Kombination von instrumentell-analytischen Verfahren und Biotests zur Untersuchung von Migraten aus Lebensmittelverpackungen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Lebensmittelchemikerin Nadine Mittag

geboren am 21. Juni 1979 in Großröhrsdorf, Deutschland

Gutachter: **Prof. Dr. rer. nat. T.J. Simat**

Prof. Dr. rer. nat. K. Speer

Eingereicht am: **30.04.2009**

Tag der Verteidigung: **16.10.2009**

Wir neigen viel zu sehr dazu, Dingen, die das Ergebnis vieler Ursachen sind, einer einzigen zuzuschreiben.

- Justus Freiherr von Liebig -

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas J. Simat, für die Betreuung, Unterstützung und Bereitstellung des Themas.

Ein weiterer Dank gilt meinen Diplomanden Susann Hoppe, Leonie Kaltwaßer, Maria Alexowsky und Steffen Förster für die gute Zusammenarbeit und ihr hohes Engagement während der Anfertigung ihrer Diplomarbeiten.

Desweiteren möchte ich Dr. Uwe Schwarzenbolz danken für die Messungen mittels LC-ESI-MS.

Mein besonderer Dank gilt dem Arbeitskreis um Prof. Dr. Doris Marko, sowie Fr. Andrea Sehr und Fr. Sylvia Renz vom Umweltbundesamt Bad Elster für die Einweisung in die unterschiedlichen Zellkulturtechniken.

Dem Institut für Fischereiökologie des Bundesforschungsinstituts für Ländliche Räume, Wald und Fischerei möchte ich für die Durchführung des Fisch-Embryo-Tests danken.

Ein spezieller Dank gilt der Firma Wipak Walsrode GmbH & Co KG für die Aufnahme der Mikrotomschnitte der Kunststofffolien.

Dem Institut für Organische Chemie danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen und Aufnahme der NMR-Spektren.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima danken.

Unseren Kooperationsfirmen der Heinz Company und Valspar möchte ich danken für die Bereitstellung der Probenmaterialien und die finanzielle Unterstützung.

Ein weiterer Dank gilt meinen „Bürokollegen“ Silke Wermann und Nadine Paul für gegenseitige kreative Denkanstöße, Motivierung und den Spaß, den wir so manches Mal im Büro 433 hatten. Außerdem danke ich den beiden, dass sie trotz ihres engen Zeitregimes noch die Möglichkeit fanden meine Arbeit zu korrigieren.

Ein ganz großer Dank gilt meiner ganzen Familie, im speziellen meinen Eltern, für die jahrelange moralische Unterstützung, ständige Motivierung, das stetige Interesse an meiner Arbeit und das häufige und vor allem das feste Daumendrücken.

Und nicht zu letzt möchte ich meinem Freund Thomas und meinem Hund Charly danken, die mir immer treu zur Seite standen, sich immer meine Probleme anhörten und mich anschließend stets zum Lachen brachten. Außerdem möchte ich mich für das stetig aufgebrachte Verständnis und für die regelmäßige Begleitung zu nächtlichen Einsätzen und „Sonderschichten“ an Wochenenden bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung I
Inhaltsverzeichnis III
Abkürzungsverzeichnis V
1 Einleitung und Zielstellung 1
2 Theoretischer Hintergrund 3
2.1 Lebensmittelverpackungen 3
2.1.1 Allgemeine Informationen, Marktdaten 3
2.1.2 Rechtliche Aspekte 4
2.1.3 Die Konservendose - eine Lebensmittelverpackung 6
2.1.4 Lebensmittelverpackungen aus Kunststoff 8
2.2 Toxikologische Untersuchungsmethoden 17
2.2.1 Allgemeine Begriffserläuterung 17
2.2.2 Bestimmung der Toxizität 19
2.2.3 Zellkulturtests zur Bestimmung der Zytotoxizität 20
3 Migration aus Konservendoseninnenbeschichtungen 26
3.1 Probenmaterial 26
3.2 Probenvorbereitung & Migrationsbedingungen 27
3.3 Untersuchung der Migrate in unterschiedlichen toxikologischen Testsystemen 27
3.4 Screening der unterschiedlichen Coating-Migrate im Neutralrottest 29
3.5 Vergleich der unterschiedlichen Migrate des EP-AH-Coatings 30
3.6 Weiterführende Untersuchungen am 95 % EtOH Migrat 36
3.6.1 Stabilitätsuntersuchungen 36
3.6.2 Untersuchungen zu den gesetzlich geregelten Substanzen 37
3.6.3 Weitere Aufklärung des zytotoxikologischen Potentials des Gesamtmigrates 42
3.6.4 Isolation und Charakterisierung von Cyclo-diBADGE 49
3.6.5 Bilanzierung des Gesamtmigrates 52
4 Migration aus Kunststoffverpackungen 54
4.1 Probenmaterial 54
4.2 Probenvorbereitung & Migrationsbedingungen 55
4.3 Untersuchung der Kunststoffreferenzsubstanzen 55
4.3.1 Untersuchung mittels RP-HPLC 55
4.3.2 Überprüfung des toxikologischen Potentials im Neutralrottest 66
4.4 Untersuchung von verschiedenen Verpackungsmigraten im NRT 73
4.5 Migration aus der Ketchupbeutelfolie 74
4.5.1 Aufbau der Folie 74

4.5.2 Identifizierung der migrierenden Substanzen 76
4.5.3 Stabilitätsuntersuchungen 85
4.5.4 Quantifizierung der migrierenden Substanzen 88
4.5.5 Bilanzierung des Gesamtmigrates 92
5 Das Modell der Effekt-Additivität 95
6 Abschließende Diskussion 102
7 Zusammenfassung 107
8 Ausblick 109
9 Literaturverzeichnis 111
10 Anhang 121
10.1 Chemikalien 121
10.1.1 Allgemeine Chemikalien 121
10.1.2 Standards der Coatinganalytik 121
10.1.3 Kunststoffadditivstandards 124
10.2 Charakterisierung von Cyclo-diBADGE 131
10.3 FT-IR-ATR zur Aufklärung des Schichtaufbaus der Ketchupbeutelfolie 133
10.4 Zelltest (Standardarbeitsanweisungen) 135
10.5 Chromatographische Methoden 139
10.5.1 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 1 139
10.5.2 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 2 140
10.5.3 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 3 140
10.5.4 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 4 141
10.5.5 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 5 142
10.5.6 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Kunststoffanalytik 1 142
10.5.7 RP-HPLC-UVD-FLD: Kunststoffanalytik 2 143
10.5.8 RP-HPLC-UVD-CLND: Kunststoffanalytik 3 144
10.5.9 RP-HPLC-UVD-MSD: Coatinganalytik 144
10.5.10 RP-HPLC-UVD-MSD: Kunststoffanalytik 145
10.5.11 Analytische SEC-UVD-ELSD 146
10.5.12 Präperative SEC-UVD-ELSD 146
10.5.13 GC-MSD 1 147
10.5.14 GC-MSD 2 147
10.6 Lebenslauf 149
10.7 Publikationsliste 151
10.8 Erklärung 153

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADI	acceptable daily intake, täglich akzeptierbare Aufnahmedosis
BADGE	2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propan, Bisphenol-A-diglycidylether
BADGE*2H_2O	Bisphenol A-bis(2,3-dihydroxypropyl)ether
BedGgstV	Bedarfsgegenständeverordnung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
BMVEL	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BPA	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan, Bisphenol A
BrdU	Bromdesoxyuridin
Chr.	Charge
CLND	Chemiluminescent Nitrogen Detector, Chemilumineszenz-Stickstoff-spezifischer Detektor
DAD	Diodenarraydetektor
DBP	Dibutylphthalat
DBS	Dibutylsebacat
DEHA	Diethylhexyladipat
DIN	Deutsches Industitut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonucleinsäure
EC	Effect concentration, Effektkonzentration
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods, Europäisches Zentrum für die Validierung von Alternativmethoden
EDI	Eidgenössische Departement des Innern
EFSA	European Food Safety Authority, Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
ELSD	evaporative light scattering detector, Verdampfungslichtstreudetektor
EN	Europäische Norm
EP-AH	Epoxy-anhydrid
EP-AM	Epoxy-anhydridmelamin
EP-PH	Epoxy-phenol
ESI	electrospray ionisation, Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
EVOH	Ethylen Vinyl Alkohol
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations, Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FLD	Fluoreszenzdetektion
FKS	fötales Kälberserum
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
HALS	hindered amine light stabilizer, sterisch gehinderte Amine
HPLC	High performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC_{50}	inhibition concentration, Inhibierungskonzentration (bei 50% der Testorganismen)

ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
IR	Infrarot
ITX	Isopropylthioxanthon
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe
KG	Körpergewicht
$\log K_{OW}$	Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient
Lbm	Lebensmittel
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und. Futtermittelgesetzbuch
MeCN	Methylcyanid (Acetonitril)
MPPO	modifiziertes Polyphenylenoxid
MSD	massenselektive Detektion
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis, Massenzahl
NOAEL	no observed adverse effect level
NOEL	no observed effect level
NMR	nuclear magnetic resonance, kernmagnetische Resonanz
OECD	Organisation for economic cooperation and development
PA	Polyamid
PC	Polycarbonat
PE	Polyethylen
PES-PH	Polyester-phenol
PES-UR	Polyester-urethan
PET	Polyethylentherphthalat
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PVC	Polyvinylchlorid
QM	höchstzulässige Restgehalte des Monomers
QSARs	Quantitative Structure-Activity Relationships, Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed; Europäisches Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, EU-Chemikalienverordnung
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
TBAC	Tributylacetylcitrat
SCF	Scientific Committee on Food, Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss der Europäischen Union
SEC	size exclution chromatography, Größenausschlusschromatographie
SML	spezifisches Migrationslimit
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIC	total ion chomatogram, Totalionenstromchromatogramm
TMA	Trimellitsäureanhydrid
UV	ultraviolett
UVD	Ultraviolettdetektion
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

1 Einleitung und Zielstellung

An Lebensmittelverpackungen wird heutzutage durch die zunehmende Nachfrage nach einfach zubereitbaren Fertigprodukten eine Vielzahl von Anforderungen gestellt. Diese Verpackungen sollen das Lebensmittel zum Beispiel vor Licht und Mikroorganismen schützen, weiterhin sollen sie verformbar, temperaturbeständig, mechanisch und chemisch belastbar sein. Sie sollen das Lebensmittel vor Aromaverlust bewahren, einen Gasaustausch ermöglichen und einen konstanten Feuchtigkeitshaushalt erhalten (Abb. 1). Für den Verbraucher dagegen sind hauptsächlich das optische Erscheinungsbild und die Qualität des verpackten Lebensmittels von Bedeutung.

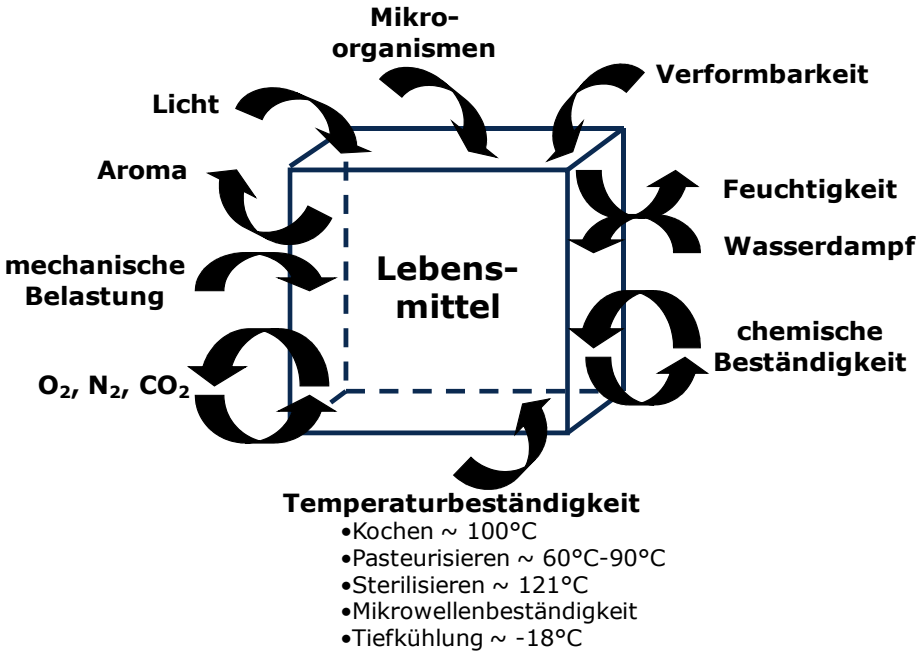


Abb. 1: Anforderungen an Lebensmittelverpackungen

Um diesen hohen Anforderungen entsprechen zu können, sind moderne Lebensmittelverpackungen technologisch sehr hochwertige Produkte, die sich durch eine Kombination von unterschiedlichen Materialien auszeichnen. Im vielschichtigen Aufbau der Verpackung liegt auch gleichzeitig die Migrationsproblematik begründet. Durch den Einsatz von unterschiedlichen monomeren Ausgangsstoffen und resultierenden Reaktionsprodukten besteht ein Migrationspotential, welches von der Verpackung auf das Lebensmittel ausgeht. Innerhalb der Europäischen Union registriert ein Schnellwarnsystem der *European Food Safety Authority (EFSA)* das *Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)* die vielzähligen Meldungen bezüglich der Migration aus Bedarfsgegenständen und sorgt somit für eine rasche Informationsweitergabe an alle beteiligten Staaten und Institutionen [EFSA, 2008]. In

den letzten Jahren handelte es sich dabei hauptsächlich um die Migration von Weichmachern und Semicarbazid aus Deckeldichtungen, die Migration von BADGE-Derivaten aus Konservendosen, und die Migration des Photoinitiators ITX aus aufwendig bedruckten Verpackungen. Der Stoffübergang von BADGE und BADGE-Derivaten aus Konservendosen wurde bereits von Biedermann et al. im Jahr 1996 beschrieben [Biedermann et al., 1996]. Bezüglich des Stoffübergangs von Weichmachern und der Migration von Druckfarbenbestandteilen gibt es Stellungsnahmen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz [BfR, 2005a; BfR, 2005b; BfR, 2005c; BMVEL, 2005].

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Migration aus verschiedenen Konservendosen und Kunststoffverpackungen, welche zum größten Teil derzeit als Verpackung im Lebensmittelsektor eingesetzt werden, zu untersuchen. Dazu sollten Gesamtmigrate mit unterschiedlichen Simulanzien hergestellt werden. Einen Schwerpunkt sollte dabei die Analytik von speziell in fetthaltige Simulanzien migrierende Substanzen darstellen, da es sich hierbei um den sogenannten *worst case* handelt.

Zusätzlich sollten alle migrierenden Substanzen mittels chromatographischer Methoden identifiziert und quantifiziert werden. Die kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen beziehungsweise die isolierten Migrationsprodukte sollten im Anschluss in einem Zellkulturtest an humanen Zelllinien auf ihr zytotoxikologisches Potential untersucht und bewertet werden. Ein Hauptaugenmerk sollte dabei auf migrierende Substanzen mit einem Molekulargewicht von unter 1000 Da gelegt werden. Moleküle von dieser Größe bilden eine mögliche Gefahr für den menschlichen Organismus, da sie durch den Gastrointestinaltrakt potentiell absorbierbar sind [EFSA, 2006].

Ähnliche analytische Ansätze wurden bereits im *BIOSAFEPAPER*-Projekt der EU und in einem Forscherteam um Binderup verfolgt, wobei es in diesen beiden Projekten das Ziel war, die Migration aus Papieren mit Lebensmittelkontakt zu untersuchen und deren Effekte im Biotest zu überprüfen [Severin et al., 2005; Binderup et al., 2002].

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Lebensmittelverpackungen

2.1.1 Allgemeine Informationen, Marktdaten

Als Werkstoffe für Lebensmittelverpackungen werden vor allem Kunststoffe, Papier und Pappe, Metall und Glas eingesetzt.

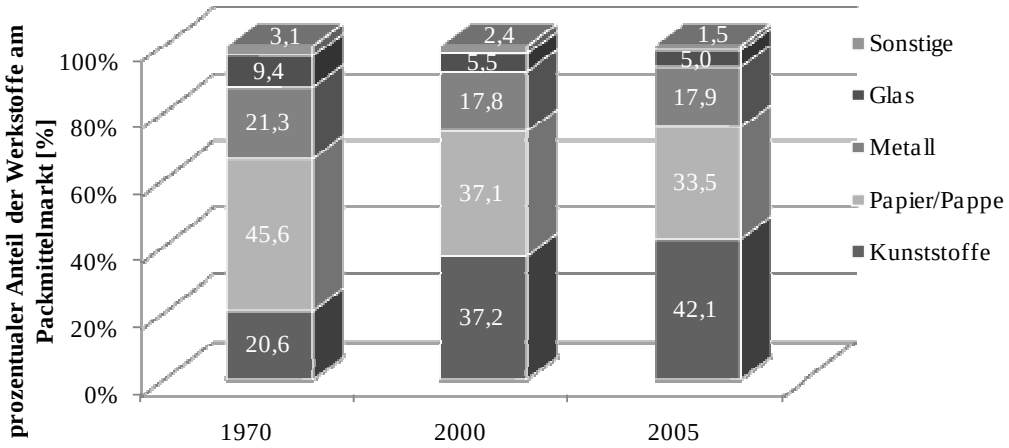


Abb. 2: Prozentualer Anteil der Werkstoffe am gesamten Packmittelmarkt in den Jahren 1970, 2000, 2005 [Industrievereinigung Kunststoffverpackungen e. V, 2007]

In den letzten 35 Jahren nahm der Anteil an verarbeitetem Kunststoff um mehr als 20 % auf dem gesamten Packmittelmarkt zu, dagegen war der Einsatz von Metallen, Glas und von Papier und Pappe leicht rückläufig (Abb. 2).

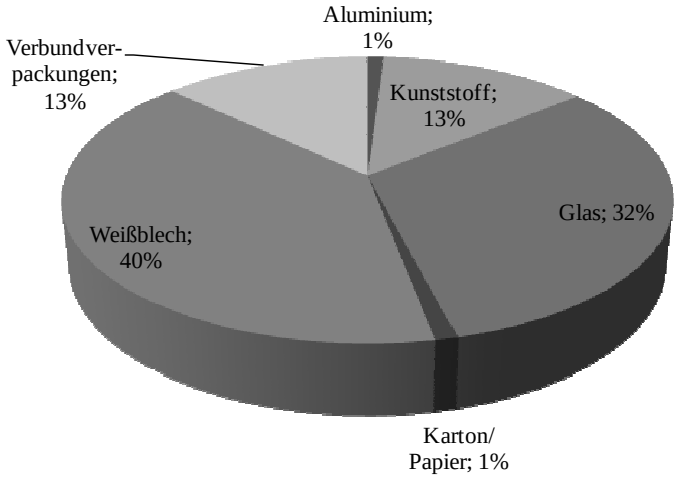


Abb. 3: Prognose über die Aufteilung des Marktes für Lebensmittelverpackungen im Jahr 2005 [Rasselstein GmbH, 2007]

Entgegen dem Trend auf dem gesamten Packmittelmarkt wurde im Bereich der Lebensmittelverpackungen im Jahr 2005 vorwiegend Weißblech (40% Marktanteil) eingesetzt. Hierzu zählten Fleisch-, Obst-, Gemüse- und Sauerkonserven, sowie

Fertiggerichte (z.B.: Suppen), Kondensmilch, Speiseöle, Nüsse (Abb. 3). Des Weiteren fanden vor allem Verpackungen aus Glas, Verbünden (Kombination mehrerer Schichten aus Papier/Pappe, Kunststoff und Metall) und Kunststoffen in größeren Mengen im Lebensmittelsektor Verwendung. Einfache Papier- oder Kartonverpackungen kamen gemäß der statistischen Erhebung nur selten zum Einsatz [Rasselstein GmbH, 2007].

2.1.2 Rechtliche Aspekte

Lebensmittelverpackungen gehören gemäß § 2 (6) des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) zu den Bedarfsgegenständen. Demnach handelt es sich dabei um „Materialien und Gegenstände […], die dazu bestimmt sind mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen“ [LFGB, 2006]. Entsprechend des § 30 des LFGB dürfen Lebensmittelverpackungen nur so hergestellt oder behandelt werden, dass von ihnen keine gesundheitliche Gefahr ausgeht. Ein Stoffübergang von der Verpackung auf das Lebensmittel soll ebenfalls weitestgehend vermieden werden. Dabei ist es laut § 31 des LFGB nicht gestattet, dass migrierende Stoffe die menschliche Gesundheit gefährden und die Zusammensetzung des verpackten Lebensmittels bezüglich der organoleptischen Eigenschaften verändern dürfen [LFGB, 2006].

Der Stoffübergang, die sogenannte Migration, wird in die Gesamt- oder Globalmigration und in die spezifische Migration unterschieden. Als Gesamtmigrat bezeichnet man die Gesamtheit aller aus der Verpackung migrierenden Substanzen in das Füllgut oder aus dem Füllgut in die Verpackung. Bei der spezifischen Migration wird nur der Stoffübergang von einer einzelnen migrierenden Substanz oder Substanzgruppe betrachtet. In § 8 der Bedarfsgegenständeverordnung ist ein maximaler Gesamtmigrationswert von 60 mg der migrierenden Stoffe pro Kilogramm Lebensmittel oder Simulanzlösemittel bzw. 10 mg/dm² Kontaktoberfläche festgelegt [BedGgstV, 2007]. Die Umrechnung von der Masse des abgepackten Lebensmittels (in kg) auf dessen Oberfläche beruht auf der von der EU definierten „Standardverpackung“. Demnach umschließt eine kubische Verpackung mit einer Oberfläche von 6 dm² ein Volumen von 1 dm³, welches bei einer Dichte von eins einem Kilogramm Lebensmittel entspricht (Abb. 4) [RL 2002/72/EG].

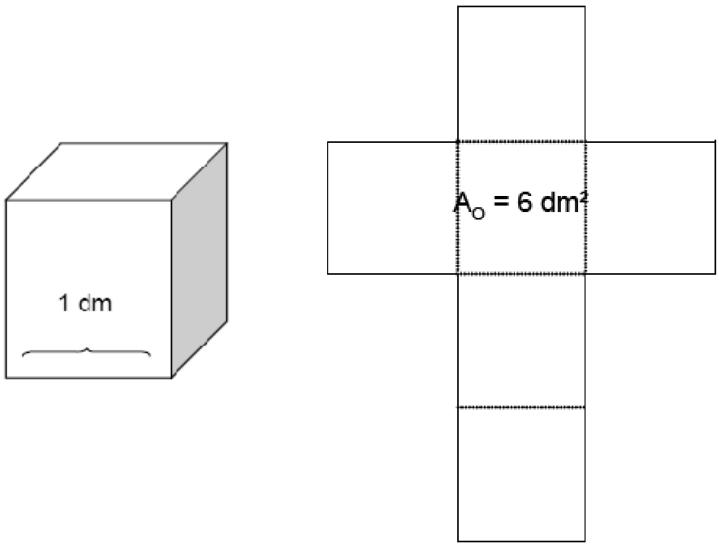


Abb. 4: EU-Würfel zur Beschreibung des Oberflächen/Volumen-Verhältnisses mit 1 dm Kantenlänge und einer resultierenden Oberfläche von 6 dm²

Zugelassene Höchstmengen, höchstzulässige Restgehalte (QM) bzw. spezifische Migrationswerte (SML) für Monomere, sonstige Ausgangsstoffe und Zusatzstoffe für die Herstellung von Bedarfsgegenständen werden in den §§ 3, 4 und 6 der Bedarfsgegenständeverordnung, ergänzt durch Anhang II und III der RL 2002/72/EG, geregelt [BedGgstV, 2007; RL 82/711/EWG]. Weitere praktische Hinweise und Angaben von Höchstwerten von Ausgangsstoffen für die Herstellung von Bedarfsgegenständen bilden Empfehlungen des Europarates (*Council of Europe*), die Stellungnahmen und Empfehlungen des Bundesinstitut für Risikobewertung, das *„Synoptic Document“* und der *„Practical Guide for food contact materials“* der Europäischen Kommission und die *„Note for Guidance for food contact materials“* der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) [Council of Europe, 2008; BfR, 2008; European Commission, 2005; European Commission, 2003; EFSA, 2006].

Zur Einhaltung der Höchstmengen und Migrationsgrenzwerte werden Migrationsuntersuchungen durchgeführt. Zum einem werden die in den Verpackungen beinhalteten Lebensmittel direkt auf den Stoffübergang untersucht und zum anderen wird der Stoffübergang aus der Verpackung mit Hilfe entsprechender Lösemittel unter standardisierten Bedingungen simuliert. Die Grundregeln zur Ermittlung der Migration (Temperatur und Kontaktzeit) aus Bedarfsgegenständen sind in der RL 82/711/EWG verankert. Die zu verwendenden Simulanzlösemittel (Tab. 1) und deren Funktion und Zusammensetzung für die Migrationsuntersuchungen sind in den RL 85/572/EWG und RL 2007/19/EG definiert.

Tab. 1: Simulanzien für die Migrationsuntersuchungen gemäß RL 85/572/EWG und RL 2007/19/EG

Lebensmittelkategorie	Simulanzlösemittel	Abkürzung
wässrig (pH > 4,5)	destilliertes Wasser	Simulanzlösemittel A
sauer (pH < 4,5)	3 % Essigsäure	Simulanzlösemittel B
alkoholisch	10 % EtOH, diese Konzentration ist dem jeweiligen Lebensmittel anzupassen, wenn dieser 10 % überschreitet	Simulanzlösemittel C
fettig	rektifiziertes Olivenöl	Simulanzlösemittel D
trocken	keines	keine

Gemäß RL 82/711/EWG darf anstelle von rektifizierten Olivenöl für die Simulation von fetthaltigen Lebensmitteln auch Isooctan, 95 % Ethanol, modifiziertes Polyphenylenoxid (MPPO, Tenax (ab Prüftemperaturen von $\geq$ 100°C)) und nach RL 2007/19/EG 50 % Ethanol für ausgewählte Milcherzeugnisse eingesetzt werden.

2.1.3 Die Konservendose - eine Lebensmittelverpackung

Herstellung

Konservendosen bestehen im Grundkörper aus Weißblech, welches aus dünn ausgewalztem Stahlblech hergestellt wird. Im Anschluss wird das Weißblech mit einem Zinnüberzug von einer Schichtdicke von 1,0 bis 5,6 g/m², als Korrosionsschutz, versehen. Um Wechselwirkungen zwischen dem verzinnten Weißblech und dem Füllgut oder Korrosion zu verhindern, werden die Dosen auf der dem Lebensmittel zugewandten Seite mit einer Lackschicht *(Coating)* überzogen. Unter den Innenseitenlackbeschichtungen spielt die Beschichtung auf Epoxidbasis die größte Rolle. Dazu wird die Lackbeschichtung entweder durch ein Walzlackierverfahren oder durch Ausspritzen der fertigen Dosen aufgebracht. Nachdem dem Lackieren erfolgt die vollständige Trocknung der Beschichtungen meist in Heißluft-Trockenöfen bei Temperaturen zwischen 160°C und 200°C und einer Einbrennzeit von 5 bis 15 Minuten. Die beschichteten Tafeln werden je nach Art der Dose (2-teilig oder 3-teilig) zugeschnitten und elektrisch verschweißt, gebördelt und der Boden aufgefalzt, beziehungsweise tiefgezogen bei 2-teiligen Dosen [Piringer, 1993].

Die Innenbeschichtung von Konservendosen

Man unterscheidet die Innenbeschichtung von Konservendosen aufgrund der Art des verwendeten Lackes. So werden zum Beispiel Lacke auf Polyesterharz-, Epoxidharz-

oder Organosolharzbasis verwendet. Coatings bestehen neben den genannten Harzkomponenten, aus Vernetzern, Gleitmitteln, Füllstoffen und Pigmenten. In der Arbeit wurde ein Migrat aus einer Epoxyanhydridbeschichtung näher untersucht. Aus diesem Grund wird im Folgenden ausführlich auf diesen Beschichtungstyp eingegangen. Charakteristisch für diesen Harztyp ist die reaktive Epoxidgruppe des Bisphenol-A-Diglycidylether (BADGE), welches aus Bisphenol A und Epichlorhydrin gebildet wird (Abb. 5) [Kittel und Krauß, 1998].

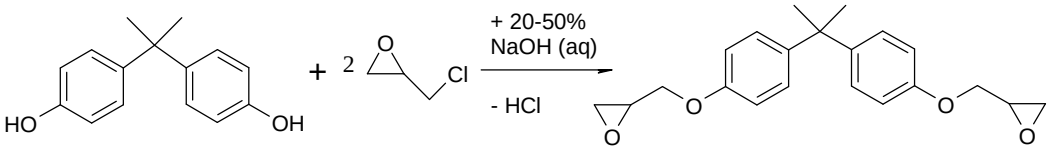


Abb. 5: Bildung von Bisphenol-A-Diglycidylether aus Bisphenol A und Epichlorhydrin

Der gebildete Diglycidylether kann in einem weiteren Reaktionsschritt mit dem überschüssigen Phenol reagieren und lineare Oligomere mit endständigen Oxirangruppen ausbilden (Abb. 6) [Kittel und Krauß, 1998].

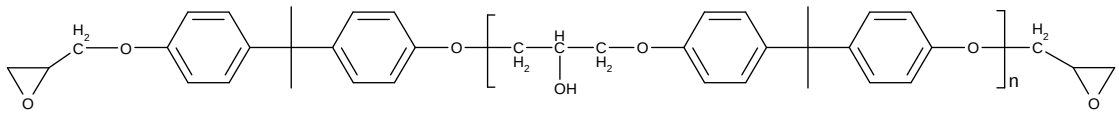
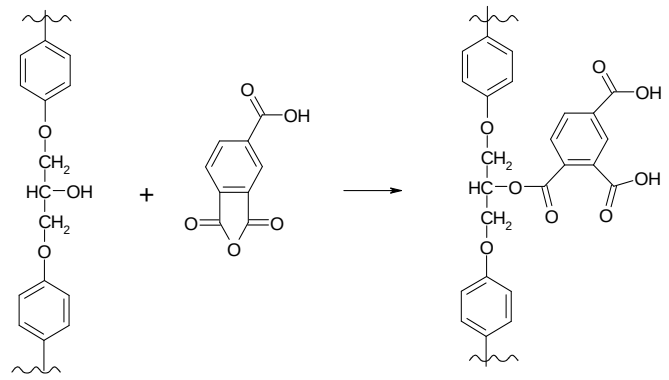


Abb. 6: Struktur eines auf Bisphenol-A basierenden Epoxidharzes

Die Epoxidharze stellen eine der jüngsten Harzklassen dar. Es handelt sich dabei um Verbindungen, die mindestens zwei endständige Epoxidgruppen besitzen, welche durch die Ringöffnung mit Nucleophilen, z.B. Aminen, und Elektrophilen, wie Wasserstoff-Ionen aus Säuregruppen, reagieren [Brock et al., 1998]. Bei dem in der Arbeit untersuchten Coatingtyp kommt es durch die Vernetzung mit Trimellithsäureanhydrid zur Ausbildung des Epoxidnetzwerkes. Dabei reagiert das Anhydrid unter Öffnung seiner Anhydridgruppe primär mit den Hydroxylgruppen des Oligomeres zum Halbester (1) (Abb. 7). In einem zweiten Teilschritt erfolgt die Reaktion mit den Epoxidgruppen des Harzes zu Diestern und so zum ausgebildeten Netzwerk [Brock et al., 1998]. Abb. 7 zeigt eine mögliche Struktureinheit des ausgebildeten Epoxyanhydrid-Netzwerkes. Das anschließende Einbrennen bzw. Härten erfolgt dabei unter hohen Temperaturen (ca. 200°C). Lacke auf Anhydridbasis sind sehr resistent

besonders gegenüber Säuren und dauerhafter Erwärmung. Deshalb wird dieser Lacktyp bevorzugt in der Verpackungsindustrie eingesetzt.

1. Teilreaktion



2. Teilreaktion

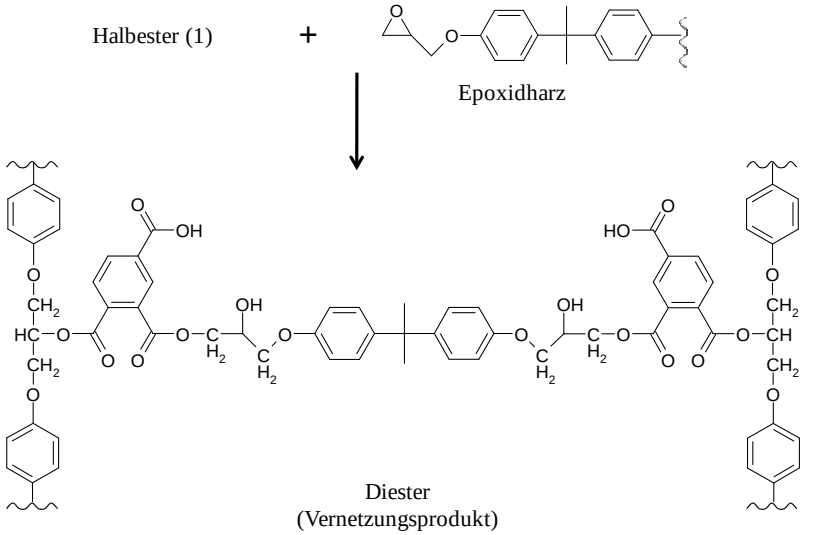


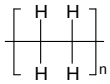
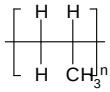
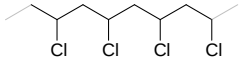
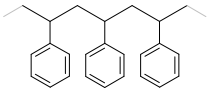
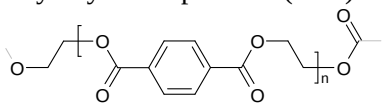
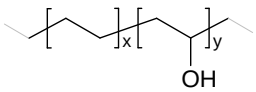
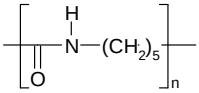
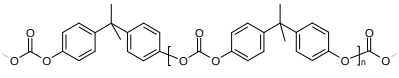
Abb. 7: Ausbildung des Epoxidanhydrid-Netzwerkes durch chemische Härtung [Brock et al., 1998]

2.1.4 Lebensmittelverpackungen aus Kunststoff

Aus den Abb. 2 und Abb. 3 konnte entnommen werden, dass Kunststoffe auf dem Lebensmittelverpackungsmarkt eine bedeutende Stellung einnehmen. Dieses Phänomen erklärt sich durch die stetige Zunahme von Fertigprodukten. Es können und werden prinzipiell alle Nahrungsmittel in Kunststoffverpackungen angeboten. Dabei bestehen die meisten Verpackungen nicht nur aus reinen Kunststofffolien, sondern aus

Kombinationen von verschieden Kunststoffen oder aus Kombinationen mit Metallschichten (Aluminiumfolien oder aufgedampften Aluminium), Pappe und Papier.

Tab. 2: Die wichtigsten Kunstoffe auf dem Verpackungsmarkt und ihre Eigenschaften [European Plastic Converter, 2006; Piringer, 1993]

Kunststoff	Markt-anteil	Eigenschaften
Polyethylen (PE) 	58 %	– chemisch stabil – siegelfähig – beständig gegenüber Wasserdampf, hohen Temperaturen und Kälte – mäßig dicht gegenüber Aromen, Gasen und Fett
Polypropylen (PP) 	14 %	– siegelfähig – beständig gegenüber hohen und niedrigen Temperaturen, Wasserdampf und Fett – formbeständig
Polyvinylchlorid (PVC) 	10 %	– beständig gegenüber unpolaren (Kohlenwasserstoffen, Fetten) und stark polaren Substanzen – geringe Durchlässigkeit von Wasserdampf, Gas; Aroma
Polystyrol (PS) 	8 %	– chemisch stabil – hart und transparent – hohe Spannungsrißempfindlichkeit – relativ hohe Durchlässigkeit für Gase und Dämpfe
Polyethylenterephthalat (PET) 	8 %	– hoher Glanz – hohe Festigkeit – gute Barriereeigenschaften gegenüber Gasen – gering beständig gegenüber Wasserdampf
Ethylen/Vinylalkohol Copolymer (EVOH) 	< 2 %	– hohe Polarität und Kristallinität, daher eine gute Barriere gegenüber Sauerstoff
Polyamid (PA) 	< 2 %	– hart – temperaturstabil – chemisch beständig (außer gegen Chlorkohlenwasserstoffe) – gas- und aromadicht – sehr geringe Wasserdampfbarriere
Polycarbonat (PC) 	< 2%	– hohe Festigkeit und Härte – wärme- und kältebeständig (-90°C bis 135°C) – gas- und wasserdampfdurchlässig

In Dieses Phänomen erklärt sich durch die stetige Zunahme von Fertigprodukten. Es können und werden prinzipiell alle Nahrungsmittel in Kunststoffverpackungen angeboten. Dabei bestehen die meisten Verpackungen nicht nur aus reinen Kunststofffolien, sondern aus Kombinationen von verschieden Kunststoffen oder aus Kombinationen mit Metallschichten (Aluminiumfolien oder aufgedampften Aluminium), Pappe und Papier.

Tab. 2 sind die am häufigsten verwendeten Kunststoffe und deren Eigenschaften zusammengefasst. Es ist zu entnehmen, dass der Kunststoff Polyethylen (PE) der am häufigsten eingesetzte Kunststoff auf dem Verpackungsmarkt ist, gefolgt von Polypropylen (PP) und Polyvinylchlorid (PVC). Dagegen werden die Kunststoffe Polystyrol (PS), Polyethylenterephthalat (PET), Polyamid (PA), Polycarbonat (PC) und Polyvinylalkohol (EVOH) in geringeren Mengen zur Verpackung eingesetzt.

Herstellung

Bei den handelsüblichen Kunststoffen und Kunststofffolien handelt es sich nicht nur um die einfachen Polymerisate aus den Monomeren. Bei der Produktion werden verschiedene Hilfsstoffe (Initiatoren, Vernetzer, Katalysatoren) und Zusatzstoffe (Stabilisatoren, Antioxidantien, Gleitmittel, Antistatika, Weichmacher, Füllstoffe, Farbmittel, Antischlagmittel) zugeführt. Hilfsstoffe dienen dazu die Polymerisationsreaktion zu unterstützen und werden nur in sehr geringen Mengen verwendet. Zusatzstoffe werden zur besseren Verarbeitung, oder zur Optimierung der Eigenschaften der Kunststoffe eingesetzt. Neben den ungebundenen Kunststoff-monomeren und überschüssigen Hilfsstoffen gehen vorzugsweise diese Zusatzstoffe von der Verpackung auf das Füllgut über. Stellvertretend sind hier die Arbeiten aus den Forschungsgruppen um Bieber et al. und Dopico-Gracia et al. zu nennen [Bieber et al., 1984; Dopico-Gracia et al., 2007]. Bereits 1984 beschäftigten sich Bieber et al. mit dem Stoffübergang von Antioxidantien (Stearyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionat) und Gleitmitteln (n-Butylstearat) aus Polyethylen, Polypropylen und Polystyrol in Lebensmittel und unterschiedliche Lebensmittelsimulantien [Bieber et al, 1984]. Die im April des Jahres 2007 publizierte Studie von Dopico-Gracia et al. zeigte Untersuchungsergebnisse aus Migrationsversuchen von industriell eingesetzten Antioxidantien (z.B. BHA, BHT, Irganox 1010, Irganox 1076, Irgafos 168) aus unterschiedlichen Kunststoffmaterialien (Polyethylen, Polypropylen, Polyvinylchlorid und Polyethylenterephthalat). In der Studie wurden handelsübliche

Kunststoffverpackungen und eine im Labor selbst hergestellte Verpackung untersucht. Die Migrationsuntersuchungen (für Simulanz A, B, C, D) der handelsüblichen Proben ergaben, dass oft eine Kombination aus Irganox 1010 oder Irganox 1076 mit Irgafos 168 beziehungsweise mit einem Abbauprodukt von Irgafos 168 eingesetzt wird. Nur im Migrat einer Verpackung wurde eine Grenzwertüberschreitung detektiert [Dopica-Gracia et al., 2007].

In Abb. 8 sind die für Kunststoffe am häufigsten eingesetzten Additive schematisch in einer Übersicht zusammengestellt.

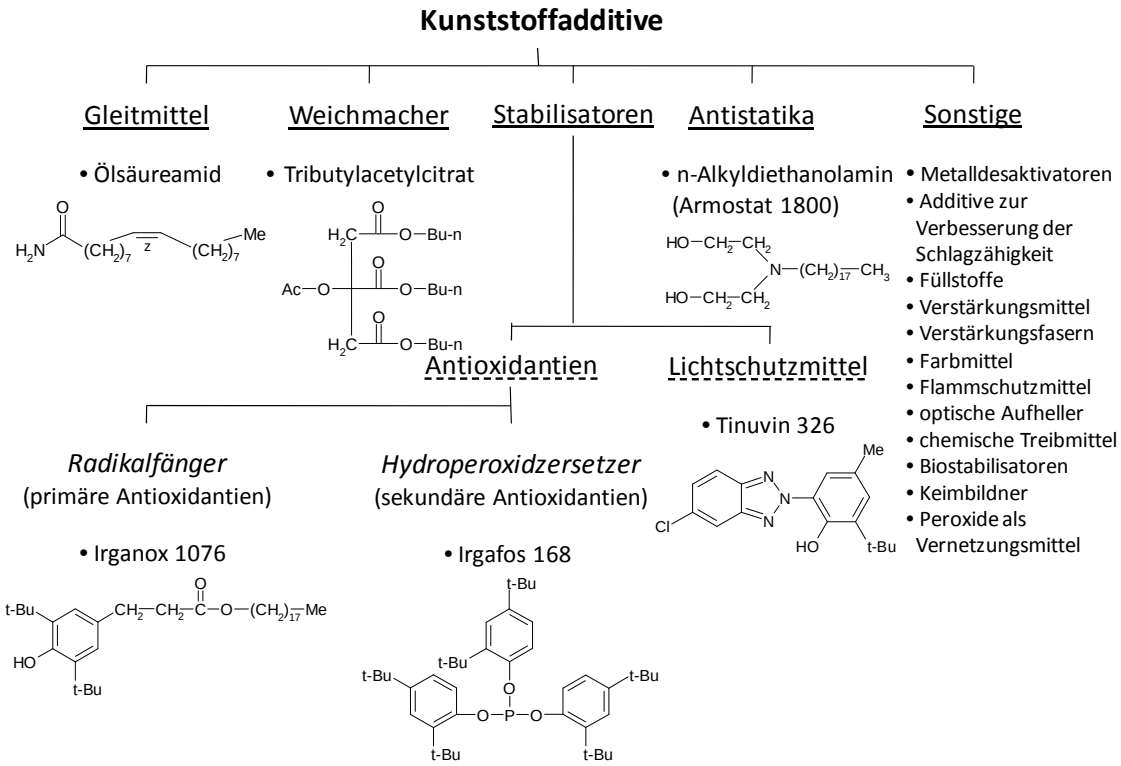


Abb. 8: Einteilung der Kunststoffadditive mit gruppenspezifischen Vertretern [Gächter und Müller, 1989]

Gleitmittel

Gleitmittel werden eingesetzt, um die bei der Kunststoffverarbeitung entstehenden rheologischen Probleme in der Schmelze zu minimieren. Man unterteilt dabei je nach Anwendung in interne und externe Gleitmittel. Interne Gleitmittel werden direkt in die Kunststoffmasse eingearbeitet. Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man nochmals in innere und äußere Gleitmittel. Innere Gleitmittel lösen sich gut im Kunststoff und erniedrigen somit dessen Schmelzviskosität. Die äußeren Gleitmittel sind hingegen nicht gut löslich im Kunststoff, sie diffundieren durch die Kunststoffmasse an deren

Oberfläche und bilden einen Film zwischen der Schmelze und dem Metall der Fabrikationsanlage. Externe Gleitmittel werden direkt von außen auf die Grenzfläche zwischen der Kunststoffschmelze und dem Metall zur Verminderung des Anhaftens aufgebracht. Typische Vertreter für Gleitmittel sind Fettalkohole, Fettsäureamide, Wachssäuren, Wachsester, Paraffine und Metallseifen, wobei meist mehrere Gleitmittel zur Kombination der Wirkungsweisen im Gemisch eingesetzt werden [Gächter und Müller, 1989].

Weichmacher

Weichmacher dienen zur besseren Verarbeitung und Erweiterung des Anwendungsbereiches des Kunststoffes. Sie erhöhen zum einen die Verformbarkeit des Kunststoffes und erniedrigen zum anderen dessen Glastemperatur und damit die Sprödigkeit. Äußere Weichmacher binden über van der Waals-Kräfte an den Kunststoff, dabei liegen sie wie ein Lösungsmittel im Kunststoff vor. Nachteilig an dieser Art der Weichmachung ist, dass aufgrund der lockeren Bindungsverhältnisse diese Weichmacher aus dem Kunststoff migrieren können. Trotzdem hat diese Art der Weichmachung einen hohen Stellenwert für die kunststoffverarbeitende Industrie, denn bereits durch den Einsatz vergleichbarer geringer Mengen an äußereren Weichmachern können bemerkenswerte Effekte erzielt werden. Zu diesen Weichmachern zählen z. B. Phthalate, Mono- und Dicarbonsäureester, Sulfonamide und Phosphate. Bei der inneren Weichmachung nutzt man Copolymerisate von Monomeren des Kunststoffes mit Monomeren anderer Stoffe, welche eine geringere Glastemperatur besitzen. Hierbei ist von Vorteil, dass die Weichmacher fest im Polymergerüst gebunden sind und nicht extrahiert werden können. Jedoch ist die Weichmachung durch Copolymere begrenzt flexibel, so dass auch in diesem Fall oft eine Kombination von inneren und äußeren Weichmachern erfolgt [Gächter und Müller, 1989].

Antistatika

Um eine elektrische Aufladung des Kunststoffes zu verhindern werden Antistatika eingesetzt. Sie setzen den Widerstand herab und ermöglichen somit eine schnellere Ableitung der Ladung. Auch hier gibt es wieder 2 verschiedene Anwendungsweisen. Innere Dauerantistatika werden direkt in den Kunststoff eingearbeitet, während mit den zeitlich begrenzten, äußeren Antistatika nur die Oberfläche des Kunststoffes behandelt wird. Die an der Oberfläche aufgebrachten Antistatika bilden eine leitfähige Schicht aus. Dazu werden grenzflächenaktive Substanzen und hygroskopische Verbindungen

(z.B.: Glycerin, Polyglycole) eingesetzt. Für die innere antistatische Wirkung werden überwiegend nichtionogene Verbindungen, z.B. Fettsäureester oder Polyethylenglycolester und –ether, in den Kunststoff eingearbeitet [Gächter und Müller, 1989].

Stabilisatoren

Eine große Gruppe der Kunststoffadditive stellt die Gruppe der Stabilisatoren dar. Diese Stoffe sollen den oxidativen Abbau der Polymere verhindern bzw. verlangsamen. Der oxidative Abbau der Polymere führt zur Qualitätsminderung des Kunststoffes und zur Einschränkung seiner funktionellen Eigenschaften. Initiator ist die Energieaufnahme durch Erwärmung des Kunststoffes oder einstrahlendes Licht. Antioxidantien und Lichtschutzmittel können die daraus resultierende Zerstörung der Polymere verhindern. Beim thermooxidativen Abbau wirken die primären Antioxidantien (Phenole oder Amine) als Radikalfänger. Sie verhindern die Zersetzung des Kunststoffes über die Reaktion mit freien Radikalen und führen so einen Abbruch der Kettenreaktion herbei. Sekundäre Antioxidantien reagieren mit auftretenden Hydroperoxiden, wobei das Schwefel- oder Phosphoratom der organischen Verbindungen in eine höhere Oxidationsstufe überführt wird [Gächter und Müller, 1989].

Katalysatorreste, Peroxide und gebildete Chromophore sind für den lichtinduzierten Abbau verantwortlich, da sie Absorptionen in einem Wellenlängenbereich von 300 – 400 nm ermöglichen. Lichtschutzmittel (auch UV-Absorber genannt) können das eingestrahlte Licht leicht absorbieren und die freigesetzte Energie in Wärme umwandeln. Hierfür werden häufig organische Substanzen, wie z.B. Benzophenonderivate, Zimtsäurederivate und Hydroxyphenylbenzotriazolderivate eingesetzt [Gächter und Müller, 1989].

Entstehung von Verpackungsfolien und Kunststoffverpackungen

Auf dem Markt werden Kunststoffverpackungen in vielen verschieden Formen angeboten (Abb. 9). Neben Folien, die anteilig am häufigsten im Angebot sind, werden Lebensmittel auch in Hohlkörpern, z.B.: Flaschen, Schalen oder Tuben, unterschiedlicher Größe verpackt. Um diese Formen herzustellen bedient man sich unterschiedlicher Werkstoffverarbeitungsverfahren. Zunächst wird dem Kunststoff in einem sogenannten Urformverfahren seine grobe Form gegeben. Dabei wird das meistens vorhandene Kunststoffgranulat, welches zuvor mit Additiven vermischt wurde

(auch Masterbatch genannt), thermisch erwärmt und durch Gießen, Spritzgießen, Pressen, Spritzpressen, Extrudieren, Kalandieren oder Schäumen in die jeweilige Urform gebracht.

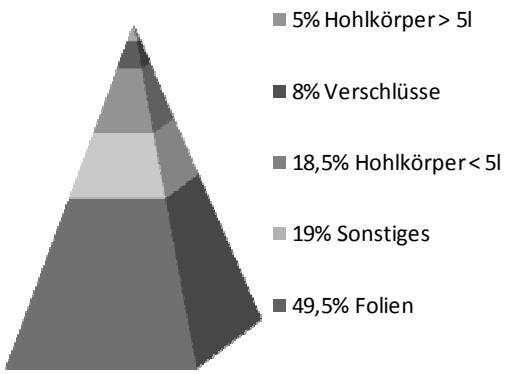


Abb. 9: Typische Anwendungen von Kunststoffen auf dem Verpackungsmarkt [Verband Kunststofferzeugende Industrie e. V. 2007]

Zur Herstellung von Kunststofffolien wird hauptsächlich das Gießen und Extrudieren eingesetzt. In einem zweiten Schritt erfolgt das Umformen und Veredeln des Kunststoffrohlings durch Warmumformen, Recken, Schrumpfen, Schneiden, Füge- und Veredelungsverfahren [Ahlhaus, 1997].

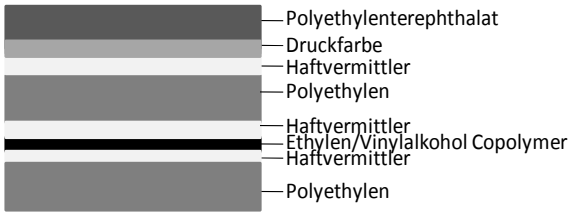


Abb. 10: Exemplarischer Aufbau einer Mehrschichtfolie

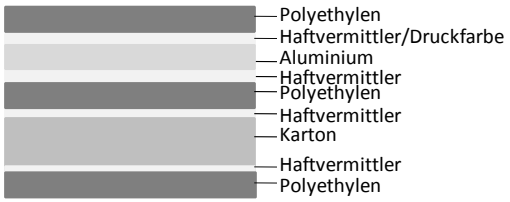


Abb. 11: Exemplarischer Aufbau einer Verbundverpackung

In vielen Fällen reicht eine Kunststoffschicht allein nicht aus, um das Lebensmittel ideal darin zu verpacken und zu schützen. Deshalb wird die Verpackung aus mehreren Schichten aufgebaut, die sich durch ihre unterschiedlichen und vielfältigen Eigenschaften optimal ergänzen. Die Kombination der unterschiedlichen Schichten kann dabei durch kaschieren oder extrudieren erfolgen. Auf diese Weise können Folien aber auch Verbundverpackungen mit bis zu 11 oder mehreren verschiedenen Schichten entstehen (Abb. 10, Abb. 11) [Jenkins und Harrington, 1992].

Bedrucken von Kunststoffverpackungen

Zur weiteren Veredelung und zur optischen Aufwertung des Produktes werden die Kunststoffverpackungen in vielen Fällen bedruckt. Die Druckfarbe bildet ein Gemisch aus Pigmenten, Farbstoffen, Bindemitteln und Lösungsmitteln, welches gut und schnell trocknet. Die angewendeten Methoden kann man in vier Hauptdruckverfahren unterteilen (Tab. 3). Der Flexodruck ist ein beliebtes Hochdruckverfahren, wobei die Druckform aufgrund ihrer Beschaffenheit (Kunststoff oder Gummi) in einem gewissen Grad flexibel ist. Dieses Verfahren kann vielseitig und mit vielen Farben eingesetzt werden. So werden beispielsweise Beutel, Säcke, Folienverbünde, Automatenfolien und Schrumpfpackmittel bedruckt [Jenkins und Harrington, 1992].

Tab. 3: Überblick über die Hauptdruckverfahren nach DIN

Verfahren	Erklärung nach DIN	Formen
Hochdruck	Druckverfahren, bei denen die druckenden Stellen der Druckform höher liegen als die nicht druckenden Stellen [DIN 16514, 1982]	Buchdruck Flexodruck indirekter Druck
Flachdruck	Druckverfahren, bei denen die druckenden und nichtdruckenden Stellen der Druckform in einer bzw. nahezu einer Ebene liegen. Die Verfahren beruhen auf dem physikalisch-chemisch gegensätzlichen Verhalten bestimmter Oberflächen (druckfarbenannehmend/-abstoßend) [DIN 16529, 1982]	direkter Flachdruck indirekter Flachdruck (Offsetdruck) elektrostatischer Flachdruck
Tiefdruck	Druckverfahren, bei denen die druckenden Stellen der Druckform vertieft liegen [DIN 16528, 1988]	Rastertiefdruck Stichtiefdruck
Durchdruck	Druckverfahren, bei denen die druckenden Stellen der Druckform druckfarbdurchlässig sind [DIN 16610, 1984]	Siebdruck

Neben dem Flexodruck ist das Tiefdruckverfahren ein weiteres, sehr häufig verwendetes Verfahren zur Bedruckung von Folien. Der Tiefdruck eignet sich besonders gut zur Wiedergabe von fotografierten Bildern und ist damit dem Flexodruck etwas überlegen. Nachteilig an diesem Verfahren ist die kostspielige Herstellung der Druckformen [Ahlhaus, 1997]. Hohlkörper und unebene Oberflächen werden bevorzugt mit dem Offsetdruck, einem Tiefdruckverfahren, bedruckt. Bei diesem Verfahren ist es möglich, dass sich die weiche Druckwalze der Oberfläche des Gegenstandes anpasst. Auch Gegenstände mit sehr glatten Oberflächen (z.B. Glas, Metall), bei denen die Farbhaftung sehr problematisch ist, können mit diesem Verfahren bedruckt werden. Die

Farbe wird beim Offsetdruck sehr pastös aufgetragen und ermöglicht dadurch eine bessere Haftung. Gleichzeitig stellt dies aber auch den Nachteil des Verfahrens dar, denn die Drucke benötigen eine sehr lange Trocknungszeit [Jenkins und Harrington, 1992]. Dosen, Tuben, Flaschen, Deckel und Hohlkörper können darüber hinaus durch den Siebdruck, ein Durchdruckverfahren, verziert werden. Hierbei ist das entstehende Muster von der Größe und Anordnung der Poren der Druckschablone abhängig. Auch bei diesem Verfahren wird mit relativ dicken Farben gearbeitet, woraus wiederum eine längere Trocknungszeit resultiert [Ahlhaus, 1997]. Neben diesen klassischen Druckverfahren werden auch der Laserdruck und Tintenstrahldruck eingesetzt. Diese Druckverfahren ermöglichen das Drucken ohne eine extra angefertigte Druckform. Größtenteils werden damit aber nur kleine Flächen bedruckt, da zumindest der Tintenstrahldruck weniger witterungsbeständig und relativ langsam ist [Ahlhaus, 1992].

