



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102944636 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 01

(21) 申请号 201210441000. 6

(22) 申请日 2012. 11. 07

(73) 专利权人 宜宾五粮液股份有限公司

地址 644007 四川省宜宾市翠屏区岷江西路
150 号

(72) 发明人 唐桥 陈林 周韩玲 练顺才

李杨华 廖勤俭

(74) 专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通

合伙) 51124

代理人 梁鑫

(51) Int. Cl.

G01N 30/88(2006. 01)

(56) 对比文件

DE 3705954 C2, 1988. 09. 08,

CN 102393434 A, 2012. 03. 28,

EP 0320275 A1, 1989. 06. 14,

王丽娟等. 超高液相色谱-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. 《色
谱》. 2012, 第 30 卷(第 9 期),

袁东等. 高效液相色谱-质谱法测定白酒中
的氨基甲酸甲酯. 《酿酒科技》. 2007, (第 4 期),

审查员 王方

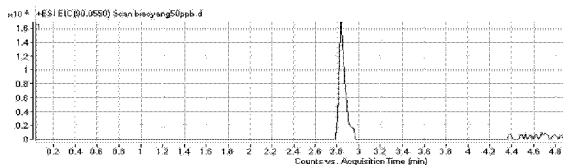
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的高效液相色谱-质
谱检测方法

(57) 摘要

本发明属于分析化学领域, 涉及蒸馏酒中氨
基甲酸乙酯的高效液相色谱-质谱检测方法。本
发明的目的是提供一种对蒸馏酒中的氨基甲酸乙
酯进行定量检测方法。本发明的技术方案是蒸馏
酒中氨基甲酸乙酯的高效液相色谱-质谱检测方
法, 其特征在于: 包括如下步骤: (1) 样品预处理;
(2) 检测。本发明方法操作简单, 检测时间短, 灵
敏度高, 结果精确。



1. 蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的高效液相色谱 - 质谱检测方法, 其特征在于: 包括如下步骤:

(1) 样品预处理: 量取一定体积的蒸馏酒样品, 在 30 ~ 40°C 下用旋转蒸发仪减压蒸馏除去样品中的乙醇, 用蒸馏水定容至原来的体积, 过滤;

(2) 检测: 取处理过的蒸馏酒样品直接进 LC-MS, 选择质子化氨基甲酸乙酯分子离子 $[M+H]^+$ 90.055 为定量离子进行检测, 经标准曲线的计算得到样品中氨基甲酸乙酯的含量;

所述的液相色谱条件如下: 流动相由 A 和 B 组成, 其中 A 为含 0.05 ~ 0.3% v/v 甲酸或乙酸的水溶液, B 为乙腈或甲醇, 洗脱梯度为流动相 B: 10% ~ 100%, 流速: 0.2 ~ 0.6 mL/min; 色谱柱为 C18 柱; 所述的洗脱梯度为: 0 ~ 3min, 10 ~ 100% B; 3 ~ 8min, 100% B; 后运行时间: 2min;

所述质谱条件如下: 采用电喷雾离子源, 毛细管电压 4000V, 毛细管出口电压 55 ~ 135V, 锥孔电压 55 ~ 75V, 离子源温度 180 ~ 300°C, 干燥气流量 5 ~ 13 L/min。

2. 根据权利要求 1 所述的蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的高效液相色谱 - 质谱检测方法, 其特征在于: 所述的 C18 柱长 50mm ~ 250mm, 内径为 2.1mm 或 4.6mm。

蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的高效液相色谱 - 质谱检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析化学领域,涉及蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的高效液相色谱 - 质谱检测方法。

背景技术

[0002] 氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate,简称 EC),又名尿烷,早在 1943 年 EC 就被证实为一种致癌物质,大量试验数据表明,EC 在动物体内存在多种代谢方式,是一种具有遗传毒性且多位点致癌的物质,国际癌症研究所将其对人类的致癌毒性归为 2B 组。2007 年,国际癌症研究机构(IARC)重新评估了 EC,将其列入 2A 组,与铅、汞并列,这意味着 EC 对人类可能致癌。饮料酒中的氨基甲酸乙酯来源于其生产及贮存过程中,目前,只有有少数国家制定了饮料酒中 EC 的限量标准。

