

# **Kemiske og toksikologiske undersøgelser af fødevareemballage fremstillet af genbrugspapir og pap**

Udarbejdet af

Mona-Lise Binderup

Gitte Alsing Pedersen

Anne Marie Vinggaard

Eva Selzer Rasmussen

Hanne Rosenqvist

Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri  
**Fødevaredirektoratet**

2000

# Indholdsfortegnelse

	<b>Sammenfatning .....</b>	<b>4</b>
	<b>Formål .....</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>Indledning .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Materialer .....</b>	<b>9</b>
2.1	Råvaretyper .....	9
2.2	Fremstillingsproces .....	9
<b>3</b>	<b>Metodebeskrivelser .....</b>	<b>10</b>
3.1	Kemiske metoder .....	10
3.1.1	<i>Fremstilling af ethanol-ekstrakter .....</i>	<i>10</i>
3.1.2	<i>Fremstilling af vand-ekstrakter .....</i>	<i>11</i>
3.1.3	<i>Analysemetode .....</i>	<i>12</i>
3.1.4	<i>Kvalitetssikring .....</i>	<i>12</i>
3.1.5	<i>Genfindelsesforsøg .....</i>	<i>13</i>
3.1.6	<i>PCB analyser .....</i>	<i>13</i>
3.2	Biologiske metoder .....	13
3.2.1	<i>Mutagentestning .....</i>	<i>13</i>
3.2.2	<i>Test for cytotoxicitet .....</i>	<i>15</i>
3.2.3	<i>Test for østrogenaktivitet .....</i>	<i>15</i>
3.2.4	<i>Test for Ah-receptor aktivitet .....</i>	<i>16</i>
3.2.5	<i>Mikrobiologiske test .....</i>	<i>16</i>
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>17</b>
4.1	Kemiske analyseresultater .....	17
4.1.1	<i>Identifikation af stoffer i ethanol-ekstrakter .....</i>	<i>17</i>
4.1.2	<i>Identifikation af stoffer i vand-ekstrakter .....</i>	<i>24</i>
4.2	Biologiske testresultater .....	27
4.2.1	<i>Mutagentestning .....</i>	<i>27</i>
4.2.2	<i>Test for cytotoxicitet .....</i>	<i>30</i>
4.2.3	<i>Østrogentest .....</i>	<i>31</i>
4.2.4	<i>Ah-receptortest .....</i>	<i>31</i>
4.2.5	<i>Mikrobiologiske undersøgelser .....</i>	<i>32</i>
<b>5</b>	<b>Diskussion og konklusion .....</b>	<b>33</b>
	<b>Referencer .....</b>	<b>37</b>

<b>Appendix 1 .....</b>	<b>39</b>
<b>Appendix 2 .....</b>	<b>40</b>
<b>Appendix 3 .....</b>	<b>41</b>
<b>Appendix 4a .....</b>	<b>42</b>
<b>Appendix 4b .....</b>	<b>43</b>

## Sammenfatning

Med henblik på at foretage en foreløbig vurdering af egnetheden af støbepap fremstillet af returfibre til emballering af levnedsmidler blev der foretaget en indledende undersøgelse af 4 forskellige materialer: en råvare fremstillet af nye træfibre (A) og 3 papprodukter (B,C,D) fremstillet af returfibre. B bestod af 40% nye fibre, 40% aviser uden tryk og 20% D. C og D er begge fremstillet på basis af aviser og ugeblade, den eneste forskel er, at D har gennemgået en "afsværtningsproces". Vurderingen blev foretaget på baggrund af mikrobiologiske undersøgelser, toksicitetstests og kemisk analyse af stoffer, der kan afgives fra emballagen. De kemiske analyser og toksicitetstestene blev udført på såvel ethanol- som vandekstrakter af de fire materialer. Ethanol er et testmedium for fede fødevarer og er i forhold til vand en strengere ekstraktion. De anvendte toksicitetstests var alle *in vitro* (cellekultur) tests:

- en cytotoxicitets test, som screeningstest for akut celletoksiske stoffer,
- en mutagentest, som screeningstest for potentielt arveanlægsbeskadigende og kræftfremkaldende stoffer
- en test til screening for stoffer med østrogenlignende effekt. Stoffer med den type effekt er mistænkt for at være medvirkende årsag til den stigende forekomst af brystkræft hos kvinder og skader på det mandlige reproduktionssystem, samt
- en test til påvisning af stoffer med Ah-receptor aktivitet. Sådanne stoffer (f.eks. dioxiner, PCB og PAH) kan fremkalde toksiske effekter som kræft og skader på reproduktions- og immunsystemet.

Den *cytotoksiske aktivitet* af ethanol-ekstrakterne viste, at ekstrakter af nye fibre er væsentlig mindre celletoksiske end ekstrakter af de 3 produkter fremstillet af returfibre. Af sidstnævnte var C det mest cytotoxiske. Vandekstrakterne var væsentlig mindre cytotoxiske end ethanol- ekstrakterne, og der var ikke nogen signifikant forskel på den cytotoxiske effekt af de 4 forskellige vandekstrakter. Dette er i rimelig overensstemmelse med de *kemiske analyser*, som viser en væsentlig forskel i mængden af stoffer, der er fundet ved ekstraktion med henholdsvis ethanol og vand. For ethanol-ekstrakterne er der en betydelig forskel på antallet og mængden af stoffer, der er ekstraheret fra henholdsvis råvaren A og produkterne B, C og D. Resultaterne viser endvidere en signifikant forskel på afgivelsen fra B i forhold til C og D.

For nogle af de stoffer, der er fundet ved *kemisk analyse*, er der fastsat grænseværdier for afgivelsen til levnedsmidler fra plastemballage. Ingen af disse grænseværdier var overskredet. Det skal dog pointeres, at der tale om en screeningsundersøgelse, at ikke alle stoffer er identificeret, og at der ikke er foretaget en sundhedsmæssig vurdering af alle identificerede stoffer.

Ingen af de testede ekstrakter viste *mutagen aktivitet* under de anvendte testbetingelser.

Det var ikke muligt at sige noget om materialernes indhold af stoffer med østrogenlignende aktivitet, da alle ekstrakterne var cytotoxiske overfor de anvendte gærceller.

Der blev fundet *Ah-receptoraktivitet* af ethanolekstrakterne af specielt papkvalitet C og D. De *kemiske analyser* for PCB kunne ikke forklare hele responset i testen, ligesom det heller ikke var muligt at forklare den svage Ah-receptoraktivitet i de vandige ekstrakter på baggrund af de kemiske analyser. Det er ikke muligt på baggrund af denne *in vitro* undersøgelse at foretage en sundhedsmæssig risikovurdering. Dette kræver, at det/de aktive stoffer identificeres.

De *mikrobiologiske analyser* viste et væsentligt lavere kimtal end pap omfattet af andre undersøgelser. Resultaterne giver ikke umiddelbart anledning til sundhedsmæssige betænkeligheder, såfremt papet anvendes til tørre levnedsmidler eller levnedsmidler, som piller eller skrælles.

Sammenfattende peger undersøgelsen ikke umiddelbart på, at de undersøgte materialer skulle give anledning til sundhedsmæssige betænkeligheder. Det er dog ikke muligt på baggrund af de

gennemførte undersøgelser at drage **generelle** konklusioner om de fire paptypers kemiske og toksikologiske egenskaber og om egnetheden af de forskellige papkvaliteter til forskellige typer levnedsmidler. Dels har undersøgelsen kun omfattet én enkelt stikprøve (indsamlet på én produktionsdag) af hver paptype, dels er der kun undersøgt én produktionsproces til fremstilling af støbepap. Undersøgelserne viser dog, at toksiciteten i de anvendte toksicitets tests og antallet/mængden af kemiske stoffer i nye fibre er lav. Resultaterne af såvel de kemiske som de toksikologiske undersøgelser viser færre/lavere koncentrationer af toksiske stoffer i papkvalitet B end i C og D. Hvorvidt stofferne i sidstnævnte materialer stammer fra trykfarver kan ikke afgøres med sikkerhed, selvom resultaterne peger i den retning. Med ovennævnte usikkerheder taget i betragtning bør produkter som C og D ikke anvendes til fede levnedsmidler.

## Formål

Der blev i juni 1999 indgået en samarbejdsaftale mellem Brødrene Hartmann A/S og Fødevaredirektoratet vedrørende projektet ”Kemiske og toksikologiske undersøgelser af fødevareemballage fremstillet af genbrugspapir og pap”.

Formålet med dette projekt har været

- a. at foretage en foreløbig vurdering af egnetheden af støbepap, baseret på returpapir, til emballering af levnedsmidler. Vurderingen er foretaget på baggrund af toksicitetstests, mikrobiologiske undersøgelser og kemisk identifikation af stoffer, der kan afgives fra emballagen.
- b. at afprøve og optimere ekstraktionsmetoder til pap og papir.
- c. at tilpasse og vurdere fire forskellige toksicitetstests: en mutagentest, en cytotoxicitets test, en test for østrogen effekt samt aryl hydrocarbon (Ah)-receptor assay til at teste papir og pap for migrerende stoffer.
- d. at foretage en mikrobiologisk vurdering af de forskellige papirkvaliteter.

## 1 Indledning

Returpapir og –pap er overvejende fremstillet ud fra indsamlede aviser og ugeblade, som oprindeligt er produceret af træfibre fra de skandinaviske nåletræsskove. Råvaren er således en fornybar ressource, der som råvare betraget er CO<sub>2</sub>-neutral. Gennem de sidste årtier har der været et stadigt stigende forbrug af emballage, bl.a. fordi flere og flere fødevarer sælges i emballeret tilstand. Ved at fremstille flere af emballagerne på basis af returfibre kan den samlede miljøbelastning reduceres. Der er således en særdeles positiv holdning til miljørigtige emballageprodukter hos såvel fødevareproducenter som forbrugere.

Fødevarer kommer på deres vej fra jord til bord på flere tidspunkter i kontakt med forskellige typer materialer og genstande, som potentielt kan afgive kemiske og mikrobiologiske forureninger til fødevarerne. Gennem det seneste årti er der gennem fælles EU-regler sket en betydelig detailregulering af materialer fremstillet af plast, især m.h.p. at begrænse migrationen af sundhedsskadelige stoffer. Det har bevirket, at såvel producenter af plastmaterialer, fødevareproducerende virksomheder og myndigheder nu i højere grad ønsker dokumentation for at emballagerne opfylder lovgivningens krav.

Gælder det papir og pap, er der endnu ikke en detaljeret regulering på området i EU. Det forventes, at EU kommissionen først påbegynder regeludformningen indenfor dette område om nogle år.

Alligevel er der allerede nu et behov for at kunne dokumentere, om emballager fremstillet af genbrugsfibre har en tilstrækkelig god hygiejnisk standard og ikke afgiver sundhedsskadelige stoffer til maden.

I Europarådet har man igennem flere år arbejdet med en *resolution* omhandlende krav til jomfrueligt papir (dvs. ubrugt papir fremstillet af nye fibre), og der arbejdes også med en *guideline* for genvundet papir. I forbindelse med udarbejdelsen af denne guideline diskuteres hvilke kvalitetskrav, der skal stilles til materialet for at sikre, at der ikke vil ske afsmitning af sundhedsskadelige komponenter, såvel kemiske som mikrobielle. Der er begrænset viden på området, og da de råvarer, der anvendes i fremstillingen af genvundet papir kan have meget forskelligartet sammensætning, overvejes det at inndele råvarerne i grupper, hvortil der kan opstilles ensartede kvalitetskrav. Kvalitetskravene differentieres ud fra en hensyntagen til hvilke levnedsmidler de færdige

emballager skal anvendes i kontakt med. Det vil således være naturligt at stille mere lempelige krav til testning af et genvundet materiale, der skal anvendes i kontakt med æg, end til et materiale, der skal anvendes i kontakt med fersk kød. I Europarådet arbejder man endvidere på at opstille forskellige krav til fremstillingsprocessen ("rensingsprocessen") af genbrugspapiret for at sikre, at produktet er egnet til anvendelse i kontakt med fødevarer. Formålet med kravene er, at potentielle forureninger fjernes. Der er ligeledes forslag om at stille mere vidtgående krav om kemiske analyser af migrerende stoffer fra slutprodukter fremstillet af genbrugsfibre, end de krav der stilles til papir og pap fremstillet af jomfruelige fibre.

Da papir og pap fremstillet af genbrugsfibre i de fleste tilfælde indeholder en lang række ukendte stoffer, er det ikke rent ressourcemæssigt muligt at identificere og teste enkeltstoffer hver for sig. Derfor er der i dette projekt anvendt den strategi at screene prøverne for indhold af kemiske stoffer ved hjælp af massespetrometri samt teste prøverne for total toksicitet ved hjælp af en række udvalgte biologiske screeningsmetoder. Muligheden for at anvende specielt mutagentests (genotoksicitets tests) og cytotoksicitets test har været diskuteret i Europarådet, men der er endnu ikke truffet nogen endelig afgørelse om at kræve disse tests udført.

I dette projekt blev afgivelsen af kemiske stoffer undersøgt fra 3 forskellige papkvaliteter fremstillet af henholdsvis

- B: baseret primært på afskær fra avisproduktion, dvs. avispapir uden tryk, og nye fibre,
- C: indsamlede aviser og ugeblade og
- D: deinkede (afsvættede) aviser og ugeblade samt en råvare
- A: baseret på nye fibre.

De 4 materialer blev ekstraheret med vand og ethanol. De benyttede kemisk analysemetoder samt biologiske *in vitro* toksicitetstests er beskrevet i det følgende.

*Kemisk analyse:* Analyse af kemiske stoffer under brug af gaschromatografi med infrarød og massespektrometri (GC-IR/MS) er et væsentligt redskab i bestemmelsen af, hvilke stoffer der kan afgives fra et emballagemateriale. Det er med denne teknik muligt at identificere en væsentlig del af de stoffer, der kan ekstraheres fra materialerne, og herefter foretage en (semi)-kvantitativ bestemmelse. Til materialer som pap og papir er metoden egnet som screeningsmetode, da der er tale om materialer, hvor antallet af ukendte stoffer kan være stort. For udvalgte stoffer kan der evt. herefter foretages en specifik analyse med større analytisk følsomhed. Ligeledes kan der være behov for at udbygge metoden med henblik på identifikation af, hvilke stoffer i prøvematerialer, der har vist sig aktive i de biologiske test. Det er dog ofte et meget krævende arbejde at finde frem til de specifikt aktive stoffer.

*Mutagentests* anvendes til at påvise kemiske stoffers evne til at beskadige arveanlæg. Skader på arveanlæggene (DNA) som følge af udsættelse for fremmedstoffer kan medføre flere alvorlige sygdomme såsom kræft og reproduktionsskader (f.eks. aborter, nedsat frugtbarhed, medfødte misdannelser og arvelige sygdomme). Evnen til at beskadige arveanlæg kan bestemmes ved hjælp af forskellige *in vitro* og *in vivo* genotoksicitets tests. Der findes en række validerede tests til påvisning af genotoksiske/mutagene stoffer, og for disse tests er der udarbejdet internationale guidelines. I denne undersøgelse er *Salmonella*/mikrosom testen (Ames test) (Maron og Ames, 1983) anvendt. Denne test er den mest anvendte og bedst validerede af *in vitro* testene. Ames test har været anvendt siden starten af 1970'erne og den indgår som "kernen" i en række strategier for genotoksicitets testning af f.eks. nye industrikemikalier, lægemidler, pesticider, tilsætningsstoffer til

levnedsmidler og tilsætningsstoffer til emballage beregnet til at komme i kontakt med levnedsmidler. Testen har endvidere været meget anvendt i forbindelse med testning af komplekse blandinger for indhold af mutagene stoffer. Det gælder f.eks. i miljøforureninger i luft, jord eller flodvand. Testen har tidligere været anvendt til at undersøge ekstrakter af levnedsmiddelemballage for indhold/afgivelse af mutagene stoffer (Binderup and Petersen, 1996, Lillemark et al., 1996) bl.a. i forbindelse med et EU finansieret projekt (AIR 941025: Safety and quality control of plastics materials for food contact).

