

同位素稀释-气相色谱-质谱法测定 发酵乳中氨基甲酸乙酯

李 杰, 于瑞祥, 许卓妮, 李永利, 陈 鹰, 王 虎

(上海市计量测试技术研究院, 上海 201203)

摘要:建立了同位素稀释-气相色谱-质谱联用测定酸奶、奶酪等发酵乳中氨基甲酸乙酯(EC)含量的方法,通过优化前处理方法,考察了提取溶剂的种类、提取次数对样品提取效果的影响。在优化的实验条件下,使用氨基甲酸乙酯-d₆作为内标定量。结果表明:在0.05~20.0 mg/L范围内线性关系良好,线性相关系数为0.999 8,检出限为0.02 mg/L;在3个加标水平下,样品的回收率在98.9%~102.9%之间,相对标准偏差为0.6%~4.8%。该方法前处理简单、提取效果好,具有比外标定量法更好的灵敏度和可靠性,适用于发酵乳中氨基甲酸乙酯含量的监控。

关键词:氨基甲酸乙酯(EC);发酵乳;同位素稀释;气相色谱-质谱(GC/MS)

中图分类号:O657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2015)03-0268-06

doi:10.7538/zpxb.youxian.2015.0006

Determination of Ethyl Carbamate in Fermented Dairy Products by Isotope Dilution-GC/MS

LI Jie, YU Rui-xiang, XU Zhuo-ni, LI Yong-li, CHEN Ying, WANG Hu
(Shanghai Institute of Measurement and Testing Technology, Shanghai 201203, China)

Abstract: A method for determination of ethyl carbamate in fermented dairy products was proposed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) with deuterium ethyl carbamate as isotopic internal standard. The types and times of extraction solvents were discussed to establish efficient pretreatment method. The results show that the calibration curve has good linearity in the range of 0.05-20 mg/L with the correlation coefficient of 0.999 8, and the limit of detection is 0.02 mg/L. The recoveries range from 98.9% to 102.9% with RSDs of 0.6%-4.8% in three levels. The method is simple, rapid, accurate, and can be applied in the quantification of ethyl carbamate in fermented dairy products.

Key words: ethyl carbamate (EC); fermented dairy products; isotope dilution; gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

收稿日期:2014-05-30;修回日期:2014-09-17

基金项目:上海市科委科研计划项目(12142201000)资助

作者简介:李 杰(1983—),男(汉族),甘肃兰州人,博士,从事色谱-质谱联用技术研究和标准物质研制。E-mail: lijie@simt.com.cn

网络出版时间:2015-01-30;网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20150130.1526.007.html

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)又称尿烷,是发酵食品(如面包、酸牛奶、乳酪、酱油及酒类饮料等)在发酵和储存过程中产生的一种化学污染物。国际癌症研究机构(IARC)将氨基甲酸乙酯列入确认的人类可能致癌物质(2A类),许多国家也针对其制定了限量标准。我国目前只有出入境检验检疫行业推荐了进出口酒中 EC 的检测标准^[1],但没有相关的限量法规,对 EC 的监管仍停留在基础方法研究和食品安全风险监控方面。

目前,对 EC 的检测方法主要有液相色谱-荧光检测法^[2-4]、气相色谱法^[5]、气相色谱-质谱法^[6-12]、液相色谱-质谱法^[13],目标样品多集中于酒类、酱油等产品,而对发酵乳中 EC 的研究较少。虽然发酵乳中 EC 含量比酒类样品中的低,但作为常见的发酵产品,在日常生活中接触很多,存在一定的风险,因此有必要对其进行监控。

本工作主要针对常见的发酵乳进行 EC 含量检测方法的研究,通过对样品前处理进行优化,采用同位素稀释质谱(IDMS)与气相色谱-质谱(GC/MS)结合的方法,希望获得较低的检出限和较好的回收率,以达到对发酵乳中 EC 进行有效检测和筛查的目的。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

6890-5975 气相色谱-质谱联用仪:美国 Agilent 公司产品,配有电子轰击源(EI);R-215 旋转蒸发器:瑞士 Buchi 公司产品;Milli-Q 超纯水器:美国 Millipore 公司产品;离心机:美国 Sigma 公司产品;MS1 涡旋混合器:德国 IKA 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

乙腈、甲醇、正己烷(色谱纯):美国 Honeywell 公司产品;乙酸乙酯、正己烷、二氯甲烷、乙醚(分析纯):国药集团化学试剂有限公司产品;无水硫酸钠:国药集团化学试剂有限公司产品,于 500 °C 烘 4 h 以上,冷却后储存于干燥器中,备用。

