

Kombinierte Anwendung von chemischer Analytik und Biotests auf Verpackungsmaterialien

Thomas J. Simat

TU-Dresden

Professur für Lebensmittelkunde und Bedarfsgegenstände

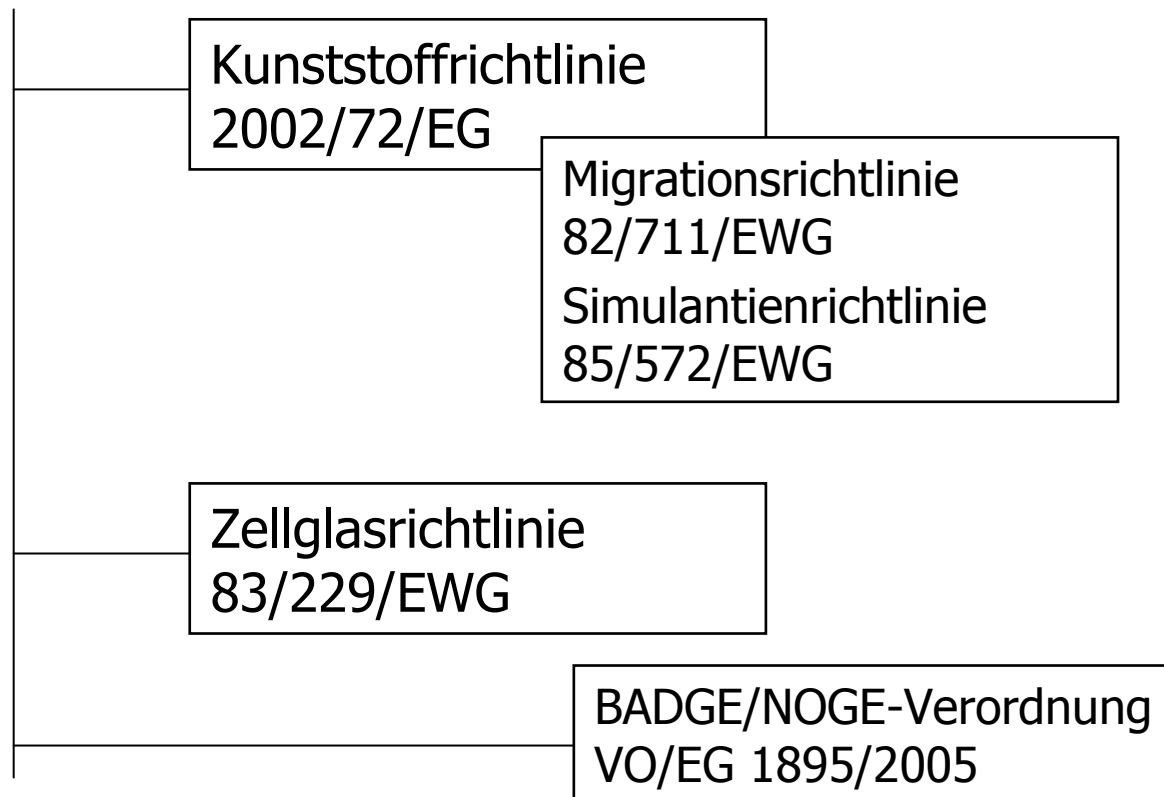
BfR-Symposium – 50 Jahre Kunststoffkommission, Berlin, 25. April 2007

Rechtliche Grundlagen

- EU Rahmenverordnung 1935/2004/EG
 - Definition ‚Materialien und Gegenstände im Lebensmittelkontakt‘
 - Anforderungen für Übergänge auf Lebensmittel
 - keine Gesundheitsgefährdung
 - Gute Herstellpraxis
 - keine sensorische Beeinträchtigung der Lebensmittel

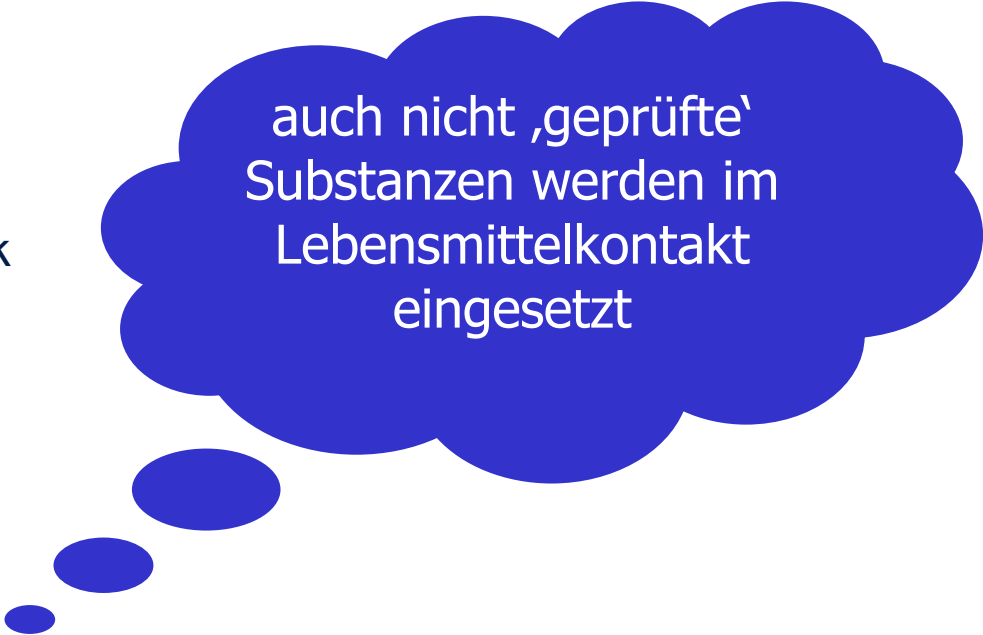
Rechtliche Grundlagen

– EU Rahmenverordnung 1935/2004/EG



Rechtliche Grundlagen

- kein harmonisiertes Recht für
 - andere Materialien als Kunststoffe und Zellglas:
 - Papier/Pappe
 - Lacke/Coatings
 - Druckfarben
 - Klebstoffe
 - Silikon
 - Elastomere/Kautschuk



auch nicht ‚geprüfte‘
Substanzen werden im
Lebensmittelkontakt
eingesetzt

Analytik von Lebensmittelkontaktmaterialien

Gesamtmigrat

Polarität: verschiedene Simulantien

Absorbierbarkeit: $</> 1000$ Da

Analytisches Screening

Einzel-
substanzen

toxikologisch
relevante
Substanzgruppen

Biotest-
Detektion

**Rechtlich
geregelte
Substanzen**

**Substanzen
mit Toxdaten**

**QSAR-
Schätzung**

Biologisches Screening

Organismen Zellen Rezeptoren

- Mutagenität, Genotoxizität
- Cytotoxizität
- Endokrine Wirksamkeit
- AH-Rezeptoraktivität

Exposition

Gesamtmigrat

Gesamtmigrat

Polarität: verschiedene Simulantien Absorbierbarkeit: $</> 1000 \text{ Da}$

– Polarität

- (Ersatz)simulantien für fettige Lebensmittel
Olivenöl; Ethanol, i-Octan
- Simulantien
Wasser, 3%-ige Essigsäure, 10% und 50% Ethanol

– Absorbierbarkeit im Gastro-Intestinaltrakt

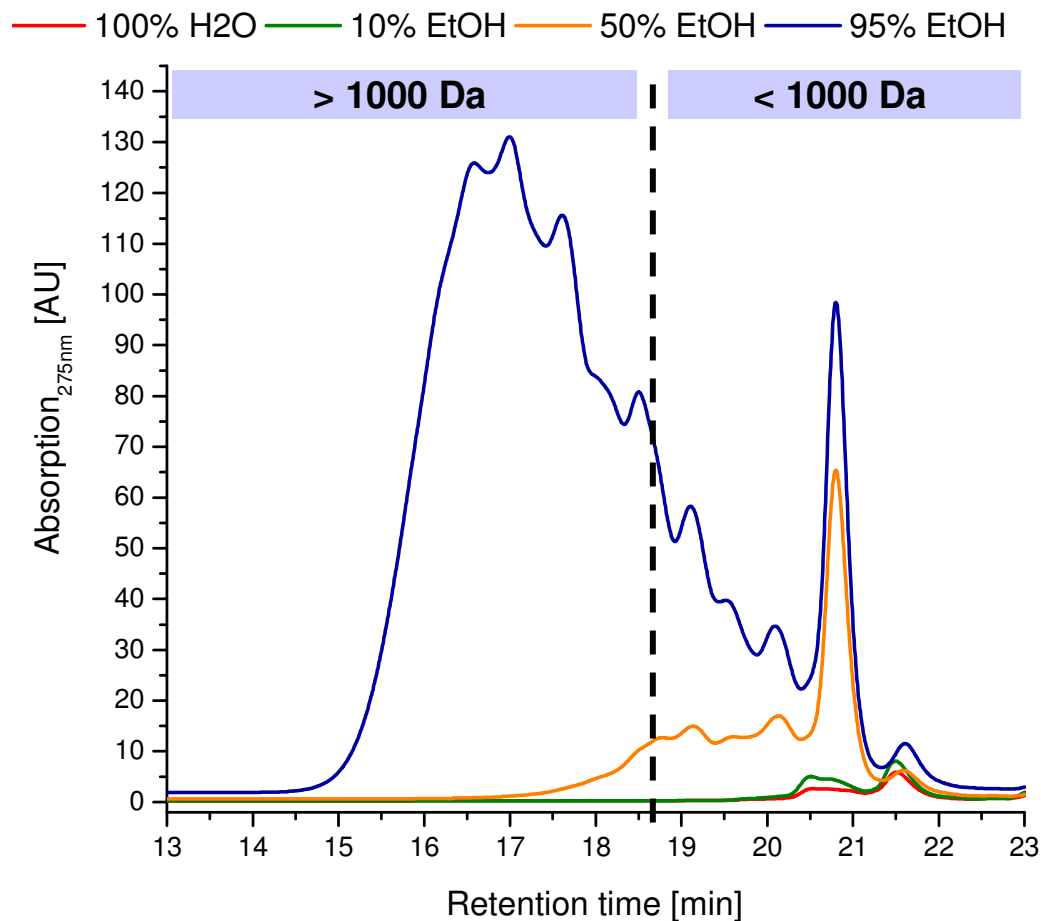
– Veränderungen der Substanzen bis zur Absorption

