

目录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
符号说明.....	VII
第一章 绪论.....	1
引言.....	1
1 水体中异味物质的来源.....	1
2 水体中异味物质造成的影响.....	2
2.1 水体中异味物质在人类生产实践生活中的影响.....	2
2.2 水体中异味物质在渔业养殖上的影响.....	3
3 异味物质的去除技术.....	3
4 异味物质的富集提取和检测技术.....	4
5 研究目的和意义.....	5
6 技术路线.....	5
第二章 养殖水体中异味物质的水平分布以及影响因素的关联性分析.....	7
引言.....	7
1 材料与方法.....	8
1.1 研究区域和样品采集.....	8
1.2 仪器与试剂.....	8
1.3 标准曲线的建立.....	9
1.4 异味物质的测定.....	9
1.5 常见水质指标的测定.....	10
1.6 数据分析.....	10
2 结果与分析.....	11
2.1 养殖水体中 2-MIB 和 GSM 的含量分析.....	11
2.2 养殖水体中异味物质的水平分布规律.....	11
2.3 不同养殖品种水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度分析.....	12
2.4 养殖水体中不同环境因子与 2-MIB 和 GSM 浓度的关联性分析.....	13
2.5 不同盐度水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度分布.....	14
3 讨论.....	15
3.1 养殖水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度及其分布.....	15
3.2 养殖品种对水体中异味物质的影响.....	16
3.3 养殖水体中常规水质参数以及盐度与水体中异味物质的关系.....	16
4 结论.....	17
第三章 水体中 2-甲基异茨醇和土臭素的超声辅助液液微萃取-气相色谱-质谱 法的建立.....	19
引言.....	19
1 材料与方法.....	20

1.1 仪器与试剂.....	20
1.2 方法.....	20
2 结果与分析.....	22
2.1 色谱条件的选择.....	22
2.2 萃取条件的优化.....	23
2.3 方法学验证.....	34
3 讨论.....	35
4 结论.....	35
第四章 磁性吸附法预富集水体中的 2-甲基异莰醇和土臭素	37
1 材料与方法.....	37
1.1 材料与试剂.....	37
1.2 方法.....	38
2 结果与分析.....	39
2.1 富集材料的筛选.....	39
2.2 样品体积.....	41
2.3 富集材料的体积.....	41
2.4 分散剂的选择.....	42
2.5 目标物质的解吸附.....	43
2.6 磁性微小球在其他物质中的应用.....	43
2.7 磁性吸附法与超声辅助液液微萃取法在水体土腥味物质提取中的结合应用.....	45
3 讨论.....	46
4 结论.....	47
全文总结.....	49
参考文献.....	51
致谢.....	57
攻读学位期间取得的学术成果目录.....	59

养殖水体异味物质分布、生成关联性因素分析及其检测技术优化

摘要

水体中的异味物质给水产养殖业的发展带来了一些负面影响,危及了养殖效益,异味物质也成为近些年来越来越受关注的水体污染物之一。本研究以养殖水体中两种最主要的异味物质:2-甲基异苊醇(2-MIB)和土臭素(GSM),在养殖水体中的水平分布规律,生成情况以及其与养殖品种、水质参数和水质盐度等因素的关联性分析,并对其检测技术进行优化。主要内容如下:

1.本研究调查了江苏省沿海滩涂地区养殖水体中异味物质的分布情况,并探究养殖品种、基本水质参数以及盐度差异等与其关联性。实验结果显示,在养殖池塘的水平维度的分布上,即进水口、塘口和排水口处的2-MIB和GSM的浓度分别为 3.54 ± 2.34 ng/L、 3.82 ± 1.60 ng/L、 3.53 ± 1.64 ng/L和 28.93 ± 20.82 ng/L、 32.51 ± 18.92 ng/L、 29.49 ± 22.19 ng/L,都没有表现出明显的浓度差异($P>0.05$)。通过进一步分析,我们还发现在该区域的养殖水体中,2-MIB的平均浓度为 2.76 ± 2.24 ng/L,GSM的平均浓度为 29.07 ± 19.44 ng/L。其中GSM是主要的异味物质,且受养殖品种的影响较大,淡水蟹的养殖水体中含量为 47.6 ± 21.0 ng/L,明显高于其他养殖鱼类的水体($P<0.05$)。其次在水质常规指标中,水体中的溶氧在某种程度上与2-MIB和GSM的生成量成正相关关系,相关系数分别为0.859和0.760,氮、磷含量对其2-MIB的影响较小,相关系数分别为-0.264和0.124;对GSM含量的影响较大,相关系数分别为0.759和0.790,呈明显的正相关关系。盐度也是水体中2-MIB和GSM的主要影响因素之一,盐度越大,其异味物质越少,相关系数分别为-0.769和-0.825。

2.在液液微萃取方法的基础上对水样中的2-MIB和GSM进行吸附提取,并优化检测条件,以解决现有检测方法中存在的检测成本昂贵、耗时长且无法进行批量化处理和检测的问题。本实验中,对比萃取剂和调整色谱条件,筛选出了四氯乙烯+Meta.X5色谱柱的最佳组合。通过Plackett-Burman模型对离心速度、样品体积、萃取剂体积、超声波浴时间、提取时温度、离心时间以及进样体积等因素进行筛选分析,得到最主要的三个因素为样品体积、萃取剂体积和进样体积。再对这三个体积参数进行Box-Behnken响应面分析,筛选得出回收率最高的萃取方案为:1 mL水样中加入50 μ L萃取溶剂,超声处理6 min、以3500 rpm的转

速离心 4 min、收集提取液，设置进样体积为 20 μ L，用 GC-MS 进行测定。

3. 为了提高超声辅助液液微萃取方法对水体中 2-MIB 和 GSM 的吸附效率，我们对其进行了补充预富集实验。本实验制备了粒径为 1 μ m 的磁性裸珠材料，通过在其表面进行修饰后偶联 MOF（铁外部包裹其他金属有机骨架材料）材料形成对水溶液中 2-MIB 和 GSM 具有特异性吸附效果的新型磁珠材料，经过此方法进行预富集实验后，配合超声辅助液液微萃取达到最终吸附的效果。在此研究中，以回收率作为参照，通过对比实验的方法，对实验中的参数进行优化，结果显示：以 10 mL/L 的磁性吸附材料对 1 L 的水体进行富集，富集时间为 15 min，配合上超声辅助液液微萃取法，对水体中的 2-MIB 和 GSM 的富集倍数高达 20000 倍，线性范围分别为 50~400 ng/L 和 40~400 ng/L，其回收率分别为 69.34%~71.56% 和 73.85%~77.26%。相对于传统的固相微萃取法检测一个样品需要 40~60 min 且无法进行批量化处理和检测的问题，此方法将水体中 2-MIB 和 GSM 的处理和检测时间缩短到约 30 min，且能够同时进行多样品的处理和检测，满足了实际生产过程中批量检测的需求。

本研究通过对养殖水体中异味物质（2-甲基异莰醇、土臭素）生成的影响因素进行分析，为解决水产养殖行业中存在的这一问题提供了科学数据和技术支撑。同时对其提取富集-检测技术进行优化，满足了水产养殖业在实际生产实践过程中的大批量检测的需求，为水产养殖业的可持续发展做出了一定的贡献。

关键词：2-甲基异莰醇；土臭素；养殖品种；水质参数；盐度；超声辅助液液微萃取；磁性吸附

CORRELATION FACTOR ANALYSIS OF DISTRIBUTION AND GENERATION OF ODOROUS SUBSTANCES IN AQUACULTURE WATER AND OPTIMIZATION OF DETECTION TECHNOLOGY

ABSTRACT

Odorous substances in water have brought some negative effects to the development of aquaculture industry and endangered the efficiency of aquaculture. Odorous substances have also become one of the water pollutants attracting more and more attention in recent years. In this study, 2-methylisoborneol (2-MIB) and geosmin (GSM), two of the most important odorous substances in cultured water, were analyzed in terms of their horizontal distribution, generation and correlation with cultured varieties, water quality parameters and water salinity, and their detection techniques were optimized. The main contents are as follows:

1. This study investigated the distribution of odorous substances in aquaculture water in coastal mudflats of Jiangsu Province, and explored the relationship between aquaculture species, basic water quality parameters and salinity differences. The experimental results show that in the horizontal dimension of the distribution of aquaculture ponds, that is, the concentration of 2-MIB and GSM at the inlet, pond and outlet are 3.54 ± 2.34 ng/L, 3.82 ± 1.60 ng/L, 3.53 ± 1.64 ng/L and 28.93 ± 20.82 ng/L, 32.51 ± 18.92 ng/L and 29.49 ± 22.19 ng/L, respectively, showed no significant difference ($P > 0.05$). Through further analysis, we also found that the average concentration of 2-MIB was 2.76 ± 2.24 ng/L and the average concentration of GSM was 29.07 ± 19.44 ng/L in the aquaculture water in this region. The content of GSM was 47.6 ± 21.0 ng/L in freshwater crab culture water, which was significantly higher than that in other fish culture water ($P < 0.05$). Secondly, among the conventional indicators of water quality, dissolved oxygen in water has a positive correlation with 2-MIB and GSM production to some extent, with correlation coefficients of 0.859 and 0.760, respectively. Nitrogen and phosphorus content has little influence on 2-MIB, with correlation coefficients of -0.264 and 0.124, respectively. The correlation coefficients are 0.759 and 0.790 respectively, showing an obvious positive correlation. Salinity is also one of the main factors affecting 2-MIB and GSM in water. Salinity is also one of the main influencing factors for 2-MIB and GSM in water, the higher the salinity, the lower the concentration of odorous

substances, with correlation coefficients of -0.769 and -0.825, respectively.

