

CHROM. 9202

ZUR TRENNUNG N-HETEROPOLYZYKLISCHER AROMATISCHER KOHLENWASSERSTOFFE VON POLYZYKLISCHEN AROMATISCHEN KOHLENWASSERSTOFFEN

ABTRENNUNG DURCH IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE UND FRAKTIONIERUNG VON ZIGARETTENRAUCHKONDENSAT

H.-J. KLIMISCH* und A. BEISS

Forschungsinstitut der Cigarettenindustrie e.V., Gazellenkamp 38, D-2000 Hamburg 54 (B.R.D.)

(Eingegangen am 19. November 1975; geänderte Fassung eingegangen am 12. März 1976)

SUMMARY

Separation of N-heteropolycyclic aromatic hydrocarbons from polycyclic aromatic hydrocarbons. Separation by ion-exchange chromatography and fractionation of cigarette smoke condensate

Chromatography on strong acidic or strong basic ion exchangers of Sephadex gels enables separation of a mixture into N-heteropolycyclic aromatic hydrocarbons aza-PAH (acridine type), aza-PAH (carbazole type) and PAH. Compounds sorbed on the ion exchangers can be eluted by addition of acids and bases to the solvent. By liquid-liquid distribution procedures a concentrate of aza-PAH and PAH is produced from cigarette smoke condensate. This concentrate is separated by column chromatography on Sephadex ion exchangers into three fractions which should contain aza-PAH (carbazole type), aza-PAH (acridine type) and PAH.

EINLEITUNG

Aza-analoge Verbindungen der polzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH), im folgenden N-heteropolzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Aza-PAH) genannt, kommen stets als Begleitstoffe zusammen mit den PAH, aber in geringeren Konzentrationen als diese vor. Sie wurden in Erdöl^{1,2}, in Automobilabgasen^{3,4} und auch im Zigarettenrauch nachgewiesen^{5,6}.

Es ist mit verschiedenen Verfahren versucht worden, eine Trennung der Aza-PAH von den PAH vorzunehmen, um eindeutige Nachweise erbringen und Aussagen über ihre biologische, eventuell carcinogene Wirksamkeit machen zu können.

Bei ersten Versuchen durch Adsorptionschromatographie an Kieselgel bzw. Aluminiumoxiden^{3,4,7} oder spezifischer mit Magnesiumoxidträgern⁸ konnten keine

* Anschrift: BASF-WPF-Tox, D-6700 Ludwigshafen, B.R.D.

vollständigen Abtrennungen erreicht werden. So gelang zwar Popl *et al.*⁹ die dünn-schichtchromatographische Abtrennung der Aza-PAH mit niedriger Ringzahl an Platten mit saurem Aluminiumoxid, die Aza-PAH mit höherem Kondensationsgrad liessen sich bei den PAH ähnlichen R_f -Werten dagegen nicht abtrennen. Das gleiche gilt für Trennungen durch Komplexchromatographie^{2,10,11}, wobei ebenfalls speziell höher kondensierte PAH nicht von Aza-PAH zu trennen waren.

Alberini und Mitarbeiter² versuchten Lösungsmittel-Verteilungssysteme zur Abtrennung der beiden Stoffklassen einzusetzen, könnten aber ebenso keine scharfe Trennung einiger PAH von Aza-PAH erreichen. Die Abtrennung basischer Aza-PAH von PAH und Nichtbasischen Aza-PAH gelang z.B. durch Extraktion mit 90% Ameisensäure¹³. In allen Fällen waren die Versuche nicht erfolgreich, nichtbasische polzyklische Stickstoffverbindungen (z.B. Carbazoltyp) abzutrennen.

Erste Erfolge einer dünnsschichtchromatographischen Abtrennung der Aza-PAH von PAH und aliphatischen Kohlenwasserstoffen hatten Brocco und Mitarbeiter⁴ an silanisierten Kieselgelen. Bei diesem System zeigten sich die ersten Tendenzen, die Trennvorteile nicht adsorptionschromatographischer Trennprinzipien einzusetzen.

