

Zur Frage der Bildung von Dimethylnitrosamin aus Tetracyclin-Derivaten bei der Nitrosierung in saurer Lösung

On the Problem of Dimethylnitrosamine Formation from Tetracycline-Derivatives
by Nitrosation Reaction in Acidic Medium

Harald Röper und Kurt Heyns

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg

(Z. Naturforsch. 32 c, 696–702 [1977]; eingegangen am 23. Juni 1977)

Minocycline, Doxycycline, Oxytetracycline, Anhydrochlorotetracycline, Dimethylnitrosamine

The hydrochlorides from tetracycline and six tetracycline derivatives* — 7-dimethylamino-6-desmethyl-6-desoxytetracycline [minocycline], 7-chlorotetracycline [chlorotetracycline], 7-chloro-anhydrochlorotetracycline [anhydrochlorotetracycline], 7-chloro-6-desmethyltetracycline [demethylchlorotetracycline], 5-hydroxytetracycline [oxytetracycline] and 6-desoxy-5-hydroxytetracycline [doxycycline] — were reacted with different amounts of sodium nitrite at 37 °C for two hours in aqueous buffer solutions at pH 2 and 4.

Dimethylnitrosamine formation was confirmed by gas-liquid chromatography and by combined gas-liquid chromatography/mass-spectrometry from minocycline, doxycycline, oxytetracycline and anhydrochlorotetracycline.

Dimethylnitrosamine formation from minocycline and doxycycline was blocked by ascorbic acid. The catalytic effect of sodium thiocyanate for the dimethylnitrosamine formation from minocycline and nitrite was investigated.

The different reactivity of the investigated tetracycline derivatives towards nitrite in acidic solutions is discussed by stereochemical considerations in connection with the formation of hydrogen bridge linkages. This hypothesis was confirmed by dimethylnitrosamine formation from anhydrochlorotetracycline and sodium nitrite at pH 2.

Einleitung

Nicht nur sekundäre Amine, sondern auch tertiäre Amine vermögen mit Nitrit in saurer Lösung unter Bildung von Nitrosaminen zu reagieren. Die Bildung von Diäthylnitrosamin aus Triäthylamin und salpetriger Säure wurde erstmals von Geuther¹ beschrieben. Einen Mechanismus für diese desalkylierende Nitrosierung schlugen Smith *et al.*^{2, 3} vor. Endprodukte dieser Reaktion sind ein Nitrosamin und eine Carbonylverbindung. Über die Historie der Reaktion berichtet Hein⁴.

Nahezu alle im Tierversuch getesteten Nitrosamine erwiesen sich als kanzerogen^{5–7}. Eine Gefährdung des Menschen durch diese chemischen Karzinogene gilt als wahrscheinlich.

Nitrosamine wurden mit zuverlässigen analytischen Methoden im Bereich 0,1–80 ppb vereinzelt in Lebensmittelproben nachgewiesen⁸. Es waren dies Dimethylnitrosamin, Diäthylnitrosamin und Nitroso-pyrrolidin.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Harald Röper, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität, Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13.

* Bei einigen Verbindungsnamen im Text handelt es sich um eingetragene Warenzeichen.

Neben diesen präformierten Nitrosaminen, die z. B. mit der Nahrung aufgenommen werden können, gilt die Aufmerksamkeit seit längerer Zeit auch den Vorstufen von Nitrosaminen, also Verbindungen mit sekundärer oder tertiärer Aminstruktur und Nitraten und Nitriten⁹, besonders nachdem eine Nitrosamin-Synthese im Tiermagen aus sekundärem Amin und Nitrit nachgewiesen wurde¹⁰. Bei den Verbindungen mit tertiärer Aminstruktur stehen aliphatische Amine^{11–13}, aber auch bestimmte Pesticide^{14, 15} und Arzneimittel^{16–18} im Mittelpunkt des Interesses.

Das Ausbeutemaximum der Nitrosaminbildung aus sekundären Aminen^{10, 19} und tertiären Aminen¹¹ liegt bei pH 3. In engem Zusammenhang mit den kinetischen Untersuchungen stehen Experimente mit Katalysatoren und Hemmstoffen einer Nitrosamin-Synthese *in vitro* und *in vivo*.

Thiocyanat-Anionen katalysierten die Nitrosamin-Synthese *in vitro*^{20–22} und *in vivo*²³. Auch die Bildung von Dimethylnitrosamin aus Aminopyrin, einem tertiären Amin, mit Nitrit in saurer Lösung wird durch Thiocyanat-Ionen katalysiert²⁴. Thiocyanat ist im menschlichen Speichel vorhanden²⁵. Eine Katalyse der Nitrosamin-Synthese im neutralen und basischen Medium durch Carbonylverbindungen



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

wurde von Keefer bewiesen^{26, 27}. Er diskutierte auch die Möglichkeit einer Katalyse durch Metallionen²⁸.

