

用气相色谱 热能分析仪同时测定 挥发性亚硝胺和烟草特有亚硝胺^{*}

李文寿

韩国人参烟草研究院 韩国 大田

摘 要

N 亚硝胺很容易在食品、饮料、化妆品、药物、卷烟烟气、各种消费品、甚至在人的胃中形成,已经发现有许多亚硝胺具有致癌性。本项研究开发了一种用气相色谱-热能分析仪同时测定烟草和烟气中的挥发性亚硝胺(VNA)和烟草特有亚硝胺(TSNA)的方法。文章详细介绍了从烟草中萃取亚硝胺的实验条件,讨论了从主流烟气和支流烟气中收集亚硝胺的方法。采用本方法,可在同一张 GC/TEA 色谱图上分离得到烟草中所有的 13 种亚硝胺。该方法具有灵敏度和准确度高、重复性好的特点。另外,文中还讨论了添加同位素硝酸盐和烟碱对主流烟气中 TSNA 含量的影响。此方法也可用于尿液和环境烟气中 VNA 和 TSNA 的分析。实验发现吸烟者与非吸烟者尿液中 VNA 的浓度差异很小,而 TSNA 的浓度很低,几乎可以忽略。室内空气中的 VNA 浓度为 $1\sim 8\text{ ng/m}$, TSNA 浓度太低,几乎检测不到。这一结果提示,环境烟气与癌症的关系应当重新考虑。

关键词: 气相色谱 热能分析法 亚硝胺 主流烟气 支流烟气 环境烟气

通常,在酸性、碱性或中性条件下,通过胺或酰胺与二氧化氮、四氧化二氮和硝酸盐这些亚硝基化剂的反应,容易形成亚硝胺。在人类生活环境中也有亚硝胺形成,如在空气、食物、饮料、化妆品、药物、烟气等许多消费品中发现有亚硝胺存在。食物中主要的挥发性亚硝胺是亚硝基二甲胺、N-亚硝基哌啶、N-亚硝基吡咯烷,若食物中存在这些亚硝胺,那么几乎是食物和包装材料受污染导致的。熏鱼中的亚硝胺含量高,其中亚硝基二甲胺含量高达 $8.0\mu\text{g/kg}$ 。亚硝胺还会在人的胃中形成(表 1)。已知许多 N-亚硝基化合物,包括挥发性亚硝胺、非挥发性亚硝胺、烟草特有亚硝胺和亚硝基氨基酸是致癌的,因此,人们正在努力研究定量测定亚硝胺的精确方法。

表 1 饮食中的挥发性 N 亚硝胺

德国人每天摄入量 (ng/d)

性别	N-亚硝基二甲胺	N-亚硝基哌啶	N-亚硝基吡咯烷
男性	286.0	5.9	1.6
女性	176.0	5.1	1.6

本研究的目的是寻找同时定量烟草特有亚硝胺

(TSNA)和挥发性亚硝胺的分析方法,给出常规分析烟草和烟草相关产品中亚硝胺的可能性,并研究环境烟气和人体尿液中 TSNA 和 VNA 的测定方法。

本项研究首先是要寻找 SPB-5 宽孔毛细管气相色谱法-热能分析仪系统的最佳工作条件,并设法同时分离 TSNA。另外,在实验的过程中研究亚硝胺的回收率。人工形成、萃取和提纯。气相色谱-热能分析仪具有高选择性和高灵敏度的特点,适用于亚硝胺的定量分析。

在 1975 年以前,人们用气相色谱法、火焰电离检测器和气相色谱-氮磷检测器来分析烟草中的亚硝胺,但由于化学发光检测器具有灵敏度高和选择性高的特点,现在人们就用它和热能分析仪进行亚硝胺的分析。目前通过抑制亚硝化的研究,证明含硫有机物和植物酚类化合物是有效的亚硝化抑制物。在过去的 10 年中, Hoffman 博士及德国癌症研究中心的 Spiegelhalder 先生一直从事烟草和烟气中亚硝胺的研究。最近,欧洲菲莫公司的 Tricker 博士和 RTR 公司的 Caldwell 博士也在从事这方面的研究。

