

## 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

王丽娟<sup>1</sup>, 柯润辉<sup>1,2\*</sup>, 王冰<sup>3</sup>, 尹建军<sup>1,2</sup>, 宋全厚<sup>1,2</sup>

(1. 中国食品发酵工业研究院, 北京 100027; 2. 国家食品质量监督检验中心, 北京 100027;  
3. 沃特世科技(上海)有限公司, 上海 201203)

**摘要:**建立了超高效液相色谱-电喷雾串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)直接测定黄酒和葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量的方法。黄酒和葡萄酒样品经蒸馏水简单稀释后,过0.22 μm微孔滤膜,直接进行UPLC-MS/MS分析检测。以Waters Acquity UPLC™ BEH C<sub>18</sub>色谱柱为分析柱,乙腈和0.1% (v/v)乙酸水溶液为流动相,采用电喷雾正离子(ESI<sup>+</sup>)模式电离,多反应监测(MRM)模式检测,以氨基甲酸丁酯(BC)作为内标进行定量。结果表明:方法在2~500 μg/L的范围内线性关系良好(相关系数大于0.995),其对黄酒和葡萄酒的检出限为1.7 μg/L,定量限为5.0 μg/L,可达到黄酒和葡萄酒中氨基甲酸乙酯的检测要求。当添加水平为10、20和100 μg/L时,黄酒和葡萄酒中待测组分的回收率为90%~102%,日内精密度的( $n=6$ )为0.8%~4.5%,日间精密度的( $n=6$ )为1.4%~5.6%。该方法样品处理简单,前处理过程不使用有机溶剂,测定快速、准确,灵敏度高,非常适合黄酒和葡萄酒中氨基甲酸乙酯的快速检测和定量分析。

**关键词:**超高效液相色谱;电喷雾离子化串联质谱;氨基甲酸乙酯;黄酒;葡萄酒

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2012)09-0903-05

## Direct determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine and grape wine by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

WANG Lijuan<sup>1</sup>, KE Runhui<sup>1,2\*</sup>, WANG Bing<sup>3</sup>, YIN Jianjun<sup>1,2</sup>, SONG Quanhou<sup>1,2</sup>

(1. China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027, China;  
2. National Food Quality Supervision and Inspection Center, Beijing 100027, China;  
3. Waters Technologies (Shanghai) Limited, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** An ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric (UPLC-ESI-MS/MS) method was established for the direct determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine and grape wine. The Chinese rice wine and grape wine samples were diluted with distilled water, filtered through 0.22 μm microporous membrane. The LC separation was performed on a Waters Acquity UPLC system with a BEH C<sub>18</sub> column, acetonitrile and 0.1% (v/v) acetic acid aqueous solution as the mobile phase. The ethyl carbamate was determined in the mode of electrospray positive ionization (ESI<sup>+</sup>) and multiple reaction monitoring (MRM). The butyl carbamate (BC) was used as the internal standard for the quantitative determination. The calibration curve showed good linearity in the range of 2 - 500 μg/L with the correlation coefficient greater than 0.995. The limit of detection (LOD) was 1.7 μg/L and the limit of quantification (LOQ) was 5.0 μg/L. The recoveries of the ethyl carbamate in Chinese rice wine and grape wine was in the range of 90% - 102%. The relative standard deviations (RSDs) of intra-day and inter-day determinations were 0.8% - 4.5% and 1.4% - 5.6% ( $n=6$ ). The results indicated that the proposed method is easy, fast, sensitive, and suitable for

\* 通讯联系人:柯润辉,博士,高级工程师,主要研究方向为食品安全检测与分析。Tel: (010)64647447, E-mail: kerunhui@yahoo.com.cn.

基金项目:中国食品发酵工业研究院科技发展基金(2011KJFZ-BS-01).

收稿日期:2012-05-07

the determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine and grape wine.