氨基甲酸乙酯标准品(纯度>99%):德国 Dr. Ehrenstorfer 公司产品;氨基甲酸乙酯-d₅(EC-d₅,纯度≥99.5%,丰度≥99.0%):上海

市计量测试技术研究院产品。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:HP-Innowax 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.5 μm);升温程序:60 °C 保持 1 min,以 7.5 °C/min 升至 180 °C,再以 30 °C/min 升至 240 °C,保持 3 min;载气(He)流速 1.0 mL/min,压力 57 kPa,进样量 2.0 μL;不分流进样。

1.3.2 质谱条件 电子轰击(EI)离子源;电子能量 70 eV;传输线温度 250 °C;离子源温度 230 °C;选择性离子监测模式(SIM);氨基甲酸乙酯定性离子 m/z 62、74、89,定量离子 m/z 62;氨基甲酸乙酯-d₅ 定性离子 m/z 44、64、76,定量离子 m/z 64;溶剂延迟 6 min。

1.4 样品前处理

酸奶:准确称取 5.00 g 样品于 15 mL 离心管中,加入 100 μL 浓度为 10 mg/L 的 EC-d₅ 溶液,再加入 5 mL 乙酸乙酯,涡旋混匀 2 min,以 4 500 r/min 离心 5 min,取上层有机相于梨形瓶中,在下层试样中加入 5 mL 乙酸乙酯,按上述步骤重复提取 1 次,合并上层有机相,旋转蒸发至干。准确加入 1 mL 乙腈,溶解残渣,加入少量无水硫酸钠,混匀。将残渣转移到离心管中,离心,取乙腈层,待测。

乳酪:准确称取 1.00 g 样品于 15 mL 离心管中,加入 5 mL 水超声溶解,再加入 100 μL 浓度为 10 mg/L EC-d₅ 溶液混匀,提取步骤同酸奶。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的优化

由于发酵乳的成分复杂,基质效应明显,需要采用相应的前处理技术进行净化。目前,检测发酵类食品中 EC 常采用硅藻土净化的前处理方法^[14],该方法不仅处理时间长,而且要消耗大量的试剂。本实验尝试采用溶剂直接萃取的方法,以达到快速、高效的目的。

实验考察了乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、乙醚等不同溶剂对发酵乳中 EC 的提取效果,具体的提取步骤参见 1.4 节。结果表明,5 种提取溶剂与发酵乳均有较好的分层效果,但由于离心后二氯甲烷提取层在底部,获取提取液困难,且易引入误差,不利于实验的进行。

外标定量法测定不同溶剂提取回收率实验表明:加标浓度为 $1.0 \mu\text{g/g}$ 时,乙腈和甲醇只有约 50% 的回收率;乙醚的回收率略好,为 55%;乙酸乙酯的回收率可达 80%,具有较高的提取效率。因此,选择乙酸乙酯作为提取溶剂,并分别考察了提取次数对提取效果的影响。实验发现,提取 2 次与 3 次获得的回收率结果相近,因此采用 2 次提取,以节省溶剂和操作时间。

2.2 内标物的选择

由于食品类样品具有基质复杂、待测物提取困难、干扰多等特点,因此,待测物很难从样品中完全提取,采用外标法定量偏差较大,而内标法能够对样品中待测物含量进行有效校正,可以提供更好的检测灵敏度和准确性。有文献报道采用氨基甲酸丁酯作为内标物检测发酵食品中 EC 含量^[7,12],此内标物具有经济实用的特点。但是鉴于氨基甲酸丁酯与 EC 在结构和极性方面存在的差异,在基质、提取液中的分配系数和提取效果也不尽相同,因此作为检测内标时回收率并不理想。同位素标记内标与待测物具有几乎一致的提取回收率、色谱保留特性、溶解性等其他理化性质,

能够有效地校正样品前处理过程中造成的偏差,是最理想的内标物质,相应的同位素稀释质谱法也是目前复杂基质样品中痕量有机物检测较为准确可靠的方法。因此,本实验采用 EC- d_5 作为检测内标物。

2.3 色谱及质谱条件的确定

由于 EC 含有的氨基具有较高的极性,因此选择极性 INNOWAX 色谱柱进行分析,实验发现,使用该柱对 EC 进行分析时,杂质干扰少、峰形对称、灵敏度高。取 EC 标准品和 EC- d_5 内标进样,获得的全扫描质谱图示于图 1。选择灵敏度高且选择性好的 m/z 62、 m/z 64 碎片离子分别作为氨基甲酸乙酯及其同位素内标物的定量离子,同时选择 m/z 44、62、89 碎片离子作为 EC 的定性离子, m/z 44、64、76 碎片离子作为 EC- d_5 的定性离子。

