

Tabak und TabakerzeugnisseBestimmung von Konservierungsstoffen mit Hochleistungs-
Flüssigchromatographie**DIN****10377**

ICS 65.160

Tobacco and tobacco products — Determination of preserving agents by
high performance liquid chromatographyTabac et produits du tabac — Dosage des conservateurs par
chromatographie liquide haute performance**Inhalt**

	Seite
Vorwort.....	2
1 Anwendungsbereich	2
2 Normative Verweisungen.....	2
3 Kurzbeschreibung	2
4 Chemikalien	2
5 Geräte und Hilfsmittel	4
6 Probenahme	4
7 Durchführung	4
8 Berechnung.....	5
9 Präzision des Verfahrens.....	6
10 Untersuchungsbericht.....	7
Anhang A (informativ) Beispiel für geeignete Chromatographiebedingungen und entsprechende Chromatogramme.....	8
Anhang B (informativ) Statistische Ergebnisse des Ringversuches.....	11
Literaturhinweise.....	17

Fortsetzung Seite 2 bis 17

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

Vorwort

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

Die Anhänge A und B sind informativ.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung der Konservierungsstoffe Benzoesäure, Sorbinsäure, para-Hydroxybenzoesäuremethyl-, para-Hydroxybenzoesäureethyl- und para-Hydroxybenzoesäurepropylester in Tabak und Tabakerzeugnissen mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie fest.

Die Methode wurde für folgende Bereiche validiert:

- 100 mg/kg bis 2 000 mg/kg Sorbinsäure sowie
- 100 mg/kg bis 5 000 mg/kg Benzoesäure und para-Hydroxybenzoesäureester.

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 Kurzbeschreibung

Die Konservierungsstoffe werden mit Hilfe eines Gemisches aus Methanol/Wasser extrahiert. Nach Filtration erfolgt die Bestimmung der im Extrakt enthaltenen Konservierungsstoffe durch Auftrennung mit Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) und anschließender UV-Detektion bzw. Diodenarray-Detektion. Die Identifizierung wird anhand der Retentionszeiten, die quantitative Bestimmung mit externen Standards über die Peakflächen vorgenommen.

4 Chemikalien

4.1 Allgemeines

Falls nicht anders angegeben, werden nur analysenreine Chemikalien und Wasser der Qualität 3 nach DIN ISO 3696 verwendet.

4.2 Essigsäure, Volumenanteil $\varphi(\text{CH}_3\text{COOH}) = 10\%$.

4.3 Methanol, für HPLC geeignet.

4.4 Ammoniumacetat-Lösung, Stoffmengenkonzentration, $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 0,01 \text{ mol/l}$.

4.5 Extraktionslösung, 70 Volumenanteile Methanol (4.3) und 30 Volumenanteile Wasser (4.1).

4.6 Mobile Phase, für die HPLC; Gradient mit Ammoniumacetat-Lösung (4.4) + Methanol (4.3).

Der pH-Wert der mobilen Phase A muss mit Essigsäure (4.2) so eingestellt werden, dass die Trennung Vanillin/Benzoesäure sichergestellt ist. Gängiger Bereich ist pH 4,0 bis pH 4,5. Beispiele für die mobile Phase A sind im Anhang A gegeben.

4.7 Kalibriersubstanzen

4.7.1 Benzoessäure

4.7.2 Sorbinsäure

4.7.3 p-Hydroxybenzoessäure-Methylester (pHB-Methylester)

4.7.4 p-Hydroxybenzoessäure-Ethylester (pHB-Ethylester)

4.7.5 p-Hydroxybenzoessäure-Propylester (pHB-Propylester)

4.8 Stammlösung, Massenkonzentration, $\rho = 1\,000 \text{ mg/l}$ je Kalibriersubstanz

Je 100 mg der Kalibriersubstanzen (4.7.1 bis 4.7.5) werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen, in 70 ml Methanol (4.3) gelöst und mit Wasser (4.1) auf 100 ml aufgefüllt. Die Stammlösung ist bei Lagerung im Kühlschrank mindestens 4 Wochen haltbar.

