

Vorabveröffentlichung:

Untersuchungsergebnisse zu PFAS in Coffee-to-go-Bechern und anderen Streetfoodverpackungen

Andrea Dombrowski (Goethe-Universität Frankfurt), Dr. Sandy Falk (Landesbetrieb Hessisches Landeslabor), Dr. Sebastian Georgii (Landesbetrieb Hessisches Landeslabor), Prof. Dr. Henner Hollert (Goethe-Universität Frankfurt), Dr. Sarah Johann (Goethe-Universität Frankfurt), Prof. Dr. Oehlmann (Goethe-Universität Frankfurt)

Zusammenfassung

Um den möglichen Eintrag persistenter, potentiell toxikologisch relevanter per- und polyfluorierter Alkylsubstanzen (PFAS) in die Umwelt und in Nahrungsmittel zu untersuchen, wurden im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) im Rahmen eines Projektes ausgewählte Lebensmittelkontaktmaterialien, die über die amtliche Lebensmittelüberwachung eingesendet wurden, auf das Vorkommen fluorierter Verbindungen untersucht. Unter den insgesamt 54 in Hessen vertriebenen Lebensmittelkontaktmaterialien befanden sich beschichtete Coffee-to-go-Becher, beschichtete Pappcontainer (Foodtrays), Papierbeutel für Lebensmittel sowie Backpapier und Muffinförmchen aus Papier. 36 Lebensmittelkontaktmaterialien wurden auf das Vorkommen organischen Fluors mit Hilfe des Summenparameters "total fluorine" (TF) untersucht. Anschließend wurden sechs der untersuchten Proben mittels Einzelstoffanalytik auf insgesamt 96 PFAS-Einzelverbindungen untersucht, um mögliche eingesetzte Substanzen zu identifizieren.

An ausgewählten Proben wurde mittels des AOF-Summenparameters zudem untersucht, ob fluorierte Verbindungen aus dem Lebensmittelkontaktmaterial in wässrige und ethanolische Migrate (Lebensmittelsimulanzien) übergehen. Eine Auswahl der untersuchten Extrakte und Migrate wurde weiterhin mit Hilfe sieben verschiedener Bioassays hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht. Dabei ist auch die biologische Aktivität in Abhängigkeit der Migrationsdauer betrachtet worden. Um die beobachteten Effekte möglichen Substanzen zuzuordnen, sind Migrate in einer weiteren Untersuchungsreihe dem TTR TRß CALUX-Test unterzogen worden, der effektbasiert spezifisch auf PFAS reagiert.

Bislang gibt es in Deutschland keinen Richtwert für das Vorkommen fluorierter Verbindungen in Lebensmittelkontaktmaterialien. Dänemark ist das einzige europäische Land, in dem seit Juli 2020 ein Richtwert für organisch gebundenes Fluor in Lebensmittelkontaktmaterialien festgelegt wurde, dieser Richtwert liegt bei 20 Milligramm pro Kilogramm (mg/kg) Material. Oberhalb dieses Gehaltes geht man von einem gezielten Einsatz fluorierter Verbindungen aus, während bei Gehalten <20 mg/kg auch Verunreinigung ursächlich sein können. In dem am 7. Februar 2023 von der ECHA veröffentlichten Beschränkungsvorschlag für die PFAS-Stoffgruppe bzw. dem zugrundeliegenden Bericht nach Anhang XV der REACH-Verordnung ist für die Überwachung in Ziffer 2.iii. als Grenzwert für PFAS insgesamt (einschließlich polymerer PFAS), gemessen als Gesamtfluorgehalt von 50 mg/kg angegebenen.

Die Untersuchungen zeigen, dass Lebensmittelkontaktmaterialien, die fluoridierte Verbindungen enthalten, mittels des Screening Verfahrens TF – bedingt auch mittels AOF – identifiziert werden können. In über der Hälfte aller untersuchten Lebensmittelkontaktmaterialien wurden TF-Gehalte oberhalb von 20 mg/kg nachgewiesen. Die TF-Gehalte der Materialien lagen zwischen 1,1 und 912 mg/kg. Mittels Einzelstoffanalytik mit 96 Analyten ließ sich jeweils nur ein niedriger Prozentteil der in den Proben festgestellten Fluorgehalte identifizieren und spezifischen PFAS-Verbindungen zuordnen. Im Ergebnis ist außerdem festzustellen, dass keine der untersuchten Migrante hinsichtlich der biologischen Aktivität unauffällig war. Bei den untersuchten Kaffeebechern sind in den Migraten insbesondere anti-estrogene und Dioxin-ähnliche Effekte nachgewiesen worden; bei Meal-to-go-Boxen waren es toxische, estrogen- und Dioxin-ähnliche. Bedenkliche biologische Wirkungen traten dabei spätestens nach zehn Minuten Kontaktzeit auf. Der TTR TRB CALUX-Test zeigt, dass Effekte in den untersuchten Migraten auf PFAS zurückgeführt werden können. Hierbei konnten für die einzelnen Lebensmittelkontaktmaterialien deutliche Unterschiede bezüglich des durch PFAS induzierten potentiellen Eingriff in das Thyroidsystem beobachtet werden.

Einleitung

PFAS (vormals auch PFC – per- und polyfluorierte Chemikalien) sind Verbindungen anthropogenen Ursprungs die, wie auch andere persistente halogenorganische Verbindungen, zu den ubiquitär vorkommenden Kontaminanten zählen. Bei perfluorierten Alkylsubstanzen handelt es sich um organische Verbindungen, bei denen alle Wasserstoffatome an der Kohlenstoffkette – mit Ausnahme der Wasserstoffatome, die Bestandteil funktioneller Gruppen sind – vollständig durch Fluoratome substituiert sind. Polyfluoralkylverbindungen hingegen sind Verbindungen bei denen die Wasserstoffatome am Kohlenstoffgerüst nur teilweise, aber nicht vollständig durch Fluoratome substituiert sind. Die Stoffgruppe der PFAS wird nach der OECD-Definition¹ anhand ihrer chemischen Struktur definiert – alle PFAS-Verbindungen enthalten eine oder mehrere vollständig fluoridierte Methyl- (-CF₃) oder Methylengruppen (-CF₂-), wobei – etwas vereinfacht – keine unmittelbare Bindung zu einer Amin-, Alkohol- oder Carbonylgruppe bestehen darf. Die Stoffgruppendefinition fußt auf der außerordentlich hohen chemischen und thermischen Stabilität vollständig fluoridierter Methyl-/Methylengruppen. Man geht derzeit davon aus, dass bis zu 10.000 Verbindungen der Gruppe der PFAS zuzuordnen sind.

PFAS sind thermisch und chemisch sehr stabil und besitzen teilweise ambiphile Eigenschaften, weshalb diese seit den 1950er Jahren in zahlreichen industriellen Prozessen, aber auch in privaten Haushalten zum Einsatz kommen. PFAS werden ab einer Kettenlänge von sechs (Perfluoralkylsulfonsäuren) bzw. sieben perfluorierten Kohlenstoffatomen (Perfluoralkylcarbonsäuren) als langkettig bezeichnet, sind vergleichsweise schlecht wasserlöslich und besitzen im Vergleich zu kurzkettigen PFAS eine hohe Bindungsaffinität gegenüber organischem Material. Daher werden kurzkettige PFAS überwiegend in wässrigen Matrices wie Oberflächen-, Grund- und Regenwasser sowie Schnee nachgewiesen und scheinen sich unter anderem über den Wasserpfad global zu verteilen; wohingegen langkettige PFAS eine vergleichsweise hohe Bindungsaffinität gegenüber organischem Material besitzen, in Umwelt und

¹ Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2021) Series on Risk Management No. 61: Reconciling Terminology of the Universe of Per- and Polyfluoroalkyl Substances: Recommendations and Practical Guidance.

<https://www.oecd.org/chemicalsafety/portal-perfluorinated-chemicals/terminology-per-and-polyfluoroalkyl-substances.pdf>.

Lebewesen sehr langlebig sind und sich in verschiedenen Organismen entlang von Nahrungsketten bis hin zum Menschen anreichern können.

