

文章编号:1673-1689(2008)01-0062-05

## 固相萃取结合 GC/MS 法测定葡萄酒中 氨基甲酸乙酯

李华, 冯丽丹<sup>1,2</sup>, 梁新红<sup>1,2</sup>, 王华<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学葡萄酒学院, 陕西杨凌 712100; 2. 河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003)

**摘要:**氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate, EC)是一种基因致癌物,葡萄酒及其它酒精饮料中含有微量的 EC。采用固相萃取柱(50 mL, Chem Elut)结合 GC/MS 方法检测葡萄酒中的 EC 的最佳参数,结果表明,待测样品最佳 pH 为自然 pH,洗脱剂二氯甲烷的用量为 175 mL,样品在柱中的停留时间在 10 min 以上时,EC 的回收率最高。方法的回收率为 85.76~102.82%,同一天检测的相对标准偏差(RSD)为 4.22~8.20%,隔天检测的相对标准偏差为 4.60~10.13%,方法的检出限为 3.0  $\mu\text{g/L}$ 。

**关键词:**葡萄酒;氨基甲酸乙酯;固相萃取柱;GC/MS 法

中图分类号:O 657.63

文献标识码: A

## Analysis of Ethyl Carbamate in Wines Using Solid-Phase Extraction in Combination with Gas Chromatography/Mass Spectrometry

LI Hua<sup>1</sup>, FENG Li-dan<sup>1</sup>, LIANG Xin-hong<sup>1,2</sup>, WANG Hua<sup>1</sup>

(1. College of Enology, Northwest University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China; 2. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** Ethyl carbamate, a known genotoxic compound, is mainly found as a natural trace constituent in wine and other alcoholic beverages. Resolution Oeno 8/98, recommended by OIV, was improved. Furthermore, parameters of ethyl carbamate extraction in wines were optimized by use of solid phase extraction column (50 mL, Chem Elut). The recoveries and precision were 85.76~102.82%, 4.22~8.20% (intraday) and 4.60~10.13% (interday), respectively. The limits of detection were 3.0  $\mu\text{g/mL}$ .

**Key words:** wine; ethyl carbamate; solid phase extraction; gas chromatography/mass spectrometry method

氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate, EC)早在 1943 年就被证实是一种致癌物质,国际癌症研究所

收稿日期:2007-09-05.

基金项目:国家科技部“科技成果重点推广计划项目”(2004EC000317).

作者简介:李华(1959-),男,重庆梁平人,教授,博士生导师,主要从事生物学及葡萄与葡萄酒研究. Email: Email: lihuawine@nwsuaf.edu.cn

把EC对人类的致癌毒性归为2B群<sup>[1]</sup>。包括葡萄酒在内的发酵饮料和食品中含有微量的EC<sup>[2]</sup>。加拿大的卫生与预防部门规定佐餐葡萄酒中EC质量浓度不得超过30  $\mu\text{g/L}$ <sup>[1]</sup>;美国食品和药品管理局(US FDA)规定1988年以后生产的佐餐葡萄酒(酒精度 $\leq 14\%$  v/v)EC质量浓度不能超过15  $\mu\text{g/L}$ <sup>[3]</sup>。目前中国尚未制定葡萄酒中EC的限量标准。

国际葡萄与葡萄酒组织(OIV)确认GC/MS法为酒精饮料中EC测定的标准方法,并推荐固相萃取柱法为样品的前处理方法。在此方法中,校正标准溶液由试剂无水乙醇配制,但目前国内外生产的试剂无水乙醇,无论是分析纯还是色谱纯,均由发酵法生产,这不可避免使无水乙醇本身含有一定质量浓度的EC<sup>[4]</sup>。作者在试验中,在分析纯和色谱纯的无水乙醇中都检测到了EC。

基于OIV标准方法Resolution Oeno 8/98,结合GC/MS分析法以氨基甲酸丙酯(*n*-Propyl carbamate, nPC)为内标,校正标准溶液的配制,不采用无水乙醇的稀释液,而采用蒸馏水配制,针对萃取葡萄酒中EC的最佳参数进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