2.2 Toxikologische Untersuchungsmethoden

2.2.1 Allgemeine Begriffserläuterung

Der Begriff Toxikologie setzt sich aus dem griechischen Wörtern „Toxikon“ für Gift und „Logos“ für Lehre zusammen [Reichl, 1997]. Die Toxikologie beschäftigt sich somit mit der schädlichen oder unerwünschten Wirkung von Substanzen auf Organismen. Dabei handelt es sich um eine interdisziplinäre Wissenschaft, die nicht nur versucht die Ursachen der toxikologischen Wirkung zu ergründen, sondern auch deren Ausmaß und gefährdendes Potential zu erfassen, die ablaufenden Reaktionsmechanismen aufzuklären und Gegenmaßnahmen zu ergreifen [Reichl, 1997]. Substanzen mit einem toxikologischen Potential können Veränderungen am Organismus hervorrufen, in dem sie direkt am Applikationsort wirken (= lokale Wirkung), oder nach Aufnahme und Verteilung im Organismus eine systematische Wirkung auslösen [Fuhrmann, 1999]. Die Wirkung von toxikologisch relevanten Substanzen kann sowohl reversible, als auch irreversible Effekte hervorrufen. Das Ausmaß ist dabei abhängig von der Art, der Intensität und der Verweildauer des Giftes und von der individuellen Beschaffenheit des betroffenen Organismus. Aufgestellte Dosis-Wirkungs-Kurven veranschaulichen die hervorgerufenen Effekte von toxikologisch relevanten Substanzen, in Abhängigkeit ihrer verabreichten Dosis bzw. Konzentration (Abb. 12). In niedrigen Konzentrationsbereichen rufen Substanzen keinen Effekt bzw. keinen messbaren Effekt hervor. Erst nach dem Erreichen des Schwellenwertes kommt es zum sigmoidalen Anstieg der Wirkung proportional zur Erhöhung der Dosis, bis jene Stufe erreicht wird, bei der die Wirkung nicht mehr gesteigert werden kann. Als NOEL (*no observed effect level*), wird die Konzentration unterhalb des Schwellenwertes bezeichnet, bei der die verabreichte Dosis keine erkennbare Wirkung hervorruft. Weiterhin kann aus diesen

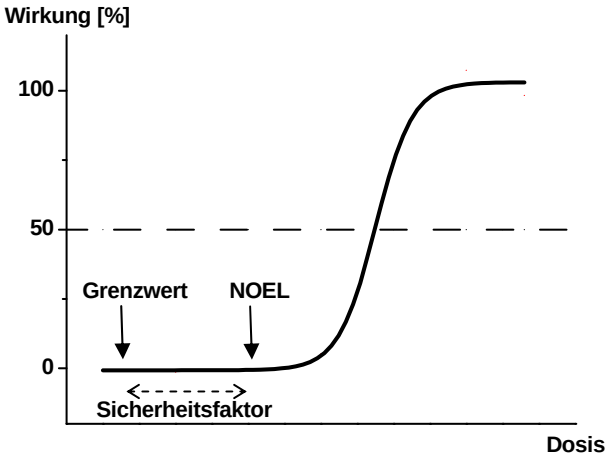


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Kurve von toxikologisch relevanten Substanzen [Greim und Deml 1996]

Dosis-Wirkungskurven die Konzentration abgelesen werden, bei der eine Wirkung von 50 % (EC_{50}) erreicht wird. Diese Effektkonzentration (EC_{50}) dient als anerkannte Vergleichsgröße innerhalb unterschiedlicher Versuchsreihen und Studien. Eine weitere toxikologische Kenngröße stellt der NOAEL-Wert (*no observed adverse effect level*) dar. Dabei handelt es sich um die Dosis, bei der noch keine feststellbaren nachteiligen Wirkungen im Testorganismus verursacht werden.

$$\mathrm{ADI}\left[\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{kg\ KG_{Mensch}} * \mathrm{d}}\right] = \frac{\mathrm{NOAEL}\,\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{kgKG_{Testorganismus}} * \mathrm{d}}}{100}$$

Formel 1: Berechnung der täglich tolerierbaren Aufnahmemenge (ADI) (KG = Körpergewicht)

$$\mathrm{SML}\left[\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{kg}}\right] = \mathrm{ADI}\left[\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{kgKG_{Mensch}} * \mathrm{d}}\right] * 60\left[\frac{\mathrm{kgKG_{Mensch}} * \mathrm{d}}{\mathrm{kg}}\right]$$

Formel 2: Berechnung des spezifischen Migrationslimits (SML)

Dividiert man den ermittelten NOAEL-Wert um den Faktor 100 so erhält man die vom Gesetzgeber festgelegte, täglich tolerierbare Aufnahmemenge (ADI) der Substanz für den menschlichen Organismus **(**Formel 1). Dieser Faktor 100 stellt das Produkt aus den Interspeziesunterschieden zwischen Mensch und Tier (Faktor 10) und Intraspeziesunterschieden zwischen den menschlichen Individuen (Faktor 10) dar. Der ADI-Wert gibt die Menge eines Stoffes an, die ein Verbraucher täglich und ein Leben lang ohne erkennbares Gesundheitsrisiko aufnehmen kann. Der ADI wird zur Bewertung des chronischen Risikos verwendet. ADI-Werte werden durch verschiedene Gremien und Institutionen festgelegt. Auf nationaler Ebene legt das BfR ADI-Werte fest, auf europäischer Ebene werden bzw. wurden ADI-Werte durch den Wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss (*Scientific Committee on Food, SCF)* und international zum Beispiel durch die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation *(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO),* die Weltgesundheitsorganisation *(World Health Organization, WHO)* und durch den gemeinsamem FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe *(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)* der Vereinten Nationen festgelegt.

Ausgehend vom ADI-Wert, multipliziert mit einem Faktor von 60, wird der SML-Wert (spezifisches Migrationslimit) für Einzelsubstanzen abgeleitet (Formel 2). Der Faktor 60 berücksichtigt sich dabei den Fall, dass eine Person mit einem Körpergewicht von 60 kg jeden Tag in seinem ganzen Leben 1 kg des „verunreinigten“ Lebensmittels zu sich nimmt [European Commission, 2005].

2.2.2 Bestimmung der Toxizität

Zur Bestimmung der Toxizität gibt es vielfältige Möglichkeiten. In Tab. 4 sind die am häufigsten durchgeführten Methoden in einer Übersicht zusammengefasst. Prinzipiell werden die Untersuchungsmethoden in *in vivo* und *in vitro* Systeme eingeteilt. Zusätzlich kann man noch in *ex vivo* Systeme unterscheiden, wobei die Untersuchungen an isolierten Organen durchgeführt werden. Gemäß der Europäischen Chemikalienverordnung (REACH) werden umfangreiche toxikologische Tests zur einheitlichen Gefährdungseinstufung von bereits zugelassenen und neuen Chemikalien gefordert [VO (EG) Nr. 1907/2006].

Tab. 4: Übersicht über die unterschiedlichen Arten der Toxizitätsbestimmung

***in vivo* Systeme**	***in vitro* Systeme**	
Säuge- und Wirbeltiere	**Bakterien**	**Zellkulturen**
– Akute Toxizität – Subakute Toxizität (28-Tage-Test) – Subchronische Toxizität (90-Tage-Test) – Chronische Toxizität (Langzeitstudie) – Akute Toxizität auf Haut und Schleimhäute – Sensibilisierung der Haut – Phototoxizität – Reproduktionstoxizität – Kanzerogenität – Ökotoxizität	Mutagenität/Kanzerogenität – Ames-Test – Vorwärtsmutation – Chromosomen-aberration – Schwesterchromatid-Austausch – Zelltransformations-test	Endpunkte: – Aufnahme von Vitalstoffen – Proteingehalt – RNA-/DNA-Synthese – Enzymaktivität

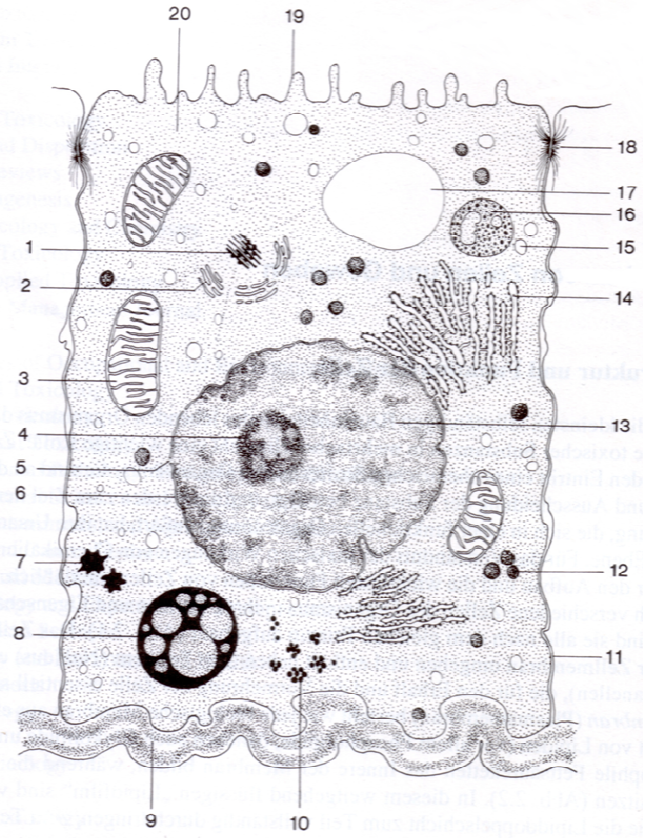
Der Testumfang ist proportional zur jährlichen Produktionsmenge der Chemikalie. *In vivo* Versuche werden an einer Vielzahl von unterschiedlichen Tierspezies durchgeführt, wobei man zusätzlich zwischen Testreihen an Nagetieren (Ratte, Maus, Hamster, Kaninchen) und Nicht-Nagern (Beagle, Primaten, Minischweine) unterscheidet. Entsprechend der Verwendung der auftretenden Chemikalien werden für die *in vivo* Studien die Substanzen oral oder parenteral appliziert. Nachteil und häufiger

Anlass zur Kritik, ist die dafür benötigte hohe Anzahl an Testorganismen. Pro Studie werden meist zwei Spezies pro Geschlecht und Dosisgruppe getestet. Jede Studie beinhaltet eine Kontrollgruppe, Dosisgruppe I (ruft keinen Effekt hervor), Dosisgruppe II (geringer Effekt) und die Dosisgruppe III (deutliches toxikologisches Potential) [Greim und Deml, 1996]. Die Kritik aus tierschutzrechtlicher Sicht ist durchaus berechtigt, da mittlerweile Studien zeigen konnten, dass die unterschiedlichen tierischen Testorganismen in vielen Fällen nicht die gleichen, oder sogar gegensätzliche Reaktionen zeigen als der humane Organismus [Kalsner,1985; Strubelt, 1974; Blogg, 1986]. Nationale und internationale Institutionen, wie die ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) des BfR, ECVAM (*European Centre for Validation of Alternative Methods*) der EU, ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee for the Evaluation of Alternative Methods*) der USA, sind bemüht tierversuchsfreie Untersuchungsmethoden zu dokumentieren, zu bewerten und ihre Anerkennung national und international zu empfehlen und durchzusetzen. Studien belegen, dass in vitro Versuche dem menschlichen Organismus sehr ähnliche Reaktionen und Ergebnisse liefern und somit sehr gut für Toxizitätsstudien geeignet sind. Zu bereits anerkannten Methoden innerhalb der OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) gehören der AMES-Test, der Micronucleus-Test und der Chromosomen-Aberrations-Test zur Überprüfung der Mutagenität und Kanzerogenität [OECD, 1997]. Der HET-CAM-Test stellt eine geeignete Ersatzmethode zur Überprüfung der Augenreizung dar [OECD, 2002]. Der Neutralrottest wird ebenfalls zur Überprüfung des Potentials von Substanzen zur Augenreizung und der Hautverträglichkeit eingesetzt [OECD, 2004]. Zellkulturtests, sowohl an humanen, als auch an tierischen Zellkulturen, sind in der Entwicklung der alternativen Testmethoden von entscheidender Bedeutung.

2.2.3 Zellkulturtests zur Bestimmung der Zytotoxizität

Zellkulturtests stellen *in vitro* Modelle dar, mit deren Hilfe das toxikologische Potential von Substanzen bestimmt wird. Zellen sind die kleinsten Bausteine im Organismus, daher spielen sie eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme und im Metabolismus von toxisch relevanten Substanzen. Der Begriff „zytotoxisch“ oder „Zytotoxizität“ ist sehr weit gefächert. Durch zytotoxische Substanzen werden über die normalen physiologischen Schwankungsbereiche hinaus Störungen der zellulären Funktionen hervorgerufen. Diese können sowohl reversibel, als auch irreversibel sein, die

Schädigung muss also nicht unbedingt den Zelltod induzieren [Greim und Deml, 1996]. In Zellkulturstudien werden neben humanen Zellen auch tierische und pflanzliche Zellen eingesetzt. Allein der menschliche Organismus besteht aus über 200 verschiedenen differenzierten Zellen, deren grundlegender Aufbau aber prinzipiell gleich ist (Abb. 13) [Eisenbrand und Metzler, 2001]. Für toxikologisch wirksame Substanzen bilden generell alle Zellkompartimente einen Angriffspunkt. Somit sind auch alle Zellfunktionen potentiell gefährdet. Dementsprechend groß und vielfältig ist die Anzahl an Zellkulturtests, mit ihren entsprechenden Endpunkten.



1 Zentrosom
2 Golgi-Apparat
3 Mitochondrium
4 Kernkörperchen (Nukleolus)
5 Kernpore
6 Kernmembran
7 Pigmentkorn
8 Lipidtröpfchen
9 Basalmembran
10 Glykokörnchen
11 Zellmembran
12 körnchenförmige Einschlüsse (Granula)
13 Zellkern (Nukleus)
14 Endoplasmatisches Retikulum
15 kleines Bläschen (Vakuole)
16 Lyosom
17 große Vakuole
18 Desmosom
19 Mikrovilli
20 Cytoplasma

Abb. 13: Vereinfachte Darstellung des Zellaufbaus [Eisenbrand und Metzler 2001]

Im MTT und WST-1 Test wird die Reduktion der Farbstoffe zu den Formazan-Produkten durch die Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen beziehungsweise deren Reduktion durch die pyridinhaltigen Reduktionsäquvivalente NADH und NADPH überprüft [Mosmann, 1983; Berridge et al., 1996; Hamasaki et al., 1996; Ishiyama et al., 1996].

Andere Tests, wie der Coomassieblau-Test oder der Sulforhodamin-Test, untersuchen ganz unspezifisch die Zellvitalität, in dem sie die Zunahme des Gesamtproteingehaltes

nach einer entsprechenden Inkubationszeit überprüfen [Shopsis und Eng, 1985; Skehan et al., 1990].

In der RNA-Synthese oder dem BrdU-ELISA wird die korrekte Replikation von RNA bzw. DNA durch den Einbau von speziell präparierten Nukleobasen kontrolliert [Fauris et al., 1985; Enkiri et al., 2004; Muir et al. ,1990].

Eine weitere, von den unzähligen, Testmöglichkeiten stellt der Neutralrottest dar. In diesem Test wird die Funktionsfähigkeit der lysosomalen Membran überprüft [Borenfreund und Puerner, 1984]. Da es sich bei diesem Test um den in der folgenden Arbeit verwendeten Zytotoxizitätstest handelt, wird im Verlauf dieses Kapitels auf die Funktionsweise und den Mechanismus noch näher eingegangen.

Die zur Überprüfung der Zytotoxizität verwendeten Zellen unterteilt man in Primärkulturen, Subkulturen und Permanentkulturen. Bei Primärkulturen handelt es sich um aus den entsprechenden Organen frisch entnommene Zellen. Nachteilig bei dieser Art der Zellkultivierung ist die kurze Lebensdauer. Diese Zellen repräsentieren die Eigenschaften und metabolischen Aktivitäten des entsprechenden Organs sehr gut. Aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer sind die Handhabung und eine gute Reproduzierbarkeit der Testergebnisse jedoch schwierig. Zusätzlich beeinflussen geringfügige Abweichungen im Geno- und Phänotyp der Gewebe und Organe die Ausprägung der spezifischen Eigenschaften [Lindl, 2002]. Durch mehrmaliges Passagieren können aus diesen Primärkulturen die sogenannten Subkulturen gewonnen werden. Auch diese Zellen zeichnen sich durch eine begrenzte Lebensfähigkeit aus. Erst nach circa 70 erfolgreichen Passagen erhält man permanente Zelllinien. Diese Zellen besitzen einheitliche chemische und physikalische Eigenschaften, die durch ihre stetige Vermehrung dauerhaft bewahrt werden können. Außerdem ist man in der Lage gleichzeitig eine große Anzahl an Zellen zu züchten, um vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit zwei permanenten, adhärent wachsenden Tumorzelllinen gearbeitet. Bei der Zelllinie HT-29 handelt es sich um eine Coloncarzinom-Zelllinie, die bereits im Jahr 1964 etabliert wurde [Fogh und Trempe, 1975]. Diese Zellen sind in ihrem Verhalten und ihrer Differenzierung, denen der normalen Colonzellen sehr ähnlich. Sie sind nicht nur in der Lage Laktase und

Phosphatase zu bilden, sondern entwickeln die für Darmzellen typische Bürstensaummembran mit „tight junctions“ [Blais et al., 1997]. Die Zelllinie Hep-G2 wurde 1975 aus einem menschlichen Lebertumor etabliert [Aden et al., 1979; Knowles et al., 1980]. Durch die Bildung von Enzymen und Proteinen (z.B.: Albumin, Transferrin, Plasminogen) sind diese Zellen in der Lage den Metabolismus der humanen Leber zu präsentieren [Babich et al., 1988; Wilkening et al., 2003]. In einer Vergleichsstudie von primären Zelllinien mit Hep-G2 Zellen konnte gezeigt werden, dass dennoch Unterschiede zu primären Zellen im Verhaltensmuster vorhanden sind. So wurde beobachtet, dass Promutagene in primären Zellen eine deutliche Schädigung der DNA hervorriefen, aber nur teilweise in den Hep-G2 Zellen. Dieses Phänomen lässt sich wahrscheinlich durch eine verminderte Expression von Phase I Enzymen erklären [Wilkening et al., 2003]. Dawson et al. fanden zusätzlich heraus, dass die Hep-G2 Zellen auch eine verringerte Fähigkeit zur Konjugation besitzen im Vergleich zu primären Leberzellen [Dawson et al., 1995].

Neutralrottest

Der Neutralrottest wurde bereits im Jahre 1985 von Borenfreund und Puerner etabliert [Borenfreund und Puerner, 1985]. Sie selbst beschreiben in diesem Artikel, dass sie versucht haben eine zuverlässige, reproduzierbare und preiswerte *in vitro* Untersuchungsmethode zur Bestimmung von potentiell toxikologischen Substanzen zu entwickeln. Dabei untersuchten sie das toxikologische Potential von oberflächenaktiven Substanzen (anionische und kationische Tenside) an der Zelllinie BALB/c 3T3, einer permanenten Mäuse-Fibroblastenzelllinie, nach einer Inkubationszeit von 24 h. Das Testprinzip beruht auf der Akkumulation des schwach kationischen Farbstoffes Neutralrot (Abb. 14) in den Lysosomen der vitalen Zellen. Lysosomen sind kleine Vesikel mit einer einfachen Lipidmembran (Abb. 13). Deren Aufgabe ist die Aufrechterhaltung der intrazellulären Verdauung der Zelle, indem sie zelleigene und zellfremde Bestandteile abbauen.

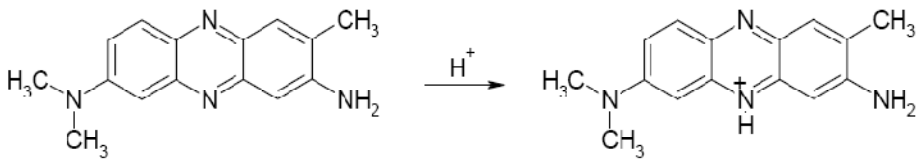


Abb. 14: Struktur und Protonierung des Farbstoffes Neutralrot (3-Methyl-3-amino-7-dimethyl-aminophenazin)

Daher besitzen sie eine Vielzahl von Enzymen (Glykosidasen, Lipasen, Phospholipasen, Proteasen, Nukleasen, Phosphatasen, Sulfatasen, Lysozym), welche bei dem vorherrschenden pH = 5 ein Aktivitätsoptimum erreichen [Horn et al., 2005]. Der Farbstoff Neutralrot gelangt mittels Diffusion durch die lysosomale Membran. Der eigentliche Vorgang der Färbung wird in der wissenschaftlichen Literatur unterschiedlich diskutiert. Lemieux et al. und MacIntyre und Cutler gehen davon aus, dass es innerhalb der Lysosomen zur Protonierung des Farbstoffes, aufgrund des pH-Gradienten zwischen dem neutralen Zytosol (pH = 7) und dem Lysosomen (pH = 5), kommt und der Farbstoff so in eine „Ionenfalle“ gelangt (Abb. 14) [Lemieux et al., 2004; MacIntyre und Cutler, 1988]. Dagegen nehmen Babich und Borenfreund in ihren zahlreichen Arbeiten an, dass sich das protonierte Neutralrot in den Lysosomen der Zellen ansammelt, indem es an anionische Stellen in der Lysosomenmatrix bindet [Borenfreund und Babich, 1987; Babich und Borenfreund, 1991].

Durch Expositionseinwirkung von toxikologisch relevanten Substanzen kann eine Schädigung oder Zerstörung der lysosomalen Membran beziehungsweise auch der gesamten Zelle hervorgerufen werden. Diese Beeinträchtigung der zellulären Vitalität minimiert oder verhindert vollständig die Färbung mit Neutralrot. Die von den Lysosomen aufgenommene Farbstoffmenge ist daher proportional zur Zellvitalität.
Der Neutralrottest ist ein zur Zytotoxizitätsbestimmung sehr häufig eingesetzter Test. In Vergleichsstudien konnte gezeigt werden, dass mit dem Test sehr gute Ergebnisse auch in niedrigen Konzentrationsbereichen erzielt wurden. So reagiert er sensitiver als ein Test zur Bestimmung des Proteingehaltes oder zur Überprüfung der Laktathydrogenase-Aktivität [Fotakis und Timbrell, 2006]. Vergleichbare Ergebnisse erzielte der Neutralrottest gegenüber der Bestimmung der mitochondrialen Enzymaktivität und der RNA-Synthese-Rate [Fotakis und Timbrell, 2006; Eirheim et al., 2004; Sauvant, 1997].
Die Vergleichbarkeit von Zellkulturtests ist jedoch von mehreren Parametern abhängig. Neben dem gewählten Endpunkt spielen die ausgewählten Zelllinien und die spezifische Reaktivität der zu untersuchenden Substanzen eine entscheidende Rolle [Locschall et al., 2002].

Heute stellt der Neutralrottest eine international anerkannte Methode zur Bestimmung der Zytotoxizität dar [OECD, 2004]. Auch für die biologische Beurteilung von

Medizinprodukten nach DIN EN ISO 10993-5 wird die Überprüfung mittels Neutralrottest empfohlen [DIN EN ISO 10993-5, 2007].

3 Migration aus Konservendoseninnenbeschichtungen

3.1 Probenmaterial

Von der Kooperationsfirma wurden sechs verschiedene Coatingtypen auf Epoxid- und Polyesterbasis für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt:

- Epoxyanhydrid-Coating, Chr. 2004 *(EP-AH 2004)*
- Epoxyanhydrid-Coating, Chr. 2007 *(EP-AH 2007)*
- Epoxyanhydridmelamin-Coating *(EP-AM)*
- Epoxyphenol-Coating *(EP-PH)*
- Polyesterurethan-Coating *(PES-UR)*
- Polyesterphenol-Coating *(PES-PH)*

Zur einfacheren Handhabung wurden die Proben in Form von beschichteten Weißblechstreifen (Maße: 1 cm*25 cm; 2 cm*12,5 cm) von der Firma Valspar geliefert. Neben den beschichteten Weißblechstreifen standen auch unbeschichtete Streifen für Blindwertmessungen zur Verfügung.

Zusätzlich zu den Coating-Proben wurden kommerziell erhältliche und selbst aufgereinigte Referenzsubstanzen (Tab. 5) und ein Harz auf Epoxidbasis (D.E.R. 667-20, The DOW Chemical Company) zur Analytik herangezogen.

Tab. 5: Untersuchte Referenzsubstanzen zur Coatinganalytik

Referenzsubstanz	Hersteller
Bisphenol A (BPA)	Merck-Schuchardt
Bisphenoldiglycidylether (BADGE)	Fluka
BADGE*2 H_2O	Fluka
BADGE*HCl	Fluka
BADGE*2 HCl	Fluka
BADGE*HCl*H_2O	Fluka
BADGE n=1	Isolationsprodukt
BADGE n=2	Isolationsprodukt
Cyclo-diBADGE	Isolationsprodukt
Trimellithsäureanhydrid (TMA; Benzol-1,2,4-tricarbonsäure-1,2-anhydrid)	Merck-Schuchardt

3.2 Probenvorbereitung & Migrationsbedingungen

Sowohl für die Untersuchungen im Neutralrottest, als auch für die chromatographischen Trennungen wurden die Standardsubstanzen in den entsprechenden Konzentrationen in DMSO gelöst.

Die Herstellung der Migrate aus den Weißblechstreifen erfolgte nach DIN EN 1186-1:2002, DIN EN 1186-3:2002, DIN EN 1186-14:2002 beziehungsweise der RL 82/711/EWG und RL 2007/19/EG. Dazu wurden die Coatingstreifen ziehharmonikaartig gefaltet und durch vollständiges Eintauchen in dem entsprechenden Simulanz (Tab. 7) extrahiert. Nach der gravimetrischen Bestimmung des Gesamtmigrates wurde der getrocknete Rückstand, für die Messungen mittels HPLC und zur Bestimmung der Zytotoxizität in DMSO bzw. THF gelöst.

3.3 Untersuchung der Migrate in unterschiedlichen toxikologischen Testsystemen

Zunächst sollte für die zytotoxikologischen Untersuchungen ein geeignetes Testsystem gefunden und am Institut etabliert werden. Durch eine Zusammenarbeit mit dem Umweltbundesamt Bad Elster und dem Institut für Fischereiökologie des Bundesforschungsinstituts für Ländliche Räume, Wald und Fischerei in Hamburg war es möglich, das toxikologische Potential der 95 % ethanolischen Migrate des Epoxyanhydrid- und Polyesterurethan-Coatings in folgenden Testsystemen auf ihre Toxizität zu überprüfen:

- Ames-Test *(Mutagenitätstest)* [Ames et al., 1975; OECD, 1997]
- RNA-Synthese-Inhibition *(Zytotoxizitätstest)* [Fauris et al., 1985; Enkiri et al., 2004]
- BrdU-ELISA *(Zytotoxizitätstest)* [Muir, 1990]
- WST-1-Test *(Zytotoxizitätstest)*[Mosmann, 1983; Hamasaki et al., 1996; Ishiyama et al., 1996; Berridge et al., 1996]
- Neutralrottest *(Zytotoxizitätstest)* [Borenfreund und Babich, 1992]
- Fisch-Embryo-Test *(aquatische Toxizität)* [DIN 38415-6T6, 2001; Kammann et al., 2005].

Die Überprüfung der Mutagenität wurde an zwei Bakterienstämmen (Salmonella Typhimurium) durchgeführt. Ein positives Resultat am Stamm TA 98 würde eine Rastermutation und am Stamm TA 100 eine Basenaustauschmutation nachweisen. Jedoch konnte weder für das Migrat des PES-UR-Coatings, noch für das EP-AH-Coating (Chr. 2004) ein mutagenes Potential in den getesteten Konzentrationen von 0,5 dm^2/l bis 20 dm^2/l bestimmt werden.

Auch im Fisch-Embryo-Test riefen die untersuchten Migrate keine signifikanten letalen Missbildungen bis zu einer getesteten Konzentration von 60 dm^2/l hervor.

Im BrdU-Elisa, WST-1-Test und Neutralrottest wurden die Migrate in einer Konzentration von 0 dm^2/l bis 30 dm^2/l getestet. Eine Minimierung des korrekten Einbaus von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA wurde in diesem getesteten Konzentrationsbereich ebenfalls nicht beobachtet. Die erzielten zytotoxischen Effekte im WST-1-Test waren sehr gering. In diesem Test wurde die Proliferation der Hela-S3 (Zervixkarzinom-Zelllinie) Zellen nur um etwa 25 % inhibiert. Die stärkste Inhibierung der Zellvitalität wurde in der RNA-Synthese-Inhibierung (EP-AH-Coating 46 % Inhibierung und PES-UR-Coating 59 % Inhibierung bei einer getesteten Konzentration von 15 dm^2) und im Neutralrottest (EP-AH-Coating: $IC_{50;Caco\text{-}2}$: 4 dm^2/l, $IC_{50;Hep\text{-}G2}$: 6,6 dm^2/l, $IC_{50;HT\text{-}29}$: 14,3 dm^2/l; PES-UR-Coating: $IC_{50;Caco\text{-}2}$: 5 dm^2/l) beobachtet [Mittag et al., 2006].

Der Neutralrottest wurde für die nachfolgenden Untersuchungen validiert und nach dem Schema in Abb. 15 durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen mit Hilfe von Trypsin abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Im Anschluss wurden die Zellen in eine 96-Well-Mikrotiterplatte in einer Konzentration von 100000 Zellen/ml pipettiert (jeweils 100 µl/Well). Nach einer Anwachsphase von 3 h wurden die Testsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 48 h wurden die Testlösungen verworfen und die Zellen mit 0,4 %-iger Neutralrotlösung für 3 h angefärbt. Im Folgenden wurde die Färbelösung wieder verworfen und die Zellen gewaschen und fixiert. Der von den Zellen aufgenommene Farbstoff wurde mit einer essigsauren ethanolischen Lösung aus den Zellen herausgelöst und dessen Absorption photometrisch bei 540 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte über ein sigmoidales Fitting (Boltzmann-Funktion) mit der OriginPro Software (Version 7.5).

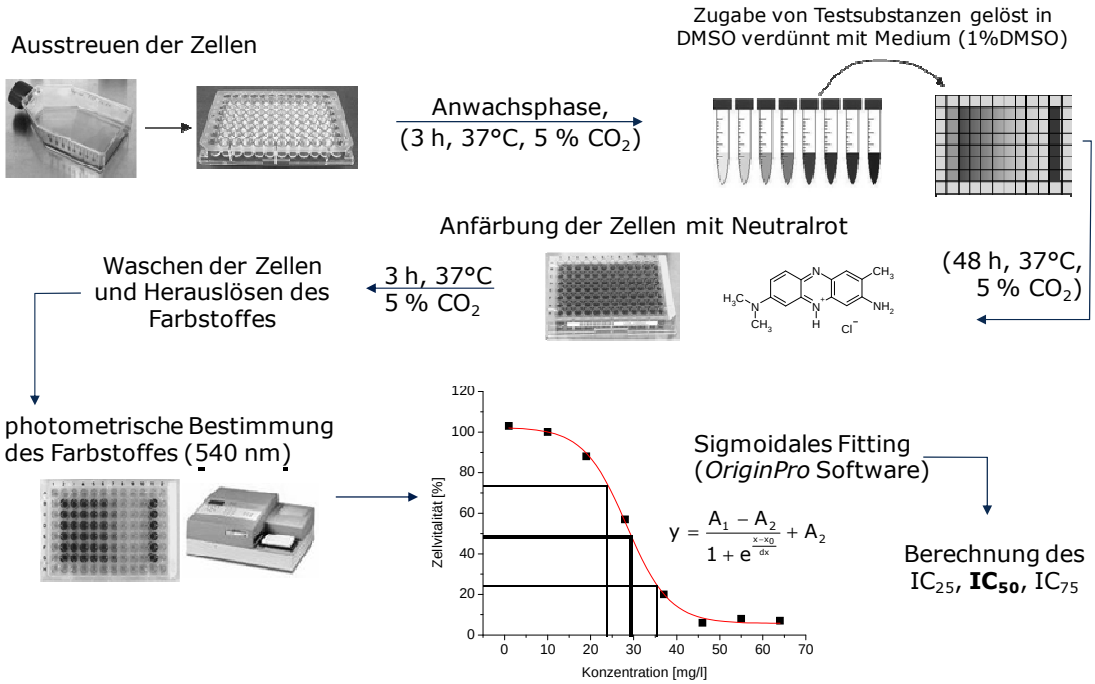


Abb. 15: Schematische Durchführung des Neutralrottest

Jede Testsubstanz wurde an drei unabhängigen Testtagen und Zellpassagen in acht verschiedenen Konzentrationen untersucht. Durch diese Vorgehensweise berücksichtigte man die biologische Streuung der Zellen. Zusätzlich wurde in jedem Testansatz eine Positivkontrolle (Bisphenol A (BPA)) mitgeführt und die ermittelten Werte in eine Regelkarte eingetragen. Somit konnte eine gleichbleibende Vitalität und Qualität der Zellkulturen gewährleistet werden. Die Standardarbeitsanweisung für die Durchführung des Neutralrottests ist im Anhang im Kapitel 10.3 zu finden.

3.4 Screening der unterschiedlichen Coating-Migrate im Neutralrottest

Gemäß DIN EN 1186 wurden von den fünf unterschiedlichen Coatingtypen 95 %-ige ethanolische Migrate hergestellt [DIN EN 1186-14, 2002]. In Tab. 6 sind die ermittelten Werte für die Gesamtmigrate zusammengefasst. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Gesamtmigrate der auf polyesterharzbasierenden Coatings deutlich geringer sind, als die der epoxidhaltigen Coatings. Des Weiteren zeigten die Gehaltsunterschiede der Chargen 2004 und 2007 des EP-AH-Coatings, dass offensichtlich Unterschiede in der Verarbeitung beziehungsweise in den Schichtdicken der Coatings bestehen.

Diese Differenzen entstehen wahrscheinlich im Prozess des Einbrennens der einzelnen Beschichtungsbestandteile bei ca. 200°C zur vollständigen Vernetzung der Coatingschicht [Piringer, 1993].

Tab. 6: Gesamtmigrat der 95 %-igen ethanolischen Migrate (n=3; MW +/- SD)

Coatingtyp	Gesamtmigrat [mg/dm^2]
EP-AH 2004	5,27 +/- 0,32
EP-AH 2007	9,38 +/- 0,06
EP-AM	5,52 +/- 0,15
EP-PH	4,29 +/- 0,23
PES-UR	1,63 +/- 0,03
PES-PH	3,22 +/- 0,06

Im Anschluss wurden die erhaltenen Migrate im Neutralrottest an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 untersucht (Abb. 16). Die Migrate der auf Polyester basierenden Coatings riefen keinen zytotoxischen Effekt im untersuchten Zellsystem bis zu einer getesteten Konzentration von 30 dm^2/l hervor. Die Migrate aus den Coatings mit Epoxidharzbestandteilen inhibierten die Zelllinien in unterschiedlich ausgeprägter Intensität.

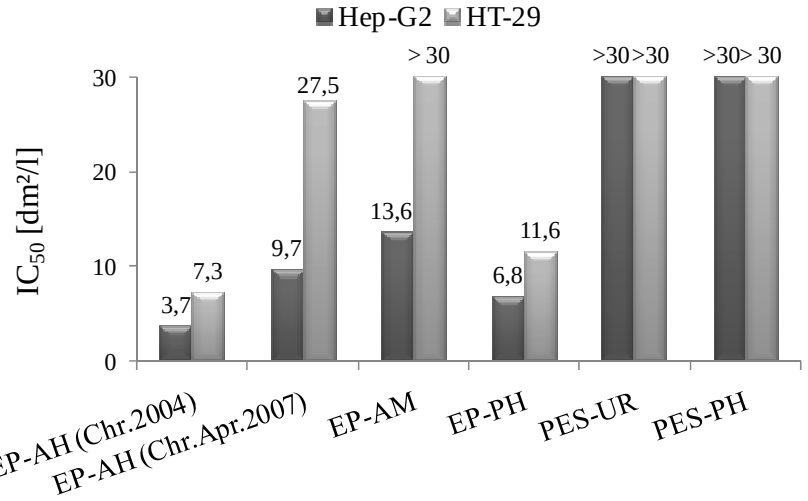


Abb. 16: IC_{50}-Werte der 95 %-igen ethanolischen Migrate im Neutralrottest an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 (n=3, MW)

Der höchste zytotoxischste Effekt wurde im Migrat des EP-AH-Coating aus der Charge des Jahres 2004 gemessen. Aufgrund der Ergebnisse des Probenscreenings und auf Wunsch der Kooperationspartner einigte man sich daher auf eine intensivere Untersuchung dieses Coatingtypes.

3.5 Vergleich der unterschiedlichen Migrate des EP-AH-Coatings

Im Anschluss wurden von dem ausgewählten EP-AH-Coating unterschiedliche Migrate zum Vergleich der übergehenden Stoffmengen hergestellt. Dazu wurden Migrate zur Simulation von wässrigen, alkoholischen und fetthaltigen Lebensmitteln und

Milcherzeugnissen angefertigt [DIN EN 1186-1, 2002; DIN EN 1186-3, 2002; DIN EN 1186-14, 2002; RL 82/771/EWG; RL 2007/19/EG].

Tab. 7: Migrationsbedingungen und die ermittelten Gesamtmigrate bei der Extraktion mit den entsprechenden Simulanzien (MW +/- SD)

	wässrig	**alkoholisch**	**Milcherzeugnisse**	**fettig**
Oberfläche/Volumen	6 dm^2/l	6 dm^2/l	6 dm^2/l	6 dm^2/l
Simulanz	bidest. H_2O	10 % EtOH	50 % EtOH	95 % EtOH
Kontaktzeit	1 h	1 h	4 h	4 h
Migrationstemperatur	121 C	121 C	60 C	60 C
Gesamtmigrat [mg/dm^2]	0,50+/-0,03*	0,79+/-0,00*	1,58+/-0,29*	5,27+/-0,32* 9,38+/-0,06**

**Charge 2004, **Charge 2007*

Aus den erhaltenen Gesamtmigraten (Tab. 7) ist zu erkennen, dass der Stoffübergang und dessen Gehalt von wässrigen (0,50 mg/dm^2) zu fetthaltigen (5,27 mg/dm^2 bzw. 9,38 mg/dm^2) Lebensmitteln stetig zunimmt.

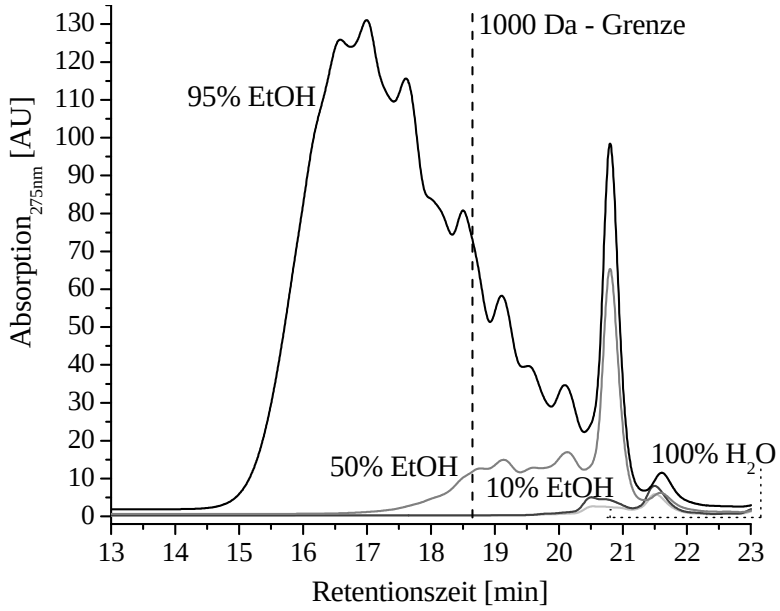


Abb. 17: SEC-UVD_{275nm}-Chromatogramme der unterschiedlichen Migrate des EP-AH-Coatings (Methode nach Schaefer et al. (10.5.11)[Schaefer et al., 2004])

Neben dem tatsächlichen Gehalt der Gesamtmigrate war auch die Molmassenverteilung der migrierenden Stoffe in den unterschiedlichen Migraten von Interesse. Dazu wurden die Migrate mittels SEC-UVD_{275nm} getrennt und deren Anteil in den Fraktionen 0-400 Da, 400-700 Da, 700-1000 Da und > 1000 Da bestimmt (Kapitel 10.5.11). Die Einteilung erfolgte gemäß einer Kalibrierung mit BADGE (340 g/mol), BADGE (n=1) (624g/mol) und BADGE (n=2) (908 g/mol). Der Betrachtungsschwerpunkt lag dabei auf den Substanzen mit einem Molekulargewicht < 1000 Da, da diese Substanzen

potentiell im Gastrointestinaltrakt absorbierbar sind. Substanzen mit einem Molekulargewicht > 1000 Da werden nur zu einem sehr geringen Anteil absorbiert und besitzen daher kein bedeutendes toxikologisches Potential [EFSA, 2006].
Die Abb. 17, Abb. 18 und Tab. 8 verdeutlichen, dass die migrierenden Substanzen in fetthaltige Lebensmittel (95 % EtOH) zum großen Teil ein Molekulargewicht von über 1000 Da aufwiesen (ca. 73 %).

Tab. 8: Gesamtmigrat und die migrierenden Anteile in den einzelnen Fraktionen (< 400 Da, 400-700 Da, 700-1000 Da und > 1000 Da) der unterschiedlichen Migrate des EP-AH Coatings (Charge 2004)

Masse mg/dm^2	100% H_2O	10% EtOH	50% EtOH	95% EtOH
0-400 Da	0,32	0,46	0,13	0,09
400-700 Da	0,18	0,33	0,93	0,71
700-1000 Da	0,00	0,01	0,34	0,60
> 1000 Da	0,00	0,00	0,18	3,89
Gesamtmigrat	0,50	0,79	1,58	5,27

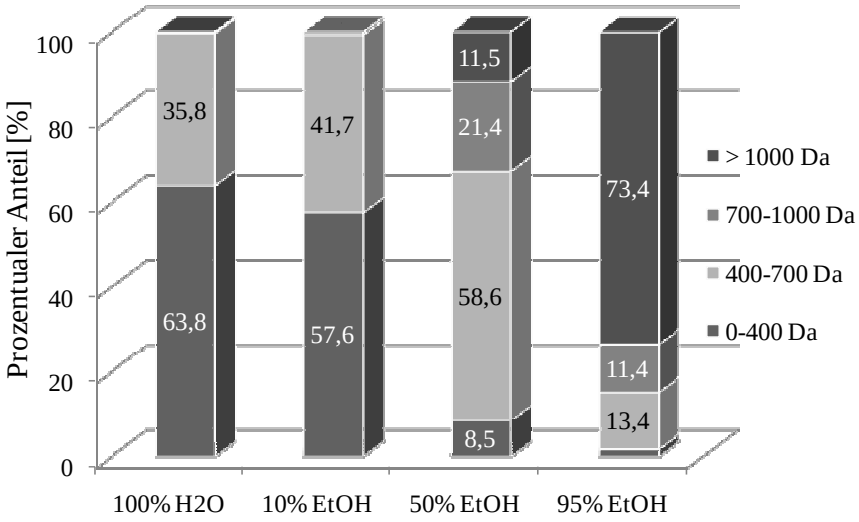


Abb. 18: Prozentuale Anteile der unterschiedlichen Migraten in den Molekulargewichtsklassen < 400 Da, 400-700 Da, 700-1000 Da und > 1000 Da

Nur ungefähr 27 % der in 95%-igen Ethanol migrierenden Substanzen hatten ein kleineres Molekulargewicht als 1000 Da. Im Vergleich zu den anderen Migraten (für wässrige und alkoholische Lebensmittel und Milcherzeugnisse) handelte es sich hier dennoch um die größte Fraktion im Bereich < 1000 Da.

Die Gesamtmigrate der überwiegend wässrigen Extrakte (100 % H_2O, 10 % EtOH) beinhalteten ausschließlich Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner 1000 Da.

Im Migrat zur Simulation von Milcherzeugnissen (50% EtOH) fanden sich sowohl Substanzen mit einem Molekulargewicht größer und kleiner 1000 Da, wobei die zuletzt genannte Fraktion quantitativ stärker vertreten war.

Im nächsten Schritt wurden die unterschiedlichen hergestellten Migrate im Neutralrottest auf ihr zytotoxisches Potential hin untersucht. Es sollte ermittelt werden inwieweit die Art und die Menge der migrierenden Substanzen das Ergebnis des Zytotoxizitätstests beeinflussen.

Sowohl bei den Untersuchungen an der Zelllinie Hep-G2 (Abb. 19), als auch an der Zelllinie HT-29 konnten für die überwiegend wässrigen Migrate (100 % H_2O, 10 % EtOH) keine zytotoxischen Effekte bis zur getesteten Konzentration von 30 dm^2/l festgestellt werden. Die Migrate aus 50 % EtOH und 95 % EtOH riefen dagegen eine deutliche Inhibierung im Zelltest hervor. Wobei der Anstieg der ermittelten IC-Werte des 95 % EtOH-Migrates steiler verlief, als der Anstieg des 50 % EtOH-Migrates (Abb. 19).

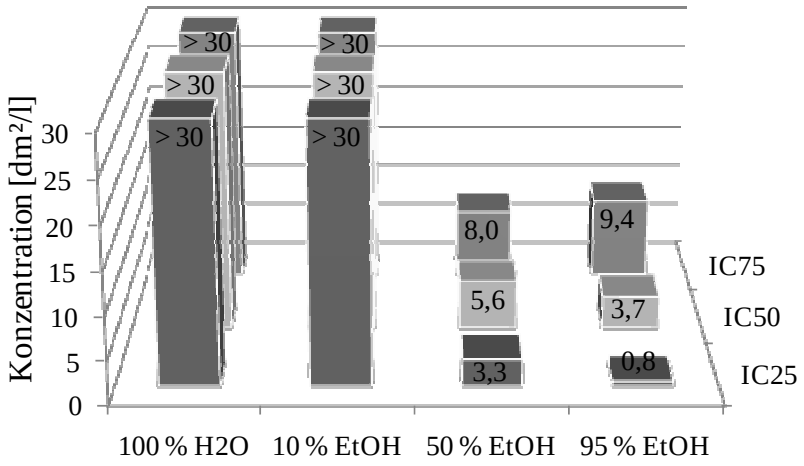


Abb. 19: IC-Werte der unterschiedlichen Migrate des EP-AH-Coatings im Neutralrottest getestet an der Zelllinie Hep-G2 (n=3; MW)

Vergleicht man die IC_{50}-Werte der beiden Migrate an der Zelllinie Hep-G2, so erkennt man, dass das 95 % -ige EtOH-Migrat deutlich stärker zytotoxisch reagierte. Die gleiche Tendenz wurde auch im Vergleich der Migrate an der Zelllinie HT-29 bestimmt.

BADGE und seine Reaktionsprodukte wurden schon häufig aufgrund ihres toxikologischen Potentials in der Literatur diskutiert. Suárez et. al zeigten in ihren Studien an humanen Lymphozyten, dass sowohl zytotoxische als auch genotoxische

Effekte durch BADGE, seine im Lebensmittel vorkommenden Hydrolyseprodukte BADGE*H_2O und BADGE*$2H_2O$ und sein Chlorierungsprodukt BADGE*HCl hervorgerufen wurden [Suárez et al., 2000]. Sueiro et al. untersuchten die gleichen Substanzen im Ames-Test auf ein mutagenes Potential [Sueiro et al., 2001]. Aus ihren Ergebnissen konnten sie schlussfolgern, dass ebenfalls ein genotoxisches Risiko von den Substanzen BADGE und BADGE*H_2O ausgeht. Die beiden anderen Substanzen riefen keine Rückmutation an den getesteten Bakterienstämmen hervor. Nakazawa et al. testeten BADGE, BADGE*$2H_2O$ und BADGE*2HCl auf ihre östrogene Wirkung [Nakazawa et al., 2002]. Im Proliferationstest an Brustkrebszelllinien zeigten alle Substanzen eine östrogene Wirkung, aber eine Bindung an den humanen Östrogenrezeptor (ERα) konnte nicht beobachtet werden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass BADGE ein allergenes Potential aufweist [Uter et al., 2004]. Nach der Vorlage von neuen toxikologischen Daten kam die Kommission der Europäischen Gemeinschaft jedoch zu dem Entschluss, dass „BADGE, BADGE*H_2O und BADGE*$2H_2O$ hinsichtlich der Karzinogenität und Gentoxizität in vivo nicht bedenklich sind und dass eine tolerierbare tägliche Aufnahmemenge von 0,15 mg/kg Körpergewicht für BADGE, BADGE*H_2O und BADGE*$2H_2O$ festgelegt werden kann Daher kann für BADGE, BADGE*H_2O und BADGE*$2H_2O$ ein höherer spezifischer Migrationsgrenzwert SML(T) festgelegt werden. Da keine Daten über die Gentoxizität in vivo der BADGE-Chlorhydrine vorliegen, ist die Behörde der Auffassung, dass der geltende spezifische Migrationsgrenzwert von 1 mg/kg Lebensmittel oder Lebensmittelsimulanz weiterhin ausreichend ist“ [VO (EG) Nr. 1895/2005].

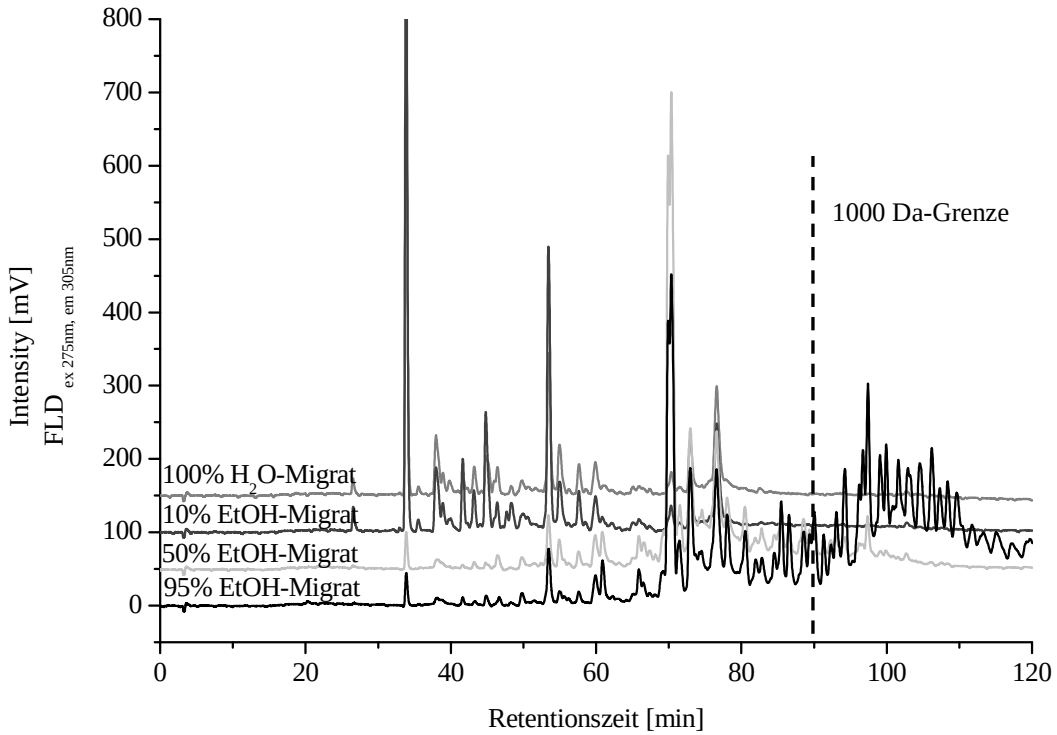


Abb. 20: Bestimmung der BADGE-Äquivalente mittels RP-HPLC-FLD$_{ex275nm,em305nm}$ (Kalibrierung der FL-aktiven Substanzen über BADGE, Kapitel 10.5.3)

Tab. 9: Vergleich der Verteilung der BADGE-Äquivalente in der Fraktion < 1000 Da und im Gesamtmigrat

	BADGE-Äquivalente < 1000 Da [mg/dm²]	BADGE-Äquivalente gesamt [mg/dm²]
100 % H_2O-Migrat	0,03	0,03
10 % EtOH-Migrat	0,07	0,07
50 % EtOH-Migrat	0,34	0,42
95 % EtOH-Migrat	1,68	2,92

Durch RP-HPLC-FLD-Messungen kann der Gehalt an BADGE-Äquivalenten < 1000 Da in den Migraten abschätzt werden. Dazu wurden alle fluoreszenzaktiven Substanzen über eine BADGE-Kalibrierung ausgewertet (Kapitel 10.5.3). Anhand der Chromatogramme und Messwerte konnte gezeigt werden, dass sich der Anteil an BADGE-Äquivalenten in den Migraten unterschiedlich verteilt (Abb. 20, Tab. 9). Die Migrate in 100 % H_2O und 10 % EtOH beinhalteten nur eine geringe Menge an fluoreszenzaktiven Substanzen, welche wie bereits durch die SEC-Messungen gezeigt werden konnte ein Molekulargewicht < 1000 Da besaßen. Im 50 % EtOH-Migrat hatten dagegen 81 % der BADGE-Äquivalente ein Molekulargewicht von unter 1000 Da. Die höchste Menge an BADGE-Äquivalenten mit einem Molekulargewicht < 1000 Da wurde für das 95 % EtOH-Migrat ermittelt. Diese Menge (1,68 mg/dm^2) entspricht

57 % der gesamten fluoreszenzaktiven Substanzen in diesem Migrat. Diese Verteilung der BADGE-Äquivalente in den verschieden Migraten spiegelt die erhaltenen Ergebnisse der Zellkulturversuche wider. Das 95%-ige EtOH-Migrat enthält den höchsten Anteil an BADGE-Äquivalenten mit einem Molgewicht kleiner 1000 Da und erzeugte im Neutralrottest auch den höchsten Effekt.

Ausgehend von den Ergebnissen des Neutralrottests, dem Gehalt an BADGE-Äquivalenten, und dass es als am geeignetsten erschien, von den sogenannten *„worst case“*-Bedingungen auszugehen, wurden die weiterführenden Untersuchungen für das 95 % EtOH-Migrat durchgeführt.

3.6 Weiterführende Untersuchungen am 95 % EtOH Migrat

3.6.1 Stabilitätsuntersuchungen

Für die weiterführenden Untersuchungen war es von Bedeutung, dass sich das hergestellte Migrat über einen längeren Zeitraum in seiner chemischen Zusammensetzung nicht verändert. Dieser Aspekt musste berücksichtigt werden, da die Untersuchungen im Zelltest an drei unabhängigen Testtagen und Zellpassagen durchgeführt wurden.
Zur Untersuchung auf Lagerstabilität wurde ein 95%-iges ethanolisches Migrat aliquotiert und auf drei verschiedene Arten gelagert:

a) Lagerung in 95 %-igen Ethanol
b) Lagerung mehrerer kleiner Aliquote in der Trockne
c) Lagerung des wiederaufgenommenen Migrates in DMSO

Im wöchentlichen Abstand wurden die Migrate über einen Untersuchungszeitraum von sechs Wochen mittels RP-HPLC-UVD/$FLD_{ex.275nm,\ em.305nm}$ auf Veränderungen im chromatographischen Muster untersucht.

