

应用UPLC-ESI-MS/MS分析黄酒和葡萄酒中氨基甲酸乙酯

王丽娟¹, 柯润辉^{1,2}, 王冰³, 尹建军^{1,2}, 宋全厚^{1,2}

(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)

摘要

建立了超高效液相色谱-电喷雾-质谱/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分析方法。样品稀释后可直接采用Waters[®] ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)分离, ACQUITY UPLC-ESI-MS/MS检测。方法检出限为1.7 μg/L。

前言

氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)是发酵食品在发酵和贮存过程中天然产生的化学污染物^[1]。早在1943年Nettleship就用实验证明了EC具有致癌作用^[2]。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^[3]。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氨基甲酸乙酯的测定方法^[4],但方法繁琐、费时,难以满足目前的快速准确分析检测需要^[5],探索快速、准确的分析方法就显得尤为重要。

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^[6]、气相色谱法^[7]、高效液相色谱-荧光检测器法(HPLC-FLD)^[8]、气相色谱-质谱法^[1, 9]、气相色谱-质谱/质谱法^[10]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。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UPLC-MS/MS测定EC含量的方法,查阅大量文献后,尚未见报道。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。

关键词

超高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱;
氨基甲酸乙酯; 黄酒; 葡萄酒

[应用纪要]

实验方法

主要材料与试剂

氨基甲酸乙酯 (EC)、氨基甲酸丁酯 (BC), (纯度99.9 %, 德国Dr. Ehrenstorfer公司); 甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯); 甲酸、乙酸、乙酸铵(纯度99.7 %); 实验用水为Milli-Q高纯水; 0.2 μm有机滤膜。黄酒与葡萄酒样品均采购与市场。

主要仪器

ACQUITY UltraPerformance LC[®]超高效液相色谱仪-ACQUITY[®] TQD电喷雾串联四极杆质谱仪; Milli-Q Reference超纯水发生器; 涡旋混合器。

色谱条件

液相系统: Waters ACQUITY UPLC[®]
色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BHC C₁₈ 色谱柱
(50mm × 2.1mm, 1.7 μm)
柱温: 40 °C
流动相:
A: 乙腈
B: 0.1% (v/v) 乙酸水溶液;
梯度洗脱
分析时间: 4 min
进样量: 10 μL
梯度方法见下表:

	时间/ (min)	流量/ (mL/min)	%A	%B	曲线
1		0.250	5.0	95.0	
2	1.0	0.250	10.0	90.0	6
3	2.5	0.250	85.0	15.0	6
4	2.8	0.250	5.0	95.0	6
5	4.0	0.250	5.0	95.0	6

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/hr; 锥孔气流速为50 L/hr; 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, 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和内标BC的质谱参数

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

前处理方法

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

结果与讨论

标准溶液的配制

EC和BC标准品，均用甲醇-水(1:9, v/v)溶液稀释配制成不同浓度的标样进行检测，可得到较好的色谱峰，且配制简单。

样品前处理条件优化

本方法采用稀释后直接进样检测，以避免复杂的前处理过程。选取某一黄酒分别稀释2-12倍进行检测，发现稀释7-9倍时，峰形和响应值达到最佳。同样方法确定葡萄酒的最佳稀释倍数为9-11倍。

流动相的优化

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，乙腈-乙酸铵，甲醇-甲酸水四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三种流动相。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0.1 %的乙酸比加入0.2 %的乙酸时的响应值要高。因此本文选择流动相A为乙腈，B为0.1 %乙酸水溶液。标准品的多反应监测（MRM）色谱图见图1，其保留时间见表1。

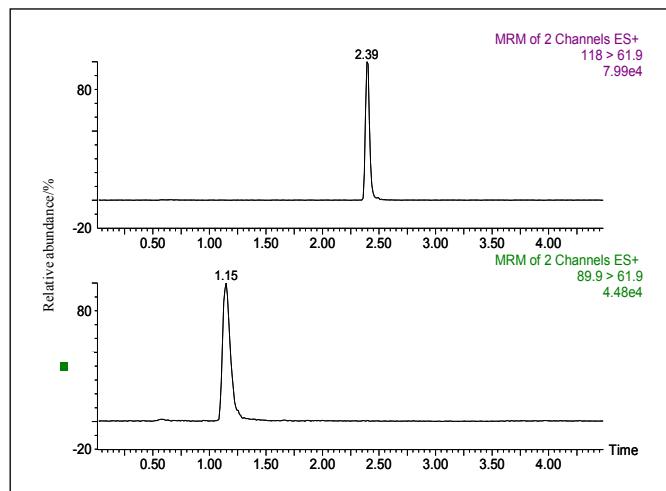


图1. EC (m/z 89.9>61.9) 和BC (m/z 118>61.9) 标准溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{L}$) 的提取离子色谱图

