

CHROM. 11,931

PURIFICATION DU BENZO[*a*]PYRÈNE COMMERCIAL

ISOLEMENT ET DÉTERMINATION DES IMPURETÉS MAJEURES

R. DEPAUS

Commission des Communautés Européennes, Centre Commun de Recherche, Établissement de Petten, Division Matériaux, Petten (Pays-Bas)

(Reçu le 15 mars 1979; manuscrit modifié reçu le 9 avril 1979)

SUMMARY

*Purification of commercial benzo[*a*]pyrene. Isolation and determination of major impurities*

Commercially available benzo[*a*]pyrene preparations contain several impurities with a structure similar to that of benzo[*a*]pyrene. In this work a chromatographic method is described for the purification of gram quantities of benzo[*a*]pyrene. The three major impurities have been isolated in weighable quantities and their structures have been identified by spectroscopic methods, showing two sulphur-containing isomers $C_{18}H_{10}S$ and one tetrahydrobenzopyrene $C_{20}H_{16}$.

INTRODUCTION

L'accroissement du nombre d'analyses effectuées sur les hydrocarbures polyaromatiques dans les problèmes relatifs à l'environnement, ainsi que les études du mécanisme cancérigène de ces produits¹ rend de plus en plus nécessaire l'obtention de produits de référence certifiés. Dans ce but, le Bureau Communautaire des Produits de Référence des Communautés Européennes met à la disposition des chercheurs et des industriels des hydrocarbures polyaromatiques de référence nantis d'un certificat de pureté et continue d'accroître la variété de ces produits.

Ce travail présente une contribution du Centre Commun de Recherche à l'établissement d'un stock de benzo[*a*]pyrène certifié. Il a pour but d'établir une méthode permettant la préparation de quelques dizaines de grammes de benzo[*a*]pyrène purifié à plus de 99.5% au départ de produits commerciaux.

Les impuretés principales rencontrées au cours de ce travail, sont isolées et caractérisées.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Conditions analytiques et expérimentales

Chromatographie en phase gazeuse. Les déterminations chromatographiques sont effectuées en isotherme à 250° à l'aide d'un appareil Hewlett-Packard 5730A.

Le détecteur à ionisation de flamme travaille sous un débit d'hydrogène de 40 ml/min et un débit d'air de 240 ml/min. La colonne en acier inoxydable a une longueur de 1 m et un diamètre de 1/8 in. La phase fixe est constituée de 1.5% de BBT [N,N'-bis(*p*-butoxybenzylidène)- α,α' -bi-*p*-toluidine] imprégnée sur Chromosorb W HP (100–120 mesh). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur.

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'appareil utilisé est constitué d'une pompe 6000A de Waters Assoc. et d'un détecteur UV 440 A, de la même firme, travaillant à 254 nm. Les fonctions analytiques et semi-préparatives sont assurées par deux colonnes en série de Partisil 5 de 25 cm de longueur et 0.9 cm de diamètre intérieur éluées à l'hexane sous un débit de 7 ml/min. La pression d'entrée est de 3000 p.s.i. L'ensemble fonctionne à température ambiante.

Combinaison chromatographie en phase gazeuse (GC)–spectrométrie de masse (MS). Un spectromètre quadrupolaire SQ 156 de la firme Ribermag équipé d'un système d'informatique S 150 est associé à un chromatographe Carbo Erba type Fractovap 2350.

Les conditions chromatographiques sont identiques à celles décrites dans la partie chromatographie gazeuse, excepté le fait que la phase de BBT est suivie sur une longueur de 10 cm d'une phase de Dexsil 300. Cette dernière phase limite l'important "bleeding" du BBT à la température de travail.

À la sortie de la colonne, une moitié de l'effluent est prélevé par un tube capillaire en Pt-Ir et envoyé au séparateur du spectromètre de masse, l'autre moitié est envoyée au détecteur à ionisation de flamme (FID). La source à bombardement électronique travaille à 150°, le potentiel des électrons est de 70 eV et le courant de 0.3 mA. La pression de travail de la source est de 10^{-6} Torr.

