

CHROM. 7047

Note

Gaschromatographisches Screening von Nitrosaminen in Lebensmitteln mit dem Stickstoff-Flammenionisationsdetektor

M. RIEDMANN

Hewlett-Packard GmbH, Gutenbergstr. 6, D-7501 Grötzingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 4. Juli 1973)

EINLEITUNG

Die Nitrosamine sind potente cancerogene Stoffe, die in Lebensmitteln, Tabak und biologischem Material vorkommen. Nitrosamine bilden sich bei der Lebensmittelbereitung oder *in vivo* zwischen Nitrat und Nitrit mit Präkursoraminen. Als Präkursoren kommen die in biologischen Systemen vorhandenen sekundären, tertiären und quartären Amine in Betracht. Direkte Bildung von Nitrosaminen entsteht durch metabolische Aktivität von Mikroorganismen.

Um die niedrigen Nitrosaminkonzentrationen in Gegenwart der höheren Konzentrationen endogener Begleitstoffe in Extrakten und Destillaten nachzuweisen und zu bestimmen, sind wirkungsvolles Clean-up und empfindliche, selektive analytische Trennmethoden erforderlich. Diese Bedingungen erfüllt vorzugsweise die Gaschromatographie (GC) gekoppelt mit selektiven Detektoren, dem Stickstoff-Flammenionisationsdetektor (N-FID), dem "Electron Capture Detector" (ECD) und dem Massenspektrometer (MS).

KOPPLUNG GC-MS

Um Spezifität für die charakteristische Masse des NO^+ -Ions der Nitrosamine zu erhalten und von anderen Bruchstücken ausreichend zu unterscheiden, ist eine Massenauflösung von mindestens 10,000 erforderlich. Die eindeutige Spezifität erfordert die Auflösung von etwa 25,000 (Lit. 1). Für eine massenspektrometrische Strukturbestimmung sind die Clean-up-Methoden nicht effizient genug, um Begleitstoffe mit gleichen Retentionszeiten zu diskriminieren, so dass Nitrosamine mit niedriger auflösenden, für die Kopplung GC-MS allgemein geeigneten Quadrupolspektrometern, nicht eindeutig identifiziert werden können. Für Screening-Verfahren durch GC-MS-Kopplung stehen hochauflösende MS im allgemeinen aus Kostengründen nicht zur Verfügung, und Quadrupolgeräte mit Massenmarker, die auf das Molekülion eingestellt werden, benötigen ein Clean-up, das um den Faktor 100-1000 besser ist, als dies für die GC mit selektiven Detektoren erforderlich ist.

KOPPLUNG GC-N-FID

Als Screening-Verfahren eignet sich die GC mit dem N-FID und mit dem ECD²⁻⁴. Der N-FID besitzt für das Screening gegenüber dem ECD folgende wesentliche Vorteile:

(i, ii) Die Technik der temperaturprogrammierten GC ist mit geringfügiger Basisliniendrift und ohne Änderung der Eichfaktoren infolge Bleeding der flüssigen Phase, das Linearität und Linearitätsbereich des ECD vermindert, anwendbar über einen für die Praxis der GC und für die Richtigkeit der quantitativen Auswertung der Nitrosaminpeaks erforderlichen linearen (10^4) und dynamischen Bereich (10^5).

(iii) Der Detektor ist weitgehend eichfrei, da die Detektorempfindlichkeit dem prozentualen Gehalt an Stickstoff im Molekül streng proportional ist. Der ECD erfordert externe Eichung auf Grund der oft nicht kontrollierbar veränderlichen Elektronabsorption. Für den N-FID kann der innere Standard verwendet werden, der die systematischen Fehler der externen Eichung nicht beinhaltet.

