

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

7.1 Primäre aromatische Amine (PAA) mittels HPLC (DAD)

1. Allgemeine Angaben

Die vorliegende Prüfvorschrift beschreibt ein Verfahren zur spezifischen Bestimmung von PAA's nach Übergang in den Wasserextrakt oder das wässrige Migrat von Papieren und Kartonagen für den Lebensmittelkontakt. Auch Michler's Keton wird erfasst. Die Vorschrift umfasst alle REACH-PAA und wurde um weitere PAA, die Edukte von Azofarbstoffen sind, bei bedruckten Papierservietten nachweisbar sein können und toxikologisch bislang nicht eingestuft worden sind (CLP-VO (EG) Nr. 1272/2006), erweitert.

2. Grundlagen des Verfahrens

Die wässrigen Migrationslösungen werden zunächst einem Anreicherungsschritt über eine Kationenaustauschersäule unterzogen. Der Nachweis und die Bestimmung der aromatischen Amine erfolgt mittels HPLC und UV-Detektion. Mit Hilfe des Vorsäulen-Rückspül-Verfahrens wird während des chromatographischen Vorgangs eine weitere Fokussierung und damit eine ausreichend niedrige Nachweisgrenze erzielt. Die Bestätigung der Befunde wird mittels UV-Spektren durchgeführt.

3. Chemikalien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien und Lösungsmittel für die HPLC zu verwenden. Unter Lösung ist eine wässrige Lösung zu verstehen. Das Wasser muss entweder bidestilliert oder von entsprechender Reinheit sein.

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Eisessig	k. A.	k. A.
Essig	3 % ig	30 ml Eisessig / 1 l Wasser
Methanol	k. A.	k. A.
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	M = 294,10 g/mol	k. A.
Citrat-Lösung	c = 0,1 mol/l	14,705 g / 500 ml
Elutionslösung	k. A.	70 Vol% 0,1 mol/L Citrat-Lösung + 30 Vol% Methanol
Natriumacetat	k. A.	wasserfrei
Natriumacetatlösung	c = 0,01 mol/l	820, 3 mg/l
Natronlauge	c = 1,0 mol/l	
PAA-Kalibriersubstanzen	k. A.	siehe Anlage
Lösungen		

Stammlösung	$c = 400 \mu\text{g/ml}$	Ca. 10 mg der Kalibriersubstanzen werden auf 0,1 mg genau in einen 25-ml-Messkolben eingewogen, in Methanol gelöst und mit Methanol zur Marke aufgefüllt.
Verdünnte Stammlösung	$c = 8 \mu\text{g/ml}$	0,5 ml der Stammlösung werden in einen 25-mL-Messkolben pipettiert und mit Elutionslösung aufgefüllt.
Standardlösung für Routineuntersuchung		In einen 10-ml-Messkolben werden 3,0 ml bidest. Wasser und 1,0 ml 1 mol/l NaOH-Lösung vorgelegt. Dazu werden je 25, 50, 75, 100 und 125 μL der verdünnten Stammlösung pipettiert und mit Elutionslösung aufgefüllt.
Lösung zur Überprüfung der Empfindlichkeit des Analysensystems	$c = 6 \mu\text{g/l}$	In einen 20-ml-Messkolben werden 6,0 ml bidest. Wasser und 2,0 ml 1 mol/l NaOH-Lösung vorgelegt. Hierzu werden 15 μL der verdünnten Stammlösung (<i>nur Benzidin beachten</i>) pipettiert und mit Elutionslösung aufgefüllt.
Lösung zur Überprüfung der Wiederfindung für Routineuntersuchung		1 ml der verdünnten Stammlösung der jeweiligen Substanz werden in 10-ml-Messkolben pipettiert und mit 3% iger Essigsäure aufgefüllt.

Tabelle 1 Chemikalien und Lösungen

Hinweis

Zur Routineuntersuchung werden die Substanzen 4-Aminobenzamide, Benzidin, Anilin und 4,4'-MDA als Mixstandard angesetzt.

Die Lösungen sind im Kühlschrank max. 1 Woche haltbar.

