

Note

Kapillargaschromatographische Bestimmung flüchtiger und tabakspezifischer N-Nitrosamine mittels des Thermo-Energy-Analyzers

H. BEGUTTER, H. KLUS* und I. ULTSCH

Austria Tabakwerke AG, Forschung und Entwicklung, Hasnerstrasse 124 a, A-1160 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 7. Dezember 1984)

Wegen ihrer cancerogenen, mutagenen und teratogenen Wirkung ist die analytische Erfassung von N-Nitrosaminen von Interesse. Spuren dieser Verbindungsklasse wurden bisher in einer Vielzahl von Lebensmitteln, in Getränken wie Bier, Pharmazeutika, Gummiwaren usw.¹ und auch im Tabak und Tabakrauch nachgewiesen²⁻⁸. Die routinemässige Bestimmung von N-Nitrosaminen war bis zur von Fine *et al.*⁹ vorgeschlagenen spezifischen Detektion mittels des Thermo-Energy-Analyzers (TEA) extrem arbeitsaufwendig. Bedingt durch eine Vielzahl notwendiger Reinigungsschritte war die Möglichkeit von falsch positiven (Artefaktbildung) und falsch negativen (Aufarbeitungsverluste) Resultaten gegeben¹⁰.

Im TEA werden N-Nitrosamine katalytisch bei erhöhter Temperatur gespalten, die dabei gebildeten NO-Radikale anschliessend im Hochvakuum mittels einer Chemoluminiszenzreaktion erfasst⁹. Zur Trennung wurden bisher im System Gaschromatographie (GLC)-TEA gepackte Säule eingesetzt, wobei je nach Nitrosaminklasse unterschiedliche flüssige Phasen verwendet wurden. Bei der Prüfung von Tabak und Tabakrauch wurden für die Bestimmung der flüchtigen Nitrosamine Carbowax 20M¹¹ oder eine Mischphase vorgeschlagen¹², die tabakspezifischen, nichtflüchtigen Nitrosamine wurden hingegen an UCW-982 (Alltech, Arlington, IL, U.S.A.) aufgetrennt¹³. Gegenüber der Detektion mittels Flammenionisationsdetektor ist bei der Erfassung mit dem TEA, bedingt durch den Vakuumdurchgriff in die Trennsäule, eine Verschlechterung der Trennleistung feststellbar.

Die Kapillargaschromatographie ist von einigen Arbeitsgruppen zur Auftrennung von N-Nitrosaminen eingesetzt worden.^{14,15} Chamberlain und Arrendale¹⁶ bestimmten die tabakspezifischen N-Nitrosamine mit Hilfe einer Fused-Silica Kapillare, beschichtet mit Superox-4 mittels stickstoffspezifischer thermoionischer Detektion. Für die Prüfung auf flüchtige Nitrosamine wurde von einer Reihe von Arbeitsgruppen die Kapillargaschromatographie eingesetzt. Grolimund und Widmer¹⁷ beschrieben erstmals die Kombination Kapillargaschromatographie-TEA, die sie zur Bestimmung flüchtiger N-Nitrosamine einsetzten. Den Vakuumdurchgriff in die Trennkapillare reduzierten sie durch ein Restriktionszwischenstück aus Stahl, das zwischen der Detektorbasis des Gaschromatographen und dem Pyrolyserohr des TEA eingesetzt wird. Nach unserer Erfahrung ist dieses System für die Spurenanalytik tabakspezifischer N-Nitrosamine nicht einsetzbar, da sich diese an heissen Metallen zersetzen. Die von uns vorgeschlagene Analysenmethode umgeht diese

Schwierigkeit, gestattet die volle Ausnützung der Trennleistung von Kapillaren und ermöglicht die gleichzeitige Erfassung flüchtiger und tabakspezifischer N-Nitrosamine, wobei im Falle des Tabaks als Aufarbeitungsgang nur zwei Extraktionschritte notwendig sind. Möglichkeiten zur Artefaktbildung und Aufarbeitungsverluste sind somit stark eingeschränkt. Die durch die Kapillarchromatographie gegebene Trennschärfe führt in Kombination mit der hohen Empfindlichkeit des TEAs im Falle des N-Nitrosodimethylamins zu einer Nachweisgrenze von 1 pg, im Falle des tabakspezifischen N-Nitrososornikotins von 6 pg pro Injektion.

