

Note

Quantitative Bestimmung von Nitrosaminen nach Trennung ihrer Derivate mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie

H.-J. KLIMISCH* und D. AMBROSIOUS

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

(Eingegangen am 3. November 1975; geänderte Fassung eingegangen am 16. Dezember 1975)

Für die quantitative Bestimmung von Nitrosaminen ist eine Reihe gaschromatographischer und dünnschichtchromatographischer Methoden entwickelt worden, von denen besonders Derivatisierungsverfahren auf Grund der gesteigerten Nachweisempfindlichkeit Bedeutung erlangt haben¹⁻⁷. Dabei hat sich eine Derivatisierung der durch Denitrosierung aus Nitrosaminen erhaltenen Amine zu fluoreszierenden farbigen Produkten des 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) sehr bewährt^{5,8,9}. Zur Trennung und gleichzeitigen quantitativen Bestimmung dieser sog. NBD-Amine ist eine schnelle routinegeeignete Methode notwendig. Wir berichten daher in der vorliegenden Arbeit über Versuche zur Trennung verschiedener NBD-Amine mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie.

MATERIAL UND METHODEN

Als NBD-Amine wurden folgende Derivate nach bekannten Methoden⁹ synthetisiert: 7-R-4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (R = folgende Amingruppen: N,N-Dimethylamin, N,N-Diäthylamin, N-Äthyl-N-methylamin, N-Äthyl-N-n-propylamin, Piperidin, Pyrrolidin).

Alle Trennungen werden mit einem Flüssigkeitschromatographen UFC 1000 (Hupe und Busch) in Verbindung mit einem UV-Detektor mit variablen Wellenlängen Modell HP-1030 B (Hewlett-Packard) bzw. mit einem Fluoreszenzdetektor Modell 836 (DuPont) durchgeführt. Schreiber: Kontron W + W 3212.

Trennsystem 1

Die Säule, 250 × 2.1 mm I.D., gefüllt mit 5-6 µm Kieselgel (Sorbax; DuPont, Friedberg/Hessen, B.R.D.); Druck, isobar, 46.5 atü; Säulentemperatur, 21°. Das Lösungsmittel war Cyclohexan-Essigsäureäthylester-Isopropanol (50:50:0.5); Durchflussrate, 16.5 ml/h. Unter diesen Trennbedingungen werden 5 µl einer Lösung von 100 ng der angegebenen NBD-Amine im gleichen Lösungsmittelsystem injiziert.

Trennsystem 2

Die Säule, 500 × 3 mm I.D., war gefüllt mit 55-65 µm Pellidon (H. Reeve

* Anschrift: BASF-WPF, D 6700 Ludwigshafen, B.R.D.

Angel, Clifton, N.J., U.S.A.); Druck, isobar, 10 atü; Säulentemperatur, 20°. Das Lösungsmittel war *n*-Heptan-Butanol-1-Essigsäureäthylester (38:1:1); Durchflussrate, 26 ml/h. Unter diesen Trennbedingungen wurden 5 μ l einer Lösung von 200 ng der angegebenen NBD-Amine im gleichen Lösungsmittelsystem injiziert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die nach der Denitrosierung und Derivatisierung der Nitrosamine erhaltenen NBD-Amine^{5,8,9} können durch Extraktion mit Methylenchlorid aus dem Reaktionsansatz gewonnen und entweder nach Zusatz eines internen Standards oder nach Einstellung auf ein bekanntes Volumen direkt chromatographiert und bestimmt werden. Im vorliegenden Fall wurden Lösungen mit bekanntem NBD-Amingehalt injiziert, um Aussagen über die Nachweisempfindlichkeit machen zu können.

Wie aus den in Tabelle I zusammengestellten Elutionswerten hervorgeht, lassen sich eine Reihe NBD-Amine gut trennen und bestimmen. Nur die NBD-Derivate des Pyrrolidins und des *N*-Äthyl-*N*-methylamins haben das gleiche Elutionsvolumen bei der Trennung an einer Kieselgelsäule (Fig. 1). Diese beiden Verbindungen lassen sich dagegen an einer Polyamidsäule (Tabelle I) trennen. Im allgemeinen sind

