



<b>Auftraggeber:</b>	Prof.Dr.Dr.h.c.mult. Bernd Michael Rode
<b>Probenbeschreibung:</b>	Sucraloselösungen 1 % (m/m) und 7,5 % (m/m) in Propylenglykol/Glycerin 3/7
<b>Besonderheiten:</b>	keine
<b>Probendatum:</b>	nicht bekannt
<b>Bearbeitungszeitraum:</b>	12.03.2020 – 03.04.2020

## 1. Zielsetzung

Da vom Auftraggeber eine temperaturabhängige Reaktion zwischen Sucralose und Propylenglykol vermutet wird, sollen Sucralose-Lösungen in Propylenglykol erstellt, mittels E-Zigarette verdampft und mögliche Reaktions- sowie Abbauprodukte im E-Liquid-Kondensat identifiziert werden. Weiters soll die mögliche Zytotoxizität der entstandenen Komponenten auf einem in-vivo Modell (HUVEC-tert2 Zellen) bestimmt werden. Die Testung wird, wie vom Auftraggeber gewünscht, mit Kondensaten aus Sucralose-Lösungen (1% und 7,5% Sucralose in Propylenglykol/Glycerin 30/70 v/v) welche bei 300°C mittels CROWN IV KIT von UWELL erstellt werden, durchgeführt.

## 2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Analyse zeigte, dass bei der Verwendung von Sucralose in E-Liquids zum Teil sehr toxische Abbauprodukte entstehen können. Diese sind unter anderem 2-Propen-1-ol, Chloracetaldehyd und 2-Methylfuran. Die chlorierten Verbindungen können ausschließlich durch den Abbau von Sucralose entstehen, da dieses dreifach chloriert ist und abgesehen von Sucralose keine halogenierten Stoffe in den Probe-Lösungen enthalten sind. Zudem kann auch eine Vielzahl an 1,3-Dioxolanen nachgewiesen werden, welche durch Wasserabspaltung von Propylenglykol und Glycerin entstehen können.

Die Toxizität der gebildeten Komponenten wurde auch in der *in vitro* Testung auf HUVEC / TERT2-Zellen durch den Vergleich von mit unbehandeltem E-Liquid und E-Liquid-Kondensaten bestätigt. Wenngleich keine Zellmembran-schädigenden Auswirkungen (Zellyse) nachgewiesen werden konnten zeigen die Ergebnisse eine hohe Zytotoxizität – also Zelltod durch Behandlung mit den während des Verdampfungsprozesses gebildeten Komponenten.

Aufgrund der Bildung von hochtoxischen Komponenten während des Verdampfungsprozesses ist von der Verwendung von Sucralose in E-Liquids abzuraten.

### 3. Probenerstellung und Details

#### 3.1. Verwendete Reagenzien

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Reagenzien.

Table 1: Auflistung der verwendeten Reagenzien

Name	Vertrieb	Materialnummer	Charge
Glycerin	Sigma-Aldrich	G7893-500ML	SHBJ8674
Propylenglycol	Sigma-Aldrich	W29004-1KG-K	MKCD8681
Sucralose	Sigma-Aldrich	69293-100G	BCCC0646

#### 3.2. Erstellung der Lösungen

Als Basis für die Sucraloselösungen dient eine Mischung aus 30 Teilen Propylenglycol und 70 Teilen Glycerin (v/v). Aufgrund der hohen Viskosität der Chemikalien wurden die erforderlichen Volumina über deren Dichte in Masse umgerechnet, wodurch die Lösungen exakt hergestellt werden konnten. Die tatsächlichen Einwaagen betragen 93,46 g Propylenglycol und 262,70 g Glycerin. Dies entspricht 30,03 Volumensprozent Propylenglycol und 69,97 Volumensprozent Glycerin - im nachfolgenden nur *Basis* genannt.