1 实验方法与条件

图 1 为本研究中使用的热能分析仪-气相色谱仪

* 收稿日期: 1998-07-07. 本文由何志庆译。

的工作流程图,该系统具有可选性、可重复性和精度高的优点。

图 2给出了毛细管和陶瓷热分解器的连接方法。陶瓷热分解器在气相色谱-热能分析仪 (GC/TEA)系统中是最重要的部分。将毛细管插入陶瓷管内 16cm 有利于气相色谱分析中的峰值分离

GC-TEA条件如下:

气相色谱仪: HP5890II

色谱柱: SPB-5石英柱 ($30\text{m} \times 0.53\text{mm}$)

进样口温度: 200°C

炉温: 50°C (5min), $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到 230°C (7min)

热能分析仪: Thermodyics 502B

裂解温度: 陶瓷管 46.5cm , 475°C

接口温度: 275°C 反应室真空度: 53.33Pa

冷阱: -125°C (乙醇-液氮)

它的显著特点是使用 SPB-5宽孔毛细管,热能分析仪热分解器的温度控制在 475°C 。

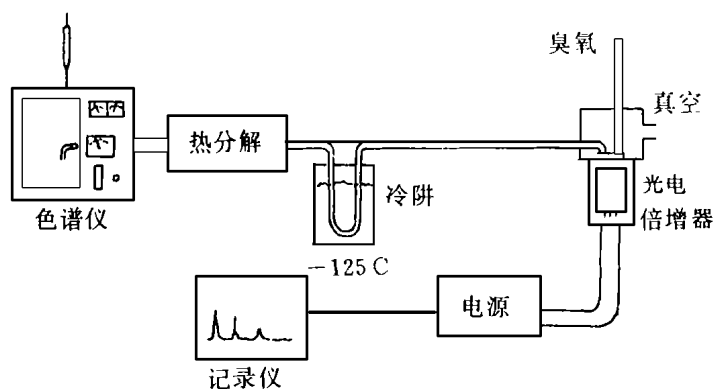


图 1 热能分析仪的工作流程图

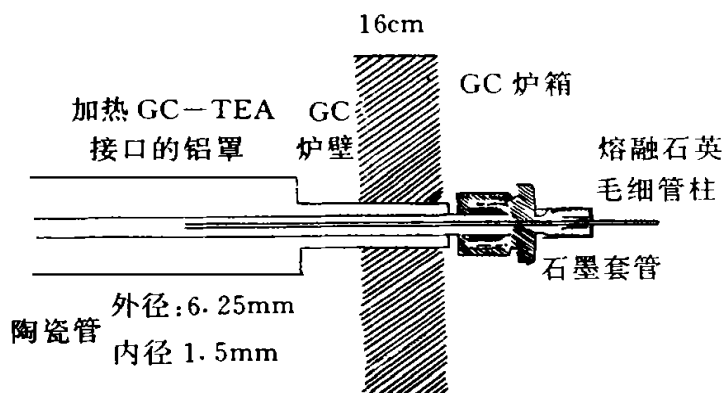


图 2 毛细管和热能分析仪检测器间的真空密封连接

图 3是 Extrelat柱设计图。本项研究用于进行烟叶亚硝胺分析的萃取和提纯,这种设计对提纯烟叶中的亚硝胺非常有效,分析烟草中的亚硝胺和特有亚硝

胺非常简单。将 5g 烟样悬浮于 100ml, 10mmol/L 氢氧化钠溶液中,氢氧化钠溶液中含有抗菌剂乙基汞硫代水杨酸钠。分析烟草特有亚硝胺时,在二氧化硅萃取

