N-ニトロソアミノ酸のガスクロマトグラフィーによる定量*

石橋 亨**, 松居 正己***, 河端 俊治**

(1974 年 7 月 29 日受理)

不揮発性 *N*-ニトロソアミノ酸 (*N*-ニトロソサルコシン, *N*-ニトロソプロリン, *N*-ニトロソピペコリン酸) をジアゾメタンでメチルエステル化し, ガスクロマトグラフィーによる定量法を検討した。上記 3 種の *N*-ニトロソアミノ酸を含む 0.5N 塩酸溶液を調製し, 2 倍量の 25% エチルアルコール・ジクロルメタンを加えて, 10 分間振とう抽出する (3 回反復)。ジクロルメタン層を合わせ, 脱水後, 濃縮乾固しジアゾメタン飽和エチルエーテルを加えて常温で 30 分間反応させる。45°C の水浴中で過剰のジアゾメタンを留去後, アルカリ熱イオン化検出器を付したガスクロマトグラフを用い, DEGS を液相とするカラムで定量分析を行う。それぞれ 50 ng まで直線性を示す検量線が得られ, 検出感度は 5 ng であった。

1 緒 言

N-ニトロソ化合物 (*N*-NC) には, 揮発性 *N*-NC と不揮発性 *N*-NC がある。これら *N*-NC には実験動物に対して強力な発がん性を示すものが多く, 特に揮発性 *N*-NC はその作用が強いといわれている。一方, 不揮発性 *N*-NC の中には第 2 級アミンの構造をもったアミノ酸と亜硝酸から生成される *N*-ニトロソアミノ酸がある。これら物質は発がん性において, 揮発性 *N*-NC のそれより弱いとされている¹⁾。しかし, *N*-ニトロソプロリン (*N*-pro) は, 加熱あるいは腸内細菌などの酵素作用によって容易に脱炭酸され, 発がん性の強い *N*-ニトロソピロリジンに変化する可能性が指摘されている²⁾。*N*-ニトロソサルコシン (*N*-sar), *N*-ニトロソピペコリン酸 (*N*-pip) も同様 *N*-ニトロソジメチルアミン, *N*-ニトロソピペリジンに変化する可能性が考えられる。これらの強い発がん性を示す揮発性 *N*-NC の前駆体である *N*-ニトロソアミノ酸の微量定量法については, それらの total 量を比色定量する方法³⁾⁴⁾があるが, 微量分別定量法に関しての報告は全くない。そこで著者らは, 上記 3 種の *N*-ニトロソアミノ酸について, 試料 (水溶液) からの溶媒による抽出条件を検討するとともに, 抽出物

をジアゾメタンによりエステル化し, ガスクロマトグラフィー (GLC) で定量分析を行う方法を検討した。*N*-ニトロソアミノ酸のエステル化率, GLC の分離管, 添回収率などについて検討したところ, 微量で, 精度よく分別定量する方法を得たので報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

ジクロルメタン: 残留農薬測定用 (和光純薬)
エチルエーテル: 特級 (和光純薬)
エチルアルコール: 特級 (和光純薬)
N-ニトロソメチルウレタン: 特級 (和光純薬)
N-ニトロソジ-*n*-ブチルアミン: ジ-*n*-ブチルアミン (特級, 和光純薬) と亜硝酸ナトリウム (特級, 和光純薬) から合成した⁵⁾。エチルエーテルを溶媒とし, 10 µg/ml の溶液を作成した。
塩酸: 特級 (和光純薬)
無水硫酸ナトリウム: 残留農薬測定用 (和光純薬)
塩化ナトリウム: 特級 (和光純薬)
水酸化カリウム: 特級 (和光純薬)
分離管: 液相として Versamid 900 を Chromosorb W (60~80 メッシュ) の担体に 20% 保持させ, 2m のガラス管に充てんしたもの, 及び diethylene glycol succinate (DEGS) の液相を Shimalite (60~80 メッシュ) に 15% 保持させ, 1m のガラス管に充てんした分離管の 2 種を使用した。

