

CHROM. 5880

Gel-verteilungschromatographisches Verfahren zur präparativen Abtrennung polarer Substanzen von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Fraktionierung von Zigarettenrauchkondensat*

Biologische Untersuchungen von Zigarettenrauchkondensat durch DONTENWILL *et al.*¹ haben gezeigt, dass eine durch flüssig-flüssig Verteilung gewonnene sogenannte Nitromethanfraktion V die biologische Wirksamkeit des Gesamtkondensates nahezu vollständig enthält. Auf Grund überlappender Verteilungsbereiche und durch Verschleppungseffekte sind in dieser Fraktion nicht nur die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH), sondern noch eine Vielzahl polarer Verbindungen wie Phenole und Nikotinalkaloide enthalten.

Da neben der biologischen Wirksamkeit der PAH eine mögliche Promotorwirkung polarer Substanzen wie z.B. phenolischer Fraktionen diskutiert wird, ist eine vollständige Trennung beider Gruppen für weitere Informationen sinnvoll.

Die Anwendung adsorptionschromatographischer Trennmethode z.B. an Kieselgel oder Aluminiumoxid wird durch die Beobachtungen^{2,3} eingeschränkt, dass ein Verlust biologisch aktiven Materials an den Säulen auftreten kann. Auf Grund ihrer hohen Trennschärfe setzten wir daher die Gel-Verteilungschromatographie⁴ als Trennmethode ein.

Experimentelles

Material. In einer Chromatographiesäule der Firma Chromatonix (5.0 × 109.0 cm) bildeten 420 g Sephadex LH-20 (Deutsche Pharmacia GmbH) als Gelträger, Methanol 85 % als stationäre Phase und *n*-Hexan als mobile Phase das Trennsystem. Die Präparierung der Säule wurde in der beschriebenen Weise⁴ vorgenommen. Die gegeneinander abgesättigten Lösungsmittel wurden mit einer peristaltischen Pumpe, Modell Vario-Perpex der Firma LKB gefördert.

Eichsubstanzen gelangten mit dem Spektralphotometer PMQ II mit Durchflussküvette der Firma Zeiss zum Nachweis.

TABELLE I

ELUTION VON TESTSUBSTANZEN MIT *n*-HEXAN ALS LÖSUNGSMITTEL

Absicht: Eichung der Chromatographiesäule mit Benzo[*a*]pyren als Standard.

Substanz	Elutionsvolumen (ml)		
	Anfang	Maximum	Ende
Benzo[<i>a</i>]pyren	860	930	1000
Nikotin	13240	^a	^a
Phenol	^b	—	—

^a Nicht gemessen.

^b Nicht eluierbar.

* Teile der vorliegenden Arbeit wurden auf der 25th Tobacco Chemists Research Conference, 6-8. Oktober 1971, Louisville Ky., V.S.A., vorgetragen.

Eichung und Fraktionierung. Die Säule wurde mit Benzo[*a*]pyren als Standard, gelöst in *n*-Hexan, geeicht (Tabelle I).

Über ein Dreiwegeventil (Chromatonix) wurde danach eine Lösung von 25 g Nitromethanfraktion V des Cigarettenrauchkondensates¹ in 25 ml Tetrahydrofuran auf die Säule gebracht. Die Säule wurde anschliessend mit der vierfachen Menge des Elutionsvolumenmaximums von Benzo[*a*]pyren mit *n*-Hexan aufsteigend eluiert. Das Eluat bildete die Hexanfraktion VI (Fig. 1). Danach wurde die Säule in absteigender Reihenfolge mit 300 ml Methanol 85 %, 500 ml Tetrahydrofuran und 1500 ml Methanol eluiert und so die Polarfraktion VII (Fig. 1) gewonnen.

