

烤烟中硝酸盐和亚硝酸盐的测定*

刘万峰 王元英 邱 军

摘 要

本文提出了一种使用紫外分光光度计测定硝酸盐和亚硝酸盐的方法。主要过程包括将烟样在弱碱性条件下热水中萃取,亚硝酸盐标准曲线的绘制,亚硝酸盐含量的测定,硝酸盐的还原,硝酸盐含量的测定,回收率的测定。该方法具有简单、高效、重复性好、不需专用仪器设备等特点,适用于各种烟草样品中硝酸盐和亚硝酸盐含量的测定。

关键词: 烤烟 分光光度计 硝酸盐 亚硝酸盐

中图分类号: TS411.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-5708(2001)04-0013-04

硝酸盐和亚硝酸盐是烟草中一类重要的含氮化合物,其含量的多少不但直接影响烟叶的吃味,从而影响烟叶品质^[1],而且还会影响其他含氮化合物形成和含量。其中,亚硝酸盐还是烟草特有亚硝胺的直接前体物,它的含量与烟草特有亚硝胺的含量显著相关^[2]。随着人们对烟草特有亚硝胺的日益关注,如何快速准确地对硝酸盐和亚硝酸盐进行定量分析也显得愈发重要。目前,国内有关对硝酸盐和亚硝酸盐进行定量分析的报道很多,例如动力学催化光度法^[3]、催化光度法^[4]、离子色谱法^[5]、极谱法等^[6],但检测对象大多集中于水体、食品、蔬菜。本文采用分光光度法对烤烟中的硝酸盐和亚硝酸盐进行定量测定^[7],取得了很好效果。基本过程是在弱碱性条件下,用热水从样品中提取亚硝酸离子(NO_2^-)和硝酸离子(NO_3^-),然后加入亚铁氰化钾和乙酸锌,过滤后分取两整份溶液,一份直接加入磺胺和萘乙二胺盐酸盐,在波长 538nm 处测量其吸光度,计算样品中原有的亚硝酸离子中(NO_2^-)含量;另一份用金属镉还原硝酸离子(NO_3^-)为亚硝酸离子(NO_2^-),然后同上显色,测量样品中原有的亚硝酸离子(NO_2^-)和硝酸离子(NO_3^-)还原生成的亚硝酸离子(NO_2^-)的总量,由二者之差计算硝酸离子(NO_3^-)含量。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

1.1.1 仪器 电热恒温水浴锅,高速组织捣碎机,振荡机(北京沃德电子实验设备厂,TZ-2EH),分光光度计(岛津 UV-2201),分析天平(感量 0.0001g)。

1.1.2 试剂 饱和硼砂溶液,0.25mol/L 亚铁氰化钾溶液,1mol/L 乙酸锌溶液,200g/L 硫酸镉溶液,锌片(长约 10cm,宽约 3cm),氨缓冲液(37.4g 氯化氨溶于 1000mL 水后调 pH 值至 9.6),亚硝酸钠(基准试剂),粉末状活性炭。

显色溶液:

溶液 I: 称取 2g 磺胺,放入盛有 800mL 水的 1000mL 容量瓶中,在沸水浴上加热溶解。冷却后(必要时过滤)加入 100mL 盐酸,用水定容,避光保存。

溶液 II: 称取 0.1g 萘乙二胺盐酸盐,放入 100mL 容量瓶中,加水溶解后定容,避光保存。

溶液 III: 量取 445mL 盐酸,放入 1000mL 容量瓶中,加水定容。

亚硝酸钠标准储备溶液: 称取在 $115 \pm 5^\circ\text{C}$ 下烘至恒重的亚硝酸钠(基准试剂)0.1500g 于 50mL 容量瓶中,加水溶解后定容。此溶液含亚硝酸离子(NO_2^-)2000mg/L。

标准工作溶液 I: 用移液管吸取亚硝酸钠标准储备溶液 1mL 于 1000mL 容量瓶中。该溶液中含亚硝酸离子(NO_2^-) $2\mu\text{g/mL}$ 。

标准工作溶液 II: 用移液管吸取亚硝酸钠标准储

* 刘万峰,男,29岁,现为中国农业科学院遗传育种硕士研究生,中国农业科学院烟草研究所,山东青州,262500

王元英,邱军,通讯地址同第一作者

收稿日期:2001-04-30

备溶液 5mL 于 1000mL 容量瓶中。该溶液中含亚硝酸离子(NO_2^- 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

