

气相色谱-质谱检测葡萄酒中氨基甲酸乙酯 预处理方法的比较研究

章 晴, 陈士恒, 史晓梅, 杨永坛*

(中粮营养健康研究院, 北京市营养健康与食品安全重点实验室, 北京 102209)

摘要: **目的** 比较液液萃取法、固相萃取法和分散式固相萃取法作为预处理方法对葡萄酒中的氨基甲酸乙酯的处理效率。**方法** 葡萄酒样品中的氨基甲酸乙酯分别用二氯甲烷进行液液萃取, 用氨基甲酸乙酯专用柱进行固相萃取, 用乙腈、石墨化炭黑和 N-丙基乙二胺进行分散式固相萃取, 再以气相色谱-质谱联用仪测定其含量。**结果** 3种预处理方法的平均回收率均在 70%~110%之间, 相对标准偏差($n=5$)均小于 6%。液液萃取法处理单个样品成本小于 5 元, 富集倍数可达 5 倍, 可用于低含量样品的预处理和进出口企业的产品合规性检测; 固相萃取法操作简便, 每人每工作日可处理 40 个样品, 可用于企业的高通量检测; 分散式固相萃取法成本适中、回收率最佳、综合预处理效率高, 一次预处理可同时检测葡萄酒中农药残留和氨基甲酸乙酯含量, 适用于葡萄酒中多种有害物质的筛查。**结论** 三种方法各具优势, 综合考虑处理效率和实验成本, 分散式固相萃取法更适合葡萄酒生产企业的日常应用。该方法已用于葡萄酒中氨基甲酸乙酯的含量测定。

关键词: 葡萄酒; 氨基甲酸乙酯; 液液萃取法; 固相萃取法; 分散式固相萃取法

Comparison of different pretreatment methods for determination of ethyl carbamate in wine by gas chromatography-mass spectrometry

ZHANG Qing, CHEN Shi-Heng, SHI Xiao-Mei, YANG Yong-Tan*

(Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety, COFCO Nutrition & Health Research Institute, Beijing 102209, China)

ABSTRACT: Objective To compare the preconditioning efficiencies of ethyl carbamate in wine by liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE) and dispersive solid phase extraction (d-SPE). **Method** Three methods of LLE with dichloromethane, SPE with Cleanert EC column and d-SPE with acetonitrile, graphitized carbon and primary secondary amine were separately used to extract the ethyl carbamate of the wine samples, which was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in selected ion monitoring mode. **Result** The spiked recoveries at 3 levels of these methods were in the range of 70%~110% and the relative standard deviations ($n=5$) were less than 6%, indicating that those methods had a good accuracy and precision. Since it was low-cost and had a high enrichment efficiency, LLE was suitable for pretreatment of samples with trace amount and could meet the requirements of compliance detection in import and export manufacturers. SPE was more appropriate for high through-put determination due to convenience and fast speed. d-SPE could be well applied to various hazard substances screening, because it was mid-cost, best recovery and high comprehensive efficiency. **Conclusion** In consideration of the pretreatment efficiency

*通讯作者: 杨永坛, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: yangyongtan@cofco.com

*Corresponding author: YANG Yong-Tan, Senior Engineer, Food Quality & Safety Center, COFCO Nutrition & Health Research Institute, No.4 Road, Future Science and Technology Park South, Beiqijia, Changping, Beijing 102209, China. E-mail: yangyongtan@cofco.com.

and cost, d-SPE was more suitable for the daily quality control inspection in wine manufacturers. d-SPE coupled with GC-MS had been applied to determination of ethyl carbamate in wine.

KEY WORDS: wine; ethyl carbamate; liquid-liquid extraction; solid phase extraction; distributed solid phase extraction

1 引言

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC), 又称尿烷, 是酒精饮料与发酵食品在生产和储存过程中天然形成的副产物, 其含量从 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 到 mg/kg 不等^[1,2]。由于氨基甲酸乙酯具有遗传毒性和致癌性, 2007 年世界卫生组织国际癌症研究机构将它列为 2A 类致癌物(对人类很可能有致癌性)。

发酵食品和饮料中含有多种可以生成氨基甲酸乙酯的前体物质, 如氢氰酸、尿素、瓜氨酸、氰苷和其他 N-氨基甲酰化合物等^[3]。它有两个主要的形成机制^[4]: 最常见的途径是尿素和乙醇在酸性介质中发生化学反应; 另一个自然产生过程是植物中的氰苷降解成氢氰酸, 再氧化为氰酸盐后, 和乙醇反应。

