

国家自然科学基金面上项目资助

河南省教育厅自然科学研究资助计划项目资助

# 中国葡萄酒中 氨基甲酸乙酯的研究

梁新红 孙俊良◎著



科学出版社

国家自然科学基金面上项目资助

河南省教育厅自然科学研究资助计划项目资助

# 中国葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究

梁新红 孙俊良 著

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

本书在有关氨基甲酸乙酯致癌理论的基础上,系统地阐述了 GC/MS 方法检测葡萄酒中氨基甲酸乙酯的四种前处理方法,用建立的方法对我国 60 余种葡萄酒样品进行氨基甲酸乙酯含量测定及数据分析,提出了我国葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量的限量指标建议值。同时本书对葡萄酒中形成氨基甲酸乙酯的前体物质精氨酸和瓜氨酸的检测方法进行了研究,并建立了简便、快捷、经济的精氨酸和瓜氨酸检测方法。作为一部酒品中氨基甲酸乙酯研究的学术论著,本书从理论及实践两方面为推动酒品的质量安全提供了新思路。

本书适合从事发酵食品及食品质量安全与检测的科研人员、生产人员及企业管理人员阅读,也可作为高等院校食品科学与工程专业教师、本专科学生及研究生的参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

中国葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究/梁新红,孙俊良著. —北京: 科学出版社, 2015. 7

ISBN 978-7-03-045014-2

I. ①梁… II. ①梁… ②孙… III. ①葡萄酒-氨基甲酸-乙酯-研究-中国 IV. ①TS262.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 130826 号

责任编辑: 贾 超 刘志巧 / 责任校对: 张小霞

责任印制: 徐晓晨 / 封面设计: 铭轩堂

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2015 年 7 月第 一 版 开本: 787×1000 B5

2015 年 7 月第一次印刷 印张: 7 3/8

字数: 140 000

POD 定价: 68.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

# 前 言

氨基甲酸乙酯早在 1943 年就被证实是一种致癌物质。对啮齿类动物,氨基甲酸乙酯是一种多位点致癌物,可导致肺癌、淋巴瘤、肝癌和皮肤癌等疾病。国际癌症研究所已将其认定为 2A 级致癌物。世界卫生组织提议规定酒类饮料中氨基甲酸乙酯的限量标准。FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会(JECFA)第 64 次会议建议,为了保障人类身体健康,应尽可能降低发酵饮料和食品中氨基甲酸乙酯的含量。

近年来,我国葡萄酒的产量和消费量都保持了强劲的增长势头。随着消费量的增加及葡萄酒进出口的需要,我国对葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究越来越重视。但目前,我国还没有对包括葡萄酒在内的发酵饮料和食品中氨基甲酸乙酯含量进行限定的标准和法规。随着我国人民生活水平和健康意识的不断提高,酒精饮料的消费量日趋上升,对各种酒品中氨基甲酸乙酯的研究将会越来越受到重视,制定酒精饮料中氨基甲酸乙酯限量标准势在必行。

本书为葡萄酒中氨基甲酸乙酯研究专著,系统地阐述了氨基甲酸乙酯检测前处理方法、氨基甲酸乙酯前体物质检测方法,并根据研究结果,制定了葡萄酒中氨基甲酸乙酯检测的标准以及我国葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量限量标准指标建议值。作者基于近 10 年来的研究与生产实践,结合国内外最新的研究成果,突出理论与生产实际相结合,努力体现研究的科学性与经济实用性,反映近年来酒精饮料中氨基甲酸乙酯研究的新成果。相信本书对推动降低我国酒精饮料中氨基甲酸乙酯含量具有一定的理论价值和应用价值。

本书由河南科技学院梁新红和孙俊良著。研究过程得到西北农林科技大学李华教授的指导。在出版过程中,得到了国家自然科学基金面上项目(31171641)和河南省教育厅自然科学研究资助计划项目(14A550010)资助,同时得到河南科技学院国际交流处赵瑞香教授的大力帮助和支持,在此一并表示衷心的感谢!

由于作者水平有限,书中难免有不足之处,恳请读者批评指正。

梁新红

2015 年 3 月

# 目 录

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 第一章 葡萄酒中氨基甲酸乙酯概述 .....                    | 1  |
| 第一节 酒精饮料中 EC 测定方法的研究进展 .....              | 1  |
| 第二节 EC 的致癌作用 .....                        | 13 |
| 第三节 葡萄酒中 EC 的形成 .....                     | 14 |
| 第四节 影响葡萄酒中 EC 含量的因素 .....                 | 23 |
| 第五节 降低葡萄酒中 EC 含量的措施 .....                 | 25 |
| 第六节 我国对酒精饮料中 EC 含量研究进展 .....              | 27 |
| 第七节 研究方法 .....                            | 27 |
| 第二章 LLE 结合 GC/MS 法测定葡萄酒中 EC 含量 .....      | 29 |
| 第一节 研究方法概述 .....                          | 29 |
| 第二节 校正标准曲线的绘制 .....                       | 31 |
| 第三节 KCl 用量对 EC 回收率的影响 .....               | 31 |
| 第四节 pH 对 EC 回收率的影响 .....                  | 32 |
| 第五节 二氯甲烷用量对 EC 回收率的影响 .....               | 33 |
| 第六节 葡萄酒样品中 EC 含量的萃取与测定 .....              | 34 |
| 第七节 研究小结 .....                            | 35 |
| 第三章 SPE 结合 GC/MS 法测定葡萄酒中 EC 含量的方法研究 ..... | 36 |
| 第一节 研究方法概述 .....                          | 36 |
| 第二节 pH 对萃取的影响 .....                       | 39 |
| 第三节 二氯甲烷用量对萃取的影响 .....                    | 40 |
| 第四节 校正标准曲线 .....                          | 40 |
| 第五节 葡萄酒中 EC 的萃取及测定 .....                  | 40 |
| 第六节 研究小结 .....                            | 41 |
| 第四章 SPME 结合 GC/MS 方法检测葡萄酒中 EC 的方法 .....   | 42 |
| 第一节 研究方法概述 .....                          | 42 |
| 第二节 萃取头的选择 .....                          | 45 |
| 第三节 溶液离子强度的影响 .....                       | 46 |

