

CHROM. 5879

# DAS GELCHROMATOGRAPHISCHE TRENNVERHALTEN VON POLYSTYROLGEL FÜR KOHLENWASSERSTOFFE, AMINE UND PHENOLE

## PRÄPARATIVE FRAKTIONIERUNG VON CIGARETTENRAUCHKONDENSAT FÜR BIOLOGISCHE VERSUCHE\*

H.-J. KLIMISCH UND D. REESE

*Forschungsinstitut der Cigarettenindustrie e.V., D 2 Hamburg 54 (B.R.D.)\*\**

(Eingegangen am 13. Dezember 1971)

### SUMMARY

*Gel chromatographic separation of hydrocarbons, amines and phenols on a polystyrene gel column. Preparative fractionation of cigarette smoke condensate for biological experiments*

Separations of *cata*- and *peri*-condensed aromatic hydrocarbons, of alkanes, alkenes, phenols, aromatic amines, N-heterocycles, terpenes and fatty acid esters were achieved on a column with the polystyrene gel Bio-Beads SX-8 in tetrahydrofuran. A molecular sieving effect was the predominant factor in the separation. In addition, the separation was influenced by interactions with the gel matrix or reactions with the solvent, depending on the structure of the compounds. The loading capacity was determined by the use of radioactive-labelled compounds. A fraction of cigarette smoke condensate was separated into three subfractions, one of them containing polycyclic aromatic hydrocarbons composed of up to six rings.

### EINLEITUNG

Die Trennleistung der Gel-Permeationschromatographie (GPC) ist in neuerer Zeit verstärkt zur Trennung kleinerer Moleküle herangezogen worden. Über präparative Anwendungen bei der Auftrennung komplexer Stoffgemische von Aminen, Phenolen, aliphatischen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen ist bisher jedoch wenig berichtet worden.

Wahl des Gelträgers und des Lösungsmittels haben neben strukturellen Eigenschaften der Substanzen entscheidenden Einfluss darauf, ob Molekularsieb- oder Adsorptionseffekte das Trennprinzip vorwiegend beeinflussen. So können z.B. die

\* Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf der 25th Tobacco Chemists Research Conference, Louisville, Ky., U.S.A., 6-8. Oktober 1971, vorgetragen.

\*\* Direktor: Prof. Dr. W. DONTENWILL.

biologisch wirksamen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) nach zwei unterschiedlichen Prinzipien aufgetrennt werden: (1) in der Reihenfolge zunehmender Ringgrösse: die Trennung erfolgt in stark polaren Lösungsmitteln unter Elektronenwechselwirkungen mit dem Gelträger<sup>1-3</sup>; (2) in der Reihenfolge abnehmender Ringgrösse: die Trennung erfolgt in weniger polaren Lösungsmitteln nach gelchromatographischem Prinzip<sup>2,4</sup>.

Wir suchten nach einem Trennsystem, das die genannten Substanzklassen und insbesondere die PAH vorwiegend nach Prinzip 2 gelchromatographisch auftrennt. EDSTROM UND PETRO<sup>4</sup> haben eine Reihe PAH mit einer Styragel-Säule untersucht. An Stelle von Styragel verwandten wir ein weniger starr vernetztes Polystyrol, Bio-Beads SX-8, das in Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel einen höheren Quellfaktor und damit ein grösseres Separationsvolumen besitzt. Um das Trennverhalten des Systems kennenzulernen, testeten wir in der vorliegenden Arbeit die Säule zunächst mit 43 Substanzen verschiedener Verbindungsklassen.

Die so gewonnenen Ergebnisse übertrugen wir anschliessend auf die präparative Fraktionierung einer Zigarettenrauchkondensatfraktion<sup>5</sup>, die neben PAH eine Vielzahl anderer Verbindungen wie Paraffine, N-Heterozyklen, Terpene und Pigmentstoffe enthält.

