酒中氨基甲酸乙酯及尿素的研究进展

许宏贤,段 钢
(杰能科(中国)生物工程有限公司,江苏 无锡 214028)

摘 要: 对酒中的氨基甲酸乙酯形成途径、限量标准和检测方法进行了简要概述,并介绍氨基甲酸乙酯重要前体物质尿素在酒中的来源和检测方法。指出这些方法在我国发酵食用酒精生产中有着重要的作用。

关键词: 氨基甲酸乙酯; 尿素; 酒; 酸性蛋白酶
中图分类号:TS262.2;TS261.7;TS262.3 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2012)06-0092-04

Research Progress in Ethyl Carbamate and Urea in Liquor

XU Hongxian and Duan Gang
(Genercor (China) Bio-product Co. Ltd, Wuxi, Jiangsu 214028, China)

Abstract: Ethyl carbamate (EC) is a well known genotoxic carcinogen which is widely contained in liquor. In this paper, the mechanisms of EC formation, its limit levels, and its analytical methods were reviewed. Urea, as the most important precursors for the formation of EC, its source in liquor and its measurement methods were also introduced. These methods played important roles in the fields of edible alcohol production.

Key words: ethyl Carbamate; urea; liquor; acid protease

氨基甲酸乙酯(又名尿烷、乌来坦、胺甲酸乙酯等),英文名:Ethyl carbamate,简称 EC,是由氨基甲酸形成的一种酯。其分子量 89.1,为无色无味晶体;沸点 182~184 ℃,熔点 48~50 ℃;相对密度 1.1,蒸汽压(25 ℃)48 Pa,相对蒸汽密度 3.07 (空气为 1),燃烧点 92 ℃。氨基甲酸乙酯是一种广泛存在于酒中的致癌物质且不易挥发,在水中的溶解度大约为 2 g/mL,在有机溶剂中溶解度稍低,蒸汽压较高。这些特征会使得在分析检测酒精饮料中的氨基甲酸乙酯含量时,若样品前处理不恰当会造成其损失。

氨基甲酸乙酯的主要商业用途是生产农药,特别是杀虫剂。尽管过去氨基甲酸乙酯曾经用于治疗慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤等[1],但现在氨基甲酸酯类化合物(苯基、甲基、丁基等)仅用于实验室的研究[2]。

人类对氨基甲酸乙酯的研究始于 20 世纪中期。EC 是烟草叶及香烟的天然成分,也是发酵食品(如面包、酸牛奶、乳酪等)和酒精饮料(如葡萄酒、中国黄酒和日本清酒等)的伴随产物[3]。早在 1943 年,Nettleship[4]等人的研究已经表明,氨基甲酸乙酯具有一定的致癌性。1971 年,Lofroth 和 Gcjva1 在发酵食品中发现了 EC,并测定了葡萄酒中 EC 含量[5];1976 年,Ough 发现在酒精饮料中含有 EC[6]。人体摄取 EC 主要是通过饮用酒精饮料。

1 酒中的氨基甲酸乙酯

1.1 对人体的危害与限量标准

Beland[7]等人在对许多物种包括各种鼠类和猴子的研究中发现 EC 具有遗传毒性和致癌性。另有研究表明,氨基甲酸乙酯在生物体内的代谢主要与细胞色素 P450 有关[8]。EC 几乎可被胃、肠和皮肤迅速地完全吸收[9],从而导致肺肿瘤、淋巴癌、肝癌、皮肤癌等。基于流行病学和试验数据,国际癌症研究机构和美国环保局将 EC 列为可能致癌物质 2B 类。2007 年 3 月,世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)将 EC 从可能致癌物质 2B 类提高为 2A 类[10],即对动物有致癌作用,对人类可能有致癌作用。

调查显示,如果人饮用氨基甲酸乙酯含量超过 30×10^{-6} g/L 的酒后患癌机率将大大增加。根据加利福尼亚环保机构的一项统计数据得知,假设每个人的患癌症的机率为 1×10^{-5},可推断氨基甲酸乙酯的摄入量大约为 0.7 μg/d[3]。可见氨基甲酸乙酯是危害人类健康的一个不可忽视的因素。考虑到人体摄取 EC 主要是通过饮用酒精饮料,一些国家对饮料酒中 EC 的含量设定了上限,具体见表 1。

