

CHROM. 7373

ANALYTIK VON N-NITROSO-VERBINDUNGEN

2. MITT*. TRENNUNG UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON HOMOLOGEN N-NITROSO-N-ALKYLHARNSTOFFEN UND N-NITROSO-N-ALKYLURETHANEN DURCH SCHNELLE HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE

KURT HEYNS und HARALD RÖPER

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg, Hamburg (B.R.D.)

(Eingegangen am 25. Januar 1974)

SUMMARY

Analysis of N-nitroso compounds. II. Separation and quantitative determination of N-nitroso-N-alkylureas and N-nitroso-N-alkylurethans by high-speed high-pressure liquid chromatography.

Physical data, elementary analysis data and IR, UV, NMR and mass spectra have been determined for N-nitroso-N-alkylureas and N-nitroso-N-alkylurethans. The fragmentation patterns in the mass spectrometer induced by electron impact are discussed. A fast separation is described of model mixtures of alkyl homologous N-nitroso-N-alkylureas and N-nitroso-N-alkylurethans by reversed-phase liquid-liquid distribution in a liquid chromatograph. Detection is carried out by UV absorption at 254 nm. Calibration curves for the quantitative determination of separated N-nitroso-N-alkylureas are given. The lowest detection limit for N-nitroso-N-methylurea was 10 ng.

EINLEITUNG

N-Nitroso-N-alkylharnstoffe und N-Nitroso-N-alkylurethane sind Substanzen mit carcinogener Wirksamkeit, die durch Tierexperimente nachgewiesen ist¹. Aus diesem Grund ist die Spurenanalytik dieser Verbindungen — Trennung, eindeutige Identifizierung und quantitative Bestimmung im Mikrogramm- bis Nanogramm-bereich — besonders im Hinblick auf die Möglichkeit ihres Vorkommens in Umweltmedien z.B. in Nahrungsmitteln von grosser Wichtigkeit.

Die Analyse verläuft in mehreren Schritten, von denen jeder, in Abhängigkeit von dem untersuchten Medium, in geeigneter Weise optimiert werden muss: (1) Extraktion mit geeigneten Lösungsmitteln, (2) Abtrennung von Begleitsubstanzen, die die Endbestimmung stören (clean up), (3) Aufkonzentrierung, (4) Endbestimmung (Trennung, Identifizierung, quantitative Bestimmung). Der letzte Schritt bei der

* 1. Mitt.: *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 145 (1971) 69.

Spurenanalyse von N-Nitroso-N-alkylharnstoffen und N-Nitroso-N-alkylurethanen ist Gegenstand dieser Arbeit.

Die quantitative Bestimmung einzelner N-Nitroso-N-alkylharnstoffe und von N-Nitroso-N-methylurethan auch in Gegenwart von Serum, Blut und Organhomogenat wurde nach einer Methode von Forist² — spektralphotometrische Bestimmung von Streptozotocin, einem Antibiotikum mit N-Nitroso-N-methylamidgruppe — von Preussmann und Schaper-Druckrey³ unter optimierten Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Methode beruht auf einer sauren Spaltung der N—NO Bindung. Freigesetzte salpetrige Säure wird über ein aromatisches Diazoniumion zu einem Azofarbstoff umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird. Über eine Trennung und gleichzeitige quantitative Bestimmung alkylhomologer N-Nitroso-N-alkylharnstoffe oder N-Nitroso-N-alkylurethane wurde bisher nicht berichtet. Wegen der thermischen Labilität dieser Verbindungen entfällt eine gaschromatographische Trennung.

MATERIALIEN UND METHODEN

N-Nitroso-N-alkylharnstoffe (alkyl = methyl, äthyl, *n*-propyl, *n*-butyl) und N-Nitroso-N-alkylurethane (alkyl = methyl, äthyl, *n*-propyl) wurden analog zu bekannten Methoden präparativ dargestellt^{4,5}. Alle Substanzen wurden im Exsikkator über $(P_2O_5)_2$ im Kühlschrank bei 4° aufbewahrt.

