

# 黄酒中氨基甲酸乙酯的分析与控制

耿予欢<sup>1</sup>, 吕芬<sup>2</sup>, 黄伟雄<sup>2</sup>, 李国基<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广东省疾病预防控制中心, 广东广州 510300)

**摘要:** 氨基甲酸乙酯是一种存在于黄酒中的致癌物质。本文采用气质联用法检测了广东市场上 42 种黄酒样品中氨基甲酸乙酯含量, 28 个样品中 EC 含量超过 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 占 66.67%, 其中 7 个样品中 EC 含量超过了 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (日本清酒中 EC 的限量标准), 最高的高达 1210  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。研究了脲酶对黄酒处理的效果, 结果发现, 一定条件下添加脲酶能够去除酒里的尿素, 破坏产生氨基甲酸乙酯的主要途径, 从而控制氨基甲酸乙酯含量不再剧增。并在单因素试验结果的基础上, 进行正交实验, 得出脲酶最佳的处理条件为酶浓度 150  $\text{mg}/\text{L}$ 、处理温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ , pH 值为 3.5, 处理时间 10d。该条件下进行处理, 可使酒中氨基甲酸乙酯含量降低 45.83%。

**关键词:** 黄酒; 氨基甲酸乙酯; 脲酶; 气质联用法

文章编号: 1673-9078(2013)9-2271-2274

## Analysis and Control of Ethyl Carbamate in Chinese Rice Wine

GENG Yu-huan<sup>1</sup>, LV Fen<sup>2</sup>, HUANG Wei-xiong<sup>2</sup>, LI Guo-ji<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Centers for disease control and prevention of guangdong province, Guangzhou 510300, China.)

**Abstract:** Ethyl carbamate (EC) is one of the carcinogenic substances in rice wine. The content of ethyl carbamate in 42 yellow rice wines from Guangdong market were analyzed by GC/MS in this paper. 28 samples contained EC of more than 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , being 66.67% of the total sample tested, 7 samples showed high EC content of more than 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (standard for EC content in Japanese sake), with the maximum value of up to 1210  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The effect of urease on content of EC was studied. It was found that that adding urease into the yellow rice wine can reduce the content of urea and break the main pathway for the production of EC. So the content of EC can be reduced. Based on the single element experiment, the conditions for urease treatment in wine were optimized by orthogonal experiment as follows: urease concentration 150  $\text{mg}/\text{L}$ , treatment temperature 25  $^{\circ}\text{C}$ , pH 3.5 and treatment time 10 days. Under these conditions, the content of ethyl carbamate could reduce by 45.83%.

**Key words:** yellow rice wine; ethyl carbamate; urease; GC/MS

早在 1943 年, Nettleshi 证实氨基甲酸乙酯 (Ethyl carbamate, EC) 是致癌物质, 可导致肺癌、淋巴瘤、肝癌和皮肤癌等疾病<sup>[1]</sup>。随后, 世界各国学者在蒸馏酒、白兰地、威士忌、酱油和面包等发酵饮料和食品中也检测到了氨基甲酸乙酯, 引起了各国对发酵食品和酒类饮料中氨基甲酸乙酯含量的重视, 世界卫生组织也提议规定酒类饮料中氨基甲酸乙酯的限量标准<sup>[2]</sup>。在我国传统酒类中, 黄酒有着悠久的历史, 其传统精湛纯熟的酿酒工艺, 营养保健功能齐全和独特的色香味风格是任何酒类无法相比的。黄酒在当今国际上享有较高声誉, 拥有广泛的市场, 越来越受到我国人民和国外华侨、港澳台同胞以及世界各国人民

收稿日期: 2013-05-25

基金项目: 广东省科技计划项目 (2010B031000011)

作者简介: 耿予欢 (1973-), 女, 博士, 高级工程师, 从事食品发酵工程研究工作

通讯作者: 李国基 (1955-), 男, 高级工程师

的喜爱和欢迎。由于我国黄酒一直沿用传统工艺发酵, 且对黄酒中尿素的研究较少, 若酒液中尿素含量较高, 会直接导致氨基甲酸乙酯的含量居高不下, 将影响我国黄酒行业向国际市场的拓展, 同时, 对国内消费者也是一种潜在的威胁<sup>[3]</sup>。降低黄酒中氨基甲酸乙酯的含量、保障人们的健康生活, 对我国黄酒中氨基甲酸乙酯的含量进行研究, 是食品科学研究工作者的责任。

