

Afdeling Contaminanten 1982-05-10

Pr.nr. 505.0410

Verslag 82.37 W

Onderwerp: Literatuuronderzoek naar de
bepalingsmethoden van niet-vluchtige
nitrosaminen.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling
Contaminanten (4x), afdeling Normalisatie (Humme),
afdeling Projektbeheer, projekteleider, Drabbe (2x).

VERSLAG 82.37

Project: Ontwikkeling methoden voor het aantonen en bepalen van
nitraat, nitriet en nitrosaminen.

Onderwerp: Literatuuronderzoek naar de bepalingsmethoden van niet-
vluchtige nitrosaminen.

Doel:

Het geven van een literatuuroverzicht van de bepalingsmethoden van niet-vluchtige nitrosaminen in voedingsmiddelen en andere agrarische produkten. In eerste instantie werd van een computer uitdraai van bepalingsmethoden van niet-vluchtige nitrosaminen uitgegaan, maar de informatie was niet altijd bruikbaar en recent zodat dit alleen maar een basis geweest was om verder te zoeken.

Tevens wordt een algemene inleiding van de nitrosaminen gegeven.

Samenvatting:

Aanwezigheid van de n-nitrosaminen in produkten is gezien de verwachte carcinogene eigenschappen ongewenst.

De detektie van de verbindingen op ppb-niveau is vanwege bovengenoemde carcinogeniteit noodzakelijk. Behalve een algemene inleiding over de fysische en chemische eigenschappen, de bronnen, het voorkomen en de carcinogeniteit van n-nitrosaminen werden de bepalingsmethoden van niet-vluchtige nitrosaminen bestudeerd.

Voor de detektie van n-nitrosaminen is de thermische energieanalysator (TEA) ontwikkeld.

Dit systeem gekoppeld aan de GC maakt het mogelijk verschillende componenten afzonderlijk te bepalen. Hierbij is het noodzakelijk om na extractie en clean-up de niet-vluchtige verbinding in een vluchtige derivaat om te zetten.

Bepaling via GLC-MS vindt plaats door na extractie en opwerking de verbindingen om te zetten in een vluchtig stabiel derivaat.

Vaak wordt gebruik gemaakt van specifieke ion monitoring massaspectrometrie.

HPLC gekoppeld aan de TEA is geschikt voor de bepaling van niet-vluchtige nitrosaminen. In complexe matrices is opwerking voor het isoleren van de componenten vereist voordat scheiding en detektie plaatsvindt. Terwijl in een eenvoudige matrix dit hoogstens het oplossen van de componenten vereist in een oplosmiddel.

Conclusie:

De TEA is geschikt voor detektie van n-nitrosaminen op het ppb-niveau. Scheiding van de afzonderlijke componenten is mogelijk door de TEA te koppelen aan de GC of HPLC. GLC al dan niet gekoppeld aan een TEA vereist een derivatisering van de niet-vluchtige verbinding naar een vluchtige stabiel derivaat, na extractie en clean-up, wat bewerkelijk is.

HPLC-TEA vereist deze derivatisering niet en is van de voornaamste analysemethoden uitermate geschikt voor de bepaling van niet-vluchtige nitroaminen in zowel eenvoudige als complexe matrices.

Omdat HPLC-TEA niet als voldoende bewijs kan worden beschouwd voor gemeten positieve resultaten is conformatie nodig. Hiervoor is GLC-MS erg geschikt ook al vereist dit derivatisering na extractie en opwerking.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra
Medewerker/Samensteller: C.F.J. Drabbe
Projectleider: W.A. Traag

1. ALGEMEEN

1.1 Inleiding n-nitrosaminen

De meeste nitrosaminen - in het algemeen n-nitrosoverbindingen - hebben extreem kankerverwekkende eigenschappen voor uiteenlopende soorten proefdieren en naar aangenomen wordt ook voor de mens (1).

Sporen nitrosaminen kunnen zowel buiten (exogeen) als in het lichaam (endogeen) ontstaan. 100 van de 130 onderzochte nitrosaminen (2) blijken carsinogeen te zijn waarbij de werking varieerde van zwak tot extreem sterk. opvallend is de sterk organotrope werking (d.w.z. de nitrosoverbinding is in staat kanker in een bepaald orgaan te verwekken) van nitrosaminen en n-nitroverbindingen in het algemeen.

Hun aanwezigheid in voedingsmiddelen en in het leefmilieu is ongewenst en moet waar mogelijk worden voorkomen of teruggedrongen.

N-nitrosaminen kunnen worden onderverdeeld in 2 groepen, namelijk in een vluchtige- en niet-vluchtige groep. De term "niet-vluchtige nitrosaminen" is van toepassing op alle n-nitrosoverbindingen die niet vluchtig zijn in stoom (3). Zulke verbindingen omvatten lange ketens diethyl nitrosaminen, n-nitrosooureas, n-nitrosopeptides en n-nitroso-derivaten van organische basen zoals n-nitrososarcosine en n-nitroso-proline.

De meeste hoog moleculaire nitrosaminen zijn niet-vluchtig. Enige voorbeelden van zowel vluchtige als niet-vluchtige nitrosaminen:

Tabel 1. Enige voorbeelden van nitrosaminen.

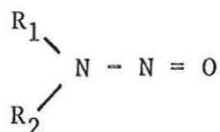
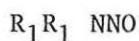
n-nitrosamine	vluchtig	niet-vluchtig	mol gewicht (a.m.e.)
N-DMA 1)	x		74
N-PYR	x		100
N-PIP	x		114
N-PRO 2)		x	144
N-SAR 2)		x	118
H-HPRO 2)		x	160
N-HPYR		x	116
N-NNN		x	177
N-DELA		x	134

- 1) Voor de betekenis van de afkorting en structuurformule zie pag. 20
- 2) Is een n-nitrosaminozuur.

