

气相色谱-串联质谱法测定黄酒和酱油中的氨基甲酸乙酯

徐小民¹, 何华丽², 阮瑜迪², 黄百芬¹, 任一平^{1*}

(1. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051; 2. 浙江工业大学化学工程与材料科学学院, 杭州 310014)

摘要: **目的** 建立气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)测定黄酒和酱油中氨基甲酸乙酯的分析方法。**方法** 样品添加同位素内标氨基甲酸乙酯-d₅后, 直接上样到填充好 ExtrelutTM NT 有机硅藻土的柱中进行基质固相分散萃取, 先用正己烷淋洗除杂, 再用乙酸乙酯:乙醚(1:9, v/v)的混合溶剂洗脱氨基甲酸乙酯, 洗脱液经浓缩后采用 GC-MS/MS 多反应监测(MRM)模式测定。**结果** 方法检出限和线性范围分别为 2 μg/kg 和 5~1000 μg/kg ($R > 0.999$)。在 50、200、500 μg/kg 三个添加水平下, 黄酒基体中氨基甲酸乙酯的加标回收率为 97.4%~98.8%, RSD 为 4.0%~8.4%。向酱油基体中添加 10、50、200 μg/kg 三个浓度水平, 氨基甲酸乙酯的加标回收率为 96.2%~104.0%, RSD 为 5.3%~10.0%。**结论** 该方法定量准确、操作简单、灵敏度高、定性确证可靠, 适用于黄酒和酱油中氨基甲酸乙酯的测定。

关键词: 饮料氨基甲酸乙酯; 黄酒; 酱油; 气相色谱串联质谱法; 同位素内标法

Determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine and soy sauce by gas chromatography-tandem mass spectrometry

XU Xiao-Min¹, HE Hua-Li², RUAN Yu-Di³, HUANG Bai-Fen¹, REN Yi-Ping^{1*}

(1. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China; 2. College of Chemical Engineering and Material Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for qualitative and quantitative determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine and soy sauce by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). **Methods** After spiked with internal standard ethyl carbamate-d₅, the sample was directly loaded to an ExtrelutTM NT column for matrix solid-phase dispersion extraction. Hexane was added to wash the matrix interferences and 90% (v/v) ethyl ether/ethyl acetate mixture was used to elute the analyte. The concentrated extract was detected by GC-MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The limit of detection (LOD) was 2 μg/kg and the linear range was 5~1000 μg/kg ($R > 0.999$). For Chinese rice wine, the recoveries at the spiked levels of 50, 200, and 500 μg/kg were 97.4%~98.8% with the RSD of 4.0%~8.4%. For soy sauce, the recoveries at the levels of 10, 50, and 200 μg/kg were 96.2%~104.0% with the RSD of 5.3%~10.0%. **Conclusion** The method is highly sensitive, easy operating, accurate for quantitative analysis, and reliable for qualitative detection. It is suitable for determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine and soy sauce.

*通讯作者: 任一平, 本科, 教授级高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检验技术及食品安全检测技术。E-mail: renyiping@263.net

*Corresponding author: REN Yi-Ping, Professorate Senior Engineer, Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, No. 3399, Bingsheng Road, Binjiang District, Hangzhou 310051, China. E-mail: renyiping@263.net

KEY WORDS: ethyl carbamate; Chinese rice wine; soy sauce; gas chromatography-tandem mass spectrometry; isotope labeled internal standard