根据 EC 质谱图尝试解析了其可能的裂解途径和机理,示于图 2。氮带正电荷的自由基离子会发生 α 断裂生成 m/z 44 碎片离子,或经过氢自由基迁移、逆 Diels-Alder 重排后生成 m/z 62 碎片离子;氧带正电荷的自由基离子会发生 α 断裂或 α 均裂,分别生成 m/z 74、45 碎

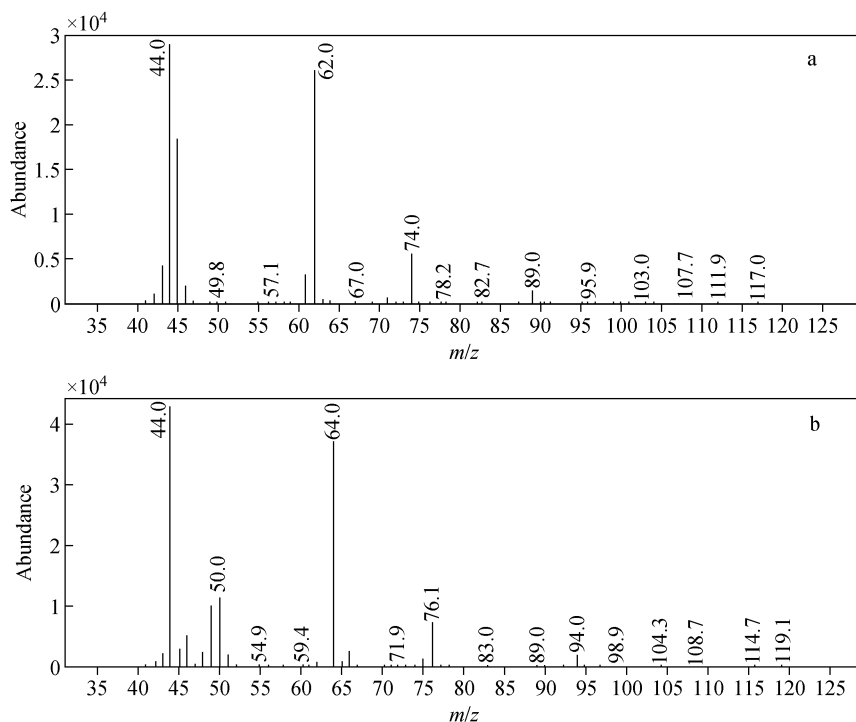


图 1 氨基甲酸乙酯(a)及其同位素内标氨基甲酸乙酯- d_5 (b)的质谱图

Fig. 1 MS spectrum of EC(a) and EC- d_5 (b)

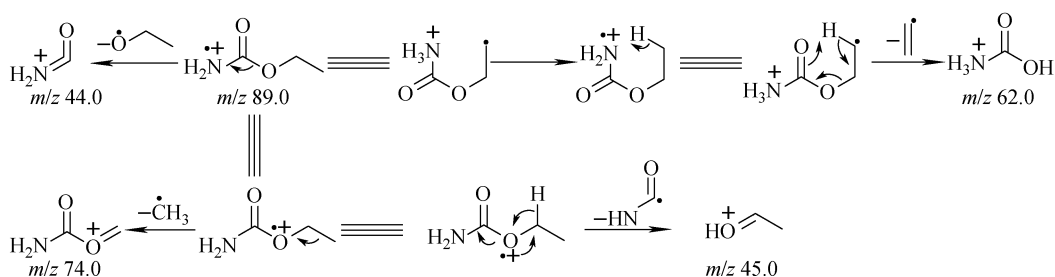


图2 氨基甲酸酯可能的裂解途径

Fig. 2 The proposed fragmentation pathway of ethyl carbamate

片离子。因氧元素的电负性强于氮元素,氮正离子较氧正离子的稳定性更好,所以 m/z 89、62 碎片离子的强度和高于 m/z 74、45 碎片离子的强度和;由于 m/z 62 碎片离子可以通过 N—C—O 的共轭系统稳定正离子,所以具有最高的强度。通过以上裂解途径推测出的 EC-d₅ 裂解情况与实际得到的 EC-d₅ 质谱图完全相符,验证了本实验所推测的裂解机理。