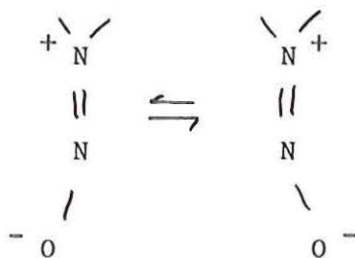
Nitrosoverbindingen zijn in het algemeen onstabiel en hebben nogal een grote verscheidenheid aan fysische eigenschappen vooral betreffende vluchtige en oplosbaarheid. Ondanks de relatief eenvoudige chemische structuur van nitrosaminen (zie 1.2) blijft het moeilijk hiervoor betrouwbare analysemethoden te ontwikkelen voor het bepalen en kwantificeren van sporen nitrosaminen in het microgram-nonogram gebied. Dit komt omdat het een groep verbindingen is die als "indifferent" te boek staan en zich meestal bevinden in een complete matrix.

1.2 Eigenschappen

De uitdrukken nitrosaminen wordt dikwijls gebruikt als een korte en handzame benaming voor een zeer grote groep van verbindingen, namelijk de n-nitrosoverbindingen. De algemene formule van deze verbinding is



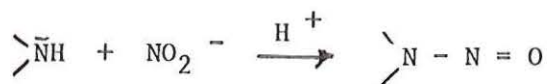
De enigste overeenkomst van de n-nitrosaminen is de NNO functionele groep. Het zijn vaste stoffen of oliën die geel zijn vanwege lichtabsorptie door de NNO groep. De electronen delocalisatie in de NNO groep zorgt voor een voldoende dubbele band karakter op de N-N binding, zodat de cis en trans isomeren vaak gescheiden kunnen worden.



Een voorbeeld is de cis en trans vorm van NNNN.

1.3 Syntheses

Nitrosaminen ontstaan zeer gemakkelijk door reactie van secundaire aminen en nitriet in zuurmilieu (optimale pH omstreekt 3-4)



Deze verbindingen kunnen vlot worden gesynthetiseerd en kunnen onder bepaalde omstandigheden in het leefmilieu gevormd worden. De nitrosering verloopt langzamer naarmate het secundaire amine een sterkere base is. Alhoewel primaire en tertiaire aminen ook n-nitrosaminen kunnen vormen, is de opbrengst in het algemeen veel lager.

Nitrosaminen kunnen ook ontstaan uit secundaire aminen en stikstofdioxiden (NO_x). Deze laatste zijn aanwezig in tabaksrook, verbrandingsgasen en verontreinigde lucht.

De vorming van nitrosaminen kan zowel gekatalyseerd als geremd worden. Katalysatoren zijn bijvoorbeeld fenolen, formaldehyde, thiocynaat, suikers en alcoholen. Ascorbinezuur (vitaminen C) en α -toxoferyl (vitamine E) zijn voorbeelden van remmers.

1.4 Bronnen van nitrosaminen

Secundaire aminen en nitriet of stikstofdioxiden geven hoofdzakelijk aanleiding tot de vorming van nitrosaminen. In tabel 2 zijn de belangrijkste milieu-bronnen van nitroserende reagentia gegeven. Opgemerkt wordt dat nitraat in bepaalde produkten in vivo kan worden gereduceerd tot nitriet en derhalve eveneens moet worden beschouwd als een potentiële nitrosaminevormer.

Tabel 2. Potentiële bronnen van nitroserende reagentia in het leefmilieu

Nitraat	Nitriet	NO_x
<u>Algemene bronnen</u>		
Groenten	Speeksel	Tabaksrook
Vleeswaren	Vleeswaren	Uitlaatgassen Verontreinigde lucht
Drinkwater	Ongekoeld bewaarde groenten	
Kaas		
Speeksel	Geneesmiddelen	
<u>Technologische, Agrarische en beroepsmatige produkten</u>		
Vleeswaren	Vleeswaren	Verbrandingsgasen
Pekels	Pekels	
Kunstmest	Corrosieremmers	
Stalmest		

Terwijl tabel 2 de nitroserende agentia opsomde, geeft tabel 3 de belangrijkste nitroseerbare substraten in het milieu.

Tabel 3. Nitroseerbare substraten in het leefmilieu

Algemeen	Beroepsmatig
Mout	Snijoliën
Vis	Pesticiden
Tabaksrook	Hulpstoffen bij de
Specerijen	leder en rubber fabricage
Vlees	Kosmetica
Geneesmiddelen	
Kosmetica	
Pesticiden	

Mout, vis, tabak en specerijen zijn rijk aan secundaire en/of tertiaire aminen. Veel geneesmiddelen zijn zelfs voor de volle honderd procent secundaire of tertiaire aminen en dus belangrijk nitroseerbare substraten. De blootstelling van de mens aan nitrosaminen afkomstig uit bronnen anders dan voedingsmiddelen kan vele malen groter zijn (tot enkele mg/kg) dan blootstelling aan of belasting met nitrosaminen aanwezig in de voeding (enkele 10-den tot 10-tallen µg/kg).

1.5 Het voorkomen van niet-vluchtige nitrosaminen

Tabel 4 geeft een opsomming van produkten waarin niet-vluchtige nitrosaminen zijn aangetoond.