脲酶能够降除酒里的尿素, 破坏产生氨基甲酸乙酯的主要途径, 从而控制氨基甲酸乙酯含量不再剧增。浓度、温度以及 pH 值会影响脲酶的活性、酶的反应速率。本研究分析了广东市场国产黄酒中氨基甲酸乙酯的含量, 初步研究了不同温度、脲酶用量、pH 值等对脲酶处理黄酒效果的影响, 并进行正交实验, 研究脲酶处理黄酒的最佳使用条件。为降低黄酒中 EC 含量提供了一定的应用基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料、仪器及试剂

### 1.1.1 黄酒样品

市场购买, 广东省市面上常见黄酒

### 1.1.2 脲酶

购自上海源叶生物科技有限公司, 用 Berthelot reaction 法<sup>[4]</sup>测定酶活为 0.862 U/mg。

### 1.1.3 仪器设备

气相色谱-质谱联用仪 (EI 源) SHIMADZU (岛津) GCMS-QP2010; 电子天平 (感量 0.1 mg); 漩涡混匀器; 氮吹仪; 玻璃层析柱: 柱长 20 cm, 柱内径 2 cm。下端填以玻璃棉, 再填装 3 g 硅藻土; 双光束紫外可见分光光度计, 型号 TU-1901; 酸度计, 型号 Delta320; 分析天平, 型号 AL204; 电热恒温水浴锅, 型号 SHZ-2; 全恒温摇床柜, 型号 NYC-G。

### 1.1.4 化学试剂

氨基甲酸乙酯标准品 (纯度>99.0%)、d<sub>5</sub>-氨基甲酸乙酯 (纯度>98%)、硅藻土 (Extrelut™20)、无水硫酸钠、无水乙醚、甲醇、苯酚、硝基铁氢化钠、氧化钠、氯酸钠、氯乙酸溶液、柠檬酸、柠檬酸三钠、尿素、氯化铵。

除非另有说明, 所用试剂均为分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 溶液的配制

d<sub>5</sub>-氨基甲酸乙酯溶液: 准确称取 (精确至 0.1 mg) 适量的 d<sub>5</sub>-氨基甲酸乙酯标准品, 用甲醇配制成浓度为 1.00 mg/mL 的标准储备液, 使用时用甲醇稀释至 1.00 μg/mL。

氨基甲酸乙酯标准溶液: 准确称取 (精确至 0.1 mg) 适量的氨基甲酸乙酯标准品, 用甲醇配制成浓度为 1.00 mg/mL 的标准储备液, 使用时用甲醇稀释至 1.00 μg/mL。

标准系列: 准确吸取 0.10、0.50、1.00、1.50、2.00、2.5 mL 的氨基甲酸乙酯标准溶液 (1.00 μg/mL), 各加 1.00 mL d<sub>5</sub>-氨基甲酸乙酯标准溶液 (1.00 μg/mL), 用甲醇定容至 10.0 mL, 得到 10.0、50.0、100、150、200、250 ng/mL 的标准使用液 (100.0 ng/mL d<sub>5</sub>-氨基甲酸乙酯)。

### 1.2.2 操作步骤

试样制备: 称取 2 g (准确到 0.1 mg) 酒样于 10 mL 比色管中, 加 100 μL d<sub>5</sub>-氨基甲酸乙酯内标使用液 (1.00 μg/mL), 涡旋混匀。

净化: 将试样加到层析柱中, 放置 30 min, 用乙醚洗脱, 收集 10 mL 洗脱液于 10 mL 具塞刻度试管中,

在 30 °C 下用氮气缓缓吹至近干, 加少量无水硫酸钠除水, 加入 1.00 mL 甲醇, 涡旋混匀, 静置, 取上清液供 GC/MS 分析。

### 1.2.3 色谱-质谱条件

色谱柱: DB-INNOWAX 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)