由于饮酒是人类摄入氨基甲酸乙酯的主要方式, 所以欧美多国规定了酒类饮料中 EC 的限量标准: 佐餐葡萄酒的 EC 限量是 15~30 $\mu\text{g}/\text{L}$, 强化葡萄酒的 EC 限量是 60~100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 白兰地的 EC 限量是 400~1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[4]。而我国还没有对酒类中的 EC 进行限量规定。

目前, 氨基甲酸乙酯的色谱质谱分析常用方法有: 液液萃取-气质联用^[5]、固相萃取-气质联用^[6-8]、固相微萃取-气相色谱^[9]、柱前衍生-液相色谱^[10]、液质联用^[11]等。我国商检标准 SN/T 0285-2012 中采用的是液液萃取方法^[12], 该方法对目标物的富集倍数大、耗材成本低; 但操作较繁琐、处理速度慢。美国分析化学家协会(AOAC)和国际葡萄与葡萄酒组织(OIV)的标准方法均是采用固相萃取方法^[13,14], 该方法可同时完成提取与净化, 内标法定量可以在一定程度上消除由操作条件等变化所引起的误差; 但洗脱剂用量过大, 需要分步浓缩, 耗时较长。固相微萃取法对目标物富集能力强、自动化高; 但萃取纤维价格高、寿命有限。液相色谱荧光检测器检测氨基甲酸乙酯灵敏度高, 但需要对目标物进行衍生处理。液质联用仪检测酒类样品中氨基甲酸乙酯可以直接进样, 简便高效; 但仪器价格高昂, 且对操作者要求较高。

本研究对 SN/T 0285-2012 的液液萃取方法和

AOAC、OIV 的固相萃取方法进行改进, 以提高回收率和预处理效率。分散式固相萃取方法简便高效成本低, 已广泛用于食品中农药残留的预处理^[15], 本实验将考察该方法对葡萄酒中氨基甲酸乙酯的预处理效率, 以期实现一次预处理可同时满足葡萄酒中农药残留和氨基甲酸乙酯的检测要求。通过对 3 种预处理方法的比较, 为葡萄酒生产企业在氨基甲酸乙酯检测方面提供相关参考依据。

2 材料与方法

2.1 材料、仪器与试剂

2.1.1 葡萄酒样品

超市购买, 市面上常见葡萄酒。4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存, 使用前混匀。

2.1.2 仪器设备

7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪(配 EI 源, 美国安捷伦科技有限公司); BSA 224S-CW 电子天平(感量 0.1 mg, 德国赛多利斯公司); HGC-24A 氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司); QL-902 旋涡混合器(海门其林贝尔仪器制造有限公司); Allegra 64R 离心机(美国贝克曼公司); SB-3200 DTDN 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2.1.3 化学试剂

氨基甲酸乙酯标准品(CAS 51-79-6, 纯度 >99.0%, 美国 AccuStandard 公司); 二氯甲烷(色谱纯, Cleman 公司); 乙腈、正己烷(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 乙酸、氯化钠、无水硫酸钠(分析纯, 北京化工厂); 无水乙酸钠、无水硫酸镁(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 石墨化炭黑(GCB)填料、N-丙基乙二胺(PSA)填料、氨基甲酸乙酯专用净化柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的配制

氨基甲酸乙酯标准溶液: 准确称取(精确至 0.1 mg)适量的氨基甲酸乙酯标准品, 用乙腈配置成浓度为 1.00 g/L 的标准储备液, 使用时用乙腈分别稀释至

20.00 mg/L 和 1.00 mg/L。

标准系列: 准确移取 0.50、0.25、0.10、0.05 mL 的氨基甲酸酯标准溶液(20.00 mg/L)和 0.50、0.20、0.10、0.05 mL 的氨基甲酸酯标准溶液(1.00 mg/L), 分别用乙腈定容至 10.0 mL, 得到 5、10、20、50、100、200、500、1000 $\mu\text{g/L}$ 的标准曲线工作液。

2.2.2 液液萃取法(LLE)