|     |                             |    |
|-----|-----------------------------|----|
| 第四节 | 解析时间的影响                     | 47 |
| 第五节 | 萃取温度、萃取时间和溶液 pH 等萃取参数优化     | 48 |
| 第六节 | 葡萄酒样品中 EC 含量的检测             | 52 |
| 第七节 | 研究小结                        | 52 |
| 第五章 | SLE 结合 GC/MS 法测定葡萄酒中 EC 含量  | 54 |
| 第一节 | 研究方法概述                      | 54 |
| 第二节 | pH 对萃取的影响                   | 56 |
| 第三节 | 二氯甲烷用量对萃取的影响                | 56 |
| 第四节 | 校正标准曲线                      | 57 |
| 第五节 | 葡萄酒中乙醇浓度对 EC 回收率的影响         | 57 |
| 第六节 | 葡萄酒中 EC 的萃取及测定              | 58 |
| 第七节 | 研究小结                        | 59 |
| 第六章 | EC 萃取方法的比较及中国葡萄酒中 EC 含量调查分析 | 60 |
| 第一节 | 四种萃取方法对葡萄酒样品中 EC 含量检测结果分析   | 60 |
| 第二节 | 中国葡萄酒中 EC 含量的调查             | 61 |
| 第三节 | 研究小结                        | 68 |
| 第七章 | 葡萄汁中 L-精氨酸含量检测              | 69 |
| 第一节 | 研究方法概述                      | 70 |
| 第二节 | 坂口反应工艺参数优化                  | 73 |
| 第三节 | 强阳性离子交换树脂分离提取精氨酸的工艺参数优化     | 76 |
| 第四节 | 葡萄汁中精氨酸含量的测定                | 79 |
| 第五节 | 验证性试验                       | 80 |
| 第六节 | 研究小结                        | 80 |
| 第八章 | 分光光度法测定葡萄酒中尿素含量             | 82 |
| 第一节 | 研究方法概述                      | 82 |
| 第二节 | 丁二酮单肟添加量对吸光度的影响             | 84 |
| 第三节 | 氨基硫脲添加量对吸光度的影响              | 85 |
| 第四节 | 丁二酮单肟和氨基硫脲添加量正交试验           | 85 |
| 第五节 | 沸水浴时间对反应液吸光度的影响             | 87 |
| 第六节 | 干扰物质对检测的影响                  | 87 |
| 第七节 | 葡萄酒中尿素含量的测定                 | 88 |

---

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| 第八节 方法的验证性试验 .....               | 89  |
| 第九节 研究小结 .....                   | 89  |
| 第九章 葡萄酒中氨基甲酸乙酯研究成果探讨 .....       | 90  |
| 第一节 葡萄酒中氨基甲酸乙酯影响因素探讨 .....       | 90  |
| 第二节 葡萄酒中氨基甲酸乙酯研究创新 .....         | 92  |
| 参考文献 .....                       | 94  |
| 附录 1 葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量检测标准方法 .....    | 105 |
| 附录 2 葡萄酒中氨基甲酸乙酯含量限量标准指标建议值 ..... | 109 |

# 第一章 葡萄酒中氨基甲酸乙酯概述

氨基甲酸乙酯 (ethyl carbamate, EC, 又叫 Urethane) 早在 1943 年就被证实是一种致癌物质<sup>[1-3]</sup>, 研究表明, 对啮齿类动物, EC 是一种多位点致癌物, 可导致肺癌、淋巴瘤、肝癌和皮肤癌等疾病, 并且乙醇对 EC 的致癌性有促进作用<sup>[4-7]</sup>。1971 年, Lofroth 和 Gejvall 在葡萄酒中发现了 EC。1976 年, Ough 在酸乳酪和葡萄酒中检测到了 EC<sup>[8-9]</sup>。此后, 在 20 世纪 70~80 年代, 世界各国研究学者又先后在蒸馏酒、白兰地、威士忌、酱油和面包等发酵饮料和食品中检测到了 EC。这些发现引起了各国政府对发酵食品中 EC 含量的重视, 世界卫生组织也提议规定酒类饮料中 EC 的限量标准。1985 年, 加拿大的卫生与预防部门 (Health Protection Branch of Canada) 对酒精饮料中 EC 含量规定了强制性限量标准: 佐餐葡萄酒 30  $\mu\text{g/L}$ , 加强葡萄酒 100  $\mu\text{g/L}$ , 蒸馏酒 150  $\mu\text{g/L}$ , 烈性酒和水果白兰地 400  $\mu\text{g/L}$ , 日本清酒 100  $\mu\text{g/L}$ <sup>[1]</sup>。随后, 1988 年, 美国食品和药品管理局 (US FDA)、美国葡萄酒研究所和美国酒商协会制定了有关葡萄酒中 EC 含量的非强制性标准: 1988 年以后生产的佐餐葡萄酒 (酒精度 $\leq 14\%$ , 体积分数) EC 含量不能超过 15  $\mu\text{g/L}$ , 1989 年以后生产的甜葡萄酒 (酒精度 $\geq 14\%$ , 体积分数) EC 含量不能超过 60  $\mu\text{g/L}$ <sup>[10]</sup>。FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 第 64 次会议建议, 为了保障人类身体健康, 应尽可能降低发酵饮料和食品中 EC 含量。

