J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 16, 1978, pp. 365–369

Zur Umsetzung von Cyclohexylsulfaminsäure (Cyclamat) mit salpetriger Säure in wäßriger HCl-Lösung, isoliertem menschlichen Magensaft und Urin

Von A. Kinawi und H. Kia

Institut für Biochemie und Molekularbiologie (FB 23 / WE 03) der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 18. Oktober 1977/3. Februar 1978)

Zusammenfassung: Die pH-Abhängigkeit der Bildung und des Zerfalls des bei der Umsetzung der Cyclohexylsulfaminsäure mit salpetriger Säure entstehenden N-Nitrosoderivats wurde photometrisch durch kontinuierliche Messung der Absorptionsänderung untersucht. Es wurde ein optimaler pH-Wert von 2,45 ermittelt, bei dem eine maximale Ausbeute an dem zerfallenden N-Nitrosoderivat entsteht. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der Zerfallsreaktion bei pH 2,61 (Molverhältnis: Cyclohexylsulfaminsäure/Natriumnitrit = 1/1,11) liegt bei 13,6 min. Bei pH 4,5 zeigt das N-Nitrosoderivat eine relativ hohe Stabilität.

Der Verlauf der Umsetzung in isoliertem menschlichen Urin und Magensaft zeigte die gleiche pH-Abhängigkeit wie bei der Durchführung der Umsetzung in wäßriger HCl-Lösung.

The reaction of cyclohexylsulphamic acid (Cyclamate) with nitrous acid in aqueous HCl-solution, isolated human gastric juice and urine

Summary: The pH dependency of the formation and decomposition of the N-nitroso derivative, which is produced by the reaction of cyclohexylsulphamic acid with nitrous acid, was investigated by means of continuous photometric measurement of the changes in absorbance. Reaction at pH 2.45 resulted in an optimal yield of the N-nitroso derivative. The half-life of the decomposition reaction (the reactants cyclohexylsulphamic acid/sodium nitrite being in a molar ratio of 1:1.11) at pH 2.61 was 13.6 min. The N-nitroso derivative showed a relatively high stability at pH 4.5.

The reaction in isolated human gastric juice and urine showed the same pH dependency as in aqueous HCl solution.

Einleitung

Die Süßstoffe Cyclamat und Saccharin wurden hinsichtlich einer möglichen karcinogenen, co-karcinogenen, mutagenen und cytotoxischen Wirkung untersucht (1–10). Weiterhin wurden Untersuchungen über den Einfluß dieser Stoffe auf Fertilität und Lebensdauer durchgeführt (11–12). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die an Mäusen, Ratten, Kaninchen und Rhesusaffen als Versuchstieren sowie an Menschen durchgeführt wurden, erschweren wegen häufiger Abweichungen und Widersprüche eine eindeutige Stellungnahme zur Frage der Unbedenklichkeit der Anwendung von Cyclamat als Zuckerersatzmittel (13).

Während Schmähl et al. (1, 2) weder eine karcinogene noch eine co-karcinogene Wirkung dieser Süßstoffe nachweisen konnten, stellten Price et al. (3) das Auftreten von Blasenkrebs bei den mit Cyclamat behandelten Ver-

suchstieren fest, und schließlich ist nach der Arbeit von Chowaniec et al. (4) dem Cyclamat eine co-karcinogene Wirkung zuzuschreiben.

