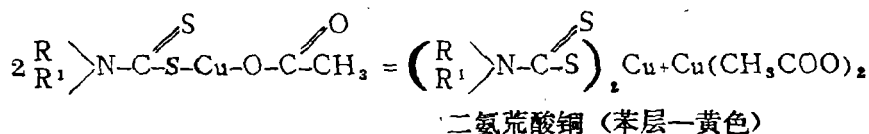
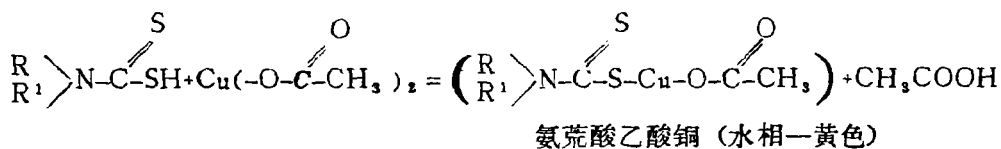
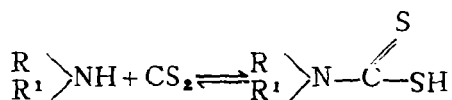


水蒸气蒸馏—比色法测定食物中的仲胺

药学系 黄家琛 黎兰馨

据报道^{①②}, 仲胺与亚硝酸(或亚硝酸盐)在体内、外于适当的酸度下, 均能合成强烈致癌物质—亚硝胺。合成亚硝胺的前身物质如胺类和亚硝酸盐等, 广泛存在于食物中, 因为胺类是蛋白质腐败时的分解产物, 亚硝酸盐是在腌制肉类时和食盐一道加进去的; 植物性食物中的硝酸盐经细菌的作用, 也可以还原为亚硝酸盐, 故测定食物中的仲胺在卫生分析及肿瘤病因学上有一定的意义。本文采用水蒸气蒸馏—比色法测定食物中的仲胺, 并在操作方法上作了一些改进。

已知仲胺在酸性介质中可生成稳定的盐。仲胺的盐在强硷作用下, 又形成游离的仲胺, 并可用水蒸气蒸馏法蒸出, 蒸出的仲胺常用酸吸收^{③④}。本文改用乙醇溶液吸收, 然后使仲胺的乙醇溶液与二硫化碳(CS₂)、乙酸铜等试剂反应, 生成黄色的氨荒酸铜络合物, 萃取入苯中, 即可进行比色测定。显色反应如下:



叔胺不与CS₂起反应^{⑤~⑥}, 因此无干扰。本试验证实伯胺的氨荒酸与二价铜离子所成的盐或络合物, 颜色很淡, 产生的误差很小, 而吡啶、芳香胺和二苯胺等也不与CS₂起反应, 故本法对仲胺有一定的选择性。

仪器及试剂

(一) 二乙胺标准溶液 准确吸取二乙胺(比重0.705~0.715) 0.38毫升, 溶于乙醇(1:1)中, 移入500毫升容量瓶, 用乙醇(1:1)稀释至刻度。此溶液每毫升含100微克氮。临用前以乙醇(1:1)稀释10倍, 得每毫升含10微克氮的二乙胺标准溶液。

同法配制N-甲基苯胺的标准溶液。

(二) 二硫化碳试剂 二硫化碳7.0毫升, 加吡啶5.0毫升和异丙醇13.0毫升。当天配制使用。

(三) 铜试剂 乙酸铜40毫克, 加蒸馏水100毫升溶解, 再加吡啶100毫升。

(四) 10%乙酸溶液。

以上试剂均为2级或3级。

(五) 水蒸汽蒸馏装置 包括玻璃水蒸汽发生器, 250毫升凯氏烧瓶(连温度计、导气管), 直形冷凝管和50毫升带塞比色管为接液管等。

(六) 50毫升带塞比色管。

(七) 500毫升带塞锥形瓶。

(八) 60毫升梨形分液漏斗。

(九) 72型分光光度计。

显色条件

(一) 二氨羧铜络合物的吸收光谱

取含12微克氮的仲胺(如二乙胺或N-甲基苯胺)标准溶液, 置于分液漏斗中, 加乙醇(1:1)至溶液的体积为5.00毫升, 加CS₂试剂4.00毫升, 铜试剂2.00毫升, 密塞振荡5分钟, 再加10%乙酸溶液3.00毫升, 苯4.00毫升, 密塞振荡3分钟, 放置待分层, 弃去水相, 加入无水硫酸钠约0.4克, 振荡使脱水, 放置40~60分钟, 取出有机相于1厘米比色皿中, 在可见光波段测定其消光值(以苯调零点), 作吸收值一波长曲线, 如图1所示。