称取 10 g 均匀试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 4 g 氯化钠振摇 2 min, 使其饱和。加入 10 mL 二氯甲烷, 涡旋混匀 1 min, 以 6000 r/min 离心 3 min, 将下层有机相转移另一支 50 mL 离心管中。试样中再加入 10 mL 二氯甲烷, 重复提取 1 次, 合并下层有机相, 涡旋混匀后, 准确移取 10 mL 提取液于 15 mL 离心管中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气浓缩至体积小于 0.1 mL。用乙腈溶解残渣, 定容至 1 mL。加入 2 mL 正己烷, 涡旋混匀 1 min, 以 6000 r/min 离心 3 min, 弃正己烷相, 再加入 2 mL 正己烷重复净化 1 次。在乙腈相中加入 50 mg PSA 填料, 涡旋混匀 1 min, 过 0.22 μm 有机相滤膜。待 GC/MS 测定。

2.2.3 固相萃取法(SPE)

称取 2 g 均匀试样(精确到 0.01 g)于 15 mL 离心管中, 将样品载入净化柱上, 静置 10 min 以保证葡萄酒样品和净化柱填料充分接触。用 12 mL 二氯甲烷洗脱, 用流速调节阀控制流速为 2 mL/min 左右, 全部洗脱液收集在具有精确刻度的玻璃试管中。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气浓缩至 1 mL, 加入 0.8 g 无水硫酸钠, 静置 5 min, 过 0.22 μm 有机相滤膜后, 待 GC/MS 测定。

2.2.4 分散式固相萃取法(d-SPE)

称取 10 g 均匀试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈(含 1% 乙酸)提取液、4 g 氯化钠和 1 g 无水乙酸钠, 振摇 2 min 后超声提取 20 min(超声时需加冰袋以防止水温快速升高)。超声结束后, 加入 6 g 无水硫酸镁后快速振摇 2 min, 以 3000 r/min 离心 5 min。取 10 mL 上清提取液于一支 15 mL 离心管中, 加入 50 mg GCB、250 mg PSA 和 1 g 无水硫酸镁, 振摇 2 min 后, 以 6000 r/min 离心 3 min。取 5 mL 上清净化液于具有精准刻度的玻璃试管中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气浓缩至 1 mL, 过 0.22 μm 有机相滤膜后, 待 GC/MS 测定。

2.2.5 气相色谱-质谱条件

色谱柱: VF-WAXms 毛细管柱(30 m \times 0.25 mm,

0.25 μm); 进样口: 180 $^{\circ}\text{C}$, 脉冲不分流方式进样; 升温程序: 初温 60 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 140 $^{\circ}\text{C}$, 后运行 220 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min; 进样量: 2 μL ; 载气: He, 纯度 99.999%, 流量 1.0 mL/min。

离子源: EI; 电离能量: 70 eV; 离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$; 四级杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 接口温度: 220 $^{\circ}\text{C}$; 溶剂延迟: 15 min; 扫描方式: 选择离子监测(SIM); 监测离子(m/z): 62.0(定量)、45.0、74.0、89.0。

3 结果与讨论

3.1 液液萃取法、固相萃取法与现有标准方法的比较

3.1.1 液液萃取法与 SN/T 0285-2012 标准方法的比较

SN/T 0285-2012 标准方法中要求将全部的 20 mL 二氯甲烷提取液吸出后, 进行旋转蒸发浓缩。由于液液萃取存在一定的乳化现象, 无法保证吸出全部有机提取液, 使得氨基甲酸酯的回收率降低; 且旋转蒸发浓缩实验为逐个样品操作, 浓缩效率不高。本实验液液萃取法选择准确吸取全部 20 mL 二氯甲烷提取液中的 10 mL, 经氮吹浓缩后, 用 1 mL 乙腈复溶, 浓缩倍数仍为 5 倍, 但避免了在转移提取液步骤造成的目标物损失, 提高了回收率; 且氮吹步骤可以一批浓缩多个样品, 提高了处理效率。

3.1.2 固相萃取法与 AOAC、OIV 标准方法的比较

AOAC 和 OIV 标准方法用 160 mL 的二氯甲烷为洗脱剂, 有机试剂用量大, 造成后续浓缩步骤复杂, 需先旋转蒸发再氮吹浓缩, 处理效率速度慢。本实验固相萃取法采用高性能的硅藻土 SPE 柱, 其具有更大的比表面积和更低的表面活性, 使得洗脱剂用量减少至 12 mL, 浓缩步骤只需简单氮吹即可, 既节省试剂又提高处理效率。