Der Hochdruckflüssigkeitschromatograph, Modell ALC 100 der Fa. Waters Ass. (Framingham, Mass., U.S.A.), war mit UV-Detektor (254 nm), Differentialrefraktometer und Pumpe Modell 6000 (max. Druck 6000 p.s.i. bis 10 ml/min) ausgerüstet. Auch die analytischen Säulen (2 ft. × 1/8 in. äusserer Durchmesser) und die stationäre Phase (Bondapak Corasil/C₁₈, 37–50 μ) wurden von Waters Ass. bezogen. Die Säulen wurden trocken gepackt. Als mobile Phasen wurden Wasser–Acetonitril Mischungen (15:1) und (10:1) verwendet.

Entsalztes Wasser wurde in einer Quarzapparatur destilliert. Acetonitril (zur Synthese, Merck, Darmstadt, B.R.D.) wurde nach der Vorschrift von Walter und Ramaley⁶ gereinigt. Die Spritze, Modell Unimetrics Nr. UMS 450 (50 μl), gas- und flüssigkeitsdicht, wurde von der Fa. Macherey, Nagel und Co. (Düren, B.R.D.) bezogen. Zur Auswertung der quantitativen Messungen wurde ein Digital Integrator Modell CRS-100 A (mit Drucker) der Fa. Infotronics (Houston, Texas, U.S.A.) verwendet.

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte an einem Massenspektrometer Modell SM 1 der Fa. Varian-MAT (Bremen, B.R.D.) bei 70 eV und 300 μA mit der Direkteinlasstechnik. Die übrigen Spektren wurden an einem ¹H-NMR-Spektrometer Modell T 60 der Fa. Varian, einem IR-Spektrometer Modell 257 der Fa. Perkin-Elmer (Norwalk, Conn., U.S.A.) und einem UV-Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer aufgenommen. Zur Aufnahme der UV-Spektren wurden 0.2 mM Lösungen der Substanzen in Methanol (Uvasol, Merck) verwendet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In den Tabellen I und II werden physikalische, elementaranalytische, und spektroskopische Daten (IR, UV, NMR) der N-Nitroso-N-alkylharnstoffe wiedergegeben. Fig. 1 zeigt die Massenspektren dieser Verbindungen. Die Tabellen III und IV und Fig. 2 zeigen entsprechende Daten und Massenspektren der N-Nitroso-N-alkylurethane.

TABELLE I

PHYSIKALISCHE, ELEMENTARANALYTISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE DATEN

$$\begin{array}{c} \text{O} \text{ R} \\ \parallel \quad | \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{N}=\text{O} \end{array}$$

DER N-NITROSO-N-ALKYLHARNSTOFFE, $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{N}=\text{O}$

R	F.p. ($^{\circ}\text{C}$) (Lit.)	C, H, N (%) gef. (ber.)	IR (KBr) ν NO (cm^{-1})	UV (Methanol)	
				λ_{max} (nm)	ϵ
CH ₃	122.0 (123-124)	23.67, 4.95, 40.38 (23.30, 4.89, 40.67)	1460	232	6400
C ₂ H ₅	104.0 (103-104)	31.21, 6.06, 35.53 (30.77, 6.03, 35.88)	1475	234	5840
n-C ₃ H ₇	75.0 (-)	36.64, 6.91, 31.68 (36.64, 6.92, 32.04)	1475	236	5550
n-C ₄ H ₉	80.0 (85.0)	41.99, 7.76, 28.87 (41.37, 7.64, 28.95)	1470	236	4700

TABELLE II

$$\begin{array}{c} \text{O} \text{ R} \\ \parallel \quad | \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{N}=\text{O} \end{array}$$

¹H-NMR-SPEKTREN (60 MHz) DER N-NITROSO-N-ALKYLHARNSTOFFE, $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{N}=\text{O}$

R	δ (ppm) (CDCl ₃ /TMS)
CH ₃	3.20 (s, 3H, N-CH ₃), 6.6 (2H, NH ₂)
C ₂ H ₅	1.03 (t, 3H, -CH ₂ -CH ₃), 3.89 (q, 2H, -CH ₂ -CH ₃), 6.3 (2H, NH ₂)
n-C ₃ H ₇	0.83 (t, 3H, CH ₃), 1.2-1.77 (m, 2H, -CH ₂ -), 3.83 (t, 2H, N-CH ₂ -) 6.2 (2H, NH ₂)
n-C ₄ H ₉	0.85 (t, 3H, CH ₃), 1.15-1.70 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -), 3.83 (t, 2H, N-CH ₂) 6.2 (2H, NH ₂)

