

鱼体中挥发酚的提取与残留分析

战培荣, 王海涛, 陈中祥, 卢玲, 刘伟

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:挥发酚是重要的环境污染物, 食用被挥发酚污染的鱼损害人体健康, 因此鱼体中挥发酚残留量的准确分析方法研究非常重要。本文比较了两种蒸馏方法提取鱼体中挥发酚的效果, 研究了鱼体中挥发酚残留量的测定方法。结果表明, 水蒸汽蒸馏提取法效果好, 4-AAP 法适用于处理后样品的分析测定。本研究建立的方法, 线性范围 $0.005\sim6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 回收率 $85.5\%\sim105\%$, 相对标准偏差 $1.6\%\sim6.3\%$, 检出限 $0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。方法实用, 便于操作, 已应用于鱼体中挥发酚残留量的测定。

关键词: 鱼; 挥发酚; 水蒸汽蒸馏; 提取; 残留

中图分类号: X830.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)02-0801-04

Extraction and Residue Analysis of Volatile Phenols in Fish

ZHAN Pei-rong, WANG Hai-tao, CHEN Zhong-xiang, LU Ling, LIU Wei

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Fishery Environment and Aquatic Product Quality Supervision Testing Center, the Ministry of Agriculture, Harbin 150070, China)

Abstract: The volatile phenols are important environment pollutants. The analysis method of volatile phenols residue in fish is very important since eating polluted fish harms to the health of people. The effect of two distillation methods in extracting the volatile phenols residue in fish was compared, and the determination method of volatile phenols residue in fish was studied. The results showed that the steam distillation extraction method was more effective, and 4-aminoantipyrine (4-AAP) method was suitable for the analysis and determination of samples after treated. The linear range of the method was $0.005\sim6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, with relative standard deviations $1.6\%\sim6.3\%$, the recovery $85.5\%\sim105\%$ and detection limit of $0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The method is practical and simple and has been applied successfully to the determination of volatile phenols in fish.

Keywords: fish; volatile phenols; steam distillation; extraction; residue

挥发酚主要来源于炼焦、石油、制药等行业, 其废水排入江河水体中, 对水生生物产生严重影响, 不仅抑制鱼类的生长和损害中枢神经、鳃、肝、肾等, 而且使鱼肉产生异味, 对水产品的食用安全性构成威胁。食用酚污染鱼类, 会使人恶心、头晕、呕吐和烦躁不安。美国国家环保局 (USEPA) 公布的致癌物质, 就包括酚类物质^[1], 鱼体中挥发酚的残留情况已引起人们广泛关注。

在 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下能与水蒸汽一起挥发的酚类统称为挥发酚, 是多组分酚类的混合物, 总体含量是重要的环境指标。水中挥发酚的测定普遍采用 4-氨基安替比林分光光度法 (4-AAP) 法^[2,3], 4-AAP 光度法是

国际公认的针对多组分酚类化合物测定的方法。该方法具有对多组分的挥发酚类显色灵敏稳定、可靠准确、简便易操作等优点。鱼体中挥发酚测定需解决的问题是如何进行样品的前处理, 使挥发酚被有效地提取和准确分析。目前, 鱼体中挥发酚的提取主要采取水质样品分析使用的直接蒸馏方法, 但在蒸馏时, 样品易产生泡沫、暴沸等现象, 影响分析结果的准确性。虽然一些学者探索采用固相萃取结合色谱仪分析的方法加以改进, 但尚处于探索起步阶段。色谱等方法多用于测定单组分, 多组分分析计算繁琐费时, 仪器配备要求较高, 推广也受一定影响^[4,5]。分光光度法以其操作简单, 仪器常见而应用广泛。鉴此, 本文研究了水蒸汽蒸馏提取鱼体中挥发酚的效果, 并用分光光度法对回收率和精密度进行了测定和比较, 取得了良好的效果。

收稿日期: 2007-04-19

基金项目: 科技部国家科技基础条件平台项目 (2004DE70880-02)

