

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences**

**Optimierung und Validierung einer GC-MS-MS Methode zum Nachweis und zur
Bestimmung von *N*-Nitrosaminen in Kosmetika**

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Viviane Jochmann

Hamburg, Dezember 2011

Erstprüferin: Prof. Dr. Susanne Töpfke (HAW Hamburg)
Zweitprüfer: Dr. Nikolai Kupfermann (Firma Eurofins GmbH)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Firma
Eurofins Consumer Product Testing GmbH

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. Nikolai Kupfermann, Laborleiter der Eurofins Consumer Product Testing GmbH dafür danken, dass er mir das Thema dieser Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat. Die professionelle Betreuung vor Ort, sowie die Bereitschaft zur Hilfestellung, gepaart mit dem eigenständigen Umgang und Erarbeiten meines Themas, haben die Bachelorarbeit zu einem spannenden und erfolgreichen Projekt gemacht.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Susanne Töpfke, Laborleiterin der organischen Chemie der HAW Hamburg für die Ermutigung, das für mich neue Thema anzugehen, die hervorragende Betreuung während meiner Bachelorarbeit sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Jan Sameluck, der mir als Mitarbeiter der Firma Eurofins während der Laborphase jederzeit mit seinem qualifizierten und wissenschaftlichen Rat zur Seite stand.

Diese Bachelorarbeit ist meiner Familie, insbesondere meinem Vater Peter Jochmann gewidmet.

Wer noch nie einen Fehler gemacht hat, hat sich noch nie an etwas Neuem versucht...
Albert Einstein

Abstract

N-nitrosamines belong to the most carcinogenic materials worldwide and still mystify researchers. To this day no threshold value is known and a prevention of the exposition of this material class is almost impossible as the formation of *N*-nitrosamines can occur in the body itself from the uptake of their precursors.

The aim of this bachelor thesis was to develop, optimize and validate a method to determine *N*-nitrosamine in personal care products with a quantitation limit of 3 µg/kg.

The analysis method and validation was performed on a GC-MS-MS, type Agilent 7000. The following validation parameters were investigated.

- Precision (measuring, method and intermediate precision)
- Linearity (measuring and method)
- Blank value (standard and sample)
- Limit of detection
- Limit of quantitation
- Recovery
- Stability

As a first step, a literature study on the device features as well as the sample preparation was performed. Based on the literature study and with the assistance of the lab supervisor a method for the sample preparation was developed.

The best results were obtained by steam distillation of the cosmetic sample, followed by extraction with dichloromethane and evaporation of the extract.

An improvement of the measuring method was found by using the Cold Application System (CAS) of the gear. Four different liner heating programs were performed and based on the ideal chromatographic peak shape, the best program selected.

The validation was performed using the optimized preparation and measurement method. The outcome of the validation leads to the following conclusions.

- The results for the determination of the precisions show a good selectivity for all eight *N*-nitrosamines with a coefficient of variation in an ideal range. These findings demonstrate the robustness of the method.
- Both, the calibration curve of the standards and the method, show a certainty measure for all eight *N*-nitrosamines greater than 0,995 and thus can be described as linear functions.
- An extrapolation of the calibration curves leads to a slightly different blind value compared to the separately determined one. However, all these values have a sufficient distance to the signal intensity of the detection limit concentration and the lowest calibration standard. Therefore they can be neglected.
- The detection and quantitation limits were determined by using the standard deviation method. Detection limits between (0,58-1,19) $\mu\text{g}/\text{kg}$ and quantitation limits of (2,07-3,33) $\mu\text{g}/\text{kg}$ were found. Thus the aim of establishing a method with a quantitation limit of 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was achieved.
- The results of the absolute recovery rates show the amount of loss of analyte for this method. Values between (60,73-15,93) % were found. Using the internal standard as compensation much higher recovery rates between (77,41-108,65) % are determined.
- The stability of the standard solution and the sample were analysed by measuring the samples 3 times over a period of 168 hours and comparing the results with a new fresh standard. There was no significant change discovered in the concentration of the samples. Therefore no influence of the matrix on the stability of the analyte concentration could be observed.

Zusammenfassung

N-Nitrosamine gehören seit mehreren Jahrzehnten zu den weltweit kanzerogensten Stoffen und bergen immer noch viele Rätsel. Bis heute ist kein Schwellenwert für sie bekannt und eine Vermeidung der Exposition dieser Stoffklasse so gut wie unmöglich, da sie im Körper selbst durch die Aufnahme von Vorläufern entstehen können.

Diese Bachelorarbeit hatte zum Ziel, eine Methode zu entwickeln, die eine Bestimmung von 3 µg/kg *N*-Nitrosaminen in kosmetischen Pflegeprodukten möglich macht und diese Methode anschließend zu validieren. Die Validierung ist ein Teil der Qualitätssicherung und erlaubt, nach erfolgreicher Durchführung, die Übernahme der Methode in die Routine. Die Analysenmethode sowie die Validierung wurde an einer GC-MS-MS der Firma Agilent durchgeführt. Untersucht wurden hierbei folgende Validierungsparameter.

- Präzision (Mess-, Methoden-, laborinterne Vergleichspräzision)
- Linearität (Kalibrierfunktion, Methode)
- Blindwert (Standard, Methode)
- Nachweis, Bestimmungsgrenze
- Wiederfindung
- Stabilität

Im ersten Schritt wurde eine intensive Literaturrecherche bezüglich der Geräteeigenschaft sowie der Methoden der Probenaufbereitung betrieben. Basierend auf dieser Recherche und mit Unterstützung der Laborleitung wurde eine Probenaufbereitungsmethode entwickelt. Die besten Resultate wurden durch eine Wasserdampfdestillation der Kosmetikprobe mit anschließender Extraktion mittels Dichlormethan und Eindampfen des Extrakts erreicht.

Unter Verwendung des Cold Application System der verwendeten GC-MS-MS war eine Verbesserung der Messmethode möglich. Das CAS zeigte bei der Aufnahme unterschiedlicher Temperaturprogramme des Liners Auswirkung auf die Peakformen der Analyten.

Unter Verwendung des optimierten Aufbereitungs- und Messverfahrens wurde die Validierung der Methode durchgeführt.

Die Resultate der Methodenvalidierung lassen folgende Schlüsse zu.

- Die untersuchten Präzisionen zeigen eine gute Selektivität für alle acht *N*-Nitrosamine und liegen für alle betrachteten Analyten mit den zum Vergleich herangezogenen Verfahrenskoeffizienten in einem guten Bereich und zeugen von guter Methodenrobustheit.
- Sowohl das Bestimmtheitsmaß der Kalibrierfunktion als auch das der Linearität der Methode weisen Werte größer 0,995 auf und können somit als linear beschrieben werden. Die Matrix nimmt hier, wie gezeigt werden kann, jedoch einen meist negativen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Methode.
- Eine Extrapolation der Kalibriergeraden zeigt Unterschiede zu den separat ermittelten Werten der Blindproben. Alle Blindwerte weisen jedoch ausreichend Abstand zu den Signalen der Bestimmungsgrenze und des kleinsten Kalibrierstandards auf, so dass diese Blindwerte zu vernachlässigen sind.
- Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden in der vorliegenden Arbeit mittels der Standardabweichung ermittelt. Die so errechneten Werte der Nachweisgrenze liegen in Bereichen zwischen (0,58-1,19) µg/kg und die der Bestimmungsgrenze zwischen (2,07-3,33) µg/kg. Damit war das Ziel der Bachelorarbeit, nämlich eine Methode mit einer Bestimmungsgrenze um die 3 µg/kg zu entwickeln, erreicht.
- Die Ergebnisse der absoluten Wiederfindungsraten zeigen, wie hoch der Verlust der Analyten durch die Methode wirklich ist. Hier wurden Werte zwischen (60,73-15,93) % gefunden. Zieht man den internen Standard in die Ermittlung der Wiederfindungsrate mit ein, so fallen diese deutlich höher aus. Sie erreichen Werte zwischen (77,41-108,65) %.
- Die Untersuchung der Stabilität der Standardlösung sowie einer realen Probe wurde durch das Vermessen beider Proben über einen Zeitraum von 168 h in 3 Messungen als stabil bewertet. Es wurde kein Einfluss der Matrix auf den Analytgehalt festgestellt.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Abstract	IV
Zusammenfassung	VI
Inhaltsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
Formelverzeichnis	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Kosmetik.....	3
2.2 <i>N</i> -Nitrosamine.....	5
2.2.1 Struktur und Eigenschaft von <i>N</i> -Nitrosaminen.....	5
2.2.2 Bildung von <i>N</i> -Nitrosaminen.....	7
2.2.3 Belastung durch <i>N</i> -Nitrosamine.....	9
2.2.4 Kanzerogenität der <i>N</i> -Nitrosamine	12
2.3 GC-MS-MS.....	14
2.4 Methoden zur Probenvorbereitung	19
2.4.1 Wasserdampfdestillation.....	19
2.4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	20
2.4.3 Festphasen-Extraktion	20
3 Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Geräte.....	23
3.1.2 Lösungsmittel und Chemikalien	24
3.2 Methoden	26
3.2.1 Probenvorbereitung.....	26
3.2.2 Aufnahme des Säulenprofils der polaren Chromabond Si-OH Säule.....	29
3.2.3 Methodvalidierung	30

3.2.3.1	Präzision.....	32
3.2.3.2	Linearität.....	33
3.2.3.3	Blindwert	35
3.2.3.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	35
3.2.3.5	Wiederfindung	36
3.2.3.6	Stabilität.....	36
3.2.4	Statistische Methoden und Vorgehensweise zur Bewertung der Ergebnisse	37
3.2.4.1	Bewertung der Peakbeschaffenheit.....	37
3.2.4.2	Auswertung mittels internem Standard.....	38
3.2.4.3	Arithmetischer Mittelwert.....	39
3.2.4.4	Standardabweichung.....	39
3.2.4.5	Variationskoeffizient	41
3.2.4.6	Prüfung auf Normalverteilung der Messwerte.....	41
3.2.4.7	Prüfung auf Ausreißer innerhalb der Messwerte	41
3.2.4.8	Prüfung auf Trend der Messwerte	42
4	Auswertung und Ergebnisse	43
4.1	Ergebnisse der Probenaufbereitung	43
4.1.1	Ergebnisse der Methode 1.....	44
4.1.2	Ergebnisse der Methode 2.....	44
4.1.3	Ergebnisse der Methode 3.....	46
4.1.3.1	Erstellen eines Säulenprofils.....	47
4.1.4	Ergebnisse der Methode 4.....	49
4.1.4.1	Weitere Untersuchungen zur Methode 4	50
4.1.4.2	Qualitätskontrolle der Probenaufarbeitung.....	51
4.2	Optimierung der Messmethode.....	52
4.2.1	Cold Application System	52
4.3	Ergebnisse der Methodvalidierung	54
4.3.1	Messpräzision	54
4.3.2	Ermittlung der Kalibrierfunktion	57
4.3.3	Blindwert Gerät.....	62
4.3.4	Linearität Methode.....	63
4.3.5	Blindwert Methode	65
4.3.6	Methodenpräzision.....	66
4.3.7	Laborinterne Vergleichpräzision	68
4.3.8	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	69
4.3.9	Wiederfindung	71
4.3.10	Stabilität.....	73
5	Diskussion und Ausblick	76

Literaturverzeichnis	80
Verzeichnis der Internetquellen	83
Erklärung	86
Anhang.....	87

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Emulsionstypen	4
Abbildung 2 : Allgemeine Strukturformel der <i>N</i> -Nitrosamine.....	5
Abbildung 3: Reaktionsgleichung der Nitrosierung aus einem sekundären Amin.....	7
Abbildung 4: Belastungsarten durch <i>N</i> -Nitrosamine.....	9
Abbildung 5: Mechanismus der Aktivierung der <i>N</i> -Nitrosamine.....	14
Abbildung 6: Aufbau des Probenaufgabesystems	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines MS-MS Systems, bestehend aus Ionisationseinheit, Triple Quadrupol und Detektor	17
Abbildung 8: Darstellung des elektrischen Felds im Hexapol der Kollisionszelle	18
Abbildung 9 : Verwendete programmierbare Wasserdampfdestillationsapparatur.....	19
Abbildung 10: Wechselwirkungsmechanismus in einer unpolaren Säule.....	22
Abbildung 11: Angewandte Probenaufarbeitungsarten	27
Abbildung 12: Ablauf zur Aufnahme des Säulenprofils der Chromabond Si-OH Säule30	
Abbildung 13 : Kalibrierfunktion mittels nativen Analyt und internem Standard	34
Abbildung 14: Peak Darstellung zur Ermittlung charakteristischer Kenngrößen	37
Abbildung 15: Manuelle Integration beim Auftreten eines Schulterpeaks.....	38
Abbildung 16: Verwendete CAS Programme in zeitlicher Verlaufsdarstellung.....	52
Abbildung 17: Trendverlauf des NDEA	56
Abbildung 18: Darstellung der Kalibrierfunktion und der Linearität der Methode	65
Abbildung 19: Typisches Chromatogramm des kleinsten Kalibrierstandards	66
Abbildung 20: Graphische Darstellung der absoluten Wiederfindungsrate	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Strukturformeln und physikalisch-chemische Eigenschaften der acht untersuchten <i>N</i> -Nitrosamine	6
Tabelle 2: Kosmetische Konservierungsstoffe mit hohem nitrosierenden Potential	11
Tabelle 3: Verwendete SPE Säulen und ihre Kenndaten.....	21
Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel	23
Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien mit Angaben der Hersteller und Chargennummern.....	24
Tabelle 6: Stammlösung der nativen <i>N</i> -Nitrosamine zum Herstellen der Standards und zum Spiken der Proben	25
Tabelle 7: Stammlösung ($c = (1000 \pm 10) \mu\text{g/mL}$) der deuterierten <i>N</i> -Nitrosamine, zur Herstellung der ISTD Verdünnungen	25
Tabelle 8: Geräteeinstellung für die zu validierende Methode.....	31
Tabelle 9: Vorgehensweise zum Erstellen der Kalibrierstandards	33
Tabelle 10: Herstellen der Kalibrierfunktion zur Bestimmung der Methoden Linearität	35
Tabelle 11: Rechenwerte für die empirische Ermittlung der Standardabweichung mit Hilfe von festgelegten x Werten.	40
Tabelle 12: Chromatogramme der Methode 1	44
Tabelle 13: Chromatogramme der Methode 2	45
Tabelle 14: Chromatogramme der Methode 3	46
Tabelle 15: Chromatogramme der Aufnahme des Säulenprofils der verwendeten Chromabond SI-OH Säule	48
Tabelle 16: Chromatogramme der Methode 4	49
Tabelle 17: Chromatogramme der Optimierung der Methode 4	50
Tabelle 18: Ausschnittsvergrößerung des NDEA aus Tabelle 17	51
Tabelle 19: Herstellung und Ergebnisse der Qualitätskontrolle	51
Tabelle 20: Chromatogramme der Temperaturprogramme des Liners	53
Tabelle 21: Ergebnisse der Messpräzision.....	56
Tabelle 22: Zwischengrößenberechnung zur Ermittlung der Kalibrierfunktion	58
Tabelle 23: Berechnung der Quotienten zur Ermittlung der Kalibrierfunktion.....	58
Tabelle 24: Ergebnisse der linearen und quadratischen Regression.....	59
Tabelle 25: Berechnung der wichtigsten Verfahrenskenngrößen.....	60
Tabelle 26: Vergleich der Koeffizienten der linearen und quadratischen Regression ...	60
Tabelle 27: Ergebnisse aus der Ermittlung der Kalibrierfunktion für alle acht <i>N</i> -Nitrosamine.....	62
Tabelle 28: Responsewerte aus der Ermittlung des Blindwertes der Standardlösung....	62
Tabelle 29: Ergebnisse aus der Ermittlung der Methoden Linearität	63

Tabelle 30: Quotienten zur Beurteilung der Methoden Linearität in %	64
Tabelle 31: Messungen des Methodenblindwertes	65
Tabelle 32: Ergebnisse der Methodenpräzision	67
Tabelle 33: Vorgaben der zulässigen Verfahrenskoeffizienten nach Eurofins, bezogen auf den Analytgehalt, zur Untersuchung der Methodenpräzision	68
Tabelle 34: Ergebnisse der laborinternen Vergleichspräzision	68
Tabelle 35: Vorgaben der zulässigen Verfahrenskoeffizienten nach Eurofins, bezogen auf Analytgehalt, zur Untersuchung der Vergleichspräzision	69
Tabelle 36: Faktoren zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze	69
Tabelle 37: Ergebnisse zur Ermittlung der NWG und BG	70
Tabelle 38: Ergebnisse der absoluten Wiederfindungsrate	71
Tabelle 39: Ergebnisse der relativen Wiederfindungsrate	72
Tabelle 40: Vergleich der Messwerte eines alten 1 µg/kg Standards gegen einen frischhergestellten	73
Tabelle 41: Untersuchung der Stabilität einer 15 µg/kg Standardlösung	74
Tabelle 42: Untersuchung der Stabilität eines 15 µg/kg Probenextraktes	75
Tabelle 43: Ergebnisse der Messpräzision bei unterschiedlichen Konzentrationen	78
Tabelle 44: Ergebnisse der Messpräzision	87
Tabelle 45: Ergebnisse der Kalibrierfunktion	88
Tabelle 46: Ergebnisse der Methoden Linearität	89
Tabelle 47: Ergebnisse der Methodenpräzision	90
Tabelle 48: Ergebnisse laborinterne Vergleichspräzision	91
Tabelle 49: Ergebnisse der Nachweis- und Bestimmungsgrenze	92
Tabelle 50: Ergebnisse der Wiederfindung	93
Tabelle 51: Elutrope Reihe	94
Tabelle 52: David Tabelle	95
Tabelle 53: Grubbs Tabelle	96
Tabelle 54: Neumann Tabelle	97
Tabelle 55: Mandel Tabelle	97

Formelverzeichnis

Formel 1: Nernst'scher Verteilungssatz	20
Formel 2: Berechnung des Responsefaktors.....	39
Formel 3: Berechnung der Analytkonzentration mittels Responsefaktor und internem Standard	39
Formel 4: Ermittlung des arithmetischen Mittelwertes	39
Formel 5: Empirische Formel zur Verifizierung des Mittelwertes.....	39
Formel 6: Ermittlung der Standardabweichung.....	39
Formel 7: Empirische Formel zur Ermittlung der Standardabweichung.....	40
Formel 8: Formel zur Ermittlung der Reststandardabweichung.....	40
Formel 9: Formel zur Ermittlung der Verfahrensstandardabweichung	40
Formel 10: Ermittlung des Variationskoeffizienten	41
Formel 11: Prüfgrößenberechnung nach David.....	41
Formel 12: Bestimmung von Ausreißern.....	42
Formel 13: Prüfung auf Trend nach Neumann	42
Formel 14: Berechnung der Prüfgröße nach Mandel.....	60
Formel 15 : Formel zur Bestimmung der Wiederholgrenze	67
Formel 16: Formel zur Ermittlung der Vergleichsgrenze.....	69
Formel 17: Bestimmung der Wiederfindung.....	71

Abkürzungsverzeichnis

a	Y-Achsenabschnitt
b	Lineare Steigung
BG	Bestimmungsgrenze
c	concentration, Konzentration
CAS	C old A pplication S ystem, Kalt Aufgabe System
CI	C hemical I onization, Chemische Ionisation
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIN	D eutsche I ndustrie N orm
d-	deuteriert
e	Quadratische Steigung
EAC	Ethylacetat
EI	Electron Impact, Elektronen Ionisation
Fkt.	Funktion
GC	Gaschromatograph/ie
g_o	oberer Grenzwert nach David
g_u	unterer Grenzwert nach David
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
h	hour, Stunde
ISTD	Interner Standard
K	Nernst'scher Verteilungskoeffizient
Konz.	Konzentration
Kp	Siedepunkt
LLE	L iquid- L iquid- E xtraction, Flüssig-Flüssig Extraktion
Lsg.	L ösung
min	Minute
Mittelw.	Arithmetischer Mittelwert
MRM	M ultiple R eaction M onitoring
MS	Massenspektrometer
\bar{x}	Arithmetischer Mittelwert
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
n	number, Anzahl der Werte
NDBA	<i>N</i> -Nitrosodibutylamin

NDEA	<i>N</i> -Nitrosodiethylamin
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NDPA	<i>N</i> -Nitrosodipropylamin
NMEA	<i>N</i> -Nitrosomethylethylamin
NMOR	<i>N</i> -Nitrosomorpholin
NPIP	<i>N</i> -Nitrosopiperidin
NPYR	<i>N</i> -Nitrosopyrrolidin
NWG	Nachweisgrenze
ppb	Parts per billion
P	Propability, Wahrscheinlichkeit (Signifikanzniveau)
P^T	Dampfdruck
PG	Prüfgröße nach David oder Mandel
ppm	Parts per million
Q	Prüfgröße nach Neumann
r^2	Bestimmtheitsmaß
r	Korrelationskoeffizient, oder Wiederholgrenze
R	Vergleichsgrenze
R_f	Reponsefaktor
rpm	r evolutions p er m inute, Umdrehungen pro Minute
S	Signal
s	Standard deviation, Standardabweichung
s_{x0}	Verfahrensstandardabweichung
SIM	S ingle I on M onitoring
SPE	S olid P hase E xtraction, Festphasen Extraktion
s_y	Reststandardabweichung
TEA	T hermal E nergy A nalyzer
V_K	Variationskoeffizient
V_{K0}	Verfahrensvariationskoeffizient
WFR	Wiederfindungsrate

1 Einleitung und Zielsetzung

N-Nitrosamine sind chemische Verbindungen, die aus den Stickstoffverbindungen, den Aminen, durch Umsetzung mit Nitritverbindungen, entstehen. Ihr Gefahrenpotential liegt in ihrer akuten Toxizität begründet. Diese basiert auf ihrer Fähigkeit, Tumore zu bilden (Kanzerogenität), Erbgutänderungen zu verursachen (Mutagenität) und Missbildungen zu erzeugen (Teratogenität).¹ *N*-Nitrosamine gehören zu den potentesten chemischen Cancerogenen², deren Verbindungen in mehr als 80 % der Fälle zu Tumorbildung führen, was in Tierversuchen mit unterschiedlichsten Tierspezies nachgewiesen wurde.³

Mit der Bildung von *N*-Nitrosaminen ist überall dort zu rechnen, wo nitrosierbare Amine zusammen mit nitrosierenden Agentien auftreten. Diese Reaktion kann im Menschen selbst durch verschiedene Bakterienstämme katalysiert, als auch durch die externe Aufnahme von *N*-Nitrosaminen, wie beispielsweise Tabakrauch, Lebensmittel oder Bedarfsgegenstände wie Kosmetika, erfolgen.

1984 entdeckten die Wissenschaftler Spiegelhalder und Preussmann erstmalig *N*-Nitrosamine in Kosmetikprodukten. Rund ein Fünftel der 1984 untersuchten 145 Produkte wurden positiv auf *N*-Nitrosamine getestet.⁴

Seither wurden verschiedenste Analysemethoden zur Bestimmung von *N*-Nitrosaminen entwickelt. Antriebsfeder hierfür war das immer noch gültige ALARA Prinzip (**A**s **L**ow **A**s **R**easonable **A**chievable), welches den Gehalt einer genotoxischen und kanzerogenen Substanz in einem Produkt auf einen Wert limitiert, der nach neuesten Verfahren, technisch möglich ist. Dies macht eine immer genauere Messmethode erforderlich.⁵

Allen angewandten Analysemethoden ist eine chromatographische Trennung gemein. Hierbei hat sich die Methode der GC (Gaschromatographie) gegenüber der DC (Dünnschichtchromatographie) und HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie) durchgesetzt. Die Detektionsentwicklung reichte von der spektrophotometrischen Untersuchung bei den Dünnschichtchromatographien über UV-Detektoren in der HPLC bis zu den

¹ Vgl. Spiegelhalder B. (1999)

² Vgl. Preussmann R. (1982), S. 143-148

³ Vgl. Spiegelhalder B. (1999)

⁴ Vgl. Spiegelhalder B. (1984), S. 160-163

⁵ Vgl. Sonnenschein G. (1992), S. 45-57

Flammenionisationsdetektoren, Elektroneinfangdetektoren, TEA (Thermal Energy Analyzer) und neuesten Massenspektrometern in der GC.

Gaschromatographie, gekoppelt mit Tandem Massenspektrometrie und positiv chemischer Ionisation, ist gegenüber den vorherigen Analysemethoden, aufgrund der höheren Empfindlichkeit und Selektivität die richtige Wahl zur Untersuchung auf flüchtige *N*-Nitrosamine und wird auch als Grundlage dieser Thesis dienen.

Das Ziel der vorliegenden Bachelorarbeit ist die Entwicklung einer Probenvorbereitung sowie die Optimierung der Messmethode mit anschließender Methodvalidierung, für die quantitative Untersuchung von kosmetischen Pflegeprodukten auf *N*-Nitrosamine mit einer Bestimmungsgrenze von 3 µg/kg. Die Validierung einer Analysenmethode ist die Überprüfung und Bewertung der Methodenqualität. Dabei muss nachgewiesen werden, dass das Analysenverfahren aussagekräftige, richtige und präzise Informationen über das analytische Problem liefert, um in den Routinebetrieb aufgenommen werden zu können. Neben diesen betriebswirtschaftlichen Aspekten ist das Kernziel der Methodenentwicklung, dem Minimierungsprinzip im Umgang mit *N*-Nitrosaminen gerecht zu werden, um die Verbraucher vor unnötiger Exposition dieser starken Kanzerogene zu schützen.

Die in dieser Bachelorarbeit entwickelte und validierte Methode zum Nachweis von *N*-Nitrosaminen in Kosmetika bezog sich dabei auf die acht flüchtigen *N*-Nitrosamine, NDMA, NMEA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR und NMOR, die in 2.2.1 genauer erläutert sind.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Kosmetik

Allgemein werden unter kosmetischen Mitteln solche Stoffe verstanden, die der äußeren Anwendung des menschlichen Körpers zur Reinigung und Parfümierung dienen.

In Abhängigkeit ihres Anwendungszweckes unterscheidet man mehrere Arten von kosmetischen Formulierungen, z.B. Emulsionen wie Cremes oder Lotionen, Salben, Gele und Öle. Diese Formulierungen unterscheiden sich stark bezüglich

- rheologischen Eigenschaften (flüssig oder streichfähig)
- Polarität (hydrophil oder lipophil)
- physiko-chemische Eigenschaften (ein- oder mehrphasig)⁶

Im Zuge dieser Bachelorarbeit wurde hauptsächlich mit Proben der Hauptpflege wie Cremes, Lotionen, und Masken gearbeitet. Aus diesem Grund wird sich auf die Erklärungen der Formulierung dieser Klasse beschränkt.

Als Basisformulierung dienen Emulsionen. Sie stellen ein heterogenes Zweiphasensystem dar, d.h. sie sind nur begrenzt ineinander mischbar und lassen sich in sogenannte o/w und w/o- Emulsionen einteilen. Erstere ist eine Öl-in-Wasser Phase. In ihr liegen die Öltröpfchen in der äußeren wässrigen Phase vor. Solche Systeme eignen sich als Reinigungsemulsionen. Sie sind mit Wasser abwaschbar und hinterlassen keinen Fettglanz auf der Haut. Die Gruppe der Wasser-in-Öl Emulsionen hingegen dienen der Hautbefeuchtung. In ihr liegt das Wasser als innerer Kern vor und die Grundformulierung stellt das Öl dar.⁷ In einigen Fällen werden Mehrfachemulsionen hergestellt. Eine Übersicht hierzu gibt Abbildung 1. Unter bestimmten Bedingungen kann eine Phaseninversion stattfinden in der eine o/w- Emulsion in eine w/o-Emulsion übergeht und umgekehrt.

Um die Stabilität der Emulsionen besonders bei Änderungen der Temperatur sicherzustellen, dient der Einsatz von Emulgatoren.⁸ Sie stellen eine Verbindung zwischen den beiden Phasen her. Ein häufiger Zusatz solcher Emulgatoren sind Amine wie das

⁶ Pharmazeutische Zeitung online Dermopharmazie (Hrsg.), o. V.,
<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=30128>

⁷ Vgl. Frauen M. (2001), S. 31

⁸ Uni-Kiel (Hrsg.), Stock N.,
http://www.uni-kiel.de/anorg/bensch/lehre/Dokumente/versuch_k3_emulsionen.pdf

Triethanolamin.⁹ Treten diese Substanzen mit bestimmten Konservierungsstoffen der Kosmetik in Wechselwirkung, liegt ein hohes Risiko der *N*-Nitrosaminbildung vor.