2.2 装 置

ガスクロマトグラフ: 島津 GC-5APF 型にアルカリ熱イオン化検出器 (AFID) を装着した。

* 食品中の *N*-ニトロソ化合物に関する研究—IX。前報は河端俊治, 赤築秀憲, 石橋 亨: 日水誌, **40**, 1251 (1974)

** 国立予防衛生研究所食品衛生部: 東京都品川区上大崎 2 丁目

*** 島津製作所東京研究所: 東京都調布市柴崎 1 丁目

2.3 *N*-ニトロソアミノ酸及びメチルエステルの調製

N-sar, *N*-pro, *N*-pip: サルコシン (特級, 和光純薬), *L*-プロリン (特級, 和光純薬), ピペコリン酸 (特級, 和光純薬) を用い, Sander⁶⁾ 及び Lijinsky⁷⁾ の方法によって合成した。

N-sar メチルエステル, *N*-pro メチルエステル, *N*-pip メチルエステル: それぞれの *N*-ニトロソアミノ酸をジアゾメタンでメチルエステル化し, 分取用カラムを付けたガスクロマトグラフで分取した。分取したそれぞれのメチルエステルは GLC で単一ピーク, 薄層クロマトグラフィーで単一スポットを示した。それを今回の実験の標準品とした。

2.4 ジアゾメタンの調製

Schlenk ら⁸⁾ の方法により *N*-ニトロソメチルウレタンからジアゾメタン 飽和 エチルエーテル 溶液を調製した。

2.5 分析条件

Table 1 に示す。

Table 1 Operating conditions for gas chromatography

Operating condition	Column	
	15% DEGS	20% Versamid 900
Glass column length	1m	2.5m
Support	Shimalite (60~80 mesh)	Chromosorb W (60~80 mesh)
Carrier gas	N ₂ 40 ml	N ₂ 60 ml
Gas flow rate	air 0.7 l/min	0.7 l/min
H ₂	20 ml/min	20 ml/min
Column temperature	180°C	
Detector	AFID	
Injection part temperature	200°C	
Detector temperature	200°C	
Chart speed	10 mm/min	
Apparatus	Shimadzu-GC-5APF	

2.6 定量操作

3 種の *N*-ニトロソアミノ酸をそれぞれ 100 µg 含む水溶液を調製し, それを 6N 塩酸で 0.5N 塩酸濃度溶液になるように調製する。次に塩析剤として塩化ナトリウム (溶液 10 ml あたり 1 g) を加えて, 25% エチルアルコール・ジクロロメタンを水溶液に対して 2 倍量加え 10 分間振とう抽出を行う。この操作を 2 回繰り返す, ジクロロメタン層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 45°C の水浴中で減圧濃縮, 乾固する。次にジアゾ

メタン飽和 エチルエーテル 3 ml を加えて, 常温で 30 分間エステル化を行う。反応終了後 45°C の水浴中で, 過剰のジアゾメタンを留去し, 内部標準物質 *N*-ニトロソジ-*n*-ブチルアミン 1 ml を加えて, Table 1 に示した分析条件で分析を行う。

3 結果及び考察

3.1 抽出条件の検討

著者らは, 食品などの試料溶液から揮発性 *N*-NC の抽出溶媒として, ジクロロメタンは非常に優れていることを報告した⁹⁾。しかし, 不揮発性 *N*-NC の抽出について検討した報告は全く見当たらない。そこで, 今回は食品あるいは生体から不揮発性 *N*-NC の抽出の予備実験として, 水溶液についてジクロロメタンによる抽出条件を検討した。

3.1.1 ジクロロメタン抽出に及ぼす塩酸の濃度

N-ニトロソアミノ酸の抽出における塩酸濃度と抽出率の関係を調べた。3 種の *N*-ニトロソアミノ酸のそれぞれ 100 µg を各種塩酸濃度の水溶液 30 ml に溶かして試料溶液をつくり, 塩析剤を加えてジクロロメタン 60 ml を加え, 10 分間振とう抽出した。ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後, 2.6 の減圧濃縮, 乾固以下の操作に従って分析した。*N*-ニトロソアミノ酸の 1 回抽出における抽出率を Fig. 1 に示したが, 塩酸濃度が 0.5N でほぼ一定値となり, それより濃度が高く