Es wurden zwei Sucraloselösungen mit einer Konzentration von 1 Masseprozent und 7,5 Masseprozent hergestellt. Die Einwaagen und die daraus resultierenden Konzentrationen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Table 2: Einwaagen zur Erstellung der Probelösungen

Konzentration	Einwaage Sucralose / g	Einwaage Basis / g	Endkonzentration
1 % (m/m)	0,451	44,563	1,00 % (m/m)
7,5 % (m/m)	3,373	41,636	7,49 % (m/m)

#### 3.3. Kondensaterstellung

Zur Generierung des Kondensats wurde das CROWN IV KIT von UWELL verwendet. An der temperaturgesteuerten E-Zigarette wurden 300 °C und 60 W eingestellt. Vor jeder Probenerstellung wurden die Verdampferspulen neu eingesetzt und die Probelösung mindestens zwei Stunden vor Gebrauch eingefüllt. Die E-Zigarette wurde auf einem Stativ in einem Winkel von 45° angebracht. Der Dampf wurde durch ein Glasröhrchen in ein konisches 15 ml Probengefäß geleitet, welches mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde und so als Kühlfalle diente. Angesaugt wurde über eine peristaltische Pumpe (Integra, Modell: DOSE IT P910) welche ein Volumen von 84 ml in drei Sekunden fördert. Je 10 Zyklen wurden pro Probe durchgeführt. Um ein Überhitzen der Verdampferspule zu vermeiden wurde zwischen den Zyklen 30 sekundige Pausen eingelegt. Für die reine Base sowie für die beiden Sucraloselösungen wurden je sieben Kondensate hergestellt (3 in PBS-Puffer für die zellbiologischen Testungen und 4 in DMSO für die GCMS-Messung). Alle verwendeten Arbeitsgeräte (Probengefäße, Schläuche, Glasrohr und Verdampfer) wurden jeweils vor und nach der Kondensaterstellung abgewogen. Aus den Massedifferenzen wurden Ausbeuten und Wiederfindung berechnet. Diese sind in Tabelle 3 aufgelistet (B = Base, L = Low Concentration 1 % Sucralose, H = High Concentration 7,5 % Sucralose).

Table 3: Wiederfindung der Kondensate sowie zugegebenes Lösungsmittel (B: Base; L: Sucralose 1%; H: Sucralose 7,5%)

Interne Bezeichnung	Kondensat / mg	Lösungsmittel / µl	Lösungsmittel	Differenz im Kopf / mg	Wiederfindung / %
B1	280,5	1445	DMSO	306,0	91,67
B2	263,9	1495	PBS	282,5	93,42
B3	235,7	1214	DMSO	241,8	97,48
B4	264,8	1501	PBS	272,8	97,07
B5	291,4	1501	DMSO	300,9	96,84
B6	299,2	1695	PBS	302,4	98,94
B7	340,3	1753	DMSO	365,0	93,23
L1	298,6	1538	DMSO	304,7	98,00
L2	325,0	1842	PBS	334,7	97,10
L3	351,6	1811	DMSO	371,3	94,69
L4	345,4	1957	PBS	365,9	94,40
L5	274,8	1416	DMSO	281,2	97,72
L6	266,8	1512	PBS	271,9	98,12
L7	291,9	1504	DMSO	299,2	97,56
H1	286,4	1475	DMSO	301,7	94,93
H2	249,0	1411	PBS	259,2	96,06
H3	241,9	1246	DMSO	248,3	97,42
H4	316,1	1791	PBS	318,0	99,40
H5	209,5	1079	DMSO	216,0	96,99
H6	213,9	1212	PBS	214,8	99,58
H7	218,3	1125	DMSO	222,1	98,29

### 3.4. Probenüberführung

Von den Kondensaten B7, L7 und H7 wurden je 500 µl in Headspace-Vials überführt. Anschließend wurden 5 µl 4-Methyl-2-pentanol als Interner Standard dazu pipettiert.

