

N-亚硝基化合物 分析方法

胡荣梅 马立珊 编著



科学出版社

0.23

内 容 简 介

本书论述了强化学致癌物质 N-亚硝基化合物的研究概况和分析方法。在系统介绍 N-亚硝基化合物的化学和物理性质和各类样品提取、分离和纯化方法的基础上,分章详细介绍了 N-亚硝基化合物的可见和紫外分光光度法、薄层色谱法、气液色谱法、气相色谱-质谱法、极谱法和热能分析法等仪器分析方法,供各种设备条件的实验室选择采用。本书还介绍了八种常用 N-亚硝胺标准样品的合成方法和五类 N-亚硝基化合物的致癌活性。

本书可供环境科学、医药卫生、食品检验等方面的科研、教学和其他分析检测工作者参考。

N-亚硝基化合物分析方法

胡荣梅 马立珊 编著

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1980 年 8 月第 一 版 开本: 787×1092 1/32

1980 年 8 月第一次印刷 印张: 5 7/8

印数: 0001—3,900 字数: 131,000

统一书号: 13034·51285

本社书号: 1783·11-185

定价: 0.92 元

导 言

N-亚硝基化合物的强烈致癌性和广泛分布引起了环境科学、肿瘤病因、食品卫生等方面的广大科研工作者的重视和关注。在对 N-亚硝基化合物进行研究和检测的要求日益迫切的情况下,我们参阅了国内外的有关文献资料,结合我们的研究工作,编写了这本系统的分析方法,供有关科技工作者参考。

第一章概述了 N-亚硝基化合物研究和分析方面的问题,如研究的重要意义和检测的必要性, N-亚硝基化合物及其前身物在食品、水、土等自然和人为环境中的分布,以及在生物体内和体外合成的条件和可能性等。

第二章介绍了亚硝化剂和亚硝化作用, N-亚硝基化合物的化学性质,如与无机酸的作用、还原、氧化、硝化、环化,形成偶氮烷链、分解、脱胺和光化学反应等性质,它的一般物理性质,结构和光谱性质。为分析方法和进一步研究提供了根据和基础。第三章详细介绍了从各种性状差别很大的基质中提取、分离和纯化 N-亚硝胺的各种技术,以满足各类样品制备的特殊要求。

由于目前需要自力更生解决 N-亚硝胺的标准样品,根据我们的经验,在实验室完全有可能合成高纯度的标准样品,故将 N-亚硝胺的合成方法详细列在第四章内,具体介绍了常用的八种 N-亚硝胺的合成条件和步骤。

从第五章到第十一章,系统地叙述了国内外常用的 N-亚硝基化合物的仪器分析方法,即可见和紫外分光光度法、薄层

色谱法、气液色谱法、气相色谱-质谱法、极谱法、热能分析法和非挥发性 N-亚硝胺总量测定法。每种方法按方法原理、仪器设备、溶剂和试剂、实验方法的程序进行说明。力求使从事这方面研究的工作人员能根据所在实验室的具体设备条件选择合适的分析方法,开展研究和检测工作。虽然国内绝大多数单位的实验室缺乏气相色谱仪-质谱仪和热能分析仪等大型仪器,但考虑到长远的发展和这些分析方法的高灵敏度,对气相色谱-质谱法和热能分析法还是作了介绍,以反映 N-亚硝基化合物分析的进展和全貌。