2. Based on liquid-liquid microextraction method, 2-MIB and GSM in water samples were extracted by adsorption, and the detection conditions were optimized to solve the problems of high cost, long time consuming and unable to conduct mass processing and testing in the existing testing methods. In this experiment, the combination of tetrachloroethylene + Meta.X5 column was selected by comparing extraction agents and adjusting chromatographic conditions. The Plackett-Burman model was used to screen and analyze centrifugation speed, sample volume, extractant volume, ultrasonic bath time, temperature during extraction, centrifugation time and injection volume, and the three most important factors were obtained as sample volume, extractant volume and injection volume. The Box-Behnken response surface analysis was then performed on these three volume parameters, and the extraction scheme with the highest recovery rate was collated as follows: 50 μ L extraction solvent was added to 1 mL water sample for ultrasonic treatment for 6 min and centrifugation at 3500 rpm for 4 min. The extract was collected. The injection volume was set to 20 μ L and GC-MS was placed for determination.

3. In order to improve the adsorption efficiency of the ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method for 2-MIB and GSM in water, we supplemented the pre-enrichment experiment. In this experiment, a magnetic bare bead material with a particle size of 1 μ m was prepared. After surface modification, MOF (iron externally wrapped with other metal-organic skeleton materials) was coupled to form a new magnetic bead material with specific adsorption effect on 2-MIB and GSM in aqueous solution. After pre-enrichment experiment with this method, Ultrasonic assisted liquid-liquid microextraction was used to achieve the final adsorption effect. In this study, the recovery rate was taken as the reference, and the parameters in the experiment were optimized by the method of comparative experiment. The results showed that: With 10 mL/L magnetic adsorption material for enrichment of 1 L water, abdominal muscle time is 15 min, combined with ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction method, the enrichment factor of 2-MIB and GSM in water body is up to 20000 times, linear range is 50-400 ng/L and 40-400 ng/L, respectively. The recoveries were 69.34%-71.56% and 73.85%-77.26%, respectively. Compared with the traditional solid-phase microextraction method, which requires 40-60 min to detect a sample and cannot conduct mass processing and detection, this method shortens the processing and detection time of 2-MIB and GSM in water to about 30 min, and can simultaneously

process and detect multiple samples, meeting the needs of batch detection in the actual production process.

This study provided scientific data and technical support for solving the problem in aquaculture industry by analyzing the influencing factors of the formation of odorous substances (2-methylisoborneol and geosmin) in aquaculture water. At the same time, the extraction enrichment and detection technology were optimized to meet the needs of large-scale detection in the actual production and practice of aquaculture industry, and to make a certain contribution to the sustainable development of aquaculture industry.

KEY WORDS: 2-methylisoborneol; Geosmin; Breeding varieties; Salinity; Water quality parameters; Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction; Magnetic adsorption

符号说明

2-MIB 2-甲基异莰醇

GSM 土臭素

TN 总氮

TP 总磷

COD_{Mn} 高锰酸盐指数

GC-MS 气相色谱-质谱联用仪

SPME 固相微萃取

USADLLME 超声辅助液液微萃取

MOF 铁外部包裹其他金属有机骨架材料

Fe₃O₄@SiO₂@PDA@NH₂ 氨基合硅包铁材料

Fe₃O₄@SiO₂@PDA@Lys 赖氨酸合硅包铁材料

第一章 绪论

引言

水资源是地球上的生命体不可或缺的资源,也是人类社会经济发展所需要的环境的一个最主要组成部分^[1]。在水产养殖中,水也是作为其第一要素^[2]。但由于部分水资源受到不同程度的污染,其水环境科学越来越受到人们的关注,其中认为人类活动是水污染的主要来源,包括人类活动过程中产生的有机污染物、无机污染物以及一些微生物等^[3]。但近些年来,有学者提出了新型污染物的概念,其中就包括在水体中以纳克每升检测到的污染物。这些物质通常会对水质产生一些可接受性的负面影响但未被管制,且可能会造成环境危害,甚至影响人类和水生生物的健康。本研究就聚焦在导致水体中产生土腥异味的微量物质。研究显示,水体中土腥味物质的产生主要与蓝藻等有关,包括 2-甲基异茨醇(2-MIB)、土臭素(GSM)、2-异丁基-3-甲氧基吡嗪(2-IBMP)、2,3,6-三氯乙酸(2,3,6TCA)和 2,4,6-三氯乙酸(2,4,6-TCA),其中 2-甲基异茨醇(2-Methylisoborneol, 2-MIB)和土臭素(geosmin, GSM)是导致水体异味的主要化合物^[4]。在水产养殖中,这些异味物质能够进入水产品的体内,严重影响了水产养殖的发展,以及给水产品的销售带来了严重的问题^[5]。

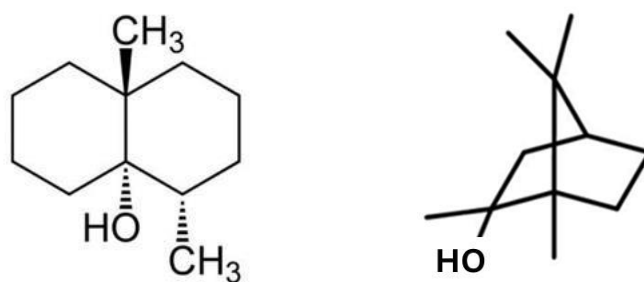


图 1-1 2-MIB 和 GSM 的化学结构

Fig.1-1 Chemical structure of 2-MIB and GSM

1 水体中异味物质的来源

现有研究表明,蓝藻是异味物质的重要生产者之一^[6],很多丝状蓝藻包括长胞藻、伪鱼腥藻、束丝藻等,都具有很强的产异味能力^[7]。蓝藻细菌是由水体的富营养化和全球变暖导致的藻类爆发后产生的有机生物体。来自蓝藻生长的化合物主要是土臭素(GSM)、2-甲基异茨醇(2-MIB)、2-异丁基-3-甲氧基吡嗪(2-

IBMP)、2,3,6-三氯苯甲醚(2,3,6-TCA)和2,4,6-三氯苯甲醚(2,4,6-TCA)。其中土臭素和2-甲基异茨醇是导致水中难闻气味的主要化合物^[8]。这些化合物在本质上是挥发性的,如果存在于饮用水中会产生更大的危害。

此外,硅藻等真核浮游植物也可能产生异味物质,但目前针对真核浮游植物的研究相对较少。不同藻的生境并不相同,其中底栖藻类需要附着于基质生存,不容易迁移,只有其释放的异味物质可能威胁水质安全。而浮游藻则可以随着水流迁移,不仅其释放至胞外的异味物质可能威胁供水安全,浮游藻类本身也可能迁移至水厂,随着藻细胞在水处理过程中破裂,其胞内的异味物质也会释放出来,对于供水安全造成更大的威胁。在浅水水体中异味物质更可能来自底栖藻,而深水湖泊中更可能来自浮游藻^[9]。不仅是浮游植物,微生物也是异味物质的重要生产者之一^[10]。放线菌、链霉菌和变形菌等都已经证明可以产生异味物质^[11]。

在一些厌氧水体中容易产生硫化物。浮游植物及植物体内含有大量硫元素,其死亡后在厌氧水体中进行厌氧分解,从而产生可引起异味的硫化物^[12]。

2 水体中异味物质造成的影响

2.1 水体中异味物质在人类生产实践生活中的影响

水体中的异味物质对人类生活的最大影响就是在生活饮用水的供应过程中,会产生一些异样的气味。研究人员已经意识到饮用水供应中的异样味道和气味化合物是水质问题,且已经被证实。极低浓度的异味物质即可造成强烈的生理效应。异味物质分子量都较小,因此其易于发生分子热运动,更容易向周边环境移动,属于挥发性有机物,很容易被人类的嗅觉感受器所接收。异味物质是一种痕量物质,仅需要极低的浓度即可被人类感受到,人恰好能感受到异味物质的浓度称为嗅阈值。2-MIB和GSM的嗅觉阈值分别为9 ng/L~42 ng/L和4 ng/L~10 ng/L^[13]。如此低浓度的嗅觉阈值导致仅需非常微量的异味物质就可以引起强烈的生理效应,使消费者对水质安全产生质疑。

我国大量的湖泊和水库都存在异味问题,而我国湖泊和水库中的水很多被作为饮用水水源,这在一定程度上加大了饮用水供应商在处理饮用水过程中的难度。而且湖泊和水库中的蓝绿藻会产生各种毒素,如肝毒素、柱状精子蛋白、微囊藻毒素、神经毒素、背毒素、高背毒素、皮肤毒素和海兔毒素等,这些毒素会导致肝脏、神经系统和皮肤出现各种疾病^[14]。据美国环保署(2013)报道,生物体的身体部位暴露在含有蓝藻细胞及其毒素的水中,会造成皮肤损伤,而人类摄入它们会导致腹痛、呕吐、恶心、腹泻、口周起泡、喉咙痛甚至引发肺炎。基于这些

