

272. Die Bestimmung des 3,4-Benzpyrens auf photographischem Wege

von Heinz Kastien und René Tomingas

(6. VI. 66)

In einer Zeit, in der der Lufthygiene mehr Beachtung geschenkt wird als früher, gewinnen auch die Nachweismethoden cancerogener Stoffe immer mehr an Bedeutung. Die cancerogenen polycyclischen Aromaten, die in Luftstäuben, Tabakrauch, in Motorabgasen und auch – wie in neueren Arbeiten gezeigt wird – in Lebensmitteln gefunden werden, treten im allgemeinen nur in sehr geringen Mengen auf. Zur Identifizierung von μg Mengen ist die Chromatographie bestens geeignet. Obwohl sich die aromatischen Polycyclen auf einem Chromatogramm nicht anfärben lassen, so bereitet weder ihre chromatographische Auftrennung noch ihre Identifizierung eine Schwierigkeit, da sie unter dem UV.-Licht eine deutliche Fluoreszenz zeigen.

Die nachfolgende Bestimmungsmethode bezieht sich in erster Linie auf 3,4-Benzpyren; lässt sich jedoch auch auf andere fluoreszierende Kohlenwasserstoffe ausdehnen; dies wurde durch Bestimmung von 1,2-Benzpyren und Anthracen bestätigt.

Schon 1948 gibt FISHER [1] an, dass die Fleckengrösse eines chromatographierten Stoffes seiner Konzentration proportional ist. Der Fehler wird mit 10–15% angegeben. Dieser relativ hohe Fehler erklärt sich aus der Tatsache, dass die Intensität der Flecke, in diesem speziellen Fall die *Fluoreszenzintensität*, nicht berücksichtigt wird.

Es lag daher nahe, neben der Bestimmung der Fleckengrösse die Intensität der Fluoreszenz in die quantitative Bestimmung einzubeziehen. PIETZSCH & BUECHNER [2] ermittelten die Fluoreszenzintensität auf photographischem Wege, jedoch fehlt leider in der Arbeit eine exakte Beschreibung der Methode und auch die Angabe, wie die quantitative Bestimmung durchgeführt wurde. Wir versuchten nun eine Methode auszuarbeiten, die es gestattet – ausgehend von einem Negativ eines im UV.-Licht photographierten Papierchromatogramms – den Gehalt an mehrkernigen Aromaten zu bestimmen.

Arbeitsweise. – A. *Anfertigung einer Eichkurve:* Auf ein Blatt Chromatographiepapier (SCHLEICHER & SCHÜLL, 2043 b 21 ac) vom Format 24×16 cm werden 3 cm vom unteren Rand je $5 \mu\text{l}$ von folgenden vier benzolischen 3,4-Benzpyrenlösungen im Abstand von 3 cm zueinander aufgetragen: In 100 ml Benzol sind 2 mg (Lös. 1), 1 mg (Lös. 2), 0,67 mg (Lös. 3) und 0,5 mg (Lös. 4) 3,4-Benzpyren der Firma FLUKA gelöst.

Als Laufmittel dient ein Gemisch von Äther:Methanol:Wasser (4:4:1), mit dem zunächst die Atmosphäre des Chromatanks gesättigt wird, Laufzeit bei 20°C ca. 4 Std.; Rf-Wert des 3,4-Benzpyrens: 0,07 bis 0,075. Die Chromatogramme werden an der Luft getrocknet und – da nach einigen Tagen die Fluoreszenz der Flecke stark nachlässt – *sofort* photographiert (Fig. 1) und die Fleckengrösse mit einem Planimeter ausgemessen. Als UV.-Lampe dient eine HERAEUS-Quecksilber-Hochdrucklampe mit einer Wellenlänge von 366 nm. Die verwendete Kleinbildkamera trägt einen BW-UV-

Filter und Vorsatzlinsen, die eine formatfüllende Aufnahme des Chromatogramms zulassen. Filmmaterial: Blauempfindlicher AGEPE-Film der Firma AGFA; die Fluoreszenz des 3,4-Benzopyrens liegt im Bereich des blauen Lichts. Zur Photographie der Chromatogramme muss durch Probeaufnahmen die Belichtungszeit ermittelt werden; bei zu hoher Schwärzung der Negative – die Flecke erscheinen schwarz auf transparentem Untergrund – ist eine Auswertung unmöglich, da Fluoreszenzminimum und -maximum sehr flach verlaufen. Die Negative müssen daher im mittleren Graubereich liegen.