Als Hemmstoffe einer Nitrosamin-Synthese im Magen aus Aminen und Nitrit sind natürliche „Nitrit-Fänger“, wie primäre Amine, Aminosäuren²⁹, Proteine^{30, 31}, Phenole³², Tannine³³ u. a. zu nennen. Die Ascorbinsäure wurde erstmals von Mirvish³⁴ als Hemmstoff einer Nitrosamin-Synthese *in vitro* erkannt. Er wies diese Hemmung bei der Nitrosierung sekundärer und tertiärer Amine, z. B. Oxytetracyclin, nach³⁵. Sie beruht auf einer schnellen Reaktion der Ascorbinsäure mit Nitrit³⁶.

Die Bildung von Dimethylnitrosamin aus einem Tetracyclin-Antibiotikum (Oxytetracyclin) und Nitrit in saurer Lösung wurde erstmals von Lijinsky *et al.*^{16, 17} nachgewiesen. Das Ergebnis wurde von Mirvish³⁴ und Rao¹⁸ bestätigt. Diese *in vitro* Modell-Versuche wurden insbesondere hinsichtlich der gewählten Nitrit-Konzentrationen unter nicht-physiologischen Bedingungen durchgeführt. Die Ausbeuten an Dimethylnitrosamin waren dabei relativ hoch.

Das Ausbeutemaximum der Nitrosamin-Bildung wurde zwischen pH 3 und pH 4 gefunden. Scheunig und Ziebart³⁷ wählten als Reaktionsmedium Magensaft. Die eingesetzten Mengen an Nitrit³⁸ entsprachen eher realen physiologischen Verhältnissen im menschlichen Magen. Eine Bildung von Dimethylnitrosamin konnte nicht nachgewiesen werden. Umfassende *in vitro* Nitrosierungsexperimente am Oxytetracyclin unter simulierten „magenähnlichen“ Bedingungen in wäßrigem Milieu wurden von einer Arbeitsgruppe der Fa. Hoechst AG³⁹ durchgeführt. Die Ausbeuten an Dimethylnitrosamin, bezogen auf eingesetztes Oxytetracyclin, betragen 0,002 – 0,05%.

In verschiedenen Übersichtsartikeln wird über die Nitrosamin-Problematik berichtet^{40–45}.

Wir haben eine Reihe von Tetracyclin-Derivaten vergleichend auf eine mögliche Dimethylnitrosamin-Bildung in Gegenwart von Nitrit untersucht (Tab. I). Es wurde versucht, die Versuchsparameter dieser *in vitro* Nitrosierungsreaktionen denen anzugeleichen, die unter bestimmten Bedingungen auch im menschlichen Magen auftreten können (Tetracyclin- und Nitrit-Konzentrationen, pH-Bedingungen, Temperatur, Reaktionszeit). Auch der katalytische Einfluß von Thiocyanat-Ionen und der hemmende Effekt von Ascorbinsäure auf eine Dimethylnitrosamin-Bildung unter physiologischen Konzentrationsverhältnissen wurden in die Untersuchungen einbezogen. Hierbei können die tatsächlichen Verhältnisse im Magen mit

diesen Reaktionen nur teilweise simuliert werden. Sie sind jedoch für die Abschätzung einer möglichen Gefährdung des Menschen durch eine *in vivo* Bildung von kanzerogenem Dimethylnitrosamin aus Tetracyclinen und Nitrit im Magen wichtig.

Materialien und Methoden

Tetracycline (Tab. I)

Tetracyclin (Achromycin HCl), Minocyclin (Minocyclin HCl), 7-Chlortetracyclin (Aureomycin HCl) und Demethylchlortetracyclin (Ledermycin HCl) wurden von der Fa. Lederle-Cyanamid, Oxytetracyclin HCl von der Fa. Hoechst und Doxycyclin HCl von der Fa. Pfizer zur Verfügung gestellt.

Anhydrochlortetracyclin (Anhydroaureomycin HCl) wurde nach der Vorschrift von Stephens *et al.*⁴⁶ präparativ dargestellt. Die Schmelzpunkte stimmen mit Literaturangaben überein. Die eingesetzten Tetracyclin-Mengen entsprechen etwa den in der Therapie applizierten höchsten Einzeldosen (Tab. II.) Alle Reagentien und Lösungsmittel erwiesen sich als frei von Amin- und Nitrosamin-Verunreinigungen.