Um Beziehungen zwischen der chemischen Zusammensetzung von Zigarettenrauchkondensat und dessen biologischer Aktivität an der Mäusehaut nachweisen zu können, wurden bislang zahlreiche Versuche unternommen, die wirksamen Substanzen in einer möglichst kleinen Fraktion anzureichern. In letzter Zeit veröffentlichte Untersuchungen geben Anlass zu der Feststellung, dass bei adsorptionschromatographischen Trennsystemen ein Verlust an biologischer Aktivität durch chemische Veränderung des Kondensates oder durch irreversible Adsorption am Trägermaterial eingetreten sein könnte<sup>6-8</sup>. Daher wurde die GPC, deren Trennleistung vorwiegend auf Ausschlusseffekten und weniger auf Adsorptionswirkungen beruht, zur weiteren Fraktionierung angewandt.

## MATERIAL UND METHODE

### Apparatur

Bio-Beads SX-8, 200-400 mesh (Bio-Rad Laboratories), Ausschlussgrenze 1000, wurde in THF (frisch über KOH destilliert und unter Stickstoffbegasung gehalten) gequollen.

Als Trennsäulen benutzten wir folgende Säulen der Fa. Chromatonic: (a) 24.5 × 1090 mm, Geleinswaage 150 g,  $V_t^*$  417 ml,  $V_0^{**}$  171 ml, Elutionsgeschwindigkeit 120 ml/h; (b) 50 × 1090 mm, Geleinswaage 600 g,  $V_t$  1725 ml,  $V_0$  692 ml, Elutionsgeschwindigkeit 200 ml/h.

Als Detektoren wurden ein Spektralphotometer PMQ II (Fa. Zeiss) mit Durchflussküvette und das Differentialrefraktometer Lamidur (Winopal-Forschung) eingesetzt.

Die Säulen wurden mit radioaktiv-markierten Substanzen geeicht, die im Flüssigkeits-Scintillator Ansitron II (Picker-Nuclear) vermessen wurden.

\*  $V_t$  = Gesamtvolumen.

\*\*  $V_0$  = Volumen ausserhalb der Gelpartikel.

*Trennverhalten von Testsubstanzen*

Zur Prüfung des Trennvermögens der Säule bestimmten wir das Elutionsvolumen ( $V_e$ ) der in Tabelle I genannten Substanzen, die gelöst in THF nacheinander aufgetragen und eluiert wurden.

*Belastbarkeit*

Die Belastbarkeit der Säulen wurde auf zwei Arten bestimmt: (1) das Elutionsvolumen ( $V_e$ ) der Eichsubstanz 1,2,5,6-Dibenzanthracen wurde allein und unter Zusatz von steigenden Mengen Naphthalin als Belastschubstanz ermittelt; (2) die Elutionsvolumina ( $V_e$ ) der Lösungen von  $[9-^{14}\text{C}]$ Anthracen bzw.  $[^3\text{H}]$ Benzo[*a*]pyren in je 10 ml THF wurden einzeln und unter Zusatz von 4 g Hexanfraktion VII eines Cigarettenrauchkondensates<sup>8</sup> gemessen.

*Fraktionierung von Cigarettenrauchkondensat*

Als Eichstandard wurde 1,2,5,6-Dibenzanthracen, gelöst in THF, aufgetragen und der Beginn der Elution von der Säule a mit 925 ml bestimmt. Dieser Eichwert wurde jeweils als Fraktionierungsschnitt festgelegt. Danach wurde die Säule mit einer 50% Lösung von 4.2 g Hexanfraktion VII<sup>8</sup> in THF auf die Säule gegeben. Mit einem Schnitt bei 925 ml und einem Endvolumen von 1300 ml wurden zwei Fraktionen eluiert und die Ausbeuten nach dem Einengen gravimetrisch bestimmt. Die zweite Schnittfraktion wurde noch zweimal als 50% Lösung in THF unter gleichen Bedingungen aufgetrennt und die Ausbeuten ermittelt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das ausgewählte Trennsystem Bio-Beads SX-8/THF sollte die genannten Inhaltsstoffe des Cigarettenrauchkondensates nach gelchromatographischen Prin-

TABELLE I

## ELUTION DER TESTSUBSTANZEN

An Säule a (siehe im Text *Apparatur*).

