

KOHLENWASSERSTOFFE IN DER UMGEBUNG DES MENSCHEN

I. MITT. EINE METHODE ZUR SIMULTANEN BESTIMMUNG VON DREIZEHN POLYCYCLISCHEN KOHLENWASSERSTOFFEN

G. GRIMMER UND A. HILDEBRANDT

Universität Hamburg (Deutschland)

(Eingegangen am 1. März 1965)

Polycyclische Kohlenwasserstoffe werden als auslösendes Agens bei der Bildung maligner Tumoren betrachtet. Für die Beurteilung der Frage, welche Mengen an Kohlenwasserstoffen aus der Umgebung des Menschen aufgenommen werden, ist eine systematische Untersuchung von Lebensmitteln, Luftverunreinigungen und Verpackungsmaterial notwendig. In der Folge ist eine Untersuchungsreihe beabsichtigt, die diese Frage für Grundnahrungsmittel klären soll.

Die Bestimmung einer Einzelkomponente, wie des 3:4-Benzopyrens (Benzo[*a*]-pyren), ist ein Hinweis, der aber für den Grad der Verunreinigung durch Kohlenwasserstoffe nicht als exakt repräsentativ angesehen werden kann. Der Idealfall, alle polycyclischen Kohlenwasserstoffe bis zu einer gewissen Konzentrationsgrenze zu erfassen, ist ein bisher nicht gelöstes Trenn- und Identifizierungsproblem. Für das geplante Routineanalyse-Verfahren scheint uns die Erfassung von 13 Kohlenwasserstoffen in jeder Probe ein guter Kompromiss zu sein. Das so erhaltene Spektrum verschiedener Kohlenwasserstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen könnte ausserdem auch Hinweise auf den Ursprung des die Lebensmittel verunreinigenden Russes geben.

Als Modell für die Entwicklung eines geeigneten Bestimmungsverfahrens wählten wir einen Staub, der einem Tunnel mit Kraftverkehr entnommen worden war. Dieses Verfahren ist im folgenden beschrieben und erfasst die einzelnen Komponenten zu 88–95%, was durch die Zugabe bekannter Mengen authentischer Kohlenwasserstoffe zum Extrakt ermittelt werden konnte.

Nur wenige der bisher in der Literatur beschriebenen Bestimmungsverfahren² haben eine durch Testgemische ermittelte Angabe der Ausbeute, die in keinem Falle die hohe und reproduzierbare Ausbeute des beschriebenen Verfahrens erreicht. Die hohe Zahl der angewandten Reinigungsschritte erwies sich im Hinblick auf die in den Lebensmitteln vorhandenen abzutrennenden Begleitstoffe als unbedingt erforderlich.

ALLGEMEINE VERFAHRENSBESCHREIBUNG

Durch Kombination von flüssig–flüssig Extraktion, Chromatographie an Silikagel, Papierchromatographie und Trennung an Aluminiumoxid haben wir die Kohlenwasserstoffe angereichert und anschliessend den Gehalt an Phenanthren, Anthracen, Pyren, Fluoranthren, 1:2-Benzanthracen, Chrysen, 3:4-Benzopyren, 1:2-Benzopyren,

Perylen, Anthanthren, 1:12-Benzperylene, 1:2;5:6-Dibenzanthracen und Coronen spektrophotometrisch ermittelt. Eine vollständige Trennung in Einzelkomponenten ist hierbei nicht notwendig, da auch häufig zwei in Gemisch vorliegende Kohlenwasserstoffe aufgrund ihrer charakteristischen Bandenlagen im U.V.-Spektrum bestimmt werden können. Zur Kontrolle der quantitativen Trennung aller betrachteten Kohlenwasserstoffe in 7 Fraktionsgruppen bedienten wir uns der Papierchromatographie an acetyliertem Papier.

METHODIK

1. Extraktion

Um die Frage einer möglichst vollständigen Extraktion durch geeignete Lösungsmittel zu entscheiden, verwendeten wir Methanol, Methanol mit 10 % Wasserzusatz, Benzol und Dimethylformamid. Diese Lösungsmittel wurden mehrfach destilliert und auf den Gehalt an Kohlenwasserstoff-Verunreinigungen untersucht. Zur Klärung dieser Frage betrachteten wir nur die beiden isomeren Benzopyrene.

200 mg Luftstaub (Staub aus Luftfilteranlagen eines Tunnels mit Kraftverkehr) wurden in je 60 ml Lösungsmittel 30 min zum Sieden erhitzt, die überstehende Lösung nach dem Erkalten dekantiert, filtriert und das Lösungsmittel bei 30° Badtemperatur bei 14 Torr abdestilliert. Der extrahierte Luftstaub wurde mit dem gleichen Lösungsmittel gegebenenfalls ein zweites und drittes Mal extrahiert.

Nach einer Anreicherung und Reinigung der Kohlenwasserstoffe wurde der Gehalt an 3:4-Benzopyren und 1:2-Benzopyren spektrophotometrisch ermittelt. Die Tabelle I gibt die mit den verschiedenen Lösungsmitteln und Extraktionen erhaltenen Mengen beider Kohlenwasserstoffe wieder.