质谱条件的优化

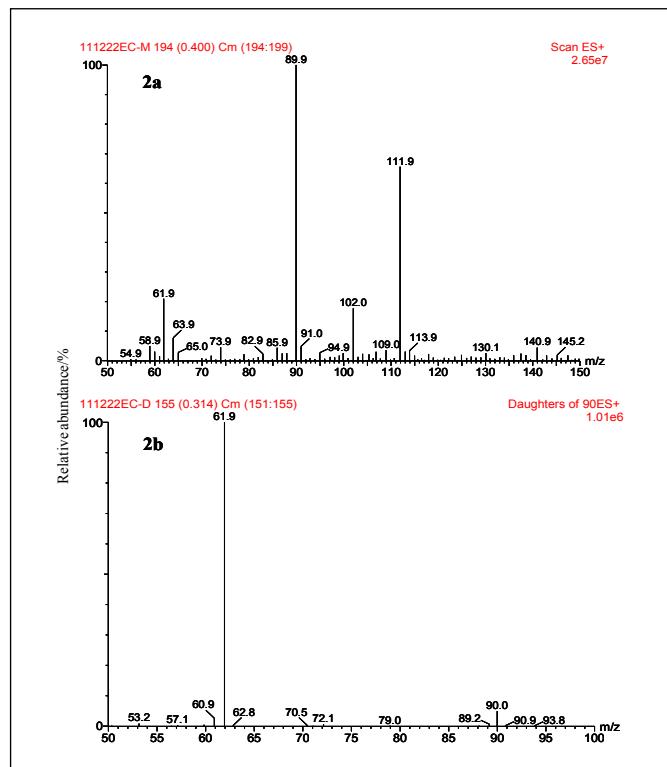


图2. EC的一级全扫描质谱图 (图2a) 和 m/z 61.9的子离子扫描质谱图 (图2b)

用流动注射的方式将目标标准溶液直接注入质谱仪，进行全扫描，得到一级质谱和准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (母离子)，再用惰性气体轰击该母离子，获得其二级质谱图及相应子离子。

利用MRM模式对选定的定量和定性碎片离子进行毛细管电压、碰撞能量、锥孔电压等质谱参数进行优化，使各监测离子丰度和信号达到最佳。EC一级全扫描质谱图 (图2a) 和子离子扫描质谱图 (图2b)。

[应用纪要]

线性范围、回收率、精密度、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 μg/L, BC含量为10 μg/L的标准工作液，按1.4所确定的色谱-质谱条件进行测定，记录标准工作溶液中EC和BC的响应值，算出两者的峰面积比，用最小二乘法进行回归分析，得到EC的线性回归方程和相关系数。以信噪比 (S/N) 3作为检出限 (LOD)，以信噪比 (S/N) 10作为定量限 (LOQ)，相关参数见表2。

表2. EC的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限

Compound	Linear range (μg/L)	Calibration curve	r ²	LOD (μg/L)	LOQ (μg/L)
EC	2-500	y=0.6695x-0.0933	0.9988	1.7	5

y: peak area ratio of the EC and internal standard;
x: concentration ratio of the EC and internal standard

空白黄酒和葡萄酒样品添加EC为10、20和100 μg/L三个浓度水平进行回收实验，按上述实验步骤进行处理和测定，重复6次，连续测定3天，计算日内相对标准偏差 (Intra-day RSD) 和日间相对标准偏差。方法回收率和相对标准差 (RSD) 结果见表3。

表3. 黄酒、葡萄酒中EC的添加回收率和相对标准偏差 (n=6)