Natriumnitrit

Es wurde Natriumnitrit p.a. (Fa. Merck) eingesetzt. 10 ppm (mg/kg) NaNO₂ werden im menschlichen Magen bei normaler Ernährung nicht überschritten⁴⁷. Eine bakterielle Reduktion von Nitrat zu Nitrit ist bei dem niedrigen Magen-pH eingeschränkt.

Die mittlere Nitrataufnahme eines US-Bürgers wurde von White⁴⁸ auf 106 mg Nitrat/Tag geschätzt. Zwei Drittel des Nitrits, das den Magen erreicht, kann aus dem Speichel herühren, ein Drittel aus gepökelten Fleisch-Produkten. Der Nitritgehalt des menschlichen Speichels kann bei übermäßiger und einseitiger Nahrungsaufnahme bis zu 300 ppm (z. B. bei Genuss von Portulak) betragen⁴⁹. Über Nitrat- und Nitritgehalte von Lebensmitteln und Trinkwässern wurde berichtet^{50–52}.

Die in den Modellversuchen eingesetzten Mengen von Natriumnitrit betrugen 30 mg, 20 mg, 10 mg und 1 mg in je 100 ml Reaktionslösung. Dies entspricht 300 ppm, 200 ppm, 100 ppm und 10 ppm NaNO₂ in dem Reaktionsansatz (Tab. II).

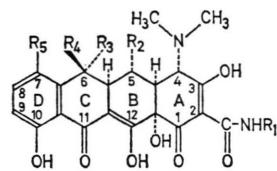
Reaktionsbedingungen

Das Volumen des Mageninhaltes beim Menschen beträgt etwa 50 ml im nüchternen Zustand und 500 ml nach Einnahme einer normalen Mahlzeit.

Der pH-Wert normal aciden Mageninhalts liegt bei etwa pH 2. Bei Anacidose sind die pH-Werte zu höheren Werten verschoben. Das pH-abhängige Ausbeutemaximum der Dimethylnitrosamin-Bildung

Tab. I. Hinsichtlich einer möglichen Dimethylnitrosamin-Bildung untersuchte Tetracyclin-Antibiotika⁵⁵.

Handels-präparate	Antibiotikum	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Untersuchte Präparate
		H	H	CH ₃	OH	H	
Achromycin, Hostacyclin, Tetracyclin u. a.	Tetracyclin	H	H	CH ₃	OH	H	Achromycin HCl 98%, MG 480,9 Batch 6070 D 4,74
Minocin	7-Dimethylamino-6-desmethyl-6-desoxy-tetracyclin [Minocyclin]	H	H	H	H	N(CH ₂) ₃	Minocyclin HCl 81,9%, MG 493,94 Batch 198 4,74
Aureomycin u. a.	7-Chlor-tetracyclin [Chlortetracyclin]	H	H	CH ₃	OH	Cl	Aureomycin HCl 97,2%, MG 515,34 Batch 3234 E 10,74
Ledermycin u. a.	7-Chlor-6-desmethyl-tetracyclin [Demethylchlortetracyclin]	H	H	H	OH	Cl	Ledermycin HCl 95,6%, MG 501,32 Batch 738 10,74
Terramycin u. a.	5-Hydroxy-tetracyclin [Oxytetracyclin]	H	OH	CH ₃	OH	H	Freie Base MG 460,44 Hydrochlorid MG 496,90
Vibramycin	6-Desoxy-5-hydroxy-tetracyclin [Doxycyclin]	H	OH	CH ₃	H	H	Doxycyclin HCl MG 480,9 lot 636-58146



aus Oxytetracyclin wurde zwischen pH 3 und pH 4 gefunden^{16–18}.

Die Nitrosierungsexperimente wurden jeweils in 100 ml Volumina wäßriger Pufferlösungen von pH 2 und pH 4 (s. u.) durchgeführt. Es wurde 2 Stunden lang bei 37 °C umgesetzt. Die Reaktionen wurden in 250 ml Rundkolben (NS 29) mit Rückflußkühler durchgeführt.

0,1 M Natriumcitratpuffer (pH 2)

58,82 g Natriumcitrat 2 H₂O (Fa. Merck) wurden in einem 2 l Meßkolben mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mit 49,2 ml konz. HCl auf pH 2 eingestellt (Glaselektrode).

0,2 M Natriumacetatpuffer (pH 4)

54,4 g Natriumacetat 3 H₂O (Fa. Merck) wurden in einem 2 l Meßkolben mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mit 26,3 ml konz. HCl auf pH 4 eingestellt (Glaselektrode).