TABELLE I

WAHL DES LÖSUNGSMITTELS

60 ml für 200 mg Staub; je 30 min Siedehitze.

Substanz	1.Me	2.Me	3.Me	4.B	5.B	Benzol	90% Me	DMF
1:2-Benzopyren	34.3	0.80	0.25	0.35	0.25	30.3	31.2	34.8 µg/g
3:4-Benzopyren	28.2	0.95	0.40	0.55	0.15	26.9	25.7	27.9 µg/g

1. (2., 3.)Me = erste (zweite, dritte) Extraktion mit Methanol.

4.B = dreimalige Extraktion mit Methanol und anschließende Extraktion mit Benzol.

5.B = daran anschließend nochmalige Benzolextraktion.

Benzol = einmalige Extraktion mit Benzol.

90% Me = einmalige Extraktion mit Methanol-Wasser (10 %)-Gemisch.

DMF = einmalige Extraktion mit Dimethylformamid (80°).

Allgemeine Extraktionsbedingungen. 2.0 g Staub wurden dreimal mit Benzol und anschließend zweimal mit Methanol (je 100 ml) in der Siedehitze eine halbe Stunde extrahiert.

2. Einengen der Extraktionslösungen

Unter bestimmten Bedingungen waren einige Kohlenwasserstoffen beim Eindampfen zur Trockne merklich flüchtig, so dass wir die Lösungen nur einengten ohne

den Rückstand zu trocknen. Alle Lösungen wurden in einem 100 ml Rundkolben bei einer Badtemperatur von 30° und einem Vakuum von 12–14 Torr am drehenden Rotationsverdampfer auf etwa 0.5 ml eingengt.

Die Tabelle II demonstriert die Verluste bei kleinen Einwaagen (ca. 5 µg) am Beispiel von Cyclohexanlösungen (ca. 100 ml) nach verschiedenen Trocknungszeiten (3–50 min). Die Messung der Kohlenwasserstoffe erfolgte nach Auflösen des Rückstandes in 3.00 ml Cyclohexan (spektralrein) spektrophotometrisch (siehe weiter unten).

Alle Extraktionslösungen wurden aufgrund dieses Befundes bei einer Badtemperatur von 30° und geeignetem Vakuum (je nach Lösungsmittel auf 0.5 ml eingengt). In jedem Falle wurde das Eindampfen zur Trockne vermieden.

TABELLE II

BESTIMMUNG DER TROCKNUNGSVERLUSTE VON KOHLENWASSERSTOFFEN
30° Badtemp., 14 Torr.

Substanz	Einwaage (µg)	Gefunden nach		
		30 min (µg)	6 min (µg)	3 min (µg)
Anthracen	7.25	0.88	3.33	7.02
Phenanthren	5.45	0.28	0.84	1.93
Pyren	6.00	0.87	3.91	5.84
Fluoranthren	6.50	1.00	4.44	6.21
1:2-Benzanthracen	5.56	4.75	5.05	5.22
Chrysen	5.60	5.68		
3:4-Benzopyren	13.26	13.20		
1:2-Benzopyren	6.80	6.85		
Perylen	6.65	6.43		
Anthanthren	5.81	5.48		
1:12-Benzperylene	7.25	7.18		
1:2;5:6-Dibenzanthracen	5.50	5.62		
Coronen	6.15	6.20		

3. Flüssig-flüssig Verteilung

Die vereinigten Extraktionslösungen des russhaltigen Staubes (3 × 100 ml Benzol, 2 × 100 ml Methanol) wurden auf ca. 0.5 ml eingengt und zwischen Cyclohexan (50 ml, spektralrein) und Methanol-Wasser (50 + 5 ml) verteilt. Die abgetrennte Methanolphase wurde ein zweites Mal mit frischem Cyclohexan ausgeschüttelt und die vereinigten Cyclohexanphasen auf etwa 0.5 ml eingengt. Sie enthalten 92–96 % der betrachteten Kohlenwasserstoffe von der extrahierbaren Gesamtmenge.

4. Chromatographie an Silikagel

Die Cyclohexanlösung der Kohlenwasserstoffe wurde auf eine mit Cyclohexan eingeschwemmte Kieselsäule (20 g, 8 × 400 mm) mit einer Glasstempelpipette aufgetragen. Die mit 35–300 ml Cyclohexan (spektralrein) eluierte Fraktion enthielt alle betrachteten Kohlenwasserstoffe, wenn das Silikagel entsprechend unter Kontrolle einer Testsubstanz desaktiviert worden war.

Die Vorbereitung des Silikagels erfolgte in der nachstehend beschriebenen Weise¹.

