

Methoden zur Untersuchung von Papier, Karton und Pappe für Lebensmittelverpackungen und sonstige Bedarfsgegenstände

7. Multimethoden-Methoden für einzelne Stoffgruppen, die in mehreren Laboratorien erprobt wurden

7.3 Bestimmung von phenolischen Monomeren

1. Allgemeine Angaben

Bei der angeführten Methode handelt es sich um ein erprobtes Verfahren, das vom *chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Münsterland-Emscher-Lippe (CVUA-MEL)* entwickelt wurde.

Die vorliegende Methode dient zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung einer Reihe von Photoinitiatoren und ggf. weiterer migrierfähiger Substanzen in Verpackungsmitteln aus Papier und Kartonage.

Zudem wird auch ein Verfahren zur Bestimmung der Substanzen mithilfe einer Tenax-Migration beschrieben. Dieses Verfahren ist auch auf Verpackungen aus anderen Materialien (z.B. Kunststoff) anwendbar.

Diese Methode kann, aufgrund von Blindwertproblemen, nicht für Phthalate angewendet werden.

2. Grundlagen des Verfahrens

Die Extraktion der Proben erfolgt mit Hilfe der ASE (Accelerated Solvent Extraktion). Die dabei extrahierten Substanzen werden mittels GC-MS bzw. GC-MS/MS quantifiziert.

Bei der Tenax-Migration werden die Substanzen nach erfolgter Migration vom Tenax eluiert und nach Aufkonzentrierung mittels GC-MS bzw. GC-MS/MS quantifiziert.

3. Chemikalien und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, müssen die verwendeten Chemikalien analysenrein sein.

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Ottawa-Sand	k. A.	k. A.
Aluminiumoxid (ALOX)	k. A.	z.B. Alumina-B Super, Firma ICN, Aktivitätsstufe I
Tenax	k. A.	Um blindwertfreies Tenax zu erhalten wird das gesamte Tenax mit Ethylacetat gereinigt (Elution in großer Glassäule) und anschließend auf Blindwertfreiheit

Aceton	k. A.	überprüft.
Gereinigtes Hexan	k. A.	picograde, für die Rückstandsanalyse Hexan (picograde) wird mit 3,5 Gew.-% Aluminiumoxid versetzt, gut geschüttelt und mindestens 5 Stunden – am besten über Nacht – stehen gelassen.
Ethylacetat	k. A.	picograde, für die Rückstandsanalyse
Lösungen		
ISTD-Stammlösungen	c = 200 µg/ml	10 mg Benzophenon d10 werden in einem 50-ml-Messkolben genau eingewogen und mit Ethylacetat aufgefüllt. 10 mg Di-n-propylphthalat werden in einem 50-ml-Messkolben genau eingewogen und mit Ethylacetat aufgefüllt.
ISTD-Verdünnung 1	k. A.	2,0 ml der Benzophenon-d10- und 0,5 ml Di-n-propylphthalat-Stamm-lösungen werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert und mit Ethylacetat aufgefüllt.
ISTD-Verdünnung 2	k. A.	1,0 ml der Verdünnung 1 wird in einen 25-ml-Messkolben pipettiert und mit Ethylacetat aufgefüllt.
Kalibrier-Stammlösung	c = 400 µg/ml	Jeweils 10 mg der Referenzsubstanzen werden in einem 25-ml-Messkolben genau eingewogen und mit Ethylacetat aufgefüllt.
Standardlösung I	je 40 µg/ml	1 ml der Kalibrier-Stammlösung) wird in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und mit Ethylacetat aufgefüllt
Standardlösung II	c = 0,4 µg/ml	0,5 ml der Standardlösung I werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert und mit Ethylacetat aufgefüllt.
Kalibrierlösungen	k. A.	0,5 ;1,0; 2,0; 5,0; 8,0; 10,0 ml Standardlösung II sowie je 0,5 ml ISTD-Verdünnung 1 werden in je einen 25-ml-Messkolben pipettiert und mit Ethylacetat aufgefüllt

Tabelle 1 Chemikalien und Lösungen

Hinweis:

Die Liste der Kalibriersubstanzen sowie die Berechnung der Standardkonzentrationen sind in einer selbstgelenkten Exceltabelle dargelegt.

Der 0,5 ml Kalibrierstandard dient zur Überprüfung der Nachweisgrenzen.

4. Geräte und Hilfsmittel

Die benötigten Pasteurpipetten und GC-Vials müssen vor Verwendung für mind. 4 h bei 400 °C im Muffelofen ausgeglüht werden! Die Septumkappen müssen vor Verwendung mit gereinigtem Hexan gewaschen und im Trockenschrank getrocknet werden!

