

饮料酒中氨基甲酸乙酯测定方法的研究

袁身淑 刘杨岷 王林祥 汤 坚

(中央研究所)

赵光鳌 刘吉泉

(发酵工程系)

摘要 本研究用 GC/MS 法分离和测定了饮料酒中的氨基甲酸乙酯。样品用二氯甲烷、乙酸乙酯萃取,经脱水浓缩后进 GC/MS 分析。在 DX-1 柱上用多离子检测 (MID) 法定性和定量。本方法有较高的选择性和灵敏度,回收率高,重复性好。

关键词 氨基甲酸乙酯;酒精饮料;色谱质谱联用

0 前 言

氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate或Urethane,以下简称EC)的致癌作用在1943年就被Nattleship^[1]等所证实,后来Mirvish^[2]等也证实了EC能引起一些恶性肿瘤。但在70年代前并未引起人们的足够重视。1971年Lofroth^[3]等首先发现发酵食品中含有EC,此后才逐渐引起人们的关注。世界卫生组织规定了软饮料中EC的限量标准^[4]。加拿大在1985年规定了各类酒中EC的限量标准^[5]。美国也已规定自1989年1月1日起,在美出售的威士忌酒中EC含量必须低于125ppb。因此,有必要建立一个快速、灵敏、可靠的测定饮料酒中EC含量的方法。

至今报道过的EC分析方法主要有三类:放射免疫测定法、同位素稀释法及气相色谱法。前二种方法灵敏度较低(ppm级),不能满足饮料酒中限量标准的测定要求。近几年来用气相色谱法测定EC的研究国外已有一些报道。1974年Walker等^[7]用气相色谱分离、Coulson氮检测器检测,检测限为100ppb。1976年Ough^[8]用同样的检测器,改进了样品处理方法,使检测限达10ppb。Joe等^[9]用火焰离子检测器使检测限达10ppb,回收率达71%。Bailey^[10]等用形成EC的二甲基衍生物的方法,提高了氮磷检测器对EC的响应。1987年Wasserfallen等^[11]通过蒸馏法除去乙醇,使EC回收率达80%—90%,检测限达5ppb。本研究用二氯甲烷、乙酸乙酯萃取,以硝基苯(NB)作参照物。用色谱—质谱联用仪,选择离子(m/z 62、74、77、123)测定法测定饮料酒中EC的含量。本方法的优点是灵敏度、回收率和重复性都能达到令人满意的结果,操作也较简单。EC测定方法在国内尚属首次提出,填补了EC研究方面的一项空白。

1 实验部分

1.1 主要仪器

气相色谱质谱联用仪 Finnigan Mat4610

旋转蒸发器 SBXZ-1(上海玻璃仪器厂)

1.2 试剂

氨基甲酸乙酯 东京化成工业株式会社

二氯甲烷、乙酸乙酯 A.R试剂, 并重蒸、硝基苯、氯化钠、无水硫酸钠 A.R

1.3 样品

各种酒样均为市售商品

1.4 色谱条件

色谱柱DX-1(J. & W. 0.25mm×0.25μm×15m); 载气: 高纯氮, 1ml/min; 汽化室温度200℃; 柱温: 60℃保持2min, 以10℃/min的速度升至160℃, 再以20℃/min的速度升至210℃, 并保持10min。进样量1μl, 无分流进样。

1.5 质谱条件

电离方式EI; 离子源温度160℃; 灯丝电流0.25mA; 电子轰击能量70eV; 倍增器电压—1000V; 选择离子: m/z62, 74, 77, 123。

1.6 试样制备

1.6.1 标准溶液配制 准确称取EC20.0mg, 用乙酸乙酯定容至50ml, 配成400ppm之储备液。使用前用乙酸乙酯配成10ppm之溶液。再准确称取NB20.0mg, 用乙酸乙酯定容至10ml作为储备液, 使用前用乙酸乙酯稀释成10ppm之溶液。然后分别吸取10ppm之EC溶液0.05、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0ml, 各添加10ppm之NB溶液0.2ml, 分别定容至10ml。即得参照物(NB)浓度为200ppb, EC浓度分别为50、100、300、500、700、900、1000ppb的标准溶液。

