

Eine Methode zum Nachweis von Nitrosaminen

Von JOHANNES SANDER

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen* (Direktor: Prof. Dr. R.-E. Bader)

(Der Schriftleitung zugegangen am 16. März 1967)

Zusammenfassung: Die photochemische Nitritabspaltung aus Nitrosaminen mit langwelligen UV-Strahlen in alkalischer Lösung wurde untersucht. Ihre Anwendung als ein Nitrosamin-Nachweis

hoher Spezifität und Empfindlichkeit wurde dargestellt. Das Verfahren erwies sich als brauchbar, um damit qualitative und quantitative Untersuchungen durchzuführen.

Summary: Nitrite is produced from nitrosamines by irradiation with long wave ultra-violet in alkaline solution. This reaction forms a highly specific and

sensitive test for nitrosamines. Less than 1 μg of a nitrosamine can be measured, and the method is suitable for qualitative and quantitative studies.

In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Nitrosamine im Tierversuch als starke Cancerogene erwiesen. Es ist noch unbekannt, ob sie als Ursache menschlicher Tumoren eine Rolle spielen. Will man prüfen, ob sie in der Umgebung des Menschen vorkommen, so bedarf es einer geeigneten Methode. Ziel der vorliegenden Untersuchung war, eine Reaktion zu finden, mit der Nitrosamine in Lösung, ohne vorherige Isolierung, nachgewiesen werden können. Das Verfahren sollte als Suchreaktion ebenso geeignet sein wie für die quantitative Bestimmung bekannter Nitrosamine.

Die bisher üblichen Methoden beruhen auf der Extraktion der Nitrosamine mit Äther und der chemischen oder chromatographischen Identifizierung^{1,2}. In biologischem Material sind Nitrosamine nur in geringer Konzentration zu erwarten. Ihre Extraktion und der chromatographische Nachweis werden häufig durch Stoffe, die sich chemisch ähnlich verhalten, behindert. Dadurch wird es erschwert, solche Methoden als Suchreaktion oder zum quantitativen Nachweis kleiner Nitrosamingen einzusetzen.

Nitrosamine, die die allgemeine Formel R-N(N=O)-R' haben, können die verschiedensten chemischen Eigenschaften besitzen, da R und R' beliebig gebaut sein können. Eine Bestimmungsmethode von allgemeiner Anwendbarkeit muß daher auf dem Nachweis der N-Nitrosogruppe beruhen.

Wie bekannt, läßt sich aus Nitrosaminen durch *kurzwellige* UV-Strahlen Nitrit abspalten. Andere Verbindungen mit Stickstoff-Sauerstoff-Gruppen reagieren in gleicher Weise. Es sollte untersucht werden, ob die Absorption der N-Nitrosoverbindungen im Bereich *langwelliger* UV-Strahlen geeignet ist, Nitrosamine selektiv zu spalten und eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen.

Material und Methoden

Herstellung von Nitrosaminen

Die Synthese der Nitrosamine erfolgte in Anlehnung an die bekannten Vorschriften.

N-Nitroso-L-prolin: 20 g L-Prolin wurden mit 40 ml Wasser und 30 ml 25proz. HCl versetzt. Nach Erwärmung auf 85°C wurde eine Lösung von 13 g NaNO_2 in 25 ml Wasser tropfenweise zugefügt. Das rotbraune Reaktionsgemisch wurde angesäuert und mit Dichlormethan extrahiert. Es fiel ein bräunliches Pulver an. Nach Umkristallisation aus Benzol ergaben sich braune Kristalle. Ausbeute: 37% d. Th., Schmp. 101°C.

$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ (144,14) Ber. N 19,14 Gef. N 19,18

* Postanschrift: Dr. JOHANNES SANDER, 74 Tübingen, Hygiene-Institut der Universität.

¹ R. PREUSSMANN, G. NEURATH, G. WULF-LORENTZEN, D. DAIBER u. H. HENGY, Z. analyt. Chem. **202**, 187 [1964].

² G. NEURATH, B. PIRMANN u. M. DÜNGER, Chem. Ber. **97**, 1631 [1964].