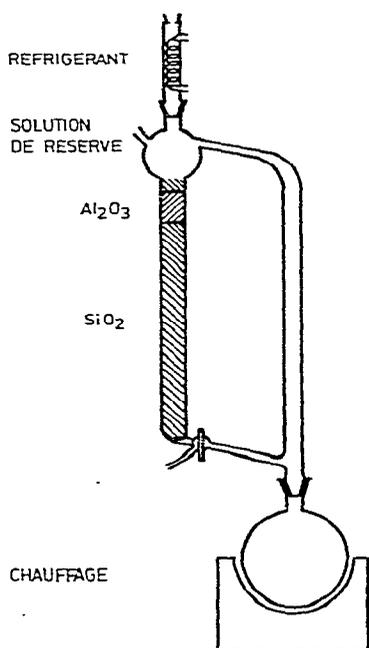


Fig. 1. Colonne d'éluant. Eluant: 3 à 5% de benzène dans l'hexane.

Chromatographie sur colonne. La purification chromatographique du benzo[a]pyrène est effectuée par une colonne en verre de 50 cm de longueur et de 2.5 cm de diamètre intérieur (Fig. 1) avec recyclage de l'éluant par distillation. L'éluant est une solution de 3 à 5% de benzène dans l'hexane. La colonne est remplie sur 30 cm de silica gel (No. 923; W. R. Grace & Co., Baltimore, Md., U.S.A.) chauffé durant une nuit à 170° et refroidi à température ambiante sous exsiccateur. Le silica gel est précédé de 5 cm de bauxite (Porocel, 20-60 mesh) intimement mélangé à 5 g de benzo[a]pyrène commercial. La durée de l'éluion est de 10 h et son avancement est suivi par fluorescence UV.

Quatre fractions sont recueillies. Les deux premières contiennent principalement les impuretés (moins de 1% de la charge). La troisième fraction est recyclée (40 à 50% de la charge). La quatrième fraction contient le benzo[a]pyrène de pureté > à 99.5%.

Recristallisation. Le benzo[a]pyrène (1 g) à 98.7% de pureté (Fig. 2) en solution benzénique saturée est ajouté à température ambiante à 300 ml d'hexane. Après homogénéisation, la solution est abandonnée sous refroidissement d'eau courante à 13°. La cristallisation s'amorce quasi-immédiatement. Après 4 h environ, 50% du produit est cristallisé.

