

CHROM. 3918

FRAKTIONIERUNG VON CIGARETTENRAUCHKONDENSAT

II. GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE VON FLUORESZIERENDEN
INHALTSSTOFFEN EINER WASSERLÖSLICHEN FRAKTION AUS
CIGARETTENRAUCHKONDENSAT

H. ELMENHORST, L. STADLER UND E. GOERTZ

*Institut der wissenschaftlichen Forschungsstelle im Verband der Cigarettenindustrie, Gazellekamp 38,
2000 Hamburg 54 (Deutschland)*

(Eingegangen am 12. Dezember 1968)

SUMMARY

Fractionation of cigarette smoke condensate. II. Gel filtration chromatography of the fluorescing components of a water-soluble fraction of cigarette smoke condensate

The fluorescing components of the water-soluble fraction of cigarette smoke condensate were separated by chromatography on Sephadex gel. Thin-layer chromatographic investigations of the subfractions obtained demonstrated that the fluorescence of the water-soluble part of cigarette smoke condensate is due to the substances scopoletin, harman, norharman and at least 22 additional substances which occur in lesser quantities and which have not yet been identified. Scopoletin and the mixture of harman and norharman were separated from the other fluorescing substances by gel chromatography.

In the different subfractions, nicotine, nicotine-N-oxide, nicotinic acid as well as 17 other substances which react positively with BrCN/benzidine and which have not yet been completely identified, were found in the form of nonfluorescing components. These substances can also be partly separated from each other by gel chromatography. Therefore, chromatography on Sephadex gel appears to be a useful procedure for fractionating water-soluble components of tobacco smoke condensate.

EINLEITUNG

Bei der Fraktionierung von Cigarettenrauchkondensaten¹ fiel uns auf, dass in wasserlöslichen Fraktionen fluoreszierende Stoffe auftraten. Um diese Stoffe näher zu untersuchen, haben wir, unter Anlehnung an eine von DEMETRIOU *et al.*² beschriebene Methode, versucht, die wasserlöslichen Anteile des Cigarettenrauchkondensates an Sephadex G 15 Säulen aufzutrennen. Die Chromatografie an Sephadexgel scheint uns

eine brauchbare Methode zur Fraktionierung von wasserlöslichen Inhaltsstoffen des Rauchkondensates zu sein.

METHODEN

Vorbereitung und Betrieb der Säule

Das vernetzte Dextran Sephadex G 15 (Pharmacia), welches wir in den nachfolgend beschriebenen Versuchen benutzten, hatte eine Korngrösse von 40–120 μ und ein Wasseraufnahmevermögen von 1.5 ml/g. Für ein Säulenbettvolumen von 100 ml wurden *ca.* 33 g trockenes Gel benötigt.

Als Säule wurde ein Sephadexchromatografierohr Typ SR 25/45 mit einem Durchmesser von 2.5 cm und einer Länge von 45 cm verwendet. 33 g Sephadex G 15 wurden in 150 ml dest. Wasser aufgeschlämmt, über Nacht quellen gelassen und am nächsten Tag blasenfrei in die mit wenig dest. Wasser gefüllte Säule eingeschlämmt. Nach 5–10 min hatte sich das Gel abgesetzt. Das untere Säulenende wurde verschlossen und der obere Stempel der Säule vorsichtig mit offenem oberem Schlauchende soweit abgesenkt, bis die Unterkante des Stempels 1–2 mm von der Oberfläche des Gelbettes entfernt war. In dem Raum zwischen Gelbett und Stempel, sowie im oberen Schlauch waren keine Luftblasen mehr vorhanden. Das Ende des oberen Schlauches wurde in ein Niveaugefäss mit dest. Wasser gehängt und das Niveaugefäss so hoch gestellt, dass zwischen der Oberfläche des Gelbettes und dem Flüssigkeitsspiegel des Gefässes eine Höhendifferenz von 30 cm entstand. Die Säule wurde mit 100–250 ml dest. Wasser gewaschen und war dann betriebsfertig. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug am Anfang 150–200 ml/Std. Nach einigen Stunden sank sie auf 100 ml/Std.

Etwa 30 mg der wasserlöslichen Rauchkondensatfraktion, gelöst in 1 ml Wasser, wurden auf die Säule aufgetragen.

Das Eluat wurde in Fraktionen von 10 ml mit einem Fraktionssammler Ultrorac 7000 der Firma LKB Stockholm aufgefangen.

Es wurden zwei verschiedene Elutionsmittel verwendet; zuerst 500 ml dest. Wasser und anschliessend 500 ml einer 5 mM Kochsalzlösung, die mit 1 N Salzsäure auf pH 4.0 eingestellt war. Das Gesamtelutionsvolumen betrug 1,000 ml. Nach Abschluss der Elution wurde die Säule mit 100 ml dest. Wasser gewaschen und war dann für einen neuen Versuch verwendungsfähig.