N-Nitroso-L-ephedrin: 20 g *L-Ephedrin* wurden mit 25 ml Wasser und 5 ml 25proz. HCl versetzt und auf 80°C erwärmt. 8 g NaNO₂, gelöst in 15 ml Wasser, wurden unter Rühren langsam zugegeben. Beim Abkühlen schied sich ein dickes gelbes Öl ab, das auskristallisierte. Die Umkristallisation aus Dichlormethan ergab weiße Kristalle vom Schmp. 86°C; Ausbeute: 95% d. Th.

C₁₀H₁₄N₂O₂ (194,23) Ber. N 14,42 Gef. N 14,44

N-Nitroso-diäthylamin: Zu 20 g *Diäthylamin*, vermischt mit 20 ml Wasser und 40 ml 25proz. HCl wurden nach Erwärmung auf 90°C 21 g NaNO₂, in 20 ml Wasser gelöst, langsam zugegeben. Die Reinigung des rotbraunen Rohproduktes geschah durch zweimalige Destillation im Vak. Ausbeute: 70% d. Th.

C₄H₁₀N₂O (102,14) Ber. N 27,45 Gef. N 26,95

N-Nitroso-N-methylanilin (Schuchardt, reinst) und *N-Nitroso-diphenylamin* (Schuchardt) waren Handelsprodukte.

Photochemische Spaltung der Nitrosamine

Mengen von 0,5 bis 5 µg Nitrosamin, gelöst in 0,25 ml Aceton, wurden mit 1,5 ml 0,1N KOH vermischt. In einem mit Gummistopfen verschlossenen Reagenzglas aus gewöhnlichem Glas mit 14 mm lichter Weite erfolgte die Bestrahlung unter einer UV-Lampe mit Schwarzglasfilter (Hanau, Quarzlampengesellschaft), deren Strahlungsmaximum bei 366 mµ lag. Die Reagenzgläser wurden schräg (Winkel Unterlage/Reagenzglas = 10°) in den Strahlenkegel gelegt. Der Abstand zwischen Lampenfilter und Flüssigkeitsspiegel betrug 12 cm. Mit Hilfe eines Gebläses wurden die Röhrchen auf Zimmertemperatur gehalten. Diese Bedingungen wurden bei allen Versuchen exakt eingehalten. Als Kontrolle dienten entsprechende unbestrahlte Proben. Die Bestrahlungsdauer betrug 3 Std.

Weitere Verbindungen (Handelsprodukte) mit Stickstoff-Sauerstoff-Gruppen wurden in gleicher Weise bestrahlt, die eingesetzten Konzentrationen waren jedoch 100 µg/ml 0,1N KOH. Diese Verbindungen waren: Nitrat, Nitroverbindungen (Nitromethan und Nitrobenzol), *C*-Nitrosoverbindungen (4-Nitroso-benzoesäure-methylester und *p*-Nitroso-dimethylanilin), als Isonitrosamin: Pyruvaldehyd-1-oxim.

Quantitative Bestimmung

Zu 1,5 ml nitrithaltiger 0,1N KOH wurden 0,5 ml GRIESSches Reagenz (α-Naphthylamin und Sulfanilsäure in 30proz. Essigsäure) hinzugefügt. Die Lichtabsorption des entstehenden roten Farbstoffes wurde in 2 cm Schichtdicke in Mikroküvetten gegen einen Leerwert aus 1,5 ml 0,1N KOH plus 0,5 ml GRIESSches Reagenz im Zeiss-Spektralphotometer bei 520 mµ gemessen. Aus den Extinktionswerten ließ sich mit Hilfe einer Eichkurve die Nitritkonzentration ermitteln.

Beseitigung störender Substanzen

In der Probe primär enthaltene Nitrit und Ester der salpetrigen Säure würden mit GRIESSchem Reagenz eine positive Reaktion ergeben. Sie müssen deshalb zuvor beseitigt werden. Dies läßt sich, wie bekannt, in salzsaurer Lösung mit Harnstoff durchführen. 1,5 µg Nitrosamin und die fünffache Menge Nitrit, Isoamylnitrit oder Äthylnitrit wurden in 0,5 ml 0,1N HCl, welche 5% Harnstoff enthielt, gegeben und 30 Min. auf 37°C erwärmt. Das meist übliche Erhitzen auf 100°C wurde nicht angewendet, um den Verlust flüchtiger Nitrosamine zu vermeiden. Nach Zugabe von 1 ml 0,15N KOH im Anschluß an die Erwärmung entsprach die Lösung einer 0,1N KOH. Die Bestrahlung erfolgte dann wie oben beschrieben, nachdem zuvor in einer Probe auf Nitritfreiheit geprüft worden war.

