

**HS-SPME zum Nachweis  
von Tabakadditiven**

# Klare Sicht im blauen Dunst

In Zusammenarbeit mit Schweizer Kollegen haben Wissenschaftler des Instituts für Rechtsmedizin der Charité in Berlin erprobt, wie sich eine möglichst große Bandbreite unterschiedlicher chemischer Substanzen, die Zigaretten als Additiv zugesetzt werden, effizient nachweisen lassen. Gelandet sind sie bei der GC/MS in Verbindung mit der HS-SPME.

Sie beeinflussen den Geschmack einer Zigarette, ihren Feuchtigkeitsgehalt und ihr Abbrennverhalten, den pH-Wert des Zigarettenrauchs und sensorische Eigenschaften. Während Kritiker der Tabakindustrie vorwerfen, das Suchtpotenzial von Zigaretten erhöhen zu wollen, begründen die Hersteller den Einsatz von Additiven in Tabakprodukten mit der Nachfrage der Konsumenten. Auf der Homepage von British American Tobacco Germany heißt es:

„Zusatzstoffe werden in Tabakprodukten verwendet, um dem Produkt die vom Verbraucher erwartete Qualität zu geben. Sie unterscheiden sich nach Art und Menge je nach Tabakmischung und den Geschmackspräferenzen im Bestimmungsmarkt. Obwohl die meisten Zusatzstoffe nur in sehr kleinen Mengen (ppm/ppt) eingesetzt werden, leisten sie doch ihren Beitrag zur Ausprägung unterschiedlicher Geschmackscharakteristika.“

Wie auch immer man die Sachlage beurteilt, Tatsache ist: Zigaretten dürfen Zusätze enthalten. Gemäß der „Verordnung über Tabakerzeugnisse“ sogar mehrere hundert Substanzen, darunter Zucker, Schellack als Klebemittel, Ammonium-

chlorid (Salmiak), Lakritz, Kakao, Tee, Kaffee und Feuchthaltemittel wie Glycerin oder Propylenglycol. Verboden ist nur, was nicht ausdrücklich erlaubt ist!

Wissenschaftler weisen indes darauf hin, einige der Tabakadditive erhöhten das toxische Potenzial von Zigaretten. Sie beeinflussten die Nikotinaufnahme unmittelbar und könnten die Sucht verstärken. Zudem würden einige Aromen verbrennen, und zwar unter Bildung giftiger Reaktionsprodukte. „Es ist nur konsequent“, sagt Professor Fritz Pragst, „dass der Gesetzgeber eine exakte Bestimmung der Additive fordert.“ Der Toxikologe vom Institut für Rechtsmedizin der Berlin Charité entwickelte in Zusammenarbeit mit Schweizer Kollegen eine Analysenmethode, mit der sich 89 relevante Zigarettenadditive effizient und sensitiv nachweisen lassen, publiziert im *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 10-19.

## Probenvorbereitung der Wahl

Es liegt in der Natur der Dinge, zum Nachweis von Zigarettenadditiven die Gaschromatographie in Verbindung mit einem geeigneten Detektor einzusetzen. Bei der Probenvorbereitung jedoch lässt sich aufgrund

Prof. Dr. Fritz Pragst  
Institut für Rechtsmedizin  
Charité,  
Universitätsmedizin Berlin  
Abt. Toxikologische Chemie  
Hittorfstraße 18  
14195 Berlin  
fritz.pragst@charite.de



der komplexen Tabakmatrix und der chemischen Divergenz der Additive auf Anhieb kein Königsweg erkennen: „Herkömmliche Verfahren wie Dampfdestillation, Lösemittelextraktion, Trappen auf Adsorbentien oder auch Kombinationen der genannten Techniken erwiesen sich als zu arbeitsintensiv. Zudem lässt die Empfindlichkeit zu wünschen übrig, wegen der sehr geringen Konzentrationen der eingesetzten Verbindungen“, urteilt Pragst.

Die HS-SPME hingegen hat sich in vielerlei Hinsicht in der Probenvorbereitung und Probenaufgabe bei der GC/MS-Analyse flüchtiger und schwerflüchtiger Substanzen in einer großen Vielfalt von Matrices bewährt: Sie ist leicht zu handhaben und reduziert den Einsatz von Lösemitteln. „HS-SPME ermöglicht es auch, die Probe in einem einzigen, lösemittelfreien Schritt aufzunehmen, zu extrahieren, zu konzentrieren und aufzugeben“, stellt der Professor fest.