Die unterschiedlichen Befunde von Schmähl et al. und Chowaniec et al. hinsichtlich einer möglichen Co-karcinogenität des Cyclamats sind eventuell auf die Unterschiede der angewendeten Testsysteme zurückzuführen. Während Schmähl et al. mit dem System Cyclamat/Butyl-butanol-nitrosamin das Fehlen einer co-karcinogenen Wirkung bewiesen, gelang Chowaniec et al. der Nachweis einer Co-karcinogenität mit der Kombination Cyclamat/N-Methyl-N-nitrosoharnstoff. Zur Erhärtung dieses Befundes weisen die Autoren darauf hin, daß das Cyclophosphamid in Kombination mit N-Methyl-N-nitrosoharnstoff keine Verstärkung der karcinogenen Wirkung des Nitrosamids bewirkt. Im Rahmen reaktionskinetischer Untersuchungen zur Entstehung von N-Nitroso-

verbindungen aus Arzneimitteln bei Einwirkung von salpetriger Säure (14–16) wurde u. a. der Einfluß von Cyclohexylsulfaminsäure auf die Bildung von N-Nitrosoephedrin untersucht (16). Hierbei wurde die Bildung des N-Nitrosoephedrins fast vollständig gehemmt, da die Cyclohexylsulfaminsäure sich rasch mit der salpetrigen Säure umsetzt. Dieser Befund veranlaßte uns, diese Umsetzung näher zu untersuchen, zumal keine Angaben über eine mögliche Karzinogenität bzw. Co-karzinogenität von Cyclamat in Gegenwart von Nitrit bekannt sind.

Das bei der Nitrosierung von Cyclamat primär entstehende N-Nitrosoderivat zerfällt spontan unter Bildung von Schwefelsäure, Stickstoff und Carbonium-Ion, wobei das letzte sich durch Bildung von Cyclohexen und Cyclohexylnitrit stabilisiert (17–20). Im Rahmen der Erforschung einer möglichen karzinogenen bzw. co-karzinogenen Wirkung des Cyclamats ist es von Interesse, die Entstehung und den Zerfall des entsprechenden N-Nitrosoderivats in Abhängigkeit von der Nitritkonzentration sowie der Azidität des Reaktionsmediums zu untersuchen, zumal das strukturell ähnliche und ebenfalls instabile N-Nitrosoderivat des Phenacetins ein direkt wirkendes Karzinogen darstellt (21).

Material und Methoden

Natriumnitrit, Cyclohexanol, Cyclohexen, konzentrierte Salzsäure, Natriumhydroxid, Cyclohexylnitrit und Cyclohexylsulfaminsäure (p. a., Merck). Das Cyclohexylnitrit wurde nach den Angaben von *Dalziel* (17) hergestellt.

Geräte

1. Spektralphotometer (Beckmann-Photometer, Typ DB).
2. Schreiber (Beckmann 10" Recorder), Papiervorschub: 0,2 inch/min. Spannung: 100 mV.
3. Knick Digital-pH Meter.

Herstellung der Natriumnitrit- und Cyclohexylsulfaminsäurelösungen

1. Natriumnitritlösung: 1 g/l dest. Wasser.
2. Cyclohexylsulfaminsäure-Stammlösung: 10 g/l dest. Wasser.

In 100-ml-Meßkolben wurde je 1 ml der Cyclohexylsulfaminsäure-Stammlösung mit 98 ml dest. Wasser verdünnt, die Verdünnung mit wenig (< 1 ml) Salzsäure bzw. Natronlauge unter pH-Messung versetzt, und der Meßkolben mit dest. Wasser auf 100 ml gefüllt. Die so erhaltenen Cyclohexylsulfaminsäurelösungen (100 mg/l) wiesen folgende pH-Werte auf:

1,09; 1,58; 2,18; 2,61; 2,93; 3,30; 3,26; 3,42; 4,06 und 5,10.

Zur Durchführung der Umsetzung (s. u.) wurden je 1,4 ml jeder Lösung mit 10, 20, 30, 40, 50 bzw. 60 µl der Nitritlösung versetzt. Weiterhin wurden die in Tabelle 1 angegebenen Cyclohexylsulfaminsäure-HCl-Lösungen (1,4 ml) mit den entsprechenden Natriumnitritverdünnungen (60 µl) umgesetzt. Hierbei wurde sowohl der pH-Wert der Lösungen (2,61) als auch das Molverhältnis Cyclohexylsulfaminsäure/Natriumnitrit (1/1, 111) konstant gehalten.