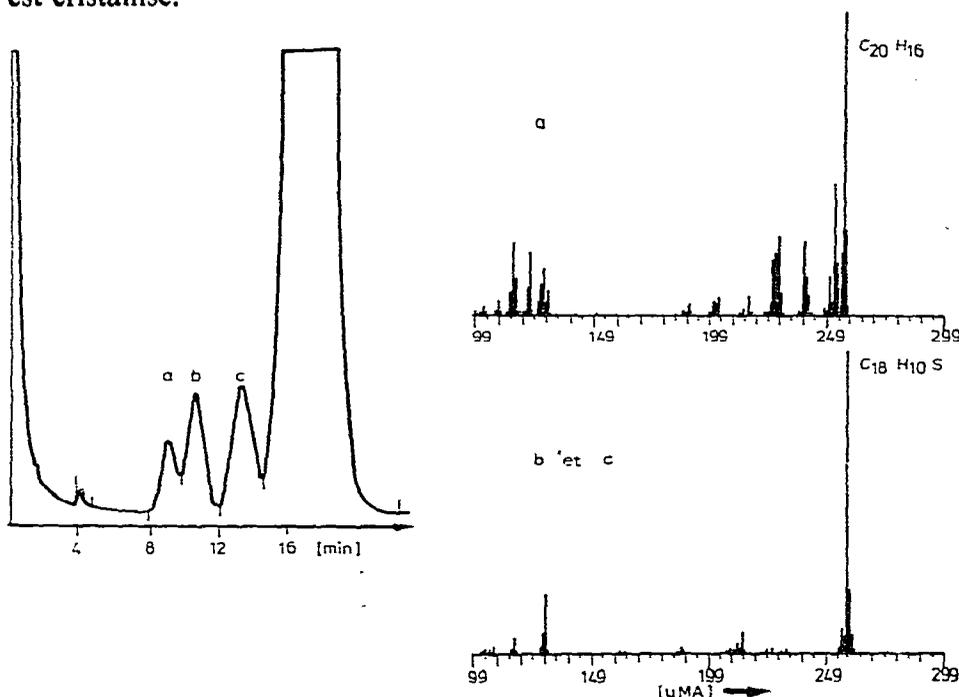


Fig. 2. GC et GC-MS du lot expérimental de benzo[a]pyrène. Pics: a, tétrahydrobenzo[a]pyrène; b et c, benzanthracéno- et chrysénthiophène.

La pureté du produit cristallisé est alors de 98.5%, la solution résiduelle après évaporation sous vide du solvant fournit un benzo[a]pyrène à 98.85% de pureté. La pureté est déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

Sulfonation des impuretés. Une solution benzénique saturée de 1 g de benzo[a]pyrène commercial est étendue de deux fois son volume d'hexane et portée à la

température d'un bain de glace. L'acide sulfurique concentré (10 cm³) est ajouté peu à peu en agitant la solution. On laisse ensuite le bain revenir à température ambiante et on dilue la solution acide par 200 ml d'eau. La solution benzénique est décantée, lavée par une solution alcaline diluée et séchée sur Na₂SO₄ anhydre. Après passage sur une colonne de 10 cm de silicagel, on obtient environ 0.6 g de benzo[*a*]pyrène à 99.4% de pureté.

Spectrométrie ultra-violette. Les analyses UV sont réalisées à l'aide du spectromètre à double faisceau Modèle 25 de la firme Beckmann couvrant la gamme de 190 à 700 nm par deux sources de radiation; une lampe au tungstène et une lampe au deuterium. Toutes les analyses ont été effectuées en solution dans l'hexane.

Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces analyses sont réalisées par un appareil Jeol Type PS 100. Les échantillons sont mis en solution dans le CS₂.

Mesure des points de fusion. Les points de fusion sont relevés à l'aide de l'appareil Mark I de la firme Electrothermal Engineering.

Produits chimiques

Solvants. Tous les solvants utilisés pour ce travail proviennent de la firme Baker Chemicals (Deventer, Pays-Bas) et sont d'une pureté >99%.

*Benzo[*a*]pyrène.* Le lot de benzo[*a*]pyrène utilisé au cours de ces travaux a été choisi après examens chromatographiques (GC, HPLC et GC-MS) parmi les benzo[*a*]pyrènes commerciaux alors disponibles en quantité suffisante (Fig. 3). L'analyse chromatographique montre 3 impuretés principales et donne une pureté de 98.7% au lot utilisé dans ce travail (Fig. 2).

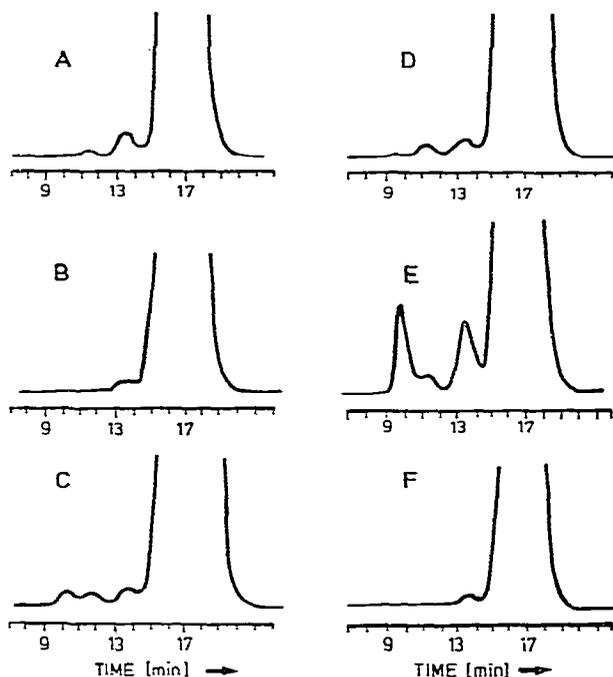


Fig. 3. GC de 6 benzo[*a*]pyrène commerciaux (A-F). Colonne 1 m × 3 mm I.D. 1.5% BBBT sur Chromosorb. Température de colonne 250°.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'examen préliminaire (Fig. 3) montre que tous les échantillons commerciaux analysés présentent principalement les mêmes impuretés.