TABELLE III

PHYSIKALISCHE, ELEMENTARANALYTISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE DATEN

$$\begin{array}{c} \text{O} \text{ R} \\ \parallel \quad | \\ \text{H}_5\text{C}_2-\text{O}-\text{C}-\text{N}-\text{N}=\text{O} \end{array}$$

DER N-NITROSO-N-ALKYLURETHANE, $\text{H}_5\text{C}_2-\text{O}-\text{C}-\text{N}-\text{N}=\text{O}$

R	K.p. ($^{\circ}\text{C}/\text{Torr}$) (Lit.)	C, H, N (%) gef. (ber.)	IR (Film) ν NO (cm^{-1})	UV (Methanol)	
				λ_{max} (nm)	ϵ
CH ₃	81.0/18 (59.0/10)	36.23, 6.04, 21.01 (36.40, 6.05, 21.20)	1500	238	6500
C ₂ H ₅	87.5/18 (70/15)	41.29, 6.89, 19.25 (41.10, 6.85, 19.30)	1505	240	6300
n-C ₃ H ₇	85.5/15 (94.0/35)	45.25, 7.84, 17.27 (45.00, 7.50, 17.50)	1510	242	6250

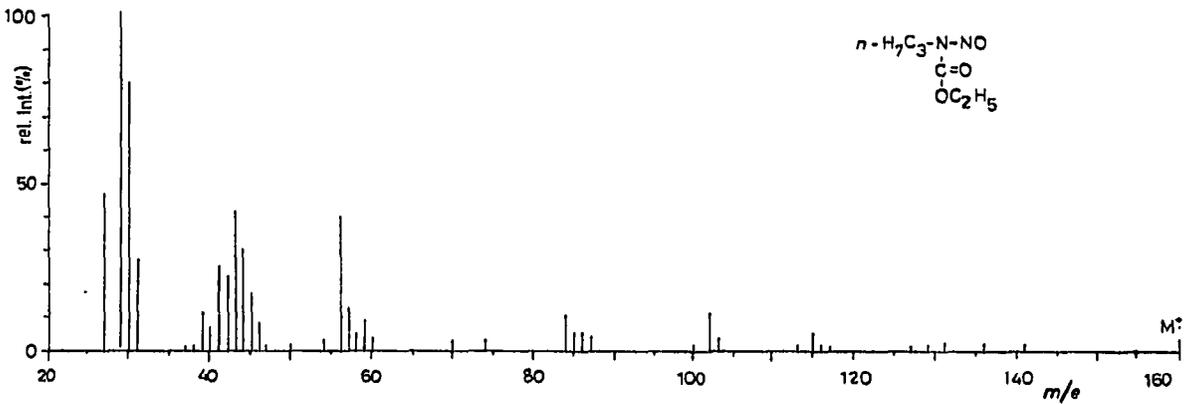
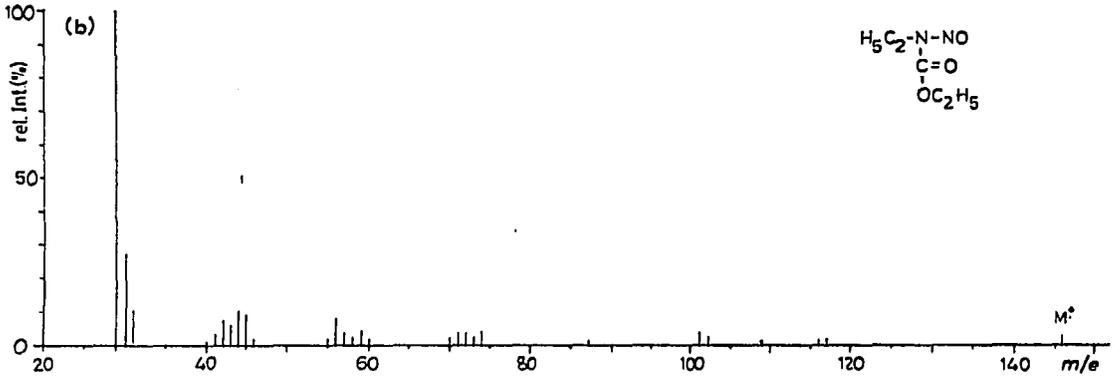
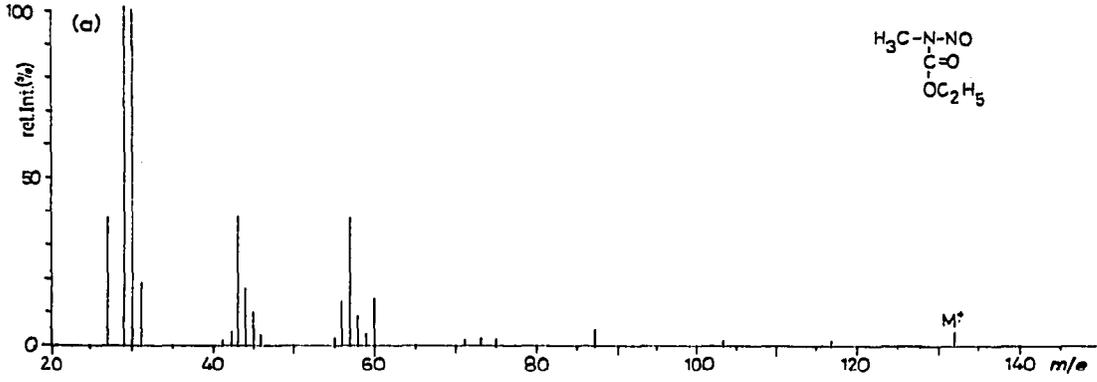


