

87. Sur la composition chimique de la fumée du tabac

III. La fraction acide et l'uréthanne

par J. Bonnet et S. Neukomm.

(2 III 57)

I. Introduction.

Comme suite à l'étude des composés neutres¹⁾ et alcalins²⁾, éventuellement cancérigènes, contenus dans la fumée de cigarette, nous avons entrepris l'étude de la fraction acide.

Les cancérigènes susceptibles de se trouver dans cette fraction peuvent être des phénols, des acides aromatiques et deux quinones: la p-benzoquinone et la naphthoquinone-1,4.

L'étude analytique des phénols et des acides aromatiques a été faite avec le goudron recueilli par le procédé décrit dans notre premier mémoire¹⁾. Les deux quinones se détruisant rapidement dans le condensat de la fumée de cigarette, comme nous l'avons constaté, nous avons recherché la p-benzoquinone en recueillant la fumée selon un procédé particulier. Quant à la naphthoquinone-1,4, nous avons dû renoncer à la rechercher (voir sous § III).

En complément (voir sous § IV), une étude spéciale a été faite en vue de rechercher l'uréthanne (carbamate d'éthyle), substance reconnue cancérigène dans certaines conditions³⁾ et qui, parmi les composés aliphatiques cancérigènes très peu nombreux³⁾⁴⁾, est le seul qui nous paraisse susceptible de se trouver dans la fumée de cigarette.

II. Analyse de la fraction acide.

1. *Les composés colorés en brun.* Les goudrons acides, comme les goudrons neutres et alcalins, contiennent une quantité importante de produits colorés en brun. Leurs propriétés physiques et chimiques sont identiques à celles déjà observées et déjà décrites lors de l'étude des fractions neutre et alcaline.

A nouveau, nous avons conclu qu'il s'agissait de substances polymérisées.

¹⁾ J. Bonnet & S. Neukomm, Helv. **39**, 1724 (1956).

²⁾ J. Bonnet & S. Neukomm, Helv. **40**, 113 (1957).

³⁾ J. L. Hartwell, Survey of Compounds Which Have Been Tested for Carcinogenic Activity, P. H. S., Bethesda (Md) 1951.

⁴⁾ Cancer Res.; Proceed. Amer. Soc. Cancer Res.; Brit. J. Cancer (1948—1956).

2. Extraction et séparation de la fraction acide en cinq sous-fractions.

De la solution benzénique, dans laquelle les goudrons de la fumée de 500 cigarettes ont été absorbés¹⁾, on extrait les goudrons acides par NaOH 1-n. La solution aqueuse basique est acidifiée par HCl conc. Les sous-fractions sont obtenues comme suit:

GA-I: extraction à l'éther de pétrole (Eb. 50—60°). *GA-II*: par extraction au benzène. *GA-III*: par extraction à l'éther. *GA-IV*: par extraction par un mélange d'alcools éthylique et butylique 1:5. *GA-V*: est la solution aqueuse résiduaire.

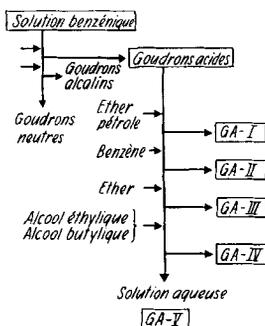


Fig. 1.

A) *Fraction GA-I*. Nous avons fait trois séparations chromatographiques: de la fraction globale (fig. 2, Schéma A) sur Al_2O_3 neutre; des substances à fonctions phénoliques (fig. 2, Schéma B) sur Al_2O_3 alcalin et des substances devenant neutres par estérification (fig. 2, Schéma C), sur Al_2O_3 neutre. Le mode d'éluat et les volumes des différents solvants utilisés sont indiqués sur la fig. 2.

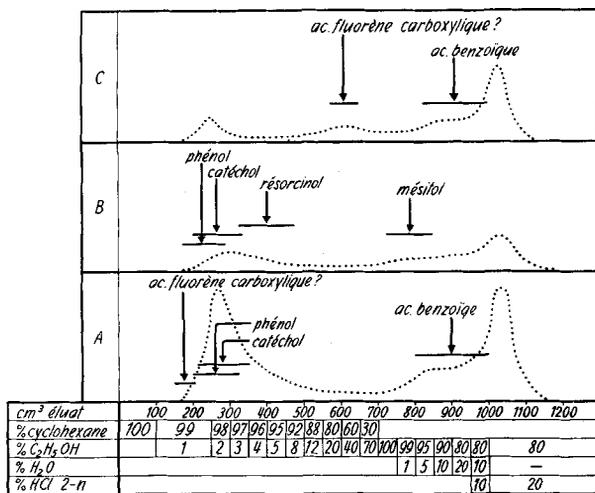


Fig. 2.

..... Absorption de fond au spectrophotomètre.

Remarque: Sur les schémas de chromatographie (fig. 2), l'absorption de fond est marquée par des courbes en pointillé. Pour établir ces courbes, on a mesuré pour chaque éluat la dilution nécessaire pour que la transmission optique fût de 80% à 300 m μ .