Fig. 1 Effect of concentration of HCl on the extraction rates of *N*-nitroso amino acids with dichloromethane

Sample size: 100 µg; Sample solvent ratio: 1:2; Extraction: single, for 10 min by a mechanical shaker

なると、むしろ抽出率は低下する傾向がみられた。それぞれの *N*-ニトロソアミノ酸の最高抽出率は *N*-sar 20%, *N*-pro 45%, *N*-pip が 96% であった。

3.1.2 ジクロルメタン 抽出に 及ぼすエチルアルコールの添加効果 5%, 15%, 25%, 35% のエチルアルコールを含むジクロルメタン溶液をつくり、上記と同様に調製した試料溶液 0.5 N 塩酸濃度時の 1 回抽出の抽出率を調べた。結果を Fig. 2 に示したが、エチルアルコール濃度が増すにつれて 3 種の *N*-ニトロソアミノ酸のジクロルメタンによる抽出率は増加した。しかし、35% エチルアルコール・ジクロルメタンで抽出した抽出液中には相当量の水が含まれ、抽出液の脱水に多量の無水硫酸ナトリウムが必要になってくる。従って操作中無水硫酸ナトリウムに *N*-ニトロソアミノ酸の吸着が起こる可能性が考えられるので、本法における抽出溶媒としては 25% エチルアルコール・ジクロルメタンを使用することにした。

Fig. 2 Effect of concentration of ethanol on the extraction rates of *N*-nitroso amino acids in 0.5 N HCl with dichloromethane

Conditions of extraction were the same as shown in Fig. 1.

3.1.3 エチルアルコール・ジクロルメタン 抽出に 及ぼす塩酸の濃度 25% エチルアルコール・ジクロルメタンを抽出溶媒としたとき、試料溶液の塩酸濃度と抽出率の関係を調べた。ジクロルメタンのみで抽出率をみたときと条件を同じにして、塩酸濃度をかえて検討した結果 Fig. 3 に示したように 0.5 N 塩酸濃度で最高抽出

Fig. 3 Effect of concentration of HCl on the extraction rates of *N*-nitroso amino acids with 25% ethanol-dichloromethane

Conditions of extraction were the same as shown in Fig. 1.

率が得られた。なお Fig. 3 には、1 回抽出の結果を示したがこれを 3 回反復すると抽出率の低い *N*-sar は 94% の抽出率が、また他の *N*-pro, *N*-pip は 98% の抽出率が得られた。

3.2 *N*-ニトロソアミノ酸のエステル化の検討

N-ニトロソアミノ酸のカルボキシル基をメチルエステル化するには、アミノ酸などの場合には、無水塩酸とメチルアルコールによる方法が行われている。しかし、*N*-ニトロソアミノ酸の場合強酸性下では加水分解されニトロソ基を遊離する。そこで *N*-ニトロソアミノ酸を分解させずにメチルエステル化を行う方法としてジアゾメタンを用いることにした。

3.2.1 エステル化率 3 種の *N*-ニトロソアミノ酸のそれぞれ 100 μ g/ml のエチルエーテル溶液 1 ml を共せん付き遠沈管にとり、ジアゾメタン飽和エチルエーテル 3 ml を加えて常温で 30 分間メチルエステル化を行った。反応終了後エチルエーテルで 5 ml に定容後 GLC 分析を行いメチルエステル化率を算出した。その結果を Table 2 に示した。エステル化率は *N*-sar が 98.4%, *N*-pro 93.4%, *N*-pip 92.8% であった。

3.2.2 加温濃縮によるエステル化合物の損失 エステル化後、過剰のジアゾメタンは 45°C の水浴中で加温留去した。その濃縮中にエステル化合物の損失が起こる可能性があるため、それについて検討した。3 種の *N*-

Table 2 Esterification rates of *N*-nitroso amino acids with diazomethane

Sample	Exp. number					Average	C. V. (%)
	1	2	3	4	5		
<chem>CC(N(=O)C)C(=O)O</chem>	98.5	100	98.0	97.4	98.0	98.4	0.90
<chem>C1CCN(C1)C(=O)O</chem>	87.5	93.5	93.5	93.5	99.0	93.4	3.92
<chem>C1CCN(C1)C(=O)O</chem>	83.5	89.5	99.0	94.0	99.0	92.8	6.39

Sample size : 100 μ g; Reaction time : 30 min; Reaction temperature : at room temperature; Ether saturated with diazomethane : 3 ml; C. V. : coefficient of variation.