Fig. 2. Massenspektren der N-Nitroso-N-alkylurethane

TABELLE IV

¹H-NMR-SPEKTREN (60 MHz) DER N-NITROSO-N-ALKYLURETHANE,

R	δ (ppm) (CDCl ₃ /TMS)
CH ₃	1.45 (t, 3H, CH ₃ -CH ₂ -O-), 3.15 (s, 3H, N-CH ₃), 4.55 (q, 2H, CH ₃ -CH ₂ -O-)
C ₂ H ₅	1.05 (t, 3H, N-CH ₂ -CH ₃), 1.42 (t, 3H, O-CH ₂ -CH ₃) 3.75 (q, 2H, CH ₃ -CH ₂ -N), 4.55 (q, 2H, CH ₃ -CH ₂ -O-)
n-C ₃ H ₇	0.81 (t, 3H, N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃), 1.40 (m, 5H, O-CH ₂ -CH ₃ , N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃) 3.65 (t, 2H, N-CH ₂ -CH ₂ -), 4.55 (q, 2H, O-CH ₂ -CH ₃)

Massenspektren der N-Nitroso-N-alkylharnstoffe

Für den Zerfall der N-Nitroso-N-alkylharnstoffe (Fig. 1) im Massenspektrometer wird folgendes Fragmentierungsschema (Fig. 3) vorgeschlagen:

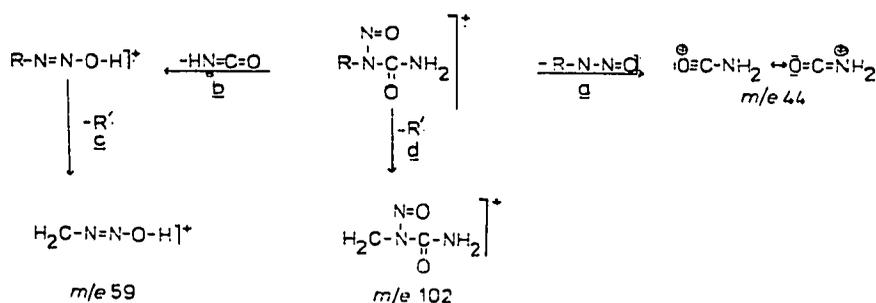
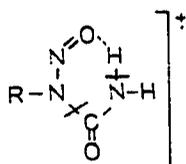


Fig. 3. Fragmentierungsschema der N-Nitroso-N-alkylharnstoffe.
R = Alkyl = CH₃, C₂H₅, n-C₃H₇, n-C₄H₉.

Fragmentierung a. Unter Abspaltung von $-\text{R-N-N=O}]^{\cdot}$ -Radikalen ($M^+ - 59$, $M^+ - 73$, $M^+ - 87$ und $M^+ - 101$) aus den Molekülionen werden Kationen mit $m/e 44$ gebildet, die mesomeriestabilisiert sind. Diese werden auch bei der Fragmentierung von Carbonsäureamiden gebildet.

Fragmentierung b. Eine interessante Umlagerung zeigt dieser Zerfallsweg. Aus den Molekülradikalkationen werden wahrscheinlich über einen cyclischen sechsgliedrigen Übergangszustand unter H-Verschiebung und Abspaltung eines Neutralmoleküls (HN=C=O) Radikalkationen ($M^+ - 43$) gebildet.



