Beiträge zur Tabakforschung · Band 2 · Heft 2 · Juni 1963

DOI: 10.2478/cttr-2013-0057

Quantitative Bestimmung von Phenolen im Tabakrauch mit 4-Aminoantipyrin (AAP)*

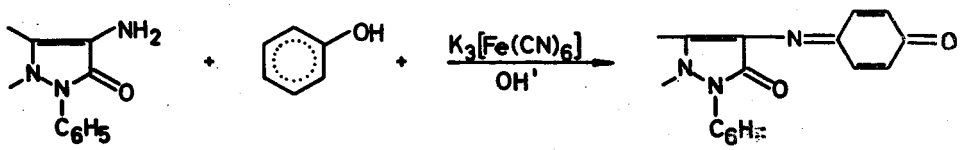
von G. Lorentzen und G. Neurath

Forschungslaboratorium H. F. u. Ph. F. Reemtsma, Hamburg

EINLEITUNG

Die von *D. Hoffmann* und *E. L. Wynder* (1) vorgeschlagene gaschromatographische Bestimmung von Phenolen im Tabakrauch ist zeitraubend und daher für Routineuntersuchungen nicht geeignet.

Phenole reagieren nach *E. Emerson* (2) mit 4-Aminoantipyrin (1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-aminopyrazolon-[5]) in alkalischer Lösung mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) nach dem folgenden Reaktionsschema zu Farbstoffen:



Die gebildeten Farbstoffe absorbieren in wässeriger Lösung konstitutionsabhängig bei Wellenlängen zwischen 510 und 540 nm. Die Farbstoffe lassen sich mit Chloroform aus wässeriger Lösung extrahieren und absorbieren in diesem Lösungsmittel einheitlich bei 456 nm (3). Die molaren Extinktionskoeffizienten differieren jedoch in Abhängigkeit von der Konstitution in beiden Lösungsmitteln nicht unerheblich. Para-substituierte Phenole reagieren gar nicht. Den höchsten molaren Extinktionskoeffizienten besitzt der Farbstoff des Phenols C_6H_5OH (Abb. Seite 76).

Die Farbreaktion wurde von *B. Drábek* (3) in einer sehr sorgfältigen Arbeit unter Ausnutzung der Löslichkeit des Farbstoffes in Chloroform für die kolorimetrische Bestimmung von Phenolen in Wasser vorgeschlagen.

Wir haben versucht, diese Methode für die Erfassung der wasserdampfflüchtigen Phenole des Tabakrauchkondensates einzusetzen. Da die Methode alle Phenole des Rauches erfaßt und eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufweist, erschien sie als Relativmethode unter Bezug der Gesamtphenole auf die Eichkurve des reinen Phenols von vornherein geeignet. Weitere Vorteile der Methode liegen in der Kürze der Ausführung und in der Erfassung sehr kleiner Mengen von Phenolen (0,1 ppm).

* eingegangen am 31. Januar 1963

Die von uns beschriebene Methode benutzt das nach den Einheitlichen Vorschriften für die Analyse von Tabak und Tabakrauch (4) aus mindestens 10 Cigaretten durch elektrostatische Niederschlagung gewonnene Rauchkondensat, das in Alkali gelöst und anschließend in phosphorsaurer Lösung einer Wasserdampfdestillation unterworfen wird. Das Wasserdampfdestillat wird unmittelbar für die Farbreaktion eingesetzt. Die so erhaltene Lösung der Farbstoffe der gesamten Phenole des Tabakrauchkondensates wird mit Chloroform extrahiert und bei 456 nm, gegen einen in gleicher Weise erhaltenen Reagensblindwert, spektrophotometrisch vermessen. Die gemessenen Werte werden an der Extinktionskurve des reinen Phenols abgelesen. Wir drücken demgemäß den gesamten Phenolgehalt des Tabakrauchkondensates in

Mikrogramm Phenole als C_6H_5OH/Cig.

bzw.

ppm Phenole als C_6H_5OH / verrauchte Tabakmenge

aus.

