

Charakterisierung von ungesättigten Kohlenwasserstoffen der Vaseline und Nachweis des Fehlens carcinogener Verbindungen, 9. Mitteilung: Über den Einfluß chemischer und physikalischer Meßdaten auf die Gebrauchseigenschaften von Vaseline

Von H. Kassebaum und H. Sucker*

Aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie, Abteilung für Pharmazeutische Technologie der Universität Hamburg

In allen von uns geprüften 28 Vaselinen waren ungesättigte Kohlenwasserstoffe vorhanden. Diese wurden näher charakterisiert. Kleine polycyclische Kohlenwasserstoffe wurden in ubiquitär vorhandenen Mengen gefunden. 3,4-Benzopyren wurde in Vaselinen nicht nachgewiesen. Bei der Heißluftsterilisation nimmt der Anteil polycyclischer Kohlenwasserstoffe ab. Mit der Elementaranalyse läßt sich in olefinischen Kohlenwasserstoffen ein H-Defizit gegenüber gesättigten Verbindungen ermitteln, aus dem die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül berechnet werden kann. In olefinischen Fraktionen der Vaselinen mit mittleren Molekulargewichten zwischen 400 und 820 wurden 5 bis 9 Doppelbindungen pro Molekül berechnet. Neben Kohlenwasserstoffen wurden geringe Mengen Stickstoff und Schwefel nachgewiesen.

Einleitung

Im DAB 7¹ ist vorgeschrieben, daß weißes Vaseline zu verwenden sei, wenn Vaseline ohne nähere Bezeichnung verordnet ist. Damit soll die Verwendung von gelben Vaselinen eingeschränkt werden.

Im Kommentar zum DAB 7² wird die Beschränkung damit begründet, daß gelbes Vaseline eine zehnmal stärkere Lichtabsorption in dem Bereich aufweist, der für polycyclische Aromaten charakteristisch ist. Die Lichtabsorption wird bei 275 nm, bei 295 nm und oberhalb von 300 nm gemessen, nachdem von weißer Vaseline zunächst eine 1%ige Lösung in Isooctan und von gelber Vaseline eine 0,1%ige Lösung hergestellt wurde.

Die Bestimmung geht auf H. Böhme und W. Hühnermann³ zurück, die die Fluoreszenz von Vaselinen und Paraffinen untersuchten. Sie führten Absorptionsmessungen durch und fanden einen steilen unspezifischen Anstieg zum Kürzerwelligen mit einem Maximum bei 260 bis 270 nm und zogen aus den unterschiedlichen Absorptionen bei weißen und gelben Vaselinen sowie Paraffinen gewisse Schlüsse auf den Aromatengehalt. Danach enthielt weiße Vaseline tausendmal und gelbe Vaseline zehntausendmal soviel Aromaten wie flüssige DAB 7 Paraffine.

Gezielte Untersuchungen auf polycyclische Aromaten, pcKW, in der Biosphäre des Menschen werden in vielen Arbeitsgruppen vorwiegend der Biochemie, der Lebensmittelchemie und der Mineralöl- und Tabakforschung durchgeführt und haben zu zahlreichen Veröffentlichungen geführt (Zusammenfassung siehe Lit. 4).

* Anschrift der Verfasser: Dr. H. Kassebaum, Institut für Pharmazeutische Chemie, Abt. für Pharmazeutische Technologie, Laufgraben 28, 2000 Hamburg. Prof. Dr. H. Sucker, Fa. Sandoz AG, Pharm. Forschung und Entwicklung, CH 4002 Basel.

¹ Deutsches Arzneibuch, 7. Ausgabe BRD 1968.

² H. Böhme u. K. Hartke, Kommentar zum DAB 7, Wissenschaftliche Verlagsges. m.b.H., Stuttgart 1969.

³ H. Böhme u. W. Hühnermann, Arch. Pharmaz. **299**, 368 [1966].

⁴ R. E. Schaad, Chromatogr. Rev. **13**, 61 [1970].