GC/MS: Thermo Trace GC ultra-DSQ, 美国Finnigam公司生产; 旋转蒸发器: SENCO W201, 上海申生科有限公司产品; 固相萃取小柱: 50 mL, Chem Elut, 美国Varian公司产品。

### 1.2 试剂

EC标准品: CAS 51-79-6, 纯度 $>99\%$ , Sigma-Aldrich公司生产; nPC内标: 纯度 $>98\%$ , Sigma公司产品; 丙酮: 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心; 二氯甲烷: 分析纯, 天津市博迪化工有限公司; 酒石酸: 分析纯, 中国派尼化学试剂厂; 氢氧化钠: 分析纯, 中国派尼化学试剂厂; 甲醇: 色谱纯, 天津市科密欧化学试剂开发中心。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 标准溶液的配制

1) EC标准溶液 母液: 1.00 mg/mL, 将100 mg的EC用丙酮溶解, 以100 mL容量瓶定容; 标准溶液: 10.0  $\mu\text{g/mL}$ , 将1.0 mL EC母液加入100 mL容量瓶中, 用丙酮稀释至刻度<sup>[3]</sup>。

2) PC标准溶液 母液: 1.00 mg/mL, 将100 mg的PC用丙酮溶解, 以100 mL容量瓶定容; 标准溶液: 10.0  $\mu\text{g/mL}$ , 将1 mL PC母液加入100 mL容量瓶中, 用丙酮稀释至刻度<sup>[3]</sup>。

1.3.2 PC内标溶液 800 ng/mL, 将8 mL PC标准溶液加入100 mL容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度<sup>[3]</sup>。

1.3.3 模式溶液的配制 将1.3.1中10.0  $\mu\text{g/mL}$ 的EC标准溶液用蒸馏水稀释, 配制成质量浓度为100 ng/mL的EC模式溶液。

#### 1.3.4 SPE柱萃取方法

1) 活化吸附剂 在萃取样品之前先对硅藻土进行活化, 具体操作为, 用100 mL二氯甲烷冲洗小柱, 接着用50 mL甲醇再次冲洗小柱, 流完后加100 mL水冲洗, 保持硅藻土湿润状态下加样液<sup>[5,6]</sup>。

2) 上样 将待测酒样装入活化后的固相萃取柱, 用10 mL的蒸馏水冲洗烧杯, 并将冲洗用水装入柱中。

3) 洗涤 上样溶液在柱中停留一段时间, 用3倍上样液体积的蒸馏水冲洗小柱, 弃去废液。

4) 洗脱 加入规定量的二氯甲烷将EC洗脱下来, 加以收集浓缩。

1.3.5 校正标准曲线的绘制 校正标准溶液的配制: 用蒸馏水将1.3.1中的EC标准溶液和PC标准溶液进行稀释, 得到以下浓度的EC-PC校正溶液: (200 ng EC + 800 ng PC)/mL, (400 ng EC + 800 ng PC)/mL, (600 ng EC + 800 ng PC)/mL, (800 ng EC + 800 ng PC)/mL, (1000 ng EC + 800 ng PC)/mL 和 (1200 ng EC + 800 ng PC)/mL。

校正标准曲线的绘制: 准确吸取各浓度的校正标准溶液1.0 mL, 置于100 mL小烧杯中, 加入蒸馏水使总体积量达到40 mL, 混合均匀, 放入萃取柱中, 然后用二氯甲烷进行洗脱。洗脱液流经装有10 g无水硫酸钠的漏斗, 收集在蒸馏烧瓶中, 洗脱液用真空旋转蒸发器在30  $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行浓缩, 浓缩至4 mL左右转至KD瓶中, 用少量的二氯甲烷润洗圆底烧瓶, 使EC完全转入KD瓶中, 在同样条件下浓缩至1 mL, 转至离心管中进行GC/MS定量分析。对EC-nPC的峰面积比值和EC的质量浓度绘制标准曲线示意图, 并计算出标准曲线回归方程。