**Key words:** ultra performance liquid chromatography (UPLC); electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS); ethyl carbamate; Chinese rice wine; grape wine

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)是发酵食品在发酵和贮存过程中产生的化学污染物<sup>[1]</sup>。早在 1943 年, Nettleship 等<sup>[2]</sup>就用实验证明了 EC 具有致癌作用。2007 年, 国际癌症研究机构再次对 EC 进行评估, 认为经食物(不包括酒精饮品)摄入的 EC 量对健康的影响不大, 但经食物和饮料酒摄入的 EC 总量则可能对健康造成潜在危险<sup>[3]</sup>。随着饮料酒销售量逐年上升, 各国都更加关注其中的 EC 水平。1985 年, 加拿大首先建立了饮料酒中的 EC 限量, 美国、捷克、法国及德国也先后开展了饮料酒中 EC 最高限量的研究<sup>[4]</sup>。2005 年, 世界卫生组织/联合国粮食与农业组织(FAO/WHO)食品添加剂联合专家委员会(JECFA)第 64 次会议建议, 为了保障人类身体健康, 应尽可能降低发酵饮料和食品中 EC 含量<sup>[5]</sup>。对饮料酒中 EC 含量的准确定量是监管和控制其含量的前提, 为此, 国际食品法典委员会(CAC)、国际葡萄与葡萄酒组织(OIV)、美国官方分析化学家协会(AOAC)、欧盟及韩国等许多国际组织和国家都推荐了酒中 EC 检测的标准方法。虽然我国有出口酒类中氨基甲酸乙酯的测定方法<sup>[6]</sup>, 但方法繁琐、费时, 难以满足目前快速准确分析检测的需要<sup>[7]</sup>。为了更好地监控我国饮料酒中的 EC 含量, 保障消费者健康, 为我国黄酒和葡萄酒产品顺利出口提供技术支持, 探索快速、准确的分析方法显得尤为重要。

目前, 国内外文献报道 EC 的检测方法较多, 主要有薄层色谱法<sup>[8]</sup>、气相色谱法<sup>[9,10]</sup>、高效液相色谱-荧光检测器法(HPLC-FLD)<sup>[11]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[11,12]</sup>、气相色谱-质谱/质谱法<sup>[13,14]</sup>等, 但这些方法有的灵敏度较低或易受干扰, 并普遍需要对样品进行复杂的前处理且分析时间长。目前, 在 EC 检测中应用得比较广泛的前处理方法主要有液液萃取<sup>[6]</sup>、固相萃取<sup>[9,15]</sup>、顶空-固相微萃取<sup>[16,17]</sup>等, 但在实际应用过程中也存在着一定的局限性: 如耗时费力, 消耗大量有机溶剂, 对环境和操作者的身体健康都会造成不良影响; 或实验结果受操作者技能的影响较大, 重现性和稳定性相对较差。超高效液相色谱-串联四极杆质谱仪(UPLC-MS/MS)集合了 LC 的分离能力和串联四极杆质谱的高灵敏度定量监测能力, 且测定时间短, 已成为定量分析强有力的工具, 非常适合黄酒和葡萄酒中 EC 的快速检测, 但目

前国内外鲜有文献报道<sup>[18,19]</sup>。采用直接进样方式检测黄酒和葡萄酒中的 EC, 简单快速, 且不使用有机溶剂, 可弥补传统方法的欠缺。样品经简单稀释、过滤后直接进样于 UPLC-MS/MS 测定 EC 含量的方法尚未见文献报道。本研究建立了采用蒸馏水对样品进行稀释、UPLC-ESI-MS/MS 直接进样测定黄酒和葡萄酒中 EC 的方法。该方法灵敏度高、简便、快速和准确, 适合大批量黄酒和葡萄酒样品中 EC 的检测及确证分析。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

ACQUITY Ultra Performance LC<sup>TM</sup>超高效液相色谱仪-ACQUITY TQD 电喷雾串联四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); Milli-Q Reference 超纯水发生器(美国 Millipore 公司); 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜(美瑞泰克科技有限公司)。

氨基甲酸乙酯(EC)、氨基甲酸丁酯(BC, 内标)(纯度 99.9%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Baker 公司); 乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 甲酸、乙酸(HPLC 级, 迪马科技有限公司); 乙酸铵(分析纯, 西陇化工股份有限公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

### 1.2 标准溶液的配制

分别准确称取 10 mg(精确至 0.1 mg) EC 和 BC 标准品于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 分别配制成 1 000 mg/L 的标准储备液, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。根据使用需要用甲醇-水(1:9, v/v)溶液逐级稀释成适当浓度的混合标准工作液。