*Cytotoksicitets tests* anvendes til at bedømme stoffers akutte giftighed for celler. For de fleste kemiske stoffer findes der en sammenhæng mellem deres giftvirkninger på enkelte celler (cytotoksicitet) og lokale og i nogle tilfælde også mere systemiske toksiske effekter. Cytotoksiciteten kan bestemmes i kulturer af mange forskellige celletyper og ved brug af forskellige mål for cellernes overlevelse, f.eks. bestemmelse af protein, DNA, RNA eller af cellernes stofskiftemæssige aktivitet. I denne undersøgelse blev bindevævsceller (fibroblaster) fra forhud fra nyfødte drenge anvendt. Valget af denne celletype skyldes, at det er robuste primære menneskeceller. Celleantallet opgøres med indikatoren resazurin, der omsættes til det fluorescerende stof resorufin i takt med at drabet af celler ændrer kulturernes redoxpotentiale (Rasmussen, 1999).

*Tests for østrogen aktivitet:* I de senere år er der i stigende omfang fokuseret på de mulige sundhedsskadelige effekter, som kan forårsages af østrogenlignende stoffer i miljøet og i kosten. Det er foreslået, at baggrunds niveauer af miljøfremmede stoffer kan være medvirkende til den stigende forekomst af brystkræft hos kvinder og de observerede skader på det mandlige reproduktionssystem såvel som reproduktionsproblemer hos vildtlevende dyr. I denne undersøgelse blev det rekombinante gær østrogen-assay (Routledge and Sumpter, 1996) anvendt. Testen er baseret på gærceller, der er transfekterede med expressionsvektoren for den humane østrogen-receptor og et plasmid kodende for et østrogen-respons element efterfulgt af genet for  $\beta$ -galactosidase. Når et stof binder til og aktiverer receptoren, syntetiseres enzymet  $\beta$ -galactosidase, der katalyserer omdannelse af det tilsatte chlorphenolrødt/ $\beta$ -galactopyranosid til chlorphenolrødt. Et positivt respons i dette assay detekteres som et farveskift, der kan måles spektrofotometrisk. Dette assay har tidligere været anvendt til testning af ekstrakter af forskellige fødevareremballager (Vinggaard et al. 2000).

#### *Ah-receptor aktivitet*

Den meget udbredte miljøforurening 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) menes at mediere sine toksiske effekter (kræftfremmende effekt og skader på reproduktions- og immunsystemet) via den såkaldte Aryl hydrocarbon(Ah)-receptor, som findes i cytosolen i de fleste celler. Flere persistente miljøforureninger, som polychlorerede biphenyler og polycykliske aromatiske hydrocarboner (PAH), er i stand til at binde til og aktivere Ah receptoren. Det er derfor relevant at screene ekstrakter af fødevareremballage for et eventuelt indhold af miljøfremmede stoffer med evne til at aktivere denne receptor. Chemically Activated Luciferase Expression assay (CALUX) bygger på rotte hepatocytter (H4IIE), som er stabilt transfekterede med et plasmid kodende for et luciferase reportergen forudgået af adskillige dioxin respons-elementer, til hvilke receptor-ligand komplekset binder. Cellerne i dette assay udtrykker konstitutivt den cytosoliske Ah receptor. Stigningen i luciferase aktivitet er således et mål for stoffets evne til at binde til Ah receptoren. Assayet er meget følsomt med en detektionsgrænse på 0,5 fmoL 2,3,7,8-TCDD (Murk et al., 1996). Dette assay har i anden sammenhæng været anvendt til test af miljøprøver (Murk et al., 1996).

*Mikrobiologiske tests:* Der er en potentielt større risiko for, at papir og pap fremstillet af genbrugsfibre indeholder flere mikroorganismer end papir og pap fremstillet af jomfruelige fibre.



Derfor har det også været diskuteret i Europarådet, hvorvidt der skal stilles specielle krav om mikrobiologiske analyser for genbrugspapir og pap beregnet til levnedsmidler, såvel af hygiejniske grunde (grænse for antal kim) som for at undgå overførsel af sygdomsfremkaldende bakterier fra emballage til levnedsmidler. I denne undersøgelse blev homogeniserede prøver undersøgt for det samlede indhold af aerobe bakterier samt antallet af aerobe og anaerobe sporedannere, inklusive *Bacillus cereus/thuringiensis*. Yderligere blev både våde og tørre papoverflader undersøgt for antal aerobe bakterier samt antal gær og skimmel.

## 2 Materialer

I projektet er en råvare (A) og tre produkttyper baseret på forskellige støbepaprecepter og fremstillingsmetoder (B,C og D) undersøgt.

I råvaren og de tre produkttyper er grundbestanddelen træmasse. Træmasse består overvejende af cellulose (35-60%), hemicellulose (20-30%) og lignin (10-30%). Cellulose ligger som mikrofibriller i en matrix af hemicellulose og lignin. Cellulose består af glucosemolekyler. Hemicellulose er mindre forgrenet og har en lavere molekylvægt end cellulose. Det består af forskellige suktermolekyler bl.a. glukose (60-70%) og xylose (20-30%) samt mannose, arabinose, galactose og uorganiske syrer. Lignin er et kompliceret makromolekyle, hvis struktur endnu ikke er helt fastlagt. Byggestenene er blandt andet forskellige phenylpropanenheder (Matforsk, 1993).

### 2.1 Råvaretyper

Type A (Nye fibre): En prøve af TMP (termomekanisk pulp) er fremstillet i laboratoriet ved opslemning af fibrene i vandværksvand, hvorefter de er presset til ark og tørret i ovn. TMP fremstilles ved at træet bliver bearbejdet mekanisk under forhøjet temperatur uden brug af kemikalier.

Type B (Superhvid): Består af ca. 40 % afskær fra avisproduktion, ca. 40% nye fibre og ca. 20 % deinked pulp. Afskær kommer direkte fra avistrykkerierne, og er papir fra de utrykte kanter af aviserne. Afskær har ikke været ude hos forbrugere.

Type C (Indsamlede aviser og ugeblade, ikke afsværtede): En del af denne råvaretype er indsamlet af forbrugere. Resten er typisk usolgte og ulæste oplag direkte fra bladudgiverne. Der er ikke sket nogen behandling for at fjerne tryksværte fra disse produkter.

Type D (Indsamlede aviser og ugeblade, afsværtede): Tryksværten bliver fjernet fra denne råvaretype ved anvendelse af sæbe i et afsværnings-anlæg. Der anvendes ikke chlorerede blegemidler. En del af denne råvare type er indsamlet af forbrugere.

### 2.2 Fremstillingsproces

Fremstillingsmetoden ved støbepapproduktion hos Brødrene Hartmann A/S starter med, at papiret (f.eks. type C: ca. 70% aviser og 30% ugeblade) opslemmes i vand for at sønderdele papirfibrene, så der dannes en papirmasse (kaldet pulp). Pulpen kan herefter afsvæertes (gælder type D), uden brug af chlorerede blegemidler, ved hjælp af sæbe. Pulpen føres herefter til formemaskinens kar i en opløsning på ca. 1% tørstof. Formemaskinen består af et suge- og et overføringshjul. På sugehjulet er anbragt en række forme med overflader som det produkt, der skal fremstilles. Når sugeforme-

hjulet roterer, bringes formene ned i maskinkarret, hvor der opsuges pulp på formens yderside. Opsugningen sker ved at vandet suges gennem den perforerede form, medens papirfibrene sætter sig på formens overflade. Efter formen er kommet op af karret, tørsuges emnet til en tørstofprocent på ca. 25%. Herefter overføres det våde emne til en overføringsform på formemaskinens andet hjul, der endelig lægger emnet af på en gyng, der bringer dette gennem en ovn. Ovnens temperatur er mellem 160-220°C, og produkterne er ca. 15 minutter i ovnen. Efter tørring er tørstofindholdet i emnerne ca. 97%. Gennem en efterbehandling kan produktet efterpresses med et 180°C varmt værktøj for at opnå en flot overfladefinish og gode dimensions-tolerancer samt udstanses til de korrekte ydermål. Endelig stables og pakkes emnerne. Produkterne indeholder ca. 7% vand ved normale danske temperaturer og fugtbetingelser (21°C, 50 % RH).

Til brug for beregning af indholdet af visse af de fundne stoffer i forhold til materialets overflade er der oplyst om følgende sammenhæng mellem vægt og areal for de undersøgte materialer:

Materiale A: 4,5 g/dm<sup>2</sup>  
Materiale B: 3,9 g/dm<sup>2</sup>  
Materiale C: 3,5 g/dm<sup>2</sup>  
Materiale D: 3,9 g/dm<sup>2</sup>.

### **3 Metodebeskrivelser**

#### **3.1 Kemiske metoder**

De fire materialer af støbepap er undersøgt for afgivelse af kemiske stoffer ved ekstraktion med henholdsvis destilleret vand og 95 % ethanol. Vand benyttes som levnedsmiddelsimulator til estimering af et materiales afsmitning til vand og vandige levnedsmidler jvf. cirkulære om kontrol med materialer og genstande bestemt til at komme i berøring med levnedsmidler (Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, 1998). Ethanol kan benyttes som alternativt testmedium til levnedsmiddelsimulatoren olivenolie ved estimering af et materiales afsmitning til fede levnedsmidler jf. cirkulæret. Ekstraktion med ethanol vurderes generelt at give resultater, der er lig med eller højere end dem, der opnås ved test med olivenolie, afhængig af de benyttede testtider og temperaturer.

##### **3.1.1 Fremstilling af ethanol-ekstrakter**

Fremstilling af ethanol-ekstrakter er foregået ved varm ekstraktion af materialet under brug af et Büchi ekstraktions-system. Prøvematerialet blev klippet i mindre stykker, og fra hvert materiale blev afvejet i alt 50 g materiale. Materialet blev fordelt med 5 g i hvert ekstraktionsbæger, og der blev tilsat 150 ml ethanol. Ekstraktionsbægrene blev placeret i ekstraktionsudstyret, og prøverne ekstraheredes i 3 timer ved 78°C (kogepunkt for ethanol). Ekstraktionsudstyret er tilkoblet kølevand, således at der sker en løbende kondensering og et tilbageløb af det ethanol, som fordamper under ekstraktionen.

Efter ekstraktion blev prøvematerialet taget op, idet så meget væske som mulig blev presset ud af materialet og tilsat det øvrige ekstrakt, som samlet blev overført til centrifugeglas. Ekstrakterne blev centrifugeret ved 3000 rpm i 10 min., hvorved partikulære rester fra materialet blev bundfældet. Herefter dekanteredes ekstrakterne, hvorefter de blev inddampet under vacuum til 3-4 ml. De inddampede ekstrakter fra samme prøvemateriale blev poollet og inddampet samlet under vakuum til

i alt 10 ml svarende til 5 g materiale/ml ekstrakt. Prøveekstrakterne blev opbevaret ved 5° C indtil kemisk analyse og undersøgelser i en række toksicitetstest.

### **3.1.2 Fremstilling af vand-ekstrakter**

Ved fremstilling af de vandige ekstrakter blev CEN standarden: DS/EN 645 "Papir og karton til fødevareemballage - fremstilling af koldtvandsekstrakt" (CEN, 1993) fulgt, idet ekstraktionstemperaturen dog blev ændret fra 24° C til 40° C. Testtemperaturen på 40° C blev valgt, da det er den testtemperatur, der normalt benyttes ved undersøgelse af afsmitning fra materialer og genstande, der er beregnet til brug ved stuetemperaturer (Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, 1998).

Materialet blev klippet i mindre stykker på 1-2 cm<sup>2</sup>. Der blev afvejet 10 g materiale i 250 ml koniske kolber og tilsat 200 ml glasdestilleret vand, således at alt materialet blev dækket med vand. Kolberne blev lukket med glasprop og sat i varmeskab ved 40 +/-1° C i 24 timer. Prøverne blev rystet undervejs med passende mellemrum. For at opnå en tilstrækkelig mængde ekstrakt blev der gennemført en 6-dobbelt ekstraktion af hver prøvetype.

Ekstraktet dekanteredes over i en 250 ml kolbe, og prøvematerialet blev vasket med vand, som ligeledes blev overført til kolberne. Det samlede ekstrakt blev ekstraheret gennem et glasfilter med glasfilterskiver, hvor prøvematerialet blev suget fri for vand ved påsætning af vacuum.

Den samlede vandfase blev udrystet med ethylacetat for at opnå et ekstrakt, der er egnet til analysere på GC-IR/MS. Ethylacetat er valgt som ekstraktionsmiddel pga. dets relativt polære karakter i sammenligning med andre opløsningsmidler, der heller ikke er blandbare med vand. Vand-ekstrakterne blev tilsat 50 ml ethylacetat og rystet i 1 min. For at lette den efterfølgende faseadskillelse blev tilsat 10 ml mættet NaCl-opløsning. Ethylacetatfasen blev opsamlet, og vandfasen blev udrystet yderligere to gange med 20 ml ethylacetat. Ethylacetatfaserne blev samlet og filtreret over tørret natriumsulfat for at fjerne restindhold af vand. Herefter blev ekstrakterne inddampet under vacuum til et mindre volumen, hvorefter de enkelte ekstrakter fra samme materiale blev poolet. Det samlede ekstrakt inddampedes herefter under vacuum til 12 ml, således at det færdige ekstrakt, ligesom ethanol-ekstrakterne, svarer til 5 g materiale/ml. Ethylacetatfaserne til toksicitetstest blev inddampet under vacuum til næsten tørhed og genopløst i dimethylsulfoxid (DMSO) svarende til en koncentration på 10 g materiale/ml. Der blev således også ved toksicitetstestene benyttet en udrystning af de vandige ekstrakter med ethylacetat og inddampning af denne fase. Dette blev foretaget for at opnå en opkoncentrering af prøveekstrakterne, hvilket blev vurderet nødvendigt i forhold til testenes følsomhed. Prøveekstrakterne blev opbevaret ved 5° C indtil analyse.

Den benyttede ekstraktions og opkoncentrerings procedure viste sig at give problemer med blindværdier ved Ah-receptor testen af ekstrakterne, idet DMSO i høje koncentrationer viste sig at give et positivt respons i testen. Derfor blev de vandige ekstraktioner gentaget, idet filtrering af prøverne blev udført ved brug af et Millipore filtreringssystem bestående udelukkende af glas. Efter filtrering blev de vandige prøver inddampet direkte uden udrystning med ethylacetat. Ekstrakterne blev herefter udelukkende testet i Ah-receptor testen.

### 3.1.3 Analysemetode

Analyseapparatur:

(GC-IR/MS):

GC: Gaschromatograf (Hewlett-Packard 5890 Series II Plus). GC-temperaturprogram: 90 °C i

1 min., stigende til 280 °C (og i nogle tilfælde til 325 °C) med 10 °C/min.. Max. temperaturen holdes i 5 til 15 min.

IR: Infrarød detektor (Hewlett-Packard 5965 B). Der blev optaget spektre mellem 550 og 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

MS: Massespektrometer (Hewlett-Packard 5972): Ionisering: EI, 70 eV. Masseområde: 40 u – 700 u. Scantid 1,1 scan/s.

Kolonne: DB5-MS (30 m, 0,32 mm indre diameter, filmtykkelse 0,5  $\mu\text{m}$ )

Bæregas: Helium

Injiceret prøvevolumen: 2  $\mu\text{l}$

Splitforhold fra GC til IR/MS: ca. 5/1.

Identifikation af stoffer: Vha. biblioteker i MS.

Prøveekstrakterne blev overført til autosampler glas og analyseret på GC-IR/MS ved ovenstående analysebetingelser. Stofferne blev identificeret under brug af søgninger i analyseudstyrets IR og MS biblioteker. Herved kan spektret af det ukendte stof sammenlignes med spektre af kendte stoffer i de to biblioteker. I de tilfælde, hvor biblioteket ikke indeholder et spektum, der svarer til det aktuelle stof, kan det sandsynliggøres, hvorvidt der er tale om en aromatisk eller alifatisk forbindelse samt hvilke funktionelle grupper, der indgår i stoffet.