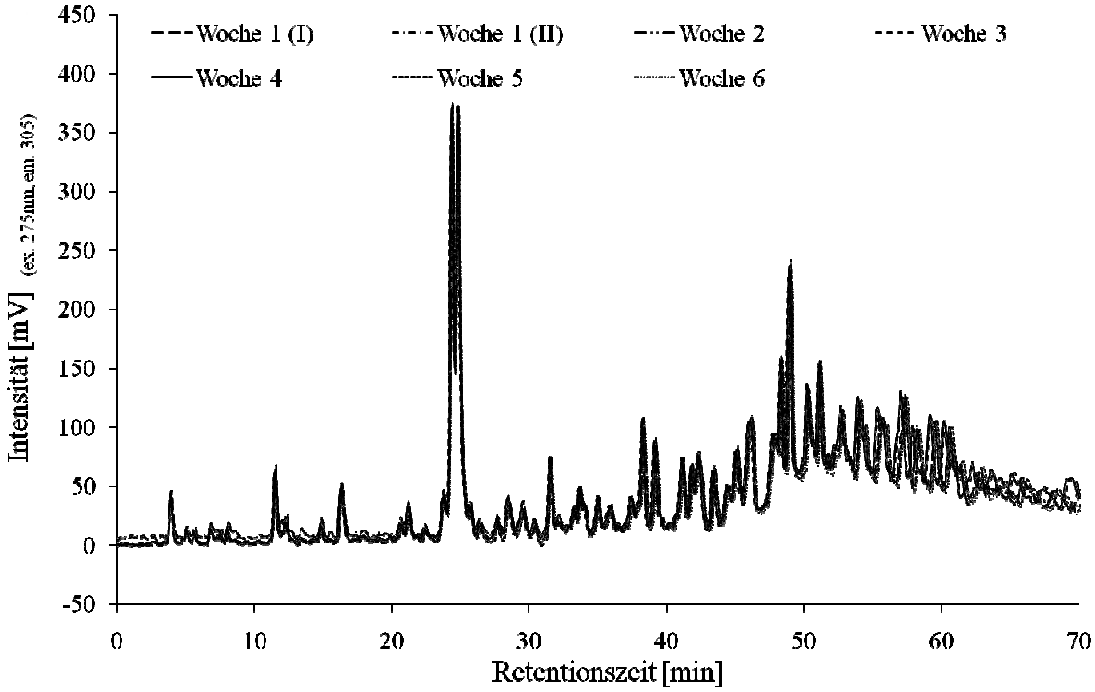


Abb. 21: RP-HPLC-FLD$_{ex.275nm,\ em.305nm}$-Chromatogramme des in DMSO gelagerten Migrates zur Bestimmung der Lagerstabilität über einen Zeitraum von 6 Wochen (Kapitel 10.5.1)

In Abb. 21 sind die Chromatogramme für die Lagerung in DMSO dargestellt. Die aufgenommenen chromatographischen Muster zeigten weder in der Anzahl der Peaks oder der Peakintensität, noch in der Peakform wesentliche Unterschiede beziehungsweise Veränderungen während des Untersuchungszeitraumes (Kapitel 10.5.1). Für die in 95%-igen Ethanol und in der Trockne gelagerten Aliquote des Migrates konnten ebenfalls keine Veränderungen im chromatographischen Muster detektiert werden. Alle drei Arten der Lagerung waren daher gleichermaßen geeignet. Es wurde sich dennoch entschieden die Proben in DMSO zu lagern, da so parallel Untersuchungen im Zellkulturtest und weitere chromatographische Untersuchungen aus einem Migrat möglich waren [Mittag et al., 2006].

3.6.2 Untersuchungen zu den gesetzlich geregelten Substanzen

Gemäß der Verordnung der EG 1895/2005 ist die Verwendung von BADGE, seinen Hydrolyse- und Hydrochlorierungsprodukten „für Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen“ gesetzlich geregelt [VO (EG) Nr. 1895/2005]. In epoxidhaltigen Coatings wurden unter anderen die in Tab. 10 aufgelisteten gesetzlich geregelte Substanzen identifiziert [Schaefer und Simat, 2004].

Tab. 10: Grenzwerte der gesetzlich geregelten Substanzen

Substanz	Grenzwert
BADGE BADGE*H_2O BADGE*2H_2O	Σ 9 mg/kg Lbm bzw. 9 mg/6 dm²
BADGE*HCl BADGE*2HCl BADGE*HCl*H_2O	Σ 1 mg/kg Lbm bzw. 1 mg/6 dm²
BPA	0,6 mg/kg (SML)
TMA	5 mg/kg (SML)

Weiterhin existieren für das Ausgangsmonomer Bisphenol A (BPA) und den Vernetzter Trimellithsäureanhydrid (TMA) spezifische Migrationsgrenzwerte speziell für „Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen“ [RL 2004/19/EG; RL 2002/72/EG].

Zunächst wurden diese Standardsubstanzen im Neutralrottest auf ihr zytotoxikologisches Potential untersucht (Abb. 22). Außer für TMA, welches bis zu einer Konzentration von 2 g/l getestet wurde, konnte für alle Substanzen ein entsprechender IC_{50}-Wert ermittelt werden. Dabei schwankten die ermittelten IC_{50}-Werte der einzelnen Substanzen in den dazu erforderlichen Konzentrationen stark. Für die Substanz BADGE*2H_2O wurde im Vergleich zu den anderen Substanzen das geringste zytotoxikologische Potential ermittelt, es wurden über 80 mg/l der Substanz benötigt um 50 % der Zellen zu inhibieren.

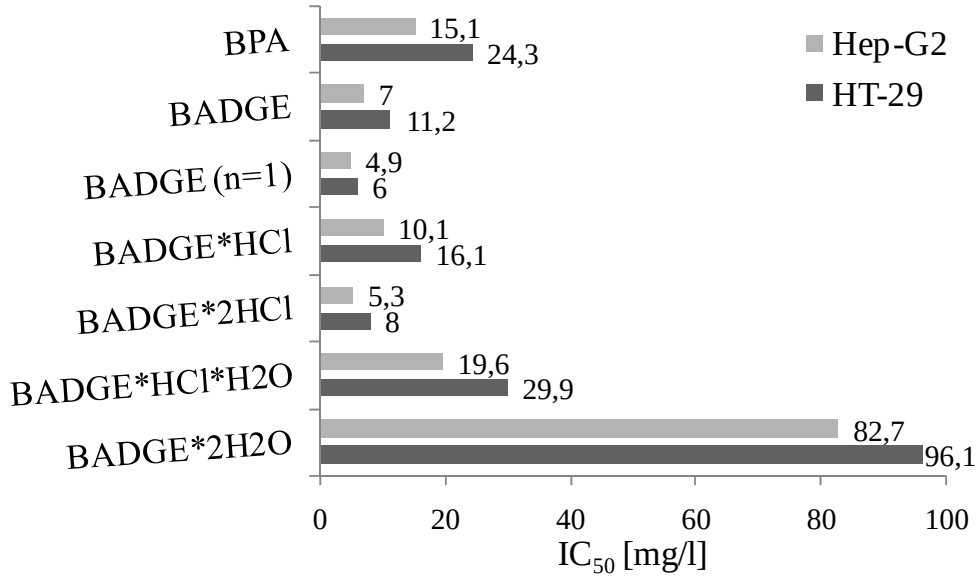


Abb. 22: Ermittlung der IC_{50}-Werte der gesetzlich geregelten Substanzen im Neutralrottest an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 (n=3, MW)

Die höchsten zytotoxikologischen Effekte wurden für das nicht gesetzlich geregelte lineare Dimer von BADGE und das geregelte BADGE*2HCl ermittelt. Von diesen Substanzen genügten ca. 5 mg/l um die Zellvitalität um 50 % zu minimieren. Sortiert man die erhaltenen Ergebnisse entsprechend der Zunahme des toxikologischen Potentials so erhält man folgende Reihenfolge: BADGE*2H_2O < BADGE*HCl*H_2O < BPA < BADGE*HCl < BADGE < BADGE*2HCl < BADGE (n=1). Diese Reihenfolge begründet sich hauptsächlich auf der unterschiedlichen Lipophilie der Substanzen. Im Anhang sind auf S. 121 in Tab. 30 die log K_{OW}-Werte für die untersuchten Substanzen aufgeführt. Gemäß der Abfolge bezüglich der Zytotoxizität ist BADGE*2H_2O die Substanz mit dem geringsten Potential, auch deren log K_{OW}-Wert ist im Vergleich der niedrigste (1,93). Dies bedeutet, dass die Substanz weniger unpolar ist und daher erschwerter die lipophile Zellmembran durchdringen kann. Dagegen besitzen das BADGE Dimer (7,22) und BADGE*2HCl (5,55) relativ hohe log K_{OW}-Werte, aufgrund dieser Eigenschaft sind diese Substanzen eher in der Lage in den Zellorganismus einzudringen und eventuelle Schädigungen hervorzurufen.

Aufgrund einer verminderten Löslichkeit des Trimers von BADGE (BADGE (n=2)) kam es mit zunehmender Konzentration zu Trübungen und zur Ausfällung im Zellkulturmedium. Deshalb wurde diese Substanz unter Verwendung einer Konzentration von 1 % und 2 % DMSO im Zellkulturmedium untersucht. Innerhalb der Untersuchungen an der Zelllinie HT-29 konnte in beiden Fällen kein IC_{50}-Wert für diese Substanz bestimmt werden. Für die Zelllinie Hep-G2 wurden folgende IC_{50}-Werte ermittelt: $IC_{50,\ Hep\text{-}G2,\ 1\%DMSO}$ = 21,8 ± 3,7 mg/l (Trübung des Mediums) und $IC_{50,\ Hep\text{-}G2,\ 2\%DMSO}$ = 17,6 ± 2,3 mg/l. Im Vergleich zum Monomer und Dimer besaß das Trimer von BADGE eine deutlich geringere zytotoxikologische Aktivität im Neutralrottest. Dieses Phänomen kann möglicherweise durch die geringe Löslichkeit und die große Molekülmasse des Trimers (MG = 909,14 g/mol) und der damit erschwerten Aufnahme in die Zellen begründet werden.

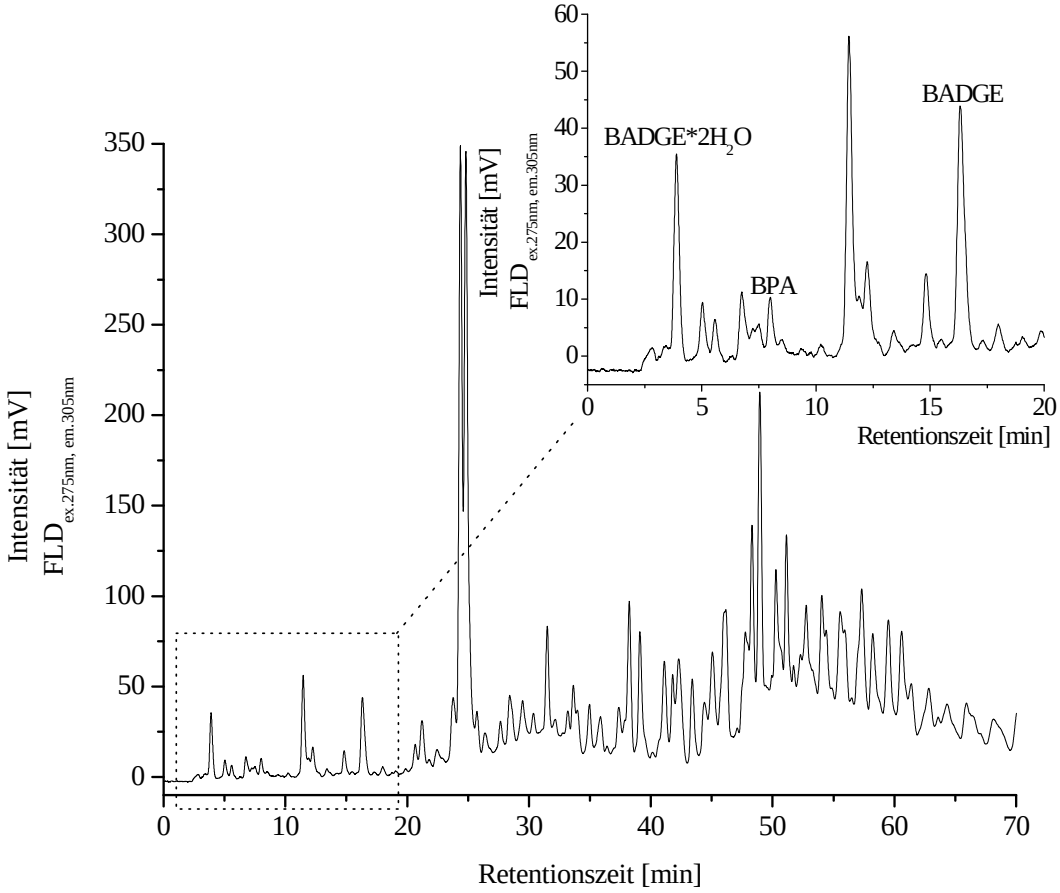


Abb. 23: Identifizierung und Quantifizierung der gesetzlich geregelten Substanzen im 95 %-igen EtOH EP-AH-Migrat mittels RP-HPLC-FLD (Kapitel 10.5.1)

Tab. 11: Gehalte der gesetzlich geregelten Substanzen BADGE, BADGE*2H2O, BPA und TMA im 95%-igen EtOH Migrat

Gehalt	BADGE	BADGE*2H_2O	BPA	TMA
[µg/l]	29 ± 2	48 ± 1	14 ± 1	316 ± 5
[µg/dm²]	4,83 ±0,33	8,00 ± 0,17	2,33 ± 0,17	52,67 ± 0,83

Des Weiteren sollten die Gehalte der gesetzlich geregelten Substanzen im 95 %-igen EtOH Migrat des EP-AH-Coatings bestimmt werden. Dazu wurden die etablierten HPLC-Methoden von Schaefer et al. (Kapitel 10.5.1) und Wermann und Simat (Kapitel 10.5.5) angewendet [Schaefer et al., 2004] [Wermann und Simat, 2008]. Neben dem Monomer BPA und dem Vernetzter TMA konnten im Migrat BADGE und das Hydrolyseprodukt BADGE*2H_2O identifiziert und quantifiziert werden. Aus Abb. 23 und Tab. 11 ist zu erkennen, dass diese Substanzen nur einen geringen Beitrag zum Gesamtmigrat beisteuerten. Der Hauptteil (ca. 99,6 %) der migrierenden Substanzen unterlag keiner gesetzlichen Regelung.

Unter Berücksichtigung der im Migrat enthaltenen gesetzlich geregelten Substanzen und deren zytotoxikologische Potentialen, bezogen auf die ermittelten IC_{50}-Werte in den Zelltests, war man in der Lage, deren Anteil an der Gesamttoxizität des Gesamtmigrates abzuschätzen. In diesem Fall gingen wir von einem additiven Effekt aus. Dies bedeutet, dass sich die Zytotoxizitäten der einzelnen Substanzen zu einer Gesamttoxizität addieren. Synergistische Effekte, wie eine Verstärkung beziehungsweise Verminderung des gesamten toxikologischen Potentials durch gegenseitige Wechselwirkungen der Substanzen wurden in diesem Modell nicht berücksichtigt [Berenbaum, 1985].

$$TF = \frac{IC_{Migrat}\ [\frac{mg}{l}]}{IC_{Substanz}\ [\frac{mg}{l}]}$$

Formel 3: Berechnung des Toxizitätsfaktors (TF) der gesetzlich geregelten Substanzen

$$TA\ [\%] = TF * GS\ [\%]$$

Formel 4: Berechnung des Toxizitätsanteils (TA) der gesetzlich geregelten Substanzen an der Toxizität des Gesamtmigrates (TF = Toxizitätsfaktor; GS = prozentualer Anteil der Substanz am Gesamtmigrat)

Zunächst wurde der Toxizitätsfaktor der Substanz im Verhältnis zur Toxizität des Gesamtmigrates bestimmt (Formel 3). Mit Hilfe des ermittelten Toxizitätsfaktors ist es nun möglich den Anteil an der Toxizität des Gesamtmigrates der einzelnen Substanz zu berechnen (Formel 4). Im letzten Schritt wird die Summe aus den einzelnen Toxizitätsanteilen gebildet (Formel 5).

$$E = \sum_{i=1}^{n} E\ (TA_i)$$

Formel 5: Summierung der Toxizitätsanteile (TA) zum additiven Effekt (E)

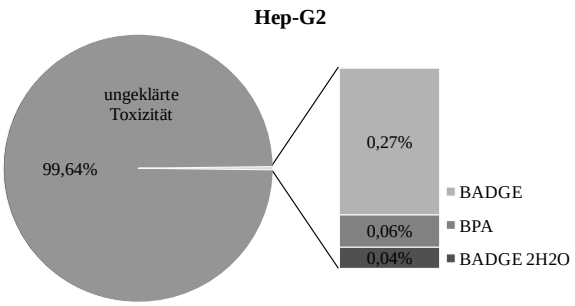


Abb. 24: Anteile der gesetzlich geregelten Substanzen an der Zytotoxizität des Gesamtmigrates für die Zelllinie Hep-G2

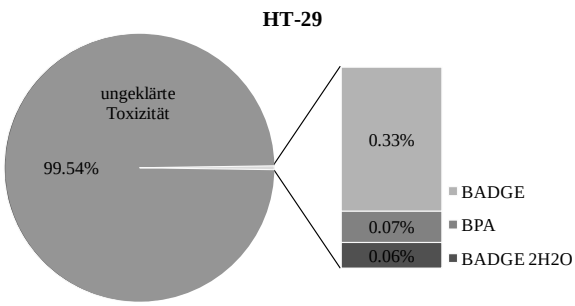


Abb. 25: Anteile der gesetzlich geregelten Substanzen an der Zytotoxizität des Gesamtmigrates für die Zelllinie HT-29

In den Abb. 24 und Abb. 25 sind die addierten Toxizitäten für die im Migrat enthaltenen gesetzlich geregelten Substanzen in einem Kreisdiagramm dargestellt.

Die addierten zytotoxischen Effekte von BPA, BADGE und BADGE*2H_2O erklärten sowohl für die Zelllinie Hep-G2 als auch für die Zelllinie HT-29 weniger als 0,5 % der Zytotoxizität des Gesamtmigrates.

3.6.3 Weitere Aufklärung des zytotoxikologischen Potentials des Gesamtmigrates

Ausgehend von den im vorangegangenen Kapitel aufgeführten Ergebnissen sollte das toxikologische Potential des Gesamtmigrates weiter aufgeklärt werden. Dazu wurde das Gesamtmigrat, wie in Kapitel 3.5, in die 4 Fraktionen (< 400 Da, 400-700 Da, 700-1000 Da, > 1000 Da) mittels SEC-HPLC-UVD fraktioniert, um den Bereich der toxikologisch relevanten Substanzen bezüglich ihrer Molekülgröße einzugrenzen (Abb. 26, Kapitel 10.5.12, Tab. 12).

Tab. 12: Gravimetrisch bestimmte Gehalte der einzelnen Fraktion des Gesamtmigrates

Fraktion	Masse [mg/dm²]
> 1000 Da	3,6
700-1000 Da	0,6
400-700 Da	0,5
< 400 Da	0,4

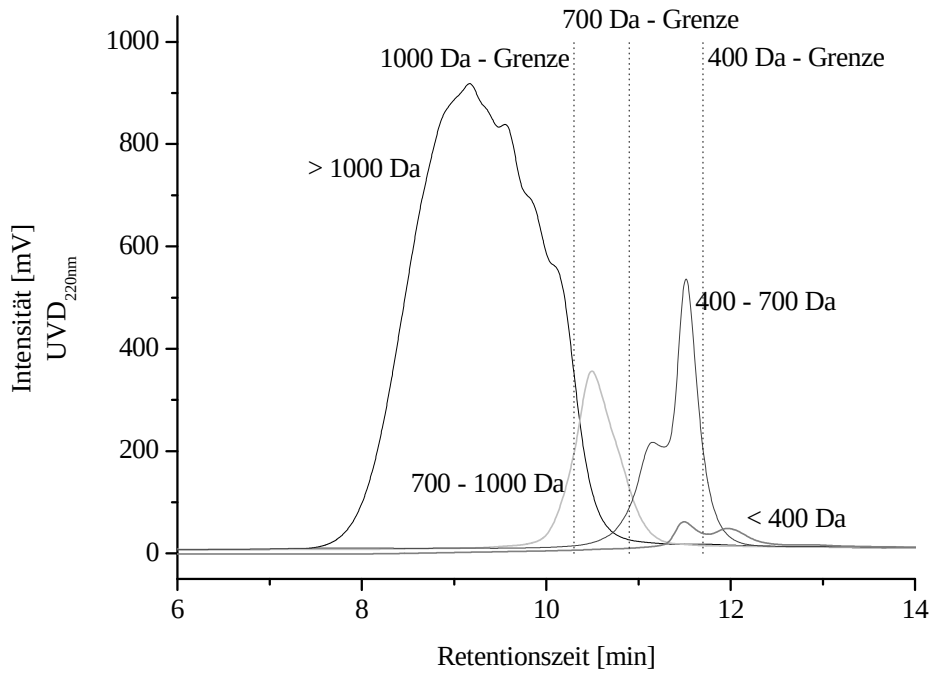


Abb. 26: Fraktionierung des Gesamtmigrates mittels SEC-HPLC (Kapitel 10.5.12)

Im Anschluss wurden die gesammelten Fraktionen im Neutralrottest an beiden Zelllinien im Konzentrationsbereich von 0-38,2 dm²/l getestet. In Tab. 13 sind die ermittelten IC_{50}-Werte der Fraktionen und des Gesamtmigrates an den beiden Zelllinien gegenübergestellt.

Tab. 13: Vergleich der IC_{50}-Werte der einzelnen Fraktionen und des Gesamtmigrates an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 (MW ± SD, n=3)

Fraktion	IC_{50} Hep-G2 [dm²/l]	IC_{50} HT-29 [dm²/l]
> 1000 Da	> 38,2	> 38,2
700-1000 Da	18,8 ± 2,5	32,5 ± 2.8
400-700 Da	12,7 ± 2,2	21,2 ± 3,6
< 400 Da	> 38,2	> 38,2
Gesamtmigrat	3,7 ± 0,7	7,3 ± 1,2

Anhand der Ergebnisse aus Tab. 13 war deutlich zu erkennen, dass in den Fraktionen mit einem Molekulargewicht < 400 Da und > 1000 Da kein zytotoxikologisches Potential bis zu den getesteten Konzentrationen nachweisbar war. Ein Effekt konnte für die Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 400-700 Da und 700-1000 Da detektiert werden. Vergleicht man das zytotoxikologische Potential der beiden Fraktionen, so ist festzustellen, dass die Fraktion 400-700 Da eine stärkere Inhibierung der Zellvitalität hervorrief. Das Potential der beiden Fraktionen liegt jedoch deutlich unter dem Potential des Gesamtmigrates.

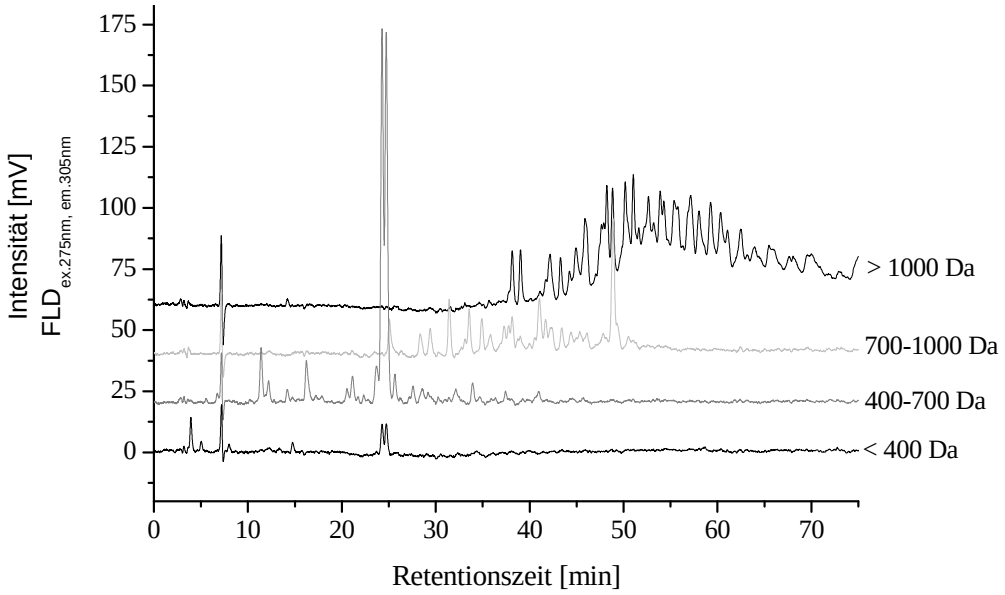


Abb. 27: RP-HPLC-$FLD_{ex.275nm,em.305nm}$-Chromatgramme der einzelnen Fraktionen (Kapitel 10.5.2)

Zur genauen Betrachtung der migrierenden Substanzen in den jeweiligen Fraktionen wurden diese mittels RP-HPLC-FLD$_{ex.275nm,\ em.305nm}$ rechromatographiert (Abb. 27, Kapitel 10.5.2). Erwartungsgemäß nahm der Anteil der unpolaren Substanzen in den Fraktionen mit höherem Molekulargewicht deutlich zu. Die Fraktion > 1000 Da stellte dabei die Fraktion mit dem höchsten gravimetrisch bestimmten Gewicht (Tab. 12) und der größten Peakvielfalt dar, welche aber keinen zytotoxikologischen Effekt im angewendeten Testsystem hervorrief. Die Fraktion < 400 Da enthielt im Gegensatz nur eine sehr geringe Anzahl an Peaks, dies spiegelte sich zum einen in dem geringen gravimetrischen Ergebnis (Tab. 12) und zum anderen in dem Ausbleiben des zytotoxischen Effekts wieder. Auch die toxikologisch relevante Fraktion 700-1000 Da zeichnete sich durch eine Vielzahl von Peaks aus, wobei kein Peak markant hervortrat.

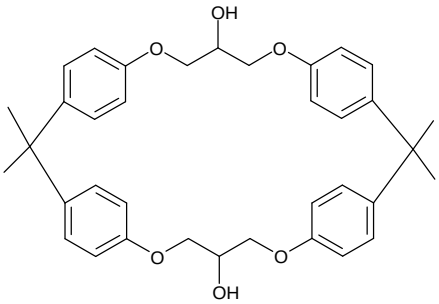


Abb. 28: Struktur des Cyclo-diBADGE

Dagegen hob sich ein Doppelpeak bei einer Retentionszeit von ca. 25 min in der am toxikologisch bedeutsamsten Fraktion 400-700 Da klar von den anderen Peaks im Chromatogramm ab. Bei dieser Substanz handelte es sich um Cyclo-diBADGE (MG 568 Da), ein zyklisches Dimer von BADGE (Abb. 28). Diese Substanz ist keine Unbekannte [Biedermann und Grob, 1998]. Cyclo-diBADGE ist ein Reaktionsprodukt aus BADGE und BPA, welches durch intramolekulare Zyklisierung während der Vorpolymerisation bei der Harzherstellung und auch während des Brennvorgangs entsteht [Grob et al., 1999]. Berger et al. quantifizierten bereits im Jahr 2001 den Gehalt an Cyclo-diBADGE in Extrakten aus Thunfischkonserven (Thunfisch in Öl) [Berger et al., 2001]. Dabei bestimmten Sie den Gehalt an Cyclo-diBADGE sowohl direkt im Fisch, als auch im Öl. Auch Schaefer und Simat und Scheunert identifizierten Cyclo-diBADGE in Chromatogrammen von Migraten aus unterschiedlichen Coating-Typen bzw. Lebensmittelkonserven als einen der dominanten Peaks [Schaefer und Simat, 2004; Scheunert, 2007]. Von einer gesundheitlichen Gefährdung für den Verbraucher wurde bei dieser Substanz nicht ausgegangen, da man annahm, dass die fehlenden

Epoxidgruppen und die damit verbundene Reaktionsträgheit der Substanz einen erschwerten Übergang in das Lebensmittel bzw. eine erschwerte Aufnahme durch den humanen Gastrointestinaltrakt zur Folge hat.

Um diese Annahme zu überprüfen, sollte im nächsten Schritt diese Substanz isoliert und auf ihr toxikologisches Potential überprüft werden. Zur Isolierung von Cyclo-diBADGE standen neben den beschichteten Coatingstreifen des EP-AH-Coatings auch das Ausgangsharz D.E.R. 667-20 der Firma DOW Chemical Company zur Verfügung. Im Ausgangsharz zählt Cyclo-diBADGE im Acetonitril-Migrat (24 h bei Raumtemperatur) nicht zu den Leitsubstanzen (Abb. 29). Offensichtlich wird die deutliche Zunahme des Peaks im Gesamtmigrat des Coatings (Abb. 27) durch die verminderte Reaktivität der Substanz ausgebildet, da die anderen im Chromatogramm ersichtlichen Peaks während des Einbrennvorgangs chemisch umgesetzt werden. Zusätzlich soll der Gehalt an Cyclo-diBADGE während des Brennens zunehmen [Grob et al., 1999]. Um diese Zunahme zu überprüfen, wurde der Gehalt an Cyclo-diBADGE in einem unbehandelten Harz und in hitzebehandeltem Harz (200°C, 12 bzw. 60 min) bestimmt.

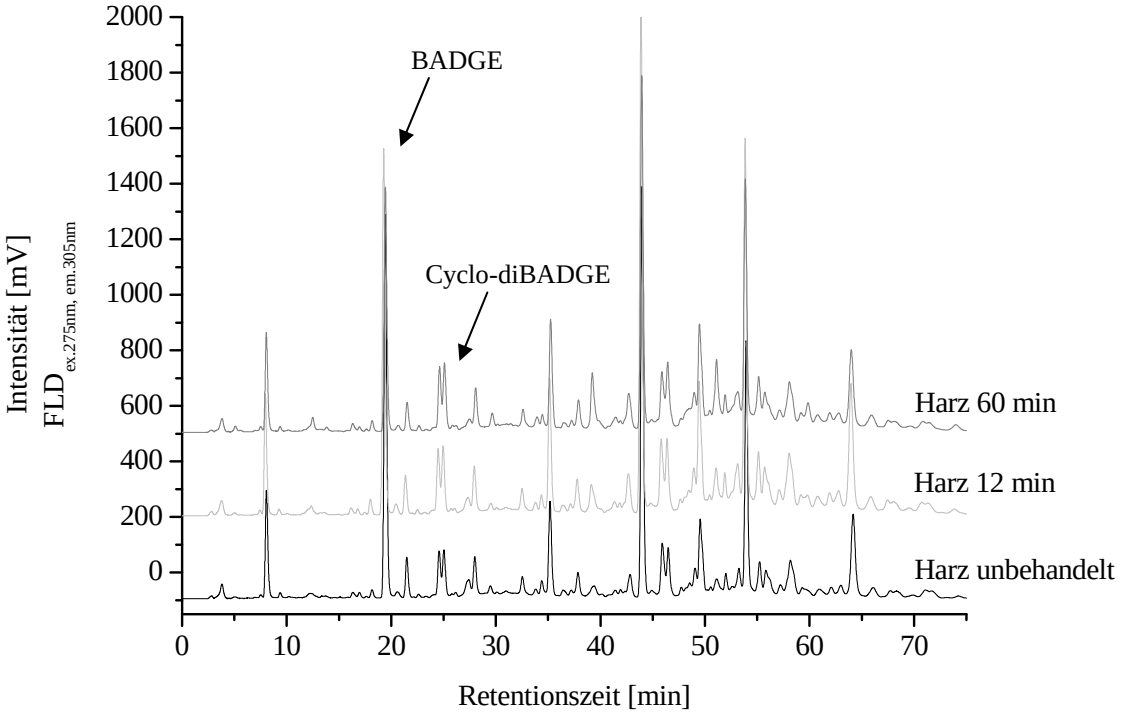


Abb. 29: RP-HPLC-FLD$_{ex.275nm,\ em.305nm}$-Chromatogramm des Acetonitril-Extraktes des epoxidhaltigen Harzes DOW Chemical Company D.E.R. 667-20 (Behandlung des Harzes: unbehandelt, nach Behandlung bei 200°C für 12 min bzw. 60 min; Migrationsbedingungen: 24 h bei Raumtemperatur in Acetonitril) (Kapitel 10.5.2)

Die gewonnen Acetonitril-Extrakte wurden dazu mittels RP-HPLC-$FLD_{ex.275nm, em.305nm}$ chromatographiert (Abb. 29) und über eine BADGE-Kalibrierung ausgewertet (Tab. 14). Der Gehalt an Cyclo-diBADGE stieg unabhängig von der Zeit bei dem Brennvorgang nur um circa 30 %, während der BADGE-Gehalt um fast 60 % sank.

Tab. 14: Gehalt an Cyclo-diBADGE und BADGE in unterschiedlich behandelten Harzen (n=1)

	Cyclo-diBADGE [$mg_{BADGE\text{-}Äquivalente}$/100 mg Harz]	**BADGE [mg/100 mg Harz]**
Harz unbehandelt	0,25	0,90
Harz 12 min	0,33	0,80
Harz 60 min	0,32	0,53

Für die spätere Isolierung von Cyclo-diBADGE wurde sich bei der Isolierung für die Auflösung des Harzes in THF entschieden (Kapitel 3.6.4), da der Extraktionsvorgang aus dem gebrannten Harz sich als sehr zeit- und lösungsmittelaufwendig herausstellte.

Aus Tab. 13 ist zu entnehmen, dass die Toxizitäten in den Fraktionen 400-700 Da und 700-1000 Da nicht der Toxizität des Gesamtmigrates entsprachen. Aus diesem Sachverhalt ergeben sich 2 weitere Fragestellungen:

1. Gibt es Verluste oder eine Verstärkung der Toxizität während der Fraktionierung?
2. Ruft die Fraktion 400-1000 Da die gleiche Toxizität hervor wie das Gesamtmigrat des Coatings?

Für die Beantwortung dieser Fragen wurde folgender Analysenplan aufgestellt. Zunächst wurden circa 30 dm² des EP-AH-2007-Coatings und 30 dm² von den Blindwertstreifen in 95 % EtOH extrahiert. Die getrockneten Rückstände wurden in 20 ml THF aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Aliquotierung des Extraktes und des Blindwertes nach folgendem Schema:

a) 1,2 ml der Probenlösung und des Blindwertes wurden direkt mit der Pipette entnommen ***(Migrat direkt)***
b) Injektion der Probelösung und des Blindwertes in das chromtographische System ohne Trennung über eine Säule ***(Migrat ohne Säule)*** (Kapitel 10.5.12)
c) Injektion der Probelösung und des Blindwertes in das chromatographische System zur Auftrennung über die analytische SEC-Säule, das komplette Eluat wird aufgefangen ***(Migrat über Säule)*** (Kapitel 10.5.12)

d) Injektion der Probelösung und des Blindwertes in das chromatographische System zur Auftrennung über die SEC-Säule, die Fraktionen < 400 Da, 400-1000 Da und > 1000 Da werden separat voneinander aufgefangen ***(Fraktionen: < 400 Da, 400-1000 Da, > 1000 Da)*** (Kapitel 10.5.12)

Die Probe a) diente als Vergleichsprobe für die weiteren Proben, sie stellte die allgemeine Probenvorbereitung für den direkten Einsatz im Zelltest dar. Mit der Probe b) sollte überprüft werden, ob es bereits nur durch die Injektion zu einer Veränderung der Probenmenge und der damit verbundenen Toxizität kommt. Anhand von Probe c) wurde der Einfluss der chromatographischen Trennung auf die Zytotoxizität getestet. Mit Probe d) sollte nun geklärt werden, ob in der Fraktion zwischen 400 und 1000 Da die gleiche zytotoxikologische Information vorhanden ist, wie im Gesamtmigrat. Oder ob die bisher negativ getesteten Fraktionen < 400 Da und > 1000 Da einen Teil zur Gesamttoxizität beitragen. Die aufbereiteten Proben wurden zur Trockne gebracht und gravimetrisch bestimmt [DIN EN 1186-14, 2002].

Tab. 15: Gravimetrisch ermittelte Massen in den nach dem Schema auf S.46 aufbereiteten Proben a), b), c) und d) des 95%-igen EtOH Migrates des EP-AH-2007-Coatings (n=1)

Probe		Masse [mg]	
a)	Migrat direkt	16,0	
b)	Migrat ohne Säule	14,1	
c)	Migrat über Säule	14,2	
d)	Fraktion < 400 Da	0,7	Σ 15,3
	Fraktion 400-1000 Da	2,8	
	Fraktion > 1000 Da	11,8	

Tab. 15 ist zu entnehmen, dass sich die bestimmten Massen der Migrate von Probe a) und den Proben b) bis d) nur geringfügig unterschieden. Diese Unterschiede lagen sicherlich in den verschiedenen fehlerbehafteten Arten der Probenabmessung (Probe a): Abnahme durch Pipette; Probe b) – d): Injektion durch den Autosampler) begründet. Die Rückstande wurden in 602 µl DMSO (c = 3000 dm²/l) für die Überprüfung der Zytotoxizität im Zelltest gelöst.

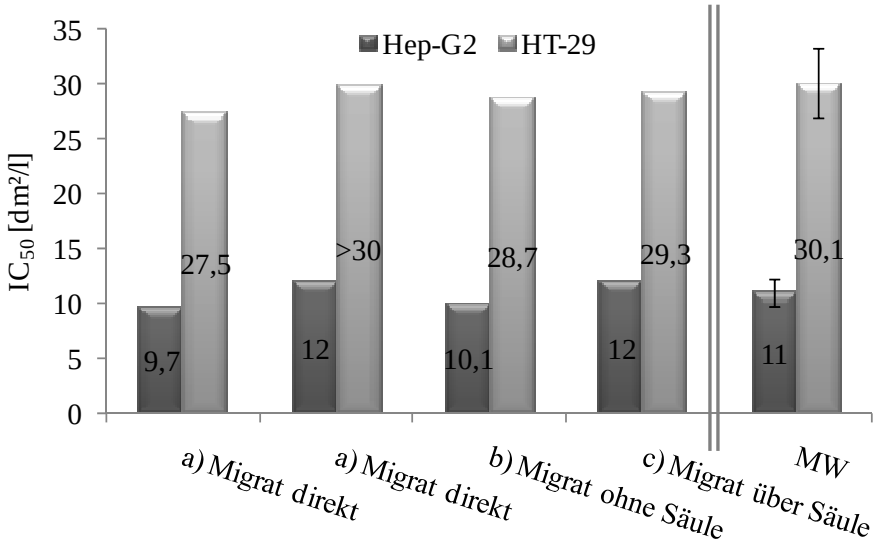


Abb. 30: IC_{50}-Werte der Gesamtmigrate der Proben a) zweifache Durchführung zur Bestimmung des IC_{50}-Wertes, b), c) (n=3, MW) und der errechnete Mittelwert (MW) aus diesen Bestimmungen als weitere Vergleichsgröße

In Abb. 30 sind die IC_{50}-Werte der Gesamtmigrate für die Proben a), b) und c) bestimmt im Neutralrottest zusammengestellt. Entsprechend einer einfaktoriellen Varianzanalyse (Software: SPSS Vers. 11.5) bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den ermittelten IC_{50}-Werte der Proben a), b) und c) mit ihren verschiedenen Aufarbeitungstechniken. In Abb. 30 ist zusätzlich der Mittelwert (MW) aus den Bestimmungen der Proben a) bis c) aufgeführt, diese Größe wurde zum Vergleich für die nachfolgenden Untersuchungen herangezogen.

Auch die Fraktionen der Probe d) wurden im Zelltest untersucht und mit dem IC_{50}-Mittelwert aus Abb. 30 des Gesamtmigrates verglichen (Abb. 31). Wie bereits in Tab. 13 gezeigt werden konnte, riefen auch in diesem Versuch die Fraktionen < 400 Da und > 1000 Da keinen zytotoxischen Effekt im Zellsystem hervor. Für die Fraktion 400-1000 Da wurde ein $IC_{50,\ Hep\text{-}G2}$ = 7,5 ± 1,9 dm²/l und $IC_{50,\ HT\text{-}29}$ = 16,9 ± 2,5 dm²/l (n=3, MW ± SD) bestimmt.

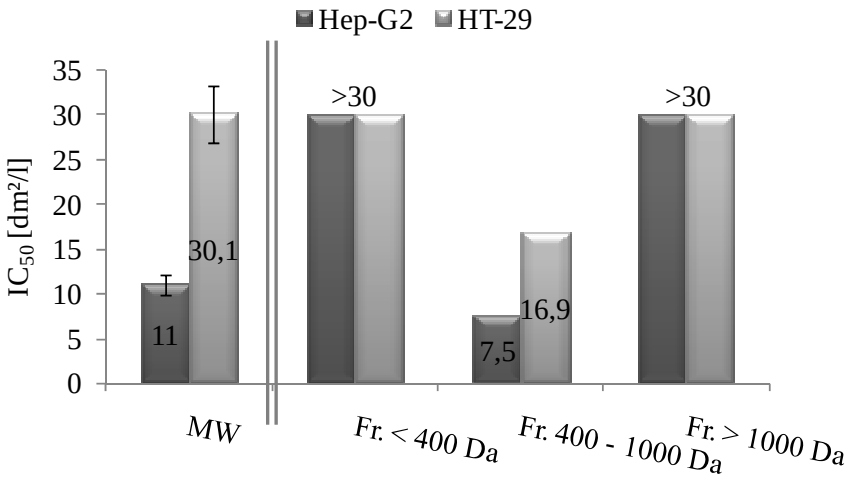


Abb. 31: IC_{50}-Werte der Fraktionen der Probe d) (n=3, MW) und dem errechneten Mittelwert (MW) des Gesamtmigrates aus den Proben a), b) und c) (Abb. 30)

Diese IC_{50}-Werte waren deutlich geringer, als die IC_{50}-Werte des Gesamtmigrates. Damit besaß die Fraktion mit den Substanzen mit einem Molekulargewicht von 400 bis 1000 Da ein deutlich höheres toxikologisches Potential. Dieses Ergebnis war nach den in Tab. 13 ermittelten Werten nicht zu erwarten. Zwar wurden in diesen Zelltests für die Fraktionen 400 – 700 Da und 700 – 1000 Da ein zytotoxikologisches Potential ermittelt, doch die jeweiligen IC_{50}-Werte waren deutlich höher als der IC_{50}-Wert des Gesamtmigrates. Es konnte also gezeigt werden, dass die Substanzen aus den beiden Fraktionen (400 - 700 Da und 700 – 1000 Da) sich im Gemisch in ihrer Toxizität verstärken, aber nicht die Toxizität des Gesamtmigrates widerspiegeln. So schienen die Fraktionen < 400 Da und > 1000 Da, welche allein in den getesteten Konzentrationen kein zytotoxikologisches Potential aufwiesen, die Zytotoxizität des 95 %-igen EtOH-Gesamtmigrat ebenfalls zu beeinflussen und in diesem Beispiel eher abzuschwächen. Das zytotoxikologische Potential des Gesamtmigrates setzte sich synergistisch aus allen Substanzen, in den im Migrat enthaltenen Konzentrationen, unabhängig von deren Molekulargewicht zusammen.

3.6.4 Isolation und Charakterisierung von Cyclo-diBADGE

Für die Gewinnung von Cyclo-diBADGE wurde das von der Firma DOW Chemical Company produzierte Epoxid-Harz D.E.R. 667-20 verwendet. Die durchgeführten Isolierungsschritte erfolgten in Anlehnung an die von Schaefer und Simat durchgeführte Isolierung zur Gewinnung von BADGE (n=1) und BADGE (n=2) (Abb. 26) [Schaefer und Simat, 2004]. Zunächst wurden 60 g des genannten Harzes vollständig in 400 ml

THF gelöst. Im Anschluss wurde zur Harzlösung ein Gemisch aus 1400 ml EtOH und 200 ml bidest. Wasser addiert. Dabei kam es zur Ausfällung von Substanzen mit einem Molekulargewicht > 2000 Da, welche durch Zentrifugation und Filtration von der Harzlösung abgetrennt wurden. Das klare Filtrat wurde am Rotationsverdampfer unter milden Bedingungen eingeengt.

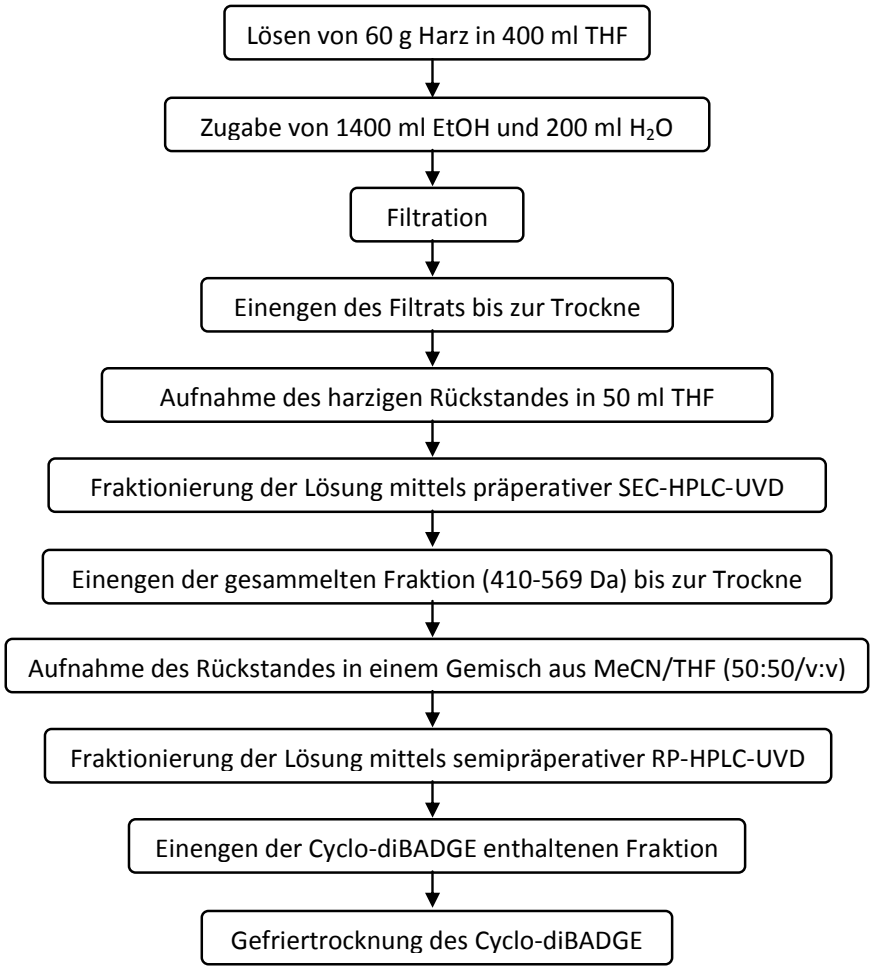


Abb. 32: Schematische Darstellung der Isolierung von Cyclo-diBADGE

Der harzige Rückstand wurde wiederum in THF (50 ml) gelöst und in 100 µl Aliquoten in das SEC-HPLC-UVD_{254nm}-System injiziert (Kapitel 10.5.12). Die Fraktion zwischen 410-569 Da (12 min:10 sec-12 min:36 sec) wurde separat aufgefangen (Abb. 33). Nachdem die gesammelten Fraktionen am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht wurden, wurde der gewonnene Rückstand zur weiteren Reinigung in einem Gemisch aus THF/MeCN (50:50 / v:v) gelöst. Diese Reinigung erfolgte mittels semipräperativer RP-HPLC-UVD_{275nm} in 25 µl Aliquoten (Kapitel 10.5.4). Es wurde die Fraktion in einem Zeitfenster von 7 min:28 sec bis 9 min:55 sec. aufgefangen.

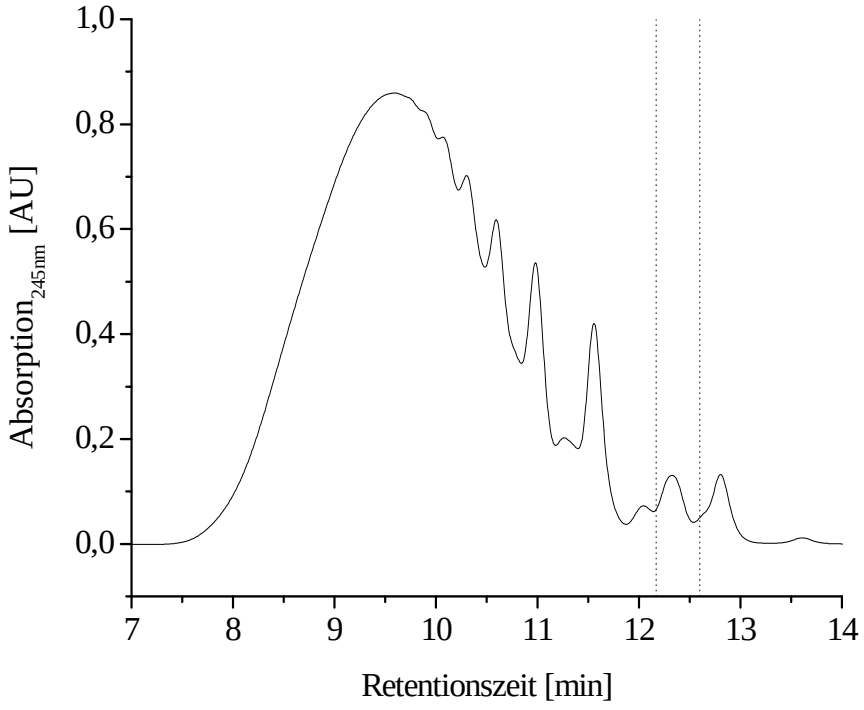


Abb. 33: SEC-Chromatogramm des Harzes gelöst in THF, gestrichelt: aufgefangene Fraktion mit Cyclo-diBADGE (Kapitel 10.5.12)

Die Cyclo-diBADGE enthaltene Fraktion wurde gesammelt, eingeengt und gefriergetrocknet. Die Ausbeute betrug 272,3 mg Cyclo-diBADGE, dies bedeutet bezogen auf das Ausgangsgewicht des Harzes 0,45 % bzw. 38,5 % auf den Gehalt an Cyclo-diBADGE im Harz. Die Reinheit wurde zu 83,1 % mit RP-HPLC-UVD_{232nm} bestimmt (Kapitel 10.2). Die weitere Charakterisierung der Substanz erfolgte mittels Elementaranalyse, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR; ESI-MS, Schmelzpunkt und IR (Kapitel 10.2).

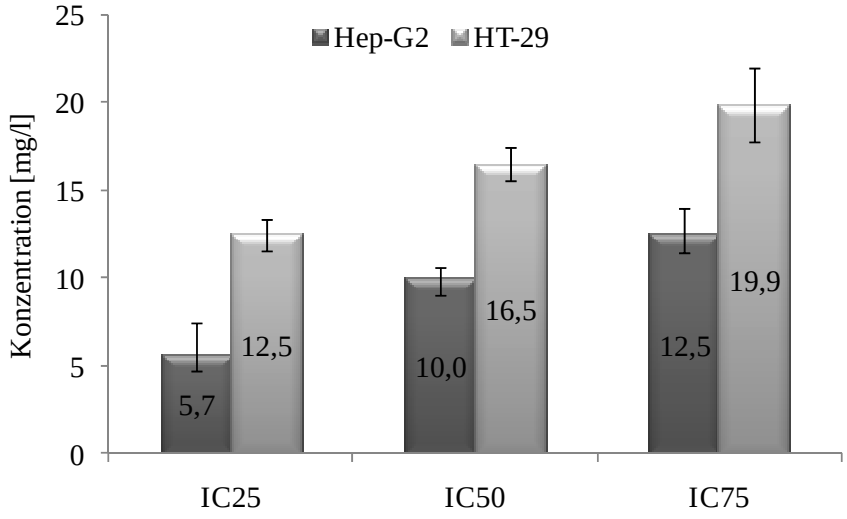


Abb. 34: Bestimmung der IC-Werte von Cyclo-diBADGE im NRT an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 (n=3, MW ± SD)

Auch das zytotoxikologische Potential von Cyclo-diBADGE wurde im Zelltest untersucht. In Abb. 34 sind die IC_{25}-, IC_{50}- und IC_{75}-Werte für die beiden untersuchten Zelllinien graphisch dargestellt. Die IC_{50}-Werte betrugen 10,0 ± 0,6 mg/l für die Zelllinie Hep-G2 und 16,5 ± 0,9 mg/l für die Zelllinie HT-29.

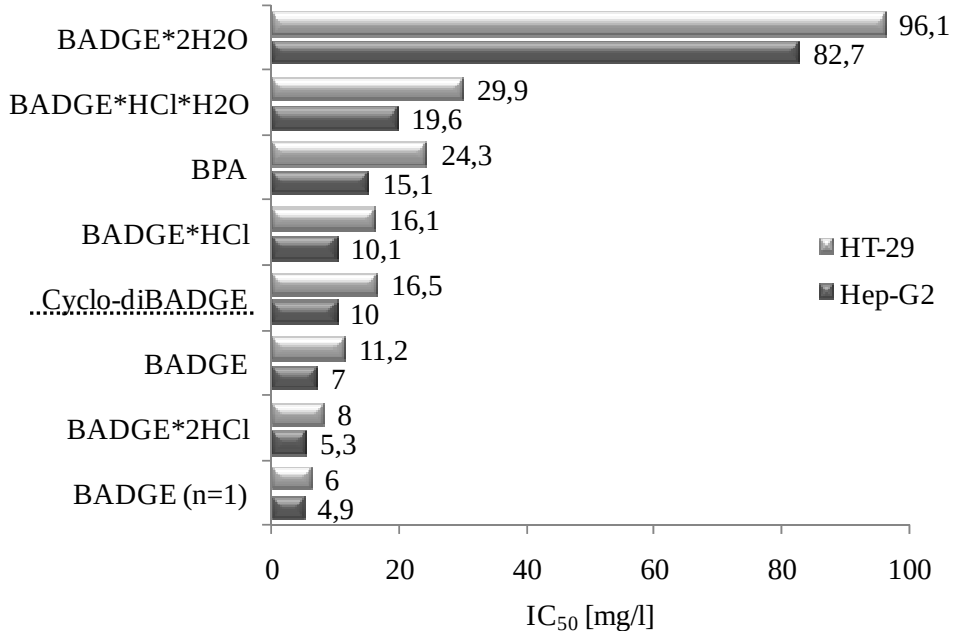


Abb. 35: IC_{50}-Werte der gesetzlich geregelten Substanzen, BADGE (n=1) und Cyclo-diBADGE im Neutralrottest an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 (n=3, MW)

Stellt man die ermittelte Zytotoxizität des Cyclo-diBADGE und den in Kapitel 3.6.2 untersuchten gesetzlich geregelten Substanzen gegenüber, so war zu erkennen, dass es sich in seinem Potential zwischen den Substanzen BADGE und BADGE*HCl eingliedert (Abb. 35). Aufgrund dieser Ergebnisse ist das isolierte Cyclo-diBADGE mit den gesetzlich relevanten und in der wissenschaftlichen Literatur diskutierten Substanzen durchaus vergleichbar.

3.6.5 Bilanzierung des Gesamtmigrates

Nachdem der Gehalt an Cyclo-diBADGE (c = 481,8 ± 39 µg/dm^2) im 95 % EtOH-Migrat des EP-AH-Coatings mittels RP-HPLC-UVD/FLD bestimmt wurde, konnte nun dessen Anteil an der Toxizität des Gesamtmigrates abgeschätzt werden (Kapitel 10.5.2). Bei dieser Abschätzung wurde wie im Kapitel 3.6.2 von dem vereinfachten Modell der additiven Toxizitäten ausgegangen. Die Abb. 36 und Abb. 37 zeigen die Anteile von den gesetzlich geregelten Substanzen (BPA, BADGE, BADGE*2H_2O) und Cyclo-diBADGE an der Gesamttoxizität des 95 % EtOH-Migrates.