Materialien und Methoden

Dem Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) wurden [REDACTED] insgesamt 54 Lebensmittelkontaktmaterialien eingesendet. Unter den Proben befanden sich beschichtete Coffee-to-go-Becher aus Pappe, Pappteller, fett- und wasserabweisende Papier- und Folienverpackungen für Burger, Döner und Torten, beschichtete Pappcontainer (Foodtrays, Salatschalen, Burger- und Sandwichboxen), Papierbeutel für Lebensmittel, Backpapiere sowie Muffinförmchen aus Papier. Die verschiedenen Probenarten, ihre Materialien sowie die Probenanzahl sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Untersuchte Materialien

Probenart	Bestimmung/Material	Anzahl
Beschichtete Kaffeebecher	Einmal-Trinkbecher und Coffee-to-go-Becher auf Cellulosebasis	19
Essenscontainer aus beschichteter Pappe	Salatschalen, Sandwichboxen, Burgerboxen, Foodtrays	16
Beschichtete Papier- und Folienverpackungen	Verpackungen für Burger, Torten, Döner	6
Papierförmchen	Muffinförmchen, Backförmchen	5
Papierbeutel	Imbiss-/Snack-/Bäckereitüten	2
Backpapiere	Backpapierzuschnitte auf Cellulosebasis teilweise bedruckt	3
Pappteller	teilweise bunt bedruckt	2
Musterfolien für Lebensmittelkontaktmaterialien	Folie für Lebensmittelverpackungen	1

Extraktionsverfahren

Für Untersuchungen am Extrakt wurden die Proben zunächst zerkleinert und anschließend extrahiert. Die Extraktionsbedingungen wurden so gewählt, dass sie möglichst ein „worst-case-Szenario“ abdecken, dazu wurde aus den zerkleinerten Proben einerseits ein Heißwasserextrakt (in Anlehnung an DIN EN 647²) andererseits ein ethanolischer Extrakt (in Anlehnung an Trier et al. 2011³ und VO (EU) Nr. 10/2011⁴) hergestellt.

² DIN EN 647:1994-01. Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln; Herstellung eines Heißwasserextraktes; Deutsche Fassung EN 647:1993

³ Trier X, Granby K, Christensen JH (2011). Polyfluorinated surfactants (PFS) in paper and board coatings for food packaging. Environmental science and pollution research international, 18:1108–1120.

⁴ VERORDNUNG (EU) Nr. 10/2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen vom 14. Januar 2011.

Heißwasserextraktion

Für die Heißwasserextraktion wurden je 50 cm² aus zwei identischen Prüfmustern entnommen (entsprechend einer Gesamtprobenfläche von 1 dm²). Die Proben wurden in 1 bis 2 cm große Stücke geschnitten, in ein verschließbares Glasgefäß gegeben, mit 40 mL Wasser (auf 70 °C vorgewärmt) aufgefüllt. Das Glasgefäß wurde verschlossen und im vorgeheizten Ultraschallbad zwei Stunden bei konstanter Temperatur (70 °C) extrahiert. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und mittels Faltenfilter filtriert. Für die weitere Aufarbeitung und Messung wurde jeweils ein Aliquot von 20 ml entnommen.

Ethanolische Extraktion

Für die ethanolische Extraktion wurden je 50 cm² aus zwei identischen Prüfmustern entnommen (entsprechend einer Gesamtprobenfläche von 1 dm²). Die Proben wurden in 1 bis 2 cm große Stücke geschnitten, in ein verschließbares Glasgefäß gegeben und mit 40 mL Ethanol (95 % v/v), das zuvor auf 70 °C erwärmt wurden, aufgefüllt. Das Glasgefäß wurde verschlossen und im vorgeheizten Ultraschallbad zwei Stunden bei konstanter Temperatur (70 °C) extrahiert. Der Überstand (In-vitro-Assays), bzw. ein Aliquot von 20 mL (AOF), wurde in einen geeigneten Rund- oder Spitzkolben überführt und mittels Rotationsverdampfer auf 1-2 mL eingengt. Die Probe wurde zur weiteren Aufarbeitung und Messung in einem geeigneten Volumen Wasser (AOF) bzw. DMSO (In-vitro-Assays) rekonstituiert.

Migrationsverfahren

Die Migrationsversuche wurden mithilfe ethanolischer Lösung (95 % vol) als Lebensmittelsimulanz für fettthaltige Lebensmittel und Getränke und wässriger Migrationslösung als Lebensmittelsimulanz für Lebensmittel mit hydrophilen Eigenschaften einschließlich Getränken in Form einer Heißwasser-migration über zwei Stunden bei 70 °C im Trockenschrank durchgeführt. Die Migrationsbedingungen erfolgten in Anlehnung an VO (EU) Nr. 10/2011. Die Gehalte wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Migrationslösungsvolumina auf die Kontaktfläche bezogen.

Die Essenscontainer und die Backförmchen haben den Migrationsbedingungen bei 70 °C nicht standgehalten, alternativ wurde daher bei diesen Proben die Migration mit wässriger Simulanz für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Untersuchung der zeitabhängigen biologischen Aktivität wurde die Migration jeweils nach 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten gestoppt.

Bestimmung des Summenparameters „total fluorine“ (TF)

In der Verbrennungs-Ionen-Chromatographie (engl. Combustion Ion Chromatography, CIC) wird ein Hochtemperaturverbrennungsofen mit Absorptionsmodul mit einem Ionenchromatographen (IC) gekoppelt. Diese Gerätekonfiguration ermöglicht die Umsetzung organischer Verbindungen in anorganische Derivate mittels kontrollierter Verbrennung und anschließender Bestimmung der gebildeten anorganischen Ionen mittels IC. Beim Parameter „Totale Fluorine“ (TF) genannt, wird der Gesamtfluorgehalt einer feste Probe (hier Papier) mittels CIC (Combustion Ion Chromatography) bestimmt. Das Probenmaterial wird getrocknet, zerkleinert und bei ca. 1.000 °C verbrannt. Die Verbrennungsgase werden im Wasser absorbiert und die gebildeten Fluoride werden mittels Ionenchromatographie quantifiziert. Der TF wird von einigen Laboren standardmäßig für die

summarische Bestimmung fluorierter Verbindungen in Lebensmittelkontaktmaterialien eingesetzt. Zu den summarisch erfassbaren organischen Fluorverbindungen gehören Per- und polyfluorierte Alkylsubstanzen (PFAS) sowie fluoridierte Pflanzenschutzmittel und Arzneimittel. Die TF-Bestimmung wurde vom Institut Eurofins Umwelt Ost GmbH durchgeführt.

Bestimmung des Summenparameters „adsorbierbares organisches Fluor“ (AOF)

Beim Parameter AOF werden die fluoridierten organischen Probeninhaltsstoffe (organische Fluorverbindungen) wässriger Matrices an Aktivkohle adsorbiert. Die angereicherte Aktivkohle wird bei 1.000 °C im Sauerstoff/Argon-Strom verbrannt. Die dabei gebildeten Fluoride werden durch Ionenchromatographie mit Leitfähigkeit-Detektion bestimmt.

Die im LHL entwickelte CIC-Methode für die Bestimmung des Summenparameters AOF ermöglicht eine Bestimmung der organischen Fluorverbindungen in wässrigen Umweltmatrices⁵ und wird als akkreditierte Hausmethode für Umweltuntersuchungen verwendet, ist bislang jedoch für die Bestimmung von Migraten aus Lebensmittelkontaktmaterialien nicht validiert und akkreditiert. Die durchgeführte Analytik hatte daher den Charakter einer Screening-Untersuchung.

Bestimmung ausgewählter PFAS-Einzelverbindungen

Die Untersuchung sechs ausgewählter Proben auf insgesamt 96 Einzelverbindungen erfolgte beim SGS-Institut Fresenius. Die Bestimmung von insgesamt 83 Einzelverbindungen (darunter Per- und Polyfluorierte Perfluoralkylcarbon- und Perfluoralkylsulfonsäuren, ADONA, Perfluoralkylphosphonsäuren, PAPs und diPAPs) erfolgte mittels LC-MS/MS nach Extraktion und anschließender Aufreinigung und Anreicherung der Analyten, weitere 13 Verbindungen (darunter Fluortelomeralkohole und Fluoracrylate) wurden mittels GC-MS analysiert.