附录列出了对称性二烷基亚硝胺、不对称二烷基亚硝胺、具功能团的亚硝胺、环状亚硝胺和烷基(或芳基)亚硝酰胺的致癌活性。

由于时间仓促,水平有限,经验不足,本书难免出现缺点和错误,恳切地期望专家和读者们指正,并望介绍宝贵经验,以便将来作进一步的修改和补充。

目 录

导言	v
第一章 N-亚硝基化合物研究和分析方法概述	1
1.1 化学致癌物质 N-亚硝基化合物的重要性	1
1.2 N-亚硝基化合物及其前身物的分布	3
1.3 N-亚硝基化合物的体内外合成	4
1.4 N-亚硝基化合物检测的必要性	6
1.5 N-亚硝基化合物分析方法概述	7
第二章 N-亚硝基化合物的化学和物理性质	10
2.1 亚硝化剂和亚硝化作用	10
2.2 N-亚硝基化合物的化学性质	12
2.3 N-亚硝基化合物的物理性质、结构和光谱	27
第三章 N-亚硝胺化合物的提取、分离和纯化方法	32
3.1 样品制备概述	32
3.2 仪器设备	33
3.3 溶剂和试剂	36
3.4 分离方法	39
3.5 纯化方法	45
第四章 N-亚硝胺标准样品合成方法	50
4.1 二甲基亚硝胺	50
4.2 二乙基亚硝胺	52
4.3 二正丙基亚硝胺	53
4.4 二正丁基亚硝胺	54
4.5 甲基苯基亚硝胺	56
4.6 甲基苄基亚硝胺	57
4.7 二苯基亚硝胺	59

4.8	N-甲基-N-亚硝基尿素	60
第五章	可见和紫外分光光度法	64
5.1	方法原理	64
5.2	仪器设备	65
5.3	试剂	66
5.4	实验方法	67
第六章	薄层色谱法	72
6.1	方法原理	72
6.2	仪器设备	78
6.3	溶剂与试剂	79
6.4	实验方法	82
第七章	气液色谱法	94
7.1	方法原理	94
7.2	仪器设备	96
7.3	溶剂与试剂	97
7.4	实验方法	102
第八章	气液色谱-质谱法	123
8.1	方法原理	123
8.2	仪器设备	131
8.3	溶剂与试剂	131
8.4	实验方法	132
第九章	极谱法	141
9.1	方法原理	141
9.2	仪器设备	143
9.3	试剂	143
9.4	实验方法	144
第十章	热能分析法	147
10.1	方法原理	147
10.2	仪器设备	150
10.3	试剂	150

10.4 实验方法	150
第十一章 N-亚硝胺化合物的总量测定法	154
11.1 方法原理	154
11.2 仪器设备	155
11.3 试剂	155
11.4 实验方法	156
附录: N-亚硝基化合物的致癌活性	158
参考文献.....	170

第一章 N-亚硝基化合物研究和 分析方法概述

1.1 化学致癌物质 N-亚硝基化合物的重要性

N-亚硝基化合物是一类很强烈的化学致癌物质,包括亚硝胺和亚硝酰胺两类化合物,通常泛称为亚硝胺,它们能诱发许多动物的恶性肿瘤。与N-亚硝基化合物近似的化合物还有偶氮化合物和三氮烯类化合物。

N-亚硝基化合物对人的危险性开始受到人们的重视是在本世纪五十年代。1954年英国某工业研究实验室内从事用二甲基亚硝胺为溶剂工作的三名研究人员中,有二人患肝硬化,另一人死于支气管肺炎,在病理解剖时也发现有肝硬化。Barnes 和 Magee 研究了这次中毒事件,证明三人的肝硬化确实与接触二甲基亚硝胺有关。随后继续进行了大量的动物实验,结果表明,二甲基亚硝胺能成功地诱发大鼠肝癌。从此以后,N-亚硝基化合物作为环境中的潜在的致癌物质引起了各方面研究者的重视和关注,开展了大量的实验研究工作。在经动物实验初步证实有致癌作用的一千多种无机和有机化学致癌物中,N-亚硝基化合物是研究得较多,资料积累较完整的一类化合物。