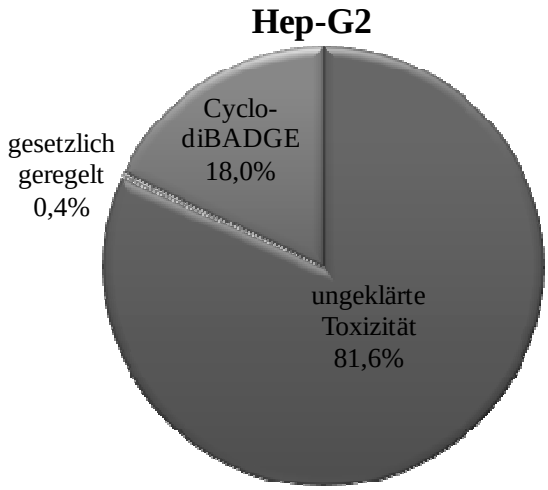


Abb. 36: Anteil der gesetzlich geregelten Substanzen und Cyclo-diBADGE an der Zytotoxizität des Gesamtmigrates bestimmt an der Zelllinie Hep-G2 unter additiven Bedingungen

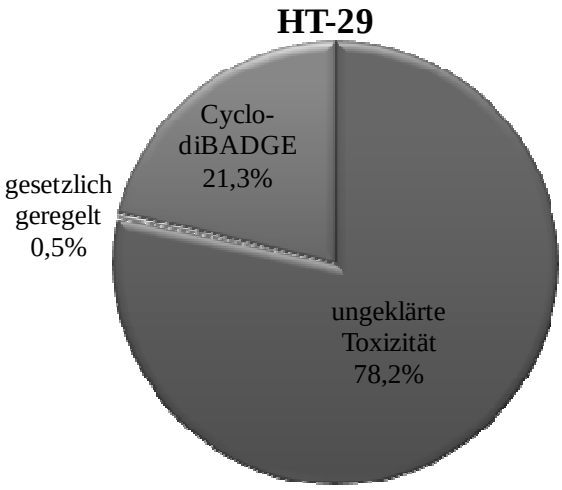


Abb. 37: Anteil der gesetzlich geregelten Substanzen und Cyclo-diBADGE an der Zytotoxizität des Gesamtmigrates bestimmt an der Zelllinie HT-29 unter additiven Bedingungen

Den Diagrammen ist zu entnehmen, dass durch die Substanz Cyclo-diBADGE, aufgrund deren relativ hohen Konzentration im Migrat auch ein großer Teil der Zytotoxizität des Gesamtmigrates erklärt werden konnte. Jedoch blieben unter der gewählten Annahme 82 % (Zelllinie Hep-G2) bzw. 78 % (Zelllinie HT-29) der Toxizität des Gesamtmigrates immer noch ungeklärt.

Ein größerer Anteil der Toxizität des Gesamtmigrates hätte durch eine weitere Identifizierung und Quantifizierung von migrierenden Substanzen noch weiter aufgeklärt werden können. Betrachtet man jedoch die erhaltenen Chromatogramme (Abb. 27) so kann man erkennen, dass es sich dabei um eine Vielzahl von kleineren, gleichwertig intensiven Peaks handelt. Neben der Substanz Cyclo-diBADGE waren keine weiteren Leitsubstanzen in den chromatographischen Mustern vorhanden, die sich deutlich von den anderen im Migrat anwesenden Peaks abhoben. Dadurch wäre eine weitere Identifizierung von toxikologisch relevanten, in 95%-igem EtOH migrierenden Substanzen mit den gewählten Analysenmethoden nur erschwert möglich gewesen.

4 Migration aus Kunststoffverpackungen

4.1 Probenmaterial

Von der Kooperationsfirma wurden folgende Lebensmittelverpackungen für das Probenscreening zur Verfügung gestellt:

- Suppentasse 1 (mit Amisorb) und Deckelfolie
- Suppentasse 2 mit Deckelfolie
- Menüschale 1 aus Recyclingmaterial und Deckelfolie
- Menüschale 2 mit Deckelfolie
- Ketchupflasche „top down“
- Ketchupflasche aus PET
- Ketchupbeutelfolie für Dispenser
- Ketchupbeutelfolie für Einzelportionen mit farbigen Aufdruck

Tab. 16: Untersuchte Kunststoffadditive und deren Funktionen (weiterführende Informationen im Kapitel 10.1.3)

Funktion	Referenzsubstanz	Hersteller
Antistatika	Armostat 300	Akzo Nobel
	Armostat 400	Akzo Nobel
	Armostat 1000	Akzo Nobel
	Armostat 1800	Akzo Nobel
	Armostat 2000	Akzo Nobel
Gleitmittel	Erucamid	Akzo Nobel
	Ölsäureamid	Akzo Nobel
Antioxidantien	Irgafos 126	Ciba
	oxd. Irgafos 126	Eigenherstellung
	Irgafos 168	Ciba
	oxd. Irgafos 168	Eigenherstellung
	Irganox 1010	Ciba
	Irganox 1076	Ciba
	Irganox 1098	Ciba
	Irganox 1330	Ciba
Lichtschutzmittel	Tinuvin 312	Ciba
	Tinuvin 326	Ciba
	Tinuvin 327	Ciba
	Tinuvin 770	Ciba
	Tinuvin P	Ciba
optischer Aufheller	Uvitex OB	Ciba
Weichmacher	Dibutylsebacat	VWR
	Diethylhexyladipat	VWR
	Tributylacetylcitrat	VWR
	Dibutylphthalat	VWR
	o/p-N-Ethyltoluolsulfonamid	axcentive
	p-N-Ethyltoluolsulfonamid	Sigma-Aldrich

Für die spezifische Untersuchung der Kunststoffadditive wurden 27 häufig in der Industrie eingesetzte Referenzsubstanzen ausgewählt. Tab. 16 zeigt eine Übersicht und die Einteilung der ausgewählten Additive gemäß ihrer Funktion im Kunststoff.

Die Strukturen, CAS-Nummern Molekulargewichte, pks- und log k_{ow}-Werte der verwendeten Standardsubstanzen sind in Kapitel 10.1.3 aufgeführt.

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Polyethylen (PE) wurde Mirathen A17MA der Firma Leuna-Werke AG verwendet. Bei diesem Kunststoff handelt es sich um ein additivfreies PE mit niederer Dichte.

4.2 Probenvorbereitung & Migrationsbedingungen

Für die Untersuchungen im Neutralrottest wurden die Standardsubstanzen in DMSO gelöst. Aufgrund der geringen Löslichkeit einiger Standards wurden diese Substanzen für die chromatographischen Trennungen zum Teil in THF angelöst und mit DMSO weiter verdünnt oder direkt in 100%-igem DMSO gelöst.
Die 95 %-igen ethanolischen Migrate der Lebensmittelverpackungen wurden entsprechend ihrer Form nach DIN EN 1186 und RL 82/711/EWG angefertigt. Im Anschluss wurden die Extrakte bis zur vollständigen Trockenheit eingeengt und das Gewicht des Rückstandes gravimetrisch ermittelt. Der getrocknete Rückstand wurde zur Bestimmung der Zytotoxizität in DMSO gelöst und zusätzlich für die Messungen mittels RP-HPLC membranfiltriert (PA, 0,2 µm).
Für die Messungen mittels SEC-UVD/ELSD wurden sowohl die Standards als auch die getrockneten Migrate in THF gelöst.

4.3 Untersuchung der Kunststoffreferenzsubstanzen

4.3.1 Untersuchung mittels RP-HPLC

Zu Beginn der Studie wurden zunächst 22 Referenzsubstanzen mittels RP-HPLC im UVD, FLD, ELSD, CLND und im MSD charakterisiert.

Tab. 17: Einteilung der Referenzsubstanzen in Gruppen für die chromatographischen Untersuchungen

Gruppe a	Gruppe b	Gruppe c	Gruppe d
Tinuvin 770	Armostat 300	Armostat 400	TBAC
Armostat 2000	Tinuvin 312	Armostat 1800	DEHA
Tinuvin P	Irganox 1098	Ölsäureamid	
Armostat 1000	Erucamid	Tinivin 327	
Uvitex OB	Tinuvin 326	oxidiertes Irgafos 168	
Irganox 1010	Irgafos 126	Irganox 1330	
Irgafos 168	Irganox 1076		

Da es unter den gewählten chromatographischen Bedingungen bei dieser Vielzahl von Substanzen zu Coelution kam, wurden diese zur Bestimmung der Retentionszeiten gemäß Tab. 17 in vier Gruppen (Gruppe a-d) für die chromatographischen Untersuchungen eingeteilt.

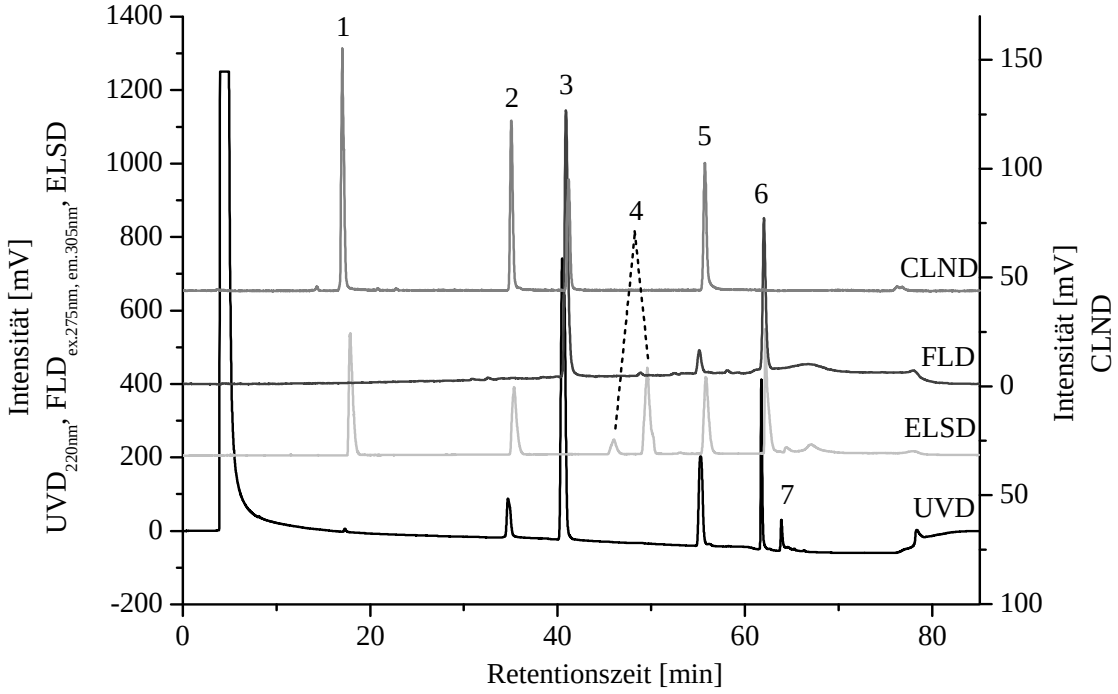


Abb. 38: RP-HPLC-UVD/FLD/ELSD/CLND Chromatogramme der Referenzsubstanzen der Gruppe a: 1 Tinuvin 770, 2 Armostat 2000, 3 Tinuvin P, 4 Armostat 1000, 5 Uvitex OB, 6 Irganox 1010 + oxidiertes Irgafos 168, 7 Irgafos 168 (Kapitel 10.5.6, 10.5.8, 10.5.10)

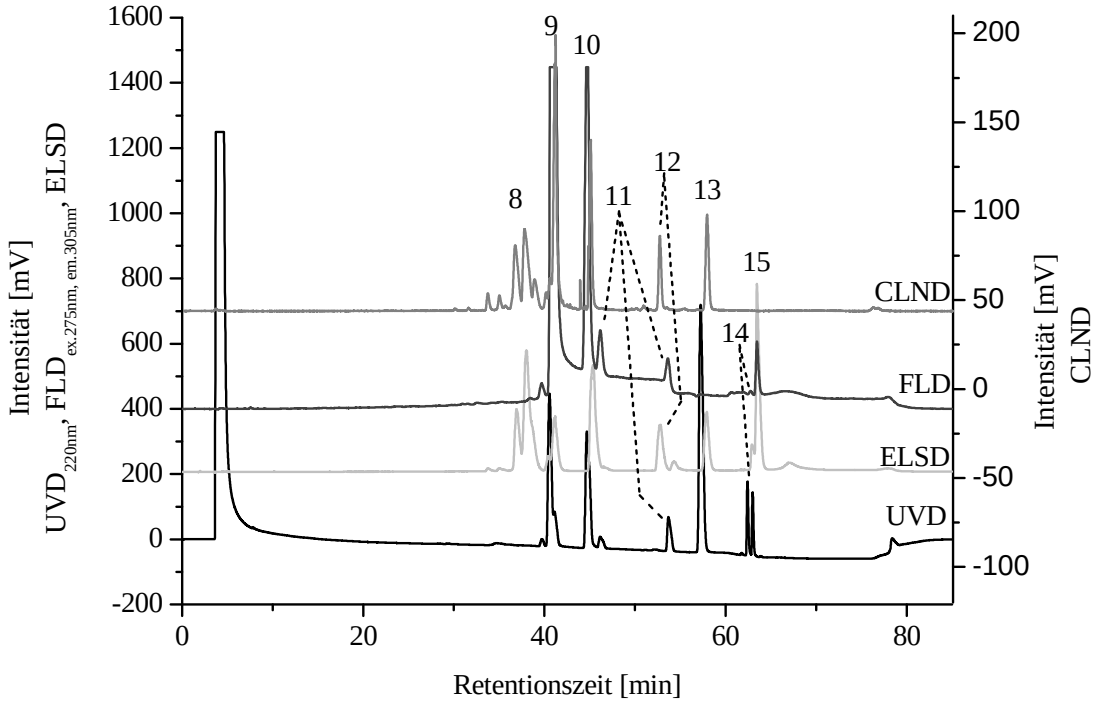


Abb. 39: RP-HPLC-UVD/FLD/ELSD/CLND Chromatogramme der Referenzsubstanzen der Gruppe b: 8 Armostat 300, 9 Tinuvin 312, 10 Irganox 1098, 11 Irgafos-126-Produkte, 12 Erucamid, 13 Tinuvin 326, 14 Irgafos 126, 15 Irganox 1076 (Kapitel 10.5.6, 10.5.8, 10.5.10)

In den Abbildungen Abb. 38, Abb. 39, Abb. 40 und Abb. 41 sind die Chromatogramme für die einzelnen Gruppen zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass es nicht möglich war mit nur einem Detektionssystem zu messen, da die Substanzen aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften sich in ihren Detektionsmöglichkeiten stark unterscheiden. Zusätzlich wurde zur Überprüfung der korrekten Peakzuordnung auch eine massenspezifische Detektion durchgeführt (Kapitel 9.4.9).

Bei den in Gruppe a detektierten Substanzen fiel auf, dass Armostat 1000 (Peak 4) in 2 Peaks eluierte (Abb. 38). Der Hersteller (Akzo Nobel) dieses Industriestandards gibt an, dass der Monoester mit ca. 90 % im Produkt vertreten ist, daneben ist noch freies Glycerol und Stearinsäure vorhanden, welche den zusätzlichen Peak erklären könnten. Die Substanz Irgafos 168 (Peak 7) ist sehr reaktiv und reagiert bereits nach kurzer Zeit zu seinem Oxidationsprodukt [Gächter und Müller, 1989]. Dieser Oxidationsvorgang wird später in diesem Kapitel noch genauer betrachtet (S.62). Aufgrund seiner Polarität eluierte das Produkt bei 62 min und coeluierte mit Irganox 1010 (Peak 6). Armostat 300 (Peak 8) setzt sich aus einem Gemisch aus Alkyldiethanolaminen mit Alkylketten unterschiedliche Länge zusammen (Tab. 31). Dieses Gemisch spiegelte sich in einer Vielfalt von Peaks in der CLND-Spur wieder (Abb. 39). Genau wie das sekundäre

Antioxidans Irgafos 168 (Peak 7) setzte sich die Substanz Irgafos 126 (Peak 14) bereits während der Messungen relativ schnell zu seinen Oxidationsprodukten um [Gächter und Müller, 1989]. Auf diese Oxidation wird ebenfalls an späterer Stelle in diesem Kapitel detaillierter eingegangen (S.62).

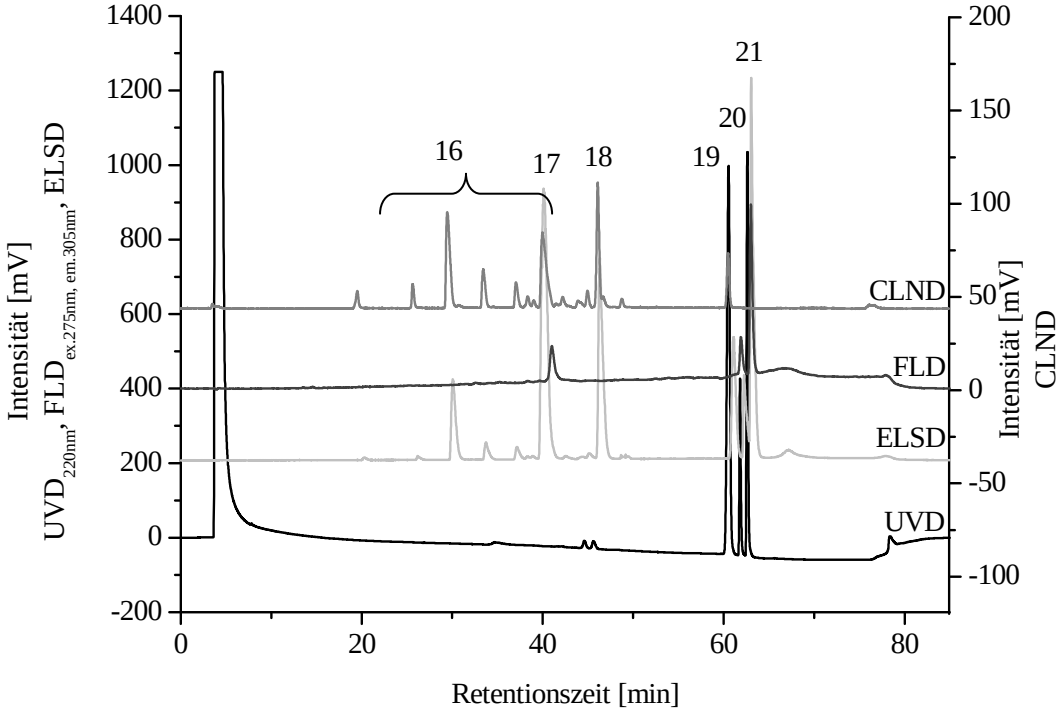


Abb. 40: RP-HPLC-UVD/FLD/ELSD/CLND Chromatogramme der Referenzsubstanzen der Gruppe c: 16 Armostat 400, 17 Armostat 1800, 18 Ölsäureamid, 19 Tinuvin 327, 20 oxidiertes Irgafos 168, 21 Irganox 1330 (Kapitel 10.5.6, 10.5.8, 10.5.10)

Die Substanz Armostat 400 (Peak 16) besteht wie Armostat 300 (Peak 8) aus einem Gemisch aus Alkyldiethanolaminen mit Alkylketten unterschiedlicher Kettenlänge (Tab. 31). Die Alkylketten sind dabei kürzer als bei dem Gemisch von Armostat 300 (Peak 8), daher eluierte dieses Substanzgemisch bereits ab einer Retentionszeit von 20 min (Abb. 40). Bei einer Retentionszeit von 46 min retardierte der Hauptpeak von Ölsäureamid (Peak 18), welcher von kleineren Peaks umgeben war. Bei Ölsäureamid handelt es sich ebenfalls um ein Substanzgemisch mit geringen Mengen an freien Fettsäuren und anderen Fettsäureamiden (z.B.: Palmitinamid), welche diese Nebenpeaks hervorrufen [Huck, 1963]. Allgemein muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass es sich bei den hier in den Untersuchungen verwendeten Standardsubstanzen um Industriestandards handelte, welche eine geringere Reinheit als Analysenstandards besitzen. In dieser Gruppe c wurde zusätzlich die oxidierte Form des Irgafos 168 (Peak 20) aufgenommen, da aufgrund der schnellen Oxidation davon ausgegangen

wurde, dass sich wahrscheinlich immer beide Substanzen, Irgafos 168 und oxidiertes Irgafos 168, in den gewonnenen Migraten befinden werden.

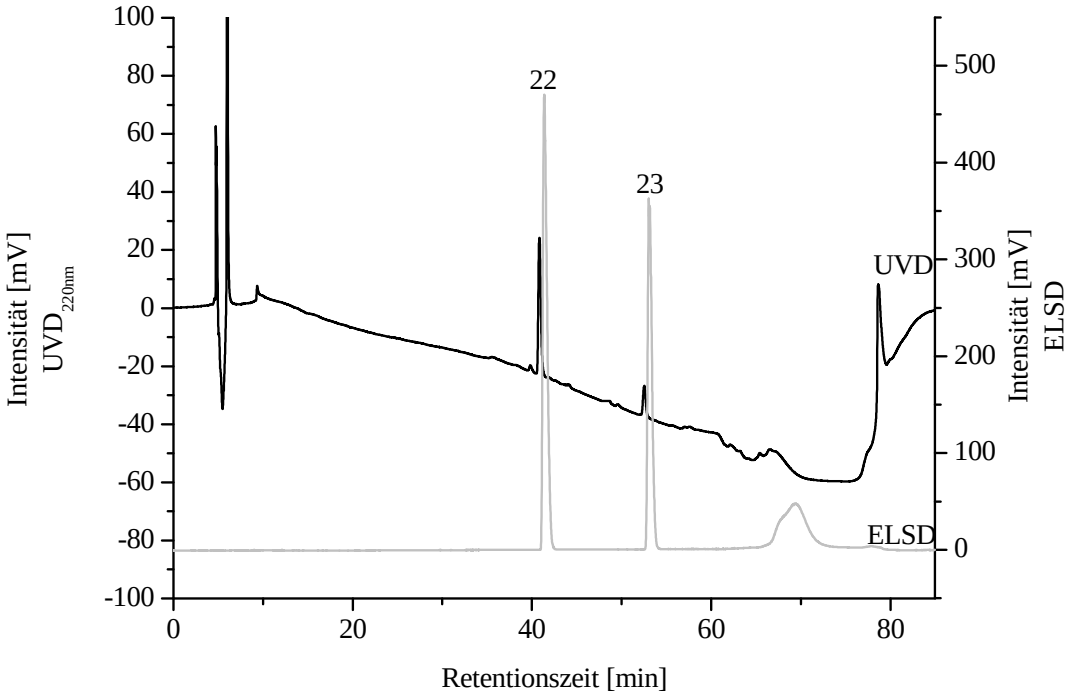


Abb. 41: RP-HPLC-UVD/ELSD Chromatogramme der Referenzsubstanzen der Gruppe d: 22 TBAC, 23 DEHA (Kapitel 10.5.6, 10.5.8, 10.5.10)

Für die Substanzen aus Gruppe d sind in der Abb. 41 nur die UV_{220nm}- und ELSD-Spur abgebildet wurden, da TBAC (Peak 22) und DEHA (Peak 23) weder fluoreszenzaktiv, noch stickstoffhaltig sind.

Unter Anwendung des etablierten chromatographischen Trennsystems war es möglich alle Substanzen mit nur einer Trennsäule und einem Gradienten zu erfassen. Dabei war eine Detektion mittels UV_{220nm} und ELSD ausreichend, um alle Referenzsubstanzen zu detektieren, zur Absicherung und Vereinfachung der analytischen Messungen wurde jedoch die Detektion mittels FLD, CLND und MSD weiterhin mitgeführt.

Stabilitätsuntersuchung der Kunststoffadditive durch Lagerung in DMSO

Für längerfristige Untersuchungen sollte auch im Fall der Kunststoffanalytik eine Stabilität der Referenzsubstanzen gelöst in DMSO (zum Teil angelöst in THF) gewährleistet werden. Dazu wurde ein Lagerungsversuch über einen Zeitraum von 29 Tagen durchgeführt. Die Referenzen wurden innerhalb der einzelnen Gruppen am Tag der Herstellung und in einem Abstand von 7 Tagen im Verlauf eines Monats mittels RP-HPLC-UV_{220nm}/ELSD chromatographisch aufgetrennt und die erhaltenen

Muster auf Veränderungen untersucht. Zwischen den Bestimmungen wurden die Proben im Kühlschrank gelagert.

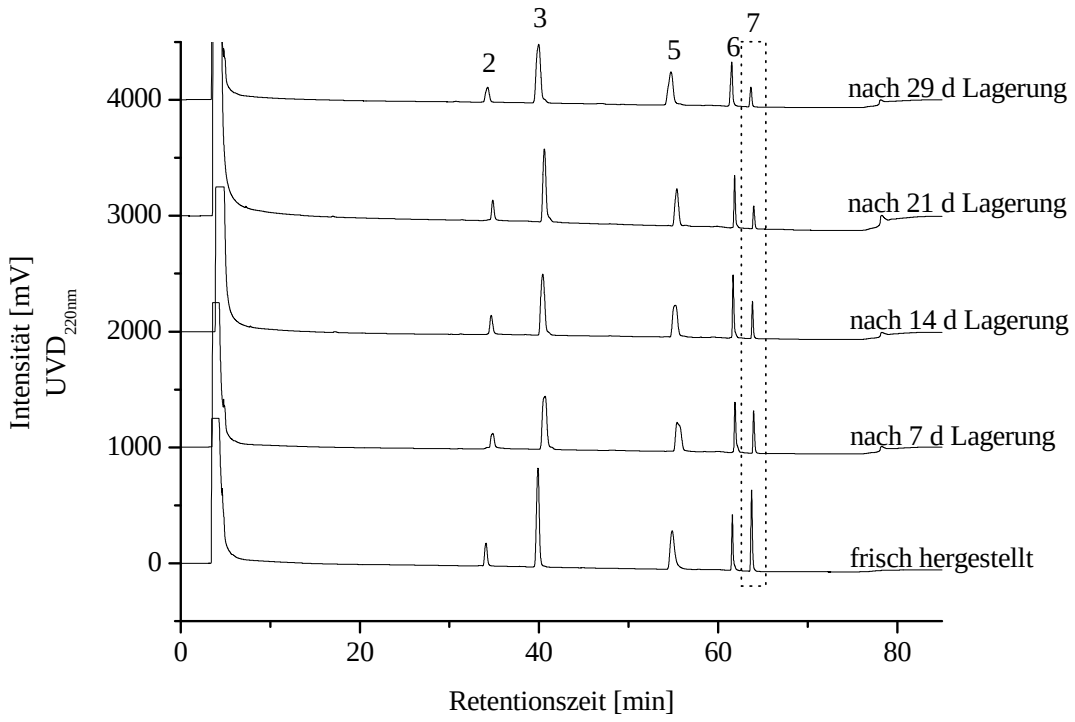


Abb. 42: Chromatogramme (RP-HPLC-UVD$_{220nm}$) des Lagerungsversuch für die Referenzen aus Gruppe a: 2 Armostat 2000, 3 Tinuvin P, 5 Uvitex OB, 6 Irganox 1010 + oxidiertes Irgafos 168, 7 Irgafos 168 (Kapitel 10.5.6)

In Abb. 42 sind die Chromatogramme für den Lagerungsversuch der Gruppe a zusammengefasst Bereits nach einer Woche Lagerung in DMSO verringerte sich die Konzentration von Irgafos 168 sichtbar (Peak 7, Abb. 42). Wie bereits erwähnt kommt es auf Grund ihrer Funktion im Kunststoff bei der Lagerung von Antioxidantien zur Oxidation [Gächter und Müller, 1989]. Das in diesem Fall entstandene Oxidationsprodukt von Irgafos 168 coeluierte mit Irganox 1010, wodurch sich die Intensitätszunahme des Peaks mit der Nummer 6 erklärte. Die Substanzen Tinuvin 770 (Peak 1) und Armostat 1000 (Peak 4) unterlagen innerhalb den hier nicht abgebildeten ELSD-Chromatogrammen keiner Intensitätsveränderung im gewählten Untersuchungszeitraum.

Im Lagerungsversuch der Gruppe b erschien im Laufe des Untersuchungszeitraums bei einer Retentionszeit von 54 min ein ganz neuer Peak (Peak 24) im Chromatogramm (Abb. 43). Hierbei handelt es sich offensichtlich um ein Oxidationsprodukt von Irgafos 126 [Garrido-López et al., 2007]. Parallel dazu verliert der Peak 14 (Irgafos 126) während der Lagerung an Intensität. Die stickstoffhaltigen Referenzsubstanzen

Armostat 300 (Peak 8) und Erucamid (Peak 12) blieben während des Untersuchungszeitraumes stabil.

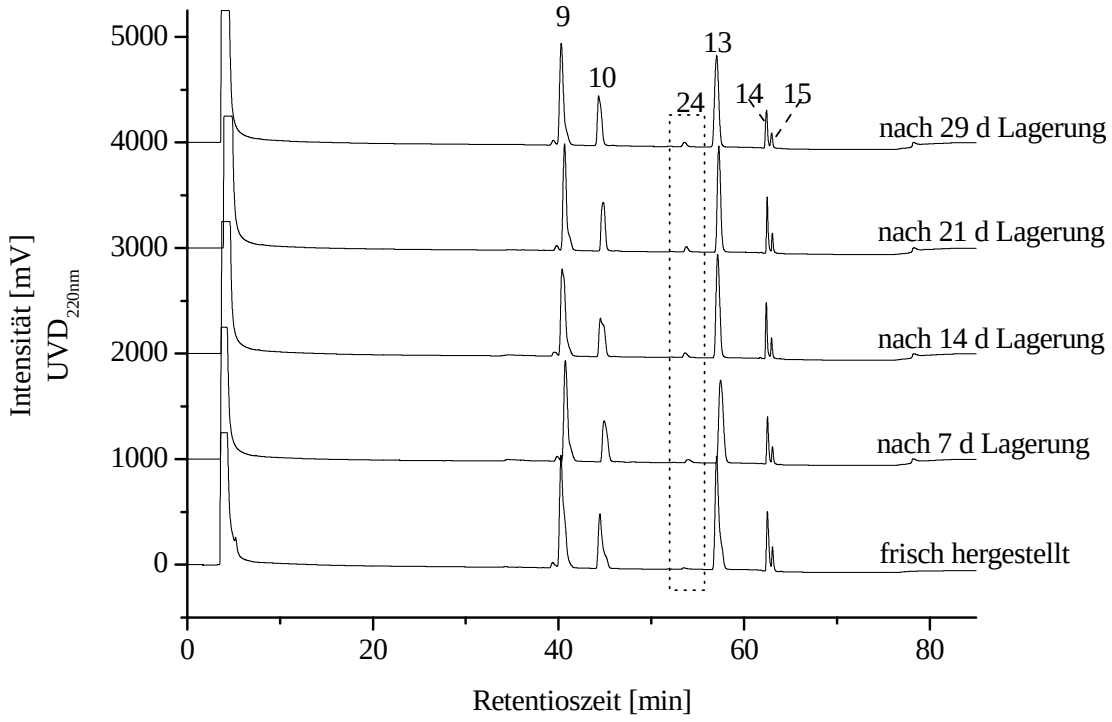


Abb. 43: Chromatogramme (RP-HPLC-UVD$_{220nm}$) des Lagerungsversuch für die Referenzen aus Gruppe b: 9 Tinuvin 312, 10 Irganox 1098, 24 Irgafos 126-Produkt, 13 Tinuvin 326, 14 Irgafos 126, 15 Irganox 1076 (Kapitel 10.5.6)

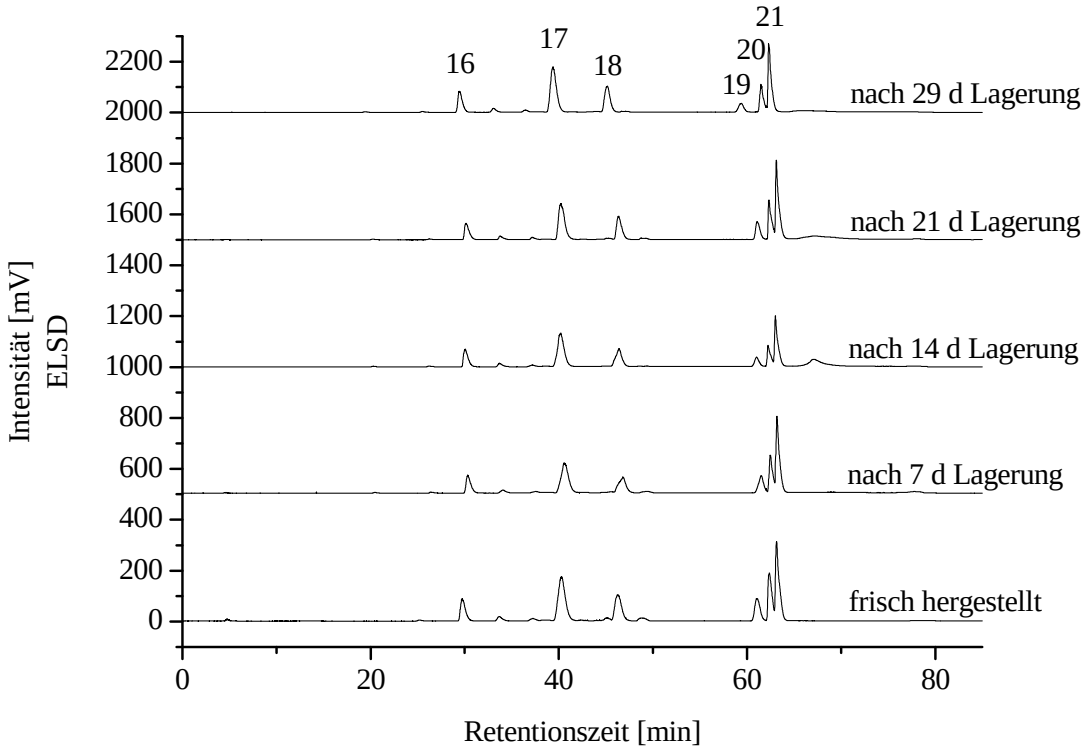


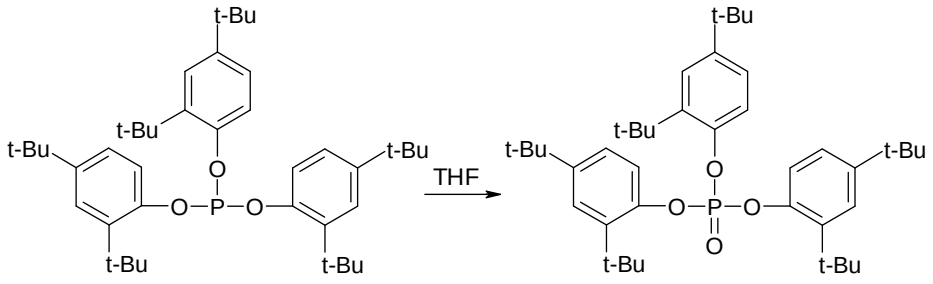
Abb. 44: Chromatogramme (RP-HPLC-ELSD) des Lagerungsversuch für die Referenzen aus Gruppe c: 16 Armostat 400 (Hauptpeak), 17 Armostat 1800, 18 Ölsäureamid, 19 Tinuvin 327, 20 oxidiertes Irgafos 168, Irganox 1330 (Kapitel 10.5.6)

Die chromatographischen Muster der Substanzen aus Gruppe c (Abb. 44) und auch die der Weichmacher aus Gruppe d veränderten sich nicht in ihrer Peakzusammensetzung und Peakform innerhalb des Untersuchungszeitraums.

Aus dieser Studie konnte geschlussfolgert werden, dass bis auf Irgafos 168 und Irgafos 126 alle anderen Referenzsubstanzen (gelöst in DMSO) über einen Zeitraum von 4 Wochen bei einer Lagerung im Kühlschrank keinen Veränderungen unterlagen und somit auch für einen Einsatz im Zelltest gut geeignet waren.

Oxidation von Irgafos 168 und Irgafos 126

Die Substanzen Irgafos 168 und Irgafos 126 gehören zu der Gruppe der sekundären Antioxidationen. Sie zerstören Hydroperoxidgruppen und verhindern somit die Kettenverzweigungsreaktionen als Folge der Hydroperoxidspaltung. Beide Substanzen sind Phosphite (Tab. 31) und reduzieren die Hydroperoxide zu Alkoholen und werden selbst in Phosphate umgewandelt [Gächter und Müller, 1989].



Irgafos 168
647,6 $(M+H)^+$

oxidiertes Irgafos 168
663,5 $(M+H)^+$

Abb. 45: Oxidation von Irgafos 168 [Garrido-López et al., 2007]

Für die Substanz Irgafos 168 wurde in der Literatur nur ein Phosphat als Oxidationsprodukt (Abb. 45) beschrieben [El Mansouri et al., 1998, Garde et al., 2001; Gardio-Lopez et al., 2007]. Diese Oxidation findet bevorzugt in polaren Lösungsmitteln, wie zum Beispiel in nicht stabilisiertem THF und MeCN statt [El Mansouri et al., 1998]. Nach 24 h soll Irgafos 168 gelöst in THF vollständig zu oxidiertem Irgafos 168 umgesetzt sein [Garde et al., 2001]. Nerin et al und Dopico-Gracias beschreiben noch den weiteren Abbau von Irgafos 168 zu 2,4-di-tert-butylphenol [Nerin et al., 2003; Dopico-Gracias et al., 2007].

Zur Herstellung des oxidiertem Irgafos 168 Analysenstandards wurde Irgafos 168 in peroxidhaltigem THF (c = 0,5 g/l) gelöst. Der Fortschritt der Oxidation wurde mittels RP-HPLC-UVD$_{220nm}$ im Abstand von 2 h dokumentiert (Abb. 49, Kapitel 10.5.7). Den Chromatogrammen war zu entnehmen, dass die Oxidation sofort nach der Herstellung der Lösung einsetzte und ein vollständiger Umsatz bereits nach 16 h erreicht war.

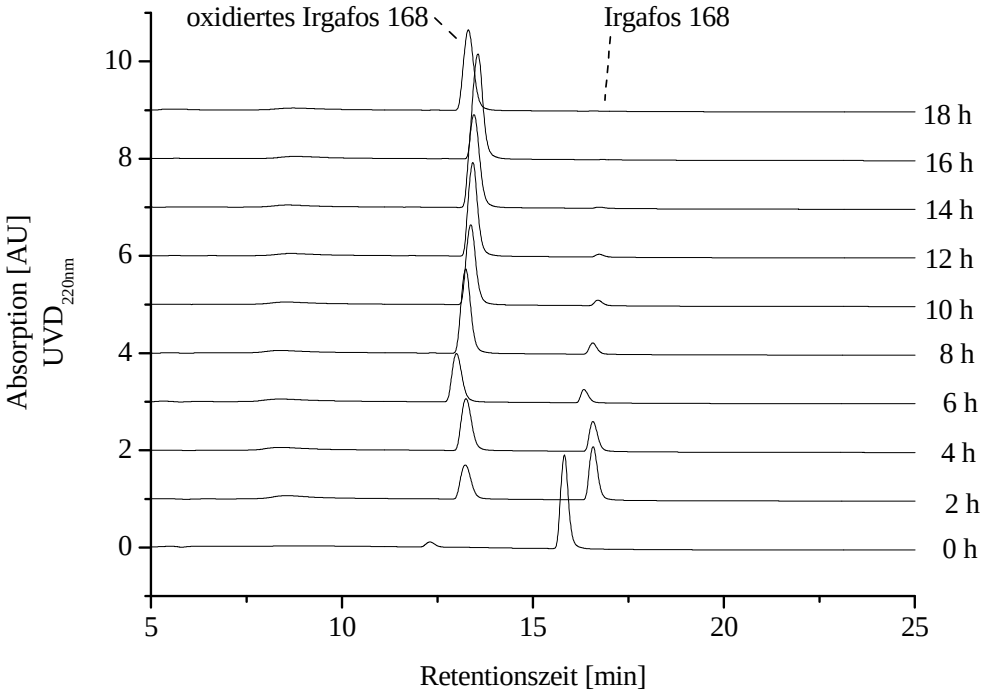


Abb. 46: Überprüfung der vollständigen Oxidation von Irgafos 168 in peroxidhaltigem THF (Kapitel 10.5.7)

Für die Substanz Irgafos 126 wurde von Garrido-López et al. ebenfalls nur ein Reaktionsprodukt, das doppelt oxidierte Irgafos 126 beschrieben (Abb. 47) [Garrido-López et al., 2007].

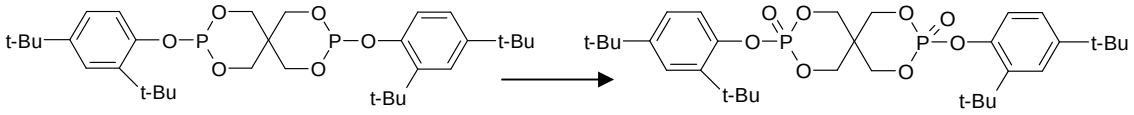


Abb. 47: Oxidation von Irgafos 126 [Garrido-López et al., 2007]

Bereits bei den Versuchen zur Lagerstabilität wurde festgestellt, dass ein zusätzlicher Peak mit einer Retentionszeit von t_R = 54 min auftrat, als Irgafos 126 mit THF in Kontakt kam. Zusätzlich zeigte sich bei Untersuchungen zur Wiederfindung, dass dieser Peak verschwand und ein weiterer Peak bei t_R = 47 min hinzukam [Alexowsky, 2007].

Zur Überprüfung des Oxidationsverhaltens von Irgafos 126 wurde diese Substanz sowohl in THF, 95 % EtOH und 100 % EtOH gelöst (c = 1 g/l). Die hergestellten Lösungen wurden entsprechend den Migrationsbedingungen bei 60°C für 1 h, 2 h und 4 h gelagert und anschließend mittels RP-HPLC-UVD-MSD untersucht (Kapitel 10.5.6) [RL 82/711/EWG].

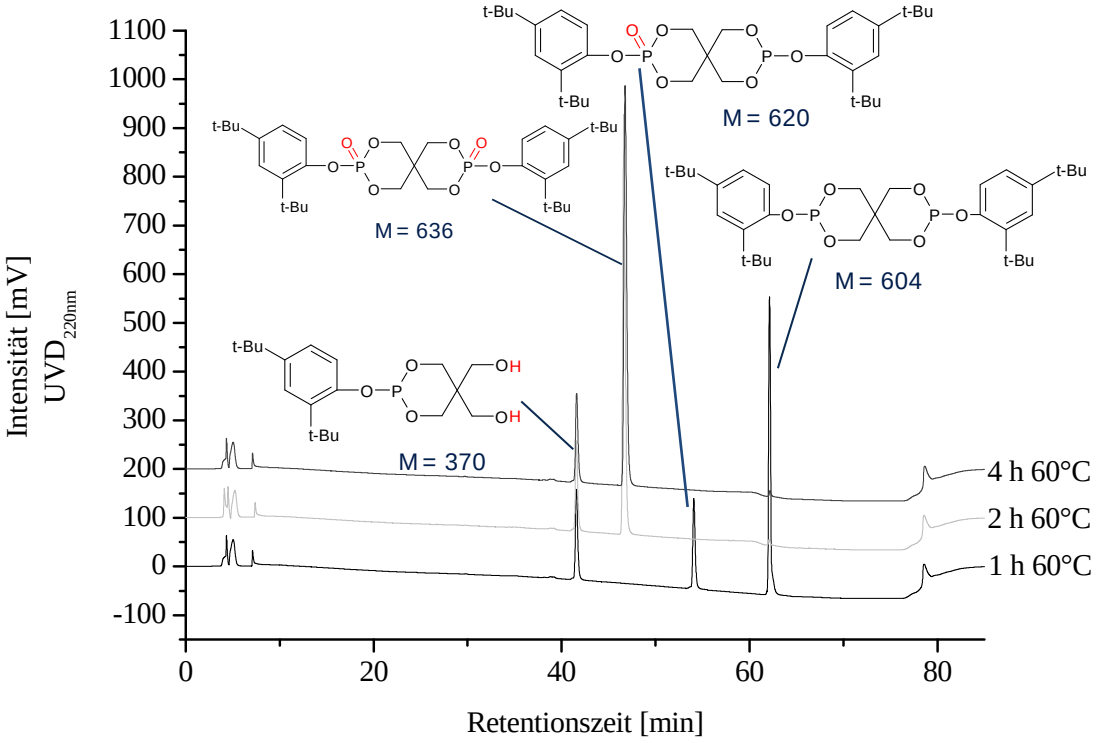


Abb. 48: Überprüfung der Oxidation von Irgafos 126 in THF (Kapitel 10.5.6)

Die Reaktionen waren sowohl für die Untersuchung in THF, als auch für die Untersuchungen in Ethanol bereits nach 2 h vollständig abgelaufen. Im darauffolgenden Zeitraum bis 4 h kam also zu keiner weiteren Veränderung im Peakmuster. In Abb. 48 sind die RP-HPLC-UVD_{220nm}-Chromatogramme mit den ermittelten Molekulargewichten und Strukturvorschlägen für die Oxidation in THF dargestellt. Bei der Retentionszeit t_R = 63 min eluierte die Ausgangssubstanz Irgafos 126. Bereits nach einer Behandlungsdauer von 2 h bei 60°C kam es zum fast vollständigen Abbau dieser Substanz. Parallel zum Abbau von Irgafos 126 entstand nach 1 h bei 60°C das einfach oxidierte Abbauprodukt von Irgafos 126 (t_R = 54 min, MG = 620 g/mol). Neben dieser Oxidationsreaktion kommt es auch zur Hydrolyse von Irgafos 126. Bei einer Retentionszeit von t_R = 41 min wurde dieses polarere Produkt mit einem Molekulargewicht von 370 g/mol detektiert. Die vollständige Umsetzung zum doppelt

oxidierten Irgafos wurde nach 2 h bei 60°C erreicht. Dieser Substanz war der Peak bei einer Retentionszeit von t_R = 47 min und einem Molekulargewicht von 636 g/mol zuzuordnen. Im TIC-Modus traten noch weitere kleinere Signale auf, welche in der parallel gemessen UV-Detektion keine messbaren Signale ergaben. So eluierte bei circa 30 min ein Peak mit einem Molekulargewicht von 402 g/mol und bei 39 min mit 416 g/mol. Möglicherweise handelte es sich hier um weitere Hydrolyseprodukte.

Bei den Untersuchungen mit 100 % EtOH und 95 % EtOH entstanden die gleichen Reaktionsprodukte, daher sind in Abb. 49 nur die Chromatogramme für die Reaktion in 95 % EtOH abgebildet.

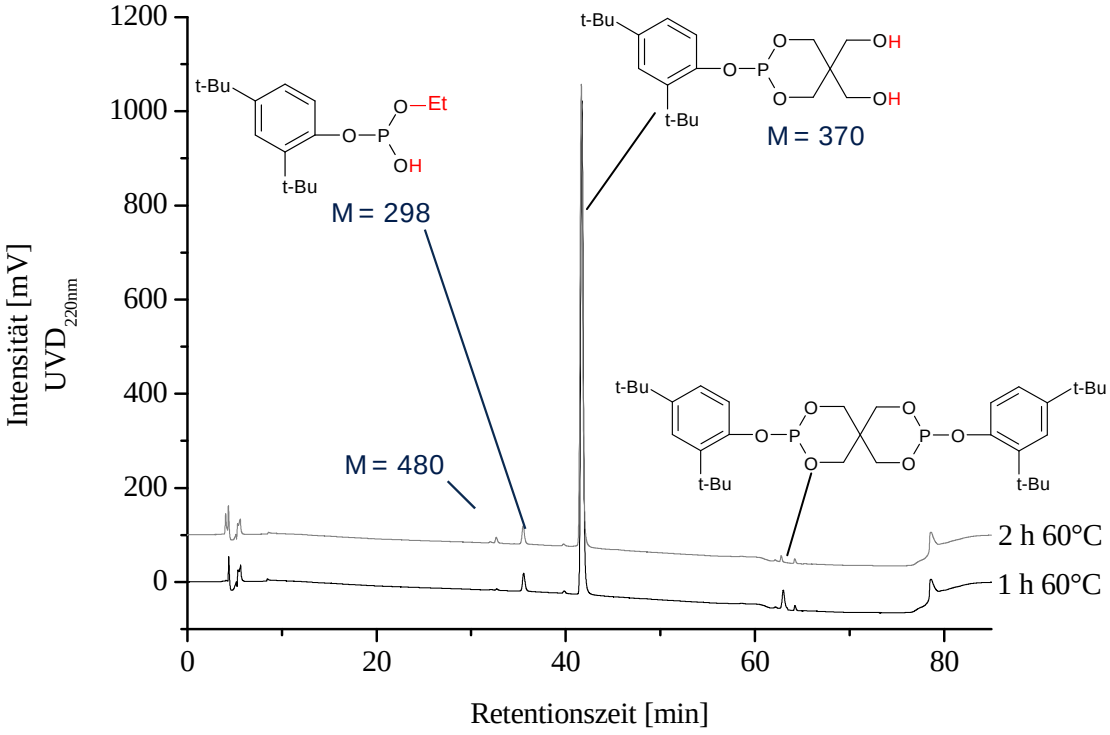


Abb. 49: Überprüfung der Oxidation von Irgafos 126 in 95 %-igem EtOH (Kapitel 10.5.6)

In diesem Versuchsansatz konnte ebenfalls das Hydrolyseprodukt mit einem Molekulargewicht von 370 g/mol (t_R = 41 min) identifiziert werden. Zusätzlich wurde noch ein Ethylester des Hydrolyseproduktes mit einem Molekulargewicht von 298 g/mol bei einer Retentionszeit von t_R = 40 min ermittelt. Für den Peak mit einem Molekulargewicht von 480 g/mol und die drei nicht uv-aktiven Peaks (TIC-Modus) mit den Molekulargewichten von 462 g/mol, 220 g/mol und 312 g/mol konnten keine Strukturvorschläge ermittelt werden, dabei kann es sich aber wie bereits erwähnt auch

um Verunreinigungen aus dem Industriestandard handeln. Die eigentlich erwarteten Reaktionsprodukte bildeten sich im Vergleich zur Reaktion mit THF in der 95 %-igen ethanolischen Lösung nicht beziehungsweise in einem geringeren Umfang.

Aus diesem Experiment konnte geschlussfolgert werden, dass man sich bei der Untersuchung von Irgafos 126 nicht nur auf das Ausgangsprodukt und das doppelt oxidierte Produkt konzentrieren darf, da je nach Lagerung beziehungsweise Behandlung zusätzlich weitere bzw. temporäre Nebenprodukte entstehen, welche durch ihre spezifischen Eigenschaften das Migrat und natürlich die Qualität des ursprünglichen Verpackungsmaterials beeinflussen können.

Alexowsky ermittelte im Rahmen ihrer Diplomarbeit für die übrigen in Tab. 17 genannten 20 Substanzen die Wiederfindungsraten [Alexowsky, 2007]. Sie bestimmte die Wiederfindungsraten für verschiedene in der Studie angewendete Probenaufarbeitungsvarianten. Bei Variante 1 wurden die Additive direkt in 95 %-igen Ethanol gelöst und bei 60°C für 4 h die Migration vollständig simuliert. Die anschließende Probenaufarbeitung erfolgte durch das Entfernen des Ethanols am Rotationsverdampfer, Überführung des Rückstandes mit THF ins Vial und der Aufnahme des erneut getrockneten Rückstandes in DMSO für die HPLC-DAD/ELSD-Messung. Für die Variante 2 wurde der Migrationsschritt ausgelassen, die Additive wurden dafür ebenfalls in 95%-igem Ethanol gelöst und wie in Variante 1 beschrieben weiter aufgearbeitet. Die Ergebnisse der dritten Variante dienten als Bezugsgröße für die Varianten 1 und 2, denn diese Variante enthielt keinen Schritt der Probenaufarbeitung. Es wurde ein Standardmix direkt in DMSO hergestellt und gemessen (Kapitel 10.5.6). Je nach Variante 1 oder 2 wurden so Wiederfindungsraten zwischen 82 % und 100 % ermittelt [Alexowsky, 2007].

4.3.2 Überprüfung des toxikologischen Potentials im Neutralrottest

Die ausgewählten Referenzsubstanzen wurden im Neutralrottest an den beiden Zelllinien (Hep-G2, HT-29) auf das Auslösen eines zytotoxischen Effektes untersucht. Elf der Referenzsubstanzen (Armostat 1000, Dibutylsebacat, Diethylhexyladipat, Dibutylphthalat, Erucamid, Irgafos 168, Irganox 1010, Irganox 1076, Irganox 1098, Irganox 1330, Tinuvin 312) zeigten keinen Effekt im Zellkulturtest bis zu den jeweils getesteten Konzentrationen. Bei vier von den getesteten Substanzen

(Tributylacetylcitrat, Tinuvin 327, Tinuvin P, Uvitex OB) konnten entweder nicht alle IC-Werte, oder nur Effekte in einer der beiden Zelllinien beobachtet werden (Tab. 18). In Abb. 50 sind die ermittelten IC_{50}-Werte der zehn positiv getesteten Referenzsubstanzen in einem Säulendiagramm dargestellt. Wie schon in den vorangegangenen Untersuchungen stellte auch bei diesen Substanzklassen die Zelllinie Hep-G2 die empfindlichere Zelllinie dar. Ausnahmen bildeten die Substanzen Tinuvin 770 (HALS) und Tinuvin 326 (UV-Absorber), bei diesen beiden Substanzen wurden für die Zelllinie HT-29 kleinere IC_{50}-Werte ermittelt. Dabei zeigten vor allem die stickstoffhaltigen Antistatika (Armostat 300, Aromstat 400, Armostat 1800, Armostat 2000) und die Lichtschutzmittel (Tinuvin 326, Tinuvin 327, Tinuvin 770) ein deutlich höheres toxikologisches Potential als die stickstofffreien Substanzen (Tab. 31). Dieses erhöhte toxikologische Potential wird möglicherweise durch oxidative Bioaktivierungsreaktionen der stickstoffhaltigen Xenobiotika hervorgerufen. Verschiedene Phase-I-Enzyme (Cytochrom-P-450-haltige Monooxidasen, Monoaminoxidasen, Peroxidasen) können diese stickstoffhaltigen Substanzen aktivieren, indem die Oxidation am Stickstoffatom zu reaktiven Intermediaten führt [Kalgutkar et al., 2002]. Cytochrom-P450-Enzyme sind hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum der Leber lokalisiert, aber sie befinden sich auch in geringeren Mengen in anderen Organen, zum Beispiel im Darm, Pankreas, Gehirn, Lunge, Niere, Nebenniere, Haut und Geschlechtsorganen. Das Isoenzym CYP3A4 spielt dabei eine zentrale Rolle bei der Biotransformation von Xenobiotika, ca. 50 % der Medikamente werden über dieses Enzym verstoffwechselt. Mit einem Anteil von ca. 70 % ist CYP3A4 im Gastrointestinaltrakt das dominierende Isoenzym, wodurch es auch bereits im Darm zu den genannten Oxidationsreaktionen kommen kann [Papp-Jambor et al. 2002]. Die Bioaktivierungsreaktionen werden dabei in direkte und indirekte Oxidierungsreaktionen untereilt. Beispiele für eine direkte oxidative Bioaktivierungsreaktionen sind zum Beispiel Oxidationsreaktionen von aromatischen Aminen am Beispiel des Antiarrhythmikums Procainamid oder die Oxidation von N-Imiden (z.B. das Antikonvulsivum Phenytion). Die Hydroxylierungsreaktion von Diclofenac (nichtopioides Analgetikum) zu 4- bzw. 5-Hydroxydicolfenac wird als indirekte Bioaktivierungsreaktionen bezeichnet [Kalgutkar et al., 2002; Shen et al., 1999].

