

CHROM. 7245

Note

Fluorimetrische Bestimmung von Nitrosaminen nach säurekatalysierter Denitrosierung und Derivatisierung mit 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol

H.-J. KLIMISCH und L. STADLER

Forschungsinstitut der Cigarettenindustrie e.V., D 2 Hamburg 54 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 4. Oktober 1973)

Die Methodik der Spurenanalytik flüchtiger N-Nitrosoverbindungen ist in letzter Zeit vielseitig untersucht worden. In Kombination mit Anreicherungs- und clean-up-Verfahren war die Ausarbeitung spezifischer und empfindlicher Nachweismethoden von Interesse. Der direkte und damit spezifische gaschromatographisch-massenspektrometrische Nachweis der Nitrosamine ist meist nur bei höheren Nitrosaminkonzentrationen und einem sehr intensiven clean-up möglich. Andere Bestimmungsmethoden basieren ebenfalls auf dem Erhalt der N–N-Bindung. Sowohl die Reduktion der Nitrosamine zu Hydrazinen als auch die Oxidation zu Nitraminen führen unter einheitlichen Reaktionsbedingungen bei Nitrosamingemischen zu unterschiedlichen und teilweise niedrigen Ausbeuten. Ein gewisser Verlust an Spezifität stellt die gut reproduzierbare säurekatalysierte Denitrosierung¹ mit anschliessendem Nachweis der Amine dar. Sie führt dann zu sicheren Aussagen, wenn eine sorgfältige Abtrennung der freien Amine vorgeschaltet und eine Contaminierung mit Aminen vermieden wird. Bisher ist der Nachweis der Amine vorzugsweise durch Derivatisierung zu halogenhaltigen Amiden mit anschliessender gaschromatographischer Bestimmung mit dem "electron capture detector" vorgenommen worden^{2–5}. Eine weitere Derivatisierung mit anschliessender fluorimetrischer Bestimmung der Amide wurden mit Dansylchlorid ausgeführt².

In einer eingehenden Untersuchung haben wir die Vorteile des 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazols (NBD-Cl) für den mikroanalytischen Nachweis von Aminen⁶ beschrieben. In der folgenden Arbeit beschreiben wir die Derivatisierung der Amine mit NBD-Cl nach der säurekatalysierten Denitrosierung der Nitrosamine.

MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien

NBD-Cl (Merck, Darmstadt, B.R.D.) wurde aus Methanol–Wasser umkristallisiert und anschliessend sublimiert. Es enthielt dann keine fluoreszierenden Verunreinigungen mehr. Schmelzpunkt: 96–96.5°. Alle Lösungsmittel wurden frisch destilliert und über Säulen (Al₂O₃, sauer, W-200; Woelm, Eschwege, B.R.D.) gereinigt. Die Nitrosamine N-Nitrosodimethylamin und 1-Nitrosopiperidin (Schuchardt, München, B.R.D.) wurden frisch destilliert. Zur Denitrosierung wird eine Lösung von 3% HBr in Eisessig, Suprapur (Merck) hergestellt.

* Direktor: Prof. Dr. W. Döntenwill.

Denitrosierung und Derivatisierung mit NBD-Cl

125 μ l einer Lösung der Nitrosamine in Methylenchlorid (entsprechend 8.22 μ g N-Nitrosodimethylamin bzw. 6.7 μ g 1-Nitrosopiperidin) wurden zusammen mit 500 μ l 3% HBr in Eisessig in einem 1-ml Messkolben gemischt. Der fest verschlossene Messkolben wurde im Wasserbad bei 50° 30 min erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in 125 μ l Methanol aufgenommen, mit 125 μ l einer 0.05% NBD-Cl-Lösung in Methanol und 50 μ l einer 0.1 M wässrigen NaHCO₃ Lösung versetzt, fest verschlossen und 1.5 Std. im Wasserbad bei 55° erwärmt. Nach dem Abkühlen wird bis zur Marke aufgefüllt.