自 2002 年以来,EC 已经成为世界卫生组织重点监控物质之一,但由于多方面因素的限制,到目前我国仍没有制定有关 EC 的限量标准,出现黄酒、葡萄酒、米酒、啤

收稿日期:2012-03-07
优先数字出版时间:2012-04-28;地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20120428.1127.001.html。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　部分国家饮料酒中 EC 上限标准　(μg/L)

国家	佐餐葡萄酒	强化葡萄酒	蒸馏酒	日本清酒	水果白兰地
加拿大	30	100	150	200	400
捷克	30	100	150	200	400
法国	nr	nr	150	nr	1000
德国	nr	nr	nr	nr	800
美国	15	60	nr	nr	nr
瑞士	nr	nr	nr	nr	1000

注:“nr”,目前为止没有规定。

酒、食用酒精中 EC 含量偏高的现象。李凤华[11]等人采用 GC-MS 测定市售的黄酒、白酒、葡萄酒(各 10 种)中氨基甲酸乙酯含量,结果显示,黄酒为 6.0～80.6 μg/kg,白酒为 6.4～107.7 μg/kg,葡萄酒为 10.7～32.9 μg/kg。随着人民生活水平的提高,酒类饮料已经成为人们的消费热点,如何降低发酵酒中 EC 含量也正逐渐受到研究人员的重视,制定我国的 EC 限量标准势在必行。

1.2　氨基甲酸乙酯在酒的形成机制

相关研究表明[3,5,10,12-20],酒中 EC 主要有 3 个产生途径:一是在酿造过程中形成的,主要通过与尿素有关的途径,即尿素在加热的情况下,与乙醇反应,生成 EC;二是由发酵过程中染菌所引起 EC 含量增加,清酒、黄酒、葡萄酒、啤酒等发酵酒中 EC 的形成绝大部分来源于这 2 种途径;酒中 EC 的另一个来源是在蒸馏过程或贮存中通过氰化物途径[20],即由氰氢酸与乙醇反应生成 EC。这一途径首先在威士忌酒生产过程中得以揭示。

1.2.1　由尿素和乙醇反应生成氨基甲酸乙酯

氨基甲酸乙酯最常见的形成方式,是在酸性条件下,由尿素和乙醇加热反应生成,其生产反应方程式如下:

$$NH_2CONH_2+C_2H_5OH=C_2H_5OCONH_2+NH_3$$

研究发现[16],影响 EC 生成量的因素除尿素和乙醇浓度外还有酵母种类、葡萄汁中 α-氨基酸态氮的含量、发酵及贮藏温度、pH 值等,其中反应温度对 EC 的形成速度影响最大,加热可以加快 EC 的形成。有研究表明,温度每升高 10 ℃,EC 的形成速度就增加约 1 倍。该机制是酒中 EC 形成的最主要途径。

1.2.2　染菌生成氨基甲酸乙酯

在酿酒后期,如果不慎染上杂菌(如乳酸菌)则精氨酸将通过精氨酸脱亚氨基酶(ADI)路径加速降解,从而生成瓜氨酸、鸟氨酸及氨甲酰磷酸等,其中的能量则耦合于细胞的生长及发酵(见图 1)。现今普遍认为,瓜氨酸是氨基甲酸乙酯形成的重要前体物质,在乳酸菌胞内精氨酸降解过程中,一部分瓜氨酸被分泌到胞外,从而扩散到培养基中,另一部分在胞内继续参加生化反应,Liu[21]等发现乳酸菌胞内精氨酸降解主要在 pH3.5～4。因此,这是黄酒染菌后氨基甲酸乙酯含量增加的主要原因之一。

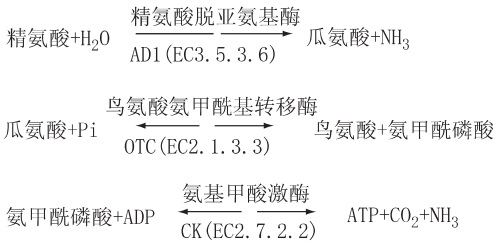

图 1　乳酸菌(LAB)胞内精氨酸降解及瓜氨酸的形成(AD1 途径)

