

CHROM. 12,681

## ANALYTIK VON N-NITROSOVERBINDUNGEN

### V. SPURENANALYSE VON N-NITROSOAMINOSÄUREN: GASCHROMATOGRAPHIE UND SPEKTROSKOPIE VON N-NITROSOAMINOSÄUREMETHYLESTERN

HARALD RÖPER und KURT HEYNS

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

(Eingegangen am 13. Dezember 1979)

---

#### SUMMARY

*Analysis of N-nitroso compounds. V. Trace analysis of N-nitrosoamino acids: Gas chromatography and spectroscopy of N-nitrosoamino acid methyl esters*

N-Nitrosoamino acids (N-NO-sarcosine, N-NO-L-proline, N-NO-4-OH-L-proline and N-NO-D,L-piperidine-2-carboxylic acid) were reacted with methanol-H<sup>+</sup> or diazomethane to the corresponding methyl esters in preparative and analytical scale. N-NO-4-OH-L-proline methyl ester was reacted with N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide to give N-NO-4-O-trimethylsilyl-L-proline methyl ester in quantitative yield.

The N-nitrosoamino acid methyl esters were characterized by physical (b.p., m.p.,  $R_F$  values) and spectral data (infrared, mass spectrometry, <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR), <sup>13</sup>C NMR). The fragmentations of N-NO-sarcosine methyl ester, N-NO-L-proline methyl ester and N-NO-D,L-piperidine-2-carboxylic acid methyl ester induced by electron impact in the mass spectrometer, were studied by high-resolution measurements, metastable ions, DADI-technique and defocusing method.

The ratios of *E*- and *Z*-isomers of N-nitrosoamino acid methyl esters in solution are determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The resonances of the methyl ester protons appear as two singlets. This is explained by interaction of the N-NO-groups with the methyl ester protons via cyclic arrangements in equilibria of *E*- and *Z*-isomers and confirmed by the <sup>1</sup>H NMR spectrum of N-NO-sarcosine-trideuteromethyl ester.

The N-nitrosoamino acids are quantitatively converted to the corresponding N-nitrosoamino acid methyl esters by reacting with diazomethane. These derivatives of N-nitroso-amino acids (including N-NO-4-O-trimethylsilyl-L-proline methyl ester) can be separated by gas-liquid chromatography on OV-17 as stationary phase.

This derivatization procedure allows separation and quantitative determination of N-nitrosoamino acids by gas-liquid chromatography and confirmation by gas-liquid chromatographic-mass spectrometric analysis in nanogram amounts.

---

## EINLEITUNG

Methodisch wurde auf dem Gebiet der Spurenanalytik sogenannter "flüchtiger N-Nitroso-Verbindungen", speziell der Nitrosamine, im Verlauf der letzten Jahre intensiv gearbeitet. Extraktions-, Aufreinigungs-, Trenn- und Nachweisverfahren wurden in zunehmendem Mass verfeinert, so dass heute zuverlässige qualitative und quantitative Aussagen über das Vorkommen dieser kanzerogenen Verbindungen in Umweltmedien bis in den ppb-Bereich möglich sind<sup>1-12</sup>. Einen wichtigen Beitrag lieferten hier Ringanalysen, die von der International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, initiiert und organisiert werden.

Erfolge bei der Entwicklung zuverlässiger mikroanalytischer Methoden für den zweifelsfreien Nachweis sogenannter "schwerflüchtiger N-Nitroso-Verbindungen", z.B. von Nitrosamiden<sup>13-15</sup>, schwerflüchtigen Nitrosaminen<sup>16</sup> und N-Nitrosoaminosäuren<sup>17-22</sup> aus Umweltmedien zeichnen sich ab<sup>23</sup>.

Von den N-Nitrosoaminosäuren erwiesen sich N-NO-Prolin, N-NO-4-OH-Prolin und N-NO-Piperidin-2-carbonsäure im Tierexperiment als nicht kanzerogen<sup>24-26</sup>, N-NO-Sarkosin erzeugte jedoch bei Ratten Oesophagus-Tumore<sup>27,28</sup>.

N-Nitrosoaminosäuren werden in saurem Medium aus den Aminosäuren Sarkosin, Prolin, 4-OH-Prolin und Piperidin-2-carbonsäure in Gegenwart von Nitrit gebildet. Ihre Bildungskinetik wurde eingehend untersucht<sup>29,30</sup>.

Ihr Vorkommen in gepökelten, also nitrithaltigen Fleischprodukten wurde erst in jüngster Zeit nachgewiesen. In nicht erhitztem, gepökeltem Bacon wurden im ppb-Bereich N-NO-Sarkosin<sup>19</sup> und N-NO-Prolin<sup>19,31,32</sup> nachgewiesen.

Eine mögliche Gefährdung für den Verbraucher von gepökelten Fleischprodukten ist weniger in ihrem Gehalt an N-Nitrosoaminosäuren zu sehen als in der Tatsache, dass diese beim Erhitzen, also beim Kochen oder Braten, zu kanzerogenen Nitrosaminen<sup>33</sup> decarboxyliert werden. N-NO-Sarkosin decarboxyliert zu Dimethylnitrosamin, N-NO-Prolin zu N-NO-Pyrrolidin, N-NO-4-OH-Prolin zu N-NO-3-OH-Pyrrolidin und N-NO-Piperidin-2-carbonsäure zu N-NO-Piperidin.

Besonders im Hinblick auf diese Problematik (Bildung von Dimethylnitrosamin, N-NO-Pyrrolidin und N-NO-3-OH-Pyrrolidin beim Erhitzen von gepökelten Fleischprodukten) wurde in den letzten Jahren intensiv mit Modellversuchen<sup>34-42</sup> und mit gepökeltem Bacon<sup>32,39-44</sup> gearbeitet. In erhitztem, aber in der Regel nicht im rohen, gepökelten Bacon wurden Dimethylnitrosamin, N-NO-Pyrrolidin<sup>45-55</sup> und N-NO-3-OH-Pyrrolidin<sup>56-59</sup> im ppb-Bereich nachgewiesen.

Neben den N-Nitrosoaminosäuren werden für die Bildung von Nitrosaminen in gepökelten Fleischprodukten weitere Vorstufen diskutiert.

(1) Dimethylnitrosamin: Dimethylamin (aus Kreatin, bzw. Sarkosin), Trimethylamin, quartäre Ammoniumsalze, Lecithin.

(2) N-NO-Pyrrolidin: Pyrrolidin (aus Prolin), Ornithin, Putrescin, Spermidin und Kollagen.

(3) N-NO-3-OH-Pyrrolidin: 3-OH-Pyrrolidin (aus 4-OH-Prolin).

(4) N-NO-Piperidin: Piperidin (aus Piperidin-2-carbonsäure), Lysin, Cadaverin.

Für die Bildung von Dimethylnitrosamin und N-NO-Pyrrolidin beim Erhitzen von gepökeltem Bacon werden zwei Bildungswege diskutiert: (1) Thermische Decarboxylierung der Aminosäuren Sarkosin bzw. Prolin zu Dimethylamin bzw. Pyrrolidin. Anschliessende Reaktion mit Restnitrit zu den Nitrosaminen. (2) Zuerst Nitro-

sierung von Sarkosin bzw. Prolin zu N-NO-Sarkosin bzw. N-NO-Prolin und dann thermische Decarboxylierung zu Dimethylnitrosamin bzw. N-NO-Pyrrolidin.

Der bevorzugte Bildungsweg wird kontrovers diskutiert. Er dürfte stark von den jeweiligen Temperaturen beim Bratprozess abhängen.