L'analyse par GC-MS identifie deux isomères $C_{18}H_{10}S$ de masse moléculaire 258 de structure benzophénanthrothiophène (Fig. 2) et un composé $C_{20}H_{16}$ de structure tétrahydrobenzopyrène.

Purification du benzo[a]pyrène

Par recristallisation. Le benzopyrène est peu soluble dans les solvants usuels et par conséquent nécessite l'emploi de grands volumes de solvant lorsque l'on traite plusieurs grammes de produit. L'opération est longue, car le taux de purification du benzopyrène est faible et l'oxydation est un problème important encore aggravé si l'on utilise des solvants oxygénés tels que le méthanol et le tétrahydrofurane. Dans ce travail, les meilleurs résultats ont été obtenus en cristallisant une solution benzénique saturée de benzo[a]pyrène, dans l'hexane.

La recristallisation provoque un enrichissement du composé cristallisé en impuretés soufrées tandis que la solution résiduelle s'enrichit en autres impuretés.

En reprenant alternativement la solution et le produit cristallisé, on obtient après quatre opérations, un benzopyrène à 99.3% de pureté.

L'oxydation, inévitable lors des manipulations, est aisément éliminée par l'éluion du benzo[a]pyrène oxydé, en solution benzénique, sur une colonne de 10 cm de silica gel. Le rendement est voisin de 30%.

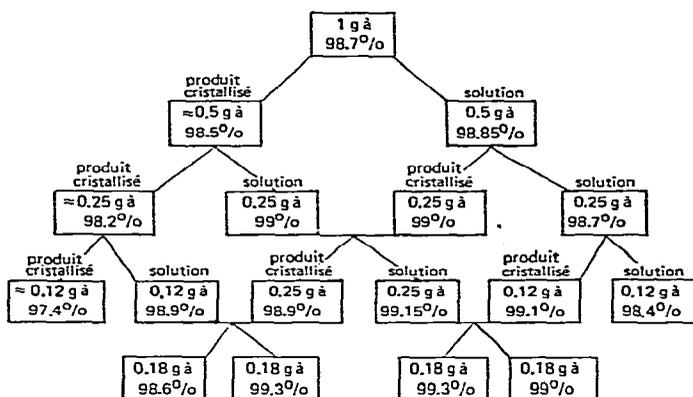


Schéma de recristallisation.

Par voie chimique. Se basant sur le fait que la sulfonation du benzo[a]pyrène est une réaction lente à basse température en présence d'acide sulfurique concentré², il est possible de se débarrasser des composés soufrés en dissolvant le benzopyrène à froid dans l'acide sulphurique. Les composés soufrés, légèrement plus réactifs que le benzo[a]pyrène sont sulfonés préférentiellement.

Par chromatographie sur colonne. Le silica gel et l'alumine permettent tous deux de séparer les impuretés du benzo[a]pyrène³. L'éluion de ce dernier par une solution d'hexane contenant 3 à 5% de benzène sur une colonne de silica gel activé

permet d'obtenir un benzopyrène d'une pureté voisine de 100% avec un rendement approchant l'unité. L'éluion est cependant très longue (8 à 10 h) et les volumes d'éluants engagés sont importants.

Afin d'éviter ces volumes d'éluants qui deviennent gênants, surtout lors de la concentration des impuretés, il est préférable de recycler l'éluant en le distillant grossièrement après passage sur la colonne chromatographique. Le distillat est condensé en tête de colonne par un réfrigérant, comme l'indique la Fig. 1.