Al₂O₃ neutre: Obtenu à partir de Al₂O₃ alcalin standardisé (utilisé précédemment) par lavage par HCl 2-n., puis par CH₃OH et par 24 h de réactivation à 200°.

Séparation des phénols et des acides carboxyliques par estérification. On ajoute au goudron 20 cm³ de C₂H₅OH abs. et 0,5 cm³ de H₂SO₄ conc. et chauffe 8 h au bain-marie à 80°; on ajoute 50 cm³ d'eau, on alcalinise et on extrait les esters par l'éther. On acidifie et on extrait les phénols par l'éther, dont le résidu d'évaporation est chromatographié (fig. 2, B). Les esters sont hydrolysés pendant 4 h par NaOH 2-n. bouillant, on acidifie la solution aqueuse et on extrait les acides par l'éther. Après évaporation du solvant, le résidu est chromatographié (fig. 2, C).

Résultats: Nous avons identifié les substances éluées par leurs spectres d'absorption (comparaison avec ceux de substances connues), la préparation de dérivés solides purs ayant échoué en raison de la présence des polymères colorés. Comme unique vérification analytique nous avons recherché si l'élution des divers composés identifiés dans GA-I était semblable à celle de substances connues, en présence des polymères.

a) *Phénols*. 1. *Phénol*.

2. *Pyrocatéchol* qui est élué presque en même temps que le phénol.

3. *Résorcinol* qui est élué après le catéchol, bien qu'ils aient des constantes de dissociation identiques. Le résorcinol n'est pas visible au spectrophotomètre lors de la séparation de la fraction GA-I globale.

4. *Mésitol* qui se comporte dans la séparation chromatographique sur Al₂O₃ alcalin comme une substance à groupement carboxylique faiblement acide. Ce comportement s'explique par le fait que l'hydrogène de la fonction phénolique est activé par les trois groupes méthyle. Il n'est pas visible lors de la séparation de la fraction GA-I globale.

b) *Acides aromatiques*: 1. *Acide benzoïque*.

2. *Un acide ou un mélange d'acides fluorène-carboxyliques* (?). Le spectre d'absorption de cette substance présente des maxima à 348, 317 et 301 m μ . Cette substance, n'ayant que un ou des groupements carboxyliques comme fonction acide (elle devient neutre par estérification), et se trouvant en quantité trop faible pour nous permettre d'en faire un dérivé solide, nous l'avons soumise à la décarboxylation sur CaO, pour savoir de quel hydrocarbure aromatique elle était dérivée. A cet effet, les éluats dans lesquels on observe au spectrophotomètre l'acide inconnu sont réduits à petit volume. On ajoute à cette solution 5 à 10 mg d'acide benzoïque qui dilue l'acide inconnu et empêche sa destruction complète lors de la décarboxylation. On verse la solution dans un tube à essai contenant environ 5 cm³ de CaO en grain et évapore le solvant au bain-marie. On chauffe fortement le tube à essai, placé horizontalement, sur flamme nue, de telle façon qu'au refroidissement CaO soit légèrement gris. On lave la masse froide par du cyclohexane. On chromatographie sur Al₂O₃ cette solution réduite à petit volume, en éluant par du cyclohexane.

En plus du benzène, nous avons observé une substance dont le spectre et le comportement chromatographique sont ceux du fluorène. Et, comme dans les conditions de décarboxylation décrites, l'acide benzoïque n'a jamais donné d'autres composés que le benzène, nous avons conclu que l'acide inconnu était un acide fluorène-carboxylique.

Remarque: Nous n'avons pas étudié les substances aliphatiques à groupements carboxyliques se trouvant dans la fumée de cigarette, substances qui ont déjà été étudiées dans le tabac⁵⁾ et qui ne présentent pas d'activité cancérigène. Ces acides aliphatiques sont volatilisés lors de la combustion du tabac et doivent se retrouver dans le goudron, à condition d'être stables à la chaleur.

B) *Fraction GA-II*. La séparation chromatographique a été faite sur Al₂O₃ alcalin, dans une colonne de 250 sur 15 mm. L'élution a été faite comme pour GA-I, mais avec

⁵⁾ C. Neuberger & J. Burkard, Biochem. Z. **243**, 472 (1932); J. A. Bradford, E. S. Harlow & H. R. Hanmer, Ind. Eng. Chemistry **29**, 45 (1937); A. Wenusch, Pharm. Zbl. **76**, 297 (1935).

des quantités de solvant doubles de celles qui sont indiquées sur la fig. 2. Nous avons observé trois substances: le phénol, le pyrocatechol et l'acide benzoïque, qui se trouvaient déjà dans GA-I. Il n'y a pas de substances aromatiques nouvelles.

C) *Fractions GA-III, -IV et -V.* Nous n'y avons pas trouvé de substances à spectres caractéristiques de composés aromatiques.