Wegen dieser Problematik war die Entwicklung zuverlässiger Analysemethoden für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von N-Nitrosoaminosäuren und das schwerflüchtige N-NO-3-OH-Pyrrolidin, speziell in Fleischprodukten, im ppb-Bereich erforderlich. Die Isolierung dieser schwerflüchtigen Verbindungen aus der Fleisch-Matrix und die Abtrennung von niedermolekularen Begleitstoffen erfolgt durch flüssig-flüssig Extraktion und Ionenaustauschchromatographie<sup>19</sup>. Die Endbestimmung (Trennung, Identifizierung und quantitative Bestimmung) erfolgt in der Regel durch gaschromatographische (GC) und GC-massenspektrometrische (MS) Analyse geeigneter flüchtiger Derivate.

Sen *et al.*<sup>58</sup> bestimmten so N-NO-3-OH-Pyrrolidin. Eisenbrand *et al.*<sup>18</sup> entwickelten eine GC-MS-Analysemethode für N-Nitrosoaminosäuren, indem sie diese mit MSTFA in die entsprechenden Trimethylsilylderivate überführten. Kawabata<sup>17</sup> setzte die N-Nitrosoaminosäuren mit Diazomethan zu den Methylestern um, die gaschromatographisch getrennt und quantitativ bestimmt werden können. Kushnir *et al.*<sup>31</sup> derivatisierten N-NO-Prolin mit Methanol-H<sup>+</sup>, Dhont und Van Ingen<sup>19</sup> auch die übrigen N-Nitrosoaminosäuren zu den entsprechenden Methylestern, die mit einem GC-MS-System analysiert wurden.

Als Trenn- und Nachweisverfahren für freie N-Nitrosoaminosäuren wird die Hochdruckflüssigkeitschromatographie in Verbindung mit einem Thermal energy analyzer (TEA-Detektor)<sup>20</sup> oder einem photohydrolytischen Detektor<sup>21</sup> beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit werden N-Nitrosoaminosäuren mit Methanol-H<sup>+</sup> oder mit Diazomethan im präparativen und analytischen Masstab in die Methylester überführt. Ihre physikalischen (K<sub>p</sub>, F<sub>p</sub>, R<sub>F</sub>-Werte) und spektroskopischen Daten [Infrarot (IR), MS, <sup>1</sup>H-magnetische Kernresonanz (NMR), <sup>13</sup>C-NMR] werden ermittelt. N-NO-4-OH-Prolin-methylester wird mit MSTFA in den N-NO-4-OTMS-Prolinmethylester überführt. Für die gaschromatographische Trennung werden geeignete Trennphasen ermittelt.

Die Massenspektren der N-Nitrosoaminosäuremethylester und ihr Fragmentierungsverhalten werden untersucht; <sup>1</sup>H-NMR und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren werden diskutiert.

## MATERIALIEN UND METHODEN

Alle verwendeten Substanzen und Lösungsmittel waren von p.a. Qualität.

N-Nitrosoaminosäuren: N-NO-Sarkosin, N-NO-L-Prolin, N-NO-4-OH-L-Prolin und N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäure wurden nach der Vorschrift von Lijinski *et al.*<sup>34</sup> hergestellt.

### *N-Nitrosoaminosäuremethylester*

Die Veresterungsreaktionen wurden dünnenschichtchromatographisch verfolgt. DC-Alufolie Kieselgel GF<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, B.R.D.). Laufmittel: Dichlormethan p.a. (Merck). Es ergaben sich folgende R<sub>F</sub>-Werte: N-NO-Sarkosinmethylester, 0.35; N-NO-L-Prolinmethylester, 0.30; N-NO-4-OH-L-Prolinmethylester, 0.08; N-

NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester, 0.41. Die N-Nitrosoaminosäuren verbleiben am Start. Die Verbindungen erscheinen im UV-Licht (254 nm) als violette Flecken und können nach photolytischer Abspaltung der NO-Gruppe und Ansprühen mit Griess-Reagenz<sup>60</sup> und Erwärmen auf 110 °C als violett-rosa Azofarbstoffe sichtbar gemacht werden.

(a) *Veresterung mit Diazomethan.* Diazomethan-Lösung: Nitrosomethylharnstoff wird in Äther gelöst und bei -5 °C mit kalter 40% Natronlauge unterschichtet. Nach 10 Min wird die ätherische Diazomethanlösung abdekantiert und über festem Kaliumhydroxid getrocknet.

N-NO-4-OH-L-Prolin wird in Methanol-Wasser (10:1, v/v), die übrigen N-Nitrosoaminosäuren in Äther gelöst. Zu den Lösungen wird unter Rühren bei Raumtemperatur ein Überschuss an Diazomethanlösung zugesetzt, bis eine Gelbfärbung bestehen bleibt und keine Stickstoffentwicklung mehr zu beobachten ist. Die Methylester haben sich in quantitativer Ausbeute gebildet. Nach Abziehen des Lösungsmittels bleiben die N-Nitrosoaminosäuremethylester als gelbe, ölige Flüssigkeiten mit Aldehyd- bzw. Pyrazin ähnlichem Geruch zurück.

(b) *Veresterung mit Methanol-H<sup>+</sup>.* Je 100 mg der N-Nitrosoaminosäuren werden in 3 ml abs. Methanol gelöst und 1 Tropfen conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugesetzt. Bei Raumtemperatur hat sich das Veresterungsgleichgewicht nach 20 Stunden eingestellt. Die Ausbeute an N-Nitrosoaminosäuremethylestern beträgt etwa 90%. Bei Erwärmen der Reaktionslösungen auf 40 °C haben sich diese Veresterungsgleichgewichte bereits nach 1 Stunde eingestellt. Zur Aufarbeitung wurde vom Lösungsmittel abrotiert und die Rückstände mit wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert. Die Methylester werden mit Äther extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und nach Abziehen des Lösungsmittels an der Ölpumpe destilliert. Es wurden folgende Siedepunkte (°C/Torr) gemessen: N-NO-Sarkosinmethylester, 107/6; N-NO-L-Prolinmethylester, 138/3; N-NO-4-OH-L-Prolinmethylester, 190/3; N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester, 127/3.

*N-NO-Sarkosinrideuteromethylester.* Für <sup>1</sup>H-NMR spektroskopische Untersuchungen wurden 10 mg N-NO-Sarkosin mit CD<sub>3</sub>OD-H<sup>+</sup> nach Methode (b) zum Trideuteromethylester umgesetzt.

*N-NO-4-OTMS-L-Prolinmethylester.* N-NO-4-OH-L-Prolinmethylester ist wegen seiner Schwerflüchtigkeit für eine gaschromatographische Trennung nicht geeignet. Er wird mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) (Macherey, Nagel & Co., Düren, B.R.D.) zum N-NO-4-OTMS-L-Prolinmethylester umgesetzt.

N-NO-4-OH-Prolinmethylester wird in einem Schraubdeckelgläschen mit MSTFA im Überschuss versetzt. Nach 30 Min Stehen bei Raumtemperatur zeigt das Dünnschichtchromatogramm mit Dichlormethan als Laufmittel quantitative Umsetzung zum N-NO-4-OTMS-L-Prolinmethylester ( $R_F = 0.9$ ). Nach Abziehen des überschüssigen Reagenzes verbleiben farblose, hygroskopische Kristalle der Trimethylsilylverbindung ( $F_p = 45-50$  °C).