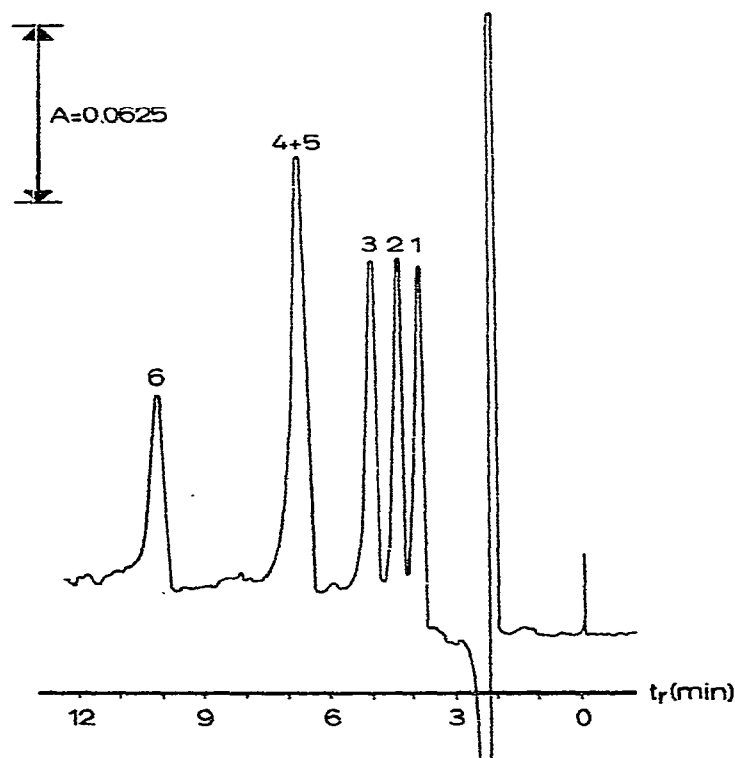


Fig. 1. Trennung folgender NBD-Amine an einer Kieselgelsäule (Sorbax®). 1 = *N*-Äthyl-*N*-*n*-propylamino-NBD; 2 = Piperidino-NBD; 3 = *N,N*-Diäthylamino-NBD; 4, 5 = Pyrrolidino-NBD — *N*-Äthyl-*N*-Methylamino-NBD; 6 = *N,N*-Dimethylamino-NBD.

TABELLE I

TRENNUNG FOLGENDER NBD-AMINE AN KIESELGEL (TRENNSYSTEM 1) ODER POLYAMID (TRENNSYSTEM 2)

NBD-Amine	V_e (ml)	
	System 1	System 2
N-Äthyl-N- <i>n</i> -propylamino-NBD	1.09	—
Piperidino-NBD	1.22	—
N,N-Diäthylamino-NBD	1.41	7.4
Pyrrolidino-NBD	1.91	5.3
N-Äthyl-N-methylamino-NBD	1.91	6.2
N,N-Dimethylamino-NBD	2.82	—

die chromatographischen Eigenschaften der Kieselgelsäule durch kürzere Retentionszeiten und damit höhere Nachweisempfindlichkeit der Substanzen günstiger.

Bei der Verwendung des UV-Detektors liegen die Nachweisgrenzen bei einer Wellenlänge von 473 nm bei ca. 25 ng der NBD-Amine in 5 μ l injizierter Probe. Mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors liess sich die Empfindlichkeit noch erhöhen. Sie lag bei Verwendung eines Anregungswellenlängenfilters für 365 nm und eines Emissionswellenlängenfilters für 451 nm bei ca. 0.5 ng NBD-Amin in 5 μ l injizierter Probe. Damit ist diese Methode zum Mikronachweis von Nitrosaminen geeignet.

LITERATUR

- 1 M. Pailer und H. Klus, *Fachliche Mitt. Oesterr. Tabakregie*, 12 (1971) 203.
- 2 J. W. Rhoades und D. E. Johnson, *Nature (London)*, 236 (1972) 307.
- 3 G. M. Telling, T. A. Bryce und J. Althorpe, *Agr. Food Chem.*, 19 (1971) 937.
- 4 A. R. Mosier und C. E. Andre, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 372.
- 5 H.-J. Klimisch und L. Stadler, *J. Chromatogr.*, 90 (1974) 223.
- 6 J. B. Brooks, C. C. Alley und R. Jones, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 1881.
- 7 T. A. Gough, K. Sugden und K. S. Webb, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 509.
- 8 H.-J. Klimisch und L. Stadler, *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.*, im Druck.
- 9 H.-J. Klimisch und L. Stadler, *J. Chromatogr.*, 90 (1974) 141.