作者简介: 战培荣 (1961—), 男, 研究员, 研究领域为渔业环境及水产品质量安全。E-mail: zhanpr@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鳕洗净、去皮取背部肌肉,组织捣碎,贮藏备用。实验过程中所使用的水均为无酚水。

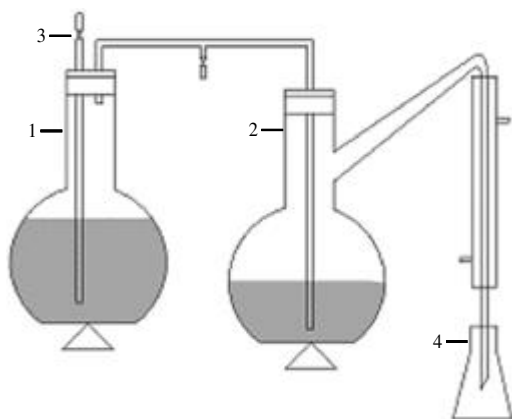
试剂均为分析纯:氯仿(CHCl_3),氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 50%硫酸溶液, 10%氢氧化钠溶液, 8%铁氰化钾溶液, 10%硫酸铜溶液, 0.05%甲基橙指示液, 氯化铵-氨水缓冲溶液 (pH 约 10.7), 2% 4-氨基安替比林溶液, $1.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 酚标准溶液。

仪器:水蒸汽发生器蒸馏装置(水蒸汽发生瓶+500 mL 样品蒸馏瓶), 岛津 UV-2401PC 紫外可见分光光度计, 500 mL 普通全玻璃蒸馏器, 500 mL (锥形) 刻度分液漏斗, 组织捣碎机, 电子天平, 调温电炉。

1.2 方法

1.2.1 水蒸汽发生器蒸馏提取

水蒸汽发生器蒸馏装置(自制)由水蒸汽发生瓶和样品蒸馏瓶等组成见图1。



1. 水蒸汽发生瓶(Steam occur flask) 2. 样品蒸馏瓶(Sample distillation flask) 3. 调节阀(adjust valve) 4. 接收瓶(receiver)

图1 水蒸汽发生器蒸馏装置示意图

Figure 1 Schematic diagram of simultaneous steam distillation extraction

称取预处理的样品 10 ~ 20 g (精确到 0.01 g), 放烧杯中, 加入 10% 氢氧化钠溶液 75 mL, 搅拌均匀。再加 3 ~ 5 滴甲基橙指示剂, 用 50% 硫酸调节 pH < 4 (溶液呈橙红色), 再加 10% 硫酸铜溶液 5 mL 混均后, 置于 500 mL 蒸馏瓶中, 用少量无酚水洗净烧杯, 洗涤液并入样品蒸馏瓶中并加数粒玻璃珠。水蒸汽发生瓶和样品蒸馏瓶连接好, 确保严密不漏汽后开启电炉, 使水蒸汽发生瓶产生蒸汽。样品蒸馏瓶也应略

低于水蒸汽发生瓶的温度加热, 防止水蒸汽发生瓶通入的蒸汽冷凝而集水, 控制蒸馏速度 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。回收馏出液, 至约 240 mL 时, 停止蒸馏, 打开水蒸汽发生瓶和样品蒸馏瓶间的阀门, 使瓶内外压力平衡。用无酚水冲洗冷凝管, 洗涤液并入馏出液中, 定容至 250 mL。

1.2.2 直接蒸馏提取

样品及试剂用量与水蒸汽发生器蒸馏提取相同, 只是蒸馏过程中不使用水蒸汽发生瓶, 样品在蒸馏瓶中直接蒸馏。

1.2.3 分析测定

样品的测定: 将馏出液移入分液漏斗中, 加 2.0 mL 缓冲溶液, 混匀。加 1.5 mL 4-氨基安替比林溶液, 混匀, 再加 1.5 mL 铁氰化钾溶液, 充分混匀后, 放置 10 min。准确加入 10.0 mL 氯仿, 密塞, 剧烈振摇 2 min, 静置分层, 彻底澄清透明后, 用干脱脂棉拭干分液漏斗颈管内壁, 于颈管内塞入一小块滤纸, 弃去最初滤出的数滴萃取液, 用 1 cm 的比色皿收集滤液, 静置 30 min, 于 460 nm 波长下, 以空白氯仿萃取液为参比, 用分光光度计测量吸光度, 其他具体步骤参照 GB7490 水质中挥发酚的测定^[3]。