3.2 氨基甲酸酯的定性

在 2.2.5 的气相色谱-质谱条件下, 氨基甲酸酯的保留时间约是 16.2 min。对标准品与样品均按照上述条件进行检测, 标准品和样品的总离子流色谱图和质谱图见图 1。若样品在 16.2 min 处有色谱峰出现, 在扣背景后的样品质谱图中, 所选择的 4 个离子具有相同的出峰趋势, 并同时满足离子相对丰度范围(见表 1), 则定性确认样品中存在氨基甲酸酯。

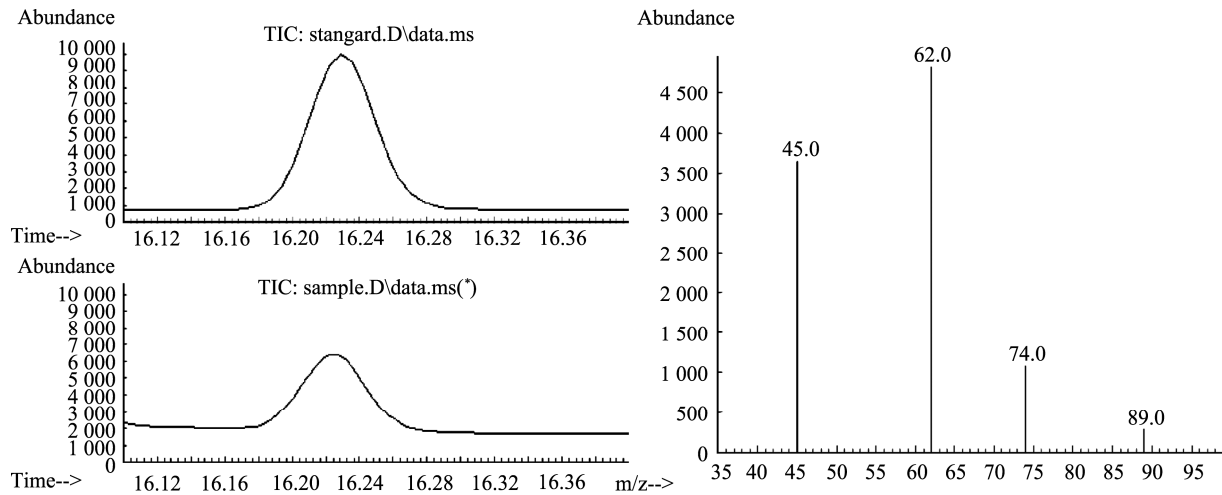


图 1 氨基甲酸酯总离子流色谱图(左)和质谱图(右)

Fig. 1 Total ion chromatogram (left) and mass spectrum (right) of ethyl carbamate

表 1 离子的相对丰度和最大容许偏差

Table 1 Relative intensity and maximum permitted tolerances of selected ions

选择离子 m/z	62.0	45.0	74.0	89.0
离子相对丰度 I (%)	100	73.6	21.5	5.8
容许相对误差 I (%)	± 10	± 10	± 15	± 50

3.3 线性范围和检出限

按照 2.2.5 的气相色谱-质谱条件,对 2.2.1 配制的 5~1000 $\mu\text{g/L}$ 的标准曲线工作液进行测定,以氨基甲酸酯定量离子的色谱峰面积对质量浓度绘制标准曲线,线性方程和相关系数见图 2。以 $S/N=3$ 计算方法中氨基甲酸酯的检出限是 2.83 $\mu\text{g/L}$ 。

3.4 三种预处理方法的比较

3.4.1 准确度和精密度比较

为考察 3 种不同的预处理方法的准确度,按照

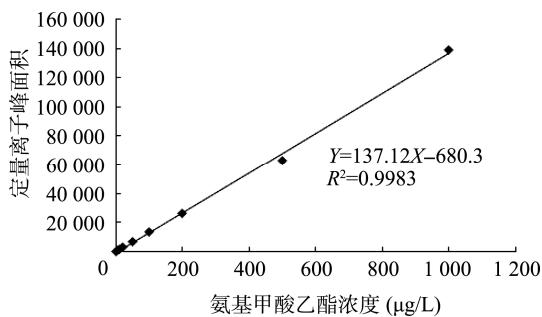


图 2 氨基甲酸酯标准曲线

Fig. 2 Calibration curve of ethyl carbamate

2.2.2~2.2.4 所述的实验方法,在线性范围内进行了三个水平(20、50、100 $\mu\text{g/kg}$)的添加回收实验;为考察 3 种不同的预处理方法的精密度,每个水平做 5 个平行实验。平均回收率和相对标准偏差(RSD)结果见表 2。3 种预处理方法的平均回收率均在 70%~110%之间, RSD 均小于 6%,说明这 3 种预处理方法的准确度和精密度均能满足检测的需要。其中 d-SPE 法在 3 个添加水平的回收率均在 100%~110%之间,明显优于其他两种方法,说明极性较大的乙腈更适用于极性目标物的提取,且分散式固相萃取净化剂能很好地去除基质中的色素、糖、酸等杂质而没有吸附氨基甲酸酯。