### Gaschromatographie

Gaschromatograph Modell Fractovap 2101 (Carlo Erba) mit Flammenionisationsdetektor. 2-m Glassäulen (I.D.: 2 mm) gepackt mit (a) Carbowax 20M, 5% auf Gas-Chrom Q (100-120 mesh; Applied Science Labs.). (b) OV-17, 3% auf Gas-Chrom Q (100-120 mesh; Applied Science Labs.). N<sub>2</sub>-Strömung: 30 ml/min (100 °C).

Gesamtretentionszeiten der N-Nitrosoaminosäuremethylester sind in Tabelle I zusammengestellt. Die Nachweisgrenze des FID ist für N-NO-Sarkosinmethylester bei etwa 4 ng Ester/1  $\mu$ l Dichlormethan.

TABELLE I

## GESAMTRETENTIONSZEITEN DER N-NITROSOAMINOSÄUREMETHYLESTER

Ester	$t_R$ (min)	
	Carbowax 20 M (140 °C)	OV-17 (150 °C)
N-NO-Sarkosinmethylester	5.02	1.20
N-NO-L-Prolinmethylester	22.50	4.90
N-NO-4-OH-L-Prolinmethylester	—	—
N-NO-4-OTMS-L-Prolinmethylester	—	11.00
N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester	16.03	5.53

*Derivatisierung im Mikromassstab*

Die Umsetzung der N-Nitrosoaminosäuren mit Diazomethanlösung zu den Methylestern verläuft schnell und quantitativ. Sie wird daher als Mikro-Derivatisierungs-Technik gewählt.

In einem 1-ml Glaskolben mit Schliffstopfen werden 50  $\mu$ l einer methanolischen Eichlösung, die je 1  $\mu$ g N-Nitrosoaminosäure/1  $\mu$ l enthält, mit einem Überschuss ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach 20 Min Stehen bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und 500  $\mu$ l MSTFA zugesetzt. Nach zwei Stunden wird das überschüssige Reagenz abgezogen und der Rückstand in 50  $\mu$ l p.a. Dichlormethan gelöst. Dünnschichtchromatographische und gaschromatographische Untersuchungen ergaben quantitative Umsetzungen zu den gewünschten Derivaten. Die N-NO-Gruppen werden durch MSTFA nicht angegriffen.

*Massenspektrometrie*

80-eV Massenspektren der N-Nitrosoaminosäuremethylester (Fig. 1) wurden mit einem GC-MS-Kombinationsgerät Modell MAT 111 (Varian MAT) aufgenommen. 2-m Glassäule (I.D.: 1.7 mm), gepackt mit OV-17, 3% auf Gas-Chrom Q (100–120 mesh). He-Strömung: 15 ml/min (25 °C). T: 120 °C (isotherm).

Von 15 ng N-NO-Sarkosinmethylester in der Ionenquelle konnte ein einwandfreies Massenspektrum erhalten werden. Dies ist etwa die untere Nachweisgrenze für dieses Gerät.

Hochauflösende Messungen von Fragmentionen wurden an einem doppelt-fokussierenden Massenspektrometer MAT 311 A (Varian MAT) bei einem Auflösungsvermögen von 20,000 durchgeführt (Tabelle II, Fig. 2). Die Messung metastabiler Ionen (Tabelle II) erfolgte an einem Massenspektrometer Modell CH 7 (Varian MAT). Die Messungen mit DADI- und Defokussierungstechnik erfolgten ebenfalls am MAT 311 A Massenspektrometer (Fig. 2).

*Infrarotspektren*

Die Spektren wurden von Substanzfilmen zwischen NaCl-Platten an einem IR-Spektrometer Modell 297 (Perkin-Elmer) aufgenommen. Charakteristische Absorptionen treten bei 1750  $\text{cm}^{-1}$  (Ester-Carbonyl) und 1420–1450  $\text{cm}^{-1}$  (N-NO) auf.

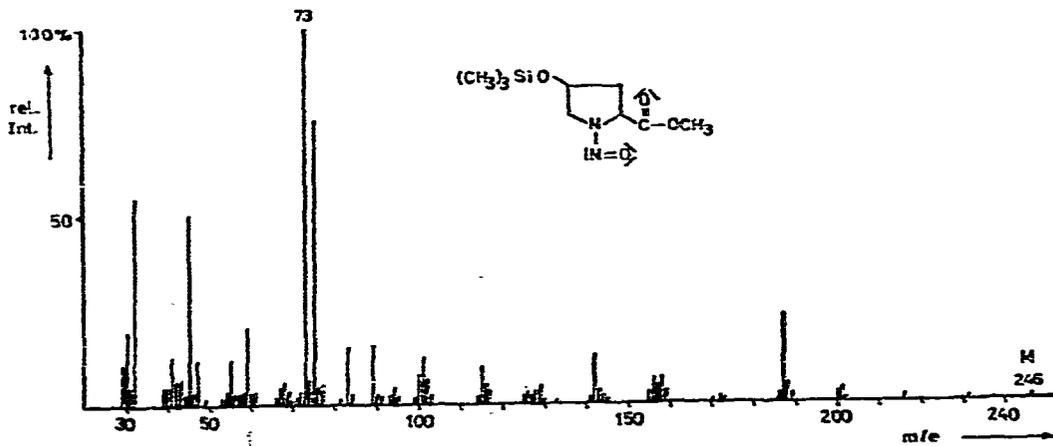
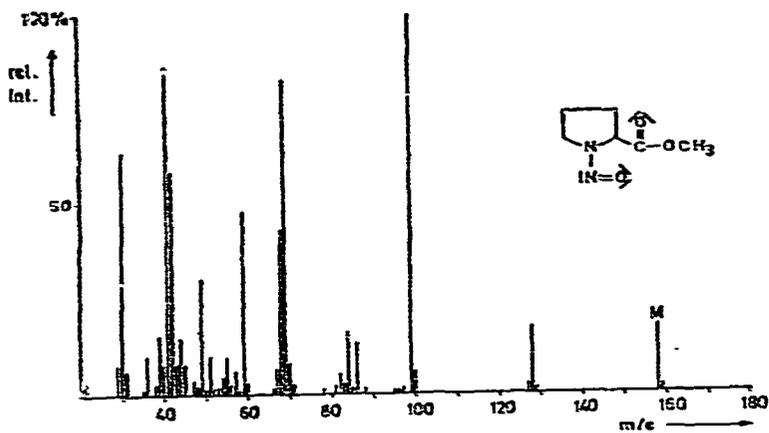
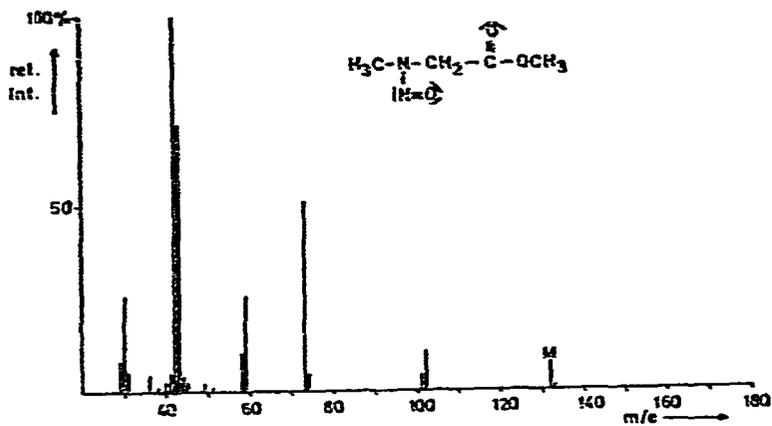


Fig. 1.

