

**Lebensmittelkonserven:
Screening auf den Übergang resorbierbarer
und toxikologisch relevanter Substanzen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
Abteilung für Lebensmittelchemie

vorgelegt von
Christian Scheunert
aus Fährdorf

Hamburg 2007

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von März 2001 bis Oktober 2005 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie der Universität Hamburg durchgeführt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Fischer

Begutachtende der Disputation:

Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart
Prof. Dr. José A. C. Broekaert
Dr. Monika Körs

Tag der mündlichen Prüfung (Disputation): 03. August 2007

DANKSAGUNG

Bei der Anfertigung dieser Arbeit habe ich Unterstützung von vielen Personen erhalten. Ich danke allen, die dabei geholfen haben, meine Bemühungen zu einem erfolgreichen Ende zu führen, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart für die Überlassung des Themas und die Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Markus Fischer für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Thomas J. Simat, Frau Angela Schäfer, Frau Andrea John, Frau Anja Heidenreich, Frau Franziska Hanft und Frau Bozena Wegryznek für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Johannes Westendorf und Frau Sabine Schröder vom Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie des Universitätsklinikums Eppendorf für die Durchführung der toxikologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Heinz Bergmann, Herrn Dr. Hans-Herbert Pott und Herrn Dr. Helmut Rottsahl für die Bereitschaft, mir bei der Anfertigung der Arbeit neben meiner eigentlichen beruflichen Tätigkeit weitestgehend Handlungsspielraum zu gewähren.

Dem Bundesministerium der Verteidigung danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit (Projektnummer: InSan I 1098-V-7503).

Mein ganz besonderer Dank gebührt meinen Kindern Jannick und Merle Annika, die es auf bewundernswerte Art ertragen haben, dass ich ihnen viel gemeinsame Zeit genommen habe. Der wichtigste Dank gebührt jedoch meiner Frau Hanne, die stets an mich geglaubt und mich unterstützt hat. Ohne ihren Rückhalt hätte ich diese Arbeit weder durchführen noch zu einem glücklichen Ende führen können.

Abkürzungsverzeichnis

ACA	Acrylsäure
ADA	Adipinsäure
AM	Allgemeine Methode
AP-ESI	Atmospheric Pressure Electrospray Ionisation, Elektrospray-Ionisierung bei Atmosphärendruck
ATR	Attenuated-total reflexion - abgeschwächte Totalreflexion
BA	Benzoessäure
BADGE	2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propan, Bisphenol A-Diglycidylether
BADGE·2 H ₂ O	Bisphenol A-bis-(2,3-dihydroxypropyl)ether
BADGE·2HCl	Bisphenol A-bis-(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether
BADGE·HCl	2-[4-(2,3-Epoxypropoxy)phenyl]-2-[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propan
BADGE·HCl·H ₂ O	2-[4-(2,3-Dihydroxypropoxy)phenyl]-2-[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propan
BD	1,2- / 1,3- / 1,4- / 2,3-Butandiol
BFDGE	2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]methan, Bisphenol F-Diglycidylether
BPA	2,2-Bis-(4-hydroxy)phenyl]propan, Bisphenol A
CE	Cholesterolester
CHDI	trans-1,4-Cyclohexandiisocyanat
CHDM	1,4-Bis(hydroxymethyl)-cyclohexan
CHI	Cyclohexylisocyanat
CN 825	3-teilige Weißblechdose
CS	Cholesterol
DAD	Dioden-Array-Detektor
DAG	Diacylglycerin
DBA	Dibutylamin
DCHM	Dicyclohexylmethan-4,4'-diisocyanat
DDIB	3,3'-Dimethyl-4,4'-diisocyanatobiphenyl
DEA	Diethylamin
DEG	Diethylenglykol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPA	Dipropylamin
DPDI	Diphenylether-4,4'-diisocyanat
EA	Erucasäureamid
EBDI	2-Ethylbutan-1,4-diisocyanat
EFSA	European Food Savety Authority
EG	Ethylenglykol
ELSD	Electronic Light Scattering Detector, Verdampfungslichtstreuendetektor
EPO	lineares BADGE-Oligomer mit Oxiranring
FA	Fettalkohol
FID	Flammenionisationsdetektor
FLD	Fluoreszenzdetektor, Fluoreszenzdetektion
FS	freie Fettsäuren
FSA	Fettsäureamid
FSME	Fettsäuremethylester
FTIR	Fourier-transforme infrared spectroscopy , Fourier-Transform Infrarotspektroskopie
GC	Gaschromatographie
HD	Hexan-1,6-diol
HDI	Hexamethylendiisocyanat
HG	Hexylenglykol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie

IPA	Isophthalsäure
IPDI	Isophorondiisocyanat
IS	Interner Standard
LB	2-teiliger Aluminiumleichtmetallbehälter
LFGB	Lebensmittel- Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
M+1 / M+23 / M+39	Wasserstoff- / Natrium- / Kaliumaddukt des Moleküls
MA	Maleinsäure
MAG	Monoacylglycerin
MAMA	9-(Methylaminomethyl)-anthracen
MDI	2,4'- / 4,4'-Diphenylmethandiisocyanat
MIC	Methylisocyanat
MOPP	1-(2-Methoxyphenyl)-piperazin
MPD	2-Methylpropan-1,4-diol
MPDI	2-Methylpentan-1,5-diisocyanat
MPPO	Modifiziertes Polyphenylenoxid
MSD	Massenselektiver Detektor, Massenselektive Detektion
NCO	Isocyanat-Gruppe
NDI	1,5-Naphthylidiisocyanat
NEPO	lineares BADGE-Oligomer, bei dem beide Epoxidgruppen abreagiert haben
NH ₄ -formiat	Ammoniumformiat
NI	Naphthylisocyanat
Nitro C	1-(4-Nitrophenyl)-piperazin
NOGE	Novolak-Glycidylether
NPG	2,2-Diethyl-1,3-propandiol (Neopentylglykol)
NR	Neutralrot
ODI	Octadecylisocyanat
PA	Phthalsäure
PAA	primäre aromatische Amine
PD	1,2- / 1,3-Propandiol
PDI	1,3- / 1,4-Phenylendiisocyanat
PE	Polyethylen
PET	Polyethylenterephthalat
PF	Paraffin
PI	Phenylisocyanat
PMA	Pyromellithsäure
PMPPi	Polymethylenpolyphenylisocyanat
PP	1-(2-Pyridyl)-piperazin
PVC	Polyvinylchlorid
RP	2-teilige Aluminiumdose mit Ringpullverschluss
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
SCF	Scientific Committee on Food, Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss der Europäischen Kommission
SEC	Size Exclusion Chromatography, Größenausschlusschromatographie
SIM	Einzelionenüberwachung, Single Ion Monitoring
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
TAG	Triacylglycerin
TDI	2,4- / 2,6-Toluoldiisocyanat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

TIC	Totalionenstrom, Total Ion Current
TMA	Trimellithsäure
TMDI	2,2,4- / 2,4,4- Trimethylhexan-1,6-diisocyanat
TMP	1,1,1-Tris(hydroxymethyl)propane (Trimethylolpropan)
TMPD	2,2,4-Trimethylpentan-1,3-diol
TPA	Terephthalsäure
Tra	Tryptamin
UVD	Ultraviolett-Detektion
WE	Wachsester
XDI	Xylenoldiisocyanat
λ_{Ex} , λ_{Em}	Excitation/Emission Wavelength, Anregungs-/Emissionswellenlänge

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Allgemeiner Teil.....	5
2.1	Migration.....	5
2.2	Rechtliche Grundlagen.....	6
2.3	Isocyanate.....	9
3	Übersicht über die Analytik von Verpackungsbestandteilen.....	16
3.1	Analytische Methoden zur Bestimmung der Hauptbestandteile.....	17
3.2	Analytische Methoden zur Bestimmung toxikologisch relevanter Bestandteile.....	18
3.3	Biologische Verfahren zur Beurteilung der Toxikologie von Lebensmittelverpackungen.....	22
3.4	Problemstellung.....	24
4	Die analytische Erfassung von Isocyanaten.....	25
4.1	Ausgangssituation für die Untersuchungen.....	25
4.2	Derivatisierungsreagenzien für Isocyanate.....	25
4.3	Optimierung der chromatographischen Trennung.....	30
4.4	Optimierung der Detektion.....	35
4.5	Zusammenfassung der optimierten Flüssigchromatographie.....	44
4.6	Optimierung der Aufarbeitung.....	45
4.7	Validierung des Verfahrens.....	49
5	Die analytische Untersuchung von Rohstoffen für Lebensmittelverpackungen.....	53
5.1	Polyol- und Isocyanatkomponenten.....	53
5.2	Polypropylen-Film.....	64
5.3	Lubricant.....	66
5.4	Laminatuntersuchungen.....	66
5.5	Kinetische Untersuchung der Kleberkomponenten.....	73
5.6	Isocyanathaltige Verbundfolien.....	78
6	Die analytische Untersuchung von Lebensmittelverpackungen.....	80
6.1	3-teilige Weißblechdose (CN 825).....	81
6.2	2-teilige Aluminiumdose mit Ringpullverschluss (RP 100).....	84
6.3	2-teilige Aluminiumdose mit Ringpullverschluss (RP 170).....	86
6.4	2-teilige Aluminiumleichtbehälter mit Easy-Open-Verschluss (LB 50, LB 150, LB 300).....	88
7	Die Anwendbarkeit von Diffusionsmodellen.....	93
7.1	Migratest © Lite 2001.....	93
7.2	Durchführung der Extraktion.....	93
7.3	Modellierung der Migration mittels MIGRATEST © Lite.....	96
8	Diskussion.....	98
8.1	Die analytische Erfassung von Isocyanaten.....	98
8.2	Die analytische Untersuchung von Rohstoffe für Lebensmittelverpackungen.....	101
8.3	Die analytische Untersuchung von Lebensmittelverpackungen.....	104
8.4	Die Anwendbarkeit von Diffusionsmodellen.....	106
8.5	Konsequenzen für die Praxis.....	106

9	Zusammenfassung.....	108
9.1	Deutsche Version.....	108
9.2	Englische Version.....	109
10	Experimenteller Teil.....	111
10.1	Geräte und allgemeine Methoden	111
10.2	Chemikalien	112
10.3	Allgemeine Methoden (AM):.....	115
10.4	Die analytische Erfassung von Isocyanaten	126
10.5	Ergebnisse der Untersuchung von Rohstoffen für Verpackungen.....	136
10.6	Ergebnisse der analytischen Untersuchungen an den Lebensmittelverpackungen.....	141
10.7	Anwendbarkeit von Diffusionsmodellen	148
11	Literatur.....	153

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Zugelassene Isocyanate mit einem Summengrenzwert von 1 mg/kg Verpackung.....	11
Abb. 2	Isocyanate die im Endprodukt nicht mehr nachweisbar sein dürfen	11
Abb. 3	Polyurethan aus TDI und Trimethylolpropan (BAYER, 2001)	13
Abb. 4	Herstellung eines Biuret-Adduktes.....	14
Abb. 5	Isocyanurate	14
Abb. 6	HDI-Uretidion.....	15
Abb. 7	Diisocyanat-Polyadditionsverfahrens.....	15
Abb. 8	Derivatisierungsreagenzien für Isocyanate.....	26
Abb. 9	HPLC-UV-D-Chromatogramm von PP.....	27
Abb. 10	Bildung eines Harnstoffderivates aus Isocyanat und PP	27
Abb. 11	Isocyanatderivate: Spezifische MS-Fragmente.....	28
Abb. 12	Diisocyanatderivate: MS-Responsebereiche	28
Abb. 13	Isocyanatstandardgemisch der PP-Derivate.....	31
Abb. 14	Abhängigkeit von der Elutionsmittelzusammensetzung.....	33
Abb. 15	Isocyanatstandardgemisches der PP-Derivate	34
Abb. 16	Isocyanatstandardgemisch der zusätzlich untersuchten PP-Derivate	34
Abb. 17	UV-Spektren aliphatischer Isocyanat-PP-Derivate (links) und vom NI-PP-Derivat (rechts)	35
Abb. 18	UV-Spektrum der Isocyanat-PP-Derivate bei pH 3.....	36
Abb. 19	Isocyanatkalibrationen: Vergleich der Steigungen.....	37
Abb. 20	2,4-TDI-PP-Derivat	40
Abb. 21	Standardisocyanate: Derivatisierung mit PP.....	41
Abb. 22	Standardisocyanate: Derivatisierung mit DEA	41
Abb. 23	Abhängigkeit MS-Intensität des PP-Qualifiers m/z 121 von der Fragmentorspannung	42
Abb. 24	Abhängigkeit MS-Intensität des Harnstoff-Qualifiers m/z 190 von der Fragmentorspannung.....	43
Abb. 25	MS-Intensitäten der PP-spezifischen Qualifier sowie der Molekülionen M+1	44
Abb. 26	Isocyanat-Rückstände: Vergleich verschiedener Aufnahme-Lösungen.....	47
Abb. 27	Folien- und Isocyanat-Rückstände: Vergleich verschiedener Aufnahme-Lösungen	47
Abb. 28	Aufarbeitungsschema nach Optimierung.....	48
Abb. 29	BADGE•1H ₂ O-Addukt: MS-Spektrum (Scan-Modus, 160 V)	51
Abb. 30	BADGE•1H ₂ O-PP-Addukt: Strukturformel	51
Abb. 31	BADGE•1H ₂ O-DEA-Addukt (MG = 431 g/mol)	52
Abb. 32	Komponente KAS-1 B: SEC-ELSD-Chromatogramm.....	54
Abb. 33	Komponente KAS-2B: SEC-ELSD-Chromatogramm nach Derivatisierung mit DEA	55
Abb. 34	Berechnungsschema: Anzahl freier Isocyanatgruppen.....	58
Abb. 35	MDI-Homologe nach KITTEL (1998): Strukturformel.....	59
Abb. 36	IPDI-Isocyanurat (Trimer): Strukturformel.....	59
Abb. 37	Overlay: FLD-Chromatogramm KAS-5 B und Desmodur® Z 4470 BA.....	60
Abb. 38	Overlay: FLD-Chromatogramme KAS-7 IK und Desmodur® L 75.....	61
Abb. 39	Polypropylen-Film : NP-HPLC-ELSD-Chromatogramm des Ethanol-Migrats	65
Abb. 40	KAS-5: Polyesterscreening der Extrakte von Laminat A (oben) und Laminat D (unten)	69
Abb. 41	Laminat C: HPLC-MSD-Chromatogramm des Acetonitrilextraks.....	70
Abb. 42	KAS-1: Polyesterscreening der Extrakte von Laminat C (oben), Laminat E (unten)	71
Abb. 43	Laminat A: MSD-Chromatogramm des PP-Extraks.....	72
Abb. 44	KAS-1: HPLC-FLD-Chromatogramme der kinetischen Isocyanatuntersuchung.....	74
Abb. 45	KAS-1: Grafik der kinetischen Isocyanatuntersuchung.....	75
Abb. 46	KAS-5: HPLC-FLD-Chromatogramme der kinetischen Isocyanatuntersuchung.....	76
Abb. 47	KAS-5: Grafik der kinetischen Isocyanatuntersuchung.....	77
Abb. 48	PET/PE-Folie nach Derivatisierung mit PP.....	78
Abb. 49	PET/PE-Verbundfolie: MS-SIM-Spektrum des Signals bei einer Retentionszeit von 23,5 min	79
Abb. 50	CN 825 Korpus: FTIR-Spektrum mit Ausschnitt aus einem BPA-basierenden Epoxidharz	81

Abb. 51	CN 825 Siegelnaht: FTIR-Spektrum mit Ausschnitt aus einem Polyesterharz	81
Abb. 52	CN 825 Korpus: Migratzusammensetzung, Gesamtmigrat: 11,1 mg/dm ²	83
Abb. 53	CN 825 Deckel: Migratzusammensetzung, Gesamtmigrat: 6,1 mg/dm ²	84
Abb. 54	RP 100 Korpus: Migratzusammensetzung, Gesamtmigrat: 2,98 mg/dm ²	86
Abb. 55	RP 170 Korpus: Migratzusammensetzung, Gesamtmigrat: 4,08 mg/dm ²	87
Abb. 56	LB 50: FTIR-Spektrum.....	88
Abb. 57	LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Variante des „Plating Efficiency“-Test.....	90
Abb. 58	LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels „Plating Efficiency“-Test nach Fraktionierung	91
Abb. 59	Deckel LB: Migratzusammensetzung	91
Abb. 60	Korpi LB: Migratzusammensetzung.....	92
Abb. 61	Vergleich verschiedener Simulanzien und Extraktionsmittel	95
Abb. 62	Migrationskinetik in BADGE-Equivalenten, (CN 825, Ethanol 50%).....	95
Abb. 63	Modellierung der Migrationskinetik am Beispiel von cyclo-Di-BADGE (CN 825, 50% Ethanol).....	96
Abb. 64	Polystyrolstandard: SEC-ELSD-Chromatogramm	116
Abb. 65	Overlay: Carbonsäure-Mischstandard und Maleinsäurestandards	118
Abb. 66	KAS-1B: Polyester-Screening	120
Abb. 67	Lipidstandard: NP-HPLC-ELSD-Chromatogramm.....	122
Abb. 68	IPDI: Beispielhafte Grundkalibriergerade	135
Abb. 69	IPDI: Beispielhaft die Residuen der Grundkalibrierung	135
Abb. 70	Komponente KAS-1 B: Polyesterscreening	136
Abb. 71	Komponente KAS-2 A: Polyesterscreening	137
Abb. 72	Komponente KAS-5/6 A und KAS-7 HK: Polyester-Screening	138

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Simulanz- und Ersatzlösemittel gemäß DIN EN 13130-1:2004.....	8
Tab. 2	PP- und DEA-Derivate: Gruppenspezifische Fragmente (Qualifier).....	38
Tab. 3	Derivatisierung mit PP und DEA: Charakteristische Molekülfragmente und Addukte.....	39
Tab. 4	Übersicht über die Parameter	45
Tab. 5	Grundkalibrierung Isocyanate: mittlere Kenndaten	49
Tab. 6	Grundkalibrierung Isocyanate: Arbeitsbereich.....	49
Tab. 7	Polyolkomponenten: Molekulargewichtsbestimmung.....	54
Tab. 8	Isocyanatkomponenten: Molekulargewichtsbestimmung	55
Tab. 9	Isocyanatkomponenten: Gesamtisocyanatgehalt (berechnet als NCO).....	56
Tab. 10	Kleberkomponenten: Isocyanatgehalt.....	57
Tab. 11	Polyisocyanatkomponenten: postulierte Prepolymere	58
Tab. 12	Polyesterkomponenten: Carbonsäurezusammensetzung nach Hydrolyse.....	62
Tab. 13	Polyesterkomponenten: Polyolzusammensetzung nach Hydrolyse.....	63
Tab. 14	Laminate: Daten zur Herstellung	67
Tab. 15	Laminate: Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung aus den Migraten	68
Tab. 16	Laminat C: Auswertung des Polyesterscreenings des Acetonitril-Extraktes	70
Tab. 17	Laminate: Gesamtisocyanatgehalt.....	72
Tab. 18	Laminate: Herstellerangaben für die kinetische Untersuchung.....	73
Tab. 19	IPDI-Gehalt der PET/PE-Verbundfolie im Rahmen der Aushärtung	79
Tab. 20	Untersuchungsmaterialien	80
Tab. 21	Untersuchungsumfang und Untersuchungsmethoden.....	80
Tab. 22	CN 825: Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel.....	82
Tab. 23	Leichtmetallbehälter: Gesamtmigrate	88
Tab. 24	Leichtmetallbehälter: Lipophile Verbindungen	89
Tab. 25	Migrationsbedingungen	94
Tab. 26	Liste der verwendeten Gefahrstoffe.....	112
Tab. 27	Chromatographische Bedingungen zu AM 2	115
Tab. 28	Chromatographische Bedingungen zu AM 3	117
Tab. 29	Chromatographische Bedingungen zu AM 4	118
Tab. 30	Chromatographische Bedingungen zu AM 5	119
Tab. 31	Chromatographische Bedingungen zu AM 6	121
Tab. 32	Chromatographische Bedingungen zu AM 7	121
Tab. 33	Lipidklassen	122
Tab. 34	Ergebnis des Löslichkeitsversuchs	123
Tab. 35	Chromatographische Bedingungen zu AM 10	124
Tab. 36	Ames Test: Positivkontrollen zur Prüfung des Versuchsmodells und des S9-Mix	125
Tab. 37	Methodenentwicklung: Isocyanat-Standardgemische.....	126
Tab. 38	Methodenentwicklung: erweitertes Isocyanatstandardgemisch	126
Tab. 39	Methodenentwicklung: Derivatisierungslösungen	126
Tab. 40	Derivatisierungsreagenzien: Detektionsbedingungen für die Derivate.....	127
Tab. 41	Derivatisierungsreagenzien: Qualifier	127
Tab. 42	Isocyanatderivate: MS-Response	127
Tab. 43	Isocyanatderivate: Elutionsverhalten	128
Tab. 44	Chromatographische Bedingungen zur Optimierung des Trennsystems.....	128
Tab. 45	Retentionszeiten der Isocyanat-PP-Derivate in Abhängigkeit vom pH-Wert bei MS-Detektion	128
Tab. 46	Retentionszeiten der Isocyanat-DEA-Derivate in Abhängigkeit des pH-Wertes bei MS-Detektion.....	129
Tab. 47	Retentionszeiten der Isocyanat-PP-Derivate in Abhängigkeit der Säulentemperatur bei FL-Detektion.....	129
Tab. 48	Retentionszeiten der Isocyanat-PP-Derivate in Abhängigkeit des Anteils am organischen Modifier ...	129
Tab. 49	Retentionszeiten der Isocyanat-DEA-Derivate in Abhängigkeit des Anteils am organischen Modifier.	129
Tab. 50	Retentionszeiten der Isocyanat-PP-Derivate sowie relative Retentionszeiten	130

Tab. 51	Optimierung der MS-Detektion: Abhängigkeit der MS-Response des PP-Qualifiers m/z 121	130
Tab. 52	Optimierung der MS-Detektion: Abhängigkeit der MS-Response des PP-Qualifiers m/z 190	131
Tab. 53	PP-spezifische Qualifier und der Molekülonen M+1: MS-Response.....	131
Tab. 54	Substanzspezifische Cluster- und Fragmentionen	131
Tab. 55	Abhängigkeit der Peak-Fläche des IPDI-PP-Derivates vom Dry Gas Flow	132
Tab. 56	Abhängigkeit der Peak-Fläche des IPDI-PP-Derivates vom Nebulizer Pressure	132
Tab. 57	Untersuchung verschiedener Extraktionsmittel	132
Tab. 58	Untersuchung verschiedener Aufnahmegemische für die Rückstände	133
Tab. 59	Untersuchung verschiedener Aufnahmegemische für die Rückstände	133
Tab. 60	Grundkalibrierung für Methodvalidierung: Standardkonzentrationen.....	134
Tab. 61	Grundkalibrierung für Kaschierkleberkomponenten: Standardgemisch.....	134
Tab. 62	Grundkalibrierung für Methodvalidierung: Verfahrenskenndaten	134
Tab. 63	Grundkalibrierung für Kaschierkleberkomponenten: Verfahrenskenndaten	135
Tab. 64	Wiederfindungsraten von NI (IS)	136
Tab. 65	Komponente KAS-1 B: Auswertung des Polyesterscreenings.....	136
Tab. 66	Komponente KAS-2 A: Auswertung des Polyester-Screenings.....	137
Tab. 67	Komponente KAS-5/6 A und KAS-7 HK: Auswertung des Polyester-Screenings.....	138
Tab. 68	PP-Folie: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11).....	139
Tab. 69	PP-Folie: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest.....	139
Tab. 70	Peakflächenverhältnisse der Extrakte der LB und des Lubricants.....	139
Tab. 71	Lubricant: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11).....	139
Tab. 72	Lubricant: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest.....	140
Tab. 73	Laminate: Auswaagen und Gesamtmigrate.....	140
Tab. 74	Kinetische Untersuchung des Laminats von KAS-1	140
Tab. 75	Kinetische Untersuchung des Laminats von KAS-5	141
Tab. 76	CN 825: spezifisches Migrat von Carbonsäuren (s. 10.3 AM 3)	141
Tab. 77	CN 825 - Siegelnaht: Carbonsäuren nach Hydrolyse (s. 10.3 AM 5)	141
Tab. 78	CN 825: Harzbestandteile im Acetonitrilextrakt (s. 10.3 AM 6).....	142
Tab. 79	CN 825: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11)	142
Tab. 80	CN 825: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest (s. 10.3 AM 12).....	142
Tab. 81	RP 100: Harzbestandteile im Acetonitrilextrakt (s. 10.3 AM 6).....	142
Tab. 82	RP 100: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11).....	143
Tab. 83	RP 100: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest (s. 10.3 AM 12)	143
Tab. 84	RP 170: Carbonsäuren nach Hydrolyse (s. 10.3 AM 5).....	143
Tab. 85	RP 170: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11).....	143
Tab. 86	RP 170: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest (s. 10.3 AM 12)	143
Tab. 87	LB 150: Carbonsäuren nach Hydrolyse (s. 10.3 AM 5)	144
Tab. 88	LB: Lipophile Substanzen (vgl. AM 7)	144
Tab. 89	LB 300: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11)	144
Tab. 90	LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest (s. 10.3 AM 12)	144
Tab. 91	Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest	145
Tab. 92	LB 300: Toxizitätsprüfung, Bakterienstamm Salmonella Typhimurium TA 100	145
Tab. 93	LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität Plating Efficiency, 1. Durchgang	146
Tab. 94	LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität Plating Efficiency, 2. Durchgang	146
Tab. 95	LB 300: Fraktionierung mittels SEC-ELSD	146
Tab. 96	LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Plating Efficiency nach Fraktionierung.....	147
Tab. 97	Migrationskinetik: 50% Ethanol, 40 °C	148
Tab. 98	Migrationskinetik: 50% Ethanol, 60 °C	149
Tab. 99	Migrationskinetik: 50% Ethanol, 80 °C	149
Tab. 100	Migrationskinetik: 95% Ethanol, 60 °C.....	150
Tab. 101	Migrationskinetik: Isooktan, 80 °C.....	150
Tab. 102	Migrationskinetik: 33% Butylacetat / Isooktan, 60 °C.....	151

Tab. 103	BADGE-Derivate im Acetonitrilextrakt und im Migrat mit Sonnenblumenöl.....	151
Tab. 104	Berechnung der Diffusionskoeffizienten mittels MIGRATEST © Lite	152

1 Einleitung

Der Verbraucher stellt an seine Ernährung und somit an die Lebensmittel die seiner Ernährung dienen, zunehmend höhere Anforderungen. Sie sollen preisgünstig, schnell zuzubereiten und lange haltbar sein. Dabei sollen sie gesund sein und gut schmecken. Die Lebensmittelindustrie steht der Herausforderung einer langen Haltbarkeit mit zwei grundsätzlichen Lösungsansätzen gegenüber: Eine Verkürzung der Herstellungs- und Transportzeiten vorwiegend im Bereich der Frischeprodukte und der Produkte mit nur begrenzter Haltbarkeit sowie einer Verlängerung der Haltbarkeit durch Zusatzstoffe und die Art der Verpackung. Die Übergänge zwischen den einzelnen Lösungswegen sind fließend und immer nur ein Kompromiss in Hinsicht auf die Anforderungen des Verbrauchers.

Eine Konservierung kann einerseits durch den Zusatz von Konservierungsstoffen erfolgen und andererseits durch die Art und Weise der Herstellung und die verwendete Verpackung. Da die Akzeptanz beim Verbraucher für Zusatzstoffe, allen voran Konservierungsstoffen sehr gering ist, spielt die Verpackungstechnologie in der heutigen Zeit eine entscheidende Rolle. Primärer Zweck von Lebensmittelverpackungen ist es, Lebensmittel vor physikalischen, biologischen und chemischen Schädigungen zu schützen. Lebensmittelverpackungen werden von Alters her dergestalt konzipiert, dass die Nahrung vor Reaktionen, die von der Verpackung ausgehen können, geschützt wird und insbesondere das Risiko einer Freisetzung von Verpackungsbestandteilen, die durch Migration auf Lebensmittel übergehen können, möglichst gering gehalten wird. Gemäß der derzeitigen Rechtsvorschriften der Europäischen Gemeinschaft wird eine höchstmögliche Inertheit der Materialien mit Lebensmittelkontakt und somit eine möglichst geringe Lebensmittelkontaminierung gefordert. So dürfen Verpackungsmaterialien keine unvermeidbare Veränderung der Zusammensetzung eines Lebensmittels oder eine nachteilige Beeinträchtigung seiner organoleptischen Eigenschaften herbeiführen. Zur Überprüfung ob ein unerlaubter Stoffübergang stattfindet, dienen unterschiedliche Migrationsuntersuchungen an den Verpackungen oder Berechnungen mittels Diffusionsmodellen.

Verwendung finden heute, neben klassischen Lebensmittelverpackungen, aktive und intelligente Verpackungssysteme. Bei aktiven Verpackungssystemen treten Materialien und Gegenstände in Wechselwirkung mit Lebensmitteln und reagieren dahingehend, dass sie den Zustand des Lebensmittels während der Lagerung konservieren oder sogar verbessern und die Haltbarkeit des verpackten Lebensmittels verlängern. Hierzu zählen z.B. Sauerstoffbinder, Aromastoffe, Materialien, die Konservierungs- bzw. Antioxidationsmittel freisetzen und Absorber für Ethylen, unerwünschte Gerüche sowie bestimmte Wellenlängen des Lichts. Intelligente Materialien und Gegenstände überwachen permanent den Zustand verpackter Lebensmittel und geben Aufschluss über ihren Zustand. Sie sind mit Frische-, Sauerstoff- oder Feuchteindikatoren, Zeit-Temperatur-Indikatoren und/oder Gas-/ Leckgassensoren versehen.

Zur Indikation von Frische und Feuchte, Sauerstoffgehalt oder Beschädigung der Verpackung detektieren Mikrosensoren die Anwesenheit bestimmter Stoffe und wandeln diese in Verbindungen mit einer Indikatorsubstanz in Farbsignale um. Zeit-Temperatur-Indikatoren wirken als Temperaturlogger und zeigen ebenfalls über eine Färbung nachteilige Beeinflussung bei Transport oder Lagerung an. Zukünftige Systeme sollen über Mikrosensoren verfügen, die mit Chips verbunden werden und Daten an Computersysteme übermitteln und völlig neue Möglichkeiten bieten. Die Kosten-Nutzen-Probleme verhindern jedoch derzeit eine wirtschaftliche Verwendung.

Nicht zuletzt wegen der Kosten ist die klassische und noch immer am weitesten verbreitete Möglichkeit bei der Versorgung mit lange haltbaren Produkten die Verwendung von lange lagerfähigen Lebensmittelkonserven für Halbfertig- und Fertigprodukte. Neben der Verwendung von Glas, vor allem in Form von Schraubdeckelgläsern, wird Metall in Form von Weißblechdosen oder Leichtmetallbehältern verwendet. Um Wechselwirkungen zwischen Lebensmittel und Metall, wie Korrosion des Metalls durch Bestandteile des verpackten Lebensmittels oder Ausbildungen von Verfärbungen oder Fehlparfums durch Metallbestandteile, zu verhindern, erfolgt eine Beschichtung des Metalls. Zu diesem Zweck werden die metallischen Verpackungen entweder mit einer Polymerschicht in Form von Epoxidharzen oder Organosolen (Polyvinylchlorid-Lacke, PVC-Lacke) oder Polyesterlacken versehen oder es wird eine Kaschierung mittels eines meist Isocyanathaltigen Klebers und einer Kunststoffolie vornehmlich Polypropylen durchgeführt. An beide Arten der Beschichtung werden hohe Anforderungen gestellt, da sie die Verformung der Verpackung beim Produktionsprozess und gegebenenfalls eine Hitzesterilisation überstehen müssen.

Zahlreiche Bestandteile der Beschichtungen besitzen als Reinsubstanzen ein hohes toxikologisches Potential. Am bekanntesten sind hierbei in der Lebensmitteltechnologie die auf 2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propan (Bisphenol A-Diglycidylether, BADGE) (KANERVA et al., 1991, VANHOUTTE et al., 1995) basierenden Epoxidharze und Organosole und die primären aromatischen Amine (PAA), die sich aus Isocyanaten und Wasser bilden können, sowie die Isocyanate selbst. Letztere sind aus der Lackindustrie als die Hauptursache für berufsbedingtes Asthma bekannt und machen insgesamt bei den berufsbedingten Asthmaerkrankungen in den USA im Zeitraum 1993 bis 1999 einen Anteil von 8% aus (NIOSH 2003). Aber auch eine Reihe weiterer Stoffe, wie Phenole, Xylole und Glykole finden Anwendung bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen.

Durch Polymerisationsreaktionen der unterschiedlichsten Monomere entstehen die eigentlichen Beschichtungen. Im Endprodukt verbleiben jedoch in der Regel Reste an Monomeren und kleinere Reaktionsprodukte die auf Grund ihrer chemischen Eigenschaften in der Lage sind, in das Lebensmittel überzugehen und beim Verzehr des Lebensmittels vom Verbraucher aufgenommen zu werden. Über die toxikologische Relevanz der Substanzen, die potentiell aus

einer Verpackung in Lebensmittel übergehen können, existieren derzeit keine Untersuchungen. Es ist lediglich möglich auf toxikologische Daten für die verwendeten Monomere zurückzugreifen. Es sollten daher im Rahmen dieser Arbeit Erkenntnisse gesammelt werden, die Aussagen ermöglichen, ob mit einem Übergang nennenswerter Mengen an toxikologisch relevanten Verbindungen aus Verpackungen in Lebensmittel gerechnet werden muss.

Bisher beschränkte sich die Analytik meist auf einzelne Substanzen oder Gruppen gesetzlich geregelter Monomere. Der Wissenschaftliche Lebensmittelausschuss der Europäischen Kommission (Scientific Committee on Food – SCF) und die European Food Safety Authority (EFSA) betrachten den gesamten Bereich mit einem Molekulargewicht von unter 1000 Dalton (Da) als toxikologisch relevant, weil dieser durch den Gastrointestinaltrakt vom Menschen resorbiert werden kann (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001a, EFSA 2006). GROB (1999) schlägt erstmals einen Ansatz vor, wie eine umfassende Analytik von Lebensmittelverpackungen unter Berücksichtigung toxikologischer Aspekte erfolgen könnte. Er geht hierbei von einem fraktionierenden Schema mit Untersuchung der Einzelfractionen aus. Der Ansatz von SIMAT und SCHAEFER (2004) führt hingegen konkrete Methoden zur Analytik der Hauptbestandteile von Lebensmittelverpackungen an und sieht die Notwendigkeit spezieller Screeningmethoden für toxikologisch relevante Substanzgruppen vor.

Analysenverfahren für die Gruppe der auf Bisphenol A (BPA) basierenden Epoxidharze, die sowohl Monomere als auch Oligomere erfassen, werden für Oligomere bis zum BADGE-Pentamer (1476 Da) von BIEDERMANN und GROB (1998), für BADGE mit Kettenstopper- oder Lösungsmitteladdukten von BIEDERMANN et al. (1998) sowie von BERGER et al. (2001) beschrieben. SCHÄFER beschreibt ein routinetaugliches Analysenverfahren für auf BPA basierende Epoxidharze mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da (SCHÄFER et al. 2004a) und für cyclische oligomere Polyester mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da (SCHÄFER et al. 2004b) sowie für lipophile Substanzen (SCHÄFER et al. 2003).

Für Untersuchungen auf die aus den hochtoxischen Isocyanaten hervorgehenden noch immer Isocyanathaltigen Reaktionsprodukte stehen bisher keine routinetauglichen Analysenverfahren zur Verfügung. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer routinetauglichen validierten Methode, mit der es möglich ist oligomere Isocyanathaltige Verbindungen mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da erfassen zu können und die gesetzlichen Regelungen hinsichtlich der Verwendung monomerer Isocyanate überwachen zu können.

Bisher sind in der Literatur keine Untersuchungen an handelsüblichen Lebensmittelverpackungen beschrieben, bei denen das Globalmigrat in Bezug zu einzelnen spezifischen Migraten gesetzt wurde, mit dem Ziel möglichst das gesamte Migrat aufzuklären. Lediglich bei SIMAT und SCHAEFER (2004) werden Daten für Polyester- und Epoxybasierende Beschichtungen angeführt, die sich jedoch auf Modellsubstanzen beziehen und nicht auf handelsübliche Verpackungen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, die

Hauptkomponenten am Globalmigrat zu quantifizieren, speziell auf toxikologisch relevante Substanzen zu screenen und zu prüfen, welcher Anteil am Globalmigrat noch verbleibt. Als Untersuchungsmaterial dienen unterschiedliche Lebensmittelkonserven aus dem Verteidigungsvorrat der Bundeswehr, sowie ausgesuchte Rohstoffe für die Herstellung der untersuchten Lebensmittelkonserven.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Migration

Als Migration (Stofftransfer) wird der Übergang von Stoffen aus dem Packstoff in das kontaktierte Lebensmittel bezeichnet.

Ein Übergang von Metallionen kann durch eine Lackierung oder Kunststoffbeschichtung vermieden werden. An dessen Stelle tritt jedoch die Migration von Bestandteilen aus den Beschichtungen.

Als Bestandteile von Beschichtungen kommen mehrere hundert monomere Substanzen in Betracht, aus denen durch zahlreiche Reaktionen eine Vielzahl von Oligomeren und Polymeren entstehen kann. Je nach Beschichtung können Monomere und Oligomere aus den Beschichtungen in Lebensmittel migrieren. Der Gesetzgeber unterscheidet bei der Überwachung zwei Arten der Migration: Die Globalmigration und die spezifische Migration.

Als Globalmigration wird die Gesamtheit aller migrierenden Substanzen unter festgelegten Bedingungen verstanden. Die Spezifische Migration hingegen bezieht sich auf eine einzelne Substanz oder eine Gruppe von ähnlichen Substanzen.

Zur Bestimmung der Migration stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die Globalmigration wird üblicherweise gravimetrisch bestimmt. Andere Verfahren beschreiben eine Methode auf Basis der Größenausschlusschromatographie (Size-Exclusion-Chromatography – SEC) mit Verdampfungslichtstreuendetektor (Electronic-Light-Scattering-Detector – ELSD) (SCHÄFER et al., 2004c).

Die Spezifische Migration wird hingegen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Methoden bestimmt, da sie substanz- bzw. gruppenspezifisch erfolgt.

Besondere Bedeutung auf Grund der toxikologischen Relevanz der Einzelverbindungen besitzen die Untersuchungen auf BADGE und seine Derivate. BIEDERMANN et al. (1997) stellten eine Methode zur simultanen Bestimmung von BADGE und seinen Hydrochlorierungsprodukten vor. RAUTER et al. (1999) entwickelten das Verfahren, zur Bestimmung von BADGE und seinen Hydrolyseprodukten in Lebensmitteln, welches später auf die durch den SCF (1999) in den Grenzwert einbezogenen Derivate ausgedehnt wurde (BIEDERMANN et al., 1999a, BILES et al., 1999, LINTSCHINGER und RAUTER, 2000). PETERSEN et al. (2003) entwickelten ein Verfahren zur Bestimmung von BADGE und seinen Derivaten in Lebensmitteln mittels internem Standard und SCHÄFER et al. (2004a) haben ein Verfahren entwickelt, welches neben BADGE, seinen Hydrochlorierungs- und Hydrolyseprodukten zusätzlich auf Bisphenol A (BPA) basierende Oligomere mit einem Molekulargewicht von <1000 Da erfasst.

Weitere Substanzen, die bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen verwendet werden und bekanntermaßen ein toxikologisches Potential besitzen sind Isocyanate und die durch

Reaktion mit Wasser, entweder aus der Luft oder aus dem Lebensmittel selbst, aus den Isocyanaten entstehenden primären aromatischen Aminen (PAA). Für die Bestimmung der Isocyanatmonomere steht eine DIN-Methode und für die Bestimmung von PAA eine § 35-LMBG-Methode zur Verfügung. Bei der ersteren werden die Monomere erfasst und bei der letzteren die Summe der PAA.

Die Migration eines Stoffes aus der Verpackung in das Lebensmittel ist ein Diffusionsvorgang, der von verschiedenen Faktoren, wie der Kontaktdauer, Temperatur bei der Herstellung und Lagerung, Art der Verpackung, sowie Art des Lebensmittels (sauer, fetthaltig, usw.), der Schichtdicke des Kunststoffes oder Lackes, des Molekulargewichtes sowie der Konzentration der übergehenden Substanz abhängig ist. Gemäß der Richtlinie 2002/72/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002b) wird die Einhaltung der spezifischen Migrationshöchstwerte entweder durch Bestimmung des jeweiligen Stoffes im Lebensmittel oder in einem Lebensmittelsimulanz oder durch Verwendung eines allgemein anerkannten und wissenschaftlich belegten Diffusionsmodell geprüft. Der Software Migratest © Lite 2001 liegt ein solches anerkanntes Diffusionsmodell zugrunde, mit dessen Hilfe eine Abschätzung der Migration von Kunststoffen in Lebensmittel oder Lebensmittelsimulanzien ermöglicht wird. Migratest © Lite 2001 ist ursprünglich konzipiert für die Migration aus Kunststoffen, nicht jedoch für Lacke, bei denen die Schichtdicke geringer ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die Software Migratest © Lite 2001 auch für Lacke anwendbar ist.

2.2 Rechtliche Grundlagen

In Artikel 2 der Rahmenrichtlinie 89/109/EWG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1989) wurde festgelegt, dass Bedarfsgegenstände als Fertigerzeugnis an Lebensmittel keinen ihrer Bestandteile in einer Menge abgeben dürfen, die geeignet ist, die menschliche Gesundheit zu gefährden oder eine unverträgliche Veränderung der Zusammensetzung der Lebensmittel herbeizuführen. Diese Forderung wurde leicht abgewandelt in den § 31 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenstandesgesetzes (LMBG, 1997) übernommen, der es verbietet Gegenstände als Bedarfsgegenstände gewerbsmäßig so zu verwenden oder für solche Zwecke in den Verkehr zu bringen, dass von ihnen Stoffe auf Lebensmittel oder deren Oberfläche übergehen können, ausgenommen gesundheitlich, geruchlich und geschmacklich unbedenkliche Anteile, die technisch unvermeidbar sind. Die Richtlinie 89/109/EWG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1989) ist durch die Verordnung 1935/2004/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2004) ersetzt worden. Die o.a. Anforderungen werden nunmehr in Artikel 3 Absatz 1 angeführt. Der Geltungsbereich ist erweitert um den Aspekt, dass aktive und intelligente Materialien und Gegenstände mit aufgenommen wurden und die Verpackung keine Bestandteile auf Lebensmittel in Mengen abgeben darf, die geeignet sind, eine Beeinträchtigung der organoleptischen Eigenschaften der Lebensmittel herbeizuführen

Das LMBG regelt zudem im § 30, dass es verboten, ist Bedarfsgegenstände derart herzustellen, dass sie bei bestimmungsgemäßen oder vorausszusehendem Gebrauch geeignet sind, die Gesundheit durch ihre stoffliche Zusammensetzung, insbesondere durch toxikologisch wirksame Stoffe oder durch Verunreinigungen zu schädigen.

Das LMBG (1997) ist durch das Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB, 2006) ersetzt worden. Bezüglich der Regelungen im Hinblick auf die Migration bei Bedarfsgegenständen kam es hierbei nicht zu inhaltlichen Änderungen.

Die konkrete Umsetzung der Richtlinie 89/109/EWG erfolgte durch die Richtlinie 90/128/EWG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1990), die die Verwendung von Monomeren als Ausgangssubstanzen bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen aus Kunststoff regelt. Sie erlaubt den Einsatz für die unterschiedlichsten Monomere, begrenzt jedoch den Restgehalt des jeweiligen Monomers im fertigen Produkt und verbietet Produkte, in denen eine unerlaubte Migration in das verpackte Lebensmittel auftritt. Der Restgehalt eines Monomers kann auf eine einzelne Substanz bezogen sein, oder wie zum Beispiel im Fall der Isocyanate als höchstzulässiger Restgehalt einer Substanzgruppe (Summengrenzwert). So wurde der Summengrenzwert für 12 Isocyanate auf 1 mg Isocyanat, berechnet als Isocyanat (NCO) pro kg Verpackung festgelegt. Die Richtlinie 90/128/EWG führt darüber hinaus einen Gesamtmigrationsgrenzwert von 10 mg Stoffe pro cm² Oberfläche des Bedarfsgegenstandes in Simulanzien an. Simulanzien sind Lösemittel, die Lebensmittel bei Migrationsuntersuchungen ersetzen, um standardisierte Bedingungen zu schaffen. In besonderen Fällen, wenn die Simulanzlösemittel für fetthaltige Lebensmittel nicht verwendet werden können, ist die Verwendung von Ersatzlösemitteln zulässig. In der Analytik werden teilweise jedoch auch Extraktionsmittel verwendet, mit denen im Einzelfall möglichst alle unter normalen Bedingungen migrierenden Substanzen aus einem Bedarfsgegenstand herausgelöst werden sollen, um den „worst case“ zu simulieren. Die Grundregeln für die Ermittlung der Migration, die sowohl bei den Einzelsubstanzen, als auch dem Globalmigrat anzuwenden sind, sind in der Richtlinie 82/711/EWG (EUROPÄISCHER RAT, 1982) geregelt. In der zweiten Änderungsrichtlinie 97/48/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1997) werden u.a. Ersatzlösemittel für fetthaltige Lebensmittel eingeführt, wenn Simulanzlösemittel ungeeignet sind. Je nach Verwendungszweck des Bedarfsgegenstandes sind die Kontaktdauer und Kontakttemperatur für die Migrationsuntersuchung in der Richtlinie 97/48/EC vorgeschrieben. Die Richtlinie 85/572/EWG (EUROPÄISCHER RAT, 1985) beinhaltet eine Liste der Simulanzien für Migrationsuntersuchungen. Zusammengefasst sind die Bedingungen der Richtlinien für die Prüfverfahren zur Ermittlung der spezifischen Migration von Substanzen aus Kunststoffen in Lebensmittel und Prüflebensmittel, sowie die Auswahl und Kontaktbedingungen in der DIN EN 13130-1 (2004) (Tab. 1).

Tab. 1 Simulanz- und Ersatzlösemittel gemäß DIN EN 13130-1:2004

Lebensmittelkategorie	Simulanzlösemittel	Ersatzlösemittel
Wässrige Lebensmittel (pH > 4,5)	Destilliertes Wasser oder Wasser von gleichwertiger Qualität	-
Saure Lebensmittel (wässrige Lebensmittel mit einem pH-Wert ≤ 4,5)	3 %ige Essigsäure	-
Alkoholische Lebensmittel	10 %iges Ethanol (v/v)	-
Fetthaltige Lebensmittel	Rektifiziertes Olivenöl (oder Gemisch synthetischer Triglyceride oder Sonnenblumenöl oder Maiskeimöl)	Isooktan 95 %iges Ethanol Modifiziertes Polyphenylenoxid (MPPO)

Die Richtlinie 90/128/EWG ist mehrfachen Änderungen unterworfen gewesen und letztendlich durch die Richtlinie 2002/72/EG ersetzt worden. Eine wesentliche Änderung betraf die neu eingeführte Möglichkeit, die Einhaltung spezifischer Migrationsgrenzwerte durch allgemein anerkannte, wissenschaftlich belegte Diffusionsmodelle belegen zu können. Eine weitere Änderung betraf die Einbeziehung von 3 weiteren Isocyanaten in den Summengrenzwert, womit einem Vorschlag des SCF gefolgt wurde. Die Richtlinie 2002/72/EG selbst ist derzeit in Form der Änderungsrichtlinie 2007/19/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2007) gültig, mittels der Regelungen bezüglich von Deckeldichtungen eingeführt wurden. Des weiteren werden die Regelungen konkretisiert, bei welchen Materialien der flächenbezogene und wann der massenbezogene Grenzwert für das Gesamtmigrat zu verwenden ist. Zudem wurde ein Fettreduktionsfaktor für Lebensmittel mit einem Fettgehalt von über 20% eingeführt.

Die Richtlinie 90/128/EWG und Folgerichtlinien gelten jedoch nicht für Innenbeschichtungen oder Klebmaterialien von Lebensmittelverpackungen, die nicht vollständig aus Kunststoff bestehen.

Die einzige Richtlinie, die auch Rechtsgültigkeit für Oberflächenbeschichtungen und Klebstoffe besaß, war die Richtlinie 2001/61/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001b), die durch die Richtlinie 2002/16/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002a) ersetzt wurde und 3 Gruppen von Beschichtungssubstanzen erfasst hat. Dies sind BADGE und seine Derivate, 2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]methan (BFDGE) und seine Derivate und sonstige Novolac-Glycidylether (NOGE) und seine Derivate. Für BADGE und BFDGE war der Grenzwert auf 1 mg/kg bzw. 1 mg/ 6dm² festgelegt. Bestimmte NOGE-Komponenten durften in Lebensmittelverpackungen nicht mehr nachweisbar sein (Nachweisgrenze 0,2 mg/6 dm²), wenn sie ein Molekulargewicht <1000 Da besitzen. Die Richtlinie 2002/16/EG ist durch die Verordnung 1895/2005/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2005) ersetzt worden. Diese berücksichtigt für BADGE und seine Derivate neueste toxikologische Daten zur Karzinogenität und Gentoxizität in vivo, so dass der Migrationshöchstwert für BADGE, BADGE•H₂O und

BADGE•2H₂O auf 9 mg/kg bzw. 9 mg/6dm² festgelegt wurde, während der Migrationshöchstwert für die BADGE-Chlorhydrine wegen fehlender Daten zur Gentoxizität unverändert bleibt. Für BFDGE und NOGE ist die Verwendung nicht mehr zulässig, da der Europäischen Kommission keine toxikologischen Daten vorgelegt wurden, die eine weitere Verwendung ermöglicht hätten.

Eine Ausweitung der Regelungen für Bedarfsgegenstände aus Kunststoffen auch auf Beschichtungen, wie es durch die Richtlinie 2002/16/EG für bestimmte Bestandteile bereits erfolgt war, erfolgt voraussichtlich mit der neuen Superdirective (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2003). Dann dürfte auch die Resolution AP(96)5 (COUNCIL OF EUROPE 1996), die sich auch auf Beschichtungen bezieht, jedoch keine direkte Rechtsgültigkeit innerhalb der EU besitzt, ihre Notwendigkeit verlieren.

Der SCF führt im Synoptic Document (2005) Monomere und Additive an, die als Substanzen zur Herstellung von Kunststoffen für den Kontakt mit Lebensmitteln verwendet werden können. Dieses Dokument gibt die Position der EU und des SCF zur Beurteilung der gelisteten Substanzen wieder. Das Synoptic Document ist die Grundlage für die Substanzen, die in den EU-Richtlinien und der Bedarfsgegenständeverordnung für die Herstellung von Lebensmittelverpackungen zugelassen werden.

2.3 Isocyanate

Isocyanate sind die Rohstoffe zur Herstellung von Polyurethanen. Diese Substanzen werden bei der Produktion von Kunststoffen, Coatings, Klebstoffen und Lacken eingesetzt und diese Produkte finden wiederum Anwendung in den Industriezweigen Bau, Automobile, Textilien und Schuhe sowie Möbel, Haushaltsgeräte und Verpackungen. Die Produktion an Polyurethanrohstoffen beträgt allein in Europa jährlich über drei Millionen Tonnen (ISOPA, 2003).

Haupteinsatzgebiete für Isocyanate in der Lebensmittelverpackungsindustrie sind Zweikomponentenkleber in Form von Polyesterurethanen für Lamine. Die Lamine bestehen aus einer Aluminiumfolie und einem Kunststofffilm, die mittels des Klebers miteinander verbunden werden. Dieser Vorgang wird als Kaschierung bezeichnet. Die Kombination dieser beiden Materialien verhindert, dass das Lebensmittel in Kontakt mit dem Aluminium kommt und bewirkt einen Synergieeffekt zwischen Stabilität beim Tiefziehen und Sterilisieren bei möglichst geringem Gewicht und Gasdichtheit.

Beim Laminieren wird das Lösungsmittel des Klebstoffes in einem Ofen verdampft. Die vollständige Aushärtung erfolgt anschließend über einen Zeitraum von 5 bis 7 Tagen bei 40-50°C (SIELAFF 1996, POCIUS 2002).

In der Verpackungstechnologie und Verpackungsanalytik ist der Begriff Isocyanat nicht eindeutig definiert. Es hat sich vielmehr die Verwendung des Begriffs Polyisocyanate für alle in

der Verpackungstechnologie verwendeten isocyanathaltigen Verbindungen mit zwei oder mehr Isocyanatgruppen durchgesetzt.

Eine Einteilung der Polyisocyanate erfolgt auf Grund ihrer strukturellen und technologischen Eigenschaften:

Monomere Polyisocyanate, d. h. Isocyanatmoleküle mit mehr als einer freien Isocyanatgruppe, die noch nicht einer Polymerisationsreaktion unterlegen waren, sind die eigentlichen Rohstoffe. Sie werden unterteilt in aliphatische bzw. cycloaliphatische und aromatische Polyisocyanate. Zur Verdeutlichung struktureller Besonderheiten werden in dieser Arbeit die Begriffe Diisocyanat für monomere Polyisocyanate mit zwei freien Isocyanatgruppen und der Begriff Monoisocyanat für monomere Verbindungen mit einer freien Isocyanatgruppe verwendet. Als Präpolymere werden Polyisocyanate bezeichnet, die durch Reaktion von monomeren Polyisocyanaten untereinander und oder mit anderen Molekülen zu kleineren Verbindungen reagiert haben und für Polymerisationsreaktionen vorgesehen sind. Eine Sonderform bilden innerhalb der Präpolymere die durch Harnstoffvernetzung hervorgehenden Biuret-Addukte (s. 2.3.2 Abb. 4), die durch Dimerisierung entstehenden Uretidione (s. 2.3.2 Abb. 6) und die durch Trimerisierung entstehenden Isocyanurate (s. 2.3.2 Abb. 5). Polyurethane gehören zu den mengenmäßig wichtigen makromolekularen Isocyanaten. Der Begriff Isocyanat wird verwendet, wenn keine nähere Differenzierung in die angeführten Gruppen erfolgt.

2.3.1 Monomere Isocyanate

In Deutschland sind für die Herstellung von Lebensmittelverpackungen aus Kunststoff insgesamt 15 Isocyanatmonomere zugelassen. In den Verpackungen darf allerdings der Summengrenzwert von 1mg/kg Verpackung nicht überschritten werden. Es handelt sich hierbei um die 4 aliphatischen Isocyanate Hexamethylendiisocyanat (HDI), Octadecylisocyanat (ODI) und eine Mischung (40:60 m/m) aus 2,2,4-Trimethylhexan-1,6-diisocyanat (2,2,4-TMDI) und 2,4,4-Trimethylhexan-1,6-diisocyanat (2,4,4-TMDI), die 3 cycloaliphatischen Isocyanate Cyclohexylisocyanat (CHI), Dicyclohexylmethan-4,4'-diisocyanat (DCHM) und Isophorondiisocyanat (IPDI) und die 8 aromatischen Isocyanate 3,3'-Dimethyl-4,4'-diisocyanatobiphenyl (DDIB), Diphenylether-4,4'-diisocyanat (DPDI), Diphenylmethan-2,4'-diisocyanat (2,4'-MDI), Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (4,4'-MDI), 1,5-Naphthalindiisocyanat (NDI), 2,4-Toluoldiisocyanat (2,4-TDI), 2,6-Toluoldiisocyanat (2,6-TDI) und das 2,4-Toluoldiisocyanat-dimer (TDI-Dimer) (Abb. 1).

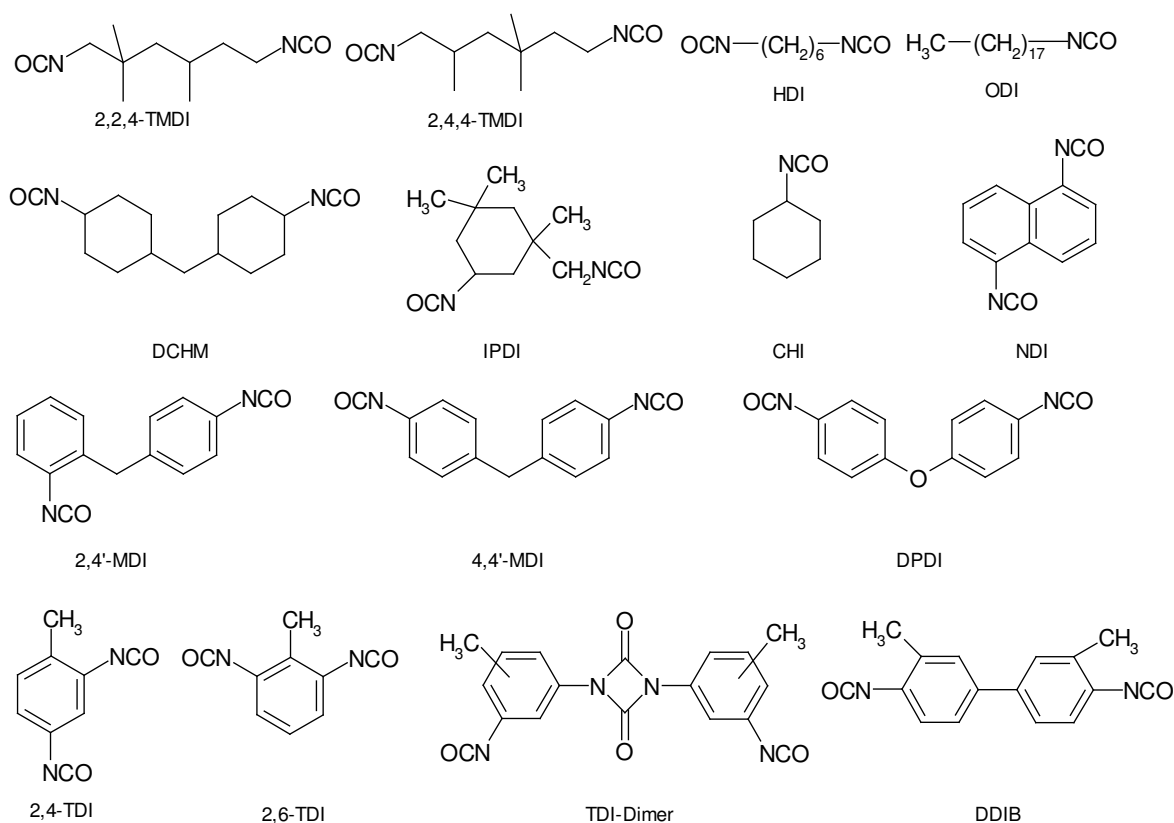


Abb. 1 Zugelassene Isocyanate mit einem Summengrenzwert von 1 mg/kg Verpackung

Im Synoptic Document werden zusätzlich zu den o.a. Isocyanaten die Verbindungen 1,4-Cyclohexandiisocyanat (CHDI), 2-Ethylbutan-1,4-diisocyanat (EBDI), 2-Methylpentan-1,5-diisocyanat (MPDI), 1,3- und 1,4-Phenylendiisocyanat (PDI) und Phenylisocyanat (PI) für die Herstellung von Lebensmittelverpackungen angeführt. Die Industrie verwendet darüber hinaus, auf Grund technologischer Vorteile für manche Produkte, auch Xylenoldiisocyanat (XDI). Diese Substanzen dürfen jedoch in der Verpackung, im Gegensatz zu den o.a. Isocyanaten, nicht mehr nachweisbar sein (Abb. 2).

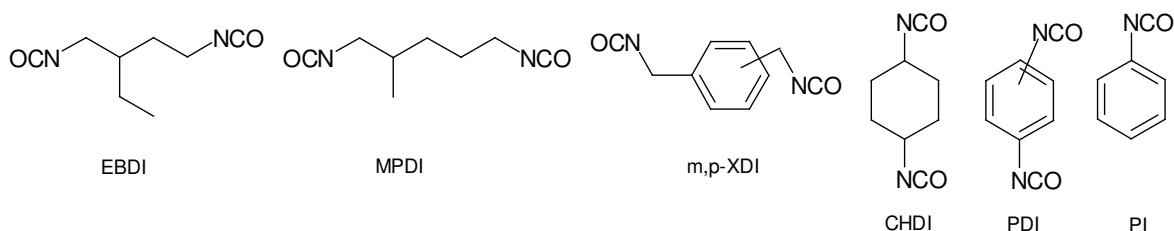


Abb. 2 Isocyanate die im Endprodukt nicht mehr nachweisbar sein dürfen

Die Auswahl für die Verwendung der einzelnen Monomere erfolgt auf Grund ihrer unterschiedlichen technologischen Eigenschaften unter wirtschaftlichen Aspekten.

Die bedeutendsten monomeren Polyisocyanate bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen sind HDI, IPDI, TDI und MDI.

Bei HDI handelt es sich um ein symmetrisches Diisocyanat, das als Präpolymer oder als auf HDI basierendes Biuretaddukt (s. 2.3.2 Abb. 4) oder Trimer z.B. zur Produktion von Lacken für Coatings eingesetzt wird. Nicht flüchtige Polyisocyanate werden aus HDI hergestellt und als vernetzende Substanzen, z.B. zur Herstellung von Klebstoffen, eingesetzt.

IPDI wird meist als Gemisch aus 75% trans- und 25% cis-Isomer auf den Markt gebracht. Es ist bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen in Form von blockierten Derivaten d.h. mit Schutzgruppe versehen, für Lacke und als Klebstoff von Bedeutung. Die beiden Isocyanatgruppen besitzen eine unterschiedliche Reaktivität, die z.B. selektive Reaktionen ermöglichen. Die sekundäre am cycloaliphatischen Ring befindliche Isocyanatgruppe weist eine 8-10 mal geringere Reaktivität auf als die primäre Isocyanatgruppe.

Die größte Bedeutung unter den aromatischen monomeren Polyisocyanaten besitzt das relativ kostengünstige TDI. Es wird hauptsächlich als technisches TDI-Gemisch aus dem 2,4- und dem 2,6-Isomer im Verhältnis 80:20 als Kleber bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen eingesetzt. TDI beeinflusst die Eigenschaften von Polymeren, deren Strukturen es vernetzt in der Art, dass es zu Härte sowie guter chemischer und Wasserresistenz führt. Von Nachteil sind die auf Grund der Härte bedingten nur mittelmäßigen mechanischen Eigenschaften und die von der aromatischen Struktur herrührende gelbe Eigenfärbung, sowie eine der höchsten Toxizitäten aller Isocyanate, da TDI einen hohen Dampfdruck von 0,033 hPa bei 25°C aufweist (OSHA, 1980; BAYER, 1995). Bedingt durch die hohe Toxizität (LC_{50}) des TDI-Monomers, die bei der Ratte inhalativ mit 610 mg/m³ - 1h Exposition angegeben wird (BAYER, 1995) und der damit einhergehenden hohen Anforderungen beim Umgang mit der Substanz werden wie bei nahezu allen anderen Isocyanaten vorwiegend Präpolymere verwendet.

Ein weiteres bedeutendes aromatisches Diisocyanat ist MDI, welches ebenfalls bei der Produktion von Lebensmittelverpackungen eingesetzt wird und sowohl als 4,4'-Isomer als auch als Gemisch aus 2,4'- und 4,4'-Isomer im Handel erhältlich ist. Das 4,4'-Isomer kann aufgrund seiner festen Konsistenz und der damit verbundenen reduzierten Expositionsgefahr bei der Herstellung von Lacken verwendet werden. In vielen Fällen kommt jedoch auch polymeres MDI zum Einsatz. Es sind verschiedene flüssige oligomere Zubereitungen von MDI mit unterschiedlichen Funktionen sowie Verhältnissen an 2,4'- und 4,4'-Isomer im Einsatz. Diese werden zur Herstellung von Lacken und Klebstoffen genutzt, während die reine Form von MDI zu Polyurethanelastomeren verarbeitet wird. MDI-Isomere verfügen über Oberflächenstabilität und Chemikalienresistenz, führen jedoch wie alle aromatischen Isocyanate zur Färbung des Endprodukts.

2.3.2 Präpolymere Isocyanate

Allen Diisocyanaten ist gemeinsam, dass sie auf Grund ihrer Flüchtigkeit als Isocyanate mit hoher Expositionsgefahr eingestuft sind. Daher werden sie in der Regel auch nicht in Form ihrer Monomere in Lebensmittelverpackungen eingesetzt, sondern auf polymerer Basis als Vernetzer in Klebstoffen und als geblockte Isocyanate in Lacken für Coatings. Als Blockierungsreagenzien werden vor allem Amine, Oxime oder Alkohole reversibel mit dem Isocyanat verbunden. Erst beim Einbrennprozess des Lackes bei Temperaturen von 100 bis 200°C werden, als ursprüngliche reaktive Form, die Isocyanate wieder freigesetzt, die daraufhin das Hauptpolymer des Lackes vernetzen (OLDRING, 2001).

Neben der Herabsetzung des Dampfdruckes bei der Polymerisation entstehen durch diese Reaktionsform polyfunktionelle Moleküle, die z.B. als Vernetzer in verschiedenen Produkten eingesetzt werden. Darüber hinaus können jedoch auch andere funktionelle Gruppen in das Molekül eingeführt werden. Auf diese Weise entstehen durch Reaktion mit Polyolen Polyurethane (Diisocyanat-Polyadditionsverfahren, Abb. 7), durch Reaktion mit Harnstoff Biuret-Addukte (Abb. 4) und durch Autopolymerisation Isocyanurate (Abb. 5).

Die erste, nach dem Diisocyanat-Polyadditionsverfahren aus TDI und Trimethylolpropan hergestellte Substanz war das Desmodur L[®] (BAYER, 2001) (Abb. 3).

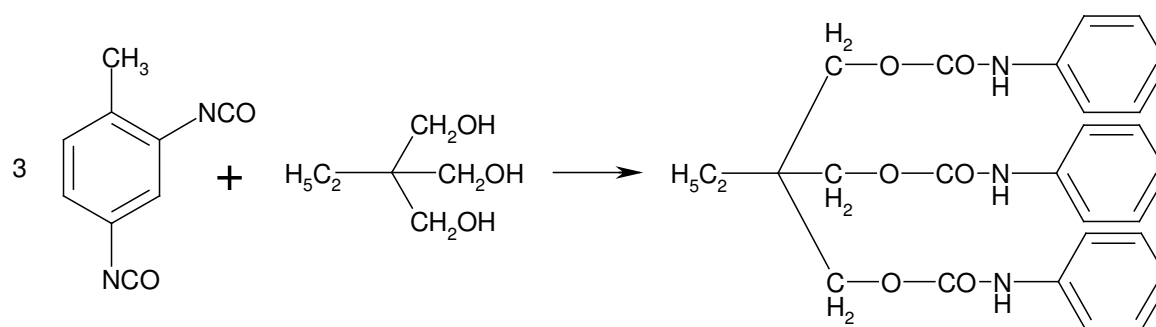


Abb. 3 Polyurethan aus TDI und Trimethylolpropan (BAYER, 2001)

Die Biuret-Addukte (Abb. 4) waren die ersten Diisocyanat-Oligomere, die in Lacken eingesetzt wurden. Mit den Isocyanuraten (Abb. 5) wurde jedoch ein Ersatz mit größerer thermischer und Lichtstabilität gefunden. Die Bildung eines Biuret-Adduktes erfolgt ausgehend von der Reaktion von Diisocyanat mit Wasser. Bei der anschließenden Abspaltung von Kohlendioxid entsteht ein Harnstoffderivat, welches mit überschüssigem Diisocyanat unter Anwesenheit eines Katalysators und bei einer Temperatur von 100-150°C das Biuret-Addukt bildet. Ein Beispiel der Biuret-Synthese ist die Herstellung von wichtigen Isocyanat-Härtern für Verpackungen auf der Basis von HDI. Die Biuret-Strukturen können durch Reaktion mit weiterem Diisocyanat zusätzliche Quervernetzungen ausbilden. Infolge der geringen Reaktivität der

Wasserstoffatome der NH-Bindung verläuft diese Reaktion wesentlich langsamer als die Harnstoff- bzw. Urethanbildung. Durch Einsatz eines Katalysators kann die Reaktion jedoch stark beschleunigt werden.