2.4 线性范围、检出限

按照本实验条件,分别配制含 1.0 mg/L EC-d₅ 内标的 0.05、0.2、1.0、5.0、20.0 mg/L 系列 EC 标准溶液,用内标定量法测定。以分析物与内标物峰面积比值(y)对分析物的质量浓度(x)进行线性回归,获得的线性方程为 $y = 1.1359x + 0.0344$,相关系数(R^2)为 0.9998。结果表明,在 0.05~20 mg/L 范围内,EC 和 EC-d₅ 定量离子的响应峰面积比值与 EC 的质

量浓度有很好的线性关系。以 3 倍信噪比(S/N)计算 EC 的检出限为 0.02 mg/L。

2.5 检测方法相对标准不确定度的估算

根据样品中氨基甲酸酯含量计算公式 $C_{EC} = k \frac{C_{内} V_{内} A_{EC}}{m_{均} A_{内}}$ 可知,影响检测结果的不确定度分量主要为:1) 内标溶液浓度;2) 加入内标溶液的体积;3) 样品的称量质量;4) EC 和 EC-d₅ 峰面积。由于在线性范围内质量歧视因子和仪器检测线性引入的不确定度可以忽略;另外,由于对 EC 和 EC-d₅ 具有相同影响,前处理时的稀释、定容以及仪器进样量、流动相流速等引入的不确定度可以完全抵消。

在不确定度的主要影响分量中,内标溶液浓度的不确定度主要由内标标准品的纯度和丰度不确定度、称量不确定度、定容不确定度组成,所以该分量引入的相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(C_{内}) = \sqrt{\left(\frac{0.03}{0.995\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0.02}{0.990\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0.05}{1.0194\sqrt{3}}\right)^2 + (0.052)^2} = 0.36\%$$

另外,峰面积的不确定度可以由多次测量的重复性表示。由于各分量是独立的,因此检测酸奶中 EC 含量的相对标准不确定度为: $U_{rel} =$

$$\sqrt{\left((0.0036)^2 + \frac{1.6}{100\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0.02}{50\sqrt{3}}\right)^2 + (0.024)^2}$$

$= 2.6\%$ 。类似的,检测乳酪中 EC 含量的相对标准不确定度为 2.6%。

2.6 回收率与精密度

在不含 EC 的发酵乳样品中按照前述方法进行添加回收和精密度实验。在 0.1、1.0、10.0 mg/L 3 个加标水平下,每个水平做 6 次平行实验,得到的结果列于表 1。由表 1 可见,同位素标记内标定量法检测 EC 的回收率在

98.9%~102.9% 之间,相对标准偏差(RSD)小于 5%($n=6$)。结果表明,本方法具有很好的准确度和精密度,与使用外标定量法回收率实验结果(约 80%)相比,可以明显的体现出同位素稀释质谱法在复杂基质样品中痕量物质检测时前处理简单高效、结果准确可靠的优势。

2.7 实际样品分析

按照实验建立的方法,分别对老酸奶、酸奶和乳酪 3 种不同的实际样品进行测定,结果列于表 2。结果表明,部分样品中检测出极少量的 EC,说明发酵乳产品中存在含有 EC 的风险,鉴于国家尚未出台相应的检测限量标准,对发酵乳制品中 EC 含量的风险监控非常必要。

表 1 加标样品的回收率和精密度($n=6$)

Table 1 Recoveries and RSDs of ethyl carbamate in fermented dairy

样品	添加水平/ (mg/L)		回收率/%				平均回收率/%		RSD/%
	1	2	1	2	3	4	5	6	
酸奶	0.1	105.4	98.9	100.2	103.2	93.1	94.8	99.2	4.8
	1.0	102.9	98.7	103.8	100.6	99.2	104.6	101.6	2.4
	10.0	103.7	99.4	98.6	100.3	101.1	98.3	100.2	2.0
乳酪	0.1	103.2	107.4	102.2	106.1	101.8	96.6	102.9	3.7
	1.0	98.4	98.2	99.2	100.2	97.4	99.9	98.9	1.1
	10.0	99.1	99.7	100.7	99.2	99.6	100.3	99.7	0.6