Tab. 1. Verdünnungsreihe der Reaktionspartner.

	Cyclohexylsulfaminsäure-HCl-Lösung (pH 2,61) mg/l	Natriumnitrit (mg/l)
1.	50	0,5
2.	25	0,25
3.	12,5	0,125
4.	6,25	0,0625
5.	3,125	0,03125
6.	1,563	0,01563
7.	0,781	0,00781

Um den Verlauf der Umsetzung in Magensaft und Urin zu untersuchen, wurde Cyclohexylsulfaminsäure in drei verschiedenen durch Zentrifugation von Schleim befreiten Magensäften gelöst (50 mg/l). Die pH-Werte dieser Lösungen lagen bei 1,5, 2 und 2,3. Die drei verschiedenen Urinproben (50 mg/l Cyclohexylsulfaminsäure) wurden, wie oben beschrieben, durch Zusatz von wenig Natronlauge auf die pH-Werte 3,8, 4,0 und 5,1 gebracht. Je 1,4 ml dieser Cyclohexylsulfaminsäurelösungen wurde mit je 30 µl der Nitritlösung (1 g/l) versetzt.

Blindversuch

Um den Einfluß der Zerfallsprodukte auf die Bestimmungsmethode zu ermitteln, wurden, unter der Annahme einer 100-prozentigen Ausbeute an dem Zwischenprodukt N-Nitroso-Cyclohexylsulfaminsäure, zu 100 ml einer wässrigen HCl-Lösung (pH 2,61) jeweils 50 µl Cyclohexen, Cyclohexylnitrit und Cyclohexanol zugesetzt. Die erhaltene Lösung wurde gegen Cyclohexylsulfaminsäure-HCl-Lösung (100 mg/l, pH 2,61) photometriert (320–200 nm).

Durchführung

Vorversuche zur reaktionskinetischen Untersuchung der Umsetzung der Cyclohexylsulfaminsäure mit salpetriger Säure mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie haben gezeigt, daß die Umsetzung, besonders mit zunehmender Azidität des Reaktionsmediums, zu rasch verläuft, so daß genaue Ergebnisse nur unter kontinuierlicher Verfolgung des Reaktionsverlaufes erzielbar sind. Aus diesem Grunde wurde die Umsetzung unter kontinuierlicher Messung der Absorption der Reaktionslösung bei 250 nm in einer Halbmikroküvette durchgeführt.

Hierzu wurden bei Raumtemperatur (25°C) je 1,4 ml der oben erwähnten Cyclohexylsulfaminsäurelösungen in eine Halbmikroküvette gegeben, mit der vorgesehenen Menge an Natriumnitritlösung versetzt, und mit Hilfe einer Pasteurpipette der Inhalt der Küvette durch zweimaliges rasches Ansaugen und Entleeren gut vermischt. Die Messung erfolgte gegen eine mit der gleichen Cyclohexylsulfaminsäurelösung gefüllte Referenzküvette. Bei der Durchführung der Umsetzung in stark saurem Bereich (pH 1 und 1,5) darf der Vorgang der Nitritzugabe und der Mischung der Reaktionslösung nicht länger als 3–4 s dauern, da sonst die Ermittlung der für die Auswertung benötigten Peakhöhe (s. u.) wegen Überlagerung von Bildung und Zerfall des N-Nitrosoderivats nicht möglich ist.

Auswertung und Ergebnisse

Wie der Blindversuch gezeigt hat, wird die Bestimmungsmethode durch die Entstehung der Zerfallsprodukte in der Reaktionslösung nicht gestört. Während das Absorptionsmaximum von Cyclohexylnitrit, Cyclohexen und Cyclohexanol unter den Versuchsbedingungen bei 210 nm liegt, zeigt das Nitrosoderivat eine relativ hohe Ab-

sorption mit einem Absorptionsmaximum bei 238 nm (s. Abb. 1).

