

advanced that the latter control is mediated through brain stem reticular neurones. However, the activation of a more specific pathway in such a control cannot be excluded.

**Riassunto.** L'eccitabilità delle terminazioni afferenti del trigemino, saggiata con il metodo di WALL<sup>5</sup> aumenta quando stimoli condizionanti sono dati a strutture reticolari del tronco (in particolare ai nuclei reticularis gigantocellularis, pontis caudalis e pontis oralis) ed a fibre di nervi periferici cutanei e muscolari di gruppo II, III.

F. BALDISSERA, G. BROGGI  
and M. MANCIA

*Istituto di Fisiologia Umana dell'Università di Milano and Impresa di Elettrofisiologia del CNR, sezione di Milano (Italy), 31st October 1966.*

## STUDIORUM PROGRESSUS

### Zur Frage des Vorkommens von N-Nitroso-Verbindungen im Tabakrauch

Als DRUCKREY und PREUSSMANN<sup>1</sup> im Jahre 1962 darauf hinwiesen, dass die Bildung von Nitrosaminen aus Stickoxiden und sekundären Aminen auch im Tabakrauch möglich sein müsste, fehlte es an geeigneten Methoden, diese Verbindungsklasse im Zigarettenrauch nachzuweisen. Inzwischen sind jedoch einige Arbeiten erschienen, die den qualitativen Nachweis und mindestens eine semi-quantitative Bestimmung dieser Stoffe zulassen<sup>2-5</sup>. Mit einigen dieser Methoden ist der Nachweis ausserordentlich geringer Mengen von Nitrosaminen im Tabakrauch geführt worden<sup>6-8</sup>. Bei den Arbeiten hat es sich jedoch gezeigt, dass die Untersuchungen experimentell aufwendig und schwierig sind und die Beachtung einer ganzen Reihe von Besonderheiten erfordern. Ausserdem sind in der Zwischenzeit eine Reihe von Grundlagen-Untersuchungen, so über das Vorkommen von Flüchtigen Basen – insbesondere sekundären Aminen – in Tabak und Rauch<sup>9,10</sup>, über den Nitratgehalt verschiedener Tabaktypen<sup>11-13</sup> und über geeignete Bestimmungsmethoden<sup>14,15</sup> für diese Ausgangskomponenten zur Bildung von N-Nitroso-Verbindungen erschienen.

Es ist daher sicher an der Zeit, eine zusammenfassende Darstellung dieses Arbeitsgebietes und seiner Problematik zu geben.

**Analytik der Nitrosamine.** Die Nitrosamine haben sich auf zwei Wegen für Nachweis- und Identifizierungsreaktionen zugänglich erwiesen. Der erste ist die photolytische Spaltung der N-NO-Bindung, bei der, nach Abspaltung von NO, Stickoxide entstehen, die dann alkalisch abgefangen und mit den üblichen Nitritreagenzien, z.B. dem Griess'schen Reagenz, nachgewiesen werden können<sup>2,3</sup>. Der zweite Weg ist die Reduktion der N-Nitroso-Verbindungen zu asymmetrischen Hydrazinen, die wiederum als 5-Nitro-2-hydroxybenzal-Derivate<sup>4</sup> oder als 4'-Nitroazobenzolcarbonsäure-(4)-hydrazide<sup>4,5</sup> in Form von kristallisierten, gefärbten Derivaten zum Nachweis der Nitroso-Verbindungen dienen können.

Nach den beiden letztgenannten Methoden ist der Nachweis von Spuren Nitrosaminen im Tabakrauch geführt worden<sup>6-8</sup>.

**Stickoxide im Tabakrauch.** Die gleichzeitige quantitative Erfassung von Stickstoffmonoxid und Stickstoffdioxid im Tabakrauch ist ein noch ungelöstes Problem. Stickstoffmonoxid ist ein analytisch aus Gemischen wie Tabakrauch schwierig absorbierbares Gas ( $K_p = -151,8^\circ\text{C}$ ), das nur unter gleichzeitiger Oxydation zu Stickstoffdioxid gefasst werden kann, während das Stickstoffdioxid ( $K_p = 22,4^\circ\text{C}$ ) bei der Rauchttemperatur weitgehend dimer vorliegt und bei der Absorption in wässrigem Alkali sofort zu Nitrit und Nitrat dispor-

portioniert. Mit Wasser wird aus Stickstoffdioxid Salpetersäure und NO gebildet.

