BOGDAN KOWALSKI

OZNACZANIE LOTNYCH N-NITROZOAMIN W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr hab. *T. Juszkiewicz*

Opisano metodę oznaczania N-nitrozoamin w różnorodnym materiale biolgicznym z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej i chromatografii gazowej

WSTĘP

Stwierdzenie przez *Magee* i *Barnesa* [9] w 1956 r. kancerogennego działania N-nitrozodwumetyloaminy (NDMA) zapoczątkowało okres gwałtownego wzrostu zainteresowania i intensywnych badań nad toksycznością, mechanizmem działania, metabolizmem oraz właściwościami mutagennymi i kancerogennymi różnych związków nitrozowych. Wkrótce okazało się, że szereg N-nitrozoamin wykazuje bardzo silne działanie kancerogenne u różnych gatunków zwierząt doświadczalnych. Zależnie od struktury chemicznej, dawki i sposobu podania, N-nitrozoaminy selektywnie wywołują u zwierząt doświadczalnych nowotwory wątroby, płuc, żołądka, przełyku, nerek i pęcherza moczowego.

Badania chemiczne wykazały, że N-nitrozoaminy łatwo tworzą się w reakcji amin drugo- i czwartorzędowych z azotynami lub tlenkami azotu w środowisku kwaśnym. Stosunkowo szerokie rozprzestrzenienie w środowisku prekursorów N-nitrozoamin (szczególnie amin drugo- i czwartorzędowych oraz azotanów, które w pewnych warunkach mogą ulegać redukcji do azotynów) sugerowało potencjalną możliwość tworzenia się N-nitrozoamin w określonych warunkach środowiskowych.

Dokładne badania analityczne prowadzone w wielu ośrodkach naukowych potwierdziły te przypuszczenia. Występowanie N-nitrozoamin stwierdzono w rybach wędzonych i paszowych mączkach rybnych, mięsie surowym i wędzonych przetworach mięsnych, niektórych gatunkach serów, napojach alkoholowych, tytoniu i kondensatach dymu tytoniowego.

Badania eksperymentalne wykazały możliwość powstawania N-nitrozoamin w zwierzęcym i ludzkim przewodzie pokarmowym. Istnieją więc przesłanki do przypuszczeń, że N-nitrozoaminy mogą stanowić ważny czynnik w etiologii nowotworów u ludzi i zwierząt.

W związku z tym wyłoniła się konieczność opracowania dostatecznie czułej i selektywnej metody ilościowego oznaczania N-nitrozoamin. Na przestrzeni ostatnich kilku lat opublikowano szereg metod oznaczania N-nitrozoamin z zastosowaniem techniki spektrofotometrii [2, 3, 14], polarografii [8, 19], chromatografii cienkowarstwowej [13, 16], chromatografii gazowej [1, 4, 7], spektroskopii fluorescencyjnej [10] oraz che-

miluminescencji [5, 11]. Część opisanych metod charakteryzuje się bądź niedostateczną czułością bądź też zbyt niską selektywnością, co pociąga za sobą potencjalne niebezpieczństwo rejestrowania artefaktów.

W praktyce laboratoryjnej stosuje się obecnie najczęściej równolegle dwie podstawowe techniki analityczne: chromatografię gazową i chromatografię cienkowarstwową [16]. W laboratoriach lepiej wyposażonych metodą z wyboru stała się chromatografia gazowa w połączeniu ze spektrometrią masową wysokiej rozdzielczości [6, 18]. Ogólnie bowiem przyjmuje się, że kombinacja chromatografii gazowej ze spektrometrią masową stanowi obecnie najlepszy układ pomiarowy, zapewniający zarówno dość pewną identyfikację związku jak również bardzo dokładne oznaczenie ilościowe.

Pomimo niezaprzeczalnych zalet w/w zestawu aparaturowego jest on dotychczas używany tylko w nielicznych laboratoriach i to do niewielkiej liczby analiz, głównie ze względu na bardzo wysoki koszt spektrometru masowego o odpowiednich parametrach technicznych i eksploatacyjnych i dość żmudną procedurę analityczną.