Fragmentierung c. Radikalkationen ($M^+ - 43$) $R-N=N-O H]^+$ können unter weiterer α -Alkylspaltung zu Ionen mit m/e 59 zerfallen (ab $R = C_2H_5$).

Fragmentierung d. Aus den Molekülonen werden bei N-Nitroso-N-alkylharnstoffen ab Alkyl ($=n-C_3H_7$) unter α -Spaltung Alkylradikale abgespalten unter Bildung von Ionen mit m/e 102.

Die Kationen mit m/e 59 und m/e 102 sind mesomeriestabilisiert.

Im Bereich niederer Massenzahlen werden folgende Fragmente gebildet: m/e 26 (C_2H_2), m/e 27 (HCN), m/e 28 (C_2H_4 , CO), m/e 29 (C_2H_5), m/e 30 (NO), m/e 43 (OCNH, C_3H_7), m/e 44 (OCNH₂) und m/e 57 (C_4H_9).

Fragmente $M^+ - NO$ treten in den Massenspektren nicht auf.

Massenspektren der N-Nitroso-N-alkylurethane

Die Massenspektren der N-Nitroso-N-alkylurethane (Fig. 2) sind im oberen Massenbereich arm an Ionenintensitäten. Auch die Intensitäten der Molekülonen sind kleiner als 5%. Einige in allen drei Massenspektren auftretende Fragmentierungen können in einem allgemeinen Fragmentierungsschema zusammengefasst werden (Fig. 4).

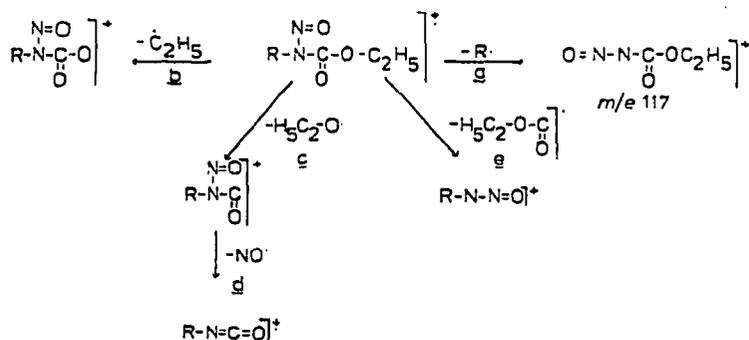


Fig. 4. Fragmentierungsschema der N-Nitroso-N-alkylurethane.
R = Alkyl = CH_3 , C_2H_5 , $n-C_3H_7$.

Fragmentierung a. Aus den Molekülonen werden durch Abspaltung der verschiedenen Alkylgruppen (R) Kationen mit m/e 117 gebildet.

Fragmentierung b. Durch Abspaltung von Äthylradikalen aus der Carboäthoxygruppe der Molekülonen werden Kationen mit m/e 103, 117 und 131 gebildet.

Fragmentierung c, d. Aus den Molekülonen werden Äthoxyradikale abgespalten (c) unter Bildung von Kationen mit m/e 87, 101 und 115. Diese bilden unter NO-Abspaltung (d) Fragmente mit m/e 57, 71 und 85.

Fragmentierung e. Aus den Molekülonen werden die Carboäthoxygruppen als Radikale abgespalten unter Bildung von Ionen mit m/e 59, 73 und 87.

Im Bereich niederer Massenzahlen treten folgende Fragmente auf: m/e 27 (HCN), m/e 28 (CO), m/e 29 (C_2H_5), m/e 30 (NO), m/e 31 (CH_2OH), m/e 43 (OCNH, C_3H_7) und m/e 45 (OC_2H_5).

Fragmente $M^+ - NO$ treten in den Massenspektren nicht auf.