(iv) Derivatbildung, um die Nitrosamine "detektorempfindlich" zu erhalten, ist nicht nötig. Die Derivatbildung, Trifluoracylierung nach Spaltung des Nitrosamins³ oder Oxydation zum Nitramin⁴, beinhaltet systematische Fehler, die abhängig von der chemischen Struktur des Nitrosamins sind. Der Elektronabsorptionskoeffizient der Heptafluorbuttersäureamide ergibt eine um den Faktor 10 niedrigere Empfindlichkeit gegenüber dem N-FID.

(v) Der Detektor ist für den Nachweis aller Nitrosamine anwendbar. Nitrosopiperidin und Phenylnitrosamine zersetzen sich bei Oxydation mit Peroxytrifluoressigsäure zu nicht ECD-affinen Verbindungen⁴.

(vi) Artefakte, die bei der Herstellung der Derivate gebildet werden und im Chromatogramm interferieren können, werden vermieden.

Fig. 1 ist ein Gaschromatogramm von Di-*n*-amylnitrosamin durch Lösungsmittel-extraktion aus Weizenmehl angereichert und mit dem N-FID detektiert. Das Chromatogramm demonstriert die Selektivität des Detektors. Die negativen Signale (Peak 1, 2, 3, 4, 6) sind mitextrahierte Begleitstoffe aus dem Weizenmehl. Im Tailing des Nitrosaminpeaks stört der negative Peak 6, der in einer Menge von etwa 1-5 μg Begleitsubstanz vorhanden ist, das quantitative Signal in keiner Weise. Die Nitrosaminpeakfläche entspricht 32 ng. Bei einer Kopplung GC-Quadrupolspektrometer wäre eine Strukturbestimmung von Di-*n*-amylnitrosamin im Weizenmehlextrakt ausgeschlossen, ohne hier das Clean-up wesentlich zu verbessern.

Die Selektivität des N-FID kann nach Wahl eingestellt und nicht stickstoffhaltige Begleitstoffe als positive oder negative Signale zur Anzeige gebracht werden. Die negative Anzeige von nicht stickstoffhaltigen Begleitstoffen besitzt den Vorteil der eindeutigen Erkennung der Nitrosaminpeaks in Form der positiven Signale. Die theoretischen und experimentellen Grundlagen des N-FID und die Erklärung des Vorganges der Peakumkehr sind in der Literatur ausführlich beschrieben^{5,6}.

Fig. 2a ist das Chromatogramm eines Methylenchloridextraktes von Nitrosaminen, die einem Molkereiprodukt zugesetzt wurden, mit dem FID detektiert, temperaturprogrammiert. Die Peaks 2, 3, 5 und 6 entsprechen aus der Retentionszeit identifizierten Nitrosaminen. Dieselbe Probe, unter gleichen GC Bedingungen mit dem N-FID detektiert, zeigt, dass die negativen Peaks 1, 4 und 7 keinen Stickstoff