Characterization of Unsaturated Hydrocarbons of Vaseline and Detection of the Absence of Carcinogenic Compounds 9: Influence of Chemical and Physical Data on the Practical Properties of Vaseline

Unsaturated hydrocarbons were found in 28 samples of vaseline tested. Small amounts of polycyclic hydrocarbons were found in ubiquitary amounts. 3,4-benzopyrene was not detected in vaselines. The amount of polycyclic hydrocarbons decreases after sterilization with hot air. By elemental analysis of olefinic hydrocarbons the amount of hydrogen lesser than the saturated compounds can be determined from which the number of double bonds per molecule is calculated. In olefinic fractions of vaselines, which have an average molecular weight between 400 and 820, five to nine double bonds per molecule have been found. Small amounts of nitrogen and sulfur have been detected beside hydrocarbons.

Dabei ist nach der Isolierung der Gruppe der pcKW eine Auftrennung in die Einzelsubstanzen erforderlich. Ein gemeinsamer quantitativer Nachweis ist wenig erfolgversprechend, da die Absorptionsmaxima einiger pcKW bei den Minima anderer liegen. Konjugierte Olefine fluoreszieren gleichfalls im Bereich der polycyclischen Kohlenwasserstoffe.

Vaselinhersteller erwarten keine Aromaten in ihren Produkten, da die paraffinbasierten Rohprodukte bereits einer Flüssig/flüssig-Extraktion mit Furfurol unterzogen sind, bevor sie verschnitten werden. Weiter sollten die aromatischen Systeme bei der anschließend erfolgenden Hochdruckhydrierung erfaßt werden. Wenn aromatische Strukturen vorkommen sollten, so muß mit kleinsten Mengen gerechnet werden.

1. Abtrennung und Identifizierung polycyclischer Kohlenwasserstoffe

G. Grimmer und A. Hildebrandt⁵ führten die Flüssig/flüssig-Extraktion zwischen Cyclohexan und Dimethylformamid (DMF) mit 10% Wasser ein, die von vielen Laboratorien übernommen wurde. Die im DMF angereicherten pcKW werden in einem zweiten Schritt durch Zugabe weiteren Wassers wieder in Cyclohexan übergeführt. Die Reinigung erfolgt zunächst über eine desaktivierte Kieselgelsäule, deren Eluat auf Sephadex LH 20 in Propanol in zwei Fraktionen geschnitten, entweder auf einer Al₂O₃-Säule weiter fraktioniert oder mit Hilfe der isothermen Kapillargaschromatographie analysiert wird.

Die festgelegten Fraktionen des Al₂O₃-Eluats werden spektralphotometrisch gemessen, und die Extinktion substanzspezifischer Maxima wird mit der benachbarter Minima verglichen. Dabei beschränkt G. Grimmer sich auf die 13 wichtigsten und am häufigsten anzutreffenden carcinogenen und nicht carcinogenen pcKW, nachdem abgeklärt wurde, daß andere die Methode nicht stören.

⁵ G. Grimmer u. A. Hildebrandt, J. Chromatogr. **20**, 89 [1965].

G. Grimmer untersuchte nach seiner Methode u. a. Kraftfahrzeugabgase, Straßenstaub und Lebensmittel.

G. Biernoth⁶ übernimmt die Beschränkung auf die 13 pcKW und untersucht Speisefette und Öle. Er modifizierte die Methode von G. Grimmer und A. Hildebrandt. Die pcKW werden dünnstichtchromatographisch auf Al₂O₃-Platten fraktioniert. Zu einer ausreichenden Trennung der Flecken ist viermalige Entwicklung mit dazwischen erfolgendem schonendem Trocknen erforderlich. Die unterschiedlich fluoreszierenden Flecken werden unter UV-Licht markiert und dann in Zentrifugengläser übertragen. Nach Elution der pcKW vom Al₂O₃ durch Äthanol wird spektralphotometrisch vermessen wie bei G. Grimmer und A. Hildebrandt.

L. Toth und W. Blaas^{7,8} untersuchten geräucherte Fleischwaren und benutzten zur DC die Mischplatte nach M. Köhler und H. J. Eichhoff⁹.

In eigenen Versuchen bewährte sich die Methode nach G. Biernoth sowohl nach der Trennschärfe als auch nach der Recovery am besten.

Bei der Arbeit mit Testsubstanzen auftretende Mehrgehalte im Umfang bis zu einigen 100 Nanogramm können während der Aufbereitung der Proben aus spektralreinen Lösungsmitteln sowie vielen anderen Laborchemikalien eingeschleppt werden.

