



Abschlussbericht

Projekt Tabakzusatzstoffe

Im Auftrag des Bundesamtes für Gesundheit (BAG) der
Schweiz

Caren Merckel und Fritz Pragst



August 2005

CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Campus Benjamin Franklin
Institut für Rechtsmedizin

Prof. Dr. F. Pragst

Abteilung Toxikologische Chemie
Hittorfstr. 18, 14195 Berlin

Fernruf (030) 450 525031 FAX (030) 450 525904

Bundesamt für Gesundheit (BAG)
Herrn Dr. Roland Charriere
Schwarzenburgstr. 165
CH 3003 Bern
Schweiz

Berlin, 12.08.2005

Abschlussbericht

Tabakzusatzstoffe

C.Merckel und F.Pragst

Die vorliegende Forschungsarbeit wurde mit Unterstützung des BAG der Schweiz,
Vertrag Nr. 02.001151 / 2.26.02.-39, erarbeitet.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	8
ABSTRACT	10
ZUSAMMENFASSUNG	11
1 EINLEITUNG	14
2 THEORETISCHER TEIL (LITERATURÜBERSICHT): ANWENDUNG, WIRKUNG UND GEFAHREN VON TABAKZUSATZSTOFFEN BEI ZIGARETTEN	16
2.1 PROZESSE BEIM RAUCHEN EINER ZIGARETTE	16
2.2 GEGENWÄRTIGES ZIGARETTENDESIGN UND ZUSATZSTOFFE.....	16
2.3 DURCH ANWENDUNG DER ZUSATZSTOFFE VERFOLGTE ZIELE	18
2.4 EINBRINGEN DER ZUSATZSTOFFE IM HERSTELLUNGSPROZESS	19
3 MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	21
3.1.1 GC/MS-System.....	21
3.1.2 Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME).....	21
3.1.3 Ammoniumselektive Elektrode	21
3.1.4 Weitere Laborgeräte und Materialien	22
3.2 CHEMIKALIEN UND REFERENZSUBSTANZEN.....	22
3.2.1 Chemikalien zur Probenvorbereitung für HS-SPME-Untersuchungen.....	22
3.2.2 Chemikalien zur Probenvorbereitung für Alkaloidbestimmung	24
3.2.3 Chemikalien zur Probenvorbereitung für Ammoniak- und Harnstoffbestimmung	24
3.2.4 Chemikalien zur Probenvorbereitung für die pH-Messungen	25
3.3 TABAK- UND ZIGARETTENPROBEN.....	25
3.4 PROBENVORBEREITUNG.....	26
3.4.1 Qualitative und quantitative HS-SPME-Untersuchungen.....	26
3.4.2 Alkaloidbestimmung	28
3.4.3 Ammoniak- und Harnstoffbestimmung	30
3.4.4 pH-Messungen	31
3.5 HS-SPME-BEDINGUNGEN.....	31
3.6 GASCHROMATOGRAPHISCHE PARAMETER	32
3.6.1 HS-SPME-Untersuchungen.....	32
3.6.2 Alkaloid-Bestimmung.....	32
3.7 MASSENSPEKTROMETRISCHE PARAMETER	32
3.7.1 HS-SPME-Untersuchungen.....	32
3.8 QUALITATIVE AUSWERTUNG DER HS-SPME/GC-MS-MESSUNGEN	33
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	35
4.1 ERGEBNISSE DER VORUNTERSUCHUNGEN.....	35
4.2 IDENTIFIZIERUNG DER ZUSATZSTOFFE IN ZIGARETTEN	45
MITTELS HS-SPME / GC-MS.....	45
4.3 QUANTIFIZIERUNG DER ZUSATZSTOFFE	61
4.4 BEDEUTUNG DER FESTGESTELLTEN SUBSTANZEN ALS ZUSATZSTOFFE.....	70
4.5 ERGEBNISSE DER TABAKALKALOIDBESTIMMUNG.....	72
4.6 ERGEBNISSE DER AMMONIUM- UND HARNSTOFFBESTIMMUNG.....	83

4.6.1 Ammoniumsalze	83
4.6.2 Harnstoff.....	88
4.7 ERGEBNISSE DER PH-MESSUNGEN	91
4.8 LITERATURRECHERCHE ZU EIGENSCHAFTEN UND ANWENDUNGSZWECK.....	93
AUSGEWÄHLTER ZUSATZSTOFFE UND DER TABAKALKALOIDE	93
4.8.1 Ammoniumsalze und Harnstoff.....	94
4.8.2 Aldehyde (Formaldehyd, Acetaldehyd, Acrolein).....	96
4.8.3 Aromastoffe	98
4.8.4 Kakao	99
4.8.5 Zucker	100
4.8.6 Menthol.....	101
4.8.7 Feuchthaltemittel (Glycerol, Propylenglycol, Triethylenglycol).....	102
4.8.8 Lakritze	103
4.8.9 Nikotin	103
4.8.10 Nebenalkaloide des Tabaks	104
5 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	108
6 EMPFEHLUNGEN	110
7 LITERATURVERZEICHNIS	112

Danksagung

Durch die hervorragende Vorarbeit von Herrn Dr. Werner Bernhard und die Unterstützung bei der Auswertung der Messdaten durch Herrn Dr. Beat Aebi, Inst. f. Rechtsmedizin Bern, war es möglich, uns gut in die undurchsichtige Thematik einzuarbeiten und immer wieder wichtige Hinweise und Ergänzungen aufzunehmen. Hierfür möchten wir uns herzlich bedanken.

Unser besonderer Dank geht an Frau Astrid Ratzinger, die mit Ihrer Diplomarbeit einen wesentlichen Anteil an der Methodenentwicklung und -optimierung für die vorliegende Forschungsarbeit geleistet hat.

Weiterhin möchten wir den Firmen PLANTA TABAK-MANUFAKTUR, Berlin und Schwanteland Jungpflanzen GmbH, Vehlefan, sowie Frau Prof. Dr. Aufderheide, Fraunhofer Institut für Toxikologische und Experimentelle Medizin, Hannover, für die Bereitstellung von Tabaken, Tabakpflanzen und Referenzzigaretten danken.

Für die interessanten Hinweise und Insider-Informationen aus der Sicht der Zigarettenindustrie danken wir ganz besonders Herrn Dr. Jeffrey Wigand, USA.

Den Praktikantinnen und Praktikanten Frau Thierbacher, Frau Rabeus, Frau Thiele, Herrn Hennig und Herrn Leppin der Abteilung Toxikologische Chemie danken wir für die Unterstützung bei der Durchführung in vielen Messungen während der praktischen Laborarbeit.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Abbildung 1a	Schema des Abbrandes von Zigarettentabak	16
Abbildung 1b	Strukturformeln einiger Zusatzstoffe	17
Abbildung 2a	HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Mischung von 17 Reinsubstanzen (1 µg) erhalten durch Extraktion bei niedriger Temperatur	38
Abbildung 2b	HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Mischung von 7 Reinsubstanzen (1 µg) erhalten durch Extraktion bei niedriger Temperatur	38
Abbildung 3	HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Mischung von 11 Reinsubstanzen (100 ng) erhalten durch Extraktion bei erhöhter Temperatur	39
Abbildung 4a	HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Zigaretten-sorten „10(S)“ in der Nachmessung (Dezember 2002)	40
Abbildung 4b	HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Zigaretten-sorten „10(S)“ bei den Voruntersuchungen (Sommer 2001)	40
Abbildung 5a	Vergleich der Massenspektren einiger Referenz-substanzen mit denen der entsprechenden Signale bei der Messung einiger Zigarettenarten	42
Abbildung 5b	Vergleich der Massenspektren einiger Referenz-substanzen mit denen der entsprechenden Signale bei der Messung einiger Zigarettenarten	43
Abbildung 6	Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Zigarettenart „9(S)“ ohne Zugabe und nach Zugabe von einigen basischen Substanzen	44
Abbildung 7	Vergleich der Massenspektren von γ -Undecalacton (M=184) in der Sorte „8(S)“ und in der Wiley-Spektrenbibliothek	46
Abbildung 8	Vergleich des Massenspektrums von p-Anisaldehyd (M=136) in „16(S)“ der Wiley-Spektrenbibliothek und der Referenzsubstanz bei Zugabe zur neutral aufgearbeiteten Zigarettenart „19(S)“	47
Abbildung 9	TIC von „10(S)“ mit und ohne Zusatz von Triacetin und o-Phenylphenol als Reinsubstanzen bei neutraler Aufarbeitung	48

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Abbildung 10	TIC von „19(S)“ mit und ohne Zusatz einiger Reinsubstanzen bei neutraler Aufarbeitung	48
Abbildung 11	Chromatogramm der Reinsubstanzen Propylenglycol, Tri- und Dipropylenglycol je 500 µg und der Zigarette „10(S)“ mit Zusatz von je 200 µg einiger Substanzen	49
Abbildung 12	Vergleich des Massenspektrums des Signals bei $t_R = 7,26$ min im Chromatogramm der Sorte „10(S)“ mit dem Massenspektrum von Tripropylenglycol aus der Wiley-Spektrenbibliothek	50
Abbildung 13	Vergleich der TIC der Sorte „30(S)“ und des Rohtabakmixes, saure Aufarbeitung	51
Abbildung 14	Vergleich der TIC/Chromatogramme der Sorten „4(S)“, „2(S)“ und des Rohtabakmixes, neutrale Aufarbeitung	52
Abbildung 15	Vergleich der TIC/Chromatogramme der Sorte „29(S)“ und des Rohtabakmixes, basische Aufarbeitung	53
Abbildung 16	Konzentration von 2-Ethyl-1-hexanol in Zigaretten-sorten verschiedener Herkunft	67
Abbildung 17	Konzentration von Menthol in Zigaretten-sorten verschiedener Herkunft	67
Abbildung 18	Nikotin- und Pyridingehalte in Rohtabaksorten	70
Abbildung 19	Strukturformeln einiger wichtiger Tabakalkaloide und des Nikotin-Hauptmetaboliten Cotinin	72
Abbildung 20	Chromatogramm des verdünnten Ether-Extraktes der Zigaretten-sorte „29(S)“	73
Abbildung 21	Chromatogramm der Analyse von Nikotin aus der Zigaretten-sorte „29(S)“	74
Abbildung 22	Chromatogramm der Zigaretten-sorte „29(S)“ zur Bestimmung der Begleitalkaloide	74
Abbildung 23	Ammoniakgehalt von drei Zigaretten-sorten mit niedrigem Gehalt ohne und mit Zusatz von Diammoniumhydrogenphosphat (entsprechend 3 mg NH_3 /halbe Zigarette)	84
Abbildung 24	NH_3 -Bestimmung von Schweizer Zigaretten und Zigarettenfiltern (aus 2000)	84
Abbildung 25	Vergleich der Ammoniakgehalte einiger Schweizer Zigaretten aus 2000 und 2003	85

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Abbildung 26a	Gesamtübersicht der Ergebnisse der Harnstoff- und Ammoniakmessungen	86
Abbildung 26b	Ergebnisse der Ammoniakbestimmung Schweizer Zigaretten im Vergleich mit den zugehörigen aus Deutschland	87
Abbildung 27	Vergleich der Ammoniak- und Harnstoffgehalte von Zigaretten gleicher Marke aus unterschiedlichen Ländern	90
Abbildung 28	Harnstoff- und Ammoniakgehalte in Rohtabaken	91
Abbildung 29	Einfluss des Zusatzes von Diammoniumhydrogenphosphat auf den pH-Wert von Zigarettenaufschlämmungen	92
Abbildung 30	Literaturangaben zum Vergleich der pathologischen Potenz von Nikotin und seinen Nebenalkaloiden im Tierversuch hinsichtlich einiger cholinergischer Parameter	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Seite
Tabelle 1a	Herkunft der Tabak- und Zigarettenproben für HS-SPME-Untersuchungen	25
Tabelle 1b	Herkunft der Tabak- und Zigarettenproben für Alkaloidbestimmung	26
Tabelle 1c	Herkunft der Tabak- und Zigarettenproben für Ammoniak- und Harnstoffuntersuchungen	26
Tabelle 2a	Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden, neutral extrahierbaren Substanzen	27
Tabelle 2b	Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden, basisch extrahierbaren Substanzen	27
Tabelle 3	Kalibrationsfunktionen für die Quantifizierung	28
Tabelle 4	Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden Nebenalkaloide und Nikotin	29
Tabelle 5	Kalibrationsfunktionen für die Quantifizierung der Alkaloide	29
Tabelle 6	Kalibrationsstandards für die Ammoniak- und Harnstoffbestimmung	30
Tabelle 7	SIM-Parameter für die Quantifizierung der Substanzen bei der HS-SPME-Untersuchung	33
Tabelle 8	SIM-Parameter für die Quantifizierung der Alkaloide	33
Tabelle 9	Ergebnisse der Voruntersuchungen von 12 Schweizer Zigaretten	36-37
Tabelle 10	Retentionszeiten der Reinsubstanzen und der entsprechenden Peaks in den Chromatogrammen der Zigaretten sowie Übereinstimmung („Match“) der Massenspektren in den Zigarettenarten mit denen der Reinsubstanzen in der selbsterstellten Spektrenbibliothek	41
Tabelle 11	Ergebnisse der Konzentrationsabschätzungen nach der Methode der Standardaddition	45
Tabelle 12	Übersicht über die in Schweizer Zigaretten gefundenen Zusatzstoffe	56-58
Tabelle 13	Länderspezifische Zusatzstoffe der Sorten „9“, „18“ und „19“	59-60

Tabelle	Bezeichnung	Seite
Tabelle 14a	Übersicht über die Konzentration der im neutralen quantifizierten Substanzen in den einzelnen Sorten und Rohtabaken	62-63
Tabelle 14 b	Übersicht über verwendete Zusatzstoffmengen im Vergleich mit selbst ermittelten und von der britischen Regierungen erlaubten Konzentrationen	65
Tabelle 15	Übersicht über die Konzentration der im basischen quantifizierten Substanzen in den einzelnen Sorten und Rohtabaken	68-69
Tabelle 16	Erwartungswerte für die Tabakalkaloidkonzentrationen aus der Literatur sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen LOD und LOQ des verwendeten Analysenverfahrens	73
Tabelle 17	Konzentrationen von Tabakalkaloiden [mg/g] in 32 Schweizer Zigarettenarten	77-78
Tabelle 18	Konzentrationen von Tabakalkaloiden [mg/g] in 20 Zigarettenarten, die im September 2003 in Berlin gekauft wurden	79-80
Tabelle 19	Konzentrationen von Tabakalkaloiden [mg/g] in selbst angebautem Tabak und in Rohtabakproben einer Zigarettenfabrik	81-82
Tabelle 20	Überblick über die Ergebnisse der pH-Werte von Schweizer und Deutschen Zigaretten. Es wurden die Werte nach 5 min. Aufschlammung des Tabaks aufgeführt	92
Tabelle 21	Literaturangaben zur Menge von Substanzen im Hauptstromrauch von Zigaretten	105
Tabelle 22	Alkaloidgehalte im Zigarettenrauch	105
Tabelle 23a	Vergleich der Wirkungen von Nikotin und seinen Nebenalkaloiden im Tierversuch	105
Tabelle 23b	Vergleich der Wirkungen von Nikotin und seinen Nebenalkaloiden im Tierversuch, Fortsetzung	106

Abstract

In the manufacturing of cigarettes, up to 25% by weight additives are added. These substances affect the smoking behaviour and are intended to increase the attractiveness of the product, especially for young people and children. More than 600 additives are known, which include also complex mixtures like cocoa and licorice. The aim of this investigation was to screen commercial cigarettes for such additives, to quantify the important one of them and to interpret them with respect to toxicological effects.

Compounds with high and medium volatility were detected by a systematic qualitative analysis using headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and GC-MS. The cigarette samples were extracted with water at acidic, neutral and basic pH followed by HS-SPME with a 65 µm CW-DVB-fiber and GC/MS. By library search using commercial spectra libraries, 48 compounds were identified, between them benzylalcohol, 2-ethyl-1-hexanol, menthol, vanillin, tripropylenglycol, geranylacetone, anisaldehyde, anisalcohol, thymole, but also some amines such as pyridine, fururylamine, 3-methylbutanamine, phenylethylamine and 1-methylpyrrolidine. Some of these compounds were found in raw tobacco, the reference cigarette 2R4F and in cigarettes, others were only present in the cigarettes and were obviously added.

Altogether 51 different cigarette sorts from 8 countries were analysed. The quantitation was performed by external calibration with 5 concentrations in tobacco matrix. After testing of 4 common brands from 5-8 different countries, regional differences in the additive profile of the cigarettes could be seen. As an example, the following concentrations were measured in the cigarettes: 2-ethyl-1-hexanol 0.06-12 µg/g, menthol 0.02-13.3 µg/g (in non-menthol-cigarettes) and 0.79 mg/g in a menthol-cigarette, indole 0.16-2.1 µg/g, pyridine 6.4-34.9 µg/g and benzylalcohol 6.6-40.8 µg/g.

Nicotine as well as its side alkaloids norNicotine, nicotyrine, myosmine, anabasine, anatabine and 2,3-bipyridine were quantitatively analysed by GC-MS in 20 German and 32 Swiss cigarette brands. For comparison, raw tobacco and reference cigarettes were included in the analysis. The concentrations measured for Nicotine (13,1-27,7 mg/g) and its side alkaloids (nornicotine: 0,3-1,9 mg/g, myosmine: 0,003-0,04 mg/g, nicotyrine: 0,08-0,4 mg/g, anabasine: 0,09-0,3 mg/g, anatabine: 0,5-1,5 mg/g, 2,3-bipyridine: 0,06-0,2 mg/g) were in the same range as described before in the literature. No indications were found for an addition of Nicotine and its side alkaloids to tobacco.

Furthermore, it is known, that basic substances are used to alkalis the tobacco smoke in order to increase the amount of the free base form of Nicotine in the smoke. Therefore, ammonium ions and urea in the same cigarettes and tobacco samples were determined using an ammonium selective electrode. After an aqueous extraction of the cigarettes the ammonium concentration was directly measured and urea was enzymatically transformed into NH₃ and then measured. As a result, between 0.11 and 3.7 mg/g ammonia and between 0.01 and 0.37 mg/g urea were determined.

From the evaluation of the known toxicological properties follows that the additives themselves as well as their pyrolysis products increase the harmful properties of cigarette smoking.

Zusammenfassung

Die Eigenschaften von Zigaretten werden in beträchtlichem Maße durch Zusatzstoffe bestimmt. Diese Additive beeinflussen den Geschmack, die Feuchtigkeit, die Branntrate, den Rauch-pH-Wert und auch sensorische Eigenschaften wie Sanftheit, Härte und Schärfe des Rauches. Damit verbunden ist eine Erhöhung der Attraktivität des Produktes, vor allem für jugendliche Einsteiger. Es besteht der Verdacht, dass durch Verstärkung der Nikotinwirkung das Suchtverhalten gesteigert wird. Aus verschiedenen Listen der Tabakindustrie und der Gesetzgeber sind über 600 Zusatzstoffe bekannt, die verwendet werden. Ziel dieses Projektes war es daher, Methoden zur schnellen qualitativen und quantitativen Überprüfung der in Zigaretten vorhandenen Zusatzstoffe und komplexen Zusatzstoffgemische zu entwickeln sowie in der gegenwärtigen Praxis der Zigarettenherstellung wirklich eingesetzte Zusatzstoffe, insbesondere für die in der Schweiz marktführenden Zigarettenarten, zu erfassen. Eine Gegenüberstellung der Aussagen zum toxischen Potential und zu den suchtfördernden Eigenschaften von Zusatzstoffen sowie zu deren Einfluss auf die geschmackliche Attraktivität und Akzeptanz aus Sicht der Zigarettenindustrie einerseits und unabhängiger Wissenschaftler andererseits soll die Widersprüche zwischen beiden deutlich machen.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden folgende Methoden angewendet, die für die spezielle Problematik der Zigarettenzusatzstoffe optimiert wurden: Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in Kombination mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), Flüssigextraktion und GC-MS-Messung der Extrakte, Ammoniak- und Harnstoffbestimmung mittels ionenselektiver Elektrode und pH-Messungen wässriger Extrakte. Die mittels GC-MS und Bibliothekssuche in kommerziellen Datenbanken festgestellten Inhaltsstoffe wurden zusätzlich nach Vergleichsmessungen der Referenzsubstanzen durch Übereinstimmung von Retentionszeit und Massenspektrum bestätigt. Wichtige Inhaltsstoffe wurden nach Kalibrierung quantitativ bestimmt.

Mit den genannten Methoden wurden insgesamt 51 verschiedene Zigarettenmarken untersucht, wobei von einigen dieser Marken Packungen aus unterschiedlichen Ländern einbezogen wurden, so dass eine Gesamtzahl von 79 Zigarettenpackungen überprüft wurde. Alle Messungen erfolgten mindestens in Doppelbestimmung. Für Vergleichszwecke wurden parallel dazu Referenzzigaretten und verschiedene Rohabaksorten sowie junge Tabakpflanzen analysiert.

Die systematische qualitative Untersuchung mit HS-SPME von 32 Schweizer Zigarettenmarken ergab 48 Zusatzstoffe (und weitere 9 basische Zusatzstoffe aus den in den Voruntersuchungen analysierten Zigaretten), darunter Anisaldehyd, Anisalkohol, Benzylbenzoat, Benzylalkohol, 2-Ethyl-1-hexanol, Ethylpalmitat, Ethylvanillin, Furfurylamin, Isopulegol, Menthol, γ -Nonalacton, Phenylethanol, 3-Phenylpropanol, n-Propyl-p-hydroxybenzoat, Propylenglycol, Thymol, Triacetin, γ -Undecalacton, Vanillin, Vanillinmethylether, Zimtaldehyd und Zimtalkohol.

Die meisten der nachgewiesenen Substanzen dienen als Aroma- und Geschmacksstoffe oder als Lösemittel für solche. Des Weiteren wurde das Feuchthaltemittel Propylenglycol in fast allen Schweizer Zigaretten nachgewiesen. Propylenglycol kann durch Pyrolyse beim Rauchen Propylenoxid bilden, was als Kanzerogen gilt. Alle gefundenen Zimtverbindungen können durch Decarboxylierung Styrol erzeugen, was ebenfalls im Verdacht steht, Krebs zu erzeugen.

Menthol kommt eine besondere toxikologische Bedeutung zu, da es u.a. den Nikotinabbau im Körper verzögert. Es wurde außer in der als Mentholzigarette deklarierten Marke (0,79 mg/g) auch in vielen Nicht-Mentholzigaretten (0,9 – 13,3 μ g/g) eindeutig als Zusatzstoff identifiziert. Mentholkonzentrationen bis 0,2 μ g/g gelten nach unseren Untersuchungen als natürlicher Gehalt in Tabak.

Benzylalkohol und 2-Ethyl-1-hexanol sind ebenfalls natürliche Inhaltsstoffe des Tabaks, die den Zigaretten darüber hinaus noch zugesetzt werden. Für Benzylalkohol wurden Konzentrationen in Zigaretten zwischen 3,8 – 40,8 µg/g ermittelt, während die höchste Konzentration in der Rohtabaksorte Virginia (aus Zimbabwe) 20,7 µg/g und in der Referenzzigarette 8,1 µg/g beträgt. Die 2-Ethyl-1-hexanol-Konzentrationen in Zigaretten schwanken zwischen 0,06 µg/g und 12,0 µg/g, während die Referenzzigarette nur 0,07 µg/g enthält und im Orienttabak (aus Griechenland) 0,46 µg/g festgestellt wurden.

Für Pyridin, das in Konzentrationen von 6,35 µg/g – 34,9 µg/g bestimmt wurde, ergaben sich zwar z.T. Unterschiede zu den Referenzzigaretten, trotzdem wird von einem Zusatz dieser Base nicht ausgegangen. Analoges gilt für Furfurylamin, Indol, Benzaldehyd und Acetophenon.

3-Phenylpropanol konnte in Konzentrationen von 0,17-0,58 µg/g in fünf der Schweizer Zigarettenarten als Zusatzstoff eindeutig nachgewiesen werden.

Nikotin sowie die Tabaknebenalkaloide Nornikotin, Nicotyrin, Myosmin, Anabasin, Anatabin und 2,3-Bipyridin wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie quantitativ in 20 in Deutschland gekauften und 32 in der Schweiz gekauften Zigaretten unterschiedlicher Marken bestimmt. Zum Vergleich wurden auch hier Rohtabakproben sowie eine Referenzzigarette einbezogen. Die festgestellten Konzentrationen an Nikotin (13,1-27,7 mg/g) und seinen Nebenalkaloiden (Nornikotin: 0,3-1,9 mg/g, Myosmin: 0,003-0,04 mg/g, Nicotyrin: 0,08-0,4 mg/g, Anabasin: 0,09-0,3 mg/g, Anatabin: 0,5-1,5 mg/g, 2,3-Bipyridin: 0,06-0,2 mg/g) befanden sich in den Zigaretten im Schwankungsbereich der bereits früher in der Literatur beschriebenen Werte. Für einen Zusatz von Nikotin oder seinen Alkaloiden als Einzelsubstanzen ergaben sich keine Anhaltspunkte. Ein Zusatz der Nebenalkaloide scheint einerseits wegen des hohen Preises dieser Substanzen und andererseits wegen der geringeren Wirkung im Vergleich zu Nikotin generell unwahrscheinlich. Dieses schließt aber eine Aufstockung mit Tabakextrakten nicht aus (z. B. rekonstituierter Tabak). Zwischen den in der Schweiz und in Deutschland gekauften Zigaretten bestanden bei gleicher Sorte hinsichtlich der Alkaloidkonzentrationen meist nur sehr geringe Unterschiede.

Die Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff mittels ionenselektiver Elektrode erfolgte für alle im Projekt überprüften Zigarettenpackungen. Es wurden zwischen 0,11 und 3,1 mg/g NH₃ im Tabak europäischer Zigaretten festgestellt. US-amerikanische Zigaretten enthalten 0,67 – 3,74 mg/g NH₃ im Tabak. Da die hier untersuchten Rohtabaksorten, die in der Zigarettenherstellung verwendet werden, bereits einen Ammoniakgehalt von 0,05-1,7 mg/g besitzen, können diese Werte nicht zwingend auf einen Zusatz von Ammoniumsalzen zurückgeführt werden. Allerdings gilt ein Zusatz ab 1 mg/g als wahrscheinlich. Es wurde festgestellt, dass der Ammoniakgehalt bei längerer Lagerung der Zigaretten absinkt. Der Vergleich zwischen den in Deutschland und in der Schweiz gekauften Zigaretten einiger Sorten weist darauf hin, dass der Ammoniakgehalt markentypisch ist.

Harnstoff konnte als Zusatzstoff nicht nachgewiesen werden, da sich die Konzentrationen in den Zigaretten von denen im Rohtabak, in der Referenzzigarette und in Jungpflanzen nicht sehr unterscheiden.

Die pH-Werte der wässrigen Extrakte von den Zigarettenarten aus der Schweiz und aus Deutschland wurden zwischen 5,4 und 6,0 gemessen. Solche Unterschiede können durch Zusatzstoffe bedingt sein. Weniger saure Zigaretten könnten zu einer Erhöhung des freien Nikotins in der Gasphase des Rauches führen.

Die aktuelle Literatur über Zusatzstoffe in Zigaretten wurde hinsichtlich deren Auswirkungen auf den Rauchvorgang und deren toxikologische Bedeutung ausgewertet. Dabei wurden soweit als möglich sowohl die unveränderten Substanzen als auch durch Pyrolyse entstehende Produkte betrachtet. Z. T. existieren je nach Autoren (Zigarettenindustrie oder unabhängige Wissenschaftler) widersprüchliche Aussagen. Insbesondere wurden Ammoniumverbindungen und Harnstoff als Ammoniak-liefernde Zusätze, Formaldehyd, Acetaldehyd und Acrolein als Pyrolyseprodukte von Zuckern oder Glycerin, die sehr heterogene Gruppe der Aromastoffe, Kakao, Zucker, das in einigen Zigaretten in

beträchtlichen Mengen zugesetzte Menthol, die Feuchthaltemittel Glycerin und Propylenglycol sowie Lakritze betrachtet.

Es zeigte sich weiterhin, dass Zusatzstoffe einerseits erheblich zur Steigerung des an sich schädlichen Zigarettenkonsums beitragen und andererseits vor allem in Form ihrer Pyrolyseprodukte eigene toxische Eigenschaften besitzen.

Im Ergebnis dieser Untersuchungen wird empfohlen, über die bereits gesetzlich von den Herstellern geforderte Deklaration der Zusatzstoffe hinaus eine von der Zigarettenindustrie unabhängige analytische Prüfung einzurichten, die den Nikotingehalt, den Säure-Base-Status, Ammoniumionen und Harnstoff, ein Screening auf flüchtige und mittelflüchtige Zusätze, die quantitative Bestimmung der Hauptzusatzstoffe sowie eine Analyse von Aldehyd-bildenden Substanzen umfasst. Die dabei ermittelten Konzentrationen sollten auf der Basis festzulegender cut-off-Werte bewertet werden.

1 Einleitung

Gemessen an den nachweislich erzeugten gesundheitlichen Schäden steht der Tabakrauch unter allen Umweltgiften, denen der Mensch heute ausgesetzt ist, an erster Stelle. An diese Position trat er zu Beginn des 20. Jahrhunderts, als in Europa das Rauchen von Zigaretten populär wurde. Während im Jahre 1897 in der Bevölkerung durchschnittlich nur 40 Zigaretten pro Kopf und Jahr geraucht wurden, stieg diese Zahl am Ende des 1. Weltkrieges auf etwa 300 und betrug 1939 etwa 650. Sie erhöhte sich in den 70er Jahren auf 2650 [1; 2] und hat sich seitdem auf diesem Niveau stabilisiert.

In der Schweiz rauchen ca. 32% der über 15 Jährigen in der Bevölkerung, der durchschnittliche Zigarettenkonsum liegt bei ca. 21 Zigaretten pro Tag. Schwerwiegende, durch Tabakrauch hervorgerufene Erkrankungen sind Lungenkrebs (Bronchialkarzinom), aber auch Tumore des oberen Respirationstraktes, der Harnblase sowie Schädigungen des Herzens und des Kreislaufsystems. Jährlich gibt es in der Schweiz etwa 8300 Rauchertote. Obwohl diese gesundheitlichen Risiken seit etwa 50 Jahren klar nachgewiesen sind, ist die kritische Einsicht hierzu nicht gewachsen und der Pro-Kopf-Verbrauch nimmt weltweit weiter zu. Ursachen sind einerseits die süchtige Gewohnheitsbildung und andererseits der enorme Werbungsdruck der Zigarettenindustrie.

Das im Tabak enthaltene Nikotin ist ein Suchtgift, dessen regelmäßige Aufnahme dem Raucher durch Zigaretten ermöglicht wird, und dessen pharmakologische Aktivität durch die Tabaknebenalkaloide, Aromastoffe und Acetaldehyd vergrößert wird [3]. Um u. a. die Akzeptanz und die suchtbildende Wirkung der Zigarette beim Verbraucher zu erhöhen, werden dem Tabak im Herstellungsprozess Zusatzstoffe beigefügt.

In der Schweiz fallen Tabakerzeugnisse als Genussmittel unter die Bestimmungen des Lebensmittelgesetzes (LMG)[4]. In diesem Gesetz findet man auch eine mehr oder weniger genaue Definition der Zusatzstoffe:

Art. 4 LMG:

„Zusatzstoffe sind Stoffe, die bei der Herstellung von Lebensmitteln zur Erzielung bestimmter Eigenschaften oder Wirkungen verwendet werden.“

In der Tabakverordnung Artikel 6 ist definiert, welche Zusatzstoffe zur Herstellung von Tabakerzeugnissen verwendet werden dürfen.

In der EG-Richtlinie 89/107 heißt es über Zusatzstoffe :

„Ein Stoff mit oder ohne Nährwert, der in der Regel weder selbst als Lebensmittel verzehrt wird, noch als charakteristische Lebensmittelzutat verwendet wird und einem Lebensmittel aus technologischen Gründen bei der Herstellung, Verarbeitung, Zubereitung, Behandlung, Beförderung und Lagerung zugesetzt wird, wodurch er selbst oder seine Nebenprodukte zu einem Bestandteil des Lebensmittels werden oder werden können.“

ausgeschlossen:

Verarbeitungshilfsstoffe, Pflanzenbehandlungsmittel, Aromen, Stoffe zu Ernährungszwecken

Zusatzstoffe werden demnach u. a. dazu verwendet, um die natürlichen Eigenschaften einer Ware, wie z. B. Tabak, zu beeinflussen. Es sind über 600 Tabakzusatzstoffe bekannt, z. T. handelt es sich dabei um komplexe, nicht eindeutig definierte Gemische.

Welche zusätzlichen Stoffe im Tabak enthalten sein dürfen, regelt in der Schweiz die Verordnung über Tabak und Tabakerzeugnisse (Tabakverordnung) [5]. Die für Tabakerzeugnisse geltenden Vorschriften der EU-Mitgliedsstaaten unterscheiden sich untereinander noch wesentlich und sollen angeglichen werden. Die Hersteller und Importeure von Tabakerzeugnissen sind zur Zeit verpflichtet, der EU-Kommission alle tatsächlich verwendeten Inhaltsstoffe zu benennen. Die EU-Kommission sollte spätestens am 31.12.2004 einen Vorschlag für ihre gemeinsame Liste der für Tabakerzeugnisse zugelassenen Inhaltsstoffe vorlegen [6].

In den letzten 25 Jahren gab es zahlreiche Innovationen im Bereich der Tabakzusatzstoffe, jedoch nur minimale Prüfungen bezüglich deren Regulierung. Aus diesem Grund wird gefordert, offen zu legen und zu kontrollieren, welche Zusatzstoffe in welcher Marke enthalten sind, und zu zeigen, dass von diesen keine toxischen Wirkungen in verbrannter und unverbrannter Form ausgehen. Der Zweck, Nutzen und die Wirkung der existierenden und neuer Zusatzstoffe auf die Gesundheit muss geklärt und bewertet werden.

In der totalrevidierten schweizerischen Tabakverordnung, in Kraft seit 01. November 2004, werden diese Forderungen gesetzlich verbindlich geregelt. Kernpunkte der neuen Tabakverordnung sind die Einführung von deutlichen Warnungen auf Tabakprodukten sowie eine obligatorische Meldepflicht der zugesetzten Stoffe.

Nach Artikel 10 sind Hersteller und Importeure von Tabakerzeugnissen, die in der Schweiz abgegeben werden sollen, gegenüber dem Bundesamt für Gesundheit (BAG) zu folgenden Angaben verpflichtet:

- Liste der markenspezifisch dem Rohtabak hinzugefügten Stoffe (Liste 1)
- Liste der Funktionen und der Höchstmengen aller dem Rohtabak hinzugefügten Stoffe (Liste 2)
- Liste der hinzugefügten Stoffe in tabakfreien Bestandteilen (Liste 3)
- Liste der Schadstoffe in Zigaretten (Teer-, Nikotin- und Kohlenmonoxidgehalt) (Liste 4)

Beizufügen sind die toxikologischen Angaben der verwendeten Stoffe in verbrannter und unverbrannter Form, soweit sie der meldepflichtigen Person bekannt sind. Das BAG macht diese Angaben der Öffentlichkeit zugänglich.

Beim Rauchvorgang spielen leicht- und mittelflüchtige Verbindungen eine wesentliche Rolle. Als einfache, spezifische und empfindliche Methode zum Nachweis und zur Bestimmung dieser Verbindungen aus dem Tabak eignet sich daher die Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in Kombination mit der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).

Eine Teilaufgabe dieses Projektes war es daher, eine größere Zahl handelsüblicher Zigarettenarten mittels Headspace-Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HS-SPME/GC-MS) qualitativ und quantitativ auf solche Zusatzstoffe zu analysieren.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine Aufstockung des Tabaks mit Nikotin oder Tabaknebenalkaloiden in der Praxis eine Rolle spielt. Aus diesem Grund erfolgte eine quantitative Bestimmung der Tabakalkaloide mittels GC/MS.

Es ist bekannt, dass durch Alkalisierung des Rauches mittels Ammoniumsalzen oder Harnstoff die Verfügbarkeit von Nikotin im Rauch erhöht wird. Daher sollten derartige Zusatzstoffe ebenfalls in den Zigaretten bestimmt werden. Aufschluss über Zusätze zur Alkalisierung des Rauches können auch pH-Messungen von Tabakextrakten geben.

Insgesamt sollen die analytischen Ergebnisse dazu dienen, Angaben der Zigarettenhersteller über Zusatzstoffe zu überprüfen und, gemeinsam mit der toxikologischen Bewertung der Zusatzstoffe, die Formulierung konkreter Richtlinien für die Gesetzgebung über Tabakprodukte zu unterstützen.

2 Theoretischer Teil (Literaturübersicht): Anwendung, Wirkung und Gefahren von Tabakzusatzstoffen bei Zigaretten

2.1 Prozesse beim Rauchen einer Zigarette

Die Vorgänge beim Rauchen einer Zigarette sind in Abb. 1 dargestellt.

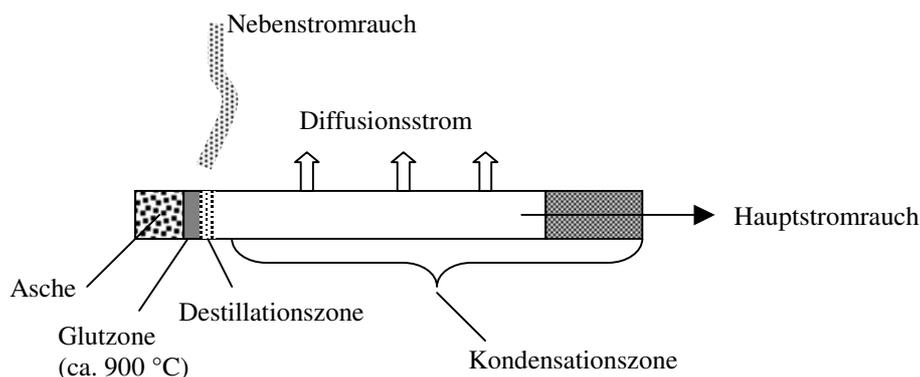


Abb. 1a: Schema des Abbrandes von Zigarettentabak

Durch den Sog am Mundstück der Zigarette werden in der Glutzone Temperaturen von ca. 900 °C erreicht. Dort findet unter Sauerstoffmangel die thermische Zersetzung des organischen und anorganischen Materials statt. Die gasförmigen Reaktionsprodukte gelangen in die Destillationszone, wo wasserdampfgefährliche Stoffe, u. a. das Nikotin und Zusatzstoffe, freigesetzt werden. Dahinter bildet sich durch Abkühlung ein Aerosol, das sich mit abnehmender Temperatur im verbleibenden Teil der Zigarette (Kondensationszone) niederschlägt. Dort zunehmend angereichert, wird es mit fortschreitender Glutzone erneut abdestilliert und gelangt in den Hauptstromrauch. In den Zugpausen erfolgt im Nebenstromrauch eine Abdestillation nach außen. Da hier bei sehr viel niedrigeren Temperaturen (Glimmen) weniger Material verbrannt und mehr abdestilliert wird, unterscheidet sich die Zusammensetzung des Nebenstromrauches von der des Hauptstromrauches. Der Hauptstromrauch wird vom Raucher beim Ziehen am Mundstück eingeatmet. Der in die Umwelt gelangende Rauch besteht zu ca. 85% aus Nebenstromrauch und zu ca. 15% aus z. T. wieder ausgeatmetem Hauptstromrauch.

Zigarettenrauch ist ein Aerosol, das aus einer nicht sichtbaren Gasphase und einer Partikelphase besteht. In der Gasphase werden v. a. neutrale Verbindungen angereichert, die sich während des Rauchvorgangs durch Pyrolyse des Tabaks bilden. Die Hauptkomponenten der Partikelphase sind Nikotin und die anderen Tabakalkaloide. Im Tabakrauch sind bisher ca. 4800 chemische Substanzen identifiziert worden, darunter 69 organische und anorganische Kanzerogene sowie zahlreiche hoch reaktive und toxische Verbindungen [1; 2].

2.2 Gegenwärtiges Zigaretten-Design und Zusatzstoffe

Als Reaktion auf die Erkenntnisse, dass das Lungenkrebsrisiko hauptsächlich durch den Teer bedingt ist, wurden in den verschiedenen Ländern Veränderungen in der Zigarettenproduktion vorgenommen, die auf eine Verringerung der Teeremission abzielten [3]. Wesentliche Maßnahmen hierbei waren die Einführung von Filtern aus Celluloseacetat

und die Verwendung von Filtern mit Perforierung, durch die der Hauptstrom mit Luft verdünnt wird (Ventilation). Des Weiteren wurde der Teergehalt im Hauptstromrauch durch den Einsatz von hoch durchlässigem Zigarettenpapier, wodurch mehr Teerpartikel in den Nebenstromrauch gehen, sowie rekonstituiertem und expandiertem Tabak (Definitionen in Abschnitt 2.4) reduziert.

Neben diesen äußeren Veränderungen der Zigarette wurde versucht, durch Zusatzstoffe die Akzeptanz für aktive und passive Raucher zu erhöhen. Mit der Einführung von Filterzigaretten mit geringerem Teergehalt und weniger natürlichen Aromastoffen („low-tar-cigarettes“ und „low-yield-cigarettes“) am Ende der 60er Jahre stieg der Einsatz von Zusatzstoffen dramatisch an [7; 8].

599 Additive wurden 1999 in einer auf Angaben der Tabakindustrie basierenden Liste („Additives found in American Cigarettes“ [9]) veröffentlicht.

Bei den Zusätzen handelt es sich zum Teil um komplexe Gemische, deren Komponenten im Detail nicht angegeben sind und zum anderen Teil um definierte Einzelsubstanzen. Die Einzelsubstanzen können aus chemisch-struktureller Sicht in folgende Stoffgruppen eingeteilt werden:

- Ammoniumsalze: -carbonat, -phosphat, -sulfid
- Andere Salze: Natrium-, Magnesiumsalze
- Benzolderivate: aromatische Aldehyde und Ketone, Vanillin, Zimtaldehyd, Anisolderivate, Benzoesäureester, Benzylester, Zimtsäureester, Salicylsäure-derivate, Piperonal
- Phenole: Carvacrol, Guajacol, Thymol, Eugenol
- Stickstoffheterocyclen: Pyridin, Pyrazin, Pyrrol, Thiazol, deren Substitutionsprodukte, Chinoxalin, Indol
- Xanthine: Coffein, Theobromin
- Terpene: Borneol, Bornylacetat, Camphen, β -Caroten, Carvon, Citral, Eucalyptol, Farnesol Fenchon, Menthol, Menthon, Menthylverbindungen
- Hydroxyverbindungen: Glycerin, Ethylenglycol, Propylenglycol, oligomere Glycole
- Sonstige: Ionon-Derivate, Glycyrrhizin, Solanon, Aliphatische Alkohole, Aldehyde, Carbonsäuren, Carbonsäureester, Lactone, Furanderivate, Aminosäuren

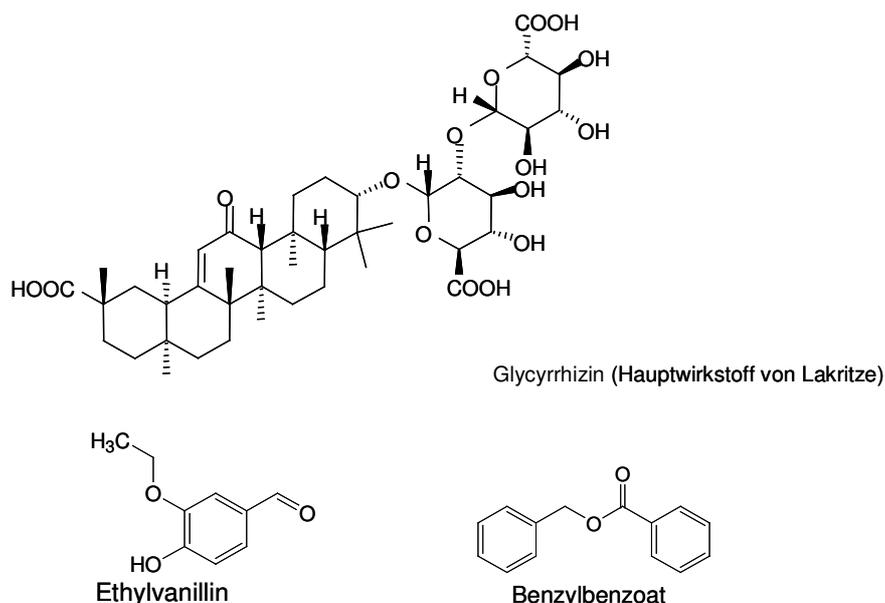


Abb. 1b: Strukturformeln einiger Zusatzstoffe

Zu den komplexen Gemischen gehören Kakao, Schokolade, Lakritze, Kaffee u. a.. Teilweise werden auch Stoffe zugesetzt, die bereits im Rohtabak enthalten sind, jedoch beim Herstellungsprozess verloren gehen. Dieses dient auch dazu, Gehaltsunterschiede je nach Wachstumsort und Sorte des Tabaks auszugleichen. Daher werden diese natürlichen Inhaltsstoffe nach der Tabakaufbereitung wieder aufgestockt oder angereichert, um den natürlichen Geschmack zu erhalten und zu verstärken.