对健康造成的影响，研究异味物质对饮用水的安全性以及对人类和其他动物的毒理学是迫切需要的。

2.2 水体中异味物质在渔业养殖上的影响

异味物质严重影响我国渔业养殖的发展。异味物质被认为是淡水养殖业发展中的主要障碍，因为在水产品的销售过程中，消费者对于水产品的优劣区分，很大一部分取决于水产品是否具有异味，通常异味会使水产品的价格降低^[15]。异味物质对很多重要的商业水产品都有影响，包括罗非鱼，虾，大西洋鲑，大马哈鱼，虹鳟鱼和鲑鱼等^[16]。对水产品造成最大影响的异味主要是土霉气味，主要由 2-MIB 和 GSM 造成。这两种异味物质都是亲脂性的，水体中的 2-MIB 和 GSM 一部分经鱼鳃进入血液后，进入鱼体，并在身体脂肪含量高的组织沉积，还可以直接被鱼体表皮吸收，通过渗透作用进入鱼体组织^[17]；另外，鱼类吞食的水中含有分泌土臭味物质的细菌及土臭味物质，这部分物质则透过肠上皮细胞进入鱼体，且很难被净化去除。

3 异味物质的去除技术

异味物质的去除较为困难。极低的浓度导致异味物质难以被彻底去除，水厂的常见处理工艺如絮凝沉降、砂滤等仅能消除很低比例的异味物质，效果不佳^[18]。其他研究也表明，饮用水水厂常用的处理措施例如混凝、沉淀和氯化对去除 2-MIB 和 GSM 没有效果^[19]。另一项研究指出，由于挥发造成的 2-MIB 和 GSM 的半衰期长达一年，因此供水过程中其挥发损失可以忽略不计；光解异味物质所需的光强过高，难以有效去除；而吸附过程降低异味物质的量也很低；仅有水处理过程中砂滤步骤可以有效去除异味物质，其原因是处理过程中微生物可以对异味物质进行生物降解，而这一过程的效率也并不高^[20]。目前有效的解决异味物质的手段包括活性炭吸附、高级氧化和膜法等。活性炭吸附可能是最为常见也最为有效的手段，通过多孔结构对异味物质进行吸附，之后去除。这一方法的去除效果较好，但在水中有有机质含量高的情况下效率较低，这是由于水体中的天然有机物与异味物质竞争吸附，导致活性炭的吸附效率大大降低^[21]。此外，在强降水或其他水体浊度较高的情况下，活性炭的吸附效率也会降低，需要投加更高浓度的活性炭才能得到让消费者可以接受的水。活性炭的使用可以产生更多的活性污泥，对污泥的处置是较为复杂的，而且会大大增加饮用水水厂的成本。高级氧化同样是一种有效的去除异味物质的方法。其中效率较高的方法是使用臭氧，它对于 2-

MIB 和 GSM 的去除效果很好,但是容易产生消毒副产物如同样存在异味问题的低分子量的酮^[22]。其他方式例如紫外线,过氧化氢等也可以有效地去除异味物质,其中的羟基自由基是有效的进行氧化。这些氧化技术效果良好,但是可能大幅增加饮用水厂的成本。此外,生物降解法,即利用砂滤过程中微生物的降解对异味物质进行去除也是一种非常有效且成本较低的去手段。此外,亦有研究者认为可以通过控制水位的方式控制产异味蓝藻的生长,从而间接地控制异味物质浓度^[23]。

4 异味物质的富集提取和检测技术

类似于 2-MIB 和 GSM 这类即使在很低的浓度下也会影响水生生物的污染物,一种有效的萃取分析技术以及对其准确测定的方法具有非常重要的意义。目前可靠的提取分析技术已经发展到可以分析这些化合物的微量。主要采用的分析方法有:感官分析法、闭环溶出法和开环溶出法^[24]、搅拌棒吸附萃取^[25,26]、液-液萃取法^[27]、液相微萃取法^[28]、固相萃取法^[29]、固相微萃取法^[30]和搅拌棒吸附提取^[25]等,现在实验室中运用最多的方法是气质联用仪(gas chromatograph-mass spectrometer, GC/MS)来对这些化合物进行鉴定和定量分析^[30]。到目前为止,GC-MS 检测 2-MIB 和 GSM 的技术基本成熟,两种化学物质的不同形式已能够被检测和识别。目前最常用的用于提取检测水体中的 2-MIB 和 GSM 的技术是固相微萃取配合 GC-MS,这种方法的最主要影响因素为萃取溶剂的体积、样本体积、配置时间、搅拌速度^[31]。

传统的分析方法,例如感官分析法主要是在仪器设备尚不充足或检测技术不能够达到标准时使用,包括嗅阈检测法(TON)和嗅觉层次分析法(FPA)。TON 最早用于描述水体中异味的检测方法,即将水样稀释,直到能刚好闻出异味的稀释倍数称为嗅阈值。此外,嗅觉层次分析法的原理与 TON 相似,但是这种方法将气味特征细化,并将其强度分为几个等级,再进行稀释检测。这种方法和开环溶出法以及闭环溶出法都有着操作简单、成本低的优势,但需要大量的时间、人力和精力。其他技术,例如液液萃取等,有着时间消耗、检测限的不稳定等不足的地方^[32]。

实验已经证明,目前使用的最广泛的固相微萃取方法(SPME)对 2-MIB 和 GSM 具有良好的分析效果。与早期的液液萃取、固相萃取和搅拌棒吸附法相比,该方法具有无溶剂、所需样品量小,提取效率高等优点^[33]。但其他分析方法也有其优势所在,例如搅拌棒吸附法在分析较为清澈的水样时更适合,顶空固相微萃取法却更适用于检测富营养化水体中的这些化合物^[26]。自 2010 年以来,多项实

验研究已经发现，由于在参数的优化下（如萃取时间、温度、离子强度和纤维类型等）能够得到较低的检测限，使其具有较大的优势。在最新开发的技术中，由于 MIF-1b 聚偏氟乙烯中空纤维具有较高的孔隙率和溶剂相容性，在与 GC-MS 技术结合使用，能够达到很好的萃取的检测效果。尽管如此，该方法与 SPME-GC-MS 的缺点类似且很明显，例如萃取纤维的选择成本昂贵，实际操作工序中单个样本的检测时间太长，且无法进行批量化处理和检测等。这些缺陷大大的限制了其在水产养殖产业上的实际应用，更多的是适用于实验室中检测^[34-36]。

5 研究目的和意义

水产养殖业作为社会经济发展的重要助推力，在提高居民经济水平及生活质量方面发挥着至关重要的作用^[37]。近几十年来，随着人们对于水产品的需求越来越高，我国的水产行业也得到了迅速的发展。行业的发展不仅仅在于数量上的增加，也伴随着质量的提升。所以，如何提高水产品的质量，推动水产行业的发展成为了研究人员关注的热点，也是消费者对于更高生活水平的一种期望。

目前对于水体中异味物质的分析大多集中于水源地水库湖泊等饮用水源上，很少有对于水产养殖水体中异味物质的分布规律以及生成量的影响因素的分析报告^[12]。对养殖水体中异味物质生成量的影响因素进行分析，为解决水产养殖行业中存在的这一问题提供了科学的理论数据和依据，为水产养殖业的可持续发展做出了一定的贡献。研究中以江苏省沿海滩涂流域的水产养殖水体为代表，分析了养殖水体中异味物质生成的关联性因素。传统的检测技术 SPME-GC-MS 在对养殖水体中的异味物质进行检测的过程中，存在着诸多的不便，例如只能进行单个样品循序检测、检测时间长等，无法满足在水产养殖业水质检测的过程中大批量样本检测的实际需求。因此文章中对提取富集-检测技术进行了优化，用液液微萃取替代固相微萃取技术，并对其气质条件进行优化，使其适应水产养殖业在实际生产实践过程中的大批量检测的环境。故本论文的选题具有一定的理论意义和实际应用价值，具有重要的经济、生态和社会意义。

6 研究内容与技术路线

本研究以养殖水体中两种最主要的异味物质：2-甲基异茨醇（2-MIB）和土臭素（GSM），在养殖水体中的水平分布规律，生成情况以及其与养殖品种、水质参数和水体盐度等因素的关联性分析，并对其检测技术进行优化。主要内容分为三部分：首先调查了江苏省沿海滩涂地区养殖水体中异味物质的分布情况，并

探究养殖品种、基本水质参数、盐度差异以及基本水质指标等与其关联性。其次利用超声辅助+液液微萃取方法对水样中的 2-MIB 和 GSM 进行吸附提取，并优化提取和检测条件，以解决现有检测方法中存在的检测成本昂贵、耗时长且无法进行批量化处理和检测的问题。最后为了提高超声辅助液液微萃取方法对水体中 2-MIB 和 GSM 的吸附效率，我们对其进行了补充预富集实验，即利用磁性吸附技术对水体中 2-MIB 和 GSM 进行预富集处理，以满足实际生产过程中的需求。技术路线如图 1-2 所示。