1.2.3　由氰化物和乙醇反应形成氨基甲酸乙酯

大约有 2000 多种植物含有氰苷(cyanoglycosides),如木薯是世界上第三大食物来源,其含氰化合物含量就很高。有研究结果表明[22],氰苷在 β-葡聚糖酶的作用下水解,形成氰化物(cyanide,CN-),该化合物被氧化为氰酸盐(cyanate,NCO-),氰酸盐与乙醇反应生成 EC。氰化物氧化为氰酸盐由铜离子催化反应完成。反应式见图 2。

$$2Cu(Ⅱ)+4CN^- \rightarrow 2Cu(CN)_2$$
$$2Cu(CN)_2 \rightarrow 2CuCN+C_2N_2$$
$$C_2N_2+2OH^- \rightarrow NCO^-+CN^-+H_2O$$
$$NCO^-+C_2H_5OH+H^+ \rightarrow C_2H_5OCONH_2$$

图 2　氰化物和乙醇反应形成氨基甲酸乙酯

由于氨基甲酸乙酯的沸点高达 182～184 ℃,因此很少有液态 EC 在蒸馏过程中被蒸发到馏分中。相关研究估计[22-23],酒中约 80 %的 EC 是在蒸馏步骤或(和)蒸馏后 48 h 内形成的,故气态 EC 前体对 EC 的形成至关重要。蒸馏时液态酒精中的氢氰酸和氰酸盐是 EC 形成的前体,并且二者的沸点非常低(＜30 ℃),极易蒸发为气态,从而在气相或(和)气-固异相时形成 EC[10]。

1.3　氨基甲酸乙酯在酒中的检测方法

Weber 小结了 EC 在酒中的检测方法[10],见表 2。

2　酒中尿素

在酒中,尿素是氨基甲酸乙酯的重要前体物质。同时,在许多发酵食品如酸奶、奶酪、面包、大部分烘培食品、含酒精或不含酒精的饮料中都可以检测出尿素。

2.1　主要来源

2.1.1　由酿造原料带入

氮源是植物生长过程中不可或缺的营养因素,在原料生产过程中尿素已经成为一种普遍使用的氮源,尤其在葡萄酒生产过程中尤为如此。葡萄在生长及采摘过程中其表皮、枝叶都会残留尿素,在随后的压榨过程就会将其大量带入葡萄汁中,这是葡萄酒尿素的主要来源[24]。

酿造原料中尿素的水平与原料预处理紧密相关。研究表明,精制米中的尿素含量远低于原料米,随着精制水平的提高,尿素的含量逐渐降低。当使用流动水清洗大米

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 酒中 EC 的检测方法[10]

方 法	方法描述	分析产品	检测限(μg/L)	标准偏差(%)
GC-TSD 多维	液-液提取并浓缩	酒,米酒	1	2～3
GC/MS 多维	固相提取并浓缩	佐餐葡萄酒,清酒等	1	3
GC/MS	固相提取并浓缩	蒸馏酒,酱油,各种发酵的液体、固体食品	0～10	2～32
	直接进样	水果白兰地,糖蜜蒸馏酒	10～11	13～15
GC/PICI-MS/MS	提取并浓缩	面包	1.2	7
GC/MS/MS	顶空固相微萃取	水果酒	110	4
FTIR-PLS	快速检验无预处理	水果酒	半定量方法	
HPLC-FLD	筛选方法无需预处理	佐餐酒，蒸馏酒等	0.8～4	5～18

2 遍后,尿素含量也会降低 50 %,因此提高原料米的精制程度以及加大清洗力度都可以减少尿素含量[25]。

2.1.2 在发酵时作为氮源加入

在以谷物为原料的食用酒精的发酵过程中，由于原料中所含蛋白质不能被酵母直接利用，为达到提高发酵速率及酒精产量的目的，通常需要额外添加尿素或硫酸铵等无机氮源以补不足[26-27]。由于尿素的理论含氮量高达 46.67 %,故尽管相对其他无机氮源而言单价贵,但因为绝对加量少,性价比高,依然被绝大多数酒精厂采用。依据原料的不同，尿素的添加量在 400～800 mg/L。另外,在酿造高质量的白兰地原酒时,为了降低影响风味质量的杂醇油生成，也需添加一定量的尿素或硫酸铵等无机氮源[19]。

早在 1987 年,Ingledew[13]等人就以 19.4°Brix 的葡萄汁为原料,发酵 20 d,研究了不同氮源对 EC 形成的影响。尽管在发酵过程中所有氮源所形成的 EC 都小于 20 μg/L,但当 88 ℃加热 8 h 处理后,采用尿素为氮源的样品中 EC 含量高达 82700 μg/L,远远高于其他样品。其研究结果见表 3。

表 3 不同氮源对酵母生成 EC 的影响 (μg/L)