Der Einsatz der HS-SPME zur Analyse von Tabak und Zigarettenrauch ist in der Fachliteratur vielfach beschrieben worden. „In den meisten Fällen waren die Methoden jedoch nur auf einige wenige Substanzen beschränkt, etwa auf organische Säuren, Al-

kenylbenzole, Cumarin, Piperonal und Pulegon sowie die Acetate von C<sub>1</sub> bis C<sub>4</sub>-Alkoholen oder auf Geschmackszusätze. Polyphenole wurden mittels HPLC und Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie nachgewiesen“, resümiert Pragst.

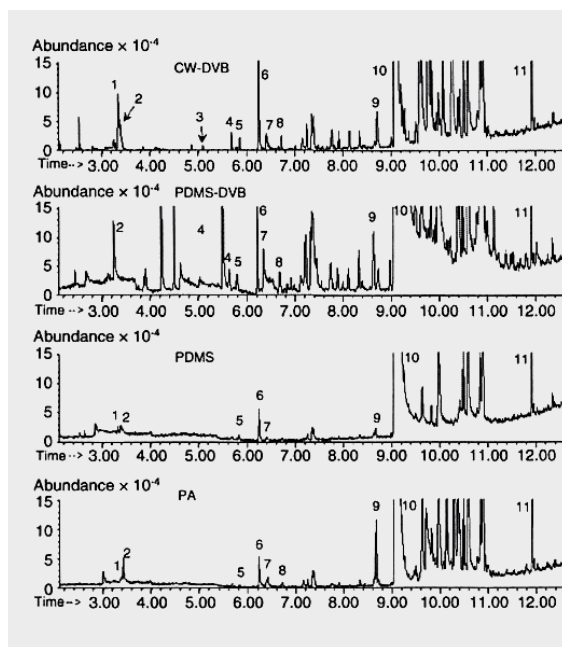
### Suche nach geeigneten Methoden

Da sich Zigarettenadditive chemisch unterscheiden – manche sind basisch, andere neutral, wieder andere sauer – könne man nicht erwarten, alle Substanzen in einem einzigen GC-Lauf zu detektieren: „Unser Ziel war es“, erklärt Careen Merckel, wissenschaftliche Mitarbeiterin von Professor Pragst, „eine Screening-Methode zu entwickeln, mit der sich möglichst viele der in Zigaretten verwendeten Additive mit einer begrenzten Anzahl von Messungen sensitiv bestimmen lassen.“

Eine Aufgabe, die eine Reihe von Experimenten erforderte. Die Toxikologen mussten etwa herausfinden, welche SPME-Faser geeignet war, eine möglichst große Bandbreite unterschiedlich polarer Verbindungen zu extrahieren. Merckel: „Optimale Ergebnisse im Hinblick auf die Zahl der detektierten Substanzen sowie der Signalintensität und der Peakform wurden mit der CW-DVB-Faser erzielt.“ Die Wahl wurde durch Vergleich der Peakflächen einiger Komponenten nach basischer, neutraler und saurer Vorbereitung bei Messungen im SIM-Modus bestätigt. Als Kapillar-GC-Säule erbrachte die PTA-5 von Supelco die besten Ergebnisse: „Sie ist eine spezielle basendeaktivierte Poly-Säule (5% Diphenyl / 95% Dimethylsiloxan), die für die Analyse von Aminen und anderen basischen Analyten bestimmt ist“, schildert Merckel die Ergebnisse der Experimente.

Die Wissenschaftler präparierten Probenlösungen unterschiedlicher pH-Werte. Die Zigaretten entstammten 55 Zigarettenpackungen, wobei es sich um 32 Zigarettenmarken handelte. Als Kompromiss zwischen Analysenzeit und Extraktionsergebnis wurde für die Routinemessungen eine Extraktionszeit von 15 min bei 95 °C gewählt. Die Auswirkung der Tabakmenge auf das Extraktionsergebnis der HS-SPME wurde mit Verwendung von 2,6-Dichlortoluol als internem Standard für die quantitative Analyse untersucht.

„Es zeigte sich, dass mit steigender Tabakmenge die Peakfläche von 2,6-Dichlortoluol sehr stark abnahm“, schildert Professor Pragst. Auch bei anderen Komponenten wie 2-Ethyl-1-hexanol oder Indol wurden kleinere Peaks bei steigender Probenmenge festgestellt. Erklären lässt sich der



Gesamtionenchromatogramm einer Zigarettenprobe, die mittels HS-SPME und GC-MS gemessen wurde, und zwar mit den SPME-Fasern 65 µm CW-DVB, 65 µm PDMS-DVB, 100 µm PDMS und 85 µm PA nach basischer Proben-

- vorbereitung:
- (1) Propylenglykol
  - (2) Pyridin
  - (3) 2-Methyl-2-Cyclopentenon
  - (4) Benzaldehyd
  - (5) 6-Methyl-5-Hepten-2-One
  - (6) 2-Ethyl-1-Hexanol
  - (7) Benzylalkohol
  - (8) Acetophenon
  - (9) Indol
  - (10) Nikotin
  - (11) Neophytadien

Effekt mit der begrenzten Faserkapazität. Zudem weisen die Chromatogramme bei Anwesenheit größerer Tabakmengen einen größeren Hintergrund auf, wodurch sich kleinere Signale nur ungenügend empfindlich detektieren lassen. „Uns erschien eine Probenmenge von 50 mg als optimal“, sagt Professor Pragst.