Silikagel (Riedel de Haen, Seelze), Siebfraktion 0.125–0.160 mm (elektrische

Siebmaschine Typ EML der Fa. Haver u. Boecker, Oelde) wurde mit 5 N HCl übergossen und 24 Stunden stehen gelassen, säurefrei gewaschen (Wasser, Methanol) und 12 Stdn. bei 130° getrocknet. Nach dem Anrühren mit dest. Wasser, dekantieren des überschüssigen Wassers und trocknen (60° Badtemp., 12 Torr) in einem rotierenden Rundkolben (Rotationsverdampfer der Fa. Büchi) wurde durch Wägung ein Wassergehalt von etwa 9–10 % eingestellt. Die Aktivität des Kieselgels wurde an abgenommenen Proben ermittelt, die in einer Testsäule (20 g) für 3:4-Benzpyren (5 µg) mit spektralreinem Cyclohexan ein Elutionsvolumen von 90 ml (Anfang)–140 ml (Ende) ergeben sollen. Eine in dieser Weise behandelte Chromatographiesäule (3:4-Benzpyren von 90–140 ml) zeigt für die betrachteten Kohlenwasserstoffe die in der Tabelle III wiedergegebenen Elutionsvolumina.

5. Papierchromatographie

Die auf 0.5 ml eingengte Elutionsfraktion der Silikagelsäule (von 35–300 ml) wurde mit einer Pipette (0.2 ml) auf die Startlinie eines mit Dimethylformamid imprägnierten Papierstreifens aufgetragen (Schleicher u. Schüll 2043 a oder b, 50 × 8 cm) und absteigend mit halbgesättigtem Dekalin entwickelt.

Der R_F -Wertbereich zwischen 0.30 und 0.60 wurde auf dem noch feuchten Streifen markiert und zweimal mit Cyclohexan 20 min in der Kälte extrahiert.

Die Vorbereitung der Papierchromatographie-Streifen erfolgte in der nachstehend beschriebenen Weise. Der Streifen wurde beschriftet, 5 min in eine Lösung von Dimethylformamid in Aceton (40 % ig) getaucht, zwischen trockenem Filtrierbogen abgepresst, unter die Startlinie ein Glasstab gelegt und die Lösung aufgetragen. Nach zweimaligem Nachspülen des Kolbens mit Cyclohexan und Aufbringen der Lösung wurde die Startlinie mit etwas Dimethylformamidlösung nachimprägniert und als Leitsubstanz 1:2-Benzpyren aufgetragen. Es wurde absteigend mit halbgesättigtem Dekalin als mobile Phase chromatographiert. Die verwendeten Glaszylinder (14 × 60 cm) wurden durch Einsetzen von Schalen mit beiden Lösungsmitteln gesättigt. Der R_F -Wertbereich der 13 Kohlenwasserstoffe liegt zwischen 0.38 und 0.54 (1:2-Benzpyren 0.49) und wurde unter einer U.V.-Lampe (366 mµ) markiert, im feuchten Zustand herausgeschnitten und zerkleinert in Cyclohexan (100 ml) einige Minuten stehen gelassen. Nach dem Dekantieren der Lösung wurde nochmals mit 100 ml Cyclohexan übergossen. Um eine irreversible Absorption der Kohlenwasserstoffe zu vermeiden, darf die Dimethylformamid-Imprägnierung nicht teilweise abgedampft sein, da sonst eine quantitative Extraktion der Kohlenwasserstoffe mit Cyclohexan bei Raumtemperatur nicht möglich ist. Das Herausnehmen des Papierstreifens bis zum Einbringen in Cyclohexan soll nicht länger als 5 min dauern.

Die Cyclohexanlösungen wurden nach dem Waschen mit Wasser auf wenige Milliliter eingengt und an einer Aluminiumoxidsäule fraktioniert.

6. Chromatographie an Aluminiumoxid

Die Lösung des mit Cyclohexan (2 × 100 ml) vom Papierchromatogramm extrahierten Gemisches der Kohlenwasserstoffe (ca. 2–3 ml) wurde mit einer Glasstempelpipette auf eine mit Cyclohexan eingeschlemmte Aluminiumoxidsäule (15 g, 8 × 200 mm) aufgetragen. Nach zweimaligem Nachspülen mit spektralreinem Cyclohexan wurden die in der Tabelle III angegebenen Fraktionen (1–7) getrennt gesammelt und eingengt.

Aluminiumoxid (Merck AG., Darmstadt), Siebfraction 0.08–0.09 mm, wurde, in der gleichen Weise wie beim Silikagel beschrieben, gewaschen. Die Aktivität des Adsorbens, die durch vorsichtiges Abdampfen des Wassers eingestellt wurde, soll für 3:4-Benzpyren an einer Testsäule (15 g) mit spektralreinem Cyclohexan das Elutions-

TABELLE III

ELUTIONSVOLUMINA VON 13 KOHLENWASSERSTOFFEN

Chromatographie an Silikagel (20 g) und Aluminiumoxid (15 g) mit Cyclohexan

Verbindung	SiO ₂ (in ml)	Al ₂ O ₃ (in ml)	Frakt. Nr.
Anthracen	40–90	20–35	1
Phenanthren	40–95	19–34	
Pyren	45–105	34–55	2
Fluoranthren	57–105	40–70	
1:2-Benzanthracen	67–130	108–150	3
Chrysen	75–140	106–154	
3:4-Benzpyren	90–140	205–320	4
1:2-Benzpyren	95–160	235–350	
Perylen	84–170	240–360	
Anthanthren	84–160	430–600	5
1:12-Benzperylen	105–180	490–680	
1:2;5:6-Dibenzanthracen	125–220	680–890	6
Coronen	130–260	1150–1620	7

volumen von 210–320 ml haben (etwa 4 % Wassergehalt). Vor der Verwendung wurde die mit Cyclohexan eingeschlemmte Säule solange gespült, bis das austretende Cyclohexan (bei 240 nm gegen Wasser gemessen) rein war.