### 3.5. GC-Parameter

Für die Messungen wurde ein Agilent 7890B GC System verwendet, welches mit einem Agilent 5977B MSD Massenanalysator ausgestattet ist. Die Komponenten wurden auf einer HP-5MS UI Kapillare von J&W getrennt (30 m, Durchmesser 0,25 mm und Filmdicke 0,25 µm). Die Flussrate an Helium betrug 1 ml/min. Der FID wurde auf 300 °C mit 320 ml/min Luft, 30 ml/min Wasserstoff und 15 ml/min Makeup Gas (Stickstoff) betrieben. Der Glasliner wurde auf 250 °C erhitzt und ein Split von 10:1 eingestellt. Säulenofen: Anfangs wurde die Temperatur für 0,5 min bei 32 °C gehalten, dann mit 4 °C/min auf 60 °C erhöht, diese Temperatur für eine Minute gehalten, dann mit einer Heizrate von 15 °C/min auf 200 °C erhitzt und anschließend mit 30 °C/min auf 250 °C. Diese Temperatur wurde für zwei Minuten gehalten. Das Injektionsvolumen betrug 0,5 µl. Die Inkubationszeit des Vials betrug 5 min bei einer Temperatur von 80 °C. Der Massenanalysator wurde im Scanmodus bei einem m/z-Verhältnis von 19 bis 250 betrieben.

## 4. Ergebnisse GC/MS Analyse

In Abbildung 1 sind drei überlagerte Spektren dargestellt. In Blau dargestellt: Chromatogramm von E-Liquid Kondensat ohne Sucralose; in Grün dargestellt: E-Liquid Kondensat aus 1 % Sucralose in Propylenglykol/Glycerin. in Rot dargestellt: E-Liquid Kondensat aus 7,5 % Sucralose in Propylenglykol/Glycerin. Um die im Vergleich zu Propylenglykol und Glycerin niedrig konzentrierten Abbauprodukte von Sucralose detektieren zu können, wurde die Trennsäule überladen weshalb der nach ca. 8,2 min eluierende Dimethylsulfoxid-Peak stark abfällt. Die Spektren wurden mittels internem Standard (4-Methyl-2-pentanol, Retentionszeit: 6,0 min) normiert.

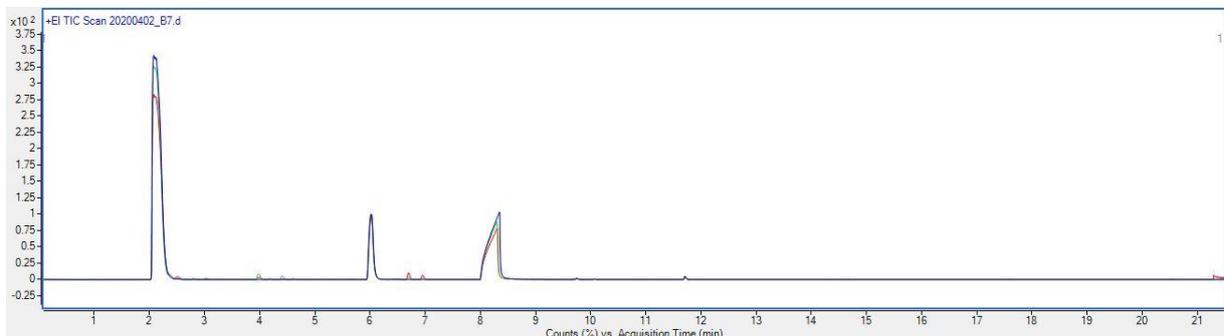


Abbildung 1: In Blau dargestellt: Chromatogramm von E-Liquid Kondensat ohne Sucralose; in Grün dargestellt: E-Liquid Kondensat aus 1 % Sucralose in Base; in Rot dargestellt: E-Liquid Kondensat aus 7,5 % Sucralose in Base;