Die pcKW aus Lösungsmitteln können durch mehrfache schonende Destillation oder über eine Säule mit Aktivkohle entfernt werden.

Versuchsbedingungen

5,0 g Vaseline werden in 70 ml Cyclohexan für die Spektroskopie (Merck 2822) gelöst und in einem Scheidetrichter nach SQUIBB zweimal mit 50 ml einer Mischung aus 45 ml N,N-Dimethylformamid für die Spektroskopie (Merck 2937) und 5 ml Wasser ausgeschüttelt.

Die vereinigten DMF-Phasen enthalten die Aromaten. Sie werden einmal mit 50 ml Cyclohexan gewaschen.

Die Aromatenfraktion wird mit 50 ml Wasser verdünnt und mit 100 ml Cyclohexan für die Spektroskopie drei Minuten ausgeschüttelt und sorgfältig getrennt.

Die Aromaten befinden sich jetzt in der Cyclohexanphase. Diese wird im Scheidetrichter mit Natriumsulfat, trocken, reinst DAB 7 (Merck 6643) entwässert, filtriert und bei 30° C Badtemperatur auf 1 ml eingengt.

Der eingengte Aromatenextrakt wird auf einer eisenfrei gewaschenen Kieselgelsäule, die mit 10% Wasser deaktiviert wurde, mit spektralreinem Cyclohexan eluiert.

Der Anteil des dabei zwischen 30 ml und 300 ml erhaltenen Eluats wird mit Natriumsulfat getrocknet und bei Temperaturen unter 30° C vorsichtig eingengt. Mit Hilfe eines birnenförmigen Kolbens von 25 ml Fassungsvermögen läßt sich ein Endvolumen von weniger als 0,5 ml erreichen.

Zur Dünnstichtchromatographie dienen Aluminiumoxid-Platten, Woelm neutral, Schichtdicke 0,25 mm, die zwei Stunden bei 90° C aktiviert wurden.

Die Entwicklung erfolgt in einer gesättigten Chromatographiekammer mit Isooctan (Riedel 16 514) unter Lichtabschluß.

Bei einfacher Entwicklung ist die Trennung nicht ausreichend. Die Platte wird der Chromatographiekammer entnom-

⁶ G. Biernoth, J. Chromatogr. 36, 825 [1968].

⁷ L. Toth u. W. Blaas, Die Fleischwirtschaft 52, 1121, 1419 [1972].

⁸ L. Toth, J. Chromatogr. 50, 72 [1970].

⁹ M. Köhler u. H. J. Eichhoff, Z. analyt. Chem. 232, 49 [1967].

men und unter Lichtschutz im Stickstoffstrom aus der Druckgasflasche getrocknet und solange weiter entwickelt, bis die blauviolett Flecken von Phenanthren und Anthracen eine Laufstrecke von ca. 10 cm zurückgelegt haben. Wiederholungsflecken erscheinen bei Mehrfachentwicklung, wenn die Platten stärker als angegeben aktiviert werden.

Nach der Trennung werden alle Flecken unter UV-Licht markiert und sorgfältig voneinander getrennt so schnell wie möglich mit zwei sehr flachen Spateln abgekratzt. Sie werden in Reagenzgläser übergeführt, in die 2 ml Äthanol für die Spektroskopie (Merck 969) vorgegeben waren.

Die Reagenzgläser werden verschlossen und 15 Minuten auf dem GFL-Schüttler Typ 3015 bei Amplitudenzahl 80 so stark geschüttelt, daß das Aluminiumoxid in heftige Bewegung versetzt wird.

Der Inhalt der Röhrchen wird in Zentrifugengläser übergeführt. Durch Nachspülen mit 3 ml Äthanol spektralrein wird das Volumen der Eluierflüssigkeit auf 5 ml erhöht. Die Lösungen werden 10 Min. in der Christ Laborzentrifuge 00 902 bei höchster Geschwindigkeitsstufe dieses Gerätes zentrifugiert.

Die klaren Lösungen werden, nach G. Biernoth im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gegen reines Lösungsmittel vermessen.

Nach Abtrennung der pcKW aus Vaselinen wurde das eingengte gereinigte Konzentrat z. B. nach dem Schema der Tab. 1 aufgetragen. Das recovery zeigt Tab. 2.