- Magensäure
- Enzyme

Gesamtmigrat

Beispiel: Analytik von Coatings

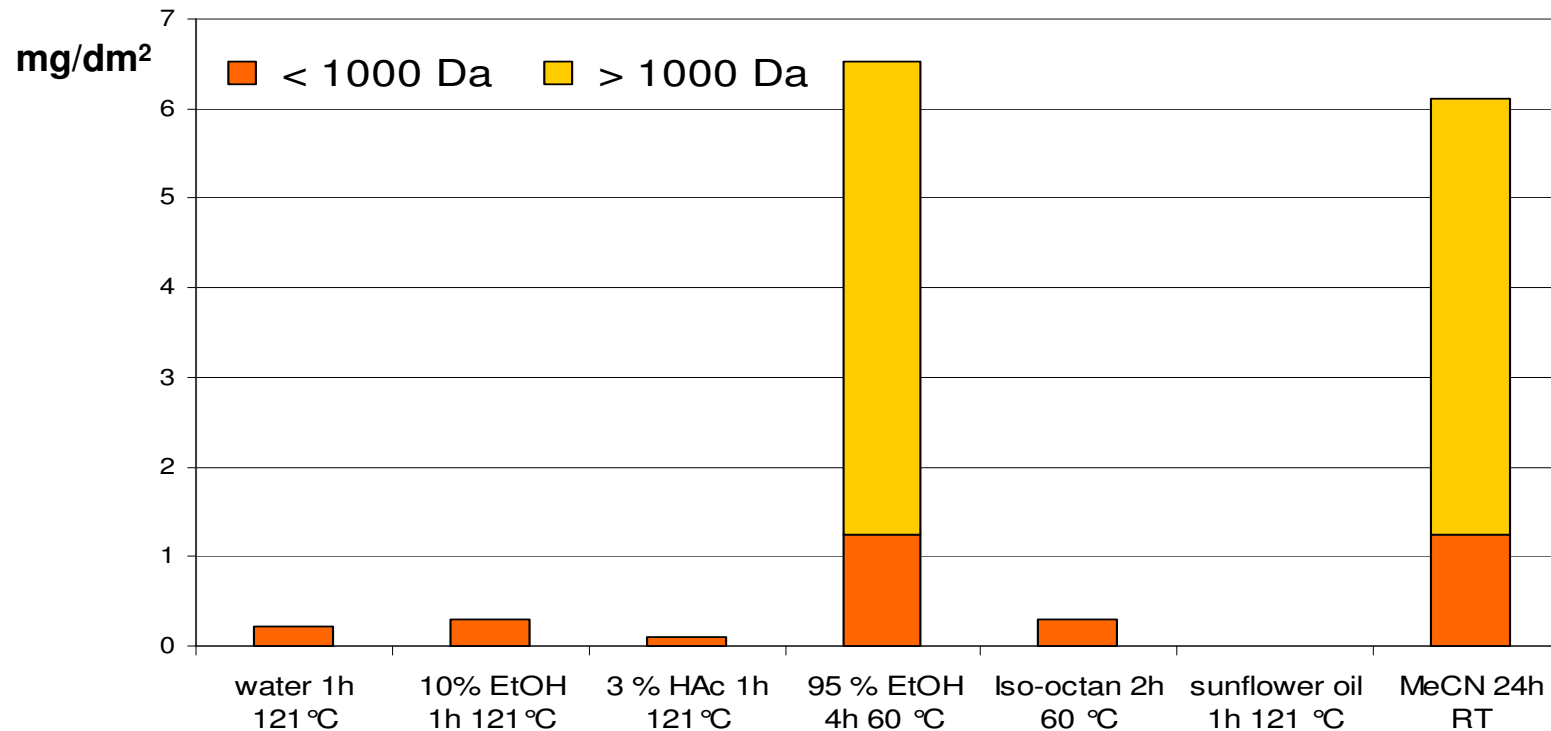
- SEC von Gesamtmigraten eines Epoxy-Anhydrid-Coatings



Gesamtmigrat

Beispiel: Analytik von Coatings

- Gravimetrische Bestimmung
Abhängigkeit vom Simulanz und Molekulargewicht



Analytik von Lebensmittelkontaktmaterialien

Gesamtmigrat

Polarität: verschiedene Simulantien

Absorbierbarkeit: $</> 1000$ Da

Analytisches Screening

Einzel-
substanzen

toxikologisch
relevante
Substanzgruppen

Biotest-
Detektor

Biologisches Screening

Organismen Zellen Rezeptoren

- Mutagenität, Genotoxizität
- Cytotoxizität
- Endokrine Wirksamkeit
- AH-Rezeptoraktivität

Rechtlich
geregelte
Substanzen

Substanzen
mit Toxdaten

QSAR-
Schätzung

Exposition

Migrat – Substanzspezifische Analytik

Beispiel: Analytik von Coatings

– Spezifische Migrationslimits für:

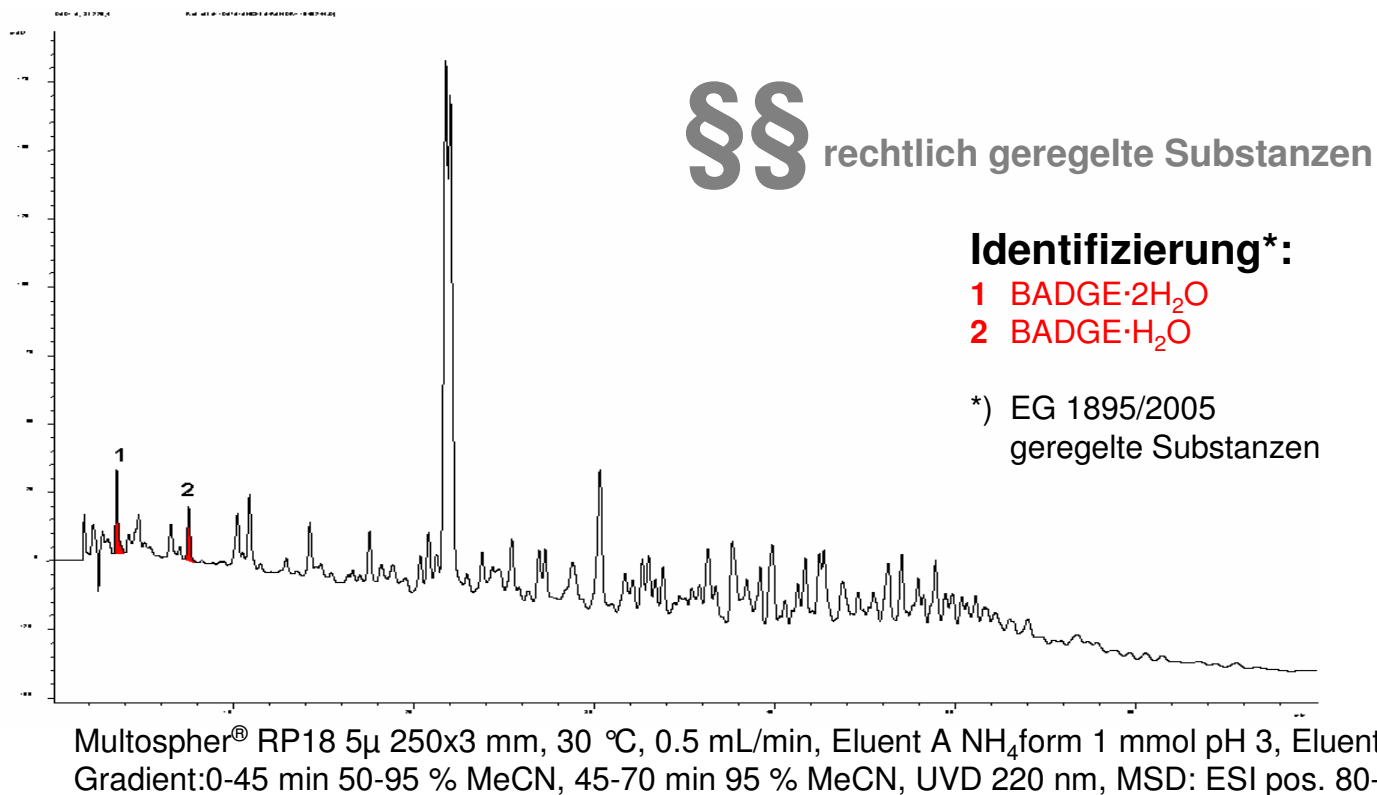
- Bisphenol A 0,6 mg/kg
- $\Sigma(\text{BADGE} + \text{Hydrolyseprodukte})$ 9 mg/kg bzw.
9 mg/6dm²
- $\Sigma(\text{BADGE}, \text{BADGE} \cdot 2\text{HCl}, \text{BADGE} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O})$ 1 mg/kg bzw.
1 mg/6 dm²
- Trimellitsäureanhydrid 5 mg/l

	SML (mg/kg)	Migrat (mg/kg)
BPA	0,6	0,014
BADGE	} 9	0,03
BADGE · 2H ₂ O		0,05
TMA	5,0	0,48

Migrat – Substanzspezifische Analytik

Beispiel: Analytik von Coatings

- EtOH-Migrat (< 1000 Da) eines Epoxyanhydrid-Coatings



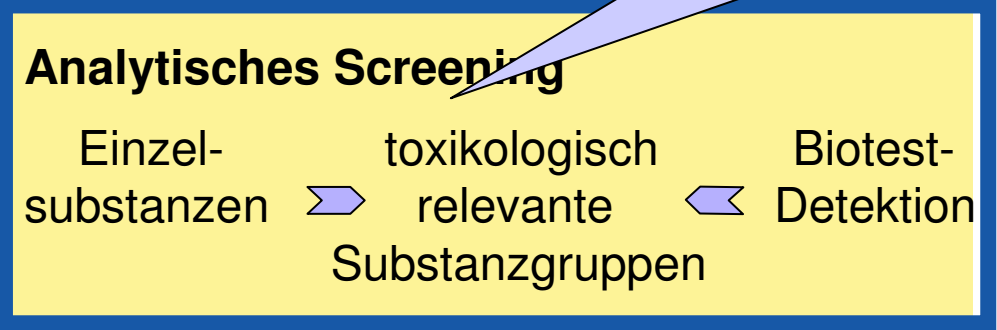
Identifizierung ‚unbekannter‘ Substanzen im Migrat

- z.T. sind durch rechtliche Regelungen nur ein geringer Teil der migrierenden Substanzen erfasst
 - für einige Bereiche (Druckfarben, Klebstoffe etc.) gibt es keine substanzrechtlichen Regelungen
 - Reaktionsprodukte sind i.d.R. nicht reguliert
 - Folge: ‚forest of unknown peaks‘
- Lösungsansätze für ‚unbekannte Substanzen‘
 - Summenbestimmung relevanter Substanzgruppen
 - Analytisches ‚non-target‘ Screening
 - Einsatz von Biotests als zusätzlichen Detektor
 - Direkte Risikoabschätzung durch eine Biotestbatterie

Analytik von Leb

- ### Lösungsansätze für ‚unbekannte Substanzen‘
- **Summenbestimmung relevanter Substanzgruppen**
 - Analytisches ‚non-target‘ Screening
 - Einsatz von Biotests als zusätzlichen Detektor
 - Direkte Risikoabschätzung durch eine Biotestbatterie

Polarität: verschiedene Simurante... $</> 1000 \text{ Da}$



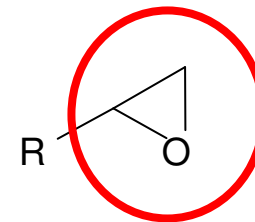
- ### Biologisches Screening
- Organismen Zellen Rezeptoren
- Mutagenität, Genotoxizität
 - Cytotoxizität
 - Endokrine Wirksamkeit
 - AH-Rezeptoraktivität

