

CHROM. 11,305

Note

Direkte quantitative Bestimmung von Nitrosaminen aus wässriger Lösung durch Gaschromatographie oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie

HARALD RÖPER

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg, Martin-Luther-King Platz 6, 2000 Hamburg 13 (B.R.D.)

(Eingegangen am 5. Juli 1978)

Über die Spurenanalytik von cancerogenen Nitrosaminen aus Umweltmedien wurde im Verlauf der letzten Jahre methodisch intensiv gearbeitet¹⁻⁹.

Die gaschromatographische (GC) Trennung von Nitrosaminen erfolgt in der Regel aus organischen Lösungsmitteln an gepackten GC-Säulen¹⁰⁻¹⁴ oder Kapillaren¹⁵. Foreman *et al.*¹⁶ und Mosier und Andre¹⁷ berichteten erstmals über eine direkte GC-Trennung von Nitrosaminen aus wässriger Lösung. Sie benutzten Chromosorb 101 bzw. Chromosorb 103 als stationäre Phase.

Über eine Trennung von Nitrosaminen mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) berichtete erstmals Cox¹⁸. Als stationäre Phase diente Di(2-cyanoäthyl)äther auf Zipax, als mobile Phase 2,2,4-Trimethylpentan. Fine *et al.*¹⁹ trennten Nitrosamine an μ Bondapak-NH₂ mit Heptan-Dichlormethan (3:1) als mobiler Phase.

Die in der Nitrosamin-Spurenanalytik übliche Abtrennung der Nitrosamine von störenden Begleitstoffen durch Wasserdampfdestillation aus alkalischem und saurem Medium mit anschließender Überführung in ein organisches Lösungsmittel durch Extraktion und Aufkonzentrierung ist Zeit aufwendig und führt zu Nitrosamin-Verlusten. Für die Spurenbestimmung von Nitrosaminen aus "komplexen" Matrices, wie Lebensmittel, ist dies mit dem normalerweise verfügbaren analytischen Instrumentarium der Weg der Wahl. Anders sind die Verhältnisse bei der Nitrosaminanalyse in Begleitstoff armen Systemen.

In vitro Nitrosierungsexperimente an Arzneistoffen mit tertiärer Amingruppierung²⁰ werden modellhaft in wässrig saurem Medium durchgeführt um eine chemische Nitrosamin-Synthese *in vivo* abschätzen zu können. Eine direkte Trennung und quantitative Bestimmung von gebildeten Nitrosaminen ist hier ohne Aufreinigung und Konzentrierung aus dem wässrigen Medium möglich. Der zeitliche Verlauf einer Nitrosaminbildung kann bei laufender Reaktion ermittelt werden. Als GC-Phase wurde Tenax, als HPLC-Phase μ Bondapak-C₁₈ verwendet. Die Leistungsfähigkeit der beiden Trennmethode wird —nach Optimierung der Arbeitsbedingungen— durch Auftrennung einer Standardlösung demonstriert, die vier Nitrosamine im Konzentrationsbereich 1 μ g/ μ l enthält (Fig. 1 und 2).