Zum anderen werden tabakfremde Substanzen zugesetzt. Dazu zählen Geschmacks- und Aromastoffe, welche als Sauce über die Tabakmischung gegeben („Casing ingredients“) oder am Ende des Herstellungsprozesses aufgesprüht („Top dressing“) werden [10].

Außerdem dienen Additive im Tabak der verkaufsfertigen Zigarette als Bindemittel, Füllstoffe, Feuchthaltemittel, Konservierungsstoffe. Im Herstellungsprozess werden Des weiteren Befeuchter und Prozesshilfsstoffe verwendet [11].

2.3 Durch Anwendung der Zusatzstoffe verfolgte Ziele

Wie durch Studium interner Industriedokumente bekannt wurde, verfolgt die Zigarettenindustrie durch die Anwendung von Zusatzstoffen folgende Ziele [7; 8], [11-13]:

- Freisetzung einer höheren Menge freien, ungebundenen Nikotins (Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Nikotin) durch basische pH-Einstellung des Rauches („free basing“). Zu diesem Zweck wird vor allem Diammoniumphosphat eingesetzt, das über die Freisetzung von Ammoniak den pH-Wert anhebt.
- Ausnutzung synergistischer Effekte zur Erhöhung der Nikotinwirkung, z. B. durch Acetaldehyd, Pyridin, Lävulinsäure, Theobromin, Glycyrrhizin.

Dazu ein Zitat aus internen Dokumenten der Zigarettenindustrie:

„Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden: 1. Acetaldehyd wirkt im Tierversuch mit Ratten als positiver Verstärker. 2. Bei der gleichen Dosierung von Acetaldehyd und Nikotin führt Acetaldehyd zuverlässiger zur Aufrechterhaltung des Konsumverhaltens. 3. Das endogene Opioidsystem ist in die Aufrechterhaltung des Acetaldehydkonsums nicht einbezogen. 4. Die Kombination von Acetaldehyd bewirkt überadditive Effekte, wenn eine Selbstadministration vorgenommen wird.“ (Philip Morris 1982) [14].

- Verbesserung des Geschmacks von Tabakrauch, Erzeugung eines mildereren Geschmacks oder spezieller Geschmacksrichtungen, um die Attraktivität der Zigaretten zu steigern, z. B. durch Aromen und Gewürze.
- Ersatz für den fehlenden rauhen Geschmack bei Reduzierung des Teeranteils („Full flavor low tar“).
- Zusatz von Süßwaren und Schokolade sollen die Zigarette attraktiver für Anfänger und Kinder machen.
- Eugenol und Menthol betäuben die Rachenschleimhaut und unterdrücken auf diese Weise das Gefühl der Reizung durch den Rauch.

Dazu Zitate aus internen Dokumenten der Zigarettenindustrie:

„Auch unterhalb der Wahrnehmungsgrenze mildert Menthol den Tabakrauch.“ (Brown&Williamson, 1971) [14]

„Menthol wird nicht auf Grund seiner Wirkung auf das zentrale Nervensystem gebraucht, jedoch kann es alle Ebenen des zentralen Nervensystems stimulieren.“ (R.J. Reynolds, 1984) [14]

- Maskierung des Geruches, der irritierenden Wirkung und des sichtbaren Anteils des Rauches [12], um natürlichen Warnsignalen und Beschwerden von Passivrauchern entgegenzuarbeiten und den Rauch auch für diese angenehm erscheinen zu lassen.

Additive beeinflussen somit den Geschmack, die Nikotinabgabe, verschiedene Produkteigenschaften wie Feuchtigkeit, Abbrennrage, pH-Wert des Rauches sowie sensorische Eigenschaften des Rauches wie Sanftheit, Härte und Druck. Zwei bedeutende Eigenschaften von Zigarettenrauch sind der Nikotingehalt und der Anteil des in freier Form vorliegenden Nikotins. Die Nikotinaufnahme durch den Raucher ist vom Anteil der freien Base Nikotin abhängig, da diese flüchtiger ist und in den Körper des Rauchers schneller übergeht. Im Zigarettenrauch und -tabak liegt Nikotin in gebundener Form als Salz organischer Säuren vor. Die Steigerung des Anteils freien Nikotins im Rauch durch „free basing“, der basischen pH-Einstellung des Rauches, z. B. mit freiwerdendem Ammoniak, soll bei gegebenem oder sogar reduziertem Nikotingehalt der Zigarette, auch bei gleichzeitig sinkendem Teeranteil die abhängig machende Wirkung des Nikotins erhalten oder erhöhen. Dazu werden Wissenschaftler der Tabakindustrie in der Literatur [7; 11] wie folgt zitiert:

„Since the unbound Nicotine is very much more active physiologically, and much faster acting than bound Nicotine, the smoke at high pH seems to be strong in Nicotine.“

“AT (ammonia technology) is the key to competing in smoke quality with PM (Philip Morris) worldwide. All US manufacturers ... use some form of AT on some cigarette products.“ [7; 11]

2.4 Einbringen der Zusatzstoffe im Herstellungsprozess

Die Aufbereitung der geernteten Tabakblätter erfolgt in folgenden Schritten:

- Trocknen: an der Sonne „sun-cured“ (Orient), an normaler Umgebungsluft „air-cured“ (Burley), in Heißluftrohren „flue-cured“ (Virginia), Feuer Trocknung „fire-cured“ (verschiedene asiatische Sorten)
- Fermentation: Reifung der Tabakblätter durch Gärung, dabei chemischer Abbau von Eiweißstoffen und Umwandlung von Pflanzenstärke in Zucker und somit Ausbildung des typischen Tabakaromas
- Feuchten: mit Wasserdampf werden die getrockneten Roh tabakblätter voneinander gelöst und die Blattporen geöffnet
- Einbringen von Zusatzstoffen: Beigabe verschiedener, z. T. natürlicher Zusatzstoffe (als sog. Saucen bzw. Flavour) zur Stabilisierung des Feuchtegehalts und zur Aromatisierung; Zusatzstoffe dringen durch Besprühen der Tabakblätter in die Blattporen ein
- Mischen: bis zu 50 verschiedene Partien Tabak werden gemischt, um die für eine Zigarettenmarke typische, gleich bleibende Mischung („blend“) zu erzeugen
- Schneiden: Tabakblätter werden maschinell nach dem Vorschnitt von den Blattrippen befreit und anschließend in Streifen geschnitten (0.6 mm breit bei Zigaretten und Feinschnitttabak)

Entsprechend der unterschiedlichen Herstellung und Zusammensetzung unterscheidet man Roh tabak, rekonstituierten Tabak und expandierten Tabak.

- *Roh tabak* sind Blätter, Blatt- oder Rippenstücke der Tabakpflanzen *Nicotiana tabacum L.* und *Nicotiana rustica L.*, die getrocknet, fermentiert oder in anderer industrieüblicher Weise behandelt worden sind [5].
- *Rekonstituierter Tabak* (homogenisierter Tabak) sind Folien, folienartige Gebilde oder Flocken, die aus fein gemahlenem und wieder gebundenem Roh tabak oder aus ebenso behandelten, sauberen Fabrikationsabfällen hergestellt sind. In ihnen sind die einzelnen Pflanzenteile makroskopisch nicht mehr erkennbar. Er muss, bezogen auf die Trockensubstanz, mindestens 70 Massenprozent Roh tabak enthalten [5].
- *Expandierter Tabak* ist Tabak, der mit einem Expansionsagens behandelt wurde (z.B. CO₂ oder Trichlorfluormethan) und dadurch eine expandierte Blattzellstruktur erhält. Die Tabakfüllung in der Zigarette wird durch den Zusatz von expandiertem Tabak voluminöser.

Additive kommen während der Herstellung von Zigaretten in mehreren Produktionsschritten zur Anwendung. Schwerflüchtige Additive können der Tabakmischung schon vor dem Schnitt zugefügt werden, leichtflüchtige Verbindungen dagegen erst unmittelbar vor der Verarbeitung zur Zigarette. Nach Anwendung der weniger flüchtigen Verbindungen Zucker, Feuchthaltemittel, Lakritze und Kakao (casing solutions) folgt häufig ein Erhitzen, welches zur Karamelisierung der Zucker und zur Erzeugung neuer Verbindungen beiträgt. Leichtflüchtige aromatische Verbindungen und Geschmacksstoffe werden zusammen mit einem Stabilisator (z. B. Propylenglycol, Ethanol, Glycerol, Triacetin) auf den geschnittenen Tabak gesprüht (top dressings) [8].

Harnstoff und Ammoniumsalze gelangen durch den rekonstituierten Tabak in die Zigarette. British American Tobacco, UK gibt an, dass sog. Paper RTS (rekonstituierter Tabak in Form dünner Blättchen) 2,5-3,5 % Diammoniumhydrogenphosphat und 1,75-2,25 % Harnstoff enthält. Band Cast RTS (rekonstituierter Tabak in Form dünner Bänder) enthält 3-4% Ammoniumhydroxid und 6-8% Diammoniumhydrogenphosphat [15].

Zusammenfassend ergibt sich folgende Zusammensetzung einer typischen American-Blend-Zigarette:

- 45-55 % Rohtabak (55% Burley Tabak, 45 % Flue cured Tabak (Virginia), 5 % Orient Tabak)
- 20-30 % Rekonstituierter Tabak (Paper und Bandcast)
- 10-20 % Expandierter Tabak
- 10-25 % Additive
- Blattstängel, Blattrippen u.a.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Materialien

3.1.1 GC/MS-System

- Gaschromatographen: - 6890, Agilent Technologies (Waldbronn, Germany)
- 6890N (G1530N), Agilent Technologies (USA)
- Massenselektive Detektoren: - 5973 MSD, Agilent Technologies (Waldbronn, Germany)
- 5973N (Network) MSD, Agilent Technologies (USA)
- Autosampller: - Multi Purpose Sampler MPS2, Gerstel (Mühlheim a.d.Ruhr, Germany)
- GC/MS-Trennsäulen: - PTA-5-Säule (Supelco) (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm)
für Voruntersuchung:
- HP5-MS-Säule (Agilent) (30m x 0,25mm x 0,25 µm) bei saurer und neutraler Aufarbeitung
- DB-17-MS-Säule (Agilent) (30m x 0,25mm x 0,25 µm) und
- HP-Basic Wax (Agilent) (30m x 0,25mm x 0,25 µm) bei basischer Aufarbeitung
- Software: Steuerung des Autosamplers:
- PAL Cycle Composer 1.5.2
Einstellung der Messparameter für GC/MS:
- Enhanced Chemstation G1701DA, Version D.00.01.27, Agilent Technologies, 2002
- Spektrenbibliotheken: - Wiley (1995, 275821 Einträge)
- PMW_Tox3 (2000, 6360 Einträge)
- Masslib IRM (Bern)

3.1.2 Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)

- SPME-Faserhalter: - SPME Fiber Holder for Autosampler, Supelco
- SPME-Fasern: - CW-DVB-Copolymer, 65 µm, Supelco (Bellefonte, USA)
Für Voruntersuchung:
- PDMS 100 µm
- Polyacrylat 85 µm
- PDMS-DVB-Copolymer 65 µm, Supelco (Bellefonte, USA)

3.1.3 Ammoniumselektive Elektrode

- Elektrode: - Ammoniak-Elektrode Modell 95-12, Orion
- Ionometer: - per pHecT Model 370, Orion

3.1.4 Weitere Laborgeräte und Materialien

pH-Messgerät:	- per pHecT Model 370, Orion - Elektrode: Sure Flow Silver Chloride 91-72 BN, Orion
Ultraschallbad:	- Sonorex Super RK 255 H, Bandelin electronic (Berlin, Germany)
Thermoschüttler:	- Thermomixer Comfort 5535R, Eppendorf (Hamburg, Germany)
Zentrifuge:	- Labofuge 400, Heraeus Instruments (Osterode, Germany)
Trockenschrank:	- UE 300 Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Germany)
Spritzenfilter:	- CME 0,22 µm Rotilabo Spritzenfilter, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany)
Einmalspritzen:	- Injekt 2 ml B.Braun AG (Melsungen, Germany)

3.2 Chemikalien und Referenzsubstanzen

3.2.1 Chemikalien zur Probenvorbereitung für HS-SPME-Untersuchungen

Zur Vorbereitung der Tabak- bzw. Zigarettenproben wurden folgende Chemikalien (p.A-Qualität) eingesetzt:

NaOH-Lösung:	1 M
H ₃ PO ₄ -Lösung:	1 M
HCl-Lösung:	1 M
Phosphat-Puffer pH 2,3:	0,1 M: 6,66 g KH ₂ PO ₄ auf 1 l bidestilliertes Wasser, pH 2,3 eingestellt mit 1 M H ₃ PO ₄
Acetat-Puffer pH 4,0 :	0,1 M: 5,7 ml Eisessig auf 1 l bidestilliertes Wasser, pH 4,0 eingestellt mit 1 M KOH
NaCl:	Riedel-de-Haen AG
Na ₂ SO ₄ :	Riedel-de-Haen AG

Als Lösungsmittel für den internen Standard (ISTD) und die Referenzsubstanzen diente Methanol (p.A-Qualität, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt).

3.2.1.1 Referenzsubstanzen und Interne Standards

Zur Bestätigungsanalyse wurden folgende Verbindungen in den in Klammern angegebenen Reinheitsgraden verwendet.

Bestand des Instituts für Rechtsmedizin

Acetaldehyd, Benzaldehyd, Benzylalkohol (99%), Ethylpalmitat (99%), Ethylstearat (99%), Menthol (puriss.), Vanillin (97%)

Aroma Chemicals Holzminden

γ -Nonalacton (Kokosaldehyd, 4-Nonanolid)

ICN Biochemicals

trans-Anethol, Phenylacetaldehyd

Fluka

4-Hydroxybenzoesäurepropylester (>99%), Methylpalmitat (>99,5%), Thymol (>99%)

Merck

2-Aminobenzonitril (>98%), p-Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd), Anisol (Methoxybenzol, >99%), Anisylethanol (4-Methoxyphenethylalkohol, >97%), Benzimidazol (>99%), 2,2-Bipyridin (>99,5%), γ -Butyrolacton (>99%), Carvacrol (Isothymol, 5-Isopropyl-2-methylphenol, z. Synthese), Cinnamaldehyd (Zimtaldehyd, z. Synthese), Cinnamylalkohol (Zimtalkohol, >98%), Cyclododecan (>99%), Dibutylamin (>99%), Ethylheptadecanoat (Ethylönanthat, Oenanthsäureethylester, >98%), 2-Ethyl-1-hexanol (>99%), Furfurylamin (>98%), 2-Heptanon (>98%), Indazol (99%), Indol (>99%), Lävulinsäure (>98%), Maltol (3-Hydroxy-2-methyl-4-pyranon, z. Synthese), Methylbenzoat (>98%), N-Methylbutylamin (>98%), Methylcinnamat (>99%), 5-Methylfurfural (5-Methyl-2-furaldehyd, >98%), 6-Methyl-5-hepten-2-on (>98%), Methylmyristat (99%), Methyloleat (>96%), Methylphenylacetat (>99%), 3-Methylpyridin (>98%), 3-Octanon (>96%), 2-Phenylethylamin (z. Synthese), Piperidin (98%), n-Propylhydroxybenzoat (Propyl-4-hydroxybenzoat, >99%), Pyrrol (>97%), Pyrrolidin (99%), 4-(1-Pyrrolidiny)pyridin (>98%), Triacetin (Glyceroltriacetat, >99%), Vanillinmethylether (3,4-Dimethoxybenzaldehyd, Veratrindehyd)

Sigma-Aldrich

Acetophenon (99%), Acetophenon-d3 (98%), 4-Acetylanillin (4-Aminoacetophenon, >99,5%), 3-Acetylpyridin (99%), Anabasin (>99,5%), Benzylalkohol-d5 (98%), Benzylbenzoat (>99%), β -Butyrolacton (99%), Carbitol (Diethylenglykolmonoethylether, >98%), cis-Carveol (>95%), 2,6-Dichlortoluol (>99%), Diethylenglykoldiethylether (>99%), Dipropylenglycol (>99%), Ethylmyristat, Ethylpentadecanoat, Ethylphenylacetat (Phenylelessigsäureethylester, >99%), Ethylvanillin (3-Ethoxy-4-hydroxybenzaldehyd, >98%), N-Formylpyrrolidin (97%), Geranylacetone (96%), Heliotropin (Piperonal, 3,4-Methylendioxybenzaldehyd, >99%), Indolin (2,3-Dihydroindol, 99%), Isobutyl-p-hydroxybenzoat (4-Hydroxybenzoesäure-butylester, >99%), Isophoron (97%), (-)-Isopulegol (p-Menth-8-en-3-ol, >99,5%), (\pm)-Linalool (>95%), Lavandulylacetat (Lavandulolacetat, 98,5%), Linalooloxid (97%), Methylacetat (>99,5%), 3-Methylbutylamin (99%), N-Methylpyrrol (99%), 2-Methylpyrrolidin (96%), N-Methylpyrrolidin (97%), Methylsalicylat (Wintergrünöl, >99%), Methylstearat (>99,5%), (+)-Neomenthol (>98,5%), Nikotin, Persicol (γ -Undecanolid, γ -Heptyl- γ -butyrolacton, >97%), 2-Phenylphenol (2-Hydroxybiphenyl, 99,7%), 3-Phenylpropanol (Hydrozimtalkohol, >98,5%), Propylenglycol (>99,5%), Pyridin (>98%), Pyridin-d5 (99,96%), Tetrahydropyridin (97%), Tripropylenglycol (>95%)

3.2.2 Chemikalien zur Probenvorbereitung für Alkaloidbestimmung

Zur Vorbereitung der Tabak- bzw. Zigarettenproben wurden folgende Chemikalien eingesetzt:

NaOH-Lösung:	1 M
tert.-Butylmethylether:	99% (GC), Sigma-Aldrich (Seelze, Germany)

3.2.2.1 Referenzsubstanzen und Interne Standards

Anabasin	Sigma-Aldrich (Germany)
Anatabin, Myosmin sowie Nicotyrin:	Toronto Research Chemicals (Canada)
Nornikotin:	ICN Pharmaceuticals (Germany)
Nikotinditartrat:	Research Biochemicals International (Natick, USA)
Nikotin-d ₄ , Cotinin-d ₃ , 0,1 mg/ml in Methanol:	Promochem (Wesel, Deutschland)

3.2.3 Chemikalien zur Probenvorbereitung für Ammoniak- und Harnstoffbestimmung

Zur Vorbereitung der Tabak- bzw. Zigarettenproben wurden folgende Chemikalien eingesetzt:

NaOH-Lösungen:	10 M, 1 M
Aqua dest. :	Bidestilliertes Wasser
Urease aus Schwertbohnen:	104 U/mg Sigma Aldrich (Steinheim, Germany) Lagerung: - 18 °C
Ureaselösung:	10 mg/ml in Boratpuffer pH 8,0, täglich frisch angesetzt

3.2.3.1 Referenzsubstanzen und Interne Standards

Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP):	p.a. 99,8 % Merck (Darmstadt)
Diammoniumhydrogenphosphatlösung:	0,1 M
Ammoniumchlorid:	p.a. 99,8 % Merck (Darmstadt)
Ammoniumchloridlösung:	0,1 M
Harnstoff:	p.a. 99,5 % Merck (Darmstadt)
Harnstofflösungen:	0,2g/100ml, 0,5g/100ml, 0,02g/100ml, 0,05g/100ml

3.2.4 Chemikalien zur Probenvorbereitung für die pH-Messungen

Aqua dest.

Bidestilliertes Wasser

3.2.4.1 Referenzsubstanzen und Interne Standards

Kalibrierlösung pH 4,0:

neoLab-Pufferlösung pH 4,00 farbcodiert Rot
neoLab GmbH (Heidelberg, Germany)

Kalibrierlösung pH 7,0:

neoLab-Pufferlösung pH 7,00 farbcodiert Grün
neoLab GmbH (Heidelberg, Germany)

3.3 Tabak- und Zigarettenproben

Die untersuchten Tabak- und Zigarettenproben wurden von den unten genannten Quellen im freien Handel erworben. Dabei wurde versucht eine repräsentative Auswahl von leichten, und stärkeren Marken sowie aromatischen und „natürlichen Zigaretten“ zu treffen, die häufig geraucht werden. Bezug genommen wurde dabei auf eine Liste mit den ausgelieferten Zigarettenmarken (Stückzahlen) der Schweiz von 2002.

Alle Zigarettenproben wurden bei -15 °C, die Rohtabake bei Raumtemperatur in geschlossenen Glasgefäßen gelagert. Eine detaillierte Auflistung der verschiedenen Zigarettenarten erfolgt in der Auswertung, im Abschnitt 4.2.

Tabelle 1a. Herkunft der Tabak- und Zigarettenproben für HS-SPME-Untersuchungen

Herkunftsland	Kaufdatum	Quelle
Zigaretten aus Deutschland	09/2003	Tabakladen in Berlin
Zigaretten aus der Schweiz	10/2003	Tabakladen in Bern
Zigaretten aus China	01/2004	Tabakladen in Peking
Zigaretten aus Belgien	01/2004	Tabakladen in Brüssel
Zigaretten aus den USA	05/2004	Tabakladen in Chicago
	09/2004	Tabakladen in Washington
Zigaretten aus Tschechien	02/2004	Tabakladen in Rokytnice
Zigaretten aus Polen	05/2004	Tabakladen in Warschau
Zigaretten aus Irland	06/2004	Tabakladen in Dublin
Referenzzigaretten (Kentucky Reference 2R4F, Hersteller: Tobacco and Health Institute, University of Kentucky, Lexington, USA)	11/2003	zur Verfügung gestellt von: Fr. Prof. Aufderheide, Fraunhofer Inst. f. Toxikologie u. Experimentelle Medizin, Hannover
Rohtabakproben (Orient Griechenland, Burley Malawi, Virginia Zimbabwe, Virginia Deutschland)	03/2003	PLANTA Tabakfabrik Berlin
Lakritze	10/2003	Apotheke in Bern
Kakao (handelsüblich)	02/2004	Extra-Supermarkt Berlin

Tabelle 1b. Herkunft der Tabak- und Zigarettenproben für die Alkaloidbestimmung

Herkunftsland	Kaufdatum	Quelle
Zigaretten aus Deutschland	09/2003	Tabakladen in Berlin
Zigaretten aus der Schweiz	10/2003	Tabakladen in Bern
Referenzzigaretten (Kentucky Reference 2R4F, Hersteller: Tobacco and Health Institute, University of Kentucky, Lexington, USA)	11/2003	zur Verfügung gestellt von: Fr. Prof. Aufderheide, Fraunhofer Inst. f. Toxikologie u. Experimentelle Medizin, Hannover
Rohtabakproben (Orient Griechenland, Burley Malawi, Virginia Zimbabwe, Virginia Deutschland)	03/2003	PLANTA Tabakfabrik Berlin
Jungpflanzen (Virginia Deutschland, Deutersheimer Corso Deutschland)	04/2003	Schwanteland Jungpflanzen GmbH Vehlefan
Im Topf gezogene Virginiapflanzen	Ernte 08/2003	Selbst gezogen im Topf
Deutersheimer Corso Freilandzucht	Ernte 08/2003	Selbst gezogen im Garten

Für die Ammoniak- und Harnstoffbestimmung wurden die Tabak- und Zigarettenproben untersucht, die in Tabelle 1a – 1b bereits aufgeführt sind.

Tabelle 1c. Herkunft der Tabak- und Zigarettenproben für die pH-Messungen

Herkunftsland	Kaufdatum	Quelle
Zigaretten aus Deutschland	09/2003 und 03/2004	Tabakladen in Berlin
Zigaretten aus der Schweiz Referenzzigaretten (Kentucky Reference 2R4F, Hersteller: Tobacco and Health Institute, University of Kentucky, Lexington, USA)	10/2003 11/2003	Tabakladen in Bern zur Verfügung gestellt von: Fr. Prof. Aufderheide, Fraunhofer Inst. f. Toxikologie u. Experimentelle Medizin, Hannover

3.4 Probenvorbereitung

3.4.1 Qualitative und quantitative HS-SPME-Untersuchungen

3.4.1.1 Tabak- und Zigarettenproben

Die Tabak- und Zigarettenproben wurden für die Extraktion nach Optimierung der Methode wie folgt vorbereitet:

- Einwaage von 50 mg der Zigarette inkl. Papier bzw. des Rohtabaks in ein 10 ml Headspace-Gefäß
- Zugabe von 20 µl 2,6-Dichlortoluol-Lösung (ISTD, 0,1 mg/ml in MeOH) sowie
 - a) für die basische Extraktion: 500 mg Na₂SO₄, 1 ml NaOH (1M)**
(500 mg NaCl, 1 ml NaOH (1M) bei Voruntersuchung)
 - b) für die neutrale Extraktion: 500 mg NaCl, 1 ml destilliertes Wasser**
(1 g NaCl, 2 ml destilliertes Wasser bei Voruntersuchung)
 - c) für die saure Extraktion: 500 mg Na₂SO₄, 1 ml H₃PO₄ (1M)**
(1 g, Na₂SO₄, 2 ml Phosphatpuffer pH 2,3 bei Voruntersuchung)
- Zukrimpen des Headspace-Gefäßes mit einer magnetischen Septum-Verschlusskappe

Die Aufarbeitung der Kakao- bzw. der Lakritzprobe erfolgte analog mit ca. 10 mg Kakaopulver bzw. 100 µl einer selbst hergestellten Lakritzlösung in destilliertem Wasser der Konzentration 1 mg/ml.

Die Rohtabakmischungen wurden in den folgenden Massenverhältnissen hergestellt und untersucht:

- Rohtabakmischung 1: 33% Virginia, 33% Oriental, 33% Burley
- Rohtabakmischung 2: 45% Virginia, 35% Burley, 20% Oriental
- Rohtabakmischung 3: 45% Virginia, 55% Burley, 5% Oriental

Die Rohtabaksorte Virginia wurde zuvor im Verhältnis 1:1 aus Rohtabaken aus Zimbabwe und Deutschland gemischt.

3.4.1.2 Lösungen der Referenzsubstanzen

Von den Referenzverbindungen wurden Lösungen der Konzentration 1 mg/ml in Methanol hergestellt. Von diesen Stammlösungen wurden durch Zusammengeben von je 20 µl und Auffüllen mit Methanol auf 1 ml Arbeitslösungen mit mehreren Referenzverbindungen der Konzentration 20 µg/ml hergestellt. Diese Mischungen einzelner Substanzlösungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Tabak- bzw. Zigarettenproben gemessen. Dazu wurden 50 µl der jeweiligen Mischung (1 µg pro Substanz) in ein Headspace-Gefäß gegeben bzw. einer Zigarettenprobe zugesetzt.

3.4.1.3 Quantifizierung

Von den zu quantifizierenden Substanzen (siehe Tab. 2a und 2b) wurden Stammlösungen (1 mg/ml) in Methanol hergestellt. Durch Zusammengeben der sechs neutral extrahierbaren Substanzen bzw. der drei basisch extrahierbaren Substanzen und Auffüllen auf 500 µl mit Methanol wurden je fünf verschieden konzentrierte Gemische hergestellt (siehe Tab. 2a und 2b).

Tabelle 2a. Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden neutral extrahierbaren Substanzen

	Konzentrationen in ng/µl				
	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5
Benzaldehyd	20	50	70	100	200
2-Ethyl-1-hexanol	0,3	0,5	0,7	1	2
Menthol	0,3	0,5	0,7	1	2
Indol	1	2	5	7	10
Acetophenon	0,3	0,5	0,7	1	2
3-Phenylpropanol	0,3	0,5	0,7	1	2

Tabelle 2b. Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden basisch extrahierbaren Substanzen

	Konzentrationen in ng/µl				
	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5
Pyridin	5	10	15	20	40
Furfurylamin	2	3	5	7	10
Benzylalkohol	2	4	7	10	20

Die externe Kalibration für die neutral extrahierbaren Substanzen erfolgte, indem zu einer Tabakmatrix (Referenzzigarette, Zigarette „21(Ws)“, Zigarette „15(S)“) 50 µl einer Lösung von Acetophenon-d3 in Methanol (0,01 mg/ml) sowie je 50 µl einer der Substanzmischungen gegeben wurden. Die externe Kalibration für die basisch extrahierbaren Substanzen wurde vorgenommen, indem zu einer Tabakmatrix (Referenzzigarette, Zigarette „21(Ws)“, Zigarette „15(S)“) je 25 µl einer Lösung von Pyridin-d5 und Benzylalkohol-d5 in Methanol (0,01 mg/ml) sowie je 50 µl einer der Substanzmischungen gegeben wurden.

Die Kalibrierung wurde fünfmal durchgeführt. Für jede Substanz wurde eine Kalibrationsfunktion erstellt, indem die Flächenverhältnisse der Quantifier-Massen (siehe Abschnitt 3.7.1) von Analyt/Standard gegen die absolut zugesetzte Menge des Analyten [μg] aufgetragen wurden. Dabei wurde jeweils die Fläche des Analyten aus einer Messung der Tabakmatrix ohne Zusatz des Analyten abgezogen („Leerwert“). Die Geradengleichungen für die einzelnen Substanzen sind Tab. 3 zu entnehmen.

Zur Bestimmung der Menge des jeweiligen Analyten in einer Zigarettenprobe wurde die Fläche der Quantifiermasse integriert und in die Kalibrationsfunktion eingesetzt.

Tabelle 3. Kalibrationsfunktionen für die Quantifizierung

Substanz	Geradengleichung	R ²
Acetophenon	$y = 1.8427x - 0.0053$	0.9988 (5 Pkt.)
3-Phenylpropanol	$y = 3.1903x - 0.0244$	0.977 (5 Pkt.)
Menthol	$y = 1.4309x - 0.0005$	0.9945 (5 Pkt.)
2-Ethyl-1-hexanol	$y = 0.9379x - 0.0002$	0.998 (3 Pkt.)
Benzaldehyd	$y = 0.0392x - 0.0076$	0.9981 (5 Pkt.)
Indol	$y = 17.19x + 0.0291$	0.9771 (5 Pkt.)
Pyridin	$y = 3,0914x - 0,2052$	0,9834 (5 Pkt.)
Furfurylamin	$y = 0,5052x - 0,0642$	0,9572 (5 Pkt.)
Benzylalkohol	$y = 4,1159x$	0,9938 (5 Pkt.)

3.4.2 Alkaloidbestimmung

3.4.2.1 Tabak- und Zigarettenproben

Die Tabak- und Zigarettenproben wurden für die Extraktion wie folgt vorbereitet:

Nikotinbestimmung:

- Einwaage von ca. 50 mg Zigarette inkl. Papier, ohne Filter in 5 ml Braunglasröhrchen
- 5 h Extraktion auf dem Thermoschüttler (22°C) mit 2 ml tert.-Butylmethylether und 1 ml 1N NaOH
- Zentrifugieren, Abtrennen der organischen Phase
- Verdünnen des Extraktes 1:8 mit tert-Butylmethylether
- 40 μl abnehmen und mit 10 μl Nikotin-d₄ (0,1 mg/ml in MeOH) versetzen
- 1 μl in GC/MS injizieren

Nebenalkaloidbestimmung:

- 40 μl der oben gewonnenen organischen Phase abnehmen und mit 10 μl Cotinin-d₃ (0,1 mg/ml in MeOH) versetzen
- 1 μl in GC/MS injizieren

3.4.2.2 Quantifizierung

Für die Kalibrierung wurden von den zu bestimmenden Substanzen Lösungen in Methanol in folgenden Konzentrationen hergestellt:

Nikotin, Nornikotin, Nicotyrin: 1 mg/ml, Anabasin, Anatabin: 0,1 mg/ml, Myosmin: 0,01 mg/ml. Daraus wurde folgende Stammlösung für die Kalibrierung der Nebenalkaloide hergestellt:

10 µl Nornikotin, 50 µl Nicotyrin, 10 µl Anabasin, 50 µl Anatabin, 20 µl Myosmin mit tert.-Butylmethylether auf 800 µl aufgefüllt. Für die Kalibrierung von Nikotin wurden 100 µl mit tert.-Butylmethylether auf 800 µl aufgefüllt. Anschließend wurden fünf verschiedenen konzentrierte Mischungen der Substanzen hergestellt, so dass die in Tab. 4 dargestellten Konzentrationen resultierten. Die Kalibrierung der Nebenalkaloide erfolgte getrennt von der Nikotinkalibrierung.

Von den Mischungen wurden je 40 µl in ein GC-Mikroviaial überführt und nach Zugabe von 10 µl Cotinin-d3 (0,1mg/ml) für die Kalibrierung der Nebenalkaloide bzw. 10 µl Nikotin-d4 für die Kalibrierung von Nikotin 1 µl ins GC/MS injiziert.

Jede Konzentration wurde fünfmal gemessen.

Tabelle 4. Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden Nebenalkaloide und Nikotin

Nebenalkaloide	Konzentrationen in ng/µl				
	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5
Nornikotin	10	30	50	70	100
Nicotyrin	5	15	25	35	50
Anabasin	1	3	5	7	10
Anatabin	5	15	25	35	50
Myosmin	0,2	0,6	1	1,4	2
Nikotin	10	30	50	70	100

Für jede Substanz wurde eine Kalibrationsfunktion erstellt, indem die Flächenverhältnisse der Quantifier-Massen (Tab. 8, Abschnitt 3.7.2) von Analyt/Standard gegen die absolut zugesetzte Menge des Analyten [ng] aufgetragen wurden. Zur Bestimmung der Menge des jeweiligen Analyten in einer Zigarettenprobe wurde die Fläche der Quantifiermasse integriert und in die Kalibrationsfunktion eingesetzt. Diese Geradengleichungen für die einzelnen Substanzen sind Tab. 5 zu entnehmen.

Tabelle 5. Die Kalibrationsfunktionen für die Quantifizierung der Alkaloide

Substanz	Geradengleichung	R ²
Nikotin	$Y = 0,0518x$	0,9938
Nornikotin	$Y = 0,0145x - 0,0439$	0,9971
Nicotyrin	$Y = 0,0072x - 0,0025$	0,9973
Anabasin	$Y = 0,0175x - 0,0067$	0,9975
Myosmin	$Y = 0,1311x + 0,0059$	0,9958
Anatabin	$Y = 0,0235x - 0,0245$	0,9976
2,3-Bipyridin	$Y = 0,0026x + 0,0049$	0,9948

3.4.3 Ammoniak- und Harnstoffbestimmung

3.4.3.1 Tabak- und Zigarettenproben

Die Tabak- und Zigarettenproben wurden für die Extraktion wie folgt vorbereitet:

Ammoniakbestimmung:

- Einwaage von 300 mg einer Zigarette ohne Filter, mit Papier in 10 ml Becherglas
- Grob zerkleinern
- 5 ml Aqua dest. zugeben
- 5 min stehen lassen, gelegentlich schwenken
- Filtration des Extraktes über Spritzenfilter mit Porengröße 0,22 µm
- Entnahme von 1,5 ml Extrakt
- 20 µl 10 N NaOH zugeben und sofort messen

Harnstoffbestimmung:

- weitere 1,5 ml des oben gewonnenen wässrigen Extraktes wurden mit 10 µl 1 N NaOH auf pH 7,5-8,0 eingestellt
- 20 µl Ureaselösung zugeben und kurz schütteln
- Ansatz 20 min bei RT stehen lassen
- 20 µl 10 N NaOH zugeben und sofort messen

3.4.3.2 Quantifizierung

Die Kalibration erfolgte mit wässrigen Lösungen von Ammoniumchlorid bzw. Harnstoff, die in gleicher Weise wie die Zigarettenextrakte gemessen wurden. Die Kalibration wurde täglich wiederholt.

Für die Kalibrierungen wurden wässrige Stammlösungen von 0,1 M NH₄Cl und 0,2 g/100ml, 0,5g/100ml, 0,02g/100ml, 0,05g/100ml, 0,002g/100ml und 0,005g/100ml Harnstoff hergestellt. Daraus wurden die Kalibrationslösungen mit den in Tab. 6 dargestellten Konzentrationen in 5 ml Aqua dest. hergestellt.

Tabelle 6. Kalibrationsstandards für die Ammoniak- und Harnstoffbestimmung

Konzentration Ammoniak [mol/l]	ppm Ammoniak	Konzentration Harnstoff [mmol/l]	ppm Harnstoff
0,0005	8,5	0,006	0,4
0,001	17	0,0166	1
0,002	34	0,06	4
0,005	85	0,166	10
0,0064	108,8	0,333	20
0,008	136	0,6	40
0,01	170	0,83	50
0,012	204	1,66	100
0,02	340		

3.4.4 pH-Messungen

3.4.4.1 Tabak- und Zigarettenproben

Die Tabak- und Zigarettenproben wurden für die Extraktion wie folgt vorbereitet:

- Einwaage einer Zigarette ohne Filter, mit Papier in 250 ml Bechergläser
- Grob zerkleinern
- 20 ml Aqua dest. zugeben
- pH-Wert messen nach:
 - 5 min
 - weiteren 5 min Ultraschallbad-Behandlung
 - weiteren 1 h stehen lassen
 - weiteren 3 h stehen lassen

Die Elektrode wurde vor jeder Messserie mit den Kalibrierlösungen pH 4,0 und pH 7,0 neu kalibriert.

3.5 HS-SPME-Bedingungen

Die reproduzierbare Durchführung der HS-SPME ermöglichte der computergesteuerte Autosampler MPS2, mit dem während der Extraktion und Desorption eine konstante Position der SPME-Faser gewährleistet war. Die Konditionierung der Fasern erfolgte gemäß der Empfehlung des Herstellers. Nach der Optimierung wurde die HS-SPME mit folgenden Parametern ausgeführt:

Faser:	65 µm CW-DVB für Voruntersuchung: <ul style="list-style-type: none">- PDMS 100 µm- Polyacrylat 85 µm- PDMS-DVB-Copolymer 65 µm, Supelco Bellefonte, USA)
Faserkonditionierung:	30 min bei 220 °C im GC-Injektor
Temperieren/Inkubation der Probe:	3 min bei 95 °C einzeln im Heizblock
Extraktion der Probe:	15 min bei 95 °C aus dem Headspace Voruntersuchung: 15 min bei 40 °C aus dem Headspace 15 min bei 90 °C aus dem Headspace
Schütteln der Probe:	250 rpm in Intervallen von 5 sec Schütteln/2 sec Ruhe
Desorption:	5 min bei 250 °C im GC-Injektor Voruntersuchung: 5 min bei 260 °C im GC-Injektor

Vor, während oder nach einer Messserie wurde die Faser bei Raumtemperatur für 10 sec in ein leeres HS-Vial gehalten und 10 min bei 250 °C im GC-Injektor ausgeheizt („Leermessung“).

3.6 Gaschromatographische Parameter

3.6.1 HS-SPME-Untersuchungen

Die Trennung der aus dem Headspace extrahierten Verbindungen wurde unter folgenden GC-Bedingungen durchgeführt:

Injektion:	splitless, bei 250 °C Inlet-Liner: 0,75 mm ID
Trärgas:	Helium, Flussrate: 1,0 ml/min
Temperaturprogramm:	70 °C (2 min), mit 20 °C/min auf 280 °C (3 min) Voruntersuchung: <ul style="list-style-type: none">- Niedriges Temperaturprogramm: 45 °C (2min), mit 20 °C/min auf 240 °C (3 min)- Hohes Temperaturprogramm: 70 °C (2 min), mit 20 °C/min auf 300 °C (2 min) für HP-5-MS-Säule 70 °C (2 min), mit 20 °C/min auf 260 °C (4 min) für HP-Basic Wax-Säule
Temperatur der GC/MS-Transfer-Line:	280 °C

3.6.2 Alkaloid-Bestimmung

Injektion:	splitless, bei 200 °C Inlet-Liner: 0,75 mm ID
Trärgas:	Helium, Flussrate: 1,0 ml/min
Temperaturprogramm:	70 °C (2 min), mit 20 °C/min auf 280 °C (4 min)
Temperatur der GC/MS-Transfer-Line:	280 °C

3.7 Massenspektrometrische Parameter

3.7.1 HS-SPME-Untersuchungen

Die massenspektrometrische Detektion der Analyte erfolgte im Scan-Modus im Messbereich von $m/z=45$ bis $m/z=400$. Bei den Voruntersuchungen erfolgte die Detektion im Messbereich von $m/z=30$ bis $m/z=300$ im niedrigen Temperaturprogramm bzw. von $m/z=50$ bis $m/z=550$ im hohen Temperaturprogramm. Die Quadrupol-Temperatur betrug 150 °C.

Die Ionisierung der Probe erfolgte durch Elektronen-Stoß-Ionisation (EI = Electron Impact) bei 70 eV und einer Ionenquellen-Temperatur von 230 °C.

Das Massenspektrometer wurde nach jeder Wartungsmaßnahme (z.B. Säulen Kürzung, Reinigung der Ionenquelle) oder wöchentlich mit Autotune der ChemStation-Software kalibriert.

Für die Quantifizierung einiger Substanzen wurde eine SIM-Methode mit folgenden Massenspuren, Retentionszeiten und Zeitfenstern programmiert (Tab. 7). Das jeweils zur Quantifizierung benutzte Ion ist fett gedruckt.

Tabelle 7. SIM-Parameter für die Quantifizierung der Substanzen bei der HS-SPME-Untersuchung

Substanz	Detektierte Massenspuren	Retentionszeit [min]	Zeitfenster [min]
Benzaldehyd	106 105 77	5,50	5,30-5,80
2-Ethyl-1-hexanol	83 98 70	6,07	5,80-6,30
Acetophenon	120 105 106	6,53	6,30-6,60
Acetophenon-d3	123 105 77	6,50	6,30-6,60
Menthol	123 138 95	7,46	6,60-7,70
3-Phenylpropanol	117 118 136	7,89	7,70-8,20
Indol	117 90 89	8,42	8,20-9,00
Pyridin	79 52 50	3,13	2,80-3,30
Pyridin-d5	84 57 55	3,12	2,80-3,30
Furfurylamin	97 96 69	4,10	3,80-4,30
Benzylalkohol	108 107 91	6,11	5,80-6,30
Benzylalkohol-d5	113 112 96	6,09	5,80-6,30

3.7.2 Alkaloidbestimmung

Für die Detektion im „selected ion modus“ (SIM) wurden die in Tabelle 8 angegebenen Massen verwendet. Das jeweils zur Quantifizierung benutzte Ion ist fett gedruckt.

Tabelle 8. SIM-Parameter für die Quantifizierung der Alkaloide

Substanz	Detektierte Massenspuren	Retentionszeit [min]	Zeitfenster [min]
Nikotin	162 133 161	9,17	8,90-9,50
Nikotin-d4	166 137 165	9,15	8,90-9,50
Nornikotin	148 119 147	9,66	9,50-9,85
Myosmin	146 118 145	9,71	9,50-9,85
Nicotyrin	158 130 157	10,06	9,85-10,25
Anabasin	162 106 119	10,16	9,85-10,25
Anatabin	160 106 159	10,34	10,25-11,35
2,3-Bipyridin	155 130 156	10,46	10,25-11,35
Cotinin-d3	179 101 122	11,50	11,35-15,00

3.8 Qualitative Auswertung der HS-SPME/GC-MS-Messungen

Zur Identifizierung der Analyten wurden die Retentionszeiten und Massenspektren herangezogen. Die Massenspektren konnten durch Vergleich mit denen in kommerziellen Spektrenbibliotheken (siehe Abschnitt 3.1.1) unter Angabe der Match-Qualität (Übereinstimmung) bestimmten Substanzen zugeordnet werden. Die Identität der Verbindungen wurde anhand der Übereinstimmung mit der Retentionszeit und dem Massenspektrum der jeweiligen Referenzsubstanz, die mit der gleichen Methode durch Zugabe zur Zigarettenmatrix ermittelt wurden, bestätigt.