### 1.3 黄酒、葡萄酒样品前处理方法

准确量取 1.25 mL 黄酒和 1.00 mL 葡萄酒各自置于 10 mL 容量瓶中, 加入一定量的 BC 内标, 再各自分别用水溶液定容至 10 mL, 混匀, 经 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤, 滤液供 UPLC-MS/MS 测定。

### 1.4 检测条件

#### 1.4.1 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC<sup>TM</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相: A 相为乙腈, B 相为 0.1% (v/v, 下同) 乙酸水溶液; 流速为 0.25 mL/min; 梯度洗脱程序: 0 min, 5% A; 0 ~ 1

min, 5% A ~ 10% A; 1 ~ 2.5 min, 10% A ~ 85% A; 2.5 ~ 2.8 min, 85% A ~ 5% A, 2.8 ~ 4.0 min, 5% A; 柱温为 40 °C; 进样量为 10  $\mu$ L。

#### 1.4.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM)模式;毛细管电压为 3.10 kV;离子源温度为 110 °C;脱溶剂气温度为 400 °C,流速为 650 L/h;锥孔气流速为 50 L/h;采用 MRM 模式采集 EC 和 BC 的母离子及对应的响应较强的子离子,由于 EC 和 BC 的相对分子质量较小,电离后只能选出一个特征子离子作为定性和定量离子<sup>[18,19]</sup>,其保留时间、母离子、子离子及锥孔电压和碰撞能量等参数见表 1。

表 1 EC 和 BC 的质谱参数  
Table 1 MS/MS parameters for ethyl carbamate (EC) and butyl carbamate (BC)

Analyte	Retention time/min	Parent ion ( $m/z$ )	Daughter ion ( $m/z$ )	Collision energy/eV	Cone voltage/V
EC	1.15	89.9	61.9	5	17
BC	2.39	118	61.9	5	17

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理条件的优化

目标化合物在黄酒和葡萄酒中属于痕量物质,若采用传统的液液萃取、固相萃取方法,回收率低,重复性差,且会使用大量溶剂。本研究采用直接进样方式进行分析,但为减少基质效应对测定的影响,需对样品进行稀释处理。选取若干主流品牌的黄酒分别稀释 2 ~ 12 倍进行检测,发现在较低稀释倍数下,随着稀释倍数的增加,基质干扰逐渐减小,峰形变好,响应值增加,当稀释倍数增加到 7 ~ 9 倍时,信噪比达到最佳,继续增大稀释倍数,峰形开始变差,响应值也相应降低。本文最终选择黄酒的稀释倍数为 7 ~ 9 倍。同样方法确定葡萄酒的最佳稀释倍数为 9 ~ 11 倍。

### 2.2 检测条件的优化

#### 2.2.1 色谱条件的选择

目标物测定时采用正离子模式(ESI<sup>+</sup>)电离,用反相色谱柱分离,有机相通常使用乙腈和甲醇溶液,水相常用乙酸铵、甲酸铵、乙酸或甲酸溶液。为了获得目标化合物最好的色谱分析效果,考察了乙腈-水、乙腈-甲酸水溶液、乙腈-乙酸铵水溶液,甲醇-甲酸水溶液 4 种混合溶剂体系作为流动相对目标化合物的色谱行为和离子化程度的影响。结果表明,乙腈-水的洗脱效果优于其他 3 种流动相。在乙腈-水

流动相体系中分别加入 0.1% 和 0.2% 的乙酸进一步比较其影响,发现加入乙酸后,不但可以获得较高的分离度和灵敏度,还能够保证样品中 EC 和 BC 具有良好的色谱峰形。此外,加入 0.1% 的乙酸比加入 0.2% 的乙酸时的响应值高。因此,选择乙腈和 0.1% 乙酸水溶液作为流动相组成。EC 和 BC 标准品的 MRM 模式下的提取离子流色谱图见图 1。

