

Untersuchung von Tabak und Tabakerzeugnissen
**Bestimmung des Glycerol-, Propylenglycol-
 und Sorbitolgehaltes**
 Hochleistungs-flüssigchromatographisches Verfahren

DIN
10372

ICS 65.160

Analysis of tobacco and tobacco products —
 Determination of glycerol, propylene glycol and sorbitol
 contents — Method using high performance liquid
 chromatography

Analyse du tabac et des produits du tabac —
 Dosage du glycérol, du propylène glycol et du sorbitol —
 Méthode par chromatographie liquide haute performance

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
1 Anwendungsbereich	2
2 Normative Verweisungen	2
3 Symbole und Abkürzungen	2
4 Prinzip	2
5 Chemikalien	3
6 Geräte	3
7 Durchführung	4
8 Berechnung	5
9 Präzision des Verfahrens	6
10 Untersuchungsbericht	7
Anhang A (informativ) Beispielhaftes Chromatogramm für die Bestimmung von Feuchthaltemitteln durch HPLC	7
Anhang B (informativ) Regenerierung der HPLC-Säulen und Kontrolle der Trennleistung	8
Anhang C (informativ) Statistische Ergebnisse des Ringversuches . . .	9
Literaturhinweise	11

Fortsetzung Seite 2 bis 11

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)
 im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Vorwort

Diese Norm wurde vom Arbeitsausschuss „Tabak- und Tabakrauchanalyse“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) erarbeitet.

Die Anhänge A, B und C sind informativ.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes der Feuchthaltemittel Glycerol, 1,2-Propylenglycol und Sorbitol in Tabak und Tabakerzeugnissen mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigchromatographie fest. Das Verfahren ist anwendbar für Gehalte über 0,3 g je 100 g Trockenmasse.

ANMERKUNG Unter Verwendung des in dieser Norm beschriebenen Verfahrens können die Gehalte an Glucose, Fructose und Saccharose in Tabak und Tabakerzeugnissen gleichzeitig nach DIN 10371 bestimmt werden.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

DIN 10252, *Untersuchung von Tabak und Tabakerzeugnissen — Bestimmung des Wassergehaltes — Karl-Fischer-Verfahren.*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696:1987.*

3 Symbole und Abkürzungen

3.1 Symbole

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Symbole:

c Stoffmengenkonzentration;

ρ Massenkonzentration.

3.2 Abkürzungen

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Abkürzungen:

HPLC Hochleistungs-Flüssigchromatographie;

SPE Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion);

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure;

FHM Feuchthaltemittel.

4 Prinzip

Die FHM werden aus dem gemahlenden Tabak oder Tabakerzeugnis durch Schütteln mit verdünnter Natriumhydroxidlösung extrahiert. Durch Verwendung von standardisierter Kieselgur während der Extraktion wird eine Reinigung des Extraktes erzielt. Die FHM werden an einem Ionenaustauscher-Harz (sulfoniertes Polystyrol-Divinylbenzol in der Ca^{2+} -Form) durch isokratische Elution mit einer wässrigen Lösung von Calciumdinatrium-EDTA als mobiler Phase getrennt. Die Detektion der FHM erfolgt durch ein Differential-Refraktometer, ihre quantitative Bestimmung nach dem Verfahren des externen Standards.

5 Chemikalien

5.1 Allgemeines

Es sind, sofern nicht anders angegeben, analysenreine Chemikalien zu verwenden.

5.2 Wasser für den Laborgebrauch, mindestens der Qualität 3 nach DIN ISO 3696.

5.3 Calciumdinatrium-EDTA-Lösung I, $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{CaNa}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 50 \text{ mg/l}$, zum Eluieren der FHM.

Die Lösung ist täglich frisch anzusetzen. Vor der Verwendung ist die Lösung über einen Membranfilter zu filtrieren und zu entgasen.

5.4 Calciumdinatrium-EDTA-Lösung II, $\rho(\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{CaNa}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 500 \text{ mg/l}$, zum Regenerieren der HPLC-Säule.

5.5 Natriumhydroxidlösung I, $c(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mol/l}$.

5.6 Natriumhydroxidlösung II, $c(\text{NaOH}) = 0,01 \text{ mol/l}$, hergestellt durch Verdünnen der Natronlauge nach 5.5 mit Wasser nach 5.2.