Trennung alkylnomologer N-Nitroso-N-alkylharnstoffe und N-Nitroso-N-alkylurethane mit einer schnellen flüssig-flüssig Verteilung

Mit Modellgemischen der N-Nitroso-N-alkylharnstoffe und N-Nitroso-N-alkylurethane wurden an verschiedenen stationären Trennphasen unterschiedlicher Polarität mit mobilen Phasen verschiedener Zusammensetzung ohne Erfolg Trennversuche unternommen: Durapak Carbowax 400/Corasil (37–50 μ) mit Chloroform-*n*-Hexan-Mischungen und Durapak OPN/Porasil C (36–75 μ) mit Chloroform-*n*-Hexan-Mischungen. Als geeignete stationäre Phase für diese Trennprobleme erwies sich Bondapak Corasil/C₁₈ (37–50 μ). Octadecylsilylgruppen (stationäre flüssige Phase) sind über stabile Si–O–Si-Bindungen chemisch auf der Oberfläche unporöser inkompressibler Silikatkugeln (Corasil) gebunden.

Als mobile Phasen wurden Wasser–Acetonitril-Mischungen verwendet. Die Trennungen erfolgten an einer oder zwei hintereinandergeschalteten Säulen (Fig. 5 und 6).

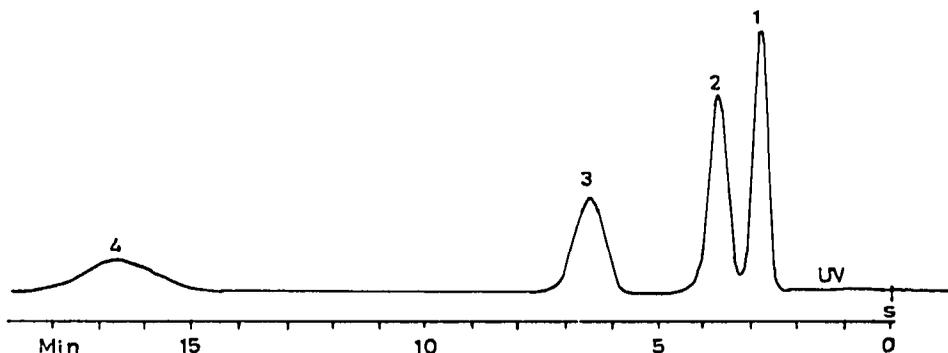


Fig. 5. Trennung der N-Nitroso-N-alkylharnstoffe. 2 Säulen, 2 ft. \times 1/8 in. äußerer Durchmesser; stationäre Phase, Bondapak Corasil/C₁₈; mobile Phase, Wasser–Acetonitril (15:1); Volumendurchfluss, 1.3 ml/min (1000 p.s.i.), Temperatur, 25°; Abschwächung UV (254 nm), \times 32; injiziertes Probenvolumen, 1 μ g pro Substanz/5 μ l. 1 = N-Nitroso-N-methylharnstoff; 2 = N-Nitroso-N-äthylharnstoff; 3 = N-Nitroso-N-*n*-propylharnstoff; 4 = N-Nitroso-N-*n*-butylharnstoff.

Die getrennten Verbindungen — N-Nitroso-N-alkylharnstoffe bzw. N-Nitroso N-alkylurethane — unterscheiden sich nur durch verschiedene Alkylreste.

Auf Grund der unterschiedlichen Verteilungsgleichgewichte über den lipophilen Molekülteil der Verbindungen zwischen der stationären unpolaren flüssigen Phase und der polaren mobilen Phase werden die Verbindungen nach verschiedenen Zeiten von der Säule eluiert. Dieser Typ einer flüssig-flüssig Verteilung—unpolare stationäre Phase/polare mobile Phase— wird als "reversed-phase chromatography" bezeichnet.

Die Löslichkeit der N-Nitroso-N-alkylharnstoffe und -urethane nimmt mit wachsendem Alkylrest in der unpolaren stationären flüssigen Phase zu, in der polaren mobilen Phase dagegen ab. Dies erklärt die Reihenfolge der Elution.