ニトロソアミノ酸メチルエステルのそれぞれ 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g, 25 μ g, 50 μ g を含む 2 ml のエチルエーテル溶液にジアゾメタン飽和エチルエーテルを 3 ml ずつ加え、これらを 1 ml になるまで 45°C の水浴中で加温し、次にエチルエーテルでそれぞれ 5 ml の定容にして GLC 分析を行いエステル化合物を測定した。結果を Table 3 に示した。3 種の *N*-ニトロソアミノ酸メチルエステルは各濃度で 5% 以下の損失であり、実用的にはほとんど無視できる程度であった。

Table 3 Loss of *N*-nitroso amino acid methyl-esters during concentration of reaction mixture of methylation

Sample	Sample size (μ g)				
	5	10	15	25	50
<chem>CC(N(=O)C)C(=O)OC</chem>	1.5	2.5	2.5	6.0	5.0
<chem>C1CCN(C1)C(=O)OC</chem>	0	0	4.5	5.5	4.5
<chem>C1CCN(C1)C(=O)OC</chem>	3.5	0	5.0	4.5	3.0

Each 5 ml of test solution was concentrated to 1 ml in water bath at 45°C.

3.3 分離管の選択

著者らはすでに揮発性 *N*-NC の分析に PEG 6000 (定性用), Versamid 900 (定量用) を液相として用いる方法を報告した⁹⁾。今回の実験では Versamid 900, PEG 6000 のほか DEGS, SE-30 の液相を用いた分離管について分析を行った。得られた相対保持時間を Table 4 に示した。SE-30 では揮発性 *N*-NC と同じように

Table 4 Relative retention times for *N*-nitroso amino acid methylesters

Sample	Column		
	15% DEGS†	20% Versamid 900†	25% PEG 6000†
<chem>CC(N(=O)C)C(=O)OC</chem>	2.11	0.69	1.63
<chem>C1CCN(C1)C(=O)OC</chem>	7.33	2.65	6.10
<chem>C1CCN(C1)C(=O)OC</chem>	5.44	2.65	5.00

† The retention time for *N*-nitroso di-*n*-butylamine as an internal standard determined by column were as follows : DEGS=1.0 min, Versamid 900=6.5 min, PEG 6000=9.2 min

ピークのテーリングが大きく、分離管としては不適であることが分かった。Versamid 900 は *N*-pro メチルエステルと *N*-pip メチルエステルの分離ができなかったがピークのテーリングは認められなかった。PEG 6000 と DEGS の分離管ではそれぞれの *N*-ニトロソアミノ酸メチルエステルの分離がよく、またピークのテーリングが認められなかった。以上の結果から、本法で使用する分離管としては DEGS の液相を用いることにした。次に、DEGS を液相とし 3 種の *N*-ニトロソアミノ酸メチルエステルを分析した結果を Fig. 4 に示した。

Fig. 4 Gas chromatogram of *N*-nitroso amino acid methylesters analyzed on column of DEGS

3.4 内部標準物質の選択

今回の実験では、揮発性 *N*-NC のうちで特に高沸点

である *N*-ニトロソジ-*n*-ブチルアミンを選んで使用した。

3.5 測定値の変動

液相に DEGS を用いた分離管について, 3 種の *N*-ニトロソアミノ酸メチルエステルを含むエチルエーテル溶液のそれぞれ 5 μ l ずつを注入して測定する実験を 10 回繰り返した。得られたピーク面積について測定値の変動を調べた。結果は Table 5 に示したが変動係数は 3% 以内であった。