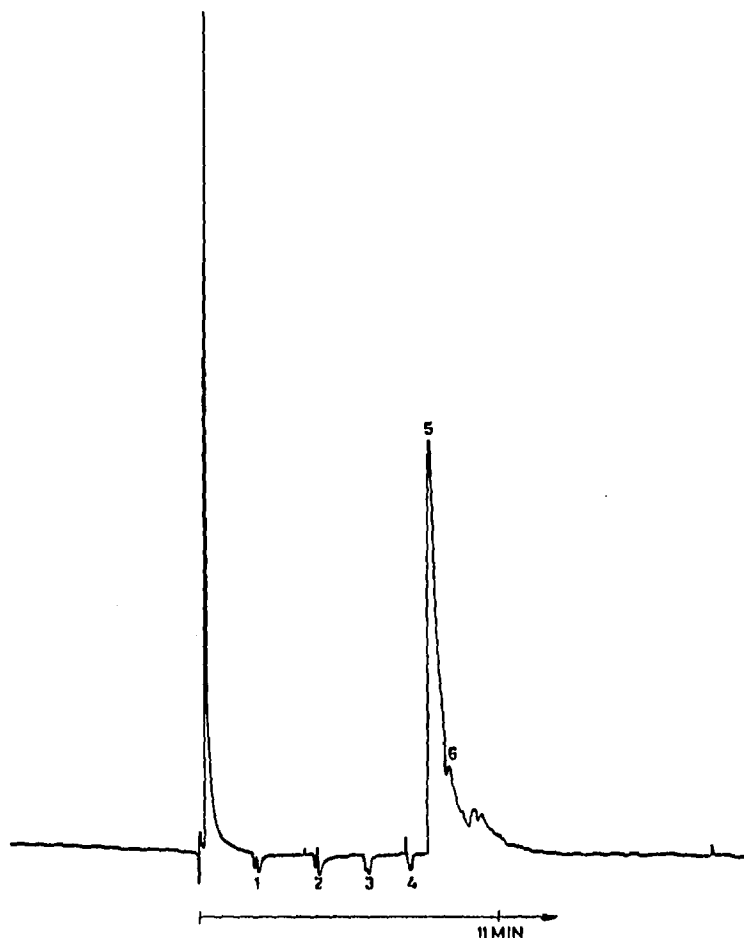


Fig. 1. Gaschromatogramm von Di-*n*-amylnitrosamin. Gerät: Hewlett-Packard 5750G Gaschromatograph. Detektor: 15161A N-FID. Säule: 4 Fuss \times 4 mm I.D., Glas. Träger: Chromosorb G AW-DMCS, 80–100 mesh. Phase: 1% SE-30. Temperaturprogramm: 70–250°; Rate 15°/min. Empfindlichkeit: 16×10^2 . Peaks: 1, 2, 3, 4, 6 = Begleitstoffe; 5 = Di-*n*-amylnitrosamin, 32 ng.

enthalten. Peak 5 ist der Retentionszeit nach 1-Nitrosopiperidin, eine Substanz mit einem Stickstoffgehalt vergleichbar den Nitrosaminen Peak 2, 3 und 6. Auf Grund dessen ist eine vergleichbare Relation zwischen dem FID-Kohlenstoffsignal und dem N-FID-Stickstoffsignal bei sämtlichen Nitrosaminen zu erwarten. Aus Fig. 2b ist das Nitrosopiperidinsignal aber etwa zehnmal grösser. Phosphororganische Verbindungen werden vom N-FID etwa zehnmal empfindlicher angezeigt als Stickstoffverbindungen. Daher ist zu schliessen, dass retentionszeitgleich ein pesticider Phosphorsäureester (oder ein Metabolit) eluiert wird.

Fig. 3 ist das temperaturprogrammierte Gaschromatogramm eines Gemisches von Nitrosaminen im Mengenbereich von je etwa 50 pg. Das Chromatogramm zeigt die hohe Empfindlichkeit des N-FID, die besonders für den Nachweis von niedrigen Nitrosaminkonzentrationen in kleinen Mengen an biologischem Material genutzt