3.4.2 预处理效率比较

由 2.2.2~2.2.4 的实验方法可知:液液萃取法需要进行 2 次液液萃取、氮吹浓缩和基质固相萃取净化的操作,这些步骤大多是逐个样品的操作,较为费时,粗略估算每人每工作日可以预处理样品 15 个;固相萃取法操作简便,可以一批处理多个样品,且提取和净化同时进行,粗略估算每人每工作日可以预处理样品 40 个;分散式固相萃取法需要进行超声提取、分散式固相萃取净化 and 氮吹浓缩的操作,粗略估算每人每工作日可以预处理样品 25 个。

液液萃取法可将样品中氨基甲酸酯的浓度浓缩 5 倍,更适合氨基甲酸酯含量低的样品的预处理;固相萃取法仅可以将样品中氨基甲酸酯的浓度浓缩 2 倍,更适合限量值较高的葡萄酒的快速批量预处理;分散式固相萃取法处理的葡萄酒样品不仅可以

表2 三种预处理方法的回收率(%)和相对标准偏差(%) (n=5)

Table 2 Average spiked recoveries and relative standard deviations of the three pretreatment methods (n=5)

	20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平	
	回收率 / (%)	RSD / (%)	回收率 / (%)	RSD / (%)	回收率 / (%)	RSD / (%)
LLE	71.61	2.62	76.85	2.84	82.13	1.59
SPE	83.63	5.34	84.99	5.14	98.92	3.48
d-SPE	102.37	1.50	109.72	2.39	106.68	3.25

检测氨基甲酸酯, 同时还可以检测农药残留量, 适用于葡萄酒安全性指标快速筛查, 提高综合预处理效率。

3.4.3 预处理成本比较

由 2.2.2~2.2.4 的实验方法可计算出 3 种不同的预处理方法处理一个样品分别需要盐、有机溶剂、净化剂和 SPE 柱的用量, 对这些耗材进行粗略的成本估算, 对比结果见表 3。液液萃取法主要是通过目标物在有机相与水相的分配系数差异提取目标物, 所以主要消耗的是有机溶剂, 成本最低; 固相萃取法步骤简单、处理效率高, 主要依赖于高性能的 SPE 柱, 成本最高; 分散式固相萃取法用乙腈作提取剂, 除目标物外, 还提取出大量的色素、糖等杂质, 所以需用到较多的分散式净化剂, 成本适中。

3.5 实际样品检测

按照 2.2.4~2.2.5 的实验方法, 利用分散固相萃取-气相色谱-质谱法对干红葡萄酒样品中的氨基甲酸酯含量进行检测, 定量结果为 47.2 $\mu\text{g}/\text{L}$, 色谱图见图 3。

4 结论

本实验比较液液萃取法、固相萃取法和分散式固相萃取法对葡萄酒中氨基甲酸酯的处理效果。3 种预处理方法的平均回收率均在 70%~110%之间, RSD 均小于 6%, 说明这 3 种预处理方法的准确度和精密

表3 三种预处理方法的成本比较

Table 3 Cost comparison of three pretreatment methods

	盐 / (g)	有机溶剂 / (mL)	净化剂 / (g)	SPE 柱 / (支)	成本 / (元)
LLE	4.00	25.00	0.05	0	4.50
SPE	0.80	12.00	0	1	25.00
d-SPE	11.00	20.00	1.30	0	10.00

