



Foto: www.pixabay.com

Hormonforstyrrende stoffer i fødevareemballage

Trods den omfattende brug af pap- og papiremballage til fødevarer mangler der viden om emballagernes kemiske sammensætning og eventuelle toksikologiske effekter. Det er et nyt studie med til at ændre på.

Af Linda Bengtström, Ph.D., tidligere Ph.D.-studerende ved DTU Fødevareinstituttet, nu post doctoral researcher ved University of Central Lancashire, UK

Pap og papir anvendes til en række forskellige materialer, som er i kontakt med fødevarer. Dette kan f.eks. være bagepapir, mikrobølge-popcorns-poser og emballager til morgenmadsprodukter og fastfood. Trods den omfattende anvendelse mangler der både viden om den kemiske sammensætning af de forskellige typer af pap- og papir-emballager, samt de toksikologiske effekter af disse forbindelser. For at opnå større viden på dette område, lavede vi på DTU Fødevareinstituttet et tværfagligt projekt, som kombinerede kemiske analyser og in vitro tests. Formålet med dette set-up var at adskille prøver med og uden aktivitet, ved at screene ekstrakter fra pap- og papir-emballage. Således sikrede vi, at der i projektet udelukkende blev arbejdet videre med aktive prøver. Studiets ultimative mål var at identificere det stof eller stofferne, der i pap og papir medfører en sundhedsskadelig effekt.

Introduktion

Efter plast er pap og papir de mest anvendte materialer til fødevareemballage. Da forbrugere jævnligt spiser mad, som er pakket i emballage lavet af pap og papir, kan det derfor betyde,

at de bliver eksponeret for sundhedsskadelige stoffer. Da pap og papir er porøse materialer, vil en del af forbindelserne i emballagen kunne migrere ud af materialerne. Der forekommer således lækage af stoffer, uanset om emballagen har direkte kontakt med fødevaren eller ej.

De stoffer, der åndes i pap og papir, stammer fra de naturlige dele af cellulose-baserede plantematerialer eller fra forbindelser, som tilføjes papiret for f.eks. at give det fedtafvisende kvaliteter eller overfladebehandling til tryk. De migrerende forbindelser kan især udgøre et problem, da udgangsmaterialernes oprindelse kan variere eller være ukendt. Nogle af disse udgangsmaterialer er ikke beregnet til at ende i fødevareemballage, og de kan derfor indeholde store mængder af potentielt sundhedsskadelige stoffer. Derudover kan der i materialerne også eksistere stoffer, som bidrager til en såkaldt ”cocktail effekt”, hvilket betyder, at, selv om de individuelle komponenter der er til stede i blandingen ikke i sig selv, giver nogen toksikologisk effekt, kan blandingen af stofferne godt gøre det.

Da der er mangel på viden, er der brug for en strategi, således at der for nogle produkter kan prioriteres og foretages mere grundige undersøgelser. I sidste ende ønskes det at identificere det stof eller de stoffer, som åndes i de mange forskellige pap- og papiremballager, og som er ansvarlige for de potentielt sundhedsskadelige effekter.



Fraktioner fra ekstrakt af pizzabakke af genbrugspapir. Disse fraktioner blev testet i celletests for hormonforstyrrede effekter.

Ekstraktion og fraktionering

Samlet set betyder det, at de kemiske forbindelser i pap- og papiremballager kan være særdeles komplekse, hvilket kan give særlige udfordringer, når der skal laves kemisk identifikation af de enkelte stoffer. Kemisk identifikation giver heller ikke oplysninger om, hvorvidt de identificerede forbindelser har potentiale til at forårsage sundhedsskadelige effekter.

På baggrund af dette har man ved hjælp af tværfaglige studier forsøgt at screene pap- og papiremballager for forskellige toksikologiske effekter ved at kombinere kemiske analyser med *in vitro* tests. Formålet med screeningen er at sortere prøverne i toksikologiske relevante og irrelevante prøver. De irrelevante prøver ekskluderes fra studiet, og der arbejdes kun videre med relevante prøver, hvor der efterfølgende foretages grundigere undersøgelser. Denne screening stiller høje krav til ekstraktionsmetoden, som både skal være omfattende og kompatibel med både kemiske og toksikologiske analyser.

I studiet blev tyve forskellige pap- og papiremballager fra det danske marked ekstraheret ved hjælp af kogende ethanol. Ekstrakterne blev efterfølgende testet i otte celletests, der hver især havde forskellige toksikologiske endpoints som f.eks. hormonforstyrrende aktiviteter, genotoksicitet og effekter på metabolisme. På baggrund af resultaterne fra de første celletests, blev tre emballager udvalgt til videre analyse for ultimativt at identificere det eller de stoffer, som besidder toksikologiske effekter.