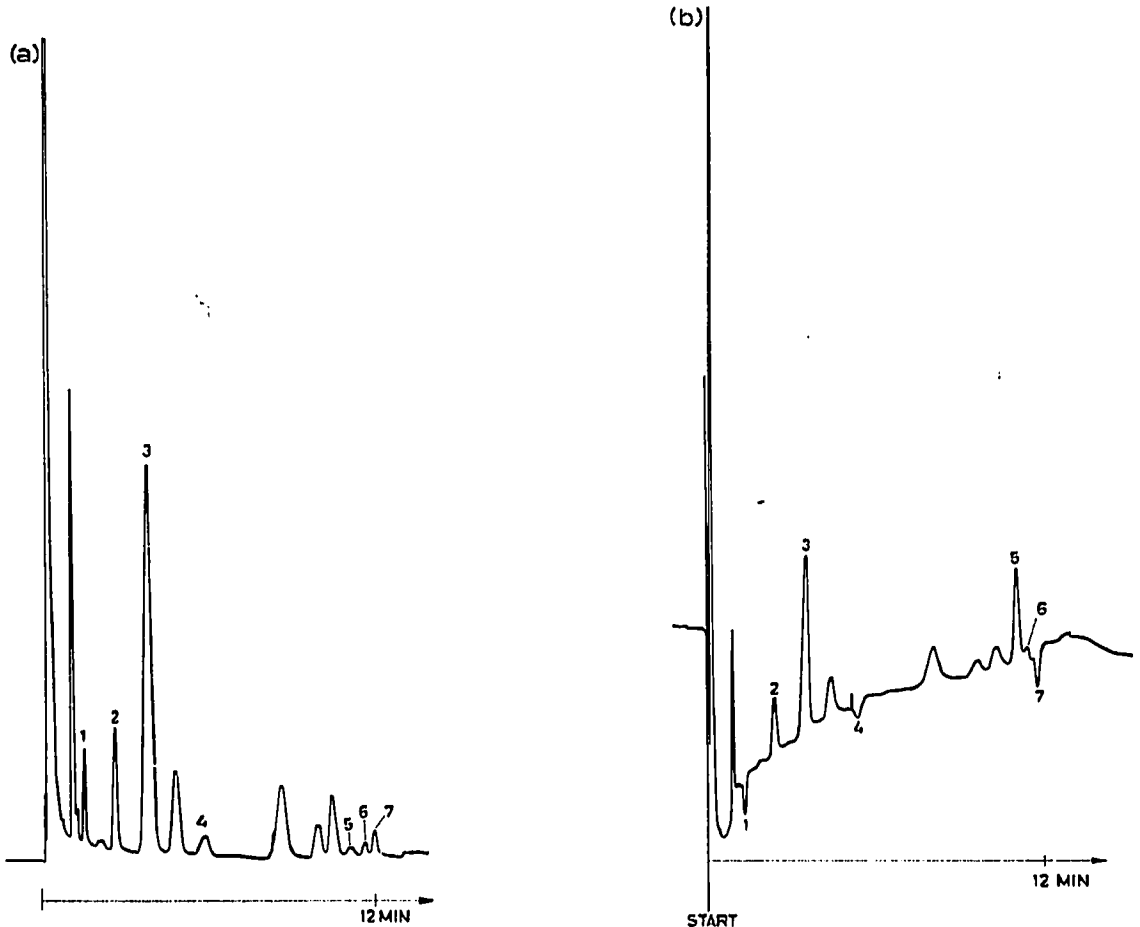


Fig. 2. Gaschromatogramme eines Methylenechloridextraktes von Nitrosaminen. Detektor: (a) FID, Empfindlichkeit 16×10 ; (b) 15161A N-FID, Empfindlichkeit 16×10^3 . Gerät: Hewlett-Packard 5750G Gaschromatograph. Säule: 4 Fuss \times 2 mm I.D., Glas. Träger: Haloport F, 40–60 mesh. Phase: 2% Carbowax 20M. Temperaturprogramm: 5 min isotherm, 50–120°; Rate 15°/min. Peaks: 1, 4, 7 = Begleitstoffe; 2 = Dimethylnitrosamin; 3 = Diäthylnitrosamin; 5 = 1-Nitrosopiperidin; Phosphorverbindung; 6 = Di-*n*-butylnitrosamin.

werden kann. Die Selektivität des Detektors ist bei dieser höchsten Empfindlichkeitseinstellung gegenüber der in Fig. 1 gezeigten Selektivität nicht vermindert.