所用试剂除注明者外,均为分析纯,水为无离子水。

1.1.3 烟叶材料 几种烤烟烟叶,抽去主脉,烘干后磨碎,过 40 目筛备用。

1.2 试验方法

1.2.1 样品中亚硝酸盐、硝酸盐的提取 准确称取烟样 10.00g,放入 200mL 烧杯中,加入 5mL 饱和硼砂溶液和 100mL 热水(80℃左右),在振荡机上振荡 10min,然后置沸水浴中加热 30min 并不断摇动。取出后冷却至室温,再加入 10mL 亚铁氰化钾溶液、10mL 乙酸锌溶液和 3g 活性炭粉,每次加后均充分摇匀。然后定量转入 20mL 容量瓶中,用水定容。过滤,滤出液再加入 5g 活性炭粉,再过滤,得无色清亮提取液。

1.2.2 亚硝酸盐测定的标准工作曲线的绘制 用移液管吸取不同体积的亚硝酸钠标准工作溶液 I (NO_2^- 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别加入 7 个 50mL 容量瓶中,各加水至约 30mL,然后加入 5mL 溶液 I、3mL 溶液 III、混匀,于室温避光处加入 1mL 溶液 II,混匀,3min 后用水定容。15min 内,在分光光度计上,于 538nm 处测其吸光度并打印出工作曲线。

1.2.3 亚硝酸盐的测定 用移液管吸取提取液 25mL 于 50mL 容量瓶中,用水稀释至约 30mL。加入 5mL 溶液 I,再加入 3mL 溶液 III,混匀。于室温避光处加入 1mL 溶液 II,混匀,3min 后用水定容。15min 内,在分光光度计上,用 1cm 光径吸收池,以空白溶液调零,于 538nm 处测其吸光度,找出相应的亚硝酸离子(NO_2^-)的质量。同一样品做两个平行测定,同时做空白试验。

1.2.4 硝酸盐测定的标准工作曲线的绘制 用移液管吸取不同体积的亚硝酸钠标准工作溶液 II (NO_2^- 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别加入 7 个 50mL 容量瓶中,以下各步同(1.2.2)此系列标准工作溶液中分别含有不同浓度的亚硝酸离子。于 538nm 处测其吸光度并打印出工作曲线。

1.2.5 硝酸盐的测定 用移液管吸取提取液(1.2.1) 10mL 于 50mL 具塞锥形瓶中,加入 5mL 蒸馏水,5mL 氨缓冲液(总体积 20mL)和 2g 镉粒(用锌片还原硫酸镉生成,加入前用滤纸吸干镉粒上的水分),盖好瓶塞,在振荡机上振荡 10min。过滤,弃去部分初滤液,收集滤液于三角瓶中。用移液管吸取还原滤液 2mL 于 100mL 容量瓶中,定容后用移液管吸取 10mL 置于

50mL 容量瓶中,用水稀释至约 30mL。以下各步同(1.2.3)。于 538nm 处测其吸光度,找出相应的亚硝酸离子(NO_2^-)的质量。同一样品做两个平行测定,同时做空白试验。

1.2.6 分析结果的表述 样品中亚硝酸离子(NO_2^-)和硝酸离子(NO_3^-)的含量以 $\mu\text{g}/\text{g}$ 表示。按下列公式计算:

$$\text{NO}_2^-(\mu\text{g}/\text{g}) = M_1 \times \frac{200}{M_0 \times V_1}$$

式中: M_1 ——从工作曲线上查得的测试液中亚硝酸离子(NO_2^-)质量(μg)

M_0 ——样品的称取量(g)

V_1 ——整取过滤液体积(mL)

$$\text{NO}_3^-(\mu\text{g}/\text{g}) = 1.348 \times \left(\frac{M_2 \times 200 \times 2 \times 50}{V_2 \times M_0} - \frac{M_1 \times 200}{M_0 \times V_1} \right)$$

式中: M_2 ——从工作曲线上查得的测试液中亚硝酸离子(NO_2^-)质量(μg)

V_2 ——硝酸离子(NO_3^-)还原为亚硝酸离子(NO_2^-)后的过滤液稀释后吸取的体积 mL

2——硝酸离子(NO_3^-)还原前后吸取液的体积比值

50——硝酸离子(NO_3^-)还原为亚硝酸离子(NO_2^-)后的过滤液稀释倍数

1.348——亚硝酸离子(NO_2^-)换算为硝酸离子(NO_3^-)的系数;