Die Methode eignet sich unseres Erachtens als konventionelle Methode und läßt insbesondere ohne weiteres die Wirksamkeitsbestimmungen von Filtern gegenüber Phenolen zu.

METHODE

Reagenzien:

4-Aminoantipyrin (1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-amino-pyrazolon-[5]),	Merck p.a., 2 %ige wässerige Lösung, täglich frisch bereitet.
Kaliumhexacyanoferrat-(III),	Merck p.a., 8 %ige wässerige Lösung.
Natronlauge	Riedel de Haën p.a., 32 %ig, auf 5 % verdünnt.
Ammoniumchlorid	Merck p.a., 5 %ige wässerige Lösung.
Ammoniaklösung	Merck p.a., d = 0,910.
Chloroform	Merck oder Riedel de Haën p.a.
Phosphorsäure	Merck oder Riedel de Haën p.a., 85 %ig, auf 10 % verdünnt.

Testsubstanzen:

Phenol	Merck p.a., frisch destilliert.
o-, m-, p-Kresol	Merck p.a., frisch destilliert.

Apparaturen:

Rauchmaschine *British Cigarette Components,* Ethel Mark VI.

Spektrophotometer *Beckmann,* Model DK 1.

p_H-Meter *Knick,* Glas- und Calomelelektrode.

Eichkurve:

1 g frisch destilliertes Phenol wird in einem Liter Wasser gelöst. Diese Lösung wird im Verhältnis 1:100 (5 ml/500 ml) verdünnt und als Standardlösung benutzt (Anm. 1).
Phenolgehalt der Lösung 10 ppm.

In mit 400 ml Wasser (Anm. 6) gefüllte 500 ml-Scheidetrichter werden aus einer Bürette (25 ml, Unterteilung in 0,1 ml) aliquote Teile (1—10 ml = 10—100 mcg Phenol) der Phenolstandardlösung zugegeben. Dann gibt man 10 ml 5%ige Ammoniumchloridlösung und soviel konzentrierte Ammoniaklösung hinzu, daß der p_H-Wert 10 mit einer Genauigkeit ± 0,1 (Kontrolle mit der Glaselektrode) erreicht wird. Man fügt dann nacheinander mit Vollpipetten jeweils unter kräftigem Schütteln 3 ml 2%ige AAP-Lösung und 3 ml 8%ige Kaliumhexacyanoferrat-(III)-lösung hinzu. Man läßt 3 min stehen und extrahiert anschließend dreimal mit je 10,10 und 5 ml Chloroform. Die vereinigten Chloroformextrakte werden in einen 25-ml-Meßkolben filtriert und mit Chloroform bis zur Marke aufgefüllt (Anm. 2).
Die Messung erfolgt gegen einen Blindwert, der alle Reagenzien außer der Phenolstandardlösung enthält, in 20 mm Glasküvetten.
Das Maximum liegt bei 456 nm. Für die Einwaagen zwischen 10 und 50 mcg Phenol liegen die Extinktionen zwischen 0,200 und 0,700.
Die Eichkurve wurde aus den Durchschnittswerten von vier Versuchsreihen ermittelt (Abb. 2), die mit verschiedenen Reagens-Lösungen durchgeführt wurden. Durch die Wasserdampfdestillation tritt praktisch kein Fehler auf.
An den Chloroformextrakten zeigt sich beim Stehenlassen bis zu 24 Std im Tageslicht keine Veränderung.