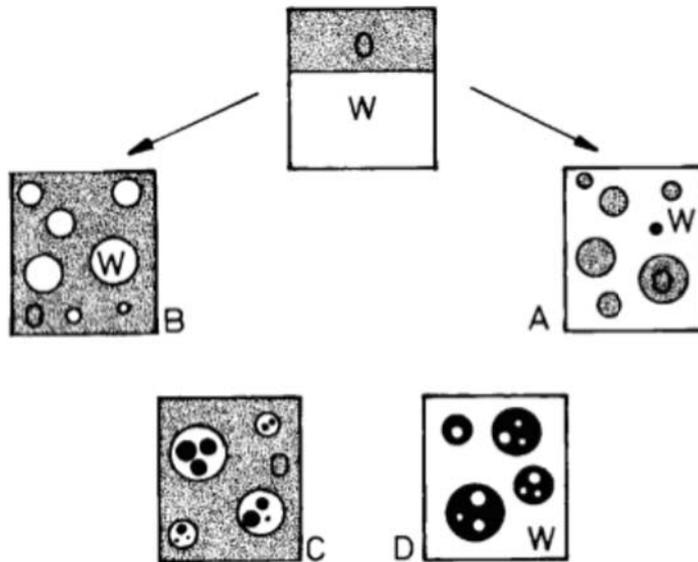


Abbildung 1 : Emulsionstypen¹⁰

A: Öl-in-Wasser-Emulsion B: Wasser-in-Öl-Emulsion

C: o/w-in-Öl-Mehrfachemulsion D: w/o-in-Wasser-Mehrfachemulsion

Die Untersuchung von Kosmetika auf *N*-Nitrosaminverbindungen kann, vor allem wenn mehrphasige Systeme vorliegen, recht aufwendige Schritte zur Matrixabtrennung beinhalten. Häufig ist es hier sinnvoll, eine Festphasenextraktion und / oder Säulenchromatographie zur Abtrennung der wässrigen Bestandteile und zur Anreicherung der *N*-Nitrosaminverbindungen durchzuführen, wobei verschiedene stationäre Phasen und Laufmittel zum Einsatz kommen können.

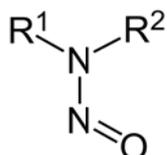
⁹ Kosmetische Praxis (Hrsg.), Lautenschläger H.,
http://www.dermaviduals.de/cms/upload/Publikationen_deutsch/KP-3-04-Emulgatoren.pdf

¹⁰ Uni-Kiel (Hrsg.), Stock N.,
http://www.uni-kiel.de/anorg/bensch/lehre/Dokumente/versuch_k3_emulsionen.pdf

2.2 *N*-Nitrosamine

2.2.1 Struktur und Eigenschaft von *N*-Nitrosaminen

Bei den *N*-Nitrosaminen handelt es sich um chemische Verbindungen, die als funktionelle Gruppen sowohl eine Amino-, als auch eine Nitrosogruppe tragen. Allgemein lassen sich *N*-Nitrosamine durch folgende chemische Struktur beschreiben.



R_1, R_2 : Alkyl-, Aryl-Gruppen

Abbildung 2 : Allgemeine Strukturformel der *N*-Nitrosamine¹¹

Bei den *N*-Nitrosaminen unterscheidet man symmetrische, unsymmetrische und zyklische Verbindungen.¹² Diese werden in zwei Gruppen eingeteilt.

- Flüchtige *N*-Nitrosamine (Volatile *N*-nitrosamine, VNA) sind meist niedermolekulare, nitrosierte dialkyl- oder cyclischeamine. Die flüchtigen *N*-Nitrosamine lassen sich aus unterschiedlichsten Lebensmittelmatrices in guten Ausbeuten > 70 % durch wässrige Destillation isolieren und benötigen zur gaschromatographischen Analyse keine Derivatisierung.¹³ Die wichtigsten Vertreter dieser Substanzklasse sind die acht in dieser Bachelorarbeit verwendeten *N*-Nitrosamine.
- Nichtflüchtige *N*-Nitrosamine (Nonvolatile *N*-nitrosamine, NVNA) stellen die zweite Gruppe dar. Sie lassen sich nicht durch destillative Techniken isolieren.¹⁴ Zu ihnen gehören das *N*-Nitrososarcosin und *N*-Nitrosoprolin.¹⁵

Die Strukturformeln, der in dieser Arbeit untersuchten acht flüchtigen *N*-Nitrosamine, sind zusammen mit einigen physikalisch-chemischen Eigenschaften in Tabelle 1 dargestellt.

¹¹ Wikipedia (Hrsg.), o. V.,
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/Nitrosamine_Formulae_V.1.svg

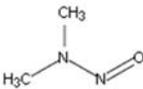
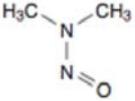
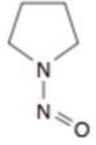
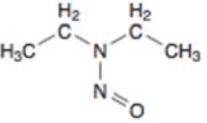
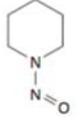
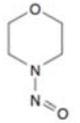
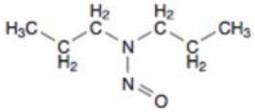
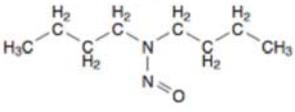
¹² Vgl. Marquardt H. (1997)

¹³ Vgl. Urban U. (2002)

¹⁴ Vgl. Urban U. (2002)

¹⁵ Vgl. Urban U. (2002)

Tabelle 1: Strukturformeln und physikalisch-chemische Eigenschaften der acht untersuchten *N*-Nitrosamine

Strukturformel und Name	Synonym	Molare Masse (g/mol)	Dampfdruck Siedepunkt
 <i>N</i> -Nitrosodimethylamin	NDMA	74,1	P^T : 5,6 hPa ³⁰ K_p : 151 °C
 <i>N</i> -Nitrosomethylethylamin	NMEA	88,13	P^T : 1,33 hPa ²⁵ K_p : 163 °C
 <i>N</i> -Nitrosopyrrolidin	NPYR	100,1	P^T : 0,095 hPa ²⁰ K_p : 214 °C
 <i>N</i> -Nitrosodiethylamin	NDEA	102,1	P^T : 1,1 hPa ²⁰ K_p : 176,9 °C
 <i>N</i> -Nitrosopiperidin	NPIP	114,2	P^T : 0,12 hPa ²⁰ K_p : 215 °C
 <i>N</i> -Nitrosomorpholin	NMOR	116,1	P^T : 0,048 hPa ²⁰ K_p : 224 °C
 <i>N</i> -Nitrosodi-n-propylamin	NDPA	130,2	P^T : 0,11 hPa ⁵⁰ K_p : 205,9 °C
 <i>N</i> -Nitrosodi-n-butylamin	NDBA	158,3	P^T : 0,04 hPa ²⁰ K_p : 234-237 °C

2.2.2 Bildung von *N*-Nitrosaminen

N-Nitrosamine bilden sich aus einem nitrosierenden Agens (N_xO_y) und einem nitrosierbaren Amin. Nachfolgend ist die Reaktionsgleichung für die Bildung eines *N*-Nitrosamins aus einem sekundären Amin formuliert.

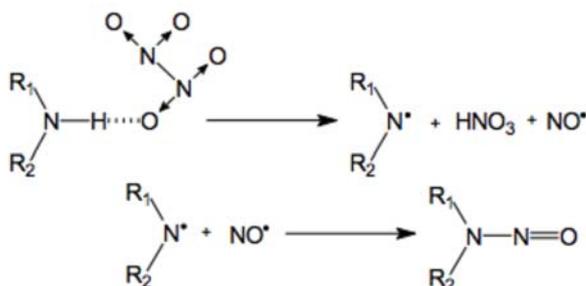


Abbildung 3: Reaktionsgleichung der Nitrosierung aus einem sekundären Amin¹⁶

Abhängig von der Anzahl der Wasserstoffatome, die durch einen Kohlenstoffrest substituiert werden, unterscheidet man zwischen den folgenden Aminen.

NH_3	RNH_2	R_2NH	R_3N
Ammoniak	Primäres Amin	Sekundäres Amin	Tertiäres Amin

Einer Nitrosierungsreaktion können zwar alle Amine unterworfen sein, jedoch tritt diese Reaktion besonders häufig mit sekundären Aminen auf. Primäre und tertiäre Amine scheinen nur in Nebenreaktionen nitrosiert zu werden und sind oftmals instabil, so dass die Ausbeute an *N*-Nitrosaminen hier gering ausfällt.¹⁷

Nitrosierungsreaktionen können sowohl in der Gasphase als auch in einer Fest- bzw. Flüssigphase ablaufen, jedoch sind die Reaktionsoptima je nach Phase sehr unterschiedlich. Eine Studie von J. Sander¹⁸ zeigte, dass die Bildung von *N*-Nitrosaminen in wässrigem Milieu bei einem pH-Wert zwischen 1-3 optimal abläuft und dass die Basizität der sekundären Amine einen erheblichen Einfluss auf die Ausbeute hat. Die Nitrosierbarkeit der wenig basischen sekundären Amine war um ein Tausendstel höher, als die der stark basischen.¹⁹

¹⁶ Donit Tesnit Ltd. (Hrsg.), o. V.,
http://www.donittesnit.si/fileadmin/user_upload/technical_info/Technical_Facts/Nitrosamines.pdf

¹⁷ Vgl. Tischer M. (1992), S. 13-27

¹⁸ Vgl. Sander J. (2009), S. 1437-4315

¹⁹ Vgl. Sander J. (2009), S. 1437-4315

Die Nitrosierungsreaktion ist, chemisch gesehen, eine Reaktion zweiter Ordnung. Bei niedriger bis sehr niedriger Belastung an Nitrosierungsagens erfolgt praktisch keine *N*-Nitrosaminbildung.²⁰

Von den zahlreichen Nitrosierungsmitteln spielen Stickoxide in der Praxis die wichtigste Rolle.²¹ Faktoren, wie das Vorhandensein von Halogeniden, können die *N*-Nitrosierung durch Bildung von NO_x beschleunigen, welches reaktiver ist als N₂O₃.

Unter Einwirkung von Stickoxiden nitrosieren primäre und sekundäre Amine unabhängig von der Basizität desamins.²²

Weitere wichtige Faktoren, die die Bildung von *N*-Nitrosaminen begünstigen, sind nachfolgend aufgeführt.²³

- Hohe Konzentrationen der Reaktionspartner (nitrosierendes Agens und nitrosierbares Amin) in flüssigen und festen Systemen, wobei das nitrosierende Agens immer in majorisierender Menge vorliegen muss
- Hohe Temperatur
- Hoher Dampfdruck flüchtiger Reaktionspartner bzw. hoher Partialdruck gasförmiger Reaktionspartner bei Gasphasenreaktionen
- Anwesenheit von Katalysatoren (z.B. Formaldehyd, Thioharnstoff, Thiole, Halogenid- und Pseudohalogenid-Ionen und einzelne Metallionen)
- Anwendungen mit Aerosolbildung

Neben diesen Faktoren gibt es aber auch Stoffe, die die *N*-Nitrosaminbildung weitestgehend unterbinden können. Diese Stoffe werden als Inhibitoren bezeichnet. Zu ihnen zählen primäre Alkanolamine, Ascorbinsäure, Ascorbinsäure-Derivate, Sulfamate, *p*-Aminobenzoesäure, Alkansulfonamide, α -Tocopherol und α -Tocopherol-Derivate, sowie einzelne Phenole.²⁴ UV- Licht zeigt sogar eine *N*-Nitrosamin abbauende Wirkung.

²⁰ Vgl. Preussmann R. (1985), S. 22

²¹ Vgl. Tischer M. (1992), S. 13-27

²² Vgl. Machholz R. (1989)

²³ Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Hrsg.), o. V., S. 4
<http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/TRGS-552.html>

²⁴ BG Bau (Hrsg.), o. V.,
<http://www.bgbau-medien.de/tr/trgs615/2.htm>

2.2.3 Belastung durch *N*-Nitrosamine

Die Gesamtbelastung durch *N*-Nitrosamine setzt sich aus zwei Einzelbelastungen zusammen, der exogenen und endogenen Belastung. Die Belastungsarten sind in Abbildung 4 dargestellt.



Exogene Belastung

Verbrauchsbedingt

Tabak und Tabakrauch

Lebensmittel, Bedarfsgegenstände

Arzneimittel, **Kosmetika**

Sonstige

Berufsbedingt

Luft am Arbeitsplatz

Gummi-, Leder-

Chemieindustrie

Endogene Belastung

Aufnahme von Vorläufern

Nitrit

nitrosierbare Aminoverbindung

Nitroso Gase NO_x

Bildung von Vorläufern

Nitrit aus Nitrat

(Speichel, Magensaft)

Abbildung 4: Belastungsarten durch *N*-Nitrosamine²⁵

Die exogene Belastung ist die Belastung mit vorgebildeten *N*-Nitrosaminen aus der Umwelt. Sie wird unterteilt in verbrauchsbedingte und berufsbedingte exogene Belastung.

Die häufigste verbrauchsbedingte Aufnahme an *N*-Nitrosaminen ist die Aufnahme durch Tabak und dessen Rauch.²⁶ Der Rauch einer Zigarette enthält unter anderem

²⁵ Eisenbrand G. (1985), S. 31, bearbeitet von Jochmann V.

²⁶ Vgl. Preussmann R. (1985), S. 18

3 ng NDBA, 28 ng NDEA und bis zu 65 ng NDMA.²⁷ Krebserzeugende *N*-Nitrosamine in Lebensmitteln entstehen vorwiegend beim Erhitzen. Nitrit wird als Pökelsalz vielen Lebensmitteln zur Konservierung zugegeben und kann zusammen mit Aminen der Proteine unter begünstigten Bedingungen (erhöhte Temperatur) zur Entstehung von *N*-Nitrosaminen führen. Allein durch die Nahrung nimmt der Bürger in Westeuropa im durchschnitt täglich 0,5 µg *N*-Nitrosamine zu sich.²⁸ Somit wird der Verzehr von beispielsweise Pizza, Toast Hawaii und Grillwürstchen zum ernährungsbedingten Risikofaktor.

Kosmetische Produkte waren in den 1970er Jahren oftmals, mit flüchtigen *N*-Nitrosaminen, wie NDMA und NMOR, kontaminiert.²⁹ Nachdem das Gesundheitsrisiko nachhaltig bewiesen wurde, arbeitete man stetig an der Reduktion der *N*-Nitrosaminbelastung durch veränderte Rezepturen, sowie Beimischung von Inhibitoren.³⁰ Trotzdem kommt es immer wieder vor, dass positive Proben, besonders von Kosmetikprodukten aus dem asiatischen Raum, auftauchen. Der deutsche Lebensmittelchemiker Tag präsentierte 2006 erwähnenswerte Ergebnisse. So wurden in 22 % der 400 zwischen 2001 und 2005 untersuchten Proben, krebserregende *N*-Nitrosamine gefunden.³¹

In der Richtlinie 76/768/EEC der Europäischen Gemeinschaft für Kosmetik (European Cosmetic Regulation) heißt es im Anhang 2, dass *N*-Nitrosamine der Stoffklasse angehören, die in dem kosmetischen Erzeugnis nicht enthalten sein dürfen. Laut Artikel 4.2 sind sie jedoch als Spuren in der GMP (Good Manufacturing Practice) wenn technisch unvermeidbar, akzeptiert, solange sich das Endprodukt nach Artikel 2 der Kosmetikrichtlinie richtet.

*„ (...) Die innerhalb der Gemeinschaft in den Verkehr gebrachten kosmetischen Mittel dürfen bei normaler Anwendung nicht geeignet sein, die menschliche Gesundheit zu schädigen“.*³²

²⁷ Vgl. Department of Health and Human Services (Hrsg.), o. V., <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/Nitrosamines.pdf>

²⁸ Vgl. Koehl W. (1999), S. 743-754

²⁹ Vgl. Spiegelhalder B. (1984), S. 160-163

³⁰ Vgl. Challis B. S. (1995), S. 119-131

³¹ Vgl. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.), Walther C., http://www.lgl.bayern.de/produkte/kosmetika/kosmetische_mittel/ue_2007_kosmetische_mittel_nitrosamine.htm#bis

³² Richtlinie 76/768/EWG

Nitrosierbare Amine finden als Schaumstabilisatoren, Anwendung in der Emulsionsherstellung von Kosmetika.³³ Einer der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind die Alkanolamine wie Mono-, Di- oder Triethanolamin (MEA, DEA oder TEA). Zur eigentlichen *N*-Nitrosaminbildung kann es dann kommen wenn Konservierungsstoffe mit einem hohen nitrosierenden Potential zugesetzt werden. Einige gängige Stoffe sind in Tabelle 2 festgehalten.

Tabelle 2: Kosmetische Konservierungsstoffe mit hohem nitrosierenden Potential

Chemikalie	Nutzen als
Bronopol	Konservierungsmittel
2-Bromo-2-Nitropropane-1,3-Diol	Konservierungsmittel
5-Bromo-5-Nitro-1,3-Dioxan	Konservierungsmittel
Diazolidinyl Urea	Konservierungsmittel
DMDM Hydantion	Konservierungsmittel
Imidazolidinyl-Urea	Konservierungsmittel

Die Bildung von *N*-Nitrosaminen in vitro kann durch Vitamin C (Ascorbinsäure)³⁴, Vitamin E (α -Tocopherol), primäre Aminosäuren sowie weiteren Komponenten der Gruppe der Pyrrole und Phenole in Kosmetika und Arzneistoffen verhindert werden.³⁵ Diese Entdeckung wurde von Forschern der University of Nebraska zufällig aufgedeckt. Sie untersuchten den Wirkstoff Aminopyrin und entdeckten, dass eine neue, Ascorbinsäure enthaltene Charge keine *N*-Nitrosamine bildete.³⁶ Nach Bützer kann Nitrosaminbildung annähernd verhindert werden, wenn das Verhältnis von Ascorbinsäure zu Nitrit größer als 2:1 ist.³⁷

Die beste Präventionsmaßnahme ist, nitrosierbare Komponenten aus der Kosmetikproduktion fernzuhalten und auf den Einsatz, nitrosierender Konservierungsstoffe zu verzichten. Explizit gilt für Fettsäuredialkanolamide und Trialkanolamine ein Grenzwert von 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ für *N*-Nitrosaminverunreinigungen im Rohstoff. Zusätzlich dürfen diese Stoffe nicht mit nitrosierenden Stoffen (z.B. dem Bronopol) verwendet werden.

³³ Richtlinie 76/768/EWG

³⁴ Vgl. Tannenbaum S.R. (1991), S. 50-247

³⁵ Vgl. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Hrsg.), o.V., <http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/TRGS-552.html>

³⁶ Linus Pauling Institute (Hrsg.), Scanlan R.A., <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/nitrosamine.html>

³⁷ Vgl. Bützer P. (Hrsg.), o. V., http://www.buetzer.info/fileadmin/pb/HTML-Files/Vitamin_C_Theorie.htm

Berufsbedingte Exposition mit *N*-Nitrosaminen kommen besonders häufig in Vulkanisationsprozessen der Gummiindustrie, bei der Verwendung von Korrosionsschutzmitteln und Kühlschmierstoffen in der Metallindustrie, sowie der chemischen Industrie durch Abfüllen von Aminen, vor.³⁸

Die endogene Belastung ist die Bildung von *N*-Nitrosaminen im Organismus selbst. Dies geschieht entweder durch die Aufnahme oder die Bildung von sogenannten Vorläufern, den Präkursoren. Dies sind nitrosierende Agenzien, wie Nitrit, nitrose Gase und nitrosierbare Aminoverbindungen. Keine dieser Verbindungen ist allein krebserregend. Das saure pH Milieu im Magen jedoch bietet ideale Bedingungen für die oben genannten Komponenten zur *N*-Nitrosaminbildung.³⁹

Der Nitritgehalt im Magen lässt sich hauptsächlich auf Nitrat zurückführen, welches mit der Nahrung aufgenommen und durch bakterielle Nitrosierung zu Nitrit reduziert wird. Eine solche bakterienvermittelte Nitrosierung findet zum Beispiel über die Bakterien der Mundhöhle statt, die 5 % der aufgenommenen Menge an Nitrat, zu Nitrit reduzieren.⁴⁰ Dieses wird nahezu komplett mit dem Speichel geschluckt und stellt so die Hauptquelle (80 %) für das Nitrit im Magen dar.⁴¹

2.2.4 Kanzerogenität der *N*-Nitrosamine

N-Nitrosamine sind schon seit langer Zeit als chemische Substanzen bekannt. Ihre Toxizität und die damit einhergehende Kanzerogenität wurde aber erst im Jahre 1954 von Magee und Barnes entdeckt.⁴²

Seit 1999 waren die in dieser Bachelorarbeit untersuchten *N*-Nitrosamine im § 35 Absatz 3 des Abschnitts 6 der Gefahrenstoffverordnung den krebserzeugenden Stoffen zugeordnet und mit Konzentrationsgrenzen versehen. In der aktuellsten Fassung vom 28.07.2011 werden sie im Anhang II Nummer 6 Ziffer 8. „(...) *N*-Nitrosaminverbindungen, ausgenommen solche *N*-Nitrosaminverbindungen, bei denen sich in entsprechenden Prüfungen auf krebserzeugende Wirkungen ergeben hat“, ohne Angaben von Grenzwerten als gefährliche krebserzeugende Stoffe ausgewiesen.

³⁸ Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Hrsg.), o. V., <http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/TRGS-552.html>

³⁹ Vgl. Preussmann R. (1985), S. 17

⁴⁰ Vgl. Tyroller S. (2004), S. 26

⁴¹ Vgl. Tyroller S. (2004), S. 27

⁴² Vgl. Spiegelhalder B. (1984), S. 160-163

Bisher wurde in zahlreichen Tierversuchen belegt, dass rund 90 % der heute etwa 300 bekannten *N*-Nitrosamine kanzerogene Wirkung zeigen.⁴³ Die umfangreichen Untersuchungen der Karzinogenforschung führten zu einigen verallgemeinerten Aussagen über die Struktur-Wirkungs-Beziehung der *N*-Nitrosamine. So nimmt die kanzerogene Potenz bei symmetrischen, aliphatischen oder cyclischen *N*-Nitrosaminen mit steigendem Molekulargewicht und fallender Basizität des dem *N*-Nitrosamin zugrundeliegendem Amins ab.⁴⁴

Es ist derzeit keine Tierspezies bekannt, die gegen ihre kanzerogene Wirkung resistent wäre. Die Untersuchung besonders stark kanzerogener *N*-Nitrosamine an Primaten ergab, dass auch sie keine Resistenz gegen diese Substanzklasse zeigten, worauf schließen lässt, dass auch der Mensch in dieser Hinsicht keine Ausnahme darstellt.⁴⁵

Es gibt bisher jedoch keine direkten Beweise einer Kanzerogenität von *N*-Nitrosoverbindungen beim Menschen. Es wurde aber gezeigt, dass Krebspatienten die mit *N*-Nitrosoharnstoffen als Therapeutika behandelt worden waren, etwa 3-4 Jahre nach dieser Behandlung an Leukämie erkrankten.⁴⁶

Um ihr kanzerogenes Potenzial entfalten zu können, müssen *N*-Nitrosamine metabolisch aktiviert werden. Diese metabolische Aktivierung ist in Abbildung 5 dargestellt. Zur Aktivierung bedarf es der Beteiligung verschiedener Cytochrom P450 Isoenzyme, die gewebespezifisch wirken können. Dies hat eine für *N*-Nitrosamine charakteristische Organspezifität zur Folge, in der die Tumorentstehung unabhängig vom Ort der Applikation, auftritt.⁴⁷

⁴³ Vgl. Tyroller S. (2004), S. 25

⁴⁴ Vgl. Askar A. (1979), S. 145

⁴⁵ Vgl. Doering I. (2010), S. 9

⁴⁶ Vgl. Spiegelhalder B. (1999)

⁴⁷ Vgl. Heling A.-K. (1979), S. 12

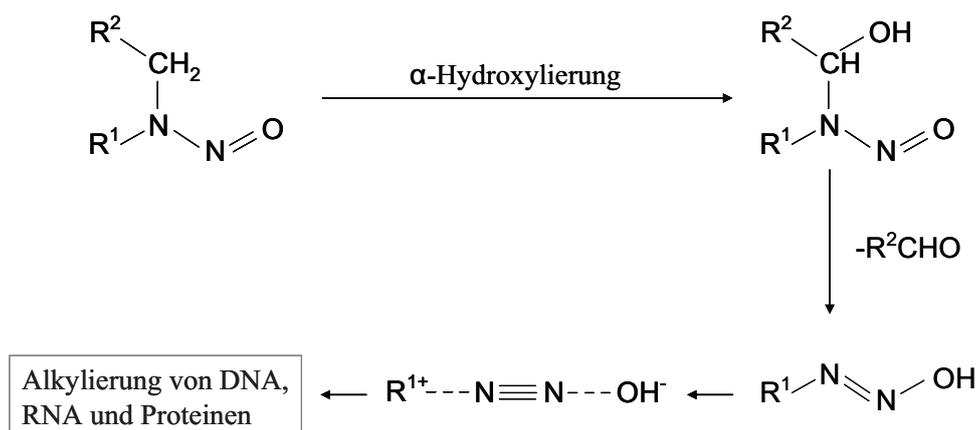


Abbildung 5: Mechanismus der Aktivierung der *N*-Nitrosamine⁴⁸

Die Aktivierung beginnt mit der Hydroxylierung der Kohlenstoffatome des *N*-Nitrosamins mittels einer Cytochrom Monooxygenase und führt zu dem chemisch instabilen Zwischenprodukt der α -Hydroxynitrosamine, die unter Aldehydabspaltung schließlich zu Diazohydroxiden reagieren. Diese gelten als besonders reaktionsfreudig und zerfallen sehr schnell im Wasser zu Stickstoff und einem Carbeniumion, welches DNA, RNA und Proteine alkyliert.⁴⁹

Man spricht aus medizinischer Sicht daher auch von einer mehrstufigen Kanzerogenese. Aus den sogenannten proximalen Kanzerogenen (inaktive *N*-Nitrosamine) entstehen ultimale Kanzerogene (Carbeniumion), die dann wiederum kovalent an die DNA, RNA oder Proteine binden⁵⁰, bleibende Veränderung an der DNA verursachen und trotz kurzfristiger Wirksamkeit in der Tumorbildung enden können. Da kein Schwellenwert bekannt ist und schon eine einmalige Dosis dieser Verbindung zur Tumorbildung führen kann, zählen *N*-Nitrosamine heute zu den kanzerogensten genotoxischen Substanzen.

2.3 GC-MS-MS

Bei der GC-MS-MS handelt es sich um eine Gerätekopplung eines Gaschromatographen mit einem Tandem-Massenspektrometer. Zusammen stellen sie ein Gesamtverfahren der Analytik dar, welches niedrige Nachweisgrenzen in komplexen Matrices ermöglicht.

⁴⁸ Vgl. Tyroller S. (2004), S. 25

⁴⁹ Vgl. Doering I. (2010), S. 10

⁵⁰ Vgl. Doering I. (2010), S.10

Da bei dieser Gerätekopplung sehr viele unterschiedliche Einstellungen und Anwendungen möglich sind, werden nachfolgend ausschließlich die im Rahmen der Bachelorarbeit verwendeten Funktionen beschrieben.

Die Gaschromatographie ist eine Analysenmethode zur Auftrennung von Stoffgemischen. Sie basiert auf der Flüchtigkeit und der Interaktion der Analyten mit der stationären Phase der Trennsäule bzw. Kapillarsäule, die je nach Aufgabenstellung zu wählen ist. In dieser Bachelorarbeit erfolgt die Trennung der Analyten mittels einer stark polaren DB-WAXETR Säule, deren stationäre Phase aus vernetzten PEG (polyethylenglykol)-Gruppen besteht.

Vor der Auftrennung der Analyten in der Säule selbst, erfolgt deren Verdampfung in einem sogenannten Liner, der Teil des Gaschromatographen ist.

