## **Bisphenol A-Diglycidylether:**

# Vorkommen, Ersatzstoffe und Reaktionen mit

# Lebensmittelbestandteilen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Hauke Petersen aus Kiel

Abteilung für Lebensmittelchemie

Hamburg 2003

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1998 bis September 2001 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie – Abteilung für Lebensmittelchemie – durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Steinhart
 Gutachter: Prof. Dr. W. Francke

Tag der mündlichen Prüfung (Disputation): 9. Mai 2003

#### **DANKSAGUNG**

Ich habe bei der Anfertigung dieser Arbeit von vielen Seiten Unterstützung erfahren. 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 in einem für die Forschung immer wichtiger werdenden Bereich der Lebensmittelchemie,

Herrn Prof. Dr. Wittko Francke für die Übernahme des Korreferats,

Herrn Dr. Thomas Zimmermann für die Mithilfe bei der Planung und Gewährung des Forschungsprojektes sowie für sein großes Interesse an der Arbeit und ihren Ergebnissen,

Herrn Carsten Andrees Buckow, Herrn Renaldo Binke, Frau Andrea Biereichel und Frau Kerstin Burseg für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit, und

Herrn Dr. Heinz Bergmann und Herrn Dr. Helmut Rottsahl für die Bereitschaft, mir bei der Anfertigung der Arbeit neben meiner eigentlichen beruflichen Aufgabe weitestgehenden Handlungsspielraum zu gewähren.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Thomas Simat und Frau Angela Schaefer für ihr außergewöhnliches Engagement und die häufigen, fruchtbaren Diskussionen, ohne die das Projekt nicht diesen Abschluss gefunden hätte.

Der wichtigste Dank jedoch gebührt meiner Frau Ute und meinen Kindern Jan Eike und Sünje, die mit bewundernswerter Geduld die langen Arbeitstage und die Wochenenden vor dem Computer ertragen haben. Ohne diesen Rückhalt hätte ich die Arbeit weder beginnen noch zu einem glücklichen Ende führen können.

## Abkürzungsverzeichnis

A DCI	Atmospheric Prossure Chemical Ionisation Chemicaho Ionisiorung hai
AFCI	Atmosphärendruck
AP-ESI	Atmospheric Pressure Electrospray Ionisation, Electrospray-Ionisierung bei
	Atmosphärendruck
BADGE	2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propan, Bisphenol A-Diglycidylether
BADGE·HCl	2-[4-(2,3-Epoxypropoxy)phenyl]-2-[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propan
BADGE·HCl·SCH <sub>3</sub>	Methylthio-BADGE·HCl
BADGE-2HCl	Bisphenol A-bis(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	2-[4-(2,3-Dihydroxypropoxy)phenyl]-2-[4-(3-chloro-2-
	hydroxypropoxy)phenyl]propan
$BADGE \cdot H_2O$	2-[4-(2,3-Epoxypropoxy)phenyl]-2-[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]propan
BADGE·H <sub>2</sub> O·SCH <sub>3</sub>	Methylthio-BADGE·H <sub>2</sub> O
BADGE·SCH <sub>3</sub>	Methylthio-BADGE
BADGE·2H <sub>2</sub> O	Bisphenol A-bis(2,3-dihydroxypropyl)ether
BADGE·2SCH <sub>3</sub>	Bis-Methylthio-BADGE
BADHPE	Bisphenol A-di-3-hydroxypropylether
BAMGE	2-[4-(2,3-Epoxypropoxy)phenyl]-2-phenylpropan, Bisphenol A-Monoglycidylether
BAMGE·HCl	2-[4-(3-Chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]-2-phenylpropan
BFDGE	2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]methan, Bisphenol F-Diglycidylether
BFDGE·2H <sub>2</sub> O	Bisphenol F-bis(2,3-dihydroxypropyl)ether
BFDGE·HCl·H <sub>2</sub> O	2-[4-(2,3-Dihydroxypropoxy)phenyl]-2-[4-(3-chloro-2-
	hydroxypropoxy)phenyl]methan
BFDGE-2HCI	Bisphenol F-bis(3-chloro-2-hydroxypropyl)ether
BFDHPE	Bisphenol F-di-3-hydroxypropylether
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
Boc	tertButoxycarbonyl-Schutzgruppe für Aminogruppen
BPA	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan, Bisphenol A
BPF	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)methan, Bisphenol F
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
FIA	Flow Injection Analysis, Fließinjektionsanalyse
FLD	Fluoreszenzdetektion
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
IS	Interner Standard
MSD	Massenselektiver Detektor / Massenselektive Detektion
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis, Massenzahl
NH4 form / NH4 ac	Ammoniumformiat / Ammoniumacetat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, kernmagnetische Resonanz
NOGE	Novolak-Glycidylether
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
SCF	Scientific Committee on Food - Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuß der
	Europäischen Kommission
SIM	Single Ion Monitoring, Einzelionenüberwachung
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Current, Totalionenstrom
UVD	Ultraviolett-Detektion
$\alpha_{\rm m}$	molarer Extinktionskoeffizient
$\lambda_{\text{Ex}}, \lambda_{\text{Em}}$	Anregungs-, Emissionswellenlänge
	-

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	
2.1	Epoxidharze	3
2.2	BADGE und seine Reaktionsprodukte	4
2.3	Rechtliche Grundlagen für die Verwendung von BADGE	7
2.4	Analytik von BADGE und seinen Derivaten	8
2.5	Phenol-Formaldehyd-Harze als Lackbestandteile und Ersatzstoffe für BADGE	9
2.6	Problemstellung	11
3	Synthese von BADGE-Derivaten als Referenzstandards	
3.1	Synthesekonzept für die Standardsubstanzen	12
3.2	Synthese der Standardsubstanzen	14
3.3	Zusammenfassung	16
4	Die analytische Erfassung von BADGE und seinen Derivaten	
4.1	Ausgangssituation für die Untersuchungen	17
4.2	Anpassung der chromatographischen Trennung	18
4.3	Optimierung der Detektion	
4.4	Optimierung der Detektionsbedingungen für BADGE und seine Derivate	
4.5	Zusammenfassung der optimierten Flüssigchromatographie	29
4.6	Optimierung der Aufarbeitung von Lebensmitteln	29
4.7	Zusammenfassung der optimierten Probenvorbereitung	
4.8	Validierung des Verfahrens	
5	Die analytische Erfassung von BFDGE und seinen Derivaten	
5.1	Strukturelle Besonderheiten von BFDGE und NOGE gegenüber BADGE	
5.2	Ausgangssituation und Vorgaben für die Optimierung der Trennung	
5.3	Optimierung der chromatographischen Trennung	40
5.4	Validierung des Verfahrens	41
5.5	BFDGE und NOGE als Bestandteile von Lebensmittelverpackungen	46
6	Reaktionen von BADGE mit Lebensmittelbestandteilen in vitro	49
6.1	Umsetzung von BADGE in ausgewählten Lebensmitteln	49
6.2	Umsetzung von BADGE in Modellösungen	
6.3	Die Reaktion mit isolierten Lebensmittelproteinen	53
6.4	Nachweis von BADGE-Protein-Addukten	56
6.5	Die Reaktion von BADGE mit proteinogenen Aminosäuren	61
7	Die Entstehung von Methylthioderivaten von BADGE in Lebensmitteln	66
7.1	Entstehung in dotierten Lebensmitteln	66
7.2	Synthese der Methylthioderivate	68
7.3	Nachweis der Methylthioderivate in Lebensmitteln	69

8	Diskussion	
8.1	Synthese von BADGE-Derivaten als Referenzstandards	73
8.2	Die analytische Erfassung von BADGE und seinen Derivaten	73
8.3	Die analytische Erfassung von BFDGE und seinen Derivaten	76
8.4	Reaktionen von BADGE mit Lebensmittelbestandteilen in vitro	78
8.5	Die Entstehung von Methylthioderivaten von BADGE in Lebensmitteln	80
8.6	Konsequenzen für die Überwachung	
9	Zusammenfassung	
10	Experimenteller Teil	
10.1	Geräte und allgemeine Methoden	
10.2	Chemikalien	
10.3	Synthese von BADGE-Derivaten als Referenzstandards	
10.4	Die analytische Erfassung von BADGE und seinen Derivaten	
10.5	Die analytische Erfassung von BFDGE und seinen Derivaten	
10.6	Reaktionen von BADGE mit Lebensmittelbestandteilen in vitro	115
10.7	Die Entstehung von Methylthioderivaten von BADGE in Lebensmitteln	
11	Literatur	

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Bisphenol A-Diglycidylether (BADGE)	1
Abb. 2	Struktur eines Epoxidharzes auf Basis von Bisphenol A und Epichlorhydrin	3
Abb. 3	Mechanismus der BADGE-Synthese	4
Abb. 4	BADGE und seine Hydrolyse- und Hydrochlorierungsaddukte	5
Abb. 5	Schema der Entstehung eines Novolak-Polymers (Phenol-Formaldehyd-Harz)	9
Abb. 6	Vorgehen zur Synthese der Standardsubstanzen	12
Abb. 7	Reaktionsverfolgung der BADGE-Synthese bei Raumtemperatur	13
Abb. 8	Flächenplot des experimentellen Raumes für die BADGE·HCl-Ausbeute [g/100g]	15
Abb. 9	Flächenplot des experimentellen Raumes für die BAMGE-Restmenge [g/100g]	15
Abb. 10	BADGE – Standard und Olivenöl-Blindwert	17
Abb. 11	Allgemeines Aufarbeitungsschema für die Flüssigchromatographie an Umkehrphasen	18
Abb. 12	Standardgemisch BADGE-assoziierte Substanzen	18
Abb. 13	Chromatogramm einer unbelasteten Matrix (Jagdwurst)	19
Abb. 14	Veränderung der Retentionszeiten bei Zumischung von Methanol	20
Abb. 15	Trennung der Standardsubstanzen bei unterschiedlichen Gradienten	21
Abb. 16	Standardgemisch mit optimiertem Elutionsgradienten	22
Abb. 17	UV- und Fluoreszenzspektren von Bisphenol A	22
Abb. 18	Massenspektrum von BADGE	23
Abb. 19	Scan und extrahierte Clusterionen (M+18) der BADGE-Gruppe	25
Abb. 20	Differenzierung von BADGE·2H2O und BADGE·HCl	26
Abb. 21	Fließinjektionsanalyse von BADGE bei unterschiedlicher Fragmentorspannung	27
Abb. 22	Signal-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von der Puffersubstanz	28
Abb. 23	Mittlere Wiederfindungsraten der Standards nach Filtration über die SPE-Säule	30
Abb. 24	Mittlere Wiederfindungsraten nach Lipidextraktion der Jagdwurst	31
Abb. 25	Bisphenol A-di-3-hydroxypropylether	32
Abb. 26	Aufarbeitungsschema nach der Optimierung	33
Abb. 27	Chromatogramm der optimierten Trennung	34
Abb. 28	Vergleich der molaren Fluoreszenzresponse aller Analyten ( $\lambda_{Ex}$ 275 nm, $\lambda_{Em}$ 305 nm)	35
Abb. 29	Vergleich der Wiederfindungsraten für Olivenöl als Lebensmittelsimulans	35
Abb. 30	Stichprobenmittelwerte der BADGE-Derivate sowie des Summengehalts	37
Abb. 31	Isomere Formen des BFDGE	38
Abb. 32	Chromatogramm der Standardsubstanzen	39
Abb. 33	Chromatogramm der optimierten Trennung	41
Abb. 34	Trennung von o,p- und o,o-BFDGE mit Hilfe des Recycling-Verfahrens	43
Abb. 35	Signalaufspaltung der aromatischen Protonen der BFDGE-Isomere ( <sup>1</sup> H-NMR)	43
Abb. 36	UV-Spektren der BFDGE-Isomere	44
Abb. 37	Fluoreszenzresponse für BFDGE-Isomere bei verschiedenen Anregungswellenlängen	45

Abb. 38	Chromatogramm eines Deckelextraktes	47
Abb. 39	Trennung von NOGE in Acetonitril-Extrakten von Schraubdeckeln	48
Abb. 40	Wiederfindung von BADGE in Pfirsich nach Inkubation	50
Abb. 41	Wiederfindung von BADGE in Thunfisch in eigenem Saft nach Inkubation	51
Abb. 42	Thunfisch in eigenem Saft dotiert mit BADGE und IS ( $\beta = 1 \text{ mg/kg}$ )	51
Abb. 43	Umsetzung von BADGE mit Glucose und BSA unter verschiedenen Bedingungen	53
Abb. 44	Umsetzungsraten für BADGE·H2O mit Lebensmittelproteinen	55
Abb. 45	Nukleophile Ringöffnung eines Oxirans	56
Abb. 46	Wiederfindung von BADGE und IS nach Inkubation mit Salzsäure bei Raumtemperatur	57
Abb. 47	Chromatogramme der Proteinhydrolysate	58
Abb. 48	Chromatogramm der BADGE·H <sub>2</sub> O-His-Synthese und Massenspektrum des Addukts	59
Abb. 49	Chromatogramm-Overlay von BADGE·H2O-His und BADGE·H2O-inkubiertem BSA-Hydrolysat	60
Abb. 50	Reaktionsmöglichkeiten des BADGE·H <sub>2</sub> O mit His	60
Abb. 51	Chromatogramm der Reaktion von BADGE·H2O mit Valin	62
Abb. 52	Verlauf der Umsetzung von BADGE·H <sub>2</sub> O zu BADGE·H <sub>2</sub> O·SCH <sub>3</sub>	64
Abb. 53	$Reaktionskinetik \ der \ Addukt bildung \ zwischen \ BADGE \cdot H_2O \ und \ proteinogenen \ Aminosäuren$	64
Abb. 54	Chromatogramm des dotierten Thunfisches nach Sterilisation	66
Abb. 55	Chromatogramm des Reaktionsansatzes von BADGE mit N-Acetyl-Met	68
Abb. 56	Massenspektrum von $BADGE \cdot SCH_3$ und Struktur des gruppenspezifischen Fragments	69
Abb. 57	Chromatogramm des aufgearbeiteten Lebensmittels "Schmelzkäsezubereitung"	70
Abb. 58	Belastung des Einsatzvorrats Verpflegung mit BADGE und seinen Derivaten	70
Abb. 59	BADGE-Derivate in Grießspeise aus BADGE-haltigen Verpackungen	71
Abb. 60	Umsetzung von BADGE in gelagerter Grießspeise	72
Abb. 61	Ermittlung signifikanter Einflußgrößen; a: BADGE·HCl, b: BAMGE	88
Abb. 62	Synthesemonitoring BADGE·HCl	91
Abb. 63	Synthesemonitoring BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	93
Abb. 64	Synthesemonitoring BADGE·H <sub>2</sub> O	94
Abb. 65	Synthesemonitoring BADHPE	101
Abb. 66	Synthesemonitoring BFDHPE	109
Abb. 67	HPLC-MSD/UVD der Umsetzung von BADHPE mit Salzsäure	125
Abb. 68	Enzymatische Hydrolyse von BADGE·H2O-dotiertem BSA-Hydrolysat	127
Abb. 69	Enzymatische Hydrolyse von BADGE·H <sub>2</sub> O-dotiertem BSA-Hydrolysat	127
Abb. 70	Massenspektren von BADGE·H <sub>2</sub> O-His	128
Abb. 71	Spektrum und Struktur von BADGE·H <sub>2</sub> O-Val (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)	130
Abb. 72	Spektrum und Struktur von BADGE·H <sub>2</sub> O-Phe (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)	131
Abb. 73	Spektrum und Struktur von BADGE·H <sub>2</sub> O-N-Acetyl-Lys (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)	132
Abb. 74	Spektrum und Strukturen von BADGE·H <sub>2</sub> O-Boc-His (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)	133

Abb. 75	Spektrum und Struktur von BADGE·H <sub>2</sub> O-N-Acetyl-Tyr (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)	134
Abb. 76	Spektrum und Struktur von BADGE·H <sub>2</sub> O-N-Acetyl-Cys (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)	135
Abb. 77	Massenspektrum und Struktur von BADGE·H <sub>2</sub> O-N-Acetyl-Met (Intermediat) (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)	137
Abb. 78	Massenspektrum und Struktur von BADGE·H <sub>2</sub> O·SCH <sub>3</sub> (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)	137

#### 1 Einleitung

Bei der Erschließung neuer Märkte im Lebensmittelsektor setzt die Industrie zunehmend auf die Bequemlichkeit der Verbraucher, die immer weniger Zeit zur Zubereitung von Lebensmitteln aufwenden. Hierdurch gewinnen Lebensmittelkonserven als Halbfertig- und Fertigprodukte an Bedeutung.

Bei der Herstellung führt die abschließende Konservierung des Produkts zu Konsequenzen für die Verpackungstechnologie. Entscheidend ist hier die Wechselwirkung zwischen Verpackung und verpacktem Lebensmittel. Da es sich überwiegend um metallische Werkstoffe handelt, steht der Schutz des Metalls vor korrodierenden Produkten ebenso im Mittelpunkt wie der Schutz des Lebensmittels vor unerwünschten Einflüssen des Metalls – wie die Ausbildung von Verfärbungen oder Fehlaromen. Besonders muß jedoch auf die Verhinderung von toxikologisch relevanten Einflüssen geachtet werden.

Um diese Wechselwirkungen zwischen Metall und Lebensmittel zu verhindern, werden die meisten metallischen Verpackungen mit einer Polymerbeschichtung versehen. An diese Beschichtung werden hohe Anforderungen gestellt, da sie die Verformung des Metalls beim Produktionsprozeß überstehen und zugleich als Schmierstoff bzw. Verschleißschutz für die Werkzeuge dienen müssen. Diesen Anforderungen werden Epoxidharze und Organosole (Polyvinylchlorid-Lacke, PVC-Lacke) in besonderem Maß gerecht.

Beide Lackarten werden unter Verwendung von 2,2-Bis-[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propan (Bisphenol A-Diglycidylether, BADGE, Abb. 1) hergestellt. BADGE dient hierbei als Monomer im Epoxidharz und als Stabilisator im Organosol. Darüber hinaus können Klebermaterialien zur festen Verbindung des Polymerfilms mit der metallischen Oberfläche von Leichtbehältern mit BADGE als Grundlage hergestellt werden. Im Endprodukt verbleibt in allen Fällen ein Rest an monomerer Substanz, die wegen ihrer chemischen Eigenschaften in der Lage ist, in Lebensmittel überzugehen.



Abb. 1 Bisphenol A-Diglycidylether (BADGE)

BADGE besitzt zwei Epoxidgruppen, die aufgrund ihrer hohen Ringspannung leicht Reaktionen mit einer Vielzahl von Stoffen eingehen können. Die Reaktion von BADGE mit physiologischen Substanzen führt zur Ausbildung eines allergenen Potentials (KANERVA et al., 1991). Im Rahmen von Untersuchungen zur Bildung von DNA-Addukten wurden verschiedene Reaktionsprodukte von BADGE mit Nukleosiden nachgewiesen (VANHOUTTE et al., 1995). Darüber hinaus entstehen bereits bei der Herstellung von PVC-Organosolen Additionsprodukte von BADGE mit Salzsäure, die wegen ihrer Strukturanalogie zu Chlorpropanolen ein eigenes toxikologisches Potential besitzen können (BIEDERMANN und GROB, 1997).

Das Migrationspotential des lipophilen BADGE in fetthaltige Lebensmittel sowie die unzureichenden Erkenntnisse über die Toxikologie von BADGE veranlaßten den Wissenschaftlichen Lebensmittelausschuß der Europäischen Kommission (Scientific Committee on Food, SCF) 1996 zu der Empfehlung eines vorläufigen Grenzwertes für den Gehalt an BADGE und seinen Hydrolyseprodukten in Lebensmitteln. Die in diesen Grenzwert einzubeziehenden Reaktionsprodukte wurden ein Jahr später präzisiert (SCF, 1997).

Nachdem hohe BADGE-Gehalte in Lebensmittelkonserven ermittelt wurden (BIEDERMANN et al., 1996), suchte die Industrie intensiv nach Alternativen. Als besonders geeignet erwiesen sich strukturanaloge Harze auf der Basis von Bisphenol F (BRONZ et al., 1997).

Die Untersuchung von Lebensmitteln auf die Anwesenheit von BADGE, insbesondere aber auch seiner durch den SCF (1997) benannten Reaktionsprodukte, steht noch am Anfang. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer routinefähigen, validierten Methode zur Überwachung des SCF-Grenzwertes. Darüber hinaus sollte die Untersuchung auf analoge Ersatzstoffe auf der Basis von Bisphenol F ausgedehnt werden.

Die Reaktion von BADGE mit Lebensmittelinhaltsstoffen ist bislang nur wenig beachtet worden. Obwohl wegen der Reaktivität der Oxiranringe die Bildung von Addukten zu erwarten war, wurde lange Zeit ausschließlich nach BADGE-Hydrolyseprodukten gesucht. In jüngerer Zeit berichteten RICHARD et al. (1999) über den Verlust von BADGE nach Dotierung zu Lebensmitteln, ohne daß bekannte Abbauprodukte entstanden. Eine Identifikation von Reaktionsprodukten gelang nicht. Es sollten daher Untersuchungen über BADGE-Addukte von Lebensmitteln durchgeführt werden, die über die Erkenntnisse von RICHARD et al. (1999) hinaus über die strukturelle Identität der entstandenen Verbindungen Auskunft geben.

## 2 Allgemeiner Teil

## 2.1 Epoxidharze

Bereits SCHLACK (1934) synthetisierte erstmals Polymere auf der Grundlage von hochmolekularen Epoxiden. Die kommerzielle Nutzung begann jedoch erst, nachdem CASTAN (1940) feststellte, daß ein aus Bisphenol A (BPA) und Epichlorhydrin hergestelltes Harz (Abb. 2) nach der Härtung mit Phthalsäureanhydrid besonders gut auf verschiedenen Materialien haftet. Die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten führte zu einem Anstieg der Produktion von 5000 t im Jahr 1954 auf etwa 150000 t Mitte der 80er Jahre (MAY, 1988). Zehn Jahre später betrug die Produktion bereits 850000 t (BROCK et al., 1998).



Abb. 2 Struktur eines Epoxidharzes auf Basis von Bisphenol A und Epichlorhydrin

Mit Beginn der Nutzung von Epoxidharzen setzte auch deren kommerzielle Verwendung als Innenbeschichtung für Konservendosen und Leichtbehälter ein. Mittlerweile werden Epoxidharze in 90 % aller Doseninnenbeschichtungssysteme verwendet (VERBAND DER LACKINDUSTRIE e. V., 1997). Ihre Vorzüge liegen in der guten Beständigkeit gegenüber Säuren und Laugen, ihrer Flexibilität bei gleichzeitig hohem Härtegrad und ihrem Adhäsionsvermögen auf Metallen. Die zur Lackherstellung erforderliche Härtung geht entweder von den Epoxidgruppen oder von sekundären Hydroxygruppen aus. Diese können mit Resolen, Melaminharzen, Harnstoffharzen oder Polyisocyanaten und Polyanhydriden umgesetzt werden (BROCK et al., 1998).

Neben den technologischen Vorzügen werden Epoxidharze auch wegen ihrer geringen Toxizität geschätzt. Der Grad der Toxizität hängt vom Anteil an freien Epoxidgruppen ab. Dieser als Epoxid-Equivalent angegebene und als die Masse Harz, welches 1 g freier Oxiranringe enthält, berechnete Anteil sinkt demnach mit steigendem Molekulargewicht (MAY, 1988). So beträgt die letale Dosis für Ratten bei Harzen mit einem mittleren Molekulargewicht von 380 g/mol und einem Epoxid-Equivalent von 200 bei 11,4 g/kg Körpergewicht. Bereits bei einem mittleren Molekulargewicht von etwa 900 g/mol sowie einem Epoxid-Equivalent von 500 wird nicht mehr von der letalen Dosis im eigentlichen Sinn gesprochen. Hier liegt die Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere schwer erkrankten, bei 30 g/kg Körpergewicht (MAY, 1988).

#### 2.2 BADGE und seine Reaktionsprodukte

#### 2.2.1 Synthese von BADGE

BADGE wird aus BPA und Epichlorhydrin als Präpolymer für die Epoxidharz-Herstellung synthetisiert (BRAUN und LEE, 1976). Die Reaktion erfolgt unter Erhitzen bei Anwesenheit von Alkalien, wobei intermediär die hydrochlorierten Derivate 2,2-Bis-[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propan (BADGE·2HCl) und 2-[4-(2,3-Epoxypropoxy)-phenyl]-2-[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propan (BADGE·HCl) entstehen (Abb. 3). Die Synthese verläuft demnach über eine nukleophile Ringöffnung des Epoxids und anschließende Eliminierung von Wasser unter Rekonstitution des Oxiranrings.



Abb. 3 Mechanismus der BADGE-Synthese

#### 2.2.2 Physiologische Reaktionen von BADGE

Wie alle Epoxide ist BADGE hydrolyseempfindlich. Bei Kontakt mit wasserhaltigen Lebensmitteln oder Simulanzien entstehen die Hydrolysederivate 2-[4-(2,3-Epoxypropoxy)-phenyl]-2-[4-(2,3-dihydroxy)phenyl]propan (BADGE·H<sub>2</sub>O) und 2,2-Bis-[4-(2,3-dihydroxy)\text{phenyl}]\text{propan} (BADGE·2H<sub>2</sub>O). Durch Kombination von Hydrolyse und Hydrochlorierung entsteht das Produkt 2-[4-(3-Chloro-2-hydroxypropoxy)\text{phenyl}]-2-[4-(2,3-dihydroxy)\text{phenyl}]\text{propan} (BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O) (Abb. 4).



Abb. 4 BADGE und seine Hydrolyse- und Hydrochlorierungsaddukte

PASEIRO LOSADA et al. (1993) und PHILO et al. (1997) untersuchten die Kinetik der Hydrolyse von BADGE und anderen Monomeren in wäßrigen Lebensmittelsimulanzien. Hierbei wurden gemäß der Richtlinie 82/711/EWG (EUROPÄISCHER RAT, 1982) Wasser, 15 %ige Ethanollösung, 3 %ige Essigsäure sowie Speiseöl als Simulanzien verwendet. Die Halbwertzeit von BADGE in Wasser bei 40 °C wurde von PASEIRO LOSADA et al. (1993) mit 43 Stunden ermittelt. In 3 %iger Essigsäure betrug die Halbwertzeit bei 40 °C nur 8.1 Stunden. Durch Hydrolyse entstanden BADGE·H<sub>2</sub>O sowie BADGE·2H<sub>2</sub>O.

Der SCF (1999a) beschrieb in seiner Stellungnahme zu BADGE das Auftreten der bereits erwähnten Hydrochlorierungsderivate in Konserven, deren Verpackung mit Epoxidharzen beschichtet ist. Es ist daher davon auszugehen, daß in salzhaltigen Lebensmitteln eine Reaktion von BADGE mit Chlorid erfolgen kann. Diese Annahme wurde durch RICHARD et al. (1999) bestätigt, die BADGE zu Lebensmitteln mit unterschiedlichen Salzgehalten dotierten und anschließend geringe Mengen an BADGE·HCl sowie BADGE·2HCl fanden.

Die Umsetzung von BADGE mit anderen Lebensmittelbestandteilen wurde ebenfalls von RICHARD et al. (1999) beschrieben. Diese dotierten BADGE zu verschiedenen Lebensmitteln und beobachteten die Abnahme des Gehaltes sowie die Zunahme an bereits bekannten Derivaten. Die Abnahme von BADGE war jedoch nicht allein auf die Bildung von Hydrolyseund Hydrochlorierungsprodukten zurückzuführen, sondern mußte auch durch die Bildung von BADGE-Addukten mit anderen Bestandteilen der Lebensmittel bedingt sein, wobei diese Adduktbildung den bevorzugten Umsetzungsweg darstellte. Es wurde postuliert, daß die Reaktion mit einer Majorkomponente von Lebensmitteln stattfindet, da die Abnahme von BADGE unabhängig von der dotierten Menge war. Bislang ist es jedoch nicht gelungen, diese Majorkomponente zu identifizieren.

Die hohe Reaktivität der Oxiranringe ermöglicht die Umsetzung von BADGE mit nukleophilen Partnern. VANHOUTTE et al. (1995) zeigten die Entstehung von Addukten zwischen BADGE und Nukleobasen der DNA. Daneben wurde bereits 1991 (KANERVA et al.) von allergischen Reaktionen bei Arbeitern, die einem Kontakt mit BADGE ausgesetzt waren, berichtet. Im Hinblick auf die Ergebnisse von VANHOUTTE et al. (1995) ist es möglich, daß BADGE allergieauslösende Strukturänderungen bei Proteinen hervorruft.

Die Toxikologie des monomeren BADGE ist nicht abschließend geklärt. Wie bereits beschrieben, besitzt er praktisch keine akute Toxizität. Die von VANHOUTTE et al. (1995) identifizierten BADGE-DNA-Addukte ließen jedoch mutagene und teratogene Eigenschaften analog zum toxischen Wirkprinzip des Benz[a]pyren vermuten. Da die Bildung der Addukte allerdings unter nichtphysiologischen Bedingungen erfolgte und BADGE durch Epoxidhydrolasen aus Mäuseleber und -haut sehr schnell abgebaut wird (BENTLEY et al., 1989), wird inzwischen davon ausgegangen, daß die chronische Toxizität von BADGE ebenfalls nur als gering einzuschätzen ist. Bestätigt wird diese Einschätzung durch Untersuchungen von PFEIFFER und METZLER (1998), die an V79-Zellkulturen zeigten, daß BADGE in Abwesenheit von Enzymsystemen mutagen und cytotoxisch wirkt, bei Anwesenheit von Cytosol oder Mikrosomen aus Rattenleber aber in wenigen Minuten vollständig zu BADGE·2H<sub>2</sub>O hydrolysiert wird.

Die neueren Entwicklungen in der toxikologischen Bewertung führten zu Änderungen der rechtlichen Einstufung.

#### 2.3 Rechtliche Grundlagen für die Verwendung von BADGE

Die Verwendung von BADGE als Ausgangssubstanz bei der Herstellung von Lebensmittelverpackungen aus Kunststoff ist bereits seit Langem geregelt. Die Richtlinie 90/128/EWG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1990) erlaubte den Einsatz, begrenzte jedoch den Restgehalt des Monomers im fertigen Produkt und verbot Produkte, in denen eine Migration der monomeren Substanz in das verpackte Lebensmittel auftritt.

Die Richtlinie gilt jedoch nicht für Innenbeschichtungen oder Klebermaterialien von Lebensmittelverpackungen, die nicht vollständig aus Kunststoff bestehen. Dieser Umstand sowie die ungeklärte toxikologische Relevanz veranlaßten den SCF (1996) nach BADGE-Funden in beschichteten Lebensmittelverpackungen (BIEDERMANN et al., 1996) zu einer Stellungnahme, in der ein vorläufiger Grenzwert für drei Jahre von 1.0 mg/kg Lebensmittelsimulanz für die Summe aus BADGE und seinen Hydrolyseprodukten empfohlen wurde. Nachdem BIEDERMANN et al. (1997) in weiteren Untersuchungen das Auftreten von BADGE·HCl und BADGE·2HCl in Lebensmitteln beschrieben, wurde die Empfehlung des SCF präzisiert (1997). Der empfohlene Grenzwert umfaßte nunmehr die bereits genannten Hydrolyse- und Hydrochlorierungsprodukte mit Ausnahme des gemischten Addukts BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O.

Die während der vom SCF (1996) gesetzten Frist durchgeführten Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf teratogene oder kanzerogene Reaktionen durch BADGE bei dermaler Applikation auf Ratten. Es wurde aber ein Verdacht auf Leberschädigung geäußert. Der SCF (1999a) empfahl deshalb die Beibehaltung des vorläufigen Grenzwerts von 1.0 mg/kg Lebensmittel für alle Hydrochlorierungs- und Hydrolysederivate von BADGE, nun aber unter Einbeziehung von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O. Wegen der erwiesenen geringen Toxizität von BADGE·2H<sub>2</sub>O wurde diese Substanz nur noch in Sonderfällen als Markersubstanz in die rechtliche Bewertung einbezogen. Die EUROPÄISCHE KOMMISSION erhob diese Empfehlung mit der 5. Änderungsrichtlinie zur Richtlinie 90/128/EWG (1999) für Lebensmittelbedarfsgegenstände aus Kunststoff zur Rechtsnorm.

Wegen der erwähnten Ungültigkeit der Richtlinie für Beschichtungen und Kleber war es erforderlich, eine Rechtsgrundlage zu schaffen, die die Verwendung von BADGE auch in diesen Materialien reguliert. Mit der Richtlinie 2001/61/EG wurde der Summengrenzwert für alle Bedarfsgegenstände mit Lebensmittelkontakt übernommen (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001) und in der aktuell gültigen Richtlinie 2002/16/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002) bestätigt.

Zur Überwachung der Einhaltung der rechtlichen Vorgaben war die Entwicklung einer validen Analytik unter Einbeziehung aller geregelten Derivate erforderlich.

#### 2.4 Analytik von BADGE und seinen Derivaten

Für die Untersuchungen zur Belastung von verpackten Lebensmitteln mit Bestandteilen der Verpackung sind grundsätzlich zwei verschiedene Wege denkbar.

Einerseits ist die Ermittlung der spezifischen Migration der bekannten Analyten in ausgewählte Simulanzien möglich. Hierfür sind Grundregeln erstellt worden (EUROPÄISCHER RAT, 1982), die durch Kategorisierung von Lebensmitteln in vier Gruppen einen generellen Überblick über die Migration ergeben sollen. Bei der nicht überblickbaren Vielzahl von Fertiggerichten soll hier eine vereinfachte Analytik zu schnellen und zuverlässigen Aussagen führen.

Andererseits können die Analyten direkt aus dem vorliegenden Lebensmittel untersucht werden. Dieser Ansatz erfordert eine Anpassung an die jeweilige Matrix und damit komplizierte Reinigungsverfahren, liefert jedoch Erkenntnisse über die wahren Verhältnisse im Hinblick auf Migration und Reaktionen der Analyte im speziellen Lebensmittel.

Auch für die Analytik von BADGE sind beide Prinzipien möglich. Es ist jedoch zu bedenken, daß wegen der bereits dargelegten hohen Reaktivität und im Hinblick auf die Ergebnisse von RICHARD et al. (1999) die Bestimmung der Migration in Lebensmittelsimulanzien nur einen groben Anhalt für die tatsächliche Situation darstellen kann. Insofern ist eine valide Analysenmethode zur Bestimmung der tatsächlichen Belastung in Lebensmitteln vorzuziehen.

Mit CRATHORNE et al. (1986) begann die Entwicklung analytischer Verfahren zur Bestimmung der Migration von BADGE in Lebensmitteln. Während zunächst die Untersuchung des Überganges aus epoxidharzbeschichteten Pipelines in Wasser im Vordergrund stand, bestimmten PASEIRO LOSADA et al. (1991) die Migration aus Verpackungen in wäßrige Lebensmittelsimulanzien. Als Konsequenz aus diesen Untersuchungen und den Erkenntnissen über die Hydrolyse von BADGE (PASEIRO LOSADA et al., 1993) wurden die Untersuchungen auf die Hydrolyseprodukte ausgedehnt (PASEIRO LOSADA et al., 1997).

Nach ersten Berichten über die Migration von BADGE in mikrowellen-erhitzte Lebensmittel (BEGLEY et al., 1991) wurden die Untersuchungen zur Ermittlung des Gehalts an BADGE in Lebensmitteln mit der Bestimmung von BADGE in Mikrowellenbesteck und mikrowellenfähigen Fertigpizzas von SHARMAN et al. (1995) wieder aufgenommen. Durch die Arbeiten von BIEDERMANN et al. (1996) und die darin beschriebenen hohen Gehalte an BADGE in Lebensmitteln erhielt die Entwicklung einer leistungsfähigen Methodik besonderen Auftrieb. Neben weiteren Methodenentwicklungen (ROUBTSOVA et al., 1997) wurden aus verschiedenen europäischen Ländern die Ergebnisse von Analysen veröffentlicht, die einen Überblick über die aktuelle Belastungssituation geben sollten (NIELSEN et al., 1997, SUMMERFIELD et al., 1998, THEOBALD et al., 1999a und 1999b).

Daneben wurden Methoden entwickelt, durch die neben BADGE auch einige seiner Derivate in die Bewertung der Belastung einbezogen werden konnten. BIEDERMANN et al. (1997) stellten eine Methode zur simultanen Bestimmung von BADGE und seinen Hydrochlorierungsaddukten vor und beschrieben die Ergebnisse einer Studie über den Schweizer Lebensmittelmarkt. RAUTER et al. (1999) entwickelten ein Verfahren zur Bestimmung von BADGE und seinen Hydrolyseprodukten in Lebensmitteln, welches in der Folge auf die durch den SCF (1999a) in den Grenzwert einbezogenen Derivate ausgedehnt wurde (BIEDERMANN et al., 1999a, BILES et al., 1999, LINTSCHINGER und RAUTER, 2000).

Alle genannten Verfahren wurden entwickelt, ohne daß allgemein verfügbare Standardsubstanzen vorlagen. Die Quantifizierung erfolgte über die externe Kalibrierung von BADGE unter der Annahme, daß BADGE und seine relevanten Derivate identische Fluoreszenzeigenschaften besitzen (BIEDERMANN et al., 1997). Diese Annahme war bislang nicht überprüfbar.

#### 2.5 Phenol-Formaldehyd-Harze als Lackbestandteile und Ersatzstoffe für BADGE

BADGE wird, wie bereits beschrieben, aus BPA und Epichlorhydrin synthetisiert. Das Edukt BPA wird aus der Reaktion von Phenol mit Aceton gewonnen.

Neben Epoxidharzen auf der Basis von BADGE haben auch Harze aus anderen Ausgangsstoffen Verwendung gefunden. Besonders wichtig sind hier Epoxidharze auf der Grundlage von Phenol und Formaldehyd. Das bei der Reaktion entstehende Bisphenol F (BPF) ist Edukt für ein komplexes Gemisch hochmolekularer Kunststoffe, die als Novolake bezeichnet werden. Im Gegensatz zu BPA ist beim BPF eine Substitution in ortho-Position möglich, da durch die Abwesenheit der Methylgruppen aus dem Aceton keine sterische Hinderung mehr erfolgt. Durch mehrfache Substitution an einem Benzolring erfolgt die Entstehung hochmolekularer Polyphenole (Abb. 5).



Abb. 5 Schema der Entstehung eines Novolak-Polymers (Phenol-Formaldehyd-Harz)

Durch die Möglichkeit der Substitution in ortho- und para-Stellung liegen die Reaktionsprodukte in Isomerengemischen vor.

Die Herstellung eines Epoxidharzes erfolgt durch die Reaktion von Novolak mit Epichlorhydrin zu einem technischen Gemisch von Novolak-Glycidylether (NOGE). Die kleinste Struktureinheit stellt Bisphenol F-Diglycidylether (BFDGE) dar.

Ebenso wie BADGE wird auch NOGE zur Herstellung von Epoxidharzen und PVC-Organosolen eingesetzt. Dies führt zu einer vergleichbaren Verwendungsbreite und schließt die Möglichkeit ein, NOGE als Ersatzstoff für BADGE zu nutzen, um die rechtlichen Bestimmungen zu umgehen. NOGE selbst wurde bis vor kurzem in keiner europäischen Richtlinie erwähnt, da davon ausgegangen wurde, daß er nicht als monomerer Ausgangsstoff zur Polymerisation genutzt wird, sondern als Zwischenprodukt aus Phenol, Formaldehyd und Epichlorhydrin bei der Lackherstellung entsteht. Diese Überlegungen vernachlässigten jedoch den Einsatz von NOGE als Additiv in PVC-Organosolen (BIEDERMANN et al., 2000)

Die toxikologische Bedeutung von NOGE ist ungeklärt. Es ist davon auszugehen, daß ähnliche Reaktionsmechanismen wie bei BADGE als Grundlage für die Bewertung dienen können. Zu beachten ist jedoch, daß NOGE als komplexes Gemisch vieler Einzelsubstanzen mit einer hohen Bandbreite im Molekulargewicht eine deutlich abweichende Eliminationskinetik besitzen kann. Die beschriebene Entgiftung unter Einwirkung von Epoxidhydrolasen (BENTLEY et al., 1989) kann nicht ohne weiteres auch für NOGE angenommen werden, da höhermolekulare Anteile mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehr als Substrat für dieses Enzym in Betracht kommen. Damit besteht ein erhöhtes Risiko, intakte Epoxide aufzunehmen, so daß das teratogene und mutagene Potential gegenüber BADGE als deutlich höher angesehen werden muß.

Analytische Verfahren wurden parallel zu BADGE entwickelt. Bereits CRATHORNE et al. (1986) waren in der Lage, BFDGE neben BADGE zu bestimmen. Auch PASEIRO LOSADA et al. (1992) dehnten ihre Migrationsuntersuchungen auf BFDGE und seine Hydrolyseprodukte aus, nachdem sie mittels gaschromatographischer Trennung und massenselektiver Detektion (MSD) Hydrolyseprodukte von BFDGE identifizieren konnten (SIMAL GÁNDARA et al., 1992).

Auch GROB und seine Mitarbeiter erkannten die Bedeutung der Phenol-Formaldehyd-Harze im Zusammenhang mit dem Übergang in Lebensmittel. BRONZ et al. (1997) erweiterten das analytische Spektrum auf die BADGE-analogen Hydrolyse- und Hydrochlorierungsderivate mit Ausnahme von 2-[4-(2,3-Dihydroxypropoxy)phenyl]-2-[4-(3-chloro-2hydroxypropoxy)phenyl]methan (BFGDE·HCl·H<sub>2</sub>O), schlossen darüber hinaus aber auch erste Versuche zum Nachweis und zur Bestimmung von NOGE ein. BIEDERMANN und GROB (1998) beschrieben ein verbessertes Verfahren hierzu und zeigten die analytische Problemstellung der Quantifizierung von NOGE auf. Alle BADGE-analogen Addukte im Sinne des SCF (1999a) wurden durch BIEDERMANN et al. (1999a) in die Untersuchungen eingeschlossen. Die unklare toxikologische Bewertung und die Untersuchungen von BIEDERMANN et al. (1999b) führten zu ersten Reaktionen im Hinblick auf die rechtliche Bewertung innerhalb der Europäischen Union. Der SCF (1999b) stufte den Gebrauch von NOGE als nicht wünschenswert ein. Im Rahmen der Richtlinie 2002/16/EG über die Verwendung von BADGE und NOGE (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002) wurde die Verwendung von NOGE bis März 2003 unter einer restriktiven Begrenzung des zulässigen Restgehaltes im fertigen Bedarfsgegenstand erlaubt.

## 2.6 Problemstellung

Vor dem Hintergrund der rechtlichen Bestimmungen und im Hinblick auf das Fehlen geeigneter Standardsubstanzen waren folgende Problemstellungen zu bearbeiten:

- Synthese und Charakterisierung von Standardsubstanzen für die flüssigchromatographische Analyse der durch den SCF (1999a) in den Grenzwert für BADGE einbezogenen Derivate als Referenzsubstanzen
- Entwicklung einer flüssigchromatographischen Trennung der synthetisierten Standardsubstanzen
- Entwicklung eines allgemein anwendbaren Extraktionsverfahrens zur Vorbereitung von verschiedenen Lebensmitteln für die flüssigchromatographische Analyse
- Validierung des Verfahrens für den Routinebetrieb in akkreditierten Prüflaboratorien
- Weitestgehende Ausdehnung der Methode auf BFDGE und seine analogen Derivate
- Identifikation von NOGE in Bedarfsgegenständen

Darüber hinaus sollte ein Beitrag zur Aufklärung der bislang ungeklärten Abnahme von BADGE in Lebensmitteln nach Dotierung geleistet werden. Im Einzelnen ging es um:

- Die Identifizierung der reagierenden Majorkomponente
- Falls erforderlich, die Identifizierung der reagierenden Struktur der Majorkomponente
- Die Untersuchung der Bildungsbedingungen von BADGE-Lebensmittel-Addukten
- Die Identifikation von BADGE-Lebensmittel-Addukten in der Lebensmittelmatrix

## **3** Synthese von BADGE-Derivaten als Referenzstandards

Zur Überwachung des Grenzwertes für BADGE und seine Derivate war es zunächst erforderlich, ein chromatographisches Verfahren zu entwickeln, mit dem alle BADGE-Derivate, die der rechtlichen Regelung unterliegen, zuverlässig nachweisbar und quantifizierbar sind.

Da nicht alle rechtlich relevanten BADGE-Derivate (SCF, 1999a) als Standards für die Untersuchung kommerziell erhältlich waren, sollten zunächst Synthesen für alle erforderlichen Standards entwickelt werden, um diese Substanzen in hinreichender Reinheit und Menge zur Verfügung stellen.

## 3.1 Synthesekonzept für die Standardsubstanzen

Der in Abb. 3 dargestellte Reaktionsmechanismus zeigt BADGE·HCl und BADGE·2HCl als Intermediärprodukte der BADGE-Synthese (BRAUN und LEE, 1976, FEDTKE und TÄNZER, 1982). Abb. 6 stellt das Syntheseprinzip aller SCF-relevanten BADGE-Derivate dar.