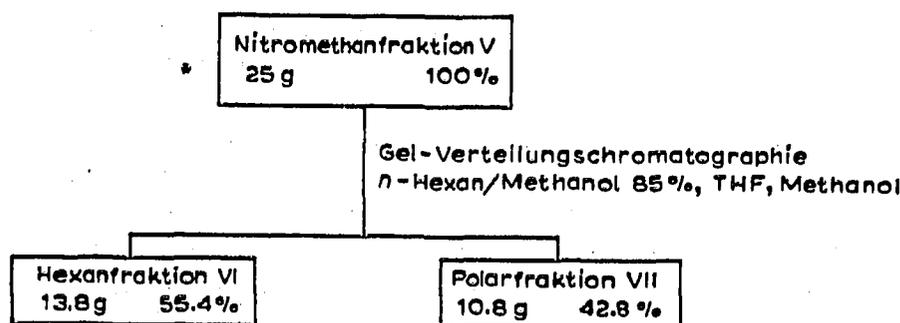


Fig. 1. Quantitative Verteilung bei der Auftrennung einer Cigarettenrauchkondensatfraktion (Nitromethanfraktion V).

Ergebnisse und Diskussion

Um sicher zu sein, dass mit dem angegebenen Trennsystem eine Abtrennung der Nikotinalkaloide und Phenole von PAH möglich ist, orientierten wir uns mit den in Tabelle I angegebenen Testsubstanzen über das Trennverhalten der Säule. Danach beginnt eine Elution von Nikotin mit dem Lösungsmittel *n*-Hexan erst nach der dreizehnfachen Menge des Elutionsvolumens von Benzo[*a*]pyren. Wie zahlreiche Untersuchungen verschiedener PAH gezeigt haben⁴, liegen die Elutionsvolumina höher kondensierter PAH eng zusammen.

Daher legten wir eine Fraktionierung einer Cigarettenrauchkondensatfraktion so fest, dass wir unter Bezug auf Benzo[*a*]pyren zunächst mit der vierfachen Menge des Elutionsvolumenmaximums dieser Eichsubstanz mit *n*-Hexan eluierten. Die so gewonnene Hexanfraktion VI enthielt 55.4 % der aufgetragenen Nitromethanfraktion V (Fig. 1). Als Trenntechnik empfiehlt sich eine aufsteigende Entwicklung der Säule. Damit erreicht man eine höhere Systemstabilität. In der Hexanfraktion VI waren nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung keine Nikotinalkaloide mehr nachweisbar. Die Polarfraktion VII wurde dann in absteigender Richtung eluiert. Fig. 2 zeigt die typische quantitative Verteilung im Verlauf der Auftrennung an der Säule und verdeutlicht die sichere Abtrennung polarer von weniger polaren Substanzen.

Die Belastung der Säule kann um ein Mehrfaches erhöht werden. Auch dann bleibt eine Konstanz im Elutionsvolumen zugesetzter Eichsubstanzen gewahrt.

Dem Elutionsverhalten einer grossen Anzahl von Eichsubstanzen zufolge⁴ verteilen sich auf die Hexanfraktion VI die PAH, Paraffine, Olefine und Terpene,

auf die Polarfraktion VII Verbindungen wie die Nikotinalkaloide, Phenolkörper und der vorwiegende Anteil brauner Pigmentstoffe.

Gewinnung der Polarfraktion

Während das Einengen der Hexanfraktion VI am Rotationsverdampfer bei 40° Wasserbadtemperatur nicht zu Substanzverlusten führte, konnte bei der Polarfraktion VII eine deutliche Verminderung der phenolischen Verbindungen beobachtet werden. Die Ursache dürfte auf Grund des Wassergehaltes der Phase in einer Art "Wasserdampfdestillation" während des Einenschrittes zu suchen sein. Derartige Verluste müssen aber vermieden werden, wenn man die Fraktionen für biologische Teste einsetzen will.