### Anwendung auf reale Proben

Die von Pragst et al. entwickelte HS-SPME-GC/MS-Methode wurde für die Untersuchung einer großen Zahl von Zigarettenmarken eingesetzt. Zum Vergleich wurden verschiedene Rohabaksorten und zwei verschiedene Additiv-freie Zigaretten hinzugenommen. Repräsentative Proben, hergestellt etwa durch Homogenisierung und Mischung einer großen Anzahl Zigaretten einer Marke und Charge, wurden nicht vermessen. Ungeachtet dessen „zeigen die Ergebnisse der qualitativen und quantitativen Doppelmessungen stets das gleiche Additivprofil. Unterschiede in der Konzentration innerhalb einer einzelnen Zigarette und zwischen den Zigaretten einer Packung liegen unter 20 Prozent“, konstatiert der Toxikologe.

Für jede Zigarettenmarke wurden doppelte HS-SPME/GC-MS-Analysen von der basischen, der neutralen und der sauren Suspen-

sion durchgeführt. Der Massenscan erfolgte im Bereich von m/z = 45 – 400; jeder Peak wurde mit den Massenspektren der Wiley- und der NIST-Datenbank verglichen. Darüber hinaus, schreiben Pragst et al., erfolgte eine verbesserte Analyse der Spektren unter Verwendung von selbstentwickelten Datenbanken. Zur Bestätigung wurden die Retentionszeiten und Massenspektren mit den entsprechenden Referenzsubstanzen verglichen, die unter gleichen Bedingungen gemessen wurden.

Insgesamt wurden 89 wichtige chemische Komponenten identifiziert, darunter natürliche Tabakbestandteile wie Nikotin und andere Tabakalkaloide sowie Geschmacksstoffe, Feuchthalte- und Lösungsmittel, die bei der Zigarettenherstellung hinzugefügt wurden. Durch Vergleich der Chromatogramme kommerzieller Zigaretten mit Chromatogrammen von Referenzzigaretten und Rohabak konnte beurteilt werden, welche Komponenten natürlicherweise vorhanden waren und welche hinzugefügt wurden, darunter flüchtige Aldehyde und Ester, die in der Aroma, Geschmacksstoff- und Lebensmittelindustrie häufig verwendet werden.

Professor Pragst: „γ-Nonalacton, bekannt als Kokosnussaldehyd, und γ-Undecalacton (Pfirichaldehyd) sorgen für süße und fruchtige Noten. Pfefferminz- und Gewürzgeschmack wird durch Isopulegol, Thymol und Menthol verursacht. Triacetin, Propylenglykol





## Material, Zubehör und technische Details

Für die GC/MS-Messungen wurde ein GC 6890 N verwendet, gekoppelt an einen MSD 5973 N (beide von Agilent Technologies). Die Probenvorbereitung und Probenaufgabe erfolgten online mit einem GERSTEL-Multi-PurposeSampler (MPS).

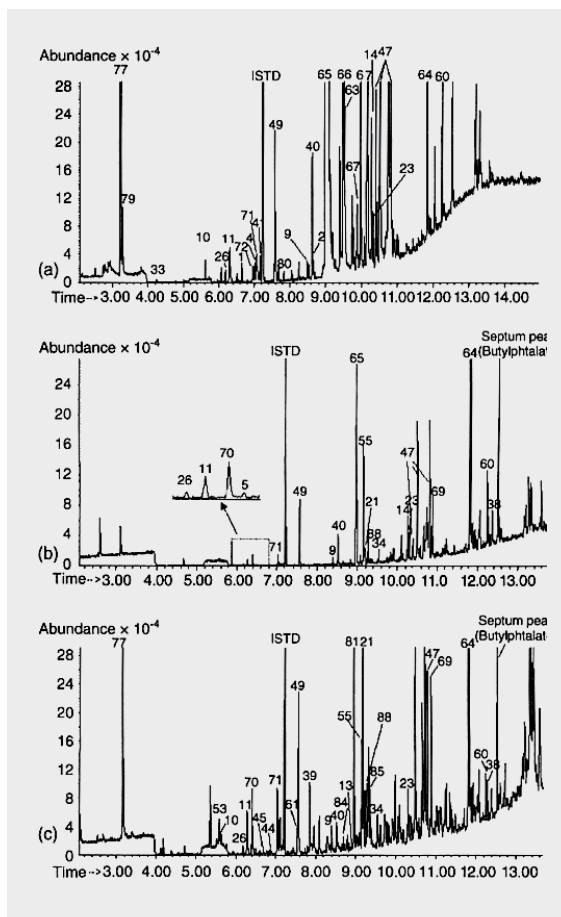
Für die GC-Trennung wurde eine PTA-5-Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm, Supelco) mit Helium als Trägergas (1,0 mL/min) verwendet. Für die Optimierung wurde auch eine Kapillarsäule HP-5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent) getestet.