Snyder und Mitarbeiter^{15,16} setzen erstmals Ionenaustauscher in Verbindung mit einer linearen Elutionschromatographie ein, um durch solche Kombinationsverfahren Aza-PAH von Gemischen aus parafinischen Kohlenwasserstoffen und PAH abzutrennen.

Lederer und Roch¹⁷ prüften eine Reihe von Systemen an Cellulosepapieren und Polyamiden zur Trennung der Aza-PAH. In letzter Zeit haben sich ähnliche chemische Strukturträger, nämlich organische Gele auf der Basis quervernetzter Dex-trane (Sephadex® Typen, Pharmacia, Frankfurt, B.R.D.) bei der Chromatographie von PAH bewährt. Durch die Ausbildung von π -Donatorkomplexen dieser Gele mit den PAH wird eine ausserordentlich hohe Selektivität im Trennverhalten dieser Systeme erreicht¹⁸⁻²⁰. Dieser Effekt ist in vielen Variationen zur Abtrennung der PAH von anderen Verbindungsklassen²¹ ausgenutzt worden.

Es lag daher nahe, dieses chromatographische Verhalten in Verbindung mit Ionenaustauschereffekten zur Trennung komplexer Gemische in PAH, nichtbasische Aza-PAH und basische Aza-PAH einzusetzen. Wir beschreiben daher Versuche zur Trennung dieser Stoffgemische an sauren und basischen Sephadex-Ionenaustauschern und wenden das Verfahren bei der Anreicherung und Abtrennung von Aza-PAH aus Zigarettenrauchkondensatfraktionen an.

MATERIAL UND METHODEN

Chromatographie an stark sauren Ionenaustauschern (System I)

SP-Sephadex C-25 (Pharmacia) Ionenaustauscher wurde laut Gebrauchsanweisung mit Essigsäure-Natriumacetat-Puffer (pH 5) aktiviert und in eine Säule 1.27×32 cm (Chromatronix) mit PTFE-Stempeln und PTFE-Schlauchverbindungen bis auf eine Gelbett Höhe von 18.7 cm in Methanol eingefüllt. Die gefüllte Säule wurde eine Stunde mit Methanol gespült. Über ein Probendosierventil wurden $10-15 \mu\text{l}$ der im Lösungsmittel gelösten Reinsubstanzen an Aza-PAH bzw. PAH aufgetragen und von jeder Substanz das Elutionsvolumen bestimmt. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Vario Perplex, LKB) wurde eine Durchflussrate von 100 ml/h eingestellt, die Substanzen mit Hilfe eines UV-Detektors (Hewlett-Packard, Modell 1032 A)

nachgewiesen und auf einem Schreiber (Kompensograph III, Siemens) aufgezeichnet. Bei der Chromatographie der basischen Aza-PAH wurde mit Methanol bis zu einem Elutionsvolumen von 100 ml entwickelt und danach auf das Lösungsmittel 1% Essigsäure-Methanol umgestellt. Die angegebenen Elutionsvolumina der basischen Aza-PAH beziehen sich auf 1% Essigsäure-Methanol als Elutionsmittel.

Chromatographie an stark basischen Ionenaustauschern (System II)

QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) Ionenaustauscher wurde laut Gebrauchsanweisung aktiviert und in eine Säule 1.27×32 cm (Chromatronix) bis auf eine Gelbett Höhe von 23.8 cm in Cyclohexan gefüllt. Alle weiteren chromatographischen Bedingungen waren wie oben beschrieben. Bei der Chromatographie der nichtbasischen Aza-PAH (Carbazoltyp) wurde bis 100 ml mit Cyclohexan entwickelt und danach auf das Lösungsmittel 1% Triäthylamin in Cyclohexan umgestellt. Die angegebenen Elutionsvolumina der nichtbasischen Aza-PAH beziehen sich auf das Elutionsmittel 1% Triäthylamin in Cyclohexan.

