

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

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

7.6 Primäre aromatische Amine (PAA) mittels HPLC-MS/MS

Stand 04/2022

7.6.1 Allgemeine Angaben

Die vorliegende Prüfvorschrift beschreibt ein Verfahren zur spezifischen Bestimmung von PAA nach Übergang in den Kalt- oder Heißwasserextrakt.

Tabelle 1 listet alle PAA, die die analytische Messmethode mindestens beinhalten sollte. Diese Auflistung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern beinhaltet eine Zusammenstellung besonders eingestufte PAA. Insbesondere bei Kenntnis über die Möglichkeit des Vorkommens weiterer PAA (z. B. aus den Rezepturbestandteilen) ist auch auf diese zu prüfen.

Tabelle 1. Substanzname mit zugehöriger CAS-Nummer aller PAA, die die HPLC-MS/MS Methode mindestens umfassen sollte.

Name	CAS-Nr.
4-Aminoazobenzol	60-09-3
2-Aminobiphenyl	90-41-5
4-Aminobiphenyl	92-67-1
4'-Amino-2,3'-dimethylazobenzol	97-56-3
2-Amino-6-ethoxynaphthalin	293733-21-8
4-Amino-3-fluorphenol	399-95-1
2-Aminonaphthalin	91-59-8
4-Amino-2-nitrophenol	119-34-6
Anilin	62-53-3
o-Anisidin	90-04-0
4,4'-Benzidin	92-87-5
4-Chloranilin	106-47-8
5-Chlor-2-methylanilin	95-79-4
4-Chlor-o-toluidin	95-69-2
2,4-Diaminoazobenzol	495-54-5
3,3'-Diaminobenzidin ¹	91-95-2
1,5-Diaminonaphthalin	2243-62-1
2,4-Diaminotoluol	95-80-7
2,6-Diaminotoluol	823-40-5
3,3'-Dichlorbenzidin	91-94-1
3,3'-Dimethoxybenzidin	119-90-4
2,4-Dimethylanilin	95-68-1
2,6-Dimethylanilin	87-62-7
3,3'-Dimethylbenzidin	119-93-7
4,4'-[(4-Imino-2,5-cyclohexadien-1-yliden)methylen]dianilin	479-73-2

Name	CAS-Nr.
2-Methoxy-5-methylanilin	120-71-8
4-Methoxy-1,3-phenylendiamin	615-05-4
4,4'-Methylen-bis (2-chloranilin)	101-14-4
4,4'-Methylen-bis-2-ethylanilin	19900-65-3
2,2'-Methyldianilin	6582-52-1
2,4'-Methyldianilin	1208-52-2
4,4'-Methyldianilin	101-77-9
4,4'-Methylen-di-o-toluidin	838-88-0
2-Methyl-5-nitroanilin	99-55-8
2-Nitro-p-phenylendiamin	5307-14-2
4,4'-Oxydianilin	101-80-4
<i>m</i> -Phenylendiamin	108-45-2
<i>o</i> -Phenylendiamin	95-54-5
<i>o</i> -Toluidin	95-53-4
<i>p</i> -Toluidin	106-49-0
1,4,5,8-Tetraaminoanthrachinon ¹	2475-45-8
4,4'-Thiodianilin	139-65-1
2,4,5-Trimethylanilin	137-17-7

¹ Die grau unterlegten Analyten sind in der vorliegenden Methode (noch) nicht enthalten.

7.6.2 Grundlagen des Verfahrens

Die Analyten werden entsprechend DIN EN 645 kaltwasserextrahiert oder nach DIN EN 647 heißwasserextrahiert, dabei sind die Vorgaben der Methodensammlung Papier, Karton und Pappe des BfR zu beachten (1.2 Kaltwasserextrakt oder 1.3 Heißwasserextrakt). Die resultierenden Extrakte werden anschließend mittels Umkehrphasen Flüssigchromatographie gekoppelt mit tandem-massenpektrometrischer Detektion (RP-HPLC-MS/MS; reversed phase high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry) gemessen und quantifiziert. Zwei ausgewählte Fragmentationen und die Retentionszeit dienen zur Identifizierung der jeweiligen Analyten. Die Quantifizierung erfolgt über eine externe Kalibration anhand eines ausgewählten Massenübergangs (Peakflächenverhältnis des Analyten zum internen Standard (ISTD)).