Effekt-basierte Bestimmung der toxischen Wirkung

Ein Teil der vom LHL chemisch-analytisch charakterisierten Lebensmittelkontaktmaterialien (vier Kaffeebecher, zwei Essenscontainer und ein Papierförmchen) wurden an der Goethe-Universität (GU) auf ihre biologische Aktivität bzw. toxische Wirkung mit Hilfe effekt-basierter In-vitro-Assays untersucht. Dafür wurden von den Lebensmittelkontaktmaterialien mit dem bereits oben beschriebenen Verfahren Heißwasser- und ethanolische Extrakte sowie wässrige und ethanolische Migrationslösungen mit einer Temperatur der genutzten Flüssigkeiten von 70 °C hergestellt. Für die Testung in den In-vitro-Assays wurden die Extrakte und Migrationslösungen über eine Festphasenextraktion (SPE – solid phase extraction mit Oasis HLB-Kartuschen gemäß Herstellervorgaben) angereichert und in Dimethylsulfoxid mit einem Anreicherungsfaktor von 1.000 (ethanolische Migrate) oder 2.500 (wässrige Migrate) überführt.

Zusätzlich zu den zwei Stunden dauernden Migrationsversuchen, wurde auch eine zeitabhängige Migration von vier zuvor auffälligen Lebensmittelkontaktmaterialien durchgeführt. Dafür wurde die Migration jeweils nach 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten gestoppt und die Basistoxizität (Mikrotox-Assay)

⁵ von Abercron E, Falk S, Stahl T, Georgii S, Hamscher G, Brunn H, Schmitz F (2019). Determination of adsorbable organically bound fluorine (AOF) and adsorbable organically bound halogens as sum parameters in aqueous environmental samples using combustion ion chromatography (CIC). Sci Total Environ 673: 384–391.

und die Dioxin-ähnliche Aktivität, bei zwei Kaffeebechern zusätzlich auch die auffällige anti-estrogene Aktivität, bei zwei Streetfoodverpackungen die estrogene Aktivität ermittelt.

Die **Basistoxizität** der Proben wurde im Mikrotox-Assay mit dem Bakterium *Aliivibrio fischeri* gemäß der ISO-Richtlinie 1134 8-3:2007 ermittelt⁶. Die Hemmung der Lumineszenz von Leuchtbakterien ist dabei der erfasste Parameter für die auch als unspezifische Toxizität bezeichnete Basistoxizität der Inhaltsstoffe des untersuchten Extrakts oder Migrats.

Die **Mutagenität** der Proben wurde im Ames-Fluktationstest mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* gemäß ISO-Richtlinie 11350:2012⁷ mit den Bakterienstämmen YG 1041 und YG 1042, jeweils mit und ohne S9-Mix ermittelt. Die im Test eingesetzten Mangelmutanten von *S. typhimurium* sind nicht in der Lage, in Histidin-freiem Medium zu überleben. Eine mutagene Probe führt zu einer Rückmutation und dem Überleben der Bakterien. Sofern der Anteil der Rückmutationen 20,8 % überschreitet, ist die Probe mutagen. Der S9-Mix ist eine Präparation einer Mischung von Leberenzymen und wird eingesetzt, um die enzymatische Umwandlung von Substanzen in der Leber in In-vitro-Testverfahren zu simulieren, bei der aus einer nicht mutagenen Ausgangssubstanz mutagene Metabolite entstehen können.

Die rezeptorvermittelte **endokrine** (hormonähnliche) **Aktivität** der Proben wurde über rekombinante Hefe-Reportergergen-Assays ermittelt. Die Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) exprimieren das humane Gen für den Estrogenrezeptor α bzw. den Testosteronrezeptor, so dass eine Aktivierung bzw. Blockade der Rezeptors erfasst werden kann. Die Durchführung erfolgte gemäß ISO-Richtlinie 19040-1:2018⁸. Die estrogene Aktivität wurde im YES (yeast estrogen assay), die androgene Aktivität im YAS (yeast androgen assay), die anti-estrogene Aktivität im YAES (yeast anti-estrogen assay) und die anti-androgene Aktivität im YAAS (yeast anti-androgen assay) ermittelt.

Analog zu den endokrinen Aktivitäten wurde die **Dioxin-ähnliche Aktivität** ebenfalls mit einem rekombinanten Hefe-Reportergergen-Assay ermittelt, dem YDS (yeast dioxin screen). Die Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) exprimieren in diesem Fall das humane Gen für den Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah- oder Dioxin-Rezeptor), der eine wichtige Rolle bei der Induktion des Phase I-Metabolismus und damit bei der Umwandlung von aufgenommenen Fremdstoffen im Organismus spielt, was gegebenenfalls zur Bildung giftigerer Metabolite führen kann.

PFAS spezifische TTR-disruptive Aktivität

Die rezeptorvermittelte **TTR-disruptive Aktivität spezifischer PFAS-Komponenten** wurde mittels des TTR-TR β -CALUX-Tests untersucht. In diesem Test wurden die ethanolischen Migrats ausgewählter Lebensmittelkontaktmaterialien in einer Verdünnungsreihe mit einem maximalen Anreicherungsfaktor von 1.000 untersucht. In diesem Versuch wurde die humane Osteosarkom-Zelllinie U2-OS mit dem stabil integrierten Reportergergen für die Expression des humanen Thyroidrezeptors β (TR β) verwendet. Das zellbasierte Testverfahren nutzt die Wechselwirkung von PFAS-Chemikalien mit dem menschlichen Schilddrüsenhormonsystem und ist ein zweistufiges Verfahren.

⁶ ISO 11348-3:2007. Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 1: Method using freeze-dried bacteria

⁷ ISO 11350:2012 . Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water — *Salmonella*/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)

⁸ ISO 19040-1:2018. Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Der erste Schritt des Verfahrens stellt der Bindungassay dar. In diesem Test binden PFAS oder strukturell ähnlichen Komponenten an das Protein Transthyretin (TTR), das als Transportprotein für die Schilddrüsenhormone des Menschen dient. Dabei wird das natürliche Hormon Thyroxin (T4) durch PFAS-Chemikalien aus dem Transportprotein verdrängt. Neben der unbekannten Probe (mit PFAS Komponenten) wurde zudem Perfluorooctansäure (PFOA) als Positivkontrolle und Referenzsubstanz für PFAS in bekannten Konzentrationen eingesetzt und ebenfalls mit T4 und TTR inkubiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit der Probe (inklusive PFAS-Komponenten) oder des PFOA mit natürlichem T4 und TTR werden die Komponenten über ein Biogel aufgetrennt, sodass nur TTR-T4 und TTR-PFAS Komplexe eluiert werden. Während einer anschließenden kurzen Dissoziationszeit zerfallen sämtliche TTR-Komplexe in die Einzelkomponenten im Eluat und das Eluat wird im zweiten Schritt, dem TRß-CALUX, untersucht. Hierbei wird im Eluat enthaltenes T4 an den TRß binden und aufgrund des Lumineszenz-induzierten Signals in Relation zu einer Referenzsubstanz (Triiodthyronin, T3) quantifiziert werden.

Die Quantifizierung der spezifischen Aktivität erfolgte anhand der Referenzsubstanz PFOA und wurde als µg PFOA-Äquivalent / L Probe berichtet. Die Methode des TTR-TRß CALUX ist damit ein negativ-korreliertes, indirektes Nachweisverfahren von PFAS oder strukturell ähnlichen Substanzen. Je höher das Signal im TRß-CALUX, desto weniger PFAS ist in der ursprünglichen Probe enthalten, da die ursprünglich eingesetzte T4 Menge nicht verdrängt wurde. Die Durchführung des TTR-Bindungsassays erfolgte anhand der Standardprozedur von BDS⁹. Der TRß-CALUX wurde nach Collet et al. 2020 durchgeführt¹⁰.