Fig. 1.
*Konzentrationsreihe von 3,4-Benzopyren,
im UV.-Licht photographiert*

B. Erstellung der Graukeilkurve: Zur Umrechnung der Schwärzungsgrade der Negative in Konzentrationen ist noch das Negativ eines Graukeils erforderlich. Als Vorlage dient ein 30stufiger $\sqrt{2}$ -Graukeil, der im Blaulicht photographiert wurde (Fig. 2) bei einer Beleuchtung mit einer normalen Glühbirne unter Vorschaltung eines AGFA-Blaufilters No. 562. Der Graukeil muss unbedingt mit der *gleichen* Belichtungszeit und Blende photographiert werden wie die Konzentrationsreihe. Um auf dem Negativ die gleichen Abstufungen zu erhalten, wie sie das Positiv aufweist, wird die Beleuchtungsstärke der Glühbirne mit einem Widerstand einreguliert. Graukeil und Konzentrationsreihe werden auf dem gleichen Film aufgenommen und gleichzeitig entwickelt, um unsystematische Fehler zu vermeiden.

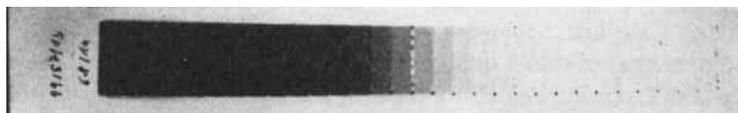


Fig. 2. $\sqrt{2}$ -Graukeil

C. Auswertung der Konzentrationsreihe und des Graukeils: Die Negative des Graukeils und der Konzentrationsreihe laufen nun durch ein Mikrophotometer, dessen Schreiber die Transparenz des Negativs zu dessen Vorschub aufträgt. Das Negativ des Graukeils ergibt eine Treppenkurve. Die Pikhöhen dieser Kurve werden auf der Ordinate gegen die Beleuchtungseinheit ($\log E = \text{Nummer der Graustufe} \times 0,15$) auf der Abszisse aufgetragen. Man erhält die $\sqrt{2}$ -Graukeilkurve (Fig. 3). Die Auswertung

der Negative der Verdünnungsreihe ergibt eine Reihe fallender Pike (Fig. 4). Aus der erstellten Graukeilcurve und den Pikhöhen der Verdünnungsreihe wird die Eichkurve aufgestellt. Die Pikhöhen der Verdünnungsreihe werden auf der Graukeilcurve abgegriffen und der dazugehörige $\log E$ gesucht. Der $\log E$ wird auf der Abszisse gegen die Konzentrationen der 3,4-Benzpyrenlösungen aufgetragen. Die so erhaltene Kurve gibt die Beziehung zwischen 3,4-Benzpyrenkonzentration und Belichtungseinheit wieder (Fig. 5).