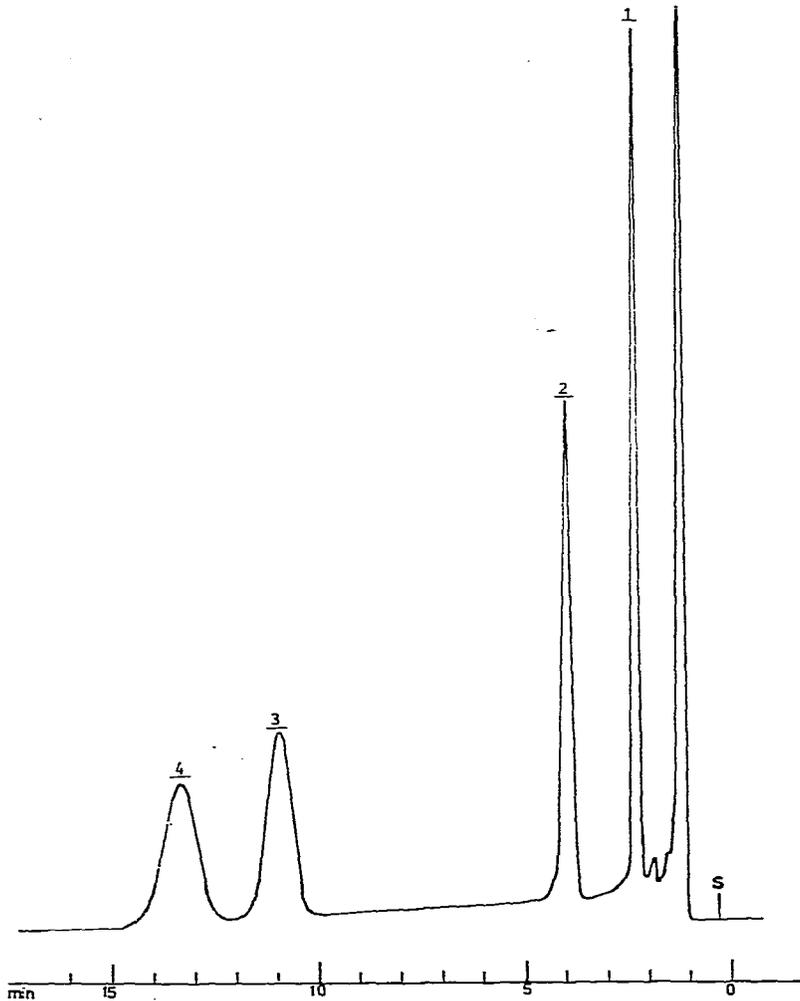


Fig. 1. GC-Trennung von 1 μ l wässriger Nitrosamin-Standardlösung an Tenax-GC. Temperatur: 200° (isotherm). Abschwächung: 1/256. 1 = Dimethylnitrosamin (1.08 μ g/ μ l); 2 = Diäthylnitrosamin (0.98 μ g/ μ l); 3 = N-NO-Piperidin (0.97 μ g/ μ l); 4 = N-NO-Pyrrolidin (1.02 μ g/ μ l).

EXPERIMENTELLES

Gaschromatographie

Ein Carlo Erba Gaschromatograph Modell Fractovap 2101 mit Flammenionisationsdetektor wurde verwendet. Glassäule, 2 m \times 2 mm I.D., gepackt mit Tenax-GC, 60–80 mesh (Applied Science Labs., State College, Pa., U.S.A.); Stickstoff-Strömung, 30 ml/min (100°); Arbeitstemperatur, 200° (isotherm).

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Ein Waters Hochdruckflüssigkeitschromatograph Modell ALC 100 mit UV-Durchflusszelle (254 nm) und Differentialrefraktometer wurde verwendet. Stahl-

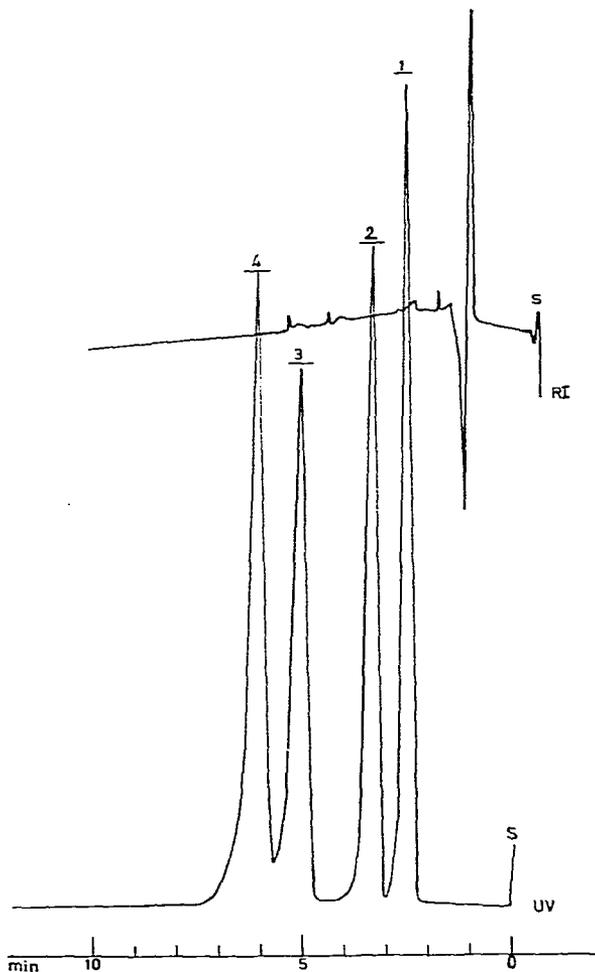


Fig. 2. HPLC-Trennung von 5 μ l wässriger Nitrosamin-Standardlösung an μ Bondapak- C_{18} (10 μ m). Temperatur: 25°. Mobile Phase: Acetonitril-Wasser (1:9). Durchfluss: 2.2 ml/min (3500 p.s.i.). Abschwächung: RI: $\times 8$, UV (254 nm): $\times 16$. 1 = Dimethylnitrosamin (5.38/5 μ l); 2 = N-NO-Pyrrolidin (5.10 μ g/5 μ l); 3 = Diäthylnitrosamin (4.90 μ g/5 μ l); 4 = N-NO-Piperidin (4.83 μ g/5 μ l).

säule, 30 cm \times 4 mm I.D. mit μ Bondapak- C_{18} (10 μ m) (Waters Assoc., Milford, Mass., U.S.A.); mobile Phase, Acetonitril (p.a.)-Wasser (dest.) (1:9).