Substanz	MG	$V_M$	$V_e$ (ml)	Symbol
<i>Alkane</i>				×
n-Hexan	86	131.6	233	
n-Heptan	100	147.5	236	
n-Octan	114	162.3	230	
n-Dodecan	170	227.0	219	
n-Eicosan	282	359.8	190	
<i>Alkene</i>				○
2-Decen	140	188.5	225	
1-Dodecen	168	226.8	220	
1-Eicosen	280	356.0	192	
<i>kata-Aromaten</i>				■
Benzol	78	88.9	281	
Naphthalin	128	125.0	271	
Anthracen	178	160.2	256	
Naphthacen	228	196.0	238	

(Fortsetzung auf S. 302)

TABELLE I (Fortsetzung)

Substanz	MG	$V_M$	$V_e$ (ml)	Symbol
<i>kata-peri-Aromaten</i>				□
Dibenzo[a,h]pyren	302	—	254	
Benzo[a]pyren	252	203.7	252	
Pyren	228	171.5	269	
<i>peri-Aromaten</i>				△
Coronen	300	228	271	
Benzo[g,h,i]perylene	275	219	266	
Perylen	252	202	261	
<i>Methyl-kata-Aromaten</i>				◆
Toluol	92	105.6	263	
1-Methylnaphthalin	142	141.9	259	
9-Methylantracen	192	162.6	249	
<i>Äthyl-kata-Aromaten</i>				○
Äthylbenzol	106	120.5	253	
1-Äthyl-naphthalin	156	153.1	249	
9-Äthylantracen	206	—	239	
<i>Aromatische Amine</i>				●
Anilin	93	91.8	238	
1-Aminonaphthalin	143	141.5	230	
1-Aminoanthracen	193	241.3	225	
<i>N-Heterozyklen</i>				●
Pyridin	79	80	270	
Chinolin	129	118.0	261	
Acridin	179	—	251	
Dibenz[a,h]acridin	279	—	234	
Carbazol	167	151.5	230	⊖
Dibenzo[a,g]carbazol	267	—	215	
<i>Phenole</i>				▲
Phenol	94	87.6	234	
2-Hydroxynaphthalin	144	131.4	228	
Resorcin	110	95.8	214	
Pyrogallol	126	86.8	200	
<i>Terpene u. Fettsäureester</i>				
Stearinsäuremethylester	298	—	178	
Ölsäuremethylester	296	—	186	
Linolsäuremethylester	294	—	191	
Linolensäuremethylester	292	—	195	
Limonen	136	—	229	
Squalen	410	—	171	

zipien trennen. Um das Elutionsverhalten der Säule a zu charakterisieren, testeten wir daher die in der Tabelle I aufgeführten Reinsubstanzen.

Zur Interpretation der Elutionsbefunde wurden die halblogarithmischen Systeme Log Molekulargewicht (MG) bzw. Molvolumen ( $V_M$ ) und die Elutionsvolumina ( $V_e$ ) herangezogen<sup>9</sup>. Dabei ergaben sich für Alkane (Kurve I) und Alkene (Kurve II) in Fig. 1 und 2 nur geringfügig parallelverschobene Kurvenverläufe, die eine Elution nach dem Prinzip des Molekularsiebeffektes beweisen.

Bei aromatischen Verbindungen beeinflussen dagegen Strukturmerkmale das Elutionsverhalten. *Kata*-kondensierte Aromaten der Acenreihe (Kurve III, Fig. 1, 2)