## 第一节 酒精饮料中 EC 测定方法的研究进展

为了降低酒精饮料中 EC 的含量, 大多数国家都采取了相应措施, 其中简便、快捷、准确的 EC 含量的检测方法是其中最重要的内容之一。下面对国内外 EC 的检测方法研究进展进行概述。

### 一、EC 的物理化学性质

EC 的分子式为  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ , 相对分子质量为 89.1, 为无色、无味的白色粉末状晶体, 其主要的物理化学性质见表 1-1<sup>[2, 11]</sup>。

表 1-1 EC 的物理化学性质

| 项 目          | 数 据                |
|--------------|--------------------|
| 沸点/℃         | 182~184 (760mm Hg) |
| 熔点/℃         | 48~50              |
| 相对密度         | 1.1                |
| 蒸气压/Pa (25℃) | 48                 |
| 相对蒸气密度       | 3.07 (空气为 1)       |
| 燃烧点/℃        | 92                 |
| 表观状态         | 无色无味晶体             |

EC 不易挥发，在水中的溶解度大约为 2 g/mL<sup>[2]</sup>，在有机溶剂中溶解度稍低，蒸气压较高。由于这些特征，在分析检测酒精饮料中痕量 EC 时，样品前处理过程会造成 EC 的损失。

EC 是以 98% $\text{H}_2\text{SO}_4$  作催化剂，用无水乙醇将尿素直接进行醇解得到的产物<sup>[12]</sup>。EC 在化学反应中既表现羧酸酯的性质，又能表现氨基化合物的性质，反应产物为一些酯类、氨基化合物、烯醇和氰酸盐。在密封容器中，150℃条件下，EC 和氨反应生成尿素。EC 和亚硫酸二氯反应，生成脲基甲酸盐。

二、EC 检测方法

从 20 世纪 70 年代在发酵食品和饮料中发现 EC 以来，许多文献报道了酒精饮料中 EC 的检测方法。表 1-2<sup>[13-30, 10]</sup>中列举了 1986 年以来报道的酒精饮料中 EC 检测的主要方法。从表中可以看出，样品前处理方法及检测方法都在不断改进。萃取方法从液/液萃取发展至固相萃取柱乃至方便简单的固相微萃取；从 1986 年后，EC 的气相检测开始以毛细管柱代替填充柱，EC 的检测器也从气相检测器发展至高灵敏度的 GC/MS 乃至灵敏度及精密度更高的 GC/MS/MS。然而，随着人们对发酵酒精饮料中 EC 含量的进一步重视，新的检测方法也在不断出现。Melo Abreu 等<sup>[31]</sup>第一次报道了用 HPLC-FLD 检测酒精饮料中 EC 的方法的可行性，但方法的准确度和精确度较低，特别是干红、干白葡萄酒中 EC 检测精确度的相对标准偏差在 10.9%~74.6%，因此这种检测方法并没有得到推广。随后，Park 等<sup>[32]</sup>报道了采用 HPLC/MS/MS 方法检测酱油中 EC，精确度的相对标准偏差在 1.1%~2.2%，但此方法所需设备仪器昂贵。Lachenmeier<sup>[33]</sup>报道了用傅里叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared, FTIR) 对核果酒精饮料中的 EC 含量进行快速检测的方法，但报道的方法仅适合于定性及半定量检测。很显然，随着研究的深入，FTIR 方法的灵敏度和精密度进一步提高，必将是 EC 检测快速、方便的一种检测方法，但目前，这种快速检测方法不能满足酒精饮料中 EC 限量标准的测定要求。总之，从以上分析及表 1-2 可以得知，20 世纪 90 年代以后，EC 的检测主要用的

是 GC/MS 法，那么样品的前处理方法在检测中起着至关重要的作用。

表 1-2 酒精饮料中 EC 检测方法列举

| 样品预处理方法 |                  | 检测器（参考文献） |     |      |     |      |                 |
|---------|------------------|-----------|-----|------|-----|------|-----------------|
|         |                  | FID       | NPD | Hall | TEA | TSD  | MS              |
| 直接进样    | 衍生化处理            | [19]      |     |      |     |      | [11], [16]      |
|         | 多维色谱技术           | [1]       | [2] |      |     |      |                 |
| 液/液萃取   | 加盐 (KCl, NaCl)   |           |     |      |     |      | [5], [14],      |
|         | 用有机溶剂萃取          |           | [7] |      |     | [15] | [10], [6], [1]  |
| 固/液萃取   | 硅藻土作吸附剂          |           |     |      |     |      |                 |
|         | 用二氯甲烷萃取          |           |     |      |     |      | [17]            |
| 固相萃取柱   | 硅藻土固相萃取柱 ENV     |           |     |      |     |      | [8], [4], [12], |
|         | + 固相萃取柱 Extrelut |           |     | [9]  | [9] |      | [18]            |
| 固相微萃取   | 非溶剂萃取            |           |     |      |     |      | [3], [20] [13]  |

注：FID—火焰离子化检测器；NPD—氮磷检测器；Hall—电导检测器；TEA—热能分析仪；TSD—热离子灵敏检测器；MS—质谱检测器，包括 EI-MS 和 CI-MS；MS/MS—串联质谱检测器