材料下放一层 5g 的抗坏血酸,目的是收集尼古丁。用二氯甲烷作洗脱剂,在氮气保护下旋转蒸发,获得 1ml 浓缩样品用于分析。

图 4 为烟气亚硝胺的吸烟装置。吸烟机型号为 Heiner borgwaldt RM20/cs

在收集主流烟气流时,要采用必要的预防措施,防止人为形成亚硝胺。点燃烟支的主烟气流在标准状态下,通过剑桥滤片或三个清洗瓶。

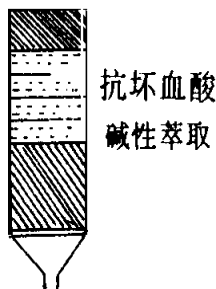


图 3 Extrelet 柱的设计图

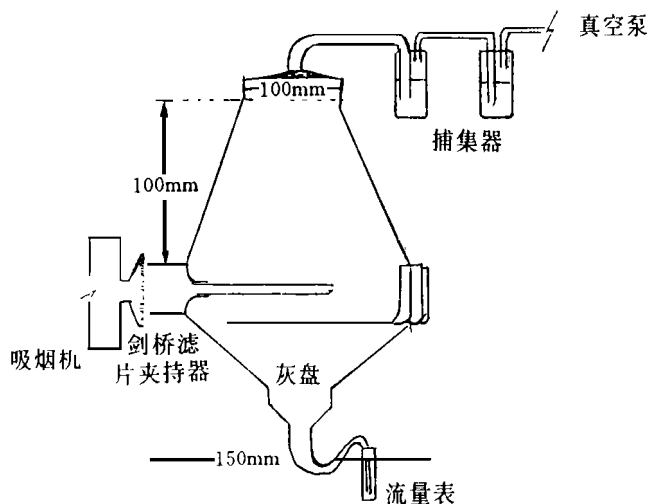


图 5 支流烟气收集装置

图 5 为日本烟草研究院 Sakuma 博士设计的支流烟气收集装置。最近, Proctor 设计的鱼尾状集气腔对收集支流烟非常有用。作者用的是支流烟气收集系统进行亚硝胺定量分析的。

图 6 概述了烟气中亚硝胺分级分离方法。在用剑桥滤片和柠檬酸-磷酸盐缓冲液收集烟气时,亚硝基二苯胺用作内标物,碱性氧化铝液柱用于提纯。

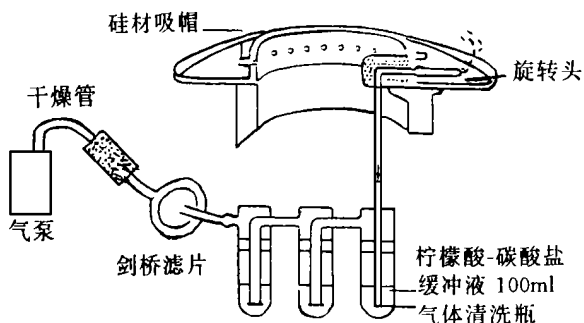


图 4 收集主流烟气中 N-亚硝胺的烟气收集装置

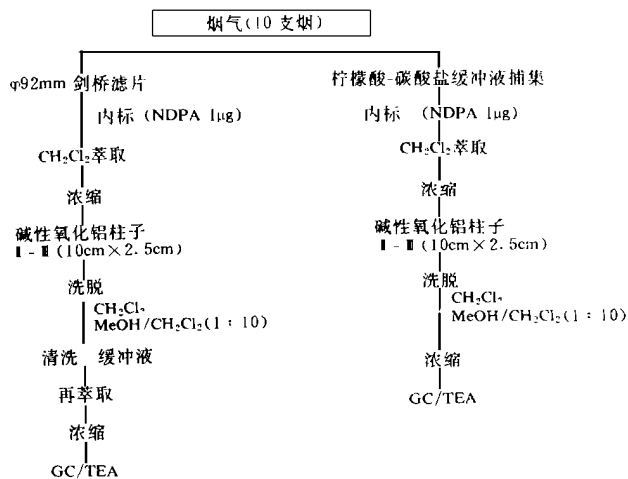


图 6 烟气中 N-亚硝胺分级分离流程图

2 测定结果与分析

2.1 测定烟草中的亚硝胺

图 7 的 GC/TEA 气相色谱图给出了用 SPB-5 毛细管分离得到的标准亚硝胺。从图中可以看到总共有 13 种亚硝胺,即 6 种挥发性亚硝胺,3 种非挥发性亚硝胺和 4 种烟草特有亚硝胺,可以同时在同一基线上进

行分离。

图 8 是烟叶中的亚硝胺气相色谱图。在样品中能分离出 13 种亚硝胺。图 9 是用剑桥滤片器收集烟气后,用碱性氧化铝提纯样品而得到的 GC-TEA 色谱图。在样品中分离出 12 种亚硝胺。