进样口: 250 °C

进样方式: 不分流进样

检测器: FPD, 温度: 250 °C

载气流量: 氮气: 60 mL/min; 氢气: 75 mL/min; 空气: 100 mL/min

升温程序: 初温 50 °C, 保持 0.5 min, 然后以 5 °C/min 升至 150 °C, 以 40 °C/min 升至 220 °C 保持 3 min

载气 (氮气) 流速: 1.0 mL/min

电离方式: EI 源, 70 eV

离子源温度: 230 °C

氨基甲酸乙酯选择监测离子 (m/z): 45、62、74; 定量离子 62

d<sub>5</sub>-氨基甲酸乙酯选择监测离子 (m/z): 50、64、76; 定量离子 64

## 2 结果与分析

### 2.1 黄酒中氨基甲酸乙酯 (EC) 含量的分析

表 1 黄酒样品中 EC 检测结果

Table 1 EC content in yellow rice wine

黄酒	EC 含量 (μg/kg)	黄酒	EC 含量 (μg/kg)	黄酒	EC 含量 (μg/kg)
1 号	672	15 号	20	29 号	45
2 号	1210	16 号	62	30 号	150
3 号	49	17 号	72	31 号	39
4 号	44	18 号	43	32 号	510
5 号	35	19 号	40	33 号	024
6 号	29	20 号	85	34 号	39
7 号	62	21 号	150	35 号	15
8 号	21	22 号	58	36 号	33
9 号	33	23 号	73	37 号	<10
10 号	29	24 号	41	38 号	<10
11 号	335	25 号	140	39 号	<10
12 号	24	26 号	32	40 号	<10
13 号	51	27 号	34	41 号	<10
14 号	30	28 号	63	42 号	<10

本研究抽取了广东省市场上的 42 种黄酒样品, 采用 GC-MS 技术, 进行了 EC 含量的测定, 结果见表

1。

从表1结果发现,在42种样品中,有28种含量超过30 μg/kg,占66.67%,其中7种更是超过了100 μg/kg(日本清酒中EC的限量标准),最高的高达1210 μg/kg。

国内外很多学者对葡萄酒和黄酒中氨基甲酸乙酯的形成进行了研究,主要形成途径有4类:焦炭酸二乙酯和氨反应;氨基甲酸磷酸和乙醇反应;尿素和乙醇反应;瓜氨酸和乙醇反应<sup>[5]</sup>。据研究表明,我国黄酒及日本清酒中90%以上的氨基甲酸乙酯是来源于酒中所含尿素与乙醇的反应<sup>[6-7]</sup>。还有研究发现在黄酒贮存的过程中,酒液中的尿素会与乙醇继续反应,酒液中尿素含量越高、贮存温度越高、贮存时间越长,形成的EC则越多<sup>[3]</sup>。因此超标原因有两种:一是生产黄酒时尿素含量过高;二是由于贮存条件不当导致EC含量剧增。

## 2.2 降低黄酒中氨基甲酸乙含量的研究

脲酶能够去除酒里的尿素,破坏产生氨基甲酸乙酯的主要途径,从而控制氨基甲酸乙酯含量不再剧增。浓度、温度以及pH值会影响脲酶的活性、酶的反应速率等。本文研究了不同温度、脲酶用量、pH值对脲酶处理黄酒效果的影响,并进行正交实验,研究脲酶处理黄酒的最佳使用条件。