Katalyse durch Thiocyanat-Ionen

Der Speichel von Nichtrauchern enthält 0,5 – 1,0 mM Thiocyanat im Liter, der von Rauchern kann bis zu 5,0 mM im Liter enthalten²⁵. Nach Boyland²¹ sekretiert ein Mensch 330 – 1000 ml Speichel und

2000 – 3000 ml Magensaft pro Tag. Der Speichel wird im Magen durch Magensaft, Nahrung und Getränke verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wird auf 5 – 10 geschätzt.

Bei Nichtrauchern mit 1,0 mM Thiocyanat im Liter Speichel entspricht dies bei einem Verdünnungsfaktor von 10 etwa einer Konzentration von 0,1 mM Thiocyanat pro Liter im Magen (8,1 mg NaSCN/1 l). Bei Rauchern mit 5,0 mM Thiocyanat im Liter Speichel entspricht dies bei einem Verdünnungsfaktor von 10 einer Konzentration von 0,5 mM Thiocyanat pro Liter im Magen (40,5 mg NaSCN/1 l). Diese Thiocyanat-Konzentrationen wurden bei den Katalyse-Experimenten zugrunde gelegt.

Hemmung durch Ascorbinsäure

Bei diesen Experimenten wurde Ascorbinsäure (Fa. Merck) in molarem oder doppelt molarem Verhältnis zum verwendeten Nitrit zugesetzt. Eine Zusammenstellung der Experimente zeigt Tab. II.

Nitrosamin-Analytik

- Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Proben. Wiederfindungsrate

Nach beendet Reaktion wurden die Reaktionsansätze mit 3 g NaOH alkaliert, mit NaCl gesättigt

Tab. II. Versuche und Ergebnisse zur entalkylierenden Nitrosierung von Tetracyclin-Derivaten mit Natriumnitrit in saurer Lösung unter Bildung von Dimethylnitrosamin*.

Tetracyclin-Derivat	NaNO ₂						DMNA-Gesamt-ausbeute ** (gaschromato-graphisch)	[μg]	[%]	GC/ MS
	[mg]	[mM]	[mg]	[mM]	[ppm]	pH				
Achromycin HCl	200	0,42	30	0,44	300	2		—	—	—
	200	0,42	10	0,15	100	2		—	—	—
	200	0,42	1	0,015	10	4		—	—	—
	200	0,42	30	0,44	300	4		—	—	—
	200	0,42	10	0,15	100	4		—	—	—
	200	0,42	1	0,015	10	4		—	—	—
Aureomycin HCl	200	0,39	30	0,44	300	2		—	—	—
	200	0,39	30	0,44	300	4		—	—	—
Anhydroaureo-mycin HCl	170	0,34	30	0,44	300	2		7,0	0,02	+
Ledermycin HCl	200	0,40	30	0,44	300	2		—	—	—
	200	0,40	30	0,44	300	4		—	—	—
Minocyclin HCl	250	0,51	30	0,44	300	2		750, 660, 734	2,0; 1,8; 2,0	+
	250	0,51	20	0,29	200	2		304	0,9	+
	250	0,51	10	0,15	100	2		220, 170, 243	0,6; 0,5; 0,7	+
	250	0,51	1	0,015	10	2		20	0,05	+
	250	0,51	30	0,44	300	4		420, 490	1,1; 1,3	+
	250	0,51	10	0,15	100	4		440	1,2	+
	250	0,51	1	0,015	10	4		83	0,2	+
	250	0,51	10	0,15	100	2	4 mg NaSCN *** [0,5 mM/1]	183	0,5	+
	250	0,51	10	0,15	100	2	1 mg NaSCN [0,123 mM/1]	228	0,6	
	250	0,51	30	0,44	300	2	77,4 mg Ascorbin-säure *** [0,44 mM]	21, 24	0,06; 0,07	+
	250	0,51	30	0,44	300	2	154,8 mg Ascorbin-säure [0,88 mM]	— —	—	
Oxytetracyclin HCl	250	0,50	30	0,44	300	2		30	0,08	+
Doxycyclin HCl	216,4	0,45	30	0,44	300	2	154,8 mg Ascorbin-säure	12, 9	0,04; 0,03	+
	216,4	0,45	30	0,44	300	2	—, —	—	—	—

* Alle Reaktionen wurden in einem Puffervolumen von 100 ml, bei 37 °C, 2 Stunden lang unter Rühren durchgeführt.

** Die Ausbeuten an Dimethylnitrosamin sind auf die eingesetzten Tetracyclinhydrochloride bezogen.

*** Reihenfolge der Komponentenzugabe: Minocyclin HCl, Ascorbinsäure, Nitrit bzw. Minocyclin HCl, NaSCN, NaNO₂.

— : DMNA nicht nachgewiesen.

