

# 乙酰胆碱酯酶抑制率法 测定氨基甲酸乙酯的研究

刘丽斌<sup>1</sup>, 黄秋婷<sup>2</sup>, 彭程<sup>2</sup>, 黄惠华<sup>1,\*</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640;

2. 广州市酒类检测中心, 广东广州 510160)

**摘要:**本研究以乙酰胆碱酯酶对底物碘化硫代乙酰胆碱进行水解, 根据氨基甲酸乙酯对乙酰胆碱酯酶的抑制作用, 测定氨基甲酸乙酯。实验发现, 经溴水溶液增敏后, 显著提高了氨基甲酸乙酯对乙酰胆碱酯酶的抑制率, 且其抑制程度与浓度在一定范围内呈线性关系, 由此建立了一种快速测定氨基甲酸乙酯的酶抑制法。该法测定氨基甲酸乙酯的线性范围为 1~7.5mg/L, 相关系数  $r=0.9972$ , 最低检出限为 0.04177mg/L, RSD 在 1.82%~9.69% 之间。该法所用试剂成本低, 方法快速简单、条件温和易于控制、所需设备少, 易于操作。本文为进一步开发基于酶抑制原理的酒精饮料及发酵食品中氨基甲酸乙酯快速检测方法技术及产品提供了相应的理论和技术支持。

**关键词:**乙酰胆碱酯酶, 酶抑制率法, 氨基甲酸乙酯

## Determination of ethyl carbamate on acetylcholinesterase inhibition rate

LIU Li-bin<sup>1</sup>, HUANG Qiu-ting<sup>2</sup>, PENG Cheng<sup>2</sup>, HUANG Hui-hua<sup>1,\*</sup>

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

2. Alcohol Testing Center of Guangzhou, Guangzhou 510160, China)

**Abstract:** The determination method of ethyl carbamate based on acetylcholinesterase inhibition was researched in this paper. It was found that inhibition rate of acetylcholinesterase activity by ethyl carbamate was significantly improved after the sensibilization by bromine solution. There was a linear relationship between inhibition rate of acetylcholinesterase activity and concentration of bromine solution in a certain range. The established determination method of ethyl carbamate had good linearity in a range of 1~7.5mg/L and linear correlation reached 0.9972 and detection limit reached 0.04177mg/L. RSD was between 1.82% to 9.69%. The method which is easy to operate and control because of rapid, simple, and required less equipment under mild conditions, is low cost. This paper provide certain theoretical and technical support for further development of rapid detection technologies and products of ethyl carbamate based on enzyme inhibition in products of alcoholic beverages and fermented foods

**Key words:** acetylcholinesterase; enzyme inhibition; ethyl carbamate

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)05-0299-04

氨基甲酸乙酯(Ethyl Carbamate, 简称 EC)是发酵酒在发酵及贮存过程中天然产生的一种有毒成分。研究表明, EC 是一种啮齿类动物的多位点致癌物, 可导致肺癌、淋巴瘤、肝癌和皮肤癌<sup>[1-2]</sup>等疾病。2007 年, 国际癌症研究所把 EC 对人类的致癌毒性归为 2A<sup>[3]</sup>类。目前 EC 的污染被认为是食品中继黄曲霉毒素之后的又一重要问题。因此对于酒类 EC 的检测是保证发酵酒类安全重要的第一步。

从上世纪七十年代在发酵酒精饮料中发现 EC 以来, 国内外文献关于 EC 的仪器分析检测方法的报道很多, 该法准确度高, 但存在仪器设备昂贵、前处理方法复杂、人员专业技术要求高、检测成本高等缺

点<sup>[4]</sup>。酶抑制率法是一种研究较多且相对成熟的对蔬果中有机磷、氨基甲酸酯类农药进行快速检测的技术<sup>[5]</sup>。然而, 和酶抑制法可检测大多数有机磷农药相比, 该法对氨基甲酸酯类农药的检测则仅限于几种带有萘基(西维因)、苯基(扑灭威、速灭威)、杂环(呋喃丹、抗蚜威、异索威)<sup>[6-8]</sup>等结构复杂的物质, 应用于 EC 检测则未见报道。