Fraktionierung von Zigarettenrauchkondensat durch Flüssig-Flüssig-Verteilungsverfahren

10 g Zigarettenrauchkondensat wurden in 300 ml Methanol unter geringfügigem Erwärmen gelöst, der Wassergehalt dieses Gemisches auf 10% eingestellt und nach bekannten Verfahren²² einer Flüssig-Flüssig-Verteilungsmethode mit Cyclohexan eine Methanolphase II und eine Cyclohexanphase III gewonnen. Aus der Cyclohexanphase III wurde nach veröffentlichten Methoden²³ ein PAH-Konzentrat VII auf folgende Weise gewonnen: Flüssig-Flüssig-Verteilung Nitromethan-Cyclohexan und Gel-Verteilungschromatographie an Sephadex LH-20 mit dem Lösungsmittelsystem *n*-Hexan-85% Methanol.

Die Methanolphase II und die Methanolphase VI werden vereinigt, auf einen Wassergehalt von 50% eingestellt und dreimal mit dem gleichen Volumen *n*-Hexan ausgeschüttelt. Die vereinigten Hexanphasen werden dreimal mit je 50 ml Wasser ausgeschüttelt, mit Na₂SO₄ getrocknet und bei 15 Torr Wasserstrahlvakuum und 40° Wasserbadtemperatur eingeengt. Der Rückstand dieser *n*-Hexanphase wurde mit dem PAH-Konzentrat VII vereinigt und wie folgt beschrieben durch Chromatographie an Sephadex-Ionenaustauschern getrennt.

Fraktionierung an stark sauren Ionenaustauschern

PAH-Konzentrat VII und *n*-Hexanphasenrückstand wurden zusammen in doppelter Volumenmenge Methanol gelöst und Anteile auf eine wie in System I präparierte Säule injiziert. Bis 110 ml wurde mit Methanol eluiert (Fraktion X) und danach mit 300 ml 1% Essigsäure-Methanol Fraktion XI gewonnen. Beide Fraktionen wurden getrennt unter standardisierten Bedingungen (40° und 15 Torr) eingeengt.

Fraktionierung an stark basischen Ionenaustauschern

Die eingeengte Fraktion X wurde in Cyclohexan gelöst und über eine wie in System II präparierte Säule chromatographiert. Bis 100 ml wurde mit Cyclohexan eluiert (Fraktion XII) und anschliessend mit 300 ml 1% Triäthylamin in Cyclohexan als Lösungsmittel Fraktion XIII abgetrennt. Beide Fraktionen wurden unter standardisierten Bedingungen (40° und 15 Torr) eingeengt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Chromatographie der Aza-PAH an sauren bzw. basischen Ionenaustauschern konnte ein deutlicher Unterschied im Trennverhalten einzelner Aza-PAH-Typen beobachtet werden. Je nach der Basizität des Stickstoffs im heterozyklischen System differenzierten sich zwei Typen heraus: Der Carbazoltyp, dessen Stickstoff keinen basischen Charakter mehr besitzt, und der Acridintyp mit noch deutlich basischem Reaktionsverhalten. Dementsprechend konnte mit Hilfe basischer und saurer Ionenaustauscher eine Trennung in die drei Gruppen PAH, Aza-PAH Carbazoltyp und Aza-PAH Acridintyp erreicht werden.

Abtrennung basischer Aza-PAH (Acridintyp) von sauren Aza-PAH (Carbazoltyp) und PAH

An einer Säule des sauren Ionenaustauschers SP-Sephadex blieben, wie aus den Elutionswerten der Tabelle I ersichtlich, die basischen Aza-PAH sorbiert und könnten erst durch Zusatz von 1% Essigsäure zum Elutionsmittel eluiert werden.

