

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 Peter Blatter
Schwarzenburgstr. 165
CH 3003 Bern
Schweiz

Berlin, 15.05.2006

Abschlussbericht

Verfügung-Nr. 05.000927 / Nachweis von Tabakzusatzstoffen in handelsüblichen Zigaretten

C.Merckel und F.Pragst

Die vorliegende Forschungsarbeit wurde mit Unterstützung des
TABakpräventionsfonds der Schweiz, Vertrag Nr. 05.000927, erarbeitet.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
TABELLENVERZEICHNIS	5
ZUSAMMENFASSUNG	7
1 EINLEITUNG	10
2 THEORETISCHER TEIL	11
2.1 CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSUCHTEN SUBSTANZGEMISCHE	11
2.1.1 Gesamtübersicht über verwendete Zusatzstoffgemische	11
2.1.2 Lakritzeextrakt	12
2.1.3 Kakao	13
2.1.4 Pfefferminzöl	15
2.2 BISHER VERWENDETEN ANALYSENMETHODEN ZUM NACHWEIS DER	19
SUBSTANZGEMISCHE (LITERATURRECHERCHE)	19
2.2.1 Lakritze	19
2.2.2 Kakao	19
2.2.3 Pfefferminzöl	20
2.3 THEORETISCHER HINTERGRUND DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN	
ANALYSENMETHODEN	21
2.3.1 HS-SPME – GC/MS	21
2.3.2 GC / MS zur Bestimmung der Alkaloide	21
2.3.3 Enzymatische UV-Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff	21
mittels Testkit	21
2.3.4 HPLC/DAD-Methode	22
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	24
3.1.1 GC/MS-System	24
3.1.2 Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)	24
3.1.3 Photometrische Ammoniak- und Harnstoffbestimmung	24
3.1.4 HPLC-DAD-Systeme	25
3.1.4 Weitere Laborgeräte und Materialien	25
3.2 CHEMIKALIEN UND REFERENZSUBSTANZEN	26
3.2.1 Chemikalien zur Probenvorbereitung für HS-SPME-Untersuchungen	26
3.2.2 Chemikalien zur Probenvorbereitung für Alkaloidbestimmung	28
3.2.3 Chemikalien zur Probenvorbereitung für die photometrische	28
Ammoniak- und Harnstoffbestimmung	28
3.2.4 Chemikalien zur Probenvorbereitung für Glycyrrhizin- und	28
Theobrominbestimmung	28
3.3 TABAK- UND ZIGARETTENPROBEN	29
3.4 DURCHFÜHRUNG DER ANALYSEN	30
3.4.1 HS-SPME Untersuchungen	30
3.4.2 Alkaloidbestimmung	34
3.4.3 Photometrische Ammoniak- und Harnstoffbestimmung	36
3.4.4 Bestimmung von Glycyrrhizin	38
3.4.5 Bestimmung von Theobromin	39
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
4.1 QUALITATIVES SCREENING MITTELS HS/SPME-GC/MS	40
4.1.1 Untersuchung der zusätzlichen Zigaretten	40
4.1.2 Untersuchung der Rohtabake	44

4.1.3 Vergleich der Rohtabake mit Zigaretten	50
4.2 QUANTITATIVER NACHWEIS EINIGER ZUSATZSTOFFE MITTELS HS-SPME /	53
GC-MS	53
4.2.1 Validierung der Methode	53
4.2.2 Quantifizierung natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Zigaretten	54
4.2.3 Quantifizierung natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Rohtabaken	60
4.2.4 Quantifizierung nicht natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Zigaretten	63
4.2.5 Quantifizierung nicht natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Tabakproben	67
4.3 QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON ALKALOIDEN	70
4.3.1 Validierung der Methode	70
4.3.2 Quantitative Alkaloidbestimmung in Zigaretten	70
4.3.3 Quantitative Alkaloidbestimmung in Tabakproben	71
4.3.4 Vergleich der Alkaloidgehalte in Tabaken und Zigaretten	72
4.4 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON AMMONIAK UND HARNSTOFF	74
4.4.1 Angaben zur Validierung der Methode	74
4.4.2 Ammoniak- und Harnstoffkonzentrationen in Zigaretten	74
4.4.3 Ammoniak- und Harnstoffkonzentrationen in Rohtabaken	79
4.4.4 Vergleich der Rohtabake und Zigaretten	81
4.5 NACHWEIS VON ZUSATZSTOFFGEMISCHEN IN ZIGARETTEN	82
4.5.1 Nachweis von Lakritze	82
4.5.2 Nachweis von Kakao	89
4.5.3 Nachweis von Pfefferminzöl	99
4.6 BEDEUTUNG DER NACHGEWIESENEN SUBSTANZEN ALS	105
ZUSATZSTOFFE	105
4.7 KONFORMITÄT MIT DER TABAKVERORDNUNG DER SCHWEIZ	108
5 SCHLUSSFOLGERUNGEN	110
7 LITERATURVERZEICHNIS	111

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: STRUKTUR VON GLYCYRRHIZINSÄURE	13
ABBILDUNG 2: STRUKTUR VON THEOBROMIN	15
ABBILDUNG 3: STRUKTUR VON TETRAMETHYLPYRAZIN	15
ABBILDUNG 4: STRUKTURFORMELN VON MENTHOL UND MENTHON	16
ABBILDUNG 5: STRUKTURFORMELN VON MENTHYLACETAT UND MENTHOFURAN	17
ABBILDUNG 6: STRUKTURFORMELN VON LIMONEN, PULEGON UND CARVON	18
ABBILDUNG 7: STRUKTURFORMELN VON α -PINEN UND β -PINEN	18
ABBILDUNG 8: STRUKTURFORMEL VON 1,8-CINEOL	18
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ZUM AUFBAU EINER HPLC-ANLAGE MIT DAD	23
ABBILDUNG 10: TYPISCHE KOHLENWASSERSTOFFE IN ORIENT TABAKPROBEN (SCAN, BASISCHE AUFARBEITUNG)	47
ABBILDUNG 11: CHROMATOGRAMM EINES REKONSTITUIERTEN TABAKS VON BAT MIT PROPYLENGLYCOL (OBEN	48
ABBILDUNG 12: 2-ACETOXY-1-PROPANOL IN TABAKMISCHUNGEN MIT ZUSÄTZEN (PM 6-8),	48
ABBILDUNG 13: CHROMATOGRAMM IM SCAN-MODUS NACH NEUTRALER	49
ABBILDUNG 14: CHROMATOGRAMME DER PROBEN PM 11-13	69
ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER AMMONIAKGEHALTE VON ZIGARETTEN GLEICHER MARKE	76
ABBILDUNG 16: MITTLERE AMMONIAKKONZENTRATIONEN UND KONZENTRATIONSBEREICHE IN ...	77
ABBILDUNG 17: CHROMATOGRAMM DER MARKE S10 „LIGHTS“ MIT TESTOSTERON	84
ABBILDUNG 18: ÜBERLAGERUNG DES UV- SPEKTRUMS VON GLYCYRRHIZIN IN DER MARKE S18	84
ABBILDUNG 19: VERGLEICH DER CHROMATOGRAMME EINER MIT THEOBROMIN GESPIKETEN ZIGARETTENPROBE	90
ABBILDUNG 20: CHROMATOGRAMM VON S02 (OBEN)	92
ABBILDUNG 21: CHROMATOGRAMM VON DER ZIGARETTENSORTE S22 BEI $\lambda = 274$ NM (OBEN LINKS) UND	93
ABBILDUNG 22: CHROMATOGRAMM VON S06 BEI	94
ABBILDUNG 23: VERGLEICH DES UV-SPEKTRUMS DES MATRIX-PEAKS IN BAT 11	98
ABBILDUNG 24: CHROMATOGRAMM VON PFEFFERMINZÖL IM SCAN-MODUS	99
ABBILDUNG 25: VERGLEICH DER MASSENSPEKTREN VON MENTHON IN PFEFFERMINZÖL	101
ABBILDUNG 26: VERGLEICH DER MASSENSPEKTREN VON 1,8-CINEOL IN PFEFFERMINZÖL	101
ABBILDUNG 27: VERGLEICH DER CHROMATOGRAMME VON D3 MENTHOL (DTL.), YESMOKE (SCHWEIZ)	103

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1. ZUSATZSTOFFGEMISCHES IN ZIGARETTEN [2-11].....	11
TABELLE 2. INHALTSSTOFFE DES KAKAOS [18].....	14
TABELLE 3. ZUSAMMENSETZUNG DES PFEFFERMINZÖLS NACH Ph.Eur. bzw. Aflatusin.....	16
TABELLE 4. ÜBERSICHT ÜBER ARBEITEN ZUR EXTRAKTION VON THEOBROMIN	19
TABELLE 5. HERKUNFT DER TABAK- UND ZIGARETTENPROBEN	29
TABELLE 6. SIM-PARAMETER FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG DER SUBSTANZEN BEI DER.....	31
TABELLE 7. SIM-METHODE ZUM NACHWEIS EINIGER PFEFFERMINZÖLKOMPONENTEN.	32
TABELLE 8. MISCHUNGEN DER KALIBRATIONSTANDARDS DER ZU QUANTIFIZIERENDEN NEUTRAL	33
TABELLE 9. MISCHUNGEN DER KALIBRATIONSTANDARDS DER ZU QUANTIFIZIERENDEN SCHWACH SAUER	33
TABELLE 10. MISCHUNGEN DER KALIBRATIONSTANDARDS DER ZU QUANTIFIZIERENDEN BASISCH	33
TABELLE 11. KALIBRATIONSTANDARDS FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG VON PROPYLENGLYCOL	33
TABELLE 12. KALIBRATIONSFUNKTIONEN FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG	34
TABELLE 13. SIM-PARAMETER FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG DER ALKALOIDE	35
TABELLE 14. MISCHUNGEN DER KALIBRATIONSTANDARDS DER ZU QUANTIFIZIERENDEN TABAKALKALOIDE	35
TABELLE 15. DIE KALIBRATIONSFUNKTIONEN FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG DER ALKALOIDE.....	36
TABELLE 16. PIPETTIERPLAN FÜR LEERWERT-BESTIMMUNG UND PROBEN-MESSUNG.....	37
TABELLE 17. ZUGELEGTE MENGEN GLYCYRRHIZIN- UND TESTOSTERONLÖSUNG ZUR BESTIMMUNG DER	38
TABELLE 18. KALIBRATIONSFUNKTIONEN FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG VON GLYCYRRHIZIN UND THEOBROMIN	38
TABELLE 19. ZUGELEGTE MENGEN THEOBROMIN- UND ETOPHYLLINLÖSUNG ZUR BESTIMMUNG DER	39
TABELLE 20. LÄNDERSPEZIFISCHE ZUSATZSTOFFE DER 09, 10 „LIGHTS“ 18 UND 19 „LIGHTS“	43
TABELLE 21. ÜBERSICHT ÜBER INHALTSSTOFFE IN DEN UNTERSUCHTEN ROHTABAKPROBEN;	45
TABELLE 22. ÜBERSICHT ÜBER DIE IN SCHWEIZER ZIGARETTEN, UNBEHANDELTE ROHTABAKEN UND	51
TABELLE 23. ANGABEN ZUR VALIDIERUNG DER METHODE ZUR BESTIMMUNG NATÜRLICHER UND NICHT NATÜRLICHER	53
TABELLE 24. ÜBERSICHT ÜBER DIE KONZENTRATIONEN NATÜRLICH VORKOMMENDER SUBSTANZEN IN ZIGARETTEN.....	54
TABELLE 25. ÜBERSICHT ÜBER DIE KONZENTRATIONEN NATÜRLICH VORKOMMENDER SUBSTANZEN IN ZIGARETTEN.....	56
TABELLE 26. GEMESSENE KONZENTRATIONEN UND ANGELEGTE MAXIMALKONZENTRATIONEN [2- 11]	59
TABELLE 27. ÜBERSICHT ÜBER DIE KONZENTRATIONEN NATÜRLICH VORKOMMENDER SUBSTANZEN IN ROHTABAKEN	60
TABELLE 28. ÜBERSICHT ÜBER DIE KONZENTRATIONEN NATÜRLICH VORKOMMENDER SUBSTANZEN IN ROHTABAKEN	61
TABELLE 29. ÜBERSICHT ÜBER DIE KONZENTRATIONEN VON ZUSATZSTOFFEN IN ZIGARETTEN ...	64
TABELLE 30. ÜBERSICHT ÜBER DIE KONZENTRATIONEN VON ZUSATZSTOFFEN IN ZIGARETTEN ...	65

TABELLE 31. GEMESSENE KONZENTRATIONEN IN SCHWEIZER ZIGARETTEN UND ANGEGBENE...	67
TABELLE 32. ÜBERSICHT ÜBER DIE KONZENTRATIONEN VON ZUSATZSTOFFEN IN TABAKPROBEN	68
TABELLE 33. ÜBERSICHT ÜBER DIE KONZENTRATIONEN VON ZUSATZSTOFFEN IN TABAKPROBEN	68
TABELLE 34. ANGABEN ZUR VALIDIERUNG DER METHODE ZUR BESTIMMUNG VON ALKALOIDEN ..	70
TABELLE 35. KONZENTRATIONEN DER IM VORPROJEKT BESTIMMTEN TABAKALKALOIDE IN SCHWEIZER ZIGARETTEN	71
TABELLE 36. KONZENTRATIONEN DER TABAKALKALOIDE IN TABAKPROBEN;	73
TABELLE 37. ANGABEN (LAUT TESTKIT) ZUR VALIDIERUNG FÜR DIE PHOTOMETRISCHE	74
TABELLE 38. KONZENTRATIONEN VON AMMONIAK UND HARNSTOFF IN ZIGARETTEN,	75
TABELLE 39. ANGEGBENE MAXIMALKONZENTRATIONEN VON AMMONIUMSALZEN UND HARNSTOFF IN ZIGARETTEN	78
TABELLE 40. KONZENTRATIONEN VON AMMONIAK UND HARNSTOFF IN TABAKEN	80
TABELLE 41. ERGEBNISSE DER VALIDIERUNG DER METHODE	83
TABELLE 42. ERMITTELTE GLYCYRRHIZINKONZENTRATIONEN UND PROZENTUALER GEHALT AN ..	85
TABELLE 43. LÄNDERVERGLEICH HINSICHTLICH DER GLYCYRRHIZINGEHALTE GLEICHER ZIGARETTENMARKEN	87
TABELLE 44. ERMITTELTE GLYCYRRHIZINKONZENTRATIONEN UND PROZENTUALER GEHALT AN LAKRITZEEXTRAKT	88
TABELLE 45. GESAMTÜBERBLICK ÜBER GLYCYRRHIZIN- UND LAKRITZEGEHALTE IN ZIGARETTEN	89
TABELLE 46. ERGEBNISSE DER VALIDIERUNG DER METHODE	91
TABELLE 47. ERMITTELTE THEOBROMINKONZENTRATIONEN UND ENTSPRECHENDE KAKAOGEHALTE	94
TABELLE 48. LÄNDERVERGLEICH HINSICHTLICH DER THEOBROMINGEHALTE GLEICHER ZIGARETTENMARKEN	96
TABELLE 49. ERMITTELTE THEOBROMINKONZENTRATIONEN UND PROZENTUALER GEHALT AN KAKAOPULVER	97
TABELLE 50. GESAMTÜBERBLICK ÜBER THEOBROMIN- UND KAKAOPULVERGEHALTE	98
TABELLE 51: PARAMETER DER SIM-METHODE ZUM NACHWEIS EINIGER PFEFFERMINZÖLKOMPONENTEN	100
TABELLE 52. QUALITATIVER NACHWEIS VON PFEFFERMINZÖLBESTANDTEILEN IN ZIGARETTEN..	104

Zusammenfassung

Da die Zusatzstofftechnologie von Zigaretten ein sehr umfassendes und komplexes Thema ist, wurde zur Bearbeitung dieses Projektes ein zweiter Teil notwendig.

Im vorangegangenen Projekt [1] wurden 32 marktführende Schweizer Zigaretten, sowie vier bekannte Zigarettenmarken aus unterschiedlichen Ländern qualitativ auf Zusatzstoffe untersucht und einige, hauptsächlich auch natürlich im Tabak vorkommende Substanzen, quantifiziert. Eine Methode zum Nachweis von Ammoniak und Harnstoff in Zigaretten sowie die Bestimmung von Tabakalkaloiden wurde präsentiert. Die Messung des pH-Wertes in wässrigen Zigarettenextrakten sollte Aufschluss über eventuell zugesetzte basische Substanzen geben. Eine Gegenüberstellung der Aussagen zur Bedeutung und zum toxischen Potential der Zusatzstoffe aus Sicht der Zigarettenindustrie einerseits und unabhängiger Wissenschaftler andererseits sollte Widersprüche zwischen beiden deutlich machen.

Im Rahmen des zweiten Projektes wurden analytische Methoden zum Nachweis komplexer Zusatzstoffgemische entwickelt und angewendet. Des weiteren war die Entwicklung einer zweiten Methode zum Nachweis von Harnstoff in Zigaretten nötig, um die Ergebnisse aus dem vorherigen Projekt zu überprüfen. Um eine bessere Vergleichsdatenlage zu haben wurden in diesem Projekt zusätzlich 26 Rohtabake bzw. Tabakmischungen analysiert und in alle Untersuchungen, einschließlich der im vorangegangenen Projekt [1] angewendeten, einbezogen. Dies sollte Aufschluss über natürlich vorkommende Tabakinhaltsstoffe und deren Gehalte geben und eine eventuelle Aufstockung mit einigen dieser Substanzen in den Zigaretten klarer beweisen.

Folgende neue analytische Methoden, die für die spezielle Problematik der Zigarettenzusatzstoffe optimiert wurden, kamen in diesem Projekt zum Einsatz: Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in Kombination mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) zur Quantifizierung einiger nicht natürlicher Zusatzstoffe und zum qualitativen Nachweis von Pfefferminzöl in Zigaretten, Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) in Kombination mit einem Photodiodenarray-Detektor (DAD) zum Nachweis von Lakritze und Kakao sowie eine enzymatisch-photometrische Nachweismethode für Ammoniak und Harnstoff unter Verwendung eines industriell hergestellten Testkits. Für das qualitative Screening der Tabake, den Nachweis flüchtiger und mittelflüchtiger natürlicher Tabakinhaltsstoffe und den Nachweis der Alkaloide wurden die bereits etablierten Methoden aus dem Vorprojekt [1] angewendet.

Alle analytischen Methoden, die zum Nachweis von Zusatzstoffen in Zigaretten im Rahmen beider Projekte entwickelt wurden, wurden validiert.

Mit den genannten Methoden wurden 32 Schweizer Zigaretten sorten, vier verschiedene Marken aus bis zu acht unterschiedlichen Herkunftsländern sowie 17 Mentholzigaretten untersucht. Des weiteren wurden 26 Tabake (unbehandelte und mit Zusätzen), die Referenzzigarette 2R4F und eine zusatzstofffreie Zigarette (Yesmoke) analysiert.

Die systematische qualitative Untersuchung der 26 Tabake ergab ein von den Zigaretten leicht verschiedenes Profil. In allen Zigaretten vorkommende Substanzen, wie 2-Ethyl-1-hexanol, Acetophenon und Furfurylamin konnten nur in einigen wenigen Tabaksorten nachgewiesen werden. In unbehandelten Rohtabaken wurden keine Zusatzstoffe festgestellt, während in expandierten Tabaken, rekonstituierten Tabaken und Tabakmischungen mit Zusätzen Aromastoffe wie Vanillin und Menthol sowie technische Hilfsstoffe, wie n-Propyl-p-hydroxybenzoat und Triacetin identifiziert wurden.

Als Aroma- und Geschmacksstoffe wurden Vanillin, Ethylvanillin, Methylcinnamat und 6-Methylcoumarin in Zigaretten und Tabaken quantifiziert. Vanillin wurde in 10 Schweizer Nicht-Vanille Zigaretten in Konzentrationen von 10,1-273 µg/g nachgewiesen, während in Vanille Zigaretten deutlich höhere Konzentrationen (416-793 µg/g) gemessen wurden. In Tabaken liegen die Vanillinkonzentrationen mit 11,3-21,9 µg/g deutlich niedriger als in den Zigaretten. Ethylvanillin war in zwei Schweizer Nicht-Vanille Zigaretten in Konzentrationen von 1,1-4,4 µg/g vorhanden. Die Gehalte an Ethylvanillin in Vanille Zigaretten waren entsprechend höher mit 296-656 µg/g. Ethylvanillin war in keinem der untersuchten Tabakproben nachweisbar. In sechs Schweizer Zigaretten war Methylcinnamat in Konzentrationen von 0,12-3,4 µg/g vorhanden, jedoch in keiner der Tabakproben. Die stark aromatische Substanz 6-Methylcoumarin kam nur in einer Vanille Zigarette in einer Konzentration von 6,1 µg/g vor. Neben diesen Aromasubstanzen wurden die als Konservierungsmittel verwendeten Substanzen n-Propyl-p-hydroxybenzoat und o-Phenylphenol, Benzylbenzoat als Lösemittel sowie Propylenglycol als Feuchthaltemittel quantitativ bestimmt. N-Propyl-p-hydroxybenzoat ist in Schweizer Zigaretten in Konzentrationen zwischen 48,8 und 105,8 µg/g enthalten und konnte in einem rekonstituierten Tabak in der Konzentration 127,1 µg/g gemessen werden. Die o-Phenylphenol-Konzentrationen liegen in Zigaretten zwischen 0,08 und 1,71 µg/g und wurden in Tabakproben nicht nachgewiesen. Benzylbenzoat, das in keiner Tabakprobe nachgewiesen wurde, kommt in Zigaretten in Konzentrationen von 0,44-21,9 µg/g vor. Propylenglycol wurde in 29 von 32 Schweizer Zigaretten in Konzentrationen von 1,1-18,9 mg/g detektiert.

Die Alkaloidgehalte, die in den Tabaken bestimmt wurden, sind denen in Zigaretten sehr ähnlich. In Schweizer Zigaretten ist der mittlere Gesamtalkaloidgehalt (21,5 mg/g) etwas höher als in den untersuchten Tabakproben (16,9 mg/g). Burley Tabake fielen durch besonders hohe Nikotin- und Nebenalkaloidkonzentrationen auf. Insgesamt gab es innerhalb einer Tabaksorte z.T. große Konzentrationsunterschiede, die auf die unterschiedlichen Anbaubedingungen des jeweiligen Herkunftslandes zurückzuführen sind. Aus den ermittelten Alkaloidwerten in den Tabaksorten konnte deshalb auch nicht auf die daraus hergestellte Zigarettenmarke geschlossen werden.

Die Ammoniakwerte, die mit der enzymatisch-photometrischen Methode in Schweizer Zigaretten ermittelt wurden (0,14-1,62 mg/g), stimmen mit denen mittels ionenselektiver Elektrode bestimmten Werte aus dem vorangegangenen Projekt (0,08-1,72 mg/g) relativ gut überein. Da die hier untersuchten unbehandelten Tabake bereits Ammoniakgehalte von 0,05-7,5 mg/g besitzen, ist ein Zusatz von Ammoniumsalzen zu Zigaretten nicht beweisbar. In Rohtabakmischungen mit Zusätzen sind Ammoniakkonzentrationen zwischen 0,35 und 2,28 mg/g bestimmt worden.

Harnstoff konnte mit der enzymatisch-photometrischen Methode in sieben von 32 Schweizer Zigaretten in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die mittleren Harnstoffgehalte der Zigaretten (MW: 0,07 mg/g) sind geringer als die in den unbehandelten Tabaken und in den Tabakmischungen mit Zusätzen (MW: 0,12 mg/g bzw. 0,10 mg/g), weshalb auch hier nicht auf einen Zusatz von Harnstoff zu Zigaretten geschlossen werden kann.

Lakritze, die ein häufig verwendetes Zusatzstoffgemisch darstellt, wurde anhand des analytischen Markers Glycyrrhizin in Zigaretten und Tabaken quantitativ bestimmt. 43 von 55 Zigaretten enthielten durchschnittlich 0,46 mg/g Glycyrrhizin (0,08-0,67 mg/g), was etwa einem prozentualen Lakritzeanteil von 0,26 % in Zigaretten entspricht. Ähnliche Konzentrationen konnten auch in Tabakmischungen mit Zusätzen (MW: 0,23 mg/g, bzw. 0,13 % Lakritze) detektiert werden. Die Referenzzigarette und unbehandelte Rohtabake enthielten kein Glycyrrhizin.

Als analytischer Marker für Kakao wurde Theobromin in Zigaretten und Tabaken quantifiziert. In Schweizer Zigaretten wurde 0,02-0,3 mg/g Theobromin festgestellt worden. Dies entspricht einem mittleren prozentuale Anteil von etwa 0,45% Kakao. Tabakmischungen mit Zusätzen enthielten vergleichbare Mengen Theobromin (0,026-0,2 mg/g), was in etwa einem mittleren Gehalt von 0,3 % Kakao entspricht. Auch in der Referenzzigarette konnte eine Spur Theobromin nachgewiesen werden.

Der qualitative Nachweis von Pfefferminzöl-Bestandteilen in Zigaretten ergab, dass die Hauptbestandteile dieses ätherischen Öls (Menthol, Neomenthol, Menthon, Isomenthon, Pulegon und Menthylacetat) nur in Mentholzigaretten auftreten, nicht jedoch in normalen Zigaretten. Die Anwesenheit von mindestens zwei dieser Komponenten neben Menthol wurde dabei als sicherer Beweis für den Zusatz von Pfefferminzöl zu Zigaretten gewertet.

1 Einleitung

In der Zusatzstofftechnologie der Zigarettenherstellung spielen verschiedene Substanzen eine große Rolle. Die Beeinflussung der sensorischen Eigenschaften der Zigaretten stehen dabei im Vordergrund. Die analytische Kontrolle von Zigaretten auf solche Zusätze ist für die Einschätzung der dadurch bedingten Erhöhung des Gefährdungspotentials und der Beeinflussung des Suchtverhaltens von Bedeutung.

In Anknüpfung an das vorangegangene Projekt [1] sollten in der vorliegenden Arbeit analytische Methoden zum Nachweis von speziellen Zusatzstoffgemischen wie Kakao, Lakritze und Pfefferminzöl entwickelt werden.

Es ist bekannt, dass als Zusatzstoffe auch komplexe Gemische, wie verschiedene ätherische Öle (Pfefferminzöl), Aromen (Rumaroma), Lakritze oder Kakao verwendet werden. Die Zusammensetzung dieser Gemische ist oft nicht eindeutig definiert, so dass unklar bleibt, welche Substanzen dem Tabak in welcher Menge beigelegt werden und der Raucher unter Umständen aufnimmt. Daher sollten für einige dieser Gemische Markersubstanzen festgelegt und quantifiziert werden, um auf die Art und Menge des eingesetzten Zusatzstoffgemisches rückschließen zu können. Dazu wurden die Einzelkomponenten von Kakao, Lakritze und Pfefferminzöl ermittelt und jeweils ein oder mehrere Marker für deren qualitativen und quantitativen Nachweis festgelegt. Anschließend wurden alle in das Vorprojekt einbezogenen Zigarettensorten mittels HPLC-DAD auf Kakao und Lakritze untersucht. Zum Nachweis von Pfefferminzöl wurde ein HS-SPME/GC-MS-Verfahren entwickelt und auf die gleichen Zigaretten angewendet.

Weiterhin sollten die Ergebnisse der elektrochemischen Methode zur Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff in Zigaretten mit einer alternativen photometrischen Methode überprüft werden.

Um eindeutige und bessere Vergleichsdaten von Rohtabaken zu haben wurden in diesem Projekt zusätzlich 14 unbehandelte Rohtabake, 3 Rohtabakmischungen mit Zusätzen, 3 Sorten Rekonstituierter Tabak sowie 6 Sorten Expandierter Tabak (2 Sorten davon mit Zusätzen) von Philip Morris und British American Tobacco untersucht. Dabei wurden diese Proben in alle einschließlich der bereits im vorangegangenen Projekt [1] etablierten Methoden einbezogen.

2 Theoretischer Teil

2.1 Charakterisierung der untersuchten Substanzgemische

2.1.1 Gesamtübersicht über verwendete Zusatzstoffgemische

Neben definierten Einzelsubstanzen, wird Zigaretten häufig auch eine Vielzahl komplexer Zusatzstoffgemische zugesetzt. Meistens handelt es sich um Extrakte von Pflanzen oder pflanzlichen Produkten, die aus vielen verschiedenen Einzelkomponenten bestehen. Eine Übersicht über verwendete Zusatzstoffgemische bietet Tabelle 1. Die Angaben über den maximal zugesetzten Anteil in Zigaretten stammen von Angaben der Zigarettenindustrie aus verschiedenen Ländern [2-11]. Es sind jedoch lediglich Zusatzstoffgemische aufgeführt, deren Höchstgehalt in der Tabakmischung mindestens 0,01% beträgt. Wenn verschiedene Firmen unterschiedliche Höchstmengen für eine Zutat haben, ist eine Spanne angegeben.

Tabelle 1. Zusatzstoffgemische in Zigaretten [2-11]

Stoffgemisch	englischer Name	maximaler Anteil
Rum	Rum	0,025-3,2%
Maissirup	Corn syrup	0,13-6,2%
Kakao und Kakaoprodukte	Cocoa and cocoa products	0,02-2%
Honig	Honey	0,1-3,3%
Lakritze / Lakritzextrakt	Licorice and/or extract	0,45-2%
Bockshornsamensextrakt	Fenugreek extract	0,012-0,62%
(Back-)Pflaumenextrakt	Plum (prune) extract	0,011-1,1%
Aprikosenextrakt	Apricot extract	0,012-0,23%
Johannisbrot und Johannisbrotextrakt	Carob gum, bean powder, extract	0,1-0,7%
Feigenextrakt	Fig extract	0,045-0,2%
Apfelextrakt	Apple extract, juice, concentrate	0,02-0,12%
Pfefferminzöl	Peppermint oil	0,0005-0,1%
Bananenextrakt	Banana extract	0,05%
Baldrianwurzelextrakt	Valerian root oil, extract	0,05-0,16%
Kaffee und Kaffeeextrakt	Coffee and coffee extract	0,0001-0,025%
Hopfenextrakt	Hop extract	0,025%
Wein	Wine	0,025%
"Nelkenpfefferöl"	Allspice oil	0,01%
Anisöl	Anise star, oil	0,01%
Zedernholzöl	Cedarwood oil	0,01%
Kamillenextrakt, -öl	Chamomile lower extract, oil	0,0001-0,053%
Zimtöl, -extrakt	Cinnamon oil, extract	0,0005-0,01%
Cognacöl	Cognac oil	0,0001-0,01%
Caramel	Caramel	0,0046-0,05%

Fortsetzung Tabelle 1.

Stoffgemisch	englischer Name	maximaler Anteil
Enzianextrakt	Gentian extract	0,01%
Zitronenöl	Lemon oils	0,0001-0,01%
Limettenöl	Lime oil, expressed	0,01%
Liebstöckelextrakt	Lovage extract	0,005-0,01%
Melasse	Molasses	0,01-0,022%
Orangenöl, -extrakt	Orange oils, extract	0,0001-0,01%
Iriswurzelextrakt	Orris root extract	0,00003-0,01%
Ananaskonzentrat, -extrakt	Pineapple concentrate, extract	0,01%
Rosenöl	Rose oil	0,00005-0,01%
Teeextrakt	Tea extract & resinoid	0,00006-0,01%
Vanilleschotenextrakt	Vanilla bean, extract	0,0005-0,0326%
Bergahornextrakt	Mountain maple extract	0,003-0,015%

2.1.2 Lakritzeextrakt

Lakritze wird aus der Wurzel des Süßholzstrauches „Glycyrrhiza glabra“ gewonnen. Die Pflanze gehört zur Gattung der Fabaceae, den Schmetterlingsblütengewächsen, wird ca. 1 - 1,5 m hoch und trägt im Frühsommer hellblaue bis violette Blüten. Ihr Namen kommt aus dem Altgriechischen: „glykos rhiza“ bedeutet „süße Wurzel“.

Die Süßholzpflanze ist eine Arzneipflanze mit langer Geschichte, die zur Behandlung von Magenbeschwerden und Erkältungen verwendet wurde. Sie stammt ursprünglich aus Asien und dem Mittelmeerraum.

Um Lakritze herzustellen, werden die Süßholzwurzeln nach der Ernte gewaschen, getrocknet und gerspelt. Daraufhin wird der Saft herausgekocht und unter Vakuum eingedickt. Man erhält Lakritzeextrakt, der hart ist und einen herben Geschmack besitzt. Die charakteristische schwarze Farbe ist auf den pflanzlichen Kohlenstoff zurückzuführen. Durch Zugabe von Zucker, Glukosesirup, Stärke, Gelatine, Salz und verschiedenen Aromen erhält man die Süßware Lakritze [12]. Salzig schmeckender Lakritze wird Salmiaksalz (Ammoniumchlorid) zugesetzt. In Deutschland hergestellte Lakritze enthält mindestens 3 % Lakritzeextrakt.

Hauptinhaltsstoff des Lakritzeextraktes ist Glycyrrhizin, welches ein Sammelbegriff für die Kalium- und Calciumsalze der Glycyrrhizinsäure (siehe Abb.1) ist. Es wird auch häufig als Synonym für Glycyrrhizinsäure selbst benutzt [12].

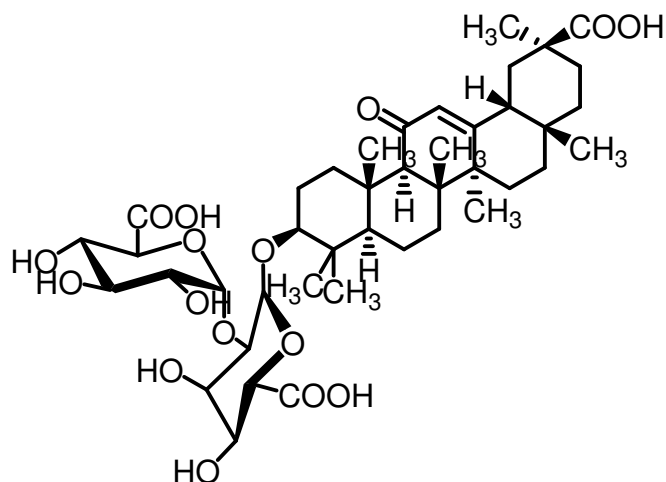


Abbildung 1: Struktur von Glycyrrhizinsäure.

Glycyrrhizin (Abb. 1) besitzt die 50fache Süßkraft der Saccharose. In der Süßholzwurzel ist es bis zu maximal 14% enthalten, der typische Gehalt beträgt jedoch nur 3 - 5%. Im Lakritzeextrakt ist der Anteil an Glycyrrhizin etwa fünfmal höher (15 – 25%). 100g handelsüblicher Lakritzsorten enthalten zwischen 34 und 500 mg Glycyrrhizin. Der durchschnittliche Gehalt liegt bei 0,17%. Produkte mit mehr als 200 mg/100 g müssen als "Starklakritze" gekennzeichnet werden.

Dass die Süßholzwurzel seit Jahrtausenden als Arznei verwendet wird, hängt zum großen Teil mit den Eigenschaften des Glycyrrhizins zusammen. Glycyrrhizinsäure wirkt entzündungshemmend und wird bei Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren sowie bei chronischer Magenschleimhautentzündung eingesetzt. Süßholz wird auch bei Erkältungen, zur Linderung des Hustenreizes verwendet.

Glycyrrhizin besitzt jedoch bei der Aufnahme größerer Mengen auch Nebenwirkungen. Bei der Verstoffwechselung von Glycyrrhizin wird der glycosidisch gebundene Zucker abgespalten. Es entsteht Glycyrrhetinsäure, die ein Schlüsselenzym im Mineralstoffhaushalt hemmt. Größere Mengen Glycyrrhetinsäure können zu Natriumanreicherungen und Kaliumverlusten führen. Die Folge sind erhöhter Blutdruck, Wassereinlagerungen im Gewebe (Ödeme) und Muskelschwäche [13-15]. Die Sonderkommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln hat daher vor einigen Jahren die Empfehlung ausgesprochen, dass die Aufnahmemenge von Glycyrrhizin 100 mg/Tag nicht überschreiten soll.

Weitere Bestandteile der Süßholzwurzel sind u.a. Flavonoide, die für die gelbe Farbe der Wurzel verantwortlich sind. Die häufigsten Vertreter dieser Substanzklasse sind Liquiritin und Isoliquiritin [16].

Ein Lakritze-Zusatz in Zigaretten soll in erster Linie der Zigarette einen spezifischen Geschmack verleihen. Wie beim Kakao ist der Verwendungszweck eine Aromatisierung und eine Milderung des herben Tabak- bzw. Nikotingeschmacks.

2.1.3 Kakao

Beim Kakao unterscheidet man, je nach Verarbeitungsstufe, verschiedene Formen: Kakaomasse (cocoa liquor), Kakaopulver (cocoa powder) und Kakaobutter (cocoa butter), wobei der Rohstoff für alle Kakaoprodukte die Kakaomasse ist.

Kakaomasse wird aus den bohnenförmigen Samen (Kakaobohnen) der Früchte des Kakaobaums (*Theobroma Cacao* L.) gewonnen. Die Früchte sind etwa 15 – 25 cm lang und 7 – 10 cm dick. Sie enthalten 25 – 50 Kakaobohnen, die in weißes Fruchtfleisch eingebettet

sind. Nach der Ernte werden die Kakaobohnen verschiedenen Bearbeitungsvorgängen unterworfen [17]:

- Fermentieren (Abtötung der Keimfähigkeit, Bildung von Aromastoffen bzw. deren Vorstufen)
- Trocknen (Wasserentzug, Erhöhung der Haltbarkeit)
- Thermische Vorbehandlung (Abtötung der Bakterien in den Kakaobohnen)
- Rösten (Vollständiges Erschließen des Aromas)
- Brechen und Schälen (Trennen der Bohnen von der Schale → Kakaokernbruch)
- Mahlen (Erhalt der flüssigen Kakaomasse)

Beim letzten Verarbeitungsschritt, dem Mahlen, wird der Kakaokernbruch so weit zerkleinert, dass Fett frei gesetzt wird und eine Verflüssigung bewirkt. Das Fett wird auch Kakaobutter genannt. Die Kakaomasse kann auf verschiedene Weise weiter verarbeitet werden. Sie ist Ausgangspunkt für die Schokoladen- und Kakaopulverherstellung.

Schokolade erzeugt man durch die Zugabe von Zucker, Milchpulver und Kakaobutter. Diese Komponenten müssen gemischt und gewalzt werden, um das fertige Produkt zu erhalten.

Kakaopulver entsteht, wenn der Kakaomasse ein Teil des Fettes entzogen wird. Unter dem hohem Druck von Hydraulikpressen wird die Kakaobutter von der Kakaomasse abgepresst. Der entstandene Presskuchen wird gemahlen und ergibt das Kakaopulver [17].

Die folgende Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Hauptbestandteile des Kakaos:

Tabelle 2. Inhaltsstoffe des Kakaos [18]

Inhaltsstoff	Kakaobohnen	Schwach entöltes Kakaopulver
Fett (Kakaobutter)	54%	24,5%
Eiweiß	11,5%	19,8%
Rohfaser	9,0%	5,7%
Kohlenhydrate	8,5%	37,9%
Gerbstoffe	6,0%	0,0%
Wasser	5,0%	5,6%
Mineralstoffe	2,6%	6,5%
Pentosane	1,5%	0,0%
Theobromin	1,2%	2,3%
Coffein	0,2%	0,0%

Die am häufigsten auftretenden Fettsäuren in Kakaobutter sind [19]:

- Ölsäure (29 - 38% aller Fettsäuren)
- Stearinsäure (24,5 - 37%)
- Palmitinsäure (22,2 - 28,2%)

Eine Besonderheit des Kakaos ist der hohe Gehalt an Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) (Abb. 2), welches strukturell mit Coffein (1,3,7-Trimethyl-xanthin) verwandt ist.

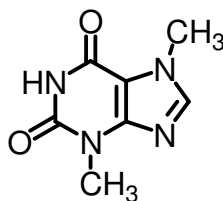


Abbildung 2: Struktur von Theobromin

Neben den in Tabelle 2 aufgelisteten Inhaltsstoffen sind insgesamt 10 psychoaktive Substanzen im Kakao identifiziert worden. Kakao enthält z.B. bioaktive Amine wie 2-Phenylethylamin (PEA), Serotonin, Histamin, Tryptophan, Tryptamin, Tyramin, Octopamin und Anandamid [20].

Eine Phytochemikalie, die im Kakao und in Schokolade vorkommt, ist neben Flavanolen und Flavonolen, wie (-)-Catechin, auch das Tetrahydroisochinolin Salsolinol, das in Kakao und Schokolade in Konzentrationen von bis zu 25 µg/g vorkommt [21].

Eine weitere Substanzgruppe, die nicht zu den Hauptbestandteilen des Kakaos gehört, aber einen wichtigen Einfluss auf den Geschmack hat, ist die der Pyrazine. 100 g Kakaobohnen enthalten 142 bis 698 µg Pyrazine. Der häufigste Vertreter ist Tetramethylpyrazin (Abb. 3), das 90% aller Pyrazine ausmacht [19]. Auch Thiazole und Piperazine sind in Kakao nachgewiesen worden.

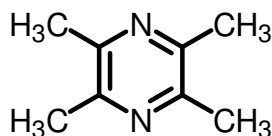


Abbildung 3: Struktur von Tetramethylpyrazin

Kakao als Zusatzstoff in Zigaretten dient in erster Linie als Geschmackskorrigenz und soll die Attraktivität des Produktes Zigarette insbesondere für jugendliche Einsteiger, erhöhen [1]. Eine antidepressive Wirkung durch die Hemmung des Enzyms Monoaminoxidase der Pyrolyseprodukte von Kakao wird diskutiert [20].

Von Salsolinol wird vermutet, dass es einen entscheidenden Beitrag zur Schokoladensucht liefert [21].

2.1.4 Pfefferminzöl

Pfefferminze ist der bekannteste Vertreter der zu den Lippenblütlern zählenden Minze-Arten. Mittels Wasserdampfdestillation kann aus ihren Blättern und Blütenständen das ätherische Öl gewonnen werden.

Pfefferminzöl ist eine farblose, mitunter schwach gelbe bis schwach grünliche Flüssigkeit. Das Rohöl enthält 70 – 90% Menthol. Bevor das Öl jedoch in den Handel kommt, wird der Mentholgehalt durch Ausfrieren auf etwa 50% gesenkt [22]. Die Komponenten von handelsüblichem Pfefferminzöl, deren Anteile sehr stark variieren können, sind in Tabelle 3 aufgelistet, wobei die Angaben des Europäischen Arzneibuchs [23] und die Angaben von A. Aflatuni [24] gegenüber gestellt sind. Die zwei Hauptkomponenten sind Menthol und das chemisch verwandte Menthon (Abb.4). Beide gehören zur Substanzklasse der Terpene. Sie

unterscheiden sich nur darin, dass Menthon statt einer Hydroxylgruppe eine Ketogruppe besitzt.

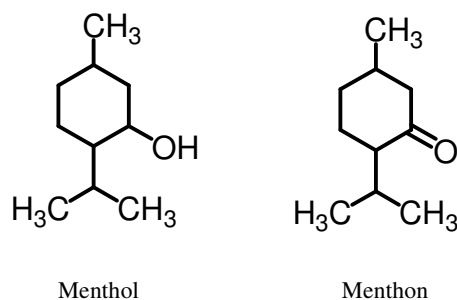


Abbildung 4: Strukturformeln von Menthol und Menthon

Neomenthol, Neoisomenthol und Isomenthon sind Stereoisomere des Menthols bzw. des Menthons und sind weitere Bestandteile des Pfefferminzöls.