[0003] 蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的检测可用 GC-MS(气相色谱 - 质谱)法、HPLC 法等。GC-MS 分析法准确,灵敏度高,但前处理方法较复杂(目前对样品所使用的前处理方法主要有液液萃取,固液萃取,固相萃取,固相微萃取等),所需时间也较长;HPLC(高效液相色谱)法需要对样品进行衍生处理(蒸馏酒中 EC 含量较低,紫外检测器无法检测 ppb 级的 EC,因此,需要使用灵敏度相对较高的荧光检测器,而 EC 本身又不产生荧光,所以必须对 EC 进行衍生处理,使其带上荧光基团),相对于 GC-MS 分析法而言,HPLC 法前处理较简单,但是灵敏度较低,色谱分离的时间也较长,且只依靠保留时间定性,准确性较差。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种对蒸馏酒中的氨基甲酸乙酯进行定量检测方法。

[0005] 本发明的技术方案是蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的高效液相色谱 - 质谱检测方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 样品预处理:量取一定体积的蒸馏酒样品,在 30~40℃ 下用旋转蒸发器减压蒸馏除去样品中的乙醇,用蒸馏水定容至原来的体积,过滤;

[0007] (2) 检测:取处理过的蒸馏酒样品直接进 LC-MS(液相色谱 - 质谱),选择质子化氨基甲酸乙酯分子离子 $[M+H]^+$ 90.055 为定量离子进行检测,经标准曲线的计算得到样品中氨基甲酸乙酯的含量。

[0008] 进一步的,所述的液相色谱条件如下:流动相由 A 和 B 组成,其中 A 为含 0.05~0.3% 甲酸或乙酸的水溶液, B 为乙腈或甲醇,洗脱梯度为流动相 B:10%~100%,流速:0.2~0.6mL/min;色谱柱为 C18 柱。

[0009] 进一步的,所述质谱条件如下:采用电喷雾离子源,毛细管电压 4000V,毛细管出口电压 55~135V,锥孔电压 55~75V,离子源温度 180~300℃,干燥气流量 5~13L/min。

[0010] 进一步的,所述的 C18 柱长 50mm~250mm,内径为 2.1mm 或 4.6mm。

[0011] 进一步的,所述的洗脱梯度为:0~3min,10~100%B;3~8min,100%B;postime(后运行时间):2min。

[0012] 本发明方法创造性的将 LC-MS 应用到蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的检测。发明人对检测过程中色谱和质谱的操作参数进行了选择,使得检测时间短,同时又能保证检测的准确性和灵敏度。此外,为了进一步提高检测的准确性,发明人对样品进行了预处理,该预处理方法操作简单、成本低廉。通过样品的预处理和检测过程的配合,使得本发明的方法操作简单,准确性和灵敏度都较高。因此,本发明方法为蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的检测提供了新的选择。

附图说明

- [0013] 图 1、浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 的基甲酸乙酯标准品提取离子轮廓图
[0014] 图 2、浓度为 20 $\mu\text{g/L}$ 的氨基甲酸乙酯标准品提取离子轮廓图
[0015] 图 3、样品 1#中氨基甲酸乙酯提取离子轮廓图
[0016] 图 4、样品 2#中氨基甲酸乙酯提取离子轮廓图
[0017] 图 5、样品 3#中氨基甲酸乙酯提取离子轮廓图
[0018] 图 1~5 中纵坐标为采集点数,横坐标为采集时间。

具体实施方式

[0019] 本发明的技术方案是蒸馏酒中氨基甲酸乙酯的高效液相色谱-质谱检测方法,包括如下步骤:

[0020] (1) 样品预处理:量取一定体积的蒸馏酒样品,在 30~40 $^{\circ}\text{C}$ 下用旋转蒸发器减压蒸馏除去样品中的乙醇,用蒸馏水定容至原来的体积,过滤;

[0021] (2) 检测:取处理过的蒸馏酒样品直接进 LC-MS (液相色谱-质谱),选择质子化氨基甲酸乙酯分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^{+}90.055$ 为定量离子进行检测,经标准曲线的回归方程计算得到样品中氨基甲酸乙酯的含量。