Table 5 Peak areas of *N*-nitroso amino acid methylesters determined by the DEGS column

Exp. No.			
1	1.02	0.94	0.71
2	1.03	0.94	0.74
3	1.03	0.94	0.74
4	1.07	0.92	0.75
5	1.06	0.99	0.77
6	1.07	0.95	0.75
7	1.00	1.00	0.76
8	1.01	0.96	0.75
9	1.07	0.95	0.75
10	1.07	0.98	0.74
Average	1.04	0.96	0.75
C. V. (%)	2.59	2.50	2.13

C. V. : coefficient of variation

3.6 検量線

3 種の *N*-ニトロソアミノ酸につき, それぞれ 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 50 μ g/ml のエチルエーテル溶液を調製し, 本法によってメチルエステル化を行ったものに内部標準物質 1 ml 加えて GLC 分析した。得られたガスクロマトグラムより縦軸に面積比, 横軸に重量

比をとり検量線を作成した。それぞれ *N*-NC として 50 ng までは原点を通る直線が得られた。

3.7 回収率

N-sar, *N*-pro, *N*-pip のそれぞれ 50 μ g, 100 μ g 含む水溶液を調製し, 本法により, 測定した結果を Table 6 に示した。

4 結 語

不揮発性 *N*-NC である *N*-sar, *N*-pro, *N*-pip をメチルエステル化して分析する方法について検討を行った。

(1) 3 種の *N*-ニトロソアミノ酸を含む水溶液からの抽出溶媒としては, 25% エチルアルコール・シクロルメタンが適していることが分かった。この水溶液を 0.5N 塩酸濃度にして上記溶媒で 10 分間振とう抽出した場合, 回収率は *N*-sar 67%, *N*-pro 82%, *N*-pip 98% であった。

(2) メチルエステル化はジアゾメタン飽和エチルエーテルを加え, 常温で 30 分間反応させた。この際供試 *N*-ニトロソアミノ酸は分解, 副反応を起こすことなく, 95% 以上のメチルエステル化率であった。

(3) 3 種の *N*-ニトロソアミノ酸メチルエステルを含むエチルエーテル溶液を加温濃縮したとき, それらのエステル化合物の損失は 5% 以下であった。

(4) GLC の分離管は DEGS 15% を Shimalite (60~80 メッシュ) に保持させた 1m のカラムで行った。このときの検出感度は 5 ng であった。

この報告の概要は IARC 主催 3rd International Meeting on "Analysis and Formation of *N*-nitroso compounds" 1973 年 10 月 17 日~20 日, Lyon において報告した。

本研究は昭和 47 年度厚生省食品衛生調査委託費及び昭和 48 年度厚生省ガン研究助成金 (石館研究班) の補助を受けて実施した。記して謝意を表す。

文 献

- 1) H. Druckrey, R. Preussmann, S. Ivankovic, D. Schmähl: *Z. Krebsforsch.*, **69**, 152 (1967).
- 2) W. Lijinsky, S. S. Epstein: *Nature*, **225**, 21 (1970).
- 3) T. Y. Fan, S. R. Tannenbaum: *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 1267 (1971).
- 4) C. L. Walters, D. G. Fueggle, T. G. Lunt: Presented at the 3rd international meeting on the analysis and formation of *N*-nitroso compound, Oct., 17~20 1973, Lyon.
- 5) 河端俊治, 石橋 亨, 松居正己: 食衛誌, **14**, 37 (1973).

Table 6 Recovery tests for *N*-nitroso amino acids

Sample size			
	%	%	%
50 μ g	89.0	96.3	98.0
"	91.0	94.0	97.5
100 μ g	89.5	97.0	98.0
"	91.0	94.0	97.5
"	88.0	95.5	95.0
Average	89.7	95.3	97.2
C. V. (%)	1.18	1.21	1.15

N-Nitroso amino acids were dissolved in 25 ml distilled water respectively. C. V. : coefficient of variation

- 6) J. Sander : *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **348**, 852 (1967).
- 7) W. Lijinsky, L. Keefer, J. Loo : *Tetrahedron*, **26**, 5137 (1970).
- 8) H. Schlenk, J. L. Gellerman : *Anal. Chem.*, **32**, 1412 (1960).
- 9) 河端俊治, 松居正己, 石橋 亨, 中村昌道 : 本誌, **21**, 1326 (1972).