- 4.1 Muffelofen, 400 °C
- 4.2 Ultraschallbad
- 4.3 Extraktionseinheit, hier: Accelerated Solvent Extraktion, ASE 200 Dionex
- 4.4 5-ml-ASE-Extraktionskammern
Die Extraktionskammern werden zunächst für 10 Min. mit Aceton und anschließend je zweimal für 10 Min. mit gereinigtem Hexan im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend werden sie mit Hilfe der ASE (Methode Nr. 3, Solvent: Ethylacetat) gespült. Dieser Schritt ist notwendig, um die Fritten ausreichend zu reinigen.
- 4.5 Glasfaserfilter für ASE-Extraktionskammern
Die Glasfaserfilter werden mit gereinigtem Hexan gewaschen und anschließend getrocknet.
- 4.6 Glasfaserfilter für 11-ml-ASE-Extraktionskammer; z.B. Dionex
- 4.7 40-ml-ASE-Vial
- 4.8 Vollpipetten: 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml; 5,0 ml; 8,0 ml und 10,0 ml
- 4.9 Messkolben: 10 ml; 20 ml; 25 ml; 50 ml
- 4.10 Glasspritze 10 ml mit LUER Konus, mit Ethylacetat gespült und getrocknet
- 4.11 Glassäulen: $\varnothing = 1$ cm, Länge = 30 cm, Glasfritte mit Porengröße 0
- 4.12 Evaporator, z.B: Büchi Evaporator
- 4.13 Büchi Syncor Analyst: R12 Rack mit Probengläsern 120 ml und 1 ml Glasappendix (Restvolumen)
- 4.14 0,45 μ m Cellulose Filter, hier: Macherey Nagel Chromafil RC45/15 MS Nr.: 729 037
- 4.15 GC-MS: ITQ (Ion Trap)
- 4.16 Säule: Factor Four VF-5ms, 30m *0,25 mm I.D. 0,25 μ m Filmdicke

5. Durchführung

Hinweis: Die Proben sollten nicht direkt mit den Fingern berührt werden, d.h. zur Probenvorbereitung müssen Schutzhandschuhe getragen werden.

5.1 Extraktion von Verpackungsmitteln aus Papier mit ASE

Ein repräsentativer Teil der Papierprobe (z.B. $\frac{1}{4}$ der Probe oder ein Streifen über die gesamte Länge, mindestens 10 g) wird zunächst in schmale Streifen von ca. 5 x 0,5 cm Kantenlänge geschnitten. Die Streifen gut mischen und einen Teil davon (ca. 2 – 4 g) in kleine Stücke von ca. 5 x 5 mm Kantenlänge zerschneiden.

Das eine Ende der 5-ml-ASE-Extraktionszelle (4.4) wird verschraubt und ein Glasfaserfilter (4.5) mit Hilfe eines Kunststoffstempels am Ende der Kammer fixiert.

1 g der zerkleinerten Probe wird in die Extraktionskammer genau eingewogen. Danach werden die Zwischenräume in der Extraktionskammer mit Ottawa-Sand aufgefüllt.

0,5 ml der ISTD-Verdünnung 1 werden in die Kammer direkt auf den Ottawa-Sand pipettiert.

Als Abschluss wird ein Glasfaserfilter auf den Ottawa-Sand gegeben und die Zelle fest verschraubt.

Die Proben werden unter Verwendung der Extraktionsmethode Nr. 1 mit der ASE der Extraktion in ein ASE-Vial (4.7) unterzogen.

Extraktion im Papier: ASE Methode 1

Preheat:	5 min.
Heat:	5 min.
Static:	10 min.
Flush:	100 %
Purge:	60 sec.
Cycles:	5
Pressure:	100 bar
Temperature:	100 °C

Solvent: Ethylacetat

Nach erfolgter Extraktion wird das ASE-Vial entnommen und das Lösungsmittel quantitativ in einen 25-ml-Messkolben überführt.

Nach dem Auffüllen des Messkolbens mit Ethylacetat wird die Lösung über ein 0,45 µm Filter (4.14) filtriert. Dazu wird eine 10-ml-Glasspritze (4.10) mit der Probenlösung gefüllt. Die ersten 7 – 8 ml werden verworfen, um den Filter zu waschen. Die letzten 2 ml werden nun in ein GC-Vial filtriert.

Falls von den hier bezeichneten Bedingungen abgewichen wird, ist die Abweichung zu dokumentieren.