Der Nachweis von DMNA durch GC/MS-Analyse erfolgte beim Anhydroaureomycin und Doxycyclin aus weiter auf konzentrierten Lösungen.

tig und einer Wasserdampfdestillation unterworfen. 150 ml wäßriges Destillat wurden aufgefangen und mit 2 ml konz. H₂SO₄ angesäuert. Nach Sättigung der Lösung mit NaCl wurde mit 3 × 10 ml CH₂Cl₂ (Uvasol für Fluoreszenzspektroskopie, Fa. Merck) extrahiert. Die vereinigten CH₂Cl₂-Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Im schwachen Stickstoffstrom wurde zuerst auf ein Volumen von 8 ml und nach Zugabe von 2 ml n-Hexan p. a. (Fa. Merck) auf ein Endvolumen von 1 ml (geeichter

Meßkolben) eingeeengt. Je 1 μl der CH₂Cl₂-Extrakte wurde gaschromatographisch (s. u.) analysiert.

Die Wiederfindungsrate wurde mit Dimethylnitrosamin-Lösungen bekannten Nitrosamingehaltes bestimmt. Sie beträgt 66%.

b) Quantitative Nitrosamin-Bestimmung mit Gaschromatographie. Nachweisgrenze

Die quantitativen Dimethylnitrosamin-Bestimmungen erfolgten gaschromatographisch an einem

Gaschromatographen, Modell Fractovap 2101 (Fa. Carlo-Erba), mit Flammenionisationsdetektor unter folgenden Arbeitsbedingungen: 2 m Glassäule [ϕ_a : 6 mm, ϕ_i : 2 mm] gepackt mit 15% Carbowax 4000 + 3% KOH auf Kieselgur 60/100 mesh (Fa. Perkin-Elmer). N₂-Strömung: 30 ml/min (100 °C), Säulentemperatur: 140 °C (isotherm), Detektor-Abschwächung: 1/16.

Die Gesamttretentionszeit von Dimethylnitrosamin beträgt unter diesen Bedingungen 233 sec.

Die quantitativen Dimethylnitrosamin-Bedingungen erfolgten mit Hilfe eines Computer-Integrators, Modell: Autolab System I (Fa. Spectra-Physics) nach der „Externen-Standard-Methode“. Die aus den Nitrosierungsansätzen gemessenen Dimethylnitrosamin-Mengen wurden hinsichtlich der Wiederfindungsrate korrigiert (Tab. II). Die Nachweisgrenze des Detektors (FID) betrug unter den Analysebedingungen ~3 ng Dimethylnitrosamin/1 µl CH₂Cl₂-Lösung.

c) Nachweis von Dimethylnitrosamin mit Gaschromatographie / Massenspektrometrie. Nachweisgrenze

Die eindeutige Identifizierung gebildeten Dimethylnitrosamins erfolgte durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie an einem GC/MS-System, Modell MAT 111 (Fa. Varian MAT), unter folgenden Arbeitsbedingungen: 3 m Glassäule [ϕ_a : 3,18 mm, ϕ_i : 1,7 mm] gepackt mit der unter b) erwähnten Phase. He-Strömung: 15 ml/min (25 °C), Säulentemperatur: 100 °C, Elektronenenergie: 80 eV, Elektronenstrom: 270 µA.

Bei der GC/MS-Analyse war von 15 ng Dimethylnitrosamin in der Ionenquelle noch ein einwandfreies Massenspektrum zu erhalten.

Diskussion der Ergebnisse

Auffällig ist, daß von den fünf erstmals untersuchten und im Handel befindlichen Tetracyclin-Derivaten (Tab. II) unter nahezu identischen Reaktionsbedingungen nur das Minocyclin HCl und das Doxycyclin HCl mit Nitrit in saurem Medium, je nach pH-Bedingungen und gewählten Nitrit-Konzentrationen, unterschiedliche Mengen an Dimethylnitrosamin bilden. Die Ausbeuten, bezogen auf eingesetztes Minocyclin HCl betragen 0,05 – 2,0% der Theorie, auf eingesetztes Doxycyclin HCl 0,03, 0,04% der Theorie.

Beim Minocyclin HCl ist der Abfall der Nitrosamin-Ausbeuten mit sinkender Nitrit-Konzentration bei konstanter Minocyclin HCl-Konzentration aus der Kinetik der Reaktion zu erklären.

Die Nitrosamin-Ausbeuten liegen für die Versuche mit 30 mg NaNO₂ bei pH 2 höher (1,8 – 2,0%), als bei pH 4 (1,1; 1,3%). Für die mit 10 mg und 1 mg NaNO₂ sind die Nitrosamin-Ausbeuten bei pH 4 höher (1,2% bzw. 0,2%) als bei pH 2 (0,5 – 0,7% bzw. 0,05%). Diese Befunde sind durch unterschiedliche Reaktionsmechanismen und Kinetik der Reaktion bei veränderten Konzentrationen zu erklären.