Tabelle 1

Anordnung und Steighöhen bei der DC von pcKW

Ant	Ant Pyr Per Cor	Phe Flu 1,12- BPe	Vas. 01 n	Vas. 01 n + 100 ng Test- pcKW	alle Test- pcKW
Steighöhen:					
10.2	10.2	10.2	10.2	10.2	10.2
	9.4			9.4	9.4
		8.8	8.8	8.8	8.8
	5.0		5.2	5.2	5.5
		4.2		4.1	4.1
	2.8			2.9	2.9
	0				

Es bedeuten: Anthracen = Ant; Phenanthren = Phe; Fluoranthren = Flu; Pyren = Pyr; Chrysen = Chr; 1,2-Benzanthracen = 1,2-BA; 1,2-Benzpyren = 1,2-BPy; 3,4-Benzpyren = 3,4-BPy; Perylen = Per; 1,12-Benzperylen = 1,12-BPe; Anthanthren = Ana; 1,2,5,6-Dibenzanthracen = 1,2,5,6-DBA; Coronen = Cor

Tabelle 2

Quantitative DC von pcKW

pcKW	aus 10 g Vas. 01 n	aus 10 g Vas. 01 n + Test-pcKW	eingesetzte Menge Test-pcKW
Anthracen	178 ng	223 ng	100 ng
Phenanthren	961 ng	1089 ng	100 ng
Pyren	—	75 ng	100 ng
Fluoranthren	106 ng	191 ng	100 ng
Chrysen	19 ng	10 ng	—
Perylen	—	116 ng	100 ng
1,12-Benzperylen	—	Glasbruch	100 ng
Coronen	—	46 ng	100 ng

Die Untersuchung weiterer Vaselinen und eines vorhydrierten Rohproduktes ergaben pcKW-Mengen in Größenordnungen, wie sie auf Gemüse in Großstadtumgebung und in Stadtluft gefunden werden¹⁰. Sie werden in der Tab. 3 mit den Befunden aus Vaseline verglichen.

Da in allen Fällen die in Vaselinen gefundenen pcKW in den Größenordnungen der ubiquitär vorhandenen Konzentrationen lagen, wurden die Versuche nicht weiter verfolgt.

gangen werden, daß die ungesättigten Verbindungen olefinischer Natur seien.

2. Untersuchung der Vaseline nach der Sterilisation

Abschließend wurde der Frage nachgegangen, ob sich bei der thermischen Belastung, die Vaseline bei der trockenen Sterilisation nach dem DAB 7 erleidet, in der Vaseline pcKW neu bilden.

Tabelle 3

Polycyclische Kohlenwasserstoffe in der Umgebung des Menschen, in Nanogramm/Gramm bzw. m³ Luft

pcKW	Salat des Hamburger Handels ¹⁰	Salat	Grünkohl	Luft in Essen ¹⁰	Rohfett ⁶	Vaseline		vorhydr. Rohprodukt
						01 n	A	
Phe	7.7	30.6	136	33.6	—	96	37	37
Ant	0.9	3.2	10.3	2.7	36	18	3	4
Pyr	9.3	20.0	111.8	85.0	58	—	10	2
Flu	14.5	37.5	23.3	109	78	11	5	9
1,2-BA	4.6	9.2	31.8	132	6	—	1	9
Chr	5.7	9.8	81.0	151	9	2	3	13
3,4-BPy	4.1	5.3	15.6	114	3	—	—	—
1,2-BPy	3.7	4.6	19.4	107	8	—	1.5	9
Per	0.8	1.1	1.6	23	0.5	—	—	—
Ana	0.2	0.2	0.2	3.8	—	—	—	—
1,12-BPe	3.3	3.0	9.9	92	1	—	—	4
1,2,5,6-DBA	0.8	0.9	0.7	10.1	—	—	1	3
Cor	0.4	0.3	0.7	10.0	1	—	1	3

Zusammenfassend darf festgestellt werden, daß die ungesättigten Kohlenwasserstoffe der Vaseline zu Unrecht als Aromaten bezeichnet werden.

Die oft gefundenen pcKW Anthracen, Phenanthren und Fluoranthren liegen in Mengen von durchschnittlich weniger als 100 ng/g vor und sind mit den ubiquitär gefundenen Mengen z. B. auf Lebensmitteln und in Großstadtluft zu vergleichen. Sie sind nicht carcinogen.