由图1可见二乙胺、N-甲基苯胺的二氨羧铜络合物的最大吸收峰均在450毫微米附近。

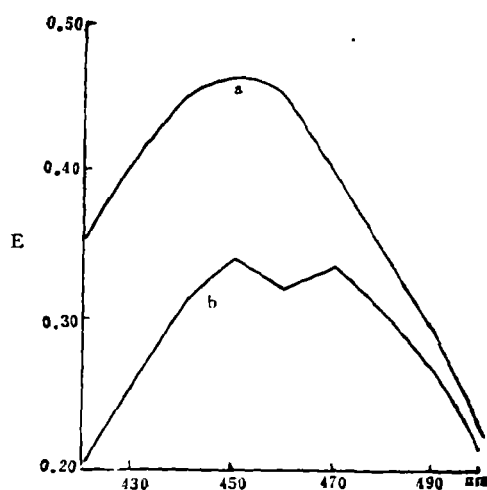


图1 二氨羧铜络合物的吸收光谱
a. 二乙胺 b. N-甲基苯胺

(二) pH值的影响

取含10.0微克氮的二乙胺标准溶液分别加入pH 2、4、5、6、7、8、9、10、11和12的不同介质中，然后按上述绘制吸收光谱所用的方法进行显色，以1厘米比色皿，于450毫微米波长（以苯调零点），测定有机相的消光值，绘制消光值-pH值曲线如图2所示，由图2可见在pH 5~8范围内，消光值基本不变。本实验采用pH 7附近。

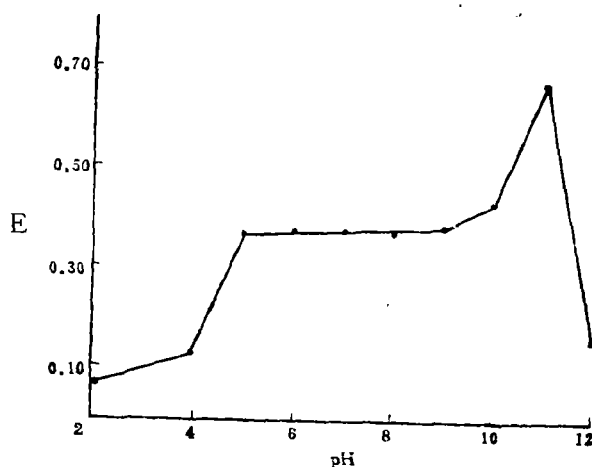


图2 pH值的影响

(三) 放置时间的影响

氨荒酸乙酸铜络合物被萃取到苯层中颜色的稳定性，随放置时间的增长，消光值略有增加，但1小时后就达到稳定状态（见表1），其原因一般认为是氨荒酸乙酸铜被萃取到苯层后，即开始转化为二氨荒酸铜，平衡时间约1小时。我们选择萃取后放置40~60分钟测有机相的消光值。

表1 显色溶液稳定性试验（显色溶液含氮16微克 / 4毫升）

放置时间 (分)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
消光值	0.562	0.574	0.572	0.580	0.585	0.590	0.590	0.590	0.594

(四) 温度的影响

含一定浓度的二乙胺溶液，在不同温度下进行显色、萃取、比色手续，发现有机相的消光值随温度升高而稍有增加（表2），宜在室温下进行实验。

表2 温度的影响（显色溶液含氮16微克 / 4毫升）

温度 (°C)	10	26	38
消光值	0.578	0.586	0.620

(五) 氨的干扰试验

按照绘制吸收光谱所用的方法, 经过加入不同量的氨溶液, 用稀乙酸调节至pH 7左右, 然后加入显色剂, 进行萃取测定, 结果如表3所示. 可见氨 ≥ 1 毫克有干扰。

表3 干扰试验 (显色溶液含量氮 10 微克/4 毫升)

加入氨 (以毫克氮计)	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
消光值	0.387	0.387	0.432	0.425	0.432

蒸馏条件

含50~100微克氮的二乙胺溶液置于250毫升凯氏烧瓶中, 加水至50毫升, 加固体氢氧化钠4克 (使溶液的硷度为2N), 滴加5~10滴甲基硅油 (去泡剂), 迅速把瓶口塞好, 摇匀使溶解, 连接冷凝管, 冷凝管的下端, 连接装有25毫升乙醇溶液 (2:1) 的50毫升比色管, 以便吸收蒸出的仲胺, 然后通入水蒸汽, 并控制凯氏烧瓶中溶液的温度为100°C, 蒸馏时间约为30分钟, 收集液总体积为50毫升。