Ergebnisse

Gesamtfluorgehalt

In den 16 untersuchten Kaffeebecherproben wurden mittels TF-Analytik Gesamtfluorgehalte zwischen 1,1 mg/kg und 131 mg/kg festgestellt (Tabelle 1. In 20 Proben unterschiedlicher Lebensmittelkontaktmaterialien (Foodtrays, Backförmchen, Backpapierzuschnitten und Papiertüten) wurden TF-Gehalte zwischen 2,4 mg/kg und 912 mg/kg festgestellt (Tabelle 1. Die vier höchsten TF-Gehalte wurden in zwei Muffin-/Backförmchen und zwei Foodtrays nachgewiesen (TF-Gehalte zwischen 912 mg/kg und 834 mg/kg). Die Einzelbefunde der TF-Untersuchungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 2: Untersuchte Materialien (Coffee-to-go Becher)

Art des Lebensmittelkontaktmaterials	Gesamtfluor TF (mg/kg)	Material Innenseite (FTIR-Ergebnis)	Material Außenseite (FTIR-Ergebnis)
Trinkbecher	1,1	Cellulose	Cellulose
Trinkbecher	1,3	Polyethylen	fraglich/nicht eindeutig spezifizierbar
Trinkbecher	2,3	Polyethylen	Cellulose
Trinkbecher	2,4	Cellulose	Cellulose
Trinkbecher	2,5	Polyethylen	Cellulose
Trinkbecher	3	Polyethylen	Hinweis auf Calciumcarbonat, -sulfat

⁹ BiodetectionSystem (BDS) Standard Operation Procedure, p-bds-144, Version D, Nov 2019.

¹⁰ Collet, Bérénice, et al. "Evaluation of a panel of in vitro methods for assessing thyroid receptor β and transthyretin transporter disrupting activities." Reproductive Toxicology 96 (2020): 432-444.

Art des Lebensmittelkontaktmaterials	Gesamtfluor TF (mg/kg)	Material Innenseite (FTIR-Ergebnis)	Material Außenseite (FTIR-Ergebnis)
Trinkbecher	3,7	Polyethylen	Hinweis auf Styrol-Acrylnitril-Copolymer
Trinkbecher	5,8	Hinweis auf Poly(Acrylic Acid)ethylene	Cellulose
Trinkbecher	34,2	Polyethylen	Cellulose
Trinkbecher	40,2	Cellulose	Cellulose
Trinkbecher	51,2	Polyethylen	Cellulose
Trinkbecher	57	Polyethylen	Cellulose
Trinkbecher	70,5	Cellulose	Cellulose
Trinkbecher	77,2	Polyethylen	Cellulose
Trinkbecher	123,1	Hinweis auf Talkum	Cellulose
Trinkbecher	130,9	Polyethylen	Cellulose

Tabelle 3: Untersuchte Materialien (sonstige Lebensmittelkontaktmaterialien)

Art des Lebensmittelkontaktmaterials	Gesamtfluor TF (mg/kg)	Material Innenseite (FTIR-Ergebnis)	Material Außenseite (FTIR-Ergebnis)
Foodcontainer/ Foodtray	2,4	Cellulose	Cellulose
Burgerpapier	3,3	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Foodcontainer/ Foodtray	6	fraglich/nicht eindeutig spezifizierbar	Cellulose
Backpapier	11,4	Cellulose	Cellulose
Hamburgerboxen/ Sandwichboxen aus Pappe	12	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Foodcontainer/ Foodtray	16,1	Polyethylen	Cellulose
Foodcontainer/ Foodtray	16,1	Cellulose	Cellulose
Foodcontainer/ Foodtray	18	Polylactat	Cellulose
Backförmchen	19,8	Hinweis auf Talkum	Cellulose
Imbiss-/Snack-/ Bäckereitüte, Papierverpackung	38,1	Polyethylen	Hinweis auf Kreide (Calciumcarbonat, -sulfat)
Backförmchen	47,3	Hinweis auf Poly(Acrylic Acid)ethylene	Hinweis auf Polyesterharz
Foodcontainer/ Foodtray	113,2	Polyethylen	Polyethylen
Papierförmchen	405	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Papierfolie	603	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Schalen aus Holzschliff	617	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Foodcontainer/ Foodtray	726,9	Hinweis auf keramische Bestandteile	Hinweis auf Acrylfarbe
Backförmchen	834,3	Polylactat	Cellulose
Foodcontainer/ Foodtray	848,2	Cellulose	Cellulose
Foodcontainer/ Foodtray	853,8	Polyethylen	Cellulose
Muffinförmchen	912	nicht bestimmt	nicht bestimmt

Die Verteilung der Befunde für die Coffee-to-go-Becher und die übrigen Lebensmittelkontaktmaterialien ist in der Abbildung 1 dargestellt. In acht der 16 untersuchten Coffee-to-go-Becher wurden Gehalte oberhalb des dänischen Richtwertes von 20 mg/kg festgestellt. In zwei Proben (12 %) wurden

Gehalte zwischen 20 mg/kg und 50 mg/kg Papier festgestellt. Sechs Proben wiesen Gehalte über 50 mg/kg Papier auf (38 %). In elf der insgesamt 20 Proben sonstiger Lebensmittelkontaktmaterialien (Food-Trays, Backpapieren, Muffinförmchen und Papiertüten) und somit in über der Hälfte der Proben, wurden Gehalte oberhalb des dänischen Richtwertes von 20 mg/kg nachgewiesen. In zwei Proben (10 %) wurden Gehalte zwischen 20 und 50 mg/kg Papier festgestellt. Neun der Proben und somit 45 % wiesen Gehalte über 50 mg/kg Lebensmittelkontaktmaterial auf. Im oberen Konzentrationsbereich von >100 mg/kg lagen neun Proben der sonstigen Lebensmittelkontaktmaterialien, bei den Coffee-to-go-Bechern waren es hingegen nur zwei.

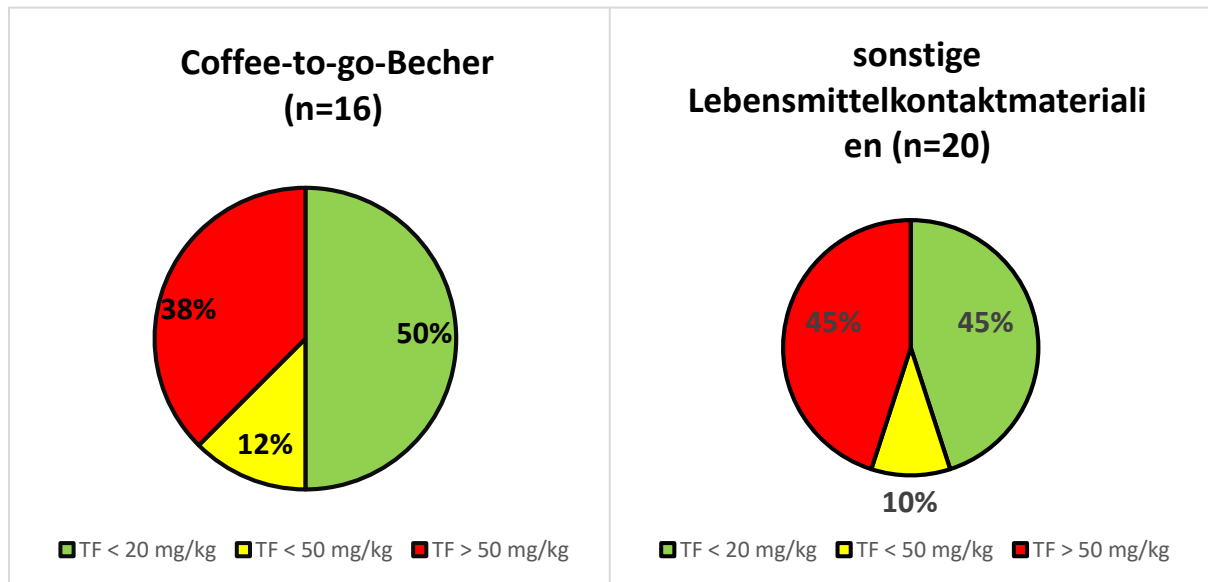


Abbildung 1 Prozentuale Verteilung der TF-Befunde in Lebensmittelkontaktmaterialien

Um zu untersuchen, ob die festgestellten fluorhaltigen Verbindungen beim Gebrauch der Lebensmittelkontaktmaterialien in Lebensmittel übergehen, wurden an sechs ausgewählten Proben, in denen vergleichsweise hohe Gehalte an fluorierten Verbindungen nachgewiesen wurden, Migrationsuntersuchungen durchgeführt. In fünf der sechs untersuchten Migrate wurden AOF-Gehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze festgestellt. Für ein Backförmchen wurde im wässrigen Migrant ein AOF-Gehalt von 27,8 µg/dm² Kontaktfläche festgestellt.