Najbardziej obecnie popularną metodą ilościowego oznaczania N-nitrozoamin jest chromatografia gazowa z zastosowaniem odpowiednio selektywnych i czułych detektorów np. detektora elektrolityczno-przewodnościowego (*Coulson* electrolytic-conductivity detector) lub detektora termojonowego (alkali flame ionization dectector) [12]. Wydaje się, że technika chromatografii gazowej w połączeniu z chromatografią cienkowarstwową, jako wstępnym testem jakościowym i półilościowym, jest jednym z lepszych systemów analitycznych stosowanych obecnie do oznaczania N-nitrozoamin.

Wobec braku w krajowej literaturze fachowej jakichkolwiek danych odnośnie metodyki oznaczania N-nitrozoamin w materiale biologicznym przy jednoczesnym dość znacznym zainteresowaniu związkami N-nitrozowymi, celowym wydaje się opublikowanie własnych doświadczeń w tym zakresie. Poniższa praca jest propozycją względnie nieskomplikowanej i jednocześnie dostatecznie dokładnej metody oznaczania N-nitrozoamin w różnorodnym materiale biologicznym. W opracowaniu metody wykorzystano zarówno dane z piśmiennictwa jak i kilkuletnie doświadczenia własne.

MATERIAŁ I METODYKA

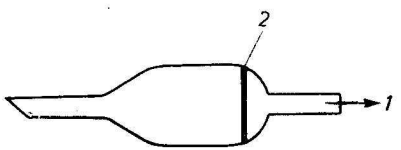
Odczynniki

1. Chlorek metylenu cz.d.a., redest. (POCh),
2. Eter etylowy do narkozy,
3. N-pentan dest. (POCh),
4. N-heksan dest. (UCB, Belgia),
5. Potasu wodorotlenek cz.d.a., (POCh),
6. Sodu jodek cz.d.a., (POCh),
7. Potasu węglan cz.d.a., (POCh),
8. Sodu siarczan bezw. cz.d.a., (POCh),
9. Kwas trójfluorooctowy (Koch-Light, Anglia),
10. Nadtlenek wodoru 50% (BDH, Anglia),
11. Silipian E-2 (Zakład Doświadczalny Silikonów — Nowa Sarzyna) — lub odpowiedni preparat przeciwpienny,
12. Tlenek magnezowy do chrom. (*Hopkin-Williams*, Anglia).

13. Tlenek glinu do chrom. obojętny, stopień aktywności III, wg *Brockmana* (Woelm, RFN),
14. Kieselgel G (*Merck*, RFN),
15. Kieselgel GF_{254} (*Merck*, RFN),
16. Odczynnik *Griessa:* mieszanina 1% kwasu sulfanilowego z 0,1% α-naftyloamina w 30% kwasie octowym (w stosunku 1 : 1),
17. Odczynnik ninhydrynowy: 0,3% roztw. ninhydryny w 2% etanolowym roztworze pirydyny,
18. Wzorce N-nitrozoamin: N-nitrozodwumetyloamina (Schuchardt, RFN), N-nitrozodwuetyloamina (*Fluka*, Szwajcaria), N-nitrozodwupropyloamina (Eastman Kodak, USA).