Tabelle 3. Zusammensetzung des Pfefferminzöls nach Ph.Eur. bzw. Aflatuni

Substanz	Nach Europäisches Arzneibuch [23]	Nach Aflatuni [24]
Menthol	30,0 – 55,5%	40%
Menthon	14,0 – 32,0%	18,7%
1,8-Cineol (Eucalyptol)	3,5 – 14,0%	7,3%
Menthylacetat	2,8 – 10,0%	3,6%
Neomenthol		3,1%
Menthofuran	1,0 – 9,0%	3,0%
Isomenthon	1,5 – 10,0%	2,5%
Limonen	1,0 – 5,0%	2,5%
β-Pinen		1,8%
α-Pinen		1,4%
„Germacrene D“		1,3%
trans-Sabinen-hydrat		1,0%
Pulegon	Höchstens 4,0%	0,8%
Carvon	Höchstens 1,0%	
Sabinen		0,8%
β-Bourbonen		0,5%
β-Caryophyllen		0,5%
α-Terpinen		0,4%
cis-Ocimen		0,4%
γ-Terpinen		0,4%
Neoisomenthol		0,4%
Myrcen		0,3%
3-Octanol		0,3%

Fortsetzung Tabelle 3.

Substanz	Nach Europäisches Arzneibuch [23]	Nach Aflatuni [24]
Linalool		0,3%
Piperiton		0,3%
Viridiflorol		0,2%
trans-Ocimen		0,1%
p-Cymen		0,1%
Terpinolen		0,1%
1-Octen-3-ol		0,1%
cis-Sabinen-hydrat		0,1%
Neoisomenthylacetat		0,1%
α -Terpineol		0,1%

Menthol ist nicht nur der Hauptbestandteil des Pfefferminzöls, sondern findet sich in noch größeren Mengen im ätherischen Öl der chinesischen und japanischen Mentha (japanisches Heilpflanzenöl). In alkoholischen Lösungen wirkt es antiseptisch und reizhemmend. Das Einreiben auf der Haut führt aufgrund von Oberflächenanästhesierung und Stimulierung der Kälterezeptoren zu einem angenehm kühlenden Effekt. Wegen seiner desinfizierenden und kühlenden Wirkung findet Menthol auch breite Verwendung in der Likör-, Süßwaren- und Parfümindustrie [22].

Menthon ist Bestandteil vieler ätherischer Öle und findet sich auch im Geraniumöl.

Wird die Hydroxylgruppe des Menthols mit Essigsäure verestert, erhält man Menthylacetat (Abb. 5), das den frischen Geruch des Pfefferminzöls bestimmt. Ein weiteres Mentholderivat, das im Pfefferminzöl vorliegt, ist Menthofuran (Abb. 5).

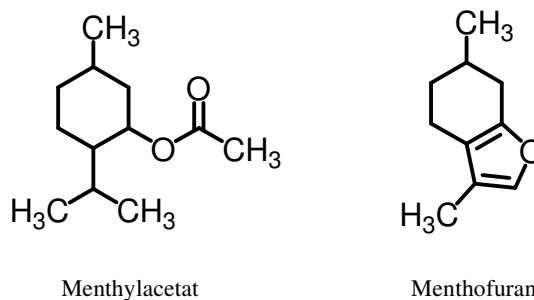


Abbildung 5: Strukturformeln von Menthylacetat und Menthofuran

Pfefferminzöl enthält außerdem die monocyclischen Terpene Limonen, Pulegon und Carvon (Abb. 6). Limonen ist auch im Kümmel- und Fichtennadelöl enthalten, Pulegon ist der Hauptbestandteil des Poleiöls (aus der Poleiminze) und Carvon ist in Dill- und Kümmelöl enthalten.

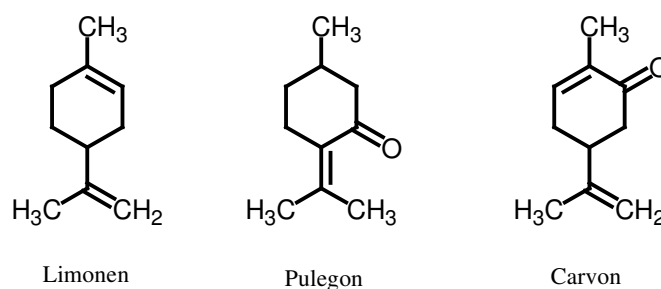


Abbildung 6: Strukturformeln von Limonen, Pulegon und Carvon

Die bicyclischen Terpene α -Pinen und β -Pinen (Abb. 6) sind die wesentlichen Bestandteile des Terpentins (80 – 90%).

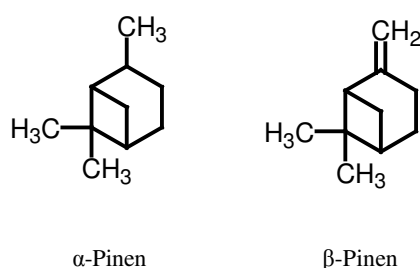


Abbildung 7: Strukturformeln von α -Pinen und β -Pinen

1,8-Cineol (Abb. 8), auch Eucalyptol genannt, ist Hauptbestandteil des Eucalyptusöls.

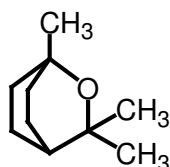


Abbildung 8: Strukturformel von 1,8-Cineol

Die Haupteffekte des Pfefferminzöls sind auf das enthaltene Menthol zurückzuführen. Der Raucher kann durch den Zusatz von Pfefferminzöl zu Zigaretten den Rauch tiefer inhalieren, da er das Gefühl hat freier atmen zu können [25]. Außerdem wird beschrieben, dass Menthol einen langsameren Nikotin-Abbau bewirkt [26]. Weitere Eigenschaften von Menthol als Zigarettenzusatzstoff sind im Abschlussbericht des Projektes Tabakzusatzstoffe aufgeführt [1] und sollen an dieser Stelle nicht wiederholt werden.

2.2 Bisher verwendeten Analysemethoden zum Nachweis der Substanzgemische (Literaturrecherche)

2.2.1 Lakritze

Als Markersubstanzen zum analytischen Nachweis von Lakritze wurden neben der Hauptkomponente Glycyrrhizin [27-32], und deren Aglycon bzw. Hauptmetabolit Glycyrrhetinsäure [30; 31; 33] auch weitere verschiedene Saponine und Flavonoide (Liquiritigenin, Isoliquiritigenin) [34] sowie phenolische Bestandteile (Licopyranocoumarin, Licoarylcoumarin, Glisoflavon) [35; 36] und Umbelliferon (7-Hydroxycoumarin) [32] in der Literatur genannt.

Die meisten Autoren beschreiben als analytische Trennmethode die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) [29; 31-34; 36]. Dabei erfolgte anschließend entweder eine UV- Detektion der zu bestimmenden Komponente bei einer festen Wellenlänge [29; 32; 34; 36] oder, bei den neueren Verfahren, eine massenspektrometrische Detektion [31; 33].

Glycyrrhizin wurde aus verschiedenen Süßholz- bzw. Süßholzwurzelarten [30; 32; 34-37] extrahiert, wobei als Extraktionsmittel u.a. Methanol [38], Ethanol/Wasser (1:1) [32] und Ethylacetat [35] diente. Zur Extraktion aus biologischen Flüssigkeiten wurde ebenfalls Ethylacetat verwendet [33] oder mit Festphasenextraktionssäulen (Oasis MCX SPE (30 mg)) gearbeitet [31]. Zur quantitativen Analyse von Glycyrrhizin wurden bei den HPLC-Techniken Indomethacin, α -Hederin und Ursolsäure als interne Standards verwendet [30; 31; 33; 39].

In weiteren Arbeiten sind u.a. die Nahe Infrarot Spektroskopie (NIR) [37] und die Kapillar-Elektrophorese (CE) [30] zur Identifizierung von Glycyrrhizin beschrieben. Putalun et. al. verwendeten zum schnellen Nachweis von Glycyrrhizin in Pflanzen, biologischen Flüssigkeiten und Nahrungsmitteln immunochromatographische Teststreifen (Immunoassay) mit anti-1 monoklonalen Antikörpern (MAb).

2.2.2 Kakao

Da Theobromin ein Hauptbestandteil von Kakao ist und sich aus eigener Erfahrung mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie sehr gut nachweisen lässt, wurde diese Methode als Nachweismethode für Theobromin gewählt.

Problematisch ist hingegen die Extraktion von Theobromin aus dem Tabak. Um diese möglichst vollständig und mit geringem Arbeitsaufwand zu gestalten, wurde in der Literatur nach Extraktionsmöglichkeiten von Theobromin aus verschiedenen Matrices gesucht.

In Tabelle 4 ist eine Übersicht zum Nachweis von Theobromin mittels HPLC zusammengestellt.

Tabelle 4. Übersicht über Arbeiten zur Extraktion von Theobromin

Matrix	Aufarbeitungsmethode	Detektion	HPLC-Säule	Nachweisgrenze (LOD/LOQ)	Literaturstelle
Kaffeebohnen, Teeblätter, Schokolade, Kakaopulver	LLE mit kochendem Wasser, Filtration mit 0,45 μ m Filter	UV 245 nm	H-209 4, 6x250 mm	k. A.	[40]
Pferdeurin	LLE mit 5% Isopropanol in Chloroform	UV 280 nm	RP-18	0,5 μ g/ml (LOQ)	[41]
Diätetische Lebensmittel	LLE mit Hexan/Isopropanol (9:1)	MS	RP- C18	0,06 μ g/g (LOQ)	[42]

Fortsetzung Tabelle 4.

Matrix	Aufarbeitungsmethode	Detektion	HPLC-Säule	Nachweisgrenze (LOD/LOQ)	Literaturstelle
Kräuterzubereitung mit Guarana	LLE mit Phosphat-Puffer(pH 3,5)/Methanol, Filtration	UV 272 nm	NP- C18	0,043 µg/ml (LOQ)	[43]
Muttermilch	Proteinfällung mit 6% Perchlorsäure	UV 272 nm	RP- C18	k.A.	[39]
Getränke, Urin	Filtration mit Whatman 41 Filterpapier, keine näheren Angaben zur Extraktion	UV 273 nm	Bondesil C18 5 µm (4,0mm x 15cm)	0,1 pg/ml (LOD)	[44]
Serum, Speichel	LLE mit Chloroform/Isopropanol (85:15)	UV 280 nm	100X4,5mm id Hypersil Octadecylsilan	k. A.	[45]
Kuvertüre	Behandlung mit Hexan zur Fettabtrennung, LLE mit HPLC-Wasser im Ultraschallbad, Filtration mit 0,45 µm und 0,20 µm Nylonfilter	UV 274 nm	RX- C18 5 µm (4,6mm x 25 cm)	< 0,1 µg/ml (LOQ)	[46]
Urin	SPE mit RP 18 - Säulen	UV 274 nm	LiChrosorb RP-18 (7 µm)	0,05 µg/ml (LOD)	[47]
Zigaretten, Tabak	LLE mit KOH/Methanol/Wasser, Filtration mit 0,2 µm PVDF-Filter	UV 280 nm	Waters-Radial-Pak 8NV C18 (4 µm)	0,6 µg/ml (LOD)	[18]

LLE= Liquid-liquid extraction (= flüssig-flüssig Extraktion)

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, dass Theobromin meistens durch Flüssigextraktion mit polaren Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen von der Matrix abgetrennt wird. Teilweise werden die Proben nach der Extraktion filtriert, was je nach Zusammensetzung der Matrix sinnvoll ist.

Als interne Standards für die Quantifizierung wurden α - bzw. β -Hydroxyethyltheophyllin [39; 41; 46; 47], Tryptophan [42] und Proxiphyllin [39; 45] benutzt.

2.2.3 Pfefferminzöl

In der Literatur wurden einige Vorschriften zur Untersuchung von ätherischen Ölen bzw. deren aromatischer Bestandteile beschrieben. Die Bestimmung der Komponenten des ätherischen Öls dient hauptsächlich zur Charakterisierung verschiedener Pflanzen [48; 49] oder zur Qualitäts- und Gütebestimmung des Öls [50]. Aber auch zur Untersuchung von Lebensmitteln wurde z.B. der Gehalt an Pulegon in Produkten mit Mintgeschmack bestimmt [51]. Um die Absorptions- und Exkretionsrate von Menthol festzustellen, wurde der Gehalt an Menthol und seinem Metaboliten Menthylglucuronid in menschlichem Urin untersucht [52]. Auch in Tabakprodukten wurden Komponenten ätherischer Öle, wie Menthol, Anethol, Menthon, Geraniol und Pinen nachgewiesen [53]. Stanfill et al. untersuchten indische Bidi-Zigaretten auf 12 geschmackgebende Substanzen, die auch in vielen ätherischen Ölen

enthalten sind (trans-Anethol, Eugenol, Methyleugenol, Pulegon, Estragol) mittels Headspace - Festphasemikroextraktion (HS-SPME) und anschließender GC/MS [54]. Auch im Tabakrauch konnten solche Aroma-Substanzen nachgewiesen werden [55].

Alle Arbeiten verwenden die Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) als Analysenmethode. Lediglich Daferera et al. nutzen als zusätzliche, vergleichende Methode die Fourier Transform Raman Spektrometrie (FT-Raman) [49].

Als Extraktionsmethoden für Menthol und ähnliche Substanzen wurde neben der HS-SPME Technik [53; 54] auch die Festphasenextraktion mit Cyanopropylsäulen (Elemicin, Eugenol, Ioeugenol, Methyleugenol, Methylisoeugenol, Myristicin, Safrol, und Piperonal aus Tabakrauch) [55], die Flüssigextraktion mit Ethylacetat (Menthol und Mentholglucuronid aus Urin) [52], die simultane Destillationsextraktion (SDE) mit der Likens-Nickerson-Apparatur (Pulegon aus Lebensmitteln mit Mintgeschmack) [51] sowie die klassische Wasserdampfdestillation mit einer Clevenger-Apparatur (Menthon und Pulegon aus Minthostachys mollis, Hauptkomponenten des ätherischen Öls von Lamiaceae-Arten) [49; 56] verwendet.

2.3 Theoretischer Hintergrund der in dieser Arbeit verwendeten Analysenmethoden

2.3.1 HS-SPME – GC/MS

Das Verfahren der Headspace-Festphasenmikroextraktion mit anschließender Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HS-SPME/GC-MS) wurde bereits im Zwischenbericht 4 des Projektes Tabakzusatzstoffe [Ratzinger, Merckel, Pragst: „Untersuchungen zu Zusatzstoffprofilen von handelsüblichen Zigarettensorten mit Hilfe der Headspace-Festphasenmikroextraktion und Gaschromatographie-Massenspektrometrie“, November 2004] ausführlich beschrieben und soll deshalb an dieser Stelle nicht wiederholt werden. Eine Publikation der Methode und der Ergebnisse erfolgte inzwischen im Journal of Chromatographie A [57].

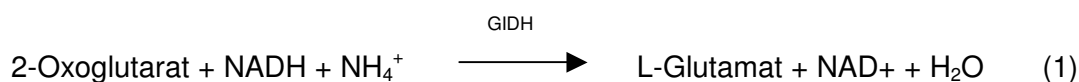
2.3.2 GC / MS zur Bestimmung der Alkaloide

Da diese Methode hinreichend bekannt ist und bereits im Zwischenbericht 2 des vorherigen Projektes [58] ausreichend beschrieben ist, soll an dieser Stelle auf das Prinzip der Massenspektrometrie in Kombination mit Gaschromatographie nicht näher eingegangen werden.

2.3.3 Enzymatische UV–Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff mittels Testkit

Die Methode der Ammoniak-Bestimmung beruht auf der enzymatischen Umsetzung von 2-Oxoglutarat unter Anwesenheit von NADH und NH_4^+ zu L-Glutamat (Gleichung (1)).

Ammoniak setzt 2-Oxoglutarat in Gegenwart von Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu L-Glutamat um, wobei NADH verbraucht wird (Gleichung (1)).

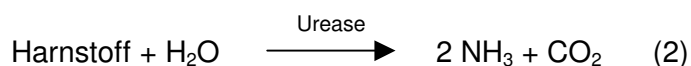


Die Reaktion wird photometrisch beim Absorptionsmaximum des NADH bei 340 nm verfolgt, bei der das entstehende NAD⁺ keine Absorption besitzt.

Durch den Verbrauch von NADH nimmt während der Reaktion (Gleichung (1)) die Extinktion bei 340 nm daher ständig ab, bis ein Stillstand (durch vollständige Umsetzung) erreicht ist.

Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Ammoniak-Menge bzw. der halben Harnstoff-Menge äquivalent.

Für den Nachweis von Harnstoff muss vorher die vollständige Umwandlung in Ammoniak durch das Enzym Urease erfolgen (Gleichung (2)).



Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ammoniak und Harnstoff ergibt sich die Konzentration dann als Differenz der Extinktionsänderungen mit und ohne Urease.

Pro Probe werden daher 2 Messungen durchgeführt, um die Extinktionsänderungen mit Zugabe von Urease und ohne Zugabe von Urease zu messen. Zur quantitativen Bestimmung von Harnstoff wird dann die Differenz dieser Extinktionen gebildet und nach einer allgemeinen Berechnungsformel (siehe Abschnitt 3.4.3.3) die entsprechende Konzentration ermittelt.

2.3.4 HPLC/DAD-Methode

Die Hochleistungsflüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC/DAD) hat sich in den letzten Jahren zu einer der wichtigsten Methoden der toxikologischen Analyse entwickelt [59]. Die Grundlagen sind in zahlreichen Monographien umfassend dargelegt. Bei der HPLC wird der zu untersuchende Probenextrakt über einen Injektor in einen Flüssigkeitsstrom gebracht, der diesen mit hohem Druck über eine Trennsäule transportiert (Abb. 9). Die Trennsäule enthält die stationäre Phase – eine häufig mit modifizierten, 3-10 µm großen Kieselgel-Partikeln gepackte Säule. Durch die Modifizierung des Kieselgels wird die Oberfläche der stationären Phase hydrophob. Die mobile Phase (der Eluent) durchströmt mit konstanter Flussrate die stationäre Phase und aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase werden Gemische in Einzelkomponenten aufgetrennt. Rückhalteeffekte der Trennsäule spielen dabei eine ebenso große Rolle wie die Eigenschaften des Eluenten.

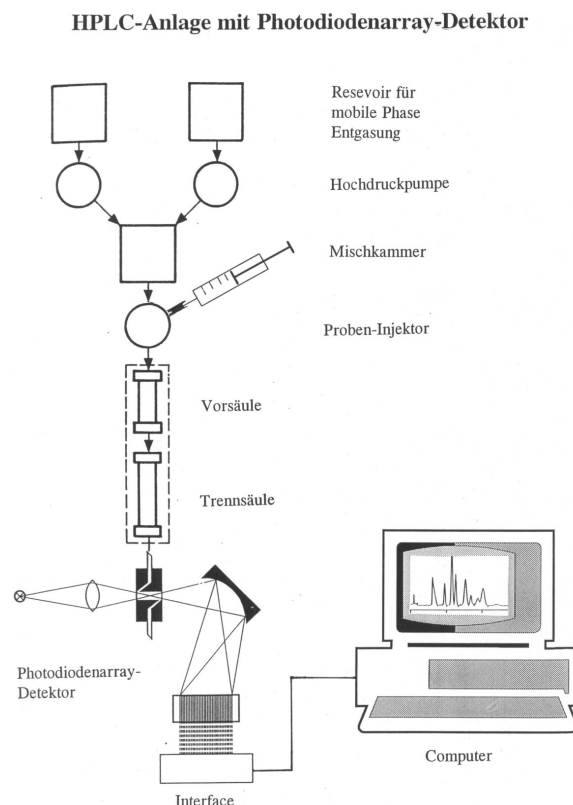


Abbildung 9: Schematische Darstellung zum Aufbau einer HPLC-Anlage mit DAD

Anschließend gelangen die Substanzen in die Messzelle des Photodiodenarray-Detektors (DAD), wo etwa alle 2 s das UV-Spektrum der hindurchfließenden Lösung aufgenommen wird. Diese Spektren werden auf einem Computer gespeichert. Der Vorteil eines Diodenarray-Detektors besteht darin, dass das gesamte Spektrum (195-800 nm) über die Analysenzeit aufgenommen wird. Dadurch können Analyte, die sehr unterschiedliche Maximumwellenlängen besitzen, besser identifiziert und ebenso Verunreinigungen in den getrennten Substanzen erkannt werden.

Zur qualitativen Auswertung dient die Retentionszeit und das UV-Spektrum der jeweiligen Substanz.

Die gemessenen Spektren aller in Frage kommenden Substanzen wurden als Spektrenbibliothek in die HPLC-Software integriert und können als sog. „Bibliothekssuche“ für die Identifizierung der Einzelsubstanzen in unklaren Fällen herangezogen werden. Als Ergebnis wird eine Trefferliste geliefert, die die Spektren der Bibliothek in der Reihenfolge fallender Ähnlichkeit angibt. Somit ist es möglich, das Spektrum eines unbekannten Peaks einer realen Probe direkt mit dem Referenzspektrum zu vergleichen. Als Maß der Ähnlichkeit zwischen Proben- und Referenzspektrum dient der sog. Similarity Index (SI), der theoretisch von Null (völlig verschieden) bis Eins (identisch) läuft. Die Spektren reiner Lösungen werden in der Regel mit einem SI von 1,000 identifiziert, während es bei geringen Konzentrationen und Matrixbelastung zu leichten Verringerungen kommen kann. Zur einwandfreien Identifizierung einer Substanz muss immer Übereinstimmung im Spektrum und in der Retentionszeit in einem definierten chromatographischen System gegeben sein.

Für die Quantifizierung einer Substanz wird die Fläche des entsprechenden Peaks bei geeigneter Wellenlänge aus dem Chromatogramm herangezogen, da diese der Konzentration direkt proportional ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kalibriermethode mit internem Standard benutzt. Hierbei wird der Quotient der Peakflächen von Analyt und Standard gegen die entsprechende Konzentration der zu bestimmenden Substanz aufgetragen. Man erhält eine Gerade, mit deren Geradengleichung man bei bekannter

Peakfläche die Konzentration errechnen kann. Der interne Standard, der bei jeder Probe in gleicher Menge zugesetzt wird, soll Schwankungen in der Methode ausgleichen.

Zu beachten ist, dass bei sehr hohen Konzentrationen die Linearität zwischen Lichtabsorption und Konzentration wegen der zu geringen Intensität des nach der Durchflussszelle messbaren Lichtes nicht mehr richtig erfasst wird. Abhängig von der Empfindlichkeit des Detektors ist dies der Fall, wenn die Extinktion über 1,5-2 ansteigt. Oft resultiert dann auch ein deformiertes Spektrum, was zu falschen Bibliothekssuchergebnissen führt [60]. Zur quantitativen Analyse lassen sich diese Probleme durch Injektion kleinerer Volumina, Verdünnung der Ausgangslösung oder Wahl einer Wellenlänge, bei der die entsprechende Substanz geringere Absorption zeigt, verhindern.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Materialien

3.1.1 GC/MS-System

Gaschromatograph	6890N (G1530N), Agilent Technologies (USA)
Massenselektiver Detektor	5973N (Network) MSD, Agilent Technologies (USA)
Autosampler	Multi Purpose Sampler MPS2, Gerstel (Mühlheim a.d.Ruhr, Germany)
GC/MS-Trennsäule	PTA-5-Säule (Supelco) (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm)
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-Faser	CW-DVB-Copolymer, 65 µm, Supelco (Bellefonte, USA)

3.1.3 Photometrische Ammoniak- und Harnstoffbestimmung

UV-Spektrophotometer 1	- Specord M 42, Carl-Zeiss Jena (Jena, Deutschland)
Typ	Zweistrahlspektrophotometer
Optik	Ebert-Monochromator: f=250 mm, Holographisches Gitter mit 1440 Linien/mm
Strahlungsquellen	- Vorjustierte Halogenlampe 6V 20 W (VIS-Bereich) - Stromstabilisierte Deuteriumlampe (UV-Bereich)
Detektor	Multialkali-Frontkatoden-SEV
Wellenlängenbereich	185-900 nm
Wellenlänge für Messung	340 nm

UV-Spektrophotometer 2	- UV/VIS- Spektrometer Lambda 15, Perkin-Elmer (Überlingen, Deutschland)
Typ	Mikrocomputergesteuertes Zweistrahl-UV/VIS-Spektrometer
Optik	Reflektionsoptik mit Gitter-Monochromator in Littrow-Anordnung, Holographisches Gitter mit 1440 Linien/mm
Strahlungsquellen	- Vorjustierte Wolfram-Halogenlampe (VIS-Bereich) - Vorjustierte Deuterium-Entladungslampe (UV-Bereich)
Detektor	Photomultiplier (PMT) R 928
Wellenlängenbereich	190-900 nm
Wellenlänge für Messung	340 nm

3.1.4 HPLC-DAD-Systeme

HPLC-System 1 (Bestimmung von Glycyrrhizin)

Autoinjektor	SIL-6B, Shimadzu, Japan
Systemcontroller	SCL-6B, Shimadzu, Japan
Detektor	SPD-M10A, Shimadzu, Japan
Pumpe:	LC-6A, Shimadzu, Japan
Entgaser	Degasys DG-1210, Uniflows (Tokio, Japan)
Analytische Trennsäule	CC 250/4 LiChrospher 100 RP8 ec mit Vorsäule 8 x 4 mm (Macherey-Nagel, Düren)
Laufmittel	LM A
Flussrate	1,0 ml/min
Software	Class MC 10 A, Version 1.64A

HPLC-System 2 (Bestimmung von Theobromin)

Autoinjektor	SIL-10A XL, Shimadzu, Japan
Systemcontroller	SCL-10A VP, Shimadzu, Japan
Detektor	SPD-M10A VP, Shimadzu, Japan
Pumpe	LC-6A, Shimadzu, Japan
Entgaser	DGU-14A, Shimadzu, Japan
Analytische Trennsäule	CC 250/4 LiChrospher 100 RP8 ec mit Vorsäule 8 x 4 mm (Macherey-Nagel, Düren)
Laufmittel	LM D
Flussrate	1,0 ml/min
Software	Lcsolution, Version 1.2.1 SP1

3.1.4 Weitere Laborgeräte und Materialien

Ultraschallbad	Sonorex Super RK 255 H, Bandelin electronic (Berlin, Germany)
Thermoschüttler	Thermomixer Comfort 5535R, Eppendorf (Hamburg, Germany)
Horizontalschüttler	mlw THYS 2 (Ilmenau, Germany)

Vortexer	Mixer 5432 Eppendorf (Hamburg, Germany)
Zentrifuge	Labofuge 400, Heraeus Instruments (Osterode, Germany)
Spritzenfilter	Rotilabo Spritzenfilter CME 0,22 µm, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany)
Zentrifugal-Filtereinheit	Millipore Ultrafree-CL, 0,22µm Durapore-Membran
Einmalspritzen	Injekt 2 ml B.Braun AG (Melsungen, Germany)
Einmalkanülen	Sterican 1,20 x 40 mm B.Braun AG (Melsungen, Germany)
Einwegküvetten	Plastibrand 2,5 ml PMMA (12,5x12,5x45mm), 1,00 cm Schichtdicke, Brand GmbH (Wertheim, Germany)
Verschlussdeckel für Küvetten	viereckig, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany)
Probengefäße	- 10 ml Headspacegefäße mit Schraubverschluss PTFE/Silikon-Septum
Messgefäße (Vials)	- 4 ml Glasvials mit Schraubverschluss PTFE/Silikon-Septum - Spitzvial 1,0ml G1s, CS-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, Germany) mit Schraubverschluss Dichtscheibe G 8-1.3 - GC-Vial Flasche R1, klar, 3,6mm mit Mikroinsert G30is und Bördeklappe R11-1,0/HP, CS-Chromatographie (Langerwehe, 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
Phosphat-Puffer pH 2,3	0,1 M: 6,66 g Kaliumdihydrogenphosphat auf 1 l Aqua bidest., pH mit 1 M Phosphorsäure eingestellt
NaCl	Riedel-de-Haen AG
Na ₂ SO ₄	Riedel-de-Haen AG

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

3.2.1.1 Referenzsubstanzen und Interne Standards

Für Vergleichszwecke und als Standards 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)

ICN Biochemicals

trans-Anethol, Phenylacetaldehyd

Fluka

Eucalyptol (1,8-Cineol, $\geq 99,7\%$), 4-Hydroxybenzoesäurepropylester ($>99\%$), Isovaleriansäure ($\geq 98,0\%$), R-(+)-Limonen ($\geq 99,0\%$), S-(-)-Limonen ($\geq 99\%$), (+)-Menthofuran ($\geq 99\%$), Menthon ($\geq 97\%$), Methylpalmitat ($>99,5\%$), (+)-Neomenthol ($\geq 99,5\%$), (+)- α -Pinen ($\geq 99,5\%$), (-)- α -Pinen ($\geq 99,0\%$), (+)- β -Pinen ($\geq 98,5\%$), (-)- β -Pinen ($\geq 99\%$), 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, Veratrinaledehyd)

Sigma-Aldrich

Acetophenon (99%), Acetophenon-d3 (98%), 4-Acetylanillin (4-Aminoacetophenon, $>99,5\%$), 3-Acetylpyridin (99%), Anabasin ($>99,5\%$), Benzylalkohol-d5 (98%), Benzophenon-d5 (98%), Benzylbenzoat ($>99\%$), β -Butyrolacton (99%), Carbitol (Diethylenglykolmonoethylether, $>98\%$), cis-Carveol ($>95\%$), 2,6-Dichlortoluol ($>99\%$), Diethylenglykoldiethylether ($>99\%$), Dipropylenglycol ($>99\%$), Ethylmyristat, Ethylpentadecanoat, Ethylphenylacetat (Phenyllessigsäureethylester, $>99\%$), Ethylvanillin (3-Ethoxy-4-hydroxybenzaldehyd, $>98\%$), N-Formylpyrrolidin (97%), Geranylaceton (96%), Heliotropin (Piperonal, 3,4-Methylenedioxybenzaldehyd, $>99\%$), 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%), (1R)-(-)-Menthylacetat (98%), 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, γ -Undecalacton (Pfersichaldehyd $>97\%$), 2-Phenylphenol (2-Hydroxybiphenyl, 99,7%), 3-Phenylpropanol (Hydrozimtalkohol, $>98,5\%$), Propylenglycol ($>99,5\%$), (R)-(+)-Pulegon (98%), Pyridin ($>98\%$), Pyridin-d5 (99,96%), Tetrahydropyridin (97%), Tripropylenglycol ($>95\%$), Tetramethylpyrazin (98%)

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 die photometrische Ammoniak- und Harnstoffbestimmung

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

UV-Test Harnstoff / Ammoniak:	R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany (je 25 Tests)
Aqua dest.	Bidestilliertes Wasser

3.2.3.1 Referenzsubstanzen und Standards

Harnstofflösungen:	- 50 mg / 100 ml Aqua bidest. (für Zusatz 1 mg/g zu Tabak) - 150 mg / 100 ml Aqua bidest. (für Zusatz 3 mg/g zu Tabak) - 14 mg / 100 ml Aqua bidest. als Standardlösung
Diammoniumhydrogen-Phosphatlösungen:	- 194,5 mg / 100 ml Aqua bidest. (für Zusatz 1 mg/g zu Tabak) - 583,5 mg / 100 ml Aqua bidest. (für Zusatz 3 mg/g zu Tabak)

3.2.4 Chemikalien zur Probenvorbereitung für Glycyrrhizin- und Theobrominbestimmung

Acetonitril	"für die Spektroskopie" Uvasol
Aqua bidest.	Destilliertes Wasser wird mit KMNO ₄ gekocht und erneut destilliert

Kaliumhydroxid-Lösung	0,5%ig (m/m)
Laufmittel D (=LM D):	Acetonitril / Phosphatpuffer pH 2,3 (15 / 85)
Chloroform- Isopropanol- Gemisch	Verhältnis 9:1 (v/v)
Glycyrrhizin:	1 mg / ml in 0,5 % KOH
Testosteron:	1 mg / ml in Acetonitril
Theobromin:	0,1 mg/ml in LM D
Etofyllin:	1 mg/ml in LM D

3.2.4.1 Referenzsubstanzen und interne Standards

Bestand des Instituts für Rechtsmedizin:
Etofyllin, Testosteron, Theobromin

Fluka:

Glycyrrhizinsäure Ammoniumsalz (≥ 95,9%)

3.3 Tabak- und Zigarettenproben

Die untersuchten Zigarettenproben wurden von den unten genannten Quellen (Tabelle 5) 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. Die Rohtabakproben stammen von den unten genannten Zigarettenfirmen aus der Schweiz.

Alle Zigarettenproben wurden bei –15 °C, die Rohtabake bei Raumtemperatur in geschlossenen Glasgefäßen gelagert. Eine detaillierte Auflistung der verschiedenen Zigaretten- und Tabaksorten erfolgt in der Auswertung, im Abschnitt 4.

Tabelle 5. Herkunft der Tabak- und Zigarettenproben

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
Zusatzstofffreie Zigarette Yesmoke (Yesmoke Tobacco SA, Schweiz)	11/2004	Zur Verfügung gestellt vom BAG der Schweiz

Fortsetzung Tabelle 5.

Herkunftsland	Kaufdatum	Quelle
4 Rohtabakproben (Orient Griechenland, Burley Malawi, Virginia Zimbabwe, Virginia Deutschland)	03/2003	PLANTA Tabakfabrik Berlin
14 Tabakproben (9 Rohtabake, 4 Expandierte Tabake, 1 Rekonstituierter Tabak)	11/2005	British American Tobacco Schweiz
12 Tabakproben (5 Rohtabake, 3 Tabakmischungen mit Zusätzen, 2 Expandierte Tabake mit Zusätzen, 2 Rekonstituierte Tabake)	11/2005	Philip Morris Schweiz

3.4 Durchführung der Analysen**3.4.1 HS-SPME Untersuchungen****3.4.1.1 Probenvorbereitung**

Die Tabakproben wurden für die Extraktion nach Optimierung der Methode wie folgt vorbereitet:

- Einwaage von 50 mg des Rohtabaks bzw der Zigaretten (mit Papaier, ohne Filter) in ein 10 ml Headspace-Gefäß sowie:
 - a) für die basische Extraktion: 500 mg Na₂SO₄, 1 ml NaOH (1M)
 - b) für die neutrale Extraktion: 500 mg NaCl, 1 ml destilliertes Wasser
 - c) für die saure Extraktion: 500 mg Na₂SO₄, 1 ml H₃PO₄ (1M)

- Zuschrauben des Headspace-Gefäßes mit PTFE/Silikon-Septum-Schraubkappe

Die Identität der natürlichen und künstlich zugesetzten Tabakinhaltsstoffe wurde bereits im vorangegangenen Projekt [1] (S.45-61) mit Hilfe von Referenzsubstanzen bestätigt und konnte deshalb in diesem Projekt vorausgesetzt werden.

3.4.1.2 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
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
Schütteln der Probe:	250 rpm in Intervallen von 5 sec Schütteln/2 sec Ruhe

Desorption: 5 min bei 250 °C im GC-Injektor
10 min bei 250 °C im GC-Injektor (schwach sauer extrahierbare Substanzen)

Vor, während (nach jeweils 6 Messungen) oder nach einer längeren 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“).

3.4.1.3 Gaschromatographische Parameter

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)
Temperatur der GC/MS-Transfer-Line: 280 °C

3.4.1.4 Massenspektrometrische Parameter

Die massenspektrometrische Detektion der Analyte wurde im Scan-Modus im Messbereich von $m/z=45$ bis $m/z=400$ durchgeführt.

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. Säulenkürzung, 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. 6). Das jeweils zur Quantifizierung benutzte Ion ist fett gedruckt.

Tabelle 6. SIM-Parameter für die Quantifizierung der Substanzen bei der HS-SPME- Untersuchung

Substanz	Detektierte Massenspuren	Retentionszeit [min]
Benzaldehyd	106 105 77	5,03
2-Ethyl-1-hexanol	83 98 70	5,60
Acetophenon	120 105 106	6,04
Acetophenon-d3	123 105 77	6,02
Menthol	123 138 95	6,98
3-Phenylpropanol	117 118 136	7,40
Indol	117 90 89	7,93
Pyridin	79 52 50	2,77
Pyridin-d5	84 56 57 55	2,75
Furfurylamin	97 96 69	3,70
Benzylalkohol	108 107 91	5,70
Benzylalkohol-d5	113 112 96	5,68
Propylenglycol	61 46 45 43	2,67
Vanillin	152 151 123	8,66
Ethylvanillin	166 137 138	9,05

Fortsetzung Tabelle 6.

Substanz	Detektierte Massenspuren	Retentionszeit [min]
n-Propyl-p-hydroxybenzoat	180 138 121	10,00
Benzylbenzoat	212 194 167	10,98
o-Phenylphenol	170 169 141	9,51
Methylcinnamat	162 131 103	8,55
6-Methylcumarin	160 132 131	9,83
Benzophenon-d5	187 186 157	10,21

Zum qualitativen Nachweis von Pfefferminzöl in Zigaretten wurde eine SIM-Methode mit den in Tab. 7 angegebenen Parametern entwickelt.

Tabelle 7. SIM-Methode zum Nachweis einiger Pfefferminzölkomponenten.

Substanz	Detektierte Massenspuren	Retentionszeit / min	Zeitfenster / min
Limonen	136 121 93	5,80	5,6 – 6,6
1,8-Cineol	154 139 108	5,85	5,6 – 6,6
Menthon	154 139 112	6,94	6,6 – 7,3
Isomenthon	154 139 112	7,03	6,6 – 7,3
Menthofuran	150 108 79	7,03	6,6 – 7,3
Neomenthol	138 123 95	7,03	6,6 – 7,3
Menthol	138 123 95	7,08	6,6 – 7,3
Pulegon	152 137 109	7,64	7,3 – 8,2
Menthylacetat	138 123 95	7,99	7,3 – 8,2

3.4.1.5 Qualitative Auswertung

Wie bereits im Vorprojekt beschrieben, wurden zur Identifizierung der Analyten 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 Massenspektrums der jeweiligen Referenzsubstanz, die mit der gleichen Methode durch Zugabe zur Zigarettenmatrix ermittelt wurden, bestätigt.

3.4.1.6 Quantifizierung

Von den zu quantifizierenden Substanzen (siehe Tab. 8–10) wurden Stammlösungen (1 mg/ml bzw. 10 mg/ml) in Methanol hergestellt. Durch Zusammengeben der jeweils sechs neutral extrahierbaren, sieben schwach sauer extrahierbaren bzw. drei basisch extrahierbaren Substanzen und Auffüllen auf 500 µl mit Methanol wurden je fünf verschieden konzentrierte Gemische hergestellt (siehe Tab. 8–10). Lediglich Propylenglycol wurde dem Tabak direkt und einzeln zugesetzt (Tab. 11). Die weitere Probenvorbereitung erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1.1 beschrieben. Abweichend davon wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Substanzen mit 500 mg Na₂SO₄ und 1 ml Phosphatpuffer pH 2,3 versetzt und anschließend mittels HS-SPME extrahiert, wie unter Abschnitt 3.4.1.2 beschrieben.

Tabelle 8. Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden neutral extrahierbaren Substanzen

	Konzentrationen in ng/µl (=µg/g)				
	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

Standard: 0,5 µg Acetophenon-d3 (50 µl 0,01 mg/ml)

Tabelle 9. Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden schwach sauer extrahierbaren Substanzen

	Konzentrationen in ng/µl (=µg/g)				
	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5
Vanillin	10	20	40	80	120
Ethylvanillin	1	2	4	8	10
o-Phenylphenol	0,2	0,4	0,8	1,2	2,0
n-Propyl-p-hydroxybenzoat	10	50	100	200	300
Methylcinnamat	0,2	0,4	0,8	1,2	2
6-Methylcoumarin	2	4	8	12	20
Benzylbenzoat	0,2	0,4	0,8	1,2	2

Standard: 0,2 µg Benzophenon-d5 (20 µl 0,01 mg/ml)

Tabelle 10. Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden basisch extrahierbaren Substanzen

	Konzentrationen in ng/µl (=µg/g)				
	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

Standards: 0,25 µg Pyridin-d5 und 0,25 µg Benzylalkohol-d5 (je 25 µl 0,01mg/ml)

Tabelle 11. Kalibrationsstandards für die Quantifizierung von Propylenglycol

	Konzentrationen in µg/µl (=mg/g)				
	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5
Propylenglycol	4	8	12	16	20

Standard: 5 µg Pyridin-d5 (50 µl 0,1 mg/ml)

Die externe Kalibration für die oben aufgeführten Substanzen erfolgte, indem zu einer Tabakmatrix (Referenzzigarette, zusatzstofffreie Zigarette (Yesmoke) bzw. unbehandelter Rohtabak) jeweils 50 µl einer der Substanzmischungen sowie die in Tabelle 8-10 angegebene Menge an deuteriertem Standard gegeben wurden.

Jede Kalibrierung wurde fünfmal durchgeführt. Für jede Substanz wurde eine Kalibrationsfunktion erstellt, indem die Flächenverhältnisse der Quantifier-Massen (siehe Abschnitt 3.4.1.4, Tabelle 6) von Analyt/Standard gegen die Konzentration des Analyten

[µg/g] bzw. [mg/g] aufgetragen wurden. Dabei wurde jeweils bei den Substanzen, die natürlicherweise im Tabak vorkommen die Fläche des Analyten aus einer Messung der Tabakmatrix ohne Zusatz des Analyten abgezogen („Leerwert“). Die Geradengleichungen für die einzelnen Substanzen sind Tab. 12 zu entnehmen.

Zur Bestimmung der Menge des jeweiligen Analyten in einer Zigaretten- bzw. Tabakprobe wurde die Fläche der Quantifizermasse integriert und das Verhältnis von Analyt/Standard in die Kalibrationsfunktion eingesetzt.

Tabelle 12. Kalibrationsfunktionen für die Quantifizierung

Substanz	Geradengleichung	R ²
Benzaldehyd	$Y = 0,0005x - 0,0004$	0,996
2-Ethyl-1-hexanol	$Y = 0,0279x + 0,0021$	0,994
Menthol	$Y = 0,0477x + 0,0016$	0,992
Indol	$Y = 0,4695x - 0,02$	0,997
Acetophenon	$Y = 0,06x + 0,0022$	0,995
3-Phenylpropanol	$Y = 0,1595x - 0,0244$	0,977
Vanillin	$Y = 0,042x - 0,0311$	0,998
Ethylvanillin	$Y = 0,0906x - 0,0411$	0,992
o-Phenylphenol	$Y = 2,0645x - 0,045$	0,998
n-Propyl-p-hydroxybenzoat	$Y = 0,0123x - 0,1407$	0,988
Methylcinnamat	$Y = 0,5824x - 0,0089$	0,990
6-Methylcoumarin	$Y = 0,2967x - 0,1948$	0,993
Benzylbenzoat	$Y = 0,185x - 0,0089$	0,992
Pyridin	$Y = 0,2476x + 0,1341$	0,999
Furfurylamin	$Y = 0,035x + 0,0125$	0,96
Benzylalkohol	$Y = 0,3909x - 0,1675$	0,998
Propylenglycol	$Y = 0,0983x - 0,0258$	0,999

3.4.2 Alkaloidbestimmung

3.4.2.1 Probenvorbereitung

Die Tabakproben wurden für die Extraktion wie folgt vorbereitet:

Nikotinbestimmung:

- Einwaage von 50,0 mg Tabak in 4 ml Glasröhrchen
- 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 Gaschromatographische Parameter

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

3.4.2.3 Massenspektrometrische Bedingungen

Für die Detektion im „selected ion modus“ (SIM) wurden die in Tabelle 13 angegebenen Massen verwendet. Das jeweils zur Quantifizierung benutzte Ion ist fett gedruckt.

Tabelle 13. SIM-Parameter für die Quantifizierung der Alkaloide

Substanz	Detektierte Massenspuren	Retentionszeit [min]
Nikotin	162 133 161	8,79
Nikotin-d4	166 137 165	8,77
Nornikotin	148 119 147	9,31
Myosmin	146 118 145	9,37
Nicotyrin	158 130 157	9,74
Anabasin	162 106 119	9,85
Anatabin	160 106 159	10,05
2,3-Bipyridin	155 130 156	10,18
Cotinin-d3	179 101 122	11,28

3.4.2.4 Quantifizierung

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

Anabasin, Anatabin Nikotin, Nornikotin: 1 mg/ml, Nicotyrin, Myosmin 0,1 mg/ml.

Daraus wurde folgende Stammlösung für die Kalibrierung der Nebenalkaloide hergestellt:

20 µl Nornikotin, 10 µl Nicotyrin, 10 µl Anabasin, 50 µl Anatabin, 10 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 verschieden konzentrierte Mischungen der Substanzen hergestellt, so dass die in Tab. 14 dargestellten Konzentrationen resultierten. Die Kalibrierung der Nebenalkaloide erfolgte getrennt von der Nikotinkalibrierung.