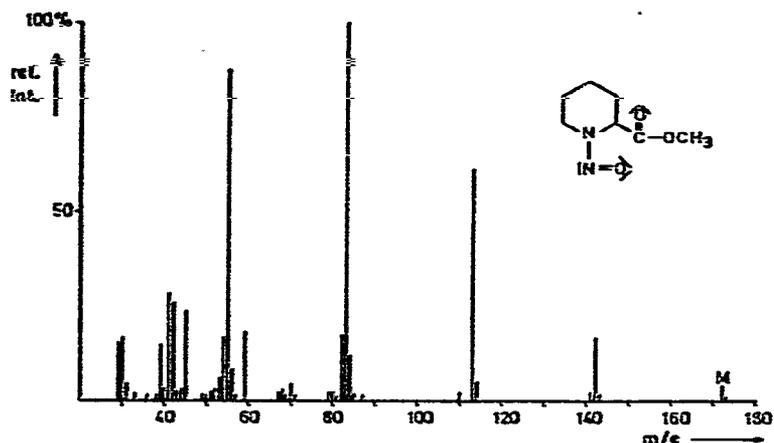


Fig. 1. 80-eV Massenspektren der N-Nitrosoaminosäuremethylester.

## TABELLE II

## MS-DATEN VON N-NITROSOAMINOSÄUREMETHYLESTERN

<i>N</i> -Nitrosoaminosäuremethylester	<i>m/e</i>	Beob.	Ber.	Fragment	
N-NO-Sarkosinmethylester	73	73.040404	73.040185	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O	
	101	101.0345536	101.035099	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	102	102.055488	102.055499	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub>	
	Metastabile Ionen		<i>m</i> (beob.)	<i>m</i> <sub>1</sub>	<i>m</i> <sub>2</sub> <i>m</i> (ber.)
			79.0	132	102    78.8
			77.5	132	101    77.3
N-NO-L-Prolinmethylester	69	69.057656	69.0578	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N	
	99	99.056545	99.0558	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O	
	128	128.06947	128.0711	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>	
	Metastabile Ionen		<i>m</i> (beob.)	<i>m</i> <sub>1</sub>	<i>m</i> <sub>2</sub> <i>m</i> (ber.)
			104	158	128    103.7
			37.5	128	69    37.2
			48	99	69    48.09
N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester	113	113.0694473	113.071484	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O	
	142	142.0883594	142.086798	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	
	Metastabile Ionen		<i>m</i> (beob.)	<i>m</i> <sub>1</sub>	<i>m</i> <sub>2</sub> <i>m</i> (ber.)
			117.5	172	142    117.2
			61.0	113	83    60.96
			36.5	83	55    36.5

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren

Die 270 MHz-Protonenresonanzspektren der N-Nitrosoaminosäuremethylester wurden in CDCl<sub>3</sub> bzw. C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> und Tetramethylsilan als innerem Standard an einem Spektrometer Modell WH 270 (Bruker) aufgenommen. Chemische Verschiebungen  $\delta$  [ppm], Kopplungskonstanten  $J$  [Hz] und die Anteile an *E*- und *Z*-Isomeren in Lösung sind in Tabelle III zusammengestellt. Die Zuordnung erfolgte durch Doppelresonanzversuche.

<sup>13</sup>C-NMR-Spektren

Die 67.91-MHz <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der N-Nitrosoaminosäuremethylester wurden in CDCl<sub>3</sub> und Tetramethylsilan als innerem Standard an einem Spektrometer WH 270 (Bruker) aufgenommen.

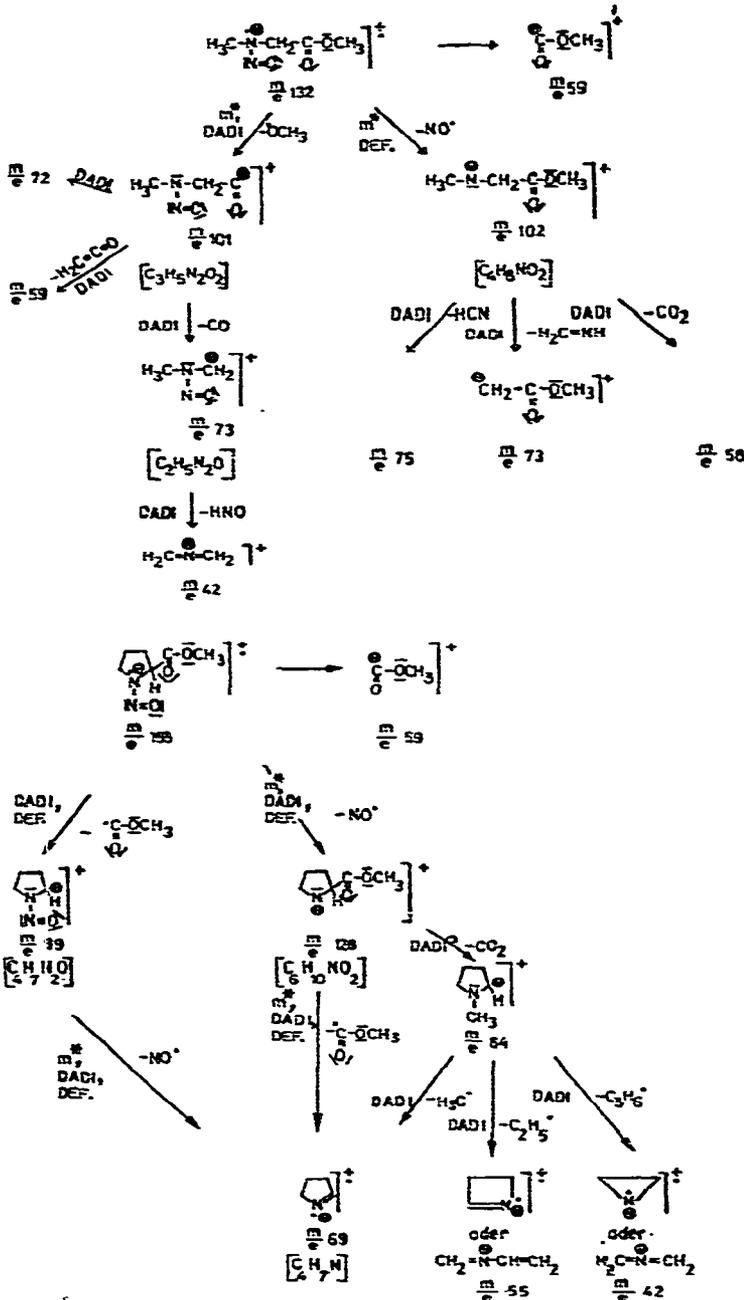


Fig. 1

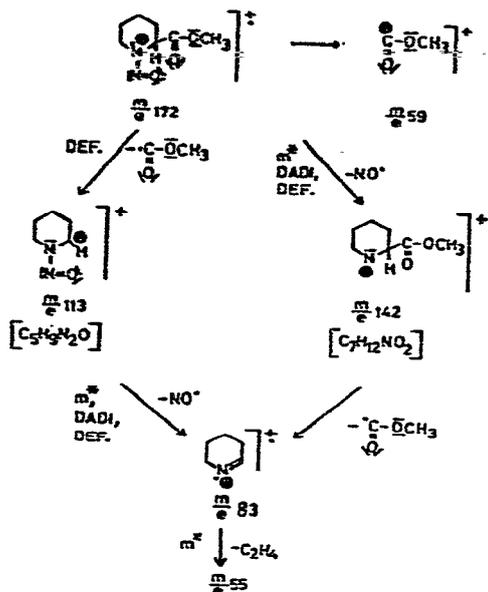


Fig. 2. Zerfall der N-Nitrosoaminosäuremethylester im Massenspektrometer.

Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  [ppm] der  $^{13}C$ -Resonanzen (Breitbandentkopplung) sind in Tabelle IV zusammengestellt. Die Zuordnung und Ermittlung der  $^{13}C$ - $^1H$ -Kopplungskonstanten  $J$  [Hz] erfolgte mit Off-Resonanz-Spektren (gated decoupling.)

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die schwerflüchtigen N-Nitrosoaminosäuren N-NO-Sarkosin, N-NO-L-Prolin, N-NO-4-OH-L-Prolin und N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäure lassen sich durch Umsetzung mit Methanol- $H^+$  oder Diazomethan in die Methylester überführen. Die Veresterung mit Diazomethan verläuft im präparativen und analytischen Masstab quantitativ. Die Umsetzung von N-NO-4-OH-L-Prolinmethylester mit MSTFA führt in quantitativer Ausbeute zum flüchtigen N-NO-4-OTMS-L-Prolinmethylester. Die übrigen N-Nitrosoaminosäuremethylester werden durch MSTFA nicht angegriffen.

Die N-Nitrosoaminosäuremethylester sind stabile, destillierbare Verbindungen (Kp, s.S. 384), die sich dünnschichtchromatographisch an Kieselgelfolien ( $R_F$ -Werte, s.S. 383) oder gaschromatographisch trennen lassen ( $t_R$ , Tabelle I).

Tabelle I gibt eine Zusammenstellung von gemessenen Gesamtretentionszeiten an Carbowax 20M (140 °C) und OV-17 (150 °C). An der OV-17-Trennphase wird ein Gemisch aller Ester unter isothermen Bedingungen getrennt. Alle Peaks sind symmetrisch und zeigen keine Bandenschweifung. N-NO-4-OH-L-Prolinmethylester wird als 4-OTMS-Derivat chromatographiert.

Nach Derivatisierung mit Diazomethan und MSTFA lassen sich die N-Nitrosoaminosäuren als Methylester auch im Mikro- bis Nanogramm-Bereich gaschromatographisch trennen und quantitativ bestimmen. Die Nachweisgrenze für den FID beträgt etwa 4 ng Methylester/1  $\mu$ l Lösung. Mit der GC-MS-Analyse ist eine eindeutige Identifizierung der Ester bis zu etwa 15 ng in der Ionenquelle möglich.

TABELLE III

270-MHz-<sup>1</sup>H-NMR-SPEKTROSKOPISCHE DATEN DER N-NITROSOAMINOSÄUREMETHYLESTER  
 Innerer Standard Tetramethylsilan. Chemische Verschiebungen  $\delta$  [ppm]. Kopplungskonstanten  $J$  (Hz). Bestimmung des *E/Z*-Isomerenverhältnisses aus den Integralverhältnissen.

<i>N</i> -Nitrosoaminosäure-methylester	<i>Z/E</i> (%)	<i>N(NO)CH</i>	<i>N(NO)CH<sub>2</sub></i>
<i>N</i> -NO-Sarkosinmethylester (CDCl <sub>3</sub> )	55/45		4.90( <i>E</i> )s 4.21( <i>Z</i> )s
<i>N</i> -NO-L-Prolinmethylester (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> )	69/31	4.77( <i>E</i> )m 4.22( <i>Z</i> )m	$\left. \begin{array}{l} J_{2,3} = 7\text{Hz} \\ J_{2,3'} = 7\text{Hz} \end{array} \right\} \text{H-2}$ 3.64( <i>Z</i> )m 3.27( <i>E</i> )m $\left. \vphantom{\begin{array}{l} J_{2,3} = 7\text{Hz} \\ J_{2,3'} = 7\text{Hz} \end{array}} \right\} \text{H-5,5'}$
<i>N</i> -NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> )	57/43	5.66( <i>Z</i> )d,d 5.23( <i>E</i> )d,d	$\left. \begin{array}{l} J_{2,3} = 4.8\text{Hz} \\ J_{2,3'} = 2.4\text{Hz} \\ J_{2,3} = 4.8\text{Hz} \\ J_{2,3'} = 2.4\text{Hz} \end{array} \right\} \text{H-2}_e$ 4.81( <i>E</i> )m,m 4.44( <i>Z</i> )m,m $\left. \begin{array}{l} J_{6,6'} = 13.6\text{Hz} \\ J_{5,6} = 5.0\text{Hz} \\ J_{5,6} = 2.4\text{Hz} \\ J_{6,6'} = 13.6\text{Hz} \\ J_{5,6} = 5.0\text{Hz} \\ J_{5,6} = 2.4\text{Hz} \end{array} \right\} \text{H-6}_e=6$

Die 80 eV-Massenspektren der *N*-Nitrosoaminosäuremethylester sind in Fig. 1, Ergebnisse von hochauflösenden Messungen von Fragmentionen und metastabilen Ionen in Tabellen 2 zusammengefasst. Fig. 2 zeigt die Fragmentierungsschemata der *N*-Nitrosoaminosäuremethylester, die auf diesen sowie auf Messungen mit DADI- und Defokussierungstechnik beruhen. In allen Massenspektren (Fig. 1) treten Molekülionen mit relativen Intensitäten von 1–17% auf. Charakteristische Fragmentationen im unteren Massenbereich sind NO<sup>+</sup> ( $m/e$  30) und COOCH<sub>3</sub><sup>+</sup> ( $m/e$  59). Bei den cyclischen *N*-Nitrosoaminosäuremethylestern werden zwei Hauptfragmentierungswege beobachtet. (Fig. 2): (1) Abspaltung von NO-Radikalen aus den Molekülionen mit anschließender Abspaltung von COOCH<sub>3</sub>-Gruppen. (2) Abspaltung von COOCH<sub>3</sub>-Radikalen aus den Molekülionen und anschließende Abspaltung von NO-Radikalen.

*N*-NO-Sarkosinmethylester spaltet aus den Molekülionen OCH<sub>3</sub>- und NO-Radikale ab. Die entstandenen Ionen zerfallen in der ermittelten Weise weiter.

Massenspektrometrische Untersuchungen an Nitrosaminen wurden u.a. von Collin<sup>61</sup>, Schroll *et al.*<sup>62</sup>, Röper<sup>63</sup> und Saxby<sup>64</sup>, an *N*-Nitrosoaminosäuren von Lijinski *et al.*<sup>64</sup> durchgeführt.

Die Protonenresonanzspektren der *N*-Nitrosoaminosäuremethylester (Tabelle III) entsprechen denen der *N*-Nitrosoaminosäuren<sup>34</sup>. Sie zeigen wie die von Nitrosaminen<sup>65–70</sup> wegen eines hohen Doppelbindungsanteils der *N*-*N*-Bindung in der NNO-Gruppe Lösungsgleichgewichte von *E*- und *Z*-Isomeren. Diese führen zu einem Auftreten von Resonanzen zur NNO-Gruppe  $\alpha$ - und  $\beta$ -ständiger Protonen bei unterschiedlichen  $\delta$ -Werten (Fig. 3).