Til kvantitativ bestemmelse af stofferne blev benyttet en standardblanding af tre alifatiske kulbrinter, C12, C20 og C24, i en koncentration på 30  $\mu\text{g/ml}$  af hvert stof. Mængden af de identificerede stoffer blev bestemt semi-kvantitativt overfor denne standardblanding ved udmåling af stoffernes tophøjde i total-ionkromatogrammet. Det enkelte stof blev kvantificeret overfor den standard, der i forhold til retentionstid er nærmest stoffet. Kvantificeringen er således foretaget ud fra en antagelse om, at alle stoffer giver samme respons i massespektrometret. Dette er ikke altid tilfældet, hvorfor de rapporterede indhold ikke skal tillægges mere betydning end værende et udtryk for størrelsesordenen.

### 3.1.4 Kvalitetssikring

Blindprøver:

Hver analyseserie indeholdt et antal blindprøver (200 ml glasdestilleret vand eller 150 ml ethanol), som hele vejen igennem blev behandlet som prøverne og analyseret sammen med disse.

Begrænsning af blindværdier:

For at undgå kontaminering af prøverne blev der gennemført følgende. Ved ekstraktion med vand blev der benyttet glasdestilleret vand. Der blev benyttet ethanol af analytisk kvalitet specielt kontrolleret for blindværdier af bla. phthalater. Alt glasudstyr blev varmebehandlet ved 450 °C inden brug, og der blev benyttet bomuldshandsker ved håndtering af prøverne.

### 3.1.5 Genfindelsesforsøg

Til bestemmelse af den vandige ekstraktionsmetodes genfindelse blev der gennemført en række tilsætningsforsøg med stoffer med forskellig polaritet. Til hvert prøvemateriale blev der tilsat

følgende stoffer i to forskellige koncentrationsniveauer svarende til en teoretisk slutkoncentration på henholdsvis 5 og 50 µg/ml i det færdige ekstrakt: Dichlorpropanol, phenol, toluen og benzophenon. Stofferne er valgt som eksempler på stof typer med forskellig polaritet, der kan minde om visse af de stoffer, der kan forekomme i pap. Efter tilsætning af stofferne til prøvematerialet blev prøverne opbevaret ved 5° C i 24 timer. Prøverne blev herefter ekstraheret med vand efter samme procedure som beskrevet ovenfor.

Af ressourcemæssige grunde blev der i denne undersøgelse ikke gennemført tilsvarende genfindelsesforsøg for ethanolekstraktionsmetoden.

### 3.1.6 PCB analyser

Til bestemmelse af om prøverne indeholdt PCB blev ethanol-ekstrakterne specifikt analyseret for PCB ved følgende metode:

Analyseapparat: GC-HRMS:

GC: Gaschromatograf (Fisons 8065). GC-temperaturprogram: 90°C i 2 min., stigning til 180°C med 20°C/min., herefter stigning til 290°C med 3°C/min.

HRMS: Massespektrometer, (Micromass AutoSpec Ultima, højtopløsende sektorinstrument).

Elektron ionisering EI. Ionenergi 37 eV. Opløsningsevne 10000. SIR, Selected Ion Recording i 3 funktioner.

Kolonne: DB-5 fra J&W (30 m, 0,25 indre diameter., filmtykkelse 0,25 µm)

Bæregas: Helium, 12 psi

Injiceret prøvevolumen: 1 µL (splitless) ved 280°C.

Der blev analyseret for følgende mono og diortho PCB-forbindelser: PCB 28, 47, 52, 101, 114, 118, 122, 128, 138, 149, 153, 156, 157, 167, 170, 180. Disse forbindelser indeholder fra 3 til 7 chloratomer og ved den massespektrometriske bestemmelse blev der for hver chloreringsgrad monitoreret på to ionfragmenter. Fordelen ved at benytte et højtopløsende massespektrometer er, at det har en finere masseadskillelse, og det betyder færre interferenser fra andre forbindelser i prøven. Positiv identifikation er foretaget ved at både den gaschromatografiske retentionstid og chlorisotopforholdet er korrekt i forhold til standarden. Kvantificering er sket overfor en ekstern standardopløsning fremstillet ud fra afvejning af rene PCB-forbindelser.

## 3.2 Biologiske metoder

### 3.2.1 Mutagentestning

Ethanol- og vandekstrakter af de 4 forskellige papirkvaliteter blev undersøgt for mutagen aktivitet i *Salmonella*/mikrosomttesten (Ames test) (Maron og Ames, 1983).

Indledningsvis blev der foretaget *toksicitetstest* med testbakterierne for at fastlægge testkoncentrationsniveauet. Testen blev udført med stammen TA98 uden metabolisk aktivering. Toksicitets testene blev udført på samme måde som mutagentestene, men med en 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> og 10<sup>7</sup> gange fortyndet bakteriekultur, og der blev anvendt agar plader med komplet medium i stedet for minimal medium (Vogel Bonner).

Til mutagentestene blev der anvendt 5 teststammer: TA98 og TA97 (til påvisning af frameshift ("læseramme skift") mutagener), TA1535, TA100 og TA102 (til påvisning af basepar substitutions

mutagener). Alle stammer er en foræring fra Bruce N. Ames (University of California, Berkeley, California, USA).

Testen blev udført med og uden metabolisk aktivering (S9-mix) fra Aroclor 1254 inducerede Wistar han rotter. Til forsøgene med metabolisk aktivering blev der anvendt 4 eller 8 mg S9 protein pr. ml S9-mix.

Mutagentestene blev udført som en mikrosuspensionstest beskrevet af Kado et al, 1983. Testen er en lettere modifikation af præinkubationstesten beskrevet af Maron og Ames, (Maron and Ames, 1983), og er udført efter principperne i OECD guideline 471. Mikrosuspensions-testen har vist sig 10-20 gange mere følsom end standardpladetesten (Kado et al., 1983) og kræver derfor mindre prøvemateriale.

En bakteriekultur blev opkoncentreret 10 gange ved centrifugering og resuspendering i en saltopløsning med fosfat buffer (PBS) til en koncentration på ca.  $1 \times 10^{10}$  celler pr. ml. Sterile glasrør på isbad blev tilsat 10 µl pap-ekstrakt, 0,1 ml S9-mix eller fosfat buffer pH 7,4 og 0,1 ml opkoncentreret bakteriekultur. Rørene blev anbragt ved 37°C i 90 minutter under omrystning. Herefter blev rørene tilsat 2 ml smeltet topagar (45°C), og blandingen hældt ud på minimal agarplader (VB plader).

Pladerne blev inkuberet ved 37°C i 72 timer, og antallet af his<sup>+</sup> revertanter blev talt på en IUL automatisk kolonitæller.

Ethanol-ekstrakter af de 4 papkvaliteter svarende til 5 g pap/ml ekstrakt (se afsnit 3.1.1) blev testet for toksicitet i TA98 uden S9. Følgende koncentrationer blev testet, svarende til: 50; 16,7; 5,6 og 2,8 mg pap/ plade. Herefter blev ekstrakterne testet for mutagen aktivitet i alle 5 stammer med og uden metabolisk aktivering. Der blev testet 5 koncentrationer, svarende til: 50, 25, 12,5, 5 og 2,5 mg pap/plade med 3 plader pr. koncentration. Der var medtaget positive og negative kontroller i alle forsøg. 95 % ethanol blev anvendt som negativ kontrol. Som positive kontroller blev anvendt: 2-aminoanthracen (alle stammer med S9), natriumazid (TA100 – S9 og TA1535 – S9), 2-nitrofluoren (TA98- S9 og TA97 – S9) og daunomycin (TA102 – S9). Til forsøg med metabolisk aktivering blev der anvendt 0,4 mg S9 protein pr. plade. Ca. 3 gange opkoncentrerede ethanol-ekstrakter af de fire papkvaliteter blev testet i følgende koncentrationer, svarende til: 150; 75; 37,5; 15 og 7,5 mg pap/plade i TA98 **med** og **uden** S9-mix med 0,4 mg S9 protein pr. plade og i TA97 og i TA98 **med** S9-mix med 0,8 mg S9 protein pr. plade. Som kontrol af ekstraktionsproceduren blev blindprøver, fremstillet på samme måde som papekstrakterne (jvf. 3.1.4), testet i alle teststammer i én koncentration svarende til højeste testede koncentration af ekstrakterne.

Vand-ekstrakter af de 4 papkvaliteter svarende til 10 g pap/ml i DMSO (jf. afsnit 3.1.2) blev testet for toksicitet i TA98 uden metabolisk aktivering i følgende koncentrationer, svarende til: 100; 33,4; 11,4 og 6,6 mg pap/plade. Herefter blev ekstrakterne testet for mutagen aktivitet i TA98, TA97, TA100, TA1535 og TA102 uden og med S9-mix. Der blev anvendt 0,8 mg S9 i forsøgene med metabolisk aktivering. Følgende koncentrationer blev testet, svarende til: 100; 50; 25; 10 og 5 mg pap/plade. Som kontrol af ekstraktionsproceduren blev blindprøver, fremstillet på samme måde som papekstrakterne (jvf. 3.1.4), testet i alle teststammer, i én koncentration svarende til højeste testede koncentration af ekstrakterne.

### 3.2.2 Test for cytotoxicitet

Ethanol- og vandekstrakter af de 4 forskellige papirkvaliteter blev undersøgt for cytotoxisk aktivitet i primære humane fibroblaster (bindevævs-celler) fra forhud. Cellerne var fra American Type Culture Collection. De blev dyrket i DMEM medium suppleret med 10% føtal bovin serum og 10 ml penicillin/streptomycin pr liter.

De humane fibroblaster blev udsået i 4 replika i sorte 96-brønds plader med klar bund med 200 µl medium pr. brønd. Pladerne blev inkuberet ved 37°C i 95% luft/5% CO<sub>2</sub> i 24 timer. Fem koncentrationer af test-ekstrakterne blev tilføjet i friskt medium. Efter 24 timers inkubation blev mediet udskiftet med medie med 5 % af en stamopløsning på 0,1 mg/ml resazurin opløst i PBS. Efter 24 timer blev fluorescensen direkte målt i pladerne med celler og medium ved brug af en excitation-bølgelængde på 560 nm og en emissions-bølgelængde på 590 nm i et Perkin Elmer luminiscensspektrometer med en Perkin Elmer pladelæser. Den koncentration af teststof, der medførte 50% cytotoxicitet (IC<sub>50</sub>) blev herefter beregnet for alle kontroller og prøver.

Ethanol-ekstrakter af de 4 pap kvaliteter svarende til 5 g pap/ml ekstrakt (jvf. afsnit 3.1.1) blev testet for cytotoxicitet. Der blev testet 5 koncentrationer, svarende til: 100, 50, 25, 10 og 5 mg pap/brønd med 4 gentagelser pr. koncentration. Poolede blindprøver (jf. 3.1.4.) blev anvendt som negativ kontrol.

Vandekstrakterne svarende til en koncentration på 10 g pap/ml i DMSO (jvf. afsnit 3.1.2) blev testet for cytotoxicitet i følgende koncentrationer: 200, 100, 50, 20 og 10 mg pap/ brønd med 4 gentagelser pr. koncentration. Poolede blindprøver (jf. 3.1.4.) blev anvendt som negativ kontrol.

### 3.2.3 Test for østrogenaktivitet

Ethanol og vandekstrakter af de 4 papkvaliteter blev testet for østrogen aktivitet i gær-celler stabilt transfekterede med den humane østrogen receptor og et reporter gen. Gær-cellerne var en gave fra Prof. John Sumpter, Brunel University. De blev dyrket i MEM medium suppleret med vitaminer og mineraler. 17β-estradiol (0.5-500 pM) blev inkluderet som positiv kontrol. Testen blev udført i 96-huls Linbro mikrotiterplader. 200 µl gær-celle-indikator medium blev tilsat hver brønd og tilsat forskellige koncentrationer ekstrakt. Pladerne blev inkuberet ved 30 °C i 4 dage. Absorbansen ved 540 og 630 nm blev aflæst direkte i pladerne. Abs<sub>540</sub> nm angiver absorptionsmaximum for chlorphenolrødt, mens aflæsning ved 630 nm er en kontrol af gær-celle-væksten i brønden. En cytotoxisk effekt vil afsløre sig ved en påvirkning af Abs<sub>630</sub> nm.

Ethanol-ekstrakter af de 4 pap kvaliteter svarende til 5 g pap/ml ekstrakt (afsnit 3.1.1) blev testet i 12 koncentrationer. 200 µl ekstrakt blev tilsat brønd 1 og 100 µl ethanol blev tilsat brønd 2-12. 100 µl blev overført fra brønd 1 til 2, mixet og 100 µl derefter overført fra brønd 2 til 3 osv. Ethanolen blev afdampet ved henstand i LAF-bænk inden tilsætning af gær-celle-indikator medium. Med denne metode var testkoncentrationerne mellem 0,25 og 500 mg pap/brønd. 95% ethanol blev medtaget som negativ kontrol, og blindprøver fremstillet som beskrevet i 3.1.4. blev medtaget som kontrol af ekstraktionsproceduren.

Vandekstrakter overført til DMSO svarende til 10 g pap/ml ekstrakt (jf. 3.1.2) blev ligeledes testet i 12 koncentrationer. Disse prøver kunne ikke inddampes til tørhed, hvorfor 10 µl vandekstrakt i 12 forskellige koncentrationer blev tilsat direkte til 200 µl gær-celle-indikator medium. De testede koncentrationer svarede til 0,05 – 100 mg pap/brønd. DMSO blev medtaget som negativ kontrol, og blindprøver fremstillet som beskrevet i 3.1.4. blev medtaget som kontrol af ekstraktionsproceduren.

### 3.2.4 Test for Ah-receptor aktivitet

Ethanol- og vandekstrakter af de 4 papkvaliteter blev testet for Ah receptor aktivitet i levercancer celler, der er stabilt transfekterede med et reporter-gen kodende for luciferase. Cellerne er en gave fra Dr. Abraham Brouwer, Amsterdam University. De blev dyrket i MEM medium suppleret med 10% føtal bovin serum og 10 ml penicillin/streptomycin pr liter og udsået i 4 replika i klare 96-brønns plader med 100 µl medium pr. brønd. Pladerne blev inkuberet ved 37°C i 95% luft/5% CO<sub>2</sub> i 24 timer. Ekstrakterne blev tilsat i frisk medium. Efter 24 timers inkubation blev 20 µl detergentopløsning tilsat, omrystning i 10 min, hvorefter 10 µl opløsning blev overført til hvide 96-huls plader. 20 µl luciferin/ATP opløsning blev tilsat og luminiscensen aflæst i 1 sec. i et BioOrbit luminometer. 2,3,7,8-TCDD blev inkluderet som positiv kontrol.

Ethanol-ekstrakter svarende til 5 g pap/ml ekstrakt (jf. 3.1.1) blev testet i koncentrationer på 0,001-10 % ekstrakt (svarende til 0,005 – 50 mg pap/brønd). 95% ethanol blev medtaget som negativ kontrol, og blindprøver fremstillet som beskrevet i 3.1.4. blev medtaget som kontrol af ekstraktionsproceduren.

Vand-ekstrakter svarende til 10 g pap/ml ekstrakt overført til DMSO (jf. 3.1.2) blev testet i de samme procentvise koncentrationer som ethanol-ekstrakterne, svarende til 0.01-100 mg pap/brønd. Da DMSO i koncentrationer > 1% viste sig at give et positivt respons i Ah receptor testen, blev der efterfølgende fremstillet rene vandekstrakter (10 g pap/ml), og det er resultater fra disse ekstrakter, der rapporteres.