Abb. 6 Vorgehen zur Synthese der Standardsubstanzen

Da neben BPA auch BADGE, BADGE·2HCl und BADGE·2H<sub>2</sub>O kommerziell erhältlich waren, beschränkte sich die Optimierung auf die Synthesen für die übrigen Substanzen. Das zunächst gebildete BADGE·2HCl reagiert unter Abspaltung von Salzsäure zu BADGE·HCl und weiter zu BADGE. Diese Eliminierung wird durch starke Basen und hohe Temperaturen begünstigt. Durch gezielte Änderung der Basenstärke sowie der Temperatur ist eine Einflußnahme auf die Bildung und Isolierung der hydrochlorierten Produkte möglich.

Zur Synthese von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O wird die Epoxidfunktion des isolierten BADGE·HCl hydrolysiert. BADGE·H<sub>2</sub>O kann durch saure Hydrolyse einer Epoxidfunktion aus BADGE gebildet werden. Als Alternative bietet sich ein Ringschluß des BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O durch Eliminierung zu BADGE·H<sub>2</sub>O an.

Durch die Optimierung der Reaktionsführung sollten größere Mengen der Produkte isoliert werden. Dazu war es erforderlich, die Produktbildung mittels Hochleistungsflüssigchromatographie an Umkehrphasen (RP-HPLC) qualitativ und quantitativ zu verfolgen.

Abb. 7 zeigt den Reaktionsverlauf der BADGE·HCl-Synthese über einen Zeitraum von 20 Stunden bei Raumtemperatur. Die Molverhältnisse zwischen BPA und Epichlorhydrin sowie die Menge und Konzentration der Natronlauge entsprechen den Vorgaben von HUNTER und DAVIS (1959).



Abb. 7 Reaktionsverfolgung der BADGE-Synthese bei Raumtemperatur

Unter Abnahme des zunächst entstandenen 2-[4-(3-Chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]-2phenylpropan (BAMGE·HCl) werden die Intermediärprodukte Bisphenol A-Monoglycidylether (BAMGE) und BADGE·2HCl gebildet. Diese werden zugunsten von BADGE·HCl sowie BADGE wieder abgebaut. Der in Kapitel 2.2 vorgestellte Mechanismus wird durch diesen Versuch bestätigt. Nach acht Stunden findet nur nach erneuter Zugabe von Natronlauge eine wesentliche Verschiebung zu BADGE als Produkt statt. Diese Verschiebung war jedoch unerwünscht.

#### 3.2 Synthese der Standardsubstanzen

#### 3.2.1 Synthese von BADGE·HCl

Aus dem vorgesehenen Synthesekonzept wird deutlich, daß insbesondere zur Synthese von BADGE·HCl eine schonende Reaktionsführung erforderlich ist, bei der die Maximierung der Ausbeute BADGE·HCl und gleichzeitige Minimierung des Restgehaltes an BAMGE im Vordergrund steht.

Die Ermittlung der optimalen Einstellungen für verschiedene Einflußfaktoren erfordert eine Versuchsplanung. Führt man die Versuchsplanung auf Basis chemometrischer Prinzipien durch, so können aus den Daten einer geringen Anzahl von Experimenten wichtige Informationen über die Zusammenhänge komplexer Reaktionen gewonnen werden.

Hierzu wurde zunächst eine Reihe von Experimenten durchgeführt, die einen bestimmten experimentellen Raum abdeckten. Aus den Ergebnissen dieser Experimente wurde ein mathematisches Modell errechnet, mit welchem die Zielgröße an allen Stellen des Raumes berechnet und damit die optimalen Reaktionsbedingungen vorhergesagt werden konnten.

Um die Zahl der erforderlichen Versuche klein zu halten, wurden die Faktoren eliminiert, die nach den bisherigen Untersuchungen eine geringe Auswirkung auf die Reaktion besitzen. Dies führte zur Beibehaltung der Reaktionszeit sowie der Verwendung einer konstanten Menge Epichlorhydrin im Ansatz. Die zu variierenden Faktoren waren somit Temperatur sowie die Menge an Natronlauge und BPA (s. 10.3.1 Tab. 14). Die Auswertung erfolgte mittels HPLC und Ultraviolett-Detektion (UVD).

Für die Bewertung der Signifikanz der Einflüsse variabler Faktoren wurde ein Signifikanzniveau von 95 % (p < 0.05) festgelegt. Hierbei wurden sowohl die linearen als auch die quadratischen Einflüsse sowie die Interaktionen untereinander betrachtet.

Während für die BADGE·HCl-Ausbeute neben einem signifikant positiven Einfluß der Temperatur ebenfalls ein positiver – jedoch nicht signifikanter – Einfluß der Menge eingesetzter Natronlauge ermittelt wurde, war hinsichtlich der Minimierung des Restgehalts an BAMGE ein signifikant negativer Einfluß dieser Faktoren zu beobachten. Dieser Zusammenhang zeigt die Beschleunigung der Bildung von BADGE·HCl über das Intermediat BAMGE bei konstanter Reaktionsdauer. Der ebenfalls erkennbare signifikant negative Einfluß der BPA-Menge auf die Bildung von BAMGE hingegen findet keine Korrelation zur Ausbeute an BAD-GE·HCl (s. 10.3.1 Abb. 61).

Die Abb. 8 und 9 zeigen die Flächenplots des experimentellen Raumes. Diese werden aus den signifikanten Daten der Syntheseoptimierung modelliert und zeigen die mathematisch berechneten wahrscheinlichen Ausbeuten im gesamten experimentellen Raum.



Abb. 8 Flächenplot des experimentellen Raumes für die BADGE·HCl-Ausbeute [g/100g]



Abb. 9 Flächenplot des experimentellen Raumes für die BAMGE-Restmenge [g/100g]

Die BADGE·HCl-Synthese aus BPA und Epichlorhydrin gelang in Ausbeuten von mehr als 60 % bei 40 °C und einer Reaktionsdauer von 72 Stunden. Die Reinigung erfolgte mittels Anionenaustauscher (s. 10.3.2) zur Entfernung des Intermediates BAMGE sowie säulenchromatographisch an Kieselgel (s. 10.3.2) zur Elimination der Nebenprodukte BADGE·2HCl sowie BADGE. Um Reinheiten von 99 % zu erreichen, waren mindestens zwei säulenchromatographische Reinigungen nötig.

Das Endprodukt mit einer Reinheit von 99 % ist ein leicht gelblicher Sirup (s. 10.3.3).

#### 3.2.2 Synthese von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O

Der einfachste Weg für eine Synthese von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O ist die Hydrolyse des Oxiranringes von BADGE·HCl. Der Oxiranring ist ein cyclischer Ether. Die Hydrolysebedingungen müssen deshalb so mild gewählt werden, daß die übrigen Etherfunktionen im Molekül nicht ebenfalls gespalten werden.

Das von IRANPOOR et al. (1997) beschriebene Verfahren zur oxidativen Spaltung von Epoxidfunktionen mit Iod in wäßrigem Medium brachte keine befriedigenden Ergebnisse. Die Hydrolyse von Epoxiden mit Schwefelsäure (LONGONI et al., 1977) war für das gestellte Problem besser geeignet. Da die Epoxidfunktion stabiler als erwartet war, mußte die Hydrolyse bei Raumtemperatur mit 1M-Schwefelsäure stattfinden. Da BADGE·HCl praktisch nicht wasserlöslich ist, wurde in einem Aceton/Wasser-Gemisch gearbeitet. Unter diesen Bedingungen lag die Ausbeute nach 72 Stunden bei 85 %. BADGE·HCl als Edukt muß dabei von hoher Reinheit sein (größer 98 %), da Reste von BADGE zu BADGE·H<sub>2</sub>O und BADGE·2H<sub>2</sub>O hydrolysiert werden und eine Reinigung unnötig erschweren.

Das nach Reinigung an Kieselgel (s. 10.3.2) erhaltene Produkt ist anfangs sirupös, bildet aber im Kühlschrank nach einigen Tagen weiße, wachsähnliche Plättchen aus (s. 10.3.4).

## 3.2.3 Synthese von BADGE·H<sub>2</sub>O

Für die Synthese von BADGE·H<sub>2</sub>O aus BADGE konnten die Bedingungen der Synthese von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O aus BADGE·HCl übernommen werden. Die Reaktion mußte jedoch mittels HPLC überwacht werden, um die unerwünschte Hydrolyse zu BADGE·2H<sub>2</sub>O gering zu halten. Die maximal erreichte Konzentration an BADGE·H<sub>2</sub>O lag bei etwa 56 %. Der verwendete BADGE muß dabei von hoher Reinheit sein, da BADGE·HCl als Verunreinigung zu BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O hydrolysiert wird und durch die beschriebenen Verfahren (s. 10.3.2) nur schwer abzutrennen ist. Nach mehreren säulenchromatographischen Reinigungen wurde das Produkt in 98 % Reinheit bei 28 % Ausbeute gewonnen. Die Kristallisationsfähigkeit ähnelt der von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O. Der klare Sirup wird nach einigen Wochen im Kühlschrank vollständig zu einem weißen Feststoff (s. 10.3.5).

## 3.3 Zusammenfassung

Mit den im Rahmen dieser Untersuchungen erarbeiteten Synthesen wurde es ermöglicht, die Entwicklung einer validen Analysenmethode zur Überwachung des BADGE-Summengrenzwerts aufzunehmen. Mit den kommerziell erhältlichen Standards BADGE sowie BADGE·2H<sub>2</sub>O und BADGE·2HCl lagen neben den synthetisierten Substanzen alle in den Summenparameter des SCF (1999a) einzubeziehenden Derivate erstmals in einer Reinheit und Menge vor, die einen Einsatz als Referenzstandard zulassen.

#### 4 Die analytische Erfassung von BADGE und seinen Derivaten

#### 4.1 Ausgangssituation für die Untersuchungen

Nach der Veröffentlichung der Stellungnahme des SCF (1996) und der Übernahme der Empfehlung durch das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV, 1996) rückte die analytische Überprüfbarkeit des vorläufigen Grenzwerts in den Vordergrund.

Hierzu lag eine als Vornorm veröffentlichte europäische Methode zur Bestimmung der spezifischen Migration von BADGE in Lebensmittelsimulanzien (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1996) vor. Nach Extraktion mit Acetonitril erfolgte eine isokratische RP-HPLC-Trennung mit nachfolgender Fluoreszenzdetektion (FLD, s. 10.4.1 Tab. 15). Bei der Untersuchung der spezifischen Migration von BADGE in Olivenöl nach den Konventionen der Richtlinie 97/48/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1997) waren keine Matrixinterferenzen im Bereich der Retentionszeit des Analyten erkennbar (Abb. 10).



Abb. 10 BADGE – Standard und Olivenöl-Blindwert HPLC-FLD; Bedingungen s. 10.4.1 Tab. 15; 1: BADGE (hier 100 μg/L)

Die Extraktion lipophiler Analyte aus einer Lebensmittelmatrix zur Vorbereitung für die RP-HPLC folgt einem generellen Schema (Abb. 11). Diesem Schema folgten ROUBTSOVA et al. (1997) sowie SUMMERFIELD et al. (1998), wobei die Ausführung der einzelnen Schritte erheblich voneinander abwich.

Im Rahmen der Teilnahme an einem Vor-Ringversuch des BgVV wurde aus drei unterschiedlichen Verfahren zur Probenvorbereitung von Lebensmitteln eine geeignete Methode ermittelt.

Danach wird homogenisiertes Probenmaterial mit einer ausreichenden Menge Kieselgur getrocknet und das analythaltige Fett mit Pentan / Diethylether (1/1, v/v) isoliert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird BADGE mit Acetonitril aus dem Fett extrahiert. Der Acetonitril-Extrakt wird mittels Festphasenextraktion gereinigt und zur HPLC-FLD eingesetzt.



Abb. 11 Allgemeines Aufarbeitungsschema für die Flüssigchromatographie an Umkehrphasen

Das in Abb. 10 dargestellte chromatographische Verfahren ist auch für die Untersuchung von Lebensmittelproben auf die Anwesenheit von BADGE geeignet. Für die Bestimmung des BADGE-Gehalts in Lebensmitteln lag damit eine Analysenmethode vor. Diese sollte als Basis für die Entwicklung eines Verfahrens zur Bestimmung aller SCF-relevanten Derivate genutzt werden.

## 4.2 Anpassung der chromatographischen Trennung

Die Anwendung der in 4.1 beschriebenen isokratischen Trennung auf ein Gemisch der Standardsubstanzen zeigte eine unzureichende Selektivität, insbesondere bei der Substanzgruppe BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O / BADGE·H<sub>2</sub>O / BPA (Abb. 12).



Abb. 12 Standardgemisch BADGE-assoziierte Substanzen HPLC-FLD, chromatographische Bedingungen s. 10.4.1 Tab. 15; 1: BADGE; 2: BADGE·HCl;
3: BADGE·2HCl; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O; 7: BPA

Im Bereich kurzer Retentionszeiten (2 - 10 Minuten) traten bei der Untersuchung von Lebensmitteln Interferenzen mit Matrixbestandteilen auf (Abb. 13).



Abb. 13 Chromatogramm einer unbelasteten Matrix (Jagdwurst) HPLC-FLD, chromatographische Bedingungen s. 10.4.1 Tab. 15

Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen war es somit nicht möglich, eine valide Analysenmethode für alle relevanten BADGE-Derivate zu etablieren.

Daher wurden zunächst die Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Selektivität der chromatographischen Trennung untersucht.

4.2.1 Veränderungen ohne Einfluß auf die Trennleistung

## Temperatur

Unterschiedliche Temperaturen zwischen 20 °C und 50 °C führen bei gleichbleibender Eluentenzusammensetzung nur zu geringfügigen Änderungen der Retentionszeiten. Die Trennleistung des Systems veränderte sich nicht. Insbesondere war kein Einfluß der Temperatur auf die Trennung von BPA und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O erkennbar (s. 10.4.2 Tab. 16).

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

## pH-Abhängigkeit bei gleicher Ionenstärke

Zur Einstellung des pH-Wertes im isokratischen Eluenten wurde der flüchtige Puffer Ammoniumformiat eingesetzt, da dieser auch für die beabsichtigte Verwendung der massenselektiven Detektion (MSD) geeignet ist.

Über einen sehr großen pH-Bereich (pH 2 - 8) veränderte sich das Elutionsverhalten der Substanzen nicht (s. 10.4.2 Tab. 17). Es war daher möglich, sowohl pufferfrei als auch mit gepufferten Systemen zu arbeiten. Diese sind besonders zur Steigerung der Sensitivität massenselektiver Detektoren erforderlich.

## 4.2.2 Veränderungen mit Einfluß auf die Trennleistung

## Veränderung der Trennung in Abhängigkeit von der stationären Phase

Bereits geringfügige Änderungen in der Zusammensetzung der stationären Phase können bedeutenden Einfluß auf die Trennleistung des Systems haben. Die untersuchten Umkehrphasen unterschieden sich insbesondere in Korngröße sowie in der Porengröße.

Ein Einfluß der stationären Phase war besonders bei den weniger polaren Substanzen erkennbar. Bei steigender Korngröße  $(3 - 5 \mu m)$  nahm die Retentionszeit deutlich zu; die Selektivität war jedoch nahezu unabhängig von der Art der stationären Phase (s. 10.4.2 Tab. 18).

Wegen der erhöhten Selektivität bezüglich des Substanzpaares BPA und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O sowie der kostengünstigen Beschaffung wurde in der Folge Multospher<sup>®</sup> 100 5C18 250x4 als Trennphase eingesetzt.

## Anteil des organischen Modifiers am isokratischen Eluenten

Die bisher durchgeführten Untersuchungen führten nur zu geringfügigen Änderungen der Trennleistung. Insbesondere wurde keine entscheidende Verbesserung der Trennung von BPA und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O erreicht. Um den geringen Unterschied im Retentionsverhalten dieser beiden Substanzen zu vergrößern, wurde der Anteil des organischen Modifiers Acetonitril verringert.

Auch hier unterlagen die weniger polaren Stoffe dem Einfluß der Veränderung deutlicher als die polaren Derivate. Die Trennung von BPA und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O wurde jedoch nur geringfügig verbessert (s. 10.4.2 Tab. 19).

## Einfluß von Methanol als weiterer Komponente des Eluenten

Um eine feinere Veränderung der Polarität des Eluenten zu ermöglichen, wurde Methanol als dritte, mäßig polare Komponente in das System eingeführt. Im Verlauf der Untersuchung blieb der Wasseranteil unverändert bei 40 %. Der Anteil an Acetonitril wurde schrittweise durch Methanol ersetzt (Abb. 14).



Abb. 14 Veränderung der Retentionszeiten bei Zumischung von Methanol

Die Erhöhung des Methanol-Anteils am organischen Modifier führte zu einer deutlichen Steigerung der Selektivität. Besonders auffällig ist die Verbesserung der Trennung von BPA und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O sowie die erheblich verlängerte Retentionszeit von BADGE·2H<sub>2</sub>O (s. 10.4.2 Tab. 20). Die Basislinientrennung aller Standardsubstanzen wurde ab einem Anteil von 40 % Methanol (Acetonitril / Methanol / Wasser 20/40/40 (v/v)) erreicht.

Die Trennung der Standardsubstanzen ist somit sowohl untereinander als auch von Matrixbestandteilen möglich. Es ist jedoch zu beachten, daß bei hohen Methanolanteilen für die Substanzgruppen BADGE, BADGE·HCl und BADGE·2HCl sowie BADGE·H<sub>2</sub>O und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O eine Elutionsumkehr stattfand.

#### 4.2.3 Entwicklung eines Elutionsgradienten zur Verbesserung der Trennleistung

Zur Trennung aller Substanzen mit isokratischem Eluenten war die Analysenzeit gegenüber der ursprünglichen Methode deutlich erhöht. Zur Verwendung in der Routineanalytik sollte diese Analysendauer bei unveränderter Selektivität erheblich verkürzt werden. Da keines der untersuchten ternären Gemische die gewünschten Eigenschaften besaß, war es notwendig, einen geeigneten Elutionsgradienten zu entwickeln.

Zur Ermittlung des optimalen Gradienten wurde jeweils der organische Modifier oder der wäßrige Anteil zum Teil durch Methanol ersetzt. Hierzu wurden Vormischungen (Wasser / Methanol sowie Acetonitril / Methanol) verwendet (s. 10.4.2 Tab. 21).

Der Ersatz von Wasser durch Methanol verkürzte die Retentionszeiten deutlich. Da jedoch die Trennleistung abnahm, wurde hierdurch keine Verbesserung erzielt. Der Ersatz von Acetonitril durch Methanol führte zu besseren Resultaten. Ein hoher Methanol-Anteil im organischen Modifier führte zur Basislinientrennung aller Standardsubstanzen.

Da bereits bei isokratischer Trennung mit einem organischen Modifier aus Methanol / Acetonitril (2/1, v/v) eine hohe Selektivität erreichbar war, wurden unterschiedliche Gradienten mit diesem Modifier untersucht (Abb. 15).



Abb. 15 Trennung der Standardsubstanzen bei unterschiedlichen Gradienten Acetonitril / Methanol / Wasser (v/v/v); 1: 22/44/34→25/50/25, 2: 20/40/40→27/54/19, 3: 20/40/40→25/50/25; jeweils in 30 Minuten

Die optimale Trennung der Substanzen erfolgte durch den Gradienten 3 (Abb. 15). Auch die Trennung der polaren Derivate von der Matrix wurde weitgehend erreicht. Abb. 16 zeigt ein Chromatogramm der Standardsubstanzen unter optimierten Bedingungen.



Abb. 16 Standardgemisch mit optimiertem Elutionsgradienten HPLC-FLD; Standardgemisch 100 μg/L; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3; 1: BADGE; 2: BADGE·HCl; 3: BADGE·2HCl; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O; 7: BPA

#### 4.3 Optimierung der Detektion

#### 4.3.1 Photometrische Detektion

Hinsichtlich ihrer UV-absorbierenden Eigenschaften und ihrer Fluoreszenzaktivität ist für BADGE und seine Derivate das BPA-Grundgerüst maßgeblich (Abb.17).



Abb. 17UV- und Fluoreszenzspektren von Bisphenol A<br/>a: UV-Spektrum, b: Anregungsspektrum bei  $\lambda_{Em}$  305 nm, c: Emissionsspektrum bei  $\lambda_{Ex}$  275 nm

Die Wellenlängen mit maximaler UV-Absorption zeigen auch im Anregungsspektrum Aktivitätsmaxima. Da die Grundstruktur die Eigenschaften maßgeblich bestimmt, waren in den Spektren von BADGE und seinen Derivaten keine nennenswerten Abweichungen feststellbar. Das Anregungsmaximum bei 230 nm (Abb. 17 b) führt ebenfalls zu einer maximalen Emission bei 305 nm.

Das als Ausgangspunkt für die Methodenoptimierung genutzte Verfahren (s. 10.4.1 Tab. 15) nutzt die FLD mit einer Emissionswellenlänge ( $\lambda_{Em}$ ) von 305 nm bei einer Anregungswellenlänge ( $\lambda_{Ex}$ ) von 230 nm. Zur Erhöhung der Spezifität der Detektion wird jedoch  $\lambda_{Ex}$  275 nm bevorzugt, da viele Matrixbestandteile bei 230/305 nm ebenfalls Fluoreszenzaktivität besitzen. 275 nm als  $\lambda_{Ex}$  wurde bereits von BEGLEY et al. (1991) verwendet, in den folgenden Arbeiten von GROB und Mitarbeitern jedoch durch 230 nm ersetzt.

#### 4.3.2 Grundlagen der Massenspektrometrie

Zur sicheren Identifizierung der chromatographisch getrennten Substanzpeaks muß eine hochspezifische Detektion herangezogen werden. Bei flüssigchromatographischer Analytik bietet sich hierfür die MSD an.

Im Massenspektrum jeder Substanz treten typische Ionen in einem charakteristischen Muster auf. Im Gegensatz zur Gaschromatographie mit MSD bezeichnet das Signal mit der höchsten Massenzahl (Masse-Ladungs-Verhältnis, m/z) meistens nicht die Masse des Moleküls, sondern stellt ein Molekülcluster mit Bestandteilen des Eluenten dar (Abb. 18 i.V.m. Tab. 2).



Detektionsbedingungen s. 4.5 Tab. 3

Durch Kollision mit Stickstoff zerfällt das Molekül auf dem energetisch günstigsten Weg in charakteristische Fragmente. Die so entstandenen Bruchstücke tragen zur Aufklärung der Molekülstruktur bei.

## 4.3.3 Identifizierung von Substanzen der BADGE-Gruppe

Bei der Fragmentierung von BADGE und seinen Derivaten entstehen sowohl gruppen- als auch stoffspezifische Teilchen, die zum Nachweis der Substanzen herangezogen werden können. Tab. 1 zeigt eine Übersicht der wichtigsten gruppenspezifischen Molekülbruchstücke.

Fragment	Massenzahl	Auftreten bei
HO HO H <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub>	135	alle BADGE-Derivate BPA
CONTRACTOR CH3	191	BADGE BADGE·H2O BADGE·HCl
HOOH HOO H_3C CH <sub>3</sub>	209	BADGE·H <sub>2</sub> O BADGE·2H <sub>2</sub> O BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O
CIOH H_3C CH_3	227 / 229	BADGE·HCl BADGE·2HCl BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O

Tab. 1Gruppenspezifische Molekülfragmente

In Verbindung mit den substanzspezifischen Molekülclustern ergibt sich für jede einzelne Substanz ein charakteristisches Muster an detektierbaren Massen, deren Auftreten und Verhältnis zueinander eine sichere Identifizierung ermöglicht. Tab. 2 zeigt die für jede Substanz charakteristischen Ionen.

Substanz	Molekülion		Cluster mit		Fragmentionen
	(H <sup>+</sup> -Cluster)	$\mathrm{H_2O}/\mathrm{NH_4}^+$	Na <sup>+</sup>	$\mathbf{K}^{+}$	(m/z)
	M+1	M+18	M+23	M+39	
BPA	229	246	251	267	135
BADGE	341	358	363	379	135 / 191
BADGE·H <sub>2</sub> O	359	376	381	397	135 / 191 / 209
BADGE·2H <sub>2</sub> O	377	394	399	415	135 / 209
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	395 / 397*	412 / 414*	417 / 419*	433 / 435*	135 / 209 227 / 229
BADGE·HCI	377 / 379*	394 / 396*	399 / 401*	415 / 417*	135 / 191 227 / 229
BADGE·2HCl	413 / 415* 417*	430 / 432* 434*	435 / 437* 439*	451 / 453* 455*	135 / 227 / 229

Tab. 2 Substanzspezifische Clusterionen und Molekülfragmente bei positiver Ionisierung

\* unterschiedliche Massen aufgrund der Anwesenheit von Chlorisotopen

#### 4.3.4 Methoden der massenselektiven Detektion

Bei der Anwendung der massenselektiven Detektion sind zwei Modi möglich. Im Scan-Modus wird ein festgelegter Massenbereich aufgezeichnet. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus (4.3.2), jedoch leidet die Empfindlichkeit des Verfahrens unter der kurzen Meßzeit für die einzelnen Massen. Höhere Empfindlichkeit unter Verlust der Spezifität wird durch die Einzelionenüberwachung (Single Ion Monitoring, SIM) erreicht. Hierbei werden ausgewählte Massen aufgezeichnet, während alle nicht relevanten Ionen ausgeblendet werden (Abb. 19). Die Meßzeit für jede aufgezeichnete Masse ist hierbei deutlich höher als im Scan.



Abb. 19 Scan und extrahierte Clusterionen (M+18) der BADGE-Gruppe HPLC-MSD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3; 1: BADGE; 2: BADGE·HCl; 3: BADGE·2HCl; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O

Durch die SIM-Detektion ist eine Unterscheidung von BADGE und seinen Derivaten bereits über das Clusterion M+18 (Tab. 2) möglich. Die Aufnahme der Masse m/z 394 indiziert die Anwesenheit zweier Stoffe (BADGE·2H<sub>2</sub>O; BADGE·HCl). Um diese Substanzen unabhängig von der Retentionszeit zu differenzieren, werden weitere Ionenspuren zur Identifikation herangezogen. Hierzu bieten sich die Massen m/z 209 sowie m/z 227 an, da beide nur in jeweils einem der beiden BADGE-Derivate vorliegen (Abb. 20). Aus den Chromatogrammen der Ionenspuren m/z 209 und m/z 227 gehen ebenfalls weitere Möglichkeiten zur Identifikation der anderen BADGE-Derivate hervor. So liegt das Fragment m/z 209 neben BADGE·2H<sub>2</sub>O auch in BADGE·H<sub>2</sub>O sowie BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O vor, das Fragment m/z 227 in BADGE·HCl, BADGE·2HCl und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O (vgl. Tab. 1). 4 Die analytische Erfassung von BADGE und seinen Derivaten



Abb. 20 Differenzierung von BADGE·2H<sub>2</sub>O und BADGE·HCl HPLC-MSD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3; 1: BADGE; 2: BADGE·HCl; 3: BADGE·2HCl; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O

Aus der Summe der aufgezeichneten Ionenspuren errechnet sich ein Totalionenstrom (Total Ion Current, TIC), aus dem für jeden Zeitpunkt der Messung ein Massenspektrum abgeleitet werden kann. Für jede im TIC detektierte Substanz ist dieses Spektrum charakteristisch.

## 4.4 Optimierung der Detektionsbedingungen für BADGE und seine Derivate

Bei der Durchführung der massenselektiven Detektion sind Modifikationen einzelner Parameter möglich, wodurch Veränderungen in der Empfindlichkeit und Spezifität auftreten. Durch die sukzessive Überprüfung der Einflußgrößen sollte eine möglichst sichere qualitative Analytik etabliert werden.

## 4.4.1 Fragmentorspannung

Der Zerfall eines Moleküls zu spezifischen Fragmenten kann durch Anlegen unterschiedlicher Spannungen so gesteuert werden, daß ein charakteristisches Massenspektrum entsteht. Zur Ermittlung der optimalen Spannung wurde BADGE mehrfach unmittelbar nacheinander in das Massenspektrometer injiziert (Fließinjektionsanalyse, FIA). Bei jeder neuen Injektion wurde die Fragmentorspannung um einen definierten Betrag erhöht (Abb. 21).
20 V	40 V	60 V	80 V	100 V	120 V	140 V	FIA TIC
20 V	40 V	60 V	80 V	100 V	120 V	FIA 140 V	m /z 358
20 V	40 V	60 V	80 V	100 V	120 V	FIA 140 V	m /z 191
20 V	40 V	60 V	80 V	100 V	FIA 120 V	m /z 135	160 V

Abb. 21 Fließinjektionsanalyse von BADGE bei unterschiedlicher Fragmentorspannung

Die für BADGE charakteristischen Fragmente m/z 191 und m/z 135 treten erst oberhalb von 80 V in nennenswerten Mengen auf. Um jedoch bei höheren Fragmentorspannungen nicht die Information aus dem Clusterion M+18 zu verlieren, kann für den Nachweis von BADGE und seinen Derivaten keine beliebig hohe Spannung gewählt werden.

Für die weiteren Untersuchungen wurde als günstigste Fragmentorspannung 100 V festgelegt.

4.4.2 Untersuchungen zur Steigerung der Empfindlichkeit

Elementare Ziele der Untersuchungen sind eine hohe Spezifität bei gleichzeitig hoher Sensitivität. Nach gelungener Identifizierung rückte die Steigerung der Empfindlichkeit in den Vordergrund.

Empfindlichkeit bei unterschiedlichen Puffersubstanzen

Die im wäßrigen Anteil des Eluenten eingesetzte Puffersubstanz übt einen erheblichen Einfluß auf die Ionisierbarkeit der Analyten aus. Im Rahmen der Untersuchungen wurden die Standardpuffer Ammoniumformiat (NH<sub>4</sub>form), Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>ac) und Trifluoressigsäure (TFA) überprüft (Abb. 22).



Abb. 22 Signal-Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von der Puffersubstanz HPLC-MSD, Scan; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3

Die Ionisierbarkeit ist eine stoffspezifische Größe. Substanzen mit intaktem Oxiranring sind empfindlicher detektierbar als vollständig hydrolysierte Derivate; ebenfalls besitzen Hydrolyseprodukte ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) als chlorhaltige Derivate. Bei der untersuchten Ionisierungstechnik wurde durch den Einsatz von NH<sub>4</sub>form sowohl im Scan als auch im SIM bei Betrachtung der intensivsten Cluster-Signale die höchste Empfind-

lichkeit erreicht (s. 10.4.3 Tab. 22 und 23).

Empfindlichkeit bei unterschiedlichen Ionenquellen

Auch die Ionenquelle selbst besitzt einen erheblichen Einfluß auf die Detektierbarkeit der Substanzen. Die massenselektive Detektion ermöglicht eine Ionisierung im elektrischen Feld (Atmospheric Pressure Electrospray Ionisation, AP-ESI) ebenso wie durch chemische Induktion (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI). Bei beiden Verfahren ist es möglich, durch unterschiedliche Polarität der Spannung positive oder negative Ionen zu erzeugen.

Die Nutzung der APCI führte zu einer erheblichen Verschlechterung des S/N. Auch die Generierung negativ ionisierter Verbindungen führte nicht zu befriedigenden Resultaten (s. 10.4.3 Tab. 24). Damit stellt die AP-ESI mit Bildung positiver Ionen die optimale Technik für die Untersuchung von BADGE und seinen Derivaten dar.

## 4.5 Zusammenfassung der optimierten Flüssigchromatographie

Mit den beschriebenen Untersuchungen wurde eine Methode erstellt, die eine zuverlässige Identifizierung von BADGE und seinen Derivaten auch bei geringen Substanzmengen ermöglicht. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die Parameter des optimierten Verfahrens.

Chromatographisches Verfahren	HPLC-FLD / HPLC-MSD		
Stationäre Phase	Multospher® 100 5C18 250x4		
Mobile Phase	Binärer Gradient mit Acetonitril-Methanol-Vormischung		
	<u>Eluent A:</u> 5 mM NH <sub>4</sub> form in Wasser (pH 3) Eluent B: Acetonitril / Methanol $1/2$ (y/y)		
	$\frac{\text{Elucht B.}}{0 \text{ min}} = 40\% \text{ Fluent A}$		
	30 min: 25 % Eluent A		
	31  min: 5%  Eluent A		
	40 min: 5 % Eluent A		
	41 min: 40 % Eluent A		
	50 min: 40 % Eluent A		
	Bei der Untersuchung von Standardlö-		
	sungen kann der Spülschritt entfallen		
Flußrate	0.8 mL / min		
Temperatur im Säulenofen	30 °C		
Fluoreszenzdetektion	Anregungswellenlänge ( $\lambda_{Ex}$ ): 275 nm		
	Emissionswellenlänge ( $\lambda_{Em}$ ): 305 nm		
Massenselektive Detektion	Elektrospray-Ionisation, positive Ionisierung		
	Fragmentorspannung: 100 V		
	Scan-Modus: m/z 100 – m/z 450		
	SIM-Modus: charakteristische Ionenspuren		
	(vgl. Tab. 1 und 2)		
	Trocknungsgas 10 L·min <sup>-1</sup> / 350° C		
	Verneblerdruck 40 psig		
	Kapillarspannung 4000 V		

 Tab. 3
 Übersicht über die Parameter

#### 4.6 Optimierung der Aufarbeitung von Lebensmitteln

Das in Kapitel 4.1 beschriebene Verfahren zur Probenaufarbeitung stellt die für BADGE optimierte Vorgehensweise dar. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Polaritäten der einzubeziehenden BADGE-Derivate und im Hinblick auf eine möglichst hohe und einheitliche Wiederfindung aller Substanzen war es erforderlich, die Methode an die neue Aufgabenstellung anzupassen. Das allgemeine Schema der Probenvorbereitung für flüssigchromatographische Verfahren (Abb. 11) sollte dabei nicht verlassen werden. Mittels Retroanalyse wurden die Entfernung der Restlipide, die Lipid-Lipoid-Trennung und die Fettextraktion optimiert. Nach diesem Prinzip werden Wiederfindungsraten ermittelt, die sich auf das gesamte Verfahren und nicht nur auf den einzelnen Schritt beziehen.

Die Optimierung der Lipidentfernung sowie der Lipid-Lipoid-Trennung erfolgte unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Standardsubstanzen BPA, BADGE·2H<sub>2</sub>O, BADGE und BADGE·2HCl, die den gesamten Polaritätsbereich der Analyte abdecken. Für die Optimierung der Fettextraktion aus dem Lebensmittel stand BADGE·HCl in hoher Reinheit als Referenzsubstanz zusätzlich zur Verfügung.

## 4.6.1 Entfernung der Restlipide

Im Rahmen des beschriebenen Verfahrens erfolgte die Entfernung der Restlipide durch Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) über nicht konditionierte SPE-Säulen ohne Spülschritt. Bei einem solchen Verfahren bleiben bedingt durch den chromatographischen Trenneffekt des Säulenmaterials nennenswerte Mengen der Standardsubstanzen, insbesondere derjenigen mit polarer Struktur, auf der Säule zurück. Abb. 23 zeigt den Effekt der Spülung der Säule auf die Wiederfindung eines Standardgemisches in Acetonitril.



 $\blacksquare$  BADGE·2H2O  $\blacksquare$  BPA  $\blacksquare$  BADGE  $\boxtimes$  BADGE·2HCl

Abb. 23 Mittlere Wiederfindungsraten der Standards nach Filtration über die SPE-Säule

Wie erwartet eluierten die Standardsubstanzen ohne Spülschritt nicht quantitativ. Besonders auffällig war die schlechte Wiederfindung des polaren BADGE·2H<sub>2</sub>O.

Durch Spülen der Festphase mit Acetonitril wurde die Wiederfindung aller Substanzen deutlich verbessert. Um auch BADGE·2H<sub>2</sub>O vollständig in das Eluat zu überführen, war die Beimischung von Wasser zum Elutionsreagenz erforderlich (s. 10.4.4 Tab. 25).

Nach Optimierung der SPE traten keine Analytverluste mehr auf.

## 4.6.2 Lipid-Lipoid-Trennung

Auch hier sollte eine Extraktion der unterschiedlich polaren BADGE-Derivate mit möglichst gleichen Wiederfindungen erreicht werden. Hierzu wurde ein Standardgemisch in Olivenöl mit unterschiedlich polaren Extraktionsmitteln isoliert (s. 10.4.4 Tab. 26).

Der Einsatz des aus der Antioxidantien-Analytik (BGVV, 1984) bewährten Extraktionsgemisches aus Acetonitril / 2-Propanol / Ethanol (50/25/25, v/v/v) ergab gegenüber der ursprünglich verwendeten Extraktion mit Acetonitril keine entscheidende Verbesserung. Die Isolierung der Analyte mit Acetonitril aus in Hexan gelöstem Fett hingegen führte zu geringfügig höheren und einheitlicheren Wiederfindungen. Der höhere Zeit- und Lösungsmittelaufwand bei nur leicht verbesserten Kenndaten rechtfertigt die Anwendung dieses Verfahrensschrittes in der Routineanalytik jedoch nicht.

Die Lipid-Lipoid-Trennung wurde demnach unverändert aus dem ursprünglichen Verfahren übernommen.

## 4.6.3 Fettextraktion

Ziel dieses Optimierungsschrittes war die Substitution des nicht redestillierbaren Lösungsmittelgemisches aus Pentan und Diethylether (s. 4.1) durch ein redestillierbares Extraktionsmittel. Für diese Untersuchungen wurde Jagdwurst, die zuvor auf die Anwesenheit der Analyte überprüft worden war, dotiert und anschließend mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln behandelt (s. 10.4.4 Tab. 27).

Bei Verwendung von Pentan / Diethylether (1/1, v/v) wurden mit Ausnahme von BADGE·2H<sub>2</sub>O (11.4 %) hohe und einheitliche Wiederfindungsraten ermittelt. Das Extraktionsgemisch ist damit zu unpolar, um diesen Analyt quantitativ zu extrahieren. Von allen eingesetzten Lösungsmitteln zeigte Diethylether die optimalen Eigenschaften (Abb. 24); nur Acetonitril stellte eine Alternative dar (s. 10.4.4 Tab. 27). Wegen der fehlenden Redestillierbarkeit bei nur geringfügiger Verbesserung der Extraktion wurde jedoch auf die Verwendung von Acetonitril verzichtet.



Abb. 24 Mittlere Wiederfindungsraten nach Lipidextraktion der Jagdwurst

Die Extraktion mit Diethylether lieferte einheitlich hohe Wiederfindungsraten für alle Analyte. Daneben wurde durch die schnelle Redestillation eine erhebliche Einsparung an Lösungsmittel ermöglicht.

## 4.6.4 Wahl des internen Standards

Die Verwendung eines internen Standards (IS) ermöglicht eine Kompensation von Analytverlusten bei der Aufarbeitung. Die Vereinfachungen für die Analytik sind jedoch nur möglich, wenn der IS den Analyten bezüglich der chemischen Struktur und des Verhaltens bei einer Behandlung ähnlich ist. Weiterhin sollte er bei chromatographischen Trennsystemen weder mit den Analyten noch Matrixbestandteilen koeluieren. Als optimale Lösung ist ein IS anzusehen, dessen Retentionszeit der mittleren Retentionszeit der Standards entspricht.

Ein IS für diese Anwendung sollte somit über eigene Synthesen leicht zugänglich sein, ein BPA-Grundgerüst besitzen und sowohl in der FLD als auch MSD detektierbar sein. Die Retentionszeit liegt im günstigsten Fall in einem Bereich von 15-20 Minuten (vgl. Abb. 16).

Zur Verwendung als IS wurden drei Substanzen untersucht, die als Grundvoraussetzung ein BPA-Grundgerüst besaßen. Alle Substanzen wurden synthetisiert und die Anwendbarkeit in der vorliegenden Fragestellung überprüft (Tab. 4).

Substanz	BPA-	einfache	Fluoreszenzak-	massenselektive	<b>Retentions-</b>
	Grundgerüst	Synthese	tivität	Detektion	zeit
Bisphenol A-	ia	nain	ia	ia	16 min
Monoglycidylether	Ja	псш	Ja	Ja	10 11111
<b>Bisphenol A-</b>	ia	io	ia	noin	18 min
Dimethylether	Ja	Ja	Ja	пстп	18 1111
Bisphenol A-di-3-	ia	io	ia	ia	10 min
hydroxypropylether	Ja	Ja	Ja	Ja	18 11111

Tab. 4Profil der potenziellen Internen Standards

Bisphenol A-di-3-hydroxypropylether (BADHPE, Abb. 25) erfüllte demnach alle genannten Anforderungen optimal. Die Gewinnung der Substanz folgte dem Prinzip einer Williamson-Ethersynthese aus Bisphenol A und 3-Chlorpropanol unter alkalischen Bedingungen und führte zu einem hochreinen Produkt (s. 10.4.5).



Abb. 25 Bisphenol A-di-3-hydroxypropylether

# 4.7 Zusammenfassung der optimierten Probenvorbereitung

Aus den Untersuchungen zur Optimierung der Aufarbeitung von Lebensmitteln ging das in Abb. 26 dargestellte Verfahren hervor:



Abb. 26 Aufarbeitungsschema nach der Optimierung

# 4.8 Validierung des Verfahrens

Erste Ansätze zur statistischen Beurteilung der BADGE-Analytik führten BIEDERMANN et al. (1999a und 1999b) durch. Sie ermittelten die Wiederfindungsrate der SCF-relevanten BADGE-Derivate in fettreichen und wäßrigen Lebensmitteln unter Nutzung der externen Kalibrierreihe für BADGE. Für die Hydrolyse- und Hydrochlorierungsaddukte nahmen sie eine identische Fluoreszenzresponse an, die für die kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen auch gezeigt werden konnte. Die verbleibenden SCF-relevanten Substanzen lagen nicht als Referenzstandards vor. ROUBTSOVA et al. (1997) sowie RAUTER et al. (1999) führten die Validierung ausschließlich für BADGE durch. In dieser Arbeit sollten erstmals sowohl eine Grundkalibrierung als auch Matrixkalibrierungen aus der Aufarbeitung des Simulanzöls und aus einer Modellmatrix für alle grenzwertrelevanten Substanzen und BPA anhand der synthetisierten Referenzsubstanzen durchgeführt werden. Durch die Verwendung eines IS war es zudem möglich, fehlerbehaftete Schritte bei der Aufarbeitung zu kompensieren.

Abb. 27 zeigt das Chromatogramm der optimierten chromatographischen Trennung (vgl. Abb. 16), jedoch bei Verwendung des IS.



Abb. 27 Chromatogramm der optimierten Trennung HPLC-FLD; Standardgemisch 100 μg/L; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3; 1: BADGE; 2: BADGE·HCl;
3: BADGE·2HCl; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O; 7: BPA; 8: IS

#### 4.8.1 Grundkalibrierung und molare Fluoreszenzresponse

Im ersten Schritt der Validierung wurde die Grundkalibrierung für alle Analyte und den IS durchgeführt. Der Arbeitsbereich des Verfahrens wurde so gewählt, daß die Überwachung des Summengrenzwerts gewährleistet ist. Das Verfahren ist über einen großen Bereich linear (Tab. 5). Die ermittelte mittlere Nachweisgrenze der Standardsubstanzen läßt eine empfindliche und präzise Bestimmung der relevanten BADGE-Derivate zu (s. 10.4.6 Tab. 29).

Tab. 5: Mittlere	Kenndaten	der	Grundkalibrier	ung
------------------	-----------	-----	----------------	-----

Arbeitsbereich	10-800 μg/L
Korrelationskoeffizient r	0.9995
Reststandardabweichung s <sub>gr</sub>	0.96 mV∙min
Verfahrensstandardabweichung s <sub>x</sub>	9.0 μg/L
Verfahrensvariationskoeffizient CV	3.4 %
Nachweisgrenze (DIN 32645)	20.5 μg/L

Aus den Flächen der Standardchromatogramme und der molaren Konzentration wurde für alle Analyten und den IS die Fluoreszenzresponse berechnet (Abb. 28, vgl. 10.4.6 Tab. 29).



Abb. 28 Vergleich der molaren Fluoreszenzresponse aller Analyte ( $\lambda_{Ex}$  275 nm,  $\lambda_{Em}$  305 nm)

Wie bereits von BIEDERMANN et al. (1997) angenommen, ist die Fluoreszenzaktivität der zu untersuchenden BADGE-Derivate annähernd gleich. Da BPA jedoch nur 50 % der Fluoreszenzresponse der BADGE-Derivate aufweist, ist diese Substanz separat zu kalibrieren. Der IS unterscheidet sich auch bezüglich seiner Fluoreszenzresponse nicht von den Analyten.

#### 4.8.2 Matrixkalibrierung und Wiederfindung

Nach Abschluß der Grundkalibrierung wurde eine Kalibrierung nach Dotierung von Olivenöl als Lebensmittelsimulans durchgeführt. Wie erwartet verschlechterten sich Linearität, Variationskoeffizient und Nachweisgrenze im Vergleich zur Grundkalibrierung. Die ermittelten Wiederfindungsraten für BADGE·2H<sub>2</sub>O, BPA, BADGE und BADGE·2HCl vor und nach Korrektur mittels IS konnten mit denen aus der Optimierung der Aufarbeitung verglichen werden (Abb. 29).