Abbildung 2 zeigt den vergrößerten Ausschnitt der überlagerten Chromatogramme und die Substanzzuordnung zu den Peaks. Bei den in Grau beschrifteten Substanzen handelt es sich um Vorschläge aus der NIST-Datenbank welche einer Verifizierung mittels analytischer Standards bedürfen, die in Schwarz beschrifteten Substanzen konnten mittels NIST-Datenbank eindeutig identifiziert werden. Das identifizierte Methylisobutylketon ist eine Verunreinigung des Internen Standards (4-Methyl-2-pentanol). Dimethyldisulfid ist eine Verunreinigung von Dimethylsulfoxid (DMSO). 2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolan wurde zweimal nachgewiesen, es handelt sich vermutlich um cis- und trans-Isomere.

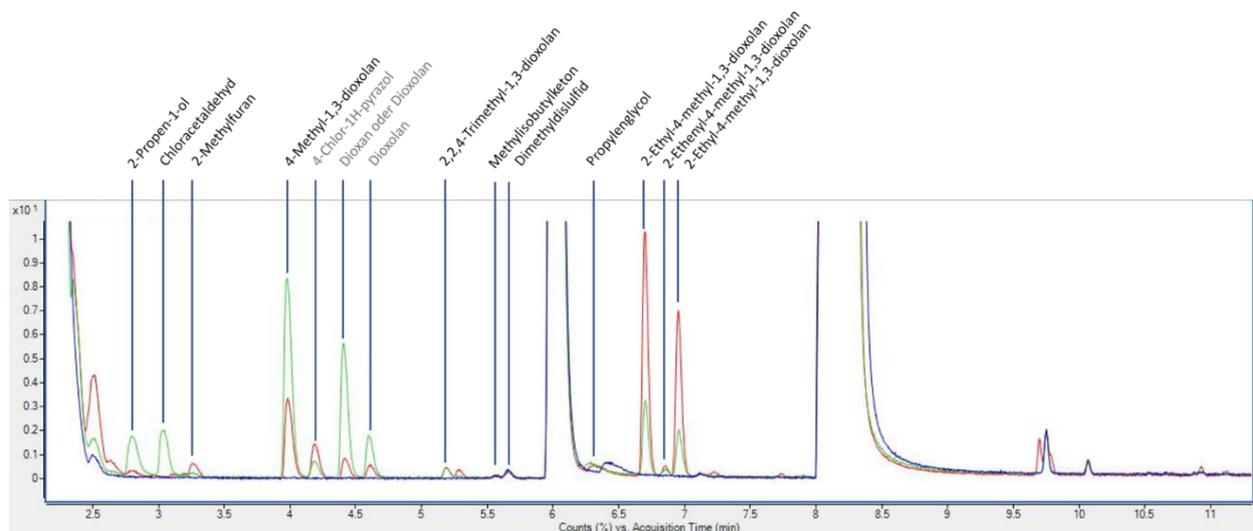


Abbildung 2 zeigt den vergrößerten Ausschnitt der überlagerten Chromatogramme und die Substanzzuordnung zu den Peaks

In Tabelle 4 sind die im Massenspektrum mittels NIST-Datenbank identifizierten Abbauprodukte sowie deren Nettoretentionszeit aufgelistet. Des Weiteren sind die Piktogramme (Quelle: GESTIS-Stoffdatenbank) der identifizierten Komponenten aufgeführt.

Table 4: Auflistung der identifizierten Abbauprodukte sowie deren Gefahrensymbole laut GESTIS-Stoffdatenbank

Substanz	Nettoretentionszeit / min	GESTIS-Stoffdatenbank
2-Propen-1-ol	2,817	
Chloracetaldehyd	2,976	
2-Methyl-furan	3,259	
4-Methyl-1,3-dioxolan	4,014	
2,2,4-Trimethyl-1,3-dioxolan	5,218	
2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolan	6,726	
2-Ethenyl-4-methyl-1,3-dioxolan	6,874	Keine Einträge
2-Ethyl-4-methyl-1,3-dioxolan	6,992	

## 5. Biologische in-vitro Testungen

Die biologischen Testungen wurden auf immortalisierten, primären HUVEC / TERT2 Zellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) durchgeführt.