Tab. 18: Zusammenfassung der ermittelten IC-Werte der Kunststoffadditive im NRT an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29

Substanz	Hep-G2			HT-29		
	IC_{25}[mg/l]	IC_{50}[mg/l]	IC_{75}[mg/l]	IC_{25}[mg/l]	IC_{50}[mg/l]	IC_{75}[mg/l]
Armostat 300	3,1	4,1	5,1	4,3	4,8	5,5
Armostat 400	2,9	3,5	4,1	3,5	3,8	4,2
Armostat 1000	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0
Armostat 1800	2,6	3,1	3,5	3,5	4,1	4,6
Armostat 2000	9,0	12,0	15,5	12,6	17,0	20,7
DBS	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0
DEHA	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0	> 100, 0
Erucamid	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0	> 500,0
Irgafos 126	16,5	19,3	23,1	19,3	21,2	23,0
Irgafos 168	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5
Irganox 1010	> 80,0	> 80,0	> 80,0	> 80,0	> 80,0	> 80,0
Irganox 1076	> 14,0	> 14,0	> 14,0	> 14,0	> 14,0	> 14,0
Irganox 1098	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0
Irganox 1330	> 60,0	> 60,0	> 60,0	> 60,0	> 60,0	> 60,0
Ölsäureamid	12,5	12,7	13,0	17,6	18,5	19,7
TBAC	27,2	39,5	56,4	46,6	> 100,0	> 100,0
Tinuvin 312	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0
Tinuvin 326	3,2	4,0	> 18,2	3,6	4,3	5,0
Tinuvin 327	2,3	3,3	5,4	> 13,5	> 13,5	> 13,5
Tinuvin 770	4,2	6,9	11,0	5,0	5,7	6,5
Tinivin P	15,7	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0
Uvitex OB	0,9	> 7,2	> 7,2	> 7,2	> 7,2	> 7,2

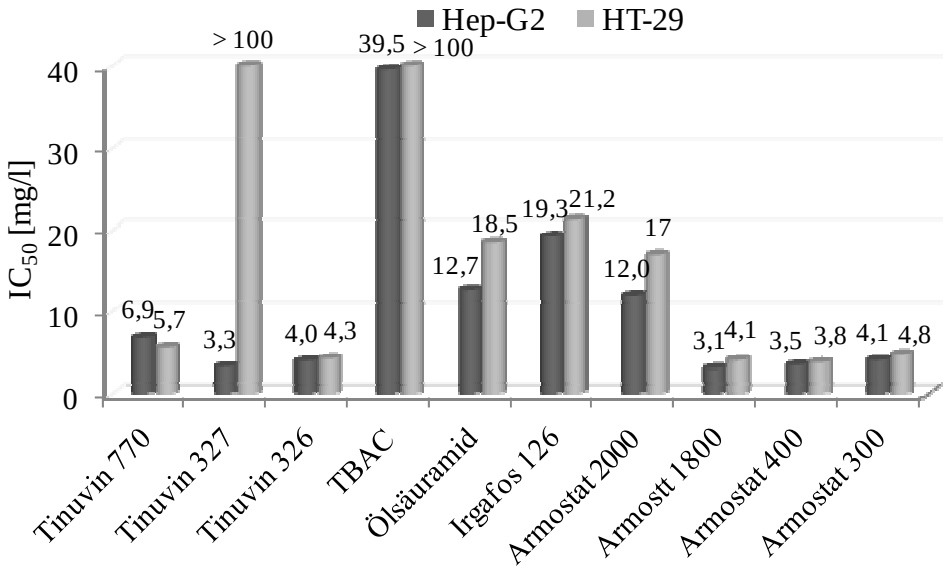


Abb. 50: IC_{50}-Werte der im Neutralrottest positiv getesteten Referenzsubstanzen an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 (MW, n=3)

Zur Begründung der im Neutralrottest ermittelten Toxizitäten der Substanzen wurden die bestimmten IC_{50}-Werte mit deren Basislinientoxizität verglichen (Abb. 51). Als

Basislinientoxizität wird die Minimaltoxizität einer Substanz bezeichnet, welche aufgrund von unspezifischen Wechselwirkungen mit den Lipiden der Zellmembran auftreten [Lipnick, 1990]. Die Basislinientoxizität einer Substanz ist von ihrer Lipophilie und somit dem Octanol-Wasser-Koeffizient (log K_{ow}) abhängig. Je größer der log K_{ow}-Wert einer Substanz, umso unpolarer ist diese und umso einfacher kann sie durch passive Diffusion durch die Zellmembran aufgenommen werden und die oben genannten unspezifischen Wechselwirkungen hervorrufen. Mit Hilfe des Octanol-Wasser-Koeffizienten können quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSARs) für den Effekt der Basislinientoxizität aufgestellt werden [Braun et al., 1999; von der Ohe et al., 2005].

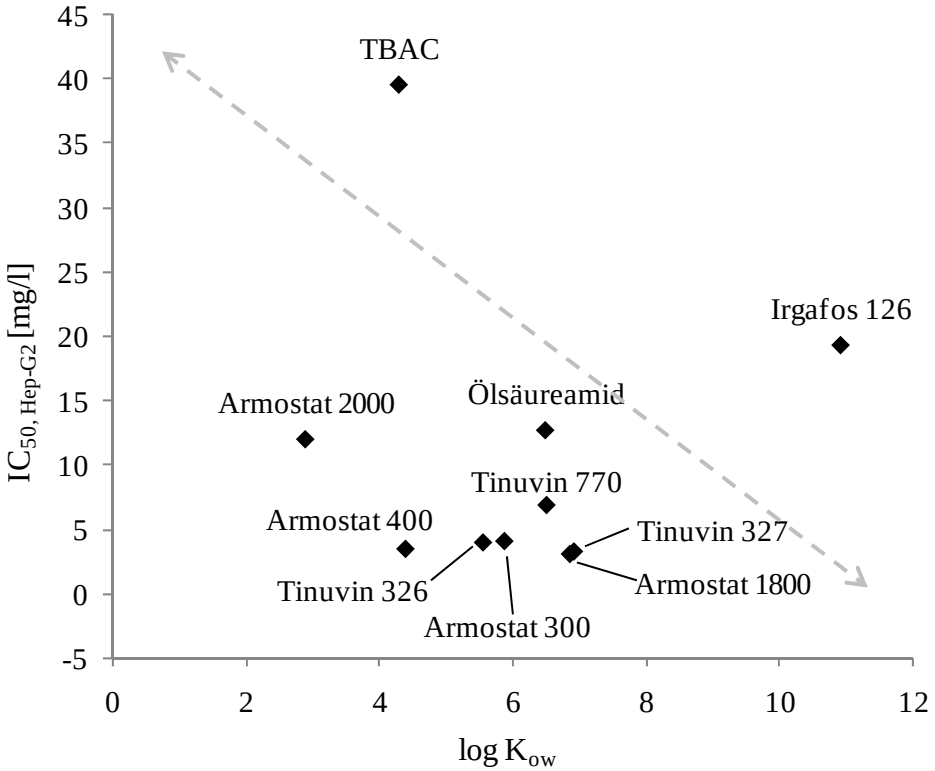


Abb. 51: Gegenüberstellung der log K_{ow}-Werte und der $IC_{50, Hep-G2}$-Werte für die positiv getesteten Kunststoffadditive, grau gestrichelte Linie: theoretische Annahme der Verteilung der Substanzen gemäß deren Basislinientoxizität

Aus der Abb. 51 ist deutlich zu entnehmen, dass nicht nur ein Substanzparameter, in diesem Fall die Lipophilie, für die zytotoxikologische Wirkung einer chemischen Substanz ausschlaggebend ist. Theoretisch erhöht sich die Toxizität von Substanzen mit steigender Löslichkeit in lipophilen Medien, welche durch geringere IC_{50}-Werte ausdrückt werden. Besitzen Substanzen eine geringere Löslichkeit in fetthaltigen Lösungsmitteln, so erschwert sich deren passive Diffusion durch die Zellmembran, die Toxizitäten sinken und die IC_{50}-Werte steigen (Abb. 51, grau gestrichelte Linie). Neben

der Lipophilie sind ebenfalls die sterische Anordnung im Molekül und das Vorhandensein von aktiven funktionellen Gruppen für die Aufnahme durch die Zellmembran und die Aktivierung bzw. Deaktivierung von Stoffwechselprozessen zuständig, aber auch der Ort der Aufnahme von Xenobiotika im Darm spielt eine wichtige Rolle [Bjarnason et al., 1995; Parlesak et al., 1994; Nejdfors et al., 2000].

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden im Folgenden die ermittelten Ergebnisse im Neutralrottest innerhalb der strukturell und funktionell verwandten Additiv-Gruppen betrachtet.

In der Gruppe der Alkyldiethanolamine (Antistatika) wurde ein sehr homogenes Ergebnis für die Substanzen Armostat 300, Armostat 400 und Armostat 1800 im Zelltest ermittelt (Abb. 50, Abb. 51), obwohl sich diese Substanzen durch eine steigende Länge in der Alkylkette unterscheiden (Tab. 31). Nur die Substanz Armostat 2000, welche durch die zusätzliche Carbonylfunktion ein Säureamid darstellt, unterschied sich auch signifikant (ANOVA, $\alpha = 0{,}05$) von den anderen, aufgrund der resultierenden geringeren Lipophilie (Abb. 51).

Die untersuchten Dicarbonester (Weichmacher) DEHA und DBS hemmten die Zellvitalität bis zu einer getesteten Konzentration von 100 mg/l nicht. Die log K_{ow}-Werte der beiden Substanzen sind ähnlich bzw. größer, als die der Alkyldiethanolamine (Tab. 31, Abb. 51). Dieser Vergleich stellt ein weiteres Indiz dafür dar, dass die hervorgerufene Toxizität der Alkyldiethanolamine nicht nur auf der Basislinientoxizität beruht. Wie bereits in diesem Kapitel erwähnt, kann die Oxidation am Stickstoffatom zu reaktiven Intermediaten führen. Alkyldiethanolamine sind tertiäre Amine, die daraus gebildeten N-Oxide sind zum Teil aktiver, als die entsprechenden Amine. Sie stehen zum Beispiel in Verdacht Krebs oder Hämolyse von humanen Erythrozyten hervorzurufen [Bickel 1969; Takácsová und Subík, 1977].

Die Phosphite Irgafos 126 und 168 zählen zur Gruppe der sekundären Antioxidantien. Aufgrund der hohen Lipophilie von Irgafos 168 ließ sich diese Substanz nur in einer sehr geringen Konzentration in DMSO lösen (Tab. 31). Bis zu dieser Konzentration von 0,5 mg/l kam es zu keiner Hemmung der Zellvitalität im NRT an beiden Zelllinien. Daher ist ein Vergleich der beiden Substanzen untereinander nicht möglich. Czajkowska et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass von einfachen Trialkylphosphiten ein

hohes toxikologisches Potential ausgeht [Czajkowska et al., 1978]. Das Forscherteam untersuchte die akute Wirkung von Trialkylphosphiten (Trimethylphosphit und Triethylphosphit) an weißen Ratten indem sie die Substanzen intraperitoneal und intragastral applizierten. Es wurden in Abhängigkeit der verabreichten Substanz LD_{50}-Werte zwischen 1,5 g/kg und 4,0 g/kg ermittelt. An den Versuchstieren wurden neben den Irritationen der Haut, Augen und der Bindehaut, eine Lähmung der Gliedmaßen und eine Degeneration von Leber- und Nierengewebe beobachtet. Die intragastrale Applikationsweise führte zusätzlich zu Nekrosen, Geschwüren und zur Ablösung der Mucosa [Czajkowska et al., 1978].

Neben den sekundären Antioxidantien wurden auch die primären Antioxidantien Irganox 1010, Irganox 1076, Irganox 1098 und Irganox 1330 getestet. Auch bei diesen Substanzen kam es aufgrund der erhöhten Lipophilie zu Problemen bei der Löslichkeit in DMSO (Tab. 18, Tab. 31). Innerhalb der getesteten Konzentrationen (c = 14 – 80 mg/l) konnte für keine der vier Substanzen ein IC_{50}-Wert im Neutralrottest ermittelt werden.

Tinuvin 326, Tinuvin 327 und Tinuvin P gehören zur Substanzklasse der 2-Hydroxyphenylbenzotriazole und übernehmen die Funktion von UV-Absorbern. Tinuvin 326 besitzt eine etwas polarere Struktur, als Tinuvin 327 (Tab. 31). Der IC_{50}-Wert von Tinuvin 326 ist daher auch geringfügig höher, statistisch gesehen ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (Abb. 50, Tab. 18, ANOVA, $\alpha = 0{,}05$). Tinuvin P ist die polarste der drei Substanzen, damit unterscheidet sie sich auch signifikant in ihrem Verhalten im NRT von den anderen Substanzen. Bis zu einer getesteten Konzentration von 50 mg/l wurde die Zellvitalität nicht inhibiert, oberhalb dieser Konzentration kam es zu Präzipitation im Zellkulturmedium. Somit scheint sich für diese Gruppe die theoretische Annahme zu bestätigen. Vergleicht man jedoch die log K_{ow}-Werte der 2-Hydroxyphenylbenzotriazole mit den log K_{ow}-Werten der Dicarbonsäuren, so kann festgestellt werden, dass offensichtlich auch für diese Substanzklasse nicht nur die Basislinientoxizität für das toxikologische Potential verantwortlich ist. Möglicherweise beeinflusst der Chlorsubstituent am Tinuvin 326 und Tinuvin 327 zusätzlich die zytotoxikologischen Eigenschaften. Die 2-Hydroxyphenylbenzotriazole enthalten ebenfalls, wie die Alkyldiethanolamine Stickstoffatome im Molekül, daher ist auch bei dieser Substanzklasse eine oxidative Bioaktivierung vorstellbar [Kalgutkar et al., 2002].

Ölsäureamid und Erucamid gehören zur Klasse der Fettsäureamide und agieren im Kunststoff als Gleitmittel (Tab. 31). Vergleicht man die beiden Substanzen anhand ihrer Lipophilie, so erkennt man dass Ölsäureamid polarer ist (Tab. 31). Dennoch inhibierte Ölsäureamid das Zellwachstum im Neutralrottest, im Gegensatz zu Erucamid, welche bis zu einer Konzentration von 500 mg/l keinen Effekt hervorrief (Tab. 18, Abb. 50). Neben dieser narkotischen Wirkung scheinen auch für das Ölsäureamid andere Eigenschaften das toxikologische Potential zu beeinflussen. Denn Ölsäureamid ist eine im humanen Organismus endogen enthaltene Substanz, welches an einer Reihe von Signalprozessen beteiligt ist, z.B. kann es die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen über gap junctions (Membrantransportkanäle) stören [Boger et al., 1998].

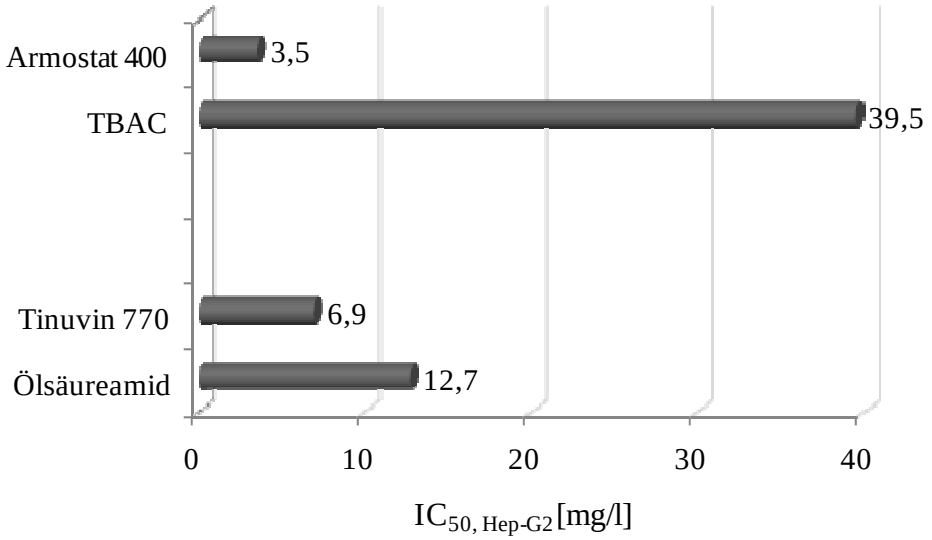


Abb. 52: Vergleich der Zytotoxizität ($IC_{50,Hep-G2}$) ähnlich lipophiler Substanzen

Innerhalb der oben beschrieben Gruppen konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität nicht allein von der Lipophilie der Substanzen abhängig ist. Diese Aussage bestätigte sich auch durch einen Vergleich von unterschiedlichen Additiven mit annähernd gleichen log K_{ow}-Werten und gleicher Lipophilie (Abb. 52). Ölsäureamid und Tinuvin 770 besitzen einen log K_{ow}-Wert von circa 6,5. Die ermittelte Zytotoxizität von Tinuvin 770 ist allerdings fast doppelt so hoch, als die von Ölsäureamid. TBAC und Armostat 400 weisen ebenfalls eine vergleichbare Lipophilie (log Kow ≈ 4,3) auf, sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Toxizität um eine Zehnerpotenz.

Über die narkotische Wirkung der Basislinientoxizität hinaus zeigen einige Substanzen unabhängig ihrer Lipophilie weitere spezifische Effekte, die das toxikologische Potential beeinflussen. Diese Effekte werden als „Exzess“-Toxizität bezeichnet. Daher

kann von diesen Substanzen auch bereits bei geringen Konzentrationen ein hohes gefährdendes Potential ausgehen und in Mischungen auch dominieren [von der Ohe et al., 2005].

4.4 Untersuchung von verschiedenen Verpackungsmigraten im NRT

Zur Überprüfung der Zytotoxizität der verschiedenen Lebensmittelverpackungen wurden die gewonnenen Migrate im Neutralrottest an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 bis zu einer maximalen Konzentration von 30 dm^2/l untersucht. Von der Ketchupbeutelfolie für Einzelportionen mit farbigen Aufdruck wurde sowohl das Migrat von der lebensmittelzugewandten Seite, als auch der Außenseite (= bedruckte Seite) auf ein zytotoxikologisches Potential analysiert.

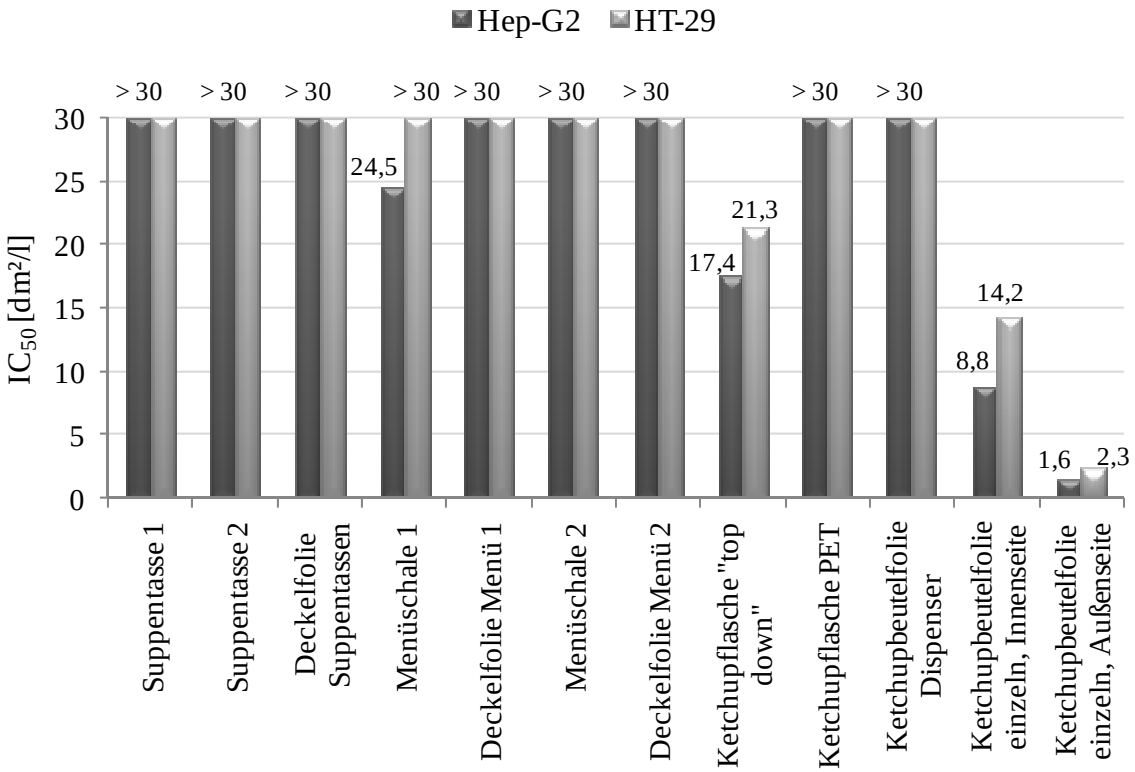


Abb. 53: Ermittelte IC_{50}-Werte der 95%-igen ethanolischen Migrate der unterschiedlichen Lebensmittelverpackungen im Neutraltrottest an den Zelllinien Hep-G2 und HT-29 (MW; n=3)

In Abb. 53 sind die ermittelten IC_{50}-Werte aus dem durchgeführten Probenscreening in einem Übersichtsdiagramm dargestellt. Nur 4 von den 12 untersuchten Migraten zeigten eine zytotoxikologische Wirkung im angewandten Testsystem. Die durch die Menüschale 1 und Ketchupflasche „top down“ hervorgerufenen Effekte sind jedoch relativ gering gegenüber den durch die Ketchupbeutelfolie für Einzelportionen bestimmten IC_{50}-Werten. Dabei besaß das Migrat der bedruckten Außenseite ein

deutlich höheres zytotoxikologisches Potential im Vergleich zu der lebensmittelzugewandten Seite. Dieser Effekt ist auf die Art und Masse der migrierenden Substanzen zurückzuführen, da in diesem Fall das Gesamtmigrat der Außenseite mit 14,78 ± 2,76 mg/dm^2 um den Faktor 6 höher als das Migrat von der lebensmittelzugewandten Seite (2,57 ± 0,09 mg/dm^2) ist (Tab. 23) [DIN EN 1186, 2002].

Diese Verpackung stellte nicht nur aufgrund des vorliegenden Analysenergebnisses eine interessante Probe dar. Denn bei dieser Verpackungsart besteht ebenfalls ein sehr ungünstiges Oberflächen-Volumen-Verhältnis (ca. 57 g Ketchup/dm$^2_{\text{Verpackungsoberfläche}}$) zwischen dem Verpackungsmaterial und dem beinhaltenden Lebensmittel. Außerdem wird die Verpackungsfolie nach der Produktion aufgerollt und in diesen großen Rollen gelagert, so dass die dem Lebensmittel zugewandte Seite in Kontakt mit der bedruckten Außenseite tritt, wodurch Abklatscheffekte von der bedruckten Außenseite auf die lebensmittelzugewandte Seite auftreten können. Anhand der zuvor angeführten Diskussionspunkte wurde für die weiterführenden Untersuchungen diese Ketchupbeutelfolie ausgewählt.

4.5 Migration aus der Ketchupbeutelfolie

4.5.1 Aufbau der Folie

Der Schichtaufbau dieser Ketchupbeutelfolie wurde sowohl mit naßchemischen (Tab. 19), spektroskopischen (Kapitel 10.3: Abb. 78, Abb. 79, Abb. 80) und mikroskopischen (Abb. 54) Untersuchungsmethoden aufgeklärt. Abb. 54 zeigt den ermittelten Schichtaufbau der Folie. Durch die Kombination der aufgeführten Bestimmungsmethoden konnte der Schichtaufbau der Ketchupbeutelfolie eindeutig bestimmt werden. Auf der Außenseite der Folie befindet sich ein Nitrocelluloselack als Schutzschicht, gefolgt vom Farbaufdruck und einer Aluminiumschicht ($\Sigma_{\text{Schichtdicken}}$ 3,88 µm), welche auf die darunter liegende Polyethylenterephthalatschicht (PET, Schichtdicke: 12,16 µm) aufgedampft wurde. Die dem Lebensmittel zugewandte dicke Polyethylenschicht (PE, Schichtdicke: 49,14 µm) ist mit der Polyethylen-terephthalatschicht durch einen Kaschierkleber (Schichtdicke: 2,59 µm) verbunden.

Tab. 19: Naßchemische Untersuchungsmethoden und Ergebnisse zur Aufklärung des Schichtaufbaus der Ketchupbeutelfolie [Braun, 1998] [Bergmaier et al., 2004] [Praktikumsvorschrift, 2004]

Versuch	Durchführung	Ergebnis
Löslichkeitsversuche	- lösen der gesamten Folie in siedendem Toluol	- Auftrennung der Verpackungsfolie in 2 Schichten (Schicht zur Innenseite wurde vollständig aufgelöst = Polyethylen (PE)) - dabei war die bedruckte Folie (Außenseite) mit Aluminium bedampft - Aufdruck und Aluminiumbeschichtung konnte mit Methanol abgewischt werden
	– lösen der Außenseiten in heißer konzentrierter Schwefelsäure	- positiver Nachweis von Polyethylenterephthalat (PET)
Beilsteinprobe	– Verbrennung am Kupferdraht	– keine Grünfärbung – keine Halogenide enthalten
pH-Wert der Pyrolysedämpfe	– Prolysedämpfe werden auf feuchtes Unitestpapier geleitet	– Innenseite pH = 4-5 – Außenseite pH = 2-3
Nachweis von Cl, S, N	– Natriumaufschluß + Bleisulfat + Silbernitrat + Eisen(II)-sulfat-Lösung, Eisen(III)-chlorid-Lösung	– kein positives Ergebnis
Untersuchung des Lacktypes	*Nachweis auf Polyvinylidenchloridlack*	
	– Pyridin, methanolische KOH (Tropfentest)	– negativer Nachweis
	Nachweis auf Acrylbeschichtung	
	– Abwischen mit MeOH	– Trübung der Folie konnte aufgrund der bedruckten Oberfläche nicht festgestellt werden
	Schnellpüfung auf Nitrolackbeschichtung	
	– Diphenylamin, bidest. H_2O, Schwefelsäure (Tropfentest)	– Blaufärbung als eindeutiger Nachweis für Nitrozellulose

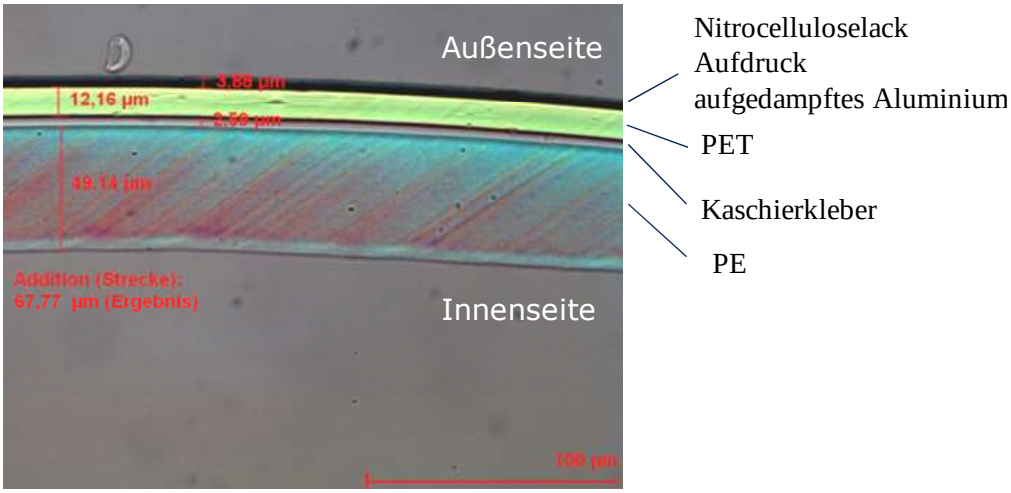


Abb. 54: Mikrotomschnitt (Leica DM RXP, Durchlicht, polarisiert, 400 x Vergrößerung) und aufgeklärter Schichtaufbau der Ketchupbeutelfolie (PET: Polyethylenterephthalat; PE: Polyethylen) erstellt von der Firma Wipak

4.5.2 Identifizierung der migrierenden Substanzen

Die 95 %-igen ethanolischen Migrate der Innen- und Außenseite der Ketchupbeutelfolie wurden unter den gleichen Bedingungen chromatographiert wie die Referenzsubstanzen (Kapitel 10.5.6, Kapitel 10.5.8, Kapitel 10.5.10). Über den Vergleich der Chromatogramme mit den Referenzsubstanzen, eine zusätzliche Standardaddition und über die entsprechenden Masseverhältnisse konnten die migrierenden Substanzen in den Migraten identifiziert werden. Neben den RP-HPLC-Methoden wurden die Migrate mittels GC-MSD (Kapitel 10.5.13) untersucht, um bisher unbekannte Substanzen zu identifizieren. Die Identifizierung mittels GC-MS erfolgte durch einen Abgleich des gemessenen Peak-Spektrums mit der vorhandenen Spektren-Datenbank (NIST 2005 Mass Spectral Library and Software, Perkin Elmer Inc.).

In Abb. 55 und der Tab. 20 sind die Ergebnisse der RP-HPLC-Messungen zur Bestimmung der migrierenden Substanzen in fetthaltige Lebensmittel (95 % EtOH) aus der dem lebensmittelzugewandten Seite (Innenseite) der Ketchupverpackung zusammengefasst. Im Migrat konnten eindeutig die Weichmacher TBAC (Peak 6), DEHA (Peak 10), DBS (Peak 8) und Triacetin (Peak 1), die Gleitmittel Ölsäureamid (Peak 9) und Erucamid (Peak 10) und die Antioxidantien Irganox 1076 (Peak 12), Irgafos 168 (Peak 13) sowie dessen oxidierte Form (Peak 11) identifiziert werden. Zusätzlich wurden weitere überwiegend uv-aktive Peaks (Peak 2, 3, 4, 5 und 7) in den Chromatogrammen mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert. Ein Strukturvorschlag konnte für diese Substanzen nicht ermittelt werden, jedoch besitzen

sie alle ein Molekulargewicht kleiner 1000 Da und sind somit toxikologisch relevant [EFSA, 2006].

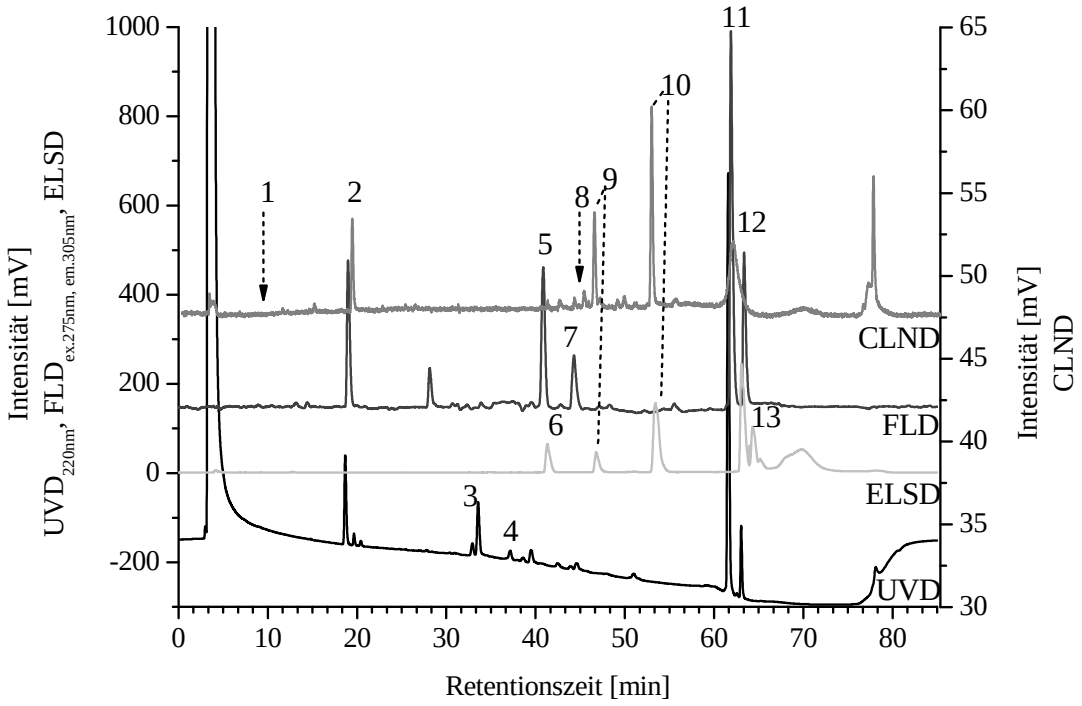


Abb. 55: RP-HPLC des 95 %-igen EtOH-Migrat der Innenseite (1 Triacetin, 2 Unbekannte (UBK), 3 UBK, 4 UBK, 5 UBK, 6 TBAC, 7 UBK, 8 DBS, 9 Ölsäureamid, 10 DEHA/Erucamid, 11 oxidiertes Irgafos 168, 12 Irganox 1076, 13 Irgafos 168)(Kapitel 10.5.6, 10.5.8)

Tab. 20: Peakzuordnung der chromatographischen Bestimmung mittels RP-HPLC für das 95 %-ige ethanolische Migrat der Innenseite (UBK = Unbekannte, x = detektierbar, - = nicht detektierbar)

Peak	Substanz	t_R [min]	UVD	FLD	ELSD	CLND
1	Triacetin	10	nur über MS detektierbar			
2	UBK, MG = 199 g/mol	19	x	x	-	x
3	UBK, MG = 428, 468, 448 g/mol	31,33,34	x	-	-	-
4	UBK, MG = 278 g/mol	38	x	-	-	-
5	UBK, MG = 682 g/mol	41	-	x	-	-
6	TBAC	41	x	-	x	-
7	UBK, MG = 362 g/mol	44	x	x	-	-
8	DBS	45	nur über MS detektierbar			
9	Ölsäureamid	46	-	-	x	x
10	DEHA, Erucamid	53	-	-	x	x
11	oxidiertes Irgafos 168	62	x	x	x	-
12	Irganox 1076	63	x	x	x	-
13	Irgafos 168	64	x	x	x	-

Die Substanz Triacetin konnte nur mittels massenspezifischer Detektion identifiziert werden (Tab. 20). Bei Peak 2 handelt es sich um eine relativ polare stickstoffhaltige Substanz mit einem Molekulargewicht von 199 g/mol. Bei einer UV-Wellenlänge von 220 nm wurden mehrere Peaks im Bereich von 30-35 min detektiert (Peak 3). Peak 5

und der Weichmacher TBAC (Peak 6) eluierten bei der gleichen Retentionszeit (t_R = 41 min). Sie sind aber aufgrund der unterschiedlichen Detektionseigenschaften voneinander unterscheidbar. Dem fluoreszenzaktiven Peak bei einer Retentionszeit von 28 min konnte keine spezifische Masse zugeordnet werden, das bedeutet, dass die Substanz entweder nicht ionisierbar ist, oder die massenspezifische Detektion in diesem Fall zu unspezifisch ist. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei dieser Substanz wahrscheinlich um eine Verunreinigung handelt. DBS (Peak 8) konnte unter den gewählten Bedingungen ebenfalls nur durch die Detektion im MSD bestimmt werden. Ölsäureamid (Peak 9) zeigte im Chromatogramm des CLND neben dem Hauptpeak (t_R = 46 min) weitere kleinere Nebenpeaks. Wie bereits erwähnt handelt es sich bei dieser Referenzsubstanz um Gemisch mit Fettsäuren oder anderen Fettsäureamiden [Huck, 1963]. Im Peak 10 coeluieren DEHA und Erucamid bei einer Retentionszeit von 53 min. Aufgrund des H^+-Na^+-K^+-Cluster der Massenspektren des Peaks war es möglich diese beiden Substanzen eindeutig zu identifizieren. Mittels der GC-MSD-Analytik war eine Trennung der Peaks möglich (Abb. 56).

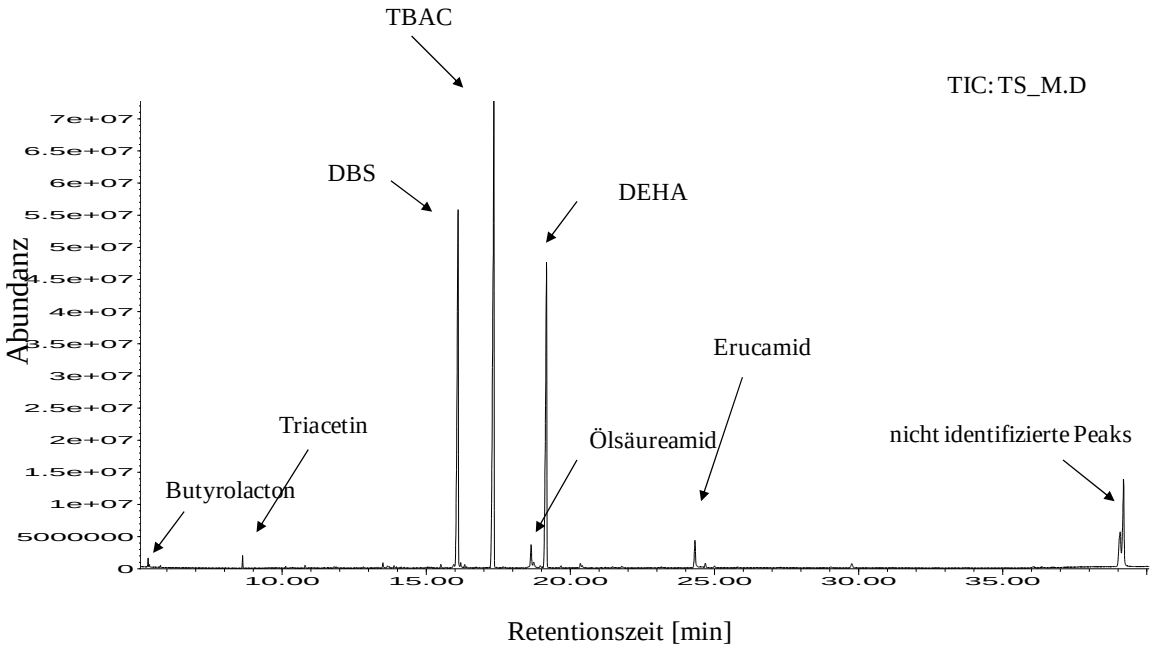


Abb. 56: TIC-Chromatogramm der GC-MSD des 95 %-igen EtOH-Migrat der Innenseite der Ketchupbeutelfolie (Kapitel 10.5.13)

Den ermittelten Daten des GC-MSD-Chromatogramms war zu entnehmen, dass auch geringe Mengen an Butyrolacton im Migrat der Innenseite der Verpackung bestimmt wurden. Butyrolacton ist ein Lösungsmittel, welches auch in der Lackherstellung als Lösungsmittel eingesetzt wird [Brock et al., 1998]. Möglicherweise kam es zu dem bereits genannten Abklatscheffekt beziehungsweise zur Migration von Butyrolacton bei

der Lagerung der Rollen von der bedruckten Außenseite in die Polyethylenschicht der lebensmittelzugewandten Seite.

Das 95 %-ige ethanolische Migrat der Außenseite wurde ebenfalls mittels RP-HPLC- und GC-MSD-Methoden untersucht. In der Abb. 57 sind die RP-HPLC-Chromatogramme abgebildet und durch die Tab. 21 erfolgte die Peakzuordnung.

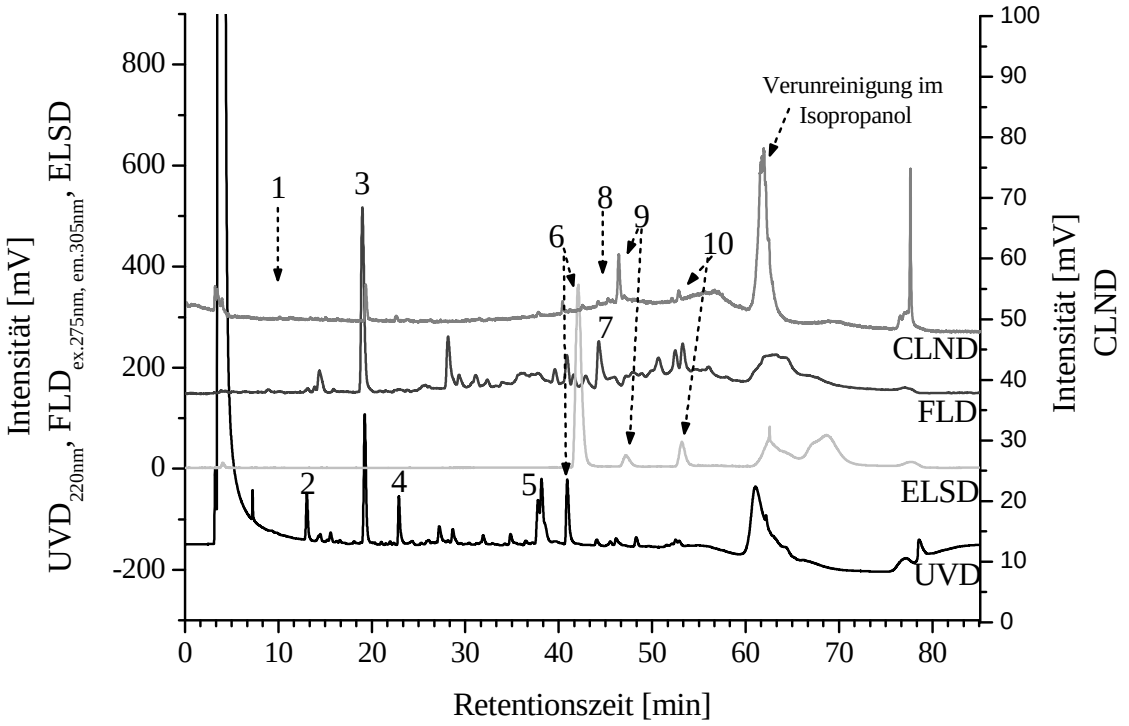


Abb. 57: RP-HPLC des 95 %-igen EtOH-Migrat der Außenseite (1 Triacetin, 2 Unbekannte (UBK), 3 UBK, 4 UBK, 5 UBK, 6 TBAC, 7 UBK, 8 DBS, 9 Ölsäureamid, 10 DEHA/Erucamid)(Kapitel 10.5.6, 10.5.8

Innerhalb der uv-Spur (Abb. 57) erkennt man eine Vielzahl kleinere Peaks, welche auf uv-aktive Substanzen aus der Farbschicht zurückzuführen sind. Bereits optisch war zu erkennen, dass rote Bestandteile aus der Lackschicht in das Simulanzlösemittel während des Migrationsvorgangs übergegangen sind (Abb. 58).

Abb. 58: Bestimmung des Gesamtmigrates: gefüllte Aluminiumschalen; links: Außenseite, Mitte: Innenseite, rechts: ein Blindwert

Aufgrund dieser Peakvielfalt wurden nur die Hauptpeaks in den Chromatogrammen ausgewertet und mittels RP-HPLC-MSD die spezifischen Molekulargewichte zugeordnet. Für alle Hauptpeaks wurde ein Molekulargewicht von kleiner 1000 Da ermittelt (Tab. 21). Dadurch sind auch diese migrierenden Substanzen aus der Außenseite der Verpackung toxikologisch relevant [EFSA, 2006].

Tab. 21: Peakzuordnung der chromatographischen Bestimmung mittels RP-HPLC für das 95 %-ige ethanolische Migrat der Außenseite (UBK = Unbekannte, x = detektierbar, - = nicht detektierbar)

Peak	Substanz	t_R [min]	UVD	FLD	ELSD	CLND
1	Triacetin	10		nur über MS detektierbar		
2	UBK, MG = 308 g/mol	13	x	-	-	-
3	UBK, MG = 199 g/mol	19	x	x	-	x
4	UBK, MG = 482 g/mol	23	x	-	-	-
5	UBK, MG = 278 g/mol	38	x	-	-	-
6	TBAC	41	x	-	x	-
7	UBK, MG = 362 g/mol	44	x	x	-	-
8	DBS	45		nur über MS detektierbar		
9	Ölsäureamid	46	-	-	x	x
10	DEHA, Erucamid	53	-	-	x	x

Die identifizierten Substanzen im Migrat der Innen- und Außenseite sind sich sehr ähnlich. Die unbekannten Substanzen der Peaks 3, 5 und 7 des Außenseitenmigrates sind ebenfalls im Migrat der Innenseite vorhanden. Auch TBAC ist im Migrat der Außenseite vorhanden, die Peakintensität ist in diesem Migrat deutlich höher als im Migrat der Innenseite. Neben den Substanzen Triacetin und DBS, welche mittels RP-HPLC-MSD detektiert wurden, konnten auch im Migrat der Außenseite Ölsäureamid, Erucamid und DEHA identifiziert werden. Im Gegensatz zum Innenseitenmigrat wurden im Migrat der Außenseite keine Antioxidantien gefunden.

Neben den mittels RP-HPLC bestimmten Weichmachern DBS, TBAC, Triacetin und DEHA konnten durch die Analysen im GC-MSD weiterhin Dibutylphthalat (DBP), Isobutyldecylphthalat (IBDP) und N-Ethyltoluolsulfonamid im Migrat der Außenseite identifiziert werden. Auch das Lösemittel Butyrolacton wurde mittels GC-MSD im Außenseitenmigrat analysiert.

Über einen Vergleich der ermittelten Molekulargewichte mittels RP-HPLC-MSD und GC-MSD konnte festgestellt, dass es sich bei dem Weichmacher DBP um die unbekannte Substanz bei der Retentionszeit von 38 min (Peak 4 der Abb. 55 bzw. Peak 5 Abb. 57) mit einem Molekulargewicht von 278 g/mol handelte. Zur eindeutigen

Bestätigung wurde eine Standardaddition für die RP-HPLC-Messungen durchgeführt. N-Ethyltoluolsulfonamid besitzt ein Molekulargewicht von 199 g/mol und konnte somit der Unbekannten mit einer Retentionszeit von t_R = 19 min (Peak 2 der Abb. 55 bzw. Peak 3 der Abb. 57) zugeordnet werden. Durch Injektion des Standards konnte auch diese Substanz eindeutig identifiziert werden. N-Ethyltoluolsulfonamid wird in der Druckfarbenindustrie ebenfalls als Weichmacher eingesetzt [Gächter und Müller, 1989; Nerin et al., 1993]. Dabei wird sowohl die para-Form, als auch die ortho-Form, oder ein Gemisch aus beiden Formen eingesetzt. Mit den vorhanden chromatographischen Methoden war jedoch eine eindeutige Zuordnung des vorliegenden Substitutionstypes nicht möglich. Der unbekannten Substanz mit der Peaknummer 7 (Abb. 55 bzw. Abb. 57) und einem Molekulargewicht von 362 g/mol konnte der Weichmacher Isobutyldecylphthalat zugeordnet werden.

Wie bereits erwähnt, wurden die meisten identifizierten Additive sowohl im Migrat der Innenseite, als auch im Migrat der Außenseite bestimmt. Es kann dabei angenommen werden, dass die Additive nicht ursprünglich in der jeweiligen Kunststoff- bzw. Lackschicht vorhanden waren, vielmehr ist eine Migration der Additive innerhalb der einzelnen Schichten der Verpackung möglich. Zum einen gibt es da den bereits genannten „Abklatscheffekt“, wo es durch Lagerung der Folienrollen zu einem Kontakt der lebensmittelzugewandten Seite mit der bedruckten Außenseite kommt. Zum anderen kann es auch zu einer Migration der Additive durch die verschiedenen Schichten der Verpackung kommen. Dabei spielen die spezifischen Stoffeigenschaften (z.B. Lipophilie, Struktur) der Additive eine entscheidende Rolle. So kann angenommen werden, dass die relativ polaren Substanzen TBAC, Triacetin und N-Ethyltoluolsulfonamid, als Weichmacher in der Lackschicht bzw. den Druckfarben dienten und über den „Abklatscheffekt“ auf die Oberfläche der Innenseite der unpolaren PE-Folie gelangten. Bestätigt wird diese Annahme durch den deutlich höheren Gehalt von TBAC im Migrat der Außenseite (Tab. 22). Auch das Lösungsmittel Butyrolacton kann auf diesen Weg zur Innenseite der Folie gelangt sein. Die Gleitmittel Ölsäureamid und Erucamid waren wahrscheinlich ursprünglich auf beiden Seiten der Verpackung vorhanden. Sie werden als Slipmittel zur Verminderung der Haftung der Folie bei der Herstellung eingesetzt. Die unpolaren Antioxidantien Irganox 1076 und Irgafos 168 wurden ausschließlich zum Schutz der Polyethylenschicht eingesetzt. Aufgrund der

Polaritäten dieser Substanzen ist eine Löslichkeit der Antioxidantien in der Nitrozelluloseschicht erschwert.

Um genau aufzuklären, welche Additive durch Migration von der Außenseite auf die Innenseite migriert sind, hätte man eine unbedruckte Folie des gleichen Typs auf Ihr Migrationsverhalten untersuchen müssen. Von der Kooperationsfirma konnte uns keine adäquate Folie zur Verfügung gestellt werden, da eine Unterbrechung des Produktionsprozess nicht durchgeführt werden konnte. Die als Ersatz gelieferte Folie zeichnete sich bereits durch einen anderen Schichtaufbau, sowohl in der Art der Schichten, als auch in der Schichtdicke aus (Abb. 59).

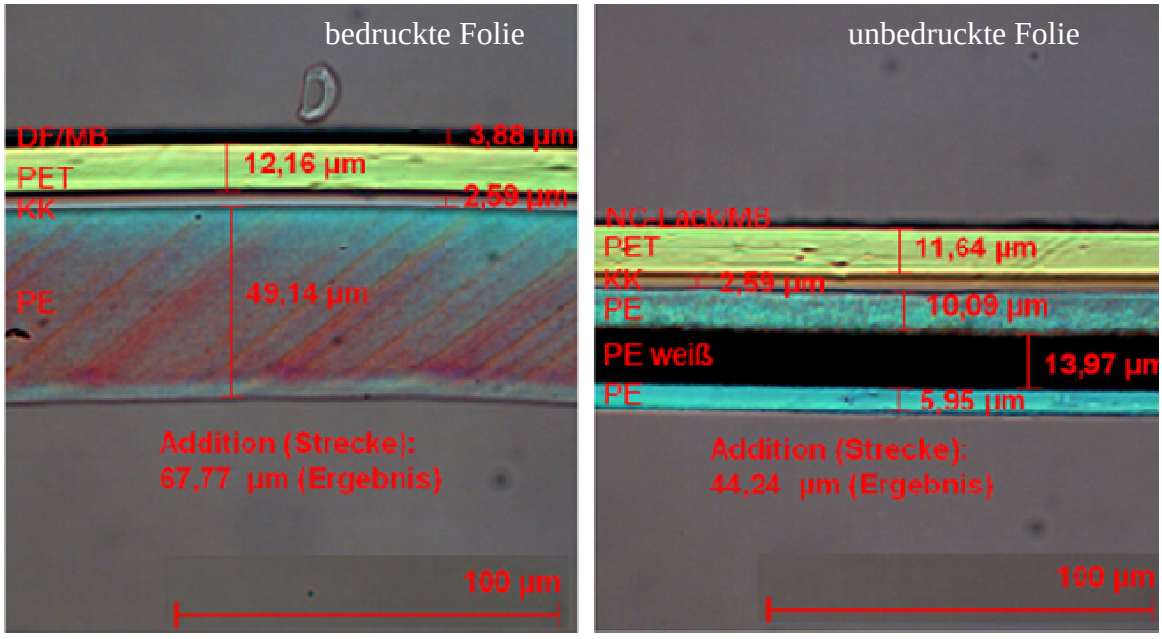


Abb. 59: Vergleich des Schichtaufbaus der bedruckten (rechts) und unbedruckten (links) Folie (NC-Lack: Nitrocelluloselack; DF: Druckfarbe; MB: Metallbedampfung; PET: Polyethylenterephthalat; KK: Kaschierkleber; PE: Polyethylen) erstellt von der Firma Wipak

In der unbedruckten Folie bestand die eigentliche Polyethylenschicht aus drei Schichten Polyethylen, wobei eine davon mit weißen Pigmenten versetzt wurde. Außerdem ist die Polyethylenschicht der unbedruckten Folie deutlich schmaler als diese Schicht in der bedruckten Folie. Auch im Vergleich der migrierenden Substanzen in 95 %-igen Ethanol konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um den gleichen Folientyp handelte (Abb. 60, Abb. 61). Es wurde erwartet, dass sich das Migrat der unbedruckten Folie durch eine geringere Anzahl an migrierenden Substanzen (Peaks) auszeichnet. In der direkten Gegenüberstellung der Chromatogramme konnte diese Annahme nur zum Teil bestätigt werden. In den Chromatogrammen der unbedruckten Folie (hellgrau) traten

zusätzlich noch neue nicht identifizierte Peaks (gestrichelte Kästen) auf. Es ist zu vermuten, dass der unbedruckten Folie noch weitere Additive zugesetzt wurden, welche in der eigentlichen Ketchupverpackung nicht vorhanden waren. Trotzdem konnte abgeleitet werden, welche Substanzen aus der Druckfarbe stammten und daher nicht in der unbedruckten Folie vorhanden waren. Im 95 %-igen EtOH Migrat der Innenseite enthielt die unbedruckte Folie geringere Mengen der Weichmacher TBAC (Peak 6) und DEHA (Peak 10) (Abb. 60). Der Weichmacher N-Ethyltoluolsulfonamid fehlte vollständig im Migrat der unbedruckten Folie. Daher kann das Vorkommen dieser teilweise polaren Substanzen auf die Druckfarbe zurückgeführt werden [Nerin et al., 1993]. Das Fehlen von Irganox 1076 (Peak 12), die Konzentrationsunterschiede bei den Substanzen Irgafos 168 (Peak 13), Ölsäureamid (Peak 9) und Erucamid (Peak 10) und das Auftreten von neuen, vor allem stickstoffhaltigen Peaks im Migrat der unbedruckten Folie war nicht auf die fehlenden Druckfarben zurückzuführen.

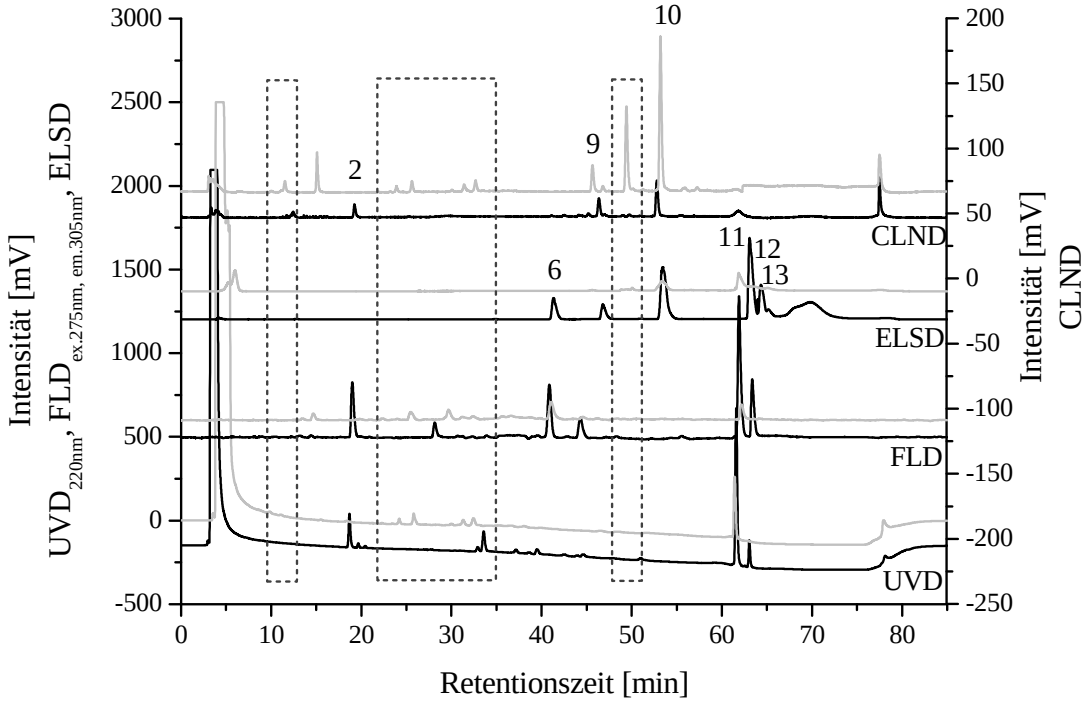


Abb. 60: Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme der Innenseitenmigrate der bedruckten (schwarz) und unbedruckten (hellgrau) Folie (2 N-Ethyltoluolsulfonamid, 6 TBAC, 9 Ölsäureamid, 10 Erucamid/DEHA, 11 oxd. Irgafos 168, 12 Irganox 1076, 13 Irgafos 168; gestrichelte Kästen zeigen deutliche Unterschiede in den Chromatogrammen) (Kapitel 10.5.6, 10.5.8)

Anhand des Vergleichs der Chromatogramme der Außenseitenmigrate ist man ebenfalls in der Lage, die migrierenden Substanzen aus der Druckfarbe zu bestimmen (Abb. 61). In den Chromatogrammen der unbedruckten Folie fehlte eine Vielzahl an polaren, uv-aktiven Substanzen. Die Weichmacher N-Ethyltoluolsulfonamid und DEHA konnten

ebenfalls nicht analysiert werden. TBAC (Peak 6) wurde nur in sehr geringen Mengen im Migrat der unbedruckten Folie nachgewiesen, dieses stammt wahrscheinlich aus der Lackschicht. Die geringen Konzentrationen von Ölsäureamid (Peak 9) und Erucamid (Peak 10) und das Auftreten des fluoreszenzaktiven Peaks bei einer Retentionszeit von t_R = 32 min kann nicht durch das Fehlen der Druckfarben in der unbedruckten Folie erklärt werden. Dieses Phänomen ist auf die unterschiedliche Zusammensetzung der untersuchten Folien zurückzuführen.