本研究首次采用酶抑制率法对 EC 进行检测。利用乙酰胆碱酯酶, 进行酶水解反应。并用溴水-氢氧化钠溶液处理 EC, 使其对乙酰胆碱酯酶的抑制率得以显著提高, 以建立一种快速测定 EC 的酶抑制法, 为进一步开发基于酶抑制原理的酒精饮料及发酵食品尤其是葡萄酒中 EC 快速检测方法技术及产品提供相应的理论和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

收稿日期: 2013-07-15 \* 通讯联系人

作者简介: 刘丽斌(1989-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 食品科学。

基金项目: 广州市科技计划项目(201300000079)。

碘化硫代乙酰胆碱(ATCHI, 10mg/mL, 溶解于蒸馏水中)、二硫代二硝基苯甲酸(DTNB, 10mg/mL, 溶解于 10mg/mL 的碳酸氢钠溶液中)、乙酰胆碱酯酶(ACHE)(BR, 酶活力 > 200U/g, 一个乙酰胆碱酯酶的酶活力定义为: 30℃, 0.1mol/L pH9.0 的 PBS 中, 酶蛋白每分钟分解底物碘化硫代乙酰胆碱的微摩尔数, 溶解于 0.1mol/L pH 9.0 磷酸盐缓冲液中, 13mg/mL) 广州菲博生物科技有限公司。

UV1800 型紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; PHS-25 型 pH 计 上海虹益仪器仪表有限公司; HH-1 数显恒温水浴锅 常州澳华仪器有限公司; XW-80A 旋涡混合器 上海精科仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 酶抑制率的测定方法 在试管中加入 5mL 样品溶液(0.1mol/L), 加入 100μL 氧化剂, 混匀, 反应 10min, 用 300μL 10% (w/v) 亚硝酸钠还原过量的氧化剂<sup>[4]</sup>, 再加入 100μL ACHE 溶液, 混匀, 加入 100μL DTNB 溶液、100μL ATCHI 溶液, 混匀后立即在 412nm 处比色, 在 3min 内每 0.1min 记录吸光度值。

以含有抑制因子的磷酸盐缓冲溶液作为样品, 以不含抑制因子的磷酸盐缓冲溶液作为参照样, 计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\Delta A_c - \Delta A_s}{\Delta A_c} \times 100$$

式中:  $\Delta A_c$ —参照样 3min 后与 3min 前吸光值之差;  $\Delta A_s$ —样品 3min 后与 3min 前吸光值之差。

1.2.2 氨基甲酸酯对酶活力的影响 配制浓度为 1、10、100、1000mg/L 的 EC 标准溶液(溶解于 pH9.0 磷酸盐缓冲溶液中)为样品, 不加氧化剂处理, 按 1.2.1 法测定反应过程中吸光度随时间的变化值。

1.2.3 最适氧化剂的比较 对溴水(3%)—氢氧化钠溶液、溴水(3%)、次氯酸钠(6%)、次氯酸钙(0.5%)<sup>[6]</sup>、氯酸钠(10%)、溴酸钠(10%)、双氧水(30%)<sup>[9]</sup>等几种氧化剂进行筛选, 得到对 EC 增敏效果最佳的氧化剂。实验过程中, 分别加入上述不同用量的氧化剂, 按 1.2.1 法测定反应过程中吸光度随时间的变化值, 进行氧化剂的增敏性比较。以抑制率 > 15% 为最低检出标准。

1.2.4 溴水-氢氧化钠溶液的处理氨基甲酸酯的最佳条件 以 2mg/L EC 标准溶液为处理样液, 根据 1.2.3 实验中得到的增敏性效果最好的溴水-氢氧化钠溶液, 进行配比、用量及作用时间的单因素实验。