1.6.2 样品制备 取一定量待测样品(视样品中EC含量而定, 如黄酒一般取15ml), 放入分液漏斗中, 加入蒸馏水调整乙醇含量至10%—15%(v/v)。加入氯化钠摇动2—3min, 使其饱和。加入15ml二氯甲烷振荡3min, 静置分层, 取有机相。水相再分别用10ml的二氯甲烷萃取2次。合并有机相, 用装有10g无水硫酸钠的玻璃柱脱水。然后, 加入2ml乙酸乙酯, 用旋转蒸发器在30℃水浴上浓缩至1.5—2ml, 再用乙酸乙酯定容至3ml, 定容前加入NB作参照物(浓度为200ppb), 即可进色质联用仪分析。

1.7 定性方法

用标准溶液确定EC和NB的保留时间, 并用MID法采集特征碎片离子, 得到特征碎片离子的质谱图, 根据这两方面的数据对照定性。

1.8 标准曲线的制备

将上述标准溶液用前述色谱、质谱条件测定, EC用m/z62的质量色谱图测峰面积, NB用m/z77的质量色谱图测峰面积。图1为EC500ppb、NB200ppb时m/z62和77的质量色谱图。

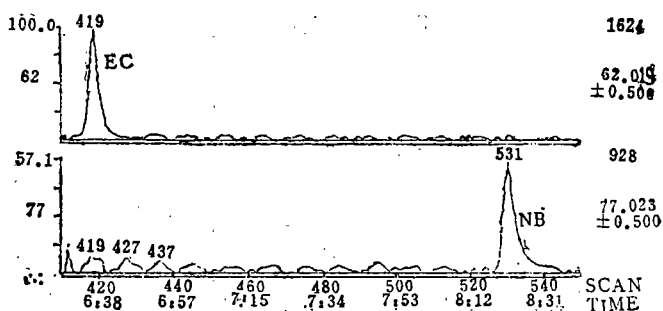


图1 EC500ppb、NB200ppb的标准溶液的m/z62和77的质量色谱图

当EC浓度在50—1000ppb范围内时, EC的浓度与测得的EC和NB峰面积之比呈良好的线性关系。其直线回归方程为

$$y = 0.0146 + 0.3345x \quad r = 0.9993$$

式中

y ——EC的浓度(ppm)

x ——ECm/z62的峰面积和NBm/z77峰面积之比

1.9 精密度测定

取同一样品, 按上述样品制备方法处理, 进色质联用仪分析, 重复5—6次, 结果列于表1。

表1 精密度测定结果

样品	测定结果					平均	标准差	变异系数
黄酒1*	106.6	107.0	101.6	99.20	105.7	104.0	3.444	3.31
白酒1*	60.43	55.24	55.05	59.26	59.36	59.03	58.06	2.311

1.10 回收率测定

分别在酒精溶液和测定过EC含量的酒样中添加一定量的EC, 用上述的样品制备方法处理后进色质联用仪测定, 求得回收率。结果列于表2、3、4中。

表2 酒精溶液中EC回收率的测定结果

酒精溶液中乙醇浓度%(v/v)	添加EC量(ppb)	回收量(ppb)	回收率(%)
12.0	100	93.16	93.16
		93.70	93.70
25.5	100	99.80	99.80
		94.04	94.04
		100.2	100.2
平均			96.18

表3 黄酒中EC回收率的测定结果(以黄酒2*为样品)

黄酒中EC含量(ppb)	添加EC量(ppb)	测定值(ppb)	回收量(ppb)	回收率(%)
142.7	150	287.0	144.3	96.2
	150	304.1	161.3	107.5
	150	289.0	146.3	97.5
142.7	200	336.9	194.2	97.1
	200	327.8	185.1	92.6
	200	342.3	199.6	99.8
平均				98.4

表4 白酒中EC回收率的测定结果(以白酒1*为样品)