### 2.2.1 脲酶用量对脲酶处理黄酒效果的影响

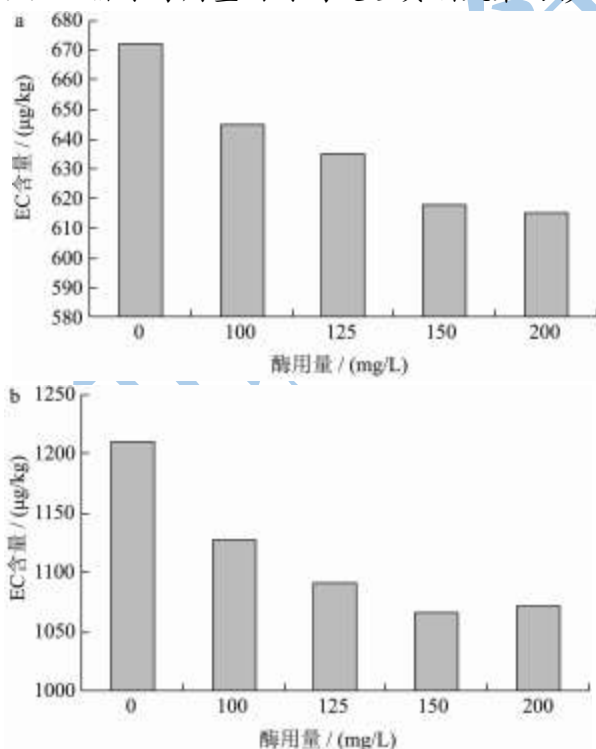


图1 脲酶用量对EC含量的影响

Fig.1 Effect of urease dosage on EC content

注: a: 黄酒1号; b: 黄酒2号; 黄酒1号 pH 3.63; 黄酒

2号 pH 3.91。均在室温下进行酶处理。

选择氨基甲酸乙酯含量最高的黄酒1号和黄酒2号作为实验用酒,分别在其中加入不同脲酶用量: 100、125、150、200 mg/L,以原酒样作空白对比,常温下处理15 d后,加入终止剂,检测氨基甲酸乙酯的含量,结果如图1所示。

由图1看出,在黄酒中添加脲酶,可以抑制氨基甲酸乙酯的生成。脲酶用量越高,生成氨基甲酸乙酯含量就越少。随着脲酶用量的增加,氨基甲酸乙酯含量先是快速减少,接着缓慢减少,最后趋于平稳。处理黄酒的适宜酶浓度为150 mg/L。添加150 mg/L脲酶处理后,黄酒1号氨基甲酸乙酯含量比原来降低了8%;黄酒2号氨基甲酸乙酯含量比原来降低了12%。

### 2.2.2 温度对脲酶处理黄酒效果的影响

在黄酒1号和黄酒2号中加入浓度150 mg/L脲酶,分成4份,在分别在8、25、31、37 °C温度下进行处理,同时以原酒样作空白对比,处理5 d后,加入终止剂终止反应,检测氨基甲酸乙酯含量。结果见图2。

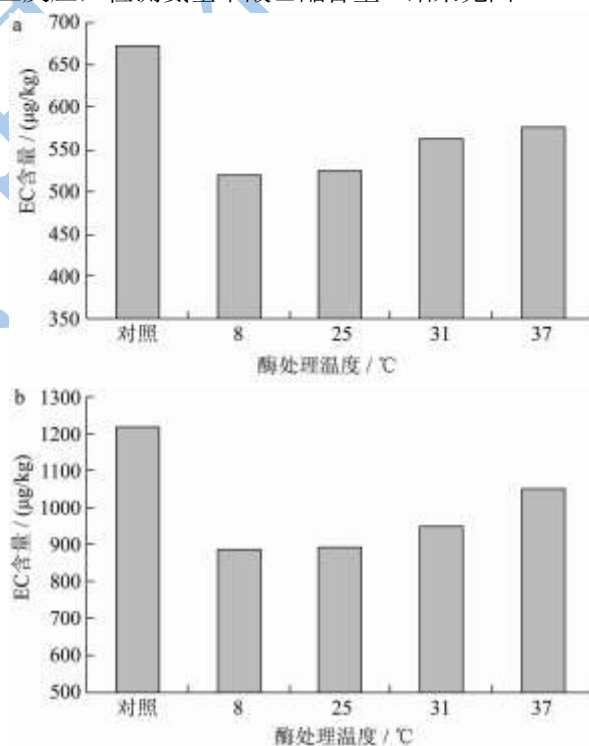


图2 温度对EC含量的影响

Fig.2 Effect of temperature on EC content

注: a: 黄酒1号; b: 黄酒2号; 黄酒1号 pH 3.63; 黄酒2号 pH 3.91。脲酶浓度: 150 mg/L

温度与酶的催化反应速度有着密不可分的关系。温度过低会降低反应速度,而温度过高则使酶失活。由图2可知,在8 °C和25 °C条件下处理后,酒中氨基甲酸乙酯含量显著降低,但二者差别不明显,到了31 °C氨基甲酸乙酯含量骤升。总的来说,氨基甲酸乙酯含