Abb. 29 Vergleich der Wiederfindungsraten für Olivenöl als Lebensmittelsimulans

Unter Berücksichtigung des über den IS berechneten Korrekturfaktors verbesserten sich die Validierungsdaten deutlich (s. 10.4.6 Tab. 32). Die Wiederfindungsrate des IS entspricht mit 73.8 % denjenigen der Analyte. Unter Einbeziehung des IS schwanken die Wiederfindungsraten daher innerhalb der Präzision des Verfahrens um 100 %. Hierdurch wurde die Anwendbarkeit von BADHPE als IS auch hinsichtlich des Verhaltens während der Probenaufarbeitung gezeigt.

Abschließend wurde die Aufarbeitung aus dem Lebensmittel validiert. Als Matrix diente Schmalzfleisch, das zuvor auf die Anwesenheit der Analyte überprüft worden war. Gegenüber der Matrixkalibrierung aus Olivenöl veränderten sich die analytischen Kenndaten nur unwesentlich (Tab. 6, vgl. 10.4.6 Tab. 35).

	Matrix-	Wiederfin-	IS-
	kalibrierung	dungsfunktion	Wiederfin-
			dungsfunktion
Arbeitsbereich [µg/kg]	50-800	50-800	50-800
Korrelationskoeffizient r	0.9787	0.9787	0.9905
Geradenstandardabweichung s <sub>gr</sub>	1.7 mV·min	42.1 µg/kg	40.3 µg/kg
Verfahrensstandardabweichung sx [µg/kg]	59.1	59.1	38.9
Verfahrensvariationskoeffizient CV [%]	16.6	16.6	10.9
Wiederfindung (ohne BADGE·2H <sub>2</sub> O) [%]		68.5	99.4
Nachweisgrenze (DIN 32645) [µg/kg]	134.7	134.7	88.6
Nachweisgrenze (S/N > 3) [µg/kg]		16.3	

Tab. 6 Mittlere Kenndaten der Matrixkalibrierung mit Schmalzfleisch

Die durch Koelution mit Matrixbestandteilen deutlich erhöhte Wiederfindung von BADGE·2H<sub>2</sub>O (125.5 %) wurde in der Zusammenfassung (Tab. 6) nicht berücksichtigt. Mit den mittleren Kenndaten erfüllt das entwickelte Verfahren die Anforderungen der Richtlinie 93/256/EWG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1993), wonach spurenanalytische Verfahren bei einem Variationskoeffizienten von etwa 20 % Wiederfindungsraten von 80 – 110 % aufweisen sollten. Mit Ausnahme von BADGE·2H<sub>2</sub>O treffen diese Akzeptanzkriterien auch auf jede individuelle Substanz zu.

Die Ergebnisse der Validierung machen deutlich, daß das entwickelte Analysenverfahren den Anforderungen in Hinblick auf die Überwachung des BADGE-Summengrenzwerts gerecht wird. Vor allem die Robustheit gegenüber Schwankungen im analytischen System, niedrige Nachweisgrenze und Linearität über einen großen Arbeitsbereich beweisen die Validität des Verfahrens.

4.8.3 Verfahrenspräzision und Grenzwertbetrachtung

Mit dem validierten Verfahren wurde die spezifische Migration der BADGE-Derivate in einem Lebensmittel aus dem Einsatzvorrat Verpflegung der Bundeswehr in verschiedenen Herstellungschargen untersucht. Dazu wurden je sechs Proben aus vier verschiedenen Chargen von "Gulasch mit Kartoffeln" untersucht (Tab. 7). Ziel war es, die Homogenität der spezifischen Migrate sowohl innerhalb einer Charge als auch Unterschiede zwischen den Chargen herauszuarbeiten.

Tab. 7 Angaben zum Untersuchungsmaterial der Chargenanalyse

Verkehrsbezeichnung	Gulasch (aus Rind- und Schweinefleisch) mit Kartoffeln
Gewicht	300 g
Fleischeinwaage	75 g (angebraten)
Herstellungsdatum	1997
Chargen	A, B, C, D

In den untersuchten Chargen waren nach Absicherung mittels massenselektiver Detektion alle BADGE-Derivate mit Ausnahme von BADGE·H<sub>2</sub>O nachweisbar. Abbildung 30 zeigt für alle nachweisbaren BADGE-Derivate die Stichprobenmittelwerte für alle Chargen.



Abb. 30 Stichprobenmittelwerte der BADGE-Derivate sowie des Summengehalts

Mit einem mittleren Variationskoeffizienten von 7 % (s. 10.4.6 Tab. 36) sind die Ergebnisse der Stichproben innerhalb der Chargen sehr homogen. Diese Varianz entspricht der analytischen Meßunsicherheit des Verfahrens (Tab. 6). Dies spricht sowohl für eine einheitliche Leichtbehälterinnenbeschichtung als auch für eine Abfüllung, die nahezu identische Einzelprodukte im Hinblick auf die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe ergibt.

Mit einer Grenzwertbetrachtung über die mittlere Standardabweichung des Summengehalts wurde die Validierung des Verfahrens abgeschlossen.

Für die untersuchten Chargen wurde die Homogenität der Varianzen festgestellt. Es war daher davon auszugehen, daß alle Chargen einer Grundgesamtheit entstammen. Der Vertrauensbereich von 133  $\mu$ g/kg umfaßt sowohl die Meßunsicherheit als auch die Chargeninhomogenität. Bei Durchführung von sechs Parallelbestimmungen liegt somit ab einem mittleren Summengehalt von 1130  $\mu$ g/kg eine signifikante Grenzwertüberschreitung vor. Alle Chargen genügen also nicht den rechtlichen Bestimmungen.

## 5 Die analytische Erfassung von BFDGE und seinen Derivaten

Im Verlauf der Untersuchungen wurde deutlich, daß die Hersteller von Lebensmittelverpackungen intensiv nach Alternativen zur Nutzung von BADGE suchten. Wegen der ähnlichen technologischen Eigenschaften und der bis dahin nicht erfolgten rechtlichen Regelung der spezifischen Migration von NOGE bot sich der Einsatz dieses Substanzgemisches als Substitution an. Schon BIEDERMANN et al. (1997) zeigten in ersten Untersuchungen die Migration von NOGE-Komponenten in Lebensmittel. Da die toxikologische Bewertung von höhermolekularen Epoxyphenolen im Vergleich zu BADGE problematisch ist (s. 2.5), wurde der Gebrauch von NOGE durch den SCF (1999b) als nicht wünschenswert erklärt. Dies machte die analytische Erfassung der NOGE-Migration erforderlich.

BFDGE fällt als Bis-Epoxyphenol im Produktionsprozeß von NOGE grundsätzlich an und ist die kleinste strukturelle Einheit des Endprodukts, das bei der Konservenherstellung eingesetzt wird. Der Einsatz von isoliertem BFDGE ohne höhermolekulare Anteile erfolgt nur in Sonderfällen zur Beschichtung von Großtanks und Pipelines. Zum Nachweis des Einsatzes von NOGE bot sich die Bestimmung von BFDGE und seinen analogen Hydrolyse- und Hydrochlorierungsaddukten an. Durch den Erlaß der Richtlinie 2001/61/EG (EUROPÄISCHE KOM-MISSION, 2001) und die hier festgelegten Grenzwerte wurde die Grenzwertüberwachung für BFDGE von der Möglichkeit zum Erfordernis.

## 5.1 Strukturelle Besonderheiten von BFDGE und NOGE gegenüber BADGE

Bei der Herstellung von BFDGE wird anstelle von Aceton Formaldehyd als Edukt eingesetzt (BIEDERMANN et al., 1997). Aufgrund sterischer Hinderungen durch die Methylgruppen des Acetons liegt BADGE in p,p-Form und nur als 2-Ring-System vor. Für BFDGE und seine Derivate sind dagegen unterschiedliche Stellungsisomere denkbar (Abb. 31). Bei NOGE erhöht sich die Zahl der Stellungsisomere entsprechend der Ringanzahl.

Die für BFDGE dargestellte Situation gilt analog auch für seine Hydrolyse- und Hydrochlorierungsderivate. Insgesamt liegen 21 Isomere der rechtlich relevanten Derivate vor, so daß an ein chromatographisches Trennsystem hohe Anforderungen zu stellen sind.



Abb. 31 Isomere Formen des BFDGE

#### 5.2 Ausgangssituation und Vorgaben für die Optimierung der Trennung

Wegen der ähnlichen Struktur von BADGE und BFDGE war davon auszugehen, daß sich die relevanten BFDGE-Derivate in ihrem Verhalten bei Probenvorbereitung und Analytik nicht erheblich von den analogen BADGE-Derivaten unterscheiden. Da BADGE und BFDGE als NOGE-Komponente auch in einem Produkt nebeneinander eingesetzt werden könnten, sollte ein Trennverfahren entwickelt werden, das die simultane Bestimmung von BADGE und BFDGE und BFDGE sowie ihren Addukten ermöglicht.

Als Grundlage für die Optimierung der chromatographischen Trennung der BADGE-Derivate, eines geeigneten IS und der neu aufgenommenen kommerziell erhältlichen BFDGE-Derivate (BPF, BFDGE, BFDGE·2H<sub>2</sub>O, BFDGE·2HCl) wurde das beschriebene Routineverfahren (s. 4) verwendet (Abb. 32). Die durch das Auftreten verschiedener BFDGE-Isomere hohe Dichte an Analyten in einem flüssigchromatographischen Verfahren führte zum Verzicht auf die Synthese der hier fehlenden Derivate.



Abb. 32 Chromatogramm der Standardsubstanzen HPLC-FLD; Standardgemisch, 200 μg/L BPA-basierte Standards, 400 μg/L BPF-basierte Standards; Bedingungen s. 4.5 Tab 3; 1: BADGE; 2: BADGE·HCl; 3: BADGE·2HCl; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O; 7: BPA; 8: IS; 9: BFDGE; 10: BFDGE·2HCl; 11: BFDGE·2H<sub>2</sub>O; 12: BPF

Zur Steigerung der Selektivität waren Modifikationen erforderlich. Insbesondere sollten die Trennung der früh eluierenden Standards BADGE·2H<sub>2</sub>O und BPF sowie die Aufhebung der Koelution des IS mit einem der drei Isomere von BFDGE erreicht werden. Darüber hinaus war eine Verlängerung der Retentionszeit der früh eluierenden Substanzen BFDGE·2H<sub>2</sub>O, BADGE·2H<sub>2</sub>O und BPF notwendig, um Koelutionen mit polaren Matrixbestandteilen weitgehend zu verhindern.

# 5.3 Optimierung der chromatographischen Trennung

Für die Bestimmung von BADGE und seinen relevanten Derivaten wurden die Chromatographie und die Detektion bereits optimiert (s. 4.2 bis 4.4). Da die Eigenschaften von BADGE und BFDGE keine gravierenden Unterschiede aufweisen, sollte eine Verbesserung der Trennleistung ausschließlich über die Veränderung des Elutionsgradienten möglich sein. Hierbei sollten die jeweiligen Eluenten in ihrer Zusammensetzung unverändert bleiben.

# 5.3.1 Auswahl eines Internen Standards

Durch die Veränderung des Elutionsgradienten konnte die Trennung aller Standardsubstanzen nennenswert verbessert werden. Es war jedoch nicht möglich, die Koelution eines BFDGE-Isomers mit dem IS zu verhindern. Daher war die Auswahl eines alternativen IS erforderlich. Wegen der strukturellen Verwandtschaft fiel die Wahl für den neuen IS auf Bisphenol F-di-3-hydroxypropylether (BFDHPE). Diese Verbindung wurde analog zur Synthese von BADHPE (s. 10.4.5) aus BPF und 3-Chlor-1-propanol hergestellt (s. 10.5.1).

Der Einsatz des neuen Internen Standards wurde möglich, weil BPF kommerziell als reines p,p-Isomer erhältlich war. Somit konnte BFDHPE in hoher Reinheit isomerenrein hergestellt werden. Wie erwartet unterscheidet sich diese Substanz in ihren Detektionseigenschaften nicht von den übrigen Referenzstandards.

# 5.3.2 Optimierte chromatographische Trennung

Die chromatographischen Bedingungen (s. 4.5 Tab. 3) wurden der veränderten Aufgabenstellung angepaßt. Alle 12 BFDGE- und BADGE-Derivate einschließlich des IS (BFDHPE) wurden unter den in Tab. 8 dargestellten optimierten Bedingungen getrennt (Abb. 33).

Stationäre Phase	Multospher® 100 50	Multospher® 100 5C18 250x4					
<b>Mobile Phase</b>	binärer Gradient mit Acetonitril / Methanol-Vormischung						
	Eluent A: 5mM-NF	Eluent A: 5mM-NH4 form in Wasser (pH 3)					
	Eluent B: Acetonitr	Eluent B: Acetonitril / Methanol (1/2, v/v)					
	Min	A [%]	B [%]				
	0	45	55				
	35	25	75				
	40	10	90				
	45	10	90				
	50	50 45 55					
	55 45 55						
Säulentemperatur	30 °C						
Flußrate	0.8 mL/min						

 Tab. 8
 Bedingungen des neuen chromatographischen Trennsystems



Abb. 33 Chromatogramm der optimierten Trennung HPLC-FLD; Standardgemisch, 200 µg/L BPA-basierte Standards und IS, 400 µg/L BPF-basierte Standards; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient Tab. 8; 1: BADGE; 2: BADGE·HCl; 3: BADGE·2HCl; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O; 7: BPA; 8: IS; 9: BFDGE; 10: BFDGE·2HCl; 11: BFDGE·2H<sub>2</sub>O; 12: BPF

#### 5.4 Validierung des Verfahrens

Auch für die Validierung diente das Verfahren für BADGE (s. 4) als Grundlage. Da die Validierung dort für fettreiche Lebensmittel durchgeführt wurde, wurden im Hinblick auf eine möglichst breite Anwendbarkeit Mais als kohlenhydratreiches und Thunfisch als proteinreiches Lebensmittel für die Validierung ausgewählt.

#### 5.4.1 Optimierung der Probenvorbereitung

Wegen der analogen Struktur der BFDGE-Derivate gegenüber BADGE unterscheidet sich das Extraktionsverhalten der neu aufgenommenen Analyte kaum von den bisherigen Analyten. Im Hinblick auf die fehlenden Methylgruppen und der daraus resultierenden erhöhten Polarität war jedoch anzunehmen, daß die Wiederfindungsrate für BFDGE·2H<sub>2</sub>O wegen der verringerten Löslichkeit im Extraktionsmittel nicht die Werte der übrigen Analyte erreichen würde. Da die Aufarbeitung bereits im Hinblick auf die großen Unterschiede in der Polarität der Analyte optimiert wurde und BFDGE·2H<sub>2</sub>O ebenso wie das analoge BADGE-Derivat nicht in die Grenzwertbetrachtungen des SCF (1999a) sowie der EUROPÄISCHEN KOMMISSION (2001) einging, wurde auf eine Optimierung verzichtet, die gleichzeitig zu einer Verschlechterung der Bedingungen für die grenzwertrelevanten hydrochlorierten Derivate geführt hätte.

Lediglich der abschließende Verdünnungsschritt vor der chromatographischen Trennung wurde den Anfangsbedingungen des Elutionsgradienten angepaßt, um durch Polaritätsunterschiede bedingte Probleme bezüglich der Peaksymmetrie und Peakschärfe zu vermeiden. Die Verdünnung erfolgte nicht mehr im Verhältnis 1 : 1, sondern mit der 1.33 fachen Menge Wasser.

#### 5.4.2 Grundkalibrierung und molare Fluoreszenzresponse

Für die Grundkalibrierung gelten die in 4.8.1 beschriebenen Grundlagen. Wegen der Anwesenheit von drei Isomeren bei den BFDGE-Derivaten wurde die doppelte Menge dieser Analyte im Vergleich zu derjenigen der BADGE-Derivaten eingewogen.

Auch für die BFDGE-Derivate wurde ein weiter linearer Arbeitsbereich ermittelt (s. 10.5.2 Tab. 38). Tab. 9 faßt die mittleren Kenndaten der Grundkalibrierung zusammen.

Arbeitsbereich [µg/L]	BADGE-Derivate +IS	50-800
	BFDGE-Derivate	100-1600
Korrelationskoeffizient r	BADGE-Derivate+IS	0.9997
	BFDGE-Derivate	0.9996
Geradenstandardabweichung s <sub>gr</sub> [mV·min]	BADGE-Derivate +IS	0.64
	BFDGE-Derivate	1.34
Verfahrensstandardabweichung $s_x$ [µg/L]	BADGE-Derivate +IS	6.9
	BFDGE-Derivate	14.0
Verfahrensvariationskoeffizient CV [%]	BADGE-Derivate +IS	1.8
	BFDGE-Derivate	2.0
Nachweisgrenze (DIN 32645) [µg/L]	BADGE-Derivate +IS	15.3
	BFDGE-Derivate	31.4

Analog zu 4.8.1 wurde für alle Standards die molare Fluoreszenzresponse berechnet, wobei für die BFDGE-Derivate die Peaksumme der jeweiligen Isomerenpeaks gebildet wurde. Unter den gewählten Bedingungen wurde für alle BFDGE- und BADGE-basierten Derivate innerhalb akzeptabler Abweichungen eine identische Fluoreszenzresponse ermittelt (s. 10.5.2 Tab. 38 i.V.m. 10.4.6 Tab. 29).

Eine Quantifizierung der BFDGE-Derivate über die Summe der Peakflächen ist nur dann möglich, wenn die molare Fluoreszenzresponse aller drei Isomere gleich ist. Diese Tatsache hätte bei gleicher Stoffmenge der Isomere auch gleiche Peakflächen zur Folge. Ist dies nicht der Fall, wäre die Quantifizierung möglich, wenn das Isomerenverhältnis des Restmonomers im Kunststoff mit dem des eingesetzten Standards übereinstimmt und die Migrationseigenschaften der Isomere identisch sind. Da ein solcher Zusammenhang bislang nicht beschrieben wurde, rückte die Überprüfung der Fluoreszenzeigenschaften der Isomere in den Vordergrund. Hierzu war es erforderlich, diese zu isolieren und getrennt zu untersuchen.

5.4.3 UV-Absorption und Fluoreszenzaktivität der BFDGE-Isomere

Die Ermittlung der photometrischen Eigenschaften erforderte die präparative Isomerentrennung für BFDGE und seine Derivate. Nach der Identifizierung der Konstitution der Einzelsubstanzen war ihr Verhalten in der UVD und FLD zu ermitteln. Hierdurch sollte sowohl die Bestimmung der Zusammensetzung des kommerziellen Standards als auch die genaue Quantifizierung im Lebensmittel ermöglicht werden.

## Trennung und Charakterisierung

Die Trennung der Isomere erfolgte mittels präparativer HPLC im Recycling-Verfahren (Abb. 34). Nach Entfernen des Eluenten wurden alle Isomere in Reinheiten über 90 % isoliert. Diese Reinheit wurde zur Charakterisierung der photometrischen Eigenschaften als ausreichend angesehen.



Abb. 34 Trennung von o,p- und o,o-BFDGE mit Hilfe des Recycling-Verfahrens nach Abtrennung von p,p-BFDGE; HPLC-UVD 275 nm; isokratisch Wasser / Acetonitril (20/80, v/v); Flußrate 20 mL/min

Die Ermittlung der Konstitution der isolierten Isomere erfolgte unter Verwendung der kernmagnetischen Resonanz-Spektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR). Hierbei wurde die Tatsache ausgenutzt, daß die aromatischen Protonen unterschiedliche Kopplungseigenschaften aufweisen. So liegen in para-substituierten Aromaten zwei equivalente Protonenpaare vor, während alle Protonen ortho-substituierter Aromaten unterschiedliche Kopplungseigenschaften besitzen. Dies führt zu veränderten Signalaufspaltungen und zu einer zuverlässigen Identifikation der Isomere (Abb. 35, vgl. 10.5.3 Tab. 39).



Abb. 35 Signalaufspaltung der aromatischen Protonen der BFDGE-Isomere (<sup>1</sup>H-NMR)

Bei allen untersuchten BFDGE-Derivaten eluierte zunächst das p,p-Isomer, gefolgt vom o,p-Isomer. Den Abschluß bildete das o,o-Isomer.

#### Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten der Isomere

Die Untersuchungen aus der Literatur sowie die eigenen Arbeiten nutzen photometrische Detektionsverfahren. Als Detektionswellenlänge in der UVD sowie als  $\lambda_{Ex}$  in der FLD werden sowohl 230 nm als auch 275 nm genutzt. Zur Überprüfung der Detektionseigenschaften wurden die UV-Spektren (Abb. 36) aufgenommen und die molaren Extinktionskoeffizienten ( $\alpha_m$ ) berechnet.



Abb. 36 UV-Spektren der BFDGE-Isomere

Die UV-Spektren der Isomere von BFDGE·2H<sub>2</sub>O sowie BFDGE·2HCl unterschieden sich nicht von denen der BFDGE-Isomere.

Das Absorptionsmaximum bei 230 nm ist sehr unterschiedlich ausgeprägt. Dies führt zu deutlichen Abweichungen im  $\alpha_m$  der Isomere. Dieser erreichte bei den o,o-Isomeren der Derivate etwa die Hälfte des Werts der p,p-Derivate. Im Gegensatz hierzu unterschied sich der  $\alpha_m$  der Isomere bei 275 nm nicht (Tab. 10).

	a <sub>m</sub> (p,p-Isomer) [L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]	α <sub>m</sub> (o,p-Isomer) [L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]	α <sub>m</sub> (0,0-Isomer) [L·mol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> ]	
BFDGE	20280	14160	9480	
BFDGE·2HCl	23200	14795	10298	230 nm
BFDGE·2H <sub>2</sub> O	19570	13548	8216	
BFDGE	3224	3360	3360	
BFDGE·2HCl	3808	3727	3840	275 nm
BFDGE·2H <sub>2</sub> O	2970	2997	2994	

Tab. 10 molarer Extinktionskoeffizient  $\alpha_m$  der Isomere bei UVD

#### Bestimmung der Fluoreszenzresponse

Die Ergebnisse der Bestimmung des  $\alpha_m$  bei den verschiedenen Wellenlängen ließen vermuten, daß sich auch das Fluoreszenzverhalten der Isomere bei einer  $\lambda_{Ex}$  von 230 nm voneinander unterscheidet. Für 275 nm wurde eine geringere Abweichung angenommen. Abbildung 37 zeigt die unterschiedliche Fluoreszenzaktivität der Isomere bei den genannten  $\lambda_{Ex}$  beispielhaft für BFDGE. Die starken Veränderungen der Response bei der UV-Detektion (230 nm) spiegelten sich auch in der Fluoreszenzresponse wieder.



Abb. 37 Fluoreszenzresponse für BFDGE-Isomere bei verschiedenen Anregungswellenlängen

Die Unterschiede im Fluoreszenzverhalten bei 230 nm als  $\lambda_{Ex}$  lassen die Bestimmung der BFDGE-Derivate über die Peaksumme der Isomere nicht zu. Die bereits für BADGE ermittelte optimale FLD bei 275/305 nm ermöglichte hingegen auch für BFDGE und seine Derivate eine Bestimmung über die Peaksumme der Isomere innerhalb akzeptabler Ergebnisunsicherheiten.

## 5.4.4 Matrixkalibrierung für kohlenhydratreiche Lebensmittel

Die Matrixkalibrierung in Gemüsemais erfolgte analog zu 4.8.2 und führte zu vergleichbaren Ergebnissen (s. 10.5.4 Tab. 41 und 42). Wie erwartet erreichte die Wiederfindung des hochpolaren BFDGE·2H<sub>2</sub>O mit 50.1 % nur einen sehr niedrigen Wert. Alle weiteren Derivate wurden innerhalb akzeptabler Schwankungen in gleicher Menge wiedergefunden. Daher wurde die Wiederfindungsrate von BFDGE·2H<sub>2</sub>O in die folgenden Berechnungen nicht einbezogen.

Gegenüber dem in 4.8.2 eingesetzten fettreichen Lebensmittel wurde für die BPA-basierten Standards vor der Korrektur mittels IS eine nahezu durchgehend höhere Wiederfindungsrate ermittelt. Nach Korrektur lag diese für BADGE, BFDGE und deren Derivate im Mittel bei 93.1 % (s. 10.5.4 Tab. 41 und 42).

Auffällig waren hier Unterschiede in der Wiederfindung der Derivate mit intakter Epoxidfunktion im Vergleich mit den vollständig umgesetzten Derivaten. Erstere besaßen mit einer mittleren Wiederfindung von 89.7 % einen niedrigeren Wert als letztere mit 95.4 %.

## 5.4.5 Matrixkalibrierung für proteinreiche Lebensmittel

Die Matrixkalibrierung für Thunfisch unterschied sich nur unwesentlich von derjenigen für Mais (s. 10.5.4 Tab. 44 und 45). Die Wiederfindung für BFDGE $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O wurde unerwartet hoch mit 91.1 % bestimmt. Die mittlere Wiederfindungsrate lag nach Korrektur mit Internem Standard im Mittel bei 94.2 %.

Von entscheidender Bedeutung war bei dieser Kalibrierung die Geschwindigkeit der Probenaufarbeitung. Die Vorbereitung begann unmittelbar nach der Dotierung und war innerhalb eines Tages abgeschlossen. Bei längerer Aufarbeitung sank die Wiederfindung – insbesondere der epoxidhaltigen Derivate – drastisch.

Auch hier unterschieden sich die Wiederfindungen der Derivate mit intakter Epoxidfunktion mit 92.8 % von denen der vollständig umgesetzten Derivate mit 95.4 %.

## 5.5 BFDGE und NOGE als Bestandteile von Lebensmittelverpackungen

In dem beschriebenen Verfahren wurden bislang die 2-Ring-Systeme BADGE und BFDGE sowie ihre Derivate betrachtet. Die Empfehlungen des SCF (1999b) sowie der Erlaß der Richtlinie 2001/61/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001) machten jedoch die analytische Erfassung von NOGE und seinen Derivaten erforderlich.

Bereits BIEDERMANN et al. (1997) wiesen NOGE in Lebensmitteln aus Konservendosen nach. Da jedoch im Rahmen der Diskussionen um die zukünftigen Grenzwerte der genannten Richtlinie bereits frühzeitig festgelegt wurde, daß für NOGE alle Derivate mit einem Molekulargewicht unter 1000 Dalton einbezogen werden sollten, die wenigstens eine intakte Epoxidfunktion oder eine Chlorhydrinstruktur aufweisen, wurde deutlich, daß wegen der Vielzahl der einzubeziehenden Analyte sowie ihrer unüberschaubaren Anzahl an Isomeren die Erfassung durch ein einfaches chromatographisches Verfahren nicht zu erreichen sein würde. Diese Probleme wurden ausführlich von WAGNER et al. (2000) beschrieben.

Zur Überwachung des Einsatzes von NOGE sollte daher ein Screeningverfahren entwickelt werden, welches den Nachweis der underivatisierten NOGE-Bestandteile bis 1000 Dalton in Beschichtungen von Lebensmittelverpackungen ermöglicht. Da die geltenden rechtlichen Bestimmungen (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002) den NOGE-Gehalt im Bedarfsgegenstand reglementieren, war eine Untersuchung von Lebensmitteln nicht erforderlich.

Durch die bisher eingesetzten Verfahren können NOGE-Komponenten mit Ausnahme von BFDGE nicht erfaßt werden. Um die Elutionskraft zu erhöhen, wurde daher auf den Zusatz von Methanol zum organischen Modifier verzichtet und ausschließlich Acetonitril als organische Komponente verwendet. Zur Elution der wenig polaren Mehrring-NOGE wurde der Anteil des organischen Modifiers am Eluenten auf bis zu 100 % erhöht. (Tab. 11).

Stationäre Phase	Multospher <sup>®</sup> 100 5C18 250x4						
<b>Mobile Phase</b>	Eluent A: 1mM-NH <sub>4</sub> form in Wasser (pH 3)						
	Eluent B: Acetonitril						
		Gradientenprogramm	1				
	Min	Min A [%] B [%]					
	0	50	50				
	50	0	100				
	60 0 100						
	70 50 50						
Säulentemperatur	30 °C						
Flußrate	1.0 mL/min						

<b>Tab.</b> 1	1 Bedingungen	des chromatograp	ohischen Systems	s zur Trennung dei	NOGE-Derivate
---------------	---------------	------------------	------------------	--------------------	---------------

Die Anwendbarkeit des Verfahrens wurde an Konserven in Schraubgläsern mit Metalldeckeln verwendet. Die Deckel ("Twist-Off-Caps") sind auf der Innenseite mit PVC-Organosolen beschichtet, zu deren Herstellung der Einsatz von Epoxiden erforderlich ist (s. 1).

Die Innenseiten von Twist-Off-Caps verschiedener Glaskonserven wurden über 24 Stunden mit 20 mL Acetonitril extrahiert. Anschließend wurde die Extraktionslösung mit dem gleichen Volumen an Wasser verdünnt. Auftretende Niederschläge wurden abfiltriert (0.45  $\mu$ m). Die klare Lösung wurde zur Chromatographie verwendet. Alle untersuchten Deckel wiesen eine Vielzahl an extrahierten und nachweisbaren Substanzen auf (Abb. 38).



Abb. 38 Chromatogramm eines Deckelextraktes HPLC-FLD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient Tab. 11

Unter den gewählten chromatographischen Bedingungen besaßen alle Standardsubstanzen der BADGE- und BFDGE-Bestimmung Retentionszeiten unter 20 Minuten. Es wurden demnach auch Substanzen mit erheblich geringerer Polarität aus der Beschichtung extrahiert. Es wurde vermutet, daß die untersuchten Twist-Off-Caps unter Verwendung von NOGE als HCl-Fänger bei der Härtung des PVC-Organosols hergestellt wurden. Die weitere Identifizierung der extrahierten Stoffe erfolgte mittels massenselektiver Detektion. Hierzu wurden für die NOGE-Komponenten mit zwei bis sieben Ringen die Molmassen berechnet. Diese Komponenten wurden durch ihre Molekülcluster mit dem Ammoniumion (M+18) im SIM-Modus nachgewiesen (Abb. 39).

Durch die Anwendung der massenselektiven Detektion wurde es möglich, alle relevanten Bestandteile von NOGE im Extrakt von Kunststoffbeschichtungen nachzuweisen. Alle untersuchten Deckel wurden unter Verwendung von NOGE hergestellt. Erkennbar ist auch die Erhöhung der Isomerenzahl mit zunehmender Anzahl der aromatischen Ringe der NOGE-Bestandteile.

In Lebensmitteln aus Glaskonserven waren NOGE und seine Derivate nicht nachweisbar. Da die Migration ins Lebensmittel im Gegensatz zur Konservendose nur über eine relativ kleine Kontaktfläche erfolgen kann und Lebensmittel in Glaskonserven in der Regel nicht sterilisiert werden, liegt hier ein verringertes Migrationspotential vor.



Abb. 39 Trennung von NOGE in Acetonitril-Extrakten von Schraubdeckeln HPLC-MSD, Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient Tab. 11

# 6 Reaktionen von BADGE mit Lebensmittelbestandteilen in vitro

Im Rahmen der Matrixkalibrierung für BADGE und BFDGE sowie ihre Derivate fiel auf, daß für die Substanzen mit intakten Epoxidfunktionen eine niedrigere Wiederfindung erzielt wurde als für die vollständig derivatisierten Standards (s. 5.4.4 und 5.4.5).

Ähnliche Ergebnisse zeigten Untersuchungen von RICHARD et al. (1999). Sie dotierten verschiedene kohlenhydratreiche und proteinreiche Lebensmittel mit BADGE, inkubierten diese jeweils für einen Tag bei Raumtemperatur sowie für 30 Minuten bei 120 °C und ermittelten die Wiederfindungsraten von BADGE und seinen Derivaten. Hierbei wurde eine geringfügige Umsetzung von BADGE zu seinen Hydrolyse- und Hydrochlorierungsderivaten ermittelt. Der größere Anteil des dotierten BADGE wurde jedoch zu Reaktionsprodukten umgesetzt, die der Analytik nicht zugänglich waren. Insbesondere im proteinreichen Lebensmittel Thunfisch war nach der Inkubation weniger als 10 % des eingesetzten BADGE in Form seiner bekannten Derivate nachweisbar.

Da die Abnahme von BADGE nicht von der dotierten Menge abhing, gingen RICHARD et al. (1999) davon aus, daß BADGE mit einer Majorkomponente der Probenmatrix reagiert. Versuche zur Identifizierung des Reaktionspartners für BADGE schlugen jedoch fehl.

Aufbauend auf diesen Untersuchungen sowie den Ergebnissen der Matrixkalibrierungen im Rahmen dieser Arbeiten sollte der Reaktionspartner von BADGE im Lebensmittel identifiziert werden.

## 6.1 Umsetzung von BADGE in ausgewählten Lebensmitteln

Zur Bestätigung der angenommenen Reaktion von BADGE mit Majorbestandteilen wurden vier Lebensmittel mit unterschiedlichen Hauptkomponenten ausgewählt. Die untersuchten Lebensmittel und ihre Zusammensetzung hinsichtlich der Majorkomponenten (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2000) ergeben sich aus Tab. 12.

	Sonnenblumenöl	Pfirsich	Thunfisch in Öl	Thunfisch in
				eigenem Saft
Protein	0.00	2.17	72.52	90.98
Fett	100.00	0.48	20.44	3.22
Kohlenhydrate	0.00	96.24	0.00	0.00

 Tab. 12
 Angaben zu den verwendeten Lebensmitteln (Gehalte in g/100g Trockenmasse)

Im Handel waren für alle gewählten Lebensmittel Produkte erhältlich, die frei von BADGE und BFDGE sowie deren Derivaten waren.

Die Lebensmittel wurden mit BADGE sowie BADHPE als IS in mehreren Konzentrationen dotiert und homogenisiert. Das homogenisierte Material wurde unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ausgesetzt (s. 10.6.2). Die Aufarbeitung erfolgte nach der Dotierung:

- sofort zur Kontrolle (Ermittlung der Aufarbeitungsverluste),
- nach Inkubation von einem Tag bei Raumtemperatur
- nach Sterilisation bei 120 °C für 30 Minuten im Autoklaven

Von jeder Probe wurde ein undotierter Blindwert aufgearbeitet und chromatographiert (s. 10.6.1 Tab. 46).

Der IS ging unter den gewählten Bedingungen keine Reaktion mit dem Untersuchungsmaterial ein. Die Wiederfindung von BADGE konnte daher über den IS ermittelt werden.

# 6.1.1 Sonnenblumenöl

Weder in der Kontrolle noch nach Inkubation von dotiertem Sonnenblumenöl war eine nennenswerte Abnahme von BADGE erkennbar (s. 10.6.2 Tab. 47). Selbst nach Sterilisation war der Verlust von BADGE gering und kann auf Aufarbeitungsverluste zurückgeführt werden.

# 6.1.2 Pfirsich

Die Behandlung von dotiertem Pfirsich führte zu einer verringerten Wiederfindung (Abb. 40).



Abb. 40 Wiederfindung von BADGE in Pfirsich nach Inkubation

Nach der Reaktion von BADGE über einen Tag war eine Abnahme von bis zu 40 % festzustellen, ohne daß eines der beschriebenen Hydrolyse- oder Hydrochlorierungsprodukte entstand. Mit Erhöhung der dotierten BADGE-Menge fiel der Verlust geringer aus (s. 10.6.2 Tab. 48).

Die Sterilisation hatte eine fast vollständige Umsetzung von BADGE und ein gleichzeitiges Auftreten des Hydrolyseproduktes BADGE·2H<sub>2</sub>O zur Folge.

In jeder Dotierungsstufe lag die Summenwiederfindung aus BADGE und BADGE $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O bei etwa 70 %.

#### 6.1.3 Thunfisch in Öl

In der wäßrig-öligen Matrix Thunfisch in Öl beliefen sich die Wiederfindungen wie bei den anderen Matrices in der Kontrollaufarbeitung auf annähernd 100 %. Nach einem Tag Lagerung bei Raumtemperatur wurden ähnliche Ergebnisse wie beim Pfirsich beobachtet. Nach der Inkubation bei 120 °C war eine erhebliche Abnahme von BADGE nachweisbar, jedoch ohne die Entstehung von bekannten Derivaten. Die Wiederfindungen lagen hier in einem Bereich von 20 % bei allen Dotierkonzentrationen (s. 10.6.2 Tab. 49).

6.1.4 Thunfisch in eigenem Saft

Die höchsten Umsetzungsraten bei der Dotierung mit BADGE wurden in Thunfisch im eigenen Saft ermittelt (Abb. 41).



Abb. 41 Wiederfindung von BADGE in Thunfisch in eigenem Saft nach Inkubation

Bereits in der Kontrollaufarbeitung unmittelbar nach der Dotierung waren Verluste von BADGE feststellbar. Nach einem Tag Lagerung wurden bereits über 80 % BADGE umgesetzt; nach der Sterilisation war BADGE nur noch in Spuren nachweisbar (s. 10.6.2 Tab. 50). Es entstanden keine bekannten Derivate (Abb. 42).



 Abb. 42 Thunfisch in eigenem Saft dotiert mit BADGE und IS (β = 1 mg/kg) HPLC-FLD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3; a: Kontrollaufarbeitung; b: 120 °C, 30 Minuten; 1: BADGE; 8: IS

# 6.1.5 Zusammenfassung

Eine Reaktion von BADGE mit Lebensmittelbestandteilen, welche zu verringerter Wiederfindung führt, ist insbesondere in proteinreichen Lebensmitteln zu beobachten. Die Umsetzung mit Bestandteilen von Fetten und Ölen ist nicht zu erwarten.

Bei Dotierung von Pfirsich als kohlenhydratreichem Lebensmittel erfolgt bei Raumtemperatur eine konzentrationsabhängige Umsetzung von BADGE zu nicht nachweisbaren Derivaten. Es ist anzunehmen, daß der Reaktionspartner hier in einer geringen Konzentration vorliegt und durch den Zusatz höherer BADGE-Mengen nahezu vollständig umgesetzt wird. Demnach erfolgt keine Reaktion zwischen BADGE und Kohlenhydraten.

Thunfisch in eigenem Saft wurde auch von RICHARD et al. (1999) als Untersuchungsmaterial verwendet. Beide Untersuchungen zeigten übereinstimmende Umsetzungsraten bei allen Dotierkonzentrationen. Unter Sterilisationsbedingungen erfolgte eine nahezu vollständige Umsetzung von BADGE.

Auch die Inkubation von dotiertem Thunfisch in Öl führte nach einem Tag bei Raumtemperatur zu erkennbaren Verlusten. Im Vergleich zum Thunfisch in eigenem Saft fand aber eine deutlich langsamere Umsetzung statt. Die Umsetzung nach Sterilisation ist mit der des Thunfisches in eigenem Saft nach einem Tag bei Raumtemperatur zu vergleichen.

Thunfisch in Öl enthält im Vergleich deutlich mehr Fett (Tab. 12). BADGE wird in der kohärenten Fettphase angereichert und vor Reaktionen geschützt. Die verminderte Umsetzungsrate bestätigt die Ergebnisse der Inkubation mit Sonnenblumenöl. Als Reaktionspartner kommen somit Lebensmittelproteine in Betracht, welche in Pfirsich in geringer Konzentration vorliegen, in Thunfisch aber die Majorkomponente des Lebensmittels bilden.

# 6.2 Umsetzung von BADGE in Modellösungen

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß eine Umsetzung vermutlich mit Lebensmittelproteinen erfolgt. Zur Absicherung wurden Modellösungen mit BADGE inkubiert. Dabei wurden anstatt des Thunfisches eine Lösung von 0.1 % Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine, BSA) als Modellprotein, anstatt des Pfirsichs eine 10 %ige Glucoselösung eingesetzt (s. 10.6.3). Die Probenbehandlung und Untersuchung erfolgte analog zur Untersuchung der Lebensmittel (6.1). Die Wiederfindungen von BADGE unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen zeigt Abb. 43 (vgl. 10.6.3 Tab. 51).



Abb. 43 Umsetzung von BADGE mit Glucose und BSA unter verschiedenen Bedingungen

Kohlenhydrate bilden keine Addukte mit BADGE. Die Wiederfindungsrate nach der Kontrollaufarbeitung sowie der Inkubationszeit von einem Tag bei Raumtemperatur lag bei etwa 90 %. Die fehlenden 10 % sind auf Aufarbeitungsverluste zurückzuführen. Nach 30-minütiger Sterilisation wurde BADGE in der Zuckerlösung zu BADGE·2H<sub>2</sub>O hydrolysiert. Unter milderen Reaktionsbedingungen war keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollaufarbeitung zu erkennen.

Die Inkubation von BSA mit BADGE führte bereits in der Kontrollaufarbeitung zu einer erheblichen Umsetzung. Etwa 50 % der dotierten Menge waren nicht mehr nachweisbar. Nach einem Tag Reaktionszeit wurde der Analyt vollständig umgesetzt, ohne daß bekannte Derivate entstanden. Bei Sterilisation entstanden etwa 30 % BADGE·2H<sub>2</sub>O bei entsprechender Verringerung der Wiederfindung.

Damit wurden Lebensmittelproteine als Reaktionspartner für BADGE identifiziert. Zur Ermittlung der Bindungsstellen für BADGE im Protein wurde in der Folge zunächst die Reaktivität verschiedener typischer Lebensmittelproteine untersucht.

## 6.3 Die Reaktion mit isolierten Lebensmittelproteinen

Zunächst wurden ausgewählte Proteine aus ihren Lebensmitteln isoliert, zu den Isolaten eine definierte Menge an BADGE·H<sub>2</sub>O, welches im Gegensatz zu BADGE nur ein reaktives Zentrum besitzt, dotiert und die Reaktionsansätze in bestimmten Zeitabständen hinsichtlich einer Abnahme des Analyten mittels HPLC-FLD untersucht.

### 6.3.1 Untersuchungsmaterial

Als Vertreter der Serumalbumine und zum Vergleich mit den bisherigen Untersuchungen wurde BSA eingesetzt. Diese Proteine stellen für den Organismus eine Aminosäurereserve dar. Sie fungieren darüber hinaus als Trägerproteine für Calcium- und Magnesiumionen, Fett-säuren oder Aminosäuren. Serumproteine sind ebenfalls in der Lage, exogene Substanzen - zum Beispiel Epoxide - zu binden (SKIPPER et al., 1994).

Auch die Reaktion von Hämoglobin mit Epoxiden unter Alkylierung der nukleophilen Seitenketten konnte vielfach beobachtet werden (PHILLIPS und FARMER, 1994; DAY et al., 1991). Um verschiedene typische Lebensmittelproteine untersuchen zu können, wurden diese aus dem jeweiligen Lebensmittel extrahiert und lyophilisiert (s. 10.6.4). Untersucht wurden

- Proteine des Hühnereiklars sowie des Hühnereidotters
- Gesamt-Milchprotein sowie Casein
- Proteine des Thunfischs und
- wasserlösliche Proteine des Weizens.

Die Proteinisolate wurden mit BADGE·H<sub>2</sub>O und IS dotiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Die chromatographische Analyse wurde nach 24 Stunden sowie sieben Tagen (BSA: fünf Tage) durchgeführt (s. 10.6.4). Die prozentuale Umsetzungsrate wurde aus der Differenz zwischen der eingesetzten Stoffmenge vor der Inkubation sowie der Summe aus BADGE·H<sub>2</sub>O und BADGE·2H<sub>2</sub>O nach der Inkubation berechnet.

#### 6.3.2 Ergebnisse

Innerhalb dieser Untersuchungsreihe war nach Dotierung und Inkubation von BSA bereits nach 24 Stunden nur noch die Hälfte des zugesetzten BADGE·H<sub>2</sub>O nachweisbar. Nach 120 Stunden wurde ein Verlust von rund 95 % verzeichnet. Der Anteil an BADGE·2H<sub>2</sub>O betrug 3.5 %. Wegen der nahezu vollständigen Umsetzung des Analyten wurde auf die Messung nach 7 Tagen verzichtet.

Die Betrachtung der parallel vermessenen Proteinisolate zeigte einen langsameren Reaktionsverlauf. Der Anteil an BADGE·H<sub>2</sub>O betrug nach 24 Stunden sowohl bei der Reaktion mit dem Thunfischprotein als auch mit Hämoglobin etwa 84 %, während für die übrigen Proteine ein Restgehalt über 92 % zu verzeichnen war. In den Reaktionslösungen des Hämoglobins und des Weizenalbumins betrug der Anteil an BADGE·2H<sub>2</sub>O über 25 % und lag somit deutlich über den Werten der übrigen Messungen (s. 10.6.4 Tab. 52).

Nach sieben Tagen waren durch die Umsetzung mit Thunfischprotein rund 65 % des dotierten BADGE·H<sub>2</sub>O verschwunden - bei Hämoglobin, Eigelbprotein, Casein und Milchprotein rund 30 %. Der Verlust an BADGE·H<sub>2</sub>O in der Reaktionslösung des Eiklarproteins betrug knapp 16 %, in der des Weizenalbumins hingegen weniger als 4 % (Abb. 44, vgl. 10.6.4 Tab. 53).