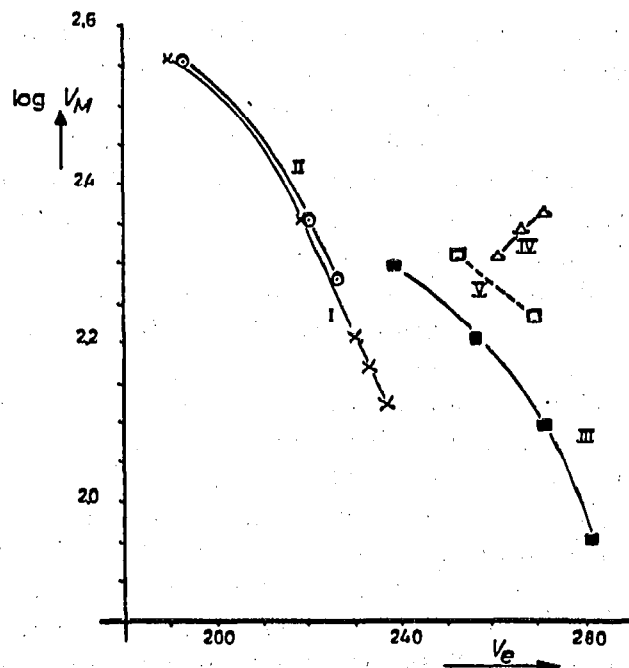
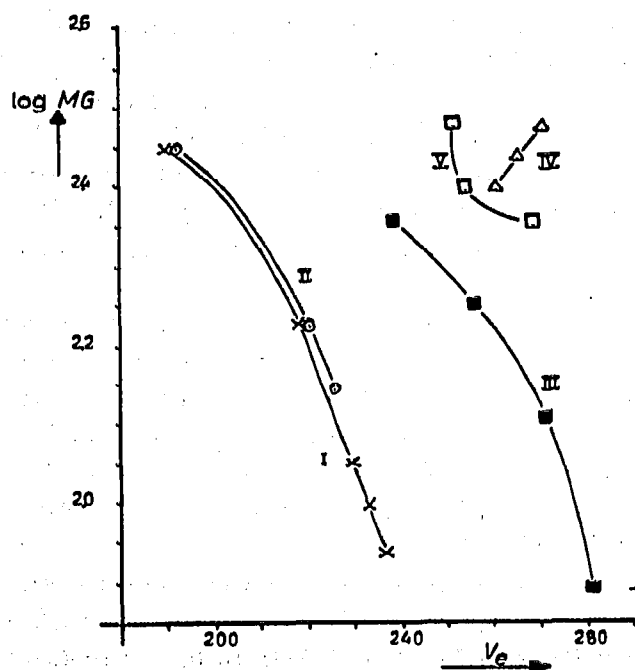


Fig. 1. Log Molekulargewicht *vs.* Elutionsvolumen von Testsubstanzen der Tabelle I.  $\times$  (Kurve I) = Alkane;  $\circ$  (Kurve II) = Alkene;  $\blacksquare$  (Kurve III) = *kata*-Aromaten;  $\triangle$  (Kurve IV) = *peri*-Aromaten;  $\square$  (Kurve V) = *kata-peri*-Aromaten.

Fig. 2. Log Molvolumen *vs.* Elutionsvolumen von Testsubstanzen der Tabelle I.  $\times$  (Kurve I) = Alkane;  $\circ$  (Kurve II) = Alkene;  $\blacksquare$  (Kurve III) = *kata*-Aromaten;  $\triangle$  (Kurve IV) = *peri*-Aromaten;  $\square$  (Kurve V) = *kata-peri*-Aromaten.