氮源	发酵 0 d	发酵结束	88 ℃加热 8 h
对照	<20	<20	<20
酪蛋白氨基酸	<20	<20	<20
磷酸氢二铵	<20	<20	<20
甘氨酸	<20	<20	<20
尿素	<20	<20	82700±3400
酵母抽提物	<20	<20	<20

我国新颁布的食品添加剂使用标准 GB2760—2011 中明确规定,尿素等 23 种物质缺乏食品添加剂工艺必要性,不得作为食品用加工助剂生产经营和使用。如拟将这些物质作为食品添加剂或食品用加工助剂的，应当依法提出食品添加剂新品种行政许可申请。可以预见,随着该规定的实施，在酿酒过程中人为添加尿素的行为将被禁止,这将在一定程度上减少 EC 的产生。

2.1.3 由酿造过程中酵母菌代谢产生

在酿造过程中除了原料、辅料和水中会带入部分尿素外,在发酵过程中由酵母菌代谢也会产生尿素。酵母菌在生长繁殖和进行酒精发酵时，合成的大量尿素除了满足自身菌体需要外,多余的则被分泌到体外,从而使酒醪中的尿素含量增加，酵母菌细胞内的精氨酸酶的活力也会随之提高,进一步加速了尿素的生成。黄酒中尿素主要由精氨酸经酵母菌细胞内精氨酸酶-尿酶途径分解而来。详见图 3、图 4[3]。

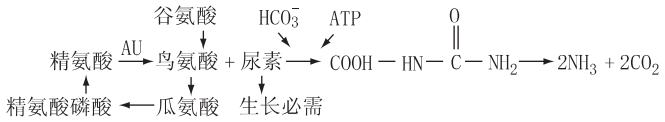

图 3 精氨酸降解及尿素的形成(AU 途径)

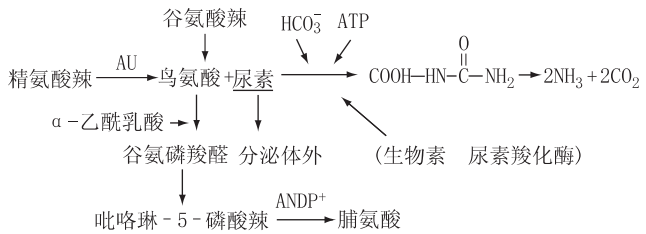

图 4 精氨酸降解时尿素的形成(AU 途径)

2.2 检测方法

尿素是 EC 形成的重要前体物质，所以发酵液的尿素含量必须受到严格控制。现代工业中要采取快速稳定的检测方法，王晓娟对在食品领域常用的尿素检测方法进行了总结,二乙酰肟法是我国国标中推荐的一种方法,在硫酸磷酸的酸性条件且 $FeCl_3$ 存在条件下，尿素与二乙酰肟和硫氨脲加热反应，产生红色化合物在一定的含量范围内,该反应符合朗-比尔定理;第二种常见的方法为脲酶-Berthlot 比色法。脲酶分解法分两步,第一步为生物学上的酶学反应,尿素在酶催化作用下生成氨气;第二步为经典的酚盐法反应，由于在酶法测定尿素时难以排除黄酒中内源性氨的影响，使得试验结果存在一定的不确定性[28]。

随着现代检测技术的发展，使用高效液相色谱检测尿素的研究也随之增多。尿素属于可溶性极性物质,可用 Alltech Econos-phere NH 柱,250 mm×4.6 mm×5 mm 作色谱柱进行分析。采用荧光检测法以 OPA(邻苯二甲醛)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作为柱前衍生剂，可以提高尿素检测的灵敏度，得到更为理想的检测限，满足尿素含量相对较低的葡萄酒的检测要求。

3　展望

以年销售收入500万元以上的企业计，不包括小企业和自产自用的酒精量，2010年我国发酵酒精产量825.93万kL[29]，食用酒精占酒精总产量的54 %左右[30]，但是到目前为止，对食用酒精、清液、DDGS等样品中EC含量的研究非常少，以淀粉质原料酿造食用酒精生产过程中不同氮源对酵母生成EC或EC在蒸馏、贮存过程中的研究尚未见报道。笔者认为，相对于其他氮源，酸性蛋白酶可以将淀粉质原料自身的蛋白质水解为酵母可利用的成分，从而改善体系的营养供应，并且当今酶制剂生产技术的进步使其大规模取代无机氮源成为可能，因此非常必要对食用酒精生产过程中，不同氮源对EC的形成进行研究。

参考文献：

[1] Holland, J.F., et al., A controlled trial of urethane treatment in multiple myeloma[J].American Society of Hematology,1966：328–342.