1.3.6 葡萄酒样品的萃取 准确量取葡萄酒样品20.0 mL于100 mL小烧杯中, 加入1.0 mL nPC内标溶液和蒸馏水使总体积量达到40 mL, 混合摇匀, 装入萃取柱中。在优化的最佳参数条件下用二氯甲烷进行洗脱。洗脱液浓缩程序同1.3.5。

试验用葡萄酒样品2\*和5\*为干白葡萄酒, 1\*、3\*、4\*和6\*为干红葡萄酒。<sup>[3]</sup>

1.3.7 GC/MS条件 色谱条件: DB-WAX毛细管

色谱柱 30 m×0.25 mm×0.25 μm, 进样口温度 190 ℃, 柱温程序: 初温 40 ℃, 保持 2 min, 然后以 10 ℃/min 升至 180 ℃, 保持 0.5 min, 再以 50 ℃/min 的速度升至 220 ℃, 保持 4 min。载气为高纯氮气, 体积流量 1.0 mL/min, 不分流进样, 进样体积 1.0 μL。

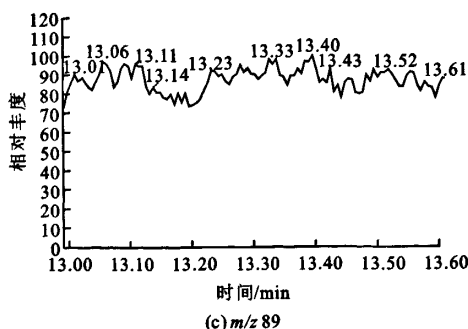
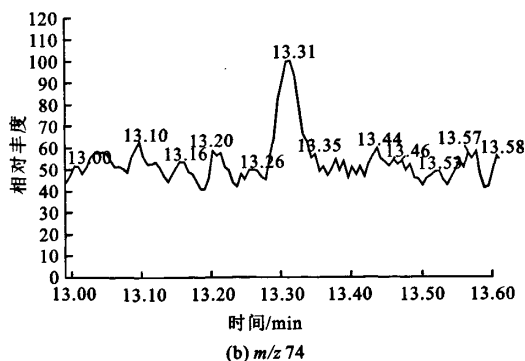
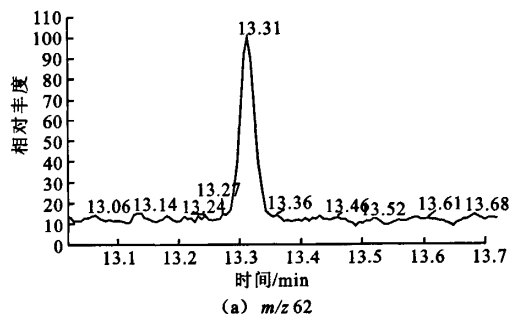
质谱条件: 离子源温度 220 ℃; 电子能量 70 eV; 接口温度 220 ℃; 电子倍增电压 1568 V; 检测离子  $m/z$  62、74、89, 定量离子  $m/z$  62。

1.4 数据处理 采用 DPSv7.55 数据处理软件对实验数据的方差显著性进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 EC 定量检测的离子片断特征

$m/z$  89、 $m/z$  74 和特征离子  $m/z$  62 是 EC 定量分析中用于 SIM 的 3 种离子。由图 1 可以看出,  $m/z$  62 在 3 种离子中强度最大。 $m/z$  62 是大多数非氮取代氨基甲酸酯类化合物的特征粒子(除去烷氧基链中不含  $\beta$ - 氢的物质, 如氨基甲酸甲酯、氨基甲酸丙酯等)。因此选择其作为 EC 的定量离子。一般情况下,  $m/z$  74 质量色谱首先被判断为丁二酸二乙酯, 然后才是氨基甲酸乙酯, 而且干扰化学物质较多。在  $m/z$  89 处, EC 的峰非常弱而不能作为 EC 的准确定量特征离子。因此,  $m/z$  62 为葡萄酒中 EC 含量检测的定量离子。

