

Einfache Methode mit Fallstricken: Beurteilung des Übergangs von optischen Aufhellern auf Lebensmittel

A. Rosenberger, T. J. Simat

Professur für Lebensmittelkunde und Bedarfsgegenstände, Technische Universität Dresden, Bergstr. 66, 01069 Dresden

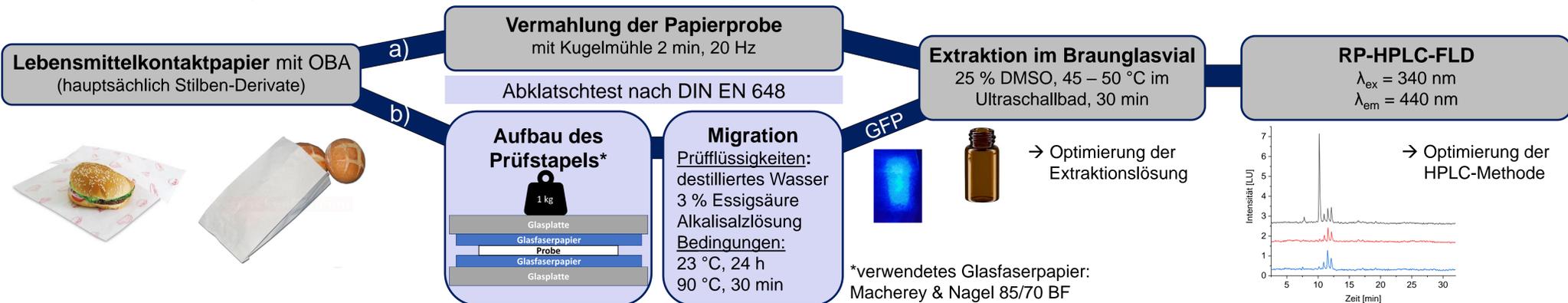
Einleitung

Bei optischen Aufhellern (OBA) handelt es sich um fluoreszierende Substanzen, welche in der Papierherstellung eingesetzt werden, um einen Gelbstich auszugleichen. In Papier werden hauptsächlich Stilben-Derivate verwendet, welche anhand ihres Sulfonierungsgrad in di- (DSS), tetra- (TSS) und hexasulfonierte (HSS) Stilben-Derivate unterteilt werden können. Werden aufgehellte Papiere im Lebensmittelkontakt eingesetzt, können OBA auf Lebensmittel übergehen. Der Übergang wird durch Art. 3 der VO 1935/2004 geregelt, allerdings gibt es bisher keine spezifischen rechtlichen Vorgaben. Bei der Herstellung von Papieren sollen OBA nach BfR-Empfehlung XXXVI in einer Menge von maximal 0,3 % bezogen auf die Papiermasse eingesetzt werden [1]. Die Prüfung auf einen möglichen Übergang in Lebensmittel erfolgt nach DIN EN 648, wobei bei der visuellen Bewertung die Stufe 5 erreicht werden muss [2]. In der DIN prEN 17600 (2020) wird alternativ eine RP-HPLC-FLD-Methode vorgeschlagen, wobei die Migrationsmethode der DIN EN 648 angewendet wird und die migrierten OBA anschließend aus dem GFP extrahiert und quantifiziert werden [3]. Ziel dieser Arbeit war es, eine Extraktionsmethode für Glasfaserpapiere und vermahlene Papierproben mit anschließender RP-HPLC-FLD-Messung zu optimieren und zu validieren. Zudem sollte die Robustheit der OBA hinsichtlich verschiedener Parameter geprüft werden.

Zusammenfassung

Die RP-HPLC-FLD-Methode zur Erfassung der OBA wurde durch Erweiterung des Gradienten optimiert, sodass DSBP erfasst und HSS und TSS getrennt werden. Zudem wurde eine Extraktionsmethode für migrierte OBA aus GFP und für OBA aus Proben optimiert und validiert. Die in DIN prEN 17600 vorgeschlagene Methode zur Quantifizierung der migrierten OBA sollte hinsichtlich mehrerer Parameter (RP-HPLC-FLD-Methode, Injektionslösung, Extraktionslösung) angepasst werden. Die Intensitätsunterschiede der Fluoreszenzstrahlung einzelner OBA werden durch die Detektion als Gruppe nicht berücksichtigt. In den Versuchen zur Stabilität ausgewählter OBA konnte gezeigt werden, dass deren Fluoreszenzintensität auf Glasfaserpapier mit der Trocknungszeit deutlich abnimmt. Dieser Effekt wurde nach visueller Betrachtung unter der UV-Lampe beobachtet und korreliert mit der Quantifizierung der OBA nach RP-HPLC-FLD. Somit werden nach DIN prEN 17600 und DIN EN 648 durch die Trocknung der GFP eventuell nicht alle OBA quantifiziert. Analog zur Durchführung der DIN EN 648 kann anhand der Fluoreszenz lediglich das fluoreszierende trans-Isomer detektiert werden. Damit werden nicht alle migrierenden Stilben-Derivate erfasst. Daher ist es fraglich, inwieweit die Fluoreszenzdetektion zur Quantifizierung von optischen Aufhellern zur Beurteilung einer Konformität nach Art. 3 VO 1935/2004 zielführend ist.

