

CHROM. 8964

TRENNUNG POLYZYKLISCHER AROMATISCHER KOHLENWASSERSTOFFE DURCH HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE

VERGLEICH EINER BESTIMMUNG VON BENZO[a]PYREN NACH TRENNUNG AN SÄULEN MIT QUERVERNETZTEM CELLULOSEACETAT UND EINEM REVERSED-PHASE SYSTEM

H.-J. KLIMISCH* und D. AMBROSIUS

Forschungsinstitut der Cigarettenindustrie e.V., Gazellenkamp 38, 2000 Hamburg 54 (B.R.D.)

(Eingegangen am 5. Dezember 1975)

SUMMARY

Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high-pressure liquid chromatography. Comparison of the determination of benzo(a)pyrene with separation on columns of cross-linked cellulose acetate and a reversed-phase system.

The behaviour of a new high-pressure liquid chromatographic support, *i.e.* a cross-linked cellulose acetate, as selective separation material for polycyclic aromatic hydrocarbons is discussed. The determination of benzo[a]pyrene is described by an example of separating a so-called benzpyrene fraction. The separation of the benzpyrene fraction was possible by combining column systems with aluminium oxide, cross-linked cellulose acetate or a reversed-phase system. By means of a fluorescence detector 0.1–0.8 ng benzo[a]pyrene could be detected in 5 μ l injection volume.

EINLEITUNG

Zur Trennung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAH) durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine Reihe von Systemen beschrieben worden^{1–8}. Dabei handelt es sich zum grössten Teil um die Trennung künstlicher Gemische aus Reinsubstanzen. Nur sehr wenige Arbeiten sind bekannt^{9–13}, wo an Beispielen aus der Praxis über Anwendungsmöglichkeiten zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung berichtet wird. Die Gründe für diese Diskrepanz sind wohl darin zu suchen, dass die PAH-Proben auf den Anwendungsgebieten Nahrungsmittelchemie, Erdöl und Treibstoffe, Luftverunreinigungen und Zigarettenrauch zu komplex zusammengesetzt sind und die Trennleistung und Nachweisempfindlichkeit der HPLC überfordern.

Es scheint daher aussichtsreicher und sinnvoller zu sein, einige selektive Trennsysteme zu untersuchen^{1,2,12,13,15} und an ihnen einzelne interessante Fraktionen der







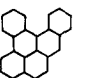


* Anschrift: BASF-WPF, E-6700 Ludwigshafen, B.R.D.

komplexen PAH-Skala aufzutrennen. Wegen seiner Bedeutung als Standard-Repräsentant carcinogener PAH hat die Bestimmung des Benzo[*a*]pyrens grosses Interesse gefunden. Diese Verbindung kommt meistens zusammen mit dem isomeren Benzo[*e*]pyren und ähnlich kondensierten PAH vor und bildet die sogenannte Benzpyrenfraktion (Tabelle I). Wir beschreiben im folgenden die Isolierung und Bestimmung des Benzo[*a*]pyrens aus dieser Benzpyrenfraktion mit einem neu entwickelten, selektiven Trägermaterial, einem quervernetzten Celluloseacetat und vergleichen dieses System mit Trennungen an Säulen auf reversed-phase Basis (Kiesel-gel mit chemisch gebundenen C₁₈-Gruppen).

In einer späteren Arbeit¹³ werden wir als praktisches Anwendungsbeispiel die quantitative Bestimmung von Benzo[*a*]pyren aus Zigarettenrauchkondensat beschreiben.

TABELLE I

ELUTIONSVOLUMINA EINIGER PAH, RELATIV ZU BENZO[*a*]PYREN

Strukturformel	Substanz	Elutionsvolumen (ml)	
		Cel-Ac-30x	μBondapak C ₁₈
	Benzo[<i>a</i>]pyren	1.00	1.00
	Benzo[<i>e</i>]pyren	0.29	0.93
	Perylen	0.41	1.00
	Benzo[<i>b</i>]fluoranthen	0.54	0.93
	Benzo[<i>k</i>]fluoranthen	0.48	0.93
	Anthanthren	1.00	1.30
	Indenopyren	0.51	
	1,2,9,10-Dibenzopyren	0.29	
	1,12-Benzperylene	1.29	