Von den Mischungen wurden je 40 µl in ein GC-Mikrovial 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 14. Mischungen der Kalibrationsstandards der zu quantifizierenden Tabakalkaloide

Nebenalkaloide	Konzentrationen in ng/µl				
	Mix 1	Mix 2	Mix 3	Mix 4	Mix 5
Nornikotin	2	6	10	14	20
Nicotyrin	0,1	0,3	0,5	0,7	1,0
Anabasin	1	3	5	7	10
Anatabin	5	15	25	35	50
Myosmin	0,1	0,3	0,5	0,7	1,0
Nikotin	10	30	50	70	100

Für jede Substanz wurde eine Kalibrationsfunktion erstellt, indem die Flächenverhältnisse der Quantifizier-Massen (Tab. 13, Abschnitt 3.4.2.3) 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 Quantifiziermasse integriert und in die Kalibrationsfunktion eingesetzt. Diese Geradengleichungen für die einzelnen Substanzen sind Tab. 15 zu entnehmen.

Tabelle 15. Die Kalibrationsfunktionen für die Quantifizierung der Alkaloide

Substanz	Geradengleichung	R ²
Nikotin	$Y = 0,063x - 0,2594$	0,990
Nornikotin	$Y = 0,2155x - 0,263$	0,990
Nikotyrin	$Y = 0,5643x - 0,0105$	0,998
Anabasin	$Y = 0,3374x - 0,1388$	0,995
Myosmin	$Y = 2,0301x - 0,0374$	0,996
Anatabin	$Y = 0,4822x - 1,0507$	0,994
2,3-Bipyridin	$Y = 0,4237x - 0,0153$	0,997

3.4.3 Photometrische Ammoniak- und Harnstoffbestimmung

3.4.3.1 Probenvorbereitung

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

- Einwaage von 50 mg Zigarette (mit Papier, ohne Filter) bzw. 50 mg des homogenisierten und gemörserten Rohtabaks in ein 10 ml Headspacevial
- Mit 2,5 ml bidest. Wasser versetzen
- Probe 2 min auf dem Vortexer schütteln
- 10 min stehen lassen und anschließend nochmals 2 min schütteln
- Wässrigen Extrakt mit einer 2 ml Spritze mit Kanüle abnehmen und über einen Spritzenfilter (CME, Porengröße: 0,22 µm) geben
- Für die Analyse wurden je 100 µl des klaren Filtrats für die Ammoniak-Bestimmung und für die Harnstoff-Bestimmung verwendet

An jedem Messtag wurde vor der Messung der Proben an jedem Messgerät je ein Leerwert für Ammoniak und ein Leerwert für Harnstoff bestimmt. Die Messung der Leerwerte und der Proben erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.3.2 beschrieben.

3.4.3.2 Durchführung der Messung

Nach Vorbereitung der Tabakproben (siehe Abschnitt 3.4.3.1) wurden 100 µl des Extraktes abgenommen und anschließend vorgegangen wie in Tabelle 16 ersichtlich. Für die Messung der Extrakte wurde ein Testkit zur Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff in Lebensmitteln verwendet, der die folgenden Lösungen enthielt:

1. Lösung 1, zusammengesetzt aus Triethanolaminpuffer, pH ca. 8,0 und 2-Oxoglutarat, ca. 220 mg (stabil bei 2-8°C)
2. Reagenz 2: 50 Tabletten mit je ca. 0,4 mg NADH (stabil bei 2-8°C)
Durch das Mischen von Lösung 1 und Reagenz 2 entsteht Reaktionsgemisch 2.
3. Lösung 3: ca. 0,7 ml Urease-Lösung, ca. 80 U (stabil bei 2-8°C)
4. Lösung 4: ca. 1,2 ml Glutamat-Dehydrogenase-Lösung, ca. 1000 U (stabil bei 2-8°C)

Zur Herstellung des Reaktionsgemisches 2 wird je nach Anzahl der Bestimmungen eine NADH -Tablette mit je 1 ml Lösung 1 versetzt.

Lösung 1 und Reaktionsgemisch 2 sind vor Gebrauch auf 20-25°C zu bringen.

Als feste Wellenlänge für die Quantifizierung wurde 340 nm festgelegt. Für die Probenvorbereitung wurden Einwegküvette aus Kunststoff (PMMA) mit 1,00 cm Schichtdicke verwendet. Das Testvolumen betrug 3,040 ml pro Probe, gemessen wurde gegen Wasser.

Tabelle 16. Pipettierplan für Leerwert-Bestimmung und Proben-Messung

In Küvetten pipettieren	Leerwert Harnstoff	Harnstoff Probe	Leerwert Ammoniak	Ammoniak Probe
Reaktionsgemisch 2	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Probelösung	-	100 µl	-	100 µl
Lösung 3	20 µl	20 µl	-	-
Bidest. Wasser	2000 µl	1900 µl	2020 µl	1920 µl
Mischen, nach ca. 5 min bei 20-25 °C Extinktionen der Lösungen messen (E1), Reaktion starten durch Zugabe von:				
Lösung 4	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Mischen, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 20 min) und Extinktionen der Lösungen messen (E2). Falls die Reaktion nach 20 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis innerhalb von 2 min keine Extinktionsänderung mehr auftritt.				

3.4.3.3 Berechnung der Konzentrationen

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml] ($V_{\text{NH}_3} = 3,04 \text{ ml}$; $V_{\text{Harnstoff}} = 3,04 \text{ ml}$)

v = Probenvolumen [ml] ($v_{\text{NH}_3} = 0,1 \text{ ml}$; $v_{\text{Harnstoff}} = 0,1 \text{ ml}$)

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]
($MG_{\text{NH}_3} = 17,03 \text{ g/mol}$; $MG_{\text{Harnstoff}} = 60,06 \text{ g/mol}$)

d = Schichtdicke [cm] (d=1 cm)

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH (bei 340 nm = $6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$)

Daraus ergibt sich für die Analyse fester Proben (wie im Falle des Tabaks und der Zigaretten), die für die Vorbereitung der Probe eingewogen werden:

$$\text{Gehalt}_{\text{Harnstoff}} = \frac{c_{\text{Harnstoff}} \text{ [g / l Probelösung]}}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g / l Probelösung}} \times 100 \text{ [g / 100 g]}$$

$$\text{Gehalt}_{\text{Ammoniak}} = \frac{c_{\text{Ammoniak}} \text{ [g / l Probelösung]}}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g / l Probelösung}} \times 100 \text{ [g / 100 g]}$$

3.4.4 Bestimmung von Glycyrrhizin

3.4.4.1 Probenvorbereitung

Die Zigaretten- bzw. Tabakproben wurden wie folgt vorbereitet:

- Einwäge von 120,0 mg Zigarette (mit Papier, ohne Filter) bzw. Tabak in ein 4 ml Glasvial
- Zugabe von 30 µl Testosteronlösung (c = 1 mg/ml) als Standard
- Zugabe von 1500 µl 0,5 % KOH als Extraktionsmittel
- 10 min schütteln im Thermomixer (Einstellungen: 25 °C, 1250 rpm)
- 1500 µl LM D hinzufügen und kurz vortexen
- 5 min zentrifugieren (3500 rpm)
- 500 µl des Überstandes abnehmen und in eine Zentrifugalfiltereinheit überführen
- Erneut 5 min (3500 rpm) zentrifugieren
- Vom klaren, braunen Überstand 100 µl abnehmen, in ein 1 ml Glas-Spitzvials überführen
- 30 µl ins HPLC-System 1 injizieren

3.4.4.2 HPLC-Parameter

Das Laufmittel (Acetonitril / Phosphatpuffer pH 2,3 (37 / 63)) wurde mit einer Flussrate von 1,0 ml/min im Kreis geführt. Die Detektion des Glycyrrhizins erfolgte nach Trennung auf einer RP-8-Säule bei einer Retentionszeit von etwa 10,5 min. Für die Peakidentifizierung wurde zusätzlich das UV-Spektrum genutzt.

3.4.4.3 Quantifizierung

Für die Kalibrierung wurde Tabak der zusatzstofffreien Zigarettenmarke Yesmoke, mit unterschiedlichen Mengen Glycyrrhizinlösung (c = 1 mg/ml) versetzt (siehe Tabelle 17). Als interner Standard diente Testosteron (30 µl einer Lösung mit c= 1 mg/ml). Die Extraktion der Proben erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.4.1 beschrieben.

Die zugegebenen Mengen Glycyrrhizinlösung und Testosteronlösung sind in Tabelle 17 angegeben:

Tabelle 17. Zugegebene Mengen Glycyrrhizin- und Testosteronlösung zur Bestimmung der Kalibriergeraden

Messpunkt	1	2	3	4	5
V (Testosteronlösung) [µl]	30	30	30	30	30
V (Glycyrrhizinlösung) [µl]	15	22	35	45	55

Die Kalibrationsfunktion wurde erstellt, indem die Flächenverhältnisse von Glycyrrhizin zu Testosteron gegen die zugesetzte Menge Glycyrrhizin in mg/g Zigarette aufgetragen wurden. Zur Bestimmung der Menge an Glycyrrhizin in einer Zigaretten- bzw. Tabakprobe wurde das Flächenverhältnis des Peaks von Glycyrrhizin zu Testosteron bei 250 nm in die Kalibrationsfunktion eingesetzt. Die Geradengleichung ist Tab. 18 zu entnehmen.

Tabelle 18. Kalibrationsfunktionen für die Quantifizierung von Glycyrrhizin und Theobromin

Substanz	Geradengleichung	R ²
Glycyrrhizin	Y= 3,4707x-0,004	0,998
Theobromin	Y= 7,537x+0,008	0,998

3.4.5 Bestimmung von Theobromin

3.4.5.1 Probenvorbereitung

Die Zigaretten- bzw. Tabakproben wurden wie folgt vorbereitet:

- Einwaage von 120,0 mg Zigarette (mit Papier, ohne Filter) bzw. Tabak in ein 10 ml Headspacegefäß
- Zugabe von 20 µl Etofyllinlösung (c = 1 mg/ml in LM D) als Standard
- 1500 µl LM D hinzufügen und kurz vortexen
- 1 h im Ultraschallbad extrahieren
- 7500 µl einer Chloroform- Isopropanol- Lösung (9:1 v/v) hinzufügen
- Probe 20 min auf dem Horizontalschüttler schütteln
- 10 min bei 3500 rpm zentrifugieren
- Chloroform- Isopropanol- Phase mittels einer Einwegspritze (v = 2 ml) abnehmen und in ein weiteres Headspacegefäß überführen
- Organische Phase bei 40° C unter dem Stickstoffstrom bis zur Trockne einengen
- In 2000 µl LM D aufnehmen und im Ultraschallbad für 1 h lösen
- Von der Lösung ca. 1 ml entnehmen und über einen Spritzenfilter (CME, 0,22 µm) in ein 1 ml Messvial überführen
- 50 µl ins HPLC-System 2 injizieren

3.4.5.2 HPLC-Parameter

Das Laufmittel (Acetonitril / Phosphatpuffer pH 2,3 (15 / 85)) wurde mit einer Flussrate von 1,0 ml/min im Kreis geführt. Die Detektion des Theobromins erfolgte nach Trennung auf einer RP-8-Säule bei einer Retentionszeit von etwa 3,5 min. Für die Peakidentifizierung wurde zusätzlich das UV-Spektrum genutzt.

3.4.5.3 Quantifizierung

Für die Kalibrierung wurde Tabak der zusatzstofffreien Zigarettenmarke Yesmoke (für Analyse der Zigaretten) bzw. ein unbehandelter Virginia Tabak (für Analyse der Tabake), mit unterschiedlichen Mengen Theobrominlösung (c = 1 mg/ml) versetzt (siehe Tabelle 19). Als interner Standard diente Etofyllin (20 µl einer Lösung mit c= 1 mg/ml). Die Extraktion der Proben erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.5.1 beschrieben.

Die Kalibriergerade wurde anhand von sieben Messpunkten erstellt, für jeden Datenpunkt wurden sechs Messungen durchgeführt und die Werte anschließend gemittelt.

Die zugegebenen Mengen Theobrominlösung und Etofyllinlösung sind in Tabelle 19 angegeben:

Tabelle 19. Zugegebene Mengen Theobromin- und Etofyllinlösung zur Bestimmung der Kalibriergeraden

Messpunkt	1	2	3	4	5	6	7
V Etofyllinlösung in µl	20	20	20	20	20	20	20
V Theobrominlösung in µl	30	60	120	240	300	360	600

Die Kalibrationsfunktion wurde erstellt, indem die Flächenverhältnisse von Theobromin (korrigierte Peakfläche) zu Etofyllin gegen die zugesetzte Menge Theobromin in mg/g aufgetragen wurden. Die Geradengleichung ist Tab. 18 zu entnehmen.

Zur Berechnung der korrigierten Peakfläche von Theobromin wurde folgende Gleichung verwendet:

$$A_{\text{korrigiert}} = A_{274 \text{ nm}} - A_{310 \text{ nm}} \cdot 0,9$$

Durch diese Korrektur wird der Beitrag einer unbekannten Störsubstanz zur Peakfläche des Theobromins berücksichtigt (s. Abschnitt 4.5.2.3).

Zur Bestimmung der Menge an Theobromin in einer Zigaretten- bzw. Tabakprobe wurde das Flächenverhältnis der korrigierten Peakfläche von Theobromin zu Etofyllin bei 274 nm in die Kalibrationsfunktion eingesetzt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Qualitatives Screening mittels HS/SPME-GC/MS

4.1.1 Untersuchung der zusätzlichen Zigaretten

Im vorangegangenen Projekt wurden die 32 Schweizer Zigarettenarten sowie vier verschiedene Marken (09, 10 „lights“, 18, 19 „lights“) aus unterschiedlichen Ländern mit der unter Abschnitt 3.4.1.1 beschriebenen Methode auf flüchtige und mittelflüchtige Inhaltsstoffe untersucht. Zusätzlich wurden in diesem Projekt noch Zigaretten der Marke 10 „lights“ aus der Schweiz, Deutschland, Irland, Chicago und Washington sowie 09, 10 „lights“, 18 und 19 „lights“ aus Washington in die Untersuchungen mit einbezogen und hinsichtlich ihres Zusatzstoffprofils verglichen.

Länderspezifische Zusatzstoffe

In Tab. 20 sind die in den vier Marken verschiedener Länder qualitativ festgestellten, zugesetzten bzw. aufgestockten Substanzen aufgelistet. Als Vergleich wurden die Referenzzigarette 2R4F, eine zusatzstofffreie Zigarette (Yesmoke, Schweiz) sowie eine Rohtabakmischung untersucht.

Aus dieser Tabelle geht hervor, dass innerhalb der vier Marken länderspezifische Unterschiede im Zusatzstoffprofil bestehen.

In allen Zigaretten wurden **Benzylalkohol** und **2-Ethyl-1-hexanol** als natürlich vorkommende Tabakinhaltsstoffe identifiziert. In amerikanischen Zigaretten ist deutlich weniger 2-Ethyl-1-hexanol enthalten, das in anderen Ländern offenbar z. T. stark aufgestockt wird, besonders in Deutschland und der Schweiz (10 „lights“), was durch die Quantifizierung dieser Substanz bestätigt wurde.

Phenylethanol und **Phenylacetaldehyd** konnten zwar nicht in allen Zigaretten nachgewiesen werden, sind aber aufgrund des Auftretens in Rohtabak und Referenzzigaretten natürliche Inhaltsstoffe von Tabak. Das Feuchthaltemittel **Propylenglycol** und das Lösemittel **Triacetin** kamen ebenfalls in allen hier untersuchten Zigaretten vor.

09-Zigaretten 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. Beiden gemeinsam ist ebenfalls das spezifische Signal für **o-Phenylphenol**. Diese Substanz tritt ausschließlich in den Sorten 09 und 10 „lights“ aus Deutschland und der Schweiz auf.

10 „lights“ unterscheidet sich durch die 09-Zigaretten in allen untersuchten Ländern durch das Vorhandensein von **Phenylacetaldehyd**. Da dieses jedoch auch in den untersuchten Vergleichsmaterialien vorhanden ist, ist es wahrscheinlich natürlicherweise in Tabak enthalten und wurde evtl. in 10 „lights“ Zigaretten aufgestockt. Ähnliches trifft auch für **Phenylethanol** zu: es sind eindeutige Signale in 10 „lights“ Zigaretten aller Länder und nur

zum Teil in den anderen Marken (09I Belgien und Washington, 18 Washington, 19 „lights“ Chicago und Washington) vorhanden.

Benzylbenzoat ist ein weiterer markanter Zusatzstoff für 09 und 10 „lights“ aller untersuchter Länder. Signale für Benzylbenzoat sind weder in 18 noch in 19 „lights“ aller Herkunftsorte identifiziert worden.

Weitere aromatische Substanzen, wie **Ethylvanillin** wurde nur in einigen der untersuchten 09 und 10 „lights“ Sorten identifiziert. Besonders hohe Signale traten in amerikanischen Zigaretten auf. **Vanillin** ist hingegen in den amerikanischen Sorten nur in Spuren vorhanden, war aber dafür in allen europäischen 09 und 10 „lights“ Sorten nachweisbar. Somit scheint auch der Zusatz von Vanillin typisch für 09 und 10 „lights“ Zigaretten zu sein, da es in 18 und 19 „lights“ aller untersuchten Länder fehlt.

Menthol lieferte besonders hohe Signale in den amerikanischen Zigaretten aus Chicago und Washington. In den vier untersuchten Marken waren hier die größten Mentholpeaks zu verzeichnen. Sporadisch wurde es in den anderen Zigarettenmarken ebenfalls nachgewiesen, allerdings meist nur in Spuren.

Auffällig ist weiterhin das Zusatzstoffprofil der chinesischen 09, in der die sonst spezifischen Zusatzstoffe der anderen 09-Zigaretten fehlen. Hier war weder Benzylbenzoat noch Ethylvanillin, o-Phenylphenol, Phenylethanol oder Phenylacetaldehyd nachzuweisen. Lediglich Signale für **Vanillin** und **Triacetin** sowie für die natürlich vorhandenen Stoffe **2-Ethyl-1-hexanol** und **Benzylalkohol** konnten identifiziert werden.

Bei den 18-Zigaretten 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.

n-Propyl-p-hydroxybenzoat ist ein Konservierungsmittel, was oft in den europäischen 18 und 19 „lights“ nachgewiesen wurde. Lediglich in den tschechischen 19 „lights“ war im Chromatogramm nur ein sehr geringes Signal nachweisbar, dieses fehlte in der Sorte 18 aus Tschechien und in den amerikanischen Zigaretten.

Auffällig war auch das Fehlen von **Ethylpalmitat** und **Methyloleat** in den Zigaretten aus Tschechien und den USA.

Auch **Ethylvanillin** und **Vanillin** scheinen als Zusatzstoffe in 18 und in 19 „lights“ Zigaretten keine Rolle zu spielen, da diese in allen untersuchten Varianten nicht nachweisbar waren. Die Signale für **Benzylalkohol** waren in nahezu allen untersuchten Varianten wesentlich kleiner als in den 09 und 10 „lights“ Zigaretten.

Surfynol® konnte hauptsächlich in 18 und 19 „lights“ identifiziert werden, während es nur in zwei 09-Zigaretten (Deutschland und Chicago) nachweisbar war. Da dieses Signal fast zeitgleich mit Vanillin im Chromatogramm auftrat, konnten beide Substanzen wegen Überlagerungen zum Teil nicht eindeutig zugeordnet werden.

In den amerikanischen Zigaretten wurden, wie schon in den amerikanischen 09- und 10 „lights“-Zigaretten, eine erhöhte Menge an **Menthol** gefunden. Man kann davon ausgehen, dass Menthol vorzugsweise zu amerikanischen Zigaretten zugesetzt wird.

Im Gegensatz zu 10 „lights“ Zigaretten konnte **Phenylacetaldehyd** nur in den deutschen 18-Zigaretten und in 18 und 19 „lights“ aus Washington nachgewiesen werden. Auch für **o-Phenylphenol** fehlen Signale in allen 18 und 19 „lights“.

Charakteristisch für die 19 „lights“ aus der Schweiz und aus Deutschland ist der Zusatz von **Anisaldehyd (p-Methoxybenzaldehyd)**, das in den Zigaretten aus Irland und Warschau

jeweils ein schwächeres Signal lieferte. Es ist offenbar eine Substanz, die spezifisch für 18 und 19 „lights“ Zigaretten ist, da diese in keiner der 09 und 10 „lights“ Zigaretten identifiziert werden konnte.

Eine Aufstockung von **Phenylethylamin** könnte in belgischen und amerikanischen Zigaretten vorliegen. Letztere zeigten auch erhöhte Signale für Phenylethanol und erneut für Menthol.

(x= Signal vorhanden, (x)=geringes Signal) D Deutschland; S Schweiz; P Peking; B Belgien; C Chicago; Ws Washington; T Tschechien; W Warschau; I Irland; YS Yesmoke Schweiz; Ref Referenzzigarette 2R4F; Roh Rohtabak

[illegible]

4.1.2 Untersuchung der Rohtabake

Im vorangegangenen Projekt wurden als Vergleichsmaterialien vier Rohtabaksorten, eine selbst hergestellte Rohtabakmischung und die Referenzzigarette 2R4F untersucht.

Um eine bessere, repräsentative Vergleichsdatenlage zu haben sind in diesem Projekt zusätzlich 26 verschiedene Rohtabakproben analysiert worden. Darunter sind 14 unbehandelte einzelne Rohtabake unterschiedlicher Herkunft, 3 Tabakmischungen mit Zusätzen, 4 expandierte Tabakmischungen ohne Zusätze, 2 expandierte Tabakmischungen mit Zusätzen und 3 rekonstituierte Tabake. Die Angaben über die Zusammensetzung dieser Proben wurde von den Angaben der Bezugsfirmen (siehe Abschnitt 3.3) übernommen.

Zur Untersuchung der Tabakproben auf deren Inhaltsstoffe wurden diese, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, vorbereitet und gemessen.

Nach Auswertung der im SCAN-Modus gemessenen Chromatogramme konnten die in Tabelle 21 aufgeführten Substanzen nachgewiesen werden.

Insgesamt wurden 46 verschiedene Substanzen identifiziert, die zum größten Teil schon aus den Messungen der Zigaretten bekannt waren. Substanzen, die in sehr geringen Mengen im Tabak vorkommen, können im SCAN-Modus mitunter nicht erkannt werden. Da die wichtigsten Zusatzstoffe und natürlichen Inhaltsstoffe jedoch quantifiziert wurden, konnten diese dann mit Hilfe der dafür entwickelten empfindlicheren SIM-Methode identifiziert werden.

Nikotin und seine Nebenalkaloide wurden in allen Tabakproben nachgewiesen. Lediglich Nicotyrin wurde nur bei der Quantifizierung festgestellt, da es im SCAN-Modus zu Überlagerungen im Chromatogramm kam. Auffällig war, dass die in den vorangegangenen Untersuchungen festgestellten natürlichen Tabakbestandteile wie 2-Ethyl-1-hexanol, Benzylalkohol, Acetophenon, Benzaldehyd, Furfurylamin und Pyridin nur in einigen Rohtabakproben nachweisbar waren. Bei 2-Ethyl-1-hexanol, Acetophenon, Benzaldehyd und Pyridin waren die Mengen teilweise so gering, dass sie erst in der Quantifizierung eindeutig identifiziert werden konnten. Furfurylamin und 2-Ethyl-1-hexanol konnten in der SCAN-Methode in keiner der Tabakproben nachgewiesen werden.

Substanzen, die in allen Rohtabakproben identifiziert wurden, sind neben den Tabakalkaloiden: Benzylalkohol, Dihydroactinidiloid, Geranylaceton, 3-Hydroxy- β -damascon, Indol, trans-m-Mentha-4,8-dien, α -Isophoron, Megastigmatrienon 1,4-Neophytadien, 3-Oxo- α -ionol, Norsolanadion, Phenylacetaldehyd und Phenylethanol.

Tabelle 21. Übersicht über Inhaltsstoffe in den untersuchten Rohtabakproben;
s sauer, b basisch, n neutral

Ret.zeit [min]	pH- Wert	Substanz	nachgewiesen in [Proben Nr.]
6,05	n	Acetophenon	BAT 7,8
4,08	s	1-Acetoxy-4-propanol	PM 6-8,11
8,02	b	(2)- oder (4)-Acetylanillin	BAT 4 –14, PM 1-14
9,33	b	Anabasin	BAT 1-14, PM 1-14
9,51	b	Anatabin	BAT 1-14, PM 1-14
5, 016	n,s	Benzaldehyd	BAT 1, 7-14, PM 1-14
5,70	n,b,s	Benzylalkohol	BAT 1-14, PM 1-14
9,63	b	2,2-Bipyridin /2,3-Bipyridin	BAT 2-3, 7-14, PM 2-4, 6-14
11,98/ 12,04 8,58/ 9,20 /13,61?	s,n	Cembren (=Thunbergen)	BAT 4, 7
10,68	n,s	trans- β -Damascenon	BAT 1, 5-14, PM 1-14
	b	Deacetylphytuberin	BAT 13
9,67	b,s	Dihydroactinidiloid (=5,7,7,9-tetrahydro-4,4,7-trimethyl-(2,4(H)-Benzofuranon)	BAT 1-14, PM 1-14
12,04	n	Eicosan	BAT 5, PM 5
6,69	b	(R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3-hepten-2-on 2-Ethyl-m-Xylene / 3- oder 4-Ethyl-o-Xylen/ m-Cymen / Durol(=1,2,4,5-	BAT 1,5, PM 1
8,77	s	Tetramethylbenzen) (?) Farnesylacetone (6,10,14-trimethyl-5,9,13-	BAT 5-10, PM 1-14
11,68	s	pentadecatrien-2-on)	BAT 11-14, PM 1-8,12-14
8,96	n,s	Geranylacetone	BAT 1-14, PM 1-14
10,45	n,b,s	n-Heptadecan	BAT 1,5
9,87	n	n-Hexadecan	BAT 1
11,27	n,s	Hexahydrofarnesylacetone (6,10,14-	BAT 1,7,13,14,(11), PM 1-
10,05	n	trimethyl-2-pentadecanon)	8(4,7wenig, 5,8 viel)
7,94/7,9	n	3-Hydroxy- β -damascon	BAT 1-14, PM 1-14
8	s,n,b	Indol	BAT 1-14,(10 -12 wenig, 13-14viel), PM 1-14
6,54	b	α -Isophoron(=3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-on)	BAT 1-14, PM 1-14
12,69	s	trans-m-Mentha-4,8-dien	BAT 1-14, PM 1-14
6,99	n	Menthol	BAT 4, 9 (Spur)
9,77; 9,88; 10,11; 10,19	b	Megastigmatrienon 1-4	BAT 1-14, PM 1-14
7,07	b	p- oder m-Methylacetophenon	BAT 1,5, PM 1
11,66	s	Methylpalmitat	BAT 11,12, PM 1,4,6,7,13,14
8,89	b	Myosmin	BAT 1-14, PM 1-14
11,24	n	Neophytadien /Phytol	BAT 1-14, ,PM 1-14,(12-14viel, 11 wenig)
8,37	b	Nicotin	BAT 1-14, PM 1-14
11,54	b,n,s	Nonadecan	BAT 1,5, PM 5
8,84	b	Nornicotine	Bat 1-14, PM 1-14
9,19	n,s	Norsolanadion	BAT 1,5 (viel),2-4 (wenig) ,6- 12(wenig),13-14 sehr wenig, PM 1-14
11,00	b,s,n	Octadecan	BAT 1,5
10,27	s, n	3-Oxo- α -ionol	BAT 1-14, PM 1-14
10,62	s,n	3-Oxo-7,8-dihydro- α -ionol (= Blumenol C)	BAT 7-14, PM 2

Fortsetzung Tabelle 21.

Ret.zeit [min]	pH- Wert	Substanz	nachgewiesen in [Proben Nr.]
5,80	s,n	Phenylacetaldehyd (Hyacinthin)	BAT 1-14, PM 1-14
6,45	s,n,b	Phenylethanol	BAT 1-14, PM 1-14
7,64	b	Piperiton (3-Carvomenthenon)	BAT 1-14, PM 1
2,67	s,n,b	Propylenglycol	BAT 4, PM 6-8, 11,12
10,00	n	n-Propyl-p-hydroxybenzoat	PM 12 (?)
2,77	b	Pyridin	BAT 1-4,10,12, PM 3-7, 11-14
8,37	s	Solanone (von Nikotin überlagert)	BAT 1,4,7-10, PM 1-14
11,27	n	Solavetivon	BAT 2-4, 6,10,12, PM 12-14
12,58	b	Thunbergol (=2,7,11-Cyclotetradecatrien-1-ol, 4-isopropyl-1,7,11-trimethyl-)	BAT 7(viel),9-11, PM 1
8,11	s	Triacetin	BAT 4, PM 12 (Spur) (BAT 4,9) (Spuren) PM 11,12 13
8,66	s	Vanillin, (überlagert mit Naphtalen-Derivat)	(Spuren)

BAT 1 Orient Griechenland;**BAT 2** Virginia USA;**BAT 3** Virginia Frankreich;**BAT 4** Rekonstituierter Tabak mit Zusätzen;**BAT 5** Orient Türkei;**BAT 6** Virginia Indien;**BAT 7** Burley Frankreich;**BAT 8** Burley Schweiz;**BAT 9** Expandierte Burley-Mischung ohne Zusätze;**BAT 10** Expandierte Virginia-Mischung ohne Zusätze;**BAT 11** Expandierter Tabak England;**BAT 12** Expandierter Tabak;**BAT 13** Maryland Brasilien;**BAT 14** Maryland USA**PM 1** Orient Türkei;**PM 2** Burley USA;**PM 3** Virginia USA;**PM 4** Virginia USA;**PM 5** Orient Griechenland;**PM 6** Tabakmischung Verschnitt mit Zusätzen;**PM 7** Tabakmischung Verschnitt mit Zusätzen;**PM 8** Tabakmischung Verschnitt mit Zusätzen**PM 11** Rekonstituierter Tabak haupts. Frankreich;**PM 12** Rekonstituierter Tabak Brasilien;**PM 13** Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen;**PM 14** Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen

Insgesamt ähneln sich die Tabakproben in ihren Inhaltsstoffen sehr, einige Substanzen sind jedoch spezifisch für gewisse Tabaksorten. Beispielsweise enthalten Orienttabake (BAT 1, 5 und PM 1, 5) langkettige Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Hexadecan, Heptadecan, Octadecan, Nonadecan und Eicosan, die in den anderen Tabaken fehlen (siehe Abb.10). In Abbildung 10 sind die Chromatogramme der zwei Orienttabake von BAT sowie eines Virginia- und eines Burleytabaks (nach basischer Aufarbeitung) übereinandergelegt. Es ist zu erkennen, dass die Signale für die vier Kohlenwasserstoffe ausschließlich in den beiden Orientsorten (BAT 1A und BAT 5A) auftreten, Burley (BAT 7A) und Virginia (BAT 2A) enthalten diese nicht. Weitere spezifische Substanzen für Orienttabak scheinen (R,S)-5-Ethyl-6-methyl-3-hepten-2-on und p- oder m-Methylacetophenon zu sein, da auch diese nur in Orienttabaken auftreten.

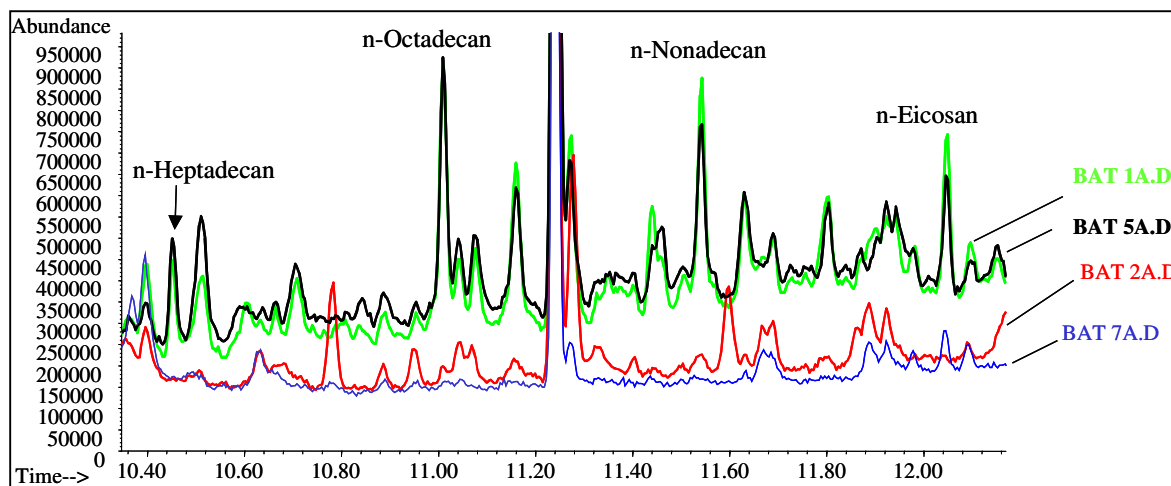


Abbildung 10: Typische Kohlenwasserstoffe in Orient Tabakproben (SCAN, basische Aufarbeitung)

BAT 1A- Orient Griechenland; BAT 5A- Orient Türkei; BAT 2A- Virginia USA ; BAT 7A- Burley Frankreich

Als nicht natürliche Tabakinhaltsstoffe wurden Propylenglycol, Triacetin, 2-Acetoxy-1-propanol und Spuren von Vanillin sowie wahrscheinlich n-Propyl-phydroxybenzoat identifiziert. Die drei erst genannten Zusatzstoffe traten nur in solchen Proben auf, von denen die Beigabe von Zusatzstoffen bekannt war. Propylenglycol trat am häufigsten auf und war in allen rekonstituierten Tabaken (BAT 4, PM 11, PM 12) sowie in den Tabakmischungen mit Zusätzen von PM (PM 6-8) nachweisbar. Die Identifizierung von Propylenglycol war anhand der guten Übereinstimmung von Retentionszeit und Massenspektrum mit der Vergleichssubstanz möglich. Abbildung 11 zeigt das Totalionenstrom-Chromatogramm von einem rekonstituierten Tabak mit Zusätzen (BAT 4) nach saurer Aufarbeitung. Zu erkennen ist der Propylenglycol-Peak bei 2,67 min sowie eine gute Übereinstimmung des Massenspektrums mit Propylenglycol aus der Wiley-Spektrenbibliothek.

Triacetin konnte in zwei rekonstituierten Tabaken identifiziert werden (BAT 4 und PM 12), wobei das Signal in der PM-Probe deutlich geringer war. Abbildung 11 zeigt das Totalionenstrom-Chromatogramm des rekonstituierten Tabaks von BAT sowie das Massenspektrum des Peaks an der Stelle 8,11 min. Ein Vergleich mit dem Massenspektrum von Glyceroltriacetat (=Triacetin) aus der Wiley-Spektrenbibliothek ergibt eine gute Übereinstimmung. Die zusätzlichen Massenfragmente in dem Probenspektren sind der Tabakmatrix zuzuordnen.

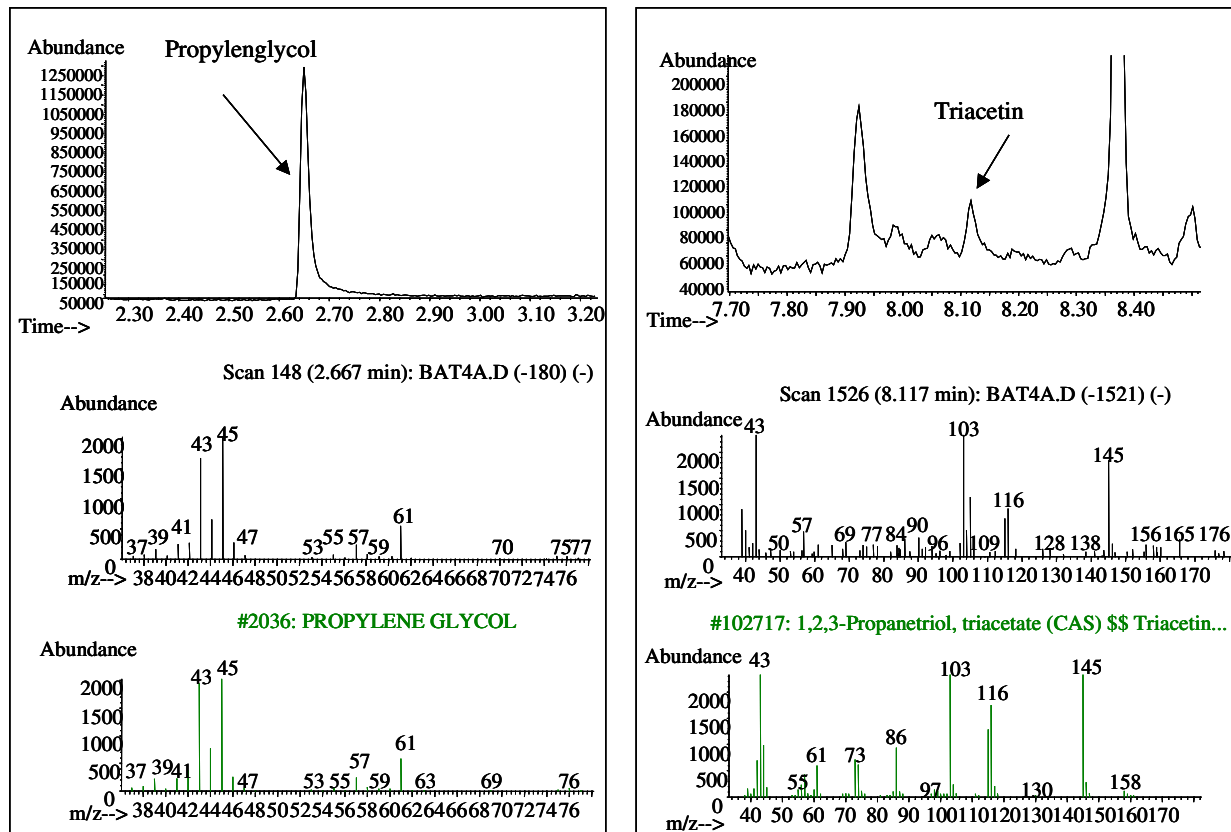


Abbildung 11: Chromatogramm eines rekonstituierten Tabaks von BAT mit Propylenglycol (oben links) und Triacetin (oben rechts) nach saurer Aufarbeitung (SCAN-Modus), Vergleich der Massenspektren aus der Probe mit denen der Wiley-Spektrenbibliothek für Propylenglycol (unten links) bzw. Triacetin (unten rechts)

In den drei PM-Tabakmischungen mit Zusätzen ist außerdem 2-Acetoxy-1-propanol nachgewiesen worden. Ein Vergleich mit den anderen Tabaksorten zeigt wiederum, dass diese Substanz ausschließlich in diesen drei Proben auftritt. Daher ist es wahrscheinlich, dass 2-Acetoxy-1-propanol zugesetzt wurde oder aus zugesetzten Substanzen entstanden ist. In Abbildung 12 sind die Chromatogramme der Tabakmischungen (PM 6A-8A) mit denen eines Orienttabaks und eines Burleytabaks übereinandergelegt dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Signale für 2-Acetoxy-1-propanol in den zusatzstofffreien Tabaken fehlen.

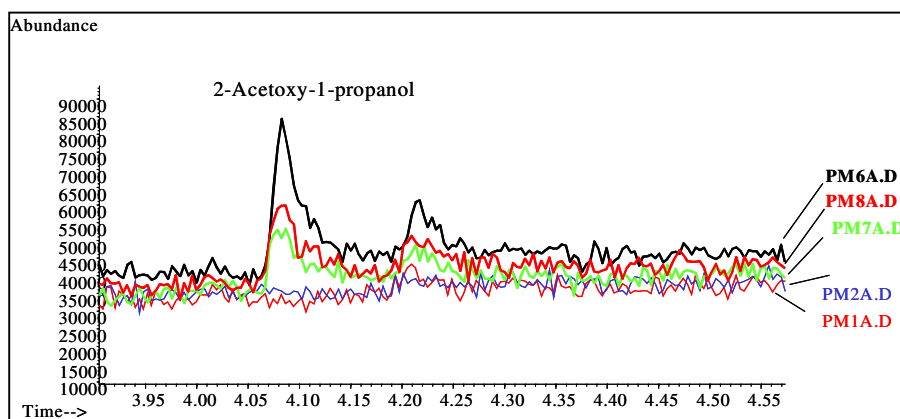


Abbildung 12: 2-Acetoxy-1-propanol in Tabakmischungen mit Zusätzen (PM 6-8), verglichen mit einem Orienttabak (PM 1A) und einem Burleytabak ohne Zusätze (PM 2A), SCAN, saure Aufarbeitung

In den Proben PM 13 und PM 14, beides laut Angaben Tabakmischungen mit Zusätzen, waren keine der erwähnten Zusatzstoffe nachweisbar.

Spuren von Vanillin konnten in den rekonstituierten Tabaken (BAT 4, PM 11,12) und in zwei expandierten Tabakmischungen (BAT 9, PM 13) detektiert werden.

Die Anwesenheit von n-Propyl-phydroxybenzoat in dem rekonstituierten Tabak aus Brasilien (PM 12) konnte anhand der SCAN-Methode nicht eindeutig bestätigt werden. Wie Abbildung 13 zeigt, ist bei 10.0 min ein kleiner, uneindeutiger Peak zu erkennen, dessen Massenspektrum mit einer Übereinstimmung von 53 % zu n-Propyl-phydroxybenzoat (aus der Wiley Spektrenbibliothek) passt. Die drei Hauptmassenbruchstücke $m/z = 180, 138, 121$ sind in beiden Spektren deutlich vorhanden. Eine abschließende Klärung ist erst unter Anwendung einer SIM-Methode in der Quantifizierung zu erwarten.

Des weiteren konnte Menthol eindeutig in dem rekonstituierten Tabak von BAT (BAT 4) sowie in der zusatzstofffreien Burley-Mischung (BAT 9) identifiziert werden. Da Spuren von Menthol auch in den bisherigen Untersuchungen in den Referenzmaterialien identifiziert wurden, ist erst nach der Quantifizierung von Menthol eine definitive Aussage über einen Menthol-Zusatz möglich.

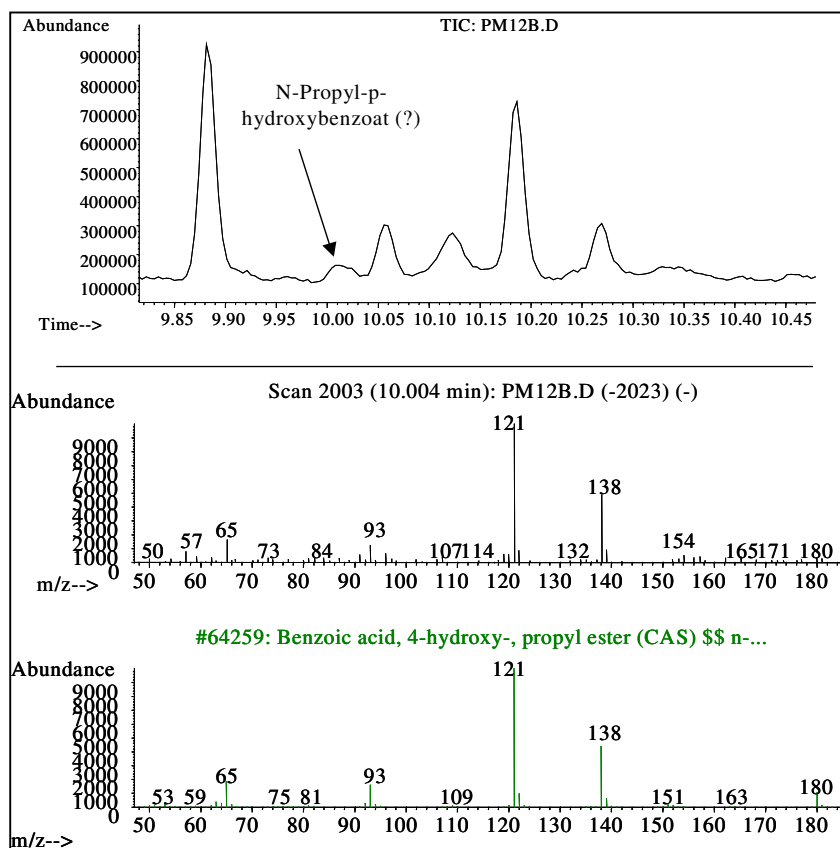


Abbildung 13: Chromatogramm im SCAN-Modus nach neutraler Aufarbeitung von rekonstituiertem Tabak aus Brasilien (PM12)

4.1.3 Vergleich der Rohtabake mit Zigaretten

Vergleicht man die Inhaltsstoffe, die in Zigaretten gefunden wurden mit denen, der Rohtabake, so fallen einige Unterschiede auf. So konnten Substanzen, die nach den vorangegangenen Untersuchungen als natürliche Inhaltsstoffe identifiziert wurden in Rohtabaken nicht oder nur zum Teil festgestellt werden. 2-Ethyl-1-hexanol, Furfurylamin und Acetophenon sind beispielsweise im qualitativen Screening in nahezu allen Zigaretten identifiziert worden, fehlen jedoch in fast allen Rohtabaken. Auch für Menthol war in der Referenzzigarette ein geringes Signal vorhanden, jedoch nur in zwei Rohtabakproben. Das heißt, dass diese Substanzen in den Zigaretten in höherer Menge vorliegen als in Rohtabaken und demnach evtl. aufgestockt wurden. Diese Vermutung konnte durch quantitative Analysen bestätigt werden. Eindeutig als Zusatzstoffe in Zigaretten identifizierte Substanzen, wie z.B. Anisaldehyd, Benzylbenzoat, Ethylvanillin, Methylcinnamat, Thymol wurden in keiner der unbehandelten Rohtabakproben gefunden.