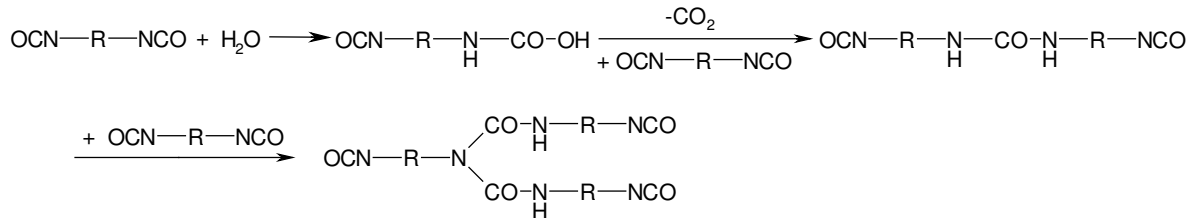


Abb. 4 Herstellung eines Biuret-Adduktes

Biuret-Addukte entstehen aus Reaktivitätsgründen eher aus aliphatischen als aus aromatischen Diisocyanaten. Aus Diisocyanat-Gemischen können ebenfalls Biuret-Addukte hergestellt werden, jedoch wird hierbei eine Diisocyanat-Regenerierung schwierig.

Die durch Trimerisierung von Diisocyanaten entstehenden Isocyanurate (Abb. 5) enthalten jeweils drei freie Isocyanatgruppen, die für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. So können durch Reaktion dieser Isocyanurate untereinander höher vernetzte Substanzen entstehen (Abb. 5). Bei der Bildung von Polyurethanen bewirkt der Isocyanurat-Ring eine bessere Stabilität beim Erhitzen, gegen Hydrolyse und gegen Oxidation sowie eine niedrigere Tendenz zur Gelbfärbung. Ein gelbgefärbter Klebstoff wäre z.B. bei Einsatz in durchsichtigen Verbundfolien ein unerwünschter Nebeneffekt.

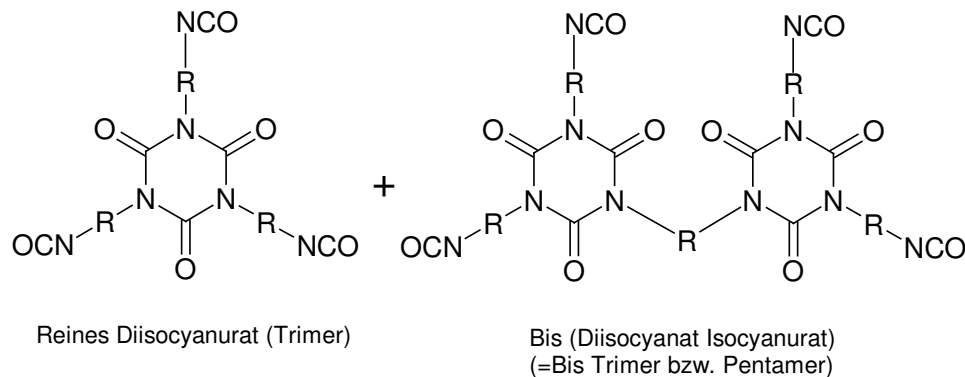


Abb. 5 Isocyanurate

Die Eigenschaften des auf HDI basierenden durch Dimerisierung entstehenden Uretidions (Abb. 6), stellen eine gute Mischung aus Härte, Flexibilität und Haltbarkeit dar.

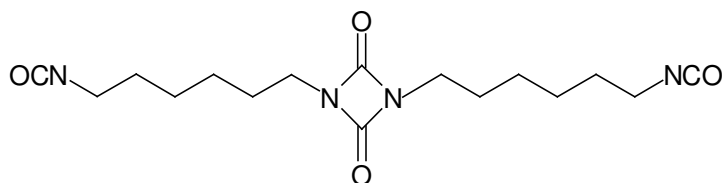
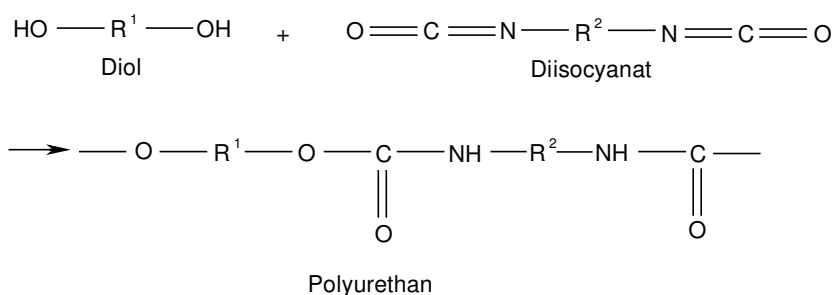


Abb. 6 HDI-Uretdion

Die Synthese der makromolekularen Polyurethane erfolgt mit dem Diisocyanat-Polyadditionsverfahren (BAYER, 2001, Abb. 7), wobei die chemischen und physikalischen Eigenschaften durch entsprechende Auswahl der Ausgangskomponenten je nach Verwendungszweck variiert werden können.



Mit R¹: niedermolekularer oder polymerer Rest
 R²: aliphatische oder aromatische Gruppe

Abb. 7 Diisocyanat-Polyadditionsverfahrens

Die Vielzahl von Reaktionsmöglichkeiten der Isocyanate und die Tatsache, dass Isocyanate aus technologischen und toxikologischen Gründen, praktisch nicht als Monomere sondern als Präpolymere bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen eingesetzt werden, zeigt die Problematik in Hinblick auf die Analytik. Diese ist derzeitig darauf ausgerichtet, den Grenzwert von 1 mg Isocyanat berechnet als freies Isocyanat (NCO) pro kg Verpackung für die gesetzlich zugelassenen monomeren Isocyanate zu überwachen und die unerlaubte Verwendung nicht zugelassener Isocyanate auszuschließen.

Die Möglichkeit der Analytik von Präpolymeren ist derzeitig ebenso begrenzt, wie die Kenntnisse über die Aushärtung von Laminaten und die Herkunft möglicherweise migrierender Isocyanatkomponenten. Im Rahmen dieser Arbeit sollen migrierende Substanzen kaschierter Aluminiumfolien identifiziert und bewertet werden, sowie eine Differenzierung nach der Herkunft der migrierenden Substanzen durchgeführt werden. Dazu erfolgt sowohl eine Untersuchung der Rohstoffe als auch daraus gefertigter Lamine vor und nach der Aushärtung. Mit Hilfe einer kinetischen Untersuchung soll zudem der Prozess der Aushärtung der benutzten Klebstoffe beobachtet werden, um eine Beeinflussung der Herstellungsbedingungen in Bezug auf eine Minimierung der Migration beurteilen zu können.

3 Übersicht über die Analytik von Verpackungsbestandteilen

Verpackungsmaterialien können systematisch untersucht werden. Hierzu erfolgt zunächst eine Klassifizierung der Hauptbindemittelkomponente mittels Fourier Transformation Infrarotspektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion (Fourier transform infrared spectroscopy – attenuated total reflection (FTIR-ATR)). Bei der FT-Technik wird gleichzeitig der gesamte zu vermessende Wellenlängenbereich mit einer geeigneten Strahlungsquelle eingestrahlt und ein Spektrum im selben Moment aufgenommen wird. Als Ergebnis erhält man eine Überlagerung verschiedener Frequenzen in einem Interferogramm, das mit Hilfe einer mathematischen Methode, der Fourier-Transformation, in seine Komponenten zerlegt wird. Diese lassen sich in Form eines üblichen Chromatogramms darstellen, in dem die Intensität gegen die Signallage (Wellenzahl / Wellenlänge) aufgetragen wird. Die Variante der ATR-Technik ermöglicht die Untersuchung von Proben, die aufgrund ihrer begrenzten Durchsichtigkeit für IR-Strahlung mit der üblichen Technik nicht vermessen werden können (wie z. B. Beschichtungen auf Dosen). Als Theorie liegt dieser Methode zugrunde, dass die auf die Hypotenusenfläche eines Prismas fallende Strahlung totalreflektiert wird. Dabei dringt sie ein wenig in die angrenzende Probe ein. Wenn diese Probe nun eine Substanz enthält, die IR-Strahlung absorbiert, so wird die totalreflektierte Strahlung bei diesen Wellenlängen geschwächt, und so die Aufnahme eines Spektrums der Probe möglich.

Es folgt eine Bestimmung des Globalmigrates nach DIN EN 13130-1 (2004, Allgemeine Methode AM 1, s. 10.3) und mittels präparativer SEC-ELSD sowie die Bestimmung des Anteils <1000 Da (SCHÄFER et al., 2004c; AM 2, s. 10.3).

Die SEC ist ein Trennsystem, mit dem Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Die kleinen Moleküle werden bei diesem Trennsystem stärker retardiert, da sie weiter in das Porensystem des Säulenmaterials hineindiffundieren als große Moleküle und eluieren somit später. Der ELSD ist ein Detektor, der alle Substanzen detektiert, deren Siedepunkt signifikant über dem des Eluenten liegt. Das Eluat wird zunächst mit Hilfe von Stickstoff zu einem feinen Aerosol vernebelt und anschließend wird in einem Verdampferrohr das Lösungsmittel verdampft. Die im Gasstrom verbleibenden festen Partikel streuen Laserlicht, dessen Intensität mit der Konzentration korreliert. Mit diesem unspezifischen Detektor lassen sich Stoffe detektieren, die keine detektionsspezifischen Molekülgruppen (z.B. Chromophore) besitzen. Eine Derivatisierung ist nicht notwendig (ONKEN und BERGER, 1998, RÖPKE, 2000).

Anschließend werden die Hauptbindemittelkomponenten hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht, mittels spezieller Methoden auf toxikologisch relevante Substanzen gescreent und toxikologische Studien an den Migraten bzw. Extrakten durchgeführt. Nach Abschluss eines derart umfangreichen Analysenaufwands sind umfangreiche Aussagen zur untersuchten Verpackung hinsichtlich ihrer Sicherheit für den Verbraucher möglich.

3.1 Analytische Methoden zur Bestimmung der Hauptbestandteile

Die Hauptbeschichtungsbestandteile und deren migrierende Anteile von Verpackungen können nach ihrer Polarität eingeteilt werden und unter Berücksichtigung ihrer Polarität mit den folgenden Methoden bestimmt werden:

3.1.1 Polare Substanzen

Zu den polaren Substanzen gehören Carbonsäuren und Polyole, die als Restmonomere aus Polyestern in der Beschichtung verbleiben und bei Kontakt mit Lebensmitteln in dieses migrieren können. Zur Anwendung kommt das von SCHÄFER et al. (2004b) beschriebene Verfahren, bei dem die Carbonsäuren mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) getrennt und mit Elektrosprayionisation (ESI) mit Massenselektiven Detektor (MSD) und Ultraviolettdetektor (UVD) bestimmt (AM 3, s. 10.3) und Polyole mittels Gaschromatographie (GC) mit Flammenionisationsdetektor (FID) untersucht werden (AM 4, s. 10.3).

Die am häufigsten verwendeten monomeren Carbonsäuren Adipinsäure (ADA), Phthalsäure (PA), Isophthalsäure (IPA), Terephthalsäure (TPA) als Bindemittelmonomere von Polyestercoatings, Trimellithsäure (TMA) und Pyromellithsäure (PMA) als Monomere in Anhydridvernetzern, Acrylsäure (ACA) als Monomer in Acrylharzen und Benzoesäure (BA) als Kettenstopper bei der Herstellung von Epoxidharzen sowie die Polyole Ethylenglykol (EG), 1,2 Propandiol (1,2-PD), 2,3-Butandiol (2,3-BD), 1,3-Propandiol (1,3-PD), 1,2-Butandiol (1,2-BD), 1,3-Butandiol (1,3-BD), 2-Methylpropan-1,4-diol (MPD), 1,4-Butandiol (1,4-BD), Neopentylglykol (2,2-Dimethylpropan-1,3-diol, NPG), Diethylenglykol (DEG), Hexan-1,6-diol (HD), Trimethylpentan-1,3-diol (TMPD), Trimethylolpropan (1,1,1-Tris(hydroxymethyl)propan, TMP), 1,4-Bishydroxymethyl-cyclohexan (CHDM) können mit diesen Methoden basisliniengetrennt, bestimmt werden.

3.1.2 Mittelpolare Substanzen

Bei den mittelpolaren Substanzen können niedermolekulare Polyester mit dem von SCHÄFER et al. (2004b) beschriebenen Verfahren bestimmt werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung stand dieses Verfahren noch nicht zur Quantifizierung zur Verfügung, so dass sich die Bestimmung auf die Identifizierung der Polyesterfragmente beschränken musste (AM 5, s. 10.3).

Für die Gruppe der mittelpolaren Substanzen, die auf BADGE basieren, wurde das von SCHÄFER et al. (2004a) beschriebene Verfahren mittels HPLC-MSD und Fluoreszenzdetektion (FLD) verwendet (AM 6, s. 10.3). Die Identifizierung erfolgt mittels MSD und die Quantifizierung mittels FLD, berechnet als BADGE-Äquivalente, da die Fluoreszenzaktivität vom BADGE-Anteil abhängt. Dieses Verfahren ermöglicht es die Substanzen mit einem Molekulargewicht <1000 Da der auf BADGE basierenden Coatings in 5 Gruppen zu klassifizieren:

- BADGE und seine Hydrochlorierungs- und Hydrolyseprodukte (BADGE, BADGE•H₂O, BADGE•HCl, BADGE•2HCl, BADGE•H₂O•HCl, BADGE•2H₂O (nur bei wässrigen Simulanzien))
- lineare Oligomere mit 2 Oxiranringen (2 EPO)
- lineare Oligomere mit 1 Oxiranring (1 EPO)
- beide Epoxidgruppen abreagiert (NEPO)
- unbekannte Derivate

3.1.3 Unpolare Substanzen

Lipophile Substanzen werden bei der Verarbeitung als Schmierstoffe zugesetzt. Mittels einer flüssigchromatographischen Methode an einer Diolphase (SCHÄFER et al., 2003; AM 7, s. 10.3) lassen sich die Schmierstoffe nach ihrem polaren Molekülrest in zwölf Lipidklassen trennen: Die vier unpolaren Lipidklassen mit Paraffin (PF), Wachsester (WE), Cholesterolester (CE) und Fettsäuremethylester (FSME), die eine mittelpolare Lipidklasse mit Triacylglycerinen (TAG) und die sieben polaren Lipidklassen mit Fettalkoholen (FA), freie Fettsäuren (FS), Cholesterol (CS), 1,3-Diacylglycerinen (1,3-DAG), 1,2-Diacylglycerinen (1,2-DAG), Monoacylglycerinen (MAG) und Fettsäureamiden (FSA). Die Zusammensetzung der Lipidklassen lässt sich nur semiquantitativ bestimmen, da die Detektorresponse des verwendeten ELSD's von der Kettenlänge und dem Grad der Sättigung abhängig ist.

3.2 Analytische Methoden zur Bestimmung toxikologisch relevanter Bestandteile

CRAMER et al. (1978) hat ein anerkanntes Schema zur Beurteilung von chemischen Substanzen entwickelt, mit dem es möglich ist, für Chemikalien eine Einstufung nach ihrem toxikologischen Schwellenwert durchzuführen. Er klassifiziert toxikologisch relevante Substanzen in 3 Klassen:

- Klasse 1 enthält Substanzen mit einer einfachen chemischen Struktur mit bekanntem Metabolismus und unschädlichen Endprodukten, die auf eine geringe orale Toxizität schließen lassen.
- Klasse 2 enthält Substanzen, die eine Zwischenposition einnehmen. Sie besitzen Strukturmerkmale, die weniger unschädlich sind als die der Klasse 1, jedoch besitzen sie keine Strukturmerkmale die eine Toxizität wie die der Klasse 3 erwarten lassen.
- Klasse 3 enthält die Substanzen, die aufgrund ihrer chemischen Struktur nicht erwarten lassen, dass sie sicher sind und auf eine signifikante Toxizität schließen lassen.

Das EUROPEAN CHEMICALS BUREAU (ECB 2006) stellt die Software ToxTree zur Verfügung, die auf der Cramer-Klassifizierung beruht und mit der chemische Substanzen den einzelnen Klassen zugeordnet werden können.

In Verpackungsmaterialien sind vor allem PAA, BADGE und seine Derivate sowie Isocyanate als Substanzen der Klasse 3 toxikologisch von Bedeutung.

Epoxidharze, die auf BADGE basieren, haben eine niedrige akute Toxizität, obwohl BADGE in vitro mutagene Effekte zeigte, die jedoch in vivo nicht bestätigt werden konnten. Dies ist darin begründet, dass BADGE durch die in der Leber vorkommenden Epoxyhydrolasen zu $\text{BADGE} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hydrolysiert und somit „entgiftet“ wird (BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT, 1997). $\text{BADGE} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ wurde in einer Toxizitätsstudie an Ratten untersucht und erwies sich als kaum toxisch und im Ames-Test als nicht mutagen. Bestätigt wurde dieses Experiment in vitro durch Zugabe eines S19-Leberenzymmixes. In Anwesenheit des Enzyms wurde BADGE innerhalb weniger Minuten vollständig zu BADGE-Diol hydrolysiert (PETERSEN, 2002). Ob die beschriebene Entgiftung auch für die BADGE-Oligomere zutrifft, ist nicht zwangsläufig zu erwarten, da höhermolekulare Anteile mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehr als Substrat für Epoxyhydrolasen in Betracht kommen. Isocyanate und PAA hingegen werden als krebserregend eingestuft (NIOSH 2005a und NIOSH 2005b, s. auch 2.3.1) und sind erwiesenermaßen auch in vivo toxisch.

3.2.1 Primäre aromatische Amine

Zur Bestimmung der PAA steht mit der Methode L 00.00-6 LMBG ein photometrisches Verfahren aus der Sammlung der §35 Methoden des LMBG zur Verfügung. Die PAA werden mit Natriumnitrit diazotiert und mittels N-(1-Naphthyl)-ethylendiaminhydrochlorid zu einem violetten Azofarbstoff umgesetzt und anschließend photometrisch bestimmt (AM 8, s. 10.3). Es handelt sich hierbei um ein Verfahren zur Erfassung der Summe an PAA's.

3.2.2 BADGE und Derivate

Zur Analytik von BADGE und seinen verwandten Verbindungen werden, neben dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren von SCHÄFER et al. (2004a), eine Vielzahl von chromatographischen Verfahren verwendet (s. 1).

3.2.3 Isocyanate

Verschiedene Forschungsprojekte zur Analytik von Isocyanaten wurden seit den achtziger Jahren weltweit durchgeführt. Die meisten Methoden zur Analytik von Isocyanaten dienen der Messung der Luftbelastung. Im Gegensatz dazu beschäftigen sich nur wenige Methoden mit der Bestimmung von Isocyanaten in Verpackungsmaterialien für Lebensmittel. Diese Matrix erfordert jedoch mit einer Extraktion der Bedarfsgegenstände eine andere Probenaufarbeitung als bei Überprüfung der Luftkontamination. Isocyanate lassen sich nur nach Derivatisierung bestimmen. Zur Derivatisierung sind unterschiedliche Reagenzien etabliert, die unabhängig von der isocyanathaltigen Matrix eingesetzt werden können.

STEVENSON und McDONALD (1986) verwendeten 1-(2-Methoxyphenyl)-piperazin (MOPP, s. 4.2 Abb. 8) als Derivatisierungsreagenz für eine Reversed Phase (RP)-HPLC-Methode mit

Elektroneneinfang/UV-Detektor zur Analytik von MDI in Luft. Diese Methode wurde von BRORSON et al. (1990) für TDI, WU et al. (1991) für PI, NIOSH (1994) für HDI, TDI, MDI und Naphthylisocyanat (NI) und RUDZINSKI et al. (1997) für HDI-Monomere und –Oligomere verwendet. Teilweise erfolgt ein Vergleich mit anderen Derivatisierungsreagenzien und Analysenverfahren. So verwenden WU et al. (1999) erstmalig 1-(2-Pyridyl)-piperazin (PP, s. 4.2 Abb. 8) in der Analytik von Isocyanaten. Ein Verfahren unter Nutzung der RP-HPLC-FLD beschreiben WU et al. (1990) mit Tryptamin (Tra) als Derivatisierungsreagenz für Methylisocyanat (MIC), HDI, TDI und Polymethylenpolyphenylisocyanat (PMPPI) in der Matrix Luft und erzielen damit eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit. SPANNE et al. (1996) führen Dibutylamin (DBA, s. 4.2 Abb. 8) in Kombination mit der RP-HPLC und UV-Detektion für die Analytik von TDI und MDI ein und machen sich die hohe Reaktivität von DBA zur Bestimmung komplexer Isocyanate zu Nutze. Das Verfahren ist jedoch für aliphatische Isocyanate nicht geeignet, da den Derivaten ein geeigneter Chromophor fehlt. Die Verwendung der RP-HPLC mit MSD und DBA erfolgt erstmals von TINNERBERG et al. (1996) für TDI und verwandte Verbindungen. TINNERBERG et al. (1997) beschreiben für Dipropylamin (DPA, s. 4.2 Abb. 8) und Diethylamin (DEA, s. 4.2 Abb. 8) eine signifikante Verkürzung der Retentionszeiten gegenüber DBA als Derivatisierungsreagenz. Die Anwendung von DBA als Derivatisierungsreagenz für ein RP-HPLC-MSD-Verfahren für aliphatische Isocyanate erfolgt von KARLSSON et al. (1998) für HDI, IPDI sowie die auf HDI basierende Biuret- und Isocyanuratverbindung. Bei diesem Verfahren wird der Reagenzüberschuss des flüchtigen DBA entfernt und ein Qualifier für das Derivatisierungsreagenz und Harnstoffaddukt beschrieben. KUCK et al. (1999) verwenden ein RP-HPLC-Verfahren mit UVD und vergleichen anhand von HDI, TDI und PI aus Luft u.a. die Derivatisierungsreagenzien PP, DBA, MOPP und Nitroreagenz C (1-(4-Nitrophenyl)-piperazin, Nitro-C).

Eine direkte Übertragung der Verfahren, die teilweise erfolgreich zur Bestimmung von Isocyanaten aus Luft beschrieben werden, auf Lebensmittelverpackungen ist nicht möglich, da die Verfahren zur Anreicherung bei Lebensmitteln begrenzt sind und es zur Mitextraktion einer großen Anzahl weiterer Verpackungsbestandteile kommt. Dies hat sowohl Auswirkungen auf die Empfindlichkeit als auch die Selektivität der eingesetzten Verfahren.

Ein geeignetes Verfahren für die Analytik der monomeren Isocyanate MDI, HDI, CHI, PI, IPDI, TDI, TDI-Dimer, NDI aus Lebensmittelverpackungen wird von DAMANT et al. (1995) unter Verwendung der RP-HPLC-FLD und 9-(Methylaminomethyl)anthracen (MAMA) als Derivatisierungsreagenz sowie NI als internem Standard (IS) beschrieben. Dieses Verfahren wurde auch von LAU und WONG (2000) verwendet und ist die Grundlage für die Methode nach DIN EN 13130-8 (2004), welche bisher als einzige routinemäßige Methode in der Praxis der Analytik von Lebensmittelverpackungen zur Anwendung kommt.

In einigen Verfahren werden Isocyanate in Form ihrer korrespondierenden Amine bestimmt, in die sie durch Reduktion überführt werden (BRORSON et al., 1990, LAWSON et al., 1996). Die mittels GC getrennten Isocyanate werden nach Derivatisierung mittels MSD erfasst. Hauptsächlich erfolgt in diesen Methoden die Bestimmung spezifischer Isocyanate aus Luft (BRORSON et al., 1990, TINNERBERG et al. 1996, KARLSSON, 1998b). BRAUER und FUNKE (2002) verwenden zur qualitativen Absicherung von Isocyanaten aus Verpackungen ein gaschromatographisches Verfahren bei dem die Isocyanate mit MAMA derivatisiert werden und mittels GC-MSD und Einzelionenüberwachung (Single Ion Monitoring, SIM) analysiert werden. Das von ELLENDT et al. (2003) beschriebene Verfahren zur Bestimmung von Isocyanaten mittels GC-MSD erfolgt hingegen ohne Derivatisierung der Isocyanate und dient zur Absicherung der zuvor mittels einer auf 13 Isocyanate erweiterten Methode nach DIN EN 13130-8 (2004b) bestimmten Isocyanate. Das als Referenzverfahren für die Bestimmung von Isocyanaten in Luft verwendete Verfahren wurde von LIND et al. (1996) für die Bestimmung in Urin und Plasma eingesetzt. Von großer Bedeutung ist aufgrund der toxikologischen Relevanz die Gesamtisocyanatbestimmung, die in einigen Methoden erprobt und teilweise als erfolgreich dargestellt wird (ROH et al., 2000). Bisher wurde sie jedoch nur bei der Matrix Luft eingesetzt. Die Identifizierung von Isocyanaten mit unbekannter Struktur wird dagegen in keiner der Methoden erwähnt, eine Voraussetzung zu dieser Art von Identifizierung ist eine Untersuchung mittels HPLC-ESI-MSD.

Die Methode nach DIN EN 13130-8 (2004) zur Bestimmung von Isocyanaten in Kunststoffen verwendet MAMA als Derivatisierungsreagenz. Es handelt sich um ein HPLC-Verfahren mit FLD. Die Methode ist durch ihren 3-stufigen Aufbau sehr aufwendig. Nach einer Lösemittelextraktion mit Dichlormethan und gleichzeitiger Derivatisierung mit MAMA und NI zur Kontrolle einer erfolgreichen Derivatisierung, wird in einer ersten Stufe auf Isocyanate gescreent. Bei positiven Isocyanatnachweis erfolgt in einer zweiten Stufe die Quantifizierung mittels Standardaddition. Die Bestätigung muss in einer dritten Stufe auf einer HPLC-Säule mit unterschiedlicher Polarität erfolgen.

Diese Methode ist nicht geeignet für oligomere Isocyanate oder Isocyanate mit unbekannter Struktur, da sie nur einen FLD verwendet und das Vorhandensein von Standardsubstanzen für eine Quantifizierung im Rahmen des Standardadditionsverfahrens voraussetzt. Ferner können oligomere Isocyanate, die einen Hauptteil von handelsüblichen Verpackungen ausmachen, sowie andere Verpackungsbestandteile, die mit MAMA reagieren, die Bestimmung stören. Eine Absicherung mittels MSD ist bei der Methode nach DIN EN 13130-8 (2004) nicht möglich, da der verwendete Triethylammoniumphosphatpuffer das ESI-Interface des MSD kontaminiert.

Um die Nachteile dieses Verfahrens zu umgehen musste eine geeignete Methode für ein Screening, welches auch für oligomere Isocyanate geeignet ist, bei gleichzeitiger Möglichkeit der Bestimmung sowohl von bekannten als auch unbekanntem Isocyanaten entwickelt werden.

Für die Bestimmung des Gesamtisocyanatgehalts steht die Methode nach DIN EN ISO 11909 (1998, s. 10.3 AM 9) zur Verfügung. Die Isocyanate werden hierbei mit einem Überschuss an Dibutylamin im wasserfreien Medium (Toluol) versetzt und der Überschuss an Dibutylamin mit Salzsäure gegen einen Farbindikator zurücktitriert.

3.3 Biologische Verfahren zur Beurteilung der Toxikologie von Lebensmittelverpackungen

Für die Zulassung neuer Stoffe im Kontakt mit Lebensmitteln wird ein umfangreiches toxikologisches Dossier verlangt. Unter anderem sind Toxizitätsstudien zu der Substanz oder ihren Reaktionsprodukten vorgeschrieben. Dazu gehören Tierversuchs- (90 Tage orale Aufnahme, Resorption, Verteilung, Metabolismus, Exkretion, Reproduktion, Teratogenität, Langzeittoxizität und Kanzerogenität) und in-vitro Studien (bakterieller Mutagenitätstest, Test auf chromosomale Aberrationen in Säugetierzellen, Test auf Genmutationen in Säugetierzellen, SCF 2000, EWG 1967, OECD 1983). Allerdings wird der Umfang der notwendigen Studien durch die Menge der Migration bestimmt: Bei Mengen unter 50 µg/kg Lebensmittel oder Simulanz ist nur die Mutagenität in 3 verschiedenen Tests auszuschließen (EFSA 2006), bei Mengen von 50 bis 5000 µg/kg muss zusätzlich zu den Mutagenitätstests der Verteilungskoeffizient Oktanol-Wasser (Bioakkumulationstest) und ein Langzeit-Tierversuch (90 Tage orale Aufnahme) durchgeführt werden.

Bisher existieren Toxizitätsdaten nur zu den Einzelsubstanzen, die für die Herstellung von Lebensmittelverpackungen zugelassen sind. Durch die Vielzahl an Reaktionen, im Verlauf der Herstellung entstehen eine unbekannte Anzahl an neuen Verbindungen, für die derzeit noch keine toxikologischen Daten vorliegen.

Ausgehend von der These, dass eine Migration von Einzelsubstanzen nur in Mengen unter 50 µg/kg Lebensmittel bzw. Simulanz stattfindet, wird der Untersuchungsumfang auf ein Verfahren zur Untersuchung auf Mutagenität sowie zusätzlich ein Verfahren zur Untersuchung auf Zytotoxizität beschränkt.

Die Migrate unterschiedlicher zum Einsatz kommender Lebensmittelverpackungen sollen mittels bakteriellem Mutagenitätstest (Ames-Test) und Zytotoxizitätstest (Neutralrottest) auf toxikologische Effekte gescreent werden.

3.3.1 Prüfung auf Mutagenität

Die Überprüfung auf mutagene Wirksamkeit der Testsubstanzen erfolgt mittels des Salmonella-Mikrosomentests der auch als Ames-Test bezeichnet wird, da er von B. Ames und Mitarbeitern an der Universität von Berkeley, CA. USA entwickelt wurde. Es handelt sich um die Bestimmung der mutagenen Wirksamkeit in Bakterienstämmen von *Salmonella typhimurium*. Die Bakterien tragen bestimmte Mutationen im Histidinoperon, die sie abhängig von einer exogenen Histidinzufuhr machen. Durch mutagene Einflüsse können die vorhandenen

Mutationen revertiert werden, wodurch die Bakterien wieder unabhängig von einer Histidinzufuhr werden. Das hier angewandte Testverfahren dient der Bestimmung potentiell mutagener Substanzen. Stoffe, die zur Veränderung der Erbsubstanz DNA befähigt sind, können als Auslöser für Krebserkrankungen fungieren. Bereits kleinste Mengen können zu irreversiblen Zellveränderungen führen, die u.U. eine tödlich verlaufende Erkrankung nach sich ziehen. Aus diesem Grunde sollte der Kontakt mit solchen Stoffen unbedingt minimiert werden.

Der Salmonella/Mikrosomentest nach Ames ist das am häufigsten verwendete und daher auch am besten evaluierte Testverfahren zur Bestimmung potentiell mutagener/kanzergener Substanzen. Durch den Zusatz eines Rattenleberextraktes (S9-Mix) werden auch Substanzen erfasst, die zur Ausübung ihrer mutagenen Wirkung einer metabolischen Umwandlung bedürfen. Die verwendeten Stämme TA 98, TA 100 und TA 1537 erfassen unterschiedliche Mutationstypen. Die Substanzen wurden in den Stämmen TA 98 (frame-shift-Variante), TA 100 (Punktmutations-Variante) und TA 1537 (frame-shift-Variante) getestet.

3.3.2 Prüfung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest

Die Überprüfung auf zytotoxische Wirksamkeit der Testsubstanzen in Säugetierzellen erfolgt mittels des Neutralrottests. Der Neutralrottest ist ein international gebräuchlicher und gut evaluierter Test zur Bestimmung der Zytotoxizität chemischer Substanzen (BORENFREND und PUERNER, 1984). Da die zytotoxische Wirkung im allgemeinen auf unspezifische Effekte zurückgeht, ist die Auswahl der zum Test verwendeten Zellen von untergeordneter Bedeutung. Die Zellen sollten aber noch die Fähigkeit besitzen, Fremdstoffe metabolisch umzuwandeln, da viele Substanzen ihre toxische Wirkung erst nach metabolischer Aktivierung entfalten. Diese Kriterien treffen für H4IIE-Zellen zu. Verwendet wird die Reuber Hepatomzelllinie H4 II E aus der American Type Collection, die aus einem Rattenhepatom entwickelt wurde. Als Maß für die zytotoxische Wirkung dient die Aufnahme des Farbstoffes Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-hydrochlorid, NR) in die Lysosomen lebender Zellen nach Inkubation mit der Testsubstanz. NR wird durch passiven Transport über die Plasmamembran in die Zellen aufgenommen und in den Lysosomen akkumuliert. In geschädigten oder toten Zellen wird NR schlechter oder überhaupt nicht mehr in den zytoplasmatischen Vakuolen gespeichert und die Zytoplasmamembran wirkt nicht mehr als Barriere, um das Austreten von NR zu verhindern. Die Quantifizierung des extrahierbaren Farbstoffs geschieht spektralphotometrisch bei 540 nm gegen eine Referenzmessung bei 620 nm. Die Abnahme der NR-Akkumulation in den Zellen dient als Maß für die Zytotoxizität der Testsubstanzen.

3.3.3 Prüfung auf Zytotoxizität mittels Plating Efficiency-Test

Der „Plating Efficiency“ ist eine Variante des Neutralrottests, bei dem die H4 II E-Zellen, nachdem sie abtrypsiniert wurden, auf 35cm²-Kulturflaschen ausgebracht werden und die

Kultivierung der Zellen erfolgt im Gegensatz zum Neutralrottest, bei dem Williams Medium E verwendet wurde, mit Dulbeccos-Medium.

Beim „Plating Efficiency“ werden nicht nur direkt toxische Effekte bestimmt, die zu einem unmittelbaren Absterben der Zellen führen, sondern auch zytostatische Effekte, die sich in einer Hemmung der Vermehrung der Zellen bemerkbar machen. Manche Schäden manifestieren sich erst nach Tagen oder nach einigen Zellteilungen.

3.4 Problemstellung

Vor dem Hintergrund der rechtlichen Bestimmungen sollten erstmals handelsübliche Lebensmittelverpackungen umfassend untersucht werden. Hierzu war es notwendig folgende Problemstellungen zu bearbeiten:

- Entwicklung einer routinetauglichen Methode mit der es möglich ist, Isocyanatmonomere sowie –oligomere mit einem Molekulargewicht < 1000 Da zu bestimmen
- Rohstoffe für Lebensmittelverpackungen in die Analytik mit einzubeziehen
- Das Globalmigrat, sowie den Beschichtungstyp und die Hauptbestandteile von Lebensmittelverpackungen zu bestimmen
- Die wichtigsten toxikologisch relevanten Bestandteile in den Lebensmittelverpackungen zu bestimmen
- Die Lebensmittelverpackungen hinsichtlich ihrer Toxizität zu untersuchen
- Zu prüfen, ob Diffusionsmodelle Untersuchungen ersetzen können.

4 Die analytische Erfassung von Isocyanaten

4.1 Ausgangssituation für die Untersuchungen

Zur Entwicklung einer HPLC-Methode, die eine Trennung der sechs bedeutendsten Diisocyanate und NI als IS sowohl von den Matrixbestandteilen als auch untereinander leistet, wurde von der DIN-Methode ENV 13130-8 (1999) zur Bestimmung von Isocyanaten in Kunststoffen ausgegangen. Diese Vornorm ist zwischenzeitlich durch die DIN EN 13130-8 (2004) ersetzt worden. Hierbei werden die zu untersuchenden, in Kontakt mit Lebensmitteln stehenden Werkstoffe und Gegenstände zunächst durch Lösungsmittelextraktion mit Dichlormethan und gleichzeitiger Derivatisierung mit MAMA mittels HPLC-FLD auf Isocyanatreste gescreent. Sind in der Probe Isocyanate enthalten, werden sie durch ein Standardadditionsverfahren quantitativ bestimmt, wobei NI erneut als IS zur Berechnung von Peakflächenverhältnissen verwendet wird. Eine Gradiententrennung der spezifischen Isocyanate erfolgt durch eine mit einer Umkehrphase gepackten Edelstahlsäule, 5C18 250x4.6 bei Raumtemperatur und der mobilen Phase Acetonitril / Triethylammoniumphosphatpuffer (pH 3). Die Methode nach DIN EN 13130-8 (2004) ist jedoch nicht im nötigen Umfang geeignet, um die bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen verwendeten monomeren, sowie oligomeren Isocyanate nebeneinander zu identifizieren und zu quantifizieren. Es liefern alle Substanzen, die mit MAMA reagieren im FLD-Chromatogramm Signale, die nur durch Vergleich mit Standardsubstanzen den Isocyanaten zugeordnet werden. Eine Absicherung bei dem flüssigchromatographischen Verfahren mittels MSD ist nicht möglich, da bei Verwendung von MAMA als Derivatisierungsreagenz ein phosphathaltiger Puffer notwendig ist, der das Interface der Ionenquelle eines MSD kontaminieren würde und langanhaltende Störsignale hinterlässt. Eine Absicherung mittels MSD ist nur bei Verwendung der GC möglich, jedoch verhältnismäßig aufwendig, da ein zweites Verfahren verwendet werden muss (BRAUER und FUNKE, 2002, ELLENDT 2003).

4.2 Derivatisierungsreagenzien für Isocyanate

Um ein geeignetes Derivatisierungsreagenz auszuwählen wurden folgende Anforderungen festgelegt:

- Das Derivatisierungsreagenz soll MS-gängige Derivate ermöglichen
- Die Derivate sollen eine gute MS-Response besitzen
- Es sollen spezifische MS-Qualifier für Harnstoffaddukte und die Monomeren existieren
- Sie sollten möglichst fluoreszierend und UV-aktiv sein
- Die Derivate sollen ein möglichst geringes Molekulargewicht besitzen, um auch Oligomere in einem angemessenen Massenbereich detektieren zu können
- Das Derivatisierungsreagenz soll eine hohe Reaktivität zu den Isocyanaten besitzen, um kurze Reaktionszeiten zu ermöglichen

- Der Reagenzüberschuss soll sich leicht entfernen lassen
- Es sollte ein möglichst in der Analytik von Isocyanaten etabliertes Reagenz sein, um den Entwicklungsaufwand der Methode gering zu halten.

Die bisher in der Analytik von Isocyanaten als Derivatisierungsreagenzien beschriebenen Substanzen PP, MOPP, Nitro-C, Tra, MAMA, DBA, DPA und DEA (Abb. 8, vgl. 10.4.1 Tab. 39) wurden verglichen.

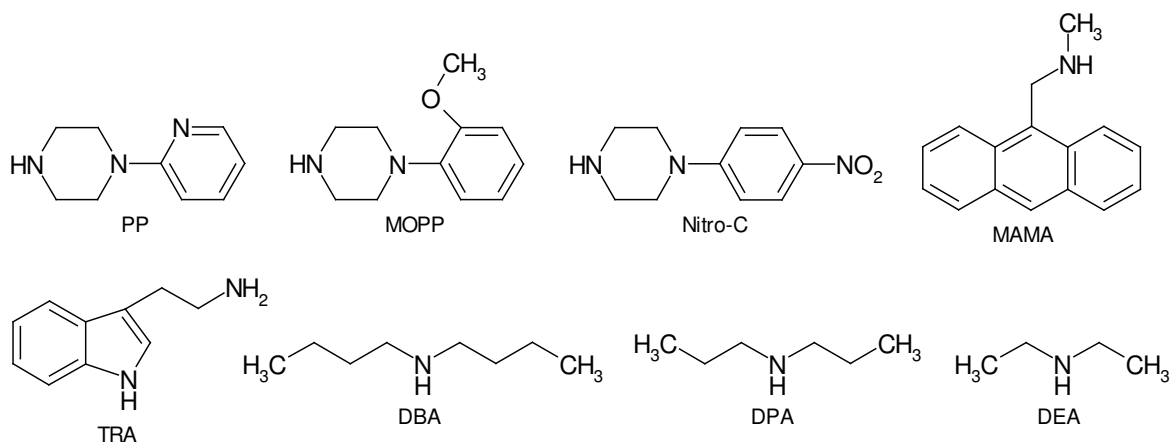


Abb. 8 Derivatisierungsreagenzien für Isocyanate

Die Derivatisierung erfolgte mit den Reagenzien an einem Isocyanat-Standardgemisch mit den Substanzen (HDI, MDI, IPDI, TDI und NI, s. 10.4.1 Tab. 37) (AM 10, s. 10.3) unter identischem Vorgehen. Lediglich bei Einsatz des MAMA-Reagenzes musste die Derivatisierung aufgrund der Lichtempfindlichkeit dieser Substanz im Dunkeln erfolgen.

Amine zeigen auf Umkehrphasen eine starke Tendenz zum Tailing, wodurch die Detektion nachfolgender Substanzen, in diesem Fall die der Derivate beeinträchtigt werden könnte (Abb. 9, oben). Wird der Reagenzüberschuss hingegen mit Essigsäureanhydrid acetyliert, so eluiert das überschüssige Derivatisierungsreagenz als scharfer Peak zu Beginn der Chromatographie (Abb. 9, unten). Die bereits von KARLSSON et al. (1998a) beschriebene Variante einer Acetylierung des überschüssigen Reagenzes wurde überprüft und für die nicht flüchtigen Reagenzien übernommen.

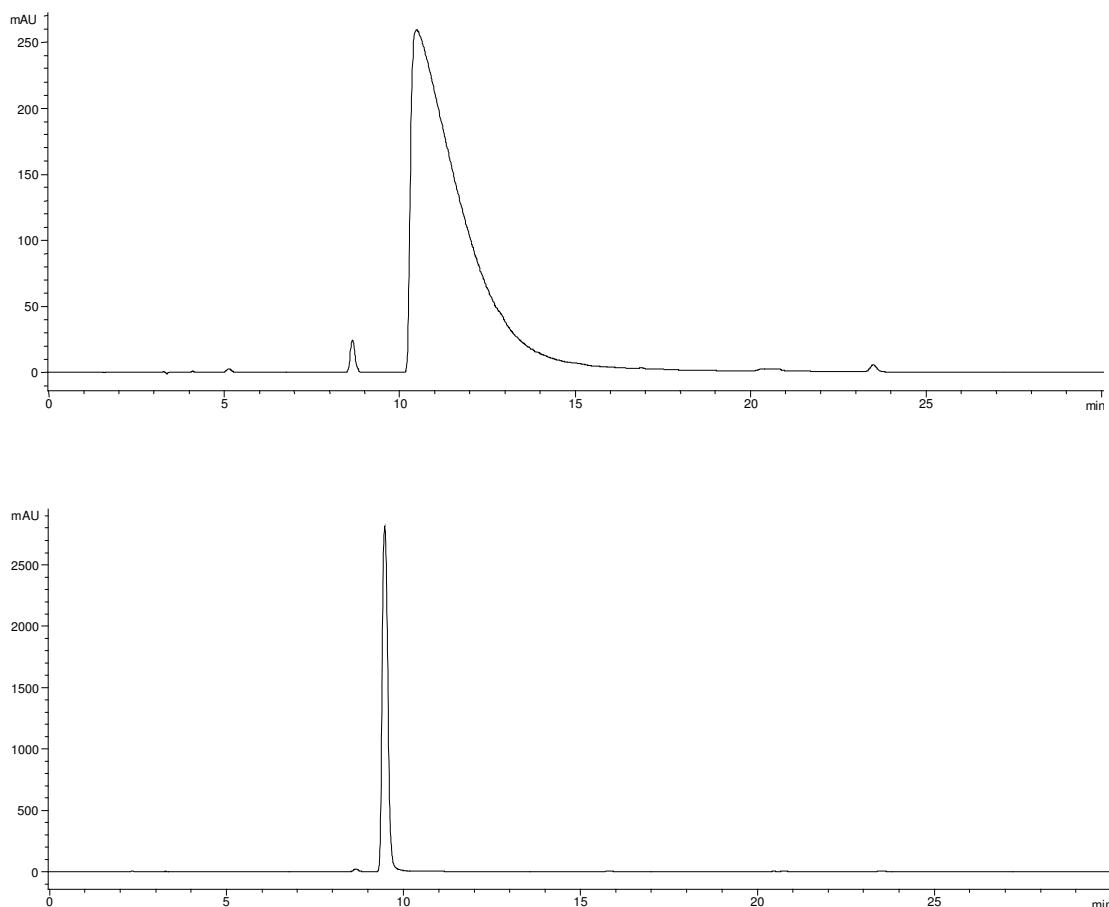


Abb. 9 HPLC-UVD-Chromatogramm von PP
Ohne Acetylierung (oben) und mit Acetylierung (unten), Bedingungen s. 4.5 Tab. 4

Bei der Derivatisierung erfolgt in einer Additionsreaktion des Isocyanates mit den primären bzw. sekundären Aminen die Bildung eines Harnstoffderivates (beispielhaft: PP, Abb. 10).

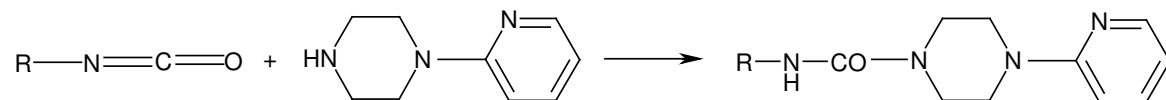


Abb. 10 Bildung eines Harnstoffderivates aus Isocyanat und PP

4.2.1 Eignung für massenselektive Detektion

Zur Überprüfung der Eignung der Derivatisierungsreagenzien für ein Screening auf Isocyanate wurde mittels HPLC-MSD auf das Vorhandensein auf spezifische Fragmente, die als Qualifier verwendet werden können, untersucht (Abb. 11).

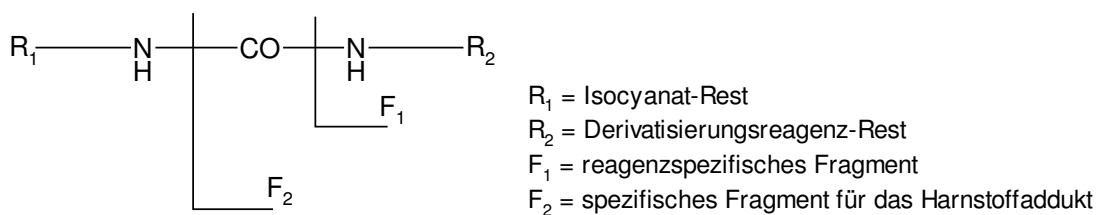


Abb. 11 Isocyanatderivate: Spezifische MS-Fragmente

Alle untersuchten Derivatisierungsreagenzien zeigten im MS ein oder mehrere für das Derivatisierungsreagenz spezifische Qualifier. Für die Derivate von Nitro-C und MAMA war kein und für die von MOPP und TRA nur ein Qualifier für ein Harnstoffaddukt mit geringer Intensität detektierbar (s. 10.4.1 Tab. 41). Als Qualifier verwertbare spezifische Fragmente für ein Harnstoffaddukt waren bei den Dialkylaminen (m/z 156 (DBA), m/z 128 (DPA) und m/z 100 (DEA)) und bei PP (m/z 190) vorhanden. Die Reagenzien Nitro-C, MAMA, MOPP und TRA sind somit für ein Screening wenig geeignet.

Die Empfindlichkeit bei der MS-Detektion ist bei den Derivaten unterschiedlich. Die Response ist bei den PP-Derivaten am höchsten, gefolgt von den MOPP-Derivaten und bei den MAMA-Derivaten am geringsten. Selbst die unempfindlichsten PP-Derivate zeigen eine höhere Response als z. B. die empfindlichsten MAMA-Derivate (Abb. 12 vgl. 10.4.1 Tab. 42)

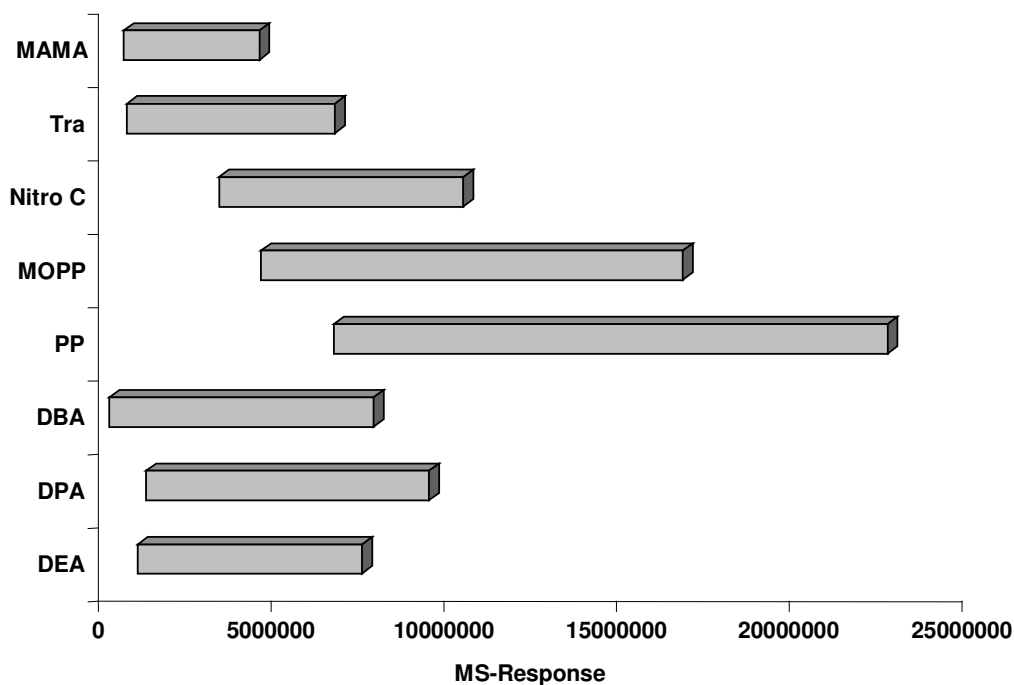


Abb. 12 Diisocyanatderivate: MS-Responsebereiche
 Derivatisierung s. Abb. 28, Bedingungen s. 4.5 Tab. 4

4.2.2 Elutionsverhalten der Derivate

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Auswahl geeigneter Derivatisierungsreagenzien sind die unter gleichen chromatographischen Bedingungen ermittelten Retentionszeiten der Derivate.

Die kürzesten Retentionszeiten zeigen die Isocyanat-Derivate der Reagenzien PP und DEA. Die Derivate von Tra, MOPP, Nitro C und DPA haben im Gegensatz dazu etwas verlängerte Retentionszeiten. Auf Grund einer starken Retardierung mussten die Derivate der Reagenzien Nitro C, DPA, DBA und MAMA bei einem höheren Acetonitrilanteil des Eluenten chromatographiert werden. Bei Verwendung von MAMA und DBA eluierte das zweite MDI-Isomer jedoch auch bei einem Acetonitrilanteil von 80% nicht mehr in einem für die Routineanalytik vertretbaren Zeitraum (s. 10.4.1 Tab. 43).

Der Acetonitrilanteil des Eluenten sollte möglichst niedrig sein, um Koelution mit Störsubstanzen aus der Verpackung zu verhindern. Somit entsprechen die Derivatisierungsreagenzien MAMA und DBA nicht den Anforderungen.

Die starke Verschiebung der Retentionszeiten von Derivaten aus Isocyanaten mit sekundären aliphatischen Aminen, die z.B. eine Verdoppelung der Retentionszeit eines MDI-DBA-Derivates im Vergleich zu dem entsprechenden Derivat von DEA zeigt, führt bereits TINNERBERG et al. (1997) an.

Da bei der Produktion von Lebensmittelverpackungen in der Regel oligomere Isocyanate in Form von Reaktivklebern oder aber geblockten Isocyanaten eingesetzt werden, ist nicht nur mit Diisocyanaten selbst, sondern auch mit höhermolekularen Isocyanaten bei der Analytik zu rechnen. Mittels eines handelsüblichen isocyanathaltigen Präpolymerisates wurde das Elutionsverhalten in Hinblick auf die Derivatisierungsreagenzien untersucht. Erwartungsgemäß zeigte sich eine Verschiebung der Elution zu späteren Retentionszeiten bzw. es war ein höherer Acetonitrilanteil notwendig, um die Elution der oligomeren Isocyanat-Derivate zu erreichen.

Reagenzien, deren Diisocyanatderivate bereits relativ spät eluieren, sind für die Detektion oligomerer Isocyanate nicht geeignet. Hierzu zählen die Reagenzien MAMA, DBA, DPA, Nitro C sowie MOPP. Ein zusätzliches Problem zeigt sich bereits in der Aufarbeitungsphase der oligomeren Isocyanatderivate. So sind einige Isocyanatderivate der verwendeten Reagenzien nicht oder nur unzureichend löslich.

4.2.3 Auswahl geeigneter Derivatisierungsreagenzien

Nach Untersuchung der Reagenzien zur Derivatisierung von Isocyanaten anhand wichtiger, oben aufgeführter Parameter, erwiesen sich PP und DEA als am besten geeignet für diese Methode. Diese Derivatisierungsreagenzien erfüllen die Kriterien, die zu Beginn der Methodenentwicklung vorausgesetzt wurden.

Zum einen ist das Molekulargewicht beider Reagenzien niedrig, im Falle von DEA mit 73 g/mol sogar sehr gering. Daher ist auch eine Detektion oligomerer Isocyanate in einem adäquaten

Massenbereich durchführbar. Zum anderen sind die chromatographischen Eigenschaften der Derivate von PP und DEA besser als die der anderen Derivatisierungsreagenzien. Es ist eine gute Trennung aller Isocyanatderivate möglich und der Acetonitrilanteil des Eluenten kann im Vergleich zu den anderen Reagenzien bei PP und DEA niedriger gehalten werden. Auch die Chromatographie des oligomeren Isocyanats ist im Gegensatz zu den übrigen Derivatisierungsreagenzien mit PP und DEA gut durchzuführen. Lediglich die starke Abhängigkeit der Retentionszeiten der Derivate vom Acetonitrilanteil des Eluenten sind als nachteilig zu bewerten.

Im Hinblick auf die Detektion der mit PP als auch mit DEA derivatisierten Isocyanate lassen sich folgende Faktoren zusammenfassen: Die massenselektive Detektion zeigt bei PP-Derivaten eine hohe Response, bei DEA-Derivaten ist diese Response etwas niedriger. Beide Reagenzien-Derivate weisen charakteristische Qualifier für reagenzspezifische Fragmente und Harnstoffderivat-Fragmente auf.

Eine UV-Detektion ist bei PP-Derivaten problemlos, bei DEA-Derivaten nur für die aromatischen Isocyanate möglich. Dies ist auf ein fehlendes Chromophor des DEA-Reagenzes zurückzuführen.

Ähnlich verhält es sich bei der Fluoreszenzdetektion. Aufgrund der Fluoreszenzfähigkeit von PP können die PP-Derivate detektiert werden. DEA verfügt aufgrund seiner Struktur nicht über fluoreszierende Eigenschaften.

Da die Methode jedoch als Routinemethode zur Bestimmung von Isocyanaten mittels Fluoreszenzdetektion eingesetzt werden soll, wurde PP als "Routine"-Derivatisierungsreagenz ausgewählt. Um aber darüber hinaus die Möglichkeit zu haben, auch unbekannte Isocyanate zu identifizieren, soll zu diesem Zweck das Reagenz DEA zum Einsatz kommen. Hierzu erfolgt eine parallele Derivatisierung der unbekanntes Isocyanate mit PP und DEA und eine Analyse mittels HPLC-MSD, an die sich durch Zuordnung korrespondierender Peaks eine Identifizierung der isocyanathaltigen Substanz anschließt.

4.3 Optimierung der chromatographischen Trennung

Bei Anwendung isokratischer Trennbedingungen ist, in einer für die Routineanalytik akzeptablen Zeit, keine vollständige Trennung der gebräuchlichsten monomeren Isocyanate möglich. Es koeluiert das 2,6-TDI-Isomer mit HDI. Zudem kommt es zu einer Koelution mit oligomeren Isocyanaten.

Vor Entwicklung eines geeigneten Gradienten erfolgte eine Untersuchung der Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Selektivität der chromatographischen Trennung.

Es wurde der Einfluss von pH-Wert, Temperatur und organischem Modifier untersucht.

4.3.1 Einfluss des pH-Wertes bei gleicher Ionenstärke

Zur Einstellung des pH-Wertes wurde der flüchtige Puffer Ammoniumformiat eingesetzt, da dieser auch für die beabsichtigte Verwendung der MSD geeignet ist.

Bei pH 4-7 ändert sich das Elutionsverhalten der PP-Derivate nicht (s. 10.4.2 Tab. 45). Unterhalb von pH 4 kommt es jedoch zu einer starken Verkürzung der Retentionszeiten, welche auf eine zusätzliche Protonierung am PP-Rest zurückzuführen ist. Das Elutionsverhalten der DEA-Derivate ändert sich hingegen bei pH 3-7 nicht (s. 10.4.2 Tab. 46), da bereits im neutralen Milieu die DEA-Derivate vollständig protoniert sind.

Es wurde ein robuster Wert von pH 6 für die Analytik gewählt. Zudem konnte bei Vergleich der MS-Intensitäten der einzelnen Isocyanat-PP-Derivate bei unterschiedlichen pH-Werten ein Optimum der Intensität bei pH 6 abgeschätzt werden.

Da eine deutliche Abhängigkeit des Elutionsverhaltens bei den PP-Derivaten unterhalb eines pH-Wertes von 4 zu verzeichnen war, wurde der Einfluss des pH-Wertes der Injektionslösung ebenfalls untersucht. Bei unvollständiger Entfernung des Essigsäureanhydrids im Anschluss an die Acetylierung ist der pH-Wert der Injektionslösung kleiner 4, so dass es erwartungsgemäß zu einer Verbreiterung der Peakform der zuerst eluierenden Diisocyanatderivate 2,6-TDI und HDI kommt (Abb. 13).

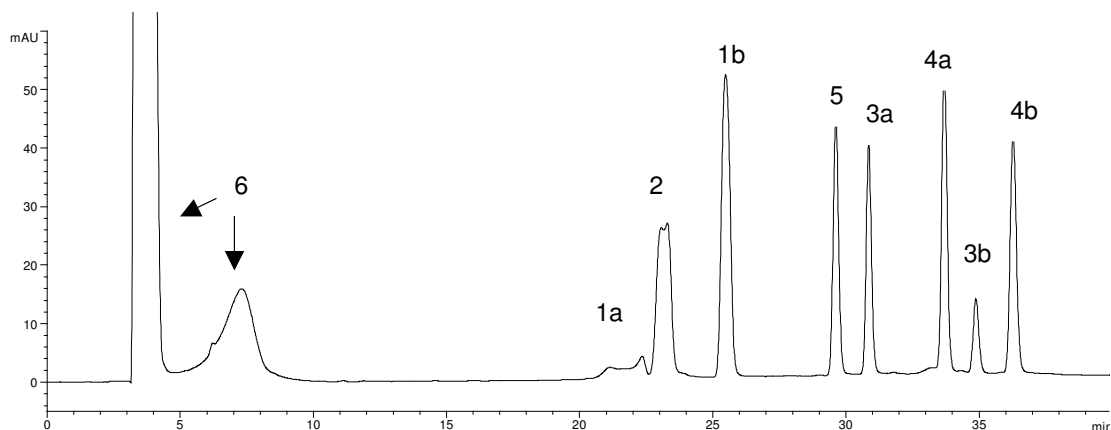


Abb. 13 Isocyanatstandardgemisch der PP-Derivate
HPLC-UV-D, pH-Wert: Injektionslösung = 3, Eluent = 6; 1a = 2,6-TDI, 1b = 2,4-TDI, 2 = HDI, 3a/b = IPDI, 4a/b = MDI, 5 = NI, 6 = PP acetyliert, Gradiententrennung, NH₄-formiat / Acetonitril, von 80/20 (v/v) auf 50/50 (v/v) in 30 min, weitere Bedingungen s. 10.4.2 Tab. 44

4.3.2 Einfluss der Temperatur

Der Einfluss der Temperatur zwischen 25 °C und 45 °C bei gleichbleibender Zusammensetzung des Eluenten führt nur zu einer geringfügigen Änderung der Retentionszeiten der PP-Derivate (s. 10.4.2 Tab. 47). Die Trennleistung des Systems verändert sich nicht. Insbesondere hat die Temperatur keinen Einfluss auf die Trennung von 2,6-TDI und HDI.

Die Säulentemperatur wurde für die folgenden Untersuchungen auf 30 °C festgelegt, um bei hohen Raumtemperaturen die Analytik auch mit Säulenthmostaten ohne Kühlfunktion ermöglichen zu können.

4.3.3 Einfluss des organischen Modifiers Acetonitril beim isokratischen Eluenten

Die bisher durchgeführten Untersuchungen führten nicht zu einer Änderung der Trennleistung. Insbesondere wurde keine Verbesserung der Trennung von 2,6-TDI und HDI erreicht. Bei den Untersuchungen zur Auswahl der Derivatisierungsreagenzien zeigte sich bereits eine deutliche Abhängigkeit des Retentionsverhaltens der einzelnen Derivate vom Anteil des organischen Modifiers. Eine Änderung der Elutionsmittelzusammensetzung von NH₄-formiat / Acetonitril 50/50 (v/v) auf 55/45 (v/v) führt zu einer deutlichen Verlängerung der Retentionszeiten vor allem im Bereich der später eluierenden Derivate (s. 10.4.2 Tab. 48). Bei dem nur einfach derivatisierten Monoisocyanat NI ist die Abhängigkeit einer veränderten Elutionskraft schwächer ausgeprägt als bei den Diisocyanaten (Abb. 27), so dass das NI-PP-Derivat bei einem Anteil von 45 % mit dem zuerst eluierenden IPDI-PP-Derivat zusammenfällt, während die Änderung des Anteils des Modifiers Acetonitril keinen Einfluss auf die Trennung von HDI und 2,6-TDI besitzt.

Die Derivate von DEA zeigen eine größere Änderung der Retentionszeiten bei Änderung der Elutionsmittelzusammensetzung als die Derivate von PP. Die später eluierenden Isocyanatderivate, die bei NH₄-formiat / Acetonitril 50/50 (v/v) eine Retentionszeit von 10-15 min aufweisen, eluieren bei NH₄-formiat / Acetonitril 55/45 (v/v) bis 40 min nicht. Lediglich NI ist auch in diesem Fall aufgrund der einfachen Derivatisierung in einem geringeren Ausmaß von dieser Abhängigkeit betroffen (s. 10.4.2 Tab. 49).

4.3.4 Einfluss von Methanol als Elutionsmittelkomponente

Ein Wechsel des organischen Modifiers auf Methanol bringt keine Verbesserung.

Mit Elutionsmittelgemischen aus NH₄-formiat / Methanol von 60/40 (v/v) und von 40/60 (v/v) war keine Elution der monomeren Isocyanat-Derivate in einem Zeitfenster bis 50 Minuten möglich. Folglich ist ein Ersatz von Acetonitril durch Methanol aufgrund der unter den angegebenen Elutionsbedingungen nicht durchführbaren Elution der Monomere und daher besonders im Hinblick auf Oligomere nicht möglich.

4.3.5 Trennung von oligomeren Isocyanaten

Der Einfluss der Elutionsmittelzusammensetzung ist bei Präpolymeren vergleichbar stark ausgebildet wie bei den Diisocyanaten. Bereits bei Acetonitrilanteilen von unter 55 % eluieren einzelne Verbindungen nicht mehr in einem für die Routineanalytik vertretbaren Zeitrahmen (Abb. 14), so dass die Möglichkeiten der Einflussnahme durch Änderung des Eluenten bei isokratischen Bedingungen nicht für eine Trennung ausreichen.

Es zeigt sich zudem, dass Präpolymere und Diisocyanate bei gleicher Elutionsmittelzusammensetzung teilweise im selben Zeitfenster eluieren.

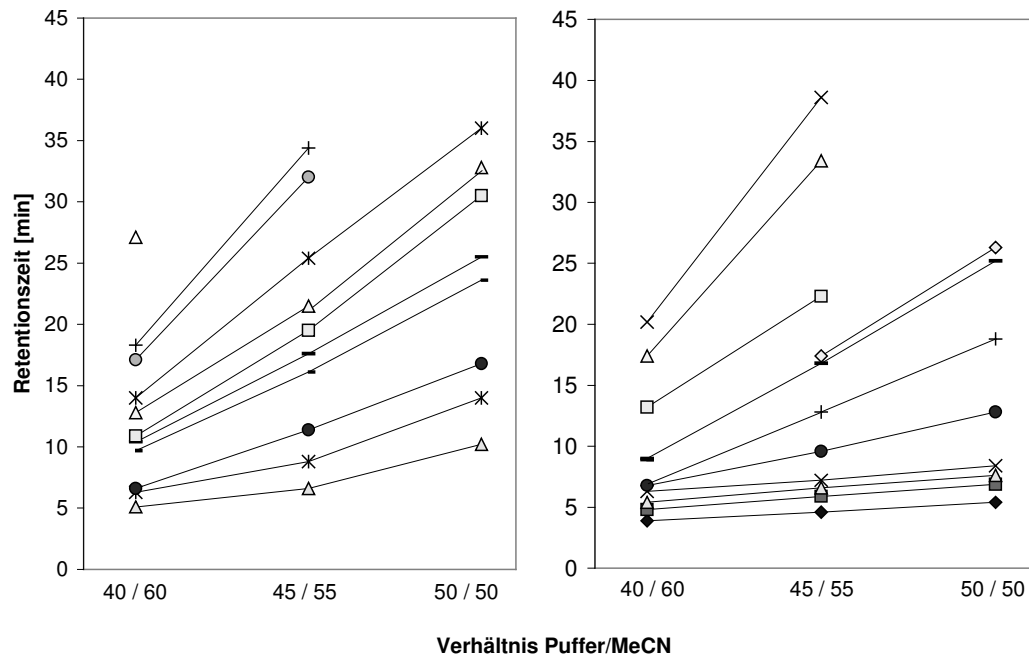


Abb. 14 Abhängigkeit von der Elutionsmittelzusammensetzung Oligomere Isocyanat-PP-Derivate (links), oligomere Isocyanat-DEA-Derivate (rechts); Auswahl von Substanzpeaks eines Präpolymerisats, die 2 % der Gesamtfläche überschritten haben, (isokratische Trennung, NH_4 -formiat pH 6 / Acetonitril 40/60 (v/v) bzw. 45/55, (v/v) bzw. 50/50 (v/v), weitere Bedingungen s. 4.5 Tab. 4)

4.3.6 Entwicklung eines Elutionsgradienten zur Verbesserung der Trennleistung

Bei isokratischer Elution ist in einer für die Routineanalytik akzeptablen Zeit keine vollständige Trennung aller monomeren Isocyanat-Derivate und möglicher Präpolymere möglich. Um jedoch eine Basislinientrennung aller monomeren Isocyanat-Derivate sowie der Präpolymere zu erzielen, war es notwendig einen geeigneten Elutionsgradienten zu entwickeln (Abb. 15).

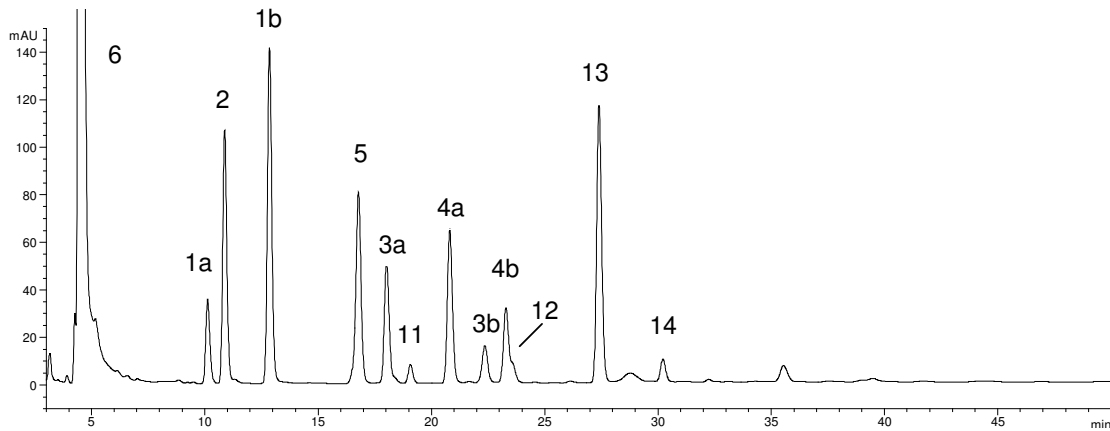


Abb. 15 Isocyanatstandardgemisches der PP-Derivate
HPLC-UVD, Substanzen s. 10.4.1 Tab. 37, mit dem oligomeren Isocyanat-Gemisch unter den optimierten Bedingungen (s. 4.5 Tab. 4), UV-Detektion bei 240 nm, 1a = 2,6-TDI, 1b = 2,4-TDI, 2 = HDI, 3a/b = IPDI, 4a/b = MDI, 5 = NI, 6 = PP acetyliert, 11-14 = Oligomere 1 bis 4

Um das Spektrum identifizierbarer Isocyanate zu erweitern, wurden über die o.a., aufgrund ihrer Verwendung bedeutendsten Isocyanate, zusätzliche Isocyanate ausgewählt, die in der Praxis in seltenen Fällen auch zur Anwendung kommen können. Mit den Substanzen CHI (s. 2.3.1 Abb. 1), PI (s. 2.3.1 Abb. 2), trans-1,4-CHDI (s. 2.3.1 Abb. 2) sowie 1,3- und 1,4-PDI (s. 2.3.1 Abb. 2) wurde ein separates Standard-Gemisch hergestellt, da mit den gegebenen chromatographischen Bedingungen keine vollständige Abtrennung von den bisher eingesetzten Isocyanaten möglich war (Abb. 16). Diese wird auch nicht für notwendig erachtet, da die Verwendung mehrerer unterschiedlicher Isocyanate in einem Kleber technologisch in der Regel nicht sinnvoll ist und die Absicherung mittels MSD eine eindeutige Zuordnung ermöglicht, an die dann eine Quantifizierung mit den jeweiligen Standards anschließen kann.