### 3.2.5 Mikrobiologiske test

De fire paptyper blev undersøgt for indhold af mikroorganismer dels på overfladen dels i dybden. Fra hver paptype (A-D) blev der udtaget 2 prøver af 10 g (dobbeltbestemmelse). De 10 g prøve blev findelt med en steril saks, fortyndet 1:9 i fortyndingsvæske (fysiologisk saltvand (0,9%) tilsat pepton (0,1%)) og homogeniseret i Stomacher i 5 min. i en stomacherpose med filter. Passende 10-ganges fortyndinger af homogeniserede prøver blev undersøgt for total-kim (dybdeudsæd på Plate Count Agar (PCA, Oxoid CM 325), aerob inkubation ved 30°C i 3 døgn), antal aerobe og anaerobe sporedannende bakterier (varmebehandling ved 80°C i 10 min, dybdeudsæd på PCA, aerob og anaerob inkubation ved 30°C i 3 døgn) og antal *Bacillus cereus/thuringiensis* (overfladeudsæd på *Bacillus cereus* selektiv agar (BC, Oxoid CM 617), aerob inkubation i 24-48 timer). Til undersøgelse af antal mikroorganismer på overfladen af pappet blev 4 papstykker (á ca. 5 x 5 cm) af hver af de 4 paptyper udklippet med en steril saks. Papstykkerne blev placeret i sterile petriskåle. To af papstykkerne blev befugtet med et stykke sterilt gaze vædet med 10 ml sterilt vand for at efterligne et vådt levnedsmiddel. Papstykkerne stod i petriskålene ved 5°C i 24 timer. Herefter blev overfladen af de tørre og befugtede papstykker undersøgt for total-kim (HYcheck kontaktagar (Difco PCA Cat. no 9053-36), aerob inkubation ved 30°C i 3 døgn) og gær og skimmel (HYcheck kontaktagar (Difco gær og skimmel Cat. no 9038-36)). Efter inkubation blev antal kolonier på agarplader og Hycheck kontakt-plader talt, og antal mikroorganismer pr. gram pap henholdsvis pr. 10 cm<sup>2</sup> pap blev estimeret.



## 4 Resultater

### 4.1 Kemiske analyseresultater

#### 4.1.1 Identifikation af stoffer i ethanol-ekstrakter

Ved analyse af ethanol-ekstrakterne med GC-IR/MS blev der fundet et stort antal stoffer. De mindste toppe i kromatogrammerne (svarende til et indhold på under ca. 1 mg/kg i prøvematerialet) er derfor ikke identificeret i denne undersøgelse, og generelt er kun få af stofferne identificeret overfor standardstoffer. I tabel 1 a og 1 b er de identificerede stoffer angivet med anførelse af CAS-numre, og de fundne koncentrationsniveauer er anført i henholdsvis mg/kg materiale og mg/dm<sup>2</sup> materiale. For stoffer listet i tabel 1b er der desuden anført, om disse har været vurderet af EU's videnskabelige komite for levnedsmidler (SCF) som plastmonomer eller additiv, idet listenummeret for disse stoffer er anført. En oversigt over denne listes symboler og forklaring på disse er angivet i rapportens appendix 1. Hvis SCF har fastsat en ADI eller TDI (henholdsvis acceptabelt eller tolerabelt dagligt indtag af stoffet pr. kg kropsvægt), er dette anført. SMG angiver specifik migrationsgrænse udtrykt som mg stof pr. dm<sup>2</sup> materiale, hvis en sådan er fastsat, er dette anført. Tabel 1a og 1 b viser, at en væsentlig del af de identificerede stoffer i materialerne B, C og D er *alifatiske kulbrinter*. For en række af disse har det ikke være muligt at give en fuldstændig beskrivelse af stoffets struktur, men for flere er der fundet hydroxy- eller carboxylsyre- funktionelle grupper. For en række af disse stoffer (no. 18, 20, 21, 25, 26, 30, 35 og 37 i tabel 1a og b) findes et højere indhold i materiale C og/eller D sammenlignet med B. For stofferne no. 4 og 8 er der fastsat gruppe TDI'er. TDI'erne kan omregnes til migrationsgrænser svarende til henholdsvis 15 mg/dm<sup>2</sup> og 0,5 mg/dm<sup>2</sup> (idet det konventionelt forudsættes, at en person vejer 60 kg og dagligt indtager 1 kg levnedsmiddel indpakket i 6 dm<sup>2</sup> materiale). For begge stoffer ligger de fundne niveauer væsentlig under migrationsgrænserne. Da resultaterne er fremkommet ved ekstraktion af materialerne med ethanol, hvilket vurderes som en skarpere test end en egentlig migrationstest, vil der ikke være behov for at gennemføre en migrationstest for disse stoffer.

Herudover er der i ethanolekstrakterne fundet et antal *aromatiske eller cykliske forbindelser*. Følgende forbindelser er identificeret, idet numrene refererer til nummerering af stofferne i tabellen:

(3) 2-Pentylfuran er fundet i B, C og D i samme lave koncentrationsniveau. Tilsvarende forbindelse er fundet i andre undersøgelser af pap og papir (Castle et al., 1997; Lindell, 1991).

(7) 2-Methoxyphenol er fundet i samme niveau i materialerne B, C og D.

(13) 4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyd (vanillin) er ligeledes fundet i samme niveau i de enkelte materialer. Det er muligt at stoffet stammer fra oxidation af lignin (Lindell, 1991). Det fundne indhold af stoffet ligger væsentlig under den grænse (= 100 mg/dm<sup>2</sup>) der kan beregnes på basis af den fastsatte ADI.

(14, 15, 32 og 40) Disse aromatiske forbindelser har det ikke været muligt at karakterisere nærmere. Stof no. 15, der er en phenol, findes i relativt højt niveau i alle de tre materialer B, C og D. Stof 32, en anden phenol, findes i materiale B i et tilsvarende niveau. De øvrige stoffer i denne gruppe forekommer i lavere niveauer, der ikke adskiller sig signifikant mellem de enkelte materialer.

(33, 35) Phenanthren-carboxylsyre og phenanthren-carboxylsyre methyl ester er fundet i B, C og D. Summen af disse stoffer er for materiale B og D fundet til et indhold på 14-16 mg/kg materiale,

mens den for materiale C er fundet i et noget højere indhold på 32 mg/kg. Det kan tyde på, at stoffet blandt andet findes i de trykfarver, der indgår i materiale C. Stoffet er fundet i flere pap- og papirmaterialer i den engelske undersøgelse i niveauer på mellem 15 og 72 mg/kg materiale (Castle et al., 1997).

(39) Diethylhexyl phthalat (DEHP) er fundet i de tre materialer baseret på genbrugsfibre B, C og D i niveauer fra 1 til 11 mg/kg. Det højeste indhold er fundet i det ikke afsværte materiale C. Phthalater heriblandt DEHP er fundet i andre undersøgelser af pap og papir (Aurela et al., 1999, MAFF, 1995; Lillemark et al. 1997). Stofferne stammer blandt andet fra trykfarver og lime og kan således forekomme i produktion af pap og papir fra recirkulerede fibre indeholdende trykfarve eller lim. EU's videnskabelige komite for levnedsmidler, SCF, har fastsat en TDI værdi for stoffet på 0,05 mg/kg legemsvægt. På baggrund af denne er der beregnet en migrationsgrænse for DEHP på 3 mg/kg levnedsmiddel svarende til 0,5 mg/dm<sup>2</sup> materiale. I Europarådets udkast til guideline for genvundet papir er phthalaterne på listen over stoffer, der specielt bør kontrolleres. Det fundne indhold i det undersøgte materiale C svarer til 40 µg/dm<sup>2</sup> materiale, hvilket er under den fastsatte specifikke migrationsgrænse for plastmaterialer. Udfra disse resultater er der således ikke behov for at følge ekstraktionsresultaterne op med egentlige migrationsundersøgelser. Da der ikke er undersøgt specifikt for phthalater er det muligt, at en række af de øvrige phthalater afgives fra materialerne i niveauer under 1 mg/kg (svarende til det laveste niveau der er bestemt ved den semikvantitative analyse i denne undersøgelse).

**Tabel 1 a:** Afgivelse af stoffer fra materialerne B, C og D i mg/kg ved ekstraktion med ethanol

Stof nr.	CAS-nr.	Stofnavn	Fundet indhold i de enkelte materialer		
			mg/kg		
			B	C	D
1	78-10-4	Salicylsyre, tetraethyl ester	9	8	9
2		Alifatisk carboxylsyre	6	8	7
3	3777-69-3	2-Pentyl furan	1	1	0,7
4	110-98-5	Isomer af dipropylenglycol	17	10	14
5	106-62-7	2-(2-Hydroxypropoxy)-1-propanol	15	9	13
6		Ligner CAS-nr. 106-62-7	3	2	3
7	90-05-1	2-Methoxyphenol	3	3	3
8	112-34-5	2-(2-butoxyethoxy)ethanol	4	3	5
9		Alifatisk ester	2	3	4
10		2,4-Decadienal	1	3	0,3
11		Ligner 2,4-decadienal	5	9	3
12		Alifatisk forbindelse med ilt	3	3	2
13	121-33-5	4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyd (vanillin)	4	3	5
14		Aromatisk forbindelse	3	3	3
15		En phenol	13	20	15
16	1002-84-2	Pentadecan syre	3	4	4
17		Alifatisk forbindelse	2	4	4
18	57-10-3	Hexadecan syre	12	24	25
19	506-30-9	Eicosan syre	< 1	<1	<1
20		Alifatisk forbindelse	13	18	24
21		Alifatisk forbindelse	3	18	12
22	629-96-9	1-Eicosanol	<1	<1	<1
23		Alifatisk forbindelse	<1	<1	<1
24		Alifatisk carboxylsyre	7	9	10
25		Alifatisk carboxylsyre		27	20
26		Alifatisk forbindelse		9	4
27		Alifatisk forbindelse	1		
28		Alifatisk carboxylsyre			<1
29		Alifatisk forbindelse	24	36	57
30	638-67-5	Tricosane		1	7
31		Alifatisk alkohol		<1	<1

Stof nr.	CAS-nr.	Stofnavn	Fundet indhold i de enkelte materialer		
			mg/kg		
32		En phenol	19	4	4
33	1235-74-1	Phenanthrenocarboxylsyre, methyl ester	7	11	11
34	646-31-1	Tetracosane	1	18	1
35	1740-19-8	Phenanthrenocarboxylsyre	7	21	5
36	629-96-9	Eicosanol	26	43	43
37		Alifatisk carboxylsyre		4	0
38		Alifatisk ester	<1		<1
39	117-81-7	Diethylhexyl phthalate (DEHP)*	1	11	4
40		Aromatisk forbindelse ?	3	4	4
41		Alifatisk forbindelse		7	5
42	(297-03-0)?	Cyclotetracosan ?	7	11	11
43	80-05-7	Bisphenol A*	3	9	6
44		Diisopropylnaphthaftalen	< 1	<1	<1
		<b>Sum af alle stoffer</b>	<b>230</b>	<b>384</b>	<b>350</b>

\*Stoffer hvor der er fastsat en specifik migrationsgrænse (se tabel 1 b).

**Tabel 1 b:** Afgivelse af stoffer fra materialerne B, C og D i mg/dm<sup>2</sup> ved ekstraktion med ethanol

	CAS-nr.	Stofnavn	Fundet indhold i de enkelte materialer, mg/dm <sup>2</sup>			SCF vurdering
			B	C	D	
1	78-10-4	Salicylsyre, tetraethyl ester	0,036	0,031	0,036	(L8)
2		Alifatisk carboxylsyre	0,023	0,031	0,026	
3	3777-69-3	2-Pentyl furan	0,003	0,005	0,003	
4	110-98-5	Isomer af dipropylenglycol	0,064	0,038	0,054	Gruppe TDI = 1,5mg/kg bw. (L2)
5	106-62-7	2-(2-Hydroxypropoxy)-1-propanol	0,058	0,033	0,049	
6		Ligner CAS-nr.106-62-7	0,010	0,008	0,013	
7	90-05-1	2-Meyhoxy phenol	0,010	0,010	0,013	
8	112-34-5	2-(2-butoxyethoxy)ethanol	0,015	0,013	0,021	Gruppe TDI=0,05 mg/kg bw. (L2)
9		Alifatisk ester	0,009	0,013	0,015	
10	2363-88-4	2,4-Decadienal	0,005	0,010	0,001	
11	25152-84-5	Ligner 2,4-decadienal	0,018	0,036	0,013	
12		Alifatisk forbindelse med ilt	0,013	0,013	0,008	
13	121-33-5	4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyd (vanillin)	0,015	0,013	0,021	ADI=10 mg/kg bw. (L1)
14		Aromatisk forbindelse	0,013	0,013	0,013	
15		En phenol	0,049	0,077	0,056	
16	1002-84-2	Pentadecan syre	0,010	0,015	0,015	
17		Alifatisk forbindelse	0,012	0,021	0,021	
18	57-10-3	Hexadecan syre	0,045	0,093	0,095	
19	506-30-9	Eicosan syre	< 0,004	< 0,004	< 0,004	(L0)
20		Alifatisk forbindelse	0,048	0,069	0,093	
21		Alifatisk forbindelse	0,012	0,069	0,046	
22	629-96-9	1-Eicosanol	< 0,004	< 0,004	< 0,004	
23		Alifatisk forbindelse	< 0,004	< 0,004	< 0,004	
24		Alifatisk carboxylsyre	0,028	0,034	0,038	
25		Alifatisk carboxylsyre		0,103	0,077	
26		Alifatisk forbindelse		0,034	0,017	
27		Alifatisk forbindelse	0,005			
28		Alifatisk carboxylsyre			< 0,004	
29		Alifatisk forbindelse	0,093	0,137	0,220	
30	638-67-5	Tricosan		0,005	0,027	
31		Alifatisk alkohol		< 0,004	< 0,004	
32		En phenol	0,074	0,016	0,014	
33	1235-74-1	Phenanthrencarboxylsyre, methyl ester	0,027	0,044	0,041	
34	646-31-1	Tetracosan	0,005	0,069	0,004	
35	1740-19-8	Phenanthrencarboxylsyre	0,027	0,082	0,019	
36	629-96-9	Eicosanol	0,099	0,165	0,165	
37		Alifatisk carboxylsyre		0,014		
38		Alifatisk ester	< 0,004	< 0,004	< 0,004	

	CAS-nr.	Stofnavn	Fundet indhold i de enkelte materialer, mg/dm <sup>2</sup>			SCF vurdering
39	117-81-7	Diethylhexyl phthalate (DEHP)	0,005	0,041	0,016	SMG=0,5 mg/dm <sup>2</sup> TDI=0,05mg/kg bw (L2)
40		Aromatisk forbindelse	0,011	0,014	0,014	
41		Alifatisk forbindelse		0,027	0,019	
42	(297-03-0)?	Cyclotetracosan ?	0,027	0,044	0,041	
43	80-05-7	Bisphenol A	0,012	0,035	0,023	SMG=0,5mg/dm <sup>2</sup> TDI=0,05mg/kg bw (L2)
44		Diisopropylnaphthaften	< 0,004	< 0,004	< 0,004	
		<b>Sum af alle fundne stoffer</b>	<b>0,883</b>	<b>1,476</b>	<b>1,347</b>	

L: SCF liste nummer  
TDI: Tolerabelt dagligt indtag pr. kg kropsvægt  
Gruppe-TDI: TDI-værdien gælder for summen af en gruppe beslægtede stoffer  
ADI: Acceptabelt dagligt indtag pr. kg kropsvægt  
SMG: Specifik migrationsgrænse

(43) Bisphenol A er fundet i niveauer på 0,3 – 9 mg/kg svarende til 1-35 µg/dm<sup>2</sup> i alle materialer. Der er specifikt undersøgt for dette stof, da det er fundet i andre materialer af genbrugsfibre, og da stoffet er dokumenteret at have østrogen effekt i *in vitro* testmetoder med gærceller. Der er fastsat en specifik migrationsgrænse for stoffet på 3 mg/kg levnedsmiddel svarende til 0,5 mg/dm<sup>2</sup> i plastmaterialer (Sundhedsministeriets bekendtgørelse nr. 1064, 1996). De fundne indhold ved ekstraktion med ethanol ligger væsentlig under den nuværende fastsatte grænse for migration. Der er således heller ikke for disse stoffer behov for opfølgning med en egentlig migrationsanalyse.