Im Rahmen des Projektes ist auch versucht worden die AOF-Gehalte ethanolischer und wässriger Extrakte zu bestimmen. Dabei konnte einerseits keine eindeutige Übereinstimmung zwischen den ethanolischen und wässrigen Extrakten festgestellt werden, andererseits unterschieden sich die AOF-Gehalte deutlich von den TF-Gehalten. Mit Hilfe des TF-Verfahrens konnte der Gesamtgehalt an Fluor in einem niedrigeren Konzentrationsbereich bestimmt werden, als dies mittels AOF-Verfahren möglich war. In diesem Zusammenhang ist auch zu berücksichtigen, dass beim AOF-Verfahren einerseits bei der Extraktion der Proben und andererseits bei der Adsorption der fluorierten Verbindungen aus dem Extrakt an der Aktivkohle Verluste auftreten können, die zu Minderbefunden führen können. Aufgrund der vergleichsweise aufwendigen Bearbeitung der Proben, hoher Blindwerte und niedriger Reproduzierbarkeiten der Messungen, wurden die AOF-Untersuchungen von Extrakten nicht weiterverfolgt. Für die weiteren Untersuchungen des Gesamtfluorgehalts der Lebensmittelkontaktmaterialien wurde daher auf das TF-Verfahren zurückgegriffen.

Einzelstoffanalytik

Sechs der untersuchten Proben (Papierförmchen, Muffinförmchen, Papierfolie, Bambusbecher, Pappteller und Schalen aus Holzschliff) wurden beim SGS Institut Fresenius auf insgesamt 96 PFAS-Einzelverbindungen untersucht. Insgesamt wurden für zwölf verschiedene PFAS Positivbefunde festgestellt. Neben klassischen Perfluoralkylcarbonsäuren mit einer Kettenlänge von 3 bis 12 fluorierten Kohlenstoffatomen, wurden zwei längerkettige polyfluorierte Alkylcarbonsäure, ein Fluortelomeralkohol (6:2 FTOH) und ein Fluoracrylate (6:2 FTAc) nachgewiesen (Tabelle 4). Für die Einzelverbindungen wurden Gehalte bis 740 µg/kg (PFBA in einer Salatschale aus Holzschliff) nachgewiesen.

Tabelle 4: Positivbefunde der PFAS-Einzelstoffanalytik

Parameter	Kürzel	CAS	BG [µg/kg]	Schalen aus Holzschliff [µg/kg]	Papier- förmchen [µg/kg]	Bambus- becher [µg/kg]	Muffin- Förmchen [µg/kg]	Pappteller [µg/kg]	Papier- Muster [µg/kg]
LC-MS/MS									
Pentafluoropropionic acid	PFPrA	422-64-0	(2)	120	< BG*	< BG*	< BG	< BG*	< BG
Perfluorbutansäure	PFBA	375-22-4	2	740	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Perfluorpentansäure	PFPeA	2706-90-3	2	66	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Perfluorhexansäure	PFHxA	307-24-4	2	440	10	< BG	< BG	< BG	< BG
Perfluorheptansäure	PFHpA	375-85-9	2	13	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
Perfluoroctansäure	PFOA	335-67-1	2	< BG	3	< BG	< BG	< BG	< BG
Perfluordecansäure	PFDA	335-76-2	2	< BG	3	< BG	< BG	< BG	< BG
Perfluordodecansäure	PFDoDA	307-55-1	2	< BG	2	< BG	< BG	< BG	< BG
3-Perfluoropentyl propanoic acid	5:3FTCA	914637-49-3	4	110	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
2H-Perfluoro-2-octenoic acid	FHUEA	70887-886	2	180	3	< BG	< BG	< BG	< BG
GC-MS									
2-Perfluorohexyl ethanol	6:2 FTOH	647-42-7	40	120	60	< BG	< BG	< BG	60
3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8- Tridecafluorooctyl acrylate	6:2 FTAc	17527-29-6	25	< BG	28	< BG	< BG	< BG	100

BG: Bestimmungsgrenze

n.a. : nicht auswertbar, Matrixstörungen

* BG wegen Matrixstörungen angehoben

Auszug aus dem Prüfbericht der Firma SGS

Fresenius

Toxische Wirkungen

Die ermittelten Aktivitäten in den In-vitro-Assays werden für die Heißwasser- und ethanolischen Extrakte auf die extrahierte Fläche des Probenmaterials bezogen, für die Migrationsproben dagegen auf den relativen Anreicherungsfaktor (REF – relative enrichment factor) bzw. auf Bioequivalent-Konzentrationen, d.h. auf die Konzentration der Positivkontrolle, die eine vergleichbare Aktivität wie die untersuchte Probe auslöst.

Basistoxizität

Alle Heißwasser- und ethanolischen Extrakte der untersuchten Kaffeebecher (Probencodes A, D, E und G) zeigten eine hohe Toxizität im Mikrotox-Assay, mit einer EC_{50} (Effektkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Lumineszenz der Bakterien führt), die generell bei einer extrahierten Fläche zwischen 0,07 und 0,60 cm² des Probenmaterials lag. Lediglich für den Kaffeebecher G ergab sich im Heißwasserextrakt mit 1,35 cm² eine leicht geringere Basistoxizität. Für die beiden Essenscontainer (Probencodes B und C) und das Papierförmchen (Probencode F) lagen die ermittelten EC_{50} -Werte mit 0,45 bis 0,64 cm² für die Heißwasserextrakte bzw. 0,14 bis 0,74 cm² für die ethanolischen Extrakte in einem ähnlichen Toxizitätsbereich.

Die bewerteten Ergebnisse für die Untersuchungen der Extrakte mit den In-vitro-Assays sind in der Abbildung 2 für die Kaffeebecher und in der Abbildung 3 für die Essenscontainer und das Papierförmchen als Heatmap dargestellt.

Kaffeebecher - to - go		Heisswasser-Extraktion				Ethanolische Extraktion			
		A	D	E	G	A	D	E	G
Toxizität	EC 50 [cm ²]								
	YAES [mg/cm ²]								
	YAAS [mg/cm ²]								
	YAS [ng/cm ²]								
	YES [ng/cm ²]								
	YDS [µg/cm ²]								
	Mutagenität (Ames-Test) ja/nein								

Abbildung 2: Heatmap zur Visualisierung der bewerteten Befunde aus den Extraktionsuntersuchungen mit den Kaffeebechern A, D, E und G mit wässrigem (links) und ethanolischem Medium (rechts). Fehlende basistoxische (Mikrotox-Assay), anti-estrogene (YAES), anti-androgene (YAAS), androgene (YAS), estrogene (YES), dioxin-ähnliche (YDS) und mutagene Aktivitäten (Ames-Test) sind in grün, mäßige Aktivitäten mit statistisch signifikanter Abweichung von der Negativkontrolle in gelb und hohe Aktivitäten in rot wiedergegeben.

Meal to go Boxen		Heisswasser-Extraktion		Ethanolische Extraktion		Muffin-Förmchen	Heisswasser-Extraktion	Ethanolische Extraktion
		B	C	B	C		F	F
Toxizität	EC 50 [cm ²]					EC 50 [cm ²]		
endocrine (Hormon-ähnliche) Aktivität	YAES [mg/cm ²]					YAES [mg/cm ²]		
	YAAS [mg/cm ²]					YAAS [mg/cm ²]		
	YAS [ng/cm ²]					YAS [ng/cm ²]		
	YES [ng/cm ²]					YES [ng/cm ²]		
	YDS [µg/cm ²]					YDS [µg/cm ²]		
Mutagenität (Ames-Test)	ja/nein					ja/nein		

Abbildung 3: Heatmap zur Visualisierung der bewerteten Befunde aus den Extraktionsuntersuchungen mit den Essenscontainern B und C sowie den Papierförmchen (Muffinförmchen) F mit wässrigem (jeweils links) und ethanolischem Medium (jeweils rechts). Fehlende basistoxische (Mikrotox-Assay), anti-estrogene (YAES), anti-androgene (YAAS), androgene (YAS), estrogene (YES), dioxin-ähnliche (YDS) und mutagene Aktivitäten (Ames-Test) sind in grün, mäßige Aktivitäten mit statistisch signifikanter Abweichung von der Negativkontrolle in gelb und hohe Aktivitäten in rot wiedergegeben.