目前,已知的N-亚硝基化合物有一百余种,其中经动物实验证明具有致癌作用的约占75—80%。

N-亚硝基化合物能诱发各种动物的肿瘤,即包括水生和陆生的大鼠、小鼠、家鼠、豚鼠、虹鳟鱼等鱼类、蝾螈、鸚鵡、貂、

兔、狗、猪以及与人更为接近的灵长类的猿猴等，无例外地都能诱发恶性肿瘤。N-亚硝基化合物几乎能引起动物所有的重要脏器和组织的各种肿瘤，致癌的主要靶器官是肝、食管、肺、胃、肾，在 92 种能诱发肿瘤的 N-亚硝基化合物中，引起肝癌的 33 种，能诱发食管癌的 32 种，此外还能诱发鼻腔、气管、支气管、前胃、腺胃、肠、胰、口腔、舌、咽喉、乳腺、颞、耳道、眼睑、膀胱、子宫、阴道、卵巢、骨盆、睾丸、造血系统、血管、中枢及末梢神经系统、皮肤和腹腔等注射部位的肿瘤。N-亚硝基化合物能通过怀孕动物的胎盘引起子代动物发生肿瘤，以不同给药途径使受孕的母鼠摄入 N-亚硝基化合物后，新生的子代动物出现畸形，或者经过一段时间出现各种器官的肿瘤，而且在母系和子代动物之间器官的亲合性是一致的。通过胎盘作用于子代动物的敏感性比母系动物本身估计要高 10—100 倍。N-亚硝基化合物在一次大剂量作用于动物后，经过一定的潜伏期，仍会发生肿瘤。

医学科学的所有进展都是建立在动物实验的基础之上的，关于致癌物质从动物实验结果应用到人体上，其主要的依据是，已知的所有对人有致癌作用的物质，包括砷在内，能诱发某些动物的肿瘤；同时，致癌作用是一种细胞现象，不同动物物种之间细胞极相类似，脱氧核糖核酸是所有细胞发生的基础。以二甲基亚硝胺进行动物体内代谢试验的研究结果表明，在人和家鼠的肝脏中的代谢作用极为相似，人肝薄片中的代谢速度与鼠肝中相近，同时核酸水平的甲基化也是相似的。由于人与实验动物体内的代谢过程和强烈毒性彼此相似甚或相同，以及 N-亚硝基化合物是许多动物，包括与人接近的灵长类动物的致癌物质，几乎没有哪些动物能抵抗它的强烈而典型的致癌作用。因此可以毫不含糊地认为，N-亚硝基化合物是引起人类恶性肿瘤的一类重要的致癌物质。

1.2 N-亚硝基化合物及其前身物的分布

N-亚硝基化合物在自然界分布很广泛。它们存在于烟草的烟中,在谷类或酒类饮料中。Neurath 证明烟草的烟中有微量的亚硝胺。Ender 和 Sakshang 发现用亚硝酸盐处理过的鱼粉中有二甲基亚硝胺。Marquardt 和 Hedler 证明西德市场上出售的含有亚硝酸盐和亚硝胺的面粉,加热后其中亚硝胺的含量增加。Kroller 发现漂白的面粉内有微量的二乙基亚硝胺,乳酪中也有微量的 N-亚硝基化合物。Hedler 等报导在麦杆、麦、麦粉、消毒牛奶和乳酪中均存在二乙基亚硝胺。Dupless 等证实非洲南部特兰斯开地区浆果中存在亚硝胺。Burrell 则从该地区的食物中分离出二甲基亚硝胺。Ender 和 Ceh 报导了在熏肉、肉、蘑菇中有少量亚硝胺。Wunn 和 Roach 发现非洲南部班图族地区生长的浆果中有二甲基亚硝胺,赞比亚的一种酒精饮料中含有亚硝胺。Sen 从乳酪和青鱼样品中测到亚硝胺, Panalaks 测定了 197 个各种保藏食物样品,其中 57 个样品发现含有二甲基亚硝胺。我国消化系统恶性肿瘤高发地区的食物中也检测出 N-亚硝基化合物。

工业方面,N-亚硝基化合物用于制造染料快色素等。N-亚硝基化合物亦用于从伯胺和叔胺中分离和纯化仲胺,用作溶剂、润滑剂、机动汽油的添加剂、杀虫剂、聚合催化剂和聚合阻滞剂等。

亚硝胺是很容易由前身物仲胺和亚硝酸盐反应合成的,无论是在实验室和自然条件下还是在人体和动物体内,合成反应均能顺利进行。因此在研究亚硝胺致癌作用时,必须考虑到其前身物的存在和分布。