MATERIAL UND METHODEN

Alle Lösungsmittel und Reagentien waren p.A. Ware. Dichlormethan wurde vor seiner Verwendung über eine Kolonne destilliert. Die flüchtigen Nitrosamine N-Nitrosodimethylamin (NDMA), N-Nitrosoethylmethylamin (NEMA), N-Nitrosodiethylamin (NDEA), N-Nitrosodi-*n*-propylamin (NDPA) und N-Nitrosopyrrolidin (NPYR) bezogen wir von Eastman-Kodak, (Rochester, NY, U.S.A.) Die tabakspezifischen Nitrosamine N-Nitrososornikotin (NNN), N-Nitrosoanatabin (NAT), N-Nitrosoanabasin (NAB) und 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) synthetisierten wir aus den entsprechenden Alkaloiden¹⁸⁻²⁰. Stammlösungen der verschiedenen Nitrosamine wurden in Dichlormethan hergestellt.

Als Gaschromatographen verwenden wir ein Gerät der Firma Varian, Modell 3700, gekoppelt an den TEA 502 der Firma Thermo Electron. Der aus dem TEA ausgebaute Pyrolysator ist direkt an die Detektorbasis des Gaschromatographen angeflanscht. Als Trennsäule dienen zwei aneinander gekoppelte Hewlett-Packard Fused-Silica Kapillaren (10 m × 0,32 mm I.D.), Serie 530 u, 19095Z-121, beschichtet mit vernetztem Methylsilicon. Die so erhaltene 20 m Kapillare ist totvolumenfrei über eine unbeschichtete Fused-silica Staukapillare (I.D. 0,17 mm) mit dem Pyrolysator des TEA verbunden. Die Länge dieser Staukapillare ist so bemessen, dass der Vakuumdurchgriff in die Trennsäule weitgehendst verhindert und somit deren Trennleistung praktisch nicht beeinflusst wird. Die Staukapillare darf mit keiner flüssigen Trennphase beschichtet sein, da sich diese im Pyrolysator zersetzt und die Zersetzungsprodukte die Erfassung der tabakspezifischen N-Nitrosamine stören.

Um eine übermäßige Belastung der Trennkapillare durch Tabak- und Tabakrauchbestandteile zu verhindern, wird in den Glasinsert des Injektors des Gaschromatographen eine 1 cm hohe Schicht aus Chromosorb W 80-100 mesh, beschichtet mit 5% OV 101 zwischen zwei Glaswollpfropfen eingebracht.

Gaschromatographische Bedingungen: Trägergas: Helium, 7 ml/min; Injektortemperatur: 270°C; Ofentemperaturprogramm: Programm A: 80 bis 160°C, Aufheizrate 10°C/min, 160 bis 200°C ballistisch, 200 bis 250°C, Aufheizrate 5°C/min; Programm B: 60 bis 160°C, Aufheizrate 10°C/min, 160 bis 200°C ballistisch, 200 bis 250°C, Aufheizrate 5°C/min; Injektion: Splitlos, 1 µl.

TEA Bedingungen: Pyrolysatortemperatur: 480°C; Sauerstoffdruck: 0,11 Bar; Abschwächung: 32/10; Abtrennung der Pyrolyseprodukte vom NO mittels eines CTR-Gas-Stream-Filter (Thermo-Electron). Integrator: HP 3390A (Hewlett-Packard).

Tabake und Tabakrauch wurden unter Beachtung der Vorsichtsmassnahmen

zur Verhinderung der Artefaktbildung mittels Pufferlösungen extrahiert bzw. in ihnen niedergeschlagen⁸. Die N-Nitrosamine wurden anschliessend mit Dichlormethan aus der wässrigen Lösung ausgezogen, die Dichlormethanolösung nach Trocknung über Natriumsulfat eingeengt und im Falle des Tabaks direkt in den Gaschromatographen eingespritzt. Tabakrauchproben wurden hingegen in Anlehnung an bereits beschriebene Methoden aufgearbeitet^{8,12}. Nach einem Vorlauf von 200 ml Dichlormethan eluierten wir jedoch flüchtige und tabakspezifische N-Nitrosamine gemeinsam mit 250 ml Dichlormethan–Azeton (80:20) von der Aluminiumoxidsäule und injizierten sie nach dem Einengen in den Gaschromatographen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fig. 1 zeigt das Kapillargaschromatographie–TEA-Chromatogramm einer Testlösung flüchtiger und tabakspezifischer N-Nitrosamine. Die Konzentration beträgt für die flüchtigen Nitrosamine 10 ng/ml, für die tabakspezifischen 25 ng/ml. Bei einer Injektion von 1 μ l entspricht die Peakfläche des DMNA einer Absolutmenge von 10 pg, die des NNN 25 pg. Es ergeben sich somit für die flüchtigen N-Nitrosamine Nachweisgrenzen von einem bis 5 pg, für die tabakspezifischen Verbindungen NNN, NAB, NAT und NNK solche zwischen 6 und 15 pg.