量随着温度的升高而增加。可见，该脲酶处理黄酒的适宜温度是在8~25 ℃范围内。添加脲酶后，在8 ℃条件下处理，黄酒1号中氨基甲酸乙酯含量比原来降低了23%，黄酒2号中氨基甲酸乙酯含量比原来降低了27%。

### 2.2.3 pH 值对脲酶处理黄酒效果的影响

向酒中加入浓度150 mg/L脲酶，分成4份，用1 mol/L的氢氧化钠或1 mol/L的盐酸调节pH值分别为3.5、4.0、4.5、5.0、5.5，同时以原酒样作空白对比。酶处理10 d后，加入终止剂。检测氨基甲酸乙酯含量。结果见图3。

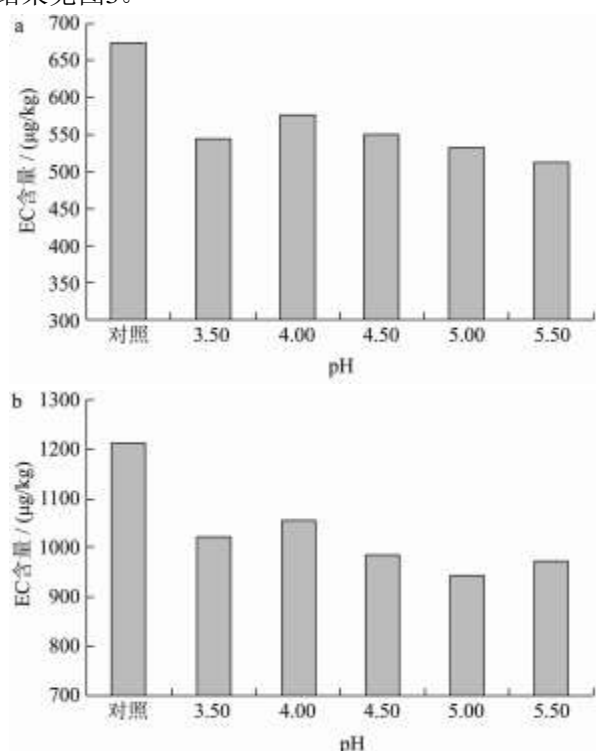


图3 pH 值对 EC 含量的影响

Fig.3 Effect of pH value on EC content

注：a：黄酒1号；b：黄酒2号。

图3反映了pH值对黄酒中氨基甲酸乙酯含量的影响，随着pH值的增加，酒中氨基甲酸乙酯含量先增加后减少，实验条件下黄酒1号中氨基甲酸乙酯含量比原来降低了24%；黄酒2号中氨基甲酸乙酯含量比原来降低了22%。

### 2.2.4 正交实验

除了以上三个影响因素之外，处理时间的长短也直接影响黄酒中氨基甲酸乙酯的含量。以黄酒1号为研究对象，作四因素三水平正交实验，分别用字母A、B、C、D表示酶浓度、温度、pH值和天数四个因素，如表2所示。

由结果可知，因素对实验指标影响的主次顺序是BADC，即处理温度影响最大，其次是酶用量和处理时间，而pH值影响最小。A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>、D<sub>3</sub>分别为A、

B、C、D因素的优水平。因此，本试验的最优组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>，即脲酶处理黄酒的最佳条件是：酶浓度150 mg/L、处理温度为25 ℃，pH值为3.5，处理时间10天。在该条件下对黄酒1号进行处理，处理后酒中氨基甲酸乙酯含量为364 µg/kg，降低了45.83%，优于正交试验中所有实验结果，证明该最佳条件成立。

