

论著

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

周萍萍 赵云峰 张 珙 吴永宁

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 建立葡萄酒中氨基甲酸乙酯(EC)的测定方法。方法 使用气相色谱 - 离子阱质谱法和稳定性同位素稀释技术,采用硅藻土 Extrelut NT进行基质固相分散萃取净化,二氯甲烷洗脱,选择离子储存方式 SIS测定。结果 方法的线性范围在10~1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,检出限为2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。3个不同加标水平葡萄酒中氨基甲酸乙酯的平均回收率为88.5%~112.8%,RSD为5.8%~9.5%($n=5$)。结论 本方法准确可靠,可用于葡萄酒中氨基甲酸乙酯的测定。

关键词:氨基甲酸酯类;乌拉坦;同位素标记;色谱法;气相;光谱分析;质量

Determination of Ethyl Carbamate in Wine by Stable Isotope Dilution
Gas Chromatography/Mass Spectrometry

ZHOU Ping-ping, ZHAO Yun-feng, ZHANG Gong, WU Yong-ning

(National Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** A method for determination of ethyl carbamate (EC) in wine by gas chromatography ion trap mass spectrometry has been developed. **Method** The diluted beverage was added with ethyl carbamate- d_5 (D_5 -EC), then absorbed onto a column of Extrelut NT and eluted with dichloromethane (DCM). The EC response was measured by GC-MS in selection ion storage (SIS) as stable isotope dilution. **Results** A linear dynamic range was established from 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ to 1 000 $\mu\text{g}/\text{L}$, with a limit of detection of 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and limit of quantitation of 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. EC average recoveries varied from 88.5 to 112.8%, RSDs were in the range of 5.8%~9.5% ($n=5$). **Conclusion** The method is sensitive, specific and easy for the determination of EC in alcohol beverage.

Key word: Carbamates; Urethane; Isotope Labeling; Chromatography Gas; Spectrum Analysis, Mass

氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate, EC),也称乌拉坦(Urethane),为动物致癌物,对人类有潜在的致癌性^[1,2]。1976年首次报道其在各种酒精饮料和食品的发酵过程中自然形成^[3]。1985年加拿大的研究人员在某些酒精饮料中检测到非常高水平的EC(mg/L)^[4],此后引起了国际社会的高度重视。一些国家已在酒精饮料中设立EC限量标准。如加拿大1985年设定葡萄酒中限量为30 $\mu\text{g}/\text{L}$;加度葡萄酒中为100 $\mu\text{g}/\text{L}$;葡萄蒸馏酒、白兰地、威士忌中为150 $\mu\text{g}/\text{L}$;水果白兰地中400 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[5]。美国FDA 1997年颁布了EC预防性法案手册^[5,6]。

我国进出口商品检验检疫局颁布了出口蒸馏酒和黄酒中EC残留气相色谱测定的行业标准SN 0285—

1993,最低检出限0.1 mg/kg ^[7]。欧盟推荐气质联用(GC/MS)作为EC检测的第一法^[8],尚未见到用离子阱质谱检测方法的报道。本文应用同位素稀释技术^[9],建立了葡萄酒中EC气相色谱-离子阱质谱的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 Saturn 2000气相色谱-离子阱质谱联用仪(美国Varian公司,Saturn GC-MS工作软件,6.41版)、色谱柱CP-Wax柱(49 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)。

EC购自美国AccuStandard公司,EC氘代同位素内标(D_5 -EC)购自美国Cambridge Isotope Laboratories公司。硅藻土Extrelut TM 20、无水硫酸钠(分析纯)、二氯甲烷、正戊烷、乙酸乙酯均为色谱纯,购自美国TEDIA公司。

1.2 材料 实验用葡萄酒均购自北京市超市。

1.3 溶液的配制 储备标准溶液(1 000 mg/L):分

基金项目:国家科技支撑计划食品安全关键技术重大项目
(2006BAK02A01)

