

CHROM. 4859

## SPURENANALYSE VON N-NITROSO-VERBINDUNGEN

III. QUANTITATIVE DÜNNSCICHT-CHROMATOGRAPHIE  
VON NITROSAMINEN

G. EISENBRAND, K. SPACZYNSKI UND R. PREUSSMANN

*Forscherguppe Präventivmedizin und Abteilung für Experimentelle Therapie, Freiburg/Br. (B.R.D.)*

(Eingegangen am 14. Mai 1970)

## SUMMARY

*Trace analysis of N-nitroso compounds. III. Quantitative thin-layer chromatography of nitrosamines*

Quantitative thin-layer chromatography of three typical nitrosamines has been investigated. To obtain reproducible and high recoveries the following conditions should be maintained: (1) Dry dichloromethane is a suitable solvent for spotting on the plate. (2) Evaporation of high solvent volumina should be done in a Kuderna-Danish evaporator to avoid losses of volatile nitrosamines. (3) Thin-layer chromatographic separation should be effected in the dark and at 4°. Layer thickness should be no less than 0.6 mm. (4) Separated nitrosamines from scratched-off sorbent can be quantitatively removed by steam-distillation. Under these conditions TLC can be used as part of a clean-up method in the trace analysis of carcinogenic nitrosamines.

## EINLEITUNG

Viele organische N-Nitroso-Verbindungen (Nitrosamine und Nitrosamide) sind starke chemische Carcinogene<sup>1,2</sup>. Ihr Vorkommen als Naturprodukte und ihr mögliches Entstehen in der menschlichen Umwelt<sup>3,4</sup> machen selektive und empfindliche Nachweismethoden für diese Stoffklasse notwendig.

Im Rahmen unserer Arbeiten zur Spurenanalyse von Nitrosaminen prüfen wir qualitativ und quantitativ mögliche Einzelschritte eines Vorreinigungsverfahrens (clean-up)<sup>5,6</sup>. Hierbei erwies sich die Dünnschicht-Chromatographie (DC) von vorgereinigten Extrakten aus Lebensmitteln, die durch Wasserdampf-Destillation aus alkalischem und saurem Medium<sup>6</sup> gewonnen waren, als ein effektives Verfahren zur weiteren Abtrennung von störenden Begleitstoffen. Da jeder Einzelschritt des Anreicherungsverfahrens quantitativ gesichert werden musste, waren die Bedingungen für die DC von Nitrosaminen so zu standardisieren, dass reproduzierbar gute Ausbeuten erhalten werden konnten. Quantitative Untersuchungen hierzu liegen unseres Wissens bisher nicht vor, obwohl sich die DC als qualitative Nachweismethode für N-Nitroso-Verbindungen bewährt hat<sup>7,8</sup>.

Als mögliche Verlustursachen bei der DC von Nitrosaminen kommen neben der Lichtempfindlichkeit besonders die hohe Flüchtigkeit der niederen Homologen von Dialkylnitrosaminen (z.B. Dimethyl-, Methyl-vinyl- oder Methyl-*n*-butyl-nitrosamin) in Betracht. Deshalb musste das Konzentrieren von Nitrosaminlösungen in verschiedenen Lösungsmitteln auf ein für das Auftragen auf die Platte geeignetes kleines Volumen ebenso untersucht werden wie Verluste durch Flüchtigkeit beim Auftragen und Entwickeln der Platte. Zur Isolierung getrennter Substanzen aus der abgelösten Sorbensschicht schliesslich war ein allgemein anwendbares Verfahren nötig, das die in ihrem physikalisch-chemischen Verhalten (z.B. Dampfdruck, Wasserlöslichkeit) sehr unterschiedliche Stoffklasse quantitativ erfasst. Hier erwies sich die Wasserdampf-Destillation der Sorbensschicht als geeignetes Verfahren.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur dargelegten Problemstellung wurden an drei charakteristischen Vertretern der Stoffklasse durchgeführt, nämlich an Dimethyl-(DMNA), Diäthyl- (DNA) und Di-*n*-amyl-nitrosamin (DANA). Die ersten beiden Verbindungen sind relativ polar und gut wasserlöslich; DMNA hat einen hohen Dampfdruck und ist stark flüchtig. DANA wurde als Beispiel eines lipophilen Nitrosamins geringer Flüchtigkeit und Wasserlöslichkeit untersucht.