试剂空白质控: 取 250 mL 无酚水, 测定步骤、条件、试剂和用量与样品测定相同, 并同时平行操作 20 次以上。

2 结果与讨论

2.1 蒸馏过程的稳定性比较

提取挥发酚主要是采用蒸馏的方法, 但是由于样品性质的不同, 特别是粘稠度存在的差异对蒸馏过程产生影响。使用直接蒸馏法提取生物样品中的挥发酚, 开始时状态稳定。但一段时间后, 蒸馏瓶内泡沫逐渐增多。还由于水的不断馏出, 瓶内黏度和水的表面张力逐渐增大, 后期产生暴沸现象, 平缓稳定的蒸馏过程难以控制。有时还造成馏出液污染, 导致蒸馏失败, 存在着难以克服的不足。本实验采取的水蒸汽发生器蒸馏法提取鱼肉样品中的挥发酚, 克服了直接蒸馏提取方法存在的不足, 其比较优势见表 1。

水蒸汽发生器蒸馏法, 泡沫产生少, 蒸馏过程稳定、容易控制, 不存在暴沸现象。蒸馏提取效果好, 优势明显, 本分析测定研究采用。

2.2 线性关系与质量控制

取酚标准溶液, 配制成 0.00、0.20 0.40 0.60 0.80 1.00 1.20 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 浓度系列, 按 1.2.3 规定的分析

表 1 两种蒸馏法过程的比较

Table 1 Process comparison of two distillation methods

样品	方法	泡沫		粘稠		暴沸	
		初始	终末	初始	终末	初始	终末
鱼肉	水蒸汽蒸馏法	+	+	+	+	-	-
	直接蒸馏法	+	+++	+	+++	+	+++

注: -无, +~+++增加。

方法测定, 绘制标准曲线, 曲线方程: $y = 0.261x + 0.0034$, $R = 0.9997$, 线性范围 $0.005 \sim 6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在测定挥发酚时, 试剂的纯度是否符合要求, 对分析结果的可靠性非常重要。通过测定空白样品($n=20$)的吸光度可以掌握实际变化情况, 实测值经计算得到空白样品吸光度控制参数: 中心线($\bar{x}$)0.028 7, 上控制限($\bar{x}+3SD$)0.040 7, 上警告限($\bar{x}+2SD$)0.036 7, 上辅助线($\bar{x}+SD$)0.032 7, 数值变化见图 2。

样品挥发酚测定时空白吸光度值在上警告限以下区域, 最小为 0.022, 最大为 0.034。

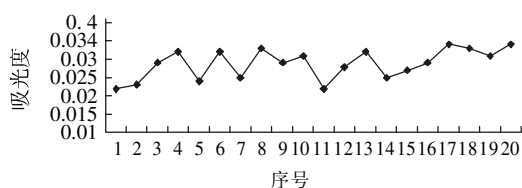


图 2 空白实验吸光度控制限值

Figure 2 Control limit of blank absorbance

2.3 精密度与回收率

取鳕肉 10 g, 加入一定量的苯酚标准溶液 ($n=8$), 按 1.2.1 进行样品的前处理, 按 1.2.3 方法测定, 精密度与回收率实验分析结果见表 2。相对标准偏差 (RSD) 在 $1.60\% \sim 6.32\%$, 回收率 $85.5\% \sim 105\%$ 。

取鳕肉, 制成不同苯酚含量的 7 个样品, 进行随机梯度加标($n=4$)回收率实验, 以得到和验证方法的准确度。梯度加标回收率实验结果为 $86.0\% \sim 103\%$, 符合要求详见表 3。