Aparatura

1. Chromatograf gazowy, np.: Varian Aerograph, model 1440 z 1 mV rejestratorem potencjometrycznym. Detektor termojonowy z pastylką siarczanu rubidu (alkali flame ionization detector) oraz rekombinacyjny detektor niklowy wychwytu elektronów (Ni^{63} electron capture detector). Kolumna szklana spiralna 3 m × × 2 mm, wypełniona 4% XF-1150 na Gas Chrom Q, 100—120 mesh Gaz nośny — azot o przepływie 23 cm^3/min. Wyjściowe szybkości przepływu wodoru i powietrza wynosiły odpowiednio 42 cm^3/min i 240 cm^3/min. Przepływy wodoru i powietrza ostrożnie korygowano w celu utrzymania maksymalnej czułości detektora termojonowego. Temperatura kolumny w oznaczeniach N-nitrozoamin wynosiła 90 °C przy oznaczaniu nitramin 115 °C. Temperatury dozownika i detektora wynosiły odpowiednio: 195 °C i 230 °C.
2. Wyposażenie do chromatografii cienkowarstwowej — płytki i komory chromatograficzne, powlekacz płytek, aplikator do preparatywnego nanoszenia pasmowego, zbierak próżniowy ze spiekiem (ryc. 1), rozpylacze itd.
3. Lampa kwarcowa UV z filtrem 254 nm.
4. Homogenizator szybkoobrotowy.
5. Elektryczne łaźnie i płaszcze grzejne z autotermoregulacją.
6. Wytrząsarka laboratoryja.
7. Odparowywacze *Kuderna-Danish* z kalibrowanymi probówkami na 5 cm^3.
8. Zestawy szklane do destylacji z parą wodną.
9. Kolumny chromatograficzne o wym. 30×1 cm.



Ryc. 1. Zbierak próżniowy do preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej. 1 — połączenie do pompy próżniowej, 2 — sączek szklany 3 G.

Ekstrakcja i oczyszczanie

Odważyć 200 g wstępnie rozdrobnionej próbki i przenieść do pojemnika homogenizatora szybkoobrotowego. Dodać 50 g chlorku sodowego, 10 g węglanu potasowego oraz 250 cm^3 wody dest. Homogenizować przez 10 min. a następnie przenieść homogenat do okrągłodennej kolby destylacyjnej o obj. 1 dm^3. Opłukać nożc i pojemnik homogenizatora kilkunastu centymetrami sześciennymi wody destylowanej i przenieść popłuczyny do kolby destylacyjnej. Dodać 0,5 cm^3 Silipianu E-2 i wstawić kolbę do łaźni elektrycznej stale utrzymującej temperaturę 70 °C.

Po wstępnym ogrzaniu przez około 10 minut podłączyć kolbę do zestawu destylacyjnego i prowadzić destylację z parą wodną aż do zebrania około 250 cm^3 destylatu. Następnie przerwać dopływ pary, odłączyć kolbę destylacyjną, przepłukać chłodnicę kilkoma mililitrami wody destylowanej i dodać roztwór z popłukania do destylatu. Przenieść destylat do rozdzielacza o pojemności 1 dm^3, dodać 3 granulki wodorotlenku potasowego, 50 g chlorku sodowego i wytrząsać do całkowitego rozpuszczenia dodanych związków.

Zalkalizowany destylat ekstrahować dwukrotnie chlorkiem metylenu porcjami po 200 cm^3. Odrzucić fazę wodną a ekstrakt chlorku metylenu wytrząsać przez 1 godzinę ze 100 g bezw. siarczanu sodowego. Przesączyć ekstrakt przez watę szklaną do odparowywacza *Kuderna-Danish* z kalibrowaną probówką na 5 cm^3. Odparować na łaźni wodnej o temp. 50 °C zwracając uwagę, aby poziom chlorku metylenu znajdował się stale powyżej poziomu wody w łaźni. Po zagęszczeniu do obj. 3—4 cm^3 przerwać odparowywanie, dołączyć do probówki kolumienkę *Snydera* i odparować do objętości 1 cm^3.

Zagęszczony ekstrakt nanieść preparatywnie (pasmowo) na płytkę do chromatografii cienkowarstwowej (20×20 cm) pokrytą Kieselgel GF_{254} o grubości warstwy 0,8 mm. Rozwijać płytkę w układzie: n-heksan — eter etylowy — chlorek metylenu (4 : 3 : 2) a następnie naświetlać lampą UV z filtrem 254 nm.