Il nous est loisible de recueillir les éluants, soit en changeant de ballon après passage de chaque impureté, soit en recueillant celles-ci par le robinet inférieur et en compensant, d'une quantité égale de la solution de réserve, le volume d'éluant extrait.

Les 4 fractions recueillies, examinées par chromatographie et spectrométrie de masse donnent:

- (a) une première fraction contenant principalement le premier, dans l'ordre GC, des isomères soufrés et le tétrahydrobenzopyrène;
- (b) Une deuxième fraction contenant principalement le deuxième isomère soufré et du benzopyrène;
- (c) une troisième fraction contenant principalement du benzopyrène de pureté voisine de 98% que l'on recycle;
- (d) une fraction de benzo[*a*]pyrène (50 à 60% de la charge) de pureté supérieure à 99.5%.

Isolement des impuretés

Les impuretés extraites des fractions enrichies obtenues dans la chromatographie sur colonne sont isolées par HPLC (Fig. 4). On recueille séparément les trois impuretés principales que l'on désire analyser en détail.

Les impuretés mineures sont rassemblées en deux fractions et identifiées par GC-MS. Elles sont essentiellement constituées de dihydrobenzopyrène, de méthyl-

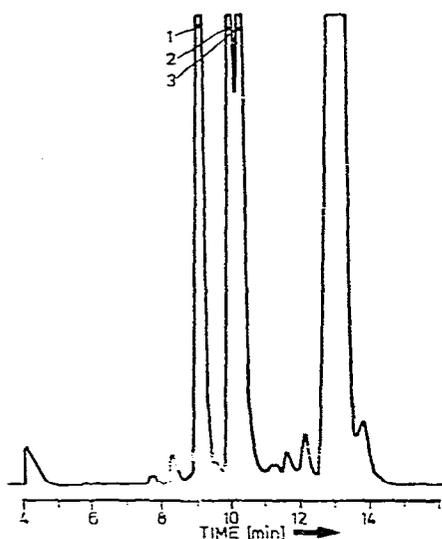


Fig. 4. HPLC des fractions enrichies en impuretés. 1 = Benz[*a*]anthracéno[1,12b,12a,12-*bcd*]-thiophène; 2 = tétrahydrobenzo[*a*]pyrène; 3 = chryséno[4,4a,4b,5-*bcd*] thiophène.

benzo[*a*]pyrène, de pyrène, de méthylpyrène, de chrysène et de tétrahydrobenzothiophenanthrène.

Il convient de noter que l'ordre d'éluion des impuretés en GC est différent de celui réalisé par HPLC. Ainsi le tétrahydrobenzopyrène qui apparaît en premier lieu en chromatographie gazeuse apparaît en second lieu en chromatographie HPLC.

Analyses des impuretés

Chaque impureté principale isolée par HPLC est examinée par spectrométrie UV, MS et RMN. Le point de fusion de chaque impureté est également relevé.

Analyse par MS

Les impuretés 1 et 3 du chromatogramme HPLC présentent le même spectre de masse (spectre b et c, Fig. 2). L'identification des composés soufrés est basée sur le caractère aromatique de ces impuretés, qui même à potentiel élevé (70 eV) assure une partie importante de l'ionisation au pic moléculaire.

Les deux introductions, chromatographique et directe, qui ont été utilisées confirment mutuellement le rapport isotopique de leurs groupes parents ($P+1 = 21\%$, $P+2 = 6\%$) permettant, sans ambiguïté, d'attribuer la formule brute $C_{18}H_{10}S$ aux composés soufrés.

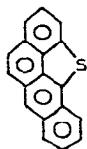
Le pic P-45, déjà rencontré dans l'analyse de phénanthrothiophène⁴ tend à indiquer une structure condensée thiophénique du type benzophénanthrothiophène pour les composés soufrés.

Les rapports isotopiques et la fragmentation de l'impureté 2 (spectre a, Fig. 2) indique un composé aromatique hydrogéné de formule brute $C_{20}H_{16}$.