1.2.5 工作曲线的绘制 分别选取 0.5、0.75、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.5、10mg/L 的 EC 溶液, 按 1.2.1 测定酶抑制率, 绘制出工作曲线。

1.2.6 检出限的确定 一个方法的检出限<sup>[10]</sup>可定义为: 能用该方法以 95% 的置信度检出的被测定组分的最小浓度。确定检出限时, 首先做 6 次空白测定, 获得空白测定结果的标准差  $S_{\text{空白}}$ , 按公式(检出标准 =  $t_{\text{空白}} S_{\text{空白}}$ )计算检出标准。然后对 0.5mg/L EC 标准溶液进行 6 次测定, 获得测定结果的标准差  $S$ , 查出相应的  $t$ , 按公式(检出限 = 检出标准 +  $S t$ )计算检出限。

1.2.7 精密度 选择 1.0、2.0、5.0mg/L 三个浓度 EC

标准溶液, 按 1.2.1 测定酶抑制率, 每一浓度重复测定 6 次, 求出相对标准偏差。

1.2.8 数据处理方法 实验结果采用软件 Origin 8.0 进行数据处理并作图分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶抑制率法测定氨基甲酸酯的条件

2.1.1 氨基甲酸酯对酶活力的影响 图 1 所示为 EC 对酶活力的影响。从图 1 可看出, 在 3min 内吸光度的变化值与 EC 溶液的浓度并没有相关性, 也就是说如果溶液中只存在 EC 分子, 对 AChE 酶活力基本上没有影响。这可能是由于 EC 分子不能与 AChE 活性中心相配合或分子互补, 因对 AChE 具有强抑制作用的化合物需为结构上类似于底物 AChI 的化合物, 大多数较有效的是芳基氨基甲酸酯类<sup>[11]</sup>。此种情况下, 利用酶抑制法测定 EC 是无效的。故只有采取一定的化学方法改变 EC 分子的结构, 才能抑制 AChE 酶活力, 从而达到利用酶抑制法进行 EC 测定的目的。

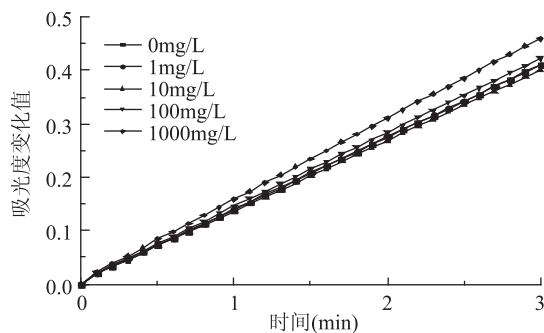


图 1 不同浓度的氨基甲酸酯对酶活力的影响

Fig.1 The influence of concentration of ethyl carbamate on enzyme activity

2.1.2 最适氧化剂 表 1 为利用各种氧化剂, 按 1.2.3 处理不同浓度的 EC 溶液, 然后检测对 AChE 的抑制率。

表 1 不同氧化剂处理氨基甲酸酯后对酶活力的抑制

Table 1 The enzyme inhibition of ethyl carbamate treated by different oxidants

| 氧化剂                    | 检出氨基甲酸酯的浓度(以抑制率 > 15% 为最低检出标准, mg/L) |
|------------------------|--------------------------------------|
| 溴水(3%)—氢氧化钠(0.01mol/L) | 1                                    |
| 溴水(3%)                 | 2                                    |
| 次氯酸钠(6%)               | 20                                   |
| 次氯酸钙(0.5%)             | 50                                   |
| 氯酸钠(10%)               | 无抑制效果                                |
| 溴酸钠(10%)               | 无抑制效果                                |
| 双氧水(30%)               | 无抑制效果                                |