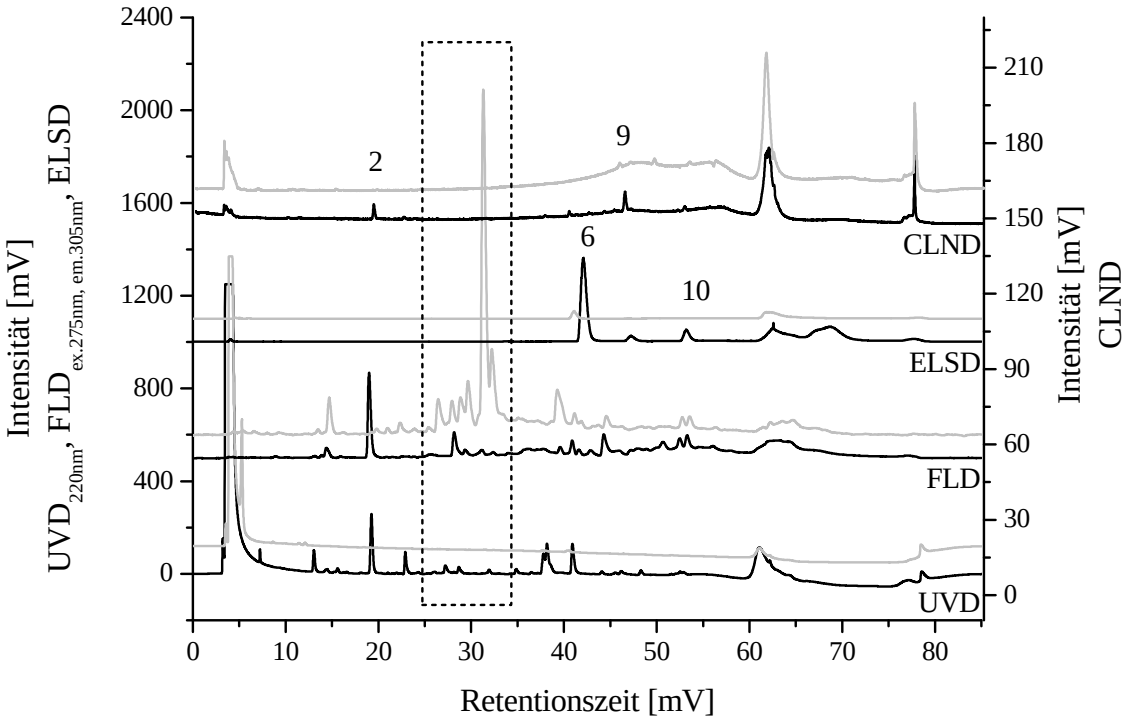


Abb. 61: Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme der Außenseitenmigrate der bedruckten (schwarz) und unbedruckten (hellgrau) Folie (2 N-Ethyltoluolsulfonamid, 6 TBAC, 9 Ölsäureamid, 10 Erucamid/DEHA; gestrichelte Kästen zeigen deutliche Unterschiede in den Chromatogrammen)(Kapitel 10.5.6, 10.5.8)

Es ist bekannt, dass Additive aus den Druckfarben und dem Lack von der Außenseite der Verpackung auf bzw. in die Innenseite migrieren können [Nerin et al., 1993]. Die Problematik besteht darin, dass keine Einschränkung in der Verwendung von Ausgangsstoffen für Druckfarben gibt. Es wird davon ausgegangen, dass die bedruckte Seite nicht in Kontakt mit dem abgefüllten Lebensmittel tritt. Für Druckfarben gelten nur die allgemeinen rechtlichen Anforderungen Verordnung (EG) Nr. 1935/2004 bzw. Verordnung (EG) Nr. 2023/2006. Bei der Verwendung von Druckfarben soll die gute Herstellungspraxis eingehalten werden und die Druckfarben dürfen die menschliche Gesundheit nicht gefährden, die Zusammensetzung der Lebensmittel nicht verändern

oder die organoleptischen Eigenschaften beeinträchtigen. Die Industrie und EU sind jedoch bestrebt, Richtlinien bzw. Hinweise zu entwickeln. Eine gemeinsame Expertengruppe des Europarates und der Industrie erarbeiten einen Beschluss über Druckfarben zur Verwendung auf der dem Lebensmittel abgewandten Oberfläche von Lebensmittelverpackungen [Council of Europe, 2005]. Auch die European Printing Ink association (EuPIA) entwickelte eine Leitlinie zur Auswahl von Druckfarben [EuPIA, 2008]. In der SchweizerVerordnung des Eidgenössischen Departements des Innern (EDI) über Bedarfsgegenstände sind bereits seit dem 07.März 2008 der Begriff der Verpackungstinten definiert und dafür zugelassene Stoffe geregelt [EDI, 2008].

4.5.3 Stabilitätsuntersuchungen

Genau wie im Fall der Innenbeschichtungen der Konservendosen musste auch für die Kunststoffe die Stabilität der Migrate über einen längeren Zeitraum überprüft werden. Diese Stabilitätsuntersuchung dient zur Qualitätssicherung für die anschließenden Untersuchungen im Zelltest. Neben der Stabilität sollte auch die optimale Art der Lagerung der Migrate ermittelt werden. Dazu wurde das Migrat nach DIN EN 1186 hergestellt und in folgenden drei verschieden Formen gelagert und untersucht:

a) das Migrat wurde direkt im Migrationsethanol gelagert
b) das Migrat wurde zur Trockne gebracht und trocken gelagert
c) das Migrat wurde zur Trockne gebracht, in DMSO aufgenommen und gelagert

Da primär die Migration von der Innenseite der Verpackung im Vordergrund stand, wurde auch nur für dieses Migrat die Stabilität untersucht.

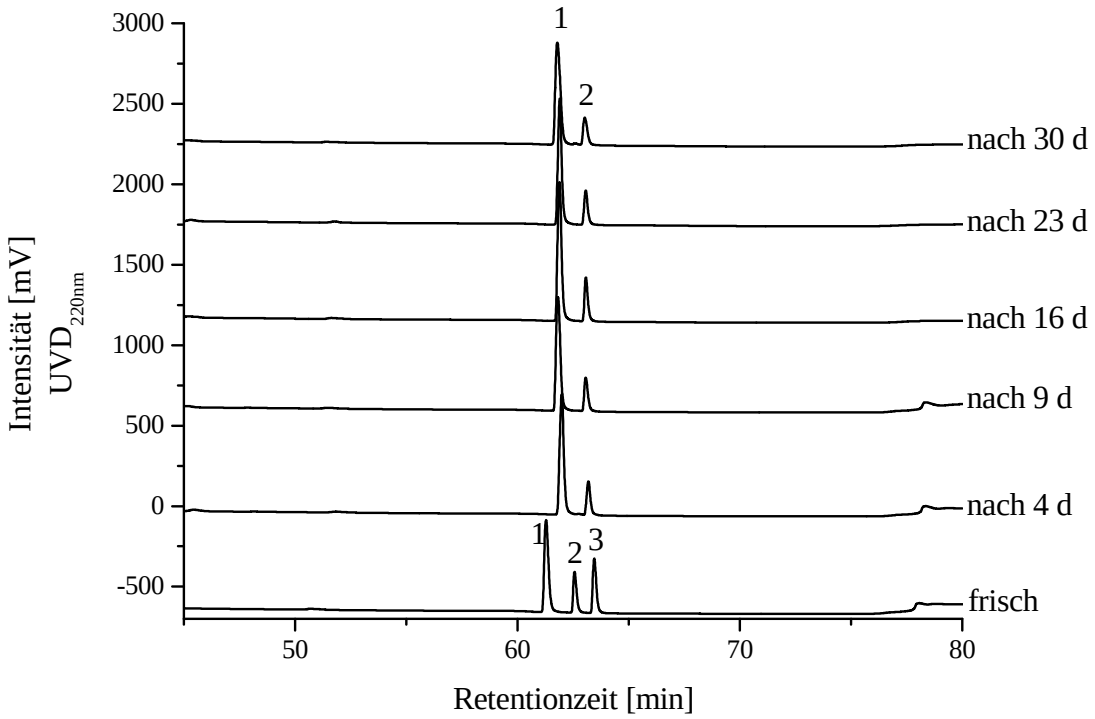


Abb. 62: RP-HPLC-UVD-Chromatogramme des 95 %-igen ethanolischen Innenseitenmigrates im Lagerungsversuch in Migrationsethanol (a) (1 oxidiertes Irgafos 168, 2 Irganox 1076, 3 Irgafos 168)(Kapitel 10.5.6)

Aus Kapitel 4.3.1 ist bereits bekannt, dass von den im Migrat identifizierten Additiven nur die Substanz Irgafos 168 während der Lagerung einer Oxidation unterliegt. Auch in dieser Untersuchungsserie unterliegt diese Substanz der Oxidation, während die anderen Substanzen innerhalb des Beobachtungszeitraums unverändert vorlagen. Bei der Lagerung direkt im 95 %-igen Ethanol konnte die Substanz Irgafos 168 nur im frisch hergestellten Migrat identifiziert werden (Peak 3 in Abb. 62). Bereits nach einer Lagerung von 4 Tagen bei ca. 4°C kam es zur vollständigen Umsetzung zum oxidierten Irgafos 168 (Peak 1 in Abb. 62).

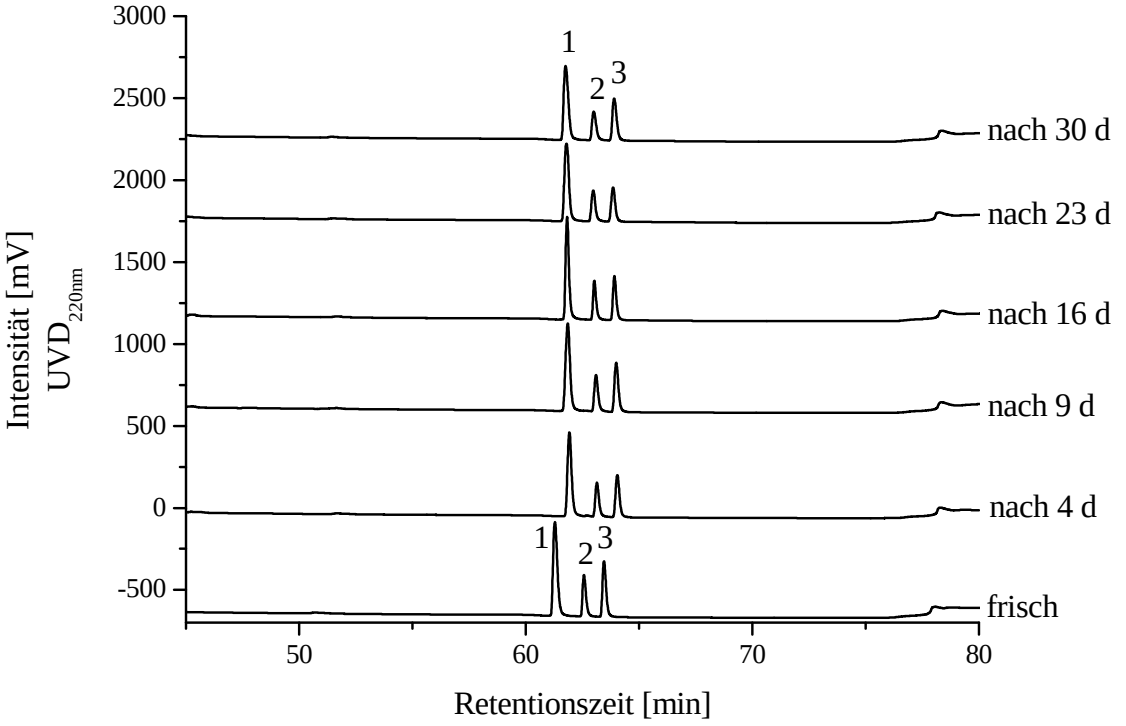


Abb. 63: RP-HPLC-UVD-Chromatogramme des 95 %-igen ethanolischen Innenseitenmigrates im Lagerungsversuch in der Trockne (b) (1 oxidiertes Irgafos 168, 2 Irganox 1076, 3 Irgafos 168)(Kapitel 10.5.6)

Bei einer Lagerung in der Trockne wurde Irgafos 168 ebenfalls oxidiert, jedoch verlief in diesem Fall die Reaktion deutlich zeitlich verzögert (Abb. 63). Auch nach einem Zeitraum von 30 Tagen wurde Irgafos 168 mit fast der gleichen Intensität detektiert wie am Tag der Herstellung. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die eigentliche Oxidation zum Zeitpunkt der Probenvorbereitung stattfindet und während der Lagerung ruht.

Auch bei der Lagerung des Migrates in DMSO fand die Oxidation des Irgafos 168 statt (Abb. 64). Schon nach einem Zeitraum von 4 Tagen konnte ein Unterschied in der Peakintensität bzw. im Peakverhältnis von Irgafos 168 (Peak 3 in Abb. 64) und oxidiertem Irgafos 168 (Peak 1 in Abb. 64) detektiert werden. Der Oxidationsprozess vollzog sich jedoch langsamer, als bei der Lagerung direkt in 95 %-igen Ethanol. Denn nach einer Untersuchungsperiode von 30 Tagen wurden im Migrat sowohl oxidiertes Irgafos 168, als auch das ursprüngliche Irgafos 168 bestimmt.

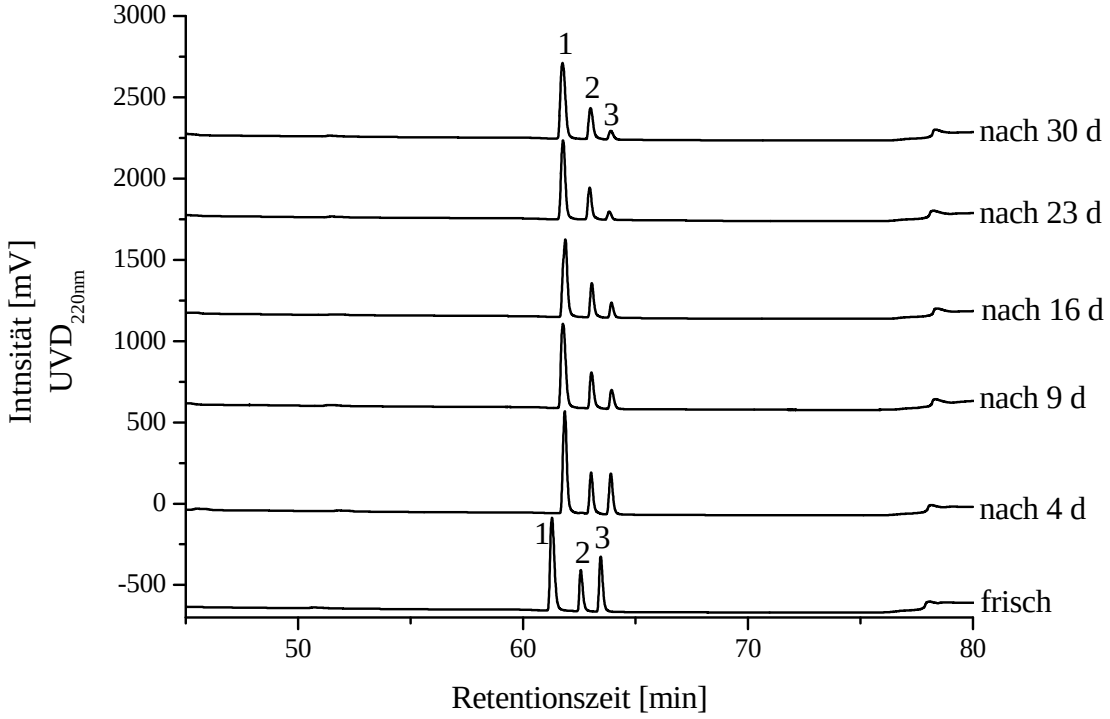


Abb. 64: RP-HPLC-UVD-Chromatogramme des 95 %-igen ethanolischen Innenseitenmigrates im Lagerungsversuch in DMSO (c) (1 oxidiertes Irgafos 168, 2 Irganox 1076, 3 Irgafos 168)(Kapitel 10.5.6)

Die Stabilität des Innenseitenmigrates zeigte eine Abhängigkeit von der Lagerungsform. Die Substanz Irgafos 168 zeigte bereits in den vorhergehenden Untersuchungen ihre Affinität zur Oxidation. Die Oxidation im Migrat trat bei allen drei Lagerungsformen auf. Dabei nahm die Geschwindigkeit von der Lagerung in der Trockne über die Lagerung in DSMO bis zur Lagerung im 95 % Ethanol stetig zu. Die Oxidation im Migrat konnte minimiert werden, in dem die Lösungsmittel Ethanol und THF nach der Migration vollständig entfernt wurden und anschließend bis zur weiteren Untersuchung in der Trockne gelagert wurde.

4.5.4 Quantifizierung der migrierenden Substanzen

Im Anschluss wurden die im 95 %-igen ethanolischen Migrat enthaltenen Substanzen mittels RP-HPLC-UVD/ELSD, RP-HPLC-UVD/CLND, RP-HPL-UVD/MSD und GC-MSD quantifiziert (Kapitel 10.5.6, Kapitel 10.5.7, Kapitel 10.5.8, Kapitel 10.5.10, Kapitel 10.5.13, Kapitel 10.5.14). Die Substanzen Butyrolacton, Triacetin und Isobutyldecylphthalat konnten aufgrund fehlender geeigneter Referenzsubstanzen nicht quantifiziert werden. Die ermittelten Konzentrationen sind in Tab. 22 für beide Seiten der Lebensmittelverpackung zusammengestellt.

Tab. 22: Gehalte der identifizierten Substanzen im Innenseiten- und Außenseitenmigrat (Irgafos-168-Äquivalente: Summe aus Irgafos 168 und oxidiertem Irgafos 168; MW ± SD, n = 3)

Substanz	$c_{Innenseitenmigrat}$ [µg/dm²]	$c_{Außenseitenmigrat}$ [µg/dm²]
Tributylacetylcitrat (TBAC)	349,6 ± 27,8	1486,8 ± 165,1
Diethylhexyladipat (DEHA)	326,9 ± 74,5	184,5 ± 41,5
Dibutylsebacat (DBS)	286,3 ± 82,0	303,2 ± 73,0
Dibutylphthalat (DBP)	3,0*	22,0*
N-Ethyltoluolsulfonamid	119,3 ± 2,2	59,3 ± 4,2
Ölsäureamid	120,1 ± 5,2	391,9 ± 7,8
Erucamid	105,6 ± 13,5	71,9 ± 8,7
Irganox 1076	51,8 ± 16,4	-
Irgafos-168-Äquivalente	153,5 ± 26,6	-

** Werte bestimmt durch Einpunktkalibrierung*

Zur Bilanzierung der Migrate wurde die Globalmigration aus beiden Seiten der Verpackung nach DIN EN 1186 bestimmt (Tab. 23). Gemäß der Richtlinie 2002/72/EG darf der Gesamtmigrationswert einen Wert von 10 mg/dm² nicht überschreiten.

Tab. 23: Gesamtmigrat der Innen- und Außenseite der Verpackung ermittelt nach DIN EN 1186

	Gesamtmigrat [mg/dm²]
Innenseite	2,57 ± 0,09
Außenseite	14,78 ± 2,76

Dieser Grenzwert ist nur für den Übergang von Stoffen aus der Lebensmittelkontaktseite in das Lebensmittel definiert, daher liegt für den Stoffübergang von der Außenseite der Ketchupverpackung keine Grenzwert Überschreitung vor.

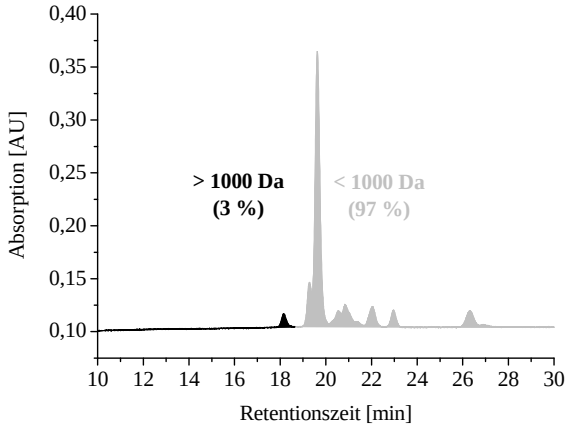


Abb. 65: Ausschnitt des SEC-DAD-Chromatogrammes des Innenseitenmigrates und die prozentualen Anteile </> 1000 Da (Kapitel 10.5.11)

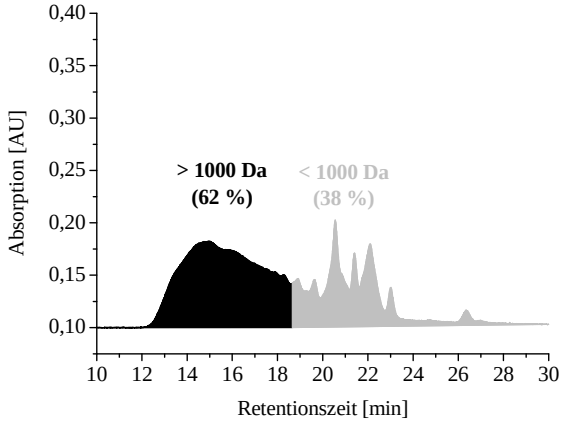


Abb. 66: Ausschnitt des SEC-DAD-Chromatogrammes des Außenseitenmigrates und die prozentualen Anteile </> 1000 Da (Kapitel 10.5.11)

Zur Abschätzung der Verteilung der Molekulargewichte der migrierenden Substanzen wurden die erhaltenen Gesamtmigrate mittels SEC-DAD-CLND/ELSD aufgetrennt. Der Betrachtungsschwerpunkt wurde auf die Fraktion kleiner 1000 Da gelegt, da wie bereits erwähnt von Molekülen dieser Größe ein toxikologisches Potential durch eine Aufnahme in den Gastrointestinaltrakt ausgeht [EFSA, 2006]. Aus den Abb. 65 und Abb. 66 ist zu entnehmen, dass sich im Innenseitenmigrat überwiegend Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner 1000 Da befinden. Das Migrat der Außenseite hingegen besteht nur zu circa 40 % aus Molekülen dieser Größe. Die Fraktion unter 1000 Da wurde in einem nächsten Schritt weiterhin unterteilt (Tab. 24).

Tab. 24: Anteile der Molekularfraktionen; ermittelt über SEC-DAD, Einheit in %

Migrat	> 1000 Da	700 – 1000 Da	400 – 700 Da	< 400 Da
Innenseite	3,3	33,1	45,1	18,5
Außenseite	62,4	6,5	12,8	18,3

Tab. 24 ist zu entnehmen, dass die migrierenden Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner 1000 Da sich in den Migraten unterschiedlich verteilen. Aus der Verpackungsinnenseite migrieren am häufigsten Substanzen mit einem Molekulargewicht zwischen 400 und 700 Da, gefolgt von den Substanzen mit dem Molekulargewicht zwischen 700 und 1000 Da und den kleiner 400 Da. Der Anteil der Substanzen mit einem Molekulargewicht < 1000 Da im Außenseitenmigrat ist im Vergleich zum Innenseitenmigrat gering. In diesem Anteil finden sich am häufigsten Substanzen mit einer Molekülgröße kleiner 400 Da.

Mit den in Tab. 22 und Tab. 23 angeführten Werten war es nun möglich, den Anteil der migrierenden Substanzen am Gesamtmigrat zu berechnen (Abb. 67, Abb. 68). Durch die Identifizierung und Quantifizierung der migrierenden Substanzen konnten für das Innenseitenmigrat fast 60 % und für das Außenseitenmigrat circa 17 % aufgeklärt werden.

Dabei war der Anteil des Weichmachers TBAC in beiden Migraten mit 13,5 % bzw. 10,0 % am größten (Abb. 67, Abb. 68, Tab. 22).

Bei der Analyse der Zusammensetzung des Außenseitenmigrates wurden nur die Hauptpeaks berücksichtigt. Durch eine vollständige Identifizierung und Quantifizierung, zum Beispiel der migrierenden Farbstoffe, würde sich der Anteil an identifizierten Substanzen deutlich erhöhen lassen.

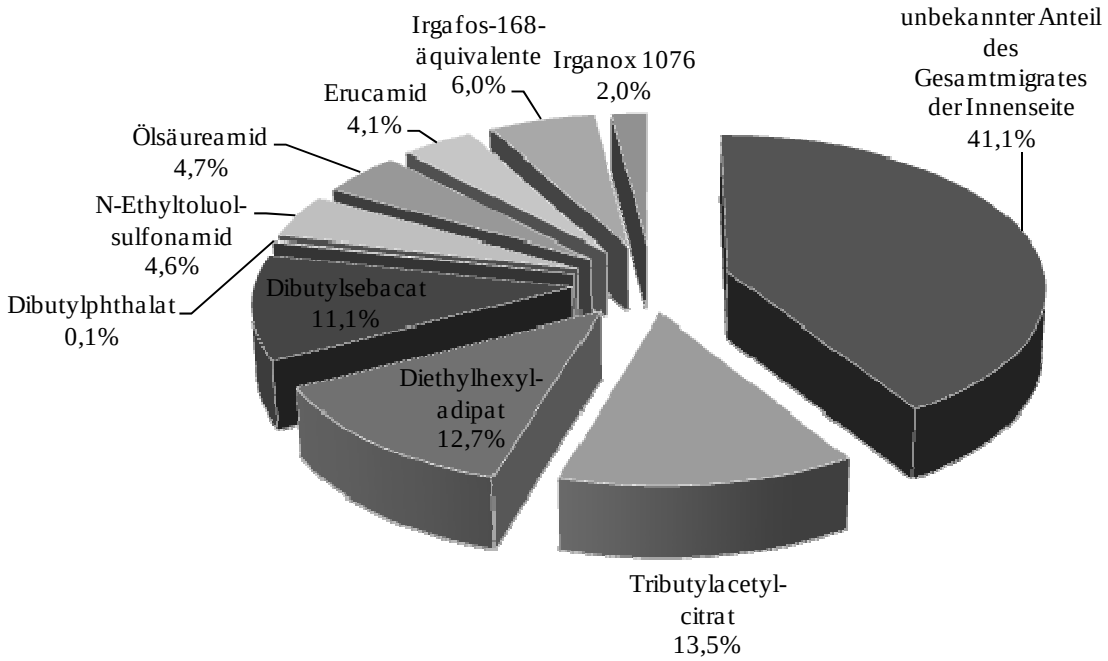


Abb. 67: Bilanzierung des 95 - igen ethanolischen Migrates der Innenseite der Ketchupbeutelfolie

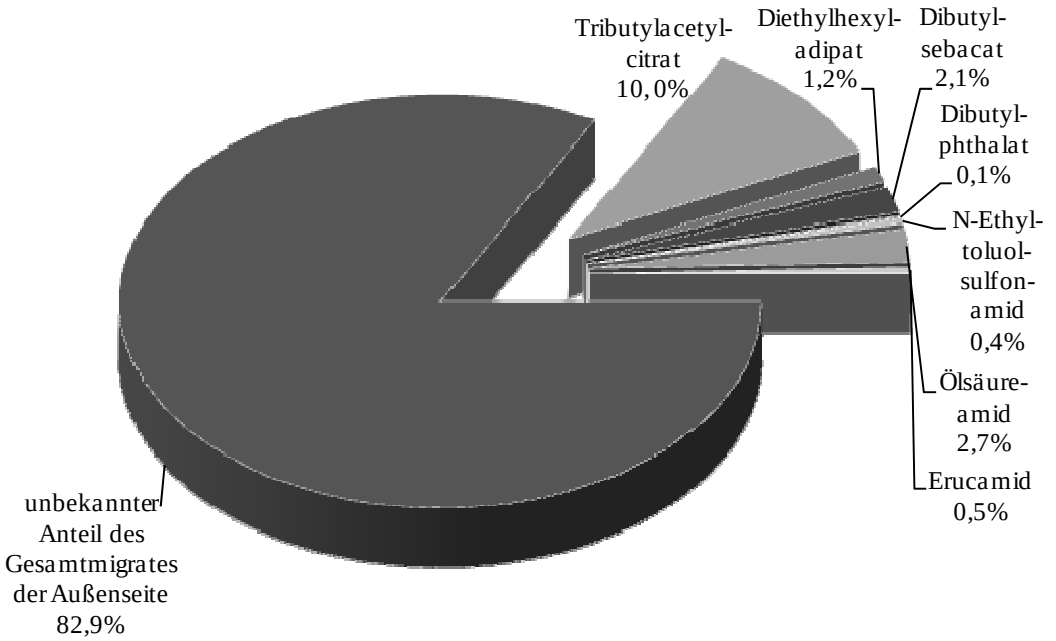


Abb. 68: Bilanzierung des 95 %- igen ethanolischen Migrates der Außenseite der Ketchupbeutelfolie

Eine mögliche Fehlerquelle bei dieser Bilanzierung besteht innerhalb der Quantifizierung der Substanzen mittels der chromatographischen Methoden. Hierzu wurden die aufgearbeiteten Proben vor der Bestimmung zur Schonung des Säulenmaterials mittels eines Membran-Filters (PA, 0,2 µm) filtriert. Die Bestimmung des Gesamtmigrat nach DIN EN 1186 sieht diese Membranfiltration nicht vor. Es ist möglich, dass so größere Moleküle (z.B. PE-Oligomere) zur Ermittlung des Gesamtmigrates beitrugen, aber durch das Filtrieren zurückgehalten wurden und somit

nicht chromatographisch detektierbar waren. Bereits Doust et al. konnte durch seine Migrationsstudien zeigen, dass PE-Oligomere durchaus in der Lage sind, aus Getränkeverpackungen zu migrieren [Doust et al., 2003].

In eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls ein Stoffübergang aus additivfreien Polyethylen in 95 % Ethanol bzw. in Isooctan beobachtet werden. Als Ausgangsstoff für diese Analysen diente das Polyethylen Mirathen A17MA der Firma Leuna-Werke AG welches für 4 h bei 60°C in 95 % Ethanol und für 2 h bei 60°C in Isooctan durch vollständiges Eintauchen extrahiert wurde [DIN EN 1186-14, 2003]. In Tab. 25 sind die ermittelten Gesamtmigrate zusammengestellt. Es konnte dabei ein deutlicher quantitativer Unterschied zwischen dem Migrat in Isooctan und 95 %-igen Ethanol bestimmt werden. Bei der Migration in Isooctan betrug das Gesamtmigrat mehr als die fünffache Menge, als bei der Migration in 95%-igen Ethanol.

Tab. 25: Gesamtmigrate ermittelt nach DIN EN 1186-14 aus additivfreien Polyethylen in 95 % Ethanol und Isooctan

	MV [mg/g]	SD [mg/g]
95 % EtOH	2,6	0,1
Isooctane	13,3	0,1

Eine weitere Fehlerquelle kann durch die Löslichkeit der Additive in unterschiedlichen Lösungsmitteln hervorgerufen wurden sein. Für die chromatographischen Quantifizierungen wurden die Migrate in DMSO gelöst aufgegeben, denn es sollte die gleiche Löslichkeit vorherrschen, wie im angewendeten Zytotoxizitätstest. Bei der gravimetrischen Bestimmung des Gesamtmigrates wurde der Rückstand zur Überführung in die tarierten Aluminiumschalen in THF gelöst. Bereits bei der Herstellung der Referenzlösungen konnte festgestellt werden, dass sich einige Referenzsubstanzen (Tinuvin 770, Uvitex OB, (oxd.) Irgafos 168, Erucamid, Tinuvin 326, Irgafos 126, Irganox 1076, Armostat 1800, Tinuvin 327) besser bzw. nur in THF lösten. Daher wurden bei der Bestimmung des Gesamtmigrates alle Substanzen und bei den chromatographischen Verfahren alle in DMSO löslichen Substanzen erfasst.

4.5.5 Bilanzierung des Gesamtmigrates

Zusätzlich zu den bereits im Zelltest untersuchten Kunststoffadditiven wurden noch die in den Migraten identifizierten Additive DBP, p-N-Ethyltoluolsulfonamid und o/p-N-Ethyltoluolsulfonamid auf ihr zytotoxikologisches Potential untersucht. Dabei riefen die

Ethyltoluolsulfonamide nur einen Effekt in der Zelllinie Hep-G2 und DBP in der Zelllinie HT-29 hervor (Tab. 26).

Tab. 26: Ergebnisse des Neutraltests für die im Migrat zusätzlich identifizierten Substanzen (MW ± SD; n = 3)

	o/p-N-Ethyltoluolsulfonamid Hep-G2 [mg/l]	p-N-Ethyltoluolsulfonamid Hep-G2 [mg/l]	DBP HT-29 [mg/l]
IC_{25}	215,1 ± 51,4	243,4 ± 113,3	39,5 ± 6,7
IC_{50}	259,0 ± 40,5	340,1 ± 119,0	46,1 ± 7,8
IC_{75}	323,9 ± 20,3	457,5 ± 73,3	54,8 ± 8,0

Für die Abschätzung der jeweiligen Anteile der Substanzen an der Toxizität des Gesamtmigrates wurden wie in Kapitel 3.6.5 die IC_{50}-Werte des Gesamtmigrates (Tab. 23) und der Einzelsubstanzen (Abb. 69) miteinander ins Verhältnis gesetzt.

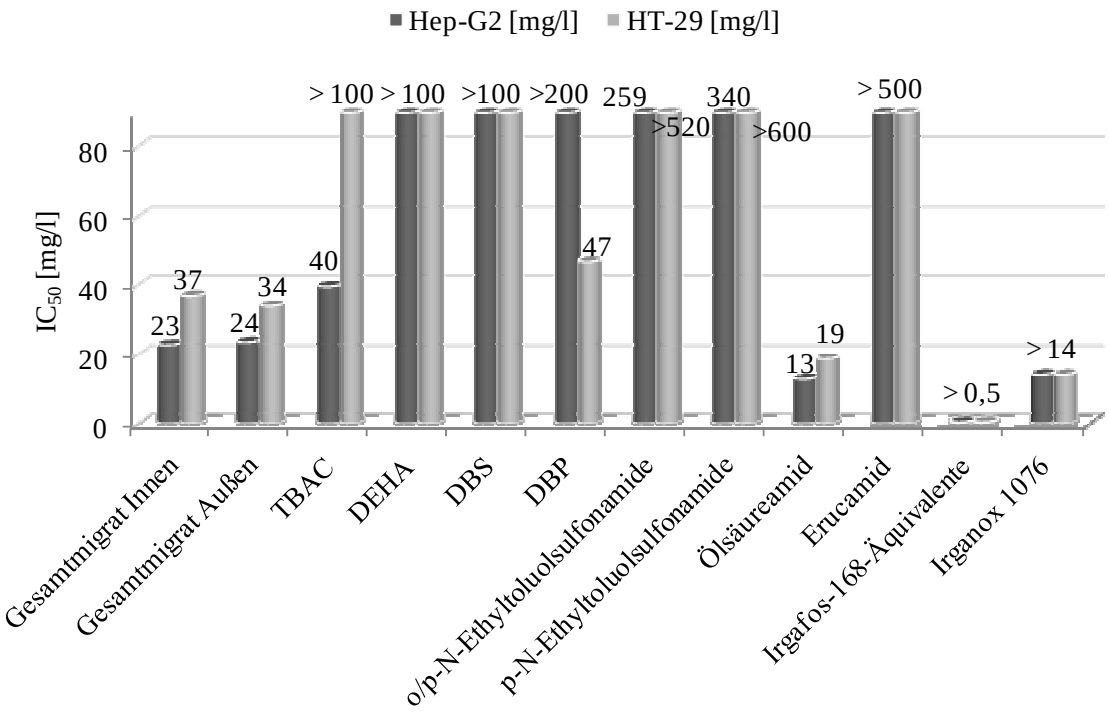


Abb. 69: Zusammenfassung der IC_{50}-Werte der in den Migraten enthaltenen Einzelsubstanzen

Mit Hilfe der ermittelten Werte konnten nun die Anteile der jeweiligen Substanzen an der Toxizität der Gesamtmigrate unter additiven Bedingungen abgeschätzt werden (Formel 5).

In Abb. 70 sind die errechneten Ergebnisse für beide Zelllinien (Hep-G2 und HT-29) sowohl für die dem Lebensmittel zugewandte Seite (Innenseite) und für die Außenseite der Verpackung zusammengestellt. Die Toxizität der Migrate konnte nur zu einem

kleinen Teil aufgeklärt werden, die Aufklärungsquote lag zwischen 5 % und 16 %. Folglich konnte für das Innenseitenmigrat ein größerer Teil im Vergleich zu den Außenseitenmigraten der Toxizität erklärt werden.

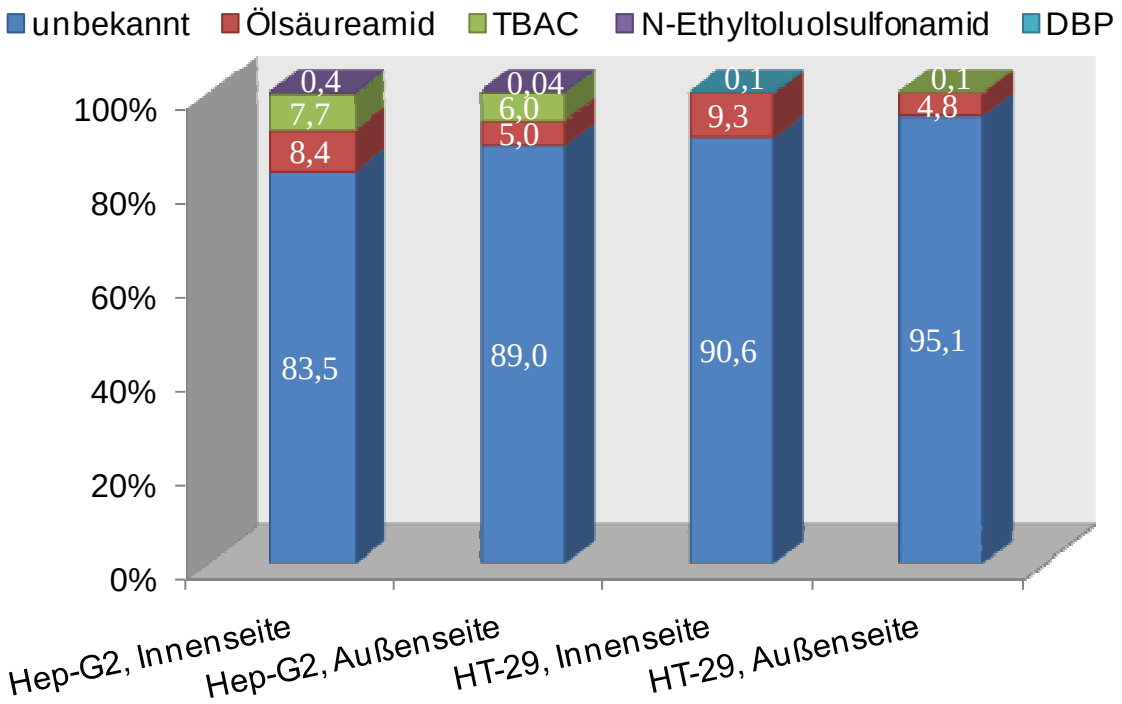


Abb. 70: Anteil der Einzelsubstanzen an der Toxizität der Gesamtmigrate unter additiven Bedingungen

Für das Innenseitenmigrat der Zelllinie Hep-G2 konnte der größte Anteil der Toxizität (16 %) des Gesamtmigrates aufgeklärt werden, dieser Anteil wurde durch die Substanzen Ölsäureamid, TBAC und N-Ethyltoluolsulfonamid ermittelt. Für die Toxizitätsermittlung innerhalb der Zelllinie HT-29 waren nur die Substanzen Ölsäureamid und DBP relevant, wobei hier die Aufklärungsquote mit 5 % bzw. 9 % noch geringer ausfiel.

5 Das Modell der Effekt-Additivität

In diesem Abschnitt soll darauf eingegangen werden, ob die Annahme der Effekt-Additivität ein geeignetes und gut gewähltes Modell für die erzielten Ergebnisse darstellt, oder ob ein anderes theoretisches Modell geeigneter erscheint.

Wie bereits erwähnt, gibt es mehrere Ansätze zur Berechnung der zu erwartenden Effekte bei der Kombination von mehreren Wirkstoffen [Berenbaum, 1985].

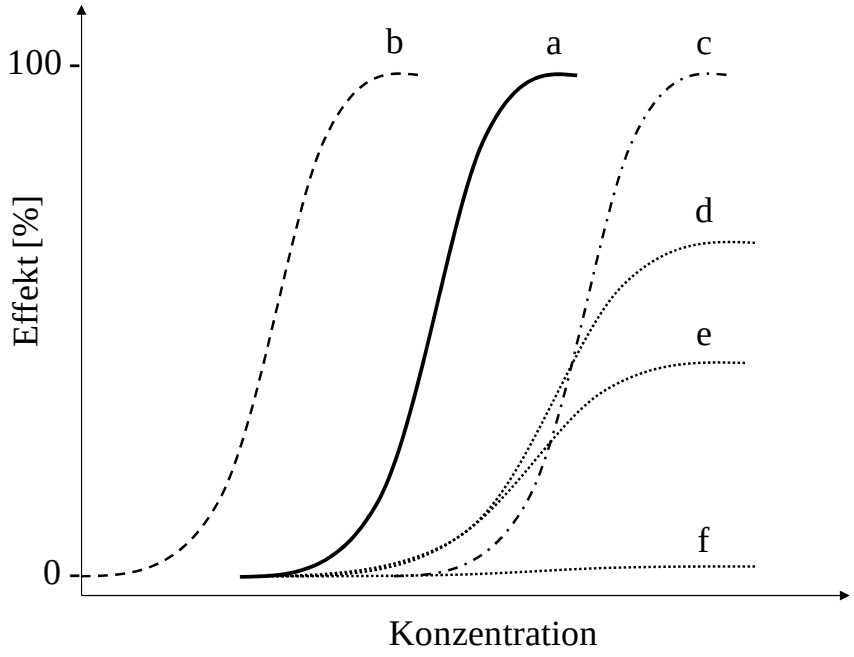


Abb. 71: Veränderung der Dosis-Wirkungsbeziehungen bei Mehrfachmedikamentation: a Wirkung der Einzelsubstanz; b additiver Effekt; c kompetitiver Antagonismus; d,e,f nichtkompetitiver Antagonist

Bei Arzneimitteln sind die Wechselwirkungen bei der Kombinationseinnahme von mehreren Medikamenten am häufigsten beschrieben. Diese allgemeingültigen Annahmen lassen sich auch auf die in der Arbeit angeführte Problematik übertragen. Substanzen können zum einem antagonistisch aufeinander einwirken, also entgegengesetzt, das bedeutet, dass die Wirkung des einen Stoffes durch die Einnahme eines weiteren Stoffes minimiert oder gehemmt wird (kompetitiver und nichtkompetitiver Antagonismus (Abb. 71)). Zum anderen ist es auch möglich, dass die Einnahme von mehreren Substanzen keine Wechselwirkungen hervorruft, da sie zum Beispiel an komplett unterschiedlichen Orten im Organismus ihre Wirkung entfalten. Aber auch Effekte mit Wechselwirkungen sind möglich. Diese Wechselwirkungen beschreiben Kombinationseffekte der einzelnen Substanzen, wobei die Kombination einen stärkeren oder schwächeren Effekt hervor ruft, als nach den Additivitätskriterien zu erwarten war. Bei einer Abschwächung des erwarteten Effektes spricht man wie

bereits genannt von einem Antagonismus, einer Sub-Additivität, einer Infra-Additivität oder einer Inhibierung. Tritt eine Verstärkung des Effektes ein so spricht man von einem Synergismus, einer Potenzierung oder einer Supra-Additivität (Abb. 72) [Marquardt und Schäfer, 2004].

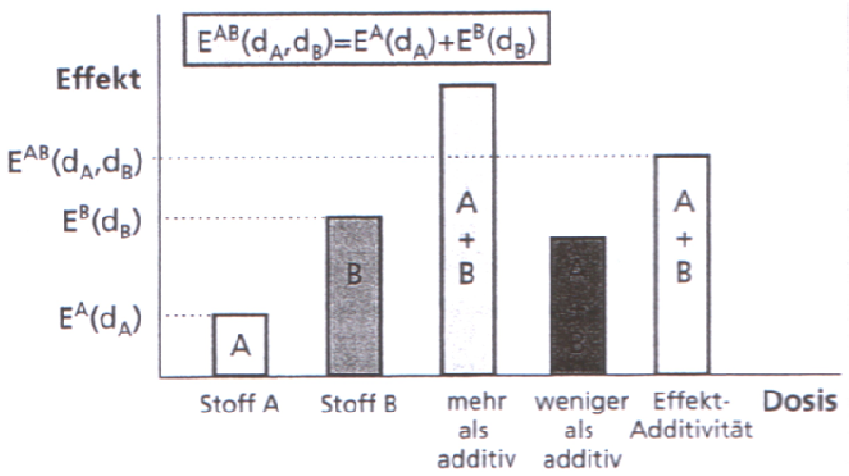


Abb. 72: Schematische Darstellung der Effekt-Additivität durch Summation der Effekte der Substanzen A und B und des synergistischen und des antagonistischen Effektes der Substanzen A und B [Marquardt und Schäfer, 2004]

Diese mathematisch theoretischen Annahmen werden in der Arzneimittelindustrie durch umfangreiche Studien überprüft, so dass das Risiko für den Patienten abschätzbar ist. In der Lebensmittelverpackungsindustrie werden solche Untersuchungen nicht durchgeführt, daher ist es erschwert zu sagen, ob es sich bei den komplexen Gemischen dieser Studie wirklich nur um reine additive Effekte handelt, oder nicht.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde versucht, für ein Substanzgemisch (BADGE, BPA, BADGE*2H_2O) den Sachverhalt detailierter zu betrachten und eine mögliche Aussage zu treffen. Die Untersuchungen erfolgten dabei an den bereits bekannten Zelllinien Hep-G2 und HT-29 im Neutralrottest.

Als Berechnungsgrundlage für die Mischungsverhältnisse dienten dafür die IC_{50}-Werte der Einzelsubstanzen von BPA und BADGE*2H_2O und deren Konzentrations-verhältnisse im Bezug auf die Substanz BADGE (≙1) am IC_{50}-Wert der jeweiligen Zelllinie (Tab. 27).

Tab. 27: IC_{50}-Werte der Einzelsubstanzen im Neutralrottest und deren Konzentrationsverhältnisse mit BADGE als Bezugsgröße

	Hep-G2		HT29	
	IC_{50} [mg/l]	**Verhältnis**	**IC_{50} [mg/l]**	**Verhältnis**
BADGE	7,0	1	11,2	1
BPA	15,1	≈ 2,2	24,3	≈ 2,2
BADGE*2H_2O	82,7	≈ 11,8	96,1	≈ 8,6

Für die Untersuchungen im Neutralrottest wurden die Mischungen aus den 3 Substanzen so gewählt, dass die jeweiligen Einzelsubstanzen in den Mengen von 110%, 100% (entspricht dem IC_{50}-Wert), 90%, 80%, 70%, 60%, 50% und 40% ausgehend von ihrem IC_{50}-Wert eingesetzt wurden (Tab. 28).

Tab. 28: Eingesetzte Konzentrationen der Substanzen BADGE, BPA und BADGE*2H_2O in den jeweiligen Mischungen ausgehend von den IC_{50}-Werten der Substanzen im Einzeltest (100 % ≙ IC_{50})

Hep-G2	**110 %**	**100 %**	**90 %**	**80 %**	**70 %**	**60 %**	**50 %**	**40 %**
BADGE [mg/l]	7,7	7,0	6,3	5,6	4,9	4,2	3,5	2,8
BPA [mg/l]	16,6	15,1	13,6	12,1	10,6	9,1	7,6	6,0
BADGE*2H_2O [mg/l]	91,0	82,7	74,4	66,2	57,9	49,6	41,4	33,1

HT-29	**110 %**	**100 %**	**90 %**	**80 %**	**70 %**	**60 %**	**50 %**	**40 %**
BADGE [mg/l]	12,3	11,2	10,1	8,9	7,8	6,7	5,6	4,5
BPA [mg/l]	26,7	24,3	21,8	19,4	17,0	14,6	12,1	9,7
BADGE*2H_2O [mg/l]	105,7	96,1	86,5	76,9	67,3	57,7	48,0	38,4

Um die Werte untereinander vergleichen zu können wurden die Kurvenverläufe der Einzelsubstanzen um den IC_{50}-Wert normalisiert. Dabei wurde jeweils der IC_{50} auf 100 mg/l gesetzt und die anderen Konzentrationen entsprechend der zuvor individuell bestimmten Boltzmann-Funktion (Abb. 15) berechnet.

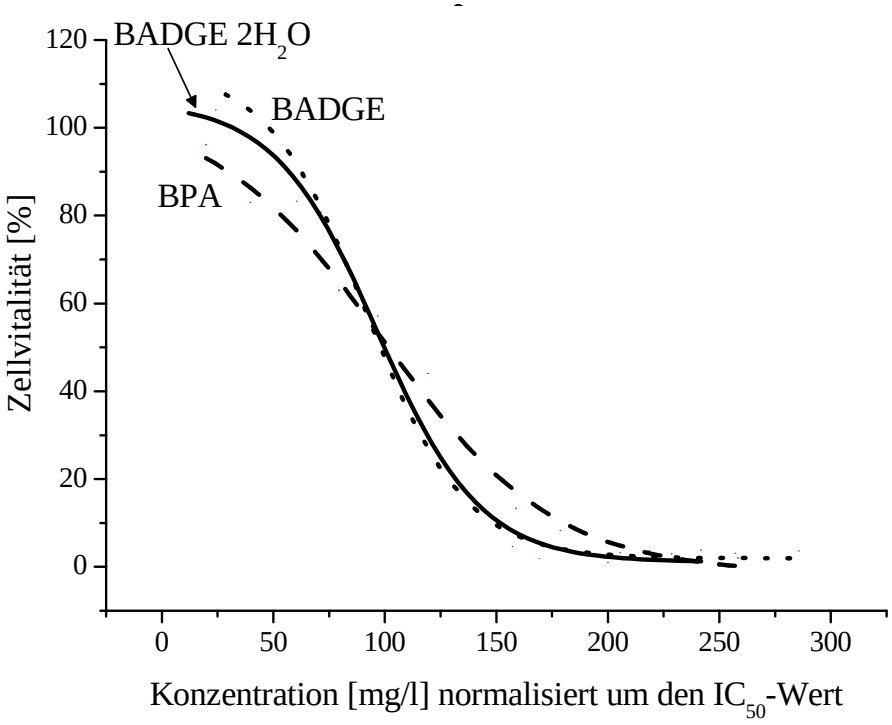


Abb. 73: Normierung der Kurvenverläufe von BADGE, BADGE*2H_2O und BPA um den IC_{50}-Wert (IC_{50} = 100 mg/l) entsprechend der für die jeweilige Substanz individuell ermittelte Boltzmann-Funktion (Abb. 15) für die Zelllinie Hep-G2

Der Abb. 73 für die Zelllinie Hep-G2 ist zu entnehmen, dass sich die einzelnen Kurvenverläufe der Substanzen sehr ähneln, besonders die Wirkungskurven für die Substanzen BADGE und BADGE*2H_2O sind fast deckungsgleich. Die Normalisierung der Wirkungskurven für die Zelllinie HT-29 sind hier nicht abgebildet, aber sie verlaufen in gleicher Weise, wie die der Zelllinie Hep-G2.

Zusätzlich wurden die IC_{25}-, IC_{50}- und IC_{75}-Werte der Einzelsubstanzen und des Substanzgemisches (Addition) verglichen, wobei wieder für den Vergleich die Normierung um den IC_{50}-Wert herangezogen wurde (Abb. 74, Abb. 75).

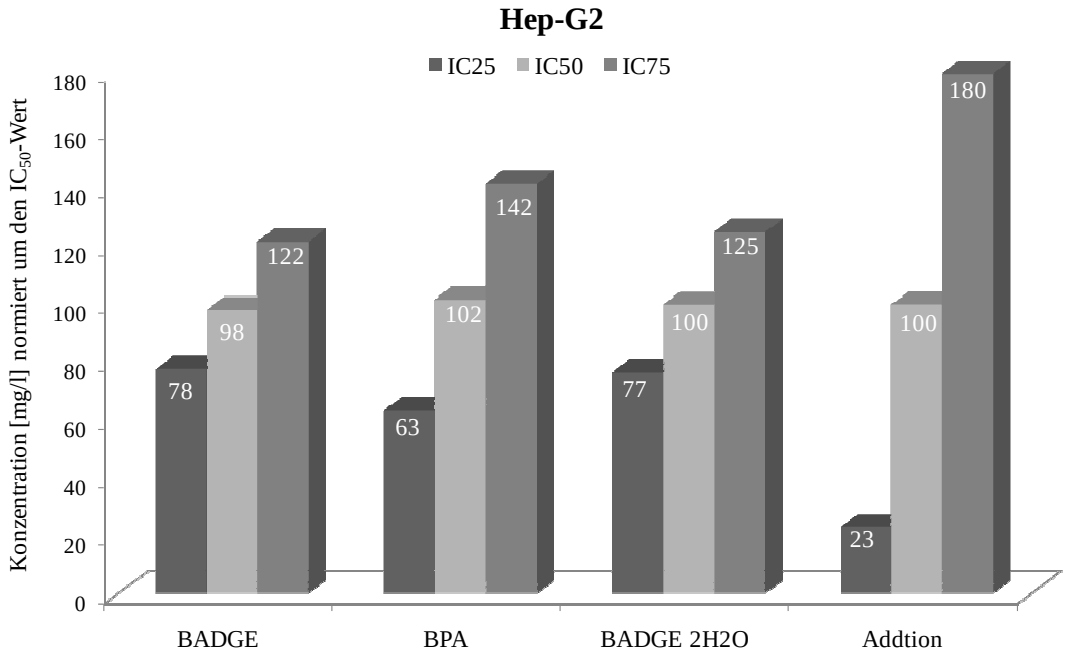


Abb. 74: Vergleich der Steilheit der Toxizität der Einzelsubstanzen und des Gemisches normiert um den IC_{50}-Wert an der Zelllinie Hep-G2 (Addition = Ergebnisse des Substanzgemisches)

Aus beiden Abbildungen (Abb. 74, Abb. 75) ist ersichtlich, dass die Anstiege der Toxizität der Einzelsubstanzen sich relativ ähnlich sind. Werden diese Substanzen jedoch in einer Mischung eingesetzt und betrachtet, verläuft der Kurvenlauf deutlich steiler und die Abstände zwischen den Inhibierungskonzentrationen (IC_{25}, IC_{50}, IC_{75}) nehmen deutlich zu.