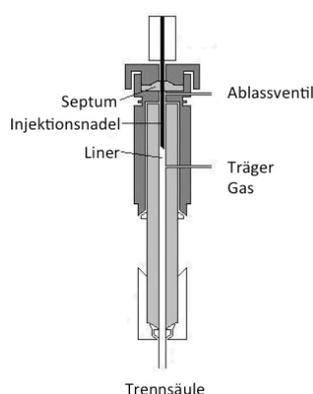


Abbildung 6: Aufbau des Probenaufgabesystems⁵¹

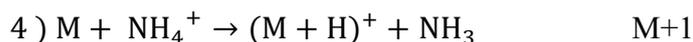
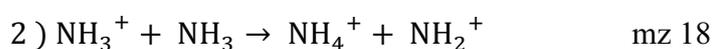
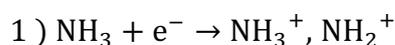
In der vorliegenden Bachelorarbeit wurde in der optimierten Messmethode mit einem CAS (Cold Application System), einem Kaltaufgabesystem, gearbeitet, dessen Hauptkomponenten in Abbildung 6 dargestellt sind. Hierbei wird das Probenextrakt unterhalb oder nahe des Siedepunktes des Lösungsmittels, flüssig unter Verwendung des Injektors im Pulsed Splitless Mode, einer Totalaufgabe-Technik, aus der Injektionsnadel in den Liner injiziert. Dieses Verfahren sorgt für eine schnelle und konzentrierte Aufgabe der Probe in den Liner und beugt somit Verlusten vor. Durch das folgende kontrollierte Aufheizen des Liners, kommt es zuerst zu der Verdampfung des Lösungsmittels. Dann erfolgt eine fraktionierte Verdampfung des Stoffgemisches. Der Vorteil dieser Technik ist, dass der Verdampfer in Form des Liners nicht gleichzeitig das komplette Verdampfungsvolumen aller Analyten und des Lösungsmittels gleichzeitig aufnehmen muss. Es können hierdurch kleinere Liner eingesetzt werden, was sich wiederum positiv auf die

⁵¹ US Davis ChemWiki by Univeristy of California (Hrsg.), Woo N., bearbeitet von Jochmann V. http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Gas_Chromatography

Transferzeit zur Trennsäule auswirkt und sich in einer gewünscht schlanken Peakform bemerkbar macht. Außerdem gelangen unverdampfbare Rückstände und Verunreinigungen nicht so leicht in die Trennsäule.⁵²

Die Trennsäule bzw. Kapillarsäule sitzt in einem temperierbaren Ofen, dessen Temperatur unabhängig vom Temperaturprogramm des Liners geregelt werden kann. Die Kapillarsäule wird von einem inerten Trägergas wie z.B. das in dieser Bachelorarbeit verwendete Helium, als mobile Phase, durchströmt. Nach dem Durchlaufen der Säule gelangen, die nun getrennt vorliegenden Stoffe, über eine Transferstrecke in die erste Einheit des MS-MS Systems, der Ionisationseinheit. Das System besteht insgesamt aus den drei Grundelementen Ionisationseinheit, Analysator und Detektor, wie in Abbildung 7 dargestellt.

Die Ionisation erfolgt bei dem verwendeten Gerät Agilent 7000 in der Ionisationseinheit mittels des Gases NH_3 im PCI Modus (Positiv Chemische Ionisation). Bei der Chemischen Ionisation (CI) wird im Unterschied zur Elektron Ionisation (EI), das Reaktantgas und nicht der Analyt (M) selbst zunächst durch Filament Elektronen ionisiert (siehe 1). Die komplette Reaktantgasionenbildung ist nachfolgend dargestellt.



Es handelt sich hierbei um eine schonende Ionisation, wodurch weniger Fragmente entstehen. Ammoniak gilt als sehr „weiches“ Reaktantgas zur Protonierung.⁵³ Es besitzt eine besonders hohe Affinität (204 kcal/mol) protoniert zu werden und eignet sich deshalb besonders gut für die PCI (siehe 2).⁵⁴ Da Analyt (M) und Reaktantgas eine hohe Affinität für einander aufweisen⁵⁵, reagiert das ionisierte NH_3 in der Gasphase besonders gut mit Aminen und *N*-Nitrosaminen, wodurch diese schließlich ionisiert werden (siehe 3).

⁵² Vgl. Brinkert T. (2005)

⁵³ Vgl. Hübschmann H-J. (1994), S. 133

⁵⁴ Agilent Technologies (Hrsg.), Riener J.,
<http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/Agilent%20Abstracts.pdf>

⁵⁵ Agilent Technologies (Hrsg.), Riener J.,
<http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/Agilent%20Abstracts.pdf>

Chemische Ionisation (CI) bietet allgemein gegenüber der Elektron Ionisation (EI) den Vorteil, dass sie nicht so stark fragmentierend ist und somit das Risiko verringert wird, dass eventuell verwandte Verbindungen ähnliche Fragmente bilden und ein falsch positives Ergebnis zur Folge haben. Außerdem sind Quantifizierungen dadurch begünstigt, dass die untersuchte Masse durch die geringe Fragmentierung meist eine hohe Masse mit großem Signal ist. Dieses ist in der Regel frei von Rauschen und anderen Störungen der Integration.⁵⁶

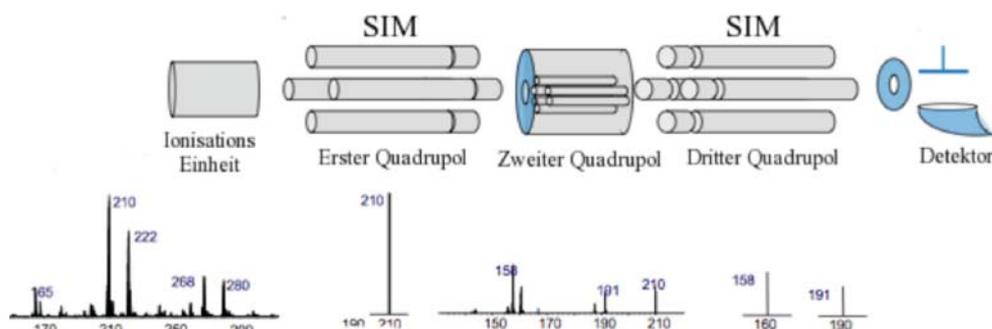


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines MS-MS Systems, bestehend aus Ionisations-einheit, Triple Quadrupol und Detektor⁵⁷

Nach der Ionisierung gelangen die Ionen und neutrale Moleküle in den aus drei Quadrupolen bestehenden Analysator. Um Kollisionen von Ionen und Molekülen so gering wie möglich zu halten, findet dieser Prozess im Hochvakuum statt.

Im Quadrupol 1 des Massenspektrometers werden die erzeugten Ionen durch ein elektrisches Feld beschleunigt und durchfliegen zentral vier parallel liegende Stabelektroden. Von diesen sind kreuzweise jeweils zwei leitend miteinander verbunden. In Abhängigkeit von den Spannungsverhältnissen haben nur Teilchen mit einem bestimmten Masse/Ladungs (m/z)-Verhältnis eine stabile oszillierende Bahn durch das Stabsystem. Trifft ein abgelenktes Ion einen Stab, so wird es entladen⁵⁸ und von der Vakuumpumpe abgesaugt. Im Wechselfeld zwischen den Quadrupol-Stäben findet so eine m/z Trennung statt, so dass jeweils nur Teilchen mit einer definierten Masse das Feld durchlaufen können, um in den zweiten Quadrupol zu gelangen.

Wie Abbildung 7 zeigt, ist der zweite Quadrupol die Kollisionszelle. Diese ist streng genommen kein Quadrupol, sondern ein Hexapol. Ähnlich wie der Quadrupol besteht

⁵⁶ Vgl. Hübschmann H-J. (1994), S. 134

⁵⁷ Agilent Technologies (Hrsg.) (2009), bearbeitet von Jochmann V., S. 21-31

⁵⁸ Vgl. Budzikiewicz H. (1998), S. 32-33

der Hexapol aus sechs parallel liegenden Stabelektroden mit entgegengesetzter Ladung (siehe Abbildung 8).

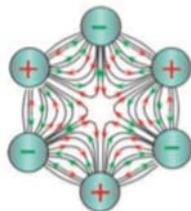


Abbildung 8: Darstellung des elektrischen Felds im Hexapol der Kollisionszelle⁵⁹

Der Kollisionszelle wird außer dem Stoffstrom aus dem ersten Quadrupol das Kollisionsgas Stickstoff, dem Helium als Quench Gas beigefügt ist, zugeführt. Das Quench Gas dient dabei der Neutralisierung des metastabilen Heliums aus der Ionisation und führt so zur Reduzierung des neutralen Rauschens, welches durch das Vorhandensein des metastabilen Heliums verursacht wird.

Das stabile Helium wird mittels Vakuumpumpe zusammen mit dem Trägergas und den nichtfragmentierten Ionen aus dem System eliminiert. Der Analyt wird in der Kollisionszelle mit Stickstoffmolekülen zu Schwingungen angeregt, worauf er in spezifische Fragmente zerfällt (siehe 4).

Zur Quantifizierung von Verbindungen wird der **Multiple Reaction Mode (MRM)** eingesetzt. Durch den Betrieb der Quadrupole im sogenannten **Single Ion Monitoring (SIM)** Modus gelangen nur Ionen mit einer bestimmten Masse von dem ersten Quadrupol zur weiteren Fragmentierung in die Kollisionszelle. Der dritte Quadrupol filtert die in der Kollisionszelle entstandenen Fragmente nochmals neu (Abbildung 7), wodurch eine hohe Selektivität erreicht wird. Dabei wird der dritte Quadrupol meist so eingestellt, dass nur das Fragment, welches aus einem Vorversuch mit Hilfe des Produktions-scans, das größte Signal-Rausch-Verhältnis zeigte, den Detektor erreichen und ein Signal verursacht. Innerhalb weniger Millisekunden kann der dritte Quadrupol ein weiteres Fragment detektieren. Der MRM Modus lässt somit parallel zu der spezifischen Fragment Bestimmung des Analyten, auch die des internen Standards, zu. Dieser Filtermechanismus des Triple Quadrupol ist in Abbildung 7 dargestellt.

Die Detektion mit dem Triple Axis Detektor, dessen Geometrie eine hohe Ionensammelrate bewirkt, sorgt für ein gutes Verhältnis von Nutzsignal zu Rauschsignal.

⁵⁹ Agilent Technologies (Hrsg.) (2011), S. 53

2.4 Methoden zur Probenvorbereitung

Die Analytik von Substanzen in (5-30) $\mu\text{g}/\text{kg}$ Konzentrationsbereichen, wie sie auch in der vorliegenden Bachelorarbeit der Fall ist, setzt eine ausreichend gute Probenvorbereitung voraus. Die Ziele der Probenvorbereitung sind das Abtrennen der Analyten von der Probenmatrix sowie ihr Anreichern bzw. Aufkonzentrieren.

Da die Probenmatrix sehr komplex ist, stellt es eine Herausforderung dar, eine Methode zu entwickeln, die sowohl alle *N*-Nitrosamine mit ihren unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften erfasst, als auch unbeeinflusst von Störkomponenten der Matrix bleibt. Hierbei bezeichnet man die Summe der Begleitstoffe der Kosmetikprobe als Matrix.

Für das Vermessen mit der GC ist es notwendig, die Probe von einem fast festen Zustand, in einen flüssigeren Zustand zu überführen ohne, dass der Analyt selbst hierbei zersetzt wird. Die Grundlagen der Methoden, die in dieser Bachelorarbeit Anwendung fanden, werden nachfolgend in ihren charakteristischen Abläufen auf wissenschaftlicher Ebene näher erläutert.

2.4.1 Wasserdampfdestillation



Um besonders die Fette und Nebenkomponenten der Matrix, die in der GC als Störungen auftreten könnten, von den Analyten abzutrennen, wurde die Wasserdampfdestillation durchgeführt.

Das Prinzip beruht darauf, dass die flüchtigen *N*-Nitrosamine mit dem Wasserdampf von dem Rest der Matrix abdestilliert werden.

Abbildung 9 : Verwendete programmierbare Wasserdampfdestillationsapparatur⁶⁰

Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass höhermolekulare Analyten wie das NDPA, sowie die Analyten mit hohen Siedepunkten NDBA, NMOR und NPIP vermutlich zu einem großen Teil in der Restmatrix zurückbleiben. Selbst nach erfolgreicher Abtrennung der Hauptmatrix durch die Wasserdampfdestillation, ist davon auszugehen, dass

⁶⁰ Gemini BV (Hrsg.)

<http://www.geminibv.nl/labware/gerhardt-vapodest-vap20/gerhardt-vapodest-vap20-2-3173.jpg>, bearbeitet von Jochmann V.

andere in der Matrix enthaltene flüchtige Störkomponenten, sich in hoher Konzentration im Destillat befinden. Eine nachfolgende Aufreinigungsmethode, wie das Verwenden einer SPE zur Abtrennung dieser Störkomponenten, ist sinnvoll.

2.4.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Das Ausschütteln mit Lösungsmitteln ist eine gängige Anwendung der Analytik und wurde aufgrund seiner leichten Durchführbarkeit gewählt. Ein Nachteil der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) ist, dass es sehr zeitaufwendig sein kann und hohe Kosten für die Entsorgung der Lösungsmittel anfallen.

Das Prinzip der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion, beruht auf der unterschiedlichen Verteilung des Analyten in der nicht miteinander mischbaren wässrigen und organischen Phase. Die Verteilung erfolgt nach dem Nernst'schen Verteilungssatz, der besagt, dass das Verhältnis der Konzentrationen des gelösten Stoffes in den beiden Phasen konstant ist.⁶¹

$$K = \frac{c_1}{c_2} \quad c_{1,2} = \text{Konzentration des Analyten in Phase 1 bzw. 2}$$

K = Nernst'scher Verteilungskoeffizient

Formel 1: Nernst'scher Verteilungssatz

Die Konzentration des Analyten in der organischen Phase c_1 wird umso höher, je größer der Verteilungskoeffizient K ist. Für Analyten mit kleinen Verteilungskoeffizienten, die mittels eines Verteilungsschrittes nicht vollständig extrahiert werden, lässt sich die Extraktionsausbeute durch mehrfache Extraktion mit kleinen Volumina steigern.⁶²

Unpolare Lösungsmittel wie Pentan und das leicht polare Dichlormethan können zur Extraktion von *N*-Nitrosaminen eingesetzt werden, ohne selbst in Wasser mischbar zu sein und bieten somit die Grundlage der Anwendung nach der Wasserdampfdestillation bzw. vor der Aufgabe auf eine polare Säule.

2.4.3 Festphasen-Extraktion

Bei der Verwendung von Säulen zur Abtrennung von Störkomponenten oder zur Aufkonzentration des Analyten stehen recht unterschiedliche Sorbentien an Festphasen zur Verfügung. Für wässrige Proben kommen ausschließlich unpolare Sorbentien in Frage,

⁶¹ Vgl. Asmussen C. (2000)

⁶² Vgl. Asmussen C. (2000)

da bei polaren Sorbentien der Überschuss an Wasser alle Adsorptionsplätze auf der Sorbensoberfläche besetzen würde und die Analyten dadurch keine Wechselwirkung mehr eingehen könnten. Der ungehinderte Durchlauf des Analyten wäre die Folge. Ein solcher Durchlauf lässt sich in der Aufnahme sogenannter Säulenprofile aufzeigen.

Für die Extraktion aus organischen Lösungen werden entsprechend nur polare Sorbentien in Frage kommen.

In dieser Bachelorarbeit wurde mit zwei unterschiedlichen SPE (Solid Phase Extraktion)-Säulen gearbeitet, die in Tabelle 3 mit ihren spezifischen Kenndaten aufgeführt sind.

Tabelle 3: Verwendete SPE-Säulen und ihre Kenndaten

Bezeichnung	Sorbens	Volumen (mL)	Füllmenge (mg)	Porenweite (Å)	Partikelgröße (μm)	Spez. Oberfläche (m^2/g)
Bond Elut Plexa	unpolar	6	200	100	45	550
Chromabond [®] Si-OH	polar	3	200	60	45	500

Im ersten Schritt wird das Sorbens konditioniert. Es handelt sich hierbei um einen Waschschrift, der Verunreinigungen des Produktionsprozesses von der Säule entfernen soll. Je nach Art des Sorbens werden bei polaren Säulen unpolare Lösungsmittel eingesetzt und umgekehrt. Das Analyt enthaltene Lösungsmittel wird nach Vorkonditionierung der Säule entsprechend der Anforderung unter Vakuum oder Normaldruck auf die Säule gegeben.

Je nach Polarität der Analyten werden diese unterschiedlich stark mit der Oberfläche des Sorbens in Wechselwirkung treten und sich dort ablagern. Das Lösungsmittel und solche Stoffe, die entgegengesetzte Polarität aufweisen, treten nicht oder nur sehr wenig mit der festen Phase in Wechselwirkung und verlassen die Säule. Danach wird der zurückgehaltene Analyt nach einem Waschschrift des Sorbens, von der Säule eluiert. Abbildung 10 veranschaulicht die Wechselwirkungen der Analyten mit der Säulenoberfläche am Beispiel einer unpolaren SPE-Säule.

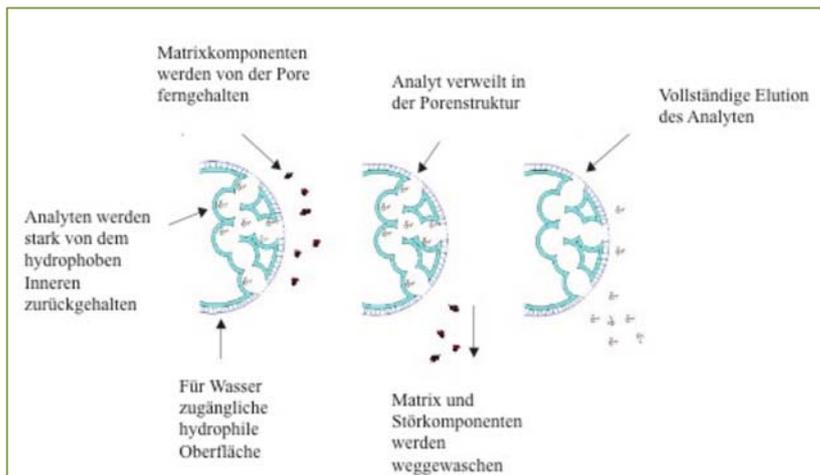


Abbildung 10: Wechselwirkungsmechanismus in einer unpolaren Säule

Pentan stellt besonders für die verwendete polare Säule ein geeignetes Aufgabemedium dar, da es laut der Elutropen Reihe (Tabelle 51), eine geringe Polarität aufweist und die *N*-Nitrosamine so auf der polaren Säule gehalten werden. Das Ethylacetat wäre als ein sehr polares Lösungsmittel ein geeignetes Elutionsmittel für die polare Si-OH Säule und würde die *N*-Nitrosamine von der Säule drängen. Für die Elut Bond Plexa eignet sich Methanol als polares Lösungsmittel zum aktivieren des Sorbens, sowie Wasser als Aufgabelösung und nach erfolgreichem Trocknen, Ethylacetat als Elutionsmittel. Da damit zu rechnen ist, dass das gebundene Wasser mit heruntergespült wird, müssen die *N*-Nitrosamine aus der oberen organischen Schicht abgenommen werden. Die Elut Bond Plexa ermöglicht eine weitere Abtrennung der Lipide, die keine Wechselwirkung mit der Säule zeigen.

Der Vorteil der Festphasen-Extraktion gegenüber dem Ausschütteln mit einer wässrigen Probe mit Lösungsmittel liegt in den hohen Anreicherungsraten, der einfachen Handhabung und in einer starken Reduktion an benötigtem Lösungsmittelvolumen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Die im Zusammenhang mit der Erstellung dieser Bachelorthesis verwendeten Geräte sind in der Tabelle 4 zusammengestellt. Die Tabelle enthält neben der Geräteart den Herstellernamen sowie die Typbezeichnung.

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller	Bezeichnung / Typ
Waage	Kern GJ	CPT Waage 3
Rührer + Heizfkt.	IKA RH	Basic 2
Destillationsanlage	Gerhardt	Vapodest 20-2
Rotationsverdampfer	Heidolph	VV 2000
GC System	Agilent	7890A
Autosampler	Agilent	7693
GC / MS Triple Quad.	Agilent	7000 A
GC Säule	Agilent	DB-WAXETR
SPE Säule	Varian	Bond Elut Plexa 200 mg
Barometer	Ashcraft	ASME B40.1 633
SPE Säule	Chromabond	200 mg, Ref. 730214
Filterpapier	595 Whatman	x 125mm, Ref. Nr. 10 300 011
Zentrifuge	Heraeus	Megafuge 1.0

3.1.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Nachfolgende Tabellen zeigen die, während der praktischen Tätigkeit im Labor der Eurofins Consumer Product Testing GmbH verwendeten, Lösungsmittel und Chemikalien.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien mit Angaben der Hersteller und Chargennummern

Chemikalie	Hersteller	Chargennummer
K ₂ HPO ₄	Merck	A0197801 120
NaOH Plättchen	Merck	B0298998 837
Silicon Entschäumer	Merck	K40785543 006
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich	7757-82-6, SZBA1460V
NaCl	VWR	27810.295
Natriumnitrit	Merck	CN 1958
Diethylamin	Merck	S6302110125, 99 %
Ethyl Acetat	Merck	1569472 051
n-Pentan	Eurofins intern	260206.325
Dichlormethan	VWR	11E060508, 23366.327
Dichlormethan	Merck	1558654043
1 mol/L Salzsäure	Merck	1.09060.1000
Lsg. 1 (1L)	Hergestellt aus 20 g NaOH gesättigt mit NaCl, pH 11	

Tabelle 6: Stammlösung der nativen *N*-Nitrosamine zum Herstellen der Standards und zum Spiken der Proben⁶³

Analyt	CAS #	Gehalt
<i>N</i> -nitrosodi- <i>n</i> -butylamin	924-16-3	(2005+/-10) µg/mL
<i>N</i> -nitrosodiethylamin	55-18-5	(2002+/-10) µg/mL
<i>N</i> -nitrosodimethylamin	62-75-9	(2005+/-10) µg/mL
<i>N</i> -nitrosodi- <i>n</i> -propylamin	621-64-7	(2005+/-10) µg/mL
<i>N</i> -nitrosomethylethylamin	10595-95-6	(2008+/-10) µg/mL
<i>N</i> -nitrosomorpholin	59-89-2	(2005+/-10) µg/mL
<i>N</i> -nitrosopiperidin	100-75-4	(2004+/-10) µg/mL
<i>N</i> -nitrosopyrrolidin	930-55-2	(2005+/-10) µg/mL

Tabelle 7: Stammlösung (c= (1000+/- 10) µg/mL) der deuterierten *N*-Nitrosamine, zur Herstellung der ISTD Verdünnungen⁶⁴

Analyt	CAS #
<i>N</i> -Nitrosodimethylamine-d ₆	17829-05-9
<i>N</i> -Nitrosodiethylamine-d ₁₀	1219794-54-3
<i>N</i> -Nitrosodipropylamine-d ₁₄	93951-96-3
<i>N</i> -Nitrosoethylmethylamine-d ₃	9278-54-2
<i>N</i> -Nitrosomorpholine-d ₈	1219805-76-1
<i>N</i> -Nitrosopiperidine-d ₁₀	960049-21-2
<i>N</i> -Nitrosopyrrolidine-d ₈	1219802-09-1
<i>N</i> -Nitrosobutylamine-d ₉	1219798-82-9

⁶³ Stammlösung der nativen *N*-Nitrosamine der Firma ULTRA SCIENTIFIC

⁶⁴ Stammlösung der deuterierten *N*-Nitrosamine der Firma ULTRA SCIENTIFIC

3.2 Methoden

3.2.1 Probenvorbereitung

Eine Literaturrecherche über die Probenaufbereitung von *N*-Nitrosaminen in kosmetischen Pflegemitteln ergab folgendes Ergebnis:

- viele Untersuchungen wurden bezüglich anderer *N*-Nitrosamine durchgeführt
- andere Analyseverfahren kamen zum Einsatz
- Vorbereitungsmethoden für die Untersuchung mit einer GC-MS-MS sind noch nicht veröffentlicht

Aus diesem Grund wurden in Anlehnung an ähnliche publizierte Problemstellungen verschiedene Verfahren ausprobiert und an die Aufgabenstellung angepasst.

Die Entwicklung der Probenvorbereitungsmethode wurde unter Verwendung einer Bodylotion durchgeführt. In dieser Phase wurde auf die Erstellung einer Kalibrierfunktion verzichtet. Um qualitative Aussagen zu ermöglichen, wurde neben der Probe ein externer Standard vermessen. In einigen Fällen wurde ein weiterer externer Standard mit aufgearbeitet und mit dem Standard ohne Aufarbeitung verglichen. So konnte ermittelt werden, ob die Aufarbeitungsmethode einen Einfluss auf den Standard hat.

Die Proben wurden vor der Aufarbeitung mit nativen *N*-Nitrosamin Standards gespickt. Unter Spiken versteht man das Zudosieren einer definierten Menge eines Kalibrierstandards.

In einigen Fällen wurde die Probe, sowie der externe Standard, zusätzlich mit einem internen Standard ergänzt. Der interne Standard ist eine dem Analyten chemisch sehr ähnliche Substanz. In der vorliegenden Arbeit wurden deuterierte *N*-Nitrosamine, siehe Tabelle 7, verwendet. Der interne Standard dient als relative Bezugsgröße und ermöglicht eine Kontrolle der Aufarbeitungsschritte. Die quantitative Auswertung der Messungen unter Berücksichtigung des internen Standards wird in 3.2.4 näher erläutert.

Drei Aufarbeitungsarten, die in Abbildung 11 dargestellt sind, wurden in vier verschiedenen Kombinationen in den Methoden angewandt und sind nachfolgend erläutert.

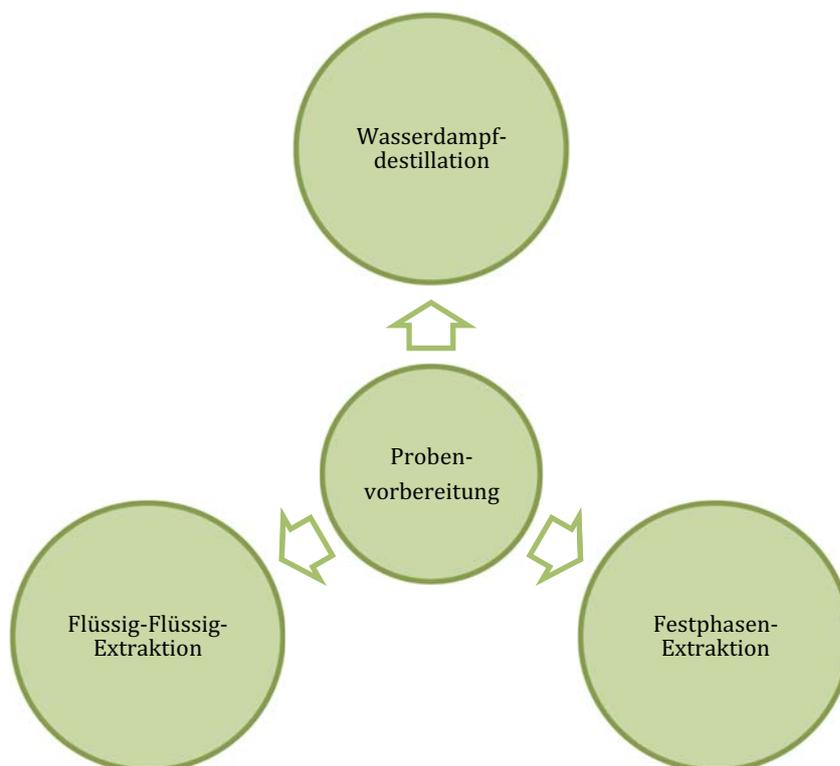


Abbildung 11: Angewandte Probenaufbereitungsarten

Methode 1: Wasserdampfdestillation mit anschließender Aufreinigung über eine unpolare Bond Elut Plexa Säule

Um eine möglichst effiziente Matrixabtrennung zu erreichen, wurde die Wasserdampfdestillation vorgenommen.

Einer 20 g gespikten Kosmetikprobe wurde 2 mL Entschäumer sowie 30 mL der Lsg. 1 vor der Wasserdampfdestillation zur Schaumreduktion bzw. Alkalisierung zugegeben. Die Wasserdampfdestillation wurde bei Erreichen eines Destillatvolumens von (100 ± 10) mL beendet.

Zu diesen ca. 100 mL Destillat wurden 100 g K_2HPO_4 gegeben und mittels Rührfisch gelöst.

Die SPE-Säule wurde mit 2 mL Methanol konditioniert und das Destillat über einen Aufsatz unter Vakuum durch die Säule gesogen. Nach dem 45 minütigem Trocknen der Säule wurde mit 1 mL Ethylacetat eluiert. 200-400 μ L des oberen organischen Überstandes wurden zum Vermessen abgenommen.

