

Methoden zur Untersuchung von Papier, Karton und Pappe für Lebensmittelverpackungen und sonstige Bedarfsgegenstände

7. Multimethoden-Methoden für einzelne Stoffgruppen, die in mehreren Laboratorien erprobt wurden

7.4 Antimikrobielle Substanzen und Schleimverhinderungsmittel

1. Allgemeine Angaben

Bei der angeführten Methode handelt es sich um ein erprobtes Verfahren, das vom *LAVES • Institut für Bedarfsgegenstände Lüneburg* entwickelt wurde.

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung von antimikrobiellen Substanzen und Substanzen zur Schleimverhinderung in Papier und Pappe mittels HPLC/DAD.

Begriff

Der Gehalt der zu bestimmenden Substanzen nach der hier beschriebenen Methode wird in mg/kg und in mg/dm² angegeben. Die Flächenmasse wird gemäß EN ISO 536 bestimmt.

2. Grundlagen des Verfahrens

Die Substanzen, die sich in der Extraktionslösung befinden, werden nach Anreicherung über eine hydrophobe Festphasen-Extraktionssäule mittels HPLC bestimmt. Die Anreicherung der Substanzen wird durch Bildung von Ionenpaaren und durch Aussalzen vervollständigt.

3. Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Natriumchlorid	k. A.	p. a.
Tetra-n-butylammoniumhydrogensulfat	k. A.	k. A.
Tetra-n-butylammoniumhydrogensulfat-Lösung	c = 0,005 M	1,6977 g/L bi-dist. Wasser
Salzsäure	c = 6 M	59,1 mL 37 %ige Salzsäure / 100 mL bi-dist. Wasser
Ammoniumacetat	k. A.	z. A.
Ammoniumacetat-Lösung	c = 0,005 M	0,385 g/L bi-dist. Wasser) → Fließmittel
Methanol	k. A.	für HPLC
Acetonitril	k. A.	für HPLC
Wasser	k. A.	bidestilliert

Tabelle 1 Chemikalien und Lösungen

3.1 Vergleichssubstanzen

3.1.1 Stammlösungen A

Die Vergleichssubstanzen (siehe Tabelle 2) werden in einzelne 25 ml Messkolben (4.1) eingewogen, in Methanol (siehe Tabelle 1) gelöst und aufgefüllt. Einige Substanzen sind nach dem Lösen in Methanol nicht lange haltbar. Dazu gehören 2-Mercaptobenzothialol, TMTD, Dazomet und 2-Bromo-2-hydroxyacetophenon. Die A-Lösungen sind immer frisch anzusetzen. Daraus resultieren die einzelnen Stammlösungen A der 17 Verbindungen der Tabelle 2.

Stammlösungen A				
		Einwaage	CAS	Lagerung
Standard B-Mix 1	2-Methyl-4-isothiazolin-3-on (MIT)	25 mg	2682-20-4	20°C
	2- Mercaptobenzothiazol	50 mg	149-30-4	20°C
	Sorbinsäure	25 mg	110-44-1	20°C
	Methylenbisthiocyanat	50 mg	6317-18-6	20°C
	1,2-Benzisothiazolin-3-on (BIT)	25 mg	2634-33-5	20°C
	Phenol	25 mg	108-95-2	4°C
	2-Bromo-2-hydroxyacetophenon	25 mg	2491-36-3	20°C
	Bisphenol A	25 mg	80-05-7	20°C
	2-Hydroxybiphenyl (oPP)	25 mg	90-43-7	20°C
Standard B-Mix 2	4- Hydroxybenzoesäure-ethylester	25 mg	120-47-8	20°C
	Benzophenon	25 mg	119-61-9	20°C
	Benzoessäure	25 mg	65-85-0	20°C
	5-Chlor-methyl-4-isothiazolin-3-on (CMIT)	25 mg	26172-55-4	-18°C
	Dazomet	50 mg	533-74-4	4°C
	Bisphenol A-(2,3-Dihydroxypropyl)-ether	25 mg	5581-32-8	4°C
	Tetramethylthiuramdisulftd (TMTD)	25 mg	13726-8	20°C
	Bisphenol A(3-Chlor-2-hydroxypropyl)ether	25 mg	4809-35-2	4°C

Tabelle 2 Stammlösungen A

3.1.2 *Standard B-Mix 1 und 2*

Es werden zwei Lösungen (Standard B-Mix 1 und 2) hergestellt, deren Zusammensetzung Tabelle 2 entnommen werden kann.