Nitrosamin-Standardlösung

107.66 mg Dimethylnitrosamin, 97.93 mg Diäthylnitrosamin, 102.01 mg N-NO-Pyrrolidin, 96.55 mg N-NO-Piperidin werden eingewogen und in einem geeichten Messkolben mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fig. 1 zeigt das Gaschromatogramm der Nitrosamin-Standardlösung. Die

Nitrosamine werden in der Reihenfolge Dimethylnitrosamin, Diäthylnitrosamin, N-NO-Piperidin, N-NO-Pyrrolidin eluiert. Die Nachweisgrenze des Flammenionisationsdetektors ist bei 3 ng Dimethylnitrosamin/ μ l (Abschwächung: 1/4).

Fig. 2 zeigt das HPLC-Chromatogramm (reversed-phase) der wässrigen Nitrosamin-Standardlösung. Die Nitrosamine werden hier in der Reihenfolge Dimethylnitrosamin, N-NO-Pyrrolidin, Diäthylnitrosamin, N-NO-Piperidin eluiert. Das Chromatogramm zeigt, dass das Differentialrefraktometer Nitrosamine um Größenordnungen unempfindlicher anzeigt, als das UV-Photometer bei 254 nm. Die Nachweisgrenze des UV-Detektors ist bei 3 ng Dimethylnitrosamin/ μ l (Abschwächung: $\times 2$). Sie entspricht der des Flammenionisationsdetektors.

Die Chromatogramme zeigen, dass unter den gewählten Arbeitsbedingungen die HPLC-Trennung der Nitrosamin-Standardlösung (7.5 min) doppelt so schnell erfolgt, wie die GC-Trennung (15 min). In der Verkürzung der Analysenzeit ist ein Vorteil der HPLC-Trennung gegenüber der GC-Trennung zu sehen.

Eine Parallelanalyse am Gaschromatographen und Hochdruckflüssigkeitschromatographen sichert bei der Nitrosamin-Analyse das qualitative- und quantitative Ergebnis. Die Bestimmungsmethoden setzen Nitrosamin-Konzentrationen von einigen Nanogramm Nitrosamin/ μ l wässriger Lösung voraus. Eine Aufkonzentrierung der Nitrosamine in wässriger Lösung ist wegen deren Wasserdampflichkeit nicht möglich.

DANKSAGUNG

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATUR

- 1 J. Sander und F. Schweinsberg, *Zentralbl. Bakteriol., Parasitenk. Infektionskr. Hyg., Abt. 1: Orig., Reihe B*, 156 (1972) 299.
- 2 N. P. Sen, in *Toxic Constituents in Animal Foodstuffs*, Academic Press, New York, 1974, Ch. 5, p. 131.
- 3 P. A. Scanlan, *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, (1975) 357.
- 4 W. Fiddler, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31 (1975) 352.
- 5 N. T. Crosby und R. Sawyer, *Advan. Food. Res.*, 22 (1976) 1.
- 6 P. Bogovski, R. Preussmann und E. A. Walker (Herausgeber), *N-Nitroso Compounds: Analysis and Formation*, IARC Scientific Publications No. 3, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1971.
- 7 P. Bogovski und E. A. Walker (Herausgeber), *N-Nitroso Compounds in the Environment*, IARC Scientific Publications No. 9, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1974.
- 8 E. A. Walker, P. Bogovski und L. Gričiute (Herausgeber), *Environmental N-Nitroso-Compounds: Analysis and Formation*, IARC Scientific Publications No. 14, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1976.
- 9 *5th Meet. Analysis and Formation of N-Nitroso-Compounds, Aug. 1978, Durham, N.H.*, IARC Scientific Publications, Lyon, im Druck.
- 10 E. Kroeller, *Deut. Lebensm. Rundsch.*, 63 (1967) 303.
- 11 H. J. Petrowitz, *Arzneim.-Forsch.*, 18 (1968) 1486.
- 12 K. Möhler und O. L. Mayrhofer, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 135 (1968) 313.
- 13 N. P. Sen, D. C. Smith, L. Schwinghamer und J. M. Marleau, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 52 (1969) 47.
- 14 N. P. Sen., D. C. Smith, L. Schwinghamer und B. Howsam, *Can. Inst. Food Technol. J.*, 3 (1970) 66.

- 15 K. Heyns und H. Röper, *Tetrahedron Lett.*, (1970) 737.
- 16 J. K. Foreman, J. F. Palframan und E. A. Walker, *Nature (London)*, 225 (1970) 554.
- 17 A. R. Mosier und C. E. Andre, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 372.
- 18 G. B. Cox, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 471.
- 19 D. H. Fine, F. Huffmann, D. P. Rounbehler und N. M. Belcher, in E. A. Walker, P. Bogovski und L. Gričiute (Herausgeber), *Environmental N-Nitroso Compounds: Analysis and Formation*, IARC Scientific Publications No. 14, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1976, p. 43.
- 20 H. Röper und K. Heyns, *Z. Naturforsch. C*, 32 (1977) 696.