

Toxikologische Bewertung von Zusatzstoffen für Tabakprodukte – Ein Leitfaden

Toxicological assessment of additives for tobacco products –
A guidance

Evaluation toxicologique des additifs pour les produits du tabac –
Lignes directrices

Zur Erstellung einer DIN SPEC können verschiedene Verfahrensweisen herangezogen werden:
Das vorliegende Dokument wurde nach den Verfahrensregeln eines Fachberichts erstellt.

Gesamtumfang 50 Seiten

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Hintergrund und Zielsetzung des Leitfadens	4
2 Gesetzliche Vorgaben, Vereinbarungen und Vorschläge – eine Bestandsaufnahme	5
3 Diskussion der Ansätze für die toxikologische Prüfung und Bewertung von Zusatzstoffen in Tabakprodukten	9
3.1 Zielsetzung	9
3.2 Grundsätzliche Überlegungen.....	10
3.2.1 Allgemeines	10
3.2.2 Prüfmatrix	11
3.2.3 Rauchgenerierung	12
3.2.4 Prüfgangs	12
3.2.5 Bezugsgrößen für die Dosis	14
3.2.6 Prüfungsumfang	14
3.2.7 In vivo- versus in vitro-Testverfahren	15
3.2.8 Positivkontrolle	15
3.2.9 Diskriminierungsfähigkeit der Testsysteme	15
3.3 Toxikologische Daten des Zusatzstoffes in seiner unverbrannten Form.....	16
3.4 Toxikologische Prüfung des Zusatzstoffes in seiner verbrannten Form	17
3.4.1 Chemisch-analytische Verfahren	17
3.4.2 Biologische Testsysteme.....	19
3.5 Interpretation und Bewertung der toxikologischen Daten	26
4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen	27
4.1 Allgemeines	27
4.2 Toxikologische Daten zum Zusatzstoff als Reinsubstanz	27
4.3 Pyrolyse des Zusatzstoffes als Reinsubstanz	27
4.4 Chemische und toxikologische Auswirkung des Zusatzstoffes auf den Hauptstromrauch	28
4.5 Bewertung der Untersuchungsergebnisse	30
Anhang A (informativ) Beispiele für Datenbanken, die autorisierte und peer reviewed toxikologische Daten zur Verfügung stellen.....	32
Literaturhinweise	36

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitsausschuss NA 057-04-01 AA „Tabak und Tabakerzeugnisse“ des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) erarbeitet.

Seit der ersten Ausgabe dieses Leitfadens im Jahr 2004 ist die Zahl der wissenschaftlichen Publikationen, die die Ergebnisse von toxikologischen Untersuchungen von Zusatzstoffen in Tabakprodukten zum Gegenstand haben, deutlich angestiegen. Aus den dort vorgestellten Strategien und Methoden und in Abwesenheit eines weltweit gültigen Standards zur toxikologischen Testung und Evaluierung von Zusatzstoffen in Tabakprodukten soll in dieser Version des Leitfadens eine dem aktuellen Stand der Technik entsprechende Testbatterie, also ein de-facto-Standard, und die dazu notwendigen Bewertungskriterien vorgeschlagen werden.

Dieses Dokument nimmt Bezug auf die Tabakproduktrichtlinie (2001/37/EG) [1]. Diese wurde überarbeitet und am 29. April 2014 veröffentlicht [2]. Sobald relevante Umsetzungen in nationale Gesetzgebungen vorliegen, wird der Arbeitskreis den vorliegenden Fachbericht aktualisieren.

Änderungen

Gegenüber DIN-Fachbericht 133:2004 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Der Leitfaden wurde an den aktuellen Stand der Technik angepasst.

Frühere Ausgaben

DIN-Fachbericht 133: 2004

1 Hintergrund und Zielsetzung des Leitfadens

Der Titel dieses Leitfadens „Toxikologische Bewertung von Zusatzstoffen für Tabakprodukte“ wirft die Frage nach einer klaren Umgrenzung des Begriffes Zusatzstoff im Zusammenhang mit Tabakprodukten auf. Im englischsprachigen Umfeld werden zwei Begriffe, oft austauschbar oder ohne eine eindeutige Definition in Bezug auf Zusatzstoffe in Tabakprodukten, nebeneinander verwendet: „Additive“ („Zusatzstoffe“) und „Ingredients“ („Inhaltsstoffe“). Beide Begriffe ergeben sich aus einer unterschiedlichen Betrachtungsweise. Stoffe, die man der Zigarette zusetzt, werden nach der Zugabe zum Inhalt der Zigarette [3].

Die in Deutschland und in der übrigen EU für die Regulierung von Tabakprodukten relevante europäische Tabakproduktrichtlinie [1] definiert zwar den Begriff „Ingredient“¹⁾, verwendet aber auch im Kontext von „Ingredient“ den Begriff „Additive“, allerdings ohne Definition. Die Definition von „Ingredient“ aus der Richtlinie stellt klar, dass Tabak und unprozessierte Tabakbestandteile nicht als „Ingredient“ angesehen werden, sondern alle Substanzen und Bestandteile, welche während des Herstellungsprozesses dem Tabakprodukt zugegeben worden sind, unabhängig davon, ob sich diese in unveränderter oder veränderter Form im finalen Tabakprodukt wiederfinden.

In Übereinstimmung mit der Tabakproduktrichtlinie sind in diesem Leitfaden Zusatzstoffe als Materialien und Substanzen definiert, welche im Herstellungsprozess verwendet werden.

Die Verwendung von Zusatzstoffen in Zigaretten oder anderen Tabakprodukten wird in den EU-Ländern und in der übrigen Welt unterschiedlich reguliert.

In vielen Ländern der EU wie z. B. Dänemark, Griechenland oder Portugal existieren keine spezifischen gesetzlichen Regulationen bezüglich der Zugabe von Zusatzstoffen zu Zigaretten oder anderen Tabakprodukten. In Deutschland gilt das Verbotsprinzip mit Erlaubnisvorbehalt. Die Zulassung der Stoffe ist insbesondere in der Tabakverordnung (TVO) über eine Positiv- sowie eine Negativliste [4] geregelt. Die Verwendung wird dort gemäß ihres Verwendungszwecks und -ortes, der Produktkategorie und der Verwendungsmenge im finalen Produkt festgelegt.

Allgemein gibt es zum Zeitpunkt der Drucklegung dieses Leitfadens eine Diskussion in der EU über die generelle Zulässigkeit von Tabakzusatzstoffen, die durch die Überarbeitung der Tabakproduktrichtlinie angestoßen wurde.

Ein weitreichendes Verbot von Tabakzusatzstoffen existiert in Kanada [5] und soll in Brasilien [6] eingeführt werden. Dabei gilt anzumerken, dass Kanada traditionell begründet eine starke Marktpresenz von sogenannten Virginiazigaretten aufweist. Diese Zigarettentypen werden weitgehend ohne Tabakzusatzstoffe hergestellt. Auch in den USA [7] und in Australien [8] wurde die Verwendung von Tabakzusatzstoffen soweit eingeschränkt, dass die finalen Tabakprodukte über das typische Tabakraucharoma hinaus keine dominanten („characterizing“, USA) oder konfektartig süßen („confectionary-like“, Australien) Geschmackseigenschaften, wie z. B. „Erdbeere“ besitzen dürfen. Mentholzigaretten sind von diesem Verbot in den USA und Australien ausgenommen. Toxikologische Untersuchungen spielten bei den restriktiveren Tabakzusatzstoffregulierungen in Kanada, USA und Australien keine Rolle.

