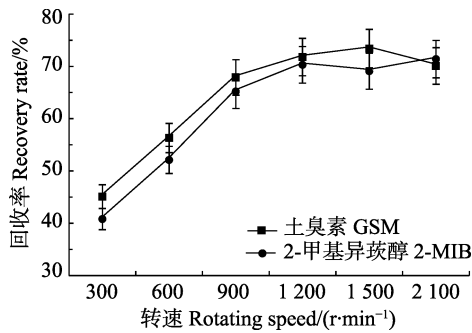


图2 不同搅拌转速对加标回收率的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of different stir speeds on recovery rate ($n=3$)

2.2.4 萃取时间 实验以 65 μm DVB/CAR/PDMS 为实验用萃取头。萃取温度均设置为 60 $^{\circ}\text{C}$ ，平衡 10 min 后，吸附时间选取 20、30 和 40 min，考察土臭味素和 2-甲基异莰醇的加标回收率，结果见图 3。结果显示，30 和 40 min 吸附时间的回收率明显高于 20 min，30 和 40 min 的回收率相接近。综合比较，萃取时间 30 min 为最佳。

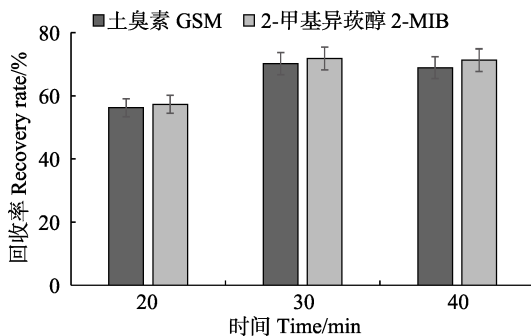


图3 不同萃取时间对加标回收率的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of different extraction time on recovery rate ($n=3$)

2.2.5 萃取温度 萃取温度对萃取结果有两方面影响，一方面温度升高有利于土臭味素和 2-甲基异莰醇的挥发，增加吸附量；另一方面，温度升高时，其余干扰物质吸附增加，从而减少目标化合物吸附量。选取萃取时间为 30 min，设置 40 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 和 80 $^{\circ}\text{C}$ 对实验结果的影响，以考察土臭味素和 2-甲基异莰醇的加标回收率，结果见图 4。结果表明，萃取温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 时，加标回收率最高。

2.3 定量方法的选择

由于土臭味素和 2-甲基异莰醇为半挥发性物质，不稳定，易损失。本研究采用外标法和内标法(顺式-十氢-1-萘酚)开展加标回收实验，结果见图 5。结果显示，外标法的回收率在 40.6%~46.7%之间，内标法回收率在 70.6%~72.3%之间，内标法的回收率明显高

于外标法。因此，选择内标法作为鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇含量的测定方法。

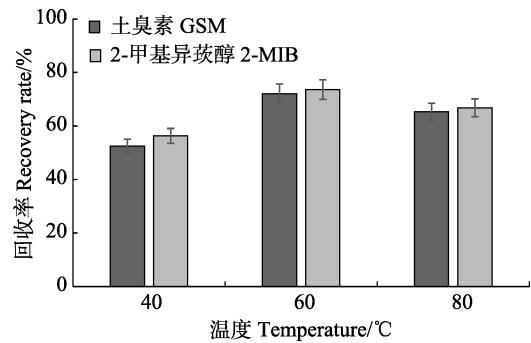


图4 不同萃取温度对加标回收率的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of different extraction temperature on recovery rate ($n=3$)

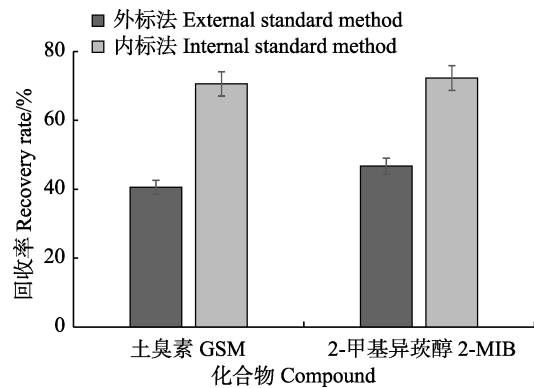


图5 外标法和内标法对加标回收率的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of external standard method and internal standard method on recovery rate ($n=3$)