Bei einem Anreicherungsfaktor von 500 für Nitrosamine sind mit dem N-FID Probenausgangskonzentrationen von 0,02–0,05 ppb als untere Nachweisgrenze zu erreichen. Bei Dosierung von 10–20 pg Nitrosamin auf die GC Trennsäule ist die Auswertegenauigkeit etwa $\pm 10\%$. Die zur Screening-Analyse erforderliche Menge an Ausgangsmaterial beträgt bei entsprechender Probeanreicherung etwa 10 g für eine Nitrosaminkonzentration von 1 ppb. Nicht stickstoffhaltige Begleitstoffkonzentrationen

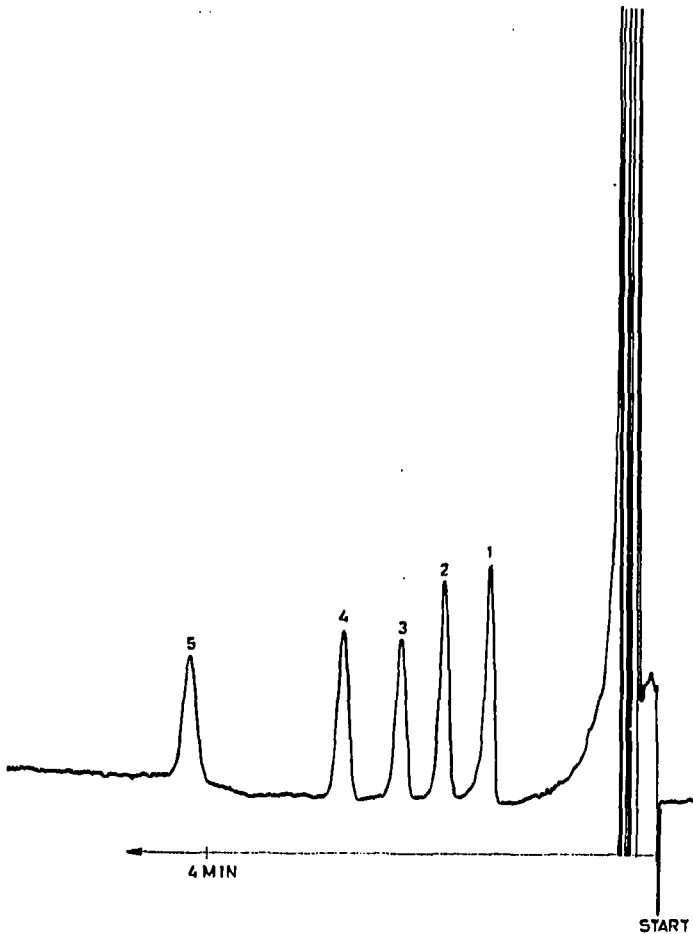


Fig. 3. Gaschromatogramm eines Gemisches von Nitrosaminen im Mengenbereich von je etwa 50 pg. Gerät: Hewlett-Packard 5750G Gaschromatograph. Detektor: 15161B N-FID. Säule: 6 Fuss \times 2 mm I.D., Glas. Träger: Chromosorb W AW-DMCS, 80-100 mesh. Phase: 5% Carbowax 20M + 2% KOH. Temperaturprogramm: 90-140°; Rate 15°/min. Empfindlichkeit: 4×10^2 . Peaks: 1 = Dimethylnitrosamin; 2 = Diäthylnitrosamin; 3 = Diisopropylnitrosamin; 4 = Dipropylnitrosamin; 5 = Dibutylnitrosamin.

trationen von etwa tausendfachem Überschuss in Extrakten und Destillaten beeinflussen bei gleicher Retentionszeit die Richtigkeit der quantitativen Auswertung der Nitrosaminsignale mit nur etwa 10%.

LITERATUR

- 1 G. M. Telling, T. A. Bryce und J. Althorpe, *J. Agr. Food Chem.*, 19 (1971) 937.
- 2 G. M. Telling, *J. Chromatogr.*, 73 (1972) 79.
- 3 G. Eisenbrand, private Mitteilung.
- 4 N. P. Sen, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 301.
- 5 H. Maier-Bode und M. Riedmann, *Res. Rev.*, im Druck.
- 6 *High Sensitivity Nitrogen FID Application Note*, Hewlett-Packard, Avondale, Pa., 1972.