**Rechtlich
geregelt
Substanzen** **Substanzen
mit Toxdaten** **QSAR-
Schätzung**

Exposition

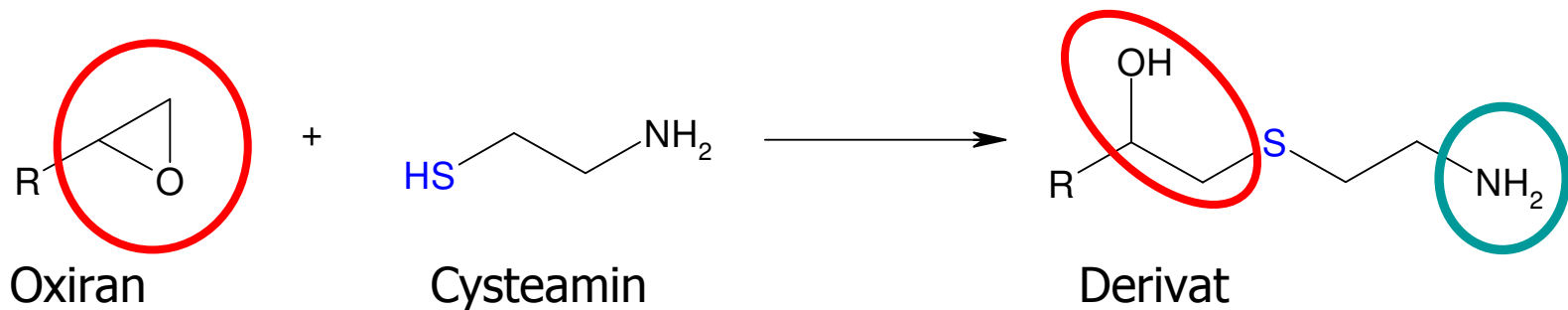
Toxikologisch relevante Substanzklassen

- Substanzen lassen sich aufgrund ihrer Struktur bzw. Strukturelemente verschiedenen Klassen toxikologischer Relevanz zuordnen:
 - z.B. nach dem Entscheidungsbaum nach Cramer
 - Epoxidgruppen gehören dabei in die Cramer-Klasse III:
 - Die Exposition mit einer Substanz aus dieser Klasse sollte unter 90 µg/Tag liegen



Summenbestimmung toxikologisch relevanter Substanzklassen

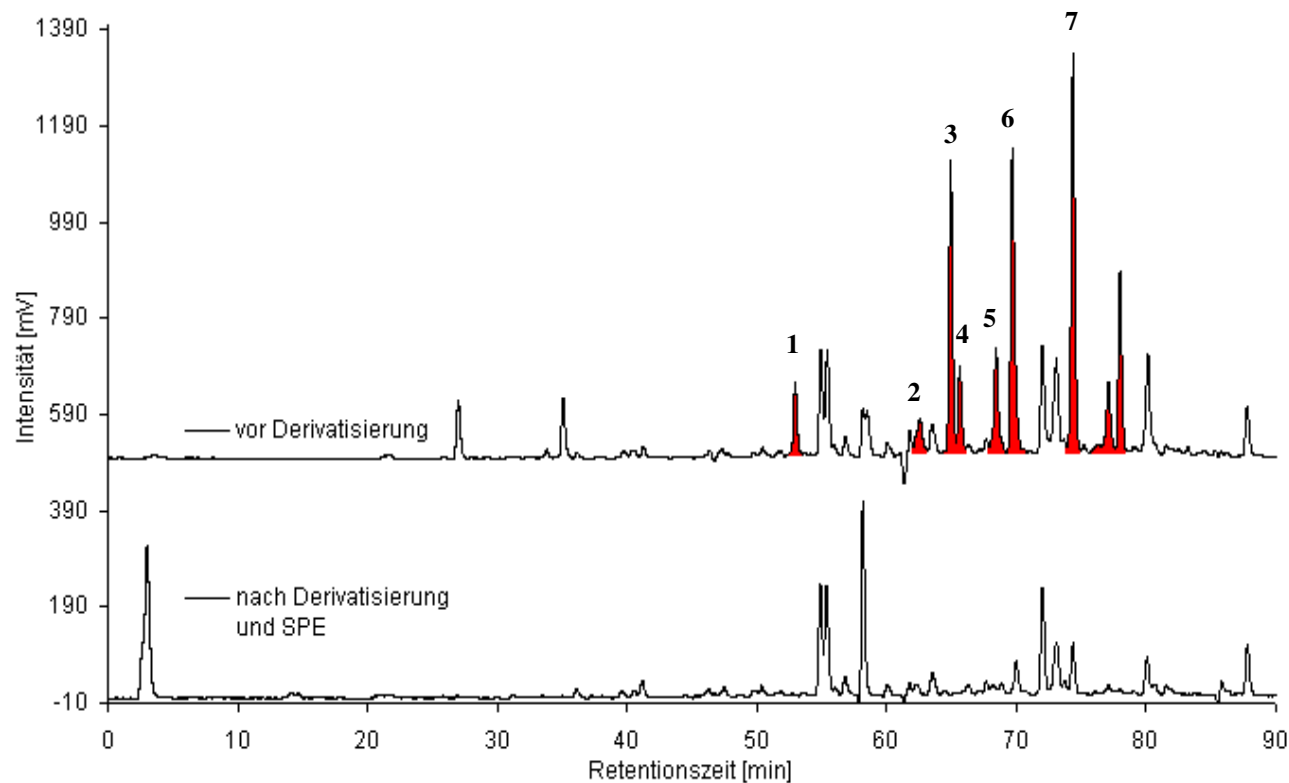
– Spezifische Bestimmung **oxiranhaltiger Substanzen**



- hohe Spezifität für **Oxirangruppen**
- die Derivate lassen sich aufgrund der **Aminogruppe** durch einen Ionentauscher aus dem Gemisch abtrennen
 - dadurch lassen sich die Peaks erkennen, die noch eine reaktive Oxirangruppe enthielten

Summenbestimmung toxikologisch relevanter Substanzklassen

- EtOH-Migrat (< 1000 Da) eines Coatings
(BPA-Harz als Binder)

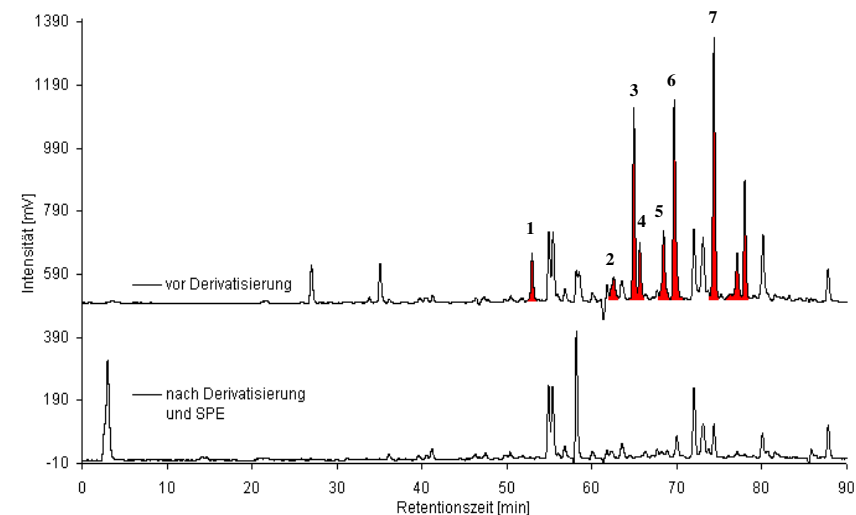
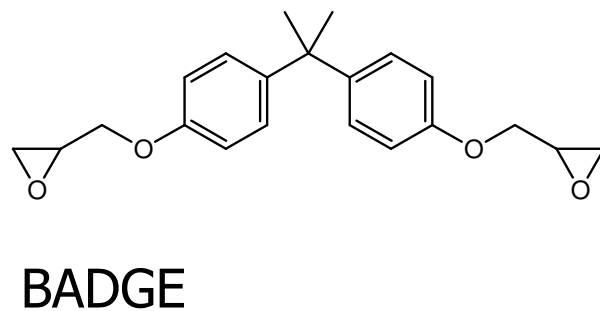


Wermann et al., Poster LC-Tag 2006

Summenbestimmung toxikologisch relevanter Substanzklassen

– Auswertung

- für BPA basierende Lacke:
die Menge der oxiranhaltigen Substanzen (rot) können mit Hilfe einer BADGE-Kalibrierung als BADGE-Äquivalente abgeschätzt werden



Wermann et al., Poster LC-Tag 2006

Analytik von Leb

Lösungsansätze für ‚unbekannte Substanzen‘

- Summenbestimmung relevanter Substanzgruppen
- **Analytisches ‚non-target‘ Screening**
- Einsatz von Biotests als zusätzlichen Detektor
- Direkte Risikoabschätzung durch eine Biotestbatterie

Polarität: verschiedene Si

Analytisches Screening

Einzel-
substanzen

toxikologisch
relevante
Substanzgruppen

Biotest-
Detektion

Biologisches Screening

Organismen Zellen Rezeptoren

- Mutagenität, Genotoxizität
- Cytotoxizität
- Endokrine Wirksamkeit
- AH-Rezeptoraktivität