作者简介:周萍萍 女 助理研究员 博士生

通讯作者:吴永宁 男 研究员 博士生导师

别准确称取 EC 标准品及 D_5 -EC 同位素内标标准品 10 mg (精确到 0.01 mg) 于每个 10 ml 棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容刻度,配制成 EC 储备标准溶液和 D_5 -EC 储备标准溶液,-20 °C 冰箱避光保存。

中间溶液(10 mg/L) 准确移取 EC 储备标准溶液和 D_5 -EC 储备标准溶液各 1.00 ml 分别置于 2 个 100 ml 棕色容量瓶中,加乙酸乙酯稀释至刻度,配制成 EC 中间溶液和 D_5 -EC 中间溶液,-20 °C 冰箱避光保存。

工作溶液(1.0 mg/L) 准确移取中间溶液 1.00 ml 置于 10 ml 棕色容量瓶中,加乙酸乙酯稀释至刻度,配制成 EC 工作溶液和 D_5 -EC 工作溶液。

EC 系列标准溶液 在 7 个 10 ml 容量瓶中分别加入 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 的 EC 工作溶液(1.0 mg/L) 和 0.50、1.00 ml EC 中间溶液(10.0 mg/L),再向上述 7 个容量瓶中分别加入 D_5 -EC 工作溶液(1.00 mg/L) 1.00 ml,用乙酸乙酯定容至刻度,EC 浓度分别为 10、20、50、100、200、500、1 000 $\mu\text{g/L}$, D_5 -EC 内标浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液。现用现配。

1.4 方法

1.4.1 试样的提取与净化 取洁净玻璃层析柱,在底部填少许玻璃棉,压紧,依次填装无水硫酸钠 10 g、Extrelut TM 20 硅藻土 5.0 g 入层析柱中。称取葡萄酒试样 5.0 g (精确至 0.001 g) 加 50 μl 内标 D_5 -EC(4 mg/ml) 混匀后和 5.0 g Extrelut TM 20 硅藻土搅拌均匀加到层析柱中。平衡 10 min,40 ml 戊烷洗 2 次,50 ml 二氯甲烷洗脱 2 次,洗脱液收集到瓶中,置旋转蒸发器(30 °C,300 mbar) 浓缩至近干。用 3 ml 的乙酸乙酯将浓缩液转移至 5 ml 的刻度管中。用氮气将液体吹至 1 ml。取 1 μl 进样。

1.4.2 线性关系和回收实验 以 1.3 所配制系列标准溶液进样,每个浓度点重复 3 次,记录每个浓度的 EC 和 D_5 -EC 内标的平均峰面积,以 EC (m/z 62) 和 D_5 -EC 内标 (m/z 64) 的峰面积比为纵坐标和对应的标准溶液中 EC 的浓度为横坐标进行线性回归,计算线性关系和相关系数。

根据仪器方法的线性范围,在空白试样中添加 3 个水平(低、中、高)的 EC 标准溶液,按照上述步骤操作进行回收率试验,对每个添加浓度平行重复 5 次,计算测定结果的相对偏差。

1.4.3 前处理的优化 硅藻土基质固相分散萃取洗脱曲线:取洁净玻璃层析柱,在底部填少许玻璃棉,压紧,依次填装无水硫酸钠 10.0 g、硅藻土 5.0 g,另称取 5.0 g Extrelut TM 20 硅藻土与 5.0 g 标准参考物质(40%乙醇含 100 $\mu\text{g/kg}$ 的 EC) 溶液搅拌均匀

匀后,装入层析柱中。平衡 10 min,40 ml 正戊烷洗 2 次,50 ml 二氯甲烷洗脱 2 次,控制流速 2 ml/min,按 25 ml 进行分段收集。在每个流分中加入内标 D_5 -EC 50 μl (0.4 mg/L),洗脱液收集到 5 ml 的刻度管用氮气将液体吹至 1 ml。取 1 μl 进样。

1.5 仪器条件

1.5.1 色谱条件 进样口温度 恒温 220 °C,不分流进样,分流比是 40。进样体积 1 μl ;色谱柱升温程序:50 °C 保持 1.0 min,以 5 °C/min 速度升至 160 °C,再以 25 °C/min 的速度升至 220 °C 保持 5 min。