### 5.1. Bestimmung der lytischen Wirkungen der Sucralose-kondensate

Mittels LDH-Assay wird die Menge an Lactatdehydrogenase (LDH) quantifiziert, einem stabilen cytosolischen Enzym, das bei der Zellyse aus den Zellen freigesetzt wird. Die Lyse bezeichnet in der Biologie und Medizin den Zerfall einer Zelle durch Schädigung oder Auflösung der äußeren Zellmembran. In Kulturüberständen freigesetztes LDH wird unter Verwendung eines gekoppelten enzymatischen Assays gemessen, der zur Umwandlung eines Tetrazoliumsalses (Iodonitrotetrazolium = INT; violett) in ein rotes Formazanprodukt führt. Die Menge des erzeugten roten Farbstoffs ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen. Absorptionsdaten für sichtbare Wellenlängen werden unter Verwendung eines Standard-Plattenlesegeräts mit 96 Vertiefungen gesammelt.

#### 5.1.1. Ergebnis

Weder die Sucralosekondensate noch Sukraloselösungen zeigen eine ausgeprägte Zellyse. Die toxischen Substanzen die bei der Verdampfung Sucralose-haltiger E-Liquids entstehen haben keine zellytische Wirkung.

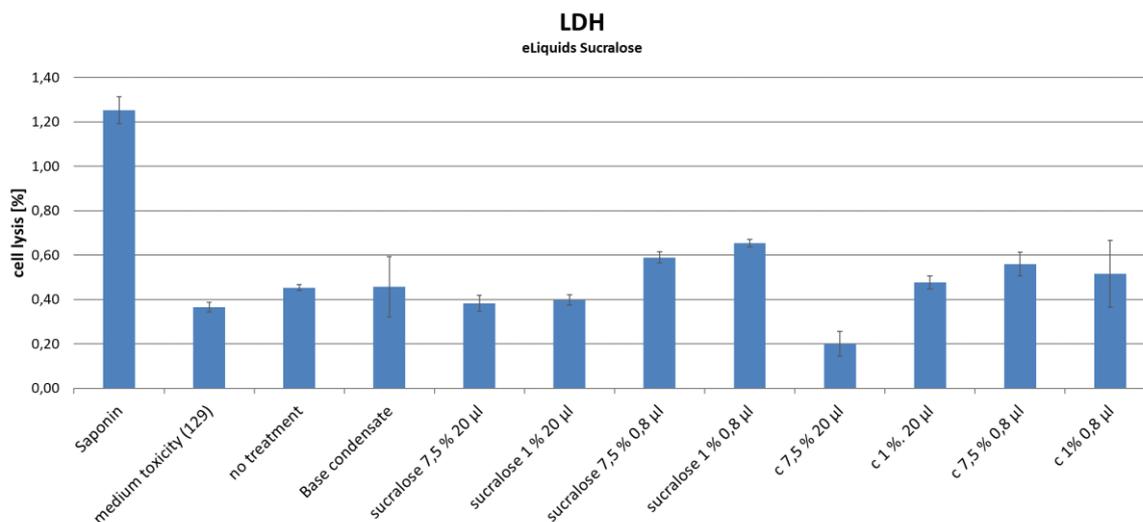


Abbildung 3: Lytische Effekte auf HUVEC / TERT2-Zellen durch Behandlung mit Sucraloselösung und Sucralosekondensat. Die Abbildung zeigt gemittelte LDH-Werte von 3 biologischen unabhängigen Experimenten (jeweils 3 technische Replikate) 24 Stunden nach der Behandlung.