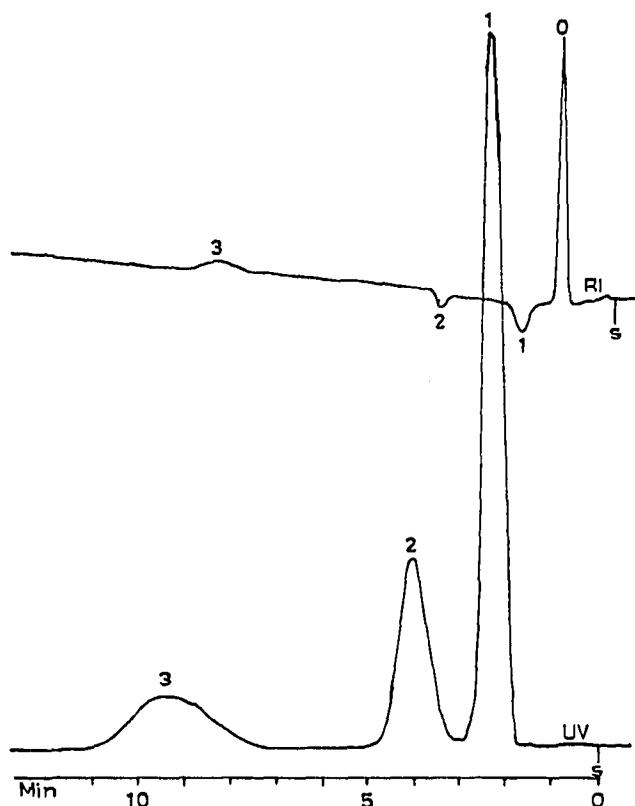


Fig. 6. Trennung der N-Nitroso-N-alkylurethane. Säule, 2 ft. \times 1/8 in. äusserer Durchmesser; stationäre Phase, Bondapak Corasil/C₁₈; mobile Phase, Wasser-Acetonitril (10:1); Volumendurchfluss, 1,7 ml/min (1300 p.s.i.). Temperatur, 25 °; Abschwächung RI, \times 8; UV (254 nm), NL; injiziertes Probenvolumen, unbekannte Konz. pro Substanz/5 μ l. 0 = Verunreinigung; 1 = N-Nitroso-N-methylurethan; 2 = N-Nitroso-N-äthylurethan; 3 = N-Nitroso-N-n-propylurethan.

Quantitative Bestimmung von N-Nitroso-N-alkylharnstoffen

Von den vier N-Nitroso-N-alkylharnstoffen wurde jeweils eine Stammlösung von 50 mg N-Nitroso-N-alkylharnstoff in 50 ml mobiler Phase hergestellt (Wasser-Acetonitril, 15:1). Diese entsprechen einer Konzentration von jeweils 5×10^{-6} g/5 μ l. Durch Verdünnen wurden Lösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 10^{-6} g/5 μ l, 5×10^{-7} g/5 μ l, 10^{-7} g/5 μ l; von N-Nitroso-N-methylharnstoff ausserdem noch folgende Lösungen: 5×10^{-8} g/5 μ l und 10^{-8} g/5 μ l. Durch mehrfaches Einspritzen von je 5 μ l dieser Lösungen in den Flüssigkeitschromatographen und elektronische Integration der UV-Detektorausgangssignale wurden Eichgeraden aufgenommen (Fig. 7). Sie zeigen die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes unter den gewählten Bedingungen. Die untere Nachweisgrenze, ermittelt für N-Nitroso-N-methylharnstoff, war 10^{-8} g/5 μ l.