Abb. 44 Umsetzungsraten für BADGE·H<sub>2</sub>O mit Lebensmittelproteinen nach 24 Stunden sowie sieben Tagen bei Raumtemperatur; Angaben in %

BSA fungiert im Organismus als Trägerprotein und bindet endogene Liganden, um diese zu den jeweiligen Zellen zu transportieren. Elektrophile Substanzen werden über die nukleophilen Seitenketten der Aminosäuren gebunden. BADGE·H<sub>2</sub>O vermag als elektrophile Substanz ebenfalls diese Reaktion einzugehen.

Neben dem BSA zeigt Thunfischprotein ebenfalls eine schnelle Umsetzung des Epoxids. Dieses Proteingemisch besteht neben kontraktilen Proteinen und Bindegewebsproteinen zu 16 bis 22 % aus Sarkoplasmaproteinen, welche den Serumproteinen zuzuordnen sind. Diese Proteine entsprechen in ihrer körpereigenen Funktion somit dem BSA.

Das in den roten Blutkörperchen lokalisierte Hämoglobin bindet über seine Häm-Gruppe molekularen Sauerstoff, um diesen zu transportieren. Es ist möglich, daß diese Funktion die Hydrolyse des BADGE·H<sub>2</sub>O zu BADGE·2H<sub>2</sub>O gegenüber der Alkylierung der nukleophilen Seitenketten begünstigt und somit ein geringerer Verlust an Epoxid gegenüber dem BSA-Ansatz zu beobachten ist.

Sowohl die Proteine des Magermilchpulvers als auch Casein weisen eine ähnliche Umsetzungsrate auf. Casein besitzt aufgrund seines hohen Anteils an Prolin (Pro) eine offene räumliche Struktur, in der die reaktiven Seitengruppen der Aminosäuren zum Teil frei vorliegen und der Reaktion mit BADGE·H<sub>2</sub>O zugänglich sind. Dies drückt sich in einem verhältnismäßig schnellen Reaktionsverlauf aus. Auch die Reaktion mit den Molkenproteinen scheint durch die nach außen liegenden hydrophilen Seitengruppen begünstigt zu werden.

Die Proteine des Eigelbs besitzen gegenüber denen des Eiklars eine größere Tendenz, mit BADGE·H<sub>2</sub>O zu reagieren. Die Serumproteine des Eis sind in der Eigelbfraktion lokalisiert. Wie bereits am Beispiel BSA diskutiert wurde, scheint diese Proteinklasse sehr gut mit BADGE·H<sub>2</sub>O zu reagieren.

In der Reaktionslösung des Weizenalbumins wurde BADGE·H<sub>2</sub>O nahezu quantitativ wiedergefunden. Die geringen Verluste werden auf Meßungenauigkeiten und Aufarbeitungsverluste zurückgeführt. Der größte Teil des BADGE·H<sub>2</sub>O wurde zu BADGE·2H<sub>2</sub>O hydrolysiert.

Nach den hier dargelegten Ergebnissen scheint der Oxiranring des BADGE·H<sub>2</sub>O bevorzugt mit Proteinen bestimmter Funktion (Serumproteine) zu reagieren. Mit reinem Serumprotein (BSA) erfolgte dabei die schnellste Umsetzung, gefolgt von der mit dem Thunfischprotein. Das Proteinisolat des Eigelbs, dessen Anteil an Serumproteinen lediglich 5.5 % beträgt, zeigte wiederum eine langsamere Reaktion mit dem Epoxid als das Thunfischprotein; mit Weizenprotein, welches keine Serumproteine aufweist, war keine Umsetzung nachweisbar.

Damit konnte dokumentiert werden, daß BADGE·H<sub>2</sub>O in der Lage ist, in vitro mit Proteinen unterschiedlicher Lebensmittel zu reagieren. Zur Aufklärung der Bindungsstellen für BADGE im Protein sollten BADGE-Aminosäure-Addukte im Hydrolysat von BADGE-Protein-Addukten nachgewiesen werden.

## 6.4 Nachweis von BADGE-Protein-Addukten

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigten eine vollständige Umsetzung mit BSA. Demnach wurden die weiteren Untersuchungen mit BSA als Modellprotein durchgeführt. Viele Aminosäuren tragen neben der reaktiven Amino- und Carboxyl-Funktion eine weitere funktionelle Gruppe. Abb. 45 zeigt den allgemeinen Mechanismus der nukleophilen Ringöffnung, wie sie bei der Bildung von BADGE-Protein-Addukten zu erwarten ist.



Abb. 45 Nukleophile Ringöffnung eines Oxirans

Um diese Addukte mittels RP-HPLC zu identifizieren und die Bindungsart aufzuklären, muß das Protein hydrolysiert werden, da die Strukturunterschiede des derivatisierten Proteins nicht zu veränderten chromatographischen Eigenschaften führen. Darüber hinaus blieben die Bindungsstellen im Protein unbekannt.

Die inkubierten BSA-Lösungen wurden nach verschiedenen Verfahren hydrolysiert.

#### 6.4.1 Esterspaltung durch alkalische Hydrolyse

Über einen basenkatalysierten Mechanismus werden Ester aus BADGE und Aminosäuren mit freier Carboxyl-Funktion (C-terminale sowie saure Aminosäuren) hydrolysiert. Diese Reaktion führt zu einer Freisetzung von BADGE als BADGE·H<sub>2</sub>O oder BADGE·2H<sub>2</sub>O.

Die wäßrige Lösung von BSA wurde mit BADGE sowie IS in unterschiedlichen Konzentrationen dotiert und über einen Tag bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hydrolyse wurde in Anlehnung an die Methode nach BANDURSKI et al. (1977) ausgeführt (s. 10.6.5). Als Blindwert wurden inkubierte Lösungen ohne Hydrolyse untersucht.

In den Blindwerten war nach der Inkubation neben Resten an BADGE eine kleine Menge BADGE·H<sub>2</sub>O nachweisbar. Nach der Hydrolyse war eine geringe, aber signifikante Erhöhung der Wiederfindungsrate durch freigesetztes BADGE·2H<sub>2</sub>O zu beobachten (s. 10.6.5 Tab. 54). Die Neigung zur Bildung von Estern aus BADGE und freien Carboxylgruppen von Aminosäuren ist demnach nur gering ausgeprägt.

## 6.4.2 Totalhydrolyse durch Säurezusatz

Mittels saurer Hydrolyse können Proteine vollständig hydrolysiert werden. Bei der Hydrolyse durch Zugabe von Salzsäure (LUCAS und SOTELO, 1982) werden allerdings einige Aminosäuren wie Tryptophan (Trp) durch Oxidation schnell zerstört.

Das Verfahren (s. 10.6.5) führte zu keiner erkennbaren Freisetzung von BADGE-Protein-Addukten. Darüber hinaus war nach Inkubation auch der IS nicht mehr nachweisbar.

Die Inkubation von Standardlösungen mit Salzsäure führte schnell zur Umsetzung von BADGE zu nicht identifizierten Addukten neben geringen Mengen an hydrochlorierten und hydrolysierten Derivaten (s. 10.6.5 Tab. 55). Auch der IS reagierte unter diesen Bedingungen zu unbekannten Verbindungen (Abb. 46).



Abb. 46 Wiederfindung von BADGE und IS nach Inkubation mit Salzsäure bei Raumtemperatur für BADGE ist die Summe seiner bekannten Derivate angegeben, vgl. 10.6.5 Tab. 55

Mittels HPLC-MSD waren für beide Substanzen Derivate mit Chlorsubstitution am aromatischen Ringsystem nachweisbar (s. 10.6.5 Tab. 56 und Abb. 67).

Da die saure Hydrolyse somit für BADGE sowie für den IS nicht geeignet ist, wurde auf weitere Untersuchungen bezüglich der Identifikation von Reaktionsprodukten sowie eine Verfahrensoptimierung verzichtet.

6.4.3 Enzymatische Hydrolyse mit Pronase E

Die enzymatische Hydrolyse wurde in Anlehnung an GARCIA und BAXTER (1992) mit Pronase E durchgeführt, welche Peptidbindungen unspezifisch spaltet. Ziel war die Freisetzung von BADGE-Aminosäure-Addukten aus dem Proteinverbund.

Wegen der möglichen Crosslink-Bildung der beiden Epoxidgruppen des BADGE mit verschiedenen Reaktionspartnern wurden in der Folge alle Untersuchungen mit BADGE·H<sub>2</sub>O, welches nur ein reaktives Zentrum besitzt, anstelle von BADGE durchgeführt (vgl. 6.3, s. 10.6.5). Daneben sollten die chromatographischen Bedingungen wegen der zu erwartenden hohen Polarität der Addukte an die Aufgabenstellung angepaßt werden. Hierzu wurde die Polarität der Ausgangszusammensetzung des Eluenten deutlich erhöht (s. 10.6.5 Tab. 57).

Durch die Hydrolyse von BSA wurden die fluoreszierenden Aminosäuren Trp und Tyrosin (Tyr) freigesetzt. Daneben waren im Hydrolysat des dotierten Proteins Peaks nachweisbar, die bei der Hydrolyse des undotierten Proteins nicht entstanden (Abb. 47). Die enzymatische Hydrolyse von BSA zeigte durch das Auftreten dieser Peaks, daß BADGE·H<sub>2</sub>O in der Lage ist, Reaktionen mit Proteinen einzugehen.



 Abb. 47 Chromatogramme der Proteinhydrolysate HPLC-FLD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient s. 10.6.5 Tab. 57; a: undotiertes Protein; b: dotiertes Protein; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 8: IS

#### 6.4.4 Identifizierung von BADGE-Aminosäure-Addukten im Hydrolysat

Zur Strukturaufklärung der durch die Hydrolyse entstandenen Peaks wurden die Hydrolysate der dotierten und undotierten Proteine mittels HPLC-MSD im Scan-Modus vermessen (s. 10.6.5). Es wurden überwiegend höher molekulare Massen aufgezeichnet, die aber keinen Hinweis auf vermutete Addukte von Aminosäuren mit BADGE·H<sub>2</sub>O gaben.

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit sowie der Spezifität wurden die charakteristischen Massen für Addukte von BADGE·H<sub>2</sub>O mit Aminosäuren berechnet und die Anwesenheit im SIM-Modus überprüft. Im Hydrolysat wurden zwei Peaks identifiziert, deren charakteristische Massen denen eines BADGE·H<sub>2</sub>O-Histidin-Adduktes entsprachen. Um die Entstehung solcher Addukte zu zeigen, war die Entwicklung einer Synthese erforderlich (s. 10.6.6).

Histidin (His) bildet mit BADGE·H<sub>2</sub>O drei Addukte (Abb. 48). Der als Molekülion identifizierte Basispeak m/z 514 bezeichnet im ESI-Massenspektrum das protonierte Additionsprodukt (M+1) aus His und BADGE·H<sub>2</sub>O. Darüber hinaus war mit m/z 468 das decarboxylierte Molekülfragment nachweisbar.



 Abb. 48 Chromatogramm der BADGE·H<sub>2</sub>O-His-Synthese und Massenspektrum des Addukts HPLC-MSD; Scan m/z 100-600, Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient s. 10.6.5 Tab. 57; Fragmentorspannung 180 V; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O, 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O, 8: IS, 13: BADGE·H<sub>2</sub>O-His

Die Retentionszeiten der synthetisierten Addukte stimmten mit denen der im Hydrolysat identifizierten potentiellen Addukte überein (Abb. 49). Auch die im SIM-Modus aufgenommenen Massenspektren waren identisch (s. 10.6.5 Abb. 70). Damit gelang der Nachweis der Entstehung eines Addukts aus BADGE·H<sub>2</sub>O und proteingebundenem His.



Abb. 49 Chromatogramm-Overlay von BADGE·H<sub>2</sub>O-His und BADGE·H<sub>2</sub>O-inkubiertem BSA-Hydrolysat HPLC-MSD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient s. 10.6.5 Tab. 57, SIM (m/z 209, 468, 470, 514, 536), Fragmentorspannung 180 V; 13a-c: BADGE·H<sub>2</sub>O-His

Den während der Inkubation von BADGE·H<sub>2</sub>O mit His entstandenen drei Addukten stehen zwei Addukte mit proteingebundenem His gegenüber. Die Aufklärung dieser Diskrepanz erfolgte durch theoretische Überlegungen zur Struktur der Addukte.

His stellt drei Stickstoffatome als potentielle Reaktionspartner zur Verfügung, von denen eines durch die Peptidbindung blockiert vorliegt, wenn His sich im Proteinverbund befindet (Abb. 50). Es ist daher davon auszugehen, daß die im Hydrolysat nachweisbaren Addukte durch Reaktion mit den verfügbaren heterocyclischen Stickstoffatomen entstanden sind. Da im Massenspektrum von Peak 13b (Abb. 49) mit m/z 468 das decarboxylierte Molekülfragment nachweisbar war, muß das entsprechende Addukt durch die Reaktion von BADGE·H<sub>2</sub>O mit der  $\alpha$ -Aminogruppe entstanden sein.



Abb. 50 Reaktionsmöglichkeiten des BADGE·H<sub>2</sub>O mit His

Weitere Addukte von BADGE·H<sub>2</sub>O mit Aminosäuren waren im Hydrolysat auch nach dem für His beschriebenen Verfahren nicht zweifelsfrei nachweisbar. Da Pronase E nicht in der Lage ist, jede Peptidbindung unspezifisch zu spalten, ist anzunehmen, daß die Proteine zum überwiegenden Teil nur zu Oligopeptiden aufgespalten wurde und diese als Addukte mit BADGE·H<sub>2</sub>O detektiert wurden.

# 6.5 Die Reaktion von BADGE mit proteinogenen Aminosäuren

Proteinogene Aminosäuren weisen neben der Carboxyl- und der  $\alpha$ -Aminogruppe funktionelle Seitengruppen auf, die polare, unpolare, elektrophile oder nukleophile Eigenschaften besitzen. Der Oxiranring des BADGE vermag aufgrund seiner ausgeprägten Elektrophilie mit nukleophilen Spezies zu reagieren. Eine generelle Reaktion mit nukleophilen Zentren der Seitenketten von Aminosäuren sowie der  $\alpha$ -Aminogruppe ist demnach zu erwarten.

Auch hier wurde aus bereits dargelegten Gründen BADGE $\cdot$ H<sub>2</sub>O an Stelle von BADGE eingesetzt. Ferner wurde ein weiter pH-Bereich zur Simulation saurer wie auch alkalischer Lebensmittel betrachtet.

# 6.5.1 Die Reaktion mit der $\alpha$ -Aminogruppe von Aminosäuren

Zu den Aminosäuren, die neben der  $\alpha$ -Amino- und der Carboxylgruppe über keine weiteren nukleophilen Zentren verfügen, gehören Glycin, Alanin, Valin (Val), Leucin und Isoleucin als Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten sowie Phenylalanin (Phe) mit aromatischer Seitenkette.

Zur Adduktbildung mit freien  $\alpha$ -Aminogruppen N-terminaler Aminosäuren wurden Lösungen von Val sowie Phe mit einem Gemisch aus BADGE·H<sub>2</sub>O und IS dotiert (s. 10.6.7). Analog zu diesen Ansätzen wurden Messungen mit N-Acetyl-Val und tert.-Butoxycarbonyl (Boc)-Phe durchgeführt. Bei diesen Aminosäurederivaten liegt die nukleophile  $\alpha$ -Aminogruppe blockiert vor. Hier sollte keine Adduktbildung erfolgen.

Bereits zwei Stunden nach Dotierung der Aminosäurelösungen war bei alkalischen Bedingungen sowohl für Val als auch für Phe neben der Hydrolysereaktion eine Adduktbildung nachweisbar, in den Ansätzen mit geschützter  $\alpha$ -Aminogruppe nicht (Abb. 51).

Der Anteil an Valin- und Phenylalaninaddukt nahm im alkalischen Milieu im Verlauf der Messung kontinuierlich zu; in den neutralen und sauren Ansätzen erfolgte ausschließlich die Hydrolyse des BADGE·H<sub>2</sub>O zu BADGE·2H<sub>2</sub>O (s. 10.6.7 Tab. 59 und 60).



Abb. 51 Chromatogramm der Reaktion von BADGE·H<sub>2</sub>O mit Valin HPLC-FLD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient s. 10.6.7 Tab. 58; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 8: IS; 13: Val-Addukt; pH 11; 4 Tage; a: Val; b: N-Acetyl-Val

Die Identifizierung der Addukte erfolgte mittels HPLC-MSD im Scan-Modus. Die Massenspektren der Val- und Phe-Addukte zeigten als Basispeak die Masse des decarboxylierten Adduktes (M-45). Das Auftreten dieses Fragments zeigt, daß die Carboxylgruppe frei vorliegt und die Reaktion somit an der Aminogruppe erfolgt sein muß (s. 10.6.7 Abb. 71 und 72). Im Protein liegt diese Gruppe in Form der Peptidbindung mit Ausnahme der N-terminalen

Aminosäure blockiert vor; eine Reaktion mit der Aminogruppe wird verhindert. Es war daher unter Verwendung  $\alpha$ -amino-geschützer Aminosäuren zu prüfen, ob eine Reaktion mit nukleophilen Zentren der Seitenketten möglich ist.

6.5.2 Die Reaktion mit α-amino-geschützen sauren oder basischen Aminosäuren

Asparaginsäure (Asp), Glutaminsäure (Glu), Histidin (His), Arginin (Arg) und Lysin (Lys) sind Aminosäuren mit geladener Seitenkette. Sie wurden in Form ihrer geschützten Derivate N-Acetyl-Asp, Boc-His, Boc-Arg und N-Acetyl-Lys untersucht (s. 10.6.7 Tab. 61 und 62). Aufgrund der Analogie zwischen Glu und Asp wurde auf die Untersuchung von Glu verzichtet.

Für N-Acetyl-Asp war keine Adduktbildung nachweisbar. Auch Boc-Arg zeigte keine Reaktionsneigung. Es ist zu vermuten, daß die Guanidino-Gruppe des Arg als schwache Säure nicht über eine ausreichende Nukleophilie verfügt, um mit dem elektrophilen Kohlenstoff-Atom des Oxiranringes zu reagieren.

Demgegenüber konnte mit N-Acetyl-Lys eine Adduktbildung bei alkalischen pH-Werten beobachtet werden. Das Addukt wurde anhand seines Molekülions (M+1; m/z 547) und des Fragments der Masse m/z 209 identifiziert (s. 10.6.7 Abb. 73).
Die Reaktion von Boc-His mit BADGE·H<sub>2</sub>O führte zu der Bildung zweier Addukte in basischem und neutralem Milieu (vgl. 6.4.4). Der Imidazolring des His verfügt mit seinen Stickstoff-Atomen über zwei Reaktionspartner, die mit BADGE·H<sub>2</sub>O reagieren können.

Die Identifizierung der Addukte erfolgte über die Masse des Molekülions (m/z 614) sowie über die Masse des Fragmentes nach Abspaltung des tert-Butyl-Restes der Schutzgruppe (M-55). Daneben war ebenfalls das Fragment nach Abspaltung der Schutzgruppe (M-100) sowie das BADGE·H<sub>2</sub>O-Fragment m/z 209 zu verzeichnen (s. 10.6.7 Abb. 74).

6.5.3 Die Reaktion mit polaren ungeladenen Seitenketten α-amino-geschützer Aminosäuren Die Aminosäuren Serin (Ser), Cystein (Cys), Tyr und Asparagin (Asn) werden aufgrund der funktionellen Gruppen ihrer Seitenketten zu den polaren ungeladenen Aminosäuren gezählt. Für den Versuch wurden die geschützten Formen eingesetzt.

Bei der Reaktion von BADGE mit N-Acetyl-Tyr konnte eine Adduktbildung über die Hydroxylgruppe beobachtet werden (s. 10.6.7 Tab. 63 und Abb. 75) – jedoch nicht bei der des Boc-Ser. Dies ist auf die höhere Nukleophilie des Phenolringes zurückzuführen. Im Alkalischen liegt ein Phenolat-Anion vor, das in der Lage ist, mit Elektrophilen zu reagieren. In neutralen und sauren Lösungen erfolgt diese Aktivierung nicht.

Boc-Asn als Säureamid bildete keine nachweisbaren Addukte mit BADGE·H<sub>2</sub>O. Die elektronenziehenden Eigenschaften des Amid-Sauerstoffs führen zu einer verringerten Nukleophilie der Aminogruppe das Amids und verhindern damit eine Addition.

N-Acetyl-Cys zeigte von allen geschützten Aminosäuren die größte Reaktionsbereitschaft. Unter optimalen Bedingungen bei pH 11 war BADGE·H<sub>2</sub>O bereits nach wenigen Stunden vollständig zum Aminosäure-Addukt umgesetzt. Diese Umsetzung war auch bei neutralem pH-Wert innerhalb einer Woche quantitativ (s. 10.6.7 Tab. 64 und Abb. 76). Damit stand Cys im Gegensatz zu allen übrigen untersuchten Aminosäuren, von denen nur His und Methionin (Met) eine nennenswerte Reaktion bei neutralem pH-Wert zeigten.

6.5.4 Die Reaktion mit unpolaren Seitenketten α-amino-geschützer Aminosäuren

Zu den Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette zählen Pro, Trp und Met, die als Boc-Pro, N-Acetyl-Trp sowie N-Acetyl-Met eingesetzt wurden. Pro nimmt unter den Aminosäuren mit unpolarer Seitenkette eine Sonderstellung ein, da es im Gegensatz zu den übrigen Aminosäuren als  $\alpha$ -Iminosäure in Ringform vorliegt. Adduktbildung mit Boc-Pro ist nicht zu erwarten, da diese Aminosäure über kein weiteres nukleophiles Zentrum verfügt.

Die Ansätze des Boc-Prolin und N-Acetyl-Trp zeigten keine Reaktion mit BADGE·H<sub>2</sub>O. Dagegen war bei Einsatz von N-Acetyl-Met eine Umsetzung zu verzeichnen, die sich von allen bisher dargestellten Reaktionen unterschied (s. 10.6.7 Tab. 65).

Die Adduktbildung mit BADGE·H<sub>2</sub>O erfolgte unabhängig vom pH-Wert. Bereits am ersten Tag war neben BADGE·H<sub>2</sub>O und seinem Hydrolyseprodukt eine zusätzliche Substanz zu erkennen, deren Anteil im Verlauf der Reaktion zunächst anstieg und nach Durchschreiten eines Konzentrationsmaximums langsam abnahm. Dieser Abbau erfolgte zugunsten einer weiteren Substanz, die nach etwa fünf Tagen erstmals nachweisbar war und im weiteren Verlauf kontinuierlich zunahm.

Mittels HPLC-MSD wurden die Strukturen des Intermediats und des Endprodukts aufgeklärt (s. 10.6.7 Abb. 77 und 78). Es entstand zunächst ein zwitterionisches Additionsprodukt, welches unter Eliminierung einer Aminosäure zu Methylthio-BADGE·H<sub>2</sub>O (BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub>) zerfiel. Der zeitliche Verlauf der Reaktion zeigte keine nennenswerten Unterschiede bei saurem, neutralem oder basischem pH-Wert (Abb. 52).



**Abb. 52** Verlauf der Umsetzung von BADGE·H<sub>2</sub>O zu BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> beispielhafte Darstellung der Reaktion bei pH 11

#### 6.5.5 Zusammenfassung

Neben der  $\alpha$ -Aminogruppe proteinogener Aminosäuren vermag der freie Oxiranring von BADGE·H<sub>2</sub>O die nukleophilen Seitengruppen von Cys, Lys, Tyr und His unter Adduktbildung zu alkylieren. Die Thiolgruppe des Cys erwies sich dabei mit Abstand als reaktivste Seitengruppe (Abb. 53).



Abb. 53 Reaktionskinetik der Adduktbildung zwischen BADGE·H<sub>2</sub>O und proteinogenen Aminosäuren bei Raumtemperatur

Da die Reaktionskinetik der Adduktbildung mit Phe derjenigen von Val entsprach, ist anzunehmen, daß die  $\alpha$ -Aminogruppen proteinogener Aminosäuren ähnliche Reaktivitäten aufweisen. Addukte mit den Seitengruppen der übrigen untersuchten Aminosäuren sowie Addukte, die aus der Reaktion mit der Carboxylgruppe resultieren, waren nicht nachweisbar. Als Nebenreaktion zeigte sich in fast allen Ansätzen die Hydrolyse des BADGE·H<sub>2</sub>O zu BADGE·2H<sub>2</sub>O, die mit sinkendem pH-Wert zunahm.

Die Reaktion des BADGE·H<sub>2</sub>O mit N-Acetyl-Met erfolgte pH-unabhängig und verlief über die Bildung eines metastabilen Intermediates, aus dessen Spaltung BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> resultierte.

Diese Reaktion kann demnach auch in Lebensmittelproteinen stattfinden und sollte im Folgenden am Beispiel ausgewählter Lebensmittel gezeigt werden, um die Verwendbarkeit von BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> als Marker für die Reaktion von BADGE·H<sub>2</sub>O mit Lebensmitteln zu überprüfen.

### 7 Die Entstehung von Methylthioderivaten von BADGE in Lebensmitteln

## 7.1 Entstehung in dotierten Lebensmitteln

Zum Nachweis der Entstehung von BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> wurden verschiedene Lebensmittel mit BADGE·H<sub>2</sub>O dotiert und sterilisiert. Hierzu wurde erneut Thunfisch in eigenem Saft wegen seiner bekannt hohen Reaktivität gegenüber BADGE ausgewählt. Daneben wurde Grießspeise aus dem Einsatzvorrat Verpflegung der Bundeswehr in die Untersuchungen einbezogen (s. 10.7.1). Dieses Produkt besteht neben Wasser, Früchten, Zucker und Pflanzenöl aus Sahne und Weizengrieß. Nach den bisherigen Ergebnissen ist davon auszugehen, daß in diesem Lebensmittel ausschließlich die Milchproteine für eine Reaktion mit dem Oxiranring zur Verfügung stehen.

In beiden Probenblindwerten waren weder BADGE noch seine Derivate nachweisbar; es zeigten sich weiterhin keine Störungen durch Matrixeinflüsse.

Die Sterilisation von dotiertem Thunfisch führte zu einer vollständigen Umsetzung des dotierten BADGE·H<sub>2</sub>O. Neben BADGE·2H<sub>2</sub>O war auch BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> in nennenswerten Konzentrationen nachweisbar. Rund 65 % des BADGE·H<sub>2</sub>O wurden zu unbekannten Produkten umgesetzt (Abb. 54, vgl. 10.7.1 Tab. 66).



 Abb. 54 Chromatogramm des dotierten Thunfisches nach Sterilisation HPLC-FLD, Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient s. 10.6.5 Tab. 57; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 8: IS; 14: BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub>; a: undotiert, b: dotiert

Die Identifizierung des BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> erfolgte mittels massenselektiver Detektion anhand der charakteristischen Molekül-Cluster mit Kalium (m/z 445), Natrium (m/z 429) und Ammonium (m/z 424) sowie der BADGE·H<sub>2</sub>O-Fragmente m/z 209 und m/z 135. In dem dotierten Homogenat der Grießspeise war BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> ebenfalls nachweisbar, welches jedoch eine Koelution mit dem in einer Konkurrenzreaktion mit Kochsalz entstandenen BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O aufwies. Der Prozentsatz beider Analyte zusammen betrug ungefähr 27 %, während 52 % zu BADGE·2H<sub>2</sub>O hydrolysiert worden waren (s. 10.7.1 Tab. 67).

Bereits RICHARD et al. (1999) wiesen BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> sowie Bis-Methylthio-BADGE (BADGE·2SCH<sub>3</sub>) und Methylthio-BADGE·HCl (BADGE·HCl·SCH<sub>3</sub>) in dotierten Thunfisch-Proben nach. Während sie die Herkunft dieser Derivate noch nicht zu erklären vermochten, kann ihre Entstehung nunmehr auf eine Reaktion zwischen BADGE·H<sub>2</sub>O und proteingebundenem Met zurückgeführt werden.

In beiden Reaktionsansätzen war neben der Bildung von BADGE·2H<sub>2</sub>O sowie BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> die Umsetzung von BADGE·H<sub>2</sub>O mit Lebensmittelproteinen zu nicht detektierbaren Addukten zu verzeichnen (s. 10.7.1 Tab. 66 und 67). Da in den in Kap. 6.5 beschriebenen Versuchen mit  $\alpha$ -geschützten Aminosäuren neben Met ebenfalls eine Adduktbildung von BADGE·H<sub>2</sub>O mit den nukleophilen Seitenketten des Cys, His, Tyr und Lys zu beobachten war, wird die Menge an proteingebundenem BADGE·H<sub>2</sub>O mit dem in Form dieser Addukte gebunden vorliegenden Anteil gleichgesetzt.

In dieser Versuchsreihe gelang die Identifizierung des BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> im Homogenat sowohl der sterilisierten Thunfischprobe als auch in demjenigen der sterilisierten Grießspeise. Nach der Addition des BADGE·H<sub>2</sub>O an das proteingebundene Met erfolgt die Freisetzung des Addukts spontan ohne eine von außen initiierte Spaltreaktion, so daß BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> als solches frei im Lebensmittel vorliegt (Abb. 52).

Mit BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> wurde somit eine Substanz ermittelt, die als Marker den Nachweis der Reaktion der Epoxidgruppe des BADGE mit Lebensmittelproteinen ermöglichen könnte. Es ist jedoch zu beachten, daß für den Nachweis der Reaktion im Lebensmittel eine hohe Stoffmenge an BADGE·H<sub>2</sub>O dotiert wurde. Die daraus resultierende Konzentration im Lebensmittel (10 mg/kg) lag deutlich über den in tatsächlich belasteten Lebensmitteln bestimmten Werten.

Es war daher erforderlich, den Nachweis der Methylthioderivate in diversen mit BADGE belasteten Produkten zu führen. Sowohl die Identifizierung dieser Derivate im Lebensmittel als auch die Optimierung der chromatographischen Bedingungen verlangte, vorab eine Synthese aller möglichen Methylthioderivate mit anschließender Charakterisierung vorzunehmen.

### 7.2 Synthese der Methylthioderivate

Die Produkte Methylthio-BADGE (BADGE·SCH<sub>3</sub>), BADGE·2SCH<sub>3</sub>, BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> sowie BADGE·HCl·SCH<sub>3</sub> sollten zur Bestimmung der jeweiligen relativen Retentionen gegenüber dem IS sowie zur Ermittlung der charakteristischen Fragmentmuster bei MSD synthetisiert werden. Dazu wurden Lösungen von N-Acetyl-Met mit BADGE beziehungsweise BADGE·HCl inkubiert und bei Raumtemperatur gelagert (s. 10.7.2).

Die Reaktion von BADGE mit N-Acetyl-Met zeigte neben BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> auch die Entstehung von BADGE·SCH<sub>3</sub> und BADGE·2SCH<sub>3</sub>. Parallel dazu erfolgte die Bildung von BADGE·H<sub>2</sub>O und BADGE·2H<sub>2</sub>O (Abb. 55). 25 % des eingesetzten BADGE lagen zum Zeitpunkt der Analyse als zwitterionische Additionsprodukte vor (s. 10.7.2 Tab. 69).



Abb. 55 Chromatogramm des Reaktionsansatzes von BADGE mit N-Acetyl-Met HPLC-MSD; SIM (s. 10.7.2 Tab. 68); Elutionsgradient s. 10.6.1 Tab. 40; 1: BADGE; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 8: IS; 14: BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub>; 15: BADGE·SCH<sub>3</sub>; 16: BADGE·2SCH<sub>3</sub>; 17: Intermediate; Koelution von 5 mit Intermediat

Die Reaktion mit BADGE·HCl führte zur Bildung von BADGE·HCl·SCH<sub>3</sub> über das entsprechende Intermediat. Als Konkurrenzreaktion erfolgte die Bildung des Hydrolyseprodukts BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O (s. 10.7.2 Tab. 69).

Die Identifizierung der Methylthioderivate gelang durch die Nutzung der massenselektiven Detektion. Alle erwarteten Produkte wurden durch ihre stoffspezifischen Molekülionen und Fragmente charakterisiert. Darüber hinaus gelang es, ein gruppenspezifisches Fragment zu ermitteln (Abb. 56). Es entspricht dem dehydratisierten Fragment der Seitenkette, an deren Ende der Thioether gebunden vorliegt.



Abb. 56 Massenspektrum von BADGE·SCH<sub>3</sub> und Struktur des gruppenspezifischen Fragments Fragmentorspannung 140 V

Damit konnten die Derivate BADGE·SCH<sub>3</sub>, BADGE·2SCH<sub>3</sub>, BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> sowie BADGE·HCl·SCH<sub>3</sub> synthetisiert und mittels HPLC-MSD die Fragmentmuster ermittelt werden. Der Nachweis des Fragmentes der Masse m/z 221 in den Spektren aller Methylthioderivate erlaubt, dies als allgemeines Charakteristikum zur Identifizierung heranzuziehen.

#### 7.3 Nachweis der Methylthioderivate in Lebensmitteln

Nach der Synthese und der Ermittlung der chromatographischen Eigenschaften der Methylthioderivate waren die Voraussetzungen zur Untersuchung von Lebensmitteln, die ursprünglich in BADGE-haltigem Verpackungsmaterial abgefüllt und hitzebehandelt wurden, geschaffen (s. 10.7.3 Tab. 70).

Die Identifizierung der Methylthioderivate wurde mittels HPLC-FLD über die auf den IS bezogenen relativen Retentionen sowie zusätzlich mittels HPLC-MSD-SIM vorgenommen. Für die Bestimmung der jeweiligen Derivate wurden externe Kalibrierreihen verwendet. Da die zu bestimmenden Substanzen nicht in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung standen, um als Referenzstandard zu dienen, erfolgte deren quantitative Bestimmung unter der Annahme der identischen Fluoreszenz-Response über die Geradengleichung des IS.

Als Untersuchungsmaterial standen Lebensmittel aus dem Einsatzvorrat Verpflegung der Bundeswehr zur Verfügung. Die in Frage kommenden Produkte wurden 1997 unter Verwendung von Aluminium-Leichtbehältern hergestellt, deren Polymerbeschichtung mit Hilfe eines BADGE-haltigen Kaschierklebers auf die Metallfolie aufgebracht wurde. Im überwiegenden Teil der untersuchten Lebensmittel waren Methylthioderivate nachweisbar (Abb. 57).



Abb. 57 Chromatogramm des aufgearbeiteten Lebensmittels "Schmelzkäsezubereitung" HPLC-FLD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient s. 10.6.1 Tab. 46; 1: BADGE;
3: BADGE·2HCl; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O; 8: IS; 14: BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub>; 15: BADGE·HCl·SCH<sub>3</sub>;
16: BADGE·2SCH<sub>3</sub>

Neben den Methylthioderivaten konnten in den untersuchten Lebensmitteln BADGE, BADGE·2H<sub>2</sub>O, BADGE·2HCl und BADGE·H<sub>2</sub>O·HCl identifiziert werden (s. 10.7.3). Der Gehalt dieser Derivate überstieg den Grenzwert von 1 mg/kg Lebensmittel (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002) teilweise bei Weitem (Abb. 58, vgl. 10.7.3 Tab. 65).



 Abb. 58 Belastung des Einsatzvorrats Verpflegung mit BADGE und seinen Derivaten Herstellungsjahr 1997; Aluminium-Leichtbehälter; grau: SCF-Derivate; diagonal: Methylthioderivate

Erkennbar sind hier die hohe Gesamtbelastung der Gruppe der Fertiggerichte sowie der hohe relative Anteil an Methylthioderivaten in Erzeugnissen, deren Protein-Anteil überwiegend durch Milchprotein charakterisiert ist.

Damit war die Reaktion zwischen Lebensmittelproteinen und migriertem BADGE erstmals unter realen Bedingungen nachweisbar. BADGE·HCl·SCH<sub>3</sub> sowie BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> waren in allen positiv getesteten Proben enthalten. Lediglich in Schmalzfleisch, Grießspeise und Schmelzkäse konnte BADGE·2SCH<sub>3</sub> identifiziert werden. BADGE·SCH<sub>3</sub> war in keinem Lebensmittel nachweisbar. Der nicht an der Alkylierung des Met beteiligte Oxiranring des BADGE wurde durch die Reaktion mit Wasser oder Kochsalz umgesetzt oder ging unter Bildung von BADGE·2SCH<sub>3</sub> eine weitere Reaktion mit Met ein.

Im Rahmen der Methodenentwicklung (s. 4) wurden unterschiedliche Lebensmittel aus BADGE-haltigen Verpackungen auf ihren Gehalt an grenzwertrelevanten Derivaten überprüft. Durch den Vergleich von Messungen in Grießspeise aus einem identischen Herstellungslos in einem Abstand von zwei Jahren (PETERSEN et al., 2001) war es möglich, über die relativen Retentionen auch hier die Methylthioderivate zu identifizieren und eine quantitative Schätzung vorzunehmen (s. 10.7.4). Dies ermöglichte die Bewertung der Weiterreaktion epoxidhaltiger BADGE-Derivate zu Methylthioderivaten im Verlauf der Lagerung (Abb. 59).



Abb. 59 BADGE-Derivate in Grießspeise aus BADGE-haltigen Verpackungen HPLC-FLD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3; 1: BADGE; 2: BADGE·HCl; 3: BADGE·2HCl; 4: BADGE·H<sub>2</sub>O; 5: BADGE·2H<sub>2</sub>O; 6: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O; 8: IS; 14: BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub>; 15: BADGE·HCl·SCH<sub>3</sub>; 16: BADGE·2SCH<sub>3</sub> a: Analyse 1999, b: Analyse 2001

Im Verlauf der Lagerung (1999 - 2001) von Konserven erfolgte die Reaktion epoxidhaltiger BADGE-Derivate mit Lebensmittelproteinen. Etwa 18% der abgebauten Substanzen traten als Methylthioderivate wieder auf. Die Gehalte an BADGE·2H<sub>2</sub>O sowie hydrochlorierten Derivaten ohne Oxiranring blieben nahezu konstant. Unter der Annahme einer linearen Reaktionskinetik wurde eine Extrapolation zur Abschätzung des BADGE-Gehalts unmittelbar nach der Herstellung durchgeführt (Abb. 60, vgl. 10.7.4).



Abb. 60 Umsetzung von BADGE in gelagerter Grießspeise grau: epoxidhaltige Derivate; waagerecht: Methylthio-Derivate; diagonal: BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O + BADGE·2HCl; senkrecht: BADGE·2H<sub>2</sub>O; weiß: unbekannte Addukte

Bereits im Rahmen der Produktion des Lebensmittels entstehen BADGE-Derivate aus der migrierten Substanz. In nebeneinander ablaufenden Reaktionen werden hierbei hydrolysierte und hydrochlorierte Addukte, aber auch Methylthioderivate gebildet. Das Entstehungsmuster ist dabei abhängig von der Grundzusammensetzung des Lebensmittels.

Über die Identifizierung der Methylthioderivate gelang der Nachweis der Reaktion von BADGE mit Lebensmittelproteinen erstmals unter realen Bedingungen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei, daß bei der Reaktion mit Met eine spontane Freisetzung des Endproduktes aus dem Proteinverband erfolgt. Es konnte damit eine Substanz ermittelt werden, die ohne zusätzlichen präparativen und analytischen Aufwand als Markersubstanz für die Reaktion von BADGE mit Lebensmitteln dienen kann.

## 8 Diskussion

# 8.1 Synthese von BADGE-Derivaten als Referenzstandards

Der eingeschlagene Weg zur Synthese der nicht kommerziell erhältlichen BADGE-Derivate folgt dem von BRAUN und LEE (1976) sowie FEDTKE und TÄNZER (1982) beschriebenen Syntheseweg für BADGE. Da die beschriebenen BADGE-Synthesen für die Herstellung von Kunststoffen entwickelt wurden (SCHLACK, 1934; CASTAN, 1940; BRAUN und LEE, 1976), wurde das Produkt nicht isoliert und gereinigt. Für die Synthese von Standards, welche für die Spurenanalytik eingesetzt werden sollen, sind jedoch zusätzliche Reinigungsschritte notwendig.

Eine klassische de-novo-Synthese wäre gegenüber dem beschriebenen Vorgehen zeit- und arbeitsaufwendiger. Die Synthese von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O gelang in einer zweistufigen anstelle einer sechsstufigen Synthese.

Durch die Faktorenanalyse zur statistischen Modellierung eines experimentellen Raumes war es möglich, die Ausbeuten für BADGE·HCl sowohl als Endprodukt wie auch als Zwischenprodukt der Synthese von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O mit geringem Aufwand zu optimieren.

Aufgrund der geringen Anzahl an Nebenprodukten und der hohen Umsetzungsrate reichten einfache säulenchromatographische Verfahren im allgemeinen zur Reinigung aus. Die Aufarbeitung des BADGE·H<sub>2</sub>O-Rohproduktes wäre durch eine präparative flüssigchromatographische Isolierung noch zu verbessern. Da BADGE·H<sub>2</sub>O aus dem preisgünstigen und einfach herzustellenden BADGE synthetisiert wurde, war eine Ausbeute von 28 % akzeptabel.

Die Synthesen gelangen in sehr guten Reinheiten über 98 % mit ausreichend guten Ausbeuten. Die angegeben Reinheiten wurden mittels HPLC ermittelt und durch Elementaranalysen bestätigt. Durch die Optimierung der Synthese und Aufarbeitung war es möglich, alle für die Entwicklung und Validierung eines analytischen Verfahrens zur Überwachung des BADGE-Summengrenzwerts notwendigen Substanzen als Referenzstandards zur Verfügung zu stellen.

# 8.2 Die analytische Erfassung von BADGE und seinen Derivaten

Mit Hilfe der synthetisierten Referenzstandards wurde ein Trennsystem für die in den Summengrenzwert (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001) eingehenden BADGE-Derivate, das Edukt BPA und BADHPE als IS entwickelt. Für alle Substanzen wurde eine Basislinientrennung innerhalb kurzer Analysenzeiten erreicht.

Ältere Methoden behandelten entweder BADGE (BIEDERMANN et al., 1996, ROUBTSOVA et al., 1997, THEOBALD et al., 1999b), BADGE und seine Hydrolyseprodukte (PASEIRO LOSADA et al., 1993, RAUTER et al., 1999) oder BADGE und seine hydrochlorierten Derivate (BIE-DERMANN et al., 1997). Erst neuere Verfahren schließen alle relevanten BADGE-Derivate ein, jedoch ohne das Edukt BPA oder die Verwendung eines IS (BIEDERMANN et al., 1999a, BILES et al., 1999, LINTSCHINGER und RAUTER, 2000). Obwohl die Übereinstimmung der Fluoreszenzaktivitäten aller Referenzsubstanzen gezeigt wurde und damit frühere Vermutungen bestätigt wurden, stellt die Bestimmung über individuelle Referenzstandards eine bedeutende Verbesserung der Validität des Verfahrens dar. Der Wechsel der  $\lambda_{Ex}$  auf 275 nm führt durch die Unterdrückung der Detektion nicht fluoreszierender Matrixbestandteile zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität.

Obwohl die Verwendung von Normalphasensystemen (BIEDERMANN et al., 1999a) eine schnelle und einfache Probenvorbereitung fetthaltiger Lebensmittel und fettiger Simulanzien erlaubt, wurde sie nicht in Erwägung gezogen. Für die beabsichtigte Absicherung der Identifizierung mittels MSD weisen sie erhebliche Nachteile auf, weil zur Ionisierung protische Lösungsmittel erforderlich sind. Weiterhin sind die polaren Derivate nicht in Heptan oder Pentan löslich, wie es für diese Technik erforderlich wäre, sondern müssen vorher acetyliert werden. Weitere Schritte zur Probenvorbereitung erschweren jedoch den Einsatz des Verfahrens als schnelle, routinefähige Analysenmethode.

Eine Verwendung des MSD für eine Quantifizierung und Validierung kam nicht in Betracht, da die während der Detektionsoptimierung beobachteten Schwankungen im Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur FLD zu schlechteren Verfahrenskenndaten führten. Eine Nachweisgrenze von 50  $\mu$ g/kg Lebensmittel kann im SIM-Modus jedoch ohne Probleme erreicht werden. Da die HPLC-MSD bisher nur in wenigen Routinelaboratorien zur Verfügung steht, war die Validierung mittels FLD im Hinblick auf die Übernahme des Verfahrens in die Routineanalytik sinnvoller.

Die erarbeiteten chromatographischen Bedingungen erlauben eine selektive Trennung von sieben BADGE-assoziierten Analyten. Darüber hinaus führt die optimierte Probenvorbereitung zu hohen und gleichmäßigen Wiederfindungsraten über einen großen Polaritätsbereich.

Nur BIEDERMANN et al. (1999a) und BILES et al. (1999) erreichten eine vergleichbare Selektivität auf RP-Phasen mit Ethanol als organischem Modifier. Die von BIEDERMANN et al. (1999a) verwendete vereinfachte Probenvorbereitung durch direkte Extraktion mit einem Ethanol / Wasser-Gemisch führte jedoch zu inakzeptablen Verlusten an epoxidhaltigen Derivaten, die vermutlich durch Hydrolyse oder andere Abbaureaktionen während der Phase zwischen Probenaufarbeitung und Analyse bedingt waren. Es ist anzunehmen, daß auch die Bildung von Ethylethern durch Ethanolyse erfolgen kann.