2.2 热能分析仪对各亚硝胺的响应因子

表 2 给出热能分析仪对各亚硝胺的响应因子,

NO /mole表示亚硝基对分子质量与亚硝胺相对分子质量之比 除 NBPA, NDBA和 NDELA外,热能分析仪对所有亚硝基化合物的响应值很接近 尤其是各烟草特有亚硝胺的热能分仪响应值非常接近。

表 2 不同 N- 亚硝基化合物的热能分析仪响应因子

相对分子质量	亚硝基化合物	NO /mol	热能分析仪响应
NDM A	74	0.405	0.657
NMEA	88	0.341	0.799
NDEA	102	0.294	0.929
NPYR	100	0.300	0.547
N PIP	114	0.263	0.795
NBPA	144	0.208	1.231
NDBA	158	0.189	1.157
NDEA	134	0.224	2.494
NNN	177	0.169	0.507
NAT	190	0.158	0.509
N AB	191	0.157	0.633
NNK	207	0.145	0.624

Injection amount 1ng.进样量: 1ng.

2.3 样品回收率的测定

表 3给出亚硝基二甲烷 (NDM A),N-亚硝基去甲烟碱 (NNN)在缓冲液剑桥滤片和 Extrelut柱中的回收率 各样品的回收率接近,幅度在 82.3%~ 95.7%

之间

表 3 NDM A NDPA N PePic A和 NNN的回收率%

缓冲液	剑桥滤片	Extrelut 柱	
NDM A	86.4(± 3.5)	75.9(± 5.2)	89.1(± 2.5)
NDPA	85.6(± 2.0)	82.3(± 2.8)	95.7(± 2.0)
N PePic A	86.2(± 2.6)	83.4(± 3.6)	86.2(± 3.6)
NNN	83.2(± 2.8)	85.3(± 2.9)	84.5(± 4.2)

2.4 亚硝胺萃取条件

表 4给出了亚硝胺萃取条件。氢氧化钠浓度不影响萃取效率,但如果不加乙基汞硫代水扬酸钠作抗氧化化合物的话,萃取效率随萃取时间的增加而增高。这是人工形成的因素 从这一实验结果得出烟叶亚硝胺萃取的最佳条件是 0.01mol/L氢氧化钠,萃取 8h 加入抗菌氧化物乙基汞硫代水扬酸钠。

2.5 烟叶的亚硝胺浓度

表 5给出了不同等级烤烟和白肋烟烟叶的亚硝胺浓度 从表中可以看出,不同种类烟叶的挥发性亚硝胺没有什么变化,但白肋烟中的烟草特有亚硝胺浓度比烤烟中的高 2.5~ 9.5倍 烟叶在调制和陈化过程中,细菌会使烟叶中的硝酸盐转化为亚硝酸盐,并增强亚硝化反应。上部烟叶的亚硝胺浓度高于下部烟叶的亚硝胺浓度。高温烘烤烟叶时,亚硝胺浓度没有明显变化,硝酸盐也类似。