Die Nitrosierungsversuche mit Minocyclin HCl unter Thiocyanat-Katalyse, entsprechend den Konzentrationen im Raucher- bzw. Nichtrauchermagen, mit 0,5 mM NaSCN/l bzw. 0,123 mM NaSCN/l und 100 ppm NaNO₂ bei pH 2 zeigen nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden bei 37 °C keinen Unterschied in der Nitrosamin-Ausbeute (0,5% und 0,6%) im Vergleich zur nicht katalysierten Reaktion (0,5 – 0,7%). Da das gebildete Nitrosamin nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden gemessen wurde, ist jedoch nicht auszuschließen, daß eine Beschleunigung der Reaktion in der ersten Reaktionsphase auftritt.

Die Versuche zur Hemmung der Dimethylnitrosamin-Bildung mit Ascorbinsäure zeigen deutliche Effekte. Bei molarem Verhältnis von Ascorbinsäure und Nitrit wird eine Hemmung der Nitrosamin-Bildung von 97% beobachtet. Bei der Umsetzung von Minocyclin HCl mit einem molaren Verhältnis von Ascorbinsäure und Natriumnitrit von 2 : 1 wird eine 100% Hemmung der Nitrosamin-Bildung beobachtet. Der gleiche Effekt wurde beim Doxycyclin HCl nachgewiesen. Die zum Vergleich durchgeführte Reaktion mit 250 mg Oxytetracyclin HCl ergab eine Dimethylnitrosaminausbeute von 0,08% (30 µg). Ergebnis und Reaktionsbedingungen sind denen der Hoehster Gruppe³⁹ ähnlich. Unter identischen Reaktionsbedingungen wurden aus 250 mg Minocyclin HCl im Mittel 710 µg Dimethylnitrosamin nachgewiesen, also im Vergleich zum Oxytetracyclin HCl die 24fache Menge. Eine abschließende Beurteilung dieser Ergebnisse als Risikofaktor für den Menschen ist zur Zeit nicht möglich. Im Realfall, d. h. im menschlichen Magen ist das Reaktionsgeschehen sehr komplex. Im Magensaft, vor allem im Speisebrei werden eine Reihe von Substanzen, z. B. Amine, Aminosäuren, Proteine, Phenole u. a., mit dem Tetracyclin-Derivat um das nitrosierende Agens konkurrieren und teilweise auch verbrauchen. Dadurch würde die Nitrosamin-Ausbeute noch herabgesetzt, vielleicht dessen Bildung, wie durch die Ascorbinsäure, vollständig verhindert.

Bis zur Klärung dieser Problematik wird als Präventivmaßnahme die gleichzeitige Applikation von Ascorbinsäure empfohlen, um eine mögliche endogene Dimethylnitrosamin-Bildung im Magen zu hemmen.

Eine Erklärung für die unterschiedliche Reaktivität der untersuchten Textracyclin-Derivate gegenüber Nitrit in sauren Pufferlösungen im Hinblick auf eine Dimethylnitrosamin-Bildung läßt sich in folgender Weise geben (Tab. I):

Achromycin, Aureomycin und Ledermycin tragen als Rest R₄ an C-6 eine OH-Gruppe. Es ist anzunehmen, daß die Tetracyclinhydrochloride in Lösung zu einem geringen Teil mit den freien Tetracyclinbasen im Dissoziationsgleichgewicht stehen. Am Molekülmodell läßt sich zeigen, daß bei den genannten Verbindungen die OH-Gruppen an C-6 (Ring C) mit der epimerisierten Dimethylaminogruppe an C-4 (Ring A) intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Derartige reversible Epimerisierungen bei Tetracyclinen in Pufferlösungen zwischen pH 2 und pH 6 sind untersucht⁵³. Ein elektrophiler Angriff von NO⁺ auf das freie Elektronenpaar der Dimethylaminogruppe ist behindert.

Die Gültigkeit dieser Arbeitshypothese wurde exemplarisch am Aureomycin HCl durch das Experiment belegt. Die für die Wasserstoffbrücke verantwortliche OH-Gruppe an C-6 wurde in saurer Lösung unter Bildung von Anhydroaureomycin eliminiert^{46, 54}. Dieses Tetracyclin-Derivat wurde unter Standardbedingungen mit Nitrit bei pH 2 umgesetzt. Die Bildung von Dimethylnitrosamin wurde massenspektrometrisch nachgewiesen (Tab. II).