Methode 2: Extraktion mit Pentan und Aufreinigung über eine polare Chromabond Si-OH Säule

Um einem möglichen Verlust von *N*-Nitrosaminen durch vorgeschaltete Probenaufbereitung, wie der Wasserdampfdestillation, vorzubeugen, wurde die direkte Extraktion in zwei Varianten durchgeführt.

Hierbei wurde eine 5 g gespikete Kosmetikprobe in einem Sarstedt Röhrchen abgewogen, mit 10 mL einer gesättigten Dikaliumhydrogenphosphat- bzw. einer 5 % NaOH-Lösung versetzt und anschließend nach Zugabe von 5 mL Pentan durch Zentrifugation, 5 min., bei 4000 rpm, extrahiert.

Der organische Überstand wurde auf die mit 5 mL Pentan konditionierte polare SPE-Säule gegeben. Diese wurde anschließend mit 3 mL Pentan gewaschen und mit 1 mL Ethylacetat eluiert. Wahlweise wurde direkt vermessen oder das 1 mL Eluat auf 200 μ L mit N₂ abgeblasen.

Methode 3: Wasserdampfdestillation, Extraktion mittels Dichlormethan und anschließender Aufreinigung über polare Chromabond Si-OH Säule

Um eine möglichst effiziente Matrixabtrennung zu erreichen, wurde die Wasserdampfdestillation vorgenommen. Die Extraktion mittels Dichlormethan wurde durchgeführt, um eine verbesserte Überführung der Komponenten aus dem Destillat zu bewirken. Dichlormethan wurde unter Zugabe von Pentan (1:2) als Aufgabemedium für die SPE-Säule verwendet.

Einer 20 g gespikten Kosmetikprobe wurde 2 mL Entschäumer sowie 30 mL der Lsg. 1 vor der Wasserdampfdestillation zur Schaumreduktion bzw. Alkalisierung zugegeben. Die Wasserdampfdestillation wurde bei Erreichen eines Destillatvolumens von (100 \pm 10) mL beendet.

Die ca. 100 mL Destillat wurden durch einen Papierfilter von groben Verunreinigungen geklärt und anschließend mittels Dreifachextraktion mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Das Extrakt wurde nach jedem Schritt über etwas Natriumsulfat getrocknet und in einem Rotationsgefäß gesammelt, um auf 1 mL bei 40 °C und einem Vakuum von 750 mbar, einrotiert zu werden.

Das 1 mL Extrakt wurde zusammen mit 2 mL Pentan auf die mit 5 mL Pentan konditionierte polare SPE-Säule gegeben und durchlief diese ohne Anschluss von Vakuum. Die Säule wurde mit 3 mL Pentan gewaschen und der Analyt mit 1 mL Ethylacetat eluiert.

Methode 4: Wasserdampfdestillation und Extraktion mit Dichlormethan

Diese Methode stellt die optimierte Aufbereitungsmethode dar, anhand der die Validierung durchgeführt wurde.

Einer 10 g gespikten Kosmetikprobe wurde vor der Wasserdampfdestillation 2 mL Entschäumer sowie 30 mL der Lsg. 1 zur Schaumreduktion bzw. Alkalisierung zugegeben. Die Wasserdampfdestillation wurde bei Erreichen eines Destillatvolumens von (100 ± 10) mL beendet.

Die ca. 100 mL Destillat wurden über einen Papierfilter geleitet und anschließend nach erneuter Zugabe von 20 mL der Lsg. 1, mittels Dreifachextraktion mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Das Extrakt wurde nach jedem Schritt über etwas Natriumsulfat getrocknet und in einem Rotationsgefäß gesammelt, um auf 1 mL bei 40 °C und einem Vakuum von 750 mbar, einrotiert zu werden.

3.2.2 Aufnahme des Säulenprofils der polaren Chromabond Si-OH Säule

Das Säulenprofil wurde aufgenommen, um feststellen zu können, wie gut die Analyten auf der SPE-Säule bleiben, bzw. welche Komponenten eventuell gar nicht binden und durch das Waschen heruntergespült werden. Außerdem lassen sich Aussagen bezüglich der notwendigen Polarität der Lösungsmittel bei der Aufgabe und der Elution treffen.

Um eindeutige Ergebnisse zu erzielen, wurde eine Konzentration der Analyten von jeweils $c = 1$ mg/kg vorgelegt.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die sechs aufeinander folgenden Aufgaben auf die Säule, sowie die sechs gewonnenen Fraktionen, die individuell aufgefangen und vermessen wurden.

Im ersten Arbeitsschritt wurde der Analyt sowie 1 mL DCM und 2 mL Pentan auf die Säule aufgegeben. In den zwei darauffolgenden Arbeitsschritten wurde die Säule mit jeweils 1 mL DCM und 2 mL Pentan beladen. Die letzten drei Arbeitsschritte beinhalteten die Aufgabe von jeweils 1,5 mL EAC zusammen mit 1,5 mL Pentan.

Analyt	1 mL DCM	1 mL DCM	1,5 mL EAC	1,5 mL EAC	1,5 mL EAC
1 mL DCM	2 mL Pentan	2 mL Pentan	1,5 mL Pentan	1,5 mL Pentan	1,5 mL Pentan
2 mL Pentan					

Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5	Fraktion 6
------------	------------	------------	------------	------------	------------

Abbildung 12: Ablauf zur Aufnahme des Säulenprofils der Chromatographie-Säule

3.2.3 Methodvalidierung

Ziel einer jeden analytischen Messung ist es, den wahren Wert einer Größe zu bestimmen. Die wichtigste Voraussetzung für die Beurteilung von Analysemethoden ist die Validierung.

Die Validierung ist weder in einem Gesetz noch einer verabschiedeten DIN- oder ISO-Vorschrift geregelt. Der Umfang einer jeden Methodvalidierung richtet sich nach den individuellen Erfordernissen in dem beabsichtigten Anwendungsbereich der Methode und wird durch die Festlegung der Validierungsparameter bestimmt. Diese sollen die Eignung des zu validierenden Prüfverfahrens für den beabsichtigten Gebrauch jedoch hinreichend beschreiben.

Die Validierung der Methode wurde mittels einer gleichbleibenden Kosmetikmatrix durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine Bodylotion der Firma EDEKA (Elkos Body Care). Die Validierungsmatrix wurde schon in den Vorversuchen verwendet und erwies sich als gute Leerprobe mit wenig Matrixeinflüssen.

In diesem Kapitel sind die in dieser Bachelorarbeit untersuchten Validierungsparameter, unabhängig von der Untersuchungschronologie, näher erläutert und deren praktische Ermittlung dargestellt. Diese Parameter wurden von dem Qualitätsmanagement der Firma Eurofins Consumer Product Testing GmbH festgelegt und für die Methodvalidierung dieser Bachelorarbeit übernommen.

Tabelle 8 zeigt die bei der Methodenvalidierung verwendeten Geräteeinstellungen der GC-MS-MS.

Tabelle 8: Geräteeinstellung für die zu validierende Methode

Injektions Volumen	1 μ L im pulsed splitless mode
Liner Temperaturprogramm	Anfangstemperatur 41 °C Anstieg mit 20 °C/min auf 270 °C 1 min Verweildauer Abfall mit 50 °C/min auf 200 °C
Säulen Temperaturprogramm	Anfangstemperatur 40 °C für 3 min Anstieg mit 10 °C/ min auf 100 °C Anstieg mit 5 °C/min auf 160 °C Anstieg mit 40 °C/min auf 240 °C 2 min Verweildauer
GC Säule	DB-WAX ETR 260 °C 30 m x 250 μ m x 0,25 μ m
He Quench Gas	2,25 mL/min
N ₂ Kollisions Gas	1,5 mL/min
Detektion	MS/MS im MRM Modus
Lösungsmittel Verzögerung	8 min
Laufzeit	25 min
Software	Mass Hunter

3.2.3.1 Präzision

„ (...) Die Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analyseergebnisse untereinander oder einfach ausgedrückt: das Maß für die Streuung von Analyseergebnissen“.⁶⁵

Die Präzision gilt generell als das quantitative Maß für die Robustheit einer Methode.⁶⁶ Sie dient als überwachende Komponente. An ihr können Verschiebungen aufgedeckt werden.

Messpräzision:

In Bezug auf die Messpräzision wird die Streuung lediglich durch das Analysengerät selbst verursacht. Ermittelt wird die Messpräzision durch Mehrfachmessung, mindestens sechsfach, eines Standards oder einer stabilen homogenen Probe.

In dieser Arbeit wurde ein Standard mit einer Konzentration von 15 µg/kg 10 mal vermessen.

Methodenpräzision:

Sie ist ein Maß für die zufällige Streuung der Analyseergebnisse über die gesamte Methode und wurde wie folgt bestimmt.

10 gleiche Proben à 10 g gespikt mit 15 µg/kg, durchliefen alle Schritte der Aufarbeitung wie in 3.2.1, Methode 4, beschrieben und wurden anschließend individuell vermessen.

Laborinterne Vergleichspräzision:

Die laborinterne Vergleichspräzision ist ein Maß für Schwankungen der Ergebnisse die in einem Labor durch alle Schritte der Methode unter bewusster Änderung unterschiedlicher Parameter verursacht werden. Sie wird durch Mehrfachanalyse, mindestens zehnfach, einer Probe mit Variation der Prüfer/ Geräte/ Chemikalien/ Arbeitstage ermittelt.

10 gleiche Proben à 10 g mit einer Konzentration von 15 µg/kg wurden an unterschiedlichen Tagen, mit verschiedenen Chemikalienchargen, sowie unterschiedlichen Mitarbeitern aufgearbeitet und vermessen.

⁶⁵ Vgl. Kromidas S. (1999), S. 52

⁶⁶ Vgl. Kromidas S. (1999), S. 110-119

3.2.3.2 Linearität

Kalibrierfunktion des Gerätes:

Unter Kalibrierung versteht man in der Analytik die Ermittlung des Zusammenhanges zwischen Messwerten, Signal des Messgerätes, und verschiedenen Konzentrationen oder Mengen durch die Verwendung von Standardlösungen. Die Kalibrierfunktion unter Nutzung von Standards erlaubt keine Rückschlüsse auf die Linearität der Methode. Es ist daher erforderlich, diese im Zuge der Methodenvalidierung mit realen Proben (Analyt+Matrix), nachzuweisen.⁶⁷ Dieses Verfahren ist im nächsten Abschnitt beschrieben.

Zur Kalibrierung der verwendeten GC-MS-MS wurden Standards, wie in Tabelle 9 aufgeführt, erstellt, in Doppelbestimmung vermessen und anschließend auf Linearität geprüft. Konkret wurden hierfür 20 mL des in Spalte 3 aufgeführten Standards (0,5 mg/kg nativ+0,2 mg/kg ISTD), aus 1 mL eines nativen Standards (c= 10 µg/kg), 4 mL eines internen Standards (c= 1 µg/kg) und Restvolumen DCM hergestellt. Diesem hergestellten Standard wurden dann definierte Volumina (siehe Spalte 3) entnommen und mit definierten Volumina eines internen Standard (c= 0,2 µg/kg) verdünnt (Spalte 4). Die nachfolgende Abbildung 13 veranschaulicht die theoretische Zusammensetzung der Kalibrierstandards für die Aufnahme der Kalibriergeraden und die konstant bleibende Menge an internem Standard.

Tabelle 9: Vorgehensweise zum Erstellen der Kalibrierstandards

Absolute Masse nativ (µg)	Konz. nativ in der Probe (µg/kg)	0,5 mg/kg nativ +0,2 mg/kg ISTD	ISTD 0,2 mg/kg
0,05	5	100 µL	900 µL
0,10	10	200 µL	800 µL
0,15	15	300 µL	700 µL
0,20	20	400 µL	600 µL
0,25	25	500 µL	500 µL
0,30	30	600 µL	400 µL

⁶⁷ Vgl. Kromidas S. (2000), S. 133-134

Unter Linearität versteht man die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind.⁶⁸

Die DIN 38402 Teil 51 sieht zwischen dem kleinsten und größten Messwert mindestens 5 äquidistante Gehalte vor. Der Kalibrierbereich wurde deshalb mit 5-30 µg/kg gewählt.

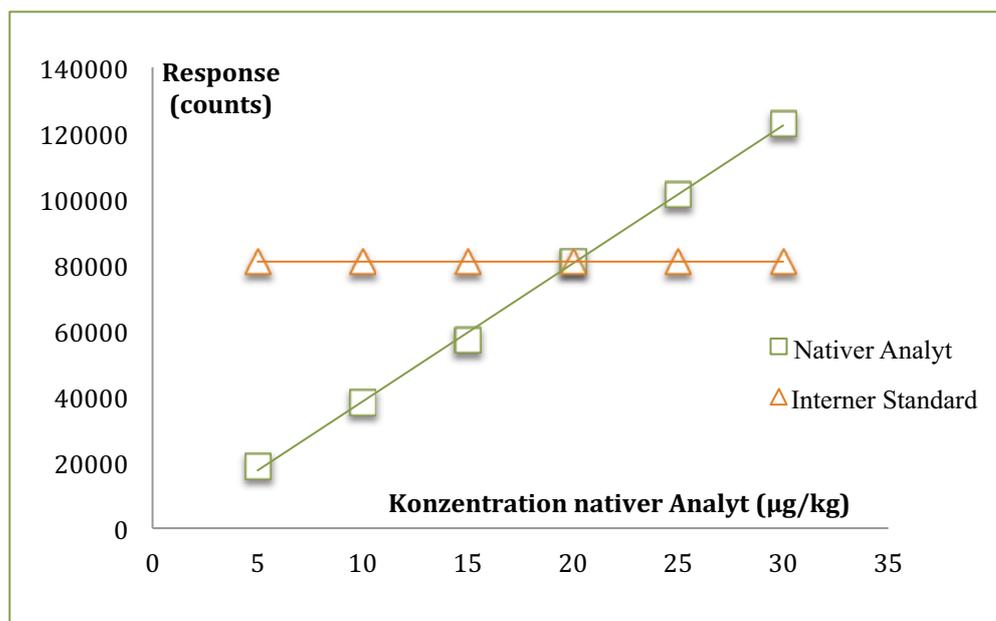


Abbildung 13 : Kalibrierfunktion mittels nativen Analyt und internem Standard

Linearität der Methode:

Die Linearität der Methode gibt an, inwiefern das Signal des Messgerätes auch unter Matrixeinfluss direkt proportional zur eingesetzten Konzentration des Analyten ist.

Es wurde eine Sechspunktkalibrierung entsprechend Tabelle 10 hergestellt. Pro Konzentrationslevel wurden 2 Aufarbeitungen nach der in Punkt 3.8 beschriebenen Methoden durchgeführt und jeder Aufarbeitung der Interne Standard vor der Aufarbeitung zugesetzt. Die Konzentration des internen Standards war dabei so gewählt, dass sie konstant bei 20 µg/kg in der Probe lag und somit leicht über die mittlere Kalibrierkonzentration hinausging.

⁶⁸ Vgl. Kromidas S. (2000), S. 133

Tabelle 10: Herstellen der Kalibrierfunktion zur Bestimmung der Methoden Linearität

Konz. nativ in der Probe ⁶⁹ (µg/kg)	Nitrosamin-nativ 0,5 mg/kg	ISTD 0,2 mg/kg
5	100 µL	1 mL
10	200 µL	1 mL
15	300 µL	1 mL
20	400 µL	1 mL
25	500 µL	1 mL
30	600 µL	1 mL

3.2.3.3 Blindwert

Die Blindwertkontrolle gibt an, inwieweit das Lösungsmittel oder das Gerät selbst (Blindwert Gerät) bzw. die Matrix über das gesamte Verfahren (Blindwert Methode), bei der Messung ein Signal verursacht.

Blindwert Gerät:

Hierzu wird nur der interne Standard 0,2 mg/kg, der in dem Lösungsmittel Dichlormethan angesetzt wird, zweimal vermessen.

Blindwert Methode:

Um den Methodenblindwert zu erfassen, wird 10 g unbelastetes Probenmaterial mit internem Standard gespikt, 1 mL des 0,2 mg/kg ISTD, über das gesamte Verfahren aufgearbeitet und zweimal vermessen.

3.2.3.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wird auch oftmals als Quantifizierungsgrenze bezeichnet. Sie entspricht dem Gehalt, der mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit quantitativ erfasst werden kann.⁷⁰

Die Nachweisgrenze wird als der geringste Gehalt definiert, der noch nachgewiesen werden kann und sich signifikant vom Blindwert unterscheidet.⁷¹

Die Bestimmungsgrenze (BG) und Nachweisgrenze (NWG) können auf unterschiedliche Weisen ermittelt werden.

⁶⁹ 10 g Probe

⁷⁰ Vgl. Kromidas S. (1999), S. 232

⁷¹ Vgl. Kromidas S. (1999), S. 240

In vorliegender Arbeit wurden sie über die Wiederholstandardabweichung durch Mehrfachmessung einer Probe von 3 µg/kg, wie in 4.3.8 dargestellt, errechnet.

3.2.3.5 Wiederfindung

Die Wiederfindung oder auch Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe. Der Idealwert der Wiederfindung ist somit 100 %.

Bei komplizierter Matrix, wie auch die Kosmetika eine darstellen, ist die Wiederfindung ein weiterer wichtiger Validierungsparameter. Man könnte die Wiederfindung auch als Ausbeute nach allen Schritten der Aufarbeitung bezeichnen.

Die Wiederfindung wurde in der vorliegenden Bachelorarbeit aus der 10 fach Aufbereitung und individueller Messung der matrixgleichen Proben mit einer nativen Analytkonzentration von 15 µg/kg und interner Standard Konzentration von 20 µg/kg, bestimmt. Auf diese Weise konnten sowohl die relative als auch die absolute Wiederfindungsraten bestimmt werden.

3.2.3.6 Stabilität

Diese Untersuchung bewertet das Stabilitätsverhalten von Analyten in einer Messlösung bzw. einem Probeextrakt.

Die Stabilität eines Analyten sollte vom Zeitpunkt der Probennahme bis zum Abschluss der Analyse gewährleistet sein. Da Messserien über Tage andauern können, ist eine Aussage über das Stabilitätsverhalten einer Probe über solch große Zeiträume von außerordentlicher Bedeutung.

In dieser Bachelorarbeit wurde zur Ermittlung der Stabilität ein 15 µg/kg Standard, sowie eine reale Probe gleicher Konzentration über einen Zeitraum von insgesamt 168 h vermessen. Messungen wurden nach 72, 96 und 168 h durchgeführt und die Probengefäße, Vials, nach jeder Messung mit einem neuen Septum versehen, um Lösungsmittelverdampfung vorzubeugen und gleiche Bedingungen zu gewährleisten. Während der gesamten Untersuchung waren die Proben den Einflüssen eines routinemäßigen Laborbetriebs ausgesetzt.

Zusätzlich zu dieser Langzeituntersuchung wurde ein im Kühlschrank über ca. 1 Jahr gelagerter und in unregelmäßigen Abständen genutzter Standard mit einer Konzentration

on von 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ gegen einen frisch angesetzten Standard gleicher Konzentration vermessen.

3.2.4 Statistische Methoden und Vorgehensweise zur Bewertung der Ergebnisse

3.2.4.1 Bewertung der Peakbeschaffenheit

Die Auswertung der Ergebnisse der Messungen an der GC-MS-MS erfolgt über eine Bewertung der Chromatogramme. Für jede Komponente wird hierzu der erhaltene Peak nach folgenden Parametern bewertet.

- Basispeakbreite
- Peakhöhe
- Peaksymmetrie

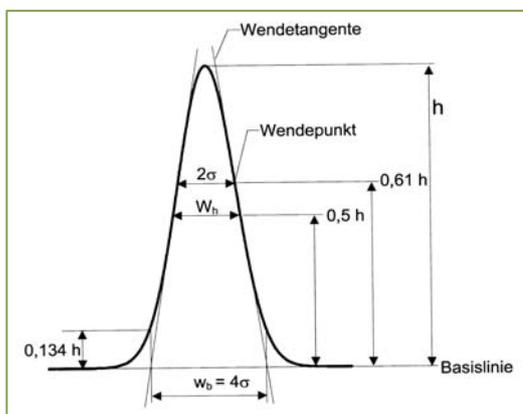


Abbildung 14: Peak Darstellung zur Ermittlung charakteristischer Kenngrößen⁷²

Bei idealen chromatographischen Peaks (Gauß-Peaks) befindet sich die Basispeakbreite in 13,4 % der Peakhöhe und entspricht der vierfachen Standardabweichung der Normalverteilung ($w_b = 4\sigma$).⁷³

Bei realen Peaks kann unzureichende Auflösung zu verschmolzenen Peaks führen, deren Komponentenzuordnung schwer möglich ist. Zur Bestimmung der Auflösung zweier dicht beieinander liegender Peaks wird die Distanz zwischen den Peaks, Ende von Peak 1 bis Anfang von Peak 2, mit der Breite des breiteren Peaks verglichen. Beträgt das Verhältnis höchstens 3 so sind die Peaks als einzelne, vollständig aufgelöste Peaks zu betrachten.⁷⁴

⁷² Kromidas S. (2008), S. 7

⁷³ Vgl. Kromidas S. (2008), S. 6

⁷⁴ Vgl. Staufer D. (2008), S. 44-45

Als Auflösung wird das Verhältnis aus Selektivität und Effizienz eines Systems bezeichnet, wobei die Selektivität ein Maß für den Retentionsunterschied und die Effizienz ein Maß für die Peakverbreiterung ist.⁷⁵

Eine quantitative Auswertung, Flächenberechnung, verschmolzener Peaks ist nicht möglich. Maßnahmen die zur Verbesserung der Auflösung führen, sind daher notwendig.

Die Peakflächenberechnungen wurden mit der Software des Gerätes, Mass Hunter, durchgeführt, graphisch dargestellt und anschließend optisch verifiziert. Bei Unstimmigkeiten wurde eine manuelle Integration vorgenommen. Dazu wurde die Basislinie vom Beginn des Peaks bis zu dessen Abfall verlängert und die dadurch eingeschlossene Fläche berechnet. Beim Auftreten von Schultern oder Doppelpeaks wurde das Lot gefällt und die Peakfläche ohne Schulter bzw. Störpeak bestimmt. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 15 bei $t = 12,709$ min. dargestellt.

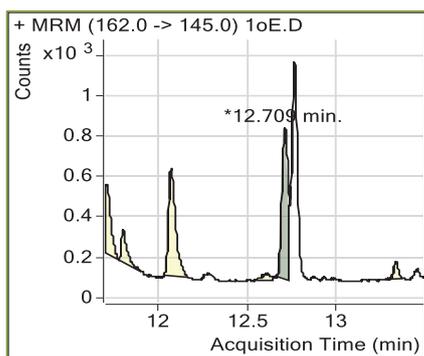


Abbildung 15: Manuelle Integration beim Auftreten eines Schulterpeaks

3.2.4.2 Auswertung mittels internem Standard

Probenmatrix und Probenaufbereitung beeinflussen das Signal des internen Standards und des Analyten in gleicher Weise, da davon auszugehen ist, dass interner Standard und Analyt gleiches physikalisch-chemisches Verhalten zeigen. Der Einsatz des internen Standards dient in dieser Bachelorarbeit der Kontrolle der Aufarbeitungsschritte und ermöglicht die rechnerische Korrektur der Analysenergebnisse.

Das Verhältnis der relativen Intensität eines Analytensignals zu dem Signal des internen Standards, Responsefaktor, dient als analytischer Parameter. Er beruht auf dem Grundsatz, dass sich die Mengen zweier Stoffe verhalten wie ihre korrigierten Peakflächen.

⁷⁵ Vgl. Kromidas S. (2008), S. 9

Der Responsefaktor ergibt sich zu

$$R_f = \frac{S_{ISTD} \times c_A}{c_{ISTD} \times S_A}$$

Formel 2: Berechnung des Responsefaktors

Mittels des Responsefaktors und der bekannten Konzentration des internen Standards in der Probe kann mittels der Signale des ISTD und Analyt dessen Konzentration wie folgt bestimmt werden.

$$c_A = R_f \times c_{ISTD} \times \frac{S_A}{S_{ISTD}}$$

Formel 3: Berechnung der Analytkonzentration mittels Responsefaktor und internem Standard

3.2.4.3 Arithmetischer Mittelwert

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n x_i$$

Formel 4: Ermittlung des arithmetischen Mittelwertes

Der Mittelwert ist normalerweise die beste, durch Messungen zugängliche, Schätzung für den “wahren Wert“. Der, von Excel berechnete Wert, wurde nach einer empirischen Formel nochmals verifiziert.⁷⁶

$$\bar{x} = \frac{\text{grösster Wert} + \text{kleinster Wert}}{2}$$

Formel 5: Empirische Formel zur Verifizierung des Mittelwertes

3.2.4.4 Standardabweichung

Die Standardabweichung ist eine Statistische Größe und ist ein Grad der Streuung einzelner Werte um den Mittelwert. Die Streuung ist das Ergebnis von zufälligen Fehlern.

In der instrumentellen Analytik gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Gründe für eine Streuung von Ergebnissen, nämlich das Analysengerät selbst und die Methode.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Formel 6: Ermittlung der Standardabweichung

⁷⁶ Vgl. Kromidas S. (2000)

Der von Excel errechnete Wert wurde mit einer empirischen Formel kontrolliert.⁷⁷

$$s = \frac{\text{grösster Wert} - \text{kleinster Wert}}{x}$$

Formel 7: Empirische Formel zur Ermittlung der Standardabweichung

x ist hierbei abhängig von der Anzahl der Werte n und kann der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 11: Rechenwerte für die empirische Ermittlung der Standardabweichung mit Hilfe von festgelegten x Werten.

n	2	3	5	6	10
x	1,4	1,9	2,6	2,7	3,3

Je kleiner die Standardabweichung, umso enger liegen die Werte um den Mittelwert.

Neben der Standardabweichung s einer Messreihe gibt es die sogenannte Verfahrensstandardabweichung s_{x0} und die Reststandardabweichung s_y .

Die Reststandardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Messwerte in y-Richtung um die Regressionsgerade.

Für eine lineare Regression wird sie wie folgt bestimmt.

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [y_i - (b \times x + a)]^2}{n - 2}}$$

Formel 8: Formel zur Ermittlung der Reststandardabweichung

Die Verfahrensstandardabweichung ist ein gütebestimmender Kennwert der aus der Reststandardabweichung s_y und der Steigung einer Regression errechnet wird.

Für eine lineare Regression wird sie wie folgt bestimmt.

$$s_{x0} = \frac{s_y}{b}$$

Formel 9: Formel zur Ermittlung der Verfahrensstandardabweichung

⁷⁷ Vgl. Kromidas S. (2000), S. 52

3.2.4.5 Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient oder auch relative Standardabweichung ist ein quantitatives Maß für die Präzision und errechnet als Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert wie in nachfolgender Gleichung dargestellt.

$$V_K = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \%$$

Formel 10: Ermittlung des Variationskoeffizienten

Neben dem Variationskoeffizienten wird in dieser Bachelorarbeit der Verfahrensvariationskoeffizient oder die relative Verfahrensstandardabweichung V_{K0} verwendet. Sie ist ein geeignetes Beurteilungskriterium für die Robustheit eines Analyseverfahrens und berechnet sich analog zu oben genannter relativer Standardabweichung, als Quotient aus Verfahrensstandardabweichung und Mittelwert.

3.2.4.6 Prüfung auf Normalverteilung der Messwerte

Die Verifizierung der Normalverteilung ist wichtig, um einer Standardabweichung eine bestimmte Wahrscheinlichkeit zuordnen zu können.

Um die Normalverteilung einer Messreihe nachzuweisen wird der Test nach David angewendet. Auch hier wird eine Wahrscheinlichkeit von 99 % zugrunde gelegt. Dieser Prüfungsmethode folgend liegt dann eine Normalverteilung vor, wenn die Prüfgröße PG, innerhalb des oberen g_o und unteren g_u Grenzwertes der David Tabelle, die im Anhang beigelegt ist, für die untersuchte Anzahl von Messwerten liegt.⁷⁸

PG errechnet nach folgender Formel:

$$PG = \frac{x_{max} - x_{min}}{s}$$

Formel 11: Prüfgrößenberechnung nach David

3.2.4.7 Prüfung auf Ausreißer innerhalb der Messwerte

In der vorliegenden Arbeit wurden Werte, die als Ausreißer verdächtigt wurden (x), durch den Test nach Grubbs, der im Unterschied zum Dixon-Test, eine schärfere Trennung zwischen Ausreißer und gültigem Messwert vornimmt, verifiziert.⁷⁹ Hierbei wurde eine Wahrscheinlichkeit von 99 % zugrunde gelegt und als Ausreißer nach Formel 12

⁷⁸ Vgl. Kromidas S. (1999), S. 70-72

⁷⁹ Vgl. Kromidas S. (1999), S. 70-72

identifizierte Werte gestrichen und dann die statistischen Kenngrößen neu berechnet. Auf eine erneute Untersuchung auf Ausreißer wurde verzichtet. Die Grubbs Tabelle ist im Anhang dieser Arbeit beigelegt (siehe Tabelle 53).

$$Q = \frac{x - \bar{x}}{s}$$

Formel 12: Bestimmung von Ausreißern

3.2.4.8 Prüfung auf Trend der Messwerte

Der Trendtest prüft Wertereihen auf Abwesenheit von sich (zeitlich) verändernden systematischen Abweichungen (z.B. Abbau von Lösungen, Temperaturdrift, schleichende Dejustierung).