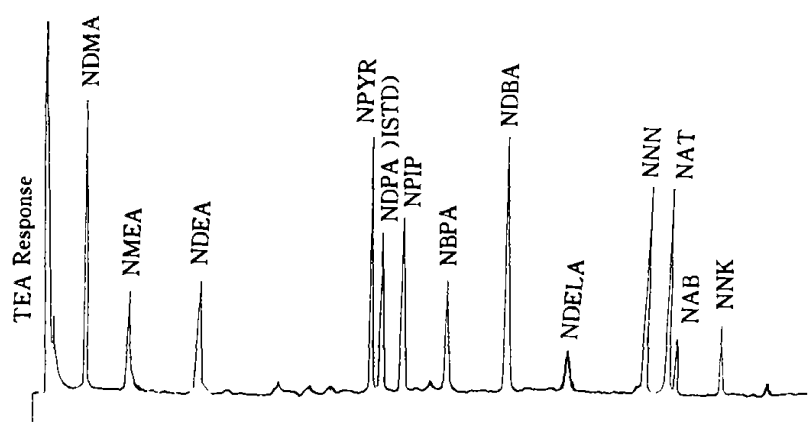


图 7 用 SPB-5石英玻璃毛细管得到的 GC/TEA标准亚硝胺混合物色谱图

表 4 亚硝酸胺萃取条件

化合物	0. 01mol /L NaOH			0. 1mol/L NaOH			0. 01mol /L NaOH		
	1h	5h	24h	1h	5h	24h	1h	5h	24h
NDEA	72. 7	79. 3	80. 2	90. 5	85. 3	86. 2	117. 4	125. 5	132. 4
NPYP	295. 5	293. 2	299. 4	292. 2	296. 8	299. 1	296. 7	302. 1	307. 8
NBPA	104. 2	111. 2	112. 4	109. 5	116. 7	118. 3	108. 3	115. 4	117. 9
NNN	56. 6	59. 7	60. 5	58. 0	64. 6	60. 1	72. 5	75. 3	79. 6
NAT	36. 9	49. 6	50. 2	33. 9	51. 4	50. 5	39. 7	45. 6	54. 8
NNK	6. 0	12. 2	15. 4	8. 4	13. 7	15. 2	18. 7	18. 4	19. 2

a 无乙基汞硫代水杨酸钠

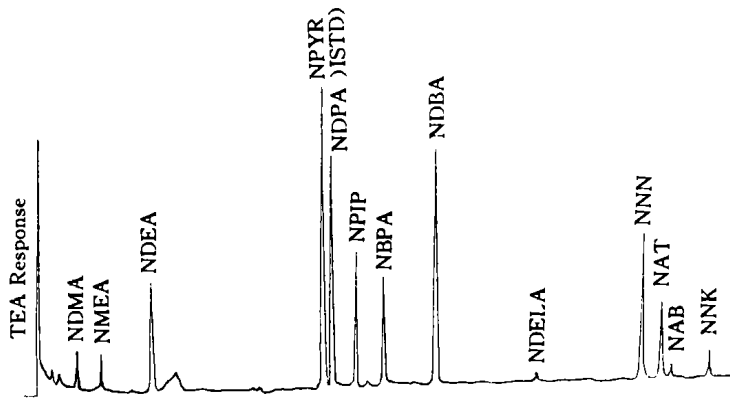


图 8 烟叶中挥发性亚硝酸胺和烟草特有亚硝酸胺的 GC/TEA色谱图

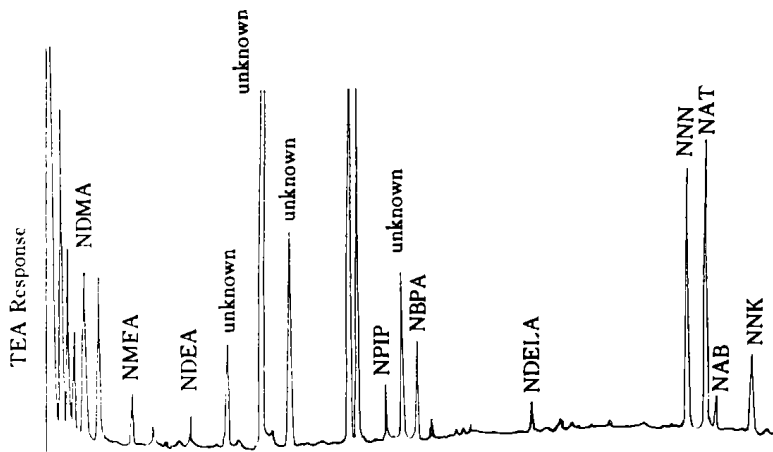


图 9 烟气中挥发性亚硝酸胺和烟草特有亚硝酸胺的 GC/TEA色谱图

2.6 不同烟气收集方法亚硝酸胺浓度的变化

表 6比较两种烟气收集方法的亚硝酸胺浓度。其中一种烟气收集法是用硝酸盐-磷酸盐缓冲液收集,挥发

性亚硝酸胺浓度较高。另一种方法是用φ92的剑桥滤片收集烟气,烟草特有亚硝酸胺浓度较高。两种烟气收集方法在标准偏差范围内变化,由于剑桥滤片收集法具有

分析时间短,实验方便的优点,因此,它是更有效的烟气收集方法

表 5 不同烟叶类别的亚硝胺浓度						
	烤烟			白肋烟		
	Hs	Hi	Ls	Hs	Hi	Ls
NO ₃ %	0.18	0.14	0.09	0.75	0.63	0.53
NDEA	75.7	69.6	71.9	78.1	80.3	72.3
NPIP	172.8	157.9	165.8	187.9	198.9	145.4
NBPA	44.9	46.7	44.2	47.5	51.9	43.9
NDBA	82.4	88.2	78.7	94.6	105.9	63.9
NDEA	15.5	6.7	12.9	16.5	6.7	痕量
NNN	13.9	8.5	7.5	92.4	108.8	83.9
NAT	22.6	18.1	9.4	40.6	43.4	46.2
NAB	痕量	痕量	痕量	痕量	痕量	痕量
NNK	6.6	痕量	2.6	19.9	7.1	31.0