M_1 、 M_0 、 V_1 的含义同亚硝酸离子计算公式

2 结果与讨论

2.1 活性炭用法与滤液脱色效果

试验中发现,当仅进行一次脱色时,即使一次加入 6~8g 活性炭,仍然不能得到很好的脱色效果,而如果进行两次脱色,则可以脱色彻底。对两次加入活性炭进行脱色过程的研究发现,第一次加入量 2g、3g、4g、和第二次加入 3g、4g、5g 的各种组合中,第一次加入量为 3g,第二次加入 5g 的脱色效果最佳,所有滤液均呈无色清亮。所以试验中采用先加入 3g 活性炭进行脱色,过滤后再加入 5g 进行第二次脱色的方案。

2.2 样品称取量、提取时间和方式与测定结果

通过对样品称取量、提取时间和方式与测定结果的研究表明:不同的样品量、不同的提取时间与方式对亚硝酸盐结果影响很大。具体分析结果见表 1 和表 2。

表 1 样品称取量与亚硝酸离子

样品	称取量 5g				称取量 10g				称取量 20g			
	1	2	平均值	相对误差	1	2	平均值	相对误差	1	2	平均值	相对误差
中烟 14	0.92	0.86	0.89	6.7%	0.79	0.80	0.80	1.3%	0.68	0.73	0.71	7.0%
遵烟 1 号	0.96	1.06	1.01	9.9%	1.16	1.18	1.17	2.0%	1.03	1.06	1.05	2.8%
辽烟 15	1.05	0.91	0.98	14.3%	0.75	0.77	0.76	2.6%	0.59	0.66	0.63	11.1%
云烟 317	1.01	0.92	0.97	9.3%	1.03	1.04	1.04	0.9%	0.95	0.87	0.91	8.8%

表 2 提取时间、方式与样品的亚硝酸离子数值(样品量 10g)

样品	80℃热水、沸水浴 10min				80℃热水、沸水浴 30min				80℃热水、振荡 10min、沸水浴 30min			
	1	2	平均值	相对误差	1	2	平均值	相对误差	1	2	平均值	相对误差
中烟 14	0.64	0.71	0.68	10.3%	0.91	0.87	0.89	4.5%	0.79	0.80	0.80	1.3%
遵烟一号	1.02	1.05	1.04	2.9%	0.96	1.01	0.99	9.9%	1.16	1.18	1.17	2.0%
辽烟 15	0.61	0.66	0.64	9.0%	1.03	0.91	0.97	13.4%	0.75	0.77	0.76	2.6%
云烟 317	0.92	0.88	0.90	4.4%	1.21	1.13	1.17	6.8%	1.03	1.04	1.04	0.9%

由表 1 可知,当样品量为 10g 时,各重复间相对误差最小。样品量为 5g 时,相对误差较大,其中的原因可能是因为滤液中的亚硝酸盐浓度太低,测量误差较大所致。当样品量为 20g 时,相对误差变化很大且所有数值均偏小,这主要原因是因为样品量过多,提取不完全,而且器皿上附有样品残余所致。而样品量为 10g 时重复性最好,相对误差也最小。表 2 数值显示,加入 80℃热水后在沸水浴中加热 10min 测得的数值最小且相对误差变化较大。而加入 80℃热水后在振荡器上振荡 10min,然后在沸水浴中再加热 30min,经过这样

处理后测得的数值的相对误差最小,重复性最好,提取效率最高。因此,本研究采用称取 10g 样品,提取方式采用加入 80℃热水后在振荡器上振荡 10min,然后在沸水浴中再加热 30min 的方案。

2.3 亚硝酸盐和硝酸盐测定时过滤液的吸取量及标准曲线的设定

硝酸盐的含量与亚硝酸盐的含量相差上千倍,因此测定时过滤液的吸取量及标准溶液的设定不可能一致。经过多次试验发现,亚硝酸盐和硝酸盐测定时过滤液的吸取量对测定结果影响显著。具体数值见表 3 和

