

同位素稀释 - GC/MS 法测定腐乳中氨基甲酸乙酯含量

王立媛 吴平谷 张晶 汤璠 赵永信

(浙江省疾病预防控制中心 杭州 310051)

[摘要] 目的: 建立了一种用于腐乳中氨基甲酸乙酯含量的同位素稀释 - 气相色谱 - 质谱联用检测方法。方法: 采用 D5 - 氨基甲酸乙酯同位素稀释技术, C18 和硅藻土固相萃取净化样品, 然后用 GC/MS 测定样品中氨基甲酸乙酯。结果: 该方法在腐乳中氨基甲酸乙酯的加标回收率在 89% ~ 99% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 小于 10%, 最低检测限达到 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论: 方法净化效果好, 检测灵敏度、准确度均满足检测要求, 可作为腐乳中氨基甲酸乙酯含量检测的确认方法。

[关键词] 气相色谱 - 质谱联用; 氨基甲酸乙酯; 腐乳

[中图分类号] O657.63

[文献标识码] A

[文章编号] 1004 - 8685(2011) 11 - 2631 - 02

Determination of ethyl carbamate in fermented bean curd by GC/MS with isotopic dilution

WANG Li - yuan, WU Ping - gu, ZHANG Jing, TANG Jun, ZHAO Yong - xin

(Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of ethyl carbamate in fermented bean curd by isotopic dilution - gas chromatograph - mass spectrometry (GC/MS). **Methods:** Ethyl carbamate was determined by gas chromatography - mass spectrometry in selection ion mode after the samples were spiked with D5 - ethyl carbamate and purified by C18 and diatomite solid phase extraction column. **Results:** The recovery rates were 89% ~ 99% and RSD < 10%, the limit of determination was 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate and could be used for determination of ethyl carbamate in fermented bean curd.

[Key words] GC/MS; Ethyl carbamate; Fermented bean curd

氨基甲酸乙酯 (Ethyl Carbamate, EC, 又叫 Urethane), 是一种具有遗传毒性及致癌性的物质, 存在于许多发酵食品 (如酱油、酵母、腐乳、奶酪等) 和酒精饮料 (如黄酒、白酒、葡萄酒等) 中^[1, 2]。当前对酒精饮料中的氨基甲酸乙酯研究已引起相关部门的重视, 国家也正在制定限制标准, 但对其他发酵类食品中的氨基甲酸乙酯含量监测报道不多。为确保我国生产的发酵食品的安全性, 进一步对氨基甲酸乙酯生成机制和防止、降低氨基甲酸乙酯的生成作深入研究, 迫切需要建立成熟的氨基甲酸乙酯检测方法。本研究采用固相萃取技术^[3, 4]对腐乳中的氨基甲酸乙酯进行富集净化, 气相色谱 - 质谱联用仪测定, 利用选择离子监测模式及内标法对其进行定性、定量, 并对市售的腐乳抽样进行了检测。

1 材料与方

1.1 仪器

6890GC - 5973MS 气相色谱质谱联用仪 (美国 Agilent 公司)、匀质机 (德国 IKA)、旋涡混合器 (上海精科)、超声波清洗器 (江苏昆山市超声仪器有限公司)、固相萃取仪 (美国 Waters 公司)。

1.2 试剂

氨基甲酸乙酯标准购自美国 sigma 公司, D5 - 氨基甲酸乙酯购自 Cerilliant Corporation; 甲醇、乙醇、乙醚、乙酸乙酯为色

谱纯、无水硫酸钠为分析纯; SLE 硅藻土固相萃取柱规格为 4000 mg/12 ml (杭州福裕科技服务有限公司)、C18 固相萃取柱规格为 500 mg/12 ml (杭州福裕科技服务有限公司)。

1.3 标准溶液

氨基甲酸乙酯标准储备溶液 (1.0 mg/ml) 的配制: 称取 10 mg 氨基甲酸乙酯标准品于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 再用甲醇稀释成浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准储备液, 存放在 4℃ 冰箱中备用。

D5 - 氨基甲酸乙酯标准储备溶液 (1.0 mg/ml) 的配制: 称取 10 mg D5 - 氨基甲酸乙酯标准品于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 存放在 4℃ 冰箱中备用, 标准使用液用甲醇稀释至 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