Liegen die  $\alpha$ -ständigen Protonen nicht in der Ebene, die durch die Gruppierung NNO aufgespannt wird, und somit im Anisotropiekegel der NNO-Gruppe, ergibt sich bei *syn*-Stellung zur N=O-Gruppe eine diamagnetische Hochfeldverschiebung, entsprechend bei *anti*-Stellung eine paramagnetischer Tieffeldverschiebung. Im Gleichgewicht der *E*-*Z*-Isomeren führt dies beim *N*-NO-Sarkosinmethylester und *N*-NO-L-

		$N(NO)CH_3$ , $C-OCH_3$ , Sonstige			
		O			
		3.84(Z)s	3.76(E)s		
		3.04(E)s	3.67(Z)s		
			3.24(E)s	1.54 m,m H-3	
			3.17(Z)s	(1H)	
				1.32 m H-3', H-4, H-4'	
				(3H)	
3.50(Z)d,d,d	$J_{6,6'} = 13.8\text{Hz}$		3.15(E)s	1.94(E)m	} H-3 1.33-0.77m(5H) H-3' H-4, H-4', H-5, H-5'
	$J_{5,6'} = 4.4\text{Hz}$		3.13(Z)s		
	$J_{5,6'} = 13.2\text{Hz}$				
2.49(E)d,d,d	$J_{6,6'} = 13.8\text{Hz}$				
	$J_{5,6'} = 4.4\text{Hz}$		1.82(Z)m		
	$J_{5,6'} = 13.2\text{Hz}$				

Prolinmethylester zu entsprechenden Signalverdopplungen  $\alpha$ - und  $\beta$ -ständiger Protonen.

Im Falle des N-NO-Piperidin-2-carbonsäuremethylesters liegt eine starre Sesselkonformation vor, in der die Estermethylgruppe an C-2 axial steht (Fig. 3). Es wird keine Diaxialkopplung  $J_{2,3}$  beobachtet. Ausserdem liegen die äquatorialen Protonen an C-2 und C-6 in der Ebene der NNO-Gruppe. Dies führt bei syn-Stellung der NO-Gruppe zu einer Tieffeldverschiebung, bei anti-Stellung zum betrachteten Proton zu einer Hochfeldverschiebung.

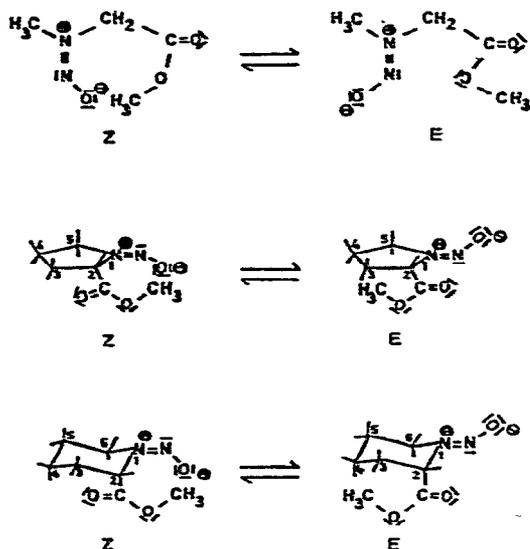


Fig. 3. *E-Z*-Isomere der N-Nitrosoamino säuremethylester.

TABELLE IV

67,91-MHz-<sup>13</sup>C-NMR-SPEKTROSKOPISCHE DATEN DER N-NITROAMINOSÄUREMETHYLESTER

Lösungsmittel: CDCl<sub>3</sub>, Innerer Standard: Tetramethylsilan, Chemische Verschiebungen  $\delta$  [ppm], <sup>13</sup>C-H-Kopplungskonstanten  $J$  (Hz) und Multiplizitäten durch Off-Resonanz-Spektren (gutes decoupling).

<i>N</i> -Nitrosoamino- säuremethylester	O-C=O	N(NO)CH	N(NO)CH <sub>2</sub>	N(NO)CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	Sonstige
N-NO-Sarkosin- methylester	168,41(E)		54,38(E)† $J=98,3$ Hz	39,64(Z)q $J=89,9$ Hz	52,60(E)q $J=93,3$ Hz	
	166,15(Z)		46,37(Z)† $J=93,3$ Hz	32,31(E)q $J=83,3$ Hz	52,43(Z)q	
N-NO-L-Prolin- methylester		C-2				
	170,22(E)	61,11(E)d $J=151,6$ Hz	49,13(Z)† $J=143,7$ Hz		51,81(E)q $J=147,7$ Hz	27,94(E)† $J=135,9$ Hz C-3
	168,34(Z)	57,18(Z)d $J=149,6$ Hz	44,80(E)† $J=147,7$ Hz		51,39(Z)q	26,84(Z)† $J=137,8$ Hz
						22,32(Z)† $J=137,8$ Hz C-4
		C-5				20,27(E)† $J=135,9$ Hz
N-NO-D,L-Piperidin- 2-carbonsäure- methylester		C-2				
	169,81(E)	60,19(E)d $J=140,8$ Hz	47,55(Z)† $J=140,8$ Hz		51,67(E)q $J=147,7$ Hz	26,82(E)† $J=132,5$ Hz C-3
	167,96(Z)	49,03(Z)d $J=139,1$ Hz	37,00(E)† $J=144,6$ Hz		51,58(Z)q	25,40(Z)† $J=132,5$ Hz
						24,36(Z)† $J=129,9$ Hz C-5
		C-6				22,94(E)† $J=130,9$ Hz
						20,15 †† $J=129,9$ Hz C-4

Ein  $\beta$ -ständiges H-3 Proton erscheint beim N-NO-L-Prolinmethylester bei 1.54 ppm und beim N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester bei 1.94 und 1.82 ppm im Lösungsgleichgewicht der *E-Z*-Isomeren als Multipllett bei tieferem Feld, als die übrigen  $\beta$ - und  $\gamma$ -ständigen Ringprotonen.

Das Verhältnis von *E*- und *Z*-Isomeren der N-Nitrosoaminosäuremethylester in Lösung wurde aus dem Verhältnis der Resonanzintegrale zur NNO-Gruppe  $\alpha$ -ständiger Protonen bestimmt (Tabelle III).

Die Methylesterresonanzen der N-Nitrosoaminosäuremethylester treten als zwei Singulets auf. Dies wird auf eine anisotrope Wechselwirkung der Estermethylgruppe mit der NNO-Gruppe im Lösungsgleichgewicht der *E*- und *Z*-Isomeren zurückgeführt. In der *Z*-Form führt die Ausbildung einer cyclischen Anordnung (Fig. 3) zu einer Hochfeldverschiebung der Methylresonanz, in der *E*-Form entsprechend zu einer Tieffeldverschiebung. Der Nachweis wird am Beispiel des N-NO-Sarkosinmethylesters durch Darstellung des Trideuteromethylesters erbracht. Hier treten im Protonenresonanzspektrum die beiden Singulets der Estermethylgruppe bei  $\delta$ :3.76 ppm [*E*] und 3.67 ppm [*Z*] nicht mehr auf.

$^{13}\text{C}$ -NMR Spektren von Nitrosaminen sind untersucht<sup>71,72</sup>. Wie hier, treten auch in den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der N-Nitrosoaminosäuremethylester (Tabelle IV) Signalverdopplungen durch Einstellung von Lösungsgleichgewichten *E-Z*-Isomere auf. Dies gilt für zur NNO-Gruppe  $\alpha$ - und  $\beta$ -ständige, jedoch nicht für  $\gamma$ -ständige C-Resonanzen (N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester).