5.2 Bestimmung des Überganges von Photoinitiatoren auf Tenax

Idealer Weise erfolgt die Tenax-Migration in einer Migrationszelle. Ist dies nicht möglich, wird die Fläche für die Migration durch inertes Material (z.B. Metall oder Glas

welches mit Ethylacetat gespült wurde) begrenzt. In jedem Fall richtet sich die Tenaxmenge nach der Fläche der Probe. Hierbei ist folgendes Verhältnis einzuhalten:

4 g Tenax pro 1 dm²

Die auf 0,01 g abgewogene Menge Tenax wird gleichmäßig auf die zuvor festgelegte Probenfläche verteilt. Die Migrationszeit ist dem Prüfplan der jeweiligen Probe zu entnehmen.

Nach erfolgter Migration wird das Tenax vollständig in eine Glassäule (4.11) gegeben, und durch leichtes Klopfen verdichtet. Anschließend werden 0,5 ml der ISTD-Verdünnung 2 direkt in die Säule auf das Tenax pipettiert.

Die Photoinitiatoren werden nun mit 40 ml Ethylacetat in ein Probenglas (4.13) eluiert. Dabei sollte die Tropfgeschwindigkeit ca. 1 - 2 Tropfen pro Sekunde betragen.

Nach der Elution wird das Ethylacetat mit dem Evaporator (4.12) auf ein Restvolumen von 1 ml eingeengt. Hierbei haben sich folgende Bedingungen bewährt:

Bad Temperatur: 40 °C

Temp. Vacuum Cover: 55 °C

Methode am Vakuumkontroller:

Step01:	Druck Start	200 mbar
	Druck Ende	130 mbar
	Zeit	2 min.
Step02:	Druck Start	130 mbar
	Druck Ende	130 mbar
	Zeit	13 min.
Step03:	Druck Start	130 mbar
	Druck Ende	90 mbar
	Zeit	1 min.
Step04:	Druck Start	90 mbar
	Druck Ende	90 mbar
	Zeit	34 min.

Nach Ablauf des Programms sollte das Restvolumen 1 ml betragen. Bei zu geringem Volumen wird mit Ethylacetat aufgefüllt. Befindet sich noch zu viel Lösungsmittel im Probenglas, darf keinesfalls mit Stickstoff abgeblasen werden! In diesem Fall wird das Ethylacetat bei gleicher Bad-Temperatur und einem Druck von 90 mbar weiter eingeengt.

Der verbleibende Milliliter wird in ein GC-Vial überführt.

Falls von den hier bezeichneten Bedingungen abgewichen wird, ist die Abweichung zu dokumentieren.

6. Auswertung und Berechnung

6.1 GC-MS Bedingungen

Die quantitative Bestimmung wird mittels GC-MS bzw. GC-MS/MS Detektion im EI-Modus durchgeführt.

6.1.1 GC-MS-Bedingungen – Ion Trap ITQ (Firma Thermo)

Instrumenten- Methode:

Trennsäule:	FactorFour VF-5ms (Varian 30 m*0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Schichtdicke)
Trärgas:	Helium
Flow:	1,2 ml/min.
Einspritzmenge:	1 µl Surge Splitless
Split open time:	1,50 min
Injektor:	280°C
Ofentemperatur:	60°C -200°C (5°C/min)-285°C (10°C/min), 285°C (9 min)
Transferline:	300°C
Ionenquelle:	250°C
Scan Mode:	Full Scan und MS ² Parameter siehe Methodenausdruck
Micro Scans :	2
Max Ion Time:	25 ms

6.1.2 Gerstel Maestro – Methode: Liquid-Standard.mth

7. Auswertung

7.1 Quantitative Bestimmung der Photoinitiatoren im Papier

Der Gehalt der Substanzen wird nach der Methode des internen Standards bestimmt. In der „Processing Method“ erfolgt die Festlegung der für die Quantifizierung benötigten Massen.

Die Auswertung erfolgt nach der Anpassung über die lineare Funktion und Berechnung mit Hilfe des internen Standards. Der so erhaltene Gehalt stellt die Konzentration der jeweiligen Substanz in µg/ml Lösung dar.

Die Berechnung des Gehaltes im Papier erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Substanz [mg/kg]} = \frac{\text{Gehalt [\mu g/ml]} * 25 \text{ ml}}{\text{Einwaage [g]}}$$

Für die quantitative Auswertung über die Gerätesoftware Xcalibur mit Hilfe des „QuanBrowsers“ wird daher folgender Dilution Faktor ermittelt und zur Berechnung in die Sequenz eingegeben:

$$\text{Dilution Faktor} = \frac{25 \text{ ml}}{\text{Einwaage [g]}} [\text{mg/kg}]$$

Der hier genannte Faktor bezieht sich auf das oben angeführte Endvolumen von 25 ml und ergibt somit die Angabe des Ergebnisses in der Einheit mg/kg.