Die gemeinsame Oxydation beider Oxide zu Nitrat ist für den Tabakrauch wegen der gleichzeitigen Anwesenheit von Ammoniak und Aminen, die ebenfalls oxydiert würden<sup>16</sup>, nicht anwendbar. Mit den zur Verfügung stehenden bekannten Methoden sind immerhin Bestimmungen der Stickoxide im Tabakrauch durchgeführt worden<sup>17,18</sup>, deren Ergebnisse in Tabelle I zusammengefasst sind.

Tabelle I. Stickoxidgehalt im Zigarettenrauch ppm (v/v)

Autoren	NO	NO <sub>2</sub>
HAAGEN-SMIT et al. <sup>17</sup>		145–655
BOKHOVEN und NIESSEN <sup>18</sup>		170–210
TADA <sup>19</sup>	72–271	19–118
NORMAN und KEITH <sup>20</sup>	442–1008	0–25
WESTCOTT <sup>21</sup>		96–1120

<sup>1</sup> H. DRUCKREY und R. PREUSSMANN, *Naturwissenschaften* 49, 498 (1962).

<sup>2</sup> R. PREUSSMANN, D. DAIBER und H. HENGY, *Nature, Lond.* 201, 502 (1964).

<sup>3</sup> R. PREUSSMANN, G. NEURATH, G. WULF-LORENTZEN, D. DAIBER und H. HENGY, *Z. analyt. Chem.* 202, 187 (1964).

<sup>4</sup> G. NEURATH, B. PIRMAN und M. DÜNGER, *Chem. Ber.* 97, 1631 (1964).

<sup>5</sup> W. J. SERFONTEIN und P. HURTER, *Nature, Lond.* 209, 1238 (1966).

<sup>6</sup> G. NEURATH, B. PIRMAN und H. WICHERN, *Beiträge zur Tabakforschung* 2, 311 (1964).

<sup>7</sup> G. NEURATH, B. PIRMAN, W. LÜTTICH und H. WICHERN, *Beiträge zur Tabakforschung* 3, 251 (1965).

<sup>8</sup> W. J. SERFONTEIN und P. HURTER, *Cancer Res.* 26, 575 (1966).

<sup>9</sup> G. NEURATH, A. KRULL, B. PIRMAN und K. WANDREY, *Beiträge zur Tabakforschung* 3, 571 (1966).

<sup>10</sup> G. NEURATH, M. DÜNGER, J. GEWE, W. LÜTTICH und H. WICHERN, *Beiträge zur Tabakforschung* 3, 563 (1966).

<sup>11</sup> G. NEURATH und H. EHMKE, *Beiträge zur Tabakforschung* 2, 333 (1964).

<sup>12</sup> G. LIPP und U. DÖLBERG, *Beiträge zur Tabakforschung* 2, 345 (1964).

<sup>13</sup> G. M. BROADDUS, J. E. YORK und J. M. MOSELEY, *Tob. Sci.* 9, 149 (1965).

<sup>14</sup> G. NEURATH, H. EHMKE und K.-H. MÜLLER, *Beiträge zur Tabakforschung* 2, 321 (1964).

<sup>15</sup> G. NEURATH und E. DOERK, *Chem. Ber.* 97, 172 (1964).

<sup>16</sup> F. WÖHLER, *Justus Liebigs Annln Chem.* 136, 256 (1865).

<sup>17</sup> A. J. HAAGEN-SMIT, M. F. BRUNELLE und J. HARA, *A.M.A. Archs ind. Hlth* 20, 399 (1959).

<sup>18</sup> C. BOKHOVEN und H. J. NIESSEN, *Nature, Lond.* 192, 458 (1961).

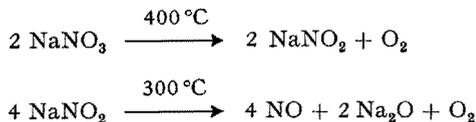
Neuere Arbeiten befassen sich mit der Differenzierung der im Tabakrauch vorkommenden Stickoxide<sup>10-21</sup> und haben ergeben, dass primär Stickstoffmonoxid im Rauch entsteht. Das Stickstoffmonoxid wird im strömenden Rauch nach der trimolekularen Reaktion  $2\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2$  relativ langsam zu Stickstoffdioxid oxydiert. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist mit der von Bodenstein ermittelten Reaktionskonstanten<sup>22</sup>

$$K = 1,70 \cdot 10^6 \text{ l}^2 \text{ Mol}^{-2} \text{ min}^{-1}$$

berechenbar. Demnach erfordert, bei der Konzentration wie sie im Tabakrauch vorliegt, die Umsetzung der Hälfte des NO zu NO<sub>2</sub> 500 sec<sup>20</sup>.