表 3 亚硝酸盐测定时过滤液的吸取量与测定结果

样品	吸取量 5mL				吸取量 10mL				吸取量 25mL			
	1	2	平均值	相对误差	1	2	平均值	相对误差	1	2	平均值	相对误差
中烟 14	nd	nd	—	—	0.91	0.87	0.89	4.5%	0.79	0.80	0.80	1.3%
遵烟一号	nd	nd	—	—	0.96	1.01	0.99	9.9%	1.16	1.18	1.17	2.0%
辽烟 15	nd	nd	—	—	1.03	0.91	0.97	13.4%	0.75	0.77	0.76	2.6%
云烟 317	nd	nd	—	—	1.21	1.13	1.17	6.8%	1.03	1.04	1.04	0.9%

表 4 硝酸盐测定时过滤液的吸取量与测定结果

样品	未经稀释,吸取 10mL				稀释 10 倍后,吸取 10mL				稀释 50 倍后,吸取 10mL			
	1	2	平均值	相对误差	1	2	平均值	相对误差	1	2	平均值	相对误差
中烟 14	974	989	982	1.5%	1235	1198	1217	3.0%	2094	2124	2109	1.4%
遵烟一号	1035	1111	1073	7.1%	1786	1958	1872	9.2%	3145	3185	3165	1.3%
辽烟 15	996	988	992	0.8%	1714	1623	1669	5.5%	2704	2695	2699	0.3%
云烟 317	1101	1231	1166	11.4%	2002	1987	1995	0.7%	3136	3194	3165	1.8%

表 4。从表 3 可以看出,亚硝酸盐测定时滤液吸取量在 5mL 左右时检测不到样品的吸收峰。当滤液吸取量为 10mL 时虽然可以检测到样品的吸收峰,但相对误差较大。而吸取量达 25mL 时,吸收峰趋于稳定,重复性较好。因此亚硝酸盐含量测定时滤液吸取量选择为 25mL。表 4 显示,硝酸盐测定时同样体积的滤出液不经过稀释和稀释 50 倍测得的结果相差很大。这可能是因为不经过稀释的滤出液中亚硝酸离子的含量过大,不能充分与显色剂反应所致。本文采用将滤出液稀释 50 倍后再吸取 10mL 进行测定,既能保证亚硝酸离子与显色剂充分反应,又可使亚硝酸离子的吸光度值在标准曲线范围内。

3.4 回收率的测定

吸取已知浓度的标准溶液,按以上操作步骤进行,测得亚硝酸盐的平均回收率为 78.2%。硝酸盐的平均回收率为 95.3%。

参考文献

- 1 肖协忠,等. 烟草化学. 北京:中国农业科技出版社,1997.
- 2 Burton H R, Dye N K and Bush L P. Relationship between tobacco-specific nitrosamines and nitrite from different air-cured tobacco varieties. J. Agric. Food Chem., 1994, 42: 2007~2011.
- 3 刘长增. 动力学催化光度法测定痕量亚硝酸根. 分析化学, 2000, 26(11):1362~1365.
- 4 张克忠,等. 催化光度法测定痕量亚硝酸根. 分析化学, 1998, 26(4):494.
- 5 周梅素,郭东龙. 离子色谱法测定蔬菜中的硝酸盐含量. 分析化学, 2000, 28(8):1056.
- 6 王耀光,等. 基于偶联反应新极谱法测定痕量亚硝酸根的研究 I. 以苯酚为偶联剂. 分析化学, 1994, 22(8):767~770.
- 7 中华人民共和国国家标准. 水果、蔬菜及其制品亚硝酸盐和硝酸盐含量的测定. 1994. 12. 30.

The quantification of nitrite and nitrate in flue-cured tobacco

Liu Wanfeng Wang Yuanying Qiu Jun

Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shandong Qingzhou 262500

Abstract

Nitrate and nitrite are important nitrogen compounds in tobacco. It has been always difficult to quantify them accurately at high speed. An analytical procedure for quantification of nitrate and nitrite in tobacco was developed using ultraviolet spectrophotometer. The procedure involves the extraction by hot water from tobacco in basic property condition. Standard curve of nitrite was drawn, quantification of nitrite, reduction of nitrate to nitrite, quantification of nitrite, recovery for the quantification of nitrate and nitrite was determined. This method is shown to be simple in determination of nitrate and nitrite in various tobacco samples with acceptable repeatability.

Key words: Flue-cured tobacco Ultraviolet spectrophotometer Nitrate Nitrite