4. Geräte und Hilfsmittel

- 4.1 normale Laborausstattung
- 4.2 Membranfilter, Cellulosenitrat, 0,45 µm (z.B. Whatman)
- 4.3 PRS-Festphasenextraktionssäulen
Propylsulfonsäure, 1000 mg, (z.B. Varian Bond Elut Art.-Nr.: 1225-6010)
- 4.4 Vakuum-Einheit für die Festphasenextraktion
- 4.5 HPLC-Gerät mit DAD und zusätzlichem 6-Wege-Ventil zur Vorsäulen-Rück-spülung
- 4.6 HPLC-Säulen
 - 4.6.1 Vorsäule: Nucleosil 100-3 C18 HD 30 * 3 mm I.D.
 - 4.6.2 Hauptsäule: Nucleodur 5-100 C18 Gravity 250 * 3 mm I.D.

5. Durchführung

- 5.1 Kaltwasserextrakt

Bei Papieren und Kartonagen, welche Wasser aufnehmen und für den Kontakt mit feuchten und/oder fettenden Lebensmitteln bestimmt sind, wird ein Kaltwasserextrakt (DIN EN 645) angefertigt. Dieser wird über einen Membranfilter (4.2) von Schwebeteilchen gereinigt.

- 5.2 Migration von beschichteten oder wasserdichten Papieren

Beschichtete und wasserdichte Papiere sowie Bedarfsgegenstände aus Kunststoff werden einer Migration unterzogen. Die Migration wird je nach bestimmungsgemäßem Gebrauch mit destilliertem Wasser oder ggf. mit 3%iger Essigsäure nach den Bedingungen der Kunststoffverordnung (EU) Nr. 10/2011 und ihrer Änderungsverordnungen durchgeführt.

- 5.3 Anreicherung über PRS-Festphasenextraktionssäulen

In einem 100-ml-Becherglas werden zu 50 ml Kaltwasserextrakt (oder Migrationslösung mit bidest. Wasser) 1,5 ml Eisessig gegeben, sodass die Lösung insgesamt 3 % Essigsäure enthält (Probelösung).

Die Konditionierung der PRS-Säulen erfolgt zuerst mit 4 x 3 ml Methanol und anschließend mit 4 x 3 ml 3%ige Essigsäure. Dabei dürfen die Säulen nicht trocken laufen!

Mit Hilfe eines Reservoirs werden die Probelösungen auf die Säulen gegeben, wonach man das Becherglas und das Reservoir mit der Säule jeweils zweimal mit je 3 mL 3%ige Essigsäure spült. Anschließend wird die Säule ca. 30 s lang trocken gesaugt.

Die Elution der Amine erfolgt mit 3 x 1 ml Elutionslösung (siehe Tabelle 1) langsam in einen 5-ml-Messkolben, der 0,5 ml 1 mol/l NaOH-Lösung (siehe Tabelle 1) enthält.

Die Elution wird in 1-ml-Schritten vorgenommen, wobei die Säulen nach jedem Schritt für 30 s trocken gesaugt werden. Anschließend wird mit bidest. Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

5.4 Kalibrierung

In der Routineuntersuchung, bei welcher Ergebnisse noch nicht absehbar sind, werden zur Orientierung die Standardlösungen (siehe Tabelle 1) direkt eingespritzt und gemessen.

5.5 Wiederfindung

0,5 ml der Lösung zur Überprüfung der Wiederfindung (siehe Tabelle 1) werden in 50 ml Migrationslösung gegeben und wie unter 5.3 beschrieben angereichert.

5.6 Kalibrierung bei Positiv-Befunden

Wird ein Amin positiv analysiert, werden für die quantitative Bestimmung die Kalibrierlösungen ebenfalls angereichert.

Hierzu werden je 25, 50, 75, 100 und 125 µl der verdünnten Stammlösung (siehe Tabelle 1) des jeweiligen Amins in ein 100-ml-Becherglas pipettiert, welches 50 ml bidest. Wasser enthält. Die Lösungen werden mit 1,5 ml Eisessig angesäuert und wie unter 5.3 angereichert.