### 三、样品前处理

#### （一）萃取溶剂

随着环保意识的增强，人们发现化学分析本身也是一种污染排放源。传统的样品处理技术，如液/液萃取等需用数量可观的有机溶剂，其中许多有机溶剂毒性很强，既危害环境又危害人体健康。因此，选择毒性低、用量少的萃取方法尤其重要。可用于萃取酒精饮料中 EC 的有机溶剂很多，如 Woo 等<sup>[34]</sup>用液/液萃取法，对韩国传统米酒中 EC 进行萃取，结果表明，以三氯甲烷为萃取溶剂 EC 的回收率比较高；Fauhl 和 Wittkowski<sup>[21]</sup>以及吴平谷和陈正冬<sup>[16]</sup>等用二乙醚萃取葡萄酒中 EC；Jagerdeo 等<sup>[23]</sup>以乙酸乙酯萃取酒精饮料中 EC；国际葡萄与葡萄酒组织（Organisation Internationale de la Vigne et du vin, OIV）（Resolution Oeno 8/98）方法采用二氯甲烷作为萃取溶剂等。下面对文献报道的萃取酒精饮料中 EC 的有机溶剂进行分析。

三氯甲烷对人具有麻醉作用，主要作用于中枢神经系统，对心脏、肝脏、肾脏有损害，吸入或经皮肤吸收会引起急性中毒。三氯甲烷对环境也有危害，在地下水中有蓄积作用。其污染行为主要体现在空气和水中，对食品及蔬菜也能造成污染，并且在水环境中很难被生物降解。三氯甲烷的熔点为 $-63.5^{\circ}\text{C}$ ，沸点为 $61.2^{\circ}\text{C}$ ，不溶于水，溶于醇、醚、苯。

二乙醚或称乙醚，是非常好的有机溶剂。但乙醚及其蒸气均极易燃烧，在强烈日光照射下，能使容器急速膨胀而导致爆炸，燃烧时所产生的毒气可使人昏迷，甚至致死。闪点为 $40^{\circ}\text{C}$ ，沸点为 $34.6^{\circ}\text{C}$ ，微溶于水，能溶于乙醇、苯、氯仿等有

机溶剂。

乙酸乙酯对环境有危害且易燃易爆，具刺激性和致敏性。其熔点为 $-83.6^{\circ}\text{C}$ ，沸点为 $77.2^{\circ}\text{C}$ 。

二氯甲烷具有溶解能力强和毒性低的优点，相对密度为 1.326，熔点为 $-96.7^{\circ}\text{C}$ ，沸点为 $40.4^{\circ}\text{C}$ 。

由以上分析可知，三氯甲烷和乙酸乙酯的沸点均较高，不利于洗脱液的浓缩，并且其对环境 and 人体具有危害性，不适合作为萃取溶剂。乙醚的沸点低于二氯甲烷，但因其毒性大且易燃易爆，也不适合作为萃取剂。因此，萃取葡萄酒中 EC 的合适的萃取剂为二氯甲烷。

## (二) 萃取方法

色谱样品的前处理过程是一个耗时、烦琐且容易引入分析测定误差的过程，样品制备方法的恰当与否直接关系到 GC 分析的成本、速度和实用性。葡萄酒中含有微量的 EC，酒样的前处理关系到 EC 检测的成功与否。近年来，用于食品和饮料中痕量成分分析的方法主要有液/液萃取、固相萃取、固相微萃取和固/液萃取等<sup>[35-37]</sup>。

### 1. 液/液萃取 (liquid/liquid extraction, LLE)

LLE 是一种传统的样品预处理技术，直至目前仍是最常用的样品前处理方法。它是利用待测组分与样品中的杂质在互不相溶的两种溶剂中的分配系数不同而实现样品的纯化。这种萃取方法操作简单，无需特殊的设备，但也存在一些难以克服的缺点：操作烦琐、费时长，且重复性差；产生乳化作用，使分析结果偏低；萃取剂消耗量大，这些有毒的有机溶剂不利于分析人员的身体健康，在萃取过程中以及之后的溶剂回收过程中会伴有严重的污染问题等。

### 2. 固相萃取 (solid phase extraction, SPE)

SPE 技术是基于液相色谱理论的一种分离纯化方法。SPE 柱的广泛应用起始于 1975 年美国 Waters 公司首次将 Sep-Pak 投放市场，用以浓缩被测组分或除去有害物质。1978 年出现一次性 SPE 商品柱<sup>[38-40]</sup>，自此以后，SPE 技术在葡萄酒成分检测等诸多领域得到了长足的发展。

(1) SPE 技术原理。吸附剂将液体样品中的目标化合物吸附，与样品的基质和干扰化合物分离，然后再用洗脱液洗脱，达到分离或者富集痕量目标化合物的目的。SPE 的主要分离模式可分为正相、反相、离子交换和吸附，其作用机理包括氢键、偶极作用、疏水性、相互作用和静电引力等<sup>[41]</sup>。

在建立 SPE 方法之前,首先要了解试样预处理所要达到的目的及分析试样的性质及其他有关信息。对于待测组分,需要了解试样基质和分析物的性质,如分子结构、 $pK_a$ 、极性、官能团、样品的溶解性和稳定性及溶液的酸碱性质;试样中分析物的浓度或浓度范围;以及试样溶剂的性质,即试样中存在哪些对分析方法有干扰的物质<sup>[42]</sup>。