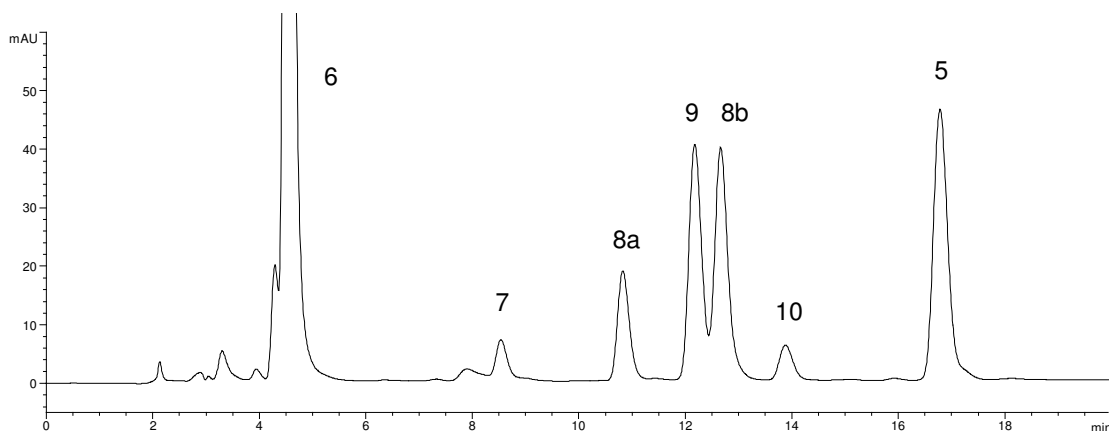


Abb. 16 Isocyanatstandardgemisch der zusätzlich untersuchten PP-Derivate
HPLC-UVD, Substanzen s. 10.4.1 Tab. 38, Bedingungen (s. 4.5 Tab. 4) mit UV-Detektion bei 240 nm, 7 = trans-1,4-CHDI, 8a/b = PDI, 9= PI, 10 = CHI, 5 = NI, 6 = PP acetyliert

4.4 Optimierung der Detektion

4.4.1 Photometrische Detektion

Isocyanate weisen strukturbedingt selbst keine Fluoreszenzaktivität auf. Hinzu kommt bei aliphatischen und cycloaliphatischen Isocyanaten das Fehlen für die UV-Detektion verwertbarer Eigenschaften. Lediglich die aromatischen Isocyanate besitzen UV-absorbierende Eigenschaften die eine Detektion prinzipiell ermöglichen. Um diesen Nachteil in der Routineanalytik auszugleichen erfolgt die Derivatisierung mit PP zu fluoreszierenden Derivaten.

Die Maxima der PP-Derivate liegen bei 240 und 305 nm (Abb. 17). Das UV-Spektrum des derivatisierten NI weist aufgrund seines Naphthalin-Grundkörpers ein zusätzliches, stark ausgeprägtes Maximum bei 220 nm auf (Abb. 17). Die Signalhöhe bei 305 nm ist zwar geringer als die bei 240 nm, dafür jedoch spezifischer, da viele UV-aktive Substanzen ebenfalls im Bereich von 240 nm absorbieren und das Signal/Rauschverhältnis bei Verwendung von 305 nm als Extinktionswellenlänge höher ist. Zudem wirkt sich der Unterschied der Spektren von aliphatischen und aromatischen PP-Derivaten vor allem im kurzwelligen Bereich aus, so dass eine Detektion bei 305 nm aus dieser Sicht ebenfalls günstiger ist.

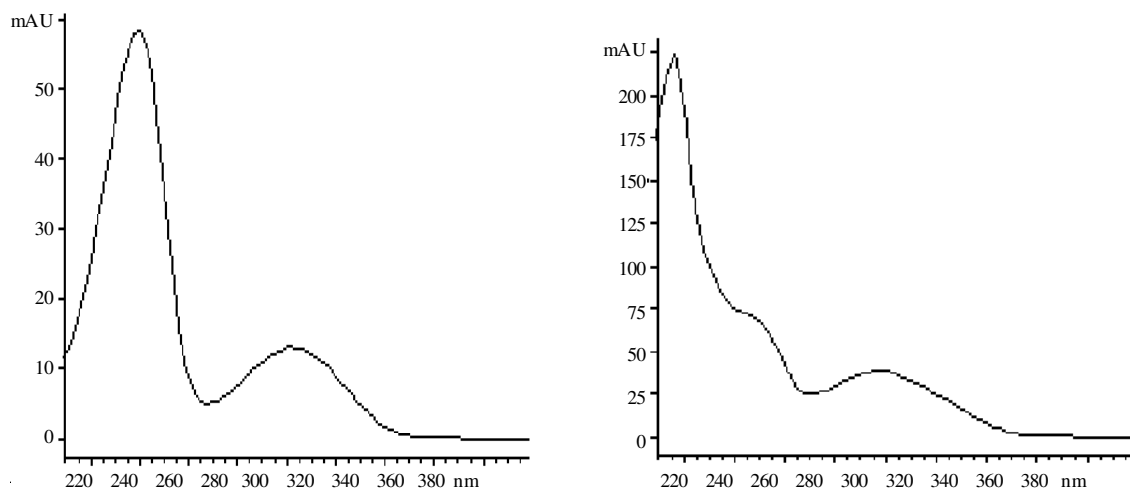


Abb. 17 UV-Spektren aliphatischer Isocyanat-PP-Derivate (links) und vom NI-PP-Derivat (rechts) bei pH 4,5 und 6

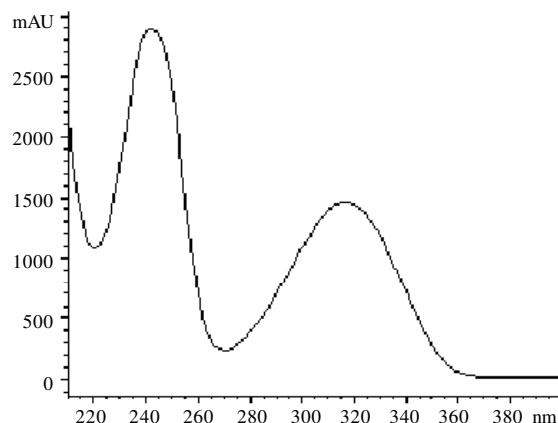


Abb. 18 UV-Spektrum der Isocyanat-PP-Derivate bei pH 3

Wie bereits bei der Optimierung des chromatographischen Trennsystems beschrieben, hat der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss bei protonierbaren Substanzen, wie den PP-Derivaten. Im Bereich zwischen pH 3 und 4 kommt es zu einer Verschiebung des längerwelligen Maximums von 305 zu 320 nm (Abb. 17 und Abb. 18). Es ist demnach davon auszugehen, dass eine zweite Protonierung der PP-Derivate unterhalb von pH 4 erfolgt. Im Bereich von pH 4 bis 6 sind die Spektren identisch.

Für die Fluoreszenzdetektion von PP-Derivaten ist in der Literatur eine Emissionswellenlänge (λ_{Em}) von 370 nm bei einer Anregungswellenlänge von (λ_{Ex}) 240 nm angeführt (OSHA, 1985). Zur Erhöhung der Spezifität der Detektion wird jedoch (λ_{Ex}) 305 nm bevorzugt, da viele Matrixbestandteile bei 240/370 nm ebenfalls Fluoreszenzaktivität besitzen und das Signal-Rausch-Verhältnis bei 305/370 nm größer ist.

Im Rahmen der Grundkalibrierung (s. 10.4.5 Tab. 60 und Tab. 62) wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Isocyanate analysiert und mittels linearer Regression die Steigungen für die einzelnen Isocyanate, berechnet als NCO, ermittelt (Abb. 19):

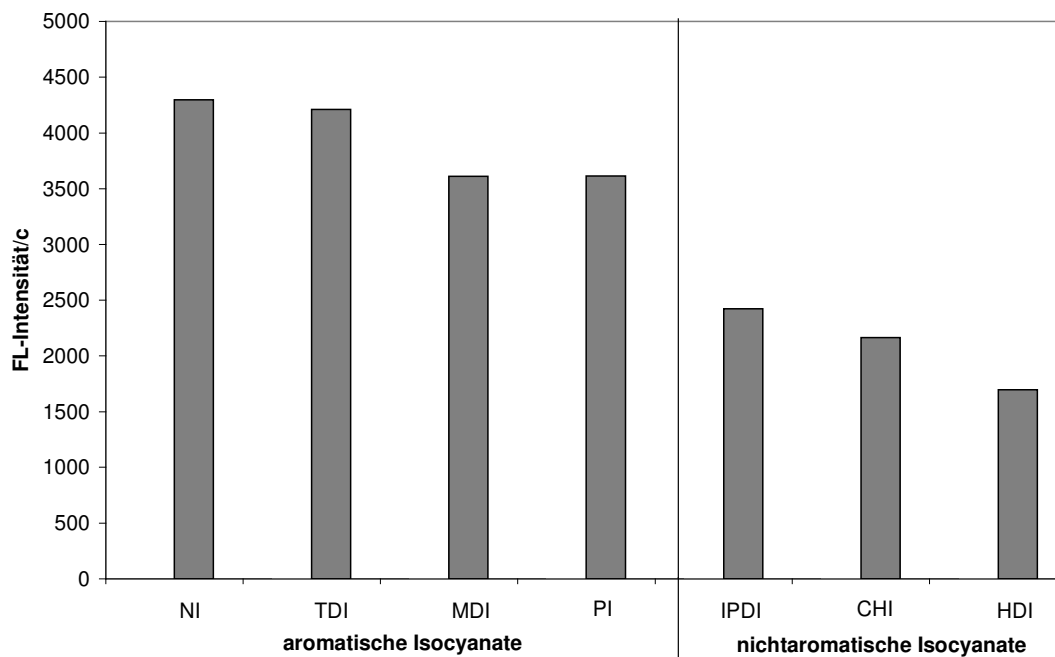


Abb. 19 Isocyanatkalibrationen: Vergleich der Steigungen
Mittels linearer Regression ermittelt und umgerechnet auf NCO, Bedingungen s. 4.5 Tab. 4

Es besteht ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität pro Konzentration zwischen aromatischen und nichtaromatischen Isocyanaten. Daher muss bei einer späteren Summenbestimmung des Gesamt-NCO-Gehaltes einer Verpackung eine separate Berechnung für aromatische und für nichtaromatische Isocyanate erfolgen, woraus schließlich die Angabe des NCO-Gehaltes in einem bestimmten Schwankungsbereich ermöglicht wird.

4.4.2 Grundlagen der Massenspektrometrie

Da mittels FLD bei den chromatographisch getrennten Substanzpeaks nicht eindeutig zwischen fluoreszierenden Isocyanatderivaten und unter den gewählten Bedingungen ebenfalls fluoreszierenden Matrixbestandteilen unterschieden werden kann, wird eine zweite hochspezifische Detektion herangezogen. Bei der vorliegenden flüssigchromatographischen Analytik ist die MSD das Mittel der Wahl. Darüber hinaus können durch sie Aussagen zu Signalen getroffen werden, die nicht unmittelbar einer bekannten Referenzsubstanz zugeordnet werden können.

Im Massenspektrum jeder Substanz treten typische Ionen in einem charakteristischen Muster auf. Während bei der Gaschromatographie mit MSD das Signal mit der höchsten Massenzahl (Masse-Ladungs-Verhältnis, m/z) meistens die Masse des Moleküls wiedergibt, ist es bei der Flüssigchromatographie mit MSD einem Molekülcluster mit Bestandteilen des Eluenten zuzuordnen.

Durch Kollision mit Stickstoff zerfallen die Moleküle auf dem energetisch günstigsten Weg in charakteristische Fragmente. Die so entstandenen Bruchstücke tragen zur Aufklärung der Molekülstruktur bei. Variation unterschiedlicher Parameter wie Fragmentorspannung,

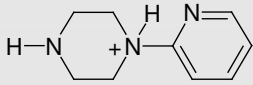
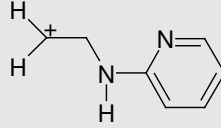
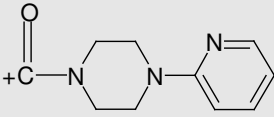
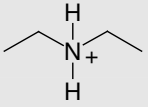
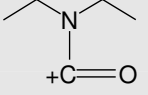
Trocknungsfluss und Versprühungsdruck üben dabei einen Einfluss auf die Menge und Art der entstehenden Fragmente aus.

4.4.3 Identifizierung der Isocyanatderivate

Bei der Fragmentierung der Isocyanatderivate entstehen sowohl gruppen- als auch substanz-spezifische Bruchstücke, die zum Nachweis der Substanzen herangezogen werden können.

Tab. 2 zeigt eine Übersicht der wichtigsten gruppenspezifischen Molekülbruchstücke.

Tab. 2 PP- und DEA-Derivate: Gruppenspezifische Fragmente (Qualifier)

Fragment	Massenzahl	Vorkommen
	164	PP, PP-Isocyanat-Derivate Derivatisierungsreagenz
	121	PP, PP-Isocyanat-Derivate Derivatisierungsreagenz
	190	PP, PP-Isocyanat-Derivate (Harnstoffderivat)
	74	DEA, DEA-Isocyanat-Derivate Derivatisierungsreagenz
	100	DEA DEA-Isocyanat-Derivate (Harnstoffderivat)

Jede einzelne Substanz ergibt zusätzlich zu den gruppenspezifischen Fragmenten ein charakteristisches Muster aus Molekülclustern und Molekülfragmenten, deren Auftreten und Verhältnis zueinander eine sichere Identifizierung ermöglicht. Tab. 3 zeigt die für ausgewählte Diisocyanate charakteristischen Ionen.

Tab. 3 Derivatisierung mit PP und DEA: Charakteristische Molekülfragmente und Addukte

Substanz	Fragmention (m/z)		Molekülion (H ⁺ -Cluster) M+1		Cluster mit Na ⁺ M+23		K ⁺ M+39	
	PP	DEA	PP	DEA	PP	DEA	PP	DEA
HDI	332	242	495	315	517	337	533	353
TDI	338	248	501	321	523	343	539	359
IPDI	386	296	508	369	530	391	546	407
MDI	414	324	577	397	599	419	615	435
NI	-	-	333	243	355	265	371	281
PI	-	-	283	193	305	215	321	231
CHI	289	199	452	362	474	384	490	400

4.4.4 Methoden der massenselektiven Detektion

Im Rahmen dieser Arbeit kommt die Methode der Elektrosprayionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Elektrospray Ionisation, API-ESI) zum Einsatz, die eine schonende Methode für höher molekulare und polare Substanzen darstellt. Eine Voraussetzung für die Verwendung der API-ESI ist das Vorhandensein ionisierbarer Gruppen in den Analyten. Im positiven Modus erfolgt eine Bildung von Addukten mit Wasser oder Ammoniumionen (z.B. bei Verwendung von NH₄-formiat als flüchtigen Puffer), während sich im negativen Modus Addukte mit Formationen bilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund der Protonierbarkeit der Substanzen ausschließlich die positive Ionisierung eingesetzt. Durch die Ionisierung bei Atmosphärendruck wird ein Eintreten von vaporisiertem Lösungsmittel in das Hochvakuum vermieden (CARERI et al., 1996).

Unterschieden wird zwischen dem Scan-Modus, mit hoher Selektivität, der in einem festgelegten Massenbereich die Anzahl an Ionenspuren aufzeichnet und aus der Summe dieser Ionenspuren den Totalionenstrom (Total Ion Current, TIC) berechnet und dem SIM-Modus, der bei höherer Empfindlichkeit, jedoch unter Verlust der Spezifität ausgewählte Massen erfasst. Die höhere Empfindlichkeit beim SIM-Modus gegenüber dem Scan-Modus wird durch eine deutlich höhere Messzeit pro aufgezeichnete Masse erreicht. Im Scan-Modus werden Massenspektren mit den charakteristischen Molekülfragmenten und Addukten wie beispielhaft vom TDI-PP-Derivat (Abb. 20) erhalten. Im SIM-Modus hingegen kann ein empfindliches Screening auf die für Isocyanatderivate charakteristischen Qualifier (Tab. 2) und ggf. einzelne Molekülfragmente und –Addukte (Tab. 3) erfolgen und somit eine sichere Identifizierung der Analyte erfolgen.

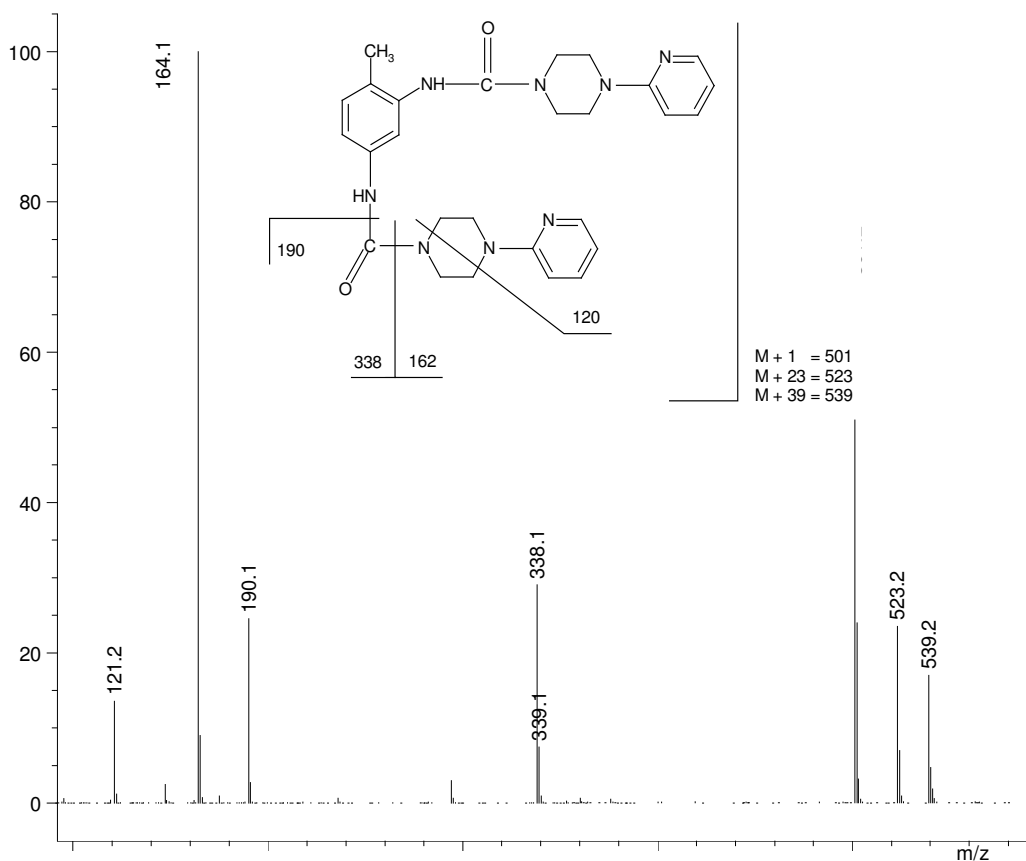


Abb. 20 2,4-TDI-PP-Derivat
MSD, Scan-Modus, weitere Detektionsbedingungen s. 4.5 Tab. 4,

Da der TIC die Summe der Ionenspuren wiedergibt, ist es möglich die Einzelionenspuren in Extract-Ion-Chromatogrammen darzustellen und somit die Zuordnung der Isocyanatderivate zu den einzelnen Signalen zu erleichtern. In Abb. 21 sind die jeweiligen Extract-Ion-Chromatogramme für die PP-Derivate und in Abb. 22 für die Isocyanat-DEA-Derivate aufgeführt, wobei das M+1-Ion des einen IPDI-Isomers (3a) aufgrund der gewählten Fragmentorspannung eine zu schwache Intensität zeigt, so dass es nicht erscheint. Aus diesem Grund wird zusätzlich das substanzspezifische intensivere MH^+-1 -Derivatisierungsreagenz-Ion für IPDI (m/z 296) angezeigt. Bei m/z 243 treten zwei Peaks auf, da neben dem NI spezifischen Molekülion M+1 mit m/z 243 das HDI spezifische MH^+-1 -Derivatisierungsreagenz-Fragment ein m/z von 242 besitzt.

Bezüglich PP sind die Fragmente m/z 164 und m/z 121 reagenzspezifisch, d.h. sie treten auch ohne Reaktion von PP mit einem Isocyanat auf, während das Fragment m/z 190 charakteristisch für das Harnstoffaddukt und damit für die Anwesenheit eines Isocyanates ist. Im Falle von DEA ist das Fragment m/z 74 reagenzspezifisch und das Fragment m/z 100 spezifisch für das Harnstoffaddukt aus DEA und Isocyanat s. 4.4.3 Tab. 2).

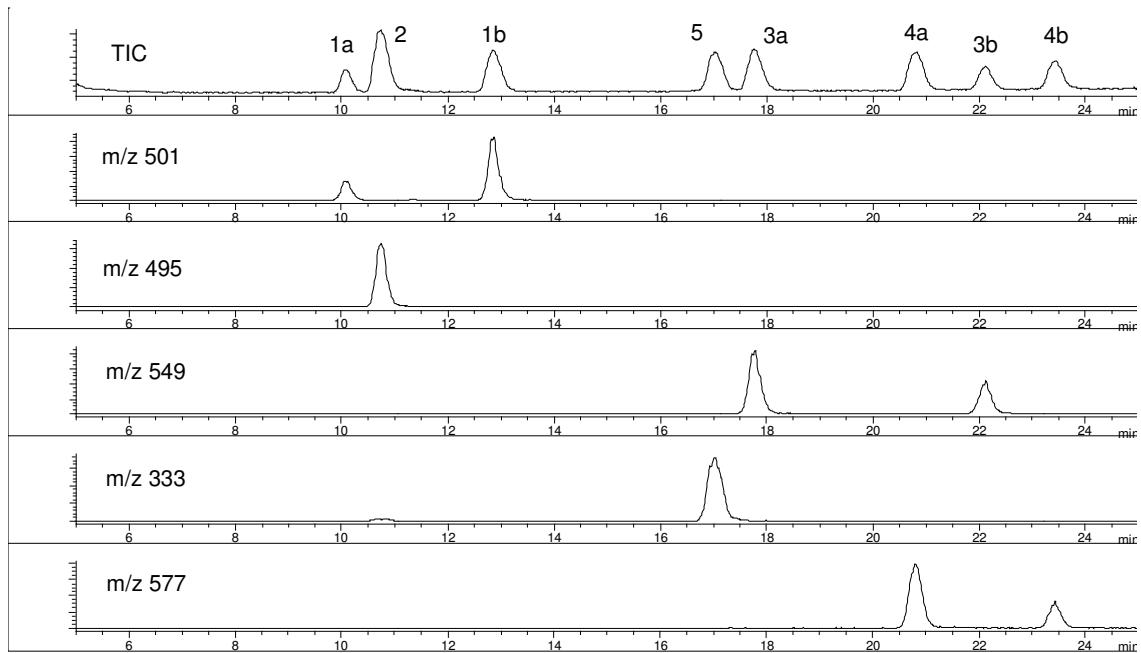


Abb. 21 Standardisocyanate: Derivatisierung mit PP
MSD, Scan-Modus, TIC und Extraktion von Einzelionenspuren, 120 V, weitere Bedingungen s. 4.5 Tab. 4,
1a = 2,6-TDI, 1b = 2,4-TDI, 2 = HDI, 3a/b = IPDI, 4a/b = MDI, 5 = NI,

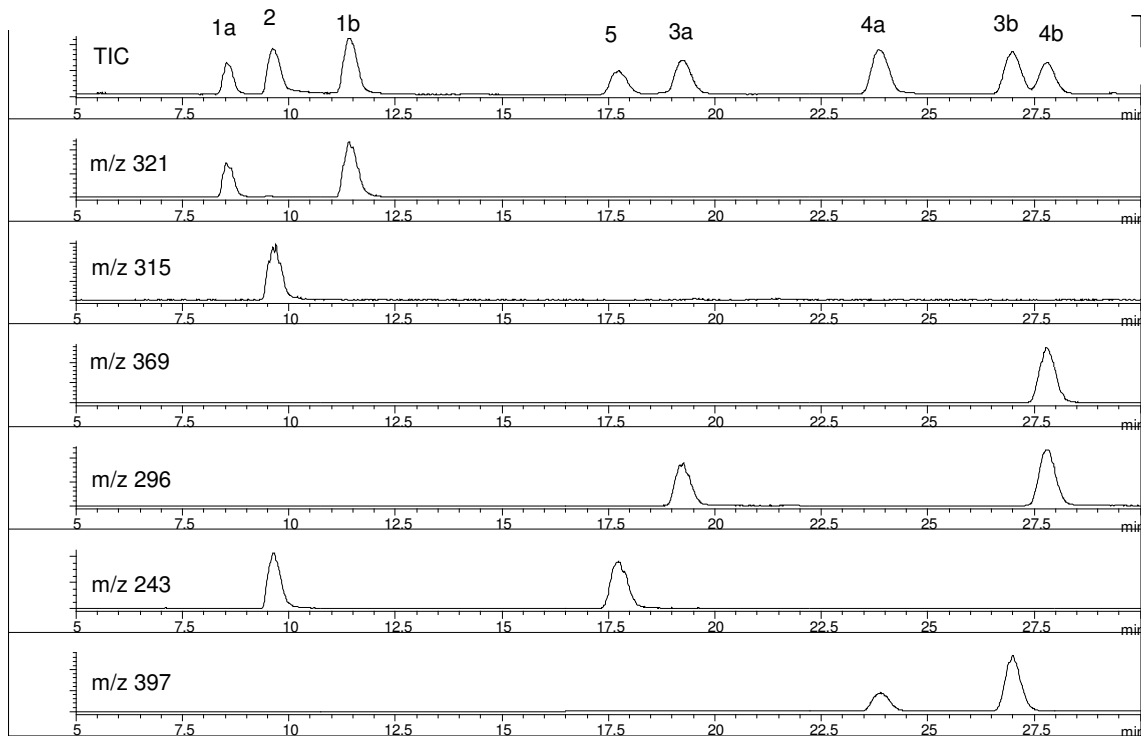


Abb. 22 Standardisocyanate: Derivatisierung mit DEA
MSD, Scan-Modus, TIC und Extraktion von Einzelionenspuren, 120 V, weitere Bedingungen s. 4.5 Tab. 4,
1a = 2,6-TDI, 1b = 2,4-TDI, 2 = HDI, 3a/b = IPDI, 4a/b = MDI, 5 = NI)

4.4.5 Optimierung der massenselektiven Detektion

Bei Verwendung der massenselektiven Detektion sind Modifikationen einzelner Parameter, wie Fragmentorspannung, Trocknungsfluss (Dry Gas Flow) und Versprühungsdruck (Nebulizer Pressure) zur Erhöhung der Empfindlichkeit und Spezifität möglich.

4.4.5.1 Fragmentorspannung

Durch Variation der Fragmentorspannung ist es möglich den Zerfall eines Moleküls zu spezifischen Fragmenten zu steuern. Um bestimmte Verpackungen auf das Vorhandensein von Isocyanaten überprüfen zu können, müssen die Qualifier für PP-Derivate (m/z 121 und 164) und das Harnstoffaddukt (m/z 190) in ausreichendem Maße erkennbar sein und stets in einem ähnlichen Verhältnis zueinander auftreten.

Für die Untersuchungen wurde ein oligomeres Handelsprodukt verwendet, um auch bei den in Verpackungsmaterialien erwarteten Isocyanaten eine entsprechende Detektion zu gewährleisten (s. 10.4.3.1 Tab. 51 und Tab. 52).

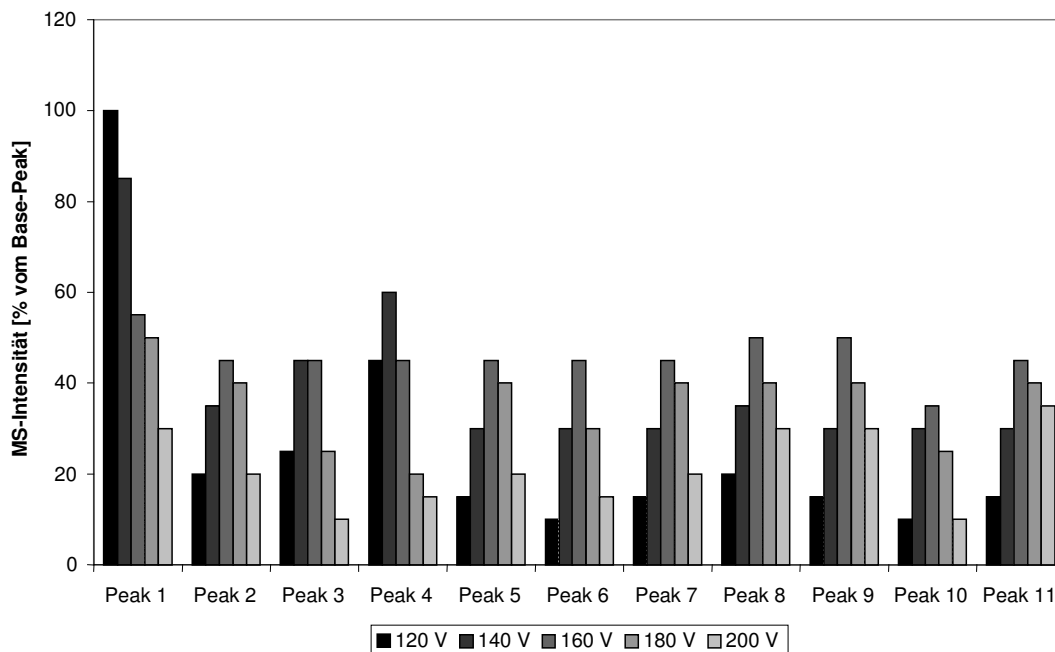


Abb. 23 Abhängigkeit MS-Intensität des PP-Qualifiers m/z 121 von der Fragmentorspannung SIM-Modus, oligomeres Isocyanat (Bedingungen: s. 4.5 Tab. 4 und 10.4.3.1 Tab. 51)

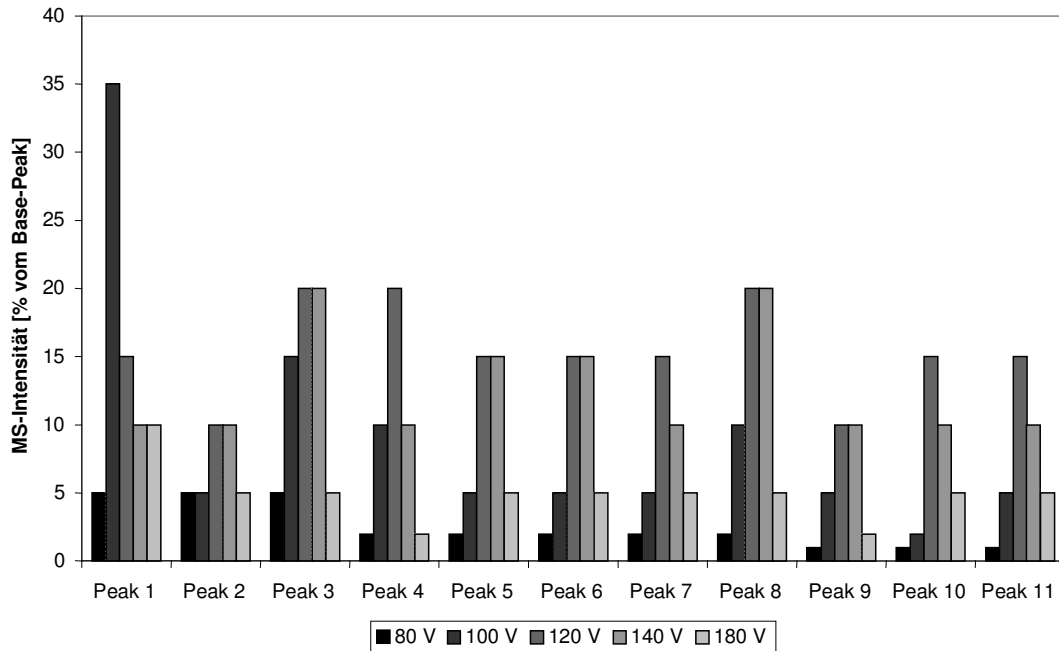


Abb. 24 Abhängigkeit MS-Intensität des Harnstoff-Qualifiers m/z 190 von der Fragmentorspannung SIM-Modus, oligomeres Isocyanat (Bedingungen: s. 4.5 Tab. 4 und 10.4.3.1 Tab. 52)

Für die beiden PP-Qualifier ergibt sich eine optimale Fragmentorspannung von 160 V (m/z 121) und 120 V (m/z 164, Abb. 23), während das Harnstoffaddukt spezifische Fragmentation (m/z 190) bei 120 V sein Optimum hat (Abb. 24).

Die Molekülionen $M+1$ wurden bei einer Fragmentorspannung von 70 V gemessen, da sie bei einer höher gewählten Spannung in ihre Bruchstücke fragmentieren. Unter den optimierten Fragmentorspannungen zeigen die mit PP derivatisierten Isocyanate und deren Qualifier die in Abb. 25 dargestellten MS-Intensitäten im SIM-Modus (s. 10.4.3.1 Tab. 53).

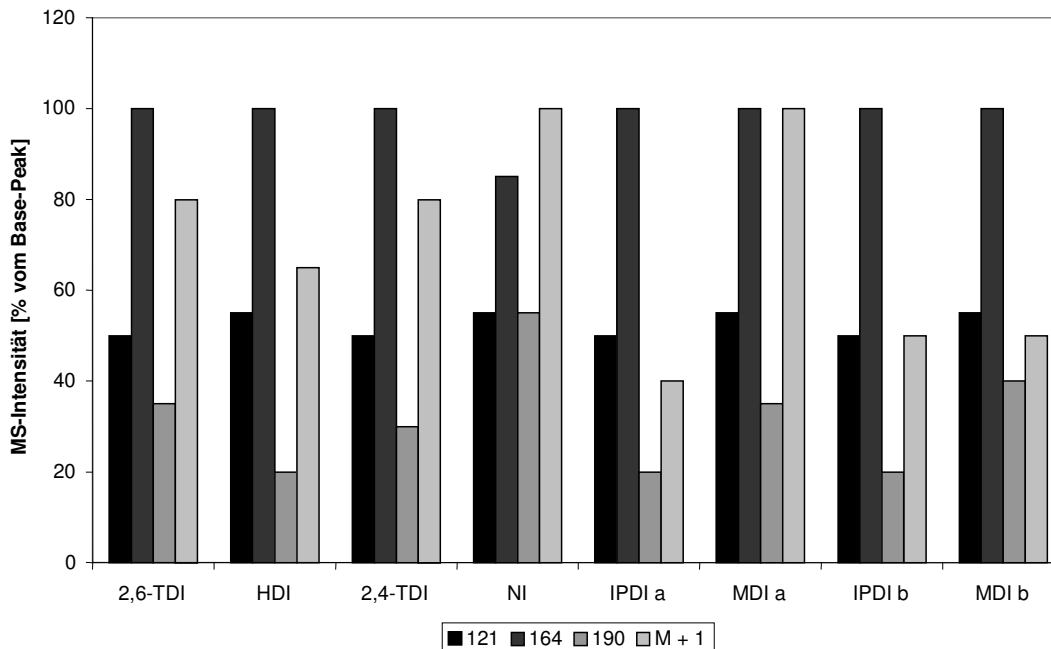


Abb. 25 MS-Intensitäten der PP-spezifischen Qualifier sowie der Molekülonen M+1
Optimierte Fragmentor-Ramp (Bedingungen: s. 4.5 Tab. 4 und 10.4.3.1 Tab. 53)

Durch Variation der Fragmentorspannung von 80 bis 200 V und Vergleich der MS-Response der PP-Derivate monomerer und oligomerer Isocyanate ergibt sich für den Scan-Modus eine optimierte Fragmentorspannung von 120 V (s. 10.4.3.1 Tab. 51 und Tab. 52).

4.4.5.2 Trocknungsfluss und Versprühungsdruck

Der Versprühungsdruck beeinflusst die Größe der entstehenden Tröpfchen. So erfolgt die für die Ionisierung erforderliche Entfernung des Lösungsmittels vom Analyten um so besser, je kleiner die Tröpfchen sind und je höher der Trocknungsfluss ist.

Der Trocknungsfluss erreicht bei 12 L/min sein Maximum (s. 10.4.3.2 Tab. 55). Eine weitere Erhöhung bringt keinen Vorteil. Der Versprühungsdruck erreicht bei 60 psig ein Optimum (s. 10.4.3.2 Tab. 56). Aufgrund der Ergebnisse wurde ein Trocknungsfluss von 12 L/min und ein Versprühungsdruck von 60 psig gewählt.

4.5 Zusammenfassung der optimierten Flüssigchromatographie

Mit den beschriebenen Untersuchungen wurde eine Methode erstellt, die eine zuverlässige Identifizierung der am häufigsten gebrauchten Diisocyanate sowie ein Screening auf seltener gebrauchte Diisocyanate und prepolymerer Isocyanate auch in niedrigen Konzentrationen ermöglicht.

Bei Vorliegen höherer Konzentrationen, sowie weitere Informationen über die bei der Herstellung eingesetzten Diisocyanate, ist eine Identifizierung mit Hinweisen auf die Struktur von prepolymeren Isocyanaten, sowie eine Bestimmung des Gesamtisocyanatgehalts möglich.

Tab. 4 zeigt eine Übersicht über die Parameter der optimierten Methode.

Tab. 4 Übersicht über die Parameter

Chromatographisches Verfahren	HPLC-FLD / HPLC-MSD
Stationäre Phase	Multospher® 120 5C18, 250x3
Mobile Phase	Binärer Gradient <u>Eluent A:</u> 1 mM NH ₄ -formiat in Wasser (pH 6) <u>Eluent B :</u> Acetonitril 0 min 65 % Eluent A 30 min 40 % Eluent A 50 min 40 % Eluent A 51 min 5 % Eluent A 56 min 5 % Eluent A 57 min 65 % Eluent A 70 min 65 % Eluent A
Flussrate	0.5 mL/min
Temperatur im Säulenöfen	30 °C
Fluoreszenzdetektion	Anregungswellenlänge (λ_{Ex}): 305 nm Emissionswellenlänge (λ_{Em}): 370 nm
Massenselektive Detektion	Elektrospray-Ionisation, positive Ionisierung Trocknungsgas: 12 L·min ⁻¹ / 350 °C Verneblerdruck: 60 psig Kapillarspannung: 3500 V Fragmentorspannung im Scan-Modus: 120 V Ionenspuren: Scan-Modus (PP-Derivatisierung): m/z 100 - m/z 1500 Scan-Modus (DEA-Derivatisierung): m/z 50 - m/z 1000 SIM-Modus (PP-Derivatisierung): m/z 121 (160 V) m/z 164 (120 V) m/z 190 (120 V) Bei positivem Ergebnis kann je nach Retentionszeit auf die M+1-Ionen sowie Na ⁺ - und K ⁺ -Addukte der möglichen Isocyanat-Derivate gescreent werden (s. 10.4.3.1 Tab. 54)

4.6 Optimierung der Aufarbeitung

Grundlegend wurde dem in der DIN EN 13130-8 (2004) zur Bestimmung von Isocyanaten in Kunststoffen angeführten Schema zur Extraktion gefolgt.

4.6.1 Optimierung der Extraktion

Das in der DIN EN 13130-8 (2004) als Extraktionsmittel für Isocyanate in Verpackungsmaterialien verwendete Dichlormethan ist das optimale Extraktionsmittel. Während Acetonitril als Extraktionsmittel nur wenig schlechter geeignet ist, vermag Tetrahydrofuran

(THF) weder den internen Standard NI gut zu lösen noch das IPDI aus der Folie zu extrahieren (s. 10.4.4 Tab. 57). Folglich wird das in der DIN EN 13130-8 (2004) bewährte Dichlormethan als Extraktionsmittel verwendet.

4.6.2 Auswahl des geeigneten Aufnahmelösungsmittelgemisches für die Extraktionsrückstände

Nach der Extraktion und dem Entfernen des Überschusses an Derivatisierungsreagenz wird ein Lösungsmittel benötigt, welches in der Lage ist den heterogenen Rückstand und die in ihm gelösten Isocyanate möglichst vollständig wieder in Lösung zu bringen.

Zur Anwendung kamen 6 Lösungsmittelgemische, die überwiegend NH_4 -formiat und Acetonitril als Hauptkomponenten enthielten mit unterschiedlichen Zusätzen an Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) und Trifluoressigsäure (TFA).

- NH_4 -formiat, pH 6, 1mM / Acetonitril 65/35 (v/v)
- DMF / NH_4 -formiat, pH 6, 1mM / Acetonitril 50/35/15 (v/v/v)
- DMF / TFA in bidest. Wasser, 0.1 %ig / Acetonitril 50/35/15 (v/v/v)
- DMSO / NH_4 -formiat, pH 6, 1mM / Acetonitril 50/35/15 (v/v/v)
- DMF / NH_4 -formiat, pH 6, 1mM / Acetonitril 70/15/15 (v/v/v)
- DMF / NH_4 -formiat, pH 6, 1mM 70/30 (v/v)

DMF und DMSO sind für ihre guten Lösungseigenschaften bei einer Vielzahl von Verbindungen bekannt. Der Zusatz sollte sich vor allem bei den höhermolekularen Isocyanaten bemerkbar machen. THF wurde als Alternative zum NH_4 -formiat-Puffer getestet mit dem Ziel eine höhere Selektivität zu erreichen. Bei einem pH kleiner 3 sollten die mehrfach protonierten PP-Derivate besser löslich sein als Matrixbestandteile.

Der Einfluss der verschiedenen Aufnahmelösungen auf die Rückstände aus monomeren und oligomeren Standardisocyanaten ist sehr gering (s. Abb. 26 und 10.4.4 Tab. 58). Sowohl die Peakflächen als auch die Peakformen und Retentionszeiten sind vergleichbar.

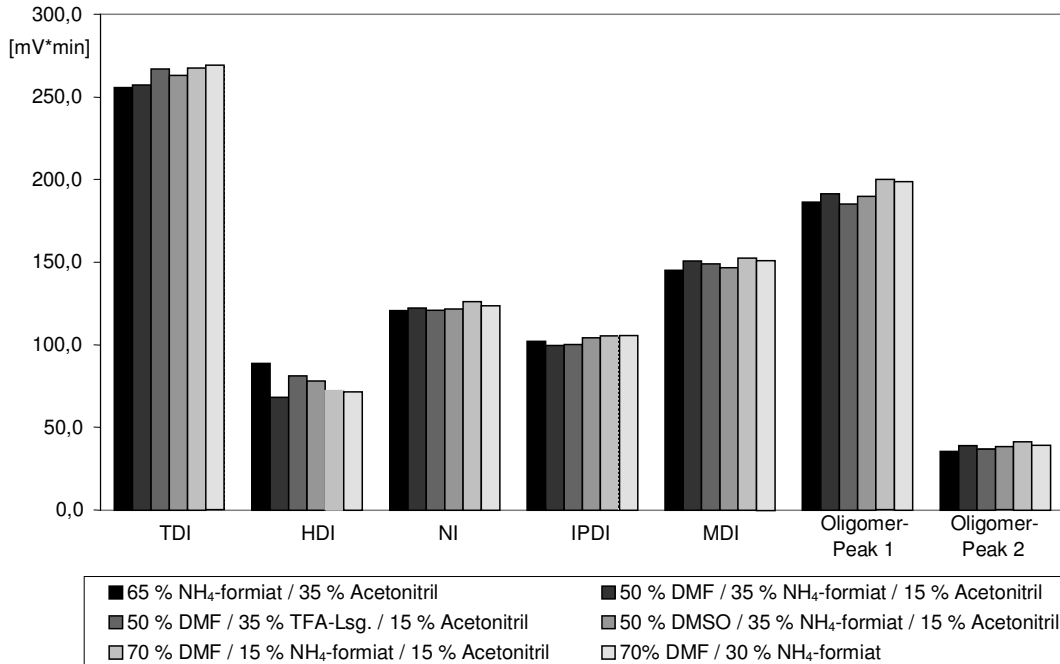


Abb. 26 Isocyanat-Rückstände: Vergleich verschiedener Aufnahme-Lösungen
Chromatographische Bedingungen s. 4.5 Tab. 4

Bei Anwesenheit von Matrix ist jedoch bei den meisten Aufnahmelösungen ein deutlicher Einfluss feststellbar (s. Abb. 27 und 10.4.4 Tab. 59). Als Matrix wurde eine isocyanathaltige Verbundfolie verwendet.

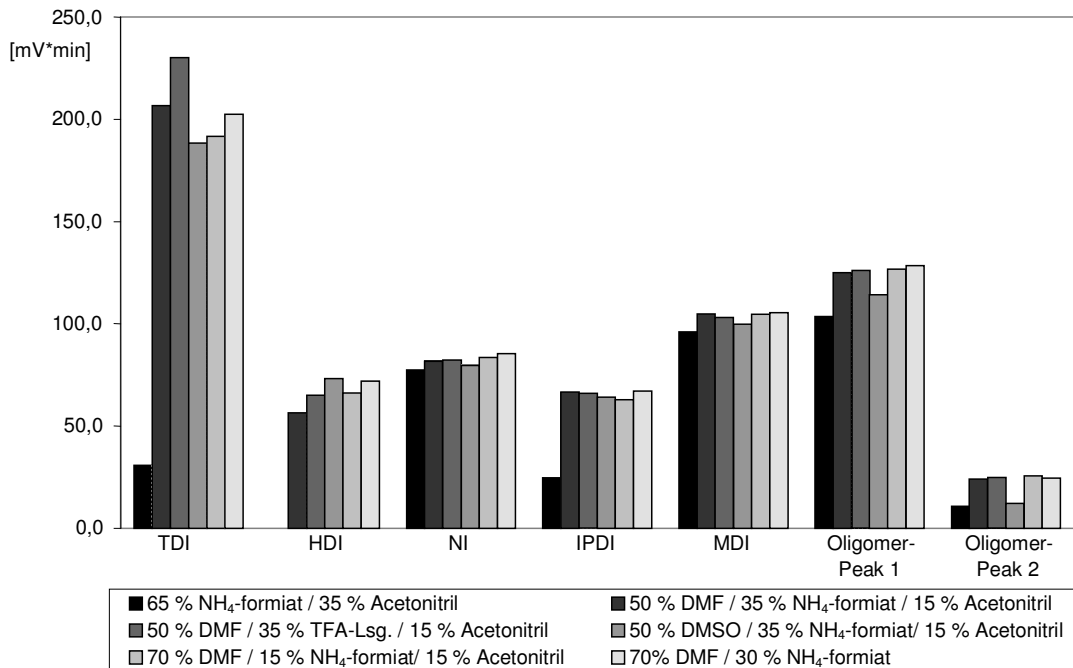


Abb. 27 Folien- und Isocyanat-Rückstände: Vergleich verschiedener Aufnahme-Lösungen
Chromatographische Bedingungen s. 4.5 Tab. 4

Die Wiederfindungsrate der Derivate bei Verwendung der Aufnahmelösungen NH_4 -formiat / Acetonitril 65/35 (v/v) und DMSO / NH_4 -formiat / Acetonitril 50/35/15 (v/v/v) ist vergleichsweise geringer, besonders hinsichtlich der oligomeren Isocyanate. Zu einer Verbreiterung der Peaks der zuerst eluierenden Standardisocyanate kommt es bei den Aufnahmelösungen DMF / TFA / Acetonitril 50/35/15 (v/v/v) und DMSO / NH_4 -formiat / Acetonitril 50/35/15 (v/v/v).

Die Verwendung von DMF / NH_4 -formiat / Acetonitril 70/15/15 (v/v/v) als Aufnahmelösung zeigt keinen Vorteil gegenüber dem Gemisch aus DMF / NH_4 -formiat / Acetonitril 50/35/15 (v/v/v). Da bei einem Anteil an DMF von 70 % jedoch die Möglichkeit der Löslichkeit von Störsubstanzen erhöht ist, wird die Aufnahmelösung bestehend aus DMF / NH_4 -formiat / Acetonitril 50/35/15 (v/v/v) für die Rückstände gewählt.

4.6.3 Zusammenfassung der optimierten Aufarbeitung (Blockdiagramm)

Aus den Untersuchungen zur Optimierung der Aufarbeitung ging das in Abb. 28 dargestellte Verfahren hervor:

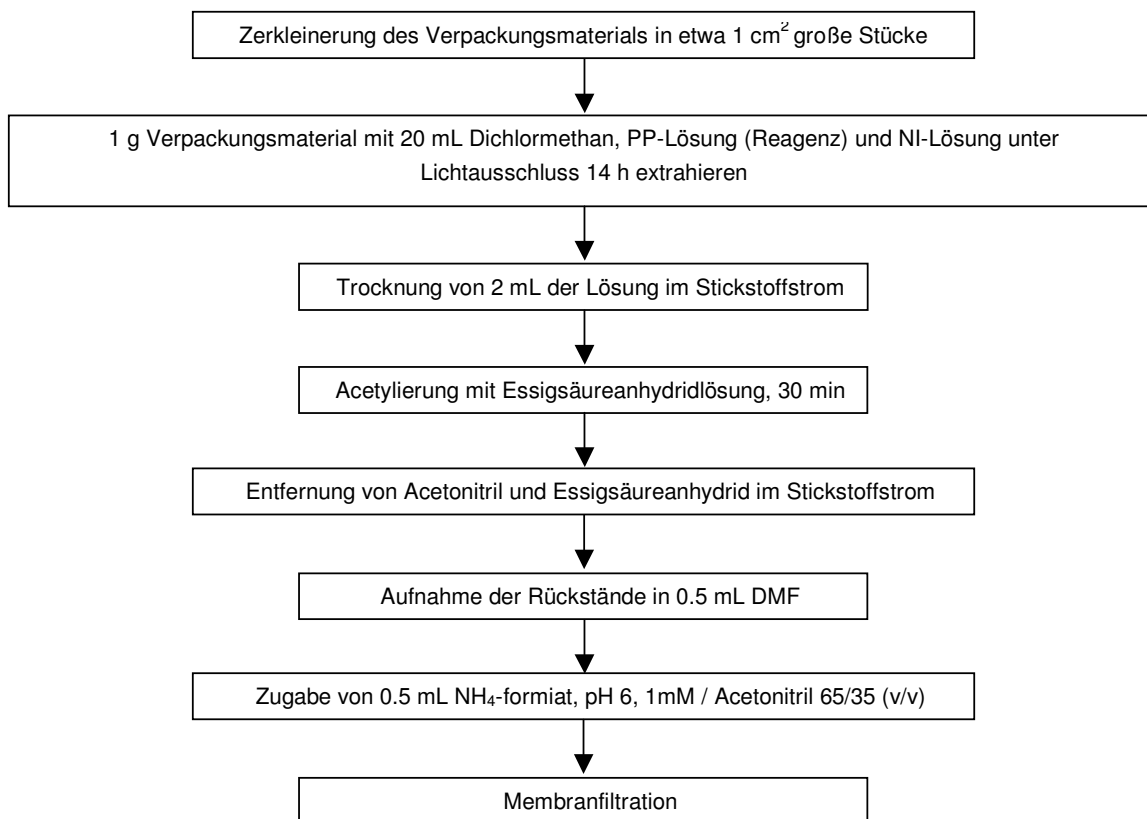


Abb. 28 Aufarbeitungsschema nach Optimierung

4.7 Validierung des Verfahrens

Weder bei WU et al. (1991) noch bei KUCK et al. (1999) werden statistische Daten für das Derivatisierungsreagenz PP angeführt. Bei WU et al. (1991) wird lediglich auf die Derivatisierungsrate anhand von PI im Vergleich mit anderen Derivatisierungsreagenzien eingegangen. Auch KUCK et al. (1999), die zusätzlich zu PI auch HDI und TDI verwenden, führen nur Daten zur Reaktivität der Reagenzien im Vergleich zu weiteren Derivatisierungsreagenzien an. Beide Autorengruppen verwenden zudem nur die UV-Detektion. TINNERBERG et al. (1997) die die gegenüber DBA und DPA verkürzte Reaktionszeit von DEA beschreiben, verwenden die MS-Detektion und führen ebenfalls keine statistischen Kenndaten an.

4.7.1 Grundkalibrierung

Es wurde für die zur Quantifizierung verwendete FL-Detektion eine Grundkalibrierung für alle Analyte und den IS durchgeführt. Der Arbeitsbereich des Verfahrens wurde so gewählt, dass der Summengrenzwert überwacht werden kann und zudem die Isocyanate, die im Endprodukt nicht mehr nachweisbar sein dürfen, detektiert werden können, wenn sie 1% des Summengrenzwertes für die zugelassenen Isocyanate erreichen (Tab. 6). Zur Analytik der Kaschierkleberkomponenten wurde der Arbeitsbereich für ausgesuchte Isocyanate nach oben erweitert, ohne dass Einbußen bei den Verfahrenskenndaten ersichtlich wurden. Das Verfahren ist über einen großen Bereich linear (Tab. 5). Die ermittelte mittlere Nachweisgrenze erlaubt eine empfindliche und präzise Bestimmung der untersuchten Isocyanate (s. 10.4.5 Tab. 62).

Tab. 5 Grundkalibrierung Isocyanate: mittlere Kenndaten

Korrelationskoeffizient r	0,9970
Reststandardabweichung s_{gr}	12,57 mV*min
Verfahrensstandardabweichung s_x	11,4 µg/L
Verfahrensvariationskoeffizient cv	5,1 %
Nachweisgrenze (DIN 32645)	43,7 µg/L
Nachweisgrenze (S/N > 3)	4,4 µg/L

Tab. 6 Grundkalibrierung Isocyanate: Arbeitsbereich

Isocyanat	untere Grenze µg/L	obere Grenze µg/L
2,6-TDI	5	1050
2,4-TDI	5	270
HDI	6	375
NI	6	375
IPDI	6	1210
2,4'-MDI	3	650
4,4'-MDI	3	670
CHI	5	200
PI	10	100
XDI	130	1320

4.7.2 Wiederfindung und Matrixkalibrierung

Es ist technisch auf Grund der Polymerisationsreaktion nicht möglich, einen definierten Isocyanatgehalt in ein Verpackungsmaterial einzubringen. Somit war es nur möglich eine definierte Standardmenge vor der Aufarbeitung zu diversen Probenmaterialien zuzudotieren.

Die mittlere Wiederfindung wurde für NI aus 5 verschiedenen Lebensmittelverpackungen, sowie zwei Verbundfolien (s. 10.4.6 Tab. 64) ermittelt. Sie beträgt 103,8%. Analysenverfahren die einen Massenanteil von über 10 µg/kg erwarten lassen, müssen gemäß der Entscheidung 2002/657/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION 2002c) eine Wiederfindungsrate von 80 bis 110% aufweisen. Diese Anforderungen werden für NI erfüllt. Auf Grund der guten Wiederfindungen wurde auf eine separate Matrixkalibrierung verzichtet.

4.7.3 Selektivität

BADGE und seine Derivate, die sehr reaktiv sind, können als Bestandteile von Lebensmittelverpackungen vorkommen, so dass zu erwarten ist, dass sie auf Grund ihrer Fähigkeit zur Fluoreszenz oder nach Reaktion mit den Derivatisierungsreagenzien als störende fluoreszierende Verbindungen auftreten.

Zur Überprüfung der Selektivität des Systems wurde unter gleichen Bedingungen wie bei den Isocyanaten BADGE•1H₂O stellvertretend für BADGE-Derivate mit PP bzw. mit DEA derivatisiert und chromatographisch getrennt. Das BADGE-PP-Derivat ergibt bei der Detektion mittels FLD ein Signal. Somit ist zu erwarten, dass BADGE und seine Derivate, wenn sie im Extrakt vorkommen, die Analytik stören können.

Die erhaltenen MS-Spektren zeigen, dass bei Verwendung von PP als Reagenz die reagensspezifischen Qualifier (m/z 121, m/z 164) teilweise vorhanden waren (Abb. 29). Der harnstoffspezifische Qualifier (m/z 190) war dagegen nicht nachweisbar, so dass eine Störung durch BADGE-Derivate beim Screening auf Isocyanate mittels MSD ausgeschlossen werden konnte.

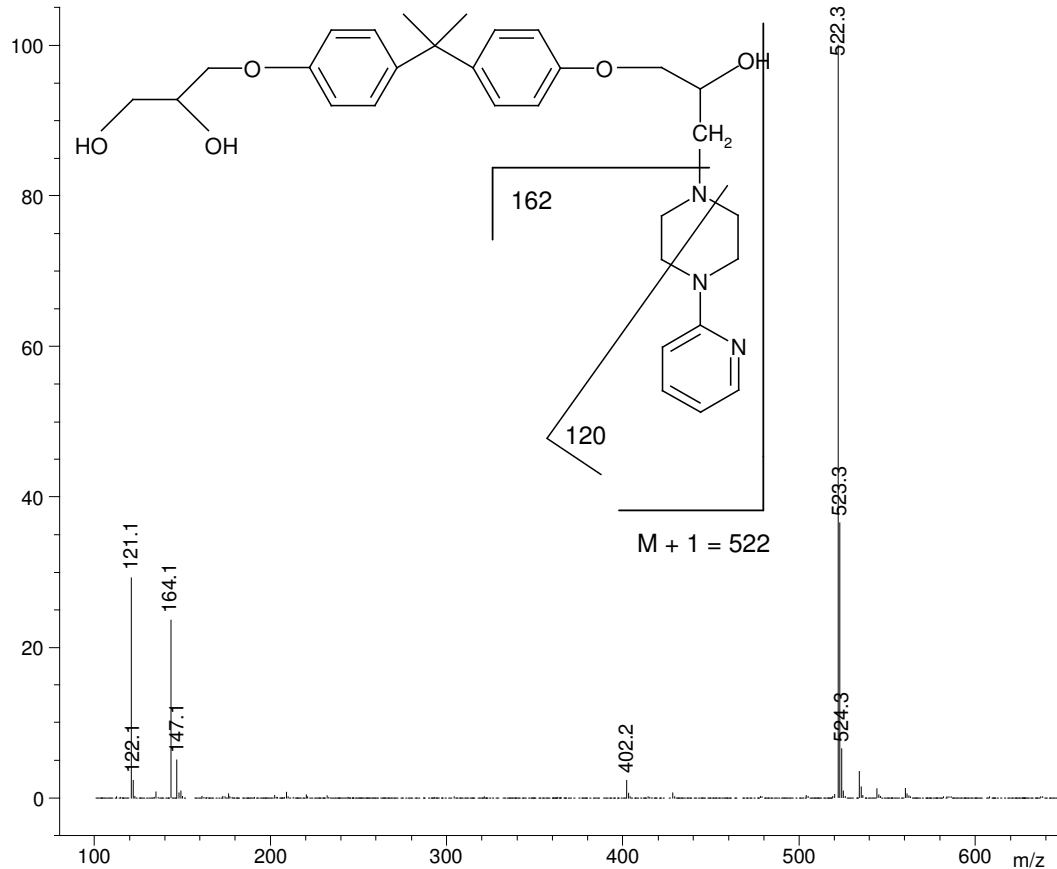


Abb. 29 BADGE•1H₂O-Addukt: MS-Spektrum (Scan-Modus, 160 V)

Durch die Behandlung während der Aufarbeitung mit Essigsäureanhydrid erfolgt eine Acetylierung einer bzw. beider Hydroxylgruppen am BADGE-Molekül (Abb. 30).

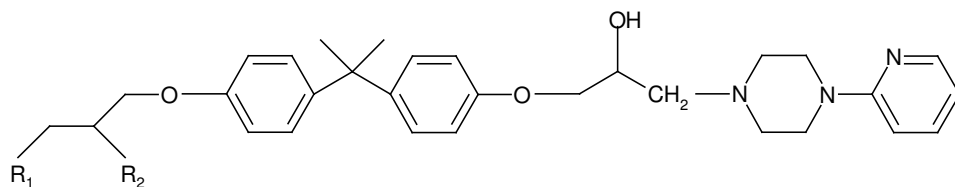


Abb. 30 BADGE•1H₂O-PP-Addukt: Strukturformel
 R₁, R₂ = OH (MG = 521 g/mol): R₁, R₂ = Acetylrest (MG = 563 g/mol): R₁, R₂ = Acetylrest (MG = 605 g/mol)

Bei Derivatisierung von BADGE•1H₂O mit DEA zeigt sich im MS-Spektrum ebenfalls das entsprechende BADGE•1H₂O-DEA-Addukt (Abb. 31). Analog zum PP war auch hier nur der reagenspezifische Qualifier (m/z 74) und nicht das entsprechende Harnstoffderivat (m/z 100) nachweisbar. Da bei Verwendung von DEA als Reagenz keine Acetylierung notwendig ist, wurden hierbei keine acetylierten BADGE-Derivate nachgewiesen.

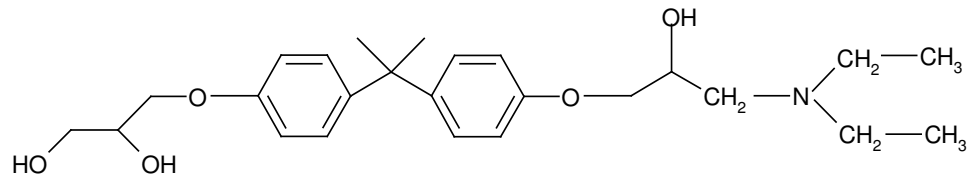


Abb. 31 BADGE•1H₂O-DEA-Addukt (MG = 431 g/mol)

5 Die analytische Untersuchung von Rohstoffen für Lebensmittelverpackungen

Zur Ermittlung von Daten über migrierende Substanzen aus kaschierten Aluminiumfolien, wie sie bei der Herstellung von Aluminiumleichtbehältern verwendet werden, wurden Rohstoffe für Kaschierkleber und ausgewählte Lamine vor und nach der Aushärtung untersucht. Ziel ist es herauszufinden, welche Stoffe zur Migration führen und ob sich die Rohstoffe, bzw. deren Migrate, bei der Aushärtung verändern.

Zur Untersuchung kamen 7 Isocyanat- und Polyolkomponenten, 1 Polypropylenfilm und 1 Lubricant, 5 Lamine, die unter Verwendung der untersuchten Isocyanat- und Polyolkomponenten hergestellt worden sind, sowie 2 Verbundfolien, die unter Verwendung der Kaschierkleber hergestellt worden sind.

5.1 Polyol- und Isocyanatkomponenten

Bei den zur Verfügung gestellten Kaschierklebern KAS-1 bis KAS-7 handelt es sich um 2-Komponenten-Polyurethanklebstoffe auf Basis von Polyesterpolyolen. Sie bestehen grundsätzlich aus Polyol- und Isocyanatkomponente, die abhängig vom Verwendungszweck unterschiedliche Mengen an Monomeren und Polymeren besitzen.

Folgende Untersuchungen wurden an den Komponenten durchgeführt:

Isocyanat- und Polyesterkomponenten:

- Bestimmung des mittleren Molekulargewichts

Isocyanatkomponenten:

- Bestimmung des Gesamtisocyanatgehalts
- Identifizierung der monomeren Polyisocyanate und Bestimmung des Monomergehaltes
- Identifizierung von Prepolymeren

Polyesterkomponenten:

- Screening auf niedermolekulare Polyester
- Hydrolyse mit anschließender Bestimmung der Polyole und Säuren

Die Polyol- und Isocyanatkomponenten wurden hinsichtlich ihres mittleren Molekulargewichtes und ggf. weiterer charakteristischer Molekulargewichte mittels SEC-ELSD (AM 2, s. 10.3) charakterisiert (s. 5.1.1 Tab. 7). Das mittlere Molekulargewicht wird aus dem nicht näher zuzuordnenden Hauptpeak abgeschätzt.

5.1.1 Mittleres Molekulargewicht der Polyolkomponenten:

Tab. 7 Polyolkomponenten: Molekulargewichtsbestimmung

Komponente	Retentionszeit [min]	Molekulargewicht [MG]	Zuordnung
KAS-1B	12,6	9700 Da	mittleres MG
	15,6 / 16,0 / 16,4 / 17,1 / 18,3	Signale mit Differenz: 260 Da	homologe Reihe von Polyestern
KAS-2A	12,1	15 kDa	mittleres MG
KAS-3B	(18,3 / 18,8)	Doppelpeak < 200 Da	außerhalb der Kalibrierung
KAS-4B	(18,4 / 18,8)	Doppelpeak < 200 Da	außerhalb der Kalibrierung
KAS-5/6A	11,7	28 kDa	mittleres MG
	18,6	kleines Signal < 200 Da	außerhalb der Kalibrierung
KAS-7HK	11,6	26 kDa	mittleres MG
	18,6	kleines Signal < 200 Da	außerhalb der Kalibrierung

Die Polyolkomponenten lassen sich bezüglich ihres Molekulargewichtes in zwei Gruppen einteilen (Tab. 7). Hochmolekulare Komponenten, teilweise mit einzelnen kleinen Signalen (KAS-1B, KAS-2A, KAS-5/6A und KAS-7HK), sowie Komponenten mit ausschließlich niedermolekularen Bestandteilen (KAS-3B und KAS-4B). Letztere sind mit dem ELSD kaum detektierbar und müssen somit flüchtig sein. Erst ab einer Konzentration von 1% ist erkennbar, dass beide Komponenten in ihrem Chromatogramm Doppelpeaks aufweisen und es sich somit um Gemische aus mehreren Substanzen handeln muss.

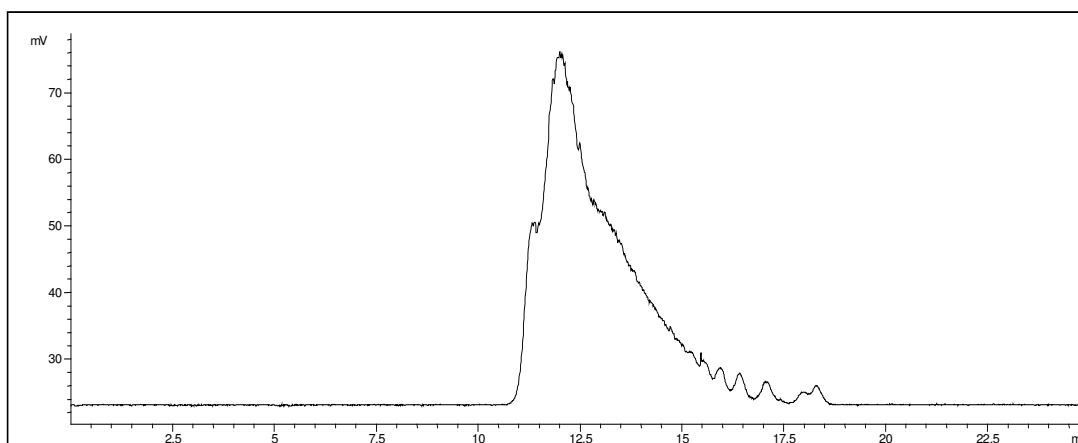


Abb. 32 Komponente KAS-1 B: SEC-ELSD-Chromatogramm
Bedingungen: s. 10.3 Tab. 35, $\beta = 0,86 \text{ g/L}$,

Die Komponente KAS-1B (Abb. 32) weist eine Reihe von kleinen Peaks auf dem auslaufenden Hauptpeak auf. Nach Abschätzung des Molekulargewichtes (s. 5.1.2 Tab. 8) ist erkennbar, dass die Gewichtsunterschiede bei den aufeinanderfolgenden Peaks ähnlich sind, sie betragen jeweils ca. 260 Da. Dies ist eine Differenz, wie sie bei homologen Reihen von Polyestern auftritt.