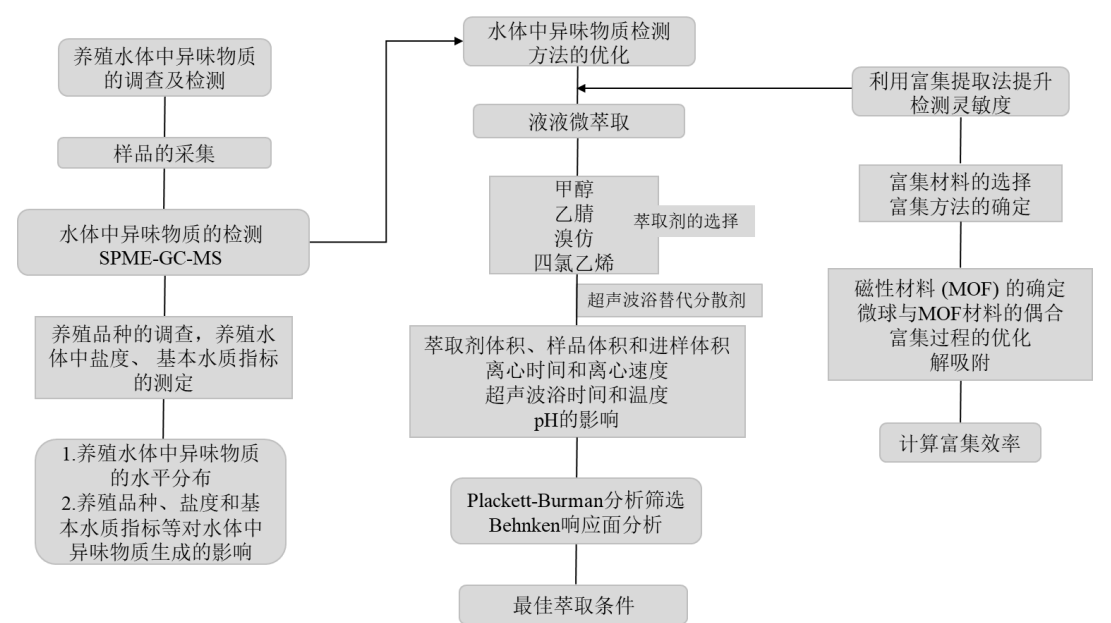


图 1-2 技术路线

Fig.1-2 Technical route

第二章 养殖水体中异味物质的水平分布以及影响因素的关联性分析

引言

水是人类社会经济发展过程所需环境的一个重要主体,与人类活动息息相关,且在水产养殖产业中也占据着最主要的地位。水资源的保护理应受到越来越多的关注。随着水资源的遭受严重的污染问题后,近些年有学者对水体中新出现的污染物给出了新的定义,即目前尚未受到监管,但会对环境造成危害,甚至影响水生生物和人类的健康的物质。这些污染物包括部分农药、个人护理产品、香料、增塑剂、激素、阻燃剂、纳米粒子、全氟烷基化合物、氯化石蜡、硅氧烷、蓝藻、稀土和放射性核素产生的藻毒素等^[38-40]。其中蓝藻是由水体富营养化和全球变暖等因素导致的藻类水华产生的有机物,在水中常常伴随着难闻的气味^[40]。研究人员将这些气味统称为异味物质,且已将其列为相当关注的问题^[41]。这些异味化合物中的陈腐味物质是影响水产养殖的一个重要因素,其主要成分为 2-甲基异茨醇(2-MIB)、土臭素(GSM)等。这些化合物在自然界中是挥发性的,能够在很低的浓度下被人们的嗅觉察觉,2-MIB 和 GSM 的嗅觉阈值浓度分别为 9 ng/L~42 ng/L 和 4 ng/L~10 ng/L^[42],且与水体的水质有着密切的关系,因此也成为了研究人员的关注目标。

目前对于水体中异味物质的分析大多集中于水源地水库湖泊等饮用水源上^[11,12],很少有对于水产养殖水体中异味物质的分布规律以及生成量的影响因素的分析报告。为了探究水产养殖水体中异味物质的水平分布以及相关驱动因素的关联性,我们选择了极具代表性的沿海滩涂地区,由于此地区的淡水、海水养殖兼具且水产品养殖种类繁多,提供了较好的研究条件。采样地点位于江苏省。2021 年 6 月对其沿海滩涂地区的典型水产养殖区域水体的异味物质和水质参数进行了调查。对养殖水体中异味物质生成量的影响因素进行关联性分析,为解决水产养殖行业中存在的这一问题提供了科学的理论数据和依据,为渔业产业的可持续发展做出了一定的贡献。

1 材料与amp;方法

1.1 研究区域和样品采集

本实验水样均在 6 月份采自江苏省沿海滩涂地区的 130 个养殖池塘（图 2-1），其中包括加州鲈鱼养殖池塘 3 个、鳊鱼养殖池塘 3 个、鲢鱼养殖池塘 16 个、四大家鱼养殖池塘 33 个、鳗鱼养殖池塘 3 个、虾养殖池塘 32 个、蟹养殖池塘 6 个、海水虾蟹混养池塘 6 个和其他水产品养殖池塘 28 个。每个养殖池塘的进水口和排水口均使用采水器放入池塘 0.5 m 左右进行取样，塘口使用五点采样法取池塘 0.5 m 左右的水样，装入棕色玻璃采样瓶中 4℃低温保存，待测。

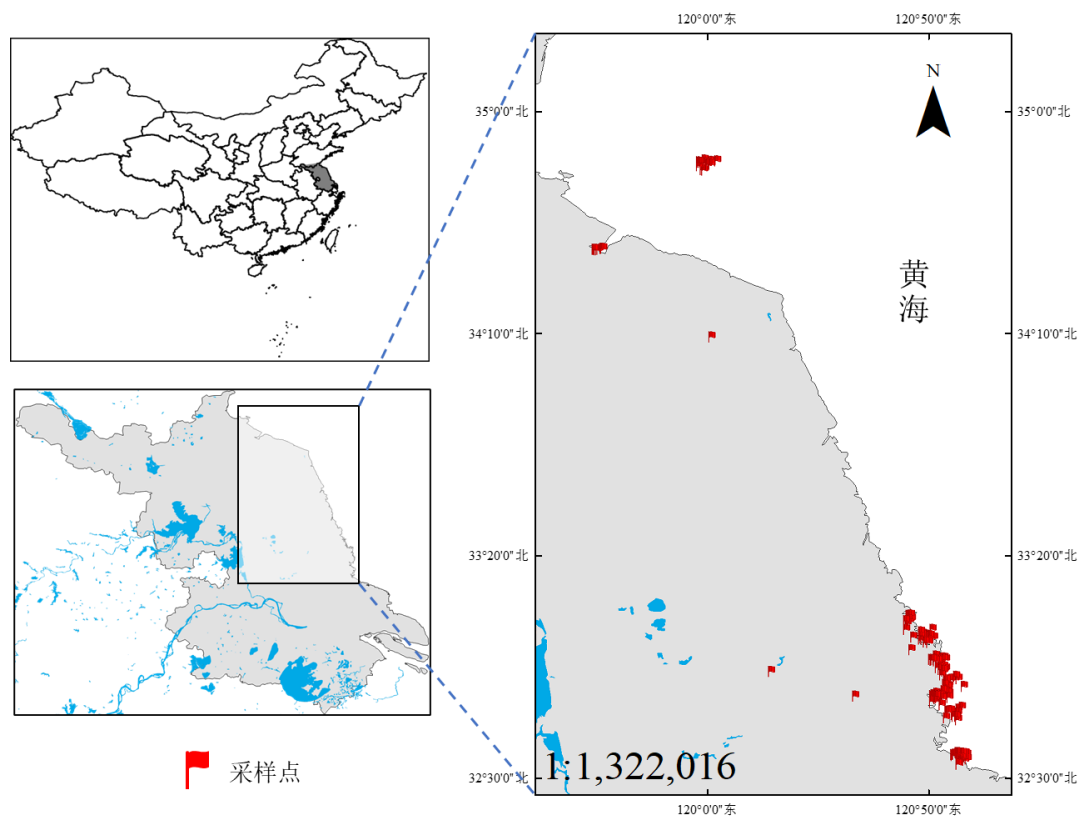


图 2-1 江苏省沿海滩涂地区的 130 个采样点，其中红色标记为采样点

Fig.2-1 130 sampling sites in coastal tidal flat areas of Jiangsu Province, among which red marks are sampling sites

1.2 仪器与试剂

仪器设备主要有：Agilent 气相色谱 -质谱联用仪 (GC-MS 色谱型号：

Agilent7890B、质谱型号： 5977B GC/MSD)、固相微萃取仪 (SPME 默克化工技术 (上海)有限公司)、微波萃取仪 (上海冉富仪器有限公司)、电子分析天平 (梅特勒 -托利多仪器有限公司 Master-QUT 水纯化系统 (上海合泰仪器有限公司)。

材料与试剂主要有：两种主要土腥味物质的标准溶液：2-甲基异莰醇 (2-MIB) 和土臭素 (GSM)，标准浓度为 100 mg/L，购买自美国 o2si smart station 公司。甲醇，色谱纯，氯化钠，分析纯固相微萃取纤维头（型号：50/30 μm DVB/CAR/PDMS），购自上海安谱实验科技股份有限公司。实验用水为超纯水。

1.3 标准曲线的建立

2-甲基异莰醇、土臭素混合标准溶液：通过甲醇将两种土腥味物质的标准溶液配制为各单体浓度为 10 mg/L 的混合标准溶液。再通过甲醇逐级稀释为 1、10、50、100 μg/L 的标准工作液，用于标准曲线的建立，现用现配。

在水样中，根据 1.4 的测定步骤，通过测定配制的已知浓度梯度（1 ng/L、10 ng/L、50 ng/L、150 ng/L、200 ng/L）的标准物质溶液，分别以 2-MIB 和 GSM 的浓度为横坐标，以离子峰面积为纵坐标绘制标准曲线。如图 2-1 所知，2-MIB 和 GSM 的峰面积和浓度呈现较好的线性关系，其线性方程分别为 $y=1937x+15527$ 和 $y=1537.5x+1057.4$ ， R^2 分别为 0.9997 和 0.9982，最低检出浓度都为 2 ng/L。

表 2-1 两种土腥味物质顶空固相微萃取法的线性范围、回归方程、检出限和定量限
Table 2-1 Linear range, regression equation, detection limit and quantitative limit of headspace solid phase microextraction for 2-MIB and GSM

分析物	线性范围(ng/L)	线性回归方程	R^2	最低检出浓度(ng/L)
2-MIB	1.00~200.00	$y=1937x+15527$	0.9997	2
GSM	1.00~200.00	$y=1537.5x+1057.4$	0.9982	2