[0022] 进一步的,所述的液相色谱条件如下:流动相由 A 和 B 组成,其中 A 为含 0.05~0.3% 甲酸或乙酸的水溶液,B 为乙腈或甲醇,洗脱梯度为 B:10%~100%,流速 0.2~0.6 mL/min ;色谱柱为 C18 柱。

[0023] 进一步的,所述质谱条件如下:采用电喷雾离子源,毛细管电压 4000V,毛细管出口电压 55~135V,锥孔电压 55~75V,离子源温度 180~300 $^{\circ}\text{C}$,干燥气流量 5~13 L/min 。

[0024] 进一步的,所述的 C18 柱长 50mm~250mm,内径为 2.1mm 或 4.6mm。

[0025] 进一步的,所述的洗脱梯度为:0~3min,10~100%B;3~8min,100%B;postime (后运行时间):2min。

[0026] 本发明中,由于蒸馏酒成分比较复杂,所以必须进行预处理,去掉一些非目标化合物的干扰,避免在检测的过程中影响目标化合物而使得定量不准确。特别是乙醇在白酒中浓度较高,直接进样检测会导致 EC 的峰开叉、变宽、变形等,使得检测不准确。

[0027] 在样品预处理过程中,若温度过高,一方面有可能会引起某些反应,导致 EC 的含量升高,另一方面,EC 可能会随着乙醇蒸出。因此在预处理过程中,温度不宜过高,以 30 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 为佳。在标准大气压下,乙醇的沸点是 78.4 $^{\circ}\text{C}$ (高于前述 30 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$),因此必须进行减压蒸馏。在控制温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,真空度必须低于 -0.085MPa (比标准大气压低 0.085MPa) 乙醇才能蒸出。

[0028] 经预处理后的样品中可能会存在一些小颗粒或者不溶物质,直接进样分析会导致色谱柱堵塞,因此,在进样前需过滤,采用常用的滤膜过滤即可。

[0029] 本发明中,建立合适的液相色谱条件,目的是让化合物能够良好的分离,使目标化合物不受其它物质的干扰;质谱条件的建立依据是让目标化合物丰度最大,信噪比最高。这两个部分条件的建立是根据目标化合物的保留时间与丰度来调节的。检测限为分析方法在规定的实验条件下所能检出被测组分的最低浓度或最低量。当被测组分的量高于检测限时,即可被检出,但不一定能准确测定。按信(号)噪(音)比确定可被检出的最低浓度。一般以信噪比(S/N)为 3 : 1 或 2 : 1 时相应的浓度或注入仪器的量确定检测限。依据 S/N 为 3 推算,本发明方法的检测限可低至 1.6 $\mu\text{g/L}$ 。

[0030] 定量限为样品中被测物能被定量测定的最低量。定量限体现了分析方法是否具备灵敏的定量检测能力。常用信噪比(S/N)法确定定量限。一般以信噪比为 10 : 1 时相应的浓度或注入仪器的量确定定量限。依据 S/N 为 10 推算,本发明方法定量限为 5.5 $\mu\text{g/L}$ 。

[0031] 在本发明液相色谱条件中,流动相的流速低则出峰慢,流速高则出峰快。一般情况下,液相色谱检测中均设定 30 $^{\circ}\text{C}$ 左右的柱温。色谱柱其它条件相同,内径小则出峰较快,内径大则出峰相对较慢。在满足样品中目标化合物分离的情况下,采用长的色谱柱(250mm)时,分离时间较长,为了更快的分析,可采用短的色谱柱(50mm)。

[0032] 用标准样品配制成不同浓度的标准溶液,在与待测组分相同的条件下,等体积准确进样,测量各峰的峰面积或峰高,用峰面积或峰高对样品浓度绘制一条相关曲线,即标准曲线: $y=bx+a$ (x- 试样中被测组分含量, y- 试样中被测组分的峰面积),相关系数 R^2 。本发明中先配制氨基甲酸乙酯标准溶液:以无水乙醇/甲醇为溶剂,配制浓度为 1000mg/L 的氨基甲酸乙酯母液,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,以蒸馏水为溶剂,稀释母液,配制浓度分别为 500 $\mu\text{g/L}$ 、250 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 的氨基甲酸乙酯标准溶液,进样分析,绘制标准曲线。