表 6 不同烟气收集方法的分析数据 (ng/支)						
	样I		样II		样III	
	缓冲液	剑桥滤片	缓冲液	剑桥滤片	缓冲液	剑桥滤片
NDMA	36.7	33.3	12.6	10.4	470.3	410.9
NMEA	3.2	2.3	3.6	4.1	134.5	137.1
NDEA	21.9	13.9	6.3	6.9	37.8	41.3
NPYR	96.7	104.9	25.9	17.3	217.4	290.9
NNN	58.3	69.9	13.5	17.2	320.5	334.6
NAT	96.1	101.6	29.3	23.6	451.2	442.5
NAB	9.2	14.2	2.3	4.3	43.1	49.4
NNK	21.7	20.3	6.3	8.4	39.5	50.4

表 8 烟气主气流中烟草				
	无滤嘴	醋酸纤维单滤嘴		
		24mm	下降率%	30mm
NNN	138. 7	69. 8	50	31. 7
NAT	149. 3	95. 5	36	45. 9
NAB	22. 0	15. 3	30	7. 6
NNK	36. 9	27. 6	25	14. 6
合计	346. 9	208. 2	40	99. 8

a 9mm 纸+ 6mm 空穴+ 9mm 醋酸纤维, b 12mm 纸+ 6mm 空穴+ 12mm 醋酸纤维

2.7 不同条件下亚硝胺输送量的变化

表 7给出了增加过滤嘴的通风度时,亚硝胺在烟气主气流中的输送量.随着过滤嘴通风度的增大,挥发性亚硝胺和烟草特有亚硝胺浓度下降.当滤嘴通风度为 65%时,挥发性亚硝胺和烟草特有亚硝胺含量分别下降 69%和 66%。

表 7 不同滤嘴通风度时亚硝胺在主烟气流中的输送量 (ng/支)							
	滤嘴通风度						
	0	25	减少%	45	减少%	65	减少%
TPM, mg/cig	18.9	12.7	33	6.8	64	3.9	80
NDMA	60.6	42.4	30	30.2	50	15.3	75
NMEA	21.2	10.8	49	8.3	61	4.2	80
NDEA	11.7	10.4	10	8.8	25	5.9	50
NPYR	135.7	125.7	7	108.8	20	42.2	69
NNN	128.8	89.8	30	65.8	49	31.7	75
NAT	144.4	95.5	34	77.9	54	45.8	68
NAB	20.8	15.3	26	10.6	49	7.6	63
NNK	34.7	27.6	20	20.5	41	14.6	58

表 8比较不同烟支滤嘴种类的烟草特有亚硝胺下降率.单段醋酸纤维滤嘴对烟草特有亚硝胺的过滤率高于三复合滤嘴,30mm 单段醋酸纤维过滤嘴对于烟草特有亚硝胺过滤率为 71%。因此,要降低烟气中的挥发性亚硝胺和烟草特有亚硝胺,具有选择性滤除作用的醋酸纤维过滤嘴是理想的选择。

不同抽吸体积时,尼古丁和亚硝胺输送量有明显变化。该实验结果中有一点很突出,当抽吸体积从 35ml 增大到 45ml 时,尽管总粒相物和尼古丁输送量有适度增加,但烟草特有亚硝胺的输送量急剧增大。

Hoffman 和 Fischer 先生已在研究报告中给出了这一结论,从吸烟者的健康的角度考虑,理想的抽吸体积应控制在 35ml 以下。

表 9 主烟气流和支流烟气中的亚硝胺 (ng /g)