7.6.3 Chemikalien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, sind analysenreine Chemikalien und Reinstwasser (>18 mΩ) sowie LC-MS grade Lösungsmittel für die HPLC zu verwenden.

Tabelle 2. Chemikalien und Lösungen.

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Acetonitril	k. A.	k. A.
Ameisensäure	k. A.	k. A.
Methanol	k. A.	k. A.
Reinstwasser	k. A.	k. A.
PAA-Standardsubstanzen	k. A.	siehe Tabelle 1, Feststoffe oder Lösungen, wenn kommerziell erhältlich
ISTD-Standardsubstanzen	k. A.	deuterierte PAA, Feststoffe oder Lösungen, wenn kommerziell erhältlich
Eluenten		
Elutionslösung A	k. A.	Wasser + 0,05 % Ameisensäure (v/v)
Elutionslösung B	k. A.	Methanol + 0,05 % Ameisensäure (v/v)
PAA und ISTD Lösungen		
PAA Stammlösungen	c = etwa 1 mg/mL	Etwa 10 mg der PAA-Standardsubstanzen einwiegen (Waagengenauigkeit 0,1 mg) und in einem 10 mL-Braunglas-Messkolben in Acetonitril lösen. Die exakte Konzentration der Einzellösungen ist abhängig von der tatsächlichen Einwaage.
PAA-Mix	c = 1 µg/mL	Das einzusetzende Volumen der einzelnen Stammlösungen richtet sich nach der tatsächlichen Konzentration der entsprechenden Lösung. Die Herstellung erfolgt in Methanol.
ISTD-MIX	c = 1 µg/mL	Die Herstellung erfolgt analog des PAA-Mixes.

7.6.4 Geräte und Hilfsmittel

normale Laborausstattung, inklusive Laborausstattung gemäß DIN EN 645 oder 647 und den jeweiligen Anpassungen der Methodensammlung Papier, Karton und Pappe des BfR (1.2 Kaltwasserextrakt oder 1.3 Heißwasserextrakt).

HPLC-Säulen

Vorsäule: PFP (Pentafluorophenyl) Material

Trennsäule: PFP-Säule (100 x 2,1 mm, 2,6 µm Partikelgröße)

7.6.5 Durchführung

7.6.5.1 Kalt- oder Heißwasserextrakt

Bei Papieren und Kartonagen, welche Wasser aufnehmen und für den Kontakt mit feuchten und/oder fettenden Lebensmitteln bestimmt sind, wird basierend auf dem vorhersehbaren

Gebrauch ein Kaltwasserextrakt gemäß DIN EN 645 oder ein Heißwasserextrakt nach DIN EN 647 angefertigt, dabei sind die Vorgaben der Methodensammlung Papier, Karton und Pappe des BfR zu beachten (1.2 Kaltwasserextrakt, 1.3 Heißwasserextrakt). Vor der Analyse wird der Extrakt entsprechend der jeweiligen Vorgaben per Filtration von Schwebeteilchen gereinigt. Vor der LC-MS/MS Messung wird die Extraktlösung mit ISTD-Mix so versetzt, dass die ISTD-Konzentration in der Messlösung 5 ng/mL beträgt.

7.6.5.2 Kalibrierung

Aus dem PAA-Mix und dem ISTD-Mix werden die im Folgenden aufgeführten Kalibratoren im 10 mL Messkolben hergestellt. Die Kalibratoren Kal 0-6 enthalten die PAA und ISTD in den angegebenen Konzentrationen.