Im folgenden werden die Verhältnisse bei den Tetracyclin-Derivaten erörtert, bei denen eine Dimethylnitrosamin-Bildung nachgewiesen wurde:

- ¹ A. Geuther, Arch. Pharm. **173**, 200 [1865]; **180**, 56 [1867].
- ² P. A. S. Smith u. H. G. Pars, J. Org. Chem. **24**, 1325 [1959].
- ³ P. A. S. Smith u. R. N. Loewky, J. Am. Chem. Soc. **89**, 1147 [1967].
- ⁴ G. E. Hein, J. Chem. Education **40**, 181 [1963].
- ⁵ P. N. Magee u. J. M. Barnes, Brit. J. Cancer **10**, 114 [1956].
- ⁶ P. N. Magee u. J. M. Barnes, Advanc. Cancer Res. **10**, 163 [1967].
- ⁷ H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovic u. D. Schmähl, Z. Krebsforsch. **69**, 103 [1967].
- ⁸ Sammlung analytischer Daten aus der Literatur, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1975.
- ⁹ W. Lijinsky u. S. S. Epstein, Nature **225**, 21 [1970].

Das Minocyclin trägt als R₄ an C-6 Wasserstoff. Eine intramolekulare Wasserstoffbrücke kann nicht ausgebildet werden. Eine Dimethylnitrosamin-Bildung ist möglich (2,0%).

Die Bildung von Dimethylnitrosamin aus Oxytetracyclin mit R₂ an C-5 und R₄ an C-6 = OH steht nicht im Widerspruch zu diesen Überlegungen. Die beiden OH-Gruppen bilden gegenseitig intramolekulare Wasserstoffbrücken aus. Dadurch bleibt das Elektronenpaar am Stickstoff der epi-Dimethylaminogruppe für einen elektrophilen Angriff von NO⁺ frei. Die geringeren Nitrosamin-Ausbeuten, im Vergleich zum Minocyclin lassen sich dadurch erklären, daß beim Oxytetracyclin noch eine zweite intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der OH-Gruppe an C-5 und der Dimethylaminogruppe an C-4 in der normalen Anordnung ausgebildet wird. NO⁺ kann nur an die freie Dimethylaminogruppe, d. h. den epimerisierten Anteil der Ausgangsverbindung angreifen.

Die letztere Überlegung gilt auch für das Doxycyclin. Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der OH-Gruppe an C-5 und dem Stickstoff des Anteils der Dimethylaminogruppe an C-4 in der normalen Konfiguration im Epimerisierungsgleichgewicht.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Lauschner (Fa. Cyanamid-Lederle), Herrn Dr. Berscheid (Fa. Hoechst AG) und Herrn Prof. Dr. Schoog (Fa. Pfizer) danken wir für die Überlassung der Tetracyclin-Derivate und Diskussionen.

- ¹⁰ J. Sander, F. Schweinsberg u. H. P. Menz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **349**, 1691 [1968].
- ¹¹ F. Schweinsberg u. J. Sander, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 1671 [1972].
- ¹² W. Fiddler, J. W. Pensabene, R. C. Doerr u. A. E. Wassermann, Nature **236**, 307 [1972].
- ¹³ W. Lijinsky u. G. M. Singer, N-Nitroso Compounds in the Environment, IARC Scientific Publications No. **9**, p. 111, Lyon 1974.
- ¹⁴ G. Eisenbrand, O. Ungerer u. R. Preussmann, N-Nitroso Compounds in the Environment, IARC Scientific Publications No. **9**, p. 71, Lyon 1974.
- ¹⁵ N. P. Sen, B. A. Donaldson u. C. Charbonneau, N-Nitroso Compounds in the Environment, IARC Scientific Publications No. **9**, p. 75, Lyon 1974.
- ¹⁶ W. Lijinsky, E. Conrad u. R. van de Bogart, Nature **239**, 165 [1972].