[0033] 本发明中,取同一个样品 5 份,在使用相同的预处理方法处理后,在相同的检测条件下对 5 份样品中的氨基甲酸乙酯进行检测,通过计算结果的 RSD (相对标准偏差)得到方法精密度,本发明检测方法精密度为 6.4%。

[0034] 本发明中,相同的样品取两份,其中一份加入定量的待测成分标准物质,两份同时按相同的分析步骤分析,加标的一份所得的结果减去未加标一份所得的结果,其差值同加入标准物质的理论值之比即为样品加标回收率。加标回收率可通过此公式计算:加标回收率=(加标试样测定值-试样测定值) \div 加标量 \times 100%。在本发明中,通过向样品中加入了三个不同浓度(50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$)的标准品来检验本发明方法的加标回收率,计算后得到的加标回收率为 89~113%。

[0035] 综合标准曲线的回归方程,本发明方法在 10~500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性相关系数大于 0.999,方法精密度为 6.4%,加标回收率为 89%~113%,具有良好的应用前景。

[0036] 实施例采用本发明方法测定白酒样品中的氨基甲酸乙酯

[0037] 样品的预处理:

[0038] 样品 1 $^{\#}$ 的预处理:用干净的 50mL 量筒取量样品 1 $^{\#}$ (从某超市中购买的威士忌,酒精度为 60 $^{\circ}$),置于旋蒸瓶中,在 30 $^{\circ}\text{C}$,真空度为 -0.1MPa (比标准大气压低 0.1MPa)下,旋转蒸发去除乙醇,将样品旋蒸至 20mL,转移至量筒中,用少量蒸馏水涮洗旋蒸瓶三次,用涮

洗液将样品定容至 50mL,混匀,经 0.22 μ m 滤膜过滤后进液相色谱-质谱仪分析。

[0039] 样品 2[#]的预处理:用干净的 50mL 量筒取量某白酒样品 2[#](酒精度为 50°),置于旋蒸瓶中,在 35℃,真空度为 -0.092MPa(比标准大气压低 0.092MPa)下,旋转蒸发去除乙醇,将样品旋蒸至 25mL,其它步骤与样品 1[#]的处理相同;

[0040] 样品 3[#]的预处理:用干净的 50mL 量筒取量某白酒样品 3[#](酒精度为 45°),置于旋蒸瓶中,在 40℃,真空度为 -0.085MPa(比标准大气压低 0.085MPa)下,旋转蒸发去除乙醇,将样品旋蒸至 27.5mL,其它步骤与样品 1[#]的处理相同。用该方法处理三份样品 3[#],进液相色谱-质谱仪分析,检测三份样品中 EC 的含量。

[0041] 液相色谱条件:

[0042] a) 色谱柱:ZORBAX SB-C18(安捷伦(Agilent)科技有限公司生产,货号为 827975-902),规格:4.6×50mm,1.8Micron 600Bar。

[0043] b) 流动相:A:0.1% 甲酸水溶液,B 乙腈。

[0044] 梯度洗脱方式:0-3min,10-100%B;3-8min,100%B;postime:2min。

[0045] c) 流速:0.3mL/min;

[0046] d) 流动相的去向:0-5min,流动相进入质谱,5-8min,流动相进入废液管道;

[0047] e) 柱温:30℃;

[0048] f) 进样量:10 μ L。

[0049] 质谱条件:

[0050] a) 离子源:电喷雾离子源;

[0051] b) 扫描方式:正离子扫描;

[0052] c) 检测方式:一级 MS 扫描;

[0053] d) 离子源温度:280℃;

[0054] e) 雾化气压力(NEB):40psig(磅/平方英寸);

[0055] f) 干燥气流量:10L/min;

[0056] g) 毛细管电压:4000V;

[0057] h) 毛细管出口电压:65V;

[0058] i) 锥孔电压:55V;

[0059] j) 采集频率:1spectrum/s

[0060] k) 质谱图的保存:0-5min:保存;5-8min:不保存。

[0061] 标准曲线的制作:

[0062] 用蒸馏水稀释浓度为 1000mg/L 的 EC 母液,配制浓度分别为 500 μ g/L、250 μ g/L、100 μ g/L、50 μ g/L、20 μ g/L、10 μ g/L 的 EC 系列标准溶液,进样分析,得到线性方程: $y=904.71x+13559$,相关系数 R^2 为 0.9994。

[0063] 样品中 EC 含量的计算:

[0064] 根据标准曲线计算得到样品 1[#]、2[#]中 EC 的含量分别为 15 μ g/L、124 μ g/L,三份样品 3[#]中 EC 的含量分别为 132 μ g/L、129 μ g/L、136 μ g/L。

[0065] 从上述结果可以看出,本发明方法操作简单,且重复性好,准确性高。

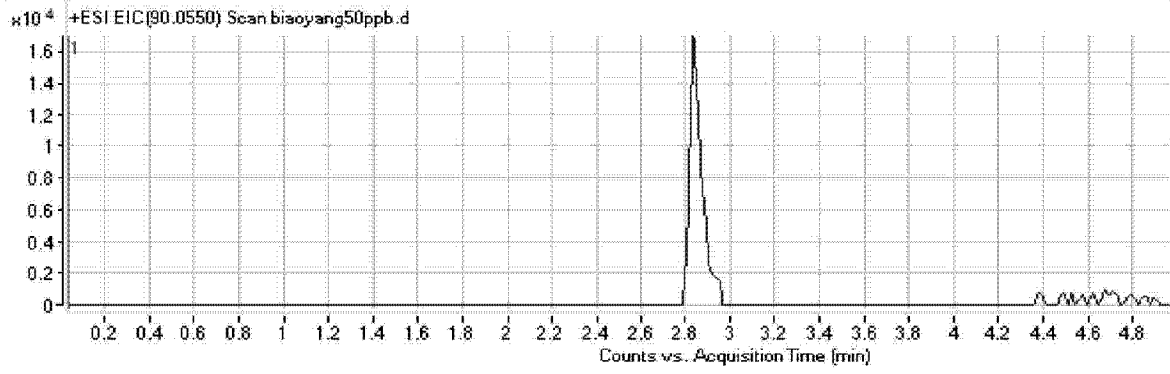


图 1

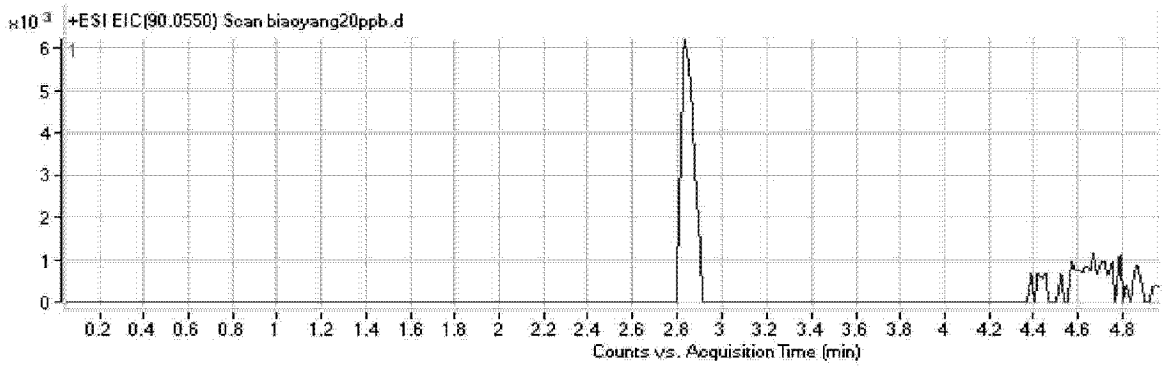


图 2

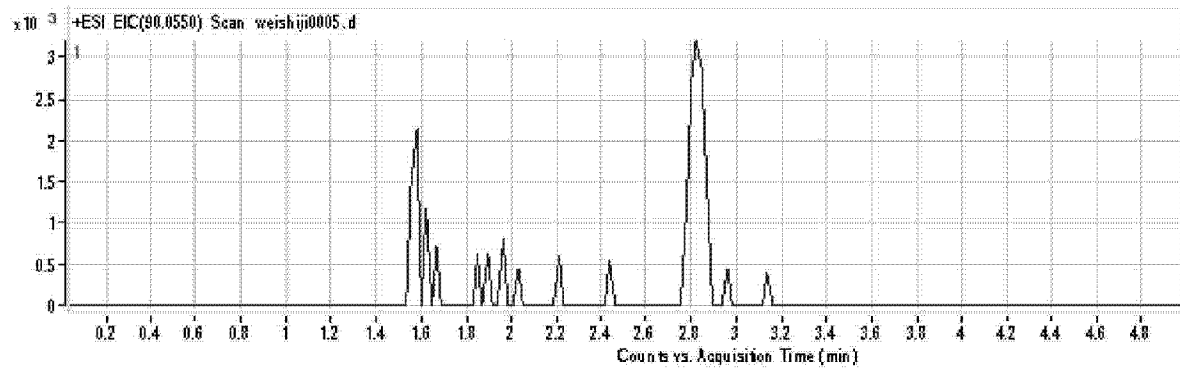


图 3

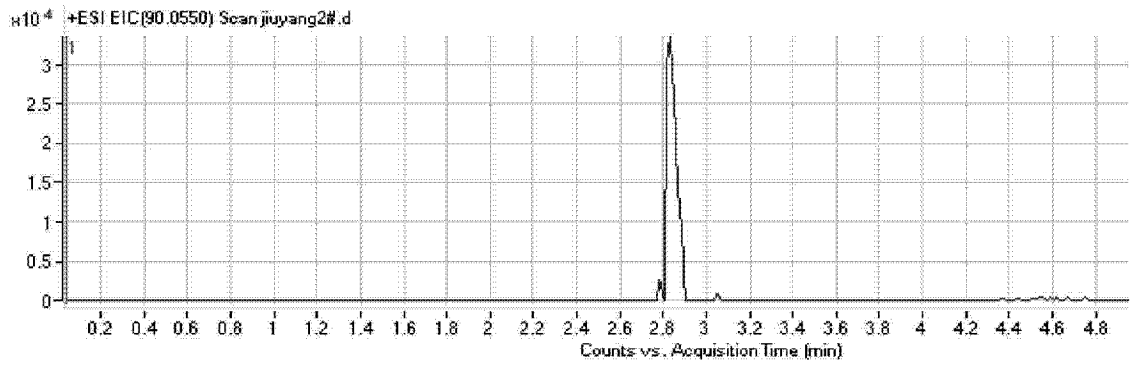


图 4

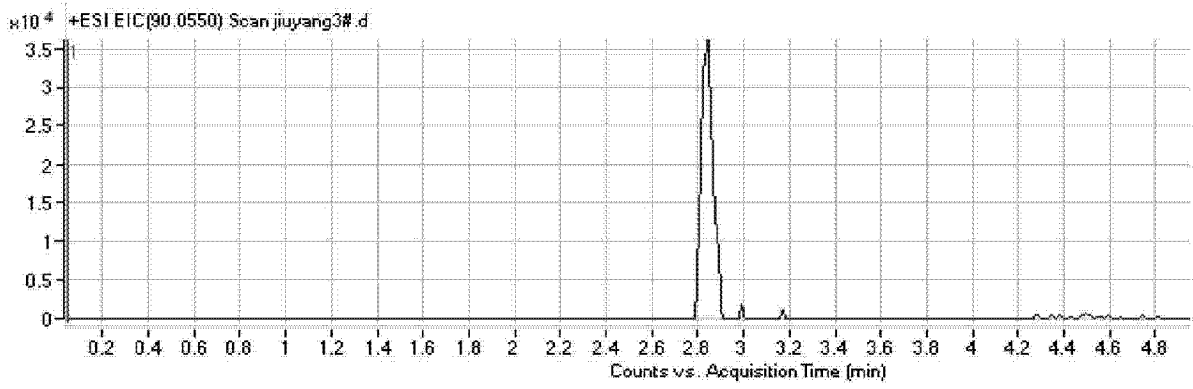


图 5