Neben den toxikologischen Überlegungen wird auch ein mögliches abhängigkeitssteigerndes Potenzial von Zusatzstoffen diskutiert. Im Rahmen dieses Leitfadens wird dieser Aspekt aus zwei Gründen nicht weiter behandelt. Während es bei der toxikologischen Bewertung von Zusatzstoffen jahrzehntelange Erfahrungen gibt und eine Vielzahl an Methoden etabliert wurden, stehen für die Messung und Bewertung einer möglichen Abhängigkeitssteigerung durch einen Tabakzusatzstoff noch keine geeigneten Methoden zur Verfügung. Des Weiteren fehlen klare wissenschaftliche Definitionen der Begrifflichkeiten in diesem Bereich. Eine europäische Expertenkommission kam zu dem Schluss, dass aufgrund der zur Verfügung stehenden Daten kein Tabakzusatzstoff identifiziert werden kann, der ein Abhängigkeitspotenzial aufweist [9].

¹⁾ Richtlinie 2001/37/EG, Artikel 2; 'Definitionen', unter 5.): *„Inhaltsstoff“ jeder bei der Herstellung oder Zubereitung eines Tabakerzeugnisses verwendete und im Endprodukt, auch in veränderter Form, noch vorhandene Stoff oder Bestandteil einschließlich Papier, Filter, Druckerschwärze und Klebstoffe, jedoch mit Ausnahme des Tabakblatts und anderer natürlicher oder nicht verarbeiteter Teile der Tabakpflanze.* Es ist geplant, in der anstehenden Neufassung der Richtlinie diese Definitionen weitergehend zu fassen.

Für die meisten Tabakzusatzstoffe in ihrer unverbrannten Form liegen ausreichend toxikologische Daten vor, da es sich bei einer Vielzahl der verwendeten Stoffe um Lebensmittelzusatzstoffe handelt. Bei Zusatzstoffen für Tabak ist aber der abweichende Aufnahmeweg (bei Rauchprodukten inhalativ) und die Aufnahmedosis der Zusatzstoffe zu berücksichtigen. Toxikologische Daten über Zusatzstoffe in verbrannter Form sind zwar für eine Vielzahl von Zusatzstoffen verfügbar, sie wurden allerdings oftmals mit unterschiedlichsten Methoden erhoben. Dementsprechend kann deren Aussagekraft sehr unterschiedlich sein.

Das Vorgehen bei der Gewinnung geeigneter Daten zur toxikologischen Bewertung von Zusatzstoffen zu Zigaretten stellt den Kernpunkt dieses Leitfadens dar. Prinzipiell sollte eine Übertragbarkeit auf andere Tabakprodukte oder Modifikationen der Zigarette möglich sein.

2 Gesetzliche Vorgaben, Vereinbarungen und Vorschläge – eine Bestandsaufnahme

Für die meisten chemischen Produkte oder Lebensmittelzusatzstoffe gibt es anerkannte Testmethoden und Bewertungskriterien, deren Untersuchungsergebnisse von den zuständigen Behörden geprüft werden. Dagegen gibt es für die toxikologische Bewertung von Tabakzusatzstoffen keine verbindlichen Vorschriften, Bewertungsstrategien oder nationale bzw. internationale Normen. Dennoch existieren eine Reihe von Vereinbarungen, Empfehlungen und Modelle zur Vorgehensweise, wie Tabakzusatzstoffe toxikologisch bewertet werden könnten, die an dieser Stelle aufgeführt werden sollen.

Diese Bestandsaufnahme erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Eine kritische Analyse der unterschiedlichen Methoden, die hier aufgeführt werden, erfolgt in Abschnitt 3.

In einer Vereinbarung zwischen dem UK Department of Health und der britischen Tabakindustrie („Voluntary Agreement on the Approval and Use of New Additives in Tobacco Products in the UK“) haben sich die Hersteller und/oder Importeure von Tabakprodukten verpflichtet, bei der Markteinführung eines neuen, d. h. eines nicht auf der bestehenden Positivliste aufgeführten Zusatzstoffes [Hunter-Liste [10] folgende Informationen den Behörden zur Beurteilung der Toxizität zur Verfügung stellen [11]:

- Zusammensetzung des Zusatzstoffes (Chemische Formel, Struktur, Spezifikationen),
- Verwendungszweck des Zusatzstoffes,
- Status bezüglich Lebensmittel-, Tabak- und Arzneimittelrecht,
- Die zu verwendende Menge,
- Informationen zur Transferrate in den Rauch,
- Destruktive Destillation, Pyrolyse und Bildung gesundheitsschädlicher Bestandteile,
- Biologischen Studien.

Diese Studien würden durchgeführt werden, nachdem die zu verwendende Menge, ihre Transferrate in den Rauch und ihre Hauptmetaboliten bekannt sind. Grundsätzlich wäre folgendes notwendig:

- Eine Inhalationsstudie (*pyrolysiertes Tabakerzeugnis*),
- Genotoxizität
 - a) *die Substanz selbst (einschließlich, sofern relevant, in pyrolysierter Form),*
 - b) *das Kondensat einer die Substanz enthaltenden Referenzzigarette.*

Nach Kenntnis des Arbeitskreises sind seit Beginn dieser Vereinbarung bisher keine Anträge auf Zulassung von neuen Zusatzstoffen in Großbritannien gestellt worden. Daher gibt es keine Erfahrungen mit diesem Bewertungssystem, die in diesen Fachbericht einfließen können.

In Kanada fordert das Gesundheitsministerium seit dem Jahr 2000 von den Zigarettenherstellern jährlich für jede ihrer Zigarettenmarken die in Kanada hergestellt und verkauft werden, Daten zur Rauchchemie (44 Analyten) und seit 2005 auch toxikologische Daten zur *in vitro*-Zytotoxizität (Neutralrot-Test), bakteriellen Mutagenität (Ames-Test) und *in vitro*-Klastogenität (Mikrokern-Test). Für die drei geforderten *in vitro*-Tests für die biologische Testung von Zigarettenrauch hat das Ministerium Richtlinien für die Durchführung vorgegeben [12-14].

2009 wurde in den USA die Regulierung von Tabakprodukten der FDA (Food and Drug Administration) übertragen [7]. In den neuen Bestimmungen der FDA ist vorgesehen, dass bei Änderungen eines Tabakprodukts, unter anderem bei der Verwendung von neuen Zusatzstoffen, die Hersteller in einem Vergleich des neuen Produktes mit seinem Vorläuferprodukt zeigen müssen, dass diese Änderungen nicht zu einer substanziellen Änderung des Produktes führen. Diese Vergleiche sollen auf der Basis einer umfassenden Untersuchung erfolgen. In bisher nicht bindenden Empfehlungen werden neben der Charakterisierung des neuen Produkts und der rauchchemischen Daten auch *in vitro*- und *in vivo*-Verfahren für eine Bewertung genannt, ohne dass diese Methoden oder die Verfahren zur Bewertung der Ergebnisse im Detail näher beschrieben werden [15]. Für sogenannte „Modified Risk“-Tabakprodukte haben die US-amerikanische Food and Drug Administration und das US-amerikanische Institute of Medicine umfassende Forderungen bzw. Vorschläge herausgegeben [16]. Darüber hinaus verlangt die FDA seit 2012 eine jährliche Analyse der Tabak-/Rauchchemie (20 Analyten) für jede Zigarettenmarke.