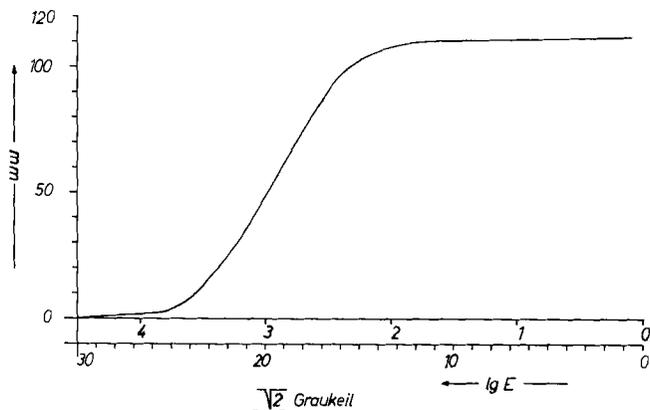


Fig. 3. Abhängigkeit der Transparenz zur Pikhöhe

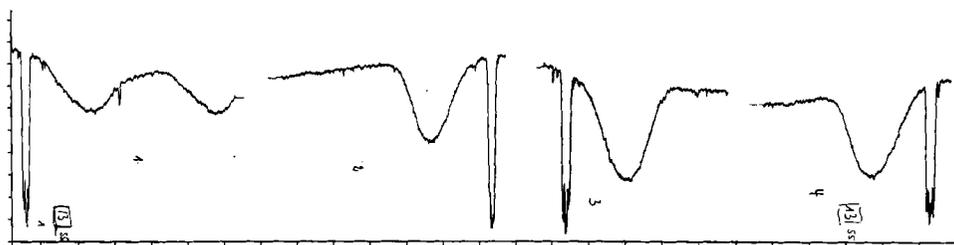


Fig. 4. Transparenzmeszkurven des Negativs der Konzentrationsreihe aus Figur 1

D. Bestimmung des Gehaltes unbekannter Benzpyrenlösungen: Die zu bestimmenden Lösungen waren Extrakte von Motorabgasen, die einerseits sehr stark durch färbende Bestandteile, andererseits durch eine grosse Anzahl *anderer, fluoreszierender Stoffe*— wie 1,2-Benzpyren, Anthracen usw. — verunreinigt waren. Zudem machte die *geringe* Konzentration an Benzpyren neben einer Reinigung eine Anreicherung nötig; beide Forderungen wurden durch Chromatographie erfüllt.

Auf ein Blatt Chromatographiepapier (SCHLEICHER & SCHÜLL, 2043 b 21 ac) der Grösse 24×16 cm werden 3 cm vom unteren Rand entfernt $100 \mu\text{l}$ der zu untersuchenden Lösung als Streifen aufgetragen und aufsteigend nach dem bereits beschriebenen Verfahren chromatographiert. Nach der Trocknung wird unter der UV.-Lampe der 3,4-benzpyrenhaltige Streifen aus dem Chromatogramm ausgeschnitten. Er ist

leicht zu erkennen, da 3,4-Benzpyren einen Rf-Wert von ca. 0,1 hat und intensiv blau-violett fluoresziert [3]. Die Verunreinigungen, z. B. 1,2-Benzpyren und Anthracen, haben weit höhere Rf-Werte, einige laufen sogar mit der Lösungsmittelfront. Der ausgeschnittene Streifen wird an einem Ende spitz zugeschnitten und so zwischen zwei Glasplatten fixiert, dass die Spitze und das hintere Ende herausragen. Die Spitze wird mittels eines ausgezogenen Glasstabes auf dem Startpunkt des zweiten Chromatogramms befestigt. Nun wird durch Eintauchen des überstehenden, hinteren Endes

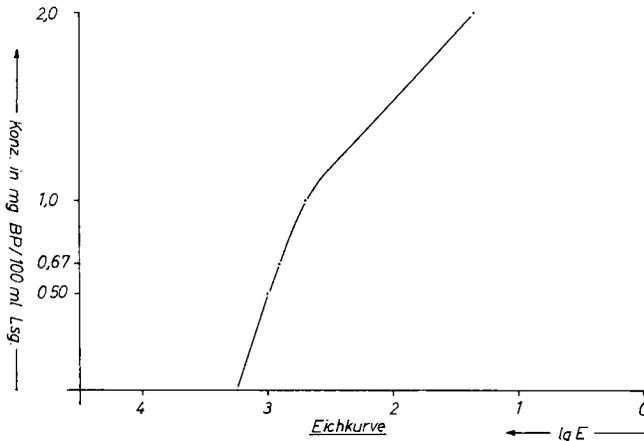


Fig. 5. Abhängigkeit der 3,4-Benzpyrenkonzentration von der Belichtungseinheit $\log E$

in Benzol letzteres solange durch den Streifen gesogen, bis er die Fluoreszenz des 3,4-Benzpyrens nicht mehr zeigt. Auf diese Art und Weise wird das 3,4-Benzpyren von den störenden Begleitstoffen getrennt und quantitativ von einem Chromatogramm auf ein zweites übertragen.