[2] Gotor, V., Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases[J].Elsevier.1999, 4：2189–2197.

[3] 夏艳秋,朱强,汪志君.谨防黄酒中氨基甲酸乙酯的危害[J].酿酒,2004,31(3)：51–53.

[4] Nettleship, A., P.S. Henshaw, H.L. Meyer.Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate (urethane)[M]. 1943：309–319.

[5] 陆健.酒精饮料中的氨基甲酸乙酯[J].江苏食品与发酵,1994(4)：27–29.

[6] Ough, C.S., Ethyl carbamate in fermented beverages and foods: Naturally occurring ethyl carbamate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1976,24：323–328.

[7] Beland FA, et al., Effect of ethanol on the tumoriginity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice[J]. Food Chem technol, 2005. 43：1–19.

[8] Benson, R.W. and F.A. Beland, Modulation of urethane (ethyl carbamate) carcinogenicity by ethyl alcohol. A review[J]. International Journal of Toxicology, 1997. 16(6)：521–544.

[9] Lepe, J.A.S. and C.A. Uthurry, Incidence of nitrogenous compounds of must on ethyl carbamate formation induced by lactic acid bacteria[J]. Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin, 2007, 41(4)：215–223.

[10] Weber, J.V. and V.I. Sharypov, Ethyl carbamate in foods and beverages: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2009,7(3)：233–247.

[11] 李凤华,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(6)：1240–1241.

[12] Baffa, J.C., et al., Ethyl-carbamate determination by gas chromatography-mass spectrometry at different stages of production of a traditional Brazilian spirit[J]. Food Chemistry，129(4)：1383–1387.

[13] Ingledew, W.M., C.A. Magnus, and J.R. Patterson, Yeast foods and ethyl carbamate formation in wine[M].Am Soc Enol Viticulture.1987：332–335.

[14] 赵光鳌,刘吉泉.酒中致癌物氨基甲酸乙酯的研究[J].食品与发酵工业,1988(6)：70–72.

[15] 袁身淑,等.饮料酒中氨基甲酸乙酯测定方法的研究[J].无锡轻工业学院学报,1991(3)：7–14.

[16] 高年发,宝菊花.氨基甲酸乙酯的研究进展[J].中国酿造,2006(9)：1–4.

[17] 宋钢.酒类的安全性调查–氨基甲酸乙酯的分析[J].中国酿造,2008(2)：99–102.

[18] 杨鲁强.酸性脲酶的制备、纯化及其性质研究[D].无锡：江南大学,2008.

[19] 吴世嘉,王洪新.发酵食品中氨基甲酸乙酯的研究进展[J].化学与生物工程,2009(9)：15–19.

[20] 范文来,徐岩.白酒功能因子与品质安全问题[J].酿酒科技，2012(3)：17–22.

[21] Liu, S.Q., C.R. Davis, and J.D. Brooks, Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine[J].Am Soc Enol Viticulture,1995：166–174.

[22] Bruno, S.N.F., et al..Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits[J].Elsevier,2007：1345–1352.

[23] Fox, N.J. and G.W. Stachowiak.Vegetable oil-based lubricants--A review of oxidation[J]. Elsevier,2007：1035–1046.

[24] Tegmo Larsson, I.M. and T. Henick-Kling.The effect of fermentation and extended lees contact on ethyl carbamate formation in New York wine[M].Am Soc Enol Viticulture,1990：269–272.

[25] Yoshizawa, K., K. Takahashi, K. Sato.Changes of urea content in rice and Sake moromi during Sake making process[J]. 1988：136–141.

[26] 许宏贤,段钢.酸性蛋白酶与无机氮源对酒精发酵和DDGS影响的比较[J].酿酒,2000(4)：35–38.

[27] 段钢.酸性蛋白酶在玉米酒精浓醪发酵上的应用[J].食品与发酵工业,2005(8)：34–38.

[28] 王晓娟.降低发酵酒中尿素含量的研究进展[J].酿酒科技，2009(2)：93–95.

[29] 王琦.2010年和2011年上半年酒精行业经济运行形势分析[C].中国酿酒工业协会酒精分会2011年年会,2011：1–17.

[30] 张国红.我国和世界酒精工业现状[J].酒精,2010(4)：1–9.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net