(2) SPE 柱的填料类型。按照填料吸附剂的不同, SPE 可分为正相、反相和离子交换固相萃取<sup>[43,44]</sup>。

正相吸附剂有:硅酸镁、氨基、氰基、双醇基键和硅胶及氧化铝等。正相萃取过程中目标物质的极性官能团与吸附表面的极性官能团发生极性作用(包括氢键作用、偶极矩作用及诱导作用等)而保留溶于非极性介质的极性化合物。由于其特殊的作用机理,在化学分析中常用于与其他类型的吸附柱连用,吸附去除干扰物,实现样品纯化。

反相吸附剂主要有键合硅胶  $C_{18}$ 、 $C_8$ , 石墨碳、多孔苯乙烯-二乙烯基苯共聚物等。此类吸附剂主要通过目标物的碳氢键同硅胶表面的官能团产生非极性的范德华力或色散力来保留目标物。这类 SPE 小柱较适用于水样中的非极性到中等极性的有机物的富集和纯化。其中最常用的是键合硅胶  $C_{18}$ 、 $C_8$  小柱。

离子交换吸附剂主要包括强阳离子和强阴离子交换树脂。离子交换填料有:季胺基、氨基、二胺基、苯磺酸基、羧基等。适用于阴阳离子型有机物,如苯酚、次氨基三乙酸、苯胺和极性衍生物、邻苯二甲酸酯类。

(3) SPE 柱的优点。与传统的 LLE 样品前处理方法相比, SPE 方法具有如下优点<sup>[35,45]</sup>:速度较快,缩短了预处理时间;采用高效、高选择性的吸附剂,大大减少有机溶剂的用量,降低了实验成本,又减少了对环境的污染;不出现乳化现象,更有效地将分析物与干扰组分分离,易获得较为纯净的分析物,分析物的回收率大大增高;分析物的精密度和准确度大大提高;操作简单,容易实现自动化。

由于葡萄酒成分复杂多样,葡萄酒中香气成分、多酚类物质及其他成分的检测过程中,样品的前处理成为一个难点和热点,固相萃取技术的迅速发展为葡萄酒成分的检测提供了样品前处理的技术基础。

### 3. 固相微萃取(solid phase microextraction, SPME)

SPME 是 1990 年年初由加拿大 Waterloo 大学 Pawliszyn 等在 SPE 基础上发展起来的样品预处理技术,属于非溶剂型选择性萃取法。其操作原理与 SPE 近似,但是操作方法迥然不同。SPME 以熔融石英光导纤维或其他材料为基体支持物,采取“相似相溶”的特点,在其表面涂渍不同性质的高分子固定相薄层,通过直接或顶空方式,对待测物进行提取、富集、进样和解析<sup>[46]</sup>。SPME 有两种萃取方式,一种是将萃取纤维直接暴露在样品中的直接萃取法,适于分析气体样品和洁

净水样中的有机化合物。另一种是将纤维暴露于样品顶空中的顶空萃取法, 广泛适用于废水、油脂、高分子量腐殖酸及固体样品中挥发、半挥发性的有机化合物的分析<sup>[47,48]</sup>。EC 是半挥发性有机化合物, 文献报道的 SPME 方法一般采用顶空萃取法<sup>[15,24,30]</sup>。

固相微萃取基本原理<sup>[49-51]</sup>和萃取机制为待测物在介质相和 / 或顶空相以及萃取纤维相的分配平衡过程, 在一定条件下达动态平衡时, 涂层吸附的待测物的量与样品中的浓度成正比, 在固相微萃取操作过程中, 样品中待测物的浓度或顶空中待测物浓度与涂布在熔融硅纤维上的聚合物中吸附的待测物浓度间建立了平衡, 吸附动力学用数学式表达为

$$n = K_{fs} V_1 C_0 V_s / (K_{fs} V_1 + V_s) \quad (1-1)$$

式中,  $n$  为待测物质被涂层吸附的量;  $K_{fs}$  为待测物质在涂层和样品基质中的分配系数;  $V_s$  为样品的体积;  $V_1$  为涂层的体积;  $C_0$  为样品中待测物质的初始浓度。

由于相对  $V_1$  而言  $V_s$  很大 ( $V_s \gg K_{fs} V_1$ ), 那么可近似地认为, 涂层萃取的待测物质的量与样品的体积无关, 而与样品中待测物质的初始浓度成正比:

$$n = K_{fs} V_1 C_0 \quad (1-2)$$

对于某一 SPME 装置,  $K_{fs} V_1$  为一常数, 设  $K_{fs} V_1 = K$ , 则

$$n = K C_0 \quad (1-3)$$

式 (1-3) 即固相微萃取的定量关系式, 以此作为定量分析的依据。

影响固相微萃取的因素<sup>[49-53]</sup>如下。

### 1) 萃取纤维涂层

根据 SPME 技术的原理及萃取过程, 可知萃取纤维涂层是影响 SPME 萃取选择性及灵敏度的重要部分。通过改变萃取纤维涂层的性质及长度和厚度, 可以改变对不同待测化合物的选择特性和吸附量, 即相应的萃取灵敏度。一般而言, 选择与目标化合物性质相近的萃取涂层, 可以提高萃取选择性。例如, 选用非极性的萃取涂层 PDMS, 对甲醇、乙醇、丙醇等极性化合物的萃取量很低, 而对乙酸乙酯等极性较弱的化合物有非常明显的吸附增量; 又如, 选用极性较强的 PA 萃取涂层, 比非极性的 PDMS 涂层对待测物质 (相对极性较强) 的吸附有明显增加; 选用部分交联和复合键合相的萃取涂层增加对待测物质的选择性, 同时吸附量大幅度增加, 如 CAR/PDMS 型的萃取纤维涂层对提取和富集表中化合物的选择性和灵敏度最佳。另外, 增加涂层厚度和长度可以提高萃取的吸附量即灵敏度。一般而言, 增加萃取纤维涂层的厚度有助于待测物质萃取回收率的提高, 但是相应的萃取时间会增加。具体来说, 高分子固定相涂层对有机物的萃取和富集是一种动态平衡过程, 涂层要对有机分子有较强的选择性, 即需要较大的固/气和固/液分配系数; 其次还需要有合适的分子结构, 保证待测物质在涂层中有较快的扩散速度。如果达到分配平衡的速度较快, 并且能在 GC 的进样口迅速热解析, 就不会造成