Zur weiteren Bestätigung der gefundenen Substanzen und für die Identifizierung unaufgeklärter Peaks mit einem umfassenden MS-Datensystem wurden die Chromatographiefiles an Dr. Bernhard und Dr. Aebi (Institut für Rechtsmedizin in Bern) übergeben.

Zur Prüfung, ob es sich um Zusatzstoffe handelt, wurden drei unterschiedliche Rohtabakmischungen und eine Referenzzigarette in die Messserien der Zigarettenarten mit einbezogen, d. h. unter identischen Bedingungen analysiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse der Voruntersuchungen

Im Jahr 2001 wurden Vorversuche an 12 Schweizer Zigarettenarten durchgeführt, deren Ergebnisse den Ausgangspunkt für das Projekt darstellen. Hierbei wurde in den erhaltenen GC-MS-Kurven eine größere Zahl an Substanzen durch Übereinstimmung der Massenspektren mit denen in kommerziellen Spektrenbibliotheken nachgewiesen. Da die Massenspektren aber zu gewissem Grade von den Untersuchungsbedingungen abhängen und die Bibliotheksspektren nie exakt reproduziert werden, ergab sich als erste Aufgabe des Projektes die Notwendigkeit, diese Ergebnisse durch erweiterte Untersuchungen zu bestätigen. Dieses erfolgte, indem die authentischen Verbindungen beschafft und unter exakt den gleichen Bedingungen gemessen wurden. Neben einer höheren Übereinstimmung der Massenspektren kann hier als zusätzliches Kriterium auch die genaue Übereinstimmung der Retentionszeit für die Identifizierung herangezogen werden. Da aliphatische und cycloaliphatische Amine durch die Möglichkeit der Bildung von kanzerogenen Nitrosaminen von besonderem Interesse sind, wurden diese Verbindungen zunächst besonders berücksichtigt.

Die 12 Schweizer Zigarettenarten (siehe Tabelle 9) wurden im Sommer 2001 unter drei unterschiedlichen pH-Bedingungen mittels HS-SPME-GC-MS in Berlin analysiert und die erhaltenen Chromatogramme in Bern (Dr. Bernhard, Dr. Aebi) ausgewertet. Die qualitativ festgestellten Verbindungen sind zum Vergleich in Tabelle 9 nochmals aufgeführt. Die für die Bestätigungsanalysen ausgewählten Substanzen sind mit „X“ gekennzeichnet.

Um Vergleichbarkeit mit den Voruntersuchungen zu ermöglichen wurden die dort gewählten Bedingungen (siehe Abschnitte 3.4.1.1, 3.5, 3.6.1) genau reproduziert. Da im wesentlichen basische Substanzen und Neutralstoffe untersucht wurden, wurden die Bestätigungsanalysen der SPME-Methode auf die basische Extraktion bei zwei verschiedenen Temperaturen beschränkt.

Alle in Tabelle 9 angegebenen Substanzen wurden bei einer Menge von 1 µg bzw. 100 ng zunächst einzeln unter den genannten Bedingungen sowohl bei niedriger als auch bei erhöhter Temperatur extrahiert und gemessen. Die Retentionszeiten sind in Tabelle 10 gemeinsam mit den bei den Zigaretten gemessenen Werten aufgeführt. Einige der Verbindungen konnten nur bei der höheren Temperatur erfasst werden. Weiterhin wurden Mischungen aus den einzelnen Substanzen hergestellt und gemessen. Erhaltene Beispiel-Chromatogramme sind in Abb. 2a-3 dargestellt. Eine gegenseitige Beeinflussung der Analyten liegt nicht vor.

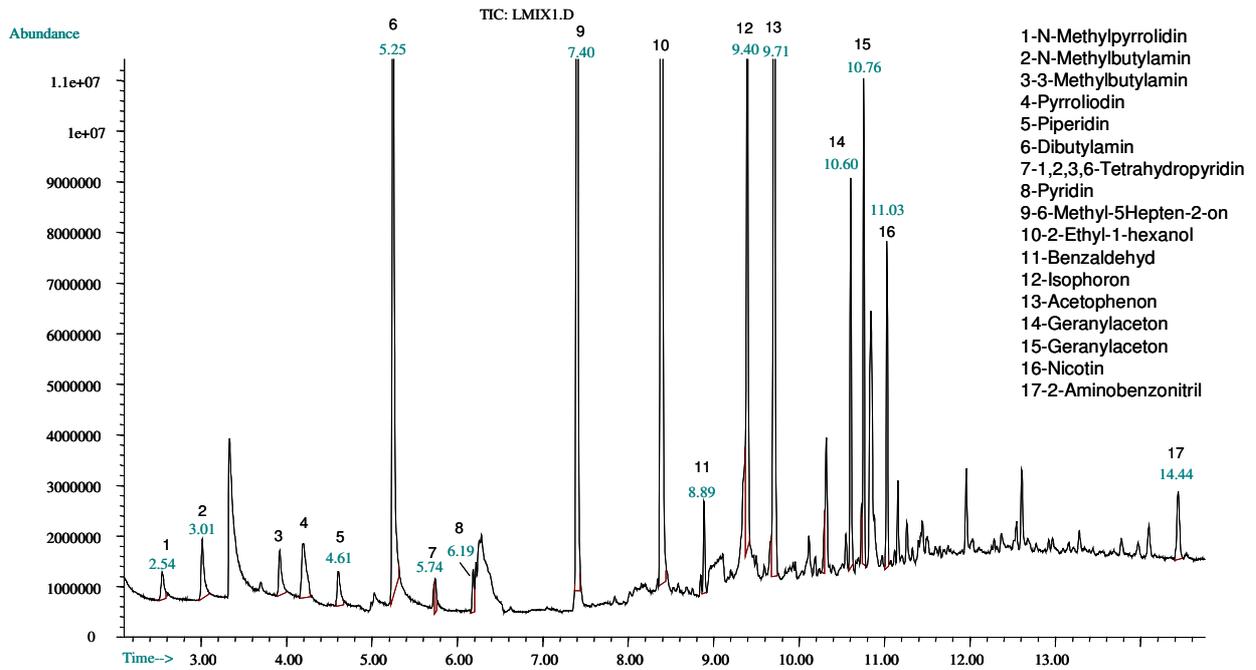


Abb. 2a: HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Mischung von 17 Reinsubstanzen (Mischung 1, Substanzmenge 1 µg) erhalten durch Extraktion bei niedriger Temperatur

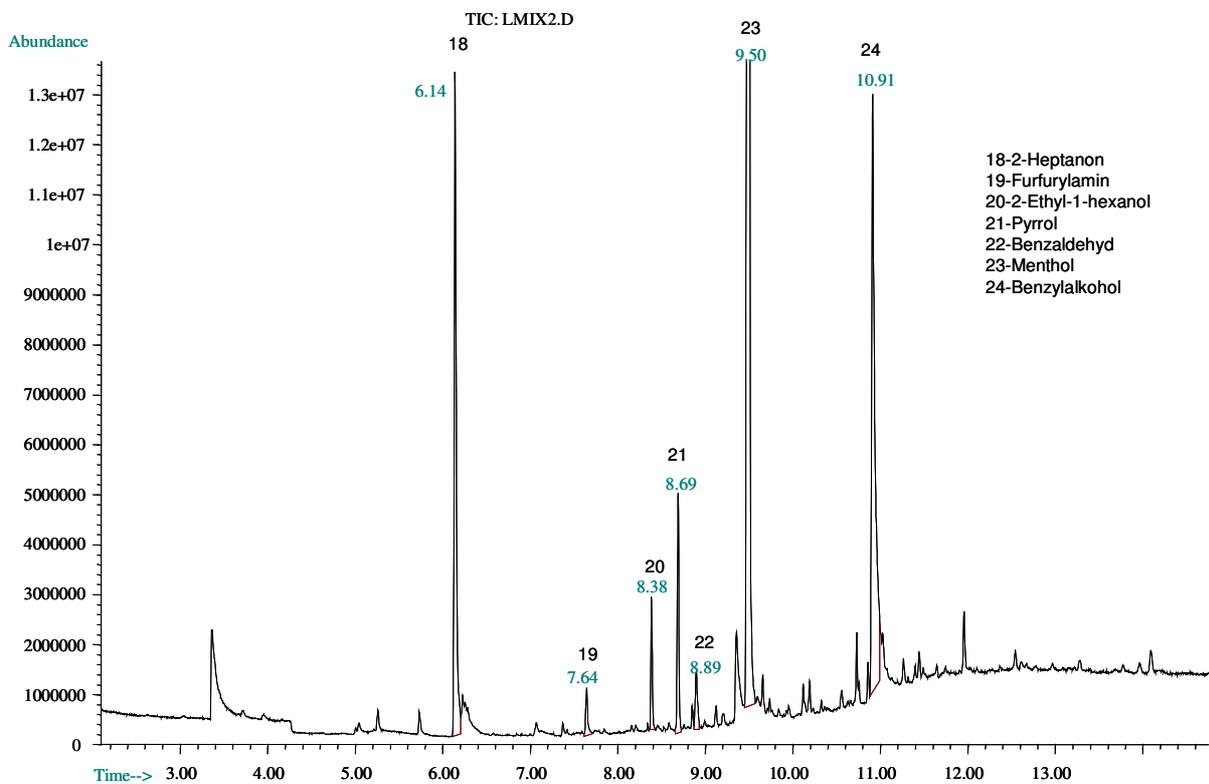


Abb. 2b: HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Mischung von 7 Reinsubstanzen (Mischung 2, Substanzmenge 1 µg) erhalten durch Extraktion bei niedriger Temperatur

Die Chromatogramme enthalten noch einige Störsignale von der GC-Kapillare. Einige der Substanzen lieferten unter diesen Bedingungen relativ schwache Peaks und wurden daher bei zehnfacher Konzentration erneut gemessen, um ungestörte Peaks und Massenspektren zu erhalten.

Es ist ersichtlich, dass durch das gesamte Verfahren gleiche Konzentrationen der verschiedenen Substanzen sehr unterschiedliche Signalintensitäten liefern. Dieses kann dadurch erklärt werden, dass bei der Headspace-Festphasen-Mikroextraktion aus wässrigem Milieu vor allem lipophile Verbindungen sehr gut extrahiert werden, während gut wasserlösliche Substanzen wie Pyridin auch im basischen nur einen geringen Dampfdruck besitzen und deutlich schwächere Signale liefern. Hinzu kommt eine unterschiedliche Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Detektion.

Insgesamt wird aber für alle Substanzen schon im Scan-Modus eine ausreichende Empfindlichkeit erreicht.

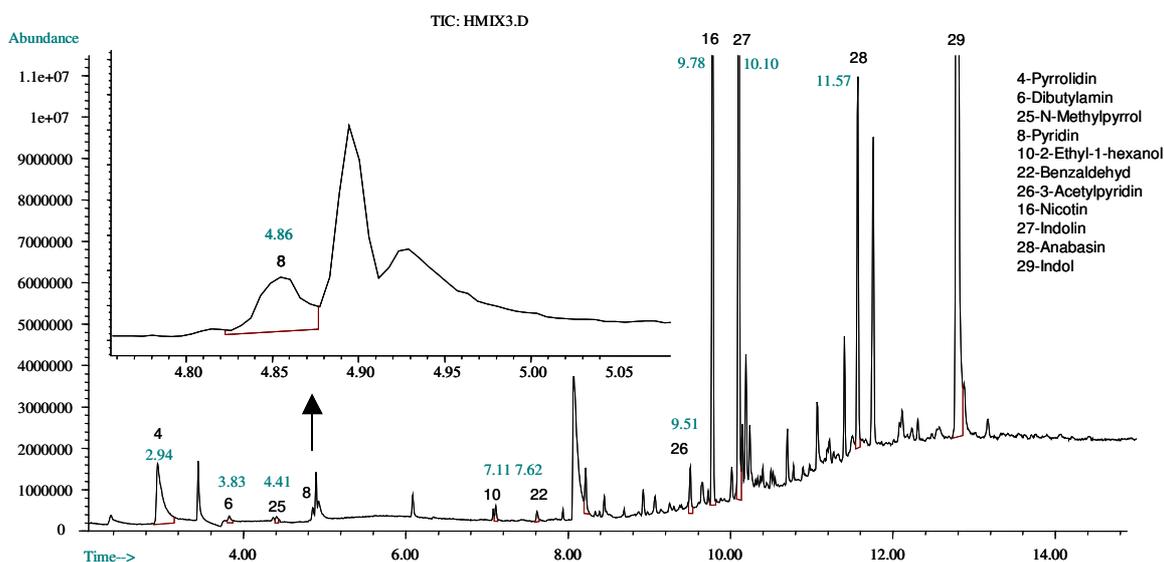


Abb. 3: HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Mischung von 11 Reinsubstanzen (Mischung 3, Substanzmenge 100 ng) erhalten durch Extraktion bei erhöhter Temperatur. Pyridin (Peak 8) wird nur relativ unempfindlich erfasst, ist aber von Matrixbestandteilen deutlich abgetrennt, wie aus der gezoomten Teildarstellung (Insert) ersichtlich ist.

Als typisches Beispiel sind in Abb. 4a und 4b die Chromatogramme von Sorte „10(S)“ bei niedriger Extraktionstemperatur für die Messung 2001 und die Nachmessung gegenübergestellt. Zur besseren Darstellung der Signale ist jeweils der vordere Bereich zusätzlich nochmals vergrößert eingefügt.

Qualitativ wurden alle in den Voruntersuchungen festgestellten Substanzen bestätigt. Analoges gilt für die Extraktion bei höherer Temperatur. Geringfügige Verschiebungen in den Retentionszeiten sind dadurch bedingt, dass die Kapillarsäule in der Zwischenzeit etwas gekürzt worden ist.

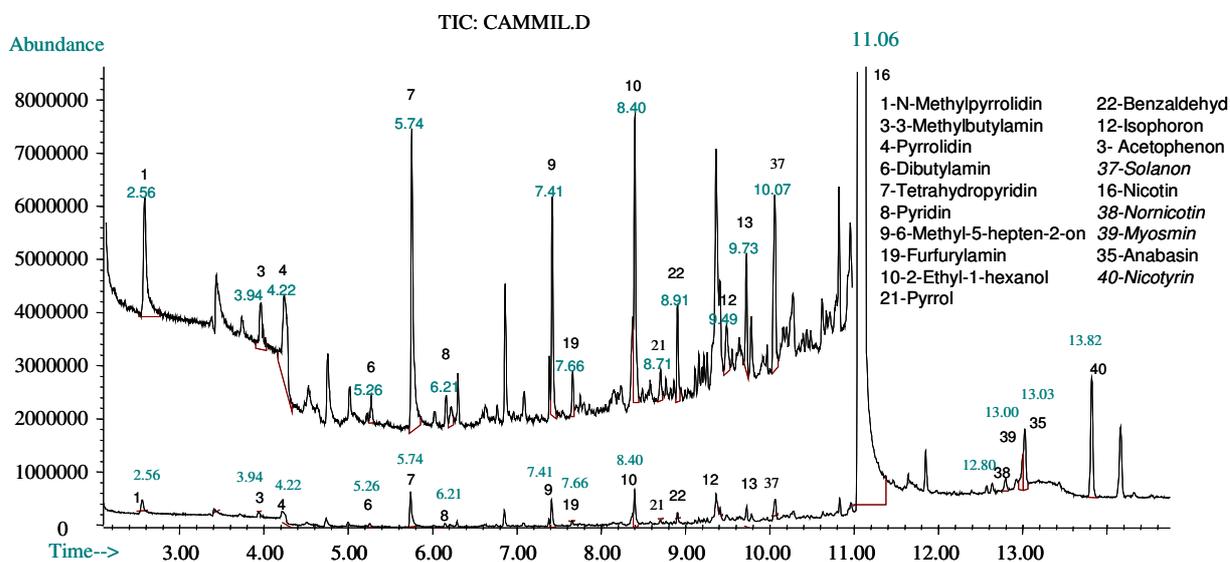


Abb. 4a: HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Zigarettensorte „10(S)“ in der Nachmessung (Dezember 2002)

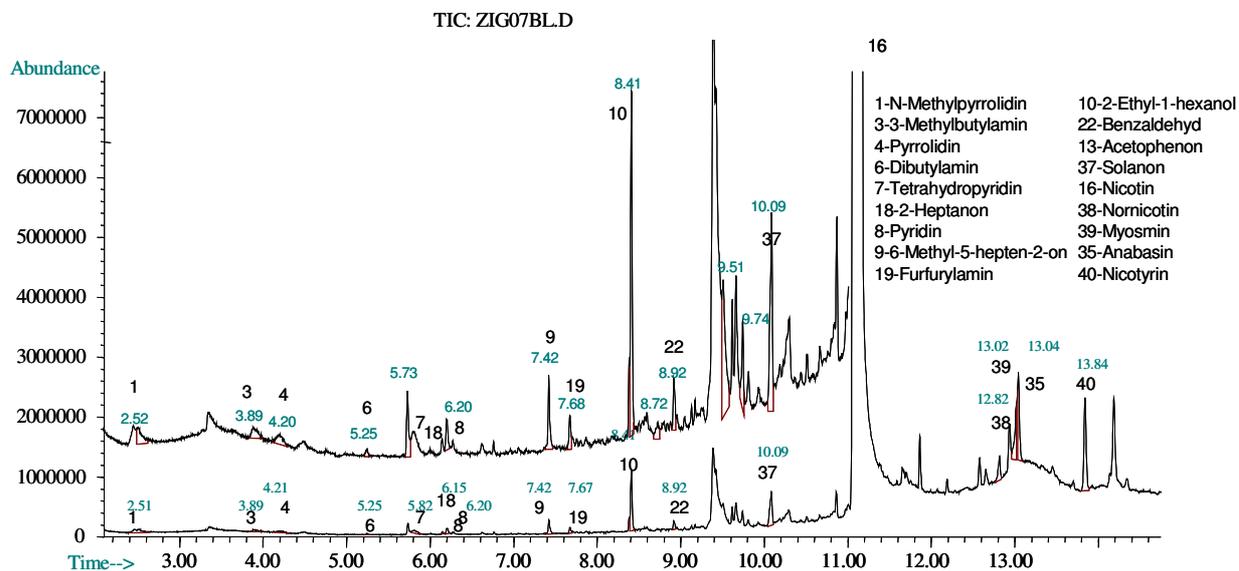


Abb. 4b: HS-SPME/GC-MS Chromatogramm der Zigarettensorte „10(S)“ bei den Voruntersuchungen (Sommer 2001).

Tabelle 10. Retentionszeiten der Reinsubstanzen und der entsprechenden Peaks in den Chromatogrammen der Zigaretten sowie Übereinstimmung („Match“) der Massenspektren in den Zigarettenarten mit denen der Reinsubstanzen in der selbsterstellten Spektrenbibliothek

Substanz	Retentionszeit der Reinsubstanzen (min)		Retentionszeit in den Zigaretten (min)		Match der Massenspektren bei Vergleich mit selbsterstellter Bibliothek*
	Hohe Temperatur	Niedrige Temperatur	Hohe Temperatur	Niedrige Temperatur	
2-Ethyl-1-hexanol	---	8,41	---	8,39-8,43	90
2-Heptanon	---	6,14	---	6,15	80
3-Acetylpyridin	9,51	---	9,50-9,55	---	97
3-Methylbutylamin	---	3,92	---	3,94-3,96	86
6-Methyl-5-hepten-2-on	---	7,40	---	7,41	95
Acetophenon	---	9,73	---	9,71-9,74	97
Benzaldehyd	---	8,89	---	8,89-8,91	96
Benzylalkohol	---	10,91	---	10,94	97
Dibutylamin	---	5,25	---	5,26	93
Furfurylamin	---	7,67	---	7,65	97
Indol	12,80	---	12,79	---	86
Isophoron	---	9,41	---	9,40	93
Menthol	---	9,50	---	9,48	97-99
N-Methylpyrrol	4,41	---	4,30-4,35	---	90
N-Methylpyrrolidin	---	2,56	---	2,54-2,56	91
Piperidin	---	4,61	---	4,61-4,65	80
Pyridin	4,86	6,21	4,86	6,20-6,21	91
Pyrrol	---	8,69	---	8,69	90
Pyrrolidin	---	4,20	---	4,20-4,22	90
Tetrahydropyridin	---	5,74	---	5,75	87
Anabasin	11,57	---	11,57	---	98
		10,61;	---	10,80	97
Geranylaceton**	---	10,76			
Nikotin	9,77	11,03	9,8	11,03	96

* Die Match-Werte wurden nach Untergrundkorrektur bestimmt. Es handelt sich um Mittelwerte der in allen Zigarettenarten mit positiven Befunden etwa gleich hohen Übereinstimmung, wobei Abweichungen bis 5 % auftraten.

** Isomerengemisch

Bei der Bestätigung mittels der selbst gemessenen Spektrendatei der Referenzsubstanzen wurden Match-Faktoren zwischen 90 und 99 % gefunden. Nur in fünf Fällen lagen die Werte zwischen 80 und 89 %. Darüber hinaus wird die Identität auch beim visuellen Vergleich der Spektren deutlich, wie in Abb. 5a und 5b für einige Beispiele gezeigt wird.

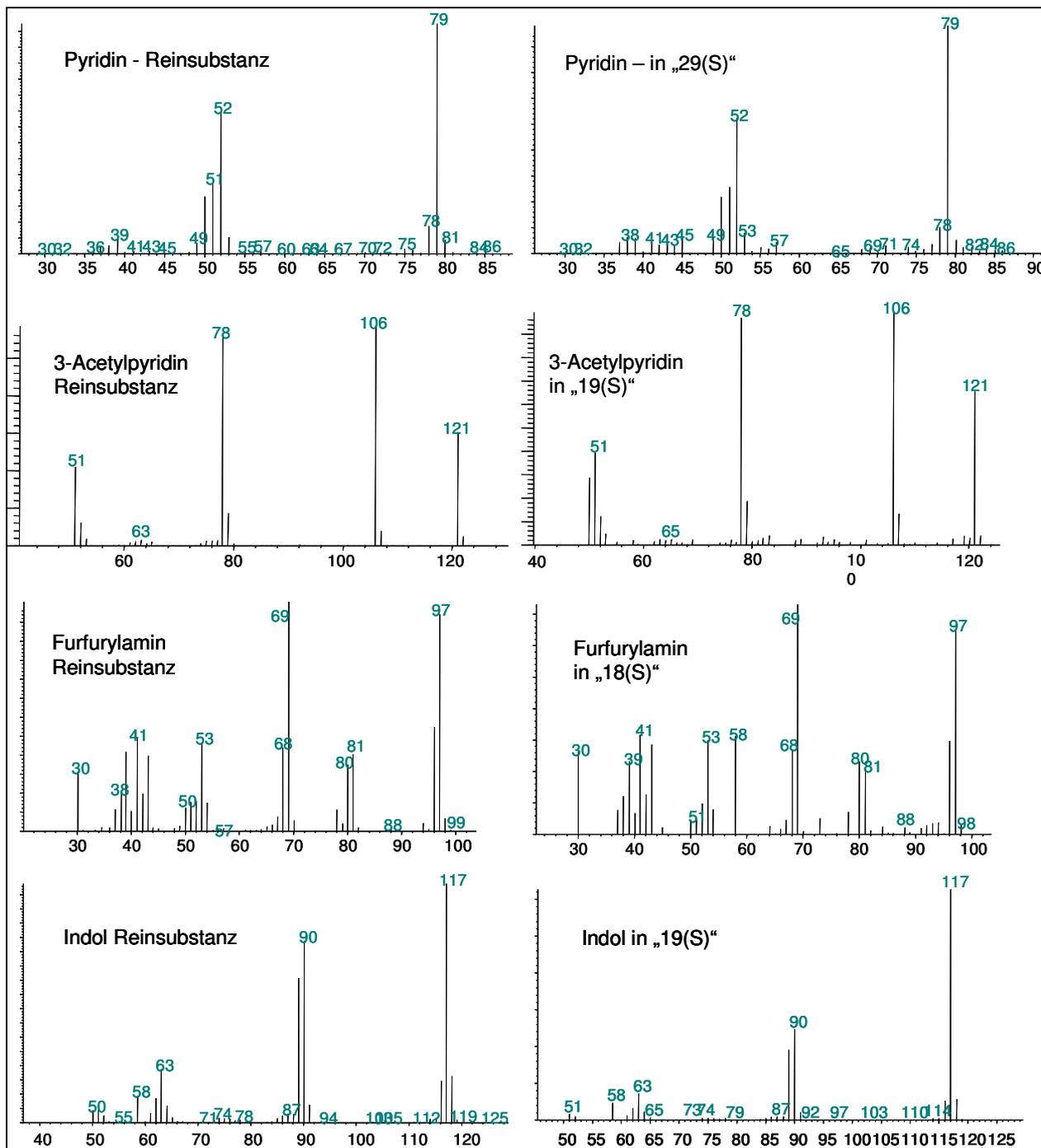


Abb. 5a: Vergleich der Massenspektren einiger Referenzsubstanzen mit denen der entsprechenden Signale bei der Messung einiger Zigarettenarten

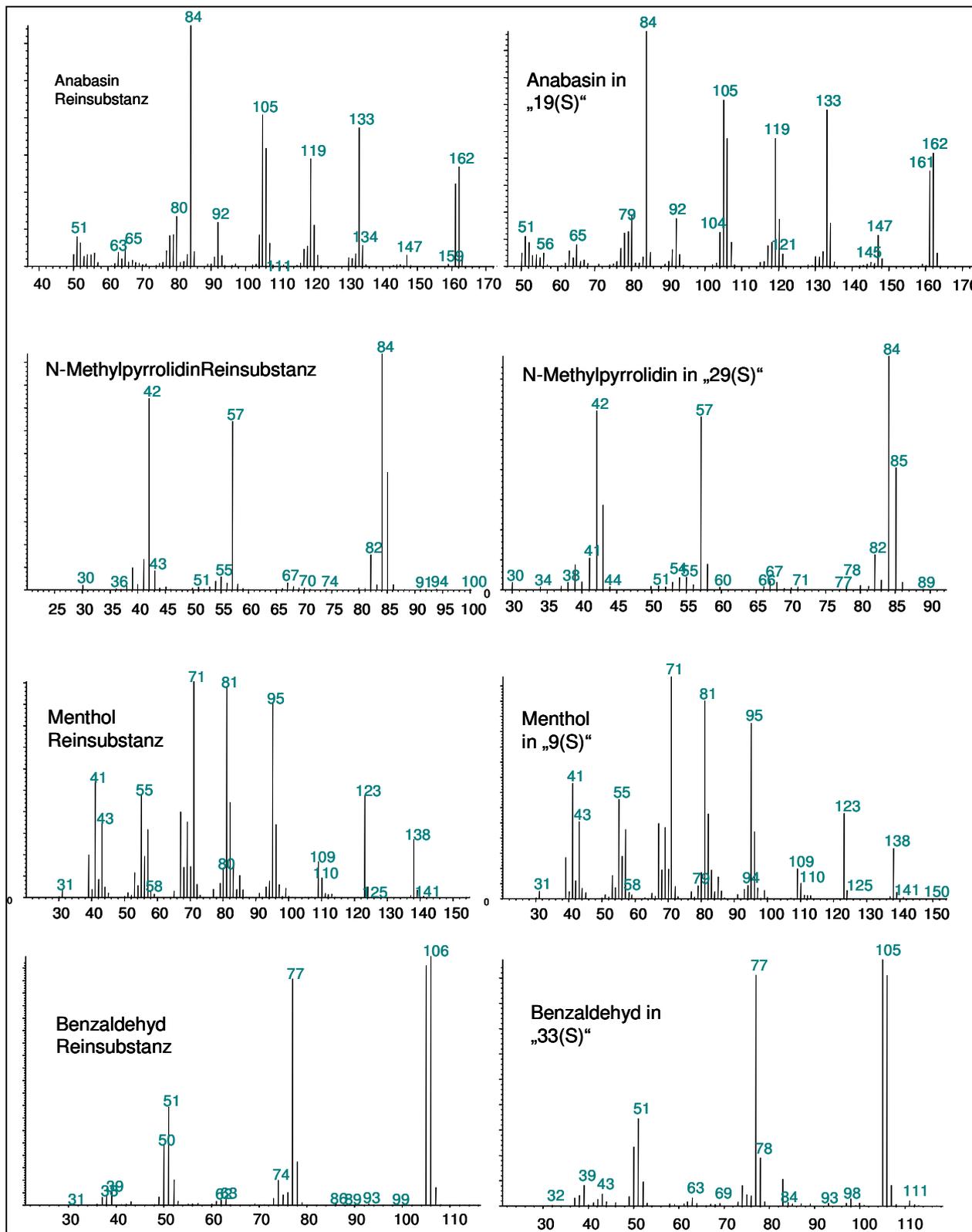


Abb. 5b: Vergleich der Massenspektren einiger Referenzsubstanzen mit denen der entsprechenden Signale bei der Messung einiger Zigarettensorten

Abschätzung der Konzentrationen

Eine erste grobe Abschätzung der Konzentrationen einiger der oben identifizierten Verbindungen wurde an vier Zigarettenarten nach der Methode der Standardaddition vorgenommen, indem die Tabakprobe einmal in unveränderter Form und einmal nach Zusatz einer bekannten Menge der Substanzen gemessen wurde. In Abb. 6 sind die beiden Chromatogramme für Zigarette „9(S)“ dargestellt. Durch Vergleich der Peakflächen kann ein erster Anhaltspunkt über die Konzentrationen erhalten werden.

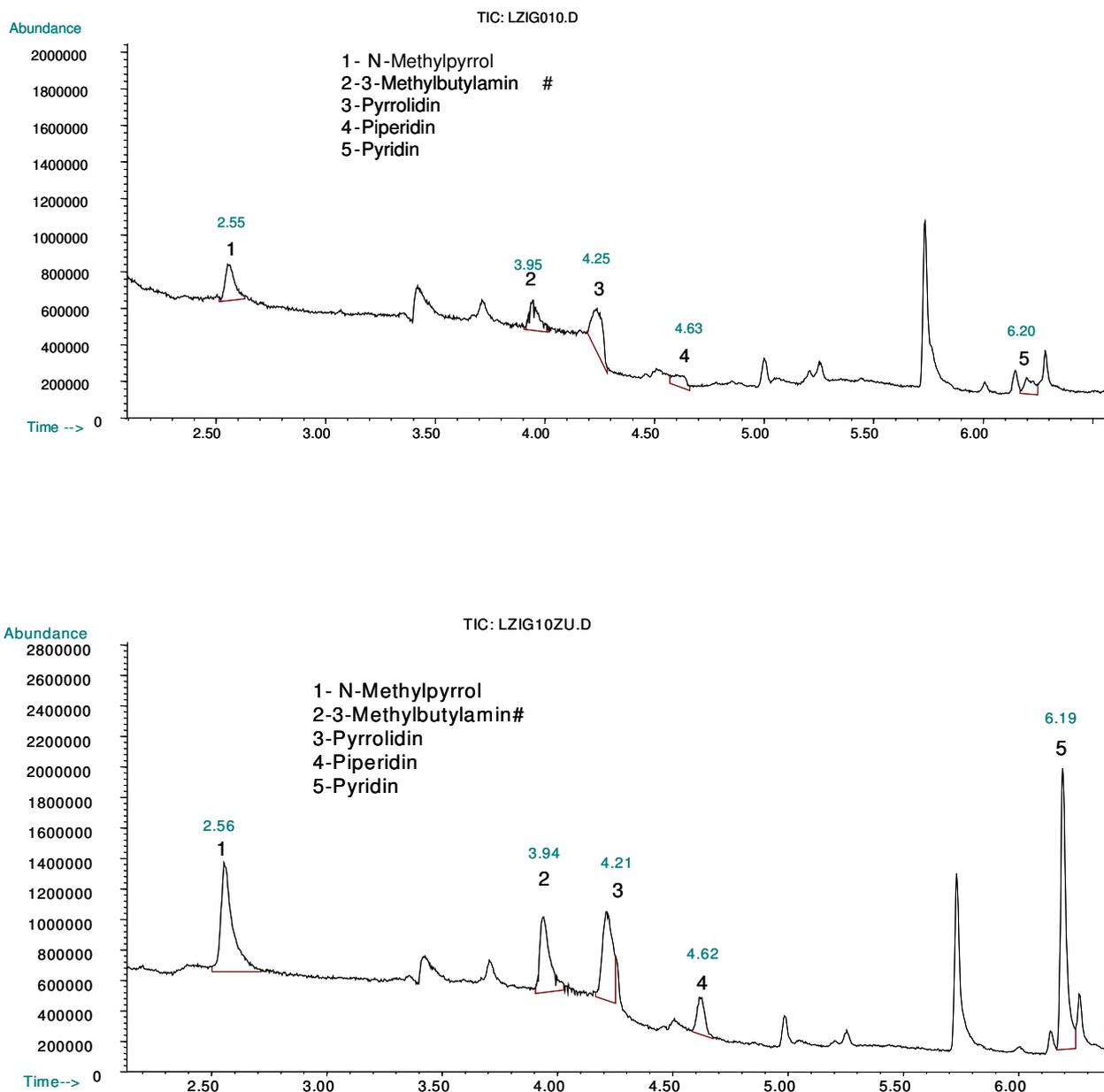


Abb. 6: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Zigarettenart „9(S)“ ohne Zugabe (oben) und nach Zugabe von 0,5 µg N-Methylpyrrol, 0,5 µg 3-Methylbutylamin, 5 µg Pyrrolidin, 0,5 µg Piperidin und 2,5 µg Pyridin (unten)

Die Ergebnisse der Konzentrationsabschätzung sind in Tabelle 11 dargestellt. Ein Vergleich mit den im Jahre 2001 aufgenommenen Chromatogrammen zeigt, dass für einige Verbindungen inzwischen eine Konzentrationsabnahme erfolgt ist, obwohl die Zigaretten im Kühlschrank gelagert wurden. Dieses wäre durch die relativ hohe Flüchtigkeit der Substanzen erklärbar.

Tabelle 11. Ergebnisse der Konzentrationsabschätzungen nach der Methode der Standardaddition

Verbindung	Konzentrationsabschätzung in µg/Zigarette			
	„29(S)“	„22(S)“	„10(S)“	„9(S)“
N-Methylpyrrolidin	0,4	6	4	3
3-Methylbutylamin	0,7	1	2	7
Pyrrolidin	21	46	21	25
Piperidin	< 0,1	0,4	0,2	< 0,1
Pyridin	0,6	2	1	1,3
3-Acetylpyridin	16	25	4	8
Indol	5	3,5	1,3	6

Erste Abschätzungen der Konzentrationen für 7 Verbindungen zeigen, dass diese wesentlich niedriger sind als die des Nikotins. Es ist ungeklärt, in welcher Form die Substanzen im Tabak gebunden sind. Es ist denkbar, dass unter den vergleichsweise milden Extraktionsbedingungen die Substanzen nur teilweise freigesetzt werden. Menthol lieferte hingegen in Zigarette „9(S)“ ein sehr intensives Signal.

Bei den oben beschriebenen Bestätigungsanalysen wurden 23 Verbindungen als Bestandteile der Zigaretten durch Vergleich mit den Massenspektren und den Retentionszeiten eindeutig identifiziert. Die in den Voruntersuchungen erfolgten Nachweise wurden damit bestätigt.

4.2 Identifizierung der Zusatzstoffe in Zigaretten mittels HS-SPME / GC-MS

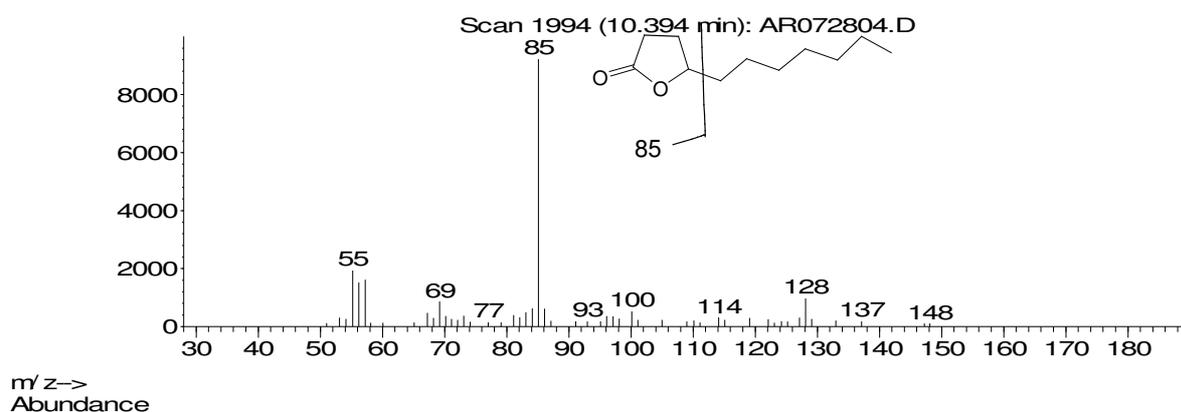
Die in diesem Abschnitt unter Tabelle 12 und 13 genannten 32 Schweizer Zigarettenarten sowie drei Sorten aus sechs bzw. acht verschiedenen Ländern wurden unter den in den Abschnitten 3.4 bis 3.7 beschriebenen optimierten Bedingungen mittels HS-SPME / GC-MS untersucht. Von jeder Zigarettenpackung wurden je zwei Zigaretten bei basischer, neutraler und saurer Aufarbeitung gemessen. Alle in den Chromatogrammen auftretenden Peaks wurden der Spektrenbibliothekssuche unterzogen. Durch den Vergleich der Massenspektren mit kommerziellen Spektrenbibliotheken wurden in den verschiedenen Sorten über 60 Substanzen ermittelt. Die jeweils identifizierten Zusatzstoffe sind in den Tabellen 12 und 13 zusammengestellt. Für die untersuchten zwei Zigaretten einer Packung wurden in allen Fällen die gleichen Substanzen identifiziert, woraus eine gute qualitative Wiederholbarkeit der Methode resultiert.

Durch den Vergleich der Chromatogramme einer Zigarette mit den Chromatogrammen der Referenzzigarette und der Rohtabakmischung konnte nachgewiesen werden, welche Stoffe sich ausschließlich in Zigaretten befinden. Diese Substanzen wurden als Zusatzstoff bewertet.

Da uns bis zum jetzigen Zeitpunkt nur die bereits genannten vier Rohtabake zur Verfügung standen, ist diese Datenmenge für Vergleichszwecke relativ gering. Um eine genauere Aussage über die Zusatzstoffe machen zu können, müssten noch weitere Rohtabake und deren Mischungen als Vergleich in die Untersuchungen einbezogen werden.

Aufgrund der Tabakmatrix und der abweichenden Messbedingungen lag die Übereinstimmung der Massenspektren mit denen der jeweiligen Spektrenbibliothek immer unter 100%, häufig aber über 90%. Außerdem wurden bei den Scanmessungen m/z-Verhältnisse beginnend mit m/z 45 aufgezeichnet, während die Bibliotheksspektren ggf. auch darunter liegende m/z-Werte enthalten. Als Beispiel ist in Abb. 7 das Massenspektrum von γ -Undecalacton, das in Zigaretten tabak der Sorte „8(S)“ bei einer Retentionszeit von 10,39 min detektiert wurde, dem entsprechenden Massenspektrum aus der Wiley-Spektrenbibliothek gegenübergestellt. Die Übereinstimmung (Match-Qualität) beider Spektren beträgt nach Untergrundkorrektur 90%. Das Molekül-Ion M^+ (m/z 184) ist instabil und konnte in der Tabakmatrix nicht detektiert werden. Das intensivste Signal bei m/z 85 entsteht durch den Verlust der Alkylkette (α -Spaltung).

Abundance



Abundance

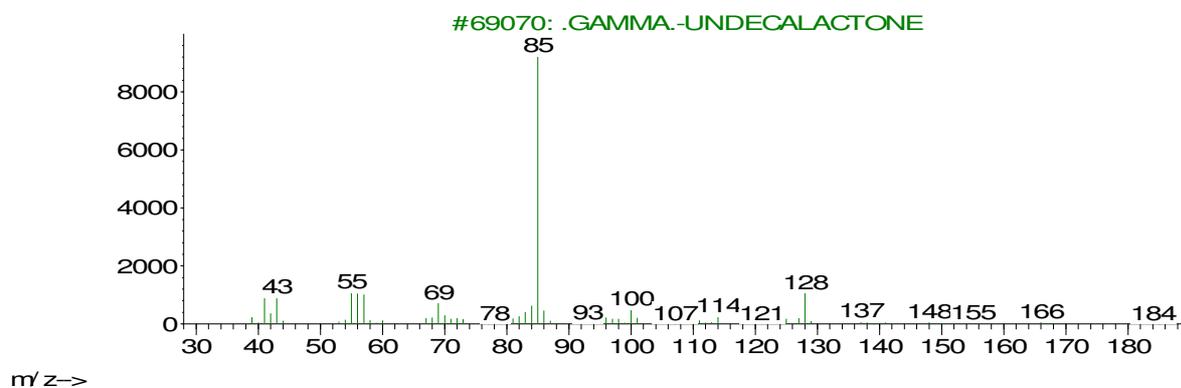


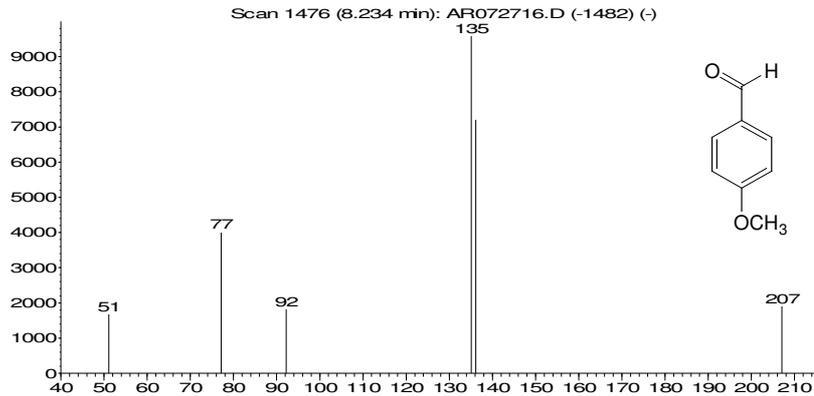
Abb. 7: Vergleich der Massenspektren von γ -Undecalacton ($M=184$) in der Sorte „8(S)“ (oben) und in der Wiley-Spektrenbibliothek (unten), Match-Qualität: 90%

Die Überprüfung der nach Bibliothekssuche vorgenommenen Zuordnung erfolgte daher, wie bei den Voruntersuchungen mit Referenzsubstanzen, die unter den gleichen Bedingungen wie die Zigaretten gemessen wurden. Anhand der höheren Übereinstimmung der Massenspektren und der exakt übereinstimmenden Retentionszeiten wurde die Identität der Verbindungen bestätigt.

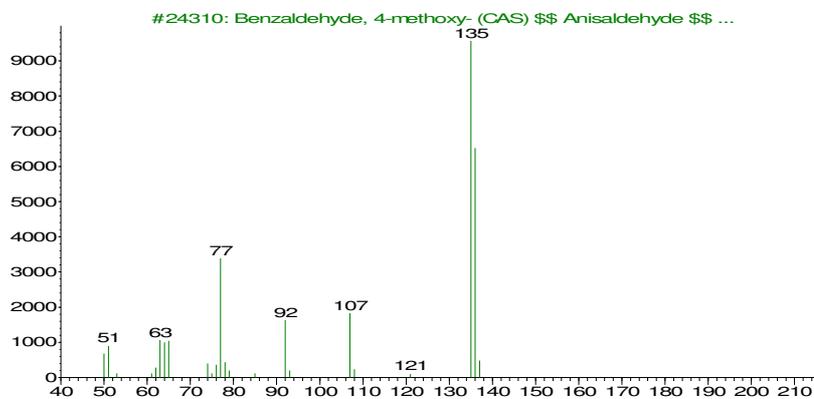
Abb. 8 zeigt die Massenspektren von p-Anisaldehyd in der Sorte „16(S)“, aus der Wiley-Spektrenbibliothek und der Reinsubstanz in Tabakmatrix. Die Übereinstimmung des ersten Spektrums mit dem entsprechenden der Bibliothek liegt nach Untergrundkorrektur bei 83%. Die Tabakmatrix bedingt, dass ein Teil der Signale unterdrückt wird, da die Substanz nur in

geringer Menge vorliegt. Das Spektrum der Reinsubstanz entspricht in höherem Maße dem Bibliotheksspektrum und wurde bei identischer Retentionszeit ($t_R = 8,23$ min) erhalten.