Die Richtlinie 2001/37/EG der Europäischen Union sieht für Tabakprodukte vor, dass Importeure und Produzenten die verwendeten Zusatzstoffe und, soweit verfügbar, ebenfalls Daten zur Toxizität dieser Zusatzstoffe in unverbrannter und verbrannter Form offenlegen.

Hierzu hat die Europäische Kommission 2007 einen Leitfaden herausgegeben, welcher ein einheitliches Format für die Offenlegung von Tabakzusatzstoffen innerhalb der EU vorschlägt [17]. Neben einer Auflistung aller verwendeten Zusatzstoffe mit Angaben zu den Massenanteilen im fertigen Produkt, der Zugehörigkeit zu einer der vorgegebenen Zusatzstoffkategorien, des Verwendungszweckes und der Funktion des Zusatzstoffes sind bei der Offenlegung auch die zur Verfügung stehenden toxikologischen Informationen anzugeben: toxikologische Daten zum unverbrannten Zusatzstoff, Daten zur Pyrolyse, Transferstudien, Daten zur Rauchzusammensetzung, Daten zur *in vitro*-Zytotoxizität und -Gentoxizität, Daten zur Kanzerogenität nach dermalen/inhalativer Exposition, Daten zur kardio-vaskulären Toxizität, zu Reproduktions- und Entwicklungsstörungen nach akuter und chronischer Inhalation, sowie Daten zur süchtig machenden Wirkung und andere toxikologische Informationen. In einer möglichen Überarbeitung der Tabakproduktrichtlinie ist neben der Erstellung einer Positiv- oder Negativliste für die Verwendung von Tabakzusatzstoffen auch die Einführung von Bewertungskriterien eine Aufgabe der Kommission. Das im Leitfaden der Europäischen Kommission vorgeschlagene Format ist mittlerweile in einzelnen Mitgliedsstaaten – mit länderspezifischen Unterschieden – gesetzlich bindend.

Das im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) angesiedelte deutsche WHO-Zentrum für Tabakkontrolle hat 2010 eine Empfehlung einer Prüfstrategie für Tabakzusatzstoffe veröffentlicht [18]. Hier wird ein mehrstufiges Bewertungsverfahren empfohlen, das die toxikologische Bewertung des unverbrannten Zusatzstoffes sowie seiner Pyrolyseprodukte beinhaltet. Sobald hier ein toxikologisch bedenkliches Einzelergebnis auftritt, sollte der Bewertungsprozess abgebrochen werden und dem Zusatzstoff sollte die Zulassung verweigert werden. Die strikte Anwendung dieses Konzepts durch die Regulatoren würde in der Praxis dazu führen, dass auf Grund der Pyrolyseergebnisse den meisten Tabakzusatzstoffen, speziell solchen organischen Ursprungs, eine Zulassung verweigert werden müsste, da bei der Verbrennung von organischem Material, wie auch bei Tabak selber, immer toxikologisch bedenkliche Substanzen entstehen [19].

Ein weiterer Ansatz wurde von regulatorischer Seite publiziert [20]. Dieser beinhaltet neben der Bewertung des unverbrannten Zusatzstoffes und seiner Pyrolyseprodukte auch die Bewertung der chemischen Zusammensetzung und biologischen Aktivität des Rauchs von Testzigaretten; jeweils mit und ohne den Zusatzstoff. In einer abschließenden Bewertung des Zusatzstoffes sollen jedoch alle Daten in ihrem Zusammenhang berücksichtigt werden.

Auch das niederländische 'National Institute for Public Health and the Environment' (RIVM) hat ein Modell zur Abschätzung der Exposition und der gesundheitlichen Gefährdung durch Rauchinhalts- und Tabakzusatzstoffen veröffentlicht [21]. Im Gegensatz zu den in beiden vorhergehenden dargestellten Modellen arbeitet das RIVM Modell nicht mit einer stufenweisen Bewertungsstrategie, sondern berechnet für einzelne Rauchbestandteile einen Sicherheitsfaktor (Margin of Exposure Level; MOE), der das Gefährdungspotenzial abbilden soll. Der MOE ist der Quotient aus den Grenzwerten LOAEL (Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level) oder NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect-Level), die auf Grund inhalationstoxikologischer Daten bestimmt wurden und der Dosis, die den Raucher über den Hauptstromrauch erreicht. Da aber für die meisten Rauchbestandteile die inhalationstoxikologischen Daten fehlen und auch synergistische oder antagonistische Effekte nicht berücksichtigt werden können, sind dem Modell in der Praxis enge Grenzen gesetzt.

In Abwesenheit von verbindlichen oder allgemein anerkannten Testverfahren haben die Zigarettenindustrie und unabhängige Forschungseinrichtungen Strategien und Systeme für die Testung von Zusatzstoffen entwickelt und etabliert. Für die toxikologische Testung diente die Vielzahl von standardisierten Methoden in biologischen Systemen für die Prüfung von Industriechemikalien und Arzneimitteln als Orientierung²⁾. Beispielhaft sind in Tabelle 1 einige systematische Arbeiten zu den jeweils verwendeten Untersuchungsmethoden aufgeführt.

²⁾ OECD: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788

ICH: <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>

Tabelle 1 — Ausgewählte Untersuchungen zur toxikologischen Bewertung von Tabakzusatzstoffen

Studie	Anzahl getesteter Zusatzstoffe	Versuchsansatz	Chemische/Biologische Tests
Kröller, 1963 – 1970 [22-40]	58	isolierte Einzelstoffprüfung durch Pyrolyse	— Einzelstoffpyrolyse bei 700 °C und Analyse der Pyrolyseprodukte
NCI, 1965 – 1980 [41-45]	25	Zusatzstoff auf Testzigarette	— Mäusehaut-Tropftest (ICR SWISS female) — <i>in vitro</i> -Zytotoxizität (humane KB Tumorzellen) — <i>in vitro</i> -Zilientoxizität (chicken tracheal epithelium)
Gaworski et al., 1998 und 1999 [46,47]	172/150	Mischung von Zusatzstoffen auf Testzigarette	— Inhalationsstudie an Ratten (Fischer 344, 13 Wochen) — Mäusehaut-Tropftest (SENCAR)
Carmines et al., 2002 [48]	333	3 Mischungen von Zusatzstoffen auf Testzigarette in 2 Dosierungen	— Hauptstromrauchanalyse mit 51 Analyten — Ames-Test (5 Stämme) — <i>in vitro</i> -Zytotoxizität (Neutralrot Test, Maus BALB/c 3T3) — Inhalationsstudie an Ratten (Sprague-Dawley, 90 Tage) — Risk-Index
Baker et al., 2004 [49-51]	482	Mischungen von Zusatzstoffen in mehreren 'typischen' Konzentrationen zu einer Standardzigarette	— Hauptstromrauchanalyse mit 44 Analyten — Ames-Test (5 Stämme) — <i>in vitro</i> -Mikrokerntest (Hamster, V79) — <i>in vitro</i> -Zytotoxizität (Neutralrot Test, Hamster V79) — Inhalationsstudie an Ratten (90 Tage, Sprague-Dawley CD®)
Baker und Bishop, 2004 und 2005 [52,53]	291/159	— isolierte Einzelstoffprüfung durch Pyrolyse	— Analyse der Pyrolyseprodukte und des Anteils nicht pyrolysierten Zusatzstoffes
a) Hahn und Schaub, 2010 [20]; b) Intorp et al., 2010 [54]; c) Roemer et al., 2010 [55]	3	Zugabe der einzelnen Zusatzstoffe in jeweils 3 Dosierungen zu einer Testzigarette. Kontrolle: Testzigarette ohne Zusatzstoffe	— a) Hauptstromrauchanalyse mit 12 Analyten — b) Hauptstromrauchanalyse mit 9 Analyten — c) Hauptstromrauchanalyse mit 40 Analyten, — Ames-Test (5 Stämme) (c) — <i>in vitro</i> -Zytotoxizität (Neutralrot Test, Maus BALB/c 3T3)