5.1.2 Mittleres Molekulargewicht der Isocyanatkomponenten:

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Isocyanatkomponenten erfolgt nach Derivatisierung mit DEA, um die freien Isocyanatgruppen zu blockieren.

Tab. 8 Isocyanatkomponenten: Molekulargewichtsbestimmung

Komponente	Retentionszeit [min]	Molekulargewicht	Zuordnung
KAS-1A	11,3	40 kDa	Schulter
	12,2	14 kDa	mittleres MG
KAS-2B	16,5 / 17,0	750 und 560 Da	3er- und 4er Homologe
	17,6	390 Da	MDI
KAS-3A	17,6	einzelner Peak 385 Da	MDI
	12,6	9500 Da	mittleres MG
KAS-4A	18,2	kleines Signal: 270 Da	
	16,1	kleines Signal: 900 Da	
	12,9	7000 Da	mittleres MG
KAS-5B	18,39	240	
KAS-6B	15,17 / 15,69 / 16,52*	1800, 1100, 720	Prepolymere
	15,32 / 15,87 / 16,77*	1500, 1050, 670	Prepolymere
KAS-7IK	15,36 / 16,26* / 16,89	1300, 820, 600	Prepolymere
	18,65	200	

* größter Peak im Chromatogramm

Die Isocyanatkomponenten KAS-1A, KAS-3A und KAS-4A sind von der Peakform den hochmolekularen Polyolen sehr ähnlich. Es handelt sich bei ihnen offensichtlich um hochmolekulare Prepolymere. Zur Überprüfung, ob es sich bei den Komponenten um Polyesterurethane handelt wird ihre Zusammensetzung nach Hydrolyse genauer bestimmt. Die Komponente KAS-3A weist neben der Hauptkomponente mit einem mittleren Molekulargewicht von 9500 Da einen weiteren Peak im niedermolekularen Bereich bei 385 Da auf. Dieser lässt sich auf derivatisiertes MDI-Monomer, welches ein Molekulargewicht von 376 Da hat, zurückführen. Gemäß Herstellerangaben soll die Komponente KAS-3A 1-3 % MDI-Monomer enthalten.

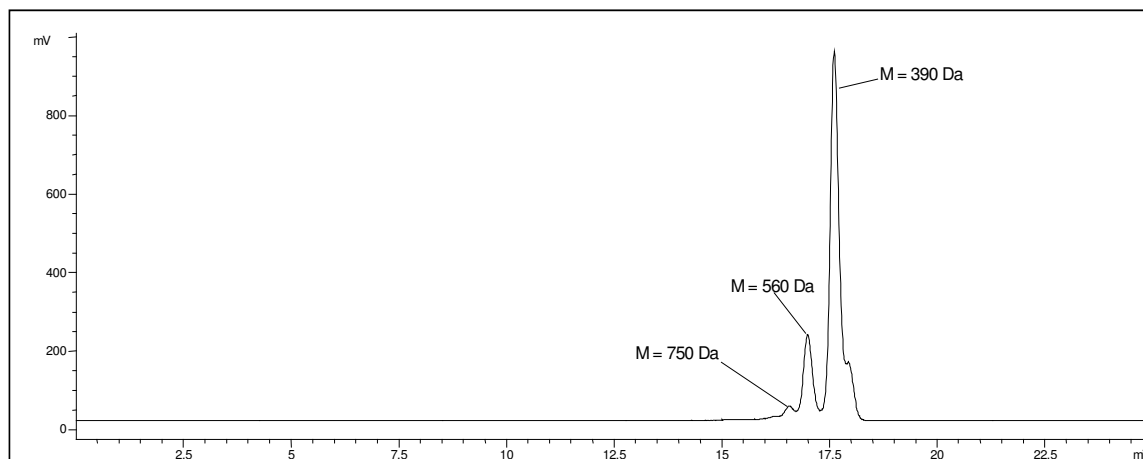


Abb. 33 Komponente KAS-2B: SEC-ELSD-Chromatogramm nach Derivatisierung mit DEA
Bedingungen: s. Tab. 35, $\beta = 0,50$ g/L

Die Komponente KAS-2B weist bei 17,6 min das Hauptsignal mit einem Molekulargewicht von 390 Da auf. Vom Molekulargewicht und der Retentionszeit stimmt der Peak mit dem niedermolekularen Peak in Komponente KAS-3 A, der MDI zugeordnet wurde, nahezu überein. Gemäß Herstellerangaben soll es sich bei der Komponente KAS-2B um ein Gemisch aus MDI-Isomeren und Homologen handeln. Bei den übrigen Peaks mit den abgeschätzten Molekulargewichten von 560 und 750 Da handelt es sich um Homologe des MDI.

Die Komponenten KAS-5B, KAS-6B und KAS-7IK weisen Peaks mit einem Molekulargewicht von 200 bis ca. 1800 Da auf (Tab. 8). Sie liegen somit unter denen der hochmolekularen Prepolymere (ab ca. 10 kDa) und zum großen Teil über dem Molekulargewicht der derivatisierten Monomere (320 – 396 Da). Es handelt sich somit um Prepolymere, die auf niedermolekularen Polyolen oder Polymeren der Monomere beruhen. Zur genauen Identifizierung dieser Prepolymere erfolgt die Untersuchung mittels HPLC-FLD/MSD (s. 10.3 AM 10 und 5.1.5 Tab. 11).

5.1.3 Bestimmung des Gesamtisocyanatgehalts

Die Bestimmung der Gesamtisocyanatkonzentration erfolgte mittels der titrimetrischen Methode nach DIN EN ISO 11909 (1998, AM 9) in Toluol und nach Modifikation unter Verwendung des Lösungsmittels Tetrahydrofuran sowie mittels HPLC-FLD (s. 10.3 AM 7) (Tab. 9).

Tab. 9 Isocyanatkomponenten: Gesamtisocyanatgehalt (berechnet als NCO)

%	KAS-1A	KAS-2B	KAS-3A	KAS-4A	KAS-5B	KAS-6B	KAS-7IK
Toluol	1,50	32,03	2,12	1,93	12,11	10,59	*
Tetrahydrofuran	1,56	32,16	2,25	2,13	12,81	11,24	13,93
HPLC-FLD	0,29	25,49	1,49	0,64	10,15	9,65	9,83

* Komponente stand zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht zur Verfügung

Die Gesamtisocyanatkonzentration ist stark abhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Der Unterschied zwischen Toluol und Tetrahydrofuran beträgt bei den einzelnen Komponenten mit Ausnahme der Komponenten KAS-2B (0,4%) und KAS-4A (9%) ca. 5%. Die Lösungseigenschaften von Tetrahydrofuran sind für schwerer lösliche Verbindungen mit freien Isocyanatgruppen besser als die von Toluol. Der geringere prozentuale Unterschied bei der Komponente KAS-2B lässt sich auf einen höheren Anteil niedermolekularer Isocyanate, die bereits in Toluol gut löslich sind, zurückführen. Bei der Komponente KAS-4A beruht der höhere Unterschied auf einem größeren Anteil hochmolekularer und damit schwerer löslicher Isocyanate.

Bei Verwendung der chromatographischen Methode ist die Löslichkeit der Isocyanatkomponenten im Aufnahmegemisch DMF / Puffer / Acetonitril deutlich schlechter. Beim Lösen der derivatisierten Komponenten fallen höhermolekulare Anteile aus und niedermolekulare Polyisocyanate können eingeschlossen und mitgefällt werden. Daher kann die chromatographische Methode für diese Anwendung als nicht geeignet angesehen werden.

5.1.4 Quantifizierung und Identifizierung von Isocyanatmonomeren mittels HPLC-FLD/MSD

Mit Ausnahme der Komponenten KAS-2B und KAS-5B entspricht der ermittelte Gehalt an Monomeren denen der Herstellerangabe (Tab. 10).

Tab. 10 Kleberkomponenten: Isocyanatgehalt

%	KAS-1A	KAS-2B	KAS-3A	KAS-4A	KAS-5B	KAS-6B	KAS-7IK
Gesamtisocyanat [ber. als NCO]	0,29	25,49	1,49	0,64	10,15	9,65	9,83
Basismonomer	IPDI	MDI*	4,4'-MDI	IPDI	IPDI	XDI	2,4-TDI
Monomergehalt [ber. als NCO]	0,17	14,95	0,72	0,30	0,07	0,10	0,09
Monomergehalt [ber. als Monomer]	0,44	44,52	2,14	0,78	0,18	0,22	0,18
Monomergehalt (Herstellerangabe)	> 0,1 – 1,0	> 50,0 – 100,0	1 – 3	< 1	> 70**	< 0,5	< 0,5

*MDI-Isomere und Homologe

** eingesetzter Monomergehalt

Die Abweichung bei der Komponente KAS-2B ist begründet in der Anwesenheit von Homologen, die auf den Monomeranteil bezogen einen geringeren Anteil an freien Isocyanatgruppen aufweisen, als dies bei reinen Monomeren der Fall ist.

Bei der Komponente KAS-5B ist nicht der Monomergehalt im fertigen Produkt, sondern der eingesetzte Monomergehalt angegeben. Somit ist ein Vergleich mit der Herstellerangabe nicht möglich.

Bei Vergleich des Gesamtisocyanatgehalts und des Monomergehaltes wird offensichtlich, dass der Monomergehalt nur einen Anteil von 47 – 59% (KAS-1A, KAS-2B, KAS-3A, KAS-4A) bzw. im Fall der überwiegend als Prepolymere eingesetzten Komponenten (KAS-5B, KAS-6B, KAS-7IK) einen Anteil von < 1% ausmacht. Da die verbleibenden Substanzen jedoch einen nicht unerheblichen Anteil freier Isocyanatgruppen besitzen, der möglicherweise toxikologisch relevant ist, ist die Aufklärung dieser Substanzen von großem Interesse.

5.1.5 Identifizierung unbekannter Polyisocyanate

Bei Kenntnis der in einem Produkt verwendeten Monomere ist es möglich für isocyanathaltige Substanzen Strukturen bzw. Strukturbestandteile zu postulieren bzw. zu identifizieren.

Hierzu wird AM 10 (vgl. 10.3) verwendet. Die Kaschierkleber werden mit PP und DEA derivatisiert und die Verbindungen, die nach Derivatisierung mit PP fluoreszierende Signale abgeben und denen ein korrespondierendes Derivat mit DEA zugeordnet werden kann, ausgewertet. Die Zuordnung erfolgt über annähernd ähnliche Retentionszeiten und Massensignale, die sich um 90 Da oder ein Vielfaches davon unterscheiden. Die Anzahl der freien Isocyanatgruppen und das Molekulargewicht berechnet sich nach dem Schema in Abb. 34:

$$\begin{aligned}
 M(\text{PP}) &= 163 \text{ Da} \\
 M(\text{DEA}) &= 73 \text{ Da} \\
 M(\text{PP}) - M(\text{DEA}) &= 90 \text{ Da} \\
 M(\text{PP-Derivat}) - M(\text{DEA-Derivat}) &= n \cdot 90 \text{ Da} \\
 \text{Daraus folgt: die unbekannte Substanz besitzt } n \text{ freie Isocyanatgruppen} \\
 M(\text{unbekannte Substanz}) &= M(\text{PP-Derivat}) - n \cdot M(\text{PP})
 \end{aligned}$$

Abb. 34 Berechnungsschema: Anzahl freier Isocyanatgruppen

Aus den ermittelten Molekulargewichten der unbekanntes Polyisocyanate lassen sich mögliche Prepolymere postulieren (Tab. 11). Wird die Masse der Anzahl an Monomeren, wie freie Isocyanatgruppen identifiziert wurden, von der Masse der unbekanntes Substanz abgezogen, so erhält man die Masse des „Kerns“, z.B. von niedermolekularen Polyolen oder kurzkettigen Polyestern, mit denen die Monomere als Addukt das Prepolymer bilden. Als mögliche Monomere der Polyole bzw. Polyester kommen die mittels der Methoden AM 4 (vgl. 10.3) und AM 3 (vgl. 10.3) bestimmten Substanzen in Betracht.

Tab. 11 Polyisocyanatkomponenten: postulierte Prepolymere

Komponente	M (PP-Derivat) [Da]	M (DEA-Derivat) [Da]	M (PP-Derivat) – M (DEA-Derivat) [Da] / Anzahl freier Isocyanatgruppen	M (unbekannte Substanz) [Da]	M („Kern“) [Da]	Mögliche Substanz
KAS-1A	548	368	180 / 2	222	-	IPDI-Monomer
	876	696	180 / 2	550	106	IPDI-DEG-IPDI
	1024	844	180 / 2	698	254	IPDI-EG-PA-EG-IPDI
	1068	888	180 / 2	742	298	IPDI-EG-PA-DEG oder IPDI-DEG-PA-EG
KAS-2B	576	396	180 / 2	250	-	MDI-Monomer
	870	600	270 / 3	474	-	MDI-3er-Homolog
	1164	804	360 / 4	606	-	MDI-4er-Homolog
KAS-3A	576	396	180 / 2	250	-	MDI-Monomer
	800	620	180 / 2	474	(-26)	?
	932	752	180 / 2	606	106	MDI-DEG
	967	697	270 / 3	478	(-272)	?
	1148	968	180 / 2	822	322	MDI-DEG-ADA-DEG-MDI
KAS-4A	1168	988	180 / 2	842	342	MDI-DEG-PA-DEG-MDI
	548	368	180 / 2	222	-	IPDI
	876	696	180 / 2	550	106	IPDI-DEG
	1092	912	180 / 2	766	322	IPDI-DEG-ADA-DEG- IPDI
	1112	932	180 / 2	786	342	IPDI-DEG-PA-DEG-IPDI
	1289	1019	270 / 3	800	134	(IPDI) ₃ TMP
	1328	1148	180 / 2	1002	558	IPDI-DEG-ADA-DEG-PA- DEG-IPDI
KAS-5B	548	368	180 / 2	222	-	IPDI
	1155	885	270 / 3	666	-	IPDI-Trimer
KAS-6B	514	334	180 / 2	188	-	XDI
	1187	917	270 / 3	698	134	(XDI) ₃ TMP

KAS-7IK	500	320	180 / 2	174	-	TDI
	780	600	180 / 2	454	106	TDI-DEG-TDI
	1060	880	180 / 2	734	386	?
	1117	847	270 / 3	628	106	(TDI) ₃ DEG
	1145	875	270 / 3	656	134	(TDI) ₃ TMP

PA steht für alle Phthalsäureisomere, da nur das Molekulargewicht relevant ist

Bei den Komponenten KAS-1A, KAS-3A und KAS-4A kann nur ein geringer Anteil des Gesamtisocyanatgehalts bestimmt werden, da es sich bei diesen Komponenten um hochmolekulare Prepolymere handelt, von denen ein großer Anteil bei der Aufarbeitung ausfällt oder auf Grund des begrenzten Scan-Bereiches des MSD von 1500 Da nicht erfasst werden kann. Es sind Prepolymere auf Basis von DEG, EG und TMP als Polyol- sowie PA und ADA als Säurekomponenten identifizierbar. Bei der Komponente KAS-2B liegen keine Addukte, sondern Isomere und Homologe von MDI vor. Es ist möglich neben dem Monomer auch die 3er und 4er-Homologe zu identifizieren (Abb. 35).

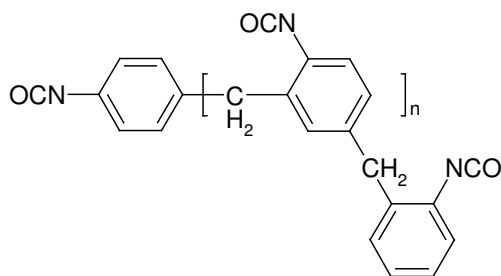


Abb. 35 MDI-Homologe nach KITTEL (1998): Strukturformel

Bei der Komponente KAS-5B weist das Chromatogramm einen charakteristischen Doppelpeak mit zahlreichen Schultern bei einer Retentionszeit von 48-53 Minuten auf. Die Masse des unbekanntes Polyisocyanats beträgt 666 Da. Da es sich bei dieser Masse genau um das Dreifache des Monomergewichtes von IPDI handelt, wurde für diese Substanz die Struktur des IPDI-Isocyanurates postuliert:

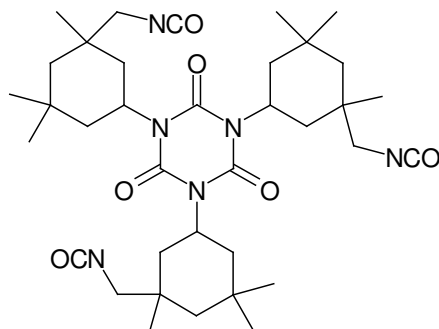


Abb. 36 IPDI-Isocyanurat (Trimer): Strukturformel

Nach KITTEL (1998) ist die Isocyanatgruppe an der Methyl-Seitengruppe 8-10 mal reaktiver, als die Gruppe am cycloaliphatischen Ring und es gibt zwei stereoisomere Formen des IPDI. Somit entstehen außer dem in Abb. 36 dargestellten Trimer eine Vielzahl von verschiedenen weiteren Isomeren, was die Ursache für die charakteristische Form des Peaks mit den vielen Schultern ist.

Zur Absicherung des postulierten Ergebnisses wird die Komponente KAS-5B mit dem handelsüblichen IPDI-Isocyanurat Desmodur® Z 4470 BA von Bayer verglichen.

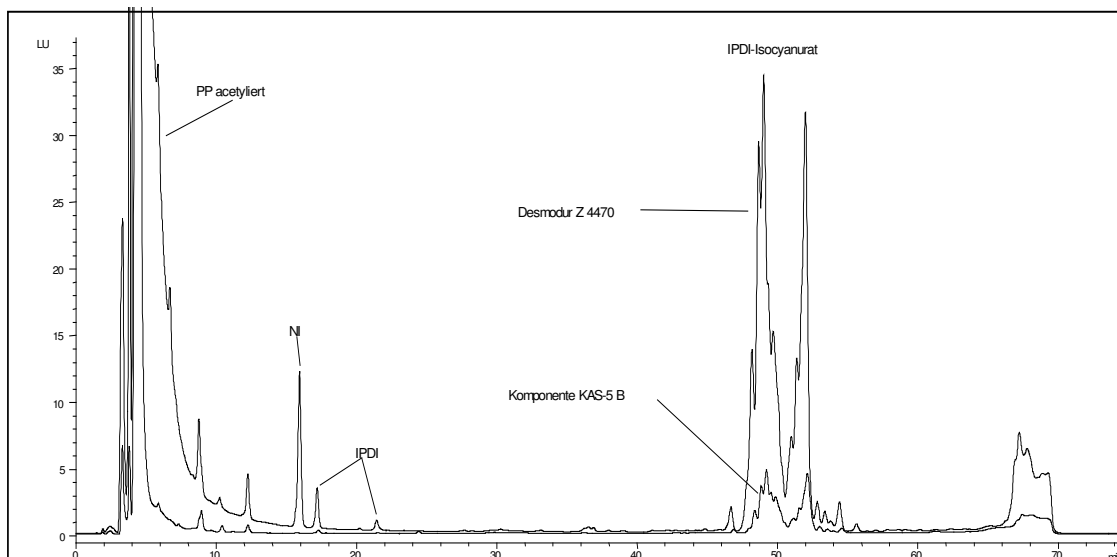


Abb. 37 Overlay: FLD-Chromatogramm KAS-5 B und Desmodur® Z 4470 BA
Bedingungen: s. 10.3 Tab. 35, KAS-5 B: $\beta = 2,00$ mg/L, Desmodur: $\beta = 13,80$ mg/L

Wie in Abb. 37 zu erkennen ist, stimmen die Retentionszeiten und das Intensitätsspektrum des Isocyanurat-Peaks in der Komponente und im Handelsprodukt überein. Bei der Bestimmung des Molekulargewichts der Derivate ist das Ergebnis des Handelsproduktes ebenfalls identisch mit dem Ergebnis der Komponente KAS-5 B. Die als IPDI-Isocyanurat postulierte Verbindung konnte somit hinreichend abgesichert werden.

Bei den Komponenten KAS-6B und KAS-7IK handelt es sich um niedermolekulare Prepolymere (s. 5.1.2). Bei der Komponente KAS-6B konnte nur die Masse des größten Peaks bestimmt werden. Es lässt sich ein Addukt aus 3 XDI und TMP postulieren. Eine Absicherung des Hauptproduktes ist nicht möglich, da XDI ein selten benutztes Monomer ist und Handelsprodukte nicht erhältlich sind. Bei der Komponente KAS-7IK sind im Chromatogramm der PP-Derivate mehrere Peaks mit der Masse 1145 Da vorhanden, die als Addukt aus 3 TDI und TMP postuliert werden. Das TDI-TMP-Addukt stellt das Hauptprepolymer dar. Es tritt in mehreren Peaks auf, weil auch beim TDI die beiden Isocyanatgruppen nicht gleichartig sind und somit bei der Herstellung des Adduktes mehrere Isomere entstehen.

Zur Absicherung des Ergebnisses wird die Komponente mit dem handelsüblichen TDI-TMP-Addukt Desmodur® L 75 von Bayer verglichen.

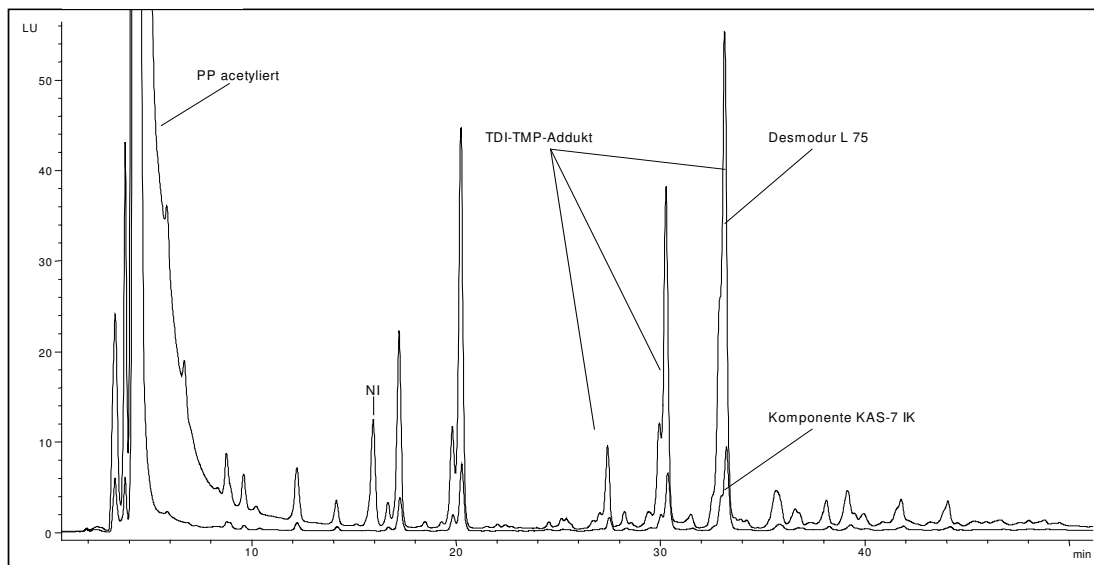


Abb. 38 Overlay: FLD-Chromatogramme KAS-7 IK und Desmodur® L 75
Bedingungen: s. 10.3 Tab. 35, KAS-7 IK: $\beta = 1,84$ mg; Desmodur® L: $\beta = 16,58$ mg

Sowohl die Retentionszeiten der Peaks (Abb. 38) als auch die Molekulargewichte der Derivate in der Komponente und im Handelsprodukt stimmen überein. Die als TDI-TMP-Addukt postulierte Verbindung ist somit hinreichend abgesichert.

5.1.6 Screening auf niedermolekulare Polyester mittels HPLC-DAD/MSD

Bei der Herstellung von Polyestern entsteht nicht ein einheitliches gewünschtes Produkt mit einem definierten Molekulargewicht, sondern als Nebenprodukt auch Polyester mit niedrigerem Molekulargewicht, die sowohl linear als auch cyclisch sein können. Da cyclische Polyester nicht mit Isocyanaten reagieren können, werden sie nicht vernetzt. Diese niedermolekularen Substanzen können aus dem gehärteten Kleber in das Lebensmittel migrieren. Zur Identifizierung dieser cyclischen Polyester und um die Zusammensetzung der Komponente der niedermolekularen Polyester abzuschätzen, wird mit den Polyesterkomponenten das Screening auf niedermolekulare Polyester (s. 10.3 AM 5) durchgeführt.

Bei der Auswertung werden die in der AM 4 (vgl. 10.3) angeführten Dirole berücksichtigt, da es sich um die am häufigsten vorkommenden Dirole handelt. Als Säuren werden Adipinsäure und Phthalsäureisomere, ohne Unterscheidung, um welches Isomer es sich handelt, in die Auswertung mit einbezogen.

Bei der Komponente KAS-1B handelt es sich um einen Polyester, welcher hauptsächlich aus den 2er-, 3er- und 4er-Cyclen sowie kurzkettingen linearen Polyestern auf Basis von BD und PD besteht. Als Säuren kommen ADA und Phthalsäureisomere vor. Während die Säuren gemischt in den Polyesterfragmenten vorkommen sind die beiden Polyole nur alternativ in den Fragmenten vorhanden (s. 10.4.6 Tab. 65 und Abb. 70).

Bei der Komponente KAS-2A ist die Zusammensetzung deutlich heterogener. Als Polyole kommen sowohl bei den 2er- und 3er-Cyclen als auch bei den kurzkettigen linearen Polyestern die Substanzen EG, BD, PD, NPG und HD vor, wobei diese Substanzen auch im Gegensatz zur Komponente KAS-1B gemischt vorkommen. Als Säuren sind wiederum die ADA und Phthalsäureisomere vertreten (s. 10.4.6 Tab. 66 und Abb. 71).

Die Komponenten KAS-3B und KAS-4B sind beide löslich in Acetonitril / Wasser. Bei Injektion in die HPLC-MSD ergeben sich jedoch keine auswertbaren Massensignale. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen beiden Komponenten nicht um Polyester, sondern um eine Mischung aus Polyolen handelt, die für eine Trennung mittels RP-HPLC zu polar sind. Die Identifizierung muss somit mittels GC-FID vorgenommen werden (s. 5.1.8).

Bei Vergleich der Chromatogramme der Komponenten KAS-5/6A und KAS-7HK wurde festgestellt, dass beide Komponenten in ihrer Zusammensetzung völlig identisch sind. Auf eine getrennte Auswertung wird daher verzichtet. Diese Komponenten bestehen aus 2er-, 3er- und 4er-Cyclen sowie linearen Polyestern auf Basis von EG, DEG und eventuell vereinzelt BD. Als Säurekomponenten waren ADA und Phthalsäureisomere nachweisbar (s. 10.4.6 Tab. 67 und Abb. 72).

5.1.7 Identifizierung von Carbonsäuren mittels HPLC-MSD nach Hydrolyse

Zur Überprüfung, welche Säuren, insbesondere Phthalsäureisomere, in den Komponenten vorkommen werden die Komponenten mit AM 3 (vgl. 10.3) untersucht. Benzoesäure, die mit der Methode ebenfalls erfasst werden kann, wird als Kettenstopper eingesetzt. Die Verwendung von Kettenstoppfern ist bei Polyesterpolyolen unerwünscht, da freie Hydroxygruppen für die Aushärtungsreaktion mit den Isocyanatgruppen nötig sind. Auch Acrylsäure und Pyromellithsäure finden bei der Herstellung von Polyesterpolyolen kaum Verwendung. Die verbleibenden Carbonsäuren sind somit Maleinsäure (MA), TMA, ADA, PA, IPA und TPA. Alle Polyesterpolyole und Polyesterurethane enthalten ADA und IPA. In den Komponenten KAS-1A und KSA-2A ist zusätzlich TPA enthalten. Außer diesen drei Säuren waren keine weiteren Säuren nachweisbar (Tab. 12).

Tab. 12 Polyesterkomponenten: Carbonsäurezusammensetzung nach Hydrolyse

Säuren	KAS-1A	KAS-1B	KAS-2A	KAS-3A	KAS-4A	KAS-5/6A	KAS-7HK
MA	-	-	-	-	-	-	-
TMA	-	-	-	-	-	-	-
ADA	+	+	+	+	+	+	+
TPA	+	-	+	-	-	-	-
PA	-	-	-	-	-	-	-
IPA	+	+	+	+	+	+	+

+ = enthalten, - = nicht enthalten

5.1.8 Identifizierung von Polyolen mittels GC-FID nach Hydrolyse

Zur Identifizierung der in den Komponenten der Kaschierkleber verwendeten Polyole wurden die Komponenten mittels AM 4 untersucht. Da es sich bei den Komponenten KAS-3B und KAS-4B um niedermolekulare Polyole handelt, wird hier nicht ein Hydrolysat verwendet, sondern eine 0,2%ige Lösung der Komponenten untersucht.

Nach Hydrolyse waren in den Komponenten nicht nur die bereits im Polyesterscreening (s. 5.1.6) bzw. bei der Identifizierung unbekannter Polyisocyanate (s. 5.1.5) nachgewiesenen, sondern auch noch weitere Polyole nachweisbar (Tab. 13). Grund dafür, dass die Substanzen erst nach Hydrolyse nachweisbar sind und nicht bereits im Polyesterscreening, kann einerseits sein, dass die jeweiligen Polyesteranteile mengenmäßig zu gering vertreten sind und durch andere Komponenten überlagert werden und zum anderen, dass sie Bestandteil höhermolekularer Komponenten sind, die mit dem begrenzten Scan-Bereich des MSD nicht erfasst werden können.

Alle Polyole, die im Screening auf Polyester und bei der Identifizierung unbekannter Polyisocyanate angeführt werden, konnten mit dieser Methode bestätigt werden.

Tab. 13 Polyesterkomponenten: Polyolzusammensetzung nach Hydrolyse

Substanz	KAS-1A	KAS-1B	KAS-2A	KAS-3A	KAS-3B	KAS-4A	KAS-4B	KAS-5/6A & 7HK
0,8*	-	-	-	-	+	-	+	-
EG	+**	-	+**	-	-	-	-	+**
1,2-PD	-	+**	-	-	-	-	-	-
2,3-BD	-	-	-	-	-	-	-	-
1,3-PD	-	-	+**	-	-	-	-	+
1,2-BD	-	-	-	-	-	-	-	-
1,3-BD	+	+**	+**	+	-	+	-	+**
MPD	-	-	-	-	-	-	-	-
1,4-BD	-	-	-	-	-	-	-	-
NPG	-	-	+**	-	-	-	-	-
DEG	+**	-	-	+**	+	+**	+	+**
HD	+	-	+**	-	-	-	-	-
TMPD	-	-	-	-	-	-	-	-
TMP	-	+	-	-	-	+**	+	-
CHDM	+	+	+	+	-	+	-	+
20,6*	+	+	+	+	-	+	-	+

* Substanz unbekannt; Angabe der Retentionszeit [min]

** Komponente bereits im Screening auf Polyester nachweisbar

Nicht alle Peaks in den Chromatogrammen konnten durch Vergleich mit den Standards oder durch Dotierung identifiziert werden. So weisen alle Komponenten außer KAS-3B und KAS-4B einen Peak mit einer Retentionszeit von 20,6 Minuten auf, der nicht identifiziert werden konnte. Da dieser Peak im Blindwert nicht auftritt, kann es sich nicht um eine Kontamination handeln.

Alle Chromatogramme der Hydrolysate weisen einen breiten Einspritzpeak auf, der durch das in der Hydrolyse verwendete Ethanol verursacht wird. Die Bestimmung wird dadurch jedoch nicht beeinflusst, weil die erste Substanz erst nach 2 Minuten eluiert.

Bei den Komponenten KAS-3B und KAS-4B ist hingegen ein Peak bei einer Retentionszeit von 0,8 Minuten auffällig der ebenfalls nicht zugeordnet werden kann und im Blindwert nicht auftritt.

5.2 Polypropylen-Film

Bei dem untersuchten Polypropylenfilm handelt es sich um eine 30 µm dicke Polypropylenfolie. Laut Herstellerangaben wurde der Polypropylenfilm nicht verstreckt, d.h. bei der Herstellung erfolgte keine weitere Formung durch Ziehen. Durch diese Art der Herstellung ist der Film dicker und stabiler und eignet sich besser zum Tiefziehen. Während der Herstellung wurde das Polypropylen mit einer gewissen Menge an Additiven versetzt. Eines der Additive ist Erucasäureamid. Es soll in einer Konzentration von 500 –1000 mg/kg vorliegen.

Der Polypropylenfilm ist identisch mit dem in den Leichtmetallbehältern verwendeten Polypropylenfilm.

Folgende Untersuchungen wurden an dem Polypropylen-Film durchgeführt:

- Bestimmung des Gesamtmigrats und des Anteils <1000 Da am Gesamtmigrat
- Identifizierung lipophiler Additive
- Überprüfung des Gehalts an Erucasäureamid (EA)
- Untersuchung zur Toxikologie

5.2.1 Gesamtmigrat und Anteil <1000 Da

Die Bestimmung des Gesamtmigrats in 95% Ethanol ergab mittels AM 1 (vgl. 10.3) einen Gehalt von 0,77 mg/dm² (n=2). Zur Bestimmung des Anteils <1000 Da wurde das Gesamtmigrat in Dioxan umgelöst und mittels AM 2 (vgl. 10.3) gegen einen Polystyrolstandard vermessen. Nahezu das gesamte Migrat hat ein Molekulargewicht von <1000 Da und liegt somit im toxikologisch relevanten Bereich.

5.2.2 Lipophile Additive und Erucasäureamid

Da Kunststoffe zur besseren Verarbeitung häufig mit lipophilen Additiven versetzt werden und diese Molekulargewichte <1000 Da haben, wird mittels AM 7 (vgl. 10.3) der Gehalt an lipophilen Additiven im Polypropylenfilm überprüft.

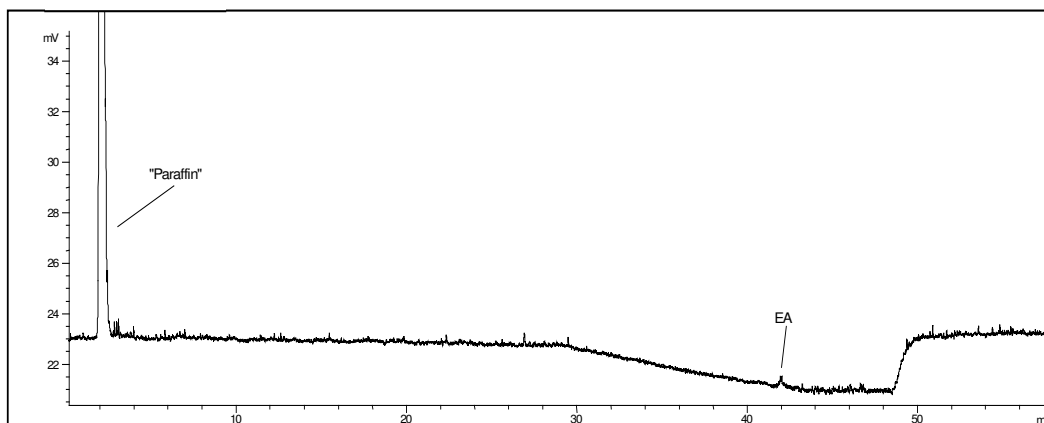


Abb. 39 Polypropylen-Film : NP-HPLC-ELSD-Chromatogramm des Ethanol-Migrats
Bedingungen: s. 10.3 AM 7

Wie in Abb. 39 zu erkennen, enthält der Polypropylen-Film auf den ersten Blick nur Paraffin. Die Zuordnung zum Paraffin ist jedoch nur bedingt möglich, da mittels der verwendeten Methode der Paraffin-Peak nahe dem Totzeit-Peak eluiert. Es wird vermutet, dass dieser Peak alle für die Trennung zu unpolaren Substanzen enthält.

Der Film soll laut Herstellerangaben 500-1000 mg/kg EA enthalten. Die Konzentration im Ethanol-Extrakt ist jedoch sehr gering. Dies liegt an der schlechten Löslichkeit von EA in dem verwendeten Lösungsmittel. Möglicherweise im Migrat enthaltenes EA wird beim klassischen Umlösen in Isooktan nicht mit gelöst und ist daher nur schlecht identifizierbar. Ein mittels Acetonitril gewonnener Extrakt weist ein sehr ähnliches Chromatogramm auf, wie das Ethanol-Migrat und ermöglicht somit keine Verbesserung der Analytik. Nach Extraktion mit Dichlormethan, Trocknung des Extraktes und Wiederaufnahme in Isooktan im Ultraschallbad in einem geschlossenen Gefäß wird eine bessere Löslichkeit erreicht. Auch im Dichlormethanextrakt ist der „Paraffin“-Peak der größte Peak. Das Verhältnis der Flächen der Peaks von „Paraffin“ und EA ist mehr als 10:1. Die ermittelte Menge an Erucasäureamid liegt mit 607 mg/kg (bzw. 0,17 mg/dm²) in dem vom Hersteller angegebenen Bereich.

Ausgehend davon, dass bei der Bestimmung des Gesamtmigrats das EA vollständig extrahiert wurde, ergibt sich eine Differenz von 0,60 mg/dm² zwischen dem Gesamtmigrat und dem insgesamt extrahierbaren EA. Dieser Anteil des Migrats ist den unpolaren Substanzen zuzuordnen.

5.2.3 Untersuchungen zur Toxikologie des Polypropylenfilms

Da bei der Untersuchung der LB (s. 6.4) toxische Effekte nachweisbar waren, wurde der zur Herstellung der LB verwendete Polypropylenfilm mittels Mutagenitätstest (s. 10.3 AM 11) und Zytotoxizitätstest (s. 10.3 AM 12) untersucht. Es waren bei den Extrakten aus dem Polypropylenfilm keine toxischen Effekte nachweisbar (s. 10.5.2 Tab. 68 und Tab. 69).

5.3 Lubricant

5.3.1 Untersuchung des Lubricants hinsichtlich seiner Zusammensetzung

Bei der Herstellung der untersuchten LB wurde ein Lubricant verwendet. Es sollte geprüft werden, ob ein seitens des Herstellers zur Verfügung gestelltes Lubricant, mit dem bei der Herstellung der LB verwendeten, identisch ist. Die Identifizierung der Einzelkomponenten erfolgte mittels AM 7 (vgl. 10.3).

Als Einzelkomponenten des Lubricants konnten TAG, 1,3-DAG, 1,2-DAG und MAG identifiziert werden.

Um herauszufinden, ob es sich um das selbe Lubricant handelt, welches in den Extrakten der LB ermittelt wurde, werden die Verhältnisse der Flächen der einzelnen Komponenten zueinander verglichen (s. 10.4.6 Tab. 70).

Die qualitative Zusammensetzung der Einzelkomponenten zwischen dem untersuchten Lubricant und dem für die Herstellung der LB-Deckel verwendeten Lubricant stimmen überein. Anhand der Verhältnisse der Einzelkomponenten zueinander ist jedoch zu erkennen, dass das untersuchte Lubricant etwas mehr 1,2-DAG und deutlich mehr TAG enthält. Dabei kann es sich jedoch auch um einen produktionsbedingten Unterschied zweier Chargen handeln. Eine abschließende Aussage, ob die beiden Lubricants identisch sind, kann somit nicht getroffen werden. Bezüglich des Lubricants zur Verwendung bei den Korpi der LB siehe 6.4.7.

5.3.2 Untersuchungen zur Toxikologie des Lubricants

Da bei der Untersuchung der LB (s. 6.4) zytotoxische Effekte nachweisbar waren, wurde das Lubricant mittels Mutagenitätstest (s. 10.3 AM 11) und Zytotoxizitätstest (s. 10.3 AM 12) untersucht. Es waren hiermit keine zytotoxischen Effekte nachweisbar (s. 10.5.3 Tab. 71 und Tab. 72)

5.4 Laminatuntersuchungen

Zur Bestimmung der Migration von Stoffen durch den Polypropylenfilm und der Veränderung der Rohstoffe bei der Aushärtung, werden vom Hersteller der Aluminium-LB kaschierte Metallfolien, sogenannte Laminare, zur Verfügung gestellt. In Absprache mit dem Hersteller werden die für die Produktion relevanten Laminare der Kleber KAS-1 und KAS-5 untersucht.

Für beide Klebstofflaminare wird die gleiche Aluminiumlegierung eingesetzt, jedoch mit unterschiedlicher Filmdicke. Bei den Laminaten von KAS-1 hat die Aluminiumfolie eine Dicke von 110 µm und bei KAS-5 von 90 µm. In beiden Fällen wurde das Aluminium gegläht und chromatiert, d.h., durch eine Behandlung mit Chromphosphorsäure wurde eine einheitliche Oberfläche geschaffen. Als Polypropylenfilm dient der in 5.2 genannte Film.

Durch Herstellung eines „Laminats“ ohne Polypropylenfilm kann eine Untersuchung der Isocyanate und eines Acetonitril-Extrakts ohne einen eventuell hemmenden Einfluss des

Polypropylenfilms, durchgeführt werden. Dies kann aus technischen Gründen nur für KAS-5 erfolgen.

Um eventuelle Unterschiede der Migrate vor und nach der Aushärtung zu erkennen, werden zum einen Lamine untersucht, die bei Raumtemperatur aushärten und zum anderen Lamine, die unter vorgeschriebenen Bedingungen im Trockenofen gehärtet wurden (Tab. 14).

Tab. 14 Lamine: Daten zur Herstellung

Bezeichnung	Kaschierkleber	Film	Härtung
Laminat A	KAS-5	mit	Raumtemperatur
Laminat B	KAS-5	ohne	Raumtemperatur
Laminat C	KAS-1	mit	Raumtemperatur
Laminat D	KAS-5	mit	5 Tage bei 45 °C
Laminat E	KAS-1	mit	3 Tage bei 45 °C

Folgende Untersuchungen wurden an den Laminen durchgeführt:

- Bestimmung des Gesamtmigrats (Ausnahme: Laminat B)
- Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der Migrate (Ausnahme: Laminat B)
- Screening auf niedermolekulare Polyester im Migrant
- Identifizierung von Isocyanaten und Bestimmung des Monomergehaltes.

5.4.1 Bestimmung des Gesamtmigrats der Lamine

Das Gesamtmigrant der Lamine wurde mittels der gravimetrischen Referenzmethode bestimmt. Bei allen Laminen beträgt der Gehalt unter 1 mg/dm^2 und ist somit deutlich unterhalb des in der Richtlinie 90/128/EWG für Kunststoffe mit Lebensmittelkontakt geforderten Grenzwertes von 10 mg/dm^2 . Die Migrate der gehärteten Lamine (D und E) liegen dabei nur geringfügig unter den Migraten der entsprechenden ungehärteten Lamine (A und C). Der Unterschied ist nicht signifikant, da die Differenz der als Doppelbestimmung durchgeführten Untersuchung, in dem geringen Konzentrationsbereich von unter 1 mg/dm^2 , mit einem Faktor von bis zu 3 erheblich ist (s. 10.4.6 Tab. 73) und eine Wägegenauigkeit von $0,05 \text{ mg}$ hinzukommt.

5.4.2 Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der Migrate der Lamine

Mittels der Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung vor und nach der Aushärtung sollen Rückschlüsse auf die Aushärtung ermöglicht werden. Die Bestimmung erfolgte mittels AM 2 (vgl. 10.3).

Alle Migrate weisen ungefähr die gleiche Peakform auf. Es handelt sich um einen breiten nicht näher definierbaren Peak aus dem zwei Peaks herausragen. Wie in Tab. 15 zu erkennen, sind die Retentionszeiten und damit die Molekulargewichte der Peaks sehr ähnlich. Die gehärteten Lamine weisen eine Schulter im höhermolekularen Bereich bei etwa 1650 Da auf. Bei allen Laminen liegt der größte Teil des Migrats unter 1000 Da .

Tab. 15 Lamine: Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung aus den Migraten

Laminat	Rt [min]	Molmasse [Da]	Zuordnung
A	15,0	2256	Beginn des Peaks
	17,5	653	
	18,6	393	größter Peak
	19,4	265	Ende des Peaks
C	15,2	2047	Beginn des Peaks
	17,5	684	größter Peak
	18,6	389	
	19,3	278	Ende des Peaks
D	15,2	2047	Beginn des Peaks
	15,7	1610	Schulter
	17,5	673	größter Peak
	18,6	395	
	19,3	278	Ende des Peaks
E	15,2	2097	Beginn des Peaks
	15,6	1671	Schulter
	17,5	668	
	18,6	395	größter Peak
	19,4	271	Ende des Peaks

Als Auswirkung der Härtung ist einerseits die Ausbildung der Peakschulter zu erkennen. Dies ist zurückzuführen auf die Vernetzung und damit Erhöhung des Molekulargewichts. Andererseits verschiebt sich das Größenverhältnis der beiden herausragenden Peaks. Dabei ist jedoch keine Aussage über die Gründe möglich. Es ist keine einheitliche Tendenz bei der Entwicklung des Molekulargewichts zu beobachten, da sich z.B. bei Kleber KAS-5 der 670 Da-Peak vergrößert, während sich im Gegensatz dazu bei Kleber KAS-1 der 395 Da-Peak vergrößert.

5.4.3 Screening auf niedermolekulare Polyester

Um das Verhalten der Polyesteranteile im Rahmen der Aushärtung zu untersuchen, wurden Acetonitrilextrakte der Lamine vor und nach Aushärtung, sowie im Falle von KAS-5 mit und ohne Polypropylenfilm, gewonnen und mittels des Polyesterscreenings (s. 10.3 AM 5) untersucht.

5.4.3.1 Lamine A, B und D zu KAS-5

Die Zusammensetzung des Extraktes von Laminat A (KAS-5, nicht ausgehärtet, mit Polypropylenfilm) und B (KAS-5, nicht ausgehärtet, ohne Polypropylenfilm) unterscheidet sich kaum, lediglich die Extraktkonzentration ist bei Laminat B erhöht. Im Vergleich mit dem Screening der Kleberkomponente KAS-5/6 A ist die Zusammensetzung im niedermolekularen Bereich ebenfalls identisch. Der höhermolekulare Bereich, der im Chromatogramm ab einer Retentionszeit von 30 Minuten erscheint, ist wegen seiner schlechten Löslichkeit nicht eindeutig auszuwerten. Die große Übereinstimmung ist auf die noch nicht erfolgte Aushärtung zurückzuführen und die Art der Extrakterstellung. Die Extrakte wurden mittels vollständigen

Eintauchens hergestellt, so dass die Extraktion an den Schnittkanten nicht durch die Folie beeinflusst wird.

Das gehärtete (Laminat D) und das ungehärtete Laminat von KAS-5 (Laminat A) weisen in der Zusammensetzung der Polyester im Gegensatz dazu Unterschiede auf. Die Härtung des Laminats hat sowohl zu einer Veränderung der Peakgrößenverhältnisse als auch zu einer Veränderung des Verhältnisses der Substanzen zueinander geführt (Abb. 40). Es ist jedoch nicht zu einer Anreicherung von cyclischen Polyestern gekommen.

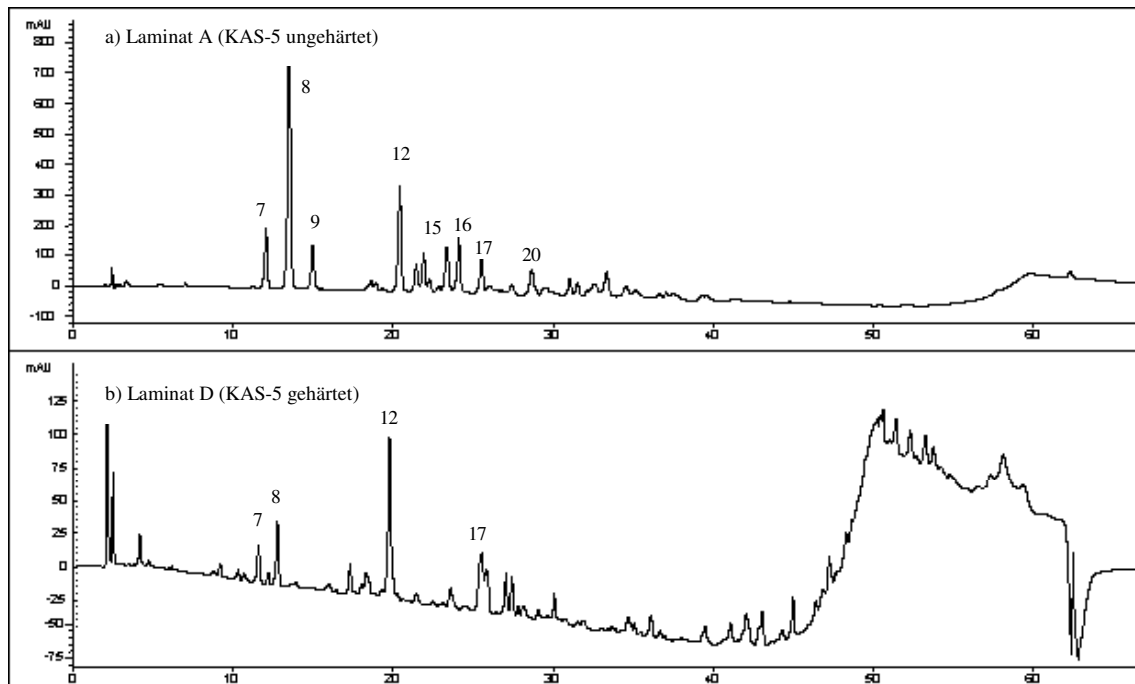


Abb. 40 KAS-5: Polyesterscreening der Extrakte von Laminat A (oben) und Laminat D (unten)
HPLC-DAD, $\lambda = 210$ nm, Auswertung s. Tab. 67 Bedingungen: s. 10.3 AM 5

5.4.3.2 Laminat C und E zu KAS-1

Die Chromatogramme der Extrakte der Laminat von KAS-1 stimmen in ihrer Zusammensetzung nicht mit denen der zugehörigen Polyesterkomponente überein.

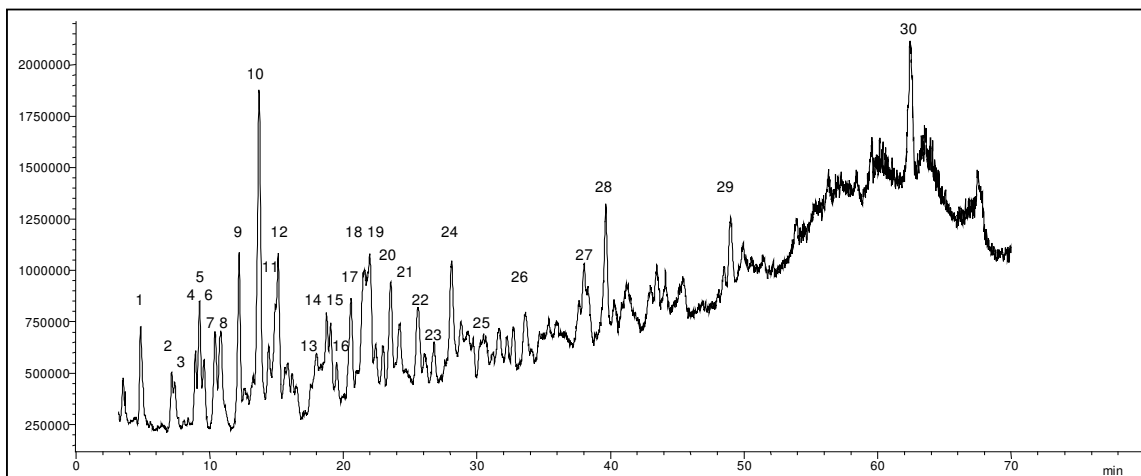


Abb. 41 Laminat C: HPLC-MSD-Chromatogramm des Acetonitrilextrakts
MSD-Scan 80-1000 m/z, Bedingungen: s. 10.3 AM 5

Tab. 16 Laminat C: Auswertung des Polyester screenings des Acetonitril-Extraktes

Peak	M (Substanz) [Da]	Zuordnung	Peak	M (Substanz) [Da]	Zuordnung
1	216	?	17	428*	cycl. DEG / EG / 2 PA
2/3	448**	PD-ADA-PD-ADA-PD	18	392**	cycl. 2 PD / ADA / PA
4	432*	cycl. 2 DEG / 2 ADA	19	688*	cycl. 3 DEG / 2 PA / ADA
5	388*	cycl. DEG / EG / 2 ADA	20	600*	cycl. DEG / 2 EG / 2 PA / ADA
6	344*	cycl. 2 EG / 2 ADA	21	708*	cycl. 3 DEG / 3 PA
7/8	468**	PD-ADA-PD-PA-PD	22	406**	EG-ADA-EG-ADA-EG
9	452*	cycl. 2 DEG / ADA / PA	23	464	?
10	408* + 472*	cycl. DEG / EG / ADA / PA + cycl. 2 DEG / ADA / PA oder 2 EG / DEG / 3 ADA	24	420 + 732	cycl. 2 BD / ADA / PA + DEG / 3 EG / 4 ADA
11	452	cycl. 2 DEG / ADA / PA	25	412**	cycl. 2 PD / 2 PA
12	364*	cycl. 2 EG / ADA / PA	26	598 + 658	3 PD / 2 PA / ADA + TMPD- ADA-TMPD-ADA-TMPD
13	654**	PD-ADA-PD-ADA-PD-PA-PD	27	804	4 PD / 3 PA / ADA
14	624*	cycl. 2 DEG / EG / PA / 2 ADA	28	686	?
15	580*	cycl. DEG / 2 EG / PA / ADA	29	446	EG-PA-EG-PA-EG
16	536*	cycl. 3 EG / 2 ADA / PA	30	390	?

* Übereinstimmung mit KAS-5/6 A (s. 10.5.1 Tab. 67)

** Übereinstimmung mit KAS-1 B (s. 10.5.1 Tab. 65);

Im Vergleich mit der Polyesterkomponente von KAS-1, treten beim ungehärteten Extrakt des Laminats zahlreiche Peaks auf, die nicht aus der Polyesterkomponente des Klebers stammen (Tab. 16). Die Zuordnung der Peaks zu den Polyesterkomponenten ähnelt denen des Klebers von KAS-5. Bei der Aushärtung des Klebers wird die Ähnlichkeit noch deutlicher. Bei der

Untersuchung der unbekanntenen Isocyanate (s. 5.1.5) der Kleberkomponente KAS-1A wurden Prepolymere auf Basis von EG und DEG identifiziert und nach Hydrolyse durch die gaschromatographische Untersuchung bestätigt. Die auf EG und DEG basierenden Substanzen aus den Prepolymeren müssen der Isocyanatkomponente KAS-1A entstammen. Auf Grund der zahlreichen Übereinstimmungen bei der Zuordnung der Signale mit der Polyesterkomponente von KAS-5/6A ist von einer ähnlichen Zusammensetzung wie bei dieser Komponente auszugehen. Im Verlauf der Aushärtung verändert sich das Polyesterspektrum deutlich (Abb. 42).

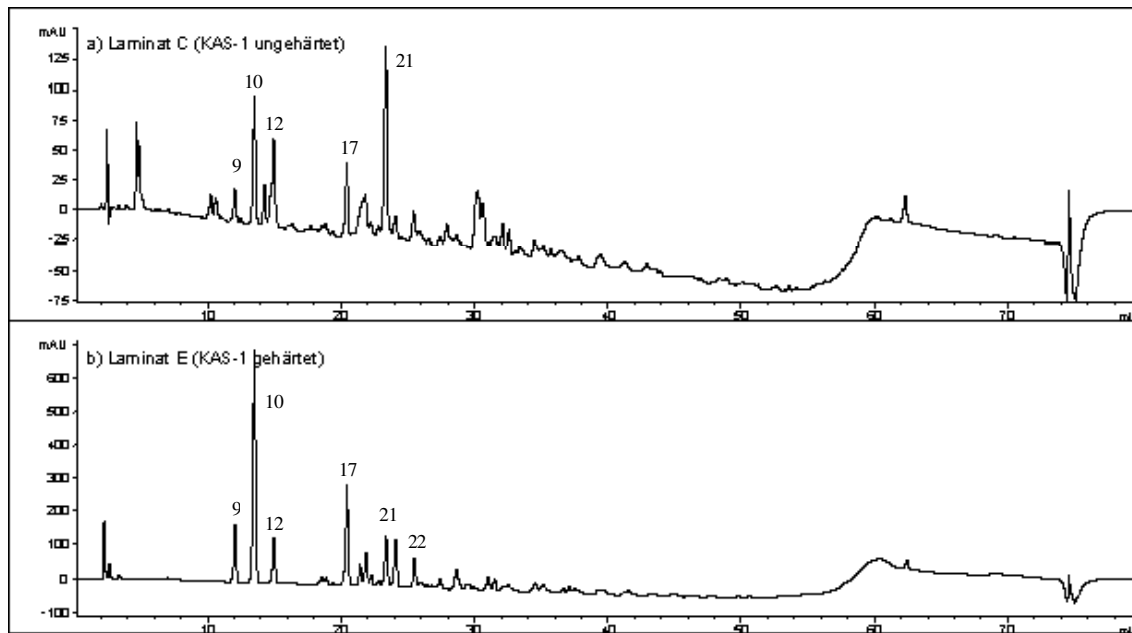


Abb. 42 KAS-1: Polyesterscreening der Extrakte von Laminat C (oben), Laminat E (unten)
HPLC-UVD, $\lambda = 210$ nm, Auswertung s. Tab. 16 Bedingungen: s. 10.3 AM 5

Die Veränderung des Extraktes im Verlauf der Härtung ist zu erklären, durch eine Reaktion kurzkettiger Polyester mit Isocyanatgruppen. Die kurzkettigen Polyester entstammen hauptsächlich der Komponente KAS-1B, so dass die Ähnlichkeit des Chromatogramms des Extraktes mit dem Chromatogramm der Komponente KAS-5/6A zunimmt. Es kommt zu einer Anreicherung niedermolekularer cyclischer Polyester im Kleber.

Bei den Signalen, die im ungehärteten Kleber von KAS-1 vorkommen aber weder KAS-1A noch KAS-1B zugeordnet werden können, könnte es sich um niedermolekulare Polyesterurethane handeln, bei denen die Isocyanatgruppen zu Aminogruppen abreagiert sind. Gestützt wird diese Annahme durch das Fehlen der entsprechenden Signale im ausgehärteten Kleber sowie Massen wie z.B. 658 Da welche sich einem Polyesterurethan zuordnen lässt.

5.4.4 Bestimmung von Isocyanaten mittels HPLC-FLD

Der Gehalt des IPDI-Monomers ist in allen untersuchten Laminaten unterhalb des kleinsten Standards von 2,2 $\mu\text{g/L}$, was einer Flächenkonzentration von 0,0085 $\mu\text{g/dm}^2$ entspricht.

Der Gesamtisocyanatgehalt kann nur näherungsweise bestimmt werden (Tab. 17), da die Bestimmung durch Löslichkeitsprobleme beeinflusst wird und somit davon auszugehen ist, dass der ermittelte Gesamtisocyanatgehalt höher ist.

Tab. 17 Lamine: Gesamtisocyanatgehalt

Laminat	A	B	C	D	E
Gesamtisocyanatgehalt [$\mu\text{g NCO}/\text{dm}^2$]	0,24	0,79	0,62	1,86	0,42

Zur Identifizierung einseitiger Reaktionsprodukte der Polyisocyanate wurde ein MSD-Scan durchgeführt. Bei den Massen handelt es sich um die selben Massen, die in den Polyesterkomponenten gefunden worden sind.

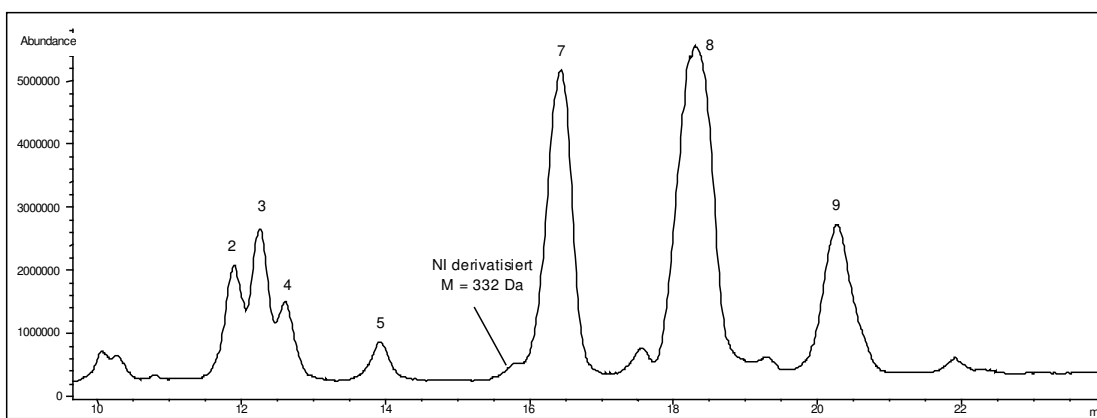


Abb. 43 Laminat A: MSD-Chromatogramm des PP-Extrakts
Ausschnitt, MSD: scan 80-800 m/z, Auswertung s. Tab. 67 Bedingungen: s. 10.3 AM 5

Abb. 43 zeigt einen Ausschnitt aus dem Massensignal des Extraktes von Laminat A. Der IS, der im FLD-Chromatogramm das größte Signal darstellt, ist im Massensignal nur als Schulter bei einer Retentionszeit von 15,7 min auf einem Peak, der von Polyesterbestandteilen stammt, zu erkennen. Daher ist davon auszugehen, dass die Identifikation anderer Isocyanate nicht möglich ist. Grund hierfür ist, dass im Extraktionsmittel Dichlormethan neben den derivatisierten Isocyanaten auch die Polyesteranteile der Kleber löslich sind. Somit lassen sich die FLD-Chromatogramme nur qualitativ auswerten.

In den Laminaten des Klebers KAS-1 lassen sich hauptsächlich hochmolekulare Isocyanate mit Retentionszeiten von über 40 Minuten nachweisen. Eine Identifizierung dieser Substanzen ist aus den o.g. Gründen nicht möglich. Bei der Härtung werden die Peaks etwas kleiner.

Bei den Laminaten des Klebers KAS-5 lassen sich im ungehärteten Zustand Derivate des IPDI-Isocyanurats im Extrakt identifizieren. Entgegen der Annahme, diese könnten einer noch nicht vollständig abgelaufenen Aushärtungsreaktion entstammen, weist der Extrakt des gehärteten Laminats einen noch deutlicheren Isocyanurat-Peak auf. Das Isocyanurat wird anscheinend nicht vollständig in der Vernetzung verbraucht. Um eine eventuelle Freisetzung des Trimers

durch eine reversible Vernetzungsreaktion zu beurteilen erfolgt eine kinetische Untersuchung (s. 5.5). Insgesamt ist der Isocyanatgehalt jedoch niedriger als erwartet.

5.5 Kinetische Untersuchung der Kleberkomponenten

Mittels kinetischer Untersuchungen sollten Daten zur Vernetzungsreaktion der Kleber von der Herstellung bis zur Aushärtung erhalten werden. Hierzu wurden frisch hergestellte Lamine Tab. 18 der Kaschierkleber KAS-1 und KAS-5 von 24 Stunden nach der Herstellung bis zur endgültigen Aushärtung nach 28 Tagen untersucht. Zur Bestimmung des Endpunktes der Aushärtung wurden Lamine der gleichen Chargen nach einer Härtung von 3 Tagen bei 50 °C und 7 Tagen bei Raumtemperatur untersucht.

Tab. 18 Lamine: Herstellerangaben für die kinetische Untersuchung

	KAS-1	KAS-5
Kleberauflage	5,0 g / m ²	5,8 g / m ²
Herstellungstemperatur	50 °C	50 °C
Trocknungstemperatur	143-149 °C	143-149 °C

Untersuchungen der Lamine im Rahmen der Kinetik:

- Bestimmung des Gesamtmigrats
- Verhalten der Isocyanate

5.5.1 Bestimmung des Gesamtmigrats im Verlauf der Kinetik

Die Bestimmung des Gesamtmigrats erfolgt mittels SEC-ELSD (s. 10.3 AM 2).

Das Gesamtmigrat ist mit unter 0,8 mg/dm² bei KAS-1 und 1,0 mg/dm² bei KAS-5 weit unter dem in der Bedarfsgegenständeverordnung (BGV, 1997) festgelegten Grenzwert für Bedarfsgegenstände aus Kunststoff von 10 mg/dm². Der größte Anteil des Gesamtmigrats liegt mit durchschnittlich 91,8% bei KAS-1 (s. 10.4.6 Tab. 74) und mit durchschnittlich 87,4% bei KAS-5 (s. 10.4.6 Tab. 75) im toxikologisch relevanten Bereich <1000 Da. Das Gesamtmigrat nimmt bei KAS-1 im Verlauf der Aushärtung auf ca. 79,4% leicht ab, während bei KAS-5, nach einem zwischenzeitlichen Anstieg in den ersten 4 Tagen, einem sich anschließendem Abfall bis zum 18. Tag es erneut zu einem Anstieg kommt und somit keine einheitliche Tendenz zu erkennen ist.

5.5.2 Verhalten der Isocyanate im Verlauf der Kinetik

Die Bestimmung der Isocyanate erfolgt wie in AM 10 (vgl. 10.3) beschrieben.

Abb. 44 zeigt Chromatogramme der Isocyanatbestimmung von KAS-1 und Abb. 46 von KAS-5 zu Beginn und am Ende der kinetischen Untersuchung.

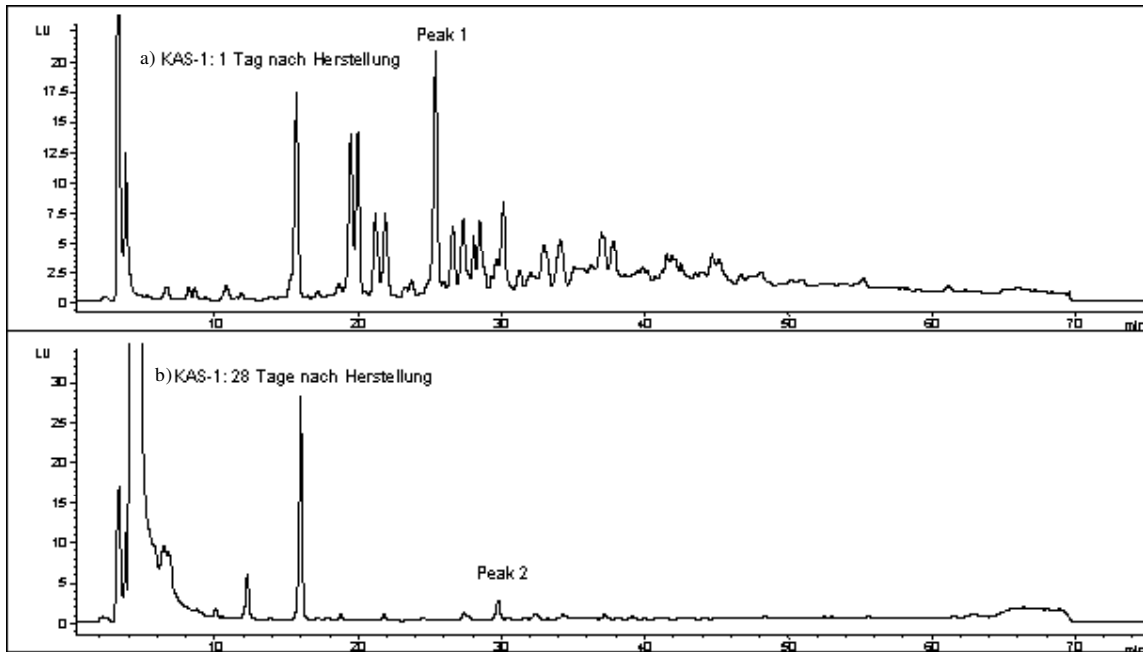


Abb. 44 KAS-1: HPLC-FLD-Chromatogramme der kinetischen Isocyanatuntersuchung
a) 1 Tag nach der Herstellung, b) 28 Tage nach Herstellung, Bedingungen: s. 10.3 AM 10

Am ersten Tag nach der Herstellung des Laminats mit KAS-1 ist eine Vielzahl von Produkten mit mindestens einer freien Isocyanatgruppe vorhanden (Abb. 44a). Eine Identifikation dieser Substanzen ist wegen der Mitextraktion der Polyester nicht möglich, da diese anteilmäßig überwiegen. Das Signal des IPDI-Monomers bei 17,4 Minuten ist bereits kurz nach der Herstellung zu klein um es auswerten zu können. Nach 28 Tagen sind kaum noch Peaks im Chromatogramm zu erkennen. Die freien Isocyanatgruppen sind durch Vernetzung und durch Reaktion mit Luftfeuchtigkeit abreagiert, können somit nicht mehr derivatisiert und folglich nicht mehr detektiert werden.