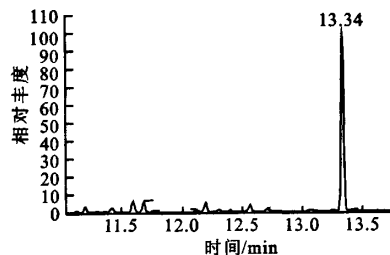


注: EC 的保留时间为 13.31。

图 1 100 μg/L EC 标准品的质谱图

Fig. 1 Mass chromatograms of 100 μg/L EC standard and the retention time of the EC was 13.31 min

由图 1(a,b,c)可知, 在葡萄酒 EC 含量检测时, 一般用  $m/z$  62 进行定量, 图 2 为葡萄酒中 EC 含量为 25 μg/L 时在  $m/z$  62 处峰强度。



注: EC 的保留时间为 13.34。

图 2 葡萄酒中 EC 含量为 25 μg/L 的  $m/z$  62 质谱图

Fig. 2 Mass chromatograms of wine containing 25 μg/L EC at  $m/z$  62

### 2.2 样品在柱中停留时间对萃取的影响

pH 为自然 pH, 二氯甲烷用量暂定为 160 mL, 按照方法 1.3.6, 取模式溶液 10 mL, 进行萃取然后进行 GC/MS 分析, 以 EC-nPC 峰面积比值为指标, 考查样品在柱中停留时间对 EC 萃取回收率的影响。结果如图 3。

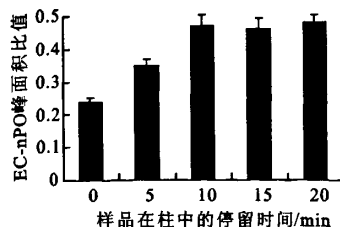


图 3 样品在柱中的停留时间对萃取回收率的影响

Fig. 3 Effect of adsorption time on EC recovery

如图 3 所示样品在柱中的停留时间在 10 min 时, EC-nPC 峰面积比值达最大值。继续延长样品

在柱中的停留时间,EC-nPC 峰面积比值不再增加。经显著性方差分析,10 min、15 min、20 min,在  $p < 0.05$  水平上没有显著性差异。因此试验中选用样品在柱中的停留时间为 10 min。

### 2.3 pH 值对萃取的影响

用酒石酸调整模式溶液的 pH 值,溶液 pH 值的考查范围为 3.0~11.0,二氯甲烷用量暂定为 160 mL,样品在柱中的停留时间为 10 min。按照方法 1.3.6,取模式溶液 10 mL 进行萃取,然后进行 GC/MS 分析,以 EC-nPC 峰面积比值为指标,考查溶液 pH 对 EC 萃取回收率的影响。EC-nPC 峰面积比值越大,表明 EC 萃取率越高,结果如图 4。

由图 4 可知,利用 SPE 方法,溶液 pH 对 EC 萃取回收率影响不明显,pH 值为 7.0 时 EC 回收率略低。此结果和 LLE 法研究结果基本一致。但从试验结果看,在  $p < 0.05$  水平上,pH 7.0 时 EC 的回收率和其它 pH 范围的回收率在  $p < 0.05$  水平上有显著性差异,实验结果与 Woo<sup>[7]</sup> 和 Lachenmeier<sup>[8]</sup> 等报道的结果不一致。溶液 pH 为 7.0 时 EC 萃取的回收率略低的原因尚不清楚,也没有相应的文献报道,因此,待测样 pH 对萃取率影响的机理还需进一步研究。

根据试验结果,葡萄酒的自然 pH 值在 3.0~4.5 之间,因此,在用 SPE 方法萃取葡萄酒中 EC 时,待测液的 pH 采用自然 pH。

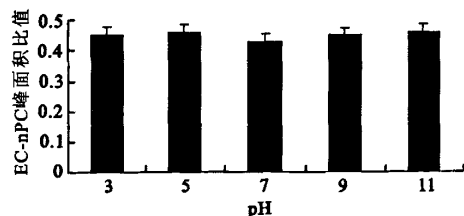


图 4 溶液 pH 对 EC 萃取回收率的影响 ( $n=3$ )