Studie	Anzahl getesteter Zusatzstoffe	Versuchsansatz	Chemische/Biologische Tests
Stavanja et al., 2003; 2006; 2008 [56-58]	4	Einzelne Zusatzstoffe auf Testzigarette in jeweils 3 Dosierungen	— Hauptstromrauchanalyse mit 19 Analyten — Ames-Test (2 Stämme) — Inhalationsstudie an Ratten (Sprague-Dawley, 13 Wochen) — Schwesterchromatidaustausch-Test (SCE) in CHO-Zellen aus Ovarien vom chinesischen Hamster — Mäusehaut-Tropftest (SENCAR) — <i>in vitro</i>-Zytotoxizität (Neutralrot Test, Maus BALB/c 3T3) mit 1 Zusatzstoff
Gaworski et al., 2011 [59]	95	Einzelne Zusatzstoffe auf Testzigarette in jeweils 3 Dosierungen	— Hauptstromrauchanalyse mit 9 Analyten — Ames-Test (5 Stämme) — <i>in vitro</i>-Zytotoxizität (Neutralrot Test, Maus BALB/c 3T3) — Inhalationsstudie an Ratten (Sprague-Dawley, 90 Tage) mit 31 Zusatzstoffen

Eine Arbeitsgruppe der CORESTA (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco) hat 2004 Empfehlungen für die *in vitro*-Testung von Tabakrauch erarbeitet [60]. In ihrem Bericht empfiehlt sie eine Testbatterie bestehend aus einem bakteriellen Mutagenitätstest (Ames-Test mit *Salmonella typhimurium*), einem Gentoxizitäts-Test in Säugerzellen (Mikronukleustest, Chromosomenaberrationstest oder den L5178Y Mauslymphomtest) und einen Zytotoxizitätstest in Säugerzellen (Neutralrottest).

In einem Untersuchungsbericht zur Testung und Bewertung von Tabakzusatzstoffen kommt die Organisation LSRO (Life Sciences Research Organization) zu dem Schluss, dass die toxikologische Testung von Zusatzstoffen grundsätzlich sinnvoll ist. Nach einer umfassenden Diskussion des breiten Methodenspektrums und der veröffentlichten toxikologischen Daten zu Tabakrauch und Tabakzusatzstoffen, stellen die Experten in dem Bericht fest, dass es keinen Test gibt, der das breite Spektrum der gesundheitlichen Effekte des Tabakrauchs vollständig abdeckt und daher eine einzige Testmethode nicht ausreichend für die Bewertung sein kann. Eine Schwierigkeit im Bewertungsprozess liege insbesondere darin, die Menge eines Zusatzstoffes festzulegen, die als sicher eingestuft werden kann. Nur der Vergleich einer Zigarette mit Zusatzstoff mit einer identischen Zigarette ohne den Zusatzstoff würde erlauben, die Effekte des Zusatzstoffes als alleinigen Faktor herauszufiltern und zu bestimmen. Der Ansatz der LSRO fokussiert auf die Bewertung der Rauchmatrix und den Aufnahmeweg durch Inhalation [61].

Zusammenfassend zeigt sich, dass es auf verschiedenen Ebenen Aktivitäten und Bestrebungen gibt, Tabakzusatzstoffe einheitlich und wissenschaftlich basiert zu regulieren. Gleichzeitig wird deutlich, dass es einen Bedarf an allgemeingültigen und konsensfähigen Testmethoden und Bewertungsstrategien gibt.

3 Diskussion der Ansätze für die toxikologische Prüfung und Bewertung von Zusatzstoffen in Tabakprodukten

3.1 Zielsetzung

Das Ziel der toxikologischen Prüfung und Bewertung von Zusatzstoffen in Tabakprodukten ist es, sicher zu stellen, dass sie das Gefährdungspotenzial von Tabakprodukten nicht erhöhen.

3.2 Grundsätzliche Überlegungen

3.2.1 Allgemeines

Für die toxikologische Prüfung von Zusatzstoffen in *unverbrannter* Form stehen anerkannte wissenschaftliche Prinzipien und Verfahren aus anderen Bereichen wie zum Beispiel von Pharmazeutika, Lebensmittel- und Kosmetikprodukten zur Verfügung.

Nationale und internationale Richtlinien für etablierte Testsysteme zur Prüfung der biologischen Aktivität, bzw. der Toxizität von Einzelsubstanzen beispielsweise der OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), FDA (Food and Drug Agency, USA), EPA (Environmental Protection Agency, USA) sowie die Prüfrichtlinien zum deutschen Chemikalien- und Arzneimittelgesetz, können hier als etablierte Standards herangezogen werden.

Im Gegensatz dazu gibt es bei der Prüfung von Zusatzstoffen in Tabakprodukten keine anerkannten Standards für die Untersuchung der Auswirkung von Zusatzstoffen auf die Toxizität des Hauptstromrauchs. Es ist jedoch naheliegend, dass zwei Anforderungen bei dieser spezifischen toxikologischen Prüfung erfüllt sein sollten:

- Die Prüfmethoden sollten sich so nah wie möglich an den oben vorgeschlagenen internationalen Richtlinien orientieren, die gut etabliert und validiert sind;
- Die Prüfmethoden sollten die bisher bekannten toxischen Eigenschaften des Tabakrauchs im Hinblick auf die mit dem Rauchen verbundenen Erkrankungen erfassen.

Neben den Gemeinsamkeiten zu den erwähnten Richtlinien für die toxikologische Prüfung der Zusatzstoffe als Reinsubstanz gibt es aber auch eine Reihe von Unterschieden bei der Prüfung von Zusatzstoffen, weil sie mit dem Tabak verbrannt und vom Konsumenten inhaliert werden können. Somit liegt es nahe, dass Zusatzstoffe unter realistischen Bedingungen im Tabakrauch getestet werden. Zu den Besonderheiten der Prüfung der biologischen Aktivität von Tabakrauch von Zigaretten mit und ohne Zusatzstoffe zählen:

- Es handelt sich bei Tabakrauch um ein gut untersuchtes Stoffgemisch. Die toxischen Effekte *in vitro*, *in vivo* und beim Menschen sind weitgehend bekannt. In diesen Systemen zeigt Tabakrauch eine deutlich messbare toxische Grundaktivität.
- Es kommt demzufolge auf quantitative Unterschiede in der Toxizität zwischen Tabakrauch aus Tabakprodukten mit und ohne Zusatzstoffe an. Es geht also in erster Linie nicht um die Frage, ob Tabakrauch in einem bestimmten biologischen Test einen Effekt zeigt oder nicht, sondern darum, ob sich durch die Zugabe des Zusatzstoffes die Toxizität erhöht.
- Tabakrauch ist kein Einzelstoff, sondern ein komplexes Gemisch aus gasförmigen und partikelgebundenen Substanzen. Eine weitere Komplikation besteht darin, dass dieses Gemisch keinem statischen, sondern einem dynamischen physikochemischen Verteilungsgleichgewicht unterliegt. Diese Tatsache stellt besondere Anforderungen an die Vorgehensweise bei der Erzeugung und Untersuchung des Tabakrauchs.
- Es ist bekannt, dass viele Rauchinhaltsstoffe ihre biologische Aktivität erst nach metabolischer Aktivierung entfalten. Für Einzelstoffe lassen sich die beim Menschen für die Metabolisierung relevanten Enzyme und Isoenzyme ermitteln und in den biologischen Tests entsprechend berücksichtigen. Bei komplexen Gemischen wie Tabakrauch ist dies praktisch nicht möglich. Die einzusetzenden metabolischen Aktivierungssysteme stellen daher immer Kompromisslösungen dar, die ein möglichst breites Substratspektrum aufweisen sollten.