**Rechtlich
geregelte
Substanzen**

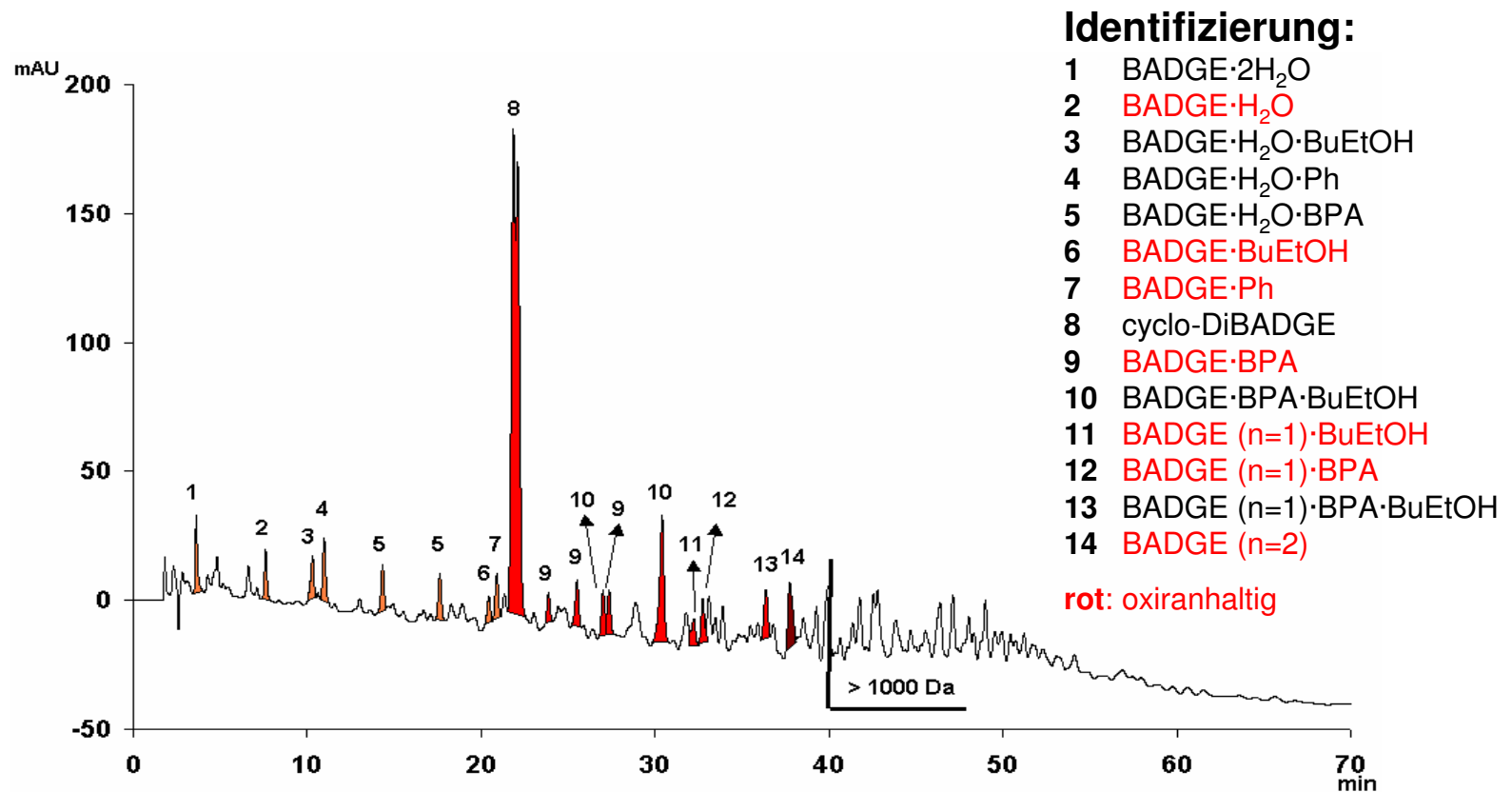
**Substanzen
mit Toxdaten**

**QSAR-
Schätzung**

Exposition

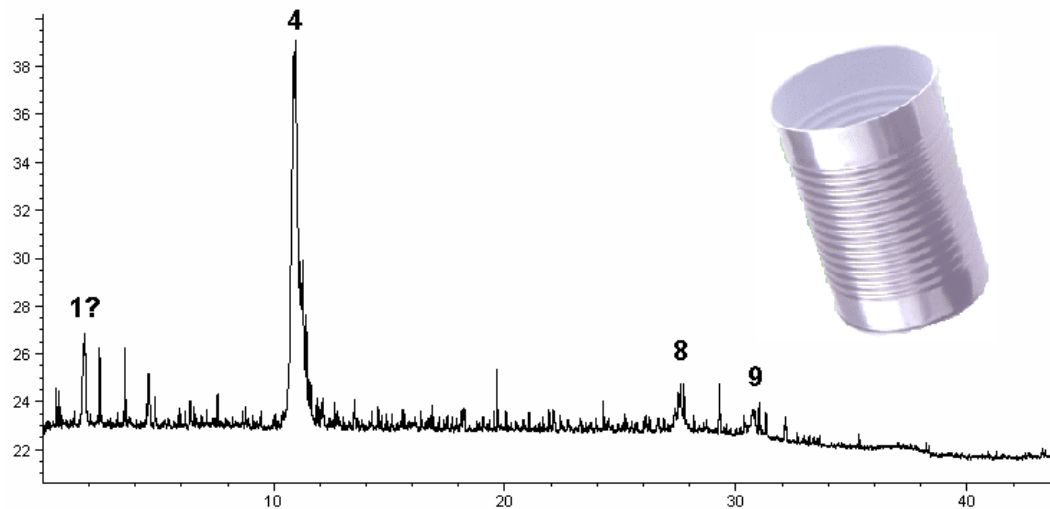
Identifizierung ‚unbekannter‘ Substanzen im Migrat

– EtOH-Migrat eines Epoxyanhydrid-Coatings
RP-HPLC-Screening



Identifizierung ‚unbekannter‘ Substanzen im Migrat

- EtOH-Migrat eines Epoxyanhydrid-Coatings
NP-HPLC-Screening



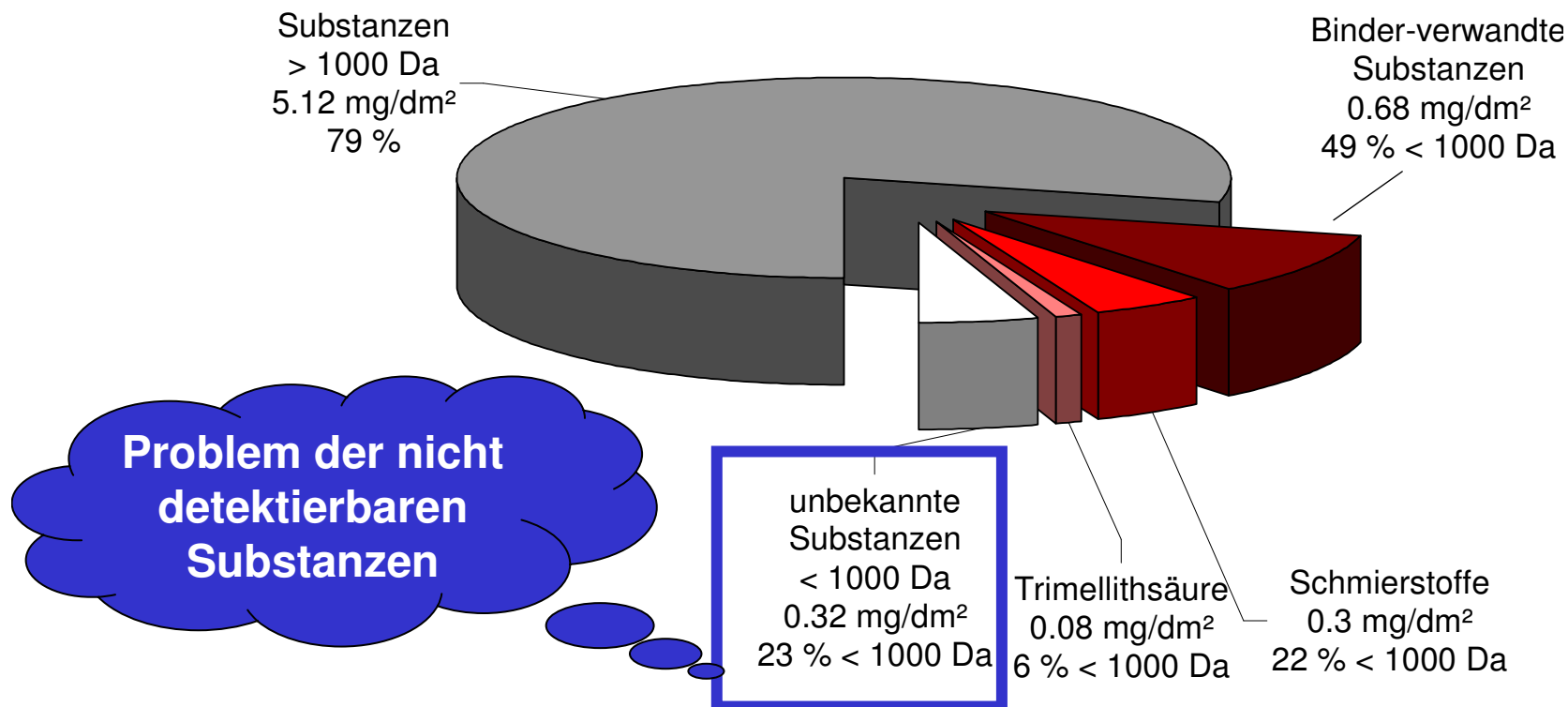
No.	Subst.	Content* (mg/sdm)
4	TAG	0.1
8	1,3-DAG	< 0.1
9	1,2-DAG	< 0.1

Coating was produced with carnauba wax and a mixture of MAG, DAG, and TAG

Diol-Column, Gradient: Isooctane/0.1% HOAc in tert.-Butylmethylether

Identifizierung ‚unbekannter‘ Substanzen im Migrat

– EtOH-Migrat eines Epoxyanhydrid-Coatings Massenbilanz



Identifizierung ‚unbekannter‘ Substanzen im Migrat

– Fazit für das analytische Screening:

- + ein großer Anteil der migrierenden Substanzen kann aufgeklärt werden
- zur Risikoabschätzung muss nach toxikologischen Daten gesucht werden bzw. mit Hilfe von QSAR-Datenbanken eine Schätzung vorgenommen werden
- Quantifizierungen sind nur als Abschätzungen möglich
- ein Teil des Migrats wird nicht detektiert und bleibt unbekannt

Analytik von Lebensmitteln

Lösungsansätze für ‚unbekannte Substanzen‘

- Summenbestimmung relevanter Substanzgruppen
- Analytisches ‚non-target‘ Screening
- **Einsatz von Biotests als zusätzlichen Detektor**
- Direkte Risikoabschätzung durch eine Biotestbatterie

Polarität: verschiedene Stoffe

Analytisches Screening

Einzelsubstanzen
toxikologisch relevante Substanzgruppen

Biotest-Detektion

Biologisches Screening

Organismen Zellen Rezeptoren

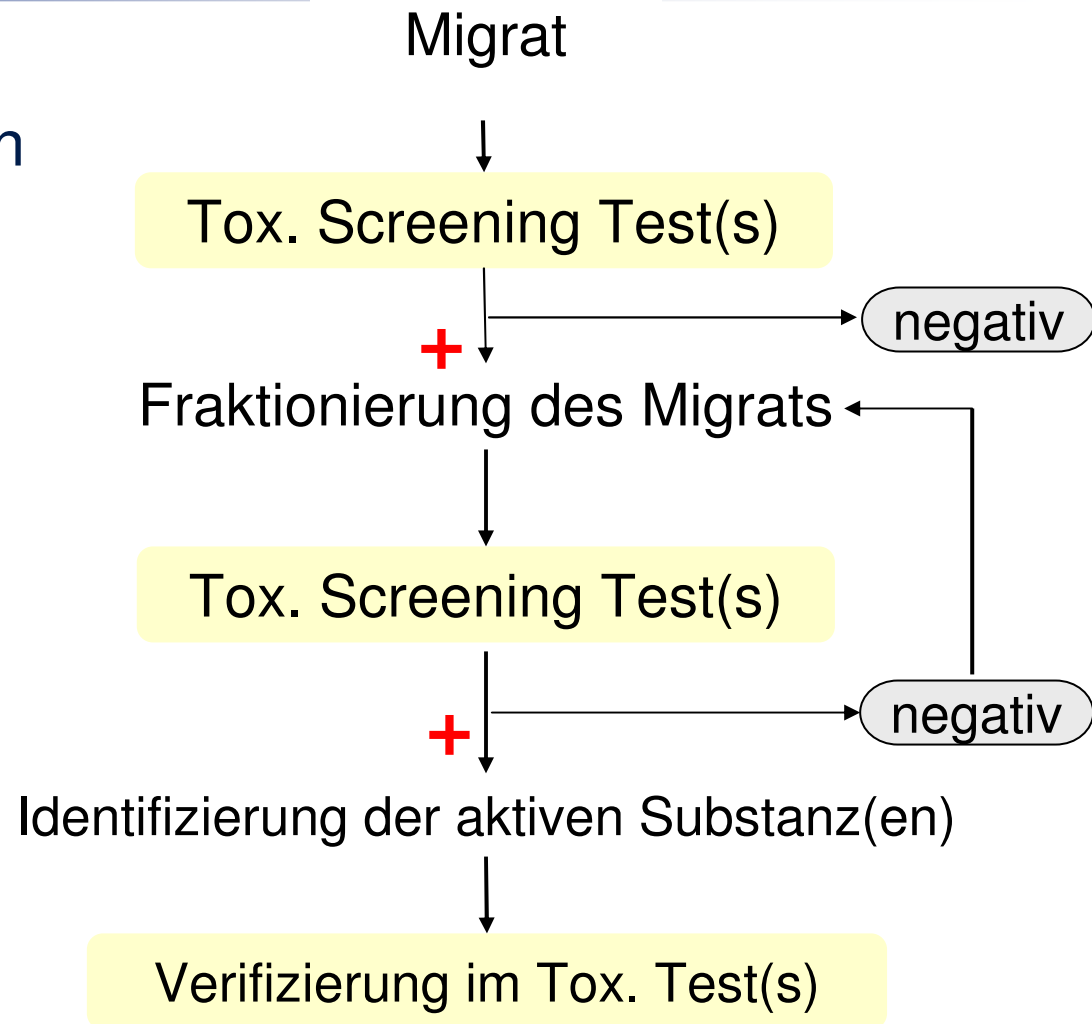
- Mutagenität, Genotoxizität
- Cytotoxizität
- Endokrine Wirksamkeit
- AH-Rezeptoraktivität