色谱峰展宽。另外,涂层材料应具有良好的热稳定性及涂渍性能,在光滑的石英纤维表面上保持均匀的涂层厚度及重复性是该技术的关键所在。

## 2) 萃取温度与时间

SPME 提取和富集样品是一个动态平衡的过程,萃取效率与待测物质在各相之间的分配系数有关。分配系数是热力学常数,温度是直接影响分配系数的重要参数。升高温度会促进挥发性化合物到达顶空及萃取纤维表面,然而 SPME 表面吸附过程一般为放热反应,低温适合于反应进行。综合考虑参数条件,应使萃取介质温度较高,而萃取纤维表面保持低温。另外还要考虑不同性质化合物的适宜萃取温度条件。

一般的测试系统均为多组分、多相的混合体系,因而存在萃取吸附竞争。不同的待测物达到动态平衡的时间长短,取决于物质的传递速率和待测物本身的性质、萃取纤维的种类等因素。挥发性强的化合物在较短时间内即可达到分配平衡,而挥发性弱的待测物质则需要相对较长的平衡时间。

## 3) 其他因素

除萃取纤维固定相、萃取温度和时间等参数外,离子强度、pH、搅拌效率、样品体积、顶空体积、进样方式、纤维位置、解析温度和时间等,都会对萃取效率产生影响。

SPME 的优点为:完全消除了有机溶剂,使萃取、预富集、进样一次完成,减少了分析时间,且可以自动进样;SPME 适用于多种样品,在分析挥发性与半挥发性有机物上更能显示出其优越性;近年来,SPME 和气相色谱联用,与高灵敏度的检测器如质谱、电子捕获检测器、原子发射光谱检测器结合,可使分析的检出限达到 $\mu\text{g/L} \sim \text{ng/L}$ 量级;与高效液相色谱和毛细管电泳结合也有一定进展<sup>[54]</sup>。

## 4. 固/液萃取 (solid/liquid extraction, SLE)

SLE 法是用硅藻土和待测样品混合均匀,装入色谱玻璃层析柱,然后用萃取溶剂洗脱的萃取方法。Matsudo 等<sup>[28]</sup>使用的 SLE 方法是最早的萃取酱油中 EC 的前处理方法。操作技术要点为:将含有被分析物的液相倒入盛有适当吸附剂的器皿中,振摇一定时间,使被分析物在两相间分配达平衡。如果吸附剂有效,则大部分被分析物被吸附于固相,然后再用适当的溶剂使之解吸附即可。

SLE 方法具有 SPE 方法的部分优点,如速度较快,缩短样品预处理时间;选用高效、高选择性的吸附剂,大大减少有机溶剂的用量,降低实验成本,又减少了对环境的污染;不出现乳化现象;分析物的精密度和准确度有一定提高等。

随着硅藻土质量的提高,检测器灵敏度的提高,SLE 也日益显示出其成本低、萃取溶剂使用量少的优点。

### 5. 多维气相色谱法 (multidimensional gas chromatography, MDGC)

MDGC 是指使用两根以上的色谱柱或两个以上的检测器,通过阀切换或改变各柱前压力来改变载气流向的办法,得到比单柱系统更多的分离信息的手段。可以采用直通式、切割式、反吹式、中心切割式四种操作方式,中心切割是多维气相色谱中应用最广的一种操作方式。同时根据改变载气流向的方式又可分为有阀切换多维色谱和无阀切换多维色谱<sup>[55]</sup>。相比较而言,有阀切换技术具有易于掌握和使用的优点。MacNamara<sup>[27]</sup>、马娅萍等<sup>[14]</sup>报道了采用多维色谱直接进样的检测方法。因酒精饮料中含有大量乙醇,分析酒精饮料中 EC 含量时直接进样有其局限性。Ma 等<sup>[26]</sup>、马娅萍等<sup>[13]</sup>和 Jagerdeo 等<sup>[23]</sup>先后报道了先将酒样经萃取预处理,然后用 MDGC 检测酒精饮料中的 EC 含量的方法,检测的灵敏度均较高。MDGC 在提高检测的灵敏度和精密度方面有其优越性,但多维气相色谱仪器价格昂贵,在检测酒精饮料中 EC 含量方面并没有推广开来。

### 四、EC 检测方法的回收率、检出限和内标

一般情况下,EC 的回收率和样品中 EC 的浓度、酒精饮料的类型以及所用的样品处理和检测方法有关。外标法的回收率较低,一般在 60%~80%。内标法的回收率较高,欧洲委员会和 OIV 规定酒精饮料中 EC 的测定采用内标法,回收率要求在 90%~110%。所有报道的酒精饮料中 EC 检测的检出限为 1~100 $\mu\text{g/L}$ 。