Die hauptsächlich in 09 und 10 „lights“ Zigaretten nachgewiesenen Substanzen Phenylethanol und Phenylacetaldehyd konnten auch in allen Rohtabakproben identifiziert werden. Somit sind auch dies natürliche Inhaltsstoffe des Tabaks. Die für Orienttabak spezifischen höheren Kohlenwasserstoffe waren auch in der Zigarettensorte S01 nachweisbar.

Erst nach Messen der Rohtabakproben im SIM-Modus konnte der Zusatz von n-Propyl-p-hydroxybenzoat in einem brasilianischen rekonstituierten Tabak (PM 12) sicher nachgewiesen werden. Diese als Konservierungsmittel verwendete Substanz wurde ebenfalls häufig in 18 und 19 „lights“ sowie in acht Schweizer Zigaretten identifiziert. Die anderen beiden rekonstituierten Tabake (PM 11, BAT 4) enthielten jedoch kein n-Propyl-p-hydroxybenzoat.

Rekonstituierte Tabake werden aus sämtlichen Abfällen, die während der Zigarettenproduktion anfallen, hergestellt. Demzufolge sind Zusatzstoffe in diesen Tabaken zu erwarten.

Die Signale für identifizierte Zusatzstoffe waren in den Rohtabakproben meist kleiner und schwächer als in den untersuchten Zigaretten. Einige Substanzen, wie Vanillin oder Menthol, waren nur als Spuren in den Tabaken nachweisbar, so dass eine nachträgliche Kontamination mit diesen Stoffen aus der Umgebung nicht ausgeschlossen werden kann.

Zum weiteren direkten Vergleich der untersuchten Tabake mit den Zigaretten dient Tabelle 22, in der die in Schweizer Zigaretten identifizierten Zusatzstoffe aufgelistet sind. Weiterhin ist angegeben, in wievielen Zigaretten, unbehandelten Rohtabaken und behandelten Rohtabaken der jeweilige Zusatzstoff nachgewiesen werden konnte.

Die Angaben in Tabelle 22 beziehen sich auf die Ergebnisse, die mit dem qualitativen HS-SPME-Screeningverfahren unter Benutzung einer SCAN-Methode ermittelt wurden.

Natürlich vorkommende Inhaltsstoffe, die nicht zusätzlich hinzugefügt wurden (Acetophenon, Pyridin, Indol, Alkaloide usw.), sind in der Tabelle nicht angegeben.

Tabelle 22. Übersicht über die in Schweizer Zigaretten, unbehandelten Rohtabaken und Tabakmischungen mit Zusätzen gefundenen Zusatzstoffe (SCAN-Methode)
Fett: eindeutig nachgewiesen als Zusatzstoff

Substanz	Zigaretten [positiv von n= 32]	Unbehandelte Rohtabake [positiv von n= 20]	Tabake mit Zusätzen [positiv von n= 6]
2-Acetylmethylfuran	1	0	0
Anisaldehyd	5	0	0
Anisalkohol	2	0	0
Benzylbenzoat	4	0	0
Benzylisobutanoat			
(unsicher)	2	0	0
2-(2-Butoxyethoxy)- ethanol	1	0	0
Butylphthalat	32	20	6
Butyrolactam (Pyrrolidon)	1	0	0
Cembren	1	1	1
Diethylenglycol- monoethylether	12	0	0
2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy- 6-methyl-4H-pyran-4-on	9	0	0
Ethylheptadecanoat	1	0	0
Ethylhexadecanoat	1	0	0
Ethylmaltol	1	0	0
n-Ethyl-4-methyl- benzensulfonsäureamid (Weichmr.)	1	0	0
Ethylmyristat	1	0	0
Ethylpalmitat	20	0	0
Ethylphenylacetat	1	0	0
Ethylvanillin	3	0	0
Furfurylamin	10	0	0
glycolähnliches Spektrum	2	0	0
n-Hexadecan	1	1	0
Hexa/hepta/pentadecan	1	1	0
Isopropyldodecanoat	2	0	0
Isopulegol	1	0	0
Maltoxazin	3	0	0
Menthol (in Nicht- Menthol-Zigaretten)	13	1	1
2-(2- Methoxyethoxy)ethanol (fraglich)	1	0	0
Methylacetat (fraglich)	4	0	0
Methylbenzoat	8	0	0
3-Methylbutanamin	1	0	0
Methylcinnamat	5	0	0
6-Methylcumarin	1	0	0
Methylethylmaleimid	1	0	0
Methylmyristat	1	0	0
Methyloleat	12	0	0
Methylpalmitat	12	4	4
Methylsalicylat	1	0	0
γ-Nonalacton (coconut aldehyd)	2	0	0

Fortsetzung Tabelle 22.

Substanz	Zigaretten [positiv von n= 32]	Unbehandelte Rohtabake [positiv von n= 20]	Tabake mit Zusätzen [positiv von n= 6]
o-Phenylphenol	2	0	0
3-Phenylpropanol			
(Hydrozimmtalkohol)	2	0	0
Piperonal	7	0	0
Propansäure, 2- Hydroxymethylester	1	0	0
Propylenglycol	29	0	6
Propylenglycol Trimer 3	2	0	0
n-Propyl-p- hydroxybenzoat	9	0	1
2,4,7,9-Tetramethyl-5- dicyne-4,7-diol (=Surfynol®)	7	0	0
Thymol	1	0	0
Triacetin	29	0	2
Tripropylenglycol	2	0	0
γ-Undecalacton (peach aldehyd)	3	0	0
Vanillin	10	0	4
Vanillinmethylether	1	0	0
Zimtaldehyd	2	0	0
Zimtalkohol	3	0	0
(unbekannt)	1	0	0
(unbekannt)	2	0	0
(unbekannt)	2	0	0
3-Acetylpyridin	2	0	0
Benzylalkohol (aufgestockt)	5	20	6
2-Ethyl-1-hexanol (aufgestockt)	18	0	0
p-Mentha-1,5,8-trien	3	0	0
Phenylethylamin	8	0	0
(unbekannt) m/z 110, 109, 82, 67, 59	6	0	0

4.2 Quantitativer Nachweis einiger Zusatzstoffe mittels HS-SPME / GC-MS

4.2.1 Validierung der Methode

Die Analysenmethode zur Bestimmung von Zusatzstoffen in Zigaretten wurde nach den Richtlinien der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) mit dem Programm "Excel Valistat 1.0" validiert. Jede Konzentration der Kalibrierung wurde zu einer Tabakmatrix zugesetzt und fünfmal an einem Tag gemessen. Daraus wurden die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen und die Gesamtstandardabweichung abgeleitet.

Einige der ermittelten Konzentrationen liegen unterhalb der mit Valistat berechneten Nachweis- bzw. Erfassungsgrenzen. Dennoch wurden diese Konzentrationen angegeben, da die Signale im Chromatogramm eindeutig zuzuordnen waren. Dieses ist dadurch berechtigt, dass im konkreten Fall die Nachweis-, Erfassung- und Bestimmungsgrenzen deutlich niedriger waren, wenn man diese aus dem dreifachen, sechsfachen bzw. neunfachen Grundrauschen der Basislinie im Chromatogramm berechnet, was ebenfalls eine zulässige Methode zur Berechnung dieser Parameter ist.

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision und der Laborpräzision wurde jeweils eine Probe an fünf aufeinander folgenden Tagen in Doppelbestimmung gemessen.

Die erhaltenen Werte der Nachweisgrenze (LOD), Erfassungsgrenze (LOI) und Bestimmungsgrenze (LOQ) sowie über die Standardabweichungen (δ) und Präzisionen sind Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23. Angaben zur Validierung der Methode zur Bestimmung natürlicher und nicht natürlicher Tabakinhaltsstoffe

Substanz	LOD [µg/g]	LOI [µg/g]	LOQ [µg/g]	δ [%]	Wiederhol- präzision [%]	Labor- präzision [%]
Acetophenon	0,16	0,32	0,48	7,1	8,2	8,2
Benzaldehyd	14,3	28,6	44,0	7,1	2,5	7,5
Benzylalkohol	1,4	2,8	4,3	12,2	7,5	12,8
2-Ethyl-1-hexanol	0,18	0,35	0,52	11,9	3,3	12,5
Furfurylamin	2,56	5,0	7,7	12,3	14,3	13,2
Indol	0,6	1,2	1,9	18,2	7,6	19,1
Menthol	0,2	0,4	0,6	7,5	3,9	7,8
Pyridin	1,2	2,4	4,0	14,7	2,5	15,8
Benzylbenzoat	0,22	0,44	0,64	11,8	9,4	12,1
Ethylvanillin	1,2	2,3	3,4	10,6	8,1	10,9
Methylcinnamat	0,23	0,46	0,68	14,2	6,6	14,9
6-Methylcumarin	1,9	3,8	5,7	8,5	7,0	8,7
o-Phenylphenol	0,11	0,22	0,36	8,5	6,2	8,8
3-Phenyl-1-propanol	0,17	0,34	0,50	18,1	11,9	19,1
Propylenglycol	0,87	1,74	2,82	10,4	10,4	10,4
n-Propyl-p-hydroxybenzoat	38,5	77,0	117,1	14,1	12,8	14,2
Vanillin	6,9	13,8	22,2	14,9	5,0	15,7

4.2.2 Quantifizierung natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Zigaretten

Wie im Abschlussbericht des 1. Projektes ([1], S.61) bereits erwähnt, sollte anhand der Quantifizierung einiger Stoffe überprüft werden, ob diese in Zigaretten noch künstlich aufgestockt werden bzw. in welchen Mengen sie in Rohtabaken vorkommen.

Mit der Untersuchung einer größeren Anzahl Rohtabake kann der natürliche Gehalt bzw. die Grenze für eine Aufstockung sicherer bestimmt werden. Weiterhin kann geklärt werden, ob die Schwankungen des Gehaltes von der Sorte und Herkunft des verarbeiteten Rohtabaks abhängen können.

Als natürlich vorkommende Stoffe wurden Acetophenon, Benzaldehyd, Benzylalkohol, 2-Ethyl-1-hexanol, Furfurylamin, Indol, Menthol und Pyridin quantitativ bestimmt. Im 1. Projekt sind bereits die 32 Schweizer Zigaretten und die vier verschiedenen Marken aus verschiedenen Ländern auf die natürlichen Inhaltsstoffe sowie auf 3-Phenylpropanol untersucht worden. Neu in diesem Projekt ist die Quantifizierung der o.g. Substanzen in den 26 Rohtabaken.

Aufgrund der höheren Empfindlichkeit der SIM-Methode, die zur Quantifizierung benutzt wurde, konnten so auch Substanzen in einigen Zigarettenarten nachgewiesen werden, die im Screeningverfahren nicht auftraten.

Die Aufarbeitung und Messung der Proben erfolgte wie im Abschnitt 3.4.1 beschrieben. Die in den untersuchten Zigarettenarten unter Anwendung der Kalibrationsgeraden (siehe Abschnitt 3.4.1.6, Tabelle 9) festgestellten Konzentrationen sind in den Tabellen 24 – 25 angegeben.

Tabelle 24. Übersicht über die Konzentrationen natürlich vorkommender Substanzen in Zigaretten
(**fett:** erhöhte Konzentrationen, *kursiv:* sehr niedrige Konzentrationen)

	Benz- aldehyd [µg/g]	2-Ethyl-1- hexanol [µg/g]	Aceto- phenon [µg/g]	Menthol [µg/g]	Indol [µg/g]
S09 Schweiz	36	12,00	<i>0,15</i>	<i>0,06</i>	<i>0,39</i>
09 Dtl.	51	5,30	<i>0,17</i>	<i>0,17</i>	<i>0,68</i>
09 Belgien	44	3,60	<i>0,15</i>	<i>0,05</i>	<i>0,67</i>
09 Non Filter USA (Ws)	43	<i>0,10</i>	<i>0,15</i>	0,79	<i>0,79</i>
09 USA (C)	42	<i>0,15</i>	<i>0,16</i>	13,32	<i>0,91</i>
09 Peking	44	1,10	<i>0,14</i>	<i>0,04</i>	<i>0,85</i>
S10 "lights" Schweiz	38	3,20	<i>0,15</i>	<i>0,05</i>	<i>0,59</i>
10 "lights" Dtl.	46	5,96	<i>0,17</i>	<i>0,23</i>	<i>0,66</i>
10 "lights" Irland	44	5,10	<i>0,15</i>	<i>0,13</i>	<i>0,99</i>
10 "lights" USA (Ws)	50	<i>0,13</i>	<i>0,16</i>	2,77	<i>0,96</i>
10 "lights" USA (C)	37	<i>0,15</i>	<i>0,13</i>	0,90	<i>0,66</i>
S18 Schweiz	39	<i>0,47</i>	<i>0,16</i>	<i>0,13</i>	<i>0,83</i>
18 Dtl.	36	<i>0,33</i>	<i>0,16</i>	<i>0,08</i>	<i>0,94</i>
18 Belgien	35	<i>0,25</i>	<i>0,17</i>	0,41	<i>0,89</i>
18 Irland	33	<i>0,34</i>	<i>0,16</i>	<i>0,03</i>	<i>0,75</i>
18 Polen	34	<i>0,45</i>	<i>0,17</i>	<i>0,04</i>	<i>0,93</i>
18 Tschechien	38	<i>0,52</i>	<i>0,16</i>	<i>0,03</i>	<i>1,02</i>
18 USA (Ws)	35	<i>0,32</i>	<i>0,16</i>	0,50	<i>0,82</i>
18 USA (C)	41	<i>0,21</i>	<i>0,15</i>	1,58	<i>0,98</i>

Fortsetzung Tabelle 24.

	Benz- aldehyd	2-Ethyl-1- hexanol	Aceto- phenon	Menthol	Indol
	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]
S19 "lights" Schweiz	36	0,33	0,15	0,06	1,00
19 "lights" Dtl.	40	0,24	0,17	0,16	1,13
19 "lights" Belgien	38	0,28	0,18	0,02	0,95
19 "lights" Irland	40	1,50	0,16	0,05	0,82
19 "lights" Polen	36	0,29	0,17	0,05	0,76
19 "lights" Tschechien	43	0,60	0,17	0,02	0,89
19 "lights" USA (Ws)	39	0,17	0,16	0,45	0,93
19 "lights" USA (C)	34	0,38	0,15	2,25	0,70
S01 "blau"	29	0,87	0,12	0,15	0,26
S02 "grün"	29	0,31	0,12	0,09	0,25
S03 "gelb"	31	0,35	0,12	0,09	0,16
S04 "lights"	42	0,26	0,16	0,29	1,53
S05 "Menthol"	40	0,38	0,18	786,60	2,10
S06 "Original"	40	0,23	0,15	1,37	1,40
S07	30	0,11	0,12	0,09	0,36
S08 "Vanille"	45	0,74	0,13	1,56	0,42
S11 "mild"	38	0,59	0,15	0,06	0,80
S12	28	0,63	0,13	0,05	0,25
S13 "lights"	36	0,15	0,17	0,52	0,79
S14 "ultra lights"	37	0,15	0,17	0,37	1,24
S15 "ights"	37	0,33	0,20	0,17	1,06
S16	42	0,31	0,15	0,35	0,95
S17 "ights"	49	0,09	0,18	0,10	1,22
S20 "ultra lights"	32	0,47	0,15	0,07	0,88
S21 "ights"	37	0,27	0,16	0,19	0,92
S22	30	0,06	0,13	0,03	0,78
S23 "ights"	44	0,65	0,17	0,06	0,81
S24 "extra"	35	0,81	0,19	7,23	1,16
S25 "mild"	36	0,54	0,16	5,86	0,93
S26 "extra lights"	34	0,26	0,16	0,07	1,17
S27 "one"	42	0,32	0,18	0,10	0,97
S28 "super lights"	29	0,28	0,15	0,07	0,69
S29	43	0,17	0,17	6,77	1,38
S30 "Vanille"	56	0,54	0,24	0,08	0,52
S31 "ultra lights"	34	0,39	0,15	1,17	0,73
S32 "super lights"	37	1,31	0,16	0,40	0,65
MW Zigaretten	38,4	1,0	0,16	0,97	0,85

Tabelle 25. Übersicht über die Konzentrationen natürlich vorkommender Substanzen in Zigaretten
(**fett:** erhöhte Konzentrationen, *kursiv:* sehr niedrige Konzentrationen)

	Pyridin [µg/g]	Furfurylamin [µg/g]	Benzylalkohol [µg/g]
S09 Schweiz	10,0	6,5	11,4
09 Dtl.	6,4	4,8	15,3
09 Belgien	11,6	6,2	16,7
09 Non Filter USA (Ws)	12,3	9,4	10,9
09 USA (C)	8,7	8,9	14,0
09 Peking	19,1	7,5	12,5
S10 "lights" Schweiz	12,0	8,2	9,6
10 "lights" Dtl.	14,6	8,7	8,9
10 "lights" Irland	10,5	5,7	15,9
10 "lights" USA (Ws)	10,2	11,1	7,9
10 "lights" USA (C)	8,9	12,5	9,7
S18 Schweiz	10,5	5,6	6,6
18 Dtl.	9,2	5,6	7,2
18 Belgien	7,6	5,7	7,9
18 Irland	18,4	5,7	7,6
18 Polen	8,2	6,9	10,2
18 Tschechien	9,9	5,7	9,7
18 USA (Ws)	13,0	8,4	7,4
18 USA (C)	14,1	5,7	7,3
S19 "lights" Schweiz	16,7	5,6	7,4
19 "lights" Dtl.	14,5	6,1	6,7
19 "lights" Belgien	7,6	5,9	8,0
19 "lights" Irland	14,7	6,4	6,8
19 "lights" Polen	6,8	5,3	8,5
19 "lights" Tschechien	11,6	4,8	7,7
19 "lights" USA (Ws)	13,3	7,7	6,6
19 "lights" USA (C)	9,5	6,5	6,6
S01 "blau"	16,1	6,2	9,2
S02 "grün"	13,8	4,4	8,4
S03 "gelb"	12,3	4,7	10,4
S04 "lights"	15,2	3,6	24,5
S05 "Menthol"	31,8	3,8	8,9
S06 "Original"	18,4	3,7	10,8
S07	34,9	8,5	9,6
S08 "Vanille"	20,4	8,0	27,1
S11 "mild"	20,6	5,6	8,7
S12	26,8	7,1	10,6
S13 "lights"			
S14 "ultra lights"	24,0	5,6	3,8
S15 "lights"	19,8	5,3	6,9
S16	25,3	4,7	9,7
S17 "lights"	13,2	7,2	8,8
S20 "ultra lights"	20,1	6,8	7,7
S21 "lights"	15,2	3,5	4,7
S22	16,9	6,0	6,0
S23 "lights"	12,8	5,5	8,0

Fortsetzung Tabelle 25.

	Pyridin [µg/g]	Furfurylamin [µg/g]	Benzylalkohol [µg/g]
S24 "extra"	19,0	7, 7	12,0
S25 "mild"	20, 5	9,1	9,1
S26 "extra lights"	13,6	5,6	7,2
S27 "one"	10,4	5,6	16,5
S28 "super lights"	13,2	5,5	7,9
S29	19,6	12,3	7,8
S30 "Vanille"	17,5	18,8	40,8
S31 "ultra lights"	12,9	5,6	10,9
S32 "super lights"	10,2	5,4	10,3
MW Zigaretten	15,0	6,7	10,4

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 aller untersuchten Rohtabake (Jungpflanzen ausgenommen), Rohtabakmischungen ohne Zusatzstoffe und der zusatzstofffreien Referenzzigarette und Yesmoke Zigarette.

Folgende cut-off-Werte ergeben sich:

Benzaldehyd: 267,2 µg/g

2-Ethyl-1-hexanol: 0,62 µg/g

Acetophenon: 0,42 µg/g

Menthol: 0,27 µg/g

Indol: 13,5 µg/g

Pyridin: 20,9 µg/g

Furfurylamin: 8,8 µg/g

Benzylalkohol: 22,0 µg/g

In den Tabellen 24 und 25 sind die nach diesen cut-off-Werten erhöhten Konzentrationen fett gedruckt, die kursiv gedruckten Werte in Tabelle 24-25 sind sehr kleine Konzentrationen.

Es fällt auf, dass die ermittelten Konzentrationen der meisten Analyten stark schwanken. Innerhalb der Zigaretten zeigen sich recht gute Übereinstimmungen der Konzentrationen für Benzaldehyd, Acetophenon und Indol. In keiner der untersuchten Zigaretten sind die Konzentrationen über dem ermittelten cut-off-Wert. Auch die Werte in den Rohtabakproben mit Zusätzen liegen unterhalb dieser Werte. In den Rohtabaken wurden sogar höhere Benzaldehyd- und Indolkonzentrationen als in den Zigaretten nachgewiesen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass diese drei Substanzen den Zigaretten nicht zugesetzt wurden.

Pyridin- und Furfurylaminkonzentrationen hingegen schwanken etwas stärker. Fünf der untersuchten Zigaretten (alles Schweizer Zigaretten) weisen erhöhte Pyridinkonzentrationen, sieben der Zigaretten erhöhte Furfurylaminkonzentrationen (davon drei Schweizer Zigaretten) auf. Da es in den Listen der Tabakindustrie keine Hinweise auf den Zusatz von Furfurylamin oder Pyridin gibt und sich Pyridin wahrscheinlich als Vorstufe oder Abbauprodukt im Tabak befindet, gelten beide Stoffe nicht als Zusatzstoffe.

Bei 2-Ethyl-1-hexanol, Menthol und Benzylalkohol sind deutlich größere Abweichungen der Konzentrationen erkennbar. 15 der insgesamt 55 untersuchten Zigaretten haben 2-Ethyl-1-hexanol-Konzentrationen, die über dem cut-off-Wert liegen. Die höchsten Konzentrationen wurde in 09-Zigaretten aus der Schweiz ermittelt (12,0 µg/g). Weitere Marken mit auffällig hohen Ethylhexanolkonzentrationen sind die Schweizer 10 „lights“ und 32 „super lights“. Die

Konzentrationen in Zigaretten (z.B. 09 Schweiz: 12,0 µg/g) sind um das bis zu 60 fache höher als in den Rohtabaken und Referenzzigaretten (MW: 0,19 µg/g). In den untersuchten europäischen 09 und 10 „lights“ Zigaretten waren die Konzentrationen an 2-Ethyl-1-hexanol deutlich höher als in den restlichen Zigaretten. In den amerikanischen Zigaretten dieser Marken waren hingegen nur Spuren nachweisbar. 2-Ethyl-1-hexanol scheint ein typischer Zusatzstoff für 09 und 10 „lights“ in Europa zu sein. Ungewöhnlich ist die relativ hohe Konzentration an 2-Ethyl-1-hexanol in der Schweizer Sorte 01 (0,68 µg/g), deren Wert sogar oberhalb des errechneten cut-off-Wertes (0,62 µg/g) liegt. Die beiden anderen Varianten dieser Marke weisen nur geringe Konzentrationen auf. Die drei Varianten S01-S03 stimmen in den sonst niedrigen Konzentrationen der anderen Inhaltsstoffe sehr gut überein.

Die Marke S05 „Menthol“ enthält die in Menthol-Zigaretten übliche hohe Konzentration von 787 µg/g Menthol. Menthol kommt allerdings als Zusatzstoff auch in vielen Nicht Menthol Zigaretten vor. In den Schweizer Zigaretten konnten die höchsten Konzentrationen in den Marken S24 „extra“, S29 und S25 „mild“ nachgewiesen werden, deren Mentholkonzentrationen bis zu 130 fache höher sind als die mittlere Mentholkonzentration in den Rohtabaken und Referenzzigaretten (S24 „extra“: 7,23 µg/g ; MW Rohtabake: 0,051 µg/g). Bei dem Ländervergleich der verschiedenen Marken sind die höchsten Mentholkonzentrationen in den amerikanischen Zigaretten zu verzeichnen. So besitzen 09, 10 „lights“, 18 und 19 „lights“ aus Washington und Chicago jeweils die höchsten Werte, während bei den Zigaretten der anderen Länder die Konzentrationen unterhalb des cut-off-Wertes liegen (mit Ausnahme von der Sorte 18 Belgien: 0,41 µg/g Menthol). Demnach wird Menthol eher in den amerikanischen Zigaretten als Zusatzstoff verwendet.

In drei der 32 untersuchten Schweizer Zigaretten konnten erhöhte Benzylalkoholkonzentrationen nachgewiesen werden. Die mit Abstand höchste Konzentration wurde in den S30 „Vanille“-Zigaretten gefunden (40,8 µg/g). Auch in der zweiten untersuchten Vanille-Zigarette S08 und der Sorte S04 „lights“ war eine erhöhte Benzylalkoholkonzentration nachweisbar. Alle anderen untersuchten Zigaretten, auch die Marken der verschiedenen Länder, enthielten Benzylalkohol in den in Rohtabaken üblichen, niedrigen Konzentrationen.

Zum besseren Vergleich sind in Tabelle 26 die Angaben einiger Hersteller [2-11] über die nicht überschrittene Menge an Zusatzstoffen in Zigaretten aufgelistet.

Tabelle 26. Gemessene Konzentrationen und angegebene Maximalkonzentrationen [2-11]
von Zusatzstoffen in Zigaretten
grau unterlegt: in den untersuchten Zigaretten überschrittene Werte

Substanz	Konzentrationen, µg/g		Nicht überschrittene Menge in µg/g Angabe der Hersteller 1-8*
	Bereich	MW	
Acetophenon (32 Schweizer Zig.)	0,12-0,24	0,16	45 ^{1a} / 1 ^{2, 3a, 3b, 4a, 4b} / 100 ⁶ / 4.8 ⁸
Benzaldehyd (32 Schweizer Zig.)	28-56	38.4	60 ^{1a} / 2.0 and 4.0 ^{1b} / 1.0 ^{2,3a,3b,4a,4b,7} / 100 ⁶ / 3.1 ⁸
Benzylalkohol (32 Schweizer Zig.)	4,7-40,8	10,4	1700 ^{1a} / 1.0 ² / 1000 ^{3a} / 500 ^{3b} / 100 ^{4a} / 5 ^{4b,7} / 4400 ⁶ / 67 ⁸
Indol (32 Schweizer Zig.)	0,16-2,1	0,85	10 ⁶
Menthol (31 Schweizer Nicht Menthol Zig.)	0,03-7,2	0,97	20 000 ^{1a} / 8379.5 ^{1b} / 6000 ^{2, 4b} / 8000 ^{3a} 9000 ^{3b} / 5000 ^{4a} / 7600 ⁶ / 5000 ⁷ / 9989 ⁸
Menthol (1 Schweizer Menthol Zig.)	787		

* Hersteller: 1a = British American Tobacco UK (2004); 1b = British American Tobacco UK 2006; 2 = British American Tobacco Australien 2000-2001; 3a = Philip Morris Australien 2000-2001; 3b = Philip Morris Australien 2003-2004; 4a = Philip Morris Schweiz 2003; 4b = Philip Morris Schweiz 2005; 5 = Philip Morris worldwide; 6 = Gallaher Tobacco Group worldwide, 2005; 7 = Philip Morris Deutschland, 2004. 8 = British American Tobacco Schweiz 2006

Nach Vergleich mit den in den Schweizer Zigaretten ermittelten Konzentrationen ist erkennbar, dass nur bei Benzaldehyd und Benzylalkohol die Maximalwerte der Hersteller von einigen Zigaretten überschritten werden. Die meisten der hier berücksichtigten Hersteller geben als nicht überschrittene Menge für Benzaldehyd in Zigaretten Werte zwischen 1.0 und 4.0 µg/g an. Alle in diesem Projekt untersuchten Zigaretten überschreiten diese Werte.

Auch die von British American Tobacco Australien (2000-2001), Philip Morris Schweiz (2005) und Philip Morris Deutschland (2004) angegebenen Mengen für Benzylalkohol werden von nahezu allen untersuchten Zigaretten überschritten.

Die Konzentrationen der restlichen Substanzen liegen alle unterhalb der von den Herstellern deklarierten Werte. Da die angegebenen Höchstwerte für Menthol mehrere Zehnerpotenzen über den von uns in Nicht Menthol Zigaretten ermittelten Konzentrationen liegen, beziehen sich die Herstellerangaben für Menthol vermutlich auf Menthol Zigaretten. Auch die untersuchte Menthol Zigarette liegt weit unterhalb der Maximalwerte, was daran liegen kann, dass bereits ein Teil des Menthols während der Lagerung verdampft sein kann und die Kalibriergerade möglicherweise nicht bis in diesen hohen Konzentrationsbereiche linear ist.

4.2.3 Quantifizierung natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Rohtabaken

Die ermittelten Konzentrationen natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Rohtabaken sind in den Tabellen 27-28 aufgeführt.

Tabelle 27. Übersicht über die Konzentrationen natürlich vorkommender Substanzen in Rohtabaken
(fett: erhöhte Konzentrationen, *kursiv*: sehr niedrige Konzentrationen)

	Benz- aldehyd [µg/g]	2-Ethyl-1- hexanol [µg/g]	Aceto- phenon [µg/g]	Menthol [µg/g]	Indol [µg/g]
Burley Malawi	94	<i>0,11</i>	0,38	<i>0,05</i>	1,5
Burley Frankreich (BAT 7)	138	<i>0,17</i>	0,28		13,1
Burley Schweiz (BAT 8)	237	0,78	0,23		6,9
Burley USA (PM 2)	55	<i>0,17</i>	<i>0,18</i>		3,0
Maryland Brasilien (BAT 13)	104	<i>0,32</i>	<i>0,082</i>		10,4
Maryland USA (BAT 14)	119	<i>0,16</i>	<i>0,067</i>		10,6
Orient Griechenland	180	0,46	0,32	<i>0,13</i>	1,6
Orient Griechenland (BAT 1)	66	<i>0,14</i>	<i>0,023</i>	<i>0,045</i>	<i>0,45</i>
Orient Griechenland (PM 5)	113	<i>0,13</i>	<i>0,045</i>		1,2
Orient Türkei (BAT 5)	62	<i>0,21</i>	<i>0,004</i>	<i>0,014</i>	<i>0,26</i>
Orient Türkei (PM 1)	46	<i>0,13</i>	<i>0,021</i>		<i>0,38</i>
Virginia Zimbabwe	39	<i>0,08</i>	<i>0,12</i>	<i>0,06</i>	<i>0,25</i>
Virginia Dtl.	69	<i>0,07</i>	<i>0,19</i>	<i>0,05</i>	<i>0,03</i>
Virginia USA (BAT 2)	54	0	<i>0,052</i>		<i>0,36</i>
Virginia USA (PM 3)	97	<i>0,17</i>	<i>0,059</i>		<i>0,5</i>
Virginia USA (PM 4)	87	<i>0,14</i>	<i>0,042</i>		<i>0,5</i>
Virginia Frankreich (BAT 3)	61	<i>0,12</i>	<i>0,091</i>	<i>0,023</i>	<i>0,44</i>
Virginia Indien (BAT 6)	31	<i>0,16</i>	<i>0,093</i>		<i>0,48</i>
Korso Freiland	240	<i>0,13</i>	<i>0,30</i>	<i>0,02</i>	<i>0,60</i>
Korso Jungpflanzen	210	<i>0,11</i>	0,46	<i>0,02</i>	<i>0,36</i>
Rohtabakmischung 2	63	<i>0,10</i>	<i>0,18</i>	<i>0,03</i>	<i>0,98</i>
Expandierter Tabak (Burley- Mischung) (BAT 9)	170	<i>0,12</i>	<i>0,088</i>	0,31	6,7
Expandierter Tabak (Virginia- Mischung) (BAT 10)	34	<i>0,13</i>	<i>0,034</i>	<i>0,15</i>	0,46
Expandierter Tabak England (BAT 11)	53	<i>0,12</i>	<i>0,06</i>		2,0
Expandierter Tabak (BAT 12)	42	<i>0,15</i>	<i>0,045</i>	<i>0,11</i>	1,0
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 6)	102	<i>0,12</i>	<i>0,033</i>	<i>0,026</i>	1,9
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 7)	107	<i>0,1</i>	<i>0,051</i>	<i>0,005</i>	1,4
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 8)	114	<i>0,12</i>	<i>0,045</i>	<i>0,007</i>	2,0
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 13)	56	<i>0,14</i>	0,11		1,5
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 14)	47	<i>0,1</i>	<i>0,016</i>		<i>0,44</i>
Rekonstituierter Tabak (BAT 4)	44	<i>0,17</i>	<i>0,038</i>	0,4	<i>0,64</i>
Rekonstituierter Tabak Frankreich (PM 11)	52	<i>0,27</i>	0,028	<i>0,012</i>	<i>0,6</i>

Fortsetzung Tabelle 27.

	Benzaldehyd	2-Ethyl-1-hexanol	Acetophenon	Menthol	Indol
	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]
Rekonstituierter Tabak Brasilien (PM 12)	73	0,18	0,072		1,0
Referenzzig.2R4F	35	0,07	0,14	0,18	0,66
Yesmoke Schweiz	38	0,22	0,17	0,07	1,8

Tabelle 28. Übersicht über die Konzentrationen natürlich vorkommender Substanzen in Rohtabaken
(**fett:** erhöhte Konzentrationen, *kursiv:* sehr niedrige Konzentrationen)

	Pyridin	Furfurylamin	Benzylalkohol
	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]
Burley Malawi	4,6	0	7,9
Burley Frankreich (BAT 7)	2,6	0	3,1
Burley Schweiz (BAT 8)	2,1	0	2,8
Burley USA (PM 2)	3,5	0	4,8
Maryland Brasilien (BAT 13)	3,1	0	4,2
Maryland USA (BAT 14)	3,6	0	6,2
Orient Griechenland	8,5	0,11	12,3
Orient Griechenland (BAT 1)	3,7	0	7,9
Orient Griechenland (PM 5)	5,2	0	8,2
Orient Türkei (BAT 5)	0,5	0	6,8
Orient Türkei (PM 1)	2,7	0	7,5
Virginia Zimbabwe	10,6	5,3	20,7
Virginia Dtl.	2,4	3,3	16,1
Virginia USA (BAT 2)	11,9	0	11,8
Virginia USA (PM 3)	9,4	0	9,3
Virginia USA (PM 4)	5,7	0	9,6
Virginia Frankreich (BAT 3)	11,5	0	12,7
Virginia Indien (BAT 6)	5,5	0	16,3
Korso Freiland	8,8	0	6,2
Virginia Jungpflanzen	3,5	0	7,0
Rohtabakmischung 2	7,5	4,8	7,3
Expandierter Tabak (Burley-Mischung) (BAT 9)	17,4	0	4,0
Expandierter Tabak (Virginia-Mischung) (BAT 10)	10,5	3,5	12,0
Expandierter Tabak England (BAT 11)	6,0	0	9,4
Expandierter Tabak (BAT 12)	4,1	0	12,8
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 6)	5,6	0	7,7
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 7)	5,2	0,17	6,3
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 8)	6,3	0	9,9

Fortsetzung Tabelle 28.

	Pyridin [µg/g]	Furfurylamin [µg/g]	Benzylalkohol [µg/g]
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 13)	7,1	0	10,4
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 14)	10,0	0	7,9
Rekonstituierter Tabak (BAT 4)	15,8	0	2,4
Rekonstituierter Tabak Frankreich (PM 11)	16,8	0	1,6
Rekonstituierter Tabak Brasilien (PM 12)	11,3	0,16	4,9
Referenzzig.2R4F	11,0	6,3	8,1
Yesmoke Schweiz	8,6	0	3,8

Der mittlere Gehalt sowie der Konzentrationsbereich von Benzaldehyd (MW: 87 µg/g, Konzentrationsbereich: 34 -240 µg/g) ist in den Rohtabaken wesentlich höher als in den untersuchten Zigaretten (MW: 38 µg/g, Konzentrationsbereich: 28-56 µg/g). Vermutlich geht während des Fermentations- und Trocknungsprozesses ein Teil des Benzaldehydes verloren und wird nicht bis zum vollen natürlichen Gehalt aufgestockt. Vor allem die Burley-Tabake (94-237 µg/g), Maryland Tabake (104-119 µg/g) und der selbst gezüchtete Korso Tabak (240 µg/g) fallen durch hohe Benzaldehydkonzentrationen auf. Lediglich der Burley aus den USA (PM 2) hat mit 55 µg/g einen vergleichsweise geringen Anteil an Benzaldehyd. Zwei der fünf Orient Tabake enthalten ebenfalls hohe Konzentrationen an Benzaldehyd. Am Beispiel des Orient Tabaks ist deutlich zu erkennen, dass die Gehalte an den hier untersuchten Substanzen sehr stark schwanken und von verschiedenen Umweltfaktoren abhängen müssen. Ein Orient aus Griechenland enthält 180 µg/g Benzaldehyd, 0,46 µg/g 2-Ethyl-1-hexanol, 0,32 µg/g Acetophenon, 0,13 µg/g Menthol und 1,6 µg/g Indol. Ein weiterer Orient, ebenfalls aus Griechenland, enthält hingegen nur 66 µg/g Benzaldehyd und 2-Ethyl-1-hexanol, Acetophenon, Menthol und Indol in extrem niedrigen Konzentrationen.

Die Konzentrationen an 2-Ethyl-1-hexanol sind in allen Tabaken auffallend niedrig. Da im Screening bereits auffiel, dass diese Substanz in keiner der Tabakproben qualitativ nachgewiesen werden konnte, ist dies also nicht verwunderlich. Lediglich in zwei Tabakproben (Burley Schweiz (BAT 8) und Orient Griechenland) wurden Mengen oberhalb der Erfassungsgrenze festgestellt. In dem Schweizer Burley Tabak wurde sogar eine relative hohe Konzentration (0,78 µg/g) gemessen.

In Burley Tabaken wurden außerdem die höchsten Acetophenon-Konzentrationen (0,18-0,38 µg/g) gefunden, die in fast allen anderen Tabaken jeweils unterhalb der Erfassungsgrenze liegen. Auch dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen des qualitativen Screenings überein.

Typisch scheinen hohe Indolkonzentrationen für Burley Tabake (1,5-13,1 µg/g), Maryland (10,4-10,6 µg/g) und zum Teil für Orient Tabake (zwei Sorten:1,2-1,6) zu sein, die sogar höher als in den Zigaretten sind. Selbst in der expandierten Burley Tabakmischung ist noch reichlich Indol (6,7 µg/g) nachweisbar. Die hier untersuchten Virginia Tabake enthalten nur geringe Konzentrationen an Benzaldehyd sowie 2-Ethyl-1-hexanol, Acetophenon, Menthol und Indol unterhalb der Erfassungsgrenze.

Die Tabakmischungen mit Zusätzen fallen nur durch erhöhte und sehr ähnliche Benzaldehydkonzentrationen (102-114 µg/g) auf. Alle anderen Substanzen lagen nicht in erhöhter Konzentration vor. Auffällig ist der hohe Mentholgehalt in der expandierten Burleymischung (BAT 9: 0,31 µg/g Menthol) und im rekonstituierten Tabak BAT 4 (0,4 µg/g). An beiden Proben war nicht vermerkt, dass diese Tabake mit Zusätzen versehen wurden.

Die höchsten Konzentrationen an Benzylalkohol konnten in Virginia Tabaken festgestellt werden (9,3-20,7 µg/g), während alle Burley und Maryland Tabake geringere Konzentrationen aufweisen (2,8-7,9 µg/g). Furfurylamin konnte nur in acht Rohtabakproben quantifiziert werden, die höchsten Werte waren auch hier in Virginia Tabaken zu finden. Rekonstituierte Tabake haben einen hohen Pyridingehalt, hingegen einen niedrigen Benzylalkoholgehalt. Alle anderen Substanzen waren ebenfalls nur in Spuren nachweisbar (Ausnahme: Menthol in BAT 4).

4.2.4 Quantifizierung nicht natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Zigaretten

Besonders wichtige Zusatzstoffe in Zigaretten sollten quantifiziert werden, um anhand deren Menge das toxische Potential abschätzen zu können. Von den nicht natürlich vorkommenden Substanzen sind für die Quantifizierung solche ausgewählt worden, die häufig zugesetzt werden und auffällige Signale im Screening lieferten: Benzylbenzoat, Ethylvanillin, Methylcinnamat, 6-Methylcumarin, 3-Phenylpropanol, n-Propyl-p-hydroxybenzoat, Propylenglycol und Vanillin.

Alle Schweizer Zigaretten und die Zigaretten aus verschiedenen Ländern wurden quantitativ auf die Zusatzstoffe Vanillin, Ethylvanillin, Benzylbenzoat, Methylcinnamat, 6-Methylcumarin, o-Phenylphenol, n-Propyl-p-hydroxybenzoat, 3-Phenyl-1-propanol und Propylenglycol analysiert. Die einzelnen Konzentrationen der positiven Proben sind in den Tabellen 29 und 30 aufgelistet.

Wie aus Tabelle 30 ersichtlich ist, konnte Propylenglycol in allen Zigaretten nachgewiesen werden. Nur in den Schweizer Marken S07 und S12 sowie in der chinesischen 09-Zigarette waren die Konzentrationen sehr klein. Die höchsten Konzentrationen der Schweizer Zigaretten wurden in S31 (18,9 mg/g) und in S08 Vanille (13,6 mg/g) bestimmt.

Weitere, häufig verwendete Zusatzstoffe sind n-Propyl-p-hydroxybenzoat und o-Phenylphenol. Wie während des qualitativen Screenings bereits vermutet, wird das Konservierungsmittel n-Propyl-p-hydroxybenzoat oft in 18 und 19 „lights“ Zigaretten verwendet, in denen auch die höchsten Konzentrationen nachgewiesen wurden. In den Schweizer Zigaretten sind die Konzentrationen an n-Propyl-p-hydroxybenzoat vergleichsweise niedrig. In keiner der untersuchten 09 oder 10 „lights“ Zigaretten konnte n-Propyl-p-hydroxybenzoat nachgewiesen werden (Ausnahme: 10 „lights“ Chicago: 28,6 mg/g).

o-Phenylphenol, welches ein typischer Zusatzstoff in Schweizer und Deutschen 09 und 10 „lights“ ist, trat auch in diesen Sorten in den höchsten Konzentrationen (0,54-1,7 µg/g) auf. Auch die ohnehin schon sehr stark aromatisierte S30 „Vanille“ enthielt deutliche Mengen an o-Phenylphenol, ebenso wie die eigentlich zusatzstoffarme Sorte S01. In den beiden Varianten der letztgenannten Sorte, S02 und S03, konnten geringen Mengen o-Phenylphenol identifiziert werden.