Tabel 4. Potentiële bronnen van niet-vluchtige nitrosaminen in het leefmilieu

Produkt	Nitrosoverbinding
Gebraden bacon	NPRO
	NPYR
	NSAR
Ongebraden bacon	NPRO
	NBAR

Produkt	Nitrosoverbinding
Gebakken spek	NHPYR
Gerookt vlees	NPRO
	NSAR
Overige vleesproduken	NDPA
	NHPYR
Tabaksrook	
Onverbrande tabak	NNNN
pruim- en snuiftabak	
Haring	NDPA
Cornflakes	NSAR
Levensmiddelen	NMPIP
	NHPYR
Kosmetica	NDELA
(shampo)	
Synthetische snijvloeistof	NDELA
Siliconenolie	NHPYR
	NSAR

Carcinogeniteit

De meeste n-nitrosoverbindingen zijn sterk kanker verwekkend voor een grote verscheidenheid van diersoorten. Meer dan 100 n-nitrosoverbindingen zijn getest en meer dan 80 waren meer of minder potentiël carcinogeen op experimentele dieren.

De n-nitrosaminen zijn in het algemeen orgaan selectief. De belangrijkste organen die beïnvloed worden door nitrosaminen zijn de lever en de longen. Er treden, buiten lever en longen, gezwellen op in de slokdarm, neus, pancreas, nieren en blaas. De nitrosaminen op zich zijn niet carsinogeen, maar vereïssen metabolische aktivering om het carsinogeen-effekt te veroorzaken. Het mechanisme dat de carsinogeniteit van de nitrosamine veroorzaakt is niet helemaal begrepen alhoewel het mechanisme voor de metabolische aktivering van n-nitrosaminen wel gepostuleerd is (4).

Gedacht wordt dat eenvoudige nitrosaminen hun kankerverwekkende aktiviteit uitoefenen na metabole aktivering tot een alkylerend agens, bijvoorbeeld het carbonium-ion (CH_3^+) welke bepaalde basen in het DNA en RNA kan aangrijpen.

Er is geen bewijsmateriaal dat aantoonst dat nitrosamine kankerverwekkende eigenschappen hebben voor de mens. Maar het zou echter zeer onverwacht zijn als dit niet het geval blijkt te zijn, gezien hun effect bij diverse, zeer uiteenlopende diersoorten. En er is al vast komen te staan dat de metabolische processen van aktivering van bepaalde nitrosaminen in dieren en in de mens identiek zijn (1).

Tabel 5. Toxicologische eigenschappen van enige n-nitrosaminen in een BD rat

Verbinding	LD50 (mg/kg)	Meest voorhand is
NDELA	7500	lever
NPYR	900	lever
NPRO	a	
NPIP	200	lever, slokdarm
NNNN	b	

a niet carsinogeen voor een BD rat

b niet onderzocht in een BD rat

N-nitrosaminen (NPRO, NSAR en NPIP), behalve NSAR zijn niet carsinogeen voor experimentele dieren. Alhoewel deze omgezet kunnen worden in carsinoge n-nitrosaminen door decarboxylering tijdens koken of bakken. Gerapporteerd is dat NPRO omgezet kan worden in carsinogeen NPYR (5), NSAR in NDMA en NHPRO in NHPYR gedurende het bakken van bacon.

1.7 Toleranties

Het niveau van de nitrosaminen waarvan aangenomen worden dat ze gevaarlijk zijn voor de mensen is nog een moeilijk probleem. De vraag dient gesteld te worden of de gevonden gehalten biologisch significant zijn, d.w.z. welke drempelwaarde kanker verwekkende verbindingen door de mens opgenomen kunnen worden zonder, ook op langere termijn, schade te berokkenen.

Voor carsinogene stoffen geldt in principe de "nul tollerantie".

2. ANALYSEMETHODEN

2.1 Inleiding

De mogelijke aanwezigheid van n-nitrosaminen in voedsel en hun mogelijke in-vivo vorming voorziet in een behoefte voor de detectie en bevestiging van lage niveaus van n-nitrosaminen in nogal complexe mengsels opgebouwd uit organische verbindingen.

HPLC systemen werden ontwikkeld voor de bepaling van niet-vluchtige n-nitrosaminen. Een variëteit van detectiesystemen, b.v. polarografie, spectrofotometrische scheiding van de NNO binding gevolgd door detectie van het resulterende nitriet, alkalische vlam detectie, elektrolytische geleidbaarheid (Coulson detector) en massaspectrometrie zijn ontwikkeld. De meest kenmerkende bijdrage aan de n-nitrosamine-analyse is de thermische energie analysator geweest, die gekoppeld kan worden aan zowel HPLC als aan de GC.

Bevestiging van de afzonderlijke nitrosaminen wordt in het algemeen verkregen door massaspectrometrie (MS). Hoge resolutie GC-MS, als GC-MS bij verschillende single-ion instellingen, kan ook worden gebruikt als een specifieke detector, speciaal wanneer naar een bepaald nitrosamine gezocht wordt.

Er is nog geen analysetechniek die volledig betrouwbaar is voor de bepaling van niet-vluchtige nitrosaminen. Dit komt omdat niet-vluchtige nitrosaminen nogal verschillen in chemische en fysische eigenschappen. De voornaamste bepalingsmethoden zullen onderstaand besproken worden.

2.2 Thermal Energy Analyser (T.E.A.)

Van een doorbraak op het gebied van de analyse van n-nitrosoverbindingen kan gesproken worden toen Fine en medewerkers in 1973 een chemiluninescantie detector introduceerde speciaal ontworpen voor het bepalen van nitrosaminen (8).

In deze detector, de zogenoemde Thermal Energy Analyser (TEA) worden alle n-nitrosoverbindingen specifiek katalytisch gepyrolyseerd waarbij stoichiometrisch per N-NO structuur fragment één molecuul stikstofmonoxide (NO) vrijkomt. Het pyrolysaat wordt vervolgens m.b.v. een inert dragergas door een koude val met een temperatuur van -150°C geleid, waarbij het NO wordt gescheiden van alle produkten niet-vluchtige bij deze temperatuur.

Het aldus gezuiverde NO laat men vervolgens reageren met in situ gegenereerd ozon waarbij geëxiteerd stikstofdioxide ontstaat.