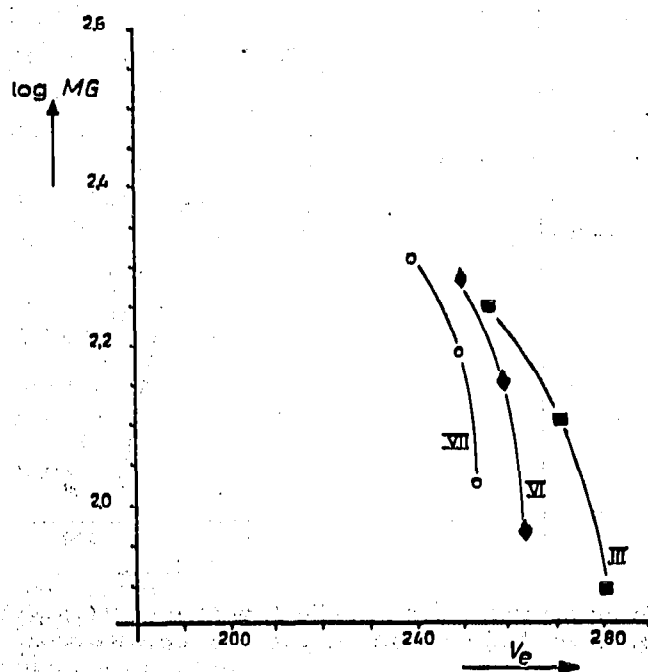


Fig. 3. Log Molekulargewicht *vs.* Elutionsvolumen von Testsubstanzen der Tabelle I.  $\blacksquare$  (Kurve III) = *kata*-Aromaten;  $\blacklozenge$  (Kurve VI) = Methyl-*kata*-Aromaten;  $\circ$  (Kurve VII) = Äthyl-*kata*-Aromaten.

zeigen einen zu höheren Elutionsvolumina verschobenen Kurvenverlauf. Ähnlich den Befunden an quervernetztem Dextran als Gelträger<sup>6</sup> dürften auch hier energetische Wechselwirkungen an der Matrix für eine Verzögerung der Elution verantwortlich sein. Für eine solche Annahme sprechen die Untersuchungen an Methyl- (Kurve VI) und Äthyl-Aromaten (Kurve VII), die in Fig. 3 in Relation zum unsubstituierten Aromaten dargestellt worden sind. Beide Beziehungen nähern sich wieder mehr der Alkanfunktion, was einer Verminderung energetischer Wechselwirkungen unter dem Einfluss einer Alkylkette entspricht.

*Peri*-kondensierte Aromaten (Kurve IV, Fig. 1, 2) unterliegen wie in anderen Trennsystemen<sup>9</sup> dem überwiegenden Einfluss energetischer gegenüber geometrischen Faktoren. Der Kurvenverlauf zeigt daher einen Anstieg des Elutionsvolumens mit zunehmendem Molekulargewicht bzw. Molvolumen. Bei Verbindungen mit *kata*- und *peri*-Kondensation ergibt sich bei den ausgewählten Beispielen (Kurve V, Fig. 1, 2) ein zunehmender Einfluss des *peri*-Strukturtyps, gekennzeichnet durch eine Krümmung der Kurve von der *kata*- zur *peri*-Funktion.

Im Vergleich zu den unsubstituierten Aromaten liegt das Elutionsvolumen der Phenole (Kurve VIII, Fig. 4) zu niedrig und zeigt keine linearen Zusammenhänge. Ähnliche Beobachtungen sind in der Literatur<sup>10,11</sup> bei Alkoholen, aliphatischen Aminen und Carbonsäuren beschrieben worden. Der Grund liegt in der Ausbildung von Assoziationskomplexen durch Wasserstoffbrückenbindung der Phenole mit dem Lösungsmittel THF. Damit vergrößert sich das Molvolumen. Zählt man dem Molvolumen der phenolischen Verbindung je nach Anzahl der Phenolfunktion