氨基甲酸乙酯标准使用液: 准确吸取 0.010 ml、0.025 ml、0.050 ml、0.10 ml、0.25 ml、0.50 ml 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 标准氨基甲酸乙酯储备液, 加 100 μl 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 D5 - 氨基甲酸乙酯溶液, 用甲醇定容至 1.00 ml, 得到 10.0 ng/ml、25.0 ng/ml、50.0 ng/ml、100.0 ng/ml、250.0 ng/ml、500 ng/ml 的标准使用液 (含 100.0 ng/ml D5 - 氨基甲酸乙酯)。

1.4 气相色谱条件

色谱柱: DB - INNOWAX 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)。进样口温度: 280℃; 柱温程序: 初温 60℃, 保持 3 min, 然后以 10℃/min 升至 200℃, 保持 2 min, 载气: 高纯氮气 (99.99%); 流速: 1.0 ml/min, 不分流进样。

1.5 质谱测定条件

EI 源: 源温 230℃; 电子能量 70 eV; 接口温度: 280℃; 电子

[作者简介] 王立媛 (1974 -), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事食品卫生检验工作。

倍增器电压: 1506 V; 质量扫描范围: 30 amu ~ 550 amu; 选择离子模式; 氨基甲酸乙酯选择监测离子 (m/z): 44、62、89; 定量离子 62。D5-氨基甲酸乙酯选择监测离子 (m/z) 44、64、76; 定量离子 64。溶剂延迟: 10 min。

1.6 样品处理

1.6.1 试样提取 将整瓶腐乳带汁倒入匀质机内, 均质 30 s 制成样品, 然后称取 2.0 g 样品于 10 ml 离心管中, 加 100 μ l 1.0 μ g/ml 的 D5-氨基甲酸乙酯溶液, 再加入 4 ml 20% 乙醇溶液, 旋涡混匀, 超声萃取 10 min, 8000 rpm 离心 10 min, 取上清液进行净化分析。

1.6.2 试样净化 将 1.6.1 上清液加到 C18 固相萃取小柱上, 收集流出液 2 ml 加到 SLE 硅藻土固相萃取柱上, 抽真空, 让试样慢慢渗入到固相萃取柱中, 静置约 10 min, 用 10 ml 5% 乙酸乙酯/乙醚 (V:V) 洗脱收集于具塞刻度试管中, 洗脱液经过预先用乙醚润湿的无水硫酸钠脱水, 洗脱液在 30 $^{\circ}$ C 下用氮气缓缓吹至近干, 用甲醇定容至 1.0 ml 制成测定液供 GC/MS 分析。标准使用液同步测定。

1.6.3 确证和结果计算 应确证要求, 如果样品峰与标准具有相同的保留时间, 扣除本底后, 该峰的质谱图中所有选定的监测离子出现, 所出现的选定监测离子间丰度与标准相同, 则样品中含有氨基甲酸乙酯。采用内标法定量。其标准色谱图、样品色谱图见图 1 ~ 图 2。