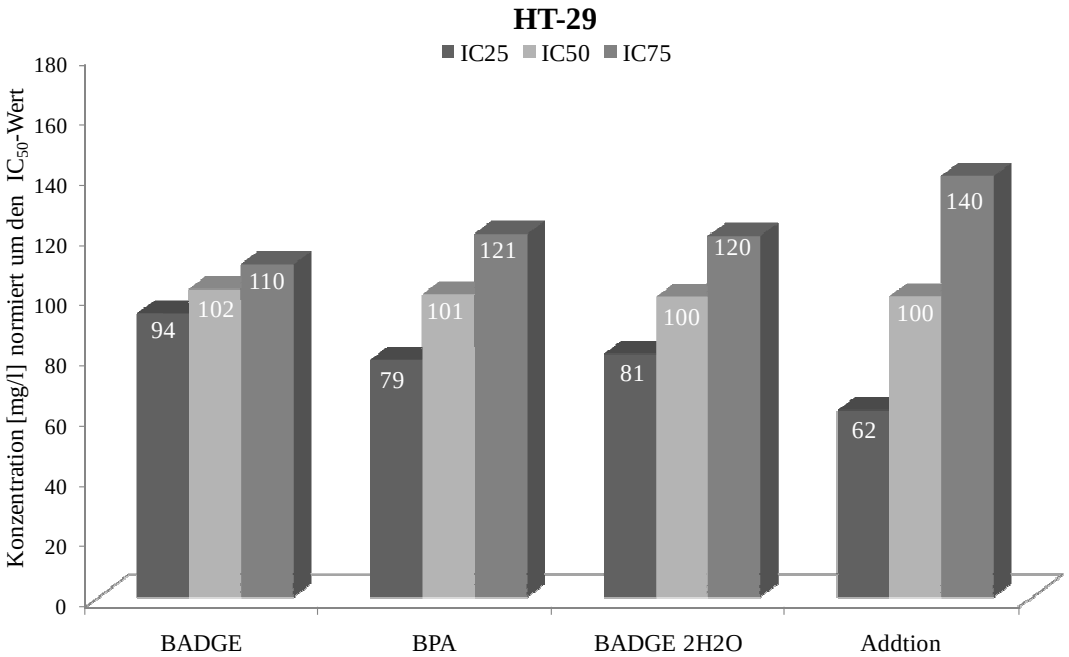


Abb. 75: Vergleich der Steilheit der Toxizität der Einzelsubstanzen und des Gemisches normiert um den IC_{50}-Wert an der Zelllinie HT-29 (Addition = Ergebnisse des Substanzgemisches)

Tab. 29: Berechnung der summierten Konzentration für den Zelltest mit dem Kombinationsansatz am Beispiel für die Zelllinie Hep-G2

eingesetzte Konzentrationen (vgl. Tab. 28) [mg/l]			normierte Konzentrationen um den IC_{50} [≙ 100 mg/l]			Summe [mg/l]	bestimmte Zellvitalität [%]
c_{BADGE}	c_{BPA}	$c_{BADGE\ 2H2O}$	N_{BADGE}	N_{BPA}	$N_{BADGE\ 2H2O}$		
2,8	6	33,1	40,00	39,74	40,02	**119,76**	**65,11**
3,5	7,5	41,3	50,00	49,67	49,94	**149,61**	**44,38**
4,2	9,1	49,7	60,00	60,26	60,10	**180,36**	**29,17**
4,9	10,6	57,9	70,00	70,20	70,01	**210,21**	**14,51**
5,6	12,1	66,1	80,00	80,13	79,93	**240,06**	**7,48**
6,3	13,6	74,3	90,00	90,07	89,84	**269,91**	**2,27**
7	15,1	82,8	100,00	100,00	100,12	**300,12**	**1,8**
7,7	16,6	91	110,00	109,93	110,04	**329,97**	**1,24**

Im Anschluss wurde abgeschätzt, ob es sich nun bei den erhaltenen Ergebnissen wirklich um eine Addition handelt oder nicht. Dazu wurden die um den IC_{50}-Wert (≙ 100 mg/l) normierten Konzentrationen der Einzelsubstanzen addiert und gegenüber der im Neutralrottest ermittelten Inhibierung des Gemisches aufgetragen (Tab. 29, Abb. 76**).**

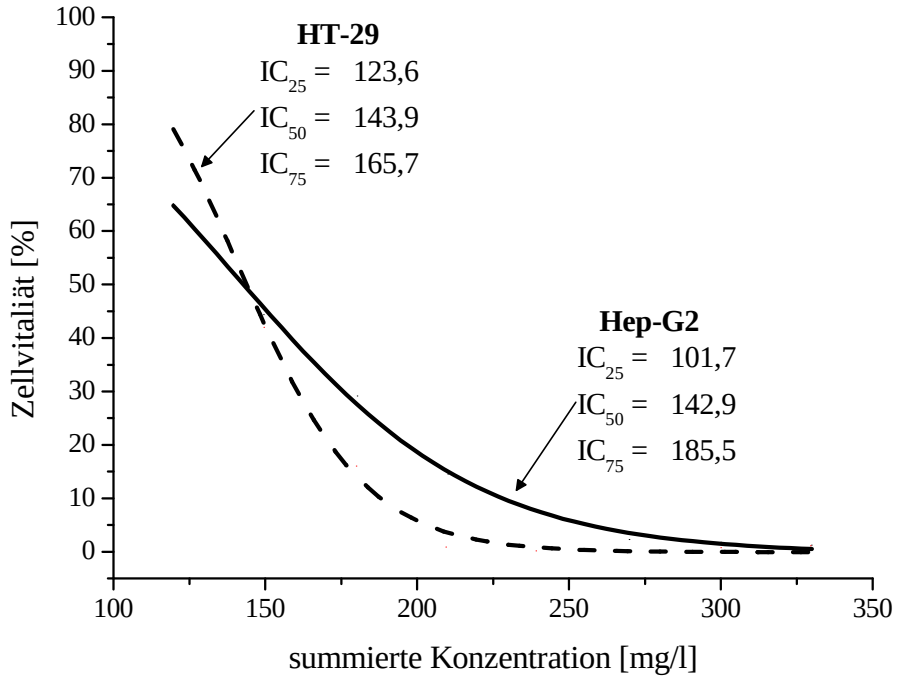


Abb. 76: Verlauf der Inhibierung der Zellvitalität im Neutralrottest bei Überprüfung eines Gemisches aus BPA, BADGE und BADGE*2H_2O (n = 3)

Im Falle einer Addition, in der sich die Substanzen gleichwertig (1+1+1) verhalten, hätte sich ein IC_{50}-Wert von 100 ergeben müssen. Diese logische Konsequenz ergab sich aus der Annahme, dass durch die Normierung alle drei Substanzen einen IC_{50}- Wert von 100 mg/l besitzen. Aus Abb. 76 war zu entnehmen, dass die IC_{50}- Werte jedoch

144 mg/l bzw. 143 mg/l betrugen. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass bei dieser Mischung nicht eine einfache Addition vorliegt, sondern ein etwas geringerer toxischer Effekt ermittelt wurde, als erwartet wurde. Nun könnte man weiterhin schlussfolgern, dass die in dieser Arbeit berechneten Toxizitätsanteile aufgrund der Additionstheorie überbewertet wurden. Mit einem geeigneteren Modell hätte wahrscheinlich ein noch geringerer Anteil der Gesamttoxizität der Migrate aufgeklärt werden können. Doch auch diese Annahme bleibt rein spekulativ, da sich nicht vorhersagen lässt, wie diese oder andere im Migrat enthaltene Substanzen in unterschiedlichen Kombinationen untereinander reagieren oder interagieren.

6 Abschließende Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Migration aus unterschiedlichen Lebensmittelverpackungsmaterialien zu untersuchen. Die migrierenden Substanzen sollten sowohl auf instrumentell-analytischem Weg identifiziert und quantifiziert als auch in einem biologischen Testsystem auf zytotoxische Effekte überprüft werden.

Es konnte gezeigt werden, dass aus unterschiedlichen Arten von Lebensmittelverpackungen Stoffe aus der Verpackung in das Lebensmittel übergehen können. Die Molekülgröße und die Menge der migrierenden Substanzen sind dabei abhängig von der Art des verpackten Lebensmittels (Kapitel 3.5). Für die beiden näher untersuchten Verpackungen wurde der sogenannte *„worst case“*, die Migration in fetthaltige Lebensmittel, gewählt. Für die untersuchte Ketchupbeutelfolie scheint diese Annahme nicht besonders geeignet, da Ketchup nur einen Fettgehalt von ca. 0,1 g/100 g (Herstellerangaben) besitzt. Vom Hersteller dieser Verpackungsfolie erhielten wir jedoch die Information, dass diese Folie sehr universell für die Verpackung von verschiedenen Lebensmitteln eingesetzt wird. So ist es vorstellbar, dass auch fetthaltige Lebensmittel, wie zum Beispiel Mayonnaise (75 g Fett/100 ml Lebensmittel, Herstellerangabe) oder „Minisalamis“ (45 g Fett/100 g Lebensmittel, Herstellerangabe) in dieser Folie verpackt werden. Für die untersuchten Konservendosen gilt ähnliches. Zwar gibt der Hersteller der Dosen dem Lebensmittelverpacker Hinweise für geeignete Produkte, man kann jedoch davon ausgehen, dass auch andere Lebensmittel in diesen Dosen verpackt werden.

Die erhaltenen Gesamtmigrate lagen bei beiden Verpackungen für die dem Lebensmittel zugewandte Seite unterhalb des gesetzlichen Grenzwertes von 10 mg/dm^2 [BedGgstV, 2007]. Bei einem Vergleich der chromatographischen Muster der Proben ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Im Migrat der Kunststoffverpackung gelang es den Großteil der detektierbaren Peaks eindeutig zu identifizieren und zu quantifizieren (Abb. 55). Das Migrat des EP-AH-Coatings zeichnete sich durch eine enorme Peakvielfalt aus (Abb. 23), wobei keine der gesetzlich geregelten Substanzen eine Leitsubstanz darstellte. Daher war es in diesem Fall besonders sinnvoll auf eine Fraktionierung zur weiteren spezifischen Untersuchung des Gesamtmigrates zurückzugreifen. Dieses Verfahren in Kombination mit biologischen Testbatterien wird besonders häufig in der Umweltanalytik bei Gewässerproben eingesetzt [Böhmler et al.,

2006; Brack, 2006]. Durch diese Methode war es möglich, die Substanz Cyclo-diBADGE als eine Substanz mit toxikologischem Potential zu identifizieren.

Vergleicht man die erzielten Ergebnisse für die 95%-igen ethanolischen Migrate des EP-AH-Coatings mit denen des Migrates der Ketchupbeutelverpackung, so ist festzustellen, dass die Aufklärungsrate für die migrierenden Substanzen des Gesamtmigrates für die Ketchupverpackung deutlich höher lag. Dieser Unterschied kann damit begründet werden, dass von der Vielzahl der migrierenden Peaks des EP-AH-Coatings nur die gesetzlich geregelten Substanzen und die Substanz Cyclo-diBADGE identifiziert und quantifiziert wurden [VO (EG) Nr. 1895/2005]. Schaefer und Simat untersuchten ebenfalls die Migration aus EP-AH-Coatings in Acetonitril [Schaefer und Simat, 2004]. In den Migraten identifizierten sie BADGE und 18 verschiedene BADGE-Derivate, welche alle ein Molekulargewicht von kleiner 1000 Da besitzen. Von diesen 19 migrierenden und potentiell absorbierbaren Substanzen unterlagen nur BADGE, BADGE*H_2O und BADGE*$2H_2O$ der gesetzlichen Regulierung [EFSA, 2006; VO (EG) Nr. 1895/2005]. In den von Schaefer und Simat hergestellten Migraten wurde ebenfalls die Substanz Cyclo-diBADGE identifiziert, welche auch da eine Leitsubstanz darstellte (vgl. Kapitel 3.6.3) [Schaefer und Simat, 2004].

Für die dem Lebensmittel zugewandte Seite der Ketchupbeutelverpackung wurden 60 % des Gesamtmigrates durch die migrierenden Kunststoffadditive und 17 % der Außenseite aufgeklärt. Ebenfalls wurde für die migrierenden Kunststoffadditive nicht für jede Substanz ein Grenzwert festgelegt (Kapitel 10.1.3), obwohl auch diese Substanzen alle ein Molekulargewicht von kleiner als 1000 Da aufweisen. Problematisch erscheint dabei die Bestimmung von Antioxidantien, die gemäß ihrer Aufgabe im Kunststoff, bereits während der Lagerung und auch der Probenvorbereitung Oxidationsreaktionen unterliegen. Die untersuchte Ketchupbeutelfolie enthielt Irgafos 168, welches sich zu oxidiertem Irgafos abbaute (Abb. 62). Bei der Analytik von migrierenden Substanzen muss demnach nicht nur eine Berücksichtigung der ursprünglich eingesetzten Substanzen erfolgen, sondern auch eventuell entstehende Reaktionsprodukte, die während der Herstellung bzw. Lagerung der Verpackungsprodukte entstehen, müssen für eine vollständige Bewertung mit beachtet werden.

Zur Untersuchung der Migrate und Einzelsubstanzen im biologischen Testsystem wurde der Neutralrottest, ein Zytotoxizitätstest, der toxische Wirkungen von Substanzen auf die Zellmembran nachweisen kann, gewählt. Mit nur einem Zytotoxizitätstest ist jedoch keine umfassende toxikologische Beurteilung von Substanzen und Substanzgemischen in den erhaltenen Migraten möglich. Dies war auch nicht Ziel dieser Arbeit, es sollte vielmehr gezeigt werden, dass für die Bewertung von Migraten aus Lebensmittelverpackungen eine Kombination von unterschiedlichen Untersuchungsmethoden sinnvoll ist um alle Aspekte für einen gewissenhaften Verbraucherschutz berücksichtigen können. Das *BIOSAFEPAPER*-Projekt der Europäischen Union machte auch am Beispiel der Migration aus Papier und Pappe diesen Aspekt, der Kombination der Methoden sehr deutlich [Bradley et al., 2008; Ozaki et al., 2005; Severin et al. 2005]. In diesem Projekt wurden 20 verschiedene Papiere und Pappen untersucht, welche mit kaltem oder heißem Wasser, Tenax oder 95 %-igem Ethanol extrahiert wurden. In den wässrigen Migraten fanden sich hauptsächlich natürliche Bestandteile des Holzes. Mittels GC-MSD-Analytik wurden von den Wissenschaftlern in den ethanolischen Migraten Diisopropylnaphthalen, Alkane und Phthalsäureester nachgewiesen. Die erhaltenen Migrate wurden dann ebenfalls im Anschluss in einer Batterie von Toxizitätstests auf akute *(Zytotoxizitätstest an HEp-2 (humane Gebärmutterhalskrebszelllinie) und Hepa-1c1c7 (Mausleberkrebszelllinie))* und subletale Toxizität *(RNA-Synthese-Assay an Hep-G2 und HeLa (humane Gebärmutterhalskrebszelllinie) und Überprüfung der Beweglichkeit von Eberspermien)* und Genotoxizität *(Ames-Test, Comet-Assay an Hep-G2)* untersucht. Nur in den Migraten des 95 %-igen Ethanols wurden zytotoxische Effekte bestimmt. Abhängig von der Art des Testsystems und der gewählten Testspezies (Zellkultur, Bakterienkultur, Spermien) wurden für die Migrate unterschiedliche Ergebnisse erzielt [Bradley, 2008]. Hier lag auch ein Schwachpunkt des EU-Konzeptes, denn es wurden nicht konsequent für alle Zellkulturversuche die gleichen Zelllinien verwendet. Dies machte eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Testsysteme untereinander fast unmöglich. Daher ist auch mit dieser umfangreichen Testbatterie keine ausführliche Bewertung des toxikologischen Potentials der Migrate möglich. Zumindest eine Eingrenzung bzw. partielle Abschätzung konnte in den jeweiligen gewählten Testsystemen mit den entsprechenden Endpunkten getroffen werden.

Wie bereits erwähnt können verschiedene Arten von Zellkulturen für diese Tests eingesetzt werden (Kapitel 2.2.3). Jede Zellkultur zeichnet sich jedoch durch ihre individuellen Eigenschaften aus. Es wäre daher sinnvoll sich auf eine Testbatterie festzulegen und dann in jedem Test die gleichen Zelllinien zu verwenden um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Auch bei der Auswahl einer Testbatterie ist es wichtig ein weites Spektrum zu wählen und so viel Endpunkte wie möglich abzudecken (Kapitel 2.2).

In der vorgestellten Arbeit wurden die erhaltenen Migrate, die Fraktionen des Gesamtmigrates und die vorhandenen Einzelsubstanzen im Neutralrottest an zwei Zelllinien (Hep-G2 und HT-29) in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Diese beiden Zelllinien wurden gezielt ausgesucht um ein möglichst realistisches Modell für die unterschiedlichen Stationen der Absorption im Gastrointestinaltrakt und die anschließende Metabolisierung der Lebensmittel in der Leber zu simulieren. Dieses Modell konnte dabei nur als Annäherung betrachtet werden, da die verwendeten Zelllinien, aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften, sich nicht exakt wie humane Leber- oder Darmzelllinien verhalten [Blais et al., 1997; Babich et al., 1988; Wilkening et al., 2003].

Es wurde beobachtet, dass die humane Leberkarzinomzelllinie (Hep-G2) in den meisten Fällen sensitiver reagierte als die humane Kolonkrebszelllinie (HT-29). Dieses Phänomen ist wahrscheinlich auf die höhere metabolische Aktivität der Hep-G2-Zellen zurückzuführen. [Wilkening et al., 2003; Dawson et al.,1995].

Für die Bewertung des zytotoxikologischen Anteils der Einzelsubstanzen am zytotoxikologischen Potential des Gesamtmigrates wurde das Konzept der additiven Effekte angenommen. Eine vollständige Aufklärung der Toxizität des Gesamtmigrates war für beide Proben nach diesem Verfahren jedoch nicht möglich. In Kapitel 5 wurde bereits gezeigt, dass es relativ schwierig ist ein geeignetes System für die Erklärung des zytotoxischen Effekts von Substanzmischungen zu finden. In Mischungen kann es auch zu Verstärkungen bzw. Abschwächungen des Effektes im Vergleich zur additiven Annahme kommen. Eine Möglichkeit zur vollständigen Aufklärung des Anteils der Einzelsubstanzen an der Gesamttoxizität des Migrates könnte darin bestehen, alle migrierenden Substanzen eindeutig zu identifizieren und zu quantifizieren. Mit den erhaltenen Informationen sollte es dann möglich sein ein Gemisch analog zum

Gesamtmigrat herzustellen und im biologischen Testsystem zu untersuchen. Im idealen Fall sollte das Gemisch die Zytotoxizität des Gesamtmigrates widerspiegeln. In einem nächsten Schritt würde man dann das Gemisch so herstellen, dass eine Substanz nicht mit beigefügt wird und wieder das toxikologische Potential bestimmen. So würde man ermitteln können, ob die aus dem Gemisch herausgenommene Substanz einen Einfluss auf das Gesamtmigrat ausübt. Bei einem Gemisch mit wenigen Substanzen scheint diese Strategie realisierbar zu sein, doch bei komplexen Gemischen, wie es im Fall des Migrates aus dem EP-AH-Coatings der Fall ist, ist dieses Verfahren nicht durchführbar. Ein weiter wichtiger Aspekt für die positive Umsetzung dieser Strategie ist das Vorhandensein aller Einzelsubstanzen, dies bedeutet unter Umständen auch die zusätzliche Synthese von Reaktionsprodukten.

7 Zusammenfassung

Der Stoffübergang von Verpackungsbestandteilen auf Lebensmitteln ist ein generelles und aktuelles Thema, da speziell im Gebiet der Bedarfsgegenstände noch Bedarf in der gesetzlichen Regulierung besteht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Lebensmittelverpackungen auf ihr Migrationsverhalten zu untersuchen. Dabei sollten nicht nur die in 95 %-igem Ethanol (4h, 60°C) migrierenden Bestandteile identifiziert und quantifiziert werden, sondern auch deren toxikologisches Potential im Neutralrottest (Zelllinien: Hep-G2, HT-29) untersucht werden. Für detaillierte Untersuchungen wurden 2 Verpackungen, eine Konservendoseninnenbeschichtung (EP-AH-Coating) und eine Verpackungsfolie für Ketchup-Einzelportionspackungen, sowie die dazugehörigen Standardsubstanzen ausgewählt.

Im Migrat des untersuchten Epoxyanhydrid-Coating wurden die gesetzlich geregelten Substanzen BADGE, BADGE*2H_2O und BPA identifiziert und quantifiziert, deren Anteil an der Toxizität des Gesamtmigrates war mit circa 0,5 % sehr gering. Zur weiteren Aufklärung der Gesamttoxizität wurde das Migrat in vier Fraktionen (< 400 Da, 400-700 Da, 700-1000 Da, > 1000 Da) eingeteilt. Es wurde gezeigt, dass eine Fraktionierung des Migrates keinen Verlust des zytotoxikologischen Potentials auslöste. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Fraktionen < 400 Da und > 1000 Da keinen zytotoxischen Effekt hervorriefen, im Gegensatz zu den Fraktionen zwischen 400-700 Da und 700-1000 Da, wobei die Fraktion 400-700 Da das höchste Potential besaß. Die Effekte der einzelnen Fraktionen lagen aber unter den bestimmten zytotoxikologischen Effekten im Gesamtmigrat. Bei der Untersuchung der gesammelten Fraktion 400-1000 Da konnte festgestellt werden, dass sich das zytotoxikologische Potential im Gegensatz zum Gesamtmigrat erhöht hat. Dies lässt auf Wechselwirkungen zwischen den Molekülen der einzelnen Fraktionen schließen, wobei offensichtlich die Substanzen < 400 Da und > 1000 Da eine inhibierende Wirkung auslösten.
Neben den genannten gesetzlich geregelten Substanzen wurde die Substanz Cyclo-diBADGE als Leitsubstanz für die Fraktion 400-700 Da identifiziert, quantifiziert und im Zelltest untersucht. Durch diese vier Substanzen konnten nun 18 % (Hep-G2) bzw. 22 % (HT-29) der Gesamttoxizität des Gesamtmigrates unter der Annahme von additiven Effekten aufgeklärt werden.

Für die Ketchupverpackung konnte der Aufbau der einzelnen Schichten aufgeklärt werden. Von der lebensmittelzugewandten Seite konnten 60 % des Gesamtmigrates durch migrierende Kunststoffadditive und 17 % von der Außenseite aufgeklärt werden. Ein Problem stellte dabei das Antioxidans Irgafos 168 dar, welches sich während der Probenvorbereitung und der Probenlagerung zu seinem Oxidationsprodukt umwandelte und somit als Summenparameter bestimmt wurde. Die anderen migrierenden Substanzen lagen nach der Probenvorbereitung und Lagerung der Probe unverändert vor.

97 % der migrierenden Substanzen aus der Innenseite der Verpackung und 38 % aus der Außenseite besaßen ein Molekulargewicht < 1000 Da und waren somit toxikologisch relevant.

Im Migrat der lebensmittelzugewandten Seite wurden die Substanzen TBAC, DEHA, DBP, N-Ethyltoluolsulfonamid, Ölsäureamid, Erucamid, Irgafos-168-Äquivalente und Irganox 1076 identifiziert und quantifiziert. Diese Substanzen stellten 58,9 % des Gesamtmigrates dar. Das Migrat der Außenseite konnte nur zu 17,1 % durch die Substanzen TBAC, DEHA, DBS, DBP, N-Ethyltoluolsulfonamid, Ölsäureamid und Erucamid aufgeklärt werden.

Von den in den Migraten der Kunststofffolie identifizierten Substanzen konnte nur für TBAC, DBP, N-Ethyltoluolsulfonamid und Ölsäureamid ein IC_{50}-Wert im Neutralrottest ermittelt werden. In Abhängigkeit der untersuchten Zelllinie wurde ebenfalls für die genannten vier Substanzen der Anteil an der Toxizität des Gesamtmigrates unter Annahme, dass additive Effekte vorherrschen abgeschätzt. Dementsprechend konnte für die dem lebensmittelzugewandte Seite 16 % (Hep-G2) bzw. 9 % (HT-29) und für das Migrat der Außenseite 11 % (Hep-G2) bzw. 5 % (HT-29) der Gesamttoxizität aufgeklärt werden.

8 Ausblick

Für die weitere Aufklärung des toxikologischen Effektes des 95 %-igen ethanolischen Migrates des Epoxyanhydrid-Coatings ist es von Bedeutung die Vielzahl der Peaks in den Chromatogrammen (Abb. 27) zu identifizieren, deren Gehalt zu quantifizieren und zytotoxikologisches Potential im Neutralrottest zu untersuchen. Dabei sollte der Fokus auf Substanzen mit einem Molekulargewicht < 1000 Da gerichtet werden.

Auch für die untersuchte Ketchupbeutelverpackung gilt es die noch nicht aufgeklärten Peaks zu identifizieren und zu quantifizieren.
Weiterhin sollte der Anteil an Polyethylen speziell im Migrat der Innenseite bestimmt und auch dieses im Neutralrottest untersucht werden. Zu dieser Quantifizierung könnte man einen Vergleich zu dem bereits bestimmten gravimetrischen Gesamtmigrat mit einem Gesamtmigrat, welches membranfiltriert (PA, 0,4 µm) wurde, heranziehen. Weiterhin würde es sich empfehlen die im Migrat bestimmten Substanzen in den bestimmten Mengenverhältnissen zu mischen und diese Mischung, analog zum Gesamtmigrat, im Zelltest zu untersuchen und zu überprüfen, ob die gleichen zytotoxischen Effekte hervorgerufen werden.
Für das Migrat der Außenseite würde sich eine weitere Untersuchung bezüglich der verwendeten Druckfarben anbieten. Dazu wäre aber eine unbedruckte Verpackungsfolie mit exakt dem gleichen Schichtaufbau notwendig.

9 Literaturverzeichnis

Aden, D.P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B.B.:

Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. In: Nature. 282(1979), 615-616.

Ahlhaus, O.:

Verpackung mit Kunststoffen. München, Wien: Carl Hanser Verlag 1997.

Alexowsky, M.: Zytotoxikologische Untersuchungen von Migraten aus Lebensmittelverpackungen. Wissenschaftliche Abschlussarbeit (2007)

Ames, B.N.; McCann, J.; Yamasaki, E.:

Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. In: Mutation Research 31 (1975), 347-363.

Babich H.; Borenfreund, E.:

Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. In: Appl. Environ. Microbiol. 57 (1991), 2101-2103.

Babich, H.; Sardana, M.K.; Borenfreund, E.:

Acute cytotoxicities of polynuclear aromatic hydrocarbons determined in vitro with the human liver tumor cell line, Hep-G2. In: Cell Biol Toxicol.4 (1988), 295-309.

BedGgstV

(idF v 23.12.1997), BGBl. 1998 I S. 5, zuletzt geändert durch Artikel 13 der Verordnung vom 08. 08.2007, BGBl. I S. 1816.

Berenbaum, M. C.:

The Expected Effect of a Combination of Agents: the General Solution. In: J. theor Biol. 114 (1985), 413-431.

Berger, U.; Oehme, M.; Girardin, L.:

Quantification of derivatives of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and novolac glycidyl ether (NOGE) migrated from can coatings into tuna by HPLC/fluorescence and MS detection. In: Fresenius J Anal Chem. 369 (2001), 115-123.

Bergmaier, J.; Washüttl, M.; Wepner, B.:

Prüfpraxis für Kunststoffverpackungen. 1. Auflage, Hamburg: Behr´s Verlag 2004.

Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D.; Wang, R.:

The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. In: Biochemica 4(1996), 14-19.

Bickel, M.H.:

The pharmacology and biochemistry of N-oxides. In: Pharmacol Rev. 21 (1969), 325-355.

Bieber, W. D.; Freytag, W.; Figge, K.; vom Bruck, C. G.; Rossi, L.:

Transfer of additives from plastics materials into foodstuffs and into food simulants - a comparison. In: Food Chem Toxicol. 22(1984), 737-742.

Biedermann, M.; Grob, K.:

Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: analysis by gradient NPLC. In: Food Addit Contam. 15 (1998), 609-618.

Binderup, M.L.; Pedersen, G.A.; Vinggaard, A.M.; Rasmussen, E.S.; Rosenquist, H.; Cederberg, T.:

Toxicity testing and chemical analyses of recycled fibre-based paper for food contact. In: Food Addit Contam. 19 (2002), 13-28.

Bjarnason, I.; Macpherson, A.; Hollander, D.:
Intestinal Permeability: An Overview. In: Gastroenterology 108 (1995), 1566-1581.

Blais, A.; Aymard, P.; Lacour, B.:
Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. In: Pflugers Arch. 434 (1997), 300-305.

Blogg, C.E.:
Halothane and the liver: the problem revisited and made obsolete. In: BMJ. 292 (1986), 1691-1692.

Boger, D.L.; Patterson, J.E.; Guan, X.; Cravatt, B.F.; Lerner, R.A.; Gilula, N.B.:
Chemical requirements for inhibition of gap junction communication by the biologically active lipid oleamide. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 95 (1998), 4810-4815.

Böhmler, G.; Brack, W.; Gareis, M.; Goerlich, R.:
Von der Wirkung zur Substanz: Wirkungsbezogene Analytik als neue Untersuchungsstrategie in der Lebensmittelkontrolle. In: J.Verbr.Lebensm. 1(2006), 294-300.

Borenfreund, E.; Babich, H.:
In vitro cytotoxicity of heavy metals, acrylamide, and organotin salts to neural cells and fibroblasts. In: Cell Biol Toxicol. 3(1987), 63-73.

Borenfreund, E.; Babich, H.:
The Neutral Red Cytotoxicity Assay. (1992) IP 64, ECVAM SIS

Borenfreund, E.; Puerner, J.A.:
A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR90). In: J Tissue Cult Meth. 9 (1984), 7-9.

Borenfreund, E.; Puerner, J.A.:
Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. In: Toxicol Lett. 24 (1985), 119-124.

Brack, W.:
Wirkungsorientierte Analytik komplexer Mischungen – Erfahrungen aus der Umwelt- und Ökotoxikologie für die Lebensmitteluntersuchung. In: J.Verbr.Lebensm. 1(2006), 301-309.

Bradley, E.L.; Honkalampi-Hämäläinen, U.; Weber, A.; Andersson, M.A.; Bertaud, F.; Castle, L.; Dahlman, O.; Hakulinen, P.; Hoornstra, D.; Lhuguenot, J.-C.; Mäki-Paakkanen, J.; Salkinoja-Salonen, M.; Speck, D.R.; Severin, I.; Stammati, A.; Turco, L.; Zucco, F.; von Wright, A.:
The BIOSAFEPAPER project for in vitro toxicity assessments: Preparation, detailed chemical characterisation and testing of extracs from paper and board samples. In: Food Chem Toxicol. 46(2008), 2498-509

Braun, D.:
Erkennen von Kunststoffen: qualitative Kunststoffanalyse mit einfachen Mitteln. 3. Auflage, München: Carl Hanser Verlag 1998.

Braun, R.; Fuhrmann, G.F.; Legrum, W.; Steffen, C.:
Spezielle Toxikologie für Chemiker: Eine Auswahl toxischer Substanzen. 1. Auflage, Stuttgart, Leipzig: Teubner Studienbücher 1999.

Brock, T. Groteklaes, M.; Miscke, P.; Zorll, U. (Hrsg.):
Lehrbuch der Lacktechnologie. Hannover: Curt R. Vincentz Verlag Hannover 1998.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR 2005a):
Übergang von Weichmachern aus Schraubdeckel-Dichtmassen in Lebensmittel, Stellungnahme Nr. 010/2005 des BfR vom 14. Februar 2005. URL: http://www.bfr.bund.de/cm/216/uebergang_von_weichmachern_aus_schraubdeckel_dichtmassen_in_lebensmittel.pdf-Download vom 05.03.2008

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR 2005b):
Übergang von Phthalaten aus Twist off-Deckeln in Lebensmittel, Gesundheitliche Bewertung Nr. 042/2005 des BfR vom 11. Oktober 2005. URL: http://www.bfr.bund.de/cm/208/uebergang_von_phtalaten_aus_twist_off_deckeln_in_lebensmit.pdf-Download vom 05.03.2008

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR 2005c):
Bestandteile von Druckfarben in Getränken aus Kartonverpackungen, Stellungnahme Nr. 044/2005 des BfR vom 25. November 2005. URL: http://www.bfr.bund.de/cm/216/bestandteile_von_druckfarben_in_getraenken_aus_kartonverpackungen.pdf -Download vom 05.03.2008

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR 2008):
Bedarfsgegenstände, Datenbank Kunststoffempfehlungen. URL: http://bfr.zadi.de/kse/index.htm - Download vom 19.01.2008.

Council of Europe:
Committee of Ministers, Resolution ResAP(2005)2 on packaging inks applied to the non-food contact surface of food packaging materials and articles intended to come into contact with foodstuffs (i.d.F. v. 14.09.2005).

Council of Europe:
Social cohesion and quality of life, Partial agreement in the social and public health field, Protection of the consumer, Food contact. URL: http://www.coe.int/t/e/social_cohesion/soc%2Dsp/public_health/food_contact/COE%27s%20policy%20statements%20food%20contact.asp#TopOfPage – Download vom 19.01.2008.

Czajkowska, T.; Graczyk, J.; Krysiak, B.; Stetkiewicz, J.:
Acute toxic effects of trimethyl and triethyl phosphites. In: Med Pr. 29 (1978), 393-398.

Dawson, J.R.; Adams, D.J.; Wolf, C. R.:
Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line HepG2. In: FEBS. 2454(1985), 219-222.

DIN 16514:
Drucktechnik. Begriffe für den Hochdruck. 1982.

DIN 16528:
Drucktechnik. Begriffe für den Tiefdruck. 1988.

DIN 16529:
Drucktechnik. Begriffe für den Flachdruck. 1982.

DIN 16610:
Drucktechnik. Durchdruck – Begriffe für den Siebdruck. 1984.

DIN EN 1186:
Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln. Kunststoffe: Teil 1: Leitfaden für die Auswahl der Prüfbedingungen und Prüfverfahren für die Gesamtmigration. 2002.

DIN EN 1186:
Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln. Kunststoffe: Teil 14: Prüfverfahren für "Ersatzprüfungen" für die Gesamtmigration aus Kunststoffen, die für den Kontakt mit fettigen Lebensmitteln bestimmt sind, unter Verwendung der Prüfmedien Iso-Octan und 95 %igem Ethanol. 2002.

DIN EN 1186:
Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln. Kunststoffe: Teil 3 Prüfverfahren für die Gesamtmigration in wässrige Prüflebensmittel durch völliges Eintauchen.2002.

DIN EN ISO 10993-5:
Biologische Beurteilung von Medizinprodukten-Teil 5. Prüfungen auf in-vitro-Zytotoxizität (ISO/DIS 10993-5:2007). 2007.

DIN-Norm 38415-6T6:
Suborganische Testverfahren (Gruppe T): Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen, Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen (T6). Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung.2001.

Dopico-Gracia, M.S.; Lòpez-Vilarinò, J. M.; Gonzales-Rodriquez, M.V.:
Antioxidant content of and migration from commercial polyethylene, polypropylene, and polyvinyl chloride packages. In: J Agric Food Chem. 55(2007), 3225-3231.

Doust, A. M. M.; Mousavi, S.M.; Oromiehie, A.:
Liquid-liquid extraction and GC-MS methods to determine the migration of organic compounds from polyethylene to packaged water. In: Environ. Chem. (2003), 1-7.

Eidgenössisches Departement des Innern (EDI 2008)
Verordnung des EDI über Bedarfsgegenstände Änderung vom 23. November 20051 in der Änderung vom 7. März 2008. 8b. Abschnitt: Verpackungstinten (i.d.F. v. 07.03.2008)

Eirheim, H.U.; Bundgaard, C.; Nielsen, H.M.:
Evaluation of different toxicity assays applied to proliferating cells and to stratified epithelium in relation to permeability enhancement with glycocholate. In: Toxicol in Vitro. 18 (2004), 649–657.

Eisenbrand, G.; Metzler, M.:
Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. 1. Auflage, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag 2001.

El Mansouri, H.; Yagoubi, N.; Ferrier, D.:
Extraction of polypropylene additives and their analysis by HPLC. In: Chromatographia 48 (1998), 491-496.

Enkiri, F.; Colle, D.; Grummt, T.; Matthews, C.; Marcos, R.; Westphal, H.; Hoekstra, E. J.: Philippe, M.; Neveu, P.:
Assessment of cytotoxicological potential of products in contact with drinking water. (2004) EUR 21397/1 EN.

EuPIA Guideline
on Printing Inks applied to the non-food contact surface of food packaging materials and articles (i.d.F. v. April 2008).

European Commission:
Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate D – Food Safety: production and distribution chain, D3 – Chemicals, contaminants and pesticides: Synoptic Document, Provisional list of monomers and additives notified to European Commission as substances which may be used in the manufacture of plastics or coatings intended to come into contact with foodstuff (i.d.F. v. 25.07.2005).

European Commission:
Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate D - Food Safety: production and distribution chain, D3 - Chemical and physical risks; surveillance: Food Contact Materials, Practical Guide, A practical guide for users of European directives (i.d.F. v. 15.04.2003).

European Food Safety Authority:
Food Contact Materials, Note for guidance, Note for guidance for petitioners presenting an application for the safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorization (i.d.F. v. 08.06.2006).

European Plastic Converter:
The European Plastics Packaging Industry. Brüssel (Belgien), 2006. - Firmenschrift.

Fauris, C.; Danglot, C.; Vilagines, R.:
Rapidity of RNA synthesis in human cells: A highly sensitive parameter for water cytotoxicity evaluation. In: Water Res. 19 (1985), 677–684.

Fogh, J. (ed.); Trempe, G.:
New human tumor cell lines. In: Human Tumor Cells in Vitro. New York: Plenum Pre. (1975), 115-159.

Fotakis, G.; Timbrell, J.A.:
In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. In: Toxicol Lett. 160 (2006), 171-177.

Fuhrmann, G. F.:
Allgemeine Toxikologie für Chemiker. Einführung in die Theoretische Toxikologie. 2. überarbeitete Auflage, Stuttgart, Leipzig: B. G. Teubner Verlag 1999.

Gächter, R.; Müller, H.:
Taschenbuch der Kunststoffadditive. Stabilisatoren, Hilfsstoffe, Weichmacher, Verstärkungsmittel, Farbmittel für thermoplastische Kunststoffe. 3. Ausgabe, München, Wien: Carl Hanser Verlag 1989.

Garde, J.A.; Catalá, R.; Gavara, R.; Hernandez, R.J.:
Characterizating the migration of antioxidants from polypropylene into fatty simulants. In: Food Addit. Contam. 18 (2001), 750-762.

Garrido-López, Á.; Sancet, I.; Montaño, P.; González, R.; Tena, M.T.:
Microwave-assisted oxidation of phosphate type antioxidant additives in polyethylene film extracts. In: J. Chromatogr. A. 1175 (2007), 154-161.

Greim, H.; Deml, E.:
Toxikologie. Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH Verlagsgesellschaft mbH 1996.

Grob, K.; Spinner, C.; Brunner, M.; Etter, R.:
The migration from the internal coatings of food cans; summary of the findings and call for more effective regulation of polymers in contact with foods: a review. In: Food Addit Contam. 16 (1999), 579-590.

Hamasaki, K.; Kogure K.; Ohwada K.:
A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. In: Toxicon. 34 (1996), 490-495.

Horn, F.; Moc, I.; Schneider, N.; Grillhösl, C.; Berghold, S.; Lindenmeier, G.:
Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 3. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2005.

Huck, N.D.:
Polyolefin films containing fatty acid amides. Patent GB 915589. 1963.

Industrievereinigung Kunststoffverpackungen e. V., Bundesverband für Kunststoffverpackungen und Folien (2007):
Branche in Zahlen, Packmittelmarkt, Kunststoffpackmittel und -folien 2005. URL: http://www.kunststoffverpackungen.de/04_branchenzahlen/04_03_branchenzahlen.html - Download vom 03.10.2007.

Ishiyama, M.; Shiga, M.; Sasamoto, K.; Mizoguchi, M.:
A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. In: Appl Environ Microbiol. 41 (1996), 1118–1122.

Jenkins, W. A.; Harrington, J. P.:
Lebensmittelverpackungen aus Kunststoff. Hamburg: Behr´s Verlag GmbH & Co 1992.

Kalgutkar, A.S.; Dalvie, D.K.; O'Donnell, J.P.; Taylor, T.J.; Sahakian, D.C.:
On the diversity of oxidative bioactivation reactions on nitrogen-containig xenobiotics. In: Curr Drug Metab. 3 (2002), 379-424.

Kalsner, S.:
Cholinergic mechanisms in human coronary artery preparations: implications of species differences. In: J Physiol. 358 (1985), 509-526

Kammann, U.; Biselli, S.; Reineke, N.; Wosniok, W.; Danischewski, D.; Hühnerfuss, H.; Kinder, A.; Sierts-Herrmann, A.; Theobald, N.; Vobach, M.; Westendorf, J.; Steinhart, H.:
Bioassay-directed fractionation of organic extracts of marine surface sediments from the North and Baltic Sea – Part II: Results of the biotest battery and development of a biotest index. In: J Soils and Sediments 5 (2005), 225–232.

Kittel, H.; Krauß, W. (Bd.-Hrsg.):
Lehrbuch der Lacke und Beschichtungen. Bd.2 Bindemittel für lösemittelhaltige und lösemittelfreie Systeme. 2., erw. und neubearb. Aufl, Stuttgart, Leipzig: S. Hirzel Verlag 1998.

Knowles, B.B.; Howe, C.C.; Aden, D.P.:
Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. In: Science. 209(1980), 497-499.

Lemieux, B.; Percival, M. D.; Falgueyret, J. P.:
Quantitation of the lysosomotropic character of cationic amphiphilic drugs using the fluorescent basic amine Red DND-99. In: Anal Biochem. 327 (2004), 247-251.

LFGB
(i.d.F. v. 26.04.2006), BGBl. I S. 945.

Lindl, T.:
Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 5. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH 2002.

Lipnick, R.I.:
Narcosis: Fundamental and baseline toxicity mechanism for nonelectrolyte organic chemicals. In: Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology. 1. Edition: Dordrecht, Kluwer Academic Publishers 1990.

Lovschall, H.; Eiskjaer, M.; Arenholt-Bindslev, D.:
Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays. In: Toxicol In Vitro. 16 (2002), 63-69.

MacIntyre, A. C.; Cutler, D. J.:
Role of lysosomes in hepatic accumulation of chloroquine. In: J Pharm Sci. 77 (1988), 196-199.

Marquardt, H.; Schäfer, S.G. (Hrsg.)
Lehrbuch der Toxikologie. 2. völlig neu bearbeitete Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 2004

Mittag, N.; Förster, S.; Hoppe, S.; Simat, T.J.; Sehr, A.; Renz, S.; Vobach, M.; Kamman, U.:
Bioassay Guided Analysis of Migrants from Can Coatings. In: J. Verbr. Lebensm. 1 (2006), 345–353.

Mosmann, T.:
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: J Immunol Methods. 65 (1983), 55-63.

Muir, D.; Varon, S.; Manthorpe, M.:
An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. In: Anal Biochem. 185 (1990), 377-382.

Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M.:
Arzneimittelwirkungen: Mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. 9. Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 2008.

Nakazawa, H.; Yamaguchi, A.; Inoue, K.; Yamazaki, T.; Kato, K.; Yoshimura, Y.; Makino, T.:
In vitro assay of hydrolysis and chlorohydroxy derivatives of bisphenol A diglycidyl ether for estrogenic activity. In: Food Chem Toxicol. 40 (2002), 1827-1832.

Nejdfors, P.; Ekelund, M.; Jeppson, B.; Weström, B.R.:
Mucosal n vitro permeability in the intestinal tract of the pig, the rat and man: Species- and region-related differences. In: Scand J Gastroenterol. 5 (2000), 501-507.

Nerin, C.; Cacho, J.; Gancedo, P.:
Plasticizers from printing inks in a selection of food packagings and their migration to food. In: Food Addit Contam. 10 (1993), 453-460.

Nerin, C.; Fernandez, C.; Domeño, C.; Salafranca, J.:
Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liqud chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. In: Agric. Food Chem. 51 (2003), 5647–5653

OECD Guideline for Testing of Chemicals 405:
Acute Eye Irritation/Corrosion. 2002.

OECD Guideline for Testing of Chemicals 432:
In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test. 2004.
OECD Guideline for Testing of Chemicals 471:
Bacterial Reverse Mutation Test. 1997.
OECD Guideline for Testing of Chemicals 473:
In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. 1997.
OECD Guideline for Testing of Chemicals:
Draft proposal for a new guideline 487(2nd version). In Vitro Micronucleus Test. 2006.
Ozaki, A.; Yamaguchi,Y.; Fujita, T.; Kuroda, K.; Endo, G.:
Safety assessment of paper and board food packaging: Chemical analysis and genotoxicity of possible contaminants in packaging. In: Food Addit Contam. 22(2005), 1053-60.
Papp-Jambor, C.; Jaschinski, U.; Forst, H.:
Cytochrom-P450-Enzyme und ihre Bedeutung für Medikamenteninteraktionen. In: Anaesthesist. 51(2002), 1-15.
Parlesak, A.; Bode, J.C.; Bode, C.:
Parallel determination of gut permeability in man with M(r) 400, M(r) 1500, M(r) 4000 and M(r) 10000 polyethylene glycol. In: Eur J Clin Chem Clin Biochem. 32 (1994), 813-820.
Piringer, O. G.:
Verpackungen für Lebensmittel. Eignung, Wechselwirkung, Sicherheit. Weinheim, New York, Basel, Cambrige: VCH-Verlag 1993.
Praktikumsvorschrift, Technische Universität Dresden, Institut für Lebensmittelchemie:
Bedarfsgegenstände. URL: http://www.chm.tu-dresden.de/lc/praktikum/bedarf/bgskript.pdf- Download vom 29.03.2009
Rasselstein GmbH, Informations-Zentrum Weißblech (2007):
Werkstoff, Marktdaten, Lebensmittel (2005) in Prozent (Prognose). URL: http://www.izw.de/Marktdaten.25.0.html - Download vom 03.10.2007.
Reichl, F.-X.:
Taschenatlas der Toxikologie. Substanzen, Wirkungen, Umwelt. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag 1997.
RL 2002/72/EG
Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (idF v. 15.08.2002), Abl. L 220, S. 18.
RL 2004/19/EG
der Kommission zur Änderung der Richtlinie 2002/72/EG über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (i.d.F. v. 01.03.2004), Abl. L 71, S.8.
RL 2007/19/EG
der Kommission zur Änderung der Richtlinie 2002/72/EG über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, und der Richtlinie 85/572/EWG des Rates über die Liste der Simulanzlösemittel für die Migrationsuntersuchungen von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (i.d.F. v. 12.04.2007), Abl. L 97, S. 50.
RL 82/711/EWG
Grundregeln für die Ermittlung der Migration aus Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (i.d.F. v. 23.10.1982), Abl. L. 297, S. 26.

RL 85/572/EWG
Liste der Simulanzlösemittel für die Migrationsuntersuchungen von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (i.d.F. v. 31.12.1985), Abl. L 372, S. 14.

Sauvant, M.P.; Pepin, D.; Bohatier, J.; Groliere, C.A.; Guillo, J.:
Toxicity Assessment of 16 Inorganic Environmental Pollutants by Six Bioassays. In: Ecotoxicol Environ Saf. 37 (1997), 131–140.

Schaefer, A.; Maß, S.; Simat, T.J.; Steinhart, H.:
Migration from can coatings: Part 1. A size-exclusion chromatographic method for the simultaneous determination of overall migration and migrating substances below 1000 Da. In: Food Addit Contam. 21 (2004), 287-301.

Schaefer, Simat, T.J.:
Migration from can coatings: Part 3. Synthesis, identification and quantification of migrating epoxy-based substances below 1000 Da. In: Food Addit Contam. 21 (2004), 390-405.

Scheunert, C.:
Lebensmittelkonserven: Screening auf den Übergang resorbierbarer und toxikologisch relevanter Substanzen. Dissertation. 2007.

Severin, I.; Dahbi, L.; Lhuguenot, J.C.; Andersson, M.A.; Hoornstra, D.; Salkinoja-Salonen, M.; Turco, L.; Zucco, F.; Stammati, A.; Dahlman, O.; Castle, L.; Savolainen, M.; Weber, A.; Honkalampi-Hämäläinen, U.; von Wright, A.:
Safety assessment of food-contact paper and board using a battery of short-term toxicity tests: European union BIOSAFEPAPER project. In: Food Addit Contam. 22(2005), 1032-41.

Shen, S.; Marchick, M. R.; Davis, M. R.; Doss, G. A.; Pohl, L. R.:
Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: Role of 5-Hydroxydiclofenac. In: Chem.Res.Toxicol.; 12 (1999), 214-222

Shopsis, C.; Eng, B.:
Rapid cytotoxicity testing using a semi-automated protein determination on cultured cells. In: Toxicol Lett.; 26 (1985), 1-8.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks. A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R.:
New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. In: J Natl Cancer Inst. 82 (1990), 1107-1112.

Strubelt, O.; Siegers, C.-P.; Breining, H.:
Comparative study of the absorption, elimination and acute hepatotoxic action of ethanol in guinea pigs and rats. In: Arch Toxicol. 32 (1974), 83-95.

Suárez, S.; Sueiro, R.S.; Garrido, J.:
Genotoxicity of coating lacquer on food cans, bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), its hydrolysis products and a chlorohydrins of BADGE. In: Mutat Res. 470 (2000), 221-228.

Sueiro, R.A.; Araujo, M.; Suárez, S.; Garrido, M.J.:
Mutagenic potential of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its hydrolysis-derived products in the Ames Salmonella Assay. In: Mutagenesis 16 (2001), 303-307.

Takácsová, G.; Subík, J.:
The hemolytic activity of heterocyclic n-alkyl amine oxides. In: Experientia. 33 (1977), 1415-1416.

Uter, W.; Rühl, R.; Pfahlberg, A.; Geier, J.; Schnuch, A.; Gefeller, O.:
Contact Allergy in Construction Workers: Results of a Multifactorial Analysis. In: Ann. occup. Hyg. 48 (2004), 21–27.

Verband Kunststofferzeugende Industrie e. V. (2007):
Informationsmaterialien. URL: http://www.vke.de/de/infomaterial/index.php?PHPSESSID=a40c27e9ebea81aaeafa2b2e48032025 – Download vom 07.05.2007.

VO (EG) Nr. 1895/2005
der Kommission über die Beschränkung der Verwendung bestimmter Epoxyderivate in Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (idF v. 18.11.2005), Abl. L 302, S.28.

VO (EG) Nr. 1907/2006
des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur (idF v. 30.12.2006), Abl. L 396, S.1.

VO (EG) Nr. 1935/2004
des Europäischen Parlamentes und des Rates über Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen und zur Aufhebung der Richtlinien 80/590/EWG und 89/109/EWG (idF v. 27.10.2004), Abl. L 338, S.4.

VO (EG) Nr. 2023/2006
der Kommission über gute Herstellungspraxis für Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (idF v. 22.09.2006), Abl. L 384, S.75

von der Ohe, P.C.; Kühne, R.; Eber, R.-U-; Altenburger, R.; Liess, M.; Schüürmann, G.:
Structural alerts--a new classification model to discriminate excess toxicity from narcotic effect levels of organic compounds in the acute daphnid assay. In: Chem. Res. Toxicol. 18 (2005), 536-555.

Wermann, S.; Simat, T.J.:
HPLC-Separation of Mono-, Di- and Polycarboxylic acids used in Plastics. Varian Application 2072 LC. URL: http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/consum/lccolumns/polaris/shared/A02072.pdf - Download vom 22.01.2008.

Wilkening, S.; Stahl, F.; Bader A.:
Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. In: Drug Metab Dispos. 31(2003), 1035-1042.