Hierzu wird jeweils 1 ml der entsprechenden Stammlösung A in einen 10 ml Messkolben (4.1) überführt und mit Methanol (siehe Tabelle 1) aufgefüllt. Daraus resultieren zwei Lösungen (Standard B-Mix 1 und 2) der Konzentration $c = 100 \mu\text{g/ml}$

3.1.3 *Interner Standard ISTD*

Als Interner-Standard werden die Substanzen Bisphenol-A und oPP verwendet. Je 500 µL der entsprechenden Stammlösung-A werden in einen 10 mL Messkolben (5.1) pipettiert und mit Methanol (4.5) aufgefüllt. Daraus resultiert eine Lösung für den internen Standard der Konzentration $c = 50 \mu\text{g/mL}$ (c (in der Messlösung) = 10 µg/mL)

Pro Aufarbeitungsreihe wird ein Probenextrakt doppelt aufgearbeitet und nach dem Lösen der Salze im Becherglas wird 1 ml Interner-Standard (3.1.3) dazugegeben.

4. **Geräte und Hilfsmittel**

- 4.1 Braunglas-Messkolben 10 ml, 20 ml und 25 ml
- 4.2 Festphasen – Extraktionssäulen, H₆H₁₁, Cyclohexyl 1g/6 ml
- 4.3 SPE-Vakuumvorrichtung
- 4.4 HPLC-Trennsäule: C18 mit 150x 4,6mm, z. B. Pursuit XR 3 µm
- 4.5 HPLC-Vorsäule: C18 4,6 mm, 3 z.B. Pursuit XRs 3 µm
- 4.6 Druckfiltrationsanlage mit Glasfilter
- 4.7 Iodzahlkolben

5. **Probenahme**

Die Probe wird bis zur Analyse in Alufolie eingeschlagen. Vor der Analyse wird eine repräsentative Menge der Probe möglichst klein (ca. 1 cm²) zerschnitten.

6. **Durchführung**

6.1 **Extraktion**

Aus der Probe wird ein Kaltwasserextrakt nach DIN EN 645 oder ein Heißwasserextrakt DIN EN 647 hergestellt.

6.2 **Anreicherung der Proben**

In einem 250 ml Becherglas werden 25 g Natriumchlorid (siehe Tabelle 1) und 170 mg Tetra-n-butylammoniumhydrogensulfat (siehe Tabelle 1; ergibt $c = 0,005 \text{ M}$) vorgelegt und dazu werden mittels Vollpipette 100 ml des Probenextraktes (6.1) dazu gegeben. Nach dem Lösen der Salze auf dem Magnetrührer wird der pH- Wert mit 6 M Salzsäure (siehe Tabelle 1) auf pH 1,0 eingestellt.

Konditionierung der Säulen:

Die Säulen werden erst mit 6 ml Methanol (siehe Tabelle 1) und danach mit 6 ml Tetra-n-butylammoniumhydrogensulfat-Lösung 0,005 M (siehe Tabelle 1) gespült. Nach jedem Konditionierungsvorgang sollte die Festphase noch mit etwas Flüssigkeit bedeckt bleiben.

Mit einem Teil der vorbereiteten Probenlösung wird die konditionierte Säule überschichtet und der Rest mit Hilfe eines Reservoirs über die Säule gegeben. Das Vakuum sollte so eingestellt sein, dass der Durchfluss 8-10 ml pro Minute beträgt.