TABELLE I

ELUTIONSVOLUMINA VON PAH UND AZA-PAH NACH CHROMATOGRAPHIE AN SAUREN (I UND II) UND BASISCHEN (III UND IV) IONENAUSTAUSCHERN

I = System I, saurer Ionenaustauscher (Lösungsmittel Methanol); II = System I, saurer Ionenaustauscher (Methanol-1% Essigsäure); III = System II, basischer Ionenaustauscher (Cyclohexan); IV = System II, basischer Ionenaustauscher (Cyclohexan-1% Triäthanolamin). — = nicht eluierbar unter den angegebenen Versuchsbedingungen.

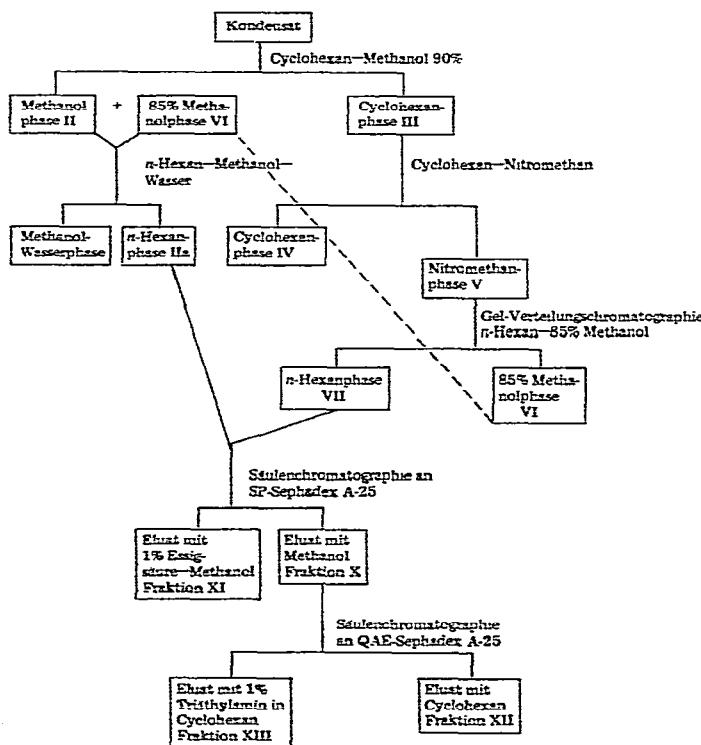
Substanz	Elutionsvolumen (ml)			
	I	II	III	IV
Anthracen	9.2		16.6	17.7
Chrysen	9.2		17.2	
Benz[a]pyren	9.2	9.3	18.3	
Coronen	9.4		18.6	
N-Methylindol	—			
Chinolin	—	74.1		
Isochinolin	—		17.0	
4-Azafluoren	—	74.2	17.2	
1-Azapyren	—	78.4	17.0	17.5
7,3-Benzo-Chinolin	—	80.4	16.3	
Acridin	—	83.0	15.7	17.5
1,2-Benzacridin	—	134.2	17.2	18.2
3,4-Benzacridin	—	136.5	17.3	18.0
6,9-Dimethyl-1,2-Benzacridin	—	198.1	17.2	
Dibenzo[a,h]acridin	—	266.4		
Dibenzo[a,j]acridin	—	267.8	18.0	18.3
Indol	9.2		—	74.8
Carbazol	9.2	9.4	—	98.3
Norharman	9.1	9.3	—	99.4
Harman	9.1		—	91.4
Acridan	9.3			
2,3-Benzcarbazol	9.4		—	112.4
3,4,5,6-Dibenzcarbazol	9.4		—	124.8
1,2,7,8-Dibenzcarbazol	9.4	9.5	—	127.3

Setzt man nur so geringe Säuremengen dem Lösungsmittel zu, so kann sogar eine verhältnismässig gute Auftrennung dieser basischen Aza-PAH des Acridin-Typs erreicht werden. Ein höherer Zusatz an Säure verkleinert das Elutionsvolumen der Aza-PAH, verschlechtert aber deren Auftrennung erheblich.