1.4 异味物质的测定

水样中异味物质的检测采用的是顶空固相微萃取 (headspace solid phase microextraction, HSPME)方法配合气相-质谱联用仪 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[43]。

顶空固相微萃取步骤为：按照水盐比 4：1 的比例将 2 g 氯化钠加入待测水样并定容到 10 mL，定容后移入顶空固相微萃取 15 mL 小瓶中。然后加入磁力搅拌子，设置搅拌速度 1200 r/min，温度恒定为 60 °C，萃取时间 30 min，结束后迅速将萃取纤维头插进气相质谱进样口，进行 GC-MS 分析。

气相-质谱联用仪的色谱、质谱条件：DB-5 色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)，柱箱升温程序：起始温度 50 °C，保持一分钟，以 10 °C/分钟的速率升温至 1200 °C，保持 1 min，以 20 °C/分钟的速率升温至 220 °C，保持 1 min；进样模式为不分流进样；进样口温度 250 °C；进样口压力：7.66 psi；总流量：44 mL/min；载气为高纯氮 (纯度>99.999%)，流速为 1.0 mL/min。

电子电离源(EI)，离子化能量 70 eV；离子源温度 230 °C；MS 四极杆温度 150 °C；传输线温度 250 °C；溶剂延迟 5 min；扫描模式选择离子检测 (SIM)(表 2-2)。

表 2-2 2-MIB 和 GSM 离子检测参数
Table 2-2 ion detection parameters of 2-MIB and GSM

化合物	保留时间 min	定性离子 m/z	定量离子 m/z
2-甲基异莰醇 (2-MIB)	12.303	95, 108, 135	95
土臭素 (GSM)	9.184	112, 125	112

1.5 常见水质指标的测定

我们对常见的水质指标也进行了测定，包括盐度、pH、溶氧、温度、高锰酸盐指数 (COD_{Mn})、总氮 (TN)、总磷 (TP) 以及悬浮物。其中盐度的检测使用手持折光仪，pH 的检测使用 pH 计，溶氧和温度的检测使用溶氧仪，淡水中水质指标分别按照中华人民共和国国家标准 GB11894-89 (过硫酸钾氧化-紫外分光光度法)、GB11893-89 (钼酸铵分光光度法)、GB11892-89 (酸性高锰酸钾法) 对 TN、TP、COD_{Mn} 进行测定，采用中性试剂光度法和重力法测定氨氮和悬浮物。

1.6 数据分析

实验数据通过 SPSS 26 软件进行独立性 t 检验和单因素 ANOVA 检验，用平均值±标准差 (Mean±SD) 的形式表示，显著性水平为 P<0.05。采样点图用 ArcGIS 10.6 所做，所有统计学图形均用软件 Origin 2021 所做。

2 结果与分析

2.1 养殖水体中 2-MIB 和 GSM 的含量分析

我们对江苏省沿海滩涂地区的主要养殖区域进行了水样采集且对其两种主要的土腥味物质进行了检测，结果显示，该区域养殖水中的 2-甲基异莰醇的浓度为 2.76 ± 2.24 ng/L，其中 26% 的水样中为未检出，99% 的水样中 2-MIB 浓度低于 9 ng/L；土臭素的浓度为 29.07 ± 19.44 ng/L，其中 90% 的水样中 GSM 浓度高于 10 ng/L（如图 2-2 所示）。总的来说，该区域水体中的 GSM 浓度高于 2-MIB 浓度。

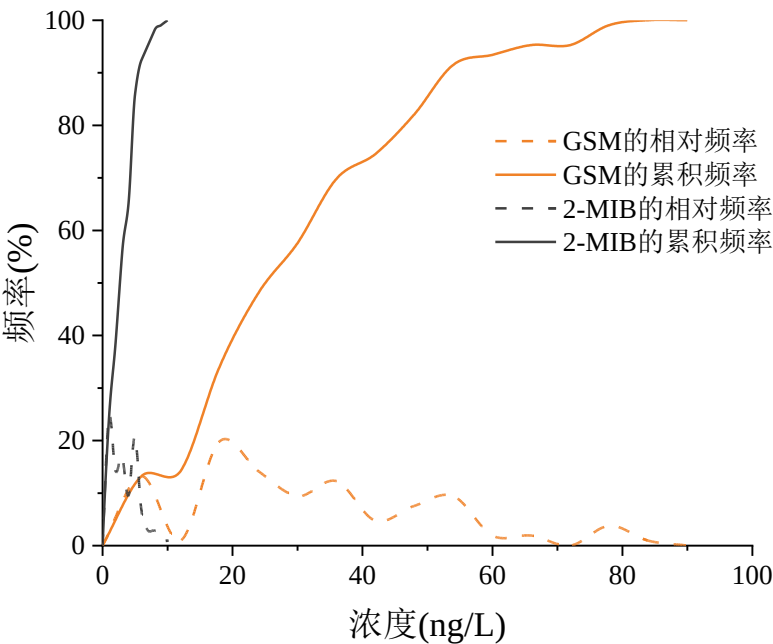


图 2-2 2-MIB 和 GSM 的浓度分布

Fig.2-2 Concentration distribution of 2-MIB and GSM

2.2 养殖水体中异味物质的水平分布规律

在对水样进行采集的过程中，也分别对同一养殖塘中的进水口，塘口以及出水口进行了采样，以分析养殖水体中异味物质的水平分布情况，结果如图 2-3 所示，进水口处的 2-MIB 和 GSM 浓度分别为 3.54 ± 2.34 ng/L 和 28.93 ± 20.82 ng/L，塘口的 2-MIB 和 GSM 浓度分别为 3.82 ± 1.60 ng/L 和 32.51 ± 18.92 ng/L，排水口出的 2-MIB 和 GSM 浓度分别为 3.53 ± 1.64 ng/L 和 29.49 ± 22.19 ng/L。对三处的异味物质进行了差异性分析，我们发现不管是 2-MIB 还是 GSM，都没有明显的差异

($P>0.05$)。

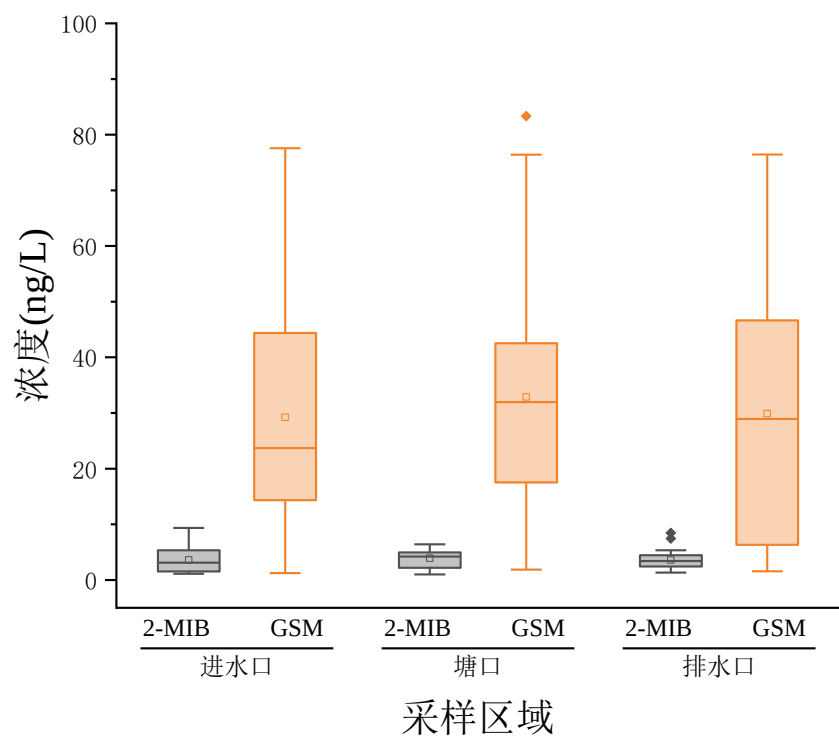


图 2-3 水体中 2-MIB 和 GSM 浓度的水平分布

Fig.2-3 Horizontal distribution of 2-MIB and GSM concentrations in water

2.3 不同养殖品种水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度分析

通过对不同养殖品种的鱼塘中 2-MIB 和 GSM 的浓度进行分析，我们发现不同养殖品种的水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度有明显的区别，加州鲈的养殖水中 2-MIB 和 GSM 的浓度分别为 1.6 ± 0.7 ng/L 和 14.7 ± 1.6 ng/L；鳊鱼的养殖水中 2-MIB 和 GSM 的浓度分别为 4.0 ± 1.5 ng/L 和 19.3 ± 4.2 ng/L；鲮鱼的养殖水中 2-MIB 和 GSM 的浓度分别为 4.1 ± 2.3 ng/L 和 27.5 ± 11.1 ng/L；四大家鱼的养殖水中 2-MIB 和 GSM 的浓度分别为 3.7 ± 1.5 ng/L 和 31.5 ± 18.3 ng/L；鳊鱼的养殖水中 2-MIB 和 GSM 的浓度分别为 5.0 ± 0.6 ng/L 和 13.4 ± 1.4 ng/L；虾的养殖水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度分别为 1.1 ± 1.2 ng/L 和 30.3 ± 18.2 ng/L；蟹的养殖水体中 2-MIB 的检测浓度为未检出，GSM 的浓度为 47.6 ± 21.0 ng/L；海水中虾蟹混养的水体中 2-MIB 的检测浓度为未检出，GSM 的浓度为 2.3 ± 1.1 ng/L；其他养殖品种中 2-MIB 和 GSM 的浓度分别为 3.68 ± 2.34 ng/L 和 37.67 ± 20.86 ng/L（如图 2-4 所示）。同时不难发现，不管是什么品种的养殖水体中，2-MIB 的浓度都显著高于