Bei der Untersuchung der Migrationsproben nach 120-minütiger Versuchsdauer waren diese für die Kaffeebecher D, E und G ebenso wenig auffällig wie die ethanolische Migrationsprobe des Essenscontainers B: Auch bei einer 90-fachen Anreicherung der Proben wurde keine 50 %ige Hemmung im Mikrotox-Assay erreicht. Dagegen wurde für den Kaffeebecher A bereits bei einer Anreicherung von 7,0 (wässriges Migrat) bzw. 7,4 (ethanolisches Migrat) eine halbmaximale Hemmung der Biolumineszenz erzielt. Die Migrate der beiden Essenscontainer waren mit EC₅₀-Werten von 11,5 bzw. 39,4 (wässriges Medium) und 36,5 (ethanolisches Medium Probe C) zwar etwas weniger aktiv als der Kaffeebecher A, wiesen aber ebenfalls eine hohe Basistoxizität nach 120 Minuten auf.

Die bewerteten Ergebnisse für Untersuchungen der Migrate nach 120 Minuten sind in der Abbildung 4 für die Kaffeebecher und in der Abbildung 5 für die Essenscontainer als Heatmap dargestellt. Für die entsprechenden Untersuchungen stand nicht genügend Material der Papierförmchen (Probe F) zur Verfügung.

Kaffeebecher - to - go		Migration in Wasser				Migration in ETOH		
		A	D	E	G	A	E	G
Toxizität	EC 50 [REF]							
endocrine (Hormon- ähnliche) Aktivität	YAES [mg/L]							
	YAAS [mg/L]							
	YAS [ng/L]							
	YES [ng/L]							
	YDS [µg/L]							
	Mutagenität (Ames-Test)	ja/nein						

Abbildung 4: Heatmap zur Visualisierung der bewerteten Befunde aus den Untersuchungen der Migrate nach 120 Minuten mit den Kaffeebechern A, D, E und G mit wässrigem (links) und ethanolischem Medium (rechts; Probe D wurde aufgrund nicht ausreichenden Materials nicht mit ethanolischem Medium getestet). Fehlende basistoxische (Mikrotox-Assay), anti-estrogene (YAES), anti-androgene (YAAS), androgene (YAS), estrogene (YES), dioxin-ähnliche (YDS) und mutagene Aktivitäten (Ames-Test) sind in grün, mäßige Aktivitäten mit statistisch signifikanter Abweichung von der Negativkontrolle in gelb und hohe Aktivitäten in rot wiedergegeben.

Meal to go Boxen		Migration in Wasser		Migration in ETOH	
		B	C	B	C
Toxizität	EC 50 [REF]				
endocrine (Hormon- ähnliche) Aktivität	YAES [mg/L]				
	YAAS [mg/L]				
	YAS [ng/L]				
	YES [ng/L]				
	YDS [µg/L]				
	Mutagenität (Ames-Test)	ja/nein			

Abbildung 5: Heatmap zur Visualisierung der bewerteten Befunde aus den Untersuchungen der Migrate nach 120 Minuten mit den Essenscontainern B und C mit wässrigem (links) und ethanolischem Medium (rechts). Fehlende basistoxische (Mikrotox-Assay), anti-estrogene (YAES), anti-androgene (YAAS), androgene (YAS), estrogene (YES), dioxin-ähnliche (YDS) und mutagene Aktivitäten (Ames-Test) sind in grün, mäßige Aktivitäten mit statistisch signifikanter Abweichung von der Negativkontrolle in gelb und hohe Aktivitäten in rot wiedergegeben.

Für die Kaffeebecher A und G sowie die beiden Essenscontainer konnte zusätzlich der zeitliche Verlauf der Aktivität in den Migrationsproben untersucht werden. Im Kaffeebecher A war erstmals nach 40 und 60 Minuten eine leichte Zunahme der Basistoxizität im wässrigen Migrat zu verzeichnen (EC_{50} mit Anreicherungsfaktor 193 bzw. 195, entspricht 15 % Abweichung vom nicht-toxischen Aktivitätslevel), die zum Versuche nach 120 Minuten stark anstieg ($EC_{50} = 6,98$). Im ethanolischen Migrat wurden dagegen bereits nach 5, 10 und 20 Minuten hohe Aktivitäten ermittelt ($EC_{50} = 24,2$ bis $28,7$), während nach 40 und 60 Minuten unauffällige Befunde vorlagen, nach 120 Minuten jedoch eine sehr hohe Aktivität ($EC_{50} = 7,37$). Das wässrige Migrat im Kaffeebecher G blieb über den gesamten Zeitverlauf ohne messbare Aktivität im Mikrottox-Assay, während das ethanolische Migrat bereits nach 5 Minuten, ebenso nach 10 und 20 Minuten hohe Aktivitäten zeigte ($EC_{50} = 21,3$ bis $26,9$), während im weiteren Verlauf nach 40, 60 und 120 Minuten keine messbare Aktivität mehr vorlag.

Einen komplexen Zeitverlauf der Aktivitäten zeigten auch die beiden Essenscontainer. Das wässrige Migrat im Container B war nach 5 und 10 Minuten noch unauffällig, nach 20, 40 und 60 Minuten nahm die Aktivität zu und erreichte ein mäßiges Niveau ($EC_{50} = 34,4$ bis $52,9$), nach 120 Minuten ein sehr hohes Niveau ($EC_{50} = 11,5$). Dagegen wurde im ethanolischen Migrat lediglich nach 10 und 60 Minuten eine sehr hohe Aktivität ermittelt ($EC_{50} = 8,92$ bzw. $11,6$), nicht jedoch zu den anderen Zeiten. Für den Essencontainer C war die Aktivität im wässrigen Migrat über den gesamten Versuchsverlauf weitgehend konstant und auf einem mäßigen Niveau ($EC_{50} = 31,4$ bis $63,7$), im ethanolischen Migrat ebenfalls überwiegend auf einem mäßigen Niveau ($EC_{50} = 19,7$ bis $36,5$), jedoch mit einer deutlichen Abweichung nach 10 ($EC_{50} = 5,62$; sehr hohe Aktivität) und 40 Minuten (keine messbare Aktivität).

Die bewerteten Ergebnisse für den Zeitverlauf der 120-minütigen Migrationsuntersuchungen sind in Abbildung 6 und Abbildung 7 als Heatmap dargestellt.

Migration Kaffeebecher in Wasser					Migration Kaffeebecher in Ethanol				
Becher	Zeit [min]	Mikrotox-Test [REF]	YDS [ng/L] LOQ = 33,07	YAES [mg/L] LOQ = 0,075	Becher	Zeit [min]	Mikrotox-Test [REF]	YDS [ng/L] LOQ = 82,96	YAES [mg/L] LOQ = 0,195
A	5				A	5			
	10					10			
	20					20			
	40					40			
	60					60			
	120					120			
G	5				G	5			
	10					10			
	20					20			
	40					40			
	60					60			
	120					120			

Abbildung 6: Heatmap zur Visualisierung der bewerteten Befunde aus den Migrationsuntersuchungen (Zeitverlauf über 120 Minuten) mit den Kaffeebechern A und G mit wässrigem (links) und ethanolischem Medium (rechts). Fehlende basistoxische (Mikrotox-Assay), dioxin-ähnliche (YDS) und anti-estrogene Aktivitäten (YAES) sind in grün, mäßige Aktivitäten mit statistisch signifikanter Abweichung von der Negativkontrolle in gelb und hohe Aktivitäten in rot wiedergegeben.