Abtrennung der Aza-PAH (Carbazol-Typ) von PAH

Setzt man dagegen einen basischen Ionenaustauscher QAE-Sephadex ein, so sind die Aza-PAH des Carbazol-Typs nicht von der Säule eluierbar und können somit von Neutralstoffen wie z.B. den PAH abgetrennt und anschliessend durch Elution mit einem basischen Lösungsmittel wieder gewonnen werden (Tabelle I). Ein ähnliches Elutionsverhalten zeigten diese Verbindungen auch, wenn statt Cyclohexan ein offenkettiger, aliphatischer Kohlenwasserstoff, wie z.B. *n*-Hexan als Lösungsmittel gewählt wurde. Statt durch Zusatz einer Base (1 % Triethylamin) lassen sich die Aza-PAH auch durch Umstellen auf ein Elutionsmittel höherer Polarität, wie z.B. Essigsäureäthylester glatt von der Ionenaustauschersäule eluieren. Da das Quellverhalten der Gele in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität aber sehr verschieden ist, kann dieses Verhalten bei der Verwendung automatischer Säulensysteme die Handhabung erschweren.

Mit Hilfe der hier angewandten Methoden der Ionenaustauscher-Chromatographie mit organischen Gelen, deren Trennverhalten gegenüber polzyklischen Kohlenwasserstoffen sehr selektiv ist, gelingt eine Trennung eines Gemisches in Aza-PAH (Acridintyp), Aza-PAH (Carbazoltyp) und PAH. Am Beispiel eines so komplexen



Fraktionierungsschema

TABELLE II

VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN EINIGER AZA-PAH IM SYSTEM *n*-HEXAN/METHANOL-WASSER (1:1)

C_H = Konzentration in *n*-Hexan; C_{M+W} = Konzentration in Methanol-Wasser (1:1).

Substanz	Verteilungskoeffizient C_H/C_{M+W}
Carbazol	3.94
3,4,5,6-Dibenzcarbazol	23.41
Acridin	9.21
Dibenzo(a,h)acridin	107

Vielkomponentengemisches wie Zigarettenrauchkondensat soll diese Methodik zur Trennung eines Konzentrates von Aza-PAH und PAH in die drei Typklassen angewandt werden.

Anreicherung und Trennung einer Fraktion des Zigarettenrauchkondensates mit PAH und Aza-PAH

Während sich die neutralen PAH aufgrund günstiger Verteilungskoeffizienten gut von polareren Begleitstoffen und paraffinischen Kohlenwasserstoffen (siehe Fraktionierungsschema und Lit. 22, 23) abtrennen lassen, so gelingt dieses Verfahren der Flüssig-Flüssig-Verteilung mit dem gleichen System bei den Aza-PAH nicht. Bereits beim ersten Verteilungsschritt im System Cyclohexan-Methanol 90% würden z.B. das Dibenzo[a,h]acridin zu 46%, das Dibenzo[c,g]carbazol sogar zu 77.5% in der Methanolfraktion vorhanden sein, während die PAH zu 98-99% in der Cyclohexanphase angereichert werden. Um aber sowohl die PAH als auch die Aza-PAH in einer möglichst gewichtsanalytisch kleinen Fraktion zusammenanzureichern, hat sich folgendes Verfahren bewährt: Die PAH werden, wie bekannt (siehe Fraktionierungsschema), in der *n*-Hexanphase VII angereichert.