N-nitrozoaminy ukazują się jako ciemne pasma na fluoryzującym tle. Zebrać ilościowo (zbierakiem próżniowym ze spiekiem) pasma żelu o tych samych wartościach R_f jak równolegle rozwijanych wzorców. Ekstrahować żel trzema porcjami eteru etylowego po 30 cm^3. Przenieść ekstrakt eterowy do odparowywacza *Kuderna-Danish* i ostrożnie zagęścić do 0,5 cm^3. Odłączyć probówkę, szczelnie zakorkować (korek lub nakładka teflonowa) i przechowywać w lodówce do dalszej analizy.

Chromatografia cienkowarstwowa — analiza jakościowa i ilościowa

Na dwie płytki pokryte 0,25 mm warstwą Kieselgel G nanieść wzorce N-nitrozoamin (0,5—5,0 μg) oraz po 50—100 μl eterowego ekstraktu próbki. Płytkę rozwijać w układzie: n-heksan — eter etylowy — chlorek metylenu (4 : 3 : 2). Jedną z płytek dokładnie spryskać 30% roztworem kwasu octowego i obie płytki razem naświetlać przez 5 minut pod silną lampą UV. Płytkę spryskaną uprzednio kwasem dokałdnie wysuszyć (fen, otwarta suszarka itp.), spryskać odczynnikiem ninhydrynowym i wstawić na 30 minut do suszarki w temp. 90 °C. Już po 10—15 minutach zaczynają pojawiać się różowo-czerwone plamki N-nitrozoamin, które po 30 minutach uzyskują maksymalną intensywność barwy. Drugą płytkę spryskać odczynnikiem *Griessa*. Pełne wybarwienie plamek następuje niemal natychmiast po spryskaniu. Ocenę ilościową chromatogramów przeprowadzić bezpośrednio po wybarwieniu ponieważ intensywność barwy plamek stosunkowo szybko zmienia się w czasie (zwłaszcza w przypadku odczynnika *Griessa*).

Chromatografia gazowa — analiza ilościowa

Po ustaleniu warunków chromatografii (patrz rozdział „Aparatura") dla detektora termojonowego, wstrzyknąć 1—2 μl zagęszczonego ekstraktu eterowego. Unikać wstrzykiwania większych objętości ekstraktu (3—5 μl) gdyż powoduje to gaszenie płomienia wodorowego. Analizę jakościową prowadzić metodą porównania czasów retencji pików próbki ze standardami. Do obliczeń ilościowych stosować metodę pomiaru wysokości pików próbki i wzorców.

Test potwierdzający — utlenianie N-nitrozoamin do odpowiednich nitramin

Pozostałą część zagęszczonego ekstraktu eterowego odparować do sucha, dodać 9 cm^3 mieszaniny utleniającej: kwas trójfluorooctowy — nadtlenek wodoru 50% (5 : 4), wymieszać i pozostawić w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Umieścić mieszaninę reakcyjną na łaźni lodowej, zalkalizować przez ostrożne dodanie 30—40 cm^3 20% roztworu węglanu potasowego i dwukrotnie ekstrahować chlorkiem metylenu w porcjach po 50 cm^3.

Osuszyć ekstrakt w chlorku metylenu nad bezw. siarczanem sodowym, odsączyć i zagęścić w aparacie *Kuderna-Danish* do objętości 1 cm^3.

Do kolumny chromatograficznej wypełnionej do połowy wysokości n-pentanem przenieść kolejno: 4 g obojętnego tlenku glinu o aktywności III, 2 g tlenku magnezu i nieco bezwodnego siarczanu sodowego (do utworzenia 1 cm warstwy). Obniżyć poziom n-pentanu w kolumnie do powierzchni warstwy siarczanu sodowego. Do 1 cm^3 ekstraktu nitramin w chlorku metylenu dodać 4 cm^3 n-pentanu, wymieszać i nanieść na kolumnę. Ustawić pod kolumną cylinder miarowy na 25 cm^3 i obniżyć poziom cieczy w kolumnie do powierzchni siarczanu sodowego.