GSM 的浓度 ($P<0.05$)。在鳊鱼、鲮鱼和鳙鱼养殖水体中 2-MIB 的浓度明显高于其它 ($P<0.05$)，虾、蟹以及海水虾蟹养殖水体中 2-MIB 明显较低甚至未检出 ($P<0.05$)。对于 GSM 浓度的比较中，蟹的养殖水体中浓度明显高于其它养殖品种的水体 ($P<0.05$)，而海水虾蟹养殖水体中 GSM 的浓度却比较低。

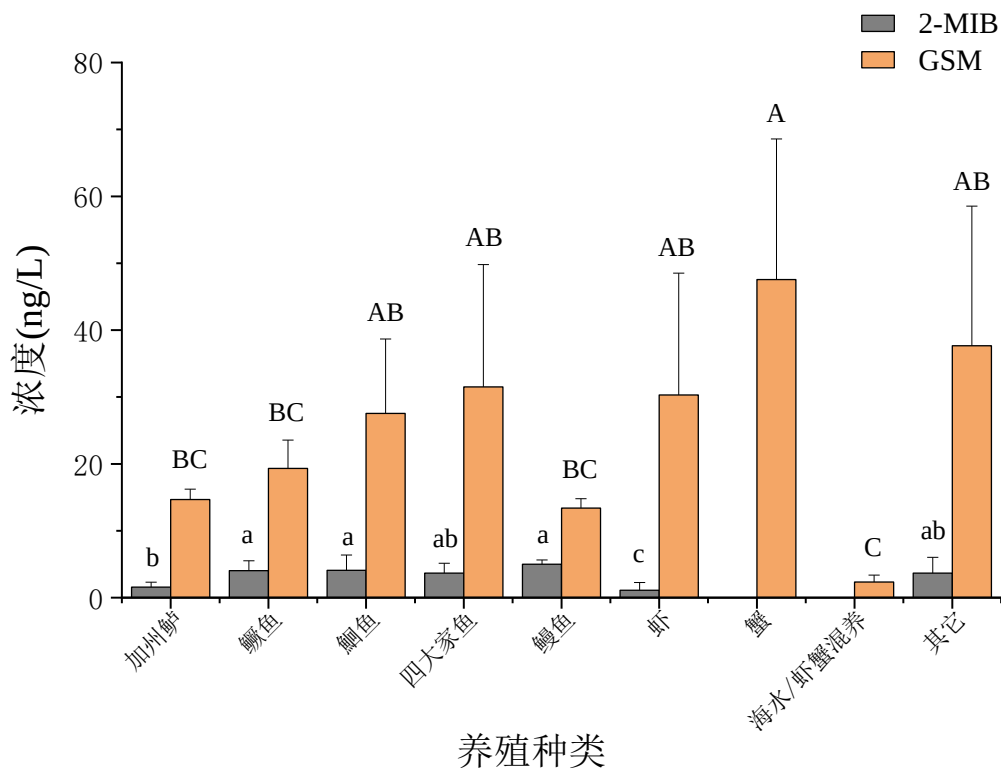


图 2-4 不同养殖品种的水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度

Fig.2-4 Concentrations of 2-MIB and GSM in water of different cultured species

2.4 养殖水体中不同环境因子与 2-MIB 和 GSM 浓度的关联性分析

养殖水体中的环境因素可能与其异味物质的产生有着千丝万缕的联系，因此对水体中水质参数与 2-MIB 和 GSM 浓度进行相关性分析是十分有必要的，其浓度与相关程度（用相关系数 r 表示）见表 2-3。由表可知，水体中的盐度与 2-MIB 和 GSM 浓度的线性相关性都较强，相关系数分别为-0.769 和-0.825，在 95%的置信区间呈负相关关系；pH 与 2-MIB 和 GSM 浓度的之间的线性相关性极低，相关系数分别为-0.035 和 0.082；水体中的溶氧指数与 2-MIB 和 GSM 浓度都具有较好的线性相关性，相关系数分别为 0.859 和 0.760，呈正相关关系；水温与

2-MIB 和 GSM 浓度的相关系数都较小, 分别为 0.340 和-0.159; 水质因子中的高锰酸盐指数与 2-MIB 和 GSM 浓度的相关系数也都较小, 分别为 0.181 和-0.199; 水体中的总氮、总磷和氨氮与 2-MIB 浓度的相关性较低, 其相关系数分别为 -0.264、0.124 和-0.533, 但与 GSM 浓度具有较好的线性相关性, 其相关系数分别为 0.759、0.790 和 0.801, 且都呈正相关关系; 总悬浮物与其水体中 2-MIB 和 GSM 浓度的相关性较低, 相关系数分别为 0.326 和 0.277。

表 2-3 养殖水体中不同水质参数与 2-MIB 和 GSM 浓度的相关性
Table 2-3 Correlation between different water quality parameters and concentrations of 2-MIB and GSM in reclaimed water

	浓度	相关系数 r	
		2-MIB	GSM
盐度 (‰)	10.29±8.87	-0.769*	-0.825*
pH	8.52±0.28	-0.035	0.082
溶氧 (mg/L)	12.34±3.67	0.859*	0.760*
温度 (°C)	28.44±1.17	0.340	-0.159
高锰酸盐指数 (mg/L)	19.06±6.25	0.181	-0.199
总氮 (mg/L)	3.49±1.79	-0.264	0.759*
总磷 (mg/L)	0.40±0.52	0.124	0.790*
氨氮 (mg/L)	0.22±0.39	-0.533	0.801*
总悬浮物 (mg/L)	73.87±159.85	0.326	0.227

注: “*”表示为相关性显著

2.5 不同盐度水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度分布

由 2.4, 我们得知水体中盐度对其 2-MIB 和 GSM 的影响较大, 且成负相关关系, 即盐度越大, 2-MIB 和 GSM 的浓度越低。于是便对不同盐度水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度分布进行了具体的分析, 如图 2-5 可知, 研究区域内水体中的盐度范围为 2.0‰~38.3‰, 其中盐度高于 30‰的池塘中, 2-MIB 的检测结果均为未检出, GSM 的检测浓度为 3.47±3.74 ng/L, 远低于平均浓度。从图 2-5 也可以得知, 80%的异味物质的可检出结果都集中在盐度为 2‰~10‰的养殖水体中。

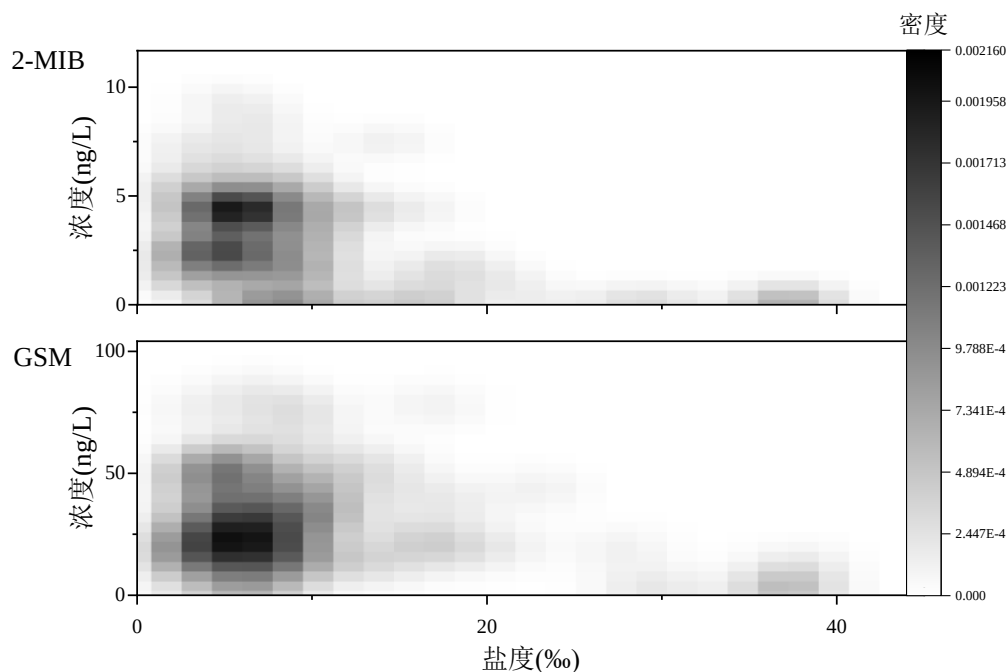


图 2-5 不同盐度的水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度分布

Fig.2-5 Concentration distribution of 2-MIB and GSM in water with different salinities

3 讨论

3.1 养殖水体中 2-MIB 和 GSM 的浓度及其分布

在目前的研究中,对于水体中 2-MIB 和 GSM 的分布以及变化规律大多集中在饮用水以及其水源上。研究人员在探究水源地的异味物质分布规律时发现,2-MIB 和 GSM 在水体中的垂直分布主要受异重流影响^[12],异重流带动水体中有机质和微生物活动,从而影响异味物质的产生和分布。但在水平维度上,特别是对于养殖水体中,由于养殖水体基本设置有进样口,排水口等,水体的流通量大,且水体面积不大,所以可能是造成其水平分布没有明显区别的主要原因。此外,也有研究表明,当水体中某一异味来源的种群为优势种群时,会造成其他产异味但生物量较低种群的作用被限制,例如,在鱼腥藻^[44]、颤藻^[45]等藻类较多时,水体中 2-MIB 的含量较高,且 GSM 的产生更多的与水体中硅藻的占比有关^[46]。这与我们在研究中发现的,在大多数的沿海滩涂的养殖水体中,2-MIB 的含量较低,而 GSM 的含量较高的结果有着相互论证的关系。鱼腥藻在盐度较高的水体中的占比低^[47],且在水样采集和检测过程中,也很少发现鱼腥藻,而硅藻含量相对丰富,这就导致了我们在沿海滩涂的养殖水体中发现的两种异味物质上浓度差