Die  $\Delta\delta$  werte (ppm) von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen *E-Z*-isomerer N-Nitrosoaminosäuremethylester sind in Tabelle V und VI zusammengestellt. Die  $\Delta\delta$ -Werte sind in den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (0.09–11.16 ppm) um den Faktor 10 grösser als in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (0.02–1.01 ppm). Die  $\Delta\delta$ -Werte fallen für beide Kerne mit zunehmendem Abstand von der anisotropen NNO-Gruppe in der Reihenfolge  $\alpha$  ( $\text{CH}, \text{CH}_2$ ) >  $\beta$  ( $\text{CH}_2$ ) >  $\gamma$  ( $\text{CH}_2$ ). In den  $^{13}\text{C}$ -Spektren werden Signalverdopplungen der Estermethyl-Kohlenstoffresonanzen (Methyl- und Carboxyl) von *E-Z*-Isomeren beobachtet.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die N-Nitrosoaminosäuren (N-NO-Sarkosin, N-NO-L-Prolin, N-NO-4-OH-L-Prolin und N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäure) werden mit Methanol-H<sup>+</sup> oder

## TABELLE V

$\Delta\delta$ -WERTE [ppm] VON  $^1\text{H}$ -NMR-RESONANZEN *E-Z*-ISOMERER N-NITROSOAMINOSÄUREMETHYLESTER

<i>N</i> -Nitrosoaminosäuremethylester	$\alpha$ -CH <i>N</i> (NO)CH	$\alpha$ -CH <sub>2</sub> <i>N</i> (NO)CH <sub>2</sub>	$\alpha$ -CH <sub>3</sub> <i>N</i> (NO)CH <sub>3</sub>	$\beta$ -CH <sub>2</sub>	$\gamma$ -CH <sub>2</sub>	$\delta$ -CH <sub>3</sub> OC-OCH <sub>3</sub>
N-NO-Sarkosinmethylester (CDCl <sub>3</sub> )		0.69	0.80			0.07
N-NO-L-Prolinmethylester (-D <sub>2</sub> O)	0.55(H-2)	0.37(H-5)		0.22(H-3)		0.07
N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester (C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> )	0.43(H-2)	0.37(H-6 <sub>e</sub> ) 1.01(H-6 <sub>a</sub> )		0.12(H-3)	*	0.02

\* Nicht gemessen.

TABELLE VI

$\Delta\delta$ -WERTE [ppm] VON  $^{13}\text{C}$ -RESONANZEN *E-Z*-ISOMERER N-NITROSOAMINOSÄURE-METHYLESTER

<i>N</i> -Nitrosoamino-säuremethylester	$\alpha\text{-CH}$ <i>N(NO)CH</i>	$\alpha\text{-CH}_2$ <i>N(NO)CH_2</i>	$\alpha\text{-CH}_3$ <i>N(NO)CH_3</i>	$\beta\text{-CH}_2$	$\beta\text{-O-C=O}$	$\gamma\text{-CH}_2$	$\delta\text{-CH}_3$ <i>OC-OCH_3</i>
N-NO-Sarkosin-methylester ( $\text{CDCl}_3$ )		8.01	7.33		2.26		0.17
N-NO-L-Prolin-methylester ( $\text{CDCl}_3$ )	3.93(C-2)	4.33(C-5)		1.10(C-3) 2.05(C-4)	1.88		0.42
N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester ( $\text{CDCl}_3$ )	11.16(C-2)	10.55(C-6)		1.42(C-3) 1.42(C-5)	1.85	0.00(C-4)	0.09

Diazomethan in präparativem und analytischem Massstab zu den entsprechenden Methylestern umgesetzt. N-NO-4-OH-L-Prolinmethylester wird durch Umsetzung mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid quantitativ in den N-NO-4-O-trimethylsilyl-L-Prolinmethylester überführt.

Die N-Nitrosoaminosäuremethylester werden durch physikalische ( $K_p$ ,  $F_p$ ,  $R_f$ -Werte) und spektroskopische Daten (Infrarot, Massenspektrometrie,  $^1\text{H}$ -magnetische Kernresonanz (NMR),  $^{13}\text{C}$ -NMR) charakterisiert. Das Fragmentierungsverhalten von N-NO-Sarkosinmethylester, N-NO-L-Prolinmethylester und N-NO-D,L-Piperidin-2-carbonsäuremethylester bei Elektronenstoss im Massenspektrometer wird mit hochauflösenden Messungen von Fragmentionen, Messungen metastabiler Ionen, DADI- und Defokussierungs-Technik untersucht.

Das Verhältnis von *E*- und *Z*-Isomeren der N-Nitrosoaminosäuremethylester in Lösung wird  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch bestimmt. Die Resonanzen der Ester-Methylprotonen erscheinen als zwei Singulets. Dies wird durch Wechselwirkung der N-NO-Gruppe mit den Methylester-Protonen in einer cyclischen Anordnung im Gleichgewicht der *E*- und *Z*-Isomeren erklärt und durch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des N-NO-Sarkosin-trideuteromethylesters bestätigt.

Die N-Nitrosoaminosäuren werden durch Umsetzung mit Diazomethan quantitativ in die entsprechenden Methylester überführt. Diese flüchtigen Derivate der N-Nitrosoaminosäuren, einschliesslich des N-NO-4-OTMS-Prolinmethylesters, können gaschromatographisch an OV-17 als stationärer Phase getrennt werden.

Diese Derivatisierungsmethode ermöglicht die Trennung und quantitative Bestimmung von N-Nitrosoaminosäuren mit Gaschromatographie sowie ihre eindeutige Identifizierung mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie bis in den Nanogramm-Bereich.

## DANK

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Herrn Dr. Volker Sinnwell danken wir für Mithilfe bei den NMR-Messungen.

## LITERATUR

- 1 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, 1972.
- 2 J. Sander und F. Schweinsberg, *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org. B*, 156 (1972) 299.
- 3 K. Möhler, O. L. Mayrhofer und E. Hallermayer, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, 150 (1972) 1.
- 4 K. Heyns, *Getreide, Mehl Brot*, 27 (1973) 249.
- 5 N. P. Sen, in *Toxic Constituents of Animal Foodstuffs*, Academic Press, New York, London, 1974, Ch. 5, S. 131.
- 6 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.
- 7 R. A. Scanlan, *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 1975, S. 375.
- 8 *Sammlung analytischer Daten über das Vorkommen von Nitrosaminen aus der Literatur*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1975.
- 9 W. Fiddler, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31 (1975) 352.
- 10 N. T. Crosby und R. Sawyer, *Adv. Food Res.*, 22 (1976) 1.
- 11 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.
- 12 E. A. Walker, M. Castegnaro, L. Gričiute und R. E. Lyle (Herausgeber), *Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds. IARC Scientific Publications No. 19*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1977.
- 13 K. Heyns und H. Röper, *J. Chromatogr.*, 93 (1974) 429.
- 14 C. L. Walters, D. G. Fueggle und T. G. Lunt, in 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, S. 22.
- 15 G. M. Singer, S. S. Singer und D. G. Schmidt, *J. Chromatogr.*, 133 (1977) 59.
- 16 D. H. Fine und F. Ruffeh, in 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, S. 53.
- 17 T. Kawabata, in 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, S. 156.
- 18 G. Eisenbrand, Ch. Janzowski und R. Preussmann, *J. Chromatogr.*, 115 (1975) 602.
- 19 J. H. Dhont und C. van Ingen, 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, S. 355.
- 20 D. H. Fine, F. Huffmann, D. 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, S. 43.
- 21 W. Iwaoka und S. R. Tannenbaum, *J. Chromatogr.*, 124 (1976) 105.
- 22 J. H. Wolfram, J. I. Feinberg, R. C. Doerr und W. Fiddler, *J. Chromatogr.*, 132 (1977) 37.
- 23 T. Y. Fan, I. S. Krull, R. D. Ross, M. H. Wolf und D. H. Fine, in E. A. Walker, M. Castegnaro, L. Gričiute und R. E. Lyle (Herausgeber), *Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds, IARC Scientific Publications No. 19*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1977, S.3.
- 24 M. Greenblatt, V. R. C. Koumineni, W. Lijinsky und H. Aham, *J. Natl. Cancer Inst.*, 50 (1973) 799.
- 25 M. Greenblatt und W. Lijinski, *J. Natl. Cancer Inst.*, 48 (1972) 1389.
- 26 H. Garcia und W. Lijinski, *Z. Krebsforsch. Klin. Onk.*, 79 (1973) 141.
- 27 H. Druckrey, R. Preussmann, G. Blum, S. Ivankovic und J. Afkham, *Naturwissenschaften*, 50 (1963) 100.
- 28 G. N. Wogan, S. Paglialunga, M. C. Archer und St. R. Tannenbaum, *Cancer Res.*, 35 (1975) 1981.
- 29 S. S. Mirvish, J. Sams, T. Y. Fan und St. R. Tannenbaum, *J. Natl. Cancer Inst.*, 51 (1973) 1833.
- 30 M. A. Friedman, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 8 (1972) 375.