(44) Der blev i undersøgelsen specifikt undersøgt for indhold af diisopropylnaphthalen (DIPN), som er rapporteret i en række andre undersøgelser af pap og papir i niveauer op til 40 mg/kg materiale (Mariani et al., 1999, MAFF, 1999a). Stoffet er ikke fundet ved den generelt benyttede sceningsmetode i nærværende undersøgelse, men er fundet på sporstofniveau, dvs. ppb niveau i ethanol ekstrakter af materialerne B, C og D ved efterfølgende specifik analyse. Diisopropylnaphthalen bruges som opløsningsmiddel for farvestoffet i selv-duplikerende papir.

Ethanolekstrakterne blev ligeledes analyseret specifikt for PCB p.g.a. positivt respons i Ah-receptor assayet (se afsnit 4.2.3). Formålet var at kontrollere, hvor stor en del af dette respons, der evt. kunne forklares med et indhold af PCB. Disse stoffer er påvist at kunne forekomme i pap og papir (MAFF, 1999b; Sipilainen-Malm, 1997).

Ethanolekstrakterne blev analyseret uden ekstra oprensning, og alle fire prøver viste lave PCB-indhold, dvs. ca. 2 ng/ml (svarende til 0,4 ng/kg materiale eller 1,5 pg/dm<sup>2</sup>) eller derunder. De fundne koncentrationer er på niveau med laboratoriebaggrunden. De lavere chlorerede PCB'er f.eks. PCB 28 er lidt højere i C og D., hhv. 10 og 5 ng/ml (svarende til 2 til 1 ng/kg materiale eller 4 pg/dm<sup>2</sup>) mod ca. 1 i A og B.

Nogle PCB-forbindelser har dioxinlignende toksisk effekt og har fået tildelt en toksicitets ækvivalens faktor (TEF), der udtrykker hvor potent den givne forbindelse er i forhold til den mest toksiske dioxin, TCDD. TEF-værdien er angivet i parentes: PCB 118 og 105 (0.0001), PCB 114, 156 og 157 (0.0005). PCB 167 (0.00001). Den samlede dioxinvirkning betegnes TEQ (toksiske ækvivalenter) og findes ved at gange koncentrationerne af de enkelte forbindelser med de tilsvarende TEF-værdierne og addere alle bidragene.

For de påviste PCB-forbindelser med TEF-værdi kan der beregnes en samlet TEQ på 0,13-0,32 µg/ml, og med den usikkerhed der er på disse lave niveauer er der ikke forskel på ekstrakterne. TEQ fra de målte PCB-forbindelser er 100 til 1000 gange lavere end den TEQ, der blev målt på prøverne ved Ah-receptorrespons.

**Tabel 2:** Afgivelse af stoffer fra materiale A (jomfruelige fibre) i henholdsvis mg/kg og mg/dm<sup>2</sup> ved ekstraktion med ethanol

	CAS-nr.	Stofnavn	Fundet indhold		SCF vurdering
			mg/kg	mg/dm <sup>2</sup>	
1	78-10-4	Silicic acid, tetraethyl ester	3	0,012	(L8)
13	121-33-5	4-hydroxy-3methoxy benzaldehyd	0,8	0,003	ADI=10mg/kg bw. (L1)
15		En phenol	3	0,012	
19	506-30-9	Eicosanoic acid	< 1	< 0,004	
22	629-96-9	1-Eicosanol	< 1	< 0,004	
23		Alifatisk forbindelse	< 1	< 0,004	
24		Alifatisk carboxylsyre	2	0,008	
33		En phenol	25	0,096	
41	117-81-7	Diethylhexyl phthalat (DEHP)	0,4	0,002	SMG=0,5mg/dm <sup>2</sup> TDI=0,05mg/kg bw.(L2)
44		Alifatisk forbindelse	1,2	0,005	
46	80-05-7	Bisphenol A	0,26	0,001	SMG=0,5mg/dm <sup>2</sup> TDI=0,05mg/kg bw. (L2)
		<b>Sum af fundne stoffer</b>	<b>36</b>	<b>0,14</b>	

L: SCF liste nummer

TDI: Tolerabelt dagligt indtag pr. kg kropsvægt

Gruppe-TDI: TDI-værdien gælder for summen af en gruppe beslægtede stoffer

ADI: Acceptabelt dagligt indtag pr. kg kropsvægt

SMG: Specifik migrationsgrænse

Analyseresultaterne fra undersøgelse af materiale A giver mulighed for at sammenligne de forskellige typer af returfiber materialer med et materiale baseret på jomfruelige fibre. Resultaterne viser en tydelig forskel på antal og mængde af stoffer i materiale A sammenlignet med B, C og D. Det tyder således på, at kun en ret begrænset mængde af de ekstraherede stoffer kommer fra selve

træmassen. Med denne undersøgelse er det ikke muligt at vurdere forskellen mellem produkter fremstillet af henholdsvis nye- og returfbre, da materiale A er en råvare, der ikke har været igennem den samme produktionsproces som de øvrige materialetyper i projektet. Der er således sandsynligt, at en del af de færre stoffer i materiale A skyldes, at der ikke har været tilsat de samme hjælpestoffer til dette materiale, som til materialerne af returfbre.

#### 4.1.2 Identifikation af stoffer i vand-ekstrakter

Resultaterne fra *genfindelsesforsøget* på den vandige ekstraktionsmetode fremgår af tabel 3. Forsøget viser, at der er stor forskel på de undersøgte stoffers ekstraherbarhed i vand og efterfølgende udrystning i ethylacetat.

**Tabel 3:** Genfindelse af dichlorpropanol, phenol, toluen og benzophenon ved ekstraktion med vand og efterfølgende udrystning med ethylacetat

Stof	Log $K_{ow}$	% Genfindelse							
		Materiale A		Materiale B		Materiale C		Materiale D	
Teoretisk slut-konc. i ekstraktet	$K_{ow}$	5 µg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml	5µg/ml	50 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml
Dichlorpropanol	0,78	-	21 %	-	33 %	-	35 %	-	28 %
Phenol	1,5	58 %	58 %	56 %	60 %	43 %	50 %	55 %	56 %
Toluen	2,6	0 %	3 %	3 %	3 %	0 %	4 %	2 %	4 %
Benzophenon	3,2	13 %	18 %	15 %	21 %	13 %	15 %	15 %	18 %

$K_{ow}$ : octanol-vand forhold angiver stoffets fordeling mellem octanol og vand.

Af tabellen ses, at der ikke er forskel i genfindelses-% mellem de forskellige materialer for samme stof. For alle materialerne ses den højste genfindelse for phenol (ca. 55 %), som pga. tilstedeværelsen af OH-gruppen er relativ polær. Til trods for dichlorpropanols større polaritet sammenlignet med phenol er genfindelsen af dette stof mindre. (Dette kan ikke umiddelbart forklares med en lavere opløselighed af dichlorpropanol i ethylacetat, da dichlorpropanol har en  $K_{ow}$ , der er tættere på  $K_{ow}$  for ethylacetat (=0,73) end  $K_{ow}$  for phenol.) Der ses en lav genfindelse for benzophenon, hvilket må forventes ud fra den givne  $K_{ow}$ . Tilsvarende ses en meget lav genfindelse for toluen, svarende til stoffets apolære karakter.

Forsøget viser, at for apolære stoffer (som toluen og benzophenon) vil ekstraktionseffektiviteten over i vand og videre i ethylacetat være meget lav. For middelpolære stoffer som phenol giver det samlede ekstraktionssystem en ekstraktionseffektivitet på op til 50 %. Udfra  $K_{ow}$  værdien ville der forventes en større ekstraktion af dichlorpropanol end den faktisk fundne. Udfra resultaterne med dichlorpropanol kan det således tyde på, at tilstedeværelsen af polære stoffer underestimeres noget i den foreliggende undersøgelse i forhold til stoffernes faktiske indhold i de vandige ekstrakter, formentlig pga. den efterfølgende udrystning med ethylacetat. Denne ekstraktion har af analytiske årsager været nødvendig for at opnå et ekstrakt, det umiddelbart er muligt at analysere på GC-IR-MS. En direkte analyse af vandige ekstrakter på GC-IR-MS ville kræve en omfattende metodeudvikling, som der ikke har været afsat ressourcer til i dette projekt.

**Tabel 4a:** Afgivelse af stoffer fra materialerne B, C og D ved ekstraktion med vand (mg/kg materiale)



Stof nr.	CAS-nr.	Stofnavn	Fundet indhold i de enkelte materialer, mg/kg		
			B	C	D
45	71-41-0	Pentanol			1
46	111-27-3	Hexanol	8	9	4
8	112-34-5	2-(2-butoxyethoxy)-ethanol	1	2	3
13	121-33-5	4-Hydroxy-3-methoxy benzaldehyd (vanillin)	3	5	4
47	126-73-8	Phosphoric acid tributyl ester (blindværdi)	(6)		
48	306-08-1	4-hydroxy-3-methoxy phenyl syre		2	3
49		En phenol	1	4	4
50		Alifatisk forbindelse	1		
51		DEHA (blindværdi)	(<1)	(5)	(0)
43	80-05-7	Bisphenol A*	0,6	0,6	0,6
		<b>Sum af fundne stoffer</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>14</b>

\*Stoffer hvor der er fastsat en specifik migrationsgrænse (se tabel 4 b)

Hvor der er fundet samme stof som i ethanolekstrakterne benyttes det samme nummer.

**Tabel 4b:** Afgivelse af stoffer fra materialerne B, C og D i mg/dm<sup>2</sup> ved ekstraktion med vand

Stof nr.	CAS-nr.	Stofnavn	Fundet indhold i de enkelte materialer, mg/dm <sup>2</sup>			SCF vurdering
			B	C	D	
45	71-41-0	Pentanol			0,004	(L3)
46	111-27-3	Hexanol	0,035	0,035	0,015	(L3)
8	112-34-5	2-(2-butoxyethoxy)-ethanol	0,004	0,008	0,012	Gruppe- TDI=0,05mg/kg bw. (L2)
13	121-33-5	4-Hydroxy-3-methoxy benzaldehyd (vanillin)	0,012	0,019	0,015	ADI=10mg/kg bw (L1)
47	126-73-8	Phosphor syre tributyl ester (blindværdi)	(0,02)			
48	306-08-1	4-hydroxy-3-methoxy phenyl syre		0,008	0,012	
49		En phenol	0,004	0,015	0,015	
50		Alifatisk forbindelse	0,004			
51		DEHA (blindværdi)	(<0,004)	(0,019)	(<0,004)	
43	80-05-7	Bisphenol A	0,002	0,002	0,002	SMG=0,5mg/kg TDI=0,05 mg/kg bw (L2)
		<b>Sum af stoffer</b>	<b>0,06</b>	<b>0,09</b>	<b>0,08</b>	

Hvor der er fundet samme stof som i ethanol ekstrakterne benyttes det samme nummer.

L: SCF liste nummer

TDI: Tolerabelt dagligt indtag pr. kg kropsvægt

Gruppe-TDI: TDI-værdien gælder for summen af en gruppe beslægtede stoffer

ADI: Acceptabelt dagligt indtag pr. kg kropsvægt

SMG: Specifik migrationsgrænse

Som det ses af tabellerne 4a og 4b er antallet af stoffer i de vandige ekstrakter betydelig mindre end ved ekstraktion med ethanol. En tydelig forskel på de to ekstrakter er således, at der kun er meget få langkædede alifatiske forbindelser i de vandige ekstrakter, hvilket skyldes den apolære karakter af disse stoffer. Gruppen af aromatiske stoffer der er identificeret i de vandige ekstrakter omfatter: 4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyd, 4-hydroxy-3-methoxy phenyl syre og bisphenol A. De to første stoffer er fundet i samme niveau som i ethanol ekstrakterne. For bisphenol A er niveauet i vandekstrakterne på 0,6 mg/kg materiale svarende til 0,002 mg/dm<sup>2</sup> væsentlig lavere end niveauet i ethanol ekstrakterne (0,012-0,035 mg/dm<sup>2</sup>). Der er fundet det samme niveau i alle vandekstrakter fra prøvematerialerne af genbrugsfibre. Niveauet er betydeligt under den for plast fastsatte specifikke migrationsgrænse på 0,5 mg/dm<sup>2</sup> (Sundhedsministeriets bekendtgørelse nr. 1064, 1996).

Ved analyse af vandekstraktet fra materiale A blev der kun fundet stofferne (13): 4-hydroxy-3-methoxy benzaldehyd, (47): phosphor syre tributyl ester og (51): DEHA. Alle stofferne var i samme niveau som for de øvrige prøver.

Ved analyse af blindprøverne for de vandige ekstrakter viste det sig at prøverne var blevet forurenede med DEHA og phosphorsyre tributyl ester stammende fra det benyttede filtreringsudstyr. De fundne

niveauer i blindprøverne er på samme niveau som prøverne. Ved den benyttede screeningsmetode er der desuden påvist spor af dibutyl phthalat, DBP (svarende til 1 µg/ml ekstrakt) og det kan ikke udelukkes, at der også kan være ekstraheret andre stoffer fra det benyttede filtreringsudstyr, som forekommer på sporstof niveau i ekstrakterne. Da DMSO (anvendt ved solvent skift af vandprøverne) også viste sig at give et svagt respons i Ah-receptor testen, blev på denne baggrund fremstillet nye vandekstrakter af prøverne ved brug af nyt filtreringsudstyr, baseret helt på glas. Da der kun blev fundet meget få kemiske stoffer i de oprindelige vandekstrakter, blev de nye vandekstrakter ikke analyseret kemisk, men udelukkende testet i Ah-receptor testen (se afsnit 4.2.3).

## 4.2 Biologiske testresultater

### 4.2.1 Mutagentestning

#### *Test for toksicitet:*

Da der ikke var nogen betydelig toksisk effekt af nogen af de testede ekstrakter af de forskellige papkvaliteter i det anvendte koncentrationsinterval (50 – 100 % overlevende celler i forhold til negativ kontrol), blev den højeste testkoncentration i toksicitetsstene også anvendt som højeste testkoncentration i mutagentestene.

#### *Test for mutagenicitet*

Ethanolekstrakter af de 4 papkvaliteter blev testet for mutagenicitet én gang i alle 5 teststammer, med og uden metabolisk aktivering (0,4 mg S9/plade). Et resultat betragtes som positivt (mutagen effekt), hvis der er en koncentrationsafhængig forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade i det undersøgte koncentrationsinterval og/eller en reproducerbar forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade ved en eller flere koncentrationer, for mindst én stamme, med eller uden metabolisk aktivering. I tvivlstilfælde kan statistiske metoder anvendes til vurdering af testresultaterne. Statistisk signifikans kan dog ikke anvendes alene, men skal sammenholdes med resultatets biologiske signifikans ved vurdering af resultaterne. Resultater af forsøgene er vist i figur 1, 2 og 3 og appendix 1 og 2. Ingen af de testede ekstrakter gav et klart positivt respons i nogen af de testede stammer i koncentrationsintervallet: 50-2,5 mg/plade. Papirkvalitet C og D viste dog en meget svag, men statistisk signifikant forøgelse (Anova efterfulgt af Dunnets test) i frameshift stammerne TA97 og TA98 (figur 1 og 2). Disse forsøg blev derfor gentaget under lidt ændrede forsøgsbetingelse som nævnt under afsnit 3.2.1. Forsøgene med TA97 og 0,8 mg S9 blev udført 2 gange. Der sås ingen mutagen effekt under de ændrede forsøgsbetingelser (jvf. figur 3 og tabel 5)

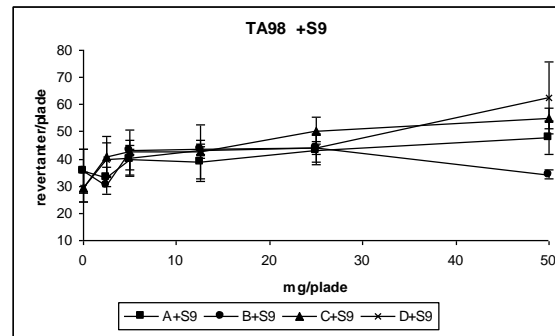
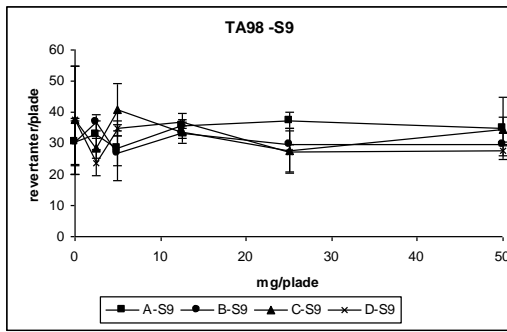
Vandekstrakterne blev ligeledes testet i alle teststammer med og uden metabolisk aktivering. Der sås ingen mutagen effekt under de anvendte forsøgsbetingelser (jvf. Appendix 2).