5.7 Überprüfung der Empfindlichkeit

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit des HPLC-Systems wird die Lösung zur Überprüfung der Empfindlichkeit (siehe Tabelle 1) direkt eingespritzt und gemessen (siehe 8.1).

5.8 HPLC-Bedingungen

Die folgenden HPLC-Bedingungen haben sich bewährt. Falls von ihnen abgewichen wird, muss dies dokumentiert werden.

HPLC-Methode: PAACYALL.M
 Flow: 0,3 ml/min
 Säulentemperatur: 25,0 °C
 Injektionsvolumen: 100 µl
 Wellenlänge: 230, 240, 280, 305 nm
 Solvent A: 0,01 mol/l Natriumacetatlösung (siehe Tabelle 1)
 Solvent B: Methanol (siehe Tabelle 1)

Gradient:	Zeit	%Solvent B
	0,0	5
	5,0	35
	42,0	67

	48,0	100
	60,0	100
	68,0	5
Posttime	17,0	
Column Switching Valve		
	Zeit	
	0,00	Back-flushing off
	0,75	Back-flushing on
	58,00	Back-flushing off

6. Auswertung und Berechnung

6.1 Auswertung

Die Bestimmung der Amine erfolgt mittels HPLC-DAD. Die Identifizierung der Amine wird mit Hilfe der UV-Spektren und der Spektrenbibliothek vorgenommen.

6.2 Kalibrierung und Berechnung

Die Auswertung erfolgt mit der Methode des externen Standards über die Peakfläche, wobei für jede Substanz eine 5-Punkt-Kalibriergerade (5.6) aufgestellt wird.

7. Validierung

Es wurden die Nachweisgrenzen sowie die Wiederfindungen ermittelt (Anlage).

8. Qualitätssicherung

Vor jeder Probenserie muss die Empfindlichkeit überprüft werden.

Bei auffälligen Proben wird eine Doppelbestimmung vorgenommen und die Quantifizierung erfolgt über die angereicherte Kalibrierung.

8.1 Überprüfung der Empfindlichkeit des Analysensystems

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit wird unter anderem die Peakhöhe benötigt. Um diese zu erhalten, ist es zweckmäßig, in der Auswerte-Software die Berechnungsgrundlage von „Area“ auf „Height“ umzustellen (Report > Specify Report > Quantitative Results Based On > Area / Height).

Es ist unbedingt darauf zu achten, dass zur Erstellung der Kalibration und zum Auswerten der Proben diese Einstellung wieder auf „Area“ gesetzt wird!

Um eine ausreichende Empfindlichkeit des aktuell verwendeten HPLC-Systems zu belegen, muss der nach dieser Prüfvorschrift angesetzte Standard (siehe Tabelle 1) für Benzidin folgende Bedingung erfüllen:

$$\frac{\text{Peakhöhe}_{\text{Benzidin}(3.7.4)} [\text{mAU}]}{c_{\text{Benzidin}(3.7.4)} [\mu\text{g} / \text{L}]} > 0,14$$

Sollte bei der Überprüfung eine nicht ausreichende Empfindlichkeit festgestellt werden, so sind geeignete Maßnahmen gemäß Gerätebuch und Herstellerangaben (Handbuch) zu treffen, um diesen Mangel zu beseitigen.

Erst wenn das verwendete Mess-System die geforderten Bedingungen erfüllt, darf mit der Bestimmung von Proben begonnen werden!

Bei jeder Serie wird eine Wiederfindung gemäß 5.5 vorgenommen. Die Wiederfindung sollte für Anilin mindestens 80 % betragen.

9. Mitgeltende Unterlagen und Literatur

- 9.1 B. Brauer, T. Funke: Spezifische Bestimmung primärer aromatischer Amine in wässrigen Migraten von Bedarfsgegenständen aus Kunststoff, Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 98 (2002) 405-411.
- 9.2 S.A.Wilkens: Spezifische Bestimmung primärer aromatischer Amine in Wasserextrakten von Papieren und Kartonagen für den Lebensmittelkontakt, Wissenschaftliche Abschlussarbeit an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster, SS 2008.