Fig. 6. Chromatogramm von 4 bekannten 3,4-Benzpyrenlösungen und einer unbekanntem Lösung in der Reihenfolge von links nach rechts im UV.-Licht photographiert

Nun werden auf dem letzteren Bogen noch Flecke mit bekannten 3,4-Benzpyrenmengen aufgetragen und das Ganze wie bereits beschrieben aufsteigend chromatographiert. Nach dem Trocknen des Chromatogramms werden die Flecke wiederum sogleich photographiert und ausgemessen (Fig. 6). Von den Negativen der Chromato-

gramme wird wiederum die Lichtdurchlässigkeit gemessen. Auf den erhaltenen Diagrammen werden nun die Pikhöhen ausgemessen und auf der Graukeilkurve der zugehörige $\log E$ abgelesen, der auf der Eichkurve die Konzentration an 3,4-Benzpyren in mg/100 ml Lösung ergibt. Dieser Wert muss noch mit dem Faktor der Fleckengrößen aus der Konzentrationsreihe und dem gemessenen Chromatogrammfleck multipliziert werden, wobei der Mittelwert aus Vorder- und Rückseite ermittelt wird; das gleiche gilt für die Lichtdurchlässigkeit. Der so erhaltene Wert ergibt nach Umrechnung der aufgetragenen Mengen, nämlich 100 μ l auf dem Chromatogramm und 5 μ l auf der Verdünnungsreihe, die wahre Konzentration in mg/100 ml Lösung.

Werden bei der Bestimmung immer die gleiche Anlage benutzt und die Belichtungseinheiten eingehalten, so lässt sich die Eichkurve für weitere Bestimmungen verwenden. Im anderen Fall müssen Graukeil und Eichkurven neu ermittelt werden.

Wir danken der Abteilung Wissenschaftliche Fotografie der Farbenfabriken BAYER AG, Leverkusen, insbesondere den Herren Dres. KLEIN, EGGERS und LANGNER, die freundlicherweise die photometrischen Messungen durchgeführt haben.

ZUSAMMENFASSUNG

3,4-Benzpyren wird auf Chromatogrammen durch gleichzeitige Messung von Fluoreszenzintensität und Fleckengröße bestimmt, wodurch die bei alleiniger Berücksichtigung der Fleckengröße auftretenden, erheblichen Fehler vermieden werden.

Heinz Kastien, Gasshof
6014 Littau/Luzern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. FISHER, *Nature* 161, 764 (1948).
 [2] A. PIETZSCH, *Die Papierchromatographie cancerogener Kohlenwasserstoffe*, *Pharmazie* 7, 24 (1957).
 [3] TH. WIELAND & W. KRACHT, *Angew. Chem.* 69, 5, 172 (1957).

273. Thione, Imine, Oxime und Azine des Riboflavins Nucleophile Substitutionsreaktionen am Flavinkern¹⁾

Studien in der Flavinreihe, 10. Mitteilung²⁾

von F. Müller³⁾ und P. Hemmerich

(12. VIII. 66)

Die Vielfalt der möglichen Flavocoenzym-Wirkungsmechanismen im breiten Spektrum der bekannten Flavoproteine zeigt sich in den jüngsten synoptischen Darstellungen [1a] [2] komplexer denn je. Zum Verständnis des Chemismus der Flavin-abhängigen biologischen Oxydation gibt es erst wenige Anhaltspunkte [2]. Dies ist zweifellos

¹⁾ Zur Nomenklatur: Flavin = Isoalloxazin = 10-substituiertes Benzo[g]pteridin-2,4-dion.

²⁾ Vorläufige Mitteilung: [1]; 9. Mitteilung dieser Reihe vgl. [9].

³⁾ Derzeitige Adresse: Medicinska Nobelinstitutet, Biokerniska avdelningen, Solnavägen 1, Stockholm 60, Schweden.

⁴⁾ Teilauszug aus der Diss. F. MÜLLER, Basel 1964.