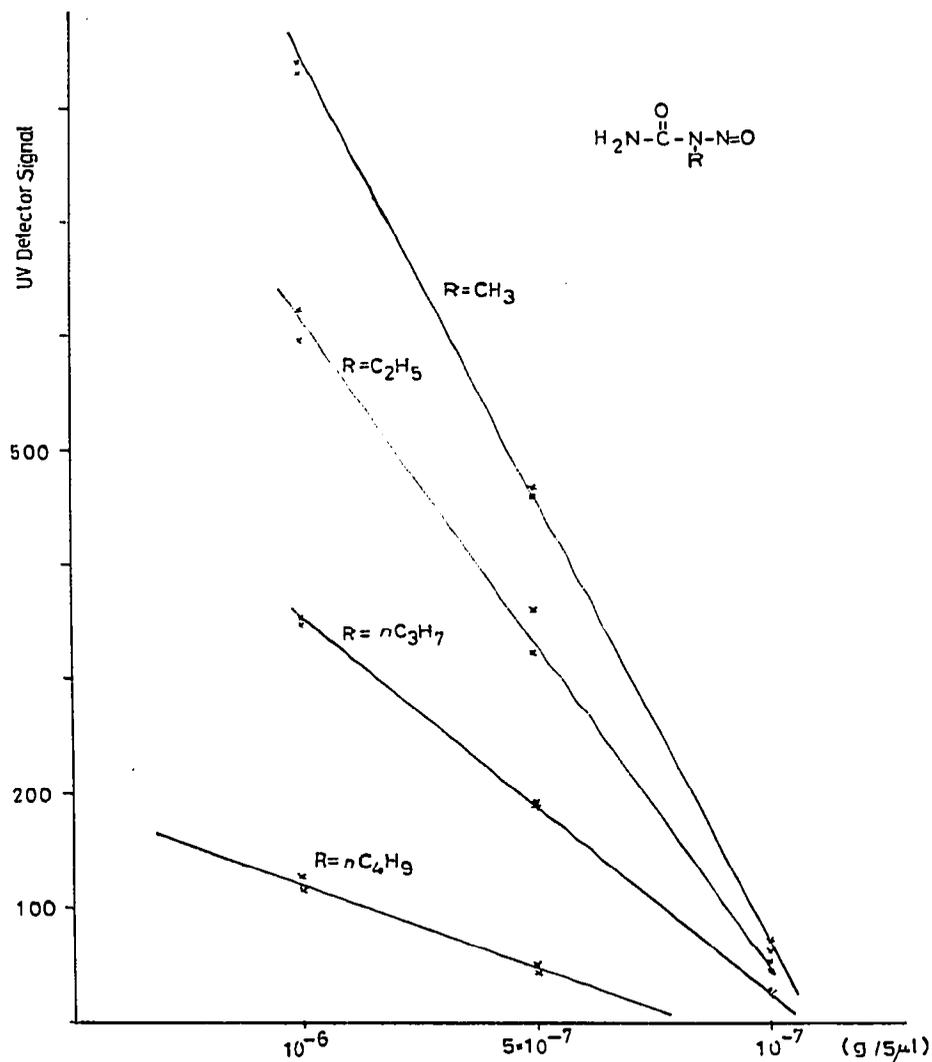


Fig. 7. Eichgeraden.

SCHLUSSBEMERKUNG

Die Ergebnisse zeigen die Möglichkeit einer schnellen Trennung und gleichzeitigen quantitativen Bestimmung von homologen N-Nitroso-N-alkylharnstoffen und N-Nitroso-N-alkylurethanen an Modellgemischen bis in den Bereich 10–50 ng pro analysierter Substanz.

Bei der Spurenanalytik dieser cancerogenen Verbindungen aus Umweltmedien ist deren Identifizierung auf Grund von Retentionszeiten nicht ausreichend, auch dann nicht, wenn durch wirksame Reinigungsoperationen (clean up) die Endbestimmung störende Begleitstoffe beseitigt wurden.

Eindeutig ist dagegen die Identifizierung der am Flüssigkeitschromatographen getrennten Substanzen — nach geeigneter Probenvorbereitung — durch Aufnahme ihrer Massenspektren und Vergleich mit vorliegenden Massenspektren.

DANK

Für die Durchführung der chromatographischen Arbeiten danken wir Fräulein A. Matthies. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die physikalischen Daten, elementaranalytischen Daten und IR-, UV-, NMR- und Massenspektren von N-Nitroso-N-alkylharnstoffen und N-Nitroso-N-Alkylurethanen werden mitgeteilt. Ihre Fragmentierung im Massenspektrometer wird diskutiert. Eine schnelle Trennung von Modellgemischen alkylhomologer N-Nitroso-N-alkylharnstoffe und N-Nitroso-N-alkylurethane unter Anwendung einer schnellen "umgekehrten" flüssig-flüssig Verteilung im Hochdruckflüssigkeitschromatographen wird beschrieben. Die Anzeige erfolgt durch UV-Absorption bei 254 nm. Eichgeraden für die quantitative Bestimmung getrennter N-Nitroso-N-alkylharnstoffe werden gegeben. Die untere Nachweisgrenze, ermittelt für N-Nitroso-N-methylharnstoff, beträgt 10 ng.

LITERATUR

- 1 H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovic und H. Schmähl, *Z. Krebsforsch.* 69 (1967) 103.
- 2 A. Forist, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1338.
- 3 R. Preussmann und F. Schaper-Druckrey, *N-Nitroso Compounds, Analysis and Formation*, IARC Scientific Publications, No. 3, Lyon, 1972, S. 81.
- 4 F. Arndt, *Org. Syn.*, Coll. Vol. II, (1943) 461.
- 5 W. W. Hartmann und R. Phillips, *Org. Syn.*, Coll. Vol. II (1943) 464.
- 6 M. Walter und L. Ramaley, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 165.