**Nitratgehalt des Tabaks.** Als Ursprung für die Stickoxide im Tabakrauch kann nach gesicherten Resultaten fast ausschliesslich der Nitratgehalt des Tabaks angesehen werden. Einheitlich hergestellte Zigaretten mit Nitratgehalten zwischen 0,2 und 1,0% Nitratstickstoff ergaben die in der Figur wiedergegebene Abhängigkeit zwischen Stickstoffmonoxid im Hauptstromrauch und dem Nitratstickstoffgehalt der Zigarette<sup>13</sup>.

Ammoniak- und Ammoniumsalze werden höchstwahrscheinlich nicht in Stickoxide umgewandelt. Zigaretten aus geschnittenem Krepppapier mit und ohne Ammoniumoxalatimprägnierung ergaben jedenfalls keine unterschiedliche Stickoxidausbeute<sup>11</sup>. Eine Ammoniakverbrennung bei den Temperaturen einer Zigaretten- glutzone (890–920 °C) ist bei Abwesenheit von Katalysatoren unwahrscheinlich. Das Vorkommen nennenswerter Nitritmengen im Tabak ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Es wurden Werte von im Mittel 0,004% an verschiedenen Tabaken gefunden<sup>12</sup>. In der Asche von Zigaretten wurde ein Nitritgehalt von 0,01% NO<sub>2</sub> ermittelt. Da Nitrat bei 400 °C unter Sauerstoffabspaltung Nitrit bildet, Nitrit aber bereits bei 300 °C unter Bildung von Stickstoffmonoxid zersetzt wird, ist die Bildung über diesen Weg anzunehmen.



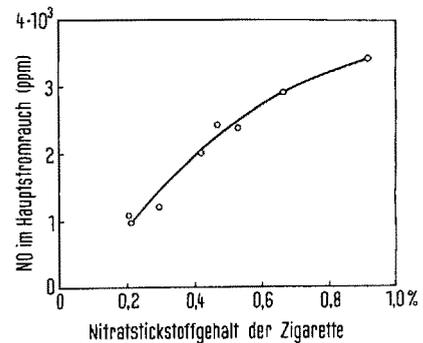
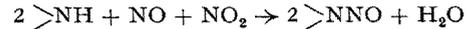
Tabake weisen – je nach Umweltbedingungen – sehr unterschiedliche Nitratgehalte auf. Mehrere Bearbeiter fanden, dass Virginia-Tabake nitratarm sind und im allgemeinen unter 0,1% NO<sub>3</sub> enthalten. Orient-Tabake enthalten im Durchschnitt zwischen 0,2 und 0,4% Nitrat, während die Nitratgehalte von Burley-Tabaken verschiedener Herkunft zwischen 1 und 5% liegen<sup>11-13</sup>. Diese Zahlen scheinen dem Fachmann zunächst auf eine Abhängigkeit von der Trocknungsart hinzudeuten und einen Zusammenhang zwischen Lufttrocknung und hohem Nitratgehalt anzuzeigen. Nähere Untersuchungen ergaben jedoch nur geringe Einflüsse von Sorte und Trocknungsart. Bedeutend sind vielmehr Bodenbeschaffenheit, Witterungsbedingungen und das Angebot an Stickstoffdünger<sup>13</sup>.

**Basen des Tabaks und des Rauches.** Bis vor kurzem wurden im Tabak lediglich Bestimmungen der «Gesamten flüchtigen Basen», unter Einschluss des Nikotins, durchgeführt. Diese Werte werden jedoch von den mengenmässig vorwiegenden Basen des Tabaks, Nikotin und Ammoniak bestimmt. Die für die Bildungsmöglichkeit der Nitrosamine relevante Angabe über die Menge sekundärer Amine im Tabakrauch fehlte jedoch vollständig. Erst in jüngster Zeit sind Methoden beschrieben worden, die die «Gesamten flüchtigen Basen» und «Flüchtigen Basen», d.h. den Basenanteil ohne die Pyridinalkaloide,

differenzieren<sup>14</sup>. Typische Werte für verschiedene Tabake sind in Tabelle III angegeben.

Die Amine des Tabaks und des Rauches sind in kürzlich erschienenen Arbeiten als 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-amide weitgehend qualitativ identifiziert und grob quantitativ bestimmt worden<sup>9,10</sup>. Die Tabelle IV gibt eine Zusammenstellung der Amine eines basenreichen Tabaks, die Tabelle V die entsprechende Zusammenstellung der Amine im Rauch aus Zigaretten dieses Tabaks, wobei die tertiären Pyridin- und Nichtpyridinbasen durch die Methode nicht erfasst wurden.

**Bildungsbedingungen der Nitrosamine im Tabakrauch.** Nach der Reaktionsgleichung



Stickstoffmonoxid im Hauptstromrauch in Abhängigkeit vom Nitratstickstoffgehalt der Zigarette nach<sup>13</sup>.