由表 1 可知, 采用不同的氧化剂对 EC 进行处理后, EC 氧化产物对 AChE 酶活力有不同的影响。其中, 次氯酸钠、次氯酸钙、溴水、溴水-氢氧化钠溶液可以显著提高 EC 对乙酰胆碱酯酶的抑制率, 而其他

氧化剂则无效果。溴水-氢氧化钠溶液处理 EC 后,可检测到 1mg/L,故在后续的实验中选择溴水-氢氧化钠溶液处理 EC。

溴水-氢氧化钠溶液处理 EC 后,显著提高了 EC 对乙酰胆碱酯酶的抑制率。这可能是由于溴水-氢氧化钠溶液可使 EC 的结构衍生,在其分子的氨基上引入一个或两个溴,生成一溴代或二溴代氨基甲酸乙酯<sup>[12]</sup>,而后者与乙酰胆碱酯酶结合的能力比 EC 更强,从而具有对乙酰胆碱酯酶的抑制性。同样的,次氯酸盐(如次氯酸钠、次氯酸钙等)、次溴酸盐和溴、氯等卤素单质<sup>[13]</sup>均可以类似的方式作用于 EC,生成一氯代/溴代或二氯代/溴代氨基甲酸乙酯,从而进一步对乙酰胆碱酯酶进行抑制。

**2.1.3 溴水-氢氧化钠溶液的最佳配比** 图 2 所示为溴水-氢氧化钠溶液中溴水与氢氧化钠不同比例混合后对 EC 的增敏作用。

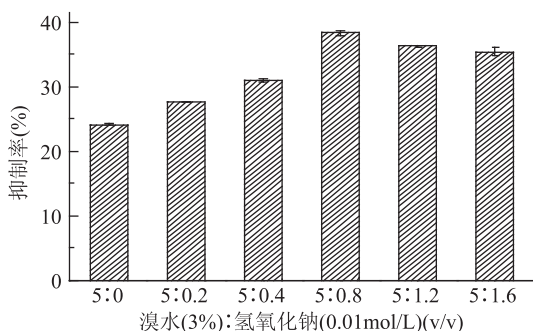


图2 溴水-氢氧化钠不同比例处理氨基甲酸乙酯的对酶抑制率的影响

Fig.2 The influence of proportions of bromine-sodium hydroxide on enzyme inhibition rate

由图 2 可看出,溴水与氢氧化钠按不同比例混合的溶液处理 EC 溶液后,其氧化物产物对 AChE 抑制率均有不同程度的提高,随着氢氧化钠比例的增加,酶抑制率不断提高,在溴水-氢氧化钠溶液的体积比为 5:0.8 时,酶抑制率最大。超过这个比例,抑制率反而会有轻微下降。这可能是由于超过最佳配比后,混合溶液中作用 EC 的有效成分浓度反而降低,故后续的实验中选择溴水与氢氧化钠的体积比为 5:0.8 作为最佳配比处理 EC 溶液。

**2.1.4 溴水-氢氧化钠溶液的最佳用量** 图 3 所示为溴水-氢氧化钠溶液按 5:0.8 混合后的用量对 EC 的增敏作用的影响。

如图 3 可看出,溴水-氢氧化钠溶液按 5:0.8 混合后处理 EC 溶液后,可以显著提高 EC 氧化产物对 AChE 的抑制率。在 50~100 $\mu$ L 内,随用量的增加,酶抑制率提高。超过 100 $\mu$ L,抑制率反而随用量的增加而降低。故后续实验中选择加入 100 $\mu$ L 溴水-氢氧化钠溶液(5:0.8)处理 EC 溶液。

**2.1.5 溴水-氢氧化钠溶液的最佳处理时间** 图 4 所示为溴水-氢氧化钠溶液按 5:0.8 比例混合后,处理 EC 的时间对其增敏作用的影响。

由图 4 可看出,用 100 $\mu$ L 溴水-氢氧化钠溶液混合溶液(5:0.8)处理 EC 溶液,在 15min 以内,随着处理时间增加,AChE 酶抑制率也在相应提高。15min