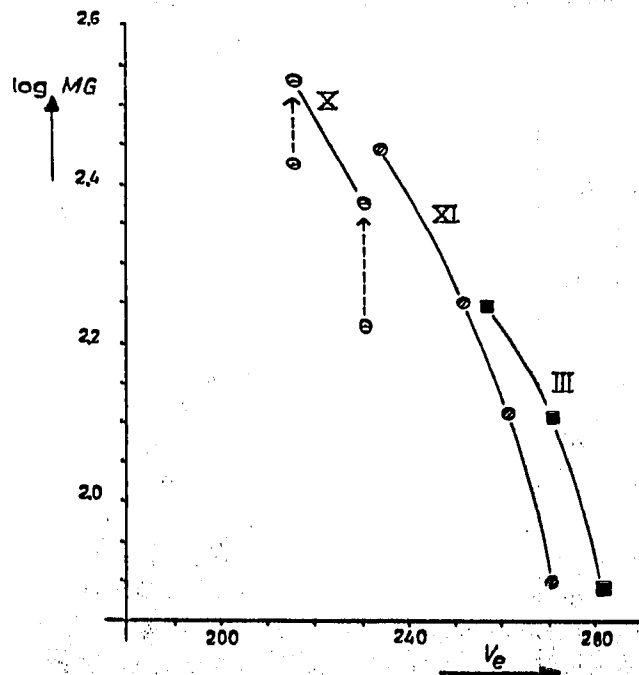
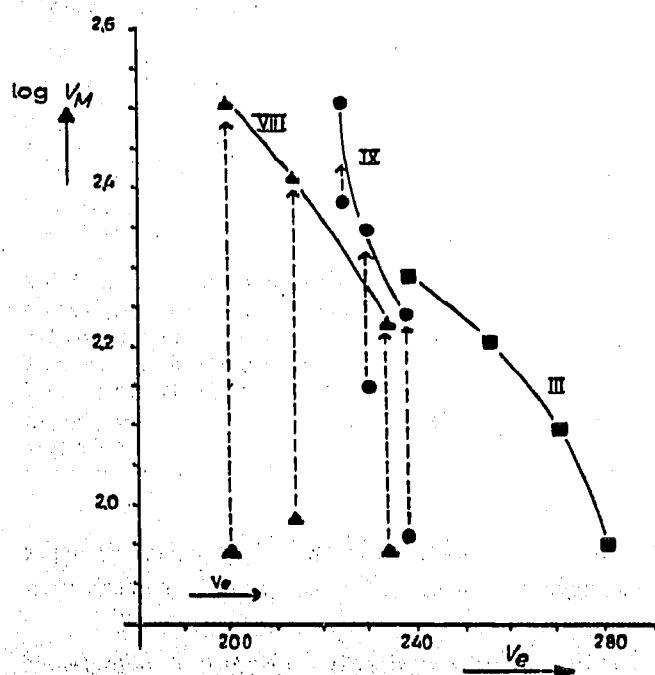


Fig. 4. Log Molvolumen vs. Elutionsvolumen von Testsubstanzen der Tabelle I. ■ (Kurve III) = *kata*-Aromaten; ▲ (Kurve VIII) = Phenole; ● (Kurve IX) = aromatische Amine. Kurven VIII und IX nach Korrektur der Molvolumina.

Fig. 5. Log Molekulargewicht vs. Elutionsvolumen von Testsubstanzen der Tabelle I. ■ (Kurve III) = *kata*-Aromaten; ⊙ (Kurve X) = N-Heterozyklen des Carbazoltyps; ● (Kurve XI) = N-Heterozyklen. Kurve X nach Korrektur der Molekulargewichte.

TABELLE II

ELUTIONSVOLUMEN VON 1,2,5,6-DIBENZANTHRACEN UNTER ZUSATZ STEIGENDER MENGEN NAPHTHALIN

An Säule a (siehe im Text *Apparatur*).

1,2,5,6-Dibenzanthracen ( $\mu\text{g}$ )	Naphthalin-Zusatz (mg)	$V_e$ max. (ml)
200	—	276
200	250	277
200	500	277
200	750	276

das  $\alpha$ -fache Molvolumen des THF's hinzu, so liegen die Werte (Kurve VIII, Fig. 4) in der Nähe der zugrundeliegenden Aromatenkurve. Dieselbe Erklärung gilt auch für die aromatischen Amine (Kurve IX, Fig. 4) und für N-Heterozyklen des Carbazoltypes (Kurve X, Fig. 5), die nach Korrektur ihrer Molvolumina bzw. Molekulargewichte in der Nähe der Kurven für Aromatenstrukturen (Kurve III) bzw. N-Heterozyklen (Kurve XI, Fig. 5) liegen.