表 2 实际样品检测结果

Table 2 The detective results of real samples

样品名称	含量/($\mu\text{g/g}$)		
	1	2	3
老酸奶	0.038	nd	nd
酸奶	nd	nd	0.030
乳酪	nd	nd	nd

注:nd 为未检出

3 结论

采用同位素稀释结合气相色谱-质谱联用的方法对发酵乳中氨基甲酸乙酯含量进行定性和定量检测,此方法前处理简单、试剂消耗量少、检测灵敏度高、精密度好、回收完全,能有效地进行发酵食品中氨基甲酸乙酯含量的检测。另外,本研究使用自制的氨基甲酸乙酯- d_5 稳定同位素标记内标,与进口稳定同位素内标试剂相比,分析成本大大降低,有利于我国摆脱对国外进口试剂的依赖,在一定程度上,对填补我国稳定性同位素化合物制备及其产业化方面的空白具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 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]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [2] MADRERA R R, VALLES B S. Determination of ethyl carbamate in cider spirits by HPLC-FLD [J]. Food Control, 2009, 20: 139-143.
- [3] AJTONYA Z, SZOBOSZLAIBN, BENCS L, et al. Determination of ethyl carbamate in wine by high performance liquid chromatography[J].

Food Chemistry, 2013, 141: 1 301-1 305.

- [4] 高年发,宝菊花,孙晓雯,等. HPLC 测定白兰地中的氨基甲酸乙酯[J]. 中国酿造,2008,(13):84-87.
- GAO Nianfa, BAO Juhua, SUN Xiaowen, et al. Determination of ethyl carbamate(EC) in brandy by HPLC[J]. China Brewing, 2008, (13): 84-87(in Chinese).
- [5] 牛栋平,陶宁萍,李学惠. 固相萃取-气相色谱法测定葡萄酒中的氨基甲酸乙酯[J]. 上海水产大学学报,2008,17(5):616-619.
- NIU Dongping, TAO Ningping, LI Xuehui. Determination of ethyl carbamate in grapewine by solid phase extraction and gas chromatography [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(5): 616-619(in Chinese).
- [6] LIM H S, LEE K G. Development and validation of analytical methods for ethyl carbamate in various fermented foods[J]. Food Chemistry, 2011, 126: 1 373-1 379.
- [7] 谭波涛,郝媛媛,赵杰,等. GC-MS 法测定发酵食品中氨基甲酸乙酯的含量[J]. 分析试验室, 2011,30(12):31-33.
- TAN Botao, HAO Yuanyuan, ZHAO Jie, et al. Determination of ethyl carbamate in fermented foods by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2011, 30(12): 31-33(in Chinese).
- [8] 李风华,曹艳平,王锡宁. GC-MS 法测定酒中的氨基甲酸乙酯[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(6):1 240-1 241.
- LI Fenghua, CAO Yanping, WANG Xining. Determination of ethyl carbamate in liquor by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2009,

- 19(6): 1 240-1 241(in Chinese).
- [9] LECA J M, PEREIRA V, PEREIRA A C, et al. Rapid and sensitive methodology for determination of ethyl carbamate in fortified wines using microextraction by packed sorbent and gas chromatography with mass spectrometric detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, (811): 29-35.
- [10] 张燕, 丰帆, 姜小梅, 等. 顶空-固相微萃取/气相色谱-质谱法检测酱油中氨基甲酸乙酯含量[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(5): 114-119. ZHANG Yan, FENG Fan, JIANG Xiaomei, et al. The development of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography tandem mass spectrometry for the detection of ethyl carbamate in soy sauce [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(5): 114-119(in Chinese).
- [11] 陈达炜, 苗虹, 赵云峰. 分散固相萃取/气相色谱-质谱法测定酱油及食醋中氨基甲酸乙酯[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(1): 108-111. CHEN Dawei, MIAO Hong, ZHAO Yunfeng. Determination of ethyl carbamate in soy sauce and vinegar by dispersive solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2014, 33(1): 108-111(in Chinese).
- [12] 吕芬, 黄伟雄, 耿予欢, 等. 同位素稀释-GC/MS法快速检测黄酒中氨基甲酸乙酯[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(3): 579-581. LV Fen, HUANG Weixiong, GENG Yuhuan, et al. Rapid determination of ethyl carbamate in yellow wine by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2013, 23(3): 579-581(in Chinese).
- [13] 王丽娟, 柯润辉, 王冰, 等. 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 Lijuan, KE Runhui, WANG Bing, et al. Direct determination of ethyl carbamate in Chinese rice wine and grape wine by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2012, 30(9): 903-907(in Chinese).
- [14] 何碧英, 柳洁, 曾灼祥, 等. 氘代同位素内标 GC/MS法测定发酵食品中氨基甲酸乙酯[J]. *中国热带医学*, 2009, 9(11): 2 107-2 108. HE Biying, LIU Jie, ZENG Zhuoxiang, et al. Determination of ethyl carbamate in fermented foods using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *China Tropical Medicine*, 2009, 9(11): 2 107-2 108(in Chinese).