4.9 Kalibrierlösungen

Aus der Stammlösung (4.8) werden durch Verdünnen mit der Extraktionslösung (4.5) die folgenden Kalibrierlösungen nach Tabelle 1 hergestellt:

Tabelle 1 — Kalibrierlösungen

Verdünnung der Stammlösung	entspricht mg/l ^a	entspricht mg/kg ^b
1 : 1 000	1	50
1 : 500	2	100
1 : 100	10	500
1 : 50	20	1 000
1 : 20	50	2 500
^a Milligramm Konservierungsstoff je Liter Kalibrierlösung (bei Einwaage von je 100 mg (siehe 4.8)) ^b Milligramm Konservierungsstoff je Kilogramm Tabakerzeugnis (bei Probeneinwaage 1,0 g und 50 ml Extraktionslösung (siehe 7.1))		

Die Kalibrierlösungen sind wöchentlich neu anzusetzen. Bei zu erwartenden geringen Gehalten empfiehlt sich eine ergänzende Kalibrierung im unteren Bereich.

4.10 Prüflösung zur Ermittlung der Trennleistung der Säule, Vanillinlösung

Massenkonzentration, ρ = 50 mg/l bis 100 mg/l in Extraktionslösung (4.5)

5 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laborgeräte und insbesondere die Folgenden:

5.1 Analysenwaage, geeignet zum Wägen auf 0,1 mg

5.2 Spritze für Membranfilter

5.3 Membranfilter, Porendurchmesser höchstens 0,45 μm

5.4 HPLC-Gradientensystem, mit Diodenarray-Detektor (DAD) oder UV-Detektor mit schaltbaren Wellenlängen; Säulenofen ist empfehlenswert

5.5 HPLC-Säulen

Analytische Umkehrphasensäulen RP-18. Die Säule muss in der Lage sein, Vanillin und Benzoesäure eindeutig zu trennen (siehe beispielhafte Chromatogramme in Anhang A).

Die Verwendung einer entsprechenden Vorsäule hat sich bewährt.

6 Probenahme

Es erfolgt eine repräsentative Probenahme. Es können auch die in den Literaturhinweisen zitierten Probenahme-Normen angewendet werden ([1], [2] und [3]).

7 Durchführung

7.1 Vorbereitung der Proben

1 g fein zerkleinerter Tabak wird auf 0,001 g in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 50 ml Extraktionslösung (4.5) versetzt und 30 min auf einer Schüttelmaschine extrahiert. Die Schüttelmaschine ist dabei auf ca. 165 min^{-1} einzustellen. Wahlweise kann 20 min im Ultraschallbad extrahiert werden.

Bei Konzentrationen unter 200 mg/kg empfiehlt sich eine Extraktion mit 20 ml Extraktionslösung (4.5). Falls die ermittelte Konzentration oberhalb der Kalibriergeraden liegt, ist die Bestimmung mit geringerer Einwaage zu wiederholen.

Nach beendeter Extraktion wird über ein Faltenfilter filtriert, wobei die ersten Milliliter des Filtrates zu verwerfen sind. Das Filtrat wird nochmals über einen Membranfilter (5.3) filtriert. Die Probenlösungen sind bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C drei Tage haltbar.

7.2 Identifizierung

Die Identifizierung der zu bestimmenden Konservierungsstoffe erfolgt durch Vergleich der Retentionszeiten der einzelnen Peaks der Probenlösung mit den Peaks der Kalibrierlösungen. Der Einsatz eines DAD kann im Einzelfall zusätzliche Informationen für die Absicherung von Positivbefunden liefern.

Beispiele für geeignete Chromatographiebedingungen und entsprechende Chromatogramme finden sich in Anhang A.

7.3 Kalibrierung

Es erfolgt eine 5-Punkte-Kalibrierung unter Verwendung der Kalibrierlösungen (4.9). Die Linearität der Kalibrierfunktion ist über den gesamten Messbereich nachzuweisen. Eine Doppelinjektion von Kalibrier- und Probenlösungen wird empfohlen. Die Stabilität des Analysensystems sollte mit einer geeigneten Kalibrierlösung nach der Injektion von ca. 10 Proben überprüft werden.

7.4 Bestimmung

Das HPLC-System wird so eingestellt, dass eine ausreichende Abtrennung der Analyten von den Matrixsubstanzen sichergestellt ist. Hierbei ist insbesondere zu prüfen, ob eine Trennung von Benzoesäure und Vanillin erreicht wird.

Geeignete Volumina, in der Regel 10 µl, der Kalibrierlösungen und der Probenlösung werden in das HPLC-System injiziert. Die Peakflächen werden integriert, und die Ergebnisse werden mit den entsprechenden Werten für die Kalibriersubstanzen verglichen.