3.2.2 Prüfmatrix

Die Beurteilung eines Zusatzstoffes und seiner Pyrolyseprodukte reicht nicht aus, um zu entscheiden, ob dieser die Toxizität des Tabakrauchs im Vergleich zum Rauch ohne Zusatzstoffe erhöht. Vielmehr muss der Zusatzstoff auch auf der Tabakmatrix durch entsprechende Testverfahren geprüft werden. Hierbei sollen sowohl die Verbrennungsprodukte des Zusatzstoffes, der Anteil des Zusatzstoffes, der unverbrannt in den Rauch übergeht, sowie Reaktionsprodukte mit anderen Rauchbestandteilen erfasst werden. Beim Verbrennen von organischem Material entstehen toxische Produkte, so auch beim Verbrennen von Tabak. Tabakrauch ist daher toxisch, unabhängig davon, ob er aus Zigaretten mit oder ohne Zusatzstoffe generiert wurde. Um eine möglichst „praxisnahe“ Testung vorzunehmen, ist für die toxikologische Bewertung des Zusatzstoffes nur der relative Vergleich zwischen der Zigarette mit dem zu prüfenden Zusatzstoff und der gleichen Zigarette ohne den zu prüfenden Zusatzstoff sinnvoll.

Bei der Erörterung der Testmatrix stellt sich die Frage, in welcher Form die Zusatzstoffe getestet werden sollen: Als Einzelstoff oder als Mischung. Für die Einzelstoff-Prüfung spricht, dass der Zusatzstoff in relativ hohen Dosen eingesetzt werden kann. Gegen dieses Vorgehen spricht, dass die möglichen Wechselwirkungen mit anderen Zusatzstoffen nicht berücksichtigt würden und dass bei den vielen verwendeten Zusatzstoffen die Einzeltestung nicht mehr möglich wäre. Als pragmatisches Vorgehen würde sich bei der Entscheidung Einzelstoff/Mischung Folgendes anbieten: Zusatzstoffe, die in größeren Mengen auf dem Tabakprodukt eingesetzt werden, könnten als Einzelstoff getestet werden; Zusatzstoffe, die nur in geringen Mengen eingesetzt werden, könnten als Mischung geprüft werden.

Bezüglich der einzusetzenden Tabakmatrix in Form einer Kontrollzigarette und einer Testzigarette³⁾ ergeben sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten:

- Bei der „Produkt-basierten“ Testung wird die aktuelle Marke vor der Änderung (Kontrollzigarette) mit dem geänderten Produkt (Testzigarette) verglichen. Die Zusatzstoffe auf der Tabakmatrix werden prinzipiell in Dosierungen geprüft, in denen sie tatsächlich dem Produkt zugesetzt werden.
- Bei der „Prinzip-basierten“ Testung wird eine Kontrollzigarette ohne die zu prüfenden Zusatzstoffe mit einer Testzigarette mit den zu prüfenden Zusatzstoffen verglichen. Kontrollzigarette und Testzigarette sind mit Ausnahme des Zusatzstoffes so weit wie möglich identisch. Die Kontrollzigaretten sollten über einen ausreichend langen Zeitraum unverändert erhältlich und bezüglich der Tabakmischung und der Spezifikation (Ausstattung hinsichtlich Filter, Filterventilation, Papier usw.) zu gängigen Markenprodukten vergleichbar sein. Möglich wäre auch die Verwendung von verschiedenen Typen von Kontrollzigaretten, wie z. B. Produkte, die aus American Blend- oder Virginia-Tabaken bestehen. Bei dieser Art der Prüfung können einzelne Zusatzstoffe und/oder Mischungen von Zusatzstoffen getestet werden.

Bei der „Produkt-basierten“ Prüfung sind die Dosierungen der Zusatzstoffe durch die Produktspezifikation vorgegeben und daher möglicherweise zu gering, um deren eventuelle Wirkung in den eingesetzten Testsystemen aufzuzeigen. Ein wichtiges Prinzip der toxikologischen Testung, nämlich das der Überdosierung gegenüber der Normalsituation, kann bei diesem Ansatz also nicht verwirklicht werden. Erschwerend kommt bei der Produkt-basierten Testung hinzu, dass die Tabakmischung von auf dem Markt befindlichen Zigaretten erntebedingten Schwankungen unterliegt.

Bei der „Prinzip-basierten“ Prüfung ist diese Überdosierung möglich. Anzustreben ist, dass die erhöhte Dosierung um mindestens den Faktor 2 über der real eingesetzten Menge liegen sollte. In der Praxis stößt dies jedoch oft auf Schwierigkeiten, da die Produktion solcher Zigaretten technische Schwierigkeiten bereiten könnte. Auch könnten die Brenneigenschaften zu stark beeinflusst werden und so zu einer Rauchzusammensetzung führen, die unter Normalbedingungen nicht auftritt. Es sollte also eine maximale Zusatzstoffdosis auf Tabak getestet werden, die die Brenneigenschaften der Zigarette noch nicht signifikant beeinflusst. Eventuell sollte noch eine dritte Dosis getestet werden, die zwischen den beiden genannten Dosen liegt. Damit können Effekte durch ihre Dosisabhängigkeit besser erkannt werden. Der Einsatz von Kontrollzigaretten mit unterschiedlichen Spezifikationen (z. B. Tabakmischungen) scheint nicht notwendig zu sein: wie man der Literatur entnehmen kann, wurden die gleichen Zusatzstoffe mit unterschiedlichen Kontrollzigaretten in mehreren Laboratorien geprüft [49,62-64]. Trotz unterschiedlicher Kontrollzigaretten führten die Vergleiche zwischen Kontroll- und Testzigarette zu den gleichen Ergebnissen.

3) Im Vergleich zur ersten Ausgabe dieses Leitfadens wird der Begriff „Referenzzigarette“ in diesem Zusammenhang nicht mehr verwendet, da er zu Verwechslungen mit dem in der Literatur gebräuchlichen Begriff „Standard Reference Cigarette“ führen kann (siehe 3.2.8).