## EXPERIMENTELLES

### *Materialien*

DMNA, DNA und DANA wurden im eigenen Labor nach bekannten Methoden synthetisiert. Sie waren gaschromatographisch einheitlich. Alle verwendeten Lösungsmittel waren analysenrein. Zur Spektroskopie im UV wurde das registrierende Spektralphotometer Zeiss DMR 21, zur Polarographie das Metrohm-Gerät Polarecord E 261 R benutzt.

### *Herstellung der DC-Platten*

Auf 20 × 20 cm Glasplatten wurden in üblicher Weise Schichten von 0.25 mm mit Kieselgel GF<sub>254</sub> (Merck) bzw. von 0.6 mm mit Kieselgel PF<sub>254</sub> (Merck) aufgebracht (Streichgerät Uiplan, Shandon). Nach 30 Min. Trocknen an der Luft wurde 2 Std. bei 120° aktiviert. Lagerung der aktivierten Platten erfolgte in einem Exsikkator über Blaugel.

## METHODIK

### *Bestimmung der Abdampfverluste beim Konzentrieren von Lösungen*

Lösungen von Dimethylnitrosamin (2.3–3.2 mg) in verschiedenen organischen Lösungsmitteln wurden nach zwei Methoden eingengt: (1) Mittels Rotationsverdampfer im Vakuum ohne Heizung des Wasserbades unter Verwendung eines 250-ml Rundkolbens mit am Boden angeschmolzenem, graduierten 10-ml Ansatz. (2) Am Kuderna–Danish-Verdampfer mit aufgesetzter 3-Kugel-Synder-Kolonnen bei Normaldruck. Bei beiden Verfahren wurden jeweils 200 ml auf ein Endvolumen von 2–3 ml eingengt. Mit Wasser mischbare Lösungsmittel (Aceton, Acetonitril) wurden mit 0.2 N HCl auf 500 ml aufgefüllt und der Nitrosamin-Gehalt polarographisch<sup>9</sup> gemessen. Lipophile Lösungsmittel (z.B. Dichlormethan oder *n*-Pentan) wurden mit

*n*-Pentan auf 250 ml aufgefüllt und die Nitrosamin-Konzentration spektrophotometrisch gegen eine in gleicher Weise hergestellte Blindprobe bestimmt.

#### *Bestimmung der Verluste während der DC*

Mengen von 80 bis 170  $\mu\text{g}$  des betreffenden Nitrosamins in 2 ml Dichlormethan p.A. wurden nach zwei Methoden strichförmig aufgetragen: (1) von Hand mittels einer Vollpipette (2 ml) bzw. (2) mit einem automatisch arbeitenden Auftraggerät (Autoliner der Fa. Desaga, Heidelberg). Das Auftragen erfolgte grundsätzlich ohne Benutzung eines Föhns. Die Auftragsstrecke war einheitlich 12 cm. Die Auftragezeit betrug mit Pipette etwa 5 Min., mit dem Autoliner etwa 15 Min.

#### *Entwicklung und Detektion*

Die Entwicklung erfolgte mit dem Fließmittel *n*-Pentan–Diäthyläther–Dichlormethan (5:2:2) bei Kammersättigung und unter Lichtabschluss. Zur Chromatographie bei 4° wurde im Kühlschrank oder Kühlraum gearbeitet. Nach Entwicklung wurden die Substanzzonen durch kurzes Betrachten unter der Camag-Universal-UV-Lampe bei 254 nm markiert.

#### *Isolierung*

Die markierten  $R_F$ -Wert-Zonen (DMNA = 0.31; DENA = 0.55; DANA = 0.91) wurden als rechteckige Banden von 3–3.3 cm Breite mit einem Objektträger abgelöst. Für den Referenzwert wurde von jeder Platte ein Band genau gleicher Breite darüber bzw. darunter genommen. Die gewonnenen Sorbensschichten wurden anschliessend einer Wasserdampf-Destillation unterworfen. Hierbei hat sich folgende Methodik bewährt:

*Platten mit 0.25 mm Schichtdicke.* Das Kieselgel wurde in einem Rundkolben (50 ml) mit 6 ml Wasser, einigen Siedesteinchen und einem Magnetrührstab versetzt. Der Kolben wurde an eine kleine Schliff-Destillationsapparatur angeschlossen, und das Destillat in einem Spitzkölbchen (50 ml) unter Kühlung mit Eis-Kochsalz gesammelt. Beheizung erfolgte durch ein Ölbad, das von einem Magnetrührer mit Heizplatte auf einer Temperatur von 150° gehalten wurde; zur Vermeidung von Siedeverzügen musste stark gerührt werden. Die Destillation erfolgte bis zur Trockene. Unter Nachspülen der Apparatur wurden auf ein Volumen von 10 ml mit Wasser aufgefüllt.