MATERIAL UND METHODEN

Quervernetztes Celluloseacetat

Als Säulenfüllmaterial wurde ein speziell hergestelltes quervernetztes Cellulose-

acetat (HPLC-Sorb, Cel-Ac-30x; Macherey, Nagel & Co., Düren, B.R.D.) mit 35% Acetatgehalt mit einer speziellen Füllmethode in Stahlsäulen V₄A 250 × 4 mm gefüllt. Alle Trennungen wurden mit einem Universal-Flüssigkeitschromatographen UFC-1000 (Hupe & Busch, jetzt Hewlett-Packard) in Verbindung mit einem UV-Detektor mit variablen Wellenlängen Modell HP-1030 B (Hewlett-Packard) bzw. einem Fluoreszenzdetektor Modell 836 (DuPont) durchgeführt. Als Schreiber wurde ein Kompensograph III, 0.25 sec Einstellzeit (Siemens) angeschlossen.

Säulenpackmethode. Trotz der deutlich verminderten Quellfähigkeit des quervernetzten Celluloseacetats sollte ein Packen der Säule mit trockenem Material vermieden werden, da sich solche Säulen nur schlecht entleeren lassen. Folgende Packmethode hat sich bewährt. Das Trägermaterial wird mindestens 6 Stunden in jeweiligen Analysen-Lösungsmitteln gequollen. Eine Suspension des gequollenen Materials wird in ein Packgefäß¹⁴ gefüllt, das über eine Ausgleichssäule mit der zu füllenden Säule verbunden wird. Unter Vibration der Suspension wird die Durchlaufgeschwindigkeit der Pumpe so reguliert, dass ein Packungsdruck erhalten wird, der unter den analytischen Trennbedingungen nicht überschritten werden sollte. Bewährt hat sich im Lösungsmittel Äthanol-Dichlormethan (2:1) ein Packungsdruck von $\Delta P = 30$ atü. Die Säulen werden an beiden Enden mit Methalfritten verschlossen.

HPLC-Analysenbedingungen. Jeweils 5 μ l einer Lösung der PAH im Analysenlösungsmittel wurden injiziert und bei einer Durchflussrate von 42 ml/h und einem Druck von $\Delta P = 3$ atü chromatographiert. Der Nachweis am UV-Detektor erfolgte bei einer Wellenlänge von 297 nm. Am Fluoreszenzdetektor wurden ein Primärfilter (326–380 nm) und ein Sekundärfilter (377 nm) verwendet.

Reversed-phase System

Die Trennungen wurden im gleichen apparativen System wie oben beschrieben mit einer μ Bondapak C₁₈ Säule, 4 × 300 mm (Waters Messtechnik) bei einer Durchflussrate von 23.5 ml/h und einem ΔP von 20 atü im Lösungsmittelsystem Methanol-Wasser (9:1) durchgeführt. 5 μ l einer Lösung der PAH in Methanol wurden injiziert und das Elutionsvolumen der Verbindungen nach UV- oder Fluoreszenzdetektion bestimmt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Unsere Erfahrungen mit der HPLC-Analytik von Benzo[a]pyren hatten zu der Entwicklung eines sehr selektiven Trennungssystems unter Verwendung von Celluloseacetatsäulen geführt^{1,2}. Bei der Routineanalytik mit diesen Säulen wurden einige Nachteile deutlich. Das Material war zu weich, hatte ein zu grosses Quellvermögen und liess sich aus diesem Grund nur sehr schwierig aus gefüllten Säulen wieder herauslösen. Der Hauptnachteil aber bestand in der zwar geringen aber doch merklichen Löslichkeit des Celluloseacetats in fast allen Lösungsmitteln. Vor allem die Löslichkeit in halogenierten Kohlenwasserstoffen war z.T. beträchtlich. So waren z.B. von einem 40% Celluloseacetat in Chloroform 88% löslich.

Wir entschlossen uns daher, durch Quervernetzung des Celluloseacetats mit bifunktionellen Verbindungen wie Dialdehyden, Diisothiocyanaten oder Diepoxiden die chromatographischen Eigenschaften des Celluloseacetats soweit zu verbessern, dass sie für die speziellen Erfordernisse der Hochdruck- oder Mitteldruckchromato-

graphie geeignet ist. Morozowich¹⁶ konnte zeigen, dass Anionenaustauscher auf der Basis von Cellulosederivaten durchaus für die HPLC geeignet sind.