Da die Umsetzung, besonders in stark saurem Bereich, zu rasch verläuft, ist es nicht gelungen, die Absorptionzunahme von Beginn der Umsetzung an zu verfolgen. Es konnten die Anstiege ab pH 2,5 ermittelt werden. Aus diesem Grund wurde nicht der Anstieg der Kurven bei der Bildung des N-Nitrosoderivats als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern die ermittelbaren Peakhöhen (maximale Absorption) bei jeder Umsetzung verwendet (s. Abb. 2).

Als Maß für die Zerfallsgeschwindigkeit wurde der „Anstieg“ $tg\alpha$ der abfallenden Kurventeile verwendet (s. Abb. 2). Um die Abhängigkeit der Zerfallsgeschwindigkeit von Ausgangskonzentration und pH-Wert zu zeigen, wurden die ermittelten $tg\alpha$ -Werte auf die entsprechenden Peakhöhen bezogen (s. Tab. 2). Zur Ermittlung des pH-Wertes bei dem, trotz Überlagerung der Bildungs- und der Zerfallsgeschwindigkeit, ein optimaler, für eine kurze Zeit vorhandener Anteil an N-Nitrosoderivat entsteht, wurden die ermittelten Peakhöhen gegen die entsprechenden pH-Werte aufgetragen (s. Abb. 3). Es ließ sich ein optimaler pH-Wert von 2,45 ermitteln.

Abb. 1. UV-Spektren der Reaktionslösung unmittelbar (Spektrum 1) nach der Umsetzung von Cyclohexylsulfaminsäure mit Natriumnitrit bei pH 2,18. Die Aufnahme der Spektren 2–6 wurde jeweils 20s nach Beendigung der vorhergehenden durchgeführt. Die Aufnahme jedes Spektrums dauerte 3 min.

Abb. 2. Änderung der Absorption (bei 250 nm) der Reaktionslösungen nach Versetzen von je 1,4 ml Cyclohexylsulfaminsäurelösung (100 mg/l) verschiedener pH-Werte mit jeweils 30 µl-Natriumnitritlösung (100 mg/l). Die Zahlenwerte auf den Kurven geben die pH-Werte der Cyclohexylsulfaminsäurelösungen wieder.

Tab. 2. Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeit zur Bildungsgeschwindigkeit ($tg\alpha$ /Peakhöhe) in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Nitritkonzentration. Je 1,4 ml Cyclohexylsulfaminsäure-HCl-Lösung (100 mg/l) wurden mit 10–60 µl Natriumnitritlösung (1 g/l) versetzt.

pH	Natriumnitritlösung (µl)					
	10	20	30	40	50	60
	$tg\alpha$ /Peakhöhe					
1,09	1,08	0,91	0,801	0,948	0,789	0,779
1,58	0,57	0,53	0,495	0,46	0,474	0,466
2,18	0,37	0,31	0,287	0,263	0,24	0,237
2,61	0,155	0,144	0,135	0,127	0,125	0,125
2,93	0,12	0,011	0,095	0,079	0,069	0,067
3,30	0,0400	0,0409	0,037	0,30	0,024	0,0235

Um die Zerfallsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom pH-Wert zu ermitteln, wurden die errechneten $tg\alpha$ -Werte gegen die entsprechenden pH-Werte graphisch dargestellt (s. Abb. 4). Hieraus läßt sich ableiten, daß das N-Nitrosoderivat bei einem pH-Wert von etwa 4,5 eine relativ hohe Stabilität zeigt.

Die Umsetzungen nach Tabelle 1 zeigten, daß die Erfassungsgrenze dieser Bestimmungsmethode bei der Umsetzung von Cyclohexylsulfaminsäure in der Konzentration von 6,25 mg/l liegt. (4. Verdünnung, Molverhältnis von 1/1,11 beim pH 2,61) (s. Abb. 5 und Tab. 2).

Abb. 3. Maximale Peakhöhe (Absorption) in Abhängigkeit von pH-Wert und Molverhältnis Cyclohexylsulfaminsäure/Natriumnitrit.