Benzylbenzoat, welches ebenfalls in allen 09 und 10 „lights“ Zigaretten in deutlichen Konzentrationen auftrat, wurde außerdem nur in den zwei Vanille Zigaretten S30 und S08 nachgewiesen. Die Konzentration in S30 „Vanille“ ist mit 21,9 µg/g etwa zehnfach höher als in den restlichen Zigaretten.

Oft eingesetzte Zusatzstoffe sind Vanillin und Ethylvanillin, die zum Teil in recht hohen Konzentrationen in den Zigaretten vorhanden sind. In den Schweizer Marken S06 „Original“ und S05 „Menthol“, beides keine Vanille Zigaretten, sind extrem hohe Konzentrationen (272,9 bzw. 178,6 µg/g) an Vanillin gemessen worden. Die ebenfalls vanillinhaltigen Marken S24 „extra“ und S25 „mild“ enthalten nur 22,0 bzw. 18,1 µg/g dieses Aromastoffes. Ähnliche Konzentrationen wurden auch in den Marken S32 „super lights“ und S31 (17,8 und 15,87 µg/g) nachgewiesen. Weiterhin ist aus Tabelle 19 a ersichtlich, dass in 09 und 10 „lights“ Zigaretten zusätzlich zu Vanillin noch Ethylvanillin in geringen Mengen zugesetzt wurde. Die höchsten Ethylvanillinkonzentrationen wurden in den amerikanischen 09 „lights“ (24,7 und 32,2 µg/g) bestimmt. Von den 29 Schweizer Nicht Vanille Zigaretten war nur in zwei Sorten

Ethylvanillin nachweisbar, in S27 4,4 µg/g sowie Spuren in S10 „lights“ (1,1 µg/g). Die zwei untersuchten Schweizer Vanille Zigaretten enthalten die höchsten Konzentrationen an Vanillin und Ethylvanillin, wobei die Konzentration an Vanillin in beiden Fällen höher war als die Ethylvanillinkonzentration.

Der Zusatzstoff Hydrozimmtalkohol (= 3-Phenyl-1-propanol) ist in geringen Mengen ausschließlich in den drei Schweizer Varianten S04-S06 (0,17-0,18) sowie in höheren Konzentrationen in den beiden Vanille Zigaretten (0,29 µg/g in S08, 0,58 µg/g in S30) nachweisbar.

Tabelle 29. Übersicht über die Konzentrationen von Zusatzstoffen in Zigaretten
(**fett:** erhöhte Konzentrationen, *kursiv:* sehr niedrige Konzentrationen)

	Ethyl- vanillin [µg/g]	Vanillin [µg/g]	Methyl- cinnamat [µg/g]	6-Methyl- cumarin [µg/g]	3-Phenyl- propanol [µg/g]
09 Schweiz	-	<i>10,1</i>	-	-	-
09 Dtl.	2,5	18,0	-	-	-
09 Belgien	<i>2,2</i>	31,9	-	-	-
09 Peking	<i>1,4</i>	13,7	-	-	-
10 "lights" Schweiz	<i>1,1</i>	<i>10,1</i>	-	-	-
10 "lights" Dtl.	<i>2,1</i>	<i>11,5</i>	-	-	-
10 "lights" Irland	-	21,8	-	-	-
10 "lights" USA (Ws)	24,7	-	-	-	-
10 "lights" USA (C)	32,2	-	-	-	-
04 "lights"	-	-	-	-	<i>0,17</i>
05 "Menthol"	-	178,6	-	-	<i>0,19</i>
06 "Original"	-	272,9	<i>0,12</i>	-	<i>0,18</i>
07	-	-	-	-	-
08 "Vanille"	296,0	416,4	<i>0,32</i>	6,1	<i>0,29</i>
11 "mild"	-	-	-	-	-
24 "extra"	-	22,0	3,4	-	-
25 "mild"	-	18,1	2,6	-	-
27 "one"	4,4	-	-	-	-
29	-	-	<i>0,15</i>	-	-
30 "Vanille"	656,0	793,5	<i>0,34</i>	-	0,58
31 "ultra lights"	-	15,8	-	-	-
32 "super lights"	-	17,8	-	-	-

Tabelle 30. Übersicht über die Konzentrationen von Zusatzstoffen in Zigaretten
(**fett:** erhöhte Konzentrationen, *kursiv:* sehr niedrige Konzentrationen)

	Benzyl- benzoat	o-Phenyl- phenol	n-Propyl- p-hydroxy- benzoat	Propylen- glycol
	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[mg/g]
09 Schweiz	0,44	1,7	-	6,8
09 Dtl.	0,67	0,54	-	6,1
9 Belgien	0,82	-	-	10,5
09 Non Filter USA (Ws)	<i>0,19</i>	-	-	4,3
09 USA (C)	1,4	-	-	13,8
09 Peking	-	<i>0,094</i>	-	<i>1,1</i>
10 "lights" Schweiz	0,46	1,2	-	6,9
10 "lights" Dtl.	0,52	1,3	-	4,5
10 "lights" Irland	0,74	-	-	12,5
10 "lights" USA (Ws)	1,14	-	-	10,5
10 "lights" USA (C)	1,16	-	28,6	10,4
18 Schweiz	-	<i>0,096</i>	88,6	6,3
18 Dtl.	-	-	146,7	7,1
18 Belgien	-	<i>0,13</i>	121,7	8,0
18 Irland	-	<i>0,12</i>	107,6	5,0
18 Polen	-	-	140,0	14,0
18 Tschechien	-	-	-	15,0
18 USA (Ws)	-	-	-	13,3
18 USA (C)	-	-	-	14,4
19 "lights" Schweiz	-	<i>0,088</i>	<i>60,1</i>	3,7
19 "lights" Dtl.	-	-	81,1	5,1
19 "lights" Belgien	-	-	149,4	6,9
19 "lights" Irland	-	-	105,8	3,9
19 "lights" Polen	-	-	134,9	14,2
19 "lights" Tschechien	-	-	<i>31,1</i>	14,2
19 "lights" USA (Ws)	-	-	-	10,8
19 "lights" USA (C)	-	-	-	10,2
S01 "blau"	-	0,31	-	-
S02 "grün"	-	<i>0,11</i>	-	-
S03 "gelb"	-	<i>0,12</i>	-	-
S04 "lights"	-	-	-	9,9
S05 "Menthol"	-	-	-	4,3
S06 "Original"	-	<i>0,11</i>	-	4,3
S07	-	-	-	<i>1,1</i>
S08 "Vanille"	2,4	-	-	13,6
S11 "mild"	-	-	<i>48,8</i>	5,4
S12	-	-	-	<i>1,3</i>
S13 "lights"	-	-	-	8,5
S14 "ultra lights"	-	-	-	6,8
S15 "lights"	-	-	-	6,6
S16	-	-	-	6,1
S17 "lights"	-	-	-	4,2
S20 "ultra lights"	-	-	<i>61,9</i>	5,0
S21 "lights"	-	-	78,2	4,6

Fortsetzung Tabelle 30.

	Benzyl- benzoat	o-Phenyl- phenol	n-Propyl- p-hydroxy- benzoat	Propylen- glycol
	[µg/g]	[µg/g]	[µg/g]	[mg/g]
S22	-	-	-	3,5
S23 "lights"	-	-	-	6,0
S24 "extra"	-	0,077	-	4,6
S25 "mild"	-	-	-	8,6
S26 "extra lights"	-	-	76,3	3,3
S27 "one"	-	-	98,7	5,2
S28 "super lights"	-	-	105,8	4,1
S29	-	-	-	5,1
S30 "Vanille"	21,9	0,21	-	7,0
S31 "ultra lights"	-	-	-	18,9
S32 "super lights"	-	-	-	8,1

Zum besseren Vergleich wurden auch hier die Angaben der Zigarettenindustrie über die Maximalgehalte an Zusatzstoffen in Zigaretten den tatsächlich gemessenen Konzentrationen in Schweizer Zigaretten gegenübergestellt (siehe Tabelle 31).

In Tabelle 31 sind die Maximalwerte grau unterlegt, die von einigen Schweizer Zigarettenarten überschritten werden. Wie zu erkennen ist, sind dies hauptsächlich Werte für Vanillin und Ethylvanillin in den Vanille Zigaretten. Lediglich die Grenzen, die von BAT UK aus dem Jahr 2004 und von der Gallaher Tobacco Group 2005 angegeben werden, wurden von den Zigaretten nicht überschritten.

Bezieht man in diesen Vergleich nur die Angaben von Schweizer Herstellern (Hersteller 4a, 4b, 8) ein, so wird festgestellt, dass die Konzentrationen in S05 „Menthol“, S06, S08 „Vanille“ und S30 „Vanille“ oberhalb dieser Werte liegen. Da die Marken S04-S06 von BAT hergestellt werden, ist also ein direkter Vergleich mit dem Hersteller 8 in Tabelle 21 erlaubt. Dieser gibt als nicht überschrittene Menge 173 µg/g für Vanillin an. In S05 „Menthol“ und S06 wurden 178,6 µg/g bzw. 272,9 µg/g Vanillin gemessen, welche beide über dem Maximalwert liegen. Das gleiche trifft für beide Vanille Zigaretten S08 und S30 zu. Allerdings liegen den Autoren keine Angaben von den Herstellern der Vanille Zigaretten vor.

Die Ethylvanillinkonzentrationen der Nicht-Vanille Zigaretten liegen unterhalb der von Schweizer Herstellern angegebenen Werte (10 µg/g bzw. 43,8 µg/g für Ethylvanillin), jedoch übersteigen die Vanille Zigaretten (296 µg/g und 656 µg/g) den von den meisten Herstellern deklarierten Wert deutlich.

Ein weiterer Vergleich bezieht sich auf Benzylbenzoat in S30 „Vanille“-Zigaretten. Hier gibt z.B. BAT Schweiz einen maximalen Gehalt von 4,8 µg/g an, der von den o.g. Zigarettenmarke deutlich überschritten wird (21,9 µg/g).

Um eine abschließende Beurteilung vornehmen zu können, ist es nötig die Angaben der herstellenden Betriebe aus dem Herstellungsjahr der hier untersuchten Zigaretten zu kennen.

Tabelle 31. Gemessene Konzentrationen in Schweizer Zigaretten und angegebene Maximalkonzentrationen von Zusatzstoffen in Zigaretten[2-11]; grau unterlegt: überschrittene Werte

Substanz	Konzentrationen, µg/g		Nicht überschrittene Menge in µg/g
	Bereich	MW	Angabe der Hersteller 1-8*
Vanillin (in 10 Nicht-Vanille Zig.)	10.1-273	68.2	864 ^{1a} / 28.1 and 158.6 ^{1b} / 88 ² / 100 ^{3a} / 50 ^{3b} / 100 ^{4a} / 50 ^{4b} / 178 ⁵ / 4400 ⁶ / 50 ⁷ / 173 ⁸
Vanillin (in 2 Vanille Zig.)	416, 793	604	
Ethylvanillin (in 2 Nicht-Vanille Zig.)	1.1-4.4	2.75	250 ^{1a} / 1.2 and 1.5 ^{1b} / 1 ² / 5 ^{3a,3b} / 10 ^{4a,4b} / 44 ⁵ / 2400 ⁶ / 43.8 ⁸
Ethylvanillin (in 2 Vanille Zig.)	296, 656	476	
Methylcinnamat (in 6 Zig.)	0.12-3.4	1.16	20 ^{1a} / 10 ⁶ / 5,3 ⁸
Benzylbenzoat (in 4 Zig.)	0.44-22	6.3	500 ^{1a} / 2.0 ^{1b} / 3 ² / 1 ^{3a,3b} / 100 ⁶ / 4.8 ⁸
n-Propyl-p-hydroxybenzoat (in 8 Zig.)	48.8-105.8	77.3	100 ^{3a,3b} / 500-2000 ^{4a,4b} / 960 ⁵ / 1000 ⁷
o-Phenylphenol (in 10 Zig.)	0.08-1.71	0.40	Keine Angaben
6-Methylcumarin (in 1 Zig.)	6.12	6.12	Keine Angaben
Propylenglycol x 10 ⁻³ (in 29 Zig.)	1.1-19	7.2	47.2 ^{1a} / 22.74 and 34.18 ^{1b} / 18.9 ² / 20 ^{3a} / 24 ^{3b} / 25 ^{4a} / 23 ^{4b} / 40 ⁵ / 45 ⁶ / 37 ⁷ / 27.9 ⁸
3-Phenyl-1-propanol (in 5 Zig.)	0.17-0.58	0.28	1 ^{1a} / 2 ^{1b} / 2.2 ⁸

* Hersteller: 1a = British American Tobacco UK (2004); 1b = British American Tobacco UK 2006; 2 = British American Tobacco Australien (2000-2001); 3a = Philip Morris Australien 2000-2001; 3b = Philip Morris Australien 2003-2004; 4a = Philip Morris Schweiz 2003; 4b = Philip Morris Schweiz 2005; 5 = Philip Morris worldwide; 6 = Gallaher Tobacco Group worldwide, 2005; 7 = Philip Morris Deutschland, 2004. 8 = British American Tobacco Schweiz 2006

4.2.5 Quantifizierung nicht natürlicher Tabakinhaltsstoffe in Tabakproben

Die Tabellen 32 und 33 zeigen die in den Tabakproben gemessenen Konzentrationen der nicht natürlichen Inhaltsstoffe.

Es ist zu erkennen, dass einige der Zusatzstoffe (Propylenglycol, Vanillin und n-Propyl-p-hydroxybenzoat) schon in den Tabakmischungen in deutlichen Mengen vorkommen. Die meisten der hier quantifizierten Stoffe sind allerdings nur in den Zigaretten enthalten.

Wie bereits bei der qualitativen Analyse auffiel, enthalten die Tabakmischungen mit Zusatz von Philip Morris sowie alle rekonstituierten Tabake (BAT 4, PM 11, PM 12) Propylenglycol. In den expandierten Tabakmischungen (PM 13, PM 14), die auch Zusätze enthalten sollen, war jedoch kein Propylenglycol nachweisbar.

Tabelle 32. Übersicht über die Konzentrationen von Zusatzstoffen in Tabakproben
(*kursiv*: sehr niedrige Konzentrationen)

	Ethyl- vanillin [µg/g]	Vanillin [µg/g]	Methyl- cinnamat [µg/g]	6-Methyl- cumarin [µg/g]	3-Phenyl- propanol [µg/g]
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 8)	-	11,3	-	-	-
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 13)	-	18,4	-	-	-
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 14)	-	21,9	-	-	-

Tabelle 33. Übersicht über die Konzentrationen von Zusatzstoffen in Tabakproben
(*kursiv*: sehr niedrige Konzentrationen)

	Benzyl- benzoat [µg/g]	o-Phenyl- phenol [µg/g]	n-Propyl- p-hydroxy- benzoat [µg/g]	Propylen- glycol [mg/g]
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 6)	-	-	-	17,4
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 7)	-	-	-	17,4
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 8)	-	-	-	16,2
Rekonstituierter Tabak (BAT 4)	-	-	-	11,1
Rekonstituierter Tabak Frankreich (PM 11)	-	-	-	12,5
Rekonstituierter Tabak Brasilien (PM 12)	-	-	127,1	13,3

Vanillin konnten in relativ geringe Mengen in den beiden expandierten Tabakmischungen sowie in einer Tabakmischung mit Zusätzen (PM 11, PM 12, PM 8) detektiert werden. Bestätigt werden konnte auch die Anwesenheit von n-Propyl-p-hydroxybenzoat in dem brasilianischen rekonstituierten Tabak. Im qualitativen Screening traten teilweise Überlagerungen mit einem natürlichen Tabakinhaltsstoff (Megastigmatrienon) auf. Erst in der SIM-Methode wurde anhand der Übereinstimmung der drei Hauptmassen und der Retentionszeit eindeutig n-Propyl-p-hydroxybenzoat identifiziert. Es zeigte sich, dass das Signal bei 10,00 min nur in der Probe PM 12 vorhanden war und auch in keiner der anderen Tabakproben auftrat. In Abbildung 14 sind die Chromatogramme der rekonstituierten Tabake (PM 11 und 12) dem Chromatogramm einer expandierten Tabakmischung (PM 13) gegenübergestellt. Es handelt sich dabei um Chromatogramme aus einer Messung im SIM-Modus, in der die drei Hauptmassenbruchstücke von n-Propyl-p-hydroxybenzoat $m/z = 180$, $m/z = 138$, $m/z = 121$ detektiert wurden. Um eindeutig auszuschließen, dass das Signal bei 10,00 min von der Tabakmatrix kommt, wurde der Probe PM 11 n-Propyl-p-hydroxybenzoat zugesetzt und die Retentionszeit verglichen. Ein Signal im Chromatogramm bei 10,00 min ist nur in der positiven Proben (PM 12) und in der Probe mit Zusatz (PM 11) erkennbar, in der negativen Probe PM 13 fehlt hingegen an dieser Stelle ein Peak.

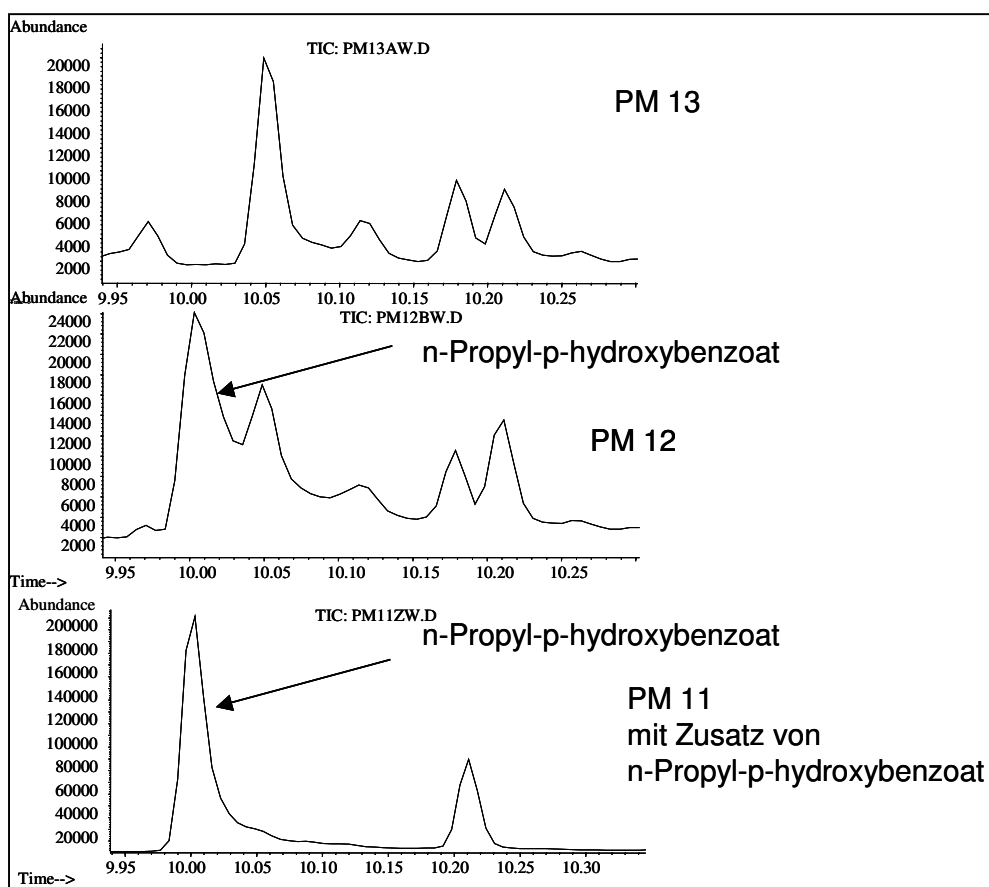


Abbildung 14: Chromatogramme der Proben PM 11-13
(aufgenommen im SIM-Modus, $m/z = 180, 138, 121$) nach neutraler
Aufarbeitung; Zusatz von n-Propyl-p-hydroxybenzoat zu Probe PM 11

4.3 Quantitative Bestimmung von Alkaloiden

Um auch die Alkaloidgehalte, die im vorangegangenen Projekt in Zigaretten bestimmt wurden besser beurteilen zu können, wurden Nikotin und seine Nebenalkaloide auch in den Rohtabakproben quantifiziert. Angewendet wurde die Analysenmethode, die im Abschnitt 3.4.2 beschrieben ist.

4.3.1 Validierung der Methode

Die Analysenmethode zur Bestimmung von Alkaloidgehalten in Zigaretten wurde validiert nach den Regeln der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) mit dem Programm "Excel Valistat 1.0".

Jede Konzentration der Kalibrierung wurde fünfmal an einem Tag gemessen (Vorgehensweise siehe Abschnitt 3.4.2.4). Daraus wurden die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen und die Gesamtstandardabweichung abgeleitet. Zur Bestimmung der Wiederholpräzision und der Laborpräzision wurde jeweils eine Tabakprobe an fünf aufeinander folgenden Tagen in Doppelbestimmung gemessen.

Die errechneten Werte für die Nachweisgrenze (LOD), Erfassungsgrenze (LOI) und Bestimmungsgrenze (LOQ) sowie für die Standardabweichungen (δ) und Präzisionen sind Tabelle 34 zu entnehmen. Auch hier wurden in der praktischen Anwendung sehr kleine Konzentrationen auch dann angegeben, wenn sie unterhalb der nach Valistat ermittelten Erfassungsgrenze lagen, da sie im Chromatogramm eindeutig identifizierbar waren.

Tabelle 34. Angaben zur Validierung der Methode zur Bestimmung von Alkaloiden

Substanz	LOD [µg/g]	LOI [µg/g]	LOQ [µg/g]	δ [%]	Wiederhol- präzision [%]	Labor- präzision [%]
Nikotin	4,8	9,6	13,3	9,9	3,9	10,4
Nornicotin	0,12	0,24	0,34	12,3	9,2	12,6
Myosmin	0,004	0,008	0,012	12,4	8,3	12,8
Nicotyrin	0,0029	0,0059	0,0093	11,2	5,0	11,7
Anabasin	0,044	0,094	0,13	9,6	6,6	9,9
Anatabin	0,25	0,50	0,73	13,7	4,8	14,4
2,3-Bipyridin	0,031	0,062	0,096	11,2	4,5	11,7

4.3.2 Quantitative Alkaloidbestimmung in Zigaretten

An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der Alkaloidbestimmung in Zigaretten, die im 1. Abschlussbericht detailliert aufgeführt sind ([1], S. 73-84) nicht wiederholt werden. Als Zusammenfassung dient Tabelle 35. Zum Vergleich sind hier nur die Konzentrationsbereiche und Mittelwerte der in Schweizer Zigaretten und der Referenzzigarette 2R4F bestimmten Konzentrationen der Alkaloide aufgeführt.

Tabelle 35. Konzentrationen der im Vorprojekt bestimmten Tabakalkaloide in Schweizer Zigaretten [1], verglichen mit Literaturangaben [61-63]

	Nikotin [mg/g]	Nornikotin [mg/g]	Myosmin [mg/g]	Nicotyrin [mg/g]	Anabasin [mg/g]	Anatabin [mg/g]	2,3- Bipyridin [mg/g]	Gesamt- alkaloide [mg/g]
Literatur- angaben [mg/g]	13-21	0,4-1,5	0,03-0,09	0,09-0,24	0,06-0,12	0,3-0,9	0,06	17-23
32 Schweizer Zig.	13,1-27,7	0,5-1,9	0,003-0,04	0,08-0,4	0,1-0,3	0,7-1,4	0,08-0,3	15,1-30,6
MW 32 Schweizer Zig.	18,9	1,1	0,01	0,16	0,20	1,1	0,14	21,5
Ref.zig. 2R4F	20,6	1,2	0,01	0,12	0,16	0,9	0,13	23,1

Wie Tabelle 35 zu entnehmen ist, liegen die Alkaloidkonzentrationen der Zigaretten sowohl im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte als auch im Konzentrationsbereich der Referenzzigarette 2R4F. Demzufolge besteht kein Grund zu der Annahme, dass Alkaloide den Zigaretten hinzugefügt werden.

Ein besonders hoher Nikotingehalt wurde in der S12 (27,7 mg/g) festgestellt, die auch den höchsten Gesamtalkaloidgehalt aufweist (30,6 mg/g). Sehr niedrige Nikotinkonzentrationen sind in den Sorten S10 „lights“ (14,1 mg/g), S21 „lights“ (13,1 mg/g) und S26 „extra lights“ (14,9 mg/g) gemessen worden. Interessant ist die Feststellung, dass der Nikotingehalt in „lights“ Zigaretten geringfügig kleiner ist als in „normalen“ Zigaretten. So beträgt die mittlere Nikotinkonzentration in „lights“ Zigaretten (n=14) 18,5 mg/g und in „normalen“ Zigaretten 19,2 mg/g.

4.3.3 Quantitative Alkaloidbestimmung in Tabakproben

Die Untersuchung der Tabakproben auf deren Alkaloidgehalt sollte zusätzliche Vergleichswerte für die Gehalte in Zigaretten liefern. Die einzelnen Konzentrationen, die in den Tabakproben gemessen wurden, sind in Tabelle 36 dargestellt. Die kursiv gedruckten Werte stellen dabei sehr kleine Konzentrationen dar, vergleichsweise hohe Konzentrationen sind fett gedruckt.

Die höchste mittlere Nikotinkonzentration besitzen die Burley Tabake (MW= 21,6 mg/g), gefolgt von den Maryland Tabaken (MW= 20,6 mg/g) und den Expandierten Tabaken (MW= 18,5 mg/g). Wie schon bei den Gehalten der anderen natürlichen Tabakinhaltsstoffe festgestellt werden konnte, unterscheiden sich jedoch die einzelnen Werte innerhalb einer Sorte sehr stark. So ist der Nikotingehalt des Burley Tabaks aus der Schweiz (40,8 mg/g) etwa 6 mal höher als in dem Burley aus Malawi (7,2 mg/g). Alle anderen Alkaloide sind in der Sorte aus der Schweiz ebenfalls höher konzentriert, mit Ausnahme von Nicotyrin. Dessen Gehalt ist im Burley Malawi (0,42 mg/g) deutlich höher als im Burley aus der Schweiz (0,052 mg/g).

Die expandierten Tabake zeigen alle sehr ähnliche Nikotin- und Gesamtalkaloidkonzentrationen (15,4-21,2 mg/g bzw. 17,1-22,7 mg/g). Lediglich die Anabasinwerte schwanken etwas stärker (0,07-0,19). Möglicherweise ist diese Homogenität durch die gleiche Behandlung dieser Tabaksorten oder Aufstocken mit Tabakextrakt zu erklären.

Orient Tabake und rekonstituierte Tabake fallen durch relativ niedrige Nikotingehalte auf. Die größten Abweichungen im Nikotingehalt sind in der Sorte Virginia zu erkennen, bei dem der deutsche Tabak eine extrem niedrige Nikotinkonzentration aufweist. Die Gehalte an den Nebenalkaloiden sind in dieser Sorte allerdings vergleichbar mit den Virginia Tabaken anderer Herkunft. Weiterhin auffällig ist hier der französische Virginia, dessen

Konzentrationen an Nikotin, Nornicotin, Myosmin, Anabasin und Anatabin weit über den mittleren Konzentrationen aller anderen Tabake liegen.

In keiner der untersuchten Tabakproben kann aufgrund typischer Alkaloidkonzentrationen auf die Sorte geschlossen werden, da die Konzentrationen stark schwanken. Offenbar unterscheiden sich die Alkaloidgehalte der Tabaksorten je nach Boden-, Licht- und Klimaverhältnissen sowie nach deren Behandlung im weiteren Verarbeitungsprozess.

4.3.4 Vergleich der Alkaloidgehalte in Tabaken und Zigaretten

Insgesamt sind die mittleren Konzentrationen aller Alkaloide in den Schweizer Zigaretten höher als in den untersuchten Rohtabaken (Vergleich Tabellen 35 und 36). Lediglich die mittleren Myosmingehalte sind in Tabaken und Zigaretten gleich.

Die Konzentrationsbereiche in Tabaken sind wesentlich größer (Gesamtalkaloidgehalte: 2,2-44,6 mg/g) als in den Schweizer Zigaretten (Gesamtalkaloidgehalte: 15,1-30,6 mg/g). Dies ist jedoch zu erwarten, da in Zigaretten viele verschiedene Tabake mit sehr unterschiedlichen Alkaloidgehalten verwendet werden und sich diese im fertigen Produkt ausgleichen. Durch die Verwendung alkaloidreicher Tabaksorten kann der Gehalt an Nikotin und seinen Nebenalkaloiden in den Zigaretten gezielt beeinflusst werden. Ein Zusatz von Alkaloiden zu Zigaretten ist jedoch nicht wahrscheinlich. Durch die Verwendung von Tabakextrakten (bis 0,1 % Zusatz laut Gallaher Tobacco Group [9]) als Zusatzstoff ist ebenfalls eine Veränderung des Alkaloidgehaltes in den Zigaretten möglich.

Die meisten Tabakproben von British American Tobacco, die in diesem Projekt untersucht wurden, werden für die Herstellung der Zigarettenmarke S25 „mild“ verwendet. Dies sind die Tabakproben BAT 1-8 und BAT 11. Vergleicht man deren mittleren Nikotin- und Gesamtalkaloidgehalte (MW Nikotin= 17,4 mg/g bzw. MW Gesamtalk.= 18,9 mg/g) mit denen von S25 „mild“ (MW Nikotin= 19,2 mg/g bzw. MW Gesamtalk.= 21,7 mg/g) so liegen diese relativ dicht beieinander. Dennoch kann man nicht von den Tabaksorten auf die daraus hergestellte Zigarette schließen, da sehr viele der untersuchten Zigarettenmarken eine ähnliche Alkaloidkonzentration aufweisen.

Tabelle 36. Konzentrationen der Tabakalkaloide in Tabakproben;
kursiv: sehr kleine Konzentrationen, **fett:** erhöhte Konzentrationen

Tabaksorte	Nicotin mg/g	Nornicotin mg/g	Myosmin mg/g	Nicotyrin mg/g	Anabasin mg/g	Anatabin mg/g	2,3-Bipyridin mg/g	Gesamtalkaloide mg/g
Burley Malawi	7,2	0,45	0,020	0,420	0,100	0,4	0,13	8,7
BAT 7 Burley FR	40,8	1,79	0,038	0,052	0,185	1,51	0,21	44,6
BAT 8 Burley Schweiz	14,4	0,49	0,014	0,028	0,047	0,39	0,06	15,5
PM 2 Burley USA	23,9	0,58	0,024	0,063	0,150	1,25	0,31	26,2
Deutersh.Korso	10,0	1,17	0,007	0,080	0,050	0,61	0,03	11,9
BAT 12 Expand. Tabak	15,4	0,54	0,014	0,031	0,131	0,81	0,14	17,1
BAT 9 Expand.Burley-Mischg.	17,4	0,52	0,016	0,029	0,073	0,39	0,14	18,6
PM 13 Expand.Tabak	19,1	0,64	0,015	0,031	0,120	0,65	0,10	20,6
PM 14 Expand.Tabak	18,5	0,68	0,018	0,045	0,185	0,99	0,15	20,5
BAT 11 Expand.Tabak England	21,2	0,60	0,014	0,035	0,107	0,67	0,14	22,7
BAT 10 Expand.Virginia-Mischg.	19,6	0,29	0,006	0,018	0,093	0,54	0,08	20,7
BAT 13 Maryland Brasil	20,4	0,81	0,023	0,053	0,106	0,55	0,16	22,1
BAT 14 Maryland USA	20,8	0,46	0,018	0,065	0,120	0,58	0,12	22,2
PM 6 Mischg. m.Zus.	14,7	0,58	0,015	0,021	0,085	0,44	0,12	16,0
PM 7 Mischg. m.Zus.	16,0	0,55	0,017	0,026	0,096	0,51	0,15	17,4
PM 8 Mischg. m.Zus.	15,2	0,36	0,012	0,019	0,076	0,40	0,12	16,2
Orient Griechenland	15,6	1,04	0,013	0,140	0,080	0,40	0,04	17,3
PM 5 Orient Griechenland	16,7	0,52	0,016	0,023	0,060	0,30	0,05	17,7
BAT 1 Orient Griechenland	7,4	0,19	0,003	0,009	0,037	0,17	0,01	7,8
PM 1 Orient Türkei	7,1	0,21	0,006	0,013	0,034	0,18	0,02	7,6
BAT 5 Orient Türkei	6,0	0,28	0,006	0,011	0,034	0,16	0,00	6,5
PM 12 Rekon.Tabak Brasilien	9,3	0,24	0,008	0,012	0,060	0,27	0,08	10,0
PM 11 Rekon.Tabak Frankreich	5,2	0,17	0,010	0,022	0,040	0,18	0,08	5,7
BAT 4 Rekon.Tabak m.Zus.	8,0	0,37	0,008	0,014	0,056	0,31	0,05	8,8
Virginia Deutschland	1,5	0,41	0,001	0,050	0,040	0,17	0,02	2,2
Virginia Zimbabwe	18,8	0,57	0,003	0,090	0,190	0,99	0,08	20,7
BAT 3 Virginia Frankreich	25,5	1,83	0,021	0,048	0,204	1,05	0,18	28,8
BAT 6 Virginia Indien	13,7	0,23	0,004	0,015	0,090	0,44	0,06	14,5
PM 3 Virginia USA	13,2	0,34	0,007	0,014	0,045	0,26	0,04	13,9
PM 4 Virginia USA	20,1	0,24	0,006	0,024	0,072	0,50	0,09	21,0
BAT 2 Virginia USA	19,5	0,48	0,007	0,024	0,187	0,96	0,16	21,3
MW	15,6	0,57	0,013	0,049	0,095	0,55	0,10	16,9

4.4 Photometrische Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff

Wie bereits im 1. Zwischenbericht [64] erwähnt, sollten die Ergebnisse der elektrochemischen Methode zur Ammoniak- und Harnstoffbestimmung mit einer zweiten Methode verglichen werden.

Die im Abschnitt 3.4.3 beschriebene Methode wurde auf 32 Schweizer Zigarettenarten, die Referenzzigarette 2R4F, die zusatzstofffreie Zigarette Yesmoke sowie auf alle Tabake angewendet.

4.4.1 Angaben zur Validierung der Methode

Da die photometrische Variante der enzymatischen Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff unter Verwendung eines industriell hergestellten Testkits erfolgte, der Angaben zu Präzision und Nachweisgrenzen enthielt, wurde diese Methode nicht noch einmal validiert.

Die Angaben aus dem Testkit sind in Tabelle 37 zusammengefasst und wurden entsprechend unserer Bedingungen umgerechnet.

Um sicher zu gehen, dass diese Methode zum Nachweis von Ammoniak und Harnstoff in Zigaretten geeignet ist, wurde lediglich die Wiederfindung bestimmt. Diese erfolgte aus wässriger Standardlösung und aus gespikten Tabakproben. Nach Zusatz von je 1 mg/g bzw. 3 mg/g Harnstoff und Ammoniak (als Diammoniumhydrogenphosphat) zu 50 mg zwei verschiedener Rohtabaksorten wurden diese über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag extrahiert und gemessen. Dabei wurde für Harnstoff eine Wiederfindungsrate von 86-113 % und für Ammoniak zwischen 88 und 98,5 % ermittelt.

Tabelle 37. Angaben (laut Testkit) zur Validierung für die photometrische Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff

	Ammoniak	Harnstoff
Präzision	0,08-0,2 mg/g	0,14-0,4 mg/g
Linearität	0,1-4,0 mg/g	0,15-6,5 mg/g
Empfindlichkeit	0,004 mg/g	0,0075 mg/g
Nachweisgrenze	0,02 mg/g	0,04 mg/g

4.4.2 Ammoniak- und Harnstoffkonzentrationen in Zigaretten

In Tabelle 38 sind die ermittelten Ammoniak- und Harnstoffkonzentrationen der UV-Methode sowie die Ammoniakkonzentrationen der elektrochemischen Methode (Ammoniakselektive Elektrode) angegeben. Da die elektrochemische Ammoniak-Bestimmung nach etwa einem Jahr wiederholt wurde, sind zusätzlich die Ergebnisse der Messung vom Januar 2004 (01 / 04) dargestellt.

Die mittels Photometrie bestimmten Ammoniakkonzentrationen in den 32 Schweizer Zigarettenarten liegen zwischen 0,14 und 1,62 mg/g, die mittlere Konzentration beträgt 0,86 mg/g. Bei den hier untersuchten Zigaretten treten also Konzentrationsschwankungen um bis zu einer Zehnerpotenz auf. Die höchste Konzentration an Ammoniak konnte in der Marke S29 (1,62 mg/g) ermittelt werden, gefolgt von den drei Varianten S04-S06 (1,28-1,46 mg/g). Sehr niedrige Konzentrationen sind dagegen in den drei Varianten S01-S03 (0,14-0,2 mg/g)

zu verzeichnen. Es fällt auf, dass Variationen der einzelnen untersuchten Marken oft sehr ähnliche Ammoniakkonzentrationen aufweisen: alle Schweizer Varianten S18, S19 „lights“, S09 und S10 „lights“ haben einen Ammoniakgehalt um 0,8 mg/g, in den Zigarettensorten S26-S28 beträgt er 0,97-1,23 mg/g, in den beiden Varianten S24 „lights“ und S25 „mild“ beträgt er um 1,2 mg/g und auch innerhalb der Sorten S01-S03 bzw. S04-S06 sind die Konzentrationen sehr ähnlich. Der Gehalt an Ammoniak scheint in Zigaretten also sortentypisch zu sein.

Tabelle 38. Konzentrationen von Ammoniak und Harnstoff in Zigaretten,
Vergleich der photometrisch bestimmten Ergebnisse mit den Ergebnissen
der elektrochemischen Bestimmung

Zigarettensorte / Tabaksorte	photometrische Bestimmung (10/05)		elektrochemische Bestimmung	
	c Harnstoff [mg/g]	c NH ₃ [mg/g]	11/04 c NH ₃ [mg/g]	01/04 c NH ₃ [mg/g]
1	n.v.	0,17	0,08	0,2
2	n.v.	0,14	0,1	0,34
3	n.v.	0,2	0,12	0,15
4	n.v.	1,44	1,39	1,42
5	0,099	1,28	1,37	1,45
6	0,04	1,46	1,51	1,57
7	n.v.	0,35	0,36	0,65
8	n.v.	0,27	0,25	0,32
9	0,043	0,83	0,87	0,77
10	n.v.	0,85	0,89	1,42
11	n.v.	0,88	0,81	1,29
12	n.v.	0,25	0,23	0,21
13	n.v.	1,02	1,09	1,38
14	n.v.	0,98	1,07	1,11
15	n.v.	0,98	0,98	1,41
16	n.v.	1,05	1,13	1,14
17	n.v.	0,94	0,99	1,06
18	n.v.	0,84	0,8	0,92
19	n.v.	0,79	0,86	0,74
20	n.v.	0,81	0,79	1,18
21	n.v.	0,86	1,11	0,91
22	0,047	0,69	0,68	1,02
23	n.v.	0,91	0,99	1,07
24	0,04	1,12	1,22	1,41
25	n.v.	1,28	1,38	1,39
26	n.v.	0,97	1,05	0,8
27	0,16	1,23	1,38	1,72
28	n.v.	1,06	1,38	1,17
29	n.v.	1,62	1,72	1,73
30	0,065	0,19	0,25	0,33
31	n.v.	0,88	0,88	1,13
32	n.v.	1,14	1,16	1,05
MW	0,07	0,86	0,90	1,01

Vergleicht man die Werte, die im November 2004 mit der Ammoniakselektiven Elektrode gemessen wurden, mit den Werten der enzymatischen UV-Methode, so stimmen diese relativ gut überein. Zwischen den Messwerten vom Januar 2004 und denen vom November 2004, die beide mittels ammoniakselektiver Elektrode ermittelt wurden, ist die Abweichung jedoch wesentlich höher (durchschnittlich 21,4%).

Es wird vermutet, dass der Ammoniakgehalt mit steigendem Alter der Proben abnimmt. Dies wird auch durch den Vergleich der mittleren Konzentrationen deutlich. Während diese im Januar 2004 noch bei 1,01 mg/g lag, betrug sie im Oktober 2005 nur noch 0,86 mg/g. Lediglich bei sieben von 32 untersuchten Zigarettenmarken wurde nach etwa zwei Jahren ein höherer Ammoniakgehalt gemessen.

Die Abweichungen der Werte können also einerseits durch einen Verlust an Ammoniak und andererseits durch die unterschiedlichen Nachweismethoden zustande kommen. Insgesamt liegen die Schwankungen jedoch in Bereichen, die für die Verwendung unterschiedlicher Analysemethoden toleriert werden können und somit kann davon ausgegangen werden, dass beide Methoden für den quantitativen Nachweis von Ammoniak in Zigaretten geeignet sind.

Außerdem könnten natürlich weitere Ursachen, wie Unterschiede in der Aufarbeitung oder inhomogenes Probenmaterial für die Abweichungen zwischen den Konzentrationen in Betracht kommen.

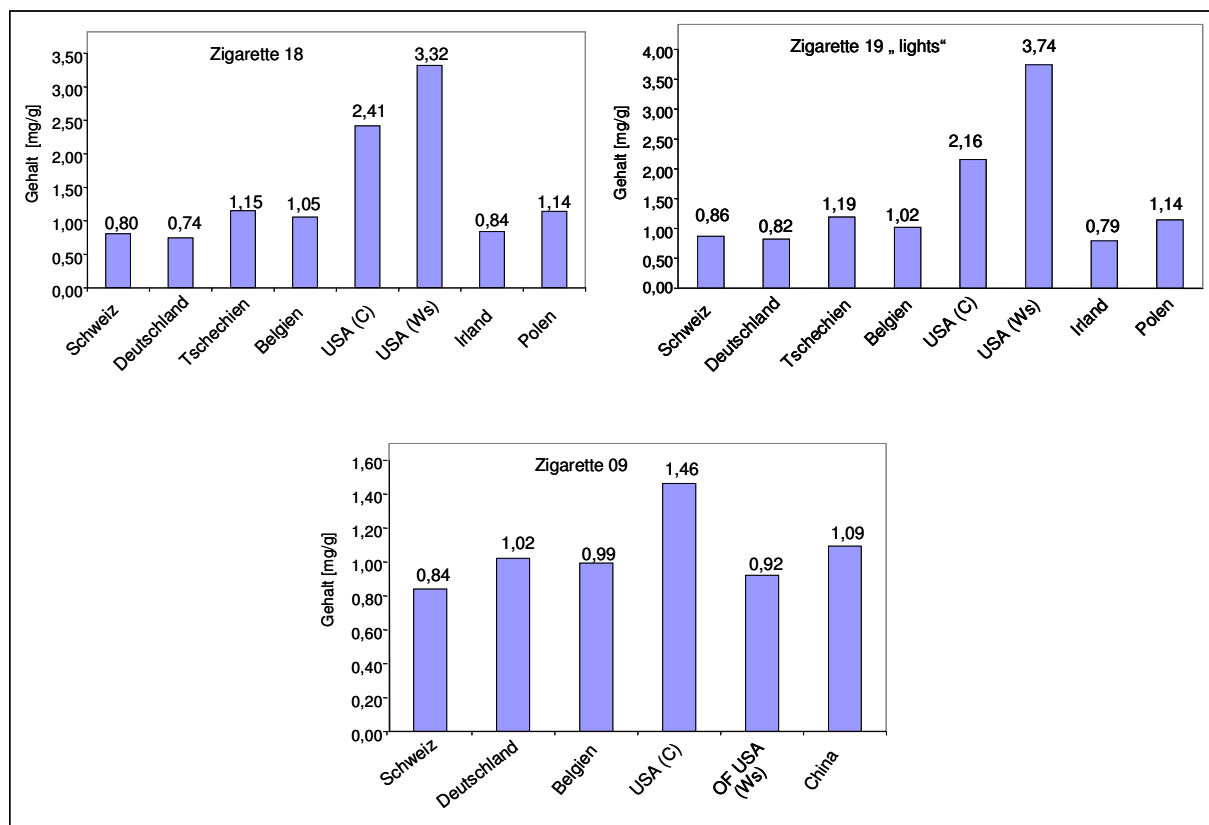


Abbildung 15: Vergleich der Ammoniakgehalte von Zigaretten gleicher Marke aus unterschiedlichen Ländern

Mit der elektrochemischen Methode wurde ein Ländervergleich der Marken 18, 19 „lights“ und 09 durchgeführt. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse dieses Vergleichs dargestellt. Auf eine Kontrolle dieser Werte mit der photometrischen Methode wurde verzichtet, da die Ergebnisse als zuverlässig gelten.