Rechtlich geregelte Substanzen **Substanzen mit Toxdaten** **QSAR-Schätzung**

Exposition

Anwendung von Biotests als zusätzlichen 'Detektor'

- Einsatz von Biotests als **Detektoren** für den Nachweis relevanter Substanzen
(analog dem US EPA Konzept 'Toxicity Identification and Evaluation, TIE)



Anwendung von Biotests als zusätzlichen 'Detektor'

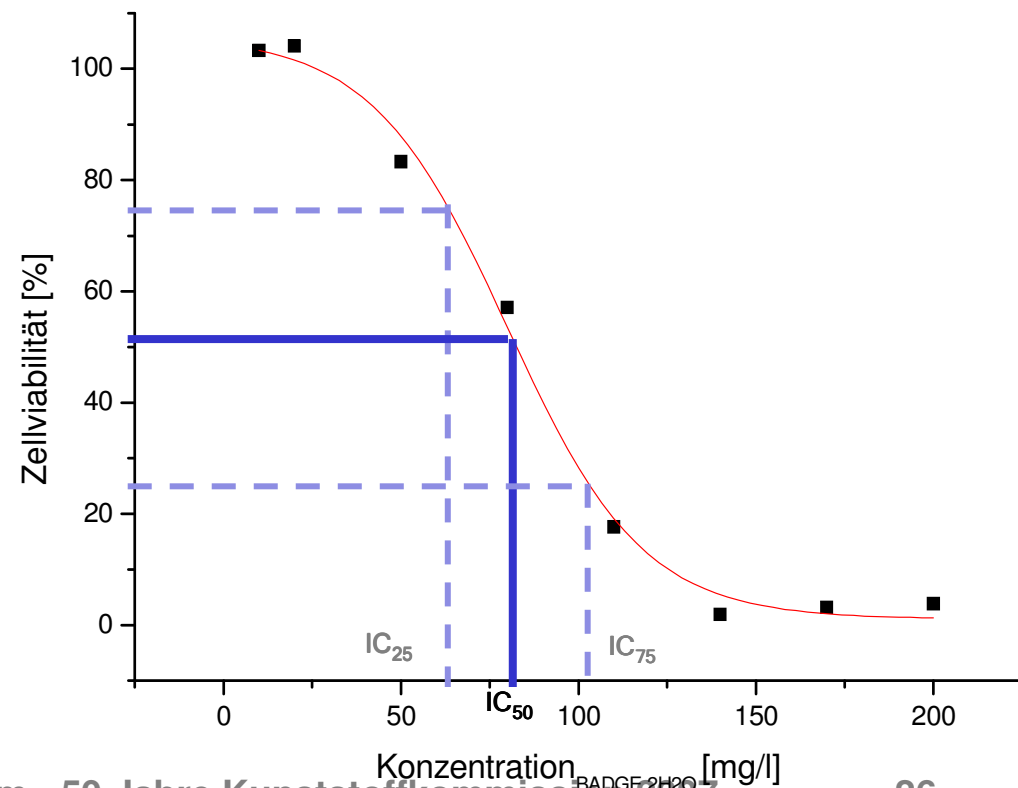
– Prinzip Neutralrot-Test



Anwendung von Biotests als zusätzlichen 'Detektor'

– Auswertung

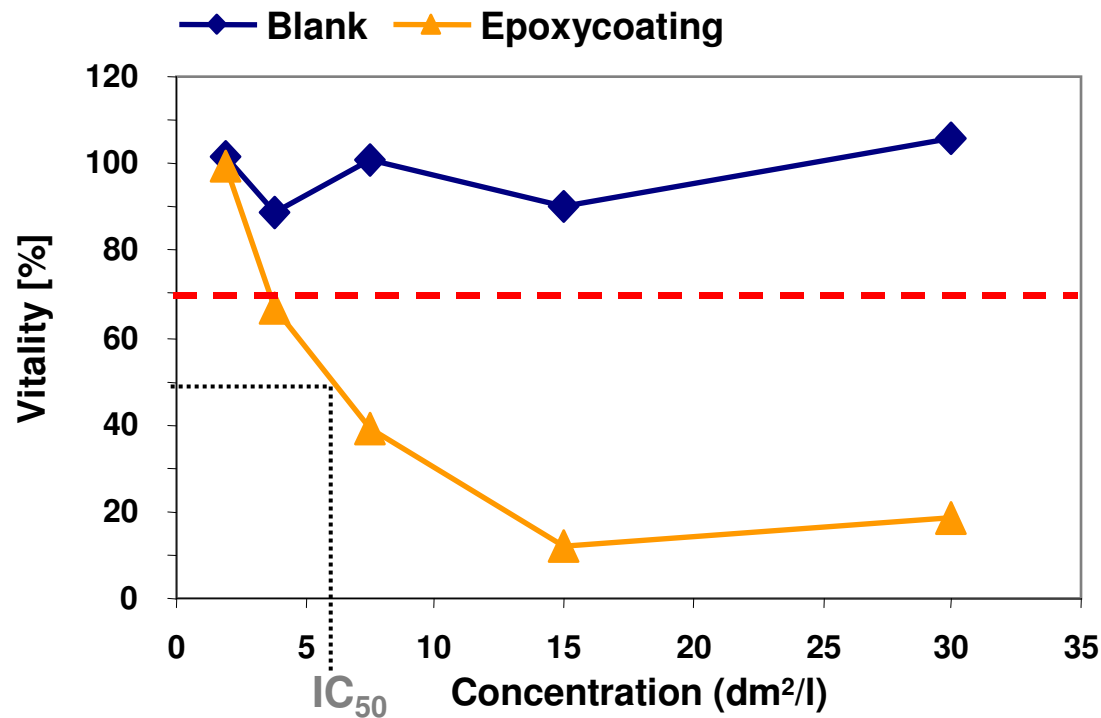
- Sigmoidales Fitting mittels OriginPro Software
- Berechnung des IC₂₅, **IC₅₀**, IC₇₅
- Angabe in MW_{+/-SD}



Anwendung von Biotests

Beispiel: Coatingmigrat

- Migrat in 95% EtOH (4h, 60 °C)
- Zellkultur Hep G2 (Leberzellen)



Anwendung von Biotests

Beispiel: Coatingmigrate



– Spezifische Migrationslimits für:

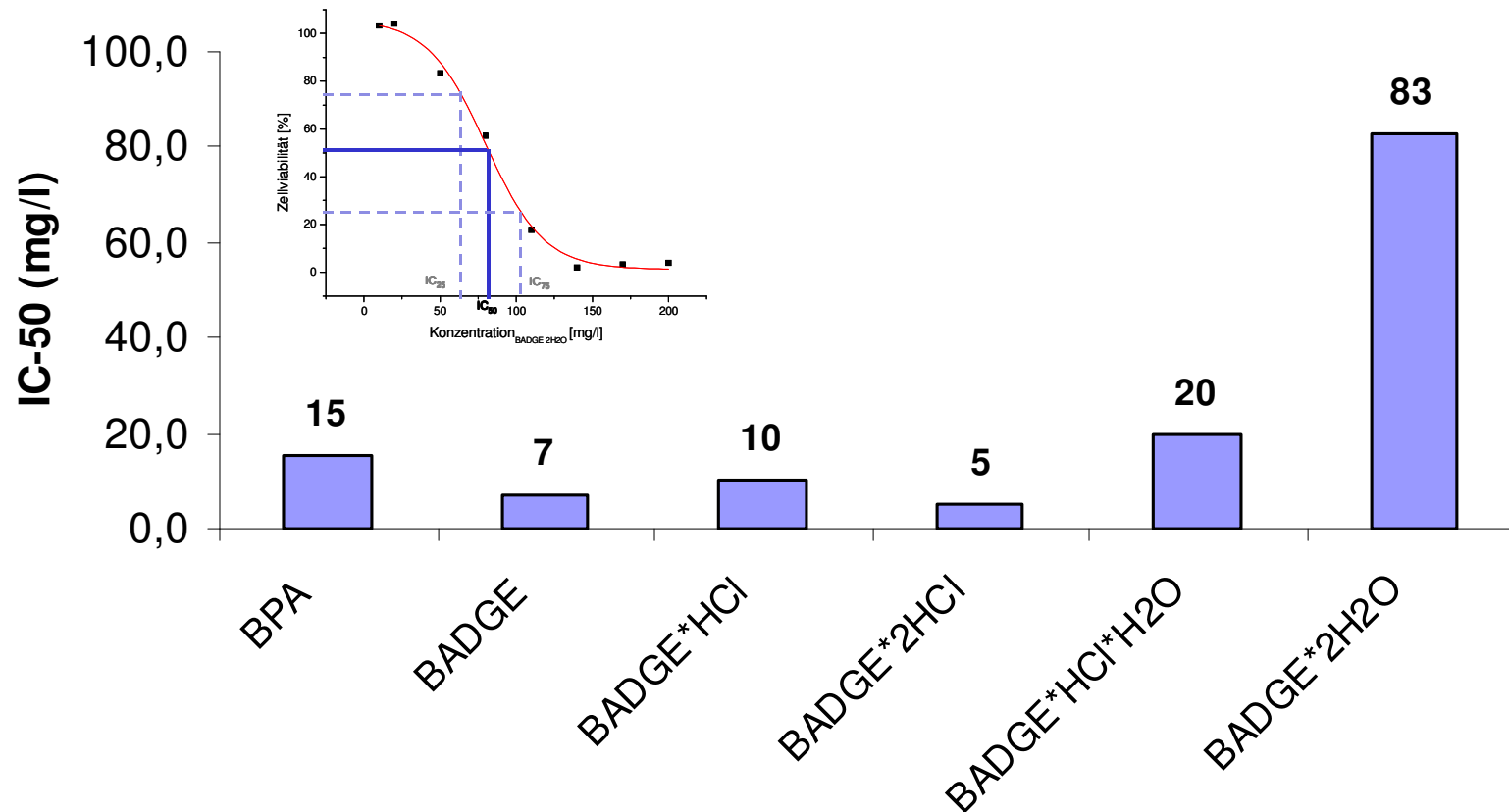
- Bisphenol A 0,6 mg/kg
- $\Sigma(\text{BADGE} + \text{Hydrolyseprodukte})$ 9 mg/kg bzw.
9 mg/6dm²
- $\Sigma(\text{BADGE}, \text{BADGE} \cdot 2\text{HCl}, \text{BADGE} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O})$ 1 mg/kg bzw.
1 mg/6 dm²
- Trimellitsäureanhydrid 5 mg/l

	SML (mg/kg)	Migrat (mg/kg)
BPA	0,6	0,014
BADGE	} 9	0,03
BADGE · 2H ₂ O		0,05
TMA	5,0	0,48