Abundance

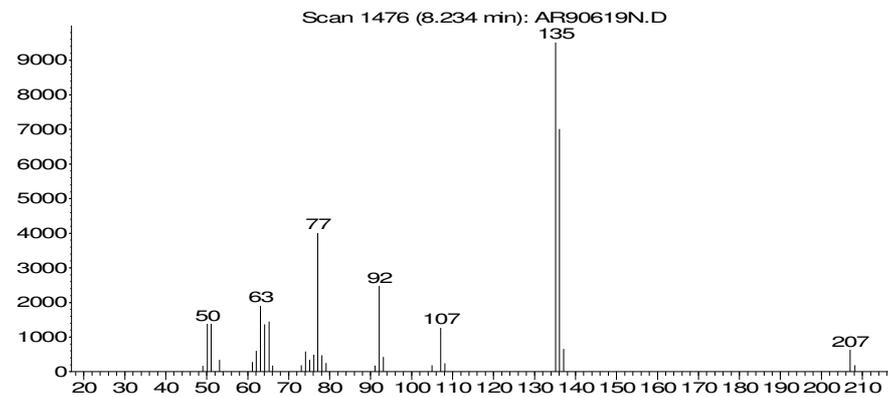


m/z ->
Abundance



m/z ->

Abundance



m/z ->

Abb. 8: Vergleich des Massenspektrums von p-Anisaldehyd ($M=136$) in Zigarette „16(S)“ (oben, bei neutraler Aufarbeitung, $t_R=8,23$ min), der Wiley-Spektrenbibliothek (Mitte) und der Referenzsubstanz (unten, bei Zugabe zur neutral aufgearbeiteten Zigarettenmatrix der Sorte „19(S)“, $t_R=8,23$ min). Der Peak bei $m/z=207$ ist der GC-Säule zuzuordnen.

Im Falle der Identität einer Substanz aus einer Zigarettenprobe mit einer Reinsubstanz stimmten auch die Retentionszeiten in den jeweiligen Chromatogrammen exakt überein. Dies ist zum Beispiel in Abb. 9 ersichtlich. Beide Chromatogramme ergaben sich bei Messungen der Sorte „10(S)“ nach neutraler Aufarbeitung, wobei in einer der beiden

Messungen die zu bestätigenden Verbindungen o-Phenylphenol und Triacetin zugesetzt waren und bestätigt werden konnten.

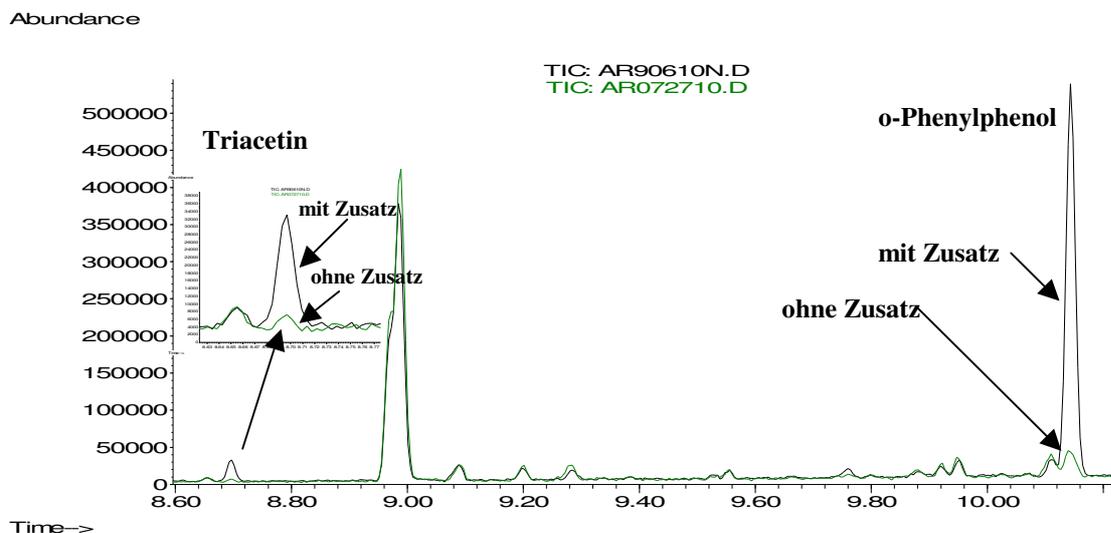


Abb. 9: TIC von Zigarette „10(S)“ mit und ohne Zusatz von Triacetin und o-Phenylphenol als Reinsubstanzen bei neutraler Aufarbeitung, $t_R = 8,60-10,20$ min

Die Chromatogramme in Abb. 10 ergaben sich analog bei Messungen der Sorte „19(S)“ nach neutraler Aufarbeitung, die mit und ohne Zusatz der Reinsubstanzen Methylbenzoat, Carveol, p-Anisaldehyd, trans-Anethol und Isobutyl-p-hydroxybenzoat erfolgten. Für Methylbenzoat und p-Anisaldehyd vergrößerte sich jeweils das Signal bei exakt gleicher Retentionszeit, so dass deren Identität bestätigt werden konnte. Ausgeschlossen werden konnte Carveol für das Signal bei $t_R = 9,26$ min, da trans(+)-Carveol bei $t_R = 7,93$ min und cis(+)-Carveol bei $t_R = 8,03$ min chromatographieren.

Durch die Bibliothekssuche konnte trans-Anethol in keiner Zigarette gefunden werden. Die durch Zusatz der Reinsubstanz ermittelte Retentionszeit von $t_R = 8,45$ min konnte in keiner Zigarettenprobe mit einem Peak in Übereinstimmung gebracht werden. Diese Substanz ist somit mit hoher Wahrscheinlichkeit in den gemessenen Zigaretten nicht enthalten.

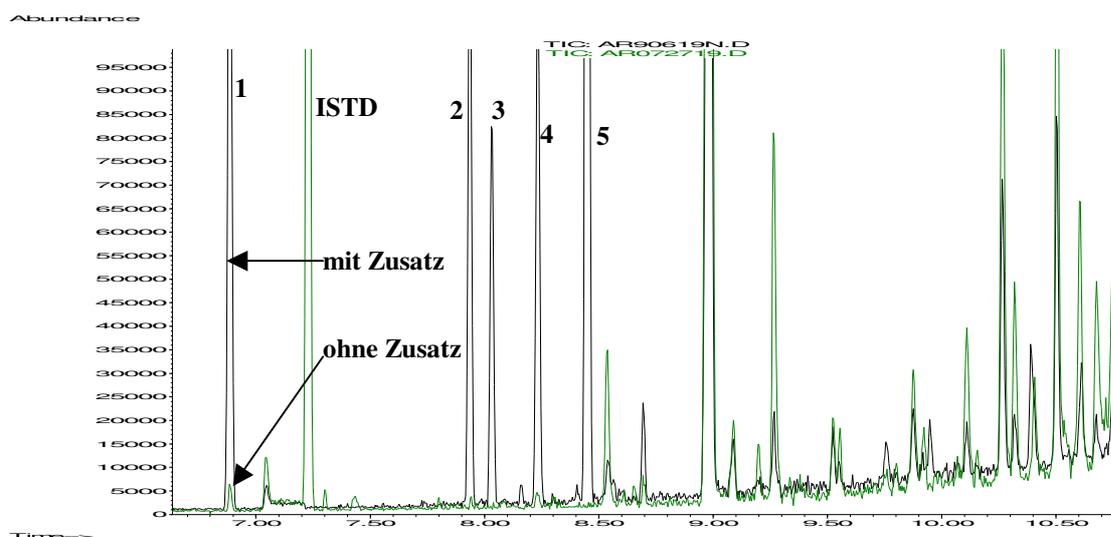


Abb. 10: TIC von Zigarette „19(S)“ mit und ohne Zusatz der Reinsubstanzen: Methylbenzoat (1), Carveol (2 trans(+)-Carveol, 3 cis(+)-Carveol), p-Anisaldehyd (4), trans-Anethol (5) und Isobutyl-p- hydroxybenzoat (kein Signal) bei neutraler Aufarbeitung, $t_R = 8,60-10,20$ min

Bisher nicht eindeutig identifiziert bleiben zwei typische Signale bei $t_R = 7,26$ min und $t_R = 7,28$ min in den Chromatogrammen der Sorten „9(S)“ und „10(S)“ nach basischer Aufarbeitung, deren Massenspektren durch Vergleich mit der Wiley-Spektrenbibliothek auf die Substanzen Tri- bzw. Dipropylenglycol hindeuteten. Der Zusatz dieser Substanzen (200 μ g) zur Tabakmatrix der Sorte „9(S)“ zeigte im Chromatogramm keine sichtbare Signalerhöhung bei den entsprechenden Retentionszeiten. Das könnte auf die zu geringe Menge der Substanzzugabe zurückzuführen sein, da die Verbindungen auch bei keiner anderen Retentionszeit Signale lieferten.

Die Messung der Reinsubstanzen in deutlich höherer Menge ohne Tabakmatrix ergab mehrere Signale, jedoch ohne eine Übereinstimmung der Retentionszeiten mit den Peaks im Chromatogramm der Zigarette „9(S)“, wie in Abb. 11 zu erkennen ist. Dipropylenglycol kann aufgrund des Massenspektrums der Reinsubstanz mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Vermutlich handelt es sich um zwei Isomere von Tripropylenglycol, von dem insgesamt vier Konstitutionsisomere und zu jedem von ihnen acht Epimere existieren, was die Signalgruppe 4 im Chromatogramm erklären kann. Die Bruchstücke im Massenspektrum der unbekanntem Signale, das in Abb. 12 zu sehen ist, sind mit Tripropylenglycol vereinbar. Es könnte sich jedoch auch um ein Propylenglycol Trimer handeln.

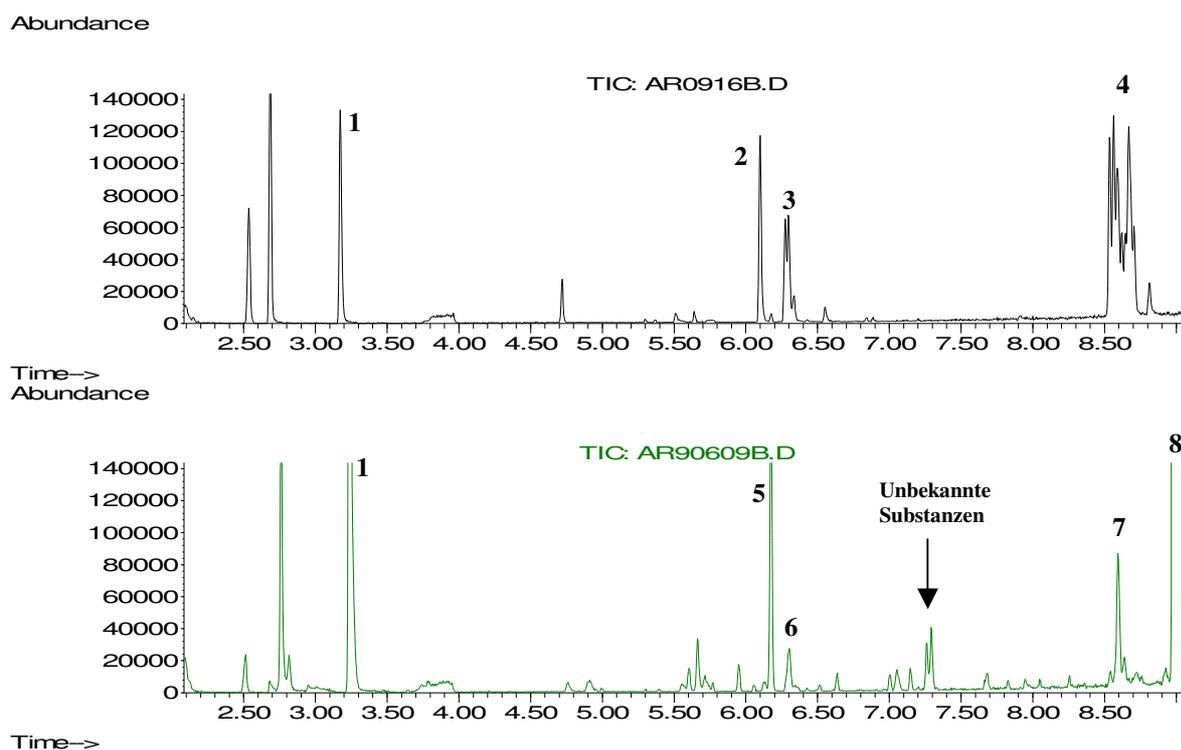


Abb. 11: Chromatogramm der Reinsubstanzen Propylenglycol, Tri- und Dipropylenglycol je 500 μ g (oben) und der Zigarette „9(S)“ mit Zusatz von je 200 μ g dieser Substanzen (unten), basische Aufarbeitung, $t_R = 0$ bis 9,00 min. **1** Propylenglycol, **2** Dipropylenglycol, **3** Tripropylenglycol-Isomere, **4** Tripropylenglycol-Isomere, **5** 2-Ethyl-1-hexanol, **6** Benzylalkohol, **7** Indol, **8** Nikotin.

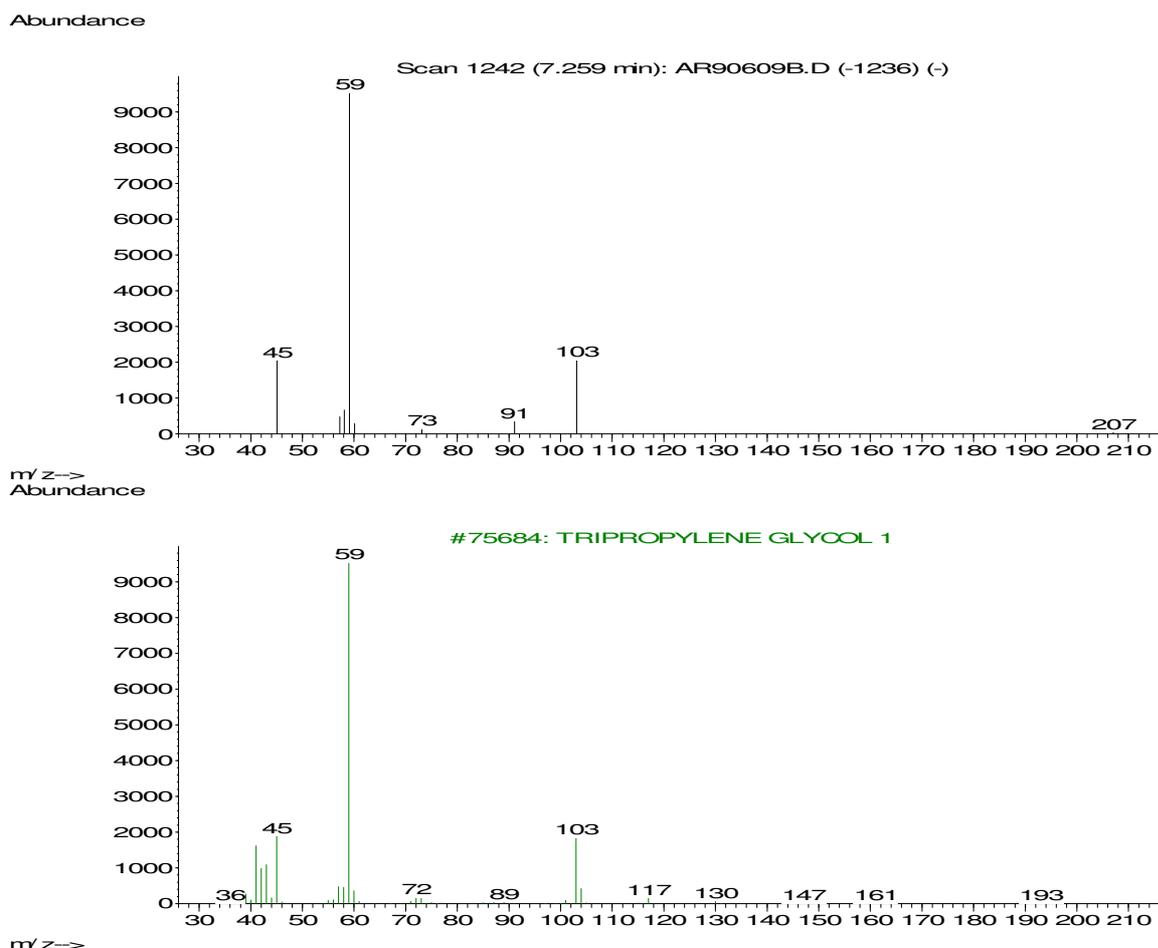


Abb. 12: Vergleich des Massenspektrums des Signals bei $t_R = 7,26$ min im Chromatogramm der Sorte „9(S)“ mit dem Massenspektren von Tripropylenglycol aus der Wiley-Spektrenbibliothek (Übereinstimmung 83% nach Untergrundkorrektur)

Alle Verbindungen, deren Vorliegen nach dieser Vorgehensweise bereits bestätigt wurde, sind in Tab. 12 und 13 fett gekennzeichnet aufgeführt.

Zur Identifizierung der gefundenen Substanzen wurden zunächst die Bestandteile des Rohtabaks und der Referenzzigarette mit Bibliothekssuche ermittelt, die teilweise mittels Reinsubstanzen überprüft und bestätigt werden konnten. Die bei saurer, neutraler und basischer Aufarbeitung erhaltenen Chromatogramme der einzelnen Zigarettensorten wurden dann jeweils den entsprechenden Chromatogrammen der Referenzzigarette und einer Rohtabakmischung gegenübergestellt, um zugesetzte Verbindungen von natürlichen Tabakbestandteilen zu unterscheiden. Durch diesen Vergleich wurde auch deutlich, dass die meisten Signale der Tabakmatrix zuzuordnen sind. Einige wenige sind Störsignale der GC-Kapillarsäule, die durch Säulenbluten hervorgerufen werden.

Im sauren wurden z. B. die folgenden Chromatogramme erhalten (Abb.13), die jeweils aus einer Messung der Sorte „30(S)“ bzw. des Rohtabakmixes resultieren. Daraus ist ersichtlich, dass z. B. Solanon ein natürlicher Tabakbestandteil ist, während es sich bei Piperonal, γ -Nonalacton, Vanillin, Ethylvanillin, γ -Undecalacton und Benzylbenzoat um zugesetzte Verbindungen handelt. Hydroxymethylfurfural könnte zusätzlich zu seinem natürlichen Vorkommen im Rohtabak aufgestockt bzw. aus zugesetzten Zuckern gebildet worden sein, was die deutlich höhere Signalintensität im Chromatogramm des Zigarettentabaks vermuten lässt.

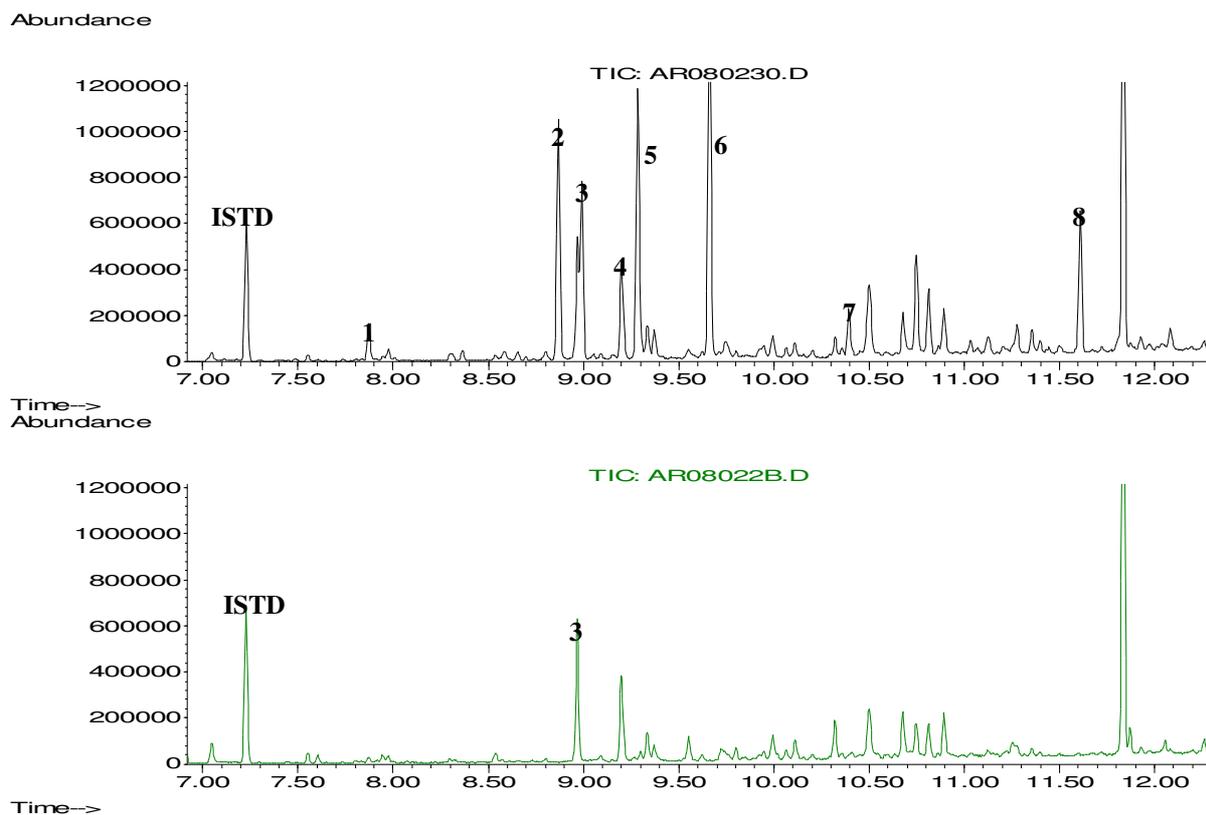


Abb. 13: Vergleich der TIC der Sorte „30(S)“ (oben) und des Rohtabakmix (unten), saure Aufarbeitung, Retentionszeiten von 7-12 min. **1** Hydroxymethylfurfural, **2** Piperonal; **3** Solanon, **4** γ -Nonalacton, **5** Vanillin, **6** Ethylvanillin, **7** γ -Undecalacton, **8** Benzylbenzoat

Im neutralen wurden z. B. die Chromatogramme in Abb. 14 bei Messungen der Sorten „4(S)“ bzw. „2(S)“ und des Rohtabakmixes erhalten. Propylenglycol, Ethylphenylacetat, Thymol, Piperonal liegen in der Sorte „4(S)“, jedoch nicht im Rohtabak vor und sind demnach Zusatzstoffe. Signale dieser Verbindungen wurden in der Messung der Zigarettenmarke „2(S)“ nicht detektiert. Das Chromatogramm dieser Sorte enthält auch keine weiteren Signale, die zugesetzten Substanzen zuzuordnen sind. Das Signal für Indol ist hier auffällig klein. Laut Eigenwerbung des Herstellers enthalten die Marken „1-3(S)“ keine Zusatzstoffe.

Die natürlichen Gehalte an Benzaldehyd und Benzylalkohol könnten aufgrund der hohen Signale dieser Substanzen in der Sorte „4(S)“ aufgestockt sein. Diese Vermutung wurde später durch die Quantifizierung von Benzaldehyd mit der SIM-Methode überprüft, da das Signal von Benzaldehyd in den drei abgebildeten Scan-Messungen durch Säulenbluten gestört und unterdrückt ist.

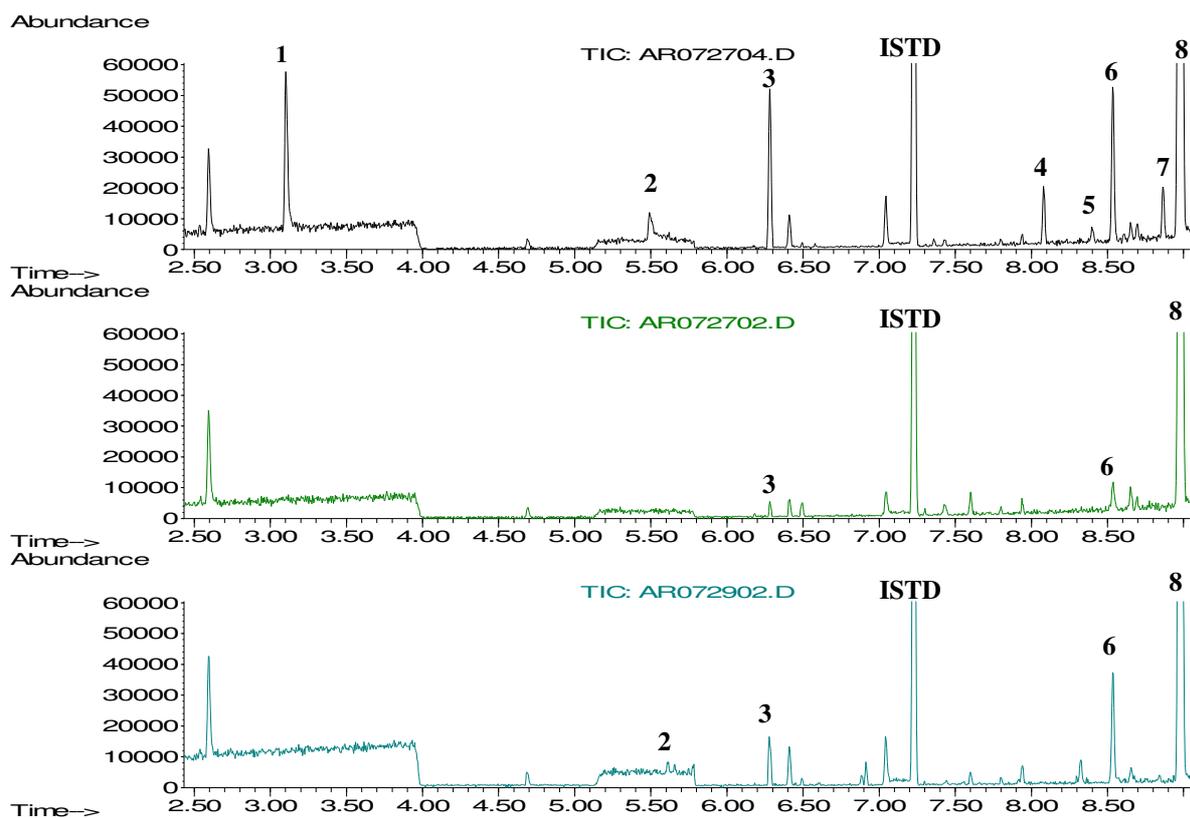


Abb. 14: Vergleich der TIC/Chromatogramme der Sorten „4(S)“ (oben), „2(S)“ (Mitte) und des Rohtabakmix (unten), neutrale Aufarbeitung, Retentionszeiten von 2,50-9 min. **1** Propylenglycol, **2** Benzaldehyd; **3** Benzylalkohol, **4** Ethylphenylacetat, **5** Thymol, **6** Indol, **7** Piperonal, **8** Nikotin

In Abb. 15 sind die Chromatogramme der Zigarettensorte „29(S)“ und des Rohtabakmix gegenübergestellt, die bei Messung nach basischer Probenvorbereitung erhalten wurden. Bei basischem pH-Wert wird Nikotin am stärksten freigesetzt und liefert daher ein Signal, das erheblich intensiver ist als alle übrigen.

Die basische Extraktion ermöglicht außerdem eine besonders gute Anreicherung basischer Verbindungen wie Amine und Stickstoffheterocyclen. Die Messung der Zigarette lieferte im Vergleich zum Rohtabak jeweils ein höheres Signal für 3-Methylbutanamin und Pyridin. Propylenglycol ist auch hier als Zusatzstoff der Zigarette erkennbar. Phenylethylamin zeigt im Chromatogramm des Rohtabaks ein deutlich kleineres Signal als in der Zigarettensorte „29(S)“, in der diese Substanz hinzugefügt sein könnte. Menthol lieferte ein vergleichsweise hohes Signal in der Scan-Messung dieser Nicht-Menthol-Zigarette. Die Quantifizierung von Menthol mit der SIM-Methode stützt dieses Ergebnis. Der Rohtabak zeigt für Menthol nur ein unterschwelliges Signal.

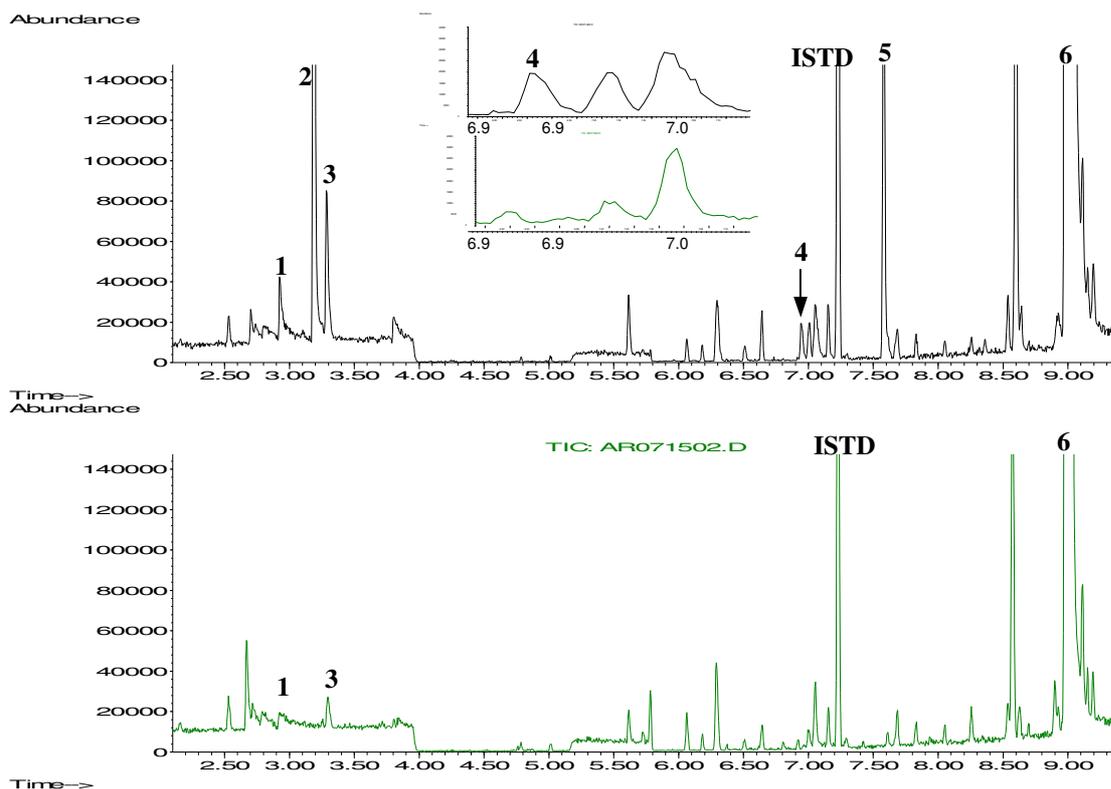


Abb. 15: Vergleich der TIC/Chromatogramme der Sorte „29(S)“ (oben) und des Rohtabakmix (unten), basische Aufarbeitung, Retentionszeiten von 2,00-9,50 min. 1 3-Methylbutanamin, 2 Propylenglycol; 3 Pyridin, 4 Phenylethylamin, 5 Menthol, 6 Nikotin

Sortentypische Signale

In der Tab. 12 sind die in den einzelnen Sorten qualitativ festgestellten Substanzen aufgelistet, bei denen es sich um zugesetzte Verbindungen handelt. Darunter sind auch Substanzen, die über ihren natürlichen Gehalt im Rohtabak hinaus aufgestockt vorliegen. Zusätzlich sind jeweils die Retentionszeit und der pH-Wert, bei dem die Extraktion des Analyten aus der Tabakprobe erfolgte, angegeben. Die Identität der fett gekennzeichneten Verbindungen wurde bereits wie oben beschrieben bestätigt.

Einige Signale zeigten sich bei sehr vielen Sorten. Dabei handelt es sich um Additive, die als Feuchthaltemittel (Propylenglycol in 29 Schweizer Sorten), Lösungsmittel für Aroma- und Geschmacksstoffe (Triacetin in 29 Schweizer Sorten) und Konservierungsmittel (n-Propyl-p-hydroxybenzoat in 9 Schweizer Sorten) dienen und in den Tabakverordnungen zu diesen Zwecken zugelassen sind [5; 16]. Eher sortenspezifisch sind dagegen Aromastoffe, die den charakteristischen Geschmack der Marke ausmachen. Für Zigaretten einer bestimmten Sorte traten daher typische Signale auf, die meist auch in den Chromatogrammen von Varianten dieser Sorte (z. B. lights und ultra lights) gefunden wurden. Das beste Beispiel hierfür ist die Sorte „25(S)“, deren Varianten „extra“ und „mild“ bis auf zwei Ausnahmen die gleichen Zusatzstoffe enthalten, als einzige jeweils Anisalkohol sowie zwei unbekannte Substanzen bei $t_R = 8,85$ und $9,85$ min nach neutraler Aufarbeitung. Des Weiteren zeigten beide Varianten dieser Sorte Signale für Methylcinnamat, Menthol und Vanillin. Außerdem wiesen z. B. nur die Chromatogramme von Zigaretten der Marke „9(S)“ und „10(S)“ jeweils die beiden bereits früher erwähnten unbekannt Peaks bei einer Retentionszeit von 7,26 bzw. 7,28 min auf, deren Massenspektren auf Tripropylenglycol deuteten. Weiterhin charakteristisch für diese Sorte ist das besonders hohe Signal für 2-Ethyl-1-hexanol.

In den Varianten der beiden Zigarettenarten „16(S)“ und „17(S)“ waren jeweils p-Anisaldehyd, Piperonal und Furfurylamin zugesetzt. Die drei Marken-Varianten „26-28(S)“ wiesen gemeinsam Methylbenzoat, n-Propylhydroxybenzoat und Ethylpalmitat auf.

Nur einige wenige Zusatzstoffe sind charakteristisch für eine einzelne Sorte bzw. eine Variante der Sorte. Diesbezüglich auffällig waren hier die drei Zigaretten-Arten „4-6(S)“: Ausschließlich in „4(S)“ lagen z. B. Thymol, Ethylphenylacetat und Butyrolactam (2-Pyrrolidon) als Zusatzstoffe vor. Isopulegol ist spezifisch für „6(S)“ nachgewiesen worden. Nur in „5(S)“ traten nach saurer Aufarbeitung drei nicht eindeutig identifizierte Signale bei Retentionszeiten von 6,70 min, 6,77 min und 6,82 min auf. 6-Methylcumarin (Übereinstimmung mit der Wiley-Spektrenbibliothek: 97 % ohne Untergrundkorrektur) wurde ausschließlich in der Zigarette „8(S)“ gefunden.

Schließlich wiesen die Sorten „8(S)“ und „30(S)“ im Wesentlichen die gleichen typischen Zusatzstoffe für diese Geschmacksrichtung auf. Dies sind z. B. neben einer stark erhöhten Konzentration von Vanillin die Stoffe Ethylvanillin, γ -Undecalacton, γ -Nonalacton, Hydrozimtalkohol, Zimtalkohol und Zimtaldehyd. Ethylvanillin zeigte ein höheres Signal als Vanillin, da es üblich ist, Vanille-Aroma durch eine höhere Menge an Ethylvanillin zu erzeugen. In diesen beiden Sorten wurden jeweils die meisten Zusatzstoffe gefunden.

Länderspezifische Zusatzstoffe

Für die Überprüfung der Zigaretten auf länderspezifische Signale wurden die Sorten „9“, „10“ (nur bei Quantifizierung), „18“ und „19“ folgender Herkunft untersucht: **D** Deutschland; **S** Schweiz; **P** Peking; **B** Belgien; **C** Chicago; **T** Tschechien; **W** Warschau; **WS** Washington **I** Irland; (Zigaretten aus Washington nur bei Quantifizierung).

In Tab. 13 sind die in den drei Sorten verschiedener Länder qualitativ festgestellten, zugesetzten bzw. aufgestockten Substanzen mit Angabe der Retentionszeit und des pH-Wertes der Extraktion aufgelistet. Bestätigte Verbindungen sind fett gekennzeichnet.

Daraus geht hervor, dass innerhalb der drei Marken länderspezifische Unterschiede im Zusatzstoffprofil bestehen. Zigarette Nr. „9“ aus der Schweiz und Deutschland stimmen im Wesentlichen überein. Neben den Schweizer Zigaretten weisen nur die deutschen Zigaretten die typischen Signale bei $t_R = 7,26/7,28$ min auf, die vermutlich Tripropylenglycol zuzuordnen sind. Die deutschen Zigaretten der Nr. „9“ zeigen spezifisch ein Signal für o-Phenylphenol. Die Sorten aus Peking und Chicago unterscheiden sich jeweils am stärksten von den anderen. In den Zigaretten Nr. „9“ aus Peking ist die Zahl der enthaltenen Zusatzstoffe geringer. Charakteristisch ist etwa das Fehlen von Benzylbenzoat und Propylenglycol, die bei den Zigaretten der Nr. „9“ anderer Herkunft stets vorhanden sind. Zigaretten aus Chicago zeigen ebenfalls ein verändertes Zusatzstoffprofil. Hier ist deutlich weniger 2-Ethyl-1-hexanol enthalten, das in anderen Ländern offenbar z. T. stark aufgestockt wird, besonders in Deutschland und der Schweiz, was durch die Quantifizierung dieser Substanz bestätigt wurde. In den beiden amerikanischen Zigaretten der Nr. „9“ werden große Mengen an Ethylvanillin und Menthol, die in Proben aus anderen Ländern nicht gefunden wurden, und größerer Menge an Benzylbenzoat zugesetzt. Dafür fehlen hier die Signale für Vanillin und Triacetin, die in den Chromatogrammen der anderen Nr. „9“-Zigaretten auftraten. Die belgischen Zigaretten dieser Sorte ähnelten denen aus der Schweiz und aus Deutschland, wobei die hohen Signale für Phenylethanol und 3-Acetylpyridin dafür sprechen, dass diese auch im Rohtabak vorkommenden Verbindungen aufgestockt sein könnten.

Bei den Zigaretten der Nr. „18“ zeigt sich im Zusatzstoffprofil eine Übereinstimmung aller sieben Proben für vier Signale. Dies sind die Feuchthalte- und Lösungsmittel Propylenglycol und Triacetin, die auch in fast allen Schweizer Zigarettenarten auftraten. Die anderen zwei gemeinsamen Signale sind Glycerol, das ebenfalls als Feuchthaltemittel eingesetzt wird, sowie ein Peak bei $t_R = 5,95$ min mit einem glycolähnlichen Spektrum. Das Signal von Glycerol war häufig durch Signale, die durch Säulenbluten verursacht wurden, überlagert. Die Zigaretten aus Tschechien und Chicago zeigen die größten Unterschiede zu den Sorten aus den anderen Ländern. Signale für Ethylpalmitat und Methyloleat fehlen. n-Propyl-p-hydroxybenzoat liefert im Gegensatz zu den Zigaretten der anderen Länder im Chromatogramm der tschechischen nur ein sehr geringes Signal und war in der Sorte aus Chicago überhaupt nicht nachweisbar. Die tschechische Zigarette weist o-Phenylphenol und

einige unbekannte Verbindungen (vermutlich verschiedene höhere Kohlenwasserstoffe) auf. In der amerikanischen Zigarette wurde, wie schon in der amerikanischen Zigarette „9“, eine erhöhte Menge an Menthol gefunden. In den deutschen Nr. „18“-Zigaretten liegen Phenylacetaldehyd, p-Methoxybenzaldehyd und Benzylalkohol möglicherweise aufgestockt vor. Diese Zigaretten lieferten außerdem ein Signal für das Zuckerderivat 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on, das auch in der deutschen „19“-Zigarette auftrat. Die „19“-Zigaretten enthielten meist die gleichen Signale wie die jeweiligen „18“-Zigaretten gleicher Herkunft. Zigaretten der „19“ aller Länder wiesen Propylenglycol, Triacetin und Glycerol auf. Die tschechischen Zigaretten zeigten wiederum o-Phenylphenol und die unbekanntes höheren Kohlenwasserstoffe. Des Weiteren war auch 2-Ethyl-1-hexanol aufgestockt. Eine Aufstockung von Phenylethylamin könnte in belgischen und amerikanischen Zigaretten vorliegen. Letztere zeigten auch erhöhte Signale für Phenylethanol und erneut für Menthol. Charakteristisch für die Zigarette „19“ aus der Schweiz und aus Deutschland ist der Zusatz von Anisaldehyd, welches in den Zigaretten aus Irland und Warschau jeweils ein schwächeres Signal lieferte.

Spezifische Signale für Kakao und Lakritze, die durch Messung dieser als Zusätze benutzten Produkte unter den gleichen Bedingungen wie die Zigarettenproben ermittelt wurden, konnten in den Zigarettenproben bislang nicht nachgewiesen werden. Für reinen Kakao konnten bei basischer Aufarbeitung z. B. folgende spezifische Hinweise nach Bibliothekssuche erhalten werden: 2-Aminoanilin ($t_R = 5,05$ min), 2-Ethyl-6-methylpyrazin ($t_R = 5,94$ min), 1,3,5-Trimethylpyrazin ($t_R = 5,98$ min), 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazin ($t_R = 6,7$ min), 2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazin ($t_R = 6,8$ min) und 3,5-Diethyl-2-methylpyrazin ($t_R = 7,4$ min). Zur Bestätigung und zum Auffinden von typischen Markern für diese und andere komplexe Zusatzgemische sind jedoch weitere, spezifischere Untersuchungen erforderlich.

Tabelle 12. Übersicht über die in Schweizer Zigaretten gefundenen Zusatzstoffe (Ref=Referenzzigarette, Roh=Rohtabak)
fett gekennzeichnet: eindeutig nachgewiesen als Zusatzstoff

Ret.zeit	pH-Wert	Substanz	Zigarettenmarke	Ref	Roh
5,72	b	2-Acetylmethylfuran	12		
8,23	n	Anisaldehyd	16, 17, 19, (23), (27)		
8,41	s, n, b	Anisalkohol	24, 25		
11,61	s, n	Benzylbenzoat	8, 9, (10), 30		
8,85	n	Benzylisobutanoat (unsicher)	24, 25		
7,62	s, b	2-(2-Butoxyethoxy)-ethanol	1		
12,06	n, b	Butylphthalat	fast alle außer Roh		
7,36	s	Butyrolactam (Pyrrolidon)	4		
12,62	s, n	Cembren	16		x
5,90/5,93	s, b	Diethylenglycolmonoethylether	2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 21, 32		
7,30	n	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-on	1, 2, 3, 12, 19, 24, 25, 26, 30		
11,56	s, n	Ethylheptadecanoat	28		
12,25	n	Ethylhexadecanoat	11		
7,76	s	Ethylmaltol	8		
10,99/11,30	s, n	n-Ethyl-4-methyl-benzensulfonsäureamid (Weichmr.)	27		
11,55	s	Ethylmyristat	26		
12,60	s, n	Ethylpalmitat	5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, (24), (25), 26, 27, 28, 32		x
8,08	s	Ethylphenylacetat	4		
9,66	s, n	Ethylvanillin	8, 10, 30		
4,23	b	Furfurylamin	7, 8, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 23, 30		x
6,37	s	glycolähnliches Spektrum	21, 32		
10,45	n, b	n-Hexadecan	1		
9,82	n, b	Hexa/hepta/pentadecan	1		
10,59	s, b	Isopropyldodecanoat	23, 13		
7,38	s, n, b	Isopulegol	5		

Fortsetzung Tabelle 12.

Ret.zeit	pH-Wert	Substanz	Zigarettenmarke	Ref	Roh
10,99	n	Maltoxazin	1, 2, 3		
7,58	s, n, b	Menthol (in Nicht-Menthol-Zigaretten)	(4), (5), 6, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 24, 25, 29, 31	x	
6,82	s	2-(2-Methoxyethoxy)ethanol (fraglich)	6		
4,65	s, n	Methylacetat (fraglich)	4, 5, 8, 17	x	
6,88	n	Methylbenzoat	19, (22), 26, 27, 28, 30, 31, (32)		x
2,93	b	3-Methylbutanamin	29		x
9,16	n	Methylcinnamat	8, 24, 25, 29, 30		
10,46	s	6-Methylcumarin	8		
7,94	n	Methylethylmaleimid	17		
11,17	b	Methylmyristat	31		
13,20	b	Methyloleat	5, 6, 9, 10, 18, 20, 21, 24, 26, 27, 28, 29		
12,26	n, b	Methylpalmitat	(4), 5, 6, 9, 11, 18, 20, 21, 24, 27, 31, 32	x	x
7,78	s	Methylsalicylat	30		
8,99	s	γ-Nonalacton (coconut aldehyd)	8, 30		
10,14	n	o-Phenylphenol	10, 30		
8,01	s	3-Phenylpropanol (Hydrozimmtalkohol)	8, 30		
8,87	n, b	Piperonal	4, 8, 16, 17, 23, 30, 31		
6,70	s	Propansäure, 2-Hydroxymethylester	6		
3,21	s, n, b	Propylenglycol	alle außer 1, 2, 3		
7,26	b	Propylenglycol Trimer 3	9, 10		
10,60/61	s, n	n-Propyl-p-hydroxybenzoat	18, 19, 20, 21, (22), 23, 26, 27, 28		
9,27	n, b	2,4,7,9-Tetramethyl-5-dicyne-4,7-diol	6, 11, 18, 19, 20, 26, 27,		
8,40	s, n	Thymol	4		
8,70	n	Triacetin	alle außer 3, 11, 12		
7,26/7,28	b	Tripropylenglycol	9, 10		

Fortsetzung Tabelle 12.