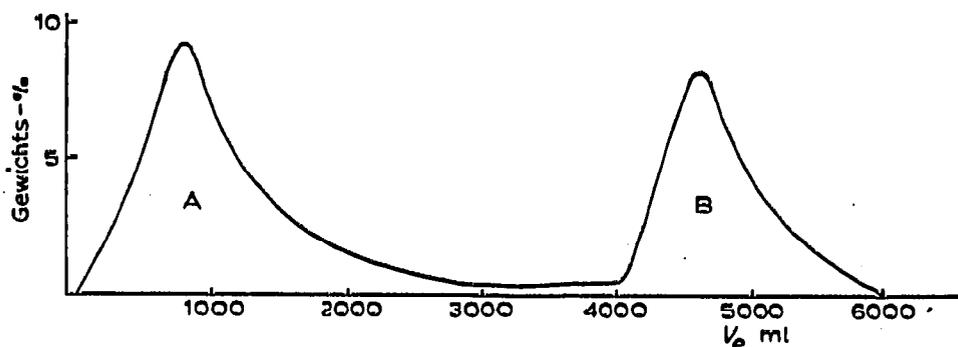


Fig. 2. Quantitative Verteilung bei der Auftrennung von 25 g Nitromethanfraktion V. A = Hexanfraktion VI (Elutionsmittel *n*-Hexan bis 3720 ml); B = Polarfraktion VII (Elution mit Methanol 85%, THF, Methanol bis 6000 ml).

Ein Trocknen der methanolischen Fraktion mit Salzen wie Natriumsulfat führte nicht zum gewünschten Erfolg. Substanzverluste liessen sich schliesslich mit folgender Methode weitgehend reduzieren: Die Polarfraktion VII wurde am Rotationsverdampfer ohne Wärmezufuhr auf ein Viertel des Volumens eingengt und das Destillat verworfen. Die restlichen Lösungsmittel wurden bei 40° Wasserbadtemperatur und intensiver Kühlung in der Destillationsblase aufgefangen. Diese vorwiegend wässrige Phase wurde mit dem gleichen Volumen Benzol überschichtet und mit 10% Natriumchlorid sowie Sephadex G-200 versetzt, wobei 1 g Gel für 25–30 ml Lösung eingesetzt wurde. Das stark hydrophile Gel quillt unter Wasseraufnahme, so dass sich das Benzol mit den gelösten Phenolkörpern gut abtrennen lässt. Nach zweimaligem Nachwaschen mit Benzol wurden die benzolischen Phasen eingengt und die so extrahierten Substanzen der Polarfraktion VII wieder zugesetzt.

Mit diesem Trocknungsschritt durch Gelzusatz von Sephadex G-200 unter Rückgewinnung der Phenolkörper erreicht man (Tabelle II), dass noch 97% der quantitativ bestimmbareren Phenole⁵ in der eingengten Fraktion vorliegen.

Die beiden beschriebenen gelchromatographischen Techniken ermöglichen eine effektive Trennung polarer von weniger polaren Substanzen einschliesslich polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe. Ihre Anwendung empfiehlt sich daher

TABELLE II

RÜCKGEWINNUNG PHENOLISCHER SUBSTANZEN

Trocknung mit Sephadex G-200 nach dem Einengen der Polarfraktion VII, und Benzolextraktion wie im Text.

Fraktion	Phenole	
	mg	%
Polarfraktion VII vor dem Einengen	32.5	100
Polarfraktion VII nach dem Einengen	28.3	87.1
Benzolextrakt des Destillates	3.2	9.9

für die Fraktionierung von Zigarettenrauchkondensat, dessen biologische Wirksamkeit in Tierexperimenten geprüft werden soll.

Forschungsinstitut der Zigarettenindustrie e.V.*,
D 2 Hamburg 54 (B.R.D.)

H.-J. KLIMISCH
L. STADLER

- 1 W. DONTENWILL, H. ELMENHORST, H.-P. HARKE, G. RECKZEH UND K. H. WEBER, *Z. Krebsforsch.*, 73 (1970) 305.
- 2 J. K. WHITEHEAD UND K. ROTHWELL, *Brit. J. Cancer*, 23 (1969) 840.
- 3 J. MILLER, W. J. CHAMBERLAIN UND R. L. STEDMAN, *Tobacco Sci.*, 14 (1970) 26.
- 4 H.-J. KLIMISCH UND L. STADLER, *J. Chromatogr.*, im Druck.
- 5 G. LORENTZEN UND G. NEURATH, *Beitr. Tabakforsch.*, 2 (1963) 73.

Eingegangen am 13. Dezember 1971

* Leiter: PROF. DR. W. DONTENWILL.

J. Chromatogr., 67 (1972) 175-178