Fig. 4 Effect of pH of model solution on EC recovery ( $n=3$ )

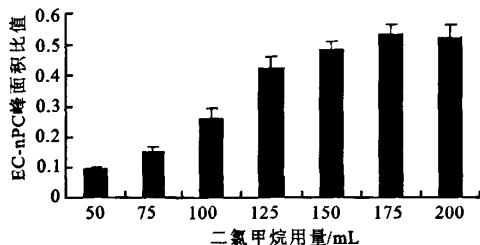


图 5 二氯甲烷用量对 EC 萃取回收率的影响

Fig. 5 Effect of dichloromethane volume on EC recovery ( $n=3$ )

### 2.4 二氯甲烷用量对萃取的影响

准确量取模式溶液 10 mL,溶液 pH 值采用自然 pH,样品在柱中的停留时间为 10 min。按照方法 1.3.6,考查二氯甲烷用量为 50~200 mL 时对 EC-nPC 峰面积比值的影响(图 5)。

由图可以看出,随着二氯甲烷用量的增加,EC 萃取回收率相应的增加,在二氯甲烷用量为 175 mL 时,EC-nPC 峰面积比值达最大值。继续增加二氯甲烷的用量,EC-nPC 峰面积比值不再增加。经显著性方差分析,二氯甲烷用量为 175 mL 和 200 mL 时,在  $p < 0.05$  水平上没有显著性差异。因此试验中选用二氯甲烷的用量为 175 mL。Resolution Oeno 8/98 方法中二氯甲烷用量为 160 mL,研究结果基本一致。

### 2.5 校正标准曲线

按照 1.3.5,校正标准溶液的 pH 为自然 pH,二氯甲烷用量为 175 mL,对系列校正标准溶液进行萃取,以 GC/MS 定量分析得到校正标准曲线:

$$y = 0.5848x - 0.0249$$

校正标准曲线的决定系数  $R^2 = 0.9910$ ,表明标准曲线的相关性较高。

### 2.6 葡萄酒中 EC 的萃取及测定

依据方法 1.3.6,酒液的 pH 值为自然 pH,二氯甲烷用量为 175 mL,对葡萄酒样品进行萃取,洗脱液浓缩后经 GC/MS 分析,结果如表 1。

表 1 SPE 法葡萄酒样品中 EC 含量测定结果 ( $n=3$ )

Tab. 1 Results of determination of EC levels from wine samples by use of SPE method ( $n=3$ )

| 葡萄酒样品 | 测定值/<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 加标量/<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 加标后测定值/<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 回收率/%  |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------|
| 1     | $37.9 \pm 1.6$              | 40                          | $74.2 \pm 2.8$                 | 90.63  |
| 2     | $12.5 \pm 0.9$              | 15                          | $25.6 \pm 1.2$                 | 87.52  |
| 3     | $24.7 \pm 1.7$              | 25                          | $50.4 \pm 1.5$                 | 102.82 |
| 4     | $18.0 \pm 0.8$              | 20                          | $36.4 \pm 1.6$                 | 91.80  |
| 5     | $7.6 \pm 0.6$               | 10                          | $16.2 \pm 0.9$                 | 85.76  |
| 6     | $6.1 \pm 0.5$               | 10                          | $14.5 \pm 1.0$                 | 86.32  |

由表 1 可以看出,采用 SPE 法分析葡萄酒中 EC 含量时,回收率在 85.76~102.82 之间,表明回收率还是比较高的,可以用于葡萄酒中 EC 含量的常规分析。

为验证方法的重现性,依据方法 1.3.6,对葡萄酒样品进行萃取,有机相浓缩后经 GC/MS 分析,计算标准偏差和相对标准偏差,结果如表 2。隔天检测数据为连续 3 d 作平行测定。

由表 2 可以看出,同一天检测的相对标准偏差

(RSD)在 4.22~8.20 %,隔天检测的相对标准偏差在 4.60~10.13 %,经误差分析,同一天与隔天检测数据的误差在 0~0.06 %范围之内,表明此萃取方法的重现性好,精密度较高。