Eluować kolumnę 1% roztworem eteru etylowego w n-pentanie aż do zebrania 25 cm^3 eluatu, po czym odrzucić eluat i kontynuować wymywanie kolumny roztworem 25% eteru etylowego w n-pentanie. Zebrać dokładnie 35 cm^3 eluatu, przenieść go do odparowywacza *Kuderna-Danish* i zagęścić do objętości 2—3 cm^3. Po ustaleniu warunków chromatografii dla detektora wychwytu elektronów ^{63}Ni (patrz rozdział „Aparatura") wstrzyknąć 1—2 µl ekstraktu eterowego nitramin. Porównać czasy retencji pików wzorca i próbki badanej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Opisaną metodę oznaczania lotnych N-nitrozoamin z powodzeniem stosowano do analizy mączki rybnej, przetworów mięsnych, treści żołądka, kiszonek paszowych, mleka i krwi. W serii analiz różnego rodzaju próbek z dodatkiem NDMA, NDEA i NDPA w stężeniach rzędu 10—50 µg/kg ustalono, że odzysk metody wynosił średnio 71—92%, zależnie od rodzaju próbki i struktury chemicznej poszczególnych N-nitrozoamin.

Procent odzysku i związana z tym powtarzalność wyników zależy głównie od dokładnego i konsekwentnego przestrzegania procedury postępowania analitycznego. Omawiane nitrozoaminy posiadają szereg kłopotliwych dla analityka właściwości fizykochemicznych. Są związkami łatwolotnymi — stąd etapy destylacji z parą wodną oraz zagęszczenia w aparatach *Kuderna-Danish* muszą być prowadzone w stałych, ściśle kontrolowanych warunkach.

Zagęszczanie roztworu N-nitrozoamin w chlorku metylenu na odparowywaczu obrotowym prowadzi do ponad 20% strat. Niewskazane jest również dłuższe przetrzymywanie na świetle ekstraktów i roztworów wzorcowych N-nitrozoamin z uwagi na ich tendencję do fotolitycznego rozkładu.

N-nitrozoaminy rozpuszczone w niedokładnie osuszonym chlorku metylenu wykazują skłonność do tworzenia z wodą azeotropów o znacznie niższych temperaturach wrzenia niż dla związków czystych. Jest to szczególnie ważne przy zagęszczaniu roztworów N-nitrozoamin metodą odparowywania.

W ostatnich kilku latach opublikowano szereg prac poświęconych oznaczaniu N-nitrozoamin i ciągle prowadzone są dalsze intensywne badania nad udoskonalaniem tych metod. Jest to niewątpliwie odbiciem

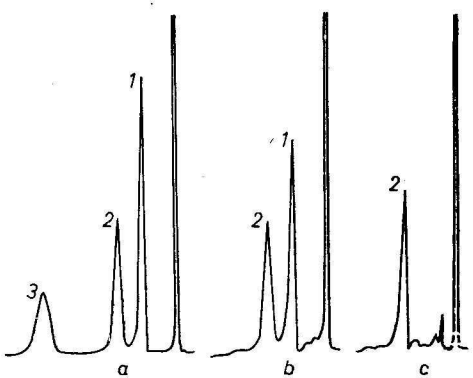
trudności metodycznych występujących w analityce omawianych związków. Pomimo wprowadzenia wielu korzystnych modyfikacji, metody oznaczania N-nitrozoamin są jednak nadal pracochłonne i czasochłonne. Stwarzają one również stosunkowo wysokie wymogi aparaturowe i odczynnikowe.

W opracowywaniu wyżej opisanej metody starano się uwzględnić zasadnicze wymogi współczesnej analizy śladowej (czułość, powtarzalność i precyzja metody, jakościowe testy potwierdzające) a jednocześnie unikać skomplikowanych modyfikacji aparaturowych i wprowadzić szereg uproszczeń technicznych umożliwiających zastosowanie metody do oznaczeń seryjnych w laboratorium nie posiadającym unikalnej aparatury pomiarowej.