Er wurde im ersten Schritt visuell durchgeführt und bei Unsicherheit bzw. wenn ein Trend der Messergebnisse mit bloßem Auge nicht erkannt werden konnte, durch den Test nach Neumann abgesichert. Dieser basiert auf der Berechnung der folgenden Prüfgröße.

$$Q = \frac{1}{(n-1) * s^2} \sum_{i=1}^{n-1} (x_i - x_{i+1})^2$$

Formel 13: Prüfung auf Trend nach Neumann

Ist Q größer als der in der Tabelle 54 vorliegende Wert, so liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % kein Trend vor.

4 Auswertung und Ergebnisse

Ergebnisse von vorangegangenen Untersuchungen der Eurofins Consumer Product Testing GmbH an der in dieser Bachelorarbeit verwendeten GC-MS-MS zeigten, dass es zu keinem Auftritt sogenannter kritischer Paare bei den acht zu untersuchenden *N*-Nitrosaminen kommt, sondern alle einzelnen Stoffe gut durch die eingebaute Kapillarsäule getrennt werden. Jede Komponente des Stoffgemisches hat durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften eine charakteristische Mobilität in der Trennsäule, die unter anderem vom Verteilungskoeffizienten zwischen stationärer und mobiler Phase bestimmt wird. Treten Komponenten nicht nur im gleichen Zeitfenster, sondern auch mit der selben Retentionszeit auf, so ist eine Trennung nicht gegeben.

Aus zeitlichen Gründen wurden die von der Software des Gerätes erstellten Chromatogramme unbearbeitet übernommen und auf eine Anpassung der Skalierung verzichtet. Um wichtige Ergebnisse zu verdeutlichen, wurden deshalb an einigen Stellen Ausschnittsvergrößerungen dargestellt und diskutiert.

4.1 Ergebnisse der Probenaufbereitung

Dieser Abschnitt ist eine Zusammenfassung und Darstellung einiger Ergebnisse, die während der Optimierung der Probenaufbereitung entstanden.

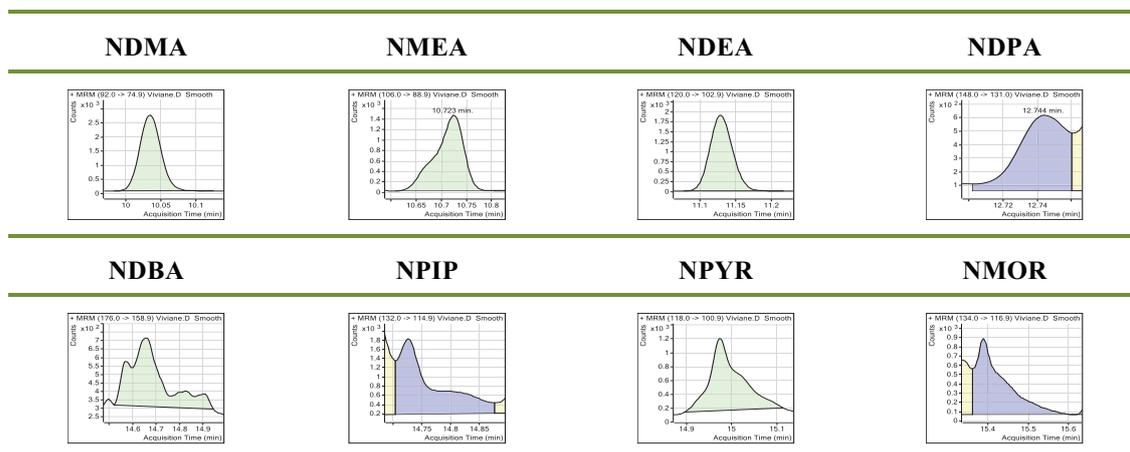
Diese Vorversuche wurden mit der, bis dato verwendeten, Analysenmethode der Firma Eurofins Consumer Product Testing GmbH zur Bestimmung von *N*-Nitrosaminen in Futtermitteln gemessen und ausgewertet. Eine verbesserte Messmethode, wie sie später für die Validierung vorlag, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht entwickelt.

In diesem Stadium der Untersuchung ging es um die grobe Einschätzung der Methodenfähigkeit für die Untersuchung von Kosmetika auf *N*-Nitrosamine in dem zukünftigen Arbeitsbereich von (5-30) µg/kg der Validierung. Anhand der Peakform der einzelnen Analyten, konnten erste qualitative Beurteilungen über Selektivitäten der jeweiligen Methoden gemacht werden. Auf eine quantitative Auswertung, Flächenberechnung, wurde verzichtet und Integrationen des Gerätes, als grüne Flächen dargestellt, nicht korrigiert.

4.1.1 Ergebnisse der Methode 1

Nachfolgend sind Ausschnitte aus dem Gesamtchromatogramm der Methode 1, Wasserdampfdestillation mit anschließender Aufreinigung über eine unpolare SPE-Säule, dargestellt.

Tabelle 12: Chromatogramme der Methode 1



Legt man die in 3.2.4.1 beschriebene Definition eines idealen chromatographischen Peaks zu Grunde, zeigen die Chromatogrammausschnitte der einzelnen Komponenten verbreiterte und vereinzelt verunreinigte Peaks, was eine Integration erschwert bzw. unmöglich macht. Die Methode könnte durch verschiedene Optimierungen eventuell zur Bestimmung des NDMA, NMEA und NDEA herangezogen werden, für eine simultane Bestimmung aller acht *N*-Nitrosamine reicht die Auflösung, Selektivität und Effizienz jedoch nicht aus.

Da es sich bei dieser Aufreinigung um einen recht langen und aufwendigen Prozess handelt, wurde auf eine weitere Verwendung der Methode verzichtet und im nächsten Schritt eine direktere Methode mittels Extraktion getestet.

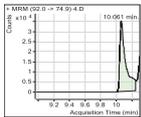
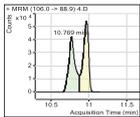
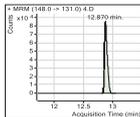
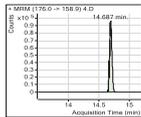
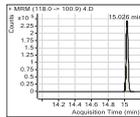
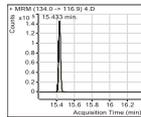
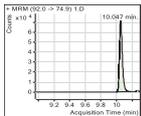
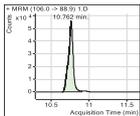
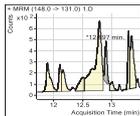
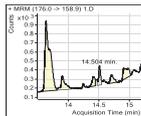
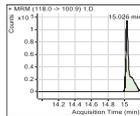
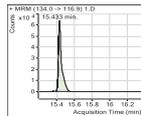
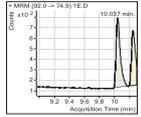
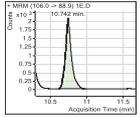
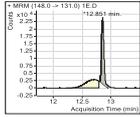
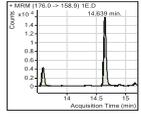
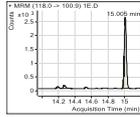
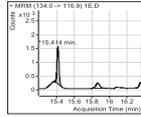
4.1.2 Ergebnisse der Methode 2

Wie unter 3.2.1 beschrieben, handelt es sich hier um eine direkte Extraktion mittels Pentan mit anschließender Aufgabe auf eine Si-OH Säule.

Die nachfolgende Tabelle zeigt den Einfluss, des vor der Extraktion zur Probe zugegebenen K_2HPO_4 bzw. NaOH auf die Peakform ausgewählter Analyten, in der verwendeten Aufbereitungsmethode. Diese beiden Zusätze waren nötig, da sich *N*-Nitrosamine in der Umgebung eines pH neutralen Milieus, schlecht mittels Pentan extrahieren lassen.

Des Weiteren wird der Verteilungskoeffizient durch den Zusatz von anorganischen Salzen positiv beeinflusst.

Tabelle 13: Chromatogramme der Methode 2

Analyt	NDMA	NMEA	NDPA	NDBA	NPYR	NMOR
Standard						
Probe mit K ₂ HPO ₄						
Probe mit 5 % NaOH ⁸⁰						

Das Chromatogramm des Standards, welcher unabhängig von der Aufbereitungsmethode hergestellt und vermessen worden ist, zeigt einen Doppelpeak bei NMEA. Die Abwesenheit der Doppelpeaks in der Probe mit K₂HPO₄, die am selbigen Tag angesetzt und vermessen wurde, ist nur damit zu erklären, dass die Messserie sehr lang war und die Probe frei von Doppelpeaks vor dem Standard vermessen worden ist. Es muss also durch die Messungen vieler „schmutziger“ Proben zu einer Verschleppung oder Verunreinigung auf der Säule selbst oder im Liner gekommen sein, was für das Auftreten der Doppelpeaks bei dem letztvermessenen Standard verantwortlich ist.

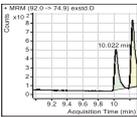
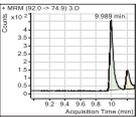
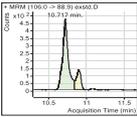
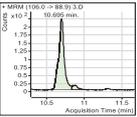
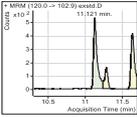
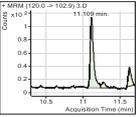
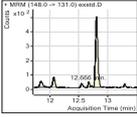
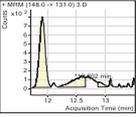
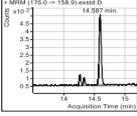
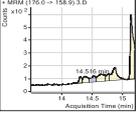
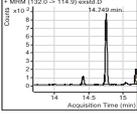
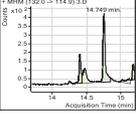
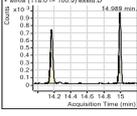
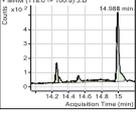
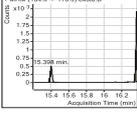
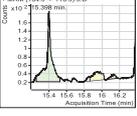
Wie man an den ausgewählten dargestellten Chromatogrammen sehen kann, zeigen beide Methodenvarianten unterschiedliches Verhalten auf die Güte des Ergebnisses. Die Anwesenheit des Dikaliumhydrogenphosphates erzielt bei der Bestimmung von NDMA, NMEA, NPYR sowie NMOR, bessere Ergebnisse als die Anwesenheit von NaOH. Ein ganz anderes Ergebnis zeigt sich bei dem Vergleich der Methodenvarianten für die Analyten NDPA und NDBA. Hier scheint sich die Anwesenheit von NaOH positiv auf die Signalgüte auszuwirken, welche sich in Form und Höhe des Peaks darstellt. Für die, hier nicht aufgeführten, zwei weiteren *N*-Nitrosamine NDEA und NPIP zeigen sich keine deutlichen Unterschiede in den Chromatogrammen der beiden angewandten Varianten.

⁸⁰ Vermessung hat an einem anderen Tag stattgefunden als die anderen Proben

Um sicherzustellen, dass sowohl das K_2HPO_4 als auch die NaOH Lösung, zusammen mit dem Pentan keine Überlagerungen zu den untersuchten Peaks zeigen und damit das Ergebnis verfälschen würde, wurden deren Blindwerte über die komplette Aufarbeitung aufgenommen und vermessen. Die Ergebnisse waren negativ. Es gab keine direkten Interferenzen. Eine weitere Verwendung dieser Methode wurde verworfen, da sie nur eine sehr geringe Probenmenge zuließ, relativ viele Störsignale aufwies und keine der beiden Varianten gute Ergebnisse für alle acht *N*-Nitrosamine erzielte.

4.1.3 Ergebnisse der Methode 3

Tabelle 14: Chromatogramme der Methode 3

Analyt	Standard	Probe
NDMA		
NMEA		
NDEA		
NDPA ⁸¹		
NDBA		
NPIP		
NPYR		
NMOR		

Diese Methode stellt eine erste Kombination aller bisher verwendeten Methoden dar. Sie beinhaltet sowohl eine Wasserdampfdestillation als auch eine Extraktion mit anschließender Säulenaufreinigung.

Der hier aufgeführte Standard stellt wieder einen externen Standard dar, der unabhängig von der Aufarbeitungsmethode hergestellt und vermessen worden ist. Die Peakform der beiden Analyten NDPA und NDBA der aufgearbeiteten Probe verdeutlichen, dass beide *N*-Nitrosamine mit dieser Methode nicht zu erfassen sind. Die Peaks sind sehr klein und werden zudem von anderen Substanzen überlagert. Hieraus ergibt sich eine Nichtdifferenzierbarkeit der Peaks.

Da diese Methode mit einer Probenmenge von 20 g durchgeführt worden ist, könnte eine Verbesserung durch Reduktion der Probenmenge möglich sein.

Die Auswertung der Ergebnisse aus der Auf-

⁸¹ Fehlinterpretation des Peaks für den Standard. Dieser hat eine Retentionszeit bei ca. 12.8 min. Es hätte somit der hohe schlanke Peak bei dieser Zeit identifiziert werden müssen.

nahme des Säulenprofils der verwendeten Säule, die als nächster Punkt in diesem Unterkapitel beschrieben ist, führte zu der Bewertung, diese Methode nicht weiter zu verfolgen, sondern sie in die Methode 4 zu überführen.

4.1.3.1 Erstellen eines Säulenprofils

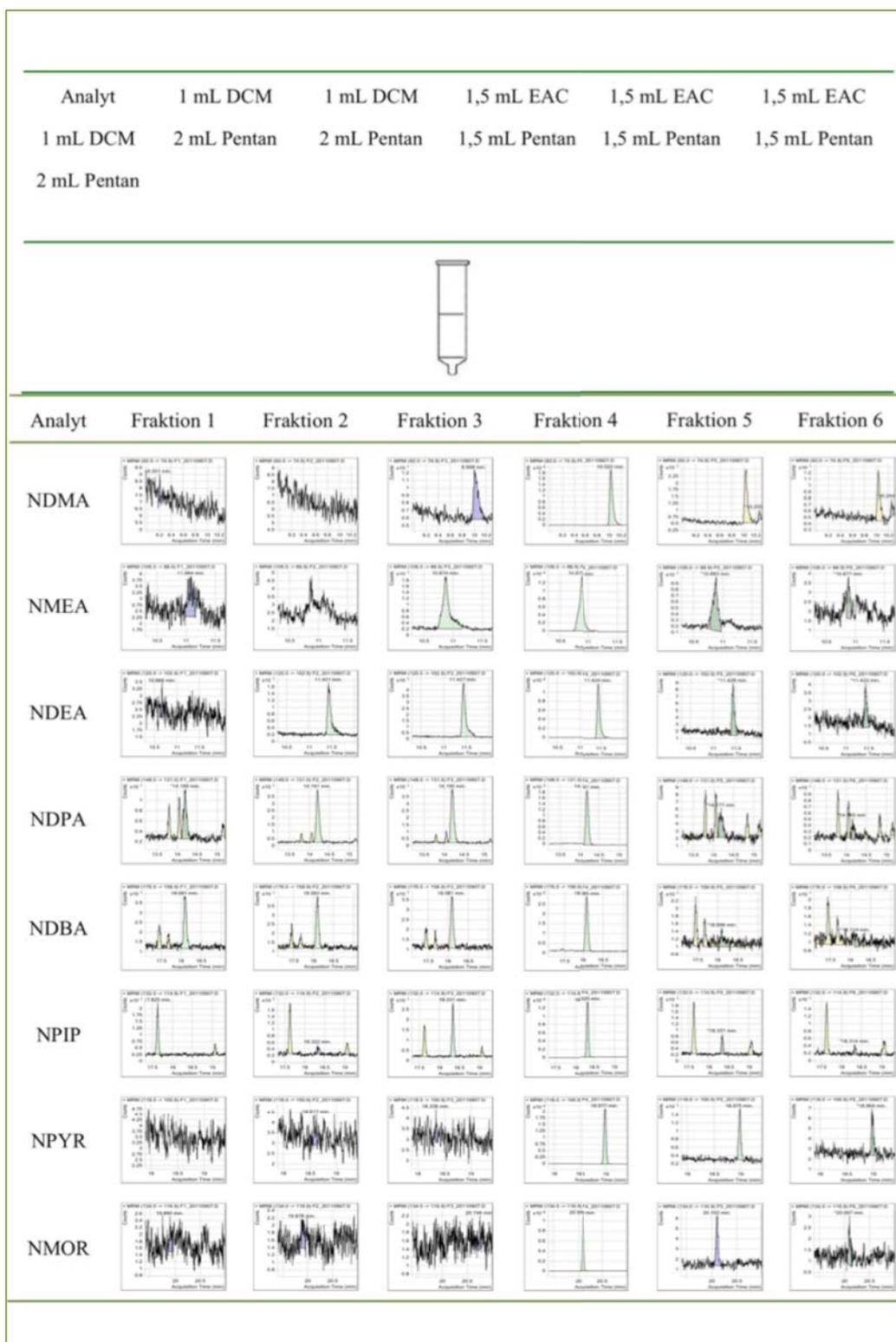
Tabelle 15 zeigt die aus der Aufnahme des Säulenprofils gewonnenen Fraktionen mit den Chromatogrammen der einzelnen Analyten. Fraktion 1 stellt die aufgefangene Durchflussmenge der ersten Aufgabenlösung dar. Wie zu sehen ist, enthält diese schon Anteile von NDPA sowie NDBA. Durch eine Fehlidentifizierung der Software wurde ebenso ein Peak für NPIP in dieser Fraktion gefunden. Allerdings unterscheidet sich die Retentionszeit zu sehr von den anderen Peaks des NPIP, so dass es sich hierbei um einen Stoff mit einem ähnlichen Retentionsverhalten handeln muss. In Fraktion 2 werden erneut das NDBA und NDPA gefunden. Neu identifiziert werden NDEA sowie Spuren von NPIP. In Fraktion 3 werden alle Komponenten mit Ausnahme des NPYR und NMOR gefunden. Die vierte Fraktion enthält alle acht *N*-Nitrosamine, wobei die Peaks des NDBA und NDPA um mindestens eine Größenordnung kleiner sind. In Fraktion 5 erscheinen die Peaks aller *N*-Nitrosamine, allerdings um den Faktor tausend kleiner als in Fraktion 4 und liegen damit in gleicher Größenordnung wie die Peaks der ersten drei Fraktionen. Der letzte Auffang in Fraktion 6 weist alle acht *N*-Nitrosamine in Spuren auf.

Die Aufnahme des Säulenprofils zeigt deutlich, dass die relativ unpolaren *N*-Nitrosamine wie NDBA und NDPA durch die Zusammensetzung der Aufgabenlösung nicht komplett auf der Säule haften bleiben, sondern mit dem unpolaren Pentan Anteil in kleiner Menge heruntergespült werden. Die Ursache hierfür kann zum einen in der Oberflächenadsorption des relativ polaren DCM an der SPE-Säule und der damit Verhinderung der Anlagerung der Analyten liegen und zum anderen dadurch verursacht werden, dass das NDBA und NDPA zu höheren Anteilen im Pentan vorliegen. Durch weitere Zugabe der Aufgabenlösung erhöht sich der Anteil des DCM auf der Säule und scheint einen Abgang weiterer *N*-Nitrosamine wie NDEA, NPIP und schließlich auch NDMA und NMEA hervorzurufen. In der eigentlichen Elution durch EAC und Pentan werden durch das stark polare Lösungsmittel Ethylacetat alle *N*-Nitrosamine zu großen Anteilen von der Säule gespült und in Fraktion 4 gesammelt.

Diese Erkenntnisse machten die weitere Verwendung der Methode 3 mit der Aufgabe der Analyten nach der Extraktion mittels Dichlormethan mit selbigem Lösungsmittel

auf die Säule unbrauchbar und zeigten, dass selbst durch Zugabe des mengenmäßig überwiegenden Pentans, ein Verlust der *N*-Nitrosamine schon bei Aufgabe auf die Säule auftritt.

Tabelle 15: Chromatogramme der Aufnahme des Säulenprofils der verwendeten Chrom-abond SI-OH Säule

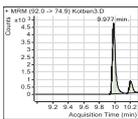
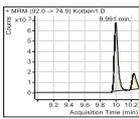
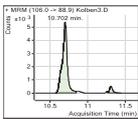
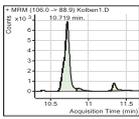
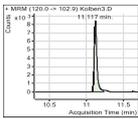
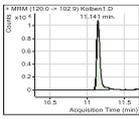
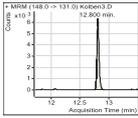
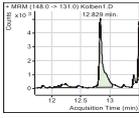
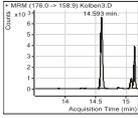
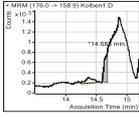
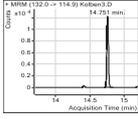
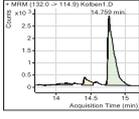
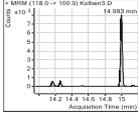
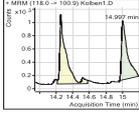
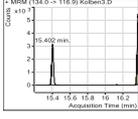
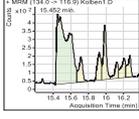


In der darauffolgenden Methode 4 wurde konsequenterweise auf eine Säulenaufreinigung verzichtet.

4.1.4 Ergebnisse der Methode 4

Diese Methode unterscheidet sich von der vorherigen Methode 3 dadurch, dass keine Aufreinigung über die Säule durchgeführt wurde. Getestet wurde die Methode anfangs durch das Verwenden von einer großen Menge an Matrix (50 g) sowie einer hohen Konzentration (10 µg/kg) an Standard. Es wurde zusätzlich ein Standard über die ganze Probenvorbereitung aufgearbeitet, um die qualitative Wiederfindung ohne Probenmatrix beurteilen zu können. Die Peaks dieses Standards sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 16: Chromatogramme der Methode 4

Analyt	Standard	Probe 50 g
NDMA		
NMEA		
NDEA		
NDPA		
NDBA		
NPIP		
NPYR		
NMOR		

Wie man an dem Vergleich von Probe und Standard sehen kann, hat die Matrix, bei eingesetzten 50 g, einen erheblichen Einfluss auf die Messung, wie es aus der Auflösung der Analytenpeaks ersichtlich wird. Insbesondere die letzten vier *N*-Nitrosamine zeigen eine erhebliche Beeinflussung des Messergebnisses durch die Probenmenge.

Die Chromatogramme des Standards zeigen, dass die Aufreinigungsmethode eine gute qualitative Wiederfindung der acht *N*-Nitrosamine in dem aufgearbeiteten Standard gewährleistet und keine störenden Interferenzen verursacht. Um quantitative Aussagen zu der Wiederfindung machen zu können, ist es jedoch notwendig, die Ergebnisse mit denen eines Standards, der nicht die Methode durchlief, zu vergleichen.

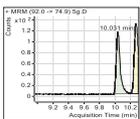
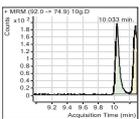
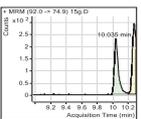
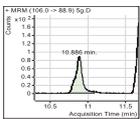
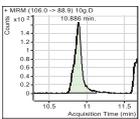
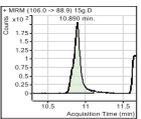
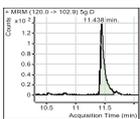
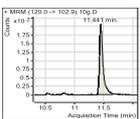
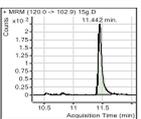
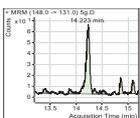
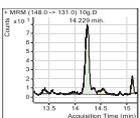
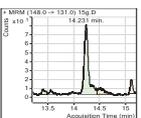
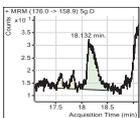
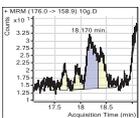
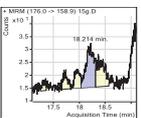
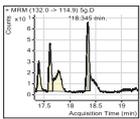
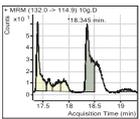
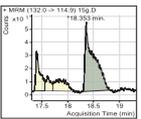
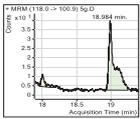
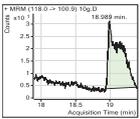
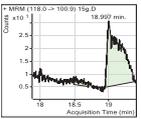
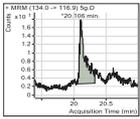
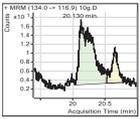
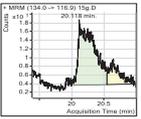
Die Chromatogramme der Kosmetikprobe zeigen einen Matrixeinfluss insbesondere für die *N*-Nitrosamine NDBA und NMOR, deren Peaks von anderen Substanzen überlagert werden und nicht auswertbar sind. Die Peaks von NDPA, NPIP und NPYR weisen ein eindeutiges Tailing auf.

Um den Einfluss der Matrix besser abschätzen zu können, wurden die Untersuchungen mit reduzierten Probenmengen, wie im nächsten Abschnitt beschriebenen, durchgeführt.

4.1.4.1 Weitere Untersuchungen zur Methode 4

Zur Einschätzung des Einflusses der Matrix auf das Verfahren, wurde diese unter Variation der Probenmenge (5, 10, 15) g bei gleichbleibender niedriger Standardkonzentration (1 µg/kg), aufgearbeitet und vermessen.

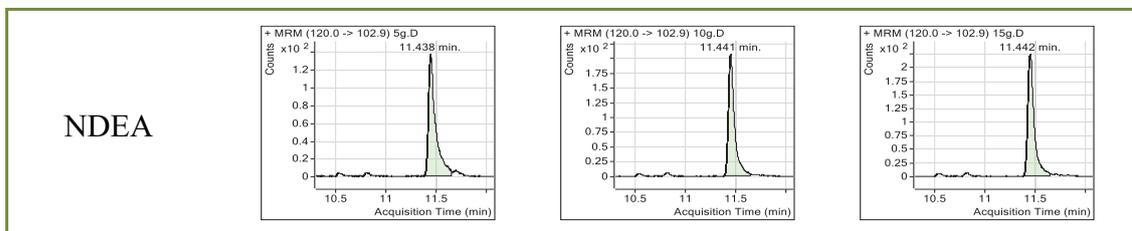
Tabelle 17: Chromatogramme der Optimierung der Methode 4

Analyt	Probe 5 g	Probe 10 g	Probe 15 g
NDMA			
NMEA			
NDEA			
NDPA			
NDBA			
NPIP			
NPYR			
NMOR			

Die nebenstehende Darstellung zeigt Ausschnitte aus den Chromatogrammen der acht *N*-Nitrosamine. Bei Beibehaltung der gleichen Konzentration und Zunahme der Probenmenge muss sich auch die absolute Menge der zugegebenen Standardkonzentration, die sich in der Peakhöhe und Breite widerspiegelt, im Verhältnis der Probenmengen ändern. Entgegen dieser Annahme zeigt ein Vergleich der Peakhöhen für die drei untersuchten Probenmengen eines Analyts zwar eine Zu-

nahme, die jedoch bezogen auf die zugeführte Menge an Standardkonzentration, eine abnehmende Tendenz aufweist. Dieser Sachverhalt ist in der Ausschnittsvergrößerung in Tabelle 18 am Beispiel des NDEA verdeutlicht.

Tabelle 18: Ausschnittsvergrößerung des NDEA aus Tabelle 17



Die Methode 4 mit einer Probeneinwaage von 10 g wurde als die erfolgversprechendste Aufbereitungsmethode bewertet und diese, für die weitere Optimierung des Gesamtverfahrens, ausgewählt. Die 10 g Einwaage stellt einen guten Kompromiss zwischen ausreichender absoluter Analytmenge einer belasteten Probe und der Störung durch die Matrix dar. Bevor diese Methode jedoch als Standardaufbereitungsmethode zur Untersuchung von *N*-Nitrosaminen in Kosmetik definiert werden kann, ist durch eine Qualitätskontrolle nachzuweisen, dass die Aufbereitungsmethode selber nicht zu einer Nitrosaminbildung führt. Dieser Nachweis ist im dem anschließenden Unterkapitel beschrieben.