III. Recherche de la *p*-benzoquinone.

La *p*-benzoquinone et la naphthoquinone-1,4 se détruisent rapidement, ainsi que nous l'avons constaté, dans le condensat global de la fumée de cigarette qui est pourtant acide (pH 5 env.). Pour pouvoir rechercher ces deux substances, il est indispensable de les transformer dans la fumée, avant sa condensation. N'ayant pas trouvé d'hydroquinone et de dihydroxy-1,4-naphtalène dans la fraction acide, nous avons essayé de réduire d'emblée en phénols correspondants les deux substances que nous voulions rechercher.

Un courant de SO₂ injecté dans la fumée convient bien, grâce à la présence de vapeur d'eau, pour transformer la *p*-benzoquinone en hydroquinone. Mais la naphthoquinone-1,4 exige un réducteur beaucoup plus énergique; nous avons dû renoncer à la rechercher, n'ayant pas trouvé de procédé utilisable pour sa transformation en composé stable dans la fumée de cigarette.

Mode opératoire: Dans notre appareil à fumer¹⁾ on fait arriver au bas du cylindre A, qui porte les cigarettes, du SO₂ gazeux à raison de 1 l/min environ. On fait fumer les cigarettes et on recueille la fumée comme précédemment. Puis on vide le benzène contenu dans les colonnes et lave tout l'appareillage par de l'éther.

On lave les solutions organiques par HCl 1-n., puis on en extrait les substances acides par NaOH 1-n. On réunit les solutions aqueuses alcalines qu'on acidifie et qu'on extrait à l'éther. Dans le résidu de distillation de l'éther, on sépare les phénols des acides selon le procédé décrit sous GA-I.

Le résidu contenant les phénols de 500 cigarettes est analysé comme la sous-fraction GA-I riche en phénols.

Résultat: A côté des phénols de GA-I nous avons trouvé une substance nouvelle, dont le spectre et le comportement chromatographique sont ceux de l'hydroquinone. Elle est éluee après le résorcinol.

En conclusion, nous pouvons dire que la fumée sortant de la cigarette contient très probablement de la *p*-benzoquinone.

IV. Recherche de l'uréthane.

L'uréthane ne pouvant pas se former, mais risquant plutôt de se détruire, au cours de la combustion de la cigarette, nous avons recherché ce composé dans le tabac fermenté, mais nos recherches ont abouti à un résultat négatif.

Mode opératoire: On extrait le tabac de 300 cigarettes par de l'éther jusqu'au moment où ce dernier n'est plus que faiblement coloré en jaune. On distille l'éther de telle manière que la température du résidu de distillation ne dépasse pas 40°. On sépare le résidu de distillation par chromatographie sur Al₂O₃ neutre, dans une colonne de 300 sur 20 mm. On élue par de l'éther, on recueille des éluats de 50 cm³.

La recherche de l'uréthanne dans les éluats se fait par sublimation : on élimine d'abord la plus grande partie de l'éther par distillation ; on verse le résidu dans l'appareil à sublimer ; on évapore sous vide le restant de l'éther, puis à pression normale ou sous léger vide, on sublime en chauffant le récipient extérieur à 60° environ et en refroidissant à +5° au moins le récipient intérieur, sur lequel l'uréthanne peut se déposer sous forme de cristaux incolores. Nous n'avons toutefois pas trouvé d'uréthanne. — Dans les essais avec des surcharges de 5 et 10 mg, ce composé se trouvait principalement dans l'éluat 6 et en faible quantité dans les éluats 5 et 7.

V. Discussion.

La fraction acide du condensat de la fumée de cigarette, testée sur l'animal, est cancérigène⁶⁾. Elle est composée d'une part de substances polymérisées colorées et d'autre part de substances à structures bien définies non cancérigènes³⁾⁴⁾. Dans ce condensat, la p-benzoquinone et éventuellement la naphthoquinone-1,4, présentes dans la fumée, sont détruites ou se sont combinées avec d'autres composés contenus dans la fumée. Les effets biologiques ne peuvent donc pas être dus aux quinones et l'on est conduit ainsi à penser que ce sont les substances polymérisées qui sont responsables du pouvoir cancérigène de la fraction acide.

Un raisonnement identique peut être tenu pour la fraction alcaline qui est maintenant reconnue cancérigène⁶⁾ et dans laquelle on trouve d'une part des substances polymérisées et d'autre part des substances à structures bien définies reconnues non cancérigènes.

RÉSUMÉ.

Dans la fraction acide du condensat de la fumée de cigarette nous n'avons pas pu déceler de substances définies dont l'activité cancérigène soit reconnue. Une partie importante de cette fraction est constituée par des produits polymérisés qui pourraient être tenus pour responsables du pouvoir cancérigène certain de la fraction acide globale. Dans le condensat de la fumée de cigarette obtenu par un procédé spécial, on a trouvé de l'hydroquinone, ce qui rend probable la présence de p-benzoquinone dans la fumée de cigarette.

Centre anticancéreux romand (Lausanne)
Service des Recherches expérimentales
Dir. Dr. S. Neukomm, P. D.

⁶⁾ E. L. Wynder & G. Wright, *Proceed. Amer. Assoc. Cancer Res.* **2**, n° 2, 159 (1956); S. Neukomm, *Oncologia* **10**, 137 (1957).