AUSFÜHRUNG DER BESTIMMUNG IM TABAKRAUCHKONDENSAT

Zur Bestimmung der Phenole im Tabakrauchkondensat wird das nach den Einheitlichen Vorschriften für die Analyse von Tabak und Tabakrauch (4) durch elektrostatische Niederschlagung aus 10 normalen Blendcigaretten mit und ohne Filter auf einer Ethel Mark VI Rauchmaschine erhaltene Kondensat verwendet.
Es werden vier Parallelbestimmungen mit dem Kondensat von je 10 Cigaretten pro Kanal durchgeführt:
Das Kondensat von 10 Cigaretten wird zweimal mit je 30 ml 10%iger Natronlauge aus den Niederschlagsrohren herausgelöst und mit etwa 60 ml Wasser nachgespült (Anm. 3). Die Niederschlagsrohre sind nach dem Herauslösen blank; die leichte Trübung in der Lösung schließt keine Phenole ein. Die so gewonnene Suspension des Kondensates wird unter Eiswasserkühlung mit etwa 80 ml 10%iger Phosphorsäure bis auf einen p_H-Wert unter 4 angesäuert und anschließend in der für Nikotinbestimmungen üblichen Apparatur mit Wasserdampf destilliert (Anm. 4). Vorlage: 500 ml Meßkolben mit 30 ml 5%iger Natronlauge. Es wird bis auf 400 ml destilliert und anschließend unter Ausspülen der Apparatur auf 500 ml aufgefüllt.
Von der Lösung werden 10 ml für die Farbentwicklung in einen mit 400 ml Wasser beschickten Scheidetrichter pipettiert (Anm. 6). Dann gibt man 10 ml 5%ige Ammoniumchloridlösung und soviel konzentrierte Ammoniaklösung hinzu, daß der p_H-Wert 10 mit einer Genauigkeit ± 0,1 (Kontrolle mit der Glaselektrode) erreicht wird. Man fügt dann nacheinander mit Vollpipetten jeweils unter kräftigem Schütteln 3 ml 2%ige AAP-Lösung und 3 ml Kaliumhexacyanoferrat-(III)-lösung hinzu. Man läßt 3 min stehen und extrahiert anschließend dreimal mit je 10,10 und 5 ml Chloroform. Die vereinigten Chloroformextrakte werden in einen 25-ml-Meßkolben filtriert und mit Chloroform bis zur Marke aufgefüllt.
Die Messung erfolgt gegen einen Blindwert, der aus dem Chloroformextrakt einer alle Reagenzien enthaltenden Blindlösung besteht, in 20 mm Glasküvetten. Die Extinktionswerte liegen für das Kondensat aus 10 Cigaretten bei 0,4—0,6.
Die Durchschnittswerte der von uns untersuchten Blendcigaretten, die aus der Eichkurve für reines Phenol ermittelt wurden, lagen bei 190—210 mcg Gesamtphenol, berechnet als C_6H_5OH pro Cigarette, das entspricht rund 225—250 ppm der verrauchten Tabakmenge.
Die untersuchten Tabakrauchkondensate enthielten im Durchschnitt 0,7% Gesamtphenol.

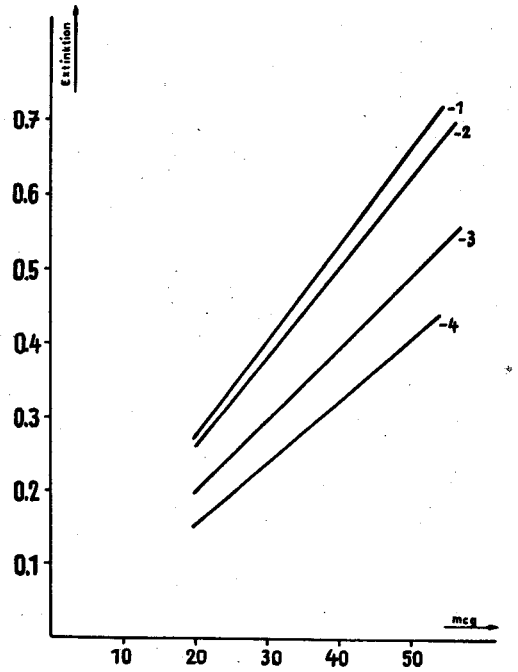


ABBILDUNG 1

Eichkurve für verschiedene Phenole

1 = Phenol, 2 = o-Chlorphenol, 3 = o-Kresol, 4 = m-Kresol
p-Kresol = keine Extinktion unter den Bedingungen der Bestimmung