Das Becherglas und die Säule werden mit 5 ml der 0,005 M Tetra-n-butylammoniumhydrogensulfat-Lösung (siehe Tabelle 1) gewaschen und die Säule 30 Sekunden lang unter Vakuum getrocknet. Die Teflonnadeln an der Unterseite des SPE-Deckels werden mit einem Papiertuch trocken gewischt.

Die Elution der Substanzen erfolgt mit Methanol in einen 5 ml Messkolben. Nach Zugabe von 2,5 ml Methanol wird dieses soweit in die Säule gesaugt, dass die Phase vollständig benetzt ist. Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten wird das Methanol in den 5 ml Messkolben gesaugt, wobei vor dem Trockenlaufen die restlichen 2,5 ml Methanol aufgegeben werden. Der 5 ml Messkolben wird mit Methanol aufgefüllt.

6.3 Kalibrierreihe

Standard B-Mix 1 und 2 (siehe Tabelle 2) jeweils in 10ml Methanol	c ~ µg/mL	1. Verdünnungsreihe Lösung 1-5 2. Lösung mit 1mL/10 ml Methanol wird weiter verdünnt.
2mL/ 1mL/ 500µL/ 250µL/100µL	20/ 10 /5 /2,5 /1,0	
Aus der 10 µg/ml Lösung weitere Verdünnung in 10ml Methanol: 750µl/ 500 µl /100 µl / 75µl / 50µl	0,75/0,5/0,1/0,07 5/0,05	3. Verdünnungsreihe Lösung 6-10 aus B-Mix 10 µg/ml (Lösung 2)

Tabelle 3 Kalibrierreihen

Hinweis: Die oben genannten Konzentrationen beziehen sich auf die Einwaage von 25 mg Substanz in 25 mL Methanol. Die tatsächliche Konzentration ist anhand der Einwaagen zu berechnen.

6.4 Chromatographische Bedingungen an der HPLC

Die Lösungen 6.2. und 6.3. werden mittels HPLC/DAD analysiert.

Zeit	Solvent B: Acetonitril	Signal DAD
1,0	0.0 Flow von 0,7 auf 10 mL / min	A: 205 nm
4,0	20 % B	B: 230 nm
7,0	30 % B	C: 250 nm
	70 % B	D: 280 nm
23,0	100.0 % B	E: 320 nm
31,0	Flow 1,0 mL/ min 100 %	
32,0	Flow 0,7 mL/ min 100 %	Solvent A. 0,005 mL/min Ammoni- umacetat Lösung
32,0	0 %	Solvent B: Ace- tonitril
37,0	0%	Posttime 5 min.