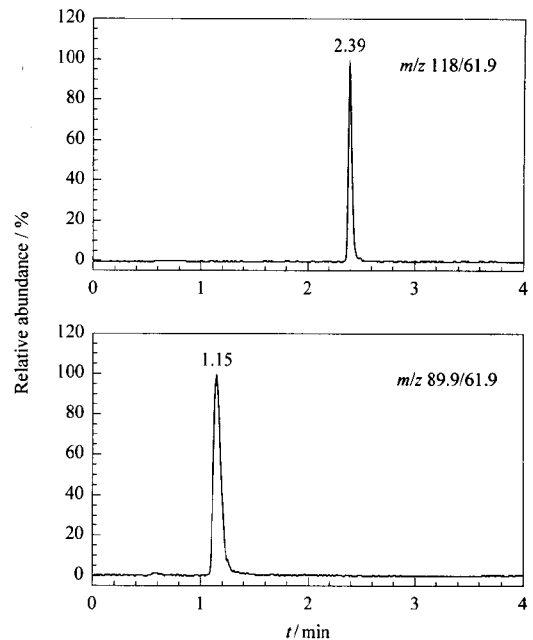


图 1 EC (20  $\mu$ g/L) 和 BC 混合标准溶液的 MRM 色谱图  
Fig. 1 MRM chromatograms of a standard mixture of EC (20  $\mu$ g/L) and BC

#### 2.2.2 质谱条件的选择

用流动注射的方式将目标物标准溶液直接注入质谱仪,进行全扫描检测,得到一级质谱图和准分子离子峰  $[M + H]^+$  (母离子),再用惰性气体 Ar 轰击该母离子,获得其二级质谱图及相应子离子。选择母离子和信号强度适宜的子离子组成监测离子对。EC 的准分子离子峰为  $[M + H]^+$  ( $m/z$  89.9) (图 2a),其子离子扫描质谱图见图 2b。BC 所选母离子为  $m/z$  118, EC 和 BC 的特征子离子均为  $m/z$  61.9。可能原因是由于  $\alpha$ -裂解和  $\gamma$ -重排作用使得 BC 和 EC 分别丢失  $C_4H_8$  和  $C_2H_4$  基团,最终产生  $m/z$  61.9 的碎片离子。由于目标物相对分子质量较小,结构简单,经质谱碰撞碎裂后只得到一个较明显的特征碎片离子,即选择一个母离子及一个特征子离子组成定性和定量离子对(这与 Park 等<sup>[18]</sup>和 Alberts 等<sup>[19]</sup>报道的结果一致),并依据离子丰度比和化合物的保留时间对 EC 进行定性和定量分析。

利用 MRM 模式对选定的定性和定量离子对进行质谱毛细管电压、碰撞能量、锥孔电压等质谱参数

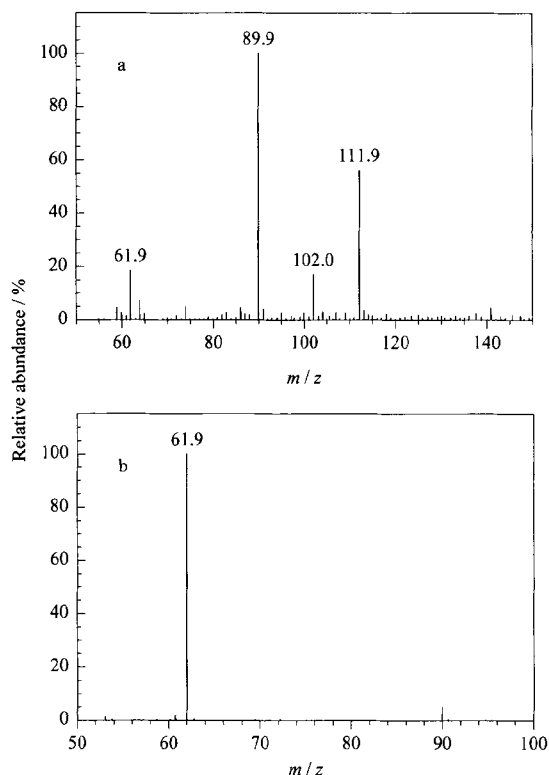


图 2 (a) EC 的一级全扫描质谱图和 (b)  $m/z$  61.9 的子离子扫描质谱图

Fig. 2 (a) Full scan mass spectrum of EC and (b) MS/MS spectrum of fragment ion  $m/z$  61.9