## 5.2. Messung der metabolischen Aktivität nach Behandlung mit Sucraloselösungen mittels Resazurin assay

Der Resazurin-Assay wurde verwendet, um die Stoffwechselaktivität von HUVEC / TERT2-Zellen zu quantifizieren. Im Rahmen der Untersuchungen wurden HUVEC / TERT2-Zellen 48 Stunden lang den E-Liquid-Kondensaten ausgesetzt, und anschließend wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen mittels Resazurinumsatz bestimmt. Normale, metabolisch aktive Zellen, verstoffwechseln Resazurin allmählich zu Resorufin, das anschließend mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert werden kann. Zytotoxische Substanzen senken die Stoffwechselaktivität von Zellen, was zu einer Verlangsamung des Resazurin-Umsatzes führt. Daraus resultiert eine Reduktion des Fluoreszenzsignals, die proportional zur geringeren Stoffwechselaktivität in der Zellkultur ist. In Abbildung 4 ist der Resazurin Assay schematisch dargestellt.

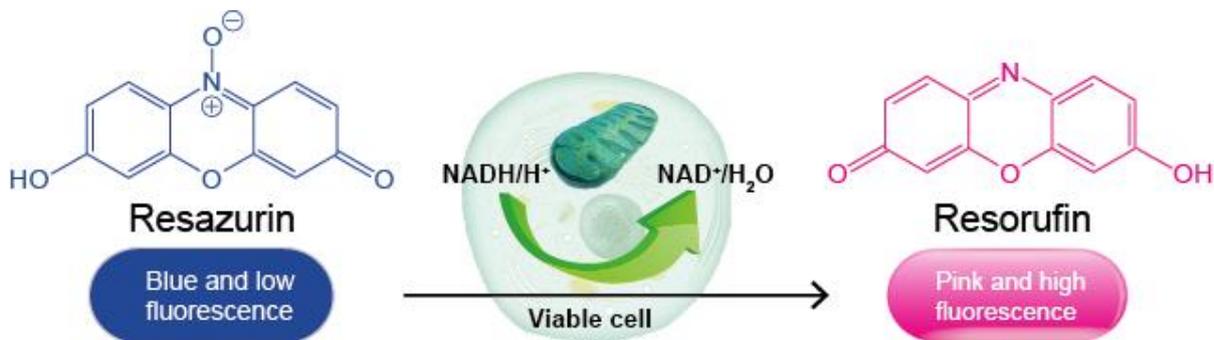


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Resazurin Assays

## 5.3. Ergebnis der *in vitro* Toxizitäts-Untersuchungen

Die Zellen, die mit Sucraloselösungen behandelt wurden, zeigen eine stark reduzierte metabolische Aktivität, was auf die hohe Toxizität der im Verdampfungsprozess gebildeten Komponenten hinweist. Nur bei der geringsten getesteten Konzentration (c 1 % 0,8 µl) trat eine sehr geringe Reduktion der metabolischen Aktivität auf, welche vergleichbar mit den Ergebnissen der direkt applizierten, nicht verdampften und re-kondensierten, Sucraloselösungen ist.

Alle unbehandelt getesteten Sucraloselösungen zeigten eine vernachlässigbare Toxizität auf das zelluläre Testsystem.

Besonders der Toxizitätsvergleich zwischen behandelten und unbehandelten Sucraloselösungen (siehe Abbildung 5) zeigt dass durch den Temperatureinfluss des Verdampfungsprozesses toxische Komponenten entstehen.