De medtagne positive og negative kontroller lå indenfor det normale interval for laboratoriets kontrolværdier for alle teststammer. Der var ingen mutagen effekt af de testede blindprøver.

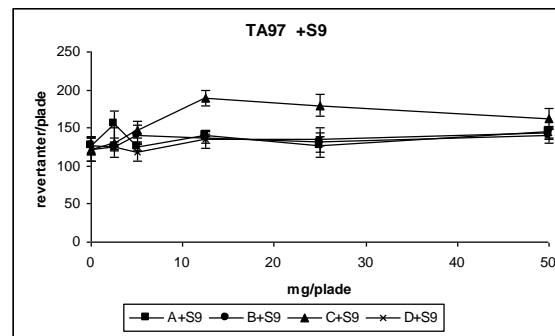
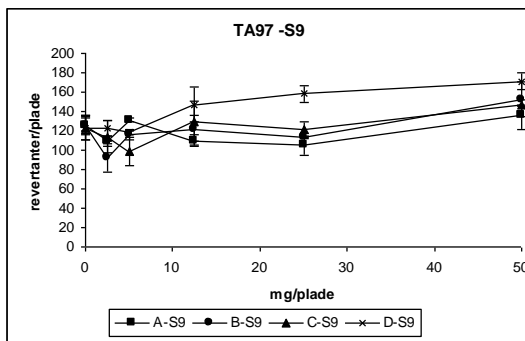
**Tabel 5** Samlet oversigt over resultaterne af mutagen forsøgene

Papir/ Teststamme	TA97 + S9	TA97 – S9	TA98 + S9	TA98 – S9	TA100 + S9	TA100 – S9	TA102 + S9	TA102 – S9	TA1535+S9	TA1535–S9
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	(-)	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
D	-	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-
A(3 x konc.)	NT	NT	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B(3 x konc.)	NT	NT	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
C(3 x konc.)	NT	NT	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D(3 x konc.)	NT	NT	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
A(3 x konc.+S9)	-*	NT	-*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
B(3 x konc.+S9)	-*	NT	-*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
C(3 x konc.+S9)	-*	NT	-*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
D(3 x konc.+S9)	-*	NT	-*	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

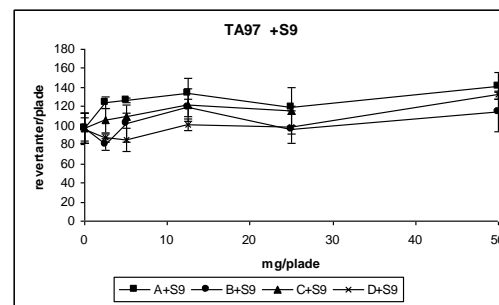
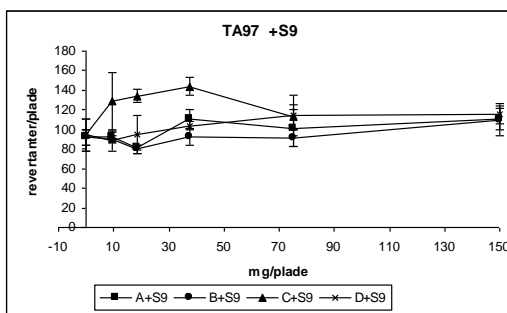
-: Ingen mutagen effekt; (-): svag men statistisk signifikant effekt (vist i figur 1 og 2); NT: ikke testet. \*: to uafhængige forsøg (vist i figur 3).



**Figur 1** Indledende mutagentest med ethanolekstrakter med TA98 ± S9 (maksimal koncentration 50 mg/plade) og 0,4 mg S9/plade (figur til højre). Der ses ingen effekt uden S9 af nogen af de testede ekstrakter. Der er en svag effekt af ekstrakt C, D, som er statistisk signifikant ved de højeste testkoncentrationer.



**Figur 2** Indledende mutagentest med ethanolekstrakter med TA97 ± S9 (maksimal koncentration 50 mg/plade) og 0,4 mg S9/plade (figur til højre). Der ses svag effekt uden S9 af ekstrakt D samt en svag effekt af ekstrakt C med S9, som er statistisk signifikant ved de højeste testkoncentrationer.



**Figur 3** Resultater af to forsøg med TA97, 3 gange opkoncentreret ethanolekstrakt og 0,8 ml S9/plade. Der var ingen effekt af nogen af de testede ekstrakter.

## 4.2.2 Test for cytotoxicitet

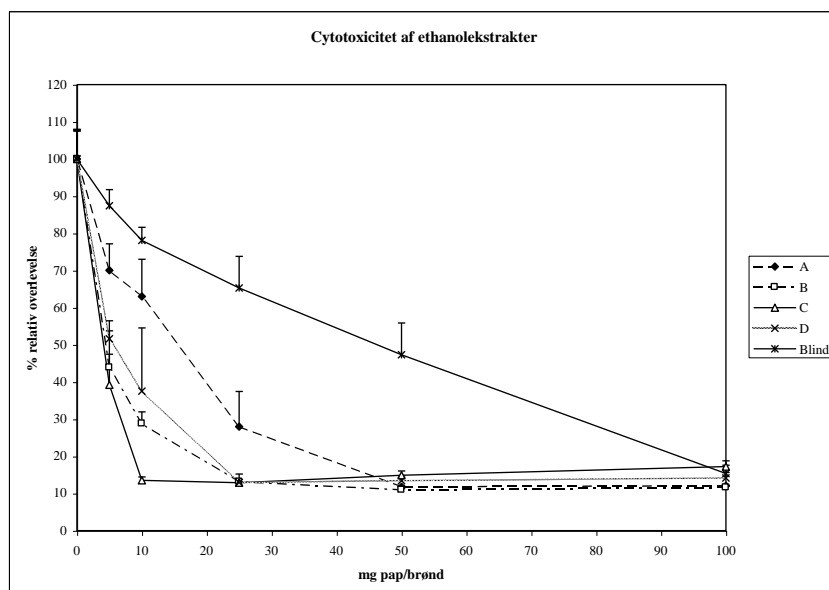
Cytotoksiciteten er opgivet som den koncentration af teststof, der medførte 50% celledød ( $IC_{50}$ ) i ekstrakt beregnet som mg pap tilsat pr. brønd.

Ethanolekstrakter. Alle de testede ekstrakter gav et klart positivt respons i cytotoxicitetstesten i koncentrationsintervallet: 100–5 mg/pap pr. brønd. Alle papirkvaliteterne var signifikant mere toksiske end 95 % ethanol(t-test). Papirekstrakterne udviste følgende potensrækkefølge  $C \geq B \geq D > A$  (jf. tabel 6 og figur 4). A var signifikant ( $p < 0.05$ ) mindre cytotoksisk end de øvrige ekstrakter, hvor imellem der ikke fandtes signifikante forskelle (Anova efterfulgt af Bonferroni's t-test).

**Tabel 6** Cytotoxicitet af ethanolekstrakter af de 4 forskellige papkvaliteter

Prøve	$IC_{50}$ i mg pap/brønd
A	$16,0 \pm 0,7^*$
B	$4,6 \pm 0,8^*$
C	$3,7 \pm 0,8^*$
D	$5,2 \pm 0,6^*$

\*: Signifikant mere cytotoksisk ( $p < 0.05$ ) end blindprøve



**Figur 4** Drabskurver for ethanolekstrakter i humane fibroblaster. Den koncentration af ekstrakt, der medfører 50% celledrab ( $IC_{50}$ ), aflæses som det punkt på x-aksen, hvor linjen for 50% relativ overlevelse skærer drabskurvernekurverne.

Vandekstrakterne gav alle et klart positivt respons i cytotoksicitetstesten i koncentrationsintervallet: 200–10 mg/pap pr. brønd, men prøverne var generelt mindre cytotoksiske end ethanolekstrakterne. Papirkvaliteterne fandtes alle signifikant ( $p < 0.05$ ) mere toksiske end den poolede blindprøve (Kruskal Wallis one way analysis on ranks efterfulgt af Dunn's test). Der fandtes ikke signifikante forskelle mellem papirekstrakternes cytotoksicitet med den anvendte ekstraktionsmetode (Anova) (tabel 7).

**Tabel 7** Cytotoksicitet af vandekstrakter af de 4 forskellige papkvaliteter

Prøve	IC <sub>50</sub> i mg pap/brønd
A	15,5 ± 2,1*
B	14,1 ± 1,8*
C	15,6 ± 0,7*
D	14,6 ± 1,6*

\*: Signifikant mere cytotoksisk ( $p < 0.05$ ) end blindprøve.

### 4.2.3 Østrogentest

Ethanolekstrakterne blev testet i koncentrationer på 0.05 – 50% ekstrakt, svarende til mellem 0,255 og 500 mg pap/brønd. Ekstrakter af alle papkvaliteter (A, B, C og D) udviste markant cytotoksicitet overfor gærcellerne (ved koncentrationer  $> 0,8 - 1,6$  %). Der var ingen østrogen aktivitet af nogen af ekstrakterne ved koncentrationer  $< 0,4 - 0,8$  % (dvs. ved  $< 1-2$  mg pap/brønd). To uafhængige forsøg gav identiske resultater. I lyset af de fundne niveauer af bisphenol A i ekstrakt B, C og D ville man teoretisk forvente at se et østrogent respons i dette assay, idet andet genbrugspapir indeholdende tilsvarende niveauer af bisphenol A har givet positivt respons under tilsvarende forsøgsbetingelser. Det er sandsynligt at den cytotoksiske effekt af ekstrakterne har maskeret for dette respons. Alternativt kunne der tænkes at være stoffer til stede i ekstraktet, som modvirker bisphenol A's respons.

Vandekstrakterne svarende til 10 g pap/ml i DMSO blev som omtalt i 3.2.3 testet i koncentrationer der var 10 gange lavere end ethanolekstrakterne (0.005-5% svarende til 0,05 – 100 mg pap/brønd). Disse ekstrakter var også markant cytotoksiske, og det var derfor ikke muligt at vurdere den østrogene aktivitet.

### 4.2.4 Ah-receptortest

Ethanolekstrakterne af papkvalitet B, C og D var cytotoksiske ved 1% ekstrakt. Ved 0.1 % (dvs. ved 0,5 mg pap/brønd) ekstrakt udviste alle 4 prøver svag Ah-receptor aktivitet med potensrækkefølgen C=D>B=A. Det maksimale respons for C og D svarede til ca. 1/3 af det maksimale respons for den positive kontrol 2,3,7,8-TCDD. Blindprøver viste ingen aktivitet (Appendix 3).

Ved test af rene vandekstrakter (uden udrykning med ethylacetat og overførsel til DMSO – jf.3.1.2) sås overraskende et tilsvarende positivt respons ved de højeste koncentrationer. Blindprøverne gav negativt respons (appendix 4). I tilstedeværelse af 1 % ekstrakt i assayet gav prøve B, C og D stort set identiske resultater, hvilket var ca. en 1/20 af det maksimale respons for 2,3,7,8-TCDD. Ved test af 10 % ekstrakt i assayet, sås cytotoksisk respons for prøve B og C, og derfor kan der ikke konkluderes noget på baggrund af test ved denne koncentration. Det er ikke muligt på baggrund af

den kemiske analyse at afgøre, hvilket eller hvilke stoffer, der er ansvarlige for Ah receptor responset. Da der er tale om rene vandekstrakter er det mindre sandsynligt, at responset skyldes de meget lipofile PCB'er og TCDD'er.

I den kemiske analyse er detektionsgrænsen 1 mg stof/kg pap. Da detektionsgrænsen i Ah receptor assay for TCDD ligger meget lavt på ca. 0,5 fmol (svarende til ca. 160 fg) og da vi højst kan tilsætte 1 µl ekstrakt (eller 10 mg pap) i assayet, betyder det, at der med en koncentration på ca. 16 ng TCDD i 1 kg pap, skulle kunne detekteres et respons i Ah receptor assay. Denne koncentration af TCDD vil dog langt fra blive detekteret i den kemiske analyse med detektionsgrænsen på 1 mg/kg. pap.

#### 4.2.5 Mikrobiologiske undersøgelser

Resultaterne af de mikrobiologiske undersøgelser fremgår af Tabel 8 og Tabel 9.

**Tabel 8** Antal bakterier per gram homogeniseret papprove

	Paptype			
	A	B	C	D
Totalkim	90	1600	820	580
Aerobe sporedannende bakterier	14	60	300	340
Anaerobe sporedannende bakterier	6	60	150	170
Bacillus cereus/thuringiensis	0	0	0	0

Tallene er gennemsnit af dobbeltbestemmelse

**Tabel 9** Antal bakterier, gær og skimmel per 10 cm<sup>2</sup> papoverflade

	Paptype			
	A	B	C	D
Totalkim – tørt pap	0	1	0	0
Totalkim – befugtet pap	0	0	0	0
Gær og skimmel – tørt pap	0	0	0	1
Gær og skimmel – befugtet pap	0	1	2	0

Tallene er gennemsnit af dobbeltbestemmelse

Af Tabel 8 ses, at det totale antal kim i de homogeniserede prøver lå fra ca. 90 kim pr gram til ca. 1600 kim pr gram. En stor del af disse kim bestod af aerobe og anaerobe sporedannende bakterier, dog ikke Bacillus cereus/thuringiensis, som ikke kunne påvises i prøverne. Kimtallene for paptype A lå ca. en faktor 10 lavere end typerne B, C og D. Alle paptyper havde meget lave kimtal på overfladen, selv på befugtede papstykker (Tabel 9).



## 5 Diskussion og konklusion

Et af hovedformålene med denne undersøgelse var at tilpasse 4 forskellige toksicitetstests og vurdere egnetheden af disse til at screene papir og pap for indhold af potentielt toksiske stoffer. Ligeledes var det et formål at afprøve og tilpasse de kemiske metoder samt vurdere mulighederne for at kombinere kemiske og biologiske testmetoder ved vurdering af emballager af pap og papir. Endvidere gik undersøgelsen ud på at foretage en foreløbig vurdering af egnetheden af støbepap baseret på retur- eller nye fibre til emballering af levnedsmidler.

### Kemisk Analyse

Resultaterne fra den kemiske analyse viser en betydelig forskel i antallet af stoffer, der er fundet ved ekstraktion med henholdsvis ethanol og vand, som er benyttet til estimering af materialernes afgivelse af stoffer til henholdsvis fede og vandige levnedsmidler.