Eine schematische Darstellung der Elutionsvolumina von 13 Kohlenwasserstoffen an Al₂O₃ zeigt die Fig. 1.

7. Quantitative spektrophotometrische Bestimmung

Die von der Aluminiumoxidsäule erhaltenen 7 Fraktionen wurden auf 3.00 ml mit Cyclohexan aufgefüllt und der U.V.-Bereich von 230–450 nm als Absorptionsspektrum gemessen (Zeiss PQM II). Im Bereich der charakteristischen Maxima und Minima erfolgte die Messung von 1 zu 1 nm, anderenfalls von 5 zu 5 nm.

Um den Untergrund (Verunreinigungen) auszuschalten, wurden charakteristische Maxima und wenige nm davon entfernte Minima zur Berechnung der Konzentrationen der Lösungen herangezogen. Im Falle des Paares Anthracen/Phenanthren wurde bei der Berechnung des Anthracengehaltes eine Korrektur (Phenanthrenabsorption) angebracht (siehe Tabelle IV).

Nach der spektrophotometrischen Messung aller Fraktionen und eventuellen Zwischenfraktionen wurden die Lösungen wiederum eingedampft und papierchromatographisch auf ihre Zusammensetzung überprüft, um zu kontrollieren, ob die Fraktionen nur die gewünschten Kohlenwasserstoffe enthielten. Die Papierchromatographie wurde auf acetyliertem Papier durchgeführt². Diese Kontrolle ist auch mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie leicht durchzuführen³.

Die Reinheit der von der Aluminiumoxidsäule erhaltenen Fraktionen ist in Fig. 2 am Beispiel der Fraktion 2 (Pyren, Fluoranthren) demonstriert.

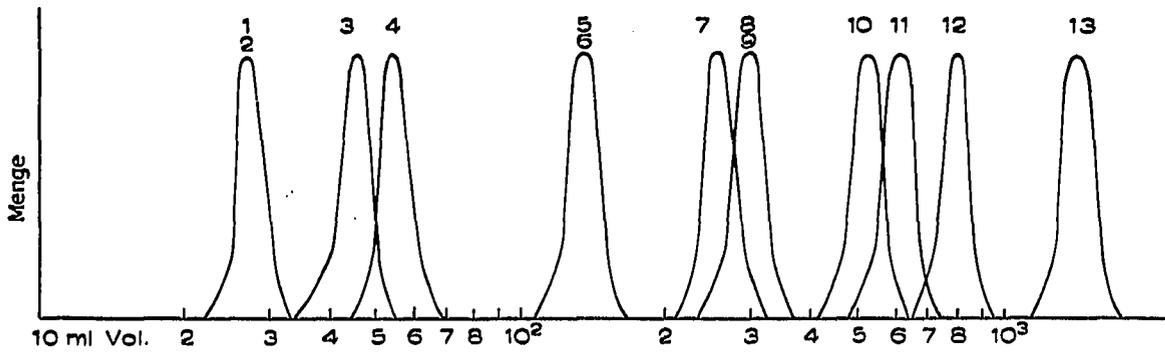


Fig. 1. Elutionsvolumen von 13 Kohlenwasserstoffen an Al_2O_3 mit Cyclohexan. (1) Anthracen; (2) Phenanthren; (3) Pyren; (4) Fluoranthen; (5) 1:2-Benzanthracen; (6) Chrysen; (7) 3:4-Benzpyren; (8) 1:2-Benzpyren; (9) Perylen; (10) Anthanthren; (11) 1:12-Benzperylene; (12) 1:2;5:6-Dibenzanthracen; (13) Coronen.