实验选用了2-异丁基-3-甲氧吡嗪和顺式-十氢-1-萘酚2种与目标化合物化学性质相似、沸点相近的内标物进行加标回收实验。结果显示，用顺式-十氢-1-萘酚作为内标物，土臭味素和2-甲基异莰醇回收率分别为71.2%和69.1%；而用2-异丁基-3-甲氧吡嗪作为内标物，土臭味素和2-甲基异莰醇回收率分别为57.3%和48.9%。因此，选择顺式-十氢-1-萘酚作为内标物。

2.4 线性范围、检出限和定量限

土臭味素和 2-甲基异莰醇混合标准系列工作液分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 和 10.0 $\mu\text{g/L}$ ，顺式-十氢-1-萘酚(内标)的浓度均为 1 $\mu\text{g/L}$ 时进样测定。以标准液中被测组分的峰面积和内标峰面积的比值为纵坐标，以标准液中被测组分的浓度和内标浓度的比值为横坐标，绘制标准工作曲线，并分别计算、验证最低检出浓度($S/N=3.0$, P/P)、最低定量浓度($S/N=10.0$, P/P)。土臭味素和 2-甲基异莰醇 GC-MS 总离子流图见图 6，线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限等结果见表 1。

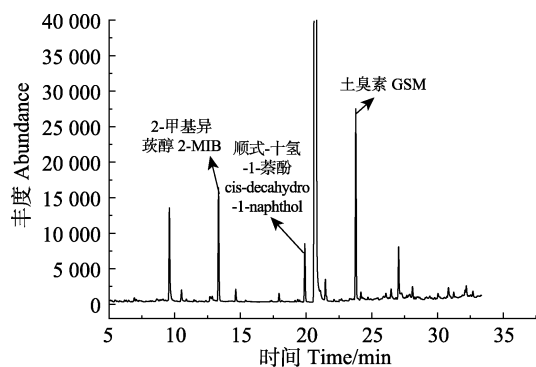


图 6 土臭味素、2-甲基异莰醇和顺式-十氢-1-萘酚 (内标)标准液总离子流图(5.0 ng/mL)

Fig.6 Total ion chromatogram of 5.0 ng/mL geosmin, 2-methylisoborneol and *cis*-decahydro-1-naphthol standard solution

2.5 精密度实验

对鲫鱼、乌鱼、罗非鱼和斑点叉尾鲷等 4 个样品进行精密度实验, 结果见表 2。结果显示, 4 种鱼肉样品中土臭味素和 2-甲基异莰醇的测定结果相对标准偏差(RSD)均小于 5%, 说明该方法重现性好。

2.6 回收率实验

对鲫鱼和罗非鱼进行加标实验, 并计算回收率, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 土臭味素的加标回收率为 68.67%~80.30%, 2-甲基异莰醇的加标回收率为 62.67%~83.40%, 相对标准偏差均小于 10%。由此可见, 该方法能较准确测定鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇的含量。

表 1 土臭味素和 2-甲基异莰醇的线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限

Tab.1 Regression equations, correlation coefficients (r^2), detection limits and quantification limits for geosmin and 2-methylisoborneol

组分 Component	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Detection limit ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	定量限 Quantification limit ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
土臭味素 GSM	0.1~10.0	$Y=10.80x-0.153$	0.999 5	0.018	0.059
2-甲基异莰醇 2-MIB	0.1~10.0	$Y=4.77x+0.265$	0.999 7	0.023	0.076