仲胺和烷基酰胺广泛存在于鱼类食品、鱼类产品、谷类、

茶和烟草中。鱼类,特别是海鱼和鱼子中仲胺较多,主要是二甲胺和二乙胺。烹调可能增加食物中仲胺的含量。用作药物、食物和日用品添加剂的胺类也很多,如蛋白质分解形成的肌氨酸用来制造去污剂和牙膏的添加剂,甲苯基乙基胺的某些衍生物用作兴奋剂及治疗血液循环障碍,哌嗪用于治疗寄生虫和关节炎以及中和酸性药物。精胺和精胺类的仲胺用作食品加工的消毒剂。尿素的衍生物烷基酰胺类化合物,有些可作降血糖的口服药, β -3-(对硝基苯基)脲基丙酸是一种甜味剂。Negwer 有机化学药物手册列出的仲胺达 300 种,东德药典规定口服的仲胺有 23 种。

N-亚硝基化合物的前身物亚硝酸盐和硝酸盐广泛分布在土壤、水体和食物中。土壤是水体和植物性食品中硝酸盐和亚硝酸盐的主要来源,而土壤中的硝酸盐和亚硝酸盐则来自土壤有机物质的分解、施用的有机和化学氮肥、含氮工业废物和废水的污染等。含硝酸盐的药物也为数甚多。亚硝酸盐常用作食物添加剂。正常人的唾液中也含有亚硝酸盐,每天每人唾液中的亚硝酸盐约为 6—12 毫克,大致相当于一日三餐以腌肉为主菜时所摄入的亚硝酸盐量。根据初步试验计算,人们摄入的硝酸盐和亚硝酸盐的量,二分之一来自唾液,四分之一来自饮用水,其余四分之一来源于腌肉制品和其他食品。

在合适的条件下,亚硝酸盐和仲胺的存在是很容易形成 N-亚硝基化合物的。

1.3 N-亚硝基化合物的体内外合成

一般说 N-亚硝基化合物能由它的前身物——亚硝酸盐和胺类作用合成,影响合成的条件有如下几种:(1)介质的酸

碱度。Ziebarth 以人们大量而长期服用的药物哌嗪等为例,在酸度为 pH 2.8—3.0 时,形成相应的亚硝胺量最高。Ender 和 Ceh 证明在正常生理条件的 pH 6.0—7.0,从 -18°C 到 22°C 温度范围内,以及在偏碱性的 pH 7.6 而反应时间较长时,均能形成 N-亚硝基化合物。

(2) 亚硝酸盐的浓度。Fiddler 等人的试验表明:加工香肠时,随添加的亚硝酸钠量的增加,合成的 N-亚硝基化合物量增高。

(3) 胺的种类和浓度。Lijinsky 和 Singer 的资料说明,烷基的叔胺在醋酸 (pH 3.7—4.0) 中亚硝化的数量,随链长的增加,即甲基、甲基氧化物、乙基、正丙基、正丁基、正辛基这样的顺序而增加。同种叔胺中随浓度的增加,合成的亚硝胺亦增加。

(4) 作用时间。Zeibarth 用哌嗪等药物在 pH 3.0 的缓冲液中随作用时间的延长,合成的 N-亚硝基化合物量增加,但以起始的头二个小时增长的速度较快。

(5) 温度。Pensabene 等人在不同温度的硅油中加热亚硝基脯氨酸,然后测定亚硝基吡咯烷的含量,结果表明,在温度为 100°C 或更低时,即使加温 20 分钟,不产生或只产生很少量的亚硝基吡咯烷,当温度升到 185°C 时,加热时间缩短为 10 分钟,形成的亚硝基吡咯烷量也大大增加。

其他如胺类化合物的碱性和催化剂等,对 N-亚硝基化合物的合成亦有很大的影响。

N-亚硝基化合物在生物体内的合成问题,联系到人和其他哺乳动物的生理特点以及前身物的丰富来源,体内合成的可能性是很大的。Tannenbaum 报导正常人的唾液中有亚硝酸盐,Boyland 提到唾液中亦有相当数量的硫氰酸盐,在吸烟者的唾液中,硫氰酸盐的含量更高,硫氰酸盐是甲基苯胺和亚

硝酸盐形成 N-亚硝基化合物的催化剂,1 毫克分子的硫氰酸盐可提高亚硝化率 550 倍。唾液中还有溴和氯离子,它们对由前身物合成 N-亚硝基化合物亦有催化作用。催化活性的顺序为 $\text{SCN}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ 。

