ニトロソアミンのニトラミンへの転換条件について

(昭和 48 年 3 月 16 日受理)

戸田 和子* 井崎やゑ子* 糸川 崇之*

Conditions of Conversion to Corresponding Nitramines
from Nitrosamines on Gas Chromatography

Kazuko TODA, Yaeko IZAKI, Takashi ITOKAWA

(Kyoto City Institute of Public Health: Higashi-Takadacho
Mibu, Nakagyo-ku, Kyoto)

A method is described for the reproducible determination of nitrosamines by conversion to their corresponding nitramines using peroxytrifluoroacetic acid.

1. The use of 90 w/w % hydrogen peroxide brings a higher, constant yield of peroxytrifluoroacetic acid.

2. The reaction between 1 mole of 90% hydrogen peroxide and 1 mole of trifluoroacetic anhydride in methylene chloride is finished very rapidly. The solution of peroxytrifluoroacetic acid is stable for 24 hours.

3. Optimum time for convertive reaction of nitrosamines is 120 minutes and the temperature is 40°C.

Using these procedures, desirable reproducible yields of nitramines are obtained.

(Received March 16, 1973)

1. ま え が き

最近、食品中あるいは生体内で、第2級アミンと亜硝酸塩から強力な発ガン性物質であるニトロソアミンが容易に生成することが明らかになり、問題になっている。

ニトロソアミンの定量法としては、薄層クロマトグラフ法、比色法、ポーログラフ法、ガスクロマトグラフ(水素炎、熱イオン化、エレクトロンキャプチャー)法など種々の方法があるが、超微量分析には検出感度の高い熱イオン化検出器ガスクロマトグラフ(FTD)法とエレクトロンキャプチャーガスクロマトグラフ(ECD)法が適切である。FTD法についてはHoward¹⁾、河端²⁾の研究が報告されているが、特異性、精度ともにすぐれた定量法である。ただ、検出器の作製にかなりの熟練が必要で、一定の感度、寿命をもつ検出器を得ることが困難である。すなわち、FTDのエミッション電極はコイル状の白金イリジウム線にケイ酸カリウムを融着させて作る(河端法)が、融着の良否により検出器の感度、寿命が著しく影響される。ECD法は、ニトロソアミンをトリフルオール過酢酸を用いてニトラミンに酸化し^{3),4)}、これをECDで検出する方法で、Sen⁵⁾、Althorpe⁶⁾の報告があり、これらの方法によるとFIDによるニトロ

ソアミン検出の100~1000倍の感度が認められているが、ニトロソアミンからニトラミンに転換する反応率が一定でないことが欠点とされている。

Senはニトロソアミンを酸化する方法として、ニトロソアミン1~5 μ gを含有する塩化メチレン溶液2~10 μ lに、トリフルオール酢酸と50%過酸化水素水の5:4の混合試薬9mlを加え、室温で12~24時間おいた。Althorpeは、塩化メチレン4~5ml中で85~90%過酸化水素水0.4mlに無水トリフルオール酢酸2.5mlを反応させ、塩化メチレンを加えて10mlにしたPTFA試薬を用いた。ニトロソアミンの塩化メチレン溶液1mlに対しPTFA試薬0.1mlを加え、室温で3時間半反応させている。しかし、いずれの文献にも、反応条件設定に関する説明がみられないため、われわれはこれらの方法を追試し、Althorpeの方法がより安定した転換率を与えることを知った。さらに、PTFA試薬調製における無水トリフルオール酢酸と過酸化水素水の混合率、酸化反応の温度条件などの改良を試み、より再現性のある良好な結果をうることができた。

2. 実験方法

2.1 試薬および装置

2.1.1 試薬

* 京都市衛生研究所：京都市中京区壬生東高田町

無水トリフルオル酢酸：特級品を再蒸留した。

過酸化水素水 90 w/w%：35% 過酸化水素水を減圧濃縮した。

塩化メチレン：一級品を再蒸留した。

ニトロソアミン標準品：ジメチルニトロソアミン、ジエチルニトロソアミンは東京化成製を使用した。ジ *n*-プロピルニトロソアミン、ジ *n*-ブチルニトロソアミン、ジ *iso*-ブチルニトロソアミン、メチルブチルニトロソアミン、エチルブチルニトロソアミン、ニトロソピペリジンは第2級アミンから合成⁷⁾、水蒸気蒸留により精製した。

ニトロソアミン標準液：各ニトロソアミン 1 μ g/ml 塩化メチレン溶液

ニトラミン標準品：ニトロソアミンから合成³⁾、水蒸気蒸留により精製し、ガスクロマトグラフ (ECD) で単一ピークを得たものにつき、ガスクロマトグラフ質量分析計で確認した。