有文献报道的 EC 检测中使用的内标有氨基甲酸甲酯<sup>[22]</sup>、氨基甲酸丙酯<sup>[10]</sup>、氘代氨基甲酸乙酯<sup>[56]</sup>等,也有采用氨基甲酸丁酯、氨基甲酸叔丁酯作为内标的报道<sup>[2,57]</sup>。欧洲委员会和 OIV 建议采用氨基甲酸丙酯作为检测 EC 的内标。

### 五、合作研究

有两篇文献报道了酒精饮料中 EC 检测的合作研究。Canas 等<sup>[10]</sup>报道了来自于美国、日本、英国、荷兰、瑞士和法国的 17 个实验室的酒精饮料中 EC 检测的合作研究。这项合作研究是根据 AOAC 制定的合作研究程序指南而设计的。合作研究采用的 EC 分析方法为:①一次性硅藻土萃取柱,以二氯甲烷作为萃取剂;②GC/MS 方法,选择性离子控制模式(selected ion monitoring, SIM)检测;③以氨基甲酸丙酯(n-propyl carbamate, nPC)作为内标。合作研究实验室对蒸馏酒、加强葡萄酒和佐餐葡萄酒的 6 种酒样进行了检测,回收率在 87%~93%。Melo Abreu 等<sup>[31]</sup>报道了把 HPLC/FLD 和 GC/MS 方法进行比较的国际合作研究,其目的是强调 HPLC/FLD 方法用于 EC 检测的可能性。合作研究是确定一种准确、可靠及可行的标准检测方法的途径,但适合当地实验室及分析条件的可行的、准确度和精密度高的检测方法研究更为重要。

## 六、质谱检测器

由表 1-2 可以看出,自 1986 年以来,用于 EC 检测的检测器普遍使用质谱的 SIM 方法。在 EC 的总离子扫描质谱中,特征离子为  $m/z$  62、 $m/z$  74 和  $m/z$  89 (图 1-1)。 $m/z$  89 为分子离子,碎片离子  $m/z$  74 ( $\text{CH}_2=\text{O}^+-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) 和  $m/z$  62 ( $\text{C}(\text{OH})_2=\text{NH}_2^+$ ) 都来自于“McLafferty+1”的重排反应(图 1-2)。因为空气中的  $\text{CO}_2$  也能离解成  $m/z$  44 ( $\text{O}=\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2$ ),因此, $m/z$  44 ( $\text{O}=\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2$ ) 一般不作为 EC 分析的特征离子。 $m/z$  89、 $m/z$  74 和特征离子  $m/z$  62 是 EC 定量分析中用于 SIM 的三种离子。

由图 1-1 可以看出, $m/z$  62 在三种离子中强度最大。 $m/z$  62 是大多数非氮取代氨基甲酸类化合物的特征离子(除去烷氧基链中不含 $\beta$ -氢的物质,如氨基甲酸甲酯、氨基甲酸丙酯等)。因此选择其作为 EC 的定量离子。虽然对于大多数烷氧基甲基酯来说, $m/z$  74 也是麦氏重排的碎片离子,但其干扰化学物质较多,一般情况下, $m/z$  74 质谱首先被判断为丁二酸二乙酯,然后才是氨基甲酸乙酯。在  $m/z$  89 处,EC 的峰非常弱而不能作为 EC 的准确定量特征离子。因此, $m/z$  62 为葡萄酒中 EC 含量检测的定量离子。