Aufgrund günstiger Verteilungskoeffizienten (Tabelle II) empfiehlt sich zur Anreicherung der Aza-PAH eine Flüssig-Flüssig-Verteilung im System *n*-Hexan/Methanol-Wasser (1:1)²⁴. Nach drei Ausschüttelungen sind z.B. vom Carbazol mit den ungünstigsten Verteilungskoeffizienten 99.2% in der *n*-Hexanphase angereichert. Daher werden alle polaren Phasen des Fraktionierungsganges, die Anteile an Aza-PAH enthalten können, vereinigt und einer Flüssig-Flüssig-Verteilung im System *n*-Hexan/Methanol-Wasser (1:1) unterworfen. Die auf diese Weise gewonnenen 3.6% Gewichtsanteile des Kondensates (Tabelle III) sollten die restlichen Anteile

TABELLE III

GEWICHTSANALYTISCHE AUSBEUTE EINIGER FRAKTIONEN EINES ZIGARETTEN-RAUCHKONDENSATES

Faktion	Ausbeute (%)
Methanolfraktion II	77.3
<i>n</i> -Hexanphase VII	3.7
<i>n</i> -Hexanphase IIa	3.6

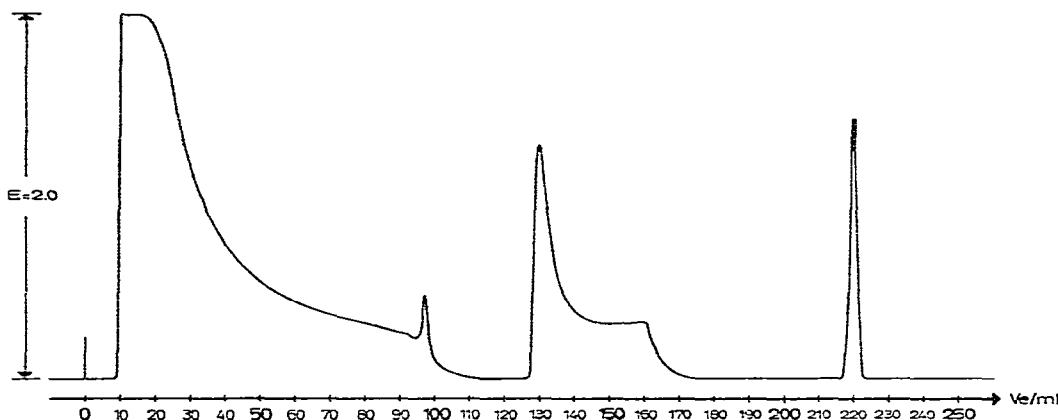


Fig. 1. Elutionschromatogramm eines Zigarettenrauchkondensates. Abtrennung basischer Aza-PAH (Acridintyp) an einer Säule mit SP-Sephadex C-25 Ionenaustauscher. Nach 110 ml Elutionsvolumen Methanol wurde auf das Lösungsmittel 1% Essigsäure in Methanol umgestellt.

der Aza-PAH enthalten, so dass beide *n*-Hexanphasen (VII und IIa) zusammen ein Konzentrat der PAH und Aza-PAH des Zigarettenrauchkondensates darstellen.

Anteile dieses Konzentrates wurden nun analog den Trennsystemen der Aza-PAH an Ionenaustauschern chromatographisch aufgetrennt. Im ersten Schritt (Fraktionierung an stark sauren Ionenaustauschern) wurden basische Aza-PAH des Acridintyps von den übrigen Verbindungen einschliesslich Aza-PAH (Carbazoltyp) und PAH abgetrennt. Wie aus der Fig. 1 ersichtlich, lassen sich mit 1% Essigsäure in Methanol UV-absorbierende Substanzen, die auch fluoreszieren, von der Säule eluieren und damit vom Vorlauf, der die Aza-PAH (Carbazoltyp) und PAH enthalten sollte, abtrennen. Anschliessend wurde mit dem System des basischen Ionenaustauschers der konzentrierte und wieder injizierte Vorlauf chromatographisch in PAH und Begleitstoffe und Aza-PAH (Carbazoltyp) getrennt. Die Identifizierung dieser Aza-PAH sollte mit Feintrennungsmethoden der Hochdruckflüssigkeitschromatographie oder mit dem System Gaschromatographie-Massenspektrometrie möglich sein.