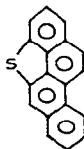
Examen UV

Le profil des spectres UV des hydrocarbures polyaromatiques⁵⁻⁸ est peu affecté par le remplacement d'un cycle aromatique par un cycle thiophénique. La Fig. 5 montre les spectres UV du thiophénanthrène et du pyrène. Ce dernier n'accuse qu'un léger décalage vers le rouge par rapport au premier.

L'impureté No. 1 montre un spectre, très voisin du benzo[*a*]pyrène (Fig. 6) qui autorise les deux structures suivantes:



(a)



(b)

Par analogie avec le déplacement vers le rouge provoqué par l'adjonction au phénanthrène, d'un cycle thiophénique, en position ortho et péri condensée entraînant le déplacement vers le rouge de 22 nm pour la bande K et de 40 nm pour la bande B, on remarque que la structure (a) proviendrait de l'adjonction d'un cycle thiophénique en position *ortho* et *péri*, au benzo[*a*]anthracène tandis que la structure (b) provien-

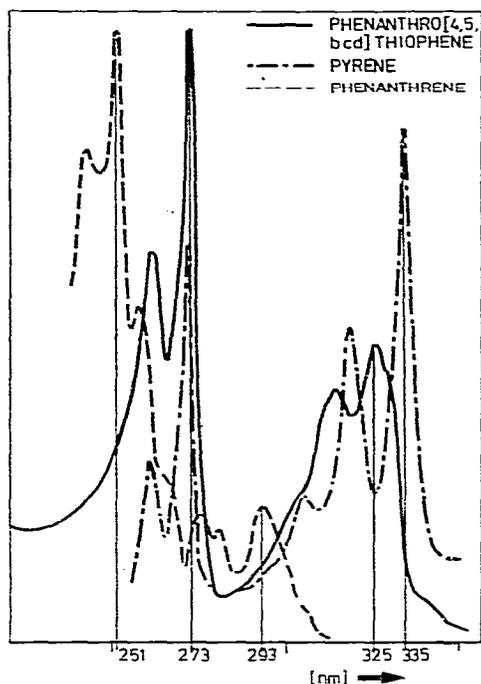


Fig. 5. Spectres UV des phénanthrène, pyrène et phénantro[4,5-*b,c,d*]thiophène dans l'hexane.

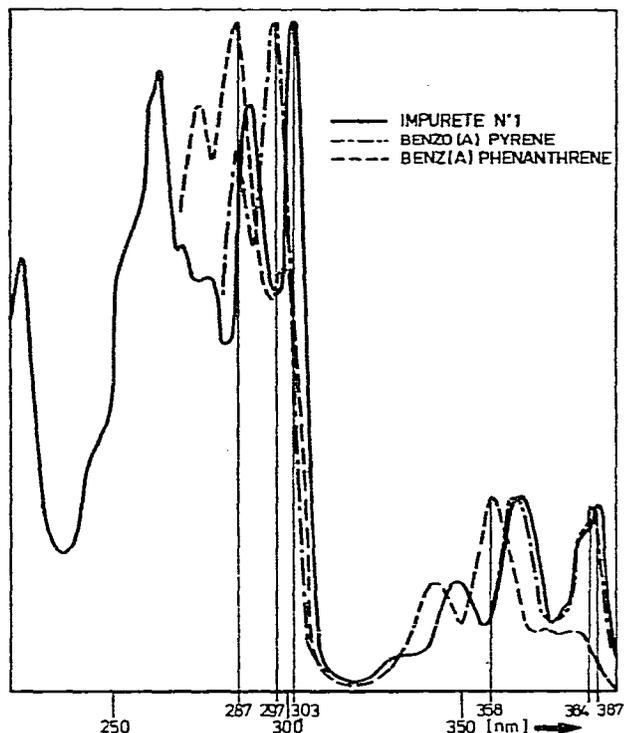


Fig. 6. Spectres UV de l'impureté HPLC No. 1, du benzo[*a*]pyrène et du benzo[*a*]phénanthrène dans l'hexane.

draît de l'adjonction d'un cycle thiophénique au chrysène. En ôtant 40 nm à la λ_{max} de bande B et 20 nm à la λ_{max} de la bande K, on trouve, pour le spectre de l'impureté No. 1 du chromatogramme HPLC, les λ_{max} du benz[*a*]anthracène, alors que la même opération sur l'impureté No. 3 (Fig. 7) restitue les λ_{max} du chrysène. On en conclut que l'impureté No. 1 correspondrait à la structure (a) et l'impureté No. 3 à la structure (b).