Wobec braku spektrometru masowego wprowadzono podwójny test jakościowy, tzn. chromatografię cienkowarstwową z dwoma różnymi odczynnikami wywołującymi oraz chromatografię gazową z detektorem wychwytu elektronów po konwersji N-nitrozoamin do odpowiednich nitramin [15, 17].

Optymalnie ustawiony detektor termojonowy z pastylką siarczanu rubidu umożliwia łatwe wykrycie około 0,5 μg NDEA. Przy tym limicie wykrywalności uzyskiwano liniowość reakcji detektora sięgającą 1×10^3.

Wyboru fazy stacjonarnej (cyjanosilikon XF-1150) dokonano w oparciu o przeprowadzone wcześniej eksperymentalne badania porównawcze. Cyjanosilikon XF-1150 zapewnia dobrą rozdzielczość kolumny i jednocześnie znacznie redukuje typową dla amin tendencję tworzenia jednostronnie asymetrycznych pików (ryc. 2).



Ryc. 2. Rozdział N-nitrozoamin na kolumnie wypełnionej 4% XF-1150 na Gas Chrom Q, 100—120 mesh; a) mieszanina wzorcowa, b) ekstrakt z mleka, c) ekstrakt z treści żołądka królika. Poszczególne piki oznakowano: 1 — NDMA, 2 — NDEA, 3 — NDPA.

Aczkolwiek dalsze prace nad udoskonaleniem metody oznaczania N-nitrozoamin w materiale biologicznym są ciągle w toku, opisana w tej pracy procedura analityczna wydaje się być godną polecenia laboratoriom zajmującym się problemem kancerogennych N-nitrozoamin.

U w a g a: W związku z silnymi właściwościami kancerogennymi lotnych N-nitrozoamin należy przy pracy ze stężonymi roztworami

wzorcowymi tych związków przestrzegać bezwzględnie odpowiednich środków ostrożności.

Б. Ковальски

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ N-НИТРОЗАМИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Содержание

Представлен газо-хроматографический метод определения N-нитрозаминов в биологическом материале. Основные этапы аналитического процесса следующие: дистиллация с водяной парой, экстракция хлорметиленом, очистка методом препаративной тонкослойной хроматографии, качественное и полуколичественное определение методом аналитической тонкослойной хроматографии и окончательное определение содержания в пробе методом газовой хроматографии с применением азотного термоионного детектора. Подтверждение идентичности отдельных N-нитрозаминов производилось методом окисления N-нитрозаминов с образованием соответствующих нитраминов при помощи перокситрифторуксусной кислоты. Полученные нитрамины потвергались добавочной очистке в колонне со смесью: окись алюминия — окись магнезия и затем проводились определения методом газовой хроматографии с детектором улавливания электронов.

Представленный метод был успешно применен для определения N-нитрозаминов в пробах мяса, рыбной муки, содержимого желудка, в крови и в молоке.

B. Kowalski

ESTIMATION OF STEAM-VOLATILE N-NITROSAMINES IN BIOLOGICAL MATERIAL

Summary

A procedure is described for thin-layer and gas chromatographic determination of volatile N-nitrosamines in biological samples. The method is based on steam-distillation, extraction with methylene chloride, purification by preparative TLC, detection and semiquantitative estimation by TLC, and final determination by gas-liquid chromatography with nitrogen detector. The confirmation of identity of individual N-nitrosamines was carried out by a technique based on the oxydation of N-nitrosamines to their corresponding nitramines with peroxytrifluorocetic acid. Appropriate nitramines were determined by electron capture gas chromatography after additional purification on alumina-magnesium oxide mixed column.

The method was successfully applied to fish meal, meat, stomach content, blood and milk samples.