的优化,使各监测离子丰度和信号达到最佳。

### 2.3 方法学评价

#### 2.3.1 线性范围、检出限和定量限

将目标物标准储备液用甲醇-水(1:9, v/v)稀释,分别配制成 EC 含量为 2、5、10、20、50、500  $\mu\text{g/L}$ , BC 含量为 10  $\mu\text{g/L}$  的标准工作液,按 1.4 节所述的色谱-质谱条件进行测定,记录标准工作溶液中 EC 和 BC 的响应值,计算两者的峰面积比,用最小二乘法进行回归分析,得到在 2 ~ 500  $\mu\text{g/L}$  线性范围内 EC 的线性回归方程为  $y = 0.6695x - 0.0933$  ( $y$ : EC 与 BC 的峰面积比,  $x$ : EC 与 BC 的浓度比) ( $r^2 = 0.9988$ );以信噪比为 3 确定检出限 (LOD) 为 1.7  $\mu\text{g/L}$ ,以信噪比为 10 确定定量限 (LOQ) 为 5.0  $\mu\text{g/L}$ 。

#### 2.3.2 精密度和回收率

空白黄酒和葡萄酒样品添加 EC 为 10、20 和 100  $\mu\text{g/L}$  3 个浓度水平进行回收试验,按 1.3 节和 1.4 节所述实验步骤和条件进行处理和测定,重复 6 次,连续测定 3 天,计算日内相对标准偏差 (RSD) 和日间相对标准偏差。方法回收率和 RSD 见表 2。图 3 给出了空白葡萄酒样品及其加标样品 (含内标) 的总离子流色谱图。

表 2 黄酒和葡萄酒样品中 EC 的添加回收率和相对标准偏差 ( $n=6$ )

Table 2 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of EC spiked in a Chinese rice wine sample and a grape wine sample ( $n=6$ )

Analyte	Spiked/ ( $\mu\text{g/L}$ )	Recovery/ %	RSD/%	
			Inter-day	Intra-day
Chinese rice wine	10	102	2.1	3.2
	20	94	1.4	1.3
	100	90	4.6	4.5
Grape wine	10	96	3.2	0.8
	20	98	5.6	2.1
	100	92	1.8	4.2

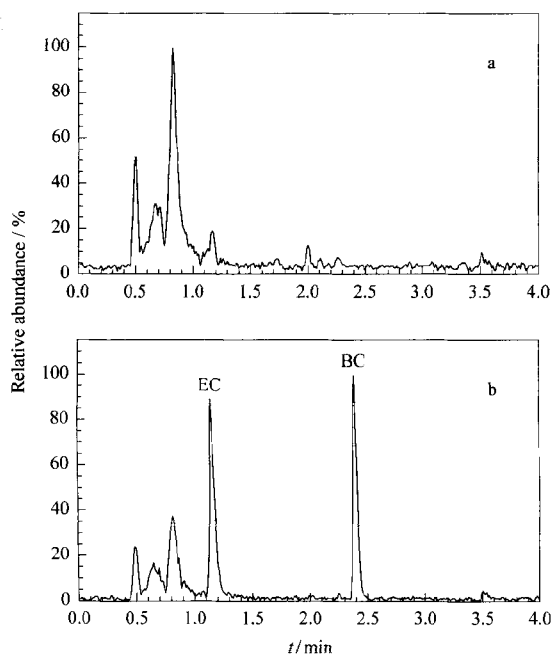


图 3 (a) 空白葡萄酒样品和 (b) 葡萄酒加标 (EC 10  $\mu\text{g/L}$ ) 样品 (含内标 5  $\mu\text{g/L}$ ) 的总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion chromatograms of (a) a blank grape wine sample and (b) the blank sample spiked with EC standard at 10  $\mu\text{g/L}$  and internal standard of BC at 5  $\mu\text{g/L}$

### 2.4 实际样品的测定

对从市场上购买的 6 个品牌的黄酒和 6 个品牌的葡萄酒样品进行了检测,每个样品重复测定 3 次,结果见表 3。除 3 种葡萄酒外,其他 9 种酒中均检出一定量的 EC。

表 3 实际样品中 EC 的含量 ( $n=3$ )

Table 3 Contents of EC in real samples ( $n=3$ )  $\mu\text{g/L}$

No.	Chinese rice wine	Grape wine
1	43.71 $\pm$ 0.34	2.42 $\pm$ 0.02
2	105.43 $\pm$ 0.84	13.41 $\pm$ 0.11
3	64.82 $\pm$ 0.52	-
4	68.88 $\pm$ 0.55	-
5	55.01 $\pm$ 0.44	6.90 $\pm$ 0.05
6	68.10 $\pm$ 0.54	-

- : The contents were lower than LOQ.