4.1.4.2 Qualitätskontrolle der Probenaufarbeitung

Um sicherzustellen, dass es während der Aufarbeitung zu keiner Bildung von *N*-Nitrosaminen kommt, werden zwei mögliche NDEA Vorläufer zusammen bei unterschiedlichem pH Wert und einer Temperatur von 40 °C einen Tag lang inkubiert. Tabelle 19 zeigt die konkrete Vorgehensweise.

Tabelle 19: Herstellung und Ergebnisse der Qualitätskontrolle

	Vorgehensweise	
	pH 11	pH 2
	30 mL der Lsg. 1, wurden mit 1 mL einer Natriumnitritlösung (c=10 mg/mL) sowie 1 mL einer DEA-Lsg. (c=1 mg/mL) versetzt und 24 h bei 40 °C in den Trockenschrank gestellt.	30 mL einer gesättigten NaCl-Lsg, wurden mit 1 mL einer Natriumnitritlösung (c=10 mg/mL) sowie 1 mL einer DEA-Lsg. (c=1 mg/mL) versetzt, auf pH 2 mit HCl (c=1 mol/L) eingestellt und 24 h bei 40 °C in den Trockenschrank gestellt.
Signalintensität	114	9264

Die Ergebnisse zeigen, dass die zur Alkalisierung verwendete Lsg. 1, die in der Aufbereitungsmethode zum Einsatz kommt, eine Nitrosaminbildung, selbst bei hoher Konzentration der Vorläufer, weitestgehend verhindert. Mit einer Nitrosaminbildung in der Aufbereitung ist somit nicht zu rechnen.

In diesem Zusammenhang ist jedoch kritisch anzumerken, dass die Überprüfung auf *N*-Nitrosaminbildung nur für das NDEA untersucht wurde. Die mögliche Bildung anderer *N*-Nitrosamine kann dadurch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4.2 Optimierung der Messmethode

4.2.1 Cold Application System

Die, bis dato bei der Firma Eurofins zur Detektion von *N*-Nitrosaminen in Futtermitteln verwendete Messmethode, deren Linertemperaturprogramm (Futtermittel) in Abbildung 16 dargestellt ist, führte in Kombination mit der Aufbereitungsmethode 4 zu nicht ausreichend guten Ergebnissen für eine Quantifizierung der Analyten. Aus diesem Grund wurde die Anwendung des Cold Application System in Betracht gezogen. Bei dem CAS handelt es sich, wie in 2.3 beschrieben, um eine Kaltaufgabe Technik, die eine erhöhte Sensitivität ermöglicht und einer Verschleppung der Analyten durch die Lösungsmittelwolke im Liner entgegenwirkt.

Um den Einfluss der Temperaturprogramme auf das Messergebnis bzw. die Güte der Peaks bewerten zu können, wurden vier verschiedene Varianten, Programm 1 bis 4, hintereinander vermessen. Diese sind in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

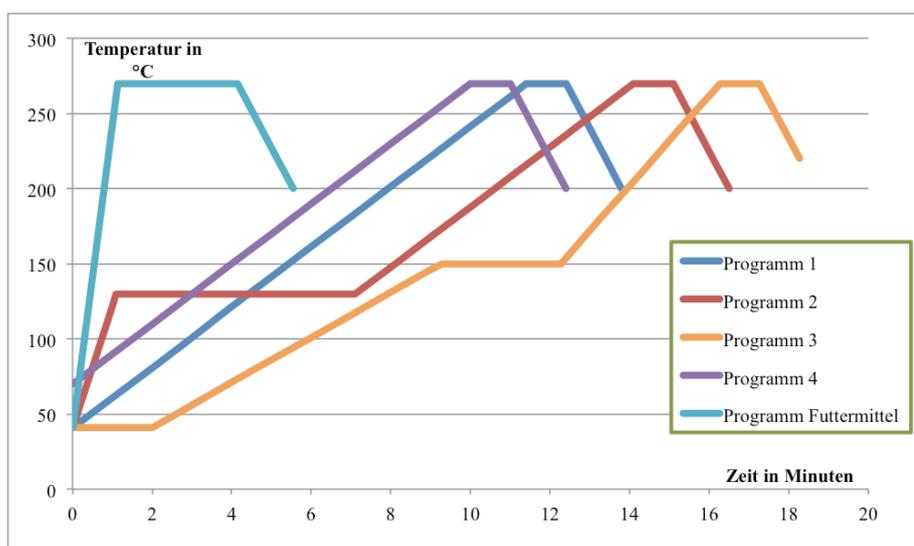
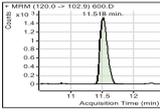
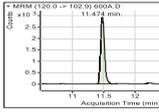
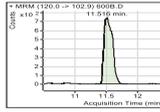
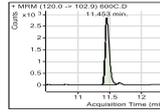
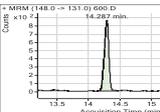
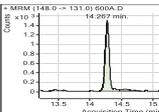
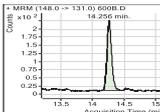
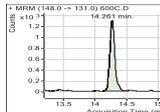
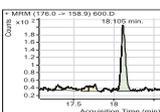
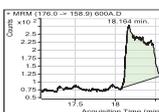
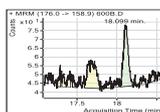
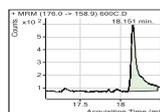
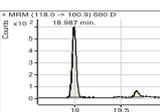
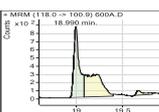
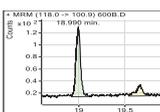
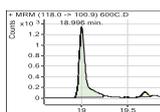
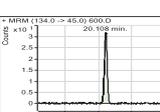
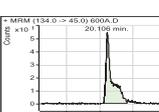
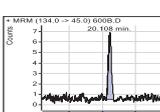
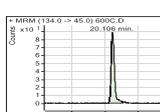


Abbildung 16: Verwendete CAS Programme in zeitlicher Verlaufsdarstellung

Die chromatographischen Peaks von fünf der acht untersuchten Analyten sind für die vier verwendeten Temperaturprogramme beispielhaft in der nachfolgenden Tabelle 20 zusammengestellt.

Tabelle 20: Chromatogramme der Temperaturprogramme des Liners

Analyt	Programm 1	Programm 2	Programm 3	Programm 4
NDEA				
NDPA				
NDBA				
NPYR				
NMOR				
	41 °C 20 °C/min bis 270 °C 1 min halten 50 °C/min bis 200 °C	41 °C 80 °C/min bis 130 °C 6 min halten 20 °C/min bis 270 °C 1 min halten 50 °C bis 200 °C	41 °C für 2 min 15 °C/min bis 150 °C 3 min halten 30 °C/min bis 270 °C 1 min halten 50 °C bis 200 °C	70 °C 20 °C/min bis 270 °C 1 min halten 50 °C/min bis 200 °C

Wie man im direkten Vergleich aller vier Programme sehen kann, zeigen Programm 1, 3 und 4 die besten Peaks für die dargestellten fünf der acht untersuchten *N*-Nitrosamine. Programm 2 scheint mit seinem zuerst schnellen Aufheizen (80 °C/min) einen schlechten Einfluss auf die hochsiedenden oder zyklischen wie NDBA, NPYR, NMOR und das nicht dargestellte NPIP zu haben, während die *N*-Nitrosamine mit niedrigerem Siedepunkt ideale Peaks mit einer guten Signalstärke zeigen. Programm 3 mit der längsten Heizzeit bringt gute Peaks hervor. Im Vergleich zu Programm 1 und Programm 4 jedoch mit deutlich niedrigerer Signalintensität. Programm 4, welches mit einer erhöhten Einspritztemperatur arbeitet, erzielt in der Signalstärke die besten Ergebnisse, weist jedoch bei einigen Komponenten Peaks mit Tailing auf. Aus diesem Grund wurde das Programm 1 für die weiteren Untersuchungen und die Validierung verwendet.

4.3 Ergebnisse der Methodvalidierung

In diesem Kapitel werden die durchgeführten Auswertungen und Berechnungen der Methodvalidierung, in einigen Fällen exemplarisch an dem Beispiel des NDEA, erläutert und der manuelle Rechenweg dargestellt. Alle nachfolgenden Bestimmungen der selben Kenngrößen werden mittels des Tabellenkalkulationsprogrammes MS Excel realisiert, in tabellarischer oder graphischer Form präsentiert und die Ergebnisse anschließend diskutiert

4.3.1 Messpräzision

Die Messpräzision wurde, wie unter 3.2.3.1 beschrieben, für die acht untersuchten *N*-Nitrosamine, bestimmt. Im Folgenden ist für das NDEA die Bestimmung der Verfahrenskennzahlen zur Beurteilung der Messpräzision rechnerisch dargestellt.

Arithmetischer Mittelwert:

Der arithmetische Mittelwert wurde wie in 3.2.4.3 beschrieben nach Formel 4 errechnet.

$$\bar{x} = \frac{0,822 + 0,822 + 0,822 + 0,820 + 0,819 + 0,820 + 0,821 + 0,825 + 0,827 + 0,826}{10}$$

$$\bar{x} = 0,822 \text{ Response}$$

Unter Response wird, wie in 3.2.4.2 beschrieben, das Flächenverhältnis Analyt zu internem Standard, verstanden.

Standardabweichung:

Die Standardabweichung wurde wie in 3.2.4.4 beschrieben nach Formel 6 errechnet.

$$s = \sqrt{\frac{0^2 + 0^2 + 0^2 + (-0,002)^2 + (-0,003)^2 + (-0,002)^2 + (-0,001)^2 + 0,003^5 + 0,005^2 + 0,004^2}{10 - 1}}$$

$$s = 0,003 \text{ Response}$$

Variationskoeffizient:

Der Variationskoeffizient wurde wie in 3.2.4.5 nach Formel 10 errechnet.

$$V_K = \frac{0,003}{0,822} \times 100 \%$$

$$V_K = 0,33 \%$$

Prüfung auf Normalverteilung:

Zum Nachweis der Normalverteilung der Messwerte wurde eine Überprüfung nach David, wie in 3.2.4.6 beschrieben, vorgenommen.

Aus Formel 11 ergibt sich für das beispielhaft aufgeführte NDEA:

$$PG = \frac{0,827 - 0,819}{0,003}$$

$$PG = 2,67$$

Die berechnete Prüfgröße ist innerhalb der Grenzen $g_u = 2,51$ und $g_o = 4,24$, die der Tabelle 52 im Anhang entnommen werden können. Eine Normalverteilung ist somit nachgewiesen.

Prüfung auf Ausreißer:

Zur Prüfung auf Ausreißer wurde der Grubbs Test, wie in 3.2.4.7 beschrieben, nach Formel 12 durchgeführt.

Der Wert mit der größten Abweichung vom Mittelwert wurde auf Ausreißereigenschaft untersucht.

$$Q = \frac{0,827 - 0,822}{0,003}$$

$$Q = 1,66$$

Für eine Anzahl von zehn Messwerten und einer Wahrscheinlichkeit von 99 % ergibt sich eine zulässige Prüfgröße Q von 2,410. Alle Werte kleiner dieser Größe stellen laut Grubbs keine Ausreißer dar.

Prüfung auf Trend:

Durch eine graphische Darstellung, wie in Abbildung 17 veranschaulicht, lässt sich nicht immer eindeutig ein Trend nachweisen. In solchen Fällen wurde der Trendtest nach Neumann herangezogen.

Wie Tabelle 21 entnommen werden kann, befinden sich für alle acht *N*-Nitrosamine die errechneten Prüfgrößen innerhalb der zulässigen Grenzen. Nach David liegt damit bei allen acht eine Normalverteilung vor.

Durch Verifizieren mit dem Grubbs Test wurde ein Ausreißer in der Messreihe des NDMA ausfindig gemacht. Dieser Wert wurde in den Berechnungen nicht berücksichtigt.

Nach dem Trendtest von Neumann weisen fünf der acht untersuchten *N*-Nitrosamine NDEA, NDPA, NPIP, NPYR und NMOR einen aufsteigenden Trend auf.

Das Auftreten von einem Trend kann unterschiedliche Ursachen haben. Denkbar ist in dem vorliegenden Fall, dass sich durch Rückstände aus unvollständiger Verdampfung das Messsignal erhöht. Ebenso kann die Ursache in möglichen Rückständen in der Trennsäule selbst liegen.

Eine Aufkonzentration der Lösung durch Verdampfung des leichtflüchtigen Lösungsmittels Dichlormethan ist eher unwahrscheinlich und müsste sich gleich stark auf alle acht *N*-Nitrosamine auswirken.

Das wohl wichtigste Kriterium für die Beurteilung der Messpräzision ist ein Vergleich des Variationskoeffizienten. Dieser liegt mit Ausnahme des NDPA bei allen unter 1 % und liegt somit in einen typischen Bereich in der Gaschromatographie nach S. Kromidas.⁸²

4.3.2 Ermittlung der Kalibrierfunktion

Die Ermittlung der Kalibrierfunktion wurde wie unter 3.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Zuerst erfolgte die Bestimmung der Korrelation zwischen Signal und Konzentration des Analyten. Es wird hierbei untersucht, ob diese Relation einen linearen Zusammenhang zeigt oder ob sie durch eine Funktion 2. Grades besser dargestellt würde. Sollten sich hier Unterschiede zeigen, so wird mit Hilfe des Anpassungstest nach Mandel auf Signifikanz geprüft. Werden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen, so kann die lineare Kalibrierfunktion akzeptiert werden.

Im Folgenden ist die Ermittlung der linearen sowie quadratischen Kalibrierfunktion einmalig beispielhaft am NDEA gezeigt. Zuerst müssen die Zwischengrößen in Tabelle 22 rechnerisch ermittelt werden.

⁸² Vgl. Kromidas S. (2000), S. 71

Tabelle 22: Zwischengrößenberechnung zur Ermittlung der Kalibrierfunktion

Konz. Stufe	x_i ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	y_i (Response)	x_i^2	x_i^3	x_i^4	y_i^2	$x_i \times y_i$	$x_i^2 \times y_i$
1	5	0,320	25	125	625	0,102	1,600	8
2	10	0,600	100	1000	10000	0,360	6,000	60
3	15	0,840	225	3375	50625	0,706	12,600	189
4	20	1,110	400	8000	160000	1,232	22,200	444
5	25	1,370	625	15625	390625	1,877	34,250	856,25
6	30	1,590	900	27000	810000	2,528	47,700	1431
Σ	105	5,830	2275	55125	1421875	6,805	124,350	2988,25

Aus den so gewonnen Zwischengrößen können nun die entscheidenden Quotienten in Tabelle 23 berechnet werden.

Tabelle 23: Berechnung der Quotienten zur Ermittlung der Kalibrierfunktion

Berechnung der Quotienten	Ergebnis
$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{105}{6}$	17,5 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n} = \frac{5,830}{6}$	0,971 (Response)
$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} = 2275 - \frac{105^2}{6}$	437,50
$Q_{yy} = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} = 6,805 - \frac{5,830^2}{6}$	1,1402
$Q_{xy} = \sum x_i \times y_i - \frac{(\sum x_i) \times (\sum y_i)}{n} = 124,350 - \frac{105 \times 5,830}{6}$	22,325
$Q_{xxx} = \sum x_i^3 - \sum x_i \frac{\sum x_i^2}{n} = 55125 - \frac{105 \times 2275}{6}$	15312,5
$Q_{xxxx} = \sum x_i^4 - \frac{(\sum x_i^2)^2}{6} = 1421875 - \frac{2275^2}{6}$	559270,83
$Q_{xxy} = \sum x_i^2 \times y_i - \sum y_i \frac{\sum x_i^2}{n} = 2988,25 - 5,83 \times \frac{2275}{6}$	777,708

Nun kann die Ermittlung der linearen und quadratischen Kenndaten erfolgen. Die Ergebnisse und Berechnung sind in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 24: Ergebnisse der linearen und quadratischen Regression

Lineare Regression		
Parameter	Berechnung	Ergebnis
Lineare Steigung b	$b = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{22,325}{437,50}$	0,051
Achsenabschnitt a	$a = \bar{y} - b \times \bar{x} = 0,971 - 0,051 \times 17,5$	0,0785
Quadratische Regression		
Quadratische Steigung e	$e = \frac{Q_{xy} \times Q_{xxx} - Q_{xxy} \times Q_{xx}}{Q_{xxx}^2 - Q_{xxy} \times Q_{xxx}}$ $= \frac{22,325 \times 15312,5 - 777,708 \times 437,5}{15312,5^2 - 437,5 \times 559270,83}$	-0,0016
Lineare Steigung b	$b = \frac{Q_{xy} - e \times Q_{xxx}}{Q_{xx}} = \frac{22,325 + 0,0016 \times 15312,5}{437,50}$	0,05653
Achsenabschnitt a	$a = \frac{\sum y_i - b \times \sum x_i - e \times \sum x_i^2}{n}$ $= \frac{5,83 - 0,05653 \times 105 + 0,0016 \times 2275}{6}$	0,0420

Hieraus ergeben sich für die vorgenommenen Regressionen folgende Gleichungen mit ihrem Bestimmtheitsmaß r^2 :

$$y = 0,051 x + 0,0785, r^2 = 0,99906$$

für die lineare sowie

$$y = -0,0016 x^2 + 0,05653x + 0,0420, r^2 = 0,99957$$

für die quadratische.

Ein Vergleich des Bestimmtheitsmaßes r^2 deutet eine leicht bessere Anpassung durch eine quadratische Funktion an.

Um beurteilen zu können, ob die lineare Regression die Kalibrierfunktion hinreichend gut beschreibt, wurden die Reststandardabweichungen, Verfahrensstandardabweichungen und Verfahrensvariationskoeffizienten berechnet sowie der Signifikanztest nach Mandel durchgeführt.

Tabelle 25: Berechnung der wichtigsten Verfahrenskenngrößen

Verfahrensgrößen	Lineare Regression	Quadratische Regression
Reststandardabweichung	$s_y = \sqrt{\frac{Q_{yy} - \frac{Q_{xy}^2}{Q_{xx}}}{n - 2}}$	$s_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - a \times \sum y_i - b \times \sum x_i \times y_i - e \times \sum x_i^2 \times y_i}{n - 3}}$
Verfahrensstandardabweichung	$s_{x0} = \frac{s_y}{b}$	$s_{x0} = \frac{s_y}{b + 2 \times e \times \bar{x}}$
Verfahrensvariationskoeffizient	$V_{K0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}} \times 100\%$	$V_{K0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}} \times 100\%$

Tabelle 26: Vergleich der Koeffizienten der linearen und quadratischen Regression

Verfahrensgrößen	Lineare Regression	Quadratische Regression
s_y (Response)	0,0164	0,0128
s_{x0} (Response)	0,3206	0,2515
V_{K0} (%)	1,8319	1,4474

Ein Vergleich der Verfahrenskennzahlen zeigt, dass die quadratische Regression die Kalibrierfunktion geringfügig besser beschreibt als die lineare.

So ist zum Beispiel die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade, ausgedrückt als Zahlenwert der Reststandardabweichung, bei der quadratischen Anpassung etwas geringer. Selbiges gilt für die Verfahrensstandardabweichung, die zusammen mit der Steigung ein Maß für die Leistungsfähigkeit der Methode darstellt. Je größer die Steigung und je kleiner s_{x0} desto leistungsfähiger die Messmethode.

Die Unterschiede der Verfahrenskennzahlen beider Regressionsansätze sind jedoch so gering, dass die Verifizierung mit dem Mandeltest herangezogen wurde.

Hierbei wird eine Prüfgröße, die sich aus den Reststandardabweichungen der beiden Regressionen errechnet, bestimmt. Die Formel zur Berechnung der Prüfgröße ist nachfolgend dargestellt.

$$PG = \frac{(n - 2) \times s_{ylinear}^2 - (n - 3) \times s_{yquadratisch}^2}{s_{yquadratisch}^2}$$

Formel 14: Berechnung der Prüfgröße nach Mandel

Die Prüfgröße wird mit einem Tabellenwert verglichen und erlaubt Aussagen über die Anwendbarkeit der linearen Regression.

Für das untersuchte *N*-Nitrosamin ergibt sich aus den in Tabelle 26 dargestellten Werten eine Prüfgröße von

$$PG = 3,497$$

diese ist kleiner als der in der F-Tabelle gelistete Wert (siehe Anhang, Tabelle 55) von 34,12 ($P=99\%$; $f_1=1$; $f_2=n-3$). Dies bedeutet, dass die Verwendung der linearen Regression für das NDEA zulässig ist.

Dieser Erkenntnis folgend, wurde für alle acht *N*-Nitrosamine die lineare Kalibrierung als repräsentativ angesehen.

Wie Tabelle 27 entnommen werden kann, führt die manuelle Berechnung der Kalibrierfunktion, der Reststandardabweichung sowie des Bestimmtheitsmaßes, vorausgesetzt man arbeitet mit 5 signifikanten Stellen, nur zu geringen Abweichungen der Werte, die vom Programm MS Excel berechnet wurden. Die vollständige Tabelle mit allen Messwerten ist der Tabelle 45 des Anhanges zu entnehmen.

Als Akzeptanzkriterien für eine lineare Kalibrierfunktion gelten laut Kromidas:⁸³

- *Korrelationskoeffizienten*, $> 0,999$ bzw. $r^2 > 0,998$
- *y-Achsenabschnitt*, $a < 0$ bis 5 % der Zielkonzentration
- *Verfahrensvariationskoeffizient* $V_{Ko} < 2\%$

Abweichend davon definiert die Firma Eurofins Consumer Product Testing GmbH ein Bestimmtheitsmaß $> 0,995$ und einen Verfahrensvariationskoeffizienten von $< 4,1\%$ als ausreichend gut. Die Bedingung des Korrelationskoeffizienten $r > 0,999$ bzw. $r^2 > 0,998$ ist bei allen erfüllt. Nach Kromidas liegt eine gute Güte der Linearität vor. Die y-Achsenabschnitte hingegen sind bei allen erhöht ($> 5\%$ der Zielkonzentration), was auf einen Blindwert der Standardlösung hinweist. Besser sieht es mit dem Verfahrensvariationskoeffizienten aus. Für diesen überschreitet nur NPYR den Grenzwert nach Kromidas von 2 %, was an einer erhöhten Streuung der Messwerte bei dieser Komponente liegt. Da aber auch diese Grenzwerte nur eine Hilfestellung zur Einschätzung geben sollen, wurden die für die Methode vorliegenden Werte als ausreichend gut befunden.

⁸³ Vgl. Kromidas S. (1999), S. 165

Tabelle 27: Ergebnisse aus der Ermittlung der Kalibrierfunktion für alle acht *N*-Nitrosamine

Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
V_{K0} (%)	1,9	1,18	1,82	1,57	1,30	1,70	2,08	1,91
Zielkonz. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
y-Wert der Zielkonz.(Response)	0,788	1,018	0,971	1,106	1,019	1,104	1,139	1,331
5 % y-Wert der Zielkonz. (+/-) (Response)	0,039	0,051	0,048	0,055	0,051	0,055	0,057	0,066
Achsenabschnitt a (Response)	0,065	0,088	0,078	0,080	0,074	0,087	0,116	0,117
Steigung b (Response)	0,041	0,053	0,051	0,059	0,054	0,058	0,058	0,069
s_y (Response)	0,0145	0,0187	0,0166	0,0159	0,0112	0,0156	0,0216	0,0232
r^2	0,999	0,999	0,999	0,999	1,000	0,999	0,999	0,999

4.3.3 Blindwert Gerät

Um das Grundrauschen des Gerätes abschätzen zu können, wurde der Blindwert ermittelt. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Responsewerte aus der Blindwertermittlung aller acht *N*-Nitrosamine.

Tabelle 28: Responsewerte aus der Ermittlung des Blindwertes der Standardlösung

Messungen des ISTD (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Messwerte (Response)							
	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
1.	0,0027	0,0006	0,0014	0,0009	0,0028	0,0039	0,0132	0,0057
2.	0,0038	0,0001	0,0005	0,0031	0,0016	0,0013	0,0058	0,0001
Mittelwert	0,0033	0,0004	0,0010	0,0020	0,0022	0,0026	0,0095	0,0029

Wie man anhand der Mittelwerte aller acht untersuchten *N*-Nitrosamine zeigen kann, unterscheiden sie sich ausreichend deutlich von den Signalen des kleinsten Standards der Kalibrierfunktion, die in einem Responsebereich zwischen 0,260-0,438 liegen. Einen Einfluss des Blindwertes auf das Messsignal ist deshalb vernachlässigbar.

Es ist davon auszugehen, dass kein Störpeak, verursacht durch den internen Standard, bei den Retentionszeiten des nativen Analyten auftritt. Werden Störpeaks in den Blindproben durch den internen Standard verursacht, so muss auf jeden Fall die Konzentration des internen Standards verringert werden.

4.3.4 Linearität Methode

Da reale Proben in der Gesamtmatrix Stoffe enthalten können, die einen Einfluss auf die Kenngrößen der Kalibrierfunktion haben, ist es daher unerlässlich, diese in der Validierung zu überprüfen.

Tabelle 29: Ergebnisse aus der Ermittlung der Methoden Linearität

Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
V_{K0} (%)	2,24	2,28	2,52	2,42	2,80	1,45	2,59	3,95
Zielkonz. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
y-Wert der Zielkonz.(Response)	0,704	0,848	0,805	0,885	0,794	0,900	0,948	1,523
5 % y-Wert der Zielkonz. (+/-)	0,0352	0,0424	0,040	0,0442	0,039	0,045	0,047	0,076
Achsenabsch a (Response)	-0,014	-0,013	0,002	-0,013	0,014	-0,011	-0,034	-0,124
Steigung b (Response)	0,041	0,052	0,046	0,051	0,044	0,051	0,056	0,094
s_y (Response)	0,0161	0,0181	0,0193	0,0215	0,0218	0,0154	0,0255	0,0649
r^2	0,999	0,999	0,998	0,998	0,998	0,999	0,998	0,996

Wie Tabelle 29 oder der vollständigen Tabelle 46 im Anhang, entnommen werden kann, ist das Bestimmtheitsmaß r^2 nur bei drei der acht *N*-Nitrosamine $> 0,998$ und erfüllt somit das Kriterium nach Kromidas. Alle acht Analyten liegen jedoch in dem zulässigen Bereich $> 0,995$ der Firma Eurofins.

Um den Einfluss der Matrix genauer beurteilen zu können, sind die, in nachfolgender Tabelle, dargestellten Quotienten aus der Kalibrierfunktion und der Methoden Linearität zu betrachten. Tabelle 30 zeigt die Ergebnisse der Quotienten für alle acht *N*-Nitrosamine.

Tabelle 30: Quotienten zur Beurteilung der Methoden Linearität in %

	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
$\frac{b_{\text{Kalibrierfunktion}}}{b_{\text{Linearität}}}$	100	102	111	116	123	117	104	73
$\frac{S_y \text{ Kalibrierfunktion}}{S_y \text{ Linearität}}$	90	103	86	74	51	101	85	36

Die Steigung ist ein Maß für die Empfindlichkeit einer Methode. Durch Bildung des in der obigen Tabelle dargestellten Quotienten, kann direkt der Einfluss der Matrix auf die Empfindlichkeit der Methode abgelesen werden. Drei der acht *N*-Nitrosamine (NDMA, NMEA und NPYR) zeigen fast keinen Einfluss. Der Quotient liefert einen Wert um 100 %. Für vier andere *N*-Nitrosamine ist die Empfindlichkeit durch die Matrix leicht verringert. Der Quotient liegt zwischen 111 % und 123 %. Lediglich das NMOR zeigt eine Empfindlichkeitssteigerung durch die Anwesenheit der Matrix, was nur durch eventuelle *N*-Nitrosaminbildung während der Herstellung der Probenlösung für die Aufnahme der Linearität zu erklären wäre. Allerdings ist eine alleinige Bildung des NMOR durch die Zusammensetzung der Matrix eher unwahrscheinlich. Das NMOR weist im Unterschied zu den restlichen sieben *N*-Nitrosaminen mit fast 4 % den höchsten Verfahrensvariationskoeffizienten auf, was durch höhere Standardabweichungen im Bezug zum Mittelwert verursacht wird und auf ungenauere Messungen hinweist.

Der Quotient aus den Reststandardabweichungen, Größe der Streuung um die Bestgerade, repräsentiert ein Maß für die Präzision der Methode. An den in der Tabelle dargestellten Werten wird deutlich, dass das Vorhandensein der Matrix sich bei allen mit Ausnahme des NPIP und NMEA, negativ auswirkt, was sich in einer stärkeren Streuung um die Bestgerade bemerkbar macht. Am extremsten betroffen sind die *N*-Nitrosamine NDBA und NMOR. Diese Erkenntnis war zu erwarten, da das Vorhandensein anderer Stoffe in der Probe zu einer größeren Abweichung als bei einem reinen Standard führen kann.