Die optimierten Analysen wurden mit der CW-DVB-Faser (Supelco) durchgeführt. Alle GC/MS-Messungen erfolgten auf der Enhanced ChemStation G1701 DA, Version D.00.01.27 von Agilent (2002).

Die Injektion erfolgte splitlos bei 250 °C. Bei der optimierten Methode wurde mit folgendem Temperaturprogramm gearbeitet: 2 min bei 70 °C, mit 20 °C/min auf 280 °C erhitzt, dann 3 min bei 280 °C. Die Temperaturen des Quadrupols und der Ionenquelle betragen 150 °C beziehungsweise 230 °C. Die Analyten wurden im Scan-Modus von  $m/z = 45$  bis 400 detektiert.

Die Peaks wurden im Scan-Modus identifiziert mithilfe der Software MassLibTM (MPI Mülheim) und der MS-Spektren-Datenbanken von Wiley, 7. Auflage (175 000 Spektren, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) und NIST05 (190 000 Spektren). Zur Quantifizierung der Substanzen im SIM-Modus wurden drei  $m/z$ -Spuren gewählt.

Gesamtionenchromatogramm einer kommerziellen Zigarette, gemessen mittels HS-SPME und GC-MS nach (a) basischer, (b) neutraler und (c) saurer Probenvorbereitung. SPME-Faser: CW-DVB.



und Tripropylenglykol sind Hilfsstoffe, die als Lösemittel für ätherische Ölkomponenten oder als Feuchthaltemittel für den Tabak verwendet werden. In einem Fall wurde 6-Methylkumarin gefunden, ein synthetischer Duftstoff mit einem süßen Kokosnussaroma.“

### Quantifizierung schafft Sicherheit

Menthol, 2-Ethyl-1-hexanol, Benzylalkohol, Benzaldehyd, Acetophenon, Indol, Pyridin und Furfurylamin kommen natürlicherweise im Tabak vor, gehen allerdings während des Herstellungsprozesses teilweise verloren. Um den natürlichen Tabakgeschmack zu erhalten, werden sie als Additive zugesetzt. Eine quantitative Analyse sei notwendig, sagt Pragst, um zwischen dem natürlichen Inhalt und der Verwendung als Additiv unterscheiden zu können.

Und das Ergebnis der Quantifizierung gibt dem Wissenschaftler recht: „Die Konzentrationen von Menthol, Benzylalkohol und 2-Ethyl-1-hexanol liegen in einigen Zigaretten deutlich über den Werten, die wir in Rohtabaken und Referenzziga-

retten gemessen haben“, bilanziert der Wissenschaftler. Beispielsweise war die Mentholkonzentration in Nicht-Menthol-Zigaretten bis zu 100-fach höher als in Rohtabaken und rund 40-fach höher als in der Referenzzigarette. Analoge Ergebnisse wurden für den Gehalt an 2-Ethyl-1-hexanol erzielt, dessen Konzentration um bis zu 170-fach höher war als in der Referenzzigarette.

### HS-SPME-GC/MS überzeugte

Professor Pragst: „Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass die HS-SPME in Kombination mit GC/MS und Massenspektren-Datenbanken beim Routinescreening von Zigaretten auf eine große Anzahl von basischen, sauren und neutralen Additiven sowie natürlichen Tabakbestandteilen mit Erfolg angewandt werden kann.“ Die HS-SPME sei besonders geeignet, weil die Mehrzahl der Additive halbflüchtige Komponenten sind. Darüber hinaus ermögliche diese Methode eine quantitative Bestimmung, um die Übereinstimmung mit festgelegten Maximalkonzentrationen von Additiven und ein künstliches Ansteigen der natürlichen Bestandteile zu kontrollieren.