Tabelle 4 HPLCDAD/ Parameter

6.5 HPLC-DAD Chromatogramme

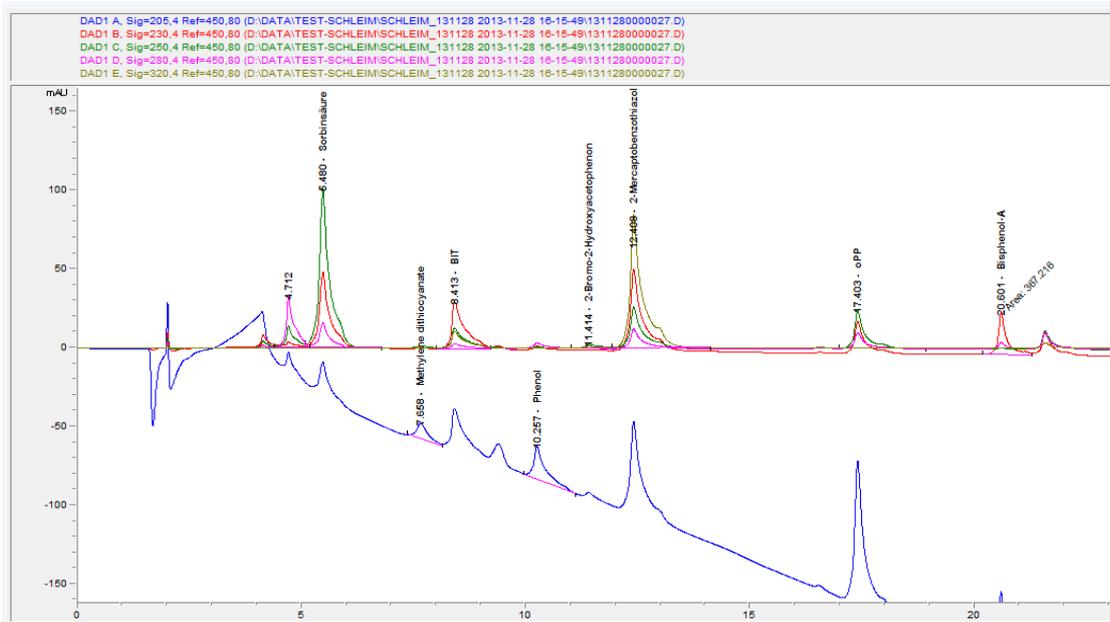


Abb. 1: HPLC/DAD Chrom. Mix 1

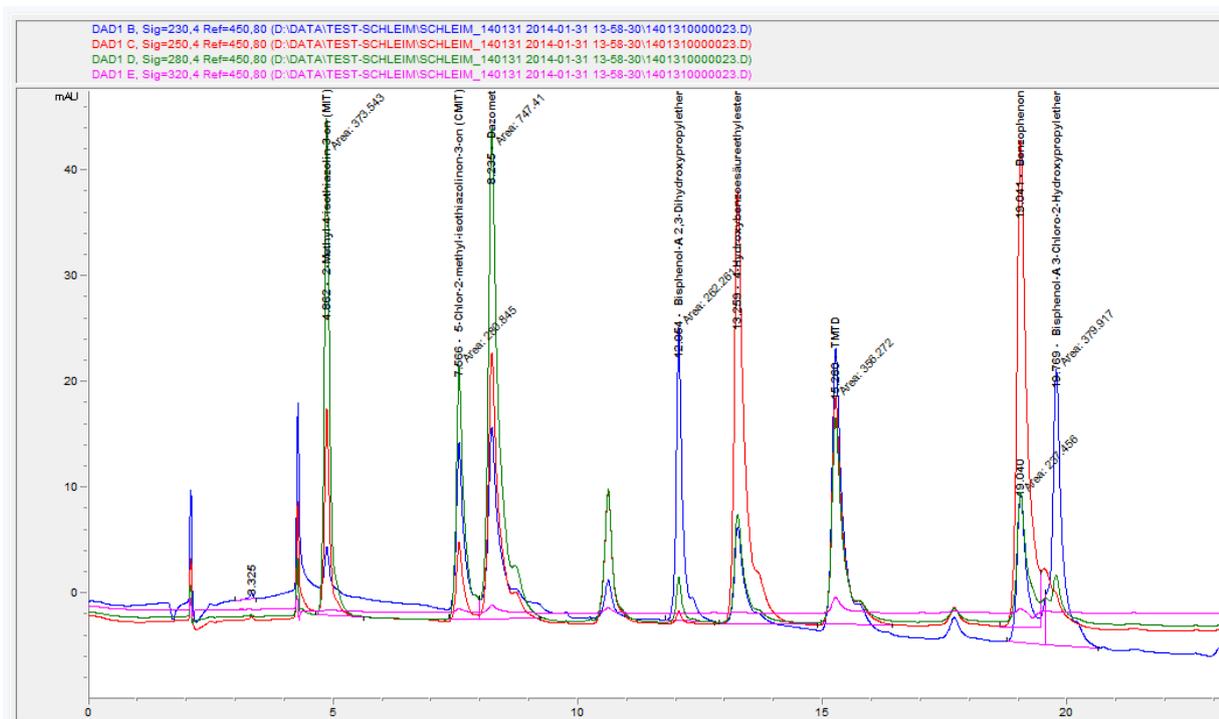


Abb. 2: HPLC/DAD Chrom Mix 2

7. Auswertung

7.1 Identifizierung

Die Peaks werden über Ihre Retentionszeit und ihre Spektren identifiziert.