Ret.zeit	pH-Wert	Substanz	Zigarettenmarke	Ref	Roh
10,39	s, n	γ-Undecalacton (peach aldehyd)	8, 29, 30		
9,28	s, n	Vanillin	5, 6, 8, 9, 10, 24, 25, 30, 31, 32		
9,75	n	Vanillinmethylether	30		
8,36	n	Zimtaldehyd	30, 8		
8,58	s, n, b	Zimtalkohol	11, 30, 8		
6,77	s	(unbekannt)	6		
9,85	n	(unbekannt)	24, 25		
11,04		(unbekannt)	14, 31		
7,01	n, b	3-Acetylpyridin (aufgestockt)	4, 27	x	x
6,30	s, n, b	Benzylalkohol (aufgestockt)	4, 8, 16, 27, 30	x	x
6,18	s, n, b	2-Ethyl-1-hexanol (aufgestockt)	1, 9, 10, 11, 12, (15), 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 32	x	x
7,17	s, n	p-Mentha-1,5,8-trien (aufgestockt)	1, 2, 3	x	
6,95	n, b	Phenylethylamin (aufgestockt)	11, 12, 13, 14, 16, 20, 27, 29	x	x
6,06	n, b	(unbekannt) m/z 110, 109, 82, 67, 59 (aufgestockt)	32, 28, 21, 20, 7, 13	x	x

4.3 Quantifizierung der Zusatzstoffe

Zunächst sollte überprüft werden, ob natürlich im Tabak vorhandene Substanzen noch zusätzlich zugesetzt werden. Daher erfolgte die Quantifizierung einiger Substanzen, die laut Tab. 12 natürliche Tabakinhaltsstoffe darstellen, jedoch sehr unterschiedliche Signalintensitäten lieferten.

Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse aufgrund der komplexen Tabakmatrix und der Verdrängungseffekte an der SPME-Faser beeinträchtigt sein können. Die begrenzte Kapazität der Faser führt beispielsweise bei hoher Matrixbelastung zu einer geringeren Aufnahmefähigkeit für den Analyten als bei niedriger Matrixbelastung. Dieser Verdrängungseffekt wird durch die Anwendung des inneren Standards nicht immer völlig korrigiert.

Aufgrund der Scan-Messungen wurde vermutet, dass die auch im Rohtabak enthaltenen Verbindungen Benzaldehyd, 2-Ethyl-1-hexanol, Acetophenon, Menthol, Indol, Pyridin, Furfurylamin und Benzylalkohol in einigen Sorten aufgestockt sind. Menthol kommt auch in Nicht-Menthol-Zigaretten vor, höhere Signale in einigen Sorten könnten auf den Zusatz von Menthol zu Nicht-Menthol-Zigaretten hindeuten. Es sollten daher die Unterschiede in den Konzentrationen dieser Substanzen bestimmt werden, um zu klären, ob die Schwankungen des Gehaltes von der Sorte und Herkunft des verarbeiteten Rohtabaks abhängen können oder ob sie hinzugesetzt werden.

3-Phenylpropanol konnte mit der SIM-Methode in fünf Sorten nachgewiesen und quantifiziert werden. Es ist also davon auszugehen, dass dies ein nicht natürlicher Inhaltsstoff ist.

Die Durchführung der Kalibrierung wurde im Abschnitt 3.4.1.3 beschrieben.

Die in den untersuchten Zigarettensorten unter Anwendung der Kalibrationsgeraden (Tabelle 3 (S.25)) festgestellten Konzentrationen sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 angegeben. Die besonders stark variierenden Substanzkonzentrationen von 2-Ethyl-1-hexanol und Menthol wurden zusätzlich in Abb. 16 und Abb. 17 aufgetragen.

Die Abweichung der Einzelmesswerte der Doppelbestimmungen vom Mittelwert (n=65) beträgt durchschnittlich für Benzaldehyd 11,6%, 2-Ethyl-1-hexanol 15,3%, Acetophenon 8,9%, 3-Phenyl-1-propanol 18,1%, Menthol 16,1%, Indol 27,1%, Pyridin 31,0%, Furfurylamin 35,2% und für Benzylalkohol 10,8%. Die teilweise großen Schwankungen bei der Doppelbestimmung können auch auf die Verwendung unterschiedlicher Zigaretten aus der jeweiligen Packung bei der Messung zurückzuführen sein. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Zigaretten einer Packung in ihrer Zusammensetzung unterscheiden und auch die Verteilung der einzelnen Substanzen innerhalb einer Zigarette nicht völlig homogen ist.

Die Standardabweichung der Interday-Wiederholbarkeit (fünf Messungen von Proben mit definiertem Zusatz an unterschiedlichen Tagen) beträgt für Benzaldehyd: 7,5%, 2-Ethyl-1-hexanol: 13,4%, Acetophenon: 2,9%, 3-Phenyl-1-propanol: 19,0%, Menthol: 7,1%, Indol: 10,7%, Pyridin: 8,2%, Furfurylamin: 13,2% und Benzylalkohol: 9,0%.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Methode sehr gut dazu geeignet ist, vergleichende Analysen durchzuführen.

Tabelle 14a. Übersicht über die Konzentration der im neutralen quantifizierten Substanzen in den einzelnen Sorten und Rohtabaken (erhöhte Konzentrationen fett gekennzeichnet)

	Benz- aldehyd	2-Ethyl-1- hexanol	Aceto- phenon	Menthol	Indol	3-Phenyl- propanol
	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]
„9“ Schweiz	36	12,00	0,15	0,06	0,39	0
„9“ Dtl.	51	5,30	0,17	0,17	0,68	0
„9“ Belgien	44	3,60	0,15	0,05	0,67	0
„9“ USA (Washington)	43	0,10	0,15	0,79	0,79	0
„9“ USA (Chicago)	42	0,15	0,16	13,32	0,91	0
„9“ Peking	44	1,10	0,14	0,04	0,85	0
„10“ Schweiz	38	3,20	0,15	0,05	0,59	0
„10“ Dtl.	46	5,96	0,17	0,23	0,66	0
„10“ Irland	44	5,10	0,15	0,13	0,99	0
Non Filter „10“ USA (Washington)	50	0,13	0,16	2,77	0,96	0
„10“ USA (Chicago)	37	0,15	0,13	0,90	0,66	0
„18“ Schweiz	39	0,47	0,16	0,13	0,83	0
„18“ Dtl.	36	0,33	0,16	0,08	0,94	0
„18“ Belgien	35	0,25	0,17	0,41	0,89	0
„18“ Irland	33	0,34	0,16	0,03	0,75	0
„18“ Polen	34	0,45	0,17	0,04	0,93	0
„18“ Tschechien	38	0,52	0,16	0,03	1,02	0
„18“ USA (Washington)	35	0,32	0,16	0,50	0,82	0
„18“ USA (Chicago)	41	0,21	0,15	1,58	0,98	0
„19“ Schweiz	36	0,33	0,15	0,06	1,00	0
„19“ Dtl.	40	0,24	0,17	0,16	1,13	0
„19“ Belgien	38	0,28	0,18	0,02	0,95	0
„19“ Irland	40	1,50	0,16	0,05	0,82	0
„19“ Polen	36	0,29	0,17	0,05	0,76	0
„19“ Tschechien	43	0,60	0,17	0,02	0,89	0
„19“ USA (Washington)	39	0,17	0,16	0,45	0,93	0
„19“ USA (Chicago)	34	0,38	0,15	2,25	0,70	0
„1“ (S)	29	0,87	0,12	0,15	0,26	0
„2“ (S)	29	0,31	0,12	0,09	0,25	0
„3“ (S)	31	0,35	0,12	0,09	0,16	0
„4“ (S)	42	0,26	0,16	0,29	1,53	0,17
„5“ (S)	40	0,38	0,18	786,60	2,10	0,19
„6“ (S)	40	0,23	0,15	1,37	1,40	0,18
„7“ (S)	30	0,11	0,12	0,09	0,36	0
„8“ (S)	45	0,74	0,13	1,56	0,42	0,29
„11“ (S)	38	0,59	0,15	0,06	0,80	0
„12“ (S)	28	0,63	0,13	0,05	0,25	0
„13“ (S)	36	0,15	0,17	0,52	0,79	0
„14“ (S)	37	0,15	0,17	0,37	1,24	0
„15“ (S)	37	0,33	0,20	0,17	1,06	0
„16“ (S)	42	0,31	0,15	0,35	0,95	0
„17“ (S)	49	0,09	0,18	0,10	1,22	0

Fortsetzung Tabelle 14a.

	Benz- aldehyd [µg/g]	2-Ethyl-1- hexanol [µg/g]	Aceto- phenon [µg/g]	Menthol [µg/g]	Indol [µg/g]	3-Phenyl- propanol [µg/g]
„20“ (S)	32	0,47	0,15	0,07	0,88	0
„21“ (S)	37	0,27	0,16	0,19	0,92	0
„22“ (S)	30	0,06	0,13	0,03	0,78	0
„23“ (S)	44	0,65	0,17	0,06	0,81	0
„24“ (S)	35	0,81	0,19	7,23	1,16	0
„25“ (S)	36	0,54	0,16	5,86	0,93	0
„26“ (S)	34	0,26	0,16	0,07	1,17	0
„27“ (S)	42	0,32	0,18	0,10	0,97	0
„28“ (S)	29	0,28	0,15	0,07	0,69	0
„29“ (S)	43	0,17	0,17	6,77	1,38	0
„30“ (S)	56	0,54	0,24	0,08	0,52	0,58
„31“ (S)	34	0,39	0,15	1,17	0,73	0
„32“ (S)	37	1,31	0,16	0,40	0,65	0
Burley Malawi	94	0,11	0,38	0,05	1,51	0
Orient Griechenland	180	0,46	0,32	0,13	1,60	0
Virginia Zimbabwe	39	0,08	0,12	0,06	0,25	0
Virginia Dtl.	69	0,07	0,19	0,05	0,03	0
Korso Freiland	240	0,13	0,30	0,02	0,60	0
Korso Jungpflanzen	210	0,11	0,46	0,02	0,36	0
Referenzzig.2R4F	35	0,07	0,14	0,18	0,66	0
Rohtabakmischung 2	63	0,10	0,18	0,03	0,98	0

Für die Bewertung der festgestellten Konzentrationen wurde ein cut-off-Wert (Grenzwert) festgelegt, oberhalb dessen man von einer Aufstockung mit natürlichen Tabakinhaltsstoffen sprechen kann. Dieser Wert wurde berechnet aus dem Mittelwert + 3facher Standardabweichung der Konzentrationen der Rohtabake (Jungpflanzen ausgenommen), Rohtabakmischung und der Referenzzigarette.

Folgende cut-off-Werte ergeben sich:

Benzaldehyd: 226,5 µg/g

2-Ethyl-1-hexanol: 0,57 µg/g

Acetophenon: 0,52 µg/g

Menthol: 0,23 µg/g

Indol: 2,61 µg/g

Pyridin: 16,8 µg/g

Furfurylamin: 10,7 µg/g

Benzylalkohol: 26,9 µg/g

In den Tabellen 14a und 15 sind die nach diesen cut-off-Werten erhöhten Konzentrationen fett gedruckt. Einschränkend ist hier anzumerken, dass die Vergleichsbasis mit den bislang einbezogenen Rohtabaksorten noch zu gering ist. Es ist daher vorgesehen, weitere Rohtabaksorten zu untersuchen und danach eine erneute Auswertung vorzunehmen.

Aus Tabelle 14a geht klar hervor, dass die bereits natürlich im Tabak vorliegenden Substanzen Benzaldehyd, Acetophenon sowie Indol nicht aufgestockt werden. Bei Acetophenon treten nur geringfügige Konzentrationsschwankungen auf. Die ebenfalls

kleinen Konzentrationsunterschiede bei Benzaldehyd und Indol sind wahrscheinlich auf die Wachstumsbedingungen des Rohtabaks sowie dessen Trocknung und Verarbeitung zurückzuführen, da die Rohtabake und Jungpflanzen z. B. für Benzaldehyd etwas höhere Werte zeigen als die Zigaretten. Auch bei den Konzentrationen im Rohtabak treten kleinere Schwankungen auf. Die höchsten Konzentrationen liegen in unverarbeiteten, getrockneten Korso Freiland- und Korso Jungpflanzen vor. Letztere enthalten auch den höchsten Gehalt an Acetophenon. Allgemein unterscheiden sich die Konzentrationen von Benzaldehyd und Acetophenon zwischen Variationen einer Sorte nicht signifikant, wie am Beispiel der Sorten „1-3(S)“, „4-6(S)“ oder „13-14(S)“ (alles Variationen einer Marke) erkennbar ist. Für die Indol-Konzentration besitzt die Schweizer Zigarettenart „5“ mit 2,10 µg/g Zigaretten tabak den höchsten Wert, dies könnte die einzige Sorte sein, in der Indol zur Erzeugung einer bestimmten Geschmacksrichtung in geringer Menge hinzugefügt ist. Auffällig sind andererseits die sehr niedrigen Indol-Gehalte in den drei Varianten der Sorten „1-3(S)“, die auch keine weiteren, tabakfremden Zusatzstoffe aufweisen. Möglicherweise werden hier zur Zigarettenherstellung Indol arme Rohtabake (z. B. der Sorte Virginia Zimbabwe oder Virginia Deutschland) verwendet.

3-Phenylpropanol (Hydrozimmtalkohol) wurde mit der SIM-Methode außer in den als Vanille-Zigaretten deklarierten Sorten „8(S) und „30(S)“ auch in den Sorten „4-6(S)“ nachgewiesen, deren Konzentrationen liegen jedoch unter denen für die Vanille-Sorten. Als Zusatzstoff kann Hydrozimmtalkohol einen angenehm süßen Geruch und Geschmack verbreiten.

In Abb. 16 sind die jeweiligen Konzentrationen an 2-Ethyl-1-hexanol in den Sorten aus verschiedenen Ländern dargestellt.

2-Ethyl-1-hexanol erreicht durch Aufstockung seine höchsten Konzentrationen in den Sorten „9“ und „10“ aus der Schweiz (12,0 µg/g), Deutschland, Belgien und Irland (siehe Abb.16). Die Konzentration in Zigaretten ist um das bis zu 170 fache höher als in der Referenzzigarette (0,07 µg/g). In den amerikanischen Zigaretten dieser Sorten wird 2-Ethyl-1-hexanol eher nicht aufgestockt, die Konzentrationen entsprechen denen im Rohtabak. In den Sorten „9“ aus Peking, „19“ aus Irland und Tschechien ist 2-Ethyl-1-hexanol in geringerem Maße zugesetzt. Bei den Schweizer Sorten zeigen besonders die Sorten „1“, „24“ und „32“ erhöhte Konzentrationen an 2-Ethyl-1-hexanol.

Die Menthol-Gehalte in den (Nicht-Menthol-) Zigarettenarten verschiedener Herkunft werden in Abb. 17 gezeigt, wobei sie, wie bereits in den Scan-Messungen, für alle amerikanischen Sorten deutlich erhöht sind. Unter den Schweizer Sorten sind die Menthol-Konzentrationen für die Marken „6“, „8“, „13“, „14“, „16“, „31“ und „32“ erhöht (Konzentrationen zwischen 0,35 und 1,56 µg/g). Für die Sorten „24(S)“ und „25(S)“ (beides Varianten der selben Marke) und die „29(S)“ liegen die Menthol-Gehalte zwischen 5,86 und 7,23 µg/g. Das ist bis zu 100 fach mehr als im Durchschnitt in den Rohtabaken, und der Rohtabakmischung (Mittelwert: 0,07 µg/g) bzw. 40 mal mehr als in Referenzzigaretten (0,18 µg/g) gefunden wurde. Die Mentholkonzentration von der Marke „29(S)“ entspricht etwa 1% des Menthol-Gehaltes in der Menthol-Zigarette „5(S)“ (786,6 µg/g).

Menthol soll demnach auch in Nicht-Menthol-Zigaretten den Tabakgeschmack beeinflussen. In der Sorte „6(S)“ könnte es zusammen mit dem zugesetzten Thymol eine Geschmacksrichtung ausmachen. Der Menthol-Gehalt im Rohtabak und der Referenzzigarette ist unterschiedlich.

In Tabelle 14b sind die ermittelten Zusatzstoff-Konzentrationen der Schweizer Zigaretten den Angaben der Tabakindustrie und den erlaubten Konzentrationen in UK gegenübergestellt.

Die mit der entwickelten Methode festgestellten Konzentrationen in Schweizer Zigaretten liegen nur für Benzaldehyd über den genannten Maximalgrenzen, die in einer Veröffentlichung von Philip Morris Schweiz angegeben sind. Nach Vergleich mit den hier untersuchten Rohtabaken, liegen die Konzentrationen in Zigaretten jedoch deutlich unter denen der unbehandelten Tabake.

Die Maximalgrenzen der Tabakindustrie scheinen teilweise sehr hoch angesetzt zu sein oder in einer großen Spannweite angegeben, wenn man z.B. die hier gefundenen Höchstkonzentrationen von Menthol und Benzylalkohol mit den entsprechenden Angaben vergleicht (siehe oben).

Insgesamt ist bei der Beurteilung zu beachten, dass die untersuchten Verbindungen flüchtig sind und ein Teil davon verdampfen kann, so dass eine kleinere als die zugesetzte Menge gefunden wird.

2-Ethyl-1-hexanol

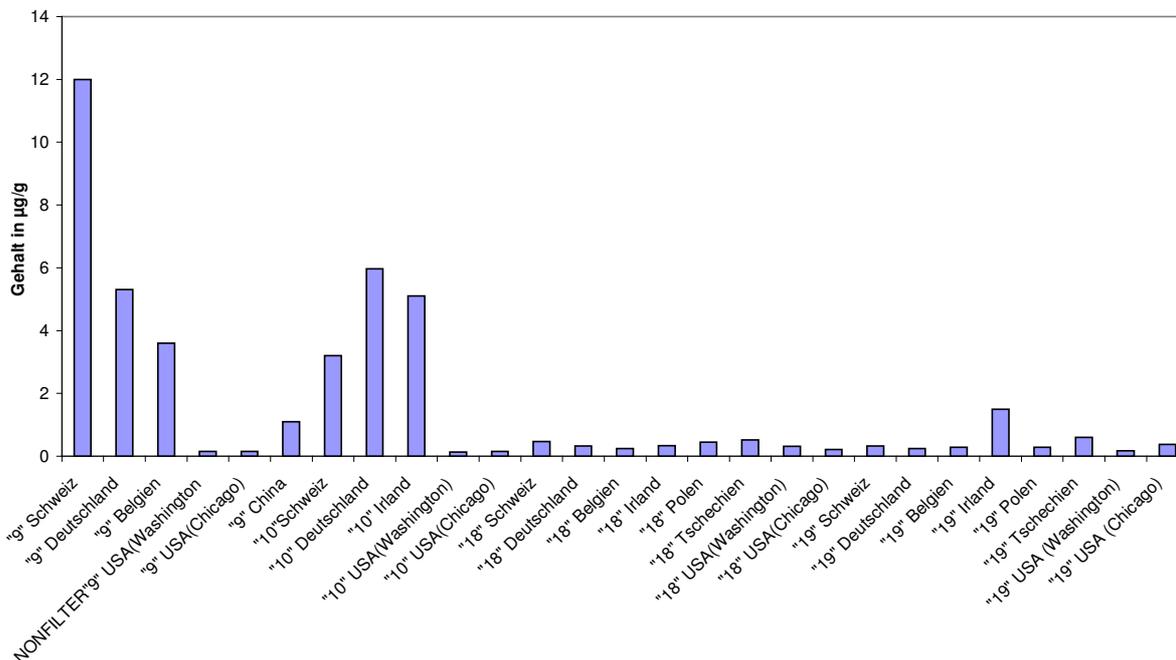


Abb. 16: Konzentration von 2-Ethyl-1-hexanol in Zigarettenarten verschiedener Herkunft

Menthol

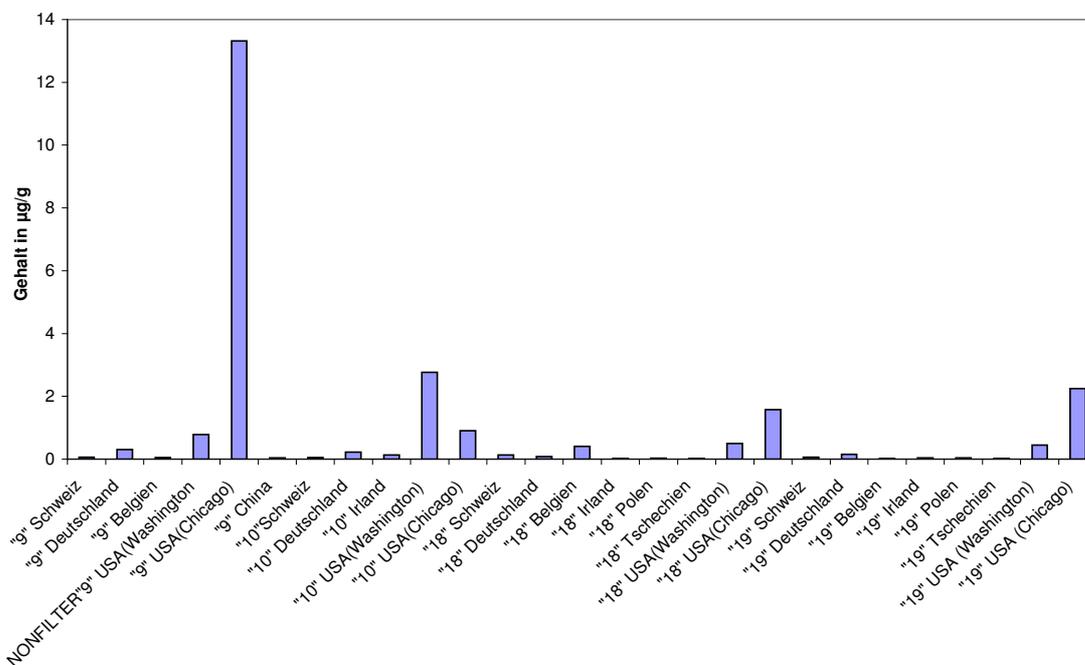


Abb. 17: Konzentration von Menthol in Zigarettenarten verschiedener Herkunft

Tabelle 15. Übersicht über die Konzentration der im basischen quantifizierten Substanzen in den einzelnen Sorten und Rohtabaken (erhöhte Konzentrationen fett gekennzeichnet)

	Pyridin [µg/g]	Furfurylamin [µg/g]	Benzylalkohol [µg/g]
„9“ Schweiz	9,97	6,48	11,36
„9“ Dtl.	6,35	4,81	15,27
„9“ Belgien	11,60	6,23	16,73
„9“ USA (Washington)	12,34	9,38	10,89
„9“ USA (Chicago)	8,73	8,92	14,01
„9“ Peking	19,06	7,51	12,46
“10” Schweiz	12,03	8,24	9,58
“10” Dtl.	14,63	8,74	8,90
“10” Irland	10,50	5,73	15,93
“10” USA (Washington)	10,23	11,07	7,86
“10” USA (Chicago)	8,92	12,52	9,74
“18” Schweiz	10,53	5,58	6,63
“18” Dtl.	9,19	5,61	7,23
“18” Belgien	7,59	5,68	7,9
“18” Irland	18,41	5,69	7,61
“18” Polen	8,20	6,94	10,23
“18” Tschechien	9,94	5,66	9,67
“18” USA (Washington)	13,00	8,35	7,39
“18” USA (Chicago)	14,13	5,74	7,30
“19” Schweiz	16,67	5,64	7,43
“19” Dtl.	14,45	6,10	6,69
“19” Belgien	7,60	5,85	7,96
“19” Irland	14,71	6,35	6,83
“19” Polen	6,81	5,27	8,47
“19” Tschechien	11,63	4,84	7,73
“19” USA (Washington)	13,34	7,67	6,59
“19” USA (Chicago)	9,54	6,48	6,59
“1” (S)	16,09	6,24	9,22
“2” (S)	13,75	4,39	8,40
“3” (S)	12,32	4,70	10,40
“4” (S)	15,19	3,64	24,49
“5” (S)	31,76	3,83	8,93
“6” (S)	18,36	3,69	10,75
” 7” (S)	34,88	8,48	9,61
” 8” (S)	20,39	7,95	27,09
” 11” (S)	20,61	5,62	8,66
” 12” (S)	26,82	7,10	10,60
” 13” (S)	21,17	4,08	7,27
” 14” (S)	24,01	5,57	3,76
” 15” (S)	19,79	5,25	6,85
” 16” (S)	25,30	4,67	9,73

Fortsetzung Tabelle 15.

	Pyridin [µg/g]	Furfurylamin [µg/g]	Benzylalkohol [µg/g]
„17“(S)	13,20	7,15	8,75
„20“(S)	20,06	6,82	7,72
„21“(S)	15,19	3,51	4,74
„22“(S)	16,92	6,01	5,96
„23“(S)	12,76	5,50	8,00
„24“(S)	19,00	7,67	12,00
„25“(S)	20,45	9,12	9,12
„26“(S)	13,64	5,64	7,18
„27“(S)	10,37	5,58	16,51
„28“(S)	13,17	5,52	7,92
„29“(S)	19,59	12,34	7,84
„30“(S)	17,54	18,80	40,82
„31“(S)	12,91	5,64	10,93
„32“(S)	10,15	5,40	10,33
Burley Malawi	4,56	0	7,89
Orient Griechenland	8,53	0,11	12,29
Virginia Zimbabwe	10,61	5,32	20,70
Virginia Dtl.	2,36	3,29	16,06
Korso Freiland	8,76	0	6,22
Virginia Jungpflanzen	3,45	0	6,96
Referenzzig.2R4F	11,03	6,34	8,06
Rohtabakmischung 2	7,54	4,77	7,30

Aus Tabelle 15 geht hervor, dass Pyridin, Furfurylamin und Benzylalkohol sowohl in der Referenzzigarette als auch im Rohtabak vorkommen. Aufgestockt scheint nur Benzylalkohol zu sein, da hier die Konzentrationsunterschiede zwischen Referenzzigarette bzw. Rohtabak und Zigaretten sehr groß sind. Die höchste Konzentration an Benzylalkohol tritt in den generell stark aromatisierten Zigaretten der Sorten „30(S)“, „8(S)“ und „4(S)“ auf. Bei diesen Sorten sind die Benzylalkohol-Konzentrationen 2,8 x - 4,6 x höher als die durchschnittliche Konzentration der übrigen Zigaretten (8,83 µg/g). Die höchsten Pyridin-Konzentrationen sind in den Sorten „7(S)“, „5(S)“, „12(S)“, „16(S)“ und „14(S)“ zu verzeichnen. Allerdings liegen diese Werte nur 1,5 x - 2,2 x über dem durchschnittlichen Pyridin-Wert (15,62 µg/g) der restlichen Zigaretten. Insgesamt sind die Pyridingehalte der Zigaretten deutlich höher als in den untersuchten Tabaken (18 von 32 untersuchten Sorten liegen über dem cut-off-Wert). Da bei drei der fünf hier angeführten Sorten auch der Nikotin- bzw. Gesamtalkaloidgehalt sehr hoch ist, kann man davon ausgehen, dass sich Pyridin möglicherweise als Vorstufe oder Abbauprodukt im Tabak befindet. Diese Theorie wird gestützt durch die Messergebnisse der Rohtabake. Bei Tabaksorten mit höherer Nikotinkonzentration ist auch die Pyridinkonzentration höher als in den nikotinärmeren Sorten (Abb.18).

Die Furfurylamin-Konzentrationen der gemessenen Zigarettenarten unterscheiden sich nur unwesentlich von dem Wert für die Referenzzigarette. Die höchste Konzentration ist auch hier in der stark aromatisierten Sorte „30(S)“ zu verzeichnen (18,80 µg/g). Die durchschnittliche Furfurylamin-Konzentration der übrigen Zigaretten liegt bei 6,05 µg/g. Furfurylamin kommt in einigen Rohtabaksorten und jungen Tabakpflanzen nicht vor, was daran liegen kann, dass dieses Amin erst in einer bestimmten Entwicklungsstufe der Pflanze oder während des Fermentationsprozesses entsteht.

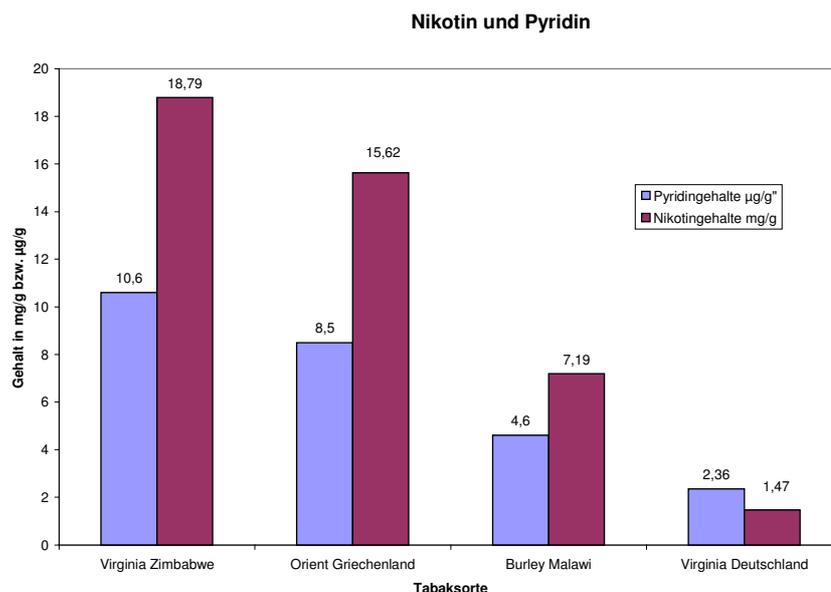


Abb. 18: Nikotin- und Pyridingehalte in Rohtabaksorten

Eine abschliessende Beurteilung der bis jetzt gemessenen Zusatzstoffkonzentrationen ist erst möglich, wenn weitere Rohtabakproben untersucht wurden, da z. Zt. noch zu wenig Vergleichsdaten vorhanden sind.

In weiteren Analysen werden Stoffe, die nicht natürlicherweise im Tabak vorkommen (z. B. Propylenglycol, Vanillin, Ethylvanillin, Anisaldehyd und 6-Methylcoumarin), untersucht. Die Ergebnisse werden dann im Bericht des Anschlussprojektes dargestellt.

4.4 Bedeutung der festgestellten Substanzen als Zusatzstoffe

Bei den in den untersuchten Zigaretten festgestellten Zusatzstoffen handelt es sich einerseits um Substanzen, die zum Zwecke der Herstellung hinzugefügt werden. Solche Verbindungen waren häufig und mit erhöhter Konzentration in den verschiedenen Sorten zu finden. Andererseits traten Substanzen, die der Zigarettemarke das gewünschte Aroma verleihen, eher sortenspezifisch auf. Bei den meisten festgestellten Verbindungen handelt es sich um Geschmacks- und Aromastoffe. Viele der Zusatzstoffe bilden während der Pyrolyse zusätzliche Kanzerogene, somit wird die ursprüngliche krebserregende Wirkung der Zigaretten noch erhöht.

Propylenglycol und Glycerol dienen zur Feuchthaltung des Tabaks, indem sie dessen Kapazität zur Feuchthaltung erhöhen. Propylenglycol mit einer maximalen Konzentration von 25 000 – 40 000 ppm pro Zigarette [17] kann jedoch bei der Pyrolyse Propylenoxid bilden, welches ein Kanzerogen ist. Glycerol (max. 40 000 ppm in Schweizer Philip-Morris-Zigaretten [17]) bildet beim Verbrennen Acrolein und Acetaldehyd.

N-Propyl-p-hydroxybenzoat (500 - 2000 ppm in Schweizer Philip-Morris-Zigaretten [17]) kommt in 9 Sorten als Konservierungsmittel zum Einsatz. **Triacetin** (max. 300 ppm in British American Tobacco Produkten [20]) wird als Lösungsmittel für Aromastoffe in 29 der 32 Schweizer Sorten verwendet. Es kann daher als ein Marker für die Zugabe von Aromastoffen angesehen werden.

Benzylbenzoat (max. 1 - 3 ppm in Australischen Zigaretten [18; 19]) und **Methylsalicylat** (max. 2,5 ppm in British American Tobacco Zigaretten, UK [20]) werden als Aroma- und Geschmacksstoff eingesetzt. Benzylbenzoat dient als Lösemittel für Riechstoffe und Cellulosederivate, als Weichmacher und Campherersatz in Celluloid. Weiterhin wird es als

Fixateur in der Parfümerie verwendet [22]. Benzylbenzoat besitzt blutgefäßerweiternde, krampflösende Eigenschaften und wird auch als Krätze- und Entlausungsmittel benutzt [22]. Sowohl Benzylbenzoat als auch Methylsalicylat bilden als Pyrolyseprodukt Phenol [18; 20]. **Phenylethanol** (40 ppm in British American Tobacco Produkten [20]) ist eine blumig riechende Substanz, die als Lösungsmittel für fette Öle, Ethylcellulose, natürliche und synthetische Harze und in der Parfümerie verwendet wird [22]. Während der Verbrennung kann sich Styrol bilden.

Methylcinnamat (20 ppm in British American Tobacco Produkten[18; 20]) ist ein Aromastoff, der angenehm fruchtig und erdbeerartig riecht. Er ist Hauptbestandteil des ätherischen Öls von Campherbasilikum und des Wurzelöls der Galgantwurzel [22]. Alle gefundenen **Zimtverbindungen** (Zimtaldehyd, Zimtalkohol und Hydrozimtalkohol) werden als Aromen vor allem Vanille-Zigaretten zugesetzt, können aber ebenfalls (durch Decarboxylierung) Styrol erzeugen, das im Verdacht steht, Krebs zu erregen.

Die in einigen Sorten in erhöhter Konzentration gefundenen Amine (**Furfurylamin, Phenylethylamin und 3-Methylbutylamin**) könnten ebenfalls zur Geschmacksbildung zugegeben werden oder den durch sie hervorgerufenen Geschmack verstärken. Phenylethylamin (=β-Phenylethylamin) kommt im Bittermandelöl und in Schokolade vor und wird als Stammsubstanz der Catecholamine mit dem Entstehen von Lust- und Glücksempfinden in Verbindung gebracht [22].

γ-Nonalacton (max. 1 ppm in Australischen Zigaretten, max. 10 ppm in British American Tobacco Produkten [18; 20] mit Trivialnamen Kokosaldehyd wird zur Erzielung von Kokos- und Aprikosennoten verwendet [22].

γ-Undecalacton (Pfirsichaldehyd, max. 1 ppm in Schweizer und Australischen Philip Morris Zigaretten bzw. max. 10 ppm in British American Tobacco Produkten[17; 19; 20]) besitzt fruchtiges, pfirsichartiges Aroma und wird zu Vanille-Zigaretten zugesetzt. Spezifische Pyrolyseprodukte sind nicht bekannt. Es wird als Aromastoff für Getränke, Süßspeisen, Speiseeis, Back- und Zuckerwaren und zur Aromatisierung von Kaugummi und Tabakwaren verwendet [22].

Für **Benzylalkohol** gibt Philip Morris maximale Konzentrationen von 100 ppm (Schweiz) bzw. 1000 ppm (Australien) pro Zigarette an. In British American Tobacco Produkten liegt die nicht überschrittene Menge an Benzylalkohol bei 1700 ppm bzw. für Australien bei 1 ppm [17-20]. Diese schwach aromatisch riechende Substanz ist bis zu 6 % in Jasminblütenöl, aber auch in Nelkenöl, Goldlacköl, Tuberosenöl, Peru- und Tolubalsam enthalten. Es wird als Riechstoff, in Lacken, Farben und als Entwicklungsbeschleuniger in der Filmindustrie verwendet. In der Pharmazie findet es Anwendung als Lokalanästhetikum und zur Konservierung von Parenteralia [22].

Für **Benzaldehyd** ist ein maximaler Gehalt von 1 ppm in Schweizer Philip Morris Zigaretten bzw. 60 ppm in British American Tobacco Produkten [17; 20] angegeben. Für **Acetophenon** wird 1 ppm in Schweizer Philip Morris Zigaretten bzw. 45 ppm in British American Tobacco Produkten pro Zigarette [17; 20] als maximale Konzentration, für **3-Phenylpropanol (=Hydrozimtalkohol)** 1 ppm in British American Tobacco Produkten pro Zigarette [20], für **Menthol** 5000 ppm in Schweizer Philip Morris Zigaretten [17] bzw. 6000 – 8000 ppm in Australischen Zigaretten [18; 19] und max. 20 000 ppm in British American Tobacco Produkten [20] pro Zigarette angegeben. Alle der genannten Verbindungen riechen angenehm und werden sowohl in der Aromaindustrie als auch in der Parfümerie verwendet.

Zu **2-Ethyl-1-hexanol** (=Isooctanol) als Zusatzstoff ist nur bekannt, dass es einen charakteristischen Geruch besitzt und als Lösungsmittel für Harze, Wachse, Fette, Öle benutzt wird und als Entschäumer, Dispergiermittel für Pigmente und zur Synthese von Phtalaten verwendet wird [22]. Angaben der Zigarettenindustrie über die Verwendung als Zusatzstoff fehlen.

Für den Zusatz von **Indol** wurde vom Departement of Health, London eine maximale Obergrenze von 1 ppm festgelegt. Indol ist leicht flüchtig mit Wasserdampf und riecht angenehm frisch und blumig. Es kommt natürlicherweise in Jasminöl, Neroliöl, Goldlackblütenöl und in Blüten der falschen Akazie vor. Verwendung findet diese Substanz vor allem in der Parfümindustrie zur Herstellung besonderer Düfte [22].

Isopulegol ist eine vom Menthol abgeleitete Verbindung, die einen Mintgeschmack besitzt. **Thymol** kommt mit seinem Isomer **Carvacrol** in Thymian-, Majoran-, Origanum-Arten vor, wirkt stark antiseptisch (stärker als Phenol) und besitzt einen würzigen, thymianartigen Geruch. Es findet vielfach Anwendung in der Pharmazie, u.a. bei Verdauungsstörungen und Bronchitis [22]. Zu Zigaretten werden maximal 10 ppm Carvacrol bzw. 0,5 ppm Thymol zugesetzt (British American Tobacco, UK [20]).

5-Hydroxymethylfurfural ist eine Verbindung mit kamilleähnlichem Geruch, die mit Wasserdampf flüchtig ist und an Luft und Licht einer raschen Autoxidation unterliegt. Es entsteht bei der Holzverzuckerung aus Fructose und Melasse und gilt als Marker für Kunsthonig (entsteht bei der Inversion von Saccharose) [22].

Das süßlich riechende **Piperonal** kommt in Veilchen-, Mädelsüß- und Robinienblüten vor und wird in der Seifenherstellung, Parfümerie und als Glanzzusatz beim Verzinken verwendet [22]. Die maximalen Konzentrationen in Zigaretten sind nach Herstellerangaben 5 ppm (Philip Morris Australien und Philip Morris Schweiz [17; 19]) bzw. 79 ppm (British American Tobacco, Australien [18]).

Viele Phenylethylester sind Riech- und Aromastoffe. **Ethylphenylacetat** besitzt z.B. einen frischen rosenartigen Duft [22] und wird zu Zigaretten in den maximalen Konzentrationen von 1 ppm (British American Tobacco und Philip Morris Australien [18; 19] bzw. 30 ppm (British American Tobacco UK [20] zugesetzt.

6-Methylcumarin (=Toncarin), was in Zigarette „8(S)“ nachgewiesen wurde, ist ein synthetischer Riechstoff mit kokosartigem, waldmeisterähnlichem Geruch [22]. Angaben zu verwendeten Konzentrationen als Zusatzstoff fehlen in den hier zitierten Quellen.

Vanillin besitzt einen starken, charakteristisch süßen Geruch und kommt natürlicherweise in Vanille-Schoten, Styrax, Nelkenöl, in Blüten der Schwarzwurzel, der Kartoffel, des Spierstrauches und in verschiedenen Lebensmitteln (Milch, Reiswein) vor. Es dient neben **Ethylvanillin**, anstelle der teuren natürlichen Vanille, als Gewürz in der Lebensmittelindustrie, Duftstoff in Kosmetika und Parfums sowie als Geschmackskorrigenz in Pharmazeutika [22]. Beide Substanzen werden in relativ hohen Konzentrationen in der Zigarettenherstellung verwendet: Vanillin: 88 ppm (British American Tobacco Australien), 100 ppm (Philip Morris Australien), 100 ppm (Philip Morris Schweiz) und 864 ppm (British American Tobacco UK) ; Ethylvanillin: 1 ppm (British American Tobacco Australien), 5 ppm (Philip Morris Australien), 10 ppm (Philip Morris Schweiz) und 250 ppm (British American Tobacco UK) [17-20].

4.5 Ergebnisse der Tabakalkaloidbestimmung

Die Strukturformeln der für die Untersuchungen ausgewählten Tabakalkaloide sind in Abb. 19 dargestellt. Zusätzlich wurde Cotinin mit aufgeführt, das in deuterierter Form (Cotinin-d₃) als innerer Standard angewendet wurde. Cotinin ist gleichzeitig der Hauptmetabolit des Nikotins im menschlichen Stoffwechsel. Es handelt sich in allen Fällen um stark basische Verbindungen, so dass alkalische Bedingungen für die Analyse sinnvoll sind.

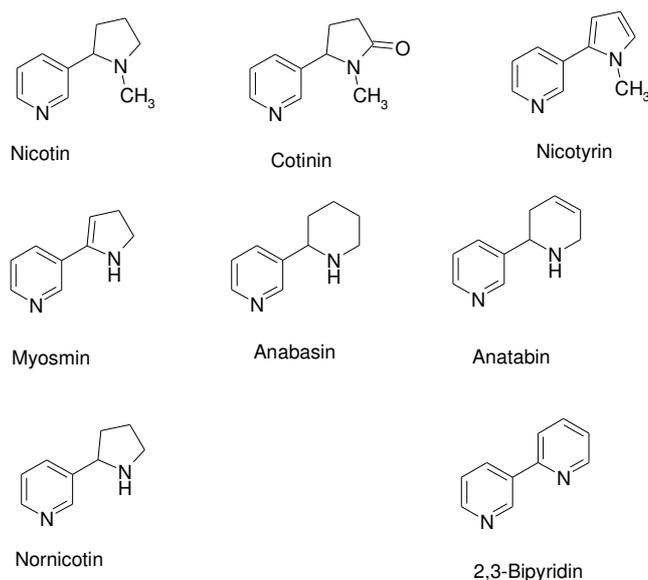


Abb. 19: Strukturformeln einiger wichtiger Tabakalkaloide und des Nikotin-Hauptmetaboliten Cotinin

Aus der Literatur ist bekannt, dass der natürliche Gehalt der Nebenalkaloide zum Teil um Größenordnungen unter dem des Nikotins liegt (s. Tab. 16). Zunächst wurde trotzdem versucht, Nikotin und die Nebenalkaloide in einem einzigen Analysengang zu bestimmen. Ein solches Chromatogramm ist in Abb. 20 dargestellt.