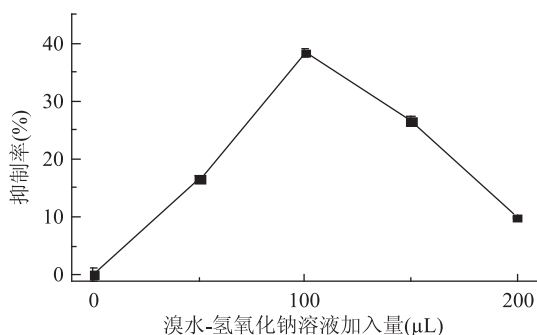


图3 溴水-氢氧化钠溶液加入量与抑制率之间的关系

Fig.3 The influence of dosage of bromine-sodium hydroxide on enzyme inhibition rate

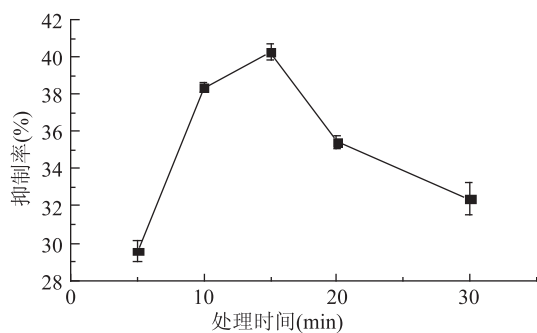


图4 处理时间对抑制率的影响

Fig.4 The influence of time on enzyme inhibition rate

以后,随处理时间增加,抑制率反而降低。这可能是由于时间过长,溴水-氢氧化钠溶液在空气中暴露会有一部分挥发损失,也有可能光照下发生分解反应。处理时间由 10min 增至 15min,抑制率由 38.35% 增至 40.26%,增幅较小,考虑到该法应用于快速检测 EC,故选择 10min 作为最佳处理时间。

## 2.2 酶抑制率法测定氨基甲酸乙酯

**2.2.1 工作曲线** 根据前面实验所得到的最佳实验条件下,利用不同浓度的 EC 标准溶液进行乙酰胆碱酯酶的抑制实验,将实验结果作图,获得相应的工作曲线,如图 5 所示。

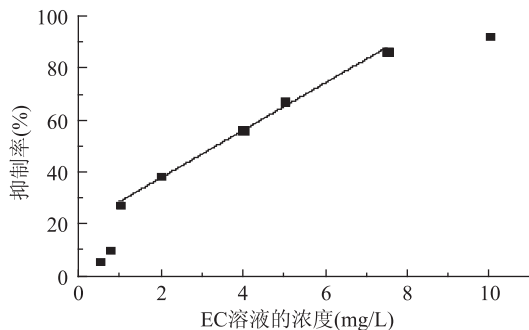


图5 EC工作曲线

Fig.5 Working curve of ethyl carbamate

由图 5 可知,经溴制剂增敏后的 EC 的线性范围为 1~7.5mg/L,线性拟合方程为  $y = 9.1375x + 19.4478$ ,相关系数  $r = 0.9972$ 。

**2.2.2 检出限和精密度** 由表 2 可得检出限为 0.04177mg/L。

表2 酶抑制率法测定氨基甲酸酯的检出限

Table 2 Detection limit of ethyl carbamate on inhibition rate

| 项目 | 空白       | 样品(0.5mg/L EC) |
|----|----------|----------------|
| 1  | 0.3853   | 0.3638         |
| 2  | 0.37035  | 0.3634         |
| 3  | 0.39055  | 0.3689         |
| 4  | 0.38005  | 0.3448         |
| 5  | 0.3830   | 0.3655         |
| 6  | 0.3944   | 0.3626         |
| SD | 0.007699 | 0.00855        |

实验的精密度实验结果如表3所示。

表3 酶抑制率法测定氨基甲酸乙酯的精密度(%)