异。此外，季节因素也是影响养殖水体中异味物质的主要原因。本次研究中的水样主要采集是在 6 月份，此季节水温高，光照充足且水体中营养盐含量丰富，有利于藻类的大量繁殖^[48]，而藻类是水体中异味物质的主要生产者^[49]。总的来说，水体中藻类的种类和数量变化是导致养殖水体中异味物质含量变化以及分布规律的主要原因，且在江苏省沿海滩涂的养殖水中，GSM 是主要的异味物质。

3.2 养殖品种对水体中异味物质的影响

在对养殖水体异味物质浓度以及产生的研究过程中，对其养殖品种以及水质参数的关联性分析是必不可少的。此前已有研究人员在对美国四个州的鲶鱼养殖水中的异味物质做过分析，不同区域的养鲶池中，其异味物质的存在也表现出了明显差异^[50]。另外，在不同的饵料投喂率下，养殖水体中也呈现了 GSM 浓度的差异^[51]。在本实验结果中，养殖不同种类的水产品时，GSM 的含量差异表现明显。在虾、蟹以及四大家鱼养殖水体中，GSM 的含量明显较高，其主要原因可能是养殖时间和饲料的投喂有关，在四大家鱼等前期投喂时，藻类也是其饵料之一，这一定程度上也增加了水体中藻类的含量，使其产生更多的异味物质。

3.3 养殖水体中常规水质参数以及盐度与水体中异味物质的关系

水体中的常规水质参数是评价养殖水体的重要指标，其与异味物质的生成有着不可分割的联系。在对合肥塘西河的水质进行调查研究时就发现，水体中异味物质与其浮游动植物、光照、有机质、微生物、氮和磷等有着明显的相关性^[52]。其中氮磷主要通过影响其水体中的营养盐含量，进而对蓝藻等产生重要的影响^[53]，但在本次研究中发现，沿海滩涂水体中 2-MIB 的浓度与其相关性不大，但 GSM 的浓度与氮磷浓度的线性相关性较好，其可能原因总氮磷含量限定微生物的生长，进而限定了作为微生物代谢产物的土臭味物质的产生，而 2-MIB 受其影响较小。藻类是其水体中主要供氧物种之一，溶氧的含量一定程度上也体现了水体中藻类的数量^[54]，因此水体中溶氧与其藻类代谢产物的异味物质在一定的范围内呈较好的正相关关系是科学的，实验结果也证明了这一点。此外，盐度对于水体中的异味物质的含量也有很大的影响，其相关度较高。盐度主要影响水体中的离子强度，而有相关研究表明，水体中的离子强度较高时，水体中易挥发物质的挥发性越强，其中包括 2-MIB 与 GSM 等挥发性异味物质^[40,55]，我们的实验结果在一定程度上也证明了此观点。但盐度与藻类的生长也有着密切的联系，有实验表明，蓝藻等藻类的生长条件与盐度的相关性最大，盐度越低，越适宜其

生长^[56]。

4 结论

通过对沿海滩涂流域的水产养殖水体中进行调查发现,在养殖池塘的进水口、塘口和出水口处,2-MIB 和 GSM 并没有明显的浓度差异。进一步分析,我们还发现土臭素(GSM)是该区域养殖水体中主要的异味物质,且受养殖品种的影响较大,淡水虾蟹以及四大家鱼中含量高于其他肉食性鱼类的水体。其次在水质常规指标中,水体中的溶氧在某种程度上与异味物质成正相关关系,氮磷含量对其 2-MIB 的影响较小,对 GSM 含量的影响较大,呈明显的正相关关系。盐度也是水体中 2-MIB 和 GSM 的主要影响因素之一,盐度越大,其异味物质越少。此次研究为解决水产养殖行业中存在的如何解决和治理异味物质的这一问题提供了科学的数据和理论依据,为渔业产业的可持续发展做出了一定的贡献。

第三章 水体中 2-甲基异茨醇和土臭素的超声辅助

液液微萃取-气相色谱-质谱法的建立

引言

水资源与人类的生活息息相关，在水产养殖产业中也不例外，因此，水环境的治理成为了社会关注的焦点之一^[57]。其中由于水体污染，水体中会产生一些陈腐的气味，这些气味的来源、影响、检测和去除也已经成为研究人员关注的一个重点^[58]。目前已知的在环境浓度中的异味物质并不会对人类或者大部分生物造成毒理效应^[55]。但暴露于水中的异味物质会让消费者对饮用水和水产品的质量造成担忧。其中 2-甲基异茨醇（2-MIB）和土臭素（GSM）是水体中存在的最具代表性的异味物质，也是现在研究人员研究的最多的，最细致的异味物质^[59]。目前对于水体中异味物质的分析大多集中于水源地水库湖泊等饮用水源上，很少有对于水产养殖水体中异味物质的分布规律以及生成量的影响因素的分析报告^[12]。对养殖水体中异味物质生成量的影响因素进行分析，为解决水产养殖行业中存在的这一问题提供了科学的理论数据和依据，为水产养殖业的可持续发展做出了一定的贡献。

异味物质对很多重要的商业水产品都有影响。对水产品造成最大影响的异味主要是土霉气味，主要由 2-甲基异茨醇（2-MIB）和土臭素（GSM）造成^[16]。这两种异味物质都是亲脂性的，水体中的 2-MIB 和 GSM 一部分经鱼鳃进入血液后，进入鱼体，并在身体脂肪含量高的组织沉积，还可以直接被鱼体表皮吸收，通过渗透作用进入鱼体组织^[17]；另外，鱼类吞食的水中含有分泌土臭味物质的细菌及土臭味物质，这部分物质则透过肠上皮细胞进入鱼体，且很难被净化去除^[12]。类似于 2-MIB 和 GSM 这类化合物的研究一直具有挑战性，因为它们的气味阈值浓度通常为纳克每升或万亿分之一，开发一种有效的测定方法以及对其准确测定具有非常重要的意义。目前可靠的提取分析技术已经发展到可以分析这些化合物的微量。主要采用的前处理方法有：闭环溶出法和开环溶出法^[49,60]、液-液萃取法^[61,62]、液相微萃取法^[63]、固相萃取法^[64]、固相微萃取法^[65]和搅拌棒吸附提取等^[43,66]，在实验室中运用最多的检测方法是气质联用仪（gas chromatograph-mass spectrometer, GC/MS）来对这些化合物进行鉴定和定量分析。

水样中的 2-MIB 和 GSM 的检测方法有很多，其中最精确的是气相色谱-质谱法。采集样品后使用顶空固相微萃取法（headspace solid phase microextraction）或其它萃取方法富集样品中的异味物质，之后使用气质联用仪对样品进行分析

[43]。但也有研究人员建立了吹扫捕集法结合气质联用仪的方法同时测定多种异味物质。闭环捕集分析 (CLSA)，液液萃取 (LLE)，固相萃取 (SPE)，吹扫捕集 (PT)，搅拌棒吸附萃取 (SBSE) 和顶空单滴微萃取 (SDME) 等也可以对目标物质进行吸附提取。甚至还可以通过特定基因片段判断蓝藻源异味物质浓度，在仪器设备尚不充足的情况下使用感官分析法中的嗅味层次分析法 (FPA) 来进行定性和简单的定量分析^[67,68]。但这些方法都有一个共同的特点，对异味物质的提取富集过程复杂，富集材料较昂贵，无法进行批量化检测，最低要求也需要受专业训练的人士利用 FPA 方法鉴定气味，且检测过程耗时长，效率低。

我们正在开发一种方便，快捷，效率高的检测方法，利用四氯乙烯对 2-MIB 和 GSM 的高富集性，通过超声波浴和离心等步骤达到富集效果，然后通过色谱进样针进样，使用气质联用仪进行测定分析。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

主要仪器与设备包括：Agilent 气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) (色谱型号：Agilent7890B、质谱型号：5977B GC/MSD)、微波萃取仪 (上海冉富仪器有限公司)、电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司)，Master-QUT 水纯化系统 (上海合泰仪器有限公司)，DB-5 色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm)、Meta.X5 色谱柱 (30 m×0.25 mm×1.0 μm)。

主要试剂有：2 种主要土腥味物质的标准溶液：土臭素 (GSM)、2-甲基异茨醇 (2-MIB)，标准溶液浓度均为 100 mg/L，购买自美国 o2si smart station 公司。甲醇、乙腈、丙酮、四氯乙烯、溴仿均为色谱纯，购自美国 Supelco 公司。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

土臭素、2-甲基异茨醇混合标准溶液：用甲醇试剂作为溶剂，将两种土腥味物质配制为单体浓度为 10 mg/L 的混合标准溶液。再用甲醇逐级稀释到 500 μg/L、250 μg/L、150 μg/L、100 μg/L 和 50 μg/L 的标准使用液，现配现用。

1.2.2 色谱条件

柱箱升温程序：起始温度 50 °C，保持一分钟，以 10 °C每分钟的速率升温至 180 °C，保持 2 min，以 4 °C每分钟的速率升温至 220 °C，保持 4 min；进样模式为不分流进样；进样口温度 270 °C；进样口压力：8.74 psi；总流量：44 mL/min；载气为氦高纯（纯度>99.999%），流速为 1.1 mL/min。