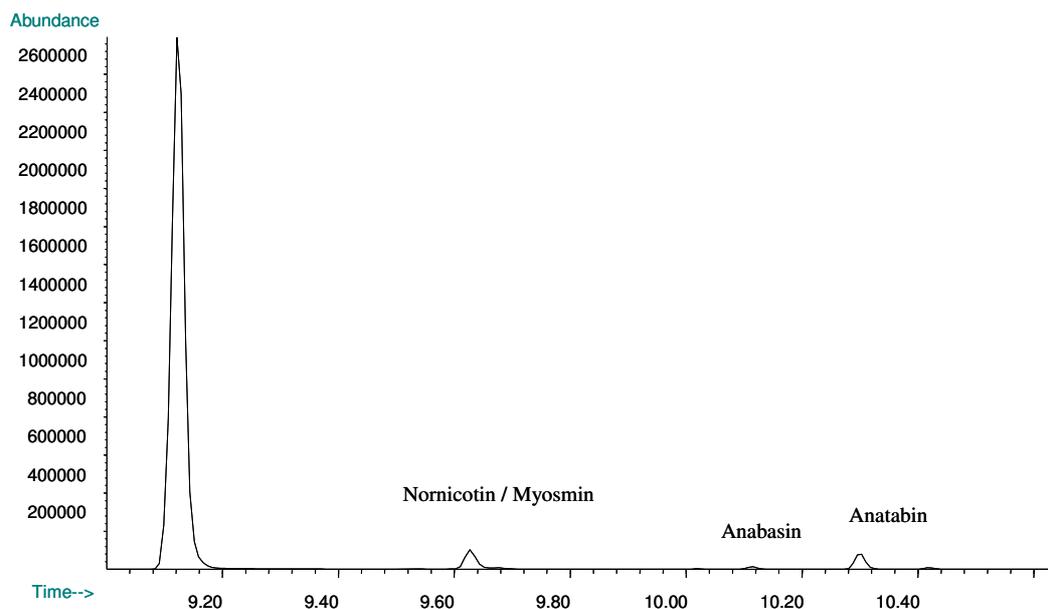


Abb. 20: Chromatogramm des verdünnten Ether-Extraktes der Zigarettenart „29“(S)

Obwohl qualitativ alle interessierenden Verbindungen nachweisbar waren, ergaben sich Probleme dadurch, dass die Extrakte stark verdünnt werden mussten, um einerseits eine Überladung der Säule beim Nikotin zu vermeiden und andererseits die Mengen an teurem deuteriertem Standard nicht zu hoch werden zu lassen. Unter diesen Bedingungen erwies sich jedoch die Empfindlichkeit für die Nebenalkaloide für eine sichere Bestimmung als zu gering. Daher wurden Nikotin und die Nebenalkaloide in getrennten Analysengängen bestimmt. Typische Chromatogramme für diese getrennte Probenaufbereitung sind in Abb. 21 für die Bestimmung von Nikotin und in Abb. 22 für die Nebenalkaloide dargestellt. Die Kalibration zeigte in allen Fällen einen linearen Verlauf (siehe Kalibrationsgleichungen Tab. 5 in Abschnitt 3.4.2.2). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden aus dem dreifachen bzw. zehnfachen Rauschen der Grundlinie abgeschätzt und sind in Tabelle 16 den erwarteten Konzentrationen gegenübergestellt.

Tabelle 16. Erwartungswerte für die Tabakalkaloidkonzentrationen aus der Literatur [23-25] sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen LOD und LOQ des verwendeten Analyseverfahrens

	Nikotin	Normikotin	Nicotyrin	Anabasin	Anatabin	2,3-Bipyridin	Myosmin
LOD (mg/g)	0,0006	0,1	0,03	0,018	0,05	0,05	0,002
LOQ (mg/g)	0,002	0,3	0,1	0,06	0,15	0,15	0,006
Erwartungswerte (mg/g)	13-21	0,4-1,5	0,45	0,06-0,12	0,3-0,9	0,06	0,03-0,09

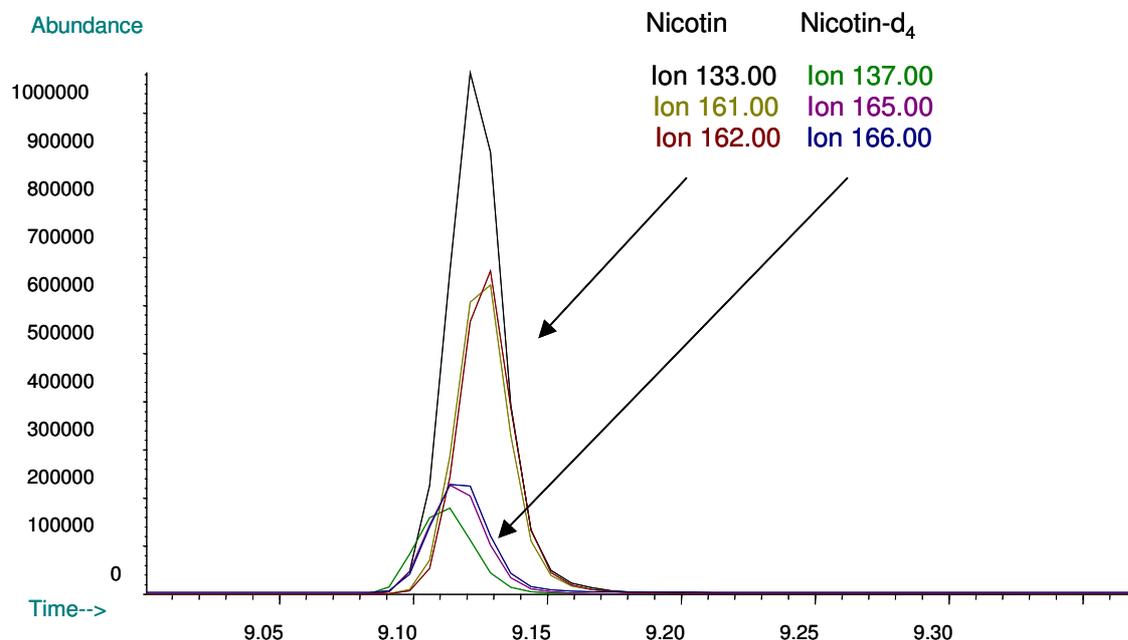


Abb. 21: Chromatogramm der Analyse von Nikotin aus der Zigaretten Sorte „29(S)“. Es ergibt sich eine Konzentration von 19,04mg/g.

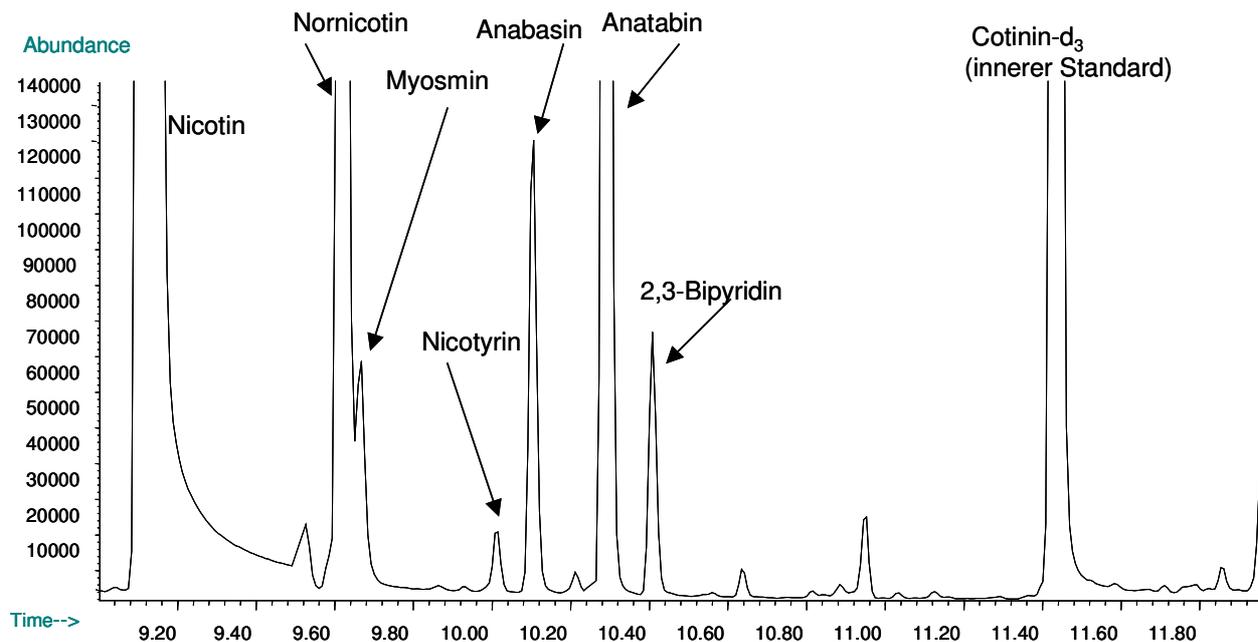


Abb. 22: Chromatogramm der Zigarettensorte „29(S)“ zur Bestimmung der Begleitalkaloide. Die Konzentrationen betragen in diesem Fall: Nornikotin 1,14 mg/g, Myosmin 0,011 mg/g, Nicotyryl 0,27mg/g, Anabasin 0,18 mg/g, 2,3-Bipyridin 0,1 mg/g.

Die in Abschnitt 3.4.2.2 genannte Methode wurde auf die in Abschnitt 3.4.2.1 genannten Zigarettensorten angewendet. Es wurden in allen Fällen auswertbare Chromatogramme erhalten. Von jeder Sorte wurden zwei Zigaretten untersucht. Die Ergebnisse stimmten im Rahmen der üblichen Toleranzen gut überein, und in den Tabellen sind die Mittelwerte angegeben. Die durchschnittliche Abweichung der einzelnen Messwerte der Doppelbestimmung ($n = 45$) vom Mittelwert beträgt für Nikotin 8,4%, Nornikotin 20,3%, Myosmin 14,2%, Nicotyryl 8,0%, Anabasin 10,7%, Anatabin 11,2% und 2,3-Bipyridin 5,9%. Die Standardabweichung der interday-Wiederholbarkeit (4 Messungen an unterschiedlichen Tagen) beträgt durchschnittlich für Nikotin 8,1%, Nornikotin 7,9%, Myosmin 12,7%, Nicotyryl 15,2%, Anabasin 5,1%, Anatabin 10,0% und 2,3-Bipyridin 9,5%. Die festgestellten Konzentrationen sind in den Tabellen 17-19 dargestellt. Zum Vergleich sind in allen Tabellen Literaturwerte angegeben, die aus [23-25] entnommen wurden. Weiterhin wurden die vom Hersteller auf den Packungen deklarierten nach der FTC/ISO-Methode ermittelten Nikotinmengen im Rauch einer Zigarette aufgeführt. Gegenwärtig werden Zigarettenwerte in der EU mit Messverfahren gemäss der Internationalen Normierungsorganisation (International Standards Organisation, ISO) gemessen. Das ISO-Verfahren ist praktisch identisch mit dem in den Vereinigten Staaten gebräuchlichen Verfahren der Federal Trade Commission (FTC). Beide Verfahren sind von der Tabakindustrie entwickelt worden. Die Werte werden gemessen, indem eine Rauchmaschine alle 60 Sekunden einen Zug von 35 cm^3 über zwei Sekunden hinweg einzieht, bis die Zigarette auf eine festgelegte Stummellänge heruntergebrannt ist. Sowohl die Tabakindustrie, als auch die FTC räumen mittlerweile ein, dass diese Messung nicht dem tatsächlichen Rauchverhalten eines wirklichen Rauchers entspricht. Die FTC/ISO-Methode dient der Bestimmung des Nikotingehaltes im Rauch, wobei nur das partikelgebundene Nikotin, keinesfalls aber die freie Base, d.h. in der Gasphase befindliches Nikotin, erfasst wird. Gerade letzteres ist aber hauptsächlich für die Wirkung zuständig.

Beim Vergleich der Werte muss beachtet werden, dass sich die von uns ermittelten analytischen Werte auf 1 g Material und die Nikotingaben der Hersteller auf eine Zigarette (in der Regel 0,6-0,8 g Tabak) beziehen. Die in den Tabellen jeweils maximalen und minimalen

Werte sind invers auf dunklem Grund gedruckt. In jeder Tabelle wurde die Referenzzigarette ebenfalls zum Vergleich hinzugefügt.

Die gemessenen Konzentrationen lassen sich wie folgt interpretieren:

Nikotin- und Begleitalkaloidgehalte schwanken, je nach Zigarettenart, bedingt durch verwendete Tabaksorten und Zusammensetzung der Zigarette.

Die festgestellten Nikotingehalte liegen bis auf wenige Ausnahmen im Bereich der Literaturangaben. Besonders hohe Werte wurden lediglich bei der Marke „12“ (aus der Schweiz) gemessen, die aber bereits wegen des hohen deklarierten Gehaltes im Rauch auffällt.

Es gibt keine gravierenden Unterschiede zwischen den in Deutschland und den in der Schweiz gekauften Zigaretten. Bei den sechs Sorten, die aus beiden Ländern untersucht wurden, waren in je zwei Deutschen und zwei Schweizer Sorten höhere Nikotingehalte, besonders gute Übereinstimmung der Werte ergaben sich bei den Sorten „1“ und „3“.

Einige Sorten wurden sowohl in der Schweiz als auch in Deutschland gekauft. Für diese sind die Konzentrationen der deutschen Zigaretten zusätzlich kursiv in der Tabelle 17 direkt unter den Spalten für die entsprechenden Schweizer Zigaretten hinzugefügt. Die Werte stimmen meist sehr gut überein oder liegen im Bereich der üblichen Toleranzen. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Deutschen Zigaretten aufgeführt.

Es besteht keine Proportionalität zwischen der deklarierten Nikotinmenge im Rauch (nach ISO/FTC) und den bestimmten Nikotinkonzentrationen im Tabak. Offensichtlich gibt es bei den Rauchmaschinen von Sorte zu Sorte Unterschiede in der Freisetzung des Nikotins, in der Absorption durch das Zigarettenfilter oder in der Effektivität der Bestimmung der analytischen Bestimmung beim Rauchversuch.

Die Konzentrationen der Nebenalkaloide liegen bei allen Sorten um eine bis drei Zehnerpotenzen unter denen des Nikotins und stimmen damit auch recht gut mit den Literaturangaben überein. Sowohl die absoluten Konzentrationen als auch deren Relation zum Nikotin schwanken sehr stark.

Die Mittelwerte der Konzentrationen an Nikotin und an den Nebenalkaloiden stimmen recht gut mit denen der Referenzzigarette überein.

Die selbst angebauten Tabaksorten (Tabelle 19) liegen in den Konzentrationen sowohl für das Nikotin als auch für die Nebenalkaloide deutlich unter denen der Zigarettenarten. Dies ist aber wohl hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass es sich teilweise um Jungpflanzen handelte, und dass die klimatischen Bedingungen nicht für hohe Nikotinbildung optimal waren. Auch bei den Roh-tabaksorten einer Tabakfabrik (Tabelle 19) gibt es beträchtliche Unterschiede. Besonders stechen die Differenzen zwischen beiden Virginiasorten aus Zimbabwe und Deutschland hervor, was wiederum mit dem Klima und den Bodenverhältnissen zusammenhängen könnte. Das betrifft vor allem das Nikotin und weniger die Nebenalkaloide.

Insgesamt gehen aus diesen Untersuchungen keine Hinweise für die Aufstockung des Alkaloidgehaltes durch zusätzliches Nikotin oder Hinzufügen einzelner Nebenalkaloide hervor. Damit kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass z. B. dem rekonstituierten Tabak alkaloidreicher Tabakextrakt zugesetzt wurde. Die gemessenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Sorten lassen sich durch die natürlichen Schwankungen im Tabak erklären. Je nach Tabakart schwankt der Gehalt an Nikotin in den Pflanzen allgemein zwischen 0,1% und 7%, abhängig vom Pflanzenabschnitt. Es ist bekannt, dass eine Zigarette nur aus 45-55% Tabak besteht, der Rest sind Zusatzstoffe, „reconstituted tobacco“ und „expanded tobacco“.

Tabelle 17. Konzentrationen von Tabakalkaloiden [mg/g] in 32 Schweizer Zigarettenarten (grau unterlegt: kleine Werte, schwarz markiert: hohe Werte)

Literaturangaben [mg/g]:	Nikotin 13-21	NorNikotin 0,4-1,5	Myosmin 0,03-0,09	Nicotyrin 0,45	Anabasin 0,06-0,12	Anatabin 0,3-0,9	2,3-Bipyridin 0,06	Gesamt- alkaloidgehalt	Angebaben des Herst. Nikotin [mg]
„7“ (S)	22,72	0,8	0,005	0,13	0,21	1,13	0,11	25,11	0,7
„7“ (D)	22,14	1,04	0,0089	0,16	0,24	1,32	0,13	25,04	
„18“ (S)	14,97	0,82	0,0106	0,13	0,15	0,75	0,12	16,95	0,9
„18“ (D)	18,59	1,09	0,018	0,20	0,18	0,95	0,16	21,20	
„19“ (S)	16,48	1,2	0,015	0,17	0,21	1,11	0,14	19,33	0,5
„19“ (D)	18,11	1,07	0,0175	0,22	0,18	0,87	0,15	20,61	
„20“ (S)	19,22	1,13	0,013	0,16	0,22	1,13	0,14	22,01	0,3
„23“ (S)	18,91	1,41	0,0139	0,10	0,19	1,05	0,13	21,81	0,5
„24“ (S)	18,85	0,73	0,0077	0,14	0,17	0,93	0,09	20,92	0,4
„25“ (S)	19,2	0,84	0,0152	0,25	0,19	1	0,16	21,66	0,7
„9“ (S)	20,25	1,07	0,0097	0,11	0,2	1,15	0,1	22,89	0,9
„9“ (D)	19,52	1	0,013	0,18	0,2	1,09	0,14	22,13	
„10“ (S)	14,06	0,82	0,0069	0,09	0,16	0,94	0,08	16,17	0,5
„13“ (S)	19,37	1,52	0,0289	0,27	0,23	1,23	0,24	22,89	0,6
„14“ (S)	19,62	1,17	0,0101	0,09	0,18	1,08	0,12	22,28	0,4
„16“ (S)	21,67	1,84	0,017	0,11	0,21	1,18	0,13	25,17	1
„17“ (S)	20,35	1,69	0,015	0,11	0,17	0,99	0,13	23,46	0,5
„31“ (S)	19,58	1,05	0,0126	0,12	0,19	1,07	0,12	22,14	0,3

Fortsetzung Tabelle 17.

Literaturangaben [mg/g]:	Nikotin 13-21	NorNikotin 0,4-1,5	Myosmin 0,03-0,09	Nicotyrin 0,45	Anabasin 0,06-0,12	Anatabin 0,3-0,9	2,3-Bipyridin 0,06	Gesamt- alkaloidgehalt	Angaben des Herst. Nikotin [mg]
„21“ (S)	13,08	0,77	0,0206	0,26	0,14	0,66	0,19	15,12	0,5
„1“(S)	18,13	0,67	0,003	0,08	0,18	0,97	0,09	20,12	1,4
„1“(D)	18,69	0,78	0,0053	0,10	0,19	1,06	0,09	20,93	
„3“(S)	22,7	0,73	0,0033	0,075	0,19	1,02	0,09	24,80	0,6
„3“(D)	22,32	0,76	0,0051	0,11	0,2	1,15	0,09	24,64	
„2“(S)	18,88	0,64	0,003	0,08	0,18	0,97	0,09	20,84	0,9
„27“(S)	20,09	1,59	0,02	0,21	0,23	1,22	0,15	23,50	0,1
„27“(D)	18,35	1,28	0,019	0,24	0,2	1,1	0,14	21,33	
„28“ (S)	21,44	1,19	0,0147	0,17	0,22	1,11	0,14	24,29	0,4
„26“ (S)	14,92	0,54	0,0106	0,13	0,16	0,83	0,12	16,71	0,3
„12“(S)	27,72	0,93	0,0059	0,15	0,27	1,44	0,12	30,64	1,2
„6“ (S)	21,23	1,94	0,0402	0,36	0,26	1,37	0,29	25,49	0,4
„4“(S)	23,5	1,3	0,025	0,22	0,2	1,02	0,19	26,46	0,1
„5“ (S)	16,09	1,58	0,0193	0,15	0,2	1,04	0,17	19,25	0,4
„30“ (S)	15,55	0,83	0,0047	0,075	0,18	0,93	0,1	17,67	0,7
„29“ (S)	19,04	1,14	0,0112	0,13	0,18	1,08	0,1	21,69	0,1
„11“ (S)	17,01	0,92	< 0,001	0,18	0,19	0,86	0,16	19,33	0,5

Fortsetzung Tabelle 17.

<i>Literaturangaben [mg/g]:</i>	Nikotin 13-21	NorNikotin 0,4-1,5	Myosmin 0,03-0,09	Nicotyrin 0,45	Anabasin 0,06-0,12	Anatabin 0,3-0,9	2,3-Bipyridin 0,06	Gesamt- alkaloidgehalt	Angaben des Herst. Nikotin [mg]
„8“ (S)	16,95	0,97	0,0057	0,08	0,21	1,05	0,12	19,39	0,6
„15“ (S)	20,16	1,14	0,011	0,09	0,17	1,04	0,12	22,73	0,7
„22“ (S)	16,27	1,2	0,0283	0,43	0,26	1,19	0,26	19,65	0,5
„32“ (S)	15,37	0,76	0,0136	0,22	0,18	0,94	0,16	17,63	0,4
Referenz 2R4F	20,64	1,18	0,0122	0,16	0,16	0,9	0,12	23,08	
Mittelwerte ohne 2R4F	18,86	1,09	0,014	0,16	0,20	1,05	0,14	21,50	

Tabelle 18. Konzentrationen von Tabakalkaloiden [mg/g] in 20 Zigarettenarten, die im September 2003 in Berlin gekauft wurden (grau markiert: kleine Werte, Schwarz markiert: hohe Werte).

<i>Literaturangaben:</i>	Nikotin 13-21	NorNikotin 0,4-1,5	Myosmin 0,03-0,09	Nicotyrin 0,45	Anabasin 0,06-0,12	Anatabin 0,3-0,9	2,3-Bipyridin 0,06	Gesamt- alkaloidgehalt	Angaben des Herstellers Nikotin (mg)
„7“ (D)	22,14	0,68	0,005	0,16	0,15	0,99	0,08	24,10	0,9
„18“ (D)	18,97	1,09	0,018	0,20	0,18	0,95	0,16	21,58	0,8
„19“ (D)	17,70	1,07	0,018	0,21	0,18	0,87	0,15	20,21	0,5
D1	19,76	1,12	0,020	0,21	0,22	1,07	0,18	22,58	0,8

Fortsetzung Tabelle 18.

<i>Literaturangaben:</i>	Nikotin 13-21	NorNikotin 0,4-1,5	Myosmin 0,03-0,09	Nicotyrin 0,45	Anabasin 0,06-0,12	Anatabin 0,3-0,9	2,3-Bipyridin 0,06	Gesamt- alkaloidgehalt	Angaben des Herstellers Nikotin (mg)
D2	20,10	1,69	0,019	0,11	0,20	1,09	0,12	23,33	0,8
D3	20,40	1,31	0,018	0,09	0,15	0,98	0,10	23,05	0,8
D4	17,02	1,13	0,020	0,21	0,22	1,08	0,18	19,87	0,8
D5	18,76	0,34	0,008	0,10	0,08	0,52	0,06	19,86	0,9
D6	19,93	1,00	0,013	0,17	0,20	1,09	0,14	22,55	0,9
„9“ (D)	20,52	1,30	0,012	0,11	0,18	1,04	0,10	23,26	0,9
D7	16,87	0,88	0,015	0,10	0,09	0,62	0,08	18,66	0,8
D8	17,66	0,98	0,012	0,14	0,15	0,80	0,10	19,84	0,6
„27“ (D)	18,35	1,28	0,019	0,24	0,20	1,10	0,14	21,33	0,1
D9	16,82	0,92	0,011	0,13	0,16	0,83	0,11	18,98	0,6
D10	19,33	0,49	0,010	0,035	0,09	0,63	0,07	20,66	0,8
„1“ (D)	18,69	0,78	0,005	0,10	0,19	1,06	0,09	20,93	1,4
„3“ (D)	22,32	0,76	0,005	0,11	0,20	1,15	0,09	24,64	0,6
D11	23,27	1,45	0,011	0,15	0,26	1,47	0,10	26,72	0,9

Fortsetzung Tabelle 18.

<i>Literaturangaben:</i>	Nikotin 13-21	NorNikotin 0,4-1,5	Myosmin 0,03-0,09	Nicotyrin 0,45	Anabasin 0,06-0,12	Anatabin 0,3-0,9	2,3-Bipyridin 0,06	Gesamt- alkaloidgehalt	Angaben des Herstellers Nikotin (mg)
D12	19,35	1,26	0,012	0,15	0,18	0,99	0,11	22,04	0,7
D13	18,78	0,76	0,007	0,13	0,17	0,91	0,08	20,84	0,9
Referenz 2R4F	20,64	1,18	0,012	0,12	0,16	0,9	0,12	23,12	k.A.
Mittelwerte	19,34	1,01	0,013	0,14	0,17	0,96	0,11	21,75	

Tabelle 19. Konzentrationen von Tabakalkaloiden [mg/g] in selbst angebautem Tabak und in Rohtabakproben einer Zigarettenfabrik**Selbst angebauter Tabak**

<i>Literaturangaben [mg/g]</i>	Nikotin 13-21	Nornikotin 0,4-1,5	Myosmin 0,03-0,09	Nicotyrin 0,45	Anabasin 0,06-0,12	Anatabin 0,3-0,9	2,3-Bipyridin 0,06	Gesamt- alkaloidgehalt
Virginia Jungpfl. 4 Wochen alt	1,63	0,20	< 0,001	0,04	0,02	0,17	0,0160	2,08
Deutersheimer Korso Jungpfl. 4Wo alt	3,47	0,34	0,0015	0,05	0,03	0,34	0,0215	4,25
Virginia im Topf gezogen	4,08	0,72	0,0083	0,075	0,05	0,31	0,0426	5,29
Korso Freiland	9,99	1,17	0,0070	0,075	0,05	0,61	0,03	11,94

Fortsetzung Tabelle 19.

Rohtabakproben einer
Tabakfabrik

	Nikotin	Nornikotin	Myosmin	Nicotyrin	Anabasin	Anatabin	2,3-Bipyridin	Gesamt- alkaloidgehalt
<i>Literaturangaben [mg/g]</i>	<i>13-21</i>	<i>0,4-1,5</i>	<i>0,03-0,09</i>	<i>0,45</i>	<i>0,06-0,12</i>	<i>0,3-0,9</i>	<i>0,06</i>	
Virginia Zimbabwe	18,79	0,57	0,0027	0,09	0,19	0,99	0,08	20,71
Virginia Deutschland	1,47	0,41	0,0013	0,05	0,04	0,17	0,02	2,16
Burley Malawi	7,19	0,45	0,0200	0,42	0,10	0,40	0,13	8,71
Orient Griechenland	15,62	1,04	0,0130	0,14	0,08	0,4	0,04	17,32

4.6 Ergebnisse der Ammonium- und Harnstoffbestimmung

Nikotin kommt, abhängig vom pH-Wert, in drei Formen vor, als freie Base, in der monoprotonierten Form und der diprotonierten Form sowie. Der Zigarettenrauch besteht im Wesentlichen aus zwei Phasen: der Gasphase und der Partikelphase. Während in der Partikelphase das Nikotin überwiegend in Salzform (mono- oder diprotoniert) an Partikel gebunden vorliegt, enthält die Gasphase nur die freie Base Nikotin. Je höher der pH-Wert der Partikelphase ist, um so größer ist der Anteil freier Base in dieser Phase und damit auch in der Gasphase. Die Resorption des Nikotins in der Lunge erfolgt aber besonders effektiv aus der Gasphase. Wird der Rauch also alkalisiert, wächst der Anteil freier Base im Rauch und der Raucher nimmt mehr und schneller Nikotin auf.

Da bekannt ist, dass den Zigaretten Ammoniumsalze (typischer Zusatzstoff Diammoniumhydrogenphosphat, DAHP) und Harnstoff als Quelle für Ammoniak, zugesetzt werden, welche den Rauch stärker basisch einstellen sollen, wurde in den oben genannten Zigaretten und Rohtabaksorten mittels einer NH_3 -selektiven Elektrode die Ammoniumkonzentration und indirekt auch Harnstoff bestimmt.

4.6.1 Ammoniumsalze

Es wurden von jeder Sorte zwei Zigaretten bzw. zwei Tabakproben (Jungpflanzen und Rohtabake) untersucht, wobei jeder Tabakextrakt dreifach gemessen wurde.

Die Abweichung der gemessenen Einzelwerte vom Mittelwert beträgt durchschnittlich 6,3% (je 2 Messungen an einem Tag, $n = 45$). Die Standardabweichung der Interday-Wiederholbarkeit beträgt durchschnittlich 12,8 % (fünf Messungen der gleichen Rohtabaksorte an unterschiedlichen Tagen).

Zur Prüfung der Methode auf ihre Eignung zum Nachweis von DAHP wurden drei Zigarettenarten (aus der Schweiz) mit niedrigem NH_3 -Gehalt mit DAHP (entsprechend 3 mg NH_3) versetzt und dann gemessen. Experimentelle Details können Abschnitt 3.4.3 entnommen werden.

Die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt. Der Zusatz ist sehr deutlich erkennbar, wenngleich die gesamten 3 mg NH_3 nur zu etwa 80 % wiedergefunden wurden. Ursachen hierfür können Verluste bei der Präparation der Zusatzproben in der Wärme im Trockenschrank sein.

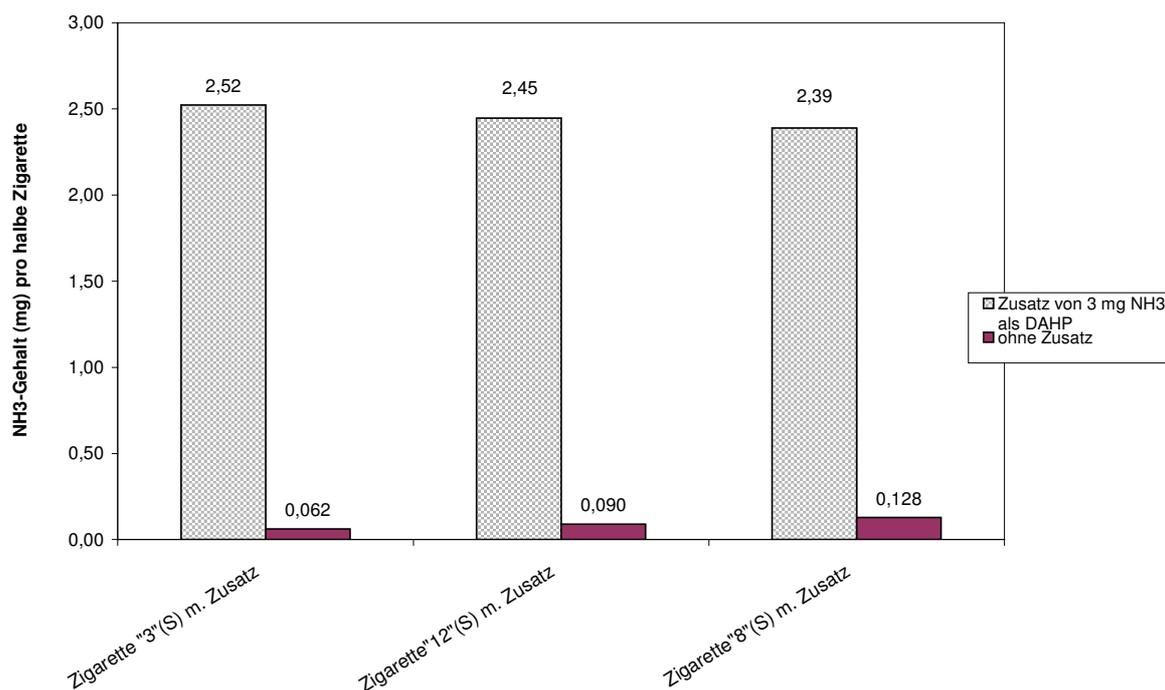


Abb. 23: Ammoniakgehalt von drei Zigarettenarten mit niedrigem Gehalt ohne und mit Zusatz von Diammoniumhydrogenphosphat entsprechend 3 mg NH₃/halbe Zigarette

In die Untersuchungen auf Ammoniak wurden zusätzlich zu den in Abschnitt 3.3 (Tab. 1a-1b) genannten Proben auch die 12 Zigarettenarten und deren Filter aus den Voruntersuchungen einbezogen. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 dargestellt.

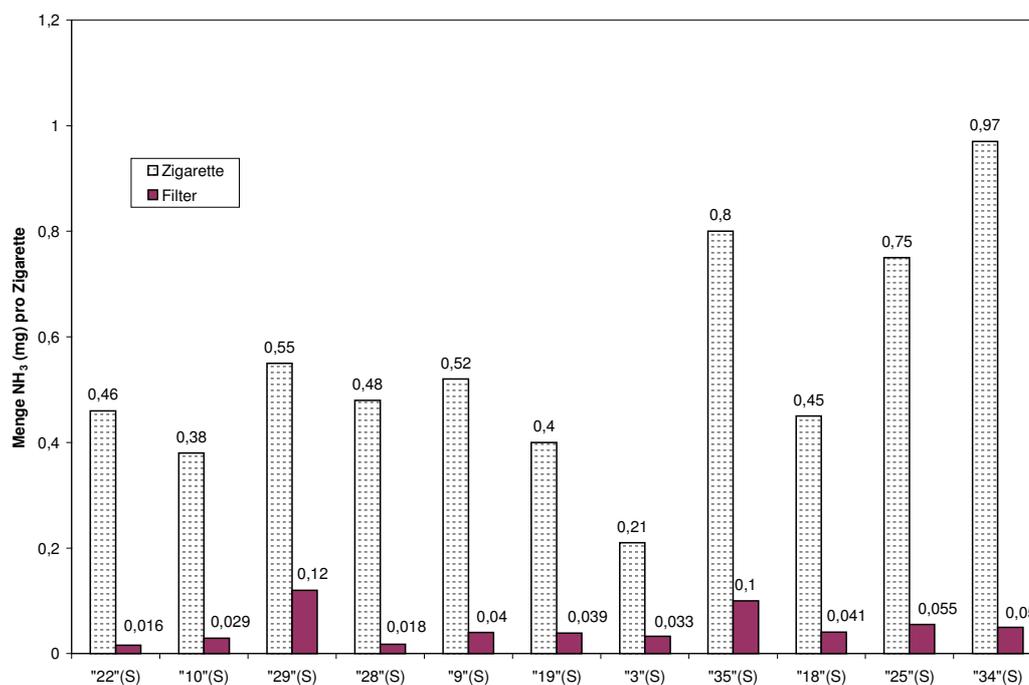


Abb. 24: NH₃-Bestimmung von Zigaretten u. Filtern der im Jahre 2000 gekauften Schweizer Zigaretten

Der Zigarettenfilter enthielt ebenfalls messbare Ammoniakmengen, wobei auch hier große Schwankungen auftreten (0,016-0,13 mg/Zigarette) und der Gehalt insgesamt wesentlich niedriger ist als im Tabak.

Aus dem Vergleich der im Jahre 2000 und 2003 in der Schweiz gekauften Zigaretten (Abb. 25) wird ersichtlich, dass der Ammoniakgehalt in den älteren Zigaretten wesentlich geringer ist als in den neueren. Dies ist durch die Lagerung bei Raumtemperatur bedingt, da bei höheren Temperaturen die ständige Dissoziation der Ammoniumsalze und die Flüchtigkeit von Ammoniak begünstigt wird. Die 2003 gekauften Zigaretten wurden deshalb bei -15°C gelagert. Auffällig ist, dass bei der Zigarettenmarke „3(S)“ keine großen Abweichungen zwischen beiden Messwerten auftritt. Demzufolge scheint hier kein Ammoniumsalz zusätzlich hinzugefügt worden sein.

Eine zusammenfassende Übersicht über die Ergebnisse aller Harnstoff- und Ammoniakmessungen ist in Abb. 26a dargestellt.

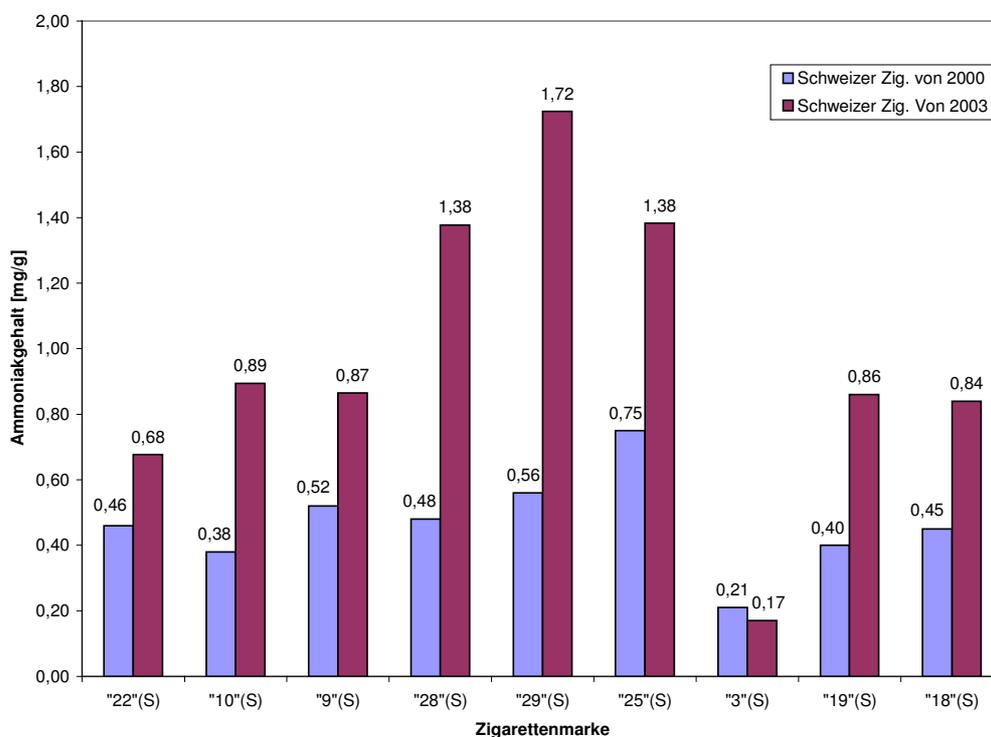


Abb. 25: Vergleich der Ammoniakgehalte einiger Schweizer Zigaretten aus 2000 und 2003

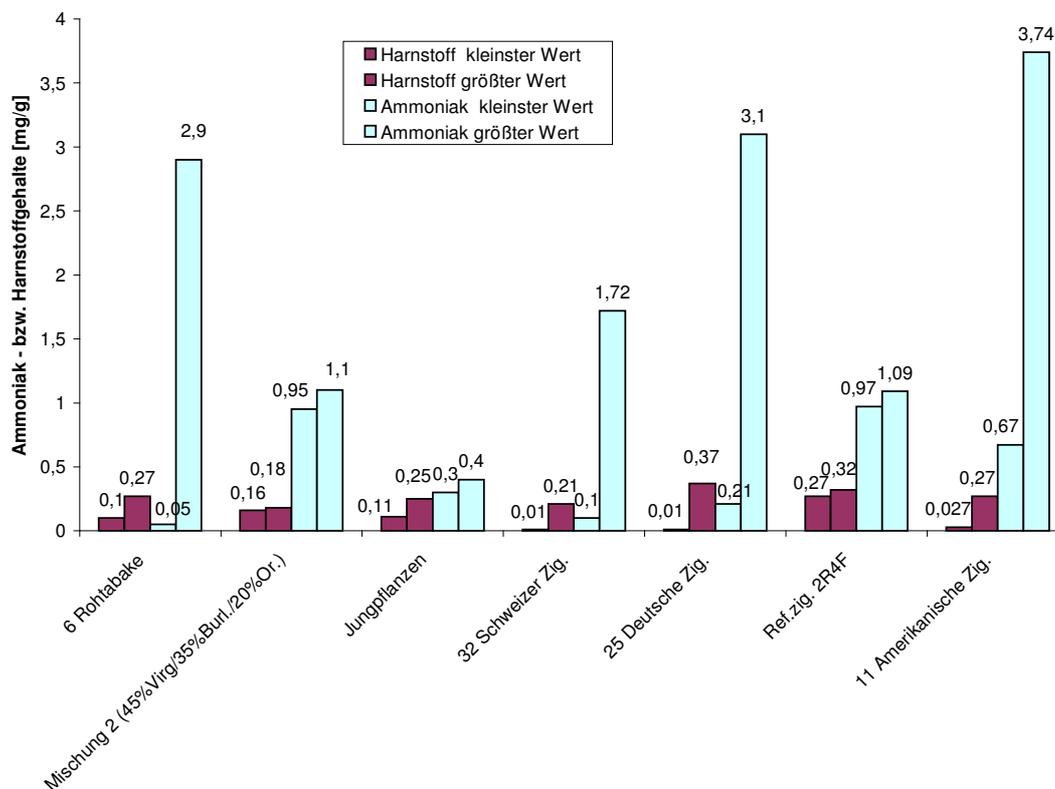


Abb. 26a: Gesamtübersicht der Ergebnisse der Harnstoff- und Ammoniakmessungen

Die Rohlabaksorten, einschließlich der von den selbst gezüchteten Pflanzen, enthalten sehr unterschiedliche Mengen an Ammoniak (Virginia aus Zimbabwe: 0,05 mg/g, Orient aus Griechenland: 1,35 mg/g, selbst gezogener Deutsheimer Korso: 2,9 mg/g). Da diese Unterschiede kaum durch eine unterschiedliche Biochemie der Pflanzen bedingt sein können, ist davon auszugehen, dass als Quelle für die Ammoniumverbindungen stickstoffhaltige Düngemittel in Frage kommen können. Die Tabaksorte Deutsheimer Korso wird zwar in Deutschland angebaut, jedoch kaum zur Zigarettenherstellung verwendet. Dieser recht kräftige Tabak kommt eher bei der Herstellung von einigen Zigarren zum Einsatz. Somit ist dieser Wert nicht zum direkten Vergleich bzw. zur Beurteilung von Zigarettenarten geeignet.

Zwischen den Zigarettenarten bestehen Unterschiede von mehr als einer Zehnerpotenz (0,21 mg/g in „1“(S) aus der Schweiz und 3,1 mg/g in „D14“ aus Deutschland), offensichtlich ist der Ammoniakgehalt in gewissen Grenzen sortentypisch.

Ein Vergleich der in Deutschland und in der Schweiz gekauften Zigaretten gleicher Sorte zeigt eine recht gute Übereinstimmung für beide Länder. Abb. 26b zeigt die einzelnen Ergebnisse der Ammoniakbestimmung der Schweizer Zigaretten im Vergleich mit den gleichen Sorten aus Deutschland.

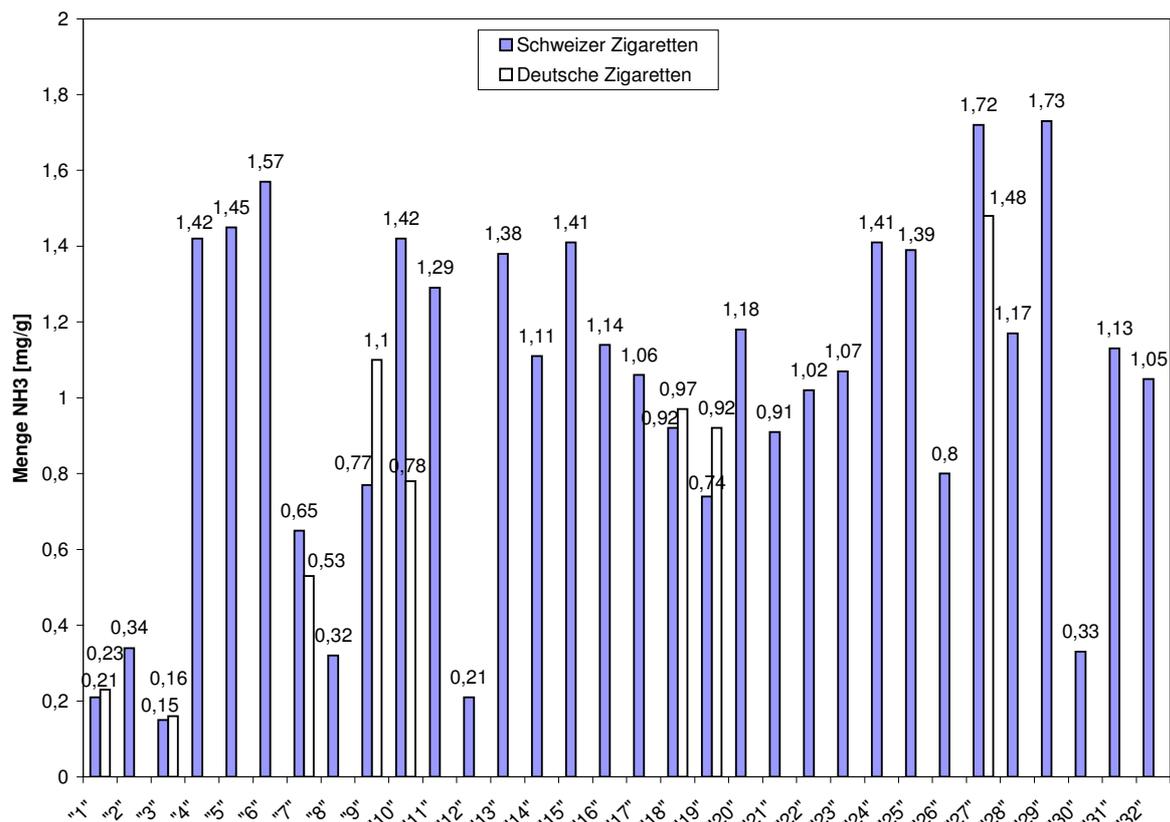


Abb. 26b: Ergebnisse der Ammoniakmessungen Schweizer Zigaretten im Vergleich mit den zugehörigen aus Deutschland

Die Referenzzigarette sowie eine selbst hergestellte „Blendmischung“ einiger Rohtabaksorten zeigten fast gleiche Ammoniumkonzentrationen, die kleiner sind als in den meisten Zigaretten (Referenzzigarette: 1,09 mg/g, Rohtabakmischung: 1,1 mg/g). Möglicherweise könnte man diese Konzentration als „cut-off“-Wert zur Beurteilung von Zigaretten heranziehen.