- 31 I. Kushnir, J. I. Feinberg, J. W. Pensabene, E. G. Piotrowski, W. Fiddler und A. E. Wasserman, *J. Food Sci.*, 40 (1975) 427.
- 32 T. Hansen, W. Iwaoka, L. Green und St. R. Tannenbaum, *J. Agr. Food Chem.*, 25 (1977) 1423.
- 33 H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovic und D. Schmähl, *Z. Krebsforsch.*, 69 (1967) 103.
- 34 W. Lijinski, L. Keeser und J. Loo, *Tetrahedron*, 26 (1970) 5137.
- 35 T. Y. Fan und St. R. Tannenbaum, *J. Food Sci.*, 37 (1972) 274.
- 36 D. D. Bills, K. I. Hildrum, R. A. Scanlan und L. M. Libbey, *J. Agr. Food Chem.*, 21 (1973) 876.
- 37 J. J. Warthens, R. A. Scanlan, D. D. Bills und L. M. Libbey, *J. Agr. Food Chem.*, 23 (1975) 898.
- 38 L. S. Hwang und J. D. Rosen, *J. Agr. Food Chem.*, 24 (1976) 1152.
- 39 J. I. Gray, M. E. Collins und B. Mac Donald, *J. Food Protection*, 41 (1978) 31.
- 40 J. I. Gray und M. E. Collins, *J. Food Protection*, 41 (1978) 36.
- 41 J. S. Lee, D. Bills, R. A. Scanlan und L. M. Libbey, *J. Agr. Food Chem.*, 25 (1977) 422.
- 42 M. Nakamura, N. Baba, T. Nakuoka und Y. Wada, *J. Food Sci.*, 41 (1976) 874.
- 43 T. A. Gough und C. L. Walters, 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, S. 195.
- 44 N. P. Sen, J. R. Iyengar, B. A. Donaldson und T. Panalaks, *J. Agr. Food Chem.*, 22 (1974) 540.
- 45 N. T. Crosby, J. K. Foreman, J. F. Palframan und R. Sawyer, *Nature (London)*, 238 (1972) 342.
- 46 N. P. Sen, *Food Cosmet. Toxicol.*, 10 (1972) 219.
- 47 A. E. Wassermann, W. Fiddler, R. C. Doerr, S. F. Osman und C. J. Dooley, *Food Cosmet. Toxicol.* 10 (1972) 681.
- 48 T. H. Fazio, R. H. White, L. R. Dusold und J. W. Howard, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 56 (1973) 919.
- 49 J. W. Pensabene, W. Fiddler, R. A. Gates, J. C. Fagan und A. E. Wassermann, *J. Food Sci.*, 39 (1974) 314.
- 50 N. P. Sen, B. Donaldson, J. R. Iyengar und T. Panalaks, *Nature (London)*, 241 (1973) 473.
- 51 G. M. Telling, T. A. Bryce, D. Hoar, D. Osborne und D. Welti, in 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, S. 12.
- 52 N. P. Sen, S. Seaman und W. F. Miles, *Food Cosmet. Toxicol.*, 14 (1976) 167.
- 53 J. J. Warthens, D. D. Bills, R. A. Scanlan und L. M. Libbey, *J. Agr. Food Chem.*, 24 (1976) 892.
- 54 E. T. Huxel, R. A. Scanlan und L. M. Libbey, *J. Agr. Food Chem.*, 22 (1974) 698.
- 55 R. L. S. Patterson, A. A. Taylor, D. S. Mottram, T. A. Gough, *J. Sci. Food Agric.*, 27 (1976) 257.
- 56 J. S. Lee, L. M. Libbey, R. A. Scanlan und J. Barbour, in E. A. Walker, M. Castegnaro, L. Gričiute, R. E. Lyle (Herausgeber), *Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds*, IARC Scientific Publications No. 19 International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1977, S. 325.
- 57 G. Eisenbrand, B. Spiegelhalder, C. Janzowski, J. Kann und R. Preussmann, in E. A. Walker, M. Castegnaro, L. Gričiute, R. E. Lyle (Herausgeber), *Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds*, IARC Scientific Publications No. 19, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1977, S. 311.
- 58 N. P. Sen, G. D. Miles, S. Seaman und J. F. Lawrence, *J. Chromatogr.*, 128 (1976) 169.
- 59 J. I. Gray, M. E. Collins und L. F. Russell, *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, 10 (1977) 36.
- 60 R. Preussmann, G. Neurath, G. Wulf-Lorentzen, D. Daiber und H. Hengy, *Z. Anal. Chem.*, 202 (1964) 187.
- 61 J. Collin, *Bull. Soc. Roy. Sci. Liege*, 23 (1954) 201.
- 62 G. Schroll, R. G. Cooks, P. Klemmensen und S. O. Lawesson, *Ark. Kemi*, 28 (1968) 413.
- 63 H. Röper und K. Heyns, in E. A. Walker, P. Bogovski und L. Gričiute (Herausgeber), *Environmental N-Nitroso Compounds: Analysis and Formation*, IARC Scientific Publications No. 14, Lyon, 1976, S. 27.
- 64 M. J. Saxby, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 9.
- 65 C. E. Looney, W. D. Phillips und E. L. Reilly, *J. Amer. Chem. Soc.*, 79 (1957) 6136.
- 66 G. J. Karabatsos und R. A. Taller, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1964) 4373.
- 67 H. W. Brown und D. P. Hollies, *J. Molec. Spectrosc.*, 13 (1964) 305.
- 68 R. K. Harris und R. A. Spragg, *J. Molec. Spectrosc.*, 23 (1967) 158.
- 69 Y. L. Chow und C. J. Colon, *Can. J. Chem.*, 46 (1968) 2827.
- 70 J. D. Cooney und S. K. Brownstein, *Can. J. Chem.*, 52 (1974) 3028.
- 71 P. S. Pregosin und E. W. Randall, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1971) 399.
- 72 J. P. Gouesnard und G. J. Martin, *Org. Magnetic Resonance*, 12 (1979) 263.