Tabelle II. Nitratgehalt getrockneter und fermentierter Tabake, NO<sub>3</sub> (% berechnet auf Trockensubstanz)

Autoren	Virginia-Tabak	Orient-Tabak	Burley-Tabak
LIPP und DÖLBERG <sup>12</sup>	0,0–0,32	0,06–0,63	0,24–5,93
BROADDUS, YORK und MOSELEY <sup>13</sup>	0,04–0,16	0,08–0,23	0,40–2,57
NEURATH und EHMKE <sup>11</sup>	0,0–0,90	0,0–0,62	0,28–5,04

Tabelle III. Flüchtige Basenanteil handelsüblicher, getrockneter und fermentierter Tabake nach<sup>14</sup> (als N in % Trockensubstanz)

Tabak	Gesamte flüchtige Basen	Flüchtige Basen	Nikotin
Virginia	0,26–0,90	0,11–0,51	0,114–0,554
Orient	0,32–0,96	0,18–0,64	0,095–0,443
Burley	0,54–1,62	0,20–1,36	0,132–0,727

<sup>10</sup> O. TADA, Rep. Inst. Sci. Lab. Kurashiki 60, 7 (1962).

<sup>20</sup> V. NORMAN und C. H. KEITH, Nature, Lond. 205, 915 (1965).

<sup>21</sup> D. T. WESTCOTT, Vortrag anlässlich der 18th Tobacco Chemist Research Conference, Raleigh, 1964; Bull. Inf. Coresta 4, 56 (1964).

<sup>22</sup> M. BODENSTEIN, Z. Elektrochem. 24, 183 (1918).

ist ein äquimolares Verhältnis der beiden Stickoxide für die Bildung der N-Nitroso-Verbindungen notwendig. Versuche, allein mit NO unter Ausschluss von Sauerstoff oder allein mit NO<sub>2</sub> zur Bildung von Nitrosaminen aus

Tabelle IV. Aminzusammensetzung eines basenreichen Tabaks

	ppm, berechnet auf Trockensubstanz
Ammoniak	1410
Methylamin	115
Äthylamin	
Isobutylamin	
Isopentylamin	80
β-Phenäthylamin	
Dimethylamin	42
Methyl-äthylamin	
Methyl-n-propylamin	
Methyl-β-phenäthylamin	
Pyrrolidin	110
Piperidin	
Δ <sup>8</sup> -Piperidein	
Anilin	
Nornikotin	455
Anabasin	130
Metanikotin	39

Die Werte wurden spektrophotometrisch aus 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-amiden nach<sup>9</sup> gewonnen. Die Amine ohne Mengenangaben sind in geringen Anteilen vorhanden.

Tabelle V. Aminzusammensetzung im Rauch des basenreichen Tabaks

	ppm, berechnet auf Trockensubstanz der verbrannten Tabakmenge
Ammoniak	440
Methylamin	30
Äthylamin	15
n-Propylamin	3
n-Butylamin	4,5
Isobutylamin	4
Isopentylamin	6
β-Phenäthylamin	6
Dimethylamin	15
Methyläthylamin	3
Diäthylamin	0,4
Methyl-β-phenäthylamin	0,8
Pyrrolidin	36
2-Methylpyrrolidin	0,8
Piperidin	1,4
Δ <sup>8</sup> -Piperidein	0,8
Anilin	0,4
3-Methylaminopyridin	0,5
Nornikotin	36
Myosmin	12
Anabasin	16
Anatabin	5
Metanikotin	5
Dihydrometanikotin	3
Methyl-n-butylamin } Methyl-isobutylamin }	2,5
Amin C	-

Die Werte wurden spektrophotometrisch aus 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-amiden nach<sup>10</sup> ermittelt.

sekundären Aminen zu gelangen, führten nicht zum Erfolg<sup>7</sup>, während bei äquimolarem Verhältnis eine optimale Ausbeute erhalten wurde, so dass diese Reaktionsgleichung als gesichert angesehen werden kann. Aus dem oben über das Vorkommen der beiden Stickoxide im Tabakrauch Gesagten geht hervor, dass beiden Gase in die Reaktion in dem Masse eintreten werden, wie die Oxydation des Stickstoffmonoxid zu Stickstoffdioxid fortschreitet. Daraus ergibt sich erstens nach dem unter Stickoxide Gesagten, dass die Bildungsmöglichkeiten für Nitrosamine verhältnismässig ungünstig sind und zweitens, dass die Reaktion vom Verhalten der Stickoxide her zeitabhängig sein muss.