人和许多哺乳动物的胃是适宜于合成 N-亚硝基化合物的,大部分哺乳动物的胃液酸度为 pH 1—3,人的正常胃液酸度大致为 pH 1.8—2.0,进食后可使 pH 升到 7.0 左右,但经 15—20 分钟,又可回复到 pH 3.0。人胃中有还原细菌和硫氰酸盐。据 Sander 和 Seif 的报告,甚至在服用硝酸盐的情况下,与相应的胺类在胃内能迅速合成 N-亚硝基化合物。

小肠为接近中性的环境,但肠道细菌的一些品种可以使芳香胺和脂肪胺与硝酸盐合成 N-亚硝基化合物。Sander 等报导不同的肠道细菌对合成的 N-亚硝基化合物的种类和数量的影响很大。

除消化系统外,Brooks 和 Harrington 等证明,在泌尿和生殖系统中可合成 N-亚硝基化合物,如受感染的膀胱、子宫颈和阴道分泌混合物中可形成二甲基亚硝胺。

1.4 N-亚硝基化合物检测的必要性

N-亚硝基化合物及其前身物在人们生活和工作环境中的广泛分布,亚硝胺体内外合成的可能性,以及最主要的 N-亚硝基化合物的广谱而强烈的致癌活性,使此类化合物在恶性肿瘤的病因研究中占有极为重要的地位。

检测环境中 N-亚硝基化合物及其前身物的种类和数量,是恶性肿瘤流行病学和病因学的重要研究内容之一。分析测定某些恶性肿瘤高发区和低发区,即不同等级的发病率或死亡率地区之间,不同来源和生活习惯有明显差别的人群之间,

在食物、饮用水、土壤中,尤其是腌制加工的鱼、肉、蔬菜中的 N-亚硝基化合物和其前身物,对恶性肿瘤环境病因的阐明是十分有用的。

为了保证环境质量和人畜健康,国外对 N-亚硝基化合物及其前身物在食物中的含量已作为监控项目经常进行检测。

二十多年来, N-亚硝基化合物的实验生物学研究,已经积累了大量的资料,各种动物的诱癌剂量报导较多。但是,大多数肿瘤病因研究者的倾向性观点认为恶性肿瘤是综合因素引起的。考虑到 N-亚硝基化合物与黄曲霉毒素等霉菌毒素、病毒、有机氯农药等致癌或促癌因素相互间有协同作用,这就要求在 N-亚硝基化合物更低浓度的检测方面提供更为灵敏和可靠的方法。

快速、灵敏和准确的 N-亚硝基化合物及其前身物的测定方法,对研究癌变过程及其机理,阐明 N-亚硝基化合物及其前身物进入人体后,在酶的作用下如何转变成最终的致癌物,以及 N-亚硝基化合物合成的阻断和有效的预防措施研究方面,都是十分迫切需要的。

经常和全面地检测环境中的 N-亚硝基化合物是环境科学、恶性肿瘤流行病学和病因学、实验肿瘤学和食品卫生学等方面的科学研究人员和工作人员的重要任务。为此,对目前分散于各种刊物上的 N-亚硝基化合物的测定方法进行综合比较是很有意义的,它将为统一分析方法和分析资料的相互对比提供有利条件,并为推动化学致癌物质的研究、阐明恶性肿瘤的发病机理、攻克癌症等作出一定的贡献。

1.5 N-亚硝基化合物分析方法概述

N-亚硝基化合物是一类化学结构和性质极为多样的化

合物。依照化学结构可以分为：对称性二烷基（芳基）亚硝酸胺，不对称二烷基亚硝酸胺，具有功能团的亚硝酸胺、环状亚硝酸胺和烷基（或芳基）亚硝酸酰胺等；按照物理性质又有挥发性和非挥发性亚硝酸胺之分。N-亚硝基化合物的性质和结构的差异性，决定了不能采取简单和划一的分析方法。同时，环境中含有N-亚硝基化合物的样品种类又十分繁多，有动物性食物腌制加工的鱼、肉类，有植物性的粮食谷类作物和蔬菜腌菜类，还有人们嗜好抽吸的烟草的烟气样，饮用的水样，以及与作物和饮用水密切有关的土壤样品等，包括气态、液态和固态三种状态的样品，这就使分析前的样品制备工作复杂化，因此在N-亚硝基化合物分析的样品制备方面出现了多种类型的操作方法。由于这些原因，研究者在各自具体的实验室条件下，针对各种检测样品，发展了多种的测定方法。本书力求将目前国内外广泛采用的N-亚硝基化合物分析法进行较全面的归纳和介绍，以便从事这方面研究的科技工作者和分析化验人员能根据分析样品的特点和各实验室的仪器设备等具体条件，选择合适的方法进行分析测定。