In der Praxis erwies es sich jedoch als günstiger, die Säule nach jedem Versuch neu einzuschlämmen, da die Laufgeschwindigkeit bei längerem Betrieb zu stark abnahm.

Automatische Registrierung der Fluoreszenz der Fraktionen

Die Fluoreszenz des Eluates wurde in einer Quarzdurchflusszelle von 1 cm Schichtdicke laufend mit einem Fluorimeter der Firma Zeiss verfolgt und auf einem Schreiber (Hitachi, Perkin Elmer Typ 159) registriert. Dadurch wurden Elutionsdiagramme erhalten, die die Fluoreszenz des Eluates in Abhängigkeit von dem Elutionsvolumen zeigten. Ein Beispiel für ein solches Elutionsdiagramm gibt die Fig. 1. Der Papiervorschub des Schreibers betrug 0.5 cm/min. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 366 nm. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde über ein Sekundärfilter, welches ab 390 nm durchlässig war, auf einem Photomultiplier verstärkt und auf dem Schreiber registriert. Die Messanordnung wurde vor jedem Versuch mit einem Fluoreszenzglasstandard geeicht.

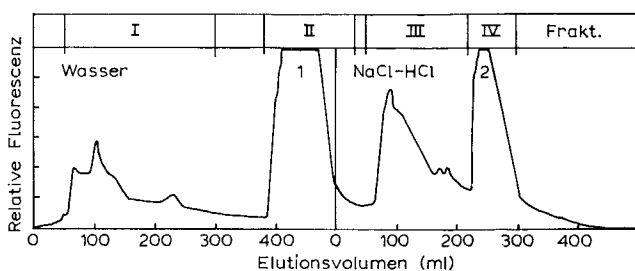


Fig. 1. Auftrennung einer wasserlöslichen Fraktion aus Cigarettenrauchkondensat an Sephadex G 15. Die Säule wurde zuerst mit 500 ml dest. Wasser und anschliessend mit 500 ml 0.005 *M* Natriumchlorid, pH 4.0 entwickelt. 1 = Scopoletin, 2 = Harman und Norharman.

Herstellung einer wasserlöslichen Fraktion aus Rauchkondensat

1 g Cigarettenrauchkondensat wurde zwischen 100 ml Äther und 100 ml Wasser verteilt. Die Ätherphase wurde noch dreimal mit je 100 ml Wasser extrahiert. Die Wasserphasen wurden vereinigt und auf dem Wasserbad bei 95° und schwachem Vakuum eingedampft. Die Ausbeute an wasserlöslichen Stoffen betrug 150 mg = 15%. 100 mg des Eindampfrückstandes wurden in 3 ml Wasser heiss gelöst und von einem geringen unlöslichen Anteil durch Filtrieren getrennt. Die so erhaltene Lösung wurde, wie oben beschrieben, auf die Säule aufgetragen.

Dünnschichtchromatografie

Für die Auftrennung und Identifizierung der Inhaltsstoffe in den Fraktionen der Gelchromatografie wurden folgende Systeme benutzt:

System A. Alkalische Kieselgelplatten. Laufmittel: Benzol-Äthanol (4:1). Die Platten wurden zweimal mit dem Laufmittel entwickelt. Zur Herstellung der alkalischen Platten wurden 20 g Kieselgel G nach Stahl in 50 ml 0.5 *N* KOH aufgeschlämmt, in einer Schichtdicke von 0.25 mm auf Glasplatten aufgetragen und an der Luft getrocknet.

System B. Neutrale Kieselgel-G-Platten. Schichtdicke: 0.25 mm. Laufmittel: Benzol-Äthanol (4:1). Die Platten wurden zweimal entwickelt.

System C. Neutrale Kieselgel-G-Platten. Schichtdicke: 0.25 mm. Laufmittel: Toluol-Essigsäureäthylester-Ameisensäure (5:4:1). Die Platten wurden zweimal entwickelt.

System D. Neutrale Kieselgelfertigplatten (Merck). Schichtdicke: 0.25 mm. Laufmittel: *n*-Butanol-Methanol-Benzol-Wasser (2:1:1:0.75).

System E. Neutrale Kieselgelfertigplatten (Merck). Schichtdicke: 0.25 mm. Laufmittel: Chloroform-Methanol-Ammoniak (60:10:1).

System F. Neutrale Kieselgelfertigplatten (Merck). Schichtdicke: 0.25 mm. Laufmittel: Chloroform-Methanol-Eisessig (60:10:1).

System G. Neutrale Kieselgelfertigplatten (Merck). Schichtdicke: 0.25 mm. Laufmittel: Benzol-Methanol-Ammoniak (82:18:0.8).