载气 高纯氦气(纯度 > 99.999%),恒压,柱前压为 10 psi。

1.5.2 质谱(MS)条件 电子倍增器电压 调节值 +200 V,灯丝电流 40 uamps;离子化方式 EI,70 eV;溶剂延迟 15 min,目标 TIC 60 000 counts,最大离子化时间 35 000 μs ,预扫描离子化时间 100 μs ;背景质谱 40 m/z ,RF Dump Value 650 m/z ;阱温度 200 °C;传输线温度 220 °C,歧盒(manifold) 温度 45 °C;全扫描质量数范围 m/z 30~100。

质谱离子监测方式为选择离子储存(SIS),全扫描 m/z :35~100,EC 监测离子为 m/z 44、62、90。 D_5 -EC 内标监测离子为 m/z 44、64、95。其中 m/z 62 和 m/z 64 丰度最大,作为定量离子,其他离子用来定性。

2 结果与讨论

2.1 监测离子的确定 以相对保留时间和 EC 相应监测离子的丰度进行定性分析。要求所检测的 EC 色谱峰信噪比(S/N) 大于 3。EC 相应监测离子的丰度偏差不得超过标准溶液中相应离子丰度的 20%。EC 分子式: $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ 。分子量: 89.09。标准 EC 的质谱图见图 1、2。通过质谱检索,本试验质谱碎片与标准谱库中的 EC 质谱图不完全一致,匹配概率是 74%,见图 3、4。谱库中的定性离子 m/z 74 和 76 在本文中的质谱图中没有显示,而谱库中的分子离子峰 m/z 89 和 94 在本文中的质谱图中对应的是 m/z 90 和 95。已有的文献报道^[10] 和标准谱库一致。这是由于 EC 的结构特点以及所应用的不同原理的质谱检测器决定的。谱库中的谱图和已有的文献报道都是用四极杆质谱检测器完成,本研究中使用离子阱质谱检测器,属首次,尚未有文献报道。

2.2 线性实验结果,检测限和定量限 实验所得到的线性方程为 $y = 0.011x - 0.0028$ ($r^2 = 0.9998$),线性良好。

取葡萄酒试样 5.0 g,做 5 个平行,按 1.4 中的前处理方法和检测方法测得基线的噪音值,按信噪比 $S/N = 3$ 为检测限(LOD), $S/N = 10$ 为定量限