### 3 结论

本文建立了超高效液相色谱-电喷雾串联质谱直接测定黄酒和葡萄酒中 EC 含量的快速测定和确证方法。应用本方法可在 10 min 内完成整个检测分析过程,同以前报道的方法相比大大提高了分析效率。样品经蒸馏水稀释后直接进样测定,黄酒和葡萄酒样品基质对目标物测定基本无干扰,避免了传统方法中复杂的萃取、净化等前处理过程。该法操作简单、灵敏度高、重复性好,能够满足黄酒和葡萄酒中痕量 EC 的分析要求,非常适合大批量黄酒和葡萄酒样品中 EC 的定性和定量分析。

### 参考文献:

- [1] Ough C S. *J Agric Food Chem*, 1976, 24(2): 323
- [2] Nettleship A, Henshaw P S, Meyer H L. *J Nat Cancer Inst*, 1943, 4(3): 309
- [3] International Agency for Research on Cancer (IARC). *Alcoholic Beverage Consumption and Ethyl Carbamate (Urethane)*. 2007. [2011-12-08]. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/mono96-7A.pdf>
- [4] European Food Safety Authority (EFSA). *The EFSA Journal*, 2007, 551: 1. [2011-12-16]. [http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific\\_Opinion/contam\\_ej\\_551\\_ethyl\\_carbamate\\_en\\_summary\\_rev.1.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/contam_ej_551_ethyl_carbamate_en_summary_rev.1.pdf?ssbinary=true)
- [5] World Health Organization (WHO). *Evaluation of Certain Food Contaminants: Sixty-Fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. WHO Technical Report Series No. 930. Geneva: World Health Organization, 2006. [2011-12-28]. [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_930\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_930_eng.pdf)
- [6] SN 0285-1993
- [7] Liu J, Xu Y, Chen S, et al. *Science and Technology of Food Industry* (刘俊, 徐岩, 陈双, 等. 食品工业科技), 2012, 33(4): 60
- [8] Na X L, Chen J H, Dai H X. *Journal of Hygiene Research* (纳新力, 陈介华, 代海香. 卫生研究), 1991, 20(6): 45
- [9] Niu D P, Tao N P, Li X H. *Journal of Shanghai Fisheries University* (牛栋平, 陶宁萍, 李学惠. 上海水产大学学报), 2008, 17(5): 616
- [10] Uthurry C A, Varela F, Colomo B, et al. *Food Chem*, 2004, 88(1): 329
- [11] Madrera R R, Valles B S. *Food Control*, 2009, 20(2): 139
- [12] Lu D S, Wang G Q, Xiong L B, et al. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society* (卢大胜, 汪国权, 熊丽蓓, 等. 质谱学报), 2009, 30(Suppl): 145
- [13] Zhou Y, Wang L Q, Liu J L, et al. *Cereals and Oils Processing* (周勇, 王力清, 刘嘉亮, 等. 粮油加工), 2010(4): 100
- [14] Lachenmeier D W, Frank W, Kuballa T. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(2): 108
- [15] Jagerdeo E, Dugar S, Foster G, et al. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(21): 5797
- [16] Lachenmeier D W, Nerlich U, Kuballa T. *J Chromatogr A*, 2006, 1108(1): 116
- [17] Zhang X N, Ye C W, Zou G, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (张雪娜, 叶长文, 邹更, 等. 色谱), 2011, 29(8): 701
- [18] Park S K, Kim C T, Lee J W, et al. *Food Control*, 2007, 18: 975
- [19] Alberts P, Stander M A, De Villiers A. *Food Addit Contam: Part A*, 2011, 28(7): 826