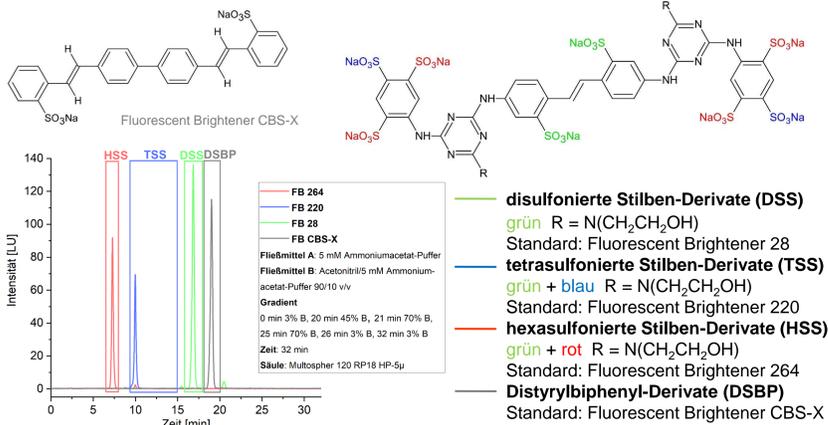
Methodik zur Erfassung a) der extrahierbaren OBA in Proben und b) der migrierten OBA auf GFP



Optimierung der Methodik

Optimierung der Trennmethode mithilfe von Standards und Proben

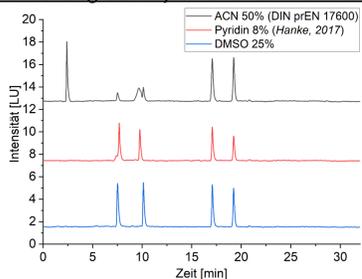
Die Anwendung der HPLC-Parameter nach DIN prEN 17600 führte zu einer unzureichenden Trennung von FB 264 und FB 220, wobei zudem der Standard FB CBS-X nicht erfasst wurde.



Trennung der vier Standards nach optimierter RP-HPLC-FLD-Methode, mit Integrationsstern für die jeweilige OBA-Gruppe und ausgewählten HPLC-Parametern

semiquantitative Erfassung der OBA als Summenäquivalent zum jeweiligen Standard (FB 28, FB 220, FB 264, FB CBS-X)

Optimierung der Injektions- und Extraktionslösung

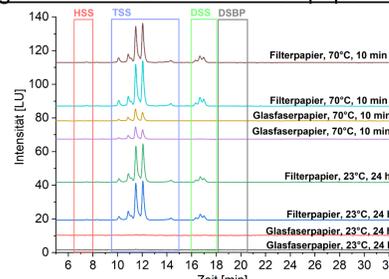


Dotierung von GFP einem Standard-Mix und anschließender Extraktion mit Acetonitril (ACN) 50 %, Pyridin 8 % und Dimethylsulfoxid (DMSO) 25 % in bidestilliertem Wasser

Für die Probenextraktion (a) und Extraktion der GFP nach Migration (b) ist **50 % ACN** als Extraktionslösung (vorgeschlagen in DIN prEN 17600) aufgrund der Peakdeformation von FB 264 und FB 220 **ungeeignet**.

Bei der Verwendung von **25 % DMSO** konnte eine hohe Extraktionsleistung mit gleichzeitig guter chromatographischer Trennung erzielt werden. In vorherigen Arbeiten von Hanke (2017) wurde **8 % Pyridin** verwendet, welches zur Peakdeformation von FB 264 führte [3].

Migration von OBA auf Glasfaserpapier im Vergleich zu Filterpapier



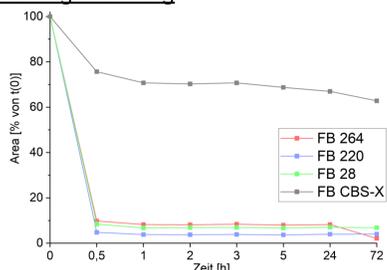
Migration von OBA der Vorderseite der Probe 10 auf Glasfaserpapier und Filterpapier unter verschiedenen Migrationsbedingungen in destilliertem Wasser

Bei der Verwendung von Filterpapier wurde eine **höhere** Menge an migrierten OBA im Vergleich zu Glasfaserpapier quantifiziert. Zusätzlich zu TSS migrierten bei 23°C und bei 70°C auch DSS auf Filterpapier.

Weitere Untersuchungen führten zu der Annahme, dass die Migration von OBA aus Proben auf Glasfaserpapier **schlecht reproduzierbar** ist (siehe Stabilität der OBA).