BILES et al. (1999) extrahierten die Derivate mit Acetonitril aus der in Hexan gelösten Aufgußflüssigkeit von Fisch in Dosen. Matrixbezogene Wiederfindungsdaten wurden jedoch nicht angegeben. Die im Rahmen der Methodenoptimierung erzielten Ergebnisse lassen für dieses Verfahren ein akzeptable Wiederfindung erwarten; es ist jedoch davon auszugehen, daß durch die Untersuchung der Aufgußflüssigkeit allein der wahre Gehalt im Lebensmittel nur verzerrt dargestellt wird. Ein Verfahren zur Extraktion aus fetthaltigen festen Lebensmitteln stellten BILES et al. (1999) nicht vor.

Beide Verfahren sind somit nicht für die Untersuchung fester Lebensmittel geeignet.

LINTSCHINGER und RAUTER (2000) erreichten keine Trennung aller Derivate. Die Auflösung zwischen BADGE·H<sub>2</sub>O und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O war nur durch die Nutzung eines zusätzlichen isokratischen Eluenten möglich. Für die übrigen Analyte wurden keine Retentionszeiten angegeben. Die Ergebnisse für BADGE·H<sub>2</sub>O und BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O lassen jedoch den Schluß zu, daß die Retentionszeiten insbesondere der hydrochlorierten Analyte unverhältnismäßig lang werden und dieses Verfahren somit nicht zur Bestimmung aller BADGE-Derivate geeignet ist. Damit ist es erforderlich, zwei unterschiedliche chromatographische Verfahren anzuwenden, um valide Ergebnisse zu erhalten. Darüber hinaus führt die Probenvorbereitung durch Fettextraktion mit Methyl-tert.-Butylether und die anschließende Isolierung der Analyte mit Methanol zu verminderten Wiederfindungen für die polaren Analyte.

Der entwickelte Interne Standard BADHPE ermöglichte neben der besseren Zuordnung der Substanzen durch relative Retentionen die Unabhängigkeit von definierten Volumina und vollständigen Extraktionen. BADHPE ist nicht als spezifisches Migrat in Lebensmitteln zu erwarten und sowohl mit FLD als auch mit MSD detektierbar. Die Fluoreszenzresponse und die Wiederfindungsrate aus Simulanzien und Lebensmitteln unterschieden sich nicht signifikant von denen der Analyte. Der von SUMMERFIELD et al. (1998) gewählte Interne Standard BFDGE stellt keine Alternative dar, da er als Bestandteil von NOGE in BADGE-Ersatzstoffen vorkommt und dementsprechend ebenfalls als Migrat in Lebensmitteln oder Simulanzien auftreten kann. Daneben führt das Vorliegen dreier Isomere unter den beschriebenen chromatographischen Bedingungen zu drei getrennten Peaks.

Die beispielhafte Untersuchung verschiedener fett-, protein- oder kohlenhydratreicher Produkte führte zur Validierung des Verfahrens für sehr unterschiedliche Lebensmittel. Die Analyse von 24 Proben "Gulasch mit Kartoffeln" aus vier Herstellungslosen in Leichtbehältern zeigte die Gleichförmigkeit der Migration aus standardisierten Lebensmitteln in identisches Verpackungsmaterial.

Die umfangreichen Arbeiten zur Anpassung der Trennung an die analytische Fragestellung sowie die Optimierung der Detektionsbedingungen führten zu der Etablierung eines validen Verfahrens, das zur Überwachung des BADGE-Summengrenzwerts als Routinemethode einsetzbar ist. Die Einführung der MSD zur zusätzlichen Absicherung sowie des IS zur Kompensation von Analytverlusten während der Aufarbeitung und Ungenauigkeiten der Messung stellen hierbei eine entscheidende Verbesserung gegenüber anderen Methoden dar.

#### 8.3 Die analytische Erfassung von BFDGE und seinen Derivaten

#### 8.3.1 BFDGE und seine Derivate in Lebensmitteln

Das für BADGE und seine Derivate optimierte Analysenverfahren wurde nur geringfügig modifiziert, um eine simultane Bestimmung des strukturanalogen BFDGE und seiner käuflichen Derivate zu ermöglichen. Der wegen einer nicht zu eliminierenden Koelution notwendige Austausch des IS wurde durch die Einführung von BFDHPE, welcher isomerenrein aus BPF synthetisiert werden konnte, vollzogen. Wie bereits zuvor BADHPE, erfüllte der neue IS die Anforderungen an den Einsatz optimal. Da die hohe Analytenzahl unter Einbeziehung aller relevanten Derivate zu erheblichen Koelutionen geführt hätte, wurde auf die Synthese der fehlenden Standards analog zu BADGE verzichtet.

Die bereits in 8.2 diskutierten Verfahren von BIEDERMANN et al. (1999a) und LINTSCHINGER und RAUTER (2000) umfaßten ebenfalls BFDGE und seine kommerziell erhältlichen Derivate. Beide erreichten jedoch mit den eingeführten chromatographischen Systemen keine selektive Trennung aller Analyte. Auch aus diesem Grund stellen sie keine Alternative zu dem entwickelten Verfahren dar, zumal die in 8.2 beschriebenen Probleme auch für BFDGE und seine Derivate in vollem Umfang gelten.

Wegen der strukturellen Besonderheiten von BFDGE, welches als Isomerengemisch vorliegt, waren an die Validierung des Verfahrens besondere Ansprüche zu stellen. Zur Quantifizierung über die Peaksumme der Isomere war die Überprüfung der jeweiligen Fluoreszenzeigenschaften erforderlich, da nur bei identischen Eigenschaften Unterschiede in der Isomerenzusammensetzung nicht ins Gewicht fallen. Nach der präparativen Isolierung der Isomere zeigte sich die bei GROB und seinen Mitarbeitern (BRONZ et al., 1997; BIEDERMANN et al., 1999a) verwendete Wellenlängenkombination von 230/305 nm ungeeignet, da erhebliche Unterschiede in der Signalintensität feststellbar waren. Bei diesen Bedingungen wurde ein scheinbares Massenverhältnis von 3:3:1 ermittelt, wogegen mit 275 nm als  $\lambda_{Ex}$  ein Isomerenverhältnis von 1:2:1 in der Elutionsreihenfolge auftrat. Bei dieser  $\lambda_{Ex}$  besitzen alle Isomere annähernd gleiche Fluoreszenzeigenschaften. Neben der bereits in 8.2 beschriebenen Matrixunterdrückung ist diese Wellenlänge besonders wegen der von 230 nm abweichenden Fluoreszenzeigenschaften zur Bestimmung von BFDGE und seinen Derivaten vorzuziehen.

Die ermittelte Elutionsreihenfolge der Isomere bestätigte die Vermutungen von BRONZ et al. (1997), die die Isomere gaschromatographisch trennten und die mittels MSD erhaltenen Spektren mit Datenbankeinträgen verglichen.

Die für BADGE und seine Derivate optimierte Aufarbeitung wurde nahezu unverändert auf das erweiterte System übertragen, obwohl die Wiederfindung von BFDGE·2H<sub>2</sub>O erheblich von derjenigen der übrigen Analyte abweicht. Diese Vorgehensweise ist wegen der fehlenden toxikologischen und rechtlichen Relevanz akzeptabel.

Der Arbeitsbereich des Verfahrens ist über einen großen Bereich linear und zur Ermittlung der Migration von BADGE und BFDGE hinreichend präzise. Wegen der geringeren Empfindlichkeit der BFDGE-Derivate durch das Vorliegen dreier Isomere wurde der Arbeitsbereich höher gewählt als für BADGE und seine Derivate; die Nachweisgrenze erreichte aber auch hier Konzentrationen, die zur Grenzwertbetrachtung ohne Weiteres ausreichen.

#### 8.3.2 BFDGE und NOGE als Bestandteile von Lebensmittelverpackungen

Durch die Mengenbeschränkung für NOGE in Beschichtungsmaterialien (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001) wurde ein Verfahren zur Bestimmung dieser Substanzklasse in Bedarfsgegenständen erforderlich. Nachdem zunächst BFDGE in Acetonitril-Extrakten von Twist-Off-Caps nachweisbar war, wurden die Untersuchungen auf Mehrring-NOGE ausgeweitet. Wegen der Komplexität der NOGE-Komponenten beschränkte sich das Verfahren auf den Nachweis von underivatisiertem NOGE mit bis zu sieben Benzolringen, womit alle NOGE mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da erfasst wurden.

Die Extraktion mit Acetonitril erfolgte unter der Annahme einer quantitative Erfassung der BPA- sowie BPF-basierten Additive. Neuere Untersuchungen für BPA-basierte Additive zeigten jedoch deutliche höhere Konzentrationen im ethanolischen Extrakt aus Epoxidharzbeschichteten Konservendosen (RYBAK, 2002). Problematisch hierbei ist jedoch die Umsetzung zu Ethylethern durch Ethanolyse während der Extraktion, die etwa 15 % der Gesamtmenge an BADGE erfaßt (RYBAK, 2002, RIJK, 2002a). Acetonitril bleibt damit weiterhin das bevorzugte Extraktionsmittel für NOGE.

BFDGE selbst stellte in Twist-Off-Caps nur einen geringen Teil der nachweisbaren NOGE-Verbindungen dar. Dies ist besonders im Hinblick auf die Betrachtung der toxikologischen Eigenschaften bedeutend, da davon ausgegangen werden muß, daß die höhermolekularen Komponenten nicht mehr als Substrate für diejenigen Epoxidhydrolasen zur Verfügung stehen, welche die intakten Oxiranringe von BADGE sowie BFDGE spalten und damit entscheidend zur Entgiftung dieser Substanzen beitragen.

Die zum Nachweis von NOGE in Beschichtungsmaterialien verwendete Methode ist zur Überwachung des zukünftigen Verwendungsverbots (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002) geeignet. Das vorgestellte Verfahren muß aber auf den Nachweis von underivatisiertem NOGE beschränkt bleiben, da die Selektivität bereits bei der Betrachtung dieser Substanzen nicht ausreicht, um eine Basislinientrennung der 5-, 6- und 7-Ring-NOGE-Komponenten voneinander zu gewährleisten. Der gleichzeitige Nachweis von hydrolysierten oder hydrochlorierten NOGE-Derivaten ist mit diesem Verfahren nicht denkbar. Die Anwendbarkeit neuerer Verfahren, die vollständig hydrolysierten NOGE als Summenparameter für die rechtlich relevanten NOGE-Derivate erfassen (RIJK, 2002b), bleibt zu überprüfen. Validierungsdaten hierzu liegen bislang nicht vor.

## 8.4 Reaktionen von BADGE mit Lebensmittelbestandteilen in vitro

Die im Rahmen der Verfahrensvalidierung in proteinreichen Lebensmitteln beobachtete erniedrigte Wiederfindungsrate für Derivate mit intakter Epoxidfunktion bestätigte die Ergebnisse von RICHARD et al. (1999). Deren Vermutung einer Reaktion mit Majorkomponenten von Lebensmitteln konnte durch die Untersuchung dotierter Lebensmittel mit unterschiedlicher Hauptkomponente bestätigt werden. Die bei RICHARD et al. (1999) fehlende Identifizierung der reagierenden Majorkomponente gelang durch die Beobachtung einer nahezu quantitativen Reaktion in proteinreichen Lebensmitteln sowie einer erschöpfenden Reaktion in kohlenhydratreichen Produkten mit geringem Proteinanteil. Die fehlende Reaktionsbereitschaft von Triglyceriden nach Inkubation mit BADGE bedingte auch die beobachteten Unterschiede in der Reaktion zwischen Thunfisch in eigenem Saft und Thunfisch in Öl. Der hohe Fettgehalt sowie die kohärente Fettphase von Thunfisch in Öl ziehen den Schutz von BADGE vor der Adduktbildung mit Proteinen nach sich.

Die Untersuchung von Modellösungen von Kohlenhydraten und Proteinen bestätigte diese Ergebnisse. Adduktbildung erfolgt demnach ausschließlich mit Proteinen, wobei während der Sterilisation von Lebensmitteln die Hydrolyse zu BADGE·2H<sub>2</sub>O als nennenswerte Konkurrenzreaktion zu beobachten war.

Entsprechende Adduktbildungen waren auch bei der Dotierung und Inkubation verschiedener isolierter Lebensmittelproteine feststellbar. Für die untersuchten Proteine wurden stark variierende Umsetzungsraten beobachtet, wobei sich das Thunfischprotein erneut als besonders reaktiv darstellte.

Die Bereitschaft der Proteine, mit BADGE zu reagieren, scheint von ihrer Funktion im Organismus abzuhängen. Besonders hohe Reaktivität zeigten Serumproteine wie BSA. Der relative Anteil dieser Proteine im Proteingemisch der Lebensmittel bestimmt die Umsetzungsrate mit BADGE. Diese Korrelation ist aus den Ergebnissen der Modellreaktionen abzuleiten und führt bei Fehlen von Serumproteinen zur quantitativen Wiederfindung von BADGE wie bei Weizenprotein. Eine Sonderstellung scheinen hier die Milchproteine einzunehmen, da sie bedingt durch ihre besondere räumliche Struktur eine hohe Anzahl an Bindungsstellen für Epoxide bereitstellen.

Zur Identifizierung von BADGE-Protein-Addukten wurde BSA in wäßriger Lösung mit BADGE·H<sub>2</sub>O dotiert und inkubiert. Der Nachweis von BADGE-Protein-Addukten nach hydrolytischer Spaltung der umgesetzten Proteine führte nicht zu den gewünschten Ergebnissen. Während die alkalische Hydrolyse nur eine geringe Neigung zur Reaktion von BADGE gegenüber freien Carboxylgruppen zeigte, war die saure Hydrolyse wegen der Bildung von chloraromatischen Derivaten für diese Untersuchungen nicht geeignet. Diese Beobachtungen erklären auch den fehlenden Erfolg von RICHARD et al. (1999). Diese suchten nach BADGE-Addukten und möglichen weiteren Reaktionsprodukten, nachdem sie Thunfisch in eigenem Saft mit einer großen Menge BADGE dotierten und anschließend einer salzsauren Hydrolyse unterzogen. Außer einem Rest von 1 % BADGE fanden sie jedoch keine weiteren Produkte. Die enzymatische Hydrolyse durch Pronase E stellt eine schonendere Methode zur Proteinspaltung dar. Da jedoch keine Totalhydrolyse erfolgt, liegen im Hydrolysat noch intakte Oligopeptide vor. Es war davon auszugehen, daß BADGE·H<sub>2</sub>O nach dieser Hydrolyse an einzelne Aminosäuren und Peptide gebunden sein und in seiner Struktur stabil bleiben würde. Daher waren nach der Hydrolyse Addukte von BADGE·H<sub>2</sub>O mit Aminosäuren oder Peptiden in der Lösung zu erwarten. Die enzymatische Hydrolyse von BSA bestätigte die Reaktion zwischen BADGE und Proteinen durch das Auftreten zusätzlicher fluoreszenzaktiver Verbindungen. Da jedoch mittels HPLC-MSD außer geringen Mengen an BADGE·H<sub>2</sub>O-His keine BADGE-Addukte identifiziert werden konnten, war anzunehmen, daß die Proteine überwiegend bis zur Peptidgröße aufgespalten und diese als Addukte mit BADGE·H<sub>2</sub>O detektiert wurden.

Durch den Nachweis der Entstehung von Addukten mit Lebensmittelproteinen rückte die Identifizierung der Bindungsstellen in den Vordergrund. Die Synthese von Aminosäure-BADGE·H<sub>2</sub>O-Addukten sollte hierüber Auskunft geben.

Die Inkubation mit freien Aminosäuren führte erwartungsgemäß zur Bildung von  $\alpha$ -Amino-Addukten. Mit  $\alpha$ -amino-geschützten Aminosäuren können Addukte nur gebildet werden, wenn diese funktionelle Gruppen mit ausreichender Nukleophilie besitzen.

Für Cys, Tyr, Lys und His waren Addukte nachweisbar, die mittels MSD charakterisiert werden konnten. Die Nukleophilie der funktionellen Gruppen der übrigen proteinogenen Aminosäuren reichte zur Reaktion nicht aus. Die erhöhte Nukleophilie von Thiolen und aromatischen Hydroxylgruppen bei hohen pH-Werten erklärt die erhöhte Reaktionsbereitschaft im alkalischen Milieu. Unter physiologischen Bedingungen führte nur die Umsetzung mit Cys zu nennenswerter Adduktbildung. Dies bestätigt die Untersuchungen von HEMMINKI (1986), der die besondere Reaktivität von Cys gegenüber Styrenoxid beschrieb.

Die Sonderstellung von Met wegen der Bildung von Methylthioderivaten von BADGE wurde bereits von RICHARD et al. (1999) beobachtet. Sie wiesen diese Substanzen in dotiertem und inkubiertem Thunfisch nach, vermochten die Herkunft jedoch nicht eindeutig zu klären. Der Versuch, aus Met und BADGE ein entsprechendes Addukt zu synthetisieren, führte nicht zum Erfolg. Der Ursprung der Methylthioderivate wurde durch diese Untersuchungen erstmals aufgeklärt.

In Verbindung der Beobachtungen von RICHARD et al. (1999) mit den hier erzielten Ergebnissen ist abzuleiten, daß die Umsetzung des BADGE·H<sub>2</sub>O zu BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> auch im Lebensmittel stattfinden kann. BADGE wird demnach über Methionin im Thunfischprotein unter Bildung der oben beschriebenen Intermediate gebunden; nach deren Spaltung erfolgt die Freisetzung der Methylthioderivate.

An ausgewählten Lebensmitteln wurde daher die Eignung der Methylthioderivate als Marker für die Proteinreaktion überprüft.

#### 8.5 Die Entstehung von Methylthioderivaten von BADGE in Lebensmitteln

Nachdem die Entstehung von BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> auch in dotierten Lebensmitteln nachweisbar war, war es zur Nutzung der Methylthioderivate als Marker erforderlich, alle denkbaren Substanzen dieser Gruppe zu synthetisieren und ihre Eigenschaften hinsichtlich der Nachweisbarkeit in den entwickelten analytischen Verfahren zu ermitteln. Nach der Synthese wurden die relativen Retentionen sowie die spezifischen Fragmentmuster mittels HPLC-MSD ermittelt. Der Nachweis des Fragmentions m/z 221 in den Spektren aller Methylthioderivate erlaubte, dies als Charakteristikum zur Identifizierung der Substanzgruppe heranzuziehen.

Abschließend wurden Lebensmittel untersucht, die 1997 unter Verwendung von BADGEhaltigen Aluminium-Leichtbehältern hergestellt wurden. Methylthioderivate wurden im überwiegenden Anteil der Lebensmittel gebildet, wobei Lebensmittel, die einen hohen Anteil an Milchproteinen enthalten, besondere Bereitschaft zur Reaktion zeigten. Bereits die isolierten Milchproteine zeigten eine erhöhte Neigung zur Adduktbildung (8.4).

Der Vergleich der Untersuchungsergebnisse für Grießspeise im Rahmen der Methodenentwicklung mit denen aus der Identifizierung der Methylthioderivate zeigte im Verlauf einer zweijährigen Lagerung eine deutliche Veränderung im Kontaminationsmuster. Während die grenzwertrelevanten Derivate ohne Oxiranring in ihrer Konzentration konstant blieben, nahm der Gehalt an epoxidhaltigen Derivaten sowie die Gesamtmenge der nachweisbaren BADGE-Derivate ab. Gleichzeitig erfolgte eine nennenswerte Zunahme der Methylthioderivate.

Durch die Abschätzung des BADGE-Gehalts unmittelbar nach der Herstellung wurde festgestellt, daß bei Vorliegen reaktiver Lebensmittelproteine im Laufe einer mehrjährigen Lagerung der tatsächlich migrierende BADGE aus Konzentrationen, die weit über dem Summengrenzwert liegen, zu rechtskonformen Gehalten umgesetzt werden kann, wenn nicht bereits anfangs in Konkurrenzreaktionen die grenzwertrelevanten BADGE-Derivate gebildet werden. Hierbei ist aber zu beachten, daß die Annahme einer linearen Reaktionskinetik zu einer sehr konservativen Schätzung führt. Der tatsächlich migrierte Anteil dürfte den berechneten noch übersteigen.

Neben dem Met ist der Oxiranring des BADGE ebenfalls in der Lage, Addukte mit den nukleophilen Seitengruppen des Cys, His, Lys und Tyr zu bilden. Der in dieser Form gebunden vorliegende BADGE wird nicht wie im Fall des Met in einer spontanen Reaktion abgespalten und konnte bei diesen Messungen somit nicht erfaßt werden. Es ist anzunehmen, daß die Abnahme der Gesamtmenge der nachweisbaren BADGE-Derivate im Verlauf der Lagerung durch Adduktbildung mit diesen Aminosäuren bedingt ist.

#### 8.6 Konsequenzen für die Überwachung

Die validierten Analysenverfahren sind bedeutende Weiterentwicklungen für die Grenzwertüberwachung der Migration von BADGE und BFDGE in Lebensmittel. Sie sind für die Routineanwendung in akkreditierten Laboratorien validiert und für alle Lebensmittelgruppen einsetzbar, wenn die Vorgaben insbesondere für proteinreiche Lebensmittel beachtet werden.

Der Nachweis der Reaktion von BADGE mit Lebensmittelproteinen wirft jedoch weitere Fragen auf. Der in der Richtlinie 2002/16/EG (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002) für beschichtete Dosen und kaschierte Leichtbehälter festgesetzte Grenzwert bezieht sich ausschließlich auf BADGE sowie seine Hydrolyse- und Hydrochlorierungs-Derivate – die Menge an proteingebundenem Epoxid wird nicht berücksichtigt.

Die untersuchte Schmelzkäsezubereitung aus dem Einsatzvorrat Verpflegung wies einen Anteil von 0.45 mg/kg Lebensmittel an grenzwertrelevanten Derivaten sowie 0.68 mg/kg Lebensmittel an Methylthioderivaten auf. Gerade am Beispiel dieser Probe - die als richtlinienkonform einzustufen ist – kann veranschaulicht werden, daß der Grenzwert unter bestimmten Umständen nicht annähernd die tatsächliche Belastung einbezieht. Bei Einbeziehung der Methylthioderivate wäre der Grenzwert überschritten.

Darüber hinaus stellen die Methylthioderivate nur Marker der Reaktion dar. Die durch Adduktbildung dauerhaft veränderten Proteine sind jedoch hinsichtlich ihrer toxikologischen Relevanz und ihres allergenen Potenzials nicht untersucht. Die von KANERVA et al. (1991) beschriebenen allergenen Wirkungen von BADGE können durchaus auf die Adduktbildung mit Proteinen der Haut zurückzuführen sein. Es bleibt daher zu klären, inwieweit die Bewertung der toxikologischen Eigenschaften von BADGE allein durch die Betrachtung seiner Hydrolyse- und Hydrochlorierungsderivate zu einem sachgerechten Ergebnis führt. Sollte dies nicht der Fall sein, ist der Grenzwert im Grundsatz neu zu überdenken.

# 9 Zusammenfassung

Bei der Herstellung von Lebensmittelkonserven werden mit Kunststoff beschichtete Metallverpackungen eingesetzt. Im Rahmen der Herstellung und Lagerung können Bestandteile des Kunststoffes in das verpackte Lebensmittel übergehen. Bisphenol A-Diglycidylether (BADGE) ist ein solcher Bestandteil.

Im Füllgut kann BADGE mit Komponenten des Lebensmittels reagieren. BADGE selbst sowie seine Reaktionsprodukte mit Kochsalz und Wasser unterliegen einem Grenzwert für die höchste zulässige Summenkonzentration im Lebensmittel. Zu dessen Überwachung wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem erstmals alle BADGE-Derivate unter Verwendung selbst synthetisierter Standardsubstanzen bestimmt wurden. Durch den Einsatz eines Internen Standards konnten durch die Probenvorbereitung bedingte Analytverluste kompensiert und Meßungenauigkeiten eliminiert werden. Das Verfahren wurde für fettreiche Lebensmittel validiert und ist für akkreditierte Laboratorien geeignet.

Im weiteren Verlauf wurde die bestehende Methode erweitert, um strukturanaloge Ersatzstoffe für BADGE simultan zu erfassen. Dies gelang für Bisphenol F-Diglycidylether (BFDGE) und seine wichtigsten Derivate.

Anhand der isolierten BFDGE-Isomere wurden umfangreiche Untersuchungen zu ihren Detektionseigenschaften durchgeführt, welche die Notwendigkeit zeigten, die Bedingungen für die Fluoreszenzdetektion strikt einzuhalten, um eine valide Bestimmung von BFDGE und seinen Derivaten zu erreichen. Die Validierung für das kombinierte Verfahren wurde auf kohlenhydratreiche sowie proteinreiche Lebensmittel ausgedehnt und ist damit für alle Arten von Lebensmitteln gleichermaßen geeignet.

Wegen der Komplexität des Stoffgemisches von Novolak-Glycidylether (NOGE) war die Einbeziehung dieser Substanzklasse in die Analytik nicht möglich. Es wurde aber ein Verfahren entwickelt, welches die Identifizierung von NOGE in Extrakten aus Lebensmittelverpackungen erlaubt. Das Verfahren ist für die Überwachung des zukünftigen Einsatzverbots für NOGE geeignet.

Bei der Validierung der Methode für BADGE und BFDGE in kohlenhydratreichen und proteinreichen Lebensmitteln fiel für die epoxidhaltigen Standards eine vergleichsweise niedrige Wiederfindungsrate auf, die auf eine bislang unbekannte Reaktion in diesen Lebensmittelgruppen deutete. Dieses Phänomen wurde zeitgleich von RICHARD et al. (1999) beobachtet und als Reaktion mit einer bislang nicht identifizierten Majorkomponente von Lebensmitteln beschrieben.

In umfangreichen Untersuchungen an Modellebensmitteln und Modellösungen von Majorkomponenten konnten die Lebensmittelproteine als Reaktionspartner ermittelt werden. Die höchste Neigung, BADGE zu binden, zeigten hierbei die Serumproteine, deren physiologische Aufgabe der körpereigene Stofftransport ist. Hier scheinen die reaktionsfähigen nukleophilen funktionellen Gruppen besonders gut zugänglich zu sein. In vitro zeigte Cystein eine überragende Reaktionsbereitschaft zur Bildung eines Thioether-Addukts mit BADGE. Die Adduktbildung mit proteinogenen Aminosäuren erfolgte jedoch bevorzugt unter alkalischen Bedingungen; bei physiologischen Bedingungen war eine Reaktion nur mit Cystein, Histidin und Methionin nachweisbar.

Die Reaktion mit Methionin fiel aus dem Muster der übrigen Aminosäuren heraus. Hier wurde in einer pH-unabhängigen Reaktion zunächst ein zwitterionisches Additionsprodukt gebildet, das unter Abspaltung eines BADGE-Methylthioethers zerfiel. Die Reaktion zu Methylthioderivaten erfolgt mit allen BADGE-Derivaten, welche noch einen intakten Oxiranring besitzen.

Die Entstehung von Methylthioderivaten wurde zunächst in Lebensmitteln beobachtet, die mit hohen Mengen an BADGE·H<sub>2</sub>O dotiert wurden. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen erfolgte der Nachweis auch in Lebensmitteln des Einsatzvorrats Verpflegung, die unter Verwendung BADGE-haltiger Verpackungen produziert worden waren. Damit konnte die Bildung dieser Substanzen auch unter realistischen Bedingungen bewiesen werden.

Wegen ihrer spontanen Freisetzung aus dem Proteinverband ohne aufwendige Probenaufarbeitungsverfahren sind die Methylthioderivate geeignet, als Markersubstanzen für den Nachweis der Reaktion von BADGE mit Lebensmittelproteinen zu fungieren. Darüber hinaus ist es möglich, durch die Dotierung von Lebensmitteln die Bildungskinetik der Methylthioderivate zu ermitteln und hieraus Rückschlüsse auf die ursprünglich migrierte BADGE-Menge zu ziehen.

Ein Großteil des migrierten BADGE entzieht sich auch nach Abschluß der Arbeiten der Bestimmung durch die entwickelten Verfahren. Obwohl Cystein der bevorzugte Reaktionspartner zu sein scheint, steht eine Bestätigung und die vollständige Bilanzierung der BADGE-Migration noch aus.

# 10 Experimenteller Teil

### 10.1 Geräte und allgemeine Methoden

### 10.1.1 Geräte

### <u>HPLC</u>

Für die *massenselektive Detektion* stand ein Komplettsystem der Serie HP-1100 (Hewlett-Packard), bestehend aus Degasser, binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen, UV-Detektor sowie massenselektivem Detektor, zur Verfügung.

Die Chromatographie mit *Fluoreszenzdetektion* wurde auf verschiedenen Geräten durchgeführt. Neben einem Komplettsystem der Serie Agilent-1100 (Agilent), Degasser, binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen, Photodiodenarray-Detektor sowie Fluoreszenzdetektor wurde folgendes System eingesetzt:

Degasser:	Uniflows Degasys DG-1310
Pumpe:	Merck-Hitachi, L 6200 A Intelligent Pump
Autosampler:	Merck-Hitachi, L 655 A
Säulenofen:	LKB Bromma 2155,
Fluoreszenzdetektor:	Merck-Hitachi, F-1080
Auswertesystem:	Bio-Tek Kontron Instruments, KromaSystem 2000

Für die Reaktionsverfolgung der Synthesen stand ein heterogenes System zur Verfügung:

Pumpe:	Merck L-5000 Controller,
Aufgabesystem:	Rheodyne-Ventil mit 20 µl Probenschleife
Detektor:	LDC, Milton Roy, Spectro Monitor™ D
	655A Variable Wavelength UV Monitor
Auswertung:	Merck Hitachi D-2000 Cromato-Integrator

Die präparative HPL	C zur Reinigung synthetisierter Standards und Addukte erfolgte an
Aufgabesystem:	Rheodyne-Ventil mit 10 mL Probenschleife
Pumpe:	Merck, Nova Prep <sup>®</sup> 200
Detektor:	Merck-Hitachi, UV-Detektor L-7400
Auswertung:	LcR $\epsilon$ Sponder <sup>TM</sup> Applications Software for preparative Liquid Chro-
	matographs

<u>Fluorimetrie</u> Fluorimeter SFM 25, Bio-Tek Kontron Instruments

Kontron Instruments WIN 25 Software

<u>NMR-Spektroskopie:</u> Bruker-Spektrometer AMX 400 Bruker-Franzen 2D Win-NMR 6.0 Die Zuordnung der Signale erfolgte durch <sup>1</sup>H<sup>1</sup>H- bzw. <sup>1</sup>H<sup>13</sup>C-COSY Experimente. Bei der Zuordnung der Methylenprotonen wurden jeweils die Protonen mit höherer chemischer Verschiebung mit einem "<sup>1</sup>" gekennzeichnet.

IR-Spektroskopie: Perkin Elmer FT-IR Spectrometer 1720X Perkin Elmer Spectrum for Windows

UV-Spektroskopie: Perkin-Elmer Lambda 7 UV/VIS Spectrophotometer

Elementaranalysen:

Die Elementaranalysen wurden im Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Zentrale Elementanalytik, durchgeführt.

Weitere Geräte	
Laborschüttler:	Edmund Bühler, Swip KL-2
Ultraschallbad:	Bandelin Sonoplex, RK 510 S
Vakuumrotationsverdampfer:	Heidolph VV 2000
SPE-Vakuum-Extraktionseinheit:	Supelco, Visiprep DL
Homogenisator:	IKA-Labortechnik, Ultra-Turrax T25
pH-Meter:	WTW, pH DIGI 520
Gefriertrocknungsanlage:	Christ LOC-2, Beta 0-16
Ethanol-Kältebad:	Christ FOC-1 K40
Autoklav:	SANOclav TKL-MCS-123
Ultrazentrifuge:	Sigma, 3 K 12

# 10.2 Chemikalien

## 10.2.1 Substanzen

Sämtliche Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Fluka, Aldrich und Sigma in Analyse- bzw. Synthesequalität erworben.

Tab. 13	Liste der	verwendeten	Gefahrstoffe

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F	11	9-16-23.2-33
Aceton-d <sub>6</sub>	F F	11	9-16-23.2-33
Acetonitril		11-23/24/25	16-27-45
Ameisensäure, 98 %	c	35	23.2-26-45
Ammoniak, 25 %	c	34-37	7-26-36/37/39-45
BADGE	×	36/38-43	28.1-37/39
BADGE·HCl	a	a	a
BADGE-2HCl	*	36/37/38	26-36
BADGE·H <sub>2</sub> O·HCl	a	a	a
BADGE·2H <sub>2</sub> O	a	a	a
BADHPE	a	a	a
BFDGE	×	36/38-43	28.1-37/39
BFDGE·2HCl	×	36/37/38	26-36
Bisphenol A	×	36/37/38-41	26-36
Bisphenol F	×	36/37/38-41	28.1-37/39
BFDHPE	a	a	a
tertButylmethylether	F F	11	9-16-29-43.3
3-Chlor-1-propanol	×n	22-36	26
Chloroform	×n	22-38-40-48/20/22	36/37
Chloroform-d <sub>1</sub> (CDCl <sub>3</sub> )	×n	22-38-40-48/20/22	36/37
Citronensäure	×i	36	24/25
Dichlormethan	Xn	40	23.2-24/25-36/37
Diethylether	F	12-19	9-16-29-33
Dioxan	<b>* *</b>	-	-
Epichlorhydrin		45.3-10-23/24/25-34-43	53-9-44
Eisessig	c	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F F	11	16-23.2-29-33
Hexan	F Xn	11-48/20	9-16-24/25-29-51
L-Arginin-Base	×	36	26
Methanol	F RET	11-23/25	7-16-24-45
Methanol-d <sub>4</sub>	F Ref	11-23/25	7-16-24-45
Natriumcarbonat	×	36	22-26

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Natriumhydroxid	c	35	22-26
1-Octanol	×	36/38	23.2
Pentan	F	11	9-16-29-33
Phosphorsäure, 85 %	c	34	26-36/37/39-45
Pronase E	Xn	36/37/38-42/43	22-24-37
1-Propanol	F F	11	7-16
2-Propanol	F F	11	7-16
Salzsäure 37 %	c	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure 96 %	c	35	26-30-45
Tetrahydrofuran	F X	11-19-36/37	16-29-33
Toluol	F Xn	11-20-47	16-25-29-33-53
Trifluoressigsäure	c	20-35	9-26-27-28.1-45
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	×	36/38	-

<sup>a</sup> Vorsicht, noch nicht vollständig geprüfter Stoff

Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Kieselgel 60 (230-400 mesh, Korngröße 0.040-0.063 nm Merck), oder an Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral (Aktivitätsstufe I, Woelm Pharma).

Die Reinigung am Anionentauscher wurde mit Diaion SA21A Gel (16-50 mesh, Cl<sup>-</sup>,  $0.8 \text{ meq/mL} \stackrel{\circ}{=} 3.1 \text{ meq/g}$ , pH 0-14) durchgeführt (Supelco).

Dünnschichtchromatographische Trennungen erfolgten auf DC Alufolien Kieselgel 60 F254, Merck und DC Plastikfolien Aluminiumoxid 60 F254 neutral (Typ E, Merck). Die Detektion erfolgte visuell mittels UV-Licht.

# 10.2.2 Lösungen

Ammoniumformiat-Puffer 5mM (1mM); pH 3

500 mL (100 mL) einer mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellten 10mM-Ammoniaklösung (0.75 mL konz. Ammoniak ad 1 L) wurden mit Wasser auf 1L aufgefüllt.

Ammoniumacetat-Puffer 5mM; pH 3

385 mg Ammoniumacetat wurden in 500 mL Wasser gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes mit Ameisensäure wurde auf 1 L mit Wasser aufgefüllt.

*Tris-HCl-Puffer 0.1M; pH 8.5 für die enzymatische Hydrolyse von BADGE-Protein-Addukten* 1.2 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan wurden in 80 mL Wasser gelöst, mit 6M-HCl auf pH 8.5 eingestellt und auf 100 mL aufgefüllt.

## 10.3 Synthese von BADGE-Derivaten als Referenzstandards

10.3.1 Synthese von BADGE·HCl - Syntheseoptimierung

Tab. 14 zeigt die Ergebnisse der Versuche bei konstanter Reaktionsdauer (12 Stunden) und konstantem Volumen Epichlorhydrin (12 mL).

Versuch Nr.	BPA [g]	NaOH [g]	T [°C]	BADGE·HCl [g/100g]	BAMGE [g/100g]
1	0.5	0.15	20	46.9	24.4
2	1.0	0.15	20	46.5	23.3
3	0.5	0.45	20	43.7	13.0
4	1.0	0.45	20	50.9	12.8
5	0.5	0.3	0	46.0	24.0
6	1.0	0.3	0	48.2	21.2
7	0.5	0.3	40	45.8	27.8
8	1.0	0.3	40	34.1	32.4
9	0.75	0.15	0	35.2	28.5
10	0.75	0.45	0	20.5	13.0
11	0.75	0.15	40	43.3	22.3
12	0.75	0.45	40	50.5	5.1
13,14,15	0.75	0.3	20	60.1	11.1

Tab. 14 Versuchsplan und Ausbeuten im Rahmen der Optimierung der BADGE·HCl-Synthese



Abb. 61 Ermittlung signifikanter Einflußgrößen; a: BADGE·HCl, b: BAMGE

## 10.3.2 Allgemeine Methoden (AM)

### Aufarbeitung mittels Anionenaustauscher (AM 1)

Pro 1 mmol abzutrennende Verbindung werden 2.3 mL ungequollenes Ionentauscherharz eingesetzt. Zur Konditionierung wird das Harz in wenig Wasser zunächst zwei Stunden gequollen. Um Verunreinigungen zu entfernen, wird mit Wasser mehrfach gewaschen. Der Ionentauscher wird in die Säule gefüllt und dort zur Beladung mit Hydroxidionen mit 15 mL 1M-NaOH langsam gespült. Überschüssige Lauge wird durch mehrmaliges Spülen mit je 30 mL Wasser entfernt (mit pH-Papier prüfen). Anschließend wird mit Methanol / Wasser (10/1, v/v) konditioniert. Die zu reinigende Substanz wird in wenig Methanol / Wasser (10/1, v/v) gelöst und auf die Säule gegeben. Mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch wird aufgefüllt und eine Laufgeschwindigkeit von ca. 2 cm Säulenhöhe pro Minute eingestellt. Die Fraktionen werden in Reagenzgläsern aufgenommen und mittels HPLC untersucht. Die Fraktionsgröße beträgt bis 300 mg Rohprodukt 10 mL, bei weniger Rohprodukt 5 mL. Es wird solange mit Methanol / Wasser (10/1, v/v) gespült, bis das Produkt restlos von der Säule gespült ist. Eine Regeneration des Ionentauschers ist nicht möglich.

#### Säulenchromatographische Trennungen (AM 2)

Die säulenchromatographischen Trennungen bzw. Reinigungen erfolgen mit den jeweils angegebenen Laufmitteln. Die Säulengröße wird dabei der aufzuarbeitenden Menge angepaßt, so daß pro 1 g Substanz etwa 40 g Kieselgel die Säule halb füllen. Die Flußrate wird auf etwa 4 cm Säulenhöhe pro Minute eingestellt. Größere Säulen funktionieren als Schwerkraftsäulen, bei kleineren Säulen (≤15 mm Innendurchmesser) wird mit Druckluft gearbeitet. Die Fraktionen werden in Reagenzgläsern aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC untersucht. Die Fraktionsgröße beträgt bis etwa 300 mg Rohprodukt 10 mL, bei weniger Rohprodukt 5 mL. Das DC-Laufmittel ist, sofern nicht anders angegeben, mit dem Säulenlaufmittel identisch. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgt am Rotationsverdampfer.

# HPLC-Reaktionsverfolgung (AM3)

Die Reaktionslösung wird mit Acetonitril / Wasser (1/1, v/v) verdünnt (1:1000) und durchmischt. Nach der Trennung an RP18-Säulen mit 125 mm Länge bei Flußraten von 0.8 bis 1 mL/min und einer Säulentemperatur von 20 °C erfolgt die Bestimmung mittels UVD (280 nm) und externer Kalibrierung für BADGE unter Annahme identischer Fluoreszenzeigenschaften für die Reaktionsprodukte.

# 10.3.3 Synthese von BADGE·HCl - optimiertes Verfahren

5 g (22 mmol) Bisphenol A werden in 48 mL (440 mmol) Epichlorhydrin gelöst. Dem Reaktionsgemisch werden 15 mL 2.9M-NaOH (44 mmol) innerhalb einer Stunde unter intensivem Rühren zugetropft. Es wird 72 Stunden bei 40 °C gerührt. Der anfänglich entstandene weiße Niederschlag verschwindet im Laufe der Reaktion unter Bildung einer milchig trüben Lösung. Die Reaktion wird mittels HPLC überwacht.

Das überschüssige Epichlorhydrin wird im Wasserstrahlvakuum (Ölbad ca. 60 °C) abdestilliert und das Reaktionsgemisch zweimal mit je 15 mL Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 20 mL Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wird in 15 mL Methanol / Wasser (10/1, v/v) gelöst und auf einem Anionenaustauscher vorgereinigt (AM1). Die Endreinigung erfolgt durch zweimalige Säulenchromatographie (AM2) auf Kieselgel mit Dichlormethan / Aceton (60/1, v/v) als Fließmittel. Anschließend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel verdampft. Das Produkt wird 24 Stunden im Feinvakuum getrocknet.

Ausbeute 4.2 g = 51 % (bezogen auf BPA), leicht gelblicher Sirup

# Elementaranalyse

C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>Cl (376.88 g/mol)

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 156.4$  (C-4), 156.0 (C-13), 144.0 (C-10), 143.6 (C-7), 127.9 (C-11), 127.8 (C-6), 114.0 (C-5), 113.9 (C-12), 69.9 (C-15), 68.8 (C-3), 68.4 (C-14), 50.2 (C-2), 46.0 (C-16), 44.8 (C-1), 41.8 (C-8), 31.0 (C-9) ppm.

<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.15$ (H-e, m, 4H), 6.83 (H-d, m, 4H), 4.22 (H-b, m, 1H), 4.19 (H-c<sup>I</sup>, m, 1H), 4.07 (H-i, m, 2H), 3.96 (H-c, m, 1H), 3.76 (H-a, m, H), 3.35 (H-j, m, 1H), 2.91 (H-k<sup>I</sup>, dd=t, 1H), 2.76 (H-k, dd, 1H), 1.64 (CH<sub>3</sub>, s, 6H) ppm.

Element	С	Н
Soll berechnet [%]	66.93	6.69
Ist [%]	67.22	6.64





Kopplungskonstanten  $J_{a/b} 5.6J_{b/c} 5.6, J_{k/j} 2.54, J_{k/k}^{I} 5.09, J_{i/j} 3.56, J_{d/e} 3.05$  Hz.

ESI-MS (100 V, positiv) 417 (4, M+K<sup>+</sup>), 415 (11, M+K<sup>+</sup>), 414 (6), 420 (7), 401 (36, M+Na<sup>+</sup>), 399 (100, M+Na<sup>+</sup>), 396 (28, NH4<sup>+</sup>), 395 (12), 394 (54, M+NH4<sup>+</sup>), 229 (9), 227 (32), 191 (16), 135 (1).

IR (KBr) 575 (m), 773 (w), 831 (s), 917 (w), 1040 (s), 1120 (w), 1185 (s), 1250 (s), 1298 (m), 1363 (w), 1385 (w), 1459 (w), 1510 (s), 1582 (w), 1608 (m), 2966 (m), 3436 (s) cm<sup>-1</sup>.

UV (Acetonitril/Wasser) 227.8 nm, 276.0 nm (max)

Reinheit (HPLC) 99 %

#### **Reaktionsverfolgung HPLC**:



Abb. 62 Synthesemonitoring BADGE·HCl

#### 10.3.4 Synthese von BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O

1.6 g (4.2 mmol) BADGE·HCl, gelöst in 14 mL Aceton / Wasser (4/1, v/v) werden mit 0.5 mL 1M-Schwefelsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird mittels HPLC verfolgt. Bei einer Ausbeute über 85 % wird die Reaktion gestoppt.

Das Reaktionsgemisch wird mit einer 10 %igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und das Reaktionsgemisch dreimal mit je 10 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 20 mL Wasser gewaschen. Anschließend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel verdampft. Die Reinigung des Produktes erfolgt säulenchromatographisch (AM2) auf Kieselgel mit Ethylacetat / Toluol (3/1, v/v) als Fließmittel. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wird das Produkt 24 Stunden im Feinvakuum getrocknet. Ausbeute800 mg = 47 % (bezogen auf BADGE·HCl) weißer, wachsähnlicher FeststoffSmp.54 °C

Elementaranalyse

 $C_{21}H_{27}ClO_5 (394.89 \text{ g/mol})$ 

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 156.2 (C-4), 156.1 (C-13), 143.9 (C-10), 143.7 (C-7), 127.9 (C-11), 127.8 (C-6), 114.0 (C-5), 113.9 (C-12), 70.4 (C-14), 69.9 (C-15), 69.2 (C-2), 68.4 (C-3), 63.7 (C-16), 46.0 (C-1), 41.8 (C-8), 31.0 (C-9) ppm.