Nachfolgend ist die Kalibrierfunktion sowie die Linearität der Methode am Beispiel des NDEA dargestellt.

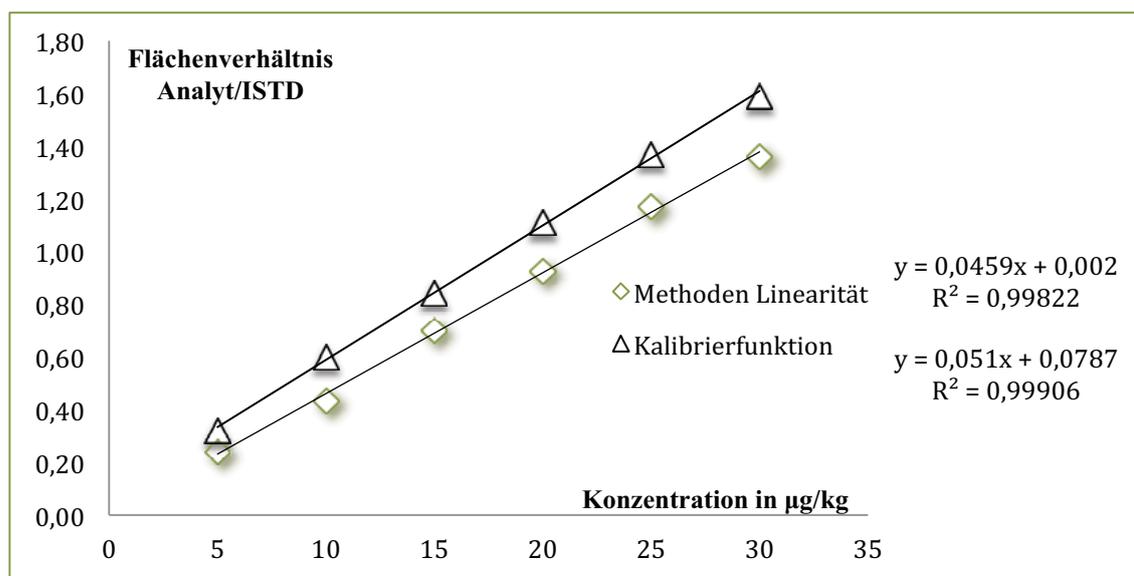


Abbildung 18: Darstellung der Kalibrierfunktion und der Linearität der Methode

Wie Abbildung 18 entnommen werden kann, weisen die realen Proben eine proportional systematische Abweichung auf, zeigen aber bezüglich der Linearität ausreichend identisches Verhalten zu den Standardlösungen, so dass diese in der Routine verwendet werden können.

4.3.5 Blindwert Methode

Tabelle 31 zeigt die, aus der Messung einer nur mit internem Standard gespickten, unbelasteten Probe, erhaltenen Responsewerte.

Tabelle 31: Messungen des Methodenblindwertes

Messungen des ISTD (20 µg/kg)	Messwerte (Response)							
	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
1.	0,0200	0,0100	0,0100	0,0100	0,0200	0,0100	0,0100	0,0200
2.	0,0100	0,0076	0,0047	0,0031	0,0500	0,0013	0,0047	0,0100
Mittelwert	0,0150	0,0088	0,0074	0,0066	0,0350	0,0056	0,0074	0,0150

Wie man anhand der Mittelwerte aller acht untersuchten *N*-Nitrosamine zeigen kann, unterscheiden sie sich ausreichend deutlich von dem Signal des kleinsten Standards der Linearität Methode, die in einem Responsebereich zwischen 0,210-0,381 liegen. Damit befinden sich diese Werte zwar deutlich über den Responsewerten der Standardblindwertuntersuchung, jedoch ist ein ausreichender Signalabstand zwischen Blindwert und kleinstem Standards auch bei den realen Proben noch gegeben.

Ein Auftauchen von Störpeaks durch das Lösungsmittel, den internen Standard oder weiteren Störkomponenten der Matrix mit gleichen Retentionszeiten wie die untersuchten Analyten, konnte auch hier ausgeschlossen werden.

Die folgende Abbildung zeigt das Chromatogramm eines 5 µg/kg Matrixstandards für die Aufnahme der Linearität der Methode und verdeutlicht den Signalabstand vom Grundrauschen, sowie die ideale Peakform der Signale des kleinsten Standards. Der besseren Übersicht halber wurde auf eine Darstellung der deuterierten Analytenpeaks verzichtet.

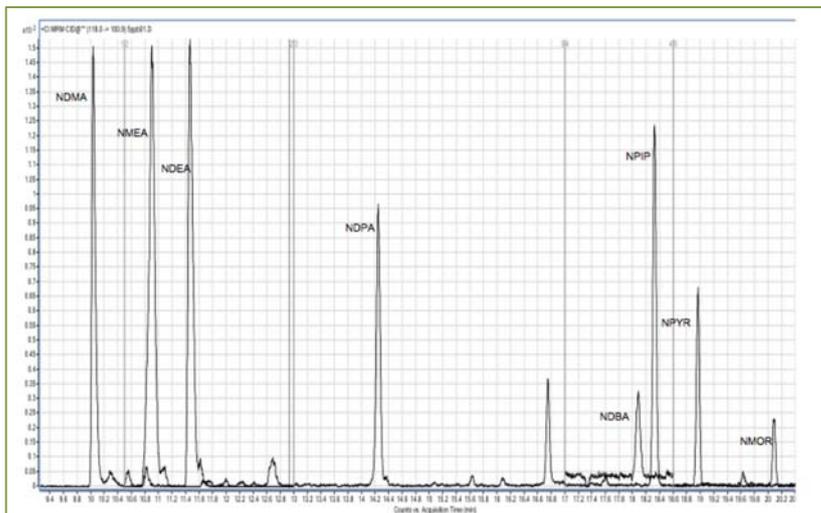


Abbildung 19: Typisches Chromatogramm des kleinsten Kalibrierstandards

4.3.6 Methodenpräzision

Die Beurteilung einer Methodenpräzision ist nicht trivial, denn es muss die Komplexität der Methode, die Matrix sowie die Konzentration berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse der Prüfung auf Normalverteilung sowie die Verfahrenskoeffizienten und Standardabweichungen wurden, wie unter 3.2.4 beschrieben, berechnet und sind in Tabelle 32 aufgeführt. Die vollständige Auflistung aller Messwerte ist der Tabelle 47 im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 32: Ergebnisse der Methodenpräzision

Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
\bar{x} (µg/kg)	13,06	12,45	12,23	12,17	11,84	12,11	12,55	17,31
s (µg/kg)	0,338	0,372	0,369	0,382	0,524	0,295	0,396	1,767
V_k (%)	2,59	2,99	3,02	3,14	4,42	2,43	3,15	10,21
r (µg/kg)	0,947	1,042	1,033	1,070	1,467	0,825	1,108	4,946
PG (David)	3,25	2,96	3,52	3,40	3,24	3,39	3,03	3,338
g_o	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24
g_u	2,51	2,51	2,51	2,51	2,51	2,51	2,51	2,51
Grubbs Test	neg.							

Die Prüfung nach David auf Normalverteilung war positiv. Alle acht *N*-Nitrosamine liegen in den vorgegebenen Grenzen und sind damit normalverteilt. Der Test nach Grubbs zeigte, dass die Messreihen frei von Ausreißern waren. Der Trendtest wurde visuell vorgenommen und ein eindeutiger Trend ist bei keinem *N*-Nitrosamin feststellbar.

Zur Bestimmung der Wiederholgenauigkeit wurde die Wiederholgrenze für alle untersuchten *N*-Nitrosamine aus den zehn Einzelmessungen nach folgender Formel bestimmt.

$$r = s \times 2\sqrt{2}$$

Formel 15 : Formel zur Bestimmung der Wiederholgrenze

Unter der Wiederholgrenze wird der derjenige Wert verstanden, unterhalb dessen man die absolute Differenz zwischen zwei einzelnen Prüfergebnissen, die unter denselben Bedingungen (derselbe Prüfer, dasselbe Gerät, dasselbe Labor, kurze Zeitspanne) erzielt werden, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % erwarten darf. Sie bestätigt das Ergebnis der Methodenlinearität, die zeigt, dass ein Einfluss der Matrix auf die Untersuchung bzgl. des NMOR stärker ausgeprägt zu sein scheint.

Da es sich bei dieser Art der Präzision um Schwankungen der Ergebnisse durch alle Schritte der Methode handelt, sind vielerlei Fehlerquellen denkbar. Von der Einwaage, über die Probenaufbereitung und Messung, bis hin zur Auswertung.

Da die Firma Eurofins Verfahrensvariationskoeffizienten $< 20\%$ als gut bewertet, siehe Tabelle 33, und diese für alle acht *N*-Nitrosamine überzeugend erreicht wurden, wurde dieser Validierungsparameter damit erfolgreich abgeschlossen.

Tabelle 33: Vorgaben der zulässigen Verfahrenskoeffizienten nach Eurofins, bezogen auf den Analytgehalt, zur Untersuchung der Methodenpräzision

Analytkonz. (ppm)	10	1	0,1	0,01	0,001
V_k (%)	7,30	11,00	15,00	21,00	30,00

4.3.7 Laborinterne Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision wurde durch das Aufarbeiten einer 15 ppb Probe an verschiedenen Tagen sowie von unterschiedlichen Mitarbeitern an dem selben Gerät bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 34 festgehalten. Eine vollständige Darstellung aller Messwerte ist in Tabelle 48 des Anhangs zu finden.

Tabelle 34: Ergebnisse der laborinternen Vergleichspräzision

Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
\bar{x} (Response)	0,589	0,717	0,691	0,741	0,743	0,758	0,787	1,279
s (Response)	0,045	0,045	0,043	0,051	0,102	0,055	0,058	0,188
V_k (%)	7,65	6,30	6,29	6,87	13,71	7,32	7,37	14,69
R (Response)	0,127	0,128	0,123	0,144	0,288	0,157	0,164	0,531
PG (David)	3,33	3,54	3,22	3,14	3,24	3,25	3,10	3,19
g_o	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24	4,24
g_u	2,51	2,51	2,51	2,51	2,51	2,51	2,51	2,51
Grubbs Test	neg.							

Die Prüfung nach David auf Normalverteilung war positiv. Alle acht *N*-Nitrosamine liegen in den vorgegebenen Grenzen und sind normalverteilt. Der Test nach Grubbs zeigte, dass die Messreihen frei von Ausreißern waren. Der Trendtest wurde visuell vorgenommen und ein eindeutiger Trend ist bei keinem *N*-Nitrosamin feststellbar.

Zur Bestimmung der Wiederholgenauigkeit im Zuge der laborinternen Vergleichspräzision wurde die Vergleichsgrenze R für alle untersuchten *N*-Nitrosamine aus den zehn Einzelmessungen nach folgender Formel bestimmt.

$$R = s \times 2\sqrt{2}$$

Formel 16: Formel zur Ermittlung der Vergleichsgrenze

Die Ergebnisse der laborinternen Vergleichspräzision sind als ein quantitatives Maß für die Robustheit der Methode anzusehen und zeigen, dass diese Methode auch dann verlässlich ist, wenn sie von verschiedenen Mitarbeitern, an unterschiedlichen Tagen mit vermutlich unterschiedlichen Chargen an Chemikalien sowie bei veränderten Labor-temperaturen, ausgeführt wird. Die Verfahrenskoeffizienten weichen nur um max. 5 % von denen der Methodenpräzision ab und liegen deutlich in dem Rahmen der zulässigen Werte der Firma Eurofins, die in Tabelle 35 gelistet sind.

Tabelle 35: Vorgaben der zulässigen Verfahrenskoeffizienten nach Eurofins, bezogen auf Analytgehalt, zur Untersuchung der Vergleichspräzision

Analytkonz. (ppm)	10	1	0,1	0,01	0,001
V _K (%)	10,9	16,42	22,39	31,34	44,87

4.3.8 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze kann auf unterschiedliche Arten berechnet bzw. ermittelt werden. Die, in dieser Bachelorarbeit, verwendete Methode, stellt die Standardmethode der Firma Eurofins Consumer Product Testing GmbH dar.

Hierbei wird für die Berechnung aus der Standardabweichung folgende Tabelle mit einem Vertrauensniveau von 95 % herangezogen.

Tabelle 36: Faktoren zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Faktor f(n)	38,97	8,04	5,08	4,10	3,63	3,36	3,18	3,05	2,96
n	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Es lassen sich mit Hilfe dieser Tabelle die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wie folgt berechnen.

$$\text{Nachweisgrenze } NWG = s \times f(09)$$

$$\text{Bestimmungsgrenze } BG = 3 \times NWG$$

Diese Methode ist mit der direkten Methode nach DIN 32645 vergleichbar, in der eine Leerwertprobe oder eine mit sehr geringem Analytgehalt, mindestens 10 fach aufgear-

beitet und vermessen wird. Mittels dieser Methode werden die Grenzen wie folgt berechnet.

$$\text{Nachweisgrenze } NWG = 3 \times s$$

$$\text{Bestimmungsgrenze } BG = 10 \times s$$

Beide Methoden liefern Ergebnisse, die sich nur sehr gering voneinander unterscheiden.

Die Ergebnisse aller acht *N*-Nitrosamine sind in Tabelle 37 aufgeführt. Die einzelnen Messwerte sind Tabelle 49 des Anhangs zu entnehmen.

Tabelle 37: Ergebnisse zur Ermittlung der NWG und BG

Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
\bar{x} (µg/kg)	3,337	2,868	2,848	3,023	3,337	2,937	3,033	3,323
s (µg/kg)	0,293	0,227	0,362	0,329	0,293	0,193	0,195	0,365
NWG (µg/kg)	0,892	0,692	1,195	1,046	0,892	0,588	0,596	1,112
BG (µg/kg)	2,677	2,077	3,314	3,137	2,677	1,763	1,788	3,337
PG (David)	4,00	3,52	3,73	3,89	4,00	3,22	3,43	3,04
go	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
gu	2,44	2,44	2,44	2,44	2,44	2,44	2,44	2,44
Grubbs Test	neg.							

Die Prüfung nach David auf Normalverteilung war positiv. Alle acht *N*-Nitrosamine liegen in den vorgegebenen Grenzen und sind somit normalverteilt. Der Test nach Grubbs zeigte, dass die Messreihen frei von Ausreißern waren. Der Trendtest wurde visuell vorgenommen und ein eindeutiger Trend ist bei keinem *N*-Nitrosamin feststellbar.

Die Ergebnisse zeigen einen Nachweisgrenzenbereich der untersuchten *N*-Nitrosamine von (0,588-1,195) µg/kg. Entscheidend ist hier, dass diese Werte sich noch ausreichend von den Blindwerten abheben. Dieser Fall ist in der vorliegenden Untersuchung gegeben.

Die Bestimmungsgrenzen liegen zwischen (1,763-3,314) µg/kg. Aufgrund dieses Ergebnisses können Konzentrationen von 3 µg/kg mit guter Genauigkeit noch nachgewiesen werden und das Ziel der Methode bzgl. der Bestimmungsgrenze ist erreicht.

4.3.9 Wiederfindung

In dieser Bachelorarbeit wurde eine relative sowie absolute Wiederfindung bestimmt. Hierzu wird das Verhältnis der Peakflächen einer Probe bekannter Stoffmenge und der Peakfläche eines Lösungsmittelstandards mit der gleichen Stoffmenge untersucht. Zur Ermittlung der relativen WFR wird der interne Standard in der Standardlösung und Probe miteinbezogen und das Verhältnis des nativen Analyten zum internen Standard gebildet.

Die Wiederfindung wird nach folgender Formel bestimmt.

$$\text{WFR} = \frac{\bar{x}}{x_R} \quad \text{mit : } x_R \text{ richtiger Wert}$$

Formel 17: Bestimmung der Wiederfindung

Für eine grobe Vorabbeurteilung gilt: wenn die Abweichung vom richtigen Wert kleiner ist als das Vierfache des Variationskoeffizienten ist, ist die Wiederfindungsrate noch akzeptabel.⁸⁴

In dem Fall der absoluten WFR der *N*-Nitrosamine trifft dieses Kriterium allerdings wie Tabelle 38 zeigt nur auf das NMEA zu.

Tabelle 38: Ergebnisse der absoluten Wiederfindungsrate

Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
\bar{x} (µg/kg)	7,53	9,11	8,29	5,85	2,43	5,61	2,84	2,39
s (µg/kg)	0,762	0,907	0,762	0,504	0,253	0,519	0,332	0,321
V_k (%)	10,11	9,96	9,19	8,62	10,42	9,24	11,70	13,42
WFR (%)	50,2	60,73	55,26	39,00	16,2	37,4	18,93	15,93
Abweichung richtiger Wert (%)	49,8	39,3	44,7	61,00	83,8	62,6	81,07	84,07
4* V_k (%)	40,44	39,84	36,76	34,48	41,68	36,96	46,80	53,68

Die Wiederfindungen für NDBA und NMOR fallen besonders schlecht aus. Erklären lässt sich das damit, dass diese beiden Analyten die höchsten molekularen Massen haben und somit eine geringe Flüchtigkeit aufweisen. Außerdem lässt sich die geringe Flüchtigkeit durch die hohen Siedepunkte beider Analyten und ihres geringen Dampfdruckes untermauern. Diese Analyten werden bei der Wasserdampfdestillation hohe Verluste haben.

⁸⁴ Vgl. Kromidas S. (2000)

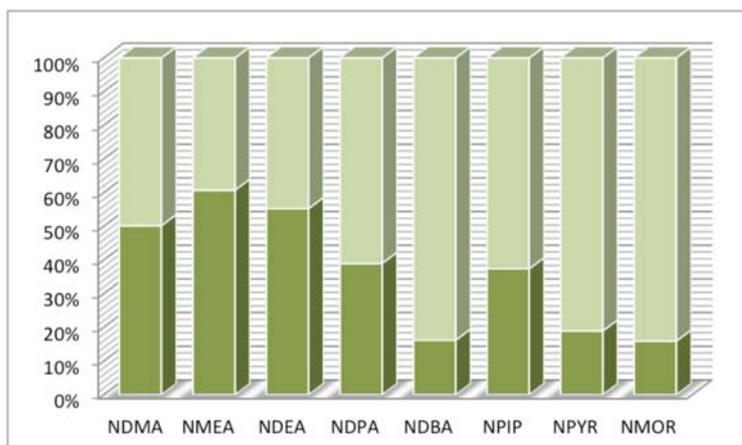


Abbildung 20: Graphische Darstellung der absoluten Wiederfindungsrate

Da die Wiederfindung ein Maß zur Beurteilung der gesamten Methode ist, fällt das Fazit hier eher schlecht aus. Wie man allerdings rückblickend auf die Ergebnisse aus der Methode 4 Kapitel 4.1.4 folgern kann, liegt die schlechte Wiederfindung nur zu einem geringen Teil in den Methoden selbst, sondern vielmehr in der sehr komplizierten und komplexen Matrix begründet. Bei der Wiederfindungsrate, die unabhängig vom Gehalt des Analyten ist, liegt ein proportionaler systematischer Fehler vor. Eine Probe kann durch Multiplikationen mit den Ausgleichsfaktoren auf die richtige Konzentration errechnet werden. Allerdings ist kritisch anzumerken, dass die WFR in der vorliegenden Arbeit nur mit einer Konzentration ermittelt worden ist.

Bei einer zu kleinen Wiederfindungsrate empfiehlt es sich, die Messsignale des Analyten auf eine dem Analyten möglichst ähnliche, Hilfskalibriersubstanz (interner Standard) zu beziehen.⁸⁵ Die Ergebnisse hierzu sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 39: Ergebnisse der relativen Wiederfindungsrate

	Messwerte (Response)								
	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR	
Standard (15 µg/kg)	0,622	0,792	0,7966	0,813	0,803	0,856	0,847	1,126	
Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR	
\bar{x} (Response)	0,547	0,658	0,756	0,675	0,622	0,691	0,715	1,223	
WRF (%)	87,96	83,02	94,95	83,00	77,41	80,72	84,38	108,65	

⁸⁵ Vgl. Kromidas S. (1999)

Anhand der Werte lässt sich deutlich eine Verbesserung der Wiederfindung aller acht *N*-Nitrosamine feststellen. Allerdings ist in diesem Zusammenhang kritisch zu hinterfragen, ob sich für alle acht untersuchten *N*-Nitrosamine, Analyten und die internen Standards identisch verhalten, denn relative Signalintensitäten eines Analyten und seines internen Standards spiegelt deren Konzentrationsverhältnis nur so lange wieder, solange sich Analyt und interner Standard identisch verhalten. Es muss also sicher sein, dass durch Störfaktoren nur die absoluten Intensitäten der Messsignale beeinflusst werden, nicht aber das Verhältnis der beiden zueinander.

Faktoren die erheblichen Einfluss auf die Wiederfindung haben können sind

- Der Dampfdruck bzw. Siedepunkt und somit die Flüchtigkeit des Analyten
- Die Polarität des Analyten

Um eine irreversible Adsorption der Analyten, z.B. an der chromatographischen Säule, für die schlechten Wiederfindungsraten als Grund auszuschließen, wäre es ratsam, einen Peakflächen/Peakhöhen Vergleich einmal mit und ohne Trennsäule vorzunehmen. Treten hier entscheidende Unterschiede auf, so kann die Wiederfindung durch Austausch der Trennsäule verbessert werden.

4.3.10 Stabilität

Wie die Vermessung eines ca. 1 Jahre alten 1 µg/kg Standards gegen einen frischgesetzten Standard selbiger Konzentration zeigt, kann die Konzentration der Analyten mit der Zeit abnehmen. Die Ergebnisse der Responsewerte, die in Tabelle 40 dargestellt sind, zeigen, dass die Signalstärke des alten Standards im Durchschnitt nur noch 69 % der Werte des neuen Standards erreicht.

Tabelle 40: Vergleich der Messwerte eines alten 1 µg/kg Standards gegen einen frischhergestellten

Zeit	Messwerte (Response)							
	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
1 Jahr	60	87	72	51	42	43	49	25
1 Tag	83	129	105	73	51	67	75	37

Diese Abnahme kann unter anderem durch UV Strahlung verursacht sein. Diese kann eine Degradation der *N*-Nitrosamine bewirken. Jedoch müssen normale Messschwän-

kungen in dieses Ergebnis miteinbezogen werden, ebenso wie die Tatsache möglicher Falschansätze des neuen oder alten Standards.

Die beiden nachfolgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Stabilitätsmessungen, wie in 3.2.3.6 beschrieben, eines 15 µg/kg Standards und einer aufgearbeiteten Probe selbiger Konzentration.

Tabelle 41: Untersuchung der Stabilität einer 15 µg/kg Standardlösung

Zeit (h)	Messwerte (µg/kg)							
	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
0	14,64	14,65	14,75	14,53	14,51	14,46	14,57	15,52
72	13,20	13,60	14,20	14,10	14,20	14,20	14,10	15,57
96	14,90	14,70	14,90	14,00	14,90	15,10	13,90	18,00
168	15,08	15,07	14,53	15,08	14,91	15,14	14,80	16,37
Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
\bar{x} (µg/kg)	14,51	14,60	14,43	14,63	14,73	14,34	16,37	14,46
s (µg/kg)	0,55	0,26	0,43	0,30	0,41	0,36	1,00	0,74
V_k (%)	3,77	1,80	2,95	2,02	2,76	2,50	6,13	5,13

Bis auf den, nach Grubbs identifizierten Ausreißer in der realen Probe, entsprechen die Variationskoeffizienten den erwarteten Werten. Sie liegen für den Standard deutlich höher als die der Messpräzision, so dass man von einem Einfluss des Vermessungszeitraumes auf den Variationskoeffizienten sprechen kann. Insgesamt lässt sich aber kein Trend der Werte durch eine Zu- bzw. Abnahme der Konzentration über die Zeit feststellen. Diese Tatsache schließt Adsorption an Gefäßwandungen oder Verdampfung des Lösungsmittels aus. Ein erhöhter Verfahrenskoeffizient ist somit sowohl auf Schwankungen der Messmethode sowie auf die tagesbedingten Schwankungen des Gerätes durch Verschmutzungen oder andere Umgebungstemperaturen als auch Proben-temperaturen, zurückzuführen.

Die Variationskoeffizienten der realen Probe liegen in dem Bereich der Variationskoeffizienten der Methodenpräzision und fallen mitunter sogar besser aus als die der Standardlösung. Dies lässt die Aussage zu, dass die Matrix einen stabilisierenden Einfluss auf die Konstanz der Messwerte über einen langen Zeitraum hat. Lediglich das NMOR weißt auch in dieser Untersuchung die größten Messschwankungen auf.

Tabelle 42: Untersuchung der Stabilität eines 15 µg/kg Probenextraktes

Zeit (h)	Messwerte (µg/kg)							
	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
0	14,70	14,00	13,70	13,70	13,00	13,90	14,40	19,30
72	13,50	13,10	13,30	13,40	12,80	13,50	14,50	23,00
96	15,10	14,90	13,90	12,50	6,10	14,30	14,10	21,30
168	15,14	14,36	13,34	14,13	13,78	14,31	14,40	18,41
Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
\bar{x} (µg/kg)	14,61	14,09	13,56	13,43	13,19	14,00	14,35	20,50
s (µg/kg)	0,66	0,66	0,25	0,60	0,42	0,33	0,15	1,78
V_k (%)	4,54	4,65	1,85	4,45	3,20	2,38	1,05	8,69

5 Diskussion und Ausblick

Die Ergebnisse der neuentwickelten Probenvorbereitung, Methode 4, die mit der optimierten Messmethode, Programm 1, erzielt wurden, zeigen, dass eine selektive Untersuchung der acht *N*-Nitrosamine in kosmetischen Pflegeprodukten mit einer geforderten Bestimmungsgrenze von 3 µg/kg möglich ist.

Anhand der Ergebnisse der Methodenentwicklung der Probenvorbereitung ist festzustellen, dass der Anspruch auf ein gleichzeitiges Untersuchen von acht *N*-Nitrosaminen in einer komplexen Matrix, wie die Kosmetika eine darstellt nicht ganz trivial ist.

Die Anwendung von SPE Säulen als Clean-up zeigt bezüglich der verwendeten Säulen keine Anwendbarkeit auf alle acht *N*-Nitrosamine.

Die Verwendung einer unpolaren SPE Säule nach der Wasserdampfdestillation wie in Methode 1 beschrieben, führt zu keiner ausreichenden Selektivität bzw. Auflösung der Peaks. Viele Komponenten zeigten Interferenzen mit Störsubstanzen.

Die Anwendung der polaren Si-OH Säule nach einer direkten Extraktion der Probe mit Pentan und dem Zusatz von NaOH oder K₂HPO₄ wie in Methode 2, zeigt, dass die Peaks der Analyten je nach Zusatz unterschiedlich gut ausfallen. Eine gute Darstellung aller acht Analytenpeaks aber nicht erreicht wird. Eine mögliche Verbesserung dieses Ansatzes könnte durch den Zusatz anderer anorganischer Salze sowie eines veränderten pH Wertes erreicht werden.

Die Aufgabe des Extraktes auf die selbige Si-OH Säule nach Extraktion mittels Dichlormethan mit vorrausgehender Wasserdampfdestillation, wie in Methode 3 beschrieben, zeigt eine unzureichende Selektivität des NDBA und NDPA. Die Aufnahme eines Säulenprofils unter Verwendung der gleichen Zusammensetzung der Aufgabenlösung zeigt, dass das NDBA und NDPA schon bei der Aufgabe zu einem großen Anteil durch die Säule durchlaufen und somit ein Verlust dieser Komponenten entsteht. Eine Verbesserung dieser Methode ließe sich durch die Veränderung der Zusammensetzung der Aufgabenlösung erreichen. Würde das relativ polare Dichlormethan weniger Adsorptionspunkte auf der SPE-Säule belegen, könnten die besagten Analyten besser wechselwirken und würden zurückgehalten werden.