1 引言

氨基甲酸酯被世界卫生组织(WHO)下属的国际癌症研究机构(IARC)于2007年评定为2A类对人类可能的致癌物^[1]。作为目前食品发酵工业不可避免的副产物,有关氨基甲酸酯可能带来的食品安全问题日益受到关注。酒类是氨基甲酸酯含量较高的食品,其中果酒氨基甲酸酯的含量最高超过1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1]。国产酒中,黄酒中的含量最高超过500 $\mu\text{g}/\text{kg}$,白酒比黄酒略低,葡萄酒中最低,一般低于40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2]。其他发酵类食品,如酱油、酸奶、面包等,氨基甲酸酯的含量一般低于100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1-4]。发酵类食品中氨基甲酸酯的检测主要有衍生液相色谱荧光检测器法(LC-FD)^[5,6]和气质联用(GC-MS)法^[7-11]。GC-MS法因其较高的灵敏度,是酒中氨基甲酸酯检测最为普遍的方法。但是因为氨基甲酸酯分子量较小,GC-MS法特征离子中除了 m/z 62,其他离子受基体干扰较大,尤其是基体较复杂且含量较低的酱油和面包,其定性确证能力受到了限制^[4,12]。有文献报道,用液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)^[4,13,14]、气相色谱-串联质谱-正化学源模式(GC-MS/MS-PCI)^[12]、GC-MS/MS电子轰击源(EI)^[15,16]等检测面包、果酒和酱油中的氨基甲酸酯。本文从样品前处理、定性和定量准确性的角度出发,研究黄酒和酱油中氨基甲酸酯的GC-MS/MS检测技术。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

7890 GC-7000B MSD三重四级杆气相色谱-质谱联用仪(美国Agilent公司);ExtrelutTM NT有机硅藻土散装填料(德国Merck公司)。

甲醇、乙醚、乙酸乙酯和正己烷(HPLC级,美国TEDIA公司);无水硫酸钠(分析纯,上海试四赫维化工有限公司,使用前经500 $^{\circ}\text{C}$ 干燥8 h);氨基甲酸酯(纯度98%,日本TCI公司);氨基甲酸酯- d_5 (纯度98%,美国CIL公司)。

黄酒和酱油购于本地市场。

2.2 材料与方法

2.2.1 标准溶液

氨基甲酸酯及其同位素内标分别用甲醇配制成浓度为1000 mg/L 的单一标准储备溶液;内标储备液用甲醇逐级稀释,配制浓度为10 mg/L 的内标使用液;用乙酸乙酯配制浓度为5、10、20、50、100、200、500、1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准系列,每个浓度每毫升加入25 μL 内标使用液(内标最终浓度为250 $\mu\text{g}/\text{L}$)。

2.2.2 样品前处理

称取1 g(准确至0.001 g)样品于5 mL试管中,准确加入25 μL 浓度为10 mg/L 的内标使用液,混匀后转移至装有1.5 g ExtrelutTM NT填料的玻璃固相萃取柱中(15 cm长 \times 1.2 cm内径,底部加有约1 cm高的无水硫酸钠),静置15 min使其吸附完全,用10 mL正己烷淋洗并弃去,再用12 mL乙酸乙酯:乙醚(1:9, v/v)的混合溶剂洗脱氨基甲酸酯,收集的洗脱液在30 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流中吹至约1 mL(不可以吹干),最后用乙酸乙酯定容到1 mL供仪器测定。

2.2.3 实验条件

色谱条件 色谱柱:Innowax (30 $\text{m}\times$ 0.25 $\text{mm}\times$ 0.25 μm ,聚乙二醇交联键合固定相,J&W,美国Agilent公司);柱温程序:50 $^{\circ}\text{C}$ 保持3 min,以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至150 $^{\circ}\text{C}$,再以40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至250 $^{\circ}\text{C}$,保持5 min;进样口和接口温度分别为240 $^{\circ}\text{C}$ 和250 $^{\circ}\text{C}$;载气:He,1 mL/min ;进样量:1 μL ,不分流进样。

串联质谱条件 电子轰击离子源(EI),多反应监测模式(MRM);离子源和四级杆温度分别为300 $^{\circ}\text{C}$ 和150 $^{\circ}\text{C}$;Quench气(He)和碰撞气(N_2)流量分别为2.25 mL/min 和1.5 mL/min ;溶剂延迟时间为10 min。