表 2 精密度实验结果

Tab.2 Results of precision test

项目 Item	样品 Sample	测定结果 Determination results ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)						平均值 Average ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD /%
		1	2	3	4	5	6		
土臭味素 GSM	鲫鱼 <i>C. auratus</i>	0.302	0.312	0.304	0.322	0.310	0.309	0.310	2.27
	乌鱼 <i>C. argus</i>	0.215	0.225	0.208	0.226	0.211	0.237	0.220	4.97
	罗非鱼 <i>Tilapia</i>	0.247	0.253	0.238	0.248	0.251	0.255	0.249	2.42
	斑点叉尾鲷 <i>I. punctatus</i>	0.325	0.304	0.306	0.293	0.311	0.321	0.310	3.78
2-甲基异莰醇 2-MIB	鲫鱼 <i>C. auratus</i>	0.152	0.149	0.158	0.146	0.155	0.144	0.151	3.54
	乌鱼 <i>C. argus</i>	0.379	0.355	0.383	0.356	0.378	0.372	0.371	3.24
	罗非鱼 <i>Tilapia</i>	0.172	0.173	0.175	0.182	0.166	0.179	0.174	3.22
	斑点叉尾鲷 <i>I. punctatus</i>	0.159	0.157	0.165	0.169	0.153	0.171	0.162	4.43

2.7 实际样品测定

为考察方法的适用性, 在水产市场上购买鲫鱼、乌鱼、罗非鱼、草鱼、花鲢、鲤鱼和武昌鱼进行土臭味素和 2-甲基异莰醇测定实验, 每个样品重复测定 3 次, 结果见表 4, 草鱼实际样品检测总离子流图见图 7。7 种鱼类的土臭味素的含量为 0.179~0.306 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2-甲基异莰醇的含量为 0.222~0.531 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在实际样品测定中, 目标化合物和内标物分离良好, 无干扰峰, 可满足鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇的定性定量测定。

3 结论

由于鱼肉中挥发性风味物质成分复杂、种类繁多, 风味物质的检测一直备受关注。土腥味物质作为一类影响鱼肉品质的挥发性成分, 提取和吸附难度大, 干扰物质繁多, 其检测难度较大。本方法选择顶空固相微萃取技术作为土腥味物质的提取和富集方法, 前处理方法简单, 不使用有机溶剂, 不对环境造成污染。称取鱼肉样品后加入等体积的超纯水, 均质,

将鱼肉中的土臭味素和 2-甲基异莰醇溶解于水相中, 经顶空固相微萃取对目标物进行提取和富集, 以顺式-十氢-1-萘酚为内标物, 通过 GC-MS 定量分析, 可减少检测过程中其他风味成分对土臭味素和 2-甲基异莰醇的干扰, 达到完好分离, 方法精密度均小于 5%,

土臭味素的加标回收率为 68.67%~80.30%, 2-甲基异莰醇的加标回收率为 62.67%~83.40%, 相对标准偏差均小于 10%, 表明该方法可满足鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇的定量检测需要, 可作为养殖水产品异味物质脱除检测方法。

表 3 回收率实验结果($n=3$)
Tab.3 Spiked recovery of different feed material samples ($n=3$)

项目 Items	样品 Sample	本底值 Background $/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	添加量 Added amount $/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	测定值 Measured value $/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	回收率 Recovery rate /%	平均回收率 Average recovery rate/%	RSD /%		
土臭味素 GSM	鲫鱼 <i>C. auratus</i>	0.310	0.30	0.529	73.00	70.4	3.22		
				0.519	69.67				
				0.516	68.67				
			1.00	1.045	73.50			77.5	4.61
			1.113	80.30					
			1.098	78.80					
	罗非鱼 <i>Tilapia</i>	0.249	0.30	0.466	72.33	73.9	4.87		
				0.483	78.00				
				0.463	71.33				
		1.00	0.987	73.80	75.7			2.40	
		1.023	77.40						
		1.009	76.00						
2-甲基异莰醇 2-MIB	鲫鱼 <i>C. auratus</i>	0.151	0.15	0.249	65.33	68.7	6.80		
				0.251	66.67				
				0.262	74.00				
			0.50	0.568	83.40			78.7	5.64
			0.524	74.60					
			0.541	78.00					
	罗非鱼 <i>Tilapia</i>	0.174	0.15	0.276	68.00	66.9	5.67		
				0.268	62.67				
				0.279	70.00				
		0.50	0.538	72.80	72.1			3.31	
		0.544	74.00						
		0.521	69.40						
	1.00		0.961	78.70	76.1	3.16			
			0.929	75.50					
			0.914	74.00					