5.7 Kalibrierlösungen

Durch Lösen von Glycerol, 1,2-Propylenglycol und Sorbitol in Wasser (siehe 5.2) wird eine Stammlösung mit einer Massenkonzentration von jeweils $1\,000 \text{ mg/l}$ hergestellt. Aus der Stammlösung werden durch Verdünnung mit Wasser Kalibrierstandards hergestellt. Bezogen auf die in 7.1 beschriebene Vorbereitung der Untersuchungsprobe und übliche FHM-Gehalte von Tabak und Tabakerzeugnissen sind folgende Verdünnungen als Kalibrierstandards geeignet:

<u>Verdünnungsfaktor</u>		<u>$\rho(\text{FHM})$</u>
—	=	$1\,000 \mu\text{g/ml}$
2	=	$500 \mu\text{g/ml}$
5	=	$200 \mu\text{g/ml}$
10	=	$100 \mu\text{g/ml}$
20	=	$50 \mu\text{g/ml}$
50	=	$20 \mu\text{g/ml}$

5.8 standardisierte Kieselgur¹⁾

Wenn andere Filterhilfsmittel verwendet werden, ist es notwendig sicherzustellen, dass ein ausreichender Reinigungseffekt erzielt wird, keine störenden Peaks im Chromatogramm auftauchen und eine ausreichende Stabilität der messfertigen Extrakte gegeben ist.

6 Geräte

Übliche Laboreinrichtungsgeräte und insbesondere die Folgenden:

6.1 HPLC-Gerät, bestehend aus HPLC-Pumpe, HPLC-Säule (6.2) und Differential-Refraktometer (RI) sowie Säulenofen und Einspritzvorrichtung.

ANMERKUNG Falls eine automatisierte Einspritzvorrichtung zum Einsatz kommt, ist eine Kühlung freigestellt.

¹⁾ Über Bezugsquellen gibt der Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte im DIN, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin, Auskunft.

6.2 HPLC-Säule, Kationenaustauschersäule mit sulfoniertem Polystyrol-Divinylbenzol in der Calciumform, Länge 300 mm, Innendurchmesser 6,5 mm.¹⁾

Eine Säule mit anderen Maßen darf verwendet werden, wenn sie gleichwertige Ergebnisse erbringt.

Die Verwendung einer Vorsäule, bestehend aus dem gleichen Material wie die Trennsäule, wird empfohlen.¹⁾

6.3 Einspritzfilter, hydrophil, unsteril, mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm.

6.4 Schüttelmaschine, regelbar, mit notwendigem Zubehör (Aufsatz für 200-ml- bzw. 250-ml-Glasgeräte).

6.5 Heizplatte.

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Etwa 1 g Tabakmaterial wird auf vier Nachkommastellen in einen 200-ml- bzw. 250-ml-Erlenmeyerkolben eingewogen, und es werden etwa 4 g standardisierte Kieselgur¹⁾ mit Hilfe eines Pulvertrichters zugefügt. Nach Zugabe von 50 ml Natriumhydroxidlösung II (V_E) (5.6) mittels eines Dispensers oder einer 50-ml-Vollpipette erfolgt die Extraktion durch 60-minütiges Schütteln; die Schüttelmaschine ist dabei auf etwa 165 min^{-1} einzustellen.

Nach beendeter Extraktion wird über ein Faltenfilter in ein Reagenzglas filtriert, wobei die ersten Milliliter des Filtrates zu verwerfen sind. Es werden mindestens 3 ml Filtrat gesammelt und über ein Einspritzfilter (siehe 6.3) in ein Probengeber-Gläschen filtriert. Das Gläschen wird verschlossen und ist für die HPLC-Analyse gebrauchsfertig. Die Zeitspanne zwischen Fertigstellung der Extrakte und der HPLC-Untersuchung darf bei Aufbewahrung der Extrakte bei Raumtemperatur 10 Stunden nicht überschreiten.

ANMERKUNG 1 Bei gleichzeitiger Erfassung der Zucker sollte die Zeitspanne zwischen Fertigstellung der Extrakte und der HPLC-Untersuchung bei Aufbewahrung der Extrakte bei Raumtemperatur 10 Stunden nicht überschreiten.

ANMERKUNG 2 Die Haltbarkeit der messfertigen Extrakte kann durch Kühlung (z. B. gekühlter Probengeber) deutlich verlängert werden.

7.2 HPLC-Bedingungen

Elutionsmittel: Calciumdinatrium-EDTA-Lösung I (siehe 5.3); temperiert auf etwa 70 °C;

Durchfluss: 0,6 ml/min;

Säulentemperatur: 80 °C (oder nach den Festlegungen in den Anweisungen des Säulenherstellers);

Einspritzvolumen: 20 µl (üblicherweise).

ANMERKUNG Das Differential-Refraktometer (Detektor) sollte bei einer konstanten Temperatur gehalten werden; die Einstellung von 35 °C bis 40 °C hat sich bewährt.

7.3 HPLC-Untersuchung

Nach Gleichgewichtseinstellung des HPLC-Systems und der Säule erfolgt eine Kontrolle der Retentionszeiten der FHM durch Injektion einer verdünnten Stammlösung (siehe 5.7).

ANMERKUNG Die Haltbarkeit der Lösung liegt bei mindestens 4 Wochen.

Ein typisches Chromatogramm einer Standardlösung findet sich in Anhang A.

¹⁾ Über Bezugsquellen gibt der Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte im DIN, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin, Auskunft.