Da eine Auswertung des Gesamtisocyanatgehalts zu ungenau ist, werden nur zwei signifikante Signale ausgewertet, die alle Qualifier aufweisen.

Peak 1 weist eine Retentionszeit von 25,4 bis 25,5 Minuten und Peak 2 von 29,6 bis 29,9 Minuten auf. Zur Auswertung wird die Fläche der Peaks gegen die Zeit aufgetragen, da die Fluoreszenz proportional zur Konzentration der freien Isocyanatgruppen ist.

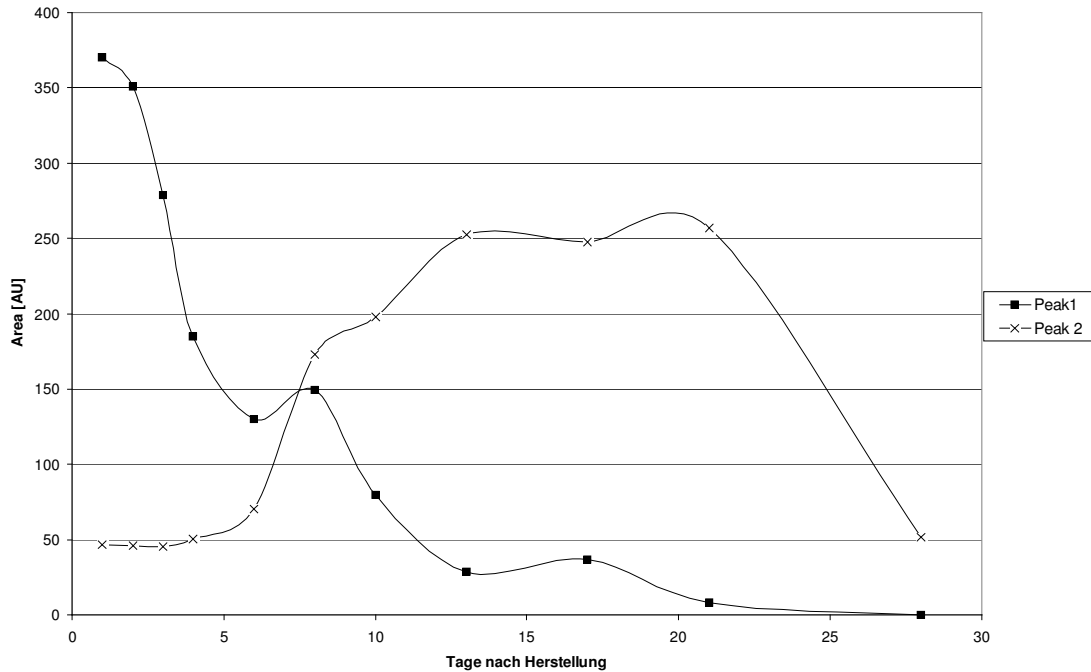


Abb. 45 KAS-1: Grafik der kinetischen Isocyanatuntersuchung
Daten s. 10.4.6 Tab. 74

Peak 1 zeigt tendenziell die bei der Aushärtung erwartete Abnahme an Fluoreszenz. An eine schnelle Abnahme in den ersten Tagen schließt sich eine langsamere Abnahme in den Folgetagen an, bis am 28. Tag nach der Herstellung des Laminats der Peak nicht mehr detektierbar ist. Die Schwankungen der Werte können auf Messungenauigkeiten und die bereits erwähnten Lösungsprobleme zurückgeführt werden.

Peak 2 zeigt eine unerwartete Entwicklung. Ab dem fünften Tag nach der Herstellung nimmt die Peakfläche und damit die Konzentration zu. Sie erreicht ihr Maximum etwa um den 20. Tag und nimmt dann wieder auf das Anfangsniveau ab. Da die Konzentration zunimmt, scheint anfangs gebundenes Isocyanat wieder freigesetzt zu werden. Da eine spätere erneute Vernetzung unwahrscheinlich ist, wird die Abnahme nach dem 20. Tag auf eine Reaktion mit Luftfeuchtigkeit zurückgeführt.

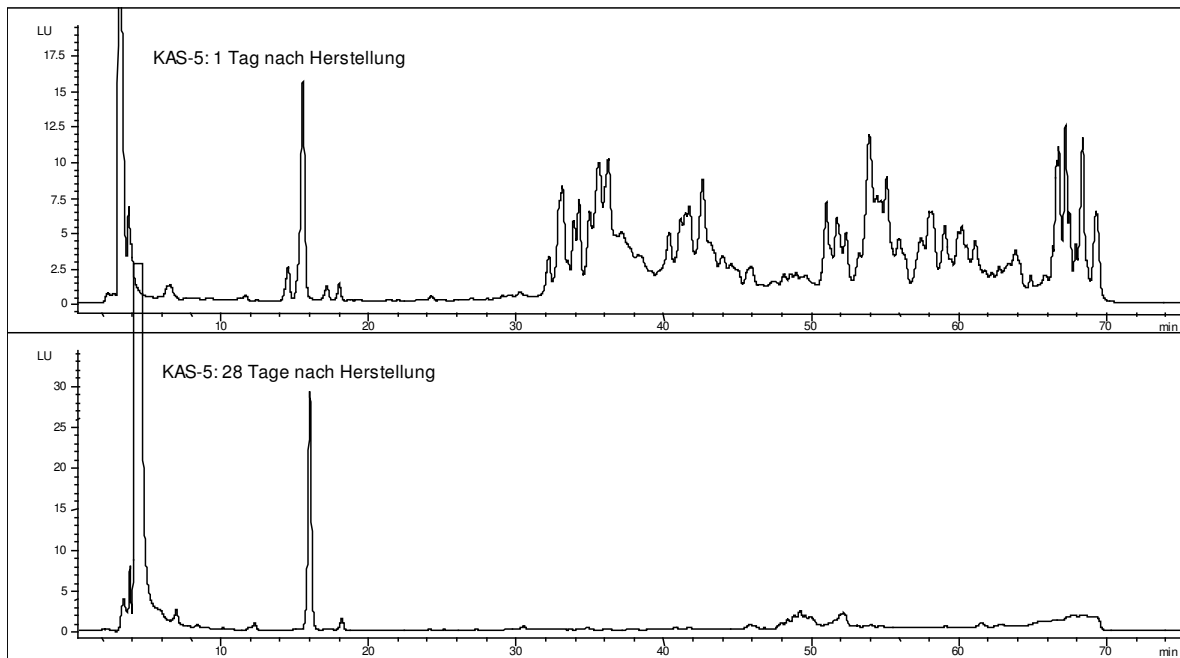


Abb. 46 KAS-5: HPLC-FLD-Chromatogramme der kinetischen Isocyanatuntersuchung
a) 1 Tag nach der Herstellung, b) 28 Tage nach Herstellung, Bedingungen: s. 10.3 AM 10

Am ersten Tag nach der Herstellung des Laminats mit KAS-5 sind zahlreiche Peaks besonders im hochmolekularen Bereich ab einer Retentionszeit von 30 Minuten vorhanden, die auf eine Vielzahl von Produkten mit mindestens einer freien Isocyanatgruppe hindeuten. Wie bei KAS-1 ist eine Identifikation dieser Substanzen wegen der Mitextraktion der Polyester nicht möglich. Auch bei KAS-5 ist der Monomerpeak des IPDI bei 17,4 Minuten bereits kurz nach der Herstellung zu klein zur Auswertung.

Im Laufe der Aushärtung nehmen die Peakflächen der unbekannt Substanzen gleichmäßig ab. Der größte Teil der unbekannt isocyanatgruppenhaltigen Substanzen ist zu diesem Zeitpunkt abreagiert. Bei einer Retentionszeit von 47-56 Minuten ist der charakteristische Isocyanurat-Peak des eingesetzten Prepolymers (Abb. 46b) deutlich zu erkennen. Für Kleber KAS-5 wird die Peakfläche des Isocyanurats ausgewertet.

Zu Beginn der Untersuchung ist das Isocyanurat nicht als einzelnes Signal zu erkennen, so dass der Bereich in den Chromatogrammen zwischen 47,1 Minuten und 56,0 Minuten integriert wird. Im Extrakt mit DEA ist zu erkennen, dass einige fluoreszierende Substanzen zeitgleich, wie das Isocyanurat eluieren. Es kann sich dabei jedoch nicht um derivatisierte Isocyanatgruppen handeln, da deren DEA-Derivate nicht fluoreszieren. Um eine Verfälschung durch diese Substanzen zu vermeiden, werden die DEA-Extrakte im gleichen Zeitraum integriert und die erhaltene Fläche als Blindwert von der Fläche des PP-Extraktes abgezogen. Zur Auswertung wird die Fläche der Peaks gegen die Zeit aufgetragen, da die Fluoreszenz proportional zur Konzentration der freien Isocyanatgruppen ist.

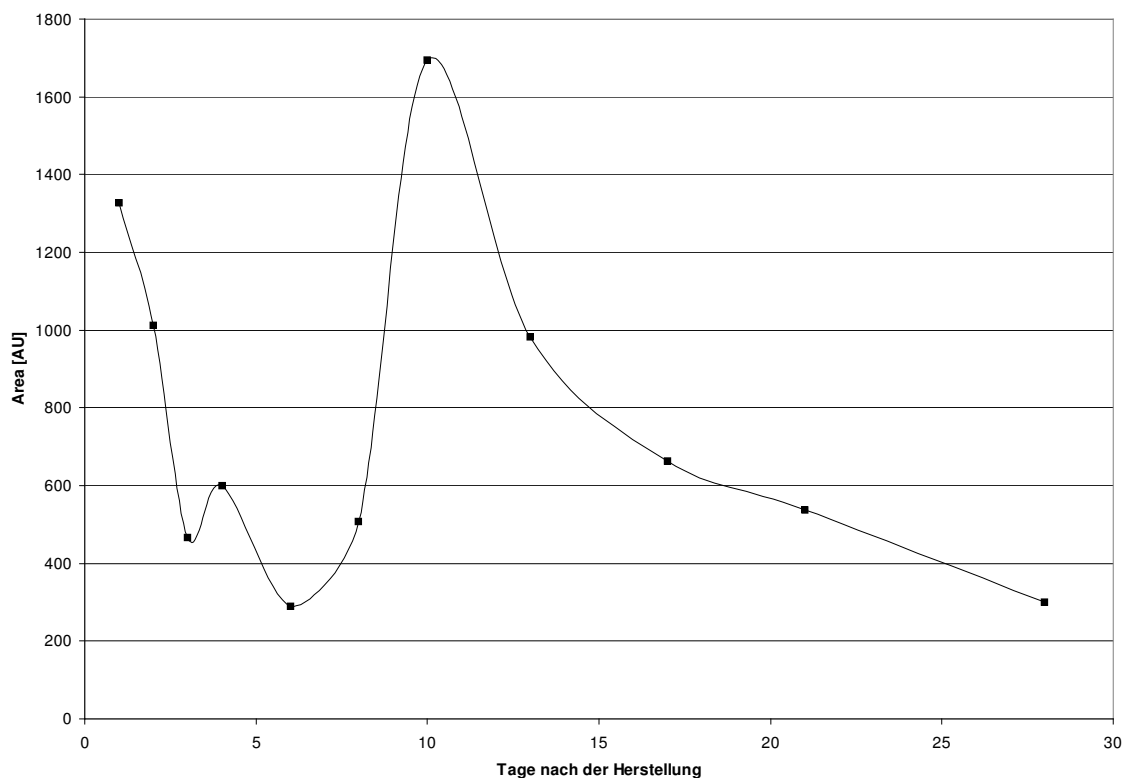


Abb. 47 KAS-5: Grafik der kinetischen Isocyanatuntersuchung
Daten s. 10.4.6 Tab. 75

Bis zum sechsten Tag nach der Herstellung zeigt die Fluoreszenz im integrierten Bereich die erwartete Abnahme. Die charakteristische Peakform des Isocyanurats ist bis dahin noch nicht zu erkennen. Daher handelt es sich bei den integrierten Peaks wahrscheinlich um koeluiierende Reaktionsprodukte. Ab dem achten Tag ist die Peak-Form deutlich zu erkennen. Wie bei Kleber KAS-1 nimmt die Peakfläche unerwartet zu, was auf eine Freisetzung des Isocyanurats mit seinen freien Isocyanatgruppen hindeutet. Die ab dem 10. Tag erfolgende Abnahme des Isocyanatgehaltes ist wahrscheinlich auf die Reaktion mit Luftfeuchtigkeit zurückzuführen (s. Abb. 47).

Bei dem Laminat, das 3 Tage bei 50 °C und anschließend 7 Tage bei Raumtemperatur ausgehärtet wurde, ist der Isocyanurat-Peak fast dreimal so groß wie der höchste im Rahmen der kinetischen Untersuchung ermittelte Wert. Für den 10. Tag nach der Herstellung ergibt sich ein Isocyanuratgehalt von 3,8 µg pro dm². Am 28. Tag hat der Gehalt auf 0,6 µg/dm² abgenommen. Im gehärteten Laminat liegt der Isocyanuratgehalt bei 9,3 µg/dm². Umgerechnet auf das Gewicht des Laminats bedeutet das einen Gehalt von 3,30 mg/kg Laminat. Bei einem Isocyanatgehalt des Isocyanurats von 18,9 % entspricht das einem Isocyanatgehalt von 0,63 mg/kg Laminat.

Da das gehärtete Laminat nach Herstellerangaben den Endpunkt der Aushärtung erreicht haben soll, muss davon ausgegangen werden, dass der Isocyanatgehalt im gehärteten Laminat im Verlauf der Aushärtung deutlich höher gelegen hat.

5.6 Isocyanathaltige Verbundfolien

Verbundfolien zur Verpackung von Lebensmitteln bestehen meist aus zwei oder mehr Einzel-
folien, die entweder allein durch Erhitzen oder aber durch isocyanathaltige Reaktivkleber
zusammengefügt werden. Für die Untersuchungen wurde eine Folie aus den Einzelfolien
Polyethylen (PE) und Polyamid, die über einem 2,4'- und 4,4'-MDI-haltigen Klebstoff kaschiert
war und eine zweite aus Polyethylenterephthalat (PET) und PE unter Verwendung eines IPDI-
haltigen Klebers hergestellt. Bei den Folien sollte der Isocyanatgehalt bestimmt werden, sowie
dessen Veränderung im Verlauf der Lagerung beobachtet werden.

Die Durchführung erfolgte mittels AM 10 sowohl unter Verwendung der HPLC-FLD, als auch
der HPLC-MSD.

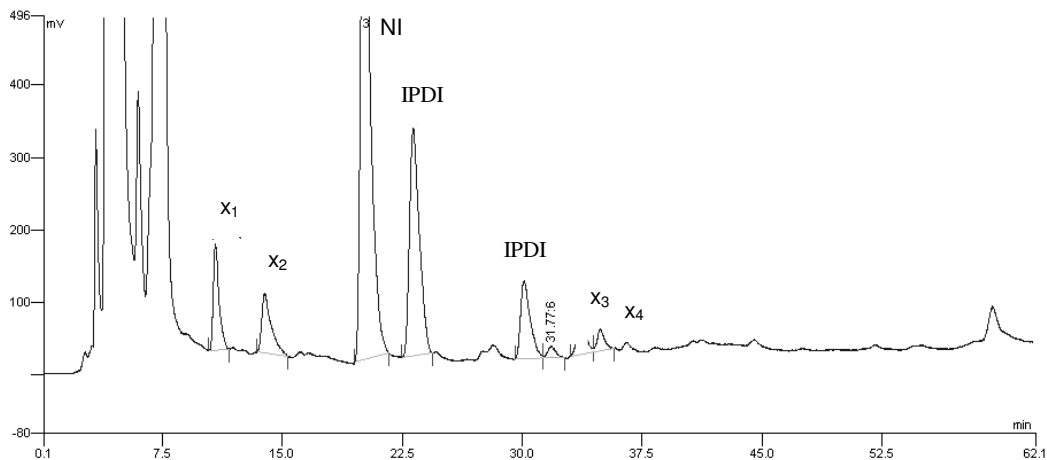


Abb. 48 PET/PE-Folie nach Derivatisierung mit PP
HPLC-FLD, x_1 - x_4 = matrixbedingte Peaks, Bedingungen s. 4.5 Tab. 4

Abb. 48 zeigt beispielhaft das FLD-Chromatogramm der PET/PE-Folie. Die matrixbedingten
Peaks wurden mittels eines Blindextraktes, der unter Ausschluss der Derivatisierung gewonnen
wurde, zugeordnet.

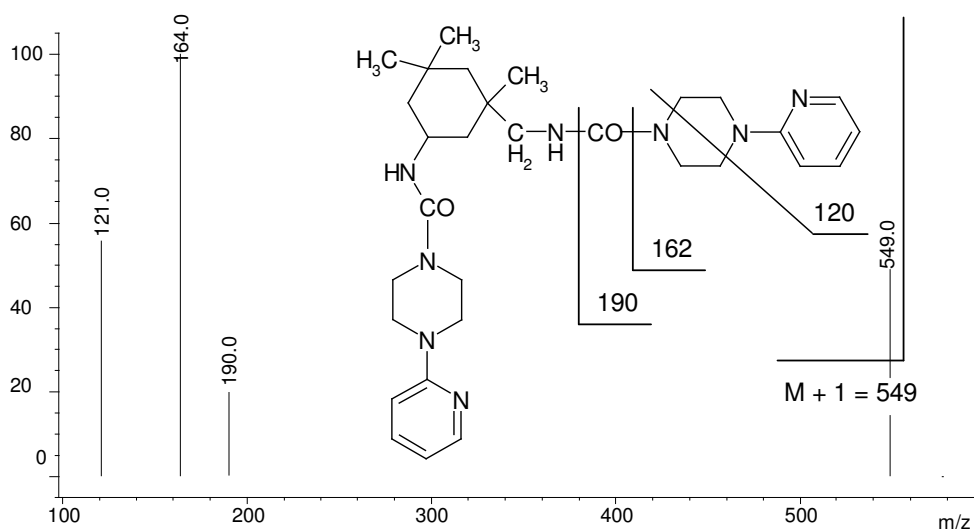


Abb. 49 PET/PE-Verbundfolie: MS-SIM-Spektrum des Signals bei einer Retentionszeit von 23,5 min

Der IPDI-Gehalt der PET/PE-Verbundfolie verringert sich kontinuierlich, bis er nach ca. 7 Wochen auf nahezu 0 abgenommen hat (Tab. 19).

Tab. 19 IPDI-Gehalt der PET/PE-Verbundfolie im Rahmen der Aushärtung

Tage nach Herstellung	7	17	28	49
IPDI-Gehalt	1,100 mg/kg	0,083 mg/kg	0,007 mg/kg	0,001 mg/kg
Gehalt berechnet als NCO	0,42 mg/kg	0,032 mg/kg	0,003 mg/kg	<0,001 mg/kg

Die Folie wurde erst 1 Woche nach Herstellung zur Analytik übergeben. Zu diesem Zeitpunkt war der Gehalt an IPDI berechnet als NCO mit 0,42 mg/kg unterhalb des Grenzwertes von 1 mg/kg Verpackungsmaterial. Da der IPDI-Gehalt jedoch innerhalb von nur zehn Tagen bei Lagerung an der Luft und bei Raumtemperatur von 1,1 mg/kg auf 0,083 mg/kg sank, kann nicht ausgeschlossen werden, dass direkt nach der Produktion der Folie der Grenzwert überschritten war.

Die MDI-haltige PE/Polyamid-Verbundfolie stand erst einige Wochen nach der Herstellung zur Analytik zur Verfügung. Zu diesem Zeitpunkt war MDI zu gering konzentriert, um es noch quantifizieren zu können.

6 Die analytische Untersuchung von Lebensmittelverpackungen

Bisher sind in der Literatur keine umfassenden Untersuchungen an handelsüblichen Lebensmittelverpackungen beschrieben, die sowohl die quantitative Bestimmung der Hauptbestandteile, als auch die Bestimmung einzelner potentiell toxikologisch relevanter Substanzgruppen sowie ein toxikologisches Screening beinhalten.

Um einen Beitrag zur Schließung dieser Lücke zu leisten wurden ausgewählte leere Verpackungen für Lebensmittel (Tab. 20) umfangreichen Untersuchungen, in Anlehnung an das von SIMAT und SCHÄFER (2004) vorgeschlagene Schema untersucht.

Tab. 20 Untersuchungsmaterialien

	Nenngewicht [g]	Nennvolumen [mL]
3-teilige Weißblechdose	825 g	850 mL
2-teilige Aluminiumdose mit Ringpullverschluss	100 g	100 mL
2-teilige Aluminiumdose mit Ringpullverschluss	170 g	265 mL
2-teilige Aluminiumleichtmetallbehälter mit Easy-Open-Verschluss	50 g	54 mL
	150 g	164 mL
	300 g	365 mL

Untersuchungsmethoden:

Soweit jeweils sinnvoll, wurden die o.a. Verpackungen mittels der in Tab. 21 angeführten Methoden untersucht.

Tab. 21 Untersuchungsumfang und Untersuchungsmethoden

	Verfahren	Standardmethode
Identifizierung der Beschichtung	FTIR-ATR	
Gesamtmigrat	Gravimetrie	AM 1
Gesamtmigrat und Anteil <1000 Da	SEC-ELSD	AM 2
Carbonsäuren	RP-HPLC-MSD/DAD	AM 3
Polyole	GC-FID	AM 4
Polyesterkomponenten	RP-HPLC-MSD/DAD	AM 5
Spezifische Migration von BPA- und BADGE-Derivaten	RP-HPLC-FLD/MSD	AM 6
Lipophile Schmierstoffe	NP-HPLC-UVD/ELSD	AM 7
PAA	UVD	AM 8
Gesamtisocyanatgehalt	Titrimetrie	AM 9
Isocyanate	RP-HPLC-FLD/MSD	AM 10
Mutagenität	Ames-Test	AM 11
Zytotoxizität	Neutralrottest	AM 12
Zytotoxizität	Plating-Efficiency	AM 13

6.1 3-teilige Weißblechdose (CN 825)

6.1.1 CN 825: Identifizierung der Beschichtung und Gesamtmigrat

Die Beschichtung der 3-teiligen Weißblechdose (CN 825) wurde mittels FTIR-ATR als auf BPA basierendes Epoxycoating (Abb. 50) identifiziert (s. 10.6.1). Nicht zuordnen lässt sich ein intensives Signal bei 1725 cm^{-1} . Die Siegelnaht basiert auf einem Polyester mit aromatischen Strukturelementen (Abb. 51) (s. 10.6.1).

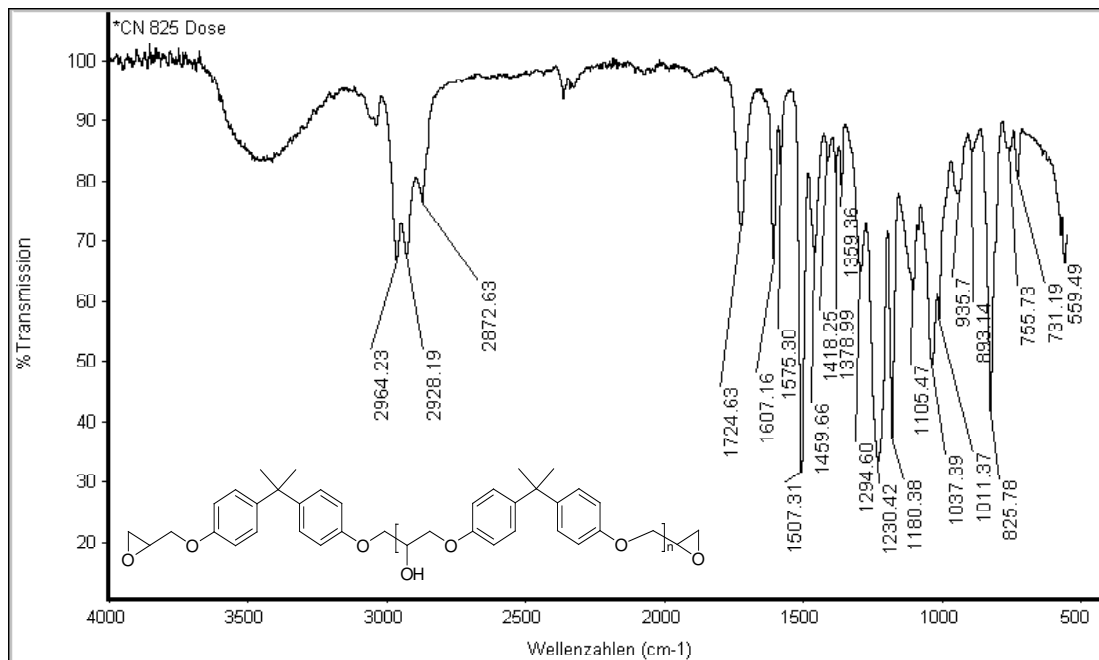


Abb. 50 CN 825 Korpus: FTIR-Spektrum mit Ausschnitt aus einem BPA-basierenden Epoxidharz

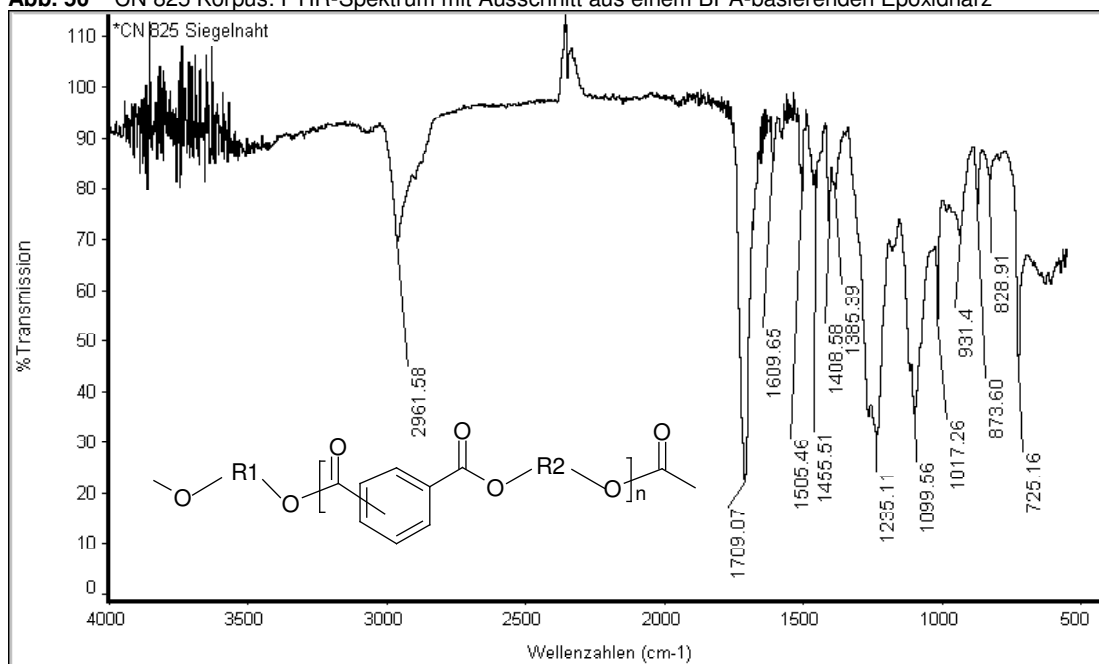


Abb. 51 CN 825 Siegelnaht: FTIR-Spektrum mit Ausschnitt aus einem Polyesterharz

Korpus und Deckel der CN 825 weisen ein unterschiedlich hohes Gesamtmigrat sowohl bei der gravimetrischen Methode (Korpus 11,07 mg/dm², Deckel 6,07 mg/dm²) als auch bei der Bestimmung mittels SEC-ELSD auf (Korpus 8,4 mg/dm², Deckel 2,7 mg/dm²). Der Anteil an Substanzen <1000 Da ist beim Deckel (1,12 mg/dm²) ebenfalls geringer als beim Korpus (2,84 mg/dm²). Der unterschiedlich hohe Gehalt bei Deckel und Korpus lässt sich auf eine unterschiedlich hohe Schichtdicke des Epoxylackes zurückführen. Die Alternative eines unterschiedlichen Gehaltes an Schmierstoffen scheidet aus, da der Anteil an Schmierstoffen (s. 6.1.4) vernachlässigbar gering ist. Das Gesamtmigrat beim Korpus liegt über dem zulässigen Grenzwert von 10 mg/dm². Es handelt sich hierbei um eine Bestimmung in Acetonitril, welches kein zulässiges Simulanz- oder Ersatzlösemittel ist (s. 2.2). Acetonitril wurde verwendet, um möglichst viele Substanzen aus der Beschichtung zu lösen. Bei Verwendung von 95% Ethanol als Ersatzlösemittel, wird ein Gesamtmigrat von 7,45 mg/dm² erhalten. Auf Grund der Differenz beim Gesamtmigrat, bei Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmitteln erfolgte ein Vergleich anhand des Korpus der CN 825 (Tab. 22).

Tab. 22 CN 825: Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel

Lösungsmittel	Gesamtmigrat	Anzahl Bestimmungen	Standardabweichung
95% Ethanol	7,45 mg/dm ²	n = 14	1,01 mg/dm ²
Isooktan	1,55 mg/dm ²	n = 2	0,49 mg/dm ²
Acetonitril	11,07 mg/dm ²	n = 2	0,17 mg/dm ²

6.1.2 CN 825: Polare Anteile

Freie Carbonsäuren liefern mit 0,20 mg/dm² nur einen relativ geringen Anteil am Gesamtmigrat. Als Hauptkomponenten konnten TMA und BA und als Nebenkomponten ACA, ADA, TPA und IPA identifiziert werden. TMA wird bei Epoxidharzen als Anhydridvernetzer und BA als Kettenstopper eingesetzt. Sie stammen aus dem Epoxycoating. ACA wird als Monomer in Acrylharzen eingesetzt. Die übrigen Carbonsäuren stammen aus dem Polyesteranteil der Siegelnaht (s. 10.4.6 Tab. 76).

6.1.3 CN 825: Mittelpolare Anteile

Nach separater Aufarbeitung der Polyesterbeschichtung der Siegelnaht konnten die unter 6.1.2 angeführten Säuren nachgewiesen werden, sowie als Polyolkomponten auf die Dirole BD, EG und Hexylenglykol (HG) gefolgert werden.

Als Bestandteile des Epoxycoatings konnten vor allem BADGE-Produkte reiner Harzherkunft, wie das mit 0,38 mg/dm² mengenmäßig dominierende cyclo-Di-BADGE, Verbindungen mit einem oder ohne Oxiranring, sowie entsprechende Mischaddukte z. B. Solvensaddukte mit Buthoxyethanol oder Ethoxyethanol und Kettenstopperaddukte mit tertiär-Butylphenol identifiziert werden. Mit BADGE (n=1) war ein Derivat mit zwei Oxiranringen nachweisbar. Insgesamt

konnten 68% (Korpus) bzw. 56% (Deckel) der fluoreszierenden Substanzen mit einem Molekulargewicht von <1000 Da, deren Response >5 ppb BADGE-Äquivalente entspricht, identifiziert werden. BADGE selbst, sowie die entsprechenden Hydrochlorierungs- und Hydrolyseprodukte waren nicht nachweisbar (s. 10.6.1 0).

6.1.4 CN 825: Unpolare Anteile

Bei den lipophilen Schmierstoffen war nur Paraffin in einer geringen Menge (Deckel: 0,03 mg/dm²) nachweisbar.

6.1.5 CN 825: Toxikologisch relevante Verbindungen

Verbindungen mit bekanntem toxikologischem Potential (PAA, Isocyanate) waren nicht nachweisbar. Ausführungen zu BADGE s. 6.1.3.

6.1.6 CN 825: Untersuchung zur Toxikologie der Migrate

Es waren weder mit AM 11 (vgl. 10.3) mutagene Effekte noch mit AM 12 (vgl. 10.3) zytotoxische Effekte nachweisbar (s. 10.6.1 Tab. 79 und Tab. 80).

6.1.7 CN 825: Zusammenfassung

Bei der CN 825 konnten beim Korpus 89% (Abb. 52) und beim Deckel 92% (Abb. 53) der migrierenden Substanzen klassifiziert werden. Den größten Anteil nehmen dabei die Verbindungen mit einem Molekulargewicht >1000 Da ein. Toxische Effekte der Migrate waren nicht nachweisbar.

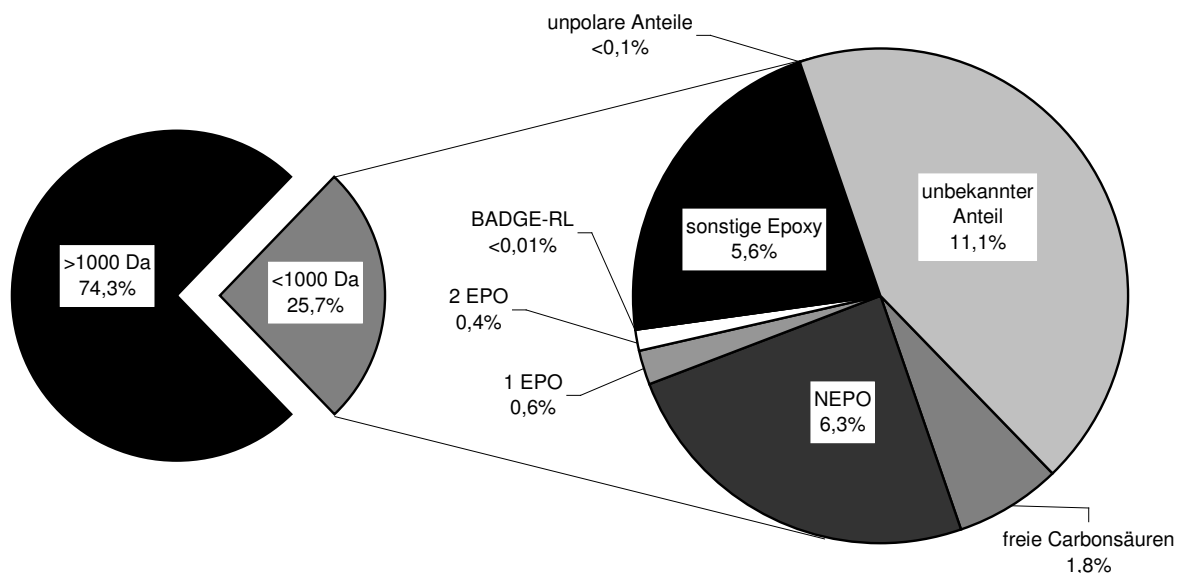


Abb. 52 CN 825 Korpus: Migrantzusammensetzung, Gesamtmigrat: 11,1 mg/dm²

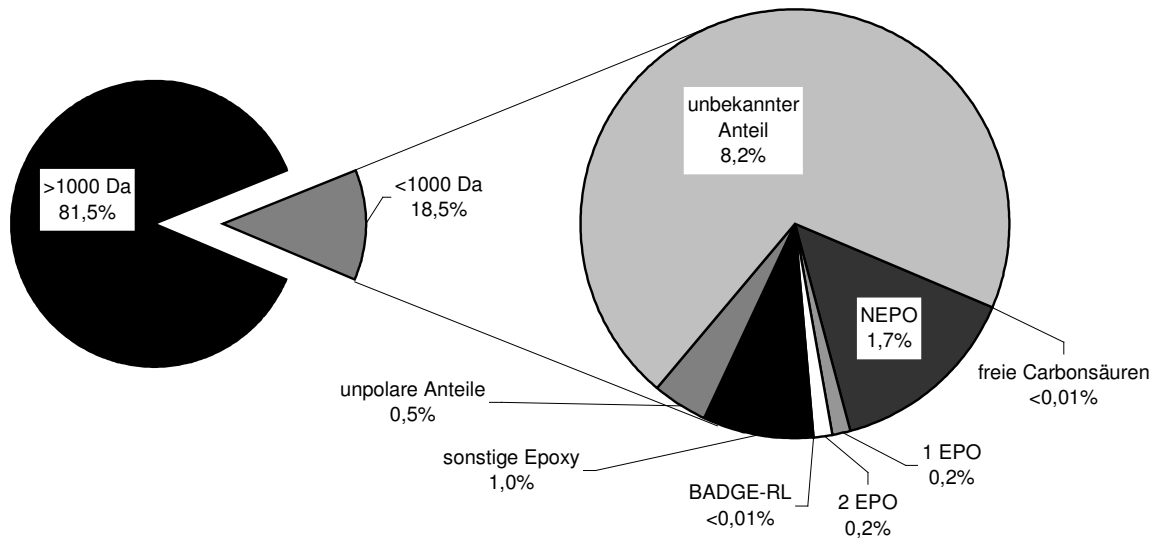


Abb. 53 CN 825 Deckel: Migratzusammensetzung, Gesamtmigrat: 6,1 mg/dm²

6.2 2-teilige Aluminiumdose mit Ringpullverschluss (RP 100)

6.2.1 RP 100: Identifizierung der Beschichtung und Gesamtmigrat

Die Beschichtung der zweiteiligen Aluminiumdose mit Ringpullverschluss (RP 100) wurde mittels FTIR-ATR als auf BPA basierendes Epoxycoating identifiziert (s. 10.6.2).

Beim Gesamtmigrat wurde mittels Gravimetrie mit 3,0 mg/dm² ein höherer Gehalt als mittels SEC-ELSD (2,3 mg/dm²) ermittelt. Der Anteil <1000 Da ist mit 0,68 mg/dm² verhältnismäßig gering.

6.2.2 RP 100: Polare Anteile:

Carbonsäuren waren nicht nachweisbar.

6.2.3 RP 100: Mittelpolare Anteile:

Polyesteranteile waren nicht nachweisbar.

Es konnten 0,41 mg/dm² an Epoxybasierenden Bestandteilen ermittelt werden. Hauptsächlich handelt es sich um Derivate mit einem oder ohne Oxiranring, sowie entsprechende Mischaddukte z. B. Solvensaddukte mit Buthoxyethanol oder Ethoxyethanol. Nur einen geringen Anteil haben Substanzen mit zwei Oxiranringen. Als einzige Substanz, die unter die Regelung der Richtlinie 2005/1895/EG EUROPÄISCHE KOMMISSION (2005a) fällt konnte BADGE•H₂O mit einem Gehalt von 0,026 mg/dm² nachgewiesen werden. Insgesamt konnten 87% der fluoreszierenden Substanzen mit einem Molekulargewicht <1000 Da, deren Response >5 ppb

BADGE-Äquivalente entspricht, identifiziert werden. Mit 60% besteht der Hauptanteil der Substanzen mit einem Molekulargewicht <1000 Da aus epoxybasierenden Verbindungen.

6.2.4 RP 100: Unpolare Anteile

Bei den lipophilen Schmierstoffen war nur Paraffin (0,32 mg/dm²) nachweisbar. Mit 47% nimmt Paraffin einen wesentlichen Anteil an den Substanzen mit einem Molekulargewicht <1000 Da ein. Die Diskrepanz zwischen dem Anteil epoxybasierender Verbindungen (0,41 mg/dm²) und Paraffin (0,32 mg/dm²) zum Anteil <1000 Da am Gesamtmigrat (0,68 mg/dm²) liegt im Bereich der analytischen Messunsicherheit, zumal die Methode zur Bestimmung des Anteils <1000 Da, eine bereits von SCHÄFER et al. (2004c) beschriebene Tendenz zu leicht erniedrigten Gehalten aufweist.

6.2.5 RP 100: Toxikologisch relevante Verbindungen

PAA waren nachweisbar. Ihr Gehalt ist jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze (0,87 µg/100mL). PAA können aus den bei der Herstellung von Epoxycoatings als Vernetzer eingesetzten Isocyanaten entstehen.

Isocyanate selbst waren nicht nachweisbar.

Ausführungen zu BADGE s. 6.2.3.

6.2.6 RP 100: Untersuchung zur Toxikologie der Migrate

Es waren weder mit AM 11 (vgl. 10.3) mutagene Effekte noch mit AM 12 (vgl. 10.3) zytotoxische Effekte nachweisbar (s. 10.6.2 0 und Tab. 83).

6.2.7 RP 100: Zusammenfassung

Bei der RP 100 konnten beim Korpus 91% (Abb. 54) der migrierenden Substanzen klassifiziert werden. Den größten Anteil nehmen dabei die Verbindungen mit einem Molekulargewicht >1000 Da ein. Toxische Effekte der Migrate waren nicht nachweisbar.

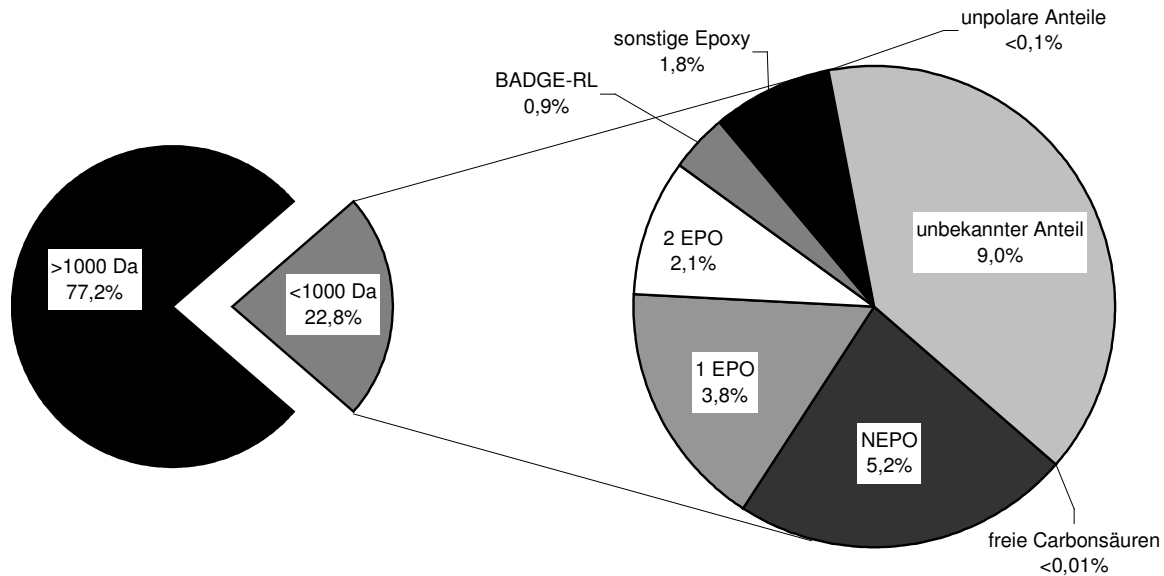


Abb. 54 RP 100 Korpus: Migratzusammensetzung, Gesamtmigrat: 2,98 mg/dm²

6.3 2-teilige Aluminiumdose mit Ringpullverschluss (RP 170)

6.3.1 RP 170: Identifizierung der Beschichtung und Gesamtmigrat

Die Beschichtung der zweiteiligen Aluminiumdose mit Ringpullverschluss (RP 170) wurde mittels FTIR-ATR als auf einem Polyester mit aromatischen Strukturelementen basierend identifiziert (s. 10.6.3).

Beim Gesamtmigrat wurde mittels Gravimetrie mit 4,08 mg/dm² ein höherer Gehalt als mittels SEC-ELSD (2,96 mg/dm²) ermittelt. Der Anteil <1000 Da ist mit 1,03 mg/dm² verhältnismäßig gering.

6.3.2 RP 170: Polare Anteile:

Carbonsäuren waren nicht nachweisbar.

6.3.3 RP 170: Mittelpolare Anteile:

Die Polyesterbeschichtung basiert auf den Phthalsäureisomeren TPA (6 µg/dm²) und IPA (13 µg/dm²), sowie den Diolen NPG und HD. Der Anteil an Säuren in dem migrierenden Polyesteranteil mit unter 0,02 mg/dm² lässt auf einen niedrigen Anteil der Polyester am Gesamtmigrat und am Anteil <1000 Da schließen.

Epoxybasierende Anteile waren nicht nachweisbar.

6.3.4 RP 170: Unpolare Anteile

Bei den lipophilen Schmierstoffen war nur Paraffin (3,06 mg/dm²) im Korpus nachweisbar. Paraffin hat ein Molekulargewicht von <1000 Da. Der Anteil <1000 Da wurde mit 1,03 mg/dm²

ermittelt. Für diese Diskrepanz kommen zwei Erklärungen in Frage. Einerseits, dass die Molmassenkalibrierung und der 1000 Da-Schnitt anhand eines Polyesterstandards festgelegt wurden und die Polyester nur einen äußerst geringen Anteil am Migrat ausmachen und andererseits, dass Paraffin unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen in der Nähe des Einspritzpeaks eluiert und somit u. U. durch andere mit eluierende Substanzen gestört wird.

6.3.5 RP 170: Toxikologisch relevante Verbindungen

Verbindungen mit bekanntem toxikologischem Potential (PAA, Isocyanate, BADGE) waren nicht nachweisbar.

6.3.6 RP 170: Untersuchung zur Toxikologie der Migrate

Es waren weder mit AM 11 (vgl. 10.3) mutagene Effekte noch mit AM 12 (vgl. 10.3) zytotoxische Effekte nachweisbar (s. 10.6.3 Tab. 85 und Tab. 86).

6.3.7 RP 170: Zusammenfassung

Bei der RP 170 ist es nicht gelungen den migrierenden Anteil <1000 Da weitergehend zu klassifizieren (Abb. 55). Die Bestimmung der unpolaren Anteile (s. 6.3.4) liefert bezüglich des Paraffins unplausible Ergebnisse. Da bei der Herstellung der tiefgezogenen Korpi der RP 170 üblicherweise Lubricants verwendet werden, ist davon auszugehen, dass ein Teil des Anteils <1000 Da den unpolaren Verbindungen zuzuordnen ist. Den größten Anteil nehmen auch bei der RP 170 die Verbindungen mit einem Molekulargewicht >1000 Da ein. Toxische Effekte der Migrate waren nicht nachweisbar.

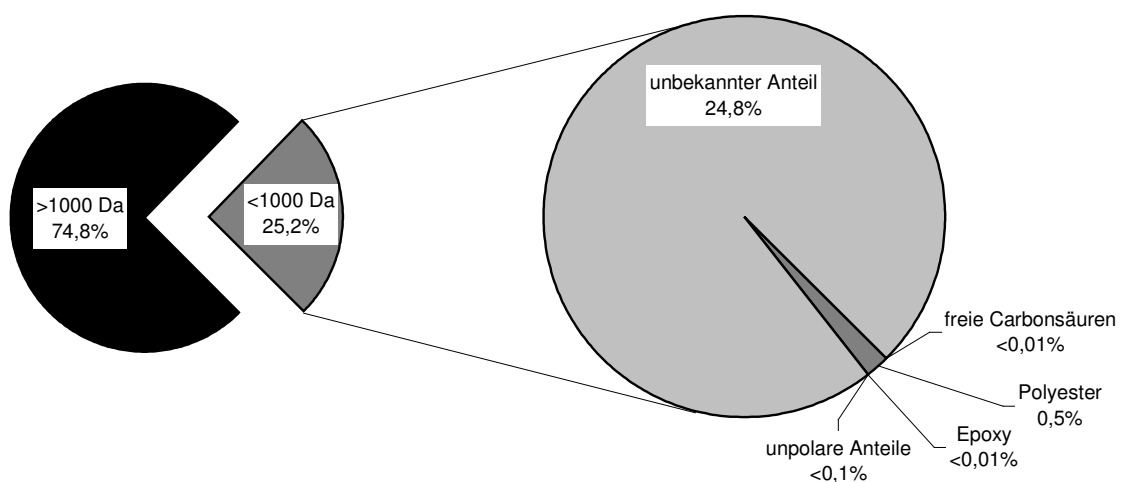


Abb. 55 RP 170 Korpus: Migratzusammensetzung, Gesamtmigrat: 4,08 mg/dm²

6.4 2-teilige Aluminiumleichtbehälter mit Easy-Open-Verschluss (LB 50, LB 150, LB 300)

6.4.1 Identifizierung der Beschichtung und Gesamtmigrat

Die Beschichtung der Aluminiumleichtbehälter wurde mittels FTIR-ATR als auf Polypropylen basierend identifiziert (s. Abb. 56 und 10.6.4).

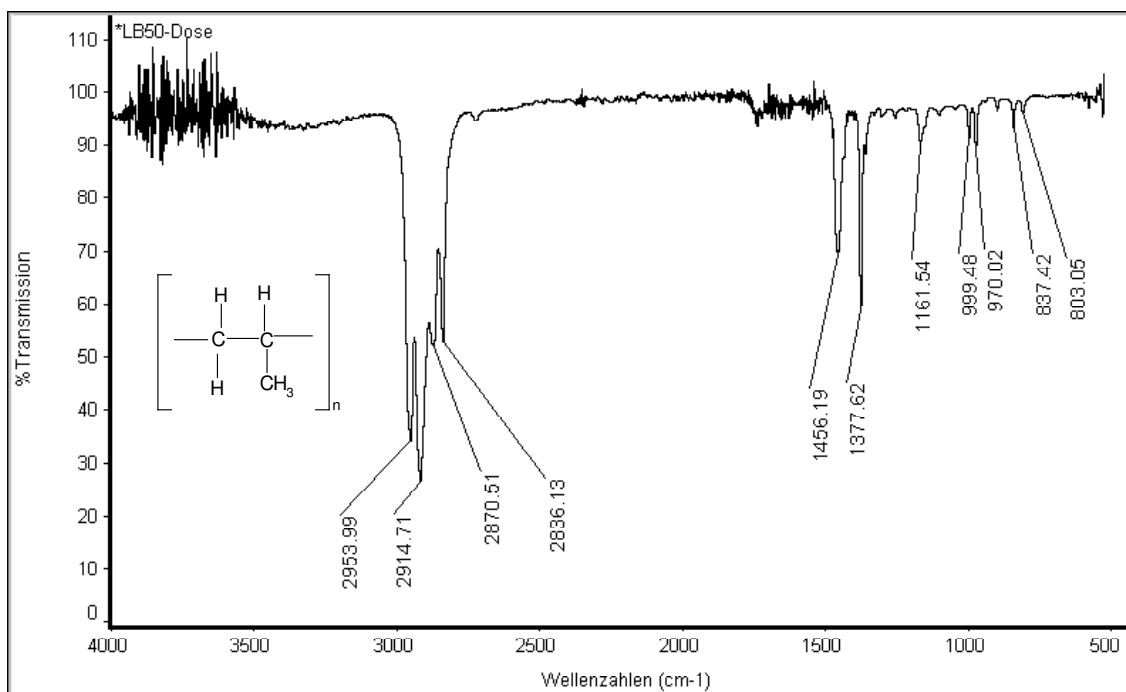


Abb. 56 LB 50: FTIR-Spektrum

Bei den Leichtmetallbehältern variiert das Gesamtmigrat der Deckel und Korpi je nach Größe und verwendeten Extraktionsmittel bzw. Simulanz erheblich (Tab. 23).

Tab. 23 Leichtmetallbehälter: Gesamtmigrat

Methode	Extraktionsmittel / Simulanz	LB50 [mg/dm ²]		LB150 [mg/dm ²]		LB300 [mg/dm ²]	
		Deckel	Korpus	Deckel	Korpus	Deckel	Korpus
Gravimetrie	Isooktan		5,83		9,45		5,80
	95% Ethanol		2,67		-		3,10
	Acetonitril	6,39	5,66	11,45	3,54	7,40	-
SEC-ELSD	Acetonitril	4,63	2,46	4,22	3,10	4,75	1,42
SEC-ELSD <1000 Da		4,63	1,85	4,22	2,61	4,75	1,27

Während bei Verwendung von Isooktan und Acetonitril vergleichbare Ergebnisse erhalten werden, ist das Gesamtmigrat bei 95% Ethanol deutlich geringer. Hier ist von quellenden Eigenschaften von Isooktan und Acetonitril auf die Polypropylenbeschichtung im Gegensatz zu 95% Ethanol auszugehen. Bei den Deckeln hat das gesamte Migrat ein Molekulargewicht <1000 Da, während dies bei den Korpi zwischen 75% (LB50), 84% (LB150) und 89% (LB300) differiert.

6.4.2 LB: Polare Anteile:

Carbonsäuren waren nicht nachweisbar.

6.4.3 LB: Mittelpolare Anteile:

Da freie Carbonsäuren nicht nachweisbar waren und die Leichtbehälter ein vergleichbares Ergebnis erwarten lassen, wurde nur beim LB 150 die Zusammensetzung der migrierenden Polyesterbestandteile untersucht. Es waren die Säuren IPA (10,0 µg/dm²) und ADA (3,8 µg/dm²) nachweisbar.

Epoxybasierende Anteile waren nicht nachweisbar.

6.4.4 LB: Unpolare Anteile

Die Zusammensetzung der lipophilen Verbindungen der Deckel unterscheidet sich von der der Korpi der Leichtbehälter. Während bei den Korpi TAG, 1,3-DAG, 1,2-DAG und MAG vorkommen sind dies bei den Deckeln PF, TAG, FS und 1,2-DAG (Tab. 24).

Tab. 24 Leichtmetallbehälter: Lipophile Verbindungen

	LB50				LB150				LB300			
	Deckel		Korpus		Deckel		Korpus		Deckel		Korpus	
	mg/dm ²	%	mg/dm ²	%	mg/dm ²	%	mg/dm ²	%	mg/dm ²	%	mg/dm ²	%
PF	0,274	40,3	<0,01	-	0,550	47,4	<0,01	-	0,639	47,0	<0,01	-
TAG	0,066	9,7	0,159	51,5	0,104	9,0	<0,01	-	0,147	10,8	<0,01	-
FS	<0,01	-	0,047	15,2	<0,01	-	0,980	39,5	<0,01	-	<0,01	-
1,3-DAG	0,092	13,5	<0,01	-	0,152	13,1	<0,01	-	0,159	11,7	<0,01	-
1,2-DAG	0,064	9,4	0,103	33,3	0,030	2,6	2,386	70,1	0,101	7,4	2,737	64,0
MAG	0,184	27,1	<0,01	-	0,324	27,9	<0,01	-	0,314	23,1	1,538	36,0
Summe	0,680	100	0,309	100	1,160	100	3,366	100	1,360	100	4,275	100

6.4.5 LB: Toxikologisch relevante Verbindungen

Verbindungen mit bekanntem toxikologischem Potential (PAA, Isocyanate, BADGE) waren nicht nachweisbar. Teilweise zeigen sich bei der Bestimmung der PAA unspezifische bräunliche Verfärbungen, die eine photometrische Bestimmung verhindern.

6.4.6 LB: Untersuchung zur Toxikologie der Migrate

Es waren weder mit AM 11 (vgl. 10.3) mutagene Effekte noch mit AM 12 (vgl. 10.3) zytotoxische Effekte nachweisbar (s. 10.6.4 Tab. 89 bis Tab. 91). Im Rahmen der Versuchsdurchführung auf mutagene Effekte wird eine Toxizitätskontrolle mitgeführt, die jedoch beim Korpus des LB 300 bei hohen Konzentrationen positive Effekte zeigte (s. 10.6.4 Tab. 92).

Der LB 300 wurde einer genaueren Untersuchung unterzogen. Zur Anwendung kam die Variante des „Plating Efficiency“-Test (s. 10.3 AM 13) zur Untersuchung auf Zytotoxizität. Bei der Variante des „Plating Efficiency“-Test werden nicht nur direkt toxische Effekte bestimmt, die zu einem unmittelbaren Absterben der Zellen führen, sondern auch zytostatische Effekte, die sich in einer Hemmung der Vermehrung von Zellen bemerkbar machen.

Nachdem sich in einem ersten Screening Proben des LB 300 aus dem Jahre 2001 und 2002 bei höheren Konzentrationen als toxisch erwiesen haben (s. 10.6.4 Tab. 93), wurden die Untersuchungen wiederholt. Bei den Proben des LB 300 aus dem Jahr 2002 waren bereits bei einer Konzentration von 0,5% Lösung im Medium keine Zellen mehr gewachsen. Da Proben des LB 300 aus dem Jahr 2002 nicht mehr zur Verfügung standen, wurden weitere Proben aus dem Jahr 2003 mit herangezogen.

Bei der Wiederholung zeigten sich dosisabhängige Effekte (Abb. 57 und s. 10.6.4 Tab. 94)

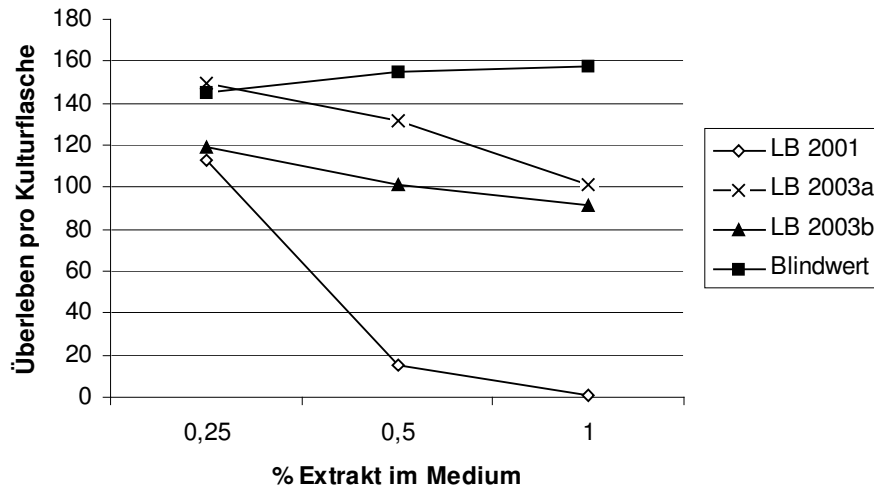


Abb. 57 LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Variante des „Plating Efficiency“-Test

Es zeigt sich demnach, dass offensichtlich aus der Verpackung Stoffe eluiert werden, die Zellen am Wachstum hindern können. Um weitere Informationen über diese Stoffe zu erhalten, wurde eine Fraktionierung der Extrakte nach ihrem Molekulargewicht mittels SEC-ELSD durchgeführt. Die erste Fraktion wurde mit einem Molekulargewicht <400 Da gewählt, da in ihr überwiegend die Monomere der möglicherweise in Frage kommenden toxischen Substanzen erwartet wurden. Die zweite Fraktion mit 400 bis 1000 Da sollte den restlichen Bereich der vom Magen-Darm-Trakt resorbierbaren Substanzen abdecken und die dritte Fraktion mit >1000 Da den restlichen Teil des Gesamtmigrates (s. 10.6.4 Tab. 95). Die Untersuchungen wurden auf den LB 300 aus dem Jahr 2001 beschränkt, da hier die toxischen Effekte am stärksten ausgeprägt waren (Abb. 57). Es erfolgte eine Doppelbestimmung. Bei fünf der sechs Probenfraktionen musste eine zusätzliche 1:10-Verdünnung hergestellt werden, da in den ersten Testkonzentrationen (50 –200 µg/mL) keine Zellen überlebt haben. Die Aussagekraft der Bestimmung ist begrenzt. Während bei der einen Probe (LB 300/2001a) bei der Fraktion 400-1000 Da dosisabhängige Effekte erkennbar sind, sind bei der zweiten Probe (LB 300/2001b) bei der Fraktion >1000 Da dosisabhängige Effekte erkennbar (Abb. 58 und s. 10.6.4 Tab. 96).

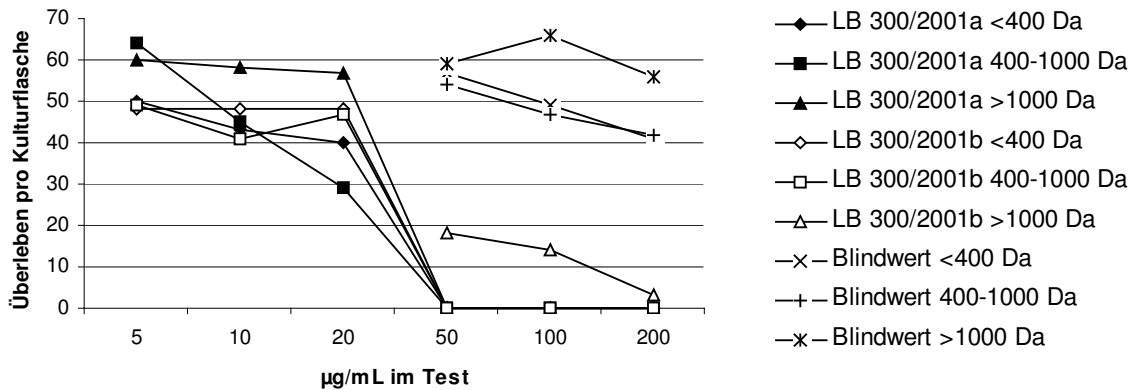


Abb. 58 LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels „Plating Efficiency“-Test nach Fraktionierung

Allen Fraktionen gemeinsam ist jedoch die Tatsache, dass bei einer Konzentration zwischen 20 und 50 µg/mL im Test die Überlebensrate dramatisch sinkt.

6.4.7 LB: Zusammenfassung

Bei den Deckeln der LB, deren gesamter migrierender Anteil ein Molekulargewicht <1000 Da besitzt, konnte nur ein geringer Teil von 16-37% als unpolare Substanzen klassifiziert werden (Abb. 59). Bei dem verbleibenden Anteil der Migrate konnten mit keiner der verwendeten Methoden weitere Verbindungen nachgewiesen werden. Das Gesamtmigrat ist bei den Deckeln vergleichbar groß. Während die Menge der unpolaren Verbindungen in den Migraten der Deckel variiert, ist die Zusammensetzung im Rahmen der analytischen Schwankungsbreite identisch (s. 6.4.4 Tab. 24).

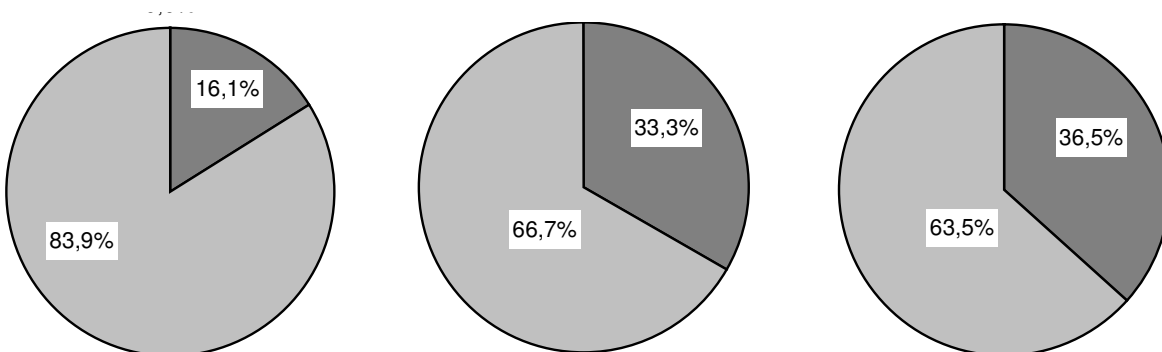


Abb. 59 Deckel LB: Migratzusammensetzung
Gesamtmigrat: LB 50 (links) 4,63 mg/dm², LB 150 (Mitte) 4,22 mg/dm², LB 300 (rechts) 4,75 mg/dm²,
■ unpolarer Anteil, □ unbekannter Anteil,

Bei den Korpi konnten 37-59% der Migrate als unpolare Verbindungen und als Verbindungen mit einem Molekulargewicht >1000 Da klassifiziert werden (Abb. 60). Bis auf einen vernachlässigbar geringen Anteil von Polyesterbestandteilen beim LB 150 (s. 6.4.3) konnten bei dem verbleibenden Anteil an den Migraten mit keiner der verwendeten Methoden weitere

Verbindungen nachgewiesen werden. Bei den Korpi variiert nicht nur die Menge der unpolaren Verbindungen, sondern auch deren Zusammensetzung (s. 6.4.4 Tab. 24). Von einem Einfluss des Tiefziehens auf die Zusammensetzung des Migrates ist bei der qualitativ deutlich unterschiedlichen Zusammensetzung der unpolaren Anteile nicht auszugehen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Migrate könnte somit eine Erklärung dafür bieten, dass nur beim Korpus des LB 300 toxische Effekte nachweisbar waren.

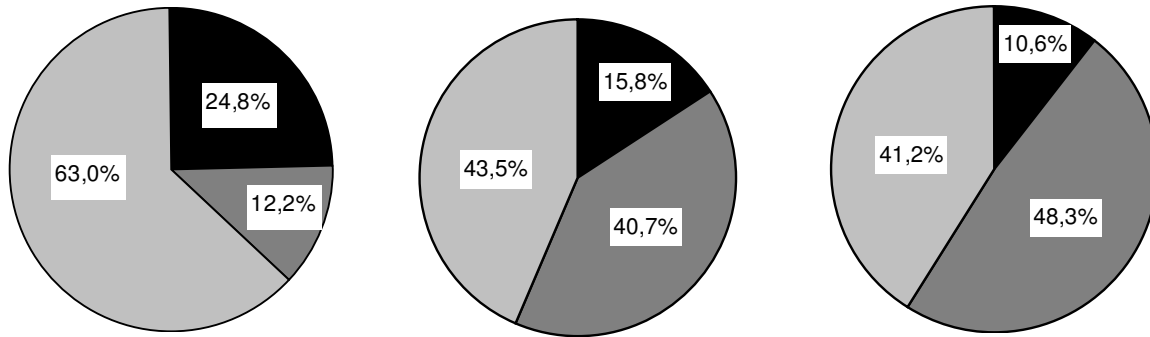


Abb. 60 Korpi LB: Migratzusammensetzung
Gesamtigrat: LB 50 (links) 2,46 mg/dm², LB 150 (Mitte) 3,10 mg/dm², LB 300 (rechts) 1,42 mg/dm²,
■ unpolarer Anteil, □ unbekannter Anteil, ■ >1000 Da

Die bei der Untersuchung auf Toxizität festgestellten Effekte lassen auf zytostatisch wirksame Verbindungen schließen, da im Testverfahren auf akute Zytotoxizität keine Effekte feststellbar waren. Eine Zuordnung zu einer Fraktion oder sogar einzelnen Substanzen ist nicht gelungen, da die Effekte in allen Fraktionen aufgetreten sind. Die Effekte rühren jedoch nicht von den erwiesenermaßen toxischen Substanzen (PAA, Isocyanate, sowie BADGE und seine Derivate) her, da diese Substanzen nicht nachweisbar waren.

7 Die Anwendbarkeit von Diffusionsmodellen

7.1 Migratest © Lite 2001

Die Einhaltung spezifischer Migrationshöchstwerte kann entweder durch Bestimmung des jeweiligen Stoffes im Lebensmittel oder in einem Lebensmittelsimulanz oder durch Verwendung eines allgemein anerkannten und wissenschaftlich belegten Diffusionsmodells geprüft werden. Zur Anwendung kam die Software Migratest © Lite 2001, der ein anerkanntes Diffusionsmodell zugrunde liegt. Migratest © Lite 2001 ist ursprünglich konzipiert für die Migration aus Kunststoffen, nicht jedoch für Lacke, bei denen die Schichtdicke geringer ist.

Die Migration eines Stoffes aus einer Beschichtung in ein Lebensmittel ist ein Diffusionsvorgang. Bei schlechter Löslichkeit des Migranten im Lebensmittel oder Lebensmittelsimulanz steigt die Konzentration langsamer an als bei guter Löslichkeit. Die Theorie der Diffusion lässt sich durch das Fick'sche Diffusionsgesetz beschreiben:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

c ... Konzentration der migrierenden Substanz
 t ... Zeit
 x ... Dicke des Kunststoffs
 D ... Diffusionskoeffizient

Für die Anwendbarkeit von Migratest © Lite 2001 ist zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten der Lacke die Aufnahme einer Migrationskinetik notwendig. Um die notwendigen Daten zur Geschwindigkeit der Migration als auch der Konzentration der migrierenden Substanzen in jedem Stadium des Überganges zu erhalten, wurden Migrationskinetiken mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität und bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Als Leitsubstanzen wurden die fluoreszierenden auf BADGE basierenden Verbindungen ausgewählt. Die Untersuchungen wurden an 3-teiligen Weißblechdosen durchgeführt.