Durch die Trennung des Konzentrates aus Zigarettenrauchkondensat ist ausserdem eine Möglichkeit gegeben, in biologischen Versuchen zu untersuchen, inwieweit die Aza-PAH an der carcinogenen Aktivität des Zigarettenrauches oder speziell einer biologisch aktiven Fraktion des Zigarettenrauches, die PAH enthält, beteiligt sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch eine Chromatographie an stark sauren bzw. stark basischen Ionenaustauschern der Sephadexgele gelingt eine Auftrennung eines Gemisches in Aza-PAH (Acridintyp), Aza-PAH (Carbazoltyp) und PAH. Die an den Ionenaustauschergelen sorbierten Verbindungen können durch Zusatz von Säuren oder Basen wieder eluiert werden. Durch Flüssig-Flüssig-Verteilungsverfahren wird ein Konzentrat von Aza-PAH und PAH aus Zigarettenrauch-Kondensat hergestellt. Dieses Konzentrat wird mit Hilfe des säulenchromatographischen Verfahrens an Sephadex-Ionenaustauschern in drei Fraktionen getrennt, die Aza-PAH (Carbazoltyp), Aza-PAH (Acridintyp), und PAH mit Begleitstoffen enthalten sollten.

LITERATUR

- 1 R. L. Snyder, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 1940.
- 2 H. H. Oelert und A. D. Giehr, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 465.
- 3 E. Sawicki, J. E. Meeker und M. Morgan, *Arch. Environ. Health*, 11 (1965) 773.
- 4 E. Sawicki, S. P. McPherson, T. W. Stanley, J. Meeker und W. C. Elbert, *Int. J. Air Water Pollut.*, 9 (1965) 515.
- 5 G. Neurath, *Arzneim.-Forsch.*, 19 (1969) 1093.
- 6 D. Hoffmann, G. Rathkamp und S. Nesnow, *Anal. Chem.*, 41 (1969) 1256.
- 7 E. Sawicki, *Mikrochem. J.*, 8 (1964) 257.
- 8 L. K. Keefer und D. A. Johnson, *J. Gas Chromatogr.*, 47 (1970) 20.
- 9 M. Popl, V. Dolanský und J. Mosteky, *J. Chromatogr.*, 74 (1972) 51.
- 10 D. M. Jewell und R. E. Snyder, *J. Chromatogr.*, 38 (1968) 351.
- 11 G. K. Hartung und D. M. Jewell, *Anal. Chim. Acta*, 27 (1962) 219.
- 12 G. Alberini, V. Cantuti und G. P. Cartoni, in A. B. Littlewood (Herausgeber), *Gas Chromatography 1966*, Institute of Petroleum, London, S. 258.
- 13 K. Rothwell und J. K. Whitehead, *Chem. Ind. (London)*, (1969) 1628.
- 14 D. Brocco, A. Cimmino und M. Possanzini, *J. Chromatogr.*, 84 (1973) 371.
- 15 L. R. Snyder und B. E. Buell, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 767.
- 16 L. R. Snyder und B. E. Buell, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 1295.
- 17 M. Lederer und G. Roch, *J. Chromatogr.*, 31 (1967) 618.
- 18 M. Wilk, J. Rochlitz und H. Beade, *J. Chromatogr.*, 24 (1966) 414.
- 19 C. A. Streuli, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 225.
- 20 H.-J. Klimisch und D. Reese, *J. Chromatogr.*, 80 (1973) 266.
- 21 H.-J. Klimisch, *Z. Anal. Chem.*, 264 (1973) 275.
- 22 H. Elmenhorst und G. Grämer, *Z. Krebsforsch.*, 71 (1968) 66.
- 23 W. Dontenwill, H.-J. Chevalier, H.-P. Harke, H.-J. Klimisch, H. Brune, B. Fleischmann und W. Keller, *Z. Krebsforsch.*, 85 (1976) 155.
- 24 D. Hoffmann und G. Rathkamp, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 366.
- 25 H.-J. Klimisch: unveröffentlichte Mitteilung.