7.2 Quantitative Bestimmung der Photoinitiatoren nach Tenax-Migration

Der Gehalt der Substanzen wird nach der Methode des internen Standards bestimmt. In der „Processing Method“ erfolgt die Festlegung der für die Quantifizierung benötigten Massen.

Die Auswertung erfolgt nach der Anpassung über die lineare Funktion und Berechnung mit Hilfe des internen Standards. Der so erhaltene Gehalt stellt die Konzentration der jeweiligen Substanz in µg/ml Lösung dar.

Die Berechnung des Übergangs, bezogen auf die Papieroberfläche, erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Substanz } [\mu\text{g}/\text{dm}^2] = \frac{\text{Gehalt } [\mu\text{g}/\text{ml}] * 1 \text{ ml}}{\text{Oberfläche Probe } [\text{dm}^2]}$$

Für die quantitative Auswertung über die Gerätesoftware Xcalibur mit Hilfe des „QuanBrowsers“ wird daher folgender Dilution Faktor ermittelt und zur Berechnung in die Sequenz eingegeben.

$$\text{Dilution Faktor} = \frac{1 \text{ dm}^2}{\text{Oberfläche Probe } [\text{dm}^2]}$$

Der hier genannte Faktor bezieht sich auf das oben angeführte Endvolumen von 1 ml und ergibt somit die Angabe des Ergebnisses in der Einheit µg/dm².

7.3 Qualitative Absicherung

Zur Absicherung der Befunde dient bei den im FullScan aufgenommenen Substanzen das Massenspektrum. Bei Übereinstimmungen mithilfe der Bibliothekssuche (Bibliotheken: CVUAMELLib; MainLib und Wiley275.HP) mit einem Match Faktor von über 900 kann von einem positiven Befund ausgegangen werden. Auch bei geringerem Match Faktor als 900 kann Übereinstimmung vorliegen. Aufgrund von Matrixeffekten, Säulenbluten, geringen Konzentrationen der Analyten oder unterschiedlicher MS-Technologie kommerzieller Bibliotheksspektren kann der Faktor geringer ausfallen.

Sofern der Match Faktor von 900 unterschritten ist, erfolgt eine visuelle Interpretation des Massenspektrums.

Bei den im MS/MS Modus ausgewerteten Substanzen ist das aus dem Mutterion entstandene Tochterion und das daraus resultierende SIM Signal eine absolut ausreichende Absicherung.

8. Qualitätssicherung

8.1 Überprüfung der Empfindlichkeit

Die Anforderungen an die Empfindlichkeit des Analysensystems (GC-MS) sind im Gerätebuch spezifiziert.

Der 0,5-ml-Kalibrierstandard dient vor jeder Probenserie zur Überprüfung der Nachweisgrenzen. Die Substanzen 2-Phenoxyethylacrylat oder Anthrachinon, müssen in diesem Standard mit einem Signal:Rausch-Verhältnis von 10:1 nachweisbar sein (Mindestanforderung).

8.2 Positive Befunde

Hohe Gehalte an Photoinitiatoren allein im Lebensmittelkontaktpapier sind nicht beurteilungsrelevant. In diesem Fall wird der Übergang der Photoinitiatoren in Tenax (oder - sofern das Papier bereits im Kontakt mit dem Lebensmittel stand - ins verpackte Lebensmittel) bestimmt.

Bei auffälligen Übergängen in Tenax wird eine Doppelbestimmung vorgenommen. Dies gilt ebenfalls für Substanzen, die toxikologisch nicht bewertet sind, und in Mengen von über 1,7 µg/dm² im Tenaxmigrat vorliegen.

9.4 Wiederfindungen

Die prozentualen Wiederfindungen der ISTD's sollten nicht außerhalb 70-130 % der Flächenwerte (Vergleich Probe zu Kalibrierstandard) liegen.

9. Mitgeltende Unterlagen und Literatur

- G. Sagratini, G. Caprioli, G. Cristalli, S. Vittori: Determination of ink photoinitiators in packed beverages by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1194 (2008) 213-220.
- Gil-Vergara, C. Blasco, Y. Pico Determination of 2-isopropyl thioxanthone and 2-ethylhexyl-4-dimethylaminobenzoate in milk: comparison of gas and liquid chromatography with mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem* (2007) 389:605-617.
- Sanches Silva A., Pastorelli S., Cruz J.M., Castaneira I., Simoneau C., Paseiro-Losada P. (2008): Development of an Analytical Method for the Determination of Photoinitiators Used for Food Packaging Materials with Potential to Migrate into Milk, *Journal of Dairy Science* 91(3), 900-909.