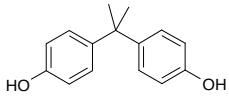
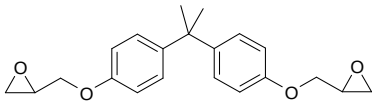
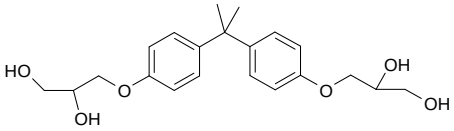
10 Anhang

10.1 Chemikalien

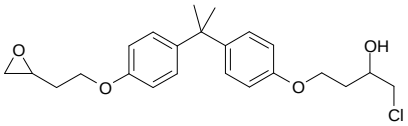
10.1.1 Allgemeine Chemikalien

10.1.2 Standards der Coatinganalytik

Tab. 30: Chemische Kenngrößen der Standards für die Coatinganalytik

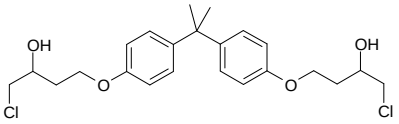
Referenzsubstanz	Struktur/Parameter
BPA	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan  CAS 80-05-7 MG [g/mol] 228,29 pks - log k_{ow} 3,64 SML 0,6 mg/kg
BADGE	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan-bis(2,3-epoxypropyl)-ether; Bisphenol A-bis(2,3-epoxypropyl)-ether  CAS 1675-54-3 MG [g/mol] 340,42 pks - log k_{ow} 3,84 SML 9 mg/kg Lbm bzw. 9 mg/6 dm² (Σ BADGE, BADGE*H_2O, BADGE*2H_2O)
BADGE*2 H_2O	 CAS 5581-32-8 MG [g/mol] 376,45 pks - log k_{ow} 1,93 SML 9 mg/kg Lbm bzw. 9 mg/6 dm² (Σ BADGE, BADGE*H_2O, BADGE*2H_2O)

BADGE*HCl



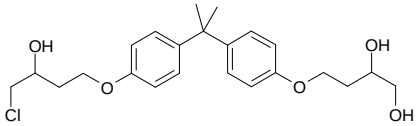
CAS	13836-48-1
MG [g/mol]	404,99
pks	-
log k_{ow}	4,99
SML	1 mg/kg Lbm bzw. 1 mg/6 dm² (Σ BADGE*HCl, BADGE*2HCl, BADGE*HCl*H_2O)

BADGE*2 HCl



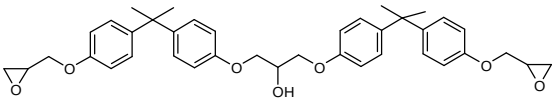
CAS	4809-35-2
MG [g/mol]	441,40
pks	-
log k_{ow}	5,55
SML	1 mg/kg Lbm bzw. 1 mg/6 dm² (Σ BADGE*HCl, BADGE*2HCl, BADGE*HCl*H_2O)

BADGE*HCl*H_2O



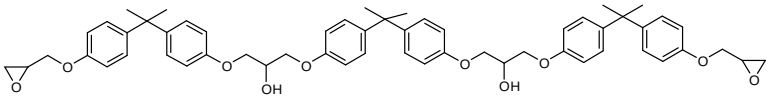
CAS	227947-06-0
MG [g/mol]	422,95
pks	-
log k_{ow}	3,83
SML	1 mg/kg Lbm bzw. 1 mg/6 dm² (Σ BADGE*HCl, BADGE*2HCl, BADGE*HCl*H_2O)

BADGE n=1

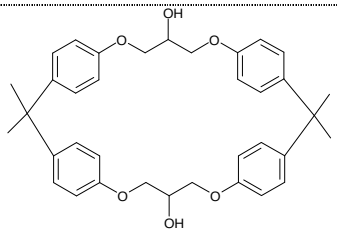
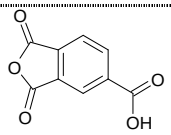


CAS	
MG [g/mol]	624,78
pks	-
log k_{ow}	7,22
SML	-

BADGE n=2

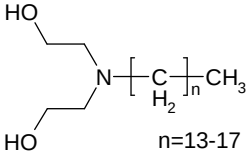
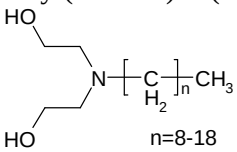
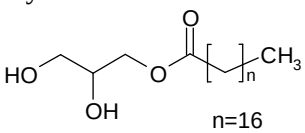
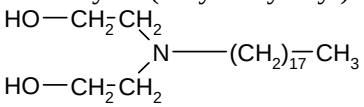


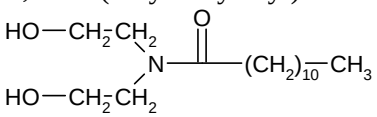
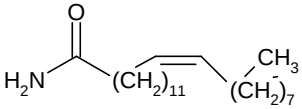
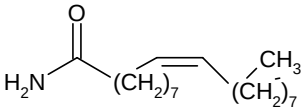
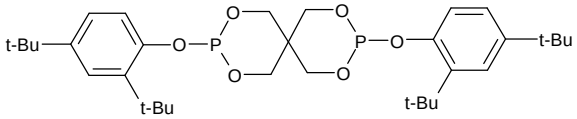
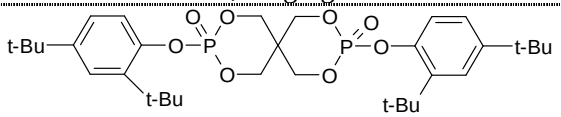
CAS	
MG [g/mol]	909,14
pks	-
log k_{ow}	11,0
SML	-

Cyclo-diBADGE		
	CAS	-
	MG [g/mol]	568,72
	pks	-
	log k_{ow}	7,39
	SML	-
TMA		
	CAS	
	MG [g/mol]	192,13
	pks	-
	log k_{ow}	2,12
	SML	5 mg/kg

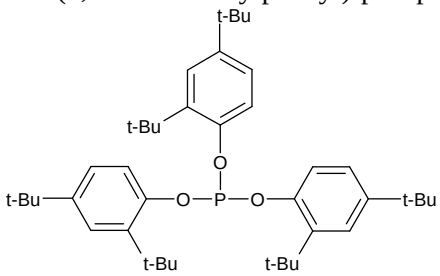
10.1.3 Kunststoffadditivstandards

Tab. 31: Strukturen und physikalische Größen der Kunststoffadditive

Referenzsubstanz	Struktur/Parameter
Armostat 300	Alkyl(C13-C18)bis(2-hydroxyethyl)amin  n=13-17 CAS 61791-44-4 MG [g/mol] 301,55 – 357,76 pks - log k_{ow} 5,87 SML 1,2 mg/kg (in Kombination mit Armostat 400)
Armostat 400	Alkyl(C8-C18)bis(2-hydroxyethyl)amin  n=8-18 CAS 61791-31-9 MG [g/mol] 273,49 – 301,55 pks - log k_{ow} 4,39 SML 1,2 mg/kg (in Kombination mit Armostat 300)
Armostat 1000	Glycerol monostearat  n=16 CAS 31566-31-1 MG [g/mol] 358,57 pks - log k_{ow} 6,62 SML -
Armostat 1800	Octadecylbis(2-hydroxyethyl)amine  CAS 10213-78-2 MG [g/mol] 357,61 pks 14,41; 8,84 log k_{ow} 8,32; 6,85 SML -

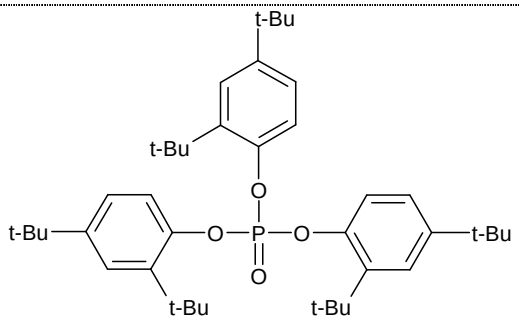
Armostat 2000	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)dodecanamid
	
	CAS 120-40-1
	MG [g/mol] 287,45
	pks 14,12; -0,85
	log k_{ow} 3,94; 2,89
	SML –
Erucamid	
	CAS 112-84-5
	MG [g/mol] 337,59
	pks 16,61; -0,49
	log k_{ow} 8,87; 8,44
	SML -
Ölsäureamid	
	CAS 301-02-0
	MG [g/mol] 281,49
	pks 16,61; -0,49
	log k_{ow} 6,75; 6,48
	SML -
Irgafos 126	Bis(2,4-di-tert-butylphenyl)pentaerythritoldiphosphit
	
	CAS 26741-53-7
	MG [g/mol] 604,71
	pks -
	log k_{ow} 11,76; 10,90
	SML 0,6 mg/kg
oxd. Irgafos 126	
	CAS
	MG [g/mol] 636,71
	pks -
	log k_{ow} 9,78
	SML -

Irgafos 168	Tris-(2,4-di-tert.-butylphenyl)-phosphit



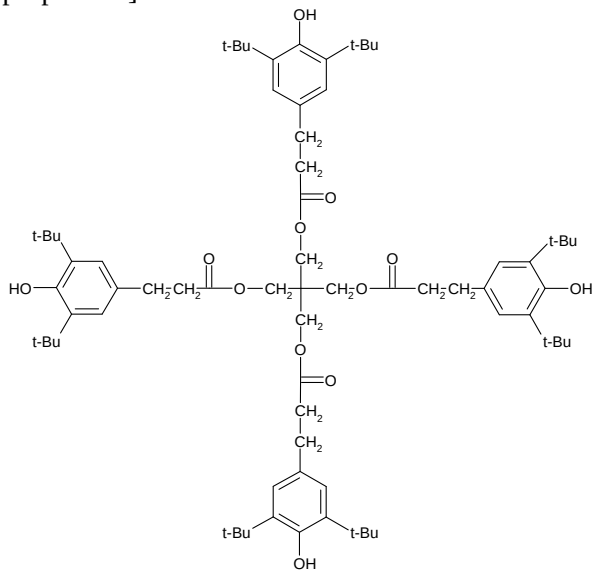
CAS	31570-04-4
MG [g/mol]	646,94
pks	-
log k_{ow}	17,56; 18,08
SML	-

oxd. Irgafos 168	



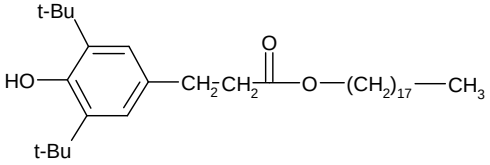
CAS	
MG [g/mol]	662,94
pks	-
log k_{ow}	16,16
SML	-

Irganox 1010	Pentaerythrit-tetrakis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propionate]



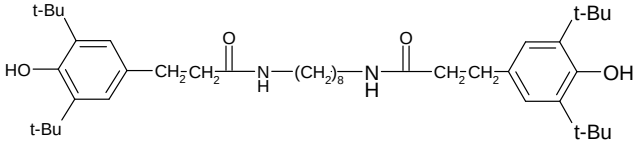
CAS	6683-19-8
MG [g/mol]	1177,67
pks	11,71
log k_{ow}	18,89; 19,60
SML	-

Irganox 1076	Octadecyl-3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionat



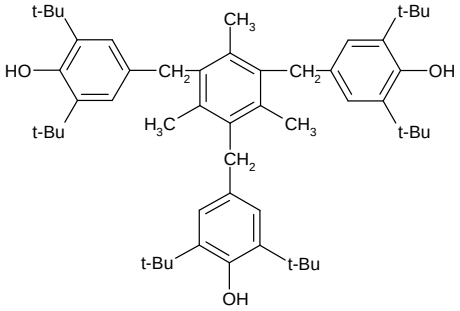
CAS	2082-79-3
MG [g/mol]	530,88
pks	12,33
log k_{ow}	13,93; 13,41
SML	6 mg/kg

Irganox 1098	1,6-Hexamethylen-bis[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionamid]



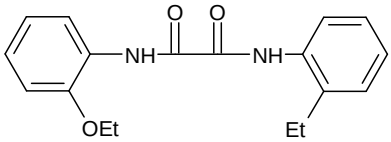
CAS	23128-74-7
MG [g/mol]	636,97
pks	11,90
log k_{ow}	7,49; 9,61
SML	45 mg/kg

Irganox 1330	1,3,5-Trimethyl-2,4,6-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)benzol



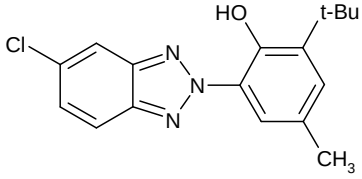
CAS	1709-70-2
MG [g/mol]	775,22
pks	-
log k_{ow}	17,17
SML	-

Tinuvin 312	2-Ethyl-2-ethoxyoxalanilid



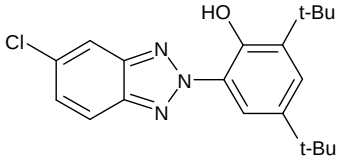
CAS	23949-66-8
MG [g/mol]	312,37
pks	10,81; 1,37
log k_{ow}	3,63; 3,69
SML	30 mg/kg

Tinuvin 326 — 2-(2'-Hydroxy-3'-t-butyl-5'-methylphenyl)-5-chlorbenzotriazol



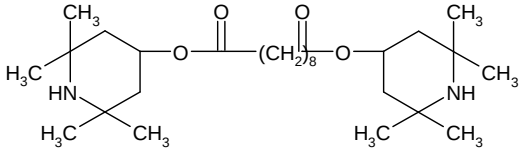
CAS	3896-11-5
MG [g/mol]	315,81
pks	9,49; -0,76
log k_{ow}	6,58; 5,55
SML	30 mg/kg

Tinuvin 327 — 2-(3',5'-Di-t-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorbenzotriazol



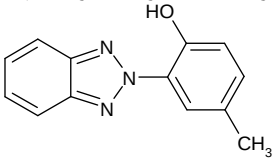
CAS	3864-99-1
MG [g/mol]	357,89
pks	9,41; -0,76
log k_{ow}	7,81; 6,91
SML	30 mg/kg

Tinuvin 770 — Bis-(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidyl)-sebacat



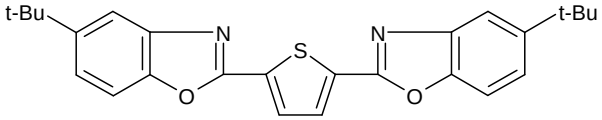
CAS	52829-07-9
MG [g/mol]	480,74
pks	10,27
log k_{ow}	7,32; 6,50
SML	-

Tinuvin P — 2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazol



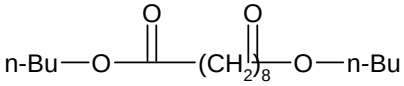
CAS	2440-22-4
MG [g/mol]	225,25
pks	8,15; 0,74
log k_{ow}	4,30; 3,00
SML	30 mg/kg

Uvitex OB — 2,5-bis(5-tert-butyl-2-benzoxazoyl)thiophen

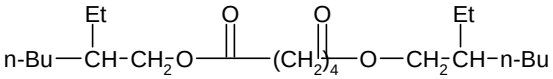


CAS	7128-64-5
MG [g/mol]	430,57
pks	1,24
log k_{ow}	8,96; 8,61
SML	0,6 mg/kg

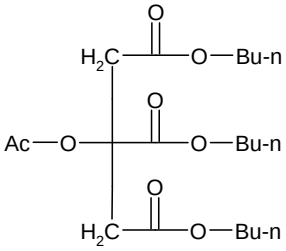
Dibutylsebacat	Sebacinsäuredibutylester



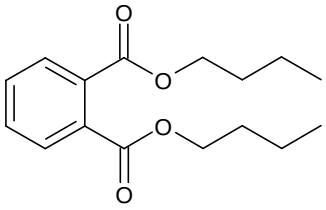
CAS	109-43-3
MG [g/mol]	314,47
pks	
log k_{ow}	5,97; 6,30
SML	-
Diethylhexyladipat	Bis(2-ethylhexyl)adipat



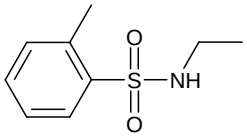
CAS	103-23-1
MG [g/mol]	370,58
pks	-
log k_{ow}	8,10; 8,12
SML	18 mg/kg
Tributylacetylcitrat	Tributyl-2-acetoxy-1,2,3-propantricarboxylat



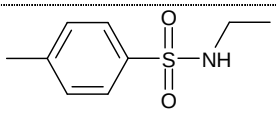
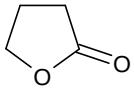
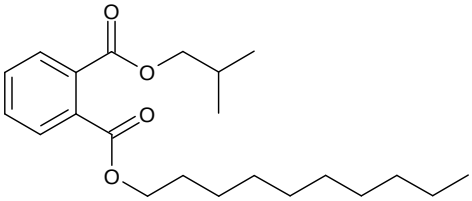
CAS	77-90-7
MG [g/mol]	402,49
pks	-
log k_{ow}	6,92; 4,29
SML	-
Dibutylphthalat	Dibutylbenzol-1,2-dicarboxylat



CAS	84-74-2
MG [g/mol]	278,35
pks	-
log k_{ow}	4,825
SML	-
N-Ethyl-toluol-2-sulfonamid	



CAS	1077-56-1
MG [g/mol]	199,27
pks	-
log k_{ow}	1,87
SML	-

N-Ethyl-toluol-4-sulfonamid		
	CAS	
	MG [g/mol]	199,27
	pks	-
	log k_{ow}	1,87
	SML	-
Butyro-1,4-lacton	Dihydrofuran-2-on	
		
	CAS	96-48-0
	MG [g/mol]	86,09
	pks	-
	log k_{ow}	-0,31
	SML	-
Isobutyldecylphthalat		
		
	CAS	
	MG [g/mol]	348,49
	pks	-
	log k_{ow}	7,07
	SML	-

10.2 Charakterisierung von Cyclo-diBADGE

Reinheitsbestimmung RP-HPLC-UVD$_{232nm}$(Kapitel 10.5.1)

Reinheit: 83,1 %
Rt: 23,63 min; 24,04 min

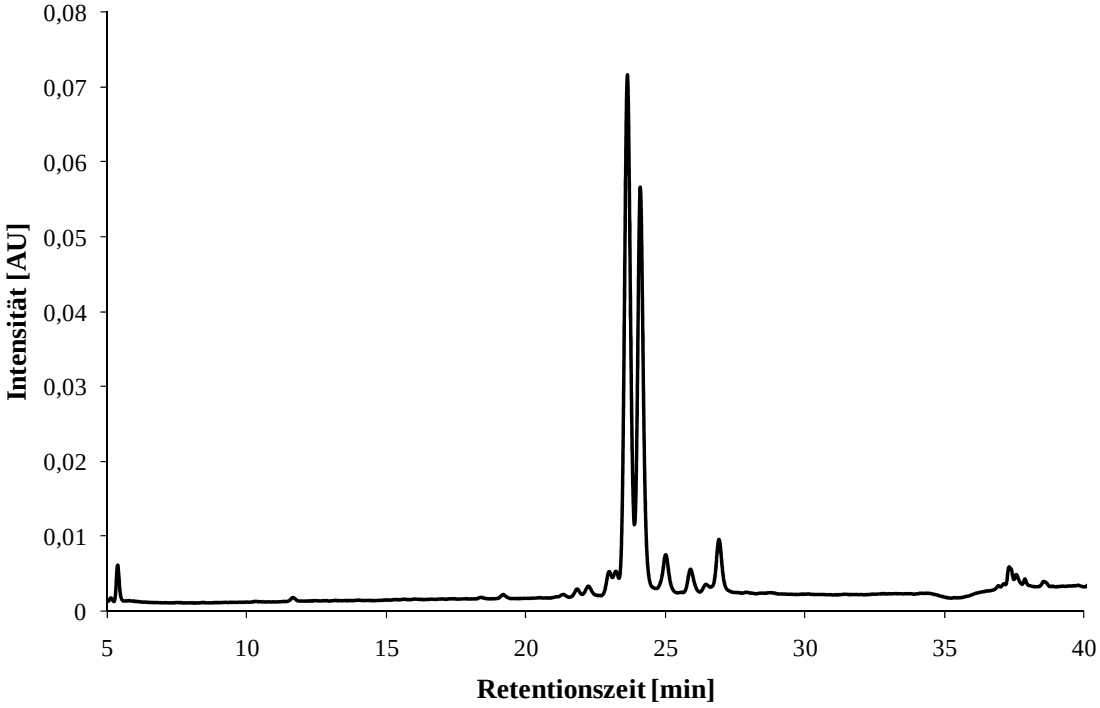


Abb. 77: Auszug des RP-HPLC-UVD$_{232nm}$-Chromatogrammes des isolierten Cyclo-diBADGE zur Bestimmung der Reinheit des isolierten Produktes (Kapitel 10.5.1)

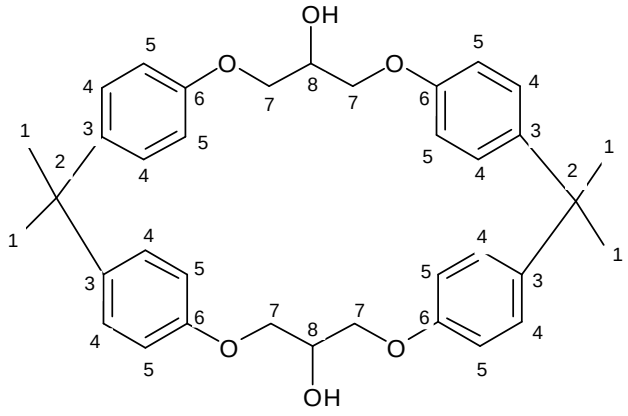
Elementaranalyse

Gerät: Fison EA1108

Element	C	H
berechnet [%]	76,03	7,09
bestimmt [%]	74,13	7,37

^{13}C-NMR

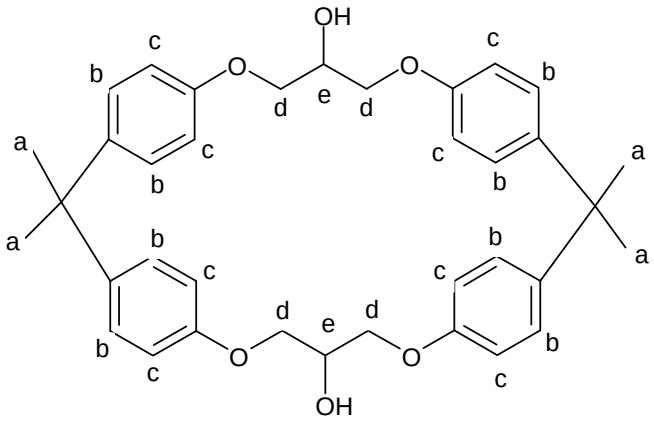
Gerät: DRX 500



C 1	25,286 ppm
C 2	49,967 ppm
C 3	142,941 ppm
C 4	127,407 ppm, 127,629 ppm, 129,697 ppm
C 5	114,045 ppm, 114,367 ppm, 114,632 ppm
C 6	156,290 ppm, 156,308 ppm
C 7	67,209 ppm, 76,239 ppm
C 8	68,388 ppm, 69,019 ppm, 69,168 ppm

^{1}H-NMR

Gerät: DRX 500



	Frequenz	Signal	Anzahl der H-Atome
a	1.519 ppm	s	12
b	7.243 ppm-6.987 ppm	m	8
c	6.913 ppm-6.683 ppm	m	8
d	4.219 ppm-3.903 ppm	m	8
e	5.415 ppm-5.368 ppm	dd	2

ESI-TOF MS

569,3 ($M+H^+$)
586,3 ($M+NH_4^+$)
591,3 ($M+Na^+$)
607,3 ($M+K^+$)
1160,6 ($MM+Na^+$)

Schmelzpunktbestimmung

Gerät: Electrothermal, IA 9000 Series, Digital Melting Point Apparatus
Schmelzbereich: 155-170°C (ein eindeutiger Schmelzpunkt war nicht bestimmbar, dies ist sicherlich auf die immer noch vorhandenen Verunreinigungen zurückzuführen)

IR (KBr)

Vorbereitung: 0,5-1,0 mg Cyclo-diBADGE wurden mit 200-300 mg KBr gemischt und ein Pressling geformt

Gerät: Perkin Elmer System 2000 FT-IR

578,76 (m)	755,33 (w)	825,47 (m)	953,61 (w)
1042,23 (m)	1107,17 (w)	1183,31 (m)	1248,03 (s)
1248,03 (ss)	1298,83 (w)	1362,56 (w)	1458,80 (w)
1509,43 (ss)	1583,14 (w)	1608,01 (m)	2965,99 (s)
3407,48 (s)			

10.3 FT-IR-ATR zur Aufklärung des Schichtaufbaus der Ketchupbeutelfolie

Gerät: Perkin Elmer System 2000 FT-IR

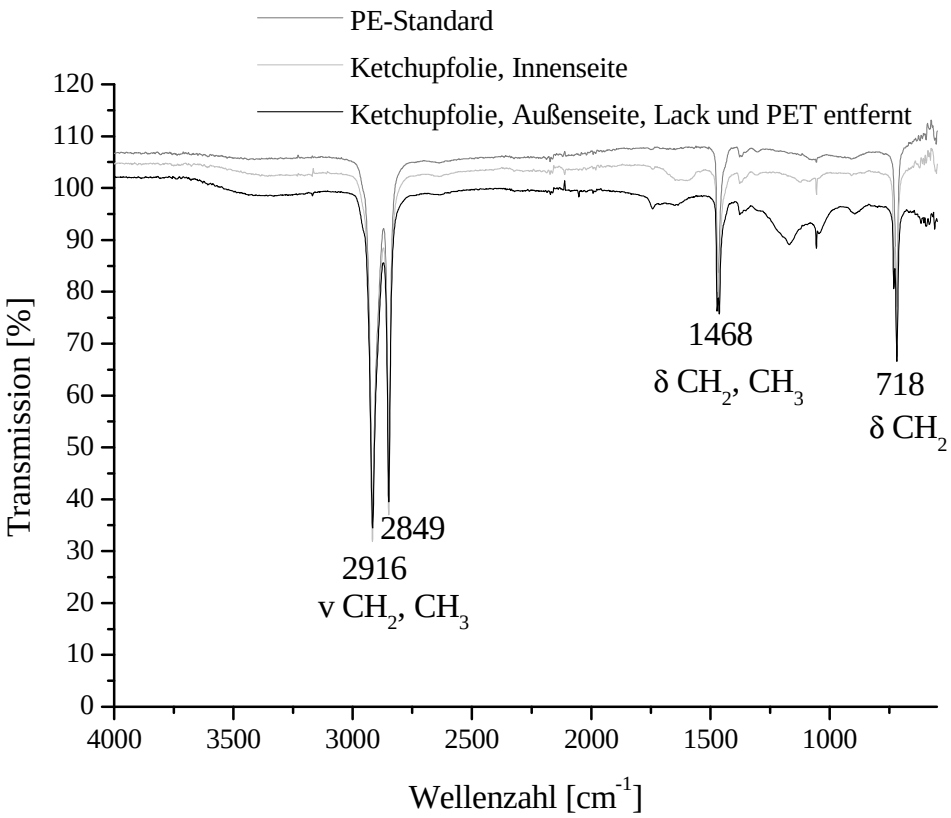


Abb. 78: IR-Spektren des Polyethylen zur Identifizierung des Schichtaufbau der Ketchupfolie (Innenseite der Folie, PE-Standard, Außenseite der PE-Folie)

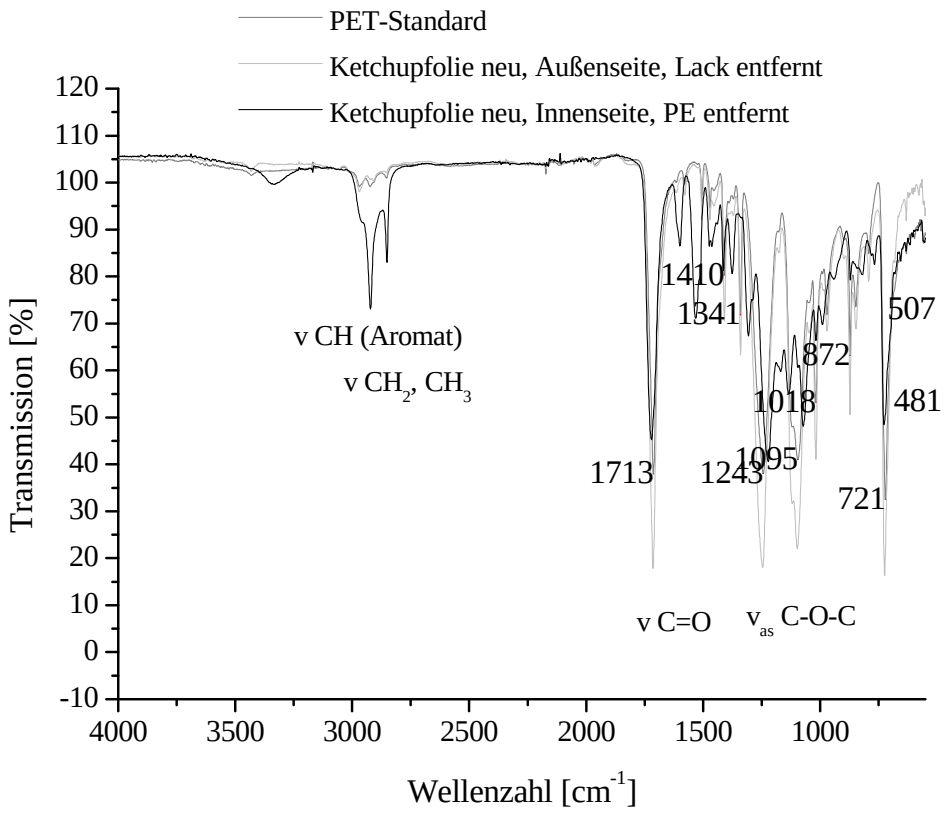


Abb. 79: IR-Spektren des Polyethylenterephthalat zur Identifizierung des Schichtaufbau der Ketchupfolie (Außenseite der Folie, PET-Standard, Innenseite der PET-Folie)

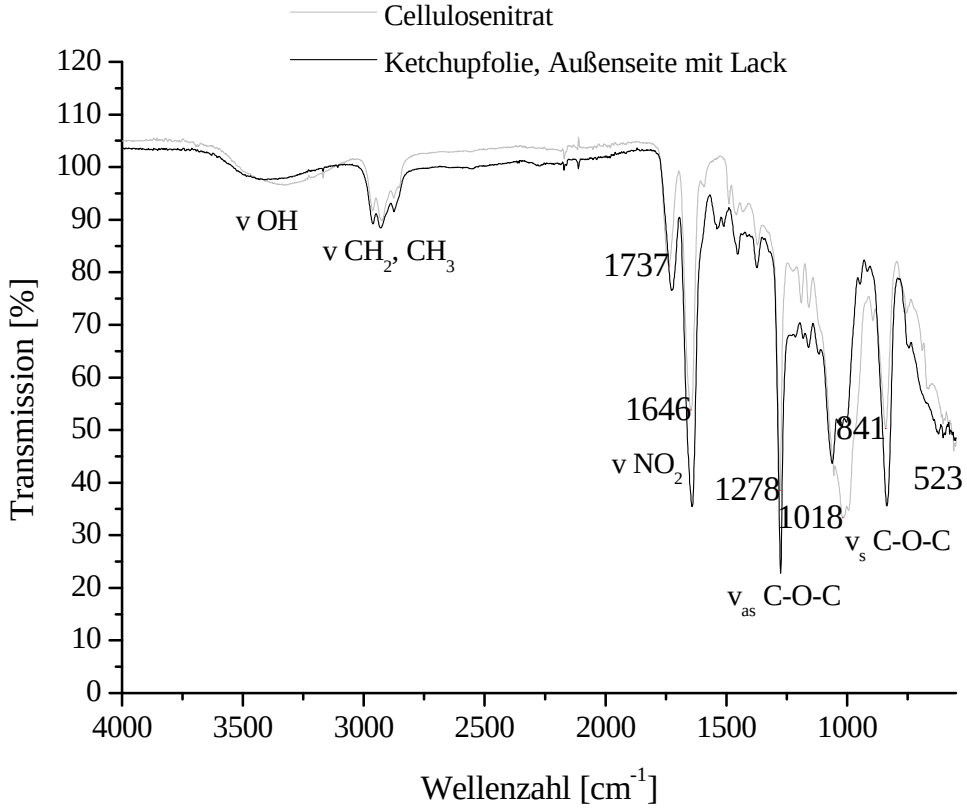


Abb. 80: IR-Spektren des Nitrocelluloselackes zur Identifizierung des Schichtaufbau der Ketchupfolie (Außenseite der Folie, Cellulosenitratfolie)

10.4 Zelltest (Standardarbeitsanweisungen)

Geräte, Verbrauchsmaterialen, Reagenzien

Tab. 32: Geräteverzeichnis für den Umgang mit den Zellkulturen

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim
CO_2-Inkubator	Binder CB150	Binder, Tutlingen
Elektronische Pipette	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Handdispenser	Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipette 0,5 – 10 µl	Research 10	Eppendorf, Hamburg
Pipette 10 – 100 µl	Research 100	Eppendorf, Hamburg
Pipette 100 – 1000 µl	Research 1000	Eppendorf, Hamburg
Pipette 500 – 5000 µl	Research 5000	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	GLF 3017	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Sterilbank	Hera Safe HS12	Kendro, Hanau
Vakuumpumpe	VCZ 224	ILMVAC GmbH, Ilmenau
ELISA-Reader	Multiskan Acsent Model 354	Thermolabsystems, Finnland
Wasserbad	GFL 1012	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Tab. 33: Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Material / Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturflasche 25 cm²	
Zellkulturflasche 75 cm²	
96-Well-Mikrotiterplatte	
Kryoröhrchen	
15 ml Zentrifugenröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, D;
14 ml Einmalröhrchen	TPP® AG, Trasadingen, CH
50 ml Zentrifugenröhrchen	
Serologische Pipette 5 ml	
Serologische Pipette 10 ml	
Serologische Pipette 25 ml	
Tips 5 ml	Eppendorf, Hamburg, D;
Tips 10 ml	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D

Herstellung von Medium mit 10 % FKS

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (Medium, 50 ml FKS, 4 ml Gentamycin) bei 37°C:
- Entnahme von 54 ml Medium aus der Mediumflasche mit einer sterilen Einmalpipette und verwerfen
- Zugabe von 50 ml FKS und 4 ml Gentamycin
- Flasche verschließen, mit „10 % FKS“, „0,8 % Gentamycin“, Datum und Signum beschriften
- Lagerung im Kühlschrank bei ca. 4°C bis zum weiteren Gebrauch

Herstellung von Medium mit 1 % FKS

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (Medium, 5 ml FKS, 4 ml Gentamycin) bei 37°C:

- Entnahme von 9 ml Medium aus der Mediumflasche mit einer sterilen Einmalpipette und verwerfen
- Zugabe von 5 ml FKS und 4 ml Gentamycin
- Flasche verschließen, mit „1 % FKS“, „0,8 % Gentamycin“, Datum und Signum beschriften
- Lagerung im Kühlschrank bei ca. 4°C bis zum weiteren Gebrauch

Herstellung von serumfreiem Medium

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (Medium, 4 ml Gentamycin) bei 37°C:
- Entnahme von 4 ml Medium aus der Mediumflasche mit einer sterilen Einmalpipette und verwerfen
- Zugabe von 4 ml Gentamycin
- Flasche verschließen, mit „0,8 % Gentamycin“, Datum und Signum beschriften
- Lagerung im Kühlschrank bei ca. 4°C bis zum weiteren Gebrauch

Herstellung von Neutralrot-Stammlösung

- 0,2 g Neutralrot in 50-ml-Maßkolben einwiegen und in Wasser lösen
- Lösung in eine Laborgewindeflasche mit Deckel überführen
- Lösung autoklavieren
- Flasche mit „Neutralrot-Stammlösung 0,4 %“, Datum und Signum beschriften
- Lagerung im Kühlschrank bei ca. 4°C bis zum weiteren Gebrauch

Auftauen von Zellen

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (Medium mit 10 % FKS) bei 37°C
- Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37°C
- Überführung der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen
- Zugabe von 10 ml Medium (10 % FKS)
- Zentrifugation bei 4°C und 800 Umdrehungen/min für 5 Minuten
- Verwerfen des Überstandes
- Aufschlämmen des Pellet mit 8 ml Medium (10 % FKS)
- Überführen der Zellsuspension in 25 cm^2 Zellkulturflasche I
- Inkubieren im CO_2-Inkubator bei 37°C, 5 % CO2 und 95 % Luftfeuchte

Mediumwechsel

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (Medium mit 10 % FKS) bei 37°C
- Absaugen des Mediums
- Zugabe von 25 ml frischen Mediums (10 % FKS) in die Zellkulturflasche
- Datum des Mediumwechsels auf der Zellkulturflasche vermerken

Passagieren der Zellen

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (PBS, Medium mit 10 % FKS,) bei 37°C
- Absaugen des Mediums
- Zellrasen mit 5 ml PBS waschen
- PBS absaugen

- 2,5 ml Trypsin auf dem Zellrasen verteilen und 1 Minute im Inkubator einwirken lassen
- Trypsin absaugen
- die Zellkulturflasche für weitere 5 Minuten in den Inkubator geben
- Zellrasen vorsichtig abklopfen und mit Medium (+10 % FKS) aufnehmen
- Zellsuspension gut resuspendieren und anschließend in eine Zellkulturflasche überführen oder die Zellzahl für einen Testansatz bestimmen oder die Zellen kryokonserviert

Bestimmung der Zellzahl undAusstreuen von Zellen in eine 96-Well-Mikrotiterplatte

- Überführung eines Aliquotes der Zellsuspension in einen Eppendorftube
- Verdünnung der Zellsuspension mit Trypan-Blau-Lösung 0,4 % (Verdünnungen sind abhängig von der Zellzahl)
- Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer
- Mikroskopische Bestimmung der Zellen:
    - Mikroskop: Nikon Typ 120; Vergrößerung: 1:10
    - Auszählen von 4 großen Quadraten mit je 16 kleinen Quadraten
    - Berechnung erfolgt nach der Formel: ermittelte Zellzahl × Verdünnung × 10^4
- Die durch Zellzahlbestimmung ermittelte Menge an Zellsuspension in ein geeignetes Zentrifugenröhrchen geben und mit Medium (+10 % FKS) auffüllen (7,5 ml/Mikrotiterplatte)
- Befüllen der äußeren Wells mit je 0,1 ml Medium (+ 10 % FKS)
- Befüllen der inneren Wells der Mikrotiterplatte mit der hergestellten Zellsuspension mit je 0,1 ml pro Well
- Inkubieren der Zellen zum Auswachsen für 3 Stunden im CO_2-Inkubator

Inkubieren der Zellen mit Testlösung

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (Medium mit 1 % FKS, Testsubstanzen, DMSO) auf 37°C
- Herstellen der Testlösungen in den sterilen Röhrchen in unterschiedlichen Konzentrationen
- Verwerfen des Mediums in die mit Papier ausgelegte Laborschale durch Ausgießen der Mikrotiterplatten in die Laborschale
- Befüllen der äußeren Wells mit Medium je 0,1 ml pro Well
- Befüllen der inneren Wells mit den unterschiedlich konzentrierten Testlösungen je 0,1 ml pro Well
- Inkubation der Mikrotiterplatte im CO_2-Inkubator für 48 Stunden

Färbung der Zellen mit Neutralrotlösung und photometrische Messung der Farbstoffaufnahme

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (serumfreies Medium, Neutralrot-Stammlösung(0,4 %), PBS) auf 37°C
- Herstellen der Neutralrot-Färbelösung: Konzentration: 50 µg/ml
    - 0,5 ml Neutralrot-Stammlösung plus 39,5 ml serumfreies Medium (für 2 Platten)
- Medium mit den Testsubstanzen der Mikrotiterplatten verwerfen
- Spülen der Wells mit PBS (0,1 ml/Well)

- Verwerfen des PBS
- Zugabe von je 0,2 ml Färbelösung pro Well
- Inkubation für 3 Stunden im CO_2-Inkubator
- Verwerfen der Färbelösung
- Fixieren der Zellen mit 1 % $CaCl_2$ (wasserfrei) in 0,37 % Formaldehyd (0,2 ml/Well)
- Verwerfen der Fixationslösung
- Herauslösen des Farbstoffes mit 1 % Essigsäure in 50 % Ethanol (0,2 ml/Well)
- Schütteln der Mikrotiterplatten für 15 Minuten bei 300 Umdrehungen/Minute mit GFL 3017
- Photometrische Messung des extrahierten Farbstoffes bei 540 nm mit Multiskan Ascent

Kryokonservierung von Zellen

- Temperieren der benötigten Flüssigkeiten (Medium mit 10 % FKS, 5 ml FKS, DMSO) bei 37°C
- Zellsuspension auf eine Zellzahl von 10.000.000 Zellen/ml durch Verdünnung mit Medium einstellen
- Herstellen des Einfriermediums durch Mischen von 11 ml Medium (10 % FKS), 5 ml FKS und 4 ml DMSO
- Das Einfriermedium sofort kühl stellen (Eisbad)
- Zellsuspension und Einfriermedium im Verhältnis 1:1 (v/v) mischen
- Pipettieren von je 1,6 ml Zellkultursuspension pro Kryoröhrchen
- Kennzeichnung der Kryoröhrchen mittels Farbcode
- Eintragen der Kennzeichnung, Zelllinie, Passage-Nr., Datum und Signum in die zugehörige Kontrollkarte
- sofortiges Kühlstellen der Kryoröhrchen in Eis
- Tieffrieren bei -20°C für 1-2 Stunden
- Überführen der Kryoröhrchen in den Tiefstkühlschrank (-78°)

10.5 Chromatographische Methoden

10.5.1 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 1

Vorsäule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säulentemperatur: 30°C

Eluent:
A: NH_4-formiat 1mM pH 3
B: MeCN
C: Isopropanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0	50	50	0
45	5	95	0
70	5	95	0
71	50	50	0
80	50	50	0

Fluss: 0,5 ml/min

Detektion:
$UVD_{220nm, 254nm, 275nm}$
$FLD_{ex275nm, em 305nm}$
ELSD, Gain 12

Injektion: 10 µl

Geräte:
Interface: Merck-Hitachi LaChrom D-7000
Degasser: ERC 3415 α
Pumpe: Merck-Hitachi LaChrom L-7100
Autosampler: Merck-Hitachi LaChrom L-7200
Säulenofen: Merck-Hitachi LaChrom L-7360
Detektor: Merck-Hitachi LaChrom L-7455
Merck-Hitachi LaChrom L-7485
Sedere Sedex Modell 75
Auswertung: HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.2 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 2

Vorsäule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säulentemperatur: 30°C

Eluent:
A: NH_4-formiat 1mM pH 3
B: MeCN
C: Isopropanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0	50	50	0
45	5	95	0
70	5	95	0
71	0	0	100
80	0	0	100
81	50	50	0
90	50	50	0

Fluss: 0,5 ml/min

Detektion:
$UVD_{220nm, 254nm, 275nm}$
$FLD_{ex275nm, em 305nm}$
ELSD, Verneblertemperatur: 35°C, Verdampfertemperatur: 30°C, Gain 12, N_2: 3,5 bar)

Injektion: 10 µl

Geräte:
Interface: Merck-Hitachi LaChrom D-7000
Degasser: ERC 3415 α
Pumpe: Merck-Hitachi LaChrom L-7100
Autosampler: Merck-Hitachi LaChrom L-7200
Säulenofen: Merck-Hitachi LaChrom L-7360
Detektor: Merck-Hitachi LaChrom L-7455
Merck-Hitachi LaChrom L-7485
Sedere Sedex Modell 75
Auswertung: HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.3 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 3

Vorsäule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säulentemperatur: 30°C

Eluent:
A: NH_4-formiat 1mM pH 3
B: MeCN
C: Isopropanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0	90	10	0
95	5	95	0
120	5	95	0
121	0	0	100
130	0	0	100
131	90	10	0
145	90	10	0

Fluss 0,5 ml/min

Detektion $UVD_{220nm, 254nm, 275nm}$
$FLD_{ex275nm, em 305nm}$
ELSD, Verneblertemperatur: 35°C, Verdampfertemperatur: 30°C, Gain 12, N_2: 3,5 bar)

Injektion 10 µl

Geräte
Interface: Merck-Hitachi LaChrom D-7000
Degasser: ERC 3415 α
Pumpe: Merck-Hitachi LaChrom L-7100
Autosampler: Merck-Hitachi LaChrom L-7200
Säulenofen: Merck-Hitachi LaChrom L-7360
Detektor: Merck-Hitachi LaChrom L-7455
Merck-Hitachi LaChrom L-7485
Sedere Sedex Modell 75
Auswertung: HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.4 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 4

Vorsäule Multospher 100 RP 18, 7µm, 50 x 10 mm, CS-Chromatographie Service

Säule Multospher 100 RP 18, 7µm, 250 x 10 mm, CS-Chromatographie Service

Säulentemperatur 30°C

Eluent A: NH_4-formiat 1mM pH 3
B: MeCN

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	27	73
15	22	78
16	27	73
22	27	73

Fluss 5,0 ml/min

Detektion UVD_{275nm}
$FLD_{ex275nm, em 305nm}$
ELSD, Verneblertemperatur: 35°C, Verdampfertemperatur: 30°C, Gain 12, N_2: 3,5 bar)

Injektion 25 µl

Geräte
Interface: Merck-Hitachi LaChrom D-7000
Degasser: ERC 3415 α

	Pumpe:	Merck-Hitachi LaChrom L-7100
	Autosampler:	Merck-Hitachi LaChrom L-7200
	Säulenofen:	Merck-Hitachi LaChrom L-7360
	Detektor:	Merck-Hitachi LaChrom L-7455
		Merck-Hitachi LaChrom L-7485
		Sedere Sedex Modell 75
	Auswertung:	HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.5 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Coatinganalytik 5

Vorsäule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säulentemperatur: 30°C

Eluent: A: 0,1 % TFA
B: MeCN

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	100	0
5	100	0
30	60	40
31	0	100
40	0	100
41	100	0
55	100	0

Fluss: 0,5 ml/min

Detektion: $UVD_{220nm, 254nm, 275nm}$
$FLD_{ex275nm, em 305nm}$
ELSD, Verneblertemperatur: 35°C, Verdampfertemperatur: 30°C, Gain 12, N_2: 3,5 bar)

Injektion: 10 µl

Geräte:

Interface:	Merck-Hitachi LaChrom D-7000
Degasser:	ERC 3415 α
Pumpe:	Merck-Hitachi LaChrom L-7100
Autosampler:	Merck-Hitachi LaChrom L-7200
Säulenofen:	Merck-Hitachi LaChrom L-7360
Detektor:	Merck-Hitachi LaChrom L-7455
	Merck-Hitachi LaChrom L-7485
	Sedere Sedex Modell 75
Auswertung:	HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.6 RP-HPLC-UVD-FLD bzw. RP-HPLC-UVD-ELSD: Kunststoffanalytik 1

Vorsäule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-

Chromatographie Service
Säulentemperatur 60°C
Eluent A: 0,1 % TFA
B: Isopropanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
49	20	80
54	20	80
55	0	100
70	0	100
71	90	10
85	90	10

Fluss 0,5 ml/min
Detektion $UVD_{220nm, 232nm, 275nm}$
$FLD_{ex275nm, em305nm}$
ELSD (Verneblertemperatur: 35°C, Verdampfertemperatur: 30°C, Gain 8, N2: 3,5 bar)

Injektion 10 µl
Geräte Interface: Merck-Hitachi LaChrom D-7000
Degasser: ERC 3415 α
Pumpe: Merck-Hitachi LaChrom L-7100
Autosampler: Merck-Hitachi LaChrom L-7200
Säulenofen: Merck-Hitachi LaChrom L-7360
Detektor: Merck-Hitachi LaChrom L-7455
Merck-Hitachi LaChrom L-7485
Sedere Sedex Modell 75
Auswertung: HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.7 RP-HPLC-UVD-FLD: Kunststoffanalytik 2

Vorsäule Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service
Säule Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service
Säulentemperatur 60°C
Eluent A: 0,1 % TFA
B: Isopropanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	20	80
10	0	100
20	0	100
21	20	80
31	20	80

Fluss 0,5 ml/min
Detektion $UVD_{220nm, 232nm, 275nm}$
$FLD_{ex275nm, em305nm}$

Injektion	10 µl	
Geräte	Interface:	Merck-Hitachi LaChrom D-7000
	Degasser:	ERC 3415 α
	Pumpe:	Merck-Hitachi LaChrom L-7100
	Autosampler:	Merck-Hitachi LaChrom L-7200
	Säulenofen:	Merck-Hitachi LaChrom L-7360
	Detektor:	Merck-Hitachi LaChrom L-7455
		Merck-Hitachi LaChrom L-7485
	Auswertung:	HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.8 RP-HPLC-UVD-CLND: Kunststoffanalytik 3

Vorsäule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säulentemperatur: 60°C

Eluent: A: 0,1 % TFA
B: Isopropanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
49	20	80
54	20	80
55	0	100
70	0	100
71	90	10
85	90	10

Fluss: 0,5 ml/min

Detektion: UVD_{220nm}
CLND (Split: 0,2 ml/min, Vakuum: 24 torr, Make Up: 43 ml/min, Inlet Ar: 50 ml/min, Inlet O2: 270 ml/min, Ozon: 25 ml/min, Photomultiplier: -750 mV)

Injektion	10 µl	
Geräte	Interface:	Agilent 35900 E
	Degasser:	Agilent 1100 Series G 1322 A
	Pumpe:	Agilent 1100 Series G 1312 A
	Autosampler:	Agilent 1100 Series G 1313 A
	Säulenofen:	Agilent 1100 Series G 1316 A
	Detektor:	Agilent 1100 Series G 1314 A
		Antek 8060
	Auswertung:	ChemStation for LC (Revision A.08.03)

10.5.9 RP-HPLC-UVD-MSD: Coatinganalytik

Vorsäule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säule: Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service

Säulentemperatur: 60°C

Eluent A: 0,5 % Ameisensäure
B: Acetonitril
C: Isopropanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0	50	50	0
45	5	95	0
70	5	95	0
71	0	0	100
80	0	0	100
81	50	50	0
90	50	50	0

Fluss 0,5 ml/min
Detektion $UVD_{220nm, 232nm, 275nm}$
ESI-TOF MS (m/z = 100 – 1700)
Injektion 10 µl
Geräte Interface: Agilent 35900 E
Degasser: Agilent 1100 Series G 1322 A
Pumpe: Agilent 1100 Series G 1312 A
Autosampler: Agilent 1100 Series G 1313 A
Säulenofen: Agilent 1100 Series G 1316 A
Detektor: Agilent 1100 Series G 1315 A
Biospectrometry Workstation, ESI-TOF MS
Auswertung: PerSeptive Biosystems, Mariner TM, Applied Biosystems Mariner Systems 5267

10.5.10 RP-HPLC-UVD-MSD: Kunststoffanalytik

Vorsäule Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 20 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service
Säule Multospher 120 RP 18 HP-5µm, 250 x 3,0 mm, CS-Chromatographie Service
Säulentemperatur 60°C
Eluent A: 0,5 % Ameisensäure
B: Isopropanol

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	90	10
49	20	80
54	20	80
55	0	100
70	0	100
71	90	10
85	90	10

Fluss 0,5 ml/min
Detektion $UVD_{220nm, 232nm, 275nm}$
ESI-TOF MS (m/z = 100 – 1700)
Injektion 10 µl
Geräte Interface: Agilent 35900 E
Degasser: Agilent 1100 Series G 1322 A

	Pumpe:	Agilent 1100 Series G 1312 A
	Autosampler:	Agilent 1100 Series G 1313 A
	Säulenofen:	Agilent 1100 Series G 1316 A
	Detektor:	Agilent 1100 Series G 1315 A
		Biospectrometry Workstation, ESI-TOF MS
	Auswertung:	PerSeptive Biosystems, Mariner TM, Applied Biosystems Mariner Systems 5267

10.5.11 Analytische SEC-UVD-ELSD

Säule	SDV® 100 Å, 5 µ, 8 x 300 mm, Polymer Standards Service; SDV® 1000 Å, 5 µ, 8 x 300 mm, Polymer Standards Service	
Säulentemperatur	30°C	
Eluent	THF	
Fluß	1 ml/min	
Detektion	$UVD_{220nm, 254nm, 275nm}$	
	ELSD (Verneblertemperatur: 35°C, Verdampfertemperatur: 30°C, Gain 8, N2: 3,5 bar)	
Injektion	10 µl	
Geräte	Interface:	Merck-Hitachi LaChrom D-7000
	Degasser:	ERC 3415 α
	Pumpe:	Merck-Hitachi LaChrom L-7100
	Autosampler:	Merck-Hitachi LaChrom L-7200
	Säulenofen:	Merck-Hitachi LaChrom L-7360
	Detektor:	Merck-Hitachi LaChrom L-7455
		Sedere Sedex Modell 75
	Auswertung:	HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.12 Präperative SEC-UVD-ELSD

Säule	SDV® 1000 Å, 5 µ, 20 x 300 mm, Polymer Standards Service	
Säulentemperatur	30°C	
Eluent	THF	
Fluss	5 ml/min	
Detektion	$UVD_{220nm, 254nm, 275nm}$	
	ELSD (Verneblertemperatur: 35°C, Verdampfertemperatur: 30°C, Gain 8, N2: 3,5 bar)	
Injektion	100 µl	
Geräte	Interface:	Merck-Hitachi LaChrom D-7000
	Degasser:	ERC 3415 α
	Pumpe:	Merck-Hitachi LaChrom L-7100
	Autosampler:	Merck-Hitachi LaChrom L-7200
	Säulenofen:	Merck-Hitachi LaChrom L-7360
	Detektor:	Merck-Hitachi LaChrom L-7455
		Sedere Sedex Modell 75
	Auswertung:	HPLC-System Manager Version 4.1 D-7000

10.5.13 GC-MSD 1

Säule	5% Phenyl Methyl Siloxane 0,25 µm (Phenomenex ZB-5MS)	
Injektorprogramm	Ausgangstemperatur:	80°C
	Heizrate:	12°C/s auf 300°C, 5 min isotherm
Injektionsvolumen	1 µl	
Transferline	300°C	
Trägergas	Helium 5.0	
Glasfluss	1 ml/min	
Split	splitless	

Ofen-Temperatur-Programm

°C/min	Tempertur [°C]	Isotherm [min]
	50	4,0
15	200	4,0
10	280	10,0
30	320	10,0

Detektormodus	Scan-Modus 40 -80 amu	
Electron Multiplier	entsprechend dem aktuellen Autotuning (gerätespezifisch)	
Solvent Delay	4,5 min	
Ionisation	Elektronenstoßionisation	
Ionisationsenergie	70 eV	
Geräte	Gaschromatograph:	Agilent G 1530 N
	Autosampler:	Agilent 7683 G Agilent 2614 A
	High vacuum pump:	Agilent EDWARDS No. G 1099-80024
	Turbomolekularpumpe: BOC EDWARDS G 2589-80062	
	Kühlung:	Peltier UPC
	Detektor:	Agilent G 2589 A
	Auswertung:	Agilent G 1701 DA
	Datenbank:	Perkin Elmer Inc., NIST 2005 Mass Spectral Library and Software

10.5.14 GC-MSD 2

Säule	5% Phenyl Methyl Siloxane 0,25 µm (Phenomenex ZB-5MS)
Injektorprogramm	250°C isotherm
Injektionsvolumen	1 µl
Transferline	280°C
Trägergas	Helium 5.0
Glasfluss	1 ml/min
Split	splitless

Ofen-Temperatur-Programm

°C/min	Temperatur [°C]	Isotherm [min]
	80	1,0
8	260	0
99	300	6,0

Detektormodus	SIM SIM-Fenster 1: m/z 74, 87, 143, 286 (ab 6 min) SIM-Fenster 2: m/z 143, 185, 199, 241 (ab 19,7 min)
Electron Multiplier	entsprechend dem aktuellen Autotuning (gerätespezifisch)
Solvent Delay	6 min
Ionisation	Elektronenstoßionisation
Ionisationsenergie	70 eV
QIon	IS Magarinsäuremethylester: 143

	Dibutylsebacat:	241
Geräte	Gaschromatograph:	Agilent G 1530 N
	Autosampler:	Agilent 7683 G Agilent 2614 A
	High vacuum pump:	Agilent EDWARDS No. G 1099-80024
	Turbomolekularpumpe:	BOC EDWARDS G 2589-80062
	Kühlung:	Peltier UPC
	Detektor:	Agilent G 2589 A
	Auswertung:	Agilent G 1701 DA
	Datenbank:	Perkin Elmer Inc., NIST 2005 Mass Spectral Library and Software

10.6 Lebenslauf

persönliche Daten

Nadine Mittag

geboren am 21.06.1979 in Großröhrsdorf

Schulbildung

von 1997 bis 1998	Gymnasium Dreikönigschule Dresden Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,7)
von 1992 bis 1997	Gymnasium Dresden-Neustadt
von 1988 bis 1992	22. Oberschule „ Dr. Richard Sorge“ mit erweitertem Fremdsprachenunterricht in Dresden
von 1986 bis 1988	26. Oberschule „Arno Lade“ in Dresden

Studium

von 2003 bis 2009	Promotionsstudium an der Technischen Universität Dresden
von 1998 bis 2003	Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Dresden Abschluss: Diplom Lebensmittelchemikerin (gut); 1.Staatsprüfung

Praktika

01.10.2001 – 31.07.2003	Studentische Hilfskraft am Institut für instrumentelle Analytik der Technischen Universität Dresden
19.02.2001 – 09.03.2001	Praktikum an der Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen
17.07.2000 – 25.08.2000	Hilfskraft im Arzneimittelwerk Dresden, Abteilung Qualitätssicherung

Werdegang

seit 01.04.2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Rostock an der Medizinischen Fakultät des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie
01.10.2007 – 31.01.2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Technischen Universität Dresden an der Professur für Bioanalytische Chemie
01.10.2003 – 30.09.2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Technischen Universität Dresden an der Professur für Lebensmittelkunde und Bedarfsgegenstände

10.7 Publikationsliste

Schriftliche Publikationen:

Mittag, N.; Förster, S.; Hoppe, S.; Simat, T. J.; Sehr, A.; Renz, S.; Vobach, M.; Kammann, U.; 2006; Bioassay Guided Analysis of Migrants from Can Coatings; Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 4, 345–353

Mündliche Präsentationen:

Zytotoxische Untersuchung an Migraten von Konservendosen mit lackierter Innenbeschichtung, Regionalverbandstagung, 17.-18. März 2005, Jena, Deutschland

Zytotoxische Untersuchung an Migraten von Lebensmittelverpackungen, Deutscher Lebensmittelchemikertag, GDCH; 18.-20. September 2006, Dresden, Deutschland

Zytotoxizitätstests zur Analytik von Lebensmittelverpackungen, Veterinärmedizin und Lebensmittelchemie, DVG-Kongress, 26.-29. September 2006, Garmisch-Patenkirchen, Deutschland

Posterpräsentationen:

Shikimisäuregehalte im Wein - Ein Schlüssel zur Rebsortendifferenzierung?, Deutscher Lebensmittelchemikertag, GDCH; 13. -15.September 2004, Bonn, Deutschland

Chemometrische Klassifizierung von Frankenweinen mit Hilfe chromatographischer Muster, Deutscher Lebensmittelchemikertag, GDCH; 13. -15.September 2004, Bonn, Deutschland

Bioassay guided analysis of migrants from can coatings, 3rd International Symposium on Food Packaging – Ensuring the Safety, Quality and Traceability of Foods, ILSI Europe, 17.-19. November 2004, Barcelona, Spain

Bioassay guided analysis of migrants from can coatings, Deutscher Lebensmittelchemikertag, GDCH; 19. -21.September 2005, Hamburg, Deutschland

Bioassay guided analysis of migrants from can coatings, Euro Food Chem XIII, 21.-23. September 2005, Hamburg, Deutschland

Abhängigkeit der Toxizität von Phenololigomeren von deren Molekulargewicht, Deutscher Lebensmittelchemikertag, GDCH; 18. -20.September 2006, Dresden, Deutschland

Kombination von Biotests und chemischer Analytik zur Untersuchung von Migration aus Kunststoffverpackungen, Deutscher Lebensmittelchemikertag, GDCH, 10. – 12. September 2007, Nürnberg - Erlangen, Deutschland

Entwicklung einer Screening-Methode zur Untersuchung der Migration von Kunststoffadditiven aus Verbundfolien, Deutscher Lebensmittelchemikertag, GDCH, 10. – 12. September 2007, Nürnberg - Erlangen, Deutschland

10.8 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Dissertation wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Simat angefertigt.

Erfolglose Promotionsverfahren haben durch mich bis jetzt nicht stattgefunden.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden in der aktuell gültigen Fassung erkenne ich in allen Teilen an.

_____

Nadine Mittag