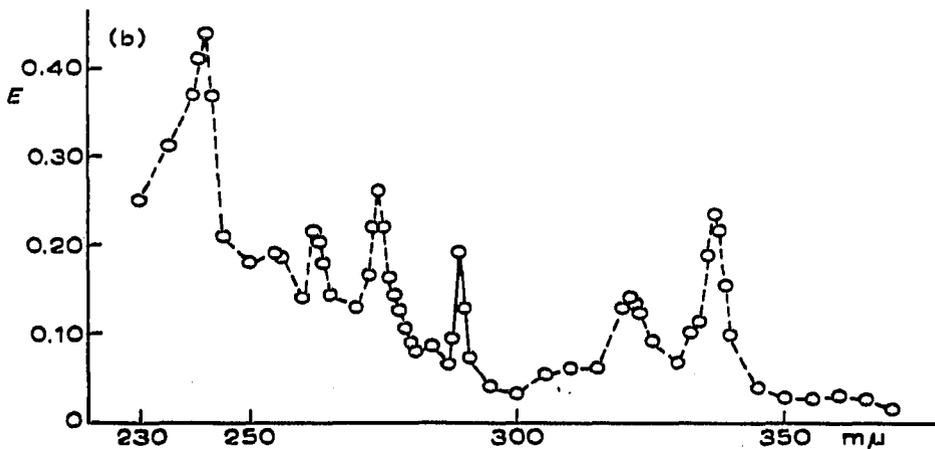
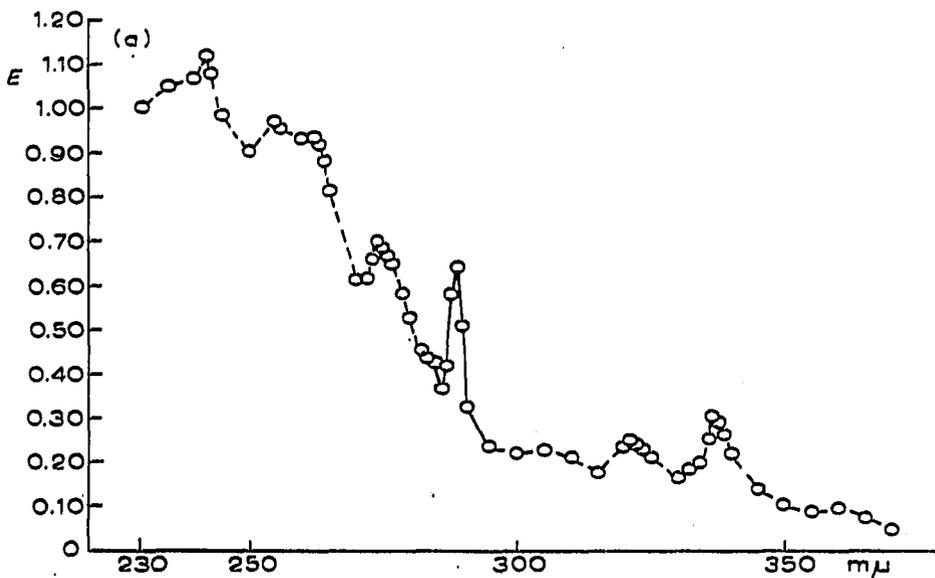


Fig. 2. (a) Spektrum der Fraktion 2 der Aluminiumoxidsäule des Tunnelstaubes in Cyclohexan. — = Fluoranthen; - - - = Pyren. (b) Spektrum eines Gemisches aus Pyren ($0.75 \mu\text{g/ml}$) und Fluoranthen ($0.64 \mu\text{g/ml}$). (Reinsubstanzen der Ges. f. Teerverwertung, Duisburg-Meiderich.) — = Fluoranthen; - - - = Pyren.

TABELLE IV

SPEKTROPHOTOMETRISCHE AUSWERTUNG DURCH DIFFERENZBILDUNG VON MAXIMA UND MINIMA (CYCLOHEXAN)

Verbindung	Maximum		Minimum		Differenz $\Delta \log I_0/I$ (f. 1.0 $\mu\text{g/ml}$)
	nm	$\log I_0/I$	nm	$\log I_0/I$	
Anthracen	254	1.280	260	0.073	1.207
Phenanthren	294.5	0.094	300	0.016	0.078
Pyren	338	0.280	345	0.012	0.268
Fluoranthren	289	0.276	295	0.041	0.235
1;2-Benzanthracen	290	0.434	296	0.081	0.353
Chrysen	270	0.666	276	0.127	0.539
3;4-Benzpyren	387	0.123	394	0.034	0.089
1;2-Benzpyren	334	0.160	340	0.013	0.146
Perylen	441	0.159	448	0.030	0.129
Anthanthren	435	0.294	440	0.035	0.259
1;12-Benzperylene	388	0.099	394	0.017	0.082
1;2;5;6-Dibenzanthracen	299	0.695	305	0.145	0.550
Coronen	304	0.943	308	0.192	0.751

Zusammenfassung der Methodik

Allgemeine Angaben. Die Lösungsmittel Benzol und Methanol (beide p.a.) wurden durch zweimalige Destillation gereinigt. Cyclohexan (p.a.) wurde 3 mal mit Oleum (10%), einmal mit konz. Schwefelsäure und anschliessend mit Wasser geschüttelt. Das gereinigte Lösungsmittel stand über fester Kalilauge und wurde unter Messung der Extinktionshöhe (bei 230 nm gegen Wasser) sorgfältig in einer reinen Apparatur destilliert. Die Reinigung des verwendeten Silikagels und Aluminiumoxids ist an anderer Stelle beschrieben.

Alle Lösungen wurden bei einer Badtemperatur von 30° und 12–14 Torr auf etwa 0.5 ml eingengt. In jedem Falle wurde das Eindampfen zur Trockne am drehenden Rotationsverdampfer vermieden.

Extraktion. 2.0 g Staub wurden dreimal mit Benzol (je 100 ml) und anschliessend zweimal mit Methanol (100 ml) in der Siedehitze eine halbe Stunde extrahiert.