Ferner können sich die Amine abhängig von ihren Alkylresten in der Reaktivität gegenüber dem Stickoxidgemisch unterscheiden. Zum anderen verhalten sie sich im Tabakrauchaerosol sicherlich entsprechend ihrem Dampfdruck und ihrer Konzentration verschiedenartig. Die schwerflüchtigeren Amine, wie die Nebenalkaloide Nornikotin und Anabasin, sind in der Partikelphase angereichert, während sich die leichtflüchtigeren Amine vorwiegend in der Gas-Dampf-Phase befinden und damit bevorzugt für die Reaktion mit den Stickoxiden zur Verfügung stehen.

Unter diesen Aspekten ist damit zu rechnen, dass von den oben angeführten Aminen des Tabakrauches die mengenmässig vorherrschenden und zudem flüchtigen, sekundären Amine wie Dimethylamin und Pyrrolidin bevorzugt reagieren.

*Bedingungen bei der Analyse des Tabakrauches auf Nitrosamine.* Generell muss bei der Wahl der Untersuchungsmethoden für den Tabakrauch gründlich erwogen werden, welche Einflüsse das angestrebte Untersuchungsergebnis verfälschen können<sup>23</sup>. Dazu ist es notwendig, das Abrauchen der Zigaretten dem natürlichen Rauchen, also den Gewohnheiten der Raucher, weitgehend anzupassen. Das ist im Internationalen Standard<sup>24</sup> bereits geschehen. Ferner geht aus dem Gesagten hervor, dass wegen der Oxydation des Stickstoffmonoxid zum Stickstoffdioxid die Verweilzeit des Rauches bis zur Niederschlagung bzw. bis zur Analyse einen Einfluss auf das Ergebnis haben muss. Die Verweilzeit sollte deshalb dem natürlichen Rauchvorgang angepasst werden. Im allgemeinen liegt die Zeit vom Beginn des Zuges bis zum Ende des Exhalierens bei Rauchern um 5 sec, dabei ist jedoch zu beachten, dass der Rauch nicht auf einmal exhaliert wird, sondern dass mindestens zwei Atemzüge dazu notwendig sind, in denen eine fortschreitende Verdünnung des Rauches stattfindet; ein Vorgang, der sich maschinell unter auch nur annähernder Berücksichtigung aller äusseren Umstände nicht nachahmen lässt.

Weiter sollte wegen der Temperaturabhängigkeit der Reaktionskonstanten die Untersuchungstemperatur nahe der Körpertemperatur von etwa 37°C liegen. Der aus der Zigarette austretende Rauch hat eine Temperatur von nicht höher als 30°C<sup>25</sup>. Die Temperaturverhältnisse im Innern der Zigarette werden durch die Untersuchung bei Einhaltung der Standardbedingungen und Verwendung heute üblicher Rauchmaschinen nicht beeinflusst.

Auf jeden Fall muss ausserdem die Kondensation der Stickoxide und der Amine durch Kältefallen oder das gleichzeitige Lösen beider Komponenten durch Lösungsmittelfallen vermieden werden, da diese Vorgänge sicher

<sup>23</sup> G. NEURATH, *Naturwissenschaften* 54, 30 (1967).

<sup>24</sup> Coresta Standard Nr. 1, Coresta Groupe Fumée, Les Rasses (1966).

<sup>25</sup> H. BOROWSKI und F. SEEHOFER, *Beiträge zur Tabakforschung* 1, 329 (1962).

zur Bildung von Nitrosaminen als Artefakte führen. Die elektrostatische Niederschlagung ist wegen der Bildung von Ozon, das zur Oxydation des NO zu NO<sub>2</sub> beiträgt, ungeeignet. Am günstigsten ist die Verwendung rein mechanisch und bei normaler Temperatur wirkender Fallensysteme wie Glasfaserfilter (Cambridge-Filter) und Wattefallen, bei denen lediglich noch eine Störung durch niedergeschlagene Feuchtigkeit und Lösungseffekte im Tabakrauchkondensat selbst denkbar wären, die jedoch gering zu veranschlagen sind.