白酒中EC含量(ppb)	添加EC量(ppb)	测定值(ppb)	回收量(ppb)	回收率(%)
58.06	100	156.7	98.64	98.64
	100	167.5	109.4	109.4
	100	149.5	91.44	91.44
	100	155.9	97.84	97.84
	100	159.7	101.6	101.6
	100	161.9	103.8	103.8
平均		158.6	100.5	100.5

1.11 各类饮料酒中EC的测定

我们用上述方法测定了部分国产黄酒、白酒、葡萄酒、啤酒、威士忌、白兰地等酒类中EC的含量。其中所检啤酒中EC含量都在10ppb以下,其它各类酒中EC的含量分别列于表5、6、7、8中。

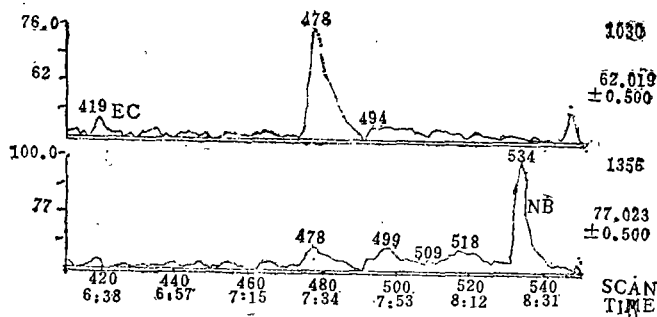


图2 某啤酒的m/z62和77的质量色谱图(EC含量8ppb)

表5 黄酒中EC的含量

样品号	1	2	3	4	5	6
EC含量(ppb)	104.0	142.7	68.40	120.0	79.30	49.40

图2和图3分别为某啤酒(EC含量8ppb)和黄酒2*(EC含量142.7ppb)的 m/z 62和77的质量色谱图。

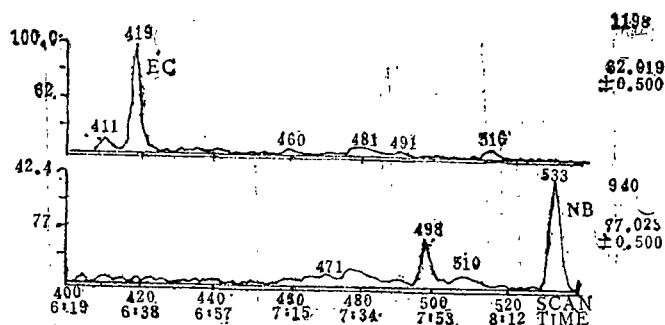
图3 黄酒2*的 m/z 62和77的质量色谱图

表6 白酒中EC的含量

样品号	1	2	3	4	5	6	7
EC含量(ppb)	58.1	57.2	44.6	57.1	痕量	64.6	68.0

表7 葡萄酒中EC的含量

样品号	1	2	3	4	5	6
EC含量(ppb)	21.5	17.9	16.6	20.7	未检出	9.1

表8 其他酒类中EC的含量

样品号	威士忌 1	威士忌 2	白兰地 1	白兰地 2	白兰地 3
EC含量(ppb)	42.0	57.2	64.7	68.1	67.2

2 讨 论

2.1 饮料酒中氨基甲酸乙酯定性、定量方法的依据

本研究中,氨基甲酸乙酯的定性同时参考了保留时间和特征碎片离子的质谱图,因此定性较可靠。氨基甲酸乙酯的质谱断裂规律如下:

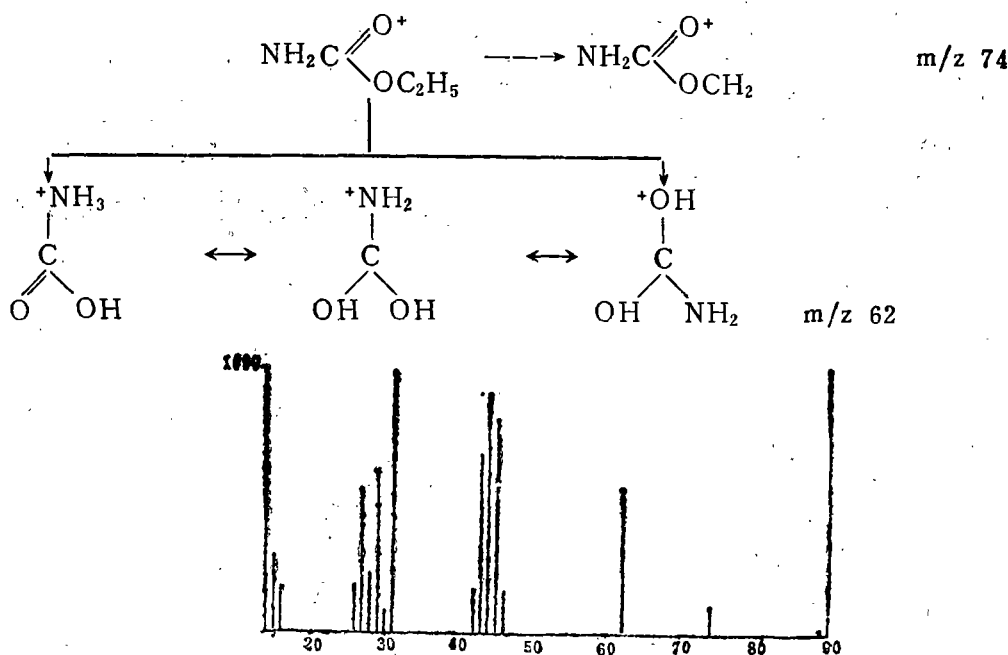


图4 氨基甲酸乙酯的质谱图

所以,在氨基甲酸乙酯的质谱图(图4)中,除不具特征的较小的碎片离子外,丰度最大的是 m/z 62,其次为74。因此,选择离子采集选用 m/z 62、74作为特征碎片离子,并以 m/z 62的质量色谱图中EC的峰面积作为定量依据。

为了排除进样量和仪器状态的波动所引起的误差,我们采用添加参照物的方法。在选择参照物时曾考虑选用氨基甲酸甲酯或氨基甲酸异丙酯,但在我们的色谱条件下,前者与乙酸乙酯出峰时间太相近,而后者又几乎与EC同时出峰。而NB的保留时间与EC相差不大,但两峰又能很好分离(见图2)。同时考虑到饮料酒中一般不含硝基苯,所以,我们认为NB是较理想的参照物。NB的质谱断裂规律如下:

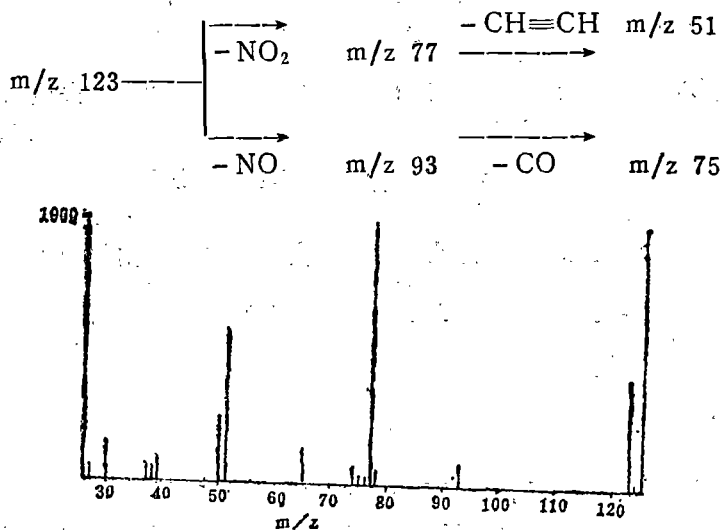


图5 硝基苯的质谱图

在NB的质谱图(图5)中, $m/z77$ 是基峰, 响应值最大。其次是51和123, 但由于51是一般含苯环的化合物都具有的碎片离子, 所以, 选择了 $m/z77$ 、123为采集离子, 并以 $m/z77$ 的质量色谱图中的峰面积作为参照物峰面积。定量就以EC的 $m/z62$ 的峰面积与NB的 $m/z77$ 的峰面积之比为依据。在本试验范围内, EC浓度与该峰面积之比呈良好的线性关系。