Anlage: Kalibriersubstanzen mit Nachweisgrenzen und Wiederfindungen

Nr.	Name	CAS	Ref.-Nr.	Signal	RT	NWG [µg/L]	WDF [%]
1	1-Amino-2-naphthol Hydrochloride	2834-92-6	172	280	13,656	X	0,00
2	5-Chloro-2-methoxyaniline	95-03-4	407	240	35,685	0,37	94,76
3	4-Chloro-2-nitroaniline	89-63-4	409	230	43,149	0,24	0,00
4	3-Amino-4-methoxybenzanilide	120-35-4	427	230	30,960	0,20	80,89
5	4-Chloro-2,5-dimethoxyaniline	6358-64-1	428	240	31,533	0,30	85,79
6	2-Methoxy-4-nitroaniline	97-52-9	429	240	25,140	X (0,52)	27,67
7	o-Tolidine	119-93-7	430	280	30,537	0,84	75,55
8	4-Aminobenzamide	2835-68-9	432	280	9,847	0,74	88,00
9	5-Chloro-2-methylaniline	95-79-4	434	240	38,755	0,37	88,33
10	Butyl Anthranilate	7756-96-9	435	240	8,329	X	0,00
11	2,4,5-Trichloroaniline	636-30-6	436	305	51,956	2,85	69,56
12	2,4-Dinitroaniline	97-02-9	437	240	29,895	X (0,22)	0,00
13	2,4-Dichloroaniline	554-00-7	438	240	46,355	0,53	94,44
14	2,5-Dichloroaniline	95-82-9	440	240	45,493	0,70	84,43
15	2-Chloroaniline	95-51-2	446	230	31,248	0,77	93,48
16	o-Phenetidine	94-70-2	447	230	31,264	0,89	96,52
17	o-Anisidin	90-04-0	237	230	22,875	1,43	95,59
18	Benzidin	92-87-5	184	280	19,855	0,53	76,30
19	Anilin	62-53-3	376	230	17,654	0,19	86,19
20	2,4-Diaminotoluol	95-80-7	178	240	13,350	0,75	74,78
21	o-Toluidin	95-53-4	170	230	24,527	0,66	90,25
22	4,4'-Oxydianilin	101-80-4	182	240	21,005	0,58	80,41
23	4,4'-Thiodianilin	139-65-1	230	240	31,243	0,53	77,50
24	4,4'-Methylendianilin	101-77-9	175	240	28,159	0,21	79,79
25	3,3'-Dimethoxybenzidin	119-90-4	176	305	29,643	1,33	75,89
26	2,4-Dimethylanilin	95-68-1	236	230	33,879	0,71	88,54
27	2,4,5-Trimethylanilin	137-17-7	294	230	41,474	1,52	87,35
28	2-Methoxy-5-methylanilin	120-71-8	222	230	31,733	1,62	93,29
29	3,3'-Dimethyl-4,4'-diaminodiphenylmethan	838-88-0	185	240	39,639	0,74	75,11
30	4-Chloranilin	106-47-8	171	240	29,538	0,40	91,99
31	1,4-Phenylendiamin	106-50-3	292	240	8,834	X	7,44
32	3,3'-Dichlorbenzidin	91-94-1	179	280	47,515	0,52	80,03
33	2-Aminonaphthalene	91-59-8	180	230	35,617	0,25	83,23
34	4-Aminobiphenyl	92-67-1	173	280	45,413	0,48	87,96
35	4-Methoxy-m-phenylendiamin	615-05-4	189	240	12,752	X	0,00
36	2-Methyl-5-nitroanilin	99-55-8	181	230	29,094	0,56	99,90
37	4,4'-Methylen-bis-(2Chloranilin)	101-14-4	183	240	49,616	0,66	86,90
38	p-Penetidine	156-43-4	448	240	22,631	0,87	88,93
39	3-Amino-4-methylbenzamide	19406-86-1	449	230	13,430	0,65	92,82
40	5-Amino-6-methylbenzimidazolone	67014-36-2	450	305	12,293	0,56	104,32