*Platten mit 0.6 mm Schichtdicke.* Unter sonst identischen Bedingungen wurden anstelle von 6 ml hier 16 ml Wasser zugesetzt. Zur Isolierung schlecht wasserlöslicher Nitrosamine wie DANA wurde 16 ml 50 %iges wässriges Methanol anstelle von Wasser zugesetzt. Das Destillat wurde auf 20 ml mit Wasser bzw. Methanol–Wasser (50 %) aufgefüllt.

#### *Konzentrationsbestimmung*

Die Nitrosamin-Bestimmung in den Wasserdampf-Destillaten erfolgte UV-spektroskopisch durch Messung im Absorptionsmaximum der Nitrosamine bei 235 nm. Das Lambert–Beersche Gesetz ist über einen grossen Konzentrationsbereich erfüllt. Eichkurven für DMNA und DENA wurden in Wasser, für DANA in 50 %igem wässrigem Methanol aufgestellt. Es wurden jeweils die Destillate der Substanzzone gegen Destillate der Kontrollzone gemessen.

TABELLE I

ABDAMPFVERLUSTE BEIM EINENGEN VON DIMETHYLNITROSAMIN-LÖSUNGEN AUF EIN KLEINES END-VOLUMEN

Lösungsmittel	Menge Nitrosamin ( $\mu\text{g}$ )	Verdampfer	Ausgangsvolumen (ml)	Endvolumen (ml)	Rückgewinnung (%)
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	3.2	Rotation	200	2	77.5
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	3.2	Kuderna-Danish	200	2.5	97
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , wassergesättigt, Trocknung über $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -säule (2 cm Durchmesser, 40 g)	3.2	Rotation	70	2	0
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , wassergesättigt, 4 Std. Trocknen mit 100 g $\text{Na}_2\text{SO}_4$ unter Rühren	2.3	Rotation	200	2	70
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , wassergesättigt, 4 Std. Trocknen mit 100 g $\text{Na}_2\text{SO}_2$ unter Rühren	2.3	Kuderna-Danish	200	2	96.5

TABELLE II

RÜCKGEWINNUNG VON NITROSAMINEN DURCH WASSERDAMPF-DESTILLATION VON ABGELÖSTEN KIESELGEL-SCHICHTEN OHNE ENTWICKLUNG

Lösungen der Nitrosamine in Dichlormethan (2 ml) wurden strichförmig mittels Pipette aufgetragen.

Nitrosamin	Adsorbierte Menge ( $\mu\text{g}$ )	Zahl der Messungen	Rückgewinnung (%)	
			Mittelwert	Niedrigster und höchster Wert
Dimethyl-	110-120	5	96.5	96-97
Diäthyl-	100-150	5	98	96-99
Di-n-amyl-	700	2	98	98

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Modellversuchen wurden zunächst die Verluste beim Einengen von Lösungen des leicht flüchtigen Dimethylnitrosamins in verschiedenen organischen Lösungsmitteln auf ein kleines, zum Auftragen auf eine DC-Platte geeignetes Volumen (2-3 ml) untersucht. Es zeigte sich, dass beim Abziehen am Rotationsverdampfer im Vakuum ohne Badbeheizung teilweise beträchtliche Verluste eintreten. Sie betragen bei Aceton als Lösungsmittel fast 50 %, bei Dichlormethan 22 % der eingesetzten DMNA-Menge. Bei der Verwendung unpolarer Lösungsmittel wie *n*-Pentan ergeben sich Verluste bis zu 100 % (vgl. Lit. 10). Abdampfen am Kuderna-Danish-Verdampfer reduzierte die Verluste signifikant. So wurden bei Verwendung von Aceton solche von 7 %, bei Verwendung von Dichlormethan Verluste von 3 % bestimmt.