Specielt for ethanol ekstrakterne tyder resultaterne på en signifikant forskel i antal og mængde af stoffer, der er fundet fra henholdsvis materiale B og fra materialerne C og D af returfibre. Det højeste indhold er således fundet i ekstraktet fra materiale C (returfibre med tryk, ikke afsværtet). En sandsynlig forklaring kan være at nogle af de fundne stoffer stammer fra trykfarver, der indgår i råvaren til materiale C. Med den benyttede analysemetode fandtes der ikke signifikant forskel på indholdet og mængden af stoffer der afgives fra materiale C og D (returfibre med tryk, afsværtet), som muligt udtryk for, at afsværtningsprocessen kun har en begrænset reducerende effekt på de pågældende stoffer. Hvorvidt dette er et typisk billede kan ikke afgøres ud fra det lille prøveantal. Det er muligt, at der sker en opkoncentrering af visse stoffer i processen som følge af den benyttede procedure med recirkulering af procesvand i Hartmanns produktion. Denne procedure kan muligvis være en del af forklaringen på, at der kun ses en begrænset effekt på antallet af kemiske stoffer ved afsværtning af materiale D.

Resultaterne viser samtidig, at der er en tydelig forskel på antal og mængde af kemiske stoffer, der afgives fra henholdsvis jomfruelige fibre (materiale A) og pap fremstillet af genvundne fibre (materialerne B, C, D). Der er benyttet to forskellige processer ved fremstilling af henholdsvis materiale A og materialerne B, C og D, hvor materialerne B, C og D er fremstillet ved en egentlig produktionsproces, mens materiale A er en råvare fremstillet i laboratorieskala uden brug af de sædvanlige hjælpestoffer. Det er derfor muligt, at nogle af de fundne stoffer fra B, C og D stammer fra selve produktionsprocessen, herunder fra tilsætning af produktionshjelpestoffer. Med det foreliggende materiale kan det således ikke afgøres, hvor stor en andel af de fundne stoffer, der stammer fra selve returfibermassen.

### Mutagentestene

Ingen af de testede ekstrakter af de 4 papkvaliteter viste mutagen aktivitet under de anvendte forsøgsbetingelser. Dette kan skyldes, at ingen af de testede papkvaliteter indeholdt mutagene stoffer, eller at testsystemet ikke var følsomt nok til at detektere stofferne. Et testsystems følsomhed overfor et stof i en given koncentration afhænger af potensen af dette stof. Med de koncentrationer, der er testet i denne undersøgelse, kan der, med den anvendte testmetode, påvises 0,1 ppm (vandekstrakter) og 0,2 – 0,07 ppm (ethanolekstrakter) af et genotoksisk stof med en specifik mutagen aktivitet på 4000 revertanter pr. µg, forudsat at stoffet er ekstraheret 100% fra papmaterialet. Tabel 10 viser en oversigt over stoffer, som er testet i mikrosuspensionstesten med

anførelse af detektionsgrænser for de enkelte stoffer med de anvendte testkoncentrationer (gælder for 3 gange opkoncentrerede ethanolekstrakter) i nærværende undersøgelse.

**Tabel 10** Beregnede detektionsgrænser for *Salmonella*/microsuspensions testen for fire kemiske stoffer med forskellig mutagen aktivitet (gælder for 3 gange opkoncentrerede ethanolekstrakter)

Stof	Revertanter/ $\mu\text{g}$ i TA98	Detektionsgrænser
Benzo(a)pyrene	3780	0,07 ppm
2-aminofluorene	18200	0,01 ppm
2-nitrofluorene	17480	0,01 ppm
4-nitroquinoline-N-oxide	9791	0,02 ppm

Stoffer som forekommer i lavere koncentrationer end anført eller stoffer med lavere potens (færre revertanter pr  $\mu\text{g}$ ) vil ikke kunne påvises med den anvendte testprocedure. Til sammenligning kan nævnes, at der med den anvendte kemiske analysemetode ikke er identificeret stoffer, som er påvist i koncentrationer lavere end 1 ppm i prøvematerialet.

### Cytotoksicitet

Ethanolekstrakternes cytotoksicitet afspejlede den forventede potensrækkefølge. De ekstrakter, der var fremstillet på basis af ikke afsværte aviser og ugeblade (type C), udviste den højeste aktivitet i cytotoksicitetstesten. Herefter kom type B (40% aviser uden tryk, 40% nye fibre og 20% D), og dernæst afsværte aviser og ugeblade (type D), men aktiviteten af disse to typer var meget ens. Nye fibre (type A) var signifikant mindre cytotoksisk end alle de øvrige papirkvaliteter.

Vandekstrakterne var generelt mindre cytotoksiske end ethanolekstrakterne, og der fandtes ikke signifikante forskelle mellem de forskellige typer papirkvaliteter. Resultaterne viser en forskel i den cytotoksiske aktivitet mellem nye fibre (som ikke har gennemgået en produktionsproces) og pap produceret af retur fibre, mens der ikke er nogen væsentlig forskel på papkvaliteten produceret af retur fibre.

### Østrogenlignende effekt

Der kunne ikke påvises østrogen aktivitet i nogen af de testede ekstrakter. Alle ekstrakter viste dog en cytotoksisk aktivitet overfor testorganismene. På det foreliggende grundlag kan det derfor ikke udelukkes, at der findes østrogen aktive stoffer i de forskellige papir typer, da cytotoksicitet kan tænkes at have maskeret for en effekt. Det er bemærkelsesværdigt, at den cytotoksiske aktivitet er så markant overfor gær cellerne sammenlignet med effekten overfor bakterier og pattedyr celler.

Effekten kan muligvis skyldes, at der af arbejdsmiljø mæssige grunde er tilsat et fungicid til ”proces vandet” under fremstillings processen. Det fundne niveau af bisphenol A ligger på et niveau, som burde give udslag ved en østrogen test, hvis ikke de testede ekstrakter havde været cytotoksiske overfor de benyttede gær celler.

## Ah-receptor aktivitet

Der blev fundet Ah-receptoraktivitet af ethanolekstrakterne af specielt papkvalitet C og D. Disse papkvaliteter er fremstillet af samme udgangsmateriale, den eneste forskel, er at kvalitet D er afsværtet, og kvalitet C ikke er. Dette kunne indikere, at de aktive stoffer stammer fra trykfarver. Derudover sås et ganske svagt Ah-receptor respons i vandekstrakt B,C og D. En endelig identifikation af de aktive stoffer er et fremtidigt og ressourcekrævende projekt. En indledende analyse af ethanolekstrakterne for mono- og diortho PCB, viste lave niveauer, tæt på baggrundsniveauerne, og da kendte Ah-receptor agonister (stoffer, der binder sig til Ah-receptoren) som PCB, dioxiner og PAH'er ikke er vandopløselige, kunne det indikere, at der er andre endnu ikke identificerede Ah receptor agonister tilstede i ekstraktet. En kemisk identifikation af de(t) aktive stof(fer) vil kræve en dybdegående og længerevarende analyse.

## Mikrobiologi

Ved sammenligning af de opnåede mikrobiologiske resultater med andre undersøgelser af pap fremgår det, at pappøverne fra Hartmann har væsentligt lavere kimtal end pappet omfattet af de andre undersøgelser, hvor der har været påvist total kimtal pr gram i størrelsesordenen 1.000-2.000.000 for pap fremstillet af genbrugspapir og i størrelsesordenen 70-200.000 for jomfrueligt pap (Väisänen et al., 1991; Jokinen & Osmonen, 1995; Sipiläinen-Malm et al., 1997; Suihko & Skyttä, 1997; Suominen et al., 1997). Disse kilder bekræfter tillige, at de hyppigst forekommende bakterier i pap er aerobe sporedannere, som pga. deres resistente sporeform er i stand til at overleve den varmebehandling, som pappet udsættes for under produktionen. De mikrobiologiske resultater for stikprøverne af de fire undersøgte paptyper giver ikke umiddelbart anledning til sundhedsmæssige betænkeligheder, såfremt pappet anvendes i forbindelse med tørre fødevarer.

## Samlet vurdering

Alle fire toksicitets tests synes egnede til at teste papir og pap for potentielt toksiske stoffer. Den anvendte østrogen test var dog ikke egnet i denne undersøgelse, da alle ekstrakter indeholdt stoffer som var toksiske overfor gærcellerne, selv i lave koncentrationer. Testen har dog tidligere vist sig egnet til at teste andre papirprodukter (Vinggaard et al.) Der bør arbejdes på at forøge følsomheden af specielt mutagentesten. Denne test er også den mest tidskrævende af de anvendte tests, derfor bør det overvejes også at afprøve andre mutagentest til dette formål. Der er endvidere en god overensstemmelse mellem resultaterne fra henholdsvis de biologiske og de kemiske test. Resultaterne af såvel de kemiske analyser som de biologiske test viser, at nye fibre indeholder væsentligt færre/lavere koncentrationer af toksiske stoffer end papprodukter fremstillet af returfibre specielt papkvalitet C og D. Hvorvidt stofferne i disse materialer stammer fra trykfarver kan endnu ikke afgøres med sikkerhed, selvom resultaterne peger i denne retning.

Resultaterne fra Ah-receptor assayet og fra den kemiske analyse tyder på, at en række stoffer (heraf nogle aktive i den biologiske test) ikke fjernes ved de-inkning. Med de gennemførte kemiske sceningsanalyser har det ikke været muligt at identificere de(t) stof(fer), der er aktive i specielt Ah-receptor assayet. Undersøgelsesresultaterne tyder på, at der for en mindre procentdels vedkommende er tale om polære stoffer, der også forekommer i vandekstrakterne. En evt. videreudvikling af den kemiske undersøgelse bør således lægge vægt på en identifikation af de Ah receptor aktive stoffer, herunder også mere polære stoffer. Derudover vil det være ønskeligt med en analyse for dioxiner for at få afklaret, om de kunne tænkes at være ansvarlige for en del af Ah receptor responset.

De mikrobiologiske resultater viser en god mikrobiologiske kvalitet af alle de undersøgte papkvaliteter. At der findes et mindre kimtal end i andre undersøgelser af pap kan formodentlig tilskrives den høje temperatur, der anvendes ved fremstilling af støbepap.

Det er ikke på baggrund af de gennemførte undersøgelser muligt at drage generelle konklusioner om de fire paptypers kemiske og toksikologiske egenskaber. Dels har undersøgelsen kun omfattet en enkelt stikprøve (indsamlet på én produktionsdag) af hver paptype, dels er der kun undersøgt én produktionsproces til fremstilling af støbepap.

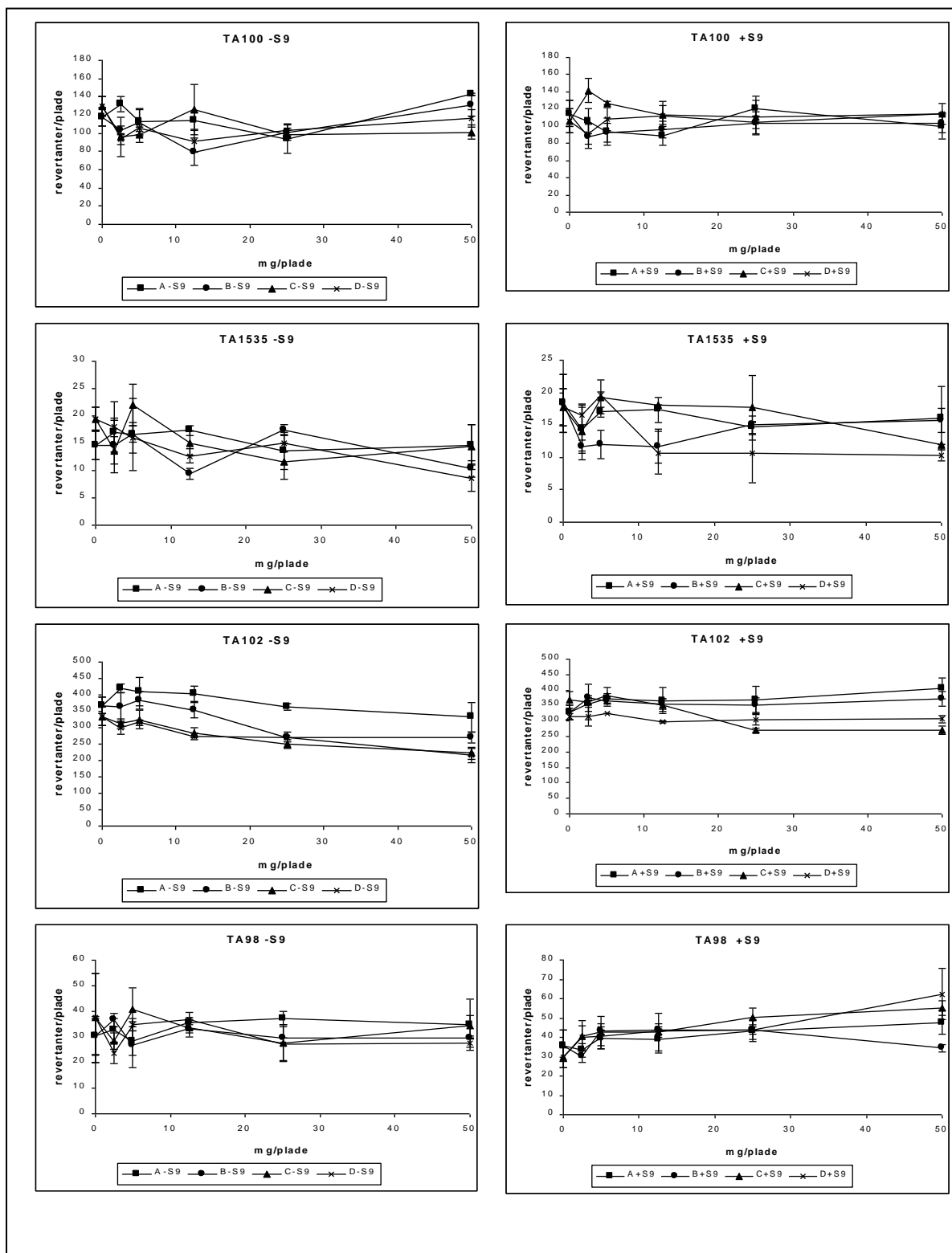
## Referencer

1. Aurela, B., Kulmala H., and Söderhjelm, L. (1999), *Food Additives and Contaminants*, Vol. 16, No. 12, 571-577.
2. Binderup M.L. and Petersen J.H. (1996), Safety Testing of Food Contact Materials: Studies of Migration of potentially genotoxic compounds from tubes for liquid foodstuffs. *Mutation res.* 360, 273.
3. Boccacci Mariani, M., Chiacchierini, E. and Gesumundo, C. (1999) *Food Additives and Contaminants*, Vol. 16, No. 5, 207-213.
4. Castle, L., Offen, C.P, Malcolm, Baxter, J. and Gilbert, J. (1997) *Food Additives and Contaminants*, Vol. 14, No. 1, 35-44.
5. *CEN metode, DS/EN 645 1. udgave.* (1993). Papir og karton til fødevareemballage. Fremstilling af et koldtvandsekstrakt.
6. Jokinen, K & Osmonen, R.-M. (1995) Microbiological, sensory and toxicological aspects of paperboard. *Paper and Timber* 77, 200-204.
7. Kado, N. Y., Guirguis, G. N., Flessel, C. P., Chan, Chang, C., K., and Wesolowsky, J. J. (1986). Mutagenicity of fine (<2,5mm) airborne particles:Diurnal variation in community air determined by a Salmonella micro pre-incubations (microsuspension) procedure. *Environ. Mutagen.* 8:53-66.
8. Lillemark, L., Binderup, M.L., Petersen, J.H., Jensen, L.K., Jørgensen, V. and Foverskov, A. (1996) Safety testing of food contact materials using FTIR, GC-IR-MS and the Ames test at International Symposium on Food Packaging Ensuring the Quality and Safety of Foods, 11-13 September, 1996, Budapest
9. Lillemark, L and Petersen, J. H. (1997) GC-analysis of recycled paper and board using on-line thermal desorption and solvent extraction. Notes from a presentation held 28 October 1997 at ISPRA, JRC, Italy.
10. Lindell H.(1991) A study of odour and taste originating from food packaging board analysed by chromatographic techniques and sensory evaluation., Åbo Akademiske Forlag, Åbo Finland,.
11. *MAFF*, (1995) *Food Packaging Bulletin*, vol. 4, no 9,.
12. Maron, D. M. and Ames, B. N.(1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Microbiol. Rev.* 113:173-215.
13. Matforsk, (1993) Emballasje til næringsmidler. Indføring i emballasjeteknologi, Matforsk; Norsk institut for næringsmiddelforskning, Ås.

14. Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri (1998). *Fødevaredirektoratet*. Cirkulære om kontrol med materialer og genstande bestemt til at komme i berøring med levnedsmidler.
15. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1999a). Diisopropylnaphthalenes in Food Packaging made from Recycled Paper and Board. *Food Surveillance Information Sheet Number 169*.
16. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1999). Survey of retail paper and board food packaging materials for polychlorinated biphenyls (PCBs). *Food Surveillance Information Sheet Number 174*.
17. Murk, A.J., Legler, J., Denison, M.S., Giesy, J.P., van-de-Guchte, C. and Brouwer, A. (1996) Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam.Appl.Toxicol.* 33(1),149-60.
18. Rasmussen, E. S. (1999) Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and cytotoxicity. *In Vitro & Molecular Toxicology*, 47-58.
19. Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Env.Tox.Chem.* Vol. 156,3, 241-248.
20. Sipiläinen-Malm, T., Latva-Kala, K., Tikkanen, L., Suihko, M.-L. & Skyttä, E. (1997) Purity of recycled fiber-based materials. *Food Additives and Contaminants* 14, 695-703
21. Suihko, M.-L. & Skyttä, E. (1997) A study of the microflora of some recycled fibre pulps, boards and kitchen rolls. *Journal of Applied Microbiology* 83, 199-207.
22. Sundhedsministeriets bekendtgørelse nr. 1064. (1996). Bekendtgørelse om materialer og genstande bestemt til at komme i berøring med levnedsmidler.
23. Suominen, I., Suihko, M.-L. & Salkinoja-Salonen, M. (1997) Microscopic study of migration of microbes in food-packaging paper and board. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19, 104-113.
24. Väisänen, O.M., Mentu, J. & Salkinoja-Salonen, M.S. (1991) Bacteria in food packaging paper and board. *Journal of Applied Bacteriology* 71, 130-133.
- 25.** Vinggaard, A.M., Körner, W., Lund, K.H., Bolz, U. and Petersen, J.H. Identification and quantification of estrogenic compounds in recycled and virgin paper for household use as determined by an in vitro yeast estrogen screen and chemical analysis (Submitted).

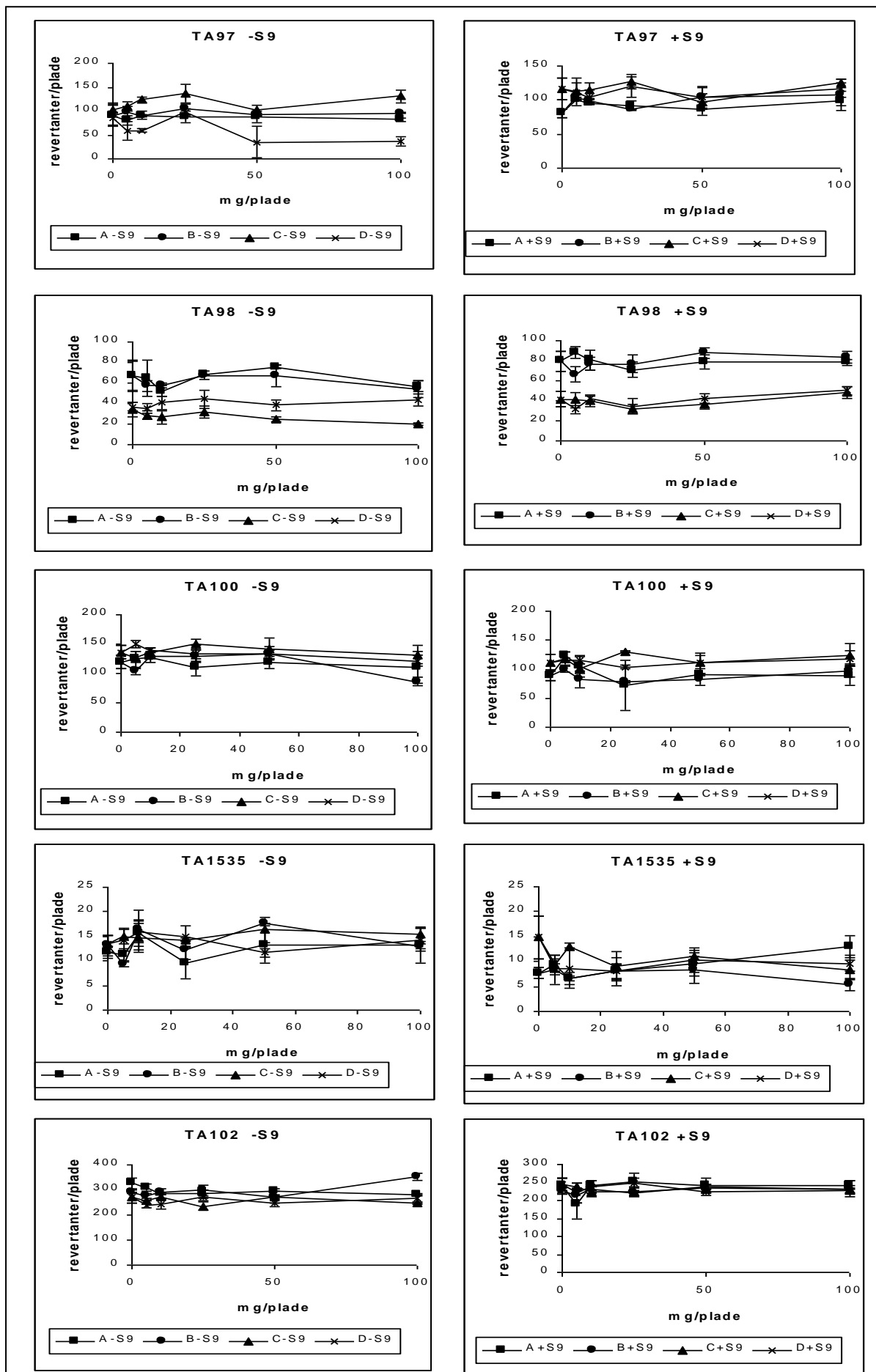
## Appendix 1

Nedenstående viser de resultater af mutagentestning af ethanolekstrakter der ikke er vist i rapporten (jvf tabel 5). Alle forsøg er udført med 0,4 mg S9/plade. Forsøgene TA98 er udført med 3 x opkoncentreret ekstrakt med maks konc på 150 mg/plade, øvrige forsøg med maks konc. På 50 mg/plade.



## Appendix 2

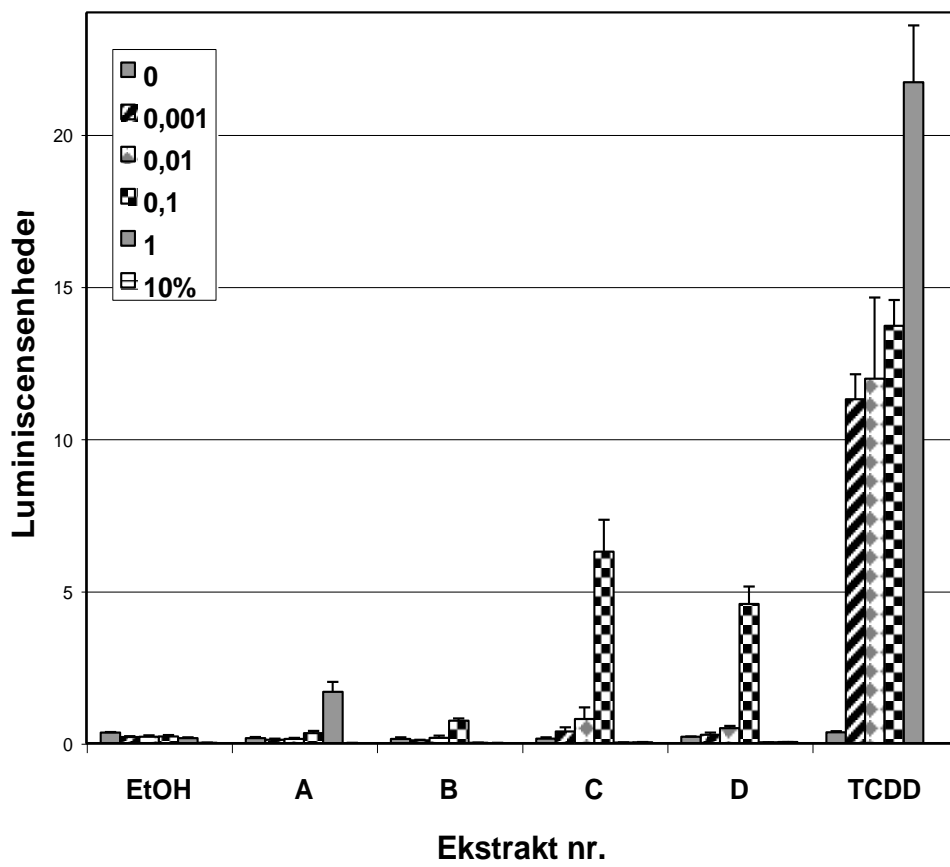
Nedenstående viser de resultater af mutagentestning af vandekstrakter. Alle forsøg er udført med 0,8 mg S9/plade med maks. konc. på 150 mg/plade



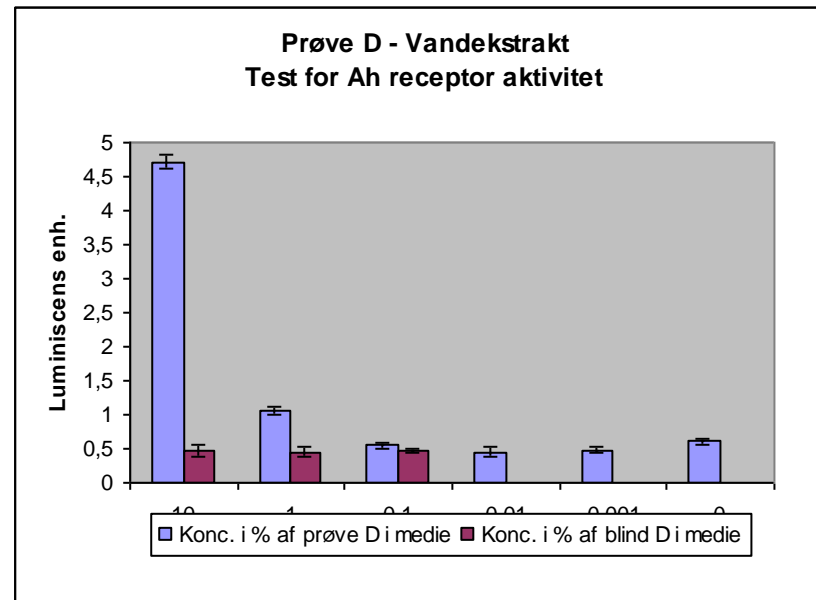
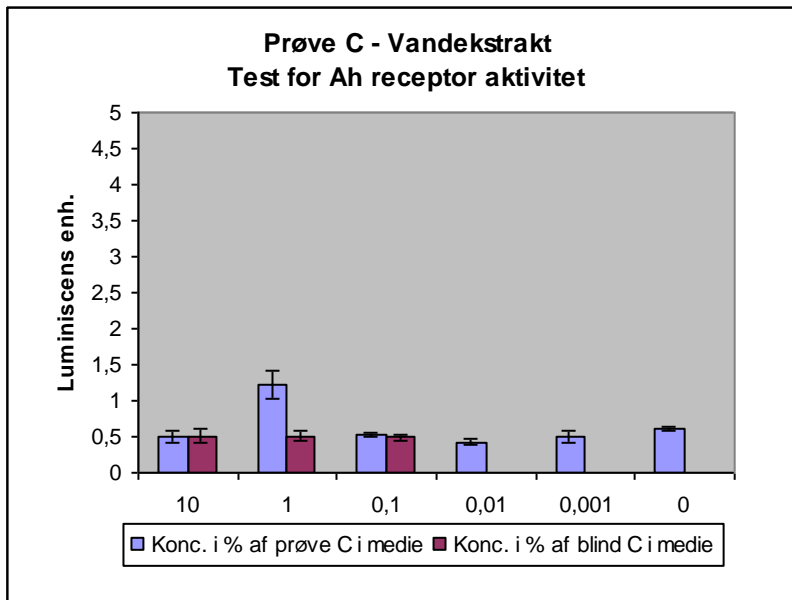
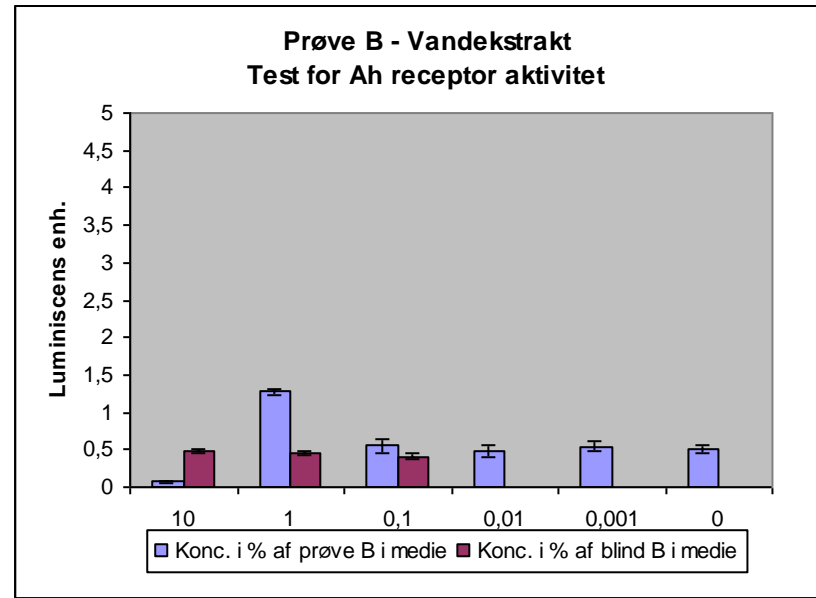
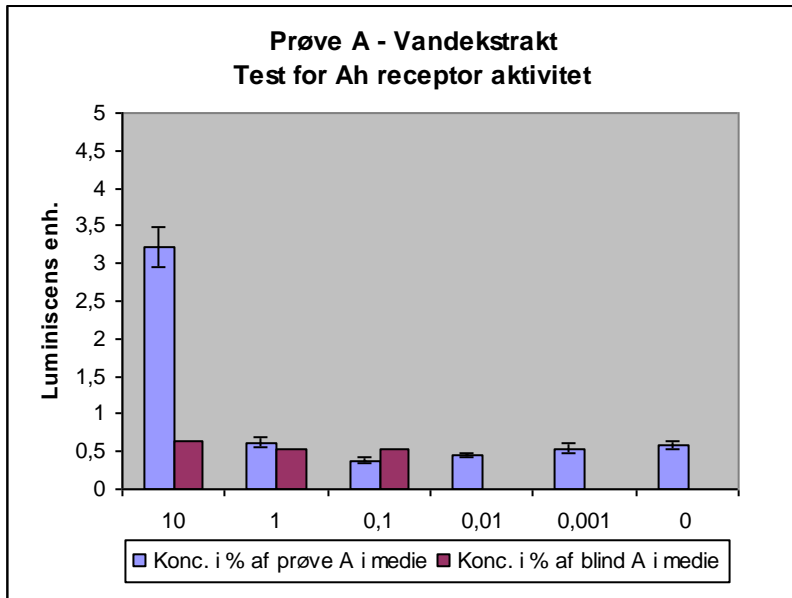


### Appendix 3

#### Test af papekstrakter(EtOH) for Ah receptor aktivitet



## Appendix 4a



## Appendix 4b