Auf Grund des Zeitmangels war eine weitere Optimierung der ausgewählten Vorbereitungsmethode, Methode 4, nicht mehr möglich. Sie stellt dennoch die beste Wahl der Probenaufbereitung dar. Die Wasserdampfdestillation der Probe erreicht ein effizientes Abtrennen der Analyten von dem Großteil der Störkomponenten der Matrix. Durch das Filtern des Destillats erfolgt ein weiterer Klärschritt möglicher Störfaktoren. Die Dreifachextraktion mittels Dichlormethan stellt ein gut anzuwendendes Extraktionsverfahren dar und wird in seiner Effizienz durch die Zugabe von anorganischen Salzen der Lsg. 1 verstärkt. Die Trocknung des organischen Extrakts über das Na_2SO_4 dient der Absicherung der Eliminierung des Wassers, welches eventuelle *N*-Nitrosamine enthalten könnte. Die anschließende Eindampfung der rund 60 mL Extrakt sorgt für eine Aufkonzentrierung des Analyten.

Auch diese Methode ließe sich durch die Untersuchung der optimalen Extraktionszeit oder des Destillationsprogrammes eventuell noch verbessern. Des Weiteren können sich Fehlerquellen in der Aufbereitung wie sie zum Beispiel durch eine Varianz in der Probeneinwaage, des Destillationsvolumens, der Extraktion sowie des Eindampfvolumens entstehen, durch die Einführung präziser skaliertes Rotiergefäße und eines auf ein Endvolumen programmiertes Destillationsprogramm vermeiden lassen.

Durch die Veränderung der vorhandenen Messmethode wurde die endgültige Optimierung der Methode 4 erreicht. Die von der Firma Eurofins zur Untersuchung von Futtermitteln auf zwei der acht *N*-Nitrosamine verwendete Methode, führte zu keiner ausreichenden Auflösung aller acht Analytenpeaks. Die Einführung eines neuen Linerprogrammes, welches deutlich langsamer hochheizt und somit für eine fraktionierte Verdampfung der Analyten sorgt, brachte die notwendige Verbesserung. Mittels der so gefundenen Methode konnte die Validierung durchgeführt werden.

Die in der Validierung untersuchte Kalibrierfunktion zeigt, dass die lineare Regression für alle Analyten das passende mathematische Modell mit einem Bestimmtheitsmaß $r^2 > 0,998$ darstellt. Die Linearität der Methode veranschaulicht, dass die Empfindlichkeit der Methode durch das Verwenden von Matrixproben abnimmt, was sich in einer Verringerung der Steigung der Ausgleichsgeraden der Linearität der Methode bemerkbar macht.

Ein Quotientenvergleich der Steigungen und Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen ohne und mit Matrix ergibt keine Empfindlichkeitseinbußen für NDMA, NMEA und NPYR. Bis auf NMOR zeigen alle anderen die zu erwartenden Empfind-

lichkeitssenkungen. Präzisionseinbußen sind für alle, bis auf NPIP und NMEA zu verzeichnen.

Anhand der Untersuchung der Mess- sowie Methodenpräzision kann gezeigt werden, dass eine Selektivität der Methode gegeben ist und dass die Methodenfähigkeit ausreicht. Mögliche Interferenzen durch die Komplexität der Matrix zeigen einen akzeptablen Einfluss auf das Analyseergebnis. Der Variationskoeffizient betrug bei der Messpräzision zwischen (0,25-1,09) % und lag damit in einem typischen Bereich der GC von < 1 %. Auch wenn die Methodenpräzision mit ihren Variationskoeffizienten zwischen (2,43-10,21) % schon deutlich höher ausfiel, lag sie immer noch deutlich in dem akzeptablen Bereich der Firma Eurofins von < 20 %. An den Werten der laborinternen Vergleichspräzision deren V_k -Werte zwischen (6,29-14,69) % lagen, ist deutlich zu sehen, dass eine Methodenrobustheit zumindest bzgl. der Tagesvarianz und Mitarbeitervarianz gegeben ist. Die gefundenen Variationskoeffizienten liegen auch hier im Akzeptanzrahmen der Firma Eurofins von < 30 %. Insgesamt kann man also von einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sprechen.

Kritisch anzumerken ist jedoch, dass alle Präzisionsuntersuchungen mit Standards oder Proben einer Konzentration von 15 µg/kg durchgeführt wurden. Da die Präzision im Allgemeinen von der Konzentration abhängt, hätte sie daher am besten für die kleinste Standard- sowie die größte Standardkonzentration untersucht werden müssen. Ein Vergleich der Verfahrenskoeffizienten der 3 µg/kg Probe aus der NWG Bestimmung mit denen der 15 µg/kg aus der Messpräzision, wie in Tabelle 43 dargestellt, zeigt, dass diese sich für sieben der acht untersuchten *N*-Nitrosamine stark unterscheiden.

Tabelle 43: Ergebnisse der Messpräzision bei unterschiedlichen Konzentrationen

Analyt	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
3 µg/kg	8,78 %	7,91 %	12,71 %	10,88 %	8,78 %	6,57 %	6,43 %	10,88 %
15 µg/kg	2,59 %	2,99 %	3,02 %	3,14 %	4,42 %	2,43 %	3,15 %	10,21 %

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mittels der Standardabweichungsmethode rechnerisch ermittelt. Die Nachweisgrenzen liegen für die untersuchten *N*-Nitrosamine in einem Bereich zwischen (0,588-1,195) µg/kg und die der Bestimmungsgrenze zwischen (1,763-3,314) µg/kg. Aufgrund dieser Ergebnisse können Konzentrationen von 3 µg/kg mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % quantitativ erfasst werden.

Im Rahmen der Validierung wurde eine relative sowie absolute Wiederfindung bestimmt. Die Werte der absoluten Wiederfindung bewegen sich zwischen (15,93-60,73) % und die der relativen (77,41-108,65) %. Diese schlechten absoluten Wiederfindungen sind durch die hohen molaren Massen und Siedepunkte einiger Analyten zu erklären, die in der Wasserdampfdestillation eine geringe Flüchtigkeit zeigen.

Wie die zahlreichen Messungen während der praktischen Laborphase bei der Firma Eurofins Consumer Product Testing GmbH gezeigt haben, ist eine Verfahrensstabilität nur bedingt gegeben. So ist es notwendig, eine eventuelle Substanzverschleppung besonders bei langen Messserien zu beobachten. Ratsam wäre in diesem Zusammenhang zwischen den Proben, in regelmäßigen Abständen einen Blindwert zu vermessen, um eine Erkennung des carryover effects sicher zu stellen. Auch die nochmalige Vermessung der Kalibrierstandards, würde bei deutlichen Abweichungen von den vorherigen Standards auf eine solche Verschleppung hinweisen. Um einer Verschmutzung des Messsystems vorzubeugen, ist der regelmäßige Austausch des Liners nach einer Messung von ca. 20 Proben empfehlenswert.

Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit, der in dieser Bachelorarbeit entwickelten Methode, ist die Teilnahme der Firma Eurofins an Ringversuchen unerlässlich. Da diese Möglichkeit zum jetzigen Zeitpunkt nicht besteht, wird die Beurteilung der Methode anhand der Ergebnisse anderer Methoden zur Untersuchung auf *N*-Nitrosaminen in unterschiedlichen Matrices vorgenommen. Eine Veröffentlichung der EPA (Environmental Protection Agency)⁸⁶ zeigt, dass diese Bestimmungsgrenzen und Nachweisgrenzen unter Verwendung einer GC-MS-MS von (1,2-2,1) µg/kg und (0,26-0,66) µg/kg für sieben der acht untersuchten *N*-Nitrosamine in Trinkwasser, erreichen. Die Methode zur Untersuchung von sieben der acht in dieser Arbeit behandelten *N*-Nitrosamine in Luft des Institutes für Arbeitsschutz⁸⁷ der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung erreicht mittels GC-TEA Bestimmungsgrenzen von (0,02-0,03) µg/m³ sowie Wiederfindungsraten von (91,1-97,5) % . Ihre Verfahrensvariationskoeffizienten liegen bei (2,6-4,3) %. Ein direkter Vergleich, der in dieser Bachelorarbeit erarbeiteten Methode zeigt, dass wichtige Validierparameter zwar absolut schlechter sind. Berücksichtigt man die Komplexität der Probenmatrix, so ist die Schlussfolgerung zulässig, dass die entwickelte Methode gute Ergebnisse liefert.

⁸⁶ Vgl. Munch J.W.(2004)

⁸⁷ Vgl. Breuer D.

<http://www.myesv.info/h/BLDG-890842-3ASJiVAc3eNEgeADaf4Q/ppd.html>

Literaturverzeichnis

Agilent Technologies (2009) (Hrsg.), o. V., Agilent 7000 A Triple Quadrupole GC/MS, QQQ Concepts Guide, 1. Aufl., USA.

Agilent Technologies (2011), o. V., Agilent Triple Quadrupole GC/MS Techniques and Operation, USA.

Askar, A. (1979), Bielig H.J. (Hrsg.), Amine und Nitrosamine, Vorkommen, Bedeutung, Stoffwechsel und Bestimmung, 2. Aufl., Technische Universität Berlin.

Asmussen, C. (2000), Chemische Charakterisierung von Alkylethoxylaten, Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin, Berlin.

Budzikiewicz, H. (1998), Massenspektrometrie, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.

Brinkert, T. (2005), Grundlagen der Gaschromatographie (GC), Abschlussarbeit Version 1.3 Institute für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie, Dortmund.

Challis, B. / Trew D.F. / Guthrie W.G. / Roper D.V. (1995), Reduction of nitrosamines in cosmetic products, International Journal of Cosmetic Science, Vol. 17.

Doering, I. (2010), Vergleichende Untersuchung zum Metabolismus von nano- und mikromolaren Konzentrationen des tabakspezifischen Nitrosamins NNK in humanen Leber- und Lungenmikrosomen, Dissertation Walther- Staub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München.

Eisenbrand G. (1985), Töpfer K. (Hrsg.) / Ministerium für Umwelt und Gesundheit Rheinland-Pfalz (Hrsg.), in Nitrosamine in Lebensmitteln-Gefahr für den Verbraucher?, Belastung des Menschen mit N-Nitrosoverbindungen aus seiner Umwelt, Pilger Druckerei, Speyer, Mainz.

Frauen M. (2001), Analytik kosmetisch wirksamer Pflanzenextrakte mit der Flüssigchromatographie- Massenspektrometrie (LC/MS), Dissertation Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie -Abteilung Lebensmittelchemie der Universität Hamburg.

Heling, A-K. (2009), Abhängigkeit von Addukten tabakspezifischer Nitrosamine in der Mundschleimhaut des Menschen von verschiedenen Genussformen des Tabaks, ihre Beeinflussung durch Ernährung, Alkohol und Chemopräventiva und die Überprüfung der Effekte an der Ratte, Dissertation Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Weimar.

Hübschmann H-J. (1994), Matter L. (Hrsg.), in Lebensmittel-und Umweltanalytik mit der Kapillar-GC, Das Massenspektrometer als Detektor in der Kapillar-GC, VCH; Weinheim.

Koehl W. / Eisenbrand G. (1999), Marquardt H (Hrsg.) / Schäfer S.G. / Mc Clellan R.O., in Toxicology, N-nitroso compounds, Academic Press.

Kromidas S. (1999), Gruber U. (Hrsg.) / Klein W. (Hrsg.), Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim.

Kromidas S. (2000), Handbuch Validierung in der Analytik, 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.

Machholz R. / Lewerenz H.J. (1989), Lebensmitteltoxikologie, Springer-Verlag, Berlin

Marquardt H. / Schäfer S.G. (1997), BI(wissenschaftlicher) Verlag, Lehrbuch der Toxikologie.

Munch J.W. / Bassett M.V. (2004), EPA (Hrsg.), Method 521 Determination of Nitrosamines in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Capillary Column Gas Chromatography with large Volume Injection and Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry (MS/MS), 1. Version, Ohio.

Preussmann R. (1982), DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.) in Nitrat-Nitrit-Nitrosamine in Gewässern, Nitrosaminbedingte Cancerogenese, acta humaniora der Verlag Chemie GmbH, Weinheim.

Preussmann R. (1985), Töpfer K. (Hrsg.) / Ministerium für Umwelt und Gesundheit Rheinland-Pfalz (Hrsg.), Nitrosamine in Lebensmitteln- Gefahr für den Verbraucher ?, Pilger Druckerei Speyer, Mainz.

Sander J. / Schweinsberg F. / Menz H.P (1968), De Gruyter W. (Hrsg.), Untersuchung über die Entstehung cancerogener Nitrosamine im Magen, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 349, Heft 2.

Sonnenschein G. (1992), Bundesanstalt für Arbeitsschutz (Hrsg.) (Vorträge der Fachtagung am 7.Mai 1992 in Dortmund) Nitrosamine, Geltende Regelungen der Gefahrstoffverordnung und des technischen Regelwerkes, Wirtschaftsverlag NW.

Spiegelhalder B. / Preussmann R. (1984), Journal of Cancer Research Clinical Oncology (Hrsg.), Contamination of Toiletries and Cosmetic Products with Volatile and Non-volatile N-Nitroso Carcinogens, Springer Verlag.

Spiegelhalder B. (1999), Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (Hrsg.), (8. Gumpensteiner Lysimetertagung), Die Bedeutung von Nitrat in der Nahrung für die in vivo-Bildung von N-Nitrosaminen.

Stauffer D. (2008), Kromidas S. (Hrsg.) / Kuss H-J. (Hrsg.), Chromatogramme richtig integrieren und bewerten, WILEY-VCH, Weinheim.

Tannenbaum S.R. (1991), The American Journal of Clinical Nutrition (Hrsg.), Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid.

Tischer M. (1992), Bundesanstalt für Arbeitsschutz (Hrsg.) (Vorträge der Fachtagung am 7.Mai 1992 in Dortmund) Nitrosamine, Vorkommen und Entstehen von Nitrosaminen, Wirtschaftsverlag NW, Dortmund.

Tyroller S. (2004), Untersuchungen zu Vorkommen und Metabolismus von Myosmin und Chemopräventive Effekte von verschiedenen Tabakalkaloiden und tabakspezifischen Nitrosaminen auf den Stoffwechsel von N²-Nitrosonornikotin, Dissertation Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians Universität München.

Urban M. (2002), Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Untersuchung der in vivo-Alkylierung in Abhängigkeit von der Tabakrauchexposition mit Hilfe unterschiedlicher Biomarker, Dissertation Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians Universität München.

Verzeichnis der Internetquellen

Agilent Technologies (Hrsg.), Riener J., Development of a sensitive Methode for the Measurement of N-Nitrosamine in Rubber Articles Using GC-PCI-MS/MS, <http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/Agilent%20Abstracts>. (Abgerufen am 16.06.2011)

Agilent Technologies (Hrsg.), Malgorzata S., Agilent 7000 A Triple Quad GC/MS, (2008), http://199.203.207.238/eldan/Agilent/Agilent_7000A_Triple_Quad_GCMS.pdf, (Abgerufen am 16.06.2011)

Agilent Technologies (Hrsg.), Schulz H-J., (2001) http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/GC_handbuch_print.pdf (Abgerufen am 08.12.2011)

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.), Walther C., Nitrosamine in Kosmetik, Vortrag beim 35. Dt. Lebensmittelchemikertag, Dresden, http://www.lgl.bayern.de/produkte/kosmetika/kosmetische_mittel/ue_2007_kosmetische_mittel_nitrosamine.htm#bis, (Abgerufen am 04.08.2011)

BG Bau (Hrsg.), o. V., TRGS 615 Begriffsbestimmung und Erläuterung, <http://www.bgbau-medien.de/tr/trgs615/2.htm> (Abgerufen am 07.12.2011)

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Hrsg.), o. V., Technische Regeln für Gefahrstoffe, N-Nitrosamine TRGS 552, (2007), <http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Gefahrstoffe/TRGS/TRGS-552.html>, (Abgerufen am 04.08.2011)

Bützer P.(Hrsg.), o. V., Vitamin C, (2004), http://www.buetzer.info/fileadmin/pb/HTML-Files/Vitamin_C_Theorie.htm (Abgerufen am 12.12.2011)

Department of Health and Human Services (Hrsg.), o. V., N-Nitrosamines: 15 Listings, (2011), National Toxicology Program, 12. Ausgabe
<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/Nitrosamines.pdf>
(Abgerufen am 09.12.2011)

Donit Tesnit Ltd. (Hrsg.), o. V.,
http://www.donittesnit.si/fileadmin/user_upload/technical_info/Technical_Facts/Nitrosamines.pdf
(Abgerufen am 7.12.2011)

Gemini BV (Hrsg.), o. V.,
<http://www.geminibv.nl/labware/gerhardt-vapodest-vap20/gerhardt-vapodest-vap20-2-3173.jpg.jpg>
(Abgerufen am 08.12.2011)

Institutes für Arbeitsschutz (Hrsg.), o. V.,
<http://www.myesv.info/h/BLDG-890842-3ASJiVAc3eNEgeADaf4Q/ppd.html>
(Abgerufen am 12.12.2011)

Kosmetische Praxis (Hrsg.), Lautenschläger H., Emulgatoren „Wir machen Mischen möglich !“, (2004),
http://www.dermaviduals.de/cms/upload/Publikationen_deutsch/KP-3-04-Emulgatoren.pdf
(Abgerufen am 07.12.2011)

Pharmazeutische Zeitung online Dermopharmazie (Hrsg.), Daniels R., Die richtige Galenik für kranke Haut, (2009), Ausgabe 24,
<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=30128>
(Abgerufen am 05.12.2011)

The Linus Pauling Institute (Hrsg.), Scanlan R.A., , Nitrosamines and Cancer, (2000),
<http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/nitrosamine.html>
(Abgerufen am 09.12.2011)

Uni-Kiel (Hrsg.), Stock N., Emulsionen,
http://www.uni-kiel.de/anorg/bensch/lehre/Dokumente/versuch_k3_emulsionen.pdf
(Abgerufen am 07.12.2011)

US Davis ChemWiki by Univeristy of California (Hrsg.), Woo N. / Thet K., Gas Chromatography,
http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Gas_Chromatography
(Abgerufen am 19.11.2011)

Wikipedia (Hrsg.), o. V., (2011),
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/Nitrosamine_Formulae_V.1.svg
(Abgerufen am 07.12.2011)

o. Hrsg., o. V., Technical Guidance Document on Minimising and Determining Nitrosamines in Cosmetics, (2008),
<http://www.colipa.eu/downloads/74.html>
(Abgerufen am 07.12.2011)

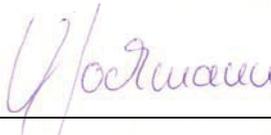
o. Hrsg., o. V., Richtlinie 76/768/EWG, Angleichung der Rechtsvorschrift der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel, (2007),
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20070919:DE:PDF>
(Abgerufen am 05.12.2011)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Hamburg, 15.12.2011

Ort, Datum



Unterschrift

Tabelle 45: Ergebnisse der Kalibrierfunktion

Konzentra- tion ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Messwerte (Response)							
		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
5	1	0,259	0,338	0,32	0,357	0,331	0,363	0,385	0,440
	2	0,260	0,334	0,316	0,358	0,334	0,361	0,384	0,436
	Mittelw.	0,260	0,336	0,318	0,358	0,333	0,362	0,385	0,438
10	1	0,486	0,631	0,601	0,678	0,625	0,683	0,714	0,832
	2	0,486	0,631	0,599	0,679	0,625	0,681	0,721	0,828
	Mittelw.	0,486	0,631	0,600	0,679	0,625	0,682	0,718	0,830
15	1	0,685	0,876	0,837	0,955	0,879	0,955	0,996	1,155
	2	0,676	0,888	0,837	0,956	0,876	0,959	0,996	1,154
	Mittelw.	0,681	0,882	0,837	0,956	0,878	0,957	0,996	1,154
20	1	0,909	1,171	1,112	1,266	1,165	1,265	1,300	1,512
	2	0,912	1,156	1,114	1,267	1,161	1,263	1,306	1,526
	Mittelw.	0,911	1,164	1,113	1,267	1,163	1,264	1,303	1,519
25	1	1,104	1,424	1,363	1,550	1,433	1,546	1,585	1,864
	2	1,104	1,434	1,366	1,556	1,421	1,548	1,592	1,865
	Mittelw.	1,104	1,429	1,365	1,553	1,427	1,547	1,589	1,864
30	1	1,290	1,662	1,589	1,821	1,676	1,811	1,844	2,169
	2	1,290	1,652	1,591	1,819	1,688	1,816	1,847	2,174
	Mittelw.	1,290	1,657	1,590	1,820	1,682	1,814	1,846	2,171
Verfahrensgrößen		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
V_{K0} (%)		1,90	1,18	1,82	1,57	1,30	1,70	2,08	1,91
Zielkonz. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
y-Wert der Zielkonz. (Response)		0,788	1,018	0,971	1,106	1,019	1,104	1,139	1,331
5 % y-Wert der Zielkonz. (+/-) (Response)		0,039	0,051	0,048	0,055	0,051	0,055	0,057	0,066
Achsenabschnitt a (Response)		0,065	0,088	0,078	0,080	0,074	0,087	0,116	0,117
Steigung b (Response)		0,041	0,053	0,051	0,059	0,054	0,058	0,058	0,069
s_y (Response)		0,0145	0,0187	0,0166	0,0159	0,0112	0,0156	0,0216	0,0232
r^2		0,999	0,999	0,999	0,999	1,000	0,999	0,999	0,999

Tabelle 46: Ergebnisse der Methoden Linearität

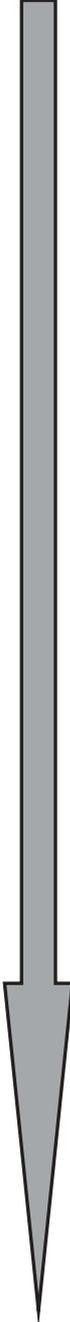
Konzentration (µg/kg)		Messwerte (Response)							
		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
5	1	0,210	0,247	0,242	0,270	0,275	0,260	0,281	0,328
	2	0,210	0,244	0,245	0,267	0,251	0,265	0,269	0,434
	Mittelw.	0,210	0,245	0,243	0,268	0,263	0,262	0,270	0,381
10	1	0,392	0,518	0,450	0,487	0,427	0,504	0,514	0,819
	2	0,384	0,453	0,418	0,484	0,467	0,493	0,518	0,784
	Mittelw.	0,385	0,485	0,435	0,485	0,447	0,498	0,516	0,801
15	1	0,594	0,713	0,693	0,739	0,662	0,784	0,778	1,340
	2	0,596	0,719	0,712	0,749	0,694	0,782	0,806	1,203
	Mittelw.	0,595	0,715	0,700	0,744	0,677	0,783	0,792	1,271
20	1	0,787	0,925	0,921	0,960	0,862	1,014	1,057	1,630
	2	0,795	0,958	0,935	1,039	0,901	1,023	1,079	1,740
	Mittelw.	0,795	0,941	0,928	0,999	0,881	1,018	1,068	1,685
25	1	0,983	1,200	1,158	1,231	1,082	1,278	1,339	2,081
	2	1,030	1,240	1,180	1,291	1,171	1,313	1,369	2,570
	Mittelw.	1,005	1,220	1,164	1,260	1,126	1,295	1,354	2,325
30	1	1,217	1,480	1,247	1,546	1,376	1,480	1,660	2,664
	2	1,248	1,470	1,475	1,460	1,369	1,560	1,705	2,690
	Mittelw.	1,235	1,475	1,361	1,550	1,372	1,520	1,682	2,677
Verfahrensgrößen		NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
V_{K0} (%)		2,24	2,28	2,52	2,42	2,80	1,45	2,59	3,95
Zielkonz. (µg/kg)		17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
y-Wert der Zielkonz. (Response)		0,704	0,848	0,805	0,885	0,794	0,900	0,948	1,523
5 % y-Wert der Zielkonz. (+/-) (Response)		0,0352	0,042 4	0,040	0,0442	0,039	0,045	0,047	0,076
Achsenabschnitt a (Response)		-0,014	- 0,013	0,002	-0,013	0,014	-0,011	-0,034	-0,124
Steigung b (Response)		0,041	0,052	0,046	0,051	0,044	0,051	0,056	0,094
s_y (Response)		0,0161	0,018 1	0,0193	0,0215	0,0218	0,0154	0,0255	0,0649
r^2		0,999	0,999	0,998	0,998	0,998	0,999	0,998	0,996

Tabelle 50: Ergebnisse der Wiederfindung

Messungsnummer	Messwerte ($\mu\text{g}/\text{kg}$)							
	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
1	7,5	9,8	9,4	6,2	2,2	5,0	2,5	2,0
2	8,0	10,0	8,0	7,0	2,5	5,5	2,5	2,0
3	8,1	9,5	8,8	5,5	2,1	4,9	2,6	2,1
4	8,8	10,1	9,2	6,3	2,4	5,8	2,9	2,5
5	8,0	9,8	8,6	5,8	2,3	5,7	2,9	2,5
6	7,2	8,9	8,3	6,2	2,7	6,2	3,0	2,5
7	7,5	9,1	8,2	5,3	2,2	5,2	2,7	2,4
8	7,7	8,9	8,3	5,6	2,5	5,7	2,9	2,3
9	6,3	7,7	6,9	5,3	3,0	6,7	3,7	3,2
10	6,2	7,3	7,1	5,4	2,4	5,4	2,7	2,3
Verfahrensgrößen	NDMA	NMEA	NDEA	NDPA	NDBA	NPIP	NPYR	NMOR
\bar{x} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	7,53	9,11	8,29	5,85	2,43	5,61	2,84	2,39
s ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0,762	0,907	0,762	0,504	0,253	0,519	0,332	0,321
V_k (%)	10,11	9,96	9,19	8,62	10,42	9,24	11,70	13,42
WFR (%)	50,2	60,73	55,26	39,00	16,2	37,4	18,93	15,93
Abweichung richtiger Wert (%)	49,8	39,3	44,7	61,00	83,8	62,6	81,07	84,07
$4* V_k$ (%)	40,44	39,84	36,76	34,48	41,68	36,96	46,80	53,68

Tabelle 51: Elutrope Reihe

Die elutrope Reihe	
Lösungsmittel	Siedepunkt (°C)
<i>n</i> -Pentan	36
Petrolether	
<i>n</i> -Hexan	69
<i>n</i> -Heptan	98
Cyclohexan	81
Cyclopentan	
Schwefelkohlenstoff (CS ₂)	47
Tetrachlorkohlenstoff	77
Xylol	
<i>i</i> -Propylether	
Toluol	110
Chlorbenzol	
Benzol	80
Chloroform	61
Diethylether	35
Dichlormethan	40
Tetrahydrofuran	66
Ethylendichlorid	84
Methylethylketon	
Dioxan	101
Essigester	77
Pyridin	115
Aceton	56
Dimethylsulfoxid	190
Nitromethan	101
Acetonitril	82
<i>i</i> -Propanol	82
Ethanol	78
Methanol	65
Ethylenglycol	
Essigsäure	118
Wasser	100
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	153



ZUNEHMENDE
POLARITÄT

 ZUNEHMENDE
ELUTIONSWIRKUNG

Tabelle 52: David Tabelle

n	Untere Schranken			Obere Schranken		
	5 %	1 %	0,1 %	5 %	1 %	0,1 %
5	2,15	2,02	1,83	2,83	2,80	2,80
6	2,28	2,25	1,83	3,16	3,16	3,10
7	2,40	2,26	1,87	3,46	3,46	3,34
8	2,50	2,35	1,87	3,74	3,74	3,54
9	2,59	2,44	1,90	4,00	4,00	3,72
10	2,67	2,51	1,90	4,24	4,24	3,88
11	2,74	2,58	1,92	4,47	4,01	3,80
12	2,80	2,64	1,92	4,69	4,13	3,91
13	2,86	2,70	1,93	4,90	4,24	4,00
14	2,92	2,75	1,93	5,10	4,34	4,09
15	2,97	2,80	1,94	5,29	4,44	4,17

Tabelle 53: Grubbs Tabelle

P einseitig	90 %	95 %	99 %
n			
3	1,148	1,153	1,155
4	1,425	1,463	1,492
5	1,602	1,672	1,749
6	1,729	1,822	1,944
7	1,828	1,938	2,097
8	1,909	2,032	2,221
9	1,977	2,110	2,323
10	2,036	2,176	2,410
11	2,088	2,234	2,485
12	2,134	2,285	2,550
13	2,175	2,331	2,607
14	2,213	2,371	2,659
15	2,247	2,409	2,705

Tabelle 54: Neumann Tabelle

n	P
	95 %
4	0,7805
5	0,8204
6	0,8902
7	0,9359
8	0,9825
9	1,0244
10	1,0523
11	1,0965
12	1,1276

Tabelle 55: Mandel Tabelle

fl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	4052	499,5	5403	5625	5764	5859	5928	5982	6022	6056
2	98,50	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,37	99,39	99,40
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,35	27,23
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05
6	13,75	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85