表 2 SPE 法检测葡萄酒样品中 EC 含量的精密度试验( $n=3$ )

Tab. 2 Accuracy tests of EC levels of wine samples by use of SPE method ( $n=3$ )

| 葡萄酒样品 | 同一天检测数据                     |       | 隔天检测数据                      |       |
|-------|-----------------------------|-------|-----------------------------|-------|
|       | 测定值/<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | RSD/% | 测定值/<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | RSD/% |
| 1     | 37.9 $\pm$ 1.6              | 4.22  | 38.2 $\pm$ 1.8              | 4.71  |
| 2     | 12.5 $\pm$ 0.9              | 7.20  | 13.3 $\pm$ 1.0              | 7.52  |
| 3     | 24.7 $\pm$ 1.7              | 6.88  | 24.4 $\pm$ 1.4              | 5.74  |
| 4     | 18.0 $\pm$ 0.8              | 4.44  | 17.4 $\pm$ 0.8              | 4.60  |
| 5     | 7.6 $\pm$ 0.6               | 7.89  | 7.9 $\pm$ 0.8               | 10.13 |
| 6     | 6.1 $\pm$ 0.5               | 8.20  | 5.9 $\pm$ 0.5               | 8.47  |

### 3 结 语

固相萃取法是 OIV 推荐的酒精饮料中 EC 含

量检测标准方法的前处理方法。Resolution Oeno 8/98 方法中校正标准溶液是用 40 %乙醇溶液配制而成,因现在试剂无水乙醇中本身含有 EC,本方法中校正标准溶液用蒸馏水配制,因此,本方法可能和 Resolution Oeno 8/98 方法结果有偏差。Resolution Oeno 8/98 方法规定检测的回收率应控制在 90%~110 %,但本研究中,回收率在 85.76~102.82 %,这可能与 Resolution Oeno 8/98 方法使用的校正标准溶液中乙醇本身含有 EC 而使回收率升高有关。

Resolution Oeno 8/98 方法规定样液在柱中的停留时间不少于 4 min,但本研究发现,样液在柱中的停留时间不少于 10 min,否则回收率会下降。

本研究采用固相萃取法萃取葡萄酒中 EC 时,溶液的最佳 pH 值采用自然 pH,样品在柱中的停留时间为 10 min,二氯甲烷用量为 175 mL。回收率试验和精密度试验表明,固相萃取法具有一定的准确度和重现性。可以用于葡萄酒中 EC 含量检测与处理方法的常规分析,方法的检出限为 3.0  $\mu\text{g/L}$ 。

### 参考文献(References):

- [1] Conacher H B S, Page B D. Ethyl carbamate in alcoholic beverages: a Canadian case history [J]. *Proceedings of Euro Food Tox II Zürich*, 1986, 237-242.
- [2] Ough, C. S. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethyl carbamate[J]. *Agric Food Chem*, 1976, 24: 323-328.
- [3] Canas B J, Joe F L, Diachenko GW, et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by chromatography with mass selective detection; collaborative study [J]. *Journal of AOAC International*, 1994, 77: 1530-1536.
- [4] Zimmerli B, Schlatter J. Ethyl carbamate; analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment [J]. *Mutation Research*, 1991, 259: 325-350.
- [5] Green C E, Abraham M H. Investigation into the effects of temperature and stirring rate on the solid phase diuron from water using a C18 extraction disk [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 885: 41-49.
- [6] Ahmed F E. Analysis of pesticides and their metabolites in foods and drinks [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2001, 20: 649-661.
- [7] Woo I S, Kim I H, Yun U J, et al. An improved method for determination of ethyl carbamate in Korean traditional rice wine[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2001, 26(6): 363-368.
- [8] Lachenmeier D W, Nerlich U, Kuballa T. Automated determination of ethyl carbamate in stone-fruit spirits using head-space solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1108: 116-120.

(责任编辑:杨 萌)