7.2 Durchführung der Extraktion

In Vorversuchen konnte ermittelt werden, dass bei Verwendung von 95%-igem Ethanol als Simulanz bereits nach 2 Stunden 90% der fluoreszierenden Substanzen migriert sind, die bei den Standardbedingungen (4 Stunden, 60 °C) der DIN 13130-1 (2004) erhalten werden. Da für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten mittels Migratest © Lite 2001 die Migrationskinetik vor allem zu Beginn der Migration von Interesse ist, musste ein alternatives Simulanz bzw. Extraktionsmittel gesucht werden, bei dem der Stoffübergang langsamer erfolgt. Zur Auswahl wurden Ethanol 95% und 50%, Isooktan, Sonnenblumenöl und die von der Arbeitsgruppe BIEDERMANN und GROB (1997) als Simulanz für fetthaltige Lebensmittel vorgeschlagene Mischung aus Butylacetat / Isooktan (33/67, v/v) verwendet. Die Prüftemperaturen und jeweiligen Extraktionsdauern sind in Tab. 25 angeführt.

Tab. 25 Migrationsbedingungen

Simulanz (S) / Extraktionsmittel (E)	Extraktionsdauer [h]	Prüftemperatur [°C]
Ethanol 95% (S)	0 – 48	60
Ethanol 50% (E)	0 – 51	40
	0 – 8	60
	0 – 9	80
Isooktan (S)	0 – 12	60
	0 – 12	80
Butylacetat/Isooktan (E) 33/67 (v/v)	0 – 4	60
Sonnenblumenöl (S)	1	121

Es wurden zwei bis drei leere Dosen parallel mit jeweils 100 mL Simulanz bzw. Extraktionsmittel versetzt, welches einer benetzten Fläche von 1,22 dm² entspricht. Die Probenahme erfolgte abhängig vom Lösungsmittel in Intervallen von 30 oder 60 Minuten. Die Bestimmungen der migrierten Substanzen wurden mittels AM 6 (vgl. 10.3) durchgeführt. Bei den Proben in Sonnenblumenöl erfolgte vor der chromatographischen Trennung eine Reinigung mittels Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE). Zur Ermittlung der Migrationskinetik werden die Konzentrationen der migrierenden Verbindungen als BADGE-Äquivalente im Simulanz bzw. Extraktionsmittel berechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Eine Kalibration erfolgt für die identifizierten Einzelsubstanzen und als Summe aller migrierenden Substanzen. Zur Bestimmung des Maximums wurde eine Migration mit Ethanol 95% über 48 Stunden bei 60°C durchgeführt. Der Maximalwert der Migration wurde mit 2,53 mg/dm² berechnet als BADGE-Equivalente bestimmt (s. 10.7 Tab. 100).

Für die beispielhafte Ermittlung einer Kinetik wurden die Werte der Migration in Ethanol 50% verwendet (s. 10.7 Tab. 97 bis Tab. 99). Bei diesem Extraktionsmittel konnten für die Auswertung mit Migratest © Lite 2001 verwendbare Ergebnisse erzielt werden. Die Migration in Ethanol 95% erfolgte in der Anfangsphase zu schnell, um brauchbare Werte für Migratest © Lite 2001 zu erhalten (s. 10.7 Tab. 100). Bei Verwendung von Isooktan wurden durchgängig sehr niedrige Konzentrationen im Verhältnis zu der Migration in Ethanol 95% ermittelt (s. 10.7 Tab. 101). Mit Ausnahme von cyclo-Di-BADGE bei 80°C waren alle Signale unterhalb einer Konzentration von 5 µg BADGE-Equivalenten /dm². Als Grund hierfür wird angenommen, dass die Prüfsimulanzien meist für Kunststofffolien oder Verpackungen aus Kunststoff validiert worden sind. Das unterschiedliche Quellverhalten von Kunststoffen und Lacken kann hierbei einen wesentlichen Einfluss auf die Migration besitzen. Bei Verwendung von Isooktan ist von einem allenfalls sehr geringen Quellverhalten auszugehen, so dass hier eine reine Diffusion stattfindet, während bei anderen Simulanzien durch die Quellung des Lackes eine deutlich schnellere Migration stattfindet. Die Migrationswerte bei Verwendung von Isooktan / Butylacetat (33/67, v/v) (s. 10.7 Tab. 102) wurden nicht verwendet, da sie 10-15% unter den Ergebnissen der rechtlich geregelten Simulanzien (Ethanol 95%, Sonnenblumenöl) liegen (Abb. 61).

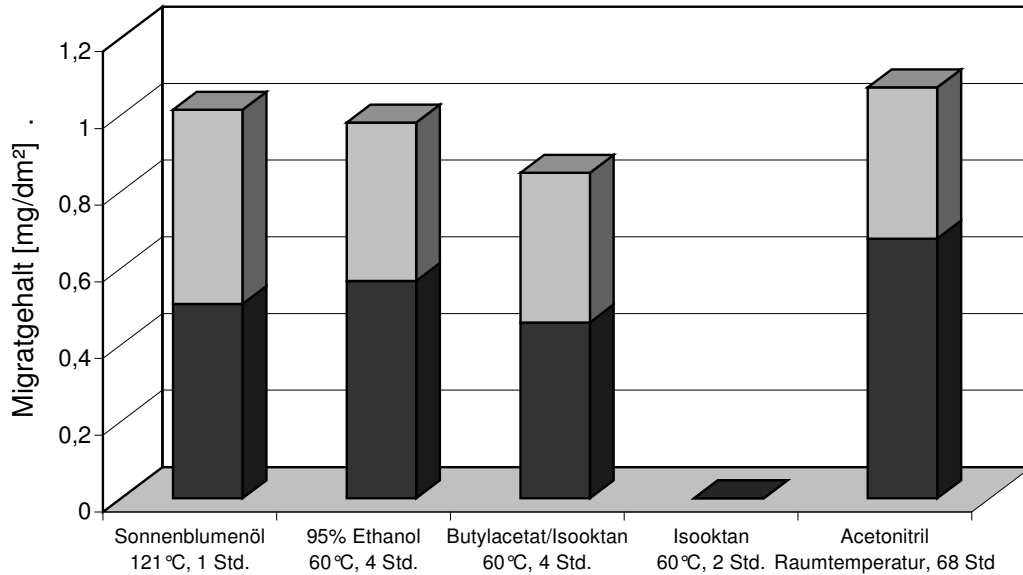


Abb. 61 Vergleich verschiedener Simulanzien und Extraktionsmittel
Summe der identifizierten Substanzen, sowie von cyclo-Di-BADGE, berechnet als BADGE-Equivalente
Daten s. 10.7 Tab. 100 bis Tab. 103, Gesamtmigrat, Anteil cyclo-Di-BADGE

Aus Abb. 61 wird erkennbar, dass die Verwendung unterschiedlicher, zugelassener Simulanzien zu deutlich unterschiedlichen Migraten führen kann.

Bei Verwendung von Sonnenblumenöl ist eine aufwendige Aufreinigung mit SPE notwendig, welche bei der Fülle von benötigten Daten zu einem nicht vertretbaren Aufwand führen würde.

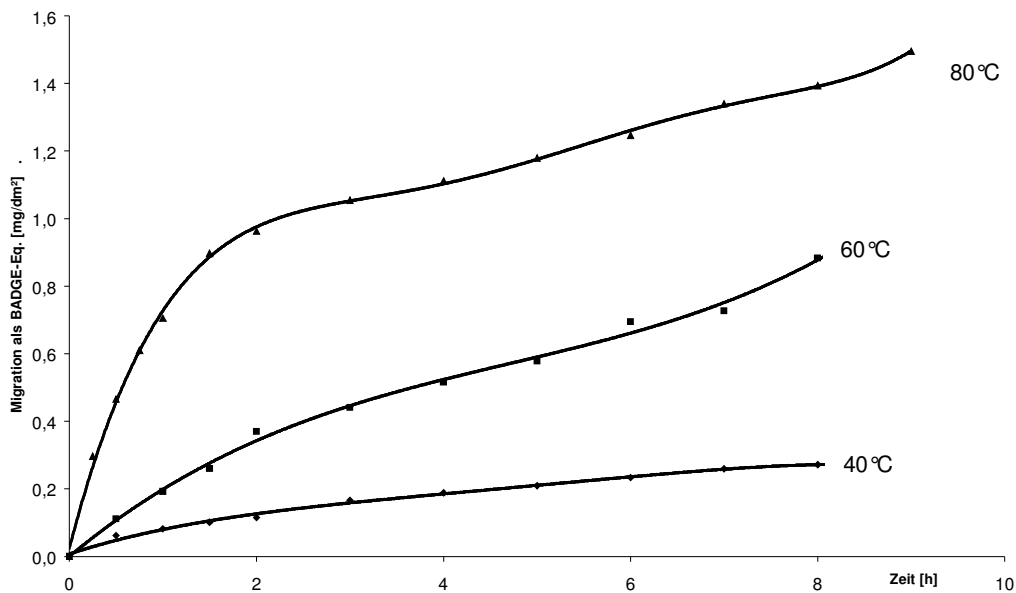


Abb. 62 Migrationskinetik in BADGE-Equivalenten, (CN 825, Ethanol 50%)

Die bei 40, 60 und 80 °C in Ethanol 50% erhaltenen Migrationswerte wurden von Herrn Dr. O. Piringer (FABES GmbH München) mit Migratest © Lite 2001 ausgewertet und die entsprechenden Diffusionskoeffizienten der identifizierten Verbindungen berechnet. „Aus den Berechnungen geht hervor, dass eine um drei Größenordnungen geringere Diffusionsgeschwindigkeit im Epoxylack im Vergleich zu Polyethylen resultiert. Der ausschlaggebende Parameter für die Diffusionskoeffizienten ist die Molekülmasse des Migranten“ (PRINGER, 2002). Wegen der relativ guten Löslichkeit der meisten BADGE-Derivate in der wässrigen Ethanolösung kann der „Verteilungskoeffizient eines Migranten zwischen Lack und Flüssigkeit mit K_p , $F=1$ angesetzt werden. Bei der Auswertung einiger Kurven resultierende höhere Werte (s. 10.7 Tab. 104) sind noch nicht ausreichend sicher, da wegen teilweiser Zersetzung der Komponenten keine genauen Gleichgewichtskonzentrationen bekannt sind“ (PIRINGER, 2002).

7.3 Modellierung der Migration mittels MIGRATEST © Lite

Die Modellierung der Migration wurde mit Hilfe des anerkannten und wissenschaftlich belegten Diffusionsmodells, welches dem MIGRATEST © Lite 2001 zugrunde liegt, geprüft (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001).

Aus der Modellierung geht hervor, dass unter Verwendung der mittels der Diffusionskinetiken bestimmten Diffusionskoeffizienten der Übergang der Epoxidharzbestandteile aus dem Lack in das Lebensmittel zum größten Teil (~95%) während der Sterilisation stattfindet. Anschließend folgt die Lagerung der Konservendosen bei Raumtemperatur, wobei nur noch ~5% der auf BPA basierenden Derivate in das Lebensmittel migrieren. Die Modellierung der Migration ist in Abb. 63 am Beispiel von cyclo-Di-BADGE dargestellt.

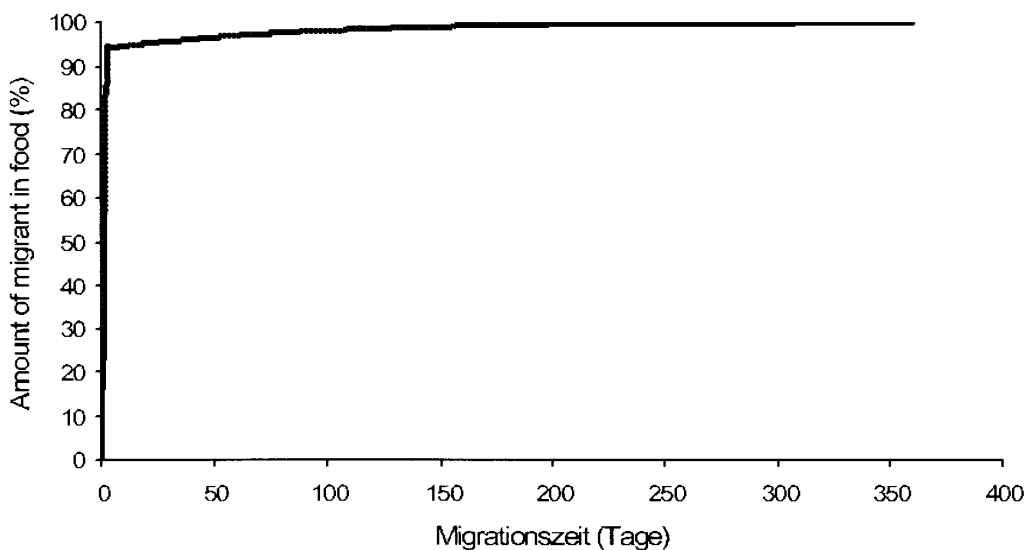


Abb. 63 Modellierung der Migrationskinetik am Beispiel von cyclo-Di-BADGE (CN 825, 50% Ethanol)

Bei der Abschätzung der Migrationswerte für Lebensmittel muss der Reduktionsfaktor, der den Einfluss des Verteilungskoeffizienten zwischen Polymermatrix und Lebensmittel darstellt mit einbezogen werden. Da die Dicke der Lackschicht nur ca. 6 μm beträgt, besitzt der Diffusionskoeffizient bei der Migration der Epoxidharzbestandteile aus der Beschichtung in das Lebensmittel nur eine geringe Rolle. Von Bedeutung ist nahezu ausschließlich der Verteilungskoeffizient zwischen der Polymerschicht und dem Lebensmittel bzw. Simulanz.

8 Diskussion

8.1 Die analytische Erfassung von Isocyanaten

Es wurde ein Trennsystem für die 7 gebräuchlichsten und mit Grenzwert belegten Diisocyanate HDI, IPDI, 2,4-TDI, 2,6-TDI, 2,4'-MDI, 4,4'-MDI und CHI, sowie für die 4 weiteren Diisocyanate 1,4-CHDI, 1,3-PDI, 1,4-PDI und XDI und das Monoisocyanat PI, die im Endprodukt nicht mehr nachweisbar sein dürfen, unter Verwendung des internen Standards NI entwickelt. Durch die Verwendung des MSD ist es nicht nur möglich eine selektive Absicherung der o.a. Isocyanate zu ermöglichen, sondern zusätzlich, durch eine Screening-Option auf die für Isocyanatderivate selektiven Fragmente, sowohl weitere nicht im Standard enthaltende monomere als auch oligomere Isocyanate detektieren zu können. Zudem ist es möglich durch Verwendung eines zweiten Derivatisierungsreagenzes, unbekannte Isocyanate hinsichtlich ihrer Anzahl an NCO-Gruppen zu charakterisieren und ggf. zu identifizieren.

Mit Ausnahme der Substanzen 2,4-TDI und 1,3-PDI konnte, in einer für die Routineanalytik vertretbaren Zeit, eine Basislinientrennung erreicht werden.

Bisher in der Analytik von Lebensmittelverpackungen beschriebene Methoden basieren alle auf einer Derivatisierung mit MAMA und anschließender Bestimmung mittels HPLC-FLD (DAMANT et al. 1995, LAU und WONG 2002, ELLENDT et al. 2003, DIN EN 13130-8, 2004b). Die Anzahl der identifizierbaren Isocyanate variiert von 6 bis 13. Lediglich ELLENDT et al. (2003) beschreiben ein Verfahren mittels GC-MSD, bei dem 14 Isocyanate identifiziert werden können. Das Verfahren dient nur zur Absicherung der zuvor mittels HPLC-FLD gefundenen Isocyanate. Die Methode mittels MAMA ist sehr zeit- und arbeitsintensiv. Eine direkte Kopplung des Verfahrens mit einem MSD ist nicht möglich. Zur Absicherung mittels GC-MSD muss eine zusätzliche Aufarbeitung erfolgen. Eine Screening-Option auf unbekannte monomere oder sogar oligomere Isocyanate besteht bei den bisher in der Analytik von Lebensmittelverpackungen angewandten Methoden nicht.

Der MSD kam für eine Quantifizierung und Validierung nicht in Betracht, da die während der Optimierung der Detektion beobachteten Schwankungen im Signal-Rausch-Verhältnis zu schlechteren Verfahrenskennwerten führten als dies bei Verwendung des FLD der Fall ist. Zudem wird ein MSD in der Routineanalytik i. d. R. derzeit nur eingesetzt, wo es keine Alternativen gibt, da er kosten- und personalintensiver ist als ein FLD.

Das entwickelte Trennsystem erwies sich als sehr robust im Hinblick auf Temperatur- und pH-Wert-Einflüsse. Ein Arbeiten unter Lichtausschluss, wie dies bei Verwendung von MAMA notwendig ist, entfällt. Der große Einfluss der Elutionsmittelzusammensetzung auf die Retentionszeiten, wie er auch in der DIN-Methode beschrieben ist, lässt sich durch Verwendung moderner Pumpen verhindern und durch den mitgeführten IS NI über die relativen Retentionszeiten kontrollieren.

NI bietet sich als IS an, da es nicht in Verpackungen zu erwarten ist und mittels FLD, UVD und MSD detektiert werden kann. Eine Quantifizierung über den IS, wie er in der Methode nach DIN praktiziert wird, ist jedoch bei Verwendung von PP als Derivatisierungsreagenz, nicht als sinnvoll zu erachten, da NI ein nicht mit allen anderen untersuchten Isocyanaten identisches FL-Detektionsverhalten aufweist. TINNERBERG et al. (1997) verwenden NDI als IS, was bei der Analytik in Luft möglich, aber auf Grund des Vorkommens in Verpackungen hier nicht in Betracht gezogen wurde.

Durch die Option der direkten Kopplung der HPLC-FLD mit dem MSD ist zudem eine unabhängige Identifizierung der Analyte von der Retentionszeit, wie sie auch bei TINNERBERG et al. (1996) und KARLSSON et al. (1998a und 1998b) unter Verwendung einer HPLC-UVD/MSD-Kopplung beschrieben wurde, möglich. Die eindeutige Identifizierung erfolgt im Rahmen dieser Arbeit über die charakteristischen Fragmente des Reagenzes PP, des Harnstoffadduktes und bei Bedarf über substanzspezifische Qualifier.

Verschiedene Forschungsgruppen hatten sich bereits mit den für Isocyanate geeigneten Derivatisierungsreagenzien und deren Reaktivität beschäftigt. Obwohl die meisten Verfahren für isocyanathaltige Luft als Probenmatrix entwickelt wurden, konnten einzelne Parameter der verschiedenen Methoden übertragen werden. Hierzu zählte vor allem die Auswahl eines geeigneten Derivatisierungsreagenzes. Bei der Untersuchung der unterschiedlich derivatisierten Isocyanate waren neben der Reaktivität jedoch auch andere Eigenschaften bezüglich der chromatographischen Trennung der Derivate und der Möglichkeit ihrer Detektion entscheidende Faktoren. Hierbei handelte es sich um spezifische MS-Fragmente, die MS-Response, das Elutionsverhalten der Derivate, sowie die Möglichkeit oligomere Isocyanate in die Analytik integrieren zu können.

Die MS-Detektion der Derivate zeigte die charakteristischen Fragmente für die Derivatisierungsreagenzien PP und DEA und einige andere Reagenzien sowie für das jeweilige Harnstoffaddukt. Diese waren für das NCO-spezifische Screening notwendig und bereits von KARLSSON et al. (1998a und 1998b) für die Isocyanat-DBA-Derivate untersucht worden. Es ergab sich hierbei eine gute Übereinstimmung mit den von KARLSSON et al. (1998b) dargestellten Detektionsmustern. So zeigten sich für alle untersuchten Diisocyanate die charakteristischen Molekülonen bzw. Molekülcluster, die substanzspezifischen und harnstoffspezifischen Fragmente, sowie die reagenzspezifischen Qualifier, die ebenfalls bei KARLSSON et al. (1998b) für Isocyanat-DBA-Derivate beschrieben sind. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit noch ein weiteres reagenzspezifisches Fragment für PP (m/z 121) sowie ein weiteres, für jedes einzelne Diisocyanat-PP-Derivat spezifisches Molekülion ($M+2H+/2$) gefunden. Die übrigen untersuchten Derivatisierungsreagenzien erwiesen sich als wenig geeignet, da ihnen entweder, wie bei Nitro-C, MAMA, MOPP und Tra die notwendigen Qualifier für eine MS-Detektion fehlten bzw. zu gering waren und / oder bei der Analytik von komplexeren Isocyanaten die

Retentionszeit zu lang wurde, wie bei Nitro-C, DBA, DPA und MAMA. Einer Verlängerung der Retentionszeit konnte nur bedingt durch eine Erhöhung des Anteils an Acetonitril entgegengewirkt werden, da dadurch die Gefahr einer Koelution mit lipophilen Substanzen aus der Verpackung stieg. Dieses Problem bestand bei SPANNE et al. (1996) nicht, die bereits die Bestimmung komplexer Isocyanate aus Luft mit DBA beschreiben.

Das Molekulargewicht des Derivatisierungsreagenzes musste möglichst gering sein, um höhermolekulare Isocyanate noch detektieren zu können. PP ist mit seinem Molekulargewicht von 163 g/mol noch gerade geeignet, während MAMA mit einem Molekulargewicht von 221 Da für die Detektion der höhermolekularen Isocyanate nicht mehr in Betracht kam. Für DEA als zweites Derivatisierungsreagenz beschreiben bereits TINNERBERG et al. (1997) die Möglichkeit, MDI-Isomere mit bis zu 6 Phenylringen detektieren zu können, während bei Verwendung von DBA nur MDI-Isomere mit 4 Phenylringen detektiert werden konnten.

Während bei der Analytik der Isocyanate aus Luft Angaben zur Selektivität gegenüber Amininen, Ethanol, Phenol, Anilin und Wasser existieren (SPANNE et al., 1996, TINNERBERG et al., 1996), wurden in dieser Arbeit erstmalig Angaben zur Selektivität gegenüber Substanzen, die in Lebensmittelverpackungen vorkommen, gemacht. Das Epoxid BADGE·1H₂O, welches identisch wie die Isocyanate aufgearbeitet und untersucht wurde, reagierte analog zu den Isocyanaten mit den Derivatisierungsreagenzien und zeigte sowohl fluoreszierende Eigenschaften, als auch die spezifischen Qualifier für das jeweilige Derivatisierungsreagenz. Der charakteristische Qualifier für das Harnstoffaddukt fehlte jedoch, so dass dieses Verfahren bezüglich epoxidhaltiger Verpackungen hinreichend selektiv ist.

Das Extraktionsmittel Dichlormethan und der Lösungsvermittler DMF, die sich bereits bei DAMANT et al. (1995) bewährt hatten, zeigten sich im Vergleich mit möglichen Alternativen als optimale Substanzen.

Der Summengrenzwert für Isocyanate von 1 mg/kg Verpackungsmaterial wird aus der Summe der einzelnen zugelassenen Isocyanate ermittelt. Will man jedoch den Gesamtisocyanatgehalt unter Einbeziehung der höhermolekularen und unbekanntenen Isocyanate ermitteln, ist für die Quantifizierung die Proportionalität der Fluoreszenzintensität zur Anzahl der NCO-Gruppen von großer Bedeutung. Im Gegensatz zu WU et al. (1990), die ein Verfahren mittels FLD und amperometrischer Detektion unter Verwendung von Tra als Derivatisierungsreagenz verwendeten und eine Proportionalität zwischen der Anzahl der NCO-Gruppen und der Fluoreszenzintensität beschreiben, war diese beim vorliegenden Verfahren nicht gegeben. Bereits STREICHER et al., die MOPP als Derivatisierungsreagenz und eine Kombination aus Elektroneneinfangdetektor und UVD verwendeten, beschreiben diese fehlende Proportionalität. Im vorliegenden Verfahren konnte jedoch jeweils für aromatische und nichtaromatische Isocyanate eine weitgehende Proportionalität nachgewiesen werden, so dass unter

Berücksichtigung eines vertretbaren Fehlers eine Summenbestimmung auch ohne substanzspezifische Quantifizierung möglich ist.

Durch die Kombination zweier Derivatisierungsreagenzien in Kombination mit einem MSD ist es erstmalig möglich bei ausreichender Konzentration der Substanzen die Anzahl freier Isocyanatgruppen bei unbekanntem Isocyanaten in einer routinetauglichen Methode zu bestimmen und mögliche oligomere Isocyanate zu postulieren.

Bei Proben mit einem hohen Anteil an oligomeren Isocyanaten lässt sich durch Anpassung des Gradienten eine Verbesserung der Trennung erreichen. Die Verfahrenskenndaten sind vergleichbar mit denen der DIN-Methode.

Die umfangreichen Arbeiten zur Auswahl eines geeigneten Derivatisierungsreagenzes, die Anpassung an die Detektion mittels FLD und MSD, die einfache Aufarbeitung der Proben und die gute chromatographische Trennung führten zu einem robusten, selektiven und validen Verfahren, welches sich als routinetauglich erwiesen hat und gegenüber den bisher verwendeten Verfahren Vorteile für die Untersuchung von monomeren Isocyanaten besitzt, sowie die Untersuchung von oligomeren Isocyanaten aus Lebensmittelverpackungen erstmalig ermöglicht.

8.2 Die analytische Untersuchung von Rohstoffe für Lebensmittelverpackungen

Die Untersuchung der Rohstoffe gibt Aufschluss über eine Reihe von Fakten, die für die Untersuchung der Lebensmittelverpackungen selbst hilfreich sind.

Von Vorteil ist, dass die Komponenten höher konzentriert vorliegen und somit leichter zu analysieren sind, als dies bei den fertigen Produkten der Fall ist. Zudem können Abhängigkeiten in der Zusammensetzung bei der Rohstoffuntersuchung und Tendenzen im Bereich der Aushärtung durch die kinetischen Untersuchungen festgestellt werden.

Nachteilig ist der hohe Anteil an höhermolekularen Verbindungen, die schwer löslich sind oder mitextrahiert werden und die Analytik einzelner Substanzen verhindern oder zumindest einschränken, sowie die begrenzte Aussagekraft der Untersuchungen an den Rohstoffen auf Grund der Veränderungen, die sich durch die weitere Verarbeitung und Aushärtung ergeben.

Durch die Untersuchung der Komponenten mittels SEC-ELSD können bereits vor einer Identifizierung der Prepolymere Aussagen über die Zusammensetzung der Komponenten gemacht werden. So ist eine Differenzierung in hoch- und niedermolekulare Anteile möglich und es können im Einzelfall sogar Hinweise auf Monomere der Komponenten erhalten werden. Zudem kann festgestellt werden, ob mit einem höheren Anteil von Verbindungen mit einem Molekulargewicht <1000 Da zu rechnen ist, wie dies bei den Laminaten und dem Polypropylenfilm der Fall war.

Löslichkeitsprobleme haben bei der Bestimmung des Gesamtisocyanatgehalts der Kleberkomponenten mittels HPLC-FLD/MSD zu einem vergleichsweise geringem Gehalt geführt und eine

Identifizierung einzelner Isocyanate im fertig gemischten Kleber der Lamine durch die Mitextraktion von großen Mengen an Polyesterbestandteilen verhindert, obwohl bei einer großen Anzahl an Peaks im HPLC-Chromatogramm die spezifischen Qualifier nachweisbar waren.

Die Bestimmung von monomeren Isocyanaten in den Rohstoffen ist hingegen problemlos möglich und führt zu vergleichbaren Resultaten, wie vom Hersteller angegeben. In den Isocyanatkomponenten konnten einige Strukturen auch höhermolekularer Derivate identifiziert werden und durch Herstellerangaben oder Vergleich mit Handelsprodukten bestätigt werden. Die Erkenntnisse über die höhermolekularen Verbindungen aus der Untersuchung der Rohstoffe können bei der Identifizierung von Signalen aus Laminaten und Lebensmittelverpackungen als Vergleich dienen.

Die Methode nach DIN EN ISO 11909 (1998) zur titrimetrischen Bestimmung des Gesamtisocyanatgehaltes konnte durch Verwendung des Lösungsmittels THF an Stelle von Toluol optimiert werden. Die Ergebnisse der DIN-Methode vor und nach Optimierung unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Von Vorteil in der Durchführung ist jedoch das höhere Lösungsvermögen von THF gegenüber Toluol für die Klebstoffkomponenten und die Möglichkeit auf die Zugabe eines Lösungsvermittlers verzichten zu können, da keine Phasentrennung auftritt.

Mittels des Screenings auf niedermolekulare Polyester konnten die für die Migration relevanten Polyesteranteile, im Gegensatz zu den Migraten aus den Laminaten, wo die Konzentration zu gering für eine Auswertung mittels MSD waren, in den Rohstoffen identifiziert werden. Durch Kenntnis der Säuren, die nach Hydrolyse bestimmt wurden und der mittels GC-FID identifizierten Polyole, ist es möglich den Polyesterfragmenten Strukturen zuzuordnen. Eine fehlende Absicherung mittels einzelner Standards für die Fragmente kann hierbei durch zusammenhängende Auswertung ersetzt werden. So zeigen sich Differenzen in den Massensignalen von z.B. 20 Da zwischen Adipinsäure und Phthalsäure und von 44 Da zwischen EG und DEG. Kombiniert mit einer Retentionszeitverschiebung bei Austausch von ADA gegen PA oder DEG gegen EG lässt sich somit ein weitgehend einheitliches Bild erstellen. Eine Aufklärung der gesamten Zusammensetzung ist jedoch nicht möglich, da der größte Teil der Substanzen bei der Aufarbeitung ausfällt.

Die Methode zur Identifizierung der Polyole mittels GC-FID muss jedoch als nicht routinetauglich bewertet werden. Die Retentionszeiten sind nicht stabil, eine Basislinientrennung aller Polyole wird mit der verwendeten Säule nicht erreicht und der FID ist ein unselektiver Detektor, so dass ein Unsicherheitsfaktor verbleibt. SCHÄFER et al. (2004b) erreichen mit der Methode zwar eine Basislinientrennung, aber sie verwenden nur 10 Standardsubstanzen. Da jedoch auch 3 weitere Butandiole, sowie DEG in Lebensmittelverpackungen vorkommen können, mussten diese in die Methode integriert werden, wodurch

die Basislinientrennung nicht mehr erreicht werden kann. Eine Absicherung durch Standard-addition ist problematisch, da einzelne Standardsubstanzen wie z.B. EG teilweise Doppelpeaks aufweisen. Eine Umstellung des Verfahrens auf ein System mit einer anderen Säule mit besserer Trennleistung, sowie einen MSD als Detektor, würde Vorteile bringen, so dass dann auch die unterschiedlichen Butandiole basisliniengetrennt werden könnten.

Ein weiteres Problem ist, dass bei der Hydrolyse nur Polyole aus den Polyestern freigesetzt werden. Die Polyole TMP und DEG, die bei der Identifizierung der Polyisocyanate als Adduktpartner der Monomere identifiziert wurden, konnten nach der Hydrolyse nicht nachgewiesen werden.

Durch die Untersuchungen des Lubricants konnte festgestellt werden, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um das selbe Lubricant handelt, welches bei der Herstellung der Lebensmittelverpackungen (s. 6.4) verwendet wurde. Toxische Effekte konnten bei dem Lubricant nicht nachgewiesen werden.

Der Polypropylenfilm wurde gemäß Herstellerangaben für die Herstellung der LB verwendet. Der Anteil der Polypropylenfolie am Gesamtmigrat der LB 300 macht ca. 25-50% aus, wenn der Prozess des Tiefziehens nicht zu einer deutlichen Verringerung führt. Bei diesem Anteil sind keine toxischen Effekte nachweisbar. Obwohl mit EA ein wesentlicher Anteil am Gesamtmigrat bei dem Polypropylenfilm ermittelt werden konnte, ist es nicht gelungen, das Migrat vollständig aufzuklären. Ein weiterer Hauptbestandteil befindet sich ebenfalls unter den unpolaren Verbindungen. Wie bereits von SCHÄFER et al. (2003) beschrieben, ist das Signal, welches sich im Bereich von Paraffin befindet, nicht eindeutig zuzuordnen und bedarf einer Absicherung mittels einer weiteren spezifischen Methode, wie sie z.B. von JICKELSS et al. (1994) beschrieben wird.

Unerwartete Ergebnisse lieferten die Untersuchungen zur Kinetik. So war im Verlauf der Aushärtung keine einheitliche Veränderung des Molekulargewichtes, wie z.B. eine Verschiebung in den höhermolekularen Bereich feststellbar. Mittels des Screenings auf niedermolekulare Polyester waren im Verlauf der Aushärtung zwar deutliche Effekte erkennbar, es kam jedoch nur in einem Fall zu einer Anreicherung von cyclischen Polyestern. Bei der Bestimmung einzelner ausgewählter Isocyanate war ebenfalls keine eindeutige Tendenz erkennbar. Während bei dem Laminat mit KAS 1 bei einem der ausgewählten Isocyanate eine stetige Abnahme zu verzeichnen ist, kommt es bei der zweiten Substanz, ebenso wie bei dem Laminat aus KAS-5, zu einem zwischenzeitlichem Anstieg, der sich nur durch eine Freisetzung des jeweiligen Isocyanats und anschließende Reaktion mit Luftfeuchtigkeit erklären lässt. Lediglich der Gehalt an Gesamtisocyanat zeigt die erwartete kontinuierliche Abnahme im Verlauf der Aushärtung, die auf eine Vernetzungsreaktion zurückzuführen ist.

Diese Untersuchungen zeigen, dass der Zeitpunkt, ab dem ein Laminat für die Herstellung von Lebensmittelverpackungen bzw. die Lebensmittelverpackung selbst erst nach einer

ausreichenden Zeit verwendet werden darf, um zu vermeiden, dass Substanzen in Lebensmittel gelangen, die erst während der Aushärtung selbst freigesetzt werden.

Insgesamt ist jedoch festzustellen, dass zu keinem Zeitpunkt der Aushärtung der Grenzwert für das Globalmigrat oder spezifische Grenzwerte überschritten wurden. Die Konzentration der Isocyanatmonomere war bereits am ersten Tag der Aushärtung zu gering, um sie analytisch erfassen zu können. Kritisch zu beurteilen sind jedoch Grenzwerte, die sich auf die Masse der Verpackung und nicht auf die Kontaktfläche beziehen, da gerade bei Laminaten, die unter Verwendung einer Aluminiumfolie hergestellt werden, durch Verwendung einer dickeren Aluminiumfolie das Verhältnis von migrierender Substanz zur Masse der Verpackung unverhältnismäßig verschoben wird.

8.3 Die analytische Untersuchung von Lebensmittelverpackungen

Erstmalig wurden verschiedene handelsübliche Verpackungen für Lebensmittel einer umfassenden Analytik mit dem Ziel der Aufklärung des Gesamtmigrats, einem Screening auf spezifische Migrante toxikologisch relevanter Substanzen sowie der Untersuchung auf Toxizität mittels biologischer Methoden unterzogen. Untersuchungen zur Aufklärung des Gesamtmigrates sind bisher nur an ausgewählten Modellsubstanzen wie bei SIMAT und SCHÄFER (2004) beschrieben. Bei Untersuchungen, die sich auf handelsübliche Verpackungen beziehen, erfolgte bisher nur die Bestimmung spezifischer Migrante von wenigen Gruppen an Substanzen, wie z.B. für BADGE (BIEDERMANN, et al., 1996, BILES et al., 1999, PETERSEN et al. 2003) und für Isocyanate und PAA (BRAUER und FUNKE et al., 2002, ELLENDT et al., 2003). Nachdem Methoden zur Verfügung standen, mit denen zu erwarten war, dass eine weitgehende Aufklärung der Zusammensetzung des Gesamtmigrates bzw. des Anteils <1000 Da gelingen könnte, sollten möglichst unterschiedliche handelsübliche Verpackungen für Lebensmittel untersucht werden. Der Anteil am Gesamtmigrat, der identifiziert werden konnte, ist abhängig von der Art der Verpackung. So war es möglich bei auf Epoxylacken basierenden Verpackungen ca. 90% des Gesamtmigrates zu klassifizieren. Der unbekannte Anteil <1000 Da von ca. 40% ist jedoch unbefriedigend. Dies ist eine vergleichbare Größenordnung wie sie von SIMAT und SCHÄFER (2004) an Modellsubstanzen, die ebenfalls auf Epoxylacken basieren, beschrieben ist. Bei Verpackungen, die auf Polyesterlacken basieren, konnten zwar 75% des Gesamtmigrates als Anteil >1000 Da klassifiziert werden, jedoch war es nicht möglich, einen nennenswerten Anteil der Substanzen <1000 Da zu identifizieren. Bei dieser Art der Verpackung besteht ein bedeutender Nachholbedarf, um den toxikologisch relevanten Anteil mit einem Molekulargewicht <1000 Da zu charakterisieren. Bei den Leichtmetallbehältern konnten durchschnittlich 40% des Gesamtmigrates klassifiziert werden, wobei sich diese auf unpolare Verbindungen und den Anteil >1000 Da aufteilen. Mit

zunehmender Größe der Verpackungen stieg der Anteil der identifizierten Verbindungen, was jedoch bei 3 unterschiedlichen Verpackungsgrößen nicht als repräsentativ angesehen wird.

Die bereits von SCHÄFER et al. (2003) beschriebenen Ungenauigkeiten hinsichtlich des Paraffins bei der Bestimmung der unpolaren Substanzen hatten, v.a. bei der Untersuchung der Leichtmetallbehälter, einen wesentlichen Einfluss, da sich hier teilweise Unstimmigkeiten durch nicht eindeutig zuzuordnende Peaks in den Chromatogrammen ergeben haben. Demgegenüber wird durch die fehlende Möglichkeit der Quantifizierung bei der Untersuchung der Polyole mittels GC-FID (SCHÄFER et al., 2004b) nicht von einem nennenswerten Einfluss ausgegangen. Die Polyole kommen v.a. als Bestandteile der Polyester vor, deren migrierender Anteil bei allen Verpackungen gering war. Zudem ließ sich der Anteil der Polyole aus den Chromatogrammen als gering abschätzen.

Ein Problem bei der Aufklärung des Gesamtmigrates stellt die Verwendung von unterschiedlichen Simulanzien und Extraktionsmitteln dar (s. 6.4.1 Tab. 23, 7.2 Abb. 61, SIMAT und SCHÄFER 2004). Während das Gesamtmigrat i.d.R. mit einem auf die jeweiligen zu verpackenden Lebensmittel abgestimmten Lösungsmittel bestimmt wird, wird in den einzelnen Methoden zur Bestimmung der spezifischen Migrate oder der Hauptbestandteile eine Reihe von Lösungsmitteln verwendet, die zwar prinzipiell als Simulanzien in Frage kommen, aber nicht unbedingt auf die zu verpackenden Lebensmittel abgestimmt sind. Bei den einzelnen Methoden werden die Simulanzien 95% Ethanol, Isooktan, 10% Ethanol, sowie die Extraktionsmittel Acetonitril und Dichlormethan verwendet. Zudem erfolgt teilweise noch ein Umlösen in ein anderes Lösungsmittel. Zudem sind gravierende Unterschiede bei der Bestimmung des Gesamtmigrates möglich. So besteht häufig eine große Differenz bei Verwendung von 95% Ethanol und Isooktan, obwohl beide Lösungsmittel für Verpackungen, in denen fettreiche Lebensmittel verpackt werden sollen, zugelassen sind.

Hier fehlen derzeit noch geeignete Untersuchungen bezüglich der Löslichkeit der unterschiedlichen Hauptbestandteile und wichtiger spezifischer Bestandteile von Verpackungen. Denkbar ist, wenn es notwendig erscheint, dass das Gesamtmigrat identifiziert werden soll, dass eine Kombination mehrerer Extraktionsschritte hintereinander verwendet wird und die weiteren Untersuchungen dann aus diesem Gesamtmigrat erfolgen. Somit wäre jedoch eine Methodenüberprüfung und gegebenenfalls eine Anpassung der Methoden notwendig.

Insgesamt wurde in keinem Fall der Grenzwert für das Gesamtmigrat oder einer der spezifischen Grenzwerte überschritten. Hinsichtlich der als toxikologisch relevant eingestuften Substanzen waren die nachgewiesenen Konzentrationen im Bereich der Bestimmungsgrenze der verwendeten Verfahren.

Mutagene Effekte waren bei keiner der Verpackungen nachweisbar. Es zeigten sich auch im Neutralrottest auf Zytotoxizität bei Konzentrationen für die CN 825 bis 6 dm²/L, die RP 100 bis 34 dm²/L, die RP 170 bis 13.6 dm²/L und bei den LB 300 bis 43 dm²/L keine Effekte. Lediglich in

der Variante Neutralrottest, dem „Plating Efficiency“-Test, zeigten sich Effekte in einer Konzentration zwischen 10 bis 20 dm²/L. Nach einer Fraktionierung konnten die Effekte keiner der Fraktionen zugeordnet werden, vielmehr traten sie in alle drei Fraktionen in Konzentrationen zwischen 10 bis 50 µg/mL auf. Eine Umrechnung auf Flächenequivalente ist nach einer Fraktionierung nicht mehr möglich, da durch die Fraktionierung ein Verlust, der den einzelnen Fraktionen nicht zugeordnet werden kann, von ca. 50% auftritt. Im Gegensatz zu Mittag et al. (2005), die bei einem Epoxycoating mittels RNA-Synthese-Test, WST-1-Test und Neutralrottest in Konzentrationen zwischen 6-25 dm²/L zytotoxische Effekte nachwiesen, waren im Rahmen dieser Arbeit keine direkt zytotoxischen Effekte nachweisbar. Es konnten jedoch durch die Kombination des Neutralrottests mit der zusätzlichen Variante des „Plating Efficiency“-Test zytostatische Effekte nachgewiesen werden.

Eine höhere Konzentration der Testsubstanzen war nicht möglich, da die handelsüblichen Verpackungen nur in begrenzten Mengen zur Verfügung standen.

8.4 Die Anwendbarkeit von Diffusionsmodellen

Aus einer Reihe von Simulanzien und Extraktionsmitteln konnte ein geeignetes Extraktionsmittel für die Simulation einer Migration ausgewählt werden. Bei der Auswahl eines geeigneten Extraktionsmittels fiel auf, dass zwischen den zugelassenen Simulanzien deutliche Unterschiede in der Höhe des Gesamtmigrates bestehen.

Erstmalig wurde anhand der Migration mit 50% Ethanol bei verschiedenen Temperaturen Diffusionskinetiken aufgenommen und der Diffusionskoeffizient von 13 BPA-Derivaten in einer lackierten Lebensmittelkonserve ermittelt. Mittels der Diffusionskoeffizienten wurde festgestellt, dass nahezu 100% der Epoxidharzbestandteile bereits bei der Sterilisation in das Lebensmittel migrieren und während der Lagerung nahezu keine Migration mehr erfolgt.

Während bei Kunststoffen, für die die Diffusionsmodelle entwickelt wurden, sowohl der Diffusionskoeffizient als auch der Verteilungskoeffizient eine wesentliche Rolle spielt, ist der Einfluss des Diffusionskoeffizienten bei Beschichtungen, die wie im vorliegenden Fall nur eine Dicke von 6 µm besitzen von untergeordneter Bedeutung. Der Einfluss des Verteilungskoeffizienten zwischen der Polymerschicht und dem Lebensmittel bzw. Simulanz überwiegt vollständig. Der Nutzen von Diffusionsmodellen ist somit bei den Beschichtungen im Gegensatz zu Kunststoffen die eine größere Dicke besitzen als gering einzustufen.

8.5 Konsequenzen für die Praxis

Es stehen eine Reihe von routinetauglichen Methoden zur Untersuchung von Lebensmittelverpackungen zur Verfügung. Mit diesen Methoden ist es möglich die Grenzwerte für die zur Herstellung zugelassenen Monomere wirkungsvoll zu überwachen.

Während noch vor knapp 10 Jahren wiederholt über Grenzwertüberschreitungen bei BADGE und seinen Derivaten berichtet wurde, sind in der jüngeren Vergangenheit diesbezügliche

Überschreitungen die Ausnahme. Bei den Isocyanaten und PAA sind in der Literatur, trotz teilweise umfangreicher Untersuchungen, keine Grenzwertüberschreitungen bei Lebensmittelverpackungen beschrieben. Es wird vielmehr angegeben, dass die ermittelten Konzentration, wie auch im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, weit unter den Grenzwerten liegen (BRAUER und FUNKE, 2002, ELLENDT et al., 2003).

In die Betrachtungen der Überwachung wurden bisher nur die Monomere für die Herstellung von Bedarfsgegenständen einbezogen, da lediglich hierfür Grenzwerte existieren. Da jedoch die Monomere i.d.R. weitestgehend abreagiert haben, bzw. vor allem bei der Herstellung von Laminaten fast nur noch Prepolymere eingesetzt werden, müssen auch kleinere Oligomere mit einem Molekulargewicht <1000 Da in die Betrachtungen mit einbezogen werden. Hier wäre denkbar, dass die Oligomere mit einem Molekulargewicht <1000 Da sowohl bei BADGE, berechnet als BADGE-Equivalente, als auch bei Isocyanaten, berechnet als NCO, mit in einen Summengrenzwert einbezogen werden.

Bei der Herstellung von Verpackungen finden Polymerisationsreaktionen statt, die von den Herstellungsbedingungen abhängig sind. Dies führt dazu, dass während der Aushärtung noch nach Tagen bis Wochen Veränderungen im Spektrum der migrierenden Substanzen stattfinden. Da nach Kontakt mit Lebensmitteln wiederum weitere Reaktionen erfolgen können, ist der Zeitpunkt an dem eine Verpackung im Rahmen der Überwachung untersucht werden sollte, der Zeitpunkt ab dem die Verpackung zum Verpacken von Lebensmitteln eingesetzt werden kann. Nur so kann sichergestellt werden, dass Verpackungen bei Kontakt mit Lebensmitteln den gesetzlichen Anforderungen entsprechen.

Ein völlig neues Gebiet wird die Überwachung voraussichtlich in der Zukunft beschäftigen. Nachdem toxische Effekte bei handelsüblichen Verpackungen in ersten Untersuchungen nachweisbar waren (s. 6.4.6, MITTELS, 2005), stellt sich die Frage nach der generellen Forderung, dass toxische Stoffe nicht in Konzentrationen auf Lebensmittel übergehen dürfen, die geeignet sind, die menschliche Gesundheit zu schädigen. Bisher liegen keine Erkenntnisse vor, ob die bisherigen Ergebnisse nur die Spitze des Eisberges oder Einzelfälle sind und ob sie sich auch in vivo bestätigen lassen. Es wird jedoch notwendig sein, geeignete standardisierte Verfahren zu etablieren, mit denen auch eine Verpackung für Lebensmittel als Gesamtheit, zumindest hinsichtlich des Übergangs toxischer Stoffe, untersucht werden kann.

9 Zusammenfassung

9.1 Deutsche Version

Zur Herstellung von Lebensmittelkonserven werden Kunststoffbeschichtungen eingesetzt. Diese werden entweder in Form eines Lackes oder als Folie durch Kaschieren auf eine Metallfolie aufgebracht. Bei der Herstellung und Lagerung können Bestandteile aus der Beschichtung in das verpackte Lebensmittel übergehen. Die Bestandteile mit einem Molekulargewicht <1000 Da können vom Gastrointestinaltrakt resorbiert werden und möglicherweise toxische Effekte im menschlichen Körper auslösen.

Bei der Herstellung kommen Stoffe zum Einsatz, die als Monomere teilweise hochtoxisch sind, wie z.B. Isocyanate und bei der Lagerung können weitere ebenfalls hochtoxische Stoffe wie die primären aromatischen Amine entstehen. Als Ausgangskomponenten für die Herstellung werden überwiegend Prepolymere verwendet, die jedoch noch Restmonomere enthalten können. Alle Stoffe, die bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen verwendet werden dürfen, unterliegen einem Grenzwert für das Globalmigrat. Spezifische Grenzwerte für die Migration aus der Verpackung in Lebensmittel existieren nur Monomere und wenige Dimere. Eine Unterscheidung zwischen resorbierbaren und nicht resorbierbaren Substanzen findet im Rahmen der gesetzlichen Regelungen derzeit nicht statt, so dass resorbierbare Prepolymere, die möglicherweise ebenso toxisch wie die zugrunde liegenden Monomere sein können, nur im Grenzwert für das Globalmigrat erfasst werden.

Zur Überwachung der Isocyanate wurde ein routinetaugliches Verfahren entwickelt, mit dem nicht nur die im Summengrenzwert für Isocyanate vertretenen Monomere überwacht, sondern auch nicht zugelassene Isocyanate identifiziert und oligomere Isocyanate mit in einen Summengrenzwert einbezogen werden können. Bei ausreichender Konzentration der Oligomeren, bzw. bei Verwendung modernster massenselektiver Detektoren besteht zudem durch die Nutzung des zweiten Derivatisierungsreagenzes, die Möglichkeit der Identifizierung der Oligomeren.

Durch Untersuchungen an Rohstoffen und Laminaten, die für die Herstellung von Aluminiumleichtmetallbehältern verwendet werden, sowie kinetische Untersuchungen zur Aushärtung der Lamine, konnten wertvolle Informationen hinsichtlich der Zusammensetzung und Veränderung der migrierenden Substanzen gewonnen werden. Diese lassen sich bei Untersuchungen an fertigen Lebensmittelverpackungen anwenden.

In umfangreichen Untersuchungen wurden erstmalig an verschiedenen Typen von handelsüblichen Lebensmittelverpackungen in der Literatur beschriebene Verfahren sowie die o.a. Methode zur Bestimmung der Isocyanate auf ihre Praxis-tauglichkeit getestet. Zudem wurden erstmalig Lebensmittelverpackungen einem toxikologischen Screening mit biologischen Verfahren unterzogen. Insgesamt konnte hierbei ein wesentlicher Beitrag zur Bilanzierung des

Gesamtmigriertes und zum Vorhandensein toxikologisch relevanter Substanzen geleistet werden.

Die Tatsache, dass toxikologisch relevante Monomere nicht nachweisbar sind, lässt keinen Rückschluss darauf zu, dass durch migrierende Substanzen aus einem Verpackungsmaterial nicht doch toxische Effekte hervorgerufen werden können. So waren erstmalig toxische Effekte, die von migrierenden Substanzen aus Aluminiumleichtmetallbehältern ausgehen, nachweisbar. Toxikologisch relevante Monomere waren hingegen nicht nachweisbar. Bei den toxischen Effekten ist davon auszugehen, dass es sich um zytostatische Effekte handelt, da in den Testverfahren auf Mutagenität und direkte Zytotoxizität keine Effekte nachweisbar waren. Die toxischen Effekte konnten im Rahmen einer Fraktionierung der positiv getesteten Migrante nicht auf eine Fraktion oder sogar eine definierte Substanz eingeschränkt werden. Die toxischen Effekte waren in allen 3 Fraktionen nachweisbar.

Wissenschaftlich belegte Diffusionsmodelle können verwendet werden, um die Einhaltung spezifischer Migrationswerte zu belegen. Während Diffusionsmodelle bei Kunststoffverpackungen von Vorteil sein können, wurde bei der Prüfung auf Anwendbarkeit auf Kunststoffbeschichtungen festgestellt, dass aufgrund der geringeren Schichtdicke der Kunststoffbeschichtungen, im Gegensatz zu Kunststoffen, lediglich der Verteilungskoeffizient und nicht der Diffusionskoeffizient von Bedeutung ist.

Obwohl geeignete Methoden für ein Screening auf toxikologisch relevante Substanzen zur Verfügung stehen und ein bedeutender Anteil der toxikologisch relevanten und weiterer migrierender Substanzen aus Lebensmittelkonserven identifiziert werden konnte, bleibt auch nach Abschluss dieser Arbeit ein Teil der migrierenden Substanzen unaufgeklärt. Zudem bedürfen die nachgewiesenen toxischen Effekte weiterer Untersuchungen.

9.2 Englische Version

As a standard procedure plastic coatings are used for the manufacturing of food cans. They were applied either in the form of lacquers or as a foil by lamination to a metal foil. During manufacturing and storage components are able to migrate from the coating into the packed food. The components with a molecular weight below 1000 Da might be absorbed in the gastrointestinal tract and potentially cause toxicological effects in the human body.

During the manufacturing process substances are used which are as monomers partially very toxic such as isocyanates. In addition very toxic substances like primary aromatic amines can develop in the storage period. As starting substances for manufacturing mostly prepolymers are used, which could contain residual monomers. All substances, that are allowed to be used for manufacturing of food packaging, are subject to a limit for global migrate. Specific limits for migration from packaging into food exist only for monomers and a few dimers. Currently there is

no difference between absorbable and non absorbable substances by legal regulations, so that absorbable prepolymers which potentially could be as toxic as the monomers they are based on, are only regulated by the limit for the global migrate.

For surveillance of isocyanates a suitable method for the routine was developed. It can be taken not only to control the maximum permitted quantity of isocyanate monomers but also for identification of not permitted isocyanates and for inclusion of oligomeric isocyanates into the maximum permitted quantity. Furthermore there is the possibility to identify the oligomers by applying the second derivatisation reagent in case the concentration of the oligomers is sufficient respectively the latest mass selective detectors are used.

The analysis of raw materials and laminates, which are used for manufacturing of aluminium light weight containers, as well as the kinetic investigations of the laminate curing both provided valuable information with respect to the composition and variation of migrating substances. These results could be used to analyse fabricated food packaging materials.

For the first time literature based procedures as well as the above-mentioned method for determination of isocyanates were tested in extensive investigations for their use in practice with different types of commercially available food packages. In addition it was the first time that food packages were analysed by a toxicological screening with biological methods. Altogether an important contribution for the balance of total migrate and the existence of toxicological relevant substances could be achieved.

The fact that toxicologically relevant monomers are not detectable allows no conclusion that toxicological effects couldn't be caused by migrating substances from packaging materials. For the first time toxicological effects, caused by migrating substances from aluminium light weight containers, were detectable. However toxicologically relevant monomers were not detectable. The toxicological effects are assumed to be cytostatic effects, because no effects were detected when testing for mutagenicity and cytotoxicity. The toxic effects couldn't be reduced down to one fraction or even one defined substance by fractionising the positive tested migrates. The toxic effects were detectable in all of the 3 fractions.

Scientifically proven diffusion models can be used to ensure the compliance with the specific migration limits. While diffusion models could be advantageous for plastic packages, the examination of applicability for plastic coatings showed that only the distribution coefficient and not the diffusion coefficient is of relevance, because of the lower layer thickness compared to plastics.

Even though applicable methods for a screening of toxicological relevant substances are available and a major part of the toxicologically relevant and other migrating substances from preserves for food could be identified, some of the migrating substances still remain unknown after this work. Moreover the toxic effects require further examination.

10 Experimenteller Teil

10.1 Geräte und allgemeine Methoden

10.1.1 Geräte

10.1.1.1 HPLC

Für die massenselektive Detektion stand ein Komplettsystem der Serie HP-1100 (Hewlett Packard), bestehend aus Degasser (G 1322 A), Autosampler (G 1313 A), binärer Pumpe (G 1312 A), Säulenofen (G 1316 A), Photodiodenarray-Detektor (G 1315 A) sowie massenselektivem Detektor (G 1946 A), zur Verfügung. Als Auswertesystem wurde die Chemstation Rev. A.08.03 der Firma Agilent Technologies verwendet.

Für die Größenausschlusschromatographie mit Lichtstreuungsdetektion (SEC-ELSD) stand ein Komplettsystem der Serie HP-1100 (Hewlett Packard), bestehend aus Degasser (G 1322 A), Autosampler (G 1313 A), binärer Pumpe (G 1312 A), Säulenofen (G 1316 A), UV-Detektor (G 1314 A) kombiniert mit einem ELSD (Sedex 75) der Firma Sedere zur Verfügung. Als Auswertesystem wurde die Chemstation Rev. A.08.03 der Firma Agilent Technologies verwendet.

Für die Chromatographie mit Fluoreszenzdetektion wurden folgende Systeme eingesetzt: System wie für Massenselektive Detektion, jedoch mit Fluoreszenzdetektor (G1321A).

Oder das folgende heterogene System:

Degasser: Uniflows Degasys DG-1310

Autosampler: Merck-Hitachi, 655A-40

Pumpe: Merck- Hitachi, Typ L-6200 A Intelligent Pump

Säulenofen: Merck, Typ T-6300 Column Thermostat

Fluoreszenzdetektor: Merck-Hitachi, Typ F-1080 Fluorescence Detector

Auswertesystem: Bio-Tek Kontron Instruments, KromaSystem 2000 und 3000

10.1.1.2 UV-Spektroskopie:

Photometer PerkinLamda 7 UV/VIS-Spektrometer

10.1.1.3 IR-Spektroskopie:

Nicolet FT-IR Spektrometer 5 DXC (Wellenzahlbereich $600-4000\text{ cm}^{-1}$) mit ATR-Einheit Sensir Technologie (Part. Number 071-1503)

Auswertesystem: Omnic ESP-Software der Firma Dicomp

10.1.1.4 GC-FID-Anlage

Shimadzu Gas Chromatograph – 8 A mit FID

10.1.1.5 Weitere Geräte

Laborschüttler:	Edmund Bühler, Swip KL-2
Ultraschallbad:	Elma, Transsonic digital, Degas
Vakuumrotationsverdampfer:	Heidolph, VV 2000
Vortexer:	Bender & Hobein, Vortex Genie 2™
pH-Meter:	WTW, DIGI 520
pH-Elektrode:	Schott, Blueline 11 pH und Elektrolyt L300
Migrationszellen:	NATEC, nach DIN EN 13130-1 (2004),
Analysenwaage:	Satorius, Fehlergrenze 0.05 mg
Autoklav:	SANOclav, TKL-MCS-123
Destillationsapparatur:	Electrothermal, Cat.No.MY 6406
Vakuumtrockenschrank:	Heraeus

10.2 Chemikalien

10.2.1 Substanzen

Sämtliche Substanzen der Firmen Acros, Aldrich, Biosolve, Chemos, Fluka, Lancaster, Linde, Merck und Riedel wurden in Analyse- bzw. Synthesqualität erworben. Bei den Substanzen der Firma Bayer handelt es sich z.T. um technische Qualität.

Tab. 26 Liste der verwendeten Gefahrstoffe

Substanz	Hersteller	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
1-(2-Methoxyphenyl)-piperazin	Aldrich	C	34	26-36/37/39-45
1-(2-Pyridyl)-piperazin	Aldrich	Xi	36/37/38	26-36
1,1,1-Trimethylolpropan	Merck	-	-	-
1,2-Butandiol	Merck	-	-	-
1,3- Phenylendiisocyanat	Aldrich	Xn	20/21/22-36/37/38-42	22-26-36/37
1,3-Butandiol	Merck	-	-	-
1,4- Phenylendiisocyanat	Aldrich	Xn	20/21/22-36/37/38-42	22-26-36/37
1,4-Bis(hydroxymethyl)-cyclohexan	Merck	-	-	-
1,4-Butandiol	Merck	Xn	22	-
1,4-Dioxan	Merck	F, Xn	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46
1,6-Hexandiol	Merck	-	-	-
1-Propanol	Merck	F, Xi	11-41-67	7-16-24-26-39
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentandiol	Fluka	Xi	36/37/38	26-37/39
2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-propan, Bisphenol A	Merck	Xn	37-41-43-62	26-36/37/39-46
2,2-Diethyl-1,3-propandiol	Merck	Xn	22-36	26
2,2-Dimethyl-1,3-propandiol	Merck	Xi	36/37/38	26-36

2,3-Butandiol	Merck	-	-	-
2,4'-4,4'-Diphenylmethandiisocyanat-Mix mit 48 % 2,4'-MDI	Bayer	Xn	20-36/37/38-42/43	23.5-36/37-45
2,4-2,6-Toluoldiisocyanat-Mix mit 79,7 % 2,4-TDI	Bayer	T+	26-36/37/38-42/43-52/53	23-36/37-45-61
2-Methyl-1,4-propandiol	Fluka	-	-	-
2-Propanol	Merck	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
3-Amino-7-Dimethylamino-2-Methylphenazin-HCl	Aldrich	-	-	-
9-(Methylaminomethyl)-anthracen	Aldrich	Xi	36/37/38	26-36
Acetonitril	Acros	Xn, F,	11-20/21/22-36	16-36/37
Acrylsäure, zur Synthese	Merck	C, N	10-20/21/22-35-50	26-36/37/39-45-61
Adipinsäure	Merck	Xi	36	-
Ameisensäure	Merck	C	35	23-26-45
Ammoniak, 25%, Suprapur ®	Merck	T, N	10-23-34-50	9-16-26-36/37/39-45-61
Anilinhydrochlorid	Merck	T, N	23/24/25-40-41-43-48-23/24/25-68-50	26-27-36/37/39-45-46-61-63
BADGE	Fluka	Xi	36/38-43	28-37/39
BADGE·1H ₂ O	Fluka	Xi	36/38-43	28-37/39
BADGE·2H ₂ O	Fluka	Xi	36/37/38	26-36
BADGE·2HCl	Fluka	Xi	36/37/38	26-36
BADGE·H ₂ O·HCl	Fluka	Xi	36/38-43	28-37/39
BADGE·HCl	Fluka	Xi	36/38-43	26-28-37/39
Benzoessäure	Merck	Xn	22-36	26
Cholesterol	Merck	-	-	-
Cholesterolester	Merck	-	-	-
Cholesterolpalmitat	Acros	-	-	-
Cyclohexylisocyanat	Fluka	T+	10-21/22-26-36/37/38-42	26-28-36/37-45
Dibutylamin	Aldrich	T	10-20/21/22	-
Dichlormethan	Biosolve	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylamin	Merck	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Diethylenglycol	Merck	Xn	22	46
Dimethylformamid	Merck	T	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	Merck	-	-	-
Dipropylamin	Merck	F, C	11-20/21/22-35	16-26-36/37/39-45
Eisessig, zur Analyse	Merck	C	10-35	23.2-26-45
Erucasäureamid	Fluka	-	-	-
Essigsäureanhydrid	Merck	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Ethanol, 99,8%ig, zur Analyse	Merck	F	11	7-16
Ethylenglycol	Merck	Xn	22	-
Glyceroltripalmitat	Fluka	-	-	-
Glycerol-1,2-palmitat	Fluka	-	-	-
Glycerol-1,3-palmitat	Fluka	-	-	-
Glycerolmonopalmitat	Fluka	-	-	-
Hexadecanol	Aldrich	Xi	35	-

Hexadekanpalmitat	Acros	-	-	-
Hexamethylendiisocyanat	Fluka	T	23-36/37/38-42/43	26-28-38-45
Isooktan	Merck	F, Xn, N	11-38-50/53-65-67	9-16-29-33-60-61-62
Isophorondiisocyanat	Bayer	T, N	23-36/37/38-42/43-51/53	26-28-38-45-61
Isophthalsäure	Merck	-	-	-
Maleinsäure	Merck	Xn	22-36/37/38	26-28-37
Methanol HPLC gradient grade	Merck	T, F	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
m-Xyloldiisocyanat	Chemos	T+	26-36/37/38-42/43-52/53	23-36/37-45-61
N-(4-Nitrophenyl)-piperazin	Aldrich	Xn	22	24/25-28-36/37/39
Naphtylisocyanat	Aldrich	Xn	20/21/22-36/37/38	26-27-36/37/38
Natriumhydroxid	Merck	C	35	26-36/37/39-45
Natriumnitrit	Merck	O, T, N	8-25-50	45-61
Paraffin	Riedel	-	-	-
Phenylisocyanat	Fluka	T+	10-22-26-34-42-52	16-26-28-36/37/39-45
Phosphorsäure, 85 %	Merck	C	34	26-45
Phthalsäure	Merck	Xi	36/37/38	26-36
Pyromellithsäure, zur Synthese	Merck	Xi	36/37/38	26-36
Salzsäure, 32%	Merck	C	34-37	26-36/37/39-45
Stearinsäure	Merck	-	-	-
Stickstoff	Linde	-	-	-
Terephthalsäure	Merck	-	-	-
Tetrahydrofuran, reinst	Merck	F, Xi	11-19-36/37	16-29-33
Toluol	Merck	Xn, F	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62
trans-1,4-Cyclohexandiisocyanat	Aldrich	T	23/24/25-34-42/43	22-26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	Merck	C	20-35-52/53	26-36/37/39-45-61
Trimellithsäure	Merck	-	-	-
Tryptamin	Merck	-	-	-

10.2.2 Lösungen

HPLC-Eluent 0,1 mM NH₄-formiat, pH 6:

100 mL Ammoniaklösung 10 M werden mit 300 mL Wasser versetzt und nach Einstellung des pH-Wertes mit konzentrierter Ameisensäure auf pH 6 mit Wasser aufgefüllt.

Herstellung der Lösungen für die Positivkontrollen AM 11

Auf die Platten werden jeweils 20 µl folgender Stammlösungen gegeben:

2-Aminoanthracen: 5 mg in 100 mL DMSO (1 µg/Platte)

Natriumazid: 1 mg in 20 mL DMSO (1 µg/Platte)

2-Nitrofluoren: 2 mg in 20 mL DMSO (2 µg/Platte)

10.3 Allgemeine Methoden (AM):

AM 1 Gravimetrische Bestimmung des Gesamtmigrates nach DIN EN 13130-1 (2004)

Bei dieser Methode handelt es sich um die derzeitige Referenzmethode zur Bestimmung des Gesamtmigrates.

Diese DIN EN-Methode ist für die Bestimmung des Gesamtmigrates in Kunststoffbeschichtungen vorgesehen, während die zu Anfang der Untersuchungen zur Verfügung stehenden Vornormen der Serie DIN ENV 1186-1 bis 14 nur zur Anwendung bei Kunststoffen und nicht bei Coatings bestimmt sind.

Die Migration in 95% Ethanol für 4 Stunden bei 60°C wurde in genormten Migrationszellen durchgeführt. Nach einer Trocknung bei 40-50°C und 90 mbar erfolgt die Wägung. Bei den Lebensmitteln wurde zudem eine Migration in Acetonitril (24 Std. bei Raumtemperatur) und in Isooktan (2 Std. bei 60°C) durchgeführt.

AM 2 Bestimmung des Gesamtmigrats, des Anteils <1000 Da und des mittleren Molekulargewichtes mittels SEC-ELSD nach SCHÄFER et al. (2004c)

Gesamtmigrat: Die Migration wurde in genormten Migrationszellen durchgeführt. Zur Anwendung kamen: 95% Ethanol für 4 Stunden bei 60°C, Acetonitril für 24 Stunden bei Raumtemperatur und Isooktan für 2 Stunden bei 60°C. Nach einer Trocknung bei 40-50°C und 90 mbar erfolgt die Wägung.

Es folgt eine Aufkonzentrierung um den Faktor 5 durch Trocknung im Stickstoffstrom und Umlösen in Dioxan. Abweichend hiervon erfolgt bei der Bestimmung des Gesamtmigrates im Rahmen der Kinetik eine Aufkonzentrierung um den Faktor 20.

Da bei den Klebstoffkomponenten keine vorgeschaltete Migration notwendig ist, erfolgt die Aufarbeitung für die Bestimmung des Anteils <1000 Da nach folgender Vorgehensweise:

Ca. 1 g Polyester- bzw. Polyolkomponente werden in 5mL THF gelöst und 50 µl ad 10 mL verdünnt.

Ca. 1 g Isocyanatkomponente werden in 5 mL THF gelöst, 100 µL mit 0,5 g DEA derivatisiert und ad 20 mL mit THF verdünnt. Die Reaktionszeit beträgt 30 Minuten. 0,5 mL der Lösung werden im Stickstoffstrom getrocknet und in 0,5 mL THF aufgenommen.