Chromatographie auf Polyamid-11 Folien und in situ fluorimetrische Vermessung

5 μ l der Reaktionslösung wurden mit einem Desaga Auftragegerät (Desaga, Heidelberg, B.R.D.) aufgetragen und in einer gesättigten N-Kammer dreimal entwickelt. Fließmittel: Heptan-Essigsäureäthylester-n-Butanol (8:1:1).

Die direkte *in situ* Vermessung der getrennten NBD-Amine erfolgte mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer (Zeiss, Oberkochen, B.R.D.) in Fluoreszenzanordnung P-M. Eine Quecksilberdampfampe mit einem Zeiss 436 Filter diente als Anregungsquelle. Bei einer Spaltbreite von 0.3 mm wurde der Emissionsmonochromator für NBD-Dimethylamin auf 530 nm, für NBD-Piperidin auf 537 nm eingestellt. Die quantitative Auswertung erfolgte über einen integrierenden Schreiber Vitatron UR 403. Als Vergleichsstandard wurden bekannte Mengen des entsprechenden NBD-Amins mitchromatographiert. Jeder Fleck wurde fünfmal ausgemessen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Denitrosierung der Nitrosamine mit HBr mussten wir gegenüber den Arbeitsbedingungen von Eisenbrand und Preussmann¹ die Reaktionszeit von 3 auf 15 min verlängern, da die Ausbeuten an Amin bei der kürzeren Reaktionszeit um ca. 10% niedriger lagen. Die anschliessende Umsetzung der Amine mit NBD-Cl erfolgte am günstigsten nach Abdestillieren des Eisessigs. Bei einer Neutralisation des Eisessigs mit anschliessender Derivatisierung beeinträchtigen die hohe Salzkonzentration der Lösung oder die erforderliche Verdünnung mit Wasser den Nachweis so geringer Aminmengen. Wie bereits beschrieben⁶, erhielten wir bei der *in situ* Vermessung auf Polyamid-11 Folien Eichkurven, die bei der gegebenen Geräteeinstellung von 15–150 ng/Fleck linear waren. Bei einer Konzentration von 5 μ g Nitrosamin pro ml erzielten wir bei zehn Bestimmungen folgende "recoveries": N-Nitrosodimethylamin 95.2% und 1-Nitrosopiperidin 89.2%. Dabei lag die Standardabweichung der Bestimmung von N-Nitrosodimethylamin bei 0.58, der Variationskoeffizient betrug 2.6% bei einer range von 93–98.1%.

Im Vergleich zu einer Derivatisierung mit Dansylchlorid ergeben sich wichtige Arbeitserleichterungen. Bei der dünnschichtchromatographischen Entwicklung der Dansylamide muss unter Lichtschutz in Kühlräumen gearbeitet werden. Ausserdem verblasst die Fluoreszenz der Flecken sehr rasch, da die Dansylamide insbesondere auf Kieselgelplatten empfindlich gegenüber hydrolytischen Einflüssen sind². NBD-Amine sind dagegen sehr stabil⁶, sodass diese Vorsichtsmassnahmen entfallen. Ausserdem treten keinerlei Störungen durch Eigenfluoreszenz des Reagenzes bzw. durch die bekannten Seitenreaktionen des Dansylchlorids⁶ auf.

Die Nachweisempfindlichkeit bei einer *in situ* dünnschichtchromatographischen Vermessung liegt bei beiden Aminderivaten in der gleichen Grössenordnung von 10^{-12} Mol Amin pro Chromatogramm. Dabei lassen sich nach Anreicherungs- und clean-up-Schritten Nitrosaminkonzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ mit einer Wiederfindungsrate von 90–95% quantitativ bestimmen.

LITERATUR

- 1 G. Eisenbrand und R. Preussmann, *Arzneim.-Forsch.*, 20 (1970) 1513.
- 2 G. Eisenbrand, persönliche Mitteilung.
- 3 T. G. Alliston, G. B. Cox und R. S. Kirk, *Analyst (London)*, 97 (1972) 915.
- 4 C. L. Walters, *Lab. Pract.*, 20 (1971) 574.
- 5 M. Pailer und H. Klus, *Fachliche Mitt. Österr. Tabakregie*, 12 (1971) 203.
- 6 H.-J. Klimisch und L. Stadler, *J. Chromatogr.*, 90 (1974) 141.