经过分段收集试验证明, 上述的蒸馏条件, 可将仲胺定量蒸出。

标准曲线的绘制

含取0.00, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0微克氮的仲胺 (二乙胺、N-甲基苯胺) 标准溶液分别依法蒸馏, 各取出总吸收液 (50毫升) 的1/5, 按上述绘制吸收光谱所用的方法进行显色, 以1厘米比色皿, 于450毫微米波长 (以苯调零点), 测定有机相的消光值, 绘制消光值—浓度曲线, 如图3所示。由图3可见含0.00至16.0微克氮的仲胺的消光值呈直线关系, 符合比尔定律。

样品分析

(一) 样品的预处理

粮食或肉类样品约500~1,000克, 用粉碎机粉碎 (如样品系腌制品或含水分较多的蔬菜, 则先切碎, 盛入搪瓷盘内, 置红外线烘箱或80~100°C烘箱中干燥后再粉碎), 过筛 (30目), 盛入搪瓷盘内, 置80~100°C烘箱干燥6小时, 中间搅拌数次, 取出, 冷却, 盛入聚乙烯袋, 置有氯化钙的干燥器内保存。

(二) 提取与水蒸汽蒸馏

取上述预处理过的粮食样品50.0克, 腌制品如咸鱼则取25.0克, 放入500毫升带塞的锥形瓶内, 加入300毫升盐酸混合溶剂 (乙醇:乙醚:水:浓盐酸 = 12:12:6:1), 充分振荡后, 放置浸泡12小时, 用脱脂棉过滤, 记取滤液量, 滤液置蒸发皿内, 在水浴上蒸

去有机溶剂,使滤液浓缩至约30~40毫升。将浓缩液放入250毫升凯氏瓶内,用约10毫升蒸馏水洗涤蒸发皿,洗液一并倒入凯氏瓶中,加入氢氧化钠4~5克及5~10滴甲基硅油(去泡剂),迅速把瓶口塞好,通入水蒸汽,用装有25毫升乙醇溶液(2:1)的50毫升带塞比色管吸收蒸出的仲胺,在蒸馏过程中控制温度为 $100 \pm 2^\circ\text{C}$,蒸馏时间30分钟,收集液总体积为50毫升(一般不用调节酸度,必要时可滴加稀酸调节至pH 7左右)。

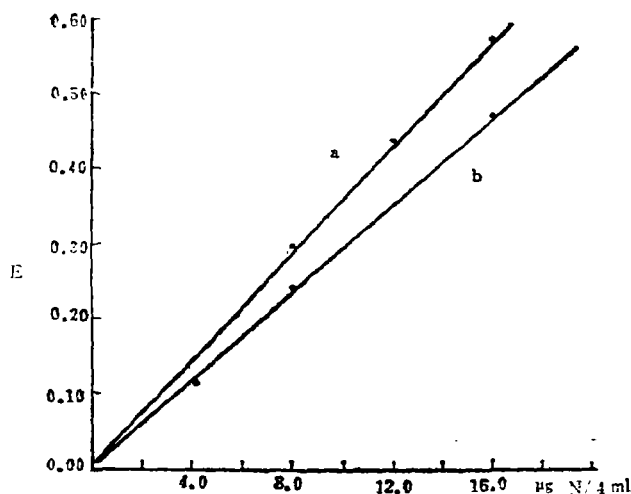


图3 标准曲线 a.二乙胺 b.N-甲基苯胺

同时取含40微克氮的二乙胺标准溶液依法蒸馏作对照试验。另取蒸馏水依法蒸馏作空白试验。

(三) 比色测定

吸取上述样品蒸馏收集液一定量(例如1,000毫升)置于60毫升梨形分液漏斗中,按绘制标准曲线的方法,加入 CS_2 试剂及铜试剂显色后,用苯萃取,有机相经过无水硫酸钠脱水,静置40~60分钟后,取出有机相于1厘米比色皿中,在450毫微米波长(以苯调零点)测定其消光值。

同时测定对照试验(以此作标准,或按标准曲线)和空白试验的消光值。

(四) 计算

1. 按标准曲线法进行计算(略)
2. 按对照试验和空白试验的结果进行计算:

$$\begin{aligned} \text{仲胺含量 (毫克氮/公斤或ppm.)} &= \frac{E_{\text{样}} - E_{\text{空}}}{E_{\text{标}} - E_{\text{空}}} \times W_{\text{标}} \times \frac{50}{10} \times \frac{1,000}{W_{\text{样}}} \times \frac{1}{1,000} \\ &= \frac{E_{\text{样}} - E_{\text{空}}}{E_{\text{标}} - E_{\text{空}}} \times W_{\text{标}} \times \frac{5}{W_{\text{样}}} \end{aligned}$$