Wie aus Abbildung 15 hervorgeht, sind die höchsten Ammoniakkonzentrationen jeweils in den amerikanischen Zigaretten vorhanden. Während sich in den hier untersuchten europäischen Zigaretten der Ammoniakgehalt um 1 mg/g bewegt, liegen die Amerikanischen Werte deutlich höher (bis 3,7 mg/g). Nur bei der Sorte 09 sind die Unterschiede innerhalb der verschiedenen Länder nicht so gravierend wie bei 18 und 19 „lights“. Auch die Untersuchung weiterer Amerikanischer Zigarettenarten bestätigte die hohen Ammoniakkonzentrationen gegenüber europäischen Zigaretten. Abbildung 16 zeigt die Konzentrationen an Ammoniak in Schweizer, Deutschen und Amerikanischen Zigaretten, die im November 2004 mit der Ammoniakselektiven Elektrode bestimmt wurden.

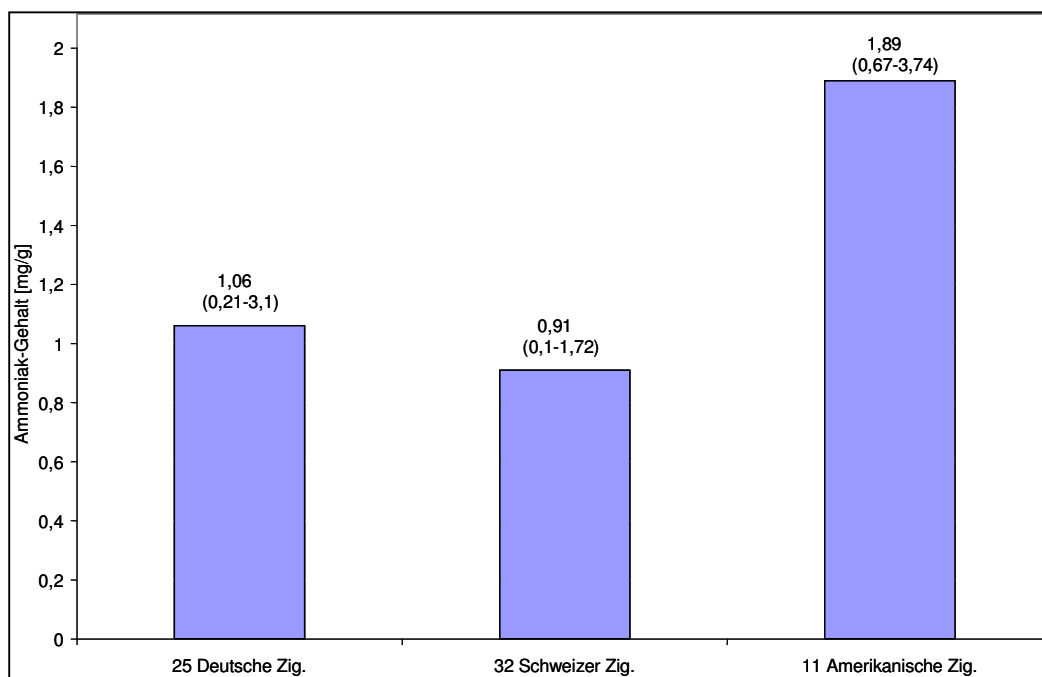


Abbildung 16: Mittlere Ammoniakkonzentrationen und Konzentrationsbereiche in Zigaretten, ermittelt mit Ammoniakselektiver Elektrode

Auch hier ist zu sehen, dass mittlere Konzentrationen und Konzentrationsbereiche von Ammoniak in den Amerikanischen Zigaretten deutlich höher liegen als in den untersuchten Schweizer und Deutschen Zigaretten.

Der besonders hohe Wert von D14 Zigaretten aus Deutschland ist mit 3,1 mg/g ähnlich den Amerikanischen Zigaretten, stellt jedoch innerhalb der 25 verschiedenen Deutschen Zigaretten eine Ausnahme dar. In Schweizer Zigaretten wurde in keiner der Zigaretten solche hohen Konzentrationen bestimmt.

Für die Menge an verwendeten Ammoniumsalzen in der Zigarettenherstellung gibt es unterschiedliche Angaben der Zigarettenindustrie (siehe Tabelle 39). Vergleicht man diese Angaben mit den von uns in Schweizer Zigaretten festgestellten Ammoniakkonzentrationen, so liegen alle unterhalb der Werte, die BAT UK und Philip Morris USA angeben. Viele übersteigen jedoch die Werte 0,025 mg/g bzw. 0,77 mg/g, die von der Gallaher Tobacco Group bzw. von BAT Australien deklariert sind. Eine Marke (S29) liegt zusätzlich oberhalb der Maximalkonzentration, die von Philip Morris Australien 2000-2001 angegeben ist. Die amerikanische 19 „lights“ übersteigt mit einem Ammoniakgehalt von 3,7 mg/g jeden Wert, der von der Zigarettenindustrie angegeben wird (Tab. 39). Von Schweizer Herstellern fehlen Angaben zum Zusatz von Ammoniumsalzen und Harnstoff zu Zigaretten.

Tabelle 39. Angegebene Maximalkonzentrationen von Ammoniumsalzen und Harnstoff in Zigaretten [2-11], [65] grau unterlegt: von Schweizer Zigaretten überschrittene Werte

Substanz	Nicht überschrittene Menge in mg/g Angabe der Hersteller 1-9*	Entspricht NH ₃ in mg/g
Diammonium- hydrogenphosphat	10 ^{1a} / 3 ² / 6 ^{3a} / 7 ^{3b} / 6,8-10,0 ⁹	2,6 ^{1a} / 0,77 ² / 1,54 ^{3a} / 1,8 ^{3b} / 1,8-2,6 ⁹
Ammoniumhydroxid	3 ^{3a,3b}	1,5
Ammoniak (25% in Wasser)	0,1 ⁶	0,025
Harnstoff	4 ^{1a} / 3-4,5 ⁹	

* Hersteller: 1a = British American Tobacco UK (2004); 2 = British American Tobacco Australien (2000-2001); 3a = Philip Morris Australien 2000-2001; 3b = Philip Morris Australien 2003-2004; 6 = Gallaher Tobacco Group worldwide; 9 = Philip Morris USA

Die mit der Ammoniakselektiven Elektrode bestimmten Harnstoffkonzentrationen wurden ebenfalls mit der photometrischen Methode überprüft.

Mit beiden Analysenmethoden wurden nur geringe Harnstoffkonzentrationen in den untersuchten Zigaretten festgestellt.

Wie bereits im 1. Zwischenbericht dieses Projektes [64] beschrieben wurde, gab es jedoch kaum Übereinstimmungen der mit den unterschiedlichen Methoden bestimmten Werte. Es ergaben sich Unterschiede von bis zu einer Zehnerpotenz innerhalb einer Zigaretten Sorte.

Nach eingehender Prüfung beider Methoden kommen wir zu dem Schluss, dass die Empfindlichkeit der elektrochemischen Methode nicht ausreichend ist. Da sich die Harnstoffkonzentration bei den hier festgestellten niedrigen Werten immer als Differenz von zwei deutlich höheren Ammoniakbestimmungen ergibt und die Potentialmessung durch den logarithmischen Zusammenhang zur Konzentration einen Fehler von 5-10 % aufweist, ist diese Methode wesentlich weniger robust als die UV-Methode. Hinzu kommt, dass in Zigaretten / Tabaken sehr kleine Harnstoffkonzentrationen gemessen wurden und in den kleinen Konzentrationsbereichen sich diese Fehler noch stärker auswirken. In höheren Konzentrationsbereichen (ab ca. 0,5 mg/g) ist auch die elektrochemische Methode ausreichend zuverlässig.

Des weiteren sind die Lösungen in dem UV-Testkit alle standardisiert, die pH-Werte genau eingestellt und es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der gemessenen Extinktionsänderung. Weitere Fehlerquellen für die Bestimmung mit einer Elektrode könnten sein:

- Ammoniak-Absorption aus der Luft, Temperaturschwankungen,
- pH-Änderungen in der Probe bzw. zu niedriger pH-Wert der Probenlösung
- veränderte Ansprechzeiten der Elektrode
- Elektroden-Drift
- Querempfindlichkeiten mit flüchtigen Aminen

Insgesamt erwiesen sich somit die Ergebnisse der enzymatischen UV-Methode als zuverlässiger und daher wird diese Methode zur Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak in Tabakproben bevorzugt.

Tabelle 38 zeigt die in den Schweizer Zigaretten bestimmten Harnstoffkonzentrationen, die mit der photometrischen Methode ermittelt wurden. In nur sieben der 32 Sorten wurde Harnstoff detektiert. Die höchste Harnstoffkonzentration wurde in den Sorten S27 (0,16 mg/g) und S05 „Menthol“ (0,099 mg/g) gemessen, die auch beide einen sehr ähnlichen und vergleichsweise hohen Ammoniakgehalt besitzen (1,23 mg/g bzw. 1,28 mg/g). Es ist jedoch kein linearer oder umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen dem Harnstoff- und dem Ammoniakgehalt in Zigaretten erkennbar. In der Sorte mit dem höchsten

Ammoniakgehalt (S29) konnte z.B. kein Harnstoff detektiert werden und die Sorte mit der kleinsten Harnstoffkonzentration (S26 „extra lights“) besaß nicht den meisten Ammoniak. Auch sortenspezifische Konzentrationen, wie beim Ammoniakgehalt, können hier nicht abgeleitet werden.

Alle in Zigaretten gemessenen Harnstoffkonzentrationen liegen weit unterhalb der deklarierten Maximalmenge, die die Tabakindustrie angibt (Vergleich Tabelle 39). Aufgrund der geringen Konzentrationen kann die Verwendung von Harnstoff als Zusatzstoff ausgeschlossen werden.

4.4.3 Ammoniak- und Harnstoffkonzentrationen in Rohtabaken

In den insgesamt 32 untersuchten Tabakproben wurden Ammoniak-Konzentrationen zwischen 0,05 mg/g (Virginia Zimbabwe) und 7,5 mg/g (Burley Frankreich) ermittelt. Es treten also wiederum Unterschiede von mehr als einer Zehnerpotenz auf.

Die als Vergleich gemessene Referenzzigarette 2R4F hat eine Ammoniak-Konzentration von 1,23 mg/g, während die als zusatzstofffrei deklarierte Yesmoke-Zigarette mit 1,68 mg/g eine relativ hohe Ammoniakkonzentration aufweist.

Betrachtet man die Tabakproben mit Zusätzen, so fällt auf, dass diese weniger Ammoniak enthalten als die unbehandelten Tabake (MW 1,34 mg/g gegenüber MW 2,16 mg/g). Die höchsten Ammoniakkonzentrationen sind einheitlich in den Burley Tabaken (MW: 4,8 mg/g) und in den Maryland Tabaken (MW: 4,25 mg/g) zu finden, während die Virginiasorten mit durchschnittlich 0,39 mg/g eindeutig die niedrigsten Konzentrationen aufweisen. Auf die Herkunft der Tabake kann man allerdings nicht schließen, da auch hier extreme Unterschiede bei gleichen Tabaksorten gleicher Herkunft bestehen. So reichen beispielsweise die Ammoniakkonzentrationen in griechischen Orient Tabaken von 0,82 mg/g – 2,7 mg/g, in türkischen Orient Tabaken nur von 0,16-0,63 mg/g.

Von den rekonstituierten Tabaken hat die Probe mit Zusätzen auch den höchsten Ammoniakgehalt. Im Vergleich mit den expandierten Tabaken (MW 3,05 mg/g) enthalten rekonstituierte Tabake jedoch (MW: 0,97 mg/g) eindeutig weniger Ammoniak. Innerhalb der expandierten Tabake ist der typisch hohe Ammoniakgehalt in der Burley- Mischung (6,44 mg/g) und der niedrige Ammoniakgehalt in der Virginia-Mischung (0,84 mg/g) erkennbar.

Wie aus Tabelle 40 zu entnehmen ist, wurde in 15 der 30 untersuchten Tabakproben Harnstoff nachgewiesen. Wie in den Zigaretten waren auch in den Tabakproben die Konzentrationen an Harnstoff sehr niedrig. Der Konzentrationsbereich reicht von 0,04 mg/g – 0,23 mg/g. Die höchste mittlere Konzentration wurden in den expandierten Tabaken gemessen (MW: 0,16 mg/g), während der höchste Einzelwert von Maryland Brasilien stammt (0,23 mg/g). In den untersuchten vorbehandelten Tabakproben konnte Harnstoff in einer mittleren Konzentration von 0,10 mg/g nachgewiesen werden, was der von unbehandelten Tabaken fast entspricht (MW: 0,12 mg/g). Sortenspezifische Konzentrationen sind nicht eindeutig erkennbar, da in vielen Tabaken kein Harnstoff nachweisbar war und in den positiven Proben die Konzentrationsunterschiede so groß waren, dass ein Mittelwert die wahren Konzentrationen nicht widerspiegeln würde. Einzig für die drei Harnstoff positiven der insgesamt sieben untersuchten Virginia Tabake liegen die Konzentrationen sehr dicht beieinander (0,04-0,05 mg/g). In der Referenzzigarette 2R4F wurde kein Harnstoff detektiert, in der zusatzstofffreien Yesmoke Zigarette dagegen 0,11 mg/g.

Tabelle 40. Konzentrationen von Ammoniak und Harnstoff in Tabaken
n.v.: nicht vorhanden

Proben-Nr.	Tabaksorte	photometrische Bestimmung (12/05)	
		c Harnstoff [mg/g]	c NH ₃ [mg/g]
BAT-7	Burley Frankreich	0,13	7,50
	Burley Malawi	0,085	2,37
BAT-8	Burley Schweiz	n.v.	6,86
PM-2	Burley USA	0,049	2,62
BAT-13	Maryland Brasilien	0,23	4,20
BAT-14	Maryland USA	n.v.	4,31
BAT-1	Orient Griechenland	n.v.	0,82
PM-5	Orient Griechenland	0,15	2,70
	Orient Griechenland	n.v.	1,28
BAT-5	Orient Türkei	n.v.	0,63
PM-1	Orient Türkei	n.v.	0,16
	Virginia Dtl.	n.v.	0,25
BAT-3	Virginia Frankreich	n.v.	0,70
BAT-6	Virginia Indien	0,05	0,51
PM-3	Virginia USA	0,04	0,30
PM-4	Virginia USA	0,039	0,57
BAT-2	Virginia USA	n.v.	0,36
	Virginia Zimbabwe	n.v.	0,05
	Deutsheimer Korso Freiland	n.v.	2,65
	Rohtabakmischung 2	n.v.	0,71
BAT-9	Expand.Burley-Mischung	0,047	6,44
BAT-10	Expand.Virginia-Mischung	0,21	0,84
BAT-11	Expand.Tabak England	0,18	3,19
BAT-12	Expand.Tabak	0,2	1,73
PM-7	Tabakmischung m. Zusätzen	n.v.	2,10
PM-8	Tabakmischung m. Zusätzen	n.v.	2,28
PM-6	Tabakmischung m.Zusätzen	0,16	1,84
PM-13	Expand.Tabak m.Zusätzen	n.v.	1,23
PM-14	Expand.Tabak m.Zusätzen	n.v.	0,37
PM-12	Rekon.Tabak Brasilien	0,04	0,35
PM-11	Rekon.Tabak Frankreich	0,1	0,98
BAT-4	Rekon.Tabak m.Zusätzen	n.v.	1,58
	MW Rohtabake ohne Zusätze (n=22)	0,12	2,16
	MW vorbehandelte Rohtabake (n=8)	0,10	1,34
	Referenzzigarette	n.v.	1,23
	Yesmoke	0,11	1,68

4.4.4 Vergleich der Rohtabake und Zigaretten

Aufgrund der geringen Anzahl der im Vorprojekt untersuchten Rohtabake war es nicht möglich einzuschätzen, ob den Zigaretten Ammoniumsalze oder Harnstoff zugesetzt werden oder nicht. Anfangs gingen wir davon aus, dass oberhalb einer Ammoniakkonzentration von 1,0 mg/g in Zigaretten ein Zusatz Ammoniumsalzen zu Zigaretten wahrscheinlich ist. Durch die nun höhere Vergleichsdatenlage konnte diese Vermutung nicht bestätigt werden. Die mittlere Konzentration der Rohtabake liegt bei 2,04 mg/g, wobei einzelne Sorten deutlich höhere Konzentrationen aufweisen. In den Schweizer Zigaretten beträgt die mittlere Ammoniakkonzentration hingegen nur 0,86 mg/g und die höchste einzelne Konzentration in S29 1,62 mg/g. Selbst die Referenzzigarette (1,23 mg/g) und die zusatzstofffreie Yesmoke Zigarette (1,68 mg/g) haben deutlich höhere Ammoniakgehalte als die mittlere Konzentration in den Zigaretten.

Die mittleren Harnstoffgehalte in Zigaretten (0,07 mg/g) sind ebenfalls kleiner als die in den unbehandelten Rohtabaken (0,12 mg/g). Eine der untersuchten Schweizer Zigaretten (S27) übersteigt den mittleren Harnstoffgehalt der Tabake. Die höchste Konzentration in den Zigaretten (0,16 mg/g S27) ist der höchsten Konzentration der Tabake (Maryland Brasilien: 0,23 mg/g) recht ähnlich. In der Referenzzigarette 2R4F wurde kein Harnstoff festgestellt.

Für die Bewertung der festgestellten Konzentrationen wurde von uns ein cut-off-Wert (Grenzwert) festgelegt, oberhalb dessen man von einer Aufstockung mit Ammoniumsalzen sprechen kann. Dieser Wert wurde aus dem Mittelwert + 3facher Standardabweichung der Konzentrationen aller zusatzstofffreien Tabakproben und Referenzzigaretten berechnet.

Folgende cut-off-Werte ergeben sich:

Ammoniak: 8,3 mg/g

Harnstoff: 0,3 mg/g

Aus diesen Werten geht nun klar hervor, dass weder ein Zusatz von Ammonium noch von Harnstoff bewiesen werden kann, da keine der hier untersuchten Zigaretten diese Werte erreichen.

Um einen natürlichen Gehalt an Ammoniak in Zigaretten zu berechnen, kann man die mittleren Konzentrationen der einzelnen Tabaksorten benutzen. Geht man von der Zusammensetzung einer typischen Blendmischung von Zigaretten aus, so besteht diese aus ca. 50 % Tabak (55% Burley, 45 % Virginia, 5% Orient), 28 % rekonstituiertem Tabak und 15 % expandiertem Tabak. Nimmt man diese Prozentangaben als Richtwerte und setzt die gemessenen mittleren Konzentrationen ein, so würde sich ein Ammoniakgehalt in Zigaretten von etwa 2,2 mg/g ergeben. Dabei bleiben die Verluste, die während der Verarbeitung auftreten sowie der Anteil an Zusatzstoffen oder anderen Materialien wie Pflanzenstängel oder -stückchen (Blattrippen usw.) unberücksichtigt.

Für Harnstoff wäre dieser theoretische Wert analog etwa 0,085 mg/g. Allerdings ist hier die Vergleichsdatenlage sehr klein, da z.B. nur in einem der sechs Orient Tabake Harnstoff nachgewiesen werden konnte.

Vergleicht man nun diese theoretisch ermittelten Werte mit den mittleren Konzentrationen, die in Zigaretten gefunden wurden, so liegen die Harnstoffkonzentrationen sehr nah an dem theoretischen Wert (MW Harnstoff in Zigaretten: 0,07 mg/g, Harnstoff theoretisch: 0,085 mg/g). Die theoretisch ermittelte Ammoniakkonzentration für Blendmischungen (2,2 mg/g) ist allerdings mehr als doppelt so hoch wie die tatsächliche mittlere Konzentration in den Schweizer Zigaretten (MW= 0,86 mg/g).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der natürliche Gehalt an Ammoniak in zusatzstofffreien Rohtabaken deutlich höher ist (im Mittel mehr als doppelt so hoch) als in Schweizer Zigaretten. Einige Amerikanische Zigaretten enthalten höhere Ammoniakkonzentrationen als die mittlere Konzentration in unbehandelten Rohtabaken. Ein Zusatz ist allerdings auch hier nicht eindeutig beweisbar.

Harnstoffkonzentrationen in Zigaretten sind denen in Tabaken sehr ähnlich.

Der natürliche Gehalt an Ammoniak und Harnstoff in Tabaken ist abhängig von den Boden-, Klima- und Düngbedingungen und kann darüber bereits in der Pflanze wesentlich beeinflusst werden. Die Verwendung des Tabaks, der Tabakmischung bzw. deren Behandlung während der Verarbeitung bestimmt den Gehalt an Ammoniak und Harnstoff in der Zigarette. So kann es während der Lagerung und bei der Verarbeitung des Tabaks zu Zigaretten zu Verlusten an Ammoniak und Harnstoff kommen.

4.5 Nachweis von Zusatzstoffgemischen in Zigaretten

Wie bereits im Abschnitt 2.1.1 ausgeführt wurde, werden als Zusatzstoffe auch komplexe Gemische, wie verschiedene ätherische Öle (Pfefferminzöl), Aromen (Rumaroma), Lakritze oder Kakao verwendet werden. Die Zusammensetzung dieser Gemische ist oft nicht eindeutig definiert, so dass unklar bleibt, welche Substanzen dem Tabak in welcher Menge beigelegt werden und der Raucher unter Umständen aufnimmt. Daher wurden für einige dieser Gemische Markersubstanzen festgelegt und anschließend quantifiziert, um auf die Menge des eingesetzten Zusatzstoffgemisches rückschließen zu können. Dazu wurden die Einzelkomponenten von Kakao, Lakritze und Pfefferminzöl ermittelt und jeweils ein Marker für deren qualitativen und quantitativen Nachweis festgelegt. Anschließend wurden die Zigaretten und Rohtabake mit Zusatzstoffen mittels HPLC-DAD auf Kakao und Lakritze untersucht. Zum qualitativen Nachweis von Pfefferminzöl wurde ein HS-SPME/GC-MS-Verfahren entwickelt und auf die entsprechenden Proben angewendet.

4.5.1 Nachweis von Lakritze

4.5.1.1 Optimierung der Methode

Nach Literaturstudium und Vergleich der Inhaltsstoffe von Lakritze (siehe dazu Abschnitt 2.2.1) wurde als Marker für dieses Gemisch Glycyrrhizin gewählt. Diese Hauptkomponente des Lakritzeextraktes besitzt geeignete chromatographische und analytische Eigenschaften: Als Strukturelement ist eine cyclische α,β -ungesättigte Carbenylgruppe im Chromophor vorhanden (vgl. Abb. 1, Abschnitt 2.1.2). Demzufolge besitzt Glycyrrhizin eine genügende UV-Absorption und ein charakteristisches UV-Spektrum, um mit der HPLC-DAD-Methode nachweisbar zu sein. In einer Zigarette, die 0,9% Lakritzeextrakt enthält, werden Glycyrrhizin-Konzentrationen zwischen 0,9 – 2,25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ erwartet. Auch für diese Konzentrationen scheint die HPLC-DAD-Methode ausreichend empfindlich zu sein.

Andere Inhaltsstoffe des Lakritzeextraktes besitzen entweder keinen Chromophor oder sind in zu geringer Konzentration im Extrakt vorhanden, so dass sie als Marker für einen Lakritze-Zusatz ungeeignet sind.

Bei der Auswahl des analytischen Standards wurden Substanzen getestet, die als Strukturanaloga zu Glycyrrhizin gelten (Testosteron, Testolacton und Desonid) und somit einen ähnlichen Chromophor besitzen. Nach Auswertung der Chromatogramme zeigte sich Testosteron als geeignet, da sowohl das UV-Spektrum eindeutig war als auch die Retention ohne Überlagerungen mit anderen Substanzen erfolgte.

Als wichtiger Optimierungsschritt in der Probenaufbereitung wurde die Filtration des Zigarettenextraktes vor der unmittelbaren Injektion in das HPLC-System angesehen. Da die Zigarettenextrakte nach der Extraktion und Zentrifugation oft noch trübe und schwebstoffhaltig waren, wurden empfindliche Teile der HPLC-Anlage (Mikrofiltereinheiten und Fritten) verstopft. Um dieses zu vermeiden, wurden nach der Zentrifugation 500 µl des Extraktes abgenommen und in eine Ultrafree®-MC Filtereinheit (0,22 µm PVDF-Membran, PP-Gehäuse) überführt, erneut zentrifugiert und anschließend 30 µl des nun klaren Überstandes ins HPLC-System überführt.

Für die Filtration wurden verschiedene Spritzenfilteraufsätze aus unterschiedlichen Gehäuse- und Membranmaterialien getestet. Bei den meisten Aufsätzen kam es zu Wechselwirkungen zwischen Gehäuse oder Membran mit dem internen Standard Testosteron und dem Analyten Glycyrrhizin. Besonders der Standard wurde durch einige Filteraufsätze stark zurückgehalten und war im Chromatogramm nur noch als sehr kleiner Peak oder gar nicht mehr zu finden. Diese Effekte traten bei den Ultrafree®-MC Filtereinheiten nicht auf, weshalb sie für alle weiteren Analysen verwendet wurden.

4.5.1.2 Angaben zur Validierung der Methode

Die Analysenmethode zur Bestimmung von Glycyrrhizin in Zigaretten wurde validiert nach den Regeln der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) mit dem Programm "Excel Valistat 1.0".

Für die Validierung wurden fünf Kalibrierungen an einem Tag gemessen sowie eine Zigarettenprobe mittlerer Glycyrrhizinkonzentration an fünf aufeinander folgenden Tagen. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung. Die Ergebnisse der Validierung sind in Tabelle 41 aufgelistet.

Die Glycyrrhizinkonzentrationen aller Zigaretten lagen oberhalb der Nachweisgrenze. Vier der insgesamt 44 positiv getesteten Zigarettenmarken enthielten Glycyrrhizinkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze, aber oberhalb der Nachweisgrenze, die mit dem Programm Valistat 1,0 ermittelt wurden. Sie wurden dennoch quantifiziert, da eine eindeutige Identifizierung anhand der Retentionszeit und des Spektrums möglich war und da die entsprechenden Peakflächen oberhalb des 9fachen Grundrauschens der Basislinie im Chromatogramm lagen.

Zusätzlich wurde die Wiederfindungsrate bestimmt, um zu prüfen, ob eine definierte Menge Glycyrrhizinsäure aus der Tabakmatrix vollständig extrahiert werden kann. Diese betrug für Glycyrrhizin 90%.

Tabelle 41. Ergebnisse der Validierung der Methode zur Bestimmung von Glycyrrhizin

Validierungsgröße	Wert
mittlere Standardabweichung vom Mittelwert	12,0%
Wiederholpräzision	9,2%
Laborpräzision	12,3%
Nachweisgrenze (LOD)	0,029 mg/g
Erfassungsgrenze (LOI)	0,057 mg/g
Bestimmungsgrenze (LOQ)	0,087 mg/g

4.5.1.3 Nachweis von Lakritze in Zigaretten

Nach Optimierung der weiteren Parameter für die Extraktions- und Messmethode (Extraktionsmittel, Extraktionsdauer, Laufmittel und Wellenlänge) wurde die Analysenvorschrift, wie sie im Abschnitt 3.4.4 beschrieben ist, verwendet.

Die Auswertung des nach der Messung erhaltenen Chromatogramms erfolgte im Absorptionsmaximum von Glycyrrhizinsäure bei 250 nm. Sowohl Glycyrrhizin, als auch der interne Standard Testosteron ergaben ausreichend große und scharfe Peaks, die gut von der Tabakmatrix abgetrennt waren (siehe Abb. 17).

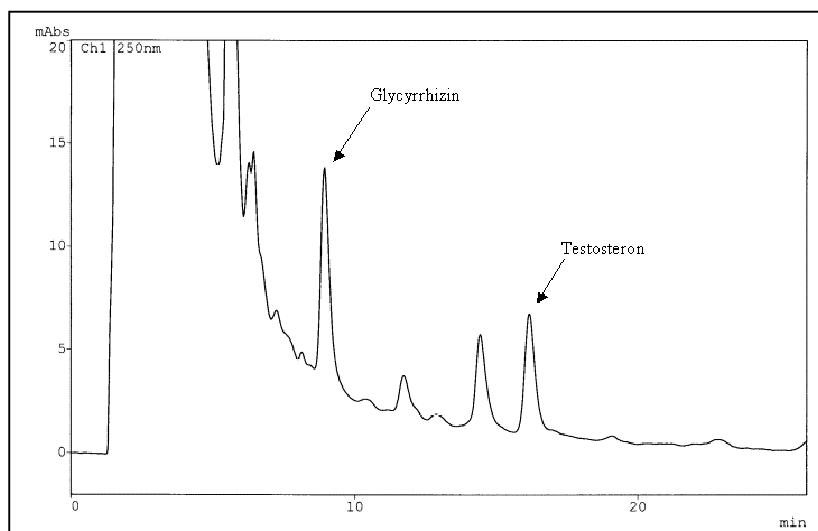


Abbildung 17: Chromatogramm der Marke S10 „lights“ mit Testosteron als internem Standard im Laufmittel A bei $\lambda = 250$ nm, Glycyrrhizinkonzentration: 0,16 mg/g

Bei allen Proben stimmten die Spektren mit dem Referenzspektrum aus der UV-Spektrenbibliothek sehr gut überein, so dass Glycyrrhizin eindeutig anhand der Retentionszeit und des UV-Spektrums identifiziert werden konnte.

Bei sehr niedrigen Glycyrrhizinkonzentrationen in der jeweiligen Probe war die Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum jedoch geringer.

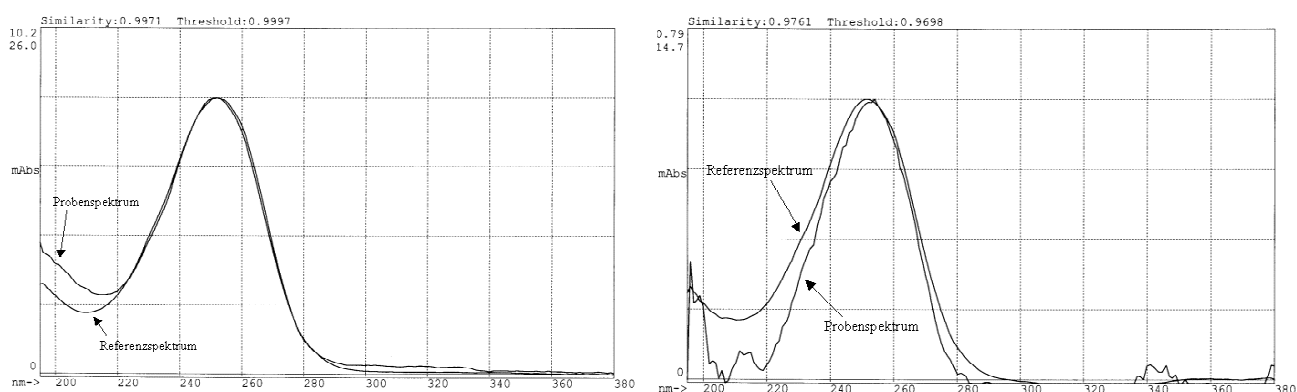


Abbildung 18: Überlagerung des UV- Spektrums von Glycyrrhizin in der Marke S18 mit einem Referenzspektrum, Similarity-Index: 0,997 (links).

Überlagerung des UV-Spektrums von Glycyrrhizin in der Marke S22 mit einem Referenzspektrum, Similarity-Index: 0,976 (rechts).

Abbildung 18 zeigt einen Vergleich der UV-Spektren von Glycyrrhizin in einer Zigarettensorte mit viel (S18: 0,33 mg/g) und mit wenig Glycyrrhizin (S22: 0,03 mg/g). Der Similarity-Index von Proben- und Referenzspektrum beträgt in der S18-Zigarette 0,997, während er in der Zigarettenprobe mit dem kleinsten positiven Nachweis (S22) nur noch 0,976 beträgt.

Insgesamt wurden 55 Zigarettensorten (32 verschiedene Schweizer Zigarettensorten sowie vier verschiedene Marken aus bis zu acht verschiedenen Herkunftsorten) mit der unter 3.4.4 beschriebenen Methode auf Glycyrrhizin untersucht. Davon enthielten 10 Zigaretten kein Glycyrrhizin, was bedeutet, dass 78 % aller untersuchten Zigaretten Lakritze zugesetzt wurde.

Die Konzentrationen der Schweizer Zigarettensorten sind in Tabelle 42 dargestellt, wobei neben den Glycyrrhizinkonzentrationen auch die entsprechenden prozentualen Lakritzeextraktanteile in den Zigaretten angegeben sind. Als Untergrenze wurde ein Glycyrrhizingehalt im Lakritzeextrakt von 25 % und als Obergrenze von 10 % angenommen (siehe Abschnitt 2.1.2). Kursiv gedruckte Konzentrationen liegen unterhalb der Erfassungsgrenze.

Es ist zu erkennen, dass 25 von 32 analysierten Sorten Glycyrrhizin enthalten und ihnen demzufolge Lakritze bzw. Lakritzeextrakt zugesetzt wurde. Die durchschnittliche Konzentrationen an Glycyrrhizin in den 32 Schweizer Zigaretten beträgt 0,26 mg/g.

Tabelle 42. Ermittelte Glycyrrhizinkonzentrationen und prozentualer Gehalt an Lakritzeextrakt in Schweizer Zigaretten ; (n.n.= nicht nachgewiesen)

Zigarettenmarke	Glycyrrhizin in mg/g	% Lakritzeextrakt in Zigarette	
		Untergrenze	Obergrenze
S01 "blau"	n.n.	-	-
S02 "grün"	n.n.	-	-
S03 "gelb"	n.n.	-	-
S04 "lights"	0,22	0,09	0,22
S05 "Menthol"	0,25	0,10	0,25
S06 "Original"	0,25	0,10	0,25
S07	n.n.	-	-
S08 "Vanille"	0,22	0,09	0,22
S09	0,16	0,06	0,16
S10 "lights"	n.n.	-	-
S11	0,40	0,16	0,40
S12	n.n.	-	-
S13 "lights"	0,08	0,03	0,08
S14 "ultra lights"	0,08	0,03	0,08
S15 "lights"	0,11	0,04	0,11
S16	0,26	0,10	0,26
S17 "lights"	0,26	0,11	0,26
S18	0,33	0,13	0,33
S19 "lights"	0,29	0,11	0,29
S20 "ultra lights"	0,34	0,13	0,34
S21 "lights"	0,39	0,16	0,39
S22	0,03	0,01	0,03
S23 "lights"	0,47	0,19	0,47
S24 "extra"	0,24	0,09	0,24
S25 "mild"	0,23	0,09	0,23
S26 "extra lights"	0,44	0,18	0,44

Fortsetzung Tabelle 42.

Zigarettenmarke	Glycyrrhizin in mg/g	% Lakritzeextrakt in Zigarette	
		Untergrenze	Obergrenze
S27 "One"	0,34	0,14	0,34
S28 "super lights"	0,51	0,20	0,51
S29	0,23	0,09	0,23
S30 "Vanille"	n.n.	-	-
S31 "ultra lights"	0,08	0,03	0,08
S32 "super lights"	0,28	0,10	0,28
MW:	0,26	-	-

In der Sorte S28 „super lights“ wurde die höchste Glycyrrhizinkonzentration (0,51 mg/g) gemessen, während in der Sorte S22 die kleinste detektierbare Menge vorkam (0,03 mg/g). Wie schon bei vorherigen Untersuchungen festgestellt werden konnte, enthalten die als „100 % natürlich“ deklarierten Sorten (S01-S03) sehr wenig Zusatzstoffe, was auch hier durch das fehlende Glycyrrhizin bestätigt wurde. Erstaunlicherweise konnte in den sonst sehr stark aromatisierten Zigaretten S30p „Vanille“ und S08 „Vanille“ ebenfalls kein Glycyrrhizin nachgewiesen werden.

Auffällig ist wiederum die Einheitlichkeit der Konzentrationen bei den Markenvarianten. So enthalten die drei Variationen S26-S28 (extra lights, one und super lights) die höchsten Werte (0,34-0,51 mg/g), in den drei Varianten S18-S20 waren die Glycyrrhizinkonzentrationen um 0,3 mg/g, die Sorten S04-S06 (Original, Menthol, lights) und die beiden Sorten S24 „extra“ und S25 „mild“ enthielten einheitlich um 0,24 mg/g Glycyrrhizin. Bei den Sorten S16 und S17 „lights“ wurden sogar gleiche Glycyrrhizingehalte ermittelt (0,26 mg/g).

Da der Gehalt an Glycyrrhizin im Lakritzeextrakt sehr stark schwanken kann, ist die Interpretation der Konzentrationen schwierig. Geht man von einem mittleren Glycyrrhizingehalt von 17,5 % in Lakritzeextrakt aus, so entspricht die mittlere Glycyrrhizinkonzentration, die in den Schweizer Zigaretten detektiert wurde (0,26 mg/g) einem Zusatz von etwa 0,15 % Lakritzeextrakt. Die Industrie gibt an, den Zigaretten 0,45-2 % [2-11] Lakritzeextrakt zuzusetzen. Angaben von Schweizer Herstellern zu Höchstwerten von Lakritze können wie folgt zusammengefasst werden:

Philip Morris Schweiz 2003: 0,9 % [11]

Philip Morris Schweiz 2005: 0,8% [5]

British American Tobacco Schweiz 2006: 0,45% (Fluid) bzw. 0,6 % (Pulver) [3]

Nach diesen Angaben würde keine der untersuchten Schweizer Marken den deklarierten Maximalgehalt an Lakritze überschreiten. Eine abschließende Beurteilung ist allerdings möglich, wenn man den genauen Gehalt an Glycyrrhizin in dem jeweils verwendeten Lakritzeextrakt kennt.

Interessant ist auch der Vergleich von Glycyrrhizinkonzentrationen gleicher Marken verschiedener Herkunft. Die Ergebnisse dieses Vergleichs sind in Tabelle 43 zusammengefasst.

Wie bereits in vorherigen Untersuchungen auffiel, sind sich die 18 und 19 „lights“ aus verschiedenen Ländern ähnlich. So enthalten alle Zigaretten dieser Marken Lakritze, wobei in den 18-Zigaretten aus Deutschland die höchste Konzentration an Glycyrrhizin aller untersuchter Zigaretten festgestellt wurde (0,67 mg/g). Die größte Homogenität ist bei der

Marke 19 „lights“ gegeben: in fünf der acht Sorten wurde die gleiche Glycyrrhizinkonzentration (0,36 mg/g) ermittelt.

Die amerikanischen Zigaretten scheinen auch hier wieder ein von europäischen Zigaretten verschiedenes Zusatzstoffdesign zu haben. In beiden amerikanischen 10 „lights“ konnte kein Glycyrrhizin nachgewiesen werden. Hingegen enthielten die untersuchten europäischen Sorten 0,16-0,39 mg/g Glycyrrhizin. An dieser Stelle soll erneut auf die Unterschiede im Zusatzstoffdesign der 09 aus Chicago (mit Filter) und der 09 aus Washington (filterlos) hingewiesen werden. Die untersuchte filterlose 09 aus Washington, enthält eindeutig Lakritzeextrakt, während in den 09 mit Filter aus Chicago kein Glycyrrhizin als Marker für Lakritze zu finden war.

Auch bei der Untersuchung auf den Lakritze-Gehalt in Zigaretten sind also teilweise länderspezifische Unterschiede zu erkennen. Das Geschmacksdesign einer Marke kann in verschiedenen Ländern anders sein. Insgesamt liegen jedoch die Glycyrrhizin-Konzentrationen alle in einer Größenordnung (0,13-0,67 mg/g) und die Unterschiede sind hier nicht so markant wie bei anderen Zusatzstoffen, bei denen Unterschiede von bis zu einer Zehnerpotenz auftraten.

Tabelle 43. Ländervergleich hinsichtlich der Glycyrrhizingehalte gleicher Zigarettenmarken unterschiedlicher Herkunft (n.n. = nicht nachgewiesen)

	09 [mg/g]	10 „Lights“ [mg/g]	18 [mg/g]	19 „Lights“ [mg/g]
Schweiz	0,22	0,16	0,33	0,29
Deutschland	0,20	0,39	0,67	0,36
China (Peking)	n.n.	Sorte nicht vorh.	Sorte nicht vorh.	Sorte nicht vorh.
Belgien	0,13	Sorte nicht vorh.	0,30	0,36
USA (Chicago)	n.n.	n.n.	0,36	0,36
USA (Washington)	0,37 (Non filter)	n.n.	0,23	0,39
Tschechien	Sorte nicht vorh.	Sorte nicht vorh.	0,34	0,36
Polen (Warschau)	Sorte nicht vorh.	Sorte nicht vorh.	0,31	0,36
Irland	Sorte nicht vorh.	0,17	0,26	0,17

4.5.1.4 Nachweis von Lakritze in Rohtabaken

Da aus den anderen Untersuchungen hervorging, dass auch einige der Tabakproben Zusatzstoffe enthalten, wurden diese in die Analyse auf Lakritze einbezogen. So wurden alle Tabakmischungen mit Zusätzen (PM 6-8 und PM 13-14) und alle rekonstituierten Tabake (PM 12-13, BAT 4) sowie die Referenzzigarette 2R4F und die zusatzstofffreie Zigarette Yesmoke mit der beschriebenen Methode untersucht. Als weitere Kontrollmaterialien wurden die Tabakproben BAT 1 (Orient Griechenland) und BAT 3 (Virginia Frankreich) gemessen, um sicher zu gehen, dass im Chromatogramm der Tabake keine Störpeaks aus der Matrix auftreten und zu Überlagerungen mit Glycyrrhizin führen.

Die einzelnen Ergebnisse der Glycyrrhizinbestimmung sind in Tabelle 44 aufgelistet. Auch hier gelten für die Berechnung der Ober- und Untergrenzen für den prozentualen Gehalt an Glycyrrhizin in Lakritze 10% bzw. 25 %.

Tabelle 44. Ermittelte Glycyrrhizinkonzentrationen und prozentualer Gehalt an Lakritzeextrakt in Tabakproben und Referenzzigaretten (n.n.= nicht nachgewiesen)

Tabaksorte	Glycyrrhizin [mg/g]	% Lakritzeextrakt in Zigarette	
		Untergrenze	Obergrenze
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 6)	0,17	0,07	0,17
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 7)	0,28	0,11	0,28
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 8)	0,19	0,08	0,19
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 13)	n.n.	-	-
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 14)	n.n.	-	-
Rekonstituierter Tabak mit Zusätzen (BAT 4)	n.n.	-	-
Rekonstituierter Tabak Frankreich (PM 11)	n.n.	-	-
Rekonstituierter Tabak Brasilien (PM 12)	0,26	0,1	0,26
Orient Griechenland (BAT 1)	n.n.	-	-
Virginia Frankreich (BAT 3)	n.n.	-	-
Referenzzigarette 2R4F	n.n.	-	-
Yesmoke	n.n.	-	-

Wie aus Tabelle 44 zu entnehmen ist, enthalten vier der acht untersuchten Tabakmischungen tatsächlich Glycyrrhizin. In drei der Tabakproben, von denen bekannt war, dass sie Zusätze enthalten sollen, war jedoch kein Glycyrrhizin nachweisbar. Von den drei untersuchten rekonstituierten Tabaken wurde lediglich dem brasilianischen (PM 12) Lakritze zugesetzt, da hier ein Glycyrrhizingehalt von 0,26 mg/g ermittelt wurde. Die mittlere Glycyrrhizinkonzentration in den behandelten Tabaken entspricht in etwa der in den Schweizer Zigaretten (0,23 mg/g in Tabaken, 0,26 mg/g in Zigaretten).

Die Glycyrrhizinkonzentrationen in den Tabakproben sind alle sehr ähnlich und weisen keine starken Differenzen auf. Offenbar wurde allen ähnliche Mengen an Lakritzeextrakt zugesetzt. Die Referenzzigarette 2R4F und die zusatzstofffreie Zigarette Yesmoke enthielten erwartungsgemäß kein Glycyrrhizin. Auch in den beiden unbehandelten Tabaken war kein Glycyrrhizin nachweisbar.