2.2 色谱柱的选择

根据EC的性质用Carbowax柱或FFAP柱来分离较为合适。在试验过程中, 我们曾在30m的DB-1、DB-5及15m的SE-54柱上做过分离试验, 试验表明EC和溶剂很难分开。而我们的FFAP柱长50m, 纵向扩散较大, 影响检测的灵敏度, 而且保留时间长, 使分析时间延长。因此, 我们选用了柱长15m的DX-1柱, 分离效果还较满意。

2.3 对本方法的评价

在以上分析条件下, 信噪比在3以上时, 检测限为5—10ppb。因样品一般经浓缩后进样, 所以, 最小检测量在2ppb以下。EC在50—1000ppb浓度范围内(NB为200ppb), EC浓度与EC和NB的峰面积之比呈良好的线性关系。精密度试验变异系数在7%以下。回收率: 酒精溶液中为 $96.18\% \pm 6.16\%$; 黄酒中为 $98.4\% \pm 3.42\%$; 白酒中为 $100.5 \pm 6.06\%$ 。可以满足饮料酒的分析要求。

2.4 本方法的实际应用

2.4.1 在降低黄酒中EC含量的研究中, 用本方法测定了大量半成品和成品酒中的EC含量, 均得到了较为满意的结果。

2.4.2 我们用以上方法测定了我国生产的一些黄酒、白酒、葡萄酒、啤酒、威士忌、白兰地等酒类中EC的含量。所检啤酒中EC含量都在10ppb以下; 所检白酒中EC含量都远低于加拿大对蒸馏酒的限量标准(400ppb); 葡萄酒中EC含量也均低于加拿大30ppb的限量标准; 其他酒类中EC含量也只在40—70ppb的水平。但所检黄酒中有些样品的EC含量已偏高, 还可能与储存期有一定关系, 应引起足够重视。为了保障人民身体健康, 提高产品质量, 有必要加强对饮料酒和其他有关食品中EC含量的检测和控制, 尽快制订出我国饮料酒中EC的限量标准。

致 谢

本试验得到绍兴酿酒总厂的大力支持, 特表谢意。

参 考 文 献

- 1 Nettleship A, Henshaw P S, Meyer H I. J Nat Cancer Inst, 1943; 4: 524
- 2 Mirvish S S. Adv Cancer Res, 1966; 11: 1
- 3 Loforth G, Gejvall T. Science, 1971; 174, 1248
- 4 World Health Organization. Joint FAO/WHO Committee on Food Additives Series, 1972; 4: 67—74
- 5 Food Chemical News. Canada Moves Against Alcoholic Products With Ethyl Carbamate. J Anal Toxic, 1986; 28: 37

- 6 美化学市场导报全国轻工信息, 1988; 3: 1
- 7 Walker G, Winterlin W, and Seiker J. J Agric Food Chemistry, 1974; 22: 944
- 8 Ough C S. J Agric Food Chemistry, 1976; 24: 323

Determination of Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages

Yan Shenshu Liu Yangmin Wang Linxiang Tang Jian
(Central Institute)

Abstract Ethyl carbamate (EC) in alcoholic beverages was extracted with dichloromethane and transferred to ethyl acetate. It was finally identified by using GC/MS. MID was used for quantification, after EC was separated with other components on DX-1 capillary column. This method is satisfied with both selectivity and sensitivity. The results have shown a good linear relationship between EC content with peak area. The recoveries obtained for different types of beverages were not significantly different, and CV was less than 7%. Detection limit was 10 ppb, EC in six types of alcoholic beverages (rice wine, Beer, wine, distilled spirit, whisky and fruit brandy) was determined. EC in few of those samples was in excess of the allowance (EC limits proposed in Canada).

Keywords Ethyl carbamate (EC); Urethane; Alcoholic beverage; GC/MS