Diese Vorversuche hatten ergeben, dass Dichlormethan das Lösungsmittel mit den günstigsten Eigenschaften ist: Es hat ein gutes Lösevermögen für Nitrosamine, hat einen niedrigen Siedepunkt und lässt sich leichter trocknen als andere Lösungsmittel. Wegen der starken Wasserdampf-Flüchtigkeit von Nitrosaminen<sup>6</sup> müssen

nämlich Lösungen vor dem Abdampfen gründlich getrocknet werden, um zusätzliche Verluste zu vermeiden. Die Ergebnisse mit Dichlormethan sind in Tabelle I zusammengefasst. Eine Schnelltrocknung wassergesättigter Dichlormethan-Lösungen über eine Säule mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (40 g, 2 cm Durchmesser) erwies sich als völlig ungenügend: Es konnte kein Dimethylnitrosamin im Abdampfrückstand mehr gefunden werden. Gute Ergebnisse wurden dagegen erzielt mit einer 4-Std. Trocknung bei ständigem Rühren mittels eines Magnetrührers (Tabelle I).

Die Ausbeuten bei der destillativen Abtrennung der an Kieselgel adsorbierten Nitrosamine sind in Tabelle II aufgeführt. Es zeigt sich, dass die Methode der Wasserdampf-Destillation von Kieselgelfractionen praktisch quantitative und gut reproduzierbare Ausbeuten liefert. Hierzu werden nur kleine Destillationsvolumina benötigt. Die Ergebnisse zeigen weiter, dass beim bandförmigen Auftragen der trockenen Nitrosaminlösungen in Dichlormethan praktisch keine Verluste entstehen. Verwendung von Acetonitril bzw. Aceton als Lösungsmittel führte im Gegensatz dazu zu Verlusten von rund 15 %.

Die Entwicklung der Dünnschichtplatten erfolgte prinzipiell im Dunklen, um mögliche Verluste durch Photolyse zu vermeiden. Das Fliessmittel *n*-Pentan-Diäthyläther-Dichlormethan (5:2:2) hat gegenüber dem früher vorgeschlagenen<sup>7</sup> Gemisch *n*-Hexan-Diäthyläther-Dichlormethan (4:3:2) den Vorteil, bei ähnlichen Trenneigenschaften leichter flüchtig zu sein und somit schneller Lösungsmittel-freie Sorbentien zu ergeben. In Tabelle III sind die Rückgewinnungsraten von DMNA und DENA nach Chromatographie auf einer 0.25 mm dicken Schicht von Kieselgel GF<sub>254</sub> in Abhängigkeit von der Auftragsmethode und der Temperatur während der Chromatographie dargestellt. Es zeigt sich, dass zwischen dem manuellen Auftragen mit Pipette und dem automatischen Auftragen (Autoliner) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ausbeute bestehen. Unbefriedigend jedoch sind die Verluste von rund 30 % an Dimethylnitrosamin und vor allem die schlechte Reproduzierbarkeit der Ausbeuten unter diesen Bedingungen. Die Chromatographie bei 4° bringt keine

TABELLE III

RÜCKGEWINNUNG VON DIMETHYL- UND DIÄTHYLNITROSAMIN NACH DC AUF KIESELGEL GF<sub>254</sub> IN ABHÄNGIGKEIT VON DER METHODE DES AUFTRAGENS UND DER TEMPERATUR BEI DER CHROMATOGRAPHIE

Schichtdicke: 0.25 mm.

Nitrosamin	Menge ( $\mu\text{g}$ )	Auftrag- Methode	DC- Temp.	Zahl der Messungen	Rückgewinnung (%)	
					Mittelwert	Niedrigster und höchster Wert
Dimethyl-	110-170	Pipette	22°	5	70.5	66-74
			4°	6	76	68-85
	110-120	Autoliner	22°	5	69.5	64-74
			4°	8	74.5	68-81
Diäthyl-	80-150	Pipette	22°	6	89.5	84-94
			4°	11	88.5	83-93
	90	Autoliner	22°	2	85.5	85-87
			4°	2	87	87

wesentlichen Verbesserungen (Tabelle III). Vor kurzem bekannt gewordene Versuche von SCHULLER<sup>11</sup> ergaben für Diäthylnitrosamin bei der DC an Kieselgel sogar Verluste bis zu 43 %.