Ergebnisse und Diskussion

Unter der Einwirkung langwelliger UV-Strahlen wurde aus den Nitrosaminen Nitrit freigesetzt. Die Menge der nachweisbaren salpetrigen Säure war, wie aus der Tabelle hervorgeht, bei konstanter Bestrahlungsdauer nur von der Konzentration des Nitrosamins abhängig. Eine quantitative Bestim-

Tabelle. Eichwerte für die Bestimmung verschiedener Nitrosamine.

µg	Nitrosamin	E ₅₂₀	µg NO ₂ [⊖] in 1,5 ml 0,1N KOH	Ausbeute [% d. Th.]
0,5	<i>N</i> -Nitroso-prolin	0,032	0,045	28
1,5		0,098	0,13	27
2,5		0,168	0,23	28
5,0		0,330	0,45	28
0,5	<i>N</i> -Nitroso-ephedrin	0,030	0,04	33
1,5		0,082	0,11	31
2,5		0,146	0,20	33
5,0		0,291	0,39	33
0,5	<i>N</i> -Nitroso-diäthylamin	0,043	0,06	30
1,5		0,123	0,17	28
2,5		0,198	0,27	28
5,0		0,403	0,54	28
0,5	<i>N</i> -Nitroso- <i>N</i> -methylanilin	0,032	0,04	25
1,5		0,096	0,13	25
2,5		0,160	0,21	25
5,0		0,318	0,40	24
0,5	<i>N</i> -Nitroso-diphenylamin	0,028	0,04	35
1,5		0,084	0,12	35
2,5		0,135	0,19	33
5,0		0,278	0,38	33

mung ist somit mit dieser Methode möglich. Bei Verwendung reiner Nitrosaminlösungen können noch 0,5 µg Nitrosamin gemessen werden.

Eine vollständige Spaltung der Nitrosamine wurde nicht versucht, da es sich gezeigt hatte, daß langdauernde Bestrahlung alkalischer Nitritlösungen zu einer Verminderung der NO_2^- -Konzentration führte. Störungen durch strukturell verwandte Verbindungen mit Stickstoff-Sauerstoff-Gruppen traten nicht auf. Aus den im methodischen Teil erwähnten Substanzen wurde durch langwellige UV-Strahlen kein Nitrit abgespalten. Salpetrige Säure und ihre Ester konnten mit dem oben geschilderten Verfahren vollständig beseitigt werden. Der Verlust an Nitrosamin betrug dabei 5 bis 10%. Damit sind die Voraussetzungen erfüllt, um die Methode auf biologisches Material anwenden zu können.

Auf exakte Einhaltung der Versuchsbedingungen ist zu achten, da Nebenreaktionen Anlaß zu Täuschungen geben können. Beispielsweise zersetzen sich Nitroverbindungen, besonders Nitromethan,

in alkalischer Lösung ohne Bestrahlung. Die Reaktion wird durch Wärme beschleunigt. Bestrahlte Probe und Kontrolle müssen deshalb auf gleicher Temperatur gehalten werden und sollen nicht über Zimmertemperatur erwärmt werden. Tageslicht enthält langwellige UV-Strahlen, die durch Fensterglas nicht zurückgehalten werden. Es ist daher unbedingt erforderlich, die unbestrahlte Kontrolle im Dunklen aufzubewahren. Ebenso sind alle Extraktionsschritte möglichst lichtgeschützt durchzuführen. Andererseits ist es möglich, zur Bestrahlung Tageslicht zu verwenden, wenn keine quantitative Bestimmung angestrebt wird. Arbeitet man mit reinen Nitrosaminlösungen, so kann diese Bestrahlung auch direkt in GRIESSSchem Reagenz erfolgen, was als einfache Bestimmungsmethode verwendet werden kann.

Frau Dr. A.-M. FRETZDORFF, Physiol.-Chem. Institut Tübingen, danke ich für die Durchführung der Stickstoffbestimmungen.