*Nitrosamine im Tabakrauch.* Das im vorhergehenden Abschnitt Gesagte muss bei der Wertung der bisher vorliegenden Arbeiten über das Auftreten von N-Nitroso-Verbindungen im Tabakrauch herangezogen werden. So wurde in unserer ersten über das Vorkommen von Nitrosaminen im Tabakrauch erschienenen Publikation<sup>6</sup> mit einem Fallensystem gearbeitet, dass aus einem Horizontalrohr aus Glas (Durchmesser 4 cm, Länge 20 cm) mit einer Wattestopfung von 15 g bestand, dem eine Wasser- und drei Pentanfallen nachgeschaltet waren. Die Pentan-Waschflaschen wurden mit Aceton-Trockeneis gekühlt. Die Wattefalle mit der Hauptmenge des Kondensates und die Wasser- und Pentanfallen wurden jeweils getrennt aufgearbeitet. Als Nachweismethode wurde die Überführung in Hydrazine und deren 5-Nitro-2-hydroxybenzal-Derivate<sup>4</sup> verwendet. Die Derivate wurden dünnschichtchromatographisch angereichert und durch ihre Farbvertiefung beim Besprühen mit Alkali, ihre Rf-Werte, UV- und IR-Spektren identifiziert. Bei Verwendung des gleichen Tabaks, dessen Aminzusammensetzung im Tabak und Rauch in den Tabellen IV und V angegeben ist, wurden in der Hauptmenge des Kondensates, die im Watterohr niedergeschlagen wurde, bei Extraktion mit Pentan keine N-Nitroso-Verbindungen identifiziert. In den nachgeschalteten und gekühlten Pentanfallen jedoch wurde N-Nitroso-methyl-*n*-butylamin in einer Menge von 0,04 µg N-NO pro Zigarette nachgewiesen. Der Wert ist nach den Erfahrungen mit der quantitativen Auswertung dieser Methode, die für die qualitative Identifizierung ausgearbeitet wurde, etwa mit dem Faktor 5 zu multiplizieren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich um Artefakte infolge Lösung der Gase in den gekühlten Pentanfallen.

Auch im Falle der kürzlich erschienenen Arbeit, in der SERFONTEIN und HURTER<sup>8</sup> den qualitativen Nachweis von N-Nitroso-dimethylamin, N-Nitroso-diäthylamin und N-Nitroso-piperidin aus Tabakrauchkondensaten erbringen, die durch Auffangen in Dichlormethan unter Eis- und Trockeneis-Aceton-Kühlung gewonnen wurden, ist Artefaktbildung anzunehmen. Nach Reduktion zu den Hydrazinen wurden die N-Nitroso-Verbindungen mit 4'-Nitroazobenzolcarbonsäure-(4)-chlorid<sup>16,20</sup> zu Säurehydraziden umgesetzt<sup>4,5</sup>. Die Identität wurde aus Rf-Werten der Derivate und Retentionszeiten der freien N-Nitroso-Verbindungen geschlossen. Als rohe quantitative Abschätzung geben die Autoren 1–5 µg N-Nitroso-piperidin pro Zigarette an, die mindestens teilweise, nach dem Ausgeführten, aus Artefakten bestehen müssen.

Auch unsere Vergleichsversuche unter ausschliesslicher Verwendung von Kühl- und Lösungsmittelfallen<sup>7</sup> lieferten 3 bis 5 mal höhere Ausbeuten als die unten erwähnte Wattefalle mit verlängerter Verweilzeit. Die Ausbeuten in der Kühlfalle erwiesen sich ausserdem als in starkem Masse von der Aufbewahrungszeit abhängig. So wurden bei sofortiger Aufarbeitung 0,013 µg, nach eintägigem Stehen 0,036 µg und nach zweitägigem Stehen 0,059 µg N-NO pro Zigarette gefunden.

Zur Prüfung der tatsächlichen Reaktionsgegebenheiten im Rauchaerosol haben wir einen weiteren Versuch mit

der oben beschriebenen Anordnung (Wattefalle, Wasser- und drei Pentanfallen), jedoch einer verlängerten Verweilzeit zwischen Rauchmaschine und Wattefalle, durchgeführt<sup>7</sup>. Während die Verweilzeit bei der ersten Anordnung 5 sec betrug, wurde sie durch Verlängerung des Verbindungsrohres auf 250 cm bei einer lichten Weite von 1,8 cm auf 40 sec ausgedehnt. Unter diesen verschärften Umständen wurde bei einem Abrauchversuch mit 5000 Zigaretten in der Wattefalle ein Gemisch von N-Nitroso-dimethylamin und N-Nitroso-pyrrolidin nachgewiesen, dessen Menge 0,004 µg pro Zigarette entsprach. In den Pentanfallen fanden sich 0,05 µg N-NO pro Zigarette in Form eines Gemisches von N-Nitroso-methyl-*n*-butylamin, N-Nitroso-dimethylamin und N-Nitroso-pyrrolidin.

Dieser Versuch zeigt, dass die Bildung von N-Nitroso-Verbindungen in der Gasphase grundsätzlich möglich ist, jedoch in Zeitabhängigkeit nach dem oben erörterten Schema zu ausserordentlich geringen Ausbeuten der N-Nitroso-Verbindungen führt. Die in den nachgeschalteten Pentanfallen auftretenden N-Nitroso-Verbindungen sind wieder Artefakte.