3,4-Benzpyren wurde nur gefunden, wenn es als Testsubstanz in die zu untersuchende Probe hineingegeben wurde.

Diese analytischen Befunde werden durch dermatologische Untersuchungen an Versuchstieren untermauert¹¹. So konnte in bisherigen Versuchen mit pharmazeutischen Vaselinen nie eine carcinogene Wirkung festgestellt werden.

Bei der weiteren Untersuchung der aliphatischen Fraktion der ungesättigten Verbindungen kann davon ausge-

Dazu wurden Proben der Vaseline 01 n sowie eine Probe der gesättigten Fraktion dieser Vaseline der Sterilisation unterworfen.

Sterilisiert wurde in einem Trockenschrank mit Umluft bei 180° C. Die Vaseline befand sich in dünnwandigen Reagenzgläsern in einem metallenen Reagenzglas gestellt.

Obwohl die Ausgleichszeit nur wenige Minuten betrug, wurde sie mit 20 Minuten angesetzt. Sterilisiert wurde in einem Versuch dem DAB 7 entsprechend 30 Minuten, in einem weiteren Versuch der häufig geübten Praxis entsprechend 90 Minuten.

Nach der Flüssig-flüssig-Verteilung von 5.0 g KW und Vorreinigung über die eisenfreie desaktivierte Kieselgelsäule wurde die Dünnschichtchromatographie auf Al₂O₃ durchgeführt. Die Vermessung der Eluate ergab die Mengen pcKW der Tab. 4.

Andere polycyclische Kohlenwasserstoffe wurden nicht nachgewiesen. Damit ist gezeigt, daß bei der Sterilisation von Vaseline keine carcinogenen pcKW entstehen.

¹⁰ G. Grimmer, Dtsch. Apotheker-Ztg. 108, 529 [1968].

¹¹ H. Brune, persönliche Mitteilung.

Tabelle 4
In sterilisierten Vaselinen gefundene ρ CKW

	5 g Vasel. 01/70 nicht erhitzt	5 g Vasel. 01/70 sterilis. 30', 180° C	5 g Vasel. 01/70 sterilis. 90', 180° C	5 g gesättigte Fraktion aus 01/70, sterilis. 90', 180° C
Anthracen	178 ng	8 ng	56 ng	28 ng
Phenanthren	961 ng	128 ng	320 ng	256 ng
Pyren	—	—	—	—
Fluoranthren	106 ng	42 ng	147 ng	84 ng
Benzpyrene	—	—	—	—

3. Untersuchung der olefinischen Kohlenwasserstoffe

Zur Charakterisierung der olefinischen KW der Vaselinen erscheint die Hydrierung wenig aussichtsreich, weil die Vaselinen bereits einer katalytischen Hochdruckhydrierung ausgesetzt waren.

Versuche zur Bestimmung der Jodzahl wurden abgebrochen, weil bei den erforderlichen Reaktionszeiten bereits Substitutionen auftraten.

Strukturen, die die Doppelbindung während einer katalytischen Hydrierung schützen, erschweren auch die Addition von Halogenen. Die Geschwindigkeit der Hydrierung von Olefinen ist von der Struktur der Molekel abhängig. Schnell reagieren endständige Doppelbindungen, langsamer mittelständige in geraden Ketten, noch langsamer solche an einer Verzweigung. Bei doppelter Verzweigung ist die Hemmung verstärkt¹².

Die sterische Hinderung durch Substituenteneinfluß wird auch von *K. Müller* in Zusammenhang mit der Bestimmung der Jodzahl beschrieben¹³. Geradkettige Olefine reagieren bei der auch von uns benutzten Methode nach *H. P. Kaufmann* quantitativ, bei verzweigten ist mit Substitution zu rechnen.

Aussichtsreicher erscheint dagegen die quantitative Elementaranalyse.

Im automatisch arbeitenden Gaschromatographen zur Elementaranalyse wird die Reproduzierbarkeit durch die Homogenität der Probe, die Genauigkeit der Einwaage und der Peakvermessung bestimmt. Unter optimalen Bedingungen werden nach Herstellerangaben $\pm 0.3\%$ erreicht.