Anwendung von Biotests

Beispiel: Coatingmigrante

- IC₅₀ der rechtlich geregelten Substanzen im NRT (Hep-G2)



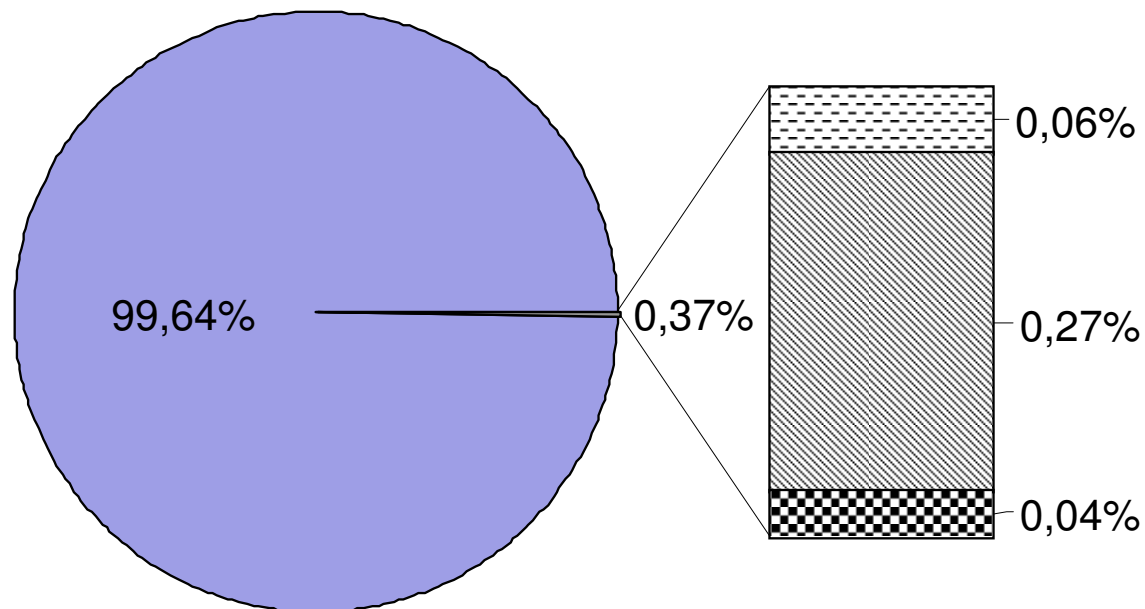
- TMA induziert keinen cytotoxischen Effekt in diesen Zelltest bis zu einer Konzentration von 2000 mg/l.

Anwendung von Biotests

Beitrag der rechtlich geregelten Substanzen zur Gesamtoxizität

- ca. 0,5 % des Effektes im Neutralrot-Test kann auf die gesetzlich geregelten Substanzen (BPA, BADGE, BADGE 2*H₂O) zurückgeführt werden
- über 99 % des Effektes muss auf andere Bestandteile des Migrates zurückzuführen sein

▨ BPA ▩ BADGE ▣ BADGE * 2 H₂O ■ nicht aufgeklärte Toxizität



Anwendung von Biotests

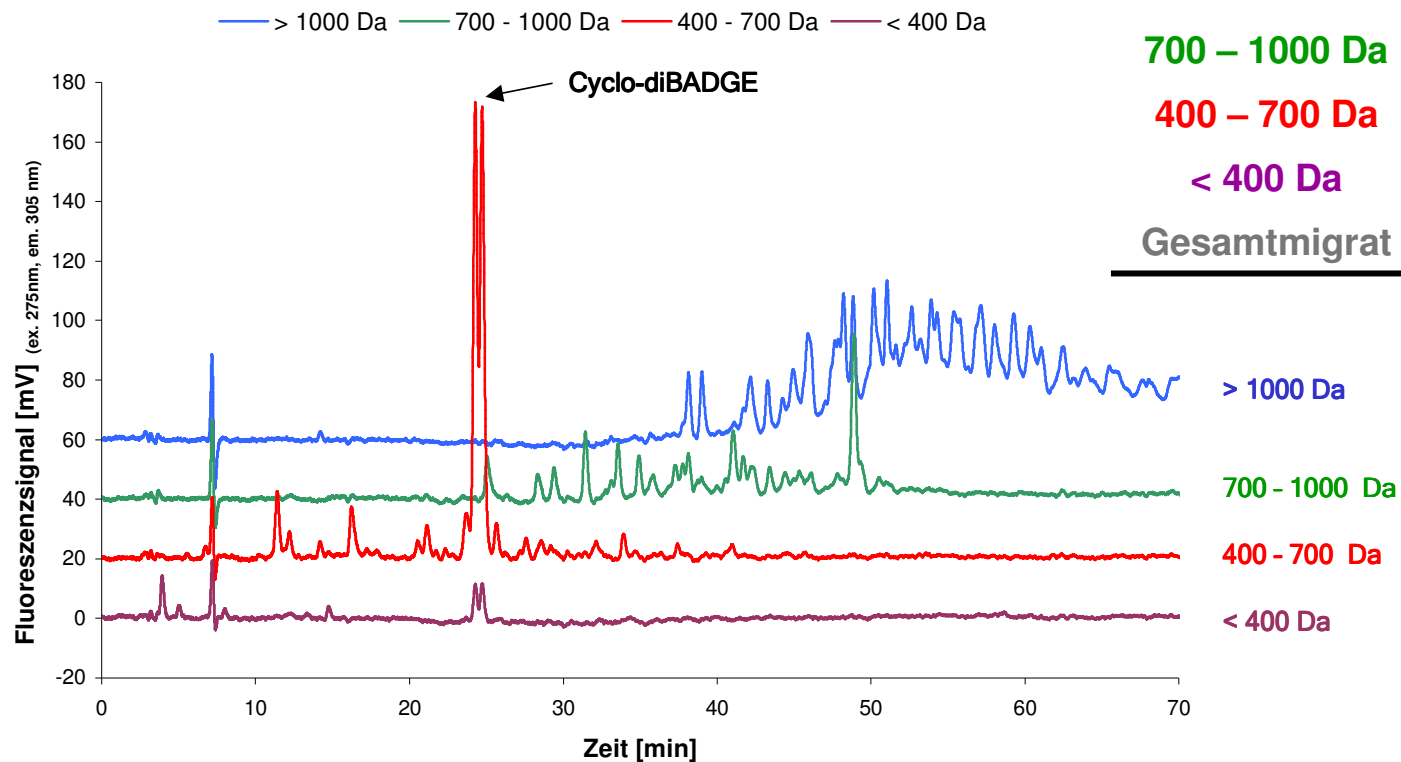
Identifizierung der zytotoxisch wirkenden Substanzen

- Fraktionierung des Migrates
- Isolierung einer Substanz
- Verifizierung des Effektes

Anwendung von Biotests

Fraktionierung des Gesamtmigrates

– RP-HPLC nach SEC-Fraktionierung

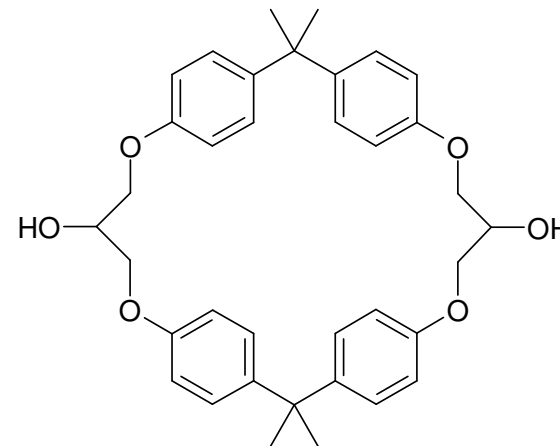


Fraktion	IC ₅₀ (dm ² /l)
> 1000 Da	> 30
700 – 1000 Da	19
400 – 700 Da	13
< 400 Da	> 30
Gesamtmigrat	4

Anwendung von Biotests

Isolierung von Cyclo-diBADGE und anderen Oligomeren

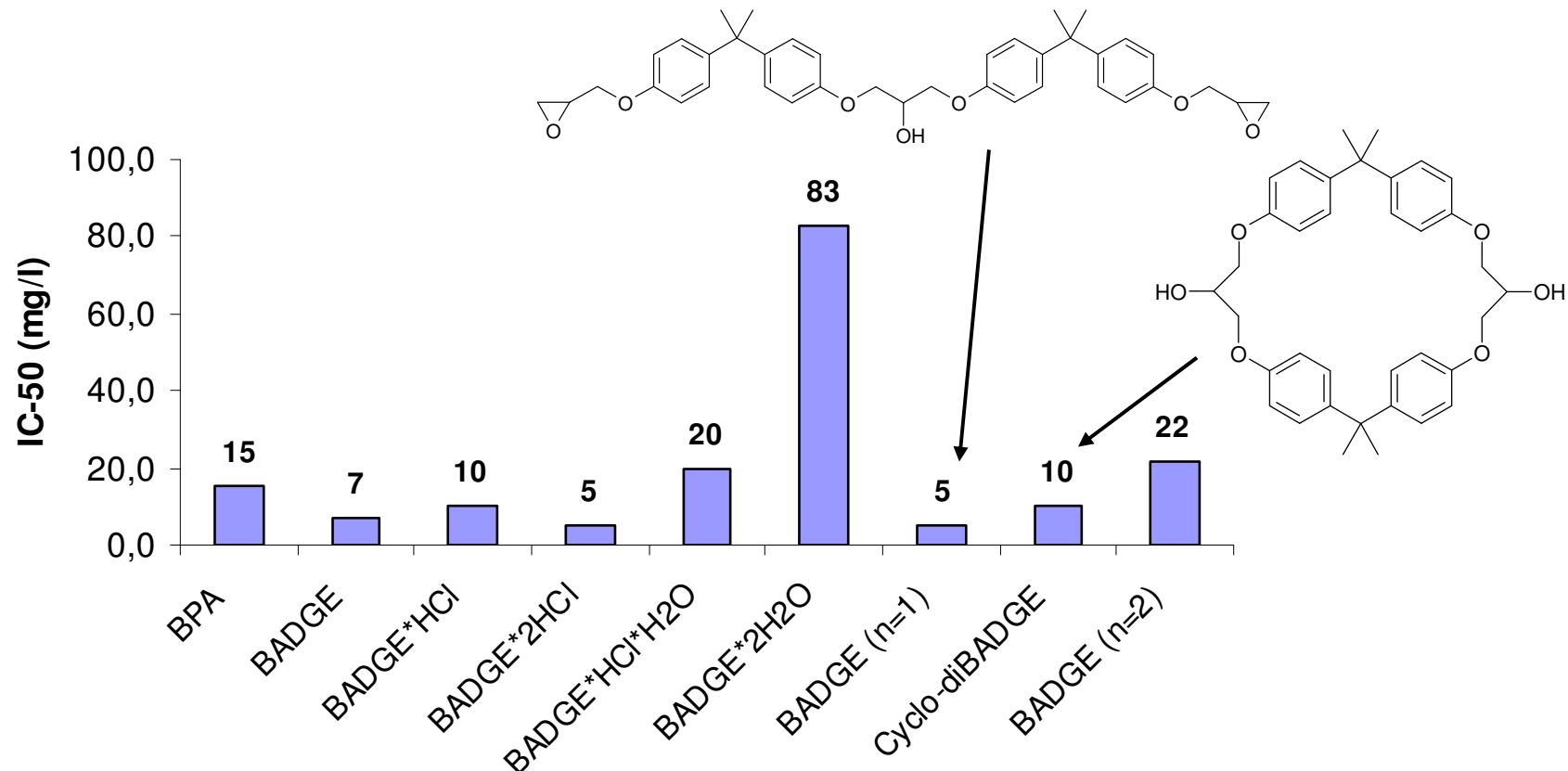
- Isolierung von Cyclo-diBADGE aus einem epoxidhaltigem Harz
 - 1. Schritt: Fraktionierung mittels SEC-HPLC-UVD
 - 2. Schritt: Reinigung über Semi-Pröp.-RP-HPLC-UVD
 - 3. Schritt: Charakterisierung
 - RP-HPLC-UVD/FLD/MS
 - NMR
 - Elementaranalyse
 - IR
 - Schmelzpunkt