Migration Meal to go Box in Wasser					Migration Meal to go Box in Ethanol				
Becher	Zeit [min]	Mikrotox-Test [REF]	YDS [ng/L] LOQ = 33,07	YES [ng/L] LOQ = 0,454	Becher	Zeit [min]	Mikrotox-Test [REF]	YDS [ng/L] LOQ = 82,96	YES [ng/L] LOQ = 1,69
B	5	grün	gelb	rot	B	5	grün	gelb	grün
	10	grün	gelb	rot		10	rot	gelb	grün
	20	gelb	gelb	rot		20	grün	gelb	grün
	40	gelb	gelb	rot		40	grün	gelb	grün
	60	gelb	gelb	rot		60	rot	gelb	grün
	120	rot	rot	rot		120	grün	rot	grün
	120	rot	rot	rot		120	grün	rot	grün
C	5	gelb	gelb	grün	C	5	gelb	gelb	grün
	10	gelb	gelb	grün		10	rot	rot	grün
	20	gelb	gelb	grün		20	gelb	gelb	grün
	40	gelb	gelb	grün		40	grün	gelb	grün
	60	gelb	gelb	grün		60	gelb	gelb	grün
	120	gelb	rot	rot		120	gelb	rot	grün
	120	gelb	rot	rot		120	gelb	rot	grün

Abbildung 7: Heatmap zur Visualisierung der bewerteten Befunde aus den Migrationsuntersuchungen (Zeitverlauf über 120 Minuten) mit den Essenscontainern B und C mit wässrigem (links) und ethanolischem Medium (rechts). Fehlende basistoxische (Mikrotox-Assay), dioxin-ähnliche (YDS) und estrogenen Aktivitäten (YES) sind in grün, mäßige Aktivitäten mit statistisch signifikanter Abweichung von der Negativkontrolle in gelb und hohe Aktivitäten in rot wiedergegeben.

Mutagenität

Die weit überwiegende Zahl der untersuchten Extraktions- und Migrationsproben war in allen vier Ames-Fluktuationstests (Stämme YG1041 und YG1042, jeweils mit und ohne S9-Mix) negativ, zeigte also keine mutagene Aktivität. Lediglich für den ethanolischen Extrakt des Kaffeebechers E wurde eine mutagene Wirkung mit dem Stamm YG1042 sowohl mit als auch ohne S9-Mix ermittelt. Für den Heißwasserextrakt des Essenscontainers B konnte eine mutagene Wirkung mit dem Stamm YG1042 ohne S9 Mix gemessen werden. (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 3).

Endokrine Aktivität

Alle untersuchten Proben zeigten im Minimum für eine der vier untersuchten endokrinen Wirkungen ein hohes Aktivitätsniveau, wenn die Ergebnisse für die Extrakte und Migrate zusammengefasst werden, weit überwiegend für mehrere der untersuchten endokrinen Endpunkte (vgl. Abbildung 2 bis Abbildung 7). So zeigte der Kaffeebecher A eine hohe anti-estrogene, anti-androgene und estrogenen Aktivität, die Becher D und E eine hohe anti-estrogene und anti-androgene Aktivität sowie der Becher G eine hohe anti-estrogene und androgene Aktivität, zusätzlich eine mäßige anti-androgene Aktivität.

Auch die beiden Essenscontainer und das Papierförmchen waren in den Tests auf endokrine Wirkungen aktiv. Der Container B wies eine hohe estrogenen sowie mäßige anti-estrogene und androgene Aktivität auf, der Container C eine hohe estrogenen und androgene Aktivität und das Papierförmchen F eine hohe anti-estrogene und androgene Aktivität sowie eine mäßige anti-androgene und estrogenen Aktivität. Damit war das Papierförmchen F die auffälligste Probe, die für alle vier untersuchten endokrinen Wirkungen positiv getestet wurde.

Bei der Untersuchung des Zeitverlaufs der Migration waren die anti-estrogene Aktivität im Heißwasser-Migrat des Kaffeebechers A und die estrogenen Aktivität des Essenscontainers B bereits nach 5 Minuten sehr hoch und blieben auf diesem Niveau bis zum Ende des Versuchs nach 120 Minuten. Dagegen war die anti-estrogene Aktivität des Bechers G nach 5 Minuten auf einem mäßigen Niveau und blieb auf diesem Niveau bis 60 Minuten nach dem Versuchsbeginn, um erst am Ende des Versuchs nach 120

Minuten ein hohes Niveau zu erreichen. Eine estrogene Aktivität des Containers C war lediglich nach 120 Minuten im Heißwasser-Migrat auf einem hohen Niveau festzustellen, während die Proben nach 5 bis 60 Minuten nicht aktiv waren.

Dioxin-ähnliche Aktivität

Alle untersuchten Kaffeebecher zeigten mäßige bis hohe dioxin-ähnliche Aktivitäten (vgl. Abbildung 2 bis Abbildung 7) in den Extraktions- und/oder Migrationsversuchen. Der Kaffeebecher A wies bei der Extraktion keine dioxin-ähnliche Aktivität auf, bei der Untersuchung der wässrigen und ethanolischen Migrats ergaben sich dagegen sehr hohe Aktivitäten von 1,13 bzw. 3,77 µg β-Naphtoflavon-Equivalente (β-NF-Eq)/L. Die Kaffeebecher D und G zeigten bei der Extraktion mit heißem Wasser sehr hohe Aktivitäten (19,4 bzw. 5,64 µg β-NF-Eq/cm²), der Becher E eine mäßige Aktivität (1,83 µg β-NF-Eq/cm²). Wurde das Bechermaterial mit Ethanol extrahiert, stieg die Aktivität im Falle des Bechers D um mehr als Faktor 6 gegenüber der Heißwasser-Extraktion auf 123 µg β-NF-Eq/cm². Die ethanolischen Migrats der Becher E und G wiesen zwar geringere dioxin-ähnliche Aktivitäten als der Becher A auf, diese waren beim Becher E aber noch hoch (0,36 µg β-NF-Eq/L), beim Becher G mäßig (0,27 µg β-NF-Eq/L).

Auch alle untersuchten Essenscontainer und das Papierförmchen wiesen dioxin-ähnliche Aktivitäten auf, die bei der ethanolischen Extraktion maximal 48,4 bzw. 60,4 µg β-NF-Eq/cm² bei den Proben B und C und 3,35 µg β-NF-Eq/cm² beim Papierförmchen F erreichten. Für die beiden Essenscontainer B und C reichte das Material aus, um auch Migrationsproben zu untersuchen. Sowohl bei der Migration in Heißwasser als auch bei der Migration in Ethanol wurden sehr hohe Aktivitätsniveaus von bis zu 1,08 µg β-NF-Eq/L beim Container B und 1,35 µg β-NF-Eq/L beim Container C erreicht.

Bei der Untersuchung des Zeitverlaufs der Migration lag für beide Essenscontainer bereits nach 5 Minuten grundsätzlich eine mäßige dioxin-ähnliche Aktivität in den wässrigen und ethanolischen Migraten vor, wobei jeweils nach 120 Minuten die höchste Aktivität ermittelt wurde.

PFAS spezifische TTR-disruptive Aktivität

Der TTR-TRß-CALUX wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen in vitro-basierten Verfahren mit ausgewählten ethanolischen Migraten durchgeführt, um einen spezifischen Biotest für die Detektion von PFAS oder strukturell ähnlichen Substanzen zu integrieren. Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die ethanolischen Migrats aller Lebensmittelkontaktmaterialien eine Grundaktivität im TTR-TRß CALUX aufwiesen. Dies wird durch die etablierten Konzentrations-Wirkungskurven ersichtlich (siehe Abbildung 8). Hierbei ist zu beachten, dass die beobachteten Aktivitäten ausschließlich auf die Lebensmittelkontaktmaterialien und nicht auf das Lösungsmittel oder die Prozessierung der Proben zurückzuführen sind, da die Kontrolle keinerlei Aktivität im getesteten Konzentrationsbereichs des TTR-TRß CALUX aufwies (vgl. Abbildung 9).