	主烟气流 (MS)	支流烟气 (SS)	SS/MS
NDMA	44.1	577.5	13.1
NMEA	3.8	299.0	77.9
NDEA	32.2	122.7	3.8
NPYR	48.1	206.4	4.3
NPIP	2.2	13.6	6.2
NEDLA	47.9	105.3	2.2
NNN	38.1	139.6	3.7
NAT	43.4	103.7	2.4
NAB	8.3	29.9	3.6
NNK	16.6	177.5	10.7

2.8 主流烟气和支流烟气中亚硝胺的分布

表 9 给出了主流烟气和支流烟气中亚硝胺的分布。各种亚硝胺在支流烟气和主烟气流中含量的比值是一个变值,如挥发性亚硝胺在 2.2 倍到 80 倍之间变化,而烟草特有亚硝胺的变化范围在 2.5~ 10.7 倍。在所有烟草特有亚硝胺中 NNK 在支流烟气和主气流中含量比率最高,达到 10.7 倍。

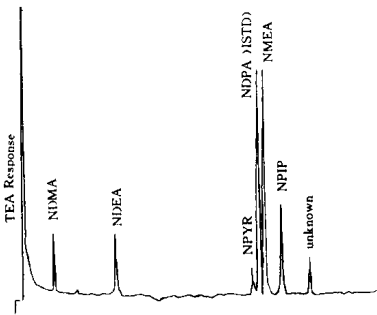


图 10 人尿中萃取出来的 N-亚硝胺的 GC/TEA 色谱图

2.9 吸烟者尿液中烟草特有亚硝胺的测定

图 10 是从人尿中萃取出来 N-亚硝胺的 GC/TEV 色谱图。图中没有烟草特有亚硝胺色谱峰。说明吸烟者和非吸烟者尿液中挥发性亚硝胺浓度没有什么不同,在人尿样中没有发现烟草特有亚硝胺。

2.10 添加同位素硝酸盐对形成烟草特有亚硝胺的影响

图 11 显示了添加同位素硝酸盐对形成烟草特有亚硝胺的影响。可以看出,当硝酸盐含量增加时,4 种 TSNA 的增加率依次为: NAT, NNK, NNN 和 NAB。当硝酸盐的含量从 4mg 皮增加到 8mg 皮时,硝酸盐对 NNK 的浓度没有影响。

Fischer 先生早已发现这一实验结果,但没有明确其机理。

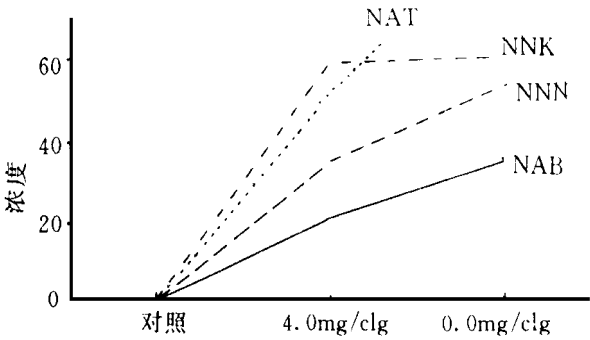


图 11 添加同位素硝酸盐对主流烟气中烟草特有亚硝胺的影响

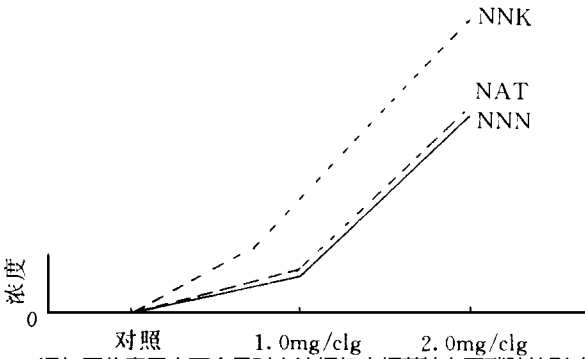


图 12 添加同位素尼古丁含量对主流烟气中烟草特有亚硝胺的影响

2.11 尼古丁含量对烟草特有亚硝胺形成的影响

图 12 给出了主流烟气中尼古丁含量对烟草特有亚硝胺形成的影响。如同上述硝酸盐含量测试一样,烟草特有亚硝胺的形成量随尼古丁含量的增加而增加。尤其,当尼古丁含量从 1.0mg 皮增至 2.0mg 皮时,烟草特有亚硝胺形成浓度增大了 3 倍。但有些科学家对烟草特有亚硝胺随尼古丁含量增大而增大持有不同的看法。