<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.13$  (H-e, m, 4H), 6.81 (H-d, m, 4H), 4.19 (H-b, m 1H), 4.09 (H-j, m, 1H), 4.05 (H-c, m, 2H), 4.01 (H-i, m, 2H), 3.78 (H-k, m, 2H), 3.73 (H-a, m, 2H), 1.63 (CH<sub>3</sub>, s, 6H) ppm.







Kopplungskonstanten  $J_{a/b} 5.08, J_{b/c} 5.09, J_{k/i} 3.56, J_{i/i} 2.54 J_{d/e} 3.06 Hz.$ 

**ESI-MS** (100 V, positiv) 435 (2, M+K<sup>+</sup>), 433 (7, M+K<sup>+</sup>), 419 (36, M+Na<sup>+</sup>), 417 (100, M+Na<sup>+</sup>), 414 (13, M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), 412 (26, M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), 397 (7, M+1)<sup>+</sup>, 395 (6, M+1)<sup>+</sup>, 386 (22), 229 (8), 228 (20), 227 (36), 209 (15), 149 (17), 135 (2).

**IR** (KBr) 554 (m), 738 (w), 827 (s), 926 (w), 1041 (s), 1089 (w), 1119 (m), 1148 (w), 1180 (s), 1254 (s), 1292 (m), 1363 (w), 1384 (w), 1414 (w), 1467 (m), 1511 (s), 1582 (w), 1609 (m), 2872 (m), 2930 (m), 2964 (m), 3038 (w), 3401 (s) cm<sup>-1</sup>.

UV (Acetonitril/Wasser) 226.8 nm, 277.9 nm (max)

**Reinheit (HPLC)** 98.4 %

### **Reaktionsverfolgung HPLC**:



Abb. 63 Synthesemonitoring BADGE·HCl·H<sub>2</sub>O

10.3.5 Synthese von BADGE $\cdot$ H<sub>2</sub>O

700 mg (2 mmol) BADGE, gelöst in 18 mL Aceton / Wasser (5/1, v/v), werden mit 1 mL 2M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird mittels HPLC verfolgt. Bei einer Ausbeute über 55 % BADGE·H<sub>2</sub>O wird die Reaktion gestoppt.

Das Reaktionsgemisch wird mit einer 10 %igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und das Reaktionsgemisch dreimal mit je 15 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit je 20 mL Wasser gewaschen. Anschließend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel verdampft. Die Reinigung des Produktes erfolgt mehrfach säulenchromatographisch (AM2) auf Kieselgel mit Ethylacetat / Methanol (60/1, v/v) als Fließmittel. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wird das Produkt 24 Stunden im Feinvakuum getrocknet.

Ausbeute196 mg = 28 % (bezogen auf BADGE), weißer FeststoffSmp.40 °C

Elementaranalyse	Element	С	Η
C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub> (358.34 g/mol)	Soll berechnet [%]	70.37	7.31
	Ist [%]	69.62	7.28

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 156.4$  (C-4), 156.2 (C-13), 143.8 (C-10), 143.6 (C-7), 127.8 (C-11), 127.8 (C-6), 114.0 (C-5), 113.9 (C-12), 70.4 (C-15, m, 1H), 69.2 (C-14), 68.8 (C-3), 50.2 (C-2), 44.8 (C-1), 41.8 (C-8), 31.0 (C-9) ppm.

<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.13$ (H-e, m, 4H), 6.81 (H-d, m, 4H), 4.18 (H-c<sup>I</sup>, dd, 1H), 4.09 (H-j, m, 1H), 4.02 (H-i, m, 2H), 3.94 (H-c, dd, 1H), 3.83 (H-k<sup>I</sup>, m, 1H), 3.74 (H-k, m, 1H), 3.34 (H-b, m, 1H), 2.89 (H-a<sup>I</sup>, dd = t, 1H), 2.74 (H-a, dd, 1H), 1.63 (CH<sub>3</sub>, s, 6H) ppm.





Kopplungskonstanten  $J_{b/c}^{I}$  3.05,  $J_{b/a}$  4.07,  $J_{b/a}$  2.03,  $J_{d/e}$  3.05 Hz.

**ESI-MS** (100 V, positiv) 397 (7, M+K<sup>+</sup>), 381 (100, M+Na<sup>+</sup>), 377 (11), 376 (46, M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), 209 (45), 210 (6), 135 (3).

**IR** (KBr) 546 (w), 575 (m), 738 (w), 772 (w), 832 (s), 862 (w), 912 (w), 1038 (s), 1109 (m), 1152 (w), 1120 (w), 1183 (s), 1250 (s), 1289 (m), 1365 (w), 1386 (w), 1456 (w), 1510 (s), 1582 (w), 1608 (m), 2872 (m), 2927 (m), 2967 (m), 3399 (s) cm<sup>-1</sup>.

UV (Acetonitril/Wasser) 226.5 nm, 277.1 nm (max)

**Reinheit (HPLC)** 98.4 %

**Reaktionsverfolgung HPLC:** 



Mobile Phase	Wasser / Acetonitril (40/60, v/v)
Flußrate	0.8 mL/min
Rt BADGE·2H2O	1.5 min
Rt BADGE·H2O	2.8 min
Rt BADGE	7.2 min

Abb. 64 Synthesemonitoring  $BADGE \cdot H_2O$ 

#### 10.4 Die analytische Erfassung von BADGE und seinen Derivaten

#### 10.4.1 Ausgangssituation für die Untersuchungen

Tab. 15 Chromatographiebedingungen - Ausgangssituation

Stationäre Phase	Multospher® 100 5C18 250x4 oder vergleichbar
Mobile Phase	Acetonitril / Wasser (60/40, v/v)
Säulentemperatur	20 °C
Flußrate	0.8 mL/min
Detektion	FLD $\lambda_{Ex}$ : 228 nm, $\lambda_{Em}$ : 305 nm

#### 10.4.2 Anpassung der chromatographischen Trennung

Die Optimierung erfolgte anhand eines Gemisches der verfügbaren Standardsubstanzen ( $\beta = 200 \ \mu g/L$  in Acetonitril / Wasser (50/50, v/v)). Die Retentionszeiten wurden unter Variation einzelner Parameter ermittelt. Die Einzelergebnisse sind in Tab. 16 bis 21 dargestellt.

Tab. 16 Retentionszeiten in Abhängigkeit von der Temperatur

	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
		Retentions	zeiten [min]	
BADGE·2H <sub>2</sub> O	2.88	2.67	2.68	2.70
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	4.95	4.78	4.67	4.50
BPA	5.22	4.87	4.67	4.50
BADGE·2HCl	12.21	11.60	11.00	10.34
BADGE·HCl	14.10	13.35	12.56	11.69
BADGE	16.34	15.44	14.43	13.30

Tab. 17 Retentionszeiten in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 30 °C

	рН 3	рН 4.5	pH 8
		Retentionszeiten [min]	
BADGE·2H <sub>2</sub> O	2.79	2.82	2.74
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O/BPA	4.79	5.15	4.99
BADGE·2HCl	11.18	11.88	11.69
BADGE·HCl	12.71	13.51	13.26
BADGE	14.49	15.46	15.19

Tab. 18 Retentionszeiten bei verschiedenen stationären Phasen bei 30 °C

	Nucleosil <sup>®</sup> 120 3C18 250x4	Superspher <sup>®</sup> 100 4C18 250x4.6	Multospher <sup>®</sup> 100 5C18 250x4	Multospher <sup>®</sup> AQ 120 5C18 250x4	Multospher <sup>®</sup> FBS 100 5C18 250x4	LiChrospher <sup>®</sup> 100 5C18 125x4
			Retention	szeiten [min]		
BADGE·2H <sub>2</sub> O	2.65	2.96	2.82	2.71	2.09	1.65
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	4.08	4.68	4.92	5.15	3.94	2.62
BPA	4.08	4.88	5.22	5.15	3.94	2.62
BADGE·2HCl	8.70	10.67	12.23	13.80	9.30	5.63
BADGE·HCl	9.94	12.20	14.26	15.70	11.05	6.42
BADGE	11.41	13.97	16.58	18.05	12.90	7.32

Acetonitril / Wasser (v/v)	60/40	55/45	50/50
	F	Retentionszeiten [min]	l
BADGE·2H <sub>2</sub> O	2.70	2.99	3.25
BPA	4.50	5.51	6.57
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	4.50	5.81	7.23
BADGE-2HCl	10.34	15.51	22.80
BADGE·HCl	11.69	17.48	25.57
BADGE	13.30	19.76	28.80

Tab. 19 Änderung der Retentionszeiten unter Einfluß des Anteils des organischen Modifiers Acetonitril bei 30 °C

Tab. 20 Änderung der Retentionszeiten unter Einfluß von Methanol in der mobilen Phase bei 30 °C

Acetonitril / Mothenol / Wessor	60/0/40	55/5/40	50/10/40	40/20/40	30/30/40	20/40/40	10/50/40
(v/v/v)	Retentionszeiten [min]						
BADGE·2H <sub>2</sub> O	2.98	3.27	3.58	4.31	5.49	6.74	9.63
BPA	5.15	5.57	6.02	6.93	8.33	9.38	12.06
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	5.15	5.89	6.82	9.04	12.79	16.61	23.38
BADGE·H <sub>2</sub> O	5.54	6.36	7.25	9.20	12.29	14.90	19.61
BADGE·2HCl	12.00	14.49	17.35	24.00	35.76	47.33	64.80
BADGE·HCl	13.72	16.24	19.01	24.84	34.42	42.17	55.60
BADGE	15.78	18.30	20.92	25.68	33.14	37.65	46.16

Tab. 21 Entwicklung eines geeigneten Gradienten bei 30 °C; optimale Gradienten der jeweiligen Vormischung

	Acetonitril / Methanol (v/v)			Methanol / Wasser (v/v)			
	9 / 1	4 / 1	1 / 2	1/9	1 / 6	1 / 4	1 / 1
Acetonitril / Methanol / Wasser (v/v/v)	36/4/60→ 63/7/30	40/10/50→ 56/14/30	20/40/40→ 25/50/25	40/6/54→ 27/3/70	51/7/42→ 72/4/24	50/10/40→ 50/6/24	40/30/30 →
<b>30 Minuten</b>							70/15/15
	Retentionszeiten [min]						
BADGE·2H <sub>2</sub> O	6.91	6.33	7.22	5.20	3.54	3.58	3.66
BPA	14.63	12.61	9.73	11.07	6.29	6.00	4.80
BADGE·H <sub>2</sub> O	17.60	15.94	14.21	13.53	7.45	7.22	5.88
BADGE·H <sub>2</sub> O·HCl	17.15	15.68	15.39	13.05	6.95	6.79	6.02
BADGE	32.49	29.38	25.39	27.58	18.27	16.87	10.86
BADGE·HCl	31.30	28.47	26.48	26.28	16.92	15.73	11.23
BADGE-2HCl	30.15	27.64	27.52	25.10	15.72	14.70	11.61

### 10.4.3 Optimierung der Detektion

Die S/N-Verhältnisse der unter optimierten Chromatographiebedingungen getrennten Referenzsubstanzen ( $\beta = 100 \text{ mg/L}$  in Acetonitril / Wasser (50/50, v/v)) bei verschiedenen Puffern im Scan- sowie SIM-Modus (Ionenspur des jeweils stärksten Molecülclusters) und unter Nutzung verschiedener Ionenquellen im positiven und negativen Modus sind in Tab. 22 bis Tab. 24 dargestellt.

	5mM-NH <sub>4</sub> form pH 3	5mM-NH4ac pH 3	0.1% TFA pH 2	Wasser			
		S/N-Verhältnis					
BADGE	301.52	138.05	130.90	85.83			
BADGE·H <sub>2</sub> O	276.11	124.98	148.07	87.71			
BADGE·HCl	221.11	66.43	90.44	19.95			
BADGE·2H <sub>2</sub> O	197.88	85.47	127.30	61.83			
BADGE·2HCl	97.96	35.83	53.46	25.21			
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	52.14	29.08	33.74	19.95			
BPA	0.00	0.00	13.48	4.77			

Tab. 22 Abhängigkeit von der Puffersubstanz (AP-ESI positiv, Scan, 100 V Fragmentorspannung)

Tab. 23 Abhängigkeit von der Puffersubstanz (AP-ESI positiv, SIM, 100 V Fragmentorspannung)

	5mM-NH <sub>4</sub> form pH 3	5mM-NH4ac pH 3	0.1% TFA pH 2	Wasser
		S/N-Verh	ältnis	
BADGE	2155.8	1364.6	644.0	597.6
BADGE·H <sub>2</sub> O	2544.6	383.0	959.2	915.9
BADGE·HCl	1972.0	315.9	342.5	317.5
BADGE·2H <sub>2</sub> O	1787.2	666.8	782.0	903.4
BADGE·2HCl	290.2	142.4	338.0	113.5
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	575.0	152.5	157.7	117.1
BPA	0.0	0.0	0.0	0.0

**Tab. 24** Abhängigkeit von der Ionenquelle und deren Polarität (5 mM-NH<sub>4</sub>form pH 3, Scan, 100 V Fragmentorspannung)

	<b>APCI</b> positiv	<b>APCI negativ</b>	<b>AP-ESI</b> positiv	<b>AP-ESI</b> negativ			
	S/N-Verhältnis						
BADGE	56.96	0.00	301.52	0.00			
BADGE·H <sub>2</sub> O	64.41	1.96	276.11	3.47			
BADGE·HCl	25.52	0.00	221.11	0.00			
BADGE·2H2O	25.55	18.47	197.88	28.76			
BADGE-2HCl	5.20	6.32	97.96	13.80			
BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O	0.53	1.99	52.14	6.57			
BPA	0.00	0.00	0.00	5.22			

Die optimierten massenselektiven Detektionsbedingungen werden in Tab. 3 (s. 4.5) wiedergegeben.

# 10.4.4 Optimierung der Aufarbeitung

# SPE-Filtration

2 mL eines Standardgemisches ( $\beta = 2 \text{ mg/L}$  in Acetonitril / Wasser (50/50, v/v)) wurden über eine mit 2 mL Acetonitril konditionierte C18ec-SPE in einen 5 mL-Meßkolben filtriert. Anschließend wurde

- a. mit Acetonitril aufgefüllt
- b. die Festphase mit 2 mL Acetonitril gespült und mit Acetonitril aufgefüllt
- c. die Festphase mit 2 mL Acetonitril / Wasser (90/10 v/v) gespült und mit Acetonitril aufgefüllt.

Das jeweilige Eluat wurde 1/1 mit Wasser verdünnt. Die Ermittlung der Wiederfindungsraten erfolgte unter den optimierten Bedingungen (s. 4.5 Tab. 3) mittels HPLC-FLD.

	Ohne Spülen	Spülen mit Acetonitril	Spülen mit Aceto- nitril/Wasser 90/10
	n = 4	<b>n</b> = 4	n = 3
		Wiederfindungsraten [%]	
BADGE·2H <sub>2</sub> O	17.6	67.5	101.7
BPA	69.0	98.4	100.1
BADGE	63.7	95.8	95.2
BADGE-2HCl	60.7	102.0	97.9

Tab. 25 Mittlere Wiederfindungsraten nach SPE-Filtration

# Lipid-Lipoid-Trennung

100  $\mu$ L eines Standardgemisches ( $\beta = 100 \text{ mg/L}$  in Acetonitril / Wasser (50/50, v/v)) wurden unter kurzem und heftigen Schütteln in 10 g Öl gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 1 mg/kg Öl für jede verfügbare Standardsubstanz. Die Extraktion erfolgte mit drei Methoden:

- a. Direkte Extraktion mit 5 mL Acetonitril
- b. Lösen des Öls in 30 mL Hexan und anschließende Flüssig-Flüssig-Extraktion im Schütteltrichter mit 30 mL Acetonitril; Einengen des Extraktes am Rotationsverdampfer und Aufnehmen des Rückstandes in 5 mL Acetonitril
- c. Extraktion des Öls in 25 mL des Lösungsmittelgemisches Acetonitril / 2-Propanol / Ethanol (50/25/25, v/v/v) und anschließendem Ausfrieren des Fettes bei –18 °C über 2 Stunden; nach Filtration Einengen des Extrakts am Rotationsverdampfer Aufnehmen des Rückstands in 5 mL Acetonitril

Die erhaltenen Acetonitril-Extrakte wurden der optimierten SPE-Filtration unterworfen. Die Ermittlung der Wiederfindungsraten erfolgte mittels HPLC-FLD (s. 4.5 Tab. 3). Die Korrektur von Koelutionen erfolgte über den Abzug des Blindwertes aus nicht-dotiertem Öl.
	Direkte Extraktion mit	Flüssig-flüssig-Extraktion	<b>Extraktion mit Aceto-</b>
	Acetonitril	mit Hexan/Acetonitril	nitril/Propanol/ Ethanol
		Wiederfindungsraten [%]	
BADGE·2H <sub>2</sub> O	98.6	98.0	108.3
BPA	82.5	90.1	87.7
BADGE	79.8	86.7	83.6
BADGE·2HCl	83.2	87.7	90.3

Tab. 26 Mittlere Wiederfindungsraten nach Lipid-Lipoid-Trennung und anschließender SPE (jeweils n = 6)

# **Lipidextraktion**

Als Matrix wurde Jagdwurst aus dem Einsatzvorrat Verpflegung der Bundeswehr verwendet. Die Abwesenheit der Analyte in der Matrix wurde. Jeweils 9.5 g Jagdwurst wurden mit 0.5 g eines Standardgemisches ( $\beta = 20 \text{ mg/L}$ ) dotiert und homogenisiert. Dies entspricht einer Konzentration von 1 mg/kg Homogenat für jede Substanz. Jeweils 10.0 g Homogenat wurden mit Kieselgur verrieben und mit je 100 mL acht verschiedener Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische in einer Säule mit Fritte (300 x 30 mm) extrahiert:

- Diethylether / Pentan (50/50 v/v)
- Pentan
- Diethylether
- Dichlormethan
- Aceton
- Tetrahydrofuran
- Ethylacetat
- Acetonitril

Die erhaltenen Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit 5 mL Acetonitril extrahiert. Die erhaltenen Lösungen wurden nach der optimierten SPE-Filtration weiterbehandelt. Die Ermittlung der Wiederfindungsraten erfolgte unter den optimierten Bedingungen (s. 4.5 Tab. 3) mittels HPLC-FLD. Die Korrektur von Koelutionen erfolgte über den Abzug des Blindwertes aus der undotierten Jagdwurst.

51 <u>2</u> ()•	<b>e</b> iis ii <i>b</i> )							
	Diethyl-	Pentan	Diethyl-	Dichlor-	Aceton	Tetrahydro-	Ethyl-	Acetonitril
	ether/Pentan		ether	methan		furan	acetat	
			W	iederfindu	ngsraten	[%]		
BADGE·2H <sub>2</sub> O	11.4	1.1	73.2	103.2	67.8	37.9	59.4	69.8
BPA	76.4	40.8	83.9	0.8	64.2	25.7	23.1	89.7
BADGE	82.7	63.6	74.8	35.0	45.0	28.5	72.7	84.9
BADGE·HCl	81.5	70.8	66.1	39.6	50.3	24.1	76.6	76.5
BADGE-2HCl	70.8	27.9	65.2	40.1	45.9	28.5	75.8	78.6

 Tab. 27 Mittlere Wiederfindungsraten nach Lipidextraktion und anschließender Lipid-Lipoid-Trennung sowie

 SPE (jeweils n = 3)

## 10.4.5 Synthese von BADHPE

1.14 g (5 mmol) Bisphenol A, gelöst in 20 mL 1-Propanol, werden mit 0.92 mL (11 mmol) 3-Chlor-1-propanol versetzt. 440 mg NaOH (11 mmol), gelöst in 5 mL Wasser, werden über 30 Minuten langsam unter Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird drei Tage bei 60 °C am Rückflußkühler gerührt. Die Reaktion wird mittels HPLC verfolgt. Bei einer Ausbeute über 70 % Produkt wird die Reaktion gestoppt.

Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch dreimal mit 10 mL Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 15 mL Wasser gewaschen. Anschließend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel verdampft. Die Reinigung des Produktes erfolgt säulenchromatographisch (AM2) auf Kieselgel mit Ethylacetat / Toluol (3/1, v/v) als Fließmittel. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wird das Produkt 24 Stunden im Feinvakuum getrocknet.

# Ausbeute810 mg = 47 % (bezogen auf BPA), weißer FeststoffSmp. $40 \degree C$

# Elementaranalyse

C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub> (344.45 g/mol)

Element	С	Н
Soll berechnet [%]	73.23	8.19
Ist [%]	73.38	8.26

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 156.6$  (C-4), 143.4 (C-7), 127.8 (C-6), 113.8 (C-5), 65.8 (C-3), 60.7 (C-1), 41.7 (C-8), 32.0 (C-2), 31.1 (C-9) ppm.

<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.13$  (H-e, m, 4H), 6.80 (H-d, m, 4H), 4.10 (H-c, t, 4H), 3.85 (H-a, t, 4H), 2.03 (H-b, m, 4H), 1.63 (CH3, s, 6H) ppm.





Kopplungskonstanten  $J_{b/c}$  6.11,  $J_{b/a}$  5.59,  $J_{d/e}$  3.56 Hz.

**ESI-MS** (100 V, positiv) 367 (7, M+Na<sup>+</sup>), 345 (8, M+1), 194 (17), 193 (100), 135 (14).

**IR** (KBr) 554 (w), 574 (w), 728 (w), 828 (s), 957 (w), 996 (m), 1066 (s), 1182 (s), 1253 (s), 1293 (m), 1360 (w), 1396 (w), 1422 (w), 1471 (m), 1513 (s), 1579 (w), 1610 (m), 2363 (w), 2873 (m), 2961 (m), 3270 (s) cm<sup>-1</sup>.

UV (Acetonitril/Wasser) 227.4 nm, 276.0 nm (max)

**Reinheit (HPLC)** 99.2 %

### **Reaktionsverfolgung HPLC**:



Mobile Phase	Wasser / Acetonitril 40/60 (v/v)
Flußrate	0.8 mL/min
R <sub>t</sub> BPA	2.8 min
Rt Monoether	3.1 min
Rt Interner Standard	3.6 min

Abb. 65 Synthesemonitoring BADHPE

10.4.6 Validierung des Verfahrens

Grundkalibrierung

Die Validierung erfolgte unter Verwendung einer Stammlösung mit allen Referenzsubstanzen sowie dem internen Standard ( $\beta = 1g/L$ ) in Acetonitril.

Die Stammlösung wurde zunächst mit Acetonitril auf 1 mg/L verdünnt. Die Herstellung der Kalibrierstandards erfolgte durch weitere Verdünnung auf 10, 20, 40, 100, 200, 400, 600 und 800  $\mu$ g/L mit Acetonitril / Wasser (50/50, v/v).

Die Grundkalibrierung erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Beispielhaft ist die vollständige Auswertung für BADGE dargestellt (Tab. 28 und Tab. 29); für die restlichen Substanzen sind die Verfahrenskenndaten in Tab. 29 zusammengefaßt.

BADGE	Meßwert	Mittelwert	Regressionsgerade	Residuen
[µg/L]	[mV·min]	[mV·min]	$\mathbf{y} = \mathbf{b}\mathbf{x} + \mathbf{a}$	yi - y(xi)
10.3	1.2718			-0.387
10.3	1.5131	1.40	1.659	-0.146
10.3	1.4016			-0.258
20.6	2.2170			-0.716
20.6	2.4865	2.45	2.933	-0.447
20.6	2.6545			-0.279
41.1	6.1261			0.645
41.1	5.1117	5.50	5.481	-0.370
41.1	5.2678			-0.213
102.8	15.730			2.605
102.8	12.364	13.55	13.125	-0.761
102.8	12.566			-0.559
205.6	26.490			0.624
205.6	24.757	25.44	25.866	-1.109
205.6	25.080			-0.786
411.2	52.297			0.950
411.2	52.455	52.14	51.347	1.108
411.2	51.657			0.310
616.8	79.637			2.810
616.8	77.653	77.86	76.827	0.826
616.8	76.285			-0.542
822.4	100.87			-1.438
822.4	101.47	101.21	102.308	-0.838
822.4	101.28			-1.028

Tab. 28 Ergebnisse der Grundkalibrierung BADGE

Tab. 29 Verfahrenskenndaten der Grundkalibrierung

	<b>BADGE</b> ·	BPA	<b>BADGE</b> .	<b>BADGE</b> .	IS	BADGE	<b>BADGE</b> .	<b>BADGE</b> .
	2H <sub>2</sub> O		H <sub>2</sub> O	HCl·H <sub>2</sub> O			HCl	2HCl
Achsenabschnitt	0.6158	0 5142	0 5356	0 4943	0 2699	0 385	0 5123	0 3288
[mV·min]	0.0120	0.5112	0.5550	0.1715	0.2099	0.505	0.5125	0.5200
Steigung	0 1063	0.0981	0 1015	0 1086	0 1215	0 1239	0 1014	0.0935
[(mV·min)/(µg/L)]	0.1005	0.0901	0.1015	0.1000	0.1215	0.1237	0.1014	0.0755
Korrelationskoeffizient	0.9993	0.9997	0.9996	0.9990	0.9996	0.9996	0.9995	0.9995
Reststandard-	1 1/18	0.780	0.888	1 1 1 3	0.814	1 007	1 1/6	0.710
abweichung [mV·min]	1.140	0.780	0.000	1.115	0.014	1.077	1.140	0.710
Verfahrensstandard-	10.80	7.95	8 75	10.25	6 70	8 85	11.01	7 59
abweichung [µg/L]	10.00	1.75	0.75	10.23	0.70	0.05	11.01	1.57
Verfahrensvariations-	3 89	2.81	3 19	4 84	2 94	3 17	3 27	3 35
koeffizient [%]	5.07	2.01	5.17	7.07	2.74	5.17	5.21	5.55
NG (DIN 32645) [µg/L]	24.62	18.13	19.95	23.37	15.28	20.18	25.10	17.31
Fluoreszenzresponse [10 <sup>6</sup> mV·min/M]	42.0	22.3	36.3	42.8	41.8	42.1	41.1	38.5

Die Fluoreszenzresponse berechnet sich aus der Peakfläche im Verhältnis zur Molarität der vermessenen Standardlösung und wird als Mittelwert der Grundkalibrierung (Tab. 28) angegeben.

## Matrixkalibrierung Olivenöl

Die Stammlösung ( $\beta = 1$  g/L) wurde zunächst auf sechs Zwischenstammlösungen der Konzentration 5, 10, 20, 40, 60 und 80 mg/L Acetonitril verdünnt. Jeweils 100 µL dieser Lösungen wurden in 10 g Olivenöl gelöst. Dies entspricht den Konzentrationsstufen 50, 100, 200, 400, 600, 800 µg/kg Öl. Die Aufarbeitung folgte dem Schema der optimierten Probenvorbereitung (s. 4.7) in einer Dreifachbestimmung. Die Auswertung erfolgte sowohl anhand der linearen Regression und Residuenplot der Matrixkalibrierung als auch anhand der Wiederfindungsfunktion mit und ohne internen Standard. Beispielhaft ist die vollständige Auswertung für BADGE dargestellt (Tab. 30 bis 32); für die anderen Substanzen sind die Verfahrenskenndaten in Tab. 32 zusammengefaßt.

BADGE	Meßwert	Mittelwert	Regressionsgerade	Residuen
[µg/L]	[mV·min]	[mV·min]	$\mathbf{y} = \mathbf{b}\mathbf{x} + \mathbf{a}$	yi - y(xi)
51.4	2.2572			0.665
51.4	2.2249	2.30	1.592	0.633
51.4	2.4063			0.814
102.8	3.2281			-0.216
102.8	3.3973	3.36	3.444	-0.047
102.8	3.4495			0.005
205.6	5.8157			-1.332
205.6	6.9506	6.47	7.148	-0.197
205.6	6.6365			-0.511
411.2	12.791			-1.765
411.2	14.341	12.73	14.556	-0.215
411.2	11.043			-3.513
616.8	24.965			3.002
616.8	24.941	25.33	21.963	2.978
616.8	26.071			4.108
822.4	24.867			-4.504
822.4	30.919	27.90	29.371	1.548
822.4	27.917			-1.454

Tab. 30 Ergebnisse der Matrixkalibrierung BADGE in Olivenöl

BADGE dotiert [µg/kg]	Meßwert [mV∙min]	BADGE berechnet (Grundkalibrierung)	Korrekturfaktor für IS	BADGE berechnet (IS-korrigierte
		[µg/kg]		Grundkalibrie- rung) [ug/kg]
51.4	2 2572	37.78	1 497	56 557
51.4	2 2249	37.12	1.541	57 209
51.4	2.4063	40.78	1.227	50.037
102.8	3.2281	57.37	1.930	110.724
102.8	3.3973	60.78	1.837	111.653
102.8	3.4495	61.83	1.619	100.103
205.6	5.8157	109.58	1.900	208.202
205.6	6.9506	132.48	1.593	211.041
205.6	6.6365	126.14	1.577	198.923
411.2	12.791	250.32	1.523	381.237
411.2	14.341	281.60	1.413	397.901
411.2	11.043	215.05	1.900	408.595
616.8	24.965	495.96	1.188	589.200
616.8	24.941	495.48	1.223	605.972
616.8	26.071	518.28	1.164	603.278
822.4	24.867	494.00	1.685	832.390
822.4	30.919	616.10	1.362	839.128
822.4	27.917	555.53	1.436	797.741

Tab 31	Wiederfindung von BADGE in	n Olivenöl ohne und mit Berücksichtigung des IS
1 40.01	Wiederindung von Drib GE	in Onvener entre und mit Derdekstentigung des is

	BADGE· 2H <sub>2</sub> O	BPA	BADGE· H <sub>2</sub> O	BADGE· HCl·H <sub>2</sub> O	IS	BADGE	BADGE• HCl	BADGE· 2HCl
Achsenabschnitt [mV·min]	0.6808	0.8867	0.0816	-0.1021	-0.2789	-0.2597	-0.3551	-0.1302
Steigung [(mV·min)/(μg/L)]	0.0294	0.0281	0.0327	0.0321	0.0359	0.0360	0.0305	0.0269
Korrelationskoeffizient	0.9742	0.9727	0.9664	0.9685	0.9767	0.9791	0.9828	0.9845
Reststandard- abweichung [mV·min]	2.007	2.011	2.537	1.852	1.909	2.217	2.042	1.230
Verfahrensstandard- abweichung [µg/L]	68.33	71.64	77.52	57.76	53.10	61.55	67.05	42.87
Verfahrensvariations- koeffizient [%]	18.6	19.7	21.4	20.7	17.7	16.7	15.1	14.3
NG (DIN 32645) [µg/kg]	155.8	163.3	176.7	131.7	121.1	140.3	152.9	97.8
mittlere Wiederfindung [%]	69.1	72.2	80.7	73.8	73.8	72.7	73.1	76.7
korrigierter Verfahrens- variationskoeffizient [%]	9.0	7.0	6.0	4.5		3.7	4.9	14.2
korrigierte NG (DIN 32645) [µg/kg]	75.6	59.8	49.8	28.7		30.8	49.5	96.7
mittlere korrigierte Wie- derfindung [%]	93.5	97.6	108.5	99.9		98.5	99.4	105.4

#### Matrixkalibrierung aus dem Lebensmittel

Als Matrix wurde Schmalzfleisch aus dem Einsatzvorrat Verpflegung der Bundeswehr verwendet. Das Material stand in ausreichender Menge aus einem einheitlichen Herstellungslos zur Verfügung. Die Abwesenheit der Analyte in der Matrix wurde unter Anwendung der optimierten Chromatographie bestätigt. Für die Matrixkalibrierung aus der sechs Ölstandards aus der Stammlösung ( $\beta = 1$  g/L) hergestellt. Hierfür wurden 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.24 und 0.32 mL der Stammlösung in 20 g Olivenöl gelöst. Jeweils 66.5 g Schmalzfleisch-Homogenat wurden mit 3.5 g Öl versetzt und erneut homogenisiert. Hieraus resultieren die Konzentrationen 50, 100, 200, 400, 600 und 800 µg/kg Homogenat. Die Aufarbeitung folgte dem Schema der optimierten Probenvorbereitung (s. 4.7) in einer Dreifachbestimmung. Die Auswertung erfolgte sowohl anhand der linearen Regression und Residuenplot der Matrixkalibrierung als auch anhand der Wiederfindungsfunktion mit und ohne internen Standard. Beispielhaft ist die vollständige Auswertung für BADGE dargestellt (Tab. 33 bis 35); für die anderen Substanzen sind die Verfahrenskenndaten in Tab. 35 zusammengefaßt.

BADGE	Meßwert	Mittelwert	Regressionsgerade	Residuen
[µg/L]	[mV·min]	[mV·min]	$\mathbf{y} = \mathbf{b}\mathbf{x} + \mathbf{a}$	yi - y(xi)
51.4	1.0454			-0.160
51.4	1.3060	1.58	1.205	0.101
51.4	2.3840			1.179
102.8	2.9270			-0.267
102.8	3.5058	3.26	3.194	0.311
102.8	3.3498			0.155
205.6	6.4883			-0.684
205.6	6.5572	6.42	7.172	-0.615
205.6	6.2149			-0.958
411.2	13.856			-1.272
411.2	17.048	15.44	15.128	1.920
411.2	15.420			0.292
616.8	22.082			-1.002
616.8	21.474	22.83	23.084	-1.610
616.8	24.935			1.851
822.4	30.802			-0.238
822.4	26.058	27.52	31.040	-4.982
822.4	25.698			-5.342

Tab. 33 Ergebnisse der Matrixkalibrierung BADGE in Schmalzfleisch

<b>BADGE dotiert</b>	Meßwert	BADGE berechnet	Korrekturfaktor für	BADGE berechnet
[µg/kg]	[mV·min]	(Grundkalibrierung)	IS	(IS-korrigierte
		[µg/kg]		Grundkalibrierung)
				[µg/kg]
51.4	1.0454	13.325	1.234	16.443
51.4	1.3060	18.584	0.865	16.075
51.4	2.3840	40.335	1.102	44.449
102.8	2.9270	51.291	1.849	94.837
102.8	3.5053	62.960	1.667	104.954
102.8	3.3498	59.822	1.299	77.709
205.6	6.4883	123.150	1.552	191.129
205.6	6.5572	124.540	1.994	248.333
205.6	6.2149	117.633	1.921	225.973
411.2	13.856	271.812	1.368	371.839
411.2	17.048	336.219	1.269	426.662
411.2	15.420	303.370	1.487	451.111
616.8	22.082	437.793	1.417	620.353
616.8	21.474	425.525	1.495	636.160
616.8	24.935	495.359	1.265	626.629
822.4	30.802	613.741	1.376	844.508
822.4	26.058	518.019	1.620	839.191
822.4	25.698	510.755	1.576	804.950

Tab. 34 Wiederfindung von BADGE in Schmalzfleisch ohne und mit Ber	ücksichtigung des IS
--	----------------------

	BADGE· 2H <sub>2</sub> O	BPA	BADGE· H <sub>2</sub> O	BADGE· HCl·H <sub>2</sub> O	IS	BADGE	BADGE• HCl	BADGE· 2HCl
Achsenabschnitt [mV·min]	-1.1549	0.5738	-0.1788	0.8705	0.3466	-0.1025	0.3045	0.0422
Steigung [(mV·min)/(μg/L)]	0.0370	0.0252	0.0240	0.0324	0.0331	0.03514	0.0302	0.0265
Korrelationskoeffizient	0.9770	0.9812	0.9799	0.9822	0.9876	0.9874	0.9779	0.9651
Reststandard- abweichung [mV·min]	2.381	1.487	1.421	1.393	1.273	0.936	2.302	1.729
Verfahrensstandard- abweichung [µg/L]	64.35	59.01	59.34	42.97	38.46	47.38	76.31	65.34
Verfahrensvariations- koeffizient [%]	17.35	15.79	16.36	15.38	12.78	12.86	17.17	21.81
NG (DIN 32645) [µg/kg]	146.7	134.5	135.3	98.0	87.7	108.0	172.0	149.0
mittlere Wiederfindung [%]	86.5	64.3	58.7	74.6	68.1	70.9	72.4	70.5
korrigierter Verfahrens- variationskoeffizient [%]	12.6	12.3	9.8	9.5		6.3	11.6	14.3
korrigierte NG (DIN 32645) [µg/kg]	105.8	104.8	80.8	60.7		53.2	117.1	97.9
NG (S/N > 3) [μg/kg]	7.8	21.6	11.0	17.6		19.8	12.9	23.7
mittlere korrigierte Wiederfindung [%]	125.5	93.5	84.8	108.4		103.1	105.0	101.8

## Verfahrenspräzision und Grenzwertbetrachtung

	Charge A	Charge B	Charge C	Charge D
Dose 1	2254.9	2183.6	2264.8	1888.2
Dose 2	2122.0	2122.4	2236.1	1595.5
Dose 3	2448.4	2189.7	2680.6	1439.8
Dose 4	2349.9	2314.0	2212.8	1643.8
Dose 5	2399.3	2060.8	2182.3	1666.0
Dose 6	2436.1	2463.0	2271.6	1845.1
Mittelwert [µg/kg]	2335.1	2222.2	2308.0	1679.7
Standardabweichung [µg/kg]	125.9	144.9	185.5	165.5
Variationskoeffizient [%]	5.4	5.8	8.0	9.9

Tab.	36	Summe	der	SCF	-relevanten	BADC	E-D	erivate	in,	,Gulasch	mit	Karto	offeln"
------	----	-------	-----	-----	-------------	------	-----	---------	-----	----------	-----	-------	---------

Zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen wurde der Bartlett-Test durchgeführt:

Prüfgröße 
$$\chi^2 = \frac{1}{C} \cdot \left[ (N-m) \cdot \ln(s^{*2}) - \sum_{i=1}^m f(i) \cdot \ln(s_i^2) \right]$$
  
mit  $C = \frac{\left(\sum_{i=1}^m \frac{1}{f(i)}\right) - \frac{1}{N-m}}{3 \cdot (m-1)} + 1$  sowie  $s^{*2} = \frac{\sum_{i=1}^m f(i) \cdot s_i^2}{N-m}$ 

wobei

N:Anzahl aller Untersuchungen(24)m:Anzahl der Chargen(4)f(i):Freiheitsgrade pro Charge(5)

Mit den in Tab. 36 angegebenen Werten beträgt die Prüfgröße  $\chi^2 = 0.762$ . Für *m-1* Freiheitsgrade und p = 0.05 liegt die Schranke der  $\chi^2$ -Verteilung bei 7.81.

*Die Varianzen sind homogen*. Alle untersuchten Chargen entstammen einer Grundgesamtheit. Für *N-m* Freiheitsgrade beträgt die Gesamt-Standardabweichung 157  $\mu$ g/kg. Bei Durchführung einer Sechsfachbestimmung und p = 0.05 beträgt der Vertrauensbereich des Mittelwertes  $\pm 133 \ \mu$ g/kg. Damit ist ab einem ermittelten *Summengehalt von 1133 \mug/kg* der Grenzwert signifikant überschritten.

# 10.5 Die analytische Erfassung von BFDGE und seinen Derivaten

# 10.5.1 Synthese von BFDHPE

2.0 g (10 mmol) Bisphenol F, gelöst in 50 mL 1-Propanol, werden mit 1.85 mL (22 mmol) 3-Chlor-1-propanol versetzt. 900 mg NaOH (22.5 mmol), gelöst in 5 mL Wasser, werden über 30 Minuten langsam unter Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 4 Tage bei 80 °C am Rückflußkühler gerührt. Die Reaktion wird mittels HPLC verfolgt. Bei einer Ausbeute über 95 % Produkt wird die Reaktion gestoppt.

Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch dreimal mit 25 mL Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 25 mL Wasser gewaschen. Anschliessend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel verdampft.

Die Reinigung des Produktes erfolgt mittels präparativer HPLC. Hierzu wird der Rückstand Rohproduktes in 80 mL der mobilen Phase (Acetonitril / Methanol / Wasser (25/25/50, v/v/v)) gelöst. Aus jeweils 10 mL Lösung wird die Produktfraktion nach isokratischer Elution bei Raumtemperatur und einer Flußrate von 39 mL/min in einem 250 mL-Rundkolben aufgenommen. Der organische Anteil des Eluenten wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die Isolierung des Produkts erfolgt mittels Gefriertrocknung über Nacht.

# Ausbeute2.00 g = 63.3 % (bezogen auf BPA), weißes PulverSmp.92 °C

# Elementaranalyse

C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> (M=316.39 g/mol)

Element	С	Н
Soll berechnet [%]	72.13	7.65
Ist [%]	71.51	7.60

<sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 157.1$  (C-4), 134.0 (C-7), 129.8 (C-6), 114.5 (C-5), 65.9 (C-3), 60.7 (C-1), 40.1 (C-8), 32.0 (C-2) ppm.

<sup>1</sup>**H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.07$  (H-d, d, 4H), 6.82 (H-e, d, 4H), 4.09 (H-c, t, 4H), 3.85 (H-a, H-f, m, 6H), 2.03 (H-b, m, 4H) ppm.





Kopplungskonstanten  $J_{b,a} = 5.1, J_{b,c}$ 

 $J_{b,a}$ = 5.1,  $J_{b,c}$ = 6.0,  $J_{d,e}$ = 8.4 Hz.

ESI-MS (100 V, positiv) 339 (20, M+Na<sup>+</sup>), 317 (7, M+1), 165 (100), 107 (22).

**IR** (KBr) 510 (w), 604 (w), 785 (w), 810 (m), 946 (m), 990 (m), 1060 (s), 1108 (w), 1176 (w), 1252 (s), 1392 (w), 1474 (m), 1513 (s), 1613 (m), 2292 (w), 2934 (s), 3311(s) cm<sup>-1</sup>.

UV (Acetonitril/Wasser) 230.0 nm , 275.0 nm (max)

**Reinheit (HPLC)** > 99%

### **Reaktionsverfolgung HPLC**:



Mobile Phase	Acetonitril / Methanol / Wasser (25/25/50, v/v/v)
Flußrate	0.8 mL/min
R <sub>t</sub> BPF	7.1 min
R <sub>t</sub> Monoether	11.1 min
Rt Interner Standard	16.1 min
R <sub>t</sub> Monoether R <sub>t</sub> Interner Standard	11.1 min 16.1 min

Abb. 66 Synthesemonitoring BFDHPE

## 10.5.2 Validierung des Verfahrens

#### Grundkalibrierung

Die Validierung des Verfahrens erfolgte unter Verwendung einer Stammlösung mit allen BPA-basierten Referenzsubstanzen sowie dem IS BFDHPE ( $\beta = 0.5$  g/L) und allen BPFbasierten Referenzsubstanzen ( $\beta = 1$  g/L) in Acetonitril.

Die Stammlösung wurde zunächst mit Acetonitril 1:500 verdünnt. Dies entspricht einer Massenkonzentration von  $\beta = 1$  mg/L an allen BADGE-Derivaten einschließlich des IS. Für die BFDGE-Derivate ergibt sich eine Massenkonzentration von  $\beta = 2$  mg/L. Die Herstellung der Kalibrierstandards erfolgte durch weitere Verdünnung auf 50 (100), 100 (200), 200 (400), 400 (800), 600 (1200) und 800 (1600) µg/L BADGE-Derivate und interner Standard (BFDGE-Derivate) mit Acetonitril / Wasser (50/50, v/v).

Die Grundkalibrierung erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Beispielhaft ist die vollständige Auswertung für BFDGE dargestellt (Tab. 37 und 38); für die restlichen BFDGE-Derivate sind die Verfahrenskenndaten in Tab. 38 zusammengefaßt. Die BADGE-Derivate werden nicht erneut aufgeführt; ihre Kenndaten unterscheiden sich nicht von den in 10.4.6 (Tab. 29) angegebenen Werten.

BFDGE [µg/L]	Meßwert [mV∙min]	Mittelwert [mV∙min]	Regressionsgerade y = bx + a	Residuen yi - y(xi)
110.3	/		*	/
110.3	14.37	14.5	15.89	-1.52
110.3	14.53			-1.36
220.5	32.64			0.52
220.5	31.87	32.2	32.12	-0.25
220.5	32.07			-0.05
441.0	64.56			-0.01
441.0	64.70	64.4	64.58	0.12
441.0	63.90			-0.63
882.0	132.39			2.90
882.0	130.27	131.0	129.49	0.78
882.0	130.45			0.96
1323.0	194.39			-0.02
1323.0	194.63	195.2	194.41	0.22
1323.0	196.68			2.27
1764.0	261.25			1.93
1764.0	255.69	258.1	259.32	-3.63
1764.0	257.23			-2.09

Tab. 37 Ergebnisse der Grundkalibrierung BFDGE

Tab. 38 Verfahrenskenndaten der Grundkalibrierung

	BFDGE·2H <sub>2</sub> O	BPF	IS	BFDGE	BFDGE·2HCl
Achsenabschnitt [mV·min]	2.047	1.320	0.243	-0.340	3.256
Steigung [(mV·min)/(µg/L)]	0.076	0.067	0.110	0.147	0.105
Korrelationskoeffizient	0.9996	0.9996	0.9998	0.9998	0.9995
abweichung [mV·min]	1.157	0.960	0.592	1.658	1.570
Verfahrensstandard- abweichung [µg/L]	15.33	14.29	5.37	11.26	14.97
Verfahrensvariations- koeffizient [%]	1.97	2.15	1.41	1.40	2.34
NG (DIN 32645) [µg/L]	40.46	37.71	14.17	29.70	17.61
Fluoreszenzresponse [10 <sup>6</sup> mV·min/M]	28.5	14.8	34.8	45.5	43.6

## 10.5.3 Photometrische Eigenschaften der BFDGE-Isomere

## Charakterisierung nach präparativer Trennung

Nach der präparativen Trennung wurde die Elutionsreihenfolge der Isomere der BFDGE-Derivate über die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der isolierten Reinsubstanzen ermittelt. Hierbei wurde neben der Betrachtung der aromatischen Protonen (s. 5.4.3) auch die Tatsache genutzt, dass bei symmetrischen Molekülen (hier: o,o- und p,p-Isomere) auch die aliphatischen Protonen equivalent sind, bei unsymmetrischen Molekülen (o,p-Isomere) hingegen nicht. Tab. 39 gibt die chemische Verschiebung der Protonen für alle Derivate und Isomere wieder.