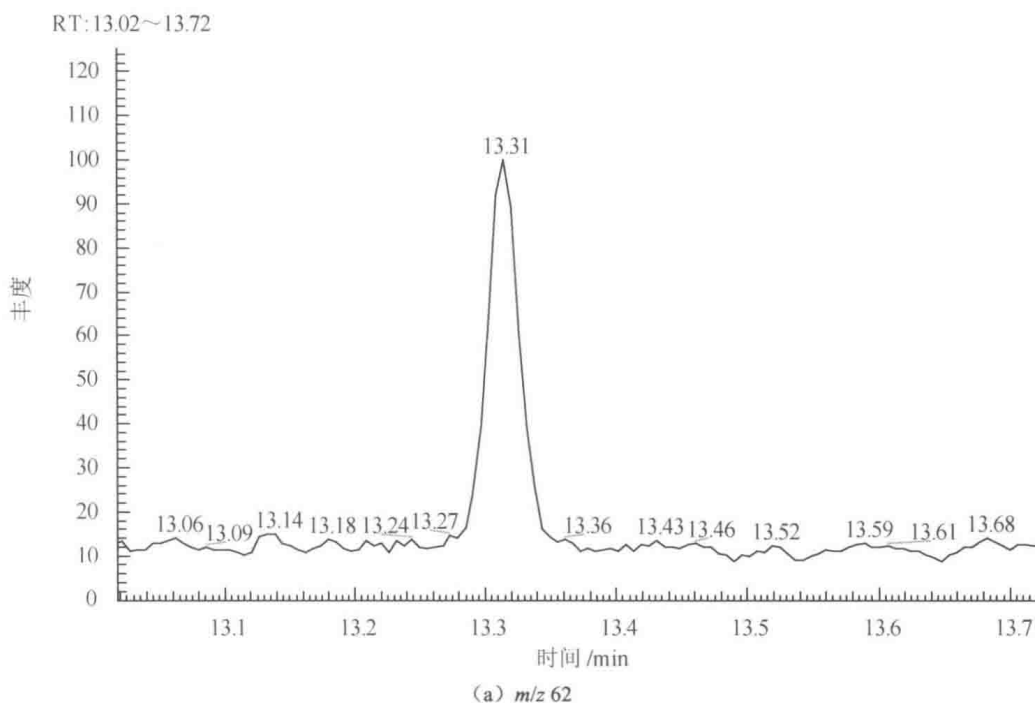
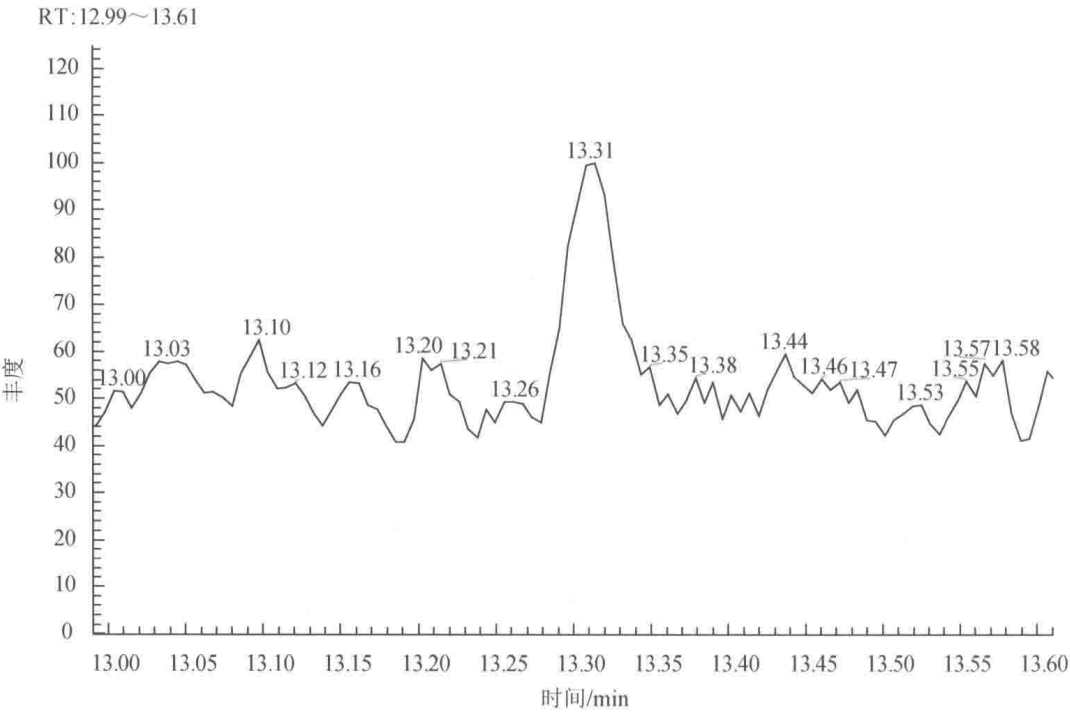
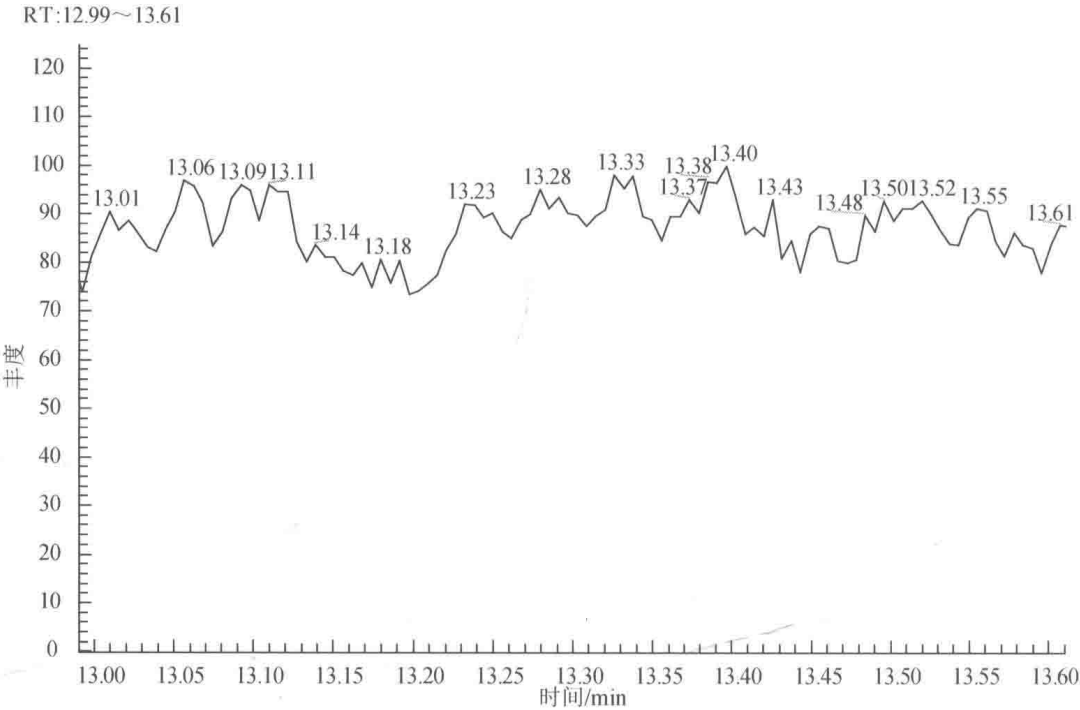


图 1-1 100 $\mu\text{g/L}$  EC 标准品的质谱图



(b)  $m/z$  74



(c)  $m/z$  89

图 1-1 100  $\mu\text{g/L}$  EC 标准品的质谱图 (续)

EC 的保留时间为 13.31min