Sprühreagenzien für Dünnschichtchromatografie

Benzidin-Bromcyan. Nachweis von Nikotinalkaloiden und Pyridinderivaten.

1% Benzidin in Methanol. Anschliessend die Platte in Bromcyandampf entwickeln. Rotbraune, orange oder violette Flecken.

Gibbs Reagenz. Nachweis phenolischer Substanzen. 0.1% Dichlorchinonchlorimid in Methanol. Auf alkalischen Platten (DC-System A) zeigen sich nach dem Ansprühen, bei Vorhandensein phenolischer Substanzen, nach kurzer Zeit blaue Flecken.

Echtblausalz B. Nachweis von Phenolen und kupplungsfähigen Aminen. 0.5% 4,4'-Bis(2-methoxybenzoldiazoniumchlorid) in Methanol. Rotbraune bis violette Flecken.

Spektren

Die U.V.-Spektren wurden mit einem registrierenden Gerät 137 UV der Firma Perkin Elmer, die Fluoreszenzspektren mit einem registrierenden Fluorimeter ZFM4 der Firma Zeiss aufgenommen.

ERGEBNISSE

Unsere Untersuchungen ergaben, dass eine Auftrennung der wasserlöslichen Fraktion des Rauchkondensates an Sephadex G 15 möglich ist.

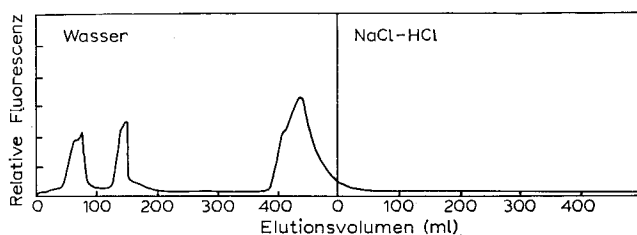


Fig. 2. Elutionsdiagramm eines wässrigen Tabakextraktes.

Fig. 1 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm. Das Diagramm lässt erkennen, dass die Fluoreszenz der wasserlöslichen Fraktion auf mindestens vier Stoffe oder Stoffgruppen zurückzuführen ist. In Fig. 2 ist das unter den gleichen Bedingungen aufgenommene Elutionsdiagramm eines wässrigen Tabakextraktes dargestellt. Ein Vergleich mit Fig. 1 zeigt, dass wahrscheinlich ein Teil der fluoreszierenden Inhaltsstoffe der wasserlöslichen Fraktion des Rauches schon im Tabak selber vorkommt, ein anderer Teil jedoch erst während des Rauchprozesses gebildet wird.

Zur weiteren Charakterisierung der fluoreszierenden Stoffe wurden die im Fraktionssammler aufgefangenen Eluate zu vier verschiedenen Fraktionen vereinigt (Fig. 1) und dünnschichtchromatografisch untersucht. Aufgrund der verhältnismässig einheitlichen Form der Elutionsmaxima der Fraktionen II und IV vermuteten wir, dass in diesen Fraktionen nur jeweils ein fluoreszierender Stoff oder eine Stoffgruppe vorhanden sei.

Bei der stark fluoreszierenden Fraktion II bestätigte sich diese Annahme. Als fluoreszierender Stoff wurde *Scopoletin* nachgewiesen. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der R_F -Werte in den Dünnschichtsystemen A, B und C und Vergleich der Fluoreszenz- und U.V.-Spektren mit denen von authentischem Scopoletin*.

* Scopoletin von der Firma Roth, Karlsruhe; nachträglich durch mehrfache DC gereinigt.

Die Fraktion IV enthielt als fluoreszierende Hauptbestandteile *Harman* und *Norharman*. Harman und Norharman konnten durch Dünnschichtchromatografie in dem System B getrennt werden. Die Fluoreszenzspektren und die R_F -Werte in den DC-Systemen A, B und C waren mit den Daten authentischer Harman- bzw. Norharmanproben* identisch.

Die Fraktion I enthielt nach Auftrennung im DC-System A, sieben fluoreszierende Substanzen. Davon lagen drei Substanzen in höherer Konzentration und die restlichen vier nur in Spuren vor.

Die Fraktion III wies, im DC-System A, zehn fluoreszierende Substanzen auf. Drei davon zeigten eine stärkere Fluoreszenz, die restlichen sieben fluoreszierten nur schwach.

Die Identifizierung dieser Substanzen gelang bisher noch nicht.