Auf der Basis einer mikrokristallinen Cellulose synthetisierten wir daher ein neues Trägermaterial, ein quervernetztes mikrokristallines Celluloseacetat (Fig. 1), das als HPLC-Sorb, Cel-Ac-30x im Handel ist. Das neue Material hat in der HPLC erhebliche Vorteile gegenüber einem nicht quervernetzten Celluloseacetat. Es ist durch seine granuläre, mikrokristalline Form rieselfähig, lässt sich in einen engeren Korngrössenbereich fraktionieren, besitzt nur noch ein geringes Quellvermögen und lässt sich damit viel leichter in Säulen packen, wobei durch die gleichmässige Struktur des Trägermaterials eine grössere Permeabilität bei geringeren Gegendrücken möglich ist. Entscheidend ist aber seine nur noch sehr geringe Restlöslichkeit von weniger als 1% in Chloroform gegenüber den 88% eines Celluloseacetats.

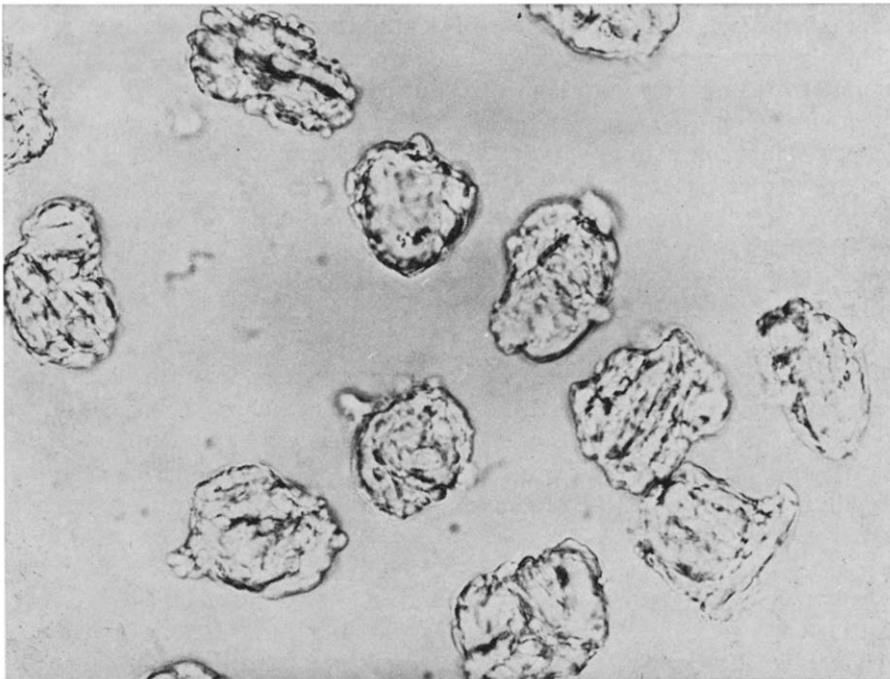


Fig. 1. Quervernetztes mikrokristallines Celluloseacetat. Korngrösse, 15–35 μm .

Wie bereits unsere chromatographischen Erfahrungen bei der Trennung der Benzpyrenfraktion mit Celluloseacetatsäulen zeigten^{1,2}, ist eine sehr selektive Abtrennung des Benzo[*a*]pyrens auch mit dem quervernetzten Celluloseacetat (HPLC-Sorb, Cel-Ac-30x) möglich, wobei die Säule nur halb so lang war (Fig. 2) und ein nur geringer Druck von $\Delta P = 3$ atü auftrat. Die Analysenzeit konnte somit verkürzt, die Nachweisempfindlichkeit gesenkt werden. Bei Verwendung eines UV-Detektors liegt die Nachweisgrenze bei 30 ng pro 5 μl Injektionsvolumen. Mit einem Fluoreszenzdetektor liegt sie noch erheblich niedriger, und zwar bei 0.8 ng pro 5 μl Injektionsvolumen. Bei so geringen Nachweismengen sind Mikrobestimmungen möglich.