E样、E标和E空——分别表示样品液、标准液和空白液的消光值

W标——显色用标准液所含二乙胺重量 (以微克氮表示)

W样——指蒸餾时所用提取液相当于样品的克数。

样品分析及回收试验

(一) 分析结果

从广东省3个县15个公社农民家中采集的大米及副食品, 依法进行仲胺测定, 结果见表4

表4 几类食物中仲胺的含量 (ppm, 二乙胺氮)

种 类	咸 鱼	酸 菜	大头菜、梅菜	芋头叶 甘薯干	大 米
样 品 数	1 0	5 3	3 5	2 0	2 6 5
含量范围	5.69~75.00	0.91~50.56	0.39~40.75	0~15.20	其中4份检出痕量, 其余未检出
平均 值	27.10	14.76	9.26	2.94	

(二) 回收试验

按本文实验方法进行样品分析, 同时加入一定量的二乙胺标准液于样品中, 进行平行试验, 结果见表5。回收率一般在92~104%之间。

表5 回 收 试 验

样 号	取 样 量 (克)	加入二乙胺氮 (微克)	测出二乙胺氮 (微克)	回 收 率* (%)
1	30.0	0.0	5.0	
1	30.0	60.0	60.0	92.3
2	30.0	0.0	248.0	
2	30.0	60.0	320.0	104.0
3	36.0	0.0	320.0	
3	36.0	20.0	344.0	101.0
4	36.0	0.0	320.0	
4	36.0	20.0	348.0	102.0

*计算式: 回收率% = $\frac{\text{测定值}}{\text{(样品液含量 + 加入标准量)}} \times 100\%$

小 结

一、本文采用水蒸汽蒸馏-比色法测定食物中可蒸出的仲胺氮,通常用二乙胺为标准,可测范围为0~16微克/4毫升。用来测定咸鱼、酸菜等食物中的仲胺氮(咸鱼平均含量27.10ppm,酸菜为14.76ppm)其回收率在92~104%之间。

二、本法所测定的是能被水蒸汽蒸出的仲胺,如二甲胺、二乙胺、N-甲基苯胺等。经过试验,芳香胺如二苯胺等则不与CS₂试剂起反应,基本上与空白溶液一样。蒸馏时如能严格控制蒸馏条件,重复性较好。

三、收集蒸出仲胺的方法,有用稀酸吸收,然后调节为pH 7的^{②③}。本文采用乙醇(2:1)吸收蒸出的仲胺,能吸收完全,一般不用调节pH,可直接用来显色,手续较简单。

四、仲胺与本显色剂形成黄色的二氢茺酸铜络合物,在室温下, pH 5~8(本文采用pH 7)时,颜色稳定。

五、由于仲胺有多种,若要区分所测定的是那一种仲胺,尚需依靠其他方法如薄层色谱、气相色谱等^{④~⑧},有待进一步的研究。

参 考 文 献

- ① 黎兰馨:亚硝胺的分析化学。分析化学 5(4):309,1977
- ② 中国医学科学院林县食管癌防治队:食物中二级胺、亚硝酸盐和硝酸盐的测定。抗癌简讯(林县)1:16,1974
- ③ 新乡师范学院化学系食管癌病因研究小组:粮食中亚硝胺、仲胺、硝酸盐和亚硝酸盐的测定。内部资料,1974
- ④ Fritz Feigl:有机分析点滴试验(英译),167~168页,燃料化学工业出版社,1972
- ⑤ 张志贤:实用有机定量分析,444~449页,上海科技出版社,1965
- ⑥ Kawabata Toshiharn, et al: Secondary amines in foods. II. Differentiation & determination of nitrosated Secondary amines by gas-liquid chromatography, J Fd Hyg Soc Japan, 14(1):37,1973; Anal Abstr 27:1652,1974
- ⑦ Fuecker K, et al: Thin-layer electrophoretic detection of biogenic amines (in food) in case of poisoning. Nahrung 18(1):1974, K₁-K₄ (in German); Anal Abstr 27:987,1974
- ⑧ Silverstein R M: Spectrophotometric determination of primary, Secondary and tertiary fatty amines in aqueous solution. Anal Chem 35(2):157,1963
- ⑨ Qureshi M, et al: Detection and spectrophotometric determination of some aromatic nitrogen compounds with 4-dimethyl amino cinnamaldehyde. Analytica Chim Acta 86:509,1976; Anal Abstr 32(5):C 37,1975