Erste Hinweise über weitere, nicht fluoreszierende Inhaltsstoffe in den Fraktionen I–IV erhielten wir durch Behandlung der Dünnschichtplatten mit verschiedenen Sprühreagenzien. Die Reaktion auf Pyridinderivate mit BrCN und Benzidin z.B. zeigte, dass die Bromcyan positiven Substanzen in den Fraktionen I und III angereichert waren. Die Fraktionen II und IV zeigten praktisch keine Reaktion mit BrCN/Benzidin. Die Fraktion I enthielt 13 Bromcyan-positive Stoffe. Drei davon konnten als *Nikotin*, *Nikotinsäure* und *Cotinin* identifiziert werden. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der R_F -Werte mit denen von authentischen Substanzproben in den sieben DC-Systemen A, B, C, E, F, G und D. Die Konzentration des Nikotins in der Fraktion I war allerdings sehr gering.

Die Fraktion III enthielt neben sehr viel Nikotin geringe Mengen von sieben weiteren Bromcyan-positiven Stoffen. Neben dem *Nikotin* konnte noch ein Stoff als *Nikotin-N-Oxid* identifiziert werden. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der R_F -Werte in den DC-Systemen A, B, C, E, F und G.

Die Reaktion mit Gibbs Reagenz und Echtblausalz B liess vermuten, dass ein Teil der Inhaltsstoffe der Fraktionen I und III phenolischen Charakter tragen. In beiden Fraktionen waren jeweils Substanzen zu sehen, die mit den beiden Reagentien eine positive Reaktion gaben (DC-System A und B). Die Fraktionen II und IV zeigten keine Reaktionen.

TABELLE I

IDENTIFIZIERUNG EINIGER INHALTSSTOFFE IN DEN FRAKTIONEN DER SEPHADEXSÄULE

Fraktion	Inhaltsstoff
I	Sieben fluoreszierende Stoffe. Nikotinsäure, Cotinin, Spuren Nikotin, zehn weitere Substanzen, die mit BrCN/Benzidin rot orange angefärbt werden. Phenolische Substanzen.
II	Scopoletin.
III	Zehn fluoreszierende Substanzen. Viel Nikotin, Spuren Nikotin-N-oxid. Sieben weitere Substanzen, die mit BrCN/Benzidin rot orange angefärbt werden. Phenolische Substanzen.
IV	Harman, Norharman. Fünf weitere fluoreszierende Stoffe in Spuren.

* Firma Fluka: Harman wurde durch mehrfache DC gereinigt.

Eine Übersicht über die bisher in den vier Fraktionen von uns nachgewiesenen Inhaltsstoffe gibt die Tabelle I. Die Untersuchung der noch nicht identifizierten Substanzen wird weiter von uns verfolgt.

Die Befunde, dass das Cumarinderivat Scopoletin von N-Heterocyclen wie Harman, die weniger basischen Pyridinderivate Nikotinsäure und Cotinin weitgehendst vom Nikotin und offensichtlich auch phenolische Stoffe in verschiedene Fraktionen getrennt werden können, bestätigen die von DEMETRIOU und Mitarbeitern² an Testmischungen gemachten Beobachtungen und weisen daraufhin, dass die Chromatografie an Sephadex-gel generell ein nützliches Verfahren zur Fraktionierung wasserlöslicher Anteile des Rauchkondensates und von Rauchkondensatfraktionen sein könnte.

ZUSAMMENFASSUNG

Die fluoreszierenden Inhaltsstoffe der wasserlöslichen Fraktion eines Cigarettenrauchkondensates konnten durch Chromatografie an Sephadexgel aufgetrennt werden. Die dünnschichtchromatografische Untersuchung der dadurch erhaltenen Unterfraktionen ergab, dass die Fluoreszenz des von uns untersuchten wasserlöslichen Anteiles des Cigarettenrauchkondensates auf die Substanzen Scopoletin, Harman, Norharman und mindestens 22 weitere in geringeren Mengen vorkommende noch nicht identifizierte Stoffe zurückzuführen ist. Scopoletin und das Gemisch aus Harman und Norharman wurden durch die Gelchromatografie in verschiedenen Fraktionen weitgehendst von den anderen fluoreszierenden Stoffen abgetrennt.

Als nichtfluoreszierende Inhaltsstoffe wurden in verschiedenen Fraktionen Nikotin, Nikotin-N-oxid, Cotinin, Nikotinsäure sowie 17 weitere mit BrCN/Benzidin-positiv reagierende, noch nicht näher definierte Substanzen gefunden. Auch diese Substanzen können teilweise durch die Gelchromatografie getrennt werden. Die Chromatografie an Sephadexgel scheint demnach ein brauchbares Verfahren für die Fraktionierung von wasserlöslichen Inhaltsstoffen des Tabakrauchkondensates zu sein.

LITERATUR

- 1 H. ELMENHORST UND G. GRIMMER, *Z. Krebsforsch.*, 71 (1968) 66.
- 2 J. A. DEMETRIOU, F. M. MACIAS, R. M. J. McARTHUR UND J. M. BEATTIE, *J. Chromatog.*, 34 (1968) 342.

J. Chromatog., 40 (1969) 264-269