ニトラミン標準液：各ニトラミンの 1 μ g/ml 塩化メチレン溶液

2.1.2 装置

ガスクロマトグラフ：島津製作所製ガスクロマトグラフ GC-5 AFE

酸化反応用装置：反応用試験管—共通すり合せ試験管、容量 10 ml, 1 ml 目盛、還流冷却管—反応用試験管に接続、ヤマト製ウォーターバス BS 44, 温度調節精度 $\pm 1^\circ$

2.2 操作

2.2.1 トリフルオル過酢酸の調製

塩化メチレン 5.0 ml に 90 w/w% 過酸化水素水 0.4 ml を混合、氷冷する。これに再留した無水トリフルオル酢酸 2.0 ml を徐々に加えかく拌、5 分間そのまま氷中に置いた後室温に戻し、塩化メチレンを加えて 10 ml にする。遮光保存、24 時間は分解しない。

2.2.2 ニトロソアミンの酸化

ニトロソアミン標準液 2.0 ml を反応用試験管にとり、氷冷しながらトリフルオル過酢酸 0.2 ml を加え静かにかく拌する。これを還流冷却管に接続、 $40 \pm 1^\circ$ の恒温水槽で 120 分間反応させる。反応後ただちに蒸留水 0.3 ml

を加え 2 分間放置する。塩化メチレンでメスアップし、炭酸カルシウム 0.5 g を加え、発泡が止むのを待って無水硫酸ナトリウム 0.5 g を加え振とう、静置して上澄液をガスクロマトグラフ用検液とした。

2.2.3 ガスクロマトグラフィー

ジメチルニトラミン、ジエチルニトラミンは Table 1 の A, その他は B の条件で測定した。

3. 実験結果および考察

3.1. トリフルオル過酢酸の生成率と安定性

3.1.1 過酸化水素水の濃度

溶媒塩化メチレン中で過酸化水素水 1 モル対無水トリフルオル酢酸 1 モルの割合で混合、反応させ、トリフルオル過酢酸を調製する。

使用する過酸化水素水の濃度を Fig. 1 に示す 7 段階とし、生成する過酸の理論値に対する割合と安定性を求めた。過酸の測定は過マンガン酸カリウム溶液滴定法によった。すなわち、生成反応終了後、静置して塩化メチレン層と水層をよく分離させる。水層には未反応の H_2O_2 が残っているため注意して塩化メチレン層のみを取り出

Fig. 1. Effect of hydrogen peroxide concentration on formation of peroxytrifluoroacetic acid

Table 1. Gas Chromatographic Conditions for Detection of Nitramine

	A	B
Stationary phase and support	20% Carbowax 1540 on 60-80 mesh Chromosorb W (DMCS)	20% Versamid 900 on 60-80 mesh Chromosorb W (DMCS)
Column size, cm	0.3 $\times$ 300	0.3 $\times$ 250
Temperature, $^\circ\text{C}$		
Column	110	110
Detector	200	200
Carrier gas	N_2	N_2
Flow rate, ml/min	30	40

Table 2. Effect of Mixing Rate of Trifluoroacetic Anhydride and Hydrogen Peroxide on Formation of Peroxytrifluoroacetic Acid

Mixing rate (mole ratio)						
(CF ₃ CO) ₂ O		1.0	1.2	1.5	1.0	1.0
H ₂ O ₂ (90 w/w %)		1.0	1.0	1.0	1.2	1.5
CF ₃ COO ₂ H	yield %					
30 min		100	100	98	66	62
24 hr		100	93	—	—	—
48 hr		85	80	—	—	—
96 hr		19	5	—	—	—

し、過マンガン酸カリウム溶液で滴定し過酸を定量する。90 w/w% の過酸化水素水を使用すると 100% 過酸が生成したが、低濃度の場合は生成率が悪く、生成したトリフルオル過酢酸は水に不安定であるため分解も早い。60% 以下のものを使用すると混合後約 4 時間は生成率の変動がはげしく不安定で、その後減少する。60~80% では約 4 時間はわずかに増加し、その後減少する。80% 以上では直後にそれぞれの最高生成率に達し、約 8 時間は安定である。90% では 24 時間後もまだ分解はみられなかった。

3.1.2 無水トリフルオル酢酸と 90% 過酸化水素水の混合比率

つぎに、無水トリフルオル酢酸と 90% 過酸化水素水の混合比率をかえ、Table 2 に示す条件で 30 分および 24, 48, 96 時間後の過酸の生成率を求めた。過酸化水素水を過量に加えたものは、30 分後の過酸の生成率が低く、また、定量値にかなりの変動があり不安定であることを示した。無水トリフルオル酢酸を過量に加えたものは、混合後 8 時間以内では差は現われなかったが、以後の分解がはやい。