L'impureté No. 2 présente un profil analogue au pyrène avec un léger décalage vers le rouge. Ceci indique que les quatre CH_2 se trouvent dans un même cycle en position *a* ou *e* du pyrène.

Analyse par RMN (Fig. 8)

L'attribution des raies d'adsorption du benzo[*a*]pyrène par Martin *et al.*⁹ ainsi que par Cavaliere et Calvin¹⁰ met en évidence l'absence de proton H_1 et H_2 dans le spectre de l'impureté No. 1.

L'impureté No. 3 montre par contre, la présence de protons H_1 et H_2 et l'absence de protons H_6 et H_7 .

Relevé des points de fusion

Les points de fusion relevés à l'aide de l'appareil Mark 1 de la firme Electro-thermal engineering nous donnent les valeurs ci-dessous:

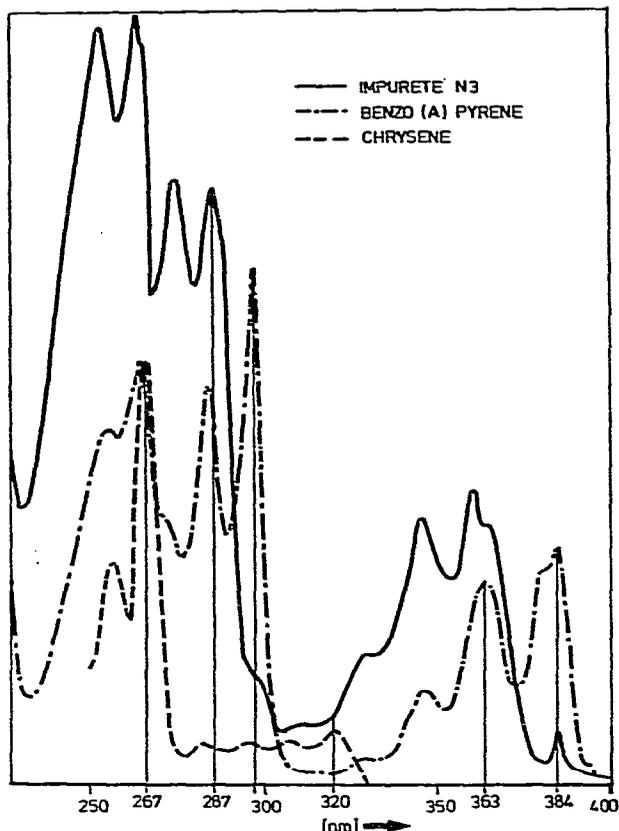


Fig. 7. Spectres UV de l'impureté HPLC No. 3, du benzo[a]pyrène et du chrysène dans l'hexane.

No. impureté	Couleur	Point de fusion (°C)
1	Jaune-clair	153.5–154
2	Blanc	111.5–112
3	Blanc	172.5–173

CONCLUSIONS

La chromatographie est le moyen de purification le plus attrayant, non seulement parce que le rendement est excellent, mais aussi parce qu'il nécessite peu de moyens et permet la récupération aisée des impuretés.

Ces impuretés présentes à haute concentration dans les premières fractions chromatographiques autorisent l'utilisation de colonnes semi-préparatives en HPLC analytique. Sans cette préconcentration, le temps requis pour isoler des quantités pondérables par ces colonnes serait prohibitif. Tel est le cas de la recristallisation où les fractions "enrichies" en impuretés présentent encore un taux d'impuretés trop faible par rapport au benzo[a]pyrène.