Anwendung von Biotests

Verifizierung des cytotoxischen Effektes von Cyclo-diBADGE

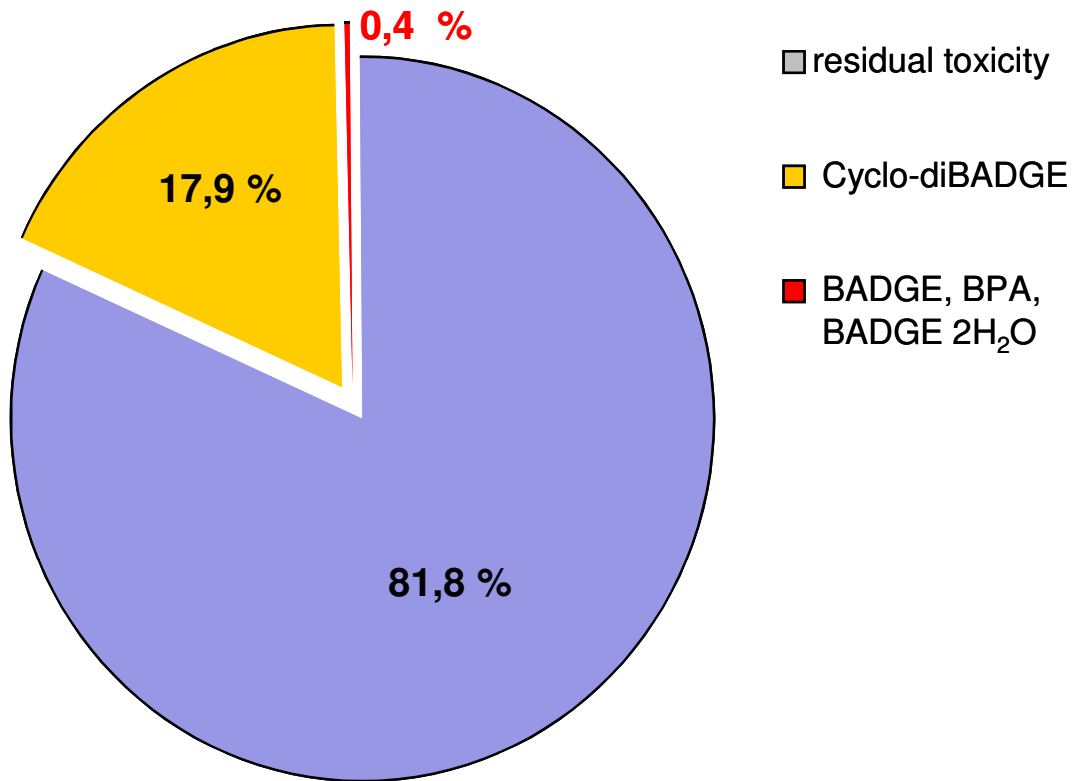
- IC₅₀ der rechtlich geregelten Substanzen sowie der BADGE-Oligomere im NRT (Hep-G2)



Anwendung von Biotests

Abschätzung des Anteils am Gesamteffekt

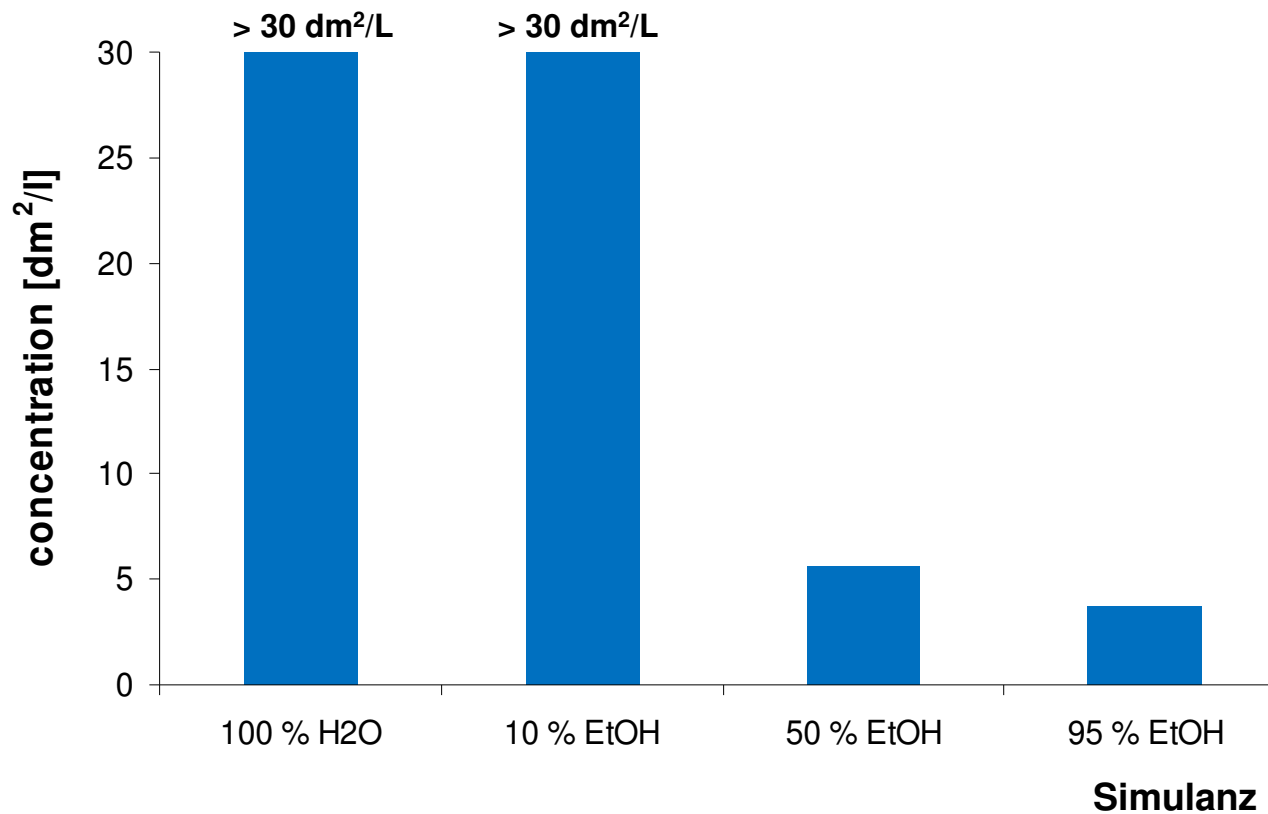
- Anteil von cyclo-diBADGE und der rechtlich geregelten Substanzen am Effekt eines Coatingmigrates im NRT



Anwendung von Biotests

Gesamteffekt im Migraten mit unterschiedlichen Simulanzien

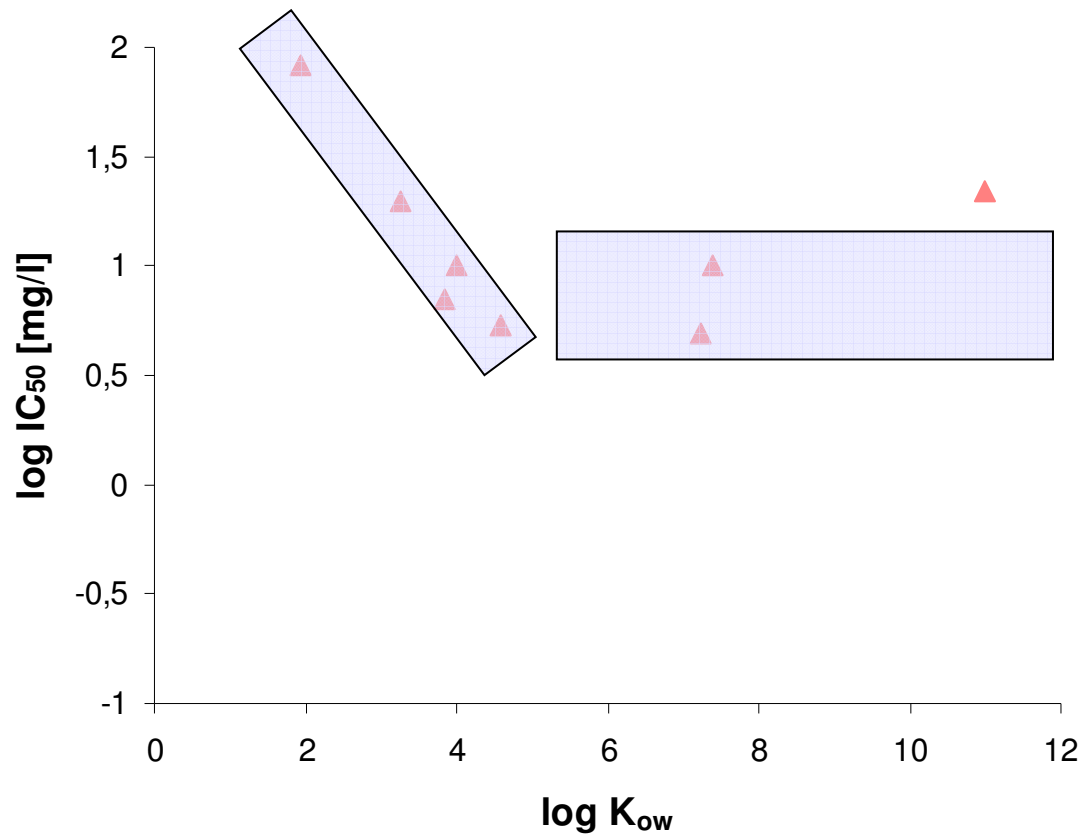
- in den polaren Migraten kann kein cytotoxischer Effekt nachgewiesen werden