Bei gesonderten Versuchen unter Verwendung von zusätzlich mit höheren Konzentrationen an Nitrat sowie Methyl-*n*-butylamin und Di-*n*-butylamin versetztem Tabak fanden sich die entsprechenden N-Nitroso-Verbindungen auch nach kurzer Verweilzeit in den Wattefallen. Bei der Extraktion der Wattefallen mit Dichlormethan anstelle von Pentan fanden sich auch bei der Verweilzeit von 5 sec, also einer dem allerersten Versuch entsprechenden Anordnung, bereits Spuren N-Nitroso-Verbindungen, die im Aerosolzustand gebildet worden waren.

Die N-Nitroso-Verbindungen der sekundären Tabakalkaloide<sup>27</sup> Nornikotin, Anabasin, Metanikotin und des neuerdings nachgewiesenen Dihydrometanikotin<sup>10</sup>, auf deren mögliches Auftreten besonders BOYLAND et al.<sup>28,29</sup> hingewiesen haben, wurden bisher im Tabakrauch nicht nachgewiesen. Ihr Auftreten ist auch wegen der geringen Konzentration der Alkaloide in der Gasphase des Tabakrauches wenig wahrscheinlich. Die Alkaloide liegen überwiegend als Salze in der Partikelphase des Rauches vor, und auch die freien Basen haben einen geringen Dampfdruck, so dass sie der Gasphasennitrosierung wenig zugänglich sind.

*Schlussbemerkungen.* Diese kritischen Ausführungen zu den verschiedenen Arbeiten über die Frage des Vorkommens von Nitrosaminen im Tabakrauch sollen zeigen, dass die experimentellen Anforderungen beträchtlich sind, die gestellt werden müssen, um verlässliche quantitative Aussagen über den Gehalt an N-Nitroso-Verbindungen im Rauch verschiedener Tabakerzeugnisse zu erhalten. Nur bei Einhaltung der genannten experimentellen Voraussetzungen lassen sich genaue Angaben erstellen.

Wenn es darum geht, lediglich eine quantitative Aussage über den Gehalt an Stoffen mit N-NO Bindungen ohne Angaben über die qualitative Zusammensetzung dieser Fraktionen zu bekommen, ist wahrscheinlich die polarographische Methode<sup>30,31</sup> die bestgeeignete. Bisher

<sup>26</sup> E. HECKER, Chem. Ber. 88, 1666 (1955).

<sup>27</sup> G. NEURATH und M. DÜNGER, Beiträge zur Tabakforschung 3, 339 (1966).

<sup>28</sup> E. BOYLAND, F. J. C. ROE, J. W. GORROD und B. C. V. MITCHLEY, Br. J. Cancer 18, 265 (1964).

<sup>29</sup> E. BOYLAND, F. J. C. ROE und J. W. GORROD, Nature, Lond. 202, 1126 (1964).

<sup>30</sup> D. F. HEATH und J. A. E. JARVIS, Analyst, Lond. 80, 613 (1955).

<sup>31</sup> H. BARKEMEYER, Privatmitteilung.

sind jedoch keine Ergebnisse veröffentlicht worden, die mit dieser Methode am Tabakrauch erhalten wurden. Ein anderes, aussichtsreiches Verfahren arbeitet gaschromatographisch<sup>32</sup>.

Die bisherigen grob quantitativen Ergebnisse mit diesen Identifizierungsmethoden erscheinen jedoch zuverlässig genug, um auszusagen, dass der Tabakrauch auch im Falle basen- und nitratreicher Tabake höchstens Mengen um 1 µg N-Nitroso-Verbindungen pro Zigarette enthält. Die höheren, von SERFONTEIN und HURTER im Zigarettenrauch gefundenen Werte müssen nach den vorhergehenden Ausführungen aus methodischen Gründen auf Artefakte zurückgeführt werden.

Über die biologische Wirkung dieser von uns als wahrscheinlich angenommenen Mengen von Nitrosaminen im Tabakrauch kann bisher noch keine Aussage gemacht werden. Alle bisher beschriebenen Tierversuche sind mit wesentlich grösseren, chronischen Gaben von Nitrosaminen durchgeführt worden, so dass Vergleiche kaum gezogen werden können. Da die einzelnen Nitrosamine eine ausserordentlich starke organotrope Wirkung entfalten, kann bisher nicht gesagt werden, ob eine solche Organotropie auch beim Menschen denkbar ist.