3.2.3 Rauchgenerierung

Bei der Prüfung von Zigarettenrauch stellt sich automatisch auch die Frage nach der Rauchgenerierung. Die Erzeugung des Rauchs sollte dabei im Regelfall normgerecht z. B. nach Standardabrauchmethoden wie DIN/ISO erfolgen [65]. Standardisierte Methoden ermöglichen die Reproduktion von Untersuchungsergebnissen in anderen Laboratorien sowie den Vergleich mit Ergebnissen, die mit anderen Zigaretten gewonnen wurden. Bei der von ISO etablierten Abrauchmethode wird die Filterventilation der Zigarette nicht blockiert und alle 60 s (Zugintervall) maschinell ein Zug von 2 s (Zugdauer) mit 35 ml Zugvolumen genommen. Diese Abrauchmethode ist praktisch identisch mit der US-amerikanischen FTC (Federal Trade Commission)-Methode. Zusätzlich zu diesen Methoden sind weitere Abrauchmethoden für Zigaretten entwickelt worden, deren Abrauchvorgang intensiver ist: die „Massachusetts-Methode“ (50 % Blockieren der Filterventilation, 30 s Zugintervall, 2 s Zugdauer, 45 ml Zugvolumen) [66] und die von Health Canada etablierte „Canada Intense“ Methode (100 % Blockieren der Filterventilation, 30 s Zugintervall, 2 s Zugdauer, 55 ml Zugvolumen) [67].

Die intensiveren Abrauchmethoden geben, speziell für Zigaretten mit niedrigen ISO-Werten, eventuell ein realistischeres Bild über die Rauchmenge, die ein Raucher tatsächlich beim Rauchen einer Zigarette aufnehmen kann. Für Zigaretten mit hohen ISO-Werten erscheinen sie jedoch, wenn man die mittleren Rauchaufnahmen über die gesamte Population der Raucher zugrunde legt, zu unrealistisch hohen Rauchausbeuten zu führen [68,69]. Da die Rauchaufnahme beim Raucher jedoch extrem variabel ist, gibt es kein typisches Rauchverhalten, das mit einer definierten Abrauchmethode abgebildet werden kann.

Die intensiveren Abrauchmethoden ergeben je Zigarette trivialerweise eine höhere Ausbeute an Rauch (Kondensat und Gasphase) und führen so zu einer höheren toxikologischen Gesamtaktivität. Die Konzentration der meisten toxischen Substanzen im Rauch und die Toxizität des Rauchs je mg Kondensat oder Nikotin sind aber niedriger. Sehr wahrscheinlich ist dies ein Effekt, der sich durch eine vollständigere Verbrennung erklären lässt, wenn man Zigaretten intensiver abraucht. Zudem gibt es beim intensiven Abrauchen einen Trend, dass sich die Schadstoffkonzentrationen und die Toxizität des Rauchs verschiedener Zigaretten angleichen. Dadurch könnten zustoffbedingte Unterschiede in der Toxizität, die unter der DIN/ISO-Abrauchmethode zu beobachten wären, bei Anwendung der intensiveren Abrauchmethoden verschwinden. Daher scheinen diese Methoden weniger sensitiv zu sein, um Unterschiede in der Qualität des Rauchs von verschiedenen Zigaretten zu erkennen, die durch einen Zusatzstoff hervorgerufen werden könnten [70].

3.2.4 Prüffagen

Prüffagen für die toxikologische Prüfung von Zigarettenrauch sind im Regelfall der Hauptstromrauch oder dessen Fraktionen.⁴⁾

Bei der chemischen Charakterisierung des Zigarettenrauchs bezüglich seiner Rauchbestandteile bestimmt man die Analyten des Hauptstromrauchs, soweit nicht die Fragestellung ein anderes Prüffagen verlangt. Kommen gleiche Analyten sowohl in der Partikel- als auch in der Gasphase vor, werden sie in beiden Phasen getrennt bestimmt.

⁴⁾ Bei der Verbrennung von Tabak entsteht ein komplexes Gemisch, das sich aus einer Gas- und einer Partikelphase zusammensetzt. Die Partikelphase des Rauchs kann beim Abrauchen mit einer Rauchmaschine im Laboratorium auf einem speziellen Glasfaserfilter (Cambridge-Filter) gesammelt werden. Der Filter scheidet 99,9 % der Partikel ab, die einen aerodynamischen Durchmesser > 0,3 µm aufweisen. Partikel > 0,1 µm werden zu 99,2 % abgeschieden. Die Masse der auf dem Filter abgeschiedenen Partikelphase (TPM = total particulate matter) wird gravimetrisch bestimmt. Substanzen, die den Filter passieren, werden als Gasphase bezeichnet.

Das in der Partikelphase enthaltene Nikotin und Wasser kann chemisch bestimmt werden. Rechnerisch ergibt sich durch Abzug von Nikotin und Wasser von der Partikelphase das nikotinfreie, trockene Kondensat (NFDPM = nicotine free dry particulate matter), welches auch Kondensat oder „Teer“ genannt wird.

Des Weiteren unterscheidet man beim Zigarettenrauch zwischen Hauptstromrauch und Nebstromrauch. Der Hauptstromrauch wird während eines Zuges im Glutkegel der brennenden Zigarette gebildet und zieht dann durch die noch nicht brennende Tabaksäule zum Mundstück und wird vom Raucher inhaliert. Der Nebstromrauch entsteht zwischen den Zügen und entweicht in die Umgebung. Wegen den ungleichen Bedingungen bei der Entstehung (wie z. B. Verbrennungstemperatur und Sauerstoffverhältnisse) zeigen Haupt- und Nebstromrauch Unterschiede in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Der Hauptstromrauch, der die Gas- und Partikelphase enthält, wird im Folgenden auch als Gesamtrauch bezeichnet.

Der Einsatz von frischem Hauptstromrauch, der das eigentliche Expositionsagens des Rauchers darstellt, ist methodisch anspruchsvoll und für die wenigsten biologischen Testsysteme etabliert. Folgende Prüfagenzien für Hauptstromrauch von Zigaretten kommen zum Einsatz:

- Frischer Hauptstromrauch (Gesamtrauch, enthält Partikel- und Gasphase, nicht älter als einige Sekunden),
- Frische Gasphase; gewonnen durch Entfernung der Partikelphase aus dem Hauptstromrauch mit einem Cambridge-Filter,
- Partikelphase (TPM: Total Particulate Matter); gewonnen durch Partikelabscheidung mit einem Cambridge-Filter aus dem Hauptstromrauch,
- Kombination von TPM und Gasphasen-Extrakt (Puffer- oder Kulturmedium-Extrakt von Gasphase)⁵⁾,
- Puffer- oder Kulturmedium-Extrakt von Hauptstromrauch (Gesamtrauch),
- Puffer- oder Kulturmedium-Extrakt von Gasphase.

Bezüglich der Prüfagenzien ist anzumerken, dass die Auswahl eines bestimmten Agens nicht unbedingt etwas darüber aussagt, welche Anteile des Rauchs das biologische Testsystem wirklich erreichen. So sind z. B. bei Gesamtrauch (abhängig von z. B. Partikelgrößen und Wasserlöslichkeit) selektive Expositionen zu erwarten, da die Abscheidung der verschiedenen Rauchbestandteile sehr unterschiedlich sein kann. Da dies jedoch auch für die verschiedenen Abschnitte des menschlichen Respirationstrakts zutrifft, ist eine Beurteilung der Realitätsnähe einer gegebenen Kombination von Prüfagens und biologischem Testsystem nicht trivial. Deshalb ist eine eingehende Charakterisierung des Prüfagens am Expositionsort im Testsystem von besonderer Wichtigkeit.