Anreicherung der Kohlenwasserstoffe. Die vereinigten Extraktionslösungen, die auf etwa 0.5 ml eingengt waren, wurden zwischen Cyclohexan (50 ml) und 90% igem Methanol (55 ml) verteilt und die Methanolphase nochmals mit frischem Cyclohexan (50 ml) ausgeschüttelt.

Die beiden Cyclohexanphasen wurden nach dem Einengen auf eine Silikagelsäule gebracht und eine Fraktion von 35–300 ml mit Cyclohexan eluiert. Die auf 0.5 ml eingengte Elutionsfraktion der Silikagelsäule wurde auf die Startlinie eines mit Dimethylformamid imprägnierten Papierstreifens aufgetragen und absteigend mit halbgesättigtem Dekalin entwickelt. Nach dem Markieren des R_F -Wertbereiches von 0.30–0.60 anhand von Leitsubstanzen unter dem U.V.-Licht wurde die ausgeschnittene Zone in der Kälte mit Cyclohexan extrahiert (zweimal 20 min), die beiden Lösungen mit Wasser gewaschen und eingengt.

Die Lösung des extrahierten Gemisches der Kohlenwasserstoffe wurde an einer mit Cyclohexan spektralrein gewaschenen standardisierten Aluminiumoxidsäule fraktioniert, wobei 7 Fraktionen entsprechend einem vorher aufgebrauchten Testgemisch

geschnitten wurden. In manchen Fällen lassen sich die Zonen durch ihre Fluoreszenz (366 nm) erkennen.

Quantitative spektrophotometrische Bestimmung. Die auf 3.00 ml mit Cyclohexan aufgefüllten Fraktionen der Aluminiumoxidsäule wurden im Bereich von 230–450 nm gemessen und die Menge durch Differenzbildung charakteristischer Maxima und Minima berechnet.

DISKUSSION UND ÜBERPRÜFUNG DER METHODIK

1. Extraktion

Bei geringen Staubmengen (200 mg) und grossen Lösungsmittelüberschuss (60 ml) waren bei einer einmaligen Extraktion in der Siedehitze nur geringfügige Unterschiede (etwa 10 %) in der Menge der extrahierbaren Kohlenwasserstoffe festzustellen. Als beste Lösungsmittel erwiesen sich Dimethylformamid und Methanol. Eine zweite und dritte Extraktion (Methanol) lieferte nur noch 3 % bzw. 0.75 % der zuerst extrahierbaren Menge. Ein anschliessender Wechsel auf Benzol brachte nochmals 1.0 % bzw. 0.5 % der mit der ersten Methanolextraktion eluierten 3:4-Benzopyrenmenge in Lösung. Aufgrund dieser Ergebnisse extrahierten wir jede Probe für die Versuchsreihen dreimal mit Benzol und anschliessend zweimal mit Methanol. Die Frage, ob nach einer weiteren Zerkleinerung des Russstaubes noch zusätzliche Mengen an Kohlenwasserstoffen extrahierbar sind, haben wir nicht untersucht.

2. Einengen der Extraktionslösungen

Unter bestimmten Bedingungen waren einige Kohlenwasserstoffe beim Eindampfen zur Trockene merklich flüchtig. Beim Abdampfen der Lösungsmittel aus 100 ml-Rundkolben bei 30° Badtemperatur und 12 Torr Vakuum am Rotationsverdampfer war nach wenigen Minuten die Hälfte der eingesetzten Phenanthrenmenge (5 µg) flüchtig. Anthracen, Pyren, Fluoranthen und 1:2-Benzanthracen erwiesen sich in geringerem Masse flüchtig, zeigten aber bei erhöhter Badtemperatur (50°) starke Abdampfverluste. Bei allen anderen Kohlenwasserstoffen war auch hierbei kein Trocknungsverlust festzustellen.

Beim Einengen von 100 ml-Lösungen, die ca. 5 µg der flüchtigen Kohlenwasserstoffe enthielten, auf 0.2–0.5 ml trat kein Substanzverlust auf.

3. Flüssig-flüssig Verteilung

Bei Verwendung des Phasenpaares Cyclohexan/wässriges Methanol (90 %) haben die untersuchten 13 Kohlenwasserstoffe in allen Fällen einen Verteilungskoeffizienten, der zwischen 3.0 und 3.9 ($K = CH/Me$) liegt. Damit ergibt sich bei zweimaliger Extraktion der Methanolphase eine über 90 % ige Anreicherung in den Cyclohexanphasen.

4. Chromatographie an Silikagel

Es empfahl sich, vom handelsüblichen Silikagel nur enge Siebfraktionen zu benutzen. Das Waschen mit 5 N Salzsäure erwies sich zur Entfernung von Schwermetallspuren als notwendig, da sonst ein Teil der aufgetragenen Kohlenwasserstoffe zerstört wurde. An dem so behandelten Adsorbens liessen sich die aufgetragenen Mengen (ca. 5 µg je Komponente) quantitativ wieder eluieren.

Diese Säule, bei der die Fraktion zwischen 35–300 ml gewonnen wird, dient nur zu einer groben Abtrennung von unpolaren und stark polaren Verunreinigungen.