Selv efter en indledende screenings-fase, giver analysen af toksikologisk relevante ekstrakter, ved kromatografske metoder komplekse resultater. Ekstrakterne blev derfor fraktioneret til flere fraktioner, som efterfølgende blev analyseret i de samme otte celletests. Formålet med fraktioneringen er at reducere antallet af forbindelser, der udviser *in vitro*-aktivitet. En eller to fraktioner fra de tre prøver, der blev fraktioneret, gav et positivt respons i de samme celletests som den oprindelige prøve.

Kemisk identifikation ved højopløseligt massespektrometri

Fraktionerne blev efterfølgende analyseret med gaskromatografi (GC) og væsekromatografi (LC) koblet til højopløseligt massespektrometri (MS). Disse to teknikker blev designet til at komplementere hinanden bedst muligt. Generelt kan flygtige og semi-flygtige, ikke-polære forbindelser identificeres med GC-MS, mens større ikke-flygtige semi-polære eller polære forbindelser kan identificeres med LC-MS.

Selvom der gøres brug af flere forskellige MS-teknikker, involverer de alle sammen tre trin;

- 1) ionisering af stoffer,
- 2) isolering af det ioniserede stof ifølge masse- til ladningsforhold (m/z) og
- 3) detektion.

En stor fordel ved at anvende GC-baserede teknikker er den standardiserede ioniseringsmetode. Den muliggør, at man kan søge i store massespektrale biblioteker og derved identificere stofferne. Det er årsagen til, at de fleste studier, der undersøger ukendte stoffer, anvender GC-MS som analysemetode. Benytter man yderligere LC-MS i stedet for udelukkende at anvende

GC-MS, er muligheden for at identificere forbindelser med potentielt sundhedsskadelige effekter større.

Da LC-MS ikke har en standardiseret metode til ionisering, er det ikke muligt at søge efter stofferne i bibliotekerne. For at lette identifikationen med LC-MS opbyggede vi derfor en database, som indeholder præcise masser for ca. 2.100 kemiske forbindelser, som forekommer i pap og papir. Denne nye database blev anvendt til at søge efter hits.

Ud fra en liste af foreløbigt identificerede forbindelser, som blev udarbejdet til de specifikke assays, blev mellem fem og otte stoffer, fra fraktioner med *in vitro*-effekt, udvalgt til yderligere verifikation af disses identitet. Denne udvælgelse blev baseret på tidligere rapporterede effekter og strukturelle ligheder med påvist toksisk effekt. Da enhver positiv identifikation fra databaser dog bør betragtes som foreløbig, blev kromatografiske og massespektrometriske data sammenlignet med analytiske, rene standarder for at verificere identifikationen og for at bestemme koncentrationen.

Toksikologiske effekter i pap- og papiremballager

Ækvivalensfaktorer for de oprindeligt observerede toksikologiske effekter og fra summen af alle de verificerede forbindelser fra samme celletests blev beregnet. Ud fra disse resultater blev det konkluderet, at de observerede hormonforstyrrende effekter, som oprindeligt blev observeret, i vid udstrækning kunne forklares med tilstedeværelsen af henholdsvis blødgørere i genbrugsåbre og ved lim anvendt i nye åbre.

Forude venter mange udfordringer både for industrien samt internationale og nationale organer, før de kan garantere, at de emballager, som anvendes til fødevarer, er sikre at bruge. Men da mange af de hundredvis eller tusindvis af forbindelser, der er til stede i pap- og papiremballager aldrig er blevet korrekt toksikologisk vurderet, hverken individuelt eller når de åndes i blandinger, er denne omfattende sikkerhed ikke mulig i dag.

Ajournførte undersøgelser af toksikologiske effekter af forbindelser eller blandinger af forbindelser anses generelt for både tidskrævende og dyre. Håbet er, at dette projekt kan fungere som udgangspunkt til en mere effektiv evaluering og identifikation af toksikologiske aktive forbindelser, der åndes i materialer i kontakt med fødevarer.

E-mail:

Linda Bengtström: lben@food.dtu.dk

Litteratur

- Bengtström, L., Trier, X., Granby, K., Rosenmail, A.K. & Petersen, J.H. (2014). Fractionation of extracts from paper and board food contact materials for *in vitro* screening of toxicity. *Food Additives & Contaminants: Part A, Volume 31* (Issue 7, July 2014), Pages 1291-1300.
- Binderup, M.L., Pedersen, G.A., Vinggaard, A.M., Rasmussen, E.S. & Rosenquist, H. (2002). Toxicity testing and chemical analyses of recycled åbre-based paper for food contact. *Food Additives and Contaminants, Vol. 19* (Supplement), 13-28.
- Bradley, E.L., Honkalampi-Hämäläinen, U., Weber, A., Andersson, M.A., Bertaud, F., Castle, L., ... von Wrigth, A. (2008). The BIOSAFEPAPER project for *in vitro* toxicity assessments: preparation, detailed chemical characterization and testing of extracts from paper and board samples. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46 (7), 2498-509.