PIŚMIENNICTWO

1. *Alliston T. G., Cox G. B., Kirk R. S.:* The determination of steam-volatile N-nitrosamines in foodstuffs by formation of electron-capturing derivatives from electrochemically derived amines, Analyst 1972, 97, 915. — 2. *Daiber D., Preussmann R.:* Quantitative colorimetrische Bestimmung organischer N-nitroso- Verbindungen durch photochemische Spaltung der Nitrosoaminbindung, Z. Anal. Chem., 1964, 206, 344. — 3. *Eisenbrand G., Preussmann R.:* Eine neue Methode zur kolorimetrischen Bestimmung von Nitrosaminen nach spaltung der N-nitroso-

gruppe mit Bromwasserstaft in Eisessig, Arzneim.-Forsch. (drug Res.) 1970, 20, 1513. — 4. *Fiddler W., Doerr R. C., Ertel J. R., Wasserman A. E.:* Determination of N-nitrosodimethylamine in ham by gas-liquid chromatography with an alkali flame ionization detector, J. Ass. Off. Agric. Chem., 1971, 54, 1160. — 5. *Fine D. H., Rufeh F.:* Description of the thermo-luminous analyzer for N-nitroso componuds, Proceedings of the IARC Meeting on Analysis and Formation of N-nitroso Compounds, Lyon, October 1973 (w druku). — 6. *Gough A. A., Webb K. S.:* The use of a molecular separator in the determination of trace constituents by combined gas chromatography and mass spectrometry, J. Chromatogr., 1972, 64, 201. — 7. *Howard J. W., Fazio T., Watts J. O.:* Extraction and gas chromatographic determination of N-nitrosodimethylamine in smoked fish: application to smoked nitrite-treated chub, J. Ass. Off. Agric. Chem., 1970, 53, 269. — 8. *Lydersen D. L., Nagy K.:* Polarographische Bestimmung von Dimethylnitrosamin in Fischprodukten, Z. Nal. Chem., 1967, 230, 277. — 9. *Magee P N., Barnes J. M.:* The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamines, Brit. J. Cancer 1956, 10, 114. — 10. *Mohler K., Mayrhofer O. L.:* Nachweis und Bestimmung von Nitrosaminen in Lebensmitteln, Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., 1968, 135, 313.

11. *Neurath G. B., Dünger M.:* Measurement of the nitrogen oxidases in tabacco smoke by means of the chemiluminescence method, Proceedings of the IARC Meeting on Analysis and Formation of N-nitroso Compounds, Lyon, October 1973 (w druku). — 12. *Palframan J. F., Macnab J., Crosby N. T.:* An evaluation of the alkali flame ionization detector and the Coulson Electrolytic-conductivity detector in the analysis of N-nitrosamines in foods, J. Chromatogr., 1973, 76, 307. — 13. *Preussmann R., Neurath G., Wulf-Lorentzen G., Daiber D., Henry H.:* Anfärbenmethoden und Dunnschichtchromatographie von organischen N-nitroso--Verbindungen, Z. Anal. Chem., 1964, 202, 187. — 14. *Sander J.:* Detection of nitrosamines, Z. Physiol. Chem., 1967, 348, 852. — 15. *Sen N. P.:* Gas-Liquid chromatographic determination of dimethylnitrosamine as dimethylnitramine at picogram levels, J. Chromatogr., 1970, 51, 301. — 16. *Sen N. P., Smith D. C., Schwinghamer L., Marleau J. J.:* Diethylnitrosamine and other N-nitrosamines in foods, J. Ass. Off. Agric. Chem., 1969, 52, 47. — 17. *Telling G. M.:* A gas-liquid chromatographic procedure for the detection of volatile N-nitrosamines at the ten parts per billion level in foodstuffs after conversion to their corresponding nitramines, J. Chromatogr., 1972, 73, 79. — 18. *Telling G. M., Bryce T. A., Althorpe J.:* Use of vacum distillation and gas-chromatography-mass spectrometry for determining low levels of volatile nitrosamines in meat products, J. Agr. Food Chem., 1971, 19, 937. — 19. *Walters C. L., Johnson E. M., Ray N.:* Separation and detection of volatile and non-volatile N-nitrosamines, Analyst 1970, 95, 485.

Dn. 4.I.1974 r.

24-100 Puławy, Al. Partyzantów 57.