表2 实验方案及实验结果

Table 2 Orthogonal experimental scheme and results

试验号	因素				EC 含量 / (µg/kg)
	A [酶用量 / (mg/L)]	B (温度/℃)	C (pH)	D (时间/d)	
1	1(100)	1(8)	1(3.5)	1(5)	575
2	1	2(25)	2(4.0)	2(7)	556
3	1	3(35)	3(4.5)	3(10)	563
4	2(150)	1	2	3	560
5	2	2	3	1	542
6	2	3	1	2	556
7	3(200)	1	3	2	566
8	3	2	1	3	529
9	3	3	2	1	571
k <sub>1</sub>	564.7	567	553.3	562.7	
k <sub>2</sub>	552.7	542.3	562.3	559.3	
k <sub>3</sub>	555.3	563	557	550.7	
极差	12	24.7	9	12	
主次顺序			B>A=D>C		
优水平	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	
优组合		A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>1</sub> D <sub>3</sub>			

## 3 结论

3.1 通过采用气相色谱质谱联用法对随机抽取42种市面上常见黄酒进行氨基甲酸乙酯含量的分析发现，黄酒中氨基甲酸乙酯含量参差不齐，低的无法检出(<10 µg/kg)，高的高达1210 µg/kg。在42种样品中，有28种氨基甲酸乙酯含量超过30 µg/kg，占66.67%，其中7种更是超过了100 µg/kg。

3.2 添加酸性脲酶是降低酒中尿素浓度的主要方法。目前，葡萄酒和日本清酒均选用酸性脲酶处理酒中尿素。国际葡萄酒组织、欧盟、美国FDA等都允许脲酶作为食品添加剂使用<sup>[8]</sup>。在单因素实验的基础上，进行正交实验。实验发现，对指标影响最大的因素是处理天数，其次是pH值和温度，酶浓度的影响最小。酒中有效利用脲酶的最佳条件是：酶浓度150 mg/L、处理温度为25 ℃，pH值为3.5，处理时间10 d，该条件下进行处理，可使酒中氨基甲酸乙酯含量降低45.83%。



3.3 黄酒的贮存期不宜过长, 一般不宜饮用贮酒期超过3年的黄酒。如果用脲酶处理黄酒, 将黄酒中的尿素含量降低, 且低温贮存黄酒, 就能大大提高黄酒的贮存时间。

#### 参考文献

- [1] 陆建,曹钰.葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究[J].食品与发酵工业,1996,3:79-82  
Lu Jian, Cao Yu. Research on Ethyl carbamate in wine vinegar [J]. Food and Fermentation Industries, 1996, 3: 79-82
- [2] 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  
Wu S J, Wang H X. Research Advancement of Ethyl Carbamate in Fermented Food [J]. Chemistry & Bioengineering, 2009, 26: 9
- [3] 王晓娟,王德良,傅力,等.降低发酵酒中尿素含量的研究进展[J].酿酒科技,2009,2:93-95  
Wang X J, Wang D L, Fu L, et al. Research Progress in Fermenting Wine [J]. Liquor-making Science & Technology, 2009, 2: 93-95
- [4] Weatherburn M W . Phenol-Hypochlorite reaction for determination of Aminonia [J]. Anal. Chem., 1967, 39(8): 971-974
- [5] 耿予欢,李国基.关于酿造酱油中氨基甲酸乙酯的探讨[J].中国酿造,2003,1:31-33  
Geng Y H, Li G J. Research on The Amino Ethyl Formate in Brewing Soy Sauce [J]. China Brewing, 2003, 1: 31-33
- [6] 白卫东,沈棚,钱敏.黄酒中氨基甲酸乙酯形成机理及控制方法研究进展[J].中国酿造,2012,7:6-10  
Bai W D, Shen P, Qian M. Research advances in formation mechanism and controlling approach of the ethyl carbamate in rice wine [J]. China Brewing, 2012, 7: 6-10
- [7] Yoshizawa K, Takahshi K. Efecets of temperature and sake components on the production of ethyl carbamate [J]. Brew. Soc. Japan., 1988, 83(1): 69-73
- [8] Seiichi Kodama, Fumio Yotsuzuka. Acid urease: reduction of ethyl carbamate formation in sherry under simulated baking conditions [J]. Journal of Food Science, 1996, 61(2): 304-307