7.2 Berechnung

Im HPLC-Daten-Report werden die Konzentrationen der jeweiligen Substanz durch interne Berechnung mit der Kalibration in µg/mL wiedergegeben.
Der Massenanteil der Substanz wird in mg/kg Probe und in mg/dm² angegeben.

$$w_1 = \frac{c \cdot V_1 \cdot V_0}{A \cdot m}$$

$$w_2 = \frac{w_1 \cdot FM}{1000 \mu g/mg}$$

w₁ = Massenanteil der Substanz in mg/kg (bzw. für die Berechnung von w₂ in µg/g)

w₂ = Massenanteil der Substanz in mg/dm²

c = Konzentration der Substanz in µg/mL aus dem HP-Chem-Report

V₀ = Volumen des Probenextraktes (hier 250 mL)

V₁ = Volumen des Messansatzes (hier 5 mL)

A = Aliquot vom Probenextrakt (hier 100 mL)

m = Einwaage in g

FM = Flächenmasse in g/dm²

7.3 Zuverlässigkeit der Methode

Substanz	NG [mg/kg]	NG [µg/dm ²]	X [µg/mL]	RSD %	C soll [µg/mL]	Wf %
2-Methyl-4-isothiazolin-3-on (MIT)	0,07	0,002	2,647	1,69	4,125	64,16
Sorbinsäure	0,12	0,004	3,611	2,08	4,182	86,35
Methylenbisthiocyanat	1,53	0,046	16,100	3,51	8,704	184,97
1,2-Benzisothiazolin-3-on (BIT)		0,380	4,334	1,79	3,973	109,09
Phenol	0,09	0,032	4,128	5,52	4,874	84,69
2-Bromo-2- hydroxyacetophenon	1,27	0,038	5,003	17,02	3,925	127,46
Bisphenol A	0,46	0,014	5,067	1,67	4,142	122,32
2-Hydroxybiphenyl (oPP)	0,14	0,004	3,700	2,40	4,240	87,26
4- Hydroxybenzoesäure- ethylester	0,13	0,004	4,036	2,40	3,933	102,62
Benzophenon	0,09	k. A.	4,916	2,45	4,378	112,29
Benzoessäure	0,45	0,013	3,115	3,36	4,027	77,34
2-Methyl-4-isothiazolin-3-on (CMIT)	0,35	0,003	2,794	2,57	3,604	77,52
2- Mercaptobenzothiazol	0,52	0,016	8,896	5,18	8,150	109,15
Dazomet	1,36	0,041	6,545	6,73	8,117	80,63
Bisphenol A-(2,3- Dihydroxypropyl)-ether	0,83	0,025	2,651	2,99	2,769	95,73
Tetramethylthiuramdisulftd (TMTD)	0,56	0,017	1,144	6,37	5,282	21,66
Bisphenol A(3-Chlor-2- hydroxypropyl)ether	0,84	0,007	2,943	6,89	4,029	73,04

Tabelle 5 Zuverlässigkeit

NG: Nachweisgrenze ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$ ausgehend von einer FM von $300 \text{ g}/\text{m}^2$)

X: Mittelwert $\mu\text{g}/\text{ml}$

n: Anzahl der Bestimmungen, hier 3

Reststandardabweichung = RSD [%]

Wiederfindung [%]

8 Literatur

Brauer, Funke, Dtsch. Lebensm.- Rundsch, 88,(1992) 243 - 246

Brauer, Funke, Dtsch. Lebensm.- Rundsch, 91,(1995) 146 - 147