MRM条件 氨基甲酸酯:62>44(25 eV,定量离子对),62>45(25 eV),62>62(5 eV),74>44(10 eV);氨基甲酸酯- d_5 :64>44(25 eV,定量离子对),76>44(10 eV)。

单级质谱选择离子监测(SIM)条件 氨基甲酸酯: m/z 62(定量离子),74,44,45;氨基甲酸酯- d_5 : m/z 64(定量离子),76。

3 结果与分析

3.1 质谱条件

氨基甲酸酯一级质谱特征离子主要有 m/z 62、74、44、45 和 89, 以定量离子 m/z 62 为 100%, 定性离子的相对比率分别为 22.6%、79.4%、55.9% 和 2.8%。相对于其他离子, m/z 89 的碎片虽然质量数较大, 但其相对比率太低, 当样品中氨基甲酸酯含量低于 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 不适合作定性离子^[12]; m/z 44 或 45 是 GC-MS 中干扰最大的离子之一, 也不适合作为定性离子。因此, 实际可用的特征离子只有 m/z 62 和 m/z 74。根据欧盟指令(2002/657/EC)对痕量污染物的确证要求, 单级质谱至少要 4 个特征离子, 所以单级质谱的定性难度较大。

氨基甲酸酯 MS/MS 法 MRM 模式的离子通道主要有 62>44(100%)、62>45(33.8%)、62>62(209%) 和 74>44(38.7%)。根据欧盟指令(2002/657/EC)对痕量污染物的确证要求, 二级质谱至少要 2 个通道, 方法选用 4 个通道的离子对, 定性确证的准确性非常高。图 1 是某酱油样品采用 MRM 模式得到的 4 个通道叠加图(含量为 15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 在酱油这种复杂基体中, 即使是低浓度水平下, 其定性离子对相对于定量离子对的比率与标准溶液比均在 10% 以内, 定性准确性非常高。

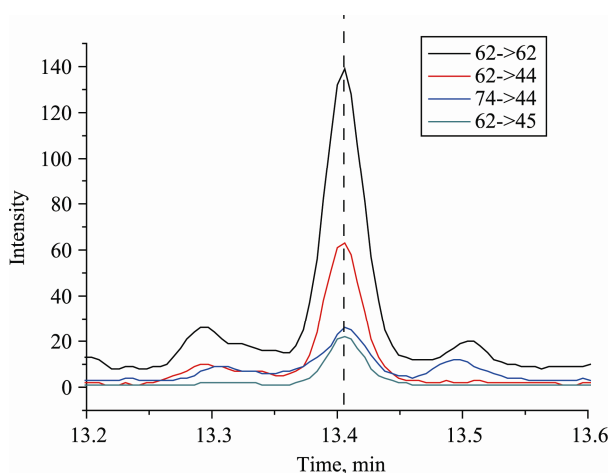


图 1 酱油中氨基甲酸酯 MRM 模式的色谱图
(15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

(沿虚线从上到下分别为 62>62、62>44、74>44 和 62>45)

Fig. 1 Chromatogram of ethyl carbamate in soy sauce with MRM mode (15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

(From top to bottom around the dash: 62>62, 62>44, 74>44 and 62>45)

3.2 前处理方法

固相萃取法提取酒或酱油中氨基甲酸酯主要采用商品柱或者散装填料自制柱两种方式。商品柱操作简单, 但是过柱后往往要增加无水硫酸钠脱水的步骤, 以保护 GC 柱^[2]。自制柱多先将填料与样品溶液拌匀, 再转移到空柱中, 与商品柱相比, 多了拌匀转移的步骤^[7,16]。本文将用于脱水的无水硫酸钠层和用于提取的硅藻土层直接装填于空柱中, 样品溶液可以像商品柱一样直接上样, 提取脱水可以一步完成, 以利于大批量样品的前处理操作。