N-亚硝基化合物的分析方法主要包括提取、分离、纯化和检测、确证等步骤。以目前分析最多的食物样品为例，其中N-亚硝基化合物的含量一般在微克/公斤范围内，即 ppb 水平，待测组分的含量是很低的，而食物中含有的其他成分，却十分复杂，而且数量大，在分析N-亚硝基化合物时它们往往会起干扰作用，必需预先去除。因此N-亚硝基化合物的分离和定量检测的每一步骤都是十分重要的，需要克服每一步骤可能遇到的困难，严格按照操作程序，谨慎工作，才能取得可靠的分析结果。

N-亚硝基化合物的提取、分离和纯化，统称样品制备或离析方法。目前通用的离析方法大都采用下列基本技术：

- (1) 溶剂萃取和分配;
- (2) 蒸馏方法,包括中性、酸性、碱性和真空蒸馏;
- (3) 消煮法;
- (4) 纯化技术,如柱层色谱法,薄层色谱法和离子交换法。

N-亚硝基化合物的检测和确证方法,随近代分析化学的发展和仪器的应用,已经相当多样和完善,选择性和灵敏度都在不断提高。根据分析方法的原理可以分为:

- (1) 紫外和可见光分光光度法;
- (2) 薄层色谱法;
- (3) 气相色谱法;
- (4) 气相色谱-质谱联用法;
- (5) 极谱法;
- (6) 热能分析法;
- (7) 非挥发 N-亚硝胺总量测定。

其中,薄层色谱法和气相色谱法是 N-亚硝基化合物的主要分析方法,测定下限可达 5—10 毫微克,采用氧化技术使 N-亚硝基化合物转化为相应的 N-硝胺后,用带电子捕获检测器的气相色谱法检测灵敏度为 16 微微克。一般测定食品中的 N-亚硝基化合物时,以薄层色谱法和气相色谱法作为初筛,初步检测出的阳性和含量较高的样品,再用气相色谱-质谱仪确证。总的讲,N-亚硝基化合物的分析化学正在迅速发展之中。

第二章 N-亚硝基化合物的化学和物理性质

N-亚硝基化合物的化学性质和物理性质是 N-亚硝基化合物的分析测定方法赖以建立的主要依据。从分析样品的提取、分离、净化到 N-亚硝基化合物的检测、确证, 每一个操作步骤都决定于 N-亚硝基化合物本身的化学和物理性质, 利用其不同于其他化合物的特性。现有分析方法的改进和新测定方法的设计, 在更大程度上, 取决于对 N-亚硝基化合物的基本理化性质的了解和运用。因此, 本章所叙述的 N-亚硝基化合物的化学和物理性质, 不局限于现有分析法所涉及的范围, 将在更为广泛和深入的基础上讨论其化学和物理性质, 供从事这方面的研究和分析工作者进一步提高和改进工作质量时的参考。

2.1 亚硝化剂和亚硝化作用

亚硝化作用是有机化合物分子中的碳、氮等原子上引入亚硝基-NO 的反应。通常是用亚硝酸等进行的。

亚硝化作用也可由近似于亚硝酸的亚硝化剂反应进行。亚硝化剂的基本结构为 NOX, 这里的 X 为氧、碱金属、NO₂、NO₃、卤素、四氟化物、H₂S 或 OH₂⁺ 等。

在碱金属亚硝酸盐与无机酸相互作用时形成亚硝酸, 进一步的转化则决定于反应条件。二个分子的亚硝酸经过亚硝酸根离子的“自动质子化”和亲核化学反应阶段转变成三氧化二氮。