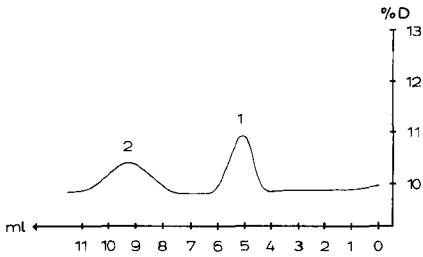


Fig. 2. Trennung des Benzo[a]pyrens (2) von Benzo[k]fluoranthen + Benzo[b]fluoranthen + Benzo[e]pyren (1) an einer Säule mit quervernetztem Celluloseacetat HPLC-Sorb, Cel-Ac-30x.

Damit werden clean-up Verfahren aus Zigarettenrauchkondensat oder ähnlichen komplexen Stoffgemischen weniger zeit- und materialaufwendig.

Bei der Analytik der Benzo[a]pyren-Bestimmung mit quervernetztem Celluloseacetat (HPLC-Sorb, Cel-Ac-30x) ist zu beachten, dass z.B. das Anthanthren, das nicht zur Benzpyrenfraktion gehört, aber stets in komplexen Gemischen aller PAH mit vorkommt, das gleiche Elutionsvolumen wie Benzo[a]pyren hat (Tabelle I). Es ist daher notwendig, die Benzpyrenfraktion von Anthanthren abzutrennen. Dies ist mit Hilfe einer Aluminiumoxidsäule¹⁷ möglich, die häufig zum clean-up komplexer PAH-Gemische eingesetzt wird.

Für die Bestimmung des Benzo[a]pyrens ist dieses selektive Trennsystem ebenso wie für die Bestimmung des Coronens^{1,2} sehr vorteilhaft.

In letzter Zeit sind vermehrt Systeme auf der Basis einer reversed-phase Chromatographie auch zur Trennung der PAH beschrieben worden¹⁸⁻²⁰. Mit diesen Systemen ist eine vielbeachtete Trennung der isomeren Benzpyrene möglich. Es stellte sich die Frage, ob mit reversed-phase Säulen die PAH der Benzpyrenfraktion (Tabelle I) so aufzutrennen sind, dass dieses Trennsystem zur quantitativen Bestimmung des Benzo[a]pyrens angewendet werden kann.

Wie aus den Elutionswerten der Tabelle I ersichtlich, ist das nicht der Fall. So werden zwar die isomeren Benzpyrene aufgetrennt, nicht dagegen das Perylen von Benzo[a]pyren. Damit ist auch bei der Verwendung von Säulen mit reversed-phase Trägermaterialien eine vorherige Auftrennung der Benzpyrenfraktion notwendig, um z.B. Benzo[a]pyren quantitativ bestimmen zu können.

Dieses Problem lässt sich so lösen, dass durch eine Kombination von Trennverfahren mit verschiedenen Trennmechanismen z.T. unterschiedliche Elutionswerte einiger PAH erhalten werden. Kombiniert man z.B. eine chromatographische Trennung an einer Säule mit quervernetztem Celluloseacetat (HPLC-Sorb, Cel-Ac-30x), die man als präparative Säule im Sinne eines clean-up-Schrittes einsetzt und mit der eine Auftrennung zwischen Benzo[a]pyren und Perylen möglich ist, anschliessend mit der Bestimmung an einem reversed-phase-System, das eine Trennung zwischen Benzo[a]pyren und Anthanthren ermöglicht, so ist eine Bestimmung einzelner PAH auf diese Weise möglich.

Im Vergleich zum Trennsystem einer Säule mit quervernetztem Celluloseacetat ist die Nachweisempfindlichkeit einer Säule mit reversed-phase Trägermaterial aufgrund der kürzeren Retentionszeit und damit der geringeren Halbwertsbreite der Peaks günstiger. So lassen sich noch von Benzo[a]pyren 30 ng (UV-Detektor) bzw.

0.8 ng (Fluoreszenzdetektor) nach einer Trennung an einer Säule mit quervernetztem Celluloseacetat nachweisen. Im System einer reversed-phase Säule liegt die Nachweisgrenze bei 4 ng (UV-Detektor) bzw. 0.1 ng (Fluoreszenzdetektor) Benzo[*a*]pyren in 5 μ l Injektionsvolumen (Fig. 3).