Stabilität ausgewählter optischer Aufheller

in wässriger Lösung:



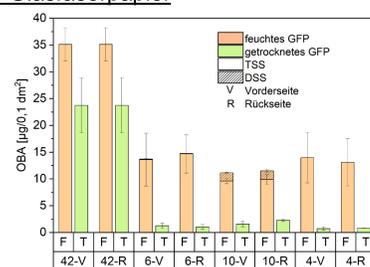
Abnahme der Fluoreszenz der vier OBA-Standards in wässriger Lösung unter Einfluss von Tageslicht, quantifiziert mittels RP-HPLC-FLD

Standard-Mix gelöst in bidestilliertem Wasser im Klarglasvial unter dem Einfluss von Tageslicht

Stilbene unterliegen bei Lichteinfluss einer cis/trans-Isomerisierung, wobei eine Umwandlung von der fluoreszierenden trans-Form in die nicht fluoreszierende cis-Form erfolgt. Daraus resultiert eine Abnahme der Fluoreszenz:

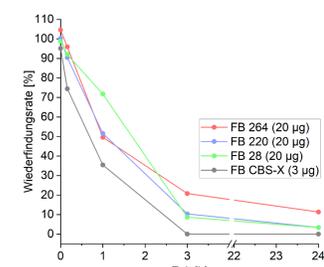
- Abnahme der Fluoreszenz der Stilben-Derivate innerhalb von 30 min auf **< 10 %** der Ausgangs-Fluoreszenzintensität bei 0 h
- das trans-Isomer des FB CBS-X als DSBP-Derivat zeigt in wässriger Lösung eine höhere Stabilität als das trans-Isomer der drei Stilben-Derivate
- das Arbeiten unter Lichtausschluss wird in der DIN EN 648 und DIN prEN 17600 gefordert

auf Glasfaserpapier

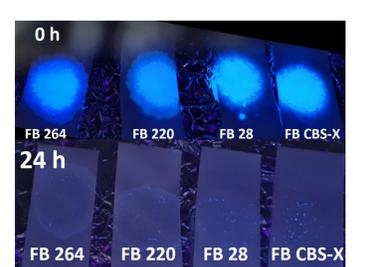


Migrierte OBA einzelner Proben nach Extraktion der feuchten GFP (F, direkt nach Migration) und nach Extraktion der getrockneten GFP (T, nach 2,5 h Trocknung), quantifiziert mittels RP-HPLC-FLD, Migrationsbedingungen 70 °C, 10 min in destilliertem Wasser

- Fluoreszenzintensität auf Glasfaserpapier nimmt bei allen vier Standards bereits nach drei Stunden Trocknungszeit **um > 80 %** ab
- Extraktion von feuchten GFP (direkt nach der Migration aus Papierproben) führt zu **höheren quantifizierbaren OBA-Übergängen** als die Extraktion von getrockneten GFP (nach 2,5 h Trocknung, gemäß DIN prEN 17600 und DIN EN 648)

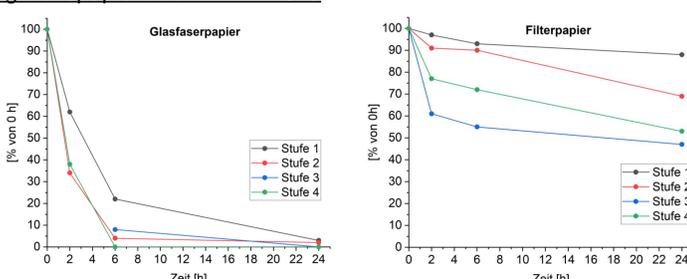


Wiederfindungsraten nach Dotierung einer definierten Menge der Standards auf GFP zu verschiedenen Trocknungszeiten, quantifiziert mittels RP-HPLC-FLD



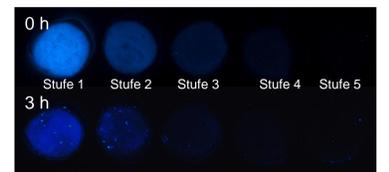
Dotierung von Glasfaserpapier mit einzelnen Standard-Lösungen zum Zeitpunkt 0 h und 24 h nach Trocknung im Dunkeln, Betrachtung unter der UV-Lampe bei 365 nm

Vergleichspapiere der DIN EN 648



Abnahme der Fluoreszenzintensität der einzelnen Vergleichspapiere nach DIN EN 648 (dotiert mit FB 28), Verwendung von GFP und quantifiziert mittels RP-HPLC-FLD

Abnahme der Fluoreszenzintensität der einzelnen Vergleichspapiere nach DIN EN 648 (dotiert mit FB 28), Verwendung von Filterpapier und quantifiziert mittels RP-HPLC-FLD



Vergleichsreihe der DIN EN 648 (Dotierung mit FB 28) zum Zeitpunkt 0 h und nach Trocknung für 3 h im Dunkeln, Stufe 1-5, Verwendung von GFP, Betrachtung unter der UV-Lampe bei 365 nm

- eine Instabilität der Fluoreszenz auf Glasfaserpapier, abhängig von der Menge an FB 28 auf den Papieren, ist erkennbar
- nach 24 h eine Abnahme der mittels RP-HPLC-FLD detektierten Menge an FB 28 von **> 95 %** für alle Stufen (GFP)
- die Fluoreszenz ist auf Filterpapier, insbesondere bei hohen dotierten Mengen, stabiler als auf GFP