Dit laatste valt snel terug in de grond-toestand onder emissie van straling in het nabije infrarood.

Na passage van de straling door een roodfilter wordt deze gemeten m.b.v. speciaal geselecteerde fotomultipliator. Een schematische weergave van de TEA is

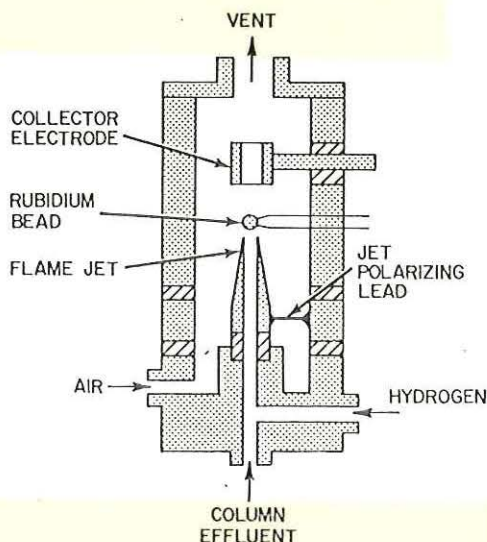


fig. 1. Vereenvoudigd schema van de weergegeven in figuur 1. Thermal Energy Analyzer.

Behalve een kleine groep verbindingen die eveneens een thermolabiele NO groep bevatten zoals het nitraat- en nitrietion, organische nitraten en nitrieten sommige polynitro-verbindingen, nitrosaminen en sommige alifatische C-nitrosoverbindingen zijn slechts zeer weinig andere verbindingen bekend die een vals positieve responsie in de TEA veroorzaken (2).

M.J. Downes e.a. 1976 (9)

Bepaling van NSAR in voedsel of een andere biologische matrix waarbij de nitrosamine met waterstofbromide gedenitroseerd wordt om een vluchtig nitrosylbromide te vormen. Na de halogenatie kan de nitrosamine bepaald worden als NO.

Respons tenminste lineair tot 200 µg.

Detektielimiet: < 6 mg.

Belangrijke storing: NaNO₂.

G.S. Drescher e.a. 1978 (10)

Snelle bepaling van totale n-nitrosaminen in water, urine en grond. 100 gram monsters wordt geëxtraheerd in methyleenchloride, teruggeëxtraheerd met gedestilleerd demiwater (voor nitrietverwijdering), gedroogd (NASO₄), geconcentreerd, gedenitroseerd (zuur gekatalyseerd) en gedetekteerd via TEA.

Detektielimiet: < 10 ppb voor meeste nitrosaminen

NDPA : 10 mg

NPRO : 70 mg

Recoverie : NPRO : geen (urine en water) tot $11 \pm 2\%$ (grond)

D.H. Fin e.a. 1975 (11)

Snelle bepaling van o.a. NDPA in "grond" vlees en haring.

Methode berust op een simpele extraktiemethode. Na homogenisering met dichloormethaan, schudden (30 min) en centrifugeren (5 min. 3500 rpm) kan een gedeelte direkt geïnjecteerd worden in de TEA.

Recoverie : 75-100% (20-242 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gespikt).

C.L. Walters e.a. 1978 (12)

Bepaling van NSAR in voedsel (cornflakes) gebaseerd op gemodificeerde methode gebruikt door Downes e.a. (9).

De methode is direkt toepasbaar op voedsel zonder extractie en clean-up op microgram niveau.

Methode maakt onderscheid tussen anorganische NO_2 en n-nitrosodifenylamine.

Lineair verband tussen tenminste 2-80 μg NSAR.

Detektielimiet: 0,7 fg uitgaand van 10 gram cornflakes

Reproduceerbaarheid: < 15% bij 2 $\mu\text{g}/\text{gram}$.

Opgemerkt wordt dat geen respons (c.q. recoverie) bij 50 μg NSAR/10 gr cornflakes waargenomen wordt.

2.4 GLC-TEA

De thermische energie analysator kan gekoppeld worden aan een gaschromatografisch systeem waardoor het mogelijk is de afzonderlijke nitrosaminen in complete matrixen te scheiden en deze afzonderlijk te bepalen.

G. Eisenbrand e.a. 1975 (13)

Methode voor bepaling van NHPYR in voedsel.

Het monster wordt gehomogeniseerd (methanol/water/celite).

Het filtraat geconcentreerd (rotavap), uitgeschud (pentaan, pentaan/dichloormethaan en ethylformiaat), gedroogd (Na_2SO_4) en geconcentreerd (N_2 -stroom) voor GLC-TEA analyse.

Detektielimiet: < 0,25 ng (signaal/ruis 4:1)

Recovery : 55%.

De nitrosaminozuren NPRO, NSAR en NHPRO worden ook bepaald. Opwerking is arbeidsintensief voor analyse kan plaatsvinden via GLC-TEA.

Detektielimiet: < 1 ng (signaal/ruis 4:1)

Recovery : 56% NSAR 10 µg/kg toegevoegd
54% NPRO 10 µg/kg toegevoegd
15-30% NMPRO 16 µg/kg toegevoegd.

G. Eisenbrand e.a. 1976 (7)

Bepaling van NHPYR op ng/kg niveau in voedsel (gebakken spek).

De methode is reeds eerder beschreven (13), maar in detail iets aangepast.

Detektielimiet: < 0,25 ng uitgaand van 50 gram

Recovery : 55%.

Ook is er een methode beschreven voor de bepaling van NPRO, NHPRO en NSAR in voedsel, welke gebaseerd is op de silyring met methylsilyltri-fluorazijnzuur (MS-TEA) zoals eerder beschreven (13).

De verbindingen worden via GLC-TEA gescheiden.

Detektielimiet: < 1 ng (50 gram monster)

Recovery : 70% NSAR
80% NPRO
50% NHPRO.