Table 3 Precision(%) of ethyl carbamate on inhibition rate

| EC 浓度 | 1mg/L  | 2mg/L  | 5mg/L  |
|-------|--------|--------|--------|
| 1     | 24.18  | 33.92  | 65.74  |
| 2     | 25.15  | 36.21  | 66.73  |
| 3     | 27.02  | 37.74  | 67.22  |
| 4     | 27.23  | 37.94  | 67.35  |
| 5     | 30.13  | 38.15  | 67.97  |
| 6     | 30.91  | 39.37  | 69.40  |
| SD    | 2.6597 | 1.9072 | 1.23   |
| RSD   | 9.6938 | 5.1238 | 1.8249 |

由表3可知RSD在1.82%~9.69%之间,表明该方法具有良好的精确度。

### 3 结论

3.1 氧化剂的处理可使EC对AChE的抑制率显著提高,其中以溴水(3%)-氢氧化钠溶液的作用最好。100 $\mu$ L溴水(3%)-氢氧化钠(0.01mol/L)溶液( $v_1:v_2=5:0.8$ )对1mg/L EC作用10min,抑制率为27.16%。

3.2 测定EC的线性范围为1~7.5mg/L,相关系数 $r=0.9972$ ,最低检出限为0.04177mg/L, RSD在1.82%~9.69%之间。

3.3 方法所用试剂成本低,方法快速简单、条件温和易于控制、所需设备少,易于操作。本文为进一步开发基于酶抑制原理的酒精饮料及发酵食品中EC快速检测方法技术及产品提供了一定相应的理论和技术支持。

### 参考文献

- [1] Sakano K, Oikawa S, Hiraku Y, *et al.* Metabolism of Carcinogenic Urethane to Nitric Oxide is Involved in Oxidative DNA Damage [J]. *Fredical Biology and Medicine*, 2002, 33(5): 703-714.
- [2] Miller Y E, Dwyer N, Keith R L, *et al.* Induction of A High Incidence of Lung Tumors in C57BL/6 Mice with MuLtipLe Ethyl Carbamate Injection [J]. *Cancer Letters*, 2003, 198(2): 139-144.
- [3] IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs[C]. 1987, 142(7): 1-440.
- [4] 梁新红, 赵瑞香, 周全霞. 酒精饮料中氨基甲酸乙酯的检测方法研究进展[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(8): 400-403, 408.
- [5] 赵艳华. 农产品农药残留速测中常见影响因素的探讨[J]. *吉林农业*, 2012(3): 13-14.
- [6] 辽宁省质量技术监督局. GB/T 18630-2002 蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯农药残留量的简易检验方法-酶抑制法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [7] 余孝颖. 有机磷农药对不同生物来源的胆碱酯酶选择性抑制的研究[J]. *环境科学*, 1996, 17(4): 41-43.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.199-2003 蔬菜中有机磷及氨基甲酸酯农药残留量的快速检测[S] 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] 朱霞萍, 何秋玲, 尹继先, 等. 双氧水活化-面粉酶抑制法测定蔬菜中有机磷农药[J]. *广州化学*, 2006, 31(3): 32-35.
- [10] 黄晓钰, 刘邻渭. 食品化学与分析综合实验[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 24-25.
- [11] Toshio N. Neurotoxicology of Insecticides and Pheromones [M]. New York: Plenum Press, 1978: 277-279.
- [12] Gutch P K, Singh R, Prabha S, *et al.* New Effective Method for Preparation of N, N - Dichlorocarbamates [J]. *Synthetic Communications*, 2011, 41: 1554-1557.
- [13] Gutch P K, Singh R, Suryanarayana M V S. A New Modified Synthetic Method for Preparation of N, N - Dichlorocarbamates [J]. *Indian Journal of Chemistry*, 2011, 5: 1677-1679.

欢迎订阅《食品工业科技》,  
邮发代号 2-399