4.5.1.5 Vergleich von Zigaretten und Rohtabaken

Die in Zigaretten festgestellten Glycyrrhizinkonzentrationen weisen größere Konzentrationsbereiche auf als die in den Tabakproben, die mittlere Konzentration ist jedoch annähernd gleich. Tabelle 45 gibt einen Gesamtüberblick über die nachgewiesenen Mengen an Glycyrrhizin in Zigaretten und Tabakproben mit Zusätzen. Es ist jeweils die mittlere Konzentration und darunter der Konzentrationsbereich von Glycyrrhizin angegeben. Die mittlere Spalte gibt den Gehalt an Lakritzeextrakt an, wenn man von einer mittleren Glycyrrhizinkonzentration im Lakritzeextrakt von 17,5% ausgeht. Unter QNE (=Quantity Not Exceeded) versteht man die in Zigaretten nicht überschrittene Menge an Lakritzeextrakt, die von den Herstellern angegeben wird [2-11].

Tabelle 45. Gesamtüberblick über Glycyrrhizin- und Lakritzegehalte in Zigaretten und Tabaken

	Glycyrrhizin [mg/g]	Lakritzextrakt [%] (17,5 % Glycyrrhizin)	QNE [2-11] [%]
32 Schweizer Zigaretten	0,26 (0,08-0,51)	0,15 (0,05-0,3)	0,45-2
6 Tabake mit Zusätzen	0,23 (0,17-0,28)	0,13 (0,1-0,16)	
2R4F	0		

QNE= Quantity Not Exceeded

Aus Tabelle 45 geht hervor, dass die Konzentrationsbereiche von Glycyrrhizin in Zigaretten größer sind als in den Tabakproben. Die zugesetzte Menge an Lakritzeextrakt ist jedoch annähernd gleich und liegt unterhalb der von der Industrie angegebenen Maximalwerte.

4.5.2 Nachweis von Kakao

4.5.2.1 Optimierung der Methode

Wie im Zwischenbericht 1 dieses Projektes ([64], S. 34-41) bereits beschrieben wurde, war die Nachweismethode für Theobromin als Marker für Kakao noch nicht fehlerfrei. Vor allem die Extraktion und die saubere Abtrennung des Theobromins von der Zigarettenmatrix bereitete Schwierigkeiten. Aus diesem Grund erfolgte eine erneutes intensives Literaturstudium zu Extraktions- und Nachweismethoden von Theobromin in verschiedenen Matrices (siehe dazu Abschnitt 2.2.2).

Die Wahl von Theobromin als Markersubstanz erwies sich als vorteilhaft, da diese Substanz durch ihren Chromophor ein typisches UV-Spektrum besitzt und eine charakteristische Komponente des Kakaos ist. Die erwartete Konzentration an Theobromin in Zigaretten liegt bei etwa 0,35 mg/g, wenn ein Theobromingehalt im Kakao von 2,3 % und ein typischer Zusatz von 1,5 % Kakaopulver zu Zigaretten angenommen wird. Diese Konzentration scheint ausreichend, um sie mittels HPLC-DAD nachweisen zu können. Auch der interne Standard Etofyllin wurde beibehalten, da er dem Analyten strukturell sehr ähnlich ist und daher ähnliche Eigenschaften bei der Extraktion und in der Chromatographie erwarten lässt.

Aus dem Literaturstudium ergab sich, dass Theobromin sowohl mit organischen als auch mit wässrigen Lösungsmitteln extrahierbar ist.

Zum Zweck der Optimierung wurden zusatzstofffreie Zigaretten mit Theobromin gespiket und anschließend unter Variation der verschiedenen Parameter (Extraktionsmittel, Extraktionsart, Extraktionsdauer, Extraktionshäufigkeit) analysiert.

Da das Hauptproblem die hohe Matrixbelastung und damit ein sehr unreines Theobrominspektrum bzw. Überlagerungen im Chromatogramm war, galt es, den nach Extraktion der Zigaretten mit dem wässrigen Laufmittel erhaltenen Extrakt aufzureinigen. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene organische Lösungsmittel getestet (tert. Butylmethylether, Ethylacetat und Chloroform/Isopropanol (9:1)). Nach Vergleich der Chromatogramme, die nach dem Eindampfen der organischen Phase und Aufnehmen in Laufmittel erhalten wurden, war die Wiederfindung an Theobromin und dem internen Standard bei Chloroform/Isopropanol am größten. Durch die Verwendung eines Überschusses an organischer Phase bei der Extraktion (Verhältnis wässrige Phase zu

organischem Extraktionsmittel = 1:5) und Steigerung der Extraktionsdauer von 10 min auf 20 min konnte die Extraktionsausbeute von Theobromin von 60 % (frühere Methode) auf 93,5 % gesteigert werden. Um danach das Theobromin aus dem zur Trockne eingedampften Rückstand des Extraktes vollständig im Laufmittel zu lösen, war eine einstündige Behandlung im Ultraschallbad nötig. Die so erhaltene Lösung wurde unter Verwendung eines Spritzenfilters mit einer 0,22 µm CME-Membran (Cellulosemischester, bestehend aus Celluloseacetat und Cellulosenitrat) von Schwebstoffen aus der Tabakmatrix befreit und anschließend ins HPLC-System injiziert. Als Resultat ergab sich ein sauberes Chromatogramm mit geringer Matrixbelastung und einem sauber abgetrennten Theobrominpeak. Abbildung 19 zeigt den Vergleich eines Chromatogramms, das nach der 1. Extraktionsmethode erhalten wurde mit einem Chromatogramm aus der optimierten Methode.

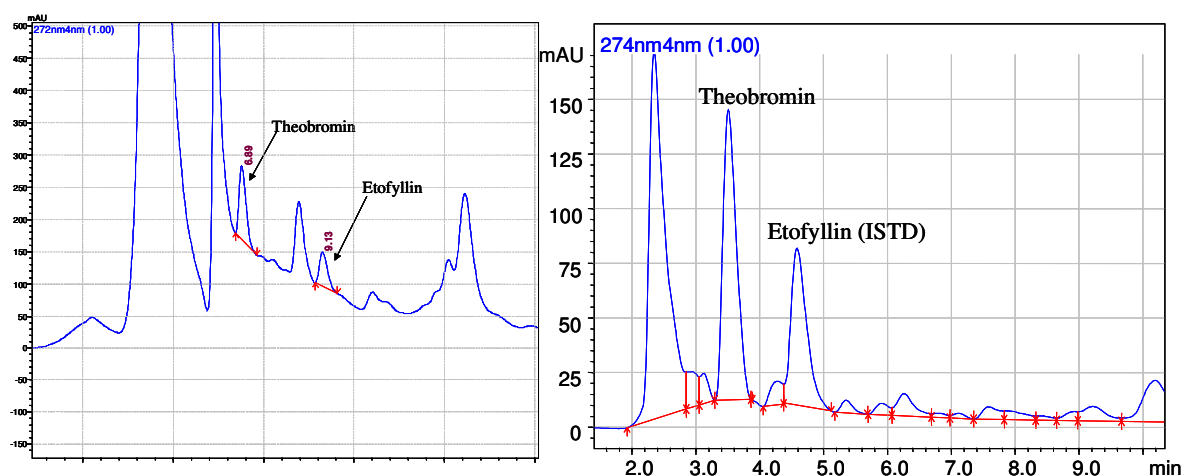


Abbildung 19: Vergleich der Chromatogramme einer mit Theobromin gespiketen Zigarettenprobe (Yesmoke) nach der alten Extraktionsmethode (links) und der neuen Extraktionsmethode (rechts)

In Abbildung 19 ist deutlich zu erkennen, dass der Theobrominpeak und der Etofyllinpeak im rechts dargestellten Chromatogramm wesentlich größer und besser abgetrennt sind. Im linken Chromatogramm sind deutlich die Effekte der Matrixbelastung zu sehen: die Basislinie ist beim Theobromin von 0 mAU auf etwa 200 mAU angestiegen und fällt erst hinter dem Etofyllin langsam wieder ab. Beide Substanzen treten hier nur als kleine Peaks aus dem Untergrund hervor und können auch nur ungenau integriert werden. Des weiteren treten im linken Chromatogramm zwei wesentlich größere Signale vor dem Theobromin auf, die sich nur ungenügend vom Analyten trennen und die nachfolgenden Substanzen stark beeinflussen, wodurch auch die UV-Spektren von Analyt und Standard stark beeinträchtigt werden. Im rechten Chromatogramm ist hingegen nur ein einzelner Matrixpeak vor dem Theobromin zu sehen, welcher eine vergleichbare Höhe wie dieser hat und sich sehr gut abtrennt.

Trotz dieser Verbesserung trat bei einer Reihe von Proben ein Störpeak mit gleicher Retentionszeit wie Theobromin aber deutlich unterschiedlichem UV-Spektrum auf. Der spektrale Unterschied beider Substanzen wurde zur Korrektur der Peakfläche herangezogen (s. Abschnitt 4.5.2.3).

4.5.2.2 Angaben zur Validierung der Methode

Die Analysenmethode zur Bestimmung von Theobromin in Zigaretten wurde validiert nach den Richtlinien der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCH) mit dem Programm "Excel Valistat 1.0".

Für die Validierung wurden fünf Kalibrierungen an einem Tag gemessen sowie eine Zigarettenprobe mittlerer Theobrominkonzentration an fünf aufeinander folgenden Tagen. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung. Die Ergebnisse der Validierung sind in Tabelle 46 zusammengefasst.

Zusätzlich wurde die Wiederfindungsrate bestimmt, um zu prüfen, ob eine definierte Menge Theobromin aus der Tabakmatrix vollständig extrahiert werden kann. Sie betrug 93,5%.

Insgesamt lagen die Konzentrationen von drei Zigaretten und vier Tabakproben unterhalb der Bestimmungsgrenze, deren Werte aus den unter Abschnitt 4.5.1.2 genannten Gründen dennoch angegeben wurden.

Tabelle 46. Ergebnisse der Validierung der Methode zur Bestimmung von Theobromin

Validierungsgröße	Wert
mittlere Standardabweichung vom Mittelwert	17,5%
Wiederholpräzision	5,0%
Laborpräzision	18,4%
Nachweisgrenze (LOD)	0,016 mg/g
Erfassungsgrenze (LOI)	0,031 mg/g
Bestimmungsgrenze (LOQ)	0,051 mg/g

4.5.2.3 Nachweis von Kakao in Zigaretten

Insgesamt wurden die 32 Schweizer Zigaretten und vier verschiedene Marken aus unterschiedlichen Herkunftsländern mit der unter Abschnitt 3.4.5 beschriebenen Methode quantitativ auf Theobromin als Marker für Kakaozusatz analysiert.

Wie bereits in Abschnitt 4.5.2.1 erwähnt, fiel bei der Auswertung der Zigarettenchromatogramme auf, dass in einigen Zigaretten bei der Retentionszeit von Theobromin (RT= 3,5 min) ein Störpeak auftrat, dessen UV-Spektrum anders aussieht als das von Theobromin. Dieser Peak konnte vor allem in Theobromin negativen Proben nachgewiesen werden, was zu der Vermutung führte, dass es sich um eine Verunreinigung handelt, die aus der Zigarettenmatrix stammt. Ein Beispielchromatogramm der Zigarettenmarke S02 und das entsprechende UV-Spektrum sind in Abbildung 20 dargestellt. Durch Überlagerung des UV-Spektrums der Verunreinigung mit dem Referenzspektrum von Theobromin ist deutlich erkennbar, dass das zweite Maximum im UV-Spektrum der Verunreinigung erheblich in den längerwelligen Bereich verschoben ist (von $\lambda = 272$ nm auf $\lambda = 294$ nm). Die geringe Übereinstimmung der beiden Spektren, charakterisiert durch einen Similarity Index von 0,9486, beweist, dass es sich nicht um Theobromin handeln kann.

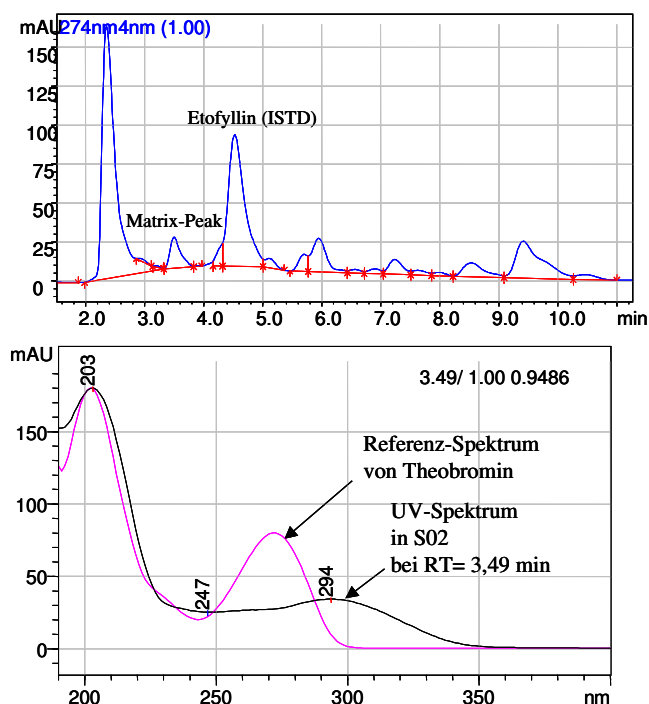


Abbildung 20: Chromatogramm von S02 (oben)
und UV-Spektrum bei RT= 3,49 min (unten),
überlagert mit dem Referenzspektrum von Theobromin
(Similarity Index= 0,9786)

Die Überlagerung mit dem Matrix-Peak führt zu einem veränderten UV-Spektrum des Theobromin-Peaks in den Zigarettenproben. Es ergab sich ein Mischspektrum aus Theobromin und der Verunreinigung, was gerade bei kleinen Theobrominkonzentrationen eine geringe Übereinstimmung mit dem Theobromin-Referenzspektrum zur Folge hatte. Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, betrug der Similarity-Index nach Überlagerung des Referenzspektrums mit dem UV-Spektrum bei RT= 3,50 min in der Zigarettensorte S22 nur noch 0,965. Legt man jedoch das UV-Spektrum des Matrix-Peaks aus einer Theobromin negativen Zigarette (S02) darüber, ergibt sich eine hohe Übereinstimmung (Similarity-Index= 0,998). Demzufolge dominiert das UV-Spektrum der Verunreinigung in Zigaretten sorten mit kleinen Theobrominkonzentrationen. Eine gute Kontrolle und Korrekturmöglichkeit für den Einfluss von dem Matrix-Peak ist gegeben, wenn man das Chromatogramm der Zigarette bei einer Wellenlänge betrachtet, bei der die Absorption von Theobromin gleich Null ist. Dies ist bei $\lambda = 310 \text{ nm}$ der Fall. Wie Abbildung 21 erkennen lässt, ist allerdings auch hier ein deutlicher Peak zu erkennen, der demnach von der Verunreinigung stammt.

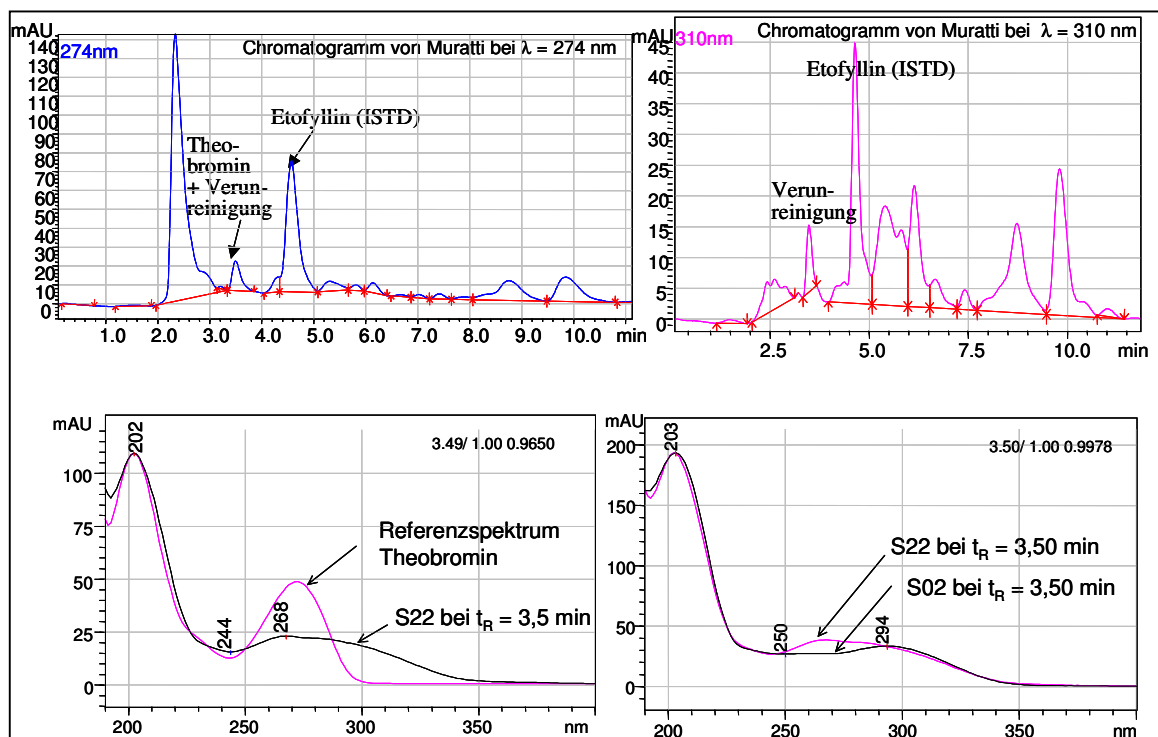


Abbildung 21: Chromatogramm von der Zigarettensorte S22 bei $\lambda = 274$ nm (oben links) und Überlagerung des UV-Spektrums bei $RT = 3,49$ min mit dem Theobromin-Referenzspektrum, (Similarity-Index: 0,965) (unten links)

Chromatogramm von der Zigarettensorte S22 bei $\lambda = 310$ nm (oben rechts) und Überlagerung des UV-Spektrums bei $RT = 3,50$ min mit dem UV-Spektrum des Matrix-Peaks in S02 (Similarity-Index: 0,998) (unten rechts)

In Zigaretten mit hohen Theobrominkonzentrationen überwiegt bei den entsprechenden UV-Spektren der Einfluss von Theobromin, was an den hohen Similarity-Indizes zu erkennen ist. In Abbildung 22 ist als Beispiel das Chromatogramm der Marke S06 und das mit dem Referenzspektrum überlagerte UV-Spektrum von Theobromin dargestellt. Es ergibt sich ein Similarity-Index von 0,995.

Um für die Theobrominkonzentrationen in den Zigaretten keine zu hohen Werte zu erhalten, wurde bei deren Berechnung die Peakfläche des Theobromins bei $\lambda = 274$ nm korrigiert. Dies gelang durch die Errechnung eines Faktors F, der gebildet wurde aus dem Verhältnis der Peakfläche bei $\lambda = 310$ nm und der Peakfläche bei $\lambda = 274$ nm in den Theobromin negativen Proben. Der so errechnete Faktor betrug im Mittel 0,90. Multipliziert man nun diesen Faktor mit der Peakfläche bei $\lambda = 310$ nm in den Theobromin positiven Proben und subtrahiert dieses von der Peakfläche bei $\lambda = 274$ nm, so erhält man die korrigierte Peakfläche für Theobromin.

Zusammenfassend ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der korrigierten Peakfläche für Theobromin:

$$A_{\text{korrigiert}} = A_{274\text{nm}} - A_{310\text{nm}} \cdot F$$

$A_{274\text{nm}}$ = Peakfläche bei $RT = 3,5$ min und $\lambda = 274$ nm

$A_{310\text{nm}}$ = Peakfläche bei $RT = 3,5$ min und $\lambda = 310$ nm

$F = 0,9$

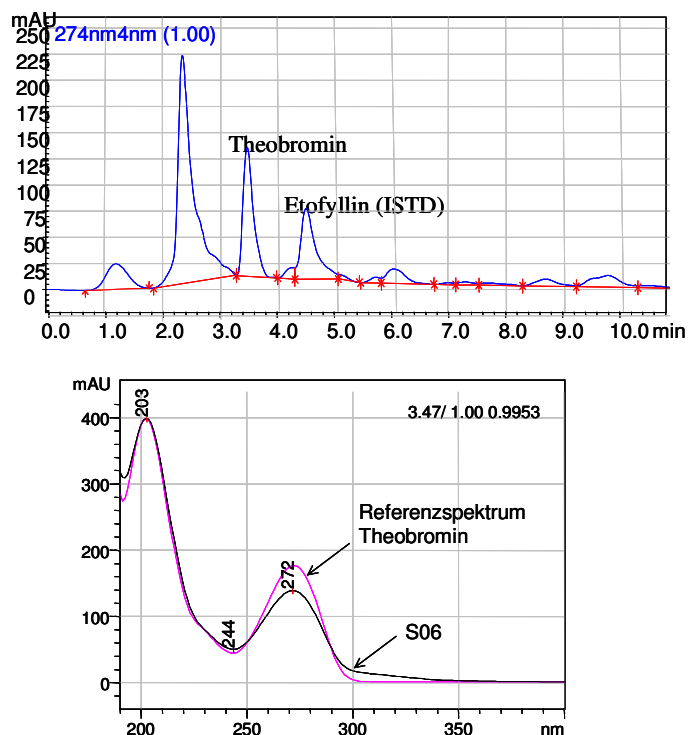


Abbildung 22: Chromatogramm von S06 bei $\lambda = 274 \text{ nm}$ (oben) und Vergleich des UV-Spektrum bei $RT = 3,49 \text{ min}$ (unten) mit dem Referenzspektrum von Theobromin (Similarity-Index: 0,995)

In Tabelle 47 sind die ermittelten Konzentrationen an Theobromin sowie die entsprechenden prozentualen Kakaogehalte (unter Annahme eines mittleren Theobromingehaltes von 2,3 % in Kakao) in Schweizer Zigaretten angegeben.

Tabelle 47. Ermittelte Theobrominkonzentrationen und entsprechende Kakaogehalte in Schweizer Zigaretten

fett: Konzentrationen überschreiten QNE*, *kursiv:* sehr kleine Konzentrationen

Zigarettenmarke	Theobromin in mg/g	% Kakao (bei 2,3 % Theobromin) in Zigarette
S01 "blau"	n.n.	-
S02 "grün"	n.n.	-
S03 "gelb"	n.n.	-
S04 "lights"	0,098	0,43
S05 "Menthol"	0,17	0,72
S06 "Original"	0,26	1,12
S07	n.n.	-
S08 "Vanille"	0,11	0,46
S09	0,11	0,46
S10 "lights"	n.n.	-
S11	<i>0,043</i>	0,19
S12	n.n.	-

Fortsetzung Tabelle 47.

Zigarettenmarke	Theobromin in mg/g	% Kakao (bei 2,3 % Theobromin) in Zigarette
S13 "lights"	0,062	0,27
S14 "ultra lights"	n.n.	-
S15 "lights"	0,064	0,28
S16	0,12	0,51
S17 "lights"	0,087	0,38
S18	0,066	0,29
S19 "lights"	0,047	0,21
S20 "ultra lights"	0,066	0,29
S21 "lights"	0,074	0,32
S22	0,014	0,062
S23 "lights"	0,10	0,45
S24 "extra"	0,28	1,22
S25 "mild"	0,17	0,73
S26 "extra lights"	0,079	0,34
S27 "One"	0,080	0,35
S28 "super lights"	0,066	0,29
S29	0,11	0,48
S30 "Vanille"	n.n.	-
S31 "ultra lights"	0,13	0,55
S32 "super lights"	0,10	0,45
MW:	0,10	0,45

*QNE= Quantity Not Exceeded (Angaben der Zigarettenindustrie über maximalen Gehalt an Zusatzstoff in Zigaretten)

Tabelle 47 ist zu entnehmen, dass 24 der 32 untersuchten Zigarettenmarken Theobromin enthalten. Es wurde eine mittlere Theobrominkonzentration von 0,10 mg/g in den Schweizer Zigaretten bestimmt. Die gemessenen Einzelkonzentrationen liegen zwischen 0,014 mg/g (S22) und 0,28 mg/g (S24 „extra lights“) und umfassen somit den Bereich von mehr als einer Zehnerpotenz.

Wie bei der Bestimmung von Lakritze in Zigaretten, konnte auch bei dem Nachweis von Kakao in den zusatzstoffarmen Sorten S01-S03 kein Theobromin nachgewiesen werden. Ebenso war auch bei den stark aromatisierten Vanille-Zigaretten S30 und S08 der Nachweis auf Theobromin negativ.

Ähnliche Konzentrationen bei den Markenvarianten konnten beim Theobromingehalt nur zum Teil festgestellt werden. So enthalten die drei Variationen S26-S28 (extra lights, one und super lights) Theobrominkonzentrationen, die knapp unterhalb der mittleren Konzentrationen aller Schweizer Zigaretten liegen (0,066-0,080 mg/g). Etwas niedriger lagen die Konzentrationen der drei Varianten S18-S20, wobei deren Werte etwas mehr streuten (0,047-0,066 mg/g). Die Sorten S04-S06 (Original, Menthol, lights) und die beiden Sorten S24 und S25 (extra und mild) enthielten die höchsten Theobrominkonzentrationen und unterschieden sich innerhalb der Einzelsorten auch relativ stark voneinander (vgl. Tabelle 47). Bei S16 und S17 „lights“ wurden wie auch bei der Glycyrrhizinbestimmung sehr ähnliche Theobromingehalte detektiert (0,12 mg/g bzw. 0,087 mg/g).

Insgesamt ist auffällig, dass alle Schweizer Zigaretten, in denen Glycyrrhizin nachgewiesen werden konnte, auch Theobromin enthielten. Lediglich die Sorte S14 „ultra lights“ enthielt nur Glycyrrhizin, dies allerdings auch in sehr geringer Menge. Vermutlich werden also Kakao und Lakritze überwiegend gemeinsam in Zigaretten verwendet.

Da der Gehalt an Theobromin im Kakao nicht so stark schwanken kann, ist die Interpretation der Konzentrationen hier wesentlich einfacher. Geht man von einem mittleren Theobromingehalt von 2,3 % in Kakao aus, so entspricht die mittlere Theobrominkonzentration, die in den Schweizer Zigaretten detektiert wurde (0,10 mg/g) einem Zusatz von etwa 0,45 % Kakao. Die Industrie gibt an, den Zigaretten 0,31-2,0% [2-11] Kakaopulver zuzusetzen. Bei diesen Werten bleiben die Angaben über andere Kakaoprodukte, wie Kakaodestillat, -extrakt, -ölrückstand oder Kakaobutterextrakt unberücksichtigt. Die Angaben von Schweizer Herstellern zu Maximalwerten können wie folgt zusammengefasst werden:

Philip Morris Schweiz 2003: 1,5 % [11]

Philip Morris Schweiz 2005: 1,3% [5]

British American Tobacco Schweiz 2006: 1,0% [3]

Nach diesen Angaben würden zwei der untersuchten Schweizer Marken (S06 „Original“ und S24 „extra“) den im Jahr 2006 British American Tobacco deklarierten Maximalgehalt an Kakao überschreiten (siehe Tabelle 47, fett gedruckte Werte).

Auch hier ist eine abschließende Beurteilung nur möglich, wenn der genaue Gehalt an Theobromin in dem jeweils verwendeten Kakaopulver bekannt ist.

Die Theobrominkonzentrationen in Zigarettenmarken unterschiedlicher Herkunft sind in Tabelle 48 zusammengefasst.

Tabelle 48. Ländervergleich hinsichtlich der Theobromingehalte gleicher Zigarettenmarken unterschiedlicher Herkunft (n.n. = nicht nachgewiesen)

	09 [mg/g]	10 „Lights“ [mg/g]	18 [mg/g]	19 „Lights“ [mg/g]
Schweiz	0,11	0,11	0,066	0,047
Deutschland	0,07	0,094	0,067	0,058
China (Peking)	n.n.	Sorte nicht vorh.	Sorte nicht vorh.	Sorte nicht vorh.
Belgien	0,086	Sorte nicht vorh.	0,060	0,069
USA (Chicago)	0,12	0,12	0,022	0,017
USA (Washington)	0,10 (Non filter)	0,14	0,026	0,022
Tschechien	Sorte nicht vorh.	Sorte nicht vorh.	0,072	0,020
Polen (Warschau)	Sorte nicht vorh.	Sorte nicht vorh.	0,023	0,021
Irland	Sorte nicht vorh.	0,072	0,053	0,097

Wie bereits in den Untersuchungen zu Lakritze auffiel, enthalten auch alle S18 und S19 „lights“ aus verschiedenen Ländern Theobromin. Allerdings sind die Konzentrationen durchgängig relativ niedrig. Besonders klein sind dabei die Konzentrationen, die in amerikanischen Zigaretten dieser Marken gemessen wurden. So liegen die Theobrominkonzentrationen in den S18 und S19 „lights“ aus Washington bzw. Chicago zwischen 0,017 und 0,026 mg/g. Auch polnische S18 und S19 „lights“ weisen sehr geringe Theobromingehalte auf.

09/10 „lights“ Zigaretten enthalten deutlich mehr Kakao als die untersuchten 18/19 „lights“ Varianten. Eine Homogenität der Theobrominkonzentrationen innerhalb einer Sorte konnte für die untersuchten 09 und 10 „lights“ festgestellt werden, in denen Theobromingehalte um 0,1 mg/g gemessen wurden.

In beiden amerikanischen 09 und 10 „lights“ wurden die jeweils höchsten Theobrominkonzentrationen dieser Sorten ermittelt. Dagegen konnte in diesen Zigaretten kein Glycyrrhizin nachgewiesen werden.

Gravierende Unterschiede im Zusatzstoffdesign der 09 aus Chicago (mit Filter) und der 09 aus Washington (filterlos) konnten bei der Untersuchung auf Kakao nicht festgestellt werden.

4.5.2.4 Nachweis von Kakao in Rohtabaken

Da aus den anderen Untersuchungen hervorging, dass auch einige der Tabakproben Zusatzstoffe enthalten, wurden diese in die Analyse auf Kakao einbezogen. So wurden alle Tabakmischungen mit Zusätzen (PM 6-8 und PM 13-14), zwei expandierte Tabake (BAT 11, 12) und alle rekonstituierten Tabake (PM 12-13, BAT 4) sowie die Referenzzigarette 2R4F und die zusatzstofffreie Zigarette Yesmoke mit der beschriebenen Methode untersucht.

Wie in den Zigaretten trat auch bei den Tabakmischungen ein Matrix-Peak auf, der ein ähnliches UV-Spektrum wie die Verunreinigung in den Zigaretten besitzt und damit auch eine entsprechend geringe Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum von Theobromin aufweist (siehe Abbildung 23).

Deshalb wurde auch hier eine korrigierte Peakfläche von Theobromin zur Berechnung der Konzentrationen verwendet. Dies erfolgte analog der Berechnung in den Zigaretten (siehe Abschnitt 4.5.2.3. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 49 aufgelistet. Auch hier gilt für die Berechnung ein mittlerer prozentualer Gehalt an Theobromin in Kakao von 2,3 %.

Tabelle 49. Ermittelte Theobrominkonzentrationen und prozentualer Gehalt an Kakaopulver in Tabakproben und Referenzzigaretten
(n.n.= nicht nachgewiesen); *kursiv*: sehr kleine Konzentrationen

Tabaksorte	Theobromin [mg/g]	% Kakaopulver in Zigarette
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 6)	0,056	0,24
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 7)	0,098	0,42
Tabakmischung mit Zusätzen (PM 8)	0,084	0,36
Expandierter Tabak (BAT 11)	n.n.	-
Expandierter Tabak (BAT 12)	n.n.	-
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 13)	<i>0,027</i>	0,11
Expandierte Tabakmischung mit Zusätzen (PM 14)	<i>0,026</i>	0,11
Rekonstituierter Tabak mit Zusätzen (BAT 4)	0,20	0,85
Rekonstituierter Tabak Frankreich (PM 11)	n.n.	-
Rekonstituierter Tabak Brasilien (PM 12)	<i>0,038</i>	0,16
Referenzzigarette 2R4F	<i>0,025</i>	0,11
Yesmoke	n.n.	-

Wie aus Tabelle 49 zu entnehmen ist, enthalten sieben der zehn untersuchten Tabakmischungen Theobromin, wobei die Konzentrationen in den expandierten Tabakmischungen und in dem brasilianischen rekonstituierten Tabak sehr klein sind.

Die mittlere Theobrominkonzentration in den behandelten Tabaken liegt etwas unterhalb der in den Schweizer Zigaretten ermittelten (0,076 mg/g in Tabaken, 0,10 mg/g in Zigaretten). Die höchsten Kakaozusätze sind in den Tabakmischungen mit Zusätzen von Philip Morris vorhanden.

In zwei der drei untersuchten rekonstituierten Tabake wurde Theobromin als Marker für Kakao nachgewiesen, wobei in der Probe BAT 4 der mit Abstand höchste Theobromingehalt vorkam.

Erstaunlicherweise enthielt auch die ansonsten zusatzstofffreie Referenzzigarette 2R4F eine Spur Theobromin.

Insgesamt sind in den Rohtabaken die Konzentrationsunterschiede an Theobromin größer als bei Glycyrrhizin.

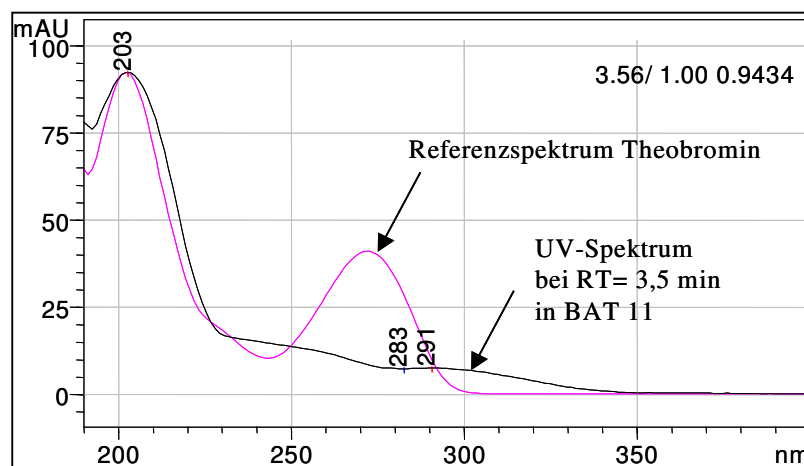


Abbildung 23: Vergleich des UV-Spektrums des Matrix-Peaks in BAT 11 (Theobromin negativ) mit dem Theobromin-Referenzspektrum (SI= 0,943)

4.5.2.5 Vergleich von Zigaretten und Rohtabaken

Tabelle 50 gibt einen Gesamtüberblick über die nachgewiesenen Mengen an Theobromin in Zigaretten und Tabakproben mit Zusätzen. Es ist jeweils die mittlere Konzentration und darunter der Konzentrationsbereich von Theobromin angegeben. Die mittlere Spalte gibt den Gehalt an Kakaopulver an, wenn man von einer mittleren Theobrominkonzentration im Kakaopulver von 2,3% ausgeht. Unter QNE (=Quantity Not Exceeded) versteht man die in Zigaretten nicht überschrittene Menge an Kakaopulver, die von einigen Herstellern angegeben wird [2-11].

Die in Zigaretten festgestellten Theobrominkonzentrationen weisen ähnlich große Konzentrationsbereiche auf wie in den Tabakproben, die mittlere Konzentration ist jedoch etwas kleiner.

Aus Tabelle 50 geht weiterhin hervor, dass die ermittelten Kakaopulveranteile in Zigaretten innerhalb der von der Industrie angegebenen Maximalwerte liegen.

Tabelle 50. Gesamtüberblick über Theobromin- und Kakaopulvergehalte in Zigaretten und Tabaken

	Theobromin [mg/g]	Kakaopulver [%] (2,3 % Theobromin)	QNE [2-11] [%]
32 Schweizer Zigaretten	0,10 (0,02-0,3)	0,45 (0,06-1,2)	0,02-2
6 Tabake mit Zusätzen	0,076 (0,026-0,2)	0,3 (0,1-0,9)	
2R4F	Spur (0,025)	0,09	

QNE= Quantity Not Exceeded

4.5.3 Nachweis von Pfefferminzöl

4.5.3.1 Auswahl der Markersubstanzen und Optimierung der Methode

Die Zigarettenindustrie gibt an, Zigaretten max. 0,1% Pfefferminzöl zuzusetzen (vgl. Tabelle 1, Abschnitt 2.1.1).

Da die Inhaltsstoffe des Pfefferminzöls nicht spezifisch sind, kann aus dem Nachweis einer einzelnen Substanz nicht auf den Zusatz von Pfefferminzöl geschlossen werden. Das Verwenden eines einzigen Markers wäre also nicht sinnvoll. Ziel war der Nachweis mehrerer Inhaltsstoffe, deren gemeinsames Auftreten eine Aussage über die Präsenz von Pfefferminzöl zulässt. Zu diesem Zweck wurden neben Menthol zusätzlich Neomenthol, Menthofuran, Menthon, Isomenthon, Pulegon, Menthylacetat sowie Limonen und 1,8-Cineol als Markersubstanzen für Pfefferminzöl festgelegt. Eine besondere Stellung nimmt Menthol als Hauptkomponente des Pfefferminzöls ein, da es auch Nicht-Menthol-Zigaretten häufig zugesetzt wird. Ein positiver Befund kann daher nicht als Gegenwart von Pfefferminzöl interpretiert werden. Man kann nur im Umkehrschluss aus der Abwesenheit von Menthol einen Zusatz von Pfefferminzöl ausschließen.

Einige Inhaltsstoffe von Pfefferminzöl wie z.B. Pulegon, Carvon, Menthofuran und Limonen besitzen Chromophore, so dass sie UV-Spektren liefern und mittels HPLC-DAD nachweisbar wären. Die Lösungen der Reinsubstanzen ergaben auch gute Peaks mit den entsprechenden UV-Spektren. Nach Injektion einer Lösung von 0,2 µg bzw. 1 µg Pfefferminzöl konnten jedoch keine Peaks im entsprechenden Chromatogramm nachgewiesen werden. Das gleiche negative Ergebnis ergab sich nach Extraktion und Messung von sechs Mentholzigaretten. Offensichtlich liegen die UV-absorbierenden Bestandteile in zu geringer Konzentration vor.

Da Pfefferminzöl ein ätherisches Öl mit intensivem Geruch ist, und demnach eine Vielzahl flüchtiger Stoffe enthält, erwies sich die Analyse mit der HS-SPME /GC-MS als besser geeignet. Diese Annahme wurde durch ein Literaturstudium bestätigt [53; 54].

Um einen Überblick über die nachweisbaren Substanzen zu gewinnen, wurde zunächst eine Lösung von Pfefferminzöl mit der bereits bestehenden HS-SPME/GC-MS-Methode im Scan-Modus gemessen. Ein typisches Chromatogramm von Pfefferminzöl ist in Abb. 24 dargestellt.

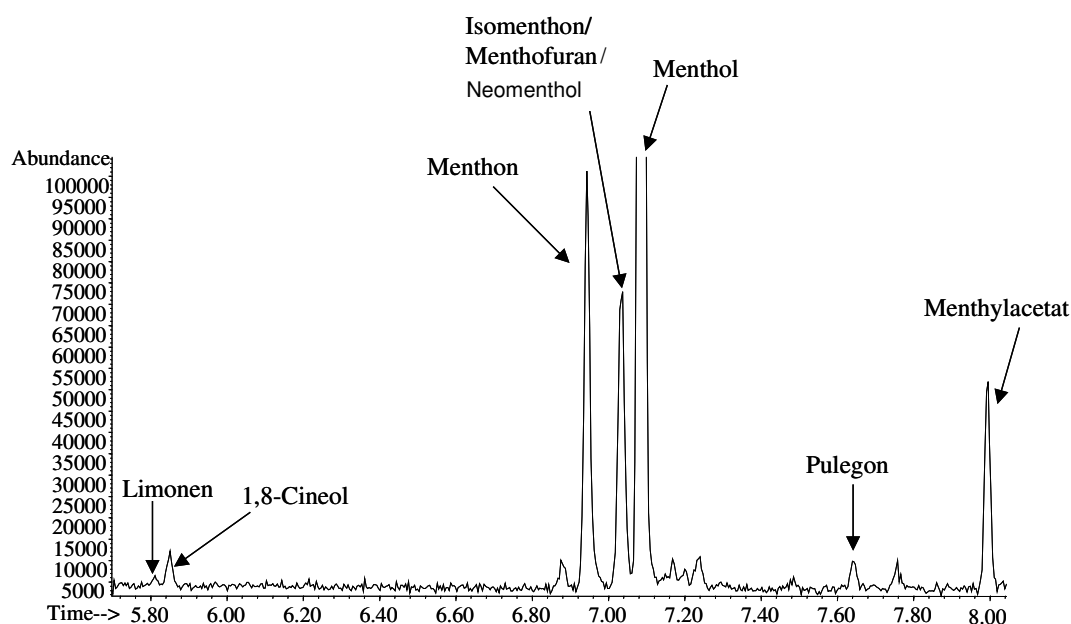


Abbildung 24: Chromatogramm von Pfefferminzöl im Scan-Modus

Es konnten insgesamt acht Substanzen zugeordnet und ihre Identität zusätzlich mit Vergleichssubstanzen bestätigt werden. Diese Verbindungen wurden in die SIM-Methode zur Prüfung auf Pfefferminzöl einbezogen.

Bei der Auswertung wurde festgestellt, dass sich bei 7,03 min drei Peaks überlagern. Die rechte Flanke des Peaks konnte eindeutig als Isomenthon identifiziert werden. Die linke Peakseite ist Menthofuran und Neomenthol zuzuordnen, die sich nicht voneinander trennen lassen und nur anhand der unterschiedlichen Massenfragmente im SIM-Modus eindeutig zu unterscheiden sind (siehe Tabelle 51).

Tabelle 51: Parameter der SIM-Methode zum Nachweis einiger Pfefferminzölkomponenten

Substanz	Detektierte Massenspuren	Retentionszeit / min	Zeitfenster / min
Limonen	136 121 93	5,80	5,6 – 6,6
1,8-Cineol	154 139 108	5,85	5,6 – 6,6
Menthon	154 139 112	6,94	6,6 – 7,3
Isomenthon	154 139 112	7,03	6,6 – 7,3
Menthofuran	150 108 79	7,03	6,6 – 7,3
Neomenthol	138 123 95	7,03	6,6 – 7,3
Menthol	138 123 95	7,08	6,6 – 7,3
Pulegon	152 137 109	7,64	7,3 – 8,2
Menthylacetat	138 123 95	7,99	7,3 – 8,2

Die Aufarbeitung der Zigarettenproben erfolgte wie im qualitativen Screening-Verfahren (neutrale Aufarbeitung), da unter diesen Bedingungen die Analyten mit ausreichender Empfindlichkeit detektiert werden konnten. Auch das Temperaturprogramm des Gaschromatographen sowie die Extraktionsbedingungen in der HS-SPME erwiesen sich als geeignet und konnten deshalb übernommen werden. Lediglich die Retentionszeiten und die charakteristischen Massenspuren der Einzelkomponenten des Öls mussten für die Erstellung einer SIM-Methode optimiert werden (siehe Tab. 51).

Nach dem Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit den Spektren der Wiley-Spektrenbibliothek konnten die Peaks eindeutig identifiziert und die drei Hauptmassenspuren für jede Substanz festgelegt werden. In Abb. 25 ist das Massenspektrum des Peaks bei 6,947 min aus dem Pfefferminzöl-Chromatogramm dem Referenzspektrum von Menthon aus der Wiley-Spektrenbibliothek gegenübergestellt. Die Übereinstimmung der Spektren beträgt 98%.