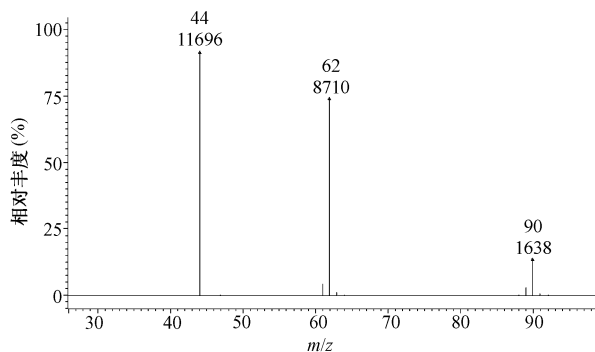


图 1 氨基甲酸乙酯 (EC) 的选择离子储存 (SIS) 扫描图

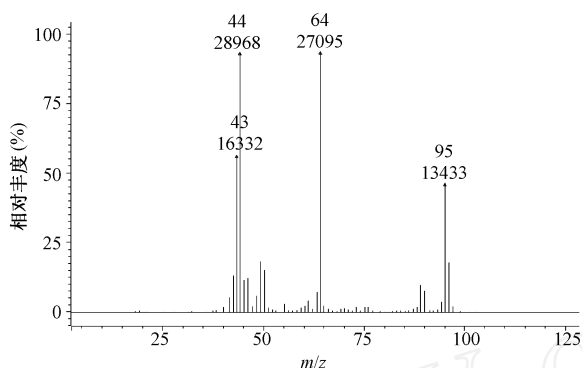


图 2 五氘代氨基甲酸乙酯 (D₅-EC) 的选择离子储存 (SIS) 扫描图

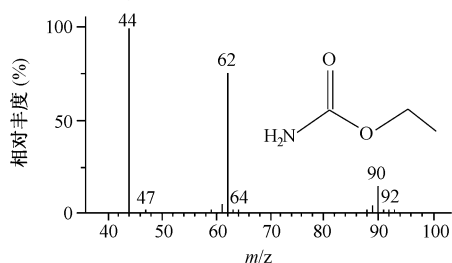


图 3 氨基甲酸乙酯 (EC) 谱图在谱库中检索所得结果图

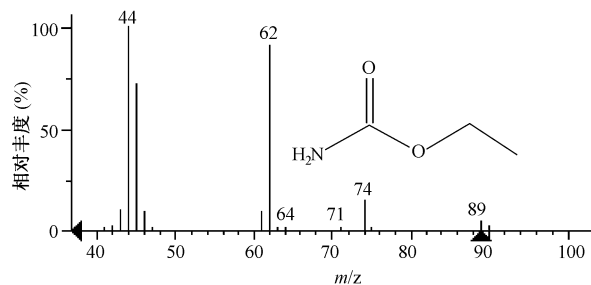


图 4 氨基甲酸乙酯 (EC) 在谱库中的标准谱图

(LOQ), 检测限为 2.0 μg/kg, 定量限为 6.0 μg/kg。

前处理优化的结果 各流分中 EC 含量见表 1。结果可见, 使用 80 ml 正戊烷淋洗基本不会损失 EC, 采用二氯甲烷洗脱目标化合物, 洗脱体积在 100 ml 基本洗脱完全。

表 1 硅藻土基质固相分散萃取洗脱效果

流分	EC 含量 (ng)	回收率 (%)
正戊烷 (80ml)	ND	0.0
二氯甲烷流分 1 (25 ml)	219	43.8
二氯甲烷流分 2 (25 ml)	168	33.6
二氯甲烷流分 3 (25 ml)	70	14.0
二氯甲烷流分 4 (25 ml)	ND	0.0

注: ND 为未检出

2.4 准确度和精密度实验 以回收率表示方法的准确度, 以每个水平的 5 次测定数据为相对标准偏差表示精密度, 结果见表 2、图 5。方法的准确度和精密度均符合分析要求。

表 2 葡萄酒加标回收试验结果 (n=5)

加标水平 (μg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
5	88.5	9.5
50	103.0	8.0
100	112.8	5.8

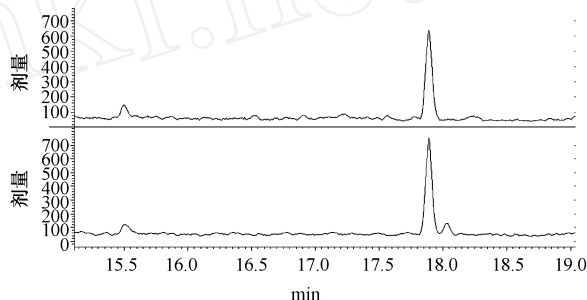


图 5 葡萄酒中 EC 低水平加标 (5 μg/kg) 的 SIM 色谱图 (上方为空白)

2.5 试样的测定 应用本实验方法, 对市售的 56 种葡萄酒和 2 种黄酒进行了检测。葡萄酒中的氨基甲酸乙酯的含量在 6.0 ~ 55.4 μg/kg 之间。黄酒中氨基甲酸乙酯的含量在 277.0 μg/kg 左右。

参考文献

- [1] JAGERDEO E, DUGAR S, FOSTER G. D, et al. Analysis of ethyl carbamate in wines using solid-phase extraction and multidimensional gas chromatography/mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(21): 5797-5802.
- [2] DE MELO ABREU S, ALVES A, OLIVEIRA B, et al. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages: an interlaboratory study to compare HPLC-HLD with GC-MS methods[J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 382(2): 498-503.
- [3] BATTALIA R, CONACHER H B S, PAGE B D. Ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages and foods: a review[J]. Food Addit Contam, 1990, 7(4): 477-496.
- [4] DENNIS MJ, HOWARTH N, KEY P E, et al. Investigation of ethyl carbamate levels in some fermented foods and alcoholic beverages[J]. Food Addit Contam, 1989, 6(3): 383-389.