Auffällig war der besonders hohe Wert für die „D14“ Zigaretten aus Deutschland mit einem Gehalt von 3,1 mg/g Ammoniak im Tabak.

Ein Vergleich von europäischen Zigaretten mit US-amerikanischen Zigaretten gleicher Marke zeigt einen deutlich höheren Ammoniakgehalt für die Zigaretten aus den USA (Abb. 27), die einen durchschnittlichen Ammoniakgehalt von 1,89 mg/g (n=11) haben. Für Schweizer Zigaretten wurde hingegen nur ein durchschnittlicher Gehalt von 0,91 mg/g (n=32) und für Deutsche Zigaretten von 1,06 mg/g (n=25) (ohne „D14“: 0,97 mg/g) ermittelt.

Für die Menge an verwendeten Ammoniumsalzen in der Zigarettenherstellung gibt es unterschiedliche Angaben der Zigarettenindustrie:

- British American Tobacco UK:
1,0 % Diammoniumhydrogenphosphat (entspricht 2,6 mg/g NH₃) [20]
- British American Tobacco Australien:
0,3 % Diammoniumhydrogenphosphat (entspricht 0,77 mg/g NH₃) [18]
- Philip Morris Australien:
0,3 % Ammoniumhydroxid [19]
- Philip Morris USA:
0,68 -1,0 % Diammoniumhydrogenphosphat (entspricht 1,8-2,6 mg/g NH₃) [26]

Philip Morris Schweiz macht zur Verwendung von Ammoniumsalzen keine Angaben. In der Liste der britischen Regierung über die verbotenen Stoffe in der Tabakherstellung wird eine maximale Konzentration an 2,0 % Diammoniumhydrogenphosphat (entspricht 5,2 mg/g NH₃) angegeben.

Die von uns festgestellten Konzentrationen liegen alle unter dem von der britischen Regierung festgelegten Maximalkonzentration. Allerdings wurden in einigen US-amerikanischen Zigaretten deutlich höhere Konzentrationen (Abb.27) festgestellt als von Philip Morris USA angegeben. Schweizer und Deutsche Zigaretten liegen unterhalb der von der Industrie genannten Grenzen. Einige Zigaretten übersteigen jedoch den Wert, den BAT Australien angibt.

Eine Korrelation mit dem gemessenen Ammoniakgehalt wurde weder für den deklarierten Nikotingehalt im Rauch noch für den bei uns gemessenen Nikotingehalt in den Zigaretten festgestellt.

Auch hier ist eine abschliessende Gesamtbeurteilung erst dann möglich, wenn weitere Rohtabake untersucht wurden, da im Moment die Vergleichsdatenlage noch zu gering ist.

4.6.2 Harnstoff

Harnstoff gilt, wie Ammoniak, als geeigneter Zusatzstoff, um den pH-Wert des Rauches zu beeinflussen. In der Hitze (also unter Rauchbedingungen) wird aus Harnstoff Ammoniak freigesetzt.



Das hat zur Folge, dass sich auch hierdurch der pH-Wert des Rauches erhöht. Es steigt, wie oben erläutert, der Anteil freier Base Nikotin in der Gasphase des Rauches und es wird mehr Nikotin durch den Raucher aufgenommen. Es ist demzufolge wichtig, den Gehalt an Harnstoff in Zigaretten und Rohtabaken zu kennen, um abzuschätzen, ob dieser in Zigaretten erhöht ist oder nicht.

Daher wurde eine Methode zur quantitativen Harnstoffbestimmung entwickelt.

Durch Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass nach Zusatz von Harnstoff zu Tabak mit der unter Abschnitt 3.4.3.1 beschriebenen Methode Konzentrationen von 0,034 mg/g sicher feststellbar sind. Nach dem Zusatz von 0,01; 0,034; 0,05; 0,1 bzw. 0,15 mg/g Harnstoff zu Tabakproben wurden Wiederfindungen von 77–181 % bestimmt. Diese relativ große Schwankung lässt Defizite an der Methoden erkennen. Da es sich bei der entwickelten Methode jedoch um Differenzmessungen (Messung der Ammoniumkonzentration vor und nach Zugabe von Urease) handelt, sind generell größere Abweichungen zu erwarten. Auf abschliessende Aussagen zur Reproduzierbarkeit der Methode wurde deshalb vorerst verzichtet.

Nach den bisherigen Ergebnissen ist zu erkennen, dass auch Rohtabake und junge Tabakpflanzen Harnstoff enthalten. Die Schwankungsbreite der Konzentrationen ist hier nicht so groß, wie bei den Ammoniakkonzentrationen (siehe Abb. 26). Jungpflanzen enthalten bereits 0,11 mg/g (Virginia) bzw. 0,25 mg/g (Deutersheimer Korso) Harnstoff. Das ist mehr, als die meisten Schweizer und Deutschen Zigaretten enthalten.

Bei dem Vergleich der untersuchten Rohtabaksorten (siehe Abb.28) fällt auf, dass der Tabak mit dem höchsten Ammoniakgehalt (Deutersheimer Korso) einen vergleichsweise geringen Harnstoffgehalt aufweist. Vergleicht man hingegen nur die vier Rohtabake aus einer Zigarettenfabrik miteinander, ist zu erkennen, dass Burley Tabak aus Malawi den höchsten Ammoniakgehalt und den höchsten Harnstoffgehalt besitzt. In beiden Virginia Tabaken mit geringen Ammoniakkonzentrationen wurden auch die kleinsten Harnstoffkonzentrationen bestimmt.

In der selbst hergestellten „Blendmischung“ einiger Rohtabake wurde eine Harnstoffkonzentration von 0,18 mg/g ermittelt. Nach den Ergebnissen der Ammoniakuntersuchungen wäre zu erwarten, dass sich dieser Wert mit dem der Referenzzigarette deckt. Dies ist nicht der Fall, hier beträgt die Harnstoffkonzentration 0,32 mg/g. Diese Konzentration wird nur von einer Deutschen Zigarette überschritten: Roth Händle mit 0,37 mg/g. Alle übrigen untersuchten Schweizer, Deutschen und Amerikanischen Zigaretten sowie die Zigaretten aus verschiedenen Ländern weisen kleinere Harnstoffkonzentrationen auf. Die untersuchten Amerikanischen Zigaretten haben den durchschnittlich höchsten Harnstoffgehalt mit 0,16 mg/g (n=8). In Schweizer Zigaretten wurden durchschnittliche Konzentrationen von 0,07 mg/g (n=32) und in Deutschen Zigaretten von 0,11 mg/g (n=25) ermittelt.

Der höchste Harnstoffgehalt konnte bei den Schweizer Zigaretten für die Marke „11“(S) (0,21 mg/g) ermittelt werden. Bei den Deutschen Zigaretten sind Marken mit hohem Harnstoffgehalt neben „D14“ (0,37 mg/g) auch „D10“ (0,29 mg/g) und „18“(D) (0,27 mg/g).

Für die Menge an verwendetem Harnstoff in der Zigarettenherstellung gibt es nur wenige Angaben der Zigarettenindustrie:

Philip Morris USA: 0,3-0,45 % (entspricht 3 - 4,5 mg/g Harnstoff)

British American Tobacco UK: 0,4 % (entspricht 4 mg/g Harnstoff)

Die von uns gefundenen Konzentrationen liegen alle unterhalb dieser Werte. Somit gibt es bis jetzt keine konkreten Hinweise auf die Verwendung von Harnstoff als Zusatzstoff bei der Zigarettenherstellung.

In einer zweiten Methode soll überprüft werden, ob die bisher erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden können.

Um endgültige Aussagen über die Verwendung von Harnstoff als Zusatzstoff machen zu können, müssen auch hier weitere Rohtabake untersucht werden.

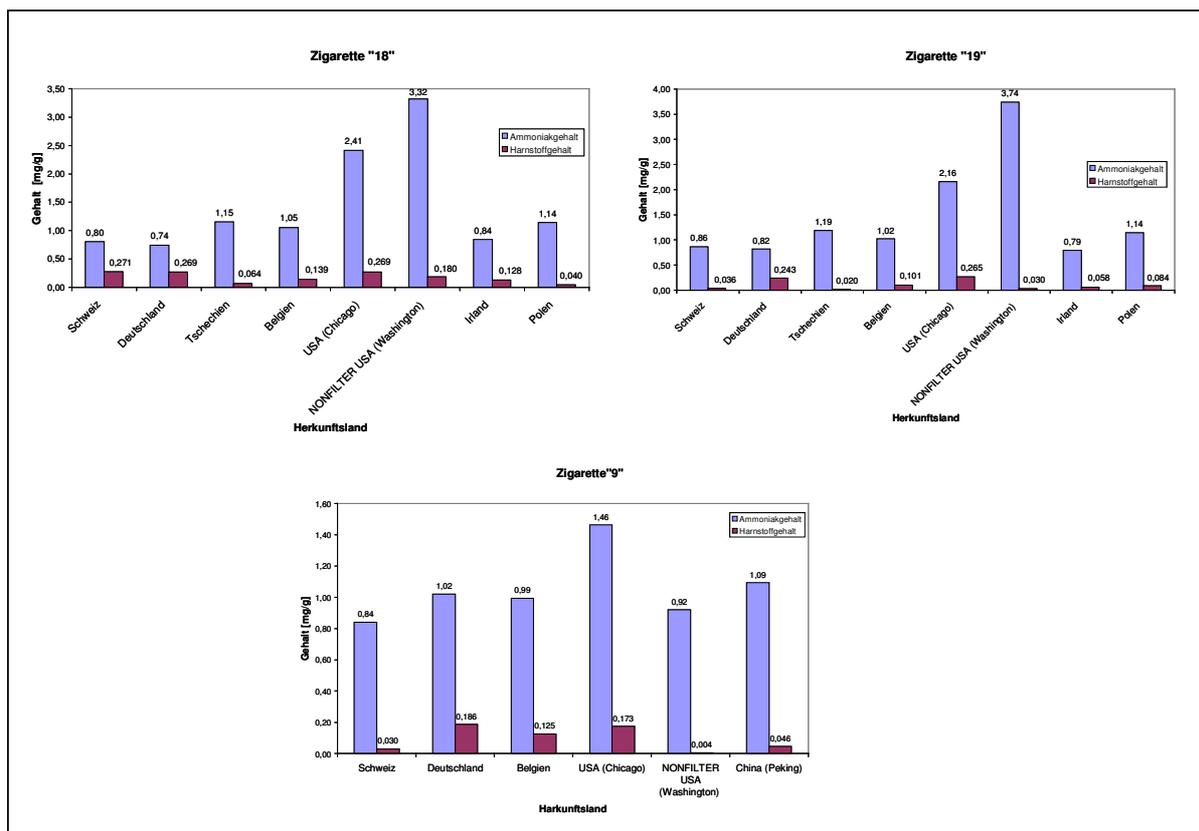


Abb. 27: Vergleich der Ammoniak- und Harnstoffgehalte von Zigaretten gleicher Marke aus unterschiedlichen Ländern

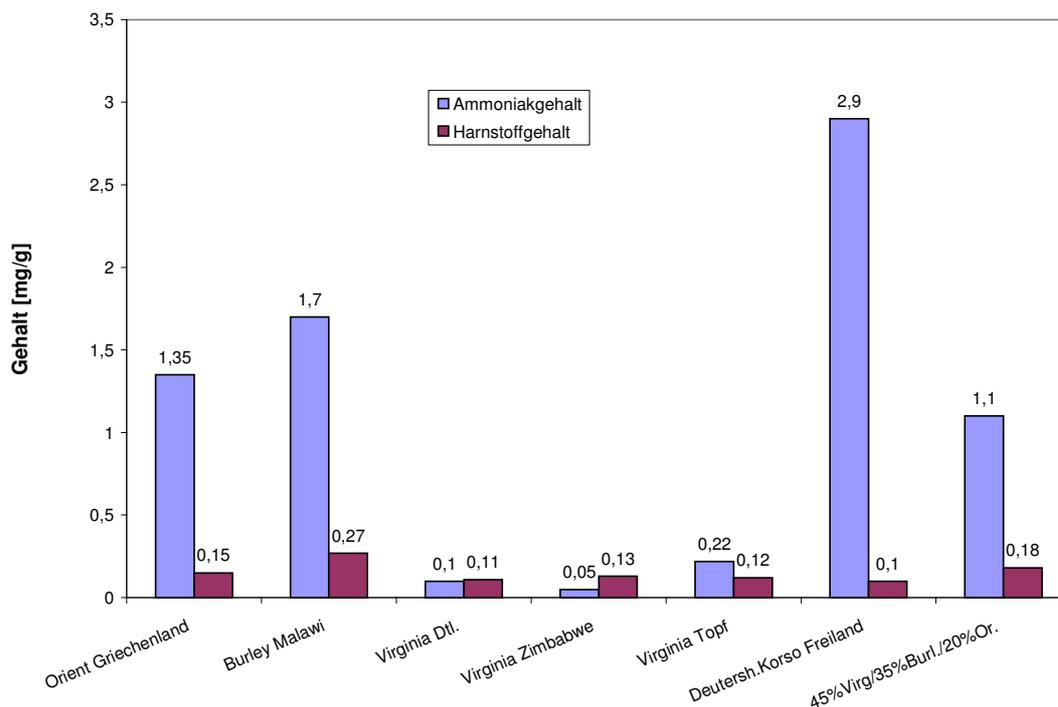


Abb. 28: Harnstoff- und Ammoniakgehalte in Rohtabaken

4.7 Ergebnisse der pH-Messungen

Eine stärker basische Einstellung des Tabakrauchs ist auch durch Zusatz anderer basischer Substanzen wie z. B. Alkalicarbonate erreichbar. Solche Zusätze sollten bei höheren Mengen eine pH-Verschiebung von wässrigen Zigarettenextrakten bewirken. Daher wurde an allen oben erwähnten Zigarettenarten pH-Messungen vorgenommen. pH-Messungen wurden durchgeführt:

- 5 min nach dem Aufnehmen in Wasser
- nach weiteren 5 min Ultraschallbad
- nach weiterer 1 h stehen lassen
- nach weiteren 3 h stehen lassen

Der pH-Wert blieb während der gesamten Untersuchungszeit nicht konstant sondern stieg langsam an, wobei sich alle Zigaretten ähnlich verhielten. Dabei traten im Mittel folgende pH-Änderungen auf:

- von 5 min bis 5 min Ultraschall: $\Delta\text{pH} = +0,27$ (Schweiz) und $+ 0,25$ (Dtl.)
- von Ultraschall-Behandlung bis 1 h stehen lassen: $\Delta\text{pH} = +0,16$ (Schweiz) und $+0,19$ (Dtl.)
- von 1h stehen bis 3h stehen lassen $\Delta\text{pH} = +0,11$ (Schweiz) $+0,08$ (Dtl.)
- von 5 min bis 1 h (incl. 5 min US-Behandlung): $\Delta\text{pH} = +0,54$ (Schw.) und $+0,49$ (Dtl.)
- von 5 min auf 3 h (incl. 5 min US-Behandlung): $\Delta\text{pH} = +0,54$ (Schw.) $+0,50$ (Dtl.)

Die Ursachen für diese Verschiebung ins basische sind unklar. Gesichert ist, dass es sich nicht um eine messtechnisches Problem (Elektrodendrift etc.) handelt.

Die Ergebnisse der pH-Messungen sind im Überblick in Tabelle 20 zusammengefasst. Die pH-Werte schwanken danach im Bereich von 0,6 Einheiten zwischen 5,4 und 6,0. Wenn gleiche Zigarettensorten aus der Schweiz und aus Deutschland gemessen wurden, betragen die Unterschiede zwischen beiden in der Regel nur 0,1 pH-Einheiten (in einem Fall 0,2 pH-Einheiten).

Tabelle 20. Überblick über die Ergebnisse der pH-Werte (nach 5 min. Extraktion) von Schweizer und Deutschen Zigaretten

	Zigaretten aus der Schweiz	Zigaretten aus Deutschland
pH-Mittelwert	5,68	5,67
Höchster pH-Wert	5,8 (11 Sorten)	6,0 („18“(D))
Niedrigster pH-Wert	5,4 (3 Sorten)	5,5 (8 Sorten)

Zur Überprüfung der Wirkung von Diammoniumhydrogenphosphat-Zusätzen auf den pH-Wert wurde dieses Salz in solchen Mengen hinzugefügt, dass sie einer Ammoniakmenge von 1, 3 und 5 mg Ammoniak entsprachen. Die Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung selbst besitzt einen pH-Wert von 8. Unter den gegebenen Messbedingungen trat nach Zugabe ein pH-Anstieg von 0,2 bis 0,5 pH-Einheiten auf. Typisch war dabei, dass bei Zigaretten mit einem an sich niedrigen pH eine viel größere pH-Zunahme resultierte, als bei Zigaretten mit einem höheren Ausgangs-pH (Abb. 29). Offensichtlich besitzen die stärker basischen Zigaretten eine höhere Pufferkapazität.

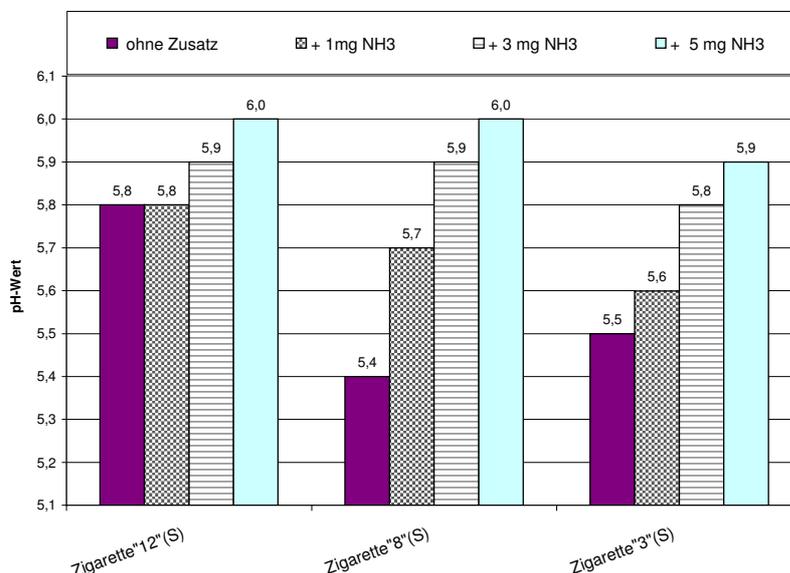


Abb. 29. Einfluss des Zusatzes von Diammoniumhydrogenphosphat auf den pH-Wert von Zigarettenaufschlämmungen, angegeben sind die den Zusätzen entsprechenden NH_3 -Mengen

Es wurde versucht, die pH-Werte der Zigarettenaufschlämmungen mit den Ammoniakgehalten, den gemessenen Nikotingehalten in den Zigaretten und den deklarierten Nikotingehalten im Rauch zu korrelieren. Dabei war jedoch kein Zusammenhang zwischen diesen Größen feststellbar.

Zusammenfassend kann zu diesem Punkt festgestellt werden, dass es messbare Unterschiede im pH-Wert von wässrigen Extrakten verschiedener Zigarettensorten gibt, und dass diese mit hoher Wahrscheinlichkeit etwas mit den Zusätzen zu tun haben. Es ist anzunehmen, dass sich diese Unterschiede auch auf den Anteil freier Base Nikotin im Rauch auswirken.

Im Säure-Base-Verhalten von Zigaretten scheint es nach einfachen pH-Messungen von Sorte zu Sorte deutliche Unterschiede zu geben, die wahrscheinlich ebenfalls von den Zusätzen herrühren.

4.8 Literaturrecherche zu Eigenschaften und Anwendungszweck ausgewählter Zusatzstoffe und der Tabakalkaloide

Aus verschiedenen Listen der Tabakindustrie [15; 17-19; 27-29] und der Gesetzgeber sind über 600 Zusatzstoffe bekannt. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse einer Recherche der aktuellen Literatur dargelegt, wobei sowohl die Wirkungen der unveränderten Substanzen als auch die nach Pyrolyse und partieller Verbrennung beim Rauchvorgang berücksichtigt wurden. Bei der Durchsicht der Literatur zeigte sich weiterhin, dass es vor allem von Seiten der Zigarettenindustrie bereits umfassende Übersichten über Zusatzstoffe und deren Wirkungen gibt, die hier nicht vollständig wiederholt werden sollen.

Additive lassen sich wie folgt nach ihrer Wirkung einteilen [12; 30; 31]:

- Steigerung des Anteils an freier Base Nikotin im Rauch:
Ammoniumsalze (Diammonium(hydrogen)phosphat, Ammoniumchlorid, Ammoniumhydroxid, Ammoniumbicarbonat), Harnstoff
- Steigerung der Bindungskapazität von Nikotin an seine Rezeptoren im Gehirn:
Levulinsäure, Zitronensäure, Maleinsäure, Milchsäure
- Nikotin-Analoga, die synergistisch mit Nikotin wirken:
Pyridin, Acetaldehyd, Kakao
- Aromastoffe
 - a) Tabakextrakt oder andere Pflanzenextrakte:
 - b) Tabakfremde Aromen (Vanillin, Lakritze, Menthol, Fruchtaromen, Gewürze, Kakao, Zimt, Benzaldehyd, Polyanethole)
- Branntbeschleuniger / Asche-Konditionierungsmittel:
Kaliumcitrat, Natriumcitrat, Calciumcarbonat, Monoammoniumphosphat
- Stoffe, die die Abbrennraten reduzieren:
Magnesiumchlorid, Ammoniumchlorid
- Zucker zur Geschmacksoptimierung:
Glucose, Invertzucker, Fruktose-Maissirup, Dextrose, brauner Zucker, Melasse
- Feuchthaltemittel:
Glycerol, Propylenglycol, Dipropylenglycol, Tripropylenglycol
- Bronchodilatoren:
Theobromin aus Kakao, Glycyrrhizin aus Lakritze
- Stoffe, die den Geruch des Nebenstromrauches reduzieren:
Acetylpyrazin, Anethol, Limonen, Phenethylalkohol, Vanillin
- Reduzierung der Sichtbarkeit des Rauches:
Natriumcitrat, Natriumacetat, Metallhydroxide, Magnesiumoxid, Calciumcarbonat, Calciumchlorid, Magnesit, Kaliumhydrogenphosphat, Monokaliumphosphat

- Reduzierung der Irritationen durch den Nebenstromrauch:
Aluminiumsulfat, Natriumhydrogenphosphat, Ammoniumsulfat

Eine andere, funktionelle Einteilung der Zusatzstoffe sieht folgende Zuordnung vor [32]:

- Flavorants:
Beinhaltet u.a. Menthol (max. 0,8% ; bis 4,5 mg/g) und Aromastoffgemische (bis 2 mg/g)
- Casing materials:
Beinhaltet z. B. Zucker (bis 25 mg/g), Lakritze (bis 10 mg/g), Kakao (bis 10 mg/g)
Wird verwendet in American-Blend-Mischungen
- Feuchthaltemittel:
Beinhaltet Glycerol (bis 25 mg/g), Propylenglycol (bis 20 mg/g), Triethylenglycol (bis 10 mg/g)

Generell ist festzustellen, dass die schädigende Wirkung der Zusatzstoffe zu einem großen Teil auch von deren Pyrolyseprodukten ausgeht und diese eine schwer kontrollierbare Eigenwirkung besitzen. Die hauptsächliche Gefahr ist aber mit der Akzeptanzerhöhung der Zigarette verbunden, die vor allem das Einstiegsalter für Raucher verringert und so vor allem Kinder und Jugendliche an die Zigarette heranführt. In diesem Sinne ist auch die Erhöhung der Bioverfügbarkeit des Nikotins durch basische Zusätze zu sehen.

Zu einigen der oben genannten Stoffe oder Stoffgruppen gibt es Untersuchungen über deren Toxizität, pharmakologische Eigenschaften und Pyrolyseprodukte. Veröffentlichungen findet man sowohl von unabhängigen Wissenschaftlern als auch von der Tabakindustrie [31].

In diesem Abschnitt ist eine Unterteilung der Literaturangaben in unabhängige Wissenschaftler und Wissenschaftler der Zigarettenindustrie vorgenommen worden, um die Widersprüche zwischen beiden deutlich hervorzuheben. Hintergrund sind Gerichtsverfahren in den USA (Prozesseröffnung 21.09.04) und in Deutschland (2003), bei denen die Zigarettenindustrie auf Schmerzensgeld verklagt wurde und wegen vorsätzlicher Suchterregung/Suchtsteigerung angeklagt wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt war die Öffentliche Hand in der Zusatzstoffproblematik untätig und erst nach Veröffentlichung und Sichtung interner Tabakindustriedokumente konnte belegt werden, welche Ziele die Zigarettenindustrie mit ihrem Zusatzstoffdesign verfolgt. Aus den Studien der Industrie geht oft hervor, dass Additive in Zigaretten die Toxizität nicht erhöhen [31]. Es ist auch nicht auszuschließen, dass nur solche Ergebnisse veröffentlicht werden und somit eine einseitige Auswahl der Studienergebnisse stattfindet.

Bei der Bewertung ist allgemein zu beachten, dass die Zusatzstoffe oder deren Pyrolyseprodukte lokale Wirkungen im oberen Atemtrakt, in den Bronchien oder den Alveolen auch dann hervorrufen können, wenn sie nicht in systemisch wirksamer Dosis durch den Rauch aufgenommen werden.

Zu folgenden Stoffen sind die wesentliche Eigenschaften hier dargestellt:

4.8.1 Ammoniumsalze und Harnstoff

Die mit der Verwendung von Ammoniumsalzen und Harnstoff als Zusatzstoffe zusammenhängenden Gesichtspunkte wurden bereits im Abschnitt 4.6 dargelegt. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Auffassungen sollen die entsprechenden Angaben hier jedoch nochmals vollständig aufgezählt werden.

Unabhängige Wissenschaftler:

- Der Zusatz von Ammoniak zu Tabakrauch-Partikeln steigert erheblich die Flüchtigkeit der freien Base Nikotin, dies erlaubt eine schnellere Absorption im Respirationstrakt [15].
- Der effektive pH-Wert des Rauches einiger ausgewählter Zigarettenmarken

- liegt bei 6,0-7,8 und der Anteil freier Base Nikotin beträgt 1-36 %, der Rest ist partikelgebunden [33].
- Der pH-Wert sowie der Anteil freier Base im Rauch hängen von der Art und Weise des Rauchens ab: bei teilweiser Blockade der Ventilationlöcher im Filter steigen beide Parameter stark an [33], [34].
 - Nikotin kann nur als freie Base (nicht salzartig gebunden) aus dem Rauch schnell im Respirationstrakt aufgenommen werden [33],[35].
 - Ausmaß und Grad der Nikotinaufnahme durch den Raucher hängen vom Anteil der freien Base Nikotin im Rauch ab [33].
 - Der pH-Wert von Tabakrauch ist ein bestimmender Faktor für seine akute Toxizität [35].
 - Mit einer Zunahme des pH-Wertes über 6,2 enthält der Rauch zunehmende Mengen unprotonierten Nikotins, der toxischsten Form dieser Substanz [35], so dass sich die Abhängigkeit schneller einstellt.
 - Nebenstromrauch enthält weniger flüchtige Säuren, wenig höhere Konzentrationen an Alkaloiden und wesentlich höhere Konzentrationen an Ammoniak als Hauptstromrauch [35].
 - Ammoniak ist ein Reizstoff für den Respirationstrakt und zeigt Zilientoxizität [8].
 - Ammoniumverbindungen reagieren bei hohen Temperaturen mit Zuckern zu Pyrazinen und anderen Aromastoffen (Maillard-Reaktion), die sensorische und pharmakologische Effekte hervorrufen [8].
 - Die Ammoniumtechnologie war die eigentliche „Seele“ der Marlboro, Philip Morris benutzte zwischen 1965-1974 ammoniumhaltige Zusätze in Tabak und der höhere pH der Marlboro half, den gleichen Gehalt freier Base Nikotin zu erreichen wie in Zigarettensorten mit wesentlich höherem Teergehalt, obwohl der Teer –und Nikotingehalt der Marlboro um 2/3 gesenkt wurde [30].

Zigarettenindustrie:

- Ammoniakliefernde Substanzen kommen natürlicherweise im Tabak vor und werden manchmal als Aromastoffe, „Aromaprecursor“ und Verarbeitungshilfsmittel bei einigen Zigarettenmarken und bei der Herstellung einiger Tabakfolien zugesetzt [15; 36].
- Ammoniumverbindungen reagieren während der Verarbeitung von Tabak mit einigen Substanzen und bilden wertvolle Verbindungen [36].
- Der Transfer von Ammoniumionen in den Hauptstromrauch in Form von Ammoniak ist eher ineffektiv (< 5%), deshalb ist die Zugabe von Ammoniumionen eine unpraktikable Art, den Ammoniakgehalt im Rauch zu beeinflussen [36].
- Der Zusatz von Ammoniumionen zu Tabak hat keinen Einfluss auf die Bestimmung des Nikotins im Rauch mittels FTC/ISO-Methode [36].
- Durch die Zugabe von Ammoniumionen zu Tabak wird der Nikotingehalt im Hauptstromrauch nicht erhöht [36].
- Der Zusatz von ammoniakliefernden Substanzen steigert den Ammoniakgehalt im Hauptstromrauch wie folgt: Der Ammoniakgehalt im Hauptstromrauch einer unbehandelten Zigarette beträgt 16 µg/Zigarette, eine DAP-behandelte Zigarette (0,2% DAP, 0,03 % Harnstoff und 0,08 % Ammoniumhydroxid) enthält 26 µg/Zigarette, eine Harnstoff-behandelte Zigarette enthält (2,0% Harnstoff) 38 µg/Zigarette Ammoniak im Hauptstromrauch [15].
- Der pH-Wert eines wässrigen Rauchextraktes einer mit Harnstoff behandelten Zigarette ist höher als der einer mit DAP (Diammoniumhydrogenphosphat) behandelten oder einer unbehandelten Zigarette [15].

- Obwohl die Nikotinablagerung im Mund bei der DAP-behandelten Zigarette signifikant erhöht war, war die Nikotininhalation bei allen drei Zigaretten gleich und die Nikotinaufnahme ins venöse Blut war unverändert durch die Zugabe von DAP oder Harnstoff zu Zigaretten [15].
- Die Menge an Pyrazinen im Tabakrauch wird durch Ammoniak/Ammoniumsalze erhöht [32].

Konzentrationen von Ammoniak und Harnstoff in Zigaretten:

- Bestimmung von Ammonium mittels Ionen-Chromatographie und mittels enzymatischer UV-Methode in 10 Zigarettenmarken: 0,7 – 4,9 mg/g [37].
- Bestimmung von Ammoniak in Zigarettentabak mittels Ammoniak elektrode: 1,1 – 4,8 mg/g [38].
- Bestimmung von Ammoniak in 100 Zigaretten mittels Flow Injection Analyses: 0,2 – 3,2 mg/g [39].
- Bestimmung von Ammoniak im Zigarettenrauch mittels Ammoniak elektrode: 36 – 153 µg/Zigarette [38]
- Bestimmung von Harnstoff mittels Kolorimetrie in 10 Zigarettenmarken: in 3 Sorten konnte Harnstoff nachgewiesen werden in Konzentrationen von 0,06 - 0,20 mg/g [37].

4.8.2 Aldehyde (Formaldehyd, Acetaldehyd, Acrolein)

Formaldehyd, Acetaldehyd und Acrolein entstehen neben ihrer Herkunft aus dem Tabak hauptsächlich während des Rauchens aus Polysacchariden, Pektinen, Proteinen und möglicherweise Triglyceriden. Diese Substanzklassen sind auch typische Bestandteile komplexer Zusatzstoffgemische. Toxizitätstudien an Ratten zeigen, dass eine Mischung aus Acetaldehyd, Formaldehyd und Acrolein zu stärkeren Schädigungen am Nasalepithel und am Respirationstrakt führt als bei Gabe der einzelnen Aldehyde [40].

Unabhängige Wissenschaftler

Formaldehyd

- Formaldehyd ist kanzerogen, es beeinflusst die Zilienaktivität und die Atemfrequenz, es wirkt bronchokonstriktorisch [41].
- Es ist eine sehr reaktive Verbindung, die leicht Kondensationsprodukte mit vielen Substanzen bildet [40].
- Tabakrauch enthält 60-130 mg/m³ Formaldehyd, was auf eine tägliche Einnahme von etwa 1 mg Formaldehyd schließen lässt (bei einem täglichen Konsum von 20 Zigaretten) [40].
- Beim Rauchen von „low-yield-Zigaretten“ tritt in der Lunge kurzfristig eine Formaldehydkonzentration von 73 mg/m³ auf [40].
- Die Irritationsreizschwelle für den Menschen (Respirationstrakt) liegt bei 0,10 ppm (0,12 mg/m³) [40].
- Formaldehyd wird aus dem Mund-Rachen-Raum und aus den Bronchien gut resorbiert und schnell zu Formiat metabolisiert [40].
- Systemische Konzentrationen an Formaldehyd sind mit 0,028 mg/kg KG relativ gering [40].
- Laut IARC (International Agency for Research on Cancer) ist Formaldehyd kanzerogen für den Menschen, die WHO schlussfolgert dagegen kein erhöhtes kanzerogenes Potential für Formaldehyd [40].

- Einige Studien besagen, dass Formaldehyd nur nasale und nasopharynginale Tumore induziert [40].
- Chronische Inhalation von Formaldehyd durch Zigarettenrauch kann in den Geweben bei direktem Kontakt zu Gewebeschädigungen, und zu Krebs führen [40].
- In hohen Konzentrationen (18 mg/m³) treten u.a. Atemdepression, Bradykardie, Blutdruckanstieg, Mucostase und Ziliastase auf [40].
- Als Zersetzungsprodukte bei Temperaturen über 150 °C entstehen Methanol und Kohlenstoffmonoxid [40].
- Formaldehyd reagiert mit Proteinen und Einzelstrang-Dann [40].

Acetaldehyd

- Acetaldehyd ist ein Verbrennungsprodukt von Zuckern, verhält sich synergistisch mit Nikotin, verstärkt die Abhängigkeit und ist ein bekanntes Tierkanzerogen [8].
- Acetaldehyd ist genotoxisch in vitro und in vivo und schädigt nach chronischer Inhalation den Respirationstrakt. Es wirkt kanzerogen nach chronischer Inhalation bei Ratten [40].
- Es hat Auswirkungen auf die Zilienaktivität und Atemfrequenz, wirkt bronchokonstriktorisch und riecht angenehm [41]. Es schädigt direkt den Respirationstrakt [40].
- Chemische Interaktionen von Acetaldehyd mit anderen Komponenten des Zigarettenrauches sind noch unklar [40].
- Acetaldehydkonzentrationen im Rauch betragen bis zu 2000 ppm (3,6 g/m³) [40].
- Die LOAEL (lowest observed adverse effect level) des Menschen liegt bei 134 ppm (241 mg/m³) [40].
- Auf Basis der Literaturdaten wird eine tolerierbare Acetaldehyd-Konzentration von 1,1 ppm (2 mg/m³) abgeleitet [40].
- Acetaldehyd, was nach Alkoholkonsum aus Ethanol entsteht, zeigt Interaktionen mit dem physiologischen und patho-physiologischen System. Es ist jedoch unklar, ob Acetaldehyd aus Zigarettenrauch systemische Interaktionen auslösen kann [40].
- Durch die geringe systemische Bioverfügbarkeit von Acetaldehyd nach Inhalation und die starke Reaktivität und Metabolisierung im Respirationstrakt ist nicht davon auszugehen, dass Acetaldehyd aus dem Rauch bis in das Gehirn gelangt [40].
- Ein Vergleich von Rauchern und Nichtraucherern zeigte keine Unterschiede in den Blutkonzentrationen von Acetaldehyd [40].

In der Literatur wird oft beschrieben, dass Acetaldehyd einen Einfluss auf die Abhängigkeit vom Rauchen hat [8]. Allerdings gehen diese Daten auf Alkoholstudien zurück (Bildung von Tetrahydroisochinolin und β -Carbolinen durch Kondensation mit Catecholaminen oder Serotonin). Die Tatsache, dass es keine Unterschiede der Blutkonzentrationen zwischen Rauchern und Nichtraucherern gibt, steht im Widerspruch zu dieser Vermutung, schließt sie aber nicht gänzlich aus [40].

Acrolein

- Acrolein entsteht in hoher Ausbeute bei der thermischen Zersetzung aus dem als Feuchthaltemittel zugesetzten Glycerin.
- Im Hauptstromrauch einer Zigarette findet man 3-228 μ g Acrolein, im Nebenstromrauch 723-1390 μ g [40].

- Durch Rauchen findet man kurzfristig im Respirationstrakt 179 mg/m^3 Acrolein ($0,11 \text{ mg/Zig.}$, Inhalationsvolumen: 615 ml/Zig.) [40].
- $2,75 \text{ mg / Tag}$ Acrolein werden durch Inhalation beim Rauchen von 25 Zigaretten / Tag aufgenommen [40].
- Die Bioverfügbarkeit nach Inhalation ist gering [40].
- Acrolein ist ein Reizstoff für den Respirationstrakt, ist hoch reaktiv und eine sehr toxische, flüchtige Verbindung [41].
- Es gibt keine Hinweise auf Kanzerogenität von Acrolein [40].
- Acrolein bildet DNA-Addukte in oralem Gewebe [40].
- Eine Senkung der Atemfrequenz tritt ab $0,7 \text{ mg/m}^3$ auf [40].
- Acrolein wird möglicherweise zu Mercaptursäuren, Acrylsäure, Glycidaldehyd und Glycerinaldehyde metabolisiert [40].
- Es treten Gewebeschädigungen im Respirationstrakt und in der Nase von Ratten durch Inhalation einer Mischung aus Acetaldehyd, Acrolein und Formaldehyd auf [41].
- Acrolein besitzt eine extreme Reaktivität und kann mit anderen Rauchbestandteilen oder körpereigenen Stoffen durch Kondensationsreaktionen, Dimerisierung, Polymerisierung, Additionsreaktionen, Oxidation und Reduktion viele verschiedene Verbindungen bilden [40].

Zigarettenindustrie:

- Der Gehalt an Formaldehyd im Rauch stieg bei Zigaretten mit „Casing Ingredients“ um 73% an (im Vergleich zu unbehandelten Zigaretten), was durch die Pyrolyse von Zuckern zu erklären ist [42].
- Die veränderte Zusammensetzung des Rauches durch Verwendung von Zusatzstoffen führt nicht zu einer Änderung der biologischen Aktivität des Zigarettenrauches und steigert nicht die allgemeine Toxizität von Zigaretten [26].
- Im Körper wird Acetaldehyd sehr schnell zu Essigsäure abgebaut, daher resultieren durch das Rauchen keine erhöhten Blutkonzentrationen an Acetaldehyd [36].
- Die pharmakokinetischen Effekte von Acetaldehyd und Nikotin sind so verschieden, dass synergistische Effekte, speziell im Gehirn, praktisch unmöglich sind. Durch die schnelle Metabolisierung von Acetaldehyd, kann dieses nicht das Gehirn erreichen [36].

4.8.3 Aromastoffe

Bei den Aromastoffen handelt es sich z.T. um komplexe Gemische, die vor allem aus aromatischen Aldehyden (z. B. Benzaldehyd, Zimtaldehyd, Anisaldehyd, Vanillin), aromatischen Ketonen (Acetophenon, Benzophenon), Lactonen (z. B. Hexalacton bis Nonalacton), verschiedensten aliphatischen und aromatischen Estern, Terpenverbindungen mit verschiedenen funktionellen Gruppen oder heteroaromatischen Verbindungen (Pyrazine, Chinoxaline) bestehen [32] und auch in Lebensmitteln vorkommen. Definitive Angaben über Pyrolyseprodukte vieler Einzelaromasubstanzen konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Unabhängige Wissenschaftler:

- Aromastoffe erhöhen die Akzeptanz des Produktes beim Konsumenten und heben die Verdünnung des Rauches, die durch starke Ventilation der Filter entsteht, auf [8].

- Viele Zusatzstoffe, die auch in der Lebensmittelindustrie verwendet werden, gelten „Generally Recognized as Safe“, bilden aber nach Pyrolyse und Inhalation neue toxische Verbindungen, die bei Inhalation schädigend wirken [30].
- Der bittere und harte Geschmack vom Nikotin soll überdeckt werden [30].
- Der ursprüngliche Tabakgeschmack soll erhalten bleiben, trotz Senken des Teer- und Nikotingehaltes [30].
- Benzylbenzoat (max. 500 ppm pro Zigarette) und Methylsalicylat (max. 2,5 ppm) werden als Aroma- und Geschmacksstoff eingesetzt, bilden aber als Pyrolyseprodukt u. a. Phenol.
- Aus allen Zimtverbindungen (Methylcinnamat, Zusatz bis 20 ppm, Zimtalkohol und Hydrozimtalkohol) sowie aus Phenylethanol, Zusatz bis 40 ppm, kann sich Styrol bilden, das im Verdacht steht, Krebs zu erregen.

Zigarettenindustrie:

- Bei der Behandlung von SENCAR-Mäusen mit Zigarettenrauch-Kondensat von Referenzzigaretten und Zusatzstoff-Zigaretten traten Unterschiede in der Tumorverteilung auf, die jedoch keine Erhöhung des Tumorrisikos bei Zusatzstoff-Zigaretten ergaben [43].
- Von 291 getesteten Zusatzstoffen gelangt nur 1/3 aus der Zigarette in die Branntzone, davon 99% intakt (weniger als 1% Pyrolyse), von den anderen 2/3 unterliegen 95% ebenfalls nicht der Pyrolyse [42].
- Zusatzstoffmixturen beeinflussen nicht die „Hoffmann-Analyten“ (Liste von 44 im Zigarettenrauch festgestellten besonders gesundheitsgefährdenden Substanzen) und verändern nicht die biologische Aktivität der Rauchpartikel (getestet mit drei in-vitro Bioassays für Genotoxizität und Zytotoxizität) [42].
- Zusatzstoffmixturen verändern nicht die Zusammensetzung der Rauchpartikel, führen zur Verringerung der Phenole, NO_x, Benzo[a]pyren und einiger aromatischer Amine im Rauch und erhöhen den Anteil von Ammoniak, HCN, Formaldehyd und einiger Carbonylverbindungen [10].
- Die meisten „casing ingredients“ hatten keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Zusammensetzung des Rauches [42].

Eine Vielzahl von Untersuchungen zur Toxizität von Tabakzusatzstoffen wurden von der Zigarettenindustrie durchgeführt und publiziert. Testergebnisse für einzelne Aromastoffe liegen nur z.T. vor. Einheitliches Ergebnis verschiedener Studien ist:

Bei Zigaretten mit Zusatzstoffen ist keine signifikante Erhöhung der biologischen Aktivität zu beobachten [44]. Viele aromatisierende Tabakzusatzstoffe sind mit den Inhaltsstoffen des Tabaks strukturell identisch oder ähnlich und bereits in den 50er Jahren fand man heraus, dass die Zugabe solcher Substanzen zum Tabak zu keiner signifikanten Erhöhung des Gesamtgehaltes an polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen oder Benzo[a]pyrenen im Hauptstromrauch führt [44]. Weiterhin sind viele Aromastoffe so stark flüchtige Verbindungen, dass sie bald nach Öffnen der Zigaretenschachtel verschwinden [32].