Bei der heute meist angewandten epikutanen Applikation von Tabakrauchkondensaten an der Maus und bei subkutaner Prüfung können Nitrosamine keine lokale Wirkung entfalten<sup>33</sup>. Es sind noch eine Reihe von analytischen und tierexperimentellen Problemen zu lösen, die sich durch die ausserordentlich geringen Mengen N-Nitroso-Verbindungen, wie sie im Tabakrauch vorkommen, stellen, bevor eine eindeutige Aussage über die Möglichkeit einer biologischen Wirkung der im Rauch enthaltenen Nitrosamine getroffen werden kann.

**Summary.** Important facts in connection with the occurrence of N-Nitroso compounds in tobacco smoke have been summarized. This paper reports on analytical methods for the identification of N-Nitroso compounds. The figures known about nitrate content and volatile bases of tobacco, as well as the nitrogen oxides and volatile bases of tobacco smoke as precursors of N-Nitroso compounds, are summarized. The third order reaction of secondary amines with an equimolar mixture of nitric oxide and nitrogen dioxide is a precondition for the formation of N-Nitroso compounds in tobacco smoke. While examining tobacco smoke for N-Nitroso compounds, temperature and time conditions have to be adapted to the natural smoking process. The use of solvent as well as cold traps has to be avoided to exclude the formation of artifacts. Analyses completed under these conditions furnished results of 0.004 µg of a mixture consisting of N-Nitroso-dimethylamine and N-Nitroso-pyrrolidine, calculated as N-NO per cigarette. A number of animal-experimental preconditions are still lacking, to judge the biological effects of these extraordinarily small amounts of N-Nitroso compounds.

G. NEURATH

Zentrallaboratorium H. F. & Ph. F. Reemtsma,  
Hamburg (Deutschland), 3. Januar 1967.

<sup>32</sup> E. NESEMAN, Privatmitteilung.

<sup>33</sup> J. H. WEISBURGER und E. K. WEISBURGER, Chem. Engng News 1966, 124.

## PRO EXPERIMENTIS

### A Simple Method of Purifying Human Sera for the Assay of Long-Acting Thyroid Stimulator

Most investigators screening sera from patients suspected of Graves' disease for the presence of the long-acting thyroid stimulator (LATS)<sup>1</sup> employ the mouse bioassay introduced by MCKENZIE<sup>2</sup>. The use of this assay is complicated by the appreciable toxicity of many human sera to the assay animals, as well as by the occurrence of 'non-specific responses' associated with the albumin fraction of some sera<sup>3</sup>. In our experience more than 1/3 of sera tested have killed half of the assay animals or more when 0.5 ml of untreated serum was administered by tail vein injection. This toxicity has made necessary the employment of laborious detoxification procedures, including chromatography on Sephadex columns<sup>4</sup> and alcohol fractionation of sera at low temperatures<sup>5</sup>. Only the last method would be expected to remove the 'non-specific' stimulatory albumin fraction.

We have used a modification of the procedure of BAUMSTARK, LAFFIN and BARDAWIL<sup>5</sup> to effect a rapid and convenient detoxification of sera for the MCKENZIE assay. Since the method was devised for the purification of 7 S γ-globulins from serum in high yield it would be expected to be applicable to the purification of LATS which has been shown to be an Immunoglobulin G<sup>6</sup>.

DEAE-Sephadex A-50 in the chloride cycle was equilibrated with M/100 phosphate buffer of pH 6.5. 2 ml of a 50% (v/v) suspension of the gel was delivered into 16 · 125 mm test tubes. After centrifugation the supernatant buffer was discarded. 5 ml of serum was added to the gel and the mixture shaken for 10 min and then centrifuged. The supernatant was transferred to a second tube containing 1 ml of packed DEAE-Sephadex and the shaking and centrifugation repeated. The final supernate was used for injection into the test mice. It was well tolerated, the mortality of test animals in a 21 h assay being about 3%, which is not significantly different from the mortality of saline-injected controls.

To assess possible losses of LATS activity due to adsorption on DEAE-Sephadex we assayed 16 sera before

<sup>1</sup> D. D. ADAMS, J. clin. Endocr. Metab. 18, 699 (1958).

<sup>2</sup> J. M. MCKENZIE, Endocrinology 62, 865 (1958).

<sup>3</sup> D. D. ADAMS, T. H. KENNEDY and H. D. PURVES, Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 44, 355 (1966).

<sup>4</sup> J. M. MCKENZIE, J. biol. Chem. 237, PC 3571 (1962).

<sup>5</sup> J. S. BAUMSTARK, R. J. LAFFIN and W. A. BARDAWIL, Archs Biochem. Biophys. 108, 514 (1964).

<sup>6</sup> J. P. KRIS, V. PLESHAKOV and J. R. CHIEN, J. clin. Endocr. Metab. 24, 1005 (1964).