Die Kurven der N-Heterozyklen (XI) und der Alkylaromaten (VI, VII) sind im Vergleich zu den ähnlich kondensierten *kata*-Aromaten alle in Richtung zu den Alkanen (Kurve I) "parallelverschoben". Wahrscheinlich werden mit abnehmend aromatischem Charakter auch hier die Einflüsse energetischer Wechselwirkungen zum Gelträger und damit die Unterschiede zu den Alkanen geringer. Testuntersuchungen von Terpenen und Fettsäureestern (Tabelle I) zeigen in der Beziehung Elutionsvolumen/Molekulargewicht keine Unterschiede zu Alkanen.

Das System Bio-Beads SX-8/THF trennt also die in der Zigarettenrauchkondensat-Hexanfraktion VII nachgewiesenen Substanzgruppen vorwiegend nach gelchromatographischen Prinzipien, wobei energetische Wechselwirkungen beteiligt sein können. Es würde zur weiteren Auftrennung einer Kondensatfraktion herangezogen.

Entscheidende Untersuchungen bei der Umstellung auf den präparativen Masstab galten der Belastbarkeit des Säulensystems. Dabei zeigte es sich, dass sich das Elutionsvolumen von 1,2,5,6-Dibenzanthracen (Tabelle II) bei der Zugabe von

TABELLE III

ELUTIONSVOLUMEN VON TESTSUBSTANZEN Z.T. UNTER ZUSATZ VON ZIGARETTENRAUCHKONDENSAT  
An Säule b (siehe im Text *Apparatur*). Zusatz von Zigarettenrauchkondensat-Hexanfraktion VII.

Substanz	$V_e$ (ml)		
	Beginn	Maximum	Ende
Anthracen	1023	1066	1125
[9- $^{14}\text{C}$ ]Anthracen	1019	1070	1130
[9- $^{14}\text{C}$ ]Anthracen + 4.0 g Kondensat	1020	1075	1145
Benzo[a]pyren	987	1038	1096
[ $^3\text{H}$ ]Benzo[a]pyren	990	1035	1102
[ $^3\text{H}$ ]Benzo[a]pyren + 4.0 g Kondensat	992	1043	1117

Naphthalin nicht änderte. Die Konstanz im Elutionsvolumen blieb auch dann erhalten, wenn die Säule b mit 4 g der Cigarettenrauchkondensatfraktion belastet war. Wie die Elutionswerte in Tabelle III zeigen, schwanken die Werte für den Elutionsbeginn oder das Elutionsmaximum von [ $^3\text{H}$ ]Benzo[a]pyren und [ $^{14}\text{C}$ ]Anthracen mit und ohne Kondensatbelastung um 91–98%. Die Säule dürfte also noch höher belastbar sein. Aus der aufgetragenen Kondensatmenge errechnet sich eine Belastbarkeit von 7 mg Substanz auf 1 g Trockengel. Im Vergleich zu adsorptionschromatographischen Trennverfahren ist diese hohe Konstanz im Elutionsvolumen einer Substanz charakteristisch für das gelchromatographische Trennprinzip und durch die damit gegebene hohe Reproduzierbarkeit von grossem Vorteil für die Fraktionierung von komplexen Stoffgemischen wie Cigarettenrauchkondensat.

Ziel der anschliessenden Auftrennung einer Cigarettenrauchkondensatfraktion sollte es sein, eine Trennung unter Bezug auf die biologisch aktiven PAH so festzulegen, dass PAH bis zu einem *kata*-Kondensationsgrad von sechs Ringen von Substanzen mit grösserem Molvolumen abgetrennt werden.

Als Eichsubstanz der 6-Ring-PAH, die das kleinste Elutionsvolumen zeigte, verwandten wir 1,2,5,6-Dibenzanthracen. Auf Grund der nachgewiesenen Konstanz im Elutionsvolumen auch bei Kondensatbelastung bestimmten wir den Beginn der Elution dieser Testsubstanz mit 925 ml und legten mit diesem Wert die Schnittgrenze der beiden Fraktionen fest. Nach 1300 ml ist die Elution beendet. Die Säule a ist danach wieder farblos.