论著

氟虫腈在酸菜腌制中的降解

凌云¹ 储晓刚¹ 雍 炜¹ 王大宁¹ 崔新仪²

(1. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所,北京 100025; 2. 天津农学院,天津 300384)

摘要:目的 研究酸菜制作过程对蔬菜中残留的氟虫腈降解的影响。方法 在模拟条件下对白菜进行喷施氟虫腈、清洗和腌制试验,用乙腈提取酸菜中的氟虫腈及其代谢物,用气相色谱法测定(电子捕获检测器 ECD)。结果 在 21 d 的腌制过程中,氟虫腈在酸菜中的最终残留量从 1.61 mg/kg 降低为 0.25 mg/kg,降解率为 85%。降解产物是氟虫腈氧化物砒(MB 46136)。结论 酸菜的制作过程能够加快蔬菜中氟虫腈残留的降解。乳酸菌和酵母菌的繁殖是降解氟虫腈的主要因素。

关键词:酸菜;杀虫药;氟虫腈;农药残留量;降解

Degradation of Fipronil During Making Pickle

LING Yun, CHU Xiao-gang, YONG Wei, WANG Da-ning, CUI Xin-yi

(Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of process of making pickle on the residues. **Method** Cabbages were sprayed with fipronil according to manufacturer instruction and washed and pickle under control condition. The fipronil and its metabolites in pickle were extracted by acetonitrile, and the residues of the pickle were determined by gas chromatography. **Results** During making pickle, the contents of fipronil decreased from 1.61 to 0.25 mg/kg. The rate of decrease was 85%. MB 46136 was product of fipronil degradation. **Conclusion** During making pickle, the fipronil levels in pickle decreased significantly. Increases of lactobacillus and microzyme could be due to the degradation of fipronil during making pickle.

Key word: Pickle; Insecticides; Fipronil; Pesticide Residues; degradation

氟虫腈(fipronil,商品名:锐劲特)是新型杀虫剂,在正常使用条件下,除了氟虫腈外,其代谢物氟虫腈氧化物砒(MB 46136)及光降解物脱亚砒基氟虫腈(MB 46513)也都有毒性^[1]。

氟虫腈由于其高效的杀虫效果,在我国的稻米和蔬菜的生产中大量使用,农产品中氟虫腈残留量

的问题已经受到关注,但是对加工食品中的残留量研究较少。酸菜是中国、韩国以及其他一些国家的传统食品,尽管制作的工艺存在着差异,但是都利用微生物的发酵过程。由于酸菜味美而且制作简单方便,中国各地有家庭制作的传统,中国的腌制泡菜的发酵期一般为 4 到 6 周,利用蔬菜表面的乳酸菌和

- [5] MIRZOIAN A, MABUD A. Comparison of methods for extraction of ethyl carbamate from alcoholic beverages in gas chromatography/mass spectrometry analysis [J]. J AOAC Int, 2006, 89(4): 1048-1051.
- [6] WHITON R S, ZOECKLEIN B W. Determination of ethyl carbamate in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry[J] AMJ Enol Vitic, 2002. 53(1): 60-63.
- [7] SN 0285-1993. 出口酒类中氨基甲酸乙酯残留量检验方法[S].
- [8] FLAMINI R, PANIGHEL A. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part II: The consumer protection[J]. Mass Spectrom Rev,

2006. 25(5): 741-774.

- [9] LACHENMEIER D W, 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.
- [10] KIM Y K, KOH E, CHUNG H J, et al. Determination of ethyl carbamate in some fermented Korean foods and beverages[J]. Food Addit Contam, 2000, 17(6): 469-475.

[收稿日期:2007-09-12]

中图分类号:R15;O657.71;O657.3

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2007)06-0492-04

基金项目:国家质检总局科技计划项目

作者简介:凌云 女 助理研究员

通讯作者:崔新仪 男 副教授