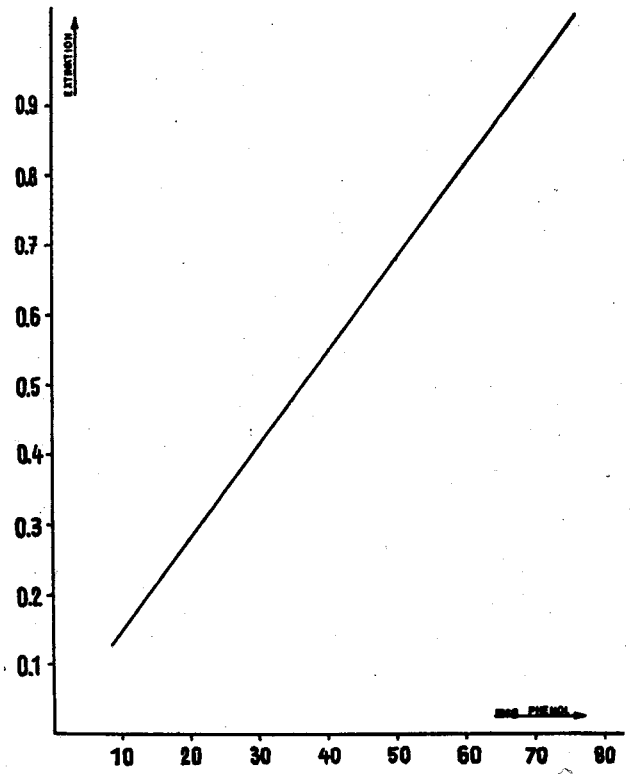


ABBILDUNG 2

Eichkurve aus 4 Versuchsreihen

Anmerkung 1 Die Testlösungen sind, im Dunkeln aufbewahrt, höchstens 8 Tage haltbar.

Anmerkung 2 25-ml-Meßkolben reicht aus, da beträchtliche Mengen Chloroform in der Wasserphase gelöst bleiben.

Anmerkung 3 Organische Lösungsmittel (Aceton, Äther und Alkohol) stören die Phenolbestimmung mit AAP. Das Tabakrauchkondensat wird deshalb mit Natriumhydroxidlösung herausgelöst.

Anmerkung 4 Aromatische Amine reagieren bei niedrigerem p_H-Wert ebenfalls mit 4-Aminoantipyrin. Durch die saure Wasserdampfdestillation wird diese Störung ausgeschlossen. Außerdem liegt das Absorptionsmaximum bei 430 nm; die molare Extinktion ist gering.

Anmerkung 5 Es ist darauf zu achten, daß mindestens 400 ml destilliert werden; eine geringere Destillatmenge reicht zum Übertreiben der Phenole nicht aus.

Anmerkung 6 Bei geringeren Verdünnungen tritt Störung durch stärkere Färbung des Blindwertes auf, dadurch verzerren sich die Absorptionsmaxima (5).

QUANTITATIVE ABSICHERUNG

Die quantitative Abscheidung der Phenole durch elektrostatische Niederschlagung wurde durch Vergleich des elektrostatischen Kondensats mit einem Kühlkondensat, das in einer der Ethel Mark VI-Maschine vorgeschalteten Aceton-Trockeneis-Falle gewonnen wurde, abgesichert.
In einem weiteren Versuch wurden einem Tabakrauchkondensat 100 mcg Phenol (C_6H_5OH) pro Cigarette zugesetzt und in der Bestimmung quantitativ wiedergefunden.