Bezeichnung	Strukturformel	<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz)
p,p-BFDGE	a b c d e f	$\begin{array}{l} (\text{CDCl}_3) \ \delta = \ 7.08 \ (\text{H-d}, \ d, \ 4\text{H}), \ 6.84 \ (\text{H-e}, \ d, \\ 4\text{H}), \ 4.18 \ (\text{H-c}', \ dd, \ 2\text{H}), \ 3.98 \ (\text{H-c}, \ dd, \ 2\text{H}), \\ 3.34 \ (\text{H-b}, \ m, \ 2\text{H}), \ 2.89 \ (\text{H-a}', \ dd, \ 2\text{H}), \ 2.74 \\ (\text{H-a}, \ dd, \ 2\text{H}) \ 3.86 \ (\text{H-f}, \ s, \ 2\text{H}) \ \text{ppm.} \end{array}$
p,o-BFDGE	$a \begin{array}{c} c \\ b \\ c \\ c \\ d \\ d$	(CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ = 7.17 (H-i, t, 1H), 7.14 (H-d, d, 2H), 7.08 (H-k, d, 1H), 6.90 (H-h, t, 1H), 6.83 (H-e/H-g, d, 3H), 3.93 (H-f, s, 2H) ppm.*
o,o-BFDGE	a b c f c b c h c h c h c h c h c h c h c h c h c	(CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ = 7.16 (H-e, t, 2H), 7.10 (H-d, d, 2H), 6.88 (H-f, t, 2H), 6.84 (H-g, d, 2H) 4.19 (H-c', dd, 2H), 3.99 (H-c, m, 2H), 3.32 (H-b, m, 2H), 2.85 (H-a', dd, 2H), 2.70 (H-a, dd, 2H), 4.02 (H-h, s, 2H)
p,p-BFDGE·2HCl	$c_{\text{OH}} \xrightarrow{a \ b \ c} \xrightarrow{c} \xrightarrow{d \ e} \xrightarrow{c} O \ O \ O \ O \ O \ O \ O \ O \ O \ O \$	(CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ = 7.08 (H-d, d, 4H), 6.83 (H-e, d, 4H), 4.19 (H-b, t, 2H), 4.05 (H-a, dd, 4H), 3.77 (H-c, dd, 2H), 3.70 (H-c', dd, 2H), 3.86 (H-f, s, 2H) ppm.
p,o-BFDGE·2HCl	$\begin{array}{c} \begin{array}{c} 1 \\ m \\ n \\ c \\ c \\ 0 \\ H \end{array} \\ 0 \\ d \\ d \\ d \\ d \\ d \\ h \end{array} \\ \begin{pmatrix} 1 \\ m \\ n \\ c \\ d \\ h \\ c \\ h \\ d \\ h \\ h$	(CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ = 7.22 (H-i, m, 1H), 7.15 (H-k, d, 1H), 7.07 (H-d, d, 2H), 6.94 (H-h, t, 1H), 6.83 (H-g/H-c, m, 3H), 4.18 (H-b, t, 1H), 4.04 (H-m/H-n/H-a, m, 5H), 3.91 (H-f, s, 2H) ppm.*
o,o-BFDGE·2HCl	$\begin{array}{c} a & b \\ c \\ \downarrow \\ OH \\ d \\ e \\ f \\ \end{array} \begin{array}{c} 0 \\ H \\ OH \\ OH \\ OH \\ OH \\ OH \\ OH \\ O$	(CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ = 7.21 (H-e, t, 2H), 7.09 (H-d, d, 2H), 6.93 (H-f, t, 2H), 6.86 (H-g, d, 2H), 4.11 (H-b, t, 2H), 4.06 (H-a, m, 4H), 3.97 (H-h, s, 2H), 3.56 (H-c, d, 4H) ppm.
p,p-BFDGE∙2H₂O	HO OH OH OH	(Aceton-d <sub>6</sub> ) δ = 7.11 (H-d, d, 4H), 6.85 (H-e, d, 4H), 3.86 (H-f, s, 2H), ppm.*
o,p-BFDGE·2H <sub>2</sub> O	$\begin{array}{c} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ HO & & & \\ HO & & & \\ & & & \\ OH & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ \end{array} \begin{array}{c} & & & \\ & $	(Aceton-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 7.16 (H-d/H-c, m 3H), 7.10 (H-k, d, 1H), 6.95 (H-g, d, 1H), 6.84 (H-e/H-h, m, 3H) 3.90 (H-f, s, 2H) ppm.*
0,0-BFDGE·2H <sub>2</sub> O	HO HO OH d d d f d d d d d d d d d d	(Aceton-d <sub>6</sub> ) $\delta$ = 7.15 (H-e, t, 2H), 7.09 (H-d, d, 2H), 6.95 (H-g, d, 2H), 6.83 (H-f, t, 2H) 4.06 (H-c', t, 2H), 4.00 (H-h, s, 2H) 3.99, (H-c, m, 2H), 3.63 (H-a, m, 4H), 2.85 (H-b, m, 2H) ppm.

Tab. 39 Chemische Verschiebung der Protonen der isomerenreinen BFDGE-Derivate

\* Eine Zuordnung der aliphatischen Protonen der Seitenkette erfolgte nicht.

# 10.5.4 Matrixkalibrierung

Die Matrixkalibrierungen erfolgten an dotierten Lebensmittelproben, die ursprünglich keine Derivate von BADGE oder BFDGE enthielten.

# Mais als kohlenhydratreiches Lebensmittel

Aus der Stammlösung ( $\beta = 0.5$  g/L für BPF-basierte Standards,  $\beta = 1$  g/L für BPA-basierte Standards und den IS) wurden fünf Ölstandards hergestellt. Hierfür wurden 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 und 0.24 mL der Stammlösung in 10 g Olivenöl über Nacht gelöst. Jeweils 47.5 g Mais-Homogenat wurden mit 2.5 g Öl versetzt und erneut homogenisiert. Hieraus resultieren die Konzentrationen 200, 300, 400, 500 und 600 µg/kg Homogenat für die BADGE-Derivate einschließlich des IS und 400, 600, 800, und 1200 µg/kg Homogenat für die BFDGE-Derivate. Für jeden Kalibrierlevel wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Aufarbeitung folgte dem Schema der optimierten Probenvorbereitung (s. 4.7) in einer Dreifachbestimmung. Die Auswertung erfolgte anhand der linearen Regression und dem Residuenplot der Matrixka-librierung. Beispielhaft ist die vollständige Auswertung für BFDGE dargestellt (Tab. 40 und 41); für die anderen Substanzen sind die Verfahrenskenndaten in Tab. 41 und 42 zusammengefaßt.

BFDGE [μg/kg]	Meßwert [mV∙min]	Mittelwert [mV∙min]	Regressionsgerade y = bx + a	Residuen yi - y(xi)
441.0	20.369		•	-2.279
441.0	19.447	20.71	22.648	-3.201
441.0	22.321			-0.327
661.5	30.235			-0.704
661.5	30.125	31.33	30.939	-0.814
661.5	33.620			2.681
882.0	43.768			4.538
882.0	43.956	42.78	39.230	4.726
882.0	40.602			1.372
1102.5	47.569			0.048
1102.5	45.992	47.15	47.521	-1.529
1102.5	47.896			0.375
1323.0	55.434			-0.377
1323.0	55.301	54.28	55.811	-0.510
1323.0	52.097			-3.714

Tab. 40 Ergebnisse der Matrixkalibrierung BFDGE in Mais

	BFDGE·2H <sub>2</sub> O	BPF	IS	BFDGE	BFDGE·2HCl
Achsenabschnitt [mV·min]	5.664	3.764	2.569	6.067	4.454
Steigung [(mV∙min)/(µg/kg)]	0.011	0.019	0.033	0.037	0.030
Korrelationskoeffizient	0.9861	0.9915	0.9914	0.9800	0.9888
Reststandard- abweichung [mV·min]	0.595	0.660	0.665	2.563	1.157
Verfahrensstandard- abweichung [µg/kg]	52.68	35.28	20.26	68.16	38.83
Verfahrensvariations- koeffizient [%]	6.37	4.99	5.02	7.70	5.72
NG (DIN 32645) [μg/kg]	139.1	93.2	53.5	180.0	102.5
mittlere Wiederfindung [%]	43.6	81.4	87.0	74.6	82.8
mittlere korrigierte Wiederfindung [%]	50.1	93.6		85.7	95.2
NG (S/N>3) [µg/kg]	p,p/o,p 105.0 o,o 54.3	29.2	43.2	p,p 30.9 o,p 32.5 o,o 32.8	p,p 42.6 o,p 53.4 o,o 71.6

Tab. 41 Verfahrenskenndaten der Matrixkalibrierung BPF-basierte Analyte in Mais

Tab. 42 Verfahrenskenndaten der Matrixkalibrierung BPA-basierte Analyte in Mais

	BADGE· 2H <sub>2</sub> O	BPA	IS	BADGE· H <sub>2</sub> O	BADGE· HCl·H <sub>2</sub> O	BADGE	BADGE· HCl	BADGE· 2HCl
Achsenabschnitt [mV·min]	1.506	2.074	2.569	1.654	2.831	1.757	0.731	0.522
Steigung [(mV·min)/(μg/kg)]	0.025	0.023	0.033	0.027	0.024	0.030	0.025	0.024
Korrelationskoeffizient	0.9681	0.9857	0.9914	0.9928	0.9796	0.9701	0.9751	0.9723
Reststandard- abweichung [mV·min]	1.108	0.530	0.665	0.474	0.746	1.063	0.942	0.918
Verfahrensstandard- abweichung [µg/kg]	43.80	23.58	20.26	17.47	30.70	35.08	38.47	38.58
Verfahrensvariations- koeffizient [%]	9.80	6.49	5.02	4.57	7.78	9.51	8.64	9.10
NG (DIN 32645) [μg/kg]	115.6	62.26	53.5	46.13	81.05	92.60	101.55	101.86
mittlere Wiederfindung [%]	84.5	82.2	87.0	84.9	81.5	78.9	73.8	85.3
mittlere korrigierte Wiederfindung [%]	97.1	94.5		97.6	93.7	90.7	84.8	98.0
NG (S/N > 3) $[\mu g/kg]$	32.1	64.3	43.2	57.3	49.2	54.3	51.6	59.4

#### Thunfisch als proteinreiches Lebensmittel

Aus der Stammlösung ( $\beta =1$  g/L für BPF-basierte Standards,  $\beta = 2$  g/L für BPA-basierte Standards und den IS) wurden vier Ölstandards hergestellt. Hierfür wurden 0.04, 0.2, 0.4 und 0.8 mL der Stammlösung in 10 g Olivenöl über Nacht gelöst. Jeweils 47.5 g Thunfisch-Homogenat wurden mit 2.5 g Öl versetzt und erneut homogenisiert. Hieraus resultieren die Konzentrationen 200, 1000, 2000 und 4000 µg/kg Homogenat für die BADGE-Derivate einschließlich des IS und 400, 2000, 4000, und 8000 µg/kg Homogenat für die BFDGE-Derivate.

Die Aufarbeitung folgte dem Schema der optimierten Probenvorbereitung (s. 4.7). Die Auswertung erfolgte anhand der linearen Regression und dem Residuenplot der Matrixkalibrierung. Beispielhaft ist die vollständige Auswertung für BFDGE dargestellt (Tab. 43 und 44); für die anderen Substanzen sind die Verfahrenskenndaten in Tab. 44 und 45 zusammengefaßt. Es ist zu beachten, daß für die Matrixkalibrierung im Gegensatz zu allen übrigen Kalibrierungen das HPLC-System der Fa. Agilent (10.1.1) eingesetzt wurde und daraus abweichende Kenndaten für die Kalibrierfunktion resultieren.

BFDGE [ug/kg]	Meßwert [mV∙min]	Regressionsgerade y = bx + a	Residuen vi - v(xi)
400.0	48.82	42.58	<u>5.84</u>
2000.0	255.26	254.42	0.83
4000.0	506.13	519.22	-13.09
8000.0	1054.88	1048.82	6.06

 Tab. 43 Ergebnisse der Matrixkalibrierung BFDGE in Thunfisch

<b>1 ub. 11</b> vertainenskeinidaden der Madrikkanorierung bit i Gasierte Anaryte in Thannsen	Tab. 44	Verfahrenskenndaten	der Matrixkalibrierung	g BPF-basierte	Analyte in	Thunfisch
---	---------	---------------------	------------------------	----------------	------------	-----------

BFDGE·2H <sub>2</sub> O	IS	BFDGE	BFDGE·2HCl
-3.03	2.89	-10.38	-4.16
0.1288	0.1398	0.1324	0.1264
0.9997	0.9999	0.9998	0.9999
11.75	2 1 8	11 12	8 36
11.75	5.18	11.15	0.50
01 10	77 77	84.05	66 16
91.19	22.11	04.05	00.10
2 53	1 27	2 33	1 84
2.55	1.27	2.55	1.04
75.6	82.9	75.1	72.8
91.1		90.6	87.8
91.1		90.0	07.0
p,p/o,p 22.5	36.0	p,p 32.1	p,p 40.9
0,0 42.9		o,p 36.0	o,p 48.6
		0,0 39.1	0,0 69.2
	BFDGE-2H <sub>2</sub> O -3.03 0.1288 0.9997 11.75 91.19 2.53 75.6 91.1 p,p/o,p 22.5 o,o 42.9	BFDGE-2H2O         IS           -3.03         2.89           0.1288         0.1398           0.9997         0.9999           11.75         3.18           91.19         22.77           2.53         1.27           75.6         82.9           91.1            p,p/o,p 22.5         36.0           o,o 42.9         36.0	BFDGE-2H <sub>2</sub> O         IS         BFDGE           -3.03         2.89         -10.38           0.1288         0.1398         0.1324           0.9997         0.9999         0.9998           11.75         3.18         11.13           91.19         22.77         84.05           2.53         1.27         2.33           75.6         82.9         75.1           91.1          90.6           p,p/o,p 22.5         36.0         p,p 32.1           o,o 42.9          o,p 36.0

	BADGE· 2H <sub>2</sub> O	IS	BADGE· H <sub>2</sub> O	BADGE· HCl·H <sub>2</sub> O	BADGE	BADGE• HCl	BADGE• 2HCl
Achsenabschnitt [mV·min]	16.22	2.89	3.65	1.73	-2.20	-2.91	-4.46
Steigung [(mV·min)/(µg/kg)]	0.1440	0.1398	0.1353	0.1377	0.1314	0.1328	0.1338
Korrelationskoeffizient	0.99999	0.9999	0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999	>0.9999
Reststandardabweichung [mV·min]	3.94	3.18	2.90	1.63	0.28	1.59	2.38
Verfahrensstandardabwei- chung [µg/kg]	27.40	22.77	21.44	11.80	2.13	11.95	17.75
Verfahrensvariations- koeffizient [%]	1.17	1.27	1.19	0.66	0.12	0.66	0.99
mittlere Wiederfindung [%]	89.7	82.9	80.5	80.9	75.9	76.4	76.5
mittlere korrigierte Wiederfin- dung [%]	108.1		97.1	97.5	91.6	92.1	92.2
NG $(S/N > 3)$ [µg/kg]	20.0	36.0	46.2	51.4	51.4	60.0	60.0

Tab. 45 Verfahrenskenndaten der Matrixkalibrierung BPA-basierte Analyte in Thunfisch

## 10.6 Reaktionen von BADGE mit Lebensmittelbestandteilen in vitro

#### 10.6.1 Aufarbeitung und Chromatographie

Für die Dotierungen der Lebensmittel zur Untersuchung der Reaktionen von BADGE wurden Lösungen von BADGE und BADHPE in Dioxan verwendet. Zur Abdeckung eines hohen Konzentrationsbereiches wurden Massenkonzentrationen von  $\beta = 40 \ \mu g/mL$ , 400  $\mu g/mL$ , 4 mg/mL sowie 20 mg/mL eingesetzt.

Die wegen ihrer unterschiedlichen Majorkomponenten ausgewählten Lebensmittel wurden homogenisiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an BADGE und internem Standard dotiert. Hierzu wurden 10 g Lebensmittel mit 250  $\mu$ L der Dotierstandards versetzt und erneut homogenisiert. Es ergaben sich die Konzentrationsstufen  $\beta = 1, 10, 100$  und 500 mg/kg.

Zur Erfassung einer großen Bandbreite der Polarität entstehender Reaktionsprodukte wurde der für die BFDGE-Analytik im polaren Bereich optimierte Gradient (s. 5.3.2 Tab. 8) auch für unpolare Produkte erweitert:

Zeit [min]	5mM NH₄form, pH 3 [%]	Acetonitril / Methanol (1/2, v/v) [%]
0	45	55
50	16	84
51	10	90
60	10	90
65	45	55
70	45	55

Tab. 46 Modifizierter Elutionsgradient zum Nachweis von BADGE-Lebensmittel-Addukten

Die zur Quantifizierung von BADGE und seinen Hydrolyse- und Hydrochlorierungsprodukten erstellte Grundkalibrierung entsprach der in 10.4.6 (Tab. 29) beschriebenen. 10.6.2 Reaktionen in ausgewählten Lebensmitteln

Die Wiederfindung von BADGE und seinen identifizierbaren Derivaten wurde nach drei unterschiedlichen Behandlungen ermittelt:

- sofort nach Dotierung (Kontrollwert zur Ermittlung der Aufarbeitungsverluste)
- nach Inkubation von einem Tag bei Raumtemperatur
- nach Sterilisation bei 120 °C für 30 Minuten

Der interne Standard zeigte keine Reaktion mit Lebensmittelbestandteilen.

Dotier-	Rohandlung	Tomporatur	Wiederfindung	bezogen auf die	Korrigierte
konzentration	Denanulung	remperatur	dotierte M	enge [%]	Wiederfindung [%]
			BADGE	IS	BADGE
1 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	75	77	98
10 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	77	79	97
100 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	73	76	96
500 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	81	85	95
1 mg/kg	1 Tag	25 °C	74	77	97
10 mg/kg	1 Tag	25 °C	63	67	93
100 mg/kg	1 Tag	25 °C	67	69	97
500 mg/kg	1 Tag	25 °C	61	64	96
1 mg/kg	30 Minuten	120 °C	74	83	89
10 mg/kg	30 Minuten	120 °C	75	81	93
100 mg/kg	30 Minuten	120 °C	92	101	90
500 mg/kg	30 Minuten	120 °C	86	93	92

Tab. 47 Daten der Aufarbeitung von Sonnenblumenöl nach jeweiliger Einzelbestimmung

Dotier-	Behandlung	Temneratur	Wiederfii dot	ndung bezoge ierte Menge [	en auf die [%]	Korri Wiederfir	gierte Idung [%]
konzentration	n series in personal		BADGE	BADGE· 2H <sub>2</sub> O	IS	BADGE	BADGE· 2H <sub>2</sub> O
1 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	95		97	99	
10 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	90		91	99	
100 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	89		93	95	
500 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	92		94	98	
1 mg/kg	1 Tag	25 °C	58		88	65	
10 mg/kg	1 Tag	25 °C	59		88	67	
100 mg/kg	1 Tag	25 °C	65		79	82	
500 mg/kg	1 Tag	25 °C	93		96	97	
1 mg/kg	30 Minuten	120 °C	2	70	104	2	67
10 mg/kg	30 Minuten	120 °C	1	72	100	1	72
100 mg/kg	30 Minuten	120 °C	1	50	73	1	69
500 mg/kg	30 Minuten	120 °C	2	53	74	3	72

Tab. 48 Daten der Aufarbeitung von Pfirsich nach jeweiliger Einzelbestimmung

Tab. 49 Daten der Aufarbeitung von Thunfisch in Öl nach jeweiliger Einzelbestimmung

Dotier- konzentration	Behandlung	Temperatur	Wiederfindung bezogen auf die dotierte Menge [%]		Korrigierte Wiederfindung [%]
			BADGE	IS	BADGE
1 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	87	96	91
10 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	85	83	103
100 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	87	85	102
500 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	86	82	104
1 mg/kg	1 Tag	25 °C	68	98	70
10 mg/kg	1 Tag	25 °C	66	78	84
100 mg/kg	1 Tag	25 °C	71	79	90
500 mg/kg	1 Tag	25 °C	70	74	93
1 mg/kg	30 Minuten	120 °C	13	82	16
10 mg/kg	30 Minuten	120 °C	9	58	15
100 mg/kg	30 Minuten	120 °C	20	81	25
500 mg/kg	30 Minuten	120 °C	20	81	25

Dotier- konzentration	Behandlung	Temperatur	Wiederfindung b dotierte M	Korrigierte Wiederfindung [%]	
			BADGE	IS	BADGE
1 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	76	87	88
10 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	77	86	90
100 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	83	89	93
500 mg/kg	Kontrolle, sofort	25 °C	88	90	98
1 mg/kg	1 Tag	25 °C	14	92	16
10 mg/kg	1 Tag	25 °C	13	92	15
100 mg/kg	1 Tag	25 °C	15	90	17
500 mg/kg	1 Tag	25 °C	20	95	21
1 mg/kg	30 Minuten	120 °C	3	121	3
10 mg/kg	30 Minuten	120 °C	1	100	1
100 mg/kg	30 Minuten	120 °C	1	98	1
500 mg/kg	30 Minuten	120 °C	1	77	1

Tab. 50 Daten der Aufarbeitung von Thunfisch in eigenem Saft nach jeweiliger Einzelbestimmung

10.6.3 Reaktionen in Modellösungen von Proteinen und Kohlenhydraten

Für die Ermittlung der reagierenden Majorkomponente wurden BSA ( $\beta = 1$  g/L in Wasser) sowie Glucose ( $\beta = 100$  g/L in Wasser, gepuffert mit 1 g/L Citronensäure) verwendet. 90 mL der Lösungen wurden mit 10 mL Standardlösung ( $\beta = 10$  mg/L BADGE und IS) versetzt. Die Wiederfindung von BADGE und seinen identifizierbaren Derivaten wurde nach drei unterschiedlichen Behandlungen ermittelt:

- sofort nach Dotierung (Kontrollwert zur Ermittlung der Aufarbeitungsverluste)
- nach Inkubation von einem Tag bei Raumtemperatur
- nach Sterilisation bei 120 °C für 30 Minuten

		BADGE	BADGE·2·H <sub>2</sub> O	IS	umgesetzter BADGE
		[%]	[%]	[%]	[%]
Glucoselösung	Kontrolle	89		102	
	1 Tag Raumtemperatur	83		104	
	30 min, 120 °C	1	102	99	
BSA-Lösung	Kontrolle	54		96	56
	1 Tag Raumtemperatur			98	100
	30 min, 120 °C		31	104	69

Tab. 51 Daten der Wiederfindung von BADGE und dem IS in den Modellansätzen

#### 10.6.4 Die Reaktion von BADGE·H2O mit Lebensmittelproteinen

#### Isolierung der Proteine

#### Eiklarprotein

Es wurden aus dem Handel bezogene Hühnereier verwendet.

100 g abgetrenntes Eiklar wurden in einen 250 mL-Rundkolben überführt. Nach Lagerung bei –80 °C über Nacht wurde der Inhalt lyophilisiert und bei –20 °C gelagert.

Ausbeute: 77.8 % der erwarteten Proteinmenge

#### Eigelbprotein (modifiziert nach BERNHISEL-BROADBENT, 1989)

Das zurückbleibende Eigelb (60 g) wurde in einem 250 mL-Iodzahlkolben mit 100 mL Aceton versetzt und 15 Minuten intensiv gerührt. Nach 30 Minuten Sedimentation wurde die überstehende Lösung abdekantiert und der Rückstand mit 100 mL Diethylether versetzt. Nach erneutem Rühren und Sedimentation wurde der Diethylether abdekantiert und verworfen. Dieser Vorgang wurde 4 mal mit je 50 mL Aceton und Diethylether wiederholt.

Der entfettete Rückstand wurde über einen Büchnertrichter filtriert. Der Filterkuchen wurde mit 100 mL Wasser auf einem Magnetrührer durchmischt. Nach 30 Minuten wurde erneut über einen Büchnertrichter filtriert, der Rückstand mit 50 mL Wasser gewaschen und in einen 250 mL-Rundkolben überführt. Nach Lagerung bei –80 °C über Nacht wurde der Inhalt lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bei –20 °C gelagert.

Ausbeute: 25.8 % der erwarteten Proteinmenge.

#### Milchprotein

100 g Magermilchpulver wurden in einen 250 mL-Iodzahlkolben eingewogen und mit 100 mL Aceton / Wasser (50/50, v/v) versetzt. Nach 30 Minuten Rühren wurde abdekantiert, der Rückstand mit 50 mL Aceton / Wasser versetzt, durchmischt und abdekantiert. Dieser Vorgang wurde 6 mal wiederholt. Die Trocknung sowie Lagerung des Rückstandes erfolgte wie bei den Eiproteinen beschrieben.

Ausbeute: 100 %

In 10 g Lyophilisat war keine Lactose nachweisbar.

#### Thunfischprotein (modifiziert nach BERNHISEL-BROADBENT, 1989)

Der Inhalt einer aus dem Handel bezogenen Konserve (Thunfisch in eigenem Saft), in der kein BADGE nachweisbar war, wurde homogenisiert. 100 g Homogenat wurden analog zum Eigelbprotein aufgearbeitet und gelagert.

Ausbeute: 121 % des mittleren Proteingehaltes in Thunfisch. Dieser Wert wird auf die natürliche Schwankungsbreite des Proteins im Thunfisch zurückgeführt.

# Weizenalbumin

100 g aus dem Handel bezogenes Weizenmehl (Typ 405) wurden analog zu Eigelbprotein entfettet und zum Abtrennen der wasserlöslichen Albuminfraktion 3 mal in 100 mL Wasser suspendiert, je 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand über einen Büchnerfilter filtriert. Das Filtrat wurde in einen 250 mL-Rundkolben überführt, über Nacht bei –80 °C eingefroren und lyophilisiert. Die Lagerung des Weizenalbumins erfolgte bei –20 °C.

# Herstellung der Proteinlösungen

# BSA, Hämoglobin, Eiklarprotein, Weizenalbumin

Je 250 mg der Proteinisolate wurden in einen 50 mL-Meßkolben eingewogen und mit Wasser aufgefüllt.

# Eigelbprotein, Casein, Milchprotein, Thunfischprotein

Je 250 mg der Proteinisolate wurden in ein 100 mL-Becherglas eingewogen und in 25 mL Wasser suspendiert. Nach der Zugabe von 8 mL Natronlauge (0.1 mol/L) wurde die Suspension 10 Minuten gerührt und mit 20 %iger Phosphorsäure tropfenweise auf pH 7.4 eingestellt. Beim Einstellen des pH-Wertes fiel ein Teil des zuvor in Lösung gegangenen Proteins wieder aus (Thunfischprotein, Eigelbprotein). Die Suspensionen wurden unfiltriert für die Untersuchungen eingesetzt.

# Herstellung und Aufarbeitung der Reaktionsansätze

Je 45 mL der Proteinlösungen und –suspensionen wurden in einer 100 mL-Braunglasflasche mit 5 mL Dotierlösung ( $\beta = 100$  mg/L BADGE·H<sub>2</sub>O und IS in Dioxan) versetzt, fest verschlossen und bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Die Reaktionslösungen enthielten 225 mg Protein sowie je 0.5 mg BADGE·H<sub>2</sub>O und IS (450facher Überschuß an Protein). Alle Versuche wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Nach 24 Stunden sowie 7 Tagen (BSA: 24 Stunden, 5 Tage) wurden je 5 mL der Reaktionsansätze mit 15 g Kieselgur in einem Mörser verrieben, in eine Chromatographiesäule überführt und mit 150 mL Diethylether eluiert. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer (40 °C / 700 mbar) zur Trockne eingeengt und der Rückstand mit 0.5 mL Acetonitril und 4.5 mL Wasser aufgenommen. Die erhaltenen Lösungen wurden 1:10 mit Wasser verdünnt und mittels HPLC-FLD (s. 4.5 Tab. 3, chromatographische Bedingungen Tab. 46) vermessen. Als externe Standardlösung wurde die Dotierlösung (s.o.) mit Wasser 1:100 verdünnt.

BSA	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O	Σ	Δ	Ø
Ansatz I	41.06	2.69	43.75	56.25	58 71
Ansatz II	35.92	2.86	38.78	61.22	38.74
Hämoglobin					
Ansatz I	48.81	37.08	85.89	14.11	15.06
Ansatz II	46.32	35.88	82.20	17.80	13.90
Thunfisch					
Ansatz I	79.81	4.7	84.51	15.49	16 50
Ansatz II	78.26	4.06	82.32	17.68	10.39
Weizen					
Ansatz I	70.80	27.76	98.56	1.44	1.01
Ansatz II	71.38	27.88	99.26	0.74	1.91
Eiklar					
Ansatz I	88.55	7.03	95.58	4.42	5 71
Ansatz II	84.46	6.48	92.94	7.06	5.74
Eigelb					
Ansatz I	88.19	4.97	93.16	6.84	5.66
Ansatz II	88.65	6.88	95.53	4.47	5.00
Casein					
Ansatz I	89.97	6.19	96.16	3.84	4.00
Ansatz II	89.54	6.31	95.85	4.15	4.00
Magermilch					
Ansatz I	86.45	6.55	93.00	7.00	6.80
Ansatz II	86.83	6.39	93.22	6.78	0.09

Tab. 52 Ergebnisse der Messung nach 24 Stunden Reaktionszeit [%]

 $\Sigma$  [%]: Summe des Anteils an BADGE·H<sub>2</sub>O und BADGE·2H<sub>2</sub>O

 $\Delta$  [%]: 100 % -  $\Sigma$  [%] = Anteil des verschwundenen BADGE·H<sub>2</sub>O

BSA 5 Tage	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O	Σ	Δ	Ø
Ansatz I	2.33	3.54	5.87	94.13	04.19
Ansatz II	2.33	3.45	5.78	94.22	94.18
Hämoglobin					
Ansatz I	5.19	68.17	73.90	26.10	27.12
Ansatz II	4.47	67.38	71.85	28.15	27.13
Thunfisch					
Ansatz I	22.85	12.18	35.05	64.97	64.94
Ansatz II	23.84	11.44	35.28	64.72	04.84
Weizen					
Ansatz I	29.64	66.97	96.61	3.39	2 72
Ansatz II	28.91	67.02	95.93	4.07	3./3
Eiklar					
Ansatz I	61.11	22.07	83.18	16.82	16.21
Ansatz II	62.50	21.71	84.21	15.79	16.31
Eigelb					
Ansatz I	55.35	13.40	68.75	31.25	20.28
Ansatz II	56.57	14.12	70.69	29.31	30.28
Casein					
Ansatz I	54.30	17.76	72.06	27.94	27.70
Ansatz II	52.99	19.37	72.36	27.64	21.19
Magermilch					
Ansatz I	50.70	19.04	69.74	30.26	20.00
Ansatz II	49 90	19 17	69.07	30.93	30.60

Tab. 53 Ergebnisse der Messung nach 7 Tagen Reaktionszeit [%]

 $\Sigma$  [%]: Summe des Anteils an BADGE·H<sub>2</sub>O und BADGE·2H<sub>2</sub>O

 $\Delta$  [%]: 100 % -  $\Sigma$  [%] = Anteil des verschwundenen BADGE·H<sub>2</sub>O

# 10.6.5 Nachweis von BADGE-Protein-Addukten

# Esterhydrolyse nach BANDURSKI et al. (1977)

Zum Nachweis von BADGE-Protein-Addukten wurden 9 mL einer wäßrigen BSA-Lösung  $(\beta = 1 \text{ g/L})$  mit 1 mL Standardlösung  $(\beta = 10 \text{ mg/L bzw. 50 mg/L BADGE}$  sowie IS in Dioxan) dotiert und einen Tag bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden nach der Inkubation, aber vor der Hydrolyse mittels HPLC-FLD vermessen, um die Vollständigkeit der Umsetzung von BADGE sowie die Entstehung bereits bekannter Derivate zu überprüfen. Die Untersuchungen erfolgten in Dreifachbestimmung.

Zur alkalischen Hydrolyse wurden die inkubierten Ansätze mit 1 mL 11M-Natronlauge versetzt. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß wurden die Lösungen in einen 20 mL-Meßkolben überführt, mit etwa 10 Tropfen 85 %iger Phosphorsäure auf pH 7 gebracht und mit Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wurde unmittelbar anschließend zur HPLC-FLD eingesetzt. Tab. 54 gibt die Wiederfindungsraten von BADGE und seinen Hydrolysederivaten vor und nach der Esterhydrolyse wieder.

Dotierte Ansätze	Konzentration	BADGE [%]	BADGE·H <sub>2</sub> O [%]	BADGE·2H <sub>2</sub> O [%]
		0.9	0.9	0.0
	1 mg/L	0.8	0.6	0.0
		0.8	0.7	0.0
ohne Hydrolyse		0.8	0.7	0.0
	5 mg/L	0.8	0.8	0.0
		0.8	0.7	0.0
		0.4	0.8	3.5
	1 mg/L	0.6	0.9	3.5
		0.4	0.6	3.1
mit Hydrolyse		0.6	0.7	3.0
	5 mg/L	0.4	0.7	3.4
		0.6	0.8	3.1

Tab. 54 Wiederfindung von BADGE und Hydrolysederivaten vor und nach Esterhydrolyse

Zum Vergleich der Mittelwerte (Summe aus BADGE, BADGE· $H_2O$  und BADGE· $2H_2O$ ) wurde der *t-Test* durchgeführt:

1. Zweiseitiger F-Test zur Homogenität der Varianzen

vor Hydrolyse  $\overline{x} = 1.55 \text{ g}/100 \text{ g mit s}^2 = 0.02$ nach Hydrolyse  $\overline{x} = 4.52 \text{ g}/100 \text{ g mit s}^2 = 1.00$ Prüfgröße  $\hat{F} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$  wobei  $s_1^2$ : größere Varianz

Die Prüfgröße beträgt  $\hat{F} = 5.14$ . Für *n-1* Freiheitsgrade und p = 0.025 liegt die Schranke der F-Verteilung bei 7.15. *Die Varianzen sind homogen*.

2. *t-Test zum Vergleich zweier Mittelwerte mit homogenen Varianzen* 

Prüfgröße 
$$\hat{t} = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n_1}}}$$
 wobei  $x_1$ : größerer Mittelwert

Die Prüfgröße beträgt  $\hat{t} = 21.267$ . Für 2n-2 Freiheitsgrade und p = 0.001 liegt die Schranke der t-Verteilung bei 4.587. Die Mittelwerte der BADGE-Summenwiederfindung vor und nach der Hydrolyse sind hochsignifikant unterschiedlich.

# Säure-Hydrolyse in Anlehnung an LUCAS und SOTELO (1982)

9 mL BSA-Lösung ( $\beta = 1$  g/L) wurden mit 1 mL Standardlösung ( $\beta = 50$  mg/L BADGE sowie IS in Dioxan) versetzt und für einen Tag bei Raumtemperatur inkubiert. Je 1 mL dieser Lösung wurde mittels Vakuumzentrifuge zur Trockne gebracht, mit 1 mL 6M-HCl versetzt und in einem Hydrolysetopf evakuiert. Die Hydrolyse erfolgte über 20 Stunden bei 110 °C. Die Hydrolysate wurden mit wenigen Tropfen 11M-Natronlauge neutralisiert, in einen 5 mL-Meßkolben überführt und mit Wasser aufgefüllt. Zur Ermittlung von Aufarbeitungsverlusten wurden säurefreie Ansätze ebenfalls über 20 Stunden bei 110 °C inkubiert. Die Vermessung erfolgte mittels HPLC-FLD nach den Bedingungen in 10.6.1 Tab. 46.

Einer nahezu quantitativen Wiederfindung in den Blindwerten stand der vollständige Abbau von BADGE sowie dem internen Standard gegenüber.

Zur Untersuchung des Abbaus wurde 1 mL Standardlösung ( $\beta = 100$  mg/L in Dioxan) mit 9 mL 6M-HCl versetzt, wobei BADGE und IS getrennt analysiert wurden. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur sowie bei 110 °C für unterschiedliche Zeiten. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde jeweils 1 mL der Hydrolysate mit einigen Tropfen 11M-NaOH neutralisiert, in einen 5 mL-Meßkolben überführt und mit Wasser aufgefüllt. Die Vermessung erfolgte mittels HPLC-FLD nach den Bedingungen in 10.6.1 Tab. 46 gegen Einzelstandards der Analyte ( $\beta = 10$  mg/L in Dioxan).

Tab. 55 zeigt die Wiederfindungen nach Inkubation bei Raumtemperatur.

Zeit	BADGE	<b>BADGE</b> .	<b>BADGE</b> ·	<b>BADGE</b> ·	<b>BADGE</b> .	<b>BADGE</b> .	Summe der	IS
[min]		2H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	HCl·H <sub>2</sub> O	HCl	2HCl	BADGE-Derivate	
1	75	0	8.4	0	10	4.2	98	99
5	78	0	6.5	0	9	2.9	98	99
10	77	0	8.3	1.1	10	2.4	99	99
30	63	0	7.3	1.6	18	2.9	94	98
60	63	0	6.9	1.3	22	3.1	97	85
120	46	0	5.2	1.1	19	3.8	75	43
180	29	0	3.2	1.1	13	2.9	50	17
	1							

Tab. 55 Wiederfindung von BADGE und seinen Derivaten sowie des internen Standards [%]

Die Inkubation bei 110 °C führte bereits nach 5 Minuten zu einer deutlichen Abnahme der Analyte (68 % Summenwiederfindung für BADGE sowie 78 % IS). Nach 20 Minuten waren weder bekannte BADGE-Derivate noch Reste des IS nachweisbar.

Identifizierung von Zersetzungsprodukten des Internen Standards aus der Säure-Hydrolyse Die Untersuchungen zum Abbau des internen Standards wurden mit einer höher konzentrierten Standardlösung ( $\beta = 1$  g/L in Dioxan) und einer längeren Inkubationszeit unter den zuvor genannten Bedingungen wiederholt und die Hydrolysate mittels HPLC-MSD analysiert. Die Vermessung erfolgte unter den in Tabelle 3 (s. 4.5) angegebenen Bedingungen. Umsetzungsprodukte des internen Standards waren erst nach Modifikation des Elutionsgradienten (Tab. 56) nachweisbar (Abb. 67).

Zeit [min]	5mM NH <sub>4</sub> -formiat, pH 3 [%]	Acetonitril [%]
0	90	10
30	30	70
31	0	100
35	0	100
36	90	10
45	90	10

Tab. 56 Modifizierter Elutionsgradient zum Nachweis von Zersetzungsprodukten des internen Standards



Abb. 67 HPLC-MSD/UVD der Umsetzung von BADHPE mit Salzsäure a: Chromatogramme, Bedingungen s. Tab. 3 und 51; b: Massenspektrum und Fragmente

# Enzymatische Hydrolyse nach GARCIA und BAXTER (1992)

90 mL einer wässrigen BSA-Lösung ( $\beta = 5$  g/L) wurden mit 10 mL Standardlösung ( $\beta = 100$  mg/L BADGE·H<sub>2</sub>O sowie IS in Dioxan) versetzt und für einen Tag bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden im Kältebad eingefroren und über Nacht lyophilisiert. 5 mg des Lyophilisats wurden in ein 1.5mL-Eppendorfgefäß eingewogen und 5 mg Pronase E zugesetzt. Die Ansätze wurden in 1mL Tris-HCl-Puffer (10.2.2) gelöst. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über 60 Minuten.

Nach Abschluß der Hydrolyse wurde zur Abtrennung des nicht hydrolysierten Proteins sowie des Rests der Pronase E mit 50  $\mu$ L Perchlorsäure (60 %ig) versetzt, zentrifugiert (4 °C, 10000 G, 15 Minuten) und durch einen Membranfilter (0.2  $\mu$ m) filtriert.

Die Untersuchungen erfolgten in Dreifachbestimmung. Analog wurde ein Blindwert mit 5 mg BSA und Pronase E mit Tris-HCl-Puffer versetzt und hydrolysiert.

Nach Anpassung des Elutionsgradienten (Tab. 57) wurden die Hydrolysate mittels HPLC-FLD analysiert.

 Tab. 57 Modifizierter Elutionsgradient zum Nachweis von BADGE·H2O-Protein-Addukten nach enzymatischer

 Hydrolyse

Zeit [min]	5mM NH <sub>4</sub> -formiat, pH 3 [%]	Acetonitril [%]
0	95	5
5	95	5
50	20	80
51	0	100
55	0	100
56	95	5
70	95	5

Nach Hydrolyse waren mittels HPLC-FLD zusätzliche Peaks nachweisbar (s. 6.4.3, Abb. 47). Zur Identifizierung möglicher BADGE-Aminosäure-Addukte wurde die massenselektive Detektion eingesetzt. Die grundsätzlichen Bedingungen werden in Tab. 3 (s. 4.5) angegeben; die Untersuchung erfolgte im Scan-Modus. Hierbei wurden je drei Chromatogramme aufgezeichnet, um über einen großen Massenbereich möglichst empfindlich zu detektieren. Die jeweils aufgezeichneten Massen umfaßten den Bereich von m/z 200 – 400, m/z 400 – 600 (Abb. 68) sowie m/z 600 – 800.



Abb. 68 Enzymatische Hydrolyse von BADGE·H<sub>2</sub>O-dotiertem BSA-Hydrolysat HPLC-MSD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient Tab. 57; Scan-Modus, m/z: 400 – 600

10.6.6 Nachweis von His-BADGE·H2O im Hydrolysat des dotierten BSA

Das BSA-Hydrolysat wurde mittels massenselektiver Detektion im SIM-Modus systematisch nach Aminosäure-Adukten von BADGE·H<sub>2</sub>O durchmustert.

Im Rahmen dieser Untersuchungen waren zwei Peaks erkennbar, deren Massenspektren die charakteristischen Massen eines BADGE·H<sub>2</sub>O-His-Adduktes besaßen (Abb. 69).



 Abb. 69 Enzymatische Hydrolyse von BADGE·H<sub>2</sub>O-dotiertem BSA-Hydrolysat HPLC-MSD; Bedingungen s. 4.5 Tab. 3 mit Elutionsgradient Tab. 57; SIM-Modus, m/z: 209, 468, 470 (Fragmentionen), 514 (M+1), 536 (M+23), Fragmentorspannung 180 V

Zur Schnellsynthese eines BADGE·H<sub>2</sub>O-His-Adduktes wurden 9 mL einer wäßrigen His-Lösung ( $\beta = 1$  g/L, pH 6.5) mit 1 mL BADGE·H<sub>2</sub>O und internem Standard ( $\beta = 1$  g/L in Dioxan) versetzt und für einen Tag bei Raumtemperatur sowie eine Stunde bei 100 °C inkubiert. Die Schnellsynthese führte zur Entstehung dreier Addukte, deren Retentionszeiten mit denen der potentiellen Adduktpeaks aus dem Hydrolysat übereinstimmten (s. 6.4.4, Abb. 48 und 49). Auch die im SIM-Modus aufgezeichneten Massenspektren waren identisch (Abb. 70).



Abb. 70 Massenspektren von BADGE·H<sub>2</sub>O-His Bedingungen s. Abb. 67; a – b: Peaks 13a und c aus Synthese (vgl. Abb. 47), c – d: analoge Peaks aus BSA-Hydrolysat

## 10.6.7 Die Reaktion von BADGE mit proteinogenen Aminosäuren

#### Herstellung der Aminosäurelösungen

Von jeder zu untersuchenden Aminosäure wurden fünf Lösungen angesetzt.

Je 10 mg Aminosäure wurde in einem 10 mL-Meßkolben mit 9 mL Wasser gelöst. Die Lösungen wurden mit 1 %iger Phosphorsäure beziehungsweise 1M-NaOH unter Verwendung einer pH-Elektrode genau auf die pH-Werte 3, 5, 7, 9 und 11 eingestellt und mit Wasser zur Marke aufgefüllt ( $\beta = 1$  g/L).