Dans tous les cas, il a été constaté une oxydation du benzo[a]pyrène en solution. Particulièrement rapide à la lumière, elle est moins importante dans l'obscurité

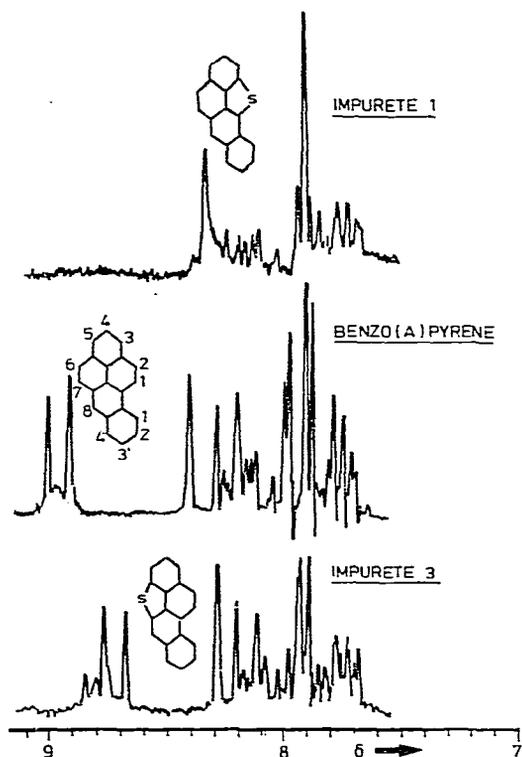


Fig. 8. Spectre RMN des impuretés HPLC No. 1, no. 3 et du benzo[*a*]pyrène en solution dans le CS₂.

et négligeable pour un produit cristallisé conservé dans un flacon coloré. Heureusement, cette oxydation est aisément éliminée par passage du produit en solution benzénique sur 10 cm de silica gel.

L'isolement et l'identification de composés soufrés dans certains hydrocarbures polyaromatiques avaient déjà été décrits dans une publication précédente⁴. Des propositions de structure pour une impureté soufrée isolée par HPLC dans le benzo[*a*]pyrène avaient même été avancées.

Ce travail démontre l'existence de deux isomères soufrés de points de fusion sensiblement différents. Leurs structures établies par RMN sur la base de l'existence des protons H₁ et H₂ sont confirmées par l'analyse ultra-violette.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement M. Ph. Glaude dont les analyses par résonance magnétique nucléaire ont permis de confirmer les structures des impuretés isolées.

RÉSUMÉ

Le benzo[*a*]pyrène délivré commercialement possède des impuretés communes, présentant toutes des structures voisines du benzo[*a*]pyrène. Ce travail propose

une méthode chromatographique permettant la purification du benzo[a]pyrène en quantité de l'ordre du gramme. Les impuretés majeures ont été isolées en quantités pondérables et leurs structures élucidées par méthodes spectroscopiques, montrent la présence de deux isomères soufrés $C_{18}H_{10}S$ et d'un tétrahydrobenzopyrène $C_{20}H_{16}$.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. Novotny, M. L. Lee et K. D. Bartle, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 606.
- 2 I. Berenblum, *Nature (London)*, 156 (1945) 601.
- 3 L. Zechmeister et L. Chohnoky, *Principles and Practice of Chromatography*, Chapman and Hall, London, 1950.
- 4 W. Karcher, R. Depaus, J. Van Eijk et J. Jacobs, *Carcinogenesis*, 4 (1979).
- 5 G. Chatot, M. Castegnaro, J. L. Roche et R. Fontanges, *Chromatographia*, 3 (1970) 507.
- 6 G. Grimmer et H. Böhnke, *Erdöl Kohle, Erdgas, Petrochem. Brenst.-Chem.*, 31 (1978) 272.
- 7 E. Sawicki, T. R. Hauser et T. W. Stanley, *Int. J. Air Poll.*, 2 (1960) 253.
- 8 E. Sawicki, W. Elbert, T. W. Stanley, T. R. Hauser et F. T. Fox, *Anal. Chem.*, 32 (1960) 810.
- 9 H. Martin, N. Defay et F. Geerts-Evrerol, *Tetrahedron*, 20 (1964) 1073.
- 10 E. Cavaliere et M. Calvin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1 (1972) 1253.