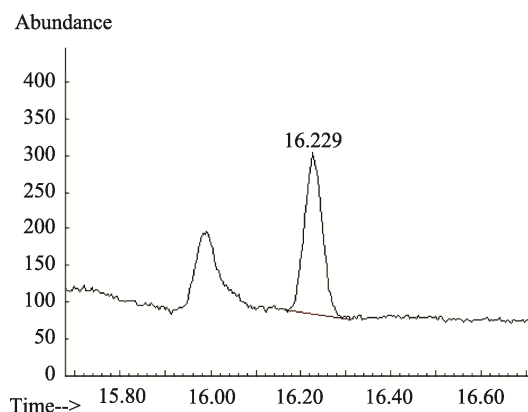


图3 干红葡萄酒样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of wine sample

度都能满足检测要求。液液萃取法成本最低, 且目标物富集倍数最大, 适用于氨基甲酸酯含量低的样品的预处理和进出口企业的产品合规性检测。固相萃取法虽然成本较高, 但操作简便、处理速度快, 适用于企业的高通量检测。比起前两种方法, 分散式固相萃取法成本适中、回收率最佳、综合预处理效率高, 一次预处理可同时满足葡萄酒中农药残留和氨基甲酸酯的检测要求, 非常适合葡萄酒生产企业的日常检测和葡萄酒中多种危害物质的快速筛查。

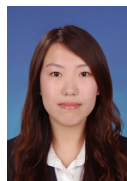
参考文献

- [1] 龙顺荣, 周勇, 郦明浩, 等. 发酵食品中氨基甲酸酯污染状况调查与分析[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(2): 196-199
Long SR, Zhou Y, Li MH, *et al.* Survey and analysis of fermented food contamination with ethyl carbamate [J]. Food Ferment Ind, 2013, 39(2): 196-199
- [2] Wu PG, Pan XD, Wang LY, *et al.* Survey of ethyl carbamate in fermented foods and beverages from Zhejiang, China [J]. Food Control, 2012, 23(1): 286-288
- [3] European Food Safety Authority (EFSA). Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages-Scientific Opinion of the

- Panel on Contaminants [EB/OL]. (2007-9-20). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/551>
- [4] Weber JV, Sharypov VI. Ethyl carbamate in foods and beverages: a review [J]. Environ Chem Letters, 2009, 7(3): 233–247
- [5] Lee KG. Analysis and risk assessment of ethyl carbamate in various fermented foods [J]. European Food Res Technol, 2013, 236: 891–898
- [6] Huang Z, Pan XD, Wu PG, *et al.* Validation (in-house and collaborative) of the quantification method for ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by GC-MS [J]. Food Chem, 2013, 141(4): 4161–4165
- [7] 耿予欢, 吕芬, 黄伟雄, 等. 黄酒中氨基甲酸乙酯的分析与控制[J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2271–2274
Geng YH, Lv F, Huang WX, *et al.* Analysis and control of ethyl carbamate in Chinese rice wine [J]. Mod Food Sci Technol, 2013, 29(9): 2271–2274
- [8] Nobrega ICC, Pereira GE, Silva M, *et al.* Improved sample preparation for GC-MS-SIM analysis of ethyl carbamate in wine [J]. Food Chem, 2015, 177: 23–28
- [9] Ye CW, Zhang XN, Huang JY, *et al.* Multiple headspace solid-phase microextraction of ethyl carbamate from different alcoholic beverages employing drying agent based matrix modification [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(31): 5063–5070
- [10] Zhang J, Liu GX, Zhang Y, *et al.* Simultaneous determination of ethyl carbamate and urea in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(13): 2797–2802
- [11] 王丽娟, 柯润辉, 王冰. 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乙酯[J]. 色谱, 2012, 30(9): 903–907
- Wang LJ, Ke RH, Wang B. 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
- [12] SN/T 0285-2012 出口酒中氨基甲酸乙酯残留量检测方法 气相色谱-质谱法[S].
SN/T 0285-2012 Determination of ethyl carbamate residues in alcohol for export-GC-MS [S].
- [13] AOAC Official Method 994.07. Ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce [S].
- [14] Method OIV-MA-AS315-04. Compendium of international methods of analysis-OIV ethyl carbamate [S].
- [15] 陈士恒, 章晴, 史晓梅, 等. DSPE-GC/MS 快速检测葡萄酒中 52 种农药残留[J]. 食品科学技术学报, 2014, 32(3): 14–22
Chen SH, Zhang Q, Shi XM, *et al.* Fast determination of 52 pesticide residues in grape wine by DSPE-GC/MS [J]. J Food Sci Technol, 2014, 32(1): 14–22

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



章 晴, 研发专员, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: zhang-qing@cofco.com



杨永坛, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: yangyongtan@cofco.com