Molverhältnis bei Kurve	(1)	1/0,186
	(2)	1/0,371
	(3)	1/0,557
	(4)	1/0,742
	(5)	1/0,927
	(6)	1/1,11

Abb. 4. Abhängigkeit der Zerfallsgeschwindigkeit von pH-Wert.

Abb. 5. Änderung der Absorption (bei 250 nm) der Reaktionslösungen nach Versetzen der Cyclohexylsulfaminsäure-HCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen mit Natriumnitrit im Molverhältnis von 1/1,11. Die Konzentrationsangaben auf den Kurven beziehen sich auf die Cyclohexylsulfaminsäure in der jeweiligen Lösung.

Die Umsetzung in Magensaft und Urin zeigte die gleiche pH-Abhängigkeit. Während die Magensaftproben und die beiden Urinproben entsprechend ihrer Azidität reagierten, ließ sich die Bildung des N-Nitrosoderivats bei der Umsetzung der Urinprobe mit den pH-Wert 5,1 in Übereinstimmung der Ergebnisse bei der Umsetzung wäßriger Proben gleicher pH-Werte nicht eindeutig nachweisen (s. Abb. 2).

Diskussion

Die starke pH-Abhängigkeit der Bildungs- als auch der Zerfallsreaktion läßt sich durch Abbildung 2 veranschaulichen. Während im stark sauren Bereich (pH 1,09 und 1,58) beide Reaktionen rasch verlaufen, zeigt die Zerfallsreaktion beim pH 2,61 eine Halbwertszeit von 11,8 min.

Nach der gleichen Zeitdauer zerfallen beim pH 2,93 lediglich 25 %, während beim pH 3,26 zu diesem Zeitpunkt kein Größenunterschied zwischen Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit vorliegt. Die Abnahme des Wertes des Quotienten $\tan \alpha$ /Peakhöhe mit Zunahme der Nitritkonzentration (s. Tab. 3) ist auf die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen. Die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht sich jedoch nicht nur auf-

grund der Erhöhung der Nitritkonzentration, sondern auch wegen Änderung des pH-Wertes während der Umsetzung durch das Zerfallsprodukt, die Schwefelsäure.

Bei der Durchführung der Umsetzung in schwach saurer Lösung verläuft die protonen-katalysierte Umsetzung langsamer, da hier keine Schwefelsäure entsteht, und der pH-Wert der Reaktionslösung verschiebt sich hierbei aufgrund des langsamen Verbrauches der salpetrigen Säure zugunsten der Stabilität des primären Reaktionsproduktes (s. Tab. 3 und Abb. 2).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit und der von der WHO tolerierten maximalen Belastung des Organismus mit Nitrit (0,4–0,8 mg/kg · d; WHO, Technical Report, 1962) ist es wahrscheinlich, daß Spuren des im Magen gebildeten N-Nitrosoderivats in den stabilisierend wirkenden physiologischen pH-Bereich gelangen können. Weiterhin ist es ebenfalls wahrscheinlich, daß die Cyclohexylsulfaminsäure, die im Harn unverändert ausgeschieden wird (22), sich mit dem Nitrit umsetzt, welches bei infektiösen Erkrankungen der Harnwege als Reduktionsprodukt des Nitrats entsteht (23).

Tab. 3. Änderung des pH-Wertes der Reaktionslösung zum Zeitpunkt 30 min nach Reaktionsbeginn. (Molverhältnis: Cyclohexylsulfaminsäure/Nitrit = 1/1,11).

pH der Cyclohexylsulfaminsäurelösung	pH der Reaktionslösung 30 min nach Reaktionsbeginn
1,09	0,93
1,58	1,45
2,18	1,98
2,61	2,51
2,93	2,80
3,26	3,15
3,30	3,20
3,42	3,87
4,06	4,50
5,10	5,85

Eine Aussage über ein etwaiges Risiko bei der Verwendung von Cyclamat als Zuckerersatzmittel muß tierexperimentellen Untersuchungen mit dem N-Nitroso-derivat bzw. Cyclamat/Nitrit vorbehalten bleiben.