Bei einer Einwaage von 4.2 g Hexanfraktion VII<sup>8</sup> ergab sich folgende Fraktionierung: 1. Schnittfraktion: 0–925 ml, Auswaage 2.85 g (66.4%); 2. Schnittfraktion: 926–1300 ml, Auswaage 1.45 g (33.6%). Die eingeeengte 2. Schnittfraktion wurde nochmals an der Säule fraktioniert und dieser Schritt ein drittes Mal wiederholt. Bezogen auf die Einwaage von 4.2 g ergaben sich die prozentuellen Verteilungen: 2. Fraktion, 33.6%, 20.7%, 19.8% mit 1., 2., 3. Lauf; 1. Fraktion, 66.4%, 79.3%, 80.2% mit 1., 2., 3. Lauf. Während ein zweiter Fraktionierungsschritt noch eine Verbesserung der Trennung erbrachte, blieb das Verhältnis beim dritten Mal fast gleich. Dass bei der nachgewiesenen Konstanz im Elutionsvolumen überhaupt noch eine Nachtrennung erfolgt, liegt wahrscheinlich an einem reduzierten Trennvermögen von Substanzen mit grösserem Molvolumen. Mit abnehmendem Diffusionskoeffizienten steht diesen Verbindungen ein kleineres Separationsvolumen zur Verfügung. Dieser Effekt könnte zu einer Bandenverbreiterung für grössere Moleküle führen. Die Trennschärfe des Systems liesse sich durch Verlängerung der Säule oder durch ein Recycle-Verfahren vergrössern.

Bei fünf Testfraktionierungen erwies sich die Reproduzierbarkeit des gelchromatographischen Trennverfahrens bei einer Standardabweichung von 0.9% als günstig. Die Variationsbreite lag bei  $R = 2\%$ .

#### ZUSAMMENFASSUNG

An dem System eines Polystyrolgels Bio-Beads SX-8 in Tetrahydrofuran wurden Trennungen von *kata*- und *peri*-kondensierten Aromaten, von Alkanen, Alkenen, Phenolen, aromatischen Aminen, N-Heterozyklen, Terpenen und Fettsäureestern untersucht. Neben den vorwiegend molekularsiebenden Trenneffekten können je



nach Strukturtyp der Verbindung energetische Wechselwirkungen mit dem Gelträger oder Reaktionen mit dem Lösungsmittel die Trennung beeinflussen. Nach Belastbarkeitsprüfungen des Systems z.T. mit radioaktiv markierten Substanzen wurde eine Cigarettenrauchkondensatfraktion so aufgetrennt, dass eine Fraktion die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe bis zu einem Kondensationsgrad von sechs Ringen enthält.

## LITERATUR

- 1 M. WILK, J. ROCHLITZ UND H. BENDE, *J. Chromatogr.*, 24 (1966) 414.
- 2 C. A. STREULI, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 219.
- 3 R. L. STEDMAN, J. MILLER, L. LAKRITZ UND W. J. CHAMBERLAIN, *Chem. Ind. (London)*, (1968) 394.
- 4 P. EDSTROM UND B. A. PETRO, *J. Polym. Sci. C*, (1968) 171.
- 5 H.-J. KLIMISCH UND L. STADLER, *J. Chromatogr.*, 67 (1972) 291.
- 6 J. K. WHITEHEAD UND K. ROTHWELL, *Brit. J. Cancer*, 23 (1969) 840.
- 7 J. MILLER, W. J. CHAMBERLAIN UND R. L. STEDMAN, *Tobacco Sci.*, 14 (1970) 27.
- 8 F. G. BOCK, A. P. SWAIN UND R. L. STEDMAN, *Beitr. Tabakforsch.*, 5 (1970) 109.
- 9 H. H. OELERT UND J. H. WEBER, *Erdoel und Kohle*, 23 (1970) 484.
- 10 J. CAZES UND D. R. GASKILL, *Sep. Sci.*, 4 (1969) 15.
- 11 G. D. EDWARDS UND Q. Y. NG, *J. Polym. Sci. C*, 21 (1968) 105.

*J. Chromatogr.*, 67 (1972) 299-307