采用散装填料, 减少了实验成本。可以回收再利用玻璃柱, 避免了一次性塑料柱体对环境的影响, 因为氨基甲酸酯在烘干后会挥发, 玻璃柱体在用自来水超声去除硫酸钠后, 在高于 120 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下烘干 4 h 以上, 就能重复使用。

本文采用的同位素内标法, 即使取样 1 g, 仍能得到很好的精密度与准确度。取样量的减少, 可以相应的减少洗脱时有机溶剂用量, 与采用外标法的文献^[16]相比, 洗脱用的有机溶剂减少了近 7 倍, 且通过优化洗脱用混合溶剂比例与用量, 最终避免使用对环境影响较大的含氯有机溶剂, 并获得了很好的回收率和较少的基体干扰。

3.3 方法学验证

方法线性范围为 5~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($R=0.9998$)。选择样品含量约为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的酱油基体, 本方法中氨基甲酸酯在酱油和黄酒基体中的 LOD(以 3 倍信噪比计)为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ 均为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。加标浓度根据两种基体中的实际含量水平来确定, 在 50、200、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个加标水平下, 黄酒基体(45.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)中氨基甲酸酯的回收率为 97.4%~98.8%, 相对标准偏差(RSD)为 4.0%~8.4%(表 1)。在 10、50、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个加标水平下, 酱油基体(15.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)中氨基甲酸酯的回收率为 96.2%~104.0%, RSD 为 5.3%~10.0%(表 1)。

在总共 173 份黄酒样品中(含量范围为 38.1~517.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 单级质谱法 SIM 模式和串联质谱法 MRM 模式两种方法检测结果的相对偏差均在 10% 之内, 对于黄酒基体, 结果较为接近。在总共 35 份酱油样品中(含量范围为 <2~85.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 两种方法的相对偏差在 2.7%~46.4%, 其中 SIM 模式的结果均高于 MRM 模式, 且部分样品在 SIM 模式下出现假阳

表1 黄酒和酱油中氨基甲酸乙酯的回收率和相对标准偏差($n=7$)
Table 1 Recovery and RSD of ethyl carbamate in Chinese rice wine and soy sauce($n=7$)

| 样品基体 | 本底值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 测定值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 回收率 (%) | RSD (%) |
|------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------|---------|
| 黄酒 | 45.2 | 50 | 94.6 | 98.8 | 6.5 |
| | | 200 | 240.0 | 97.4 | 4.0 |
| | | 500 | 538.7 | 98.7 | 8.4 |
| 酱油 | 15.3 | 10 | 25.7 | 104.0 | 10.0 |
| | | 50 | 63.4 | 96.2 | 5.3 |
| | | 200 | 214.3 | 99.5 | 6.6 |

性。Park 等^[4]在用 LC-MS/MS 和 GC-MS 对比研究酱油中的氨基甲酸乙酯时也发现采用 SIM 模式时部分样品会出现假阳性。与标准溶液相比, 定性离子(对)与定量离子(对)相对比率的准确性, MRM 模式的均在 15% 之内, SIM 模式最高达到了 243%, 说明在酱油基体中用 SIM 模式存在较大的干扰, 如果没有更好的净化方法, 建议采用 MRM 模式。

4 结论

氨基甲酸乙酯属于小分子化合物, 单级质谱特征离子质量数较小, 在复杂基体, 如酱油中, 虽然代表准确度和精密度的回收率和 RSD 均满足痕量检测的要求, 但是与抗干扰能力更强的串联质谱方法比较, 单级质谱法存在明显的基体干扰现象, 有的甚至出现假阳性。因此, 对于方法的准确性和可行性, 除了回收率和 RSD 等参数外, 有必要采用更准确的方法(如 MRM 模式), 或者对已知浓度的质控样品等进行评价。