4.8.4 Kakao

Unabhängige Wissenschaftler:

- Es sind insges. 10 psychoaktive Substanzen im Kakao bekannt: Theobromin, Coffein, Serotonin, Histamin, Tryptophan, Phenylethylamin, Tryptamin, Tyramin, Octopamin und Anandamid. Die Menge, in der sie im Tabak vorkommen, reicht jedoch nicht aus, um die Abhängigkeit von der Zigarette direkt zu steigern. Für

eine bronchoaktive Wirkung sind die Konzentrationen an Theobromin und Coffein ebenfalls zu gering [45].

- Die Pyrolyseprodukte der Substanzen hemmen das Enzym MAO (Monoaminoxidase) und haben somit eine antidepressive Wirkung, was indirekt zur Steigerung der Abhängigkeit beitragen kann [45].

Zigarettenindustrie:

- Kakao gilt laut FDA als „Generally Recognized as Safe“, hat einen geringen Grad an akuter Toxizität und wurde als nicht kanzerogen und nicht teratogen getestet [46].
- Tierstudien zeigten eine Toxizität von Theobromin gegenüber Sertoli-Zellen bei Ratten, nicht aber bei Hamstern oder Hunden [46].
- Theobromin stimuliert das ZNS nicht in der Weise wie Theophyllin oder Coffein [46].
- Rauchversuche mit Zigaretten, die Kakao enthalten, zeigten keine biologisch relevanten Veränderungen in der Zusammensetzung toxischer Rauchbestandteile [46].
- Studien zu Genotoxizität und Cytotoxizität und 90-tägige Inhalationsstudien zeigten keine signifikanten Effekte [46].
- 60 % der im Kakao identifizierten Substanzen kommen auch im Tabak/Tabakrauch vor [32].
- Die Mehrheit der Konsumenten mögen das Kakaoaroma [32].
- Bei der Pyrolyse von Kakao entstehen Kohlenwasserstoffe, Phenole, Cumen, Styren, Decan, Tridecan [32].
- Bis jetzt wurde die Pyrolyse von Proteinen aus Kakao oder das Rauchen von kakaobehandeltem Tabak noch nicht ausreichend untersucht [32].
- Die Zugabe von Kakao zum Tabak steigert den Gehalt an Phenolen und Benzo[a]pyren im Rauch [32].

4.8.5 Zucker

Unabhängige Wissenschaftler:

- Die Zugabe von Zuckern zu Zigaretten resultiert in einer Zunahme an Acetaldehyd im Zigarettenrauch [47]
- Acetaldehyd und Nikotin wirken synergistisch bei der Erhöhung des Abhängigkeitspotentials von Nikotin [47]

Zigarettenindustrie:

- Bei der Pyrolyse von Einfachzuckern (Glucose, Fructose, Sucrose) wurden verschiedene aromatische Kohlenwasserstoffe nachgewiesen, inklusive Benzo[a]pyren und niedermolekularer Phenole [32].
- Die Hauptlieferanten für Acetaldehyd sind natürlich im Tabak vorkommende Polysaccharide (wie Zellulose) [36].
- Aus Glucose entsteht beim Erhitzen 2-Furaldehyd und 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd sowie 2-Acetylfuran, 2-Methyl-2-penten-1-on, 2-Hydroxy-3-methyl-2-penten-1-on, β -Angelikalacton, γ -Butyrolacton [32].
- Pektin gilt als Precursor für Phenole [32].
- Tabakwachse gelten als Precursor für aromatische Kohlenwasserstoffe [32].
- Lignine, Pektine, Stärke, Cellulose gelten als Precursor für einfache Phenole [32].
- Steigende Mengen an Zuckern senken den pH-Wert des Rauches [32].

- Tabake mit hohen Zuckergehalten (flue-cured-Tabak, Orient-Tabak) erzeugen Zigarettenrauchkondensat mit größerer spezifischer Tumorgenizität als Tabake mit niedrigen Zuckergehalten (Burley-Tabak, Maryland-Tabak) [32].
- Während des Rauchens entstehen aus Zuckern niedermolekulare Aldehyde (Acetaldehyd, Formaldehyd, Acrolein) [32].
- Die Verbraucherakzeptanz ist proportional zum Zuckergehalt von Tabak-Blend-Mischungen [32].

4.8.6 Menthol

Unabhängige Wissenschaftler:

- Menthol-Zigaretten können bis maximal 2 % Menthol zugesetzt sein. Durchschnittlich wurden 3,1 mg Menthol/Zigarette gefunden [48].
- Menthol wird auch in nahezu allen nicht Menthol-Zigaretten verwendet, um die Härte des Rauches zu senken und den Rauch weicher zu machen [8].
- Der Raucher erlebt ein „cooling“ und hat das Gefühl freier zu atmen durch Stimulation des Nervus Trigemini [13].
- Damit ist eine tiefere Inhalation des Rauches und ein längeres Anhalten des Atems und dadurch wiederum eine stärkere Exposition mit dem Zigarettenrauch verbunden [48].
- Menthol hat direkte respiratorische Effekte wie Bronchodilatation und führt zu gesteigerten Irritationen [13].
- Menthol wirkt synergistisch mit Nikotin und hat eigene neuro-pharmakologische Effekte [13].
- Durch das Rauchen von Menthol-Zigaretten besteht ein erhöhtes Risiko gegenüber Nichtmenthol-Zigaretten für die Entstehung von Lungenkrebs [48].
- Menthol steigert die Permeabilität der Zellmembranen, was wiederum zu einer stärkeren Absorption von Toxinen im Rauch führt [48]. Menthol könnte durch seine sensorische Stimulation die Tabakabhängigkeit fördern [48].
- Menthol bewirkt einen langsameren Nikotin-Abbau im Körper. Menthol-Zigaretten hemmen offensichtlich die oxidative Metabolisierung zu Cotinin (durch Hemmung der Aktivität von CYP2A6) und vermindern die Glucuronidierung von Nikotin [48].
- Eine verminderte Nikotin-Metabolisierung steigert die systemische Verfügbarkeit von Nikotin [48].
- Raucher von Menthol-Zigaretten nehmen täglich etwa 12,5 mg Menthol auf (bei 20 Zigaretten/Tag), was einer Aufnahme von 0,625 mg Menthol pro Zigarette entspricht. Es werden also ca. 20 % des Menthols aus der Zigarette vom Raucher systemisch aufgenommen [48].

Zigarettenindustrie:

- Menthol wird in vielen Lebensmitteln verwendet und ist laut FEMA „Generally Recognized as Safe“, die mögliche durchschnittliche Einnahme pro Tag (PADI) für Menthol liegt bei 0,89 mg/kg KG/Tag [49].
- Der Höchstwert für Menthol in Zigaretten liegt bei 1,85 % pro Zigarette (18.500 ppm /Gewicht Tabak) [49].
- Menthol unterliegt keiner Pyrolyse, der Transfer von Menthol in den Rauch liegt < 10 % (0,8 mg Menthol/Zigarette im Rauch) [49].

- Rauchstudien mit Zigaretten, die Menthol enthalten zeigten gelegentlich Veränderungen in einigen analysierten Parametern, die aber nicht zu potentiellen biologischen Effekten führten [49].
- Studien zu Genotoxizität und Cytotoxizität zeigten keine signifikanten Menthol-bezogenen Effekte [49].
- Die Ergebnisse der Studien gelten nur für Konzentrationen unterhalb der Maximalkonzentration für Menthol in Zigaretten, weitere Studien sind geplant [49].

4.8.7 Feuchthaltemittel (Glycerol, Propylenglycol, Triethylenglycol)

Im Zigarettentabak können Glycerol bis zu 25 mg/g, Propylenglycol bis zu 20 mg/g und Triethylenglycol bis zu 20 mg/g enthalten sein.

Unabhängige Wissenschaftler:

- Propylenglycol wird als "Top Dressing" dem Tabak zugesetzt und dient als Lösungsmittel für flüchtige Aromastoffe und als Feuchthaltemittel [8].
- Propylenglycol kann Propylenoxid enthalten oder durch Wasserabspaltung bei der Pyrolyse bilden. Dies ist ein mögliches Kanzerogen (im Rauch einiger Zigaretten wurde 12-100 ng Propylenoxid/Zigarette bestimmt) [8].
- Propylenoxid hat sich im Tierversuch als Kanzerogen erwiesen, wirkt stark haut- und schleimhautreizend, seine Dämpfe erzeugen Übelkeit und Brechreiz [22].
- Glycerin könnte im Rauch teilweise als Carrier in der Dampfphase für Stoffe wie Nikotin dienen [8].
- Aus Glycerol entsteht beim Verbrennen toxisches Acrolein [8].

Zigarettenindustrie:

- Glycerol und Propylenglycol sind laut FDA "Generally Recognized as Safe" und zeigen schwache akute Toxizität, sind nicht kanzerogen und nicht teratogen (keimschädigend) [50], [51].
- Glycerol kommt natürlicherweise in Tabak vor, Propylenglycol und Triethylenglycol dagegen nicht [32].
- Rauchstudien zeigen, dass der Transfer von Glycerol in den Rauch 9% beträgt, und dass Acrolein das Hauptpyrolyseprodukt ist [50].
- Rauchstudien mit Zigaretten, die Glycerol enthalten zeigen keine signifikant erhöhte Menge Acrolein im Rauch [50].
- Es zeigten sich keine biologisch relevanten Veränderungen in der Zusammensetzung toxischer Rauchbestandteile durch Zusatz von Glycerol [50].
- Studien zu Genotoxizität und Cytotoxizität und 90-tägige Inhalationsstudien zeigten keine signifikanten Effekte [50],[51].
- Spezifische Untersuchungen zu Propylenoxid wurden nicht durchgeführt [51].
- Untersuchungen der Aldehydkonzentrationen im Rauch zeigen keine erhöhten Werte in Zigaretten, die mit Propylenglycol oder Glycerol versetzt sind [51].
- Die aktuelle Maximalkonzentration für Propylenglycol in Zigaretten beträgt 4% (40.000 ppm pro Tabak) [51].
- Erhöhte Mengen an Propylenglycol führen zu erhöhten Mengen an Propylenoxid im Rauch. Sie verringern hingegen die Menge an Phenol im Rauch [51].
- Unbehandelte Zigaretten zeigen ebenfalls geringe Mengen Propylenoxid [51].
- Feuchthaltemittel haben einen Verdünnungseffekt auf verbleibende Partikelphasenbestandteile des Hauptstromrauches und somit verminderte Wirkungen auf die biologische Aktivität, z.B. Mutagenität [32].

4.8.8 Lakritze

Unabhängige Wissenschaftler:

- Lakritze soll den Rauch geschmeidig und sanft machen und die Tabaksüße erhöhen [30].
- Ein Hauptbestandteil von Lakritze ist Glycyrrhizin, was bronchodilatatorisch wirkt und somit die Inhalation von Rauch erleichtern kann [30].
- Glycyrrhetinsäure (Aglycon von Glycyrrhizin) aus Lakritze kann in hohen Dosen blutdrucksteigernd wirken und Ödeme und Hypokaliämien erzeugen [52].

Zigarettenindustrie:

- Lakritze wird in vielen Lebensmitteln verwendet und ist laut FEMA „Generally Recognized as Safe“[53].
- 209 verschiedene Komponenten (u.a. Alkylpyrazine, Aminosäuren, Aminosäurezucker, Glycyrrhizin) sind in Lakritze identifiziert worden, 172 davon kommen auch im Tabak/Tabakrauch vor [32].
- Die aktuelle Maximalkonzentration für Lakritzeextrakt in Zigaretten beträgt 1,1315 % (11.315 ppm pro Tabak) [53]
- Glycyrrhizin besitzt immunstimulierende Wirkung [53].
- Glycyrrhizin und Lakritze besitzen geringe akute Toxizität [53].
- 1-Propen, Essigsäure, 1-Hydroxy-2-propanon, Phenole (Phenol, o-,m-,p-Cresol und andere Phenole), und Trimethylnaphthalene sind die Hauptpyrolyseprodukte, weiterhin entstehen Benzol und Acetaldehyd bei der Pyrolyse [32], [53].
- Während des Rauchens könnten aus Glycyrrhizin Phenole und aromatische Kohlenwasserstoffe entstehen [44].
- Lakritze im Tabak gilt als Quelle für aromatische Kohlenwasserstoffe im Rauch [32].
- Rauchstudien zeigen keine Unterschiede der Geno- und Cytotoxizität im Rauch oder Rauchkondensat im Vergleich zu lakritzefreien Zigaretten [53].
- Hohe Lakritzekonzentrationen führen zu erhöhten Phenol- und Formaldehydkonzentrationen im Rauch [53].
- Es gab keine signifikanten Effekte auf den Respirationstrakt bei der 90-Tage-Inhalationsstudie an Ratten [53].

4.8.9 Nikotin

Die toxikologischen Eigenschaften von Nikotin sind seit langem umfassend untersucht worden. Sie sollen hier trotzdem zum Vergleich nochmals aufgeführt werden. Speziell unter dem Gesichtspunkt des Rauchens sind folgende Eigenschaften von Interesse:

RIVM report 650270004 zur Wirkung von Nikotin [54]:

- Überwindet die Blut-Hirn-Schranke
- Bindet im Gehirn an prä- und postsynaptischen nikotineren Acetylcholin-Rezeptoren
- Nur (S)-Nikotin ist das aktive Enantiomer
- Die pK_S-Werte von Nikotin liegen bei 3,12 und 8,02 [55].
- pH von Zigarettenrauch amerikanischer Zigaretten: 5,5 (Nikotin liegt ionisiert vor)
- pH von Pfeifentabak und Zigarrentabak: 8,5 (Nikotin liegt in größerem Umfang als freie Base vor)
- Bei physiologischem pH-Wert (7,4) in den Lungen wird Nikotin absorbiert und gelangt so in den arteriellen Blutkreislauf.
- Nach 7-9 sec ist Nikotin im Gehirn angeflutet, dort verbleibt es für ca. 10-19 sec.

- Metabolismus: 80% zu Cotinin, 4 % zu Nikotin-N-Oxid
- In autonomen Ganglien: Nikotin ruft eine kurze und anschließend eine langanhaltende Ganglienblockade hervor und kann sowohl den Sympathikus als auch den Parasympathikus blockieren und stimulieren und provoziert eine Catecholaminfreisetzung aus der Nebenniere und den sympathischen Nervenenden.
- Folge: Blutdruckanstieg und Herzfrequenzsteigerung, sowie periphere Vasokonstriktion
- Primärer Mechanismus der Nikotinabhängigkeit: Abgabe von Dopamin ins Gehirn durch Nikotin
- Potentiell letale Dosis: ab 40-60 mg. Das entspricht der oralen Aufnahme von drei Zigaretten.

Folgende Symptome der Nikotinvergiftung sind bekannt:

- Inhalation: Magenschmerzen, brennendes Gefühl, Verwirrung, Krämpfe, Durchfall, Schwindel, Kopfschmerzen, Schweißausbruch, Übelkeit, Erbrechen, Mattigkeit
- Haut: Resorptionsgefahr, Rötung, brennendes Gefühl
- Augen: Rötung, Schmerz

Chemische Gefahren (nur bei Umgang mit der reinen Substanz):

- Zersetzung bei Erhitzen unter Bildung von giftigen Dämpfen (Stickoxide), reagiert heftig mit starken Oxidationsmitteln, greift Gummi und Kunststoffe an
- Allgemeine Inhalationsgefahr: beim Verdampfen bei 20°C tritt schnell eine schädliche Kontamination der Luft ein
- Wirkungen bei Kurzzeitexposition: Die Substanz reizt die Augen und die Haut. Möglich sind Effekte auf Herzkreislauf, ZNS. Bildung von Krämpfen, Atemstörungen. Exposition oberhalb des Arbeitsplatzgrenzwertes kann zum Tode führen. Die Effekte sind u.U. verzögert. Ärztliche Beobachtung notwendig.
- Wirkungen bei Langzeitexposition: Tierversuche zeigen, dass die Substanz möglicherweise die menschliche Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen kann.
- Arbeitsplatzgrenzwerte: TLV:- ppm; 0,5 mg/m³ (TWA) (Haut) (ACGIH 1996/97). MAK: 0,07 ppm; 0,5 mg/m²; II;1;H (1998)

4.8.10 Nebenalkaloide des Tabaks

Literaturdaten zur Wirkung der Nebenalkaloide im Vergleich zu Nikotin sind in Tabelle 23 aufgeführt. Die Wirkungen sind in „molarer Potenz“ angegeben (Nikotin=100): Für die ersten drei Parameter Blutdrucksteigerung, Darmkontraktion und Catecholaminfreisetzung aus der Nebenniere sind die Daten zusätzlich in Abb. 30 veranschaulicht. Aus der Darstellung geht hervor, dass Nikotin bei all diesen Eigenschaften die höchste Aktivität besitzt, dass aber die strukturell ähnlichsten Verbindungen Normikotin und Anabasin auch noch eine erhebliche Wirksamkeit besitzen. Allerdings gilt diese Darstellung für gleiche molare Konzentrationen. Da aber die Nebenalkaloide in wesentlich niedrigerer Konzentration vorkommen, ist der absolute Beitrag beim Rauchen wahrscheinlich gering. Dieses wird auch durch neuere Angaben über die Mengen der Nebenalkaloide im Rauch von Zigaretten bestätigt (Tabelle 21). Die Verteilung einiger Amine und der Alkaloide im Hauptstromrauch und im Nebenstromrauch sind in Tab. 21 und Tab. 22 dargestellt [56].

Tabelle 21. Literaturangaben zu Menge von Substanzen im Hauptstromrauch von Zigaretten*

Substanz	Menge im Rauch
Ammoniak	50-130 µg
Methylamin	12-29 µg
n-Propylamin	1,6-3,4 µg
n-Butylamin	360 ng
Anilin	360 ng
Pyridin	16-46 µg
Pyrol	16-23 µg
Nikotin	0,8-2,3 mg
<i>Myosmin</i>	13-33 µg
<i>Nicotyrin</i>	4-40 µg
<i>Anatabin</i>	2-20 µg
<i>2,3-Bipyridin</i>	16-22 µg

* Im Hauptstromrauch von Zigaretten gefundene Substanzen (aus Baker 1999, prepared by Philip Morris, USA November 2002)

Tabelle 22. Alkaloidgehalte im Zigarettenrauch

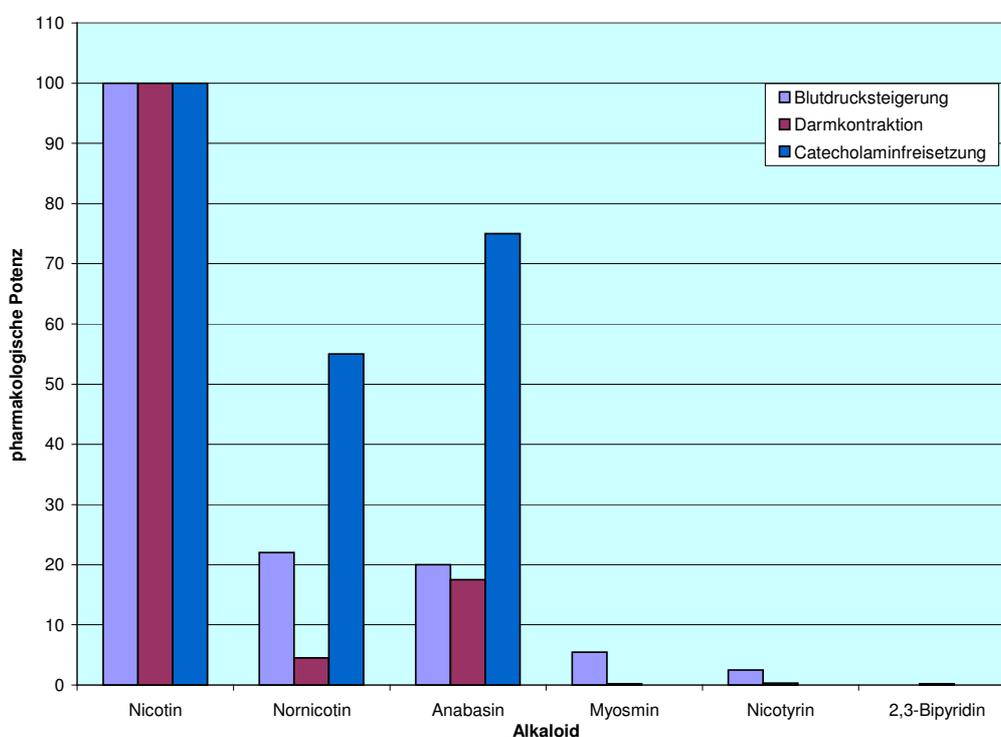
Parameter	Hauptstromrauch (mg/Zigarette)	Nebenstromrauch (mg/Zigarette)
Nikotin	2,85	0,91
Nornikotin	0,25	0,77
Anabasin	<0,01	0,02
Anatabin	0,02	<0,01

Tabelle 23a. Vergleich der Wirkungen von Nikotin und seinen Nebenalkaloiden im Tierversuch

	Blutdruck- steigerung	Ileum- kontraktion	Catecholamin- freisetzung aus der Nebenniere	Augenmuskel- kontraktion	Blockade der Zwerchfellkon- traktion
	Ratten	Meer- schweinchen	Katzen	Frösche	Meer- schweinchen
Nikotin	100	100	100	100	100
Nornikotin	22	4,5	55	61	73
Anabasin	20	17,5	75	28	50
Myosmin	5,5	0,2	0	3	12
Nicotyrin	2,5	0,3	0	0,4	<0,8
2,3-Bipyridin	0	0,2	0	0	4

Tabelle 23b. Vergleich der Wirkungen von Nikotin und seinen Nebenalkaloiden im Tierversuch, Fortsetzung

	Hemmung des Kniereflexes Katzen	Hemmung des Beugerreflexes Katzen	Hemmung des Beugerreflexes Hühner	Hemmung des Streckerreflexes Hühner
Nikotin	100	100	100	100
NorNikotin	54	54	36	27
Anabasin	17	33	33	20
Myosmin	3	<3	3	3
Nicotyrin	17	<10	51	10
2,3-Bipyridin	0,1	<0,1	0	0

**Abb. 30.** Literaturangaben zum Vergleich der pathologischen Potenz von Nikotin und seinen Nebenalkaloiden im Tierversuch hinsichtlich einiger cholinergischer Parameter

Darüber hinaus wurden in der Literatur folgende pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften beschrieben:

- Anabasin besitzt cardiovaskuläre Effekte und, oral oder sublingual verabreicht, könnte es der Raucherentwöhnung dienen [56].
- Einige der Nebenalkaloide können als sekundäre Amine während der Lagerung nitrosiert werden oder kanzerogene Nitrosamine bilden [56]. Sie werden während der Metabolisierung in chemisch reaktive Zwischenprodukte (Diazoalkane und Alkylkationen) umgewandelt, die biologische Makromoleküle (Proteine, Nukleinsäuren) alkylieren oder deren Funktion beeinflussen können [56].

- Bei Rauchern findet man alle Alkaloide in messbaren Konzentrationen im Urin. Dabei korreliert die Nikotinaufnahme vom Tabak mit den Alkaloidkonzentrationen im Urin sehr gut [40] .
- Wegen langer Plasmahalbwertszeiten von Anabasin (16h) und Anatabin (10h) lassen diese sich bei Rauchern noch 1-2 Tage nach Einstellen des Rauchens nachweisen [54].
- N-Nitrosornikotin (NNN), 4-(N-methyl-N-nitrosamino)1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und N-Nitrosoanatabin (NAT) gelten als kanzerogene Nitrosamine und entstehen aus, Nornikotin, Anatabin und 4-Methylamino-1-(3-pyridyl)-1-butanon (einer Vorstufe in der Biosynthese des Nikotins) während der Tabakverarbeitung und während des Rauchens [57; 58].
- Fermentationsprozesse scheinen die Entstehung von Nitrosaminen aus Alkaloiden im Tabak zu fördern [57].
- Der Gehalt von NNN, NNK und NNA im Tabak und im Rauch hängt vom Gehalt an Nitrat, Proteinen und Alkaloiden im Tabak ab [57].
- Im Tabak kommerzieller Filterzigaretten wurden bestimmt:
NAT: 1,3-2,0 µg/g ; NNN: 1,4-11,9 µg/g ; NNK: 0,37-1,1 µg/g [57].
- Im Hauptstromrauch kommerzieller Filterzigaretten wurden bestimmt:
NAT: 0,18-0,37 µg/Zig. ; NNN: 0,31-1,0 µg/Zig. ; NNK: 0,15-0,36 µg/Zig. [57].
- Im Nebenstromrauch kommerzieller Filterzigaretten wurden bestimmt:
NAT: 0,15µg/Zig. ; NNN: 0,15µg/Zig. ; NNK: 0,19 µg/Zig. [57].

5 Schlussfolgerungen

Aus den voranstehenden Untersuchungen können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Die HS-SPME/GC-MS ist als Hauptmethode zum Screening von Zigaretten auf leicht- und mittelflüchtige Zusatzstoffe geeignet. Dabei erwies sich die parallele Untersuchung eines sauren, eines neutralen und eines basischen wässrigen Tabakextraktes als notwendig.
- Zur Analyse schwerer flüchtiger Verbindungen und zur Quantifizierung spezieller Substanzen, z. B. der Tabakalkaloide, bewährt sich die zusätzliche Flüssigextraktion mit lipophilen Lösungsmitteln und anschließender GC-MS-Messung nach Direktinjektion.
- Für die gezielte Untersuchung von Zigaretten auf die Anwesenheit von Ammoniumsalzen kann die NH_3 -selektive Elektrode zuverlässig eingesetzt werden. Die über Differenzmessung nach dem gleichen Verfahren durchgeführte Harnstoffbestimmung ist hingegen nur bei deutlich über den natürlichen Gehalt hinausgehenden Konzentrationen geeignet.
- Komplexe Zusatzstoffgemische konnten mit den bisher etablierten Methoden nicht nachgewiesen werden.
- In den im Handel befindlichen Zigaretten sind eine Reihe von Zusatzstoffen nachweislich vorhanden, bei anderen, natürlich im Tabak vorhandenen Substanzen, kann von einer Aufstockung ausgegangen werden. Das betrifft Substanzen wie Benzylalkohol, 2-Ethyl-1-hexanol oder Menthol.
- Menthol wurde als Zusatzstoff nicht nur in Menthol-Zigaretten nachgewiesen. Auch in Nicht-Menthol-Zigaretten sind z.T. größere Mengen Menthol bestimmt worden.
- Andere, in Zusatzstofflisten häufig angegebene Substanzen wie Pyridin, Furfurylamin, Benzaldehyd, Acetophenon und Indol wurden hingegen nur in ähnlichen Konzentrationen gefunden wie in Rohtabaken und Referenzzigaretten.
- Die Konzentration von Nikotin im Tabak liegt mehr als eine Größenordnung über der deklarierten Menge im Rauch und kennzeichnet die hohe akute Giftigkeit von Tabak.
- Ab einer Ammoniakkonzentration von 1 mg/g in Zigaretten kann davon ausgegangen werden, dass dem Tabak während der Zigarettenherstellung Ammoniumsalze zugegeben worden sind.
- Ein Zusatz von Harnstoff zu den untersuchten Zigaretten konnte nicht nachgewiesen werden. Für die Bestimmung von Harnstoff in Zigaretten ist die Überprüfung der bisherigen Ergebnisse mit einer zweiten Methode ratsam.
- Bei der Messung des pH-Wertes von wässrigen Zigaretten- und Tabakextrakten muss zur Erreichung reproduzierbarer Werte eine genaue Zeitspanne (5 min) zwischen Extraktion und Messzeitpunkt eingehalten werden.
- Bei der Wirkung der Zusatzstoffe steht die Steigerung der Attraktivität der Zigarette (Erniedrigung des Einstiegsalters, Unterdrückung der natürlichen Warnsignale des Körpers, Akzeptanzerhöhung bei Nichtrauchern) gegenüber den ebenfalls zu beachtenden toxischen Effekten im Vordergrund.

- Es ist erforderlich, bei der Beurteilung der Toxizität von Additiven nicht nur die jeweilige Substanz zu betrachten, sondern vor allem die Bildung von Pyrolyseprodukten zu klären und deren Wirkung genau zu untersuchen. Die Zulassung eines Stoffes als Bestandteil von Lebensmitteln und die Deklaration als „Generally recognized as safe“ ist damit kein Maßstab für deren Ungefährlichkeit und rechtfertigt nicht die Verwendung in Tabakprodukten.

6 Empfehlungen

Nach Auswertung der in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen können folgende Empfehlungen gegeben werden:

Zur Deklaration und analytischen Prüfung von Zusatzstoffen

- Die vom Zigarettenhersteller erstellte Deklaration sollte auch die quantitative Angabe der Zusatzstoffe enthalten, da mögliche schädigende Wirkungen allein aus der qualitativen Angabe nicht abgeschätzt werden können. Bei komplexen Gemischen (z. B. Aprikosenextrakt, Baldrianwurzelextrakt, Rosenöl, Pflaumenextrakt...) sollten zusätzlich die Hauptwirkstoffe deklariert werden.
- Zusätzlich zu dieser Deklaration sollten Zigaretten durch Screeningmethoden auf die deklarierten und weitere Zusatzstoffe geprüft werden. Diese Kontrolle sollte durch spezialisierte Labors erfolgen, die von der Zigarettenindustrie unabhängig sind. Die in diesem Projekt entwickelten Methoden sollten in solche Prüfverfahren einbezogen werden.
- Das Prüfverfahren sollte u. a. die quantitative Bestimmung von Nikotin in den Zigaretten, die Charakterisierung des Säure-Base-Status, die Analyse von Ammoniumionen und Harnstoff, ein Screening auf flüchtige und mittelflüchtige saure, neutrale und basische Substanzen und eine quantitative Bestimmung der Hauptzusatzstoffe enthalten.
- Die bisher übliche ISO-Methode zur Bestimmung von Nikotin im Rauch sollte durch ein verbessertes Verfahren ersetzt werden, das nicht nur das partikelgebundene Nikotin sondern auch das in der Gasphase erfasst.
- Neben dem Nikotingehalt im Gesamtrauch sollte ein Höchstwert für den Nikotingehalt im Tabak der Zigarette festgelegt werden.
- Es sind vertiefte Untersuchungen zur Bildung von Pyrolyseprodukten aus Zusatzstoffen beim Rauchvorgang und über deren schädigende Wirkungen erforderlich, um die auf diesem Gebiet vorhandene große Erkenntnislücke zu schließen.
- Aus solchen Arbeiten sollten cut-off-Werte für die im oben vorgeschlagenen Prüfverfahren ermittelten Parameter und Konzentrationen abgeleitet werden.

Zur Revision der erlaubten Zusatzstoffe

- Zucker (z. B. C₆-Zucker), die durch Pyrolyse Aldehyde oder Epoxide bilden, sollten verboten werden. Die Abwesenheit solcher Zucker muss durch spezielle analytische Verfahren kontrolliert werden.
- Feuchthaltemittel (z. B. Triethylenglycol, 1,2-Propylenglycol oder Glycerol), die durch Pyrolyse Aldehyde (z. B. Acrolein), Epoxide (z. B. Propylenoxid) oder Säuren bilden oder freisetzen, sollten verboten werden. Die Abwesenheit solcher Feuchthaltemittel muss durch analytische Verfahren kontrolliert werden.
- Ammoniumsalze und Ammoniak liefernde Substanzen (z.B. Ammoniumcarbonat, Diammoniumhydrogenphosphat, Ammoniumhydroxid, Harnstoff) sowie andere den Rauch alkalisierende Substanzen (z. B. Natriumcarbonat) sind in Tabak und tabakfremden, in Zigaretten verarbeiteten Materialien als Zusätze zu verbieten.
- Sekundäre Amine sind als Zusätze zu verbieten, da sie kanzerogene Nitrosamine bilden.

- Menthol (als reine Substanz oder in komplexen Gemischen) sollte wegen seiner dilatierenden Wirkungen auf die Atemwege und seiner verzögernden Wirkung auf den Nikotinabbau im Körper als Zusatz verboten werden. Der natürliche Gehalt sollte analytisch überprüft werden und nicht höher als 0,20 µg/g sein.

- Komplexe Zusätze, die durch Veränderung des Geschmacks oder Geruchs das Produkt Zigarette attraktiver für Kinder und Jugendliche machen, wie z. B. Lakritze, Schokolade oder Kakao sollten untersagt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Marquardt, H. and Schäfer, S., *Lehrbuch der Toxikologie*, WbG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004.
2. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., and Strake, K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban& Fischer Verlag, München/Jena, 2001.
3. Hoffmann, D., Djordjevic, M. V., and Hoffmann, I., "The changing cigarette," *Prev.Med.*, Vol. 26, No. 4, 1997, pp. 427-434.
4. Gesetz über Lebensmittel und Gebrauchsgegenstände vom 09. Oktober 1992 (Lebensmittelgesetz, LMG) In Kraft seit 01.Juli 1995, Stand 15. Februar 2005. 2005.
5. Verordnung über Tabakerzeugnisse und Raucherwaren mit Tabakersatzstoffen (Tabakverordnung, TabV) (SR 817.06) in Kraft ab 1. November 2004. 27-10-2004.
6. EG Richtlinie 2001/37/EG Artikel 12 vom 5.Juni 2001. 2001.
7. Bates, C., Mc Neill, A., Jarvis, M., and Gray, N., "The future of tobacco product regulation and labelling in Europa: implications for the forthcoming European Union directive," *Tob.Control*, No. 8, 1999, pp. 225-235.
8. Wayne, G. F., "Chemical Additives in Cigarettes; Document prepared for WHO Scientific Advisory Committee on Tobacco Product Regulation," Oct. 2002.
9. Additives Found in American Cigarettes. 2005.
www.drugs.indiana.edu/druginfo/additives.html.
10. Baker, R. R., Pereira da Silva, J. R., and Smith, G., "The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part I: Flavorings and additives," *Food and Chemical Toxicology*, No. 42S, 3 A.D., pp. S3-S37.
11. Bates, C., Jarvis, M., and Connolly, G.. Action on Smoking and Health, London; Imperial Cancer Research Fund, London; Massachusetts Tobacco Control Program; Boston;1999.
12. Connolly, G. N., Wayne, G. D., Lymperis, D., and Doherty, M. C., "How cigarette additives are used to mask environmental tobacco smoke," *Tob.Control*, Vol. 9, No. 3, 2000, pp. 283-291.
13. Henningfield, J. E., Benowitz, N. L., Ahijevych, K., Garrett, B. E., Connolly, G. N., and Wayne, G. F., "Does menthol enhance the addictiveness of cigarettes? An agenda for research," *Nicotine.Tob.Res.*, Vol. 5, No. 1, 2003, pp. 9-11.
14. Schulze, A., Pötschke-Langer, M., and Bertram, B., "Die Tabakindustriedokumente I: Chemische Veränderungen an Zigaretten und Tabakabhängigkeit," Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Band 3, 2005.
15. Armitage, A. K., Dixon, M., Frost, B. E., Mariner, D. C., and Sinclair, N. M., "The Effect of Tobacco Blend Additives on the Retention of Nicotine and Solanesol in the Human Respiratory Tract and on Subsequent Plasma Nicotine Concentrations during Cigarette Smoking," *Chem.Res.Toxicol.*, Vol. 17, 2004, pp. 537-544.
16. Tabakverordnung (vom 20.12.1977 (BGB1. IS.2831), zuletzt geändert durch Dritte Verordnung zur Änderung der Tabakverordnung (vom 8.12.2003(BGB1. I Nr. 61 S. 2549)). 2003.
17. Philip Morris Switzerland, "Composite List of Ingredients Added to Tobacco of Philip Morris Tobacco Products Manufactured for Sale in Switzerland," 2003.

18. British American Tobacco Australia, "Composite List of Tobacco Ingredients," Reporting Period Dec. 2000 to Mar. 2001, July 2001.
19. Philip Morris LTD, "Australia Ingredients Report - Composite List of Tobacco Ingredients," Reporting Period Dec. 2000 to Mar. 2001, Dec. 2000.
20. Baker, R. R., Massey, E. D., and Smith, G., "An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity," *Food and Chemical Toxicology*, No. 42S, 4 A.D., pp. S53-S83.
21. Department of Health London, "Permitted Additives to Tobacco Products in the United Kingdom," Mar. 2000.
22. Neumüller, O.-A., *Römpps Chemie Lexikon 1-6*, Frankh'sche Verlagshandlung, W.Keller&Co., Stuttgart 1988.
23. Da Graca, L. M., Matos, A., and Oliveira, M. C., "Gas-liquid chromatographic determination of major tobacco alkaloids," *J Chromatogr A*, Vol. 898, No. 2, 2000, pp. 235-243.
24. Wu, W., Ashley, D. L., and Watson, C. H., "Determination of nicotine and other minor alkaloids in international cigarettes by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry," *Anal.Chem.*, Vol. 74, No. 19, 2002, pp. 4878-4884.
25. Yang, S. S., Smetena, I., and Huang, C. B., "Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography with nitrogen- phosphorus detection," *Anal.Bioanal.Chem.*, Vol. 373, No. 8, 2002, pp. 839-843.
26. Carmines, E. L., "Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 1: cigarette design, testing approach, and review of results," *Food Chem.Toxicol.*, Vol. 40, No. 1, 2002, pp. 77-91.
27. Clark, T. J. and Bunch, J. E., "Qualitative and Quantitative Analysis of Flavor Additives on Tobacco Products Using SPME-GC-Mass Spectroscopy," *J.Agric.Food Chem.*, Vol. 45, No. 3, 1997, pp. 844-849.
28. Fumin, P., Liangquan, S., Baizhan, L., Hongwu, T., and Shaomin, L., "Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis of the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves," *Journal of Chromatography A*, No. 1040, 2004, pp. 1-17.
29. Yang, S. S., Huang, C. B., and Smetena, I., "Optimization of headspace sampling using solid-phase microextraction for volatile components in tobacco," *J Chromatogr A*, Vol. 942, No. 1-2, 2002, pp. 33-39.
30. Bates, C., Dr.Jarvis, M., and Dr.Connolly, G., "Tobacco Additives, Cigarette Engineering and Nicotine Addiction," July 1999.
31. Wayne, G. F. and Connolly, G. N., "How cigarette design can affect youth initiation into smoking: Camel cigarettes 1983-93," *Tob.Control*, Vol. 11 Suppl 1, 2002, pp. I32-I39.
32. Rodgman, A., "Some Studies of the Effects of Additives on Cigarette Mainstream Smoke Properties. II. Casing Materials and Humectants," *Beitr.zur Tabakforschung*, Vol. 20, No. 4, 2002, pp. 279-299.
33. Pankow, J. F., Tavakoli, A. D., Luo, W., and Isabelle, L. M., "Percent free base nicotine in the tobacco smoke particulate matter of selected commercial and reference cigarettes," *Chem.Res.Toxicol.*, Vol. 16, No. 8, 2003, pp. 1014-1018.
34. Jarvis, M. and Bates, C., "Why Low Tar Cigarettes Don't Work and How the Tobacco Industry Has Fooled the Smoking Public," Mar. 1999.

35. Brunnemann, K. D. and Hoffmann, D., "The pH of tobacco smoke," *Food Cosmet. Toxicol.*, Vol. 12, No. 1, 1974, pp. 115-124.
36. Müller, L. and Röper, W., "Commentary It Ain't Necessarily So," *Beitr.zur Tabakforschung*, Vol. 19, No. 2, 2000, pp. 51-54.
37. Geiss, O. and Kotzias, D., "Determination of Ammonium, Urea and Chlorinated Pesticides in Cigarette Tobacco," *Fresenius Environmental Bulletin*, Vol. 12, No. 12, 2003, pp. 1562-1565.
38. Sloan, C. H. and Morie, G. P., "Determination of ammonia in tobacco and tobacco smoke with an ammonia electrode," *Anal.Chim.Acta*, Vol. 69, No. 1, 1974, pp. 243-247.
39. Brunt, T. M. and Verlaan, A. P. J., "Analysis of NH₄ in tobacco and NO in cigarette smoke in hundred cigarette brands," 2004.
40. van Andel, I., Schenk, I., Rambali, B., Wolterink, G., van de Werken, G., Stevenson, H., van Aerts, L. A. G. J. M., and Vleeming, W., "The health- and addictive effects due to exposure to aldehydes of cigarette smoke," Workshop on Tobacco Ingredients 30.-31.10.2003, Bilthoven 650270003/2002, 2002.
41. Cassee, R. F., "Aldehydes in Tobacco Smoke," Workshop on Tobacco Ingredients 30.-31.10.2003, Bilthoven, Oct. 2003.
42. Baker, R. R., Pereira da Silva, J. R., and Smith, G., "The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part II: Casing ingredients," *Food and Chemical Toxicology*, No. 42S, 3 A.D., pp. S39-S52.
43. Gaworski, C. L., Heck, J. D., Bennett, M. B., and Wenk, M. L., "Toxicologic evaluation of flavor ingredients added to cigarette tobacco: skin painting bioassay of cigarette smoke condensate in SENCAR mice," *Toxicology*, Vol. 139, No. 1-2, 1999, pp. 1-17.
44. Rodgman, A., "Some Studies of the Effects of Additives on Cigarette Mainstream Smoke Properties. I. Flavorants," *Beitr.zur Tabakforschung*, Vol. 20, No. 2, 2002, pp. 83-103.
45. Rambali, B. and et.al., "The contribution of cocoa additive to cigarette smoking addiction," Workshop on Tobacco Ingredients 30.-31.10.2003, Bilthoven 650270002/2002, 2002.
46. Philip Morris USA Product Integrity, "Evaluation of Cocoa for Use as a Cigarette Ingredient," Appendix 1 Review of Ingredients, Nov. 2002.
47. Bates, C., Jarvis, M., and Connolly, G., Tobacco Additives - Cigarette Engineering and Nicotine Addiction. <http://www.ash.org.uk/papers/additives/html> . 14-7-1999.
48. Benowitz, N. L., Herrera, B., and Jacob, P., III, "Mentholated Cigarette Smoking Inhibits Nicotine Metabolism," *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 310, No. 3, 2004, pp. 1208-1215.
49. Philip Morris USA Product Integrity, "Evaluation of Menthol for Use as Cigarette Ingredient," Appendix 1 Review of Ingredients, Nov. 2002.
50. Philip Morris USA Product Integrity, "Evaluation of Glycerol for Use as a Cigarette Ingredient," Appendix 1 Review of Ingredients, Nov. 2002.
51. Philip Morris USA Product Integrity, "Evaluation of Propylenglycol for Use as Cigarette Ingredient," Appendix 1 Review of Ingredients, Nov. 2002.
52. Shibata, S., "A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice," *Yakugaku Zasshi*, Vol. 120, No. 10, 2000, pp. 849-862.

53. Philip Morris USA Product Integrity, "Evaluation of Licorice Extrakt for Use as Cigarette Ingredient," Appendix 1 Review of Ingredients, Nov. 2002, Nov. 12002.
54. van Andel, I., Rambali, B., van Amsterdam, J., Wolterink, G., van Aerts, L. A. G. J. M., and Vleeming, W., "Nicotine Addiction," Workshop on Tobacco Ingredients 30.-31.10.2003, Bilthoven 650270004/2003, 2003.
55. Pankow, J. F., Mader, B. T., and et.al., "Conversion of Nicotine in Tobacco Smoke to its volatile and available free-base form through the action of gaseous ammonia," *Environ.Sci.Technol.*, Vol. 31, No. 8, 1997, pp. 2428-2433.
56. Jacob, P., III, Yu, L., Shulgin, A. T., and Benowitz, N. L., "Minor tobacco alkaloids as biomarkers for tobacco use: comparison of users of cigarettes, smokeless tobacco, cigars, and pipes," *Am.J Public Health*, Vol. 89, No. 5, 1999, pp. 731-736.
57. Hoffmann, D., Adams, J. D., Piade, J. J., and Hecht, S. S., "Chemical studies on tobacco smoke LXVIII. Analysis of volatile and tobacco-specific nitrosamines in tobacco products," *IARC Sci Publ.*, No. 31, 1980, pp. 507-516.
58. Boyland, E., "The possible carcinogenic action of alkaloids of tobacco and betel nut," *Planta Med.*, 1968, pp. 13-23.