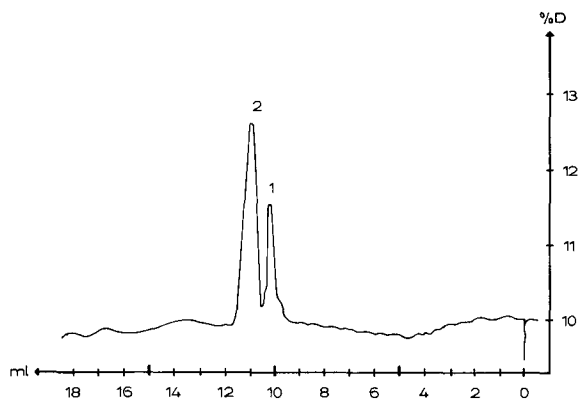


Fig. 3. Trennung von PAH an einer reversed-phase Säule μ Bondapak C₁₈. 1 = Benzo[*k*]fluoranthen + Benzo[*b*]fluoranthen + Benzo[*e*]pyren; 2 = Benzo[*a*]pyren + Perylen.

Mit den verglichenen Trennsystemen ist also eine quantitative Bestimmung des Benzo[*a*]pyrens in Gegenwart ähnlich kondensierter PAH der sogenannten Benzpyrenfraktion durch Kombination mehrerer Trennverfahren folgendermassen möglich:

1. Kombination: Aluminiumoxidsäule und quervernetztes Celluloseacetat
2. Kombination: quervernetztes Celloseacetat und reversed-phase System.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Verhalten eines neu entwickelten HPLC Trägermaterials, ein quervernetztes Celluloseacetat, als selektives Trennmateriale für polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wird diskutiert. Am Beispiel der Auftrennung einer sogenannten Benzpyrenfraktion wird die Bestimmung von Benzo[*a*]pyren beschrieben. Durch Kombination von Säulensystemen mit Aluminiumoxid, quervernetztem Celluloseacetat oder einem reversed-phase System gelingt die Auftrennung der Benzpyrenfraktion. Mit einem Fluoreszenzdetektor lassen sich noch 0.1–0.8 ng Benzo[*a*]pyren in 5 μ l Injektionsvolumen nachweisen.

LITERATUR

- 1 H.-J. Klimisch, *J. Chromatogr.*, 83 (1973) 11.
- 2 H.-J. Klimisch, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1960.
- 3 B. B. Wheals, C. G. Vaughan und M. J. Whitehouse, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 109.
- 4 R. V. Vivilecchia, R. L. Cotter, R. J. Limpert, N. Z. Thimot und J. N. Little, *J. Chromatogr.*, 99 (1974) 407.
- 5 C. G. Vaughan, B. B. Wheals und M. J. Whitehouse, *J. Chromatogr.* 78 (1973) 203.
- 6 W. Strubert, *Chromatographia*, 6 (1973) 205.

- 7 J. Vermont, M. Deleuil, A. J. de Vries und C. L. Guillemin, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1329.
- 8 B. Coq, C. Gonnet und J.-L. Rocca, *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 249.
- 9 J. K. Selkirk, R. C. Croy und H. V. Gelbroin, *Science*, 184 (1974) 169.
- 10 D. Hoffmann, G. Rathkamp, S. Nesnow und E. L. Wynder, *J. Nat. Cancer Inst.*, 49 (1972) 1165.
- 11 D. B. Walters, W. J. Chamberlain, M. E. Snook und O. T. Chortyk, *Anal. Chim. Acta*, 73 (1974) 194.
- 12 J. R. O'Hara, M. S. Chin, B. Daimins und J. H. Kilbuck, *J. Food Sci.*, 39 (1974) 38.
- 13 H.-J. Klimisch und D. Ambrosius, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
- 14 J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 206.
- 15 N. T. Ives und L. Guiffrida, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 757.
- 16 W. Morozowich, *J. Chromatogr. Sci.* 12 (1974) 453.
- 17 G. Grimmer und A. Hildebrandt, *J. Chromatogr.* 20 (1965) 89.
- 18 J. A. Schmit, R. A. Henry, R. C. Williams und J. F. Deekman, *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 645.
- 19 *VydacTM Reverse-Phase*, Technical Bulletin 201, 1974.
- 20 The Separation Group. *Application Note*, Waters Associates, 1975.