表 4 7 种实际样品测定结果

Tab.4 Quantification determination results for 7 fish muscle samples

项目 Items	样品 Sample	测定值 Measured value ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均值 Average value ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	RSD /%
土臭味素 GSM	鲫鱼 <i>C. auratus</i>	0.302	0.306 \pm 0.012	3.90
	乌鱼 <i>C. argus</i>	0.220	0.213 \pm 0.009	4.28
		0.217		
	罗非鱼 <i>Tilapia</i>	0.203		
		0.195	0.187 \pm 0.008	4.18
		0.188		
	草鱼 <i>C. idella</i>	0.179		
		0.304	0.305 \pm 0.007	2.18
		0.299		
	花鲢 <i>A. nobilis</i>	0.312		
		0.211	0.204 \pm 0.007	3.22
		0.198		
鲤鱼 <i>C. carpio</i>	0.205			
	0.189	0.179 \pm 0.008	4.86	
	0.172			
武昌鱼 <i>M. amblycephala</i>	0.177			
	0.236	0.232 \pm 0.005	1.96	
	0.227			
2-甲基 异茨醇 2-MIB	0.233			
	鲫鱼 <i>C. auratus</i>	0.359	0.353 \pm 0.019	5.40
	乌鱼 <i>C. argus</i>	0.368		
		0.331	0.344 \pm 0.015	4.52
	罗非鱼 <i>Tilapia</i>	0.344		
		0.329	0.255 \pm 0.010	3.75
		0.360		
	草鱼 <i>C. idella</i>	0.266		
		0.500	0.531 \pm 0.028	5.35
		0.556		
	花鲢 <i>A. nobilis</i>	0.537		
		0.264	0.257 \pm 0.006	2.36
0.252				
鲤鱼 <i>C. carpio</i>	0.255			
	0.227	0.222 \pm 0.009	4.38	
	0.229			
武昌鱼 <i>M. amblycephala</i>	0.211			
	0.362	0.350 \pm 0.016	4.57	
	0.356			
		0.332		

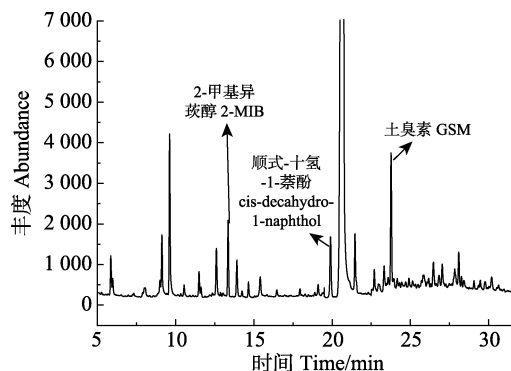


图 7 草鱼样品总离子流图

Fig.7 Total ion chromatogram of geosmin, 2-methylisoborneol, and cis-decahydro-1-naphthol in extract solution of grass carp