5. *Papierchromatographie*

Anhand von Leitsubstanzen liess sich der R_F -Wertbereich aller betrachteten Kohlenwasserstoffe reproduzierbar und deutlich unter dem U.V.-Licht markieren, wobei erhebliche Mengen an Verunreinigungen abgetrennt werden können. Testanalysen unter Verwendung dieses Reinigungsschrittes zeigten erheblich reinere Fraktionen an der Aluminiumoxidsäule, als ohne Anwendung der Papierchromatographie. Das Aufbringen der Substanzen, das Entwickeln und das Extrahieren der Kohlenwasserstoffe kann praktisch verlustlos zu 98–100 % durchgeführt werden, wie entsprechende Versuche mit Reinsubstanzen gezeigt haben. Wesentlich ist dabei ein Trocknen der entwickelten Papierchromatogramme zu vermeiden, da die Kohlenwasserstoffe an dem einmal getrockneten Papier irreversibel haften und auch in der Siedehitze nicht vollständig wiedergewonnen werden können.

6. *Chromatographie an Aluminiumoxid*

Die Erfahrungen bezüglich einer vollständigen Elution der unzersetzten Kohlenwasserstoffe, die im Falle des Silikagels beschrieben sind, legen ein Waschen des gesiebten Aluminiumoxids mit Säure und Wasser nahe. Es wurde ein Gemisch aller Kohlenwasserstoffe, die in Mengen von 1.5–6 μg vorlagen, an einer Al_2O_3 -Trennsäule dreimal analysiert, die maximalen Abweichungen pro Komponente festgestellt und die Ausbeute für jede Komponente bestimmt. Sie lag in allen Fällen zwischen 96 und 99 % der eingesetzten Menge.

7. *Quantitative spektrophotometrische Bestimmung*

Um den Reinheitsgrad der erhaltenen Fraktionen der Trennsäule (Aluminiumoxid) zu beurteilen, erscheint es notwendig, sowohl die Fraktionen mittels der Papierchromatographie an acetyliertem Papier zu betrachten, als auch ein vollständiges Absorptionsspektrum von 230–450 nm aufzunehmen. Die Berechnung der Extinktionsdifferenzen von einem Maximum und eng daran schliessenden Minimum eliminiert naturgemäss nicht in allen Fällen vorhandene Störspektren, deren Vorhandensein besser aus dem vollständig aufgenommenen Spektrum beurteilt werden kann.

8. *Quantitative Überprüfung des gesamten Verfahrens*

Mit dem Gemisch von 13 Kohlenwasserstoffen (1.1–6.3 μg pro Komponente) wurden alle Operationen hintereinander ausgeführt (Chromatographie an Silikagel, Papierchromatographie, Trennung an Aluminiumoxid und spektrophotometrische Bestimmung) und diese Testanalyse dreimal durchgeführt. Die Mittelwerte dieser dreifachen Bestimmung ergaben Ausbeuten von 88–98 % der eingesetzten Menge.

Die Tabelle V gibt die erhaltenen Mengen wieder.

ERGEBNISSE

Analyse eines Tunnelstaubes

2.000 g Tunnelstaub wurden dreimal mit 100 ml Benzol, anschliessend zweimal mit 100 ml Methanol je 20–30 min in der Siedehitze extrahiert, abfiltriert und beim

TABELLE V

GEFUNDENE MENGEN AN KOHLENWASSERSTOFFEN BEI VOLLSTÄNDIGEM ANREICHERUNGSGANG EINER TESTLÖSUNG

Verbindung	Zugegeben (μg)	Gef. (μg)	Gef. (μg)	Gef. (μg)
Anthracen	6.23	6.02	6.15	6.16
Phenanthren	4.69	4.13	4.06	4.17
Pyren	5.18	4.88	4.84	4.89
Fluoranthren	5.61	5.70	5.55	5.40
Chrysen	4.80	4.76	4.88	4.76
1:2-Benzanthracen	4.80	3.97	4.52	4.76
3:4-Benzopyren	1.14	1.14	1.06	1.05
1:2-Benzopyren	5.76	5.75	5.34	5.34
Perylen	5.64	5.40	5.82	5.53
1:12-Benzperylen	4.55	4.43	4.40	4.51
Anthanthren	5.02	4.30	4.54	4.51
1:2;5:6-Dibenzanthracen	4.76	4.63	4.49	4.41
Coronen	5.30	4.89	4.88	4.83

Einengen darauf geachtet, dass der Kolbeninhalt nicht zur Trockne eindampfte. Die weitere Aufarbeitung war wie beschrieben.

Die Tabelle VI zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse einer dreimaligen Wiederholung der Analyse (1-3), zwei Bestimmungen, bei denen der Russ vor der Extraktion 1 Std. bei 12 Torr und 50° Badtemperatur getrocknet war (4 und 5) und eine Probe, der bestimmte Mengen der Kohlenwasserstoffe zugesetzt waren (6), die zugesetzten Mengen (7) und die Differenz der Spalten 6 weniger 7 (8).