Die Stabilität der Stamm-, Mix- und Kalibrierlösungen über den Anwendungszeitraum ist sicherzustellen.

Tabelle 3. Verdünnungsschema zur Herstellung der Kalibrierlösungen.

	Volumen PAA-Mix [μ L]	Konzentration PAA [ng/mL]	Volumen ISTD-Mix [μ L]	Konzentration ISTD [ng/mL]
Kal 0	0	0	50	5
Kal 1	10	1	50	5
Kal 2	20	2	50	5
Kal 3	40	4	50	5
Kal 4	60	6	50	5
Kal 5	80	8	50	5
Kal 6	100	10	50	5

7.6.5.3 HPLC-Bedingungen

Die folgenden HPLC-Bedingungen ergeben eine ausreichende Trennung der in der Methode enthaltenen PAA. Abhängig vom verwendeten HPLC-System kann eine Anpassung der chromatographischen Parameter nötig sein.

Fluss: 0,2 mL/min
 Säulentemperatur: 40,0 °C
 Solvent A: Wasser + 0,05 % Ameisensäure (v/v) (siehe Tabelle 2)
 Solvent B: Methanol + 0,05 % Ameisensäure (v/v) (siehe Tabelle 2)

Gradient: Zeit [min] %Solvent B
 0,0 5
 6,0 95
 13,0 95
 13,5 5
 27,0 5

7.6.5.4 MS/MS-Bedingungen

Die Messungen können mit jedem kommerziellen Tandem-Massenspektrometer durchgeführt werden, sofern eine ausreichende Sensitivität gewährleistet werden kann. Analyt-spezifische Parameter sowie Quellenbedingungen müssen für das verwendete Gerät optimiert werden.

7.6.6 Auswertung und Berechnung

7.6.6.1 Auswertung

Die Bestimmung der Amine erfolgt mittels HPLC-MS/MS. Die Identifizierung wird mit Hilfe der Retentionszeit und zwei ausgewählten Massenübergängen (Quantifier und Qualifier) durchgeführt. Zur Quantifizierung wird ein Massenübergang (Quantifier) genutzt.

Die Isomere *o*- und *p*-Toluidin coeluiieren mit der beschriebenen HPLC Methode und können auch massenspektrometrisch nicht getrennt werden. Daher ist eine Quantifizierung von *o*- und *p*-Toluidin mit der vorliegenden Methode nur als Summe möglich.

7.6.6.2 Kalibrierung und Berechnung

Zur Kalibration des Systems werden die Kalibratoren Kal 0-6 (s. Punkt 7.6.5.2) gemessen und eine lineare Regression der Peakflächenverhältnisse (Quantifier) der jeweiligen PAA zum ausgewählten internen Standard gegen das Konzentrationsverhältnis durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient sollte $>0,99$ sein. Die Konzentrationen der einzelnen PAA in der Probe werden über das Peakflächenverhältnis des jeweiligen Analyten zum ISTD unter Berücksichtigung verwendeter Verdünnungsfaktoren berechnet.

7.6.7 Literatur

DIN EN 645:1994-01, Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln; Herstellung eines Kaltwasserextraktes.

EN 645:1993, Paper and board intended to come into contact with foodstuffs; preparation of a cold water extract.

DIN EN 647:1994-01, Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln; Herstellung eines Heißwasserextraktes.

EN 647:1993: Paper and board intended to come into contact with foodstuffs; preparation of a hot water extract.

1.2 Kaltwasserextrakt, Methodensammlung Papier, Karton und Pappe, https://www.bfr.bund.de/cm/343/herstellung_eines_kaltwasserextraktes.pdf

1.3 Heißwasserextrakt, Methodensammlung Papier, Karton und Pappe, https://www.bfr.bund.de/cm/343/herstellung_eines_heisswasserextraktes.pdf