☆

Gas chromatographic determination of *N*-nitroso amino acids. Tohru ISHIBASHI*, Masami MATSUI** and Toshiharu KAWABATA* (*Department of Biomedical Research on Food, National Institute of Health, 2-chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo; **Shimadzu Seisakusho Ltd., Tokyo Research Laboratory, 1-chome, Shibasaki, Chofu-shi, Tokyo)

Much attention has been paid to the possible formation of carcinogenic *N*-nitroso compounds in human environment, particularly in foods and in human digestive organs. Although a number of methods have been reported to determine volatile *N*-nitrosamines in foods, no sensitive and accurate method is currently available to measure a trace amount of non-volatile *N*-nitroso compounds. In the present studies, we have developed a method for the analysis of such non-volatile *N*-nitroso amino acids as nitroso sarcosine, nitroso proline and nitroso pipecolic acid. The prin-

ciple of this method is based on the conversion of these non-volatile substances with diazomethane to gas chromatographable derivatives, and the outline of this method is as follows: NaCl was added to the test solution, which was then acidified with 6N HCl, followed by three times extraction with the 25% ethanol-dichloromethane (CH_2Cl_2) mixture. Extraction rates for these compounds were more than 90%. The CH_2Cl_2 extract was concentrated in vacuum to complete dryness, which was subjected to the esterification with diazomethane in ethyl ether at room temperature for 30 min. The remaining diazomethane in the reaction tube was removed by evaporation (at 45°C). The rates of esterification for the three methylated derivatives were found to be more than 95%. These methyl esters were analyzed by a GLC equipped with an alkali flame ionization detector, and the column was being packed in a glass tubing (1 m $\times$ ϕ 3 mm) with 15% DEGS on Shimalite (60~80 mesh). The determination range for the three compounds were found to be 5 to 50 ng with less than 3% of deviation.

(Received July 29, 1974)

Keywords

Gas chromatography
N-Nitroso amino acids

シクロピロックス・オラミンによる鉄(III)の吸光光度定量

栗木 武男, 辻山 毅, 鈴木 紀子, 鈴木 信夫*

(1974年8月23日受理)

シクロピロックス・オラミン (6-シクロヘキシル-1-ヒドロキシ-4-メチル-2-ピリドン・エタノールアミン) を用い, クロロホルム抽出による鉄(III)の定量について検討し好結果を得た. 鉄(III)とシクロピロックスの錯体はクロロホルム, エーテル, 酢酸エチル, *n*-ヘキサン, ジクロルメタンなどに抽出されて安定である. 抽出溶媒としてクロロホルムを用いると 415nm で吸収極大を示し, 至適 pH も 0.5~10 と広範囲である. 検量線は鉄(III)濃度 (55.9~558.5) $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ クロロホルムにおいてベールの法則が成立する. 錯体のモル吸光係数は 5.4×10^3 である. マグネシウム(II), カルシウム(II), バリウム(II), ランタン(III), クロム(III), マンガン(II), コバルト(II), ニッケル(II), 銅(II), 亜鉛(II) 及び鉛(II) などは 0.2M (0.002M 鉄に対して 100 倍量), アルミニウム(III) は 0.02M, スズ(IV) は 0.002M 共存しても鉄(III)の定量を妨害しない.

1 緒言

鉄(III)の吸光光度定量法としては, チオシアン酸塩

法¹⁾, フェナントロリン法²⁾, ビピリジル法³⁾, チオグリコール酸法⁴⁾, オキシシ法⁵⁾, クロムアズロール S 法⁶⁾などがある.

また, 確認試験法として α -ピリドン, γ -ピリドンを使用し, 呈色する赤色または黄色を利用する方法も知ら

* ヘキストジャパン株式会社医薬品研究所: 埼玉県川越市南台 1-3-2