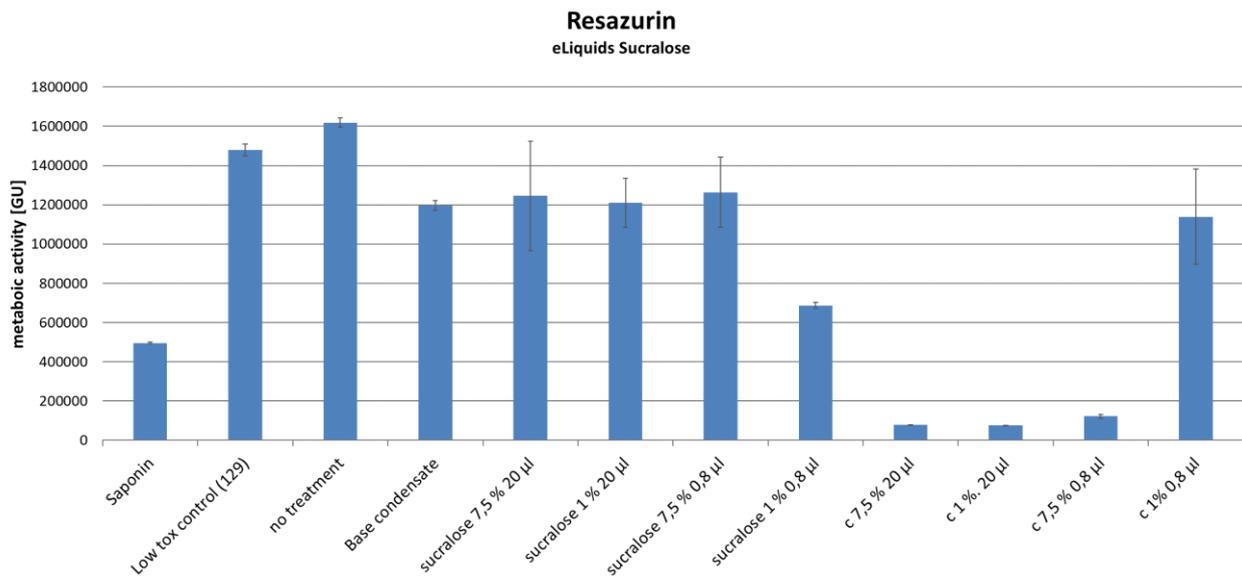


Abbildung 5: Toxische Auswirkungen auf den Stoffwechsel von HUVEC / TERT2-Zellen durch Applikation unbehandelter Sucraloselösung und Sucralosekondensat (mit „c“ beschriftet). Die Abbildung zeigt gemittelte LDH-Werte von 3 biologischen unabhängigen Experimenten (jeweils 3 technische Replikate) 24 Stunden nach der Behandlung.

## 6. Abschließendes Fazit

Die Analyse zeigte, dass bei der Verwendung von Sucralose in E-Liquids zum Teil sehr toxische Abbauprodukte entstehen können. Diese sind unter anderem 2-Propen-1-ol, Chloracetaldehyd und 2-Methylfuran. Die chlorierten Verbindungen können ausschließlich durch den Abbau von Sucralose entstehen, da dieses dreifach chloriert ist und abgesehen von Sucralose keine halogenierten Stoffe in den Probe-Lösungen enthalten sind. Zudem kann auch eine Vielzahl an 1,3-Dioxolanen nachgewiesen werden, welche durch Wasserabspaltung von Propylenglykol und Glycerin entstehen können.

Die Toxizität der gebildeten Komponenten wurde auch in der *in vitro* Testung auf HUVEC / TERT2-Zellen durch den Vergleich von mit unbehandeltem E-Liquid und E-Liquid-Kondensaten bestätigt. Wenngleich keine Zellmembran-schädigenden Auswirkungen (Zellyse) nachgewiesen werden konnten zeigen die Ergebnisse eine hohe Zytotoxizität – also Zelltod durch Behandlung mit den während des Verdampfungsprozesses gebildeten Komponenten.

Aufgrund der Bildung von hochtoxischen Komponenten während des Verdampfungsprozesses ist von der Verwendung von Sucralose in E-Liquids abzuraten.

adsi  
Austrian Drug Screening Institute GmbH  
Innrain 66a • A-6020 Innsbruck  
Tel.: +43 512 507-32203  
Fax: +43 512 507-32299  
office@adsi.ac.at • www.adsi.ac.at

04.04.2020 – Dr. Thomas Jakschitz