Die N-Nitrosamine eines nitratreichen Burley-Tabaks sind in Fig. 2 dargestellt. In diesem finden sich flüchtige N-Nitrosamine nur in sub-ppb Mengen, der Gehalt an NNN, NAT, NAB und NNK liegt hingegen um Grössenordnungen höher. Neben dem bereits bekannten DMNA und NPYR haben wir einen Hinweis auf das Auftreten von NEMA gefunden. Der vor dem NPYR auftretende Peak scheint ebenfalls ein N-Nitrosamin zu sein, dessen Struktur uns derzeit noch nicht bekannt ist.

Ein weiteres Beispiel der Leistungsfähigkeit unseres Trennsystems bietet Fig. 3,

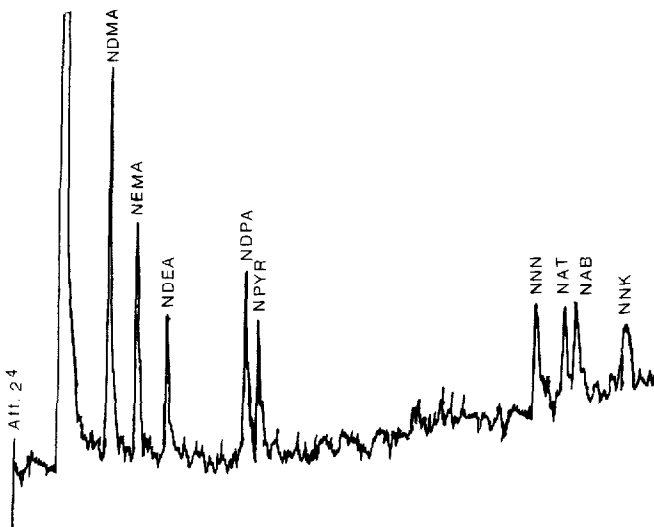


Fig. 1. Kapillargaschromatographie–TEA Chromatogramm einer Testmischung aus flüchtigen und tabakspezifischen N-Nitrosaminen. Temperaturprogramm A; Konzentrationen: Flüchtige N-Nitrosamine: 10 ng/ml Dichlormethan; Tabakspezifische N-Nitrosamine: 25 ng/ml Dichlormethan.

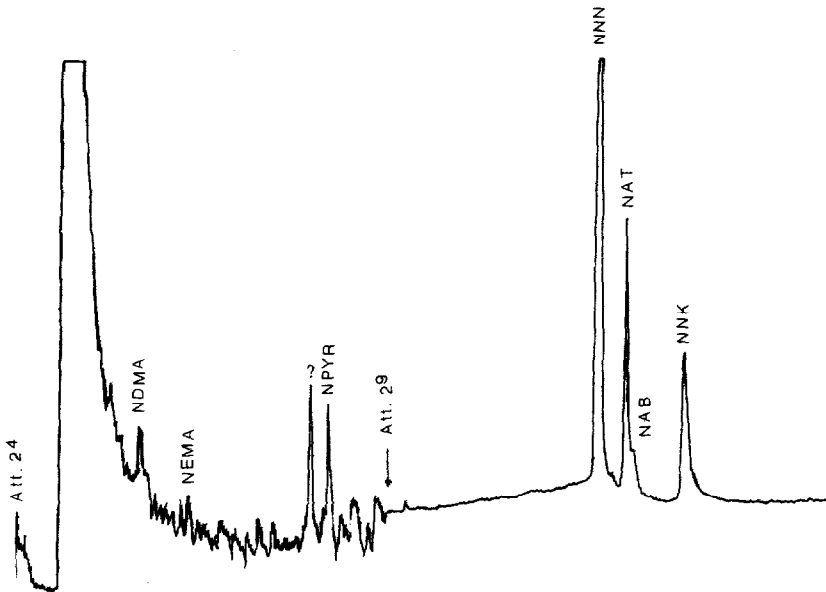


Fig. 2. Kapillargaschromatographie-TEA Chromatogramm flüchtiger und tabakspezifischer N-Nitrosamine eines Burley-Tabaks. Temperaturprogramm B.

in der die N-Nitrosamine des Hauptstromrauchs einer filterlosen Zigarette aus dunklen Tabaken dargestellt sind.