Tab. 27 Chromatographische Bedingungen zu AM 2

Chromatographisches Verfahren	SEC-ELSD
Stationäre Phase	Säule 1: SDV [®] , 100 5C 300x8 Säule 2: SDV [®] , 1000 5C 300x8
Mobile Phase	isokratisch <u>Eluent für Gesamtmigrat:</u> 100 % Dioxan <u>Eluent für Molekulargewichtsbestimmung:</u> 100 % THF
Flussrate	1,0 mL/min
Temperatur im Säulenofen	50 °C
Photometrische Detektion	UVD: 275 nm

Lichtstreuendetektion

	Gesamtmigrat	Molekulargewichtsbestimmung
Verneblerdruck:	0,8 bar	2 bar
Verdampfertemperatur:	45 °C	45 °C
Verneblerkammertemperatur:	30 °C	25 °C

Zur Bestimmung des Molekulargewichts und des Anteils <1000 Da wird eine Molekulargewichtskalibrierung für jeden Bindertyp durchgeführt. Die Retentionszeit für die 1000 Da-Grenze lässt sich dann rechnerisch ermitteln. Die Retentionszeit für die 1000 Da-Grenze muss arbeitstäglich überprüft und ggf. neu bestimmt werden, da sie Schwankungen unterliegt. Je nach Bindertyp werden folgende Standards verwendet:

Polystyrolstandard: handelsüblicher Standard der Firma PSS mit den Massen: 67000 Da, 24000 Da, 9100 Da, 4700 Da, 1900 Da, 578 Da, 474 Da, 370 Da und 266 Da (zu leicht flüchtig für ELSD); genaue Konzentration unbekannt

Epoxid-Standard: Epoxid-Harz GT 7072, Stammlösung: 140,27 mg/10mL in THF

Standardlösung: Stammlösung 1:50 verdünnt ($\beta = 0,28$ g/L)

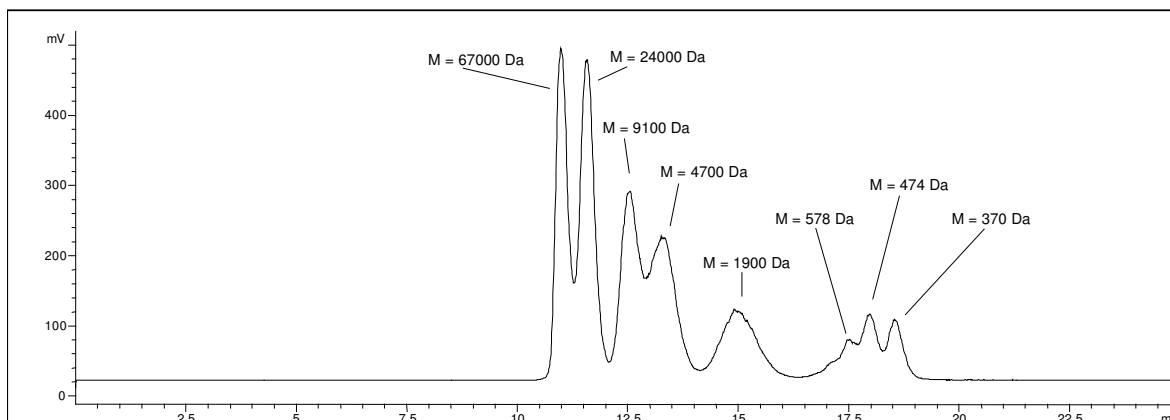


Abb. 64 Polystyrolstandard: SEC-ELSD-Chromatogramm chromatographische Bedingungen s. Tab. 27

AM 3 Identifizierung von Carbonsäuren mittels HPLC-DAD/MSD nach SCHÄFER et al. (2004b)

Zur Bestimmung der freien Carbonsäuren erfolgt die Migration in 10 % Ethanol für 1 Stunde bei 121 °C. Die Lösung wird nach Membranfiltration direkt vermessen.

Da bei den Klebstoffkomponenten keine vorgeschaltete Migration notwendig ist, erfolgt die Aufarbeitung für die Bestimmung der freien Carbonsäuren nach folgender Vorgehensweise:

- Ca. 1 g Polyester- bzw. Polyolkomponente (KAS-1B, KAS-2A, KAS-5/6A, KAS-7HK) werden in 5mL THF gelöst und 50 µl der Lösung ad 10 mL in THF verdünnt.

- b) Ca. 1 g Isocyanatkomponente (KAS-1A, KAS-3A, KAS-4A) werden in 5 mL THF gelöst. 100 µL der Lösung mit 0,5 g DEA derivatisiert und ad 20 mL mit THF aufgefüllt. Die Reaktionszeit beträgt 30 Minuten. Zur Entfernung von überschüssigen Derivatisierungsreagenz werden 0,5 mL der Lösung im Stickstoffstrom getrocknet und in 0,5 mL THF wieder aufgenommen.

Die Hydrolyse erfolgt, in dem 0,2 mL a) bzw. 0,25-0,4 mL b) im Stickstoffstrom getrocknet, anschließend in 2mL Ethanol/2-N NaOH (v/v) gelöst werden, die Lösung 2 Stunden bei 103-105°C hydrolysiert und das Ethanol verdampft wird. Es wird mit Phosphorsäure 85% angesäuert (pH 2-3).

Tab. 28 Chromatographische Bedingungen zu AM 3

Chromatographisches Verfahren	HPLC-DAD / HPLC-MSD		
Stationäre Phase	Phenomenex® Aqua 125 5C18 250x3		
Mobile Phase	Binärer Gradient mit Acetonitril-Methanol-Vormischung		
	<u>Eluent A:</u> 5 mM NH ₄ -formiat in Wasser (pH 3,9)		
	<u>Eluent B:</u> Acetonitril		
Gradient	0 min:	95 % Eluent A	
	5 min:	95 % Eluent A	
	30 min:	60 % Eluent A	
	40 min:	60 % Eluent A	
	41 min:	95 % Eluent A	
	50 min :	95 % Eluent A	
Flussrate	0,5 mL/min		
Temperatur im Säulenofen	30 °C		
Diodenarraydetektion	Wellenlänge:	Detektierte Säuren	
	210 nm	ACA, TMA, PA, IPA	
	220 nm	PMA	
	230 nm	BA	
	240 nm	TPA	
Massenselektive Detektion	APCI, negative Ionisierung		
	Fragmentorspannung:	40 V*	
	SIM-Modus:		
	Zeit	Massen	detektierte Säuren
	3,0 – 5,5 min	115 / 235 / 253	PMA, MA
	5,5 – 7,0 min	71 / 117	ACA
	7,0 – 11,5 min	191 / 209	TMA
	11,5 – 20,0 min	145 / 146 / 148 / 165 / 211	ADA, TPA, IPA, PA
	20,0 – 30,0 min	121 / 167	BA
	Trocknungsgas:	5 L·min ⁻¹ / 300 °C	
	Verdampfergastemperatur:	500 °C	
	Verneblerdruck:	40 psig	
	Kapillarspannung:	2000 V	
	Stromstärke Koronanadel:	55 µA	

In Abweichung zu der Methode nach SCHÄFER et al. (2004b) wird eine Fragmentorspannung von 40V statt 60V verwendet und die Detektion der Carbonsäuren erfolgt bei den spezifischen DAD-Wellenlängen an Stelle der Wellenlänge von 232nm.

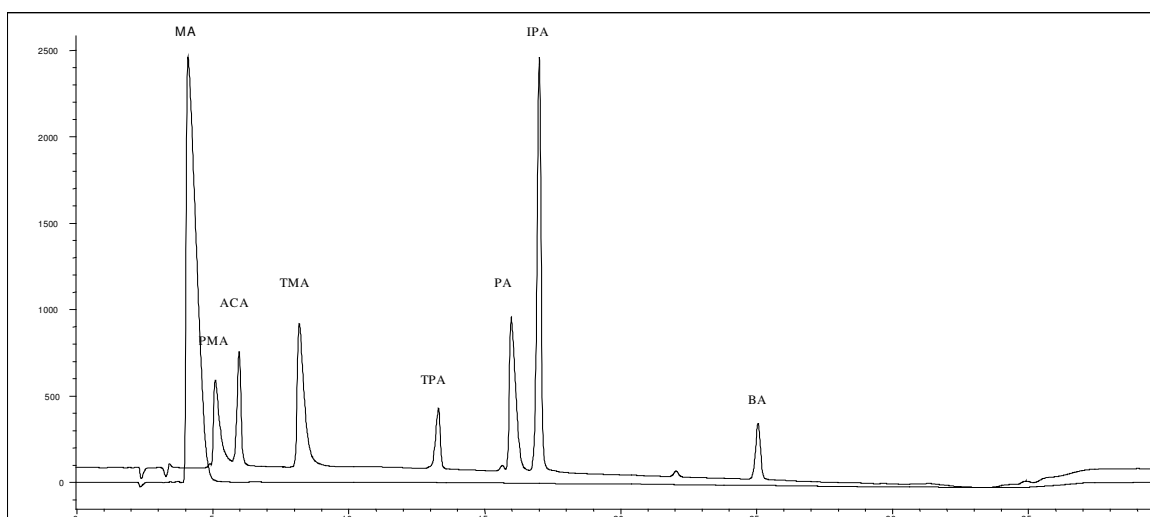


Abb. 65 Overlay: Carbonsäure-Mischstandard und Maleinsäurestandards
HPLC-DAD, $\lambda = 210$ nm, chromatographische Bedingungen s. Tab. 28

AM 4 Identifizierung von Polyolen mittels GC-FID nach SCHÄFER et al. (2004b)

Es wird ein 0,2 %iger Mischstandard mit EG, 1,3-PD, 1,3-BD, MPD, NPG, HD, TMPD und CHDM verwendet.

Zur Absicherung hinsichtlich anderer Polyole und Isomerer wurden außerdem 0,2 %-ige Standards von TMP, DEG, 1,2-PD, 1,2-BD, 1,4-BD und 2,3-BD benutzt.

Zur Hydrolyse werden ca. 1 g Polyester- bzw. Polyolkomponente in 5 mL THF gelöst und 50 μ L der Lösung ad 10 mL verdünnt. Von der Verdünnung werden 3 mL im Stickstoffstrom getrocknet und mit 2 mL Ethanol und 50 μ L NaOH (0,5 molar) versetzt. Die Hydrolyse erfolgt bei 60 °C für 1 Stunde. Nach dem Abkühlen werden 500 μ L mit dem aktivierten Kationenaustauscher DOWEX 50 W gevortext, zu 2/3 eingedampft und nach Membranfiltration zur Chromatographie eingesetzt.

Tab. 29 Chromatographische Bedingungen zu AM 4

Chromatographisches Verfahren	GC-FID
Stationäre Phase	Kapillarsäule, Plot Fused Silica, CP-Pora-Plot Q-HT 12,5mx0,32mm, Filmdicke: 10 μ m
Trägergas	N ₂
Brenngas	H ₂ / Druckluft
Temperaturprogramm	160 °C – 270 °C, 6 °C/min
Injektortemperatur	280 °C
Split	1 : 10
Detektortemperatur	280 °C

AM 5 Screening auf niedermolekulare Polyester mittels HPLC-DAD/MSD nach SCHÄFER et al. (2004b)

Die Migration aus den Verpackungen erfolgt in genormten Migrationszellen im Ersatzlösemittel Ethanol 95% für 1 Stunde bei 121 °C.

Bei den Klebstoffkomponenten werden ca. 10 g/L Acetonitril gelöst. Es wird eine 1:1-Verdünnung (v/v) der Lösung mit Wasser hergestellt und nach Membranfiltration zur Chromatographie verwendet.

Bei den Laminaten vor und nach Härtung wird je 1 dm² Laminat in 10 Streifen geschnitten und durch Schütteln über Nacht mit 50 mL Acetonitril extrahiert. Es werden je 6 mL der Extrakte der Lamine A und C, 7 mL der Extrakte von D und E und 4 mL des Extraktes von Laminat B im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt, in Acetonitril / Wasser (40/60 v/v) aufgenommen und nach Membranfiltration zur Chromatographie verwendet.

Tab. 30 Chromatographische Bedingungen zu AM 5

Chromatographisches Verfahren	HPLC-DAD / HPLC-MSD	
Stationäre Phase	Multospher [®] 120 5C18 250x3	
Mobile Phase	Binärer Gradient mit Acetonitril-Methanol-Vormischung	
	<u>Eluent A:</u> 1 mM NH ₄ -formiat in Wasser (pH 3)	
	<u>Eluent B:</u> Acetonitril	
Gradient	0 min:	60 % Eluent A*
	55 min:	5 % Eluent A
	70 min:	5 % Eluent A
	71 min:	60 % Eluent A
	80 min:	60 % Eluent A
Flussrate	0,5 mL/min	
Temperatur im Säulenofen	30 °C	
Diodenarraydetektion	Wellenlänge:	210 nm, 220 nm, 275 nm
Massenselektive Detektion	Elektrospray-Ionisation, positive Ionisierung	
	Fragmentorspannung:	80 V*
	Scan-Modus:	m/z 80 – m/z 1000
	Trocknungsgas:	12 L·min ⁻¹ / 350 °C
	Verneblerdruck:	60 psig
	Kapillarspannung:	3500 V

*Die chromatographischen Bedingungen wurden wegen einer hohen Anzahl an Substanzen im polaren Bereich (vgl. Abb. 66) auf 60/40 (v/v) gegenüber 50/50 (v/v) in der Methode nach SCHÄFER et al. (2004b) verändert. Darüber hinaus wurde die Fragmentorspannung von 150 V auf 80 V reduziert, um einen höheren Anteil an unfragmentierten Polyesterbestandteilen zu erhalten.

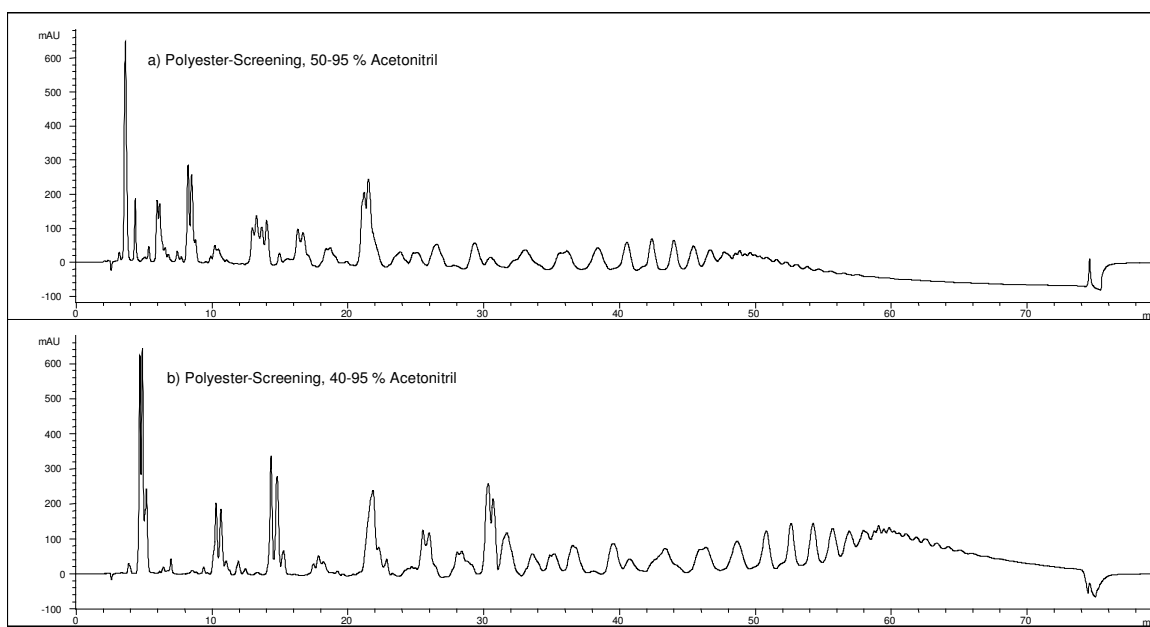


Abb. 66 KAS-1B: Polyester-Screening
HPLC-DAD, $\lambda = 220$ nm, a) Methode nach SCHÄFER et al (2004b), b) modifizierte Methode,
Bedingungen s. Tab. 30

AM 6 Epoxybasierende Verbindungen mit einem Molekulargewicht <1000 Da (PETERSEN et al. 2003, SCHÄFER et al. 2004a)

Die Aufarbeitung der Lebensmittelproben erfolgte nach dem von PETERSEN et al. (2003) beschriebenen Verfahren:

Nach der Zerkleinerung und Homogenisierung werden 10 g Probe mit 0,5 g IS und Celite verrieben und mit Diethylether extrahiert. Nach dem Einengen zur Trockene erfolgt eine erneute Aufnahme in 5 mL Acetonitril. Nach erfolgter Phasentrennung werden 2 mL der oberen Phase über eine mit 2 mL Acetonitril konditionierte RP-18 Säule gegeben. Es folgt ein Spülen der Säule mit 2 mL Acetonitril / Wasser 90/10 (v/v) und ein Auffüllen ad 5mL. Zur Herstellung des internen Standards werden 0,01592 g 2,2-Bis[4[3-hydroxypropoxy]phenyl]-propan in 5 mL Acetonitril gelöst und 0,5 mL dieses Standards ad 100 g mit Sonnenblumenöl aufgefüllt.

Die Extraktion bzw. Migration der Verpackungsmaterialien erfolgt in Ethanol 95% für 4 Stunden bei 60 °C bzw. Acetonitril für 24 Stunden bei Raumtemperatur, soweit nicht im Detail etwas anderes angegeben ist.

Die Chromatographie wird gemäß dem von SCHÄFER et al. (2004a) beschriebenen Verfahren durchgeführt, um zusätzlich zu BADGE und seinen Hydrochlorierungs- und Hydrolyseprodukten auch die weiteren epoxybasierenden Verbindungen mit einem Molekulargewicht <1000 Da bestimmen zu können.

Tab. 31 Chromatographische Bedingungen zu AM 6

Chromatographisches Verfahren	HPLC-FLD / HPLC-MSD	
Stationäre Phase	Multospher® 100 5C18 250x4	
Mobile Phase	Binärer Gradient mit Acetonitril-Methanol-Vormischung	
	<u>Eluent A:</u> 1 mM NH ₄ -formiat in Wasser (pH 3)	
	<u>Eluent B:</u> Acetonitril / Methanol 1:2 (V:V)	
Gradient	0 min:	50 % Eluent A
	50 min:	5 % Eluent A
	75 min:	5 % Eluent A
	76 min:	50 % Eluent A
	85 min:	50 % Eluent A
Flussrate	0,5 mL/min	
Temperatur im Säulenofen	30 °C	
Fluoreszenzdetektion	Anregungswellenlänge (λ_{Ex}):	275 nm
	Emissionswellenlänge (λ_{Em}):	305 nm
Massenselektive Detektion	Elektrospray-Ionisation, positive Ionisierung	
	Fragmentorspannung:	150 V
	Scan-Modus:	m/z 80 – m/z 1000
	Trocknungsgas:	10 L·min ⁻¹ / 350 °C
	Verneblerdruck:	40 psig
	Kapillarspannung:	4000 V

AM 7 Identifizierung von lipophilen Additiven mittels NP-HPLC-ELSD nach SCHÄFER et al. (2003)

Die Materialien wurden über Nacht mit Ethanol 95% bzw. Acetonitril extrahiert und nach Trocknung im Stickstoffstrom in Isooktan umgelöst

Tab. 32 Chromatographische Bedingungen zu AM 7

Chromatographisches Verfahren	HPLC-ELSD	
Stationäre Phase	LiChrospher® Diol, 100 5C 125x3	
	Säule 2: SDV®, 1000 5C 300x8	
Mobile Phase	Binärer Gradient	
	<u>Eluent A:</u> Isooktan	
	<u>Eluent B:</u> tert-Butylmethylether / Essigsäure 99,9/0,1 (v/v)	
Gradient	0 min:	100 % Eluent A
	1,0 min:	100 % Eluent A
	25,0 min:	86 % Eluent A
	35,0 min:	40 % Eluent A
	45,0 min:	40 % Eluent A
	45,1 min :	100 % Eluent A
	58,0 min :	100 % Eluent A
Flussrate	0,5 mL/min	
Temperatur im Säulenofen	25 °C	
Photometrische Detektion	UVD:	210 nm
Lichtstreuungdetektion	Verneblerdruck:	3,5 bar
	Verdampfer Temperatur:	35 °C
	Verneblerkammertemperatur:	20 °C

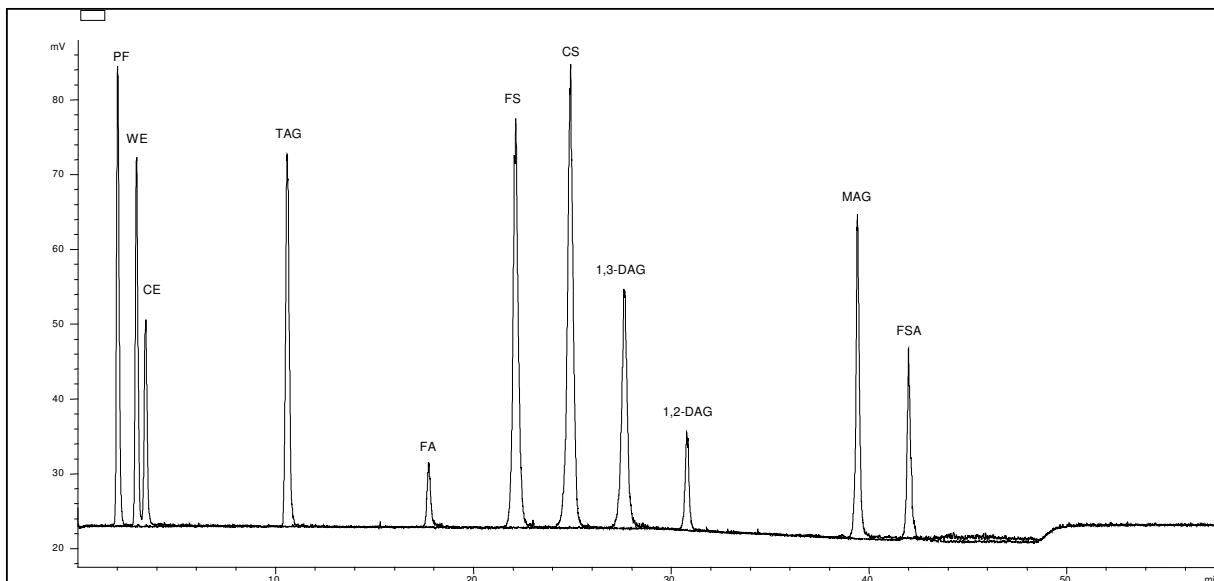


Abb. 67 Lipidstandard: NP-HPLC-ELSD-Chromatogramm
Bedingungen s. Tab. 32, Bezeichnung s. Tab. 33, c = 20 mg/L,

Tab. 33 Lipidklassen

Abkürzung	Lipidklasse	Verwendete Substanz
PF	Paraffin	Flüssiges Paraffin
WE	Wachsester	Hexadekanpalmitat
CE	Cholesterolester	Cholesterolpalmitat
TAG	Triacylglyceride	Glycerin-tripalmitat
FA	Fettalkohole	Hexadecanol
FS	Freie Fettsäuren	Stearinsäure
CS	Cholesterol	Cholesterol
1,3-DAG	1,3-Diacylglyceride	Glycerol-1,3-dipalmitat
1,2-DAG	1,2-Diacylglyceride	Glycerol-1,2-dipalmitat
MAG	Monoacylglyceride	Glycerolmonopalmitat
FSA	Fettsäureamide	Erucasäureamid

AM 8 Bestimmung von primären aromatischen Aminen in wässrigen Prüflebensmitteln (§ 35 00.00-6 LMBG, 1995)

Die Bestimmung erfolgt gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.

Aromatische Amine werden, nach Migration (1 h, 121 °C) in 3 % Essigsäure, in salzsaurer Lösung diazotiert und anschließend mit N-(1-Naphthyl)ethyldiamindihydrochlorid gekuppelt. Der violettfarbene Farbstoff wird nach Anreicherung an einer Festphase (ODS, 1000 mg) photometrisch bei 550 nm, berechnet als Anilin-HCl, bestimmt.

AM 9 Bestimmung des Isocyanatgehaltes in Klebstoffkomponenten mittels Titration (DIN EN ISO 11909, 1998)

Bei der Methode nach DIN EN ISO 11909 (1998) wird eine definierte Menge der zu untersuchenden Komponente in wasserfreiem Toluol gelöst und mit einer Maßlösung von Dibutylamin in Toluol versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten wird der Überschuss an Dibutylamin mit Salzsäure gegen Bromphenolblau zurücktitriert. Um eine Lösung der Säure in Toluol zu ermöglichen wird absolutes Ethanol als Lösungsvermittler vor der Titration zugegeben. Da Wasser durch Nebenreaktionen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führt, muss das benutzte Toluol zuvor über Calciumchlorid getrocknet werden. Zum Schutz vor Luftfeuchtigkeit muss die Reaktion in geschlossenen Gefäßen durchgeführt werden.

Während der Durchführung wurde festgestellt, dass nicht alle untersuchten Kleberkomponenten vollständig in Toluol löslich sind. Da eine unvollständige Löslichkeit die Messwerte verfälscht, wurde die Methode modifiziert.

Um eine bessere Löslichkeit zu erreichen, wurde über ein Molekularsieb getrocknetes Methanol anstatt Toluol verwendet. Ein Versuch mit der Komponente KAS-2 B zeigte jedoch eine noch schlechtere Löslichkeit und einen schwer erkennbaren Umschlagspunkt.

Um ein geeignetes Lösungsmittel zu finden, wurde ein Lösungsversuch der bis dahin vorhandenen Komponenten (KAS-1, KAS-2, KAS-3 und KAS-6) in Toluol, Ethylacetat, Dioxan und THF vorgenommen. Es wurden sowohl die Polyester- als auch die Polyolkomponenten einbezogen, um das optimale Lösungsmittel für weitere Bestimmungen, wie die Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SEC-ELSD), zu ermitteln.

Ethylacetat wurde getestet, da es in den technischen Datenblättern als mögliches Lösungsmittel zur Verdünnung der Komponenten angegeben ist. THF und Dioxan wurden in den Versuch mit einbezogen da sie als mögliche Lösungsmittel für die Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SEC-ELSD in Betracht kommen. Alle vier geprüften Lösungsmittel sind außerdem mit relativ geringem Aufwand zu trocknen.

Tab. 34 Ergebnis des Löslichkeitsversuchs

Substanz	KAS - 1		KAS - 2		KAS - 3		KAS - 6	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Toluol	+	+	+	+	-	-	-	-
Ethylacetat	+	+	+	+	-	-	-	+
Dioxan	+ ¹⁾	+ ¹⁾	+	+	+	+	+	+
THF	+	+	+	+	+	+	+	+

+: löslich

-: unlöslich, bzw. löslich mit Trübung

¹⁾: nur langsam löslich

Wie in Tab. 34 dargestellt ist THF das einzige Lösungsmittel, in dem sich alle acht getesteten Komponenten ohne Einschränkungen lösen. Daher wurde die gesamte Methode auf die

Verwendung von THF als Lösungsmittel umgestellt. Um Wasserfreiheit zu gewährleisten, wird das THF über NaOH-Plättchen mit einer Vigreux-Kolonne frisch destilliert.

Zusätzlich stellte sich heraus, dass neben dem besseren Lösungsvermögen THF den Vorteil hat, dass keine Ethanolzugabe notwendig ist, weil bei Zugabe der Säure keine Phasentrennung auftritt.

AM 10 Bestimmung der Isocyanate mittels HPLC-FLD/MSD

Die Aufarbeitung erfolgt wie in 4.6.3 Abb. 28 angeführt. Die Standardkonzentrationen, Lösungen entsprechen denen in Teil 4 angeführten Bedingungen.

Abweichend hiervon wurden folgende Bedingungen bei den Kaschierkleberkomponenten verwendet, da hier mit größeren Konzentrationen der Proben gearbeitet wurde:

Standardkonzentration: 0,12 - 1,3 mg/L; PP-Reagenz: 2,33 g/L; DEA-Reagenz: 14 g/L; Acetylierungsreagenz: 88 g/L; Interner Standard, NI: 3,08 mg/L.

Probenmengen: 0,06 - 0,1 g Komponente in 4,95 mL Dichlormethan, Verdünnung in Abhängigkeit von dem mittels AM 9 ermitteltem Isocyanatgehalt.

Tab. 35 Chromatographische Bedingungen zu AM 10

Chromatographisches Verfahren	HPLC-FLD / HPLC-MSD	
Stationäre Phase	Multospher® 120 5C18 250x3	
Mobile Phase	Binärer Gradient	
	<u>Eluent A:</u> 1 mM NH ₄ -formiat in Wasser (pH 6)	
	<u>Eluent B:</u> Acetonitril	
Gradient	0 min:	65 % Eluent A
	60 min:	15 % Eluent A
	61 min:	5 % Eluent A
	65 min:	5 % Eluent A
	66 min:	65 % Eluent A
	75 min :	65 % Eluent A
Flussrate	0,5 mL/min	
Temperatur im Säulenofen	30 °C	
Fluoreszenzdetektion	Anregungswellenlänge (λ_{Ex}):	305 nm
	Emissionswellenlänge (λ_{Em}):	370 nm
Diodenarraydetektion	Wellenlängen:	210 nm, 230 nm, 240 nm, 305 nm
Massenselektive Detektion	Elektrospray-Ionisation, positive Ionisierung	
	Fragmentorspannung:	150 V
	Scan-Modus:	m/z 80 – m/z 800 / 120 V m/z 700 – m/z 1500 / 80 V
	SIM-Modus:	m/z 121 / 160 V m/z 164 / 120 V m/z 190 / 120 V
	Trocknungsgas:	12 L·min ⁻¹ / 350°C
	Verneblerdruck:	60 psig
	Kapillarspannung:	3500 V

Der Gradient wurde angepasst (s. 4.5 Tab. 4), um eine verbesserte Trennung der oligomeren Isocyanate zu erhalten

AM 11 Prüfung auf Mutagenität mittels Salmonella - Mikrosomentest (Ames-Test)

Die Substanzen wurden in den Stämmen TA 98 (frame-shift-Variante), TA 100 (Punktmutations-Variante) und TA 1537 (frame-shift-Variante) getestet.

Die Durchführung erfolgte am Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie des Universitätsklinikums Eppendorf gemäß der Standardarbeitsanweisung SAA 10101 der Abteilung für Allgemeine Toxikologie und steht im Einklang mit der OECD-Richtlinie 471 und 472 (1983).

Verwendet wird der sogenannte liquid-test. Hierbei wird die Substanz, die zuvor mit gleichen Teilen Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert wurde, mit den Bakterien sowohl in Gegenwart als auch Abwesenheit eines metabolisch kompetenten Enzymzusatzes (Rattenleber S9-Mix) 30 Minuten lang vorinkubiert und die Bakterien anschließend auf Selektionsagarplatten aufgebracht. Die Überprüfung des Tests erfolgt mittels der in Tab. 36 angeführten Kontrollen.

Tab. 36 Ames Test: Positivkontrollen zur Prüfung des Versuchsmodells und des S9-Mix

	ohne metabolisierendes System	mit metabolisierendem System
TA 98	2-Nitrofluoren 2 µg/Platte	2-Aminoanthracen 1 µg/Platte
TA 100	Natriumazid 1 µg/Platte	2-Aminoanthracen 1 µg/Platte
TA 1537	2-Nitrofluoren 2 µg/Platte	2-Aminoanthracen 1 µg/Platte

AM 12 Prüfung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest

Die Überprüfung auf zytotoxische Wirksamkeit der Testsubstanzen in Säugetierzellen erfolgt mittels des Neutralrottests.

Die Durchführung erfolgte am Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie des Universitätsklinikums Eppendorfs gemäß der Standardarbeitsanweisung SAA 10601 der Abteilung für Allgemeine Toxikologie.

Die Verpackungsmaterialien wurden mit Extraktions- bzw. Simulanzlösemittel extrahiert, das Lösungsmittel eingedampft und der Rückstand in DMSO aufgenommen.

Von den DMSO-Lösungen wurden die jeweiligen Verdünnungen im Zellkulturmedium erzeugt.

Die Extinktionsdifferenz (540-620 nm) der Extrakte von Kontrollzellen (ohne Zusatz) wird mit derjenigen von behandelten Zellen verglichen. Für jede Konzentration der Prüfsubstanz wird das arithmetische Mittel der Extinktionswerte bestimmt. Der Prozentsatz der Überlebensrate der Kontrollzellen wird folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Überlebensrate} = \frac{\text{mittlere Extinktion der behandelten Zellen}}{\text{mittlere Extinktion der Kontrollzellen}} \times 100$$

AM 13 Plating Efficiency

Der „Plating Efficiency“ ist eine Variante des Neutralrottests, bei dem die H4 II E-Zellen nach dem sie abtrypsiniert wurden auf 35 cm²-Kulturflaschen ausgebracht werden und die Kultivierung der Zellen erfolgt im Gegensatz zum Neutralrottest, bei dem Williams Medium E verwendet wurde, mit Dulbeccos-Medium.

Beim „Plating Efficiency“ werden nicht nur direkt toxische Effekte bestimmt, die zu einem unmittelbaren Absterben der Zellen führen, sondern auch zytostatische Effekte, die sich in einer Hemmung der Vermehrung der Zellen bemerkbar machen. Manche Schäden manifestieren sich erst nach Tagen oder nach einigen Zellteilungen.

10.4 Die analytische Erfassung von Isocyanaten**10.4.1 Auswahl der Derivatisierungsreagenzien**

Zur Auswahl eines geeigneten Derivatisierungsreagenzes für die weitere Methodenentwicklung wurde von den in Tab. 37 bis Tab. 40 angeführten Bedingungen ausgegangen.

Tab. 37 Methodenentwicklung: Isocyanat-Standardgemische

Substanz	HDI	2,4-2,6-TDI-Mix	IPDI	2,4'-4,4'-MDI-Mix	NI
Konzentration [mg/L] in NH ₄ -formiat/Acetonitril 60/40 (v/v)					
HPLC-UVD-MSD	11.0	12.0	11.0	12.0	11.0
HPLC-FLD	0.11	0.12	0.11	0.12	0.11

Tab. 38 Methodenentwicklung: erweitertes Isocyanatstandardgemisch

Substanz	trans-1,4-CHDI	1,3-PDI	1,4-PDI	PI	CHI
Konzentration [mg/L] in NH ₄ -formiat/Acetonitril 60/40 (v/v)					
HPLC-UVD	10.0	11.0	11.0	11.0	10,0

Tab. 39 Methodenentwicklung: Derivatisierungslösungen

Derivatisierungsreagenz	MAMA	Tra	Nitro C	MOPP	PP	DBA	DPA	DEA
Konzentration [mg/10 mL Dichlormethan]	54.6	40.3	52.5	49.0	42.0	32.2	25.0	18.2

Die Derivatisierung des Standardgemisches (Tab. 37) erfolgte in dem 1000 µL der Isocyanat-Standardlösung mit 50 µL der jeweiligen Derivatisierungslösungen (Tab. 38) versetzt und für 5 Minuten geschüttelt wurden. Dichlormethan wurde im Stickstoffstrom entfernt. Mit Ausnahme bei den flüchtigen Reagenzien DEA, DPA und DBA wurde eine Acetylierung durchgeführt. Hierzu wurden 100 µL Essigsäureanhydridlösung (1 mL Essigsäureanhydrid / 50 mL Acetonitril) zu den derivatisierten Standards hinzugefügt und die überschüssige Essigsäureanhydridlösung im Stickstoffstrom entfernt. Nach Zugabe von 0,5 mL Lösungsmittelgemisch (HPLC-Eluent A / Acetonitril, 70/30 (v/v) und Membranfiltration wird die Lösung zur Chromatographie eingesetzt. Die Trennung der Derivate erfolgte unter den in Tab. 35 angegebenen chromatographischen Bedingungen, die Detektion der Derivate wurde unter folgenden Bedingungen erzielt (Tab. 40):

Tab. 40 Derivatisierungsreagenzien: Detektionsbedingungen für die Derivate

NCO-Derivate von	Messung mittels UVD	Messung mittels MSD	
	[nm]	(weitere Bedingungen vgl. Tab. 35)	
		Scan-Bereich	Fragmentorspannung [V]
MAMA	220 und 254	m/z 50 – m/z 750	110
Tra	220 und 242	m/z 50 – m/z 750	110
Nitro C	220 und 375	m/z 50 – m/z 750	110
MOPP	220 und 240	m/z 50 – m/z 750	110
PP	220, 240 und 254	m/z 50 – m/z 750	110
DBA	220	m/z 50 – m/z 750	110
DPA	220	m/z 50 – m/z 750	110
DEA	220	m/z 50 – m/z 750	110

Tab. 41 Derivatisierungsreagenzien: Qualifier

	Spezifische Fragmente [m/z]	
	Derivatisierungsreagenzien	Harnstoffaddukte
MAMA	191	nicht vorhanden
Tra	144, 161	187 (geringe Intensität)
Nitro C	208	nicht vorhanden
MOPP	150, 193	219 (geringe Intensität)
PP	121, 164	190
DBA	130	156
DPA	102	128
DEA	74	100

In der Tab. 42 sind jeweils die Isocyanatderivate mit der geringsten und der höchsten MS-Response für das jeweilige Reagenz angegeben.

Tab. 42 Isocyanatderivate: MS-Response

Derivatisierungsreagenz	MS-Response [TIC]	
	geringste Response (Fläche [Skt])	höchste Response (Fläche [Skt])
MAMA	510000	3930000
Tra	610000	6030000
Nitro C	3280000	7070000
MOPP	4490000	12210000
PP	6600000	16040000
DBA	110000	7650000
DPA	1170000	8190000
DEA	920000	6510000

Bei der Untersuchung des Elutionsverhaltens der verschiedenen Derivate ergaben sich unter den aufgeführten chromatographischen Bedingungen sowie bei MS-Detektion mit den in Tab. 40 angeführten Bedingungen die in Tab. 43 angegebenen Retentionszeiten.

Tab. 43 Isocyanatderivate: Elutionsverhalten

Substanz	PP	DEA	Tra	MOPP	Nitro C	DPA	MAMA	DBA
	NH ₄ -formiat pH 6/ Acetonitril 50/50 (v/v)				NH ₄ -formiat pH 6/ Acetonitril 45/55 (v/v)		NH ₄ -formiat pH 6/ Acetonitril 20/80 (v/v)	
Retentionszeit [min]								
HDI	4.6	4.6	7.4	9.5	7.7	10.9	10.8	8.6
TDI	5.6	5.4	10.6	12.8	9.8	14.5	12.8	9.6
IPDI	7.6	7.6	13.8	19.2	13.8	21.3	17.4	12.9
NI	8.3	8.4	12.2	13.8	-	12.7	7.5	6.6
MDI	9.7	9.9	19.1	25.8	17.3	28.2	19.5	14.0
IPDI	10.7	11.7	18.3	30.1	19.4	38.3	23.5	19.7
MDI	11.5	11.3	21.3	33.8	21.3	33.2	-	-

10.4.2 Optimierung des Trennsystems

Die Optimierungsdaten wurden ausgehend von den Tab. 44 angeführten chromatographischen Bedingungen aufgenommen, wobei jeweils ein Parameter variiert worden ist:

Tab. 44 Chromatographische Bedingungen zur Optimierung des Trennsystems

Chromatographisches Verfahren	HPLC-UVD-FLD-MSD
Stationäre Phase	Multospher [®] 120 RP-18, 5 µm, 250 x 3 mm
Mobile Phase	NH ₄ -formiat 1 mM, pH = 6 / Acetonitril 50/50 (v/v)
Temperatur im Säulenofen	25 °C, bzw. ab Temperaturoptimierung 30 °C
Flussrate	0.5 mL/min
Photometrische Detektion	Wellenlänge: 240 nm
Massenselektive Detektion	Scan-Modus
	Fragmentorspannung : 110 V
Fluoreszenzdetektion	Anregungswellenlänge (λ _{Ex}): 240 nm
	Emissionswellenlänge (λ _{Em}): 370 nm

Zur Optimierung des Trennsystems wurden die Standardgemische aus Tab. 37 eingesetzt. Hierzu wurden die Retentionszeiten von HDI, TDI, IPDI, MDI und NI unter Verwendung der oben beschriebenen chromatographischen Bedingungen unter Variation der einzelnen Parameter, wie pH-Wert, prozentuale Zusammensetzung der mobilen Phase, Säulentemperatur und Gradient ermittelt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 45 bis 0 dargestellt.

Tab. 45 Retentionszeiten der Isocyanat-PP-Derivate in Abhängigkeit vom pH-Wert bei MS-Detektion

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
	Retentionszeit [min]				
HDI	2.5	4.5	4.7	4.7	4.7
TDI	2.5	5.4	5.6	5.6	5.6
IPDI	2.5	7.5	7.7	7.7	7.7
NI	3.8	8.2	8.3	8.3	8.3
MDI	2.5	9.6	9.8	9.7	9.8
IPDI	2.8	10.7	10.8	10.8	10.8
MDI	2.8	11.5	11.7	11.6	11.7

Tab. 46 Retentionszeiten der Isocyanat-DEA-Derivate in Abhängigkeit des pH-Wertes bei MS-Detektion

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
	Retentionszeit [min]				
HDI	4.6	4.6	4.6	4.6	4.6
TDI	5.5	5.5	5.5	5.5	5.4
IPDI	7.8	7.8	7.7	7.7	7.7
NI	8.4	8.4	8.4	8.4	8.3
MDI	10.0	10.1	10.0	10.0	10.0
IPDI	11.4	11.5	11.3	11.4	11.3
MDI	12.1	12.1	11.9	11.9	11.9

Tab. 47 Retentionszeiten der Isocyanat-PP-Derivate in Abhängigkeit der Säulentemperatur bei FL-Detektion

	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
	Retentionszeit [min]				
2,6-TDI	10.5	10.5	10.7	10.5	10.0
HDI	11.7	11.7	12.1	11.9	11.3
2,4-TDI	15.3	15.2	15.6	14.9	14.0
NI	23.7	23.0	22.9	21.5	19.7
MDI	30.0	30.8	32.3	31.6	30.0
MDI	44.0	43.8	44.7	41.4	39.1

Tab. 48 Retentionszeiten der Isocyanat-PP-Derivate in Abhängigkeit des Anteils am organischen Modifizier Acetonitril bei MS-Detektion

	NH ₄ -formiat / Acetonitril 55/45 (v/v)	NH ₄ -formiat / Acetonitril 50/50 (v/v)
	Retentionszeit [min]	
HDI	5.8	4.6
TDI	7.2	5.6
IPDI	11.0	7.6
NI	11.0	8.3
MDI	14.7	9.7
IPDI	16.6	10.7
MDI	18.8	11.5

Tab. 49 Retentionszeiten der Isocyanat-DEA-Derivate in Abhängigkeit des Anteils am organischen Modifizier Acetonitril bei MS-Detektion

	NH ₄ -formiat / Acetonitril 55/45 (v/v)	NH ₄ -formiat / Acetonitril 50/50 (v/v)
	Retentionszeit [min]	
HDI	15.7	4.6
TDI	21.5	5.4
IPDI	33.8	7.6
NI	18.0	8.4
MDI	-	9.9
IPDI	-	11.7
MDI	-	11.3

Tab. 50 Retentionszeiten der Isocyanat-PP-Derivate sowie relative Retentionszeiten Optimierter Gradient, chromatographische Bedingungen s. 4.5 Tab. 4

Peak	Substanz	FL-Detektion	UV-Detektion	relativ
		Retentionszeit [min]		
1a	2,6-TDI	11.0	10.0	0.60
2	HDI	12.0	10.6	0.65
1b	2,4-TDI	14.4	12.7	0.77
5	NI	18.7	16.9	1.00
3a	IPDI a	20.6	17.7	1.09
4a	MDI a	23.6	20.7	1.25
3b	IPDI b	25.4	22.0	1.35
4b	MDI b	26.4	23.3	1.40
7	1,4-CHDI	9,4	8,5	0,52
8a	1,3-PDI	12,2	10,8	0,65
8b	1,4-PDI	14,4	12,7	0,76
9	PI	13,9	12,2	0,73
10	CHI	15,7	13,9	0,83
11	Oligomer 1		19,0	
12	Oligomer 2		23,6	
13	Oligomer 3		27,4	
14	Oligomer 4		30,3	

Die in der 0 aufgeführten Retentionszeiten bei FL- und bei UV-Detektion sind für dasselbe Isocyanat-PP-Derivat jeweils unterschiedlich, da zwei verschiedene Geräte mit unterschiedlichen Totvolumina eingesetzt wurden (HPLC-FLD- und HPLC-UVD-MSD-Anlage).

10.4.3 Optimierung der Detektion

10.4.3.1 Optimierung der Fragmentor-Ramp

Die Fragmentor-Ramp wurde unter den optimierten chromatographischen Bedingungen (s. 4.5 Tab. 4), bei verändertem Gradientenprogramm, variiert:

0 - 50 Min von 65%A auf 40%A, 5 Min halten, in 1 Min auf 65%A, 15 Min halten.

Die in Tab. 51 und Tab. 52 aufgeführten Peaks sind nicht oder nur teilweise aufgeklärte Peaks des untersuchten Präpolymerisates. Es wurde jeweils im SIM-Modus gemessen.

Tab. 51 Optimierung der MS-Detektion: Abhängigkeit der MS-Response des PP-Qualifiers m/z 121 von der Fragmentorspannung

Peak	120 V	140 V	160 V	180 V	200 V
	MS-Response [% der Intensität der intensivsten Masse im MS-Spektrum]				
1	100	85	55	50	30
2	20	35	45	40	20
3	25	45	45	25	10
4	45	60	45	20	15
5	15	30	45	40	20
6	10	30	45	30	15
7	15	30	45	40	20
8	20	35	50	40	30
9	15	30	50	40	30
10	10	30	35	25	10
11	15	30	45	40	35

Tab. 52 Optimierung der MS-Detektion: Abhängigkeit der MS-Response des PP-Qualifiers m/z 190 von der Fragmentorspannung

Peak	80 V	100 V	120 V	140 V	180 V
	MS-Response [% der Intensität der intensivsten Masse im MS-Spektrum]				
1	5	35	15	10	10
2	5	5	10	10	5
3	5	15	20	20	5
4	2	10	20	10	2
5	2	5	15	15	5
6	2	5	15	15	5
7	2	5	15	10	5
8	2	10	20	20	5
9	1	5	10	10	2
10	1	2	15	10	5
11	1	5	15	10	5

Tab. 53 PP-spezifische Qualifier und der Molekülonen M+1: MS-Response Isocyanat-Standardgemisch nach optimierter Fragmentor-Ramp

	m/z 121	m/z 164	m/z 190	M+1
	MS-Response [% der Intensität der intensivsten Masse im MS-Spektrum]			
2,6-TDI	50	100	35	80
HDI	55	100	20	65
2,4-TDI	50	100	30	80
NI	55	85	55	100
IPDI a	50	100	20	40
MDI a	55	100	35	100
IPDI b	50	100	20	50
MDI b	55	100	40	50

Tab. 54 Substanzspezifische Cluster- und Fragmentionen

Isocyanatderivat	Molekülonen (m/z)				Fragmentionen (m/z)
	Cluster mit	Cluster mit		Cluster mit	
	H ⁺	Na ⁺ (M+23)	K ⁺ (M+39)		2H ⁺ /2
HDI-PP	495	517	533	248	332
TDI-PP	501	523	539	251	338
IPDI-PP	549	571	587	275	386
MDI-PP	577	599	615	289	414
NI-PP	333	355	371	-	-
HDI-DEA	315	337	353	-	242
TDI-DEA	321	343	359	-	248
IPDI-DEA	369	391	407	-	296
MDI-DEA	397	419	435	-	324
NI-DEA	243	265	281	-	-

10.4.3.2 Optimierung von Trocknungsfluss und Versprühungsdruck

Zur Optimierung der MSD wurden die Einflüsse der Änderungen des N₂-Trocknungsflusses und des Versprühungsdrucks auf die Response (Fläche [Skt]) anhand des IPDI-PP-Derivates untersucht. Die Konzentration in dem verwendeten Standard betrug 11 mg/L.

Chromatographische Bedingungen: NH_4 -formiat pH 6 1mM / Acetonitril, 50/50 (v/v), Scanbereich 70-650 m/z, 110 V Fragmentorspannung.

Tab. 55 Abhängigkeit der Peak-Fläche des IPDI-PP-Derivates vom Dry Gas Flow
Nebulizer Pressure = 60

Dry Gas Flow [L/min]	8	10	12	13
Fläche _{IPDI-PP} [Skt]	22900000	30100000	32700000	32800000

Tab. 56 Abhängigkeit der Peak-Fläche des IPDI-PP-Derivates vom Nebulizer Pressure
Dry Gas Flow = 10

Nebulizer Pressure [psig]	40	50	60
Fläche _{IPDI-PP} [Skt]	28800000	28900000	30100000

10.4.4 Optimierung der Aufarbeitung

Die chromatographische Trennung erfolgte bei allen durchgeführten Untersuchungen zur Optimierung der Aufarbeitung gemäß Tab. 4 (vgl. 4.5). Die Detektion wurde mittels FLD bei 305/370 nm durchgeführt.

Zur Auswahl eines geeigneten Extraktionslösungsmittels wurden Dichlormethan, Acetonitril und THF hinsichtlich ihres Extraktionsvermögens untersucht. Es wurden 1 g einer zerkleinerten IPDI-haltigen Verbundfolie mit PP derivatisiert, 14 Stunden mit den Extraktionsmitteln geschüttelt, das Lösungsmittel entfernt, die Rückstände acetyliert und nach Aufnahme in NH_4 -formiat / Acetonitril, 65/35 (v/v), membranfiltriert. Die Ergebnisse der HPLC-FLD-Analytik sind in Tab. 57 angegeben.

Tab. 57 Untersuchung verschiedener Extraktionsmittel

Lösungsmittel	Dichlormethan		Acetonitril		THF	
	Fluoreszenzintensität der Derivate [mV*min] bei Bestimmung					
	1	2	1	2	1	2
NI	118.1	103.3	106.4	116.6	2.2	2.3
IPDI a	38.0	36.2	19.5	23.7	1.8	1.6
IPDI b	10.0	10.2	6.5	8.4	0.3	0.3

Da die Löslichkeit der Rückstände ein limitierender Faktor bei der Untersuchung ist, wurden verschiedene Aufnahmegemische für die Rückstände der monomeren und oligomeren Isocyanate nach Derivatisierung, Acetylierung und Trocknen im Stickstoffstrom überprüft. In Tab. 58 sind die Fluoreszenzintensitäten der einzelner Isocyanat-PP-Derivate, ohne Verwendung einer zusätzlichen Matrix, bei unterschiedlichen Aufnahmegemischen angegeben.

Tab. 58 Untersuchung verschiedener Aufnahmegemische für die Rückstände aus monomeren und oligomeren Isocyanaten

Aufnahmegemisch	NH ₄ -formiat / Acetonitril	DMF / NH ₄ - formiat / Acetonitril	DMF / TFA / Acetonitril	DMSO / NH ₄ -formiat / Acetonitril	DMF / NH ₄ - formiat / Acetonitril	DMF / NH ₄ - formiat
	65/35 (v/v)	50/35/15 (v/v/v)	50/35/15 (v/v/v)	50/35/15 (v/v/v)	70/15/15 (v/v/v)	70/30 (v/v)
Flächen der Derivate [mV*min]						
TDI	255.8	257.3	267.0	263.1	267.4	269.1
HDI	88.6	68.2	81.3	78.3	72.1	71.5
NI	120.8	122.3	121.0	121.7	126.3	123.7
IPDI	102.2	99.6	100.1	104.2	105.4	105.6
MDI	145.1	150.7	149.0	146.6	152.5	151.2
Oligomer-Peak 1	186.4	191.2	185.1	189.8	199.9	198.8
Oligomer-Peak 2	35.6	39.1	36.8	38.3	41.2	39.3

In Tab. 59 sind die Fluoreszenzintensitäten der Isocyanat-PP-Derivate aus den Rückständen von monomeren und oligomeren Isocyanaten und der zusätzlichen Matrix (Verbundfolie) angeführt.

Tab. 59 Untersuchung verschiedener Aufnahmegemische für die Rückstände aus monomeren und oligomeren Isocyanaten unter Verwendung einer Matrix (Verbundfolie)

Aufnahmegemisch	NH ₄ -formiat / Acetonitril	DMF / NH ₄ - formiat / Acetonitril	DMF / TFA / Acetonitril	DMSO / NH ₄ - formiat / Acetonitril	DMF / NH ₄ - formiat / Acetonitril	DMF / NH ₄ - formiat 70/30
	65/35 (v/v)	50/35/15 (v/v/v)	50/35/15 (v/v/v)	50/35/15 (v/v/v)	70/15/15 (v/v/v)	(v/v)
Flächen der Derivate [mV*min]						
TDI	30.7	206.9	230.1	188.3	191.8	202.6
HDI	0.0	56.4	65.1	73.2	66.2	71.9
NI	77.5	81.7	82.3	79.7	83.6	85.5
IPDI	24.6	66.6	65.7	64.1	62.8	67.1
MDI	96.1	104.7	103.1	99.8	104.6	105.4
Oligomer-Peak 1	103.6	125.1	125.8	114.2	126.8	128.6
Oligomer-Peak 2	10.8	23.9	24.7	12.1	25.6	24.6

10.4.5 Grundkalibrierung

Für die Grundkalibrierung wurden einzelne Stammlösungen der monomeren Isocyanate angesetzt, aus denen ein Zwischenstandard-Gemisch hergestellt wurde. Aus diesem Zwischenstandard erfolgte die Herstellung der Level für die Kalibrierung jeweils in NH₄-formiat/Acetonitril 65/35 (v/v).

Die Grundkalibrierung wurde dreimal durch erneutes Herstellen des Zwischenstandards sowie der Standardlösungen durchgeführt. Für HDI, TDI, IPDI, MDI und NI erfolgte eine 8-Punkt-, für CHI eine 6-Punkt- und für PI eine 3-Punkt-Kalibrierung. Zur Bestimmung der Isocyanate in den Kaschierkleberkomponenten wurde in einem angepassten Konzentrationsbereich eine Grundkalibrierung in Form einer 5-Punkt-Kalibrierung für TDI, MDI, XDI und IPDI durchgeführt.

Die Grundkalibrierungen wurden mittels des optimierten Trennsystems unter Verwendung des FLD erstellt (s. 4.5 Tab. 4).

Die Auswertung erfolgte mittels linearer Regression und Residuenplot.

Tab. 60 Grundkalibrierung für Methodenvalidierung: Standardkonzentrationen

Level	Stamm- lösung	Zwischen- standard	1	2	3	4	5	6	7	8
Substanz	[g/L]	[mg/L]	Konzentration [mg/L]							
HDI	5,5	110	0.0055	0.029	0.076	0.154	0.198	0.262	0.306	0.374
TDI-Mix ¹	6,0	120	0.006	0.031	0.083	0.168	0.216	0.286	0.333	0.408
IPDI	5,5	110	0.0055	0.029	0.076	0.154	0.198	0.262	0.306	0.374
MDI-Mix ²	6,0	120	0.006	0.031	0.083	0.168	0.216	0.286	0.333	0.408
NI	5,5	110	0.0055	0.029	0.076	0.154	0.198	0.262	0.306	0.374
CHI	5,0	100	0.005	0.010	0.055	0.100	0.140	0.200	-	-
PI	5,5	110	0.011	0.048	0.099	-	-	-	-	-

¹TDI-Mix: 79,7% 2,4-TDI und 20,3% 2,6-TDI; ²MDI-Mix: 48,0% 2,4'-MDI und 52,0% 4,4'-MDI

Tab. 61 Grundkalibrierung für Kaschierkleberkomponenten: Standardgemisch

Level	1	2	3	4	5
Substanz	Konzentration [mg/L]				
2,6-TDI	0,0268	0,067	0,134	0,214	0,268
2,4-TDI	0,1052	0,263	0,526	0,842	1,052
IPDI	0,1210	0,303	0,605	0,968	1,210
2,4'-MDI	0,0651	0,163	0,325	0,521	0,651
4,4'-MDI	0,0669	0,167	0,335	0,535	0,669
XDI	0,1320	0,330	0,660	1,056	1,320

Tab. 62 Grundkalibrierung für Methodenvalidierung: Verfahrenskenndaten

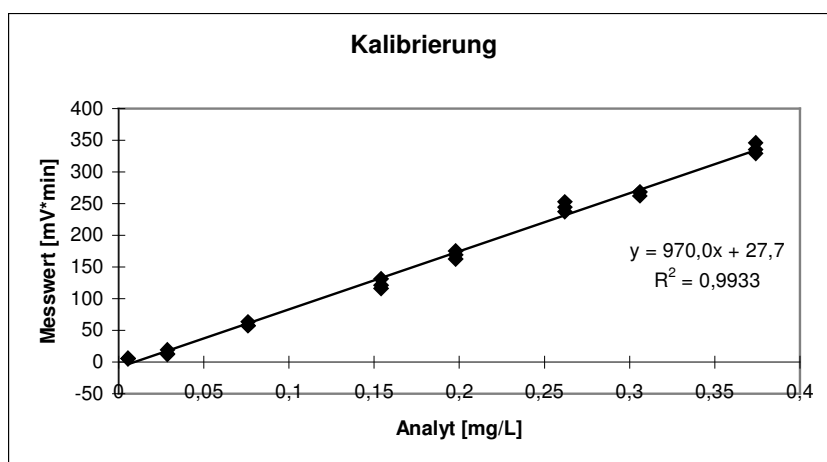
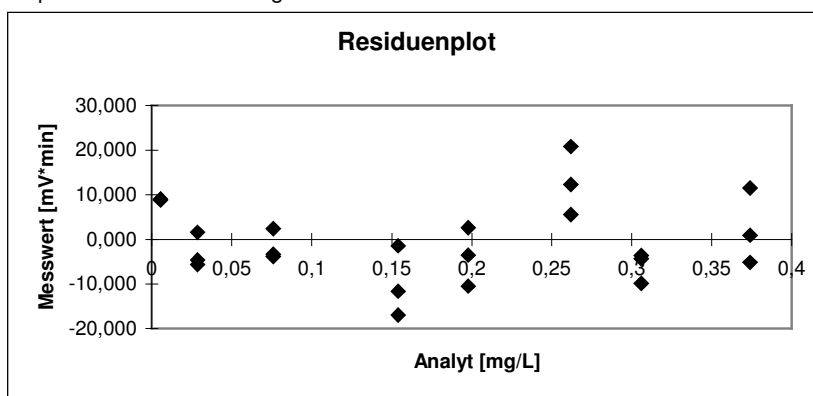
	2,6-TDI	2,4-TDI	HDI	IPDI	MDI	NI	CHI	PI
Achsenabschnitt [mV*min]	13,01	37,64	23,60	27,7	29,2	30,03	-0.79	-4.49
Steigung [(mV*min)/(mg/L)]	1984	1974	715,4	970,0	1173	1100	721.6	1277.2
Korrelationskoeffizient	0,9927	0,9944	0,9939	0,9933	0,9939	0,9941	0,9998	0,9992
Reststandardabweichung [mV*min]	7,73	26,29	11,45	16,30	20,43	17,26	1.11	2.14
Verfahrensstandardabweichung [µg/L]	4	13	16	17	17	16	1.5	1.7
Verfahrensvariationskoeffizient [%]	10,0	8,7	9,1	9,6	9,1	8,9	1.8	3.2
Nachweisgrenze DIN 32645* [µg/L]	14	49	59	62	64	58	2.5	1.8
Bestimmungsgrenze DIN 32645 [µg/L]	46	157	189	198	206	185	8,4	7,3

*Bei Ermittlung der Nachweisgrenzen über S/N > 3 werden bei allen Isocyanaten Werte von unter 10µg/L erhalten.

Tab. 63 Grundkalibrierung für Kaschierkleberkomponenten: Verfahrenskenndaten

	2,6-TDI	2,4-TDI	IPDI	2,4'-MDI	4,4'-MDI	XDI
Achsenabschnitt [mV*min]	-6,23	-6,48	1,85	-7,59	-6,84	4,38
Steigung [(mV*min)/(mg/L)]	2174	2019	1204	1365	1399	1333
Korrelationskoeffizient	0,9998	0,9998	0,9997	0,9985	0,9998	0,9997
Reststandardabweichung [mV*min]	3,83	14,17	14,90	21,14	5,11	14,12
Verfahrensstandardabweichung [µg/L]	4	14	15	21	5	14
Verfahrensvariationskoeffizient [%]	1,2	1,3	1,9	4,5	1,0	1,5
Nachweisgrenze DIN 32645* [µg/L]	10	42	73	92	22	63
Bestimmungsgrenze DIN 32645 [µg/L]	38	151	258	300	79	225

Eine Kalibriergerade (Abb. 68) und die Residuen (Abb. 69) sind beispielhaft für IPDI dargestellt.

**Abb. 68** IPDI: Beispielhafte Grundkalibriergerade**Abb. 69** IPDI: Beispielhaft die Residuen der Grundkalibrierung

10.4.6 Wiederfindung in verschiedenen Matrices

Die Wiederfindung wurde in den untersuchten Verpackungsmaterialien und 2 Verbundfolien ermittelt. Die hierbei ermittelten Wiederfindungsraten von NI als IS wurden jeweils gemittelt und sind in Tab. 64 angegeben.

Die Chromatographie erfolgte nach den optimierten Bedingungen (s. 4.5 Tab. 4), wobei der Gradient, wie unter 10.4.3 angeführt, geändert wurde.

Tab. 64 Wiederfindungsraten von NI (IS)

Untersuchungsmaterial	mittlere WFR [%]
PET/PE-Folie, n = 3	106,4
PE/PA-Folie, n = 3	104,8
CN 825, n = 2	103,9
RP 100 (Dose), n = 2	108,1
RP 100 (Deckel), n = 2	98,5
LB (Dosen), n = 4	111,1
LB (Deckel), n = 2	93,5

10.5 Ergebnisse der Untersuchung von Rohstoffen für Verpackungen

10.5.1 Auswertung der Untersuchung der Kleberkomponenten

Angeführt werden die Spektren mit der zugehörigen Auswertung des Polyesterscreenings der Kleberkomponenten.

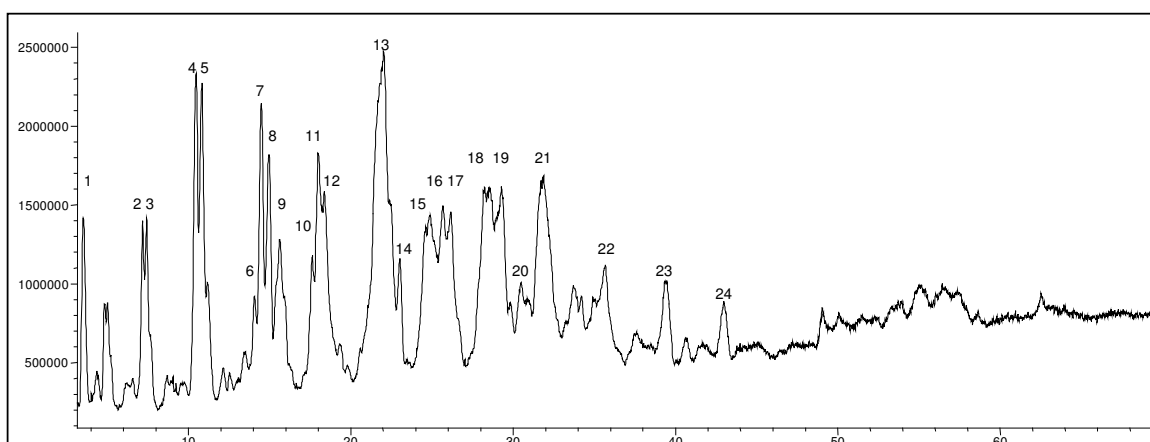


Abb. 70 Komponente KAS-1 B: Polyesterscreening
HPLC-MSD, Bedingungen s. 10.3 AM 5, $\beta = 9,6$ g/L

Tab. 65 Komponente KAS-1 B: Auswertung des Polyesterscreenings

Peak	M (Substanz) [Da]	Zuordnung	Peak	M (Substanz) [Da]	Zuordnung
1	262	PD-ADA-PD	13	392 + 674	cycl. 2 PD / ADA / PA + PD-PA-PD-PA-PD-ADA-PD
2	448	PD-ADA-PD-ADA-PD	14	392	cycl. 2 PD / ADA / PA
3	448	PD-ADA-PD-ADA-PD	15	558 + 840	cycl. 3 PD / 3 ADA + cycl. 4 BD / 2 PA / 2 ADA
4	468	PD-PA-PD-ADA-PD	16	840	cycl. 4 BD / 2 PA / 2 ADA
5	468	PD-PA-PD-ADA-PD	17	694 + 840	PD-PA-PD-PA-PD-PA-PD + cycl. 4 BD / 2 PA / 2 ADA
6	634	PD-ADA-PD-ADA-PD-ADA- PD	18	860	cycl. 4 BD / 3 PA / ADA
7	488	PD-PA-PD-PA-PD	19	578	cycl. 3 PD / 2 ADA / PA
8	488	PD-PA-PD-PA-PD	20	412	cycl. 2 PD / 2 PA
9	372	cycl. 2 PD / 2 ADA	21	880	cycl. 4 BD / 4 PA

10	654	PD-PA-PD-ADA-PD-ADA-PD	22	764	cycl. 4 PD / 3 ADA / PA
11	654	PD-PA-PD-ADA-PD-ADA-PD	23	784	cycl. 4 PD / 2 ADA / 2 PA
12	654	PD-PA-PD-ADA-PD-ADA-PD	24	804	cycl. 4 PD / ADA / 3 PA

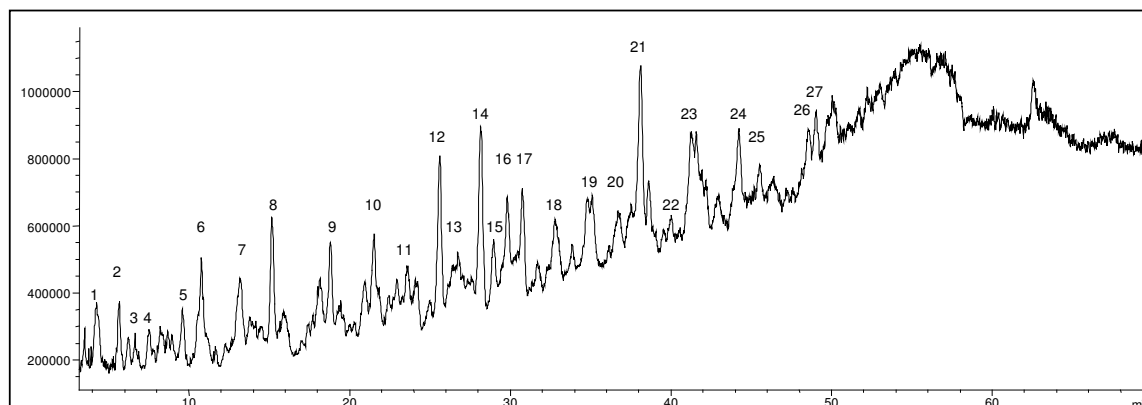


Abb. 71 Komponente KAS-2 A: Polyesterscreening
HPLC-MSD, Bedingungen s. 10.3 AM 5, $\beta = 10,8$ g/L,

Tab. 66 Komponente KAS-2 A: Auswertung des Polyester-Screenings

Peak	M (Substanz) [Da]	Zuordnung	Peak	M (Substanz) [Da]	Zuordnung
1	276	?	15	428	cycl. 2 NPG / 2 ADA
2	426	EG-ADA-EG-PA-EG	16	578	cycl. 3 PD / 2 ADA / PA oder EG-ADA-EG-ADA-EG-ADA-EG
3	310	BD-PA-BD	17	442	cycl. HD / NPG / 2 ADA
4	448	PD-ADA-PD-ADA-PD	18	456	cycl. 2 HD / 2 ADA
5	344	cycl. 2 EG / 2 ADA	19	448	PD-ADA-PD-ADA-PD oder cycl. 2 NPG / ADA / PA
6	468	PD-PA-PD-ADA-PD oder cycl. 2 NPG / 2 PA	20	440	cycl. 2 BD / 2 PA
7	482	?	21	462	cycl. HD / NPG / PA / ADA
8	364	cycl. 2 EG / ADA / PA	22	634	PD-ADA-PD-ADA-PD-ADA- PD oder cycl. 2 BD / NPG / 2 ADA / PA
9	386	?	23	476	cycl. 2 HD / PA / ADA
10	400	cycl. 2 BD / 2 ADA	24	482	cycl. HD / NPG / 2 PA
11	384 + 832	cycl. 2 EG / 2 PA + ?	25	654	PD-PA-PD-ADA-PD-ADA-PD oder cycl. 2 BD / NPG / ADA / 2 PA
12	406	EG-ADA-EG-ADA-EG	26	496	cycl. 2 HD / 2 PA
13	702	cycl. 3 NPG / 3 PA	27	446 + 668	EG-PA-EG-PA-EG + ?
14	420	cycl. 2 BD / ADA / PA			

Beim Vergleich der Chromatogramme der Komponenten KAS-5/6 A und KAS-7 HK wurde festgestellt, dass die beiden Komponenten in ihrer Zusammensetzung völlig identisch sind. Auf eine getrennte Auswertung wird daher verzichtet.