J.S. Lee e.a. 1978 (14)

NHPYR wordt bepaald in gebakken spek.

De nitrosamine wordt geëxtraheerd van gebakken spek en "fried-out" vet met water-methanol (3:2). Na verwijdering van de nitriet rest met ammonium sulfaat wordt NHPYR door continue extractie met dichloormethaan van de water-methanol fase verwijderd.

Identifikatie wordt bereikt door omzetting van NHPYR naar zijn trimethylsilyl derivaat (met MSTFA) gevolgd door scheiding via GLC-TEA en bevestigd met GLC-MS. Kwantificering en recovery studies worden verkregen zonder derivatisering.

Detektielimit: 0,07 µg/kg

Recovery : (56-67)% 95% betrouwbaarheidsinterval.

2.5 GLC

De scheiding van componenten via gas-vloeistofchromatografie is ook mogelijk zonder TEA detektie. Componenten worden gaschromatografisch gescheiden waarna b.v. FID detektie plaatsvindt.

J.D. Hondt 1976 (15)

Een clean-up procedure is gegeven voor isolatie van de nitrosaminozuren NPRO, NHPRO en NSAR in vleesprodukten.

Na malen met een aangezuurd mengsel van methanol en water wordt het supernatant na toevoeging van $ZnSO_4$ en NaOH gecentrifugeerd. Respektievelijk wordt het neerslag en de methanol verwijderd. Na aanzuring wordt het mengsel met ethylether geëxtraheerd (10 h!).

Na watertoevoeging wordt het etherextract verwijderd. De oplossing wordt over twee kolommen geleid en het extract kan gekwantificeerd worden met de fotolytische nitraatmethode, polarografie of GLC (verestering en extractie in dichloormethaan).

De grootste hoeveelheden nitrosaminozuren worden aangetroffen in gerookt paardevlees, spek, leverprodukten en gebraden gehakt.

Recovery : model systeem 90-100%
vlees 80-110%.

J.D. Dhont e.a. 1976 (16)

De ontwikkelde methode voor bepaling van NPRO, NHPRO en NSAR in vlees, is hiervoor beschreven (15).

De methode is iets aangepast, i.p.v. extractie met ethyleter (10 uur) wordt er 5 maal geëxtraheerd met ethylacetaat wat het beste oplosmiddel bleek te zijn voor nitrosaminozuren. Na enkelvoudige scheiding over een ionenwisselaar worden de componenten bepaald via GLC na omzetting naar hun methylester of door fotolyse en aansluitende bepaling van het gevormde nitriet-ion.

De methylesters van NPRO en NSAR worden geïdentificeerd via GLC-MS. Het NHPRO methylester derivaat kan niet worden bepaald via GLC-MS.

T. Ishibashi e.a. 1980 (6)

Bepaling van de gehydroxyleerde nitrosaminozuren NSAR, NRPO en NHPRO en NPIC (n-nitrosopipecoliczuur) gebaseerd op het volgende principe; de carboxylgroepen van de zuren worden geoxideerd met peroxytrifluorazijnzuur (PTFA) om de respektievelijke methylesters te vormen.

Bepaling via GLC-ECD en conformatie met GLC-MS.

Veresteringsgraad	: > 95%
Oxidatie	: 100%
Onderzocht lineair gebied	: 200-800 pg
Detektielimiet	: 200 pg.

H. Oshima e.a. 1979 (17)

Derivativering van o.a. de gehydroxyleerde n-nitrosamine NHPYR en NDELA verkregen door acylering, trifluoracelering, trimethylselering en methylering waarbij de vluchtigheid en gevoeligheid van de derivaten door GLC-FID of GC-MS detektie worden vergeleken.

De onderzochte nitrosaminen worden succesvol gederivatiseerd door acylering of trimethylsilering. De geacyleerde derivaten zijn gemakkelijk te bereiden en zelfs meer specifiek dan trimethylsilering.

Detektielimiet: methylering 5 ng
acylering 5 ng.

J.H. Wolfraam e.a. 1977 (18)

Twee gevoelige detektiesystemen worden beschreven voor de quantitative bepaling van NPRO in:

1. De nitrering gevolgd door derivatisering van proline met 7-chloor-4-nitro benzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl). Het gevormde hoog fluori-serende NBD-proline wordt bepaald door TLC of HPLC.
2. Vluchtige methylesters van NPRO wordt bereid en gedetekteerd door GLC en bevestigd door GC-MS.

De HPLC-fluorescentie techniek is ongeveer 10 x gevoeliger dan GLC-methode.

HPLC-fluorescentie

Lineair tot : 1150 ng

Detektielimiet: 0,5 ng NPRO

Recovery : 96% uitgaande van 0.1 μ mol NPRO.

TLC

Detektielimiet: 5 ng NPRO

GLC

Detektielimiet: 7 ng NPRO.

2.6 GLC-MS

Een gaschromatografisch systeem gekoppeld aan een massaspectrometer maakt analyse van afzonderlijke componenten in complete matrixen op zeer laag (ppb) niveau mogelijk.

G. Eisenbrand e.a. 1975 (19)

Bepaling van standaarden nitrosaminozuren NSAR, NPRO, NHPRO die in voedsel voor kunnen komen m.b.v. lage resolutie.

Methode is gebaseerd op trimethylsilering en GLC analyse "single ion monitoring" MS van de vluchtige trimethylsilyl derivaten van de nitrosaminozuren.

Bereiding van trimethylsilyl derivaten; het oplosmiddel acetonitril waarin de nitrosaminozuren zijn opgelost, worden onder vacuum afgedampt en gedroogd (exicator). Het droge residu wordt opgelost in MSTFA en na 30 minuten (ambiënt) gestaan te hebben geïnjecteerd in de GC. Omdat TMS-derivaten goede chromatografische eigenschappen bezitten lijkt het de methode voor kwantitatieve bepaling op µg/kg niveau in voedsel.