8 Berechnung

Die Gehalte an Konservierungsstoffen werden mittels externen Standards über eine Mehrpunktkalibrierung anhand der Peakflächen bestimmt. Die Gehalte des jeweiligen Konservierungsstoffes als Massenanteil ω in Milligramm je Kilogramm Probenmaterial werden nach folgender Gleichung bestimmt.

$$\omega = \frac{\rho_K \cdot V_E \cdot 1\,000}{m_p \cdot 1\,000} \quad (1)$$

Dabei ist

ρ_K die Massenkonzentration des jeweiligen Konservierungsstoffes, ermittelt aus der linearen Regression, in Mikrogramm je Milliliter Extraktionslösung;

V_E das Extraktionsvolumen, in Milliliter (siehe 7.1);

m_p die Einwaage, in Gramm.

Die Gehalte des jeweiligen Konservierungsstoffes als Massenanteil, bezogen auf die Trockenmasse der Probe, werden als Massenanteil ω_{TM} in Milligramm je Kilogramm Trockenmasse nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\omega_{TM} = \frac{\omega \cdot 100}{100 - \omega_{H_2O}} \quad (2)$$

Dabei ist

- ω der Massenanteil des jeweiligen Konservierungsstoffes in Milligramm je Kilogramm Probenmaterial, berechnet nach Gleichung (1);
- $\omega_{\text{H}_2\text{O}}$ der Wassergehalt des Probenmaterials bestimmt nach DIN 10252, als Massenanteil in Prozent.

Die Gehalte der jeweiligen Konservierungsstoffe werden bezogen auf die Trockenmasse in Milligramm je Kilogramm ohne Stelle nach dem Komma angegeben.

9 Präzision des Verfahrens

9.1 Allgemeines

Einzelheiten über einen Ringversuch zur Ermittlung der Präzisionsdaten sind in Anhang B gegeben.

9.2 Wiederholpräzision

Die Differenz zwischen zwei einzelnen Ergebnissen, die ein einzelner Bearbeiter an identischem Untersuchungsmaterial mit denselben Geräten innerhalb der kürzest möglichen Zeitspanne erhält, wird die Wiederholgrenze r im Mittel nicht häufiger als einmal in 20 Fällen bei korrekter Durchführung des Verfahrens überschreiten.

Die im Ringversuch ermittelten Wiederholgrenzen r für die Bestimmung der einzelnen Konservierungsstoffe in Tabakerzeugnissen sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2 — Wiederholgrenzen

Konservierungsstoffe	Wiederholgrenzen r in g/100 g TM ^{a, b}				
	Tabak A	Tabak B	Tabak C	Tabak D	Tabak E
Sorbinsäure	—	—	0,007 5	0,002 6	0,000 4
Benzoessäure	—	0,002 9	0,021 3	0,005 7	0,003 6
pHB-Methylester	—	—	0,023 4	0,004 7	0,001 0
pHB-Ethylester	—	—	0,023 3	0,003 6	0,000 5
pHB-Propylester	—	—	0,023 7	0,003 5	0,001 2
Tabak A: undotierter Rohtabak Tabak B: handelsüblicher, undotierter Pfeifentabak Tabak C: handelsüblicher Pfeifentabak, Dotierung: 2 000 mg/kg Sorbinsäure, 5 000 mg/kg Benzoessäure, je 5 000 mg/kg pHB-Methylester, pHB-Ethylester, pHB-Propylester; alle Ester berechnet als Benzoessäure Tabak D: handelsüblicher Pfeifentabak, Dotierung: 1 000 mg/kg Sorbinsäure, 1 000 mg/kg Benzoessäure, je 1 000 mg/kg pHB-Methylester, pHB-Ethylester, pHB-Propylester; alle Ester berechnet als Benzoessäure Tabak E: handelsüblicher Pfeifentabak, Dotierung: 100 mg/kg Sorbinsäure, 100 mg/kg Benzoessäure, je 100 mg/kg pHB-Methylester, pHB-Ethylester, pHB-Propylester; alle Ester berechnet als Benzoessäure					
^a Trockenmasse ^b Angegeben sind die Werte ohne Ausreißer, wobei für den gesamten Datensatz ein Labor von der Auswertung ausgeschlossen wurde.					