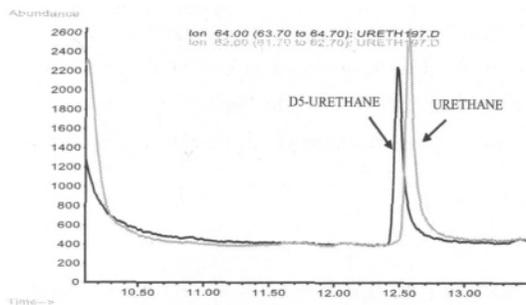


图 1 氨基甲酸乙酯和 D5-氨基甲酸乙酯标准总离子流图

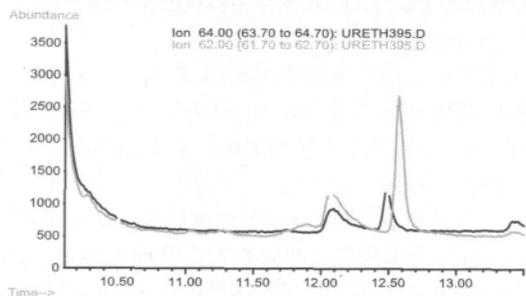


图 2 腐乳样品测试总离子流图

2 结果与分析

2.1 萃取溶剂的选择

分别以纯水、20% 乙醇水溶液、50% 乙醇水溶液、无水乙醇来提取腐乳, 通过加标回收试验, 得出 20% 乙醇水溶液回收率最高。

2.2 填料和洗脱剂的选择

先过 C18 固相萃取柱再用 SLE 硅藻土柱吸附, 以 5% 乙酸乙酯/乙醚为洗脱剂, 可以达到最佳吸附和洗脱效果, 使得洗脱剂的用量减少且降低了其他杂质; 因为腐乳样品含油脂, 尤其是南腐乳还有很深的色素, 用 C18 柱不但可以吸附色素, 也可以吸附脂肪等杂质; 用 5% 乙酸乙酯/乙醚为洗脱剂, 使洗脱

剂极性增强, 利于氨基甲酸乙酯的洗脱。

2.3 线性方程和检出限

取氨基甲酸乙酯标准使用液从低浓度到高浓度加入内标依次进样分析, 绘制标准曲线, 相关系数为 0.9994, 线性方程为 $Y = 0.0203x - 0.0478$ 。结果表明氨基甲酸乙酯在 10 μ g/L ~ 500 μ g/L 浓度范围内线性关系良好, 取样量为 2.0 g 时, 方法的检出限为 2.0 μ g/kg。

2.4 精密度与回收率

用标准加入法进行回收率试验, 对方法的准确度和精密度进行测试, 分别添加 20 g/kg 和 400 g/kg 两个浓度。取一份样品浓度低于 20.0 g/kg 作为对照, 按样品前处理方法进行加标处理, 每个浓度平行测定 8 次, 得出回收率为 89% ~ 99%, 方法精密度的为 2.3%。方法的精密度及回收率均符合分析要求。

2.5 实际样品测定

应用上述方法, 随机对市售的 20 种腐乳 (包括 10 种白腐乳、10 种南腐乳) 进行了氨基甲酸乙酯的含量测定, 样品均检出为阳性, 白腐乳中氨基甲酸乙酯的含量为 12.1 g/kg ~ 123.6 g/kg, 南腐乳中的含量为 87 g/kg ~ 278.6 g/kg。通过实验发现所检测的南腐乳中氨基甲酸乙酯含量相对高于白腐乳, 这可能和制作南腐乳过程中使用红曲有关。检测结果与 2009 年香港食品安全中心监测^[5]报道和石维妮等^[6]对腐乳中 EC 的检测结果相符。

2.6 实验过程中的注意点

样品过硅藻土柱时应充分吸附, 用 5% 乙酸乙酯/乙醚洗脱时注意流速, 过快洗脱会不完全, 无水硫酸钠脱水应完全, 否则难以吹干; 氮吹时注意温度、速度, 千万不能吹得很干, 因为氨基甲酸乙酯本身易挥发。

3 小结

通过对萃取溶剂、填料和洗脱剂的选择试验, 提出了适用于腐乳中氨基甲酸乙酯的检测方法, 本方法净化效果好, 操作简单, 灵敏度高, 采用固相萃取法提取样品也减少了试剂的使用量, 简单安全, 技术参数满足食品卫生理化检验要求, 为食品卫生监管提供了一种速度快、分析效果良好的检测技术支持。

[参考文献]

- [1] Jagerdeo E, Dugar S, Foster G, 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] Schmeltz I, Chiong KG, Hoffmann DJ. Formation and determination of ethyl carbamate in tobacco and tobacco smoke [J]. Anal Toxicol, 1978, 2(6): 265-268.
- [3] 吴平谷, 陈正冬. 固相萃取结合 GC/MS 法测定酒中氨基甲酸乙酯 [J]. 卫生研究, 2004, 33(5): 627-628.
- [4] 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, 19(6): 1240-1241.
- [5] 本地发酵食品含氨基甲酸乙酯的情况. 香港食品安全中心 2009.9 http://www.cfs.gov.hk/tc_chi/programme/programme_rafs/programme_rafs_fc_01_22.html.
- [6] 石维妮, 刘晓毅, 赵玉琪, 等. 发酵性食品中的氨基甲酸乙酯含量调研 [J]. 中国酿造, 2009, 212(11): 121-126.

(收稿日期: 2011-04-20)