Die Exposition von *in-vitro*-Testsystemen mit maximal einigen Sekunden altem Hauptstromrauch stellt hohe experimentelle Anforderungen. Dies betrifft sowohl die Erzeugung eines relativ frischen Rauchaerosols in der gewünschten Verdünnung, als auch die Exposition von Zellen oder Bakterien an einer Grenzschicht zwischen Luft und Flüssigkeit (air/liquid-exposure). Diverse Systeme für die Gesamtrauchexposition wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt und charakterisiert [71-82]. Ein Schwerpunkt dieser kürzlich publizierten Arbeiten liegt in der detaillierten Analyse der Expositionssituation, wobei neben dem Verhältnis von Partikel- zu Gasphase auch der Verlust der Partikelphase sowie chemisch/physikalische Unterschiede im Rauch direkt nach der Generierung und in der Expositionskammer untersucht wurden. Der Einsatz von frischem Hauptstromrauch als Prüfagens wird in der Literatur unter anderem zur Testung von neuartigen Tabakprodukten und als Alternative zu Tierversuchen diskutiert [82,83]. Es fehlen jedoch publizierte systematische Untersuchungen zur *in vitro*-Testung von Tabakzusatzstoffen mit frischem Hauptstromrauch. Daher gibt es keine Daten, die zeigen, dass frischer Hauptstromrauch für die *in vitro*-Testung von Tabakzusatzstoffen das am besten geeignete Prüfagens ist.

Die (air/liquid) Exposition von *in-vitro*-Systemen mit Gasphase kann durch Zwischenschaltung eines Cambridge-Filters zur Abscheidung der Partikelphase realisiert werden.

Puffer- oder Kulturmedium-Extrakte von Hauptstromrauch oder von der Gasphase des Hauptstromrauchs stellen sicherlich artifizielle Prüfagenzien für Tabakrauch dar. Dennoch kann insbesondere die Toxizität der wasserlöslichen Anteile der Gasphase mit dieser Methode getestet werden, wie in der Literatur mehrfach berichtet wird [84]. Für die Gewinnung dieser Extrakte gibt es bislang keine standardisierten Verfahren. In der Regel kommen derzeit 'in-house' Methoden zur Anwendung. Daher kann das Testagens von Laboratorium zu Laboratorium unterschiedlich zusammengesetzt sein. Andererseits ist die Testung von wässrigen Gasphasenextrakten in der Health Canada Methode T-502 (Neutralrot Test) durchaus vorgesehen [13]. Bei den in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden für Gesamtrauch ist davon auszugehen, dass, bedingt durch die niedrige Abscheiderate für Partikel, die Partikelphase im Vergleich zur Gasphase unterrepräsentiert ist. Für Gesamtrauch und Gasphase gilt, dass hydrophobe Rauchbestandteile in wässrigen Extraktionssystemen nur zu einem sehr geringen Teil eingefangen werden. Systematische Untersuchungen hierzu sind jedoch in der Literatur nicht beschrieben.

⁵⁾ Health Canada Official Method T-502, *Neutral Red Uptake Assay for Mainstream Tobacco Smoke* schreibt dieses Testagens zwingend vor.

Am weitesten verbreitet ist heute sicherlich die biologische Testung der in DMSO (Dimethylsulfoxid) oder anderen organischen Lösungsmitteln aufgenommenen Partikelphase. Die Gewinnung der Partikelphase (Kondensat, TPM) erfolgt nach gut beschriebenen ISO-Standardmethoden [85]. Die *in vitro*-Tests können mit TPM-Lösungen nach den existierenden Standardmethoden für Einzelstoffe durchgeführt werden (z. B. OECD-Guidelines), wobei die Langzeit-Alterung der Partikelphase unter kontrollierten Bedingungen keinen Einfluss auf die toxikologische Qualität der einmal gewonnenen Partikelphase hat [86]. Bei der Verwendung von TPM für die biologische Testung darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Gasphase bei diesem Ansatz fehlt und mögliche Interaktionen zwischen Gas- und Partikelphase nicht zum Tragen kommen können: Bedingt durch die Wahl des Testsystems hat sich in einigen Tests die Gasphase als weniger bedeutend als die der Partikelphase erwiesen (z. B. Mutagenitätstest nach Ames in der Plate Incorporation Version). Dies kann größtenteils durch die Expositionstechnik erklärt werden, bei der große Anteile der Gasphasenbestandteile abdampfen und das biologische Testsystem (z. B. die Bakterien) nicht mehr erreichen. Bei anderen biologischen Endpunkten kommt der Gasphase jedoch eine große Bedeutung zu (z. B. Zytotoxizität) [87]. Die Wahl des am besten geeigneten Prüfgases hängt daher sicherlich sowohl von der Fragestellung ab, als auch vom gewählten biologischen Prüfsystem und vom untersuchten biologischen Endpunkt. Bei der Testung von Zigaretten mit unterschiedlichen Filtersystemen ergaben sich z. B. bei gentoxischen (Mikrokerne) als auch zytotoxischen (Neutralrot) Endpunkten signifikante Unterschiede in der Toxizität des Gesamtrauchs, die jedoch beim Kondensat nicht beobachtet wurden [88].

3.2.5 Bezugsgrößen für die Dosis

In der Toxikologie werden Effekte in Relation zur Dosis beschrieben, die dem Testsystem zugeführt wurde. Bei der Prüfung von Tabakrauch ist diese Bezugsgröße seit Jahrzehnten üblicherweise die Gesamtmasse an Partikeln (Total Particulate Matter = TPM) oder nikotinfreies Trockenkondensat (tar = NFDPM = TPM abzüglich Wasser und Nikotin), denen das Testsystem ausgesetzt ist. Diese Bezugsgröße wird auch bei chemischen Untersuchungen für die Konzentration an Rauchinhaltsstoffen benutzt. Werden nur Gasphasenanteile betrachtet, so werden diese ebenso auf die Größen TPM oder Kondensat bezogen, die zusammen mit der Gasphase produziert wurden. Auch der Bezug auf die Anzahl Zigaretten, die abgeraucht wurden, ist speziell in der Rauchchemie üblich. In letzter Zeit wird aber immer öfter die Masse an Nikotin als Bezugsgröße gewählt. Da Nikotin eine pharmakologisch wichtige Rolle bei der Inhalation von Tabakrauch spielt, ist diese Wahl auch sinnvoll. Die Konzentration an Nikotin im Rauch ist für einen gegebenen Zigarettentyp weitgehend proportional zur Konzentration an TPM [89]. Daher können prinzipiell alle drei Bezugsgrößen (TPM, Zigaretten, Nikotin) verwendet werden. Bei der Prüfung von Tabakzusatzstoffen ist jedoch bei der Interpretation von Versuchsergebnissen auf Nikotinbasis eine Besonderheit zu beachten. Um mögliche Erhöhungen in der Toxizität aufzudecken, werden experimentelle Zigaretten eingesetzt, denen der Zusatzstoff in weit höherer Menge zugesetzt wird als in der realen industriellen Produktion vorgesehen. Zigaretten werden üblicherweise nach Masse je Zigarette produziert. Damit ersetzt der Zusatzstoff massenmäßig einen Teil des Tabaks. Da die Zusatzstoffe zwar TPM aber kein Nikotin generieren, verringert sich entsprechend die auf Nikotin bezogene Berechnungsgrundlage und biologische Aktivitäten erscheinen numerisch größer. Es ist daher für die Interpretation von Ergebnissen sinnvoll, neben der Angabe je Masseneinheit Nikotin auch die entsprechenden Werte je Masseneinheit TPM anzugeben.