Durch Erhöhung der Schichtdicke von 0.25 mm auf 0.6 mm gelang es uns jedoch, die DC von Nitrosaminen auch in quantitativer Hinsicht befriedigend durchzuführen. Wie in Tabelle IV dargestellt, ergeben sich mit dieser höheren Schichtdicke und bei Chromatographie bei 4° im Dunklen gute bis sehr gute Rückgewinnung aller drei untersuchten Nitrosamine bei guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Verluste betragen maximal *ca.* 10 %. Signifikante Unterschiede zwischen manueller und automatischer Auftragung bestehen nicht.

Die Ergebnisse beweisen, dass unter den angegebenen Bedingungen die Dünnschicht-Chromatographie von Nitrosaminen als wertvolle Reinigungsmethode in der Spurenanalyse dieser Carcinogene eingesetzt werden kann.

TABELLE IV

AUSBEUTEN DER DC VON NITROSAMINEN AN KIESELGEL PF<sub>254</sub> BEI 4° UND DUNKELHEIT  
Schichtdicke: 0.6 mm.

Nitrosamin	Menge ( $\mu$ g)	Auftrag- methode	Zahl der Messungen	Rückgewinnung (%)	
				Mittel- wert	Niedrigster und höchster Wert
Dimethyl-	110-130	Pipette	4	90	89-93
	110-130	Autoliner	4	89.5	88-92
Diäthyl-	95-160	Pipette	4	96	94-99
	95	Autoliner	3	94	93-95
Di-n-amyl-	735	Pipette	2	95	95
	735	Autoliner	2	94.5	94-95

## DANK

Die Arbeiten wurden durchgeführt mit Unterstützung der International Agency for Research on Cancer, Lyon.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die quantitative Dünnschichtchromatographie dreier typischer Nitrosamine untersucht. Zur Erzielung reproduzierbarer und hoher Ausbeuten müssen folgende Bedingungen eingehalten werden: (1) Trockenes Dichlormethan ist als Lösungsmittel zum Auftragen auf die Platte geeignet. (2) Das Einengen grösserer Lösungsmittelvolumina sollte nach sorgfältigem Trocknen in einem Kuderna-Danish-Verdampfer vorgenommen werden, um Verluste flüchtiger Nitrosamine zu vermeiden. (3) Die dünnschichtchromatographische Trennung sollte unter Lichtschutz und bei 4° vorgenommen werden. Die Schichtdicke der Platte sollte nicht geringer als 0.6 mm sein. (4) Nach Entwicklung können die Nitrosamine quantitativ durch Wasserdampf-

destillation vom Trägermaterial abgetrennt werden. Unter diesen Bedingungen kann die Dünnschichtchromatographie als Teil eines clean-up-Verfahrens in der Spurenanalytik carcinogener Nitrosamine eingesetzt werden.

## LITERATUR

- 1 H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC UND D. SCHMÄHL, *Z. Krebsforsch.*, 69 (1967) 103.
- 2 P. N. MAGEE UND J. M. BARNES, *Advan. Cancer Res.*, 10 (1967) 163.
- 3 G. EISENBRAND UND P. MARQUARDT, *Med. Ernährung*, 10 (1969) 73.
- 4 W. LIJINSKY UND S. S. EPSTEIN, *Nature*, 225 (1970) 21.
- 5 G. EISENBRAND, P. MARQUARDT UND R. PREUSSMANN, *Z. Anal. Chem.*, 247 (1969) 54.
- 6 G. EISENBRAND, A. V. HODENBERG UND R. PREUSSMANN, *Z. Anal. Chem.*, 251 (1970) 22.
- 7 R. PREUSSMANN, G. NEURATH, G. WULF-LORENTZEN, D. DAIBER UND H. HENGY, *Z. Anal. Chem.*, 202 (1964) 187.
- 8 L. FISHBEIN UND H. L. FALK, *Chromatog. Rev.*, 11 (1969) 365.
- 9 D. F. HEATH UND J. A. E. JARVIS, *Analyst*, 80 (1955) 613.
- 10 G. NEURATH, B. PIRRMANN, W. LUTTICH UND H. WICHERN, *Beitr. Tabakforsch.*, 3 (1965) 251.
- 11 P. L. SCHULLER, *IARC-Meeting on Analytical Problems in the Estimation of Traces of Nitrosamines in Food and Other Environmental Media*, London, Oct. 1969.

*J. Chromatog.*, 51 (1970) 503-509