酸化力の安定したトリフルオル過酢酸を得るには、90 w/w% 以上の過酸化水素水を使用し、塩化メチレン中で H₂O₂ 1 モルに対し無水トリフルオル酢酸 1 モルの割合で反応させ、室温で静置した後、塩化メチレン層を用いる。未反応の過酸化水素水がすみやかに分解することも考慮し、過酸は調製後 30 分以上静置したものを用いるのがよいと考える。

3.2 温度条件と転換速度

ニトロソアミンはトリフルオル過酢酸の作用により酸化されてニトラミンを生成するが、この反応はニトロソ基の反応性が乏しいため、ほかの試薬では満足な結果は得られないといわれている。反応温度は 50° 以上になると

過酸自体の分解がおこる。一般に過酸による酸化は 0~25° で数時間~数日放置することが多い。われわれは、反応の温度条件を 23° (室温), 40° に設定し、ニトラミ

Fig. 2. Effect of developing time and temperature for nitramine formation

ンへの転換の進行状況を ECD 付きガスクロマトグラフィーにより追跡した。Fig. 2 に示すように 40° で反応させると 120 分でほぼ反応終了に近づく。23° では 40° に比較して反応速度がやや緩慢である。ジメチルニトロソアミン、ジエチルニトロソアミン以外のニトロソアミン 6 種 (2.1.1 に記載) についても実験を行なったが、同様の結果を得た。

温度によって反応速度に差が生じることから、転換率を安定させるためには温度条件および反応時間を厳密に定めることが必要と考える。

3.3 再現性

2.2 の条件に基づいたニトロソアミンからニトラミンへの転換率の再現性について検討するため、ジメチルニトロソアミン、ジエチルニトロソアミンについて、過酸の生成と酸化反応を 6 回繰り返して行ない、ECD ガスクロマトグラフィーでニトラミンを測定し再現性を検討した。Table 3 に示すように変動係数 1.6, 1.8% の良好な結果を得ることができた。

3.4 転換率

Table 3. Reproducibility of Nitrosamine Determination by the Oxidation Method Using Peroxytrifluoroacetic Acid

Added (μg)	DMNA 1.00	DENA 1.00
No. of analysis	found (μg)	found (μg)
1	0.88	1.00
2	0.88	0.99
3	0.91	1.01
4	0.88	1.00
5	0.87	0.96
6	0.87	0.97
Mean	0.88	0.99
Std. dev.	± 0.014	± 0.018
Coeff. of var. %	1.6	1.8

Table 4. Efficiency of Conversion of Nitrosamine to Nitramine

Nitrosamine	Conversion (%)
Dimethyl	87.1
Diethyl	95.9
Methyl butyl	81.8
Di <i>n</i> -propyl	84.6
Ethyl butyl	81.9
Di <i>iso</i> -butyl	91.7
Nitrosopiperidine	81.6
Di <i>n</i> -butyl	76.3

8種のニトロソアミンについて、2.2に示す条件によるニトラミンへの転換率を求めた。結果はTable 4に示すとおりである。

本実験では、ECD ガスクロマトグラフによる測定において標準物質としてニトラミンを使用した。ニトロソアミン標準液を試料と同じ条件で反応させ、これを標準として定量する方法による方がより好ましいと考える。

4. ま と め

ニトロソアミンをトリフルオル過酢酸により酸化してニトラミンとし、ECD 付きガスクロマトグラフにより定量する方法について検討した。

1. 無水トリフルオル酢酸 1 モルと 90 w/w% 過酸化水素水 1 モルの割合で塩化メチレン中で反応させると、1 モル相当のトリフルオル過酢酸が生成し、遮光して保存すれば24時間は安定である。

2. 上記トリフルオル過酢酸を使用しニトロソアミンを酸化する反応において、反応条件を“ $40 \pm 1^\circ$ 恒温水槽中で還流冷却しながら 120 分”と設定することにより、安定したニトラミンへの転換率を得ることができた。

終りに、本研究の実施にあたり終始ご鞭撻いただいた所長多田博士に深謝いたします。

文 献

- Howard, J. W., Fazio, T., Watts, J. O.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. **53**, 269 (1970).
- 河端俊治, 松居正巳, 石橋 亨, 中村昌道: 分析化学 **21**, 1326 (1972).
- Emmons, W. D., Ferris, A. F.: J. Am. Chem. Soc. **75**, 4623 (1953).
- Emmons, W. D.: *ibid.*, **76**, 3468 (1954).
- Sen, N. P.: J. Chromatog. **51**, 301 (1970).
- Althorpe, J., Goddard, D. A., Sissous, D. J., Telling, G. M.: *ibid.*, **53**, 373 (1970).
- Sen, N. P., Smith, D. C., Schwinghamer, L., Marlean, J. J.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem. **52**, 47 (1969).