从上述实验结果看到尼古丁和硝酸盐可以影响亚硝化反应和烟草特有亚硝胺的形成,因此,要降低烟气中的烟草特有亚硝胺含量水平,就要降低烟叶中硝酸盐和尼古丁的浓度。

2.12 室内环境中烟草特有亚硝胺的浓度

表 10 给出控制室内 TES 标识物、挥发性亚硝胺和烟草特有亚硝胺的相对浓度。与 TES 标识物相比较,烟草特有亚硝胺的浓度是很低的。室内环境中的 TSNA 要比主流烟气和支流烟气中的 TSNA 的浓度低 100~ 1000 倍。因此,作者认为烟草特有亚硝胺形成有不同的积率,并且不同于烟气中的其他成分。

表 10 室内 ETS 标识物和亚硝胺的浓度			
ETS 标识物	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	亚硝胺	(ng/m^3)
可吸入颗粒	280.3	NDEA	3.7
茄尼醇	10.3	NDBA	7.2
尼古丁	13.9	NNN	0.2
3-乙基吡啶	3.6	NNK	0.1

表 11 给出韩国室内挥发性亚硝胺、烟草特有亚硝胺可吸入物和茄尼醇的浓度。因挥发性亚硝胺的数值在 $1.0\text{ng}/\text{m}^3\sim 8.0\text{ng}/\text{m}^3$ 范围内,而烟草特有亚硝胺的数值几乎检测不到或非常低。作者认为这是由于烟草特有亚硝胺有不同沉积率的缘故。实际上,在实际场合中烟草特有亚硝胺的浓度是很低的,几乎可以不计。因此,必须重新考虑环境烟气与癌症的关系。

地点	亚硝胺 (ng/m^3)				可吸入颗粒	茄尼醇
	NPID	NBPA	NDBA	TSNAs	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
办公室	4.7	1.1	2.0	ND	74.8	0.1
餐厅	7.9	2.4	3.6	ND	171.8	0.4
酒吧	0.8	2.8	5.1	0.1	132.6	3.2

我们今后的研究方向是降低烟气中的烟草特有亚硝胺,尤其是降低白肋烟调制过程中的生物合成,要筛选出在热合成过程中能够和抑制烟草特有亚硝胺形成的材料。此外,用这种分析方法可以对烟草、烟气、人尿和血液中的挥发性亚硝胺和烟草特有亚硝胺浓度进行日常分析。

Simultaneous Determination of VNA and TSNA by GC /TEA

Moon Soo Rhee
Korea Ginseng & Tobacco Reserach Institute, Taejon, Korea

Abstract

N-nitrosoamine can be easily formed in air, food, beverage, cosmotoc, drug, cigarette smoke and many consumer products, even in human stomach. Many of them have been found to be carcinogenic. In this study, a method of simultaneous determination of volatile nitrosomine (VNA) and tobacco specific nitrosoamine (TSNA) in tobacco and tobacco smoke was developed by Gas Chromatography Thermal Enegyry Analysis (GC/TEA). The extraction conditions of nitrosoamine from tobacco and tobacco smoke were introduced in detail. The mothod of collecting VNA and TSNA both from mainstream smoke and sidestream smoke was discussed. It was shown that all of the 13 nitrosoamines in tobacco could be separated by GC/TEA on the one baseline. This GC/TEA method has high sensitivity and accunacy as well as good repeatability. Meanwhile, the influence of nitrate and nicotine spiked on the TSNA in main stream smoke was also discussed.

This method can also be applied to determine the VNA and TSNA in human urine and environment tobacco smoke. It is found that there is little difference between smoker's urine and nonsmoker's urine in concentration of VNA, and the concentration of TSNA is so low that can be ignored in human urine, VNA in indoor air is about $1\sim 8\text{ng}/\text{m}^3$ and the concentration of TSNA is too low to detect. This result suggests that the relationship between ETS and cancer need to be reconsidered.

Key words: GC /TEA method Determination Nitrosoamine VNA TSNA Tobacco Mainstream smoke Sidestream smoke ETS