参 考 文 献

- CANE D E, HE X F, KOBAYASHI S, *et al.* Geosmin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular cloning, expression, and mechanistic study of the germacradienol/geosmin synthase. *Journal of Antibiotics*, 2006, 59(8): 471-479
- CHEN Y P, CUI W X, GAO R C, *et al.* Changes in quality of sturgeon fillet during 4°C and 3°C partial freezing storage. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 178-186 [陈依萍, 崔文萱, 高瑞昌, 等. 冷藏与微冻贮藏过程中鲟鱼肉品质变化. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 178-186]
- DENG X W, XIE P, QI M, *et al.* Microwave-assisted purge and trap extraction device coupled with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of five predominant odors in sediment, fish tissues, and algal cells. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1219(1): 75-82
- DICKSCHAT J S, BODE HELGE B, MAHMUD T, *et al.* A novel type of geosmin biosynthesis in myxobacteria. *Journal of Organic Chemistry*, 2007, 70(13): 5174-5182
- DU G W. Study on the deodorization technology of silver carp. Master's Thesis of Jiangnan University, 2006, 1-44 [杜国伟. 鲢鱼糜的脱腥技术研究. 江南大学硕士研究生学位论文, 2006, 1-44]
- GRIMM C C, LLOYD S W, ZIMBA P V. Instrumental versus sensory detection of off-flavors in farm-raised channel catfish. *Aquaculture*, 2004, 236(1/2/3/4): 309-319
- HOWGATE P. Tainting of farmed fish by geosmin and 2-methylisoborneol: A review of sensory aspects and of uptake/depuration. *Aquaculture*, 2004, 234(1/2/3/4): 155-181
- DUPUY H P, FLICK G J, STANGELO A J, *et al.* Analysis for trace amounts of geosmin in water and fish. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1986, 63(7): 905-908
- LI W, OMANNISA M, XU J L, *et al.* Comparative study of volatile components from two strains of *Pyropia haitanensis* in different culture areas. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 147-156 [李微, 阿曼尼萨·买买提, 徐继林, 等. 不同海域不同品种坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)挥发性成分

- 的比较分析. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 147-156]
- LINDHOLM-LEHTO P C, SUURNÄKKI S, PULKKINEN J T, *et al.* Effect of peracetic acid on levels of geosmin, 2-methylisoborneol, and their potential producers in a recirculating aquaculture system for rearing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacultural Engineering*, 2019, 85: 56-64
- LUDWIG F, MEDGER A, BÖRNICK H, *et al.* Identification and expression analyses of putative sesquiterpene synthase genes in *Phormidium* sp. and prevalence of geoA-like genes in a drinking water reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(21): 6988-6993
- PERSSON P E. Sensory properties and analysis of two muddy odour compounds, geosmin and 2-methylisoborneol, in water and fish. *Water Research*, 1980, 14(8): 1113-1118
- 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*. *Aquaculture*, 2005, 245(4): 89-99
- ROBIN JOEL, CRAVEDI J P, HILLENWECK A, *et al.* Off flavor characterization and origin in French trout farming. *Aquaculture*, 2006, 260(1/2/3/4): 128-138
- RUAN E D, AALHUS J L, SUMMERFELT S T, *et al.* Determination of off-flavor compounds, 2-methylisoborneol and geosmin, in salmon fillets using stir bar sorptive extraction-thermal desorption coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1323: 133-136
- SCHRADER K K, DAVIDSON J W, RIMANDO A M, *et al.* Evaluation of ozonation on levels of the off-flavor compounds geosmin and 2-methylisoborneol in water and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 2010, 43(2): 46-50
- SCHRADER K K, DAVIDSON J W, SUMMERFELT S T. Evaluation of the impact of nitrate-nitrogen levels in recirculating aquaculture systems on concentrations of the off-flavor compounds geosmin and 2-methylisoborneol in water and rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacultural Engineering*, 2013, 57: 126-130
- SUNG Y H, LI T Y, HUANG S D. Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 2005, 65(2): 518-524
- WANG G C, LI L H, HAO S Z, *et al.* Determination of geosmin and 2-methylisoborneol in tilapia meat. *Food Science*, 2011, 32(22): 188-191 [王国超, 李来好, 郝淑贤, 等. 罗非鱼肉中土臭味素和 2-甲基异莰醇的测定. *食品科学*, 2011, 32(22): 188-191]
- WANG G C. Study on the detection and removal methods of fishy taste substance in Tilapia. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012, 1-68 [王国超. 罗非鱼腥味物质成分检测及脱除方法的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1-68]
- WANG S. Effects of water quality and algae changes on tilapia odor and its removal. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2012, 1-66 [王赛. 水质、藻类变化对罗非鱼异味产生的影响及异味去除初步探讨. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2012, 1-66]
- XU L P. Study on the content, sources and influencing factors of dimethylisoamylol and geosmin in fish pond. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2009, 1-116 [徐立蒲. 鱼池中二甲基异莰醇和土臭味素的含量、来源及产生影响因素的研究. 华中农业大学博士研究生学位论文, 2009, 1-116]
- XUE Y. Study on antifreeze denaturant of catfish surimi and removal of fishy odor. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2006, 1-144 [薛勇. 鲮鱼鱼糜抗冻变性剂及土腥味脱除方法的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006, 1-144]
- YANG Y P. Study on Identification and analysis methods and removal techniques of soily odor in *Carassius auratus*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2010, 1-78 [杨玉平. 鲢鱼体内土腥味物质鉴定及分析方法与脱除技术研究. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2010, 1-78]
- ZHANG T, LI L, CHEN W, *et al.* Analysis of off-flavors in fish by microwave mediated distillation with headspace solid-phase microextraction and gas chromatograph-mass spectrum. *Journal of Hydrobiology*, 2009, 33(3): 449-454 [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. *水生生物学报*, 2009, 33(3): 449-454]
- ZHANG T, XUE Y, LI Z J, *et al.* Effects of ozone on the removal of geosmin and the physicochemical properties of fish meat from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2016, 34: 16-23
- ZHOU M H. Determination of off flavor of tilapia in different culture patterns. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2015, 1-47 [周梦海. 我国罗非鱼不同养殖模式的异味物质含量分布. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2015, 1-47]