1.2.3 质谱条件

电子电离源(EI)，离子化能量 70 eV；离子源温度 230 °C；MS 四极杆温度 150 °C；传输线温度 250 °C；溶剂延迟 5 min；扫描模式选择离子检测 (SIM)(表 3-1)。

表 3-1 2-MIB 和 GSM 离子检测参数
Table 3-1 Ion detection parameters of 2-MIB and GSM

化合物	保留时间 min	定性离子 m/z	定量离子 m/z
2-甲基异莰醇(2-MIB)	9.064	95, 108, 135	95
土臭素(GSM)	11.34	112, 125	112

1.2.4 超声辅助分散液液微萃取方法

在室温条件下，将 1mL 水样品置于一个 1.5 mL 的离心管中，离心管底部为锥形。将 50 μL 四氯乙烯作为萃取溶剂滴入样品溶液中。将混合物在超声萃取仪中超声处理 6 min，然后在离心机中以 3500 rpm 的转速离心 4 min。最后用微量进样针将沉积在试管底部的萃取剂相收集进自动进样小瓶中，放上 GC-MS 系统进行自动进样分析。

1.2.5 方法验证

1.2.5.1 标准曲线的绘制

按照 1.2.1 中标准溶液的配制来配制各浓度梯度的标准使用液 1 mL，按照 USADLLME 的步骤进行浓缩富集，提取，再使用 1.2.2 和 1.2.3 中的色谱和质谱

条件来测定，记录下各个浓度所对应的色谱峰面积，并以浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)绘制标准曲线，得出线性回归方程。

1.2.5.2 回收率的计算

为了避免标准曲线重复测定的嫌疑，本实验采用的是加标回收实验法。在测定的线性范围内，取 4 份水样品，第一份按照超声辅助液液微萃取法 USADLLME 的步骤富集提取，然后上机。再分别配制 100 $\mu\text{g/L}$ 、150 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 的低、中、高三种不同浓度的标准溶液，加入到另外 3 份水样中，同样按照上述方法进行测定，计算其加标回收率（简称为“回收率”，Recovery，简写为 R）。

1.2.5.3 检测限

取纯水样品 (空白样品)进行连续的 20 次测定，根据峰面积所对应的浓度求出其标准差，按照信噪比为 3（即 $S/N=3$ ）计算出 2-MIB 和 GSM 的方法检出限，按照信噪比为 10（即 $S/N=10$ ）计算出定量限。

1.2.6 统计学分析

采用简明统计软件进行统计分析，数据之间的比较采用方差分析，显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 溶剂和色谱柱的选择

目前最常用的顶空-固相微萃取方法中采用的是甲醇和 DB-5 色谱柱的组合。但在本实验中，由于甲醇不适用为萃取剂，因此，我们选择了四氯乙烯作为进行富集目标物质的溶剂。我们分别用甲醇和四氯乙烯将标准品直接稀释到 200 $\mu\text{g/L}$ 的浓度，并用两种色谱柱进行上机检测，得出结果如表 3-2 所示。所以我们选择四氯乙烯和 Meta.X5 色谱柱的组合。

表 3-2 不同溶剂与不同色谱柱对 2-MIB 和 GSM 的响应度
Table 3-2 Responsiveness of different solvents and columns to 2-MIB and GSM

色谱柱型号	甲醇		四氯乙烯	
	2-MIB	GSM	2-MIB	GSM
Meta.X5	-	+	++	++
DB-5	++	++	+	+

注：“-”为未响应；“+”为响应值较低；“++”为响应值正常

2.1.2 色谱以及质谱条件的优化

与其他的 2-MIB 和 GSM 的测定方法相比，由于此方法也需要用到气相色谱-质谱联用仪，所以基于相同的色谱、质谱原理，我们对仪器进行了大量的调试工作，结果如材料与方法中的 1.2.2 和 1.2.3 所示，并在该条件下使用 100 µg/L、150 µg/L、200 µg/L 的低、中、高三种不同浓度进行绝对回收率的测算，计算出绝对回收率为 75.22%，具有方法学意义。

2.2 萃取条件的优化

2.2.1 萃取方法的评价标准

富集倍数（enrichment factor, EF）是表示萃取后与萃取前样品中的目标物质浓度之比，计算公式为：

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (1)$$

其中 C_{sed} 表示样品萃取富集后的浓度， C_0 表示样品初始浓度。

绝对回收率是在空白基质中定量加入药物，经萃取处理后与标准品的比值。

相对回收率（Recovery, R）表示在测定样品的同时，于水样品中加入一定量的标准物质进行测定，将其测定结果扣除样品的测定值，而得到加入标准物质的回收率，计算公式为：

$$R\% = \frac{(C_R - C_0)}{D} \times 100\% \quad (2)$$

其中 C_R 表示加标样品测定值， C_0 表示样品测定值， D 表示加标量。其相对标准差（Relative Standard Deviation, RSD）是标准偏差与测量结果算术平均值的比值，即：

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3)$$

其中 S 为标准偏差, $\bar{X}$ 为测量平均值。

2.2.2 萃取剂的选择

选择合适的萃取溶剂是开发高效分散液液微萃取的关键。通常, USADLLME 工艺中使用的萃取溶剂必须满足以下要求:比水密度高, 在水中的溶解度低, 对目标分析物有较高的提取能力, 超声时容易分散在水中。在此基础上, 我们测试了溴仿 (CHBr_3)、四氯乙烯 (C_2Cl_4) 甲醇 (CH_3OH) 和乙腈 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) 这四种溶剂作为潜在的受体相。但由于甲醇、乙腈在水中的溶解度高, 不适用于液液微萃取。同时, 萃取溶剂在色谱分离过程中也应具有良好的色谱性能。但溴仿存在着与 GSM 峰值重叠的问题, 而且溴仿的出峰面积比四氯乙烯少, 回收率低。其结果如表 3-3 所示。因此, 选择四氯乙烯作为下一个优化过程的萃取相。

表 3-3 不同萃取溶剂对 2-MIB 和 GSM 的富集效果与回收率
Table 3-3 Enrichment factor and recovery of 2-MIB and GSM by different extraction solvents

萃取剂	2-MIB		GSM	
	富集倍数	回收率(%)	富集倍数	回收率(%)
四氯乙烯 (C_2Cl_4)	19.70	89.72	19.50	113.41
溴仿 (CHBr_3)	18.40	57.82	16.40	-
甲醇 (CH_3OH)	-	-	-	-
乙腈 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$)	-	-	-	-

注: 萃取条件为 1 mL 样品和 50 μL 萃取溶剂

2.2.3 样本的体积

样本体积的大小主要影响后续的萃取溶剂体积、离心的条件以及超声的条件。样本的体积越大, 对超声萃取以及离心机的要求越高, 所需要的萃取溶剂也越多, 且可能导致萃取效果不显著。样本的体积过小, 则不足以达到富集的效果。因此, 我们需要在保证回收率的情况下, 选择合适的样本体积。在实际实验过程中, 选择使用 1 mL 和 10 mL 的离心管盛装样品, 在萃取条件相同的情况下对 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL 和 10 mL 体积的样品进行回收率的测定, 并以样品体积为横坐标, 回收率为纵坐标做图 3-1。据图可知, 在不受萃取溶剂体积、进样体积以及其它因素影响的情况下, 样品的最佳体积为 1 mL。

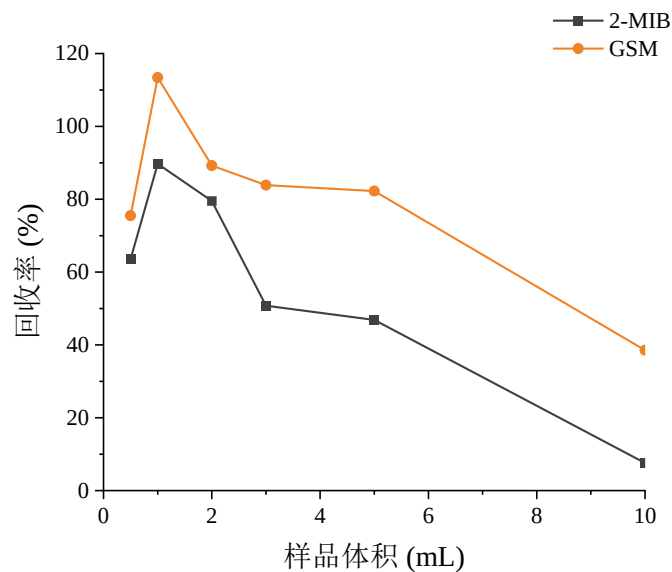


图 3-1 不同样品体积对 2-MIB 和 GSM 回收率的影响

Fig.3-1 Effects of different sample volumes on 2-MIB and GSM recovery rates

注：萃取条件 50 μ L 萃取溶剂和 20 μ L 进样体积

2.2.4 萃取剂的体积

通过实验，挑选了四氯乙烯作为萃取溶剂。为了达到最佳的富集提取效果，选择合适的萃取溶剂也是极为重要的。萃取溶剂的体积影响萃取效率从而回收率，所以用回收率作为评判标准是合适的。我们在 1 mL 的样本中加入 20 μ L、40 μ L、50 μ L、60 μ L、70 μ L、100 μ L 和 120 μ L 的四氯乙烯，并计算其对 2-MIB 和 GSM 回收率，结果如图 3-2 所示。据图可知，在不受样品体积、进样体积以及其它因素影响的情况下，萃取溶液的最佳体积为 50 μ L。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/487040132154010025>