TABELLE VI

EXTRAKTION EINES TUNNELRUSSES (2.000 g) UND SEIN GEHALT AN KOHLENWASSERSTOFFEN (IN μg)

	1	2	3	4	5	6	7	8
Anthracen	19.6	22.0	22.0	19.3	19.7	29.2	9.5	19.7
Phenanthren	93.0	102.0	106.0	108.0	99.6	294.0	180.0	114.0
Pyren	104.5	97.4	97.4	92.3	93.4	174.0	79.0	95.0
Fluoranthren	129.0	119.0	118.0	115.0	114.0	209.0	98.0	111.0
1:2-Benzanthracen	50.4	46.5	45.6	42.6	43.2	119.0	69.6	49.4
Chrysen	75.2	67.9	69.8	74.0	75.0	142.0	70.2	71.8
3:4-Benzopyren	42.2	39.0	38.1	36.1	34.9	71.1	28.1	43.0
1:2-Benzopyren	51.5	46.1	46.1	46.7	48.2	133.0	88.3	44.7
Perylen	—	—	—	—	—	83.0	81.1	—
Anthanthren	—	—	—	—	—	73.0	72.0	—
1:12-Benzperylen	—	—	—	—	—	—	—	—
1:2;5:6-Dibenzanthracen	10.0	8.1	8.5	8.1	9.0	78.5	69.5	9.0
Coronen	9.7	8.8	7.3	11.9	12.1	85.5	77.5	8.0

Die Übereinstimmung der 5 Bestimmungen ist als befriedigend zu bezeichnen. Ein Zusatz aller 13 Kohlenwasserstoffe zum Russ vor seiner Extraktion wird vollständig wiedergefunden, wie die letzte Spalte der Tabelle zeigt. Die angegebenen Werte sind auf die einzelnen ermittelten Ausbeuten korrigiert.

Damit scheint das Verfahren für eine Bestimmung der polycyclischen Kohlenwasserstoffe in Lebensmitteln geeignet zu sein.

DANK

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode für die Untersuchung von Grundnahrungsmitteln auf ihren Gehalt an polycyclischen Kohlenwasserstoffen wurde beschrieben.

Durch Kombination von flüssig-flüssig-Verteilung, Chromatographie an Silikagel und Papierchromatographie werden die Kohlenwasserstoffe angereichert und anschliessend an einer optisch leer gewaschenen Trennsäule mit Aluminiumoxid in mehrere Fraktionen zerlegt, die spektrophotometrisch ausgewertet werden.

Der Gehalt eines Modellstaubes an Phenanthren, Anthracen, Pyren, Fluoranthen, 1:2-Benzanthracen (Benz[*a*]anthracen), Chrysen, 3:4-Benzopyren (Benzo[*a*]pyren), 1:2-Benzopyren (Benzo[*e*]pyren), Perylen, Anthanthren, 1:12-Benzperylene (Benzo[*ghi*]perylene), 1:2;5:6-Dibenzanthracen (Dibenzo[*a,h*]anthracen) und Coronen wurde ermittelt, und die Abweichung mehrerer Analysen vom Mittelwert festgelegt.

Durch Zugabe aller betrachteten Komponenten in Form der authentischen Substanzen in den vorkommenden Grössenordnungen liess sich der durch die Anreicherung entstandene Substanzverlust auf 5 bis 12 % je nach Art der Kohlenwasserstoffes abschätzen.

SUMMARY

A method for estimating the content of polycyclic hydrocarbons in basic foodstuffs is described.

By combining liquid-liquid partition chromatography on silica gel and paper chromatography the hydrocarbons are concentrated and then separated into various fractions by means of a column of aluminium oxide that has been washed until optically pure. The fractions are estimated spectrophotometrically.

In a dust sample the content of phenanthrene, anthracene, pyrene, fluoranthene, 1:2-benzanthracene (benz[*a*]anthracene), chrysene, 3:4-benzopyrene (benzo[*a*]pyrene), 1:2-benzopyrene (benzo[*e*]pyrene), perylene, anthanthrene, 1:12-benzoperylene (benzo[*ghi*]perylene), 1:2;5:6-dibenzanthracene (dibenz[*a,h*]anthracene) and coronene, was estimated and the deviation of several analyses from the mean value determined.

By adding appropriate amounts of authentic samples of all the components concerned it could be estimated that the loss of substance occurring during concentration was 5 to 12 %, according to the nature of the hydrocarbon.

LITERATUR

- 1 G. GRIMMER, *Beitr. Tabakforsch.*, (1961) 107.
- 2 D. HOFFMANN UND E. WYNDER, *Cancer*, 13 (1960) 1062; 15 (1962) 93;
E. SAWICKI, *Chemist-Analyst*, 53 (1964) 24, 56, 88;
R. FISCHER, 100 Jahre BASF, *Aus der Forschung*, Verlag BASF, 1965, S. 571.
- 3 M. KÖHLER, H. GOLDBERGER UND R. SCHIESSER, *Z. Anal. Chem.*, 206 (1964) 430;
N. KUCHARCZYK, J. FOHL UND J. VYMETAL, *J. Chromatog.*, 11 (1963) 55.