Aussagekraft von Biotests

Neutralrottest

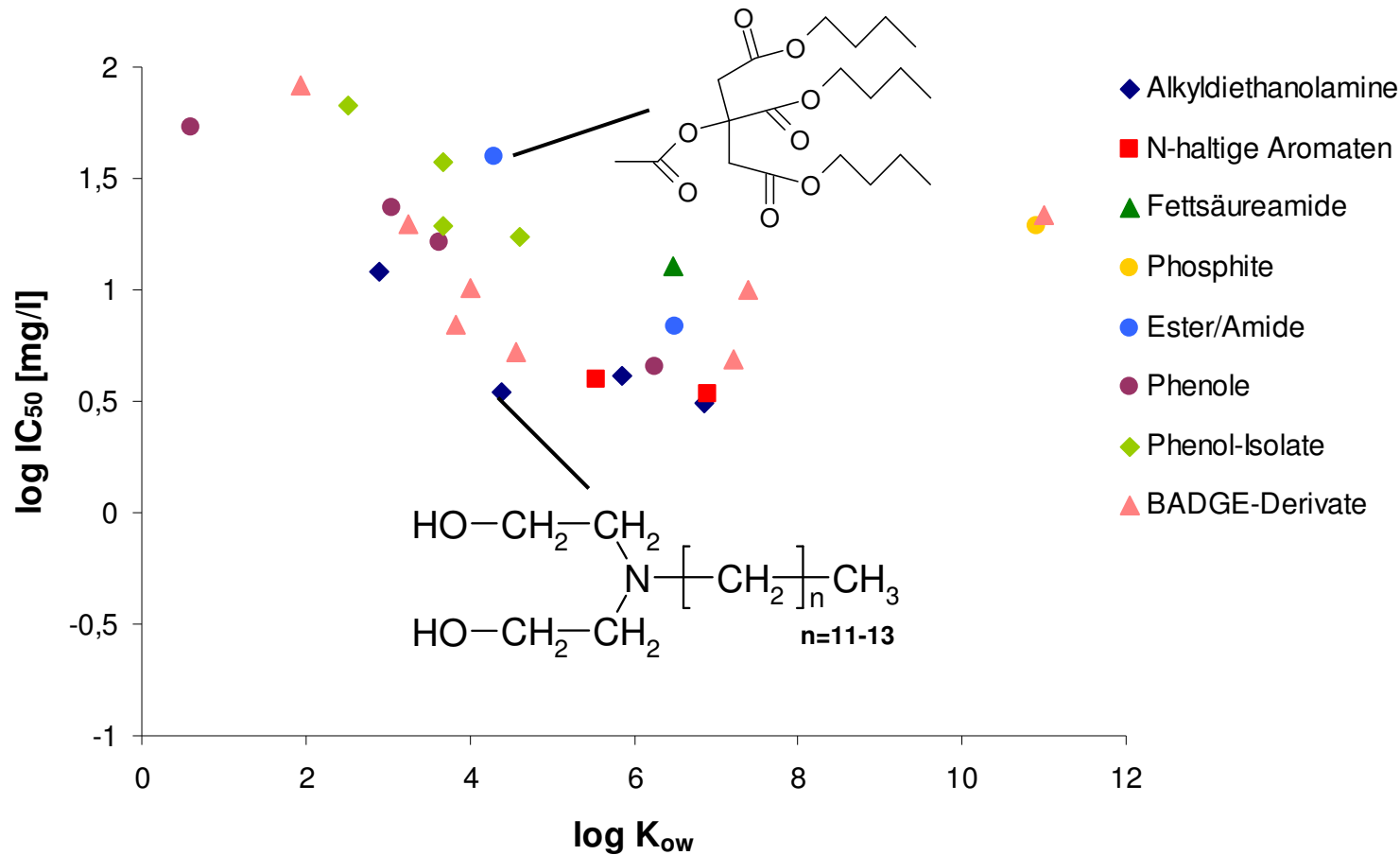
- Abhängigkeit des IC_{50} von der Lipophilie der Substanz



Aussagekraft von Biotests

Neutralrottest

– Nicht nur Abhängigkeit des IC_{50} von der Lipophilie der Substanz



Analytik von Lebensmitteln

Lösungsansätze für ‚unbekannte Substanzen‘

- Summenbestimmung relevanter Substanzgruppen
- Analytisches ‚non-target‘ Screening
- **Einsatz von Biotests als zusätzlichen Detektor**
- Direkte Risikoabschätzung durch eine Biotestbatterie

Polarität: verschiedene Simulantien

erbarkeit. </> 1000 Da

Analytisches Screening

Einzel-
substanzen

toxikologisch
relevante
Substanzgruppen



Biotest-
Detektion

Biologisches Screening

Organismen Zellen Rezeptoren



- Mutagenität, Genotoxizität
- Cytotoxizität
- Endokrine Wirksamkeit
- AH-Rezeptoraktivität

Rechtlich
geregelte
Substanzen

Substanzen
mit Toxdaten

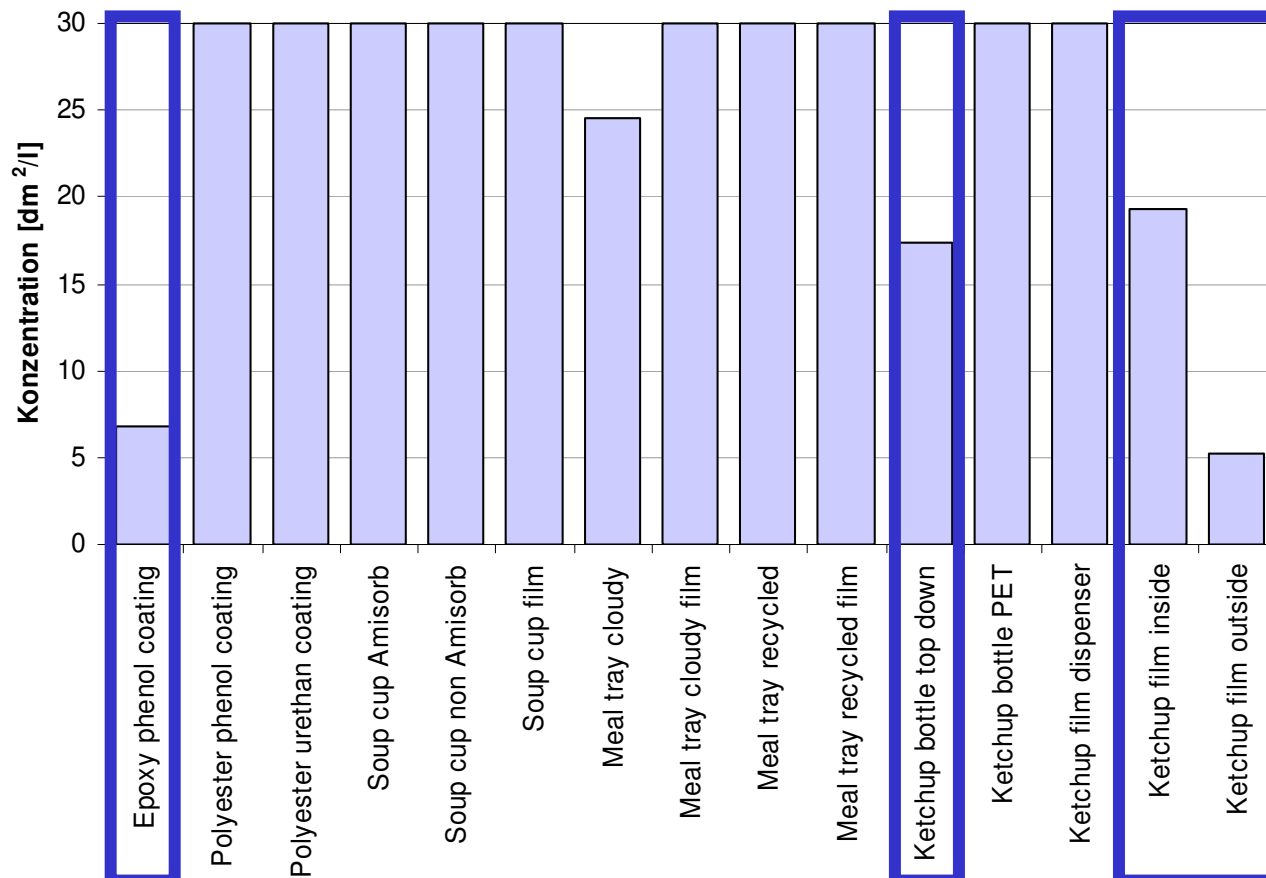
QSAR-
Schätzung

Exposition

Anwendung von Biotests

Screening

- Biotest-Screening zur Priorisierung einer Probe (95% EtOH-Extrakte)



Analytik von Leb

Polarität: verschiedene Si

Lösungsansätze für ‚unbekannte Substanzen‘

- Summenbestimmung relevanter Substanzgruppen
- Analytisches ‚non-target‘ Screening
- Einsatz von Biotests als zusätzlichen Detektor
- **Direkte Risikoabschätzung durch eine Biotestbatterie**

Analytisches Screening

Einzel- substanzen	toxikologisch relevante Substanzgruppen	Biotest- Detektion
-----------------------	---	-----------------------

Rechtlich geregelte Substanzen	Substanzen mit Toxdaten	QSAR- Schätzung
---	------------------------------------	----------------------------

Biologisches Screening

Organismen Zellen Rezeptoren

- Mutagenität, Genotoxizität
- Cytotoxizität
- Endokrine Wirksamkeit
- AH-Rezeptoraktivität

Exposition

Anwendung von Biotests

EU-Projekt BioSafePaper

- Einsatz von Biotests zur Beurteilung von Papier und Pappe im Lebensmittelkontakt (EU-Projekt BioSafePaper)
 - Entwicklung und Standardisierung einer einfachen Biotestbatterie
 - Risikobewertung ausgehend von den Ergebnissen der Biotests
 - Chemisch-analytische Prüfung soll letztendlich reduziert werden

Anwendung von Biotests

Validierung im EU-Projekt BioSafePaper

- Einsatz von Standardsubstanzen zur Qualifizierung der Biotests für die Testbatterie
 - 2,4-Diaminotoluol
 - Mix aus Phthalaten (DiBP, DBP, DEHP)
 - Benzo(a)pyren
 -

Anwendung von Biotests

Validierung im EU-Projekt BioSafePaper

– Empfindlichkeit der Biotests

Substance	Test	Detection Limits ³		Legal Limit
		Aqueous Extracts (mg/L) ¹	EtOH extract (corr. for 40g/L) ^{1,2} (mg/L)	
2,4-diamino toluene	Ames Test	(25)	1	0.02 mg/kg in food (2002/72/EC)
	Comet assay	122	240	
	RNA-synthesis	525	1050	
	Neutral-Red-assay	120	480	

¹) CEN definition: 40 g paper is extracted with 1 L water

²) concentrated ethanol extracts: 100 g paper is extracted in 1 L EtOH, then concentrated 10-fold
→ concentration factor 25 compared with aqueous extracts, but only 1% solutions can be applied

³) grammages of investigated paper and board: 70 – 700 g/m² corresponds to 4 – 40 g/6 dm²
= 4 – 40 g/kg food, therefore the CEN extraction procedure may overestimate the paper-mass to volume ratio 10-fold

Anwendung von Biotests

Schlussfolgerungen: EU-Projekt BioSafePaper

Kann der Biotest-Entscheidungsbaum aus dem Projekt BioSafePaper als globaler Ansatz für die Sicherheit von Lebensmittelkontaktmaterialien angewandt werden (vollständiger Ersatz apparativer Analytik)?

Definitiv, nein!

Die Empfindlichkeit der Biotests liegen für viele Substanzen um Zehnerpotenzen über den gesetzlichen Limits

Anwendung von Biotests

Schlussfolgerungen: EU-Projekt BioSafePaper

Kann der Biotest-Ansatz für den Ausschluss der Anwesenheit von mutagen wirkenden Substanzen aus Migraten angewandt werden?

Vielleicht!

- die Empfindlichkeit des Ames Test muss erhöht werden
- Migrate müssen stärker konzentriert werden
- Validierung muss an potentiell in diesen FCM enthaltenen Mutagenen erfolgen
- realistisch wird eine Nachweisgrenze abgeschätzt von primären aromatischen Aminen im Bereich von 50 – 200 µg/L

Danke!

– unseren Kooperationspartnern

LUA Dresden



- Meinen Mitarbeitern