3.2.6 Prüfungsumfang

Die toxikologische Prüfung von Tabakzusatzstoffen sollte die verschiedenen toxikologischen Wirkmechanismen von Tabakrauch abdecken. Hieraus ergibt sich, dass ein einziges Testsystem nicht ausreichend sein kann. Vielmehr wird man mehrere Testsysteme, d. h. eine Testbatterie, einsetzen müssen. Die Frage nach dem Umfang der Testbatterie stellt sich besonders vor dem Hintergrund, dass die Mehrheit der Tabakzusatzstoffe nur in geringen Mengen eingesetzt wird. Im Prinzip sind die toxikologischen Bedenken bei niedrigeren Dosierungen geringer als bei höheren Dosierungen. Dieser Ansatz führt zum Beispiel dazu, dass bei geringen Expositionen eine toxikologische Testung für unnötig betrachtet wird [90]. Dieses toxikologische Prinzip (Level of Toxicological Concern), das den Umfang der toxikologischen Prüfungen bestimmt, ist bei vielen anderen Sicherheitsprüfungen üblich und in Verordnungen umgesetzt. Im Bereich der Chemikalienregulierung in Europa (REACH) bestimmt im Wesentlichen die jährliche Produktionsmenge eines Stoffes den Umfang der Untersuchungen. Im Bereich der toxikologischen Bewertung von Lebensmittelzusatzstoffen ist die Exposition des Verbrauchers ein wesentlicher Parameter. Aufbauend auf diesem Prinzip ist es folgerichtig, den Umfang der Prüfung von der beabsichtigten Zugabemenge des Zusatzstoffes abhängig zu machen [91].

3.2.7 In vivo- versus in vitro-Testverfahren

Die Frage nach dem Umfang einer Testbatterie stellt sich auch im Zusammenhang mit dem Einsatz von *in vivo*-Untersuchungen. Für die Charakterisierung des Gefährdungspotenzials gelten *in vivo*-Untersuchungen im Vergleich zu *in vitro*-Untersuchungen als relevanter. In der Öffentlichkeit bestehen aber ethisch begründete Vorbehalte, Tierversuche für die Prüfung von Genussmitteln einzusetzen. In Deutschland sind Tierversuche für die Entwicklung von Tabakprodukten nach dem Tierschutzgesetz generell nicht zulässig. Auf EU-Ebene gibt es auch starke Bestrebungen, den Einsatz von Tieren zur toxikologischen Bewertung von Chemikalien durch Alternativmethoden zu reduzieren. In diesem Zusammenhang seien die Aktivitäten von ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) und ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) des BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) genannt. Unabhängig von Tierschutz-Gesichtspunkten, die für eine Reduzierung von Tierversuchen ausschlaggebend sind, werden durchaus auch aus wissenschaftlichen Gründen Bedenken gegen den Einsatz von Tierversuchen zur Bewertung der toxikologischen Wirkung von Tabakrauch vorgetragen. Die allgemein akzeptierten Inhalations-Tiermodelle für die toxikologische Testung von Zigarettendrauch zeigen reproduzierbar im Wesentlichen nur eine irritierende Wirkung im Respirationstrakt an [92]. Die irritierende Wirkung wird als tumorpromovierend angesehen und stellt einen wichtigen toxischen Effekt dar. Sie spiegelt aber nicht die vielfältigen Auswirkungen des Rauchens auf die Gesundheit des Menschen, insbesondere auf die Häufigkeit verschiedener Krebserkrankungen und das erhöhte Risiko von Herz- und Gefäßerkrankungen, wieder. Tiermodelle, wie z. B. der Mäusehaut-Tropftest, werden u. a. wegen der unterschiedlichen Applikationsweise oft kritisch gesehen. Hier könnte eine umfangreiche *in vitro*-Testbatterie eine hohe Aussagekraft erreichen.

3.2.8 Positivkontrolle

Bei der Prüfung von Chemikalien setzt man allgemein Positivkontrollen ein. Dies geschieht bei der chemischen Analyse in Form von Referenzchemikalien, deren Reinheit bekannt ist. Sie ermöglichen die Kalibrierung der Geräte und dadurch quantitative Angaben zur Menge der Analyten in der Probe. Dies ist auch Standardpraxis bei der Bestimmung von Rauchinhaltsstoffen. Bei der Prüfung in biologischen Testsystemen setzt man Referenzchemikalien ein, die biologisch aktiv sind. So kann der Nachweis erbracht werden, dass das Testsystem überhaupt in der Lage ist, die nachzuweisende Aktivität aufzuzeigen. Dies ist auch gängige Praxis bei der Prüfung von Zigarettendrauch. Der Einsatz von Referenzsubstanzen ermöglicht darüber hinaus eine quantitative Charakterisierung des Testsystems bezüglich seiner Sensitivität. Da aber Einzelsubstanzen keine Aussage über die Sensitivität des Testsystems bezüglich positiver oder negativer Interaktionen ermöglichen, wie sie beim Zigarettendrauch als komplexes Gemisch von Substanzen vorliegt, ist es allgemeine Praxis, den Rauch einer Standard-Referenzzigarette parallel zu testen. Standard-Referenzzigaretten sind kommerziell verfügbare Monitorprodukte, wie die „Kentucky Reference Zigarette 3R4F“ oder „CORESTA Monitor Test Piece CM 7“⁶⁾. Diese Zigaretten dienen auch der Langzeitkontrolle innerhalb eines Laboratoriums und ermöglichen den Vergleich zwischen verschiedenen Laboratorien und Studien, indem man den zu prüfenden Parameter für die Standard-Referenzzigarette als 100 %-Wert ansetzt und entsprechende Werte von anderen Zigaretten prozentual zu dieser Größe angibt.

3.2.9 Diskriminierungsfähigkeit der Testsysteme

Wie schon unter 3.2.2 ausgeführt, versucht man, bei der Testung von Zusatzstoffen durch eine gegenüber den Marktprodukten deutlich erhöhte Zugabemenge zu den Testzigaretten, die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, eventuelle Veränderungen in der Toxizität des Rauchs aufzudecken. Um möglichst reproduzierbare, quantitative Ergebnisse zu erhalten, sollten die Testsysteme für das Testagens Tabakrauch optimiert sein (z. B. Zellzahl, Behandlungsdauer, Konzentration des Metabolisierungssystems). Hier stellt sich die Frage, wie groß ein Unterschied in der Toxizität zwischen Kontroll- und Testzigarette sein muss, damit er als solcher in den verschiedenen Testsystemen angezeigt wird. Basierend auf den Studiendesigns mit der üblichen Anzahl von Versuchseinheiten [93], der typischen Streuung innerhalb eines Laboratoriums (intra-Studien Variabilität) und den statistischen Signifikanzniveaus (zweiseitige Fragestellung, Fehler 1. Art = 0,05, Fehler 2. Art = 0,2) lässt sich mathematisch abschätzen, wie groß dieser kleinste erkennbare Unterschied (minimal detectable difference, MDD) sein muss. Erfahrungswerte für diese tabakrauch-spezifische Untersuchung zeigen, dass je

⁶⁾ <http://www.coresta.org> (Reference products)

<http://www.ca.uky.edu/refcig/>