Analyte	Spiked/ μg/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
Wine	10	96	3.2	0.8
	20	98	5.6	2.1
	100	92	1.8	4.2

实际样品的测定

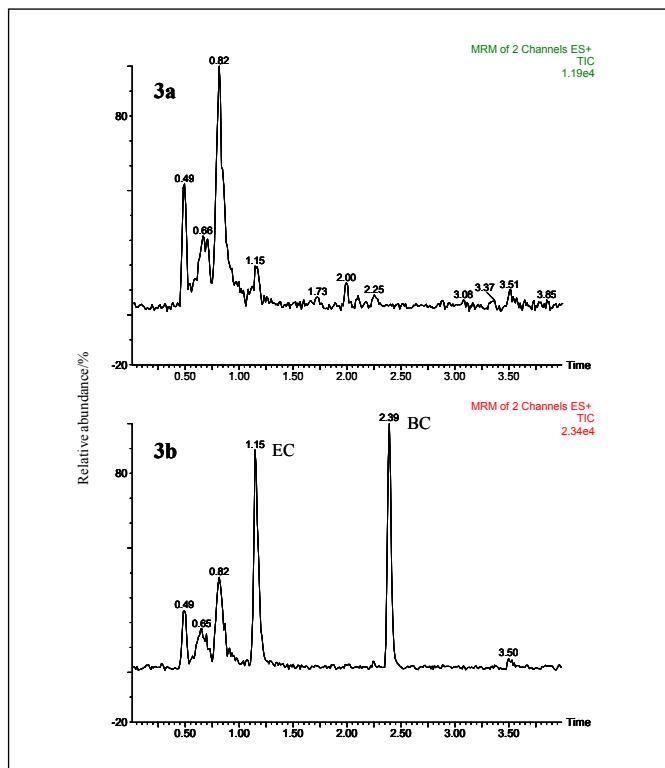


图3. (3a) 空白葡萄酒样品和 (3b) 加标样品 (含内标) (EC加标浓度10 μg/L) 中目标物与内标的总离子流图

按照本文建立的样品稀释后直接进样的检测方法，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，每个样品重复测定三次，具体结果见表4。除三种葡萄酒外，其他9种酒中均检出一定量的EC。图3给出了葡萄酒空白样品 (3a) 和其加标样品 (含内标) (3b) 的总离子流图。

表4. 实际样品中EC含量的检测结果 (n=3)

No.	Chinese Rice Wine		Wine
	Content (Mean ± SD, μg/L)	Content (Mean ± SD, μg/L)	Content (Mean ± SD, μg/L)
1	43.71 ± 0.34		2.42 ± 0.02
2	105.43 ± 0.84		13.41 ± 0.11
3	64.82 ± 0.52		—
4	68.88 ± 0.55		—
5	55.01 ± 0.44		6.90 ± 0.05
6	68.10 ± 0.54		—

— : The content is lower than LOQ.

[应用纪要]

结论

本文建立了超高效液相色谱—电喷雾串联四级杆质谱法直接测定黄酒、葡萄酒中EC的快速测定和确认方法。应用本方法可在10.0 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，不但可以避免传统方法中复杂的萃取、净化等前处理过程，并且黄酒和葡萄酒样品基质对目标物测定基本无干扰。方法操作简单、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 I. J Nat Cancer Inst, 1943, 4(3): 309
- [3] IARC (International Agency for Research on Cancer) 2007. International Agency for Research. Volume 96: Alcoholic Beverage Consumption and Ethyl Carbamate (Urethane) 6–13 February 2007 1-5. World Health Organization, Lyon, France. URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol96/mono96-7A.pdf>
- [4] SN 0285-1993
- [5] 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
- [6] Na X L, Chen J H, Dai H C. J Hygiene Research (纳新力, 陈介华, 代海香. 卫生研究), 1991, 20(6): 45
- [7] Uthurry C A, Varela F, Colomo B, et al. Food Chem, 2004, 88(1): 329
- [8] Madrera R R, Valles B S. Food Control, 2009, 20(2): 139
- [9] 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(11): 145
- [10] Lachenmeier D W, Frank W, Kuballa T. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2005, 19(2): 108



Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

©2013年沃特世公司。于中国印制
2013年9月

沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 6555
成都: 028 - 6554 5999
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com