Literatur

- Schmähl, D. (1972), Medical Tribune 14a, 18.
- Schmähl, D. & Krüger, F. W. (1972), Arzneim.-Forsch. 22, 999–1000.
- Price, J. M. Biava, C. G., Oser, B. L., Vogin, E. E., Steinfeld, J. & Ley, H. L. (1970), Science 167, 1131–1132.
- Chowaniec, J., Wakefield, J. St. J. & Hicks, R. M. (1974), Br. J. Cancer 30, 180–181.
- Leonard, A. & Linden, G. (1972), C. R. Soc. Biol. (Paris) 166, 468–470.
- Lorke, D. (1973), Humangenetik 18, 165–170.
- Bauchinger, M., Schmid, E., Pieper, M. & Zöllner, N. (1970), Dtsch. Med. Wochenschr. 95, 2220–2223.
- Green, S., Palmer, K. A. & Legator, M. S. (1970), Fd. Cosmet. Toxicol. 8, 617–623.
- Brower, L. P. (1970), Science 170, 558.
- Bickel, M. H., Burkard, B., Meier-Strasser, E. & von den Broek-Boot, M. (1974), Xenobiotica 4, 425–439.
- Lorke, D. & Machemer, L. (1975), Humangenetik 26, 199–205.
- Dalderup, L. M. & Wisser, W. (1971), Experientia 27, 519–521.
- Beringer, A. (1973), Wien. Med. Wochenschr. 123, 41–48.
- Kinawi, A., Döring, D. & Witte, I. (1977), Arzneim.-Forschung 27, 747–750.
- Kinawi, A., Onken, A., Rozyczka, B. & König, W. (1977), Arzneim.-Forsch. 27, 363–367.
- Kinawi, A. & Schuster, T., Arzneim.-Forschung, 28, 219–225 (1978).
- Dalziel, J. A. W., Johnson, R. M. & Shenton, A. J. (1972), Analyst 97, 719–722.
- Shenton, A. J. & Johnson, R. M. (1973), Analyst 98, 749–754.
- Shenton, A. J. & Johnson, R. M. (1973), Analyst 98, 745–748.
- Shenton, A. J. & Johnson, R. M. (1971), Tetrahedron 27, 1461–1464.
- Eisenbrand, G. & Preussmann, R. (1975), Arzneim.-Forsch. 25, 1472–1475.
- Renwick, A. G. & Williams, R. T. (1972), Biochem. J. 192, 869–879.
- Klinisches Labor, Merck. 11. Auflage (1970), 331–332.

Ass. Prof. Dr. A. Kinawi
Arbeitsgruppe Umweltmutagene
Ostpreußendamm 111
D-1000 Berlin 45

Preis Biochemische Analytik 1978

Die Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie verlieh den „Preis Biochemische Analytik 1978“ zu gleichen Teilen an die Biochemiker Prof. Dr. Jerker Porath, Uppsala (Schweden), und Prof. Dr. Shmuel Shaltiel, Rehovot (Israel), für ihren Beitrag zur Verbesserung der Spezifität der chromatographischen Analytik.

Prof. Pörath hat in früheren Arbeiten bereits entscheidende Grundlagen für die heutigen breiten Anwendungsmöglichkeiten chromatographischer Verfahren in der biochemischen Analytik geschaffen. Der Preis wird Prof. Porath zuerkannt für die Entwicklung zweier neuer chromatographischer Prinzipien: der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie und der Charge-Transfer-Chromatographie. Prof. Shaltiel erhält den Preis für seinen grundlegenden Beitrag zur Theorie und Praxis der Hydrophobchromatographie. Prof. Shaltiel hat damit erstmals Wege gewiesen, chromatographische Verfahren auch auf zelluläre Systeme anzuwenden.