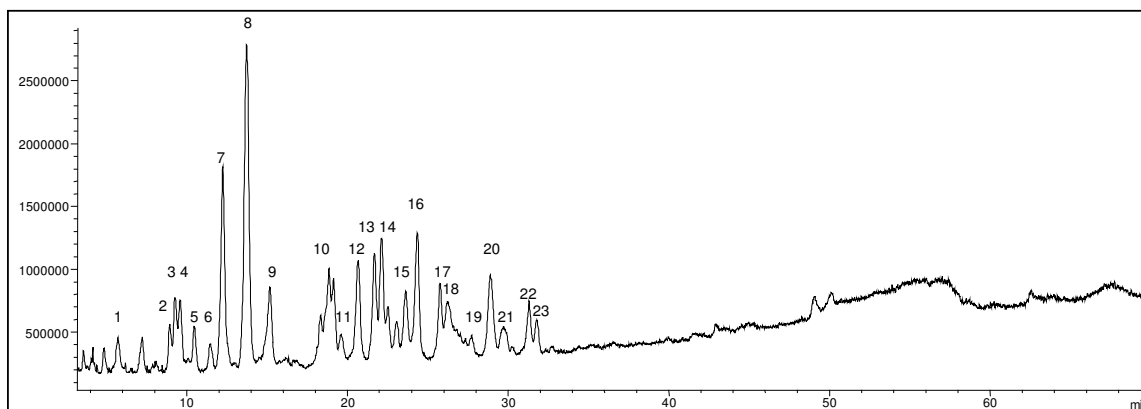


Abb. 72 Komponente KAS-5/6 A und KAS-7 HK: Polyester-Screening
HPLC-MSD, Bedingungen s. 10.3 AM 5, $\beta = 11,6$ g/L

Tab. 67 Komponente KAS-5/6 A und KAS-7 HK: Auswertung des Polyester-Screenings

Peak	M (Substanz) [Da]	Zuordnung	Peak	M (Substanz) [Da]	Zuordnung
1	514	?	13	688	cycl. 3 DEG / 2 PA / ADA
2	432	cycl. 2 DEG / 2 ADA	14	644	cycl. 2 DEG / EG / 2 PA / ADA
3	388	cycl. DEG / EG / 2 ADA	15	600	cycl. DEG / 2 EG / 2 PA / ADA oder cycl. 3 BD / 3 ADA
4	344	cycl. 2 EG / 2 ADA	16	708	cycl. 3 DEG / 3 PA
5	556	cycl. 3 EG / 2 PA / ADA	17	664	cycl. 2 DEG / EG / 3 PA
6	750	(BD-PA-BD-PA-BD-PA-BD)	18	860	cycl. 3 DEG / EG / 2 PA / 2 ADA oder cycl. 4 BD / 3 PA / ADA
7	452	cycl. 2 DEG / ADA / PA	19	620 + 772	cycl. DEG / 2 EG / 3 PA + cycl. DEG / 3 EG / 2 PA / 2 ADA
8	472 + 408	cycl. 2 DEG / 2 PA oder cycl. 2 EG / DEG / 3 ADA + cycl. DEG / EG / PA / ADA	20	880 + 924	cycl. 3 DEG / EG / 3 PA / ADA oder cycl. 4 BD / 4 PA + cycl. 4 DEG / 3 PA / ADA
9	364 + 516	cycl. 2 EG / ADA / PA + cycl. 3 EG / 3 ADA	21	836 + 880	cycl. 2 DEG / 2 EG / 3 PA / ADA + cycl. 3 DEG / EG / 3 PA / ADA oder cycl. 4 BD / 4 PA
10	624 + 570 + 580	cycl. 2 DEG / EG / PA / 2 ADA + ? + cycl. DEG / 2 EG / PA / 2 ADA	22	944	cycl. 4 DEG / 4 PA
11	536	cycl. 3 EG / 2 ADA / PA	23	900	cycl. 3 DEG / EG / 4 PA
12	428	cycl. DEG / EG / 2 PA	24	446	EG-PA-EG-PA-EG

10.5.2 Auswertung der Untersuchung der Polypropylenfolie

Tab. 68 PP-Folie: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11)

	Extraktionsmittel	Dosis [$\mu\text{g}/\text{Platte}$]	Quotient ohne S9-Mix	Quotient mit S9-Mix
PP-Folie	Acetonitril	4,9 – 400	< 2,0	< 2,0
PP-Folie	95% Ethanol	1,23 – 100	< 2,0	< 2,0

Die kritische Grenze für einen positiven Nachweis ist das Überschreiten der doppelten Spontanmutationsrate. Getestet wurde mit den Stämmen TA 98, TA 100 und TA 1537.

Tab. 69 PP-Folie: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest

Verpackung (Extraktions- mittel)	Konzentration [%Extrakt im Medium]	Konzentration im Medium [mg/L]	Flächenequivalente im Medium [dm^2/L]	Ext. $_{540\text{nm}}$	Überlebensrate [%]
Acetonitril- Blindwert	0,25	25	-	$0,055 \pm 0,009$	83
	0,5	50	-	$0,040 \pm 0,018$	61
	1,0	100	-	$0,062 \pm 0,010$	93
PP-Folie (Acetonitril)	0,25	25	78,4	$0,057 \pm 0,006$	86
	0,5	50	156,8	$0,045 \pm 0,012$	68
	1,0	100	313,6	$0,072 \pm 0,019$	108
95% Ethanol- Blindwert	0,25	25	-	$0,060 \pm 0,021$	91
	0,5	50	-	$0,067 \pm 0,009$	100
	1,0	100	-	$0,057 \pm 0,010$	86
PP-Folie (95% Ethanol)	0,25	25	47,4	$0,068 \pm 0,020$	103
	0,5	50	94,8	$0,077 \pm 0,011$	117
	1,0	100	189,5	$0,071 \pm 0,026$	108

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren

10.5.3 Auswertung der Untersuchung des Lubricants

Tab. 70 Peakflächenverhältnisse der Extrakte der LB und des Lubricants

	LB 50	LB 150	LB 300	Lubricant
	Area [AU]			
TAG	244,4	113	165,1	74,7
1,3-DAG	427,0	160,5	176,1	933,3
1,2-DAG	152,5	58,5	64,0	569,4
MAG	2139,8	863,6	818,0	7347,2
	Verhältnis			
TAG / MAG	0,11	0,13	0,20	0,01
1,3-DAG / MAG	0,20	0,19	0,22	0,13
1,2-DAG / MAG	0,07	0,07	0,08	0,08
1,2-DAG / 1,3-DAG	0,36	0,36	0,36	0,61

Vergleichslösung für das Lubricant: 3,664 g/L Isooktan, Verdünnung 1:10 und 1:50

Tab. 71 Lubricant: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11)

	Testkonzentration	Quotient ohne S9-Mix	Quotient mit S9-Mix
Lubricant	0,62 – 50 %	< 2,0	< 2,0

Die kritische Grenze für einen positiven Nachweis ist das Überschreiten der doppelten Spontanmutationsrate. Getestet wurde mit den Stämmen TA 98, TA 100 und TA 1537.

Tab. 72 Lubricant: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest

Verpackung (Extraktions- mittel)	Konzentration [%Extrakt im Medium]	Konzentration im Medium [mg/L]	Flächenequivalente im Medium [dm ² /L]	Ext. _{540nm}	Überlebensrate [%]
Lubricant (1:2 in DMSO)	0,25	25	-	0,046 ± 0,004	69
	0,5	50	-	0,039 ± 0,002	59
	1,0	100	-	0,041 ± 0,008	62

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren

10.5.4 Auswertung der Untersuchung der Laminare

Tab. 73 Laminare: Auswaagen und Gesamtmigrate

Laminat	Auswaage [mg]	Fläche [dm ²]	Migrat [mg/dm ²]	Ø Migrat [mg/dm ²]
A1	0,75	0,545	1,3761	0,8992
A2	0,23	0,545	0,4220	
C1	0,53	0,545	0,9725	0,6882
C2	0,22	0,545	0,4037	
D1	0,53	0,608	0,8717	0,7405
D2	0,37	0,608	0,6086	
E1	0,43	0,545	0,7890	0,5832
E2	0,21	0,545	0,3583	

10.5.5 Auswertung der kinetischen Untersuchung der Kleberkomponenten

Tab. 74 Kinetische Untersuchung des Laminats von KAS-1
SEC-ELSD (s. 10.3 AM 2): Gesamtmigrat und Anteil <1000 Da, LC-MSD (s. 10.3 AM 10): Isocyanate

Tage seit Herstellung	Area gesamt [AU]	Gesamtmigrat [mg/dm ²]	Anteil <1000 Da [mg/dm ²]	Area Peak 1 [AU]	Area Peak 2 [AU]
1	14222	0,7338	0,6812	369,9	46,6
2	13459	0,7082	0,6389	350,9	46,1
3	13630	0,7140	0,6568	279,0	45,3
4	16944	0,8209	0,7201	184,5	50,5
6	-	-	-	130,3	70,0
7	12427	0,6728	0,6144	-	-
8	-	-	-	149,4	172,8
10	13343	0,7043	0,6478	79,6	198,0
13	-	-	-	28,7	252,7
14	12406	0,6720	0,6158	-	-
17	-	-	-	37,0	247,7
18	8906,9	0,5425	0,5160	-	-
22	-	-	-	7,8	256,9
25	9950,8	0,5828	0,5426	-	-
28	-	-	-	< 1,0	51,6
gehärtet	-	-	-	3,2	240,9

Tab. 75 Kinetische Untersuchung des Laminats von KAS-5
SEC-ELSD (s. 10.3 AM 2): Gesamtmigrat und Anteil <1000 Da, LC-MSD (s. 10.3 AM 10): Isocyanate

Tage seit Herstellung	Area _(gesamt) [AU]	Gesamtmigrat Anteil <1000 Da		Isocyanurat			
		[mg/dm ²]	[mg/dm ²]	Area* [AU]	c [µg/dm ²]	c [mg/kg]	c [mg NCO/kg]
1	18120	0,7377	0,6602	1326,5	3,0	1,05	0,20
2	24621	0,9011	0,7558	1011,3	2,2	0,79	0,15
3	29894	1,0218	0,8345	474,2	1,0	0,36	0,07
4	28435	0,9893	0,8239	600,3	1,3	0,46	0,09
6	-	-	-	289,5	0,6	0,21	0,04
7	18774	0,7550	0,6809	-	-	-	-
8	-	-	-	508,0	1,1	0,39	0,07
10	17909	0,7321	0,6610	1694,4	3,8	1,35	0,26
13	-	-	-	982,6	2,2	0,77	0,15
14	16293	0,6882	0,6203	-	-	-	-
17	-	-	-	661,7	1,4	0,51	0,10
18	14099	0,6261	0,5962	-	-	-	-
22	-	-	-	538,4	1,2	0,41	0,08
25	36135	1,1541	0,9535	-	-	-	-
28	-	-	-	299,5	0,6	0,22	0,04
gehärtet	-	-	-	4107,2	9,3	3,31	0,63

* Differenz aus Area PP-Extrakt und Area DEA-Extrakt

10.6 Ergebnisse der analytischen Untersuchungen an den Lebensmittelverpackungen

10.6.1 Ergebnisse der 3-teiligen Weißblechdose (CN 825):

FTIR-ATR der auf BPA basierenden Epoxidharzbeschichtung (CN 825):

559(m), 731(w), 756(w), 826(s), 893(w), 936(w), 1011(w), 1037(s), 1105(m), 1180(s), 1230(s),
1295(m), 1359(w), 1379(w), 1418(w), 1460(m), 1507(s), 1575(w), 1607(m), 1725(m), 2873(m),
2923(m), 2964(m), 3050(w)

FTIR-ATR der Polyestersiegelnaht (CN 825):

725(s), 829(w), 874(w), 931(w), 1017(m), 1100(s), 1235(s), 1385(w), 1409(w), 1456(w),
1505(w), 1610(w), 1709(s), 2962(m)

Tab. 76 CN 825: spezifisches Migrat von Carbonsäuren (s. 10.3 AM 3)

(n=2)	PMA	BA	TPA	ACA	TMA	PA	IPA	ADA	Summe
spez. Migrat [µg/dm ²]	< 4,8	42,10	12,94	5,34	124,2	< 2,5	5,14	10,47	200,2

Tab. 77 CN 825 - Siegelnaht: Carbonsäuren nach Hydrolyse (s. 10.3 AM 5)

(n=2)	PMA	BA	TPA	ACA	TMA	PA	IPA	ADA
Migrat [µg/dm ²]	< 0,05	0,1	11,4	< 0,05	5,6	0,2	7,4	0,7

Tab. 78 CN 825: Harzbestandteile im Acetonitrilextrakt (s. 10.3 AM 6)

	Korpus (n=2)	Deckel (n=2)
NEPO	0,694 mg/dm ²	0,102 mg/dm ²
1 EPO	0,063 mg/dm ²	0,010 mg/dm ²
2 EPO	0,039 mg/dm ²	0,011 mg/dm ²
Substanzen der BADGE-RL ohne Zuordnung	< 0,001 mg/dm ²	< 0,001 mg/dm ²
Summe Harzbestandteil <1000 Da	0,620 mg/dm ²	0,058 mg/dm ²
identifizierter Anteil <1000 Da	1,420 mg/dm ² 56,1 %	0,180 mg/dm ² 68,3 %

Tab. 79 CN 825: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11)

	Extraktionsmittel	Dosis [μ g/Platte]	Quotient ohne S9-Mix	Quotient mit S9-Mix
CN 825	Acetonitril	0,02 - 200	< 2,0	< 2,0

Die kritische Grenze für einen positiven Nachweis ist das Überschreiten der doppelten Spontanmutationsrate

Tab. 80 CN 825: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest (s. 10.3 AM 12)

Verpackung (Extraktions- mittel)	Konzentration [%Extrakt im Medium]	Konzentration im Medium [mg/L]	Flächenequivalente im Medium [dm ² /L]	Ext. _{540nm}	Überlebensrate [%]
CN 825	0,05	5	0,60	0,143 ± 0,020	101
(Acetonitril)	0,5	50	6,04	0,129 ± 0,018	134
Acetonitril-	0,05	5	-	0,127 ± 0,080	89
Blindwert	0,5	50	-	0,122 ± 0,008	127

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren.

10.6.2 Ergebnisse der 2-teiligen Aluminiumdose mit Ringpullverschluss (RP 100)

FTIR-ATR der auf BPA basierenden Epoxidharzbeschichtung (RP 100):

726(w), 765(w), 846(s), 888(w), 937(w), 1011(m), 1037(s), 1106(m), 1180(s), 1230(s), 1295(m),
1364(w), 1384(w), 1459(m), 1506(s), 1570(s), 1606(m), 2870(m), 2923(m), 2963(w), 3031(w)

Tab. 81 RP 100: Harzbestandteile im Acetonitrilextrakt (s. 10.3 AM 6)

	Korpus (n=2)
NEPO	0,154 mg/dm ²
1 EPO	0,114 mg/dm ²
2 EPO	0,063 mg/dm ²
Substanzen der BADGE-RL ohne Zuordnung	0,026 mg/dm ²
Summe Harzbestandteil <1000 Da	0,054 mg/dm ²
identifizierter Anteil <1000 Da	0,410 mg/dm ² 87,1 %

Tab. 82 RP 100: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11)

	Extraktionsmittel	Dosis [$\mu\text{g}/\text{Platte}$]	Quotient ohne S9-Mix	Quotient mit S9-Mix
RP 100	Acetonitril	0,02 - 200	< 2,0	< 2,0

Die kritische Grenze für einen positiven Nachweis ist das Überschreiten der doppelten Spontanmutationsrate

Tab. 83 RP 100: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest (s. 10.3 AM 12)

Verpackung (Extraktions- mittel)	Konzentration [%Extrakt im Medium]	Konzentration im Medium [mg/L]	Flächenequivalente im Medium [dm^2/L]	Ext. $_{540\text{nm}}$	Überlebensrate [%]
RP 100	0,05	5	3,40	$0,113 \pm 0,020$	97
(Acetonitril)	0,5	50	33,97	$0,138 \pm 0,014$	143
Acetonitril-	0,05	5	-	$0,127 \pm 0,080$	89
Blindwert	0,5	50	-	$0,122 \pm 0,008$	127

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren.

10.6.3 Ergebnisse der 2-teilige Aluminiumdose mit Ringpullverschluss (RP 170)

FTIR-ATR der Polyesterbeschichtung (RP 170):

610(m), 728(s), 974(m), 1073(m), 1094(m), 1124(w), 1231(s), 1304(w), 1377(w), 1433(w), 1467(w), 1604(w), 1716(s), 2354(w), 2843(m), 2911(m)

Tab. 84 RP 170: Carbonsäuren nach Hydrolyse (s. 10.3 AM 5)

(n=2)	PMA	BA	TPA	ACA	TMA	PA	IPA	ADA
Migrat [$\mu\text{g}/\text{dm}^2$]	< 0,05	< 0,1	6,0	< 0,05	< 0,08	0,21	13,0	0,15

Tab. 85 RP 170: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11)

	Extraktionsmittel	Dosis [$\mu\text{g}/\text{Platte}$]	Quotient ohne S9-Mix	Quotient mit S9-Mix
RP 170	Acetonitril	0,02 - 200	< 2,0	< 2,0

Die kritische Grenze für einen positiven Nachweis ist das Überschreiten der doppelten Spontanmutationsrate

Tab. 86 RP 170: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest (s. 10.3 AM 12)

Verpackung (Extraktions- mittel)	Konzentration [%Extrakt im Medium]	Konzentration im Medium [mg/L]	Flächenequivalente im Medium [dm^2/L]	Ext. $_{540\text{nm}}$	Überlebensrate [%]
RP 170	0,05	5	1,36	$0,137 \pm 0,061$	96
(Acetonitril)	0,5	50	13,62	$0,102 \pm 0,013$	106
Acetonitril-	0,05	5	-	$0,127 \pm 0,080$	89
Blindwert	0,5	50	-	$0,122 \pm 0,008$	127

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren.

10.6.4 Ergebnisse der 2-teiligen Aluminiumleichtbehälter mit Easy-Open-Verschluss (LB 50, LB 150, LB 300)

FTIR-ATR der Polypropylenbeschichtung (LB):

803(w), 837(w), 970(w), 999(w), 1162(w), 1378(s), 14556(s), 2836(m), 2871(m), 2915(s), 2954(s)

Tab. 87 LB 150: Carbonsäuren nach Hydrolyse (s. 10.3 AM 5)

(n=2)	PMA	BA	TPA	ACA	TMA	PA	IPA	ADA
Migrat [$\mu\text{g}/\text{dm}^2$]	< 0,05	< 0,1	0,18	< 0,05	< 0,08	0,09	10,0	3,84

Tab. 88 LB: Lipophile Substanzen (vgl. AM 7)

(n=2)	Paraffin	TAG	FFA	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG	Summe
Deckel LB 50 [mg/dm^2]	0,274	0,066	-	0,092	0,064	0,184	0,680
Korpus LB 50 [mg/dm^2]	-	0,159	0,047	-	0,103	-	0,309
Deckel LB 150 [mg/dm^2]	0,550	0,104	-	0,152	0,090	0,324	1,220
Korpus LB 150 [mg/dm^2]	-	-	0,980	-	2,386	-	3,366
Deckel LB 300 [mg/dm^2]	0,639	0,147	-	0,159	0,101	0,314	1,360
Korpus LB 300 [mg/dm^2]	-	-	-	-	2,737	1,538	4,275

Tab. 89 LB 300: Untersuchung auf Mutagenität mittels Ames-Test (s. 10.3 AM 11)

	Extraktionsmittel	Dosis [$\mu\text{g}/\text{Platte}$]	Quotient ohne S9-Mix	Quotient mit S9-Mix
LB 300 / 2001	Acetonitril	0,02 - 400	< 2,0	< 2,0
LB 300 / 2002	Acetonitril	4,9 - 400	< 2,0	< 2,0
LB 300 / 2001	95% Ethanol	4,9 - 400	< 2,0	< 2,0
LB 300 / 2002	95% Ethanol	4,9 - 400	< 2,0	< 2,0

Die kritische Grenze für einen positiven Nachweis ist das Überschreiten der doppelten Spontanmutationsrate. Getestet wurde mit den Stämmen TA 98, TA 100 und TA 1537.

Tab. 90 LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest (s. 10.3 AM 12)

Verpackung (Extraktionsmittel)	Konzentration [%Extrakt im Medium]	Konzentration im Medium [mg/L]	Flächenequivalente im Medium [dm^2/L]	Ext. $_{540\text{nm}}$	Überlebensrate [%]
LB 300	0,05	5	1,76	$0,108 \pm 0,016$	76
(Acetonitril)	0,5	50	17,64	$0,108 \pm 0,012$	112
Acetonitril-	0,05	5	-	$0,127 \pm 0,080$	89
Blindwert	0,5	50	-	$0,122 \pm 0,008$	127

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren.

Tab. 91 Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Neutralrottest

Verpackung (Extraktions- mittel)	Konzentration [%Extrakt im Medium]	Konzentration im Medium [mg/L]	Flächenequivalente im Medium [dm ² /L]	Ext. 540nm	Überlebensrate [%]
LB 300/2001 (Acetonitril)	0,25	25	8,6	0,062 ± 0,013	94
	0,5	50	17,1	0,044 ± 0,020	67
	1,0	100	34,2	0,059 ± 0,011	87
LB 300/2002 (Acetonitril)	0,25	25	7,6	0,072 ± 0,018	109
	0,5	50	15,1	0,047 ± 0,009	71
	1,0	100	30,3	0,044 ± 0,004	66
Acetonitril- Blindwert	0,25	25	-	0,055 ± 0,009	83
	0,5	50	-	0,040 ± 0,018	61
	1,0	100	-	0,062 ± 0,010	93
LB 300/2001 (95% Ethanol)	0,25	25	11,0	0,086 ± 0,013	130
	0,5	50	21,9	0,093 ± 0,003	141
	1,0	100	43,8	0,082 ± 0,012	124
LB 300/2002 (95% Ethanol)	0,25	25	7,50	0,083 ± 0,010	126
	0,5	50	15,0	0,058 ± 0,003	88
	1,0	100	30,0	0,103 ± 0,036	156
95%	0,25	25	-	0,060 ± 0,021	91
Ethanol- Blindwert	0,5	50	-	0,067 ± 0,009	100
	1,0	100	-	0,057 ± 0,010	86

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren

Tab. 92 LB 300: Toxizitätsprüfung, Bakterienstamm Salmonella Typhimurium TA 100

Substanz	Dosis	Kolonien pro Platte (n = 3)		Quotient	
	[µg/Platte]	ohne S9-Mix	mit S9-Mix	ohne S9-Mix	mit S9-Mix
Wasser	20	238 ± 8	206 ± 25	1,0	1,0
DMSO	20	228 ± 1	197 ± 9	1,0	1,0
Acetonitril	0,02	199 ± 8	172 ± 23	0,9	0,9
(Lösungsmittelblindwert)	0,2	180 ± 6	170 ± 9	0,8	0,9
Lösung in DMSO	2	191 ± 9	185 ± 52	0,8	0,9
	20	195 ± 1	188 ± 14	0,9	1,0
	200	186 ± 3	181 ± 20	0,8	0,9
LB 300	0,02	171 ± 9	173 ± 4	0,7	0,9
Acetonitrilextrakt	0,2	164 ± 4	178 ± 10	0,7	0,9
Lösung in DMSO	2	176 ± 13	164 ± 9	0,8	0,8
	20	177 ± 14	123 ± 14	0,8	0,6
	200	163 ± 9	28 ± 12	0,7	0,1
Natriumazid	1	194 ± 8	nicht geprüft	1,0	nicht geprüft
2-Aminoanthracen	1	2 ± 1	191 ± 6	0,01	0,8

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren

Tab. 93 LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität Plating Efficiency, 1. Durchgang

Substanz	Konzentration [% Extrakt im Medium]	Flächenequivalente im Medium [dm ² /L]	Überleben pro Kulturflasche (n = 1)
Kontrolle			174
			134
			187
LB 2001, 95% Ethanol, 4 h, 60°C	0,25	10,5	163
	0,5	21,9	67
	1,0	43,8	192
LB 2002, 95% Ethanol 4 h, 60°C	0,25	7,5	0
	0,5	15,0	0
	1,0	30,0	0
Blindwert, 95% Ethanol Equivalentmenge	0,25	-	137
	0,5	-	143
	1,0	-	124

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren

Tab. 94 LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität Plating Efficiency, 2. Durchgang

Substanz	Konzentration [% Extrakt im Medium]	Flächenequivalente im Medium [dm ² /L]	Überleben pro Kulturflasche (n = 3)
Kontrolle			154 ± 9
LB 2001, 95% Ethanol 4 h, 60°C	0,25	12,5	113 ± 5
	0,5	25,0	15 ± 7
	1,0	49,9	1 ± 1
LB 2003a, 95% Ethanol 4 h, 60°C	0,25	10,7	150 ± 7
	0,5	21,3	132 ± 10
	1,0	42,6	101 ± 19
LB 2003b, 95% Ethanol 4 h, 60°C	0,25	21,5	119 ± 4
	0,5	43,0	101 ± 7
	1,0	86,0	91 ± 8
Blindwert, 95% Ethanol Equivalentmenge	0,25	-	145 ± 4
	0,5	-	155 ± 9
	1,0	-	158 ± 4

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren

Tab. 95 LB 300: Fraktionierung mittels SEC-ELSD

	SEC-Schnitt	LB 2001a	LB 2001b	Blindwert
Gesamte Migratmenge		42,30 mg	48,77 mg	Equivalentmenge 95% Ethanol
0 – 400 Da	17,8 – 24,0 Min	5,9 mg	5,2 mg	1,5 mg
400 – 1000 Da	15,8 – 17,8 Min	14,6 mg	16,1 mg	0 mg
>1000 Da	12,0 – 15,8 Min	3,8 mg	3,2 mg	0 mg

verwendet wurde der Polyesterstandard, Bedingungen s. 10.3 AM 2

Tab. 96 LB 300: Untersuchung auf Zytotoxizität mittels Plating Efficiency nach Fraktionierung

Substanz	Konzentration im Test [$\mu\text{g/mL}$]	Überleben pro Kulturflasche (n = 3)
Kontrolle (1% DMSO)		51 \pm 5
LB 2001a, 95% Ethanol	50	0
Fraktion <400 Da	20	40 \pm 16
	10	43 \pm 3
	5	50 \pm 12
LB 2001a, 95% Ethanol	50	0
Fraktion 400 – 1000 Da	20	29 \pm 2
	10	45 \pm 3
	5	64 \pm 9
LB 2001a, 95% Ethanol	50	0
Fraktion > 1000 Da	20	57 \pm 3
	10	58 \pm 15
	5	60 \pm 4
LB 2001b, 95% Ethanol	50	0
Fraktion <400 Da	20	48 \pm 13
	10	48 \pm 10
	5	48 \pm 9
LB 2001b, 95% Ethanol	50	0
Fraktion 400 – 1000 Da	20	47 \pm 5
	10	41 \pm 2
	5	49 \pm 7
LB 2001b, 95% Ethanol	200	3 \pm 2
Fraktion > 1000 Da	100	14 \pm 3
	50	18 \pm 4
Blindwert, 95% Ethanol	200	41 \pm 7
Fraktion <400 Da	100	49 \pm 5
	50	57 \pm 5
Blindwert, 95% Ethanol	-	42 \pm 3
Fraktion 400 – 1000 Da	-	47 \pm 11
	-	54 \pm 1
Blindwert, 95% Ethanol	-	56 \pm 6
Fraktion > 1000 Da	-	66 \pm 2
	-	59 \pm 4

Die Ausgangslösungen wurden mit unterschiedlichen Mengen an DMSO verdünnt, so dass einheitlich verdünnte Stammlösungen (10 mg/mL) für die Testdurchführung resultieren

10.7 Anwendbarkeit von Diffusionsmodellen

Tab. 97 Migrationskinetik: 50% Ethanol, 40 °C

Zeit [h]	BADGE-Äquivalente [$\mu\text{g}/\text{dm}^2$]											
	0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	7	8	27	51
BADGE·2H₂O	8,2	8,8	9,4	9,9	11,1	12,2	13,4	14,6	16,4	17,5	28,4	34,0
	8,2	8,8	9,4	9,9	11,1	12,1	13,2	14,0	15,2	17,2	27,3	33,9
	8,2	8,8	9,4	9,9	11,1	12,2	13,3	14,6	15,9			
BADGE·H₂O·BuEtOH	1,1	2,1	2,5	2,9	3,9	4,6	5,3	6,0	6,2	6,5	13,7	20,1
	1,1	1,9	2,5	2,8	4,0	4,6	5,3	5,7	6,2	6,6	13,9	19,4
	1,1	2,0	2,5	2,9	4,0	4,7	5,3	5,8	6,3	6,7	13,8	19,5
BADGE·H₂O·BPA	3,3	5,4	7,7	9,3	12,6	15,6	16,5	19,5	22,6	24,0	65,0	108,7
	3,1	5,3	7,6	8,9	12,0	15,2	16,7	19,9	22,8	24,1	64,3	105,2
	3,5	5,4	7,6	9,3	12,2	15,5						
BADGE·EtEtOH	0,8	1,1	1,5	1,6	2,0	2,3	2,6	3,0	3,3	3,5	5,6	6,4
	0,7	1,2	1,5	1,7	2,1	2,3	2,6	3,1	3,3	3,5	5,5	6,4
	0,7	1,1	1,6	1,6	2,1	2,4	2,7	3,0	3,3	3,5	5,6	6,3
BADGE	0,6	0,8	1,0	1,3	1,7	2,0	2,5	3,0	3,6	3,7	6,5	7,4
	0,3	0,8	0,9	1,2	1,5	1,9	2,1	3,0	3,6	3,7	5,9	7,0
	0,6	0,9	1,0	1,3	1,7	2,1	2,5					
BADGE·EtEtOH·BuEtOH	1,8	2,8	3,6	4,2	5,9	7,2	8,6	9,4	10,3	11,0	22,6	30,8
	1,8	2,9	3,6	4,2	5,9	7,1	8,6	9,4	10,3	11,0	22,5	30,8
	1,8	2,8	3,7	4,1	5,9	7,2	8,4	9,3	10,2	11,1	22,6	30,7
BADGE·BuEtEtOH	1,8	2,7	3,4	3,7	5,4	6,4	7,1	8,1	8,7	9,1	18,1	26,2
	1,8	2,7	3,4	3,6	5,3	6,3	7,2	7,8	8,8	9,1	18,1	25,3
	1,5	2,5	3,4	3,6	5,4	6,5	7,2	8,1	8,8	9,0	18,1	26,0
Cyclo-di-BADGE	26,1	35,3	43,1	48,8	71,8	83,4	96,8	103,7	117,9	122,8	277,0	412,7
	24,2	35,2	42,1	46,7	70,1	77,1	89,5	106,9	121,0	125,6	278,6	405,5
	25,1	32,3	42,4	46,7	69,1	81,9	88,1					
BADGE·BPA	4,6	6,6	8,4	9,8	15,3	16,1	18,7	19,4	20,9	21,5	40,4	48,4
	4,6	6,6	8,4	9,7	15,3	16,0	18,5	19,2	20,8	21,6	40,3	48,1
	4,6	6,6	8,4	9,8	15,2	16,1	18,6	19,4	20,9	21,5		
BADGE(n=1)·H₂O·BPA	4,3	4,7	7,0	9,4	13,1	13,6	14,3	15,0	15,7	16,4	30,9	43,7
	4,2	4,8	7,0	9,4	13,2	13,7	14,2	15,0	15,8	16,5	31,0	43,8
	4,2	4,8	7,0	9,4	13,1	13,7	14,2	15,0	15,8	16,4	30,9	43,7
BADGE(n=1)·2BPA	6,0	6,9	7,6	8,8	13,4	14,2	15,0	15,7	16,8	17,9	33,8	48,7
	6,0	6,8	7,6	8,6	13,4	14,2	15,0	15,8	16,8	17,8	34,1	48,7
	5,9	6,9	7,7	8,5	13,4	14,2	15,0	15,7	16,8	17,8		
BADGE(n=2)·H₂O	4,2	4,9	5,1	5,5	8,6	10,2	10,6	11,2	11,7	12,3	20,9	24,7
	4,2	5,0	5,1	5,6	8,6	10,2	10,6	11,2	11,8	12,3	20,8	24,8
	4,2	5,0	5,1	5,6	8,5	10,3	10,6	11,2	11,8	12,3	20,7	24,6
BADGE(n=2)	0,3	0,8	1,4	1,7	2,8	3,1	3,4	3,7	4,1	4,4	5,8	7,0
	0,3	0,8	1,4	1,7	2,8	3,2	3,4	3,7	4,1	4,4	5,7	7,0
	0,3	0,8	1,4	1,7	2,8	3,2	3,4	3,7	4,1	4,5	5,7	7,0
Summe	61,8	81,9	101,1	115,1	165,8	188,3	209,2	233,6	259,5	272,0	568,3	812,2

Tab. 98 Migrationskinetik: 50% Ethanol, 60°C

Zeit [h]	0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	7	8
	BADGE-Equivalente [$\mu\text{g}/\text{dm}^2$]									
BADGE-2H ₂ O	6,5	7,9	9,3	12,0	14,2	15,7	16,7	17,8	18,6	19,8
	6,4	8,0	9,2	11,9	14,1	15,6	16,7	17,9	18,7	19,8
	6,4	8,0	9,3	11,9	14,2	15,5	16,7	17,8	18,6	19,7
BADGE-H ₂ O-BuEtOH	4,3	6,7	8,2	10,4	13,2	15,1	17,0	17,8	19,7	21,4
	4,0	6,5	8,6	9,6	12,3	14,5	15,9	18,7	18,7	19,8
	3,8	6,2	8,0	9,6	12,9	14,3	16,3	17,8	19,0	20,2
BADGE-H ₂ O-BPA	4,8	8,4	11,0	15,2	18,8	22,3	25,0	29,9	30,6	34,3
	4,8	8,4	11,8	15,1	18,5	22,4	24,7	29,6	30,6	32,5
	4,6	7,8	10,9	13,7	18,4	20,4	23,8	27,3	28,7	31,8
BADGE-EtEtOH	2,5	4,2	5,4	6,8	8,7	9,7	10,6	11,2	11,8	12,3
	2,5	4,2	5,5	6,9	8,8	9,8	10,5	11,3	11,7	12,3
	2,5	4,2	5,5	6,8	8,8	9,7	10,6	11,3	11,7	12,3
BADGE	2,0	2,6	3,1	3,9	4,5	4,9	5,3	5,3	5,4	5,4
	1,9	2,6	3,3	4,0	4,6	5,0	5,4	5,4	5,5	5,7
	1,9	2,5	3,2	3,8	4,7	4,8	5,3	5,3	5,6	5,6
BADGE-EtEtOH-BuEtOH	4,3	7,9	10,4	14,3	17,5	21,1	23,9	28,3	29,5	30,8
	4,3	7,9	10,4	14,3	17,5	21,0	23,9	28,3	29,5	30,8
	4,3	7,9	10,4	14,2	17,5	20,9	23,8	28,3	29,5	30,7
BADGE-BuEtEtOH	4,6	8,2	10,1	14,1	16,7	20,8	23,3	27,8	20,9	31,1
	4,5	8,0	10,4	14,1	16,3	20,1	22,5	27,3	29,0	30,9
	4,5	7,7	10,2	14,2	16,5	19,9	22,3	26,3	28,9	30,7
Cyclo-di-BADGE	62,9	113,8	153,1	225,2	269,4	315,0	353,3	415,1	437,8	462,2
	59,0	114,1	162,2	228,4	257,6	316,5	340,9	413,3	427,7	448
	58,0	107,5	151,4	204,4	256,4	294,9	337,8	411,4	434,2	457,7
BADGE-BPA	5,2	7,0	9,3	15,1	17,0	18,7	23,0	25,8	27,4	28,0
	5,1	7,0	9,2	15,0	17,1	18,8	23,0	25,7	27,4	28,0
	5,2	7,0	9,2	15,0	17,1	18,7	23,0	25,7	27,4	28,1
BADGE(n=1)-H ₂ O-BPA	6,1	9,2	11,8	19,3	23,1	26,2	29,3	38,6	40,0	41,6
	6,2	9,3	11,9	19,3	23,1	26,2	29,4	38,5	39,9	41,6
	6,1	9,2	11,8	19,3	23,1	26,2	29,4	38,5	39,9	41,5
BADGE(n=1)-2BPA	7,4	11,3	15,2	24,0	27,3	31,9	35,4	47,1	49,2	50,1
	7,4	11,3	15,3	24,0	27,3	31,9	35,5	46,5	49,2	50,0
	7,5	11,3	15,2	24,0	27,4	31,8	35,4	47,0	49,3	50,1
BADGE(n=2)-H ₂ O	3,3	5,1	6,3	10,8	12,3	14,0	15,6	21,5	22,5	23,0
	3,3	5,1	6,4	10,9	12,3	13,9	15,7	21,6	22,6	23,2
	3,3	5,1	6,3	10,8	12,2	14,0	15,5	21,5	22,4	23,2
BADGE(n=2)	1,2	2,9	4,0	6,2	7,2	8,3	10,5	12,1	13,0	13,1
	1,2	2,9	4,0	6,3	7,2	8,4	10,5	12,2	12,9	13,2
	1,2	2,9	4,0	6,2	7,1	8,4	10,5	12,2	12,9	13,1
Summe	111,7	192,6	260,3	370,3	441,0	515,8	578,0	695,0	726,0	764,5

Tab. 99 Migrationskinetik: 50% Ethanol, 80°C

Zeit [h]	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	3	4	5	6	7	8	9
	BADGE-Equivalente [$\mu\text{g}/\text{dm}^2$]												
BADGE-2H ₂ O	11,2	13,9	15,6	17,3	18,4	19,7	21,1	22,8	23,8	25,3	32,2	33,4	34,8
	11,3	14,1	15,7	17,2	18,3	19,4	21,4	22,4	23,8	25,0	32,0	3,4	34,5
	11,2	14,1	15,5	17,4	18,1	19,7							
BADGE-H ₂ O-BuEtOH	6,0	7,9	11,5	13,2	16,0	17,1	21,2	24,2	26,6	27,6	27,7	29,1	33,3
	6,5	9,4	11,9	12,8	15,2	16,4	20,4	23,9	26,3	27,4	27,6	28,1	33,1
	6,9	9,6	11,4	13,9	15,6	16,9	20,5	24,0					
BADGE-H ₂ O-BPA	22,7	39,9	53,8	66,3	77,1	83,1	85,9	99,1	103,8	124,8	133,5	147,2	167,1
	24,5	42,4	55,7	63,0	76,9	82,1	87,8	99,4	103,4	124,8	133,1	147,8	166,2
	28,2	43,1	53,6	67,0									
BADGE-EtEtOH	3,0	4,4	5,4	6,4	7,2	7,6	8,0	8,4	8,7	9,3	9,9	10,4	10,9

	3,0	4,4	5,5	6,3	7,2	7,6	7,9	8,3	8,8	9,3	9,9	10,5	10,9
	3,0	4,4	5,5	6,4	7,2	7,7	7,9	8,3					
BADGE	3,4	4,6	4,9	5,0	5,3	5,4	5,6	6,0	6,2	6,4	6,2	5,7	5,2
	3,4	4,6	4,9	5,0	5,3	5,4	5,6	5,8	6,1	6,4	5,8	5,6	5,2
	3,4		4,9	5,0	5,3	5,4	5,7	6,0					
BADGE-EtEtOH-BuEtOH	10,7	16,7	22,3	26,3	31,1	32,6	36,1	38,7	40,3	41,9	43,3	46,4	48,3
	10,6	16,7	22,3	26,2	31,0	32,5	36,1	38,7	40,3	41,9	43,2	46,4	48,3
	10,6	16,7	22,3	26,3	61,1	32,5	36,1	38,8					
BADGE-BuEtEtOH	9,8	14,8	19,3	22,7	28,5	28,9	31,6	33,5	35,2	37,8	39,0	40,4	41,6
	11,3	15,5	19,4	22,7	27,6	29,1	31,6	34,0	35,1	37,9	38,9	40,9	41,6
	11,7	15,9	19,4	23,2	27,6	29,5	31,3	33,5	35,2				
Cyclo-di-BADGE	152,2	230,0	314,9	368,4	496,0	523,4	572,1	599,1	634,2	642,4	705,6	717,5	773,3
	166,2	243,5	313,9	346,7	457,1	527,1	580,0	583,0	610,0	643,6	696,0	711,8	770,4
	176,3	253,4	296,7	377,6	490,3								
BADGE-BPA	17,9	31,6	41,0	46,3	54,2	56,2	56,9	57,4	59,7	63,5	65,9	68,0	70,0
	18,7	31,9	41,4	46,3	54,2	55,6	56,9	57,5	60,4	63,2	66,2	67,8	70,0
	19,7	31,9	40,6	46,3	54,2	55,7	56,9						
BADGE(n=1)·H₂O-BPA	10,2	19,2	24,4	30,2	37,7	40,6	48,2	54,7	60,9	63,1	67,3	70,2	74,2
	10,5	19,6	24,6	30,2	37,8	40,0	47,5	53,5	60,2	64,1	67,1	70,4	73,7
	10,5	19,5	24,2	30,8	37,9	40,7	47,6	53,4					
BADGE(n=1)·2BPA	10,7	38,0	50,4	61,4	80,0	81,0	90,3	99,7	109,1	120,4	127,6	139,4	149,8
	17,7	38,1	50,0	60,6	79,3	81,0	90,7	99,6	109,1	120,3	128,3	139,5	148,6
	17,7	37,7	50,1	61,3	79,2	80,7	90,4	99,6	109,5				
BADGE(n=2) H₂O	11,5	21,0	27,8	34,5	45,7	49,2	55,2	58,7	63,6	65,8	69,2	72,1	73,5
	11,9	21,0	27,7	34,1	45,9	49,1	54,7	57,9	63,7	65,7	69,3	71,9	73,6
	11,9	21,0	27,4	34,2	45,8	49,2	55,1	58,5	63,6				
BADGE(n=2)	4,5	7,2	10,0	12,0	16,2	17,2	17,8	18,7	19,2	17,2	16,8	16,1	15,9
	4,5	7,1	10,0	12,0	16,2	17,2	17,9	18,8	19,1	17,0	16,7	16,1	15,9
	4,5	7,1	10,	12,0	16,3	17,1	17,8	18,7	19,1				
Summe	296,5	465,5	595,3	704,8	907,0	962,5	1054,0	1111,7	1178,9	1246,1	1339,2	1378,1	1495,0

Tab. 100 Migrationskinetik: 95% Ethanol, 60 °C

Zeit [h]	2	4	6	8	24	48
	BADGE-Equivalente [µg/dm²]					
BADGE·2H₂O	18,5	18,5	18,9	21,1	41,3	45,3
BADGE·H₂O·BuEtOH	13,5	17,4	18,8	21,4	39,5	42,3
BADGE·H₂O·BPA	29,3	37,9	43,8	49,5	89,7	91,9
BADGE·EtEtOH	8,0	8,5	9,5	9,6	20,2	26,2
BADGE	0	7,6	9,0	9,9	10,0	12,3
BADGE·EtEtOH·BuEtOH	29,7	35,1	35,8	43,9	91,0	91,8
BADGE·BuEtEtOH	24,1	32,3	37,5	43,5	76,5	78,5
Cyclo-di-BADGE	505,1	567,3	732,7	841,3	1458,5	1486,4
BADGE·BPA	26,1	29,8	31,8	32,8	77,8	79,2
BADGE(n=1)·H₂O·BPA	41,9	44,8	46,7	47,8	111,3	118,9
BADGE(n=1)·2BPA	87,3	105,7	107,1	116,4	250,4	264,8
BADGE(n=2) H₂O	24,5	29,1	31,9	35,2	82,1	83,6
BADGE(n=2)	34,8	46,1	50,1	58,3	99,3	104,8
Summe	842,8	980,1	1173,6	1330,7	2447,6	2526,0

Tab. 101 Migrationskinetik: Isooktan, 80 °C

Zeit [h]	0,5	1	1,5	2	4	6	8	12	24
Cyclo-di-BADGE, BADGE-Equivalente [µg/dm²]	7,3	9,9	12,1	14,8	17,5	19,4	21,3	25,5	40,2

übrige Verbindungen <5µg BADGE-Eq./dm²

Tab. 102 Migrationskinetik: 33% Butylacetat / Isooktan, 60 °C

Zeit [h]	BADGE-Equivalente [$\mu\text{g}/\text{dm}^2$]							
	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
BADGE·2H ₂ O	1,9	5,2	6,4	7,0	8,3	9,3	10,0	10,5
BADGE·H ₂ O·BuEtOH	1,0	6,4	8,3	8,7	9,1	9,9	10,5	11,1
BADGE·H ₂ O·BPA	2,6	25,3	33,2	37,3	40,5	47,7	52,2	55,0
BADGE·EtEtOH	0,5	5,8	6,6	7,2	7,5	7,9	8,1	8,7
BADGE	0,7	5,6	6,3	6,5	6,8	7,2	7,3	7,6
BADGE·EtEtOH·BuEtOH	1,0	15,2	19,5	19,7	21,8	22,6	23,7	25,4
BADGE·BuEtEtOH	1,6	15,1	18,0	20,4	21,9	23,5	24,8	25,7
Cyclo-di-BADGE	24,3	207,8	280,1	328,3	343,2	389,7	420,0	458,7
BADGE·BPA	2,3	29,2	37,7	40,7	44,0	48,0	52,7	55,0
BADGE(n=1)·H ₂ O·BPA	2,4	16,6	22,2	23,8	26,7	29,0	31,3	33,6
BADGE(n=1)·2BPA	1,4	30,4	41,7	48,4	52,1	57,9	65,5	68,8
BADGE(n=2)·H ₂ O	2,1	20,8	27,8	32,6	35,6	38,9	44,8	45,6
BADGE(n=2)	0,8	18,8	25,5	31,7	34,4	38,7	42,8	43,3
Summe	42,6	402,2	533,3	612,3	651,9	730,3	793,7	849,0

Tab. 103 BADGE-Derivate im Acetonitrilextrakt und im Migrat mit Sonnenblumenöl

	BADGE-Equivalente [$\mu\text{g}/\text{dm}^2$]	
	Acetonitrilextrakt (68 Stunden, Raumtemperatur)	Migrat in Sonnenblumenöl (1 Stunde 121 °C)
BADGE·2H ₂ O	10,0	18,8
BADGE·H ₂ O·BuEtOH	17,6	17,2
BADGE·H ₂ O·BPA	37,7	40,0
BADGE·EtEtOH	10,6	9,3
BADGE	6,2	18,8
BADGE·EtEtOH·BuEtOH	39,7	65,3
BADGE·BuEtEtOH	30,5	52,9
Cyclo-di-BADGE	677,6	506,9
BADGE·BPA	26,2	48,2
BADGE(n=1)·H ₂ O·BPA	52,2	71,0
BADGE(n=1)·2BPA	91,4	96,1
BADGE(n=2)·H ₂ O	26,6	33,8
BADGE(n=2)	45,5	35,3
Summe	1071,8	1013,6

Tab. 104 Berechnung der Diffusionskoeffizienten mittels MIGRATEST © Lite
 Ap und Kp,f-Werte für die Migration in 50% Ethanol, bei 40 °C, 60 °C und 80 °C

Migrant	Ap	Ap	Ap	Kp, f	Kp, f	Kp, f
	40 °C	60 °C	80 °C	40 °C	60 °C	80 °C
BADGE·2H₂O (MW:376)	3,5	1,9	0,8	200	1	1
BADGE·H₂O·BuEtOH (MW:476)	2,6	2,6	1,5	1	1	1
BADGE·H₂O·BPA (MW:586)	-	2,7	4,5	-	1	1
BADGE·EtEtOH (MW:430)	1,4	2,6	0,9	2500	1000	1500
BADGE (MW:340)	2,0	2,0	1,6	1	700	300
BADGE·EtEtOH·BuEtOH (MW:548)	2,7	2,5	2,6	1	1	800
BADGE·BuEtEtOH (MW:502)	2,4	2,7	2,4	700	700	700
Cyclo-di-BADGE (MW:568)	2,2	2,3	2,2	1	1	700
BADGE·BPA (MW:568)	5,0	3,2	4,2	700	700	1
BADGE(n=1)·H₂O·BPA (MW:870)	2,6	2,3	1,7	1	1	1
BADGE(n=1) 2BPA (MW:796)	3,1	3,1	3,3	1	1	1
BADGE(n=2)·H₂O (MW:926)	5,0	4,7	5,3	1	1	1
BADGE(n=2) (MW:908)	2,6	3,0	2,9	6000	1	1

Ap = Verhalten der Hauptdiffusion bzw. die „Leitfähigkeit“ der Polymermatrix zu der Diffusion des Migranten
 Kp, f = Verteilungskoeffizient eines Migranten zwischen Lack und Flüssigkeit

“Zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten mit MIGRATEST © Lite wird $A_p = A_p' \cdot t$ verwendet, wobei $t = 0$ und folglich $A_p' = A_p$ (aus 0) oder ganz allgemein $A_p' = 2,75$ (Mittelwert von A_p), bzw. $A_p' = A_p = 5$ (worst case) eingesetzt wird“ (PIRINGER 2002).

11 Literatur

- BAYER, Lackrohstoffe, Farbmittel und Sondergebiete,
<http://www.bayer.de/de/unternehmen/arbeitsgebiete/polymere/index.html>, **2001**
- BAYER, Sicherheitsdatenblatt Desmodur T 80 F, vom 30.06.1995
- BERGER, U., OEHME, M., and 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. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 369, 115-123
- BGV (Bedarfsgegenständeverordnung) in der Fassung der Bekanntmachung vom 23.12.1997 (BGBl. 1998 I S. 5) zuletzt geändert 13.07.2005 (BGBl. I S. 2159)
- BIEDERMANN, M., BRONZ, M., BÜRCHLER, B., GROB, K., KELLER, F., NEUKOM, H.-P., RICHARD, N., SPINNER, C., Reaction products, of bisphenol-A-diglycidyl Ether (BADGE) and bisphenol-F-diglycidyl Ether (BFDGE) with hydrochloric acid and water in canned foods with aqueous matrix, 1. Analytical, Methods, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **1999a**, 90, 177-194
- BIEDERMANN, M., GROB, K., BÖHLER, P., WIDMER, R. Identification of migrants from coatings of food cans and tubes: reaction products of bisphenol-A-diglycidylether (BADGE) with phenols and solvents. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **1998**, 92, 515-534
- BIEDERMANN, M., GROB, K., BRONZ, M., CURCIO, R., HUBER, M., LOPEZ-FABAL, F., Bisphenol-A-diglycidyl ether (BADGE) in edible-oil-containing canned foods: Determination by LC-LC-fluorescence detection, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **1996**, 87, 547-558
- BIEDERMANN, M., GROB, K., Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: analysis by gradient NPLC, *Food Addit. Contam.*, **1997**, 15, 609-618
- BIEDERMANN, M., und GROB, K., Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: analysis by gradient NPLC. *Food Addit. Contam.*, **1998**, 15, 609-618
- BILES, J. E., WHITE, K. D., McNeal, T. P., BEGLEY, T. H., Determination of diglycidyl ether of bisphenol A and its derivatives in canned foods, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 1965-1969
- BORENFREND, E. und PUERNER, J.A., A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays., *J.Tiss.Cult.Meth.* **1984**, 9, 7-9,
- BRAUER, B. FUNKE, T., Spezifische Bestimmung primärer aromatischer Amine in wässrigen Migranten von Bedarfsgegenständen aus Kunststoff, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, **2002**, 98, 405-411
- BRORSON, T., SANGÖ, C., SKARPING, G., Evaluation of chromatographic methods for the determination of isocyanates in air, *Intern. J. Anal. Chem.*, **1990**, 38, 399-413
- BUNDESAMT FÜR GESUNDHEIT BAG, Bern, Bulletin Nr. 20, <http://www.bag.admin.ch>, 26. Mai **1997**
- BUNDESAMT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄR-MEDIZIN (BgVV), L 00.00-6, Bestimmung von primären aromatischen Aminen in wässrigen Prüflebensmitteln, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln, Januar **1995**
- CARERI, M., MANGIA, A., MUSCI, M., Review-applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: pesticide, drug and toxic substance residues, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 727, 153-184
- COUNCIL OF EUROPE, Resolution, AP (96)5 über Oberflächenbeschichtungen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Kontakt zu kommen, Empfehlungen des Europarates, vom 2. Oktober **1996**
- CRAMER, G. M., FORD, R. A., HALL, R. L., Estimation of toxic hazard – A decision tree approach, *J. Cosmet. Toxicol.*, **1978**, 16, 255-276

- DAMANT, A. P., JICKELIS, S. M., CASTLE, L., Liquid chromatographic determination of residual isocyanate monomers in plastic intended for food contact use, J. AOAC Int., **1995**, 78, 711-719
- DIN EN 1136-1-14 (2002) Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln – Kunststoffe, Teil 1-14, Beuth Verlag GmbH, Berlin **2002**
- DIN EN 13130-1 (2004a) Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln – Substanzen in Kunststoffen, die Beschränkungen unterliegen – Teil 1: Leitfaden für die Prüfverfahren für die spezifische Migration von Substanzen aus Kunststoffen in Lebensmittel und Prüflebensmittel, die Bestimmung von Substanzen in Kunststoffen und die Auswahl der Kontaktbedingungen für Prüflebensmittel, Beuth Verlag GmbH, Berlin **2004a**
- DIN EN 13130-8 (2004) Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln – Substanzen in Kunststoffen, die Beschränkungen unterliegen – Teil 8: Bestimmung von Isocyanaten in Kunststoffen, Beuth Verlag GmbH, Berlin **2004b**
- DIN EN ISO 11909 (1998) Bindemittel für Beschichtungsstoffe – Polyisocyanate – Allgemeine Prüfverfahren, Beuth Verlag GmbH, Berlin **1998**
- DIN V ENV 13130-1 (Vornorm), Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln – Substanzen in Kunststoffen, die Grenzwerten unterliegen – Teil 1: Leitfaden für die Auswahl der Prüfverfahren für die spezifische Migration von Substanzen aus Kunststoffen in Lebensmittel und Prüflebensmittel, die Bestimmung von Substanzen in Kunststoffen und die Auswahl der Kontaktbedingungen für Prüflebensmittel, Beuth Verlag GmbH, Berlin **1999**
- ELLENDT, K., GUTSCHE, B., STEINER, G., Analysis of laminates – Determination of isocyanate residues and primary aromatic amine migration, Dtsch. Lebensm. Rundsch., **2003**, 99, 131-136
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Entscheidung 2002/657/EG zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen vom 12. August **2002c**
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Guidelines of the Scientific Committee on Food for the presentation of an application for safety assessment of substances to be used in food contact materials prior to its authorisation. Scientific Committee on Food document SCF/CS/PLEN/GEN/100 Final, 19. Dezember **2001a**
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 1999/91/EG zur Änderung der Richtlinie 90/128/EWG der Kommission über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, vom 23. November **1999** (ABl. EG Nr. L 310/41)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 2001/61/EG der Kommission über die Verwendung bestimmter Epoxyderivate in Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, vom 8. August **2001b** (ABl. EG Nr. L 215/26)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 2002/16/EG der Kommission über die Verwendung bestimmter Epoxyderivate in Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, vom 20. Februar **2002a** (ABl. EG Nr. L 51/27)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 2002/72/EG der Kommission über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, vom 06. August **2002b** (ABl. EG Nr. L 220/18)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 2005/1895/EG der Kommission über die Beschränkung der Verwendung bestimmter Epoxyderivate in Materialien und Gegenständen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, vom 18. November **2005a** (ABl. EG Nr. L 302/28)

- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 2007/19/EG der Kommission zur Änderung der Richtlinie 2002/72/EWG 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 Migrationsuntersuchung von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen vom 30. März **2007** (ABl. EG Nr. L 91/17)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 90/128/EWG der Kommission über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, vom 23. Februar **1990** (ABl. EG Nr. L 75/19)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 97/48/EG der Kommission zur zweiten Änderung der Richtlinie 82/711/EWG des Rates über die Grundregeln zur Ermittlung der Migration von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, vom 12. August **1997** (ABl. EG Nr. L 222/11)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Superdirective, EMB/993-Rev.5-1, draft document DG Sanco D3/LR vom 02.03.**2003**, (<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/plasticmaterialsfoodstuffs.pdf>)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Verordnung (EG) Nr. 1935/2004 des Europäischen Parlaments 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 vom 27. Oktober **2004** (ABl. EG Nr. L 338/4)
- EUROPÄISCHER RAT, Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt, vom 27. Juni **1967** (AbI. EG Nr. L 196/1), in der Fassung der Anpassungsrichtlinie 2001/59/EG vom 21.08.2001 (ABl. EG Nr. L 225/1)
- EUROPÄISCHER RAT, Richtlinie 82/711/EWG des Rates über die Grundregeln für die Ermittlung der Migration von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen vom 23. Oktober **1982** (ABl. EG Nr. L 297/26)
- EUROPÄISCHER RAT, 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, vom 19. Dezember **1985** (ABl. EG Nr. L 372/14)
- EUROPEAN CHEMICALS BUREAU (ECB) **2006**, Software ToxTree – v 1.00, <http://ecb.jrc.it.QSAR>
- EUROPEAN DIISOCYANATE AND POLYOL PRODUCERS ASSOCIATION (ISOPA), Applications of diisocyanates, http://www.isopa.org/htdocs/isopa_site/documents_ns/Soc-Econ%20Final%206-10-2003.pdf, Oktober **2003**
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 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, http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science//afc/afc_guidance/722.Par.0002.File.dat./afc/noteforguidancefcm_en1.pdf vom 08. Juni **2006**
- 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 regulating of polymers in contact with foods: a review. Food Addit. Contam., **1999**, 16, 579-590
- JICKELSS, S. M., NICHOL, J. CASTLE, L., Determination of food contamination by mineral oil material from printed cardboard using on-line coupled LC-GC-FID, Food Addit. Contam., **1994**, 11, 595-604

- KANERVA, L., JOLANKI, R., TUPASELA, O., HALMEPURO, L., KESKINEN, H., ESTLANDER, T., Immediate and delayed allergy from epoxy resins based on diglycidyl ether of bisphenol A, *Scand. J. Work Environ. Health*, **1991**, 17, 208-215
- KARLSSON, D., DALENE, M., SKARPING, G., Determination of complex mixtures of airborne isocyanates and amines, Part 5, *Analyst*, **1998a**, 123, 1507-1512
- KARLSSON, D., DALENE, M., SKARPING, G., Determination of complex mixtures of airborne isocyanates and amines, Part 4, *Analyst*, **1998b**, 123, 117-123
- KITTEL, H., *Lehrbuch der Lacke und Beschichtungen*, 3 Bände, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **1998**
- KUCK, M., BALLE, G., SLAWYK, w., Sampling of diisocyanates (HDI, TDI) in air by derivatisation with secondary amines as reagents, Part 1, *Analyst*, **1999**, 124, 933-939
- LAU, O. W., WONG, S. K., Contamination in food from packaging material, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 882, 255-270
- LAWSON, G., BARBY, C. T., LAWSON, C., Contaminant migration from food packaging laminates used for heat and meals, *Fresenius J. Anal. Chem*, **1996**, 354, 483-489
- LFGB (Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch) in der Fassung der Bekanntmachung vom 26.04.2006, (BGBl. I S. 945)
- LIND, P., SKARPING, G., DALENE, M., Biomarkers of toluene diisocyanate and thermal degradation products of polyurethane, with special reference to the sample preparation, *Anal. Chem. Acta*, **1996**, 333, 277-283
- LINTSCHINGER, J., RAUTER, W., Simultaneous determination of bisphenol A diglycidyl ether, bisphenol F diglycidyl ether and their hydrolysis and chlorhydroxy derivatives in canned foods, *Eur. Food Res. Technol.*, **2000**, 211, 211-217
- LMBG (Gesetz über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen) in der Fassung der Bekanntmachung vom 9. September 1997 (BGBl. I S. 2296)
- MITTAG, N., FÖRSTER, S., SIMAT, T.J., Zytotoxische Untersuchungen an Migraten von Konservendosen mit lackierter Innenbeschichtung, *Lebensmittelchemie*, **2005**, 59, 123-124
- NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), Manual of analytical methods (NMAM), Fourth Edition, Method 5524, Issue 2, <http://www.cdc.gov/niosh/grants>, **1994**
- NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), Pocket guide to chemical hazards, Toluene-2,4-diisocyanate, <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0620.html>, September **2005a**
- NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), Pocket guide to chemical hazards, Toluene-2,4-diisocyanate, <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0621.html>, September **2005b**
- NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), Work related asthma, <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-111/pdfs/2003-111j.pdf>, **2003**
- OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION (OSHA), Method 18: Diisocyanates 2,4-TDI and MDI, Department of Labor, Salt Lake City, <http://www.osha-slc.gov/dts/slhc/methods> **1980**
- OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION (OSHA), Method 54: Methylisocyanate (MIC), Department of Labor, Salt Lake City, <http://www.osha-slc.gov/dts/slhc/methods> **1985**
- OECD, Guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application assays, Council of the OECD adopted the guidelines 471 and 472 in **1983**
- OLDRING, P., unveröffentlichte Ergebnisse **2001**

- ONKEN, J., und BERGER, R. G., Der Lichtstredetektor (ELSD) in der Lebensmittelanalytik, Dtsch. Lebensm. Rundsch., **1998**, 94, 287-291
- PETERSEN, H., Bisphenol A-Diglycidylether (BADGE)- Vorkommen, Abbauprodukte und Ersatzstoffe in Lebensmittel, Forschungsbericht aus der Wehrmedizin, Hamburg, April **2002**
- PETERSEN, H., SCHÄFER, A., BUCKOW, C. A., SIMAT, T. J., STEINHART, H., Determination of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in food: identification and quantification by internal standard, Eur. Food Res. Technol. **2003**, 216, 355-365
- PIRINGER, O., Persönliche Mitteilung, **2002**
- POCIUS, A. V., Adhesion and adhesives technology – An introduction, 2. Auflage, Carl Hanser Verlag, München, **2002**
- RAUTER, W., DICKINGER, G., ZIHLARZ., R., Determination of bisphenol A diglycidylether (BADGE) and its hydrolysis products in canned oily foods from Austrian market, Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, **1999**, 208, 208-211
- ROH, Y. M., STREICHER, R. P., ERNST, M. K., Development of a new approach for total isocyanate determination using reagent 9-anthracenylmethyl 1-piperazinecarboxylate, Analyst, **2000**, 125, 1691-1696
- RÖPKE, W., Der Lichtstredetektor in der HPLC, Laborpraxis, Techlab GmbH, <http://www.techlab.de/applicat/laborpr.html>, **2000**
- RUDZINSKI, W., SUTCLIFFE, R., DAHLQUIST, B., KEY-SCHWARTZ, R., Evaluation of tryptamine in an impinger and XAD-2 for the determination of hexamethylen-based isocyanates in spray-painting operations, Analyst, **1997**, 122, 605-608
- SCF, Guidelines for presentation of data for toxicological evaluation of a substance to be used in materials and articles intended to come into contact with foodstuffs, <http://cpf.jrc.it/webpack2000/downloads/nguidance.pdf>, **2000**
- SCF, Opinion on bisphenol A diglycidyl ether, Document SCF/CS/PM/3243-Final vom 24. März **1999**
- SCHÄFER, A., KÜCHLER, T., SIMAT, T. J., AND STEINHART, H., Migration of lubricants from food packagings: Screening for lipid classes and quantitative estimation using a NP-HPLC-separation with evaporative light scattering-detection, J. Chromatogr. A, **2003**, 1017, 107-116
- SCHÄFER, A., MAß, A., 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, Food Addit. Contam., **2004c**, 21, 287-301
- SCHÄFER, A., OHM, V. A., SIMAT, T. J., Migration from can coatings. Part 2: Identification and quantification of migrating cyclic oligoesters below 1000 Da, Food Addit. Contam., **2004b**, 21, 377-389
- SCHÄFER, A., SIMAT, T. J., Migration from can coatings. Part 3: Synthesis, identification and quantification of migrating epoxy-based substances below 1000 Da, Food Addit. Contam., **2004a**, 21, 390-405
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF), Empfehlungen des wissenschaftlichen Lebensmittelausschusses der EU, Synoptic Document, http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/foodcontact/synoptic_doc_en.pdf, **2005**
- SIELAFF, H. Technologie der Konservenherstellung, 1. Auflage, Behr's Verlag Hamburg, **1996**
- SIMAT, T. J. und SCHÄFER, A., Migration from can coatings. Part 4: An approach to elucidate the overall migrate from can coatings. Dissertation SCHAEFER, A. Universität Hamburg, Mai **2004**, 129-156
- SPANNE, M., TINNERBERG, H., DALENE, M., SKARPING, G., Determination of complex mixtures of airborne isocyanates and amines, Analyst, **1996**, 121, 1095-1099

- STEVENSON, D., Mc DONALD, T., A comparison of methods for the determination of isocyanates in air, Intern. J. Environ, Anal. Chem., **1986**, 25, 187-193
- STREICHER, R., P., ARNOLD, J., E., COOPER, C., V., FISCHBACH, T. J., Investigation of the ability of MDHS method 25 to determine urethan-bound isocyanate groups, Am. Ind. Hyg. Assoc. J., **1995**, 56, 437-442
- TINNERBERG, H., SPANNE, M., DALENE, M., SKARPING, G., Determination of complex mixtures of airborne isocyanates and amines, Part 2, Analyst, **1996**, 121, 1101-1106
- TINNERBERG, H., SPANNE, M., DALENE, M., SKARPING, G., Determination of complex mixtures of airborne isocyanates and amines, Part 3, Analyst, **1997**, 122, 275-278
- TURNER, T. A., Canmaking, The technology of metal protection and decoration, First Edition, Blackie Academic & Professional, Kluwer Academic Pub, **1998**
- VANHOUTTE, K., JOOS, P., LEMIERE, F., VAN DONGEN, W., ESMANS, E. L., Thermospray liquid chromatography – Mass spectrometry of the DNA-adducts formed between 2'-deoxy-nucleosides and bisphenol A diglycidyl ether, J. of Mass Spectrom., **1995**, 30, 1453-1461
- WU, W. S., STOYANOFF, R. E., GAIND, V. S., Application of tryptamine as a derivatizing agent for airborne isocyanates determination, Part 4, Analyst, **1991**, 116, 21-25
- WU, W. S., STOYANOFF, R. E., SZKLAR, R. S., GAIND, V. S., Application of tryptamine as a derivatizing agent for airborne isocyanates determination, Part 3, Analyst, **1990**, 115, 801-807

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christian Scheunert
Geburtsdatum und Ort: 14. Januar 1970 in Hannover
Anschrift: Kortlund 4, D-24857 Fahrdorf
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung:

1976 – 1980 Grundschole, Nordholz
1980 – 1982 Altenwalder Schule, Cuxhaven 13
1982 – 1989 Lichtenberg Gymnasium, Cuxhaven
1989 Abitur

Beruflicher Werdegang:

01.06.1989 Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter (SaZ 16 Jahre)
01.10.1990 – 28.03.1995 Studium der Pharmazie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
01.04.1995 – 30.09.1995 Praktikum in der Zentralapotheke des Kreiskrankenhauses Offenburg
01.10.1995 – 31.03.1996 Praktikum in der Heide-Apotheke, Cuxhaven
09.05.1996 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
04.06.1996 Approbation als Apotheker
01.05.1996 – 30.04.1998 Studium der Lebensmittelchemie, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg
04.05.1998 Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
01.06.1998 – 31.05.1999 Praktikum am Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt des Landes Schleswig-Holstein, Neumünster und am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, Kiel-Kronshagen
Juni 1999 Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
29.06.1999 Befähigung als Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker
30.06.1999 – 31.12.2005 Lebensmittelchemischer Sachverständiger im Bereich Lebensmittel tierischer Herkunft und Laborgruppenleiter im Bereich Bedarfsgegenstände, Zentrale Apparative Analytik und Trinkwasser/Ökochemie am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, Kiel-Kronshagen
seit 01.03.2001 Doktorand am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
11.12.2002 Übernahme zum Berufssoldaten
seit 01.01.2006 Dezernent Lebensmittelchemie/ Pharmazie im Sanitätskommando I, Abteilung Gesundheitswesen Dezernat Lebensmittelchemie/ Pharmazie, Kiel
seit 01.03.2007 Qualitätsmanagement-Beauftragter der Inspektionsstelle Sanitätskommando I Abteilung Gesundheitswesen