## Herstellung der Reaktionsansätze

Je 10 mL der wäßrigen Aminosäurelösungen wurden in einer 100 mL-Braunglasflasche mit 1 mL der Dotierlösung ( $\beta = 100 \text{ mg/L BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O}$  und IS in Dioxan) versetzt, kurz geschüttelt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß gelagert. Die Reaktionslösungen enthielten 10 mg Aminosäure sowie je 0.1 mg BADGE $\cdot$ H<sub>2</sub>O und IS (100facher Überschuß an Aminosäure).

## Inkubationszeiten und Probenaufarbeitung

Zur Ermittlung des Reaktionsverlaufs wurden nach definierten Inkubationszeiten (2 Stunden sowie 1, 2, 3, 4 und 11 Tage) jeweils 200  $\mu$ L Reaktionsansatz entnommen und mit 800  $\mu$ L Wasser verdünnt. Nach kurzem Schütteln wurden die Lösungen zur HPLC-FLD eingesetzt

und gegen eine frisch angesetzte Standardlösung aus BADGE·2H<sub>2</sub>O, BADGE·H<sub>2</sub>O und IS  $(\beta = 1 \text{ mg/L in Dioxan / Wasser (1/9, v/v)})$  vermessen.

Zur Identifizierung von Reaktionsprodukten mittels HPLC-MSD im Scan-Modus wurden 1000  $\mu$ L Reaktionsansatz unverdünnt eingesetzt. Ansätze mit pH-Werten über 7 wurden zuvor mit einem Tropfen konzentrierter Ameisensäure angesäuert.

#### HPLC-Bedingungen

Die Untersuchungen nach Inkubationszeiten bis zu vier Tagen wurden unter Verwendung eines verkürzten Gradienten (Tab. 58) durchgeführt. Nach 11 Tagen wurde der in Tab. 57 beschriebene Gradient verwendet. Die übrigen analytischen Bedingungen gehen aus Tab. 3 (s. 4.5) hervor.

 $\textbf{Tab. 58} \ \text{Modifizierter Elutionsgradient zur Wiederfindung von BADGE·H}_2O \ nach \ Addukt bildung$ 

Zeit [min]	5mM NH₄form, pH 3 [%]	Acetonitril [%]
0	70	30
30	35	65
31	10	90
35	10	90
36	70	30
50	70	30

#### Berechnung der Wiederfindung

Die Berechnung der Anteile an BADGE·H<sub>2</sub>O, BADGE·2H<sub>2</sub>O und Addukt erfolgt über die Peakflächen der jeweiligen Substanz im FLD-Chromatogramm.

Grundlage dieser Berechnung ist die Verwendung von BADHPE als interner sowie externer Standard. Der für BADGE·H<sub>2</sub>O erwartete Flächenwert (Wiederfindung von 100 %) in der Probelösung berechnet sich über:

$$BADGE \cdot H_2O_{Probe} = \frac{BADGE \cdot H_2O_{Standard} \cdot BADHPE_{Probe}}{BADHPE_{Standard}}$$

Der Anteil der Analyte BADGE· $H_2O$  (a), BADGE· $2H_2O$  (b) und Addukt (c) am erwarteten Flächenwert für BADGE· $H_2O$  ergibt sich als:

$$Z_{a,b,c} = \frac{\text{Fläche}_{a,b,c}}{\text{BADGE} \cdot \text{H}_2\text{O}_{\text{Probe}}} \cdot 100 \quad [\%]$$

Durch Addition von Z<sub>a,b,c</sub> wird die Gesamtwiederfindung von BADGE·H<sub>2</sub>O ausgedrückt:

WF = 
$$\sum Z_{a,b,c}$$

# Ergebnisse

# Reaktion mit der $\alpha$ -Aminogruppe von Aminosäuren

2 Stunden	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O	Addukt	Unbekannt	$\Sigma$ Wiederfindung
pH 3 - 7		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		101.6 - 102.2
pH 9	99.3	1.3	0.8	0.1	101.5
pH 11	95.2	1.2	4.1	-	100.5
1 Tag					
pH 3 - 7		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		100.6 - 101.3
pH 9	89.6	3.9	6.4	-	99.9
pH 11	63.1	4.3	29.7	-	97.1
2 Tage					
pH 3 - 7		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		100.4 - 100.6
pH 9	83.0	7.2	9.6	-	99.8
pH 11	43.0	6.4	44.7	-	94.1
3 Tage					
рН 3 - 7		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		101.2 - 102.4
рН 9	76.9	9.4	14.3	-	100.6
pH 11	30.9	7.7	55.8	-	94.4
4 Tage					
pH 3 - 7		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		99.3 - 102.4
pH 9	71.8	11.4	15.1	-	98.3
pH 11	21.7	8.9	59.3	-	89.9
11 Tage					
pH 3 - 7		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		101.1 - 102.6
pH 9	44.4	25.6	26.0	1.8	97.8
pH 11	2.8	14.3	70.2	5.2	92.5

Tab. 59 Wiederfindung nach Reaktion mit Valin



Abb. 71 Spektrum und Struktur von BADGE·H<sub>2</sub>O-Val (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)

2 Stunden	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O / Addukt	Unbekannt	$\Sigma$ Wiederfindung
рН 3 - 7		Keine Adduktbildung nachweisbar		101.2 - 105.3
pH 9	99.2	1.3	-	100.5
pH 11	94.1	5.3	-	99.4
1 Tag				
pH 3 - 7		Keine Adduktbildung nachweisbar		100.8 - 101.6
pH 9	87.1	12.5	-	99.6
pH 11	55.8	38.3	-	94.1
2 Tage				
pH 3 - 7		Keine Adduktbildung nachweisbar		100.1 - 100.6
pH 9	77.6	19.5	-	97.1
pH 11	34.7	56.6	-	91.3
3 Tage				
рН 3 - 7		Keine Adduktbildung nachweisbar		98.7 - 101.7
pH 9	72.3	25.8	-	98.1
pH 11	22.1	70.7	-	92.8
4 Tage				
pH 3 - 7		Keine Adduktbildung nachweisbar		100.1 - 101.3
рН 9	65.0	28.4	-	93.4
pH 11	14.1	72.1	-	86.2
11 Tage				
pH 3 - 7		Keine Adduktbildung nachweisbar		99.0 - 101.2
pH 9	31.9	38.7	7.1	87.2
pH 11	0.7	72.7	13.2	86.6

Tab. 60 Wiederfindung nach Reaktion mit Phenylalanin

getrennte Auswertung von BADGE·2H2O und Addukt nicht möglich, da unvollständige Peaktrennung



Abb. 72 Spektrum und Struktur von BADGE·H<sub>2</sub>O-Phe (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)

Mit N-Acetyl-Val sowie Boc-Phe erfolgte keine Adduktbildung. Die Gesamtwiederfindung aller Untersuchungslösungen umfaßte 94.8 - 106.5 % (N-Acetyl-Val) sowie 98.2 - 106.2 % (Boc-Phe).

# Reaktion mit geladenen Seitenketten $\alpha$ -amino-geschützter Aminosäuren

	U	2	5		
2 Stunden	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O	Addukt	Unbekannt	$\Sigma$ Wiederfindung
рН 3 - 7		Keine Adduktbildur	g nachweisbar		101.1 - 103.3
pH 9	101.5	1.4	-	-	102.9
pH 11	96.4	1.5	2.6	-	100.5
1 Tag					
рН 3 - 7		Keine Adduktbildur	g nachweisbar		101.0 - 102.6
pH 9	96.4	4.8	0.3	-	101.5
pH 11	71.2	4.5	22.2	0.4	98.3
2 Tage					
pH 3 - 7		Keine Adduktbildur	g nachweisbar		101.1 - 102.0
pH 9	93.0	8.0	0.5	0.1	101.6
pH 11	53.9	7.9	34.1	1.8	97.7
3 Tage					
	1	Anlagen-Defekt; keine	Messung möglich	1	
4 Tage					
pH 3 - 7		Keine Adduktbildun	g nachweisbar		98.8 - 101.9
pH 9	85.3	13.3	0.9	0.2	99.7
pH 11	31.2	11.4	44.5	3.2	90.3
11 Tage					
pH 3	52.3	50.3	0.3	0.5	103.4
pH 5	70.3	30.3	0.5	0.1	101.2
pH 7	70.9	29.4	0.4	0.1	100.8
pH 9	68.9	29.5	1.4	0.2	100.0
pH 11	7.4	17.2	58.3	10.9	93.8

Tab. 61 Wiederfindung nach Reaktion mit N-Acetyl-Lysin



Abb. 73 Spektrum und Struktur von BADGE·H<sub>2</sub>O-N-Acetyl-Lys (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)

2 Stunden	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O	Addukt	Unbekannt	$\Sigma$ Wiederfindung
рН 3 - 11		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		100.3 - 101.6
1 Tag					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		100.9 - 101.6
pH 7	89.2	10.3	0.5	-	100.0
pH 9	94.0	4.8	1.3	-	100.1
pH 11	90.1	5.8	1.7	-	97.6
2 Tage					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		100.3 - 101.2
pH 7	83.7	15.1	1.2	-	100.0
рН 9	86.2	8.3	2.8	-	97.3
pH 11	83.5	9.9	3.1	-	96.5
3 Tage					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		99.8 - 102.2
pH 7	77.5	20.6	1.7	-	99.8
pH 9	83.5	11.7	4.1	0.3	99.6
pH 11	78.4	13.1	4.7	0.1	96.3
4 Tage					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		99.0 - 103.4
pH 7	74.4	22.3	2.3	-	99.0
pH 9	79.4	14.5	5.2	0.3	99.4
pH 11	73.8	16.2	6.3	-	96.3
11 Tage					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		102.0 - 106.1
pH 7	43.7	52.9	4.4	2.0	102.0
pH 9	51.4	24.1	19.4	-	94.9
pH 11	44.3	25.7	19.8	0.9	90.7

Tab. 62 Wiederfindung nach Reaktion mit Boc-Histidin

Wiederfindung des Addukts als Summe der Einzelwiederfindungen



Abb. 74 Spektrum und Strukturen von BADGE·H<sub>2</sub>O-Boc-His (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)

Mit N-Acetyl-Asp sowie Boc-Arg erfolgte keine Adduktbildung. Die Gesamtwiederfindung aller Untersuchungslösungen umfaßte 93.1 - 104.9 % (N-Acetyl-Asp) sowie 91.8 - 102.1 % (Boc-Arg).

Reaktion mit polaren ungeladenen Seitenketten  $\alpha$ -amino-geschützter Aminosäuren

	U	5	2		
2 Stunden	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O	Addukt	Unbekannt	$\Sigma$ Wiederfindung
рН 3 - 11		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		101.2 - 103.1
1 Tag					
рН 3 - 9		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		100.8 - 101.8
pH 11	92.8	4.5	3.5	-	100.8
2 Tage					
рН 3 - 9		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		100.2 - 102.0
pH 11	86.9	6.9	6.4	-	100.2
3 Tage					
рН 3 - 9		Keine Adduktbildur		101.0 - 102.2	
pH 11	79.9	10.2	10.2	0.5	100.8
4 Tage					
рН 3 - 9		Keine Adduktbildur	ng nachweisbar		101.1 - 102.9
pH 11	74.3	12.7	12.8	0.9	100.7
11 Tage					
pH 3	45.9	60.3	0.2	0.3	106.7
pH 5	69.1	26.2	0.7	-	96.0
pH 7	74.5	26.8	0.8	-	102.1
pH 9	74.4	27.8	1.0	-	103.2
pH 11	49.9	27.1	22.8	-	99.8

Tab. 63 Wiederfindung nach Reaktion mit N-Acetyl-Tyrosin



Abb. 75 Spektrum und Struktur von BADGE·H<sub>2</sub>O-N-Acetyl-Tyr (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)
2 Stunden	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O	Addukt	Unbekannt	∑ Wiederfindung
рН 3 - 11		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		101.9 - 102.4
pH 7	88.0	1.1	12.8	-	101.9
рН 9	50.2	0.9	47.8	-	98.9
pH 11	-	0.6	98.2	-	98.8
1 Tag					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		99.7 - 102.6
pH 7	42.5	2.4	51.4	-	96.3
рН 9	1.1	1.0	93.3	-	95.4
pH 11	1.3	0.7	96.8	-	98.8
2 Tage					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		99.1 - 100.3
pH 7	1.2	0.7	91.4	-	93.3
рН 9	1.2	0.7	91.4	-	93.3
pH 11	1.1	1.0	95.9	-	98.0
3 Tage					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		102.1 - 104.6
pH 7	6.5	3.3	87.6	-	97.4
рН 9	1.1	1.3	95.9	-	98.3
pH 11	1.1	1.1	96.1	-	98.3
4 Tage					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		101.0 - 101.2
pH 7	1.8	3.1	89.2	-	94.1
рН 9	0.9	1.0	93.6	-	95.5
pH 11	0.9	0.8	96.0	-	97.7
11 Tage					
рН 3 - 5		Keine Adduktbildu	ng nachweisbar		102.6 - 103.2
pH 7	0.2	3.8	95.5	-	99.5
рН 9	-	1.5	100.5	-	102.0
pH 11	-	0.5	99.3	-	99.8
100 -	1961			804.2 2	
90 - 80 - 70 - 50 - 40 - 30 -	- 106.2 - 107.1 - 174.1 - 0H		ото		- 000.4 
20 -				000 000 56 26 26 26 26 26 26 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20	

Tab. 64 Wiederfindung nach Reaktion mit N-Acetyl-Cystein



Mit Boc-Asn sowie Boc-Ser erfolgte keine Adduktbildung. Die Gesamtwiederfindung aller Untersuchungslösungen umfaßte 99.0 - 107.0 % (Boc-Asn) sowie 93.5 - 107.7 % (Boc-Ser).

## Reaktion mit unpolaren Seitenketten $\alpha$ -amino-geschützter Aminosäuren

2 Stunden	BADGE·H <sub>2</sub> O	BADGE·2H <sub>2</sub> O	Intermediat/MT-Addukt	Unbekannt	Σ
рН 3 - 11		Keine Addukt	bildung nachweisbar		98.8 - 99.9
1 Tag					
pH 3	84.8	10.7	IM: 2.8	1.0	99.3
pH 5	89.3	3.6	IM: 3.5	1.1	97.5
pH 7	87.7	3.5	IM: 4.3	1.6	97.1
pH 9	88.9	3.6	IM: 3.2	1.3	97.0
pH 11	88.3	4.1	IM: 3.4	1.3	97.1
2 Tage					
pH 3	72.6	17.3	IM: 4.6	2.5	97.0
рН 5	81.0	5.9	IM: 5.8	3.5	96.2
pH 7	78.7	6.0	IM: 7.3	3.9	95.9
рН 9	81.6	5.6	IM: 5.9	5.6	98.7
pH 11	80.9	6.8	IM: 5.6	3.7	97.0
3 Tage					
рН 3	63.9	24.6	IM: 6.6	0.9	96.0
pH 5	74.3	8.0	IM: 8.9	0.9	92.1
pH 7	71.3	7.9	IM: 11.0	1.1	91.3
рН 9	73.7	7.8	IM: 8.5	1.5	91.5
pH 11	73.7	9.0	IM:8.8	1.3	92.8
4 Tage					
рН 3	54.9	29.6	IM: 8.1	1.0	93.6
pH 5	68.5	9.7	IM: 10.7	1.2	90.1
pH 7	64.8	9.5	IM: 14.2	1.2	89.7
pH 9	68.3	10.1	IM: 11.1	1.5	91.0
pH 11	67.3	11.5	IM: 10.8	1.4	91.0
11 Tage					
рН <b>3</b>	17.4	51.8	IM: 20.1 / MT: 3.8	0.8	93.9
рН 5	31.2	19.7	IM: 26.6 / MT: 9.1	0.7	87.3
рН 7	27.5	18.2	IM: 29.5 / MT: 10.9	0.9	87.0
pH 9	30.3	19.9	IM: 26.7 / MT: 9.3	0.5	86.7
рН II 10 Т	32.7	22.9	IM: 26.6 / M1: 9.2	0.1	91.5
18 Tage	4 4	50.7	DI 20 2 / NT 10 4		04.7
рН 3	4.4	59.7 25.2	IM: 20.2 / MT: 10.4	-	94.7
рН 5	12.0	25.3	IM: 26.6 / MT: 22.4	-	86.3
рн /	9.3	22.1	IM: 28.9 / MT: 28.0	-	88.3
рН 9 	11.9	25.4	IMI: 2/.3 / MII: 22.8	-	87.4
рн II 50 Тага	12.0	28.4	INI: 20.0 / INI I: 21.0	-	88.0
		50.0	IM. 2.1 / MT. 10.9		72.0
рн 3 rH <i>5</i>	-	20.U	$11V1. \ 3.1 \ / \ 1V11. \ 19.8$ $11A. \ 2.9 \ / \ MT. \ 55.2$	-	12.9
рн 5 рН 7	-	28.U 24.5	IIVI. J.O / IVII: JJ.J IM-29 / MT. 592	-	δ/.1 96 6
рп / рЦ 0	-	24.3 20 0	IIVI. 3.0 / IVI I : 38.3 IM- 2 2 / MT- 56 9	-	00.0 88 8
рн 9 "П 11	-	∠8.8 22.0	$11V1. \ 5.2 \ / \ 1V11. \ 50.8$ $11V1. \ 2.5 \ / \ MT. \ 5.2 \ 5$	-	80.0
рн 11	-	52.0	IWI: 3.3 / WII: 33.3	-	89.0

Tab. 65 Wiederfindung nach Reaktion mit N-Acetyl-Methionin

IM: Intermediärprodukt, MT: BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub>



Abb. 77 Massenspektrum und Struktur von BADGE·H<sub>2</sub>O-N-Acetyl-Met (Intermediat) (m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)



Abb. 78 Massenspektrum und Struktur von BADGE·H<sub>2</sub>O·SCH<sub>3</sub> (Scan m/z 100 – 650; Fragmentorspannung 180 V)

Mit Boc-Pro sowie N-Acetyl-Trp erfolgte keine Adduktbildung. Die Gesamtwiederfindung aller Untersuchungslösungen umfaßte 96.4 – 105.8 % (Boc-Pro) sowie 98.1 – 106.5 % (N-Acetyl-Trp).

#### 10.7 Die Entstehung von Methylthioderivaten von BADGE in Lebensmitteln

#### 10.7.1 Entstehung in dotierten Lebensmitteln

Je 10 g homogenisiertes Lebensmittel wurden in ein Sterilisationsgefäß eingewogen. 0.2 mL einer Lösung von BADGE·H<sub>2</sub>O und IS ( $\beta = 500$ mg/L in Dioxan) wurden zupipettiert ( $\beta = 10$  mg/kg Lebensmittel) und mit einem Glasstab im Homogenat verteilt. Die Gefäße wurden verschlossen und 30 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Die abgekühlten Homogenate wurden nach dem validierten Verfahren (s. 4.7) aufgearbeitet. Für jedes Lebensmittel wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt, die Berechnung der Wiederfindung erfolgte gemäß 10.6.7.

Die chromatographische Analyse erfolgte mittels HPLC-FLD sowie HPLC-MSD (s. 4.5 Tab. 3). Der Elutionsgradient entsprach denjenigen zum Nachweis von BADGE-Protein-Addukten nach enzymatischer Hydrolyse (s. 10.6.5 Tab. 57).

e	- "					
	BADGE·MT·H <sub>2</sub> O [%]	BADGE·2H <sub>2</sub> O [%]	Σ[%]	Δ[%]		
Ansatz I	16.4	18.2	34.6	65.4		
Ansatz II	17.9	18.1	35.0	64.0		
Ansatz III	16.7	17.3	34.0	66.0		
			Mittelwert	65.1		
		Standar	dabweichung	1.0		
		Variatio	onskoeffizient	1.6		

Tab. 66 Ergebnisse der Reaktion von BADGE·H<sub>2</sub>O mit "Thunfisch in eigenem Saft"

Tab. 67 Ergebnisse der Reaktion von BADGE H <sub>2</sub> O mitGrießspeis
--

	BADGE·MT·H <sub>2</sub> O /	BADGE·2H <sub>2</sub> O [%]	Σ[%]	Δ[%]
	BADGE·HCl·H <sub>2</sub> O [%]			
Ansatz I	26.3	53.7	80.0	20.0
Ansatz II	26.8	51.7	78.5	21.5
Ansatz III	27.3	51.4	78.7	21.3
			Mittelwert	20.9
		Standar	dabweichung	0.8
		Variatio	onskoeffizient	3.8

In keinem der Reaktionsansätze war das Edukt BADGE $\cdot$ H<sub>2</sub>O nachweisbar.

#### 10.7.2 Synthese der Methylthioderivate

Zu Lösungen von 20 mg N-Acetyl-Met in 10 mL Wasser wurde 1 mL der jeweiligen Dotierlösung (BADGE und IS sowie BADGE·HCl und IS in Dioxan ( $\beta = 100 \text{ mg/L}$ )) gegeben. Die Syntheseansätze wurden nach 6 Tagen bei Raumtemperatur mittels HPLC-FLD und -MSD nach Verdünnung (1/1) vermessen. Die Bedingungen der HPLC-FLD entsprachen den in Tab. 3 (s. 4.5) angegebenen. Die HPLC-MSD erfolgte im SIM-Modus unter Verwendung einer "Fragmentor-Ramp". Jedem zu bestimmenden Fragment / Cluster wurde eine spezifische Fragmentorspannung zugeordnet und damit die individuelle Empfindlichkeit erhöht. Zu diesem Zweck wurden folgende Bedingungen gewählt:

	Masse (m/z)	Fragmentorspannung [V]
BADGE·H <sub>2</sub> O·SCH <sub>3</sub>	135	170
	209, 221	140
	424, 429, 425	70
BADGE·SCH <sub>3</sub>	135	170
	221	140
	411, 427	70
BADGE-2SCH <sub>3</sub>	135	170
	221	140
	459, 475	70
BADGE·HCI·SCH <sub>3</sub>	135	170
	221, 227, 229	140
	447, 449, 463, 465	70

Tab. 68 Aufgezeichnete Massenzahlen und zugeordnete Fragmentorspannungen für Methylthioderivate

Tab. 69 zeigt die Zusammensetzung der Syntheseansätze nach 6 Tagen.

Edukte / Produkte im Syntheseansatz des N-Acetyl-Methionins mit						
BADO	GE [%]	BADGE·HCl [%]				
BADGE	6.8	BADGE·HCl	13.9			
BADGE·H <sub>2</sub> O	10.3	BADGE·H <sub>2</sub> O	1.3			
BADGE·2H <sub>2</sub> O	16.0	BADGE·H <sub>2</sub> O·HCl	66.2			
BADGE·H <sub>2</sub> O·SCH <sub>3</sub>	3.2	BADGE·HCI·SCH <sub>3</sub>	5.3			
BADGE· SCH <sub>3</sub>	4.3	Intermediat	27.5			
BADGE-2SCH <sub>3</sub>	0.7					
Intermediate	25.3					

Tab. 69 Ergebnisse der Synthese der Methylthioderivate

## 10.7.3 Nachweis der Methylthioderivate in Lebensmitteln

## Dotierlösung des internen Standards

20 g Öl wurden mit 160 µL einer Lösung des IS in Acetonitril ( $\beta = 2 \text{ g/L}$ ) versetzt. Das Gemisch wurde 2 Stunden im Ultraschallbad homogenisiert ( $\beta = 16 \text{ mg/kg}$  Öl).

## Standardlösungen

Aus der Stammlösung ( $\beta$ = 1 g/L in Acetonitril) wurden Kalibrierstandards hergestellt. Diese besaßen eine jeweilige Massenkonzentration von  $\beta$  = 25, 50, 100, 200 und 400 µg/L – entsprechend 0.06, 0.13, 0.25, 0.50 und 1.0 mg/kg Lebensmittel.

## Aufarbeitung der Lebensmittel

Nach Zugabe von 0.5 g der Dotierlösung zu 10.0 g Lebensmittel-Homogenat ( $\beta = 0.8 \text{ mg/kg}$ ) wurde erneut homogenisiert. Die Aufarbeitung erfolgte in einer Doppelbestimmung.

Die chromatographischen Bedingungen entsprachen denjenigen zur Bestimmung von BADGE in Lebensmitteln (s. 4.5 Tab. 3), für die massenselektive Detektion wurde analog zu 10.7.2 (Tab. 68) eine variable Fragmentorspannung gewählt.

Analyt	Lebensmittel						
relative Retention	Leberwurst	Schinken- wurst	Lyoner	Schmelz- käse	Schmelz- käse m. Pfeffer	Schmalz- fleisch	
BADGE·2H <sub>2</sub> O 0.359-0.379	n.n.	0.16	0.09	n.n.	0.07	0.12	
BADGE·H <sub>2</sub> O 0.737-0.747	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·H <sub>2</sub> O·HCl 0.737-0.739	0.36	0.47	0.26	0.18	0.10	0.46	
BADGE·H <sub>2</sub> O·SCH <sub>3</sub> 0.878-0.884	n.n.	0.10	n.n.	0.20	0.16	0.08	
BADGE 1.236-1.244	n.n.	0.06	n.n.	0.06	0.04	0.34	
BADGE·HCl 1.331-1.343	n.n.	n.n.	0.09	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·2HCl 1.417-1.429	0.79	0.68	0.17	0.21	0.10	0.46	
BADGE·HCl·SCH <sub>3</sub> 1.472-1.482	n.n.	0.05	n.n.	0.21	0.28	0.09	
BADGE·SCH <sub>3</sub>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·2SCH <sub>3</sub> 1.525-1.536	n.n.	n.n.	n.n.	0.27	n.n.	0.02	
Summe SCF-Derivate	1.15	1.37	0.61	0.45	0.31	1.38	
Summe Methylthioderi- vate	n.n.	0.15	n.n.	0.68	0.44	0.19	

Tab. 70 SCF-Derivate und Methylthioderivate in Lebensmitteln [mg/kg]

Analyt	Lebensmittel						
relative Retention	Grießspeise	Obstsalat	Fruchtreis	Hamburger m. Tomate	Linsen- eintopf	Gemüse- pfanne	
BADGE·2H <sub>2</sub> O 0.359-0.379	0.47	1.52	0.38	0.77	0.60	0.47	
BADGE·H <sub>2</sub> O 0.737-0.747	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·H <sub>2</sub> O·HCl 0.737-0.739	0.61	0.26	0.11	2.68	1.59	1.71	
BADGE·H <sub>2</sub> O·SCH <sub>3</sub> 0.878-0.884	0.26	n.n.	n.n.	0.04	0.07	0.10	
BADGE 1.236-1.244	0.03	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0.20	
BADGE·HCl 1.331-1.343	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·2HCl 1.417-1.429	0.27	0.05	0.10	1.91	1.23	1.31	
BADGE·HCl·SCH <sub>3</sub> 1.472-1.482	0.13	n.n.	n.n.	0.10	0.07	0.08	
BADGE·SCH <sub>3</sub>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·2SCH <sub>3</sub> 1.525-1.536	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
Summe SCF-Derivate	1.38	1.83	0.59	5.36	3.42	3.72	
Summe Methylthioderi- vate	0.39	n.n.	n.n.	0.14	0.14	0.18	

Analyt			Lebensmittel	
relative Retention	Nudel- gericht	Cevapcici	Gulasch m. Kartoffeln	
BADGE·2H <sub>2</sub> O 0.359-0.379	0.50	0.31	0.65	
BADGE·H <sub>2</sub> O 0.737-0.747	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·H <sub>2</sub> O·HCl 0.737-0.739	4.53	1.12	1.15	
BADGE·H <sub>2</sub> O·SCH <sub>3</sub> 0.878-0.884	0.62	n.n.	n.n.	
BADGE 1.236-1.244	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·HCl 1.331-1.343	n.n.	n.n.	0.13	
BADGE·2HCl 1.417-1.429	0.94	0.98	0.73	
BADGE·HCl·SCH <sub>3</sub> 1.472-1.482	0.28	n.n.	n.n.	
BADGE·SCH <sub>3</sub>	n.n.	n.n.	n.n.	
BADGE·2SCH <sub>3</sub> 1.525-1.536	n.n.	n.n.	n.n.	
Summe SCF-Derivate	5.97	2.41	2.66	
Summe Methylthioderi- vate	0.90	n.n.	n.n.	

10.7.4 Abschätzung des ursprünglich migrierten BADGE

Nach der Ermittlung des Gehalts an Methylthioderivaten 2001 wurde anhand der im Jahre 1999 durchgeführten Untersuchungen der Gehalt abgeschätzt. Dies erfolgte unter Annahme gleicher Fluoreszenzresponse über den Vergleich der Peakflächen mit dem ermittelten BADGE-Gehalt 1999 (vgl. 7.3 Abb. 59 a).

Die Schätzung für 1997 erfolgte unter der Annahme einer linearen Bildung von Methylthioderivaten sowie konstanter Gehalte der epoxidfreien BADGE-Derivate im Verlauf der Lagerung. Die berechnete Umsetzungsrate wurde auf das Herstellungsjahr extrapoliert:



Hiernach ergibt sich ein geschätzter Gehalt an reaktionsfähigen Epoxiden von 1.93 mg/kg im Jahr 1997.

Im Lagerzeitraum von 1999 bis 2001 wurde eine Zunahme von 0.12 mg/kg Methylthioderivaten ( $\omega_{Methylthio2001}$ - $\omega_{Methylthio1999}$ ) verzeichnet. Bei Annahme einer linearen Reaktion im Rahmen der Lagerung ergibt sich die Entstehung von 0.12 mg/kg Methylthioderivaten auch zwischen 1997 und 1999. Damit liegt die geschätzte Bildung von Methylthioderivaten unmittelbar während der Herstellung des Lebensmittels bei 0.22 mg/kg. Diese wurden bei der Schätzung des Gesamtmigrates von dem Gehalt an reaktionsfähigen Epoxiden abgezogen.

#### 11 Literatur

- BANDURSKI, R.S., SCHULZE, A., Concentration of Indole-3-acetic Acid and its Derivatives in Plants, *Plant Physiol.*, **1977**, <u>60</u>, 211-213
- BEGLEY, T.H., BILES, J.E., HOLLIFIELD, H.C., Migration of an epoxy adhesive compound into a food simulating liquid and food from microwave susceptor packaging, J. Agric. Food Chem., 1991, 39, 1944-1945
- BENTLEY, P., BIERI, F., KUSTER, H., MUAKKASSAH-KELLY, S., SAGELSDORFF, P., STÄUBLI, W., WAECHTER, F., Hydrolysis of bisphenol A diglycidylether by epoxide hydrolases in cytosolic and microsomal fractions of mouse liver and skin: inhibition by bis epoxycyclopentylether and the effects upon the covalent binding to mouse skin DNA, *Carcinogenesis*, **1989**, <u>10</u>, 321-327
- BERNHISEL-BROADBENT, K., Cross-allergenecity in the legume botanical family in children with hypersensitivity, J. Allergy Clin. Immunol., **1989**, <u>83</u>, 435-440
- BGVV, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, L 00.00-11 Nachweis von Antioxidationsmitteln in Lebensmitteln in der Fassung von November 1984
- BGVV, Pressemitteilung 19/96 vom 20. November 1996
- BIEDERMANN, M., BRONZ, M., BÜRCHLER, B., GROB, K., KELLER, F., NEUKOM, H.-P., RICH-ARD, 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, <u>90</u>, 177-194
- BIEDERMANN, M., BRONZ, M., BÜRCHLER, B., GROB, K., KELLER, F., NEUKOM, H.-P., RICH-ARD, 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, 2. Results from a Survey of the Swiss Market, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **1999b**, <u>90</u>, 195-210
- BIEDERMANN, M., BRONZ, M., GROB, K., BADGE and its Accompanying Compounds in Canned Oily Foods: Further Results, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **1997**, <u>88</u>, 277-292
- BIEDERMANN, M., GROB, K., BADGE: Nur die Spitze des Eisberges Migrate aus Dosenbeschichtungen, **1997**

- BIEDERMANN, M., GROB, K., Food contamination from epoxy resins and organosols used as can coatings: analysis by gradient NPLC, *Food Addit. Contam.*, **1998**, <u>15</u>, 609-618
- 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**, <u>87</u>, 547-558
- BIEDERMANN, M., WAGNER, C., GROB, K., IMHOF, D., BEUGGERT, H., Bisphenol-A-Diglycidyl Ether (BADGE) and Novolak Glycidyl Ether (NOGE) as Additives in Can Coatings, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 2000, <u>91</u>, 274-286
- BILES, J.E., WHITE, K.D., MCNEAL, T.P., BEGLEY, T.H., Determination of the Diglycidyl Ether of Bisphenol A and its Derivatives in Canned Foods, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, <u>47</u>, 1965-1969
- BRAUN, D., LEE, D.W., Über einige Nebenprodukte bei der Herstellung von Epoxidharzen aus Bisphenol A und Epichlorhydrin, *Angew. Makromol. Chemie*, **1976**, <u>51</u>, 11-24
- BROCK, T., GROTEKLAES, M., MISCHKE, P., Lehrbuch der Lacktechnologie, *Vincentz-Verlag Hannover*, **1998**
- BRONZ, M., BIEDERMANN, M., GROB, K., Diglycidyl Ethers of Bisphenol-F and Novolac in Canned Oily Foods, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **1997**, <u>88</u>, 525-539
- CASTAN, P. (Gebrüder de Trey), Schweizer Patent 211.116, 1940
- CRATHORNE, B., PALMER, C.P., STANLEY, J.A., High-performance liquid chromatographic determination of bisphenol A diglycidyl ether and bisphenol F diglycidyl ether in water, *J. Chromatogr.*, **1986**, <u>360</u>, 266-270
- DAY, B.W., SKIPPER, P.L., ZAIA, J., TANNENBAUM, S.R., Benzo[a]pyrene anti-Diol Epoxide Covalently Modifies Human Serum Albumin Carboxylate Side Chains and Imidazole Side Chain of Histidine(146), J. Am. Chem. Soc., **1991**, <u>113</u>, 8505-8509
- 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** (ABI. EG Nr. L 75/19)
- EUROPÄISCHE KOMMISSION, Richtlinie 93/256/EWG der Kommission, Verfahren zum Nachweis der Rückstände von Stoffen mit hormonaler bzw. thryreostatischer Wirkung, vom 14. April **1993** (ABl. EG Nr. L 118)

- EUROPÄISCHE KOMMISSION, S, M & T project MAT1-CT92-0006 Final Report. Annex II of December **1996**: Determination of 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane-bis(2,3-epoxypropyl)ether in food simulants
- 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** (ABI. EG Nr. L 222/11)
- 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** (ABI. 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 2001 (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 **2002** (ABI. EG Nr. L 51/27)
- 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)
- FEDTKE M, TÄNZER W: Untersuchung von Teilreaktionen der Epoxidharz-Vorproduktbildung durch chromatographische Methoden, J. Prakt. Chem., **1982**, <u>324</u>, 429 442
- GARCIA, S.E., BAXTER, J., Determination of tryptophan content in infant formulas and medical nutritionals, J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., **1992**, <u>75</u>, 1112-1119
- HEMMINKI, K., Binding of Styrene Oxide to Amino Acids, Human Serum Proteins and Hemoglobin, *Arch. Toxicol.*, **1986**, <u>9</u>, 286-290
- IRANPOOR, I., TAMAMAI, B., NIKNAM, K., Iodine and iodine supported on polyvinylpyrrolidone as catalysts and reagents for alcoholysis, hydrolysis, and acetolysis of epoxides and thiiranes, *Can. J. Chem.* <u>75</u>, **1997**, 1913-1919

- 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, <u>17</u>, 208-215
- LINTSCHINGER, J., RAUTER, W., Simultaneous determination of bisphenol A diglycidyl ether, bisphenol F diglycidyl ether and their hydrolysis and chlorohydroxy derivatives in canned foods, *Eur. Food Res. Technol.*, **2000**, <u>211</u>, 211-217
- LONGONI, R., BERNTSSON, P., BILD, N., HESSE, M., Der massenspektrometrische Verlust von Vinylalkohol aus 1-Amino-3-aryloxy-2-propanolen, *Helvetica Chimica Acta*. <u>60</u>, **1977**, 103-111
- LUCAS, B., SOTELO, A., Amino Acid Determination in Pure Proteins, Foods and Feeds using two different acid hydrolysis Methods, *Anal. Biochem.*, **1982**, <u>123</u>, 349-356
- MAY, C.A., Epoxy Resins Chemistry and Technology, Marcel Dekker New York, 1988
- NIELSEN, H., NIELSEN, A.M., ALSING PEDERSEN, G., FOVERSKOV, A., Migration af Bisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE) i fiskekonserves, http://129.142.10.170/publikationer/publikationer/publikationer/badge, **1997**
- PASEIRO LOSADA, P., LÓPEZ MAHÍA, P., VÁZQUEZ ODÉRIZ, L., SIMAL LOZANO, J., Sensitive and Rapid Reversed-Phase Liquid Chromatography-Fluorescence Method for Determining Bisphenol A Diglycidyl Ether in Aqueous-Based Food Simulants, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1991, 74, 925-928
- PASEIRO LOSADA, P., PÉREZ LAMELA, C., LÓPEZ FABAL, M.F., SANMARTÍN FENOLLERA, P., SIMAL LOZANO, J., Two RP-HPLC Sensitive Methods To Quantify and Identify Bisphenol A Diglycidyl Ether and its Hydrolysis Products. 1. European Union Aqueous Food Simulants, J. Agric. Food Chem., 1997, 45, 3493-3500
- PASEIRO LOSADA, P., SIMAL LOZANO, J., PAZ ABUÍN, S., LÓPEZ MAHÍA, P., SIMAL GÁNDARA, J., Kinetics of the hydrolysis of Bisphenol F Diglycidyl Ether in Water-Based Food Simulants. Comparison with Bisphenol A Diglycidyl Ether, J. Agric. Food Chem., 1992, <u>40</u>, 868-872
- PASEIRO LOSADA, P., SIMAL LOZANO, J., PAZ ABUÍN, S., LÓPEZ MAHÍA, P., SIMAL GÁNDARA, J., Kinetics of the hydrolysis of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) in water-based food simulants, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1993**, <u>345</u>, 527-532
- PETERSEN, H., BURSEG, K., SIMAT, T.J., Entsorgt eine Kontaminante sich selbst ? BADGE und die Reaktion mit Lebensmitteln, *Lebensmittelchemie*, **2001**, <u>55</u>, 154-155

- PFEIFFER, E., METZLER, M., Zur genetischen Toxizität von Bisphenol A-Diglycidylether (BADGE) und seinem Hydrolyseprodukt in vitro, Posterbeitrag anläßlich des Deutschen Lebensmittelchemikertages, München, **1998**
- PHILLIPS, D.H., FARMER, P.B., Evidence for DNA and Protein Binding by Styrene and Styrene Oxide, *Crit. Rev. Toxicol.*, **1994**, <u>24</u>, 35-46
- PHILO, M.R., DAMANT, A.P., CASTLE, L., Reactions of epoxide monomers in food simulants used to test plastics for migration, *Food Addit. Contam.*, **1997**, <u>14</u>, 75-82
- RAUTER, W., DICKINGER, G., ZIHLARZ, R., Determination of Bisphenol A diglycidylether (BADGE) and its hydrolysis products in canned oily foods from the Austrian market, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **1999**, <u>208</u>, 208-211
- RICHARD, N., BIEDERMANN, M., GROB, K., Reaction of Bisphenol-A-Diglycidyl Ether (BADGE) from Can Coatings with Food Components, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 1999, <u>90</u>, 532-545
- RIJK, R., persönliche Mitteilung, 2002a
- RIJK, R., Determination of NOGE and its hydroxy and chlorinated derivatives in can coatings, Normentwurf, Arbeitspapier CEN-Analysenausschuß TC194 SC1 WG8, **2002b**
- ROUBTSOVA, S., HOLLÄNDER, J., FRANZ, R., A Rapid and Convenient Method for the Quantitative Determination of Bisphenol A Diglycidyl Ether (BADGE) in Foodstuffs, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, **1997**, <u>93</u>, 273-276
- RYBAK, K., Migration and extraction of BADGE related compounds from can coatings, Arbeitspapier CEN-Analysenausschuß TC194 SC1 WG8, **2002**
- SCHLACK, P. (IG Farbenindustrie AG), Deutsches Patent 676.117, 1934
- SCF Opinion on Bisphenol A Diglycidyl Ether, Document SCF/CS/PM 2812-Final vom 07. Juni **1996**
- SCF Opinion on Bisphenol A Diglycidyl Ether, Clarification and Explanation, Document SCF/CS/PM/2986-Final vom 13. Juni **1997**
- SCF Opinion on Bisphenol A Diglycidyl Ether, Document SCF/CS/PM/3243-Final vom 24. März **1999a**
- SCF Statement on the use of novolac glycidyl ethers (NOGE) as additives in food contact materials, http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out51\_en.html, **1999b**

- SHARMAN, M., HONEYBONE, C.A., JICKELLS, S.M., CASTLE, L., Detection of residues of the epoxy adhesive component bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) in microwave susceptors and its migration into food, *Food Addit. Contam.*, **1995**, <u>12</u>, 779-787
- SIMAL GÁNDARA, J., PAZ ABUÍN, S., PASEIRO LOSADA, P., SIMAL LOZANO J., Identification of RP-HPLC Peaks of Bisphenol F and of Bisphenol F Diglycidyl Ether and Its Hydrolysis Products by Thermospray Mass Spectrometry and Gas Chromatography/mass Spectrometry, *Chromatographia*, **1992**, <u>34</u>, 67-72
- SKIPPER, P.L., PENG, X., SOOHOO, C.K., TANNENBAUM, S.R., Protein Adducts As Biomarkers Of Human Carcinogen Exposure, *Drug Metabolism Reviews*, **1994**, <u>26</u>, 111-124
- SUMMERFIELD, W., GOODSON, A., COOPER, I., Survey of Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) in canned foods, *Food, Addit. Contam.*, **1998**, <u>15</u>, 818-830
- THEOBALD, A., SIMONEAU, C., RONCARI, R., ANKLAM, E., Correlations Between the Levels of Bisphenol-A-diglycidylether (BADGE) in Cans, Lids and Homogenised Food Matrix from Canned Fish in Oil, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, **1999a**, <u>95</u>, 187-191
- THEOBALD, A., SIMONEAU, C., RONCARI, P., RONCARI, A., ANKLAM, E., Monitoring of Bisphenol-A-Diglycidyl-Ether (BADGE) in Canned Milk Products and Vegetable Oils, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, **1999b**, <u>95</u>, 362-365
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE Food Composition Data, Nutrient Data Base for Standard Reference, Release 13, http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/index.html, **2000**
- VANHOUTTE, K., JOOS, P., LEMIÈRE, 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, <u>30</u>, 1453-1461
- VERBAND DER LACKINDUSTRIE e.V., BADGE (Bisphenol A Diglycidylether), *Informations*broschüre, **1997**
- WAGNER, C., GROB, K., BIEDERMANN, M., Migration of novolac glycidyl ether (NOGE) into foods: analytical problems, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **2000**, <u>91</u>, 146-157

# **Lebenslauf**

#### Persönliche Daten

Name:	Hauke Petersen				
Geburtsdatum und -ort:	8. Dezember 1964 in Kiel				
Anschrift:	Alfons-Huysmans-Ring 17, D-24149 Kiel				
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder				
Schulausbildung:					
1970 - 1974	Gerhart-Hauptmann-Schule, Kiel				
1974 – 1983	Staatliches Gymnasium Kiel-Wellingdorf				
1983	Abitur				
Beruflicher Werdegang					
4.07.1983	Eintritt in die Bundeswehr als Soldat auf Zeit (SaZ 2 Jahre)				
2.01.1985	Übernahme zum Sanitätsoffizieranwärter (SaZ 18 Jahre)				
1.04.1986 - 25.05.1990	Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität in Kiel				
1.06.1990 - 30.11.1990	Praktikum in der Apotheke des Bundeswehrkrankenhauses Kiel- Kronshagen				
1.12.1990 - 31.05.1991	Praktikum in der Ostsee-Apotheke, Schönberg/Holstein				
3.07.1991	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung				
18.07.1991	Approbation als Apotheker				
Juli – Oktober 1991	Tätigkeit in der Apotheke des Bundeswehrkrankenhauses Kiel- Kronshagen, Bereich Analytik und Klinische Pharmazie				
21.10.1991 - 14.04.1994	Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg				
14.04.1994	Erste lebensmittelchemische Staatsprüfung, Diplom in Lebensmittelchemie				
1.05.1994 - 31.10.1994	Praktikum am Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt des Landes Schleswig-Holstein, Neumünster				
1.11.1994 - 30.04.1995	Praktikum im Hygiene-Institut der Freien und Hansestadt Hamburg				
18.07.1995	Zweite lebensmittelchemische Staatsprüfung				
3.08.1995	Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker				
seit 14.08.1995	Lebensmittelchemischer Sachverständiger am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel-Kronshagen				
seit 1.07.1999	Doktorand am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Universität Hamburg				
6.01.2001	Übername zum Berufssoldaten				

#### **Derzeitige Position**

Leiter der Zentralen Apparativen Analytik

Leiter des Labors für Trinkwasseruntersuchung

Qualitätsmanagement-Beauftragter

Mitglied des Ausschusses NMP 893 "Migration aus Kunststoffen für den Lebensmittelkontakt" des Deutschen Instituts für Normung

Mitglied der Arbeitsgruppe TC194 SC1 WG8 "Bisphenol A diglycidyl ether" des Europäischen Kommittees für Normung