REPRODUZIERBARKEIT

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Methode wurde die Standardabweichung der Phenolbestimmung mit 4-Aminoantipyrin unter den folgenden Bedingungen ermittelt:
Um die Fehler, die durch die Abrauchbedingungen in die Phenolbestimmung hineingelangen, auszuschalten, wurde als Ausgang ein einheitliches Kühlkondensat von 600 Cigaretten benutzt.
Es wurden von zwei Bearbeitern 10 Gänge, zeitlich gegeneinander gestaffelt, nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:

Gesamtphenol als C_6H_5OH in mcg/Cig.

Bearbeiter I	*Bearbeiter II*
180	182
178	182
179	177
182	177
176	182

Mittel = 179,5 mcg/Cig.
s = ± 2,4 mcg/Cig.
v = ± 1,3 %.

Die Reproduzierbarkeit ist demnach gut.

GEGENÜBERSTELLUNG DIESER PHENOLBESTIMMUNG MIT DER METHODE NACH HOFFMANN-WYNDER

Für die Methode nach *Hoffmann-Wynder* ermittelten wir einen Variationskoeffizienten von ± 1,9 %. Ein Vergleich der beiden Methoden ist auf exakter Basis nicht möglich, da die AAP-Methode die para-substituierten Phenole nicht erfaßt, hingegen werden sicher eine Reihe phenolischer Substanzen mitbestimmt, die *Hoffmann-Wynder* in ihren Fraktogrammen nicht auswerten.
Rein zahlenmäßig mag immerhin eine Gegenüberstellung der Ergebnisse, die nach beiden Methoden an einem einheitlichen Kondensat gewonnen wurden, interessant sein: Nach *Hoffmann-Wynder* wurden durch Addition von Phenol, o-, m- und p-Kresol 202 mcg/Cig. gefunden, während mit 4-Aminoantipyrin 180 mcg/Cig., berechnet als C_6H_5OH, ermittelt wurden.

BEURTEILUNG

Die Vorteile der von uns beschriebenen Methode bestehen in der Einfachheit der Ausführung, die ohne weiteres gestattet, auch Routinebestimmungen der Phenole durchzuführen. Die Methode ist empfindlich. Die Reproduzierbarkeit ist gut.
Für die Bestimmung der Filterwirksamkeit nach der neuen Methode ist es notwendig, bei Vergleichen verschiedener Filterarten alle Filter an gleichen Tabaksträngen zu untersuchen, da über die Gleichmäßigkeit der Zusammensetzung des Phenolanteiles der Kondensate verschiedener Tabakmischungen vorerst nichts ausgesagt werden kann. Untersuchungen hierüber wurden begonnen.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue Methode zur Bestimmung der Phenole in Tabakrauchkondensaten mit Hilfe von 4-Aminoantipyrin (1-Phenyl-2.3-dimethyl-4-aminopyrazolon-[5]) beschrieben. Die Methode ist für Routinebestimmungen geeignet und weist eine gute Reproduzierbarkeit auf.

SUMMARY

The present paper describes a new method for the determination of phenols contained in tobacco smoke condensates by means of 4-aminoantipyrine. The procedure can be reproduced without difficulties and is suitable for routine estimations.

RÉSUMÉ

Dans le présent travail les auteurs décrivent une méthode nouvelle pour la détermination des phénols contenus dans les condensats de la fumée du tabac au moyen de 4-aminoantipyrine. Le procédé se laisse reproduire sans difficultés et se prête à des contrôles courants.

LITERATUR

1. Hoffmann, D. und Wynder, E. L.: Beiträge zur Tabakforschung 1 (1961) 101.
2. Emerson, E.: J. org. Chem. 8 (1943) 417.
3. Drábek, B.: Gesundheits-Ingenieur 81 (1960) 359.
4. Beiträge zur Tabakforschung 1 (1962) 307.
5. Ettinger, Ruckhoft und Lischka: Analyt. Chem. 23 (1951) 783.

Anschrift der Verfasser: Forschungslaboratorium H. F. u. Ph. F. Reemtsma, Hamburg-Bahrenfeld, Luruper Chaussee 145.