Zowel vlam-ionisatie als single-ion monitoring worden gebruikt voor kwantitatieve bepaling via GLC-MS.

Analyse GLC-FID : standaarden

GLC-MS : voedsel, vanwege lage specificiteit van FID

GLC-MS : 2 ng te bepalen

1-10 ng lineair.

T.A. Gough 1978 (20)

Het zeer uitgebreide artikel geeft een overzicht van de bepaling van - vooral vluchtige - nitrosaminen via MS met als voornaamste applicatie GLC-MS.

GS kan gekoppeld worden aan TEA voor de bepaling van de vluchtige nitrosaminen terwijl de TEA gekoppeld aan de HPLC geschikt is voor de bepaling van niet vluchtige nitrosaminen.

De techniek die het meest geschikt is voor conformatie van de componenten is MS. De artikel geef ondermeer verwijzing naar bepaling van NPRO in ham, NHPYR in gebraden ham en NPRO en NSAR in gerookt vlees. Er zijn verschillende methode voor monitoring van nitrosaminen via GLC-MS. Lage resolutie MS is geschikt voor analyse van relatief eenvoudige mengsels. Complexe mengsels daarentegen moeten worden geanalyseerd door de meer geavanceerde GLC-MS technieken zoals beschreven in dit artikel.

W.T. Rainey e.a. 1978 (21)

Artikel bevat veel informatie voor de praktische uitvoering van nitrosaminen bepaling via MS. Er wordt een lijst gegeven van 146 nitrosaminen waarin fysische constanten en massaspectra gegeven worden.

N.P. Sen e.a. 1976 (22)

Methode voor de bepaling van NHPYR in gekookte spek (cooked bacon). Na monsterextractie met acetonitril worden de vetten verwijderd door vloeistof-vloeistof extractie met n-heptaan. Clean-up via chromatografie over een zure alumina kolom. NHPYR wordt omgezet in een methylether derivaat en bepaald via GLC-MS.

Gepretendeerd wordt dat deze methode betrouwbaar is voor de bepaling van NHPYR in voedsel.

Detektielimiet: 2 µg/kg

Recovery : 51-102% (10-100 µg/kg gespikt).

N.P. Sen e.a. 1976 (23)

Bepaling van NHPYR in gebakken spek en andere vleesprodukten via GLC-MS. Na derivatisering van NHPYR naar het stabiel vluchtige 3-methoxy-1 nitrosopyrolidine wordt de verbinding geïdentificeerd via GLC-MS met specifieke ion monitoring voor NO^+ of het molekuul ion wordt gebruikt. Detektielimiet: 1 ng.

N.P. Sen e.a. 1978 (24)

Voor bevestiging van niet-vluchtige nitrosaminen wordt GLC-MS (hoge resolutie) gebruikt.

NHPYR wordt bepaald in gebakken en ongebakken spek na omzetting in de methylether door methylyring met methyljodide (basisch gekatalyseerd) en bepaald via GLC-MS (chemische ionisatie methode).

Detektielimiet: 2 µg/kg

Recovery : 51-102% (spiking 10-100 µg/kg)

Verder is er een methode ontwikkeld voor de bepaling van de nitrosaminozuren NPRO en NHPRO in ongebakken spek welke gebaseerd is op de extractie van spek met basisch acetonitril, clean-up door vloeistof-vloeistof verdeling tussen een waterige acetonitril oplossing en n-heptaan en chromatografie voor een zure alumina kolom. Semi-kwantitatieve bepaling van NPRO via TLC (conformatie wordt verkregen door de zuren om te zetten naar de methylesters, aansluitende clean-up en bepaling via GC-MS (specifieke ion monitoring).

NHPRO-methylester wordt omgezet in zijn heptafluorbutyryl (HFB) derivaat voor GLC-MS analyse.

Recovery NPRO : 80-90% spiking 100-500 µg/kg

NHPRO : 21%

HFB-NHPRO : laag

Aangetoond NPRO: 24 µg/kg (minimum in een monster)

HFB-NHPRO : 100 pg.

2.7 HPLC-TEA

De thermische energie analysator gekoppeld aan een HPLC is zeer geschikt voor de bepaling van niet-vluchtige nitrosaminen in complexe matrixen op ppb-niveau. Derivatisering zoals bij GLC (-TEA) kan achterwege gelaten worden.

T.Y. Fan e.a. 1978 (25)

Kwalifikatie van niet-vluchtige nitrosaminen in 3 klassen nl, klasse II lage polariteit, klasse III niet-ionisch, hoge polariteit en klasse IV ionisch, hoge polariteit. HPLC-TEA wordt gebruikt voor bepaling van de afzonderlijke componenten.

Eenvoudige matrix:

Vloeibare monsters zonder voorbehandeling direkt te introduceren;

Vaste monsters worden opgelost in een geschikt oplosmiddel voor introductie.

Complexe matrix:

Vereist uitgebreide opwerking voor het isoleren van de componenten. Een schema voor de fraktionering van de verschillende klassen voor analyse in biologisch en milieu monsters wordt gegeven.

D.H. Fine e.a. 1976 (26)

Eenvoudige analytische procedures worden beschreven voor de kwantitatieve bepaling van niet-ionische niet-vluchtige nitrosaminen op ppb-niveau in levensmiddelen zoals gekookt spek, vleesproduken, vis en liqueuren.

Bepaald worden n-nitrosodifenylamine en -atrazine in vodka, n-nitrosobenzylfenylamine in vis, n-nitrosocarbaryl, -carbazole en -benzylfenylamine in gekookt spek en n-nitrosobenzylfenylamine in andere vleesprodukten.