Determination of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Fish Muscle by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

ZHANG Yanhong^{1,2,3}, LI Dexiang^{1,2,3}, ZHANG Fengping^{1,2,3}^①, ZOU Changjian^{1,2,3}

(1. Sichuan Willtest Technology Co. Ltd., Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Key Laboratory of Aquatic, Livestock, Poultry Nutrition and Healthy Culturing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tongwei Co. Ltd., Chengdu, Sichuan 610093, China; 3. Key Laboratory of Aquatic Healthy Aquaculture of Sichuan Province, Tongwei Co., Ltd., Chengdu, Sichuan 610093, China)

Abstract Geosmin and 2-methylisoborneol are semi-volatile, off-flavor compounds with similar chemical structures that are produced by certain species of actinomycetes, fungi, and blue-green algae. These off-flavor compounds tend to bio-accumulate within fish, depending on the concentrations in the water, the water temperature, the fat content and mass of the fish, and other abiotic and biotic factors. It is necessary to develop an accurate test of geosmin and 2-methylisoborneol in fish muscle to improve the quality of aquaculture products. A novel qualitative and quantitative determination method for geosmin and 2-methylisoborneol in fish meat was established, using *cis*-decahydro-1-naphthol as an internal standard and headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. The method of geosmin and 2-methylisoborneol extraction and quantification in fish meat was investigated, the conditions of headspace solid phase microextraction were optimized, and the adaptability of the method was examined through the measurement of actual samples. In the range of 0.1~10.0 µg/L, the ratio of the peak area of geosmin and 2-methylisoborneol to the peak area of the internal standard was linearly related to the ratio of the mass concentration. The correlation coefficient (r^2) was > 0.999, the detection limits were 0.018 µg/kg and 0.023 µg/kg, respectively, the limits of quantification were 0.059 µg/kg and 0.076 µg/kg, the average recovery of the three concentration gradients was 68.67%~80.30% and 62.67%~83.40%, and the relative standard deviations were between 2.35%~6.53% and 3.16%~6.80%. This method is highly sensitive, has good repeatability, and can be used to determine the geosmin and 2-methylisoborneol contents of fish.

Key words Headspace solid-phase microextraction; Gas chromatography-mass spectrometry; Fish muscle; Geosmin; 2-Methylisoborneol

① Corresponding author: ZHANG Fengping, E-mail: fengpingzhang@163.com