参考文献

- [1] Weber JV, Sharypov VI. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review [J]. *Environ Chem Lett*, 2009, 7(3): 233–247.
- [2] Wu P, Pan X, Wang L, *et al.* A survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China [J]. *Food Contr*, 2012, 23: 286–288.
- [3] Ye C, Zhang X, Gao Y, *et al.* Multiple headspace solid-phase microextraction after matrix modification for avoiding matrix effect in the determination of ethyl carbamate in bread [J]. *Anal Chem Acta*, 2012, 710: 75–80.
- [4] Park SK, Kim CT, Lee JW, *et al.* Analysis of ethyl carbamate in Korean soy sauce using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection or tandem mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry [J]. *Food Contr*, 2007, 18(8): 975–986.
- [5] 肖泳, 邓放明. 发酵食品中氨基甲酸乙酯的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2012, 3(3): 216–221.
Xiao Y, Deng FM. Research progress on ethyl carbamate in fermented food [J]. *J Food Safe Qual*, 2012, 3(3): 216–221.
- [6] Fu ML, Liu J, Chen QH, *et al.* Determination of ethyl carbamate in Chinese yellow rice wine using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2010, 45(6): 1297–1302.
- [7] 周萍萍, 赵云峰, 张琪, 等. 稳定性同位素稀释技术结合气相色谱-离子阱质谱法检测葡萄酒中的氨基甲酸乙酯[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 19(6): 492–495.
Zhou PP, Zhao YF, Zhang G, *et al.* Determination of ethyl carbamate in wine by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2007, 19(6): 492–495.
- [8] Wu H, Chen L, Pan G, *et al.* Study on the changing concentration of ethyl carbamate in yellow rice wine during production and storage by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235(5): 779–782.
- [9] Machado AMD, Cardoso MD, Emidio ES, *et al.* Experimental design methodology to optimize the solid phase microextraction procedure prior to GC/MS determination of ethyl carbamate in samples of homemade cachaca [J]. *Anal Lett*, 2012, 45(10): 1143–1155.
- [10] Baffa JC, Mendonca RCS, Pereira JMD, *et al.* Ethyl-carbamate determination by gas chromatography-mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit [J]. *Food Chem*, 2011, 129(4): 1383–1387.
- [11] Chung SWC, Kwong KP, Chen BLS. Determination of ethyl carbamate in fermented foods by GC-HRMS [J]. *Chromatographia*, 2010, 72(5-6): 571–575.

- [12] Hamlet CG, Jayaratne SM, Morrison C. Application of positive ion chemical ionisation and tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the trace level analysis of ethyl carbamate in bread [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 2235–2243.
- [13] 王丽娟, 柯润辉, 王冰, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法直接测定黄酒和葡萄酒中氨基甲酸酯[J]. *色谱*, 2012, 30(9): 903–907.
- Wang LJ, Ke RH, Wang B, *et al.* Direct determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine and grape wine by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(9): 903–907.
- [14] Alberts P, Stander MA, De Villiers A. Development of a novel solid-phase extraction, LC-MS/MS method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages: application to South African wine and spirits [J]. *Food Addit Contamin Part A*, 2011, 28(7): 826–839.
- [15] Lachenmeier DW, Frank W, Kuballa T. Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography to the routine analysis of ethyl carbamate in stone-fruit spirits [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(2): 108–112.
- [16] 周勇, 王力清, 刘嘉亮, 等. 气相色谱-串联质谱(GC/MS/MS)测定酱油中氨基甲酸酯的含量[J]. *粮油加工*, 2010, (4): 00–102.
- Zhou Y, Wang LQ, Liu JL, *et al.* Determination of ethyl carbamate in soy sauce by GC/MS/MS [J]. *Cereal Oil Proces*, 2010, (4): 100–102.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



徐小民, 博士, 主要研究方向为卫生理化检验。

E-mail: chemxuxm@163.com



任一平, 教授, 主要研究方向为卫生理化检验技术及食品安全检测技术。

E-mail: renyiping@263.net