Recovery : 50-90% verschillende componenten in verschillende monsters op 10 µg/kg niveau.

D.H. Fine e.a. 1976 (27)

Gevoeligheid, lineairiteit, reproduceerbaarheid, selectiviteit en de evenredigheid respons, hoeveelheid component worden besproken van de HPLC-TEA.

HPLC-TEA staat detectie toe van massafrakties $< 10^{-9}$ of massaconcentraties $< 1 \mu\text{g/l}$ zelfs in "vuile" milieumonsters zoals landbouwgewassen, organen van dieren en levensmiddelen.

HPLC-TEA staat routine analyse van niet-vluchtige nitrosoverbinding in het milieu toe.

R.C. Massey e.a. 1982 (28)

Bij aanwezigheid van een waterige HPLC mobiele fase is de detector respons onstabiel. HPLC-TEA analyse van niet-vluchtige nitrosaminen is alleen nog maar bruikbaar voor analyse van een bepaald aantal nitrosaminen klassen zoals niet polaire-, polaire (b.v. NDELA) en ioniseerbare nitrosaminen (nitrosaminozuren) vanwege ionisatie onderdrukking veroorzaakt door de mobiele vloeistof fase. Door gebruikt te maken van microbore HPLC kunnen ionische nitrosaminen, zoals zwitterionen, kwaternaire stikstof verbindingen, bepaald worden.

HOOFDSTUK III

Diskussie en konklusie

In de overzichtstabel worden produkt, analysemethode en indien mogelijk detektiegrens en recovery samengevat.

Bij de bepaling met een TEA is het niet mogelijk om meerdere componenten afzonderlijk te scheiden en te detekteren en lijkt dus weinig zinvol.

Analyse via GLC-TEA maakt scheiding van componenten wel mogelijk maar vereist een derivatering van de niet-vluchtige verbinding naar een vluchtig stabiel derivaat, nadat de componenten eerst geëxtraheerd en opgewerkt zijn.

Dit geldt ook voor de bepaling via GLC zonder TEA detektie. De gevoeligheid zal kleiner zijn omdat de TEA bij uitstek geschikt is voor detektie van nitrosaminen. HPLC-TEA analyse is van de voornaamste analysemethode uitermate geschikt voor het bepalen van niet-vluchtige nitrosamine in eenvoudige en complete matrixen. In een vloeibare eenvoudige matrix is zelfs rechtstreeks injectie mogelijk, terwijl vaste complete matrixen alleen opwerking vereist voor het isoleren van de componenten.

GLC-MS analyse vereist ook derivatisering na extractie en clean-up, maar is uitstekend geschikt voor conformtie van de resultaten gevonden door andere methoden omdat de andere technieken niet als voldoende bewijs kunnen worden beschouwd voor identifikatie van de nitrosaminen. Dit komt vanwege de verschillen in chemische en fysische eigenschappen van niet-vluchtige nitrosaminen.

Overzichtstabel analysemethoden

Produkt	nitro- samine	analyse- methode	absolute detektie- grens	Recovery %	Auteur
Voedsel	NSAR	TEA	< 6 ng	-	Downes 1976
Water, urine grond	NDPA NPRO	TEA	10 ng 70 ng	- grond: 11	Drescher 1978
Vlees, haring	NDPA	TEA	-	75-100	Fine 1975
Conflakes	NSAR	TEA	0,7 µg	73	Walters 1978
Voedsel	NHPYR	GLC-TEA	< 0,25 ng	55	Eisenbrand 1975
	NSAR		< 1 ng	56	
	NPRO		< 1 ng	54	
	NHPRO		< 1 ng	15-30	
Gebakken spek	NHPYR	GLC-TEA	< 0,25 ng	55	Eisenbrand 1976
	NSAR		< 1 ng	70	
	NPRO		< 1 ng	80	
	NHPRO		< 1 ng	50	
Gebakken spek	NHPYR	GLC-TEA	0,07 µg/kg	56-67	Lee 1978
Vleesprodukten	NSAR NPRO NHPRO	GLC	-	80-110	Dhont 1976
Standaarden	NSAR NPRO NHPRO NPIC	GLC	200 pg	-	Ishibashi 1980
Standaard	NHPYR	GLC	5 ng	-	Oshima 1979
Standaard	NPRO	GLC HPLC TLC	7 ng 0,5 ng 5 ng	- 96 -	Wolfram 1977
Voedsel	NSAR NPRO NHPRO	GLC-MS	te bepalen: 2 ng	-	Eisenbrand 1975

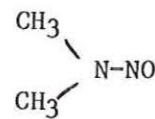
Vervolg overzichtstabel analysemethoden

Produkt	nitro- samine	analyse- methode	absolute detektie- grens	Recovery %	Auteur
Gekookte spek	NHPYR	GLC-MS	2 µg/kg	51-102	Sen 1976
Gebakken spek en andere vleesprodukten	NHPYR	GLC-MS	<u>+</u> 1 ng	-	Sen 1976
Gebakken en ongebakken spek	NHPYR	GLC-MS	2 µg/kg	51-102	Sen, 1978
Ongebakken spek	NPRO NHPRO	GLC-MS	aantoonb.: 24 µg/kg 100 pg	80-90	