Aus 17 Doppelbestimmungen konnte für die C-Bestimmung eine Standardabweichung von $0.34\% \text{ C} = 0.4\%$ des Meßwertes und für die H-Bestimmung eine von $0.06\% \text{ H} = 0.5\%$ des Meßwertes ermittelt werden.

Für den aus dem mittl. Mol.-Gew. erhaltenen Mittelwert von $(\text{CH}_2)_n$ läßt sich aus dem gegebenen C-Wert ein theoretischer H-Wert berechnen. Bei Doppelbindungen im Molekül muß der gefundene H-Wert niedriger als der berechnete liegen. Es läßt sich somit aus der Differenz der berechneten und gefundenen H-Werte ein sogenanntes H-Defizit erhalten, von dem wieder auf

¹² *G. Schiller* in *Houben-Weyl*, Methoden der organischen Chemie, Band IV/2, Georg Thieme Verlag, 4. Aufl., Stuttgart 1958.

¹³ *K. Müller*, Z. analyt. Chem. **181**, 126 [1961].

die Anzahl der Doppelbindungen im mittleren Molekül geschlossen werden darf. Die Ergebnisse der C-H-Analyse sind der Tab. 5 zu entnehmen.

Tabelle 5

Ergebnisse der C-H-Analyse der ungesättigten Fraktionen

Unges. Fraktion aus Vaseline	mittl. Mol.-Gew.	Proz. C	Proz. H	Mittl. Anzahl C	Mittl. Anzahl H	H-Def.	Verhältnis C-Atome zu gef. Doppelbindg.
05 n	820	86.59	12.41	59.1	101.0	19.3	6.1
01 n	805	86.17	13.25	57.8	105.8	11.7	9.9
03 n	780	86.42	13.19	56.1	102.1	12.2	9.2
06 n	717	86.90	12.53	51.9	89.1	16.6	6.2
02 n	701	87.08	12.92	50.8	89.9	13.8	7.4
04 n	683	87.14	12.95	49.6	87.7	13.4	7.4
23 n	482	84.98	11.48	34.1	54.8	15.3	4.5
22 n	533	86.59	12.73	38.4	67.3	11.5	6.7
D	653	83.58	12.31	45.4	79.7	13.1	6.9
A	634	86.84	12.49	45.8	78.6	15.1	6.1
E	578	83.86	12.42	40.4	71.3	11.5	7.0
C	484	87.00	12.59	35.0	60.4	11.7	6.0
24	399	88.82	11.26	29.5	44.5	16.4	3.6
60 n	397	86.11	11.63	28.4	45.7	13.1	4.3
B	591	84.59	12.13	41.6	71.1	14.1	5.9
P	539	86.68	12.52	38.9	66.9	12.8	6.1
R	462	86.50	11.78	33.3	54.0	14.6	4.6
G	574	85.24	11.97	40.8	68.2	15.3	5.3

Die bei der Addition der C- und H-Anteile gelegentlich auffallende Abweichung von 100% ist auf Anwesenheit von Schwefel und Stickstoff zurückzuführen.

In den ungesättigten KW weißer Vaselinen wurden Spuren von Schwefel gefunden, in denen gelber Vaseline bis zu 0.5%. Die ungesättigte Fraktion des vorhydrierten Rohprodukts D enthielt 4.1% Schwefel.

Vaselinhersteller mutmaßen in ihren Rohprodukten vorwiegend aliphatische Sulfide. Sie finden nach dem Entschwefeln eine Verkürzung der durchschnittlichen Kettenlänge durch Abspaltung kürzerer Ketten, die über den Schwefel gebunden waren¹⁴.

Die anschließende quantitative Bestimmung des Stickstoffs nach *Coleman* ergab für die Fraktion der ungesättigten KW 1.2 bis 1.6% Stickstoff.

Frau *M. Behr* sind wir für die sehr geschickte Mitarbeit bei der experimentellen Durchführung und Auswertung zu großem Dank verpflichtet. Für die Durchführung der Molekulargewichtsbestimmung sind wir Herrn *B. Walter*, für die Durchführung der Elementaranalyse Frau *E. Brennecke* zu Dank verbunden.

Eingegangen am 8. Januar 1976.

¹⁴ *M. Abel*, persönliche Mitteilung.