2.4 检出限

配制 20 份空白溶液, 分别测定其吸光度, 利用标准曲线方程求得空白浓度值。灵敏度取标准曲线方程的斜率, 以 (标准方差 / 灵敏度) $\times 3$ 计检出限, 计算结果本方法鱼体中挥发酚的检出限为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。一般鱼肉中残留 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时产生异味, 该检出限能够满足鱼体中残留限量的分析。

2.5 实际样品分析

取日常食用的 6 种不同鱼类, 样品量 10 g。采用不同加标量进行了回收率测定分析, 实验结果见表 4。

从表 4 可看出, 通过对 6 种不同鱼类鱼体中挥发酚残留量的测定, 结果表明, 本方法具有实用性和广泛性, 平均回收率在 85.5% 以上。

4 结论

(1) 水蒸汽发生器蒸馏提取鱼体中挥发酚的方

表 2 样品的精密度与回收率实验结果

Table 2 Results of precision and recovery test of samples

加标量/ μg	测得量/ μg				平均值/ μg	标准偏差 SD	RSD/%	回收率/%
1.000	0.914	1.021	1.060	1.074	1.028	0.057	5.50	
	0.979	1.073	1.069	1.038				
10.00	9.242	11.03	10.56	10.94	10.16	0.58	6.32	85.5~105
	9.452	10.67	10.59	10.37				
20.00	21.02	20.78	20.25	20.69	20.68	0.321	1.60	
	21.02	20.58	20.35	20.69				

表 3 梯度加标量回收率实验结果

Table 3 Results of recovery test of gradient added

样品号	加标量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	测得量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$				回收率/%
1	0.100	0.084	0.083	0.090	0.089	86.0
2	0.500	0.423	0.472	0.415	0.443	87.6
3	0.800	0.713	0.726	0.697	0.647	86.9
4	2.000	1.760	1.772	1.752	1.753	87.9
5	4.000	3.951	3.920	3.972	3.971	98.8
6	20.00	21.02	21.03	20.30	20.25	103
7	40.00	39.21	39.73	37.13	37.83	96.3

表 4 不同鱼类及加标量回收率实验结果

Table 4 Results of recovery test of gradient added for different fishes

鱼类名	虾	鲢	鲤	鳊	草鱼	鳙
加入量/ μg	1.00	1.00	5.00	5.00	10.0	10.0
回收率/%	85.55	91.20	90.08	91.50	90.87	94.63

法与直接蒸馏法比较具有明显的优势，操作便捷、蒸馏过程平稳、速度可控制和提取效果好。

(2)4-AAP 法适用于通过本法前处理后的样品，具有良好的回收率 (85.5%~105%)，精密度 (1.6%~6.3%)，最低检出限(0.05 mg·kg⁻¹)。方法实用,便于推广。

(3)水蒸汽发生器蒸馏方法可以有效的提取蛋白质溶液中具挥发性质的物质，此法对分析性质稳定、高温不被分解或破坏的化合物具有重要的实用价值。

参考文献：

[1] 洪传洁,卢纯惠. 环境卫生学进展[M]. 北京:人民出版社,1986. 167-176.

[2] 康春莉,王 英,杜尧国,等. 水体中挥发酚测定方法的改进[J]. 分析化学, 2000,28(7):872-875.

[3] 沈叔平. 水中挥发酚的测定[S]. 中华人民共和国国家标准 GB-7490-1987.

[4] Petr Bartak. Determination of phenols using simultaneous steam distillation extraction[J]. *Journal of Chromatography*, 2000, 867: 281.

[5] 姚建国. 气相色谱法测定生活饮用水中的挥发酚[J]. 化学工程师, 2003, 6: 95-96.

[6] 于洪兰. 小麦中挥发酚的测定[J]. 潍坊学院学报, 2002, 2(2): 7-8.

[7] 汤丹瑜, 胡秋芬, 杨光宁, 等. 固相萃取光度法测定食品中挥发酚的研究[J]. 干旱环境监测. 2002, 16(1): 4-5.

[8] 李 维, 刘国光, 郑立庆, 等. 土壤中噻虫嗪农药残留分析方法[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2):739-742.