Zusammenfassend, das beschriebene kapillargaschromatographische Verfahren zur Bestimmung von N-Nitrosaminen mittels TEA-Detektion erlaubt die Erfassung von N-Nitrosaminen unterschiedlichster Polarität und über einen weiten Siede-

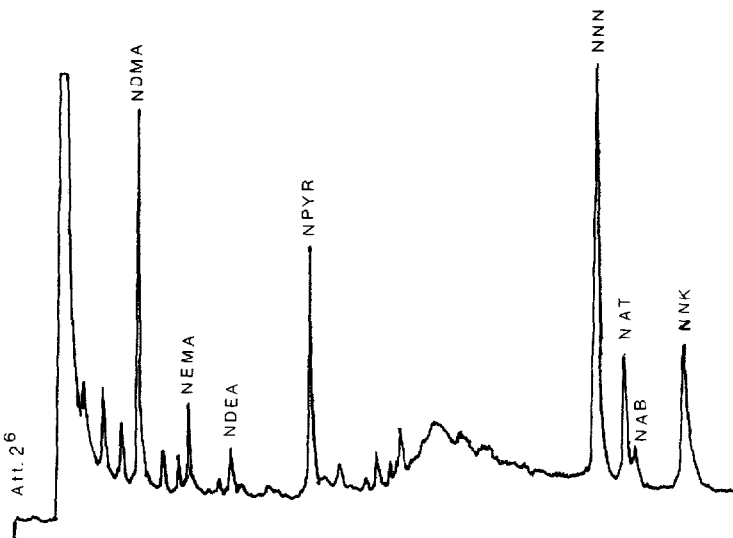


Fig. 3. Kapillargaschromatographie-TEA Chromatogramm flüchtiger und tabakspezifischer N-Nitrosamine des Hauptstromrauchs einer filterlosen Zigarette aus dunklen Tabaken. Temperaturprogramm B.

punktsbereich in einem Trenngang. Im Falle des Tabaks und des Tabakrauchs ist eine Vereinfachung des Analysenganges gegeben. Eine weitere Absenkung der bisher schon tiefen Nachweisgrenzen für diese Verbindungsklasse konnte ebenfalls erreicht werden.

LITERATUR

- 1 G. Eisenbrand, *N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt. Eigenschaften, Bildungswege, Nachweisverfahren und Vorkommen*, Wissenschaftl. Verlagsges. m.b.H., Stuttgart, 1981.
- 2 G. Neurath, B. Piermann, W. Lüttich und H. Wichern, *Beitr. Tabakforsch.*, 2 (1964) 311.
- 3 M. Pailer und H. Klus, *Fachliche Mitt. Austria Tabakwerke*, 12 (1971) 203.
- 4 H. Klus und H. Kuhn, *Fachliche Mitt. Austria Tabakwerke*, 14 (1973) 251.
- 5 D. Hoffmann, S. S. Hecht, R. M. Ornaf und E. L. Wynder, *Science*, 186 (1974) 256.
- 6 H. Klus und H. Kuhn, *Fachliche Mitt. Austria Tabakwerke*, 16 (1975) 256.
- 7 S. S. Hecht, I. Schmeltz und D. Hoffmann, *Recent Advanc. Tob. Sci.*, 3 (1977) 59.
- 8 D. Hoffmann, J. D. Adams, K. D. Brunnemann und S. S. Hecht, *Cancer Res.*, 39 (1979) 2505.
- 9 D. H. Fine, D. Lieb und F. Rufe, *J. Chromatogr.*, 107 (1975) 351.
- 10 G. Neurath, B. Pirmann, W. Lüttich und H. Wichern, *Beitr. Tabakforsch.*, 3 (1965) 251.
- 11 K. D. Brunnemann, L. Yu und D. Hoffmann, *Cancer Res.*, 37 (1977) 3218.
- 12 G. Stehlik, O. Richter und H. Altmann, *Ecotoxicol. Environm. Saf.*, 6 (1982) 495.
- 13 J. D. Adams, K. D. Brunnemann und D. Hoffmann, *J. Chromatogr.*, 256 (1983) 347.
- 14 T. A. Gough und K. Sudgen, *J. Chromatogr.*, 109 (1975) 265.
- 15 H. Kosaka, M. Kozumi und T. Nakajima, *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 54 (1984) 233.
- 16 W. J. Chamberlain und R. F. Arrendale, *J. Agric. Food. Chem.*, 31 (1983) 909.
- 17 K. Grolimund und H. M. Widmer, in H. Egan (Editor): *Environmental Carcinogens. Selected Methods of Analysis, Vol. 6, N-Nitroso-Compounds*, IARC Sci. Publ. 45, Lyon, 1983, p. 373.
- 18 S. S. Hecht, C. B. Chen, N. Hirota, R. H. Ornaf, T. C. Tso und D. Hoffmann, *J. Natl. Cancer Inst.*, 60 (1978) 819.
- 19 M. W. Hu, W. E. Bondinell und D. Hoffmann, *J. Labelled Comp.*, 10 (1974) 79.
- 20 S. S. Hecht, R. M. Ornaf und D. Hoffmann, *J. Natl. Cancer Inst.*, 54 (1975) 1237.