TTR-TR β CALUX all samples

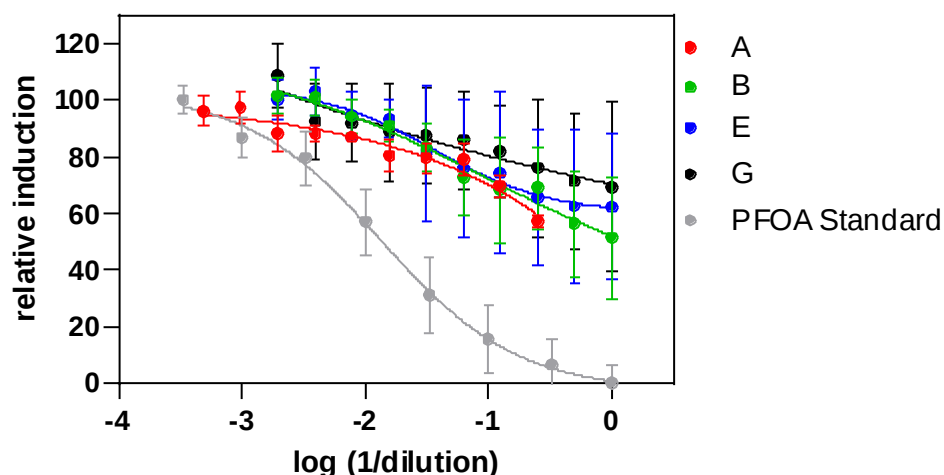


Abbildung 8: Relative Aktivität des humanen TR β in U2OS Zellen innerhalb des TTR-TR β -CALUX Tests nach Exposition mit ethanolischen Migraten ausgewählter Lebensmittelkontaktmaterialien. Symbole und Fehlerbalken zeigen die mittlere relative Lumineszenz mit Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten für die Probenmaterialien Kaffeebecher (A, E, G) und Ess-Schalen (B) sowie der PFAS-Referenzsubstanz PFOA. Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden mittels einer 4-Parameter nicht-linearen Regression (Bottom und Top fixiert auf 0, 100) an die Datenpunkte gefittet.

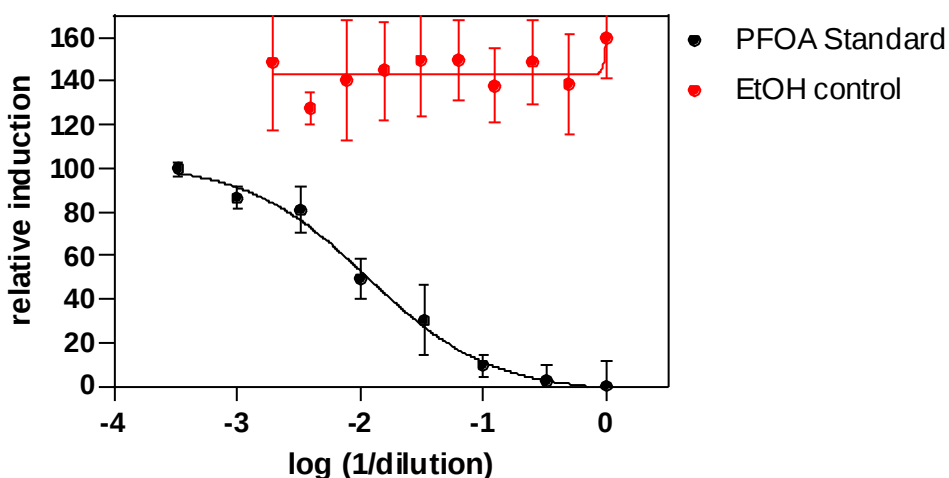


Abbildung 9: Relative Aktivität des humanen TR β in U2OS Zellen innerhalb des TTR-TR β -CALUX Tests nach Exposition mit ethanolischer Kontrolle (EtOH control). Symbole und Fehlerbalken zeigen die mittlere relative Lumineszenz mit Standardabweichung von 3 technischen Replikaten für die EtOH-Kontrolle sowie der PFAS-Referenzsubstanz PFOA. Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden mittels einer 4-Parameter nicht-linearen Regression (Bottom und Top fixiert auf 0, 100) an die Datenpunkte gefittet.

Bei einem Vergleich der einzelnen Kontaktmaterialien miteinander zeigten sich deutliche Unterschiede der toxischen Wirkung. Probe A (Kaffeebecher) wies die stärkste spezifische Aktivität (125 μ g PFOA eq./L) auf und deutete damit auf die höchste Konzentration von PFAS oder strukturell ähnlichen Komponenten im Migrat hin (vgl. Tabelle 5). Während die restlichen Proben B, E und G im Konzentrationsbereich REF 1.95 -1000 untersucht werden konnten, musste Probe A für eine Quantifizierung 4-fach verdünnt untersucht werden, sodass sich ein untersuchter Konzentrationsbereich von REF 0,49 – 250 ergab. Die Proben B (Ess-Schale) und E (Kaffeebecher) wiesen mit ca. 80 μ g PFOA eq./L, gefolgt von Probe G mit 35 μ g PFOA eq./L eine deutlich geringere Aktivität auf (Tabelle 5).

Tabelle 5 Spezifische Aktivität der Lebensmittelkontaktmaterialien im TTR-TRß-CALUX. Die spezifische Aktivität wurde basierend auf dem PC80 der Proben sowie des PFOA-Standards berechnet (siehe Abbildung 8).

Lebensmittelkontaktmaterialien	Spezifische Aktivität / (µg PFOA eq. / L sample)
A (Kaffeebecher)	124,96
B (Ess-Schale)	80,06
E (Kaffeebecher)	80,56
G (Kaffeebecher)	34,71

Bei einem Vergleich der bioanalytischen Hinweise auf PFAS-Belastungen mit den chemisch bestimmten Parametern Gesamtfluor (TF) und adsorbierbare Fluorverbindungen (AOF) ist festzustellen, dass der Trend von steigende FT/AOF Gehalte mit dem Trend stärkerer TTR-Bindungsaffinität von Probe G über E hin zu B und A korreliert. Dennoch weist die Ess-Schale B einen höheren TF/AOF Gehalt als Kaffeebecher A auf, was im bioanalytischen Ranking vertauscht ist. Diese Unterschiede geben erste Hinweise darauf, dass eine rein chemische Bestimmung von PFAS nicht ausreicht, um die thyroid-disruptive Aktivität der Proben beurteilen zu können; bioanalytische Verfahren sollten zusätzlich angewandt werden, da eine komplexe Mischung verschiedenster Kontaminanten, einschließlich verschiedener PFAS-Substanzen, eine abweichende toxische Wirkung von den zu erwartenden Einzelstoffen haben kann. Zudem ist zu beachten, dass durch die hier angewandte Probenprozessierung auch andere Komponenten der Migrate neben fluorierten Substanzen eine TTR-Bindung und damit einen Nachweis im TTR-TRß CALUX ausgelöst haben könnten.

Die Beobachtung, dass alle ausgewählten und untersuchten Lebensmittelkontaktmaterialien eine Thyroidhormon-beeinträchtigende Wirkung aufweisen, fügt sich in die bekannte Aktivität anderer Lebensmittelkontaktmaterialien ein. In einer internationalen Vergleichsstudie wurden in 11 von 17 untersuchten Lebensmittelkontaktmaterialien (65%) im gleichen bioanalytischen Verfahren (TTr TRß CALUX) signifikante TTR-disruptive Aktivitäten nachgewiesen¹¹. Hier waren vor allem Produkte aus Deutschland auffällig.

Ausblick

Die wissenschaftlichen Untersuchungen werden fortgesetzt; es ist geplant die Extrakte mittels Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) zu untersuchen und ein weiterführendes Screening auf PFAS-Einzelsubstanzen durchzuführen. Zudem sind weitere Untersuchungen der biologischen Aktivität vorgesehen. Zu gegebener Zeit ist auch eine wissenschaftliche Publikation der Ergebnisse geplant.

¹¹ Straková, J., Schneider, J., Cingotti, N. et al., 2021. Throwaway Packaging, Forever Chemicals: European wide survey of PFAS in disposable food packaging and tableware. 54 p.