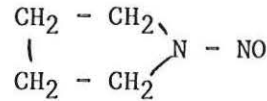
Gebruikte afkortingen

Strukturformule

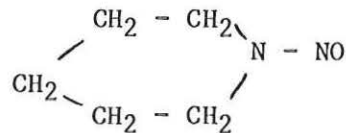
NDMA : N-nitrosodimethylamine



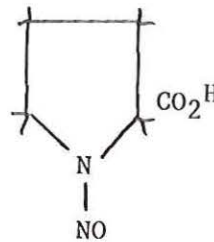
NPYR : N-nitrosopyrrolidine



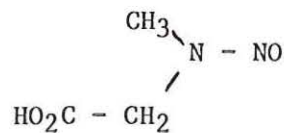
NPIP : N-nitrosopiperidine



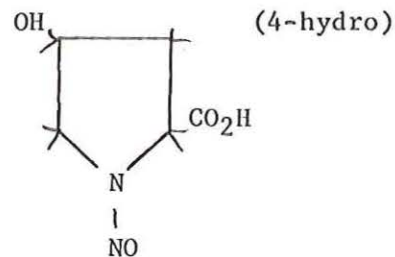
NPRO : N-nitrosoproline



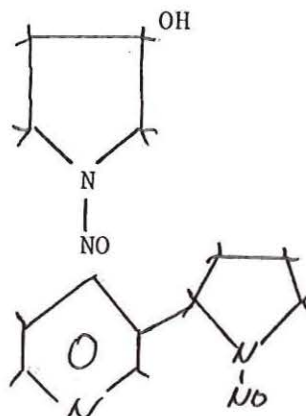
NSAR : N-nitrososarcosine
(n-methyl-n-nitrosoglycine)
(glycine = aminoazijnzuur)



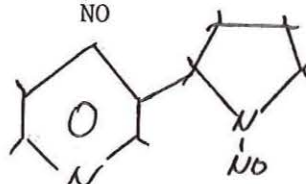
NHPRO : N-nitrosohydroxyproline



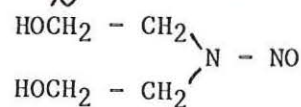
NHPYR : N-nitrosohydroxypyrrolidine



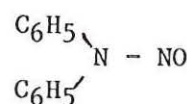
NNNN : N-nitrosornicotine



NDELA : N-nitrosodiethanolamine



NDPA : N-nitrosodifenylamine



LITERATUUR

1. P.J. Groenen, CIVO-analyse TNO.
2. R.W. Stephany en P.L. Schuller, Chemisch Weekblad, juni 1979, 373-376.
3. S.J. Kubacki, Pure and Applied Chemistry, Vol. 51, 1367-1373.
4. D.H. Fine, F. Rufeh and D. Lieb, Nature, 247, (1974), 309-310.
5. Encyclopedia of chemical technology, volume 15, third edition, Kirk - Othmer, editions Wiley-Interscience.
6. T.T. Ishibashi, T. Kawabata and H. Tanabe, J. of Chromatography, 195, (1980), 416-420.
7. G. Eisenbrand, C. Janzowski and R. Preussmann Proc. 2nd. Int. Symp. Nitrite Meat Prod., Zeist, (1976), Pudoc Wageningen, 155-169.
8. D.H. Fine, F. Rufeh, D. Lieb and P. Rounbehler, Anal. Chemistry, 47, (1975), 1188-1191.
9. M.J. Downes, M.W. Edwards, T.S. Eley and C.L. Walters, Analyst, Vol. 101, (1976), 742, 748.
10. G.S. Drescher and C.W. Frank, Anal. Chemistry, Vol. 50, No. 14, (1978), 2118-2121.
11. D.H. Fine and F. Rufeh, IARC Sci Publ., 9, (1975), 53-56.
12. C.L. Walters, M.J. Downes, M.W. Edwards and P.L.R. Smith, Analyst, Vol. 103, 1978, 1127-1133.

13. G. Eisenbrand, B. Spiegelhalder, C. Janzowski, J. Kann and C.R. Preussmann, IARC Sci. Publ., 9, (1975), 159-165.
14. J.S. Lee, L.M. Libbey, R.A. Scanlan and J. Barbour in, "Environmental aspects of n-nitroso compounds", IARC, (1978), 325-330.
15. J.D. Dhont, Prod. 2nd. Int. Symp. Nitrite Meat Prod., Zeist, (1976), Pudoc Wageningen, 221-225.
16. J.D. Dhont.
17. H. Ohshima, M. Matsui and T. Kawabate, J. of Chromatography, 169, (1979), 279-286.
18. J.H. Wolfram, J.I. Feinberg, R.C. Doerr and W. Fiddler, J. of Chromatography, 132, (1977), 37-43.
19. G. Eisenbrand, C. Janzowski and R. Preussmaan, J. of Chromatography, 115, (1975), 602-606.
20. T.A. Gough, Analyst, Vol. 103, (1978), 785-804.
21. W.T. Rainey, W.H. Christie and W. Lijinski, Biomedical Mass Spectrometry, Vol. 5, No. 6, (1978), 395-408.
22. N.P. Sen, D.E. Coffin, S. Seaman, B. Donaldson and W.F. Miles, Proc. 2nd. Int. Symp. Nitrite Meat Prod., Zeist, (1976), Pudoc, Wageningen.
23. N.P. Sen, W.F. Miles, S. Seaman and J.F. Lawrence, J. of Chromatography, 128, (1976), 169-173.
24. N.P. Sen, B.A. Donaldson, S. Seaman, I.R. Iyengar and W.F. Miles, IARC Sci. Publ., 19, (1978), 373-393.
25. T.Y. Fan, I.S. Krull, R.D. Ross, M.H. Woff and D.H. Fine, IARC Sci. Publ., 19, (1978), 3-17.

26. D.H. Fine, R. Ross, D.P. Rounbehler, A. Silvergleid and L. Son, J. Agric. Food Chem., Vol. 24, No. 5, (1976), 1069-1071.
27. D.H. Fine, D.P. Rounbehler, A. Silvergleid and R. Ross, Prod. 2nd. Int. Symp. Nitrite Meat Prod., Zeist, (1976), Pudoc Wageningen.
28. R.C. Massey Colin Crews, D.J. Mc. Weeny and M.E. Knowles, J. of Chromatography, 236, (1982), 527-529.