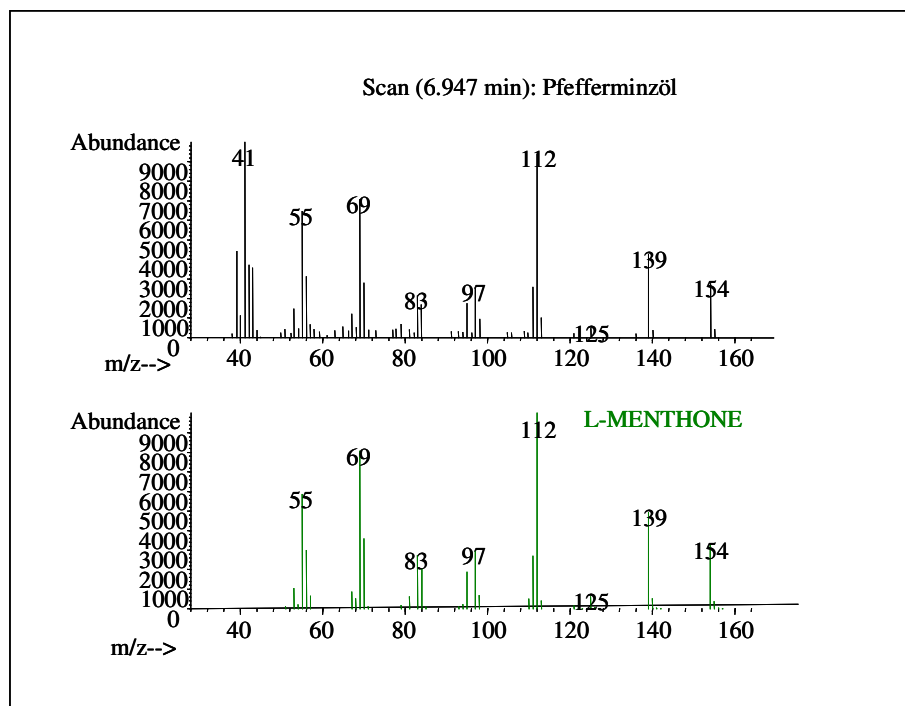


Abbildung 25: Vergleich der Massenspektren von Menthon in Pfefferminzöl (oben) und in der Wiley-Spektrenbibliothek (unten), Übereinstimmung 98%

Bei kleineren Substanzmengen, wie z.B. bei 1,8-Cineol und Limonen, war die Identifizierung anhand des Massenspektrums weniger eindeutig. So beträgt die Übereinstimmung des in Abb. 26 dargestellten Spektrums von 1,8-Cineol mit dem Bibliotheksspektrum nur 81 %. Nach Messung der Vergleichssubstanz konnte dann durch Übereinstimmung der Retentionszeit jedoch eine eindeutige Zuordnung erfolgen.

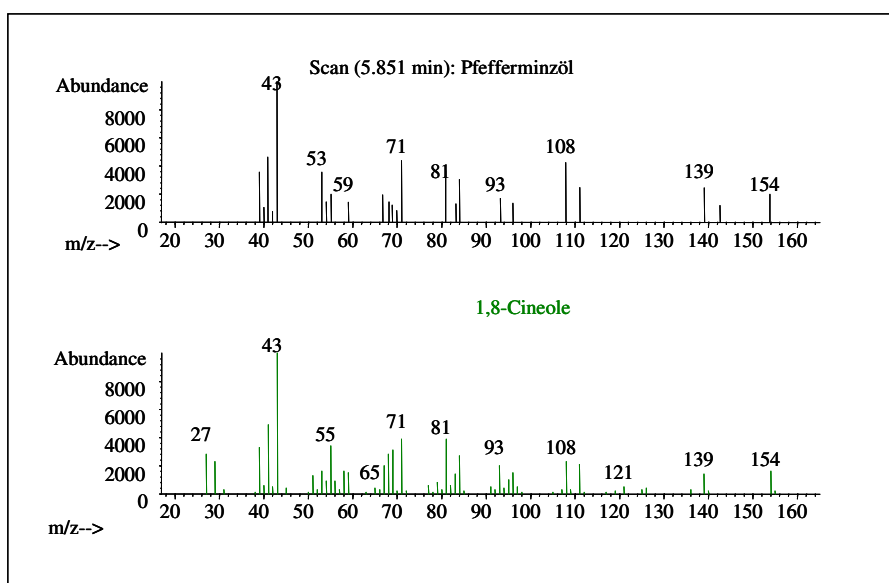


Abbildung 26: Vergleich der Massenspektren von 1,8-Cineol in Pfefferminzöl (oben) und in der Wiley-Spektrenbibliothek (unten), Übereinstimmung 81%

Für die SIM-Methode wurden bei allen Substanzen Massenspuren mit möglichst großem Masse-Ladungs-Verhältnis ausgewählt, um hohe Empfindlichkeit und Spezifität zu erreichen.

4.5.3.2 Nachweis von Pfefferminzöl in Zigaretten

Insgesamt wurden 27 Zigarettenmarken auf die Anwesenheit von Pfefferminzöl untersucht. Hierzu wurden Zigaretten ausgewählt, von denen aus den vorangegangenen Analysen ein hoher Mentholgehalt bekannt war, da hier die Wahrscheinlichkeit des Pfefferminzölsatzes am höchsten war. Darunter befanden sich 18 Menthol-Zigaretten aus insgesamt fünf verschiedenen Herkunftsorten sowie sieben Schweizer Nicht-Menthol-Zigaretten. Zwei Zigarettenmarken mit besonders niedrigem Mentholgehalt (Yesmoke (Schweiz) und 19 „lights“ (Belgien)) dienten als Referenz.

Die Tabaksorten wurden in diese Untersuchung nicht mit einbezogen, da hier nur in zwei Proben geringe Spuren an Menthol nachgewiesen wurden und somit der Zusatz von Pfefferminzöl unwahrscheinlich ist.

Tabelle 52 bietet eine Übersicht der in Zigaretten identifizierten Pfefferminzölbestandteile:

In Zigaretten eindeutig identifiziert wurden: Menthol, Neomenthol, Menthon, Isomenthon, Pulegon und Menthylacetat. Limonen, 1,8-Cineol und Menthofuran konnte in keiner der untersuchten Zigaretten nachgewiesen werden. Da deren Gehalt im Pfefferminzöl schon sehr niedrig ist, kann der Nachweis in Zigaretten aufgrund des noch geringeren Anteils in den Zigaretten negativ ausfallen. Menthol wurde in allen mit dieser Methode untersuchten Zigarettenmarken gefunden, eine Spur auch in den zusatzstofffreien Yesmoke-Zigaretten.

Die übrigen Marker des Pfefferminzöls konnten ausschließlich in den Menthol-Zigaretten nachgewiesen werden. Neben Menthol wurden mindestens drei, oft sogar fünf weitere Substanzen pro Menthol-Zigarette nachgewiesen. Es ist zu erkennen, dass alle Mentholzigaretten neben Menthol zusätzlich mindestens Menthon und Menthylacetat enthalten. Das Vorkommen der weiteren Pfefferminzölbestandteile ist je nach Sorte unterschiedlich. Das gleichzeitige Auftreten von mindestens vier dieser Substanzen wurde als Indiz angesehen, dass deren Quelle Pfefferminzöl ist.

Aus den vorangegangenen quantitativen Analysen ging hervor, dass sieben der 32 untersuchten Schweizer Zigarettenmarken relativ hohe Mengen Menthol enthalten. Wie aus Tabelle 52 hervorgeht, konnte in diesen Marken jedoch kein weiterer Bestandteil aus Pfefferminzöl nachgewiesen werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass diesen Nicht-Menthol-Zigaretten auch kein Pfefferminzöl, sondern nur Menthol zugesetzt worden ist.

Abb. 27 zeigt einen Vergleich der Chromatogramme von D3 (Deutschland) mit einer Nicht-Menthol-Zigarette, die besonders viel Menthol enthielt (S24 „extra“ (Schweiz)) und der zusatzstofffreien Zigarette Yesmoke (Schweiz).

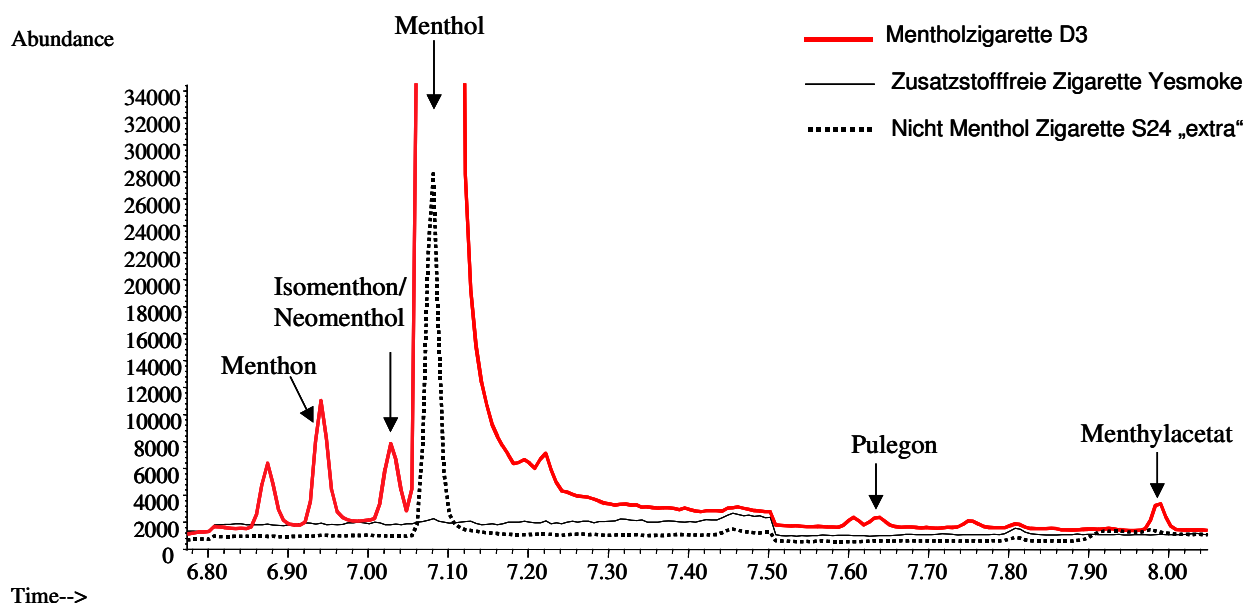


Abbildung 27: Vergleich der Chromatogramme von D3 Menthol (Dtl.), Yesmoke (Schweiz) und S24 „extra“ (Schweiz) im SIM-Modus.

In Abbildung 27 ist eindeutig zu erkennen, dass nur in der Mentholzigarette Neomenthon, Menthon, Isomenthon, Pulegon und Menthylacetat vorkommen. Die stark mentholhaltige S24 „extra“ enthält ausschließlich Menthol und in der zusatzstofffreien Yesmoke Zigarette ist lediglich eine Spur Menthol erkennbar.

Die in Tabelle 52 vorgenommene Abschätzung von hohem oder niedrigem Gehalt beruht ausschließlich auf einem Vergleich der Peakflächen. Eine quantitative Analyse der einzelnen Pfefferminzöl-Bestandteile wurde nicht durchgeführt und ist aus unserer Sicht auch nicht sinnvoll, da der Gehalt der Einzelkomponenten je nach verwendetem Öl so stark schwankt, dass nur Näherungswerte angegeben werden könnten. Hinzu kommt, dass die stark flüchtigen Bestandteile des Öls während der Lagerung unterschiedlich stark verdampfen und die Konzentrationen teilweise zu gering ausfallen würden. Demnach würde der Gehalt an Pfefferminzöl ebenfalls zu gering berechnet werden. Das Fehlen einiger Substanzen in den untersuchten Zigaretten kann daher auch durch Verdampfen aufgrund deren Flüchtigkeit bedingt sein.

Tabelle 52. Qualitativer Nachweis von Pfefferminzölbestandteilen in Zigaretten
(xxx= hoher Gehalt, x= niedriger Gehalt/Spuren)

Mentholzigaretten	Herkunft	Limonen	1,8-Cineol	Menthon	Isomenthon	Menthofuran	Menthol	Neomenthol	Pulegon	Menthylacetat
A	Dtl	-	-	x	x	-	xxx	Spur	x	x
D3	Dtl	-	-	xxx	xxx	-	xxx	x	x	x
C	Tschechien	-	-	x	-	-	xxx	-	x	x
S05 "Menthol"	Schweiz	-	-	x	-	-	xxx	x	x	x
C	Washington	-	-	x	x	-	xxx	x	x	x
D	Washington	-	-	x	-	-	xxx	x	-	x
E	Washington	-	-	x	-	-	xxx	x	-	x
F	Washington	-	-	xxx	xxx	-	xxx	Spur	-	xxx
G	Washington	-	-	x	-	-	xxx	x	x	x
H	Washington	-	-	x	-	-	xxx	x	-	x
I	Washington	-	-	xxx	xxx	-	xxx	x	xxx	x
J	Washington	-	-	xxx	x	-	xxx	xx	xxx	xxx
K	Washington	-	-	x	x	-	xxx	xx	x	x
L	Washington	-	-	x	x	-	xxx	xx	x	x
M	Washington	-	-	x	x	-	xxx	x	-	x
N	Chicago	-	-	x	x	-	xxx	x	x	x
O	Chicago	-	-	x	x	-	xxx	x	-	x
P	Chicago	-	-	x	x	-	xxx	x	-	x
Nicht-Mentholzigaretten (niedriger Menthol-Gehalt)										
Yesmoke	Schweiz	-	-	-	-	-	x	-	-	-
S19 "lights"	Belgien	-	-	-	-	-	x	-	-	-
Nicht-Mentholzigaretten (hoher Menthol-Gehalt)										
S06	Schweiz	-	-	-	-	-	xxx	-	-	-
S08 "Vanille"	Schweiz	-	-	-	-	-	xxx	-	-	-
S13 "lights"	Schweiz	-	-	-	-	-	xxx	-	-	-
S24 "extra"	Schweiz	-	-	-	-	-	xxx	-	-	-
S25 "mild"	Schweiz	-	-	-	-	-	xxx	-	-	-
S29	Schweiz	-	-	-	-	-	xxx	-	-	-
S31 "ultra lights"	Schweiz	-	-	-	-	-	xxx	-	-	-

4.6 Bedeutung der nachgewiesenen 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. Auf wichtige Gefahren und pharmakologische Wirkungen einzelner Zusatzstoffe wurde im Abschlussbericht des vorherigen Projektes bereits ausführlich hingewiesen und sollen hier nicht wiederholt werden. Lediglich deren Bedeutung für die Verwendung in Zigaretten und die üblichen Konzentrationen (nach Angaben der Zigarettenindustrie [2-11]) sollen in dem folgenden Abschnitt kurz dargestellt werden.

Propylenglycol und Glycerol dienen zur Feuchthaltung des Tabaks, indem sie dessen Kapazität zur Feuchthaltung erhöhen. Propylenglycol mit einer maximalen Konzentration von 18,9 - 47,2 mg/g pro Zigarette kann jedoch bei der Pyrolyse Propylenoxid bilden, welches ein Kanzerogen ist. Glycerol bildet beim Verbrennen Acrolein und Acetaldehyd.

N-Propyl-p-hydroxybenzoat ist ein aus der Pharmazie bekanntes Konservierungsmittel und wird in Konzentrationen von 100 - 2000 µg/g in Zigaretten eingesetzt. Das Natriumsalz von **o-Phenylphenol** wird als technisches Konservierungsmittel und als Desinfektionsmittel für Seifen, sowie in Citrusfrüchten als fungistatisches Konservierungsmittel zugesetzt [22]. In den Listen der Zigarettenindustrie sind keine Angaben über dessen Verwendung und üblichen Konzentrationen in Zigaretten gefunden worden.

Surfynol® (=2,4,7,9-Tetramethyl-5-decin-4,7-diol) wurde in sieben der 32 Schweizer Zigarettenmarken nachgewiesen. Es gehört in die Gruppe der oberflächenaktiven, nicht schäumenden, stark netzenden Verbindungen [22] und findet auch zum Teil Anwendung als Feuchthaltemittel. Auch hierüber konnten in Dokumenten der Zigarettenindustrie keine Angaben gefunden werden.

Triacetin wurde in 29 der 32 Schweizer Sorten identifiziert und wird in Konzentrationen von 0,2- 20 000 µg/g in Zigaretten verwendet. Laut Literatur ist es neben Glyceroldiacetat als Lösungsmittel in der Aromenindustrie zugelassen [22] und ist ein synthetisches Produkt, was in der Natur nicht vorkommt [22]. Philip Morris Schweiz gibt an, Triacetin nur als Hilfsstoff in Zigarettenfiltern zu verwenden.

Benzylbenzoat (max. 1 - 500 µg/g in Zigaretten) und **Methylsalicylat** (max. 2,5 µg/g in British American Tobacco Zigaretten, UK [3]) 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]. Methylsalicylat kann als Pyrolyseprodukt Phenol bilden [3; 8]. **Phenylethanol** (0,4-250 µg/g in Zigaretten [3]) 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 (5,3 - 20 µg/g in Zigaretten) ist ein Aromastoff, der angenehm fruchtig und erdbeerartig riecht. Er ist Hauptbestandteil des ätherischen Öls von Campherbasilikum und des Wurzelöls der Galgantwurzel [22]. In der Parfümerie dient Methylcinnamat als Nuanceur von blumigen und orientalischen Kompositionen und ist einsetzbar als Bestandteil von

Seifenparfums und Aromen [66]. 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. 0,2-100 µg/g in Zigaretten) mit dem Trivialnamen Kokosaldehyd wird zur Erzielung von Kokos- und Aprikosennoten verwendet [22].

γ-Undecalacton (Pfirsichaldehyd, max. 1-100 µg/g in Zigaretten) besitzt ein 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 [7; 8; 10; 11]. 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 Parfümerie und Aromenproduktion wird der aromatische Alkohol aufgrund seines guten Lösungsvermögens und dem unaufdringlichen Duft vorwiegend eingesetzt als Verdünnungs- und Lösungsmitteln [66]. Der Dufteindruck ist angenehm und etwas süßlich, jedoch nicht sehr intensiv. Der Stoff besitzt ein schwaches Mandelaroma, das sich bei Lagerung an der Luft verstärkt (Bildung von Benzaldehyd!) und einen scharfen, brennenden Geschmack [66]. Benzylalkohol ist durch Anlage 6 der deutschen Kosmetikverordnung in einer Konzentration bis zu 1% (bezogen auf das fertige Produkt) als Konservierungsstoff für kosmetische Mittel zugelassen [66]. In der Pharmazie findet es Anwendung als Lokalanästhetikum und zur Konservierung von Parenteralia (Applikationsform Injektion oder Infusion) [22].

Benzaldehyd gilt als bekannter Riechstoff und ist die typische und im Gehalt weit überwiegende Komponente von ätherischem Bittermandelöl [66]. Die bitteren Mandeln enthalten Benzaldehyd in Form von Amygdalin. Daneben ist der aromatische Aldehyd in zahlreichen anderen ätherischen Ölen (von Zimtrinde und -wurzel, Cassia, Patchouli, Makassarsamen usw.) enthalten, kann jedoch auch synthetisch hergestellt werden [66]. Benzaldehyd ist Ausgangsstoff für die Synthese zahlreicher aromatisch-aliphatischer Duft- und Aromastoffe und wird in der Lebensmitteltechnologie in Bittermandel-Aromen und als Geschmackskorrigens verwendet [66]. Benzaldehyd kann Kontaktallergien hervorrufen. Der Stoff ist gesundheitsschädlich beim Verschlucken [66]. In Zigaretten ist ein maximaler Gehalt von 1 ppm in Schweizer Philip Morris bzw. 60 ppm in British American Tobacco Produkten [3; 11] angegeben.

Für **Acetophenon** wird 1 ppm in Schweizer Philip Morris Zigaretten bzw. 45 ppm in British American Tobacco Produkten pro Zigarette [3; 11] als maximale Konzentration angegeben. Das Keton ist einerseits Bestandteil zahlreicher ätherischer Öle (z.B. Labdanum, Castereum, Cistus, *Stirlingia latifolia*) und natürlicher Aromen, andererseits auch enthalten im Steinkohlenteer [66]. Acetophenon ist aufgrund seiner reaktionsfähigen Struktur Ausgangsstoff zahlreicher Synthesen (Ausgangs- bzw. Zwischenprodukt für andere Duftstoffe und Pharmazeutika sowie Kunstharze), weiterhin einsetzbar als hochsiedendes Lösungsmittel (z.B. für Farben, Harze) [66]. Als Riechstoff-Komponente vorwiegend im technischen Bereich verwendet ("low-cost"-Einsatz: Seifen-, Detergentienparfümierung,

Haushalts- sowie Industrieprodukte). Acetophenon passt gut zu den Duftstoffen, Anisaldehyd, Terpeneol, Citral und Heliotropin sowie zu den ätherischen Ölen Bergamotte, Citronella und Labdanum. Der Reinstoff Acetophenon ist gesundheitsschädlich beim Verschlucken [66]. Er kann bei Einwirkung auf die ungeschützte Haut eine Dermatitis hervorrufen. Das Keton wirkt in höheren Konzentrationen hypnotisch (daher auch die Synonymbezeichnung *Hypnon*) [66]. Die Dämpfe erzeugen in einer Konzentration von 80 ppm (aufrechterhalten über die Zeit von 1 Stunde) starke Vergiftungserscheinungen [66].

3-Phenylpropanol (=Hydrozimmtalkohol) und seine Ester sind natürliche Duftkomponenten von Benzoe- und Styraxharz (Storaxbalsam), weiterhin ist die Verbindung enthalten in Perubalsam und im Hyazinthenduft (in letzterem sogar mit einem Anteil von 10-11%!). Auch im ätherischen Blätter- und Fruchtöl des "Rosenapfels", lat. *Syzygium jambos* (L.) ALST [66]. vorkommend. Hydrozimmtalkohol ist ein naturidentischer Duftstoff mit antimikrobiellen Eigenschaften. Zusammen mit dem Riechstoff Heliotropin ergibt er eine Mischung, die sich gut zur Haltbarmachung von kosmetischen Präparaten eignet ("Heliozimt") [66]. Laut British American Tobacco wird maximal 1 ppm zu Zigarette [3] zugesetzt. Für **Menthol** sind 5000 ppm in Schweizer Philip Morris Zigaretten [11] bzw. 6000 – 8000 ppm in Australischen Zigaretten [8; 10] und max. 20 000 ppm in British American Tobacco Produkten [3] 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** 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 µg/g festgelegt, die Gallaher Tobacco Group gibt als maximalen Gehalt in Zigaretten 10 µg/g an. Da Indol auch in allen Rohtabaken in ähnlichen Konzentrationen wie in Zigaretten bestimmt wurde, konnte es in keiner der untersuchten Zigaretten als Zusatzstoff nachgewiesen werden. 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 0,4-10 µg/g Carvacrol bzw. 0,2-1 µg/g Thymol zugesetzt.

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** wird in der Seifenherstellung, Parfümerie und als Glanzzusatz beim Verzinken, ferner als Lösemittel und Reagenz verwendet [22]. Der Duftstoff kommt zwar in der Natur vor, man kann ihn als Bestandteil ätherischer Öle aber immer nur in kleineren Anteilen finden. So ließ sich Heliotropin spurenweise im ätherischen Öl des Spierkrauts (Mädesüß), *Filipendula ulmaria* (L.) MAXIM. sowie in der Taiti-Vanille nachweisen, daneben im Akazienblütenöl von *Robinia pseudoacacia* L. (Leguminosae) und im Pfefferöl. Aufgrund des hohen Bedarfs wird der aromatische Aldehyd heute ausschließlich synthetisch hergestellt [66].

Die maximalen Konzentrationen in Zigaretten sind nach Herstellerangaben 5- 500 ppm.

Viele Phenylethylester sind Riech- und Aromastoffe. **Phenylethylacetat** besitzt z.B. einen frischen rosenartigen Duft [22] und ist Bestandteil einer Anzahl von ätherischen Ölen (z.B.

Pandanusöl) sowie Aromakomponente zahlreicher Früchte und alkoholischer Getränke, kann jedoch auch synthetisch durch Veresterung von Phenylethylalkohol mit Essigsäure hergestellt werden [66]. Der Parfumeur nutzt diesen aromatischen Ester zur geruchlichen Abwandlung bzw. Abrundung von Phenyl-ethylalkohol, so beispielsweise in Rosen-, Gardenia- und Fliederkompositionen [66]. Phenylethylacetat wird zu Zigaretten in den maximalen Konzentrationen von 1 –100 µg/g zugesetzt.

6-Methylcumarin (=Toncarin), was in S08 „Vanille“ Zigaretten 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: 28,1-4400 µg/g; Ethylvanillin: 1-2400 µg/g.

Bestimmte Substanzen, die in Zigaretten identifiziert wurden, sind auch typische Bestandteile in aromatisierten Lebensmitteln. So wurde in verschiedenen Schokoladenproben z.B. Benzaldehyd, Benzylalkohol, Phenylethanol, Ethylvanillin und Vanillin mittels HS-SPME / GC-MS nachgewiesen [67]. In untersuchten Zimtproben kamen ebenfalls Benzaldehyd und typische Komponenten von anderen ätherischen Ölen, wie 1,8-Cineol, Linalool, Caryophyllen oder Camphen vor [67]. Triacetin wurde erstaunlicherweise in dieser Arbeit in Ingwer- und Pfirsichproben nachgewiesen [67]. Furfural, 2,6-Dimethylpyrazin, Benzaldehyd und Benzylalkohol traten in Caramelproben auf [67]. Das heißt, dass einzelne Additive auch aus solchen Gemischen stammen können und nicht zwangsläufig als Einzelsubstanz zugesetzt worden sein müssen. Dies beweist einmal mehr, dass es unbedingt erforderlich ist, die genaue Zusammensetzung von Zusatzstoffgemischen zu kennen.

4.7 Konformität mit der Tabakverordnung der Schweiz

Im Abschnitt 3, Art. 6 der Tabakverordnung des Schweizerischen Bundesrates vom 27.10.2004 [68] ist aufgeführt, welche Stoffe in welcher Menge zur Herstellung von Tabakerzeugnissen ohne Bewilligung in Tabakerzeugnissen enthalten sein dürfen. Hierbei wird unterteilt in

- a. Geschmackgebende Zutaten (1. Aromen (nach Anhang 6 Ziffer 24 ZuV vom 27.03.2002), 2. Folia liatris, 3. Zuckerarten, Honig und Gewürze und 4. Süßungsmittel (nach Anhang 1 Abschnitt c Ziffer 1 ZuV)), gesamthaft bis zu 15 Massenprozent
- b. Feuchthaltemittel, gesamthaft bis zu 10 Massenprozent
- c. Weissbrand- und Flottbrandmittel
- d. Konservierungsmittel
- e. Klebe- und Bindemittel

Unter b.) Feuchthaltemittel sind in der Verordnung die einzelnen zugelassenen Substanzen aufgeführt. Dies sind: Glycerin, Sorbit, 1,2-Propylenglycol, 1,3-Butylenglycol, Triethylenglycol, Ortho-Phosphorsäure und alpha-Glycerinphosphorsäure sowie deren Natrium-, Kalium-, Calcium- und Magnesiumsalze. Auch zu den Konservierungsmitteln findet man eine Auflistung konkreter Substanzen, deren Zusatz in Zigaretten erlaubt ist:

Benzoessäure und deren Natrium-, Kalium- und Calciumsalze, Sorbinsäure und deren Natrium-, Kalium- und Calciumsalze je bis zu 3 g pro kg, p-Hydroxybenzoessäureethylester und -propylester und ihre Natriumsalze je bis zu 1 g pro kg.

Die eindeutig im qualitativen Screening der Zigaretten identifizierten Stoffe Benzylbenzoat, Triacetin, o-Phenylphenol und Surfynol® (=Acetylen glycol) können keiner dieser Gruppen eindeutig zugeordnet werden. Benzylbenzoat ist in den Zusatzstofflisten der Zigarettenindustrie [2-11] als „Flavour“ deklariert, obwohl es in der Literatur als Lösemittel für Riechstoffe und Cellulosederivate, Weichmacher, Fixateur in der Parfümerie und als Krätze- und Entlausungsmittel beschrieben ist [22] (Vgl. hierzu Abschnitt 4.6). Auch in den entsprechenden Anhängen der Tabakverordnung ist Benzylbenzoat nicht aufgeführt. Triacetin, verwendet als Lösemittel in der Geruchsstoffindustrie, wird nur von der Gallaher Tobacco Group [9] als „Flavour“ in Zigarettenprodukten aufgelistet, alle anderen führen diesen Stoff nur als Zusatz in Zigarettenfiltern auf. Eine Migration von Triacetin aus dem Filter in den Tabak ist nicht ausgeschlossen, jedoch wurden auch geringe Mengen von dieser Substanz in rekonstituierten Tabaken (BAT 4, PM 12) gefunden, was diese Theorie widerlegen würde. Zu o-Phenylphenol wurden keine Angaben in den Listen der Zigarettenindustrie gefunden. Da es als technisches Konservierungsmittel und Desinfektionsmittel für Seifen und in Citrusfrüchten Anwendung findet, müsste es in der Tabakverordnung unter Artikel 6d aufgeführt sein. Weder dort noch in den entsprechenden Anhängen zu den geschmackgebenden Substanzen ist o-Phenylphenol genannt. Gleiches gilt für das Warenzeichen Surfynol® von Air Products, das für eine Gruppe von oberflächenaktiven, nichtschäumenden, stark netzenden Acetylenalkoholen oder -glykolen oder deren Ethoxylaten steht. Weder in den Listen der Zigarettenindustrie, noch in der Tabakverordnung finden sich Angaben zu dieser Substanz.

5 Schlussfolgerungen

Aus den bisher erfolgten Untersuchungen können die Schlussfolgerungen des 1. Abschlussberichtes ([1], S. 109-110) weitestgehend übernommen werden. Folgende neue, ergänzende Schlussfolgerungen ergeben sich aus den erweiterten Untersuchungen dieses Projektes:

Die HS-SPME/GC-MS-Methode kann auch zur Quantifizierung weiterer leicht- und mittelflüchtiger Zusatzstoffe, wie z.B. Vanillin, Ethylvanillin, Propylenglycol und n-Propyl-p-hydroxybenzoat konnten mit der HS-SPME/GC-MS-Methode eingesetzt werden.

Für die gezielte Untersuchung von Zigaretten auf die Anwesenheit von Ammoniumsalzen können sowohl die NH₃-selektive Elektrode als auch die neu erprobte photometrische Nachweismethode zuverlässig eingesetzt werden.

Zum Nachweis von Harnstoff zu Zigaretten ist die in diesem Projekt eingesetzte enzymatisch-photometrische Nachweismethode besser geeignet als die auf der ionenselektiven Elektrode beruhende Methode.

Es wurden Methoden für drei komplexe Zusatzstoffgemische (Lakritze, Kakao und Pfefferminzöl) entwickelt und auf die Zigaretten angewendet.

Eine Aufstockung von Zigaretten mit natürlich im Tabak vorhandenen Substanzen (wie 2-Ethyl-1-hexanol, Benzylalkohol, Menthol) konnte durch vergleichende Analysen von insgesamt 30 Rohtabaken und Tabakmischungen bewiesen werden.

Die Konzentrationen von Nikotin und seinen Nebenalkaloiden in Zigaretten sind den in den untersuchten Rohtabaken und Tabakmischungen sehr ähnlich.

Ein Zusatz von Ammoniumsalzen zu Zigaretten, der über die Schwankungsbreite von natürlichen Gehalten in Rohtabaken hinaus geht, konnte nicht nachgewiesen werden.

Ein Zusatz von Harnstoff zu den untersuchten Zigaretten konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

In einigen vorbehandelten Tabakmischungen sind bereits Zusatzstoffe wie Propylenglycol, Triacetin, n-Propyl-p-hydroxybenzoat enthalten.

Abschließend können alle Empfehlungen, die im Abschlussbericht des 1. Projektes gegeben wurden ([1], S. 111) nach den Untersuchungen dieses Projektes aufrechterhalten werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Merckel, C. and Pragst, F., "Abschlussbericht Projekt Tabakzusatzstoffe," Vertrag-Nr.: 02.001151/2.26.02.-39, Aug. 2005.
2. British American Tobacco UK; Composite list of tobacco ingredients (Domestic cigarettes and UK travel rate). www.BAT-ingredients.com. 20-2-2006.
3. British American Tobacco Switzerland, Composite list of tobacco ingredients (Switzerland domestic cigarettes). www.BAT-ingredients.com. 20-2-2006.
4. Philip Morris International, "What's in Philip Morris brands sold in Australia", Reporting Period March 1st, 2003 to March 1st, 2004. 17-2-2006.
5. Philip Morris International "What's in Philip Morris brands sold in Switzerland" www.philipmorrisinternational.com. 17-2-2006.
6. Philip Morris International "What's in Philip Morris brands sold in Germany" www.philipmorrisinternational.com. 17-2-2006.
7. 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, 2004, pp. 53-83.
8. British American Tobacco Australia, "Composite List of Tobacco Ingredients," Reporting Period Dec. 2000 to Mar. 2001, July 2001.
9. Gallaher Tobacco Group. Ingredients added to tobacco (cigarette products); www.gallaher-group.com. 2005.
10. Philip Morris LTD, "Australia Ingredients Report - Composite List of Tobacco Ingredients," Reporting Period Dec. 2000 to Mar. 2001, Dec. 2000.
11. Philip Morris Switzerland, "Composite List of Ingredients Added to Tobacco of Philip Morris Tobacco Products Manufactured for Sale in Switzerland," 2003.
12. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., and Strake, K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer Verlag, München/Jena, 2001.
13. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) Deutschland "BgVV rät zur Vorsicht beim Verzehr von Lakritze." www.bgvv.de/cms5w/sixcms/detail.php/861. 4-10-2005.
14. Lehtihet, M. and Nygren, A., "[Licorice--an old drug and currently a candy with metabolic effects]," *Lakartidningen*, Vol. 97, No. 36, 2000, pp. 3892-3894.
15. Olukoga, A. and Donaldson, D., "Licorice and its health implications," *J.R.Soc.Health*, Vol. 120, No. 2, 2000, pp. 83-89.
16. Philip Morris USA Product Integrity, "Evaluation of Licorice Extrakt for Use as Cigarette Ingredient," Appendix 1 Review of Ingredients, Nov. 2002, Nov. 2002.
17. Hornburg, Arne "Schokolade und Kakao" <http://www.theobroma-cacao.de>. 5-10-2005.
18. RJ Reynolds Tobacco: Fix, R. J. and Jordan, F. D.. Indirect analysis of Cocoa in tobacco products via the determination of theobromine www.rjrtdocs.com. 14-2-1990.
19. Philip Morris USA Product Integrity, "Evaluation of Cocoa for Use as a Cigarette Ingredient," Appendix 1 Review of Ingredients, Nov. 2002.
20. 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.
21. Melzig, M. F., Putscher, I., Henklein, P., and Haber, H., "In vitro pharmacological activity of the tetrahydroisoquinoline salsolinol present in products from Theobroma cacao L. like coca and chocolate," *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 73, 2000, pp. 153-159.
22. Neumüller, O.-A., *Römpps Chemie Lexikon 1-6*, Frankh'sche Verlagshandlung, W.Keller & Co., Stuttgart 1988.
23. Europäisches Arzneibuch (Ph. Eur. 4), Monographie: Pfefferminzöl. 4. Ausgabe, Grundwerk 2002. 2002. Stuttgart, Deutscher Apotheker Verlag.

24. Aflatuni, A.. The yield and essential oil content of mint (*mentha* ssp.) in northern Ostrobothnia. 10-6-2005. Faculty of Science, University of Oulu, Department of Biology, Finland, Oulu University Press.
25. 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.
26. 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.
27. Putalun, W., Tanaka, H., and Shoyama, Y., "Rapid detection of glycyrrhizin by immunochromatographic assay," *Phytochemical Analysis*, Vol. 16, No. 5, 2005, pp. 370-374.
28. Wang, L., He, Y., and Qiu, Z., "Determination of glycyrrhizic acid in glycyrrhiza uralensis fisch by fiber optic near infrared spectroscopy," *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, Vol. 25, No. 9, 2005, pp. 1397-1399.
29. Yuan, X., Koh, H., and Chui, W., "A high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of arctiin, chlorogenic acid and glycyrrhizin in a Chinese proprietary medicine," *J Pharm Biomed Anal*, Vol. 39, No. 3-4, 2005, pp. 697-704.
30. Sabbioni, C., Mandrioli, R., and Ferranti, A., "Separation and analysis of glycyrrhizin, 18beta-glycyrrhetic acid and 18alpha-glycyrrhetic acid in liquorice roots by means of capillary zone electrophoresis," *J Chromatogr A*, Vol. 1081, No. 1, 2005, pp. 65-71.
31. Zhongping, J. L., Sheng-Xiang, Q., and Aisya, W., "Simultaneous determination of glycyrrhizin, a marker component in radix Glycyrrhizae, and its major metabolite glycyrrhetic acid in human plasma by LC-MS/MS," *J Chromatogr B*, Vol. 814, No. 2005, 2004, pp. 201-207.
32. Raggi, M. A., Bugamelli, F., Nobile, L., Curcelli, V., Mandrioli, R., Rossetti, A., and Cantelli, F. G., "[The choleric effects of licorice: identification and determination of the pharmacologically active components of Glycyrrhiza glabra]," *Boll.Chim.Farm.*, Vol. 134, No. 11, 1995, pp. 634-638.
33. Ding, L., Huang, X., and Yang, J., "Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by LC-ESI-MS," *J Pharm Biomed Anal*, Vol. 40, No. 3, 2006, pp. 758-762.
34. Kitagawa, I., Chen, W. Z., Taniyama, T., Harada, E., Hori, K., Kobayashi, M., and Ren, J., "[Quantitative determination of constituents in various licorice roots by means of high performance liquid chromatography]," *Yakugaku Zasshi*, Vol. 118, No. 11, 1998, pp. 519-528.
35. Hatano, T., Yasuhara, T., Fukuda, T., Noro, T., and Okuda, T., "Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase," *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)*, Vol. 37, No. 11, 1989, pp. 3005-3009.
36. Hatano, T., Fukuda, T., Liu, Y. Z., Noro, T., and Okuda, T., "[Phenolic constituents of licorice. IV. Correlation of phenolic constituents and licorice specimens from various sources, and inhibitory effects of licorice extracts on xanthine oxidase and monoamine oxidase]," *Yakugaku Zasshi*, Vol. 111, No. 6, 1991, pp. 311-321.
37. Wang, L., He, Y., and Qiu, Z., "Determination of glycyrrhizic acid in glycyrrhiza uralensis fisch by fiber optic near infrared spectroscopy," *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, Vol. 25, No. 9, 2005, pp. 1397-1399.
38. RJReynolds Tobacco: Schumacher, J. N., Cloby, D. A., and Shelar, G. R., "A literature study of licorice," 10, Mar. 1981.
39. Blanchard, J., Weber, C., and Shearer, L., "HPLC analysis of methylxanthines in human breast milk," *J Chromatogr Sci*, Vol. 28, No. 12, 1990, pp. 640-642.
40. Johnston, J. J., "Evaluation of cocoa- and coffee-derived methylxanthines as toxicants for the control of pest coyotes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 2005, pp. 4069-4075.
41. Dyke, T. M. and Sams, R. A., "Detection and determination of theobromine and caffeine in urine after administration of chocolate-coated peanuts to horses," *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 22, 1998, pp. 112-116.
42. Marchei, E., Pellegrini, M., and Pacifici, R., "Development and validation of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for methylxanthines and taurine

- in dietary supplements," *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis*, Vol. 37, No. 3, 2005, pp. 499-507.
43. Carlson, M. and Thompson, R., "Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guarana," *J AOAC Int.*, Vol. 81, No. 4, 1998, pp. 691-701.
 44. Bispo, M., Veloso, M., and Pinheiro, H., "Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography," *J Chromatogr Sci*, Vol. 40, No. 1, 2002, pp. 45-48.
 45. Scott, N., Chakraborty, J., and Marks, V., "Determination of caffeine, theophylline and theobromine in serum and saliva using high-performance liquid chromatography," *Ann Clin Biochem.*, Vol. 21, No. 2, 1984, pp. 120-124.
 46. Brown Thomas, J. and Yen, H. J. S. M. M., "Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Standard Material 2384, Baking Chocolate, using reversed-phase liquid chromatography," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, 2004, pp. 3259-3263.
 47. Zydron, M., Baranowski, J., and Baranowska, I., "Separation, pre-concentration and HPLC analysis of methylxanthines in urine samples," *J.Sep.Sci.*, Vol. 27, 2004, pp. 1166-1172.
 48. Banchio, E., Zygadlo, J., and Valladares, G. R., "Quantitative variations in the essential oil of *Mintostachys mollis* (Kunth.) Griseb. in response to insects with different feeding habits," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 2005, pp. 6903-6906.
 49. Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., and Polissiou, M. G., "Characterization of essential oils from lamiaceae species by Fourier Transform Raman Spectroscopy," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, 2002, pp. 5503-5507.
 50. Mori, M., Ikeda, N., and Kato, Y., "Quality evaluation of essential oils," *Yakugaku Zasshi*, Vol. 122, No. 3, 2001, pp. 253-261.
 51. Siano, F., Catalfamo, M., and Cautela, D., "Analysis of pulegone and its enantiomeric distribution in mint-flavoured food products," *Food Addit Contam.*, Vol. 22, No. 3, 2005, pp. 197-203.
 52. Kaffenberger, K. M. and Doyle, M. J., "Determination of menthol and menthol glucuronide in human urine by gas chromatography using an enzyme-sensitive internal standard and flame ionization detection," *J Chromatogr*, Vol. 527, No. 1, 1990, pp. 59-66.
 53. 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.
 54. Stanfill, S. B., Calafat, A. M., Brown, C. R., Polzin, G. M., Chiang, J. M., Watson, C. H., and Ashley, D. L., "Concentrations of nine alkenylbenzenes, coumarin, piperonal and pulegone in Indian bidi cigarette tobacco," *Food Chem.Toxicol.*, Vol. 41, No. 2, 2003, pp. 303-317.
 55. Stanfill, S. B. and Ashley, D. L., "Quantitation of flavor-related alkenylbenzenes in tobacco smoke particulate by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry," *J.Agric.Food Chem.*, Vol. 48, No. 4, 2000, pp. 1298-1306.
 56. Banchio, E., Zygadlo, J., and Valladares, G. R., "Quantitative variations in the essential oil of *Mintostachys mollis* (Kunth.) Griseb. in response to insects with different feeding habits," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, 2005, pp. 6903-6906.
 57. Merckel, C., Pragst, F., Ratzinger, A., Aebi, B., Bernhard, W., and Sporkert, F., "Application of headspace solid phase microextraction to qualitative and quantitative analysis of tobacco additives in cigarettes," *J Chromatogr A*, Vol. 1116, No. 1-2, 2006, pp. 10-19.
 58. Merckel, C. and Pragst, F., "2.Zwischenbericht Untersuchungen zur Konzentration und zur Bedeutung von Tabak-Nebenalkaloiden und Ammoniumionen in Zigaretten," Vertrag-Nr.: 02.001151/2.26.02.-39, Jan. 2004.
 59. Pragst, F., Herzler, M., and Erxleben, B.-T., "Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)," *Clin Chem Lab Med*, Vol. 42, No. 11, 2004, pp. 1325-1340.
 60. Pragst, F., Herzler, M., Herre, S., Erxleben, B.-T., and Rothe, M., *UV Spectra of toxic compounds*, Dr. Dieter Helm Verlag, Heppenheim, 2001.
 61. Bush, L. P., "Quantitative analysis of tobacco alkaloids by gas chromatography," *J Chromatogr*, Vol. 73, No. 1, 1972, pp. 243-247.

62. 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.
63. 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.
64. Merckel, C. and Pragst, F., "1. Zwischenbericht: Enzymatischer Nachweis von Ammoniak und Harnstoff in Zigaretten mittels Photometrie und Bestimmung spezieller Marker für verwendete Zusatzstoffgemische," Nov. 2005.
65. 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.
66. Riechstofflexikon. <http://www.chemistryworld.de/cheminfo/0572-aro.htm> . 26-2-2000.
67. Coleman, W. M. and Dube, M. F., "Headspace solid-phase microextraction analysis of artificial flavors," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005.
68. Verordnung über Tabakerzeugnisse und Raucherwaren mit Tabakersatzstoffen (Tabakverordnung, TabV) (SR 817.06) in Kraft ab 1. November 2004. 27-10-2004.