- ¹⁷ W. Lijinsky, E. Conrad u. R. van de Bogart, N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, IARC Scientific Publications No. 3, p. 130, Lyon 1972.
- ¹⁸ G. S. Rao u. G. Krishna, J. Pharm. Sciences **64**, 1579 [1975].
- ¹⁹ S. S. Mirvish, N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, IARC Scientific Publications No. 3, p. 104, Lyon 1972.
- ²⁰ E. Boyland, E. Nice u. K. Williams, Fd. Cosmet. Toxic. **9**, 639 [1971].
- ²¹ E. Boyland, N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, IARC Scientific Publications No. 3, p. 124, Lyon 1972.
- ²² E. Boyland u. S. A. Walker, N-Nitroso Compounds in the Environment, IARC Scientific Publications No. 9, p. 132, Lyon 1974.
- ²³ F. Schweihsberg, Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A **227**, 121 [1974].
- ²⁴ E. Boyland u. S. A. Walker, Arzneimittelforsch. **24**, 1181 [1974].
- ²⁵ H. Schiavelbein, E. Werle, E. K. Shulz u. R. Baumeister, Arch. Pharmak. exp. Path. **272**, 358 [1969].
- ²⁶ L. K. Keefer u. P. P. Roller, Science **181**, 1245 [1973].
- ²⁷ P. P. Roller u. L. K. Keefer, N-Nitroso Compounds in the Environment, IARC Scientific Publications No. 9, p. 86, Lyon 1974.
- ²⁸ L. K. Keefer, Environmental N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, IARC Scientific Publications No. 14, p. 153, Lyon 1976.
- ²⁹ K. Heyns u. W. Königsdorf, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **290**, 171 [1952].
- ³⁰ K. Heyns u.O. F. Woysch, Chem. Ber. **86**, 76 [1953].
- ³¹ M. E. Knowles, D. J. McWeeny, L. Couchman u. M. Thorogood, Nature **247**, 288 [1974].
- ³² B. C. Challis, Nature **244**, 466 [1973].
- ³³ P. Bogovski, M. Castegnaro, B. Pignatelli u. E. A. Walker, N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, IARC Scientific Publications No. 3, p. 127, Lyon 1972.
- ³⁴ S. S. Mirvish, L. Wallcave, M. Eagen u. P. Shubik, Science **177**, 65 [1972].
- ³⁵ S. S. Mirvish, Ann. N. Y. Acad. Sci. **258**, 175 [1975].
- ³⁶ H. Dahn, L. Loewe u. C. A. Bunton, Helv. Chim. Acta **43**, 320 [1960].
- ³⁷ G. Scheunig u. D. Ziebarth, Environmental N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, IARC Scientific Publications No. 14, p. 269, Lyon 1976.
- ³⁸ J. Sander, Arch. Hyg. **151**, 22 [1967].
- ³⁹ H. G. Berscheid, H.-W. Fehlhaber, H. Fuchs, M. Girg, W. Hofmann u. E. Schütz (Fa. Hoechst AG., Pharma Forschung), Untersuchungen zur Reaktion von Nitrit mit Arzneimitteln: In vitro und in vivo Versuche mit tertiären Aminen (Publikation in Vorbereitung).
- ⁴⁰ J. Sander u. F. Schweihsberg, Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B **156**, 229 [1972].
- ⁴¹ K. Möhler, O. L. Mayrhofer u. E. Hallermayer, Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch. **150**, 1 [1972].
- ⁴² N. P. Sen, Toxic Constituents of Animal Foodstuffs, p. 131–194, Academic Press Inc. 1974.
- ⁴³ R. A. Scanlan, Critical Reviews in Food Technology, p. 367, April 1975.
- ⁴⁴ C. Heidelberger, Ann. Rev. Biochemistry **44**, 99 [1975].
- ⁴⁵ N. T. Crosby u. R. Sawyer, Advances in Food Research **22**, 1 [1976].
- ⁴⁶ C. R. Stephens, L. H. Conover, R. Pasternack, F. A. Hochstein, W. T. Moreland, P. P. Regna, F. J. Pilgrim, K. J. Brunings u. R. B. Woodward, J. Am. Chem. Soc. **76**, 3568 [1954].
- ⁴⁷ C. L. Walters, M. J. Saxby u. B. E. Newton, N-Nitroso Compounds Analysis and Formation, IARC Scientific Publications No. 3, 122, Lyon 1972.
- ⁴⁸ J. W. White, J. Agr. Food Chem. **23**, 886 [1975].
- ⁴⁹ P. L. Schuller u. H. Nieuwenhuys, Rijks Instituut voor de Volksgezondheid, Bilthoven, Niederlande (persönliche Mitteilung).
- ⁵⁰ K. Herrmann, Ernährungs. Umschau **11**, 398 [1972].
- ⁵¹ E. Bohm, Deutsche Lebensmittel Rundschau **62**, 293 [1962].
- ⁵² K. Lang, Biochemie der Ernährung, 3. Aufl., Dr. Dietrich Steinkopff-Verlag, Darmstadt, p. 365.
- ⁵³ J. R. D. McCormick, S. M. Fox, L. L. Smith, B. A. Bitler, J. Reichenthal, V. E. Origoni, W. H. Muller, R. Winterbottom u. A. P. Doerschuk, J. Am. Chem. Soc. **79**, 2849 [1957].
- ⁵⁴ C. W. Waller, B. L. Hutchings, R. W. Borschard, A. A. Goldman, W. J. Stein, C. F. Wolf u. J. H. Williams, J. Am. Chem. Soc. **74**, 4981 [1952].
- ⁵⁵ R. Reiner, Antibiotika, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.